



**ZN(II) KOMPLEKSİNİN SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK
ETKİLERİNİN KANSER HÜCRELERİNDE
ARAŞTIRILMASI**

İmren ALİOĞLU



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ZN(II) KOMPLEKSİNİN SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN
KANSER HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI**

İmren ALIOĞLU
ID 0000-0003-0687-9362

Doç. Dr. Ferda ARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2019
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

İmren Alioğlu tarafından hazırlanan “Zn(II) kompleksinin sitotoksik ve apoptotik etkilerinin kanser hücrelerinde araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Ferda ARI
ID 0000-0002-6729-7908

Başkan: Doç. Dr. Ferda ARI
Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Egemen Dere
Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Gökçe Taner
Bursa Teknik Üniversitesi,
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü

İmza

İmza

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

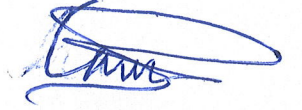
Prof. Dr. Hüseyin Abse EREN

Enstitü Müdürü

24/09/2019

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı **beyan ederim.**



24/09/2019

İmren Alioğlu

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ZN(II) KOMPLEKSİNİN SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN KANSER HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

İmren ALİOĞLU

Bursa Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ferda ARI

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile oluşan bir hastalıktır. Hücrelerin çeşitli risk faktörleri sebebiyle mutasyona uğrayıp sınırsız çoğalması ile başlayan bu süreç sonunda kanserli hücreler oluşmakta, dokulara ve organizmaya zarar vermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, kanser tedavisinde metal bazlı bileşiklerin umut verici olduğunu göstermiştir. Özellikle platin (Pt), gümüş (Ag), altın (Au) ve çinko (Zn) gibi metal kompleksleri birçok antikanser araştırmalarda kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Dolayısıyla bu tez çalışmasında, bir Zn(II) kompleksinin insan meme kanseri hücrelerinde antikanser etkileri ve bu etkilerden sorumlu mekanizmalar araştırılmıştır. Zn(II) kompleksinin insan meme kanseri hücrelerindeki anti proliferatif potansiyeli SRB canlılık testi ile belirlenmiş, hücre canlılıkları ATP canlılık testi ile doğrulanmıştır. Ayrıca kompleksin olası sitotoksik etkisi sağlıklı insan meme hücrelerinde de değerlendirilmiştir. Sitotoksik etkilerinden sorumlu olan hücre ölüm mekanizması ve apoptoz varlığını göstermek için Hoechst 33342/Propidyum İyodür ikili boyama yöntemi ve kırılmış sitokeratin-18 (M30 antijen seviyesi) yöntemi kullanılmıştır. Hücre ölümü ile ilişkili proteinlerin ekspresyon seviyeleri (B-Aktin, PARP/kırılmış PARP, COX4, DR4, Prokaspas-8/kırılmış Kaspas-8, BAX, RIP) immunoblotlama yöntemi ile gösterilmiştir. Apoptozis ile ilişkili gen ekspresyonları ise Polimeraz Zincir Reaksiyonu kullanılarak belirlenmiştir. Zn(II) kompleksinin hücre migrasyonu üzerine etkisini belirlemek amacıyla yara iyileşmesi testi uygulanmıştır. Ayrıca Zn(II) kompleksinin kanser kök hücrelerindeki sitotoksik etkisi kök hücre popülasyonunca zengin olan mamosferler üzerinde araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda, Zn(II) kompleksinin insan meme kanseri hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkiye neden olduğu sağlıklı hücrelerde ise toksik olmadığı gözlemlendi. Zn(II) kompleksinin kanser hücrelerinde apoptozisi indüklediği hem protein hem de gen düzeyinde belirlendi. Zn(II) kompleksinin kanser hücrelerinin migrasyon yeteneklerini önemli derecede engellediği gözlemlendi, ayrıca kanser kök hücrelerinde de sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, Zn(II) kompleksinin kanser tedavisinde umut verici bir ajan olarak kullanılabilmesi öngörüsüyle ileri analizlerin yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Zn(II) kompleksi, Meme Kanseri, Apoptozis, Sitotoksikite

2019, x+81 sayfa

ABSTRACT

Master's Thesis

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF ZN(II) COMPLEX IN CANCER CELLS

Imren ALIOGLU

Bursa Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ferda ARI

Cancer is a disease caused by uncontrolled proliferation of cells. This process begins with the mutation of cells due to various risk factors and unlimited proliferation. Recent studies have shown that metal-based compounds are promising in the treatment of cancer. Especially metal complexes such as platinum (Pt), silver (Ag), gold (Au) and zinc (Zn) have been used in many anticancer studies and successful results have been obtained. Therefore, the anticancer effects of a Zn(II) complex in human breast cancer cells and the mechanisms responsible for these effects were investigated in this thesis. The anti-proliferative potential of Zn(II) complex in human breast cancer cells was determined by SRB viability test. Cell viability was confirmed by ATP viability test. The possible cytotoxic effect of the complex was also evaluated in healthy human breast cells. Hoechst 33342 / Propidium Iodide dual staining method and broken cytokeratin-18 (M30 antigen level) method were used to demonstrate the presence of cell death mechanism and apoptosis responsible for cytotoxic effects. Expression levels of cell death-related proteins (B-Actin, PARP/cleaved PARP, COX4, DR4, Prokaspas-8 / cleaved Kaspas-8, BAX, RIP) were demonstrated by immunoblotting. Apoptosis-related gene expression was determined using Polymerase Chain Reaction. Wound healing test was performed to determine the effect of Zn(II) complex on cell migration. In addition, the cytotoxic effect of Zn(II) complex on cancer stem cells was investigated on mamospheres rich in stem cell population.

The results showed that Zn(II) complex caused cytotoxic effect in human breast cancer cells depending on dose and time and was not toxic in healthy cells. Zn(II) complex induces apoptosis in cancer cells was determined at both protein and gene levels. Zn(II) complex significantly inhibited the migration ability of cancer cells. Zn(II) complex also had cytotoxic activity in cancer stem cells.

When all the results were evaluated, it was concluded that further analysis should be performed with the assumption that Zn(II) complex can be used as a promising agent in the treatment of cancer.

Keywords: Zn(II) complex, Breast Cancer, Apoptosis, Cytotoxic

2019, x+81 page

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarımnda danışmanlığımı yapan, eğitimimin düzenli işleyiői için büyük bir özveri gösteren ve her konuda desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ferda ARI'ya,

Çalışmalarım süresince bana her konuda yardımcı olan, sorularımı asla yanıtsız bırakmayan, bana verdiği eğitime minettar olduğum çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Egemen Dere'ye.

Zn(II) 5-5dietilbarbitürat kompleksinin sentezini yapan ve tez çalışmamda kullanılmasına izin veren Sayın Prof. Dr. Veysel Yılmaz'a.

Tez çalışmam boyunca bilgi, deneyim ve önerilerini benimle paylaşarak bana yol göstermiş olan çalışma arkadaşım Oğuzhan Akgün'e,

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen ve hayatım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayarak her zaman yanımda olan, canım annem Semiha Alioğlu'na, her zaman bana inanıp cesaretlendiren babam Mümin Alioğlu'na, beni her zaman motive edip yaşama sevincim olan bitanecik ablam İlke Alioğlu'na, yüksek lisans döneminde bana ailemi aratmayan ve kızı gibi sahip çıkıp beni destekleyen Mümin Ekiz'e sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

İmren Alioğlu
24/09/2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	i
TEŞEKKÜR.....	i
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	iv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Kanser Oluşumu ve Gelişimi.....	4
2.3. Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	5
2.4. Meme Kanseri.....	7
2.5. Apoptozis.....	10
2.6. Apoptozis ve Nekrozis.....	12
2.7. Apoptoziste Mitokondri, Bcl-2 ve Kaspazlar.....	14
2.8. Apoptozisin İndüklenmesi.....	16
2.9. Kanser Gelişiminde Kök Hücrelerin Rolü.....	18
2.9.1. Kök Hücre.....	18
2.9.2. Kanser Kök Hücresi.....	21
2.10. Metal Bazlı Bileşikler.....	23
2.10.1. Çinko (Zn) (II) Bileşiklerin Kanser Tedavisindeki Yeri.....	24
2.10.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Zn(II) 5,5-dietilbarbitürat Bileşiğinin Biyokimyasal Yapısı.....	26
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	27
3.1. MATERYAL.....	27
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	27
3.1.2. Kullanılan Saf Malzemeler.....	28
3.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	28
3.2. YÖNTEM.....	30
3.2.1. Zn(II) Kompleksinin Hazırlanması.....	30
3.2.2. Hücre Kültürü.....	30
3.2.2.1. Hücre Soylarının Stoktan Çıkarılması.....	30
3.2.2.2. Hücre Soylarının Pasajlanması.....	31
3.2.2.3. Hücre Soylarının Stoklanması.....	31
3.2.2.4. Kullanılan Besiyerin Hazırlanması.....	32
3.2.3. SRB (Sülforodamin B) Metodu.....	32
3.2.4. ATP (Adenozin trifosfat) Canlılık Metodu.....	34
3.2.5. Kaspazla Kırılmış Sitokeratin-18 (M30 Antigen) Metodu.....	36
3.2.6. Hoechst 33342 ve Propidiyum İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi.....	37
3.2.7. Western Blot Analizi.....	38
3.2.7.1. Protein İzolasyonu.....	40
3.2.7.2. Proteinlerin BCA Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi.....	40
3.2.7.3. Western Blot Yöntemi ile Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarılması.....	41
3.2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İşleminin Uygulama Aşamaları ve Prensipleri.....	42

3.2.9. Hücre Migrasyon (Yara İyileşmesi) Testi	46
3.2.10. İstatistiksel Analiz	47
4. BULGULAR	48
4.1. SRB Canlılık Testi Bulguları	48
4.2. ATP Canlılık Testi Bulguları	50
4.3. Sağlıklı Hücrelerde Canlılık Testi Bulguları.....	51
4.4. Floresans Mikroskobu İle Morfolojik Değerlendirme Bulguları	52
4.5. Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18 (M30) Metodu Bulguları	57
4.6. Western Blot Bulguları	58
4.7. PCR Bulguları	60
4.8. Hücre Migrasyon (Yara İyileşmesi) Testi Bulguları.....	62
4.9. Zn(II) kompleksinin İnsan Meme Kanseri Kanseri Kök Hücreleri (MCF-7s) Üzerindeki Sitotoksik Etkileri.....	63
TARTIŞMA VE SONUÇ	65
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ.....	81

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
µM	Mikromolar
%	Yüzde
oC	Santigrat Derece

Kısaltmalar	Açıklama
A549	Akciğer Kanseri Hücresi
AIF	Apoptozis indükleyici faktör
As	Arsenik
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive eden faktör
Apo-1	CD95'in aktivasyonu
ATP	Adenozin trifosfat
Au	Altın
BCA	Biçinkoninik asit
BH	Bcl-2 homoloji bölgeleri
Bi	Bizmut
BSA	Sığır serum albumin
BRCA1	Meme kanseri geni 1
BRCA2	Meme kanseri geni 2
CARD	Kaspaz alımı protein ailesi
Cd	Kadyum
CD 95	Tetra safanın 95
CK	Sitokeratin
CK18	Sitokeratin 18
COX4	Cytochrome c oxidase subunit 4
Cu	Bakır
DED	Ölüm efektör alanı
DISC	Modifiye Edilmiş Hücre Kültür Besiyeri
DMEM	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DMSO	Dimetilsulfoksit
DNA	Deoksi ribonükleik asit
DR5	Ölüm reseptörü 5
Du 145	Prostat kanser hücresi
EMT	Epidermal mezankimal dömüşümü
ER	Endoplazmik retikulum
Er	Östrojen reseptörleri
FADD	Fas ilişkili ölüm alanı
FBS	Fetal sığır serumu
Fe	Demir
Ga	Galyum
HeLa	Rahim ağzı kanser hücresi
HT29	Kolon kanser hücresi
IAP	Apoptozis inhibitörü

ICAD	Kaspazla aktive edilmiş
MCF-7	Meme kanser hücresi
MDA-MB-231	Meme kanser hücresi
MOMP	Mitokondri dış membran permeabilizasyonu
Ni	Nikel
RPMI	Rosvel Rark Enstitüsü Hücre Besiyeri
PARP	Poli(ADP-riboz)polimeraz
PBS	Fosfat tuz tamponu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Pd	Palladyum
PI	Propidyum iyodür
Pt	Platin
RNA	Ribo nükleik asit
Rh	Rodyum
ROS	Reaktif oksijen türleri
Sb	Antimon
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SRB	Sulforhodamine B
TBST-1	Tris-tamponlu salin
TCA	Trikloroasetik asit
TNF	Tümör nekrozis faktör
TRADD	TNFR1 ile ilişkili ölüm domeni proteini
TRAIL	TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand
Ti	Titanyum
V	Vanadyum
Zn	Çinko

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Diğer hastalıklara kıyasla kanser nedeniyle ölüm oranları (Anonim 2016).	3
Şekil 2.2. Normal ve kanser hücre bölünmesi (Anonim 2015)	4
Şekil 2.3. Normal dokunun kanser dokusuna dönüşümü ve metastaz (Jill 2014).....	5
Şekil 2.4. Kanser hücrelerin özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011).	6
Şekil 2.5. Türkiye kanser insidansları (Anonim 2010).	8
Şekil 2.6. Kurbağa, <i>Caenorhabditis elegans</i> ve insanlarda apoptozis (Ulukaya 2003)..	11
Şekil 2.7. Apoptozu etkileyen faktörler (Wei ve ark. 2001).	12
Şekil 2.8. Apoptotik hücre ile nekrotik hücrenin morfolojik açıdan farklılıkları (Ueda ve ark. 2007).	12
Şekil 2.9. Apoptoz ve nekroz arasında morfolojik farklılıklar (Anonim 2003).....	13
Şekil 2.10. Mitokondrinin apoptozisdeki rolü (Fennell ve Swanton 2012).	14
Şekil 2.11. Başlatıcı ve efektör kaspazlar (Forro 2012 değiştirilerek alınmıştır).	15
Şekil 2.12. Ekstrinsik ve intrinsik yolak (Carla ve ark 2016).	18
Şekil 2.14. Kök hücrelerden bir kısmı sadece bir hücreye farklılaşabilirken, bazıları tümör organizmayı oluşturabilir (Bianco ve ark. 2008).....	20
Şekil 2.15. Normal tümör gelişim modeli (A), Kanser kök hücre tümör gelişim hipotezi (B) (Bradshaw ve ark. 2016).....	22
Şekil 2.16. Zn(II) 5,5-dietilbarbitürat kompleksinin biyokimyasal yapısı (Yılmaz ve ark. 2016).	26
Şekil 3.1. Sulforhadamine B moleküler yapısı (sigmaaldrich.com).	33
Şekil 3.2. ATP elde edilme reaksiyonu (Andreotti ve ark. 1995).	35
Şekil 3.3. Sitokeratin 18'in kaspazlar aracılığıyla kesimi ve bu bölgenin M30 antikoru ile tanınmasının (Leers ve ark. 1999).....	36
Şekil 3.4. Western Blot yöntemi (Laboratory Technical Manual Western Blotting 2012).	39
Şekil 4.1. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Zn(II) kompleksinin uygulamasının doza ve zamana bağlı olarak SRB testi sonrası canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın 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.	49
Şekil 4.2. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde ATP canlılık testi sonuçları. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın 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.....	50
Şekil 4.3. MCF-10A hücrelerinde canlılık testi sonuçları. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (**:p<0,01) ifade etmektedir.....	52
Şekil 4.4. Hoechst 33342 ve PI ile MCF-7 hücrelerinin 48 saat süreyle uygulama sonuçları. * Piknotik hücreler ve kromatin kondensasyonu gösterilmektedir.	53
Şekil 4.5. Hoechst 33342 ve P.I. ile MCF-7 hücrelerinin 72 saat muamelle sonucunda alınan Floresan görüntüler. *Sarı ok: Piknotik hücreler ve kromatin kondensasyonu gösterilmektedir.....	54
Şekil 4.6. Hoechst 33342 ve PI ile MDA-MB-231 hücrelerinin 48 saat muamelle sonucunda alınan görüntüler. *Sarı ok: Piknotik hücreler ve kromatin kondensasyonu gösterilmektedir.....	55

Şekil 4.7. Hoechst 33342 ve P.I. ile MDA-MB-231 hücrelerinin 72 saat muamelle sonucunda alınan görüntüler. *Sarı ok: Piknotik hücreler ve kromatin kondensasyonu gösterilmektedir.....	56
Şekil 4.8. M30 antijen (kaspazla kırılmış sitokeratin 18) standart eğri grafiği.....	57
Şekil 4.9. M30 antijen (kaspazla kırılmış sitokeratin 18) bulguları. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (**p<0,001) ifade etmektedir.....	58
Şekil 4.10. BSA standart eğri grafiği.....	58
Şekil 4.11. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde hücre ölüm mekanizmalarında rol alan protein seviyelerinin Western Blot yöntemi ile gösterimi.....	60
Şekil 4.12. MCF-7 hücrelerinde gen ekspresyon bulguları *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*:p<0,05 **:p<0,01 ***:p<0,001) ifade etmektedir.....	61
Şekil 4.13. MDA-MB-231 hücrelerinde gen ekspresyon seviyeleri bulguları *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*:p<0,05 **:p<0,01 ***:p<0,001) ifade etmektedir.....	62
Şekil 4.14. Zn(II) kompleksinin (50µM) MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde migrasyon yeteneği üzerindeki etkisi.....	63
Şekil 4. 15. Hücrelerin sfer oluşumu ve mikroskop görüntüleri.....	64
Şekil 4.16. Meme kanseri kanser kök hücrelerinde ATP canlılık testi sonuçları. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın 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.....	64
Şekil 4.1. Zn(II) kompleksinin MCF-7 hücre soyları üzerindeki sitotoksik etki mekanizması.....	71
Şekil 4.2. Zn(II) kompleksinin MDA-MB-231 hücre soyları üzerindeki sitotoksik etki mekanizması.....	72

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 1. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının özellikleri.....	30
Çizelge 2. RT-PCR siklus programı.....	46
Çizelge 3. Zn(II) kompleksi uygulanan hücre soylarında SRB canlılık testi sonuçlarına göre IC ₅₀ ve IC ₉₀ değerleri.....	48
Çizelge 4. Zn(II) kompleksi uygulanan hücre soylarında ATP canlılık testi sonuçlarına göre IC ₅₀ ve IC ₉₀ değerleri.....	50



1. GİRİŞ

Günümüzde en önemli sağlık sorunlarından biri olan meme kanseri kadınlarda görülen kanser türleri arasında ilk sırada bulunmaktadır. Meme kanseri yavaş bir gelişme hızı göstermektedir. Tanısı erken konulduğunda başarılı tedavi sonuçları elde edilmesi mümkün olup ölüm oranı azaltılabilmektedir (Baltzell ve Wrensch 2005). Meme kanserinin oluşumunda genetik, hormonal, sosyobiyojik ve psikolojik etkenlerin rol aldığı kabul edilmekle birlikte, meme kanserli kadınların yaklaşık %70-80'inde bu risk faktörleri görülmeyebilmektedir. Meme kanserli hastalarda gözlenen gen mutasyonlarının kanserin ortaya çıkışı ve gelişimi ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Biglia ve ark. 2004). Özellikle BRCA1 ve BRCA2 genlerinde gözlenen mutasyonlar kalıtsal yatkınlıkta büyük öneme sahip olup, kalıtsal meme kanserli hastalarda en sık rastlanan gen mutasyonlarıdır (Pelengaris ve ark. 2006). Kanser tedavisinde var olan imkanlar dışında daha etkin tedavinin nasıl sağlanacağı halen araştırma konusudur. Kanser tanısı konulan hastaların tedavilerinde cerrahi, kemoterapi, radyoterapi gibi yöntemler sıklıkla kullanılmakla birlikte, tam olarak başarı elde edilememektedir. Kemoterapi, tedavi yöntemleri içerisinde ilk başvuru olan yöntem olarak bilinmesine rağmen yine de yetersiz kalmakta bu nedenle birçok kanser türünde etkin bir tedavi sağlanamamaktadır (Desoize 2004). Kemoterapide uygulanan antikanser ilaçlarla kanser hücrelerini yok etmek hedeflenmektedir. Kemoterapi ilaçları hücrelerin büyümesini kontrol altına almak için kullanılmasına rağmen, sağlıklı hücrelere de zarar verebilmektedirler (Bruce ve ark. 2005). Bu nedenle kanser tedavisinde etkili yeni ilaç araştırmaları halen devam etmektedir. Bu amaçla birçok organik molekülün yanı sıra geçiş metal komplekslerinin de kullanıldığı bilinmektedir. Metaller ve metal bileşikler, geçmişten günümüze kadar ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu metaller arasında arsenik (As), antimon (Sb), bizmut (Bi), altın (Au), vanadyum (V), demir (Fe), rodyum (Rh), titanyum (Ti), galyum (Ga), platin (Pt), palladyum (Pd) ve çinko (Zn) metalleri bulunmaktadır (Desoize 2004). Yapılan bir çalışmada Zn(II) kompleksinin MCF-7 hücrelerinde apoptozu uyardığı, hücre döngüsünün G1 fazından hücre popülasyonunun birikmesine yol açtığı, DNA fragmantasyonu ve nükleer yoğunlaşma oluşturduğu bulunmuştur (Shenggui ve ark. 2013). Zn(II) ve Kadmiyum (Cd(II)) komplekslerinin biyolojik aktivitesi incelenmiş olan bir çalışmada lösemi (CEM-SS) ve kolon kanseri

(HT-29) hücre soylarında doza ve zamana bağılı olarak sitotoksik etki oluştuğı ve antioksidan aktivitesinde artış gözlemlendiğı bildirilmiştir (Taraftera ve ark. 2001).

Pek çok çalışmada farklı yapıdaki Zn(II) komplekslerinin kanser hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiğı ve apoptozisi uyardığı belirtilmektedir. Morfolojik ve biyokimyasal değışiklikler nedeniyle oluşan ve fiziksel bir süreç olan apoptozis, proliferasyon, değışim ve matürasyon süreçleri ile kanser hücrelerin organizmadan uzaklaşımaya yolaklarından birini oluşturmakta ve kanser çalışmalarında hedef olarak kullanılmaktadır (Taraftera ve ark. 2001).

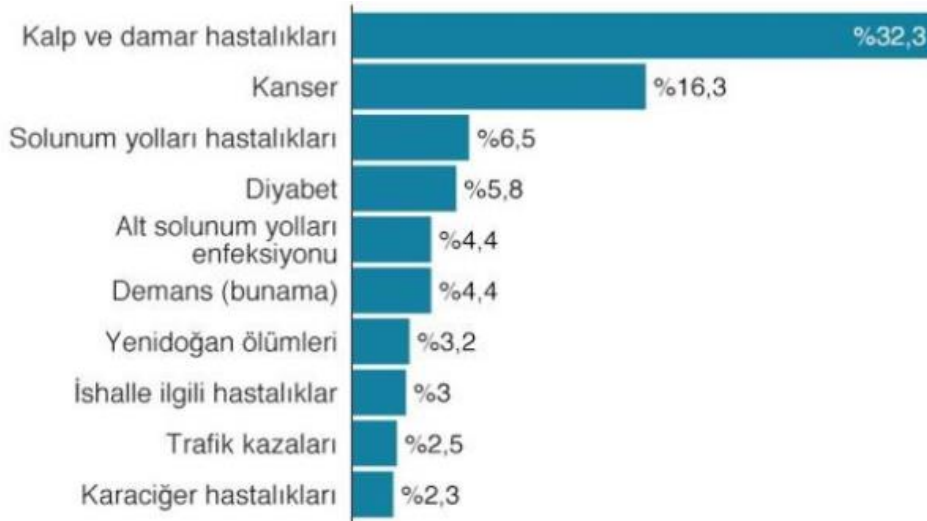
Zn(II) 5,5-dietilbarbitürat kompleksinin de içinde bulunduğı farklı komplekslerin anti kanser aktivitesinin taranması daha önce grubumuz tarafından meme (MCF-7), akciğer (A549), prostat (Du145) ve kolon (HT29) hücrelerinde yapılmıştır. Zn(II) 5,5-dietilbarbitürat kompleksinin diğer komplekslere kıyasla yüksek sitotoksik etki gösterdiğı belirlenmiştir (Yılmaz ve ark. 2016).

Elde edilen bilgiler doğrutusunda mevcut tez çalışmasında, Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü tarafından sentezlenmiş Zn(II) 5,5-dietilbarbitürat kompleksinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soyları üzerindeki olası sitotoksik ve apoptotik etkilerini ve sorumlu mekanizmalarını araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Kanser

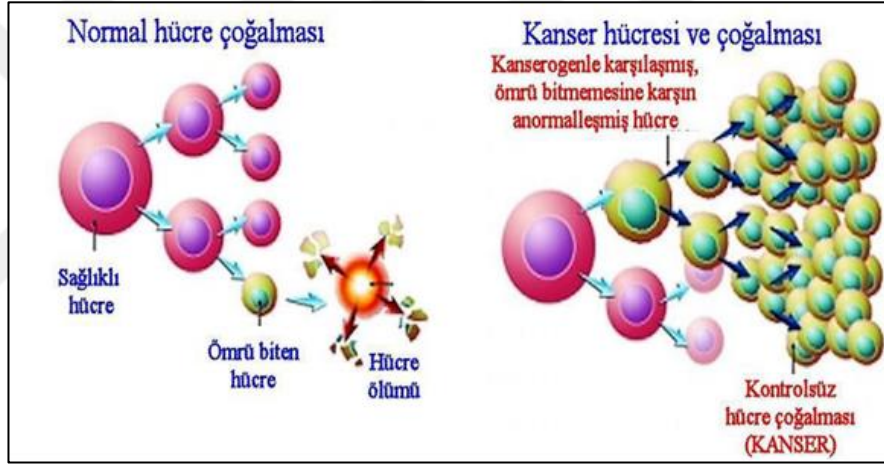
Latince'de 'yengeç' anlamına gelen kanser, bugün en yaygın hastalıklarından birisidir. Çağımızda her beş kişiden biri, hayatımızın herhangi döneminde kanser ile karşılaşmaktadır. Halen tüm yeni tedavi yaklaşımlarına rağmen kanserden ölümler gelişmiş toplumlarda ikinci sırada yer almaktadır (Harris ve ark. 1993). Kanser tanısı konulan hastaların tedavilerinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi mevcut yöntemlere rağmen yüksek oranda başarılı sonuçlar elde edilememektedir. Günümüzde uygulanan kemoterapi tedavilerinde sitotoksikite yüksek oranda görünmektedir ve yan etkilere neden olabilmektedir (Tuncer 2009). Kanser ve kanser nedeni ölümlerin her geçen gün artış göstermesi günümüz dünyasının en önemli problemlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır (Parkin ve ark. 2005). Ülkemizde de benzer bir şekilde kanser hastalığı sonucunda ölüm oranı, kalp ve damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır (Şekil 2.1) (Jemal ve ark. 2010). Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın yapmış oldukları tahminlere göre 2030 yılında 27 milyon insan kansere yakalanacak, 17 milyon insan ise aynı yıl kanser nedeniyle hayatlarını kaybedecektir (Tuncer 2009). Amerika'da ise ikinci ölüm sebebinin kanser olduğu belirtilmiş hayatları boyunca erkeklerin yarısında ve kadınların üçte birinde kanser hastalığının görülebileceği ifade edilmiştir (Jemal ve ark. 2010).



Şekil 2.1. Diğer hastalıklara kıyasla kanser nedeniyle ölüm oranları (Anonim 2016).

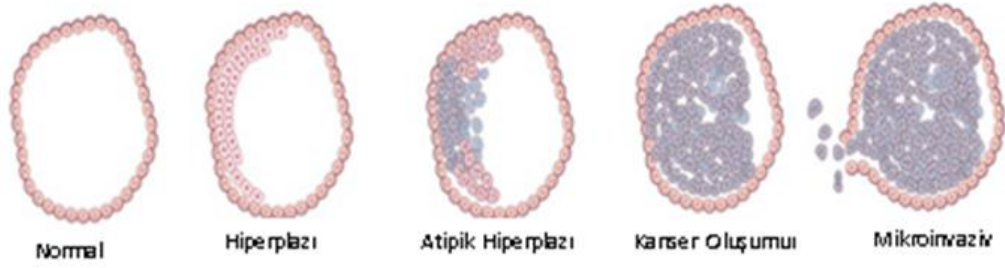
2.2. Kanser Oluşumu ve Gelişimi

Karsinogenez üç basamaktan oluşmaktadır. Bunların ilki başlangıç evresi, ikincisi artma ve son olarak ta ilerleme evresidir (Dalay 2006). Kanser gelişme evresi, başlangıç evresinin tam aksine, zamanla ve yavaş bir şekilde ilerleyen bir süreçtir. Hücre içerisinde tümöre neden olan ajana hücrenin daha uzun süre maruz kalması ile gelişebilmektedir. Bu esnadaki zaman dilimi, kanser oluşumundaki kısmen geri dönüşümlü evredir. Tümör hücresi gelişme evresinde çoğalarak yayılmaktadır ve klonal hücreler belli bir alanda bir araya gelmektedir. Tümör gelişimini klonal hücrelerin çoğalması izlemekte ve bu aşamada hücre bölünme süreci belirli bir sınırdan sonra kontrolden çıkmaktadır (Pelengaris ve ark. 2006), (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Normal ve kanser hücre bölünmesi (Anonim 2015) .

