

**DİPİRİDO [3,2-a:2',3'-c] FENAZİN İLE PLATİN(II)
VE ALTIN(III) KOMPLEKSLERİNİN
ANTİPROLİFERATİF VE SİTOTOKSİK
ETKİLERİNİN *İN VİTRO* ARAŞTIRILMASI**

Ayşe Kaplan
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Eylül, 2010

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ayşe Kaplan'ın "Dipirido [3,2-a:2',3'-c] fenazin ile Platin(II) ve Altın(III) Komplekslerinin Antiproliferatif ve Sitotoksik Etkilerinin *In Vitro* Araştırılması" başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 26.07.2010 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Doç. Dr. A. TANSU KOPARAL
Üye	: Prof. Dr. KADRIYE BENKLİ
Üye	: Doç. Dr. BERRİN AYAZ TÜYLÜ

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

Enstitü Müdürü

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

**DİPİRİDO [3,2-a:2',3'-c] FENAZİN İLE PLATİN(II) VE ALTIN(III)
KOMPLEKSLERİNİN ANTİPROLİFERATİF VE SİTOTOKSİK
ETKİLERİNİN *İN VİTRO* ARAŞTIRILMASI**

Ayşe KAPLAN

**Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Doç. Dr. A. Tansu KOPARAL

2010, 89 sayfa

Metal kompleksler ve organometalik bileşikler, kanser bilminde önemli gelişmeler sağlamıştır. Bu gelişmeler, onaylanmış ilk örnek metal olan cisplatinin başarısıyla başlamıştır. Son zamanlarda altın(III) ve platin(II) ile yapılan metal kompleksleri kanser tedavisi için önemli araştırma konusu olmuştur.

Bu tezde, pozitif kontrol madde cisplatin, dipirido[3,2-a:2',3'-c] fenazın ligandı, dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazın-platin(II) ([Pt(dppz)Cl₂]) kompleksi ve dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazın-altın(III) ([Au(dppz)Cl₂]Cl) kompleksinin, antiproliferatif ve sitotoksik etkileri, MTT (3[4,5-dimetiltiyazol2-yl]-2,5-difeniltetrazolyum bromid) deneyi ile *h-ras* onkogeni transforme edilmiş sıçan embriyo fibroblast hücreleri (5RP7) kullanılarak araştırılmıştır.

Cisplatin, dipiridofenazın ligandı ve metal türevlerinin apoptozis üzerine etkileri, sitotoksik bir dozda DAPI boyama ile floresan mikroskopunda 5RP7 hücresi üzerinde araştırılmıştır. Test maddeleri 5RP7 hücreleri üzerinde apoptotik etkiler sağlamıştır.

Dipirido[3,2-a:2',3'-c] fenazın ligand, her iki gün sonunda cisplatinden daha sitotoksik olarak belirlenmiştir. Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazın-altın(III) ([Au(dppz)Cl₂]Cl) kompleksi ve dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazın-platin(II) ([Pt(dppz)Cl₂]) kompleksi ilk gün sonunda cisplatinden daha sitotoksiktir. Ancak ikinci gün sonunda cisplatin her iki maddeden daha sitotoksik olarak belirlenmiştir. Her bir maddemiz cisplatine alternatif kemoterapötikler olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Dipiridofenazın, Platin(II), Altın(III), Sitotoksikite, DAPI, Apoptozis

ABSTRACT**Master of Science Thesis*****IN VITRO* INVESTIGATION OF ANTIPROLIFERATIVE AND
CYTOTOXIC EFFECTS OF PLATINUM(II) AND GOLD(III)
COMPLEXES WITH DIPYRIDO[3,2-a:2',3'-c]PHENAZINE****Ayşe KAPLAN****Anadolu University****Graduate School of Sciences****Biology Program****Supervisor: Associate Professor. Dr. A. Tansu KOPARAL****2010, 89 pages**

Metal complexes and organometallic compounds have been gaining growing importance in oncology. This improvements have starten with achievement of prototypic metal cisplatin. Recently, gold(III) and platinum(II) metal complexes have been important research subject for cancer treatment.

In this thesis, antiproliferative and cytotoxic effects of positive control substance cisplatin, dipyrido[3,2-a:2',3'c]phenazine ligand, dipyrido[3,2-a:2',3'c] phenazine-platinum(II) ([Pt(dppz)Cl₂]) complex and dipyrido[3,2-a:2',3'c] phenazine-gold(III) ([Au(dppz)Cl₂]Cl) complex was investigated with MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay with using rat embryo fibroblast cell line (5RP7) that transformed *h-ras* oncogene.

Effects of cisplatin, dipyridophenazine ligand and metal derivatives on apoptosis were investigated on 5RP7 cell lines with DAPI staining in a cytotoxic dose at fluorescence microscopy. Test substances have provided apoptotic effects on 5RP7 cells.

Dipyrido[3,2-a:2',3'c]phenazine ligand was determined as more cytotoxic than cisplatin at last both days. Dipyrido[3,2-a:2',3'c] phenazine-platinum(II) ([Pt(dppz)Cl₂]) and dipyrido[3,2-a:2',3'c] phenazine-gold(III) ([Au(dppz)Cl₂]Cl) complexes was more cytotoxic than cisplatin at last first day. But cisplatin was determined as more cytotoxic than both substance at last latter day. Each our substance can be used as alternative chemotherapeutics to cisplatin.

Keywords: Dipyridophenazine, Platinum(II), Gold(III), Cytotoxicity, DAPI, Apoptosis

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada bana bilgi ve yorumlarıyla yardımcı olan, lisansüstü eğitimim süresince beni yönlendiren danışman hocam Sayın Doç. Dr. A. Tansu Koparal'a teşekkür ederim.

Tezimde kullandığım kimyasal maddeleri sağlayan Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalından hocam Sayın Prof. Dr. Kadriye Benkli'ye teşekkür ederim.

Bugünlere gelmem de ve tez çalışmalarım sırasında benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme çok teşekkür ederim.

Ayşe Kaplan

Eylül, 2010

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1.GİRİŞ	1
1.1. Kanser	2
1.1.1. Kanser ve genetiği	3
1.1.2. Kanser ve tedavisi	5
1.2. Hücre Kültürü.....	6
1.3. Toksisite	8
1.4. Sitotoksisite ve Yöntemleri	10
1.5. Apoptozis	12
1.5.1. Apoptozisin morfolojisi	13
1.5.2. Apoptozisin nekrozisten farkı.....	13
1.5.3. Apoptozisin mekanizması.....	14
1.5.4. Tümör oluşumunda apoptozis.....	17
1.5.5. Apoptozis belirleme yöntemleri.....	18
1.5.5.1. Mikroskopik teknikler	19
1.5.5.2. DNA fragmentasyon analizi	21
1.5.5.3. Flow sitometri ve lazer tarayıcı sitometri analizi	23
1.5.5.4. Gen ekspresyonu analizleri.....	25
1.5.5.5. Proteinler ile birlikte apoptozisin ölçümü	25
1.6. Çalışmalarda Kullanılan Hücrenin Özellikleri.....	26
1.6.1. 5RP7 hücreleri	26
1.6.1.1. Fibroblastların kanser ile bağıntısı.....	26
1.6.1.2. <i>H-ras</i> onkogeni	27
1.7. Çalışmalarda Kullanılan Test Maddeleri	28

1.7.1. Altın ve platinden türevlenen bileşiklerin kanser tedavisinde kullanımı.....	28
1.7.2. Cisplatin.....	32
1.7.2.1. Cisplatinin etki mekanizması.....	32
1.7.2.2. Cisplatin analogları.....	34
1.7.3. Dipirido [3,2-a:2',3'-c] fenazın	37
1.7.4. Dipirido [3,2-a:2',3'-c] fenazın-platin(II) kompleksi.....	38
1.7.5. Dipirido [3,2-a:2',3'-c] fenazın-altın(III) kompleksi.....	38
1.8. Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler Hakkında Bilgiler	40
1.8.1. Mitokondriyal aktiviteye dayalı MTT testi.....	40
1.8.1.1. MTT testinin amacı	40
1.8.1.2. Uygulama.....	40
1.8.1.3. Testin yapılışı	41
1.8.1.4. Yöntemin avantajları	41
1.8.2. Floresan boyama ile morfolojik inceleme	41
2. MATERYAL VE YÖNTEM	43
2.1. Kullanılan Test Maddeleri	43
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	43
2.3. Kullanılan Sarf Malzemeler	43
2.4. Kullanılan Aletler ve Cihazlar	43
2.5. Hücre Kültüründe Kullanılan Hücreler	44
2.5.1. 5RP7 hücre kültürü	44
2.6. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması.....	44
2.6.1. Dipiridofenazın ve komplekslerinin dozlarının hazırlanması.....	44
2.6.2. Cisplatin dozlarının hazırlanması	44
2.7. Test Maddelerinin Analiz Koşulları.....	45
2.8. Test Maddelerinin Formülleri	45
2.8.1. Dipiridofenazın	45
2.8.2. Dipiridofenazın-platin(II) kompleksi.....	45
2.8.3. Dipiridofenazın-altın(III) kompleksi	46
2.8.4. Cisplatin	46

2.9. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması	46
2.10. Yöntem.....	46
2.10.1. Hücrelerin testler için hazırlanması	46
2.10.2. MTT ölçümü	47
2.10.3. Floresan boyama ile morfolojik inceleme	48
2.11. Mikroskopi	48
2.12. Fotoğrafi.....	48
2.13. İstatistiksel Değerlendirmeler	48
3. BULGULAR	49
3.1. MTT Sonuçları	49
3.1.1. Dipiridofenazinin (dppz) 5RP7 hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri	49
3.1.2. Dipiridofenazin-platin(II)'nin [dppz-Pt(II)] 5RP7 hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri	50
3.1.3. Dipiridofenazin-altın(III)'ün [dppz-Au(III)] 5RP7 hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri	51
3.1.4. Cisplatinin 5RP7 hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri	52
3.2. Floresan Boyama ile Morfolojik İnceleme Sonuçları	53
3.2.1. Dipiridofenazin ligandının 5RP7 hücreleri üzerine morfolojik etkileri	54
3.2.2. Dipiridofenazin-Pt(II) kompleksinin 5RP7 hücreleri üzerine morfolojik etkileri	54
3.2.3. Dipiridofenazin-Au(III) kompleksinin 5RP7 hücreleri üzerine morfolojik etkileri	54
3.2.4. Cisplatinin 5RP7 hücreleri üzerine morfolojik etkileri.....	55
3.3. Sitotoksik Aktiviteye Bağlı Morfolojik İnceleme.....	55
4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
1.1. Kullanımda olan platin antitümör ilaçların yapısı.....	36
2.1. Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazın yapısı.....	45
2.2. Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazın-platin(II)[Pt(dppz)Cl ₂] yapısı.....	45
2.3. Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazın-altın(III)[Au(dppz)Cl ₂]Cl yapısı.....	46
2.4. Cis-diaminedikloroplatin(II) yapısı.....	46
3.1. Dipiridofenazın (dppz) ligandının, 5RP7 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	56
3.2. Dipiridofenazın (dppz)-Pt(II) kompleksinin, 5RP7 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	56
3.3. Dipiridofenazın (dppz)-Au(III) kompleksinin, 5RP7 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	57
3.4. Cisplatinin 5RP7 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	57
3.5. 5RP7 hücreleri üzerinde apoptotik etkinin DAPI boyama ile değerlendirilmesi.....	58
3.6. Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazının 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (1.gün).....	59
3.7. Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazının 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (2.gün).....	61
3.8. Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazın-Pt(II) kompleksinin ([Pt(dppz)Cl ₂]) 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (1.gün).....	63
3.9. Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazın-Pt(II) kompleksinin ([Pt(dppz)Cl ₂]) 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (2.gün).....	65
3.10. Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazın-Au(III) kompleksinin [Au(dppz)Cl ₂]Cl 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (1.gün).....	67
3.11. Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazın-Au(III) kompleksinin [Au(dppz)Cl ₂]Cl 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (2.gün).....	69

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	: Etilen-diamin tetra asetik asit
FBS	: Fetal Bovine Serum
IC ₅₀	: Hücre canlılığını %50 inhibe eden konsantrasyon
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür)
NaHCO ₃	: Sodyum bikarbonat
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate buffer saline)

1. GİRİŞ

Yaşam ve ölüm arasındaki dengeyi muhafaza etmek, çok hücreli organizmalar için önemli bir görevdir. Yetişkin bir insan vücudunda günlük ortalama altmış milyardan üçyüz milyara kadar yeni hücre üretildiği hesaplanmaktadır. Böylece bedenimizin korunması için benzer sayıda hücrenin ölmesi gerektiği sonucuna varılmaktadır. Bu hassas dengenin bozulması kansere neden olmaktadır (Sharma ve Settleman, 2010).

Kanser, tüm dünyada hala başlıca bir ölüm nedenidir (Günes ve ark., 2009). Kanser, kalp hastalıklarından sonra tüm ölümlerin en sık ikinci sebebidir (Gazi ve Tapul, 2006). Böylece kanser tedavisi modern tıptaki en önemli sorunlardan biri olarak kalmıştır (Günes ve ark., 2009). Yaklaşık altmış yıl önce, ilaç tedavileri kanser tedavisi için odak noktası olmuştur. Antikanser ilaçlar, sitotoksinler diye ifade edilen antiproliferatif ajanlardır. Cisplatinin gözardı edilemez başarısı metal temelli antineoplastik maddelere olan araştırma ilgisini arttırmıştır. Metal temelli bileşikler çalışılmış ve çoğu umut verici sonuçlar göstermiştir. İlacın dozunun doğru miktarı ve doğru metal ligand bileşimi, dikkate alınması gereken önemli olgulardır. Ligand, metal iyonlarını bağlayan ve iyonun fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştiren organik bir bileşiktir. İnorganik ilaç dizaynının önemli bir özelliği, ligandın bir organizmada, fonksiyonel olarak uygun doz miktarında ne kadar kullanıldığıdır. Potansiyel ilacın olumlu fizyolojik yanıtının, biyomolekül ve doku hedefli *in vitro* çalışmalarda gösterilmesi gerekir. Böylece bu ilaçlar tüm kliniksel deneylerde kabul edilebilmektedir (Garza-Ortiz, 2008). Kansere karşı antitümör ajanların etkisi, sağlıklı hücrelere toksisiteyi ve artan direnç, farklı bir etki mekanizması ile yeni ilaçların araştırılmasını gerektirmektedir (Bradley ve ark., 2004).

Hücre ölüm yollarının bozulması tümör gibi çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Programlı hücre ölümü (apoptozis), çok hücreli organizmalarda normal gelişim ve homeostazis (dış ortamın bozucu etkisine rağmen iç ortamın dengesini koruması olayı) için gerekli bir olaydır (Shiraishi ve ark., 2010). Tümör hücreleri kolayca apoptozis geçiremez. Çünkü onlar ölüm sinyal yollarını aktive

etme yeteneğinden yoksundurlar. Böylece etkili bir kanser tedavisi, tümör hücrelerinin apoptozis yolunu aktive etmek içindir (Li ve ark., 2009).

Günümüzde, kanserlerin moleküler biyolojisi ve hücrenin moleküler biyolojisini anlamamız, çoğunlukla kültüre edilmiş kanser hücrelerinin kullanımıyla sağlanmıştır. Şu ana kadar, insan kanserlerinin geniş bir analizini gösteren hücre kültürlerinin binlercesi geliştirilmiştir (Wang, 2003).

Yeni gelişen antikanser metal ilaçlar için uygun analitik teknikler, biyolojik açıdan ilgili moleküller ile ilaçların etkileşimini çalışmak ve onların fizyolojik koşullar altındaki kimyasal dönüşümünü çalışmak için gereklidir (Michalke, 2010).

1.1. Kanser

Kanser, tek bir hücrede meydana gelen, kopyalanan, zarar verici bir hastalıktır (Castellanos ve ark., 2010). Kanserler, bir dizi düzenleyici sistemin bozulmasından dolayı ortaya çıkmaktadır (Voorhoeve, 2010).

Kanser, kontrol edilemeyen çoğalmaya ve anormal hücrelerin yayılmasına neden olmaktadır. Kanser, insan sağlığını ciddi şekilde tehdit etmektedir ve ölüm nedenlerinin ana sebebidir (Feng ve Chien, 2003). Sağlıklı insanlarda hücreler, vücuda gerekli yeni hücreleri oluşturmak için büyür ve bölünür. Genler hücre büyümesini ve bölünmesini düzenler (Garza-Ortiz, 2008). Hücrelerin davranışının değişimi ile anahtar düzenleyici genlerdeki (tümör baskılayıcı genler ve protoonkogenler) mutasyonlar, potansiyel olarak kanserde gelişebilen düzensiz çoğalmaya neden olabilir (Li ve ark., 2010). Kendi belirsiz çoğalmalarını devam ettirmek için etkin tümör hücreleri, apoptozisten kaçmaktadır ve yeni kan damarları meydana getirmektedir ve sonuçta vücudun çeşitli bölgelerine yerleşmek için az miktarda hücreye izin vermektedirler. Normal hücreler çoğalma, ölüm ve haberleşme, tek başına art arda uyaranlarla meydana getirilmektedir (Voorhoeve, 2010). Kanser hücreleri, büyüme ve bölünmeyi düzenleyen kontrol mekanizmasından kaçmaktadır. Böylece bu hücreler tümör denen kümelenmiş bir doku şeklini almaktadır (Garza-Ortiz, 2008). Tüm kanserlerin üçte biri sigaraya, üçte biri beslenme şekline, kalan üçte biri de

çevreye bağlıdır (Aggarwal ve ark., 2009). Gelişmiş ülkelerde en yaygın kanser türleri, akciğer, kolorektal, göğüs, mide ve prostat kanserleridir (Garza-Ortiz, 2008).

Amerikan Kanser Birliği ve Uluslararası Kansere Karşı Birliğinden gelen son haberlere göre son yıllarda on iki milyon kanser vakası teşhis edilmiştir. Bu sayının 2030'a kadar ikiye katlanacağı beklenmektedir (on yedi milyonu ölü yirmi yedi milyon vaka). Bu alandaki büyük gelişmelere rağmen, kanser hastalığı tüm hastalıklar içinde büyük orana sahiptir. Kanser ölüm oranı, son elli yılda önemli derecede artış göstermemiştir. Aynı süre zarfında yapılan yoğun çalışmalar, kanserin hayat biçiminde temel değişimler gerektiren, önlenabilir bir hastalık olduğunu ortaya koymuştur. Her yıl yaklaşık yirmi milyar dolar kanser tedavisi için harcanmaktadır (Aggarwal ve ark., 2009). Tümör hücrelerinin biyolojisi anlaşılmış olmasına rağmen, çoğu kanserin tedavisi 40 yıldır önemli derecede değişmemiştir ve ölümden erken teşhis ile sağlanmıştır (Castellanos ve ark., 2010).

