SELİN SELVİ

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİSİ

POTENT BİR ANTİ-KANSER BİLEŞİK: TERPİRİDİN İÇEREN DİNÜKLEER PALLADYUM(II) KOMPLEKSİNİN {[PD(SAC)(TERPY)](SAC)} [PD2(TERPY)2(M- TAS-N1,N4)]SO4·11H2O MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK/SİTOSTATİK ETKİLERİNİN VE MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

SELİN SELVİ

YÜKSEK LİSANS

PROF. DR. ENGİN ULUKAYA

İSTANBUL- 2019

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ 2019

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİSİ

POTENT BİR ANTİ-KANSER BİLEŞİK: TERPİRİDİN İÇEREN DİNÜKLEER PALLADYUM(II) KOMPLEKSİNİN {[PD(SAC)(TERPY)](SAC)} [PD2(TERPY)2(M- TAS-N1,N4)]SO4·11H2O MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK/SİTOSTATİK ETKİLERİNİN VE MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

SELİN SELVİ

YÜKSEK LİSANS

PROF. DR. ENGİN ULUKAYA

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 31675 Numaralı projesi ile desteklenmiştir.

İSTANBUL- 2019

ÖZET

Potent Bir Anti-Kanser Bileşik: Terpiridin İçeren Dinükleer Palladyum(II) Kompleksinin {[Pd(sac)(terpy)](sac)} $[Pd_2(terpy)_2(\mu\text{- tas- N1,N4})]SO_4 \cdot 11H_2O$ Meme Kanseri Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik/Sitostatik Etkilerinin ve Mekanizmalarının Araştırılması

Selin Selvi
Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi
Danışman: Prof. Dr. Engin Ulukaya

2019

Meme kanseri, tüm dünyada morbidite ve mortalite açısından önde gelen kanser türlerinden biridir. Tüm dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser tipi olup, tüm kanser ölümleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Meme kanseri tedavisinde cerrahi girişim ve radyoterapinin yanı sıra kemoterapi de önemli bir yer tutmaktadır.

Platin/Palladyum bazlı koordinasyon bileşikleri 25 yıldan uzun süredir kemoterapi tedavisinde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar, sisplatinin birçok kanser türünde güçlü bir anti-tümör aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Fakat sisplatinin aşırı toksik olması, nefrotoksisiteye (böbrek hasarı) ve ototoksisiteye (yüksek işitme kaybı) neden olmaktadır. Bu nedenle sisplatinden farklı özelliklere sahip, daha etkili olabilecek yeni kompleksler sentezlenmekte ve anti-kanser aktiviteleri araştırılmaktadır. Bu amaçla sentezlenen bileşiklerden biri de çok çekirdekli metal kompleksleridir. Özellikle DNA'ya bağlanma afinitelerinin yüksek olması ve kanser hücreleri üzerinde güçlü sitotoksik etki göstermesi, bu kompleksleri daha etkili tedavi yaklaşımlarını ortaya çıkarılması açısından önemli hale getirmiştir.

Sunulan tezde, dinükleer Pd(II) kompleksinin, meme kanseri hücrelerini hedefleyerek güçlü bir sitotoksik ve sitostatik aktiviteye neden olduğu bulunmuş olup bulgular yeni bir tedavi seçeneği olarak umut vermektedir. Sonuç olarak, Dinükleer, Palladyum tedavisinin, kadın meme kanseri tedavisinde kullanılabileceği öngörülerek in vivo deneylerin yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, Apoptoz, Palladyum, Sitotoksisite

ABSTRACT

A Potent Anti-Cancer Compound: Investigation of Cytotoxic / Cytostatic Effects and Mechanisms of Dinuclear Palladium (II) Complex Containing Terpiridine {[Pd (sac) (terpy)] (sac)} [Pd2 (terpy) 2 (μ - stone - N1, N4)] on Breast Cancer Cells

Selin Selvi
Cancer Biology and Pharmacology
Supervisor: Prof. Dr. Engin Ulukaya

2019

Breast cancer is one of the leading cancer types worldwide in terms of morbidity and mortality. It is the most common type of cancer among women all over the world and ranks second among all cancer deaths. In addition to surgical intervention and radiotherapy, chemotherapy plays an important role in the treatment of breast cancer. Platinum / Palladium-based coordination compounds have been used in chemotherapy treatment for more than 25 years. Studies have shown that cisplatin has strong anti-tumor activity in many types of cancer. However, excessive toxicity of cisplatin causes nephrotoxicity (kidney damage) and ototoxicity (high hearing loss). Therefore, new complexes with different properties than cisplatin, which may be more effective, are synthesized and anti-cancer activities are being investigated. One of the compounds synthesized for this purpose is multi-core metal complexes. In particular, their high binding affinity to DNA and their strong cytotoxic effects on cancer cells have made these complexes important for the development of more effective treatment approaches. In this thesis, dinuclear Pd (II) complex has been found to cause strong cytotoxic and cytostatic activity targeting breast cancer cells. These findings indicate that XXXX compound serve a promising a new treatment option. In conclusion, Dinuclear, Palladium treatment can be used in the treatment of female breast cancer.

Keywords: Breast cancer, Apoptosis, Palladium, Cytotoxicity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarımda danışmanlığımı yapan, desteğiyle hep yanımda olan, benim için çok değerli olan bilgi ve tecrübeleriyle bana her daim yol gösteren, ilgi ve yardımlarını benden hiç eksik etmeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya,

Çalışmalarım süresince bana her konuda yardımcı olup, önerilerini benimle paylaşarak bana yol göstermiş olan tüm hocalarıma,

Hayata karşı duruşuna hayran kaldığım, her zaman yanımda olarak tecrübeleriyle bana daima yol gösteren, mesleki anlamda ve hayata dair bana çok şey öğreten hakkını asla ödeyemeyeceğim benim canım dostum Merve ERKISA'ya,

Tez çalışmam boyunca bilgi, deneyim ve önerilerini benimle paylaşarak bana yol göstermiş olan başta Remzi Okan AKAR, Buse Meriç AÇAR, Barışhan KILIÇ ve Hatice DİNÇER olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma,

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen ve hayatım boyunca hayallerim için, hiçbir fedakârlıktan kaçınmayıp her zaman yanımda olarak, bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi, güler yüzleriyle her zaman benim güçlü bir şekilde hayata tutunmamı sağlayan, her zaman iyi ki benim ailem olmuşsunuz diyerek gururlandığım canım ailem, annem Zehra SELVİ, babam Oktay SELVİ, ablam Meltem MİRZA ve abim Canberk MİRZA'ya,

Araştırmacı olmak için çıktığım bu yolda, çocukken ilk hayallerimi kurmamda emeği büyük olan, her zaman farklı biri olduğumu söyleyerek hayatımda hep kalbimin sesini dinlememi öğütleyen ve kalbimin sesine hep inanan çok özlediğim canım amcam Tuncay SELVİ'ye, benim için bir hala değil de her zaman bir abla olup başımın en sıkıştığı içimin en sıkıntılı olduğu anda beni hep dinleyerek bana adeta sığınacak huzurlu bir liman olup, çözümü hep birlikte bulduğum ve desteğini benden hiç esirgemeyen, kalbindeki iyiliklerle hep hayatımı güzelleştiren canım halam Selvihan DEMİRHAN'a ve bir abi gibi bana her zaman destek olan eniştem Hasan DEMİRHAN'a

Her zaman yanımda olarak en zor anlarımda bile beni gülümsetmeyi başaran, hayallerimin sonsuz destekçisi olup beni cesaretlendiren, varlığına her gün iyi ki dediğim süper kahramanım Mehmet Furkan SAPANCI'ya sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

SELİN SELVİ

23.08.2019

İÇİNDEKİLER LİSTESİ

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
TEŞEKKÜR ..... **iii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **viii**
TABLO LİSTESİ ..... **x**
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ ..... **xii**
GİRİŞ **1**
1. GENEL BİLGİLER **2**
1.1. MEME KANSERİ 2
1.1.1 Meme Kanseri Moleküler Biyolojisi 3
1.2 APOPTOZ TERMİNOLOJİSİ 5
1.2.1 Apoptoz ve Nekroz 6
Diğer özellikler **7**
1.2.2 Apoptoz Sürecinde Kaspazların Rolü 9
1.2.3 Apoptoz Sürecinde Mitokondrinin Rolü 11
1.2.4 Apoptoz Sürecinde Bcl-2 Ailesinin Rolü 12
1.2.5 Apoptoz Mekanizmaları 13
1.2.5.1. Ekstrinsik (Dışsal) Yolak 13
1.2.5.2. İntrinsik (İçsel) Yolak 13
1.2.5.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis Oluşturulması 13
1.2.6 Apoptozis-Karsinogenez İlişkisi 17
1.3. METAL BAZLI BİLEŞİKLERİN KANSER TEDAVİSİNDEKİ YERİ 19
2. MATERYAL ve YÖNTEM **21**
2.1. MATERYAL 21
2.1.1. Kimyasal Maddeler 21
2.1.2. Sarf Malzemeler 22
2.1.3. Cihazlar 22
2.2. YÖNTEMLER 23
2.2.1. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Kimya Bölümü Tarafından Sentez Edilen Dinükleer Pd (II) Kompleksinin Hazırlanması 23
2.2.2. Hücre Kültürü 23

2.2.2.1. Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması 23
2.2.2.2. Hücre Soylarının Pasajlanması 23
2.2.2.3. Hücre Soylarının Stoklanması 23
2.2.2.4. Kullanılan Besi Yerinin Hazırlanması 23
2.2.2.5. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı 23
2.2.3. Sulforhodamine B (SRB) Canlılık Metodu 25
2.2.4. ATP (Adenozin Trifosfat) Canlılık Metodu 26
2.2.5. Floresan Boyama Yöntemi ile Ölüm Modunun Belirlenmesi 27
2.2.5.1. Anneksin-V Boyama Metodu 23
2.2.6. M30-Antijen Testi ile Ölüm Modunun Belirlenmesi 29
2.2.7. Akım Sitometri Analizleri 30
2.2.7.1. Kaspaz 3/7 Testi 30
2.2.7.2. Anneksin-V Testi 30
2.2.7.3. Mitokondri Membran Potansiyeli Testi 30
2.2.7.4. Gamma H2AX Aktivasyonu ile DNA Hasarının Belirlenmesi 30
2.2.7.5. Oksidatif Stres Belirlenmesi 30
2.2.7.6. Bcl-2 Aktivasyonunun Belirlenmesi 30
2.2.7.7. Hücre Döngüsü Analizi 30
2.2.8. Koloni Oluşturma Yeteneği Testi 38
2.2.9. Yara İyileşmesi Testi 38
2.2.10. Matrijel Hücre İnvazyon Testi 39
2.2.11. Western Blot Analizi 40
2.2.11.1. Protein Örneklerinin Hazırlanışı 42
2.2.11.1.1. Çözeltiler 42
2.2.11.2. Proteinlerin BCA Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi 42
2.2.11.2.1. Çözeltiler 42
2.2.11.2.2. BSA Standartlarının Hazırlanması 43
2.2.11.2.3. BCA Ölçümünün Yapılması 43
2.2.11.3. Western-Blot Yöntemi ile Proteinlerin Membrana Aktarılması 43
2.2.11.3.1. Çözeltiler 43
2.2.11.3.2. Proteinlerin Yüklenmesi ve Jelde Yürütülmesi 44
2.2.11.3.3. Proteinlerin Transferi 44
2.2.11.4. Proteinlerin Belirlenmesi 44

2.2.11.4.1. Bloklama 44
2.2.11.4.2. Birincil Antikor 44
2.2.11.4.3. İkincil Antikor 44
2.2.11.4.4. Görüntüleme 44
2.2.11.4.5. Birincil ve İkincil Antikorların Membrandan Uzaklaştırılması .. 45
2.2.12. İstatistiksel Analiz 45
3.BULGULAR 46
3.1. SRB VE ATP CANLILIK TESTİ BULGULARI 46
3.2. HOECHST 33342, PROPİDİUM İYODÜR (PI) VE ANNEKSİN-V İLE ÜÇLÜ BOYAMA YÖNTEMİ BULGULARI 49
3.3. M30-ANTİJEN (KASPAZLA KIRILMIS SİTOKERATİN 18) BULGULARI 51
3.4. AKIM SİTOMETRİ BULGULARI 52
3.4.1.Kaspaz 3/7 Testi 52
3.4.2. Anneksin-V Değerlendirilmesi 54
3.4.3. Mitokondri Membran Potansiyel Değişiklikleri 56
3.4.4. DNA Hasarının Belirlenmesi 58
3.4.5. Oksidatif Stresin (ROS) Belirlenmesi 59
3.4.6. Bcl-2 Aktivasyonu 61
3.4.7. Hücre Döngüsü Analizleri 63
3.5. KOLONİ FORMASYONU 64
3.6. YARA İYİLEŞMESİ BULGULARI 65
3.7. MATRİJEL HÜCRE İNVAZYON BULGULARI 67
3.8. WESTERN BLOT BULGULARI 68
4.TARTIŞMA ve SONUÇ 71
KAYNAKLAR DİZİNİ 76

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Kanserin nedenleri (Anonim 2018) 2
Şekil 1.2. Kadın meme anatomisi (Terese Winslow 2011, değiştirilerek alınmıştır.) . 4
Şekil 1.3. Apoptotik hücre ile nekrotik hücrenin morfolojik açıdan farkı (Fuchs ve ark. 2007). 6
Şekil 1.4. Apoptoz ve Nekrozun şematik karşılaştırılması (Anonim 2016) 8
Şekil 1.5. Kaspazların aktifleşme mekanizması (Clarke 2009 değiştirilerek alınmıştır). 9
Şekil 1.6. Başlatıcı ve efektör kaspazlar (Forro 2012 değiştirilerek alınmıştır). 10
Şekil 1.7. A.Kaspaz aktivasyonunun mitokondriyal yolu B.Apoptozom oluşumu ve aktivasyonu (Gewies 2004, değiştirilerek alınmıştır.) 11
Şekil 1.8. Apoptozun mitokondri yolunda yer alan Bcl-2 ailesi üyeleri (Anvekar ve ark. 2011'den değiştirilerek alınmıştır). 12
Şekil 1.9. Apoptozom oluşumu ve kaspaz aktivasyonu (Anvekar ve ark. 2011'den değiştirilerek alınmıştır). 13
Şekil 1.10. Reseptör aracılı kaspaz aktivasyonu (Fulda ve Debatin 2006'dan değiştirilerek alınmıştır). 15
Şekil 1.11. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması (Zimmermann ve ark. 2001). 16
Şekil 1.12. Kanser hücresinin özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011'den değiştirilerek alınmıştır). 18
Şekil 1.13. Proje çalışmasında kullanılacak olan Dinükleer Pd(II) kompleksinin açık molekül yapısı 20
Şekil 2.1. ATP elde edilme reaksiyonu (Andreotti ve ark. 1995 değiştirilerek alınmıştır). 27
Şekil 2.2. Apoptotik hücrelerde fosfotidil serin translokasyonu (Van Engeland ve ark. 1998'den değiştirilerek alınmıştır). 28
Şekil 2.3. Sitokeratin 18'in kaspazlar aracılığıyla kesimi ve bu bölgenin M30 antikoru ile tanınmasının şematik gösterimi (Micha ve ark., 2008) 30
Şekil 2.4. Western Blot Aşamalarının Şematik Gösterimi (Anonim 2010). 41
Şekil 3.1. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafikleri. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir.*aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: $p<0,05$ **:$p<0,01$ ***:$p<0,001$) ifade etmektedir. 46
Şekil 3.2. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle muamele edilen MCF-7 hücre soyunda faz fotoğrafları. A: 24 saat, B: 48 saat, C:72 saat. 47
Şekil 3.3. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle muamele edilen MDA-MB-231 hücre soyunda faz fotoğrafları. A: 24 saat, B: 48 saat, C:72 saat. 48
Şekil 3.4. Dinükleer Pd (II) kompleksi ile tedavi edilen, MCF-7 hücrelerinin 12 ve 24 saat sonrası floresan mikroskop görüntüleri. A: Hoechst 33342 ile boyama (Mavi), B: Anneksin-V (Yeşil), C: Propidyum iyodür ile boyama (Kırmızı) D:

Hoechst 3342, Anneksin-V ve Propidyumiyodür boyalarının merge edildiği alanlar. E: MCF-7, 12. saat kontrol hücreleri, F: MCF-7, 12. saat tedavi hücreleri, G: MCF-7, 24. saat kontrol hücreleri, H: MCF-7, 12. saat tedavi hücreleri..... 50
Şekil 3.5. Dinükleer Pd (II) kompleksi ile tedavi edilen, MDA-MB-231 hücrelerinde 12 ve 24 saat sonrası floresan mikroskop görüntüleri. A: Hoechst 33342 ile boyama (Mavi), B: Anneksin-V (Yeşil), C: Propidyum iyodür ile boyama (Kırmızı) D: Hoechst 3342, Anneksin-V ve Propidyum iyodür boyalarının merge edildiği alanlar. E MDA-MB-231, 12. saat kontrol hücreleri, F: MDA-MB-231, 12. saat tedavi hücreleri, G: MDA-MB-231, 24. saat kontrol hücreleri, H: MDA-MB-231, 12. saat tedavi hücreleri..... 51
Şekil 3.6. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavilerinin 24 ve 48 saatte MCF-7 hücre soyunda M30 seviyeleri üzerine etkisi. * aynı dozlar için farklı zaman periyotlarına göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ***:p<0,001) ifade etmektedir..... 52
Şekil 3.7. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları (Q1 (Dead)= Nekroz, Q2 (Apoptotic/Dead)= Geç Apoptoz, Q3(Live)= % Canlılık, Q4(Apoptotic)= Erken Apoptoz)..... 53
Şekil 3.8. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları (Q1(Dead)= Nekroz, Q2 (Apoptotic/Dead)= Geç Apoptoz, Q3 (Live)=% Canlılık, Q4 (Apoptotic)= Erken Apoptoz)..... 54
Şekil 3.9. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde Anneksin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları (Q1 (Dead)= Nekroz, Q2(Apoptotic/Dead)= Geç Apoptoz, Q3(Live)= % Canlılık, Q4 (Apoptotic)= Erken Apoptoz)..... 55
Şekil 3.10. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyel değişimi yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları (Q1= Depolarize/Ölü, Q2= Ölü, Q3= Depolarize/Canlı, Q4= Canlı) 57
Şekil 3.11. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyel değişimi yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları (Q1= Depolarize/Ölü, Q2= Ölü, Q3= Depolarize/Canlı, Q4= Canlı) 58
Şekil 3.12. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MCF-7 meme kanseri hücrelerinde p-γH2AX yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramı (Q1= γH2AX, Q2= p-γH2AX, Q3= γH2AX eksprese etmeyen) 59
Şekil 3.13. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde p-γH2AX yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramı (Q1= γH2AX, Q2= p-γH2AX, Q3= γH2AX eksprese etmeyen)..... 59

Şekil 3.14. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MCF-7 meme kanseri hücrelerinde ROS yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramı. M1: ROS negatif hücreler (–); M2: ROS pozitif hücreler ROS (+) 60
Şekil 3.15. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde ROS yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramı. M1: ROS negatif hücreler (–); M2: ROS pozitif hücreler ROS (+) 61
Şekil 3.16. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MCF-7 meme kanseri hücrelerinde Bcl-2 aktivasyonu yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramı. Q1: Bcl-2 inaktivasyonu, Q2: Bcl-2 aktivasyonu, Q3: Eksprese edilmeyen. 62
Şekil 3.17. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde Bcl-2 aktivasyonu yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramı. Q1: Bcl-2 inaktivasyonu, Q2: Bcl-2 aktivasyonu, Q3: Eksprese edilmeyen. 62
Şekil 3.18. MCF-7 hücrelerinin dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC90) döngü fazlarındaki (G0/G1, S ve G2/M) dağılımının 12 ve 24 saatlik histogramı 63
Şekil 3.19. MDA-MB-231 hücrelerinin dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) döngü fazlarındaki (G0/G1, S ve G2/M) dağılımının 12 ve 24 saatlik histogramı 64
Şekil 3.20. MCF-7 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneklerinin koloni formasyon testi ile ölçümü. 65
Şekil 3.21. MDA-MB-231 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneklerinin koloni formasyon testi ile ölçümü. 65
Şekil 3.22. Dinükleer Pd (II) kompleksi uygulanan MCF-7 hücrelerinde migrasyon yeteneği 66
Şekil 3.23. Dinükleer Pd (II) kompleksi uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde migrasyon yeteneği 67
Şekil 3.24. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle 12 ve 24 saatlik tedavi sonucunda MDA-MB-231 hücrelerinde invazyon yeteneği 68
Şekil 3.25. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle 12 ve 24 saatlik tedavi sonucunda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde western blot sonucu bant profilleri 68

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1 Meme kanserinin moleküler alt tiplerinin sınıflandırılması (Nursal ve ark. 2015). 5
Tablo 1.2 Nekroz ve apoptozun karşılaştırılması (Ulukaya 2003). 7
Tablo 3.1. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarının IC50 ve IC90 dozlarının belirlenmesi 49

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
7-AAD:	7-Aminoaktinomisin D
AIF:	Apoptozis indükleyici faktör (Apoptosis inducing factor)
Apaf-1:	Apoptotik proteaz aktive eden faktör
AR:	Androjen reseptörü
ASAP:	Atipik küçük asiner proliferasyon
ATP:	Adenozin trifosfat (Adenosine triphosphate)
ATP:	Adenozin Trifosfat
BCA:	Biçinkoninik asit
BH:	Bcl-2 homoloji bölgeleri
BSA:	Sığır serum albümin
CAD:	Kaspaz aktive edici DNaz
CK18:	Sitokeratin 18
DAPK:	Ölüm ilişkili protein kinaz
DD:	Ölüm alanı (Death domain)
DHEA:	Dehidroepiandrosteron
DISC:	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi (Death inducing signalling complex)
DMSO:	Dimetilsulfoksit
DNA:	Deoksi ribonükleik asit (Deoxyribonucleic acid)
DNA-PK:	DNA bağımlı protein kinaz (DNA-dependent Protein Kinase)
EDTA:	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EGFR:	Epidermal büyüme faktör reseptörü (Epidermal growth factor receptor)

ER: Östrojen reseptörü (Estrogen receptor)

FADD: Fas ilişkili ölüm alanı (Fas associated death domain)

FBS: Fetal sığır serumu (Fetal bovine serum)

FITC: Fluoresin izotiyosiyanat

GST: Glutatyon S-transferaz

GTP: Guanozin trifosfat

HER-2: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (Human epidermal growth factor receptor 2)

ICAD: Kaspazla aktive edilmiş

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü

Kbp: Klikobaz çifti

kDa: KiloDalton

MOMP: Mitokondri dış membran permeabilizasyonu

mTOR: Rapamisin hedefi (Target of rapamycin)

MTT: Metilltiazoldifeniltetrazolyum bromür

NAC: N-asetil-L-sistein

PARP: Poli(ADP-riboz)polimeraz (Poly ADP-ribose polymerase)

PBS: Fosfat tuz tamponu (Phosphate buffered saline)

PBS: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR; polymerase chain reaction**)**

Pd: Palladyum

PI: Propidyum iyodür (Propdium iodide)

PIN: Prostatik epitelyal neoplazi

PR: Progesteron reseptörü (Progesterone receptor)

PS: Fosfatidil serin (phosphatidylserine)

PSA: Prostat spesifik antijen

Pt: Platin

PTEN: Fosfataz ve tensin homolog proteini

Rb: Retinoblastoma

RNA: Ribo nükleik asit (Ribonucleic acid)

ROCK1: Rho ilişkili sarmal oluşturan kinaz 1

ROS: Reaktif oksijen türleri

RPMI:	Roswell Park Memorial Institute Medium
SDS:	Sodyum dodesil sülfat (Sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE:	SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SHBG:	Seks hormon bağlayıcı globülin
SRB:	Sulforhodamine B
TCA:	Trikloroasetik asit
TdT:	Terminal deoksinükleotidil transferaz
TNF:	Tümör nekrozis faktör
TRAIL:	TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand
VEGF:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

GİRİŞ

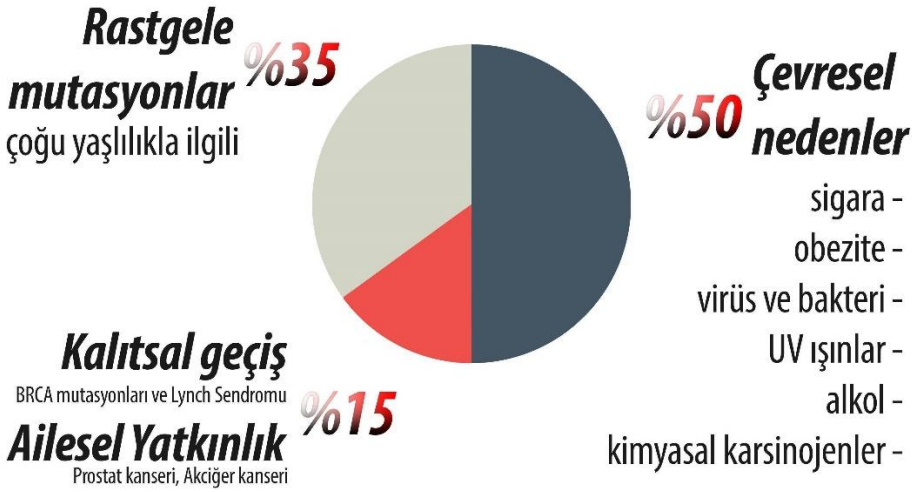
Günümüzde, mevcut ilaçlar ile kemoterapi tedavisi yetersiz kalmakta ve birçok kanser türünde tedavi sağlanamamaktadır. Bu nedenle kanseri önleyici yeni ilaç geliştirme çalışmaları umut vadeden bir alan olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanserde tedaviyi olanaklı kılmayı amaçlayan kanser araştırmacıları, anti-kanser etkisi güçlü yeni ajan/ilaç geliştirme çalışmaları üzerine yoğunlaşmaktadır.

Son yıllarda kanser tedavisinde metal bileşiklerin çok çeşitli tümör hücre hatlarına karşı umut verici etkilerinden dolayı ilaç olarak kullanımı yaygınlaşmıştır (Abu-Surrah ve ark., 2008; Ferraz ve ark., 2009; Ulukaya ve ark., 2011). Platin ve palladyum gibi metal kompleksi içeren anti-kanser ajanların DNA'ya bağlanarak DNA lezyonlarının (adduct) oluşumuna yol açarak sitotoksik etki gösterdiği bildirilmektedir (Zhu ve ark., 2009). Bu metal bileşiklerden olan Palladyum; anti-fungal, anti-viral, anti-kanser ve anti-bakteriyal etkilere sahiptir. Bu yapıdaki kimyasalların suda kolay çözünebilmeleri, membrandan kolayca geçip DNA'ya bağlanabilmeleri, ayrıca yan etkilerinin daha az olması tercih edilmelerine neden olmaktadır (Abu-Surrah ve ark., 2008). Ayrıca yapılan çalışmalarda Pd (II) bileşiklerinin kanser hücrelerinde hücre ölümünü arttırarak apoptoza neden oldukları gösterilmiştir (Keter ve ark., 2008; Ferraz ve ark., 2009; Güney ve ark., 2011). Pd (II) bileşiklerinin bu sitotoksik etkiyi DNA hasarı oluşturarak yaptıkları da gösterilmiştir (Divsalar ve ark., 2010). Pd (II) kompleksinin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre soylarına etkisi incelenmiş, doz ve zamana bağlı olarak Pd (II) kompleksinin güçlü anti-büyüme etkisi in vitro olarak gösterilmiştir. Bu etki, Balb/c farelerde in vivo olarak da doğrulanmıştır (Ferraz ve ark., 2011). Bu çalışma, Pd (II) kompleksinin, östrojen reseptör pozitif (MCF-7) ve östrojen reseptör negatif (MDA-MB-231) meme kanseri hücre soyları üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi ve bu etkinin moleküler mekanizmalarının araştırılması amacıyla yapılmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. MEME KANSERİ

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından yapılan 2018 yılına ait vaka raporuna göre, 18.1 milyon yeni kanser vakası bildirilmiştir ve kansere bağlı 9.6 milyon ölüm meydana gelmiştir. Meme kanseri kadınlarda en yaygın olarak teşhis edilen kanser türüdür ve 2018 yılında yeni teşhis edilmiş yaklaşık 2.1 milyon kişi bulunmaktadır. 2018 yılı verileri göz önünde bulundurulduğunda yaklaşık olarak her dört kadından biri meme kanser riski taşımaktadır (Bray, Freddie, ve ark., 2018). Meme kanseri erkeklerde de görülen nadir kanser türüdür ve erkeklerde görülen tüm malingn kanser türleri içerisinde %1'in altında yer almaktadır (Giordano, S.H., ve ark, 2004).



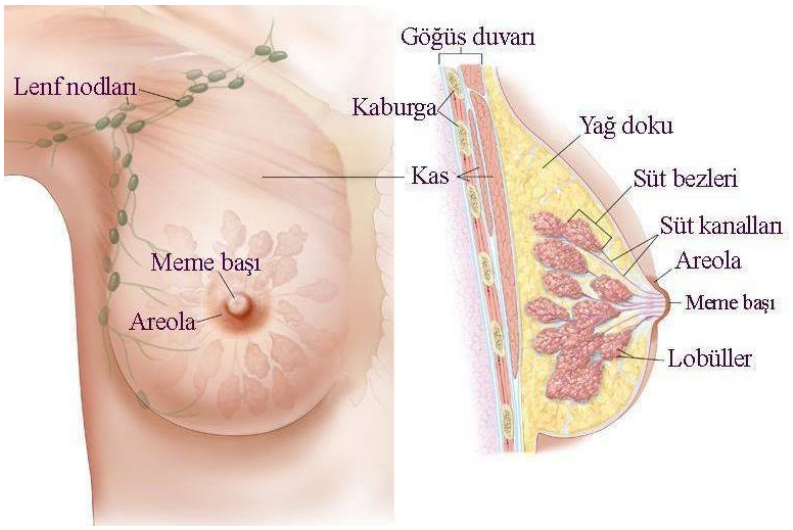
Şekil 1.1. Kanserin nedenleri (Anonim 2018)

Meme kanserine neden olan çeşitli risk faktörleri bulunmaktadır (Şekil 1.1). Son araştırmalar göz önüne alındığında, meme kanserini tetikleyen risk faktörleri arasında önemli imzalardan birini genetik faktörlerin taşıdığı görülürken, epigenetik, hormonal, sosyobiyolojik ve psikolojik etkenlerinde rolü olduğu kabul edilmektedir.

Meme tümörler, genetik yaklaşımlarla incelendiğinde, özellikle p53, BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonlarının etkili olduğu görülmektedir (Washbrook, 2006). Meme kanserinde yaş ve cinsiyet risk faktörleri arasında yer alırken, yüksek risk faktörlerinden bir diğeri ise, ailesinde meme kanseri tanısı konan bireylerdir. Meme kanseri erken teşhis edildiğinde, hasta %96 yaşam şansına sahip olur bu sebeple meme kanserinden korunmanın en etkili yolu erken teşhistir. Erken teşhis hastalarda yaş faktörüne bağlı olarak değişkenlik gösterir. İleri yaşlara gidildikçe meme kanseri riski artmaktadır. Bu sebeple erken teşhis konulabilmesi için alınan önlemler yaş gruplarına göre değişkenlik gösterir. Kişinin kendisini belirli dönemlerde muayene etmesi çok büyük önem taşımaktadır ve yirmili yaş gruplarında 3 yılda bir doktor muayenesi önerilirken, kırklı yaş grupları ve sonrasında her yıl bir kez doktor muayenesi olması gerekir. Bireylerin kendi kendilerine yaptıkları muayenede on beş günü aşan sürede ele gelen sertlik veya kitle, deride hissedilen kalınlaşma, şişme, renk değişikliği, meme başında kalınlaşma, kızarıklık yara oluşması, meme şeklinde veya meme başlarının pozisyonlarında meydana gelen değişiklik ve meme başından akıntı gelmesi gibi belirtilerin oluşma durumlarında derhal doktor kontrolüne gidilmelidir. Doktor muayenesi sonucunda kesin tanı, mamografi taraması ardından, ultrason ile inceleme ve yapılacak ince iğne aspirasyon biyopsisi ya da normal biyopsi tetkikleriyle konulur (Nursal ve ark. 2015).

1.1.1 Meme Kanseri Moleküler Biyolojisi

Meme, süt bezleri ve kanallardan oluşan modifiye bir ter bezidir. Her bez kendinden daha küçük bezcik diye adlandırılan yapılar içerir ve bu bezcikler kanallar aracılığı ile birbirine ve meme başına bağlanırlar (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Kadın meme anatomisi (Winslow 2011, değiştirilerek alınmıştır.)

Memedeki yapıların arası yağ dokusuyla doludur ve yaş ilerledikçe bu bez yapıları küçülüp yerini giderek yağ dokusuna bırakmaktadır. Meme dokusunun içinde kan ve lenf damarları da vardır. Kanser hücreleri ilk olarak bu bölgedeki lenf nodlarına yayılırlar. Meme kanseri ile ilişkili ölümlerin %90'ı metastaz ile ilişkilidir. Meme tümörleri tercih mekanizması bilinmemekle beraber metastazda sırasıyla; akciğer, beyin, kemik ve karaciğere yayılırlar. Bu yayılım organ tropizmi olarak adlandırılır (Medeiros ve ark., 2019).

Meme kanseri oluşumunu tetikleyen mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak karsinojenlere maruz kalma sonucunda kazanılan mutasyonlarla birlikte, germline mutasyonlarla kalıtılan genetik değişiklikler sonrasında tümör supresör genlerin ve proto onkogenlerin aktivasyonları apoptoz mekanizmasını bozar. Apoptoz mekanizmalarının bozulmasından köken alan, kontrol edilemeyen hücre proliferasyonu sonucunun meme kanser gelişim mekanizmalarına neden olduğu öne sürülmektedir. Buna ek olarak çeşitli büyüme faktörleri ile ilişkili reseptörlerde oluşabilecek bozuklukların da kontrolsüz hücre proliferasyonunda rol oynadığı düşünülür. Moleküler yapısı, mutasyon tipi, metastaz özelliği ve tedaviye yanıt açısından karışık ve heterojen bir hastalık olan meme kanseri, moleküler sınıflama ile; luminal A, luminal B, Her-2, bazal ve normal meme benzeri olmak üzere beş grup altında incelenir (Nursal ve ark. 2015) (Tablo 1.1).