Tümör gelişiminden sonraki aşama ilerleme aşamasıdır. Bu aşamanın da geri dönüşümü olmamaktadır (Pelengaris ve ark. 2006). Başlangıçta başlatıcı ajan tek bir hücrede DNA'yı mutasyona uğratarak, hücrenin kontrolsüz şekilde çoğalmasını uyarabilmektedir. Sonrasında proliferasyonu sağlayan promotör etkenler devreye girerek DNA üzerinde mutasyonlara neden olabilmektedir. DNA üzerinde oluşan değişimler genetik aynı zamanda bir o kadar da epigenetik değişimlerdir (Dalay 2006, Pelengaris ve ark. 2006). Hücreler bu değişimi gerçekleştirdikten sonra hızla çoğalma ve metastaz oluşturma özellikleri ile tamamen malign (kötü huylu) hale dönüşebilmektedirler (Şekil 2.3).



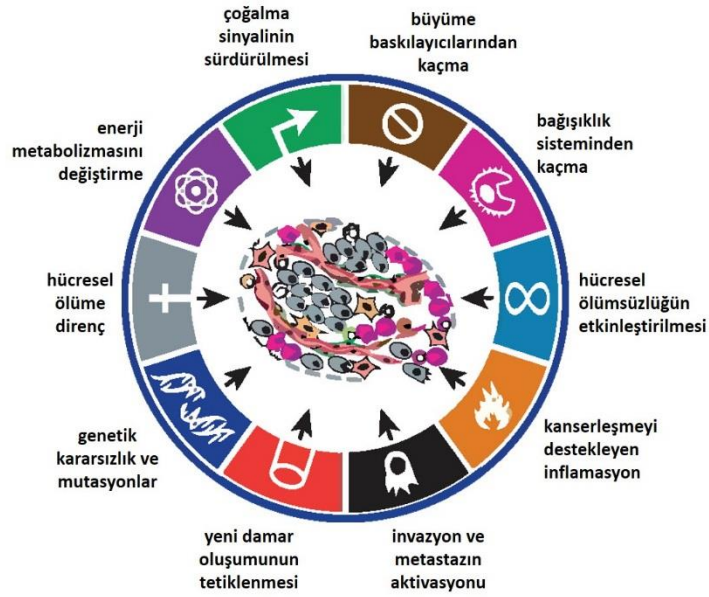
Şekil 2.3. Normal dokunun kanser dokusuna dönüşümü ve metastaz (Jill 2014).

Çoğalma hızları artmış ve sınırsız bölünme yeteneğine sahip olan hücreler bulunduğu bölgenin çevresindeki dokulara yayılmaya başlarlar (invazyon). Aynı zamanda kan ve lenf dolaşımına katılarak daha uzak bölgelere ulaşır farklı tümör dokuları oluşturabilirler (metastaz) (Dalay 2006, Penur 2013).

2.3. Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Tümör hücreleri, hücrelerin proliferatif (büyüme) sinyallerinin sürekliliği, büyüme baskılayıcı sinyallere duyarsız olması, invazyon ve metastaz aktivasyonu, sınırsız bölünme yeteneğinin etkinleştirilmesi, anjiogenezin (yeni kan damarlarının yapımı) indüklenmesi, bağışıklık savunmasından kaçınma, tümör oluşumunu destekleme, gen kararsızlığı oluşturma (mutasyon), hücresel enerjinin deregülasyonu ve hücre ölümüne karşı direnç gibi fenotipik özelliklere sahiptir (Şekil 2.4.), (Hanahan ve Weinberg 2011).

Kanserin 10 Temel Özelliği



Şekil 2.4. Kanser hücrelerin özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011).

Kanser hücrelerinin özelliklerini normal hücreler ile karşılaştırırsak, normal hücreler hücre hücre kontaklarına bağlı inhibisyonla etkilenirken, kanser hücreleri tam aksine etkilenmezler ve kontrolsüz büyümeye devam ederler. Normal hücreler büyümeleri için sinyal faktörlerine ihtiyaç duyarken, kanser hücreleri kendi büyüme faktörlerini oluşturabilir ve otokrin çoğalma sağlayabilirler. Tümör baskılayıcı genler, onkogenler ve DNA tamirinde rol oynayan kritik genlerdeki mutasyonlarla oluşan genetik değişiklik kanser hücrelerinde farklılaşmaya neden olmaktadır. Bu bahsedilen fonksiyonel yetenekler kanser hücrelerinin hayatta kalmasına, çoğalmasına ve yayılmasına olanak sağlamaktadır (Dalay 2006). Normal hücrelerin bölünme sayısı sınırlıyken kanser hücrelerinin ise sınırsız olarak tanımlanmaktadır. Kanser hücrelerinin bu özelliği immortalite olarak adlandırılır. İmmortalite mekanizmalarından biri kromozom uçları olan telomerlerdir. Sahip oldukları yüksek telomeraz enzim aktivitesi sayesinde kanser hücreleri, sınırsız çoğalma yeteneği gösterirler (Pelengaris ve ark. 2006). Kanser hücrelerinin membrana tutunma yetenekleri normal hücrelerden daha düşüktür ve tutunamadıkları için kanser hücrelerinin metastaz yapma yetenekleri artmaktadır. Normal hücreler, hücre-hücre temaslarında hareket ve çoğalma yeteneklerini kaybederler fakat kanser hücreleri hareket etmeye ve çoğalmaya devam

ederler. Bu özellik sayesinde birbirleri üzerine çıkararak çok katmanlı yapılar oluşturabilirler (Dalay 2006, Pelengaris ve ark. 2006). Normal hücreler, bölünme aşamasında G0 (durgun faz) fazından aktif proliferatif faza ilerlemeden önce mitotik büyüme sinyali ihtiyaç duyarlar. Bahsedilen bu büyüme sinyallerinin özeliği olarak adlandırılır. Kanser hücreleri ise normal hücrelerin aksine proliferatif faza ilerlemek için büyüme faktörlerine ihtiyaç duymazlar. Kanser hücrelerinde büyüme sinyali özelliğini nasıl kazanacağını açıklamaya yönelik üç moleküler stratejisi önerilmiştir. Bunlar, hücre dışından gelen büyüme sinyallerinde değişiklikler, bu sinyallerin transellüler iletimi ya da intrasellüler yollar üzerinden eyleme dönüştürülmesi olarak sıralanmaktadır (Zheng 2012, Pages ve ark. 2010). Kanser hücreleri yeteri kadar besin ve oksijeni karşılayamadıklarında, yeni kapiller oluşturacak olan büyüme faktörleri salgırlar ve yeni kan damarlarının oluşmasını (angiogenez) sağlarlar (Jones ve Thompson 2009, Abercrombie ve Ambrose 1962). Bu özellik ve salgıladıkları proteazlar sayesinde kanser hücreleri komşu dokuları parçalayarak metastaz yeteneklerini kazanmaktadırlar (Abercrombie ve Ambrose 1962).

2.4. Meme Kanseri

Meme kanseri, meme dokularındaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde hücre bölünmesi ve büyümesiyle oluşan ve dünyada akciğer kanserinden sonra en sık görülen kanser tipidir (Guarneri ve Conte 2004). Meme kanseri, dünyada yıllık 1 milyon yeni tanı ve yaklaşık 373.000 ölüm vakasıyla kadınlarda görülen en önemli kanser nedenleri arasındadır. Kadınlarda yaşam boyu gelişme riski 1/12 ile 1/20 arasında değişmektedir (Jeune ve ark. 2005). Türkiye’de meme kanseri insidansı 100 binde 43 olup yılda yaklaşık olarak 15.000 kadında meme kanseri tanısı konulmaktadır (Türkiye Kanser Kontrol Planı 2018). 2017 yılında Türkiye Kanser İstatistiği (TÜİK) verilerine göre, kanser tanısı konulan her dört kadından biri meme kanseri olup, bu oranlarda zamanla artış olacağı düşünülmektedir (Türkiye Kanser İstatistikleri 2017). Türkiye’de en sık rastlanılan kanserler içinde ikinci sırada meme kanserinin olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.5.), (Özmen 2013). Ülkemizde meme kanseri yaş dağılımı incelendiğinde, vakaların % 42,5’inin 15-49 yaşları arasında olduğu görülmektedir. İnsidans hızları 35-39 yaş grubunda 50,8 (100000 kişide kaba hız), 40- 44 yaş grubunda 81,1 (100000 kişide kaba hız) ve 45-49 yaş grubunda 109,1 (100000 kişide kaba hız) olarak gözlenmektedir

(Türkiye Kanser İstatistikleri 2014). Türkiye'nin batısında meme kanseri görülme sıklığı, doğu bölgelerine kıyasla daha fazladır. Ülkemizin batı bölgelerinde 40-50/100.000 iken doğu bölgelerinde 20/100.000 oranında meme kanseri görüldüğü tahmin edilmektedir (Türkiye Kanser İstatistikleri 2014).



Şekil 2.5. Türkiye kanser insidansları (Anonim 2015).

Meme, farklılaşmış bir ter bezidir. Lobül adı verilen memedeki birimler birleşerek lobları oluştururlar ve bu sayede süt salgısını yapan hücreler oluşur. Meme başı, etrafında bulunan 15-20 lobdan oluşur. Lobüller süt kanalları ile birbirlerine bağlıdır ve bu lobüller süt kanalları meme başına doğru birleşirler. Meme başında 6-8 adet toplayıcı geniş duktus bulunmaktadır (Aslan ve Gurkan 2007).

Memede gelişen kötü huylu tümörlerinin önemli bir kısmı adenokarsinomlardır. Günümüzde bu tümörlerin memenin duktal-lobüler (süt kanalları-bezleri) biriminden kaynak aldığı bilinmektedir. Lobülleri meydana getiren hücrelerin kontrolsüz ve sınırsız çoğalması sonucu gelişen meme kanseri süt kanallarından kaynaklanırsa duktal karsinoma adını almaktadır. Meme kanserlerinin yaklaşık % 20'si lobüllerden, % 80'i ise lobüller ile meme ucunu birbirine bağlayan meme kanallarından köken almaktadır (Aydıntug 2003).

Tümör gelişim aşamasında, memede bulunan normal biyolojik fonksiyonlar bozulmaktadır. Var olan biyolojik fonksiyon sorunu arasında proliferatif sinyalin sürekliliği bu bozukluklardan biri olup tümör hücrelerinden büyüme faktörlerinin salgılanmasında etkili olmaktadır. Bu hücrelerin yüzeyinde bulunan reseptörler ise,

büyüme faktörleri ile etkileşime girerek fonksiyon göstermektedir. Ancak, bu reseptörlerin ekspresyon düzeylerindeki artışlar veya yapısal bozulmalar tümör hücrelerinde proliferasyonda rol oynayan sinyal yollarının kontrolsüz şekilde aktivasyonuna yol açmaktadır (Aslan ve Gurkan 2007, Aydınug 2003).

Östrojen reseptörlerinin (Er), normal meme hücrelerinin östrojen uyarısıyla büyüme sinyalinde olduğu kadar meme kanseri gelişiminde de oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Östrojenin fonksiyonunu, iki spesifik hücre içi reseptörü vasıtasıyla gerçekleştirdiği bilinmektedir. Er α ve Er β olarak adlandırılan bu reseptörler, hormon bağımlı transkripsiyon düzenleyiciler olarak bilinmektedir ve bu yönde işlev görürler. Er yolu, insan meme kanseri patofizyolojisinde kritik bir rol oynamaktadır. Özellikle meme kanseri hastalarında Er α 'nın fazla ekspresyonu, iyi anlaşılmış olan prognostik ve prediktif bir faktördür. Er β 'nin prognostik anlamı tam olarak tanımlanamamıştır (Ries ve ark. 2008, Jeune ve ark. 2005).

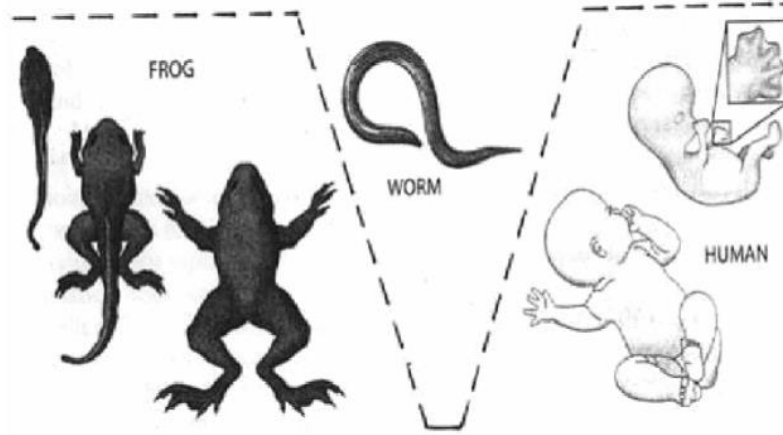
Meme kanseri gelişimine sebep olan mekanizmalar halen bilinmemektedir. Çevresel karsinojenlere maruz kalma sonrasında kazanılan mutasyonlar veya mutasyonlarla kalıtılan genetik farklılaşmalar ile tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve proto-onkogenlerin aktivasyonu sonucu apoptozis oluşum mekanizması bozulmakta ve kontrolsüz hücre çoğalması sonucunda meme kanseri gelişiminin başladığı öne sürülmektedir (Ries 2008). Risk faktörü olarak; uzun süreli ilaç alınımı, östrojen seviyelerin düzensizliği, oksidatif stres, apoptozun engellenmesi, önceden geçirilen farklı kötü huylu meme hastalıkları, erken menarş veya geç menopoz, obezite durumu, alkol kullanımı, sigara kullanımı, düşük doz radyasyon, diabetes mellitus (şeker hastalığı), ileri yaş, ilk doğumunu geç yaşta yapmış kadınlar ve pestisitlere maruz kalma gibi nedenler belirtilmiştir. Aynı zamanda çevresel ve genetik faktörler, beslenme düzeni ve hormonal durum gibi faktörler de meme kanseri gelişiminde rol oynamaktadır (Newcomb ve ark. 1994, Lambe ve ark. 1994). Meme kanseri ailesel geçiş özelliği göstermektedir. Aile geçmişinde meme kanseri vakası olan kadınların meme kanseri hastalığına yakalanma riskinin daha yüksek olduğu bilinmektedir. Bu belirlenmiş risk faktörleri, DNA hasarının artışına yol açarak kanser gelişim riskini arttırabilmektedir (McTiernan 2000, McTiernan ve ark. 2003, Biglia ve ark 2004).

2.5. Apoptozis

Hem prokaryot hem de ökaryot organizmalarda yaşam; doğum, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölüm olmak üzere belli başlı kısımlardan oluşmaktadır. Hücre ölüm tiplerinden biri olan apoptoz; 1963'te Lockshin tarafından ilk kez ipekböceği metamorfozu sırasında tanımlanıp adlandırılmıştır. Apo: ayrı, Ptoxis: düşme demektir ve terim olarak programlı hücre ölümü şeklinde ifade edilmektedir. Walther Flemming 1885'de, "chromatolysis" prosesinin tavşan ovaryumunda foliküler atrezi sırasında granüloza hücrelerinin kaybı için apoptozun sorumlu olduğunu iddia etmiştir. Aynı ölüm prosesini testiküler germ hücre dejenerasyonunda araştırmış ve gözlemlemiştir. 1983 yılında Duke ve ark. jel elektroforezi ile, apoptozda endonükleazların aktif olarak DNA kırıklarına neden olduğunu göstermişlerdir. Sonuç olarak apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtları elde edilmiştir. Bu tarihten sonra apoptoz artmıştır ve günümüze kadar devam etmiştir (Kerr ve ark.1972, Duke ve ark. 1983).

Apoptoz; yaşlanmış, gelişimi düzgün olmamış genetik olarak hasarlı hücrelerin ve güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen bir programlı hücre ölüm mekanizmasıdır (Lowe ve Lin 2000). Apoptozis insan organizmasında birçok aşamada görülmektedir. Embriyonel ve fetal gelişimde, yaşlanma sürecinde, dokuların hücre homeostazının sağlanmasında, immün tepkimelerinde koruma mekanizması olarak, hormon azalmasına bağlı involüsyonlarda ve hücrelerin herhangi bir nedenle hastalanmaları durumunda görülebilir (Lowe ve Lin 2000). Örneğin; parmak oluşumu sırasında aradaki mezenkimal hücrelerde, amfibilerin metamorfozu sırasında kuyruk hücrelerinde bağırsak gibi lümenli organların oluşumunda ve üreme organları oluşumu gibi fizyolojik olaylar sırasında görülmektedir (Şekil 2.6.), (Norbury ve Hickson 2011. Gewies 2003). Her saniye bir milyon hücrenin apoptozisle vücuttan atılmakta olduğu bilinmektedir. Atılmanın ardından ise yeni hücreler devreye girerek bu kaybı doldururlar. Bu aşama hücrelerin yapım (mitozis) ile yıkım (apoptozis) arasında kontrollü bir denge sağlar. Fakat aynı zamanda apoptozisin lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patogeneziine katkıda bulunmaktadır. Apoptozisin gereksiz yere oluştuğu veya hızlandığı hastalıklara örnek olarak AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı tip diyabet, hepatit C enfeksiyonu, miyokard enfarktüsü, ateroskleroz gibi hastalıklar verilebilirken,

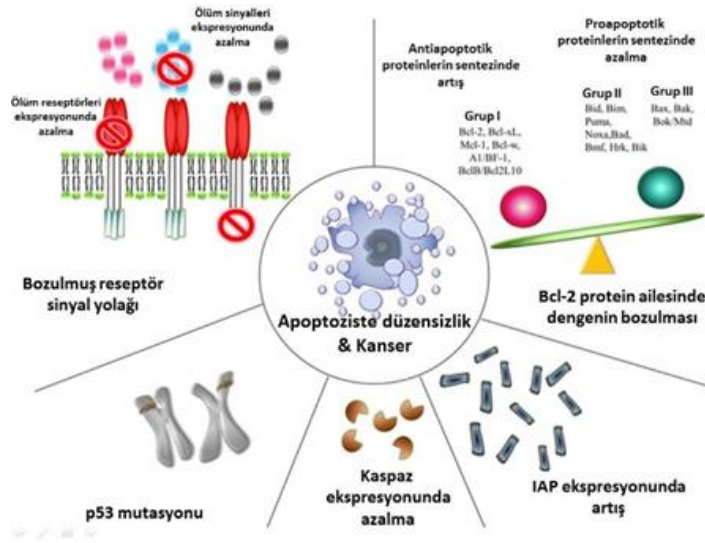
apoptozisin yavaşladığı hastalıklara örnek olarak ise otoimmün hastalıklar ve kanser verilir (Gewies 2003).



Şekil 2.6. Kurbağa, *Caenorhabditis elegans* ve insanlarda apoptozis (Ulukaya 2003).

Malign hastalıklar, kontrolsüz çoğalan hücre proliferasyonu sonucunda var olan hastalıklar olarak adlandırılmaktadır. Oysa aşırı proliferasyonun yanında azalan apoptotik ölüm hızının da malignite gelişiminde önemli rol oynadığı görülmüştür. Zamanı geldiğinde normal olarak apoptozise gidemeyen ve gereğinden fazla süre yaşayan hücreler, malign hücrelere dönüşebilme potansiyeline sahiptir (Lu ve ark. 2000).

Apoptozis birçok hastalıkta yer alır ve serbest radikal hasarı, sitokinler ve enflamatuar yaralanma tarafından tetiklenir. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) kanserde anahtar rol oynadığı ve oksidatif hasarın apoptozisin başlatılmasında etkili olduğu kanıtlanmıştır (Kannan ve Jain 2000). Son zamanlarda yapılan araştırmalarda apoptozis dengesinin bozulmasında; bozulmuş reseptör sinyal yolağı, p53 mutasyonları veya kaspazların ekspresyonlarında azalma gibi birçok sebep söz konusu olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.7.), (Lu ve ark. 2000).

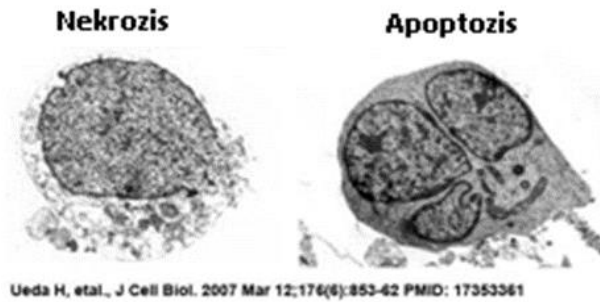


Şekil 2.7. Apoptozu etkileyen faktörler (Wei ve ark. 2001).

2.6. Apoptozis ve Nekrozis

Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik bir ölüm şekliyken, nekrozis patolojik bir ölüm şeklidir. Bu iki ölüm şeklinin işleyişlerinde önemli farklar vardır.

Apoptoz ve nekrozun yapı ve metabolik işleyişleri bakımından karakteristik farklılıkları da vardır (Rosser ve Gores 1995), (Şekil 2.8.).

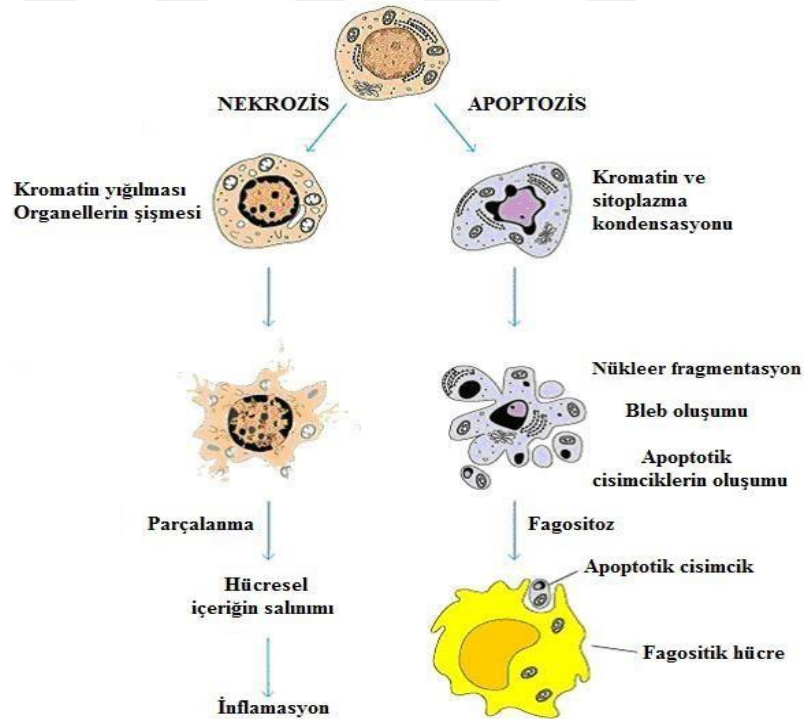


Şekil 2.8. Apoptotik hücre ile nekrotik hücrenin morfolojik açıdan farklılıkları (Ueda ve ark. 2007).

Apoptozun gerçekleşebilmesi için yüksek oranda ATP'ye ihtiyaç duyulur. Hücre içi ATP seviyesi aslında apoptoz veya nekroz ile öleceğine yön verir ve mitokondrinin önemini apoptozun erken fazında göstermektedir. Eğer hücre yüksek seviyede yaralanırsa apoptotik yol için gereken enerjiyi sağlayamayacak ve ölüm nekroz ile gerçekleşecektir. Apoptozis yolağına girmiş hücrelerin komşu hücrelerle bağları

kesilmektedir. Hücre yüzeyindeki diğer hücrelerle gerçekleştirdikleri özel bağlar kalkar ve hücre yüzeyi yuvarlak hale gelir. Yapısal değişiklik çekirdekte izlenebilmektedir. Aslında çekirdek apoptoziste odak noktasıdır. Hücreden hücreye değişmekle birlikte çekirdek büzülür. Kromatin normalden daha yoğun bir hale gelir (kondanse olur), çekirdek porları seçilemez ve çekirdek şekli düzensizleşir. Ardından ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür (fragmentasyon). Hücrede ilk olarak yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bir kısmı sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimlere dönüşür. Bu aşamada, hücre membranının iç tarafında lokalize olan fosfatidilserin, membranın dış yüzeyine transloke olur (sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunur) ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür (Cooper 1994).

Nekrotik hücrenin plazma membranı, ilk olarak bütünlüğünü kaybeder. Ardından hücre içinden dışına doğru hücre içi materyalinin çıkışı gerçekleşir. Nekrotik hücre lizise uğrar ve hücre içeriği dış ortama salınır. (Şekil 2.9.) (Erdoğan 2003, Cooper 1994).

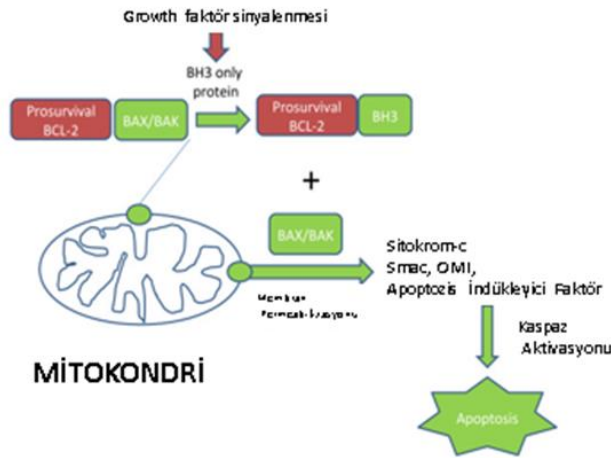


Şekil 2.9. Apoptoz ve nekroz arasında morfolojik farklılıklar (Anonim 2003)

2.7. Apoptoziste Mitokondri, Bcl-2 ve Kaspazlar

Çok hücreli organizmalarda homeostazın düzenlenmesi yeni hücrelerin proliferasyonunun kontrolünün yanı sıra istenmeyen ya da hasarlı hücrelerin de yok edilmesini gerektirir. Doku homeostazisi yani yeniden yapım ve yıkımın bir düzen içinde oluşu, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır (Hıkım ve ark. 1995, Messmer ve Pfeilschifter 2000).

Apoptozisin başlamasında ardından kesiştiği noktanın mitokondri olduğu bulunmuştur. Mitokondrinin aktivasyonu sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi apoptotik süreçte yani geri dönülemez bir noktadır. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör bcl-2 ailesidir. Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri olarak bilinmektedir. Bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle ya sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesi gerçekleşir (apoptozisin başlaması) ya da sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesi baskılanır (apoptozisin inhibisyonu) (Şekil 2.10.), (Fan ve ark. 2005).

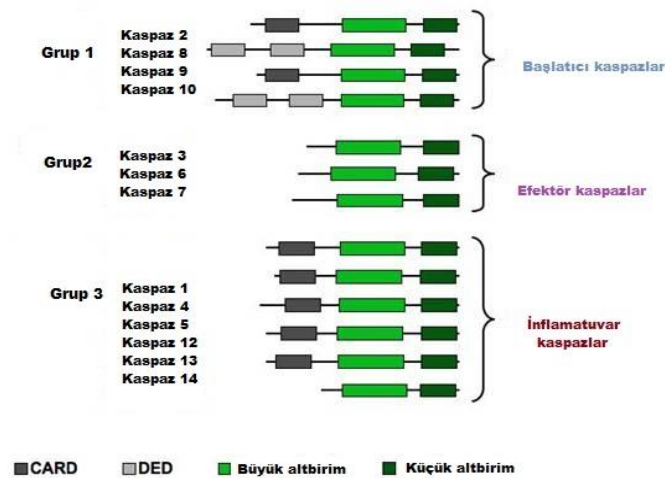


Şekil 2.10. Mitokondrinin apoptozisdeki rolü (Fennell ve Swanton 2012).

Apoptozis sürecinde anahtar rol alan olan Bcl-2 ailesi üyeleri; apoptozis düzenleyici faktörlerin grubunu oluşturmaktadır. Bcl-2 proteinlerinin bazıları anti-apoptotiktir. Mesela bunlar Bcl-2, Bcl-X1, Bcl-1 gibi ve mitokondri, endoplazmik retikulum veya nüklear membranda bulunmaktadır, bazıları ise tam tersi olarak pro-apoptotiktir. Bunlar Bax, Bcl-Xs, Bad, Bim, Bak, Bid olabilirler. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler

aralarında homo ya da heterodimerler oluştururlar. Hücrenin karakterini belirleyen bu üyelerin rölatif oranıdır. Pro-apoptotik proteinler fazla eksprese edildiğinde hücreler apoptozise daha yatkın hareket eder, anti-apoptotik proteinler daha fazla eksprese edildiğinde hücreler apoptozise daha dirençli olmaktadır (Alnemri ve ark. 1996). Pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri hücrel stres veya hasar algılayıcıları olarak çalışır ve sitozolde bulunmaktadır. Hücrel stres sonucu, anti-apoptotik proteinler bulunduğu mitokondri yüzeyine doğru yönelmektedir. Böylece pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki etkileşim oluşmaktadır. Anti-apoptotik proteinler Bcl-2 proteinlerinin normal işlevlerini bozar ve mitokondride porların oluşumuna, sitokrom-c ve diğer pro-apoptotik moleküllerin zarlar arası bölgeden açığa çıkmasına sebep olur. Sonuç olarak apoptozom oluşumu ile kaspaz kaskadı aktivasyonuna yol açar (Fan ve ark. 2005).