1.1.1. Kanser ve genetiği

Anöploidi diye adlandırılan, hücre tarafından kendine özgü kromozomların kaybı ya da kazancı, çoğu tümörün özelliğidir. Bugün tüm kanserlerin, DNA'daki genetik değişime bağlı olduğu açıklanmaktadır. Protoonkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarıcı genlerde problemler oluştuğunda, inversiyonlar, amflikasyonlar, kromozomal translokasyonlar ve delesyonlar şeklinde değişimler meydana gelmektedir. Genetik değişkenliğin bu şeklinin, tam olarak tümör gelişiminden sorumlu olup olmadığı tartışmalıdır. Genetik değişkenlik, kanser hastalarında kemoterapinin sık görülen başarısızlığı ile ilişkilendirilmiştir. Bu değişimler bununla birlikte kanser ve tedavisi için tanı belirleyicileri olarak kullanılabilir. Bu değişimlerin nasıl tetiklendiği tümüyle anlaşılmamaktadır. Ancak bu değişimlerin tetiklenmesinde çeşitli karsinojenlerin rolü bilinmektedir (Aggarwal ve ark., 2009). Kanser genleri diye adlandırılan üç yüz elliden fazla mutant genin, kanser gelişimiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Aggarwal ve ark. 2009; Li ve ark. 2010).

Kanser genlerinin belirlenmesi, çoğunlukla fiziksel ve genetik harita stratejileri kullanma yolu ile olmaktadır. Bununla birlikte bu stratejilerin her biri kanser genlerinin sadece bir alt kümesini belirleyebildiği için, kanser gelişiminde ne kadar kanser geninin yer aldığı sorusuna cevap verilememektedir (Li ve ark., 2010). DNA dizisi ve biyoinformatik teknolojisi, kanser genomunun analizine olanak sağlamaktadır. İnsan genomunun tamamlanması, kanser genomunun sistematik analizlerini meydana getirmek için, gereken genom bilgisini ve dizilim teknolojisini sağlamaktadır (Wooster ve Bachman, 2010).

Son incelemelerde insan kanser genomundaki bir çalışma, daha önce düşünülmüş kanser genlerinden daha fazla genin, kansere neden olduğunu göstermektedir. İnsan genom dizisinin ortaya çıkışı ve kanser genom dizisi, bireysel kanserlerde mutasyonların geniş incelemesini de ortaya çıkarmak için eşsiz bir imkan sağlamaktadır ve böylece bu bilgi kullanılarak tam olarak hedeflenmiş tedaviler gelişmektedir (Li ve ark., 2010). Örneğin; sinyal iletimi, DNA onarımı ve apoptozis gibi çeşitli biyolojik olaylar, tümör oluşumu sürecini açıklamaya yardımcı olmaktadır. Kanserlerin sayısı, bu biyolojik süreçler üzerine yapılan çalışmalar ile analiz edilmiştir (Wooster ve Bachman, 2010).

Mutasyonlar, DNA dizisindeki değişimin (eklenme veya DNA'nın büyük ya da küçük parçalarının delesyonları, DNA'nın yeniden düzenlenmesi, kopya sayısı artışı ve kopya sayısı azalması) birkaç çeşidini içermesine rağmen, somatik mutasyonların çoğu, tek yönlü değişimlerdir. Kanser tek yönlü mutasyonunun ilk kanıtı, normal hücrelerde transforme kanser DNA'sının iki bağımsız deneyinde belirlenmiştir. Transforme edilmiş normal hücreler, *h-ras* geninin 12. kodonunda valine karşı bir glisin değişimine bağlı olarak tek yönde Guanin>Timin değişiminden dolayı kanserli olmaktadır. Bu keşif, kanserle ilişkilendirilmiş genetik mutasyon çalışmalarının artmasıyla meydana getirilmiştir. Timin:Adenin çifti veya Guanin:Sitozin çifti tarafından Sitozin:Guanin çifti değişimi, kolorektal ve göğüs kanseri ile ilişkilendirilmektedir ve kanserlere neden olduğu açıklanabilmektedir (Li ve ark., 2010). Kabul edilmiş kanser genleri p53, Myc, Ras ve pRb, kanserin merkezi noktalarıdır ve belirlenmiş, onaylanmış ilk genler arasındadırlar (Voorhoeve, 2010).

Somatik mutasyonlar, DNA replikasyonunun olamaması ile meydana gelmektedir. Bu durum iki farklı süreç içermektedir. İlk süreçte, mutasyonlar meydana geldiği hücrede çoğalma üstünlüğü sunmaktadır. Bu süreçteki mutasyonlar “drivers” mutasyonlardır. Kanseri genleri olarak ifade edilmektedirler. İkinci süreçte, “passengers” mutasyonlar olmaktadır. “Passengers” ve “drivers” mutasyonları arasındaki farkı anlamak görünme sıklığı ve dağılımıyla ilişkilendirilmektedir (Li ve ark., 2010). Kanseri genomunun sınıflandırılmış bir dizisi, 210 değişik insan kanserinde 1007 somatik mutasyon ortaya çıkarmıştır. Çoğu somatik mutasyonun onkogeneze neden olmayan “passengers” mutasyonları olduğu düşünülmektedir. Fakat 119 gende kansere neden olan “drivers” mutasyonları bulunmuştur. Somatik mutasyon yaygınlığı akciğer kanserinde en fazladır. Bunu, mide, ovaryum, kolorektal, karaciğer, göğüs ve testis kanseri takip etmektedir.

DNA mutasyonlarının, kanseri nedeni olarak bazı bireylerde, kalıtsal olduğu gösterilmiştir. Bazı kanıtlarda, aynı zamanda kalıtsal kanseri riskine neden olabilen epigenetik değişimleri göstermektedir. Çevresel faktörler örneğin beslenme ve yaşam tarzı (sigara, alkol içmek, aflatoksin B1, UV ve bulaşıcı etkenler gibi) epigenetik değişimler ile ilişkilendirilmiştir. Bu epigenetik değişimleri içeren enzimler, aynı zamanda ilaç geliştirmeyi için hedefler olarak kullanılmaktadır. Epigenetik değişiklikler, DNA dizisinden bağımsız gen düzenlenmesidir. Örneğin DNA promotör metilasyonu ve kromatin model değişikliği veya histon modifikasyonları (fosforilasyon ve asetilasyon gibi) kanserde belirgin bir rolü olabilen belirli epigenetik değişikliklerdir (Aggarwal ve ark., 2009).

1.1.2. Kanseri ve tedavisi

Kanseri tedavisinde amaç, iyileştirmek, bazı durumlarda kontrol altına almak ya da olası semptomları (belirtileri) azaltmaktır (Garza-Ortiz, 2008).

Kanseri tedavisinin klasik metodları, mümkün olduğu kadar erken ve etkin olarak tümör hücreleriyle savaşmayı amaçlamaktadır. Hastalığın tedavisinde genelde ilk girişim, tümörlü bölgeye cerrahi yöntem uygulamaktır ve ardından

kemoterapiye devam edilmektedir (Günes ve ark., 2009). Bazen hormon tedavisi ya da biyolojik tedavi kullanılmaktadır. Bazı kanserler, tek tip tedaviye en iyi yanıt vermektedir. Çoğu da kombine tedaviye yanıt vermektedir. Tedavi planı, kanserin tipine ve durumuna bağlıdır.

Kemoterapide en önemli faktör yan etki profilleridir (Garza-Ortiz, 2008). Genelde antikanser ilaçlarının, temel hücresel mekanizmalarının anlaşılması, kanser tedavisinin etkin olması için önkoşuldur (Günes ve ark., 2009).

Günümüzde tıpta kullanılan çoğu kemoterapötik antikanser ilaçlar, kemoterapi sonucu istenilen, tümör hücrelerinin aşırı çoğalma durumunu inhibe etmek ve bunu takiben apoptozisi indüklemek için hücre döngüsü hedefli ajanları içermektedir. Bu kemoterapötik ilaçlar etki modellerine göre alt bölümlere ayrılabilirler.

1. DNA sentezini engelleyen ilaçlar
2. DNA'ya zarar veren ilaçlar
3. Mitotik iğlerin fonksiyonunu durduran ilaçlar (Schmidt ve Bastians, 2007).

1.2. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, biyolojik araştırmalarda canlılar ya bir bütün olarak ya da organ, doku veya hücre gibi yapıları alınarak *in vitro* şartlarda incelenmektedir. Hücre (doku) kültürü yöntemi, hayvan ya da bitkilerin ergin veya embriyonik dokularından izole edilen hücre, doku veya organların gerçek ortamlarına benzer biçimde hazırlanmış steril besi ortamlarında bir süre yaşatılmalarıdır (Ozban, 1988).

Hücre kültürü modelleri, ilaçların ve endojen maddelerin pasif ve aktif taşıma çalışmasında, hücre fizyolojisi ve metabolizmasını belirlemede, protein ekspresyonu, antisens oligonükleotitler ve invitro toksisite testleri gibi çok sayıda amaç için kullanılabilir (Hornof ve ark., 2005).

Hücre kültürü tekniği ilk kez 1911'de Carrel ve Burrows tarafından keşfedilmiştir. Carrel ve Burrows bir cam petride civciv embriyolarından elde ettikleri hücreleri üretmişlerdir. Bu sistemi kullanmak, kendiliğinden dönüşüm geçiren normal kemirgen hayvan hücrelerini üretmek içinde mümkündür. Fakat

insan hücreleri için değildir. HeLa, ilk continuous insan kanser hücre kültürüydü. HeLa hücreleri elli yıldan daha fazla süre önce, genç bir kadının rahminden elde edilen kanser hücreleridir. Bugün hücre kültürü, yeni antikanser ilaçlar keşfetmek için rutin olarak kullanılmaktadır. 1990'dan beri Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) altmış insan kanser hücre hattının bir paneline karşı altmışbinden fazla bileşik yayımlamıştır. Kanser araştırmalarında tüm yayınların hemen hemen %75'i, toplam yüzöniki hücre hattının kullanımına dayanmaktadır (Aggarwal ve ark., 2009).

Hücre kültürü deneyleri, ilaç yüklü nanopartiküllerin *in vivo* ortamdaki etkisini, önceden bildirmeye yardım eden öncü bilgiyi sağlamak için bir ön çalışma olarak da yapılmaktadır. Hücre kültürü deneyleri daha iyi üretilebilirlik sağlamaktadır ve *in vivo* modellere kıyasla çok sayıda örneğin görüntülenmesine izin vermektedir. Çeşitli hücre kültürlerinin ticari uygunluğu, hücre kültürünün başarısını kolaylaştırmaktadır (Feng ve Chien, 2003). Herhangi bir ilacın belli organ veya dokular üzerine zararlı etkileri, kanserojen, mutajen veya teratojen etkilerinin olup olmadığını saptamaya yönelik alternatif testler geliştirilmektedir. Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü kanser araştırmalarında fare kullanımından vazgeçerek, altmış çeşit insan kanser hücre hattı üzerinde bağırsak, akciğer, melanoma, böbrek, beyin ve kan kanseri için haftada üçyüz yeni kimyasal maddenin antikanser etkinliğini araştırabilmekte, hücre kültürlerinden alınan sonuçların daha gerçekçi ve daha spesifik olduğu ifade edilmektedir. AIDS tedavisi ile ilgili ilaç araştırmalarında eskiden immün sistemi çökertilmiş şempanze, maymun, kedi ve fareler kullanılırken, HIV virüsünün hücre kültürlerinde geliştirilmesi üzerine, artık bu tür araştırmalar insan hücre kültürleri üzerinde sürdürölmeye başlanmıştır. Ayrıca hepatit ve herpes gibi virüslere karşı test edilen ilaçlar da hücre kültürleri ile denenebilmektedirler. Epilepsi veya beyin tümörlü hastaların ameliyatlarından elde edilen beyin kesitleri ile *in vitro* koşullarda yeni ilaçların antiepileptik etkileri saptanmaktadır. İnsan sinoviyal membran ve umblikal kord (göbek bağı) hücre kültürleri de, artrit ve diğer enflamasyonlar için etkili olabilecek ilaç araştırmalarında kullanılabilir (Saygı, 2003).

Hücre kültürlerinin kullanım alanları şunlardır;

1. İlaç metabolizmasından sorumlu enzim sisteminin saptanması,
2. İlaç metabolize edici enzim aktivitesini etkileyebilecek faktörlerin saptanması,
3. İlaç metabolitleri ve bu maddelerin toksik etki potansiyellerinin saptanması,
4. İlacın metabolik yıkılma süresinin saptanması,
5. İlaçların birbirleri üzerine olan etkileşim derecesinin saptanması,
6. İlaç metabolizmasında genetik, yaş, çevre ve hastalık faktörlerinin araştırılması,
7. Bireylerin ilaç alerjisi potansiyeline sahip olup olmadığının öngörülmesi.

Bahsedilen ilaç metabolizmasıyla ilgili hususları araştırmada insan karaciğer hücre kültürleri son derece önemli bir kaynaktır.

İnsan hücre kültürlerinin toksisite araştırmalarındaki avantajları:

1. Tür farklılığını ortadan kaldırır,
2. Kimyasal maddelerin muhtemel toksik etki yapacağı düşünülen deri, karaciğer gibi spesifik doku hücreleri üzerinde araştırma yapılmasını sağlar,
3. Toksisite mekanizmalarının hücreler üzerinde aydınlatılmasına imkan verir,
4. Deneyde kullanılan hayvanların acı çekmesi veya ölmesi söz konusu değildir.

Günümüzde ikibinüçyüzden fazla insan ve hayvan hücre kültür modeli mevcuttur. Hücre kültürleri ticari olarak firmalardan sağlanabildiği gibi, araştırmacıların kendi özel hücre kültürlerini gönüllülerden veya cerrahi operasyonlardan çıkacak doku örneklerinden yararlanarak oluşturmaları da mümkündür (Saygı, 2003). Hayvan hücre kültürü tekniği, ilaçların üretimi, teşhisi ve diğer biyolojik aktif ürünlerin üretimi için biyoendüstrinin kilit bir bölümüdür (Plasier ve ark., 1999).

1.3. Toksisite

Tüm ilaçlar, temizlik ve kozmetik maddeleri, pestisitler, besin katkı maddeleri ve sanayide kullanıldığında insanların maruz kalabileceği kimyasal maddeler, kullanıma sunulmadan önce toksik potansiyelleri yönünden değerlendirilmektedirler. Bu maddelerin kullanım amaçları, maruziyet yolları ve süreleri göz önüne alınarak toksisite testleri dizayn edilmektedir. Muhtemel toksik etkiler, *in vivo* koşullarda deney hayvanlarında veya *in vitro* koşullarda hücre

kültürlerinde araştırılmaktadır. Elde edilen test sonuçlarının insanlara uyarlanması çok çeşitli faktörler nedeniyle her zaman mümkün olamamaktadır (Saygı, 2003).

Toksikoloji zehir bilimidir. Zehir ise, canlı organizmada zararlı etki gösteren herhangi bir madde olarak tanımlanabilir. Uygun yol ve dozda alınmayan her madde zehir etkisi yapabilir. Bu etki bir yapı değişikliği şeklinde olabileceği gibi biyokimyasal lezyon şeklinde de olabilir. Ortaya çıkan etki, geri dönüşümlü olabileceği gibi hücre ölümü şeklinde de olabilir.

Canlı hücreler üzerinde kimyasal maddelere bağlı önemli yapı ve fonksiyon değişikliklerinin saptanması ve yorumlanması amacıyla deneysel toksikolojik çalışmalar yapılmaktadır (Saygı, 2003). Toksikite testleri planlanırken ortaya çıkan ürünlerin çözünübilirlik özellikleri ve toksik aktivite kazanıp kazanmadıklarının göz önüne alınması gerekir. Önemli toksik etkileri olan kimyasal maddeler, genellikle biyolojik sistemin sıvı fazında çözünübilir özellik taşırlar. Bu çözünübilirlik, o maddenin hücreler tarafından alınmasını sağlar. Her ne kadar biyolojik sistemlerin sıvı fazının büyük bir kısmını su oluşturursa da, bu sıvı faz içinde protein, yağ veya benzeri materyal ile pek çok inorganik iyonlar da bulunur. Bu nedenle hücre sitoplazmasının yanında proteinler ve lipidler de kimyasal maddelerin taşınmasında önemli rol oynamaktadırlar. Gerçekten de ilaçların çoğu, zayıf organik baz veya asit özelliğinde olup, fizyolojik ortamdaki pH durumuna göre yağda veya suda çözünübilirlik (lipofil, hidrofil) özelliği taşırlar. Lipofil maddelerin biyotransformasyonu sonunda ortaya çıkan ürünler ise, genelde ana moleküle göre daha hidrofil özellik kazanırlar. Benzer metabolik yola sahip hücreler, maruz kaldığı kimyasal maddeden genellikle benzer şekilde etkilenirler. Bir kimyasal maddenin biyolojik etkisinin ortaya çıkabilmesi için, spesifik reseptör alanlarına fizikokimyasal reaksiyonlar ile bağlanabilmesi gerekir. Bu bağlanma özelliği, o maddenin moleküler yapısı ile ilişkilidir. Yapı aktivite ilişkisi diye adlandırılabilen bu kavrama göre kimyasal maddelerin molekülleri üzerindeki küçük değişiklikler biyolojik cevaplarda büyük farklılıklara, veya moleküler benzerliklerin benzer etkiler ortaya çıkarmasına neden olabilir (Saygı, 2003).

Toksikite testleri, sadece kimyasal maddelerin canlı organizmalar üzerindeki zararlı etkilerini açıklamak için yapılmaz. Bu maddelerin toksik

etkilerinin görülmeyeceği doz değerlerini saptamak için de yapılmaktadır. Eğer, uzun süreli madde maruziyetine bağlı toksik etkiler araştırılacak ise, deneyin yapıldığı zaman periyodu içinde de aynı özellikte maddelerin ve koşulların uygulanması gerekir. Beklenen toksik etkinin görülmesine yönelik testlerde, bu etkiyi oluşturduğu bilinen bir kimyasal maddenin, pozitif kontrol grubuna uygulanması ve deneyin sağlıklı işlediğinin test edilmesi gerekir (Saygı, 2003).

1.4. Sitotoksisite ve Yöntemleri

Sitotoksisite, kimyasalların hücreler ve dokular üzerindeki aktivasyon mekanizmasının anlaşılmasında önemli bir faktördür (Putnam ve ark., 2002). Bundan başka, karsinogenez ve inflamasyon (iltihap) dahil birkaç patolojik süreçte önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Zeni ve ark., 2008).

Sitotoksisite analizleri, *in vitro* toksikoloji çalışmalarında yaygın şekilde kullanılmaktadır. LDH (Laktat dehidrogenaz) sızıntı analizi, protein analizi, nötral red ve MTT (3[4,5-dimetiltiyazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolyum bromid) analizi, sitotoksisiteyi göstermek veya toksik maddelere maruz kaldıktan sonra hücre canlılığını göstermek için en yaygın kullanılan analizlerdir (Fotakis ve Timbrell, 2006).

LDH (Laktat dehidrogenaz) sızıntı analizi, ekstraselüler (hücre dışı) ortamda laktat dehidrogenaz aktivitesinin ölçümüne dayanır. Güvenilirlik, hız ve basit değerlendirme bu analizin bazı karakteristik özellikleridir. Kültür medyumunda, LDH kaybı ve onun serbest bırakılması, hücre membranına zarar vermesinden dolayı geri dönüşümsüz hücre ölümünün bir göstergesidir (Fotakis ve Timbrell, 2006).

