

**YENİ SENTEZ EDİLEN PALLADYUM (II)
BİLEŞİĞİNİN TRANSFORME FİBROBLASTLAR
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Melis DEBRELİ COŞKUN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz-2012

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1110F164**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Melis Debreli Coşkun'un “Yeni Sentez Edilen Palladyum (II) Bileşiğinin Transforme Fibroblastlar Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 06.07.2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı		İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. H. MEHTAP KUTLU		
Üye	: Yard. Doç. Dr. GÜLŞEN AKALIN ÇİFTÇİ	
Üye	: Yard. Doç. Dr. GÖKALP İŞCAN	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YENİ SENTEZ EDİLEN PALLADYUM (II) BİLEŞİĞİNİN TRANSFORME FİBROBLASTLAR ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Melis DEBRELİ COŞKUN

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU
II. Danışman: Prof. Dr. Engin ULUKAYA
2012, 116 sayfa

Kanser halen çok ciddi bir sağlık sorunudur ve tedavisinde yeni çıkan ilaçlara rağmen halen tam başarı sağlanamamıştır. Bu nedenle, kanser tedavisinde kullanılabilecek yeni bileşik arayışı sürmektedir. Bu çalışma, yeni sentez edilen palladyum (Pd) (II) bileşiğinin transforme fibroblast hücreleri üzerindeki antikanser etkisini belirlemeye yöneliktir.

Bu amaçla ilk basamak olan *in vitro* sitotoksiteyi belirlemede kullanılan MTT ve ATP canlılık testlerinden faydalanılmıştır. Ayrıca hücrelerdeki sitotoksik aktivite gerçek zamanlı sitotoksite analiz sistemi (xCELLigence RTCA) ile doğrulanmıştır. Pd (II) bileşiğinin fibrosarkom hücreleri üzerindeki sitotoksik/sitostatik etkilerinden sorumlu hücre ölümü (apoptozis/nekrozis) mekanizmasının belirlenmesi amacıyla akım sitometri sistemi kullanılmıştır. Hücrelerde apoptozis varlığı Hoechst 33342/PI/Calcein-AM üçlü boyama yöntemi ile floresan mikroskopta görüntülenerek desteklenmiştir.

Sonuç olarak, yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin fibrosarkom hücrelerinde apoptozisi indükleyerek büyüme baskılayıcı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Pd (II) bileşiğinin, insan fibrosarkomlarında yeni bir tedavi seçeneği olarak kullanılabileceği öngörüsüyle ileri *in vivo* deneylerin yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Palladyum (II) bileşiği, Sarkom, Apoptozis

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF NOVEL SYNTHESIS PALLADIUM (II) COMPLEX ON TRANSFORMED FIBROBLASTS

Melis DEBRELİ COŞKUN

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program

Supervisor: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU

Supervisor II: Prof. Dr. Engin ULUKAYA

2012, 116 pages

Cancer is still a very significant health problem and there is still not enough success its treatment despite new drugs. Therefore, the search for a new compound in cancer therapy is going on. The aim of this study is to determine the anticancer activity of novel Pd (II) complex on transformed fibroblast cells.

For this purpose, MTT and ATP cell viability tests are utilized to determine *in vitro* cytotoxicity. Furthermore, cytotoxic activity is confirmed with real time cytotoxicity analysis system (xCELLigence RTCA). Flow cytometry is used to determine the cell death mechanism (apoptosis/necrosis) in cytotoxic/cytostatic effects of Pd (II) complex on fibrosarcoma cells. Presence of apoptosis is supported with Hoechst 33342/PI/Calcein-AM triple staining method in fluorescence microscope.

In conclusion, it has been determined that novel Pd (II) complex has an antiproliferative effect on fibrosarcoma cells by inducing apoptosis. It has been concluded that there is a need for *in vivo* experiments with the prediction of usage of novel Pd (II) complex as a therapy in human fibrosarcomas.

Keywords: Cancer, Palladium (II) complex, Sarcoma, Apoptosis

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, beni yönlendiren ve güler yüzünü eksik etmeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU'ya,

Tez konumun belirlenmesinden, araştırmam sonuçlanıncaya kadar her aşamada bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, çalışma alanımla ilgili deneyim kazanmamı sağlayan, yanında çalışmaktan onur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya,

Tez çalışmam süresince kullandığım Palladyum (II) bileşiğinin sentez ve karakterizasyonunu gerçekleştirmiş olan Sayın Prof. Dr. Veysel Turan YILMAZ'a,

Tez çalışmam boyunca Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (BİBAM) bünyesindeki imkânlardan faydalanmamı sağlayan Sayın Doç. Dr. Lütü GENÇ'e, Tezimin yazım aşamasında benden yardımlarını ve güler yüzlerini hiç esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Ferda ARI ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Arzu YILMAZTEPE ORAL'a,

Tez çalışmam boyunca bana her konuda yardımcı olan, benden desteklerini esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan zevk aldığım arkadaşlarım Didem KARAKAŞ, Buse CEVATEMRE, Nazlıhan AZTOPAL ve Mehmet SARIMAHMUT'a ,

Tez çalışmam süresince moral ve desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Gamze GÜNEY, Gökhan DİKMEN ve Arzu İŞCAN'a,

Hayatım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayarak beni her konuda destekleyen, bugünlere gelmemde büyük emeği olan Ailem'e,

Hayatımın her anında yanımda olan ve bana yaşattığı tüm mutluluklar için eşim Ercan COŞKUN'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Melis DEBRELİ COŞKUN

Temmuz 2012

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi

1.GİRİŞ	1
1.1. Kanser	3
1.1.1. Kanser Hücrelerinin Özellikleri	7
1.1.2. Fibrosarkom	9
1.1.3. Kanser Oluşumunda Etkili Olan Genler	13
1.1.3.1. Onkogenler	13
1.1.3.2. Tümör Baskılayıcı Genler	16
1.2. Hücre Siklusu.....	19
1.2.1. Hücre Siklusu Kontrol Noktaları.....	20
1.2.2. Hücre Siklusu ve Kanser.....	24
1.3. Apoptozis ve Kanser Oluşumundaki Etkisi.....	26
1.3.1. Apoptozisin Morfolojik Özellikleri	28
1.3.2. Apoptozis ve Nekrozis Arasındaki Farklılıklar.....	29
1.3.3. Apoptozisin İndüklenmesi	31
1.3.4. Apoptoziste Mitokondrinin Rolü.....	34
1.3.5. Apoptoziste Bcl-2 Ailesinin Rolü	35
1.3.6. Kaspazlar.....	35
1.3.7. Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	36

1.4. Yeni Sentez Edilen Palladyum (II) Bileşiği	37
1.4.1. Palladyum (II) Bileşiğinin Kanser Tedavisindeki Yeri	37
1.4.2. Yeni Sentez Edilen Palladyum (II) Bileşiğinin Kimyasal Yapısı	48
1.4.3. Palladyum (II) Bileşiğinin Biyolojik Etki Mekanizmaları	53
2. MATERYAL VE YÖNTEM	56
2.1. Materyal.....	56
2.1.1. Kimyasal Maddeler.....	56
2.1.2. Sarf Malzemeler	56
2.1.3. Cihazlar	57
2.2. Yöntem	58
2.2.1. Hücre Kültürü.....	58
2.2.1.1. Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması	58
2.2.1.2. Hücre Soylarının Pasajlanması	58
2.2.1.3. Hücre Soylarının Stoklanması	59
2.2.1.4. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması	59
2.2.1.5. Hücrelerin Sayımı ve Bileşiğin Hazırlanması	60
2.2.2. MTT (Metiltiazotetrazolium) Canlılık Metodu.....	60
2.2.3. ATP (Adenozin trifosfat) Canlılık Metodu.....	63
2.2.4. Gerçek Zamanlı xCELLigence Empedans Analizi	65
2.2.5. Akım Sitometri	67
2.2.6. Hoechst 33342, Propidium iodide, Calcein-AM ile Üçlü Boyama Yöntemi	71
2.2.7. İstatistiksel Analiz	72
3. BULGULAR	73
3.1. MTT Canlılık Testi Bulguları	73
3.2. ATP Canlılık Testi Bulguları.....	82
3.3. Akım Sitometri Bulguları	83
3.4. Hoechst 33342, Propidium iodide, Calcein-AM ile Üçlü Boyama Yöntemi Bulguları	87

3.5. Gerçek Zamanlı xCELLigence Empedans Analizi Bulguları.....	94
---	----

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	96
---------------------------------------	-----------

KAYNAKLAR.....	101
-----------------------	------------

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Tümör gelişim aşamaları	4
1.2. Kanserin başlangıcı	5
1.3. Kanserin yayılması.....	5
1.4. Tümör hücre metastazı	6
1.5. Kanserli hücrelerin özellikleri	8
1.6. Mezenkimal kök hücre veya perisitlerin pluripotent özelliklerinin şematik olarak tanımlanması	9
1.7. p53 proteininin hücre döngüsü üzerindeki etkisi	18
1.8. Hücre döngüsündeki üç önemli kontrol noktası	21
1.9. Hücre döngüsünün aşamaları. Düzenleyici CDK/siklin komplekslerinin aktiviteleri ayrıca belirtilmiştir	24
1.10. Apoptotik hücre morfolojisi	28
1.11. Apoptotik ve nekrotik hücre ölüm mekanizmalarının karakteristik özellikleri	30
1.12. Reseptör aracılı kaspaz aktivasyonu	33
1.13. Ekstrinsik ve intrinsik apoptotik sinyal yolları	34
1.14. Sakkarin (a) ve sodyum sakkarinatın (b) açık yapısı	51
1.15. Palladyum (II) kompleksinin kimyasal yapısı	52
2.1. TGI, LC ₅₀ ve GI ₅₀ değerlerinin hesaplanması	63
2.2. ATP elde edilme reaksiyonu.....	64
2.3. Empedans ölçüm şeması	66
2.4. Flow sitometri cihazının mekanizması.....	68
2.5. Annexin V ile apoptotik hücre analizinde canlı ve apoptotik hücre populasyonlarının dağılımı	69
3.1. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiği uygulanan H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği.....	73
3.2. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiği uygulanan H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinin büyüme hızı grafiği.....	75
3.3. MTT testi uygulamasından önce H-Ras 5RP7 hücrelerinin morfolojik görüntüleri	76

3.4. MTT testi uygulamasından önce NIH/3T3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri	77
3.5. MTT testi uygulamasından sonra H-Ras 5RP7 hücrelerinde oluşan formazan kristallerinin görünümü.....	78
3.6. MTT testi uygulamasından sonra NIH/3T3 hücrelerinde oluşan formazan kristallerinin görünümü.....	79
3.7. Pd (II) bileşiği ve etoposid (pozitif kontrol) uygulanmış H-Ras 5RP7 hücrelerinin morfolojik görüntüleri	80
3.8. Pd (II) bileşiği ve etoposid (pozitif kontrol) uygulanmış NIH/3T3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri	81
3.9. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiği uygulanan H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği	82
3.10. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V-FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları.....	85
3.11. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V-FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları	86
3.12. H-Ras 5RP7 kontrol hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri.....	88
3.13. 50 µM Palladyum (II) bileşiği uygulanan H-Ras 5RP7 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri	89
3.14. 100 µM Palladyum (II) bileşiği uygulanan H-Ras 5RP7 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri	90
3.15. NIH/3T3 kontrol hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri	91
3.16. 50 µM Palladyum (II) bileşiği uygulanan NIH/3T3 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri	92
3.17. 100 µM Palladyum (II) bileşiği uygulanan NIH/3T3 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri.....	93
3.18. Pd (II) bileşiğinin 0.73-800 µM arasındaki konsantrasyonlarının H-Ras 5RP7 hücrelerindeki 48 saat süreyle hücre indeks değerleri.....	94

3.19. Gerçek zamanlı xCELLigence sisteminde kullanılan Pd (II) bileşiğinin konsantrasyonlarının farklı renklerde ve μM birimi kullanılarak gösterilmesi.....	95
3.20. Pd (II) bileşiğinin 0.73-800 μM arasındaki konsantrasyonların NIH/3T3 hücrelerindeki 48 saat süreyle hücre indeks değerleri	95

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Palladyumun fiziksel ve kimyasal özellikleri	49
1.2. Sakkarin ve sodyum sakkarinatın fiziksel özellikleri	51
3.1. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiği uygulanan hücre soylarının 48 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri	74
3.2. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiği uygulanan H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinin IC ₅₀ ve IC ₉₀ değerleri.....	75
3.3. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiği uygulanan H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinin GI ₅₀ , TGI, LC ₅₀ değerleri.....	76
3.4. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiği uygulanan H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinin canlılık yüzde değerleri.....	83
3.5. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin uygulandığı H-Ras 5RP7 hücrelerinde Annexin V-FITC değerlendirmesi ile elde edilen 48 saatlik apoptotik yüzde değerleri	84
3.6. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde Annexin V-FITC değerlendirmesi ile elde edilen 48 saatlik apoptotik yüzde değerleri	84

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AIF	: Apoptozis indükleyici faktör
ATP	: Adenozin trifosfat
PBS	: Dulbecco's sodyum-fosfat tamponu
CDK	: Siklin bağımlı kinazlar
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
FBS	: Fetal Bovin Serum
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
FS	: Fosfotidil Serin
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
MTT	: (3-(4,5-dimetiltiyazol -2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid
PI	: Propium Iodide
Pd (II)	: Palladyum (II) bileşiği
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
UV	: Ultraviyole, morötesi

1. GİRİŞ

Kanser, hücrenin normal yaşam döngüsünü kontrol altında tutan gen dengesinin bozulması sonucu hücrenin düzensiz ve ölümsüz yaşam döngüsüne geçmesi ve vücut homeostazisine zarar verir hale gelmesi olarak tanımlanabilmektedir (Rieger, 2004). Fibrosarkomlar, kollajen lifleri üreten fibroblastların (bağ doku hücreleri) çoğalmasıyla ortaya çıkan mezenkimal orijinli malignant tümörlerdir (Teicher, 2012). Günümüzde kanser tedavisi için kullanılan ilaç ve yöntemlerin yüksek maliyetli olmasının yanı sıra bu ilaçların hücresel sitotoksisiteye ve birçok yan etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca kullanıma giren birçok kanser ilacına rağmen halen kanser tedavisinde tam bir başarı elde edilememiştir. Bundan dolayı sitotoksisitesi ve hiçbir yan etkisi olmayan antikanser ilaçların üretilmesi ve yeni tedavilerin geliştirilmesi her geçen gün önemini arttırmaktadır.

Bu çalışmada, Uludağ Üniversitesi Kimya Bölümü tarafından yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin sarkomlardaki antikanser etkisi araştırılmıştır. Antifungal, antiviral, antitümör ve antibakteriyel etkilere sahip Pd (II) bileşikler, çeşitli tümör hücre hatlarına karşı umut verici etkilerinden dolayı son yıllarda sentezlenmekte ve etkileri araştırılmaktadır (Abu-Surrah ve ark., 2008; Ferraz ve ark., 2009; Garoufis ve ark., 2009; Ulukaya ve ark., 2011a). Pd (II) bileşiklerinin, farklı kanser hücrelerinde (insan servikal epiteloid karsinom, insan kronik miyeloid lösemi, osteojenik sarkom, malign melanom, meme kanseri, akciğer kanseri, insan hepatoselüler karsinom, gliyom, insan kolorektal adenokarsinom, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom, prostat kanseri, over kanseri) yüksek oranda sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Szucova ve ark., 2006; Mansouri-Torshizi ve ark., 2008; Ferraz ve ark., 2009; Abu-Surrah ve ark., 2010; Nadeem ve ark., 2010; Kontek ve ark., 2011; Guney ve ark., 2011b; Miklasova ve ark., 2012). Bu bileşiklerin suda kolay çözünebilmeleri, membranlardan kolayca geçip hücre içerisinde DNA'ya bağlanabilmeleri, ayrıca yan etkilerinin daha az olması tercih edilmelerine neden olmaktadır (Abu-Surrah ve ark., 2010).

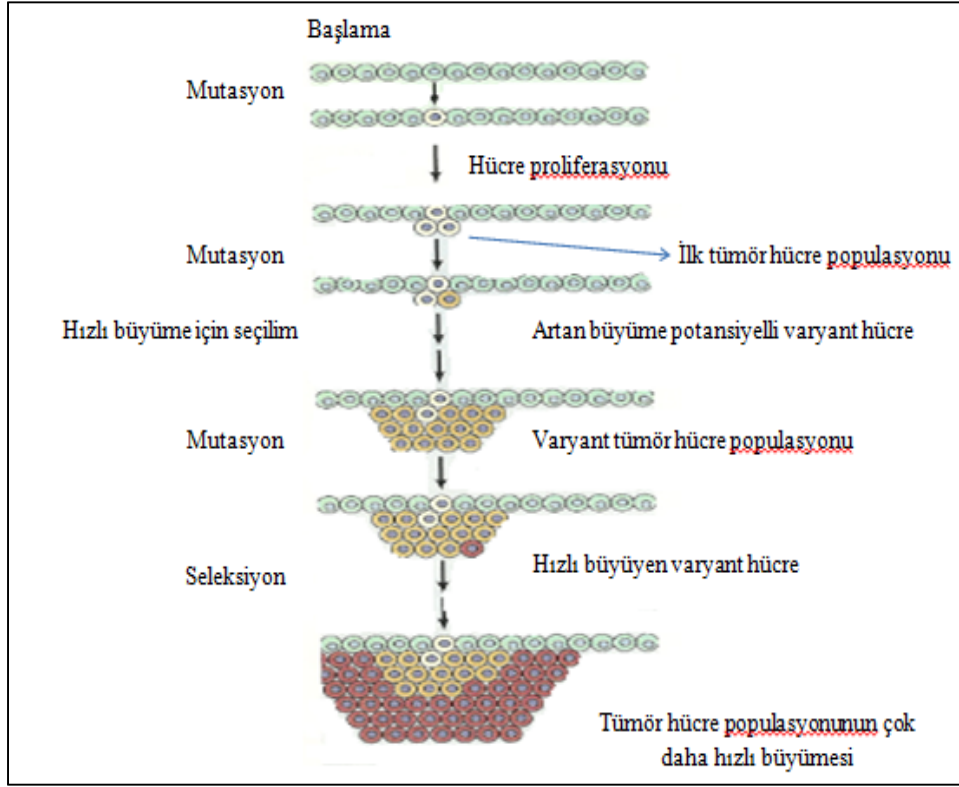
Bazı çalışmalarda Pd türevli antikanser ilaçların kanser tedavisinde etkili oldukları, Pd (II) bileşiklerinin kanser hücrelerinde hücre ölümünü artırarak apoptozise neden oldukları gösterilmiştir (Keter ve ark., 2008; Ferraz ve ark., 2009; Ulukaya ve ark., 2011b; Ferraz ve ark., 2011). Yine farklı Pd (II) bileşiklerinin DNA’da yüksek düzeyde hasarlar oluşturdukları ve apoptozisi indükledikleri belirlenmiştir (Miklasova ve ark., 2009; Miklasova ve ark., 2012).

Bu çalışma; yeni sentezlenen Pd (II) bileşiğinin transforme fibroblastlar üzerindeki antikanser etkisinin belirlenmesi ve bu etkinin moleküler mekanizmalarının araştırılması amacıyla yapılmıştır. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin 5RP7 (H-Ras onkogeni transform hücreler) ve NIH/3T3 (fare embriyo fibroblast hücreler) hücreleri üzerindeki büyümeyi baskılayıcı/sitostatik/sitotoksik etkilerinin *in vitro* olarak test edilmesi amacıyla MTT ve ATP canlılık testlerinden faydalanılmıştır. Ayrıca Pd (II) bileşiğinin hücrelerdeki sitotoksik aktivitesinin zamana bağlı değişimi gerçek zamanlı sitotoksikite analiz sistemi (xCELLigence RTCA) kullanılarak analiz edilmiştir. Pd (II) bileşiğinin fibrosarkom hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin belirlenmesi amacıyla akım sitometri sisteminden faydalanılmıştır. Hücrelerde apoptozis varlığını morfolojik olarak belirleyebilmek amacıyla Hoechst 33342/PI/Calcein üçlü boyama yöntemi kullanılmıştır.

1.1. Kanser

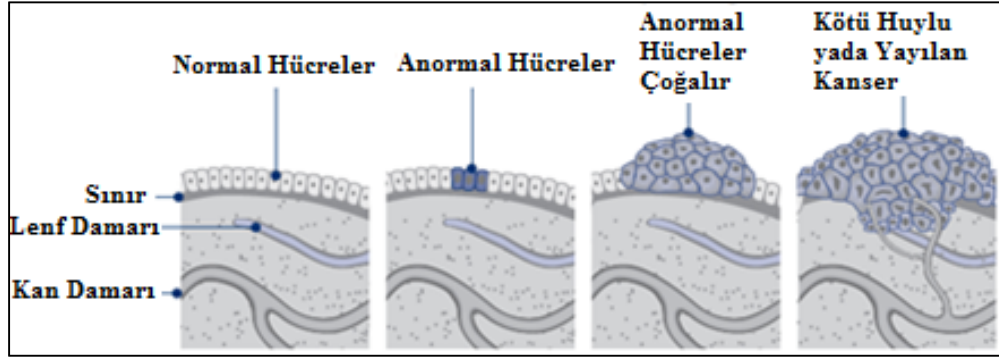
Kanser; hücrelerin aşırı ve kontrolsüz çoğalmalarına, immün sistemin gözetiminden kaçmalarına ve sonuç olarak uzaktaki dokuları istila ederek metastazlar oluşturmalarına yol açan, metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdikleri çok basamaklı bir süreçtir. Bu değişiklikler hücre çoğalmasını ve ömrünü, komşu hücrelerle ilişkilerini ve immün sistemden kaçma kapasitelerini kontrol eden genetik programlardaki modifikasyonların birikmesiyle ortaya çıkmaktadır. Kansere yol açan modifikasyonlar arasında DNA dizilimini modifiye eden genetik değişiklikler de bulunmaktadır (Merlo ve ark., 2006).

Kanser gelişimi; hücrelerin çoğalma, hayatta kalma, invazyon ve metastaz için giderek artan kapasiteleri ile birlikte mutasyon ve seleksiyonunu da içeren bir süreç olarak görülmektedir. Bu süreçteki ilk basamak olan tümör gelişiminin, tek bir hücrenin anormal çoğalmasına yol açan genetik değişikliklerin sonucu olduğu düşünülmektedir. Hücre proliferasyonu, klonal şekilde oluşan tümör hücrelerinin popülasyonunun büyümesine neden olmaktadır. Tümör popülasyonundaki hücrelerde oluşan ek mutasyonlar ile tümör gelişimi ilerlemektedir. Bu mutasyonlardan bazıları hücreye daha hızlı büyüme gibi seçici bir avantaj sağlamaktadır. Dolayısıyla bir mutasyon taşıyan hücre soyu tümör popülasyonu içerisinde baskın bir hale gelmektedir ve bu süreç klonal seleksiyon olarak adlandırılmaktadır. Klonal seleksiyon tümör gelişimi boyunca devam etmektedir dolayısıyla tümör sürekli daha hızlı büyümekte ve giderek malign (kötü huylu) hale gelmektedir. Mutasyona uğramış tek bir hücre, ilk olarak artan boyutu ile benign (iyi huylu) adenom daha sonra malign karsinom olarak ilerleyen proliferatif hücre popülasyonuna yol açmaktadır (Cooper, 2000).

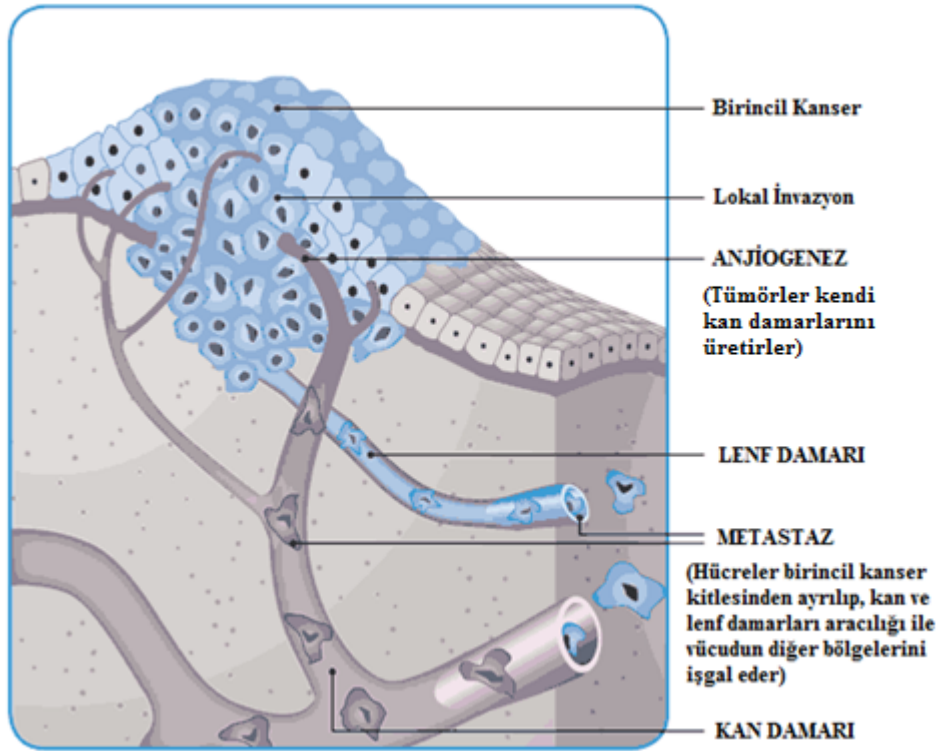


Şekil 1.1. Tümör gelişim aşamaları (Cooper, 2000)

KontROLSÜZ çoğalma tek başına kanser hastalığının ortaya çıkabilmesi için yeterli değildir. Ayrıca hücrenin invazyon (diğer sağlıklı dokuları istila etme) ve metastaz (dolaşıma geçerek sağlıklı başka dokulara yayılma) gibi diğer malign özelliklerini de içermesi gerekmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2000). Tümör hücrelerinin çoğalmasıyla oluşan doku belli bir boyuta geldiğinde kanser hücrelerinden bazıları bu dokudan ayrılmakta ve doku içerisinde ilerlemeye (invazyon) başlamaktadır. Hücre bir damarla karşılaştığında bu damarın duvarını eritir ve damar içerisine geçerek kan ile birlikte tüm vücutta dolaşmaya başlar. Damar içindeki tümör hücreleri belirli organlarda damar yüzeyine tutunarak tekrar damar duvarını eritmeye başlarlar ve hedef dokuya yerleşerek çoğalmaya devam ederler. Kanser hücrelerinin yüzey özellikleri, organın damar yapısı ve organların damar duvarındaki hücrelerin yüzey özelliklerine göre kanser hücreleri belirli organlara metastaz yapmaktadırlar. Tümör metastazında özellikle anjiojenez (tümörün kendi kan damarlarını üretmesi) ile yeni oluşan tümör damarları rol oynamaktadır (Aliustaoğlu, 2009).



Şekil 1.2. Kanserin başlangıcı (Angle, 2011)



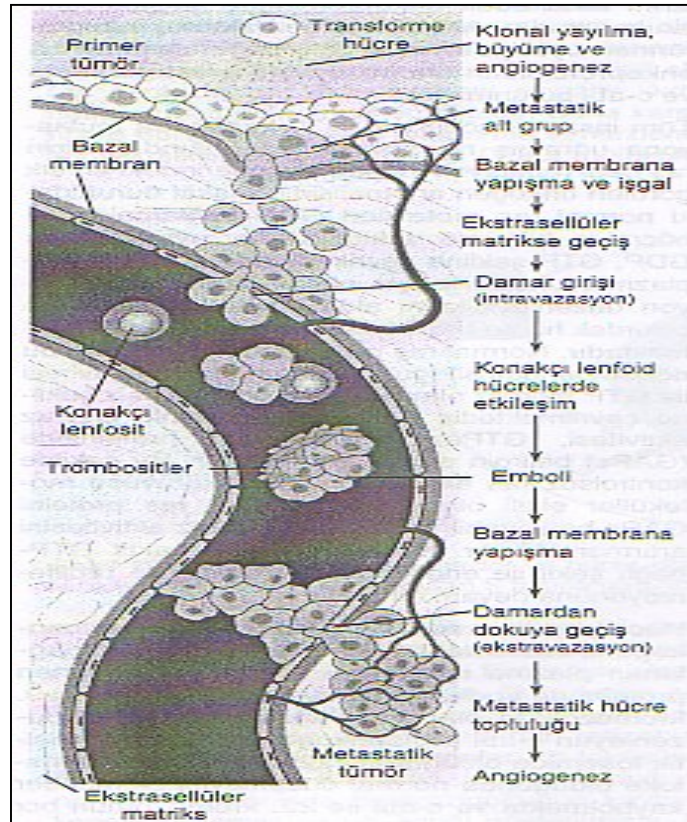
Şekil 1.3. Kanserin yayılması (Angle, 2011)

Tümör, benign veya malign olan hücrelerin aşırı çoğalmasıdır. Benign tümör, kendi özgün bölgesi ile sınırlı kalır, ne normal dokuları işgal eder ne de vücudun diğer bölgelerine yayılır. Malign tümör ise hem normal dokuları işgal etme hem de dolaşım veya lenfatik sistem ile vücuda yayılma yeteneğine (metastaz) sahip olmasından dolayı kanser olarak adlandırılır.

Hem malign hem de benign tümörler meydana geldikleri hücre türüne göre sınıflandırılmaktadırlar. Örneğin; fibrosarkom, fibroblast hücrelerinden meydana gelmektedir.

Kanser türleri üç ana gruba ayrılmaktadır;

- Karsinomlar, insan kanserlerinin % 90'ını içeren epitel hücrelerinin maligniteleridir.
- Sarkomlar, insanlarda nadir olarak görülen kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi bağ dokularının solid tümörleridir.
- Lösemi ve lenfoma, insan tümörlerinin yaklaşık % 8'ini içerir ayrıca kan üreten hücreler ve immün sistem hücrelerinden oluşmaktadır (Cooper, 2000).

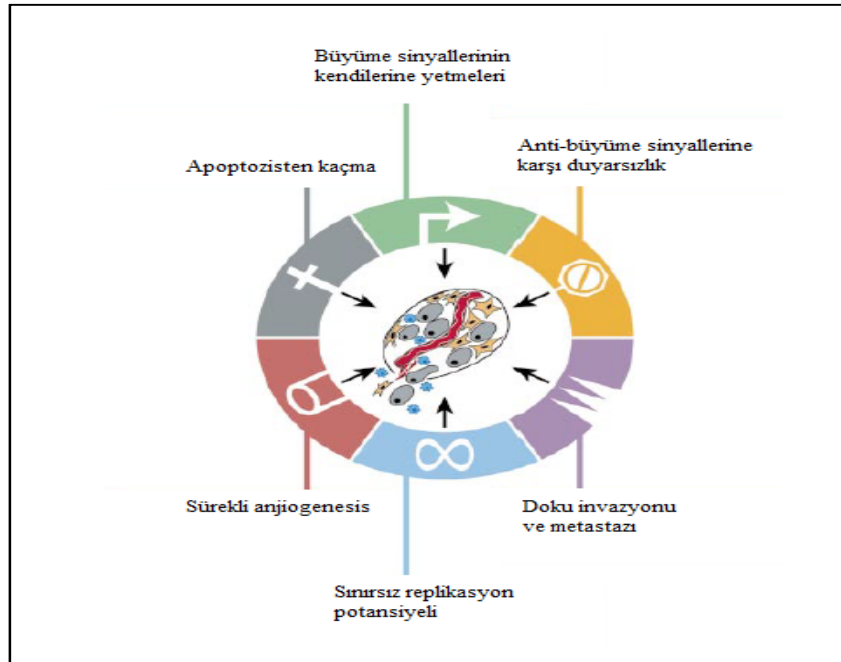


Şekil 1.4. Tümör hücre metastazı (Altınışık, 2002)

1.1.1. Kanser Hücrelerinin Özellikleri

- Çoğu kanser hücresi tek bir anormal hücreden, bazı kanserler ise birden fazla sayıda malign hücreden oluşmaktadır (klonal orijin).
- Kültürdeki kanser hücreleri ve normal hücreler arasındaki birincil ayrım, normal hücrelerin hücre proliferasyonunda yoğunluk bağımlı inhibisyon göstermesidir. Normal hücrelerin çoğalması en son hücre yoğunluğuna ulaşıncaya kadar devam eder daha sonra hücrelerin çoğalmaları durur ve hücreler hücre siklusunun G0 fazında dururlar. Kanser hücreleri ise yoğunluk bağımlı inhibisyona karşı duyarlı değildir ve kültürde yüksek hücre yoğunluklarına doğru büyümelerini sürdürebilirler.
- Kültür ortamında büyüyen normal hücreler çoğalıp üzerinde büyüdükleri tüm yüzeyi tek tabaka halinde (“monolayer”) kapladıklarında yani konfluent olduklarında bölünme özelliklerini kaybederler ve bölünemezler. Kanser hücreleri ise, hücre kültürlerinde birden fazla tabaka oluşmasına rağmen bölünmeye devam edebilirler.
- Birçok normal hücrenin sadece hareketi değil ayrıca çoğalması hücre-hücre etkileşimi ile inhibe edilmektedir. Fakat kanser hücreleri bu şekilde kontak büyüme inhibisyonuna duyarlı değildir. Kanser hücreleri beslenmeleri için gerekli besin faktörlerini tüketmelerine rağmen büyümeye devam ettiklerinden aslında kendi kendilerini öldürmektedirler.
- Kanser hücreleri, ekstrasellüler büyüme faktörlerinin gereksinimlerini azaltmaktadır. Bu hücreler genellikle ekstrasellüler matriks bileşenlerini sindirecek proteazları yapısında bulundurmakta ve normal dokulara işgale izin vermektedir.
- Kanser hücreleri, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinde normal hücrelere göre daha zayıf bağlı olarak düzenlenmiştir. Birçok kanser hücresi, hücre yüzey adezyon moleküllerinin ekspresyonlarındaki azalma sonucu normal hücrelere göre daha az bağlanma özelliğine sahiptir.
- Kanser hücreleri, yeni kan damarlarının oluşumunu teşvik eden büyüme faktörleri bulundurmaktadır (Anjiyogenez).

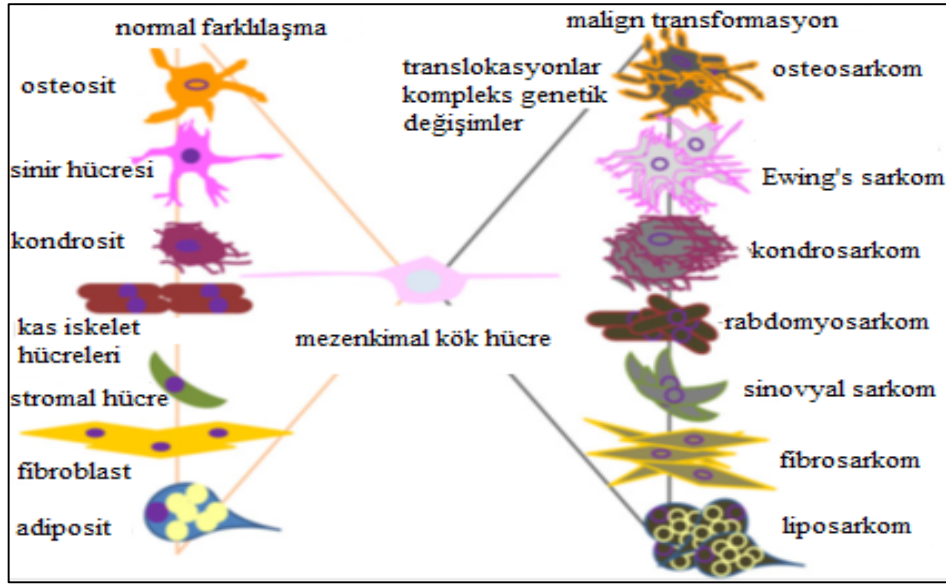
- Normal hücrelerin birçoğunun hayatta kalması, apoptozis oluşumunu engelleyen büyüme faktörleri sinyallerine veya ekstraselüler matriksten gelen sinyallere bağlıdır. DNA hasarını takiben birçok normal hücre apoptozise giderken, birçok kanser hücresi için ise bu durum engellenmiştir.
- Normal hücrenin bölünme sayısı sınırlıdır. Kanser hücreleri ise sınırsız sayıda bölünürler. İmmortalitenin mekanizmalarından biri kromozom uçları olan telomerlerdir. Hücre diferansiye olurken normal hücrelerde telomerler gittikçe kısalır, hücre istirahat durumuna geçer ve çoğalma kapasitesini kaybettiğinden ölür. Kanser hücrelerinde ise telomerler telomeraz enziminin etkisi ile yenilenirler, telomer uzunluğu sabit kalır ve hücre sınırsız sayıda çoğalır (Lowitz ve Casciato, 2000; Cooper, 2000).



Şekil 1.5. Kanserli hücrelerin özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2000)

1.1.2. Fibrosarkom

Sarkomlar, tüm kanserlerin yaklaşık % 1'ini oluşturan nadir olarak görülen tümörlerdir ve insan yaş aralığı üzerinde eşit biçimde yayılma sıklığı ile her yaştaki hastalarda görülebilmektedir. Sarkomlar, mezenkimal orijinli malignant tümörlerdir. Osteosit, adiposit, kondrosit, fibroblastlar, sinir hücreleri, kas hücreleri, stromal hücreler gibi çeşitli farklılaşmış hücrelerin oluşumuna yol açan mezenkimal kök hücre (pluripotent hücre), büyük olasılıkla sarkom için temel hücrenin orjiniidir. Mezenkimal kök hücrede kompleks genetik değişiklikler veya malign transformasyon oluştuğunda; fibrosarkom, osteosarkom, Ewing's sarkomu, kondrosarkom, rabdomyosarkom, sinovyal sarkom, liposarkom gibi sarkom oluşumu başlatılabilir. Fibrosarkomlar, kollajen lifleri üreten bağ doku hücrelerinin (fibroblastların) çoğalmasıyla ortaya çıkan kötü huylu tümörlerdir. Özellikle 40 – 60 yaş üzeri hastalarda gözlenmektedir ve 40 yaşın altında görülme sıklığı ise % 20'dir (Teicher, 2012).



Şekil 1.6. Mezenkimal kök hücre veya perisitlerin pluripotent özelliklerinin şematik olarak tanımlanması (Teicher, 2012)

Fibrosarkom, kanserli olmayan bir fibromadan gelişebileceği gibi, en başından kanserli olarak da meydana gelebilmektedir. Fibrosarkom, fibröz bağ dokusu stromaya farklılaşma eğilimi gösteren yumuşak dokularda veya kemik içerisinde ortaya çıkmaktadır. Normal kemikte oluşan primer fibrosarkomun tüm osteojenik sarkomların % 10.9'unu oluşturduğu rapor edilmiştir. Kemik fibrosarkomları merkezde veya periferde olabilmektedir ayrıca komşu yumuşak dokudan sekonder yayılma ile kemiği etkileyebilmektedir. Sarkomların en sık yerleşim yerleri ekstremitelerdir (% 60). Diğer lokalizasyonları ise, gövde (% 15), retroperiton (% 19) ve baş-boyun bölgeleridir (% 6) (Mocellin ve ark., 2006; Aksu ve Ağır, 2007). Yumuşak doku sarkomlarının ilk sırada metastaz yaptığı organ akciğerlerdir. Bölgesel lenf nodu metastazının sıklığı ise % 5'dir ve bu oran sinovyal sarkom, epiteloid sarkom, rabdomyosarkomlar gibi özel histolojik türlere göre daha düşüktür (Moureau-Zabotto ve ark., 2004). Tümör, basit bir fibröz büyümesine benzeyebilir, önemli klinik belirtileri ağrı, şişme, bazen dişlerin kaybı, parastezi ve mukozayı örten yapının ülserleşmesidir (Muzio ve ark., 1998).

Birçok sarkom, herhangi bir etiyolojik faktör taşımayan hastalarda ortaya çıkmaktadır fakat küçük bir oranda iyonize radyasyonda sarkomun olası nedenidir (Neuhaus ve ark., 2009). Bu kanserlerin % 90'ı vücudun güneşe maruz kalan bölgelerinde gelişmektedir. Güneş hasarı önemli bir karsinojenik faktör olarak görülmektedir. Ekvatora yakın bölgelerde ve deniz seviyesinden daha yüksek rakımlarda, beyaz ırkta ki insidansı artmaktadır. Mavi gözlü, açık tenli, sarışın ve kıvil saçlı insanlar ve kolayca güneş yanığı olan kişiler büyük risk altındadır. Güneş radyasyonu sadece ABD'de bir yılda 400.000'den fazla deri kanserine neden olmuştur. Özellikle ultraviyole -B ve -C en zararlı olanlarıdır. Bilim adamları güneş ışığının ultraviyole içeriğinin, p53 tümör baskılayıcı gen olarak adlandırılan tek bir geni etkileyerek deri hücrelerinin DNA'sında kalıcı mutasyon hasarına neden olduğuna inanmaktadırlar (Lowitz ve Casciato, 2000; Lam, 2003). Yumuşak doku sarkomunun gelişme riskini arttıran çevresel faktörler arasında; eksternal radyoterapi, thorotrast, arsenik pestisitler ve ilaçlar, fenoksiasidik asit türevleri, vinil klorid, dioksin, alkileyici ajanlar, androjen anabolik steroidler, insan immün yetmezlik virüsü, insan herpes virüsü tip 8 bulunmaktadır (Zahm ve Fraumeni, 1997).