Kaspazlar; hedef proteinleri spesifik aspartat kalıntılarından kıran sistein proteaz ailesine aittir. Memeli hücrelerinde 14 adet kaspaz ailesi tanımlanmıştır. Tanımlanan kaspaz üyeleri zimojen (inaktif öncül) olarak bir pro-domain ve proteaz domaini içerirler. İçsel ya da dışsal uyarılarla aktifleşen kaspazlar mitokondride membran hasarı oluşturduktan sonra zar, hücre iskeleti ve çekirdek değişimine yol açan hasarlara neden olurlar. Kaspazların bazıları (2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinmektedir. Bazıları da (3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinmektedir. Başlatıcı kaspazların apoptotik uyarı ile başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletmesi ile apoptotik hücre morfolojisi meydana gelmektedir (Şekil 2.11.), (Alnemri ve ark. 1996, Cryns ve Yuan 1998)



Şekil 2.11. Başlatıcı ve efektör kaspazlar (Forro 2012 değiştirilerek alınmıştır).

2.8. Apoptozisin İndüklenmesi

Hücrelerde apoptozisin olması için hücre içi veya dışından gelen sinyal yani uyarı ile genetik mekanizmanın harekete geçmesi gerekmektedir. Dolayısıyla apoptozis hücreye dışardan gelen bir uyarı ile başlatılabilir. Örneğin, apoptozis, hücre yüzey membranında bulunan ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi ise başlatılabilir.

Apoptozis hücre içinden gelen bir uyarı ile aktifleşebilmektedir. Aktifleşme; hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, Bcl-2 ailesi, p53 geninin aktivasyonu, sitokinler, viral/bakteriyel enfeksiyonlar ve onkojenler tarafından olabilmektedir (Kumar ve ark. 2005).

Apoptozis uyarısını aktif hale getirmenin bir başka yolu ise p53'ün indüksiyonudur. Bu yolak ile indüklenen p53, bir pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyesi olan bax'ın indüksiyonuna yol açarak apoptozisi başlatır. Apoptozis aynı zamanda reaktif oksijen radikallerinin genom, plazma membranı veya mitokondri üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir. Apoptozisi başlatan bir başka neden ise, sitotoksik T lenfositlerinden salıverilen granzim B'lerin hedef kaspaz sistemini aktifleştirmesidir (Ulukaya 2003).

Apoptozisin ekstrinsik yoluyla indüklenmesi, ligandlar ve ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile başlar. Fas ve TNFR tipik ölüm reseptörleridir. Sitolitik ölüm alanı içeren iki reseptör de TNFR ailesine aittir. TNFR ailesinin tüm üyeleri spesifik bir şekilde ligandları tanıyan ve ölüm reseptörleri ile aktifleşecek sistein ekstraselüler subdomains bölgeleri içerir. Sistein aspartik asit proteazlarıdır ve apoptoz sürecinde kaspaz aktivitesini gerçekleştiren enzimlerdir. Bahsedilen enzimlerin temel görevleri reseptör-kaynaklı yolda, Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksine (DISC) başlatıcı kaspazların (kaspaz-8 ve 10) alımı yol aşamasındadır (Ulukaya 2003).

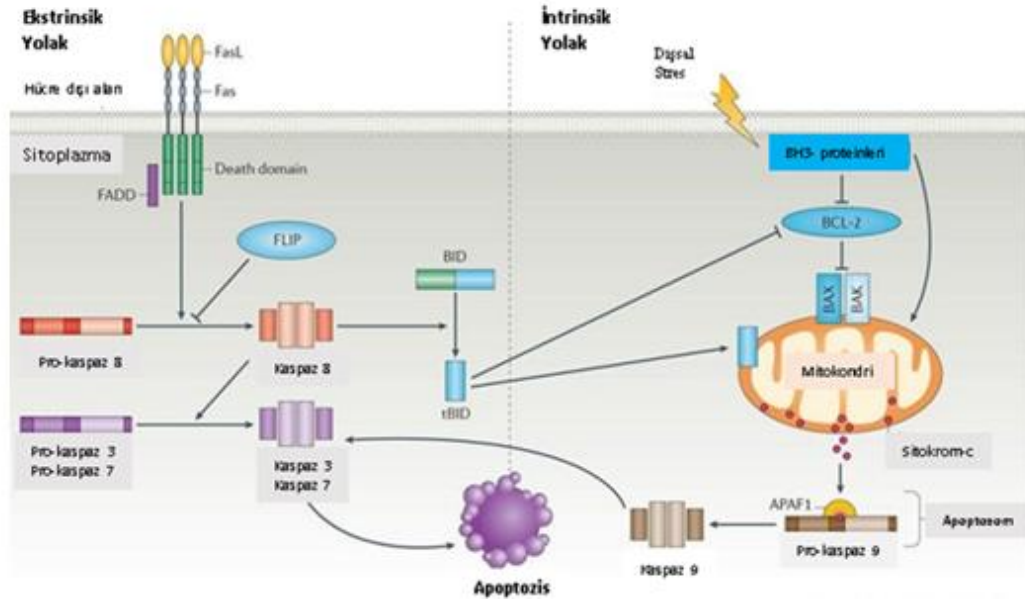
DISC, adaptör protein Fas ilişkili ölüm alanını (FADD) ve TNFR-1 ilişkili ölüm bölgesi proteinini (TRADD) içerir. Bu ölüm bölgeleri prokaspaz-8'i aktifleştirir. Aktifleşmiş kaspazlar efektör kaspazları (3, 6, 7) inaktif durumdan aktif duruma getirmesini sağlar. Böylece başlatıcı grup kaspazlar, protein-protein etkileşim motiflerini barındıran uzun bir 'prodomain' oluşturur (Cryns ve Yuan 1998).

Bu motifler, ya ölüm etkileyici alanı (DED; “death effector domain”) ya da kaspaz takviye alanıdır (CARD; “caspase recruitment domain”). Kaspazlar bu motifler sayesinde adaptör moleküllerle etkileşimlerini sağlarlar. DICS olarak adlandırılan grup aslında Fas, FasL, FADD ve pro-kaspaz-8 içeren bir komplekstir. Ölüm bölgeleri prokaspaz-8’i aktive etmektedir. 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. Aktifleşen Bip Kırılmış Bid (tBid) oluşur ve sonrasında mitokondriye geçer ve sitokrom c, SMAC (ikinci mitokondri türevli kaspaz aktivatörü) ve kalsiyum salınımını uyarır (Şekil 2.12.), (Cryns ve Yuan 1998).

İntrinsik/mitokondriyal yolak uyarıldığında, mitokondriden sitokrom-c salınımına ve böylece apoptoz oluşumuna neden olur. Her iki yolak da, düzenleyici aynı zamanda yapısal molekülleri kıran ve sonuç olarak hücrenin ölümüne sebep olan kaspaz aktivasyonunu içeren ortak bir yolda birleşir. Mitokondriyal yolun kilit olayı mitokondri dışı membran permeabilizasyonudur. Permeabilizasyon esnasında; sitokrom c, mitokondri türevli kaspaz aktivatörü/IAP bağlayıcı protein Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, apoptozis indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz D gibi mitokondri membran proteinleri sitozole salınmasıyla tamamlanır. Mitokondri içi membran yüzeyinden sitokrom c’nin sitozole salınması ile sitokrom c, sitoplazmik protein olan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1)’e bağlanır ve onu aktive eder. Böylece 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 2.12.), (Lamkanfi 2011, Ghobrial ve ark. 2005).

Apoptozomun görevi, başlatıcı kaspaz olan kaspaz 9’u aktive etmektir. Aktif kaspaz 9, kaspaz-3’ü veya diğer ilerletici kaspazları aktive ederek kaspaz kaskadına aracılık eder. 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. Fakat aktif hale geçtiğinde kromatin yoğunlaşmasına ve DNA’nın nükleozomal fragmentlere

kesilmesine neden olur. 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 2003).



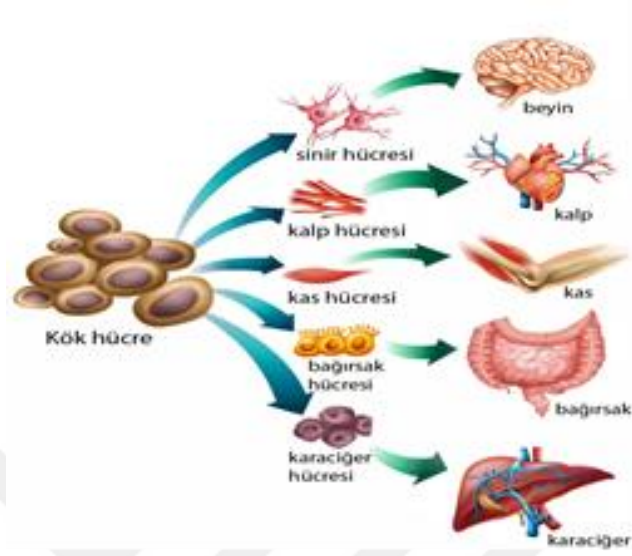
Şekil 2.12. Ekstrinsik ve intrinsik yolak (Carla ve ark. 2016).

2.9. Kanser Gelişiminde Kök Hücrelerin Rolü

2.9.1. Kök Hücre

Kök hücreler, farklı bir hücreye farklılaşması, yüksek oranda bulunan hücre türüdür. Erişkin dönemde yıllarca suskun kalabilen fakat yaralanma veya onarım durumlarında aktif hale gelebilen hücrelerdir. Kök hücreler embriyonik kök hücreler ve yetişkin tip kök hücreler olmak üzere iki ana grup olarak incelenebilirler (Razmkhah ve ark. 2011). Günümüzde, kök hücre terimi kullanımı gelişimsel biyolojide canlı bir organizmayı veya olgunlaşmış bir organizmada doku ve organları oluşturan, tamir eden ve devamlılığını sağlayan hücre grubu olarak tanımlanmaktadır. İnsan dokusu içindeki hücreler sürekli bir değişim ve yenilenme durumundadır. Olgun ve farklılaşmış hücrelerde ölüm oluşumunun ardından yerine yenileri gelir. Dokulardaki bu yenilenme olayı o dokuda bulunan bazı hücrelerin bölünmesi ve farklılaşması sonucu oluşur.

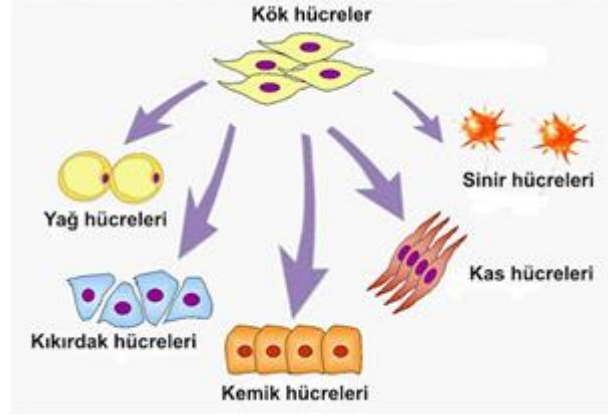
Dokularda söz edilen bu yenilenme daha uzun ömürlü ve farklılaşabilen kök hücre adı verilen hücelere bağlıdır (Rajasekhar 2014), (Şekil 2.13.).



Şekil 2.13. Kök hücreler vücudumuzdaki tüm organ ve dokuları meydana getiren farklı hücre türlerini oluşturur (Sohn 2005).

Bugün kabul edilen temel ölçüt kök hücreleri tanımlamamızda bizlere oluşum açısından yardımcı olmaktadır. Kök hücre özellikleri şu şekilde sıralanabilir:

- Kendini yenileme, kök hücreler dokularda devamlılığını sağlamak adına bölünürler ve bölünmeleri yeni kök hücrelerin oluşmasıyla sonuçlanır. Sonuçta oluşan iki hücreden biri anne kök hücreyle aynı özellikteyken diğeri bölünmelerine devam ederek farklılaşır. Farklılaşmadan kalan kök hücre dokudaki kök hücrelerin devamlılığını sağlar (Shenghui ve ark. 2009).
- Potensi kelimesi, özelleşmiş bir hücreye farklılaşabilme kapasitesini tanımlamada kullanılmaktadır. Kök hücre denecek hücre diğeri iki özellik gibi bu özelliği de gösterebilmelidir. Kök hücreler potensi özelliklerine göre bir hiyerarşi oluştururlar. Kök hücrelerden bir kısmı sadece bir hücreye farklılaşabilirken, bazıları tüm organizmayı oluşturabilir (Bianco ve ark. 2008) (Şekil 2.14).
- Klon oluşturma yeteneğine (klonalite), sahip kök hücrelerde ise bir kök hücre bölünerek kendi klonunu oluşturur. Hücreler oluşturdukları klonlarla birbirinden şekilsel ve fizyolojik farklılık gösterirler (Glauche ve ark. 2013).



Şekil 2.14. Kök hücrelerden bir kısmı sadece bir hücreye farklılaşabilirken, bazıları tümör organizmayı oluşturabilir (Bianco ve ark. 2008).

Kök hücreleri elde edildikleri kaynaklara göre veya farklılaşabilme yetkinliğine göre sınıflandırabiliriz.

Farklılaşabilme yetkinliğine göre, Totipotent, Pluripotent ve Multipotent

Elde edilebildikleri kaynaklara göre ise

1. Embriyonik kök hücreler
2. Yetişkin kök hücreleri
3. Kanseri kök hücreleri
4. Uyarılmış pluripotent kök hücreler olarak sınıflandırabiliriz (Fortier, 2005).

Totipotent kök hücreler, tüm organizmayı oluşturabilecek hücreleri tanımlamada kullanılır. Totipotent tüm organizmayı meydana getirebilecek özelliğine sahiptir. Totipotent hücre insandaki tüm hücreleri, ekstra embriyonik membranları ve plasentayı oluşturabilecek kapasiteye sahiptir (Ma 2012). Pluripotent kök hücre insanda bulunan 200 farklı hücreye farklılaşabilir. Ancak insan gelişiminde embriyo dışında kalan yapıları ve dokuları oluşturamamaktadır. Morula aşamasındaki embriyoda uterus salgılarının morulanın iç taraflarına sızmasıyla gerekse de iç tarafta bulunan hücrelerin hücreler arası alana salgılarıyla embriyonun iç kısmında blastosöl denilen bir boşluk oluşur. Bu dönemde embriyoya blastosist adı verilir. Bu aşamada blastosistin bir kutbunda yerleşmiş olan iç hücre kümesi embriyoblast, dış tarafta kalan hücreler de trofoblast olarak adlandırılır. Blastosistin iç hücre kitlesini oluşturan hücreler pluripotent özellikte olan kök hücrelerdir. Bu hücreler organizmada bulunan tüm hücrelere farklılaşabilirler. Embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent kök hücrelere embriyonik kaynaklı kök hücreler de denir (Hui ve ark. 2011).

Multipotent kök hücreler pluripotent hücrelere göre daha sınırlı bir farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerdir. Bu hücreler özelleşmiş hücrelere farklılaşabilirler. Buldukları dokunun hücrelerine farklılaşmasıyla birlikte *in vitro* olarak uygun uyaranlar sağlandığında farklı tipte hücrelere de farklılaşabilirler. Örneğin beyinde bulunan multipotent bir kök hücre nöronları ve nöroglia hücrelerini oluşturabilir. MKH'ler multipotent kök hücrelerdir (Li ve ark. 2014).

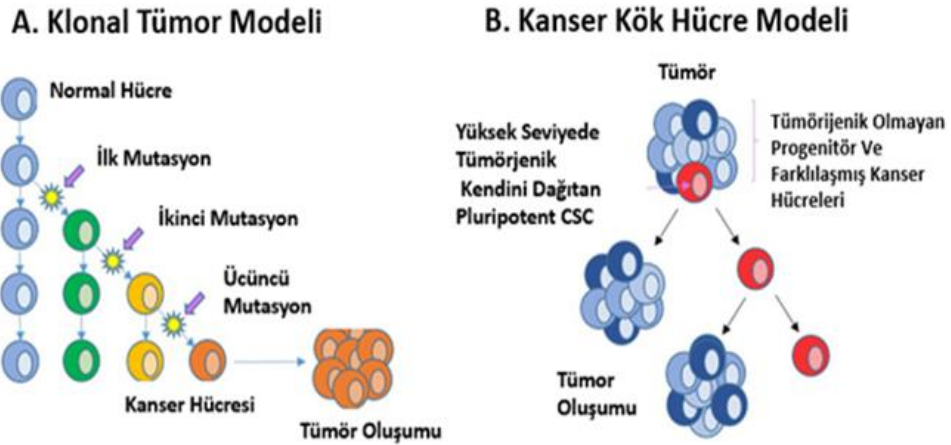
2.9.2. Kanser Kök Hücresi

Kanser kök hücreleri bazı araştırmacılara göre kanser öncülü hücrelerdir. Kanser kök hücreleri kanserin ilk olarak başlangıcından sonra büyümesine ve çevre dokulara yayılmasına kadar kanser sürecinin her aşamasında görülebilmektedir (Yu ve ark. 2012). Kanser kök hücrelerinin kaynağına bakıldığında bazı çalışmalarda bu hücrelerin aslında doku kaynaklı multipotent kök hücreler olduğu, kanserli dokuya göç ettikten sonra o çevreye uyum sağladıkları gösterilmiştir. Kanser kök hücreleri genel olarak normal kök hücrelerle aynı özellikleri gösterirler. Kanser kök hücrelerinin kanserli bir dokunun içinde yaklaşık % 0,3-2 oranında bulunduğu gösterilmiştir. Kanser kök hücreleri de uygun çevre koşulları sağlandığında farklı hücrelere farklılaşabilir, kendini yenileyebilir ve kanser dokusu oluşturabilir (Jordan ve ark. 2006).

Kanser kök hücreleri tümör aşamasının başlangıcından sorumlu olan hücrelerdir. Tümör dokusundaki çok sayıda farklılaşmış hücre topluluğunu oluşturabilmektedirler. Kanser kök hücrelerin ve normal kök hücrelerinin kendi-kendini yenileme ve/veya farklılaşmasında fonksiyonel rol oynarlar (Tuna 2009). Kanser kök hücreleri ve normal kök hücreleri aralarındaki başlıca fark; kanser kök hücrelerinde sinyal ileti sistemlerinin düzenlenmesindeki farklılıklardır. Tüm kanser kök hücrelerinin limitsiz çoğalma potansiyeli ve epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMT) sonrasında diğer organlara yayılma (metastaz) yeteneği vardır. Bu nedenle, tedavi seçenekleri için kanser kök hücrelerinin belirlenmesi ve bu hücrelerin hedeflenmesi gerekmektedir. Bugün var olan tedavi şekilleri tümör hücre topluluğunu küçültmek veya bu topluluğu öldürecek şekilde geliştirilmiştir. Kanser kök hücreleri ilaçlara karşı tümör dokusunu oluşturan hücrelerden daha dirençlidirler. Dolayısıyla, tedaviye rağmen ölmeden sessiz kalabilmektedirler. Son zamanlarda farklı tip kanserlerden elde edilen kanser kök hücrelerinin günümüzde kullanılan ilaçlara dirençlilik gösterdikleri bildirilmektedir

(Reya ve ark. 2001). Bu da kanserle mücadele etmek için kanser kök hücrelerini öldürecek daha etkili tedavilerin geliştirilmesi gerektiğini düşündürmektedir. Çünkü günümüzde bir hipotez halinde olmasına rağmen kanserin bir kök hücre hastalığı olduğu ileri sürülmektedir (Tu 2013).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, meme kanserlerinin kök hücre özelliği gösteren hücre popülasyonları tarafından geliştiğini göstermekte ve kanser kök hücre hipotezini desteklemektedir (Şekil 3). Bu hipoteze göre kök hücreler, diğer kanser kök hücrelerinin oluşumunu sağlayan kendini yenileyebilme ve tümör topluluklarını bir araya getiren hücre popülasyonlarının gelişimine yardımcı olan farklılaşma özelliklerine sahiptir. Bu nedenle tümör agresifliği, tedaviye direnç, tümörün nüksü (tekrarı) ve metastaz alanında kanser kök hücrelerin rolü çok ilgi çekmektedir ve bu ilgi zamanla artmaktadır (Reya ve ark. 2001), (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Normal tümör gelişim modeli (A), Kanser kök hücre tümör gelişim hipotezi (B) (Bradshaw ve ark. 2016).

2.10. Metal Bazlı Bileşikler

Kanser, karmaşık bir özelliğe sahip olan ve birçok gen, proteinler, sinyal yolları ile etkileşime girerek aktifleşmektedir. Bu karmaşık süreçte tedavi amaçlı başvurular ve etkin tedavi arayışı halen devam etmektedir. Son yıllarda kemoterapi, tedavi imkanları içerisinde ilk başvuru olan yol olmaktadır. Ancak kemoterapi amaçlı kullanılan ajanlar tedavi sürecinde kanserli hücrelerin yanında sağlıklı hücrelere de zarar vermektedir. Bu nedenle birçok kanser türünde etkin bir tedavi sağlanamamaktadır (Bruce ve ark. 2005). Bu nedenle kanser tedavisinde etkili yeni ilaç araştırmaları halen devam etmektedir. Bu amaçla birçok organik molekülün yanı sıra geçiş metal komplekslerinin de kullanıldığı bilinmektedir (Desoize 2004).

Au(I) ve (III) bileşikler, anti-tümör aktivitesi göstermekte birlikte yapılan araştırmalarda toksisitesi yüksek gözükmektedir. Bazı türevleri ise anti-proliferatif aktivite gösterir. Rh ve Pt aynı gruba ait olmasına rağmen farklı aktivite göstermektedir. Fakat aynı nefrotoksositeye sahiptir. Birkaç Rh bileşiği ise yapılan araştırmalarda faz I klinik denemelerine girmiştir (Desoize 2004).

İncelenen metal bileşiklerinden anti kanser aktivitesi en yüksek olanlar Pt ve Pd kompleksleri olarak bilinmektedir. Pt ve Pd gibi metal bileşiği içeren antikanser ajanların DNA'da iplikler arası çapraz bağları etkileyerek DNA kalıntılarının oluşumu ile apoptozis yollağının aktifleşmesine neden olduğu bilinmektedir (Zhu ve ark. 2009). Bu metal bileşiklerden olan Pd; antifungal, antiviral, antitümör ve antibakteriyal etkilere sahiptir. Bu yapıdaki kimyasalların suda kolay çözülebilmeleri, membranlardan kolayca geçip ve hücre içerisine DNA'ya bağlanabilmeleri, ayrıca yan etkilerinin daha az olması tedavide tercih edilmelerini sağlamaktadır (Abu-Surrah ve ark. 2008). Bugün klinikte kemoterapide kullanılan Cisplatin (diamindikloroplatin(II) kompleksi) en fazla kullanılan geçiş metali komplekslerindedir (Conklin 2004).

Günümüzde antikanser özellik gösteren birçok metal bazlı koordinasyon bileşiği sentezlenmektedir ve halen tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Metal komplekslerinin çoğu DNA'ya bağlanarak anti-tümör etkisi gösterme yeteneğine sahip olduğu, böylece kanserli hücrede DNA çoğalmasını bloke ederek, tümör hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bilinmektedir (Zhu ve ark. 2009). Metal komplekslerinin sadece DNA replikasyonunu inhibe ederek değil ayrıca apoptozisi uyararak da tümör gelişimini ve kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir. Örneğin;

yeni sentezlenen manganez (Mn) kompleksi prostat kanseri hücre soylarında (PC3, LNCAP, DU145) apoptozis indüksiyonuna neden olarak hücre canlılığını dramatik bir şekilde azalttığı gözlenmiştir (Hernroth 2018). Aynı şekilde Cu(II), Ni(II) ve Zn(II) metallerinin farklı komplekslerinin antikanser potansiyele sahip oldukları belirlenmiştir (Topkaya 2014). Zn(II) ağırlıklı metal kompleksleri de antikanser araştırmalarda kullanılmış ve çalışmalar sonucunda başarılı veriler elde edilmiştir. Yapılan bir çalışmada farklı Ni(II), Zn(II) ve Cd(II) kompleksleri sentezlenmiş ve insan meme kanseri (MCF-7 ve MDA-MB-231) hücrelerinde sitotoksik etkileri tesbit edilmiştir (Nuria ve ark. 2018). Bir başka çalışmada ise N-metil-1-fenildithiokarbamat Cu(II), Zn(II) ve Pt(II) komplekslerinin sentezi, karakterizasyonu ve antikanser çalışması sonucunda, Zn(II) kompleksinin Cu(II) ve Pt(II) kompleksine göre insan meme kanseri hücrelerinde yüksek antitümöral etki gösterdiği bildirilmiştir (Fartisinha ve Andrew 2018). Bir başka çalışmada ise Zn(II), Cd(II) ve Civa (Hg(II)) 2-aminonikotinaldehid metal komplekslerinin antimikrobiyal ve anti-kanser özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu kompleksler arasında Zn(II) kompleksinin aralarından en yüksek biyolojik aktiviteye sahip olduğu göstermiştir (Ramachary ve ark. 2018). Farklı bir çalışmada ise, Azilsartan-Zn(II) kompleksinin insan akciğer kanseri hücrelerinde (A549) sitotoksik etki görüldüğü ve apoptozise neden olduğu gösterilmiştir (Martínez ve ark. 2018). Yapılan pek çok çalışmada farklı yapıdaki Zn(II) komplekslerinin kanser hücrelerinde sitotoksik olarak apoptozisi uyardığı belirtilmektedir.

2.10.1. Çinko (Zn) (II) Bileşiklerin Kanser Tedavisindeki Yeri

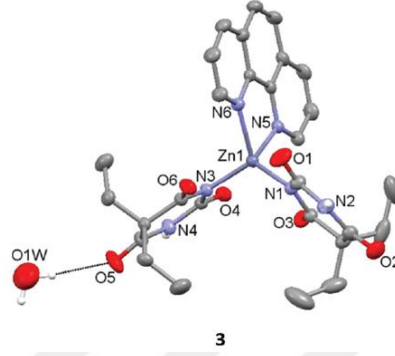
Zn periyodik çizelgenin II B grubunda yer alan ve atom numarası 30 olan kimyasal bir elementtir. Mavimsi beyaz renkte parlak; çok eskiden bu yana bilinen bir metaldir. 13. yüzyılda Hindistan'da kalaminin, yün gibi organik maddelerle indirgenmesiyle metalik olarak elde edilmiştir. 1746'da Avrupa'da Marggraf tarafından kalaminin odun kömürüyle indirgenmesiyle metalik olarak elde edilip ikinci kez keşfedilmiştir. Zn, Fe dışı metaller arasında önem ve kullanım bakımından alüminyum ve Cu'dan sonra üçüncü sırayı almaktadır (Nuria ve ark. 2018).

Zn ağırlıklı metal kompleksi olarak birçok antikanser araştırmalarda kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Yapılan bir çalışmada, bir dizi Ni(II), Zn(II) ve Cd(II) kompleksleri sentezlenmiş ve karakterizasyonları yapılmıştır. Bu komplekslerin MCF-7

ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde antikanser aktivite sahip oldukları tespit edilmiştir (Nuria ve ark. 2018). Bis (1-fenilpiperazin ditiokarbamato) Cu(II), Zn(II) ve Pt(II) kompleksi sentezlenen bir çalışmada karakterizasyonu ardından antikanser özellikleri araştırılmıştır. Çalışmada Cu(II) ve Zn(II) komplekslerinin Pt(II) kompleksine göre kanser hücre soylarında (UACC62, MCF-7 ve TK10) daha yüksek antitümöral etki bulunmuştur (Fartisinha ve Adrew 2018). Son yıllarda yapılan bir çalışmada ise Azilsartan-Zn(II) kompleksinin insan akciğer kanseri A549 hücre soylarına karşı sitotoksik etki göstermiş ve oksidatif stresi ile indüklediği belirlenmiştir. Aynı çalışmada Zn(II) kompleksinin hücrelerdeki ölüm modelinin intrinsik yolak üzerinden apoptozis ile gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Martínez ve ark. 2018). Zn(II) kompleksleri üzerinde yapılan bir araştırmada MCF-7 insan meme kanser hücre soylarına apoptozis yollağını indükleyerek sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Bir başka çalışmada ise Zn(II) kompleksinin insan karaciğer kanseri hücrelerine (HepG-2) karşı sitotoksik potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (Asadi ve Nasrollahi 2017). İnsan karsinom hücrelerine (MCF-7, EC109, SHSY5Y, QBC939) karşı Zn(II) komplekslerinin antikanser aktivitesi araştırma sonuçlarında DNA bağlanma potansiyeli ile apoptotik indüksiyon gözlenmiştir. Özellikle SHSY5Y hücrelerinde canlılığın anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir (Jin'an ve ark. 2015). Son olarak Pirolidin ditiyokarbamat Zn(II) ve Cu(II) kompleksleri tümör hücrelerinde (MDA-MB-231 ve PC-3) apoptoz yollağı üzerinde bir araştırma yapılmıştır. Elde edilen bulgularda Zn(II) kompleksinin, proteazomun inhibe edilmesinde ve apoptozun indüklenmesinde Zn(II) kompleksinin daha etkili olduğu gözlenmiştir. Ek olarak, Zn(II) ve Cu(II) komplekslerinin, tümör hücrelerini öldürmek için farklı mekanizma kullandığı görülmüştür. Zn(II) kompleksleri kalpain genini aktive etmiştir. Kalpain bilindiği üzere ubiquitinasyon ve protein katlanmasında rol oynar. Söz konusu kanser durumunda ise hipoksi ortamda hiperaktivasyon oluşturup kontrolsüz katlanma ortamı oluşturur. Ancak Zn(II) kompleksi bunu kaspaz-3'e bağlı olmayan yol ile yaptığı belirlenmiştir (Milacic ve ark. 2008).

2.10.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Zn(II) 5,5-dietilbarbitürat Bileşiğinin Biyokimyasal Yapısı

Tez çalışmasında kullanılan Zn(II) bileşiği, Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümü tarafından sentezlenmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır (Şekil 2.16.) (Yılmaz ve ark. 2016).