MTT analizi, toksik maddelere maruz kaldıktan sonra sitotoksisiteyi değerlendirmek için çok sık kullanılan diğer bir hücre canlılığı analizidir. MTT (3[4,5-dimetiltiyazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolyum bromid), mitokondri içinde süksinik asit dehidrogenaz tarafından tetrazolyum halkasının ayrılması ile çözünmez bir mor formazana dönüşen, suda çözünebilen tetrazolyum tuzudur (Ulukaya ve ark., 2008). Formazan ürünü hücre membranından geçirilemez ve böylece o, canlı hücrelerde birikir. MTT analizinin, çeşitli hücre kültürlerinde

geçerliliği test edilmiştir. Daha yeni bir bulguya göre, MTT indirgenmesinin mitokondri dışında, aynı zamanda hücre içinde NADH (nikotinamid adenin dinükleotit) veya NADPH (nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) tarafından da dolaylı ilgisinin olabildiğini göstermektedir. MTT protokolü, Mossman (1983) tarafından tanımlanmış ve analiz duyarlılığını ve tekrarlanabilirliğini geliştirmek için daha fazla değişimi önerilmiştir (Fotakis ve Timbrell, 2006).

Nötral red analizi de hücre canlılığını ölçmek için kullanılmaktadır. Primer hepatosit kültürlerinde ve diğer hücre kültürlerinde sitotoksitenin bir belirleyicisi olarak kullanılmıştır. Bu analiz Borenfreund ve Puerner (1984) tarafından belirlenen protokole dayanır (Fotakis ve Timbrell, 2006). Nötral red, lizozomlarda depolanan ve plazma membranı zarar görmemiş hücreler tarafından alınan doku hücrelerini renklendirici bir boyadır (Schröterova ve ark., 2009).

Son olarak protein analizi, hücre canlılığının dolaylı yoldan bir ölçümüdür. Bu yöntem canlı hücrelerin protein içeriğini ölçer. Protein içeriğinin belirlenmesi, Coomassie protein analiz ayırıcı kullanılan Bradford (1976) methoduna dayanmaktadır (Fotakis ve Timbrell, 2006)

Fotakis ve Timbrell'in yaptığı çalışmalar sonucu bu dört sitotoksitate analizinin duyarlılığı değerlendirilmiştir. Sonuç olarak MTT analizinin, diğer üç analize kıyasla canlılık kaybını belirlemede, daha duyarlı olduğu görülmüştür. Artan inkübasyon süresi, MTT analizi ve MTT ve Nötral red analizi ile daha doğru olarak gözlenen artan toksisite ile sonuçlanmıştır. Fotakis ve Timbrell'in elde ettiği sonuçlara göre, LDH sızıntı analizi ve protein analizi, MTT ve nötral red analizi ile kıyaslandığında daha az duyarlıdır. Fotakis ve Timbrell'in bu çalışmasında LDH sızıntı analizi ve protein analizi ile, ya metalin yüksek konsantrasyonlarında ya da uzun inkübasyon süresine maruz bırakıldıktan sonra toksisite ortaya çıkmıştır. Sitotoksitate analiz çalışması ve test ajanı kullanımına dayanan, farklı sonuçlar verebilen farklı sitotoksitate analizleri rapor edilmiştir.

Sitotoksitate analizleri, tedavi edilen hücreler ve kontrol hücreleri arasındaki anlamlı farkı, istatistiksel olarak göstermektedir. *In vitro* sitotoksitate analizleri, kimyasalların genel ayrımı için ve insandaki toksisitesini önceden belirlemek için kullanılmaktadır (Fotakis ve Timbrell, 2006).

1.5. Apoptozis

Apoptozis, programlı, fizyolojik hücre ölümüdür. Apoptozisin, embriyonik gelişim süresince, doku homeostazisinin korunmasında ve anormal hücrelerin çıkarılmasında önemli bir rolü vardır. Apoptozis birçok gen tarafından yönetilen aktif bir süreçtir. Apoptozis, hücresel bozulmaları ya engeller ya da devam etmesine neden olur (Schutte ve ark., 1998). Apoptozis, karakteristik morfolojiye sahiptir ve biyokimyasal sinyaller ile programlanmış bir hücre ölümüdür (Shemarova, 2010).

Apoptozis ilk kez Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972'de, hücre ölümünün morfolojik belirgin bir şeklini belirlemek için kullanılmıştır. Apoptozis, dokularda hücre popülasyonunu devam ettirmek için homeostatik bir mekanizma gibi ve yaşlanma ve gelişim süresince devam etmektedir (Elmore, 2007).

Apoptozisin artan veya azalan aktivitesi, kanser, otoimmünite, sinir dokusunun bozulumu, hematopoitik (kan hücreleri) bozukluklar ve kısırlık gibi tıbbi hastalıklar ile ilişkilendirilmektedir (Kiechle ve Zhang, 2002).

Apoptozis, normal gelişimde ve onkogeneze anahtar rol oynayan genlerin spesifik bir grubunun ekspresyonuna bağlı aktif bir süreçtir. Çünkü son yıllarda, antikanser ajanların apoptotik hücre ölümünü tetikleyerek biyolojik etkilerinin bir kısmını kullandıkları gösterilmiştir. Tümör hücrelerinde apoptozisin indüklenmesi tedavi edici bir hedef olmuştur (Chan ve ark., 2002). Kanser kemoterapisi için kullanılan ilaç veya ışın tedavisi, bazı hücrelerde DNA zararı ile sonuçlanmaktadır. Bu hücreler, p53 bağımlı mekanizması boyunca apoptotik ölümle ilgili olabilir. Apoptozis, zehirli ajanlar veya hastalık ile zarar verilen hücrelerde veya immun reaksiyon gibi bir savunma mekanizması olarak meydana gelmektedir. Düşük dozlarda sitotoksik antikanser ilaçları, apoptozisi indükleyebilir. Bu aynı uyarılar yüksek dozlarda nekrozise neden olabilir (Elmore, 2007).

Apoptozis ve nekrozis iki temel hücre ölüm tipidir. Apoptozis ve nekrozis, biyokimyasal ve morfolojik olarak tanımlanmaktadır (Kiechle ve Zhang, 2002).

1.5.1. Apoptozisin morfolojisi

Apoptozis, morfolojik değişimler ile tanımlanmaktadır. Bunlar hücre büzülmesi, nüklear fragmentasyon (çekirdek parçalanması) ve kromatin yoğunluğudur (Hakumaki ve Liimatainen, 2005).

Apoptozis süresince meydana gelen çeşitli morfolojik değişimler ışık mikroskobunda ve elektron mikroskobunda belirlenebilir. Elektron mikroskobu, hücre altı düzeydeki değişiklikleri daha iyi belirleyebilmektedir. Hücre büzülmesi ve nükleus büzülmesi (piknoz) ışık mikroskobunda gözlenebilir (Elmore, 2007).

Apoptozis, Yunancadan köken almaktadır. Yunancadaki anlamı bir ağaçtan yaprakların düşmesi ya da dökülmesidir. Morfolojik özellikleri sitoplazmik cepçik, kromatin yoğunlaşması, hücre büzülmesi, nüklear fragmentasyon, hücre yuvarlaklığının kaybı ve hücre büzülmesi olarak gösterilmiştir (Kiechle ve Zhang, 2002). Organel bütünlüğü hala devam etmektedir ve bunların tamamı zarar görmemiş bir plazma membranı içinde sarmalanmıştır. Bu yapılar neoplastik hücreler, parenşimal hücreler veya makrofajlar tarafından sonradan fagosite edilir ve fagolizozomlar içinde parçalara ayrılmaktadırlar (Elmore, 2007). Bu morfolojik değişiklikler, kültürde yetiştirilmiş, fikse edilmiş, boyanmış hücrelerde gözlenebilmektedir (Kiechle ve Zhang, 2002).

1.5.2. Apoptozisin nekrozisten farkı

Rudolf Virchow (1858) dahil birçok araştırmacı apoptozis ve nekrozis arasında ayırım yapmışlardır (Kiechle ve Zhang, 2002). Nekrozis, dışsal etkiler ile hücrelerin ölümüdür. Genelde plazma membranının bozulması ile meydana gelmektedir. Nekrotik hücre, şişkin morfoloji ve plazma membranının parçalanması, doku çevresinde sitoplazmik bileşenlerin görünmesi ile morfolojik değişimler ortaya çıkmaktadır. Oysa apoptozis de hücrenin yuvarlaklığı ve nüklear materyalin yoğunluğu değişmektedir. Kromatin nüklear membran boyunca bir veya birkaç küme halinde bir bütün hale gelmektedir (Formigari ve ark., 2007). Nekrozis, bir dizi aşırı fizikokimyasal baskıların sonucu olarak

tanımlanmaktadır. Örneğin; ısı, ozmotik şok, mekanik baskı, donma, erime, hidrojen peroksinin yüksek konsantrasyonları gibi fizikokimyasal baskılar ile gerçekleşmektedir (Krysko ve ark., 2008)

Nekrozis, kontrol dışı bir hücre ölümüdür. Nekrotik hücre hasarı iki ana mekanizma tarafından yönetilir. Hücrenin enerji tedarikinin engellenmesi ve hücre membranlarına karşı zarar vererek olmaktadır. Temel morfolojik değişimler; hücre şişmesi dahil, sitoplazmik vakuollerin şekillenmesi, endoplazmik retikulum şişmesi, sitoplazmik kabarcık oluşumu, yoğunlaşmış, şişkin veya kabarcıklaşmış mitokondri, ribozomların ayrılması ve dağılması, organel membranların yokolması, şişkin ve kabarmış lizozomlar ve sonuçta hücre zarının yok olması (Elmore, 2007).

1.5.3. Apoptozisin mekanizması

Araştırmalara göre iki ana apoptotik yol vardır (Elmore, 2007). Apoptozis, birbirine benzer iki yol ile başlatılmaktadır. Hücre ölüm reseptörleri ile bağlantılı dışsal yol ve mitokondri ile bağlantılı içsel yol olarak meydana gelmektedir. Her iki yolda da sistein aspartil spesifik kaspazlar, apoptozisin morfolojik ve biyokimyasal değişimleri sonucunda hücresel yapıların bağlanması ile aktive edilmektedir (Galani ve ark., 2010). Biri diğerini etkileyebilmektedir. Aracı T hücresi sitotoksitesisi içeren bir ek yol vardır ve hücrenin ölümü perforin granzim'e (serin esteraz enzimi) bağlıdır. Perforin granzim yolu, ya B granzim ya da A granzim yolu ile apoptozisi indükleyebilir. Dışsal, içsel ve B granzim yolları, aynı noktada ya da aynı işlevsel yolda birleşir. Bu yol kaspaz-3 ile başlatılır ve DNA fragmentasyonu ile hücre iskeletinin ve nüklear proteinlerin bozulması, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik yapıların şekillenmesi, fagositik hücre reseptörlerinin ligandlarının ekspresyonu ve son olarak fagositik hücreler tarafından alınımı ile sonuçlanır. A granzim yolu, kaspazdan bağımsız bir paralel hücre yolu (tek zincir DNA'ya zarar yolu ile) ile aktive edilir (Elmore, 2007).

Kaspazlar, hücre içi sistein proteazlarının bir türüdür. On dört tane kaspaz bulunmaktadır. Apoptozis süresince kaspaz 2, 3, 6, 7, 8, 9 ve 10'nun rol oynadığı gösterilmiştir. Apoptotik kaspazlar, öncü kaspazlar olarak sınıflanmaktadır. Öncü

kaspazlar, proteolitik (proteinleri parçalayıcı) kaspazlar ve efektör (etkileyen) kaspazlardır (Kaufmann ve ark., 2008). Kaspaz-9'un aktive edilmesinden sorumlu olan yapısal bir protein olan Apaf-1 (apoptotik proteaz etkinleştirici faktör-1) apoptotik mekanizma için gereklidir (Adams ve Cory, 2002).

Apoptozis ile ilgili gen ve bu genlerin ürünleri belirlenmiştir. İnsan genomunda yüzün üzerinde apoptotik gen 6 grup içinde rapor edilmiştir. Gruplar; Kaspaz (sistein bağlı proteaz), kaspaz iyileştirici bölge, ölüm bölgesi, ölümü etkileyen bölge, BIR (baculovirus IAP tekrarı) bölgesi ve Bcl-2 benzeri bölgedir (Kiechle ve Zhang, 2002). En fazla hücre ölüm sinyalleri sırayla Bax ve Bak gibi proapoptotik Bcl-2 protein ailesi üyeleridir. Aktive edilirler. Kaspaz aktivasyonunda sitokrom-c görev almaktadır. Hücreler içinde Bax ve Bak aktivasyonunu değerlendirmek için incelenmektedir.

Mitokondriyal dış membran geçirgenliği birçok proapoptotik uyarıcı ile yapılmaktadır. Bcl-2 üyelerinin kontrolü, sitokrom-c gibi mitokondriyal apoptogenik faktörlerin serbest bırakılmasıyla bağlantılıdır (Arnoult, 2008).

Apoptozis genetik olarak bir çeşit uyarıcı tarafından tetiklenmektedir. Apoptozis ile ilgili en iyi kanıtlanmış yollardan birisi, ölüm reseptörlerinin spesifik ligandlarının karşılıklı etkileşimidir. Ölüm reseptörleri, transmembran proteinlerinin bir üyesidir. Transmembran proteinleri, ölüm bölgesi olarak bilinen, korunan bir sitoplazmik bölgeyi içermektedir. Ölüm bölgesi, apoptotik uyarıcıların aktarılmasından sorumludur. Ölüm reseptörleri; tümör nekrozis faktör (TNF) ailesi ve FAS (CD95, Apo-1) gibi proteinler ve tümör nekrozis faktör reseptörünü (TNFR) içermektedir (Rozenfeld-Granot ve ark., 2001). Bu reseptörler sistince zengin bölgeler ve apoptotik sinyalleri ileten iç hücrel bölgeler olarak tanımlanmaktadır (Galani ve ark., 2010).

Apoptozisde, reseptör bağlantılı yolda hücre yüzeyi reseptörüne dış etkenler ile bir ligand bağlanmaktadır (Laken ve Leonard, 2001). Bir ligandın bağlanması, ölüm reseptörünün aktivasyonunu tetiklemektedir. Tetiklendiğinde reseptör, adaptör proteinleri çalıştırmaktadır. Ölüm reseptörlerinin ölüm bölgesi ile adaptör proteinlerin ölüm bölgesi arasında etkileşim olmaktadır. Adaptör proteinler, apoptozis öncü enzimi olan prokaspaz-8'in ölüm uyarıcı bölgesiyle etkileşen ölüm bölgesi içermektedir. Prokaspaz-8 kendiliğinden proteolitik bir

oluşum ile aktifleşmektedir (Galani ve ark., 2010). Reseptörün bağlanması, öncü kaspaz-8'i aktifleştiren sitozolde bir aracı molekülü kuvvetlendirmektedir (Laken ve Leonard, 2001). İç mitokondriyal yol baskın uyarıcıya yanıt olarak etkinleşmektedir. Örneğin; DNA zararına, kemoterapötik ajanlar, UV veya γ ışınları veya yaşamsal uyarıların aksaması (büyüme faktörleri, sitokinler veya hormonlar) neden olmaktadır. İç yol, mitokondriyal membranın uyarılması ile tetiklenmektedir. Bcl-2 ailesi mitokondri içine taşınmaktadır ve mitokondriyal membran geçirgenliğinde değişimler olmaktadır (Galani ve ark., 2010). Bcl-2 ailesi ise apoptozisi düzenleyici faktörlerdir. Antiapoptotik ve proapoptotik üyelere sahip olan Bcl-2 ailesi, antiapoptotik Bcl-2 ile sitokrom-c salınmasını önlerken, proapoptotik Bax, sitokrom-c salınmasına neden olmaktadır. Bcl-2 mitokondriyal membranda bulunabilmektedir. Diğer düzenleyici de inaktif kaspazlar ve bunlara bağlanan proteinlerin apoptozis durdurucu üyeleridir. Son zamanlarda, mitokondriden salınan ve apoptozis inhibitör etkisiyle kaspaz-9'u etkinleştiren ek bir protein olan Smac/DIABLO gösterilmektedir. Alternatif yol olan mitokondriyal yolda, mitokondriden sitokrom-c salınmaktadır. Sitozolde serbest bırakılan sitokrom-c, Apaf-1'e bağlanmaktadır ve sonra prokaspaz-9'u aktive etmektedir (Laken ve Leonard, 2001). Prokaspaz-9, kendiliğinden proteolitik olay ile etkinleşmektedir (Galani ve ark., 2010). Aktif kaspaz-9, Apaf-1 ve sitokrom-c, bir holoenzim (koenzim+apoenzim) kompleksi olarak adlandırılan apoptozomu meydana getirmektedir. Mitokondriden salınan sitokrom-c'yi başlatan sinyal olayları henüz belirlenmemiştir. Reseptör bağlantılı yolda kaspaz-8'in aktive edilmesi, mitokondriyal yol ile de yapılabilmektedir ve kaspaz etkinliğini artırabilmektedir. Aktif kaspaz-8, proapoptotik Bid'e bağlanmaktadır. Bid, mitokondriden sitokrom-c'nin salınmasını ve sonra kaspaz-9'un aktive edilmesini sağlamaktadır. Kaspaz (-8 veya -9) 'un aktive edilmesinden sonra apoptotik yol kaspaz-3 aktive edilmek üzere bir noktada birleşmektedir. Tüm kaspazların aktivasyonu uyarılan hücre tipik apoptotik morfolojiye dönüşmektedir. Kaspaz-3, -6, -7 etkinleşmektedir. Sitotoksik T lenfositler ve doğal öldürücü hücreler iki bağımsız ölüm yolu (Fas ligand ve perforin/granzim sistem) ile hedef hücrelere öldürücü zararı tetiklemektedir. (Galani ve ark., 2010).

Apoptozisin belirgin morfolojisi; hücre yüzeyinde korunmasız bulunan fosfatidilserin, nükleus yoğunluğu, fragmentler ve hücre içeriğidir (Laken ve Leonard, 2001).

1.5.4. Tümör oluşumunda apoptozis

Apoptozis çeşitli gelişimsel oluşumlar süresince ciddi şekilde önemlidir. Anormal hücre ölümü düzenlenmesi kanser gibi hastalıkların önemli bir unsurudur. Kanser, hücrelerin azalması ya da çoğalması ile işlevini yapamayan hücre döngüsünün düzenlenmesinin olduğu yerde gerçekleşen bir örnektir. Aslında kanser oluşumu (karsinogenezis) süresince apoptozisin baskılanması, gelişimde ve bazı kanserlerin oluşum sürecinde merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir. Apoptozisi baskılamak için kullanılan tümör hücrelerinin çok çeşitli moleküler mekanizmaları vardır.

P53 tümör baskılayıcı gen, hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür ve insan tümör oluşumunda en yaygın mutant gendir. P53'ün önemli rolü, tüm insan kanserlerinin %50'sinden fazlasında mutasyona uğraması ile bilinmektedir. P53, DNA hasara uğradığında DNA onarıcı proteinleri aktive edebilir. DNA hasarını tanımda tutulan G₁/S düzenlenmesinde hücre döngüsünü düzenleyebilir ve DNA hasarı onarılamaz olduğu saptanırsa apoptozisi başlatabilir. Bu sistem yanlış işlerse, tümör oluşumu meydana gelebilir. P53 genine zarar verilirse, tümör baskılanması ciddi şekilde azaltılır. P53 geni, radyasyon, çeşitli kimyasallar ve insan papillomavirüsü (HPV) yüzünden zarar görebilmektedir. Bu genin yalnızca bir fonksiyonel kopyasını kalıtsal yolla sahip olan insanlarda, erken yetişkinlikte büyük ihtimalle tümörlerin gelişimi ile özdeşleşen Li-Fraumeni sendromu gelişecektir. ataksiya telangiektazy mutant gen (ATM) de, ATM/p53 sinyal yolu ile tümör oluşumunu içerdiğini göstermiştir. ATM geni bir tümör baskılayıcı gibi bir protein kinazı şifrelemektedir. ATM aktivasyonu, DNA'ya zarar veren iyonlaştırıcı radyasyon yolu ile DNA onarımını uyarılmaktadır ve hücre siklusu ilerleyişini bloke etmektedir. Bu olaylar içinde bir mekanizmada, p53'ün ATM bağımlı fosforilasyonudur (Elmore, 2007).