Yumuşak doku sarkomunun gelişme riskini arttıran diğer faktörler arasında; daha önce kemoterapi almış olmak, vücudun karsinojen maddelere maruz kalması (arsenik, kömür katranı, flarapnel, kurflun, implant vb.), Ras onkogen ailesi (H-ras, K-ras, N-ras) ve N-myc, MDM-2, c-erb2 gibi onkogenlerdeki mutasyonlar, p53 tümör süpresör geni mutasyonları, travma sonucu gelişen kronik inflamasyon, enfeksiyon ve kalıtsal faktörler (Xeroderma pigmentosum, Bazal hücreli nevüs sendromu) yer almaktadır (Lowitz ve Casciato, 2000; Aksu ve Ağır, 2007).

Birçok yumuşak doku tümörünün klinik davranışı; histolojik grad, tümörün büyüklüğü-boyutu ve primer tümörün yeri (anatomik lokalizasyon) olmak üzere önemli üç prognostik değişken ile uyumludur. Sarkomu olan hastaya yaklaşım, kesin cerrahi müdahale yapılmadan önce tanı için yeterli doku elde edilmesiyle yani biyopsi ile başlamaktadır. Daha sonraki tedavi sarkomun türüne bağlı olarak gerçekleştirilmektedir (Mocellin ve ark., 2006; Skubitz ve D'Adamo, 2007). Lokal cerrahinin yardımcı radyoterapi ile kombine edilmesi genellikle tedavinin birinci basamağını oluşturmaktadır. Ameliyat sonrası radyoterapinin ilave edilmesil lokal nüksetme oranını azaltmaktadır. Ancak lokal tedavi özellikle yüksek dereceli tümörü olan hastaların % 50'den fazlasında uzak bölgelere metastaz oluşumunu engelleyememektedir (Paola ve Nielsen, 2002; Mocellin ve ark., 2006). Radikal cerrahi, yumuşak doku sarkomunun en etkili tedavisidir ve ameliyat sonrası radyoterapi uygulanmasının ekstremitelerdeki lokal nüksetmeyi azalttığı görülmektedir. Düşük dereceli tümörü olan fibrosarkom hastalarında da tedavi şekli cerrahidir. Tümör çevresi normal doku ile birlikte çıkartılmalıdır (geniş eksizyon). Yüksek dereceli tümörlerde ise ameliyat öncesi veya sonrası radyoterapi ve kemoterapi uygulanabilmektedir. Uygun cerrahi sınırla çıkartılan yumuşak doku sarkomlarında tekrar etme oranı % 5'tir. Ameliyat sonrasında tümörün ameliyat yerinde nüks edip etmediği veya akciğere metastaz yapıp yapmadığı mutlaka kontrol edilmelidir. Çocukluk çağı fibrosarkomlarda başarı oranı daha yüksektir (Sabah, 2009).

Yüksek riskli yumuşak doku sarkomu olan yetişkin hastalarda doksorubisin ve ifosfamid ile cerrahi öncesi kemoterapi uygulanmasının sonuçları, stratejisi ve fizibilitesi incelenmiştir. Hastalığın metastaz yaptığı kişilerde doksorubisin ve ifosfamid kombinasyonunun yanıt oranının (% 12), tek başına doksorubisin (% 3) ajanına göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (Gortzak ve ark., 2001). Yumuşak doku sarkomu tedavisinde dakarbazin ve ifosfamidin önemli antitümör aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Glabbeke ve ark., 2002). Yumuşak doku sarkomlarında; siklofosfamid, vinkristin, doksorubisin ve dakarbazin hastalar için sadece lokal nüksetmenin geciktirilmesinde tedavi destekleyici olarak kullanılmıştır. Yüksek dereceli yumuşak doku sarkomlarında; yüksek dozlu doksorubisin, ifosfamid ve lenograstim kemoterapi destekleyicisi olarak test edilmiştir (Paola ve Nielsen, 2002). Doksorubisin ve ifosfamid kombinasyonu, genellikle yüksek dereceli malign tümörlerde yaklaşık % 45 oranında yanıt verdiği ileri sürülen en etkili ajanlar ve agresif kombinasyon rejimleri olarak kabul edilmiştir. Etopositin yetişkin yumuşak doku sarkomlarında düşük etkinliği olduğu belirlenmiştir. Fakat yapılan çalışmalarla ifosfamid ve etoposit kombinasyonunun yetişkin yüksek dereceli yumuşak doku sarkomlarında yanıt oranının % 40 olduğu ortaya konulmuştur (Saeter ve ark., 1997). Sarkom tedavisi ile ilişkili toksisitelerin, doksorubisin içeren rejimlere ifosfamid eklenmesi ile belirgin şekilde arttığı belirlenmiştir. Fakat bu tedavi şeklinin lokal-ileri düzeyde ve metastatik yumuşak doku sarkomu olan kişilerde kullanılması önerilmemektedir (Verma ve ark., 2008). İnsan fibrosarkom hücrelerinin migrasyon ve invazyon özelliklerini salidroisin inhibe ettiği belirlenmiştir (Sun ve ark., 2012). İnfantil fibrosarkomda (genelde yaşamın ilk iki yılında gözlenen yumuşak doku sarkomu) kemoterapiye en yüksek yanıt oranı; vinkristin, aktinomisin D, siklofosfamid veya ifosfamid ve etoposid içeren ilaç rejimleri ile gözlenmiştir. Etkinliği açısından ve beklenen herhangi bir uzun süreli toksisitesi olmaması bakımından VA (vinkristin ve aktinomisin) rejiminin kemoterapi için uygun bir seçenek olduğu ve daha yoğun kemoterapi rejiminin VA kemoterapiye yanıt alınmadığı durumlarda düşünülmesi gerektiği ayrıca belirtilmiştir (Ferrari ve ark., 2012).

1.1.3. Kanser Oluşumunda Etkili Olan Genler

Kanser oluşumunda, proto-onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonlarındaki değişiklikler oldukça önemlidir. Bu genlerin protein ürünlerinin yetmezliği; apoptozis, genetik stabilite, hücre farklılaşması, morfogenetik reaksiyonları kontrol eden sinyal yollarının yanlış düzenlenmesi ve kanser oluşumuna neden olmaktadır.

1.1.3.1. Onkogenler

Proto-onkogenler (c-onc veya normal hücre genleri) hücrelerin büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz için aldıkları sinyalleri hücre membranından başlayarak çekirdeğe kadar ilettikleri sinyal ileti mekanizmasında görevi olan birçok proteinin ekspresyonundan sorumlu olan genlerdir. Normal hücrelerde proto-onkogenlerin aktivasyonu; mutasyon, DNA'nın yeniden düzenlenmesi ya da gen amplifikasyonu ile ortaya çıkabilmektedir.

Proto-onkogenler, hücrenin çoğalma yollarını kontrol eden genler olup ekspresyonları kontrolsüz hücre çoğalmasını önlemek için denetlenmektedir. Proto-onkogenlerdeki mutasyonlar, hücrelerin kontrolden çıkmasına, aşırı bölünmesine ve farklı kanser türlerinin oluşumuna neden olabilir. İnsanlarda proto-onkogenler, somatik mutasyon ile aktive olabilmektedir. Proto-onkogenler normal hücre genlerdir ve amplifikasyon, modifikasyon gibi çeşitli mekanizmalar yolu ile onkogenlere dönüşebilirler (Kopnin, 2000; Cabadak, 2008).

Onkogenler; kanser gelişimini doğrudan ve dolaylı olarak etkileyen, ekspresyonları tümör gelişimine neden olabilen hücre genleridir. Viral onkogenlerin etki mekanizması hücre gen proto-onkogenlerin aktivasyonunu (retrovirüs) veya tümör baskılayıcı genlerin (DNA virüsleri) inaktivasyonunu içermektedir. Kanser hücrelerinden elde edilen DNA'ların normal hücrelere alınması ve hücrelerin malignleşmesi (DNA transfeksiyonu) yoluyla hücre gen onkogenler keşfedilmiştir. Hücre gen onkogenler; neuroblastom, lösemi, karsinom, sarkom gibi tümörlerde bulunmaktadır. Onkogenler, aktivasyonu kanser gelişimine katkıda bulunabilen genler olarak da adlandırılmaktadır (Weinberg, 1983; Osborne ve ark., 2004).

Onkogenlerin ürünleri; transkripsiyon faktörleri, kromatin değiştiriciler, büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, sinyal dönüştürücüler ve apoptozis regülatörleri olmak üzere 6 gruba sınıflandırılabilir (Croce, 2008). Hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasında rolü olan proto-onkogenlerde oluşan mutasyonlar tümör gelişimine, tümör baskılayıcı genlerde oluşan mutasyonlar ise hücre siklusunun inhibisyonunu engelleyerek anormal hücre büyümesine neden olmaktadır. Onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresör genlerin inaktivasyonu hücrelerin; kontrolsüz çoğalmasına, kontak inhibisyonunun kaybolmasına, invazyon ve metastaz yeteneği kazanmasına neden olmaktadır (Aliustaoğlu, 2009).

▪ Ras Geni

Memelilerde ras gen ailesi p21s olarak adlandırılan molekül ağırlığı 21 kDa olan proteinleri kodlayan üç üyeden (H-, K- ve N-ras) oluşmaktadır. p21s, membranla ilişkili proteinler olup GTP (guanin trifosfat) bağlamakta ve hidrolize etmektedirler. p21 hücrenin proliferasyonunda ve farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır. Ras geninin ekspresyonundaki nitel ve nicel değişiklikler hücre transformasyonu için önemlidir. İnsan ve deneysel tümörlerin önemli bir bölümünde 12, 13 veya 61 nolu kodonda Ras genlerinin mutasyona uğramış formları bulunmaktadır (Quincoces ve ark., 1997).

Ras proteinleri, sitoplazmik membranın iç yüzeyinde lokalize olmuş küçük GTP bağlayıcı proteinlerdir. Böylece dış ortamdan uyarıları alır ve hücre nükleusuna iletirler. Bu grup proteinler biyokimyasal olarak heterojendir. Bu proteinler GDP (Guanozindifosfat) ve GTP ile birleşirler. Örneğin p21-GTP kimyasal olarak aktif formdur ve nükleusdaki çeşitli promotör proteinleri aktive eder. Bu proteinler GTPaz aktivitesine sahiptir. Bu aktivite, GAP olarak isimlendirilen bir sitoplazmik protein tarafından arttırılmaktadır. GTPaz GTP'yi GDP'ye dönüştürür böylece protein-GTP kompleksi inaktifleşir. GTPaz bozuk olması molekülün GTP formunun devamlı olarak aktif kalmasına yol açtığından nükleus proteinleri ve DNA transkripsiyonu devamlı olarak aktive edilir (Lowitz ve Casciato, 2000; Martinez ve ark, 2003).

Normal-tip Ras proteini zayıf GTPaz aktivitesine sahipken, mutant formu daha fazla aktiviteye sahiptir (Spandidos, 2007). H-Ras ve K-Ras ilk olarak Harvey ve Kirsten fare sarkoma virüslerinin viral (v-Ras) onkoproteinleri olarak belirlenmiş ve hücrel transformasyonda yer aldıkları bulunmuştur.

- N-Ras onkoproteini neuroblastoma hücre hattında, erkeklerde germinal doku ve timusda,
- H-Ras genellikle ciltte ve iskelet kaslarında,
- K-Ras çoğunlukla kolon ve timusda eksprese edilmektedir.

Bu genlerin herhangi birindeki mutasyon spesifik neoplazi gelişmeleri ile ilişkili olup, çeşitli tümörlerde bulunmaktadır. Örneğin; K-Ras mutasyonu, akciğer (%33), kolorektal (%44) ve pankreas tümörlerinde (%90), H-Ras mesane (%10), böbrek (%10) ve tiroid tümörlerinde, N-Ras melanom (%13), hepatosellüler karsinom (%30) ve hematolojik malignitelerde bulunmaktadır (Macaluso ve ark., 2002).

Son yıllarda yapılan gözlemler Ras aktivasyonu, apoptozis ve hücre proliferasyonu arasındaki karmaşık ilişkiyi açıklamak amacıyla yapılmaktadır. Ras onkogenindeki mutasyon sonucunda, Ras proteini GTPaz aktivitesini kaybeder ve sürekli olarak GTP-bağlı aktif forma dönüşür, böylece nükleusa sürekli olarak sinyal yollar. Bunun sonucunda kansere özgü olan kontrol edilemeyen hücre çoğalması meydana gelir. Ras genlerindeki mutasyonlar, tümör metastaz ve angiogenezde bulunan onkoproteinleri oluşturmaktadır. Tümör büyümesi ana kan damarlarının (özellikle angiogenez üzerinden) tümör bölgesine aralıksız çalışmasına bağlıdır. Güçlü onkogenler kanser hücrelerinde hem anjiogenez uyarıcılarının hem de inhibe edicilerinin ekspresyonunu engelleyebilmektedir (Macaluso ve ark., 2002; Spandidos, 2007).

1.1.3.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler (anti-onkogenler, TSG), hücrelerin bölünmesine engel olan ve kanser gelişimini baskılayan genlerdir. TSG'ler genellikle, hücre adezyonu ve proteaz aktivitesinin düzenlenmesi gibi hücrelerin invazyon ve metastaz potansiyellerini etkileyebilen büyüme veya diğer fonksiyonlarının negatif düzenleyicileridir (Osborne, 2004).

Normal hücrelerde DNA hasarı olduğunda, hücre siklusunu G0 fazında durdurur ve hücreye onarım için zaman kazandırır, hasar onarılamıyorsa hücre apoptoza gider. Tümör baskılayıcı genler eğer işlevlerini kaybederlerse hücre büyümesinin kontrolü ortadan kalkar dolayısıyla DNA onarımı olmadan hücre siklusu kontrolsüz devam eder. TSG'lerin hücre üzerindeki etkileri genetik değişiklikler sonrasında ortadan kalkmaktadır. Ayrıca resesif (çekinik) karakterli oldukları için her iki allelde de mutasyon olması sonucunda TSG'ler inaktive olur ve hücre üzerindeki etkileri tamamen ortadan kalkar. İnaktivasyon sonrasında hücre üzerindeki kısıtlayıcı etkilerinin yok olmasına bağlı olarak da kanser gelişimi gözlenmektedir (Cabadak, 2008). Kanser açısından en önemli ve en iyi bilinen tümör baskılayıcı genler Retinoblastoma (Rb) ve p53 genleridir.

- **Rb Geni (Retinoblastoma geni)**

Rb, insanın 13. kromozomu üzerinde bulunan tümör baskılayıcı gendir. Rb proteini, Rb gen ürünü olup hücre siklusunu düzenlemede önemli role sahip nükleer bir fosfoproteindir. Rb proteini, S fazında hücresel replikasyonda yer alan nükleer transkripsiyon faktörü olan E2F proteini ile etkileşime girmektedir. Bu etkileşim E2F'nin transkripsiyon faktörü olarak işlev görmesini önlemektedir. Rb proteininin fosforile formu inaktif, defosforile formu ise aktiftir. Rb aktif hipofosforile formu E2F transkripsiyon faktörlerini bağlamakta ve hücre siklusunun G1 fazından S fazına geçmesine engel olmaktadır, hiperfosforlanmış düzeyde ise Rb, E2F ile etkileşim kuramamakta ve hücre siklusunun S fazına geçmesini sağlamaktadır. Rb mutantlar (yapısal fosforile olmuş ve E2F bağlanmamış), S fazı restriksiyon bölgesinde kontrolsüz hücre bölünmesine neden olmaktadır dolayısıyla hücreler tümörojenik olabilmektedir. Rb genindeki mutasyon sonucunda çocuklarda göz kanseri oluşmaktadır (Kopnin, 2000; Hanahan ve Weinberg, 2000; Sandal, 2002).

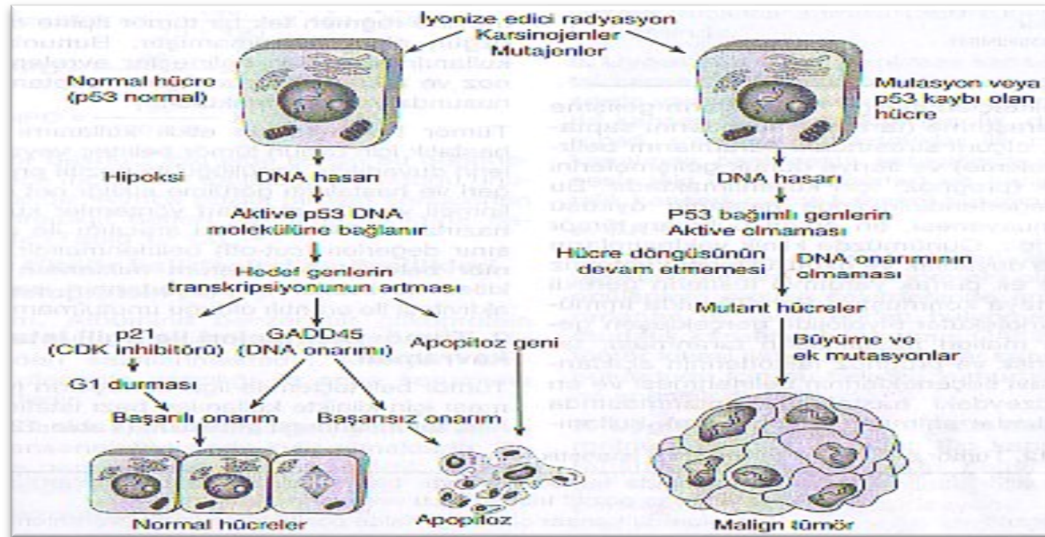
- **p53 Süpressör Gen**

p53 geni; 17 nolu kromozomun kısa kolunda lokalize olmakta, tümör baskılayıcı gen olarak işlev görmekte ve 53 kDa ağırlığında nükleer fosfoprotein kodlamaktadır (Cachot ve ark., 1998). p53 proteini hücre siklusunun baskılanmasında etkili olan genlerin ekspresyonlarını düzenleyen DNA bağlayıcı bir proteindir (Sandal, 2002).

Bir transkripsiyon faktörü olarak p53 proteini, nükleotid “mismatche”leri, DNA sarmalı kırıkları gibi DNA lezyonlarını, radyasyon veya kemoterapi ile oluşan DNA hasarlarını belirleyebilmektedir. p53 geni, hücrede bir şekilde DNA hasarı (radyasyon, kemoterapi) oluştuğunda hasar onarılncaya kadar hücre siklusunu G1 fazında durdurur böylece hücrenin S fazına girmesine engel olur ve hücreye DNA onarımı için zaman kazandırır. p53 seviyesinin artması ya tamir mekanizması proteinlerini ya da apoptozise yol açan proteinleri indüklemektedir. Eğer DNA hasarı onarılamayacak düzeyde ise p53, düzensiz hücre büyümesini ve kanser oluşumunu engellemek için apoptozisi indüklemektedir. İndüklenen p53, bir pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyesi olan bax’ın indüksiyonuna yol açar ve apoptozisi başlatmaktadır. p53 ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna neden olarak da apoptozisi başlatabilmektedir (Lowitz ve Casciato, 2000; Potten ve Wilson, 2004). p53 proteini; DNA hasarı, ribonükleotid kaybı veya hipoksi gibi çeşitli uyarılara karşı yanıt olarak hücrede birikmektedir. Bu birikim, hücre döngüsünün durmasına veya apoptozise neden olmaktadır. p53, siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21Waf1/Cip1 proteininin ekspresyonunu ve apoptozisin güçlü modülatörü olan bax proteinini uyarmaktadır (Ane ve Bechter, 1999).

Birçok insan kanserlerinin mutant p53 baskılayıcı genine sahip olduğu bulunmuştur. p53 insan kanserlerinde en sık bozulan gendir ve mesane, meme, kolon, akciğer, karaciğer, prostat ve cilt kanserlerini de içeren kanserlerin %50’den fazlası p53 mutasyonu ile ilişkilidir (Sandal, 2002).

p53 tümör baskılayıcı geni; DNA onarımı, hücre döngüsünün ve apoptozisin düzenlenmesi gibi DNA hasarına yanıt olarak aktif olan çeşitli hücresel yollarda oldukça önemlidir. Bu kritik hücre yollarının düzensizliği tümör genез süreci ile ilişkilidir. p53 fonksiyon kaybı çok çeşitli kanser türleri (fonksiyonel olmayan p53; % 15-50 meme kanseri, % 25-70 metastatik prostat kanseri, % 25-75 akciğer kanseri ve % 33-100 baş ve boyun kanseri) ile ilişkilidir. Mutant p53 varlığı; akciğer, kolon ve meme kanseri dahil olmak üzere birçok insan kanseri için olumsuz prognoz ile ilişkilidir ve bazı tedavi edilebilir kanser türlerinde (Wilm tümörü, retinoblastom, testis kanseri, nöroblastom ve akut lenfoblastik lösemi) mutant p53 nadiren bulunmaktadır. Ayrıca, p53 proteini anjiyogenez ile ilgili olan genleri transkripsiyonel olarak düzenlemektedir ve bu süreç solid tümör gelişimi için gereklidir. Mutant p53 geni taşıyan hücreler, hücre döngüsünün durma sinyallerini almadıkları için hücre genomu stabil değildir dolayısıyla bütün hücreler tümör oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. p53 aracılı apoptotik yolak kaybı veya mutasyonu, tümörlerin kemoterapi veya radyasyona dirençli hale geldikleri bir mekanizma olarak bilinmektedir. Sistematik olarak verilen ligand-lipozom p53 gen tedavisi, tümörü kemoterapi ve radyoterapiye duyarlı hale getiren fonksiyonel normal-tip p53'ün ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır (Xu ve ark., 2001; Altunkaynak ve Özbek, 2008).



Şekil 1.7. p53 proteininin hücre döngüsü üzerindeki etkisi (Altunışık, 2002)

1.2. Hücre Siklusu

Hücre siklusu (döngüsü), çoğalmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Çoğu hücrede hücre siklusu; hücre büyümesi, DNA replikasyonu, kardeş kromozomların iki yavru hücreye dağıtılması ve hücre bölünmesi olmak üzere dört farklı süreçten oluşmaktadır. Hücre siklusuna giren hücre, morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki yavru hücreye bölünerek döngüyü tamamlar. Hücrelerin ikiye bölünmesi mitozis ile gerçekleşir.

Hücre siklusunun süresi hücreden hücreye değişir. Hücreler mitozise girmeden önce bir hazırlık safhası (interfaz) geçirirler, bu safhada hücreler hem hacimce büyürler hem de bölünmeleri için gerekli olan çeşitli düzenleyici proteinler ve makromoleküller sentezlenir. İnterfaz kendi içerisinde G1, S, ve G2 olmak üzere çeşitli alt fazlardan oluşur. Mitozis ve interfaz birlikte hücre siklusu olarak bilinen bir süreci oluştururlar. Hücre siklusu, fazların işleyiş sırasına göre; G1, S, G2 ve M fazlarından oluşur. Hücreler bir bölünme sinyali almadıkları sürece hücre siklusunun aktif G1, S, G2 ve M fazlarına girmezler ve dinlenme fazı denilen G0 fazında beklerler. G1 ve G2 kısaltmaları “gap” (ara, boşluk) sözcüğünden gelmektedir. S fazı DNA sentezi (replikasyonu) fazını göstermektedir. M fazı ise mitozis anlamına gelmektedir (Cooper, 2000; Ulukaya, 2001).

G0 fazında (istirahat fazı); hücreler genellikle spesifik bir işlevi görmek üzere programlanırlar. Bu faz hücrelerin ya bölünmek, ya farklılaşmak ya da ölmek için karar verdikleri fazdır.

G1 fazında (ara faz, interfaz); hücreler kendi çevrelerini kontrol eder, sinyalleri alır, büyümeye devam eder, metabolik olarak aktiftirler fakat kendi DNA'larını replike etmezler. Bu fazda DNA sentezi (replikasyonu) için hazırlık yapılır. DNA sentezi için gereken birçok enzim üretilir. Bunlar DNA polimeraz I, DNA polimeraz II, DNA polimeraz III enzimleridir. Ayrıca bu fazda spesifik hücre fonksiyonları için proteinler ve RNA sentezlenmektedir.

S fazında (DNA sentezi fazı); hücre içindeki DNA'nın miktarı iki katına çıkar. S fazında aynı zamanda kromozom organizasyonunda görev alacak olan histon ve non-histon proteinleri sentezlenir. Hücrenin hacmi iki kat artar ve hücre bölünmesi için sinyal oluşturur.

G2 fazında; DNA sentezi durur, protein ve RNA sentezi devam eder, hücrenin kromozom sayısı iki katına çıkmıştır. Histon proteinler ile DNA kompleks yapmaya başlar. G2 fazında; hücrede sentezlenen tüm DNA'daki olası hataları saptamak için DNA replikasyonu analiz edilir ve olan hatalar düzeltilir. G2 evresinde mitozu başlatan, kromozomların kondensasyonunu, çekirdek zarının kopmasını sağlayan ve mitozla ilgili diğer olayları indükleyen MPF protein kompleksi ("maturation promoting factor") birikimi vardır.

M fazında (mitozis); protein ve RNA sentez hızı yavaşlar, genetik materyal oluşan iki yavru hücreye eşit olarak dağılır. Mitozdan sonra oluşan yeni hücreler ya G1 ya da G0 fazına girerler.

Hücre siklusunda bir faz tamamlanmadan sonraki faza geçilirse genetik materyal tam ve doğru kopyalanmadığı için hücrede hasar meydana gelebilir (Lowitz ve Casciato, 2000; Cooper, 2000; Aliustaoğlu, 2009).

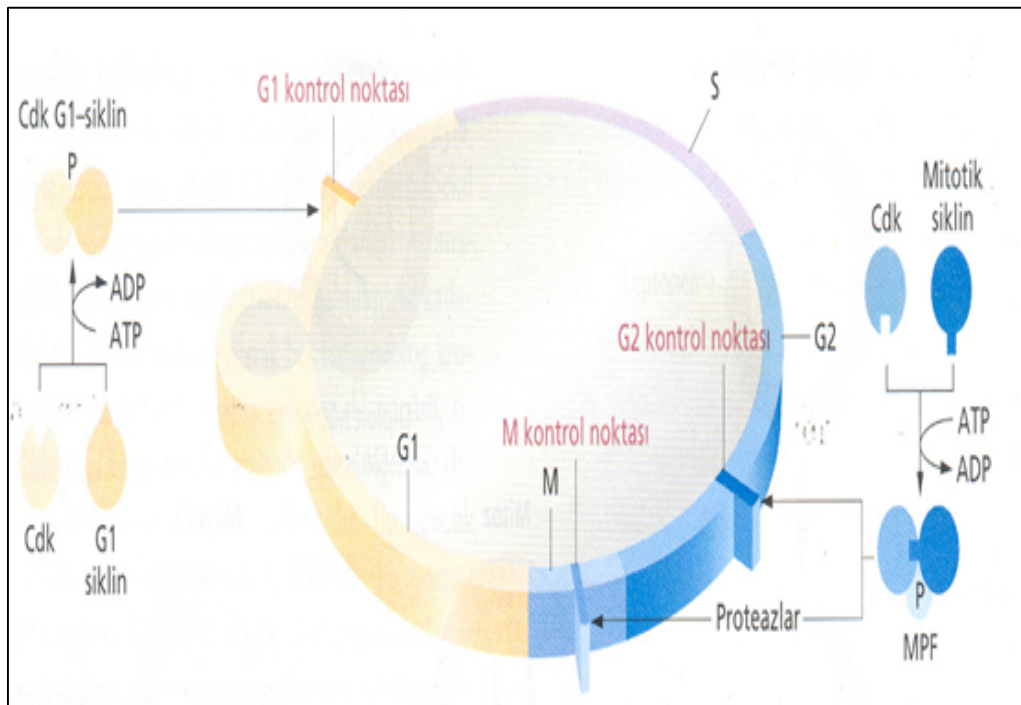
1.2.1. Hücre Siklusu Kontrol Noktaları

Çoğalma kapasitesine sahip hücreler normal olarak belli kontrol noktalarında dururlar. Bu kontrol noktalarında hücrenin siklusa devam edip etmeyeceği kararı verilmektedir. Hücre döngüsünde kontrol noktalarının fonksiyonlarının azalması, çoğalmanın ve genetik instabilitenin artmasıyla ilişkilidir (Doherty ve ark., 2003). Hücre siklusunda DNA sentezinden hemen önce G1-S geçişinde, mitozisten hemen önce G2-M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde olmak üzere üç kontrol noktası bulunmaktadır.

- İlk kontrol noktası geç G1 fazında, S fazına girmeden hemen önce bulunur. DNA sentezi için uygun ekstrasellüler sinyaller ve tüm mekanizma çalışır durumda olsa bile, hücrenin G1 fazından ayrılmadan önce DNA'nın hasarsız bir durumda olması gerekmektedir. Eğer herhangi bir hasar saptanırsa, hücreler ya hasarı onarırlar ya da apoptozise giderek ölürler. Ayrıca bu kontrol noktası p53 proteinin etki yerlerinden biridir.

- İkinci kontrol noktası hücreler M (mitozis) fazına girmeden hemen önce bulunur. DNA replikasyonu tamamıyla ve doğru şekilde tamamlanmamış ise hücre bu kontrol noktasında durur ve hatalar onarıldıktan sonra M fazına girer.
- Üçüncü kontrol noktası (mitoz iplikçik kontrol noktası) metafaz safhasından anafaz safhasına geçişi düzenler. Mitoz iplikçik kontrol noktası; olgunlaşmamış kardeş kromatidlerin ayrılmasını engeller, bütün kinetokorlara uygun mikrotübül bağlanmasını kontrol eder ve kromozomların tam olarak kardeş hücrelere ayrılmasını sağlar.

Hücre siklusu kontrol noktalarında değişimler kanser gelişimine neden olabilir. Hücrenin homeostazisi; hücre çoğalması, büyümenin durdurulması ve apoptozis ile sağlanmaktadır. Hücre siklusu; siklin bağımlı kinazlar (cdk, katalitik altbirim) ve siklinler (cyc, düzenleyici altbirim) tarafından kontrol edilmektedir. Hücre çoğalması ve hücre siklusunun ilerlemesi büyümenin kontrolünde rolü olan genlerin ekspresyonu ile bağlantılıdır (Cooper, 2000; Lowitz ve Casciato, 2000; Sandal, 2002; Cabadak, 2008).



Şekil 1.8. Hücre döngüsündeki üç önemli kontrol noktası (Çeçener, 2010)

Hücre siklusu evrelerini; büyüme faktörleri, sitokinler, onkogenler, siklinler ve siklin bağımlı kinazlar gibi proteinler uyum içerisinde düzenler.

Siklinler, hücrelerin hücre döngüsü boyunca ilerlemesinin düzenlenmesi ile ilişkili olan moleküllerdir. Bunlar siklin bağımlı kinazlar veya hücre bölünmesi döngüsü genleri tarafından üretilen proteinler ile kompleks oluştururlar. Siklinler ve kinazlar; hücrelerin bölünüp bölünmeyeceğine karar veren, kritik kontrol noktalarını etkileyen hücre içindeki proteinlerdir. Protein kinaz olarak bilinen proteinler hücre döngüsünün S ve M fazlarındaki kontrolünde rol oynamaktadır. Bu enzimler hücre döngüsünde çeşitli proteinlerin fosforilasyonuna yol açarak onların aktivitelerini düzenler. Protein kinazlar, heterodimerik proteinlerdir. Bu proteinin regülatör (düzenleyici) kısmı “*siklin*”(CYC=CLN), katalitik kısmı ise “*siklin bağımlı kinaz*”(CDK) olarak isimlendirilir. CDK, siklin (yapısal proteini) ve kinaz (enzim) dan oluşur ve her bir CDK katalitik altbirimi farklı düzenleyici altbirim (CYC) ile bir araya gelebilir. CYC-CDK düzenlenmesi, CYC altbiriminin hücredeki konsantrasyonuna, fosforillenme durumuna, DNA sentezi ve mitoz için gerekli olan esansiyel substratların aktivasyonuna ve inhibitör moleküllere bağlıdır (Arellano ve Moreno, 1997; Schulze-Gahmen ve ark., 1999; Potten ve Wilson, 2004; Malumbres ve Barbacid, 2007).

Siklinler, CDK aktivitesinin önemli araçlarıdır ve seviyeleri hücre döngüsü boyunca değişmektedir. Siklinler hücre siklusunun farklı fazlarında bir taraftan sentezlenirken diğer taraftan da yıkılırlar. G1-S siklinler, S siklinler ve M siklinler olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır. Siklin seviyesi öncelikle gen ekspresyonu (transkripsiyonal düzenleme) ve protein parçalanması (proteolitik düzenleme) ile düzenlenmektedir. Siklinler, farklı insan kanser türlerinde örneğin kolon kanseri ve meme kanserinde kontrolsüz çoğalmaya yol açan mitojenik sinyaller ve planlanmamış ekspresyona yanıt vermektedirler. Siklin, CDK ve CDI (siklin bağımlı kinaz inhibitörleri) düzeyleri hücre siklusunun çeşitli aşamalarında farklılık gösterir ve oldukça komplike bir düzen içinde siklusun ilerlemesini düzenlerler. İnsan kanserlerinin önemli bir bölümü, CDK aktivitesinin yanlış düzenlenmesi sonucunda oluşan mutasyonları taşımaktadır (Potten ve Wilson, 2004; Shah ve Schwartz, 2006).

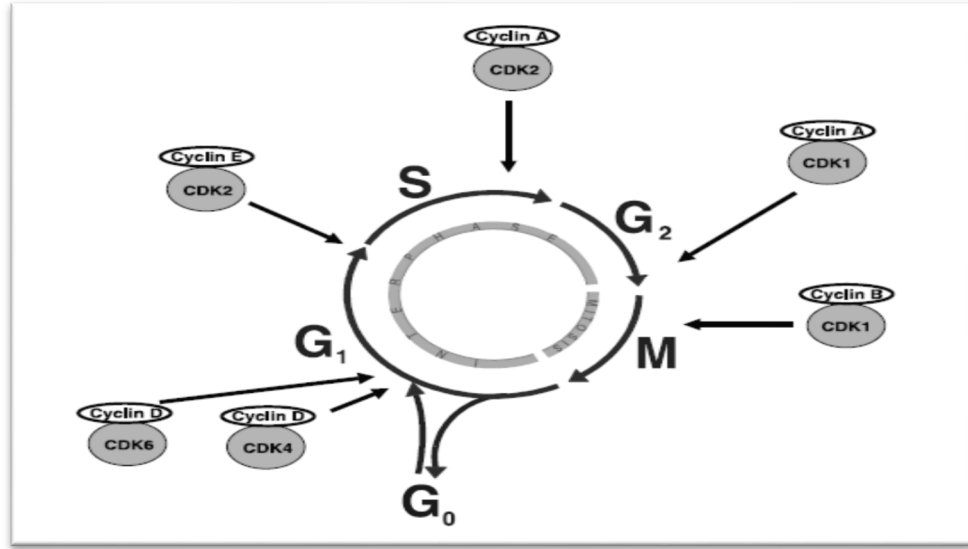
CDK herhangi bir siklin ile birleşmediği sürece hiçbir katalitik aktivite göstermez. Her bir CDK farklı bir siklin ile kompleks oluşturur ve bu kompleksdeki siklin'in tipi hangi proteinlerin fosforile edileceğini belirler. CYC-CDK kompleksleri, gerekli proteinlerin aktifleşmesini sağlayarak hücrenin metabolik aktivitelerini ve hücre bölünmesini düzenlerler.

Siklin A, siklin B, siklin C, siklin D gibi en az on farklı siklin ve CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6 gibi en az sekiz farklı CDK belirlenmiştir. CDK1 genellikle mitotik kinaz olarak kabul edilir, diğer CDK'ların hücre bölünmesinin erken evrelerinde rol oynadığı düşünülmektedir (İnterfaz). Siklin-CDK komplekslerinin aktivitelerinin düzenlenmesinde de CDK inhibitörü proteinler (CDI) etkili olmaktadır. Bu proteinler, tümör baskılayıcı genler olarak bilinen genlerin ürünleridir. CDK inhibitörü olan CDI; insan hücrelerinde substrat özgüllüğüne göre Cip/Kip ailesi (p21Cip/Kip, p27Cip/Kip ve p57Cip/Kip) ve INK4a ailesi (p15INK4a, p16INK4a ve p18INK4a) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. CDI'nın kontrolsüz çoğalmada ve tümör oluşumunda koruyucu etkisi olduğu bilinmektedir (Schulze-Gahmen ve ark., 1999; Güneş, 1999; Sandal, 2002). Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI), ya siklinlere ya CDK'lara ya da her ikisine bağlanarak CDK'ların aktivitelerini inhibe eden proteinlerdir.

Farklı siklin-CDK kompleksleri hücre döngüsünde spesifik noktalarda bulunur ve faz geçişlerinde önemli görevleri vardır. Siklin ekspresyonu hücre döngüsünde hücrenin ilerlemesi ile değişir ve hücre döngüsündeki hücrenin konumuna göre özel siklin ekspresyonları tanımlanmaktadır. Her siklin özellikle spesifik CDK'ya bağlanır (Shah ve Schwartz, 2001).

- Erken G₁ evresinde sentezlenen siklin D, CDK4 ve CDK6'ya bağlanır. G₁/S kontrol noktasında bulunan en önemli regülatör siklin D, hücrenin S fazına doğru ilerlemesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. D siklinler başlama siklinleri olarak adlandırılırlar ve büyüme faktörleri veya mitojenlere yanıt olarak eksprese edilirler.
- Geç G₁ evresinde siklin E sentezlenir ve hücre S fazına girdiği anda hızla yıkılır. Siklin E, CDK2'ye bağlanır. Bu üç kompleks, diğer araçlarla birlikte hücrenin S fazına girmesini ve S fazında ilerlemesini sağlamaktadır.

- Siklin A ve Siklin B mitotik siklinlerdir. Siklin A, S fazı boyunca sentez edilir, CDK2 ve CDK1'e bağlanır ve bu kompleksler hücrenin S fazını terk edip G₂ evresine girmesini sağlar ve Siklin B'nin oluşumunu indükler.
- Siklin B, S fazının geç döneminde sentez edilir ardından anafazda yıkılır, CDK1'e bağlanır ve bu kompleks hücrenin G₂ fazını terk edip M evresine girmesine izin verir (Ulukaya, 2001; Potten ve Wilson, 2004; Zhang ve ark., 2005; Cabadak, 2008).



Şekil 1.9. Hücre döngüsünün aşamaları. Düzenleyici CDK/siklin komplekslerinin aktiviteleri ayrıca belirtilmiştir (Vermeulen ve ark., 2003)

1.2.2. Hücre Siklusu ve Kanser

Kanser hücrelerinin en önemli özelliği anormal hücre bölünmesidir. Memeli hücrelerinde hücre bölünmesi, hücre döngüsünün çeşitli fazlarında ilerlemesini düzenleyen protein kinazlar tarafından sağlanmaktadır. CDK'lar; hücre döngüsünü, DNA sentezini ve mitoz başlangıcını düzenlemektedir. İnsan kanserlerinde en sıklıkla karşılaşılan durumlardan biri de, CDK'ların yanlış düzenlenmesidir. Son araştırmalar mitotik kinaz içeren mutasyonlarında tümör gelişimine bağlı olduğunu göstermektedir. Hücre döngüsündeki kinazların yanlış düzenlenmesi, plansız çoğalma ve genomik instabiliteye yol açan anormal hücre bölünmesinin sonucu olabilmektedir.

Normalde hücre bölünmesini baskılayan proteinleri (p15, p16, p21, p27 gibi CDK inhibitörü proteinler) kodlayan ve tümör baskılayıcı genler olarak tanımlanan genlerde oluşan mutasyonlar tümör oluşumuna neden olmaktadır (Malumbres ve Barbacid, 2007). Hücre döngüsü, ekstraselüler büyüme sinyalleri, hücre boyutu ve DNA bütünlüğünü belirleyen çok sayıda kontrol noktasını içeren bir süreçtir. CDK'lar ve siklinler hücre döngüsü ilerlemesini indükleyen pozitif hızlandırıcı veya düzenleyicilerdir. Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri ise düzenleyici sinyallere yanıt için hücre döngüsünün ilerlemesini durduran önemli negatif düzenleyicilerdir. Kanseri, pozitif düzenleyicilerin anormal ekspresyonu veya aktivasyonundan ve negatif düzenleyicilerin fonksiyonel baskısından kaynaklanmaktadır. Tümörün; farklı insan kanseri hücrelerinde çeşitli siklinler, CDK ve CDI ekspresyonundaki mutasyonlar veya anormalliklerle ilişkili olduğu bilinmektedir (Park ve Lee, 2003).