Tablo 1.1 Meme kanserinin moleküler alt tiplerinin sınıflandırılması (Nursal ve ark. 2015).

Luminal A	ER ve/veya PR(+) ve HER-2(-) Ki67<%14
Luminal B	ER ve/veya PR(+) ve HER-2(-) Ki-67≥%14
Bazal-benzeri	ER/PR/HER-2 (-)
HER-2	ER/PR(-) ve HER-2(+)
Normal meme benzeri	Non-epitelial hücre gen ekspresyonu(+)

Meme kanserinin genetik temelleri üzerindeki çalışmalar dikkate alındığında, tümörogenez sürecinde birden fazla role sahip özelleşmiş genler göze çarpmaktadır. Bu genler; onkogenler (ras, c-myc genleri), tümör supresör genleri (p53, BRCA1, BRCA2, nm23), büyüme faktör reseptör genleri (HER2), hücre döngüsünün düzenlenmesinde öncü rol alan genler (telomeraz) ve apoptozda rol oynayan genler (bcl gen ailesi) ile tümörogenez sürecinde önemli rol oynayan özellikli genlerdir (Oesterreich ve ark.,1999; Cui ve ark., 2000).

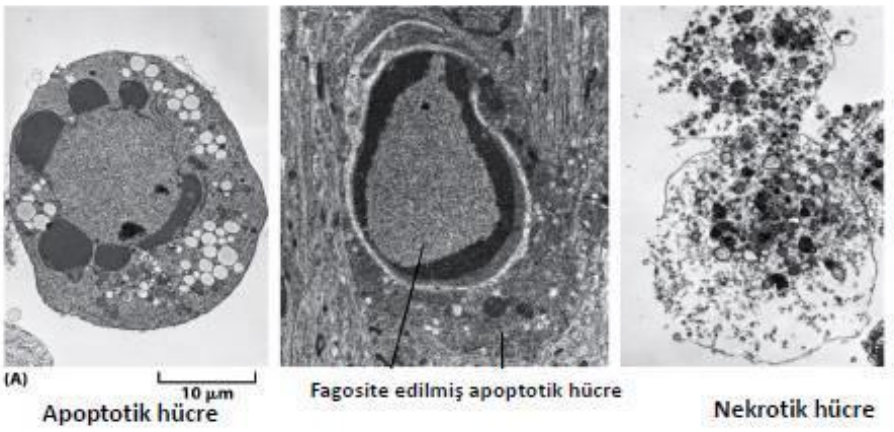
1.2 APOPTOZ TERMİNOLOJİSİ

Ökaryotik organizmaya ait hücreler doğarlar, doğum sonrası belirli bir süre yaşamaya devam ederler ve daha sonrasında programlı bir şekilde ölürler (Bowen 1988). Yaşam süresinde belirleyici rol oynayan hücrenin tipidir. Örneğin, bağırsak hücreleri 3-5 günlük bir yaşam döngüsünü takip ederken, derinin epidermal hücrelerinde bu döngü 20-25 günlük bir süreyi takip etmektedir. Miyokard kası hücreleri veya nöronlar ise ömür boyu yaşamaktadırlar. Nöronların ölmesi ancak sinapsların tam olarak oluşmadığı dönemden önce olur ve doğumda aşırı sayıda görülen nöronların sayısı uygun sinaptik ağın sağlanabilmesi için azalır. Bahsedilen hücrelerde görülmekte olan tüm bu ölümler apoptozla gerçekleşmektedir. Zamanı gelince ölen hücreler daha önceden programlanmış bir şekilde öldüklerinden dolayı da apoptoz programlı hücre ölümü olarak adlandırılmaktadır (REF EKLE). Eski bir yunan terimi olan apoptosis, kelime anlamı olarak yaprakların ağaçtan, petallerin çiçekten doğal olarak düşmesi anlamına gelmektedir (Kerr ve ark. 1972). Geçmekte olan her saniye yaklaşık bir milyon hücre apoptozla vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Böylece ölüm (apoptoz) ve yeniden yapım (mitoz) homeostazisi korumak üzere dinamik bir denge halindedir. Bu dengenin apoptoz lehine veya aleyhine bozulduğu durumlar pek çok hastalığın patogenezine katkıda bulunur (REF ekle). Normalin dışında apoptoz oluşumu veya apoptoz oluşumunun hızlandığı hastalıklara örnek

olarak AIDS, nörodejeneretif hastalıklar, insülin bağımlı tip diyabet, hepatit C enfeksiyonu, miyokard enfarktüsü, ateroskleroz gibi hastalıklar verilebilirken apoptozun yavaşladığı hastalıklara örnek olarak ise otoimmün hastalıklar ve kanser verilebilir (Fadeel ve ark. 1999, Evan ve Vousden 2001, Gewis 2003). İlk olarak 1972 yılında apoptoz terimi nekrozdan farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şeklini tanımlamak için kullanılmıştı (Kerr ve ark. 1972).

1.2.1 Apoptoz ve Nekroz

Apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilirken, nekroz fizyolojik bir ölüm şekli değildir. Başka bir deyişle, apoptoz hastalıkta ve sağlıkta karşımıza çıkabilmektedir.

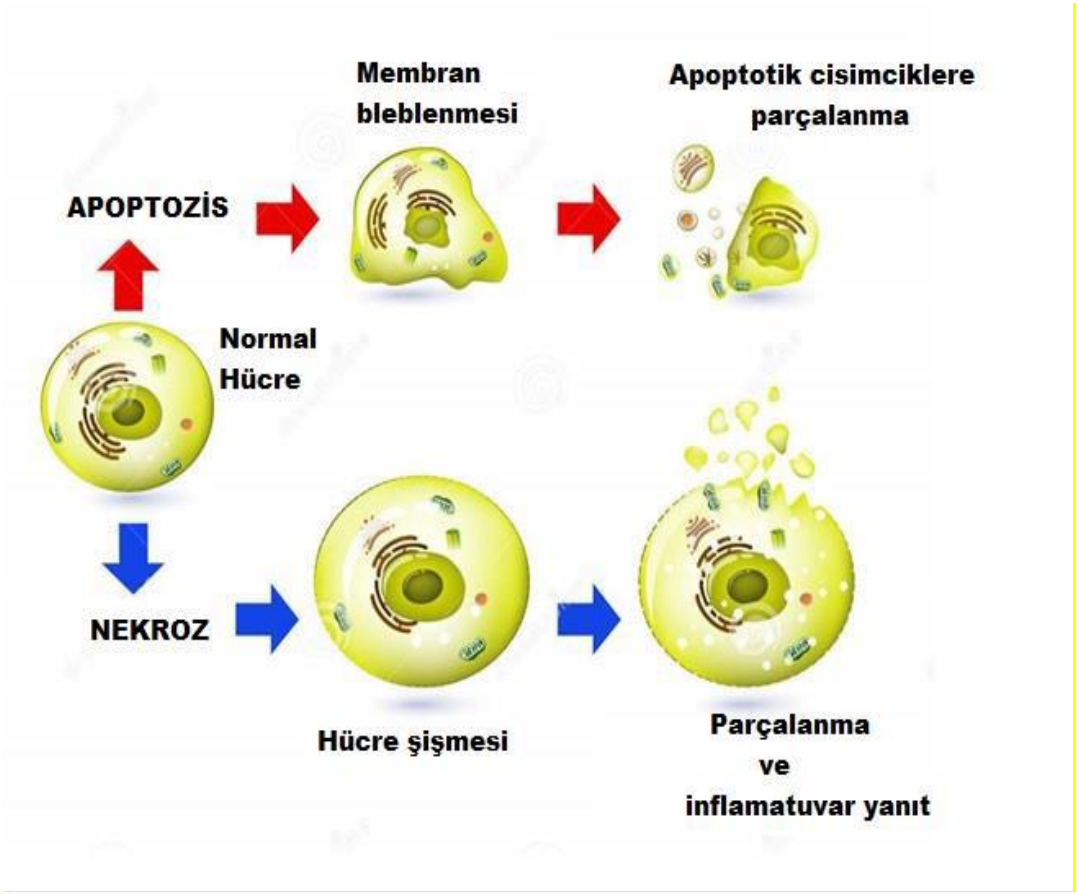


Şekil 1.3:Apoptotik hücre ile nekrotik hücrenin morfolojik açıdan farkı (Fuchs ve ark. 2007).

Nekrozda hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucunda hücre şişer "cell swelling", apoptotik hücrede ise tam tersine küçülür "cell shrinkage". Nekrozda kromatin patterni hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerken, apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır "chromatin aggregation" ve kondanse olur "chromatin condensation". Nekrotik hücre plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı olur. Ancak apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cepcikler "membran blebs" oluşur (Şekil 1.4) (Ulukaya 2003).

Tablo 1.2. Nekroz ve apoptozun karşılaştırılması (Ulukaya 2003).

ÖZELLİK	NEKROZ	APOPTOZ
Yol açan nedenler	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stress	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması "Senescence" HIV Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNFR-1(tumor nekrozis factor reseptörü-1) reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stress
Morfolojik özellikler	Hücre membranı bütünlüğünün kaybı Kromatin "flocculation"u Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	İntakt hücre membranı fakat membranda "bleb"lerin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Organellerde disintegrasyon yok Hücrenin intact mitakondri, ribozom, nucleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotic cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal özellikler	Bozulmuş iyon hemostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) +4 ^{o}C'de gerçekleşebilir DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde "smear" görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu(ölümün geç safhasında)	İyi kontrollu, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4 ^{o}C'de gerçekleşmez) DNA internukleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonukleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven patterni=apoptozisin en önemli belirteci) Prelitik DNA fragmentasyonu (=erken evrede gerçekleşir)
Diğer özellikler	Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır İnflamasyona neden olur	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler İnflamasyon görülmez



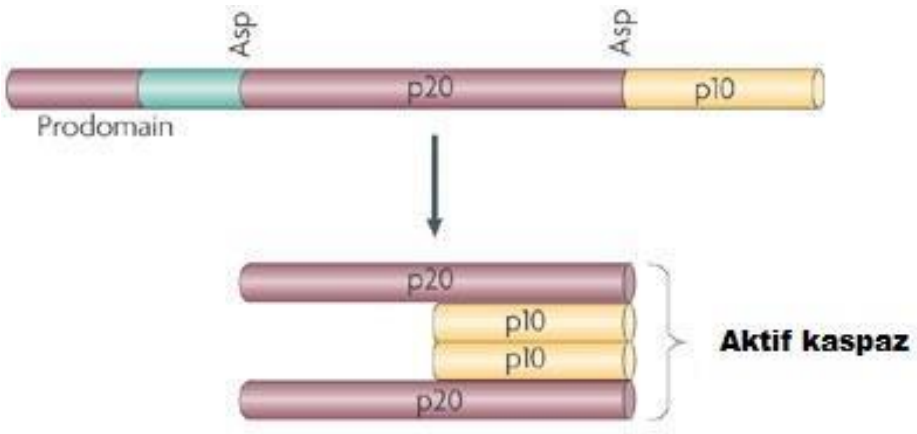
Şekil 1.4. Apoptoz ve Nekrozun şematik karşılaştırılması (Anonim 2016)

Nekrotik hücreler lizise uğrarken, apoptotik hücreler küçük cisimciklere "apoptotik bodies" parçalanır. Nekroza uğrayan hücrelerde, hücre içeriği dış ortama salındığından dolayı inflamasyon uyarılır ama apoptozda apoptotik hücre veya cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz. Apoptozun en önemli özgün yönü DNA'nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanması ve agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının "ladder pattern" ortaya çıkmasıdır. Bu durum hücre tipine bağlı olarak değişebilir ya da sadece yaklaşık 50 kilo baz çifti (kbp) boyutunda bir DNA fragmentasyonu da görülebilir. DNA'yı parçalayan bir Ca/Mg-bağımlı endonükleazdır. Ayrıca, DNase I ve II'de DNA parçalanmasından sorumludur. Hangi parçalayıcı enzimin rol alacağı hücre tipine ya da uyaranın özelliğine göre değişebilir. Apoptotik hücrede normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin (PS)'in erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olur. Bu

mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlamaktadır (Ulukaya 2003).

1.2.2 Apoptoz Sürecinde Kaspazların Rolü

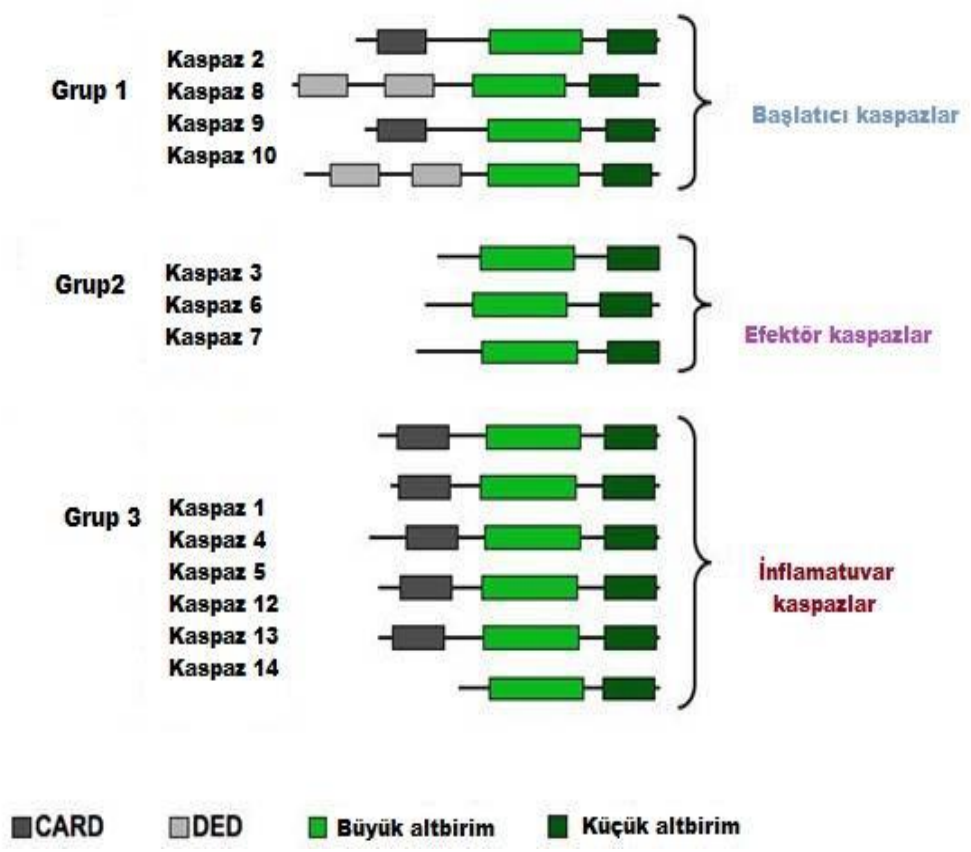
Bir ‘’prodomain’’ bir p20 büyük alt birim ve bir p10 küçük alt birim içeren inaktif (zimojen) şekilde sentez edilen sistein proteazlar kaspaz olarak adlandırılır. Aspartik asitten sonraki peptid bağını kırarark proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Memelilerde şu ana kadar en az 14 kaspaz tanımlanmış olup, filogenetik analiz sonucunda gen ailesinin ICE (Kaspaz-1) ile ilişkili ve Ced-3 benzeri olmak üzere iki alt grubu olduğu görülmektedir. Ancak proenzimlerin kısa (Kaspaz 3, 6, 7) veya uzun prodomain barındırmalarına göre de kaspazları daha alt gruplara ayırmak mümkündür. Kaspazların aktivasyonları zimojenlerin proteolitik kesimi sonucu, büyük ve küçük alt birimlere ayrılırken, ‘’prodomainler’’leri ise uzaklaştırılır ve p20 alt biriminde yer alan katalitik rezidüleri, Cys285 ve His237’den oluşan aktif bir alandan oluşur (Fuentes-Prior ve ark., 2004). Kaspazlar, subtratlarında birbirini takip eden en az dört amino asit (P4–P3–P2–P1) yapısını tanırlar ve C-terminal rezidüsünden (P1) sonra kırarlar. Bu ise genellikle Asp (aspartik asit) rezidüsüdür (Fuentes-Prior ve ark. 2004, Timmer ve Salvasen 2007).



Şekil 1.5. Kaspazların aktifleşme mekanizması (Clarke 2009 değiştirilerek alınmıştır).

Başlatıcı kaspazlar, protein-protein etkileşim motiflerini barındıran uzun bir “prodomain” içerir. Bu motifler, ya ölüm etkileyici alan (DED; “death effector 15 domain”) ya da kaspaz takviye alanıdır (CARD; “caspase recruitment domain”) (Şekil 1.6). Kaspazlar bu motifler sayesinde adaptör moleküllerle etkileşimlerini

sağlarlar. İlerletici kaspazlar, kısa bir "prodomain" içerirler ve apoptozisin ilerlemesini sağlamak için çok çeşitli hücresel substratları kırarlar (Lamkanfi 2011).

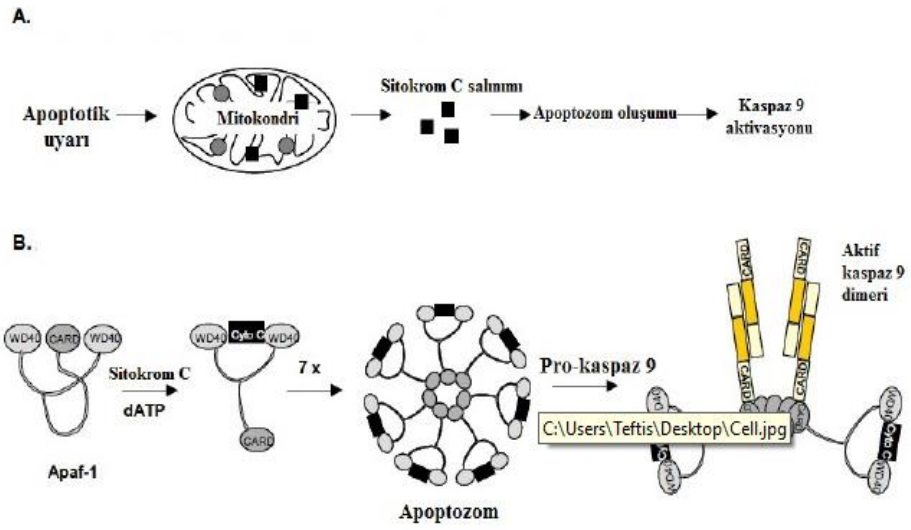


Şekil 1.6. Başlatıcı ve efektör kaspazlar (Forro 2012 değiştirilerek alınmıştır).

Başlatıcı kaspazlar ölüm sinyalini ilerletici kaspazlara iletirler. Bu iletim kaspazların birbirlerini aktifleştirerek aktivasyonun sağlanması prensibine dayandığı için, kaspaz aktivasyonu proteolitik bir şelale (kaskad) mekanizmasıyla çalışır. Kaspaz 3, DNA onarımında görevli olan PARP' ı kırarak inaktive eder ve DNA onarım mekanizmasını engeller. Bazılarının ise DNaz'ı aktive ederek DNA'nın parçalanmasına yol açtığı bilinmektedir (Ulukaya 2001, Oliver ve Valette 2005). Apoptoz inhibitörleri (IAP) sitozolde bulunurlar ve inaktif veya aktif kaspaz formlarına bağlanarak fonksiyonlarını baskılamaktadırlar. Smac/ DIABLO mitokondrinin iç zarında bulunurlar ve apoptoz sürecinde sitokrom c ile beraber salınarak, apoptoz inhibitörlerini baskılayıp kaspaz aktivasyonu sürecine yardım etmektedirler (Zimmermann ve ark. 2001, Zhang ve ark. 2003).

1.2.3 Apoptoz Sürecinde Mitokondrinin Rolü

Mitokondrinin apoptoz sürecindeki kilit rolü, mitokondri dış membran permeabilizasyonudur (MOMP). Mitokondri dış membran permeabilizasyonunun sonucunda; sitokrom c, mitokondri türevli kaspaz aktivatörü/IAP bağlayıcı protein Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, apoptozis indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz D (EndoG) gibi mitokondri membran proteinleri sitozole salınır. Mitokondri iç membran yüzeyinden sitokrom c'nin sitozole salınması ile sitokrom c, sitoplazmik protein olan Apaf-1(apoptotik proteaz aktive edici faktör-1)'e bağlanarak, Apaf-1'in aktivasyonunu gerçekleştirir. ATP'nin de ortamda bulunması ile Apaf-1/sitokrom c kompleksi heptamerik bir yapıya oligomerize olur ve bu yapının oluşması, prokaspaz 9'un Apaf-1 ile etkileşimini mümkün kılarak apoptozom kompleksi oluşur (Şekil 1.7).

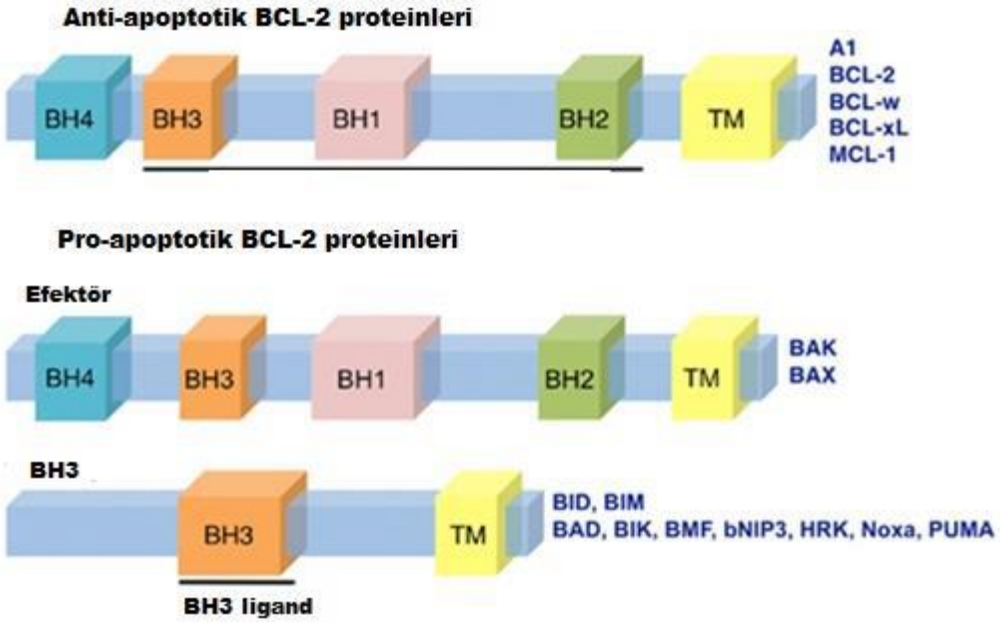


Şekil 1.7. A.Kaspaz aktivasyonunun mitokondriyal yolu B.Apoptozom oluşumu ve aktivasyonu (Gewies 2004, değiştirilerek alınmıştır.)

Apoptozomun başlıca görevi, başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz 9'u aktive etmektir. Aktif kaspaz 9 kaspaz kaskadında, kaspaz-3'ü veya diğer ilerletici kazpazları aktive ederek rol oynar. Ayrıca kaspaz aktivitesini inhibe eden ve aktiviteleri Smac veya Omi/HtrA2 gibi fonksiyonel analoglar ile engellenmiş birçok apoptozis inhibitörleri vardır. Ölen hücrelerde Smac ve Omi/HtrA2 (mitokondriyel proteinler, pro-apoptotik proteinler) mitokondriden salındığında apoptoz inhibitörleri inaktive olmaktadır. Bu şekilde ilerletici kaspazların inhibisyonu engellenerek hücrelerin apoptozise gitmeleri sağlanır (Ulukaya, 2003; Riedl ve ark., 2007; Li ve ark., 2008; Duprez ve ark., 2009).

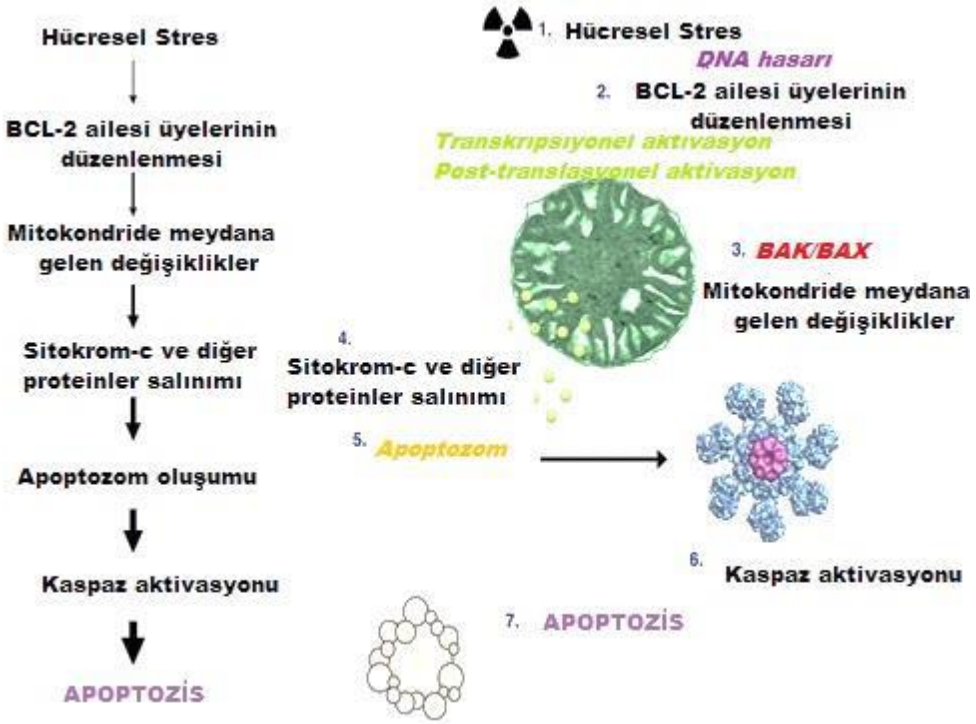
1.2.4 Apoptoz Sürecinde Bcl-2 Ailesinin Rolü

Apoptozu düzenlemede kritik rollere sahip onkoprotein olan Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkili işlevlere sahip iki gruptan oluşur (Altunkaynak ve Özbek 2008). Bunlar anti-apoptotik (Bcl-2 ve Bcl-XL gibi) apoptozu baskılayan ve pro-apoptotik (Bax, Bid gibi) apoptozu indükleyen etkilere sahip gruplardır. (Şekil 1.8) Anti-apoptotik olanlar, sitokrom c'nin salınmasını engeller; pro-apoptotik olanlar ise sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasını indükler (Kumar ve ark. 2005). Hücrelerin apoptotik uyarı süreci pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri arasındaki dengeye bağlıdır (Burlacu 2003). Anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerin aşırı ekspresyonu apoptozu baskılarken, pro-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonu apoptoza neden olur (Kumar ve ark. 2005).



Şekil 1.8. Apoptozun mitokondri yolunda yer alan Bcl-2 ailesi üyeleri (Anvekar ve ark. 2011'den değiştirilerek alınmıştır).

Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki etkileşim, anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin normal fonksiyonunu bozar ve mitokondride porların oluşumuna, sitokrom c ve diğer pro-apoptotik moleküllerin zarlar arası bölgeden salınımına neden olur (Şekil 1.9). Bu da apoptozom oluşumu ve kaspaz kaskadı aktivasyonuna yol açmaktadır (Robertson ve Orrenius 2000, Fan ve ark. 2005).



Şekil 1.9. Apoptozom oluşumu ve kaspaz aktivasyonu (Anvekar ve ark. 2011'den değiştirilerek alınmıştır).

1.2.5 Apoptoz Mekanizmaları

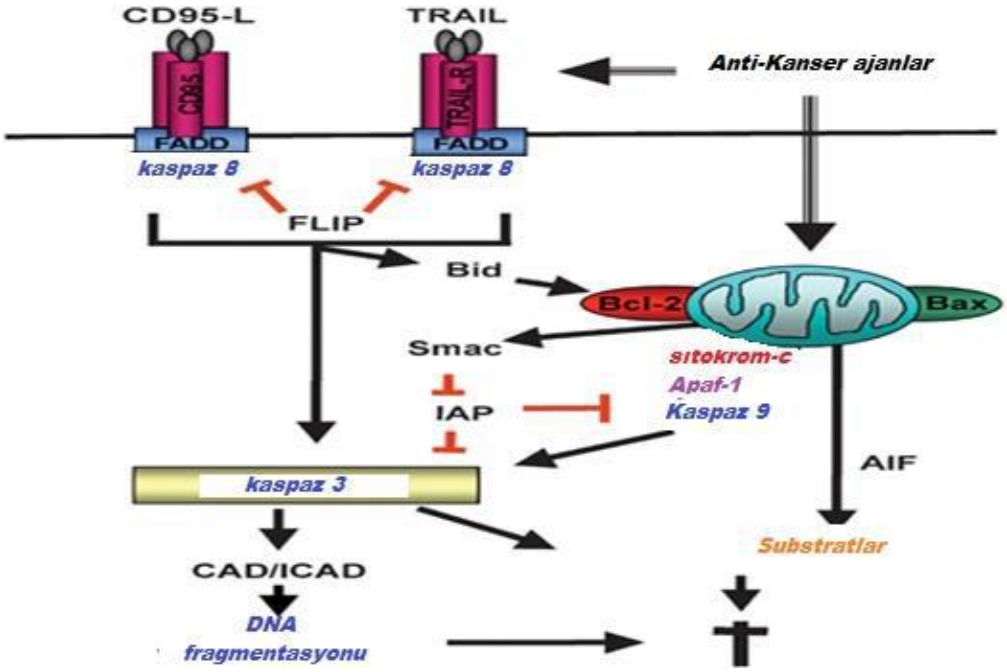
Apoptoz aktivasyonunda rol oynayan üç temel sinyal yolakları;

1. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile tetiklenme/ Ekstrinsik (dışsal) yolak
2. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması/İntrinsik (içsel) yolak
3. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis oluşturulması

1.2.5.1 Ekstrinsik (Dışsal) Yolak

Ekstrinsik yolak da, ölüm reseptörleri (DR) olarak bilinen ve Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü (TNFR) geni ailesinin üyesi olan; TNFR-1, Fas/CD95/APO-1 ve TNF-İlişkili Apoptozis İndükleyici Ligand (TRAIL) reseptörleri olan DR-3 (TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1) ve DR-5 (TRAIL-R2)'in ilgili ligandlarla etkileşime girmesi sonucunda apoptoz indüklenmektedir. TNFR süper ailesi üyeleri, tip I transmembran proteinleri olup hepsi sistein bakımından zengin ekstrasellüler bölgeler (subdomainler) içerir ve bu özellik TNFR süper ailesi üyelerinin kendilerine özgü ligandları tarafından tek tek tanınmasını sağlamaktadır. Ölüm reseptörleri ayrıca apoptotik sinyalin transdüksiyonu için gerekli olan 80 aminoasit uzunluğunda intraselüler Ölüm Bölgesi (DD) içerir. Ölüm reseptörlerine bağlanan ligandlar (FasL,

TNFα VE TRAIL) yapısal olarak reseptörler ile ilişkili proteinler olup TNF süper ailesine aittirler. Bu ölüm ligandları tip II transmembran proteinleri gibi eksprese edilirler. Bazı durumlarda, bu proteinler proteolitik kırılabilir ve serbest kalabilirler (Ghobrial ve ark. 2005, Guicciardi ve ark. 2009). Ölüm reseptörlerinin ligandları yani aktivatörleri reseptörlerin oligomerizasyonuna yol açarak aktifleşmelerine neden olmaktadır. Reseptörlerin aktivasyonu, Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi (DISC) denilen ve proteinlerden meydana gelen bir kompleks oluşumuna sebep olur. DISC, adaptör protein Fas ilişkili ölüm alanını (FADD) ve TNFR-1 ilişkili ölüm bölgesi proteinini (TRADD) içerir. Bu ölüm bölgeleri prokaspaz-8'i aktifleştirmektedir. DISC yapısında yer alan prokaspaz 8'in aktivasyonunu takiben kaspaz 8 sırasıyla kaspaz 3, 6 ve 7'nin aktive olduğu bir kaspaz kaskatını harekete geçirir. Kaspaz 8'in aktif hale geçmesi ayrıca Bid'in aktive olmasına neden olur. Kırılmış Bid (tBid) sonrasında mitokondriye geçer ve sitokrom c, SMAC (İkinci mitokondri türevli kaspaz aktivatörü) ve kalsiyum salınımını uyarır (Şekil 1.10) (Elmore 2007, Solakoğlu 2009, Dickens ve ark. 2012).



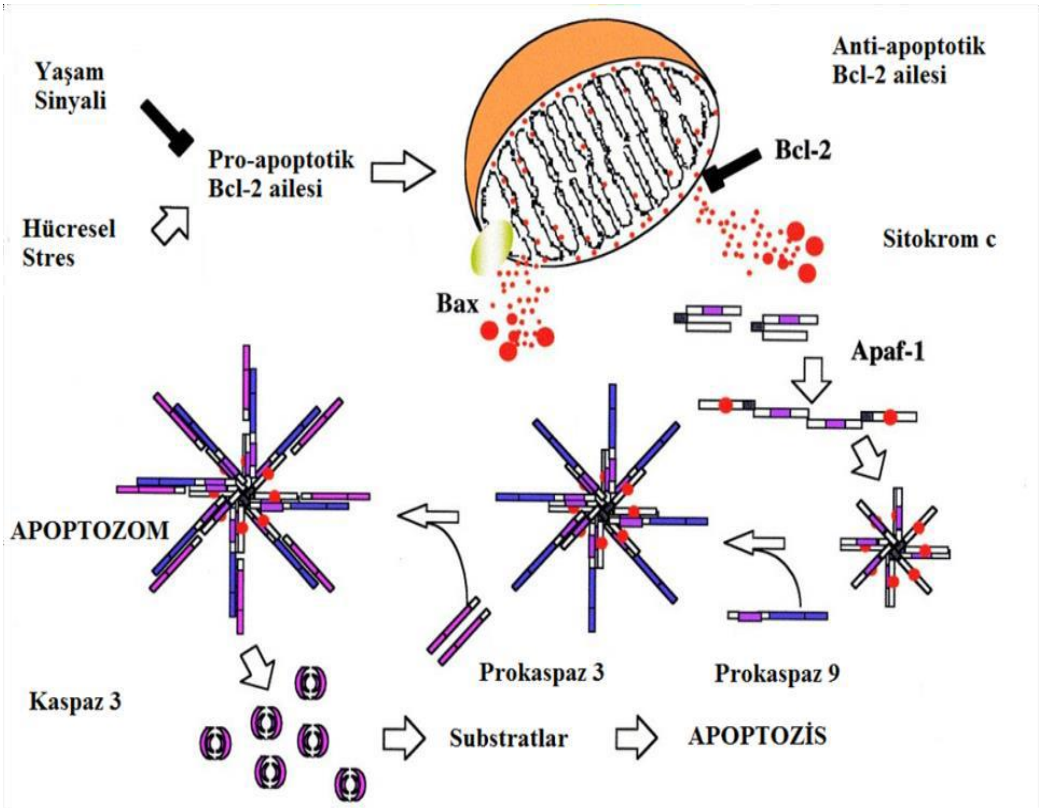
Şekil 1.10. Reseptör aracılı kaspaz aktivasyonu (Fulda ve Debatin 2006'dan değiştirilerek alınmıştır).