P53 tümör baskılayıcı proteinlerinin mutasyona uğraması ile fonksiyonel kaybı gözlenmektedir. Çünkü p53, DNA zararı ile ilgili Bcl-2 proteinlerinin transkripsiyonunu aktive ederek apoptozisi düzenlemektedir. Fonksiyonel olmayan p53 tümör gelişimine meyillidir. Diğer antiapoptotik değişimler, proteinlerin Bcl-2 ailesini içeren insan tümörlerinde gözlenmiştir. Örneğin proapoptotik Bax ve Bak'ın fonksiyonel kaybı veya antiapoptotik proteinlerin fazla ekspresyon edilmesidir. B hücre lenfomaların alt tiplerinde, bir immünoglobulin gene bitişik bir gen translokasyonunun bir dizisi olarak Bcl-2 büyük oranda eksprese edilmektedir. Bu translokasyon, fare de kendiliğinden B hücre tümörlerinin oluş sıklığını arttırmaktadır. Bir hipoteze göre, apoptozis direnci tümör gelişimine yardım etmektedir. Dahası ölüm reseptör yollarındaki değişimler aynı zamanda apoptozis direncinde rol oynayabilmektedir. Örneğin Fas reseptörün, normal kolon mukozada ekspresyonu fazladır. Fas'ın yokluğu kanser oluşumuna neden olmaktadır. Örneğin kolon kanserinde Fas'ın yokluğu tespit edilmiştir (Bruin ve Medema, 2008).

1.5.5. Apoptozis belirleme yöntemleri

Apoptozis art arda meydana gelen kompleks sinyaller yolu ile meydana gelmektedir. Bu yolda görevli proteinlerin aktivitesinin değerlendirilmesinde çok fazla olanak vardır. Bu kademelerin düzenleyicilerini, yardımcılarını ve aktivatörlerini açıklığa kavuşturabilmek için çok sayıda apoptozis analizleri, apoptotik hücrelerin hesaplanması ve belirlenmesi için tasarlanmaktadır. Ancak apoptozisin ve nekrozisin çoğu özelliği çakışabilir ve böylece apoptozis ile hücre ölümünü doğrulayan daha ayırt edici analizler önemlidir. Bir analiz, erken apoptotik olayların başlamasını belirleyebilir ve farklı bir analiz bir sonraki olayı hedef alabilir. İkinci analiz apoptozisi doğrulamak için kullanılır ve genelde farklı bir prensibe dayanır. Çok sayıda analiz vardır. Fakat her bir analiz avantajlara ve dezavantajlara sahiptir (Elmore, 2007).

Her bir analiz sisteminde, hücre ölümünün kinetiğini anlamak çok önemlidir. *In vitro* da apoptozise maruz kalan kültür hücreleri sonuç olarak ikinci nekrozise maruz kalacaktır. Herhangi bir sistemde apoptotik hücreler ölebilir ve

oldukça hızlı gözden kaybolabilir. Apoptozisin başlamasından tamamlanıncaya kadar geçen süre birkaç saat kadar çabuktur. Böylece analiz çok erken ya da çok geç yapılırsa yanlış bir negatiflik meydana gelebilir. Dahası apoptozis, organlar, dokular ve kültür içinde spesifik konumlarda veya düşük sıklıkta meydana gelebilir. Hücre ölümünün mekanizması üzerine detaylı bilgi öğrenilmek istenirse, toksin maruziyeti süresi, test bileşiklerinin konsantrasyonu ve analizin bitiş noktasının seçimi önemlidir (Elmore, 2007).

Apoptozisi belirleme yöntemleri şunlardır;

1. Mikroskopik teknikler
2. DNA fragmentasyonu analizi
3. Flow sitometri ve lazer tarayıcı sitometri
4. Gen ekspresyonu analizleri
5. Proteinler ile birlikte apoptozisin ölçümü (Kiechle ve Zhang, 2002).

1.5.5.1. Mikroskopik teknikler

a) Işık mikroskobu ile hüresel özelliklerin saptanması: Hematoksilin ve eozin ile boyanmış hücrelerde, ışık mikroskobu ile çekirdek yoğunluğu ve apoptotik yapılar belirlenebilmektedir. Işık mikroskobu apoptotik hücreleri belirlemede düşük bir yeteneğe sahiptir. Ancak ışık mikroskobu, apoptotik hücreleri, nekrotik hücrelerden ayırmaya yarayan propidyum iyodid ile çekirdeği boyanmış hücreleri büyütebilmektedir. Işık mikroskobunun görme duyarlılığı fluoresan kullanımı ile geliştirilebilmektedir (Huerta ve ark., 2007).

b) Çekirdek morfoloji analizi için fluoresan DNA boyaların kullanımı: Akridin oranj, etidyum bromid, Hoechst 33258 veya YOYO-1, çekirdek boyama veya DNA konsantrasyonunu belirlemek için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Fluoresan mikroskobu veya flow sitometri ile görüntülenmektedir (Kiechle ve Zhang, 2002). DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) gibi DNA'ya özgü fluoresan boyalar ile boyama yapılarak çekirdek morfolojisi belirlenebilmektedir. Çekirdek fragmentasyonu, DAPI boyama kullanılarak analiz edilmektedir. Hoechst 33342 ile boyama apoptozis ile nekrozis arasındaki farkı belirlemek için tercih edilmektedir. Hem DAPI hem de Hoechst 33342, fluoresan

mikroskobu kullanılarak görüntülenmektedir. Hoechst'de bu mikroskopi kullanılarak apoptotik ve nekrotik hücreler ayırtedilebilmektedir (Formigari ve ark., 2007).

Fluoresan mikroskobu kullanılan diğer boyamalar ise Anneksin V ve propidyum iyodid (PI) boyamalarıdır. Propidyum iyodid, hücre ölümünü saptamak için en yaygın kullanılan boyalardan biridir. Aynı zamanda hücre döngüsünü değerlendirmek ve tümör örneklerinde ploidi (kromozom dizisi miktarı) belirlemek için de kullanılmaktadır. Anneksin V ile propidyum iyodid kombinasyonu, membran geçirgenliğindeki farklara dayanarak canlı, apoptotik ve nekrotik hücreler arasındaki ayırımı yapmak için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Sağlam membranlar, PI'yı içeri almamaktadır ve böylece canlı ve erken apoptotik hücreler PI ile boyanamamaktadır. Geç apoptozise veya nekrozise maruz kalan hücreler, hem plazmada hem de çekirdek membranlarının geçirgenliğinde değişikliklere sahiptir. Geç apoptotik hücrelerde por geçirgenliği arttığı ve nekrotik hücrelerde mitokondrinin fonksiyonel bozukluğu ile çekirdek membran bütünlüğünün bozulması sonucu PI içeri bu hücrelerden nüfuz edilmektedir ve DNA içine girmektedir. Çekirdekte kırmızı ışığa meydana gelmektedir. PI aynı zamanda çift sarmal nükleik asitler içine de ilave olmaktadır (Rieger ve ark., 2010).

c) Konfokal lazer mikroskobunun apoptozis saptanmasında kullanımı: Konfokal lazer mikroskobu üç boyutlu görüntünün sağlanmasında uygundur. Fluorokrom ile boyanmış örneklerin konfokal mikroskobisi üç boyutlu görüntülemenin yanı sıra merkez dışı fluoresanının çıkarılmasını da sağlamaktadır. Konfokal lazer mikroskobu, hem tek hücrelerde hem de ince dokularda kullanılmıştır. Konfokal mikroskop, apoptotik yapıların fagositozunu, apoptotik yapılarda hücrenin fragmentasyonunu, DNA çift zincir kırılmalarını, çekirdek DNA içeriği ve büzülmesini görüntüleyebilmektedir. Bir dizi fluoresan boya analizleri ile apoptotik olayları görüntülemektedir. TUNEL analizi, konfokal mikroskopta görüntülenebilmektedir (Zucker ve ark., 1999).

d) Elektron mikroskobunun apoptozisin saptanmasında kullanımı: Nekrozise kıyasla apoptozise özgü morfolojik özellikleri arasındaki farklar, ilk kez elektron mikroskobuyla gözlenmiştir. Erken ve geç apoptozisde morfolojik

farklar da gözlenebilmektedir. Elektron mikroskopisi, apoptozisi belirlemede yüksek derecede hassas ve spesifiktir. Elektron mikroskopisi pahalı ekipman ve özel eğitim gerektirmektedir. Bu yüzden apoptozisi görüntülemek için yaygın bir teknik olarak kullanılamamaktadır. Aynı zamanda zaman kaybıdır ve büyük örnekleri görüntülemesi zordur (Huerta ve ark., 2007).

e) Transmisyon elektron mikroskopunun (TEM) apoptozis saptanmasında kullanımı: TEM apoptozisi belirlemek için en iyisi olarak düşünülmektedir. Çünkü bu, eğer hücre en küçük morfolojik özelliklerini içeriyorsa, bir apoptotik hücrenin sınıflandırılması aksini gösteremez. Bu özellikler; 1) Nükleus elektron yoğunluğu, 2) Nüklear fragmentasyon, 3) Hücre bütünlüğünün kaybolduğu fazda gecikmeye rağmen bozulmamış hücre membranı, 4) Dağılmış sitoplazmik organeller, 5) Büyük net vakuoller, 6) Hücre yüzeyinde cepler.

Apoptotik yapıların fagositozu TEM ile değerlendirilebilir. Dezavantajları maliyetli, zaman kaybına neden ve bir günde küçük bir bölgeyi sadece analiz edebilir. Erken safhada apoptotik hücreleri belirleyememesi de diğer dezavantajdır (Elmore, 2007).

1.5.5.2. DNA fragmentasyon analizi

a) ELISA (Enzim bağlı immunosorbent analiz): DNA fragmentasyonu, monoklonal antidi B-F6 kullanılarak flow sitometri temelli analizler ile belirlenebilmektedir. Aynı ilke ile DNA fragmentlerini saran histon, uygun ELISA kitleri kullanılarak belirlenebilmektedir. ELISA testleri, yapışan hücreler, süspanse kültürdeki hücreler, *ex vivo* elde edilen hücrenin lizatları ve serum, plazma ve yüzen hücre kültürü ile kullanılabilir (Huerta ve ark., 2007).

b) TUNEL analizi: TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin (dUTP) nick end labeling) analizleri, Gavrieli ve arkadaşları tarafından 1992'de tanıtılmıştır. TUNEL analizi apoptozis çalışmalarında en yaygın kullanılan testlerden biri olmuştur. TUNEL, fragmente olmuş DNA'nın 3'-OH sonuna terminal deoksiniükleotidil transferazın spesifik bağlanmasına dayanmaktadır. TUNEL analizleri, kültürde yetiştirilmiş hücrelerde, donmuş doku kesitleri ve formalinle fikse edilmiş parafine gömülmüş doku

kesitleri için kullanılabilir. TUNEL, *in vitro* ve *in situ* apoptozisi kanıtlamak için kabul edilen bir analizdir. Apoptozisi belirlemede kullanılan diğer metotlarla da doğrulanmaktadır (Huerta ve ark., 2007).

c) Tek zincirli DNA için immünohistokimya: Yeni bir teknik, apoptotik hücrelerde ısı denatürasyonu ile meydana gelen tek zincirli DNA'nın büyük esnekliklerinden faydalanmaktadır. Bu tekniğin adı APO ssDNA (singlestrand DNA: tek zincirli DNA) tekniğidir. APO ssDNA analizi, DNA'ya zarar veren spesifik antikorlar kullanılmaktadır. Analiz hızlıdır ve kullanımı kolaydır. Nicelik ve nitelik sonuçları vermektedir. Flow sitometri, 96 kuyucuklu plaka okuyucu veya floresan mikroskopu ile analiz edilebilmektedir (Huerta ve ark., 2007).

d) Komet analizi: Komet analizi, zincir kırıkları gibi DNA zararını belirlemede kullanılmaktadır. Bu nedenle bir apoptotik süreçte bir genotoksik belirleyicisi olarak komet analizi, DNA fragmentasyonu sonuçlarını doğrulamada kullanılabilir (Brink ve ark., 2006).

e) DNA difüzyonu: DNA difüzyonu analizinde, bir mikroskop lamı üzerine bir mikrojel ve agaroz ile hücrelerin karışımı elde edilmektedir. Tuz ve deterjan ile gömülmüş hücrelerin parçalanmasını bazik bir işlem takip etmektedir. Hücrelerin ürünleri, tek hücre jel elektroforezi veya komet analizine benzerdir. DNA difüzyon analizinde, düşük moleküler ağırlıklı DNA fragmentlerinin, tüm yöntemlerde agarozda nüfuz edilmesine izin verilmektedir. Spermin ve etanol bir karışım ile çöktirmektedir ve DNA bağlayıcı floresan bir boya ile boyanmaktadır. Apoptotik ve nekrotik DNA fragmentleri ayırtedilebilmektedir (Gichner ve ark., 2005).

f) Jel elektroforezi: Bu teknikte, apoptozisin endonükleaz parça ürünleri görüntülenebilir. Bu analiz, agaroz jel elektroforez ile yürütülen yokedilmiş bir hücrenin homojenitesinden DNA'nın çıkarılmasını içerir. Bu yöntem hassas, kolaydır. Dokular için uygundur ve çok sayıda apoptotik hücreli hücre kültürleri için uygundur. Düşük sayıda apoptotik hücreler için önerilmez. DNA fragmentasyonu apoptozisin en son safhasında meydana gelir, DNA merdivenin yokluğu, erken apoptozise uğrayan hücrelerin potansiyelini ortadan kaldırmaz. Aynı zamanda nekrotik hücrelerde de DNA fragmente olabilir (Elmore, 2007).

1.5.5.3. Flow sitometri ve lazer tarayıcı sitometri analizi

a) Hücre Döngüsü: Hücre döngüsü için sitometrik metotlar üç gruba ayrılmaktadır. İlk metot, hücre popülasyonunu ölçmedir ve DNA içeriği ölçülmektedir. İkincisi, hücre döngüsü süresince ilerleme görüntülenmektedir. Üçüncüsü ise DNA replikasyonu analizine dayanmaktadır. Hücre döngüsü analizi, Hoechst 33258 ve BrdU (5'bromo-2'-deoxyuridine) gibi DNA boyaları kullanımına dayanmaktadır. İmmünohistokimyasal bir yöntemdir. Her üç yöntemde hücreler flow sitometri ile ölçülmektedir. Üçüncü yöntem, lazer tarayıcı sitometri ile ölçülebilmektedir (Darzynkiewicz ve ark., 2006).

b) DNA içeriği: DNA içeriği analizi, hücre döngüsü analizinde sitometrik bir yöntem olarak gruplanmıştır (Darzynkiewicz ve ark., 2006). Flow sitometri kullanılarak sub-G1 DNA (apoptotik çekirdek DNA'sı) içeriği saptanıp apoptozis ölçümü yapılabilmektedir. Kültüre edilmiş hücrelerden izole edilen sağlıklı (G1, S, ve G2 DNA içeriği) çekirdek ile sub-G1 DNA içeren apoptotik çekirdek arasındaki farkların ayırımı yapılmaktadır (Portier ve ark., 2006). Propidyum iyodid, akridinler, kromomisinon, 7-aminoaktinomisin D, Hoechst veya DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) fluorokrom boyalar kullanılmaktadır. Apoptotik hücreleri, nekrotik hücrelerden ayırmada da kullanılabilir. Bu metot tüm hücre tiplerinde uygulanabilmektedir ve hızlıdır (Vermees ve ark., 2000).

c) Fosfatidilserin translokasyonu: Fosfatidilserin (PS) memeli hücre membranlarının bir komponentidir ve apoptozis gibi biyolojik süreçlerde rol oynar (Omori ve ark., 2009). Normal sağlıklı hücrelerde iç membran bölümlerinde korunan PS, apoptotik hücrelerin dış plazma membranında korunmasız olmaktadır. PS'nin korunmasızlığı bu süreçte erken bir olaydır. Yani hücre membran geçirgenliği ve hücre büzülmesi sonraki aşamalardır (Denecker ve ark., 2000). Bu yöntem plazma membranının asimetrisinin kaybını ölçmeye dayanmaktadır. Normal fizyolojik koşullar altında fosfatidilserin (PS) ile hücrel membranlarında fosfolipidlerin asimetrik ayırımı sağlanmaktadır. Ancak erken apoptozis süresince bu membran asimetrisi, membran bütünlüğü olmaksızın kaybedilir. Bu durum, Anneksin V işaretlemesi ile belirlenebilir. Anneksin V, Ca^{+2} 'nin milimolar konsantrasyonlarında PS rezidülerinde yüksek affinite

göstermektedir. Hücrelerin plazma membranının sitoplazmik kıyısında PS'ye bağlanmasından dolayı Anneksin V pozitif olmaktadır. Bu metot kan hücrelerinde apoptozisin ölçülmesi ile geliştirilmiştir. Yapışan tümör hücre kültürlerinde apoptozisi ölçmek için uygun olduğu gösterilmiştir. Görüntülenmesi konfokal tarayıcı lazer mikroskop ve flow sitometri ile yapılabilmektedir (Schutte ve ark., 1998).

d) İç mitokondriyal transmembran potansiyeli: İç mitokondriyal membran potansiyeli, apoptozisde mitokondriyal transmembran potansiyelinin geçiş yeri olarak bilinmektedir. Bu potansiyel apoptozisde erken ve temel bir olaydır. Mitokondriyal transmembran potansiyeli protonlarının ve iç mitokondriyal membranın her iki kenarındaki diğer iyonların asimetric bozulması ile sonuçlanmaktadır. İç mitokondriyal membranın iç kenarı negatif olarak yüklenmektedir. Sonuç olarak katyonik lipofilik fluorokromlar (fluoresan boyalar) mitokondriyal matrikse dağılır ve mitokondride toplanır. FCM (flow sitometri metodu) ile farklı markerlar kullanılarak ölçüm yapılabilmektedir. Rodamin 123 (RH123), 3,3'-diheksilokskarbosiyanın iyodid (DIOC₆), 5',6,6',2-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolkarbosiyanın iyodid (JC-1), klorometil-X-rosamin bu yöntemin problemleri olarak kullanılmaktadır. Canlı hücreler bu problemlerin varlığında bekletildiğinde, problemler mitokondride birikmektedir. Fluorokromun akışı, hücresel fluoresan yoğunluğu ile ölçülmektedir ve transmembran potansiyelini ifade ettiği düşünülmektedir (Vermees ve ark., 2000).

e) Kaspaz aktivitesi: Kaspaz aktivasyonunda, iki analiz uygulanmaktadır. Bunlar kolorimetrik analiz ve fluorometrik analiz yöntemleridir. Kaspaz etkinleşmesini belirlemeye yarayan bir yöntemdir. Kaspaz-3'ün aktif şekli için yüksek affiniteli bir antipodi uygundur. Kaspaz-3, -8, -9'un aktivitelerini ölçen spesifik bir yöntemdir. Fluorometrik analizde, kaspaz-3,-8,-9'un aktivitelerini ölçmeye yöneliktir. İki analiz arasındaki fark, analize yönelik farklı kaspaz inhibitörlerinin belirlenmesine uygun olarak kullanılmalarıdır (Otsuki ve ark., 2003).