Şekil 2.16. Zn(II) 5,5-dietilbarbitürat kompleksinin biyokimyasal yapısı (Yılmaz ve ark. 2016).

Zn(II) kompleksinin de içinde bulunduğu farklı komplekslerin anti kanser aktivitesinin taranması daha önce grubumuz tarafından meme (MCF-7) akciğer (A549) prostat (Du145) ve kolon (HT29) hücrelerinde yapılmıştır. Birçok metal kompleks arasında Zn(II) 5,5-dietilbarbitürat kompleksi diğerlerine oranla yüksek sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur (Yılmaz ve ark. 2016). Bu yüzden kanser etki ve mekanizmalarını belirlemek üzere yüksek potansiyele sahip Zn(II) kompleksi seçilmiş ve tez çalışmasında kullanılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Fetal sığır serumu (FBS), Gibco
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin,10mg/ml streptomisin), Gibco
- Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Gibco
- Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Gibco
- 0,05% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco
- Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma
- Triton X-100, Sigma Systeme, Hamburg, Almanya
- Tripanmavisi (%0,5), Biological Industries
- Trikloroasetikasit (TCA)
- Asetik asit
- Sülforodamin B (Santa Cruz)
- Tris Baz (TBS)
- Adenozin 5-trifosfat (ATP) Biyoluminesans Kit (Sigma)
- Biçinkoninik asit Kit (Sigma-Aldrich)
- Sığır Serum Albumin (BSA, Amresco) Standard
- MES SDS Running Buffer (Nu-PAGE, 20X, Novex
- LDS Sample Buffer (Nu-PAGE, 4X, İnvitrogen)
- Sample Reducing Agent (Nu-PAGE ,10X, İnvitrogen)
- Antioksidant (Nu-PAGE,İnvitrogen)
- Kaleidoscope Prestained Standarts (Biorad)
- Bis-Tris Mini Gels (NuPAGE, 10X, İnvitrogen) 10X -TBS-T (Tris-Buffer Saline-Tween20): Tris base NaCl, (Bioshop) 80Tween20 (Dako)
- LumiGLO Reagent A (Cell Signaling)
- Peroxide Reagent B (Cell Signaling)

3.1.2. Kullanılan Saf Malzemeler

- 25 cm² ve 75 cm² lik hücre kültür kabı, Orange Scientific
- 6 kuyucuklu hücre kültür kabı, Orange Scientific
- 96 kuyucuklu hücre kültür kabı, Orange Scientific
- 5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler
- 10µl'lik pipet uçları, SSBIO
- 100µl'lik pipet uçları, Expell
- 1000µl'lik pipet uçları, Aysset
- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Orange Scientific
- Steril santrifüj tüpleri (15 ml), Nest
- Steril santrifüj tüpleri (50 ml), Nest
- Thoma lamı, Bright –Line, Hausser Scientific Horsham, PA, USA
- Kriyovial, Corning Incorporated Corning

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

- Spektrofotometre. Biotek
- Hassas terazi, Sartorius
- CO₂ inkubatore Panasonic
- Luminometre (FL×800 Mikroplate Floresans Okuyucu)
- Buharlı sterilizatör (Otoklav), Nüve OT4060, Türkiye
- Steril kabin, Fagus
- Multipipet cihazı, Multipette Axygen
- Inverted mikroskop, Euromex
- Aspiratör, Fagus
- Kuru hava sterilizatörü, Nüve
- Santrifüj, Nüve NF-800R
- 10µl, 100µl ve 1000µl'lik pipet seti, Orange Scientific
- 0,5-5ml pipet, Brand
- 10ml pipet, Eppendorf
- 5-5µl Transferpipet, Thermo Scientific
- Pipet boy, İsolab

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Zn(II) Kompleksinin Hazırlanması

Zn(II) bileşiğinin stok çözeltisi 20mM ana stok olacak şekilde dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözülerek hazırlandı. Bu çözülmüş bileşikler daha sonra 0,5ml'lik tüplere; 12µl olacak şekilde alikotlandı ve -20°C'de saklandı. Çalışmalar için gerekli seyreltmeler ise hücre besiyeri ile yapıldı.

3.2.2. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi sürecidir. MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri hücre soyları saklama kapları içerisinde -80°C dolaplarda saklandı. Meme kanser hücreleri olan MCF-7 ve MDA-MB-231 soylarının özellikleri çizelge ile verilmiştir (Çizelge 1.).

Çizelge 1. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarının özellikleri.

MDA-MB-231 Hücre Soyu:	MCF-7 Hücre Soyu:
▶ İnsan meme kanseri hücre soyu	▶ İnsan meme kanseri hücre soyu
▶ Östrojen reseptörü (-)	▶ Östrojen reseptörü (+)
▶ Epidermal growth factor (EGF) (+)	▶ E-kaderin (+)
▶ Transforming growth factor alpha (TGF alpha) (+)	▶ Kaspaz 2: (+/-), Kaspaz 3: (-)
▶ E-kaderin (-)	▶ Daha az oranda yayılabilir.
▶ Kaspaz 2: (+), Kaspaz 3: (+)	
▶ Yüksek oranda yayılabilir.	

3.2.2.1. Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması

Hücreler -80°C dolabından saklama tüplerinden alınarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. Hücre süspansiyonu; %5 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin (Gibco) içeren 5ml DMEM besiyeri içerisine alındı. Falcon tüp 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım aspire edildi ve hücre pelleti üzerine 1ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı. Falcon tüp üzerine

4ml besiyeri ilave edildi ve 5 ml'lik hücre süspansiyonu 25cm²'lik hücre kültür kapları (Thermo Scientific) içerisine alınarak 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi.

3.2.2.2. Hücre Soylarının Pasajlanması

Deneyleerde kullanılan hücre soyları, hücre kültür kaplarının yüzeyini tamamen kapladıklarında (konfluent olduklarında) hücre kültür kaplarının içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücrelerin serumdan arındırılması için 2ml 1X PBS (Gibco) ilave edildi ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra hücre kültür kabının yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0,5ml % 0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 5dk inkübe edildi. Mikroskopla bakıldığında hücre kültür kapları yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için en az iki katı kadar besiyeri ilave edildi. Hücre kültür kapları içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan (falkondaki toplam hacim tripsinin 10 katı olmalı) 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800rpm'e 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre peleti 1ml hücre besiyerinde çözüldükten sonra 9ml besiyeri ilave edildi ve 10 ml'lik hücre süspansiyonu 75cm²'lik hücre kültür kaplarına alınarak 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde hücreler istenilen sayıya gelene kadar çoğalmaları sağlandı.

3.2.2.3. Hücre Soylarının Stoklanması

Hücreler konfluent olduklarında hücre kültür kaplarının içerisindeki besiyeri aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 1X PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırıldı ve hücrelerin hücre kültür kabının yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu eklendi. Hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 5dk inkübasyona bırakıldı. Mikroskopla bakıldığında hücre kültür kaplarının yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı kadar besiyeri ilave edildi. Hücre kültür kaplarının içerisindeki hücre süspansiyonu içerisinde besiyeri bulunan 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800rpm'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve pelet üzerine her bir kriyovial için 1,5ml dondurucu medium (5ml DMSO + 5ml FBS + 40ml DMEM) karanlık ortamda

ilave edildi. Hücre süspansiyonu saklama tüplerinin içerisine dağıtılarak -80°C dolabına kaldırıldı.

3.2.2.4. Kullanılan Besiyerin Hazırlanması

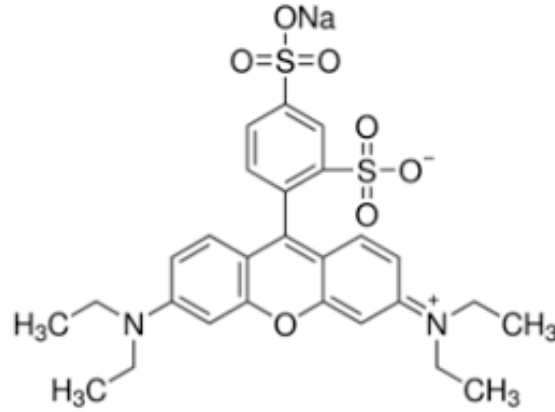
MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre soyları için kullanılan besiyeri ortamı için %5 FBS (Gibco), %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin, Gibco), %1 L-glutamin (Gibco) içeren RPMI solüsyonu kullanıldı.

3.2.2.5. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 20µl 0,5ml'lik tüpe alındı ve üzerine eşit miktarda %0,5 tripan mavisi (Biological Industries) konarak iyice karışması sağlandı. Hematositometre distile su ile iyice temizlendi. Bu karışımdan 12µl alınarak thoma lamına koyuldu ve mikroskopta lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplandı.

3.2.3. SRB (Sülforodamin B) Metodu

SRB metodu hücre kültüründe hücrelerdeki total protein ölçümüne dayanan kolorimetrik bir metoddur. Hücre kültür ortamından sitotoksitenin belirlenmesi için kullanılır. Bu metot, Amerika'da bu konularda referans merkez olarak kabul edilen NCI (National Cancer Institute)'nin çalıştığı bir yöntem olduğundan, anti-kanser ilaç araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Skehan ve ark. 1990). Sülforodamin B (SRB) bazik amino asitlere bağlanan yani proteine bağlayabilen anyonik bir boyadır (Şekil 3.1.). Bu boya Triklorik asetik asit (TCA) ile sabitlenen pH altında bazik aminoasitler ile elektrostatik bir kompleks oluşturarak hızla renk değişimi oluşturur. Oluşan renk değişimi 560 ve 580nm absorbanslar da spektrofotometre ile ölçülmektedir.



Şekil 3.1. Sulforhadamine B moleküler yapısı (sigmaaldrich.com).

Pasajlama işleminden sonra 75cm²'lik hücre kültür kaplarının içerisinde konfluent olan hücreler, hücre pasaj protokolüne uygun şekilde tripsin ile kaldırıldı. Hücre kültür kaplarının içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan (falkondaki toplam hacim tripsinin 10 katı olmalı) 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800rpm'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre peleti 1ml hücre besiyerinde çözüldükten sonra 9ml besiyeri ilave edildi ve 10ml'lik hücre süspansiyonu elde edildi. Hücreler, 96 kuyulu hücre kaplarının içerisine son hacim 200µl medium (DMEM) içinde 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Kör (negatif kontrol) için kullanılacak kuyulara ise 200µl medium eklendi. Zn(II) kompleksi çözeltisi 20mM olan stok alikotu 50µM ara stok hazırlanması için RPMI ile çözünerek hazırlandı.

SRB testi için, Zn(II) kompleksi farklı konsantrasyonları (50 µM - 0,78 µM) hücre besiyerinde hazırlanarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 100 µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde her bir kuyuya ayrı ayrı ilave edildi. Hücrelerde ölümün negatif kontrolü (maksimum canlılık, MO) olarak sadece besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı. Kör için ayrılan kuyular içerisine ise 200 µl besiyeri ilave edildi. Ardından hücreler 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalar ile 37 °C'de, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. 24, 48 ve 72 saatlik tedavi süresi sonunda hücresel proteinleri fikse etmek için her kuyuya 50µl TCA (Trikloroasetik asit) eklenerek +4°C' de 1 saat fikse edildi. TCA'nın hazırlanma koşulları ise %10 (w/v) TCA: 10 gram TCA, deiyonize su ile 100ml ye tamamlanarak %10 (w/v) Trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi elde edildi. Fiksasyon süresi tamamlandıktan sonra plate ters çevrilerek TCA döküldü. TCA'yı iyice uzaklaştırmak

için kuyular 5 kez deiyonze su ile yıkandı. Her yıkamanın sonunda 96 kuyulu kültür kaplarının ters çevrilerek döküldü.

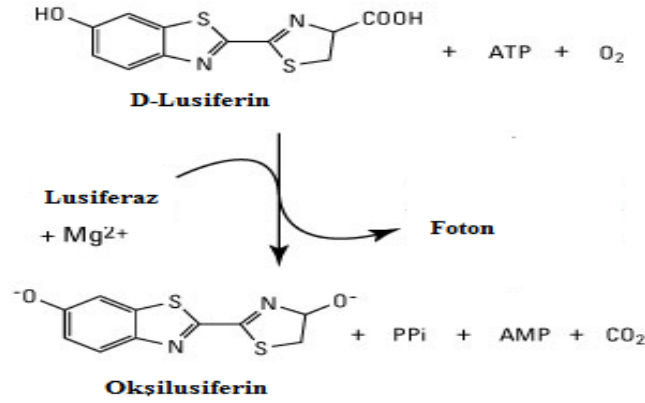
Yıkama sonunda SRB solüsyonundan her kuyuya 50µl eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. SRB boyasının kullanmak için % 0,4 w/v SRB % 1' lik asetik asit içinde hazırlanarak çözüldü.

İnkübasyon süresi sonunda SRB hücre kültür kapından dökülerek uzaklaştırıldı. Bağlanmış boyayı uzaklaştırmak için kuyular 5 kez %1'lik asetik asitle yıkandı. Yıkama sonunda hücre kültür kaplarındaki kuyular içerisinde hiç damla kalmayacak şekilde havada kurutulduktan sonra proteinlere bağlanan boyanın çözünebilmesi için 10mM tris bazı 150µl kuyu başına pipetlendi. Tris bazı hazırlamak için 10mM Tris bazından 121mg tris bazı tartıp pH 10 olacak şekilde 100ml deiyonize su ile tamamlandı. Boya solüsyonunu homojenize hale getirmek için hücre kültür kapları en az 10dk 150rpm'de shaker da inkübe edildi. Optik dansite ELISA okuyucuda 564nm'de okundu. Okunan absorbanslardan aşağıdaki formül kullanılarak hücre canlılıkları hesaplandı.

$$\% \text{ Canlılık} = 100 * \frac{\text{Bileşik ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması} - \text{Kör ortalama}}{\text{Kontrol hücre absorbansı ortalaması} - \text{Kör ortalama}}$$

3.2.4. ATP (Adenozin trifosfat) Canlılık Metodu

Adenozin trifosfat metodunda hücre kültüründe büyütülen hücrelerindeki intraselüler ATP içeriğinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. ATP seviyesi ölçümü lüminesans teknolojisi ile gerçekleştiği için canlı hücre sayısı ile bir korelasyon göstermektedir. Dolayısıyla kolorimetrik bir test olan SRB testine göre daha hassas ve güvenilirdir. ATP yöntemi; lüsiferinin Mg⁺² iyonları ve ATP varlığında lüsiferaz enzimi ile oksilüsiferine katalize olup lüminesans sinyal oluşturmasına dayanmaktadır (Şekil 3.2.) (Andreotti ve ark. 1995, Mueller ve ark. 2004).



Şekil 3.2. ATP elde edilme reaksiyonu (Andreotti ve ark. 1995).

Lüminesans sinyal (ATP konsantrasyonu) ile hücre sayısı arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (Andreotti ve ark., 1995; Mueller ve ark., 2004).

ATP testi için Zn(II) kompleksin farklı konsantrasyonları (0,78-50µM) hazırlanarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 100µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde her bir kuyuya ilave edildi. Ardından hücreler, 24, 48 ve 72 saat 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

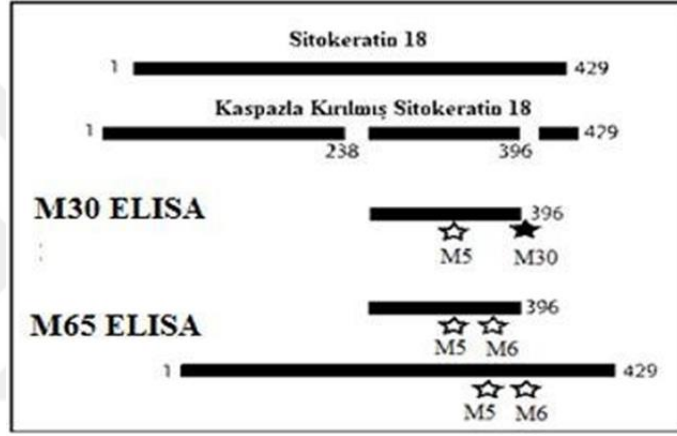
Negatif kontrol (maksimum canlılık, MO, muamele uygulanmamış hücre kontrolü) için 200 µl besiyeri içerisine 5×10^3 hücre ekildi. İnkübasyonun ardından her kuyudan 150 µl atılarak 50µl ATP kitinin (Sigma FLASC Adenosine 5' triphosphate bioluminescent somatic cell assay kit, St. Louis, MO) içinde yer alan hücre lizis tamponu (2X) eklendi ve hücre içerisindeki ATP'nin hücre dışına çıkması sağlandı. 20 dakikalık inkübasyon beklemesinin ardından mikroskopta gözlem yapıp hücrelerde lizis işlemi gerçekleştiğinden emin olduktan sonra, 50µl hücre süspansiyonu beyaz renkli 96 kuyucuklu hücre kültür ekim kaplarına aktarıldı ve ardından 50µl lusiferin-lusiferaz enzimi içeren solüsyon ilave edildi.

Reaksiyon sonunda oluşan ATP miktarı (lusiferin-lusiferaz bioluminesans reaksiyonu yardımıyla) ölçme zamanı 1 saniye olacak şekilde luminometre (Bio-Tek, Winooski, USA) kullanılarak ölçüldü. Böylece Zn(II) kompleksi ile muamele edilen ve edilmeyen hücrelerin RLU değerlerine göre sitotoksik etkileri hakkında bilgi edinildi.

$$\% \text{ Canlılık} = 100 * \frac{\text{Bileşik ile muamele edilen hücre absorbanısı ortalaması} - \text{Kör ortalama}}{\text{Kontrol hücre absorbanısı ortalaması} - \text{Kör ortalama}}$$

3.2.5. Kaspazla Kırılmış Sitokeratin-18 (M30 Antigen) Metodu

Sitokeratin 18 (CK18) apoptozis esnasında sitoiskeletin önemli bir protein üyesidir. CK18 sadece apoptotik hücrelerde aktifleşen bir enzim grubu olan kaspazların etkisiyle kırılarak, kırılmış CK18'i (CCK18-Asp396) oluşturmaktadır (Şekil 3.3), (Leers ve ark. 1999). M30 monoklonal antikor, CK18'in Asp396'da kırılan fragmanını (M30 antijen) tanıyarak ve sonuç olarak CK'lerin apoptotik bir belirteç olarak kullanımını sağlamaktadır. Böylece apoptozise özgü bir belirteç olan kırılmış CK18, ELISA yöntemiyle saptanmaktadır.



Şekil 3.3. Sitokeratin 18'in kaspazlar aracılığıyla kesimi ve bu bölgenin M30 antikoruna ile tanınmasının (Leers ve ark. 1999).

CK18'i tanıyan M30 antikoruna ortamda var olan hücrelere temas ettirildiğinde eğer ortamda apoptotik hücreler mevcut ise, apoptozisin varlığı gösterilir. M30 testi ELISA metoduyla M30 antijen fragmentini belirlemek için, MCF-7 hücreleri sayılarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 200µl içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde (3 tekrarlı) ekim yapıldı. 48 saat 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben hücreleri zedelemeyen üzerlerinden 100µl besiyeri uzaklaştırıldı. Zn(II) kompleksinin konsantrasyonu 100µl içerisinde 50µM, 25µM ve 12,5µM olacak şekilde hücrelerin üzerlerine uygulandı. Negatif kontrol kuyularından 100µl besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 100 µl taze besiyeri ilave edildi. İlaç uygulamalarını takiden hücreler 48 saat 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyon sonunda tüm kuyulara 10µl %10'luk NP-40 (Sigma, St. Louis, MO) ilave edildi. 15dk oda sıcaklığında 600rpm 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 25µl pipetlendi.

Tüm örnekler üzerine 75µl horseradish peroksidaz konjugatı eklendi. 4 saat boyunca 600rpm çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresi sonunda örnekler 250µl yıkama solüsyonu ilave edilerek 5 kez yıkama yapıldı ve hemen ardından 200µl TMB substratı ilave edilerek 20 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için 50µl stop çözeltisi ilave edildi ve oluşan renk şiddeti spektrofotometrik olarak 450nm'de (Biotek) okundu. Okunan absorbans değerlerinden elde edilen standart grafikten U/L değerleri hesaplandı.

3.2.6. Hoechst 33342 ve Propidiyum İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi

Floresan boyalar DNA'ya bağlanabilir boyalar olduğundan dolayı hücrenin kromatini yani nükleusu görünür hale gelebilmektedir. Hoechst 33342, DNA'ya bağlanabilen böylece hücre membranından nüfuz edebilen bir boyadır. Canlı ve ölü (apoptotik/nekrotik) hücrelerin çekirdeklerini boyamak için kullanılmaktadır. Propidium iyodür (PI), sadece membran hasarlı hücrelere girebilen bir boyadır ve ölü hücreleri (primer nekrotik veya geç apoptotik/sekonder nekrotik) boyayabilen floresan nükleik asit boyasıdır. Bu boya canlı hücreler tarafından dışarı atılmaktadır.

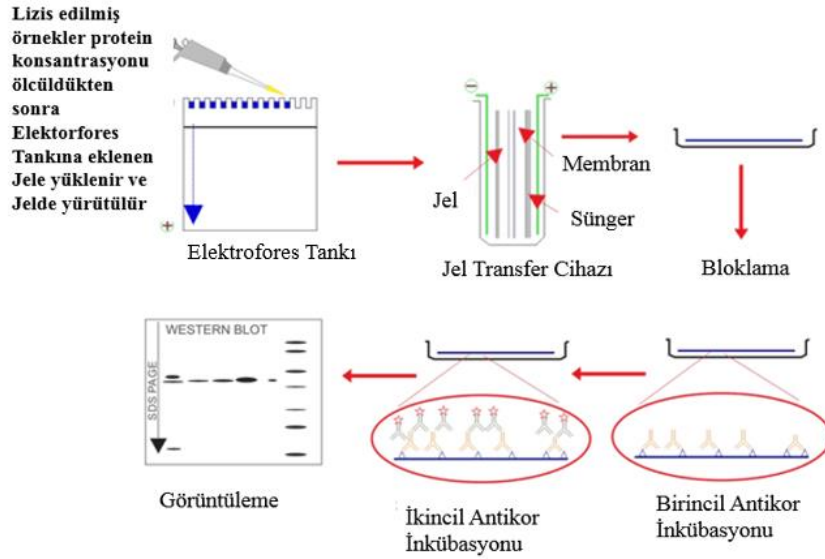
Floresan boyama testi için, Zn(II) kompleksin farklı konsantrasyonları (50µM ile 0,78µM) hücre besiyerinde hazırlanarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 100µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde her bir kuyuya ayrı ayrı ilave edildi. Ardından hücreler 48 ve 72 saat 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

Inkübasyon süreleri tamamlandıktan sonra kuyu içerisindeki besiyeri- hücreleri ve hücre kültür kaplarının zemine zarar vermeden uzaklaştırıp 1x PBS ile dikkatli bir şekilde kuyular yıkandı. Ardından floresan boya kiti kuyulara eklendi. Boya içeriği Hoechst 33342 (12,3 mg/ml) boyası son konsantrasyonu 5µg/ml olacak şekilde 1x PBS içerisinde ara stok hazırlandı. Ardından 500µl Buffer içerisinde 5µl PI ve Hoechst 33342 eklendi. Hazırlanmış floresan boya iyice karıştırıldıktan sonra tüm kuyulara 30µl eklendi ve 30dk inkübasyon halinde bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında mikroskop altından tedavilerin hücrelere sebep olan ölüm morfolojileri incelenip değerlendirildi ve görüntü alındı. İkili boyama yöntemi kullanılarak Zn(II) kompleksine maruz kalmış hücrelerin ölüm şekilleri, nükleus morfolojisine bakılarak değerlendirildi. Apoptotik hücrelerde; çekirdeğin normal hücrelere göre daha küçük olma özelliği aranırken, nekrotik hücrelerde ise çekirdeğin normal hücrelerden biraz daha büyük olması ve daha az boya alması özelliği arandı.

3.2.7. Western Blot Analizi

Western blot analizi hücrelerden elde edilen bir protein karışımında, aranan (hedef) proteinin varlığını göstermek ve molekül ağırlığını belirlemek amacıyla kullanılan özel bir protein-protein hibridizasyon tekniğidir. Western Blot tekniğinin uygulanabilmesi için ilk olarak hedef proteini tanıyarak ona bağlanabilen bir antikor mevcut olmalıdır. Western blotlama ilk olarak SDS-PAGE yöntemiyle örnek karışımında bulunan proteinlerin jel üzerinde birbirlerinden ayrılmaları sağlanır. Ardından Jelde büyüklüklerine göre ayrılarak bantlar oluşturan protein molekülleri, elektrotransfer tekniği ile nitroselüloz membrana aktarılırlar. Membrana sırasıyla, hedef proteine özgü antikor, bu antikoru tanıyan ve yapısına enzim ilave edilmiş ikincil bir antikor ile muamele uygulanır. Son olarak söz konusu enzimin substratı ile muamelesi sonucunda meydana gelen ışık aracılığı ile hedef proteinin membran üzerinde görüntülenmesi sağlanır.



Şekil 3.4. Western Blot yöntemi (Arı ve ark. 2003).

Toplayıcı jel hafif asidik (pH:6,8) ve düşük akrilamid konsantrasyona sahiptir. Bu özeliği sayesinde gözenekli jel oluşur. Aynı zamanda bazik özelliğe sahip olan jel (pH:8,8) yüksek poliakrilamid içeriği ile jel gözenekleri daha dardır. Böylece proteinler büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlar 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 SDS ile muamele edilmeleri gereklidir. SDS anyonik bir deterjandır ve 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 ayrılarak farklı protein bantları halinde odaklanırlar. SDS-PAGE işleminden sonra jeldeki protein bantlarının görüntülenmesi için kemiluminesans prensibinden yararlanılır.

Bu yöntem için ilk olarak, MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri hücre soyları yeterli miktarda üretildikten sonra Zn(II) kompleksi uygulaması için 50 μ M, 25 μ M ve 12,5 μ M dozu seçilip 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekimi yapıldı ardından 48 saat bekletildi. Sonra ikinci aşama olan protein izolasyonuna geçildi.

3.2.7.1. Protein İzolasyonu

- Çözeltiler Lizis tamponu

Solüsyonun karanlıkta hazırlanma şartı ile Lizis tamponu karışımı 3 ml lizis tamponu (RIPA lysis buffer, Santa Cruz, ABD) için 30µl 200mM Fenilmetilsülfonil florür (PMSF) (Santa Cruz, ABD), 30µl 100mM sodyum ortovanadat (Santa Cruz, ABD), 45µl proteaz inhibitör kokteyl (Santa Cruz, ABD) eklenerek hazırlandı.

Bu aşamada, ilaç uygulanan hücre kültür kaplarındaki süpernatantları, buz üzerinde tutulan 15ml'lik falkonlara toplandı ve negatif kontrol flaskının süpernatantı uzaklaştırıldı. Flasklara 10 ml soğuk 1X PBS ilave edilip hücreler "scraper" (Corning) ile kaldırıldı ve ilgili falkonlara aktarıldı. Süspansiyon +4°C'de 1000g'de 5 dakika santrifüj (NF-800R) edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 0,5ml lizis tamponu pipetlendi. Falkonlar, karanlıkta 30 dakika buz üzerinde bekletildi ve bu esnada 10 dakikada bir pipetaj yapılarak karıştırıldı. Süre bitiminde solüsyonlar 1,5ml'lik tüplere aktarıldı ve +4°C'de 10,000g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantları 0,5ml'lik tüplere toplandı ve protein miktarları ölçüldü.

3.2.7.2. Proteinlerin BCA Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

- BSA Standartlarının Hazırlanması

Protein miktarlarını ölçebilmek için sığır serum albumin (BSA) proteininin değişik konsantrasyonları (1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2mg) ultra saf su (dH₂O) ile hazırlanarak bir standart eğri grafiği çizildi.

- Protein Konsantrasyonunun Ölçümünün Yapılması

BCA protein tayin yönteminde bakır sülfat, BCA solüsyonuna eklendiğinde oluşan kompleks elma yeşili bir renk alır. Bu solüsyon, protein solüsyonuna ilave edildiğinde, proteinler ile etkileşir ve Cu⁺⁺ iyonları Cu⁺ iyonlarına dönüşür. Sonuç olarak kompleksin rengi mor tonuna dönüşür.

Ölçüm için Biçinkoninik Asit Kit (Sigma-Aldrich) ve 96 kuyuluk hücre kültür kapları (Orange Scientific) kullanıldı. Her bir kuyuya 0, 20, 40, 60, 80 ve 100µl standart ve

10µl konsantrasyonu örnekler pipetlendi. Konsantrasyonu bilinmeyen örnekler 10 kere dH₂O ile seyreltilerek ölçüm yapıldı, bu nedenle 10µl örnekler 90µl, standartlar ise 100µl'ye tamamlanacak şekilde ultrasaf dH₂O ile tamamlandı. Bu seyreltme katsayısı, hesaplamalarda dikkate alındı. Kuyuların üzerine 200µl çalışma ayıracı pipetlendi ve plate 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda oluşan renk şiddeti, spektrofotometrede 570nm'de (Biotek) okundu.