1.2.5.2 İntrinsik (İçsel) Yolak

Mitokondriyal yolak olarak bilinen intrinsik yolak, Bcl-2/Bax gen ailesi ile düzenlenmekte olup uyarıldığında mitokondriden sitokrom-c salınımına ve böylece ölüm sinyaline sebep olur.

Temelde iki yolak da (ekstrinsik ve intrinsik), düzenleyici ve yapısal molekülleri kırarak kaspaz aktivasyonunu içeren ortak bir yolda birleşirler ve hücrenin ölümüne sebep olurlar (Ghobrial ve ark. 2005). Anti-apoptotik üyeler, kaspazların öncü formlarını durdurarak ya da apoptogenik faktörlerin mitokondriden salınımını engelleyerek hücrenin yaşamasını teşvik ederken; pro-apoptotik üyeler hücreyi apoptoza teşvik ederler. Normal durumda Bax ve Bak proteinleri Bcl-2 tarafından inaktif halde tutulur. Apoptotik sinyal oluştuğunda Bcl-2 inaktif hale geçerken aktifleşen Bax ve Bak mitokondri dış membranında porların oluşmasına ve zar potansiyelinde değişime neden olurlar. Mitokondriyal yolun kilit olayı mitokondri dış membran permeabilizasyonudur (MOMP) ve sonucunda; sitokrom c, mitokondri türevli kaspaz aktivatörü/IAP bağlayıcı protein Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, AIF ve endonükleaz D (EndoG) gibi mitokondri membran proteinleri sitozole salınır. Mitokondri iç membran yüzeyinden sitokrom c'nin sitozole salınması ile sitokrom c, sitoplazmik protein olan Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1 (Apaf-1)'e bağlanır ve onu aktive eder, dATP/ATP'nin de ortamda bulunması ile Apaf-1/sitokrom c kompleksi heptamerik bir yapıya oligomerize olur. Bu yapının

oluşması, prokaspaz 9'un Apaf-1 ile etkileşimini mümkün kılar ve apoptozom kompleksi oluşur (Şekil 1.11). Apoptozomun görevi, başlatıcı kaspaz olan kaspaz 9'u aktive etmektir. Aktif kaspaz 9, kaspaz-3'ü veya diğer ilerletici kazpazları aktive ederek kaspaz kaskadına aracılık eder.



Şekil 1.11. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması (Zimmermann ve ark. 2001).

Aktif kaspaz 3, kaspazla aktive edilmiş DNaz inhibitörü (ICAD; "inhibitor of caspase-activated DNase") poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP, DNA tamir enzimi), Rho ilişkili sarmal oluşturan kinaz I (ROCKI; "Rho-associated coiledcoil forming kinase I"), aktin, fodrin ve lamin gibi hücresel substratları kırarak apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlar. CAD normal hücrelerde ICAD'üne bağlı ve inaktif halde bulunur ve aktif hale geçtiğinde kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nükleozamal fragmentlere kesilmesine neden olur. Ayrıca kaspaz aktivitesini inhibe eden ve aktiviteleri Smac veya Omi/HtrA2 gibi fonksiyonel analoglar ile engellenmiş birçok IAP'lar (apoptozis inhibitörleri) vardır. Ölen hücrelerde Smac ve Omi/HtrA2 (mitokondriyel proteinler, pro-apoptotik proteinler) mitokondriden salındığında IAP'lar inaktive olmakta ve böylece ilerletici kaspazların inhibisyonu engellenip hücrelerin apoptozise gitmeleri sağlanmaktadır (Ulukaya 2001, Zhang ve ark. 2003, Riedl ve ark. 2007, Li ve Yuan 2008, Akşit ve Bildik 2008, Duprez ve ark. 2009).

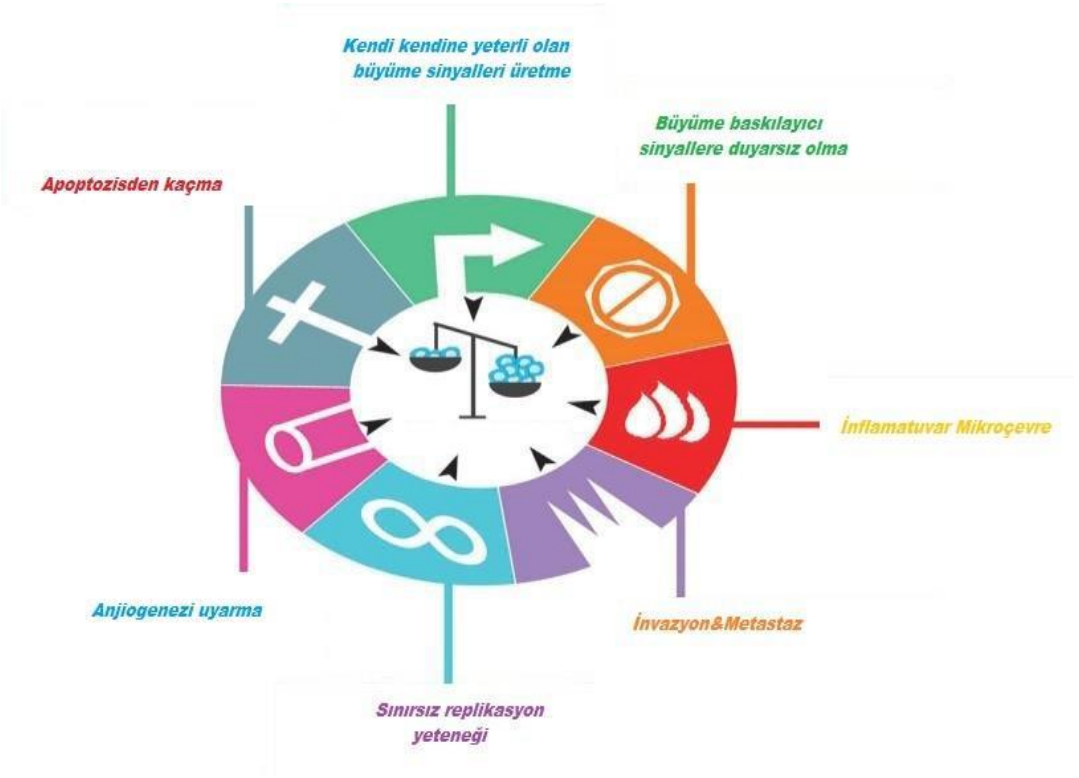
Bu içsel ve dışsal yol mekanizmaları kaspaz-bağımlı apoptozisi göstermektedir. Ayrıca kaspazlardan bağımsız olarak apoptozise neden olduğu düşünülen kaspaz aktivasyonunun gerçekleşmediği bir mekanizma da bulunmaktadır. Bu mekanizmada AIF mitokondriden salınıp nükleusa geçmekte ve nükleazları aktifleştirerek DNA hasarına yol açmaktadır. AIF, steroidler, granzyme B ve endonukleaz G kaspazlardan bağımsız olarak apoptozise neden olmaktadır (Ulukaya 2003, Dash 2007).

1.2.5.3 Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis Oluşturulması

Son zamanlarda amiloid β nörotoksisitesine katkıda bulunan kaspaz 12'ye bağımlı Endoplazmik retikulum aracılı apoptotik yol tarif edilmiştir (Nakamura ve ark. 2000, Keane ve ark. 2001). Bu yol mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptör aracılı apoptozisten farklı bir yol olup kaspaz 12, Endoplazmik retikulum membranında lokalize halde bulunur ve Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis için gerekli bir kaspazdır. Son çalışmalar göstermiştir ki Ca++ seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile prokaspaz 12 aktifleşir. Aktifleşen kaspaz 12 sitoplazmaya yönelerek kaspaz 9 ile etkileşir ve sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder (Rao ve ark. 2001).

1.2.6 Apoptozis-Karsinogenez İlişkisi

Karsinogenez süreci, homeostatik "feedback" mekanizmalara yanıt veren normal hücrelerin bu mekanizmaların kontrolundan çıkıp, kontrolsuz ve spontan olarak büyüyebilen ve komşu dokulara invazyon yapabilen hücre şekillerine dönüşmelerini kapsayan süreç olarak tanımlanabilmektedir. Bu süreçte rol alan kanser hücrelerinin; kendi kendine yeterli olan büyüme sinyalleri üretme, büyüme baskılayıcı sinyallere duyarsız olma, hücre ölümüne direnç, sınırsız replikasyon potansiyeline sahip olma, anjiogenezi uyarma, invazyon ve metastazı uyarma gibi öne çıkan altı farklı biyolojik yeteneği vardır. Son yıllarda, enerji metabolizmasını yeniden programlama ve bağışıklık tahribinden kaçınma özellikleri de bu listeye eklenmiştir (Şekil 1.12) (Hanahan ve Weinberg 2011).



Şekil 1.12. Kanser hücresinin özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011'den değiştirilerek alınmıştır).

Apoptozisin gerçekleşmesi karsinogenez sürecinde kritik bir öneme sahiptir (Letai 2008). Tümör hücreleri örneğin DNA hasarına cevap olarak birçok sinyal üretir ve onkojenik aktivasyon meydana gelir ve bu durumda da apoptozis uyarılmaktadır. Bununla birlikte mutasyona uğrayan tümör hücreleri apoptotik cevaptan kaçabilir, sonuçta sağkalım olur ve hücreler çoğalırlar. Apoptozisden kaçma mutasyonların birikimine yol açar. Tümör hücreleri, normal hücrelere kıyasla birçok apoptozisi uyaran sinyal (örneğin oksidatif stres ve onkogen aktivasyonu) alır ve bu yüzden tümör hücreleri normal hücrelere oranla apoptotik cevabı tetiklemeye çok daha yatkındır. Bununla birlikte, apoptotik yol tümör hücrelerinde çoğu kez hatalıdır. Bu hatalar, tümür hücrelerine hipoksik koşullardan ve oksidatif stresten korunma sağlamış olur. Bu yüzden tümör hücrelerinde örneğin; p53'ü hedef alarak apoptotik yolun onarımı hedefleyen çalışmalar yeni kanser terapötiklerinin tasarımı açısından önemli bir değere sahiptir. Bunun yanı sıra Bcl-2' yi hedef alan yeni inhibitörlerin geliştirilmesi, PKB/Akt (Protein kinaz B) sinyalinin inhibisyonu ve fotodinamik tedavi gibi yeni stratejiler apoptozis ve hücre sağkalımının moleküler mekanizmalarının aydınlatılması kanser tedavisinde yeni stratejilerinin gelişmesine olanak sağlamıştır (Anderson ve ark. 2016, Silva ve ark. 2016).

1.3. METAL BAZLI BİLEŞİKLERİN KANSER TEDAVİSİNDEKİ YERİ

Sisplatin testis, over, mesane, baş-boyun, akciğer ve meme gibi birçok kanser türünün tedavisinde kullanılan ve tedavi sürecinde oldukça fazla yan etkiye sahip olduğu klinik çalışmalar sonucu gösterilmiş bir ilaçdır (Florea ve ark., 2011). Bazı kanser türlerinde sisplatine karşı gözlenen doğal direnç dışında, başlangıçta tedaviye olumlu yanıt veren fakat ileriki dönemlerde gelişen bir direnç mekanizması da mevcuttur. Sisplatinin doz sınırlayıcı nefrotoksisite, nörotoksisite ve ototoksisite gibi ciddi yan etkilere sahip olması dışında hastaların birçoğunda yüksek tansiyon, ishal, şiddetli bulantı ve kusma gibi belirtiler gözlenmektedir. Platin grubu bir diğer ilaç olan karboplatin, sisplatinin neden olduğu bu ciddi yan etkilere daha az sebep olan klinikte sisplatinden daha yüksek dozlarda uygulanabilen bir ilaçdır. Fakat yine de ne karboplatin ne de daha sonrası sentez edilen platin türevleri (AMD-473, oxaliplatin) düşük dozlarda güçlü bir sitotoksik aktiviteye sahip olamadığı gibi direnç mekanizmalarının da üstesinden gelememiştir.

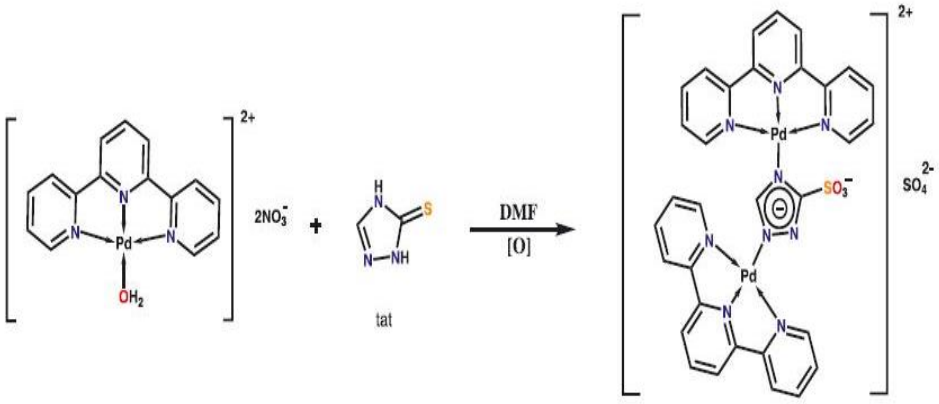
Sisplatinin keşfinden bu yana, geliştirilen yeni platin veya palladyum tabanlı kanser ilaçları, etkinliği arttırılmış, daha az toksik ve sağlıklı hücreye zarar vermeyecek şekilde tasarlandı, fakat bunlardan sadece birkaçı faz çalışmalarında başarılı olup klinikte tedavi de yerlerini almıştır (Wilson ve ark., 2013; Harper ve ark., 2015). Bu yüzden araştırmacılar, sisplatin ile yapısal olarak benzemeyen, kemoterapi için uygun geniş bir spektrumda aktivite gösteren ve DNA ile farklı interaksiyonlar kuran yeni bileşiklerin sentezine yöneldiler (Cheung-Ong vr ark., 2013). Carmichael ve arkadaşlarının yaptıkları, faz II klinik denemelerine kadar ilerleyen çalışmada, sisplatinden farklı yapıda olan yüklü trinükleer bileşik BBR 3464'ün yeni DNA adduct yapılarının oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir (Carmichael ve ark., 1987).

Çok çeşitli stratejiler kullanılarak multi nükleer metal komplekslerinin etkinliği arttırılmaya çalışılmıştır. Özellikle terpiridin içeren dinükleer [Pt(terpy)] komplekslerinin mononükleer [Pt(terpy)] komplekslerine göre daha sitotoksik olduğu belirtilmiştir (Wheate ve ark., 2007). Bu sitotoksik etki, artmış elektriksel yük sayesinde DNA bağlanma afinitesinin daha fazla olması ile ilişkilidir. Dinükleer Pt (II) kompleksleri ile yapılan çalışmalarda bu komplekslerin normal ve kanser hücrelerinin DNA sekanslarındaki farklılıklara karşı yüksek seçicilik ve özgüllük

gösterdiği ortaya konmuştur (Chaires ve ark., 1997). Bu durum kanser tedavisi için büyük önem arz etmektedir.

Fakat sınırlı sayıdaki kanser türü platin-bazlı ilaçlar ile tedavi edilebilmektedir ki bu ilaçların hastalar üzerinde gösterdiği yan etkiler oldukça fazladır. Bunun dışında kemoterapideki başarısızlığın en önemli sebebi olan ilaç direnci platin-bazlı ilaçlara olan ilgiyi azaltmıştır (Galanski ve ark., 2005). Son yıllarda, dinükleer Pt (II) komplekslerine kıyasla daha çözünür ve daha az nefrotoksik olan dinükleer Pd (II) kompleksleri ile yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlar alınmaktadır (Tušek-Božić ve ark., 1998; Ulukaya ve ark., 2011).

Tüm bunların umut vaadeden terpiridin içeren Pd (II) kompleksinden dinükleer Pd(II) kompleksi geliştirilerek sentez edilmiştir (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. Proje çalışmasında kullanılacak olan Dinükleer Pd (II) kompleksinin açık molekül yapısı

Bu tez kapsamında anlatılan bilgilerin ışığında, kanser tedavisinde kullanılabilecek yeni bir ilaç adayı olabileceğini düşündüğümüz dinükleer Pd (II) kompleksini, meme kanseri ve sağlıklı meme hücreleri üzerine olan sitotoksik/sitostatik, apoptotik etkileri ve moleküler mekanizması araştırılmıştır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. MATERYAL

2.1.1. Kimyasal Maddeler

-Palladyum (II) bileşiği, Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü

-Klorokin, Sigma, Almanya

-3 Metil Adenin, Sigma, Almanya

-SRB (Sulforhodamine B), Santa Cruz, ABD

-Adenosine 5'-triphosphate (ATP) bioluminescent somatic cell assay kit, Sigma, Almanya

-Muse® Annexin V & Dead Cell Assay Kit, Merck Millipore

-Muse® Caspase-3/7 Assay Kit, Merck Millipore

-Muse® Mitopotential Assay Kit, Merck Millipore

-Muse® Oxidative Stress Kit, Merck Millipore

-Muse® H2A.X Activation Dual Detection Kit, Merck Millipore

-Muse® Bcl-2 Activation Dual Detection Kit, Merck Millipore

-Muse® Cell Cycle Kit, Merck Millipore

-Fetal sığır serumu (FBS), PAA, USA

-Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco, USA

-L-glutamin, Gibco

-Fosfat tuz tamponu (PBS), HyClone, Thermo Scientific, USA

-Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Lonza

-0,05% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco, USA

-Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma, Almanya

-Triton X-100, Sigma, Almanya, İsrail

-Tripan mavisi (%0,5), Biological Industries

-SDS Molecular Biology grade, BioChemica Applicham, Almanya

-Annexin V-Fluos, Roche

-Cell Viability Imaging kit, Roche, Almanya

-Hoechst dye 33342 ve and Propidium Iodide (PI), Sigma Aldrich, USA

-Bovine Serum Albumin (BSA), Amresco, USA

-Triz bazı (Tris base), Scharlau, İspanya

-Sodyum klorür (NaCl), Merck, Almanya

-Kristal viyole, Sigma, ABD

-Tween20, Amresco, USA

-ß-merkaptoetanol, Merck, Almanya

2.1.2. Sarf Malzemeler

-25cm2 ve 75cm2'lik flask, Corning

-6 kuyulu plate, Corning

-96 kuyulu flat plate, Corning

-5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Set inject

-10µl'lik pipet uçları, Biohit

-100µl'lik pipet uçları, Biohit

-1000µl'lik pipet uçları Biohit

-Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Orange Scientific

-Steril santrifüj tüpleri (15ml), Nest

-Steril santrifüj tüpleri (50ml), Nest

-Thoma lamı, Bright –Line, Hausser Scientific Horsham, PA, USA

-Kriyovial, Corning

2.1.3. Cihazlar

-Spektrofotometre, BGM Labtech

-Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D

-CO_2 inkübatörü, Panasonic

-Buzdolabı, Panasonic

-Steril kabin, Telstar

-Muse Cell Analyzer, MerckMillipore Sigma, Toronto

-Multipipet cihazı, Multipette eppendorf

-Inverted mikroskop, Nikon, Japonya

-Santrifüj, Hitachi, Japonya

-10µl, 100µl ve 1000µl'lik pipet seti, Orange Scientific

-0,5-5ml pipet, Brand

-10ml pipet, Eppendorf

-5-50µl Transferpipet, Thermo Scientific

-Pipet boy, ISO fill

-20-200µl Transferpipet, Brand, Almanya

2.2. YÖNTEMLER

2.2.1. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Kimya Bölümü Tarafından Sentez Edilen Dinükleer Pd (II) Kompleksinin Hazırlanması

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Kimya Bölümü tarafından yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin stok çözeltisi (40 mM); moleküler biyolojik su içerisinde çözüldü.

2.2.2. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi sürecidir. Ticari olarak Amerika Hücre Kültür Koleksiyonundan satın alınan MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri hücre soyları kriyovial denen kaplar içerisinde -80ºC dolaplarda saklandı. Kullanılan hücre soylarının özellikleri aşağıda belirtilen şekildedir.

MCF-7 Hücre Soyu:

- ✓ İnsan meme kanseri hücre soyu
- ✓ Östrojen reseptörü (+)
- ✓ E-kaderin (+)
- ✓ Kaspaz 2: (+/-), Kaspaz 3: (-)
- ✓ Daha az oranda yayılabilir.

MDA-MB-231 Hücre Soyu:

- ✓ İnsan meme kanseri hücre soyu
- ✓ Östrojen reseptörü (-)
- ✓ Epidermal growth factor (EGF) (+)
- ✓ Transforming growth factor alpha (TGF alpha) (+)
- ✓ E-kaderin (-)
- ✓ Kaspaz 2: (+), Kaspaz 3: (+)
- ✓ Yüksek oranda yayılabilir.

2.2.2.1. Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması

Hücreleri çoğaltmak amacıyla kriyovialler -80ºC den alınarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. Hücre süspansiyonu; %5 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin (Gibco)içeren 5ml RPMI (Gibco) besiyeri içerisine alındı. Falkon tüp 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım aspire edildi ve hücre peleti üzerine 1ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı. Falkon tüp üzerine 4 ml besiyeri ilave edildi ve 5 ml'lik hücre süspansiyonu 25cm^2'lik flasklar (Corning) içerisine alınarak 37ºC'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edildi.

2.2.2.2. Hücre soylarının pasajlanması

Deneylerde kullanılan hücre soyları, flask yüzeyini tamamen kapladıklarında (konfluent olduklarında) flask içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücrelerin serumdan arındırılması için 25cm^2'lik flask içerisine 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edildi ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0.5 ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37ºC'de, %5 CO2'li ortamda 5dk inkübe edildi. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için en az iki katı kadar besiyeri ilave edildi. Böylece tripsinin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlaması engellenmiş oldu.

Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan (falkondaki toplam hacim tripsinin 10 katı olmalı) 15 ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800rpm'e 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre pelleti 1ml hücre besiyerinde çözündükten sonra 9ml besiyeri ilave edildi ve 10 ml'lik hücre süspansiyonu 75cm^2'lik flasklara alınarak 37ºC'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde hücreler istenilen sayıya gelene kadar çoğalmaları sağlandı.

2.2.2.3. Hücre Soylarının Stoklanması

Hücreler flask yüzeyini tamamen kapladıklarında flask içerisindeki besiyeri aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 1X PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırıldı ve hücrelerin flask yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu eklendi. Hücreler 37ºC'de, %5 CO_2'li ortamda 5 dk inkübasyona bırakıldı. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden

ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için en az iki katı kadar besiyeri ilave edildi.Flask içerisindeki hücre süspansiyonu içerisinde besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve pellet üzerine her bir kriyovial için 1 ml dondurucu medium (5 ml DMSO + 5 ml FBS + 40 ml DMEM) karanlık ortamda ilave edildi. Hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine dağıtılarak -80ºC'ye kaldırıldı.

2.2.2.4. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre soyları için kullanılan besiyeri ortamı için %5 Fetal Bovine Serum (Capricorn Scientific), %1 Penisilin-Streptomisin solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin, Gibco), %1 L-glutamin (Gibco) içeren RPMI 1640 (Gibco) solüsyonu kullanıldı.

2.2.2.5. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Hücre sayımı yapabilmek amacıyla öncelikle hücrelere tripsinizasyon işlemi uygulandı. Elde edilen hücre süspansiyonundan 10 µl alındı ve 96 kuyucuklu bir hücre kültürü kabının boş bir kuyusuna eklendi. Üzerine eşit miktarda %0,5 tripan mavisi (Biological Industries, İsrail) konularak iyice karışması sağlandı. Bu karışımdan 10 µl alınarak thoma lamına koyuldu ve mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplandı.

2.2.3. Sulforhodamine B (SRB) Canlılık Metodu

SRB metodu, Amerika'da bu konularda referans merkez olarak kabul edilen NCI (National Cancer Institute)'nün de kabul gören hücre canlılık metodudur. Yöntemin prensibi Sülforadamin B (SRB) molekülünün asidik ortamda proteinlere stokiyometrik olarak bağlanması prensibine dayanmaktadır (Vichai ve ark.,2006). Uygulamada hücreler, 2500-7500 arası değişen yoğunlukta, kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. Hücrelerin adaptasyonunu sağlamak üzere, hücreler 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra dinükleer Pd(II) kompleksi (0,7-50 µM/ml dozları arasında) 24, 48 ve 72 saat süreyle muamele edilerek tedavi süresi sonunda hücreler %50 (w/v) soğuk TCA ile 60 dk in situ fikse edildi ve ardından %1 asetik asit içinde %0,4 (w/v) SRB ile boyandı. Boyama süresi sonunda hücrelere bağlanan SRB boyası, tamponlanmamış 10 mM Tris kullanarak

çıkarılarak ve optik yoğunluk (absorbans) 530 nm'de "microplate" okuyucusunda (LUMIStar Omega, BMG Labtech, Almanya) ölçülerek değerlendirildi.

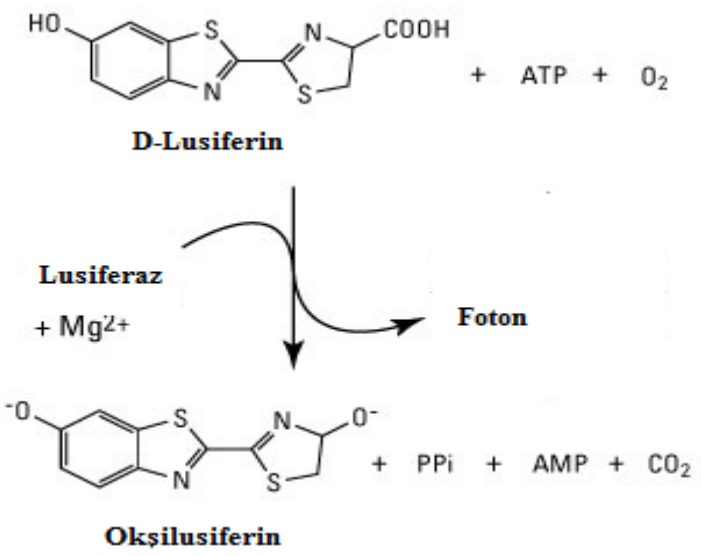
% Canlılık hesabı:

İlaç uygulanmamış kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, ilaç uygulanan hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı. Deney içerisinde her bir konsantrasyon birbirinden bağımsız üç farklı kuyuda tekrarlandı. % Canlılık=[100×(Bileşik ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması-kör ortalama)/(Kontrol hücre absorbansı ortalaması-kör ortalama)] olarak hesaplandı.

2.2.4. ATP (Adenozin Trifosfat) Canlılık Metodu

ATP yöntemi lüminesans bazlı metodolojiye bağlı olarak in vitro sitotoksite ölçümleri açısından SRB yöntemine göre çok daha hassas ve güvenilir olarak yapılabilmektedir. Hücre içerisindeki en önemli enerji deposu olan ATP; biyolojik sentez, sinyal iletimi, taşıma, hareket gibi önemli süreçler için kullanılmaktadır. Hücresel ATP hücre canlılığını ölçmede en hassas uç noktadır. Bu yöntemin prensibi hücre kültüründe büyütülen hücrelerdeki intraselüler ATP içeriğinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. İntrasellüler ATP içeriğinin seviyesi yaşayan hücrelerin sayısının belirlenmesinde kullanılan bir göstergedir (Andreotti ve ark. 1995, Dexter ve ark. 2003, Ulukaya ve ark. 2008).

Kemoterapötik ajanlar veya mitokondriyal toksinler ile muamele sonucu hücrelerde ATP seviyesi anlamlı şekilde azalmaktadır. ATP yöntemi; lüsiferinin Mg^{2+} ve ATP varlığında lüsiferaz enzimi ile oksilüsiferine katalize olup lüminesans sinyal oluşturmasına dayanmaktadır (Şekil 2.1). Lüminesans sinyal ve ATP konsantrasyonu veya hücre sayısı arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (Andreotti ve ark. 1995, Mueller ve ark. 2004, Wadhawan ve ark. 2010).



Şekil 2.1. ATP elde edilme reaksiyonu (Andreotti ve ark. 1995 değiştirilerek alınmıştır).

Bu amaçla, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları, 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildikten sonra dinükleer Pd(II) kompleksi (0,7-50 µM/ml) 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanacaktır. Tedavi uygulanmış hücrelerdeki ve kontrol hücrelerindeki ATP içeriği, yukarıda gösterilen lusiferin-lusiferaz bioluminesans reaksiyonu yardımıyla ölçme zamanı 1 saniye olacak şekilde luminometre (LUMIStar Omega, BMG Labtech, Almanya) kullanılarak ölçülecektir. Sonuçlar rölatif ışık ünitesi (Relative Light Unit, RLU) olarak alınacaktır. Böylece, tedavi uygulanmış ve kontrol hücrelerinden elde edilecek RLU değerlerine göre örneklerin % canlılığı hesaplanacaktır. Canlılık hesabı aşağıdaki şekilde yapılacaktır.

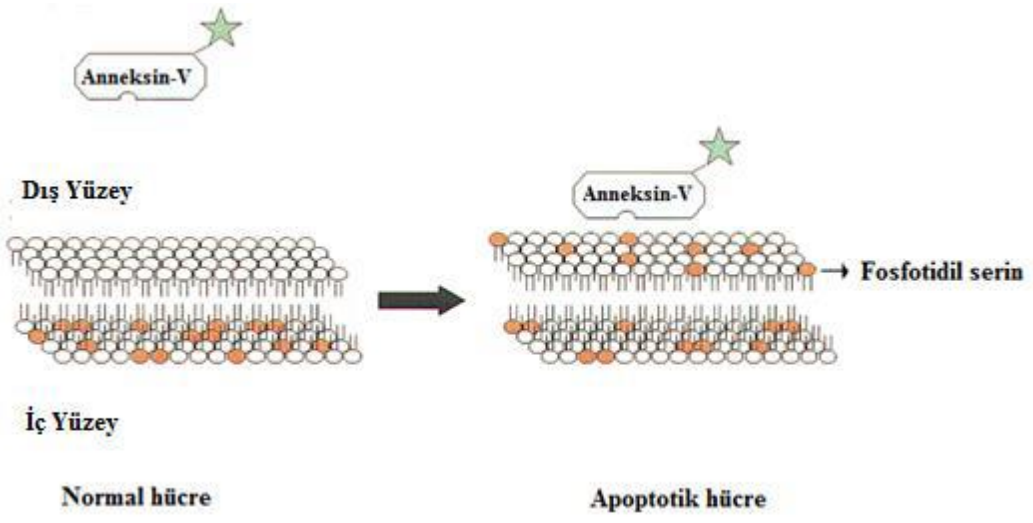
Canlılık (%) = [100 x (Örnek RLU) / (Kontrol RLU)]

2.2.5. Floresan Boyama Yöntemi ile Ölüm Modunun Belirlenmesi

2.2.5.1. Anneksin-V Boyama Metodu

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan PS bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozisle ölürse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar (Şekil 2.2). Bu yer değiştirme apoptotik hücrelerde henüz membran bütünlüğünün bozulmadığı yani ölümün erken dönemlerinde meydana gelir (Ulukaya 2013). Anneksin-V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan PS'ye bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücreler görünür hale getirilir ve floresan mikroskobu ile incelenebilir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için yöntem çalışılırken ikinci boya olarak propidyum

iyodür (PI) eklenmektedir. PI, sadece membran hasarlı hücrelere girebilen, dolayısıyla tüm ölü hücreleri (primer nekrotik veya geç apoptotik/sekonder nekrotik) boyayabilen floresan nükleik asit boyasıdır. Bu boya canlı hücreler tarafından dışarı atılmaktadır. Primer nekrozis (hücre hacminin artması fakat fragmente ya da piknotik nukleusların gözlenmemesi) toksik koşullar (hipoksi, iskemi, hipertermi vb.) altında gerçekleşen klasik ölüm şeklidir. Sekonder nekrozis ise, piknotik ya da fragmente nükleus ile karakterize olup, apoptozisin geç safhasıdır. Hücre kültürü ortamında apoptozise giden hücrelerin membranları intakt (erken apoptozda) olmasına rağmen daha ileri dönemlerde geç apoptozis/sekonder nekrozun gelişmesi ile hücrelerin membran bütünlükleri bozulmaktadır. Sekonder nekroz aşamasına kadar olan süre içinde hücreler non-vital boyalar denilen (PI) boyalar ile boyanacak olurlarsa apoptozis başlamış olmasına rağmen membran intakt olmasından dolayı bu boyalarla boyanamazlar. Sekonder nekroz geliştikten sonraki aşamalarda hücreler membran bütünlüklerinin bozulması ile non-vital boyalar ile boyanmaya başlarlar. Dolayısıyla PI pozitif ve Hoechst pozitif boyanmaktadırlar. Hücreler eş zamanlı olarak Anneksin-V-Fluorescein (yeşil floresan) ve non-vital boya olan propidyum iyodür (kırmızı floresan) ile boyanır. Canlı hücreler; FITC-/PI-, erken apoptotik hücreler; FITC+/PI- ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler; FITC+/PI+ boyanırlar ve bu şekilde birbirlerinden ayırt edilirler (Güleş ve Eren 2008, Ulukaya ve ark. 2011).