1.5.5.4. Gen ekspresyonu analizleri

a) RT-PCR (revers transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi: mRNA ekspresyonunun analizi için kullanılmaktadır. Çok hızlı ve ucuzdur. Sadece bir ya da birkaç genin analizini gerektiren durumlarda kullanılabilir (Sandvik ve ark., 2006). Kültüre edilmiş doku veya hücrelerden RNA izole edilmektedir. İzole edilen RNA, genomik DNA içermektedir. Genomik DNA jel üzerinde yürütülerek işlem yapılmaktadır (Otsuki ve ark., 2003).

b) Northern blot: Northern blot yöntemi, güvenilir bir yöntem olup, spesifik mRNA'ların miktarını ölçmek için yüksek standartlarda olduğu düşünülmektedir. Ancak zaman kaybıdır ve çok miktarda RNA gerektirmektedir. Bu nedenle rutin tıbbi kullanım için uygun değildir. Bu yöntem RT-PCR yöntemi ile tamamlayıcı bir hal almaktadır (Sandvik ve ark., 2006).

c) İmmünohistokimya: İmmünohistokimya, proteinlerin ekspresyonu ve dokulardaki yerleşimi hakkında bilgiler sağlamaktadır. Bu yöntem CD (cluster differentiation: farklılaşmış yığılım molekülleri) markerlar gibi antikorlar kullanılarak yapılmaktadır. Antikorlar hücrelere bağlanarak immunofluoresan boyalar ile belirlenmektedir. Flow sitometri ile takip edilmektedir. Genomdaki protein ekspresyonu sistemli olarak tanımlanabilmektedir (Warford ve ark., 2007).

1.5.5.5. Proteinler ile birlikte apoptozisin ölçümü

a) ELISA: Bush ve arkadaşlarının (1997) geliştirdiği yöntemle göre ELISA yönteminde protein örnekleri, 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile muamele edilip, protein-DNPH birleşimine karşı üretilmiş bir antikor ile araştırılmadan önce bir ELISA plakasının kuyucuklarında yüzeye tutturulmaktadır. Antikori, protein miktarının ölçümü için streptavidin-biotinylated horseradish ile tepkimeye sokulmaktadır. Düşük miktara sahip proteinleri içeren örnekler yoğunlaştırılmaktadır (Alamdari ve ark., 2005).

b) Western blot: Western blot yöntemi, çok uygun ve yaygın olarak kullanılan immünokimyasal bir tekniktir. Western blot yöntemi özellikle protein miktarını belirlemektedir. Tek başına Bcl-X_L (antiapoptotik) veya Bcl-X_S gibi

proteinlerin miktarını ayırtedemeyebilmektedir. Bu nedenle immünohistokimya ile kombine edilerek kullanılması tavsiye edilmektedir (Otsuki ve ark., 2003).

c) Elektroforetik değişkenliği değişimi analizi: Elektroforetik değişkenliği değişimi analizi (EMSA), DNA bağlanma proteinlerini saptamak için kullanılan bir yöntemdir. Transkripsiyon faktörlerini belirlemede ve DNA'ya spesifik bağlanan protein dizilerini belirlemede kullanılmaktadır. Dört temel protokole sahiptir. İlki, hücrelerden proteinlerin izolasyonu, ikincisi DNA probunun radyo işaretlenmesi ve yapımı, üçüncüsü, izole edilmiş proteinler ve DNA proplar, DNA prob ile proteinlerin bağlanmasını sağlayan EMSA bağlayan tampon ile bekletilmektedir. Son olarak DNA-protein kompleksi, sadece DNA probunun parçalanmasına neden olan, denatüre olmayan bir poliakrilamid jel üzerine yüklenir ve yürütölmektedir (Holden ve Tacon, 2010).

1.6. Çalışmalarda Kullanılan Hücrenin Özellikleri

1.6.1. 5RP7 hücreleri

Bilimsel adı *Rattus norvegicus* olan, bir fare embriyo dokusundan elde edilen fibroblast hücrelerine benzeyen morfolojiye sahip hücrelerdir. *H-ras* onkogeni transforme edilmiş bu fibroblastların yaşam uzunluğu sınırsızdır. Bu hücreleri sınıflandırırsak transforme edilmiş hücrelerdir. Bu hücreler, saklandığı Takeda hücre bankasında T. Kanamaru tarafından stoklanmıştır. Japanese Cancer Research Resource Cell Bank (JCRB) hücreyi almış ve stoklamıştır. 5RP7 hücreleri Institute of Fermentation Osaka (Japonya) dan satın alınmıştır (Garbisa ve ark., 1987).

1.6.1.1. Fibroblastların kanser ile bağıntısı

Uzun yıllardır kötü huylu tümörler, kendine özgü aşırı hücre bölünmesi (hiperproliferative) kazanmış transforme hücreleri meydana getirilerek incelenmiştir. Bununla birlikte tümörler, sadece tümör hücreleri ile değil aynı zamanda tümörle ilgili bağ doku hücrelerinin ve tümör mikro ortamının direncini

arttıran tüm sitokinez ve kemokinez matriks bileşenlerini içeren bir ekstraselüler ortamın, kompleks organ kopyasıdır. Fibroblastlar, tümör stromalarının önemli bir bileşenidir. Sınırlı fibroblastlar, benzer fenotipe sahip çok sayıda stromal hücreler içerir.

Fibroblastik hücre tipleri, çeşitli şekillerde reaktif fibroblastlar, miyofibroblastlar veya kanserle ilgili fibroblastlar olarak bilinir. Bu hücreler hastalık teşhisinde markerlar gibi davranma yeteneği yüzünden önemi artmıştır. Böylece tümör gelişimini düzenleyen önemli hücresel ve/veya moleküler olayların aydınlatılması, tedavi için potansiyel şekilde ilgi uyandıran hedefleri gösteren savlar olarak önemlidir (Franco ve ark., 2010).

1.6.1.2. *H-ras* onkogeni

H-ras onkogeni, tümör gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Tümörler, hücre proliferasyonu, anjiogenez gibi mekanizmaları düzenleyen kompleks konakçı tümör etkileşimleri arasında devam ve tespit ettirilmektedir. Konakçı tümör etkileşimlerinin bazıları, onkogenler ve tümör baskılayıcı genler tarafından düzenlenmektedir. Onkogenler, tümöre karşı normal hücre transformasyonunda temel bir rol oynamaktadır.

Son çalışmalar katı tümörlerin, hem oluşumunu hem de onarımını sağlayan *H-ras* gibi spesifik onkogenleri göstermiştir. Protoonkogenlerin ras ailesinin, hücre çekirdeğine ekstraselüler sinyallerin aktarımında fonksiyonu olduğu rapor edilmiştir. *H-ras*'ın, tümör damar gelişiminde gerekli VEGF'in (vasküler endotelial büyüme faktörü) ekspresyonunu düzenlemenin yanı sıra uyarılmasını da yaptığı gösterilmiştir.

Kanser için bir tedavi şekli olarak onkogen hedefler, kanser araştırmasının oldukça yeni ve ilgi çeken bir alanıdır. Kanser için tedavi olarak *H-ras* onkogenlerinin kullanımının rapor edildiği literatürdeki çalışmalar, birkaç tanedir (Perkins ve ark., 2003).

1.7. Çalışmalarda Kullanılan Test Maddeleri

1.7.1. Altın ve platinden türevlenen bileşiklerin kanser tedavisinde kullanımı

Farmasötikal (eczacılığa ait) ajanların en büyük kısmını metal bileşikleri içermektedir. Kullanım alanları ise hızla belirlenmektedir (Valentini ve ark., 2006).

Metaller binlerce yıldır çeşitli şekillerde tıbbi alanda ilaç olarak ve çeşitli kanser tedavilerinde kullanılmaktadır. Metal bileşikler eski ilaç kılavuzlarında doğal maddelerden yapılmış ilaçlarla aynı kategoride görülürler. Onların sınırlı duyarlılıkları ve toksisitelerinden dolayı uzun bir süre ihmal edilmişlerdir (Alama ve ark., 2009). Metal türevleri içinde kanser tedavisinde genelde platin bileşikleri kullanılmaktadır. Platin üzerine araştırmaların olması, ilaç olarak kullanımını büyük ölçüde arttırmıştır. Tarihsel olarak platin türleşmesi, özellikle platin temelli otokatalizatörün tanıtımından sonra, ilk olarak bu yüksek metalin çevresel akümüasyonu ile ilgili olarak gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, yakın zamanda platin türleşmesi biyolojik ve tıbbi uygulamalarda genişletilmiştir. Çünkü platin alerjenik potansiyele ve çok fazla öneme sahiptir. Platin, çoğu antikanser ilaçlar içinde anahtar bir metaldir (Michalke, 2010). Amerika'da kadınlar arasında en yaygın dördüncü ölüm nedeni olarak görülen epiteliyal ovaryum kanserinde platin bileşikleri kullanılmaktadır. Diğer önemli ve en eski metal türevi olan altın, en fazla araştırılan metal komplekslerinden biridir (Lange ve ark., 2008).

Platin komplekslerinin şimdilerde kabul gören etki mekanizması, DNA polimeraz sürecinin durdurulması (inhibisyonu) ve DNA yapısında kırılmalara öncü olan DNA koordinasyonu ile tedavi edici etkisinin ortaya çıkmasıdır. Fakat doz sınırlayıcı yan etkileri, nefrotoksisite (böbrek hücrelerinin yıkımı ya da zarar görmesi) dahil platin bileşiklerinin bazılarına karşı direnç gösterilmesi hala temel bir problemdir. Çeşitli tümör tiplerinin ölüm oranları, platinin yüksek oranda kullanımıyla önemli ölçüde azaltılabilir.

1960'da Roberts platin komplekslerinin hücre bölünmesini inhibe ettiğini keşfetmiş ve ilk kez Rosenberg tarafından 1965'de yayımlanmıştır. Bu zamanda platin içeren çoğu bileşik, etkin olduğunu veya en azından antikanser özelliklere umut verici olduğunu göstermiştir (Michalke, 2010).

Metal komplekslerin, DNA'ya kovalent ve kovalent olmayan bağlar ile bağlandıkları bilinmektedir. Cisplatin bilinen en eski örnektir. Adenin ve guanin ya da iki guanin çiftinin N7 pozisyonuna göre Pt atomunun birleşmesi ile DNA'ya bağlanmaktadır. Metal kompleksleri ve DNA arasındaki kovalent olmayan etkileşimler; hidrojen bağı, elektrostatik bağ ve araya eklenmeyi içermektedir. DNA-metal araya ekleme üzerine ilk çalışmalar, square planar Pt(II) komplekslerinin kullanımı ile başlamıştır ve sonra aromatik dimen ligandlar içeren oktahedral metal kompleksler ile genişletilmiştir. Çünkü araya eklenme iki nükleotid baz birimi arasına bir planar aromatik molekülün girmesini içermektedir (Pucci ve ark., 2006).

Roberts ve Pascoe ilk kez platin ve DNA etkileşimini göstermiştir. Bunun dışında sadece cisplatin değil yukarıda sözü edilen tüm metal komplekslerin tedavi edici etkileri içinde kabul gören bir görüştür. Bu platin türleri, 35-40° ile DNA yapısında kırılmaya neden olan DNA'ya karşı bir koordinasyona uğrar. Son olarak, DNA polimeraz sürecinin durdurulmasının bir sonucu olarak, kanser hücrelerinde apoptozis/nekrozis indüklenir. Platin, DNA ve yoğun şekilde karakterize edilmiş oligonükleotidleri yaklaştırır. Öncelikli DNA hedefi, platin kompleksi ve DNA arasında şekillenen intrastrand yapıların olduğu yerdeki guanin rezidüleri olarak teşhis edilir. DNA'nın maruz kaldığı platin temelli ilaçların etkisi, büyük oranda onların hidrolizasyon ürünlerini üretme yeteneklerine ve sülfür içeren aminoasitler ya da peptidler ya da serum proteinlerine bağlanarak onların inaktive edilmesine bağlıdır. Platin-protein kompleksinin ilaç etkisinde tam olarak rolü, henüz açıklığa kavuşmamıştır. Bazı raporlar, cisplatinin proteinlere bağlanarak ilacın yan etkilerinin çoğuna neden olabileceğini varsaymıştır. Ne yazık ki platin temelli ilaçların her biri sınırlı sayıda tümöre karşı kemoterapötik etkiye sahiptir (Michalke, 2010). Hayvanlarda antitümör aktivitesi için platin bileşiklerinin test edilmesi ile kısa sürede aynı sonuçlar elde edilmiştir. Trans izomerler aktif değilken, cis izomerler aktiftir.

Cis-DDP'nin (Cisplatin), özellikle büyük oranda hayvan tümörlerine karşı aktivitesi gözlenmiştir (Sherman ve Lippard, 1987).

Altın'ın tıbbi özellikleri, uygarlaşma tarihi boyunca araştırılmıştır. Eski Hint ve Mısır çeşitli tıbbi amaçlar için kullanmıştır. Tedavide en erken kullanımı, Çin'de milattan önce 2500 de çiçek hastalığı, kızamık ve ülserde gerçekleştirilmiştir. Japonlar yiyecek ve içeceklerinde bu maddeyi kullanmışlardır. İnsan sağlığına yararlığı olduğunu düşünerek kullanmışlardır. İyileştirici etkilerinin yanı sıra birkaç toksik yan etkide gözlenmiştir. Eski kimya bilginleri bu soruna çözüm bulmak için içilebilir altın iksiri yapmışlardır. Bu, çeşitli bitkiler ile altın karışımı hazırlanarak yapılmıştır. Her ne kadar eski kimya bilginleri kimya hakkında çok fazla bilgiye sahip olmasalar da bunu yapabilmişlerdir. Altın ve altın kompleksleri, tarihte hastalıklarda geniş bir kullanım alanına sahip olmasına rağmen tıpta rasyonel olarak kullanımı 1920'lerin başlarına gitmektedir. Altın, tıpta kullanılan en eski metallere birisidir. Bu nedenle kansere karşı kullanımında da artış olması şaşırtıcı değildir (Milacic ve Ping Dou, 2009).

Son yıllarda altın (III) bileşikleri, cisplatin tedavisine karşı bir alternatif olarak kullanılmaktadır. Çünkü bunlar yapısal olarak birbirleriyle benzer özellikler gösterir. Altın(III), platin(II) ve tetrakordinat altın (III) ile izoelektroniktir. Cisplatine olduğu gibi yapısal benzerlik göstermektedirler. Altın ilaçlarının onlarca yıldır kullanıldığı düşünülmektedir. Ancak bunların etki mekanizması hala anlaşılamamıştır.

Altın (III) bileşikleri yüksek oranda etkili oldukları için altın (I) bileşikleri kadar geniş kapsamlı araştırılmamıştır (Milacic ve Ping Dou, 2009). Altın bileşiklerinin insan tümör hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi *in vitro* yöntemlerle test edildiğinde cisplatinden daha sitotoksik olduğu gözlenmiştir. Örneğin; Vesna Milacic ve Q. Ping Dou (2009) altın(III) bileşiklerinin sitotoksik ve kansere karşı etkilerini *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda insan göğüs kanseri hücrelerine karşı değerlendirmiş, altın(III) bileşiklerinin tümör proteozom'u için önemli bir hedef olduğunu belirlemişler ve *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda insan göğüs kanseri hücrelerinde apoptozisi indüklediği ile bağlantılı olarak proteozom yapısını da inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir.

Altın (I) bileşiklerinin *in vitro* çalışma yapılarak sitotoksik potansiyeli ve antitümör aktivitesi değerlendirilmiştir. Örneğin; P388 lösemi tümörlerine karşı antitümör aktivite ve sitotoksikite göstermesine rağmen katı tümör modellerine karşı sınırlı derecede aktivite göstermiştir (Milacic ve Ping Dou, 2009). Altın (III) bileşikleri belirli kanser tiplerine karşı platin (II) bileşiklerinden daha fazla umut verici etki göstermiştir. Altın (III) bileşikleri antikanser araştırmalarının artmasını sağlamıştır. Altın (III) bileşiklerinin birkaç insan hücre hattı ile sitotoksik etkileri kıyaslanarak cisplatinden daha etkili olduğu gözlenmiştir (Milacic ve Ping Dou, 2009). Örneğin A2780 ovaryum kanser hücre hattına yönelik, cisplatin dirençli varyantına karşı altın(III) maddesinin çeşitli kompleksleri oluşturulup denenmiş ve bu kompleksler cisplatine kıyasla büyük oranda önemli sitotoksik etkiler göstermişlerdir.

Moleküler çalışmalar sonucunda altın (III) kompleksleri cisplatine göre farklı antikanser mekanizmalarından yararlanmada daha çok önerilebileceği şeklinde onay görmüştür. Bu komplekslerin, cisplatin hassasiyeti ve cisplatin dirençli ovaryum kanser hücrelerine karşı eşit miktarda etkili olduğu görülmüştür (Milacic ve Ping Dou, 2009).

Bruijninx ve Sadler'in yaptığı bir çalışmada hücre ölümünün bir düzenleyicisi olarak teşhis edilen mitokondri hedefli altın antikanser ilaçlarının etkili olanından örnekler verilmiştir. Biri, altın(I)-fosfol kompleksidir. Diğer umut verici grup, altın(III) porfirindir. Bu kompleksler, hepatosellüler (karaciğer ile bağlantılı hücreler) ve nazofarenkse ait kanserlere karşı *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda etki göstermektedir. Bir fonksiyonel proteomik (proteinlerin yapı ve fonksiyonları) çalışma, gerçekten apoptozisi indüklemeye mitokondrinin bağıntısını göstermektedir. Son olarak altın(III) tiyokarbamat, *in vitro* ortamda cisplatinden ve cisplatin dirençli hücrelerde daha sitotoksiktir. Öncü hedefin yine, apoptozisin indüklemesiyle sonuçlanan inhibisyonun proteozom olduğu düşünülmektedir (Bruijninx ve Sadler, 2008).

1.7.2. Cisplatin

Kanser tedavisinde, şu anda en yaygın şekilde kullanılan ilaçlardan birisi cisplatindir (Valentini ve ark., 2006). 1965’de Rosenberg tarafından tesadüfi keşfedilerek, çoğalmaya karşı etkili aktivitesiyle bir platin kompleksi olan cisplatin belirlenmiştir ve testis kanserinin tedavisinde (1978) başarılı tanıtımının sonrasında yenilenmiş ve geliştirilmiştir (Alama ve ark., 2009). Testis kanserinin %90 ‘nından daha fazlasının tedavisinden sorumludur ve diğer kanser türlerinden ovaryum, beyin, idrar kesesi, rahim, melanoma ve lenf kanseri gibi hastalıklarda da önemli rol oynar (Marzano ve ark., 2002; Milacic ve Ping Dou., 2009).