Mutasyonlar genellikle proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde ortaya çıkmaktadır. Proto-onkogenler veya onkogenlerden mutasyona uğramış olanlar, tümör büyümesine neden olabilir. Hücre döngüsünün kontrolü, kanser ile ilişkilidir ki bu da hücre döngüsünün farklı düzeylerinde mutasyona uğramış önemli proteinler ile ortaya çıkmaktadır. Kanserde mutasyonlar, *CDK*, *siklin*, *CDK aktive edici enzim*, *CDI*, *CDK substratları* ve *kontrol noktası proteinlerini kodlayan genlerde* gözlenmektedir (Vermeulen ve ark., 2003).

Tümör baskılayıcı genlerde oluşan mutasyonlar, hasarlı hücrelerin hücre sikluslarının ilerlemesine ve tümör gelişimine neden olurlar. p53 proteini; hücre büyümesinin durdurulması, apoptozis, hücre farklılaşması ve DNA onarımının başlatılmasında rol alır. Tümör baskılanmasında önemli rolü olan p53 geni işlevini kaybederse hücre büyümesinin kontrolü ortadan kalkar ve DNA onarımı olmadan hücre siklusu kontrolsüz devam eder. p53 proteinin hücre siklusunda en karakteristik rolü transkripsiyon faktörü olmasıdır. Kanseri hücrelerinde mutasyona uğramış olan p53 kalıntıları DNA'nın bağlanması için önemlidir. Apoptozisi düzenleyen genlerin mutasyonu da kansere yol açmaktadır.

Hücre döngüsü ilerlemesinde Ras proteininin rolü; G0 fazından çıkan ve çoğalmaya devam eden hücrelerde belirgindir. Ras genlerindeki mutasyon, tümör metastazı ve anjiojenezde bulunan onkoproteinleri oluşturmaktadır. Endojen kaynaklı Ras, hücre döngüsü için önemlidir ve onkogenik Ras proteini hücre döngüsüne girişte serbest olan büyüme faktörlerini arttırmaktadır. Bu gendeki mutasyonlar genellikle 12. ve 13. kodonda oluşmaktadır. Diğer sıklıkla mutasyona uğrayan kodonlar ise 59. ve 61. kodondur (Macaluso ve ark., 2002).

Radyasyon veya toksine maruz kalan hücrelerde DNA'da oluşan hasara göre hücre siklusu kontrol noktaları G1'den S fazına veya G2'den mitozaya geçişi engellerler. Kanserin ilerlemesinde tümör baskılayıcı fonksiyon, DNA onarımı ve apoptozis kritik yolaklardır (Collins ve ark., 1997; Cabadak, 2008; Foster, 2008).

Hücre döngüsünün düzenlenmesinde kontrol noktaları oldukça önemlidir. Hücre döngüsü kontrol noktaları; DNA replikasyonu ve kromozom ayrımı gibi kritik olaylarda hasarları belirlemektedir (Collins ve ark., 1997). DNA onarımı tamamlanmadan hücre döngüsü kontrol noktalarının kaldırılması, hücre ölümüne yol açan apoptotik kaskadı aktive edebilir (Schwartz ve Shah, 2005). Hücre döngüsü kontrol noktaları kanser hücrelerinde, hücrelerin bölünmesini ve tümör oluşumunu önlemek için mutlaka aktif olmalıdır, kanserin gelişimini sağlayan hatalı kontroller genetik hasara yol açabilmektedir. Dolayısıyla hücre döngüsü kontrolü kanser oluşumunu anlamada oldukça önemlidir (Nurse ve ark., 1997).

1.2. Apoptozis ve Kanser Oluşumundaki Etkisi

Apoptozis, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar (örneğin; hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon, kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar) ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma ile hücre ölümünü kontrol eden aktif bir süreçtir (Altunkaynak ve Özbek, 2008). Kerr, Wyllie ve Currie, 1972 yılında yayımladıkları bir makalede o tarihe kadar fazla tanımlanmamış ve nekrozdan farklı morfolojik özellikler taşıyan diğer bir hücre ölüm şeklini ifade etmişler ve bu olayı apoptozis olarak adlandırmışlardır. Eski bir yunan terimi olan apoptozis, bir çiçeğin yapraklarının sonbaharda dökülmesi anlamına gelmektedir (Kerr ve ark., 1972; Gewies, 2003).

Apoptozisin genellikle hücre intiharı olarak belirtilmesinin nedeni, hücrelerin kendi ölümlerinde aktif olarak rol aldıkları bir süreç olmasıdır. Apoptozis; farklı biyolojik sistemlerde normal hücre yenilenmesini, bağışıklık sistemini, embriyonik gelişimi, metamorfoz, hormon bağımlı atrofi (doku yada organın küçülmesi) ve kimyasallar ile uyarılan hücre ölümünü de içeren fizyolojik bir mekanizmadır. Bir kanser hücresinin çoğalmasını ve ölümünü, onkogenler ve tümör baskılayıcı genler kontrol etmektedir. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar kanser hücresinin oluşmasını ya da oluşmamasını belirlemektedir (Dash, 2007; Rastogi ve ark, 2009).

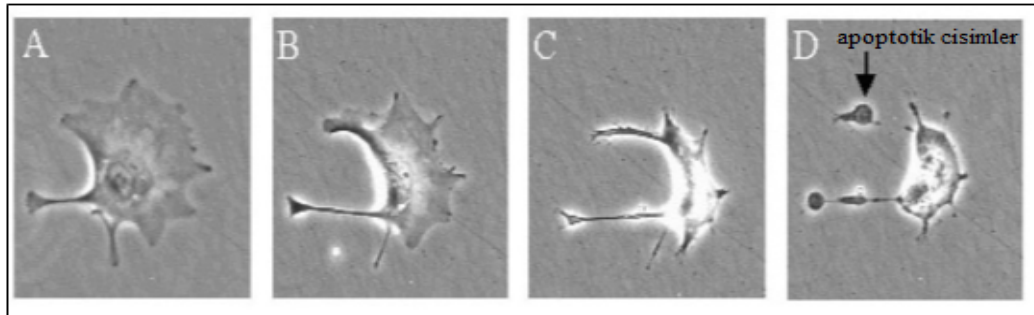
Çok hücreli organizmaların hem hücre sayılarını belli bir aralıkta sabit tutabilmeleri için hem de hasar gören dokularını yenileyebilmeleri için çoğalmaya ihtiyaçları vardır, dolayısıyla hücre çoğalması ve apoptozis arasında kontrollü bir denge olması gerekmektedir. Bu denge apoptozis yönünde bozulursa Alzheimer, Parkinson, İnsüline bağımlı tip diyabet (tip 1 diyabet), Hepatit C enfeksiyonu ve miyokard enfarktüsü gibi hastalıklara; hücre çoğalması yönünde bozulursa otoimmün hastalıklara, viral enfeksiyonların yayılmasına ve kansere neden olabilmektedir (Evan ve Vousden, 2001; Gewies, 2003).

Kanser hücreleri büyümelerini düzenlemek ve normalden daha fazla proliferatif olabilmek için normal hücresel sinyalleri görmezden gelmelerine izin veren bir dizi mutasyona sahiptir. Normal şartlar altında hasarlı hücreler apoptozise gitmektedir fakat kanser hücrelerinde mutasyon oluşması durumunda hücrelerin apoptozise gitmesi engellenmektedir.

Sonuç olarak, hücresel proliferasyon kontrol edilemediğinden tümör oluşumuna bağlı olarak hastalık ilerleyebilmektedir. Çoğu durumda bu tümörleri, hücrelere hasar veren birçok kanser tedavisi ile (radyasyon veya kimyasallar) öldürmek zor olabilmektedir ve apoptotik yolaktaki mutasyonlar sürekli bu tür saldırılara dirençli hücreler üretmektedir. Örneğin Parkinson ve alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda, nöronal ölümün (apoptozisin) tetiklenmesi söz konusudur. Apoptozisin ayrıca birçok oto-immün hastalıkların ilerlemesinde de rol oynadığı düşünülmektedir (Dash, 2007). Bu hastalıkların oluşumlarının engellenmesi ve tedavi edilebilmesi için apoptozis kontrol mekanizmalarının bilinmesi oldukça önemlidir.

1.3.1. Apoptozisin Morfolojik Özellikleri

Apoptozise giden hücrelerde morfolojik olarak ilk gözlenen değişiklik, hücrelerin mikrovillus gibi özel yüzey farklılaşma yapılarını ve diğer hücrelerle temas yüzeylerini kaybetmeleridir. Apoptotik hücreler membran bütünlüklerini korurlar. Hücre büzülmesi, hücre membranının tomurcuklanması, kromatin yoğunlaşması, DNA'nın nükleozomal bölgelerden kesilmesi ve nükleus parçalanması (DNA fragmentasyonu) görülmektedir. Ayrıca apoptozis, sitoplazmik organellerin sıkışması, endoplazmik retikulumun genişlemesi, hücre hacmindeki azalma ile sonuçlanan plazma zarı değişiklikleri ile karakterize edilmektedir. Apoptotik hücre ölümünün son aşamasında hücre, organeller ya da çekirdek parçaları içeren küçük parçalara bölünür ve apoptotik cisimcikler ortaya çıkar (Gewies, 2003; Ulukaya, 2003). Bunlar çoğunlukla makrofajlar bazen de komşu hücreler tarafından fagosite edilirler ve apoptotik ölüm sonrasında hücre membran bütünlüğünün korunmasıyla hücre içeriği ortama dökülmediği için inflamatuvar yanıt oluşmamaktadır (Elmore, 2007; Hotchkiss, 2009). Nekroz alternatif bir hücre ölüm şeklidir. Akut doku zedelenmesine, toksik faktörlere, hipoksi ve iskemiye karşı bir reaksiyon olarak ortaya çıkabilmektedir. Nekrotik hücre ölümü, enerji üretim yetmezliği, iyon kanallarındaki bozukluklar veya pH dengesindeki aşırı değişimler gibi birtakım fizyolojik koşulların aşırı bozulması sonucunda ortaya çıkar ve sonuç olarak hücre içerisine osmozla su girmesiyle hücre patlar, hücre membran bütünlüğü kaybolur ve inflamatuvar yanıt oluşur. DNA rastgele-düzensiz olarak parçalanır ve hücrenin mitokondrisi şişer (Gültekin ve ark, 2008).

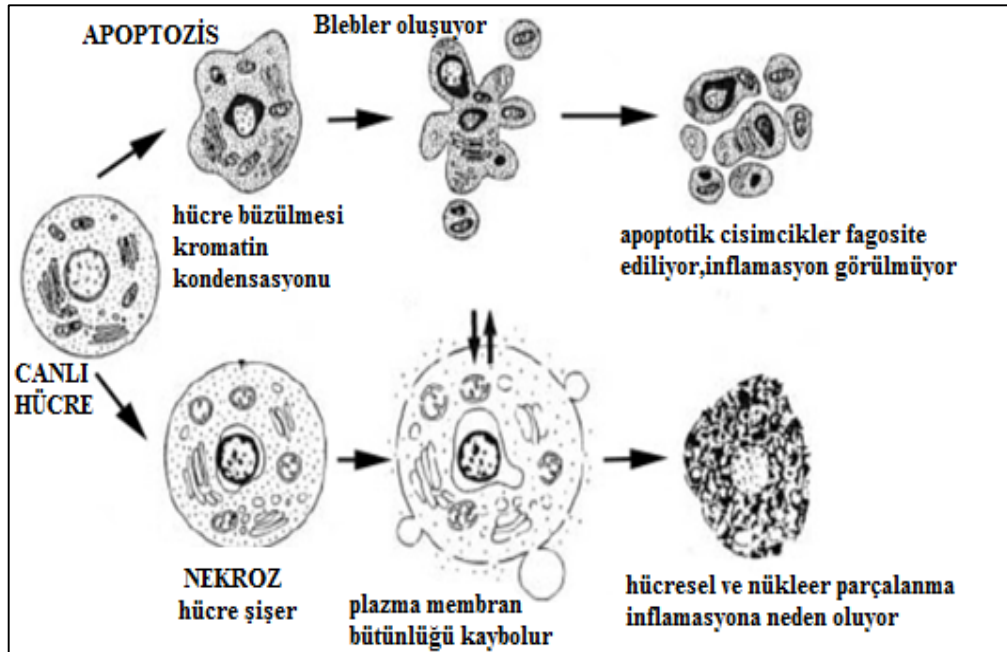


Şekil 1.10. Apoptotik hücre morfolojisi (hücrenin 6 saatlik zaman dilimi içerisindeki görüntüleri)
(Dash, 2007)

1.3.2. Apoptozis ve Nekrozis Arasındaki Farklılıklar

- Apoptozis fizyolojik koşullarda veya bazen patolojik koşullarda gözlenen programlı hücre ölümüdür. Nekrozis her zaman patolojik koşullarda hücre hasarı sonucu ortaya çıkan ölüm şeklidir.
- Apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır, nekrozda ise kromatin materyali hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzemektedir.
- Apoptozisin en önemli yönü, DNA'nın internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları şeklinde DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Dolayısıyla apoptoziste nüklear fragmentasyon oluşurken, nekrozda ise nüklear parçalanma olmamaktadır.
- Apoptoziste hücre büzülmesi ve küçülmesi gözlenirken, nekrozda hücre şişer ve boyutu artar.
- Apoptoziste hücre membranı yüzey farklılaşmalarını kaybeder, büzülür, kıvrıntılı görünüm alır ve bozulmadan kalır. Nekrozda ise, hücre zarında ve organel membranlarında parçalanma gözlenir, hücre membranı sızdıran konuma geçer.
- Apoptoziste hücre sitoplazmasının yoğunluğu artar, hücre organelleri normal görünümelerini korurlar, nekrozda ise hücre sitoplazması berrak hale gelir ayrıca hücrenin şişmesi (hücreler tarafından sodyum iyonları ve suyun alınması ile) ve organellerin şişmesi belirgindir.
- Apoptoziste erken hücre-hücre temas kaybı, nekrozda ise geç hücre-hücre temas kaybı gözlenmektedir.
- Apoptozis için ATP gereklidir (aktif süreç) , nekrozda ise ATP gerekmez çünkü pasif süreçtir.
- Apoptotik hücrelerde ayrıca normalde plazma membranının iç yüzünde transloke olan fosfatidilserin, aminofosfolipid transferaz enzimi ile erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olmaktadır. Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını ve fagosite olmasını sağlamaktadır. Nekrotik hücre ise lizise uğramaktadır.

- Apoptoziste; apoptotik hücre veya cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden dolayı inflamasyon oluşmaz (anti-inflamatuar cevap) fakat nekrozda hücre içeriği dış ortama salındığından inflamasyon reaksiyonu (inflamatuar cevap) uyarılmaktadır.
- Apoptoziste intakt hücre membranı bulunur fakat membranda bleb'ler oluşmaktadır. Ayrıca hücre membranla kaplı, farklı miktarda nükleus ve diğer hücre içi yapıları içeren küçük cisimciklere "apoptotik cisimciklere" parçalanmaktadır.
- Apoptoziste hücreler tek tek veya bir kaç birarada ölmektedir, nekrozda ise hücreler grup halinde ölmektedirler.
- Apoptozis yaşlanmış ve yararsız hale gelen normal hücrelerin ortamdan yok edilmelerini (eliminasyonlarını) sağlar.
- Apoptozis organizmanın kendi dokularını tanıyan T hücrelerinin eliminasyonunda da rol alır. Böylece, bu hücrelerin organizmaya karşı immun atağı önlenmiş olur (Robertson ve Orrenius, 2000; Ulukaya, 2003; Gewis, 2003; Potten ve Wilson, 2004; Rastogi ve ark., 2009).



Şekil 1.11. Apoptotik ve nekrotik hücre ölüm mekanizmalarının karakteristik özellikleri
(Gewis, 2003)

1.3.3. Apoptozisin İndüklenmesi

Apoptozis; hücrenin içinden ya da dışından çeşitli uyarılarla örneğin; hücre yüzey reseptörlerinin ligasyonu, DNA onarım mekanizmalarındaki hatalar sonucu oluşan DNA hasarı, sitotoksik ilaçlar veya radyoterapi ile tedavi, yaşamsal sinyallerin eksikliği, hücre döngüsü sinyallerindeki tutarsızlık, adezyonun kaybı, Fas veya TNFR-1 gibi ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile tetiklenebilmektedir. (Gewis, 2003).

Memeli hücrelerinde başlıca iki apoptotik sinyal yolu tanımlanmaktadır. Dış yol, ligandların (aktivatör) hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanması ile reseptörlerde meydana gelen konformasyon değişikliklerine bağlıdır. İç yol, mitokondriyal işlevi içerir ve büyüme faktörünün eksikliği, kortikosteroidler, radyasyon, sitotoksik ilaçların neden olduğu DNA hasarı tarafından başlatılır (Anonim). Dışsal apoptoz sinyalleri, spesifik ligandlarla bağlanma sonucunda apoptotik sinyalleri ileten ve ölüm reseptörü olarak adlandırılan hücre yüzey reseptörlerinin aktivasyonu ile oluşturulmaktadır.

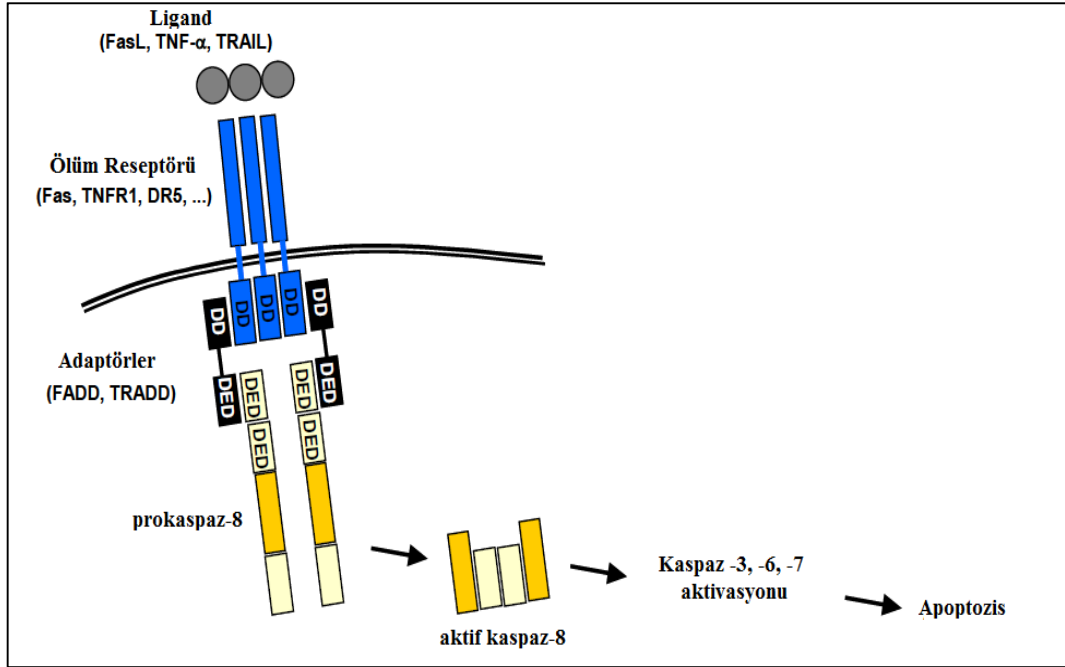
Ölüm reseptörleri (DR) olarak bilinen ve TNFR (Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü) geni ailesinin üyesi olan; TNFR-1, Fas/CD95/APO-1 ve TRAIL reseptörleri olan DR-3(TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1) ve DR-5 (TRAIL-R2)'in ilgili ligandlarla etkileşime girmesi sonucunda apoptozis indüklenir. TNFR süper ailesi üyelerinin birincil yapıları farklı olmasına rağmen hepsi sistein bakımından zengin ekstrasellüler subdomainler içermektedirler. Bu özellik TNFR süper ailesi üyelerinin kendilerine özgü liganları tarafından tek tek tanınması sağlamaktadır. Ölüm reseptörleri ayrıca homolog sistein bakımından zengin 80 aminoasitlik alan içermektedir, ölüm alanı (DD) olarak isimlendirilen bu bölge hücre yüzeyinden sinyalleri intrasellüler sinyal yollarına iletmede önemli rol oynamaktadır. Adaptör moleküller olan FADD, TRADD veya DAXX (ölüm bölgesi ile ilişkili protein), kendileri DD içerdiklerinden dolayı DR ile etkileşime girebilmektedirler (Mahmood ve Shukla, 2010).

Ölüm reseptörlerinin ligandları yani aktivatörleri reseptörlerin oligomerizasyonuna yol açarak aktifleşmelerine neden olmaktadır. Reseptörlerin oligomerizasyonu sonrası, özgün adaptör proteinler FADD (FAS ilişkili ölüm bölgesi proteini) ve TRADD'in (TNFR-1 ilişkili ölüm bölgesi proteini) reseptörlere bağlanması ile DISC (ölüm uyarıcı sinyal kompleksi) oluşmaktadır ve kaspaz sistemi aktifleşmektedir. Bu ölüm bölgeleri prokaspaz-8'i aktifleştirmektedir. Prokaspaz-8 moleküllerinin lokal konsantrasyonları kendi otokatalitik aktivasyonlarına ve aktif kaspaz-8 salınımına yol açmaktadır. Aktif kaspaz-8 ya doğrudan kaspaz-3' ü kırar ve aktifleşmesine neden olur ya da Bid (pro-apoptotik protein ve Bcl-2 ailesi üyesi)'i kırar. Kırılan Bid, sitoplazmadan mitokondriye transloke olup mitokondriden sitokrom c'nin salınmasına neden olur ve hücrede apoptotik süreci devam ettirir. Mitokondri iç 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, ATP'nin de ortamda bulunması ile apoptozom kompleksi oluşur. Apoptozomun görevi, başlatıcı kaspaz olan kaspaz-9'u aktive etmektedir ve bu da kaspaz-3'ü aktive ederek kaspaz kaskadına aracılık eder ve bu şekilde hücre ölümü adım adım gerçekleşir (Ulukaya, 2003; Potten ve Wilson, 2004; Holcik ve ark., 2005; Dash, 2007; Tanel ve Averill-Bates, 2007; Akşit ve Bildik, 2008; Duprez ve ark., 2009).

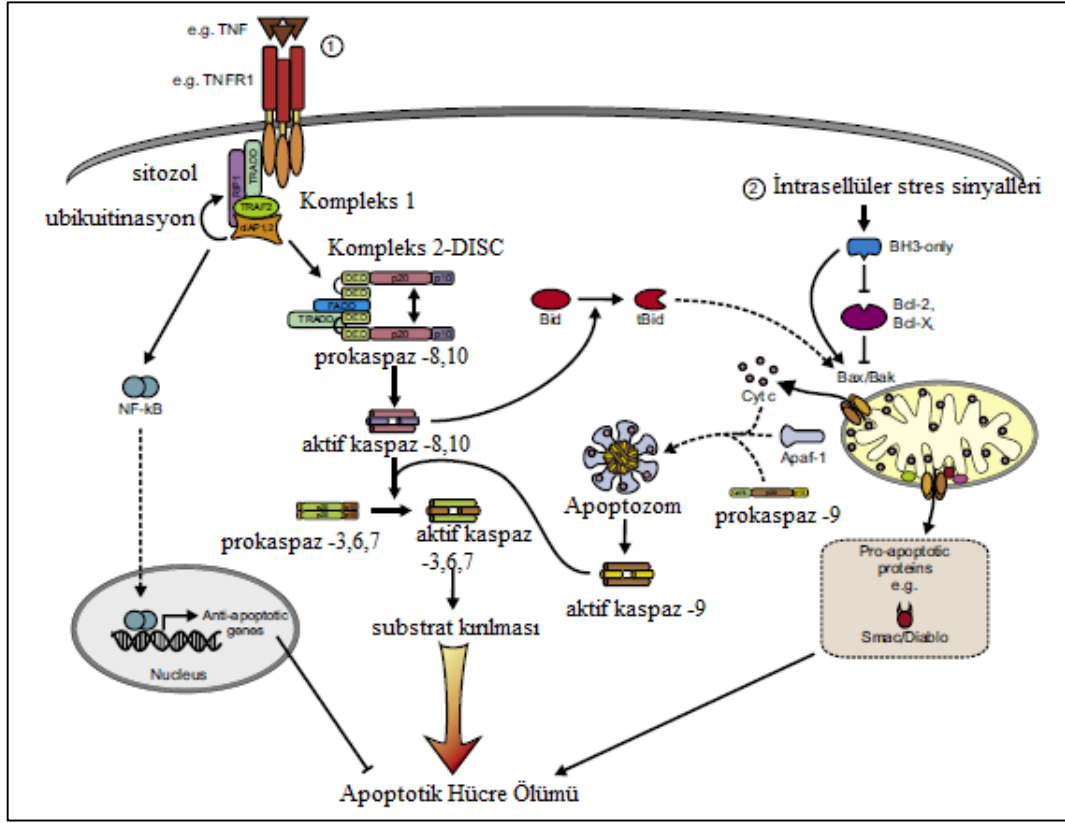
Ayrıca canlı hücrelerde kaspaz aktivitesini inhibe eden ve aktiviteleri Smac veya Omi/HtrA2 gibi fonksiyonel analoglar ile engellenmiş birçok IAPs (apoptozis inhibitörleri) vardır. Ölen hücrelerde Smac ve Omi/HtrA2 (mitokondriyel proteinler, pro-apoptotik proteinler) mitokondriden salındığında IAPs inaktif olmaktadır böylece kaspaz-3 ve kaspaz-9 inhibisyonunu engelleyerek hücrelerin apoptozise gitmelerini sağlamaktadır. Bu nedenle IAP inhibisyon yolunun mitokondriyal yolak ile ilişkili olabildiği düşünülmektedir (Holcik ve ark., 2005; Duprez ve ark., 2009).

Hücre ölüm reseptörlerinden TNFR-1 ve DR-3 de adaptör proteinler olarak FADD ve TRADD'ı kullanarak kaspaz-8' in aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu içsel yolak ve dışsal yolak mekanizmaları kaspaz-bağımlı apoptozisi göstermektedir. Ayrıca kaspazlardan bağımsız olarak apoptozise neden olduğu düşünülen kaspaz aktivasyonunun gerçekleşmediği mekanizmada bulunmaktadır.

Bu mekanizmada AIF (apoptozis indükleyici faktör) mitokondriden salınıp nükleusa geçmekte ve nükleazları aktifleştirerek DNA hasarına yol açmaktadır. AIF, steroidler, granzyme B ve endonukleaz G kaspazlardan bağımsız olarak apoptoze neden olmaktadır. Apoptozis genotoksik ajanların etkisi sonucu oluşan ağır DNA hasarına karşı gelişen p53 indüksiyonu ile de başlamaktadır. p53'ün indüklenmesi bax'ın (pro-apoptotik, bcl-2 ailesi üyesi) indüksiyonunu neden olur ve bu şekilde apoptozisi başlatabilir. Ayrıca apoptozis reaktif oksijen radikallerinin oluşturabileceği hasarlara bağlı olarakta başlatılabilir (Ulukaya, 2003; Dash, 2007).



Şekil 1.12. Reseptör aracılı kaspaz aktivasyonu (Gewis, 2003)



Şekil 1.13. Ekstrinsik ve intrinsik apoptotik sinyal yolları (Duprez ve ark., 2009)

1.3.4. Apoptoziste Mitokondrinin Rolü

Mitokondri hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Mitokondri, AIF (apoptozis indükleyici faktör), Smac/DIABLO ve sitokrom c gibi birçok pro-apoptotik proteini içermektedir. Bu faktörler mitokondriyal membranda por oluşumu ile mitokondriden salınmaktadır. Bu porların; hücresel stres, serbest radikal hasarı veya büyüme faktörü yoksunluğu gibi apoptotik sinyaller ile aktive olan bcl-2 ailesi proteinlerinin pro-apoptotik üyelerinin aktivitesi yoluyla oluştuğu düşünülmektedir. Bcl-2 ailesi mitokondrinin aktivasyonuna neden olan en önemli faktördür. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri olan bcl-2 ailesinin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileri ile ya sitokrom c sitozole salınarak apoptozis uyarılmaktadır ya da sitokrom c salınımına engel olunarak apoptozis baskılanmaktadır (Dash, 2007).

1.3.5. Apoptoziste Bcl-2 Ailesinin Rolü

Bcl-2 ailesi üyeleri apoptozis düzenleyici faktörlerin önemli bir grubunu oluşturmaktadır. Bcl-2 özellikle mitokondri dış membranda bulunmaktadır ve iyon transportunu düzenlemektedir. Bcl-2 proteinlerinin bazıları anti-apoptotiktir (bcl-2, bcl-XL, Mcl-1) ve mitokondri, endoplazmik retikulum veya nüklear membranda bulunmaktadır, bazıları ise pro-apoptotiktir (bax, bcl-Xs, Bad, Bim, Bak, Bok, Bid). Apoptotik uyarılara karşı hücrelerin duyarlılığı pro-apoptotik ve anti-apoptotik bcl-2 proteinlerinin dengesine bağlıdır. Pro-apoptotik proteinler fazla eksprese edildiğinde hücreler apoptozise daha duyarlı, anti-apoptotik proteinler daha fazla eksprese edildiğinde hücreler apoptozise daha dirençli olmaktadır. Pro-apoptotik bcl-2 proteinleri hücrel hasar ya da stresin algılayıcıları olarak genellikle sitozolde bulunmakta ve hücrel stres sonucu, anti-apoptotik proteinlerin bulunduğu mitokondri yüzeyine doğru yer değiştirmektedirler. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki etkileşim, anti-apoptotik bcl-2 proteinlerinin normal işlevlerini bozar ve mitokondride porların oluşumuna, sitokrom c ve diğer pro-apoptotik moleküllerin zarlar arası bölgeden açığa çıkmasına neden olabilir. Bu da apoptozom oluşumu ve kaspaz kaskadı aktivasyonuna yol açmaktadır (Robertson ve Orrenius, 2000; Fan ve ark., 2005; Dash, 2007).

1.3.6. Kaspazlar

Apoptozisin erken evrelerinde büyük bir proteaz enzim ailesi olan kaspazlar aktive olmaktadır. Kaspazlar, normal hücrel fonksiyonlar için gerekli olan hücre iskeleti yapısal proteinleri ve DNA tamirinde rol alan nüklear proteinlerin parçalanmasından sorumludurlar (Kandaş, 2004). Memelilerde, apoptosis sırasında hücre yapısının bozulmasını sağlayan kaspazların tümünde etkin bir sistein bölgesi bulunur ve substratları aspartik asit kalıntılarının ardından keserler. Kaspazlar, aktin dahil hücre iskeletinin ana bileşenlerini, nüklear laminleri ve diğer yapısal proteinleri kesmektedirler. Kaspazlar normalde hücrede etkin olmayan prokaspazlar olarak bulunurlar. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek preteolitik bir kaskada neden olurlar.

Başlangıçta, kaspazlar mitokondride membran hasarı oluştururlar daha sonra zar değişimleri, hücre iskeleti ve çekirdek değişimine yol açan hasarlar ortaya çıkartırlar. Bunların etkinleşmesi iki yolla olmaktadır; ligandlar Fas/CD95 gibi ölüm reseptörlerine bağlandıklarında ölüm reseptörü yolu tetiklenir (ekstrinsik yol), DNA hasarı gibi iç darbelerle ve hücre dışı sinyallerle mitokondriyel yol tetiklenir (intrinsik yol). Bu yolun başlatıcıları arasında UV ışını, radyasyon, ısı, H₂O₂ (hidrojen peroksit) ve sitotoksik ilaçlarda bulunmaktadır. Her iki yolda da prokaspazlar bir araya getirilmektedir. Sonrada birbirlerini keserek etkin kaspazları açığa çıkartmaktadırlar. Örneğin; ligandın (FasL ya da CD95L) CD95'e bağlanması prokaspaz-8 moleküllerini bir araya getirir, mitokondriyel bileşenlerin salınması ise prokaspaz-9'ları bir araya getirmektedir. Daha sonra etkinleşen kaspaz-8 ve 9, prokaspaz-3 gibi diğer prokaspazları aktifleştirmektedir (Gewis, 2003; Holcik ve ark., 2005; Kumar ve ark., 2005). Kaspazların bazıları (2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken, 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 (Ulukaya, 2003).

1.3.7. Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

→ Morfolojik görüntüleme yöntemleri

- Işık Mikroskobu (Hematoksilen boyama, Giemsa boyama)
- Floresan Mikroskobu / Lazer Taramalı Konfokal Mikroskobu (Propidium İyodür, Hoechst Boyası)
- Faz Kontrast Mikroskobu
- Elektron Mikroskobu

→ İmmunohistokimyasal yöntemler

- Annexin-V Yöntemi
- Tunel Yöntemi
- M30 Yöntemi
- Kaspaz-3 Yöntemi

→ Biyokimyasal yöntemler

- Agaro Jel Elektroforezi- DNA fragmentasyonu
- Western Blotlama
- Flow Sitometri (Annexin-V)

→ İmmunolojik yöntemler

- ELİSA (DNA fragmentasyonu, M30 düzeyi)
- Fluorimetrik Yöntem (Kaspaz aktivasyonu)

→ Moleküler biyoloji yöntemleri

- DNA Microarray
- Gen ekspresyon dereceleri (Hücre ölüm reseptörleri, kaspazlar) (Ulukaya, 2003; Akşit ve Bildik, 2008; Güleş ve Eren, 2008).

1.4. Yeni Sentez Edilen Palladyum (II) Bileşiği

1.4.1. Palladyum (II) Bileşiğinin Kansere Tedavisindeki Yeri

Kanser tedavisi için kullanıma giren ilaç sayısındaki hızlı artışa rağmen tedavideki başarı oranları aynı oranda artmamıştır. Bu nedenle, anti-tümör etkisi yüksek yeni metal komplekslerin sentezlenmesine gereksinim duyulmaktadır. Metal bileşikler kanser tedavisinde ilaç olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır.

Cisplatin en başarılı metal bazlı ilaç olmasına rağmen, farklı etki mekanizmalarına sahip tümör inhibe edici metal komplekslerin sentezi ve sayısı giderek artmaktadır. Palladyum (Pd) türevlerinin; standart platin bazlı ilaçlara (cisplatin, karboplatin, oksaliplatin) benzer şekilde sitotoksik aktivite gösterdiği, aynı zamanda diğer ağır metal antitümör bileşiklerine göre daha az yan etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Pd komplekslerinin, platin (Pt) komplekslerine kıyasla suda kolay çözünabilmeleri ve membranlardan kolayca geçip hücre içerisinde DNA'ya bağlanabilmeleri daha fazla tercih edilmelerine neden olmaktadır.

Antifungal, antiviral, antitümör ve antibakteriyel etkilere sahip Pd kompleksleri, çeşitli tümör hücre hatlarına karşı umut verici etkilerinden dolayı özellikle son yıllarda sentezlenmekte ve etkileri araştırılmaktadır (Budzisz ve ark., 2004; Abu-Surrah ve ark., 2008; Garoufis ve ark., 2009; Miklasova ve ark., 2009; Al-Masoudi ve ark. 2010; Divsalar ve ark. 2010; Tamasi ve ark. 2010; Abu-Surrah ve ark., 2010; Ulukaya ve ark., 2011a; Ulukaya ve ark., 2011b).

1978 yılında cisplatin, tedavi edilen hastalarda birçok olumsuz yan etkileri olmasına rağmen onkoloji tedavisi için ilk platinum bazlı ilaç olarak kabul edilmiştir. Cisplatini; antitümör aktiviteyi geliştiren ve cisplatinin dezavantajlarını azaltan karboplatinin 1985 yılında (ikinci platinum bazlı ilaç), oksaliplatinin 1996 yılında (üçüncü platinum bazlı ilaç) onaylanması izlemiştir (Starha ve ark., 2009).

Platinum ilaçları metal bazlı antikanser ajanlar olarak kanser tedavisinde önemli role sahiptir. Özellikle cisplatin, karboplatin ve oksaliplatin içeren Pt kompleksleri yaklaşık 30 yıldır; yumurtalık, testis, rahim, baş, boyun, küçük hücreli akciğer, kolorektal, serviks ve lenfomayı da içeren birçok kanser türünün tedavisinde klinik olarak kullanılmaktadır (Mansuri-Torshizi ve ark., 1992; Rabik ve Dolan, 2007; Divsalar ve ark., 2007; Petrovic ve ark., 2007).

Cisplatin, *cis-diamminedichloroplatinum(II)(cis-DDP)*, tüm dünyada kullanılan en etkili antitümör ilaç olarak bilinmesine rağmen; nefrotoksisite, nörotoksisite ve emetojeniteyi de içeren ciddi toksik yan etkilerinin olması hastalara verilen dozu sınırlamaktadır. Hücre içerisinde ilaç konsantrasyonunun nükleofilik kükürt grupları içeren biyomoleküllerle geri dönüşümsüz reaksiyon ile indirgenmesi, DNA'nın geçirdiği yapısal modifikasyonların onarımı ve programlı hücre ölümünün apoptotik mekanizmasının inaktivasyonu gibi birtakım mekanizmalar ile kanser hücrelerine karşı aktivitesi azalan cisplatine, birçok kanser türü direnç geliştirebilmektedir (Mansouri-Torshizi ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2011).

Pd (II) komplekslerinin, kimyasal ve yapısal özellikleri bakımından Pt (II) kompleksleri ile benzerlik göstermesinden dolayı antitümör etkiye sahip oldukları tahmin edilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bazı Pd (II) komplekslerinin standart platin bazlı ilaçlar (cisplatin, karboplatin ve oksaliplatin) ile karşılaştırıldığında farkedilir düzeyde *in vitro* sitotoksik etki gösterdiğini kanıtlamaktadır (Rau ve van Eldik, 1996; Miklasova ve ark., 2009; Guney ve ark., 2011a). Ayrıca metal içeren antitümör ajanların önemli bir özelliği olarak, bazı Pd komplekslerinin tedavide kullanılan cisplatin ilacına göre yüksek anti-tümör aktiviteye ve daha az böbrek toksisitesine neden oldukları gösterilmiştir (Divsalar ve ark., 2007; Ulukaya ve ark., 2011b).

Kanser tedavisinde kullanılan standart platin bazlı ilaçların başarısı, araştırmacıları geliştirilmiş ön ilaç potansiyelleri ile yeni aktif metal kompleksleri geliştirmeye teşvik etmektedir. Bu nedenle çalışmalar, standart kemoterapiye yanıt vermeyen tümörlerde platin direncini önleyebilen yüksek etkinliği olan ilaçlar üzerine odaklanmıştır.

Mono-, di-, polinükleer Pd (II) kompleksleri çeşitli N-donör veya S-donör ligandlar ile kanser tedavisine umut verici ajanlar olmuşlardır (Starha ve ark., 2009). Abu-Surrah ve ark. (2002) tarafından diamino veya kompleks aminoether bidentat ligandlar taşıyan Pd (II) komplekslerinin antitümör aktiviteleri araştırılmıştır.

Tiyosemikarbazonlar ve bunların metal kompleksleri; antimikrobiyal, antitümör ve antiviral ajanlar olarak farmakolojik uygulamalarda kullanılmaktadır. Miklasova ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada; benzaldehit tiyosemikarbazonun insan tümör hücre hatlarına (karsinom, melanom ve lösemi) karşı sitotoksikite gösterdiği ve tiyosemikarbazondan türetilmiş Pd (II) komplekslerinin cisplatin dirençli hücre hatlarına karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Bunun sonucu olarak komplekslerin etki mekanizmasının, DNA ile intrastrand (zincir içi) çarpaz bağlanma yerine, cisplatin koordinasyon mekanizmasında olduğu gibi interstrand (zincirler arası) çarpaz bağlanmayı içerdiği bulunmuştur (Ferraz ve ark., 2009).

Platin ve palladyum komplekslerinin tümör hücrelerine karşı toksisitesi, genotoksik etkilerine dayanmaktadır. DNA'nın bütünlüğünün, siklik ligandlar ile komplekslerin metal merkezi tarafından etkilenmiş olabileceği düşünülmektedir (Kasparkova ve ark., 2010). DNA zincirleri arasında çarpaz bağlantı oluşturan bazı platin kompleksleri rapor edilmiştir. Metal komplekslerin, DNA oligonükleotidler ile çarpaz bağlanması ve DNA'ya bağlanma özellikleri birçok standart antikanser ilacının sitotoksitesinin düzenlenmesinde ve etki mekanizmasında kritik faktörlerdir. DNA'nın yapısında indüklenmiş platin ile oluşan bozulmaların, kompleks hücresel mekanizma boyunca apoptozise neden olduğu belirlenmiştir (Miklasova ve ark., 2012).