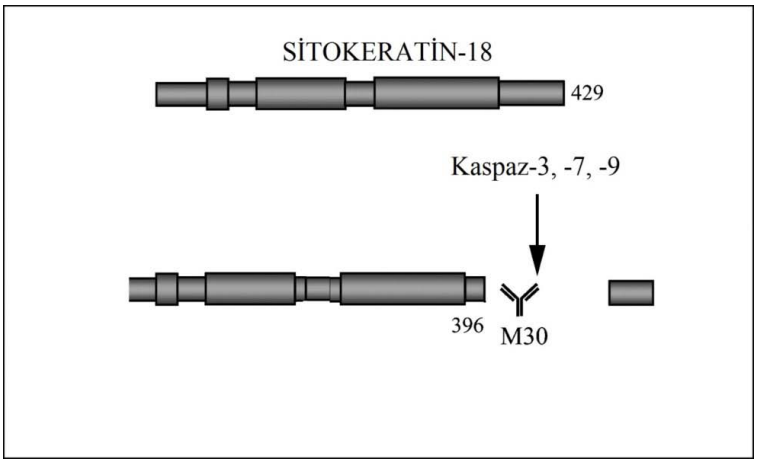


Şekil 2.2. Apoptotik hücrelerde fosfotidil serin translokasyonu (Van Engeland ve ark. 1998'den değiştirilerek alınmıştır).

Dinükleer Pd(II) kompleksi ile tedavi edilen hücrelerin apoptoz veya nekrozla ölüp ölmediklerinin ayrımı nukleus morfolojisine ve membran bütünlüğüne bakılarak yapıldı. MCF-7 VE MDA-MB-231 meme kanser hücreleri sayılarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 100 µl içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde (3 tekrarlı) ekim yapıldı. 24 saat 37ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübasyonu takiben her iki hücre soyu da dinükleer Pd(II) kompleksinin IC90 dozu ile muamele edilerek 12 ve 24 saat süreyle 37ºC, %5 CO2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürelerinin sonunda hücreleri zedelemeden üzerlerinden tüm besiyeri (yaklaşık 180 µl) uzaklaştırılarak Anneksin-V-FLUOS Staining Kit (Roche, Manheim, Germany) içeriğine uygun olarak çalışıldı. 500 µl Incubation Buffer içerisine 5 µl Anneksin-V-Fluorescein ve 5 µl PI boyası pipetlendi. Ayrıca hücrelerin nükleus morfolojisini de incelemek amacıyla Hoechst 33342 (200 µg/ml) boyası son konsantrasyonu 5 µg/ml (40X sulandırılarak) olacak şekilde bu karışıma eklendi. Her kuyuya boya karışımından 30 µl pipetlenerek yarım saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tedavilerin hücrelerde sebep olduğu ölüm şekli floresan mikroskop altında değerlendirildi.

2.2.6. M30-Antijen Testi ile Ölüm Modunun Belirlenmesi

Sitokeratinler (CK), kanser tanısında kullanılan intermediate filament protein ailesine ait proteinlerdir. Apoptozis esnasında sitoiskeletin önemli bir protein olan CK18 sadece apoptotik hücrelerde aktifleşen bir enzim grubu olan kaspazların etkisiyle kırılarak, kırılmış CK18'i (CK18-Asp396) oluşturmaktadır (Leers ve ark., 1999). M30 monoklonal antikor, özellikle CK18'in Asp396'da kırılan fragmanını (M30 antijen) tanıyarak CK'lerin apoptotik bir belirteç olarak kullanımını sağlamaktadır (Ueno ve ark., 2003). Böylece apoptoza özgü bir belirteç olan kırılmış CK18, ELISA yöntemiyle saptanmaktadır (Şekil 2.3). Bu özel CK18'i tanıyan M30 antikoru, hücrelerin bulunduğu ortamla temas ettirilirse ve eğer ortamda apoptotik hücreler de var ise, apoptozun varlığı gösterilmiş olur.



Şekil 2.3. Sitokeratin 18'in kaspazlar aracılığıyla kesimi ve bu bölgenin M30 antikoru ile tanınmasının şematik gösterimi (Micha ve ark., 2008)

ELISA metoduyla M30 Antijen fragmentini belirlemek için, MCF-7 hücreleri sayılarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 100 µl içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde (3 tekrarlı) ekim yapıldı. 24 saat 37ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübasyonu takiben dinükleer Pd(II) kompleksi IC90 dozları 100 µl içerisinde olacak şekilde muamele edilerek 48 saat süreyle 37ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tüm kuyulara 10µl %10'luk NP-40 (Sigma, St. Louis, MO) ilave edildi. 15 dakika oda sıcaklığında 600 rpm çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Tüm kuyulardaki supernatant toplandı ve 2000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilip M30 Apoptosense ELISA (M30-Apoptosense ELISA kit, Peviva, Bromma, Sweden) kit içeriğine uygun olarak çalışıldı. Supernatantlar, kitin içerisinde yer alan CK18'i tanıyan fare monoklonal M30 antikoru kaplı striplere 25 µl pipetlendi. Tüm örnekler üzerine 75 µl horseradish peroksidaz konjugatı eklendi. 4 saat boyunca 600 rpm çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda örneklere 250 µl yıkama solüsyonu ilave edilerek 5 kez yıkama yapıldı ve hemen ardından 200 µl TMB substratı ilave edilerek 20 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için 1N H_2SO_4 içeren 50 µl stop çözeltisi ilave edildi ve oluşan renk şiddeti, spektrofotometrik olarak 450 nm'de okundu.

2.2.7. Akım Sitometri Analizleri

Akım sitometresindeki analizler için hücrelerin sıvı içinde süspansiyon halinde bulunması gerekmektedir. Ölçüm sırasında hücreler sıvı içerisinde tek tek askıda olmalı ve hücreleri içeren süspansiyon sürekli bir akışla lazer ışını içinden geçmelidir. Akım sitometri cihazında bir saniyede binlerce hücre, lazer ışını ile

karşılaştıkları flow cell adı verilen bölümden geçer ve hücreler lazer ışığı ile uyarılırlar. Her bir hücre lazer ışığının bir kısmını saptırır ve aynı zamanda lazer ışığı tarafından uyarıldıklarından yani ekstra enerji yüklenmiş olduğundan, floresan ışığı yayarlar. Hücreler yüzeylerindeki veya hücre içindeki proteinlere özgün antikorlarla inkübe edilerek antijenlere bağlanmaları sağlanır. Her spesifik antikor FITC, PE, PerCP (Peridinin klorofil), 7-AAD (7-Aminoaktinomisin D**)** gibi floresan boyalarla işaretlenmiştir. Böylece belirli antijene sahip hücrelerin lazer ışını ile karşılaştığında verdiği floresan sinyalleri değerlendirerek o hücrenin hangi spesifik antijeni taşıdığı belirlenebilir (Karaboz ve ark. 2008).

2.2.7.1. Kazpaz 3/7 Testi

Kaspazlar, programlı hücre ölümü olan apoptoz sürecinde merkezi bir öneme sahip sistein proteazlardır (Riedl ve ark. 2004). Apoptotik sinyal boyunca etkili olan efektör kaspazlardan: kaspaz 3/7 aktivasyonu membran integritesi ve hücre ölümü hakkında önemli bilgiler vermektedir.

Kaspaz 3/7 testi için MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına MCF-7 1 ml içerisinde 100×10^3 hücre MDA-MB-231 1 ml içerisinde 100×10^3 olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübasyonu takiben üzerlerine dinükleer Pd(II) kompleksi 1 ml besiyeri içerisinde olacak şekilde IC90 dozları ile muamele edilerek 12 ve 24 saat süreyle süreyle uygulanarak, 37ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol kuyularından 1 ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1 ml taze besiyeri ilave edildi. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0.5 ml %0.05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37ºC'de, %5 CO_2'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda mikroskopla incelendiğinde yüzeyden ayrıldığı gözlenen hücreler, tripsinin inhibe olması için on katı besiyeri ile muamele edildi. Böylelikle tripsinin hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra hücre membranına zarar vermeye başlaması engellenmiş oldu. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve 1

ml'sinde 2×10^4- 5×10^5 hücre olacak şekilde hücre peleti sulandırıldı. Tedavi gruplarını içeren etiketli ependorflara hücre süspansiyonundan 50 µl eklendi. Daha sonra kaspaz 3/7 çalışma solüsyonundan her bir tedavi grubunu içeren ependorflara 5 µl konuldu. Kısa bir pipetaj işleminin ardından ependorflar kapakları açık bir şeklide 37ºC'de, %5 CO_2'li ortamda 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda ependorf içerisinde hücre süspansiyonlarına 150 µl DNA'ya bağlanabilen 7-AAD eklenerek kısa bir pipetaj gerçekleştirildi. Daha sonra oda sıcaklığından karanlık ortamda 5 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra Muse cihazında kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirildi.

2.2.7.2. Anneksin-V Testi

Anneksin-V, PS için yüksek afinite ile Ca^{2+} bağlayıcı bir proteindir ve FITC gibi floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücreleri görünür hale getirilebilmektedir. PS moleküllerinin Ca^{2+} iyonu varlığında Anneksin-V-FITC komplesi ile bağlanması sonucu apoptotik hücre ölüm yüzdesi belirlenmektedir. Bu yöntemde ayrıca 7-Aminoaktinomisin D (7-AAD) boyası da kullanılmaktadır. Bu boya DNA için güçlü afiniteye sahip floresans özellikte bir kimyasal bileşiktir. İntakt (sağlam) hücre zarından kolayca geçemez, bu nedenle zar bütünlüğü bozulmuş hücrelerde (geç apoptotik; nekrotik) çift zincirli DNA'nın GC bakımından zengin bölgelerine bağlanmaktadır.

Boyaların hangi aşamadaki hücrelerle nasıl yanıt verdiği aşağıda özetlenmiştir;

Non-apoptotik hücreler: Anneksin V (-) ve 7- AAD (-)

Erken apoptotik hücreler: Anneksin V (+) ve 7- AAD (-)

Geç apoptotik hücreler ve ölü hücreler: Anneksin V (+) ve 7- AAD (+)

Çok fazla nükleer debris: Anneksin V (-) ve 7- AAD (+)

Muse Annexin V & Dead Cell Kiti, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerinde denendi. 100×10^3/1 ml MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına ekim yapıldı. 24 saat boyunca 37ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübe edildi. Devamında, hücreler dinükleer Pd(II) kompleksinin IC90 dozları ile 1 ml besiyeri içerisinde muamele edilerek 12 ve 24 saat süreyle 37ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol kuyularından 1 ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1 ml taze besiyeri ilave edildi. Tedavi süreleri sonunda kit bileşenleri oda sıcaklığına getirildi. İnkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15 ml'lik falkon tüplere toplandı ve negatif kontrol kuyularının süpernatantı

uzaklaştırıldı. Hücreler tripsin ile kaldırıldı ve ilgili falkon tüplere toplandı ve 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar uzaklaştırıldı ve 100 µl %1 FBS içeren besiyeri pelet üzerine eklendi ve pelet süspanse edildi. Etiketli ependorflara 100µl hücre süspansiyonu alındı. Bu ependorflara 100µl Muse™ Annexin V & Dead Cell solüsyonu eklendi. Orta hızda yaklaşık 5 saniye vorteks yapıldı. Karanlık ortamda 20 dk oda ısısında inkübasyon sonunda Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı.

2.2.7.3. Mitokondri Membran Potansiyeli Testi

Mitokondride meydana gelecek değişiklikler, hücre sağlığı ve stresi hakkında bilgi veren önemli belirteçlerdendir Mitokondri apoptoz sürecinde önemli bir role sahip olan regülatörlerden biridir. Apoptotik yolların kesiştiği bir kavşak noktası olan mitokondri aktivasyonu (sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması) apoptotik süreçte geri dönüşümsüz noktayı gösterir (Finkel 2001). Bu yüzden apoptotik uyarıyı takiben, hücrelerde mitokondriyal bütünlüğün kaybı gözlemlenmektedir.

Mitokondri membran potansiyeli testi için MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri başlangıç hücre sayısı 1 ml içerisinde 100×10^3 olacak şekilde ayarlanarak, 6 kuyulu hücre kültür kaplarına ekim yapıldı. 24 saat 37ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübasyonu takiben hücreler dinükleer Pd(II) kompleksinin IC90 dozları ile 1 ml besiyeri içerisinde muamele edilerek 12 ve 24 saat süreyle 37ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı.. Negatif kontrol kuyularından 1ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1ml taze besiyeri ilave edildi. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0,5 ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37ºC'de, %5 CO_2'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15 ml'lik falkon tüplere toplandı 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantları uzaklaştırıldı ve %1 FBS içeren besiyeri ile hücre peletleri süspanse edildi. Ardından 95 µl çalışma solüsyonu eklendi pipetleme ile kısa süre karıştırıldıktan sonra hücreler 20 dk 37ºC'de, %5 CO_2'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücrelere 5 µl 7-AAD

boyası eklenerek orta hızda yaklaşık 5 saniye vorteks yapıldı. Örnekler 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı.

2.2.7.4. Gamma H2A.X Aktivasyonu ile DNA Hasarının Belirlenmesi

DNA molekülü sürekli olarak genotoksik strese yol açan çeşitli faktörlerin etkisi altındadır. Endojen ve ekzojen kökenli pek çok fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktör DNA zincir kırıklarının oluşumuna neden olan şeker-fosfat omurgasında kırılmalara yol açar. Özellikle DNA çift zincir kırıkları, hücrenin yaşamı boyunca sürekli olarak ortaya çıkabilen en tehlikeli lezyon türleridir ve bunların etkili bir şekilde onarılması hücrenin sağlıklı bir şekilde fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için son derece önemlidir. Çünkü tamir edilemeyen bu hasar; genomik kararsızlık, kanser gelişimi ve neoplastik transformasyona yol açan mutasyonların oluşumuna neden olabilmektedir (Kuo ve Yang 2008, Podhorecka ve ark. 2010).

DNA tamirinin gerçekleştiği kromatinlerin yapısal ve işlevsel birimleri nükleozomlardır. Her nükleozom 147 baz çiftinden oluşan DNA zinciri ve bu zincirin etrafında sarıldığı dört çekirdek histonundan her birinin iki kopyasından oluşur. Nükleozom yapısını meydana getiren dört çekirdek histon ailesi H2A, H2B, H3 ve H4'tür. H2A histon protein ailesinin de H2A1, H2A2, H2AX ve H2AZ gibi varyantları vardır. Önemli bir H2A tipi olan H2AX proteini, hücre ve doku tipine bağlı olarak memeli H2A histon havuzunun %2-25'lik bir bölümünü oluşturur. Ayrıca karboksil kuyruk kısmında son derece korunmuş özel bir diziye sahip olduğu için H2AX proteini, ökaryotlarda önemli ölçüde korunmuş olan bir H2A histon tipidir. Diğer H2A histon ailesi üyeleri gibi, H2AX de fosforilasyon, asetilasyon ve ubikitinasyona uğrayarak pek çok hücresel olayın düzenlenmesini sağlar. Hasarlı bölgelerde görev alan bu histon tipi, DNA hasar tamiri sürecinde anahtar bir rol oynadığı için, hücre bölünmesi ve büyümesi, immüno-reseptörlerin düzenlenmesi gibi pek çok hücresel olay, genomik kararsızlık ve DNA hasar tamiri ile ilgili sendromlarla yakından ilişkilidir (Kinner ve ark. 2008, Rakiman ve ark. 2008). H2AX, DNA hasarına yanıt yollarda görev alan ilk proteinlerden birisidir. Fosforile olmuş H2AX, gammaH2AX (γH2AX) adını alır ve DNA çift zincir kırıkları oluştuğunda görülebilir nükleer odaklar oluşturur. Bu nedenle γH2AX'nin ekspresyonu DNA çift zincir kırıklarının tespitinde hassas bir indikatör olarak son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır. DNA tamiri gerçekleştikten sonra γ-H2AX, protein fosfataz 2A tarafından defosforile edilir ve böylece hücredeki γ-H2AX seviyesi

düzenlenir. Bu nedenle γ-H2AX 'in de fosforilasyonu DNA tamir çalışmaları için de çok uygun bir parametre oluşturur.

γ-H2AX 'in fosforilasyonu belirlemek amacıyla Muse™ H2A.X Activation Dual Detection Kit kullanıldı. Bu amaçla öncelikle, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına MCF-7 1 ml içerisinde 100×10^3 hücre MDA-MB-231 1 ml içerisinde 100×10^3 olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübasyonu takiben, üzerlerine dinükleer Pd(II) kompleksi 1 ml besiyeri içerisinde IC90 dozları ile muamele edilerek 12 ve 24 saat, 37ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol kuyularından 1 ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1 ml taze besiyeri ilave edildi. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0,5 ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37ºC'de, %5 CO_2'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler 300 g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda örnekler 1X PBS ile yıkandı. Fiksasyon aşaması için kit içeriğindeki fiksatif kullanılarak örnekler buz üzerinde 5 dk fikse edildi. Daha sonra örnekler 300 g'de 5 dk santrifüj edildi ve supernatantlar atılarak hücreler permeabilizasyon için kit içerisindeki permeabilizasyon solüsyonu ile 5 dk buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler 300 g'de 5 dk santrifüj edildi ve daha sonra supernatant kısmı atılarak kit içerisindeki antikorlar ile hazırlanan çalışma solüsyonu ile 30 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler 300 g'de 5 dk santrifüj edildi ve çalışma solüsyonu ile sulandırılarak DNA hasarının belirlenmesi üzerine Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapılarak değerlendirildi.

2.2.7.5. Oksidatif Stres Belirlenmesi

ROS (Reaktif oksijen türleri) normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2\bullet^-$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH•)'dir. ROS, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar. Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik

reaksiyonlarda enzimlerin aktif yerinde ara ürünler olarak devamlı serbest radikaller oluşabilir. ROS oluşumu enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı (pO_2), ozon (O_3) ve azot dioksit (NO_2•), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar ve hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Kanser, alzheimer, sepsis, diyabet ve kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi çeşitli patofizyolojik hastalıklarda önemli rol oynamaktadır (Dumont ve Beal 2011, Pelicano 2014).

Kullanılan Muse® Oksidatif Stres kiti de hücre içi süperoksit radikallerini saptayarak hücrelerde görülen oksidatif stres yüzdesi hakkında bilgi vermektedir. Kit içeriğindeki oksidatif stress solusyonuda hücrelerdeki ROS seviyesini saptamaktadır.

Oksidatif stres testi için, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına MCF-7 1 ml içerisinde 100×10^3 hücre, MDA-MB-231 1 ml içerisinde 100×10^3 olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübasyonu takiben üzerlerine dinükleer Pd(II) kompleksi 1 ml besiyeri içerisinde IC90 dozları ile muamele edilerek 12 ve 24 saat süreyle, 37ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol kuyularından 1ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1 ml taze besiyeri ilave edildi.

Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0,5 ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37ºC'de, %5 CO_2'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15 ml'lik falkon tüplere toplandı ve 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücre pelleti ml'sinde 1×10^6-1×10^7 hücre olacak şekilde kit içeriğindeki oksidatif stres çalışma solüsyonu ile muamele edilerek kısa pipetleme ile karıştırıldı ve 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda örneklerin ölçümü Muse™ Cell Analyzer cihazı ile gerçekleştirildi.

2.2.7.6. Bcl-2 aktivasyonunun belirlenmesi

Bcl-2 ailesinin üyeleri anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler olmak üzere iki alt gruptan oluşmaktadır. Anti-apoptotik Bcl-2 proteini, mitokondriyal membran geçirgenliğini kontrol eden proteinleri düzenleyerek sitokrom c salınımının

önlenmesinden sorumludur ve Bcl-2'nin anti-apoptotik fonksiyonu fosforilasyon düzeyinde düzenlenmekte olup özellikle Ser70 fosforilasyonunun apoptoz ve otofaji süreçlerinde önemli role sahip olduğu bilinmektedir (Murphy ve ark. 2000, Wei ve ark. 2008). Bu yöntemin prensibi, Bcl-2'nin total (anti-Bcl-2-PECy5) ve fosforlanmış (anti-phospho-Bcl-2 (Ser70)-Alexa Fluor®555) düzeylerini belirleyen iki farklı antikor kullanımı ile total Bcl-2 ifadesine göre Bcl-2 fosforilasyonunun ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bcl-2 aktivasyonunun belirlenmesi için, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına MCF-7 1 ml içerisinde 100×10^3 hücre, MDA-MB-231 1 ml içerisinde 100×10^3 olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübasyonu takiben, üzerlerine dinükleer Pd(II) kompleksi 1 ml besiyeri içerisinde IC90 dozları ile muamele edilerek 12 ve 24 saat süreyle, 37ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol kuyularından 1ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1ml taze besiyeri ilave edildi. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0,5ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37ºC'de, %5 CO_2'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler 300 g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda örnekler 1X PBS ile yıkandı. Fiksasyon aşaması için kit içeriğindeki fiksatif kullanılarak örnekler buz üzerinde 5 dk fikse edildi. Daha sonra örnekler 300 g'de 5 dk santrifüj edildi ve supernatantlar atılarak hücreler permeabilizasyon için kit içerisindeki permeabilizasyon solüsyonu ile 5 dk buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler 300 g'de 5 dk santrifüj edildi ve daha sonra supernatant kısmı atılarak kit içerisindeki antikorlar ile hazırlanan çalışma solüsyonu ile 30 dk karanlıkda oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler 300 g'de 5 dk santrifüj edildi ve çalışma solüsyonu ile sulandırılarak Bcl-2 aktivasyonunun belirlenmesi üzerine Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapılarak değerlendirildi.

2.2.7.7. Hücre Döngüsü Analizi

Hücre döngüsü analizi, "Muse® Cell Cycle Assay Kit" kullanılarak yapıldı. Hücre döngüsü analizi için, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre

kültür kaplarına MCF-7 1 ml içerisinde 100×10^3 hücre, MDA-MB-231 1 ml içerisinde 100×10^3 olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübasyonu takiben, üzerlerine üzerlerine dinükleer Pd(II) kompleksi 1 ml besiyeri içerisinde IC90 dozları ile muamele edilerek 12 ve 24 saat süreyle, 37ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol kuyularından 1ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1 ml taze besiyeri ilave edildi. Tedavi süreleri sonunda, hücreler üzerindeki besiyeri 15 ml santrifüj tüplere toplandı. Ardından, hücreler soğuk 1X PBS ile yıkandı ve tekrar aynı tüplere toplandı. Hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla, kuyu başına 0,5 ml %0,05 Tripsin-EDTA ilave edildi ve hücreler 37ºC'de, %5 CO_2'li ortamda 5 dakika inkübe edildi. Süre sonunda, mikroskopla pleyt yüzeyinden kalktığı doğrulanan hücreler üzerine 5 ml besiyeri ilave edilerek aynı 15 ml'lik santrifüj tüplere toplandı ve 4ºC'de 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant aspire edildi ve pellet üzerine 500 µl %70'lik etanol (PBS ile hazırlanan) eklenerek, içerik 1,5 ml'lik santrifüj tüplere aktarıldı, 5 saniye vorteks yapıldı ve -20ºC'de 3 saat boyunca fikse edildi. Fiksasyon sonunda, hücre süspansiyonu 4ºC'de 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, süpernatant aspire edildi. Etanolü uzaklaştırmak amacıyla, hücreler üzerine 500 µl 1X PBS eklendi ve 5 saniye vorteks sonrası tekrar 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, süpernatant aspire edildi ve 1 µl'de 300 hücre olacak şekilde hücreler üzerine "Cell Cycle Reagent" pipetlendi, 5 saniye vorteks yapıldı ve hücreler oda sıcaklığında, karanlıkta 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, hücrelerin döngü fazlarındaki dağılımları, 5000 event ile Muse® cihazında değerlendirildi.

2.2.8. Koloni Oluşturma Yeteneği Testi

MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kuyu başına 1×10^3 hücre olacak şekilde ekildi. Ardından dinükleer Pd (II) kompleksinin IC 50 dozlarında uygulamaları yapıldı ve hücreler 14 gün inkübe edildi. Süre sonunda koloniler kristal viole ile boyanarak ve fotoğraflandıktan sonra değerlendirildi.

2.2.9. Yara İyileşmesi Testi

Meme kanseri hücre hatlarının yatay göç etme yeteneğinin tedavi ile değişimi, yara iyileşmesi deneyi ile değerlendirildi. Hücrelerin, 6 kuyucuklu kültür kaplarının içine %90 konfluensi sağlanacak şekilde ekim yapıldıktan sonra yara çizgileri, her bir

kuyunun ortasında bir plastik pipet ucu (1 mm) uygulayarak oluşturuldu. Hücre artıklarının temizlenmesi ve yüzen hücrelerin uzaklaştırılması için kuyucuklar üç kez 1XPBS ile yıkandı ve sonrasında, 24 saat süreyle dinükleer Pd(II) kompleksi ile tedavisi gerçekleştirildi. Yara yüzeyine hücre göçü görüntüleri, belirtilen zaman noktalarında invert mikroskop altında incelenerek, görüntülendi.

2.2.10. Matrijel Hücre İnvazyon Testi

Hücre invazyonunu test etmek amacıyla kullanılacak insertler, 200 µl matrijel, 3 ml serum içermeyen besiyeri ile homojen şekilde karıştırıldı. 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına yerleştirilen insertler, hazırlanan matrijel karışımıyla kuyu başına 100 µl olacak şekilde kaplanarak matrijellerin donması sağlandı. Dinükleer Pd(II) kompleksi ile tedavi edilen meme kanseri hücre hatları tripsin ile yüzeyden toplandıktan sonra, matrijel kaplanmış insertlerin içine kuyu başına yaklaşık 5×10^4-8×10^4 olacak şekilde serumsuz besiyeri içinde ekilerek insertlerin dışına kemoatraktan özellikli ortam sağlamak amacıyla, %10 FBS içeren besiyeri eklendi ve hücreler 24 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda hücreler Hema 3 boyama kiti kullanılarak boyama işlemi gerçekleştirildi. Boyama protokolü basamakları aşağıda belirtildiği gibidir:

• İnsertlerin dışarısına ve içerisine kuyuyu tamamen kaplayacak şekilde fiksatif eklenerek, oda ısısında 20 dakika inkübe edildi. Sonra kuyulardan uzaklaştırılıp solüsyon-1 eklendi.

• Solüsyon-1 kuyu ve insertlerden uzaklaştırılarak ve solüsyon-2 eklendi. 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.

• Kuyu ve insertlerden solüsyon-2 uzaklaştırıldı. İnsertler, distile su içerisinde fazla boyalardan uzaklaştırılmasının ardından oda ısısında kurutuldu.

• Bir sonraki gün arka plandaki fazla boyamaları temizlemek amacıyla, pamuklu çubuk ıslatılarak insertlerin iç kısımlarındaki fazla boyalar dikkatlice temizlendi ve bistüri yardımıyla insertlerin taban kısmı kesilerek, membranlar lam üzerine aktarılıp ve permount kapatma solüsyonu damlatılarak üzerlerine lamel kapatıldı. Her bir insert için rastgele 5 alan mikroskop ile (Nikon Eclipse Ts2) fotoğraflanarak değerlendirildi.

2.2.11. Western Blot Analizi

Hücrelerden elde edilen bir protein karışımında hedef proteinin varlığını tespit etmek ve moleküler ağırlığını belirlemek amacıyla kullanılan özel yöntemdir.

İmmünoblotlama olarak da adlandırılan bu tekniğin uygulanabilmesi için öncelikle hedef proteini tanıyarak ona bağlanabilen bir antikor mevcut olmalıdır. Western blotlama temel olarak dört aşamada gerçekleştirilir:

i. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemiyle örnek karışımda bulunan proteinlerin jel üzerinde birbirlerinden ayrılmaları sağlanır.

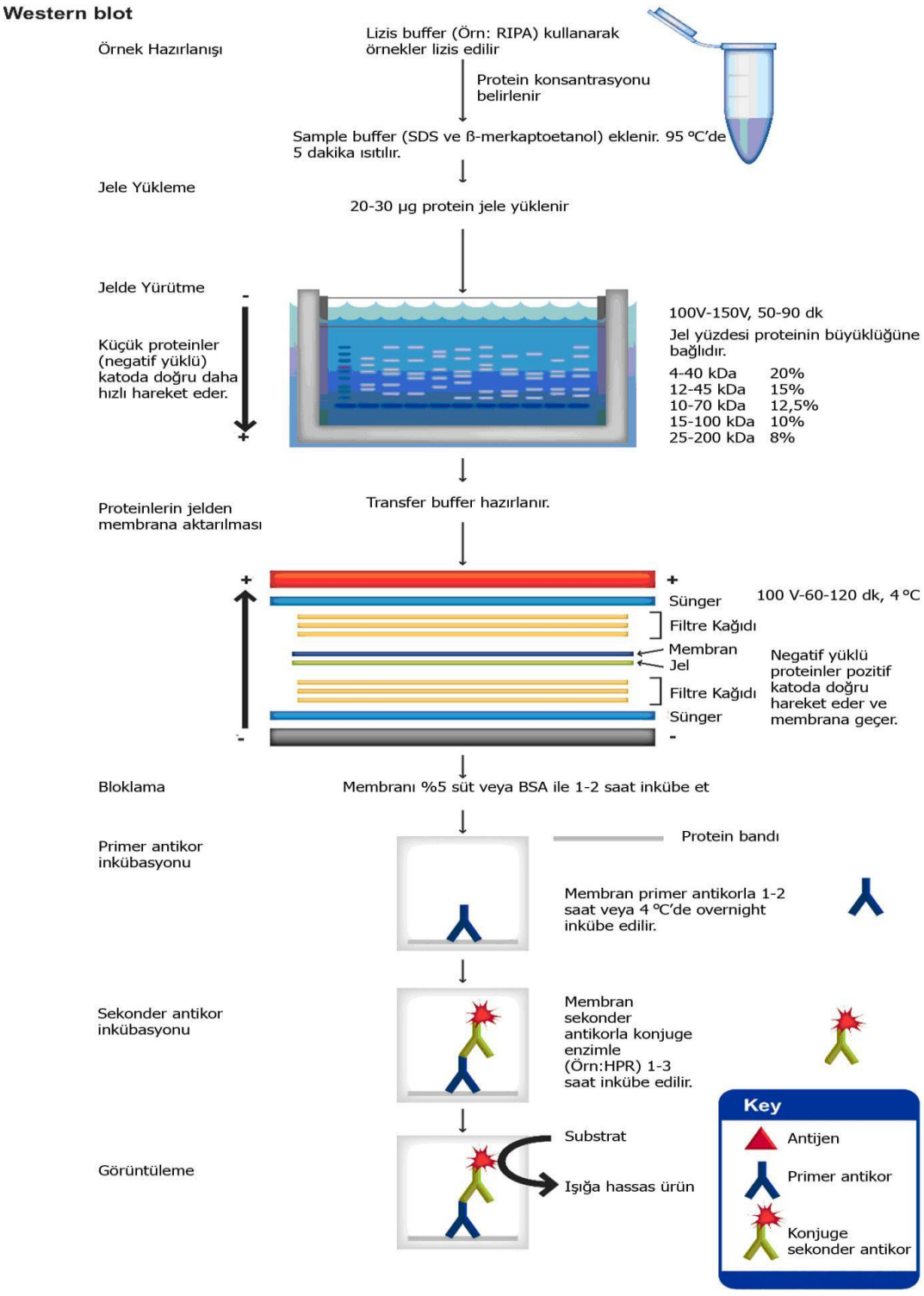
ii. Jelde büyüklüklerine göre ayrılarak bantlar oluşturan protein molekülleri, elektrotransfer tekniği ile nitroselüloz membrana aktarılırlar.

iii. Membrana sırasıyla, hedef proteine özgü antikor, bu antikoru tanıyan ve yapısına enzim ilave edilmiş ikincil bir antikor ile muamele uygulanır.

iv. Son olarak söz konusu enzimin substratı ile muamelesi sonucunda meydana gelen ışık aracılığı ile hedef proteinin membran üzerinde görüntülenmesi sağlanır (Şekil 2.4).

Proteinlerin saflığının kontrolü ve moleküler ağırlıklarının saptanması amacıyla kullanılan SDS-PAGE yöntemi Western blot analizinin ilk aşamasını oluşturur. Western blot yönteminde toplayıcı jel ve ayırıcı jel olmak üzere iki farklı jel kullanılır. Toplayıcı jel hafif asidik (pH:6,8) olup düşük akrilamid konsantrasyona sahiptir ve bu sayede gözenekli jel oluşur. Ayırıcı jel baziktir (pH:8,8) ve yüksek poliakrilamid içeriği ile jel gözenekleri daha dardır. Proteinler bu sayede büyüklüklerine göre ayrılır ve büyük proteinlere kıyasla küçük proteinler daha kolay ve hızlı ilerler.

SDS-PAGE yöntemi ile ayrılmak istenilen proteinlerin sadece büyüklüklerine göre ayrımını sağlamak için önce ısı ile denatüre edilmeleri ve sonra Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ile muamele edilmeleri gereklidir. Anyonik bir deterjan olan SDS, proteinlere bağlanıp negatif yüklü hale getirerek lineer forma dönüşmelerini sağlar. SDS sayesinde negatif yük ile yüklenen proteinler elektroforez sırasında anoda göç ederler. Elektroforez işlemi tamamlandığında farklı büyüklükteki proteinler jel boyunca ilerlerken ayrışarak farklı protein bantları halinde odaklanırlar. SDS-PAGE işleminden sonra jeldeki protein bantlarının görüntülenmesi için kemiluminesans prensibinden yararlanılır (Coşkun-Arı 2003, Mahmood ve Yang 2012).



Şekil 2.4. Western Blot Aşamalarının Şematik Gösterimi (Anonim 2010).

Protein örneklerinin hazırlanması için MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri 1 ml'de $2{,}5\times10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekim yapıldı. 24 saat 37ºC', %5 CO_2'li ortamda inkübasyonu takiben üzerlerine dinükleer Pd(II) kompleksi 1 ml besiyeri içerisinde IC 90 dozları ile muamele edilip 12 ve 24 saat süreyle, 37ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı.. Negatif kontrol kuyularından 1ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1 ml taze besiyeri ilave edildi. İnkübasyon süresinin sonunda bir sonraki aşama olan protein izolasyonuna geçildi.

2.2.11.1. Protein Örneklerinin Hazırlanışı

2.2.11.1.1. Çözeltiler

Lizis tamponu: 3 ml lizis tamponu (RIPA lysis buffer, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) için 30 µl 200 mM PMSF (Santa Cruz, CA, USA), 30 µl 100 mM sodyum ortovanadat (Santa Cruz, CA, USA), 45 µl proteaz inhibitör kokteyl (Santa Cruz, CA, USA) eklendi. Solüsyon karanlıkta hazırlandı.