Cisplatinin en son gelişmelerine dair görüş, onun etki mekanizmasına, tanınmasında etkili faktörlere, platin zararının onarımına ve platin antikanser ajanların yeni sınıflamalarına dayanmaktadır (McGowan, 2005). Temel metal ilaçların, özellikle de antitümör ajan olarak organometalik bileşiklerin gelişmesine yardım etmiştir (Alama ve ark., 2009). Metaller, uzun süredir, deneylerde ilaç amaçlı kullanılmış olmasına rağmen, cisplatinin keşfi ile dönüm noktası olmuş, tam olarak öneminin farkına varılıp araştırılmıştır. Bugüne dek, bu prototipik (ilk örnek) antikanser ilaç, tıbbi kullanımda en etkili kemoterapötik ajanlardan birisi olarak gösterilmektedir. Tümörler erken teşhis edilirse, hemen hemen %100 oranında etkili bir tedavi başarılmaktadır. Ancak nörotoksisite, hepatoksisite ve nefrotoksisite gibi doz sınırlayıcı yan etkilere sahiptir. Bunun dışında ikinci problemde bu maddeye karşı, doğal yani kendiliğinden meydana gelen direnç gösterilmesidir. Bu problemler aynı zamanda farklı ilaç hedefleri koymak ve farklı metaller üzerine dayanan alternatif stratejiler geliştirmek için kimyagerleri teşvik etmiştir. Klasik kemoterapide, antikanser ajanlar sonuç olarak hücre ölümünü tetikleyen lezyonlar oluşturmak için, cisplatin paradigma dizisine göre doğrudan DNA hedeflenmektedir (Bruijninx ve Sadler, 2008).

1.7.2.1. Cisplatinin etki mekanizması

Antikanser ilacı cisplatinin etkileşim gösterdiği ve onun asıl hedefi olan DNA, yaygın olarak 40 yılı aşkındır yoğun bir araştırma konusu olmuştur.

DNA'ya bağlanan ilaçlar, DNA ile olan bağlantısına göre sınıflandırılabilir: Koordine bağlanan ajanlar, eldiven şeklinde bağlanma (groove-binder), eklentisel ve daha çok da son zamanlarda fosfodiester omurgaya bağlanmasıdır. Koordine olmayan etkileşimler, elektrostatik etkileşimler, şekil ve boyutsallığa dayanan moleküler tanıma ve hidrojen bağına dayanır.

Bugüne kadar klinikte kullanılan DNA hedefli metal içeren ilaçlar, sadece platin temelli ilaçlardır ve bunların koordineli bağlanma sırasında ilk olarak nükleik asit ile etkileşimde olduğuna inanılır. Cisplatin ve platin temelli ilaçların başarısına rağmen, hedef yine de daha iyi yaşam sunan yeni, yararlı metalden türevlenmiş ilaçlar elde edebilmektedir. Örneğin; tıbbi maliyeti düşük ve ağır yan etkilerini azaltmaya yardımcı ağızdan alınabilen ilaçlar gibi. Buna ek olarak araştırma, en yüksek etkili ilaçlar, başka bir ifadeyle çoğu tümörde doğal bulunan ya da sonradan kazanılmış cisplatin direncinin üstesinden gelebilen, hedef DNA ile çeşitli etkileşimlerde bulunabilen ve şu anki kemoterapiye karşı duyarsız tümörlere karşı aktif olan ilaçların üzerine yoğunlaşmaktadır (Pizarro ve Sadler, 2009).

Cisplatin ilk kez Genoa Üniversitesinde kimya profesörü Michele Peyrone tarafından yapılmıştır (Alama ve ark., 2009). Cisplatinin DNA ile etkileşiminden kansere karşı etkisi ortaya konulmuştur ve böylece programlanmış hücre ölümünü (apoptozis) tetiklemesi, transkripsiyon ve replikasyonu engellemesi ile etki gösterdiği belirlenmiştir. Cisplatinin DNA ile etkileşimi çalışılmıştır ve bu şimdi Pt-GG çapraz bağı olarak iyi bilinir ve cisplatin toksisitesine sebep olan ciddi yapısal bozulmadır (Milacic ve Ping Dou, 2009). Cisplatin, alkilleştirici ajanlara benzer DNA'ya zarar vererek en aktif antikanser ajanları arasında yer alır (Alama ve ark., 2009).

Kansere karşı güçlü bir etkisi olan cisplatin, DNA modifiye edici bir ajan olarak bilinir. Kemoterapide tedavi edici bir ajan olarak çok kullanılmasına rağmen, cisplatin, nefrotoksitesi, ototoksitesi ve alerji gibi çok ciddi yan etkilere sahiptir (Budzisz ve ark., 2004). Cisplatinin toksik yan etkilerinin ligand hasarıyla bağlantılı olduğu ortaya çıkarılmıştır (Milacic ve Ping Dou, 2009).

Cisplatin, idrar yolları tümörleri gibi insan katı tümörlerinin tedavisinde en etkili kanser ilaçlarından birisidir. Cisplatinin işlevsel etkisi, ilaca karşı olan

dirençlilik ve önemli yan etkilerinden dolayı oldukça sınırlıdır. Gerçekte bazı tümörler cisplatine karşı kendine özgü direnç gösterirken, diğerleri birkaç dizi tedaviden sonra, sonradan kazanılmış bir direnç gösterir. Toksik etkisi az olan fakat aynı zamanda tesirli cisplatin analogları elde edilmeye çalışılmış ve çok sayıda platin bileşikleri hazırlanmıştır (Miernicka ve ark., 2008).

1.7.2.2. Cisplatin analogları

Cisplatinin yapısal analogları, cisplatine kıyasla tedavi edici bir etki göstermemiştir. Büyük olasılıkla tüm cisplatin bileşikleri benzer DNA bağlanma yolları ve aynı zamanda benzer biyolojik sonuçlar gösterir. Bu sonuçlardaki bir benzerlikte yapısal birlikler olarak kullanılabilen yeni maddelerin belirlenmesi için kullanılabilir. Çünkü cisplatinin yapısal analoglarının DNA'ya bağlanma şekilleri oldukça farklı olabilir (Miernicka ve ark., 2008). Cisplatin hücre içerisine girerek DNA ile zincir içi ve zincirler arası köprüler kurarak kovalent bağlar yapar (Gazi ve Tapul, 2006).

Hücresinin, cisplatine ve analoglarına karşı olan direnci DNA'nın onarılması esnasında hücre yüzeyinde reseptörlerin artmasına bağlıdır. Bu sorunun üstesinden gelmek için yeni Pt(II) (tiyoplatin ve pikoplamin gibi) ve Pt(IV) (satraplatin ve ethakraplatin) bileşikleri geliştirilmiştir. Son yıllarda antikanser aktivitesi ve düşük toksik yan etkileri gösterebilen Pt(II) ve Pt(IV) bileşikleri sentezlenmiştir. Yapılan bir çalışmada pikoplaminin akciğer kanser hücrelerinde bu biyomoleküllerin reaktivitesini azalttığı gösterilmiştir (Alama ve ark., 2009).

Platin(IV) öncü ilaçlar, cisplatin ve onun analogları ile birlikte, bazı problemlerin üstesinden gelmek için kullanılabilir. Platin(IV)'ün yüksek kinetik durgunluğu, ilaç stabilitesini ortaya çıkaran, onların platin(II) analoglarına bağlıdır (Bruijninx ve Sadler, 2008). Dinükleer ve polinükleer platin bileşiklerine ayrıcalıklı önem verilmiştir. Antitümör aktiviteli transplatin bileşiklerde aynı zamanda incelenmiştir (McGowan, 2005).

Cis-diamineplatin (II) türleri sitotoksik aktiviteye sahip bilinirken, trans-diamineplatin (II) türleri sitotoksik aktiviteye sahip değildir. İki izomerin arasında

antitümör aktivitesel farkı, onların iki yarı değişken klorid veya karboksilat ligandlarının arasında 180° açı olmasından dolayı 1,2-GpG iç çapraz bağlanmaların şekillenmesine karşı trans izomerin yetersizliğine bağlıdır (Michalke, 2010).

Cis-[PtCl₂ (DMSO)L] genel formüllü birkaç yeni platin(II) kompleksi, cisplatin'e kıyasla daha yüksek veya benzer etki göstermiş bir Schiff modeli ya da hidrazondur (McGowan, 2005).

Benzoylpirol-platin(II) kompleksi, Jurkat (lenf hücresi) hücre ölümünü tetiklemiştir (McGowan, 2005).

L-alanin ve L-fenilalanin ile bağlantı içeren yeni platin(II) kompleksi insan rahim kanseri HeLa ve lösemi HL-60 hücre hatlarında sitotoksik aktivite göstermiştir (McGowan, 2005).

Bir seri siyanoksim ligandları ve onların platin(II) kompleksleri HeLa hücre hatları kullanılarak *in vitro* ortamda test edilmiştir ve cisplatin ile aynı koşullarda aktivitesi kıyaslandığında umut vericidir (McGowan, 2005).

Amino dikarboksilik asit içeren platin(II) kompleksi, cisplatin ve karboplatine duyarlı olmayan insan mide kanser hücre hatlarında mükemmel *in vitro* aktivite göstermiştir (McGowan, 2005).

Yaklaşık 3000 platin kompleksi *in vitro* ve *in vivo* ortamda test edilmiştir. Bunlardan birkaçı kemoterapik özellikler göstermiştir. Bunlar arasında karboplatin ve oksaliplatin iyi bilinmektedir. (Marzano ve ark., 2002).

Platin (II) bileşiklerinden karboplatin, oksaliplatin, nedaplatin ve lobaplatinin tümörlerde aynı oranda aktif olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Alama ve ark., 2009).

Şu ana kadar 40'a yakın bileşik kliniksel deneylerde araştırılmış ve bunlardan sadece karboplatin ve oksaliplatin yazılış sırasına göre biri 1989 ve diğeri 2003 yıllarında tıbbi kullanımda kabul görmüştür (Alama ve ark., 2009).

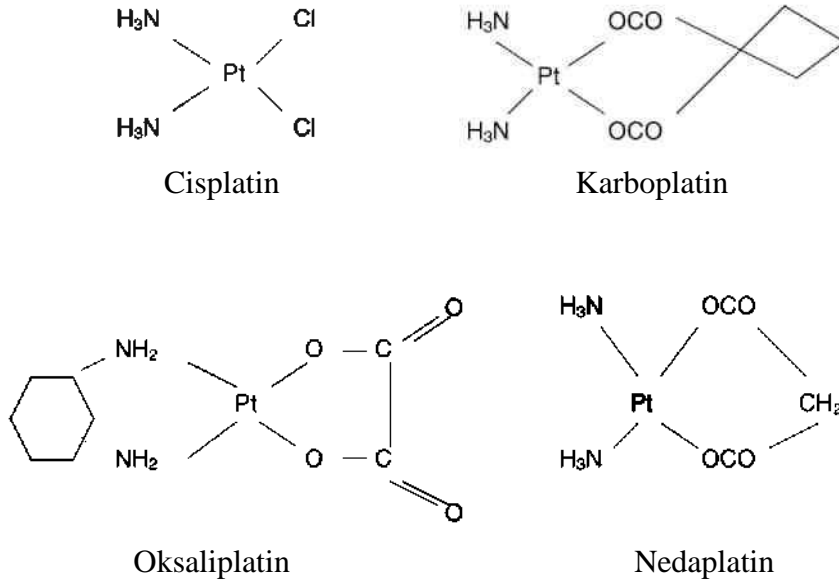
Şu anda, cisplatin, karboplatin, ve oksaliplatin kemoterapide temel metal antikanser ajanlardır. Bu bileşikler gerçekte, geniş bir antineoplastik dizi gösterir, ve diğer kemoterapik ajanlar ile olan kombinasyonu testis, yumurtalık, kolon, serviks ve akciğer kanserinde yüksek oranda etkili olabilir. Oksaliplatin özellikle 5-FU (flourourasil) ile kombinasyonu mide-bağırsak kanserinin tedavisinde

etkilidir (Alama ve ark., 2009). Kanser tedavisinde kombine ilaç kullanımında amaç, tedavinin başarısını arttırmak ve olası ilaç yan etkilerini azaltmaktır (Gazi ve Tapul, 2006).

Karboplatin, *in vivo* ortamda cisplatinden daha iyi tolere edilebilir ve *in vitro* analizlerde oldukça az bir aktiviteye sahip olmasına rağmen cisplatine karşı dayanıklılığı olmayan hastalarda farklı tümör çeşitleri için geçerliliği olan bir ilaçtır (Alama ve ark., 2009).

Araştırmalar, Fransa'da kolorektal kanserin tedavisi için onaylanan oksaliplatin üzerine yoğunlaşmıştır. Oksaliplatin, cisplatin dirençli tümörlerle test edildiğinde, cisplatine karşı olan direnç gözlenmemiş, ancak sadece biraz nefrotoksisite gözlenmiştir (Michalke, 2010). Bir seri alkil içeren oksaliplatin türevleri, oksaliplatin ile kıyaslandığında, kolon kanser hücrelerine karşı üstün antiproliferatif özellikler göstermektedir (McGowan, 2005).

Şu anda Pt(II) kompleksleri cisplatin, karboplatin ve oksaliplatin tıbbi kullanımda dünya çapında onay görmektedir. Bu ilaçlardan başka nedaplatin, lobaplatin ve heptaplatin sadece bölgesel olarak sırasıyla, Japonya, Çin ve Güneykore'de, antikanser ajan olarak kullanılmaktadır (Mi, 2010).



Şekil 1.1. Kullanımda olan platin antitümör ilaçların yapısı (Pasetto ve ark., 2009)

1.7.3. Dipirido [3,2-a:2',3'-c] fenazın

Dipiridofenazın türevleri, genellikle DNA ve DNA arasında hızlı elektron transferinin çalışması için moleküler bir anahtar gibi kullanılmaktadır (Han, 2006; He ve Han, 2006). Dipiridofenazın (dppz), Ru(II) gibi bazı uygun metal iyonları ile koordine edildiğinde, light switchler olarak bilinen çiftlerin varlığında ya da yokluğunda karakteristik bir fluoresans özellikler göstermektedir (Kitamura ve ark., 2003). Dipirido [3,2-a:2',3'-c] fenazın (dppz) gibi moleküller, çok düzlemsel birleşmiş aromatik yapılar ve bidentat koordinasyon yeteneği ve rijiditesi (değişmezlik) gibi önemli özelliklere sahip yapılarla kombine edilir. Onların π kabul özelliği ve nitrojen bölgeler, hidrojen bağlarını destekler ya da DNA içine araya ilave olmasını sağlamaktadır. DPPZ'nin yapısı, H bağ yapan veya koordinasyonu destekleyebilen iki türdeş pirazin sahiptir. Dipiridofenazınların kolay redüksiyonu fenazın parçalarının düşük enerjili π^* yörüngesinden kaynaklanmaktadır. Böylece dipiridofenazında π kabul bölgesi molekülün fenazın kısmına lokalize olmaktadır (Miranda ve ark., 2008).

Benitez ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada dipiridofenazın molekülü planar şeklinden dolayı araya ilave edilerek DNA ile etkileşmeyi başarabildiğini göstermişlerdir. DNA'da bu etkileşimle kırılma, çapraz bağlanma ve helezonlaşma gözlenmektedir (Benitez ve ark., 2009).

Maruyama ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada dipirido [3,2-a:2',3'-c] (dppz) fenazın ligand içeren komplekslerin DNA'ya yüksek bağlanma affinitesine sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu kompleksler diğer komplekslerden daha fazla bağlanma affinitesi göstermektedir. Çünkü dppz ligand, bir DNA sarmalının baz çifti arasına eklenebilir (Maruyama, 2001).

Dipiridofenazın tek başına kanser hücre hatlarına karşı test edilmiştir. Bu bileşiğin sitotoksik aktivitesi, genelde cisplatin ile kıyaslanır. Yaygın şekilde kullanılan bir antikanser ilacıdır. Bununla birlikte bazı hücre hatlarında (A2780R gibi) dppz'nin aktivitesi önemli derecede yüksektir (Szczepanik ve ark., 2009).

1.7.4. Dipirido [3,2-a:2',3'-c] fenazin-platin(II) kompleksi

Aromatik dimin ligandlarını içeren platin(II) komplekslerinin DNA'ya bağlandığı bilinmektedir. Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazin aromatik ligandlardır (Ma ve ark., 2009).

DPPZ ligand (dipirido [3,2-a:2',3'-c] fenazin) içeren oktohedral metal kompleksler özellikle rutenyum(II) ile iyi metal eklenenlerdir. Ancak nükleik asitlerle kovalent bağ yapmaları zordur. Aromatik dimin ligandlarının square-planar platin(II) komplekslerinin, bu probleme karşı olası çare olduğu bildirilmektedir (Che ve ark., 1999). Dipiridofenazin-platin(II) koordinasyon türlerinin potansiyel tedavi edici faydaları kanıtlanmıştır. Önemli kemoterapötik aktiviteler gösterdiği belirlenmiştir (Szczeapanik ve ark., 2009).

1.7.5. Dipirido [3,2-a:2',3'-c] fenazin-altın(III) kompleksi

Yaklaşık son 20 yıldır, potansiyel antikanser ajanı olarak Altın(III) bileşiklerinde yeni bir merak oluşmuştur. Böylece çok sayıda altın(III) hedefleri araştırılmıştır. Altın(III) komplekslerinin çoğu grubu önemli antikanser aktiviteye sahip olabilir. Bunlar, altın(III) koordine kompleksler, altın(III) biyoligand içeren kompleksler ve organometalik altın(III) türleri olarak sınıflandırılabilir (Palanichamy ve Ontko, 2006).

Altın(III), platin(II) ile hem izoelektronik (aynı elektronik dizilime sahip) hem de izosteriktir (square-planar kompleks). Bu durum, cisplatine benzer özellik gösteren altın(III) türevlerini araştırmaya yöneltmiş iki tipik özelliktir (Casas ve ark., 2004). Birkaç altın(III) kompleksinin, ligandlar ile uyumlu etkiler gerçekleştirilmesi ve seçilmiş hücre hatlarında *in vitro* test edildiğinde ilgi uyandıran sitotoksik özellikleri göstermesi nedeniyle yeterince uygun olduğu gösterilmiştir. Örneğin Buckley ve arkadaşları (1996), *Audamp* kompleksinin hem *in vitro* da hem *in vivo* da umut verici antitümör özellikler gösterdiğini rapor etmişlerdir. Henderson ve arkadaşları (1998), hazırlanmış ve karakterize edilmiş bir dizi organik altın(III) komplekslerin önemli antibakteriyal, antitümör ve antifungal özelliklerini göstermiştir. Abbate ve arkadaşları (2000), [AuphenCl₂]Cl

kompleksinin cisplatin direnci ve duyarlılığı gösteren A2780 hücre hattına karşı, yüksek oranda sitotoksikite gösterdiğini gözlemişlerdir. Platin(II) analogları ile altın(III) kompleksleri kıyaslandığında, altın(III) kompleksleri daha reaktiftir (Monlien ve ark., 2002).