3.2.7.3. Western Blot Yöntemi ile Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarılması

- Proteinlerin Yüklenmesi ve Jelde Yürütülmesi

Örnekler istenen hacimlerde toplam protein miktarı 30µg (BCA yöntemiyle belirlenen) ve sample buffer ve reducing agent 1X olacak şekilde 0,5ml'lik tüplere pipetlendi. Ardından su banyosunda bekletildi. Bu esnada jel, elektroforez (Invitrogen) tankına yerleştirildi ve SDS running buffer eklendi. Ardından jelde bulunan koruma sıvısı pipet yardımıyla al-ver yapılarak uzaklaştırıldı ve 500µl antioksidan eklendi. Marker, yüklenmeden önce 400 °C'de 1 dakika bekletildi. Daha sonra marker (5µl) ve örnekler kuyulara pipet yardımıyla belirlenen miktarlarda yüklendi. Yükleme işlemi sonunda 60 dakika 150V yürütme yapıldı (Vwr).

- Proteinlerin Transferi

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel dikkatli bir şekilde yürütme tankından çıkarılır. Ardından ıslak koşullar altında jeli ambalajından ayırıp I-blot jel transfer cihazına aktarılır. Transfer işlemi için I-Blot jel transfer (Invitrogen) cihazına sırasıyla anot bakır (+), jel, filtre kağıdı (ultra saf H₂O ile ıslatılır), katot bakır (-) ve sünger yerleştirildi. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda 8 dakika transfer işlemi gerçekleştirildi.

Transfer gerçekleştikten sonra membran bloklama aşaması gerçekleşir. Bloklama TBS-T içerisinde %5'lik süt (Santa Cruz) çözeltisi hazırlandı ve 30 dakika oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Süre sonunda, 3 defa 1,5 dakika ve ardından 1 defa 10 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı. Bu yıkama işlemi üç defa yapıldı. Ardından birincil antikor eklenir. Birincil Antikor tüm kullanılan antikorlar kullanım şartlarına uygun bir şekilde hazırlandı ve 24 saat +4°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 15 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı. Yıkama işlemi üç defa tekrarlandı.

Yıkamanın ardından ikincil antikor eklendi. İkincil antikor birincil antikora uygun şekilde kullanım şartlarına uygun ikincil antikor hazırlandı ve çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 1,5 dakika ve ardından 1 defa 10 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı. Bu yıkama işlemi üç defa yapıldı.

- **Görüntüleme**

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, Fusion FX-7 (Vilber Lourmat, Torcy, France) cihazı kullanılarak görüntülendi. Bu şekilde nitroselüloz membran üzerine transfer edilmiş olan proteinlere bağlanan antikorlar görüntülendi.

3.2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İşleminin Uygulama Aşamaları ve Prensipleri

PCR reaksiyonu; DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklıkla birbirinden ayrılmasını (denatürasyon), ardından sentetik oligonükleotidlerin hedef seçilen DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyon), zincirin uzaması (polimerizasyon, çift iplikçikli DNA'ların sentezi) ve bahsedilen siklusların belirli bir sayıda tekrarlanmasını kapsamaktadır (Şekil 3.5).

PCR tekniğinden her bir siklus esnasındaki ısıtma ve soğutma işlemlerini yazılım programları doğrultusunda gerçekleştiren PCR cihazları yardımıyla sağlanmaktadır. Bu cihazlarda sıcaklık +4°C ile 100°C'ler arasında programlanabilir ve reaksiyon işlemlerinin sona ermesiyle +4°C'ye ayarlanarak tüpler uzun süre bu sıcaklıkta tutulabilmektedir.

- **DNA'nın Denatürasyonu Aşamaları**

Denatürasyon esnasında çift zincirli hedef DNA sarmalını birbirinden ayrılması sağlanmaktadır. Denatürasyon aşamasında, sıcaklık 93-96°C'ye kadar çıkarılır ve bu sayede çift sarmallı DNA, hidrojen bağlarından ayrılır. Bu sıcaklıkların uygulanmasıyla DNA'nın denatürasyonu "Thermocycler" cihazlarında gerçekleştirilmektedir. Bunun yanı sıra denatürasyon sıcaklığının çok yüksek veya süresinin uzun olması enzim aktivitesinin olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır.

- **Primerlerin Bağlanması (Hibridizasyon, Annealing) Aşaması**

Primer olarak adlandırılan ve çoğaltılması istenen DNA için spesifik olan oligonükleotidler, denatürasyon aşamasında elde edilen DNA tek sarmalı üzerinde kendisine komplementer olan diziyeye bağlanmaktadır. DNA zincirlerinin eşleşmesi daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşmektedir (37-65 °C). Primerlerden birinin kendine ait olan 5' ucu, hedef DNA'lardan birinin 3' ucuyla, diğer primer de ikinci tek iplikçik DNA'nın anti paralel olan diğer ucunda bulunan 3' ucuna DNA polimerazın çalışma yönüne (5'→3') uygun olarak bağlanırlar.

- **Primerlerin Uzatılması (Polimerizasyon, Extention, Elongation) Aşaması**

Primerlerin bağlanması oluşturulduktan sonra, primerlerin hibritleştiği tek sarmalların karşılığı DNA polimeraz (genellikle Taq polimeraz) tarafından sentezlenir. Taq Polimerazın optimum çalışma sıcaklığı 72°C'dir ve 5'→3' yönünde aktivite göstererek, primerlerin 3' uçlarından başlamak üzere ortamdaki nükleotidleri kullanarak hedef DNA dizisinin birebir kopyasını yapmaktadır.

- **Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu nükleik asit çoğalmasıyla eşzamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle, kısa sürede kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir. Ticari olarak geliştirilmiş üç tipi bulunmaktadır. Bunlar; LightCyler (Roche), TaqMan (PE Biosystem) ve iCycler (BIO-RAD)'dır. LightCyler sisteminin uygulanmasında; yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (Syber green 1) kullanılarak, çoğalmaya bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarıyla ölçülmektedir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan Syber green miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir. Fakat, floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü çift sarmal DNA'ya entegre olan Syber green 1 ortamda hedef moleküller olmadığında primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar (primer dimer) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü engellemek amacı için amplifikasyon ürünlerinin melting curve (erime eğrisi) analizi

yapılmaktadır. Her çift sarmal DNA, kendine özgü melting temperature (T_m , çift sarmal DNA'nın % 50'sinin tek sarmal hale gelmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir. PCR çoğalmasının ardından sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrılmaya başlayınca Syber green 1 boya serbest kalmakta ve floresans miktarı azaltılmaktadır. Denatürasyon olduğunda floresans sinyal aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak ampliconun T_m derecesi saptanabilmektedir. İncelenen örneğe ait T_m derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün T_m derecesiyle karşılaştırılarak, PCR sonucunun doğru veya hatalı olduğuna karar verilmektedir.

LightCycler'in diğer bir uygulama şekli, hedefe özgül problar kullanmaktır. Burada problarla testin özgüllüğü artırılmıştır. Problardan biri 3' ucundan floresans boyayla işaretli (donör boya), diğeri 5' ucundan alıcı boyayla (acceptor dye) işaretlenmiştir. Problar, hedef ampliconlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotid uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji, ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır. FRET (Fluorescence resonance energy transfer) olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine, diğer bir ifadeyle PCR siklusu süresince oluşan ampliconların miktarına bağlı olarak artmaktadır). Eş zamanlı PCR, kısa sürede kantitatif sonuç verebilmektedir. Tüpler açılmadan tanıya gidildiği için kontaminasyon riski düşüktür. Elektroforeze gerek kalmadan çoğalma esnasında sonuç alınabilmektedir. Ayrıca floresan veren problar kullanılarak hedef nükleik asitteki mutasyonlar saptanabilmektedir.

- **Hücrelerden Total RNA İzolasyonu**

Total RNA izolasyonu Total RNA PureLink™ Mini Kit (Jena Bioscience) kullanılarak yapıldı. RNA izolasyonu aşamasında ilaç uygulanan örnek kuyuların süpernatantları, buz üzerinde tutulan 15ml'lik falkonlara toplandı ve negatif kontrol kuyularının süpernatantı çıkartıldı. Kuyulara 2ml soğuk 1x PBS ilave edilip hücreler %0,05 Tripsin- EDTA ile hücrelerin hücre kültürü kaplarından kaldırıldı ve ilgili falkonlara aktarıldı. Süspansiyon +4°C'de 1000g'de 5 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları yeniden uzaklaştırıldı ve örnekleri pelet miktarının üzerine 600µl lizis tamponu ve 1.12µl merkapetanol eklenerek 10sn vortex

yapıldı. Vortex yapıldıktan sonra falkonda bulunan hacmin 0,6 katı kadar (yaklaşık 180 µl) %70 etanol eklendi ve 10sn vortex yapıldı. Kiti içerisinde yer alan filtre tüpler, koleksiyon tüpler ile birleştirildi ve filtre tüplerin içine 700µl washing yıkama tamponu pipetlendi. Daha sonra 12.000g'de 28 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonunda koleksiyon tüplerde biriken sıvı uzaklaştırıldı. Falkonlarda bulunan örnekler filtreli tüplere aktarıldı ve 12.000g'de 28 saniye santrifüj edilip alta geçen sıvı yeniden uzaklaştırıldı. Filtre tüplere 500µl washing buffer II solüsyonu pipetlendi ve 12.000g'de 28 saniye santrifüj edildi, santrifüj sonunda koleksiyon tüplerde biriken sıvı uzaklaştırıldı. Bu aşama 2 defa tekrarlandı. Her aşamadan sonra geçen sıvı uzaklaştırıp yeni alt tüp eklendi. Daha sonra filtreler kuru olarak 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 30µl dH2O eklenerek 2 dakika santrifüj edildi. Son olarak tüplerin üzerine etiketler eklenip örnekler -20°C'de saklandı.

- **İzole Edilen RNA'ların Kontrolü**

İzolasyonu gerçekleştirilen RNA'ların kalitesi ve miktarları Nanodrop cihazı ile ölçüldü. RNA örneklerinden 1µl alındı ve suya karşı kör alınan cihaz ile ölçümler yapıldı.

- **cDNA Sentezinin Yapılması**

Elde edilen total RNA örnekleri, SCRIPPT cDNA Sentez Kiti (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit) ile cDNA'ya çevrildi. Çevrim esnasında, kullanılacak RNA örnek sayısından 1 örnek fazla olacak şekilde gerçekleşir. "1 çevrim" sütunundaki hacimler (RNA hariç) bu sayı ile çarpılarak bir karışım (cDNA Sentez karışımı) hazırlanır. Bu karışım buz üzerinde Etiketli PCR tüplerine eşit şekilde dağıtıldı ve son olarak da RNA konsantrasyonları eşit olacak şekilde pipetlendi. Pipetleme işlemi sonrası pcr tüpleri cihaza (StepOnePlus Real-Time PCR System) yerleştirildi ve thermalcyler programında 25°C 10dk, 37°C 120dk, 85°C 5dk'lık bir döngüde cDNA çevrimi gerçekleştirildi. cDNA çevrimi sonrası örnekler RT-PCR analizi için kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı

- Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizinin Yapılması

Literatür araştırmaları sonucunda apoptozis (GAPDH, PARP, Fas, BCL-2, TNF10A, P53) ile ilişkili sinyal yollarında etkili olan önemli genler belirlendi. Bu genlerin primerleri kullanılarak qPCR master karışımı hazırlandı. Hazırlanan bu karışımdan 18,5µl PCR platelerinin örnek kuyucuklarına dağıtıldı. Üzerlerine cDNA'lardan 1,5µl pipetlendi. Real Time PCR cihazına yerleştirildi. Aşağıda verilen program ayarlanarak PCR tamamlandı (Çizelge 2.). Sonuçlar $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak değerlendirildi.

Çizelge 2. RT-PCR siklus programı

	Amplitaq Gold Enzim Aktivasyonu	PCR	
Aşama	Bekleme	Siklus Sayısı (40)	
Zaman	10 dk	Denatürasyon	Uzama/Sonlanma
Sıcaklık (°C)	95 °C	95 °C	60 °C

3.2.9. Hücre Migrasyon (Yara İyileşmesi) Testi

Hücre migrasyon (göç) etkisini değerlendirmek için yara iyileşmesi analizi yapılmıştır. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri, 6 kuyulu hücre kültür kaplarına ekildi ve %70-80 birleşme noktasına kadar inkübe edildi. 6 kuyulu hücre kültür kaplarına çizilen yaralar, hücre kültür kaplarının yüzeyine bir pipet ucu (1000 x) ile mümkün olduğunca eşit ve düz bir şekilde çizerek oluşturuldu. Daha sonra hücreler 1x PBS eklenip ardından asipe edildi. Kontrol grubuna hücre soylarına uyumlu olarak besiyerleri 1ml eklenirken, Zn(II) kompleksi kuyu için 50µM dozu pipetlendi. Hücre migrasyon testi göç oluşana dek mikroskopta takip edildi. Hücrelerin zamana bağlı olarak oluşan göç görüntüleri alındı ve göç mesafesi daha sonra faz kontrast mikroskobu ile analiz edildi.

3.2.10. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Graph Pad Prism 6 programı aracılığı ile t-testi, çoklu veri analizi ANOVA ile değerlendirildi. 3 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart hata ile verildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ değerine göre belirlendi.



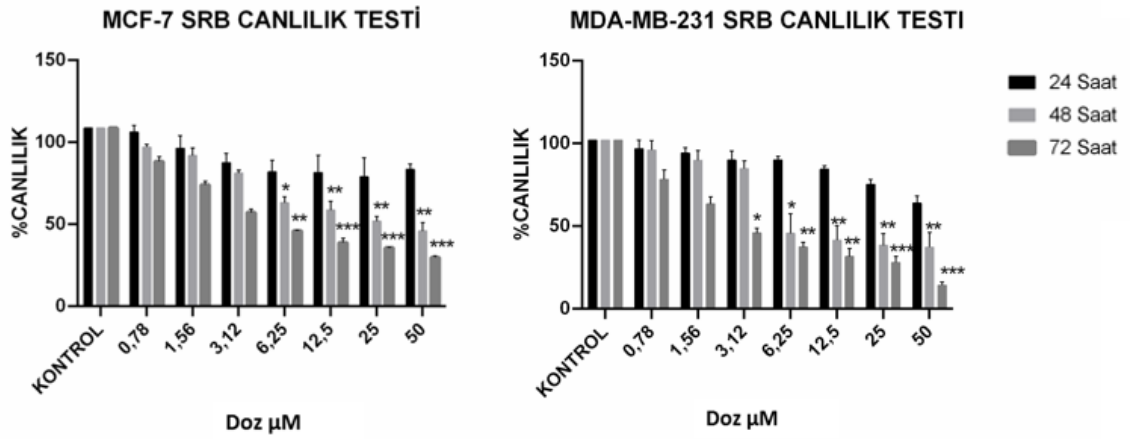
4. BULGULAR

4.1. SRB Canlılık Testi Bulguları

Zn(II) kompleksinin (0,78-50 μ M) insan meme kanseri MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soyları üzerine olan etkisini belirleyebilmek için SRB canlılık testi yapıldı. Hücre soylarına 24, 48 ve 72 saat süre ile Zn(II) kompleksi uygulandı ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.1'de gösterildi. Zn(II) kompleksinin uygulandığı hücre soylarında konsantrasyon arttıkça hücrelerin canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). Özellikle 72 saat sonuçları 24 ve 48 saat sonuçları ile karşılaştırıldığında hücre canlılıklarında önemli bir derecede azalma olduğu gözlemlendi.

Zn(II) kompleksinin MCF-7 meme kanseri üzerine etkisi değerlendirildiğinde; 48 saatte 6,25 μ M ve üzerindeki dozlarında, 72 saatte ise 1,56 μ M dozundan itibaren istatistiksel olarak hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir azalmaya neden olduğu gözlemlendi (*p<0,05 **p<0,01), (Şekil 4.1). En yüksek doz aralığı olan 50, 25 ve 12,5 μ M dozlarında sırayla %10, %25 ve %30 canlılık oranları belirlendi. Zn(II) kompleksi uygulanan MDA-MB-231 hücreleri üzerine etkisi değerlendirildiğinde; 48 ve 72 saatte 6,25 μ M ve üzeri dozlarında hücre canlılıklarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalmalara sebep olduğu bulundu (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). En yüksek doz aralığı olan 50, 25 ve 12,5 μ M konsantrasyonlarında 72 saat tedavi sonrasında sırayla % 20, %25 ve %30 canlılık oranları gözlemlendi (Şekil 4.1.).

Alınan bu sonuçlar, Zn(II) kompleksin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığını göstermektedir.



Şekil 4.1. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Zn(II) kompleksinin uygulamasının doza ve zamana bağlı olarak SRB testi sonrası canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın 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.

Sitotoksik verilerin değerlendirilmesinde önemli olan parametrelerden IC₅₀ (kontrol hücrelerine kıyasla kompleksler ile hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) ve IC₉₀ (kontrol hücrelerine kıyasla kompleksler ile hücrelerin %90'ini öldüren konsantrasyon) değerlerini hesaplamak için SRB canlılık test sonuçları kullanıldı.

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında IC₉₀ değerleri >50 µM sonucunu verirken, IC₅₀ (kontrol hücrelerine kıyasla tedavi sonrası hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) değerleri 48 saat tedavi sonrasında MCF-7 hücrelerinde 28,14µM; MDA-MB-231 hücrelerinde 30,37µM olarak ve 72 saat sonrasında MCF-7 hücrelerinde 7.47µM; MDA-MB-231 hücrelerinde 3.00µM olarak hesaplandı (Çizelge 3.).

Çizelge 3. Zn(II) kompleksi uygulanan hücre soylarında SRB canlılık testi sonuçlarına göre IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri.

		MCF-7	MDA-MB-231
24 SAAT	IC50	>50	>50
24 SAAT	IC90	>50	>50
48 SAAT	IC50	28,14	30,37
48 SAAT	IC90	>50	>50
72 SAAT	IC50	7,47	3,00
72 SAAT	IC90	>50	>50

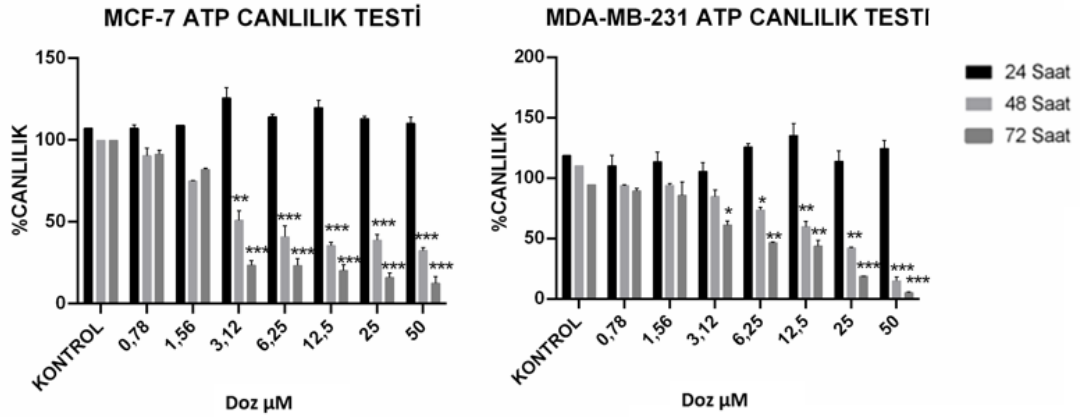
4.2. ATP Canlılık Testi Bulguları

ATP canlılık testi ile hücrelerde canlılığın bir göstergesi olan intrasellüler ATP miktarı ölçülmektedir. Zn(II) kompleksi ile 24, 48 ve 72 saatlik tedavi sonrası MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde doza ve zamana bağımlı olarak hücre canlılığının azaldığı belirlendi (Şekil 4.2). 12,5, 25 ve 50µM konsantrasyonlarda hücreler kontrol grubu sonuçları ile karşılaştırıldığında canlılık oranında Şekil 4.2.'de görüldüğü üzere istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi (*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001).

Zn(II) kompleksinin MCF-7 meme kanseri üzerine etkisi değerlendirildiğinde; 48 ve 72 saatte 3,12,-50 µM dozlarında istatistiksel olarak hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir azalmaya neden olduğu gözlemlendi (*:p<0,05 **:p<0,01 ***:p<0,001) (Şekil 4.2). En yüksek doz aralığı olan 50, 25 ve 125µM konsantrasyonlarında 72 saat sonuçlarında sırayla %5, %15 ve %40 canlılık oranları belirlendi.

Zn(II) kompleksi uygulanan MDA-MB-231 meme kanseri üzerine etkisi değerlendirildiğinde; 48 ve 72 saatte 3,12, 6,25, 12,5, 25 ve 50µM dozlarında hücre canlılıklarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalmalara sebep olduğu bulundu. En yüksek doz aralığı olan 50, 25 ve 12,5µM konsantrasyonlarında 72 saat tedavi sonrası sırayla %5, %7 ve %10 canlılık gözlemlendi (Şekil 4.2.).

Alınan bu sonuçlar, Zn(II) kompleksinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde doza ve zamana bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığını göstermektedir.



Şekil 4.2. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde ATP canlılık testi sonuçları. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın 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.

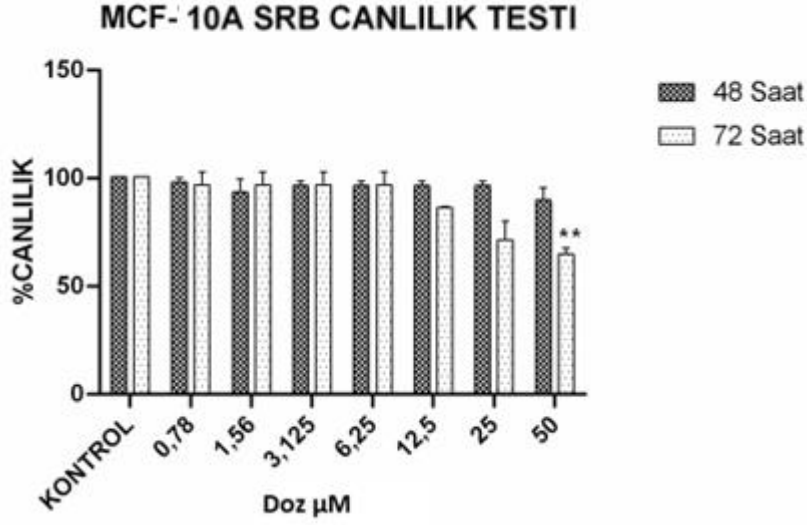
MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında IC₉₀ değerleri >50 µM sonucunu verirken, ATP canlılık testi sonuçları kullanılarak IC₅₀ değerleri hesaplandığında, 48 saat sonrasında MCF-7 hücrelerinde 3,45µM, MDA-MB-231 hücrelerinde 19,35µM olarak hesaplandı. 72 saat Zn(II) kompleksi ile tedavi sonrasında IC₅₀ değerlerinin MCF-7 hücrelerinde 2,32µM; MDA-MB-231 hücrelerinde 7,42µM olarak belirlendi (Çilerge 4.).

Çizelge 4. Zn(II) kompleksi uygulanan hücre soylarında ATP canlılık testi sonuçlarına göre IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri.

		MCF-7	MDA-MB-231
24 SAAT	IC ₅₀	>50	>50
24 SAAT	IC ₉₀	>50	>50
48 SAAT	IC ₅₀	3,45	19,35
48 SAAT	IC ₉₀	>50	>50
72 SAAT	IC ₅₀	2,32	7,42
72 SAAT	IC ₉₀	>50	>50

4.3. Sağlıklı Hücrelerde Canlılık Testi Bulguları

Zn(II) kompleksinin (0,78-50µM) MCF-10A sağlıklı insan meme hücre soyu üzerine olan etkisini belirleyebilmek için SRB canlılık testi yapıldı. Hücre soyunun 48 ve 72 saat süre boyunca Zn(II) kompleksi uygulamasını takiben elde edilen sonuçlar Şekil 4.3'de gösterilmektedir. 48 saat sonrasında konsantrasyon arttıkça hücrelerin canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlenmezken, 72 saat sonucunda 3,12µM dozundan itibaren artan konsantrasyonlarda hücre canlılıklarında azalmalar gözlemlendi (*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001), (Şekil 4.3.).



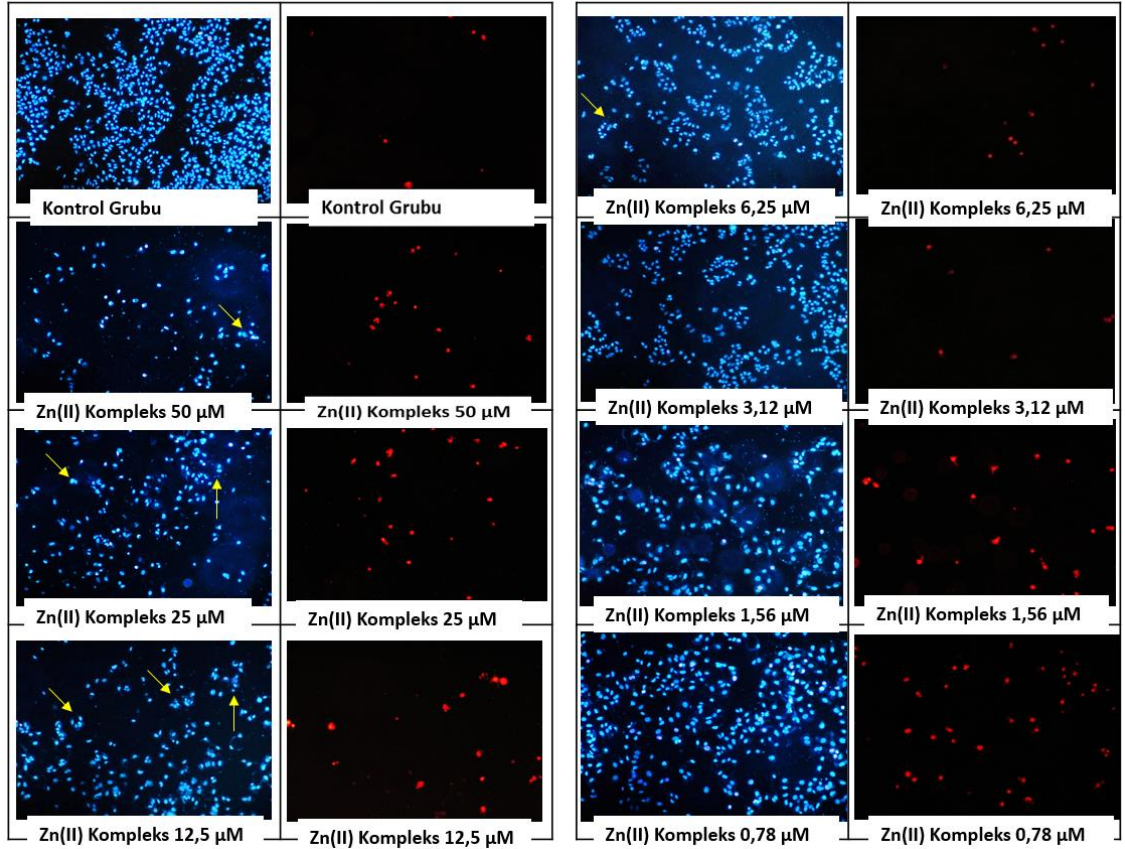
Şekil 4.3. MCF-10A hücrelerinde canlılık testi sonuçları. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (**:p<0,01) ifade etmektedir.

4.4. Floresans Mikroskobu İle Morfolojik Değerlendirme Bulguları

Floresan boyalar DNA'ya bağlanabilir boyalar olduğundan dolayı hücrenin kromatini yani nükleusu görünür hale gelebilmektedir. Hoechst 33342, DNA'ya bağlanabilen böylece hücre membranından nüfuz edebilen bir boyadır. Canlı ve ölü (apoptotik/nekrotik) hücrelerin çekirdeklerini boyamak için kullanılmaktadır. PI, sadece membran hasarlı hücelere girebilen bir boyadır ve 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 nükleusların 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 apoptoz/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. Yani PI negatif ve Hoechst boyası pozitif boyanmaktadırlar. Sekonder nekroz geliştikten sonraki aşamalarda hücreler membran bütünlüklerinin bozulması ile

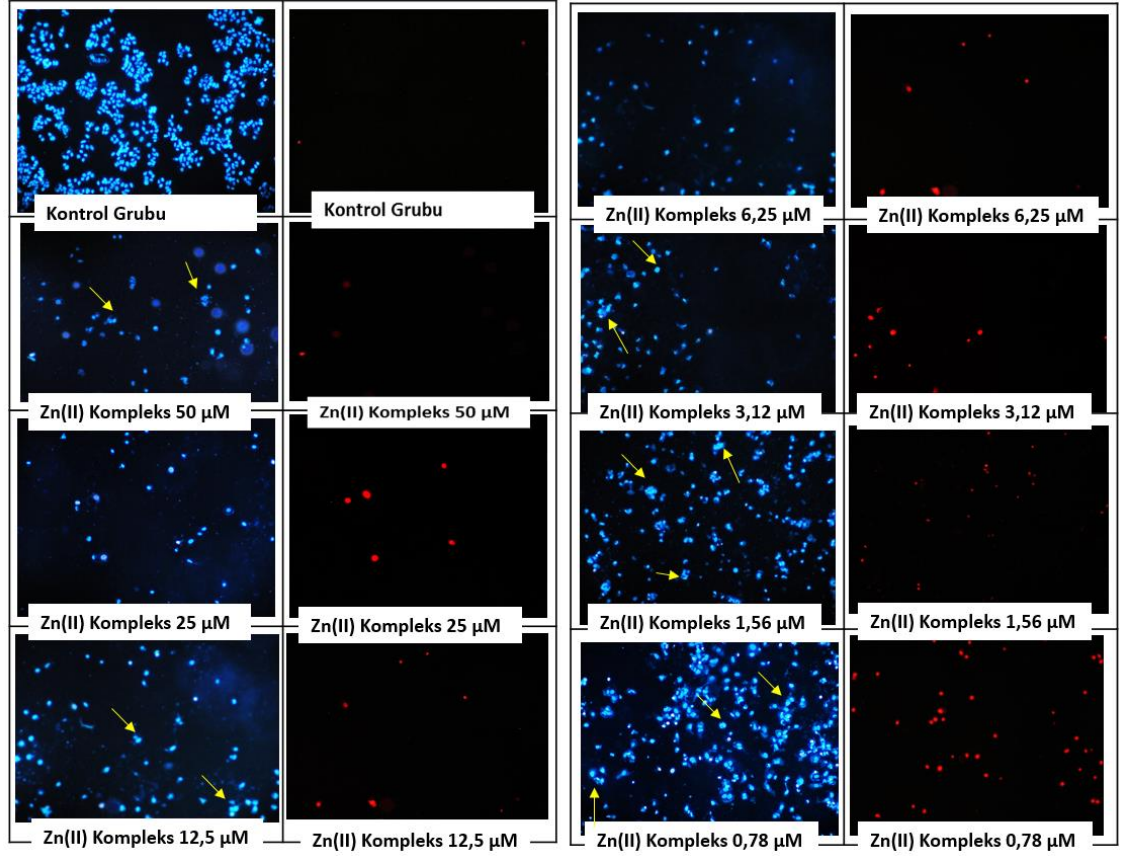
non-vital boyalar ile boyanmaya başlarlar. Dolayısıyla PI pozitif ve Hoechst pozitif boyanmaktadır.