Ulukaya ve ark. (2011b) tarafından Pd (II) $[Pd(sac)(terpy)](sac).4H_2O$ kompleksinin insan meme kanseri hücre hatları (MDA-MB-231 ve MCF-7) üzerine büyümeyi baskılayıcı/sitotoksik etkileri araştırılmış, doz ve zamana bağlı olarak Pd (II) kompleksinin güçlü anti-büyüme etkisi *in vitro* olarak gösterilmiştir. Ayrıca bu etki, Balb/c farelerde *in vivo* olarak da doğrulanmıştır. Pd kompleksi MDA-MB-231 hücrelerinde anti-invazif etkiye sahip olduğunun göstergesi olarak matrigel üzerinde tübül formasyonunu etkili biçimde bozduğu gözlenmiştir. Ayrıca Pd (II) kompleksinin apoptozisi DR4 ve DR5 isimli apoptozis hücre ölüm genleri aracılığı ile indüklediği gösterilmiştir.

Ulukaya ve ark. (2011a) tarafından yukarıdaki çalışmaya ek olarak yeni Pt (II) ve Pd (II) bileşiklerinin büyüme inhibe edici etkilerini üç farklı akciğer kanseri hücre hattında (A549, H1299, PC-3) araştırılmıştır. Sonuç olarak, Pd (II) kompleksinin $[PdCl(terpy)](sac).2H_2O$ mitozu inhibe ederek ve nekrotik hücre ölümünü uyararak bütün hücre hatlarında büyüme inhibe edici etkisinin olduğu ve bu büyüme karşıtı etkisinin cisplatinden (akciğer kanseri için standart kemoterapötik ajan) daha fazla olduğu bulunmuştur.

Matesanz ve ark. (1999) tarafından tiyosemikarbazonlardan daha faydalı biyolojik özellikleri olan Pd (II) bis(tiyosemikarbazon) bileşiğinin sitotoksik etkilerini HeLa (insan serviks epitel karsinom hücresi), Pam 212 (normal fare keratinosit), Pam-ras (H-ras onkogen transforme edilmiş fare keratinosit ve cis-DDP dirençli) ve Vero (transforme maymun böbrek fibroblast hücresi) hücre hatları üzerinde araştırılmıştır.

Sonuç olarak, Pd (II) bileşiğinin $[(\text{PdL}^4)\text{DMF}]$ bütün hücre hatlarında klinikte kullanılan ilaçlara göre (cis-DDP, etoposid ve adriamisin) IC_{50} değerinin daha düşük olduğu ve yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur (Matesanz ve ark., 1999).

Budzisz ve ark. (2004); Pt(II) ve Pd(II) bileşiklerinin biyolojik gelişimini, sitotoksitesini, alkilleyici etkisini, apoptozis indükleyici özelliğini ve DNA'ya bağlanma yeteneğini pirazol içeren ligandlar ile (1b: 5-(2-hydroxyphenyl)-1,3-dimethyl-4-methoxycarbonyl-1H]-2-pyrazole) test etmişlerdir. Pt (II) (cis-[Pt(1b)₂Cl₂]) ve Pd (II) (trans-[Pd(1b)₂Cl₂]) bileşiklerinin lösemi hücre hatlarına (HL-60 ve NALM-6) karşı yüksek sitotoksikite gösterdiği ayrıca kaspaz-3 aktivitesini indüklediği bulunmuştur (Budzisz ve ark., 2004).

Szucova ve ark. (2006) tarafından siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri ile Pt (II) ve Pd (II) komplekslerinin sentezi, karakterizasyonu ve antitümör aktivitesi araştırılmıştır. Hazırlanan kompleksler ve uygun CDK inhibitörleri (ligand olarak kullanılmakta); kronik miyeloid lösemi (K-562), meme kanseri (MCF-7), malign melanom (G-361) ve osteojenik sarkom (HOS) kanser hücre hatlarında araştırılmıştır. Ayrıca komplekslerin IC_{50} sitotoksik değerleri cisplatin ve oksaliplatin gibi antitümör ajanlarla karşılaştırılmıştır. Pt (II) bileşiği (cis-[Pt(L₁)₂Cl₂].H₂O) için en düşük IC_{50} değerleri G-361 ve HOS hücre hatlarında gözlenmiştir. Bu değerler tek başına L1'in (6-benzylamino-9-isopropylpurine'den türetilmiş siklin bağımlı kinaz inhibitörleri) IC_{50} değerlerinden daha düşük bulunmuştur. Bu sonuçların cisplatin için elde edilen değerler ile benzer ve oksaliplatin değerlerinden daha iyi olması umut verici bulunmuştur.

Husain ve ark. (2007) tarafından Pd (II) indol-3-karboksaldehid tiyosemikarbazon komplekslerinin sentezi, karakterizasyonu ve anti-amoebic aktivitesi araştırılmıştır.

Mansouri-Torshizi ve ark. (2008), 2,2'-bipiridin ve ditiokarbamat ligandları içeren Pt (II) ve Pd (II) komplekslerini sentezlemişlerdir. Bu bileşiklerin sitotoksik etkileri in vitro koşullarda K562 (insan kronik miyeloid lösemi) hücre hattında değerlendirmişlerdir. Pd (II) (IC_{50} : 18 μM) ve Pt(II) (IC_{50} : 14.3 μM) bileşiklerinin % 50 sitotoksik konsantrasyon değerlerinin cisplatinden (IC_{50} : 154 μM) daha düşük olduğunu ve cisplatinden daha etkili olduğunu belirlemişlerdir.

Ayrıca Saddler ve ark. palladyum komplekslerinin cisplatinin başarısız olduğu gastrointestinal bölgedeki tümörlerin tedavisi için yararlı olabileceğini ileri sürmektedirler.

Tusek-Bozic ve ark. (2008) yaptıkları bir çalışmada; Pd (II) monoetil 8-quinolyl metilfosfonat komplekslerinin sentezini, karakterizasyonu ve anti-tümör etkisini KB (insan oral epidermoid karsinom) ve L1210 (fare lösemi) hücre hatlarında araştırmışlardır. Bu alanda yapılan çalışmaları doğal sistemle olan ilişkisi ve biyolojik/farmakolojik özelliklerinden dolayı, aromatik aminofosfonatlı kompleksler üzerine odaklanmıştır ve çeşitli tümör hücre hatlarına karşı sitostatik etki gösteren bir dizi palladyum ve platin kompleksini sentezlemiş ve karakterize etmişlerdir. Komplekslerin biyolojik özellikleri anti-tümör etkileri değerlendirilerek incelenmiş ve L1210 hücre hattının, KB hücre hattından çok daha hassas olduğu bulunmuştur. Pd (II) komplekslerinin arasında; farklı yapısal özellikler, farklı hidroliz özellikleri, hücre içerisinde farklı taşıma mekanizmaları, farklı şekilde DNA'ya bağlanma ve ayrılma yetenekleri olmasına rağmen, anti-tümör etki açısından önemli farklılıklar olmadığı dikkat çekmiştir. Bazı durumlarda palladyum komplekslerinin kendi platin analoglarından daha aktif olduğu belirlenmiştir.

Pd (II) ve Pt (II) bileşiklerinin koordinasyon kimyası arasındaki benzerlik Pd (II) komplekslerinin antitümör ilaçlar olarak kullanılmasını savunmaktadır (Rau ve van Eldik, 1996). Platinin çok kullanılır olması ligand değişim kinetiğinden gelmektedir. Palladyum komplekslerinde hidroliz, kendi platin analoglarından 105 kat daha hızlı gerçekleşmektedir (Abu-Surrah ve ark., 2008).

Keter ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada, Pd (II) ve Pt (II) pirazol komplekslerinin kanser hücrelerinde apoptozise neden olarak hücre ölümünü arttırdıklarını göstermişlerdir. Bu çalışmada; Pt (II) dikloro-bis(pirazol) kompleksinin, insan servikal epiteloid karsinom hücre hatlarında (CaSki ve HeLa) ve insan T-hücresi lösemi hattında (Jurkat) diğer komplekslere göre daha fazla pro-apoptotik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Apoptozis; fosfotidilserinin membran dış yüzeyine transloke olması, kaspaz-3 aktivasyonu, DNA fragmentasyonu yöntemleri ile gösterilmiştir.

Miklasova ve ark. (2009) tarafından yeni sentez edilen palladyum kompleksleri ile organoarsenik ligandların potansiyel antitümör etkisi ve genotoksitesi insan tümör (MLS) ve normal hücre (Hfl-1) hatlarında araştırılmıştır. Pd komplekslerinin normal hücrelerde olduğu gibi tümör hücrelerinde de 24 saat sonunda hücre canlılığını inhibe ederek anti-proliferatif etki gösterdiği bulunmuştur. Bu çalışmada palladyum kompleksleri; insan tümör hücre hattında (MLS), normal hücre hattına (Hfl-1) göre daha yüksek sitotoksosite göstermiş ve öldürücü doz standart metal bazlı kemoterapötik ilaçlarla (karboplatin ve oksaliplatin) karşılaştırılmıştır. Bütün komplekslerde IC_{50} değerleri MLS hücrelerinde Hfl-1 hücrelerine göre daha düşük bulunmuştur. Farklı palladyum komplekslerinin DNA'da yüksek düzeyde hasarlar oluşturdukları ve apoptozisi indükledikleri belirlenmiştir. Bu komplekslerden, Pd (II) $[PdCl_2L_2](L:2\text{-methoxyphenyl-diphenylarsine})$ kompleksinin tümör hücrelerinde apoptozisi indüklemeye önemli etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bu etkinin komplekslerin DNA ikincil yapı ile etkileşimine bağlı olduğu belirtilmiştir.

Starha ve ark., (2009) tarafından adenin-bazlı ligand içeren Pd (II) okzalato komplekslerinin, insan kronik miyeloid lösemi (K562) ve insan meme adenokarsinomu (MCF7) kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak; Pd (II) komplekslerinin, $[Pd(L^3)_2(ox)]$ (*L3:2-chloro-N6-(2,3-dimethoxybenzyl)-9-isopropyladenine*) ve $[Pd(L^5)_2(ox)]$ (*L5:2-chloro-N6-(4-methylbenzyl)-9-isopropyladenine*) MCF-7 meme kanseri hücre hattında önemli sitotoksik etki gösterdiği ve aynı hücre hattında IC_{50} değerlerinin anti-neoplastik ilaçlar olarak kullanılan cisplatin ve oksaliplatinden daha düşük olduğu bulunmuştur. Ayrıca K562 kanser hücre hattında en düşük IC_{50} değeri $[Pd(L^5)_2(ox)]$ bileşiğinde gözlenmiştir.

Ferraz ve ark. (2009) tarafından 2-Benzoil Piridin-*N*-(4)-tolil tiyosemikarbazonlar ve Pd (II) komplekslerinin HepG2 (insan hepatoma), Jurkat, HL60 (insan promiyelositik lösemi) ve HL60.Bcl-XL hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. $[Pd(2Bz4oT)Cl]$ ve $[Pd(2Bz4mT)Cl]$ bileşiklerinin Jurkat ve HL60 hücre hatlarında cisplatine benzer şekilde sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur.

Bu çalışmada; Pd (II) bileşikleri [Pd(2Bz4oT)Cl] normal-tip HL60 ve Jurkat hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederken, dirençli HL60.Bcl-XL lösemi hücre hattı Pd (II) bileşiğine [Pt(2Bz4oT)Cl] karşı dirençli bulunmuştur. Hücrelerde Bcl-XL proteininin aşırı ekspresyonunun, ilaçlar tarafından indüklenen çeşitli sitotoksik uyarılara direnç kazandırdığı bilinmektedir. Bu anti-apoptotik protein, membran potansiyelini ve mitokondrinin homeostazisini düzenlemektedir. Ayrıca hücrelerde apoptotik uyarılarla muamele edilmiş değişiklikleri inhibe etmekte ve apoptozis ile hücre ölümünü önleyerek hücre canlılığını desteklemektedir. Bu direnç apoptozis ile hücre ölümünde bulunan mitokondriyal yolun etkisinin inhibe edilmesine bağlıdır. Bu çalışmanın sonucunda, Pd (II) bileşiğinin, [Pd(2Bz4oT)Cl], HL60 hücrelerine karşı sitotoksik etkisinin apoptozis ile hücre ölümünün indüksiyonuna bağlı olduğu bulunmuştur.

Nadeem ve ark. (2010) tarafından bazı Pd (II) bileşiklerinin sitotoksik etkilerini tuzlu su karidesi (*Artemia salina*) ve insan prostat kanseri hücre hattında (PC-3) göstermişlerdir. Araştırılan Pd (II) komplekslerinin insan prostat kanseri hücreleri üzerindeki etkileri doksorubisin ile karşılaştırıldığında Pd (II) komplekslerinin önemli sitotoksik aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Gao ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada; tetranüklear Pd (II) kompleksi $[Pd_4(phen)_4(\mu-pydc)_4].10H_2O$ (phen=1,10-phenanthroline, pydc=pyridine-3,4-dicarboxylate) ve cisplatinin sitotoksik etkileri insan serviks epiteloïd karsinom hücreleri (HeLa), insan hepatoselüler karsinom hücreleri (Hep-G2), insan oral epitelyal kanser hücreleri (KB) ve insan akciğer kanseri hücrelerinde (AGZY-83a) araştırılmıştır. Kompleksin bütün hücre hatlarına karşı sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca Pd (II) kompleksinin HeLa ve Hep-G2 hücrelerine karşı cisplatin ile benzer şekilde sitotoksik etki gösterdiği fakat KB ve AGZY-83a hücrelerine karşı cisplatinden daha az etki gösterdiği bulunmuştur.

Vujic ve ark. (2010) tarafından yapılan bir başka çalışmada; R₂edda türevi ligandlar ile birlikte Pd (II) bileşiğinin sentezi, karakterizasyonu ve kronik lenfositik lösemi hücrelerine (CLL) karşı *in vitro* anti-tümöral etkisi araştırılmıştır. Pd (II) komplekslerinin cisplatinden daha fazla antitümöral aktivite sergilediği gözlenmiştir. CLL hücrelerinde Pd (II) bileşiğinin ([PdCl₂{(S,S)-nPr₂eddl}] cisplatinden 13,6 kat daha fazla etkili olduğu bulunmuştur.

Güney ve ark. (2011b) tarafından bis(2-piridil metil) amin (bpma) ve sakkarinat (sac) içeren Pd (II) ve Pt (II) bileşiklerinin sentezi, karakterizasyonu, yapısı, A549 (akciğer kanseri), C6 (sıçan beyin gliom hücresi) ve CHO (çin hamsteri yumurtalık hücresi) hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Yeni komplekslerin sitotoksik etkileri standart kemoterapötik ilaç olan cisplatin ile karşılaştırılmıştır. Pt (II) komplekslerinin [Pt(bpma)(sac)](sac).2H₂O ve [Pt(bpma)(sac)]Cl.1,5H₂O bütün hücre hatlarındaki etkisi az olmasına rağmen, Pd (II) komplekslerinin [Pd(bpma)(sac)](sac).2H₂O ve [Pd(bpma)Cl](sac).2H₂O duyarlı hücre hatları üzerinde önemli bir sitotoksikite gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle, Pd (II) bileşiğinin, [Pd(bpma)Cl](sac).2H₂O, tüm hücre hatlarında hücre ölümünü indüklemeye özellikle etkili olduğu bulunmuştur.

Mansouri-Torshizi ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada, Pd (II) kompleksinin insan kronik miyeloid lösemi hücrelerine (K562) karşı büyüme inhibe edici etkisinin cisplatinden daha fazla olduğu bulunmuştur. Pd (II) kompleksinin IC₅₀ (15.6 µM) değeri cisplatinin IC₅₀ (154 µM) değeri ile karşılaştırıldığında Pd (II) kompleksinin IC₅₀ değerinin cisplatine göre çok daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada; kompleksin seçici ve sürekli olarak DNA biyosentez oranını inhibe etmesinden dolayı, kompleksin hedef molekülünün hücre DNA'sı olduğunu ileri sürülmüştür.

Karaküçük-İyidoğan ve ark. (2011) tarafından yapılan bir başka çalışmada; 5-sübstüetiyofen-2-karboksaldehitlerden türetilen tiyosemikarbazonların Pt (II) ve Pd (II) bileşiklerinin *in vitro* anti-viral ve sitostatik/sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

Bu çalışmada bütün komplekslerin sitotoksik etkileri; insan lenfosit (CEM), insan serviks kanseri (HeLa), feline böbrek Crandell (CRFK), Madin-Darby köpek böbrek (MDCK) ve insan akciğer fibroblast hücrelerine (HEL) karşı belirlenmiştir. Pt (II) kompleksinin ($C_{12}H_9N_4O_2S_2Cl_2Pt$) insan serviks hücrelerine karşı en fazla sitostatik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Pd (II) komplekslerinin genel olarak Pt (II) komplekslerinden daha az sitostatik olduğu sonucuna varılmıştır.

Kontek ve ark. (2011) tarafından ligand olarak dietil (piridin-2-il-metil) fosfatları içeren trans-palladyum (II) kompleksinin; normal lenfositlerde, insan küçük hücreli akciğer (A549) ve insan kolorektal adenokarsinom (HT29) hücrelerinde apoptozis ve nekrozisi indüklediği bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar ile yeni trans-palladyum (II) kompleksinin *in vitro* koşullarda A549 ve HT29 tümör hücrelerinde, normal hücrelere kıyasla daha fazla sitotoksik olduğu ve hücre büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, yeni trans-palladyum (II) kompleksinin araştırılan bütün kanser hücre hatlarında apoptozisi, normal lenfosit hücrelerine göre daha fazla indüklediği bulunmuştur.

Ferraz ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada *N*(4)-tolil-2-benzoil piridin türevli tiyosemikarbazonların ve bunların Pd (II) ve Pt (II) komplekslerinin insan solid tümör hücrelerine karşı sitotoksitesisi araştırılmıştır. Tiyosemikarbazonların; karaciğer kanser hücresi (HepG2) ve melanom (UACC-62) hücre hatlarına karşı anti-proliferatif etkisinin, insan epidermoid karsinom (A431) hücrelerinde daha yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. A431 hücrelerine karşı sitotoksik etki mekanizmasının araştırılması ile Pd (II) kompleksinin $[Pd(2Bz4oT)Cl]$ hücrelerde DNA fragmentasyonu ve apoptozisi indüklediği bulunmuştur. A431 hücrelerine karşı tiyosemikarbazonların ve Pd (II) $[Pd(2Bz4oT)Cl]$ kompleksinin yüksek düzeyde anti-proliferatif etkisi ile birlikte pro-apoptotik etkisinden dolayı Pd (II) kompleksinin kemoterapötik ilaç adayı olabilecek potansiyele sahip olduğu ileri sürülmüştür.

Zhang ve ark. (2011) tarafından Pd (II) komplekslerinin; immatür granülosit lösemi (HL-60), karaciğer kanseri (Bel-7402), mide kanseri (BGC-823) ve nazofarenks kanseri (KB) olmak üzere farklı insan kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik etkisi araştırılmıştır.

Bu çalışmada; Pd (II) bileşiklerinin bütün hücre hatlarında sitotoksik etki gösterdiği fakat sitotoksitesinin cisplatinden daha az olduğu belirlenmiştir. Buna bağlı olarak bütün aminoasitlerin, N-içeren ligandların ve metal iyonlarının sitotoksiste üzerinde önemli etkisinin olduğu fakat IC₅₀ değerlerinin çeşitli aminoasitler, N-içeren ligandlar ve metal iyonları ile belirli bir korelasyon göstermemesinden dolayı komplekslerin sitotoksitesinin tümör hücresinin türü ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür.

Juribasic ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada Pd (II) kinolinil aminofosfonat komplekslerin sentezi, yapısal karakterizasyonu, anti-tümör ve anti-mikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Pd (II) komplekslerinin; kolon kanseri (SW 620 ve HCT 116), akciğer kanseri (H 460), meme kanseri (MCF-7) ve T-lenfoblast lösemi (MOLT-4) insan kanser hücre hatlarına karşı anti-tümör etkisi *in vitro* olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada, dibütil ester L6 'dan türetilen dipalladyum komplekslerinin [Pd₂(L6)₃Cl₄] ve [Pd₂(L6)₃Br₄] düşük mikromolar aralığında hücre büyümesini inhibe edici etkiye ve yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir.

Khan ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada; karışık ligandlı ditiyokarbamat Pd (II) komplekslerinin sentezi, karakterizasyonu ve anti-kanser etkisi araştırılmıştır. Sentezlenen metal bazlı ilaçların anti-kanser etkisi DU145 insan prostat kanseri (HTB-81) hücrelerinde araştırılmıştır. IC₅₀ değerlerinden Pd (II) komplekslerinin cisplatin dirençli DU145 insan prostat kanseri hücrelerine karşı önemli düzeyde etkili olduğu gösterilmiştir.

Ghani ve Mansour, (2012) tarafından yaptıkları bir çalışmada; Pd (II) ve Pt (II) 1H-benzimidazol-2-il-metil-N-(4-bromo-fenil)-amin komplekslerinin yapısı ve anti-kanser aktivitesi araştırılmıştır. Komplekslerin, insan meme kanseri (MCF-7), hepatokarsinom (HepG2) ve kolon kanseri (HCT) hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Pt (II) (C₁₄H₁₂BrCl₂N₃Pt) bileşiğinin IC₅₀ değeri (10.2 µM), cisplatin (9.91 µM) ile karşılaştırıldığında MCF-7 hücre hattına karşı benzer anti-tümör etkiye sahip oldukları gösterilmiştir.

Miklasova ve ark. (2012) tarafından Pd (II) ve Pt (II) komplekslerinin; insan hepatik kanser kök hücre, normal hepatik kök hücre ve normal hepatosellüler karsinom (HepG2) hücre hatlarındaki anti-proliferatif etkisi araştırılmıştır.

Bu çalışmada; komplekslerin normal hepatosellüler karsinom hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin, oksaliplatinden farklı olarak, tümör hücre hatları ile karşılaştırıldığında daha az olduğu sonucuna varılmıştır. Pt (II) trans-[PtI₂{2-PriOC₆H₄As(C₆H₁₁)₂-kAs}₂] ve Pd (II) trans-[PdCl₂{2-MeOC₆H₄As(C₆H₁₁)₂-kAs}₂] kompleksleri ile kök hücre tedavisinin DNA hasarına neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu bileşiklerin anti-mitotik etkilerinin genotoksisitelerine ve DNA zincirleri arasında çarpaz bağ oluşturma kapasitelerine bağlı olduğu belirlenmiştir. Pt (II) komplekslerinin DNA'da lezyonların artışına yol açarak hücrelerde apoptozisi indüklediği gözlenmiştir. Pt (II) komplekslerinin tümör kök hücrelerine karşı oksaliplatinden daha fazla sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Pd (II) kompleksleri ve Pt (II) kompleksinin (trans-[PtI₂{2-PriOC₆H₄As(C₆H₁₁)₂-kAs}₂]) kanser kök hücrelerine karşı yüksek sitotoksisite gösterdiği bulunmuştur.

Al-Noaimi ve ark. (2012) tarafından fenilazo aril metin bağlı ligandlar içeren Pd (II) komplekslerinin sentezi, spektral ve anti-tümör etkisi araştırılmıştır. Klonal büyüme inhibisyonu; insan duktal göğüs karsinom (T47D), sıçan meme adenokarsinom (MTLn3) ve sıçan lösemi (RAW 264.7) kanser hücre hatlarında belirlenmiştir. Sonuç olarak bütün Pd (II) komplekslerin anti-tümör etki gösterdiği tespit edilmiştir.

1.4.2. Yeni Sentez Edilen Palladyum (II) Bileşiğinin Kimyasal Yapısı

Palladyum metali ilk olarak 1803 yılında William Hyde Wollaston tarafından keşfedilmiştir. Platin ve palladyum 10. Grup, Nikel grubu elementlerindendir. Palladyum [Kr] 4d¹⁰5s⁰, platin ise [Xe] 4f¹⁴5d⁹6s¹ elektronik düzenine sahiptir. Pd (II) ve Pt (II) d⁸ geçiş metal iyonlarıdır ve komplekslerinde çoğunlukla sp²d hibritleşmesi yaparak kare düzlem kompleksler meydana getirirler. Palladyum, rodyum, iridyum, osmiyum, rutenyum ve platin elementleri 'platin grubu elementler' olarak adlandırılır. Palladyum metali diğer platin grubu metalleri ile birlikte bulunur. Mineralinin nitrik asit veya hidroklorik asit ile çözünmesi sonucunda altın, platin ve palladyumun H₂MCl₄ kompleksleri oluşur. Çözeltideki altın FeCl₂ ile çöktürülerek, platin ise (NH₄)₂PtCl₆ şeklinde çöktürülerek çözeltiden uzaklaştırılır.

Palladyum, NH_4OH ve HCl ile çöktürülerek $\text{PdCl}_2(\text{NH}_3)_2$ kompleksi elde edilir. Bu bileşiğin yanması ile de metalik palladyum elde edilir. Palladyum saf haldeyken altınimsı beyaz renktedir. Platin grubu metalleri arasında yoğunluğu en az, erime noktası en düşük olanıdır (Greenwood ve Earnshaw, 1997).

Pt (II) ve Pd (II) yumuşak Lewis asidi olarak bilinmektedirler. Pd (II) yumuşak Lewis asidi olmasından dolayı yumuşak Lewis bazlarına (Cl^- , Br^- , I^- ...gibi ligantlar ve P, S, Se, As, Sb.... içeren ligantlarla) karşı yüksek affinite göstermektedirler. Bu nedenle oksijen donörlerinden (sert bazlar) ise, nitrojen veya kükürt donörleri (yumuşak bazlar) ile güçlü bağlar oluştururlar. Azot küçük yarıçapı ve yüksek elektronegatifliği nedeniyle sert baz sınıfındandır. Ancak elektronegatifliğini azaltacak şekilde bağlı olan süstitüentler varlığında davranışı değişerek Pt (II) ve Pd (II) ile kararlı kompleksler oluşturabilir (Pearson, 1967). Pd (II) ve Pt (II) iyonları özellikle azot ve kükürt uçlu ligantlarla kompleksler oluştururlar. Anti-tümör ve anti-mikrobiyal Pd (II) komplekslerinin oluşturulmasında azot ve kükürt donör ligandları olarak genellikle tiyosemikarbazonlar ve ditiyokarbamatlar kullanılmaktadır. Bu ligandlar; antiviral, antimalarial, antifungal, antimikrobiyal, antitümör aktiviteye ve kendi etki mekanizmalarına sahiptir (Petrovic ve ark., 2007; Birinci, 2008; Garoufis ve ark., 2009). Pd (II) komplekslerinin yapısına ditiyokarbamat parçası ilavesi, antikanser ligandların antiproliferatif etkilerinin geliştirilmesi ve taşıyıcı protein yapısında daha az etkisi olması açısından önemli bir role sahiptir (Divsalar ve ark., 2007).

Çizelge 1.1. Palladyumun fiziksel ve kimyasal özellikleri

Palladyum	
Atom numarası	46
Atomik sembol	Pd
Atom ağırlığı	106,42
Elektronik yapı	$[\text{Kr}] 4d^{10}5s^0$
Erime noktası ($^{\circ}\text{C}$)	1554,9
Kaynama noktası ($^{\circ}\text{C}$)	2963
Yoğunluk (g/cm^3)	12,023
Kararlı yükseltgenme basamakları	0, +1, +2, +4

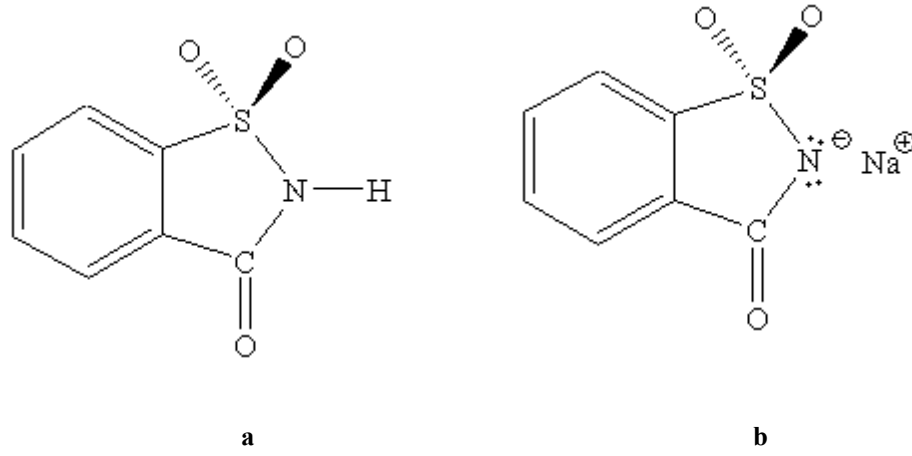
Pt (II) kompleksleri termodinamik ve kinetik olarak Pd (II) komplekslerinden daha kararlı olmalarına rağmen, Pd (II) kompleksleri çözünme ve ligand değişim reaksiyonlarına Pt (II) komplekslerine göre 105 kat daha hızlı uğramaktadır (Garoufis ve ark., 2009). Özellikle geçiş metalleri, yaygın organik bazlı ilaçlardan daha fazla avantaja sahiptir. Pt (II) ve Pd (II) kompleksleri arasındaki yapısal ve termodinamik benzerlik temelinde, Pd (II) türevlerinin potansiyel antikanser ilaçlar olarak araştırılmasına dayanmaktadır (Zhang ve ark., 2011).

Bu çalışmada kullanılan, $[PdCl(terpy)](sac).2H_2O$ olarak formüle edilen yeni sentez edilen Pd (II) kompleksi, Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümü tarafından sentezlenmiş ve yayınlanmıştır (Güney ve ark., 2010b). Sakkarin ($sacH$, 1,2-benzisothiazol-3(2H)-one-1,1-dioxide) günümüzde en yaygın olarak kullanılan yapay tatlandırıcılardan biridir ve sulu çözeltisinde imin protonunu kaybederek sakkarinat (sac) anyonunu oluşturmaktadır. Bu bileşiğin sodyum tuzu olan $Na(sac)$, suda çok yüksek oranda çözünür ($20^{\circ}C$ 'de 830 g/l) ve gerek ligand olarak, gerekse tatlandırıcı olarak bu bileşiğin kullanımı oldukça yaygındır. Sakkarinat (sac); imino azot, karbonil ve sülfonil oksijen atomu donör bölgelerinin varlığı ile mono-, bi- veya tridentat polifonksiyonel ligand olarak hareket etmektedir. Böylece tüm bu verici kısımları ile metallere koordine olabilmektedir. Ayrıca koordinasyon yeteneği sayesinde, mononükleer türlerden koordinasyon polimerlerine kompleksler oluşturarak birçok geçiş metali iyonlarını düzenlemektedir. Son 20 yıldır farklı araştırma grupları, çok sayıda yeni sakkarinat-metal komplekslerini içeren çalışmalar yapmaktadırlar (Haider ve ark., 1985; Nabors ve Robert, 1991; Baran ve Yilmaz, 2006; Güney ve ark., 2011a).

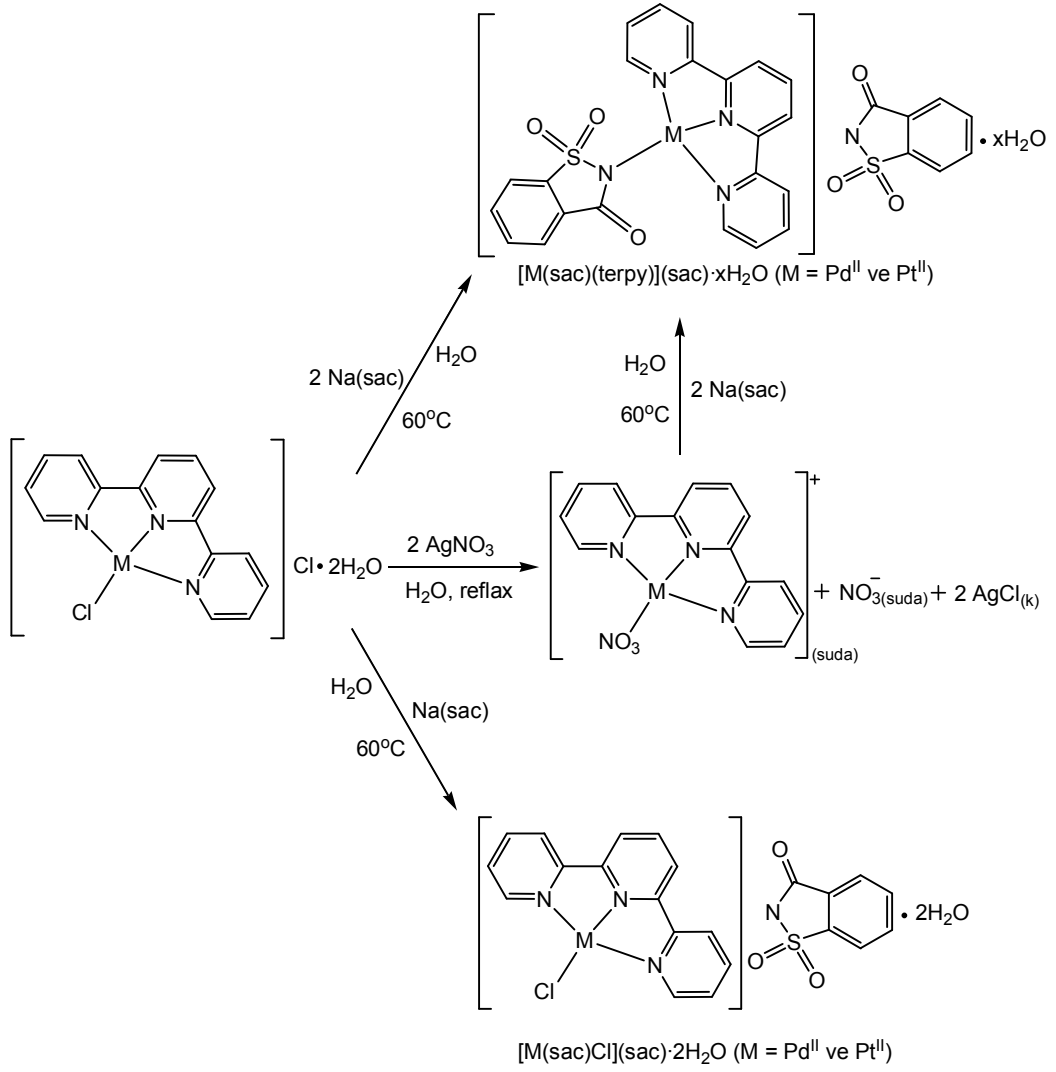
Bu araştırmada kullanılan Pd (II) kompleksi sentezinde Pd (II) iyonları; sakkarinat, Cl⁻ ve terpiridin ile koordinasyonu sonucu oluşmaktadır. Sakkarin ve sodyum sakkarinatın fiziksel özellikleri ve açık yapısı aşağıda verilmiştir.

Çizelge 1.2. Sakkarin ve Sodyum sakkarinatın fiziksel özellikleri

	Sakkarin (SacH)	Sodyum sakkarinat [Na(sac)]
	C ₇ H ₅ NO ₃ S	C ₇ H ₄ NO ₃ Na
Mol kütlesi	183,19 g mol ⁻¹	204,19 g mol ⁻¹
Erime Noktası	228,8–229,7 °C	226–230 °C
Suda Çözünürlüğü	3,45 g L ⁻¹ (20 °C)	830 g L ⁻¹ (20 °C)



Şekil 1.14. Sakkarin (a) ve sodyum sakkarinatın (b) açık yapısı (Baran ve Yılmaz, 2006)



Şekil 1.15. Palladyum (II) kompleksinin kimyasal yapısı $[\text{PdCl(terpy)}](\text{sac}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,
 sac:sakkarinat, terpy:2,2':6',2''- terperidin, Pd:palladyum (Güney ve ark., 2010)

1.4.3. Palladyum (II) Bileşiğinin Biyolojik Etki Mekanizmaları

Hem Pt (II) hem de Pd (II) komplekslerinin DNA ile etkileşimlerinin mekanizmaları araştırılmış ve DNA'yı iki farklı mekanizma üzerinden etkiledikleri anlaşılmıştır.

Birinci mekanizma Pt (II) veya Pd (II) iyonlarının DNA sarmalındaki amino uçlarına bağlanarak koordinasyon bileşiği oluşturmasına dayanmaktadır. Cisplatin gibi küçük hacimli Pt (II) veya Pd (II) kompleksleri DNA' yı oluşturan pürin bazları guanin ve adenin ile etkileşir. Guanin ve adenin DNA sarmalının kolay ulaşılabilir konumunda bulunur ve nükleofilik özellik gösterirler. Metabolizma içinde yaklaşık 2,5 saat içinde önce hidroliz olur, daha sonra bu uçlardan DNA sarmalına bağlanırlar. Pt (II) veya Pd (II) iyonlarının DNA ile etkileşimi sonucunda hücre bölünmesinde DNA sentezi imkansız hale gelmekte ve DNA' sını tamir edemeyen hücre ölmektedir (Petrovic ve ark., 2007).

İkinci mekanizma ise daha hacimli ligantların bağlı olduğu Pt (II) veya Pd (II) komplekslerinin DNA sarmalında araya girerek (interkalasyon) ve DNA'ya hidrojen bağları ile tutunarak hücre bölünmesini durdurması ile gerçekleşmektedir (Howe-Grant ve ark., 1976; Petrovic ve ark., 2007).

Platin bazlı antikanser ilaçlarının (cisplatin gibi) DNA hasarına yol açarak etki gösterdikleri düşünülmektedir. Platinli ajanlar hücre içerisine girdikten sonra DNA, RNA ve proteinlere bağlanarak lezyonlar oluşturabilirler ve oluşan lezyonlarda sitotoksositeye neden olabilmektedir. Platinli ajanlar DNA'da tek ya da çift zincir kırıklarına neden olmakta ve apoptozisi arttırmaktadırlar. Oksaliplatin, diğer bir platin bazlı ilaç olan cisplatin ile çeşitli mekanik özellikleri bakımından benzerdir. İki ilaçta çıplak DNA'da GC (guanin-sitozin) bakımından zengin aynı bölgelerle reaksiyona girmektedir ve benzer şekilde hücresel DNA'nın GC bakımından zenginleştirilmiş bölgelerini seçmektedirler. Cisplatin gibi oksaliplatin de esas olarak interstrand (zincirler arası, DNA'nın karşılıklı zincirlerinde) çarpaz bağların ve aynı zamanda hücresel DNA'da intrastrand (zincir içi, tek DNA zincirinde) çarpaz bağların ve DNA-protein çarpaz bağların oluşumunu indükler. Tüm bu oksaliplatinin indüklediği DNA lezyonlarının hücre büyümesi inhibisyonunda rol oynaması muhtemeldir (Faivre ve ark., 2003).

Cisplatin, karboplatin ve oksaliplatin gibi platinli kompleksler kanser hücrelerinde kompleks sinyal yollarını aktive ederler (Kartalou ve Essigmann, 2001). Bu yollar sonucunda aktive olan transkripsiyon faktörleri genlerin ekspresyonuna neden olarak kanser hücre ölümünü arttırırlar (Rabik ve Dolan, 2007). Cisplatin, endoplazmik retikulum stres yollarını uyararak apoptotik kaspazların aktifleşmesini (Mandic ve ark., 2003) ve apoptozisi inhibe eden proteinlerin ekspresyonunu engelleyerek (Li ve ark., 2001) apoptozisin artmasını sağlamaktadır. Oksaliplatin ise apoptozis inhibitörü olan survivin protein ekspresyonunu ve Bcl-2, Bax fosforilasyonlarını azaltarak apoptozisi arttırmaktadır (Fujie ve ark., 2005).

Pt (II) ve Pd (II) komplekslerinin DNA'da yüksek düzeyde hasar oluşturdukları (Miklasova ve ark., 2009) ve apoptozisi indükledikleri bilinmektedir (Keter ve ark., 2008). Pd(II) kompleksinin apoptozisi DR4 ve DR5 isimli apoptozis ölüm genleri üzerinden indüklediği bulunmuştur (Ulukaya ve ark., 2011b).

Pd kompleksleri; N-N-diaminler, O-S-donör, N-S-aminotiyoeter, diaminoasitler, dikarboksilik asitler ve en önemlisi ditiyokarbamatlar gibi şelatlama ligandlarına sahiptir. Şelatlama ligandlarının sadece Pd (II) komplekslerinin cis koordinasyonunu düzenlemediği aynı zamanda aqua, hidrokso veya polinükleer türlerin oluşumunu önlediği kabul edilmektedir. Platin ve palladyum antikanser maddeleri için genellikle kabul edilen temel hedef, DNA olmaktadır. Cisplatinin, DNA biyosentezini inhibe ettiği ve transkripsiyon seviyesinde *in vivo* etkisini kanıtladığı bildirilmiştir fakat hücre ölümüne neden olan reaksiyon mekanizması doğrulanmaya devam etmektedir. Platin temelli ilaçların sitotoksitesi, bu ilaçların neden olduğu çeşitli lezyonların ortak etkisine bağlıdır. Palladyum kompleksi DNA'yı eşit olmayan iki parçaya ayırır ve hafif DNA parçası yerine ağır parçaya güçlü bir şekilde bağlanır (Mansouri-Torshizi ve ark., 2008).