Bu aşamada, ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, buz üzerinde tutulan falkon tüplere toplandı ve negatif kontrol kuyusunun süpernatantı uzaklaştırıldı. Kuyulara 1 ml soğuk PBS ilave edilip hücreler "scraper" (Corning) ile kaldırıldı ve ilgili falkon tüplere aktarıldı. Süspansiyon 4°C'de 1000 g'de 5 dakika santrifüj (Hettich Zentrifugen, Almanya) edildi. Santrifüj sonrası tüplerden süpernatantlar uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 0,05 ml lizis tamponu pipetlendi. Örnkler, karanlıkta 45 dakika buz üzerinde bekletildi ve bu esnada 10 dakikada bir sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. Süre bitiminde solüsyonlar 1.5 ml'lik tüplere aktarıldı ve 4°C'de 13.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Süpernatantları 0.5ml'lik tüplere toplandı ve protein miktarları ölçüldü.

2.2.11.2. Proteinlerin Biçinkoninik asit (BCA) Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

2.2.11.2.1. Çözeltiler

Bicinchoninic Acid Kit (Sigma, St. Louis, MO)

Bovine Serum Albumin (BSA, Amresco, Solon, OH, USA) Standardı

2.2.11.2.2. BSA Standartlarının Hazırlanması

BCA ile protein miktarlarını ölçebilmek için sığır serum albumin (BSA) proteininin değişik konsantrasyonları ultra saf dH_2O ile hazırlanarak bir standart eğri grafiği çizildi. 1 ml'sinde 1, 0.8, 0.6, 0.4 ve 0.2 mg BSA bulunan standartlar hazırlandı.

2.2.11.2.3. BCA Ölçümünün Yapılması

BCA protein tayin yönteminde bakır sülfat, BCA solüsyonuna eklendiğinde oluşan kompleks elma yeşili bir renk alır. Bu solüsyon, protein solüsyonuna ilave edildiğinde, proteinin peptit bağları ile etkileşir ve Cu^{++} iyonları Cu^{+} iyonlarına dönüşür. Neticesinde kompleksin rengini mora çevirir. Bu yöntem hızlı, hassas ve kesindir ancak deterjan ve organik solventlerle etkileşimlerine dikkat etmek gerekmektedir.

Ölçüm için Biçinkoninik Asit Kit ve 96 kuyuluk plate kullanıldı. Her bir kuyuya 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 µl standart ve 10 µl konsantrasyonu bilinmeyen örnekler pipetlendi. Konsantrasyonu bilinmeyen örnekler 10 kere ultrasaf dH_2O ile seyreltilerek ölçüm yapıldı, bu nedenle 10 µl örnekler 90 µl, standartlar ise 100 µl'ye tamamlanacak şekilde ultrasaf dH_2O ile tamamlandı ve bu seyreltme katsayısı, hesaplamalarda dikkate alındı. Kuyuların üzerine 200 µl çalışma ayıracı pipetlendi ve plate 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda oluşan renk şiddeti, spektrofotometde 570 nm'de okundu.

2.2.11.3. Western Blot Yöntemi ile Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarılması

2.2.11.3.1. Çözeltiler

MES SDS Running Buffer (Nu-PAGE, 20X, İnvitrogen, CA, USA): 30ml Running buffer, 570ml ultra saf H2O ile tamamlandı.

Nu-PAGE LDS Sample Buffer (4X, İnvitrogen, CA, USA)

Nu-PAGE Sample Reducing Agent (10X, İnvitrogen, CA, USA)

Nu-PAGE Antioksidant (İnvitrogen, CA, USA)

Kaleidoscope Prestained Standarts (Biorad, CA, USA)

%4-12 gradient, NuPAGE Bis-Tris Mini Gels, 1mm, 12 kuyucuk (İnvitrogen, CA, USA)

10X pH:7,6 TBS-T (Tris-Buffer Saline-Tween20): Tris base 24,23 g (Scharlau, Barcelona, Spain) NaCl (Merck, Darmstadt, Germany)

80,06 g ve 5 ml Tween20 (Dako, CA, USA) 1L ultra saf H_2O ile çözüldü.

Chemiluminescent Detection Kit, Mouse (Amersham, Buckinghamshire, UK)

Phototope®-HRP Western Blot Detection System (Cell signalling, MA, USA)

2.2.11.3.2. Proteinlerin Yüklenmesi ve Jelde Yürütülmesi

Örnekler istenen hacimlerde toplam protein miktarı 20 µg (BCA yöntemiyle belirlenen) ve "sample buffer" ve "reducing agent" 1X olacak şekilde 0.5 ml'lik tüplere pipetlendi. Ardından tüpler 95ºC'de 5 dk bekletildi. Bu esnada jel, elektroforez tankına yerleştirildikten sonra SDS running buffer, doluluk sınırına kadar eklendi. Hazır jelde bulunan koruma sıvısı uzaklaştırıldıktan sonra 500 µl antioksidan eklendi. Marker (5 µl) ve örnekler kuyulara pipet yardımıyla belirlenen miktarlarda yüklendi. Yükleme işlemi sonunda 90 dakika boyunca100V elektrik uygulanarak protein örnekleri jel içerisinde elektrik akımk yönünde yürütüldü.

2.2.11.3.3. Proteinlerin Transferi

Transfer işlemi için I-Blot jel transfer cihazına sırasıyla anot bakır (+), jel, filtre kâğıdı (ultra saf H_2O ile ıslatılır), katot bakır (-) ve sünger yerleştirildi. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda 8 dakika transfer işlemi gerçekleştirildi.

2.2.11.4. Proteinlerinin Belirlenmesi

2.2.11.4.1. Bloklama

Uygun protein için, TBS-T içerisinde %5'lik süt çözeltisi hazırlandı ve 60 dakika oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

2.2.11.4.2. Birincil Antikor

Uygun birincil antikor 1:1000 olacak şekilde %5'lik BSA veya %5'lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı ve 18 saat 4ºC'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

2.2.11.4.3. İkincil Antikor

İkincil antikor için, uygun Anti-Rabbit veya Anti-Mouse 1:2000 olacak şekilde %5'lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı ve çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

2.2.11.4.4. Görüntüleme

Görüntüleme için; Lumiglo reagent A (20X, Cell Signaling, MA, USA) ve Peroksidaz reagent B (20X, Cell Signaling, MA, USA) iki kat seyreltilerek kullanıldı. Membranlar hazırlanan solüsyon ile 1 dakika inkube edildikten sonra açığa çıkan kemiluminesans sinyal, ImageQuant LAS 500 chemiluminescence CCD camera cihazı kullanılarak görüntülendi. Bu şekilde nitroselüloz membran üzerine transfer edilmiş olan proteinlere bağlanan antikorlar görüntülendi.

2.2.11.4.5. Birincil ve İkincil Antikorların Membrandan Uzaklaştırılması

Birincil ve ikincil antikorları membrandan uzaklaştırmak (Stripping) için üretici firmanın (Cell Signaling, MA, USA) Western blot yeniden işaretleme (reprobing) protokolü kullanıldı. Stripping solüsyonu hazırlamak için; 100 ml ultrasaf su içerisine 0,76 g Tris-base (Scharlau, Barcelona, Spain), 2 g SDS (Applichem, Darmstadt, Germany) ve 700 µl ß-merkaptoetanol (Merck, Schuchard, Germany) eklendi (1X, pH:6,8). Membran 4 kez 5 dakika TBS-T ile yıkandıktan sonra stripping solüsyonu eklenerek 150-300 rpm, 37ºC'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 2 kez 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı ve membranda sinyal olup olmadığını kontrol etmek amacıyla görüntüleme yapıldı. Görüntüleme sonunda membranlarda sinyal yoksa 4 kez 5 dakika TBS-T ile yıkama yapılarak bloklama aşamasına geçildi.

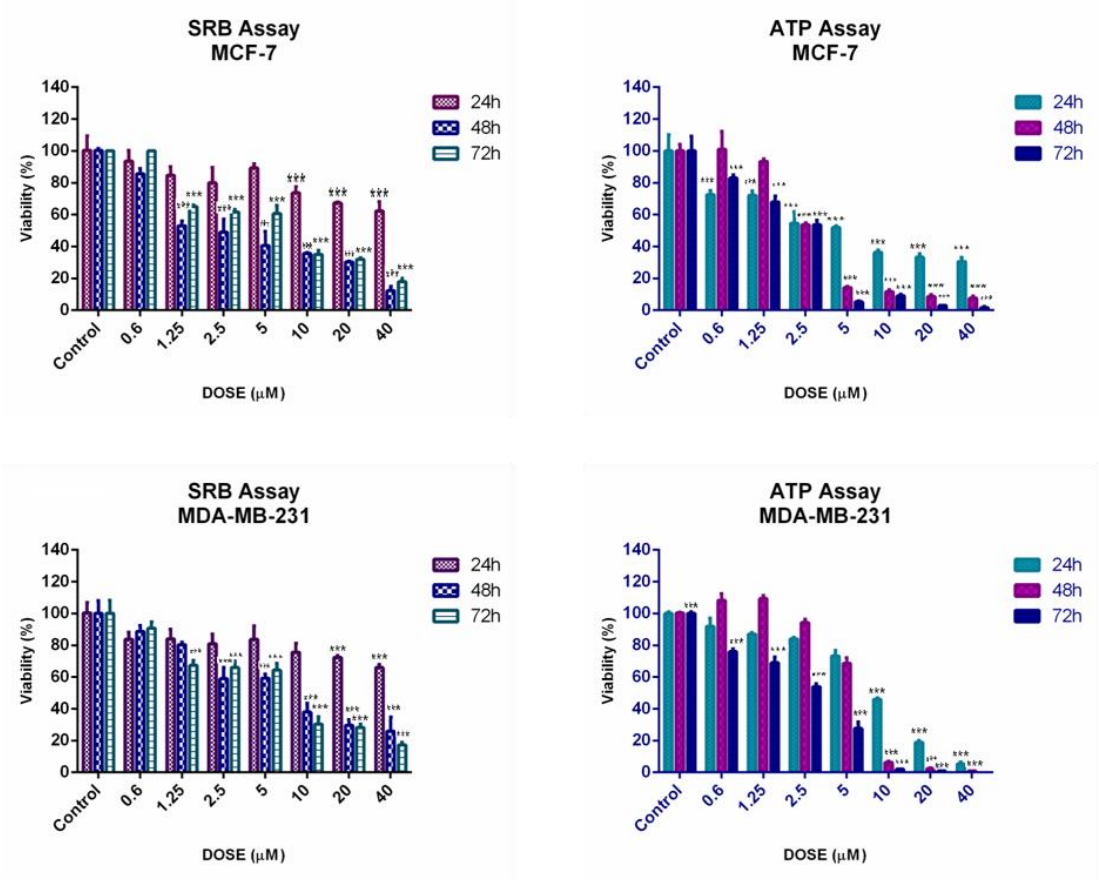
2.2.12. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Graph Pad programı aracılığı ANOVA testi ile değerlendirildi. 3 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ değerine göre belirlendi.

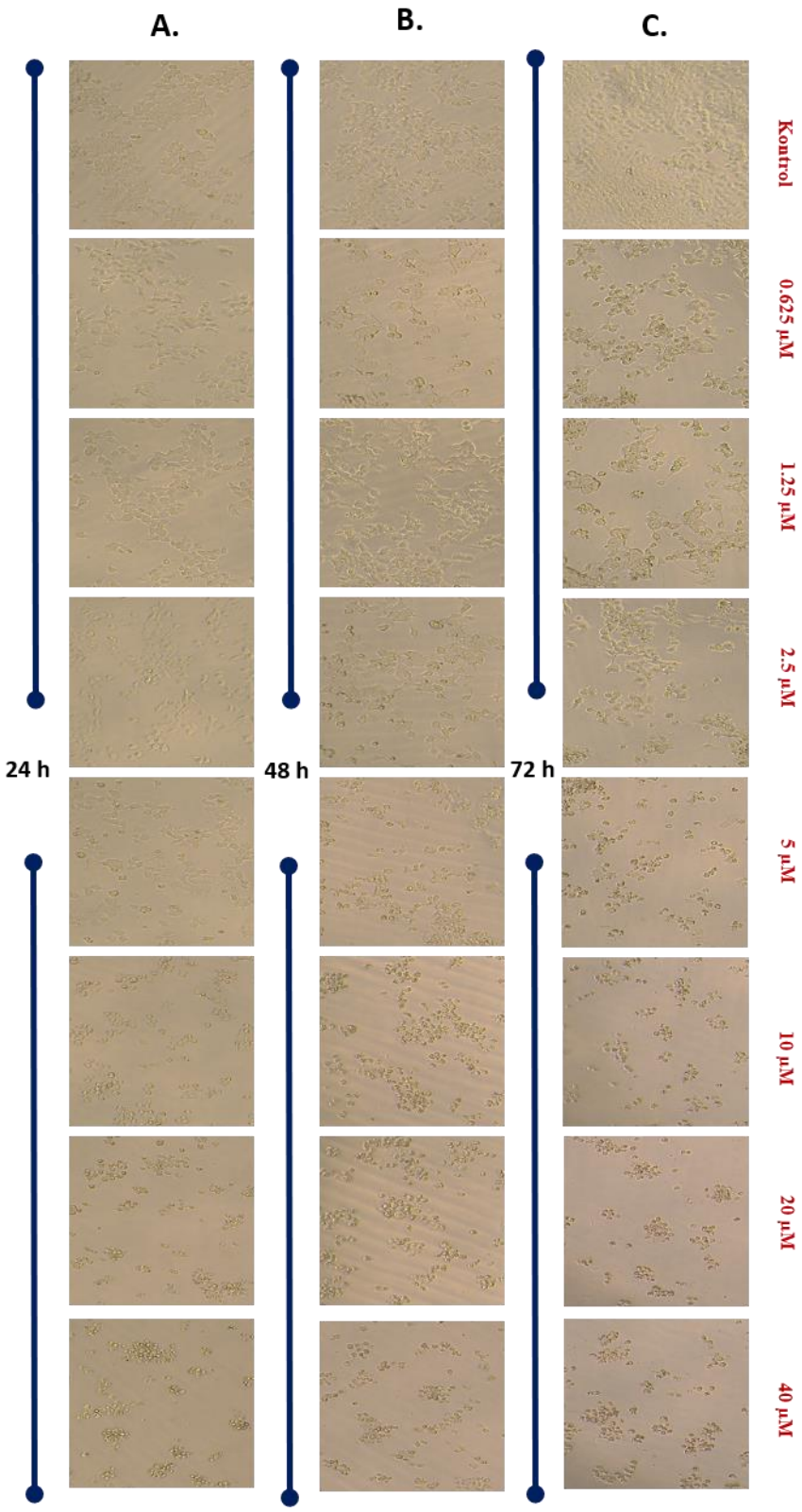
3.BULGULAR

3.1. SRB VE ATP CANLILIK TESTİ BULGULARI

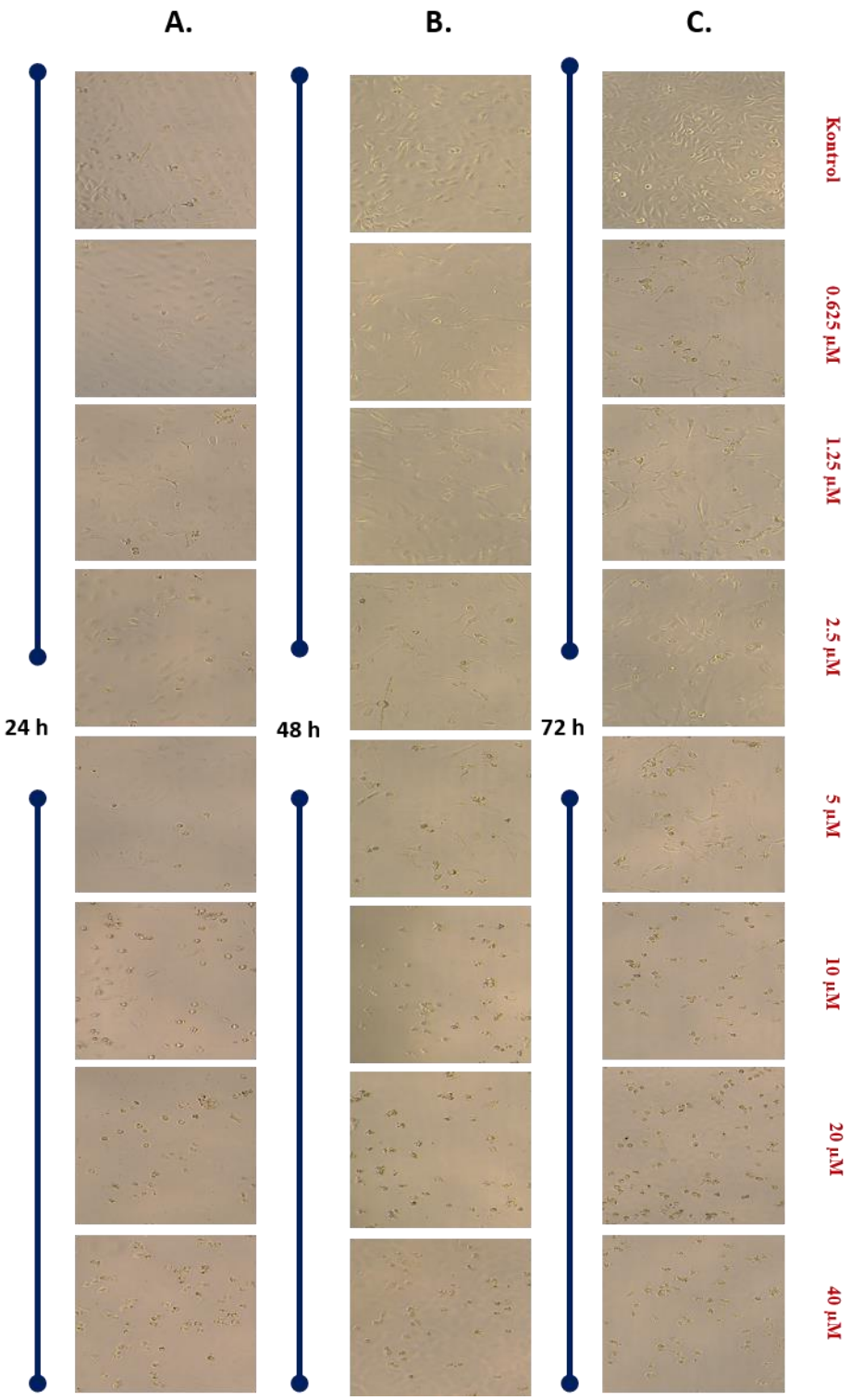
Dinükleer Pd (II) kompleksinin yedi farklı konsantrasyonunun MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10F hücre soylarının canlılığı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için SRB ve ATP canlılık testleri yapıldı. Hücre soylarına 24, 48 ve 72 saat sürelerinde dinükleer Pd (II) kompleksi ile muamele edilerek ortaya çıkan sonuçlar Şekil 3.1'de gösterildi. Bileşiğin uygulandığı hücre soylarında konsantrasyon arttıkça hücrelerin canlılık yüzdesinde, uygulanan konsantrasyonlarda hem istatistiksel olarak hem de faz fotoğrafları ile uyumlu bir şekilde anlamlı azalmalar gözlendi (Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3).



Şekil 3.1. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafikleri. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun XXX ortalamasını temsil etmektedir.*Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: p<0,05 **:p<0,01 ***:p<0,001) ifade etmektedir.



Şekil 3.2. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle muamele edilen MCF-7 hücre soyunda faz fotoğrafları. A: 24 saat, B: 48 saat, C:72 saat.



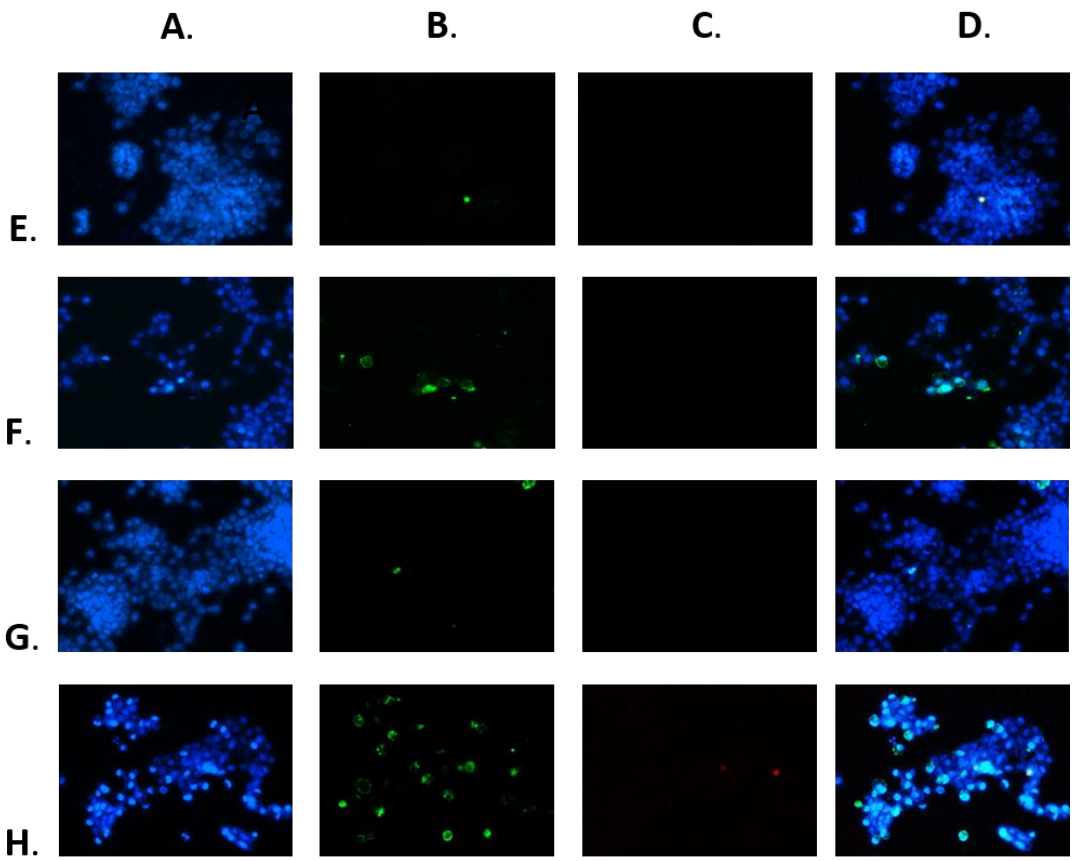
Şekil 3.3. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle muamele edilen MDA-MB-231 hücre soyunda faz fotoğrafları. A: 24 saat, B: 48 saat, C:72 saat.

Tablo 3.1. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarının IC50 ve IC90 dozlarının belirlenmesi

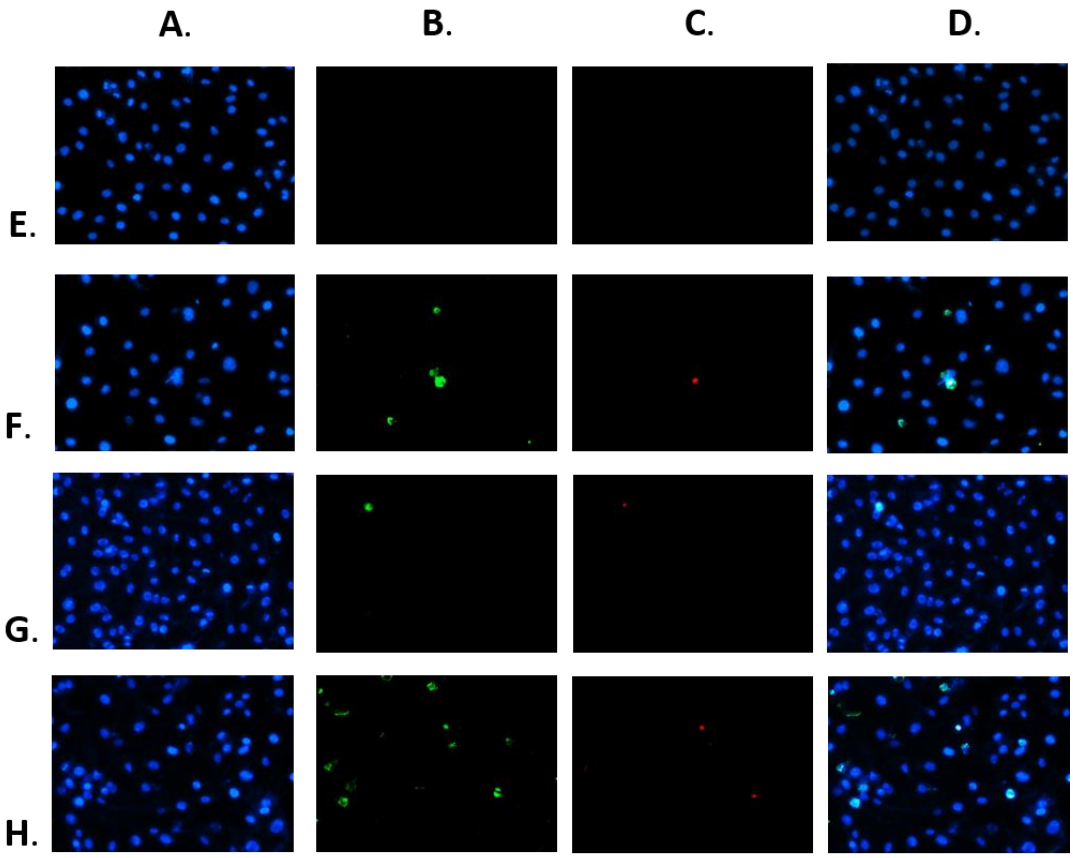
MCF-7 hücre soyu	IC50	IC90
24h	5,6 µM	>40 µM
48h	2,7 µM	**16,2 µM**
72h	2,7 µM	4,8 µM
MDA-MB-231 hücre soyu	IC50	IC90
24h	9,3 µM	33 µM
48h	6,5 µM	**8,7 µM**
72h	2,9 µM	8,4 µM

3.2. HOECHST 33342, PROPİDİUM İYODÜR (PI) VE ANNEKSİN-V İLE ÜÇLÜ BOYAMA YÖNTEMİ BULGULARI

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine dinükleer Pd (II) kompleksinin IC90 dozu uygulandı. 12. ve 24. saat ilaç uygulamasını takiben üçlü boyama yöntemi uygulanarak elde edilen floresan mikroskop görüntüleri değerlendirildi. Dinükleer Pd (II) kompleksinin muamelesi sonucunda, Hoechst 33342 boyası ile her iki hücre soyunda gözlenen nükleer fragmentasyon varlığı ve/veya piknoz tespit edilmiştir. Aynı bölgeler için Anneksin-V boyama sonuçları pozitif görülürken propidium iyodür boyaması negatif görülmüştür. Bulgular hücrelerin ölüm modunun apoptoz olduğunu düşündürtmektedir (Şekil 3.4 ve 3.5).



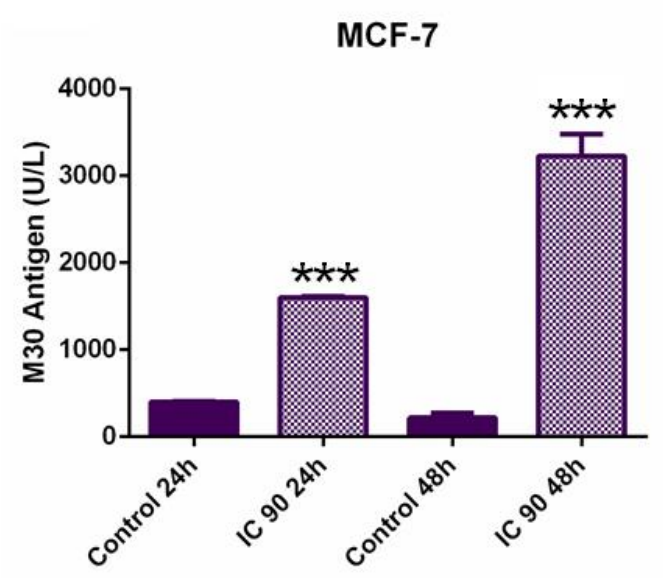
Şekil 3.4. Dinükleer Pd (II) kompleksi ile yapılan 12 ve 24 saatlik tedavi sonrası, MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri. A: Hoechst 33342 ile boyama (Mavi), B: Anneksin-V (Yeşil), C: Propidyum iyodür ile boyama (Kırmızı) D: Hoechst 3342, Anneksin-V ve Propidyum iyodür boyalarının merge edildiği alanlar. E: MCF-7 12. saat kontrol hücreleri, F: MCF-7 hücreleri 12. saat tedavi hücreleri, G: MCF-7 24. saat kontrol hücreleri, H: MCF-7 hücreleri 12. saat tedavi hücreleri



Şekil 3.5. Dinükleer Pd (II) kompleksi ile yapılan 12 ve 24 saatlik tedavi sonrası, MDA-MB-231 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri.. A: Hoechst 33342 ile boyama (Mavi), B: Anneksin-V (Yeşil), C: Propidyum iyodür ile boyama (Kırmızı) D: Hoechst 3342, Anneksin-V ve Propidyum iyodür boyalarının merge edildiği alanlar. E MDA-MB-231 12. saat kontrol hücreleri, F: MDA-MB-231 hücreleri 12. saat tedavi hücreleri, G: MDA-MB-231 24. saat kontrol hücreleri, H: MDA-MB-231 hücreleri 12. saat tedavi hücreleri

3.3. M30-ANTİJEN (KASPAZLA KIRILMIS SİTOKERATİN 18) BULGULARI

Dinükleer Pd (II) kompleksinin hücreler üzerinde sitotoksik aktivite gösterdiği belirlendikten sonra hücre ölüm modunu araştırmak amacıyla apoptoza özgü bir belirteç olan kaspazla-kırılmış CK18 (M30) düzeylerine bakıldı. MDA-MB-231 hücrelerinde CK18 ekspresyonu olmadığı için MCF-7 hücrelerinde CK18 düzeylerine bakıldı (Sommers, Connie L. ve ark., 1989). M30-Antijen ölçümlerinin değerlendirilmesi için ölçülen absorbanslar formül üzerinden değerlendirilerek M30 miktarları U/L cinsinden hesaplandı (Şekil 3.6). IC90 dozunda dinükleer Pd (II) kompleksiyle muamelesi sonucunda 24 ve 48 saatte MCF-7 hücrelerinde, zamana bağlı olarak M30 seviyelerinde artış olduğu belirlendi (Şekil 3.6).



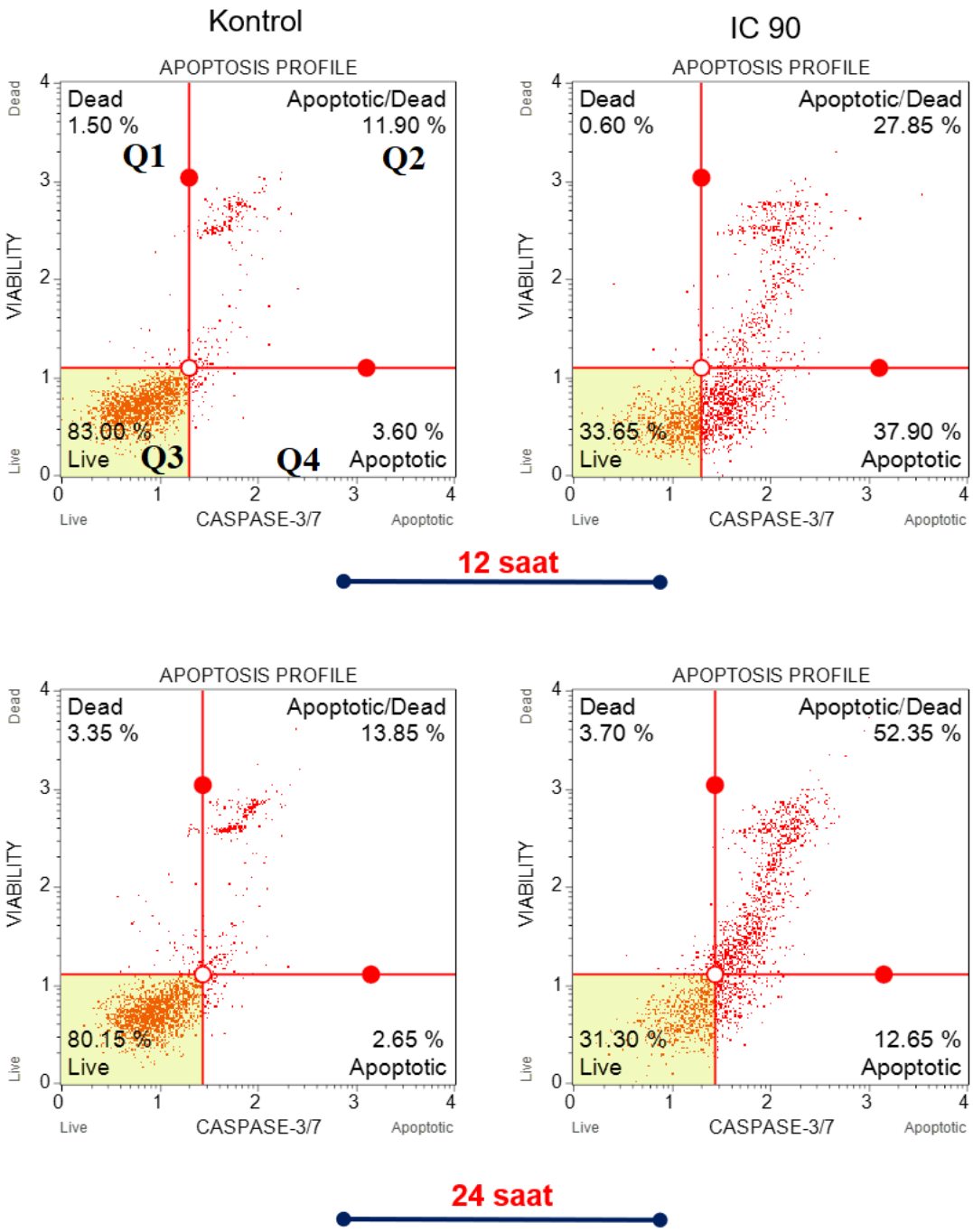
Şekil 3.6. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavilerinin 24 ve 48 saatte MCF-7 hücre soyunda M30 seviyeleri üzerine etkisi. * aynı dozlar için farklı zaman periyotlarına göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ***:p<0,001) ifade etmektedir.