Floresan Boyama MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde 48 ve 72 saat aralıklarında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen görüntülerde MCF-7 hücrelerinde 48 saat sonuçlarında kontrol grubuna kıyasla Zn(II) kompleksi uygulanan dozlarda, doza ve zamana bağlı olarak hücre sayılarında azalmalar gözlenmiştir. İlk dört dozda (50-6,25 μ M) hücre canlılığı yüksek oranda azalmış ve Şekil 4.4.'te görüldüğü üzere apoptotik cisimcikler ve piknotik hücreler gözlenmiştir. İlk üç dozda hücre canlılığı azalmaları nukleotik fragmentasyonlar ve kromatin kondansasyonu gözlemlenirken aynı zamanda PI pozitif görünmesi sonucunda sekonder apoptoz olduğu bulunmuştur. Azalan dozlarda (6,25 ve 3,15 μ M) piknotik hücreler tespit edilirken, PI boyanın negatif olması ile primer veya erken apoptoz olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4.).



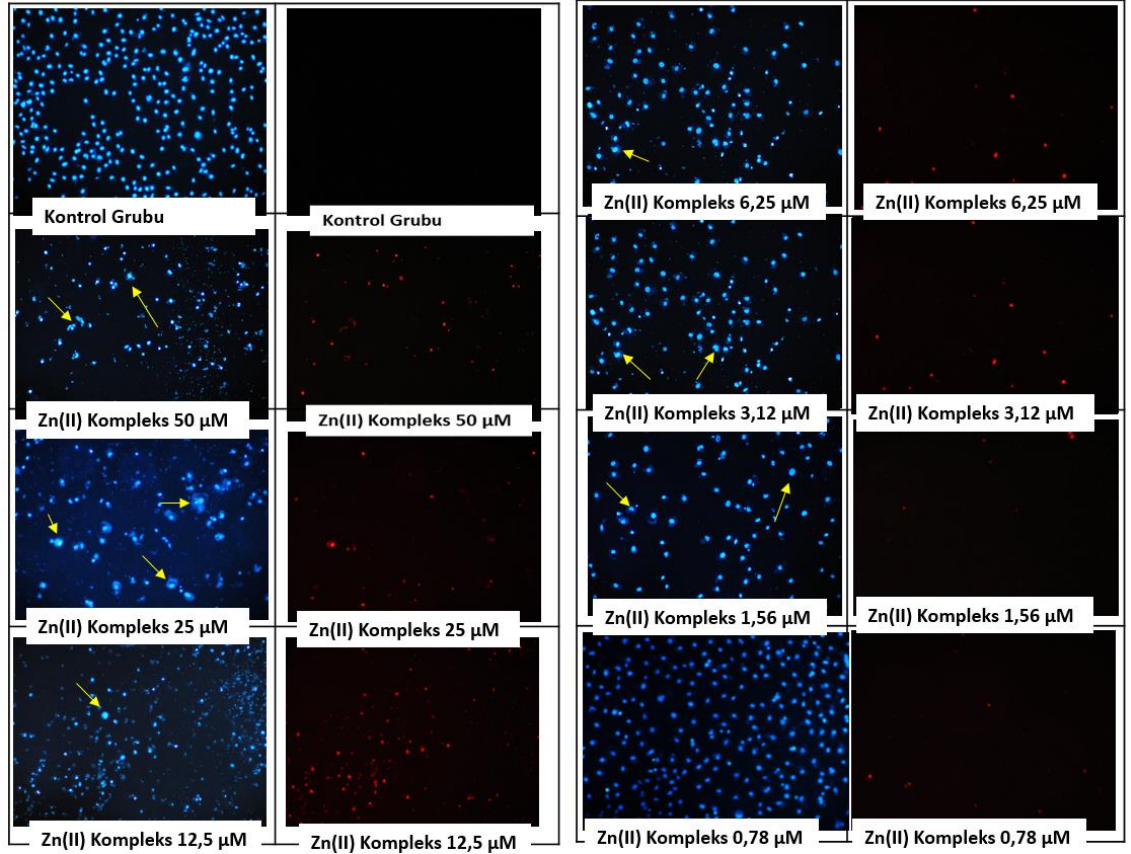
Şekil 4.4. Hoechst 33342 ve PI ile MCF-7 hücrelerinin 48 saat süreyle uygulama sonuçları. * Piknotik hücreler ve kromatin kondansasyonu gösterilmektedir.

MCF-7 hücrelerinde 72 saat sonrasında hücrelerin Şekil 4.5.'te görüldüğü üzere hücre ölüm oranlarının arttığı ve kromatin kondensasyonunun azaldığı görünmektedir. Hoechst pozitif ve PI pozitif görünmesinden dolayı ilk 4 dozda (50- 6,25 μ M) kontrol grubundaki hücrelerde kıyaslandığında hücre yoğunluğunun önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Özellikle 3,15, 1,5 ve 0,78 μ M dozundan kromatin kondensasyonu ve apoptotik piknoz görüntüleri sarı ok ile şekillerde işaretlenmiştir. 72 saat sonucunda ilk dört (50-6,25 μ M) dozda hücre sayılarının azalması gözlenirken düşük dozlarda ise Hoechst 33342 ve PI pozitif olmasından dolayı sekonder apoptoz gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).



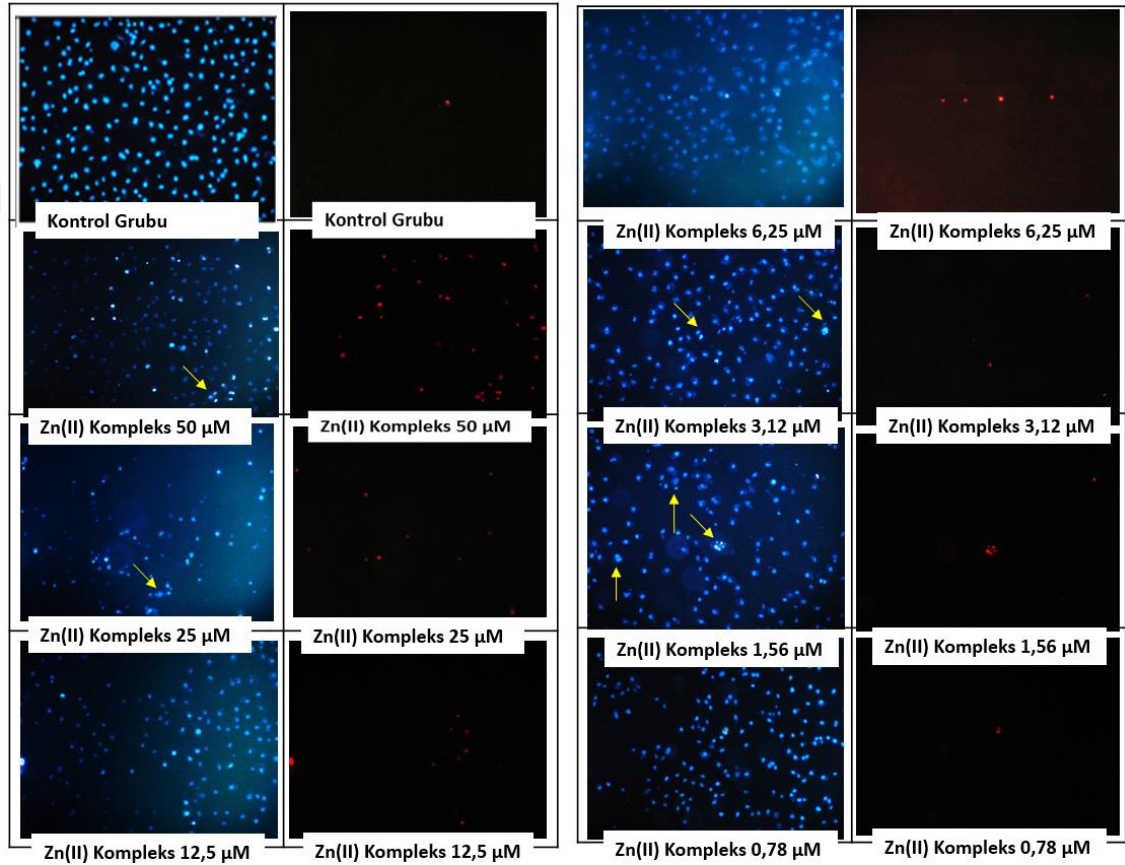
Şekil 4.5. Hoechst 33342 ve P.I. ile MCF-7 hücrelerinin 72 saat muamelle sonucunda alınan Floresan görüntüler. *Sarı ok: Piknotik hücreler ve kromatin kondensasyonu gösterilmektedir.

Hoechst 33342 ve PI ile MDA-MB-231 hücrelerinin 48 saat muamele sonucunda Şekil 5.6'da görüldüğü üzere kontrol grubundan elde edilen görüntülere kıyasla hücre yoğunluğunun azaldığını ve piknotik nükleusların oluştuğu gözlemlenmiştir. 50 μ M dozunda Hoechst 33342 ve PI pozitif olmasıyla nedeniyle hücrelerin sekonder apoptoz ile ödükları görülmektedir. Aynı zamandan hücresel morfoloji de değışimleri gözlenmektedir. Hücre morfolojisinde hücrenin büzülmesi ve apoptotik cisimlere parçalanma gibi görüntüler elde edildi. Konsantrasyon düşüktüce hücre yoğunluğunun arttığı, Hoechst 33342 pozitif ve PI negatif olduğu gözlenmiştir. Azalan dozlarda yani 6,23 ve 0,78 μ M dozlarında piknotik nükleuslar ve kromatin kondensasyonu görülmektedir. Bu dozlarda primer apoptoz olduğu söylenebilir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Hoechst 33342 ve PI ile MDA-MB-231 hücrelerinin 48 saat muamelle sonucunda alınan görüntüler. *Sarı ok: Piknotik hücreler ve kromatin kondensasyonu gösterilmektedir.

Hoechst 33342 ve PI ile MDA-MB-231 hücrelerinin 72 saat sonucunda alınan görüntülerde kontrole hücreleri ile kıyasla canlılığın azaldığı ve piknotik nükleus görüntüleri elde edilmiştir. 48 saat sonuçlarına kıyasla hücre canlılığının daha da azaldığını ve Hoechst 33342 ile PI pozitif olduğu görünmüştür. Boyanan nükleuslarda piknotik ve kromatin kondensasyonu sergilenmiştir. Azalan konsantrasyonlar aralarında Hoechst 33342 pozitif ilen PI negatif bulunması primer apoptoz ile yorumlanmıştır (Şekil 4.7.).

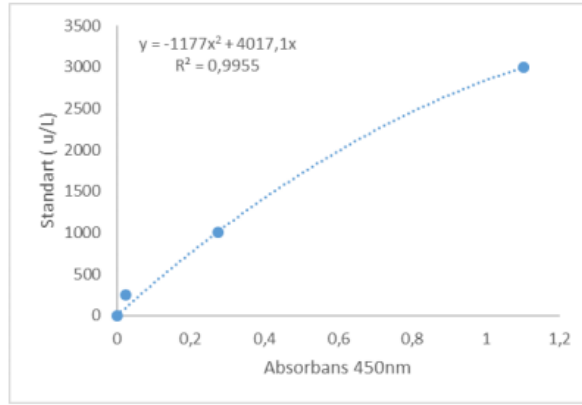


Şekil 4.7. Hoechst 33342 ve P.I. ile MDA-MB-231 hücrelerinin 72 saat muamelle sonucunda alınan görüntüler.*Sarı ok: Piknotik hücreler ve kromatin kondensasyonu gösterilmektedir.

4.5. Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18 (M30) Metodu Bulguları

Hücre ölüm modunu araştırmak amacıyla apoptozise özgü bir belirteç olan kaspazla-kırılmış CK18 (M30 antijen) seviyelerine bakıldı. Hücre canlılık testleri ve floresan boyama sonuçlarına göre Zn(II) kompleksinin hücre canlılığı üzerine etkili olan 12,5µM, 25µM ve 50µM konsantrasyonları ile MCF-7 hücre soyları 48 saat süreyle muamele edildi. Tedavi süresi sonunda M30 antijen düzeylerine bakıldı.

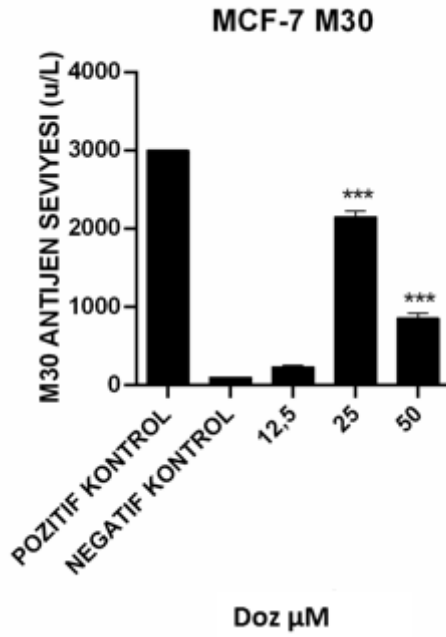
M30 antijen ölçümlerinin değerlendirilmesi için öncelikle standart grafiği hazırlandı (Şekil 4.8.). Ölçülen absorbanslar standart eğri grafiği yardımıyla belirlenen formülü



üzerinden değerlendirilerek M30 antijen miktarları (U/L) hesaplandı.

Şekil 4.8. M30 antijen (kaspazla kırılmış sitokeratin 18) standart eğri grafiği.

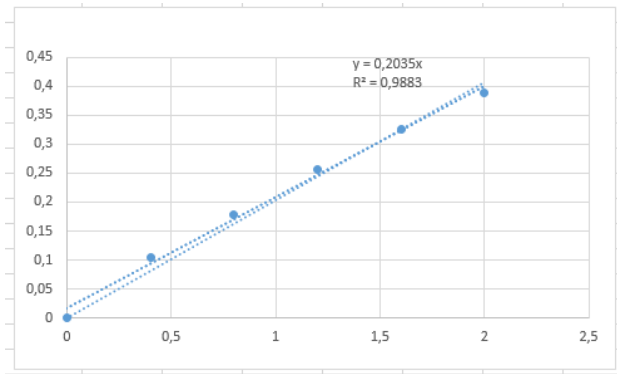
Şekil 4.9’da görüldüğü üzere pozitif kontrol kitin içerisinde çıkan maksimum M30 antijen seviyesini gösterirken negatif kontrol ise Zn(II) kompleksi içermeyen hücre popülasyonunu göstermektedir. Zn(II) kompleksi uygulaması sonrası 12,5µM konsantrasyonunda M30 antijen seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmedi. Fakat 50µM ve 25µM konsantrasyonlarındaki M30 antijen seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı artışı ölüm modunun apoptozis olduğunu göstermektedir (**p<0,001). Floresans boyama sonuçlarında gözlenen piknotik nükleusların varlığı ile M30 antijen sonuçları birbirlerini doğrular niteliktedir.



Şekil 4.9. M30 antijen (kaspazla kısılmış sitokeratin 18) bulguları. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (***) $p < 0,001$) ifade etmektedir.

4.6. Western Blot Bulguları

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri %70-80 doluluk oranına ulaştıklarında, Zn(II) kompleksinin 50µM, 25µM ve 12,5µM dozları uygulandı. 48 saat sonunda protein izolasyonu sonrasında protein konsantrasyonlarını belirlemek üzere bir standart eğri grafiği hazırlandı. Örnek protein konsantrasyonları bu grafikten elde edilen formül yardımıyla hesaplandı (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. BSA standart eğri grafiği.

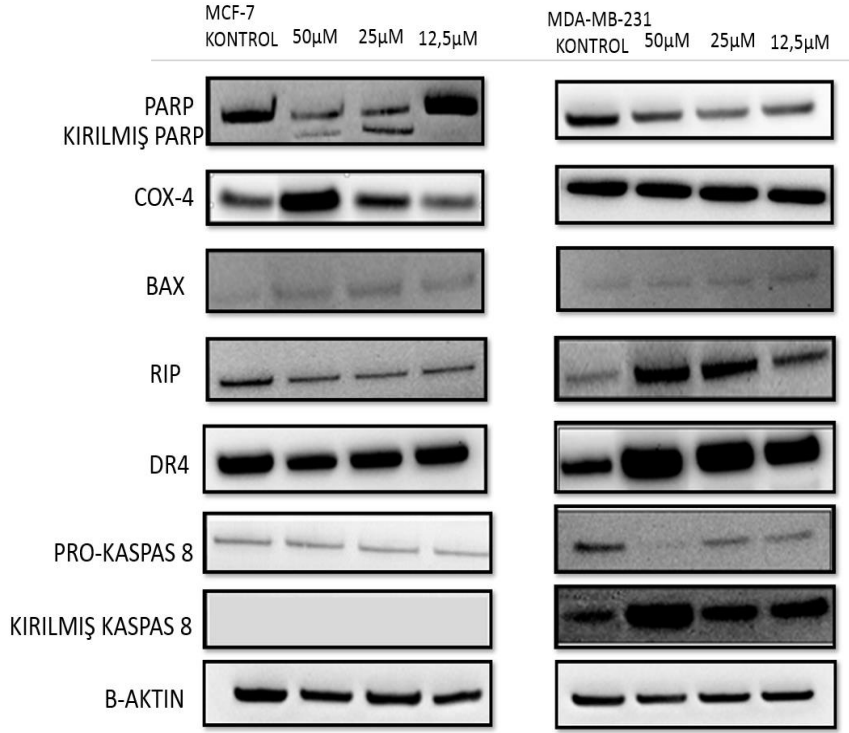
Hücrelerde ölüm mekanizmalarında görevli olan PARP/kırılmış PARP, COX4, DR4, Prokaspaz-8/kırılmış Kaspaz-8, BAX, RIP proteinlerin seviyelerine bakıldı.

Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP-1) proteini çevresel strese yanıt olarak DNA onarımında görevlidir. Ayrıca apoptoz sırasında kaspazlar tarafından Asp214 birimlerinden kırılmaktadır. MCF-7 hücrelerinde 50 ve 25µM konsantrasyonlarında PARP seviyesinin azaldığı, kırılmış PARP seviyesinin arttığı belirlendi (Şekil 4.11.). BAX proteini özellikle içsel apoptotik yolda görev almakta ve apoptoz indükleyici bir faktör olarak görev almaktadır. MCF-7 hücrelerinde 50 ve 25µM Zn(II) kompleksi uygulaması sonunda Bax protein seviyelerinde kontrole kıyasla bir artış gözlemlendi (Şekil 4.11.). COX-4 proteini mitokondride sitokrom c salımında ve oksidatif stres oluşumunda etkili olarak apoptozis mitokondriyal yollarda rol almaktadır. COX-4 seviyesinin MCF-7 hücrelerinde kontrole kıyasla arttığı bulundu. Buna rağmen apoptozisin dışsal yolağında rol alan RIP, DR4 ve aktif kaspaz-8 protein seviyelerinde herhangi bir değişim gözlemlenmedi (Şekil 4.11.).

DR4 TNF ligand ailesinin bir üyesi olup hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanması ile apoptozisi başlatılmasında görevlidir. MDA-MB-231 hücrelerinde dışsal apoptoz yolağında rol alan DR4 protein seviyesinin 50, 25 ve 12,5µM dozlarında Zn(II) kompleksi uygulaması sonrasında kontrole kıyasla arttığı belirlendi.

RIP apoptoz dışsal yollak reseptörü olan Fas ile etkileşimdedir. Ölüm alanlarını içeren RIP proteinleri, prokaspaz-8'in aktivasyonu ile apoptozu doğrudan uyarmaktadır. MDA-MB-231 hücrelerinde dışsal apoptoz yolağında rol alan RIP protein seviyesinin 50 ve 25µM dozlarında Zn(II) kompleksi uygulaması sonrasında kontrole kıyasla arttığı belirlendi.

Kaspaz-8, ölüm reseptörleri yoluyla dışsal apoptotik sinyal yolunda önemli rol oynayan bir sistein proteazıdır. Bulgularda apoptotik bir belirteç olan prokaspaz-8 düzeyinde Zn(II) kompleksi uygulaması sonrasında artış gözlemlenmezken kırılmış kaspaz-8'de 48 saatlik Zn(II) kompleksi uygulaması sonrasında 50µM, 25µM ve 12,5µM dozlarında artış gözlemlendi (Şekil 4.11.).



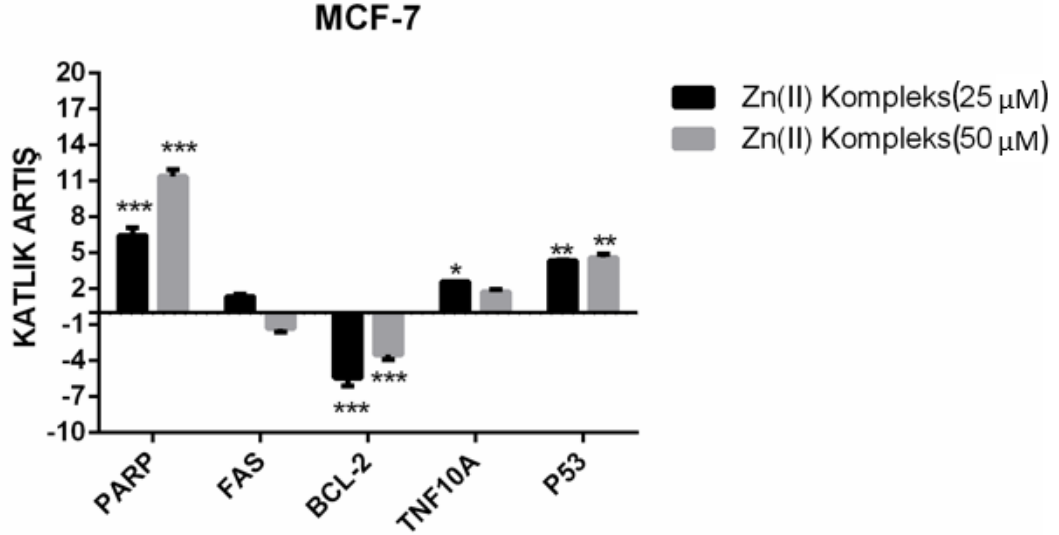
Şekil 4.11. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde hücre ölüm mekanizmalarında rol alan protein seviyelerinin Western Blot yöntemi ile gösterimi.

4.7. PCR Bulguları

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Zn(II) kompleksinin 48 saatlik tedavi sonrasında bazı hücre ölüm genlerinin (PARP, TNF10A, Fas, BCL-2, P53) ekspresyonları üzerine etkisi Real-Time PCR ile araştırıldı. Sonuçlar 2^{-ddCT} formülü ile hesaplandı. Grafiksel gösterim katlık artış olarak gösterildi ve 2/-2 arasındaki değerler dışında kalan sonuçlar anlamlı kabul edilerek yorumlandı.

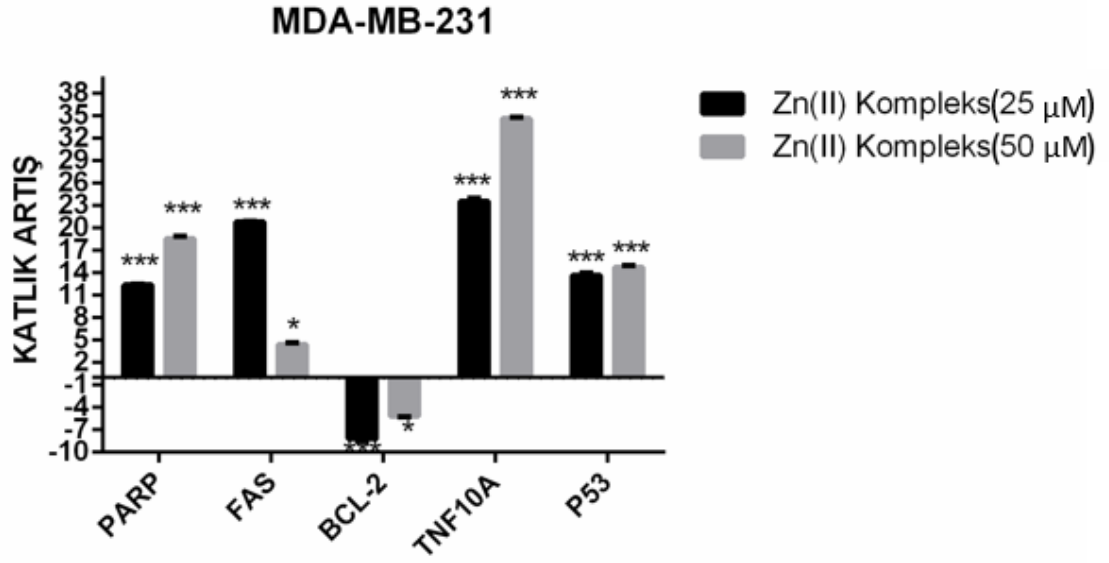
Alınan gen ekspresyon analizi sonuçlarına göre, MCF-7 hücre soyunda Zn(II) kompleksi uygulamasını takiben (50 ve 25µM; 48 saat) PARP ve P53 gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı; BCL-2 gen ekspresyonunun azaldığı belirlendi (**p<0,01, ***p<0,001), (Şekil 4.12). PARP gen ekspresyonunun kontrole oranla 25µM Zn(II) kompleksi tedavisi sonrasında 3,5 kat; 50µM Zn(II) kompleksi tedavisi sonrasında 9,5 kat arttığı gözlemlendi. BCL-2 gen ekspresyonunun kontrole oranla 25µM Zn(II) kompleksi tedavisi sonrasında 3 ve 50µM Zn(II) kompleksi tedavisi sonrasında 3,5 katlık azalma bulundu. P53 gen ekspresyon seviyesinde ise 25µM Zn(II) kompleksi uygulaması ile 4 kat ve 50µM Zn(II) kompleksi uygulaması sonrasında 4,5 kat katlık artışı gözlemlendi. Dışsal yolla rol alan TNF-10A ve Fas genlerinin

ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir artış olmaması MCF-7 hücrelerinin ölüm modunun içsel apoptotik yolak ile gerçekleştiğini desteklemektedir.



Şekil 4.12. MCF-7 hücrelerinde gen ekspresyon bulguları *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*:p<0,05 **:p<0,01 ***:p<0,001) ifade etmektedir.