Koordinasyon molekülü canlı hücre içerisinde bir kez ayrıştığında ligandlar ve metaller sinerjistik yararlı etkiye sahip olabilirler. Metal kompleksin belirli kriterlere uyması gerekmektedir;

- koordinasyon molekülleri kanda taşınabilmesi ve fazla değişiklik olmadan bazı koruma bölgelerini geçebilmesi için optimal kinetik inertlik
- belirli ortam ve dokular tarafından emilimi sağlayan uygun lipofilisite
- serbest ligandtan farmakolojik etki ve DNA replikasyonunu, ayrıca genetik bilgi aktarımını engellemek için metal merkezin yüksek etkinliği
- sağlıklı dokular ve sağlıklı organlara karşı sitotoksisiteyi azaltmak (Tamasi ve ark., 2010).

Metal organik ilaçların (cisplatin gibi) metal merkezleri pozitif yüklü olduğundan negatif yüklü biyo-moleküllere bağlanma yeteneğine sahiptirler. Bu nedenle proteinler ve nükleik asitler bu ilaçlar için mükemmel hedeflerdir. Bu bileşiklerin reaktivitesi, metal iyonla bağlı ligandların stereokimyasına bağlıdır. Yeni metal bazlı antikanser ilaçlar biyoaktiviteyi geliştirmek için ligandları değiştirirken cisplatin ve analoglarının kimyasal yapısını korumalıdır. Eşleşmemiş elektronlar ile oksijen, nitrojen ve sülfür atomlarını içeren nükleofilik gruplar cisplatine bağlanma yeteneğine sahiptir. Bu gruplar DNA, RNA ve proteinlerde bulunmaktadır ve cisplatin bu biyolojik moleküller ile kompleks oluşturabilmektedir. Cisplatin-DNA bağlantısının oluşumu DNA transkripsiyonu ve replikasyonunu bloke etmekte ve hücrelerin hücre döngüsünün G2 fazında durmasını sağlamaktadır (Keter ve ark., 2008).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal maddeler

- Yeni sentez edilen palladyum (II) bileşiği, Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü
- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid), Sigma
- Fetal Bovin Serum (FBS), Biochrom AG
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10000U/ml penisilin,10 mg/ml streptomisin), Gibco
- Dulbecco's sodyum-fosfat Tamponu (PBS), Gibco
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Gibco
- Tripsin-Etilendiamintetraasetik asit (Tripsin/EDTA), Sigma
- Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma
- Triton X-100, Sigma, USA
- Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit,BD Pharmingen™, San Jose, CA USA
- FLASC-1KT Adenosine 5'- triphosphate (ATP) bioluminescent somatic cell assay kit, Sigma, Steinheim, Almanya
- Cell Viability Imaging kit, Roche, Almanya
- Tripan blue solüsyonu (%0,5), Biological Industries, İsrail
- SDS Molecular Biology grade, BioChemica Applicham, Almanya

2.1.2. Sarf malzemeler

- 25 cm² ve 75 cm² 'lik flask, Orange Scientific
- 6 kuyulu plate, Orange Scientific
- 96 kuyulu flat plate, Orange Scientific
- E-Plate 96, Roche, Almanya
- 10 ml'lik pastör pipetler, Corning Incorporated Costar
- 25 ml'lik pastör pipetler, Lp Italiana Spa İtalya
- 2 ml'lik cam pastör pipetler, Heinz Herenz
- 5 ml ve 10 ml hacimlerinde enjektörler, Set inject
- 10 µl'lik pipet uçları, Biohit
- 100 µl'lik pipet uçları, Expell
- 1000 µl'lik pipet uçları, Ayset

- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Orange Scientific
- Steril santrifüj tüpleri (15 ml), Orange Scientific
- Steril santrifüj tüpleri (50 ml), Nest
- 1 ml ve 5 ml'lik Kombi tip, Eppendorf
- Analiz tüpleri, 12×75 mm, BD Pharmingen™, San Jose, CA USA
- Thoma lamı, Bright –Line, Hausser Scientific Horsham, PA, USA
- Kriyovial, Corning Incorporated Corning
- Otoklavlanabilir cam şişe, Isolab, Almanya

2.1.3. Cihazlar

- Akış sitometri cihazı, FACS Aria flow cytometer (BD Pharmingen™, San Jose, CA USA)
- Spektrofotometre (FLASHScan S12, Analytik Jena, Almanya)
- Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D
- Luminometre (FLx800 Mikroplate Floresans Okuyucu)
- CO₂ inkübatörü, Sanyo, Japonya
- Mikroplate inkübatör ve çalkalayıcı, Heidolph, Almanya
- Buharlı sterilizatör (Otoklav), Nüve OT4060, Türkiye
- Sıvı azot tankı, Taylor-warton.model-rs serisi
- Steril kabin, ESCO, Singapur
- Multipipet cihazı, Multipette eppendorf, Hamburg, Almanya
- Inverted mikroskop, Olympus CKX41, Japonya
- Güç kaynağı ünitesi, Olympus, U-RFLT50, Japonya
- xCELLigence RTCA cihazı, Roche, Almanya
- Aspiratör, Rocker 300, Tayvan
- Kuru hava sterilizatörü, Elektro-mag M 420, Türkiye
- Santrifüj, Rotina 35R, Almanya
- 10 µl, 100 µl ve 1000 µl'lik pipet seti, Orange Scientific
- 0,5 -5 ml pipet, Brand
- 10 ml pipet, Eppendorf
- 5-50 µl Transferpipet, Thermo Scientific
- Pipet boy, ISO fill
- 20-200 µl Transferpipet, Brand, Almanya

2.2. Yöntem

2.2.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi sürecidir. Deneylerde, sıçan embriyo fibroblast 5RP7 (H-*ras* onkogeni transform hücreler) hücreleri ve NIH/3T3 fare embriyo fibroblast hücreleri kullanılmıştır. NIH/3T3 (fare embriyo fibroblast) hücre serisi George Todaro ve Howard Green tarafından 1963 yılında; 5RP7 sıçan embriyo fibroblast (H-*ras* onkogeni transform hücreler) hücreleri ise Garbisa ve arkadaşları tarafından 1987 yılında türetilmiştir.

2.2.1.1. Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması

Hücreleri çoğaltmak amacıyla kriyovialler -80 °C'den alınarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözöldü. Hücre süspansiyonu; % 10 FBS, % 1 penisilin-streptomisin ve % 1 L-glutamin içeren 5 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besiyeri içerisine alındı. Falcon tüp 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım aspire edildi ve hücre peleti üzerine 1 ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı. Falcon tüp üzerine 4 ml besiyeri ilave edildi ve 5 ml'lik hücre süspansiyonu 25 cm²'lik flasklar içerisine alınarak 37 °C'de, % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi.

2.2.1.2. Hücre Soylarının Pasajlanması

Deneylerde kullanılan hücre soyları, flask yüzeyini tamamen kapladıklarında (konfluent olduklarında) flask içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücrelerin serumdan arındırılması için 25 cm²'lik flask içerisine 2 ml 1×PBS ilave edildi ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0.5 ml 1×Trypsin/EDTA solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37 °C'de, % 5 CO₂'li ortamda 5 dk inkübe edildi. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için en az iki katı kadar besiyeri ilave edildi. Böylece tripsinin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlaması engellenmiş oldu.

Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan (falkondaki toplam hacim tripsinin 10 katı olmalı) 15 ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre peleti 1 ml hücre besiyerinde çözündükten sonra 9 ml besiyeri ilave edildi ve 10 ml'lik hücre süspansiyonu 75cm²'lik flasklara alınarak 37 °C'de, % 5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde hücreler istenilen sayıya gelene kadar çoğalmaları sağlandı.

2.2.1.3. Hücre Soylarının Stoklanması

Hücreler flask yüzeyini tamamen kapladıklarında flask içerisindeki besiyeri aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 1×PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırıldı ve hücrelerin flask yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için 1×Trypsin/EDTA solüsyonu eklendi. Hücreler 37 °C'de, % 5 CO₂'li ortamda 5 dk inkübasyona bırakıldı. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücelere, tripsinin inhibe edilmesi için en az iki katı kadar besiyeri ilave edildi. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu içerisinde besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve pelet üzerine her bir kriyovial için 1.5 ml dondurucu medium (5 ml DMSO + 5 ml FBS + 40 ml DMEM) karanlık ortamda ilave edildi. Hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine dağıtılarak -80°C'ye kaldırıldı.

2.2.1.4. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

NIH/3T3 ve H-Ras 5RP7 hücre soyları için kullanılan besiyeri ortamı için % 10 FBS (Fetal Bovine Serum, Biochrom AG), % 1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10000U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin, Gibco), % 1 L-glutamin (Gibco) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco) solüsyonu kullanıldı.

2.2.1.5. Hücrelerin Sayımı ve Bileşiğin Hazırlanması

Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 10 µl ependorf tüpe alındı ve üzerine 10 µl tripan blue boyası konarak iyice karışması sağlandı. Bu karışımdan 10 µl alınarak thoma lamına koyuldu ve mikroskopta hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml mediumda ne kadar hücre olduğu hesaplandı.

Uludağ Üniversitesi Kimya Bölümü tarafından yeni sentez edilen Palladyum (II) bileşiğinin stok çözeltisi; 10 ml DMEM içerisinde 59.3 mg Palladyum (II) bileşiğinin çözülmesi ile hazırlandı.

2.2.2. MTT (Metiltiazotetrazolium) Canlılık Metodu

MTT yöntemi, ilk kez Mosmann ve ark. tarafından 1983 yılında belirlenmiştir ve hücre kültüründe büyütülen hücrelerdeki mitokondriyel dehidrogenaz enzim aktivitesinin kolorimetrik ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Mossmann ve ark., 1983).

Bu enzim aktivitesi yaşayan hücrelerde gözlenirken, ölen hücrelerde ise gözlenmemektedir. Ortama konulan bileşiğe yanıt olarak eğer hücreler ölürse enzim aktivitesinin azaldığı veya kaybolduğu görülmektedir. Bu nedenle hücreler mitokondriyel dehidrogenaz enziminin değişime uğrattığı MTT maddesine (tetrazolyum (3-(4,5-dimetiltiyazol -2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) maruz bırakılırlar. MTT, sarı renkli suda çözünebilen tetrazolium tuzu olup canlı hücreler tarafından alınır ve mitokondriyel süksinat dehidrogenaz enzimleri tarafından suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkli formazan kristallerine dönüştürülür. Dolayısıyla indirgenme ve formazan kristallerinin oluşum bölgelerinin mitokondri olduğu kabul edilmektedir. Sitotoksik bileşiklerin hücrelere zarar vermesi MTT tetrazoliumun formazana indirgenmesini azaltmaktadır. Sonuç olarak; canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mavi-mor renkte boyanmakta, ölü veya mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler ise boyanmamaktadır. Daha sonra oluşan bu formazan kristalleri SDS (% 10 sodyum dodesil sülfat + steril distile su + 0.01N HCl) kullanılarak suda çözünür hale getirilir ve oluşturdukları renk şiddeti 570 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülür.

Sonuç olarak; başlangıçta aynı sayıda ekilmiş hiç ilaç uygulanmamış kontrol hücrelerindeki (MO) renk şiddeti ile ilaca maruz bırakılmış hücrelerdeki renk şiddeti oranlanarak ilaca maruz bırakılmış hücrelerdeki canlılık oranı (yüzdesi) hesaplanmış olur.

MTT yöntemi için; hazırlanan stok çözeltiden çeşitli seyreltmeler yapılarak Palladyum (II) bileşiğinin 1000 μM , 100 μM , 10 μM , 1 μM , 0.1 μM , 0.01 μM ve 0.001 μM konsantrasyonları 100 μl içinde olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı (3 tekrarlı). Hücreler de 100 μl içerisinde $1 \times 10^4/\text{ml}$ hücre olacak şekilde her bir kuyuya ilave edildi. Plate 48 saat 37°C , % 5 CO_2 'li ortamda inkübasyona bırakıldı. MTT maddesi, 5 mg/ml PBS tamponu içerisinde Ph 7.2 olacak şekilde stok olarak hesaplandı. Hazırlanan MTT çözeltisi filtre edilerek steril hale getirildi. 48 saat sonunda NIH/3T3 ve H-Ras 5RP7 hücrelerine her bir kuyucuğa 20 μl MTT boyası eklendikten sonra hücreler 37°C 'de 4 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Oluşan formazan kristallerini çözünür hale getirmek için bütün kuyucukların üzerine % 10'luk SDS solüsyonundan 100 μl eklenerek 18 saat 37°C 'de % 5'lik CO_2 'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerde oluşan renk şiddeti spektrofotometrede (FLASHScan S12, Jena, Almanya) 570 nm dalga boyunda ölçüldü ve okunan absorbanslar kullanılarak hücrelerin canlılık oranları belirlendi. Deneyde kullanılan palladyum (II) bileşiğinin 0.001-1000 μM arasındaki doz konsantrasyonları 3 tekrarlı olmak üzere, bu yöntem NIH/3T3 ve H-Ras 5RP7 hücre hatlarında 3'er defa tekrar edildi.

2.saatteki Tz (başlangıç popülasyonu optik dansite) değerinin belirlenmesi için, ilaç uygulanmayan kontrol hücreleri 96 kuyulu kültür kaplarına ekilip inkübatöre kaldırıldıktan 2 saat sonra Tz değerinin belirleneceği kuyucuklara 20 μL MTT boyası eklendi ve 96 kuyulu kültür kabı 4 saat 37°C 'de % 5'lik CO_2 'li etüvde inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik sürenin sonunda bu kuyucuklara % 10' luk SDS solüsyonundan 100 μl eklenerek, 18 saat 37°C 'de % 5'lik CO_2 'li etüvde inkübe edildi. Tz değerlerinin olduğu kuyular 18 saat sonunda bir başka 96 kuyulu kültür kabına aktarılarak spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda okutuldu.

% Canlılık hesabı: İlaç uygulanmamış kontrol hücre (MO) canlılığı % 100 olarak kabul edilerek, ilaç uygulanan hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı. Deney içerisinde her bir konsantrasyon birbirinden bağımsız üç farklı kuyuda tekrarlandı.

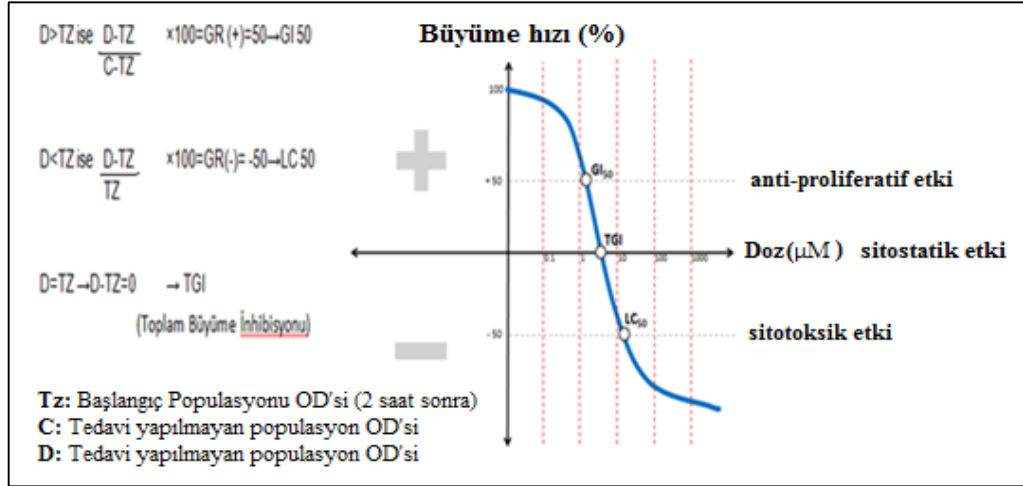
$$\text{Canlılık (\%)} = [100 \times (\text{Bileşik ile tedavi edilen hücre absorbansı} - \text{kör ortalama}) / (\text{Kontrol hücre absorbansı} - \text{kör ortalama})]$$

TZ (Başlangıç popülasyonu optik dansite) hesabı; 2.saat sonundaki Tz değerlerinin ($\times 3$ tekrarlı) her birinden 2.saatteki kör ortalamasının ($\times 3$ tekrarlı) çıkartılıp elde edilen değerlerin ortalamasının alınması ile hesaplandı.

Yeni sentez edilen palladyum (II) bileşiğinin NIH/3T3 ve H-Ras 5RP7 hücreleri üzerindeki sitotoksik, sitostatik ve anti-proliferatif etkileri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. Bu veriler ile hücrelerin canlılığının % 50'ye ulaştığı konsantrasyon için GI_{50} değerleri belirlenebilmektedir.

- **GI_{50} parametresi;** yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin, kontrol hücrelerine göre tedavi sonrasındaki hücrelerin % 50'den fazla büyümesini baskılayan konsantrasyonunu göstermektedir ve " $100 \times (D - Tz) / (C - Tz) = 50$ " denklemi ile hesaplanmaktadır.
- **TGI;** bileşiğin sitostatik etki (total büyümesini inhibe eden etki) gösterdiği konsantrasyondur ve $100 \times (D - Tz) / (C - Tz) = 0$ denklemi ile hesaplanmaktadır.
- **LC_{50} ;** yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin, tedavi sonrasında ilk andaki hücre popülasyonunu % 50 oranında azaltan konsantrasyonunu göstermektedir ve $100 \times (D - Tz) / Tz = -50$ denklemi ile hesaplanmaktadır.

C: Tedavi süresi (48 saat) ile aynı süre inkübe edilmiş, tedavi edilmemiş hücrelerdeki (kontrol) absorbans değerini, **Tz:** bileşiğin hücrelere uygulandığı andan itibaren 2 saat sonundaki kontrol hücrelerdeki absorbans değerini, **D:** bileşiğin hücrelere uygulandığı tedavi süresi (48 saat) sonundaki absorbans değerini belirtmektedir (Matsingou ve ark., 2005; Matsingou ve ark., 2006).



Şekil 2.1. TGI, LC₅₀ ve GI₅₀ değerlerinin hesaplanması

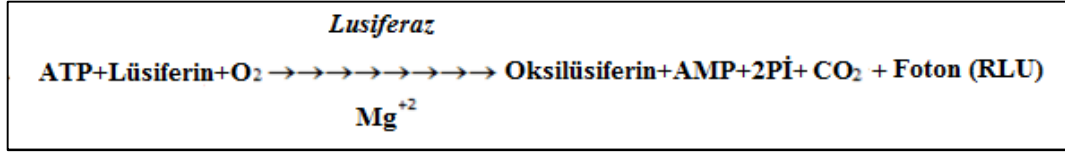
2.2.3. ATP (Adenozin trifosfat) Canlılık Metodu

MTT yöntemi, sıklıkla kullanılan ucuz bir yöntem olmasına rağmen ATP yöntemi, lüminesans bazlı metodolojiye bağlı olarak teknolojik açıdan daha gelişmiştir ve *in vitro* sitotoksosite ölçümlerini MTT yöntemine göre çok daha hassas ve güvenilir yapabilmektedir.

ATP hücre içerisindeki en önemli enerji deposudur ve biyolojik sentez, sinyal iletimi, taşıma, hareket gibi süreçler için kullanılmaktadır. Hücresel ATP hücre canlılığını ölçmede en hassas uç noktalardan biridir. Bu yöntemin prensibi hücre kültüründe büyütülen kanser veya normal hücrelerdeki intraselüler ATP içeriğinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. İntraselüler ATP içeriğinin seviyesi yaşayan hücrelerin sayısının belirlenmesinde kullanılan bir göstergedir (Maehara ve ark., 1987; Andreotti ve ark., 1995; Dexter ve ark., 2003; Ulukaya ve ark., 2008).

Hücrelerde örneğin; kemoterapötik ajanlar veya mitokondriyal toksinler ile öldürücü hasarlar oluştuğunda ATP seviyesi önemli ölçüde azalmaktadır. Bu amaçla, yeni sentezlenmiş bileşiklerle tedavi edilmiş hücrelerdeki intraselüler ATP içeriği ATP kiti (SIGMA FLASC-1KT Adenosine 5' triphosphate bioluminescent + somatic cell assay kit) kullanılarak belirlenmektedir. ATP yöntemi; lüsiferinin Mg^{+2} ve ATP varlığında lüsiferaz enzimi ile oksilüsiferine katalize olup lüminesans sinyal oluşturmaya dayanmaktadır.

Lüminesans sinyal ve ATP konsantrasyonu veya hücre sayısı arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (Andreotti ve ark., 1995; Mueller ve ark., 2004; Wadhawan ve ark., 2010).



Şekil 2.2. ATP elde edilme reaksiyonu (Andreotti ve ark., 1995)

ATP yöntemi için; hazırlanan stok çözeltilerden çeşitli seyreltmeler yapılarak Pd (II) bileşiğinin 1000 µM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 0.1 µM, 0.01 µM ve 0.001 µM konsantrasyonları 100 µl içerisinde olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı. Hücreler de 100 µl içerisinde 1×10^4 /ml hücre olacak şekilde kuyulara ilave edildi. 96 kuyulu hücre kültür kapları 48 saat 37 °C, % 5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Deneyde kullanılan Pd (II) bileşiğinin 0.001-1000 µM arasındaki doz konsantrasyonları 3 tekrarlı olmak üzere, bu yöntem NIH/3T3 ve H-Ras 5RP7 hücre hatlarında 3'er defa tekrar edildi.

Negatif kontrol (maksimum canlılık, MO, tedavi edilmemiş hücre kontrolü) için 100 µl besiyeri içerisinde 100 µl 1×10^4 hücre ekildi. *Kör* için ayrılan kuyular içerisinde ise 200 µl besiyeri ilave edildi. *Pozitif kontrol* (minimum canlılık, MI, % 100 öldüren doz) olarak 100 µl hücre süspansiyonu içerisinde 100 µl hücre ölümünü % 100 indüklediği bilinen % 1'lik Triton X-100 ilave edildi. Hücreler 37 °C 'de % 5 'lik CO₂ 'li etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında intraselüler ATP içeriği ATP kiti kullanılarak belirlendi. İlk olarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarındaki her kuyudan 150 µl atıldı. ATP kitinin içerisindeki hücre lizis tamponundan 50 µl her kuyuya ilave edildi ve böylece hücre içerisindeki ATP'nin dışarı çıkması sağlandı. 20 dakikalık bekleme süresini takiben hücre kültür süspansiyonundan 50 µl beyaz renkli 96 kuyulu hücre kültür kaplarına aktarıldı. Ardından her kuyuya 50 µl/kuyucuk lusiferin-lusiferaz enzimi içeren solüsyon ilave edildi.

Elde edilen ATP miktarı şekil 2.2’de formülize edildiği gibi lusiferin-lusiferaz bioluminesans reaksiyonu yardımıyla ölçme zamanı 1 saniye olacak şekilde luminometre (FLx800 Mikroplate Floresans Okuyucu) kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar rölatif ışık ünitesi (RLU) olarak verilecektir. Böylece tedavi alan ve almayan hücrelerin RLU değerlerine göre yeni sentezlenmiş bileşiklerin sitotoksik/sitastatik etkileri hakkında bilgi edinilecektir.

(%) Canlılık hesabı = $[100 \times (\text{Bileşik ile tedavi edilen hücre absorbanısı} - \text{MI}) / (\text{Kontrol hücre absorbanısı} - \text{MI})]$ olarak hesaplanmaktadır.

2.2.4. Gerçek Zamanlı xCELLigence Empedans Analizi

Hücresel olaylar xCELLigence sistemi ile hiçbir işaretleme yapmadan gerçek zamanlı olarak analiz edilebilmektedir. Sistem, hücre kültürü E-Plate’lerinin zeminine yerleştirilmiş mikro-elektrodlar sayesinde, gerçek zamanlı hücresel durumu belirlemek için elektriksel empedans ölçer. Bu ölçüm sırasında elektrotlara uygulanan gerilim yaklaşık 20 mV civarındadır. Düşük voltajlı alternatif akım sinyallerinin uygulanması ile elektrodlar arasında bir elektrik alanı oluşmasına sebep olur. Sensör elektrodlarının elektronik empedansı; elektrotlar üzerindeki hücrelerin fiziksel değişikliklerinin izlenmesine ve belirlenmesine izin vermek için ölçülmektedir. Elektrotlar arasında ölçülen empedans, elektrot geometrisine, iyon konsantrasyonuna ve hücrelerin elektrotlara bağlı olup olmamasına bağlıdır. Hücrelerin yokluğunda elektrot empedansı, elektrot çözeltisi ara yüzeyinde ve bütün çözeltideki iyon ortamı ile belirlenmektedir. Hücrelerin varlığında, elektrot sensörü yüzeyine hareket eden hücreler yalıtkanlar olarak davranmaktadır. Empedans okuması; hücre sayısı, hücre canlılığı, hücre ölümü, hücre morfolojisi ve adezyonundaki değişiklikleri belirler ve hücrelerin bu biyolojik durumları hakkında kantitatif bilgi verir (Urcan ve ark., 2010; Anonim, 2012).



Şekil 2.3. Empedans ölçüm şeması (Urcan ve ark., 2010)

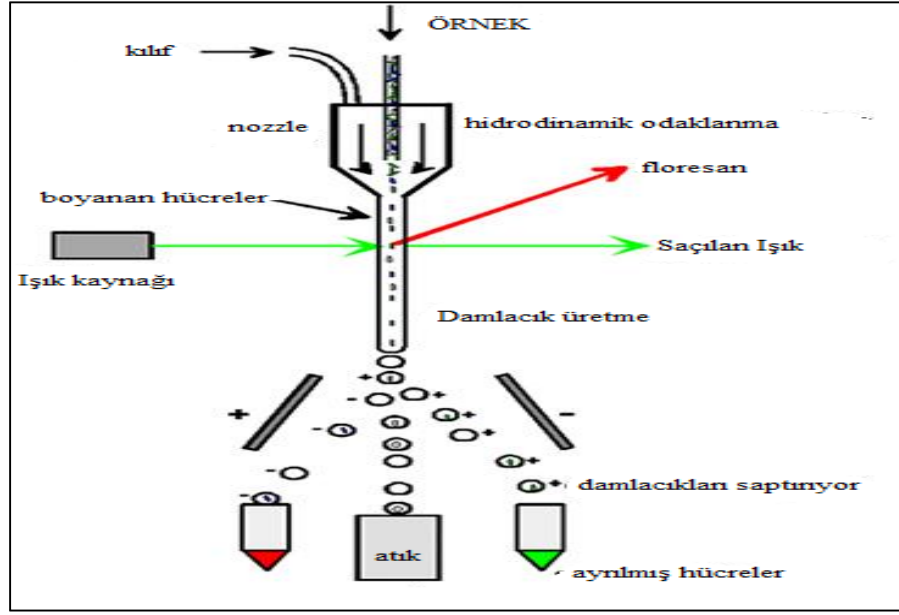
Gerçek zamanlı xCELLigence sisteminde; hücreler altın mikroelettrotlarla entegre E-plate'lere ekilir. Bu elektrotlar; kuyucuklar içerisindeki mediumun iyonik çevresi ile etkileşim halinde olduğundan elektrotları saran hücrelerin sayısı, morfolojisi ve yapışma gücüyle sürekli olarak değişebilir. xCELLigence sistemi gerçek zamanlı olarak yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin NIH/3T3 ve H-Ras 5RP7 hücre hatlarında sitotoksik etkilerini, hücre büyümesini, proliferasyonunu, morfolojik değişikliklerini ve canlılığını görüntülemek için kullanılmıştır.

xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi için; 96 kuyulu E-plate içerisindeki her kuyuya 100 µl besiyeri koyuldu ve 30 dakika 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben bazal ölçüm yapılmak üzere E-plate xCELLigence cihazına yerleştirildi. Ölçüm tamamlandıktan sonra E-plate cihazdan çıkartıldı ve hücre soyları 100 µl besiyeri içerisinde 1×10^4 hücre/kuyucuk (4 tekrarlı) olacak şekilde 96 kuyucuklu altın mikroelettrotlarla entegre E-plate'lere ekildi. 30 dakika 37°C, % 5 CO₂'li ortamda inkübasyon sonunda E-plate cihaza yerleştirildi. 96 saat 37°C, % 5 CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben yapışmış olan hücreler üzerinden hücrelere zarar vermeden 100 µl besiyeri uzaklaştırıldı. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin konsantrasyonları 100 µl içerisinde 800 µM, 400 µM, 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12.5 µM, 6.25 µM, 3.12 µM, 1.5 µM ve 0.78 µM olacak şekilde hücreler üzerine uygulandı. Hücreler 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde xCELLigence cihazında 48 saat inkübasyona bırakıldı ve zamana bağlı hücre indeksi grafiği RTCA software programı kullanılarak görüntülendi.

2.2.5. Akım Sitometri

Akım sitometri ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Ölçüm sırasında hücreler sıvı içerisinde tek tek askıda olmalı ve hücreleri içeren süspansiyon sürekli bir akışla lazer ışını içinden geçmelidir. Akım sitometri cihazında bir saniyede binlerce hücre, lazer ışını ile karşılaştıkları flow cell adı verilen bölümden geçer ve hücreler lazer ışığı ile uyarılırlar. Her bir hücre lazer ışığının bir kısmını saptırır ve aynı zamanda lazer ışığı tarafından uyarıldıklarından yani ekstra enerji yüklenmiş olduğundan, floresan ışığı yayarlar. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli florokromlar (floresan özellikte boyalar) da olabilir. Bu sinyaller histogramlar olarak ekrana aktarılır. Histogramlar ölçülen parametrelerin frekans dağılımlarının görsel sunumudur. Böylece hücre ya da partikülün immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi elde edilebilir (Macey, 2007; Karaboz ve ark., 2008).

Akım sitometri de apoptozis ile ilgili ilk belirlenebilecek farklılık ışık saçılımındaki (SSC/FCS) değişikliktir. Işığın ileri doğru saçılımı (Forward light scatter, FCS) hücre boyutu ile ilişkilidir. 90 derece ile yana saçılım (Side Scatter, SSC) ışığın kırılma ve yansımaları verir, hücrenin granülaritesi ve kompleks yapısı ile ilgilidir. Apoptotik hücre ölümünde hücre boyutundaki küçülmeden dolayı FSC sinyalinde düşüş gözlenirken, DNA fragmentasyonu, sitoplazma ve kromatin kondensasyonu nedeni ile SSC sinyalinde artış gözlenmektedir. Bu şekilde canlı ve ölü hücreler ışık saçılım plotunda belirgin şekilde ayrılmaktadır (Ormerod ve ark., 1995; Macey, 2007).

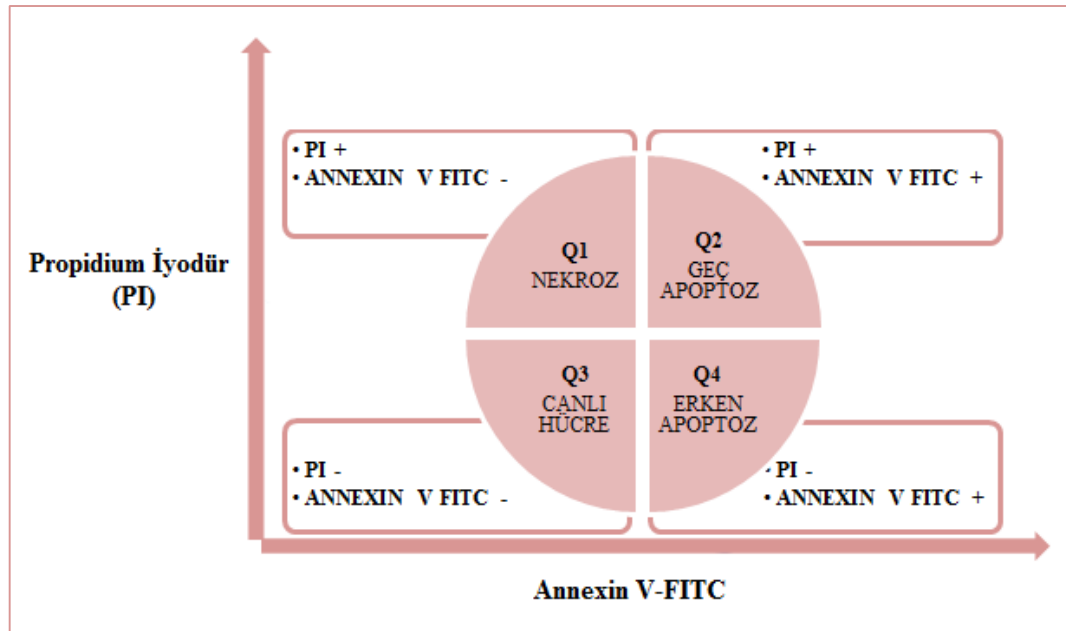


Şekil 2.4. Flow sitometri cihazının mekanizması
(<http://missinglink.ucsf.edu/lm/molecularmethods/flow.htm>)

Akım sitometri ile floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptoziste eksprese olduğu bilinen herhangi bir yüzey proteini saptanabilmektedir. Kolay uygulanabilir olması, uzun zaman almaması ve kantitatif sonuçlar vermesi açısından klinikte apoptozisin saptanmasında oldukça kullanışlı bir yöntemdir (Ulukaya, 2003).

Annexin V-FITC (floresan izotiyosiyanat), bir populasyon içerisinde aktif olarak apoptozis geçiren hücrelerin yüzdesini kantitatif olarak belirlemek için kullanılmaktadır. Bu durum apoptozisin erken evrelerinde hücrelerin membran asimetrilerini kaybetme özelliklerine dayanmaktadır. Normalde fosfolipidler plazma membranının iç ve dış tabakasında asimetrik olarak dağılmışlardır. Bu asimetri apoptozis sürecinde bozulur ve membran fosfolipidi olan fosfotidilserin (PS), plazma zarının iç kısmından dış kısma transloke olması ile yüksek affinite gösteren antikoagulant protein Annexin V'in bağlanmasına açık hale gelir. Annexin V, diğer birçok fosfolipide göre fosfotidilserin için yüksek affiniteye sahip kalsiyum bağımlı fosfolipid bağlayıcı protein olup, fosfotidilserin salınımı ile apoptotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Koopman ve ark.,1994; Macey, 2007).

Propidium iyodür (PI), DNA fragmentasyonu ve hücre döngüsü analizleri için sıklıkla kullanılan bir boyadır ve çift sarmal DNA'nın baz çiftleri arasına yerleşir. PI, canlı hücreleri ölü hücrelerden ayırt etmede kullanılan standart bir flow sitometrik canlılık probudur. İntact membrana sahip olan canlı hücreler PI geçirmez iken, ölü ve hasarlı hücrelerin membranları PI geçirmektedir (Geç apoptoz + nekroz). PI boyası, ölü hücrelerin nükleuslarının boyanmasını sağlayarak hücrelerin apoptotik ya da nekrotik olmaları hakkında bilgi vermektedir. Annexin V ve PI ile boyanan hücrelerde; apoptoz (erken ve geç olmak üzere), nekroz ve canlı hücre popülasyonları yüzde olarak ifade edilmektedir. Bu amaçla, yeni sentezlenmiş Pd (II) bileşiği ile tedavi edilmiş hücrelerdeki apoptotik hücre yüzdesi 'BD Pharmingen FITC Annexin-V Apoptosis Detection Kiti' kullanılarak belirlenmektedir.



Şekil 2.5. Annexin V ile apoptotik hücre analizinde canlı ve apoptotik hücre popülasyonlarının dağılımı

- Q1:** PI + Annexin V-FITC - nekrotik hücrelerin,
- Q2:** PI + Annexin V-FITC + geç apoptoza (sekonder nekroz) uğrayan hücrelerin,
- Q3:** PI - Annexin V-FITC - canlı hücrelerin,
- Q4:** PI - Annexin V-FITC + erken apoptoza uğrayan hücrelerin popülasyon yüzdesi hakkında bilgi vermektedir.

Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin hücre soyları üzerindeki apoptotik etkilerini ölçmek için hücreler 1 ml 'de 1×10^6 /ml olacak şekilde 6 kuyulu kültür kabı içerisine ekildi. MTT canlılık testi sonucuna göre her iki hücre soyu için belirlenen Pd (II) bileşiğinin IC₅₀ ve IC₉₀ konsantrasyonları 1 ml içerisinde olacak şekilde 6 kuyulu kültür kabındaki hücreler üzerine ilave edildi. Hücreler 48 saat 37°C, % 5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında; 6 kuyulu kültür kabındaki kontrol hücrelerinin besiyeri aspire edilirken, IC₅₀ ve IC₉₀ dozlarının bulunduğu kuyular içerisindeki besiyeri direk 15 ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 6 kuyulu kültür kabı yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden kaldırılması için her kuyunun içerisine 1×tripsin/EDTA ilave edildi. Tripsinizasyon işlemi sonunda tripsinin hücre membranlarına olası hasarını önlemek için kuyular içerisine hücre besiyeri ilave edildi ve hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkon tüp içerisine toplandı. 800 rpm de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra hücrelerin süpernatant kısımları aspire edildi ve pellet üzerine 2 ml soğuk 1×PBS koyularak tekrar santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Soğuk 1×PBS ile yıkama işlemi bir kez daha tekrar edildi. Santrifüj işleminden sonra tekrar süpernatant kısım aspire edildi ve pellet üzerine 100 µl 1×Annexin V bağlayıcı tampon eklendi ve iyice süspanse edildikten sonra hücre solüsyonundan 100 µl alınarak flow tüplerine aktarıldı. Daha sonra her bir tüpe 5 µl Annexin V-FITC ve 5 µl PI eklendi. Oda sıcaklığında 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildikten sonra her bir tüpe 400 µl 1×Annexin-V bağlayıcı tampon ilave edildi ve hücreler 1 saatlik boyama süresi içerisinde analize alındı. FACS Aria flow cytometer cihazında Diva 6.0 software kullanılarak hücrelerin yüzdeleri saptandı.

2.2.6. Hoechst 33342, Propidium iodide, Calcein-AM ile Üçlü Boyama Yöntemi

Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilmektedir. Hoechst 33342, DNA'ya bağlanabilen hücreden geçebilen bir boyadır ayrıca canlı veya ölü (apoptotik/nekrotik) hücrelerin çekirdeklerini boyamak için kullanılmaktadır.

Propidium iyodür (PI), sadece hasarlı hücrelerin membranlarından geçebilen, ölü tüm hücreleri (geç apoptotik / sekonder nekrotik veya primer nekrotik) boyayabilen floresan nükleik asit boyasıdır. Bu boya canlı hücreler tarafından dışarı atılmaktadır.

Calcein-AM, hücre membranından geçebilen fakat kendi başına floresan bir özelliği olmayan bir moleküldür. Canlı hücrelerde bulunan esterase, calcein (floresan molekül) üretmek için Calcein-AM ile etkileşime girmektedir. Sadece canlı hücreler Calcein-AM ile tedavi sonrasında boyanmaktadır. Bu şekilde boyanan hücreler floresan mikroskopu ile tanınabilmektedirler.

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, Calcein-AM pozitif ve Hoechst boyası pozitif boyanmaktadırlar. Sekonder nekroz geliştikten sonraki aşamalarda hücreler membran bütünlüklerinin bozulması ile non-vital boyalar ile boyanmaya başlarlar. Dolayısıyla PI pozitif, Calcein-AM negatif ve Hoechst pozitif boyanmaktadırlar (Ulukaya ve ark., 2011).

Üçlü boyama yöntemi kullanılarak yeni sentezlenen komplekslere maruz kalmış hücrelerin apoptozisle veya nekrozisle ölüp ölmediklerinin ayrımı nükleus morfolojisine bakılarak yapılabilir. Apoptotik hücrelerde; çekirdek fragmentasyonunun normal hücrelere göre daha küçük olması ve daha çok boya alma özelliği aranırken, nekrotik hücrelerde ise çekirdeğin normal hücrelerden biraz daha büyük olması ve daha az boya alması özelliği aranmaktadır.

Bu amaçla, yeni sentezlenmiş Pd (II) bileşiğinin hücre soyları üzerindeki etkilerinin morfolojik olarak floresan mikroskopta görüntülenebilmesi için Cell Viability Imaging kit, Roche kullanılmıştır.