Square-planar altın(III) kompleks çalışmaları, antikanser aktivitesinde rolü olan DNA'ya eklenme ile etkileşimini göstermiştir. Polipiridil ligandlar, en ince ayrıntısıyla çok sayıda metal kompleksleri ile çalışılmıştır. Özellikle rutenyum ve platin metalleri ile çalışılmıştır. Bu yeni bileşiklerin biyolojik aktivitesi ve kimyasal özellikleri arasındaki bağıntıyı daha iyi anlamak için bir kanser hücre hattına karşı bu bileşiklerin antitümör aktivitesi rapor edilmiştir. Sonuç olarak yeni altın(III) kompleksleri, kliniksel olarak önemli platin(II) kompleksleri ile izoelektronik ve izoyapısal olduğu için, bu platin(II) ilaç direncinin üstesinden gelebilenler arasında potansiyel adaylar olarak, bu bileşiklerin araştırılmasına en büyük sebeptir (Palanichamy ve Ontko, 2006). Altın(III) ve platin(II) bileşiklerinin arasında yakın yapısal ve kimyasal ilişki, benzer biyolojik özellikler ve uygun sitotoksik ve antitümör özelliklere neden olabilir. Bu iki metalin etki mekanizmasındaki küçük farklar platin direncinin üstesinden gelme ile sonuçlanabilir. Calamai ve arkadaşları (1999), bir square planar altın(III) kompleksinin DNA'ya karşı iyi bağlanma özelliğini göstermişlerdir. DNA'ya bağlanma yeteneği, sitotoksik etki mekanizmasını gösterebilir. Etki mekanizmasında antitümör metal komplekslerinin toksik etkilerinde metal-protein etkileşimleri anahtar rol oynamaktadır. Bu durum, DNA antitümör metal ilaçları için ilkin hedef olduğu örnekleme hızla reddetmekte ve artık geçersiz hale getirmekte olduğu için daha önemli olduğu belirtilmektedir. Özellikle de platin olmayan antikanser metal komplekslerinde bu durum geçerlidir. Çünkü cisplatinin proteinlerle etkileşimi ile bilgilendirme birkaç çalışma ile sınırlıdır. Marcon ve arkadaşları, bir dizi antitümör altın(III) komplekslerini serum albumin proteini ile etkileşimlerini değerlendirmiş ve spesifik etki ile sonuçlandığını görmüşlerdir. Yani ya sistein ya da histidin rezidülerine spesifik zarar verme görüldüğü ve bu bileşiklerin amaca uygun sitotoksik etkilerin sebebi olabileceği gösterilmiştir (Marcon ve ark., 2003).

1.8. Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler Hakkında Bilgiler

1.8.1. Mitokondriyal aktiviteye dayalı MTT testi

MTT yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon bir mitokondriyal enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu, soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem hücrelerin MTT boyasıyla inkübasyonu, reaksiyon ürününün çözünür hale getirilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır (Yaka ve ark., 2006). MTT, mitokondri dışında hem non-mitokondriyal enzimler hem de endozom ve lizozomlar ile ilgilidir (Vellonen ve ark., 2004).

1.8.1.1. MTT testinin amacı

MTT testi indirekt olarak hücre çoğalması ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan, hücre kültürü esasına dayanan bir ilaç duyarlılığı testidir (Doğan ve ark., 2004).

1.8.1.2. Uygulama

MTT testi, sitotoksitenin değerlendirilmesinde, hücre canlılığı ve tümör hücreleri ile antikanser ilaçların araştırılmasında yaygın şekilde kullanılmaktadır. Kanser araştırmalarında kanser hücre çoğalması, yeni kemoterapötik ilaçların sitotoksitesini ölçmek için kullanılmaktadır (Vellonen ve ark., 2004). *In vitro* analizlerde kullanılmaktadır (Young ve ark., 2005).

1.8.1.3. Testin yapılışı

Bu yöntem 96 kuyucuklu plaka şeklinde ilaç formulasyonuna uygundur (Vellonen ve ark., 2004). MTT, mikro kuyucuklardaki hücrelerin medyumuna eklenmektedir (Holst ve Oredsson, 2005). Anahtar adım, hücrelerin MTT boya ile inkübe edilmesidir. MTT için inkübasyon süresi 0,4 den 4 saate kadar değişmektedir (Young ve ark., 2005). MTT canlı hücreler tarafından endositoz yolu ile alınmaktadır ve mitokondriyal nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADH) yolu ile hücre içinde mavi formazan kristallerine dönüştürülür. MTT içeren medyumun uzaklaştırılmasından sonra, hücrelerde formazan kristalleri DMSO (dimetil sülfoksit) gibi ilavelerle çözülmektedir ve yoğunluk görüntülenir (Holst ve Oredsson, 2005). 570 nm dalga boyunda yoğunluğu ölçülür. (Young ve ark., 2005).

1.8.1.4. Yöntemin avantajları

MTT testi hızlıdır, uygulaması oldukça kolaydır, başka hücre tiplerine kolayca uygulanabilir ve geniş bir konsantrasyon aralığında bilgi sağlayabilir (Huveneers-Oorsprong ve ark., 1997).

1.8.2. Floresan boyama ile morfolojik inceleme

4,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), DNA'ya bağlanan bir fluorokromdur (sarı renkli boya). Hücre siklusu analizi için ve nükleer DNA içeriğinin belirlenmesi için kullanılmaktadır. DAPI floresans, çok uzun boyama süresi gerektirir. Fakat eşit miktarda boyandığı belirlenen tek başına kalmış çekirdeklerde yaklaşık 5 dakikada boyama başarılmıştır. Kapuscinski (1995), DAPI'nin ilk kez sezyum gradientlerinde mitokondriyal DNA'nın izolasyonu için kullanıldığını rapor etmiştir. DAPI floresansı adenine bağlanarak ve timince (AT) zengin DNA'ya bağlanarak geliştirilmiştir. Çünkü RNaz parçalaması, DAPI floresansı üstünde etkiye sahip değildir. Çift sarmallı DNA'ya spesifik bağlandığı sanılmaktadır. Sonraki çalışmalar, DNA küçük oyğunun AT'ce

zengin bölgesine DAPI'nin bağlandığını doğrulamıştır. DAPI, mikoplazma kontaminasyonun görüntülenmesi ve DNA içeriğinin flow sitometrik değerlendirmesi içinde kullanılmaktadır (Krishan ve Dandekar, 2005).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Test Maddeleri

Dipiridofenazin, dipiridofenazin-platin(II) kompleksi ve dipiridofenazin-altın(III) kompleksi olan metal türevi maddeler kullanılmıştır. Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'ndan elde edilmiş olup, maddelerin kimyasal formülleri verilmiştir.

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma ve Biological Industries), Fetal Bovine Serum Gold (PAA), Penicilin-Streptomycin (Sigma), Cisplatin (Sigma), Tripsin-EDTA solution (10X, Sigma), %0,5 lik Triton X-100 (Sigma), Sodyum bikarbonat (Sigma), %3,7 Formaldehit (Merck), Dimetil Sülfoksit (Merck), KCl (Sigma), NaCl (Merck), KH_2PO_4 (Merck), Na_2HPO_4 (Merck), EDTA (Merck), Sıvı azot.

2.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

25 cm²'lik flasklar (TPP ve Cell Star), 96 ve 6 kuyucuklu plakalar (TPP), cam mezürler, cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 ml hacimlerinde), enjektörler (10, 20 ve 50 ml hacimlerinde), 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 ml'lik Durham şişeleri, 10 ml'lik tek kullanımlık pipetler. Steril polipropilen santrifüj tüpleri (15 ve 50 ml hacimlerinde), steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Thoma lamı.

2.4. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Heraus), kuru hava sterilizatörü (Nüve), otoklav, derin dondurucu (-20, -86), buzdolabı, manyetik karıştırıcı, CO₂ inkübatörü (Heraus), steril kabin (Heraus), sıvı azot kapları, otomatik pipetler, kar-buz makinesi (Scotsman), su banyosu (Clifton), Eliza okuyucu (ELx808-IU,

Bio-Tek), Fluoresan ataçmanlı ışık mikroskobu (BX50, DP71) Inverted mikroskop (Olympus, DP70), 12 kanallı mikropipet (eppendorf), dağıtıcı pipet (eppendorf).

2.5. Hücre Kültüründe Kullanılan Hücreler

2.5.1. 5RP7 hücre kültürü

5RP7 hücreleri inaktif hale getirilmiş %10'luk Fetal Bovine Serum, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Penicilin-Streptomycin ve % 9,2 NaHCO₃ içeren besiyerinin bulunduğu 25 cm²'lik flasklarda %95'lik hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında, 37°C'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmiştir.

2.6. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması

2.6.1. Dipiridofenazin ve komplekslerinin dozlarının hazırlanması

Dipiridofenazin, dipiridofenazin-platin(II) ve dipiridofenazin-altın(III) kompleksi dimetil sülfoksit (DMSO; Merck) içinde çözülerek 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM ve 40 µM'lık dozlar hazırlanmıştır. Maddelerimiz DMSO içinde çözüldüğü için, negatif kontrol olarak, çözücü madde olan DMSO kullanılmıştır.

2.6.2. Cisplatin dozlarının hazırlanması

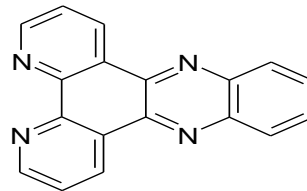
Cisplatin, dimetil sülfoksit (DMSO; Merck) içinde çözülerek 0,5 µM, 1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM ve 40 µM'lık dozlar hazırlanmıştır. Cisplatin, DMSO içinde çözüldüğü için, negatif kontrol olarak, çözücü madde olan DMSO kullanılmıştır.

2.7. Test Maddelerinin Analiz Koşulları

Bu tez kapsamında, dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazin ligandı (L) (dppz) kullanılarak, dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazin-platin(II) kompleksi ($[\text{Pt}(\text{dppz})\text{Cl}_2]$) ve dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazin-altın(III) kompleksi ($[\text{Au}(\text{dppz})\text{Cl}_2]\text{Cl}$) sentezlenmiş, reaksiyonlar İTK (ince tabaka kromatografisi) yöntemi ile izlenmiştir. Gerektiği durumlarda bazı maddelerin saflaştırılmalarında kolon kromatografisi yöntemi uygulanmış bunun için, kolonlarda dolgu maddesi olarak sefadeks ya da silikagel ve uygun bir yürütücü çözücü kullanılmıştır. Ara ürünlerin ve sonuç ürünlerinin yapı aydınlatma çalışmalarında bileşiklerin elementel analizleri ile IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR ve kütle analizlerinden faydalanılmıştır.

2.8. Test Maddelerinin Formülleri

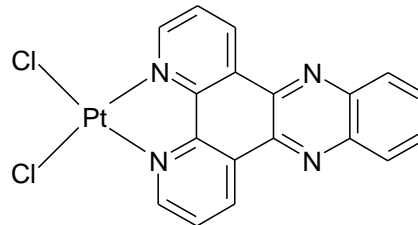
2.8.1. Dipiridofenazin



Ligand: dppz (dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine)

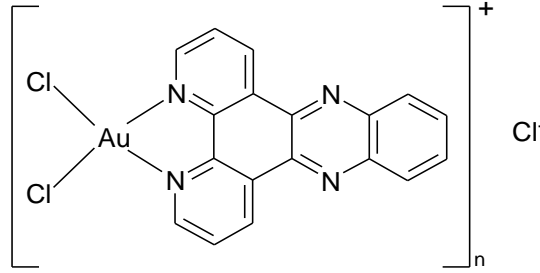
Şekil 2.1. Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazin yapısı

2.8.2. Dipiridofenazin-platin(II) kompleksi



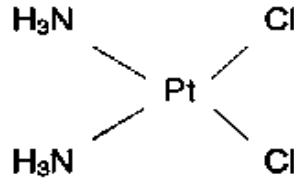
Şekil 2.2. Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazin-platin(II) $[\text{Pt}(\text{dppz})\text{Cl}_2]$ yapısı

2.8.3. Dipiridofenazin-altın(III) kompleksi



Şekil 2.3. Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazin-altın(III) [Au(dppz)Cl₂]Cl yapısı

2.8.4. Cisplatin



Şekil 2.4. Cis-diaminedikloroplatin(II) yapısı

2.9. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180°C'de 2 saat, yine bazı cam ve plastik malzemeler ve sıvı solüsyonlar da alüminyum folyolara sarılı olarak otoklavda 121°C, 1,5 atm/Hg basınçta 20 dakika süre ile steril edilerek kullanılmıştır. Kullanılan bazı sıvı kimyasallar 0,2 µm aralıklı selüloz nitrat filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

2.10. Yöntem

2.10.1. Hücrelerin testler için hazırlanması

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman Tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır, Trypan blue (tripan mavisi) boyası ile boyanan hücreler Thoma

lamı yardımıyla 3 kez sayılarak MTT testi için 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının her kuyucuğuna 3000 hücre olacak şekilde ekilmişlerdir. Hücrelerin yapışması ve yeni ortama alışması için 37°C’de, 24 saat inkübe edilmişlerdir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine test maddelerinin sitotoksik etkilerini belirlemek üzere test maddelerinin istenen konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri ilave edilip 24, 48 saat 37°C’de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.

Test maddelerinin belirlenen dozları hazırlanmıştır. Dipiridofenazin, dipiridofenazin-platin(II) kompleksi ve dipiridofenazin-altın(III) kompleksi için çözücü olarak DMSO (dimetil sülfoksit) kullanılmıştır. DMSO oranı % 0,1’i geçmeyecek şekilde hazırlanmıştır ve final konsantrasyonları: Dipiridofenazin, dipiridofenazin-platin(II) kompleksi ve dipiridofenazin-altın(III) kompleksi’nin 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM ve 40 µM’lık dozlar olması sağlanmıştır. Bu konsantrasyonlarda besiyerinde hazırlanan test maddelerinin konsantrasyonları, kontrol grubu (sadece besiyeri) ve %0,1 DMSO içeren çözücü kontrol grubu da teste eklenmiştir. Cisplatinde pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

2.10.2. MTT ölçümü

Test maddeleri ile 24–48 saat muamele edilen hücrelerden inkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 5mg/ml⁻¹ MTT solüsyonu ile canlı hücrelerin metabolik aktiviteleri sonucu MTT boyasının suda çözülmeyen formazan tuzu haline dönüştürülebilmesi için karbondioksit inkübatöründe 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmıştır. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözülmesi için her bir kuyucuğa DMSO ilave edilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik densiteleri ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test 3 kez tekrar edilmiştir (Mosmann 1983).

2.10.3. Floresan boyama ile morfolojik inceleme

6'lı plakalara yerleştirilen steril lameller üzerine ekilen 5RP7 hücreleri 24 saat lamellerin üzerine yapışmaları için 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmişlerdir. Metal türevlerin sitotoksikite testleri sonucunda belirlenen belirleyici sitotoksik dozu, lameller üzerine yapışan hücrelere 24 saat süresince uygulanmıştır. Bu süre sonunda lameller % 3,7'lik formaldehit ile tespit edilmişlerdir. Daha sonra steril fosfatlanmış tampon çözeltisi (PBS: 137 µM NaCl, 2.7 µM KCl, 15 µM KH₂PO₄, 8 µM NaHPO₄; pH 7.3) ile yıkamaları yapılan lameller, 1mg/ml DAPI ile 30 dakika boyanmışlardır. Daha sonra PBS ile yıkanan lameller fotoğraflanmıştır.

2.11. Mikroskopi

Hücreler floresan ataçmana sahip Olympus BX50 mikroskobunda incelenmişlerdir.

2.12. Fotoğrafi

Kültür hücrelerinin mikroskop altında saptanan uygun floresan görüntüleri Olympus DP-71 fotomikrografi aracı kullanılarak fotoğraflanmıştır. Hücrelerin boyanmamış halleri, Olympus IX71 inverted mikroskobunda incelenerek, Olympus DP-70 fotomikrografi aracı ile fotoğraflanmıştır.

2.13. İstatistiksel Değerlendirmeler

İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) programı kullanılmıştır. Elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak p<0.05 kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. MTT Sonuçları

3.1.1. Dipiridofenazinin (dppz) 5RP7 hücrelerinin çoğalmasında üzerine etkileri

Dipiridofenazinin 0,5 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %2 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %5 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1). Bu doz cisplatin ile kıyaslandığında, ligand maddenin cisplatin kadar sitotoksikite göstermediği gözlenmiştir.

Dipiridofenazinin 1 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %2 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %17 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1). Bu doz cisplatin ile kıyaslandığında, ligand maddenin cisplatin kadar sitotoksikite göstermediği gözlenmiştir.

Dipiridofenazinin 2 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %7 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %50 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında büyük oranda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1). Bu dozda ligand madde cisplatinin 2,5 μM 'lık dozuyla kıyaslandığında iki gün sonunda aynı azalma etkisine sahip oldukları görülmektedir. Bu dozda, cisplatin (2,5 μM) ile aynı etkiyi gösteren ligandımız daha sitotoksiktir denilebilir.

Dipiridofenazinin 5 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %18 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %90 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında büyük oranda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1). Bu dozda ligand maddenin, hücrelere karşı cisplatinden daha fazla sitotoksikite gösterdiği gözlenmiştir.

Dipiridofenazinin 10,20 ve 40 μM 'lık konsantrasyonları, hücre sayısında kontrole göre birinci gün yaklaşık %70 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %97 oranında düşüşe neden oldukları saptanmıştır. Hücre sayısında büyük

oranda azalmaya neden oldukları belirlenmiştir (Şekil 3.1). Bu üç dozda da ligand maddenin, hücrelere karşı cisplatinden daha fazla sitotoksosite gösterdiği gözlenmiştir.

3.1.2. Dipiridofenazin-platin(II)'nin [dppz-Pt(II)] 5RP7 hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri

Dipiridofenazin-Pt(II)'nin 0,5 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %9 oranında artışa neden olurken, ikinci gün ise %10 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.2). Bu dozda kompleks madde, cisplatin maddesi ile kıyaslandığında birinci gün cisplatin gibi sitotoksosite göstermemiştir. Hücreler, sayısında artış göstermiştir. İkinci gün kompleks madde, hücre sayısında düşüşe neden olmuştur. Ancak cisplatin ile daha fazla sitotoksik etki gözlenmiştir.

Dipiridofenazin-Pt(II)'nin 1 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %7 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %17 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.2). Bu doz cisplatin ile kıyaslandığında, ligand maddenin cisplatin kadar sitotoksosite göstermediği gözlenmiştir.

Dipiridofenazin-Pt(II)'nin 2 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %8 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %23 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.2). Bu doz ile cisplatinin 2,5 μM 'lık dozu ilk gün aynı etkiye sahipken ikinci gün cisplatin daha sitotoksik görülmüştür. Bunun nedeni uygulanan doz miktarının daha fazla olmasıdır.

Dipiridofenazin-Pt(II)'nin 5 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %8 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %54 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.2). Bu doz cisplatin ile kıyaslandığında, ligand maddenin cisplatin kadar sitotoksosite göstermediği gözlenmiştir.

Dipiridofenazin-Pt(II)'nin 10 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %25 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %85

oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.2). Bu doz cisplatin ile kıyaslandığında, kontrole göre hücre sayısında, birinci gün cisplatin daha fazla sitotoksosite gösterirken, ikinci gün kompleks madde ile daha fazla sitotoksosite gözlenmiştir.