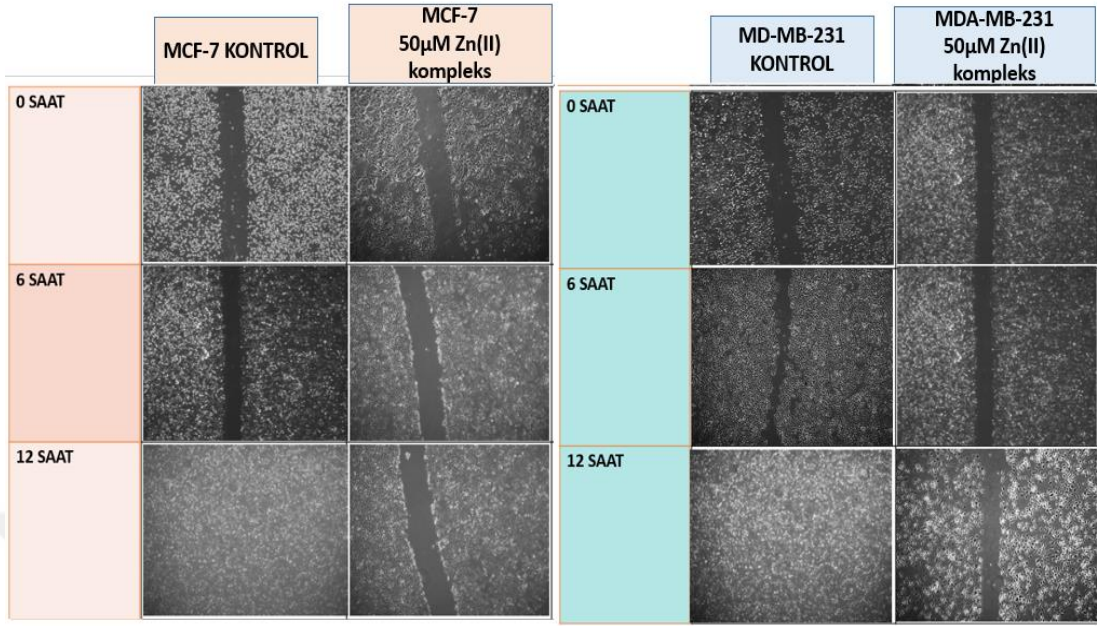
Alınan gen ekspresyon analizi sonuçlarına göre, MDA-MB-231 hücre soyunda Zn(II) kompleksi uygulamasını takiben (50 ve 25µM; 48 saat) PARP, TNF10A ve Fas gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı (***)p<0,001); BCL-2 gen ekspresyonunun azaldığı belirlendi (**p<0,01, ***p<0,001), (Şekil 4.13). PARP gen ekspresyonunun kontrole oranla 25µM Zn(II) kompleksi tedavisi sonrasında 10 kat; 50µM Zn(II) kompleksi tedavisi sonrasında 15 kat arttığı gözlemlendi Fas gen ekspresyonunun kontrole oranla 25µM Zn(II) kompleksi tedavisi sonrasında 16 kat; 50µM Zn(II) kompleksi tedavisi sonrasında 2 kat arttığı gözlemlendi. TNF10A gen ekspresyonunun kontrole oranla 25µM Zn(II) kompleksi tedavisi sonrasında 20 kat; 50µM Zn(II) kompleksi tedavisi sonrasında 32 kat arttığı gözlemlendi. BCL-2 gen ekspresyonunun kontrole oranla 25µM Zn(II) kompleksi tedavisi sonrasında 5 ve 50µM Zn(II) kompleksi tedavisi sonrasında 3 katlık azalma bulundu. P53 gen ekspresyon seviyesinde ise 25µM Zn(II) kompleksi uygulaması ile 8 kat ve 50µM Zn(II) kompleksi uygulaması sonrasında 9 kat katlık artışı gözlemlendi. Bu bulgular sonucunda MDA-MB-231 hücrelerinin ölüm modunun dışsal apoptotik yolak ile gerçekleştiğini desteklemektedir.



Şekil 4.13. MDA-MB-231 hücrelerinde gen ekspresyon seviyeleri bulguları *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*:p<0,05 **:p<0,01 ***:p<0,001) ifade etmektedir.

4.8. Hücre Migrasyon (Yara İyileşmesi) Testi Bulguları

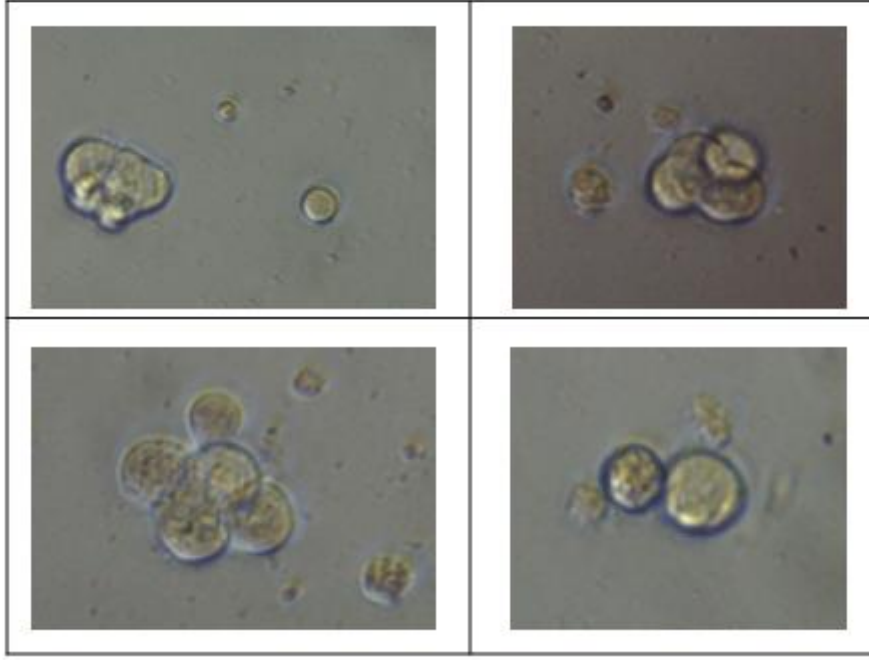
Hücre Migrasyon testi için MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri Zn(II) kompleksinin 50 µM dozu ile muamele edildi. Hücreler kompleksin uygulandığı ilk anda (0. Saat) ve daha sonra devamlı gözlenerek kontrol grubumuzda (tedavi almamış) yara iyileşmesi tamamen kapanıncaya kadar fotoğraflandı. Alınan hücre görüntüleri incelendiğinde, kontrol hücrelerinde 6. saatten itibaren yaranın kapanmaya başladığı, 12. saatte ise tamamen kapandığı gözlemlendi. MCF-7 hücrelerinde 50µM dozunda hücre göçü gözlemlenmediği ve 12 saat sonunda 0. Saatten bir fark olmadığı belirlendi. MDA-MB-231 hücrelerinde ise benzer bir durum gözlenmiş olup Zn(II) kompleksi uygulaması sonucunda hücre migrasyon yeteneğinin inhibe olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.14).



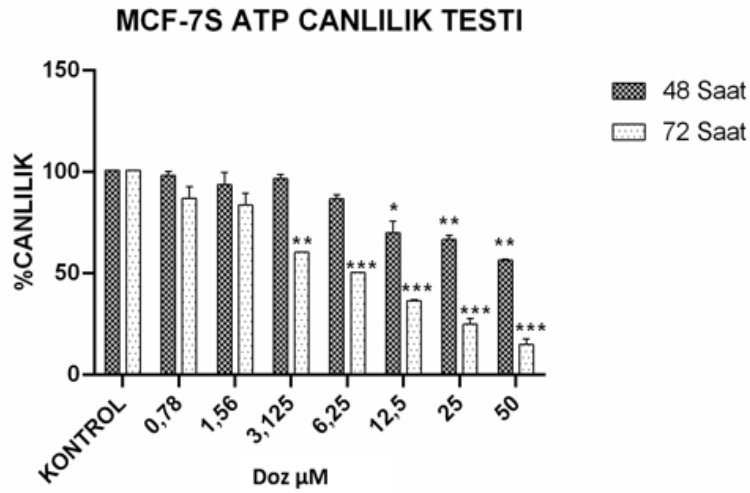
Şekil 4.14. Zn(II) kompleksinin (50µM) MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde migrasyon yeteneği üzerindeki etkisi.

4.9. Zn(II) kompleksinin İnsan Meme Kanseri Kanseri Kök Hücreleri (MCF-7s) Üzerindeki Sitotoksik Etkileri

İlk olarak MCF-7 kanser hücrelerinden uygun besiyeri ve şartlandırılmış koşullar altında mamosfer oluşumları gerçekleştirildi. Hücrelerin sfer oluşumunu tamamlamaları ve ekime hazır hale gelmeleri mikroskop altında gözlemlendi (Şekil 4.15). Ekime hazır hale gelen hücreler uygun besiyerini ortamında 96 kuyucuklu hücre kaplarına ekim yapılarak istenilen hücre sayısına gelmesi için mikroskop altında takip edildi. İstenilen hücre çoğunluğu elde edildiğinde Zn(II) kompleksinin farklı konsantrasyonları ile (0,78-50µM) 48 ve 72 saat tedavi edildi. MCF-7s hücrelerinde canlılığa olan etkisi şekil 4.2'de gösterildi. Zn(II) kompleksinin 48 ve 72 saat sonra uygulamasının MCF-7s soylarında doza ve zamana bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığı belirlendi. Özellikle 72 saat sonuçlarında 3,12-50µM konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi (*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001), (Şekil 4.16).



Şekil 4. 15. Hücrelerin sfer oluşumunu ve mikroskop görüntüleri.



Şekil 4.16. Meme kanseri kanser kök hücrelerinde ATP canlılık testi sonuçları. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın 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.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Modern çağın insanları, artan bir sıklıkta kanser yüzünden ölümlerle karşılaşmaktadırlar. İstatistikler erkeklerde; akciğer, bağırsak, rektum ve prostat kanserinin, kadınlarda ise meme, bağırsak, rektum ve mide kanserinin sık görüldüğünü rapor etmektedir (Abdulla ve Greber 2000). Kanser, Hipokrat (460-370 M.Ö.) tarafından karsinoma ve karsinoz olarak ifade edildiği zamandan bu yana kanser üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Tüm bu çalışmalara rağmen hala bazı kanserlerin tedavilerinin çok kısıtlı olduğu ya da mümkün olmadığı belirtilmiştir (Hanahan ve Weinberg 2011). Kanser tedavisi için yapılan birçok çalışmaya rağmen kansere bağlı ölüm oranlarının her geçen gün daha da arttığı hatta 2050 yılında yaklaşık 17 milyon kişiye yeni kanser teşhisi konulacağı belirtilmektedir (Inzucchi ve Kinder 2005). Meme kanseri, kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türü olup, kansere bağlı ölümlerin başında yer almaktadır. Meme kanseri insidansı ve ölüm hızı genellikle yaşla birlikte artış göstermektedir. Meme kanseri ölümlerinin %97'si 40 yaş ve üstü kadınlarda görülmektedir (Anonim 2014). Erken tanındaki gelişmelere ve meme kanseri biyolojisinin moleküler temelini anlaşılmış olmasına rağmen erken evre meme kanserli olguların %30'unda nüksler (tekrarlar) görülmektedir (Gonzalez-Angulo ve ark. 2007). Bu yüzden, meme kanserinin tedavisinde ve önlenmesinde yeni alternatif ajanların araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Yaramış 2011). Bugüne kadar birçok tedavi yöntemi uygulanmasına karşın kemoterapi halen diğer yöntemlere göre daha etkili görülmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Kullanılan kemoterapi ilaçları kanser hücrelerini öldürmek için geliştirilse de, aynı zamanda sağlıklı hücrelere de zarar vermekte ve buna bağlı olarak hastalarda yan etkiler ile birlikte ölümlere neden olmaktadır (Bruce ve ark. 2005).

Metaller ve metal bazlı bileşikler uzun yıllardır kanser tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır. İncelenen metal bileşiklerinden anti kanser aktivitesi en yüksek olanlar Pt ve Pd kompleksleridir. Günümüzde klinikte kemoterapide kullanılan Cisplatin, en fazla kullanılan metal bazlı anti kanser ilaçlardan biridir. Metal bileşikleri içeren antikanser ajanların DNA'da iplikler arası çapraz bağları etkileyerek DNA kalıntılarının oluşumuyla apoptozise neden olduğu bilinmektedir (Zhu ve ark. 2009). Metal kompleksleri ile yapılan antikanser araştırmalar giderek artmakta ve yeni ve farklı metal bazlı bileşikler geliştirilmektedir. Zn(II) komplekslerinin biyolojik

aktivitelerinin belirlenmesi özellikle son yıllarda antikanser potansiyellerinin araştırılmasına yönelik çalışmaları da arttırmıştır. Örneğin yapılan bir çalışmada Zn(II) ve Cu(II) kompleksleri sentezlenmiş ve bu kompleksler arasında Zn(II)-1,10-fenantrolin kompleksinin insan meme (MCF-7), hepatoselüler (HepG2) ve kolon (HT29) kanser hücrelerinde anlamlı sitotoksik etkiye neden olduğu tespit edilmiştir (Wang ve ark. 2017). Bir başka çalışmada ise bis (asetilasetonat-k20, O) (1,10-fenantrolin-k2N, N) Cu(II) ve Zn(II) komplekslerinin sentezi yapılmış ve Zn(II) kompleksi farklı kanser hücre soylarında sitotoksikte testleri uygulanmıştır. İnsan meme kanseri hücrelerinde (MCF-7 ve MDA-MB-231) yüksek antitümöral etki gösterdiği bildirilmiştir (Trejo-Solis ve ark. 2017).

Pirolidin ditiyokarbamat-Zn(II) ve Cu(II) komplekslerinin proteazom etkinliğini inhibe ederek tümör hücrelerinde apoptozisi teşvik etmesine yönelik yapılan bir başka çalışmada, Zn(II) kompleksinin, apoptozun indüklenmesinde Cu(II) kompleksinden daha etkili olduğu belirlenmiştir (Milacic ve ark. 2008).

Bu tez çalışmasında, yukarıdaki bilgiler ışığında Zn(II) 5,5-dietilbarbitürat bileşiğinin insan meme kanseri hücre soyları olan MCF-7 ve MDA-MB-231 de sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Zn(II) kompleksinin de içinde bulunduğu farklı komplekslerin anti kanser aktivitesinin taranması daha önce grubumuz tarafından meme (MCF-7), akciğer (A549), prostat (Du145) ve kolon (HT29) hücrelerinde yapılmıştır. Birçok kompleks arasında Zn(II)5-5 dietilbarbitürat kompleksinin diğerlerine oranla meme kanserinde daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği gösterilmiştir (Yılmaz ve ark. 2016). Bu yüzden meme kanser hücrelerinde sitotoksik etkisini ve mekanizmalarını belirlemek üzere Zn(II) kompleksi seçilmiş ve ileri analizler bu kompleks üzerinden tasarlanmıştır.

Son zamanlarda Zn(II) kompleksi içeren birçok yeni çalışma söz konusudur. Bu çalışmalar arasında yapılan bir çalışmada Zn(II) ve Cu(II)- Bis (tiyosemikarbazon) kompleksleri sentezlenmiş ve neuroepithelioma (SK-N-MC) hücreleride anti kanser etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sitotoksik verilerinde Zn(II) kompleksinin 72 saatlik tedavi sondası IC₅₀ değerleri 8,63µM olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada farklı bir Zn(II) kompleksinin 72 saatlik IC₅₀ değerleri 18,84µM olduğu bildirilmiştir (Anjum ve ark. 2019). Bir başka çalışmada, farklı bir Zn(II)-2,6-diasetilpiridin-bis (tiyosemikarbazon) kompleksinin kanser hücrelerinde (T24, HeLa, SKOV-3, 7402 ve

WI38) anti tümöral etkileri araştırılmıştır. 72 saat sonunda elde edilen IC₅₀ değerleri mesane kanser (T24) hücrelerinde 39,54µM, rahim ağzı kanser (HeLa) hücrelerinde 38,82µM, over kanser (SKOV-3) hücrelerinde 41,3µM, karaciğer kanser (Bel-7402) hücrelerinde 40,43µM ve akciğer kanser (WI38) hücrelerinde 12µM olduğu belirlenmiştir (Yu 2019).

Çalışmamızda Zn(II) kompleksinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, SRB ve ATP canlılık analizleri ile değerlendirildi. Zn(II) kompleksinin doza ve zamana bağımlı olarak MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında, hücre canlılığını azalttığı belirlendi. Tez çalışmamızda 72 saatteki IC₅₀ değerleri MCF-7 hücrelerinde 7,47µM; MDA-MB-231 hücrelerinde ise 3,00µM bulundu. Elde edilen bu bulgular sonucunda tez aşamasında kullandığımız Zn(II) kompleksinin insan meme kanser hücrelerinde diğer çalışmalarındaki Zn(II) kompleksine göre daha yüksek bir sitotoksik etki gösterdiği açıktır. Nitekim içinde MCF-7 hücresinin de bulunduğu farklı kanser hücreleri üzerinde farklı Zn(II)-fenantrolin-salisilaldimin komplekslerinin antikanser potansiyelleri araştırılmış ve 48 saatlik IC₅₀ değeri MCF-7 hücrelerinde 21,8µM olarak belirlenmiştir (Matos 2019). Bizim kullandığımız Zn(II) kompleksi ise MCF-7 hücrelerinde 48 saatlik IC₅₀ değeri 3.45µM olarak bulunmuştur. Bu sonuç tez çalışmamızda kullandığımız Zn(II) kompleksinin anti proliferatif aktivitesinin daha yüksek olduğunu desteklemektedir.

Bahsedilen çalışmada ile karşılaştırıldığında tez aşamasında kullandığımız 5,5-dietilbarbitürat kimyasalı, Zn(II) metali ile daha etkili bir sinerji oluşturduğu ve insan meme kanser hücrelerindeki sitotoksik sonuçlarından IC₅₀ değerleri daha düşük olduğu sonucunda varılmıştır. 5-dietilbarbitüratın (barb) Pd(II) ve Pt(II) komplekslerinin antikanser aktivitesi meme kanseri hücre soyları üzerinde araştırılmıştır. İnsan meme (MCF-7) kanserinden alınan Pd(II) kompleksinin IC₅₀ değerinin; 50,4 Pt(II) kompleksinin IC₅₀ değerinin; 78,4µM olarak bulunmuştur (İçsel ve ark. 2015).

Yapılan bir çalışmada, Zn(II)-2-asetil-5-kloro tiofen tiyosemikarbazon kompleksi sentezi gerçekleştirilmiş ve sağlıklı kolorektal (CCD-18Co) ve kanser kolorektal hücrelerinde (Caco-2, DLD-1 ve SW620) sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Zn(II)-2-asetil-5-kloro tiofen tiyosemikarbazon kompleksi ile tedavi edilen hücrelerin 48 saatlik inkübasyonun ardından IC₅₀ değerinin; CCD-18Co 16,74µM, Caco-2 28,9µM, DLD-1 14,8µM ve SW620 27,68µM olduğu bildirilmiştir (Şen ve ark. 2019). Literatürdeki

çalışmalar farklı yapıda sentezlenen Zn(II) komplekslerinin kanser hücrelerinde anti tümöral potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

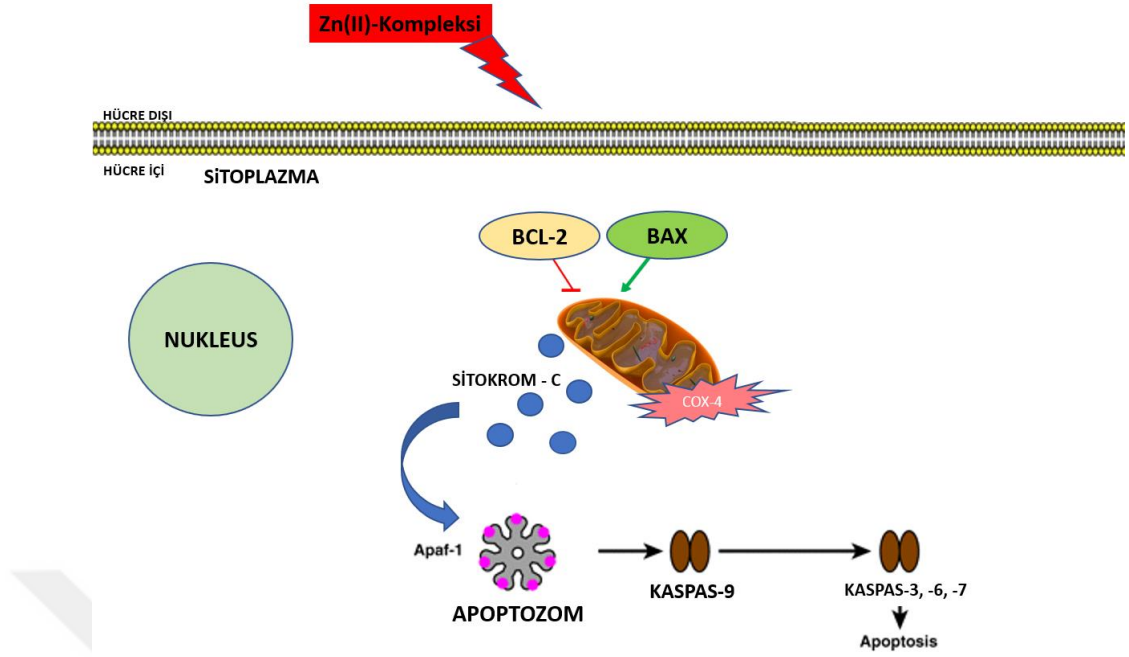
Çalışmamızda Zn(II) kompleksinin farklı konsantrasyonlarında (0,78-50 µM, 48 ve 72 saat) sağlıklı meme hücre soyları (MCF-10A) üzerindeki sitotoksik olan etki değerlendirildi. Kanser hücrelerinin 48 saat sonuçlarında, MCF-7 hücrelerinde 50 µM dozunda %30 canlılık, MDA-MB-231 hücrelerinde %10 canlılık belirlendi. MCF-10A hücrelerinde ise 48 saat sonucunda anlamlı azalma gözlenmedi. Buda Zn(II) kompleksinin sadece kanser hücrelerinde toksikken sağlıklı hücrelerinde herhangi bir etkiye neden olmadığını göstermektedir. Bu durum anti kanser ajanlarda aranan bir özellik olup oldukça önemlidir. Bu sonuçlar göz önüne alınarak ileri analizlerin 48 saate yapılmasına karar verilmiştir.

Hücre ölüm modunu belirleyebilmek için floresans boyama yöntemi uygulandı. Hoechst 33342 ve PI kullanılarak floresans mikroskopla hücreler görüntülendi. MCF-7 hücrelerinin Zn(II) kompleksi ile uygulanması sonunda yüksek dozlarda hücre görüntülerinde azalmalar nuklear fragmantasyonlar ve kromatin kondensasyonları gözlenmiş aynı zamanda PI pozitif görünmesi ile sekonder apoptoz ile hücrelerin öldüğü bulunmuştur. Daha düşük dozlarda ise piknotik hücreler ile PI boyanın negatif olması primer apoptoz olduğunu ortaya çıkmıştır. MDA-MB-231 hücrelerinde Zn(II) kompleksi muamelesi sonucunda hücre yoğunluğunun azaldığını, piknotik nukleuslar ile kromatin kondensasyon oluşturduğu gözlemlenmiştir. Özellikle düşük dozlarda Hoechst 33342 pozitif ve PI negatif olan görüntüler ile hücreleride primer apoptoz belirlenmiştir. Daha uzun inkübasyon sürelerinde ise hücrelerin sekonder apoptoz ile öldüğü belirlenmiştir. Sonuç olarak her iki hücre soyunda da hücrelerin apoptozis yolağı ile öldüğü gözlemlenmiştir. Yapılan bir çalışmada farklı bir Zn(II) benzoksazol tabanlı kompleksinin fare lösemi (L5178Y) hücreleride floresan boyama verilerinde 72 saat inkübasyon sonucunda hücrelerinin ölüm modunun geç apoptoz olduğu bildirilmiştir (Spengler ve ark. 2018). Bir başka çalışmada ise Zn(II)-ftalosiyanın-altın-dendrimerik nanopartikül kompleksinin insan meme kanser hücresinde (MCF-7) ölüm modeli araştırılmış ve floresan boyama bulgularında sekonder apoptoz morfolojileri elde edilmiştir (Tynga ve ark. 2018). Bahsedilen bu araştırmalar sonucunda Zn(II) kompleksi tedavisinin kanser hücrelerini apoptotik yollak ile ölümü gerçekleştirebildiğini doğrulamaktadır.

Sitotoksik testler ve floresan foyama sonuçları değerlendirildikten sonra ileri analizleri 48 saate ve sitotoksik bulunan konsantrasyonları (12,5, 25 ve 50 μ M) üzerinde apoptoze özgü bir belirteç olan kaspazla-kırılmış CK18 (M30 antijen) düzeylerine bakıldı. Zn(II) kompleksin 50 ve 25 μ M dozunda MCF-7 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir M30 antijen artışa neden olduğu gözlemlendi. Floresan boyamadaki 48 saat sonuçları ile karşılaştırıldığında, apoptotik cisimcikler ve piknotik nükleusların varlığı M30 sonuçlarını doğruluğunu desteklemektedir. Zn(II) ve Cu(II)- pirolidin-ditiyokarbamat kompleksi üzerine yapılan çalışmalarda Zn(II) komplekslerinin insan meme (MDA-MB-231) ve prostat (PC-3) kanser hücrelerinde sitotoksik etkisinde ve apoptozisin indüklenmesinde Cu(II) kompleksinden daha çok etkili olduğu gözlenmiştir (Vesna ve ark. 2008). Bir benzer çalışmada Zn(II) kompleksinin sitotoksik ve apoptotik etkileri hepatoselüler karsinoma (HepG2, SMMC7721) ve akciğer kanser (A549) hücrelerinde araştırılmış, Zn(II) kompleksinin antitümoral etkisinin apoptozisi indükleyerek gerçekleştirdiği bulunmuştur (Tan ve ark. 2009). Bu bulgular Zn(II) apoptotik yollağı teşvik edebildiğini ve bizim bulgularımızı destekleyen bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda, Zn(II) kompleksinin meme kanseri hücre soyları üzerindeki etkilerinin ileri moleküler mekanizmaları protein seviyelerinde western blot, gen ekspresyonu seviyesinde ise RT-PCR yöntemi kullanılarak aydınlatılmaya çalışılmıştır. İlgili proteinler arasında β -aktin, PARP, Kırılmış PARP, DR4, BAX, COX4, Kaspas8, Kırılmış Kaspas 8 antikorları kullanıldı. Gen ekspresyon analizlerinde ise PARP, Fas, TNF10A, BCL-2 ve P53 genlerinin ekspresyonları incelendi. MCF-7 hücrelerinde 50 ile 25 μ M Zn(II) kompleksi uygulamasının, apoptozis belirteci olan kırılmış PARP'ın ekspresyon düzeyinde kontrole kıyasla artış gözlenirken buna paralel PARP protein seviyelerinde azalma belilendi. PARP proteini kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin hedefi olarak kırılabilir. PARP kaspazlar tarafından kırıldıktan sonra DNA'nın uç kısımlarına geri dönüşümsüz olarak bağlanır ve apoptozis uyarılmaktadır (Smulson ve ark. 1998). RT-PCR bulgularından PARP geninde benzer olarak anlamlı katlık artış göstermekte ve western sonuçlarını desteklemektedir. MCF-7 hücrelerinde dışsal yollak proteinlerde (DR4 ve RIP) herhangi bir ekspresyon göstermemiş olmasından dolayı ileri analizlere BAX ile devam edildi. BAX geni BCL-2 protein ailesine ait olup bir apoptotik aktivatör olarak işlev görmektedir. Apoptoz indükleyici belirteç olan BAX protein

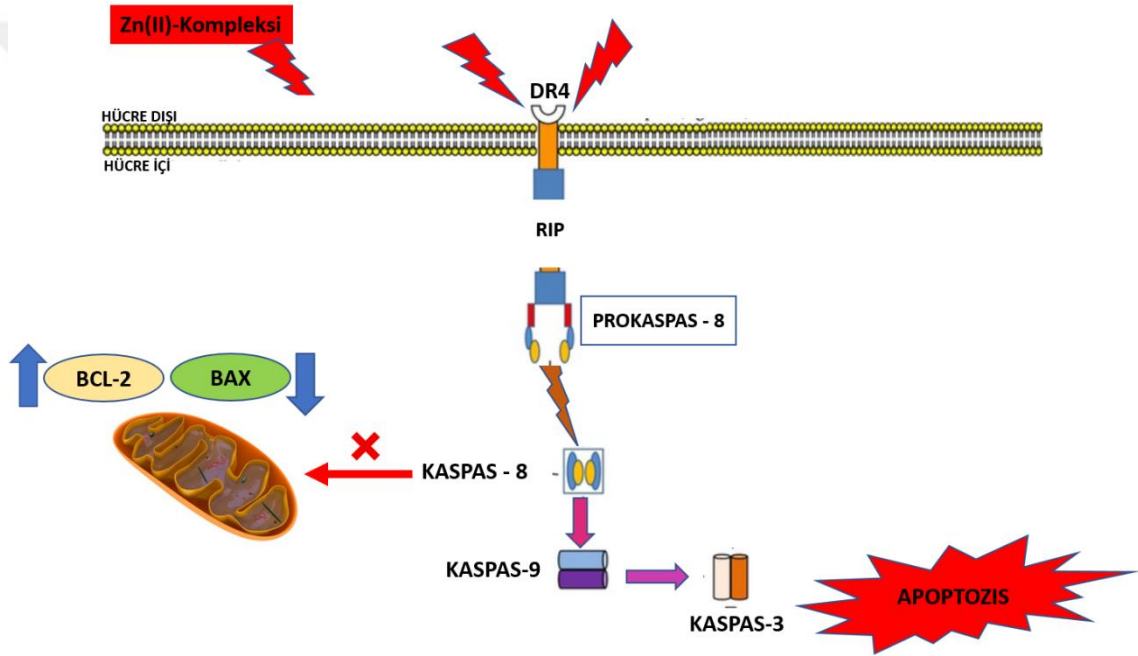
ekspresyonunda kontrole kıyasla seçilmiş ilk iki dozda (50 ve 25 μ M) artış gözlemlendi. BCL-2 geni apoptoz yollağında bulunan BCL-2 ailesinin bir uyesi olup anti-apoptotik özeliğe sahiptir. BCL-2 geninde ise MCF-7 hücrelerinde ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur. BAX ve BCL-2 seviyeleri ters orantılı olmasından dolayı gen ekspresyon sonuçlarındaki BCL-2 seviyesinin düşmesi BAX artışını desteklemektedir. BAX oranının artmasını göz önünde bulundurarak ardından COX4 protein üyesine bakılmıştır. Sitokrom c oksidaz (COX) mitokondriyal solunum zincirinin terminal enzimidir. COX4, elektronların sitokrom c'den moleküler oksijene transferini birleştiren ve iç mitokondriyal membran boyunca bir proton elektrokimyasal gradyanına katkıda bulunan çok altbirimli bir enzim kompleksidir (Xuefeng ve William 2006). Mitokondri'de sitokrom c salımında ve oksidatif stres oluşumunda etkili olarak apoptozis mitokondriyal yollak belirteci olan COX-4 50 μ M Zn(II) kompleksi uygulaması sonucunda protein ekspresyon düzeyinde kontrole göre artış gösterildi. Elde edilen bulgular sonucunda MCF-7 hücrelerinde, hücre ölüm modunun içsel apoptoz yolağında olduğu belirlenmiştir. BAX genin ekspresyonu, tümör süpresörü P53 tarafından düzenlenir ve P53 aracılı apoptozda rol oynadığı bilinmektedir (Marx ve Meden 2001). P53 organizmalarda homolog genler tarafından kodlanan bir proteinin herhangi bir izoformudur. Bu homolog kanser oluşumunu engellediği çok hücreli organizmalar için çok önemlidir, bu nedenle tümör baskılayıcı olarak işlev görür. Bu nedenle, p53, genom mutasyonunu önleyerek stabiliteyi korumadaki rolünden dolayı "genomun koruyucusu" olarak tanımlanmıştır. P53, bir tümör baskılayıcı gen olarak sınıflandırılır. MCF-7 hücrelerinin p53 sonuçlarındaki gen ekspresyon artışının apoptozis bulgularının desteklemektedir. Literatür çalışmaları da farklı Zn(II) komplekslerinin hücre ölümlerini farklı apoptozis yolları üzerinden sağladığını göstermektedir. Örneğin, azilsartan-Zn(II) kompleksinin sığır serum albüminine bağlı formülasyonunun insan akciğer kanseri (A549) hücre soylarında sitotoksik olduğu ve intrinsik apoptotik yolağı üzerinden hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (Martínez ve ark. 2018). Farklı bir çalışmada ise Zn(II)-ftalosiyanın kompleksinin rahim ağzı kanser (HeLa) kanser hücrelerinde sitotoksik etki sergilendiği ve ölüm modunun içsel yollak ile gerçekleştiğini desteklemektedir (Santiago ve ark. 2008), (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Zn(II) kompleksinin MCF-7 hücre soyları üzerindeki sitotoksik etki mekanizması.