Üçlü boyama yöntemi için; ilk olarak 96 kuyulu plate de her kuyuda 100 μ l içerisinde 1×10^4 hücre/ml olacak şekilde ekim yapıldı. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin 50 μ M ve 100 μ M konsantrasyonları 100 μ l içerisinde olacak şekilde kuyulara ilave edildi. Hücreler 24 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kit prosedür işlemlerinin karanlık ortamda yapılması gerekmektedir. Kit içerisinde bulunan 3 bileşenin (Hoechst 33342, Propidium Iodide (PI), Calcein-AM) oda ısısına gelmesi sağlandı ve her biri kısa süreli vorteks yapıldı. 5 ml Hoechst, 5 ml PBS (1 $\times$, CaCl₂ +, MgCl₂ +) içerisine pipetlendi ve kısa bir vorteks yapıldı. Bu hazırlanan karışıma 25 μ l PI pipetlendi ve kısa bir vorteks yapıldı. En son bu hazırlanan karışıma 3 μ l Calcein-AM pipetlendi ve kısa süreli vorteks yapıldı. Plate de bulunan hücreler üzerinden 50 μ l hücrelere zarar vermeden uzaklaştırıldı ve her kuyuya 50 μ l hazırlanmış olan bu karışımdan ilave edildi. Her kuyuda hücreleri kaldırmamaya dikkat edilerek pipetaj yapıldı. Plate 37°C, %5 CO₂'li ortamda 30 dk inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonrasında floresan mikroskop altında değerlendirildi.

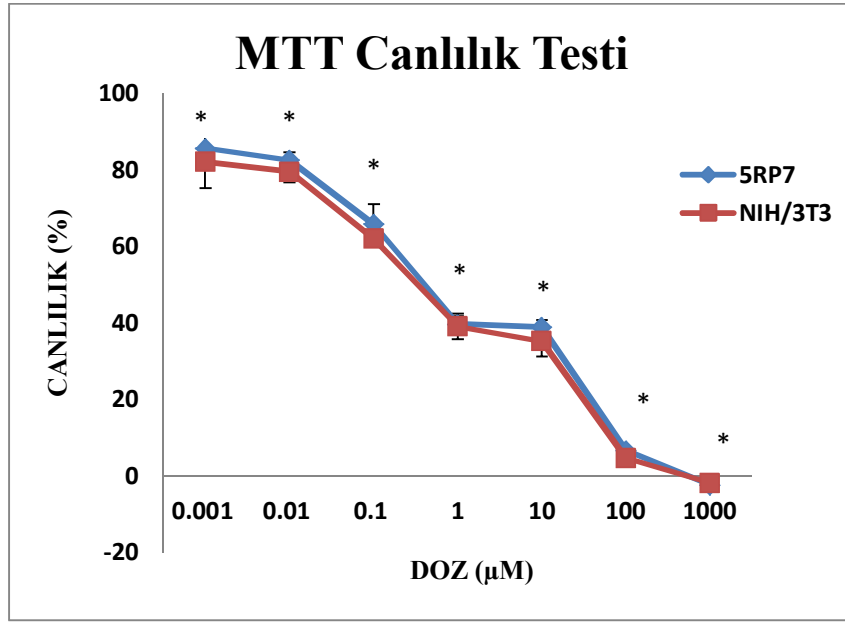
2.2.7. İstatistiksel Analiz

MTT ve ATP canlılık test sonuçlarının istatistiksel analizleri SPSS 20.0 bilgisayar paket programı kullanılarak yapıldı. Yüzde canlılık değerleri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak hesaplandı. 3 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p < 0.05$ değerine göre belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. MTT Canlılık Testi Bulguları

Yeni sentez edilen palladyum(Pd) (II) bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının (0.001-1000 μ M) NIH/3T3 ve H-Ras 5RP7 hücre soylarının canlılığı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için MTT canlılık testi yapıldı. Hücre soylarına 48 saat süre ile Pd (II) bileşiği uygulandığında ortaya çıkan sonuçlar şekil 3.1’de gösterildi. Pd (II) bileşiğinin uygulandığı hücre soylarında konsantrasyon arttıkça hücrelerin canlılık yüzdesinde, uygulanan tüm konsantrasyonlarda, istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi ($p<0.05$). Pd (II) bileşiği uygulanan hücre soylarının 48 saatlik tedavi sonrasında hesaplanan canlılık yüzde değerleri çizelge 3.1’de verildi.



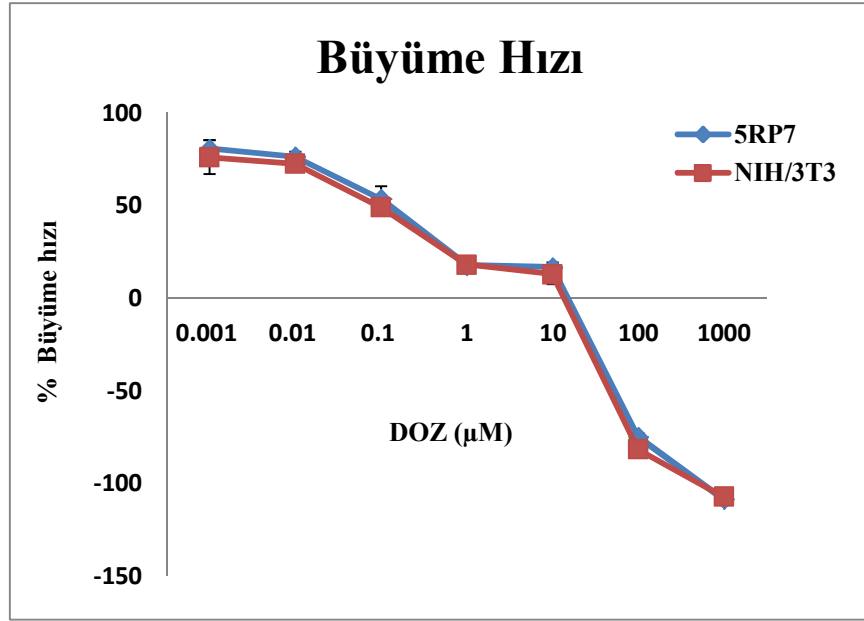
Şekil 3.1. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiği uygulanan H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinin canlılık yüzdelерinin grafiğı. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir

- * Aynı hücre soyunda Pd (II) bileşiğinin farklı konsantrasyonları ile tedavi edilmiş hücreler, kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0.05$) ifade etmektedir.

Çizelge 3.1. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiği uygulanan hücre soylarının 48 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri

DOZLAR (μM)	48 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzdeleri (%)	
	H-Ras 5RP7	NIH/3T3
1000 μM	-2.3	-1.8
100 μM	6.6	4.7
10 μM	38.8	35.1
1 μM	39.6	39.0
0.1 μM	65.8	61.9
0.01 μM	82.5	79.4
0.001 μM	85.6	82.0

Pd (II) bileşiğinin; hangi konsantrasyonlarda hücre soylarında sitotoksik, sitostatik ya da anti-proliferatif etkiye neden olduğunu belirlemek için büyüme hızı grafiği oluşturuldu (Şekil 3.2). Sonuçlara göre, Pd (II) bileşiğinin 100 μM ve 1000 μM dozlarının hücrelerde sitotoksik etkiye; 0.001-10 μM arasındaki dozların ise hücrelerde anti-proliferatif etkiye neden olduğu bulundu. Pd (II) bileşiğinin sitotoksik aktivitesinin gösterilmesinde önemli olan IC_{50} (kontrol hücrelerine kıyasla tedavi sonrası hücrelerin % 50'sini öldüren konsantrasyon) ve IC_{90} (kontrol hücrelerine kıyasla tedavi sonrası hücrelerin % 90'nını öldüren konsantrasyon) değerleri her iki hücre hattı için de MTT testi sonuçlarına göre belirlendi. IC_{50} ve IC_{90} değerleri Gen5TM programı kullanılarak hesaplandı. H-Ras 5RP7 hücreleri için IC_{50} dozu 18.2 μM , IC_{90} dozu 84.5 μM ; NIH/3T3 hücreleri için IC_{50} dozu 16.7 μM , IC_{90} dozu 78.8 μM olarak bulundu (Çizelge 3.2). Pd (II) bileşiğinin 0.001-1000 μM arasındaki dozlarının hücre soyları üzerine olan etkileri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doz artışına bağlı olarak canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar olduğu tespit edildi ($p < 0.05$).



Şekil 3.2. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiği uygulanan H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinin büyüme hızı grafiği

Çizelge 3.2. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiği uygulanan H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinin IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri

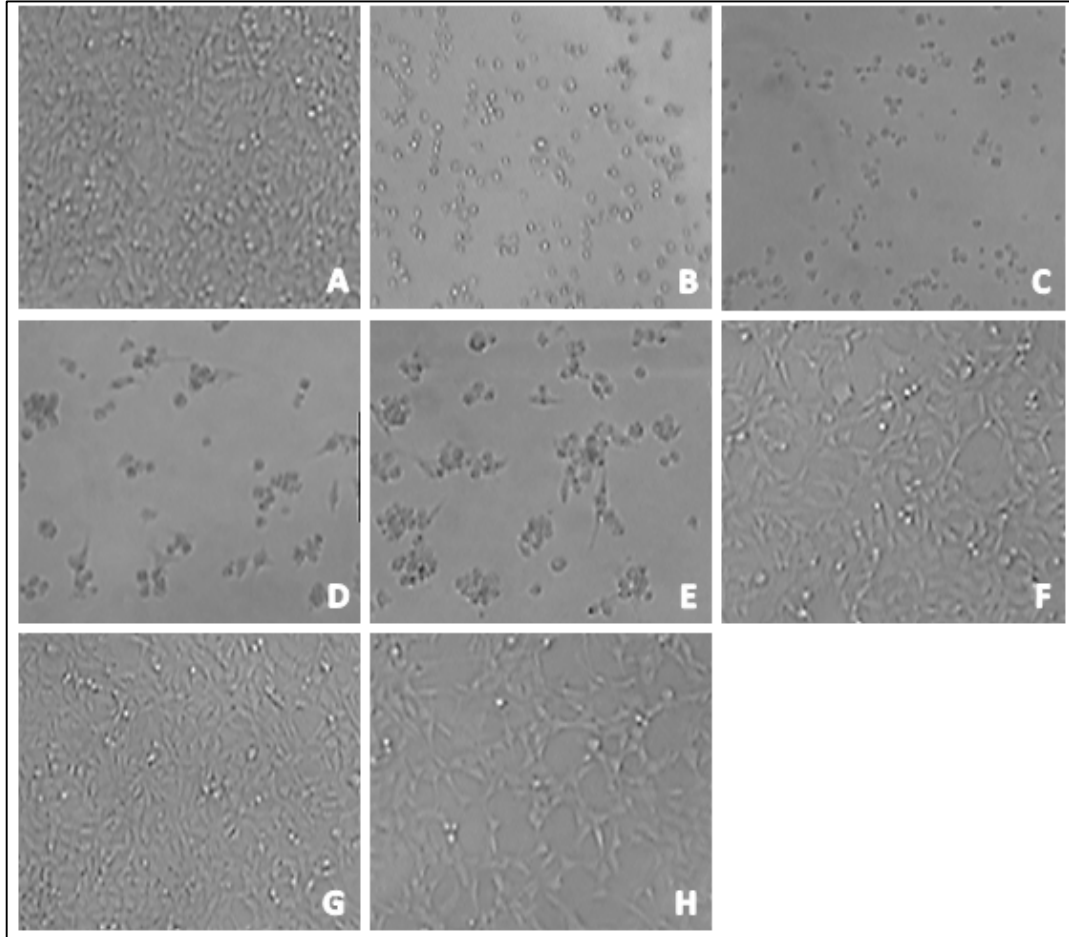
Doz (µM)	5RP7	NIH/3T3
IC ₅₀	18.2	16.7
IC ₉₀	84.5	78.8

Büyüme hızı grafiğine göre GI₅₀, TGI ve LC₅₀ değerleri hesaplandı. GI₅₀ parametresi; yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin, kontrol hücrelerine göre tedavi sonrasındaki hücrelerin büyümesini % 50 oranında baskılayan konsantrasyonu göstermektedir. 5RP7 hücreleri için GI₅₀ değeri 0.18 µM, NIH/3T3 hücreleri için ise GI₅₀ değeri 0.09 µM olarak bulundu. TGI; bileşiğin sitostatik etki (hücrelerin gelişimini durduran, total büyümesini inhibe eden) gösterdiği konsantrasyonu göstermektedir ve 5RP7 hücreleri için TGI değeri 26.2 µM iken NIH/3T3 hücreleri için TGI değeri 22.0 µM olarak bulundu. LC₅₀ parametresi; yeni sentez edilen Pd (II) bileşiği ile tedavi sonrasında, ilk andaki hücre popülasyonunu % 50 oranında azaltan konsantrasyonu göstermektedir ve LC₅₀ değeri 5RP7 hücreleri için 75.3 µM, NIH/3T3 hücreleri için 69.7 µM olarak belirlendi (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiği uygulanan H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinin GI_{50} , TGI, LC_{50} değerleri

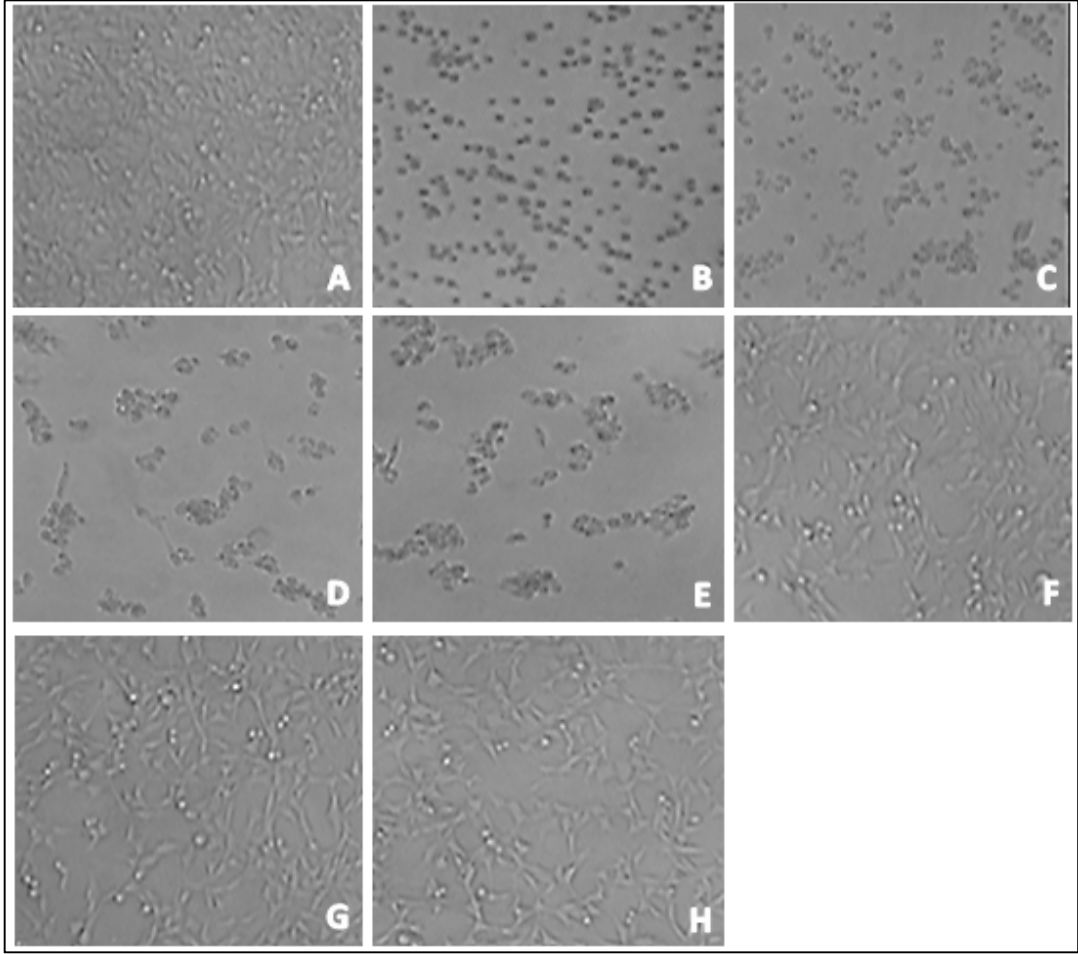
Doz (μM)	5RP7	NIH/3T3
GI_{50}	0.18	0.09
TGI	26.2	22.0
LC_{50}	75.3	69.7

MTT canlılık testi uygulaması aşamasında; Pd (II) bileşiğinin 0.001-1000 μM konsantrasyonlarının 48 saatlik tedavi sonrasında H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücreleri üzerindeki etkileri MTT koyulmadan önce morfolojik olarak faz-kontrast mikroskopunda görüntülendi (Şekil 3.3 ve 3.4).



Şekil 3.3. MTT testi uygulamasından önce H-Ras 5RP7 hücrelerinin morfolojik görüntüleri

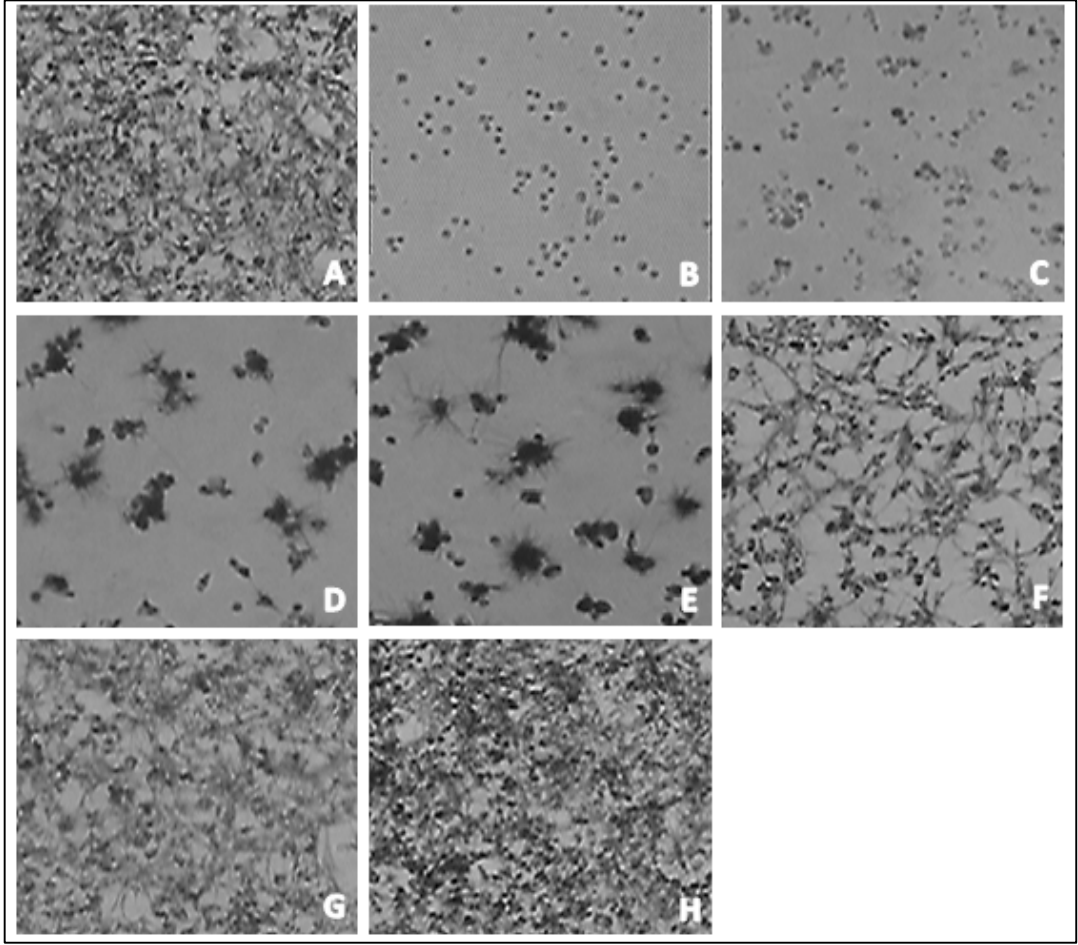
A: H-Ras 5RP7 kontrol hücreleri **B:** 1000 μM Pd (II) bileşiği **C:** 100 μM Pd (II) bileşiği
D: 10 μM Pd (II) bileşiği **E:** 1 μM Pd (II) bileşiği **F:** 0.1 μM Pd (II) bileşiği **G:** 0.01 μM Pd (II) bileşiği **H:** 0.001 μM Pd (II) bileşiği



Şekil 3.4. MTT testi uygulamasından önce NIH/3T3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri

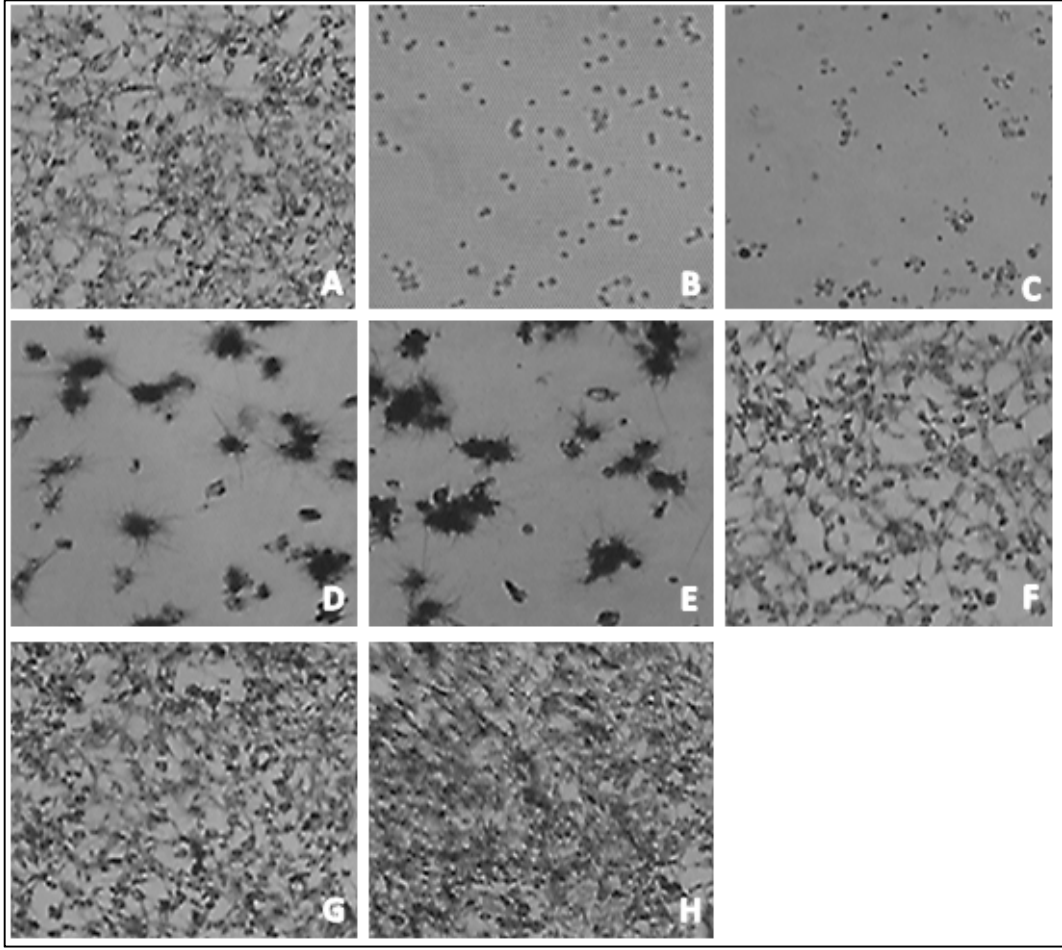
A: NIH/3T3 kontrol hücreleri **B:** 1000 μM Pd (II) bileşiği **C:** 100 μM Pd (II) bileşiği
D: 10 μM Pd (II) bileşiği **E:** 1 μM Pd (II) bileşiği **F:** 0.1 μM Pd (II) bileşiği **G:** 0.01 μM Pd (II) bileşiği **H:** 0.001 μM Pd (II) bileşiği

Pd (II) bileşiğinin 0.001-1000 μM konsantrasyonlarının 48 saatlik tedavi sonrasında H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücreleri üzerindeki etkileri MTT koyulduktan 4 saat sonra morfolojik olarak faz-kontrast mikroskopunda görüntülendi (Şekil 3.5 ve 3.6). Sonuç olarak; Pd (II) bileşiğinin yüksek konsantrasyonlarının sitotoksik etkisinden dolayı MTT tetrazolium tuzunun formazana indirgenmesini azalttığı görüldü. Ayrıca kontrol hücrelerinde, mitokondriyel süksinat dehidrogenaz enzimleri tarafından suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkli formazan kristallerinin oluşumu gözlenirken, ölü hücrelerde ise formazan kristal oluşumu gözlenmedi.



Şekil 3.5. MTT testi uygulamasından sonra H-Ras 5RP7 hücrelerinde oluşan formazan kristallerinin görünümü

A: H-Ras 5RP7 kontrol hücreleri **B:** 1000 µM Pd (II) bileşiği **C:** 100 µM Pd (II) bileşiği
D: 10 µM Pd (II) bileşiği **E:** 1 µM Pd (II) bileşiği **F:** 0.1 µM Pd (II) bileşiği **G:** 0.01 µM Pd (II) bileşiği **H:** 0.001 µM Pd (II) bileşiği

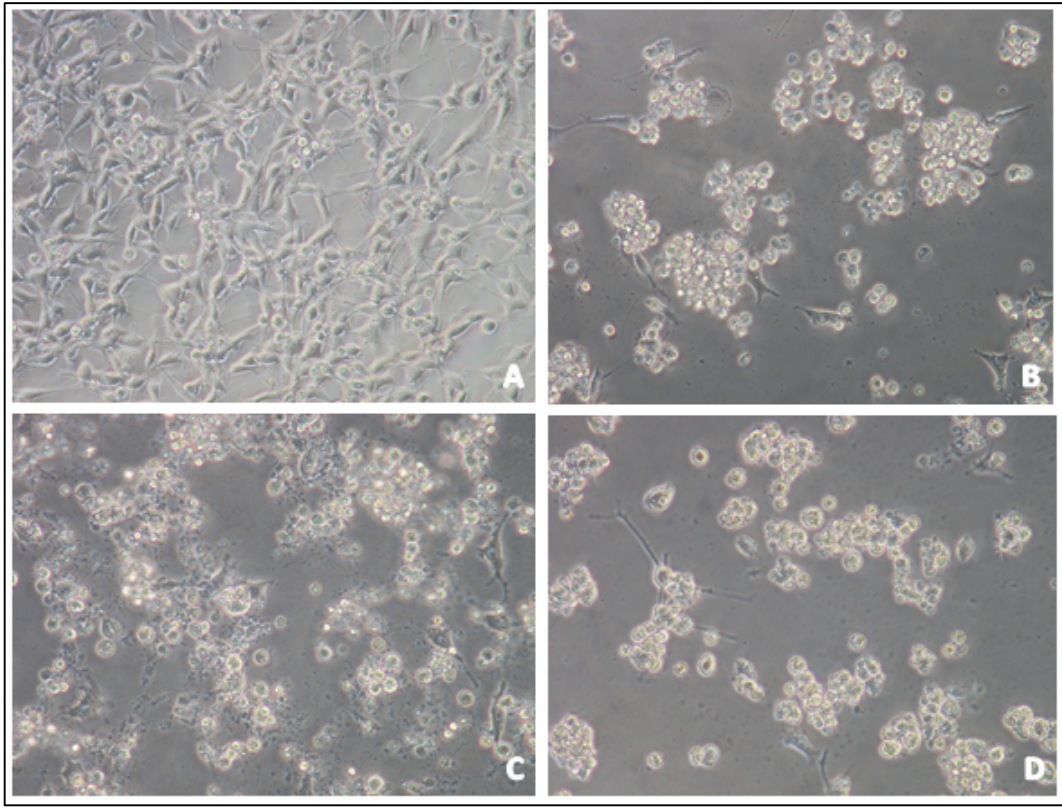


Şekil 3.6. MTT testi uygulamasından sonra NIH/3T3 hücrelerinde oluşan formazan kristallerinin görünümü

A: NIH/3T3 kontrol hücreleri **B:** 1000 µM Pd (II) bileşiği **C:** 100 µM Pd (II) bileşiği
D: 10 µM Pd (II) bileşiği **E:** 1 µM Pd (II) bileşiği **F:** 0.1 µM Pd (II) bileşiği **G:** 0.01 µM Pd (II) bileşiği **H:** 0.001 µM Pd (II) bileşiği

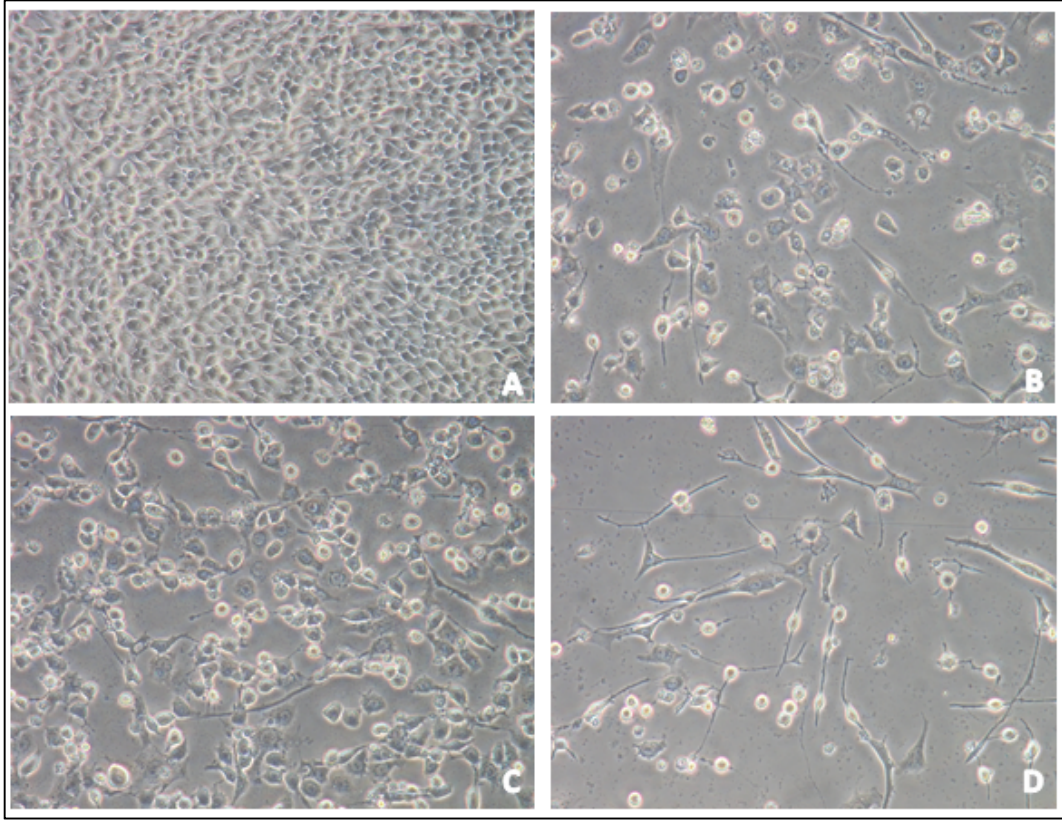
Bu çalışmaya ek olarak, Pd (II) bileşiğinin 3.12 µM ve 25 µM düşük konsantrasyonlarının, 48 saatlik tedavi sonrasında H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücre soyları üzerindeki etkileri, hücrelerin kollajen kaplı kültür kaplarına ekilmesi ile morfolojik olarak faz-kontrast mikroskobu ile görüntülendi (Şekil 3.7 ve 3.8). Pozitif kontrol olarak, sarkom tedavisinde kemoterapötik ajan olarak kullanılan etopositin 25 µM konsantrasyonu kullanıldı. Pd (II) bileşiğinin her iki hücre soyu üzerindeki etkisini etopositin ile karşılaştırmak amacıyla Pd (II) bileşiğinin de 25 µM konsantrasyonu kullanıldı.

Pd (II) bileşiğinin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak hücrelerin sayısında kontrol hücrelerine kıyasla azalmalar gözlemlendi. Pd (II) bileşiğinin 3.12 μ M ve 25 μ M konsantrasyonlarının uygulandığı her iki hücre hattında da 48 saat sonunda hücrelerin substratından ayrıldığı ve yuvarlaklaştığı görüldü. Ayrıca H-Ras 5RP7 hücrelerine uygulanan 25 μ M Pd (II) bileşiği ile 25 μ M etopositin etkileri karşılaştırıldığında hücreler üzerinde benzer etkiye neden oldukları belirlendi. NIH/3T3 hücrelerinde ise 25 μ M etopositin, 25 μ M Pd (II) bileşiğine göre daha etkili olduğu görüldü.



Şekil 3.7. Pd (II) bileşiği ve etopositin (pozitif kontrol) uygulanmış H-Ras 5RP7 hücrelerinin morfolojik görüntüleri

A: H-Ras 5RP7 kontrol hücreleri (negatif kontrol) **B:** 25 μ M Pd (II) bileşiği **C:** 3.12 μ M Pd (II) bileşiği **D:** Etopositin 25 μ M (pozitif kontrol)

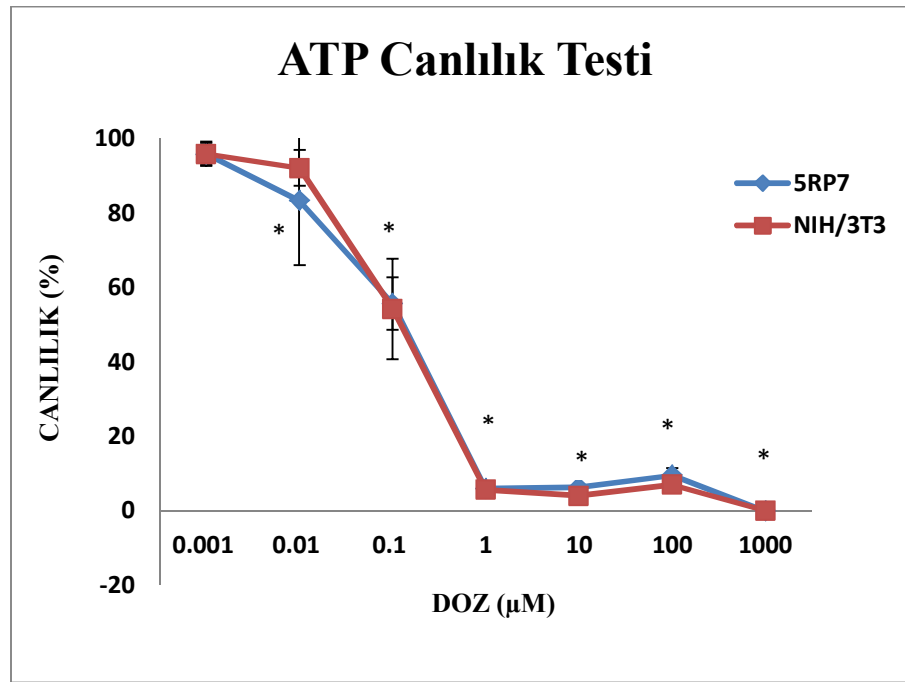


Şekil 3.8. Pd (II) bileşiği ve etoposid (pozitif kontrol) uygulanmış NIH/3T3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri

A: NIH/3T3 kontrol hücreleri (negatif kontrol) **B:** 25 μM Pd (II) bileşiği **C:** 3.12 μM Pd (II) bileşiği **D:** Etoposid 25 μM (pozitif kontrol)

3.2. ATP Canlılık Testi Bulguları

ATP canlılık testi ile hücrelerde canlılığın bir göstergesi olan intrasellüler ATP miktarı belirlendi. 0.001-1000 μM doz aralığında hazırlanan Pd (II) bileşiğinin 48 saatte H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücre hatlarındaki intrasellüler ATP miktarına olan etkisi Şekil 3.9’da gösterildi. Pd (II) bileşiğinin, konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak uygulandığı hücre soylarında intrasellüler ATP miktarında azalmalara neden olduğu belirlendi. Ayrıca Pd (II) bileşiği uygulanan H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinin canlılık yüzde değerleri çizelge 3.4’te gösterildi. Sonuç olarak, Pd (II) bileşiğinin 1-1000 μM arasındaki konsantrasyonlarının hücre soyları üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu bulundu. Pd (II) bileşiğinin 0.1-1000 μM arasındaki dozlarının hücre soyları üzerine olan etkileri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$) bulundu.



Şekil 3.9. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiği uygulanan H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinin canlılık yüzdelерinin grafiğı. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir

* Aynı hücre soyunda Pd (II) bileşiğinin farklı konsantrasyonları ile tedavi edilmiş hücreler, kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0.05$) ifade etmektedir.

Çizelge 3.4. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiği uygulanan H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinin canlılık yüzde değerleri

DOZLAR (μM)	48 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzdeleri (%)	
	H-Ras 5RP7	NIH/3T3
1000 μM	-0.06	-0.01
100 μM	9.5	6.9
10 μM	6.2	3.9
1 μM	5.8	5.5
0.1 μM	55.6	54.1
0.01 μM	83.3	92.0
0.001 μM	95.7	95.8

3.3. Akım Sitometri Bulguları

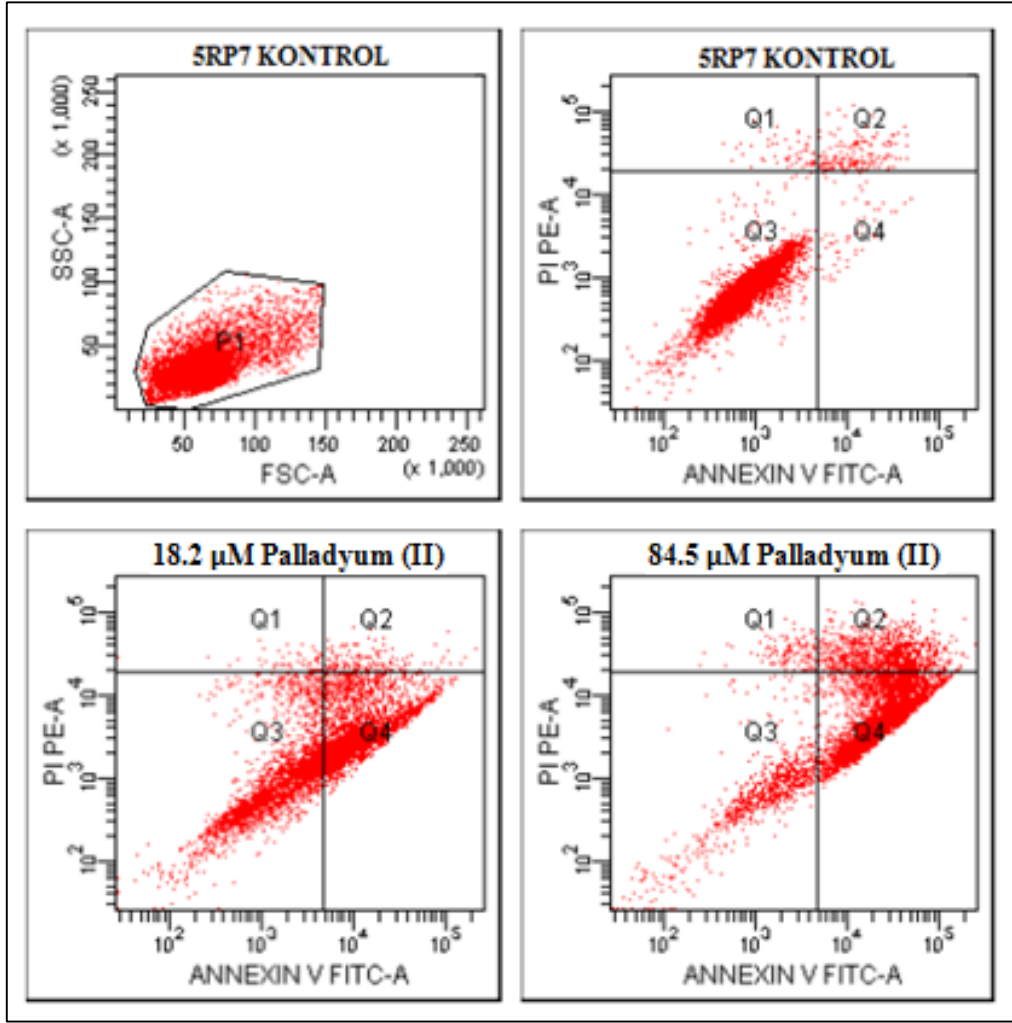
Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin H-Ras 5RP7 hücreleri ve NIH/3T3 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisine bakıldığında 48 saat sonunda doza bağlı olarak canlılık yüzdesinde azalma gözlemlendi. 48 saatlik tedavi sonrasında H-Ras 5RP7 hücre hattına uygulanan 18.2 μM (IC_{50}) konsantrasyonda canlılık yüzdesi % 52.0, apoptotik oran yüzdesi % 47.2; 84.5 μM (IC_{90}) konsantrasyonunda ise canlılık yüzdesi %14.5, apoptotik oran yüzdesi % 83.9 olarak bulundu (Çizelge 3.5, Şekil 3.10). 48 saatlik tedavi sonrasında NIH/3T3 hücreleri üzerindeki etkisine bakıldığında uygulanan 16.7 μM (IC_{50}) olan konsantrasyonda canlılık yüzdesi % 36.5; yüzde apoptotik oran % 55.7; 78.8 μM (IC_{90}) olan konsantrasyonda canlılık yüzdesi % 17.0; yüzde apoptotik oran % 78.6 olarak bulundu (Çizelge 3.6, Şekil 3.11). Annexin V-FITC ve PI (Propidyum iyodür) negatif olan bölge canlı hücreleri (Q3), Annexin V-FITC ve PI pozitif olan bölge geç apoptotik hücreleri (Q2), Annexin V-FITC pozitif ve PI negatif olan bölge erken apoptotik hücreleri (Q4), Annexin V-FITC negatif ve PI pozitif olan bölge ise nekrotik hücrelerin yüzde değerlerini göstermektedir.