3.4. AKIM SİTOMETRİ BULGULARI

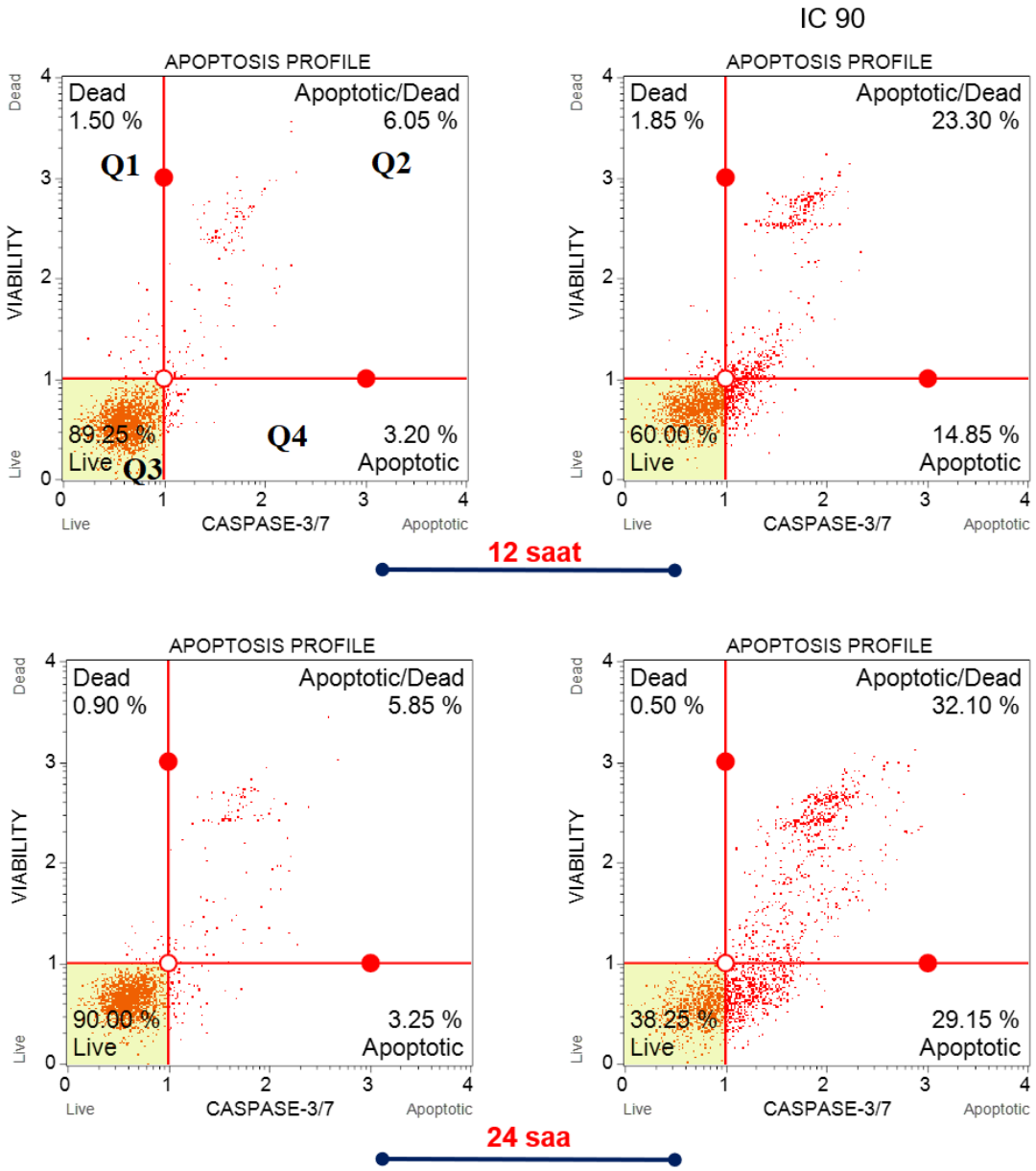
3.4.1.Kaspaz 3/7 Testi

Apoptotik hücre ölümünün gerçekleşmesinde, kaspaz proteazların aktifleşmesi önemli rol oynamaktadır. Apoptotik sinyal boyunca etkili olan efektör kaspazlardan: kaspaz 3/7 aktivasyonu membran integritesi ve apoptotik hücre ölümü hakkında bilgiler veren apoptotik belirteçlerdendir.

Apoptotik hücre ölüm mekanizmasının akım sitometrisinde Kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirilmesi sonucunda; 12 saatlik tedavi sonrasında dinükleer Pd (II) kompleksi uygulanmış (IC90) MCF-7 hücrelerinde apoptotik oran %65,75 (Q2+Q4), MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik oran %38,15 (Q2+Q4)'dir. 24 saatlik tedavi sonrasında dinükleer Pd (II) kompleksi uygulanmış (IC90) MCF-7 hücrelerinde apoptotik oran %65 (Q2+Q4), MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik oran %61,25 (Q2+Q4)'dir.



Şekil 3.7. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları (Q1(Dead)=Nekroz, Q2(Apoptotic/Dead)=Geç Apoptoz, Q3(Live)=% Canlılık, Q4(Apoptotic)=Erken Apoptoz)

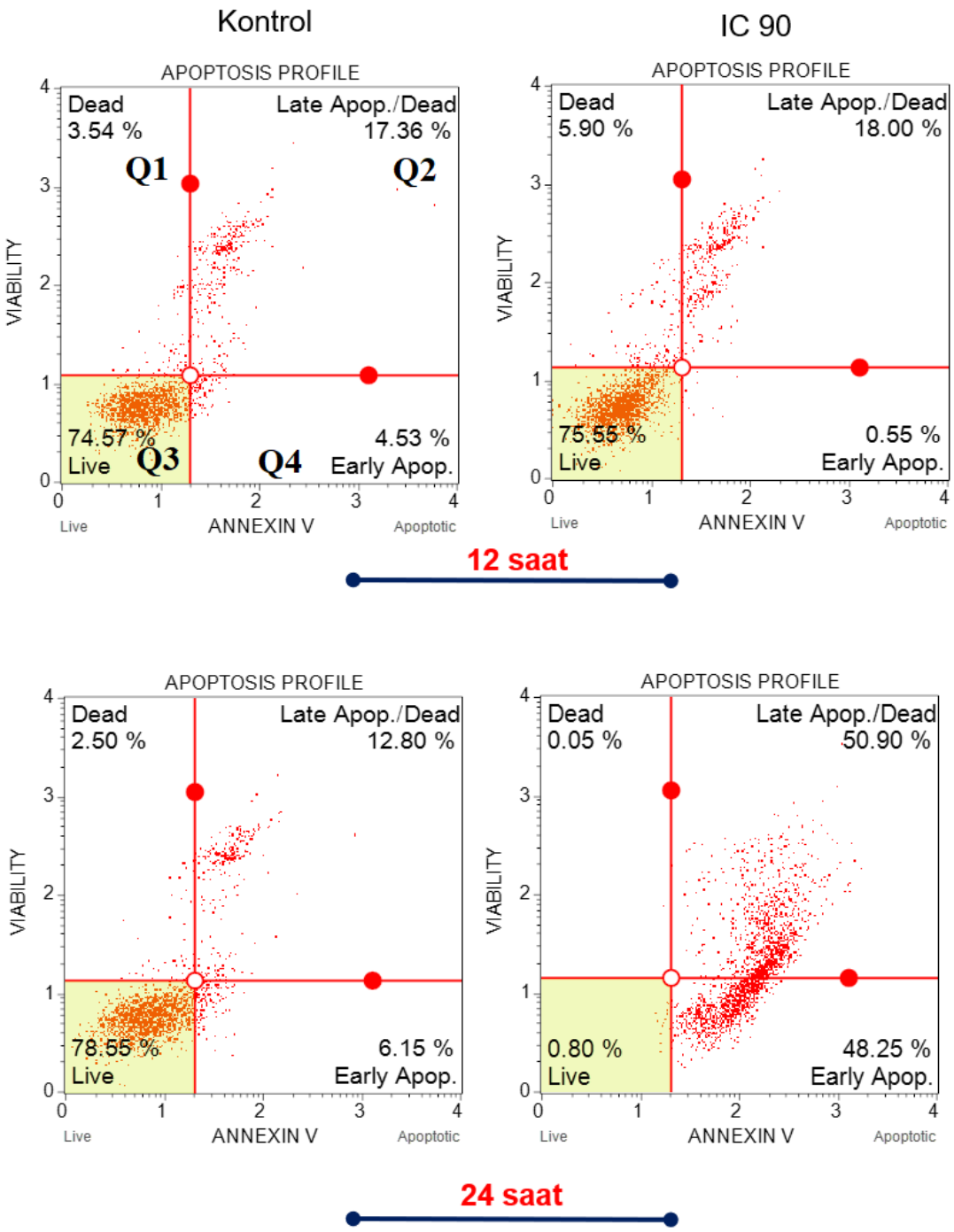


Şekil 3.8. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları (Q1(Dead)=Nekroz, Q2(Apoptotic/Dead)=Geç Apoptoz, Q3(Live)=% Canlılık, Q4(Apoptotic)=Erken Apoptoz)

3.4.2. Anneksin-V Değerlendirilmesi

Apoptotik hücre ölüm mekanizmasının akım sitometrisinde Anneksin-V değerlendirilmesi sonucunda; 12 saatlik tedavi sonrasında dinükleer Pd (II) kompleksi uygulanmış (IC90) MCF-7 hücrelerinde apoptotik oran %18,55 (Q2+Q4), MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik oran %38,8 (Q2+Q4)'dir. 24 saatlik tedavi sonrasında dinükleer Pd (II) kompleksi uygulanmış (IC90) MCF-7 hücrelerinde apoptotik oran %99,15 (Q2+Q4), MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik oran %49,9 (Q2+Q4)'dir.

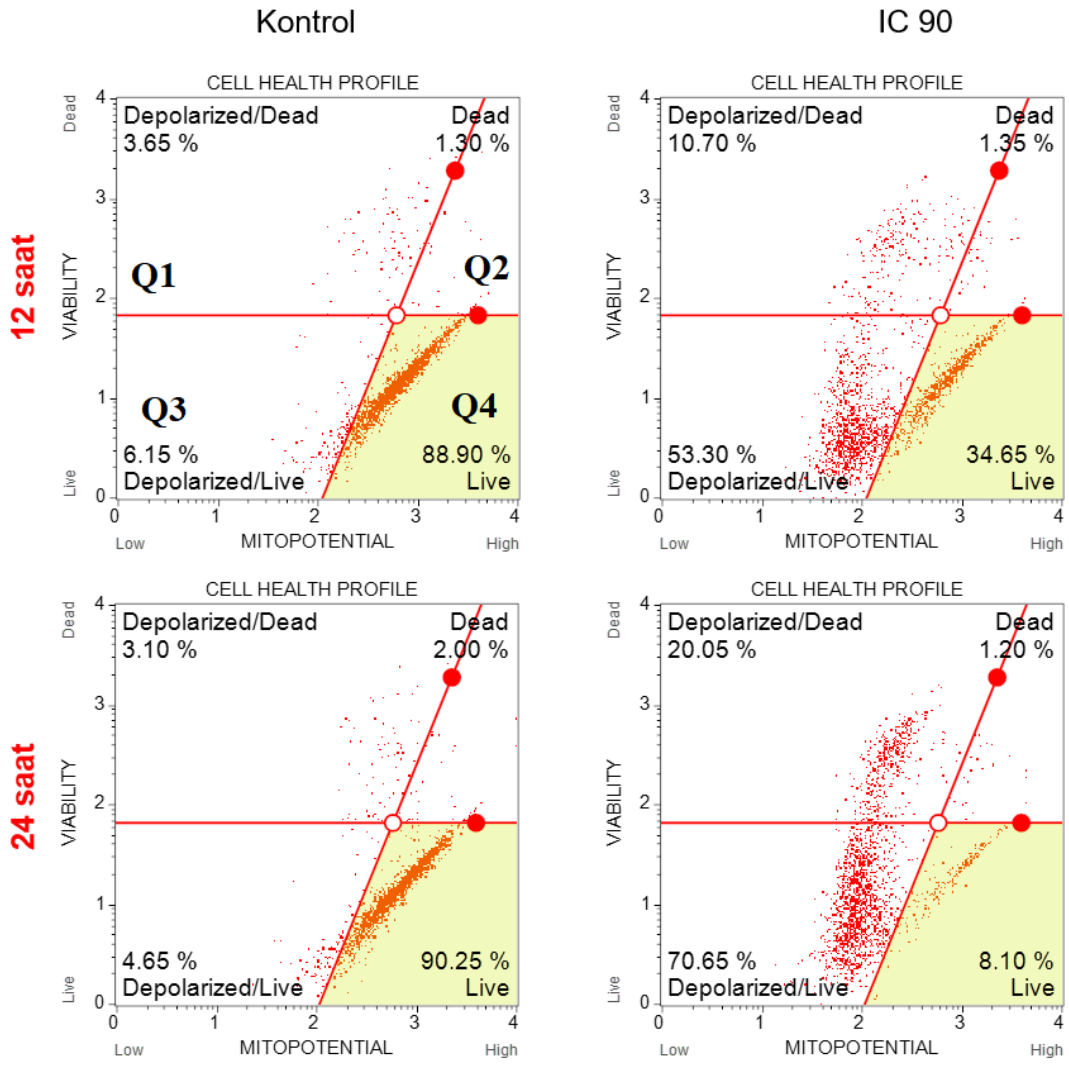
Annexin V-FITC ve 7-AAD (negatif olan bölge canlı hücreleri (Q3), Annexin V-FITC ve 7-AAD pozitif olan bölge geç apoptotik hücreleri (Q2), Annexin V-FITC pozitif ve 7-AAD negatif olan bölge erken apoptotik hücreleri (Q4), Annexin V-FITC negatif ve 7-AAD pozitif olan bölge ise nekrotik hücrelerin yüzde değerlerini göstermektedir.



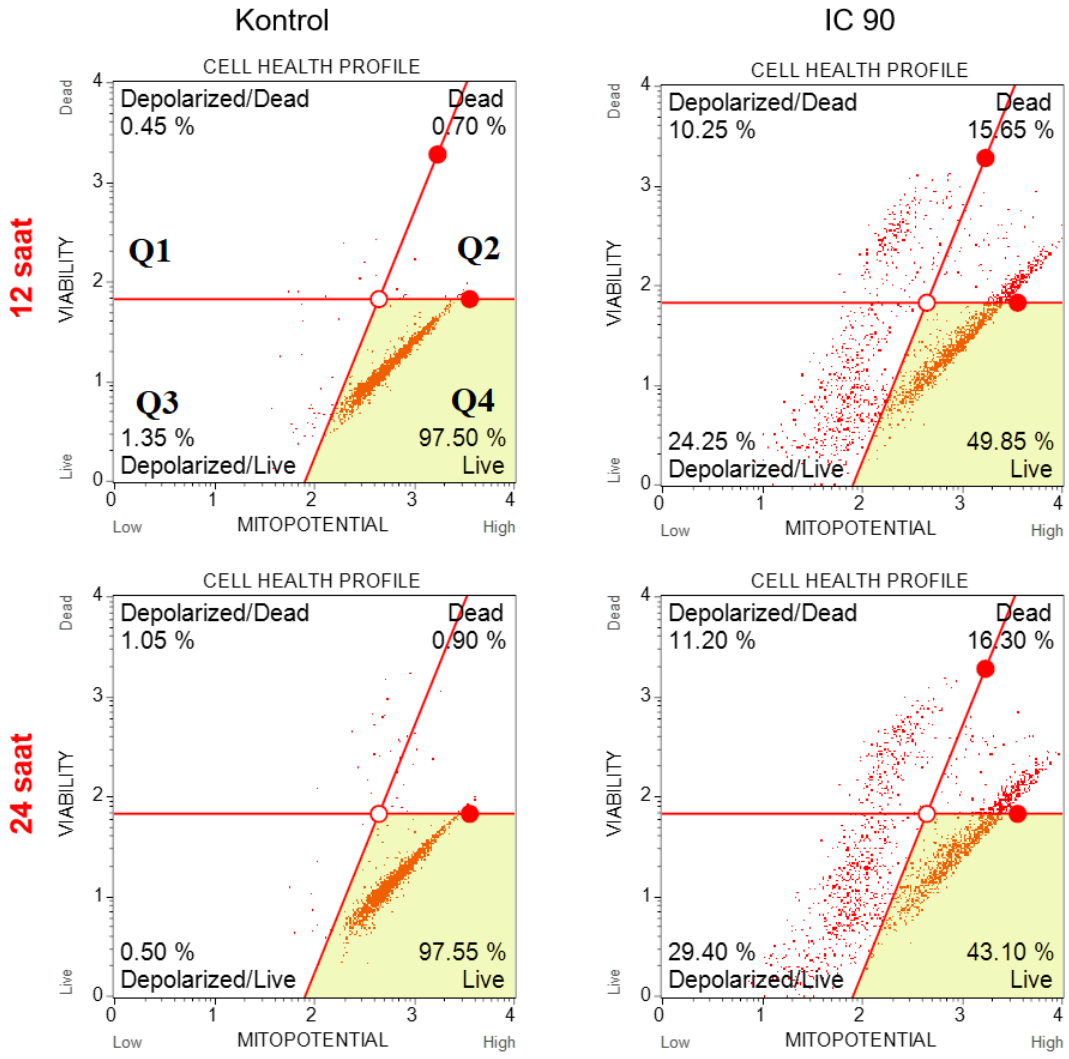
Şekil 3.9. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde Anneksin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları (Q1(Dead)=Nekroz, Q2(Apoptotic/Dead)=Geç Apoptoz, Q3(Live)=% Canlılık, Q4(Apoptotic)=Erken Apoptoz)

3.4.3. Mitokondri Membran Potansiyel Değişiklikleri

Mitokondriyal membran permeabilitesinin değişimi apoptotik süreçde gözlenen önemli değişikliklerideni biridir. 12 saatlik tedavi sonrasında dinükleer Pd (II) kompleksi uygulanmış (IC90) MCF-7 hücrelerinde mitokondrisi depolarize olan hücrelerin total yüzdesi %64 (Q1+Q3), MDA-MB-231 hücrelerinde mitokondrisi depolarize olan hücrelerin total yüzdesi %34,5 (Q1+Q3)'dir. 24 saatlik tedavi sonrasında dinükleer Pd (II) kompleksi uygulanmış (IC90) MCF-7 hücrelerinde mitokondrisi depolarize olan hücrelerin total yüzdesi %90,7 (Q1+Q3), MDA-MB-231 hücrelerinde mitokondrisi depolarize olan hücrelerin total yüzdesi %40,6 (Q1+Q3)'dir (Şekil 3.10 ve 3.11).



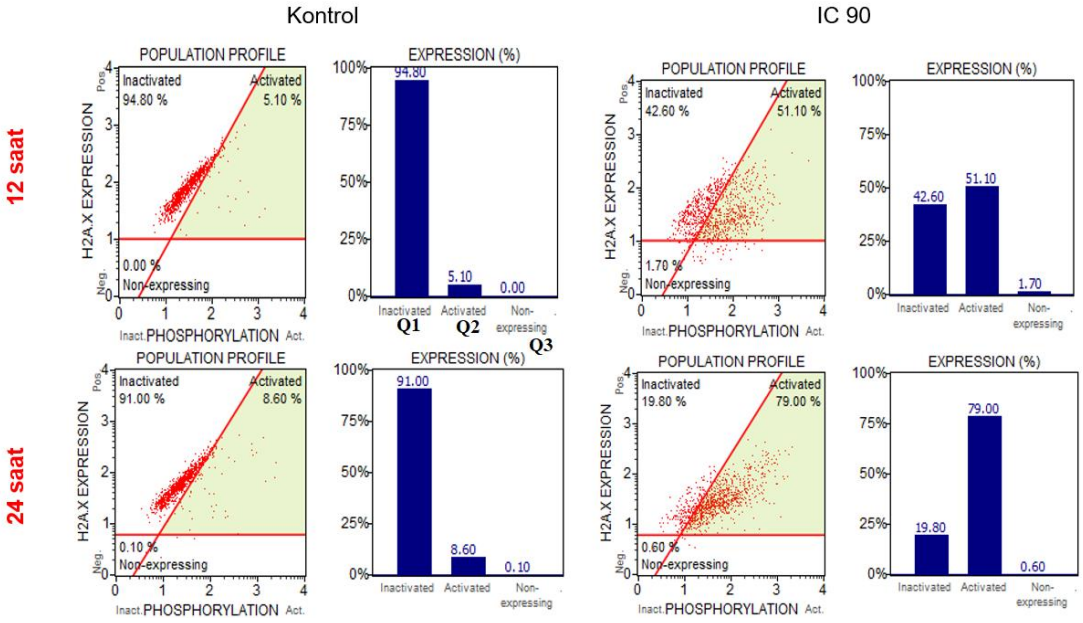
Şekil 3.10. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyel değişimi yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları (Q1=Depolarize/Ölü, Q2= Ölü, Q3=Depolarize/Canlı, Q4= Canlı)



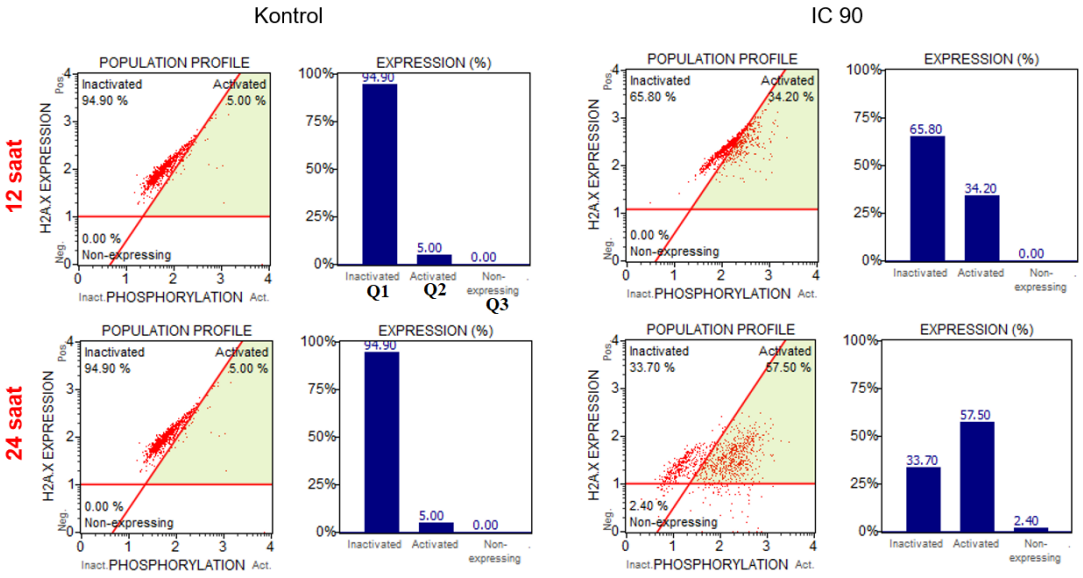
Şekil 3.11. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyel değişimi yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları (Q1=Depolarize/Ölü, Q2= Ölü, Q3=Depolarize/Canlı, Q4= Canlı)

3.4.4. DNA Hasarının Belirlenmesi

γH2AX'nin ekspresyonu DNA çift zincir kırıklarının tespitinde hassas bir belirteçtir. Akım sitometrisinde p-γH2AX'nin değerlendirilmesi sonucu, 12 saatlik tedavi sonrasında dinükleer Pd (II) kompleksi uygulanmış (IC90) MCF-7 hücrelerinde %51,10 (Q2), MDA-MB-231 hücrelerinde %34,20 (Q2) olarak DNA hasarına neden olur. 24 saatlik tedavi sonrasında ise dinükleer Pd (II) kompleksi uygulanmış (IC90) hücrelerde bu oranlar, MCF-7 hücrelerinde %79 (Q2), MDA-MB-231 hücrelerinde olan %57,50 (Q2)'dir (Şekil 3.12 ve 3.13).



Şekil 3.12. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MCF-7 meme kanseri hücrelerinde p-γH2AX yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramı (Q1= γH2AX, Q2= p-γH2AX, Q3= γH2AX eksprese etmeyen)

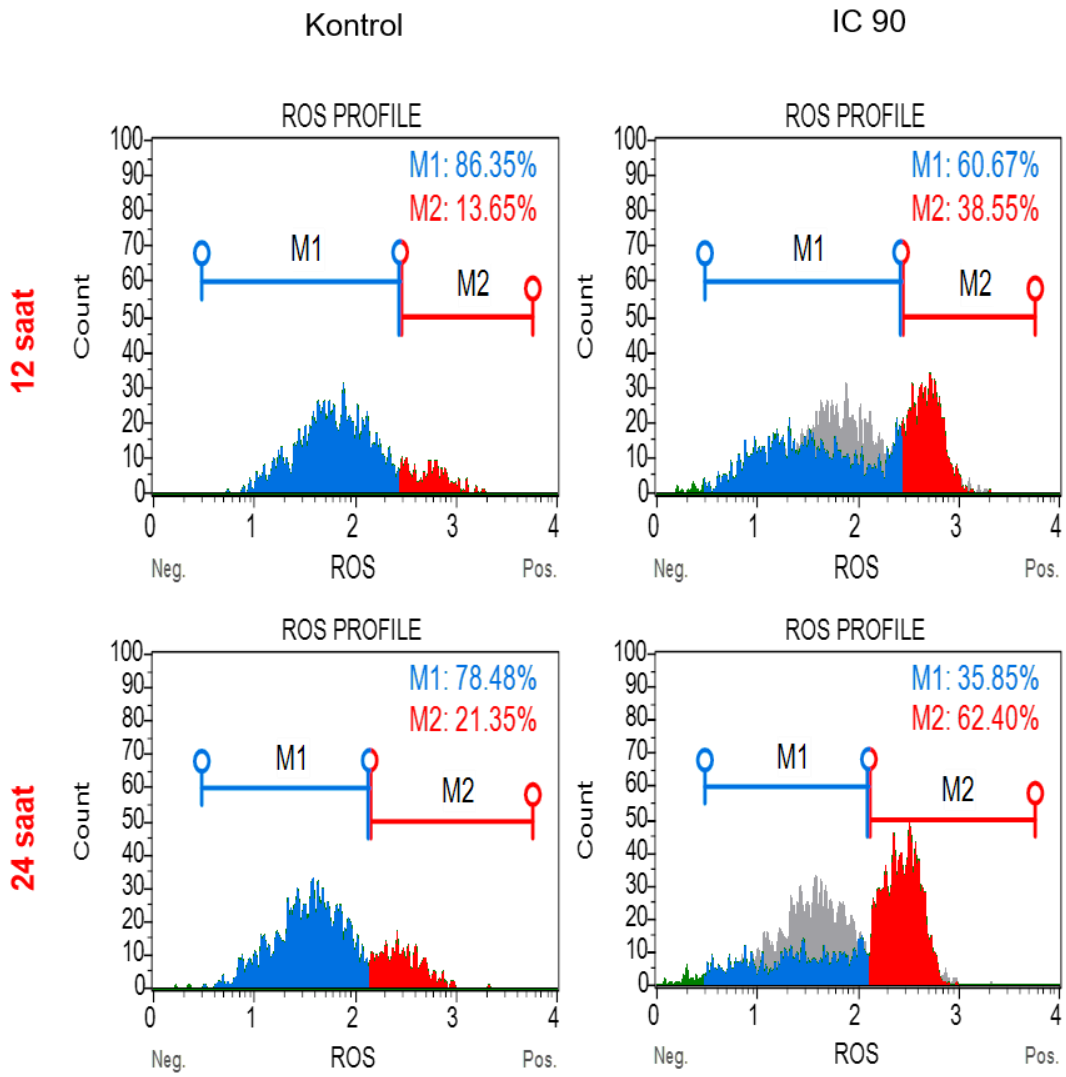


Şekil 3.13. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde p-γH2AX yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramı (Q1= γH2AX, Q2= p-γH2AX, Q3= γH2AX eksprese etmeyen)

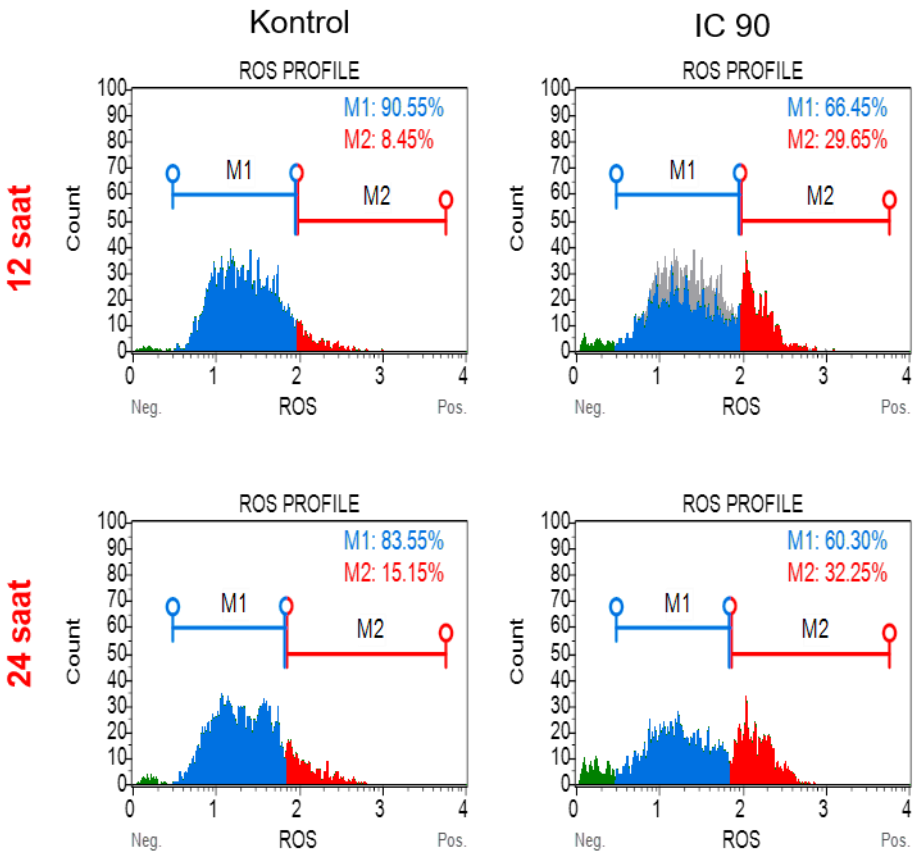
3.4.5. Oksidatif Stresin (ROS) Belirlenmesi

DNA hasarının ROS kaynaklı mı yoksa değil mi sorusuna yanıt olarak akım sitometrisinde ROS miktarı incelendi. MCF-7 hücrelerinde dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi uygulamasının sonucunda ROS miktarları, Kontrol hücreleri ROS miktarı: 13,65 ve 12 saat dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi görmüş

hücrelerin ROS miktarı: 38,55'dir (Şekil 3.14). MDA-MB-231 hücrelerinde dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi uygulamasının sonucunda ROS miktarları, Kontrol hücreleri ROS miktarı 8,45 ve 12 saat dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi görmüş hücrelerin ROS miktarı: 29,65'dir (Şekil 3.15). MCF-7 hücrelerinde dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi uygulamasının sonucunda ROS miktarları, Kontrol hücreleri ROS miktarı 21,35 ve 24 saat dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi görmüş hücrelerin ROS miktarı 62,40'dir (Şekil 3.14). MDA-MB-231 hücrelerinde dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi uygulamasının sonucunda ROS miktarları, Kontrol hücreleri ROS miktarı 15,15 ve 24 saat dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi görmüş hücrelerin ROS miktarı 32,25'dir (Şekil 3.15).