MDA-MB-231 hücre soyunda, western blot sonuçlarında apoptozis belirteci olarak incelenen kırılmış PARP, COX-4, BAX'ın ekspresyon düzeyinde kontrole göre bir artış gözlenmedi. Bu yüzden dışsal apoptotik yollak proteinlerine ve genlere bakıldı. DR4 ("Death receptor 4") reseptörü tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptozis indükleyici ligand (TNFSF10/TRAIL) tarafından aktive edilir ve hücreye ölüm sinyalini ileterek apoptozisi indükler (Kazhdan ve Merciriok 2004). MDA-MB-231 hücrelerinde 50, 25 ve 12,5µM Zn(II) kompleksinin DR4 protein seviyesinin artışına neden olduğu bulundu. Aynı zamanda Fas reseptörünün ölüm alanı ile etkileşen RIP proteininde de artış bulunmuştur. RIP ölüm reseptörü sinyallerinin anahtar bileşeni olarak hücrede apoptozisi tetiklemektedir (Grimm ve ark. 1996). Fas hücre yüzeyinde bulunan ve apoptozise yol açan bir ölüm reseptörüdür. (Fan ve ark. 2005). TNF10A ("Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10") tümör nekroz faktörü reseptörüne bağlanan bir ligandır. Reseptör ligant ilişkisi ile gerçekleşen aktifleşme ile dışsal yollak apoptozisi indüklenir (Fan ve ark. 2005). RT-PCR bulgularındaki gen ekspresyonlarının FAS ve TNF10A genlerinin seviyelerindeki anlamlı katlık artışta hücrelerde dışsal yollak apoptozis gerçekleştiğini desteklemektedir. Aynı zamanda p53 genindeki katlık aktivasyonunda Zn(II) kompleksi ile MDA-MB-231 hücrelerinde dışsal apoptozis

gerçekleştiğini göstermektedir. Dışsal apoptozis yolağının bir başka anahtar bileşeni ise Kaspaz-8'dir. MDA-MB-231 hücrelerinde prokaspaz-8 düzeyinde bir değişim gözlenmezken kırılmış kaspaz-8 de ise belirgin artış gözlenmesi tüm bulgularımızı destekler niteliktedir. Western blot ve RT-PCR bulguları sonucunda MDA-MB-231 hücrelerinin ölüm yollağının dışsal apoptoz olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan bir çalışmada çalışmada Zn(II)-dendrimerik nanopartiküller kompleksinin insan meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) gen ekspresyon seviyeleri incelenmiş ve sonuç olarak kanser hücrelerinin ölüm modelinin apoptoz dışsal yollak olduğu belirlenmiştir (Tynga ve ark. 2018). Bu bulguların Zn(II) kompleksinin apoptoziste dışsal yollağı aktive ettiğini desteklemektedir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Zn(II) kompleksinin MDA-MB-231 hücre soyları üzerindeki sitotoksik etki mekanizması.

Çalışmamızda, Zn(II) kompleksinin hücre migrasyonu (göç) üzerine etkisini değerlendirmek için yara iyileşmesi analizi yapıldı. Alınan hücre görüntüleri incelendiğinde, kontrol hücrelerinde 6. saatten itibaren yaranın kapanmaya başladığı, 12. saatte ise tamamen kapandığı gözlemlendi. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde 50µM Zn(II) kompleksinin hücre migrasyonunu engellediği gözlemlendi. Sonuçlar Zn(II) kompleksinin anti migrasyon potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Literatürde Zn(II) kompleksinin hücrelerde migrasyon yeteneği üzerine etkisini gösteren bir çalışma

olmaması tez çalışmamızın hem kullanılan Zn(II) kompleksi hem de yöntemler bakımından orijinal olduğunu göstermektedir.

Tez çalışmamızda, Zn(II) kompleksinin meme kanseri kanser kök hücrelerinde sitotoksik etkisi de değerlendirilmiştir. Bildiği üzere kanser kök hücreleri tümörün başlangıcından sorumlu olan ve tümör dokusundaki çok sayıda farklılaşmış hücre topluluğunu oluşturan hücrelerdir. Aynı özgü sinyal ileti sistemleri kanser kök hücrelerin ve normal kök hücrelerinin kendi-kendini yenileme ve/veya farklılaşmasında fonksiyonel rol oynarlar (Tuna 2009). Özellikle kanser kök hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapi tedavisine dirençli olduklarının belirlenmesi kanser kök hücrelerini öldürecek daha etkili tedavilerin geliştirilmesi gerektiğini düşündürmektedir (Tu ve ark. 2013). Birçok kanser hücresinin sınırlı çoğalma yeteneği olduğu için, tümör dokusunun küçülmesi bu hücrelerin öldürüldüğünü göstermektedir. Fakat kanser kök hücreleri, ilaçlara karşı tümör dokusunun en az %99'unu oluşturan hücrelerden daha dirençlidirler. Dolayısıyla, tedaviye rağmen ölmeden sessiz kalabilmektedirler. Bu bilgileri göz önüne alınarak Zn(II) kompleksinin kanser kök hücre popülasyonunca zengin olan MCF-7s hücrelerindeki etkisi araştırıldı. Zn(II) kompleksinin 48 ve 72 saat sonra uygulamasının MCF-7s soylarında doza ve zamana bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığı belirlendi. Elde edilen bulgular sonucunda Zn(II) kompleksinin MCF-7s kanser kök hücrelerinde de sitotoksik etki gösterdiği ($IC_{50}:2,48 \mu M$) bulunmuştur.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, Zn(II) 5,5-dietilbarbitürat kompleksinin MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre soylarında ve kanser kök hücrelerinde yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Buna ilaveten, hücrelerde içsel ve dışsal yolak üzerinde apoptozisi indüklediği belirlenmiştir. *In vitro* olarak gerçekleştirilen bu çalışmanın umut vaad edici bulgularından dolayı Zn(II) 5,5-dietilbarbitürat kompleksinin potansiyel bir antikanser ajan olabileceğini ve daha ileri analizler (*in vivo*, klinik) etkisinin incelenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abercrombie, M., Ambrose E.J. 1962.** The surface properties of cancer cells. *Cancer Research*, 22: 525-48.
- Abdulla, M., Greber, P. 2000.** Role of diet modification in cancer prevention. *Biofactors*, 12: 45-51.
- 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.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J. 1996,** Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell*. 87: 171.
- Anonim. 2003.** Apoptoz <https://dogalbitkiselorganiksaglik.blogspot.com.tr/2015/10/kanser-hakknda-hersey.html> (Erişim tarihi: 01.03.2019). (Erişim tarihi: 01.03.2019).
- Anonim. 2015.** Kanser <https://dogalbitkiselorganiksaglik.blogspot.com.tr/2015/10/kanser-hakknda-hersey.html> (Erişim tarihi: 01.03.2019).
- Anonim. 2014.** 2014 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri. <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/2014-yili-turkiye-kanser-istatistikleri.html> (Erişim tarihi: 01.03.2019).
- Anonim. 2016.** <https://www.bbc.com/turkce/haberler-dunya-47460922> (Erişim tarihi: 01.03.2019).
- Andreotti, P.E., Cree, I.A., Kurbacher, C.M., Hartmann, D.M., Linder, D., Harel, G., Gleiberman, I., Caruso, P.A., Ricks, S.H., Untch, M., Sartori, C., Bruckner, H.W. 1995.** Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosin triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian cancer. *Cancer*, 5: 5276-5782
- Anjum, R., Palanimuthu, D., Kalinowski, D.S., Lewis, W., Park, K.C., Kovacevic, Z., Khan, I.U., Richardson, D.,R. 2019.** Synthesis, Characterization, and in Vitro Anticancer Activity of Copper and Zinc Bis(Thiosemicarbazone) Complexes. *Inorganic Chemistry*, 7: 276-282
- Arı, C., F., F. 2003.** Western Blotlama Yöntemi ile Protein Tespiti: Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kurs Kitabı, Isparta Türkiye, 125: 189-198
- Asadi, Z., Nasrollahi, N. 2017.** The effect of metal and substituent on DNA binding, cleavage activity, and cytotoxicity of new synthesized Schiff base ligands and Zn (II) complex. *Journal of Molecular Structure*, 1147, 582-593
- Aslan, F.E., Gurkan, A. 2007.** Kadınlarda meme kanseri risk düzeyi. *The journal of breast health*, 3:2, 063-068.
- Aydıntug, S. 2003.** Meme kanserinde erken tanı. Prof.; Ankara Ü. Genel Cerrahi AD, Ankara. Sted; 226-228.
- Baltzell, K., Wrensch M., R. 2005.** Strengths and limitations of breast cancer risk assessment. *Oncology Nursing Forum*, 32(3):606-613.
- Bianco, P., Robey, P.G., Simmons, P.J. 2008.** Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell*, 2(4) : 313-319
- Biglia, N., Defabiani, E., Ponzone, R., Mariani, L., Marengo, D., Sismondi, P. 2004.** Management of risk of breast carcinoma in postmenopausal women. *Endocr Relat Cancer*, 11: 69-83.
- Bradshaw, A., Wickremsekera, A., Tan, S., Peng, L., Davis, P.F. 2016.** Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. Neurosurgery.

- Bruce, A. Chabner, Thomas, G., Roberts, Jr. 2005.** Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer*, 9: 19-23.
- Conklin, K.A. 2004.** Chemotherapy-Associated Oxidative Stress. *Chemotherapeutic Effectiveness*, 5 66–68.
- Cooper, G.,M. 1994.** Programmed cell death. *The Cell*, 592-596.
- Cryns, V., Yuan, J., 1998.** Prpseases to die for. *Genes Dev.* 12: 1551-1570.
- Dalay, N. 2006.** Kanser. İçinde: Hücre: Moleküler Yaklaşım. RE. 3. Baskı. İzmir, İzmir Tıp Kitabevi, 2006: 631-671.
- Desoize, B. 2004.** Metals and Metal Compounds in Cancer Treatment. *Anticancer Research*, 24: 1529-1544
- Duke, R., C., Chervenak, R., Cohen, J., J. 1983.** Endogenous endonucleaseinduced DNA fragmentation: an early event in cell-mediated cytolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80 (20) : 6361-6365.
- Erdoğan, B.B. 2003.** Apoptozis mekanizmaları: Tümör gelişiminde fasfasl bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi*, 4: 165-174
- Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., Liang, J. 2005.** Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* 37: 719–727
- Fartisinha, P., Andrew, P.A., 2018.** Synthesis, characterization and anticancer studies of bis(1-phenylpiperazine dithiocarbamato) Cu(II), Zn(II) and Pt(II) complexes: Crystal structures of 1-phenylpiperazine dithiocarbamato-S,S' zinc(II) and Pt(II). *Journal of Molecular Structure*, 1170: 24-29
- Fennell, D.A., Swanton, C. 2012.** Unlocking Pandora's box: personalising cancer cell death in non-small cell lung cancer. *EPMA Journal*, 10: 1186-1878
- Forro, G. 2012.** <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/forro-gabriella-2009-12-02/HTML/chapter2.html>. (Erişim tarihi: 04.09.13).
- Fortier, L.A. 2005.** Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg*, 34(5), 415-423.
- Gewies, A. 2003.** Introduction to apoptosis. *Cancer research*, 1-26.
- Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., Adjei, A.A. 2005.** Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *Cancer J Cli.* 55: 178
- Grimm, S., Stanger, B.Z., Leder, P. 1996.** RIP and FADD: two "death domain"-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable, pathways. *Proc Natl Acad Sci*, 93(20): 10923–10927
- Glauche, I., Bystrykh, L., Eaves, C., Roeder, I. 2013.** Stem cell clonality Theoretical concepts, experimental techniques, and clinical challenges. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 50(4), 232-240.
- Gonzales-Angulo, A.M., Morales-Vasquez, F., Hortobagyi, G., N. 2007.** Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exo Med Biol.* 608: 1-22
- Guarneri V., Conte P.F. 2004.** The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 1: 149-61
- Hanahan, D., Weinberg, R. 2011.** The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100: 57-70.
- Harris J.R., Morrow, M., Banadonna, G. 1993.** Cancer of the breast. *Principles and Practice of Oncology.* 4: 1264-1332.
- Hernroth, B., Holm, I., Gondikas, A., Tassidis, H. 2018.** Manganese Inhibits Viability of Prostate Cancer Cell. *Anticancer Research*, 38: 137-154

- Hikim, A.P.S., Wang, C., Leung, A.R., Swerdloff, S. 1995.** Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology*, 136: 2770-2775.
- Hui, H., Hu, M., Zhao, X., Tang, Y. 2011.** Stem Cells: General Features and Characteristics: Intech Open Access Publisher.
- Icel, C., Yilmaz, V., T., Kaya, Y., Durmus, S., Sarimahmut, M., Buyuk, 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: 38-5
- Inzucchi, E., Kinder, B., K. 2005.** Endocrine Emergencies. Hypoglycemic and Hyperglycemic Crises In. Kebebew. Textbook of Endocrine Surgery. Philadelphia. W.B. Saunders: 789-799
- Jemal, A., Siegel R., Xu, J., Ward E. 2010.** Cancer statistics 2010. *A Cancer Journal For Clinicians*, 60: 277-300.
- Jeune, M.A.L, Kumi-Diaka, J., Brown, J. 2005.** Anticancer activities of Pomegranate extract and genistein in human breast cancer cells. *Journal of Medicinal Food*, 8(4):469-475.
- Jill, U.A. 2014.** Essentials of Cell Biology. Cambridge, MA: NPG Education
- Jin'an Z, Yan, G., Jiyong, H., Huaibin, Y., Shuangcheng, Z., Junshuai, Z. 2015.** Potential anticancer activity of benzimidazole-based mono/dinuclear Zn(II) complexes towards human carcinoma cells. *Polyhedron*, 102:163-172
- Jones, R.G., Thompson, C.B. 2009.** Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes*, 23(5): 537-548.
- Jordan, C. T., Guzman, M. L., Noble, M. 2006.** Cancer stem cells *New England Journal of Medicine*, 355(12): 1253-1261.
- Kannan, K.I., Jain, S.K. 2000.** Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, 7(3):153-163.
- Kazhdan, I.I, Marciniak, R.A. 2004.** Death receptor 4 (DR4) efficiently kills breast cancer cells irrespective of their sensitivity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Cancer Gene*, 11(10):691-8
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. 1972.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26 (4): 239-257.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. 2005.** Cellular adaptations, cell injury, and cell death. Basis of Disease. 7th ed. Philadelphia: Elsevier, 3-46.
- Lambe, M., Hsieh, C., Trichopoulos, D., Ekblom, A., Pavia, M. ve Adami, H. O. 1994.** Transient increase in the risk of breast cancer after giving birth. *N Engl J Med*, 331: 5-9
- Lamkanfi, M. 2011.** Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* 11(3): 213-220.
- 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. *J Pathol*, 187: 567-72.
- Li, A.I., Hokugo, A., Jarrahy, R., Zuk, P.A. 2014.** Human Adipose Tissue as a Source of Multipotent Stem Cells. *Stem Cells in Aesthetic Procedures*. 67-83.
- Lowe, S.W., Lin, A.W. 2000.** Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3):485- 495.

- Lu, J, Ashwell, K., Ken, W.S., Waite, P. 2000.** Advances in spinal cord injury: Role of apoptosis. *J. Spine*, 25: 1859-1866.
- Ma, M., H., Y., Y., M. 2012.** Totipotent of Stem Cell. *Stem Cell*, 3(4),1
- Martínez, V.R., M.V., Aguirreb, J.S., Todarob O.E., Piroc, G.A., Echeverriac, E.G., Ferrera, P.A., Williams, M.A. 2018.** Zn(II) complex. Synthesis, anticancer mechanisms of action and binding to bovine serum albumin. *Toxicology in Vitro*, 48: 205-220
- Marx, D.I., Meden, H. 2001.** Differential Expression of Apoptosis-Associated Genes bax and bcl-2 in Ovarian Cancer. *Methods Mol Med*, 39:687-91.
- McTiernan, A. 2000.** Physical activity and the prevention of breast cancer. *Medscape Womens Health*, 5: 1
- McTiernan, A., Kooperberg, C., White, E., Wilcox, S., Coates, R., AdamsCampbell, L. L., Woods, N. ve Ockene, J. 2003.** Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women: *the Women's Health Initiative Cohort Study*, 290: 1331-1336
- Messmer, U.K., Pfeilschifter, J. 2000.** New insights into the mechanism for clearance of apoptotiz cells. *BioEssays*, 22: 878-88
- Milacic, V., Chen, D., Giovagnini, L., Diez, A., Fregona, D., Dou, Q.P. 2008.** Pyrrolidine dithiocarbamate-zinc(II) and -copper(II) complexes induce apoptosis in tumor cells by inhibiting the proteasomal activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231: 24-33
- Matos, C.P., Addis, Y., Nunes, P., Barroso, S., Alho, I., Martins, M., Matos, A.P.A., Marques, F., Cavaco, I., Pessoa C.J., Correia, I. 2019.** Exploring the cytotoxic activity of new phenanthroline salicylaldehyde Zn(II) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 19: 110-727
- 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. *J. Biomol.Screens*, 9: 506–515.
- Newcomb, P. A., Storer, B. E., Longnecker, M. P., Mittendorf, R., Greenberg, E. R., Clapp, R. W., Burke, K. P., Willett, W. C. ve MacMahon, B. 1994.** Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *New England Journal and Medicine*, 330: 81-87
- Norbury C.J., Hickson I.D. 2001.** Cellular responses to DNA damage. *Pharmacol Toxicol*. 41:367–401
- Nuria, A., Illán-Cabeza S.B., Pulido, J., Hueso-Ureña, F., Ramírez-Expósito, J.M., Sánchez-Sánchez, P., Martínez-Martos, J.M., Moreno-Carretero, M.N. 2018.** Effects on estrogen-dependent and triple negative breast cancer cells growth of Ni(II), Zn(II) and Cd(II) complexes with the Schiff base derived from pyridine-2-carboxaldehyde and 5,6-diamino-1,3-dimethyluracil explored through the renin-angiotensin system (RAS)-regulating aminopeptidases. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 185: 52-62
- Özmen, V. 2013.** Breast Cancer in Turkey. *Turkiye Klinikleri*, 6(2):1-6
- Özgürtaş, T. 2004.** Kanser, Kanser Genleri ve Büyüme Faktörleri. İçinde: Harper Biyokimya, Dikmen N, Özgünen T (editörler). Harper's Biochemistry. 25. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 787-811.
- Pages, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.C., Tartous, E., Sautes-Fridman, C., Fridman, W.H. 2010.** Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, 29(8): 1093-1102.

- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. 2005.** Global cancer statistics. *A Cancer Journal For Clinicians*, 55:74-108
- Pelengaris, S., Khan, M, Steward, W., Blasco, M., Yee, C., Shima, D., Streuli, C., deWit, N.C.J., Rudd, N., Ruhrberg, C., Thomas, A., Waterhouse, E., Roussel, M. 2006.** The molecular biology of cancer. Blackwell Publishing, Massachusetts, A.B.D. 6-309
- Penur, Ö. 2013.** Kanser Biyokimyası. *Biyokimya*, 2. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 653-674.
- Rajasekhar, V. 2014.** Cancer Stem Cells. Somerset, NJ, USA: John Wiley & Sons, Incorporated.
- Ramachary, M., Ramaiah, K., Ramu, G.N., Munirathinam, D., Gandamallad, N., Reddy, Y., Laxma, R.K. 2018.** Zn(II), Cd(II) and Hg(II) metal complexes of 2-aminonicotinaldehyde: Synthesis, crystal structure, biological evaluation and molecular docking study. *Inorganica Chimica Acta*, 469: 66-75
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Weissman, I.L. 2001.** Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859): 105-11
- Ries, L.A.G., Melbert, D., Krapcho, M. 2008.** Cancer Statistics, 1975–2005. *Bethesda, MD*. National Cancer Institute.
- Rosser, B.G., Gores, G.J. 1995.** Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology*, 108(1):252-75.
- Razmkhah, M., Jaberipour, M., Erfani, N., Habibagahi, M., Talei, A.-r., & Ghaderi, A. 2011.** Adipose derived stem cells (ASCs) isolated from breast cancer tissue express IL-4, IL-10 and TGF- β 1 and upregulate expression of regulatory molecules on T cells: do they protect breast cancer cells from the immune response. *Cellular immunology*, 266(2): 116-122.
- Santiago, R.V., Juan, C., Stocker, M., Cañete, P., Acedo, Á. V. 2008.** Mitotic catastrophe induced in HeLa cells by photodynamic treatment with Zn(II)-phthalocyanine. *International Journal of Oncology*, 32(6):1189-96
- Shenggui, l., Wenqiang, C., Lianling, Y., Zheng, W., Linlin, l., Cundong, F., Tianfeng, C. 2013.** Zinc(II) complexes containing bis-benzimidazole derivatives as a new class of apoptosis inducers that trigger DNA damage-mediated p53 phosphorylation in cancer cells. *Dalton Transtaction*, 42: 5932-5940
- Türkiye Kanser İstatistikleri 2017. Ankara, 2018** <http://hsgm.saglik.gov.tr/> Türkiye, (Erişim Tarihi: 20.06.2019).
- Türkiye Kanser Kontrol Planı. 2013-2018.** Meme Kanseri Taramaları. http://kanser.gov.tr/Dosya/NCCP_2013-2018.pdf. (Erişim Tarihi: 15.05.2019).
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R. 1990.** New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82: 1107–1112
- Smulson, M. E., Pang, D., Jung, M., Dimtchev, A., Chasovskikh, S., Spoonde, A., Dritschilo, A. 1998.** Irreversible binding of poly (ADP) ribose polymerase cleavage product to DNA ends revealed by atomic force microscopy: possible role in apoptosis. *Cancer research*, 58(16): 3495-349
- Sohn E. 2005.** From stem cell to any cell. *Science News for Students*. <https://www.sciencenewsforstudents.org/node/840>
- Spengler, G., Kincses, A., Rácz, B., Varga, B., Watanabe, G., Saijo, R., Sekiya, H., Tamai, E., Maki, J., Molnár, J., Kawase, M. 2018.** Benzoxazole-based Zn(II) and

Cu(II) Complexes Overcome Multidrug-resistance in Cancer. *Anticancer Research*, 38(11): 6181-6187;

Şen, B., Kalhan, H.K., Demir, V., Güler, E.E., Kayalı, H.A., Subaşı, E. 2019. Crystal structures, spectroscopic properties of new cobalt(II), nickel(II), zinc(II) and palladium(II) complexes derived from 2-acetyl-5-chloro thiophene thiosemicarbazone:Anticancer evaluation. *Materials Science and Engineering*, 98: 550-559.

Tan, J., Wang, B., Zhu, L. 2009. DNA binding, cytotoxicity, apoptotic inducing activity, and molecular modeling study of quercetin zinc(II) complex. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17: 614-620

Tarafdera, M.T.H., Kasbollaha, A., Crousea, K.A., Alib, A.M., Yaminc, B.M., Fun. H.K. 2001. Synthesis and characterization of Zn(II) and Cd(II) complexes of S-benzyl--N-(2-pyridyl)methylenedithiocarbazate (HNNS):bioactivity of the HNNS Schiff base and its Zn(II), Cu(II) andCd(II) complexes and the X-ray structure of the [Zn(NNS)2] complex. *Polyhedron*, 20: 2363-2370

Topkaya, G.C. 2014. Synthesis and characterisation of Cu (II), Ni (II), and Zn (II) complexes of furfural derived from aroylhydrazones bearing aliphatic groups and their interactions with DNA. *Chemical Papers*, 10: 1293-1303

Tu, M.S.M. 2013. Cancer: a “stem-cell” disease?. *Cancer Cell International Hypothesis*, 2867:13-40

Tuna, M., 2009. Cancer stem cells in solid tumors and leukemia. *Turkish Journal Of Oncology*, 24:1

Tuncer, A.M. 2009. Kanserin Ülkemiz ve Dünyadaki Önemi, Hastalık Yükü ve Kanser Kontrol Politikaları. Türkiye'de Kanser Kontrolü, Ankara, T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı. 3-108.

Trejo-Solis, C., Alvarez-Lemus, M.A., Jiménez-Farfán, D., Anaya-Rubio, I., López-González, R., Palencia, G., Frías-Márquez, D.M., González-García, G., Rubio-Orsorio, C., Calvillo-Velasco, M., Márquez-Chablé, G. 2017. In vitro evaluation of apoptotic effect of bis(acetylacetonato-k2 O,O')(1,10-phenanthroline-k2 N,N')Zn(II) complex. *Chemical Biology and Drug Desing*, 89(4):529-537

Tynga, M., , Houreld, N., Abrahamse, H. 2018. Evaluation of cell damage induced by irradiated Zinc-Phthalocyanine-gold dendrimeric nanoparticles in a breast cancer cell line. *Biomedical Journal*, 41(4): 254–264.

Ueda, H., Fujita, R., Yoshida, A., Matsunaga, H., Ueda, M. 2007. Identification of prothymosin-alpha1, the necrosis-apoptosis switch molecule in cortical neuronal cultures. *Jurnal Cell Biology*, 176(6):853-62.

Ulukaya, E. 2003. Apoptozis Ders Notları. Uludağ Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı. Bursa

Vesna, M., Di, C., Lorena, G., Diez, A., Fregona, D., Doua, Q.P., 2008. Pyrrolidine dithiocarbamate-zinc(II) and -copper(II) complexes induce apoptosis in tumor cells by inhibiting the proteasomal activity. *Toxicol Appl Pharmacology*, 231: 24–33

Yilmaz, V.T., Iysel, C., Suyunova, F., Aygun, M., Aztopal, N., Ulukaya, E. 2016. Ni(ii)/Cu(ii)/Zn(ii) 5,5-diethylbarbiturate complexes with 1,10-phenanthroline and 2,2'-dipyridylamine: synthesis, structures, DNA/BSA binding, nuclease activity, molecular docking, cellular uptake, cytotoxicity and the mode of cell death. *Dalton Transactions*, 45: 10466-10479

Wang, Q., Mao, H., Wang, W., Zhu, H., Dai, L., Chen, Y., Tang, X. 2017. Synthesis, X-ray crystal structure, DNA/BSA binding, DNA cleavage and cytotoxicity

studies of phenanthroline based copper(II)/zinc(II) complexes. *Biometals*, 30(4):575-587

Wei Q, Kazmierz S, Kadiiska M. 2001. Mechanism of arsenic-induced cross tolerance to nickel cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis in rat liver epithelial cells. *Toxicological Sciences*, 63: 189-195.

Xuefeng, S., William, D. 2006. Translational Regulation of Nuclear Gene COX4 Expression by Mitochondrial Content of Phosphatidylglycerol and Cardiolipin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 26(3): 743-753.

Yaramış, A. 2011. İnsan Meme Kanseri MCF7 Hücre Dizisinde Fumagillinin Antikanserojenik Etkilerinin Araştırılması. *Doktora Tezi*, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.

Yu, Z., Pestell, T. G., Lisanti, M. P., Pestell, R. G. 2012. Cancer stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(12): 2144-2151.

bis(thiosemicarbazone) complex. *The Royal Society of Chemistry Metallomics*, 2:16-19

Zheng, J. 2012. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Oncol. Lett*, 4(6): 1151-1157.

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

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : İmren ALİOĞLU
Doğum Yeri ve Tarihi : İskeçe /Yunanistsn 16.7.1993
Yabancı Dil : İngilizce, Yunanca

Eğitim Durumu
Lise : 3rd General High School of Xanthi
Lisans : Atina Üniversitesi Teknolojik Eğitim Kurumu
Sağlık Bilimleri Fakültesi, Diş Teknolojisi Bölümü

Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji

İletişim (e-posta) : ialioğlu77@gmail.com