Çizelge 3.5. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin uygulandığı H-Ras 5RP7 hücrelerinde Annexin V-FITC değerlendirmesi ile elde edilen 48 saatlik apoptotik yüzde değerleri

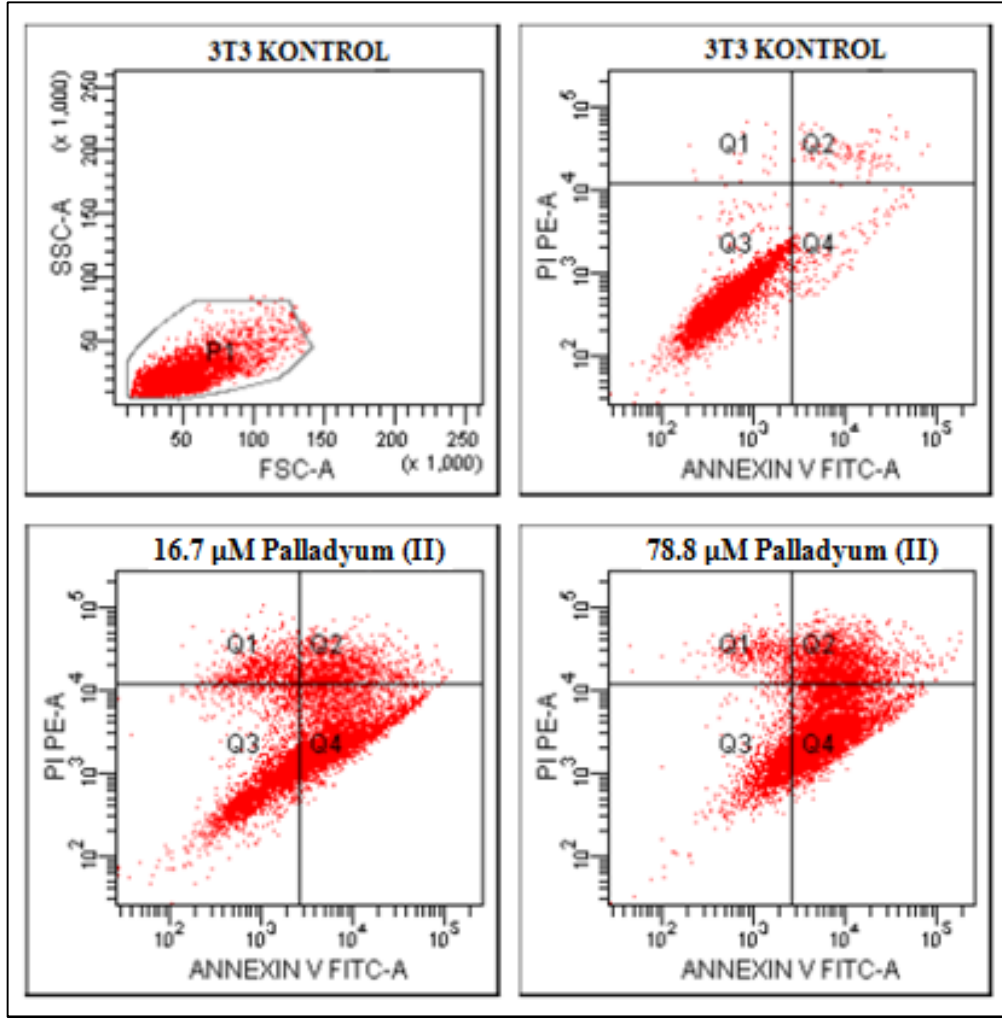
48 Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kontrol	0.6	1.9	96.3	1.2
18.2 μ M (IC ₅₀)	0.8	1.9	52.0	45.3
84.5 μ M (IC ₉₀)	1.5	14.1	14.5	69.8

Çizelge 3.6. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde Annexin V-FITC değerlendirmesi ile elde edilen 48 saatlik apoptotik yüzde değerleri

48 Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kontrol	0.2	1.3	95.9	2.6
16.7 μ M (IC ₅₀)	7.8	10.9	36.5	44.8
78.8 μ M (IC ₉₀)	4.3	23.1	17.0	55.5



Şekil 3.10. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin uygulandığı 5RP7 hücrelerinde, Annexin V-FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Q1=Nekroz, Q2=Geç Apoptoz, Q3=% Canlılık, Q4=Erken Apoptoz)



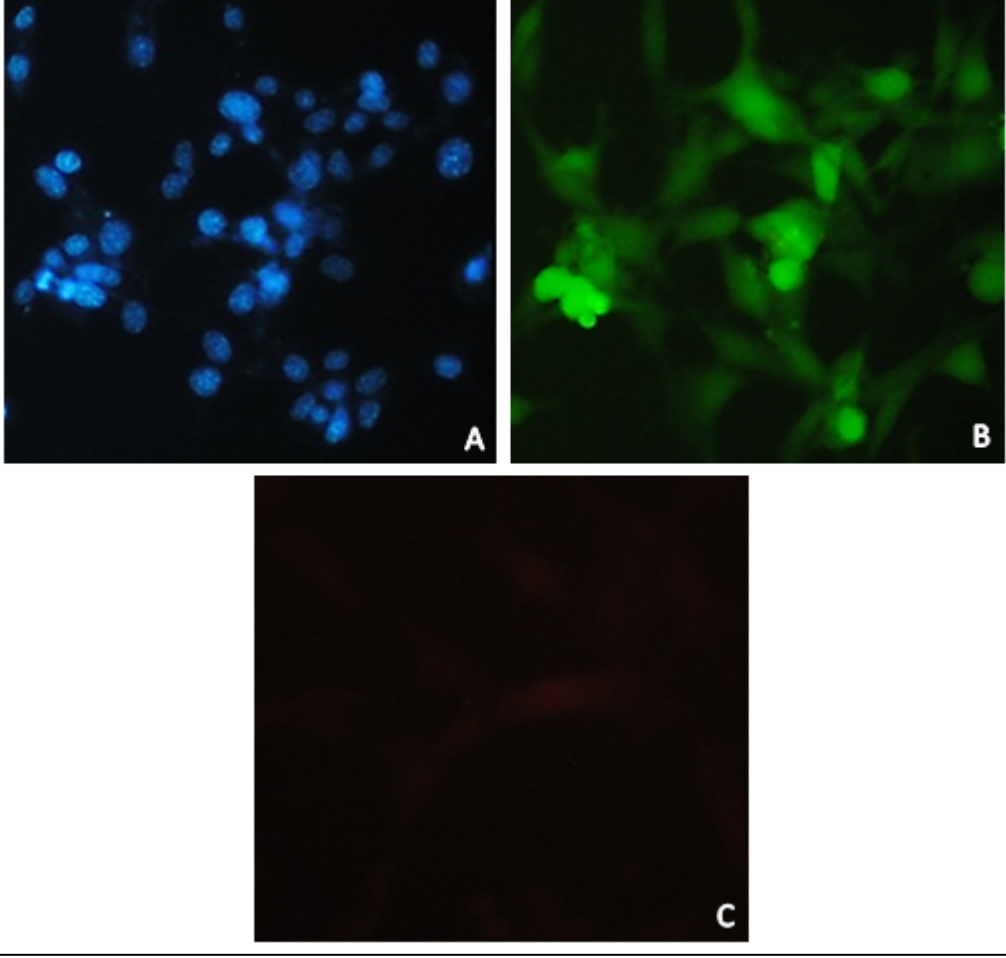
Şekil 3.11. Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde, Annexin V-FITC değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramları (Q1=Nekroz, Q2=Geç Apoptoz, Q3=% Canlılık, Q4=Erken Apoptoz)

3.4. Hoechst 33342, Propidium iodide (PI), Calcein-AM ile Üçlü Boyama Yöntemi Bulguları

H-Ras 5RP7 hücreleri ve NIH/3T3 hücrelerine Pd (II) bileşiğinin 50 μ M ve 100 μ M konsantrasyonları uygulandı. 24 saat ilaç uygulamasını takiben üçlü boyama yöntemi uygulanarak floresan mikroskopta değerlendirme yapıldı (Şekil 3.12 ve 3.17). Yeni sentez edilen Pd (II) bileşiği uygulanmış H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinde çok sayıda piknotik nükleus varlığı gözlemlendi.

Pd (II) bileşiğinin 50 μ M ve 100 μ M dozlarının hücre soyları üzerindeki etkilerine bakıldığında; Hoechst 33342 boyası ile gözlenen nükleer fragmentasyon varlığı aynı bölge için Calcein-AM ile boyama sonucunda Calcein-AM pozitif (hücre membranı intakt, hücre parlak yeşil renkli boyanır), propidium iyodür ile boyanma sonucunda ise PI negatif görülmesi (hücre kırmızı boyanmaz) hücrenin ölüm modunun apoptoz (erken apoptoz) olduğunu göstermektedir. Ayrıca Hoechst 33342 boyası ile belirlenen nükleer fragmentasyon varlığı aynı bölge için Calcein-AM ile boyama sonucunda Calcein-AM negatif (hücre membranı intakt değil, hücreler yeşil renkli boyanmazlar içleri hafif kırmızıdır), PI ile boyama sonucunda ise PI pozitif görülmesi (hücreler parlak kırmızı boyanır) hücrenin ölüm modunun geç apoptoz = sekonder nekroz olduğunu göstermektedir.

H-Ras 5RP7 KONTROL



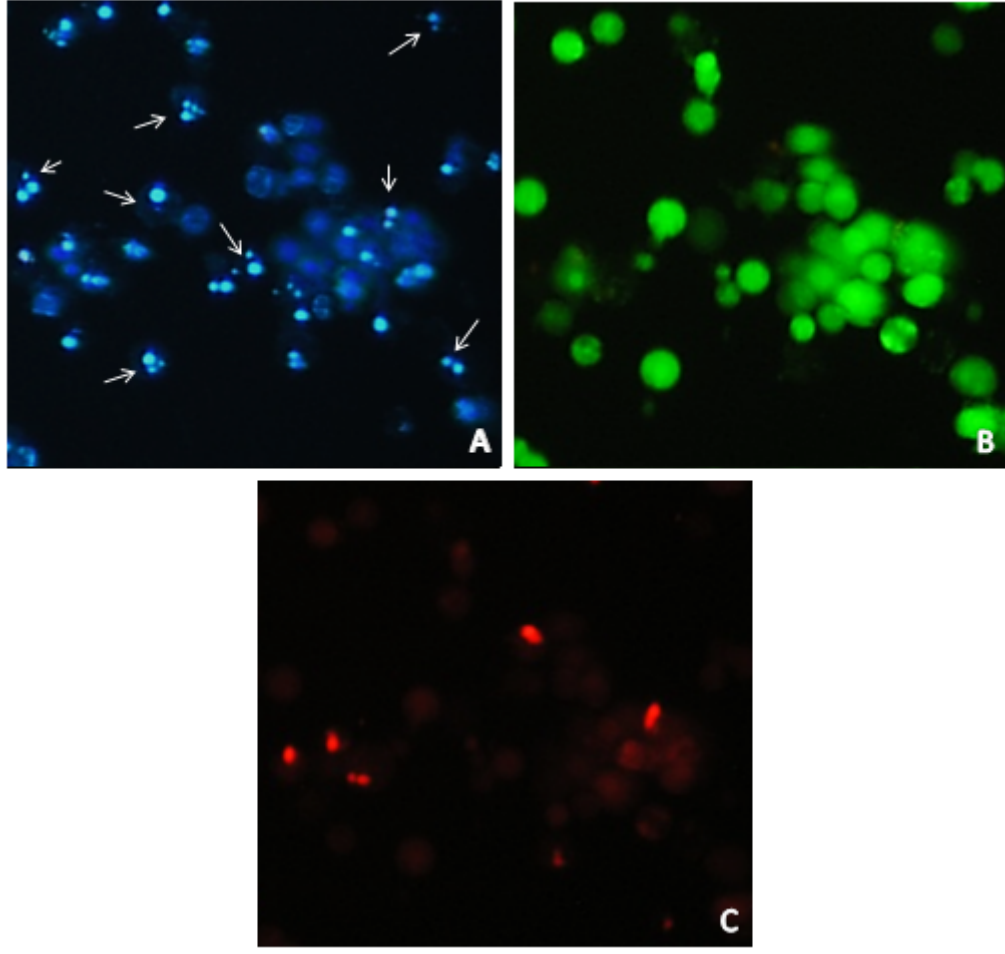
Şekil 3.12. H-Ras 5RP7 kontrol hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri

A: Hoechst 33342 ile boyama,

B: Calcein-AM ile boyama,

C: Propidium iyodür ile boyama. Hücreler 24 saatlik tedavi sonunda boyandılar.

50 μ M Palladyum (II) Bileşigi



Şekil 3.13. 50 μ M Palladyum (II) bileşigi uygulanan H-Ras 5RP7 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri

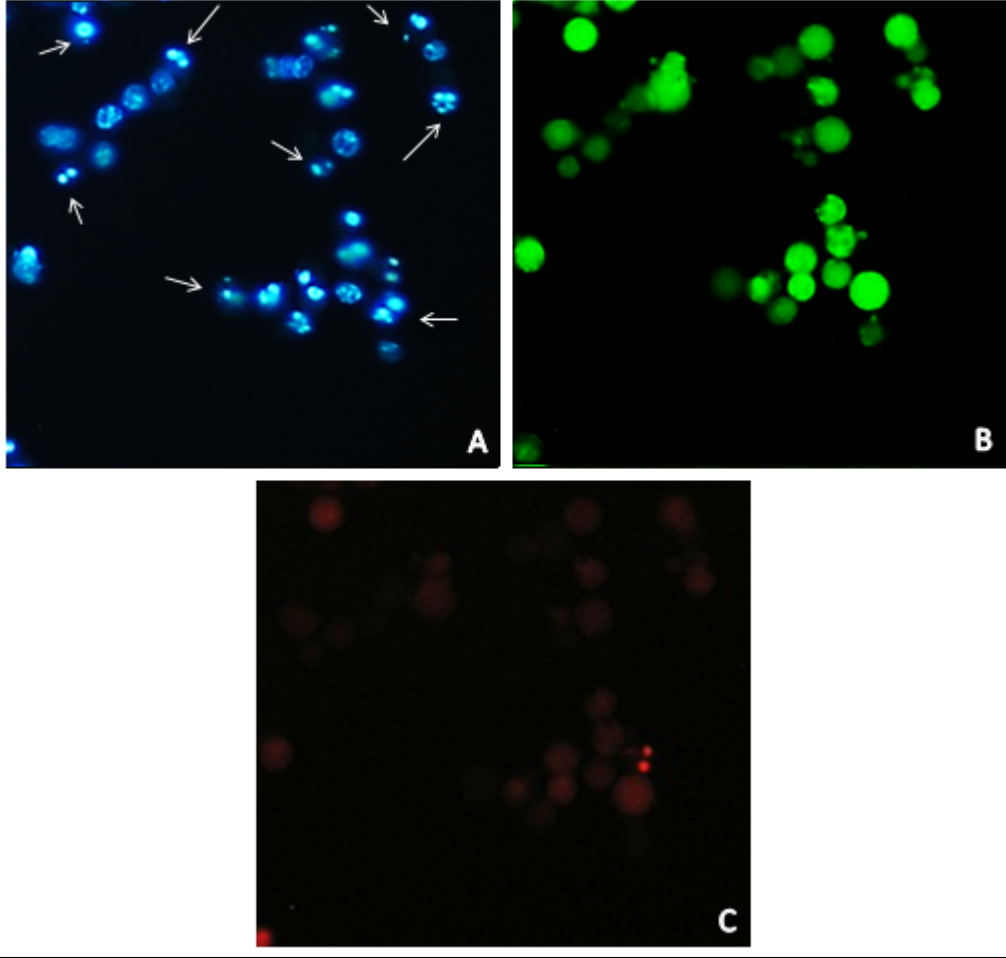
A: Hoechst 33342 ile boyama,

B: Calcein-AM ile boyama,

C: Propidium iyodür ile boyama. Hücreler 24 saatlik tedavi sonunda boyandılar.

→ Apoptozis ile hücre ölümünü temsil eden piknotik nükleus varlığını göstermektedir.

100 μ M Palladyum (II) Bileşigi



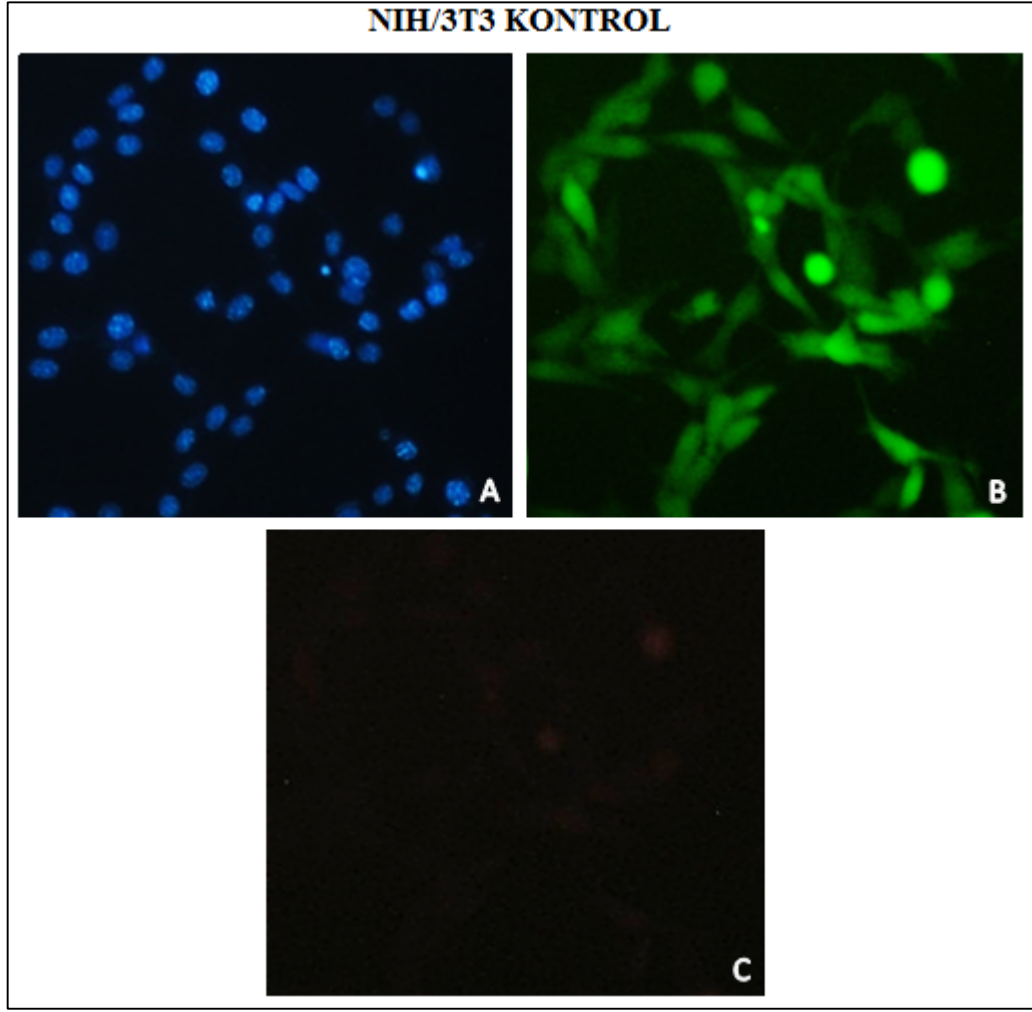
Şekil 3.14. 100 μ M Palladyum (II) bileşigi uygulanan H-Ras 5RP7 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri

A: Hoechst 33342 ile boyama,

B: Calcein-AM ile boyama,

C: Propidium iyodür ile boyama. Hücreler 24 saatlik tedavi sonunda boyandılar.

→ Apoptozis ile hücre ölümünü temsil eden piknotik nükleus varlığını göstermektedir.



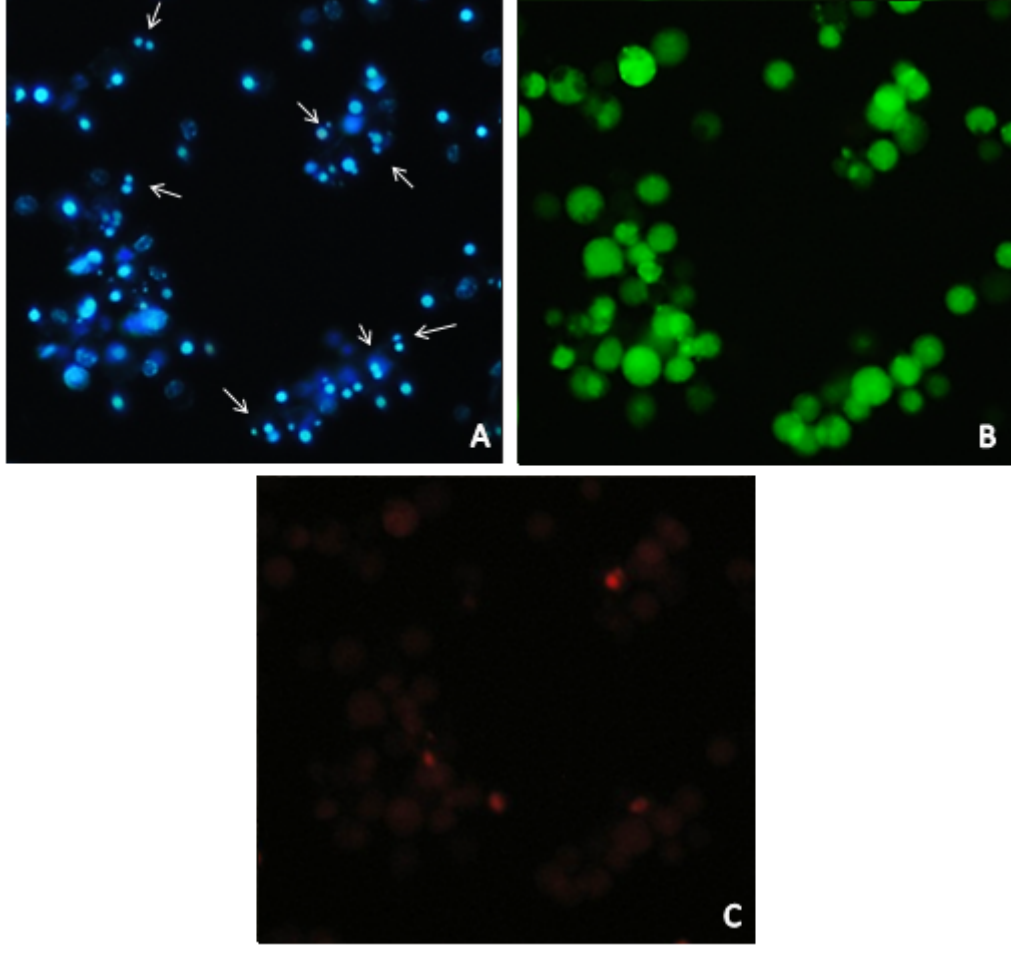
Şekil 3.15. NIH/3T3 kontrol hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri

A: Hoechst 33342 ile boyama,

B: Calcein-AM ile boyama,

C: Propidium iyodür ile boyama. Hücreler 24 saatlik tedavi sonunda boyandılar.

50 μ M Palladyum (II) bileşiği



şekil 3.16. 50 μ M Palladyum (II) bileşiği uygulanan NIH/3T3 hücreslerinin floresan mikroskop görüntüleri

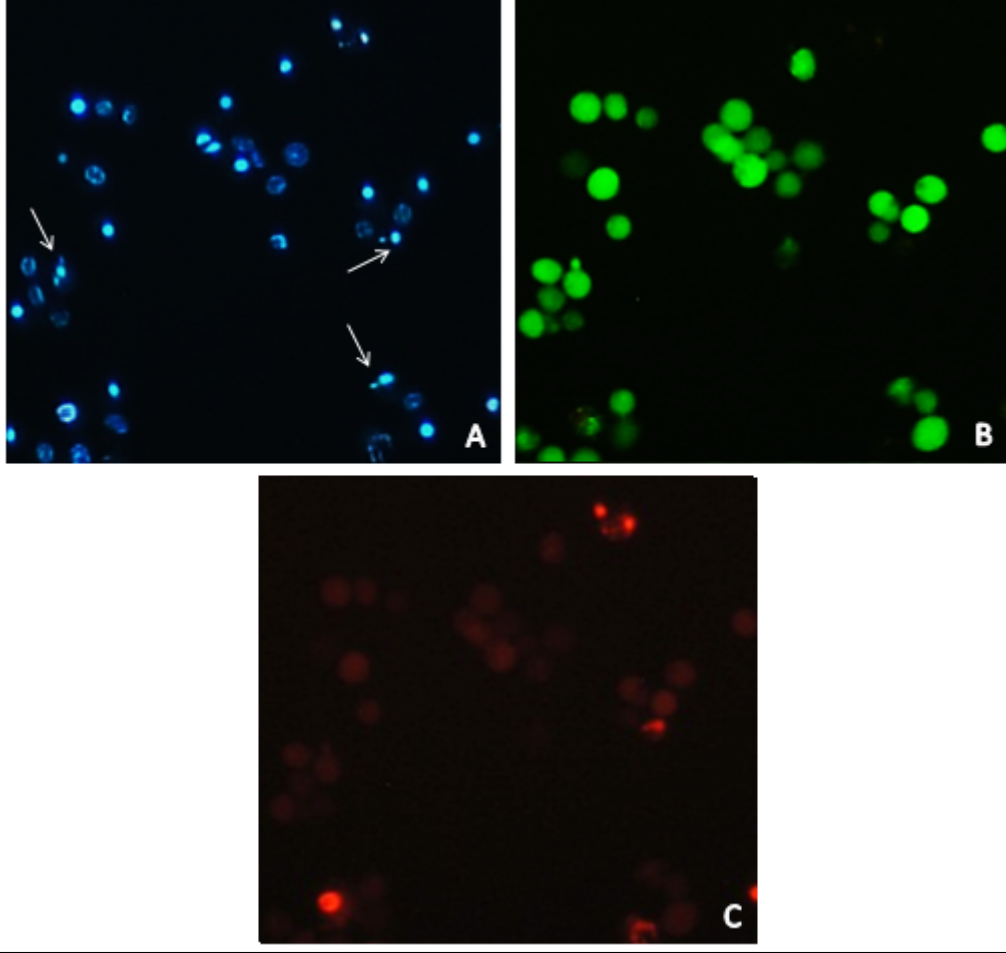
A: Hoechst 33342 ile boyama,

B: Calcein-AM ile boyama,

C: Propidium iyodür ile boyama. Hücreler 24 saatlik tedavi sonunda boyandılar.

→ Apoptozis ile hücre ölümünü temsil eden piknotik nükleus varlığının gözlenmesi.

100 μ M Palladyum (II) bileşiği



şekil 3.17. 100 μ M Palladyum (II) bileşiği uygulanan NIH/3T3 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri

A: Hoechst 33342 ile boyama,

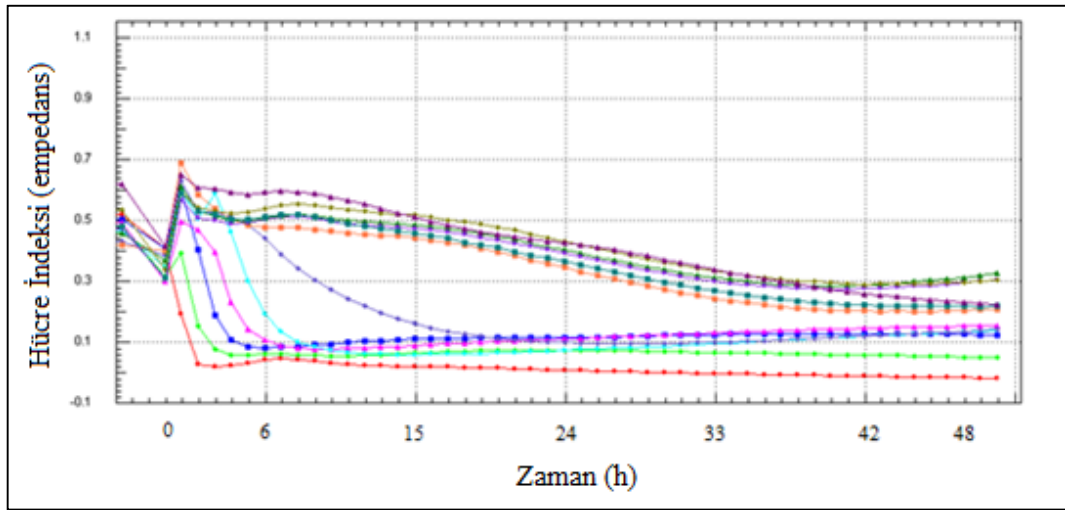
B: Calcein-AM ile boyama,

C: Propidium iyodür ile boyama. Hücreler 24 saatlik tedavi sonunda boyandılar.

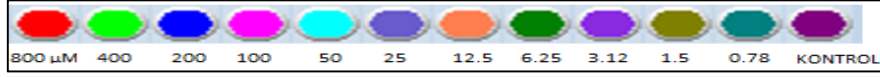
  Apoptozis ile hücre ölümünü temsil eden piknotik nükleus varlığının gözlenmesi.

3.5. Gerçek Zamanlı xCELLigence Empedans Analizi Bulguları

Pd (II) bileşiğinin 0.78 - 800 μM arasındaki konsantrasyonlarının H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerindeki etkisi gerçek zamanlı sitotoksosite analiz sistemi kullanılarak 48 saat süre ile izlendi (Şekil 3.18 ve 3.20). H-Ras 5RP7 hücrelerinde; ilaç uygulanmadan önce hücre indeks değeri 0,7 iken, uygulama sonrası 2 ila 15 saat içinde bu değer en yüksek konsantrasyon olan 6 konsantrasyonda (800 μM , 400 μM , 200 μM , 100 μM , 50 μM ve 25 μM) konsantrasyonun azalmasına bağlı olarak artan saatlerde hücre indeksinin 0'a düştüğü, tüm hücrelerin öldüğü gözlemlendi. Bu bulgular ışığında ilk 6 dozun sitotoksik etkiye neden olduğu belirlendi. 12.5 μM dozunda ilaç uygulanan hücrelerin yaşamları xCELLigence sistemi ile yine 48 saat boyunca izlendiğinde, hücre indeks değerlerinin kontrol hücrelerine benzer ve paralel şekilde seyrettiği ancak daha düşük olduğu gözlemlendi. Bu bulgular, H-Ras 5RP7 hücrelerinde 12.5 μM dozunun sitostatik olduğunu düşündürse de zamanla kültür ortamındaki besinlerin tüketilmesine bağlı olarak hem kontrolde hem de 12.5 μM ve daha düşük konsantrasyonlarda (6.25 μM , 3.13 μM , 1.58 μM ve 0.78 μM) hücrelerin ölümü nedeniyle giderek hücre indeksinin düştüğü gözlemlendi.

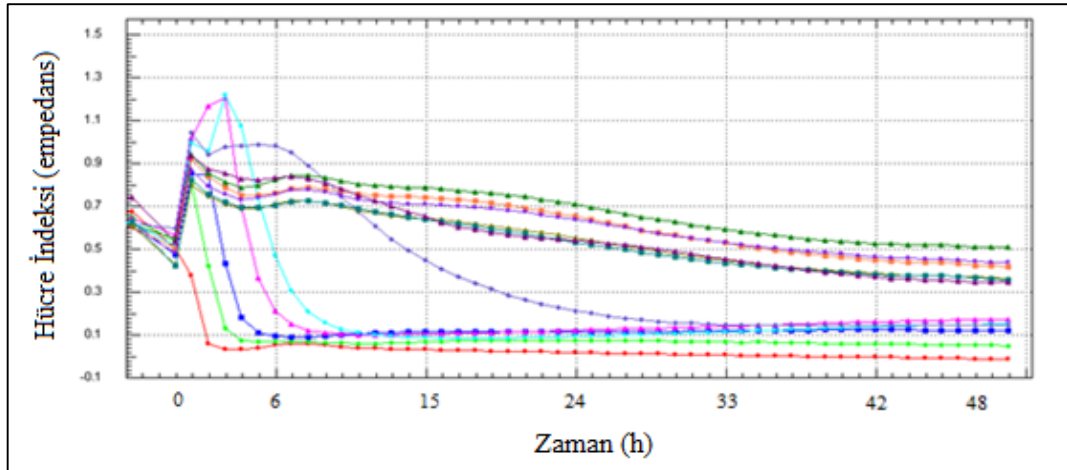


Şekil 3.18. Pd (II) bileşiğinin 0.73 - 800 μM arasındaki konsantrasyonlarının H-Ras 5RP7 hücrelerindeki 48 saat süreyle hücre indeks değerleri [Grafığı oluşturan konsantrasyonlar farklı renklerde ve “ μM “ birimi ile gösterilmektedir (Şekil 3.19)]



Şekil 3.19. Gerçek zamanlı xCELLigence sisteminde kullanılan Pd (II) bileşiğinin konsantrasyonlarının farklı renklerde ve μM birimi kullanılarak gösterilmesi

NIH/3T3 hücrelerinde; ilaç uygulanmadan önce hücre indeks değeri 1 iken, uygulama sonrası 2 ila 6 saat içinde bu değer en yüksek 3 konsantrasyonda (800 μM , 400 μM ve 200 μM) konsantrasyonun azalmasına bağlı olarak artan saatlerde hücre indeksinin 0'a düştüğü (tüm hücrelerin öldüğü değer) gözlemlendi. Bu bulgular ışığında ilk 3 dozun sitotoksik etkiye neden olduğu belirlendi. 100 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında ilaç uygulanmasını takiben, ilk birkaç saatte hücre indeks değerlerinin 1.3 değerlerine kadar yükseldiği fakat kısa bir süre içerisinde (~ 6-10 saat) hücre indeks değerinin 0'a düştüğü gözlemlendi. Bu bulgular ile 100 μM ve 50 μM konsantrasyonlarının da hücrelerde sitotoksik etkiye neden olduğu belirlendi. Aynı etki 25 μM konsantrasyonunda ise 30 saat içerisinde gözlemlendi. 12.5 μM ve daha düşük konsantrasyonlarda (6.25 μM , 3.13 μM , 1.58 μM ve 0.78 μM) ilaç uygulanan hücrelerin yaşamları xCELLigence sistemi ile 48 saat boyunca izlendiğinde, hücre indeks değerleri grafiğinin benzer ve kontrol hücrelerine paralel şekilde seyrettiği gözlemlendi. Dolayısıyla 6.25 μM 'dan daha düşük ilaç dozlarının herhangi bir etkisinin olmadığı sonucuna varıldı.



Şekil 3.20. Pd (II) bileşiğinin 0.73 - 800 μM arasındaki doz konsantrasyonlarının NIH/3T3 hücrelerindeki 48 saat süreyle hücre indeks değerleri [Grafiği oluşturan konsantrasyonlar farklı renklerde ve " μM " birimi ile gösterilmektedir (Şekil 3.19)]

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Sarkomlar, tüm kanserlerin yaklaşık % 1' ini oluşturan nadir olarak görülen mezenkimal orijinli malignant tümörlerdir (Teicher, 2012). Son yıllarda kanser tedavisinde sitotoksik ajanlar olarak, Pd (II) ve Pt (II) bileşiklerinin uygulanması ile kanser hücrelerinin yok edilmesi amaçlanmıştır. Pd (II) ve Pt (II) bileşiklerinin koordinasyon kimyası arasındaki önemli benzerlikten dolayı Pd (II) bileşiklerinin anti-tümör ilaçlar olarak araştırılması kanseri tedavi etmeye yönelik yeni bir yaklaşımdır (Rau ve van Eldik, 1996; Abu-Surrah ve ark., 2002). Son yapılan çalışmalar, bazı Pd (II) komplekslerinin standart platin bazlı ilaçlar (cisplatin, karboplatin ve oksaliplatin) ile karşılaştırıldığında farkedilir düzeyde *in vitro* sitotoksik etki gösterdiğini kanıtlamaktadır. Pd (II) bileşikleri, potansiyel kemoterapötik ajanlar olarak kabul edilmektedir (Keter ve ark., 2008; Güney ve ark., 2011b; Ulukaya ve ark., 2011a; Miklasova ve ark., 2012). Bu nedenle Pd (II) bileşikleri, çeşitli tümör hücre hatlarına karşı umut verici etkilerinden dolayı son yıllarda sentezlenmekte ve etkileri araştırılmaktadır.

Bu çalışmada, yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin, H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücreleri üzerindeki büyüme baskılayıcı/sitostatik/sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. MTT canlılık testi sonuçlarına göre, her iki hücre soyunda da konsantrasyon artışına bağlı olarak canlılık yüzdesinde anlamlı azalmalar bulunmuştur. MTT testi verileri ile Pd (II) bileşiğinin; hangi konsantrasyonlarda hücre soylarında sitotoksik, sitostatik yada antiproliferatif etkiye neden olduğunu gösteren büyüme hızı grafiğinde, Pd (II) bileşiğinin her iki hücre soyunda da 100-1000 μ M konsantrasyonlarının hücrelerde sitotoksik etkiye neden olduğu belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda da Pd (II) bileşiklerinin; farklı kanser hücrelerinde (lösemi, sarkom, deri, meme, karaciğer, akciğer, over, prostat, beyin, böbrek, kolon) yüksek oranda sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Abu-Surrah ve ark., 2002; Budzisz ve ark., 2004; Divsalar ve ark., 2007; Tusek-Bozic ve ark., 2008; Garoufis ve ark., 2009; Ferraz ve ark., 2009; Abu-Surrah ve ark., 2010; Juribasic ve ark., 2011; Khan ve ark., 2011; Kontek ve ark., 2011; Güney ve ark., 2011b; Karaküçük-İyidoğan ve ark., 2011; Ghani ve Mansour, 2012).

Son yıllarda yapılan bir başka çalışmada Pd (II) bileşiğinin karaciğer kanser kök hücrelerinde de sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Miklasova ve ark. 2012).

Literatürde Pd (II) bileşiklerinin IC₅₀ değerleri arasındaki farklılık bileşiğin yapısı ve biyolojik aktivitesi arasındaki ilişkiye dayanarak açıklanabilmektedir. Güney ve ark. (2011b) tarafından Pd (II) bis(2-piridilmetil) amin bileşiğinin farklı hücre hatlarında farklı IC₅₀ değerleri ile sitotoksik etkiye neden olduğu belirlenmiştir. Bir başka çalışmada Pd (II) bileşiğinin K562, HeLa ve L929 hücre hatlarına karşı sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Pd (II) bileşiğinin aktivitesi, K562 (miyeloid lösemi) hücrelerinde (IC₅₀: 55.9 µM); üç standart kemoterapötik ilaca göre (cisplatin IC₅₀: 16.3 µM, karboplatin: 32.9 µM ve oksaliplatin: 0.5 µM) daha az etkili bulunmuştur. HeLa (serviks karsinom) hücrelerinde Pd (II) bileşiğinin (IC₅₀: 86.1 µM) ve 3 standart kemoterapötik ilacın (cisplatin 94.3 µM, karboplatin 104,3 µM ve oksaliplatin 71.3 µM) benzer etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Abu-Surrah ve ark., 2002). MTT yöntemi ile elde ettiğimiz bulgular ışığında IC₅₀ dozu H-Ras 5RP7 hücreleri için 18.2 µM, NIH/3T3 hücreleri için ise 16.7 µM olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda Pd (II) bileşiğinin hücre çeşidine bağlı olarak az da olsa sitotoksik aktivitesinde farklılık olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda kullandığımız fibrosarkom hücresinin bir başka soyunda (L₉₂₉) Abu-Surrah ve ark. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada; Pd (II) bileşiğinin (*trans*-bis{(R)-(+)-bornylamino} palladyum (II) diklorür) ve üç standart kemoterapötik ajanın (cisplatin, karboplatin ve oksaliplatin) sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile araştırılmıştır. MTT testi sonuçlarına göre IC₅₀ değerini; Pd (II) bileşiği için >111.9 µM, cisplatin için 9.3 µM, karboplatin için >134.8 µM ve oksaliplatin için 15.8 µM olarak belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda kullanılan Pd (II) bileşiğinin benzer hücre soyu olan fare fibrosarkom hücre hattında (H-Ras 5RP7) çok daha düşük IC₅₀ değerinin belirlenmesi ile bu bileşiğin etkisinin daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır.