Şekil 3.14. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MCF-7 meme kanseri hücrelerinde ROS yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramı. M1: ROS negatif hücreler (–); M2: ROS pozitif hücreler ROS (+)

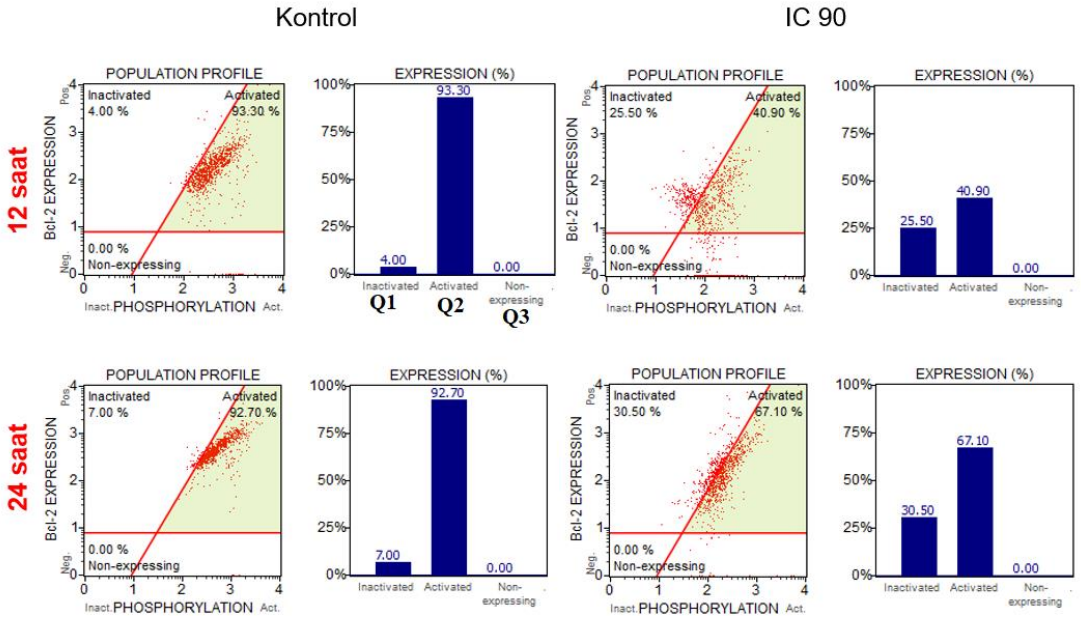


Şekil 3.15. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde ROS yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramı. M1: ROS negatif hücreler (–); M2: ROS pozitif hücreler ROS (+)

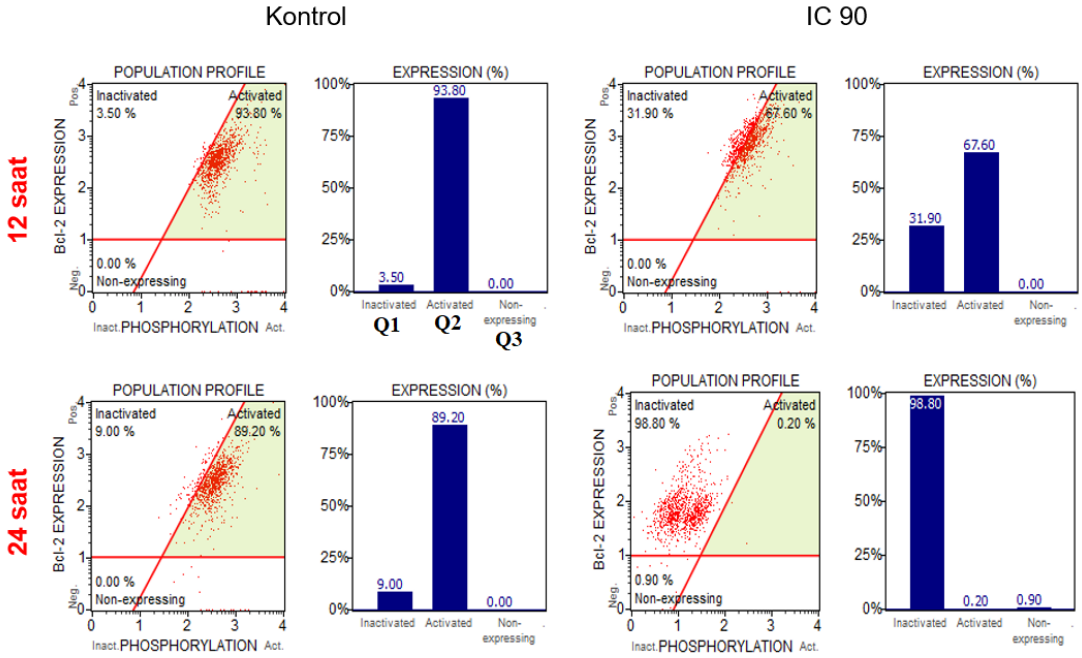
3.4.6. Bcl-2 Aktivasyonu

Bcl-2 aktivitesindeki azalma, mitokondriyal aracılı apoptozun düzenlenmesiyle ilgilidir ve bu nedenle Bcl-2'nin aktivasyonundaki değişiklik, akış sitometrisinde incelenmiştir. MCF-7 hücrelerinde dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi uygulamasının sonucunda; kontrol hücreleri Bcl-2 inaktivasyonu: %4, ve 12 saat dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi görmüş hücrelerin Bcl-2 inaktivasyonu %25,50'dir (Şekil 3.16). MDA-MB-231 hücrelerinde dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi uygulamasının sonucunda Bcl-2 inaktivasyonu; Kontrol hücreleri Bcl-2 inaktivasyonu: %3,50 ve 12 saat dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi görmüş hücrelerin Bcl-2 inaktivasyonu %31,90'dır (Şekil 3.17). MCF-7 hücrelerinde dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi uygulamasının sonucunda Bcl-2 inaktivasyonu, Kontrol hücreleri Bcl-2 inaktivasyonu: %7 ve 24 saat dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi görmüş hücrelerin Bcl-2 inaktivasyonu: %30,50'dir (Şekil 3.16). MDA-MB-231 hücrelerinde dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi uygulamasının sonucunda Bcl-2 inaktivasyonu, kontrol hücreleri Bcl-2 inaktivasyonu: %9 ve 24 saat dinükleer

Pd (II) kompleksiyle tedavi görmüş hücrelerin Bcl-2 inaktivasyonu: %98,80'dir (Şekil 3.17). Bulgulara göre, her iki hücre soyunda da dinükleer Pd(II) kompleksiyle tedavi sonucunda kontrole kıyasla artan Bcl-2 inaktivasyonları apoptozun mitokondri aracılı yolak üzerinden gerçekleştiğini düşündürtmektedir.



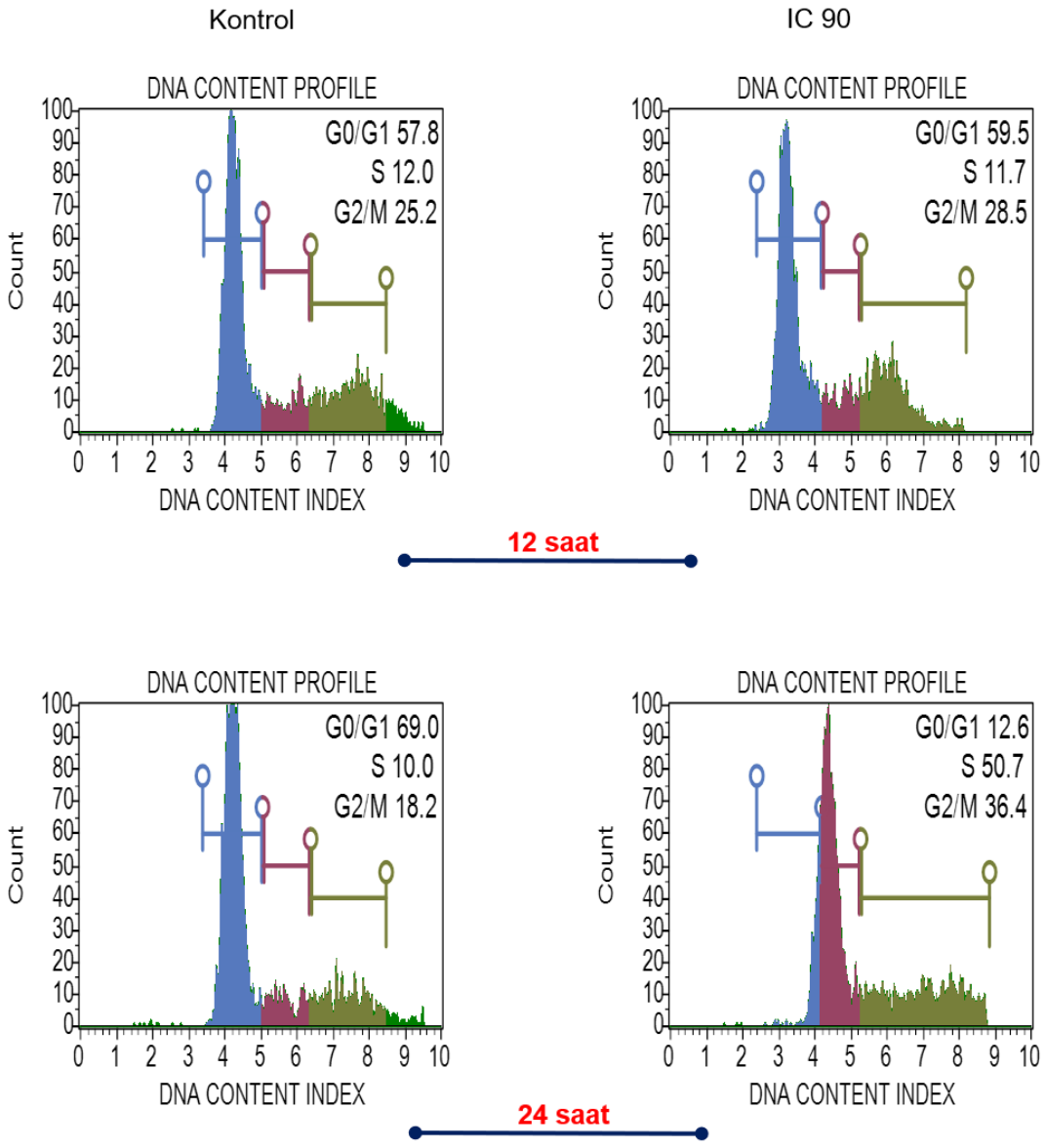
Şekil 3.16. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MCF-7 meme kanseri hücrelerinde Bcl-2 aktivasyonu yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramı. Q1: Bcl-2 inaktivasyonu, Q2: Bcl-2 aktivasyonu, Q3: Eksprese edilmeyen.



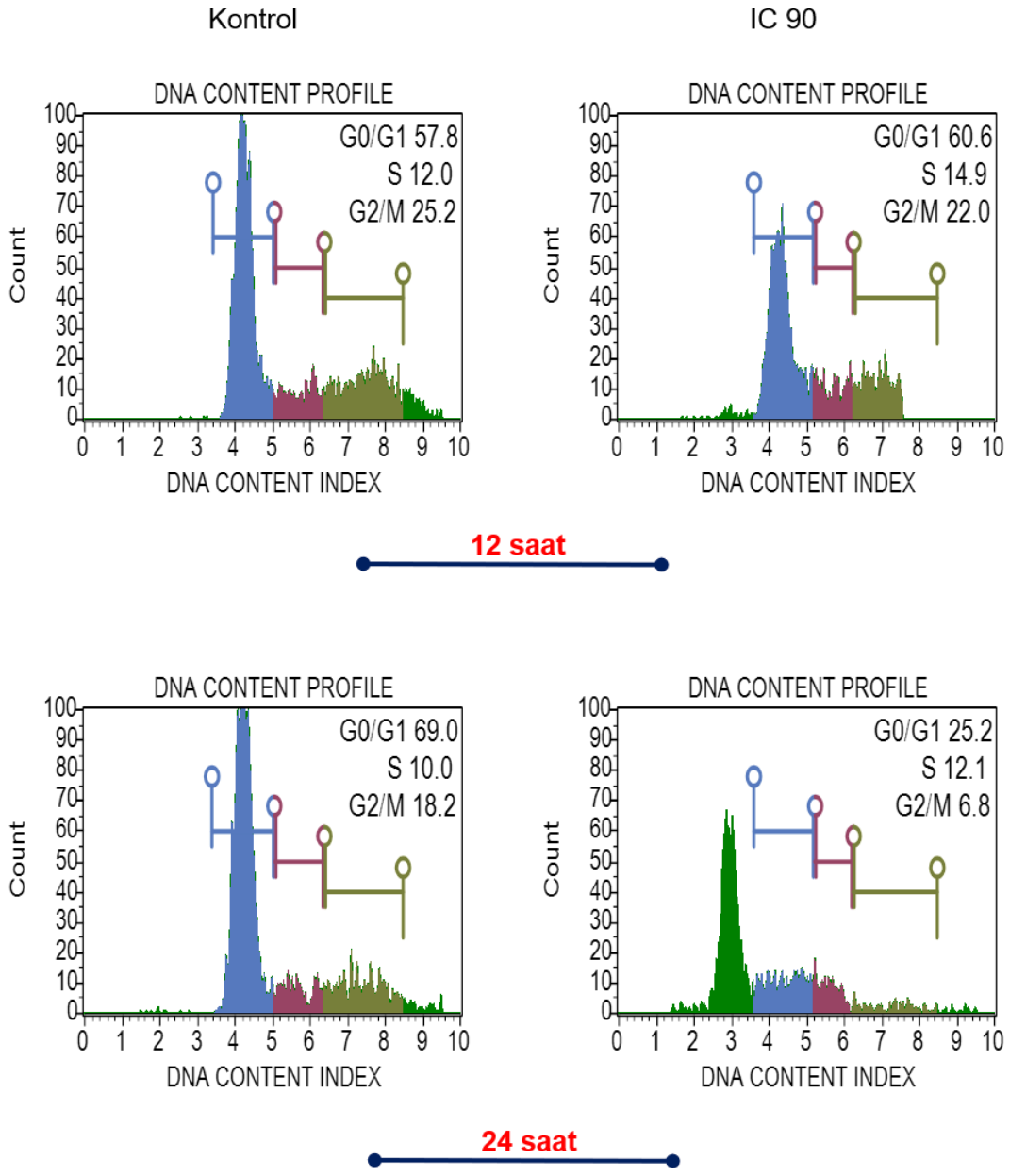
Şekil 3.17. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde Bcl-2 aktivasyonu yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramı. Q1: Bcl-2 inaktivasyonu, Q2: Bcl-2 aktivasyonu, Q3: Eksprese edilmeyen.

3.4.7. Hücre Döngüsü Analizleri

Bu çalışmada, dinükleer Pd (II) kompleksinin sitostatik etkilerini araştırmak için hücre döngüsü analizi yapılmıştır. Özellikle MCF-7 hücrelerinde dinükleer Pd (II) kompleksiyle muamele sonrasında zamana bağlı olarak kontrole (%10) kıyasla S fazında (%50,7) artış gözlendi (Şekil 3.18 ve Şekil 3.19).



Şekil 3.18. MCF-7 hücrelerinin dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC90) döngü fazlarındaki (G0/G1, S ve G2/M) dağılımının 12 ve 24 saatlik histogramı

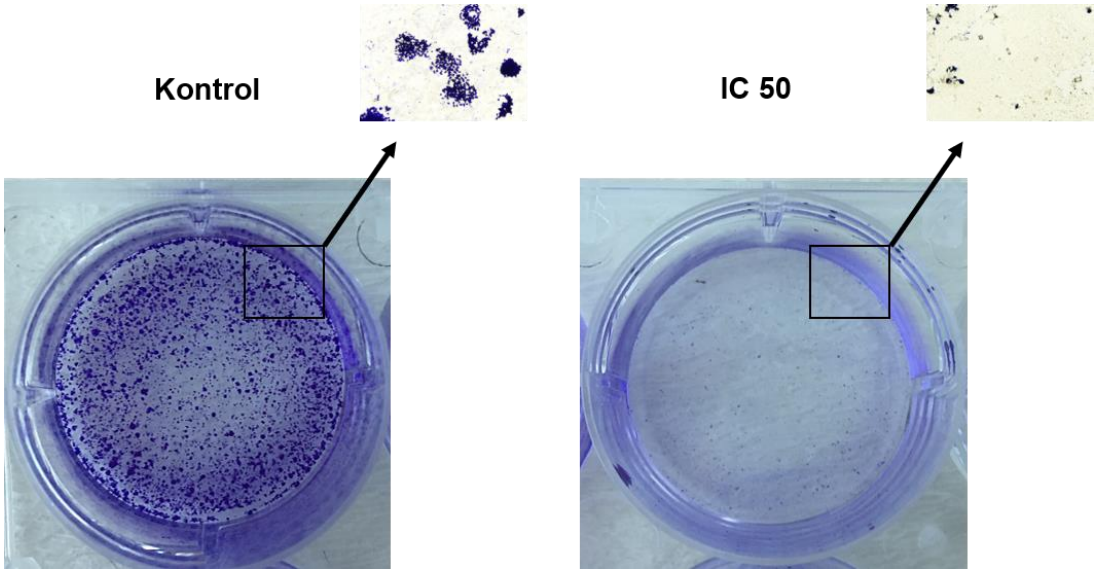


Şekil 3.19. MDA-MB-231 hücrelerinin dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında (IC 90) döngü fazlarındaki (G0/G1, S ve G2/M) dağılımının 12 ve 24 saatlik histogramı

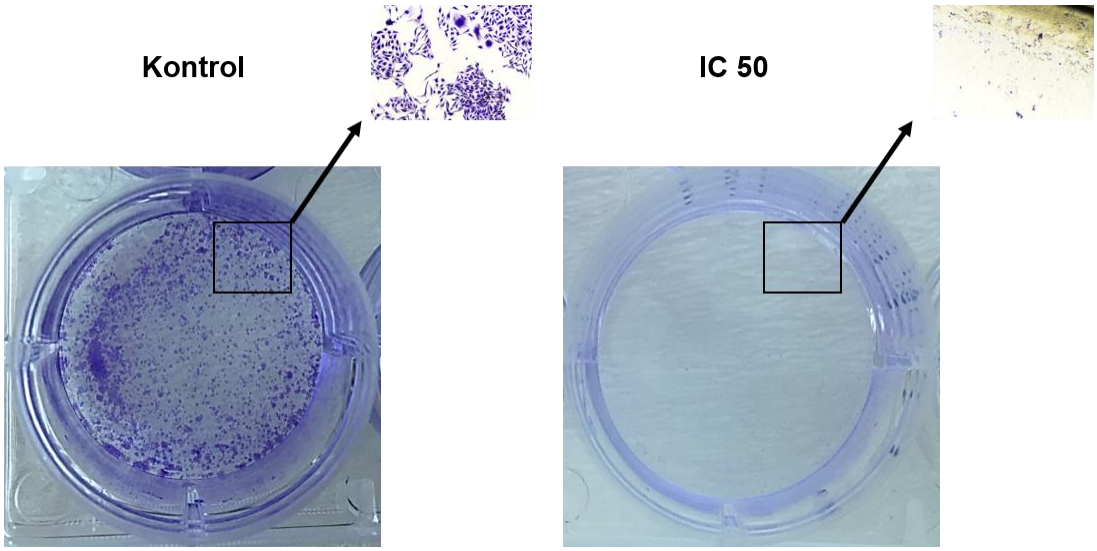
3.5. KOLONİ FORMASYONU

Dinükleer Pd (II) kompleksinin her iki meme kanser hücre soyunda da koloni oluşturabilme yeteneği üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla koloni oluşturma testi (koloni formasyon testi) gerçekleştirildi. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi

edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin koloni oluşturabilme yeteneklerinin önemli düzeyde baskılandığı gözlendi (Şekil 3.20 ve 3.21).



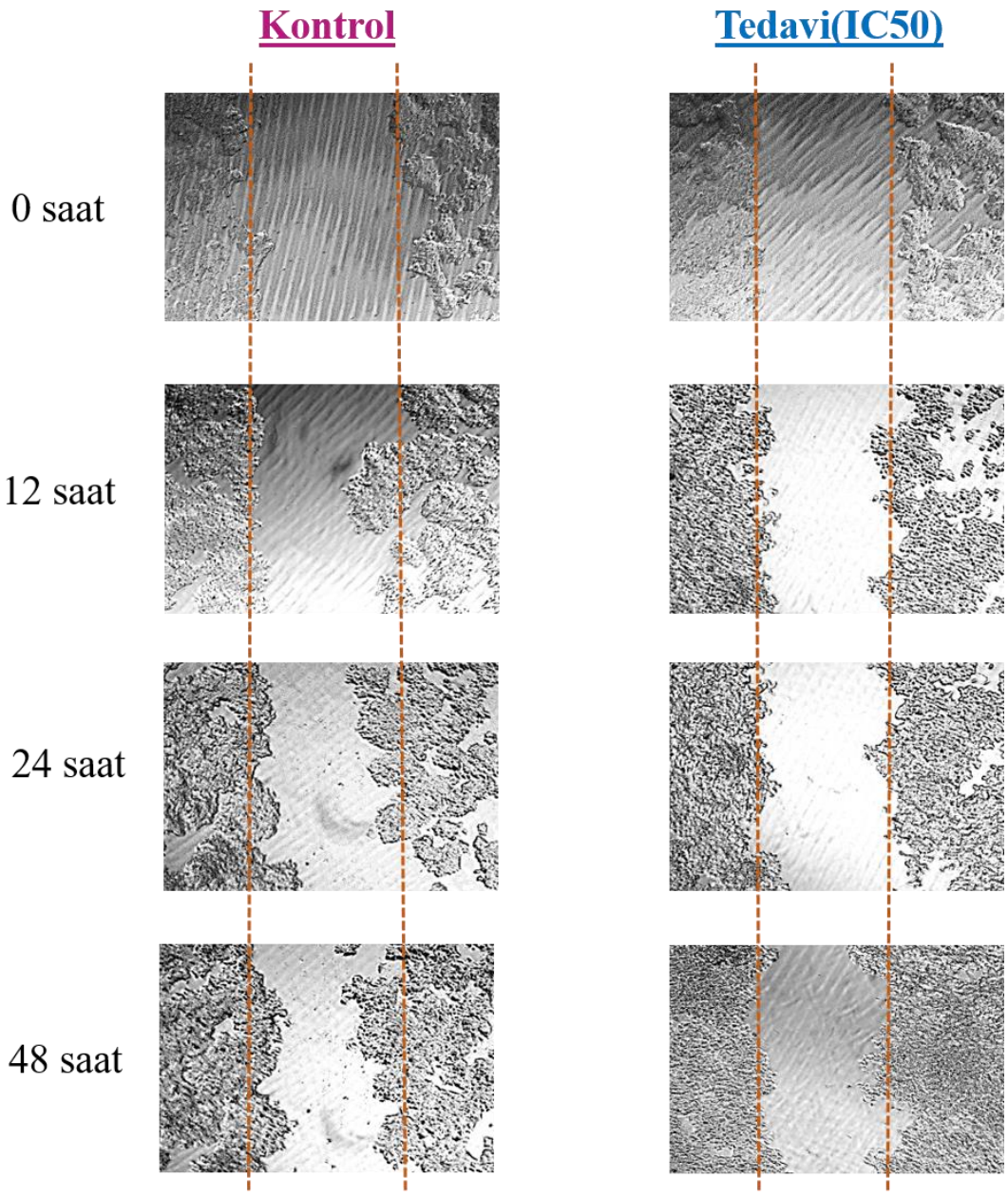
Şekil 3.20. MCF-7 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneklerinin koloni formasyon testi ile ölçümü.



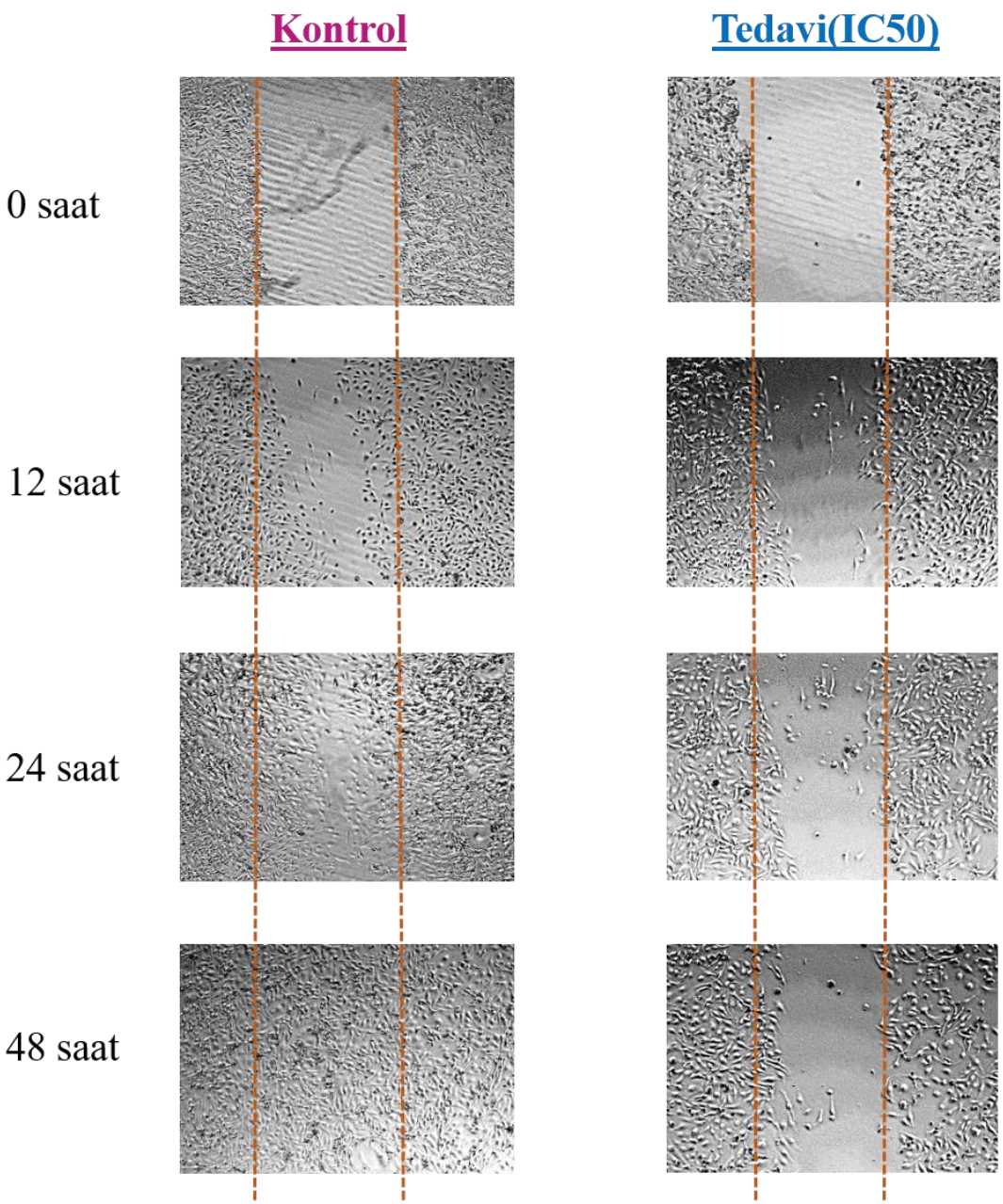
Şekil 3.21. MDA-MB-231 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneklerinin koloni formasyon testi ile ölçümü.

3.6. YARA İYİLEŞMESİ BULGULARI

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında, dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonucunda metastatik sürece olan etkisini değerlendirmek amacıyla migrasyon testi gerçekleştirildi. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavisi sonucunda, dinükleer Pd (II) kompleksi uygulanmamış hücrelere kıyasla migrasyon yeteneklerinin azaldığı gözlendi (Şekil 3.22 ve 3.23).



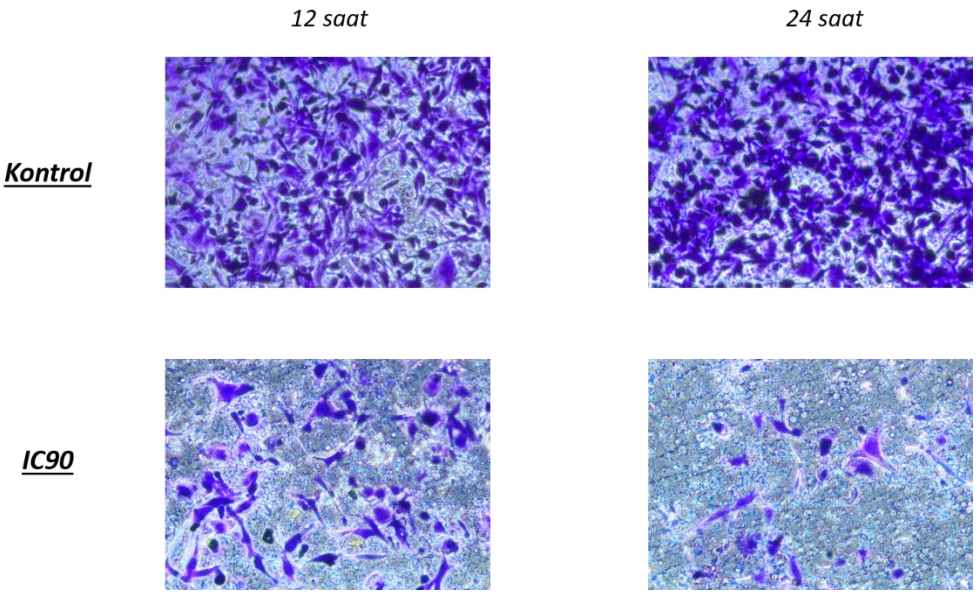
Şekil 3.22. Dinükleer Pd (II) kompleksi uygulanan MCF-7 hücrelerinde migrasyon yeteneği



Şekil 3.23. Dinükleer Pd (II) kompleksi uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde migrasyon yeteneği

3.7. MATRİJEL HÜCRE İNVAZYON BULGULARI

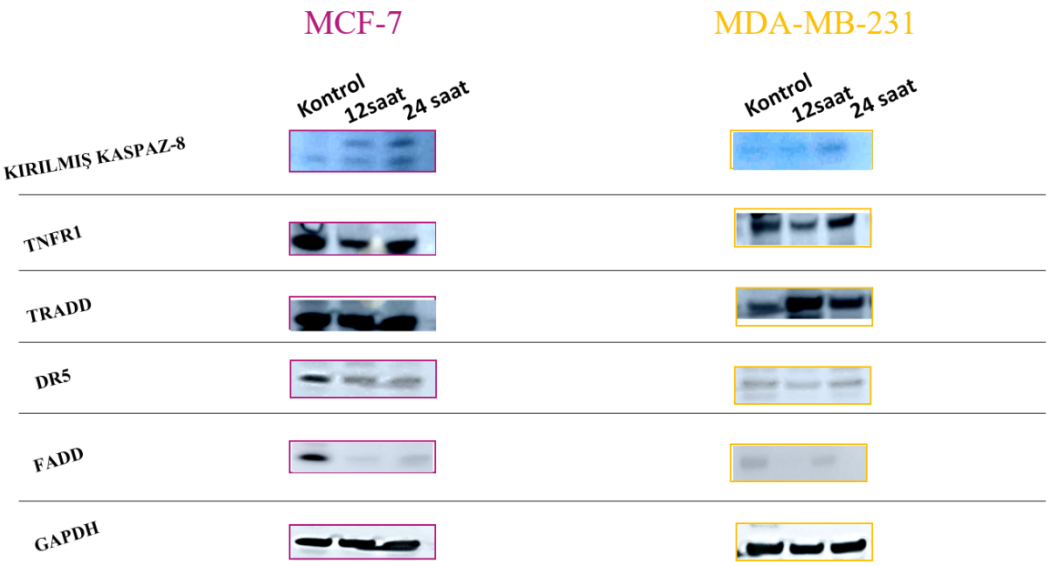
MDA-MB-231 hücrelerinin, dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonucunda metastatik sürece olan etkisini değerlendirmek amacıyla invazyon testi gerçekleştirildi. MDA-MB-231 hücrelerinde dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavisi sonucunda, dinükleer Pd (II) kompleksi uygulanmamış hücrelere kıyasla invaziv olan kanser hücrelerinin invazyon yeteneklerinin azaldığı gözlendi (Şekil 3.24).



Şekil 3.24. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle 12 ve 24 saatlik tedavi sonucunda MDA-MB-231 hücrelerinde invazyon yeteneği

3.8. WESTERN BLOT BULGULARI

Western blot analizi, 20 µg protein lizatı ve kontrol olarak da GAPDH antikorları kullanılarak gerçekleştirildi. Yapılan deney sonucunda; Dinükleer Pd (II) kompleksinin 12 ve 24 saatlik muameleleriyle her iki hücre soyunda da Kaspaz 8'in kırıldığı bulundu (Şekil 3.25).



Şekil 3.25. Dinükleer Pd (II) kompleksiyle 12 ve 24 saatlik tedavi sonucunda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde western blot sonucu bant profilleri

4.TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri kanserdir ve her yıl milyonlarca insan kanserden yaşamını kaybetmektedir. Güncel olarak kanser tedavisinde, kemoterapide kullanılan 60'dan fazla sitotoksik ilaç bulunmaktadır. Tedavi sürecinde ve sonrasında karşılaşılan en önemli sorun ise kanser hücresinin bu ilaçlara karşı gösterdiği dirençtir. Bu nedenle, kemoterapi rejimlerinde bu direnç mekanizmalarını hedeflemek, araştırmacılar için önem taşımaktadır. Metal bileşikler klinikte anti-kanser ilaç olarak kullanılmaktadır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan, platin grubu bir kemoterapötik ajan olan sisplatinin kullanımı birçok kanser türünde başarılı sonuçlar vermesine rağmen yol açtığı ciddi yan etkiler ve hücrelerde gelişen platin direnci araştırmacıları yeni metal bileşiklerin sentezine yöneltmiştir (Reedijk 2003, Alderden ve ark., 2006; Dasari ve ark., 2014). Pd (II) bileşiklerinin antifungal, antiviral, antitümör ve antibakteriyal aktivitelere sahip olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olmakla birlikte özellikle önemli anti-tümör aktivite sergilemeleri ve sisplatine kıyasla daha düşük yan etkilere sahip olmaları, araştırmacılar için yeni bir umut niteliğini taşımaktadır (Gao ve ark., 2010). Çeşitli çalışmalarda Pd (II) bileşiklerinin, farklı kanser hücrelerinde yüksek sitotoksik aktivite göstererek apoptotik hücre ölümünü indüklediği ve bu toksisitenin DNA'da yüksek düzeyde hasarlar oluşturmalarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Szucova ve ark., 2006; Mansouri-Torshizi ve ark., 2008; Abu-Surrah ve ark., 2010; Güney ve ark., 2011).

Tüm bunların ışığında Bülent Ecevit Üniversitesi Kimya Bölümü araştırma grubu tarafından, umut vaadeden terpiridin içeren Pd (II) kompleksi geliştirilerek dinükleer Pd(II) kompleksi sentez edildi ve bu tez kapsamında insan meme kanser hücre soyları üzerine olan sitotoksik etkileri çalışıldı. SRB ve ATP canlılık testi sonuçlarına göre, MCF-7 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat dinükleer Pd(II) kompleksinin uygulanması sonucu 0.6, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 ve 40 μM dozlarında kontrole kıyasla hücre canlılığınında istatiksel açıdan anlamlı azalmalar görüldü.

Aynı şekilde MDA-MB-231 hücre soyunda da 24,48 ve 72 saat dinükleer Pd (II) kompleksinin uygulanması sonucu 0.6, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 ve 40 μM dozlarında kontrole kıyasla hücre canlılığında istatiksel açıdan anlamlı azalmalar belirlendi . Daha önce yapılan çalışmalarda da farklı yapıda olan Pd (II) bileşiklerinin; farklı kanser hücrelerinde (lösemi, sarkom, deri, meme, karaciğer, akciğer, over, prostat, beyin, böbrek, kolon) yüksek oranda sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Abu-Surrah ve ark., 2002; Budzisz ve ark., 2004; Divsalar ve ark., 2007; Tusek-Bozic ve ark., 2008; Garoufis ve ark., 2009; Ferraz ve ark., 2009; Abu-Surrah ve ark., 2010; Güney ve ark., 2011a; Karaküçük-İyidoğan ve ark., 2011b; Ghani ve ark., 2012; Yıldız ve ark., 2019). Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde, Pd (II) bileşiklerinin IC50 değerleri arasındaki farklılık bileşiğin yapısı ve biyolojik aktivitesi arasındaki ilişkiye dayanarak açıklanabilmektedir. Güney ve ark. (2011) tarafından Pd (II) bis(2-piridilmetil) amin bileşiğinin farklı hücre hatlarında farklı IC50 değerleri ile sitotoksik etkiye neden olduğu belirlenmiştir. Başka bir çalışmada Pd (II) bileşiğinin K562 (miyeloid lösemi), HeLa (insan serviks adenokarsinomu) hücre soylarına karşı sitotoksik etkisi araştırılmıştır (REF ekle). Pd (II) bileşiğinin aktivitesi, K562 hücrelerinde (IC50: 55.9 μM); üç standart kemoterapötik ilaca göre (sisplatin IC50: 16.3 μM, karboplatin: 32.9 μM ve oksaliplatin: 0.5 μM) daha az etkili bulunmuştur. HeLa hücrelerinde Pd (II) bileşiğinin (IC50: 86.1 μM) ve 3 standart kemoterapötik ilacın (sisplatin 94.3 μM, karboplatin 104.3 μM ve oksaliplatin 71.3 μM) benzer etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Abu-Surrah ve ark. 2002). ATP yöntemi ile elde ettiğimiz bulgular ışığında bu tez kapsamında kullanılan dinükleer Pd (II) kompleksinin IC50 dozu MCF-7 hücreleri için 2.7 μM, MDA-MB-231hücreleri için ise 6.5 μM olarak belirledik veya belirlendi.Yukarıda verilen farklı Pd (II) bileşklerine ait IC50 değerlerine bakıldığında MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde bizim kullandığımız Pd (II) bileşiği ile muamele sonrasında daha düşük değerler saptandı. IC50 değerleri arasındaki değişkenlik Pd (II) bileşiğinin yapısının çalışmalarda farklı olmasına ek olarak farklı hücre türlerinin kullanılması ile de ilişkili olabileceği düşündürmektedir.