Bizim çalışmamızda kullandığımız Pd (II) bileşiğinin ([PdCl(terpy)](sac)·2H₂O) etkileri insan küçük hücreleri akciğer kanseri hücre soylarında (A549, H1299 ve PC-3) Ulukaya ve ark. (2011a) tarafından araştırılmıştır. Pd (II) bileşiğinin IC₅₀ değerleri A549 hücrelerinde (2.1 µM), H1299 hücrelerinde (1.8 µM) ve PC-3 hücrelerinde (1.8 µM) belirlenmiştir ve bu değer diğer komplekslere ve cisplatine göre daha düşük olduğu ayrıca daha fazla büyüme inhibe edici etkisinin olduğu gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise aynı Pd (II) bileşiği H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinde kullanılmıştır. Pd (II) bileşiğinin IC₅₀ dozu H-Ras 5RP7 hücreleri için 18.2 µM, NIH/3T3 hücreleri için ise 16.7 µM olarak belirlenmiştir. Buradan farklı sitotoksosite seviyelerinin sadece Pd (II) bileşiğinin yapısı ile ilgili olmadığı ayrıca hücre türü ile de ilişkili olabildiği görüşüne varılmaktadır.

Elde ettiğimiz büyüme hızı grafiğine göre, Pd (II) bileşiğinin her iki hücre soyunda da daha düşük konsantrasyonlarda (0.001-10µM) yüksek konsantrasyonların aksine hücrelerde büyüme baskılayıcı etkiye neden olduğu belirlenmiştir. Alınan sonuçlar Pd (II) bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda farklı etkiye neden olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalarda da Pd (II) bileşiklerinin; farklı kanser hücreleri (akciğer, lösemi, kolorektal, epitelyal, karaciğer) üzerinde anti-proliferatif (büyümeyi baskılayıcı) etkiye sahip oldukları bulunmuştur (Divsalar ve ark., 2007; Tusek-Bozic ve ark., 2008; Ulukaya ve ark., 2011; Kontek ve ark., 2011; Mansouri-Torshizi ve ark., 2011; Ferraz ve ark., 2011; Miklasova ve ark., 2012).

MTT canlılık testinde hücre canlılığı üzerine olan etki, dehidrogenaz enzim aktivitesi miktarına göre belirlenirken, ATP testinde ise intraselüler ATP düzeylerine göre belirlenmektedir. Her iki canlılık testi de hücrelerdeki metabolik aktiviteyi göstermesine rağmen, elde edilen sonuçlar birbirinden farklı olabilmektedir. Bu durum, kullanılan ilacın etki mekanizmasına göre değişmektedir. 48 saat Pd (II) bileşiği uygulaması sonucunda H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinde ATP seviyesinde doz artışına bağımlı olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

Bulgulara göre bazı Pd (II) konsantrasyonlarında (10 μ M, 1 μ M ve 0,1 μ M) ATP seviyesindeki azalma ile hücre canlılığındaki düşüşün MTT testi sonuçlarına göre daha fazla olmasından dolayı, hücrelerin ölüyor olmasına rağmen halen dehidrogenaz içeriğini devam ettirdiğini sonucuna varılmıştır. MTT öncesi ve sonrası çekilen faz-kontrast mikroskop görüntüleri ile 10 μ M, 1 μ M ve 0,1 μ M konsantrasyonlarındaki hücre canlılığındaki azalma desteklenmiştir. Daha önce “Ulukaya ve ark. (2008)” yılında yaptıkları bir çalışmada MTT testinin hücrelerde yaşam aktivitesini ATP testine göre yalancı olarak daha yüksek belirleyebildiğini (inhibisyonu daha az gösterdiğini) göstermişlerdir. Pd (II) bileşiğinin 3.12-25 μ M konsantrasyonlarının H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücre hatları üzerindeki etkileri 48 saatlik ilaç uygulaması sonrasında morfolojik olarak faz-kontrast mikroskobu ile görüntülenmiştir. Pd (II) bileşiğinin dozundaki artışa bağlı olarak her iki hücre hattında da kontrol hücrelerine kıyasla hücrelerin sayısında azalmalar gözlenmiştir. Sarkom tedavisinde kemoterapötik ajan olarak kullanılan etopositin 25 μ M konsantrasyonu ile Pd (II) bileşiğinin 25 μ M konsantrasyonunun karşılaştırılması sonucunda, H-Ras 5RP7 hücrelerinde benzer etkiye neden oldukları fakat NIH/3T3 hücrelerinde etopositin Pd (II) bileşiğine göre daha etkili olduğu görülmüştür. Gerek mitozisde gerekse apoptozisin erken evresinde hücreler üzerine yapıştıkları substratuma yayılmış halde değil, tam tersine yuvarlaklaşmış ve küçülmüş olarak görülürler. Pd (II) bileşiğinin uygulandığı her iki hücre hattında da substratundan ayrılan hücrelerin yuvarlaklaştığının gözlenmesi Pd (II) bileşiğinin H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinde apoptozise neden olabileceği görüşüne öncülük etmektedir.

Çalışmanın bir sonraki kısmında, Pd (II) bileşiğinin etkisini daha geniş doz aralığında (0.78-800 μ M) inceleyebilmek için gerçek zamanlı sitotoksikite analiz sistemi kullanılmıştır. xCELLigence sistemi hücre canlılığının ve sitotoksitenin hızlı bir şekilde belirlenmesinde kullanılan yeni ve güncel bir yöntemdir (Urcan ve ark., 2010). xCELLigence sonuçlarına göre yüksek konsantrasyonlarda hücre indeks değerinin giderek artan saatlerde 0'a düştüğünün gözlenmesi (tüm hücrelerin öldüğü değer), bu konsantrasyonların sitotoksik etkiye neden olduğunu belirtmiştir.

Her iki hücre hattında da ilaç uygulanmasını takiben hücrelerin yaşamları xCELLigence sistemi ile 48 saat boyunca izlendiğinde daha düşük konsantrasyonlar da ise hücre indeks değerleri grafiğinin benzer ve kontrol hücrelerine paralel şekilde seyrettiği gözlenmiştir. Zamanın ilerlemesi ile kültür ortamındaki besin öğelerinin yetersizliğine bağlı olarak hücre indeks değerlerinin hem düşük konsantrasyonlu ilaç uygulanan hücrelerde hem de kontrolde giderek azaldığı gözlenmiştir. Alınan sonuçlar Pd (II) bileşiğinin H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinde sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu bir başka yöntemle desteklemiştir. Daha önce bu hücrelerle yapılan bir çalışma olmaması çalışmamızın literatüre yeni ve değerli bilgiler getireceğini göstermektedir.

Pd (II) bileşiğinin H-Ras 5RP7 hücreleri ve NIH/3T3 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi Annexin V-FITC ile akım sitometride değerlendirildiğinde; 48 saat sonunda konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılık yüzdesinde azalma, apoptotik hücre oran yüzdesinde ise artış belirlenmiştir. Pd (II) bileşiğinin her iki hücre hattında da apoptozise neden olduğu Hoechst 33342, Propidium iodide, Calcein-AM üçlü boyama yöntemi ile morfolojik olarak görüntülenerek de doğrulanmıştır. Pd (II) bileşiği uygulanmış H-Ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinde, apoptozis ile hücre ölümünü temsil eden piknotik nukleus varlığının gözlenmesi bu hücrelerin ölüm modunun apoptozis olduğunu belirtmiştir. Her iki hücre hattında gözlenen apoptotik hücrelerin varlığı akım sitometri sonuçlarını destekler niteliktedir. Yapılan çalışmalarda Pd (II) bileşiklerinin; farklı kanser hücrelerinde (akciğer, over, serviks, kolorektal, meme, epitel, karaciğer) DNA'da yüksek düzeyde hasar oluşturdıkları (Miklasova ve ark., 2009; Miklasova ve ark., 2012) ve apoptozisi indükledikleri belirlenmiştir (Malesevic ve ark., 2006; Keter ve ark., 2008; Miklasova ve ark., 2009; Ulukaya ve ark., 2011a; Ulukaya ve ark., 2011b; Kontek ve ark., 2011; Ferraz ve ark., 2011; Miklasova ve ark. 2012).

Bu *in vitro* çalışma sonucunda; yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin transforme fibroblastlar üzerindeki sitotoksik/apoptotik etkileri belirlenmiş ve bu konuda çok az olan literatür bilgisine katkıda bulunulmuştur. Bu sonuçlara göre kullanılan Pd (II) bileşiğinin sarkom tedavisindeki büyüme baskılayıcı etkisinin bir sonraki inceleme basamağı olan *in vivo* olarak araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abu-Surrah, A.S., Al-Allaf, T.A.K., Rashan, L.J., Klinga, M. ve Leskela, M. (2002), "Synthesis, crystal structure and initial biological evaluation of the new enantiomerically pure chiral palladium(II) complex trans-bis{endo-(1R)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]-heptan-2-amino}palladium(II) dichloride," *European Journal of Medicinal Chemistry*, **37**, 919-922.
- Abu-Surrah, A.S., Al-Sa'doni, H.H. ve Abdalla, M.Y. (2008), "Palladium-based chemotherapeutic agents: Routes toward complexes with good antitumor activity," *Cancer Therapy*, **6**, 1-10.
- Abu-Surrah, A.S., Safieh, K.A., Ahmad, I.M., Abdalla, M.Y., Ayoub, M.T., Qaroush, A.K. ve Abu-Mahtheieh, A.M. (2010), "New palladium(II) complexes bearing pyrazole-based Schiff base ligands: Synthesis, characterization and cytotoxicity," *European Journal of Medicinal Chemistry*, **45**, 471-475.
- Aksu, G. ve Ağır, H. (2007), "Yumuşak doku sarkomlarının tedavisinde radyoterapinin rolü," *Türk Onkoloji Dergisi*, **22(2)**, 95-103.
- Akşit, H. ve Bildik, A. (2008), "Apoptozis," *YYÜ VET FAK DERG*, **19(1)**, 55-63.
- Al-Masoudi, N.A., Abdullah, B.H., Essa, A.H., Loddo, R. ve LaColla, P. (2010), "Platinum and palladium-triazole complexes as highly potential antitumor agents," *Arch Pharm (Weinheim)*, **343**, 222-227.
- Al-Noaimi, M., Abu-Surrah, A.S. ve Tahtamouni, L. (2012), "Palladium(II) complexes incorporating phenylazo arylmethine ancillary ligands: Synthesis, spectral and antitumor activity," *Arabian Journal of Chemistry*, DOI: 10.1016/j.arabjc.2012.03.009
- Aliustaoğlu, M. (2009), *Temel Kanser Fizyopatolojisi*.
http://www.klinikgelisim.org.tr/eskisayi/kg22_3/8.pdf
- Altınışık, M. (2002), *Kanserin moleküler temeli - onkogenler*.
<http://www.mustafaaltinisik.org.uk/34-1-4-18.ppt>
- Altunkaynak, B.Z. ve Özbek, E. (2008), "Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?," *Tıp Araştırmaları Dergisi*, **6(2)**, 93 -104.

- Ane, C.P., Bechter, E. (1999), "Cellular Characterisation of p53 Mutants with a Single Missense Mutation in the b-Strand 326-333 and Correlation of their Cellular Activities with in Vitro Properties," *J. Mol. Biol.*, **288**, 891-897.
- 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 adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian cancer," *Cancer Res.*, **55**, 5276-5282.
- Angle, A. (2011), *What is cancer?*.
http://www.cancervic.org.au/about-cancer/what_is_cancer
- Anonim, *Kanser gelişiminin mekanizmaları 3, Bölüm1-4*.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789283204237_tur_p189-260.pdf
- Anonim (2012), *xCELLigence System*.
<http://www.roche-applied-science.com/sis/xcelligence/ezhome.html>
- Arellano, M. ve Moreno, S. (1997), "Regulation of CDK/cyclin Complexes During the Cell Cycle," *Int. J. Biochem. Cdl Bid.*, **29**, 559-573.
- Baran, E.J. ve Yilmaz, V.T. (2006), "Metal complexes of saccharin," *Coordination Chemistry Reviews*, **250**, 1980-1999.
- Birinci, E. (2008), *Melamin-Formaldehit-Tiyöüre (MFT) reçinesi ile çözeltilerden Palladyum (II) iyonlarının geri kazılması*, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- Budzisz, E., Krajewska, U., Rozalski, M., Szulawska, A., Czyz, M. ve Nawrot, B. (2004), "Biological evaluation of novel Pt(II) and Pd(II) complexes with pyrazole-containing ligands," *European Journal of Pharmacology*, **502**, 59-65.
- Cabadak, H. (2008), "Hücre siklusu ve kanser," *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, **9(3)**, 51 - 61.
- Cachot, J., Galgani, F. ve Vincet, F. (1998), "cDNA cloning and expression analysis of flounder p53 tumour suppressor gene," *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, **121**, 235-242.

- Collins, K., Jacks, T. ve Pavletich, N.P. (1997), "The cell cycle and cancer," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2776–2778.
- Cooper, G.M. (2000), *The Cell A Molecular Approach Second Edition*, Sinauer Associates Inc, Sunderland, A.B.D..
- Croce, C.M. (2008), "Oncogenes and Cancer," *The New England Journal of Medicine*, **358**, 502-511.
- Çeçener, G. (2010), *Hücre döngüsü ppt*.
- Dash, P. (2007), *Apoptosis*.
<http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/>
- Dexter, S.J., Camara, M., Davies, M. ve Shakesheff, K.M. (2003), "Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population," *Biomaterials*, **24**, 27–34.
- Divsalar, A., Saboury, A.A., Yousefi, R., Moosavi-Movahedi, A.A. ve Mansoori-Torshizi, H. (2007), "Spectroscopic and cytotoxic studies of the novel designed palladium(II) complexes: β -Lactoglobulin and K562 as the targets," *International Journal of Biological Macromolecules*, **40**, 381–386.
- Divsalar, A., Saboury, A.A., Mansoori-Torshizi, H., Ahmad, F. (2010), "Design, synthesis, and biological evaluation of a new palladium(II) complex: beta-lactoglobulin and K562 as targets," *J Phys Chem B*, **114**, 3639–3647.
- Doherty, S.C., McKeown, S.R., McKelvey-Martin, V., Downes, C.S., Atala, A., Yoo, J.J., Simpson, D.A. ve Kaufmann, W.K. (2003), "Cell Cycle Checkpoint Function in Bladder Cancer," *Journal of the National Cancer Institute*, **95**, 1859-1868.
- Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T.V. ve Vandenabeele, P. (2009), "Major cell death pathways at a glance," *Microbes and Infection*, **11**, 1050-1062.
- Elmore, S. (2007), "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death," *Toxicol Pathol*, **35**, 495-616.
- Evan, G.I. ve Vousden, K.H. (2001), "Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer," *NATURE*, **411**, 342-348.
- Faivre, S., Chan, D., Salinas, R., Woynarowska, B. ve Woynarowski, J.M. (2003), "DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells," *Biochemical Pharmacology*, **66**, 225–237.

- Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S. ve Liang, J. (2005), "Caspase Family Proteases and Apoptosis," *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **37(11)**, 719–727.
- Ferrari, A., Orbach, D., Sultan, I., Casanova, M. ve Bisogno, G. (2012), "Neonatal soft tissue sarcomas," *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, **xxx**, 1-8.
- Ferraz, K.S.O., Ferandes, L., Carrilho, D., Pinto, M.C.X., Leite, M.F., Souza-Fagundes, E.M., Speziali, N.L., Mendes, I.C. ve Beraldo, H. (2009), "2-Benzoylpyridine-N(4)-tolyl thiosemicarbazones and their palladium(II) complexes: Cytotoxicity against leukemia cells," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17**, 7138–7144.
- Ferraz, K.O.S., Cardoso, G.M.M., Bertollo, C.M., Souza-Fagundes, E.M., Speziali, N., Zani, C.L., Mendes, I.C., Gomes, M.A. ve Beraldo, H. (2011), "N(4)-tolyl-2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their palladium(II) and platinum(II) complexes: Cytotoxicity against human solid tumor cells," *Polyhedron*, **30**, 315–321.
- Foster, I. (2008), "Cancer: A cell cycle defect," *Radiography*, **14**, 144-149.
- Fujie, Y., Yamamoto, H., Ngan, C.Y., Takagi, A., Hayashi, T., Suzuki, R., Ezumi, K., Takemasa, I., Ikeda, M., Sekimoto, M., Matsuura, N. ve Monden, M. (2005), "Oxaliplatin, a potent inhibitor of survivin, enhances paclitaxel-induced apoptosis and mitotic catastrophe in colon cancer cells," *Jpn J Clin Oncol.*, **35(8)**, 453-463.
- Gao, E.J., Wang, K.H., Zhu, M.C. ve Liu, L. (2010), "Hairpin-shaped tetranuclear palladium(II) complex: Synthesis, crystal structure, DNA binding and cytotoxicity activity studies," *European Journal of Medicinal Chemistry*, **45**, 2784-2790.
- Garbisa, S., Pozzatti, R., Muschel, R.J., Saffiotti, U., Ballin, M., Goldfarb, R.H., Khoury, G., Liotta, L.A. (1987), "Secretion of type IV collagenolytic protease and metastatic phenotypic induction by transfection with c-HA-ras but not c-HA-ras plus ad2-ela," *Cancer Research*, **47(6)**, 1523-1528.
- Garoufis, A., Hadjikakou, S.K. ve Hadjiliadis, N. (2009), "Palladium coordination compounds as anti-viral, anti-fungal, anti-microbial and anti-tumor agents," *Coordination Chemistry Reviews*, **253**, 1384–1397.

Gewis, A. (2003), *Introduction to Apoptosis, ApoReview*.

<http://www.cellddeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm>

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

Glabbeke, M.V., Verweij, J., Judson, I., Nielsen, O.S., on behalf of the EORTC Soft Tissue ve Bone Sarcoma Group. (2002), “Progression-free rate as the principal end-point for phase II trials in soft-tissue sarcomas,” *European Journal of Cancer*, **38**, 543–549.

Gortzak, E., Azzarelli, A., Buesa, J., Bramwell, V.H.C., Coevorden, F.V., Geel, A.N.V., Ezzat, A., Santoro, A., Oosterhuis, J.W., Glabbeke, M.V., Kirkpatrick, A., Verweij, J., the E.O.R.T.C. Soft Tissue Bone Sarcoma Group ve the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group/Canadian Sarcoma Group. (2001), “A randomised phase II study on neo-adjuvant chemotherapy for ‘high-risk’ adult soft-tissue sarcoma,” *European Journal of Cancer*, **37**, 1096–1103.

Greenwood, N. ve Earnshaw, A. (1997), *Chemistry of the elements, second edition*, Butterworth-Heinemann, İngiltere.

Guney, E., Yilmaz, V.T. ve Buyukgungor, O. (2010a), “Neutral and cationic palladium(II) and platinum(II) complexes of 2,2’-dipyridylamine with saccharinate: Syntheses, spectroscopic, structural, fluorescent and thermal studies,” *Inorganica Chimica Acta*, **363**, 2416–2424.

Guney, E., Yilmaz, V.T, Sengul, A. ve Buyukgungor, O. (2010b), “Platinum(II) and palladium(II) saccharinato complexes with 2,2’:6’,2’’-terpyridine: Synthesis, characterization, crystal structures, photoluminescence and thermal studies,” *Inorganica Chimica Acta*, **363**, 438–448.

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

- Güney, E., Yılmaz, V.T., Ari, F., Büyükgüngör, O. ve Ulukaya, E. (2011b), "Synthesis, characterization, structures and cytotoxic activity of palladium(II) and platinum(II) complexes containing bis(2-pyridylmethyl)amine and saccharinate," *Polyhedron*, **30**, 114-122.
- Güleş, Ö. ve Eren, Ü. (2008), "Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler," *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2**, 73-78.
- Gültekin, N., Karaoğlu, K. ve Küçükateş, E. (2008), "New discoveries in the mechanisms of apoptosis and cell survival and novel potential therapeutic strategies," *Türk Kardiyol Dern Arş - Arch Turk Soc Cardiol*, **36**, 120-130.
- Güneş, H. (1999), "Sitokinlerin Hücre Döngüsü Üzerinde Etkileri," *Tr. J. of Biology*, **23**, 283-292.
- Haider, S.Z., Malik, K.M.A., Ahmed, K.J., Kauffman, G.B. ve Karbassi, M. (1985), "Metal Complexes of Saccharin," *Inorganic Syntheses*, **23**, 47.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R.A. (2000), "The Hallmarks of Cancer," *Cell*, **100**, 57-70.
- Holcik, M., Lacasse, E., Mackenzie, A. ve Korneluk, R. (2005), *Apoptosis in Health and disease*, Cambridge, İngiltere.
- Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E. ve Swanson, P.E. (2009), "Cell Death," *N Engl J Med.*, **361**, 1570-1583.
- Howe-Grant, M., Wu, K.C., Bauer, W.R. ve Lippard, S.J. (1976), "Binding of platinum and palladium metallointercalation reagents and antitumor drugs to closed and open DNAs," *Biochemistry*, **15(19)**, 4339-4346.
- Husain, K., Abid, M. ve Azam, A. (2007), "Synthesis, characterization and antiamoebic activity of new indole-3-carboxaldehyde thiosemicarbazones and their Pd(II) complexes," *European Journal of Medicinal Chemistry*, **42**, 1300-1308.
- Juribasic, M., Malcanov, K., Kojic-Prodic, B., Bellotto, L., Kralj, M., Zani, F. ve Tusek-Bozic, L. (2011), "Palladium(II) complexes of quinolinylaminophosphonates: Synthesis, structural characterization, antitumor and antimicrobial activity," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **105**, 867-879.

- Kandaş, N.Ö. (2004), "Apoptozis, programlı hücre ölümü," *Ankara Üniversitesi Dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, **5(1)**, 7-10.
- Karaboz, İ., Kayar, E. ve Akar, S. (2008), "Flow Sitometri ve Kullanım Alanları," *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, **6(2)**, 01-18.
- Karaküçük-İyidoğan, A., Taşdemir, D., Oruç-Emre, E.E. ve Balzarini, J. (2011), "Novel platinum(II) and palladium(II) complexes of thiosemicarbazones derived from 5-substitutedthiophene-2-carboxaldehydes and their antiviral and cytotoxic activities," *European Journal of Medicinal Chemistry*, **46**, 5616-5624.
- Kartalou, M. ve Essigmann, J.M. (2001), "Mechanisms of resistance to cisplatin," *Mutation Research*, **478**, 23-43.
- Kasparkova, J., Suchankova, T., Halamikova, A., Zerzankova, L., Vrana, O., Margiotta, N., Natile, G. ve Brabec, V. (2010), "Cytotoxicity, cellular uptake, glutathione and DNA interactions of an antitumorlarge-ring Pt^{II} chelate complex incorporating the cis-1,4-diaminocyclohexane carrier ligand," *Biochemical Pharmacology*, **79**, 552-564.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. ve Currie, A.R. (1972), "Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics," *Br J Cancer.*, **26**, 239-245.
- Keter, F.K., Kanyanda, S., Lyantagaye, S.S.L., Darkwa, J., Rees, D.J.G. ve Meyer, M. (2008), "In vitro evaluation of dichloro-bis(pyrazole)palladium(II) and dichloro-bis(pyrazole)platinum(II) complexes as anticancer agents," *Cancer Chemother Pharmacol*, **63**, 127-138.
- Khan, H., Badshah, A., Murtaz, G., Said, M., Rehman, Z.U., Neuhausen, C., Todorova, M., Jean-Claude, B.J. ve Butler, I.S. (2011), "Synthesis, characterization and anticancer studies of mixed ligand dithiocarbamate palladium(II) complexes," *European Journal of Medicinal Chemistry*, **46**, 4071-4077.

- Kontek, R., Matlawska-Wasowska, K., Kalinowska-Lis, U., Kontek, B. ve Ochocki, J. (2011), "Evaluation of cytotoxicity of new trans-palladium (II) complex in human cells in vitro," *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, **68**, 127-136.
- Kopnin, B.P. (2000), "Targets of Oncogenes and Tumor Suppressors: Key for Understanding Basic Mechanisms of Carcinogenesis," *Biochemistry (Moscow)*, **65**, 2-27.
- Lam, M. (2003), *Beating cancer with natürel medicine, 16 Reasons Why You Get Cancer*, Bloomington, A.B.D..
- Lowitz, B.B. ve Casciato, D.A. (2000), *Medical oncology & principles of cancer biology, Cancer Biology and Oncogenes*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, A.B.D..
- Li, J., Feng, Q., Kim, J.M., Schneiderman, D., Liston, P., Li, M., Vanderhyden, B., Faught, W., Fung, M.F.K., Senterman, M., Korneluk, R.G. ve Tsang, B.K. (2001), "Human Ovarian Cancer and Cisplatin Resistance: Possible Role of Inhibitor of Apoptosis Proteins," *Endocrinology*, **142**, 370-380.
- Macaluso, M., Russo, G., Cinti, C., Bazan, V., Gebbia, N. ve Russo, A. (2002), "Ras Family Genes: An Interesting Link Between Cell Cycle and Cancer," *Journal of Cellular Physiology*, **192**, 125-130.
- Macey, M.G. (2007), *Flow Cytometry Principles and Applications*, Humana Press Inc, Totowa, New Jersey.
- Maehara, Y., Anai, H., Tamada, R., Sugimachi, K. (1987), "The ATP assay is more sensitive than the succinate-dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability," *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **23**, 273-276.
- Mahmood, Z. ve Shukla, Y. (2010), "Death receptors: Targets for cancer therapy," *Experimental Cell Research*, **316**, 887-899.
- Malesevic, N., Srdic, T., Radulovic, S., Sladic, D., Radulovic, V., Brceski, I. ve Andelkovic, K. (2006), "Synthesis and characterization of a novel Pd(II) complex with the condensation product of 2-(diphenylphosphino) benzaldehyde and ethyl hydrazinoacetate. Cytotoxic activity of the synthesized complex and related Pd(II) and Pt(II) complexes," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **100**, 1811-1818.

- Malumbres, M. ve Barbacid, M. (2007), "Cell cycle kinases in cancer," *Current Opinion in Genetics & Development*, **17**, 60–65.
- Mandic, A., Hansson, J., Linger, S. ve Shoshan, M.C. (2003), "Cisplatin Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Nucleus-independent Apoptotic Signaling," *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 9100-9106.
- Mansuri-Torshizi, H., Srivastava, T.S., Chavan, S.J. ve Chitnis, M.P. (1992), "Cytotoxicity and DNA binding studies of several platinum (II) and palladium (II) Complexes of the 2,2'-bipyridine and an anion of 2-pyridinecarboxylic/2-pyrazinecarboxylic acid," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **48(1)**, 63-70.
- Mansouri-Torshizi, H., I-Moghaddam, M., Divsalar, A. ve Saboury, A.A. (2008), "2,2'-Bipyridinebutyldithiocarbamatoplatinum(II) and palladium(II) complexes: Synthesis, characterization, cytotoxicity, and rich DNA-binding studies," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**, 9616–9625.
- Mansouri-Torshizi, H., Saedifar, M., Divsalar, A. ve Saboury, A.A. (2011), "Binding studies of a novel antitumor palladium (II) complex to calf thymus DNA," *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **30**, 405–422.
- Martinez, J.D., Parker, M.T., Fultz, K.E., Ignatenko, N.A. ve Gerner, E.W. (2003), "Cancer-Related Genes," *Molecular Biology of Cancer* (Ed: Abraham, D.J.), John Wiley&Sons Inc, 21-26.
- Matesanz, A.I., Perez, J.M., Navarro, P., Moreno, J.M., Colacio, E. ve Souza, P. (1999), "Synthesis and characterization of novel palladium(II) complexes of bis(thiosemicarbazone). Structure, cytotoxic activity and DNA binding of Pd(II)-benzyl bis(thiosemicarbazone)," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **76**, 29–37.
- Matsingou, C., Hatziantoniou, S., Georgopoulos, A., Dimas, K., Terzis, A. ve Demetzos, C. (2005), "Labdane-type diterpenes: thermal effects on phospholipid bilayers, incorporation into liposomes and biological activity," *Chemistry and Physics of Lipids*, **138**, 1–11.

- Matsingou, C., Dimas, K. ve Demetzos, C. (2006), "Design and development of liposomes incorporating a bioactive labdane-type diterpene. In vitro growth inhibiting and cytotoxic activity against human cancer cell lines," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **60**, 191–199.
- Merlo, L.M.F., Pepper, J.W., Reid, B.J. ve Maley, C.C. (2006), "Cancer as an evolutionary and ecological process," *Nature*, **6**, 924-935.
- Miklasova, N., Fischer-Fodor, E., Lönnecke, P., Schrepler, M.P., Virag, P., Tatomir, C., Cernea, V.I., Hey-Hawkins, E. ve Silaghi-Dumitrescu, L. (2009), "Antiproliferative effect and genotoxicity of novel synthesized palladium complexes with organoarsenic ligands," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **103**, 1739–1747.
- Miklasova, N., Fischer-Fodor, E., Lönnecke, P., Tomuleasa, C.I., Virag, P., Schrepler, M.P., Miklasova, R., Dumitrescu, S. ve Hey-Hawkins, E. (2012), "Antiproliferative effect of novel platinum(II) and palladium(II) complexes on hepatic tumor stem cells in vitro," *European Journal of Medicinal Chemistry*, **49**, 41-47.
- Mocellin, S., Rossi, C.R., Brandes, A. ve Nitti, D. (2006), "Adult soft tissue sarcomas: Conventional therapies and molecularly targeted approaches," *Cancer treatment reviews*, **32**, 9-27.
- Mosmann, T. (1983), "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of Immunological Methods*, **65(1-2)**, 55-63.
- Moureaux-Zabotto, L., Thomas, L., Bui, B.N.G., Chevreau, C., Stockle, E., Martel, P., Bonneville, P., Marques, B., Coindre, J.M., Kantor, G., Matsuda, T. Ve Delannes, M. (2004), "Management of soft tissue sarcomas (STS) in first isolated local recurrence: a retrospective study of 83 cases," *Radiotherapy and Oncology*, **73**, 313–319.
- 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.Screen.*, **9**, 506–515.

- Muzio, L.L., Mignogna, M.D., Pannone, G., Staibano, S. ve Testa, N.F. (1998), "A rare case of fibrosarcoma of the jaws in a 4-year-old male," *Oral Oncology*, **34**, 383-386.
- Nabors, L.O. ve Robert, C.G. (1991), *Alternative Sweeteners 2nd Edition*, Marcel Dekker Inc, New York, A.B.D..
- Nadeem, S., Bolte, M., Ahmad, S., Fazeelat, T., Tirmizi, S.A., Rauf, M.K., Sattar, S.A., Siddiq, S., Hameed, A. ve Haider, S.Z. (2010), "Synthesis, crystal structures and, antibacterial and antiproliferative activities in vitro of palladium(II) complexes of triphenylphosphine and thioamides," *Inorganica Chimica Acta*, **363**, 3261–3269.
- Neuhaus, S.J., Pinnock, N., Giblin, V., Fisher, C., Thway, K., Thomas, J.M. ve Hayes, A.J. (2009), "Treatment and outcome of radiation-induced soft-tissue sarcomas at a specialist institution," *EJSO*, **35**, 654-659.
- Nurse, P., Masui, Y. ve Hartwell, L. (1998), "Understanding the cell cycle," *Nature Medicine*, **4**, 1103-1106.
- Osborne, C., Wilson, P. ve Tripathy, D. (2004), "Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapeutic applications," *The Oncologist*, **9**, 361-377.
- Park, M.T. ve Lee, S.J. (2003), "Cell Cycle and Cancer," *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **36**, 60-65.
- Paola, E.D.D., Nielsen, O.S., on behalf of the EORTC Soft Tissue ve Bone Sarcoma Group. (2002), "The EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group," *European Journal of Cancer*, **38**, S138–S141.
- Pearson, R.G. (1967), "Hard and soft acids and bases," *Chemistry in Britain*, **3**, 103-107.
- Petrovic, D., Stojimirovic, B., Petrovic, B., Bugarcic, Z.M. ve Bugarcic, Z.D. (2007), "Studies of interactions between platinum(II) complexes and some biologically relevant molecules," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **15**, 4203–4211.
- Potten, C. ve Wilson, J. (2004), *Apoptosis the life and death of cells*, Cambridge University of Press, A.B.D..

- Quincoces, A.F., Polanco, I., Thomson, T. ve Leon, J. (1997), "Positive autoregulation of *ras* genes expression in fibroblasts," *FEBS Letters*, **416**, 317-323.
- Rabik, C.A. ve Dolan, M.E. (2007), "Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents," *Cancer Treatment Reviews*, **33**, 9– 23.
- Rau T, van Eldik, R. (1996), "In metal ions in biological systems. In: Sigel H, Sigel A (eds) Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy. *Marcel Dekker*, New York, **31**, 339–378.
- Rastogi, R.P., Sinha, R, ve Sinha, R.P. (2009), "Apoptosis: Molecular Mechanisim and Pathogenicity," *EXCLI Journal*, **8**, 155-181.
- Ormerod, M.G., Paul, F., Cheetham, M. ve Sun, X.M. (1995), "Discrimination of Apoptotic Thymocytes by Forward Light Scatter," *Cytometry*, **21**, 300-304.
- Rieger, P.T. (2004), "The biology of cancer genetics," *Seminars in Oncology Nursing*, **20**, 145-154.
- Robertson, J.D. ve Orrenius, S. (2000), "Molecular Mechanisms of Apoptosis Induced by Cytotoxic Chemicals," *Critical Reviews in Toxicology*, **30(5)**, 609–627.
- Sabah, D. (2009), *Yumuşak Doku Tümörleri*.
<http://www.dundarsabah.com/Makale/9/Yumusak-Doku-Tumörleri.htm>
- Saeter, G., Alvegard, T.A., Monge, O.R., Strander, H., Turesson, I., Klepp, R., Söderberg, M., Wist, E., Raabe, N., Erlanson, M., Solheim, O.P. ve Hannisdal, E. (1997), "Ifosfamide and Continuous Infusion Etoposide in Advanced Adult Soft Tissue Sarcoma. A Scandinavian Sarcoma Group Phase II Study," *European Journal of Cancer*, **33**, 1551-1558.
- Sandal, T. (2002), "Molecular Aspects of the Mammalian Cell Cycle and Cancer," *The Oncologist*, **7**, 73-81.
- Schulze-Gahmen, U., Jung, J.U. ve Kim, S.H. (1999), "Crystal structure of a viral cyclin, a positive regulator of cyclin-dependent kinase 6," *Structure*, **7**, 245-254.

- Schwartz, G.K. ve Shah, M.A. (2005), "Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy," *Journal of Clinical Oncology*, **23**, 9408-9421.
- Shah, M.A. ve Schwartz, G.K. (2001), "Cell Cycle-mediated Drug Resistance: An Emerging Concept in Cancer Therapy," *Clinical Cancer Research*, **7**, 2168-2181.
- Shah, M.A. ve Schwartz, G.K. (2006), "Cyclin dependent kinases as targets for cancer therapy," *Update On Cancer Therapeutics*, **1**, 311-332.
- Skubitz, K.M. ve D'Adamo, D.R. (2007), "Sarcoma," *Mayo Clin Proc.*, **82(11)**, 1409-1432.
- Spandidos, D.A. (2007), "Oncogenes and tumor supressor genes as paradigms in oncogenesis," *Journal of BUON*, **12(Suppl 1)**, S9-S12.
- Stafford, E.S. ve Ward, G.E. (1953), "Treatment of fibrosarcoma," *Annals of Surgery*, **137**, 639-644.
- Starha, P., Travnicek, Z. ve Popa, I. (2009), "Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity of the first palladium(II) oxalato complexes involving adenine-based ligands," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **103**, 978-988.
- Sun, C., Wang, Z., Zheng, Q. ve Zang, H. (2012), "Salidroside inhibits migration and invasion of human fibrosarcoma HT1080 cells," *Phytomedicine*, **19**, 355- 363.
- Szucova, L., Travnicek, Z., Zatloukal, M. ve Popa, I. (2006), "Novel platinum(II) and palladium(II) complexes with cyclin-dependent kinase inhibitors: Synthesis, characterization and antitumour activity," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14**, 479-491.
- Tamasi, G., Casolaro, M., Magnani, A., Sega, A., Chiasserini, L., Messori, L., Gabbiani, C., Valiahdi, S.M., Jakupiec, M.A., Keppler, B.K., Husthouse, M.B. ve Cini R. (2010), "New platinum-oxicam complexes as anti-cancer drugs. Synthesis, characterization, release studies from smart hydrogels, evaluation of reactivity with selected proteins and cytotoxic activity in vitro," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **104**, 799-814.

- Tanel, A. ve Averill-Bates, D.A. (2007), "Activation of the death receptor pathway of apoptosis by the aldehyde acrolein," *Free Radical Biology & Medicine*, **42**, 798–810.
- Teicher, B.A. (2012), "Searching for molecular targets in sarcoma," *Biochemical Pharmacology*, **84**, 1–10.
- Todaro, G.J ve Green, H. (1963), "Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines," *J. Cell Biol.*, **17**, 299-313.
- Tusek-Bozic, T., Juribasic, M., Traldi, P., Scarcia, V. ve Furlani, A. (2008), "Synthesis, characterization and antitumor activity of palladium(II) complexes of monoethyl 8-quinolylmethylphosphonate," *Polyhedron*, **27**, 1317–1328.
- Ulukaya, E. (2001), "Hücre Siklusu ve Apoptozis," *Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar* (Ed: Engin, K. ve Özyardımcı, N.), Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Şti, Bursa.
- Ulukaya, E. (2003), *Apoptozis ders notları*.
http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf
- Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Yilmaztepe-Oral, A. ve Demirci, M. (2008), "The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested," *Toxicology in Vitro*, **22**, 232–239.
- Ulukaya, E., Ari, F., Dimas, K., Sarimahmut, M., Guney, E., Sakellaridis, N. ve Yilmaz, V.T. (2011a), "Cell death-inducing effect of novel palladium(II) and platinum(II) complexes on non-small cell lung cancer cells in vitro," *J Cancer Res Clin Oncol*, **137**, 1425–1434.
- Ulukaya, E., Ari, F., Dimas, K., Ikitimur, E.I., Guney, E. ve Yilmaz, V.T. (2011b), "Anti-cancer activity of a novel palladium(II) complex on human breast cancer cells in vitro and in vivo," *European Journal of Medicinal Chemistry*, **46**, 4957-4963.

- Urcan, E., Haertel, U., Styllou, M., Hickel, R., Scherthan, H. ve Reichl, F.X. (2010), “Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts,” *dental materials*, **26**, 51–58.
- Verma, S., Younus, J., Stys-Norman, D., Haynes, A.E., Blackstein, M. ve On behalf of the Members of the Sarcoma Disease Site Group of Cancer Care Ontario’s Program in Evidence-Based Care. (2008), “Meta-analysis of ifosfamide-based combination chemotherapy in advanced soft tissue sarcoma,” *Cancer Treatment Reviews*, **34**, 339– 347.
- Vermeulen, K., Bockstaele, D.R.V. ve Berneman, Z.N. (2006), “The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer,” *Cell Prolif.*, **36**, 131–149.
- Vujic, J.M., Cvijovic, M., Kaluderovic, G.N., Milovanovic, M., Zmejkovski, B.B., Volarevic, V., Arsenijevic, N., Sabo, T.J. ve Trifunovic, S.R. (2010), “Palladium(II) complexes with R2edda derived ligands. Part IV. O,O’-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N’-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride and their palladium(II) complexes: Synthesis, characterization and in vitro antitumoral activity against chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, **45**, 3601-3606.
- Wadhawan, T., McEvoy, J., Prüß, B.M. ve Khan, E. (2010), “Assessing tetrazolium and ATP assays for rapid in situ viability quantification of bacterial cells entrapped in hydrogel beads,” *Enzyme and Microbial Technology*, **47**, 166–173.
- Weinberg, R.A. (1983), “Oncogenes and the molecular biology of cancer,” *The Journal of Cell Biology*, **97**, 1661-1662.
- Xu, L., Pirollo, K.F. ve Chang, E.H. (2001), “Tumor-targeted p53-gene therapy enhances the efficacy of conventional chemo/ radiotherapy,” *Journal of Controlled Release*, **74**, 115–128.
- Zahm, Z.H. ve Fraumeni, J.F. (1997), “The epidemiology of soft tissue sarcoma,” *Semin Oncol.*, **24(5)**, 504-514.

- Zhang, X., Zhao, M., Huang, A., Fei, Z., Zhang, W., Wang, X. (2005), "The effect of cyclin D expression on cell proliferation in human gliomas," *Journal of Clinical Neuroscience*, **12(2)**, 166-168.
- Zhang, J., Li, L., Ma, L., Zhang, F., Zhang, Z. ve Wang, S. (2011), "Synthesis, characterization and cytotoxicity of mixed-ligand complexes of palladium(II) with 2, 2'-biquinoline/1, 4-diaminobutane and 4-toluenesulfonyl-L-amino acid dianion," *European Journal of Medicinal Chemistry*, **46**, 5711-5716.