Dinükleer Pd (II) kompleksi tarafından tetiklenen hücre ölüm modunu belirlemek amacıyla apoptotik belirteçler araştırıldı. Öncelikle bir apoptozis belirteci olan Anneksin-V-FITC boyaması yapıldı ve floresan mikroskobu altında değerlendirildi. Anneksin-V boyama yöntemi ile erken dönem apoptotik hücreler belirlenebilmektedir. Bunun nedeni Anneksin-V fosfotidilserine bağlanması

membran hasarlanmadan önce nüklear kondensasyon safhasına denk gelmektedir (Koopman ve ark. 1994, Boersma ve ark. 1996, Zhang ve ark. 1997). Ancak hücreler membran bütünlüğünü kaybetmeye başladığında (geç apoptosis/sekonder nekrozis veya primer nekrozis) Anneksin-V intraselüler fosfotidilserine bağlanarak pozitif sonuç verir. Bu nedenle membranı hasarlı hücreleri belirleyebilmek için propidyum iyodür ile birlikte kullanılır (Hammill ve ark. 1999). MCF-7 hücrelerinin dinükleer Pd(II) kompleksiyle tedavisi sonucunda Anneksin-V pozitif boyanan bölgelerde PI negatif sonuç verdi. MDA-MB-231 hücrelerinin dinükleer Pd(II) kompleksiyle tedavisi sonucunda 12 ve 24 saat muamelesi sonrasında Anneksin-V pozitif boyanan bölgelerde PI'de negatif sonuç verdiği gözlendi. Gözlemler sonucunda hücrelerde apoptoz geliştiği belirlenmiştir. Bu ayrımı daha net yapabilmek açısından yöntem çalışılırken ortama Hoechst boyası eklenerek nükleus morfolojisine de bakıldı. Kontrole kıyasla hücrelerin nükleuslarının küçüldüğü (piknotik) gözlendi. Kontrole göre küçülmüş (piknotik) ve/veya fragmente nükleusların varlığı apoptoza özgü belirteçlerdendir (Ulukaya 2011). Çalışmanın bir sonraki kısmında, hücrelerin ölüm modunu belirlemek amacıyla apoptoz belirteci olan kaspazla-kırılmış sitokeratin 18 (M30) düzeylerine bakıldı. Bu durumda M30 testi, sadece sitokeratin 18'i eksprese eden hücrelerde çalışmaya uygundur. MDA-MB-231 hücrelerinde CK18 ekspresyonu olmadığı için MCF-7 hücrelerinde CK18 düzeylerine bakıldı (Sommers ve ark., 1989). MCF-7 hücreleri M30 düzeylerinde zamana bağlı olarak anlamlı bir artış gözlenmiş olup 3'lü boyama sonuçlarıyla korelasyon içerisinde ölüm modunun apoptoz olduğunu düşündürtmektedir. Dinükleer Pd(II) kompleksiyle muamelesi sonucunda MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi kaspaz 3/7 testi ile akım sitometride değerlendirildiğinde; 12 ve 24 saat tedavilerin sonunda hem hücre canlılık yüzdesinde azalma, hem de apoptotik hücre oran yüzdesinde artış belirlendi. MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirildiğinde ise, 12 ve 24 saat süren tedavi sonunda hem hücre canlılık yüzdesinde azalma hem de apoptotik hücre oran yüzdesinde artış belirlendi. Anneksin-V testi ile akım sitometride değerlendirildiğinde; dinükleer Pd(II) kompleksiyle muamelesi sonucunda her iki hücre soyunda da özellikle 24 saatlik tedavide hem hücre canlılık yüzdesinde azalma, hem de apoptotik hücre oran yüzdesinde artış belirlendi. Bu sonuç her iki hücre soyunda da Hoechst 33342, Anneksin-V ve Propidyum iyodür boyama yöntemi sonucu elde edilen görüntüleri de destekler niteliktedir. Bu çalışmaları takiben her iki hücre soyunda da mitokondri membran potansiyelindeki

değişimler incelendi. Dinükleer Pd(II) kompleksiyle muamelesi sonucunda her iki hücre soyunda da 12 ve 24 saatlik tedavide mitokondri membran potansiyelinin bozularak mitokondri membranlarında depolarizasyon gerçekleştiği belirlendi.

Yapılan çalışmalarda metal komplekslerinin hem ekstrinsik (dışsal) yolak hem de mitokondriyal yolak aracılığıyla apoptozu tetiklediği gösterilmektedir (Tan ve ark. 2010, Arı ve ark. 2013). Pd (II) bileşikleriyle yapılan araştırmalarda; farklı kanser hücrelerinde (akciğer, over, serviks, kolorektal, meme, epitel, karaciğer) DNA'da yüksek düzeyde hasar oluşturdukları (Miklasova ve ark., 2009; Miklasova ve ark., 2012) ve apoptozu indükledikleri rapor edilmiştir (Malesevic ve ark., 2006; Keter ve ark., 2008; Miklasova ve ark., 2009; Ulukaya ve ark., 2011; Kontek ve ark., 2011; Ferraz ve ark., 2011; Miklasova ve ark., 2012). Bu çalışmada da MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde dinükleer Pd(II) kompleksiyle tedavi sonucunda kontrole kıyasla DNA'da yüksek seviyede hasar oluşturulduğu tespit edildi. Oksidatif stresin, farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, abazik bölgeler, DNA-protein çapraz bağlanması gibi birtakım lezyonlara neden olarak hasara yol açtığı bilinmektedir (Williams ve Jeffrey 2000, Cooke ve ark. 2003). Çalışmamızda, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde görülen DNA hasarının oksidatif stres kaynaklı mı sorusuna yanıt olarak akım sitometrisinde ROS miktarı saptandı. Her iki hücre soyunda da dinükleer Pd(II) kompleksiyle tedavi sonucunda kontrole kıyasla ROS miktarının belirgin derecede arttığı görüldü. Bulgularımız, dinükleer Pd(II) kompleksi tedavisinin hücre soylarında oluşan yüksek seviyedeki DNA hasarının nedeninin ROS kaynaklı gerçekleştiğini önermektedir. Dinükleer Pd(II) kompleksiyle tedavi sonunda her iki hücre soyunda da görülen Bcl-2 in inaktivasyonundaki artş, apoptozun mitokondri aracılı yolak üzerinden gerçekleştiğini düşündürtmektedir. Hücre döngüsü, 4 fazdan meydana gelir. Bunlar G1, S, G2 ve M olup, G1 ve G2 dinlenme fazları iken, S sentez periyodu, M ise duplike edilen DNA'nın yavru hücrelere dağıtıldığı mitoz sürecidir. Kanser ilaçları sitotoksik ve sitostatik olarak sınıflandırılabilir. Sitotoksik ilaçlar, hücrelere toksik olup onları öldürebilirken, sitostatik ilaçlar hücreleri öldürmez ve döngülerinde onları tutarak çoğalmalarını durdurmaktadır. Bu çalışmada, dinükleer Pd (II) kompleksinin hücre döngüsü üzerindeki MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine olan etkileri araştırıldığında, özellikle MCF-7 hücrelerinde dinükleer Pd (II) kompleksiyle muamele sonrasında zamana bağlı olarak kontrole (%10) kıyasla S fazında %50,7 artış gözlendi. Bu durum literatürde S fazı blokajı olarak adlandırılmaktadır (Ren X

ve ark., 2019). Hücre döngüsü analizleri sonucunda dinükleer Pd(II) kompleksinin sitotoksik ve sitostatik etkilerinin olduğu düşünülmektedir.

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin dinükleer Pd (II) kompleksiyle muamelesi sonucunda koloni oluşturma ve migrasyon yetenekleri değerlendirildiğinde; her iki hücre hücre soyunda da dinükleer Pd (II) kompleksi tedavisinin koloni oluşturma kapasitesini ve migrasyonu inhibe ettiği belirlendi. Metastatik meme kanser hücre soyu olan MDA-MB-231 hücrelerinde dinükleer Pd (II) kompleksi tedavisiyle invazif olan kanser hücrelerinin invazyon yeteneklerini kaybettikleri belirgin bir şekilde gözlemlendi. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında apoptozu indükleyen dinükleer Pd (II) kompleksinin bu süreçte hangi mekanizmaları etkinleştirdiği üzerine fikir vermesi için Western blot yöntemiyle çalışılmıştır. MCF-7 hücrelerinde dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında TNFR ekspresyonlarının azalması reseptör aktivasyonunu düşündürürken, kırılmış kaspaz 8'deki artış aktivasyonu doğrular niteliktedir. MDA-MB-231 hücrelerinde dinükleer Pd (II) kompleksiyle tedavi sonrasında ise 12 saatde başlayan ekstrinsik yolak aktivasyonu, 24 saatde aşırı derecede kırılmış olan kaspaz 8 ile doğrulanmıştır. Her iki hücre soyunda da DR5 ve FADD için bir artıştan bahsedilemezken bu durum TNFR1 ve onun ligandı TRADD üzerinden giden ekstrinsik yolağı işaret etmektedir. Sonuç olarak, dinükleer Pd (II) kompleksinin her iki hücre soyu üzerindeki ölüm etkisini apoptozun ekstrinsik yolağını aktive ederek gerçekleştirdiğini düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasının sonuçlarından yola çıkarak, dinükleer Pd (II) kompleksinin insan meme hücre soylarında (MCF-7 ve MDA-MB-231) güçlü bir apoptotik etkiye neden olduğu, aynı zamanda moleküler düzeyde hücrenin sağkalım ve ölüm süreçlerinde farklı moleküler hedefleri etkiledikleri tespit edilmiş olup yeni bir terapötik hedef olabileceği açıkça ortaya koymuştur. Bir sonraki inceleme basamağı olarak bu bileşiğin kliniğe uyarlanabilmesi için in vivo olarak araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abu-Surrah, A. S., Al-Sa'doni, H. H., & Abdalla, M. Y. (2008). Palladium-based chemotherapeutic agents: routes toward complexes with good antitumor activity. Cancer therapy, 6, 1-10.

Akşit, H., & Bildik, A. (2008). Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *19*(1), 55-63.

Alderden, R. A., Mellor, H. R., Modok, S., Hambley, T. W., & Callaghan, R. (2006). Cytotoxic efficacy of an anthraquinone linked platinum anticancer drug. *Biochemical pharmacology*, *71*(8), 1136-1145.

Altunkaynak. B.Z., Özbek E. 2008. Programmed Cell Death: What is the Apoptosis? *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6(2): 93 -104.

Anderson, M. A., Deng, J., Seymour, J. F., Tam, C., Kim, S. Y., Fein, J., Majewski, I. J. 2016. The BCL2 selective inhibitor venetoclax induces rapid onset apoptosis of CLL cells in patients via a TP53 independent mechanism. *Blood*, 2016.

Andreotti, P.E., Cree, I.A., Kurbacher, C.M., Hartmann, D.M., Linder, D., Harel, G. 1995. Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Research*, 55(22): 5276-5282.

Anvekar, R. A., Asciolla, J. J., Missert, D. J., Chipuk, J. E. 2011. Born to be alive: a role for the BCL-2 family in melanoma tumor cell survival, apoptosis, and treatment. *Frontiers in Oncology*, 1(34).

Ari, F., Ulukaya, E., Sarimahmut, M., Yilmaz, V. T. 2013. Palladium (II) saccharinate complexes with bis (2-pyridylmethyl) amine induce cell death by apoptosis in human breast cancer cells in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(11): 3016-3021. Ashnagar, A., Sheeri, B. 2007. Novel synthesis of barbiturates. *Chinese Journal of Chemistry*, 25(3): 382-384.

Boersma, A. W. M., Nooter, K., Oostrum, R. G., Stoter, G. 1996. Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate-labeled Annexin V in Chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. *Cytometry*, 24: 123–130.

Bowen, I. D. 1988. Proportions of mitotic and apoptotic cells in a range of untreated experimental tumours. *Cell Proliferation*, 21(1): 45-49.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, *68*(6), 394-424.

Budzisz, E., Krajewska, U., Rozalski, M., Szulawska, A., Czyz, M., Nawrot, B. 2004. Biological evaluation of novel Pt (II) and Pd (II) complexes with pyrazole-containing ligands. *European Journal of Pharmacology*, 502(1): 59-65.

Burlacu, A. 2003. Regulation of apoptosis by Bcl- 2 family proteins. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 7(3): 249-257.

Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., & Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer research, 47(4), 936-942.

Chaires, J. B., Leng, F., Przewloka, T., Fokt, I., Ling, Y. H., Perez-Soler, R., ve ark. (1997). Structure-based design of a new bisintercalating anthracycline antibiotic. Journal of medicinal chemistry, 40(3), 261-266.

Chang, H. Y., Yang, X. 2000. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4): 821-846.

Cheung-Ong, K., Giaever, G., & Nislow, C. (2013). DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. Chemistry & biology, 20(5), 648-659.

Chi, S., Kitanaka, C., Noguchi, K., Mochizuki, T., Nagashima, Y., Shirouzu, M., ve ark. 1999. Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene*, 18(13).

Clarke, P. G. 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and Embryology*, 181(3): 195-213.

Clarke, P., Tyler, K. L. 2009. Apoptosis in animal models of virus-induced disease. *Nature Eeviews Microbiology*, 7(2): 144-155.

Clinton, S. K., Palmer, S. S., Spriggs, C. E., Visek, W. J. 1988. Growth of Dunning transplantable prostate adenocarcinomas in rats fed diets with various fat contents. *Journal of Nutrition*, 118(7): 908-914.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. 2003. Oxidative DNA damage: Mechanism, mutation and disease. *FASEB Journal*, 17(10): 1195 214.

Coşkun-Arı, F.F. 2003. Western Blotlama Yöntemi ile Protein Tespiti: Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kurs Kitabı, Isparta Türkiye, 189-198.

Dasari, S., Tchounwou, P. B. 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740: 364-378.

Dash, P. 2007. Apoptosis. http:/www.sgul.ac.uk/depts/immunology/dash/apoptosis (Erişim tarihi:12 Mayıs 2013).

Dekernion, J. B. 2005. Reexamination of current staging for renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*, 173(3): 680-680.

Desantis, C., Siegel, R., Bandi, P., Jemal, A. 2011. Breast cancer statistics, 2011. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(6): 408-418.

Dexter, S.J., Camara, M., Davies, M., Shakesheff, K.M. 2003. Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomaterials Journal*, 24: 27–34.

Dickens, L. S., Boyd, R. S., Jukes-Jones, R., Hughes, M. A., Robinson, G. L., Fairall, L., MacFarlane, M. 2012. A death effector domain chain DISC model reveals

a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. *Molecular Cell*, 47(2): 291-305.

Divsalar, A., Saboury, A.A., Mansoori-Torshizi, H., Ahmad, F. (2010). " Design, synthesis, and biological evaluation of a new palladium(II) complex: beta-lactoglobulin and K562 as targets", J Phys Chem B., 114(10), 3639-47.

Divsalar, A., Saboury, A.A., Mansoori-Torshizi, H., Ahmad, F. 2010. "Design, synthesis, and biological evaluation of a new palladium(II) complex: beta-lactoglobulin and K562 as targets," *The Journal of Physical Chemistry B*, 114: 3639–3647.

Divsalar, A., Saboury, A.A., Yousefi, R., Moosavi-Movahedi, A.A.ve Mansoori-Torshizi, H. 2007. "Spectroscopic and cytotoxic studies of the novel designed palladium(II) complexes: β-Lactoglobulin and K562 as the targets," *International Journal of Biological Macromolecules*, 40: 381–386.

Doran, W. J. 1959. Medicinal Chemistry. Barbituric Acid Hypnotics, John Wiley and Sons, New York, 5.

Dumont, M., Beal, M. F. 2011. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5): 1014-1026.

Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T. V., Vandenabeele, P. 2009. Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection*, 11(13): 1050-1062.

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

Evan, G. I., Vousden, K. H. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411(6835): 342-348.

Fadeel, B., Gleiss, B., Högstrand, K., Chandra, J., Wiedmer, T., Sims, P. J., ve ark. 1999. Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266(2): 504-511.

Faivre, S., Chan, D., Salinas, R., Woynarowska, B., Woynarowski, J. M. 2003. DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 66(2): 225-237.

Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S., Liang, J. 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11): 719-727.

Ferraz, K. O., Cardoso, G. M., Bertollo, C. M., Souza-Fagundes, E. M., Speziali, N., Zani, C. L., ve ark. (2011). N (4)-tolyl-2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their palladium (II) and platinum (II) complexes: cytotoxicity against human solid tumor cells. Polyhedron, 30(2), 315-321.

Ferraz, K. O., Cardoso, G. M., Bertollo, C. M., Souza-Fagundes, E. M., Speziali, N., Zani, C. L., Beraldo, H. 2011. N (4)-tolyl-2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their palladium (II) and platinum (II) complexes: Cytotoxicity against human solid tumor cells. *Polyhedron*, 30(2): 315-321.

Ferraz, K. S., Ferandes, L., Carrilho, D., Pinto, M. C., de Fátima Leite, M., Souza–Fagundes, E. M., ve ark. (2009). 2-Benzoylpyridine-N (4)-tolyl thiosemicarbazones and their palladium (II) complexes: cytotoxicity against leukemia cells. Bioorganic & medicinal chemistry, 17(20), 7138-7144.

Ferraz, K. S., Ferandes, L., Carrilho, D., Pinto, M. C., de Fátima Leite, M., Souza Fagundes, E. M., ve ark. 2009. 2-Benzoylpyridine-N (4)-tolyl thiosemicarbazones and their palladium (II) complexes: cytotoxicity against leukemia cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(20): 7138-7144.

Finkel E. 2001. The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science*. 292: 624-626.

Florea, A. M., & Büsselberg, D. (2011). Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. Cancers, 3(1), 1351-1371.

Fornari, F. A., Randolph, J. K., Yalowich, J. C., Ritke, M. K., Gewirtz, D. A. 1994. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Molecular Pharmacology*, 45(4): 649-656.

Fuentes-Prior, P.,Salvesen, G. S. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochemical Journal*, 384(2): 201-232.

Fulda, S., Debatin, K. M. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34): 4798-4811.

Galanski, M., Jakupec, M. A., & Keppler, B. K. (2005). Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: novel design strategies and innovative analytical approaches. Current medicinal chemistry, 12(18), 2075-2094.

Garoufis, A., Hadjikakou, S. K., & Hadjiliadis, N. (2009). Palladium coordination compounds as anti-viral, anti-fungal, anti-microbial and anti-tumor agents. Coordination Chemistry Reviews, 253(9-10), 1384-1397.

Garoufis, A., Hadjikakou, S.K., Hadjiliadis N. 2009. "Palladium coordination compounds as anti-viral, anti-fungal, anti-microbial and anti-tumor agents", *Coordination Chemistry Reviews*, 253: 1384–1397.

Gewis, A. 2003. Introduction to Apoptosis. *ApoReview*, 1-26.

Ghani, N. T. A., Mansour, A. M. 2012. Novel palladium (II) and platinum (II) complexes with 1H-benzimidazol-2-ylmethyl-N-(4-bromo-phenyl)-amine: Structural studies and anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*: 47, 399-411.

Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., Adjei, A. A. 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55(3): 178-194.

Giordano, S. H., Cohen, D. S., Buzdar, A. U., Perkins, G., & Hortobagyi, G. N. (2004). Breast carcinoma in men: a population- based study. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, *101*(1), 51-57.

Guicciardi, M. E., Gores, G. J. 2009. Life and death by death receptors. *The FASEB Journal*, 23(6): 1625-1637.

Guney, E., Yilmaz, V. T., Ari, F., Buyukgungor, O., & Ulukaya, E. (2011). Synthesis, characterization, structures and cytotoxic activity of palladium (II) and platinum (II) complexes containing bis (2-pyridylmethyl) amine and saccharinate. Polyhedron, 30(1), 114-122.

Güleş Ö., Eren Ü. 2008. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 2: 73-78.

Güney, E., Kaya, Y., Yilmaz, V.T. ve Gumus, S. 2011a. "Synthesis, experimental and theoretical characterization of palladium(II) and platinum(II) saccharinate complexes with 2-(2-pyridyl)benzimidazole," *Spectrochimica Acta Part A*, 79: 1171– 1178.

Güney, E., Yilmaz, V. T., Ari, F., Buyukgungor, O., Ulukaya, E. 2011b. Synthesis, characterization, structures and cytotoxic activity of palladium (II) and platinum (II) complexes containing bis (2-pyridylmethyl) amine and saccharinate. *Polyhedron*, 30(1): 114-122.

Hammill, A. K., Uhr, J. W., Scheuermann, R. H. 1999. Annexin V staining due to loss of membrane asymmetry can be reversible and precede commitment to apoptotic death. *Experimental Cell Research*, 251(1): 16-21.

Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5): 646-674.

Harper, B. W., & Aldrich-Wright, J. R. (2015). The synthesis, characterisation and cytotoxicity of bisintercalating (2, 2′: 6′, 2″-terpyridine) platinum (ii) complexes. Dalton Transactions, 44(1), 87-96.

Howe-Grant, M., Wu, K. C., Bauer, W. R., Lippard, S. J. 1976. Binding of platinum and palladium metallointercalation reagents and antitumor drugs to closed and open DNAs. *Biochemistry*, 15(19): 4339-4346.

Icsel, C., Yilmaz, V. T., Kaya, Y., Durmus, S., Sarimahmut, M., Buyukgungor, O., Ulukaya, E. 2015. Cationic Pd (II)/Pt (II) 5, 5-diethylbarbiturate complexes with bis (2-pyridylmethyl) amine and terpyridine: Synthesis, structures, DNA/BSA interactions, intracellular distribution, cytotoxic activity and induction of apoptosis. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 152: 38-52.

Jesenberger, V., Jentsch, S. 2002. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(2): 112-121.

Karaboz, İ., Kayar, E., Akar S. 2008. Flow Sitometri ve Kullanım Alanları. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 06(2): 01-18.

Karaküçük-İyidoğan, A., Taşdemir, D., Oruç-Emre, E. E., Balzarini, J. 2011. Novel platinum (II) and palladium (II) complexes of thiosemicarbazones derived from 5-substitutedthiophene-2-carboxaldehydes and their antiviral and cytotoxic activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(11): 5616-5624.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4): 239.

Keter, F. K., Kanyanda, S., Lyantagaye, S. S., Darkwa, J., Rees, D. J. G., & Meyer, M. (2008). In vitro evaluation of dichloro-bis (pyrazole) palladium (II) and dichloro-bis (pyrazole) platinum (II) complexes as anticancer agents. Cancer chemotherapy and pharmacology, 63(1), 127-138.

Keter, F. K., Kanyanda, S., Lyantagaye, S. S., Darkwa, J., Rees, D. J. G., Meyer, M. 2008. In vitro evaluation of dichloro-bis (pyrazole) palladium (II) and dichloro-bis (pyrazole) platinum (II) complexes as anticancer agents. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63(1): 127-138.

Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. 2008. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research*, 36: 5678-5694

Koopman, G., Reutelingsperger, C. P. M., Kuijten, G. A. M., Keehnen, R. M. J., Pals, S. T., van Oers, M. H. J. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84: 1415–1420

Kuo LJ, Yang LX. 2008. Gamma-H2AX-A novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*, 22: 305-310.

Leers, M.P., Kölgen, W., Björklund, V., Bergman, T., Tribbick, G., Persson, B., Björklund, P., Ramaekers, F.C., Björklund, B., Nap, M., Jörnvall, H., Schutte, B. 1999. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *The Journal of Pathology*, 187: 567-72.

Letai, A. G. 2008. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 8(2): 121-132.

Levine, B., Sinha, S. C., Kroemer, G. 2008. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 4(5): 600-606.

Li, J., Yuan, J. 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48): 6194-6206.

Mahmood, T., Yang, P. 2012. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9): 429–434.

Mansouri-Torshizi, H., Mahboube, I., Divsalar, A., Saboury, A. A. 2008. 2, 2′-Bipyridinebutyldithiocarbamatoplatinum (II) and palladium (II) complexes: synthesis, characterization, cytotoxicity, and rich DNA-binding studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(21): 9616-9625.

Mansouri-Torshizi, H., Saedifar, M., Divsalar, A. ve Saboury, A.A. 2011.“Binding studies of a novel antitumor palladium (II) complex to calf thymus DNA,” *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 30: 405–422

Mansuri-Torshizi, H., Srivastava, T.S., Chavan, S.J. ve Chitnis, M.P. 1992.“Cytotoxicity and DNA binding studies of several platinum (II) and palladium (II) Complexes of the 2,2′-bipyridine and an anion of 2-pyridinecarboxylic/2-pyrazinecarboxylic acid,” *Journal of Inorganic Biochemistry*, 48(1): 63-70.

Matesanz, A. I., Pérez, J. M., Navarro, P., Moreno, J. M., Colacio, E., Souza, P. 1999. Synthesis and characterization of novel palladium (II) complexes of bis (thiosemicarbazone). Structure, cytotoxic activity and DNA binding of Pd (II)-benzyl bis (thiosemicarbazonate). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 76(1): 29-37.

Medeiros, B., & Allan, A. L. (2019). Molecular Mechanisms of Breast Cancer Metastasis to the Lung: Clinical and Experimental Perspectives. *International journal of molecular sciences*, *20*(9), 2272.

Mueller, H., Kassack, M.U., Wiese, M. 2004. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *Journal of Biomolecular Screening*, 9: 506–515.

Nadeem, S., Bolte, M., Ahmad, S., Fazeelat, T., Tirmizi, S. A., Rauf, M. K., ve ark. 2010. Synthesis, crystal structures and, antibacterial and antiproliferative activities in vitro of palladium (II) complexes of triphenylphosphine and thioamides. *Inorganica Chimica Acta*, 363(13): 3261-3269.

Nahleh, Z. A. 2006. Hormonal therapy for male breast cancer: a different approach for a different disease. *Cancer Treatment Reviews*, 32(2): 101-105.

Nakamura, K., Bossy-Wetzel, E., Burns, K., Fadel, M. P., Lozyk, M., Goping, S., ve ark. 2000. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 150(4): 731-740.

Nursal, A. F. Triple Negatif Meme Kanserinin Moleküler Temeli. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, *24*(2), 251-259.

Pelicano, H., Carney, D., Huang, P. 2004. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*, 7(2): 97-110.

Petrovic, D., Stojimirović, B., Petrović, B., Bugarčić, Z. M., Bugarčić, Ž. D. 2007. Studies of interactions between platinum (II) complexes and some biologically relevant molecules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(12): 4203-4211.

Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P. 2010. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *Journal of Nucleic Acid,* 1-9.

Rabik, C.A. ve Dolan, M.E. 2007. "Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents," *Cancer Treatment Reviews*, 33: 9– 23.

Rakiman I, Chinnadurai M, Baraneedharan U, FDP Solomon, Venkatachalam P. 2008. γ-H2AX assay: a technique to quantify DNA double strand breaks. *Tools & Techniques - Advanced* Biotechnology, 39-41.

Rangwala, R., R. Leone, Y. C. Chang, L. A. Fecher, L. M. Schuchter, A. Kramer, ve ark. 2014. Phase I trial of hydroxychloroquine with dose-intense temozolomide in patients with advanced solid tumors and melanoma. *Autophagy*,10:1369–1379.

Rao, R. V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Ellerby, L. M., Ellerby, H. M., ve ark. 2001. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program mechanism of caspase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36): 33869-33874.

Rau T, van Eldik, R. 1996. "In metal ions in biological systems. In: Sigel H, Sigel A (eds) Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy. *Marcel Dekker, New York*, 31: 339–378.

Reedijk, J. 2003. New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7): 3611-3616.

Ren, X., Liu, J., Hu, L., Liu, Q., Wang, D., & Ning, X. (2019). Caffeic Acid Phenethyl Ester Inhibits the Proliferation of HEp2 Cells by Regulating Stat3/Plk1 Pathway and Inducing S Phase Arrest. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, b19-00315.

Riedl, S. J., Salvesen, G. S. 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 8(5): 405-413.

Riedl, S.J., Shi, Y., 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(11): 897-907.

Robertson, J. D., Orrenius, S. 2000. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Critical Reviews in Toxicology*, 30(5): 609-627.

Silva, L. C., Ferreira-Strixino, J., Fontana, L. C., Gonsalves, A. M. D. A. R., Serra, A. C., Pineiro, M., ve ark. 2016. Molecular analysis of apoptosis pathway after

photodynamic therapy in breast cancer: Animal model study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 14: 152-158.

Sommers, C. L., Walker-Jones, D., Heckford, S. E., Worland, P., Valverius, E., Clark, R., ve ark. (1989). Vimentin rather than keratin expression in some hormone-independent breast cancer cell lines and in oncogene-transformed mammary epithelial cells. *Cancer research*, *49*(15), 4258-4263.

Starha, P., Travnicek, Z. ve Popa, I. 2009. "Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity of the first palladium(II) oxalato complexes involving adenine-based ligands," *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103: 978–988.

Szucova, L., Trávnícek, Z., Zatloukal, M., Popa, I. 2006. Novel platinum (II) and palladium (II) complexes with cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis, characterization and antitumour activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(2): 479-491.

Takahara, P. M., Frederick, C. A., Lippard, S. J. 1996. Crystal structure of the anticancer drug cisplatin bound to duplex DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 118(49): 12309-12321.

Thornberry, N. A., Lazebnik, Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 281(5381): 1312-1316.

Timmer, J. C., Salvesen, G. S. 2007. Caspase substrates. *Cell Death & Differentiation*, 14(1): 66-72.

Tušek-Božić, L., Furlani, A., Scarcia, V., De Clercq, E., & Balzarini, J. (1998). Spectroscopic and biological properties of palladium (II) complexes of ethyl 2-quinolylmethylphosphonate. Journal of inorganic biochemistry, 72(3-4), 201-210.

Ueno, T., Toi, M., Bivén, K., Bando, H., Ogawa, T., Linder, S. 2003. Measurement of an apoptotic product in the sera of breast cancer patients. *European Journal of Cancer*, 39: 769-74.

Ulukaya, E. 2001. Akciğer Kanserleri, Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar: Hücre Siklusu ve Apoptozis. Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul.

Ulukaya, E. 2003. Apoptozis ders notları. Erişim:[http://biyokimya.uludag. edu. tr/ apoptozis dersnotu. (Erişim tarihi, 2007).

Ulukaya, E., Acilan, C., Yilmaz, Y. 2011. Apoptosis: Why and how does it occur in biology? *Cell Biochemistry and Function*, 29: 468-480.

Ulukaya, E., Ari, F., Dimas, K., Ikitimur, E. I., Guney, E., & Yilmaz, V. T. (2011). Anti-cancer activity of a novel palladium (II) complex on human breast cancer cells in vitro and in vivo. European journal of medicinal chemistry, 46(10), 4957-4963.

Ulukaya, E., Ari, F., Dimas, K., Ikitimur, E. I., Guney, E., Yilmaz, V. T. 2011b. Anti-cancer activity of a novel palladium (II) complex on human breast cancer cells in vitro and in vivo. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(10): 4957-4963.

Ulukaya, E., Ari, F., Dimas, K., Sarimahmut, M., Guney, E., Sakellaridis, N., & Yilmaz, V. T. (2011). Cell death-inducing effect of novel palladium (II) and platinum (II) complexes on non-small cell lung cancer cells in vitro. Journal of cancer research and clinical oncology, 137(10), 1425-1434.

Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Yilmaztepe-Oral, A., Demirci, M. 2008. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology In Vitro*, 22: 232–239.

Van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., Reutelingsperger, C. P. 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31(1): 1-9.

Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols*, *1*(3), 1112.

Wadhawan, T., McEvoy, J., Prüβ, B.M., Khan, E. 2010. Assessing tetrazolium and ATP assays for rapid in situ viability quantification of bacterial cells entrapped in hydrogel beads. *Enzyme and Microbial Technology*, 47: 166–173.

Wang N, Feng Y, Zhu M. 2010. Berberine induces autophagic cell death and mitochondrial apoptosis in liver cancer cells: the cellular mechanism. *Journal Cell Biochemistry*, 111: 1426–1436. 2010.

Washbrook, E. (2006). Risk factors and epidemiology of breast cancer. *Women's Health Medicine*, *3*(1), 8-14.

Wheate, N. J., Brodie, C. R., Collins, J. G., Kemp, S., & Aldrich-Wright, J. R. (2007). DNA intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis. Mini reviews in medicinal chemistry, 7(6), 627-648.

Williams GM, Jeffrey AM. 2000. Oxidative DNA damage: Endogenous and chemically induced. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32 (3): 283-92.

Wilson, J. J., & Lippard, S. J. (2013). Synthetic methods for the preparation of platinum anticancer complexes. Chemical reviews, 114(8), 4470-4495.

Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R., Yan, G. 1997. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V. *Biotechniques*, 23: 525–531.

Zhang, J. H., Zhang, Y., Herman, B. 2003. Caspases, apoptosis and aging. *Ageing Research Reviews*, 2(4), 357-366.

Zhang, J., Li, L., Ma, L., Zhang, F., Zhang, Z., Wang, S. 2011. Synthesis, characterization and cytotoxicity of mixed-ligand complexes of palladium (II) with 2, 2′-biquinoline/1, 4-diaminobutane and 4-toluenesulfonyl-L-amino acid dianion. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(11): 5711-5716.

Zhu, J., Lin, M., Fan, D., Wu, Z., Chen, Y., Zhang, J. ve ark. (2009). The role of bridging ligands in determining DNA-binding ability and cross-linking patterns of dinuclear platinum (II) antitumour complexes. Dalton Transactions, (48), 10889-10895.