Dipiridofenazin-Pt(II)'nin 20 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %55 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %96 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında büyük oranda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.2). Bu dozda kompleks maddenin, hücrelere karşı cisplatinden daha fazla sitotoksosite gösterdiği gözlenmiştir.

Dipiridofenazin-Pt(II)'nin 40 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %74 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %96 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında büyük oranda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.2). Bu dozda kompleks maddenin, hücrelere karşı cisplatinden daha fazla sitotoksosite gösterdiği gözlenmiştir.

3.1.3. Dipiridofenazin-altın(III)'ün [dppz-Au(III)] 5RP7 hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri

Dipiridofenazin-Au(III)'ün 0,5 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %1 oranında artışa neden olurken, ikinci gün ise %16 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.3). Bu dozda kompleks madde, cisplatin maddesi ile kıyaslandığında birinci gün cisplatin gibi sitotoksosite göstermemiştir. Hücreler, sayısında artış göstermiştir. İkinci gün kompleks madde, hücre sayısında düşüşe neden olmuştur. Ancak cisplatin ile daha fazla sitotoksik etki gözlenmiştir.

Dipiridofenazin-Au(III)'ün 1 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %6 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %20 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.3). Bu doz cisplatin ile kıyaslandığında, ligand maddenin cisplatin kadar sitotoksosite göstermediği gözlenmiştir.

Dipiridofenazin-Au(III)'ün 2 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %16 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %25

oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.3). Bu dozda kompleks madde cisplatinin 2,5 μM 'lık dozu ile kıyaslandığında, birinci gün cisplatinden daha sitotoksik olduğu gözlenmiştir. İkinci gün cisplatin daha fazla sitotoksik etki göstermiştir.

Dipiridofenazin-Au(III)'ün 5 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %34 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %88 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.3). Bu dozda kompleks maddenin, hücrelere karşı cisplatinden daha fazla sitotoksikite gösterdiği gözlenmiştir.

Dipiridofenazin-Au(III)'ün 10 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün, %52 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise konsantrasyonda %90 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında büyük oranda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.3). Bu dozda kompleks maddenin, hücrelere karşı cisplatinden daha fazla sitotoksikite gösterdiği gözlenmiştir.

Dipiridofenazin-Au(III)'ün 20 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %55 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %90 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.3). Bu dozda kompleks madde cisplatin ile kıyaslandığında, birinci gün hücrelere karşı daha fazla sitotoksikite göstermiştir. İkinci gün ise iki maddenin de aynı oranda sitotoksikite gösterdiği gözlenmiştir.

Dipiridofenazin-Au(III)'ün 40 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %61 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %90 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.3). Bu dozda kompleks madde cisplatin ile kıyaslandığında cisplatinden oldukça az bir oranla daha az sitotoksikite gösterdiği gözlenmiştir.

3.1.4. Cisplatinin 5RP7 hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri

Cisplatinin 0,5 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %7 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %14 oranında

düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.4).

Cisplatinin 1 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %10 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %30 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.4).

Cisplatinin 2,5 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %7 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %48 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.4).

Cisplatinin 5 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %14 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %65 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.4).

Cisplatinin 10 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %31 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %83 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.4).

Cisplatinin 20 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %39 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %90 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında büyük oranda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.4).

Cisplatinin 40 μM 'lık konsantrasyonu, hücre sayısında kontrole göre birinci gün %63 oranında düşüşe neden olurken, ikinci gün ise %91 oranında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Hücre sayısında büyük oranda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.4).

3.2. Floresan Boyama ile Morfolojik İnceleme Sonuçları

Dört adet test maddesinin MTT deneylerinden elde edilen sonuçlarına göre belirlenen dozunun, apoptozise neden olup olmadığı, 5RP7 hücreleri üzerinde DAPI boyaması uygulandıktan sonra Olympus BX50 floresan mikroskobu

kullanılarak araştırılmıştır. Saptanan uygun görüntüler Olympus DP-71 otomatik fotomikrografi aracı kullanılarak fotoğraflanmıştır.

3.2.1. Dipiridofenazin ligandının 5RP7 hücreleri üzerine morfolojik etkileri

Dipiridofenazin ligandı, yapılan MTT testlerinde hücrelere karşı belirleyici sitotoksik etkinin gözlemlendiği doz olan 10 μM 'da (hücre sayısında birinci gün %70 oranında düşüşe neden olmuştur) apoptotik etki göstermiştir. Hücrelerin içindeki DNA fragmente ve kondanse olmuş, hücre sayısında da bir azalma gözlenmiştir (Şekil 3.5-c).

3.2.2. Dipiridofenazin-Pt(II) kompleksinin 5RP7 hücreleri üzerine morfolojik etkileri

Dipiridofenazin-Pt(II) kompleksi, yapılan MTT testlerinde hücrelere karşı belirleyici sitotoksik etkinin gözlemlendiği doz olan 10 μM 'da (hücre sayısında birinci gün %25 oranında düşüşe neden olmuştur) apoptotik etki göstermiştir. Hücrelerin içindeki DNA fragmente ve kondanse olmuş, hücre sayısında da bir azalma gözlenmiştir (Şekil 3.5-d).

3.2.3. Dipiridofenazin-Au(III) kompleksinin 5RP7 hücreleri üzerine morfolojik etkileri

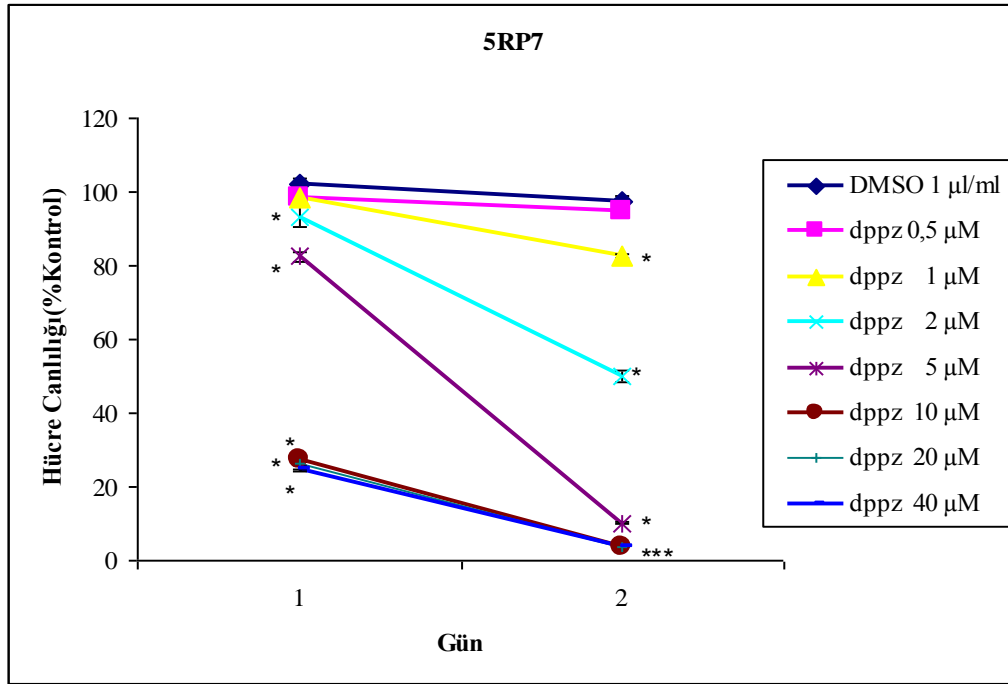
Dipiridofenazin-Au(III) kompleksi, yapılan MTT testlerinde hücrelere karşı belirleyici sitotoksik etkinin gözlemlendiği doz olan 10 μM 'da (hücre sayısında birinci gün %52 oranında düşüşe neden olmuştur) apoptotik etki göstermiştir. Hücrelerin içindeki DNA fragmente ve kondanse olmuş, hücre sayısında da bir azalma gözlenmiştir (Şekil 3.5-e).

3.2.4. Cisplatinin 5RP7 hücreleri üzerine morfolojik etkileri

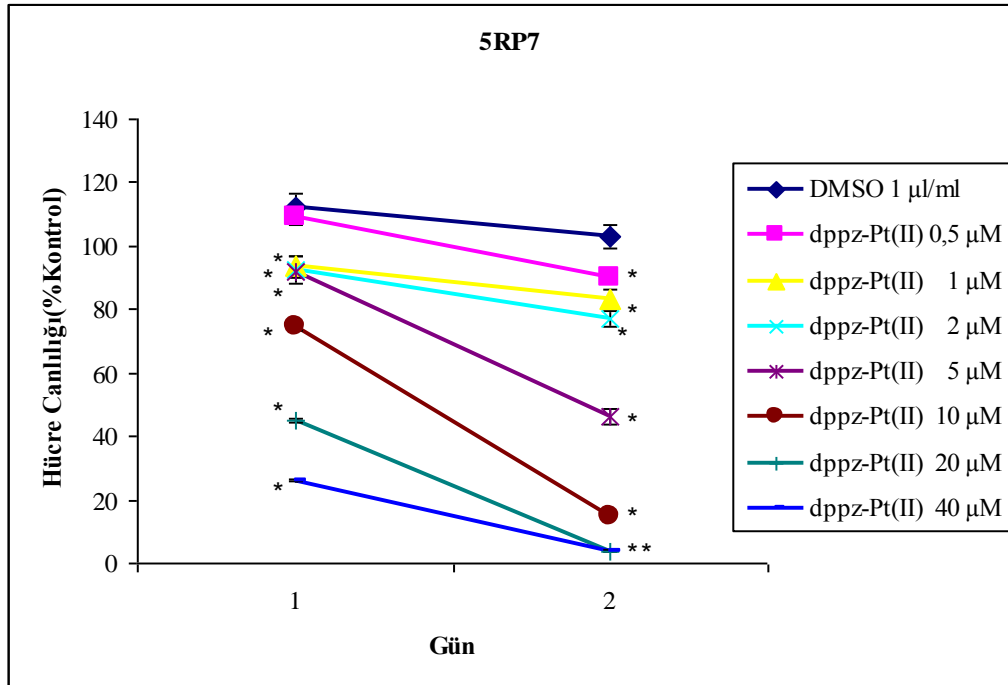
Cisplatin maddesi, yapılan MTT testlerinde hücrelere karşı belirleyici sitotoksik etkinin gözlendiği doz olan 10 μM 'da (hücre sayısında %31 oranında düşüşe neden olmuştur) apoptotik etki göstermiştir. Hücrelerin içindeki DNA fragmente ve kondanse olmuş, hücre sayısında da bir azalma gözlenmiştir (Şekil 3.5-f)

3.3. Sitotoksik Aktiviteye Bağlı Morfolojik İnceleme

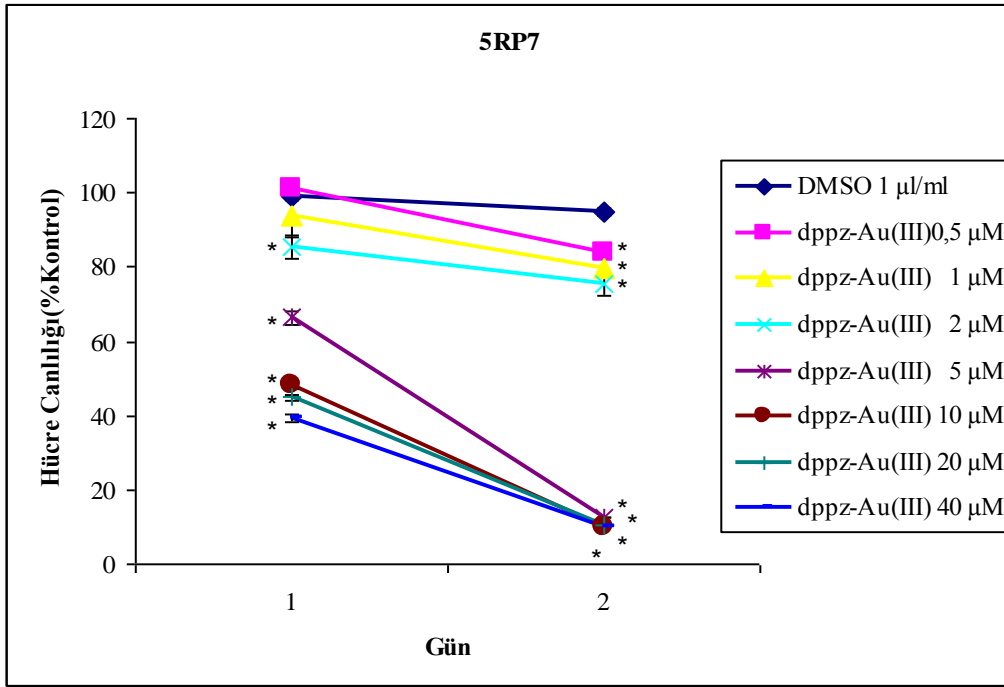
5RP7 hücrelerinin inverted mikroskop ile çekilmiş bu görüntüleri, hücrelerin üzerine test maddelerinin belirlenen konsantrasyonlarını içeren besiyerleri ilave edilip, 24 saat ve 48 saat sonunda, MTT boyası verilmeden hemen önce fotoğraflanmıştır. En düşük konsantrasyondan, en yüksek konsantrasyona doğru hücre sayısındaki azalma görüntülenmiştir (Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11).



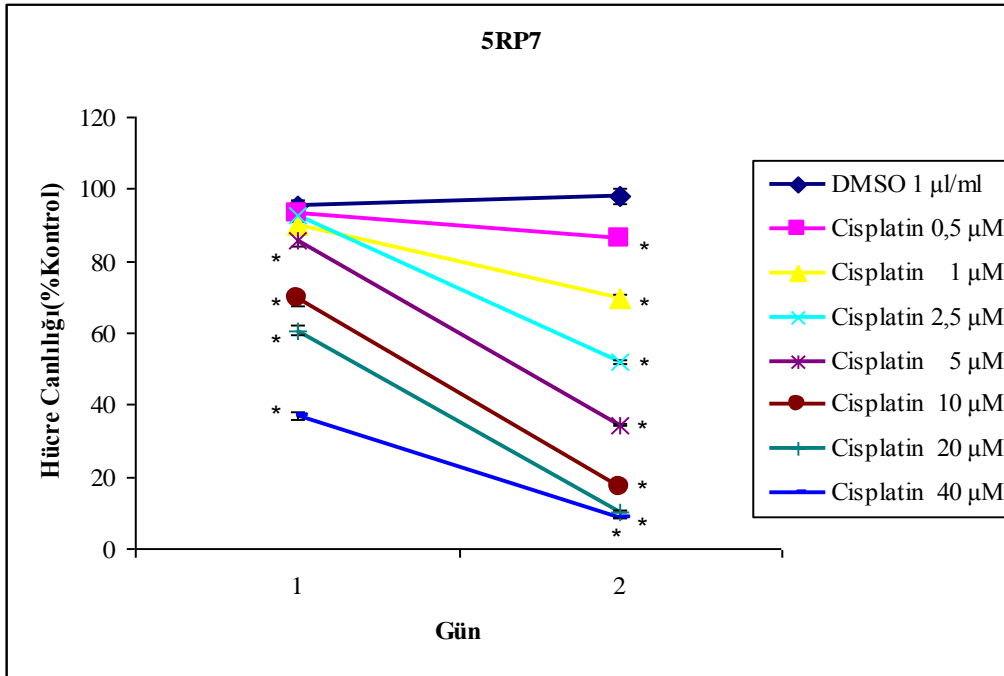
Şekil 3.1. Dipiridofenazinin (dppz), 5RP7 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



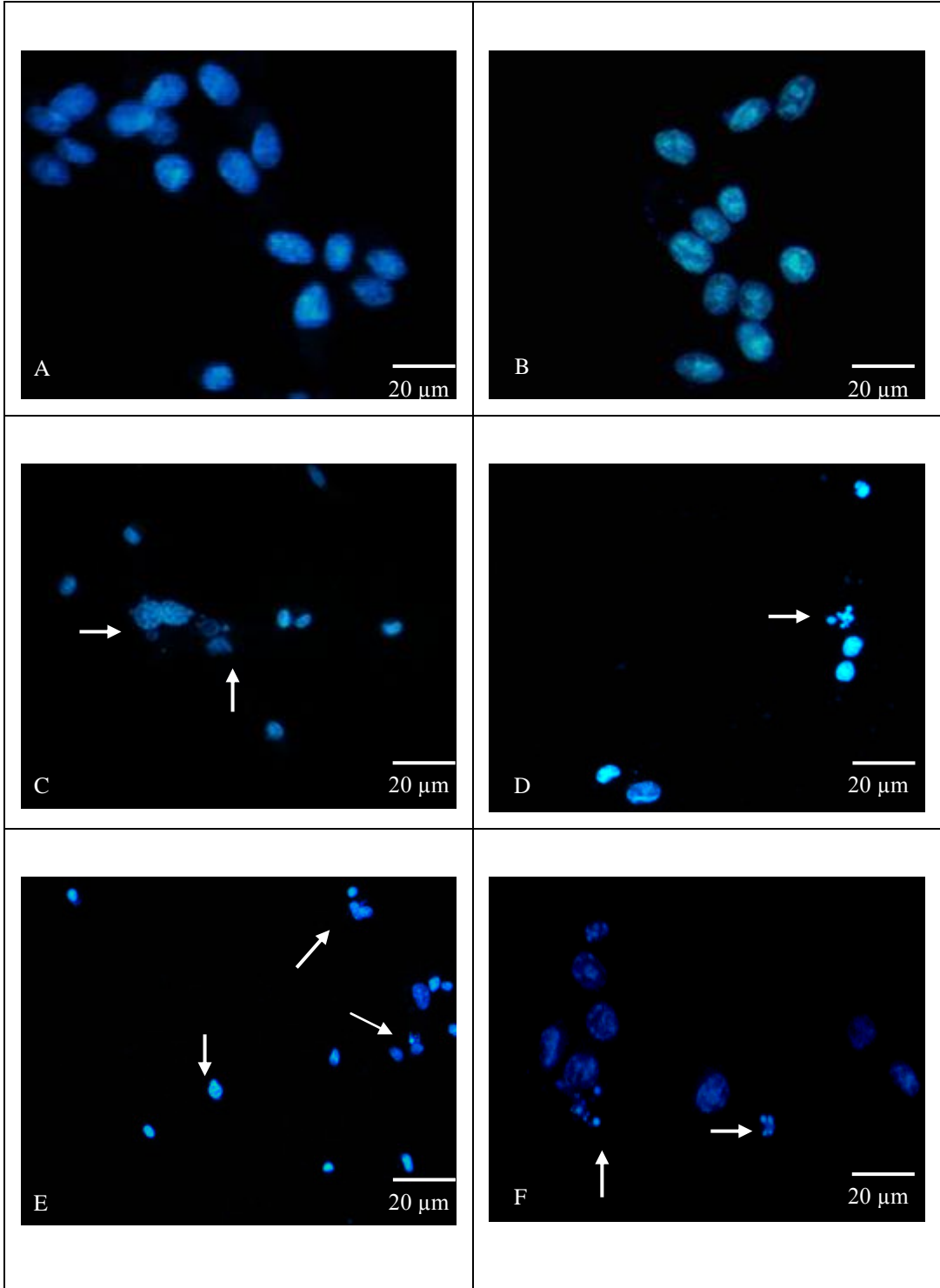
Şekil 3.2. Dipiridofenazin(dppz)-Pt(II) kompleksinin, 5RP7 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



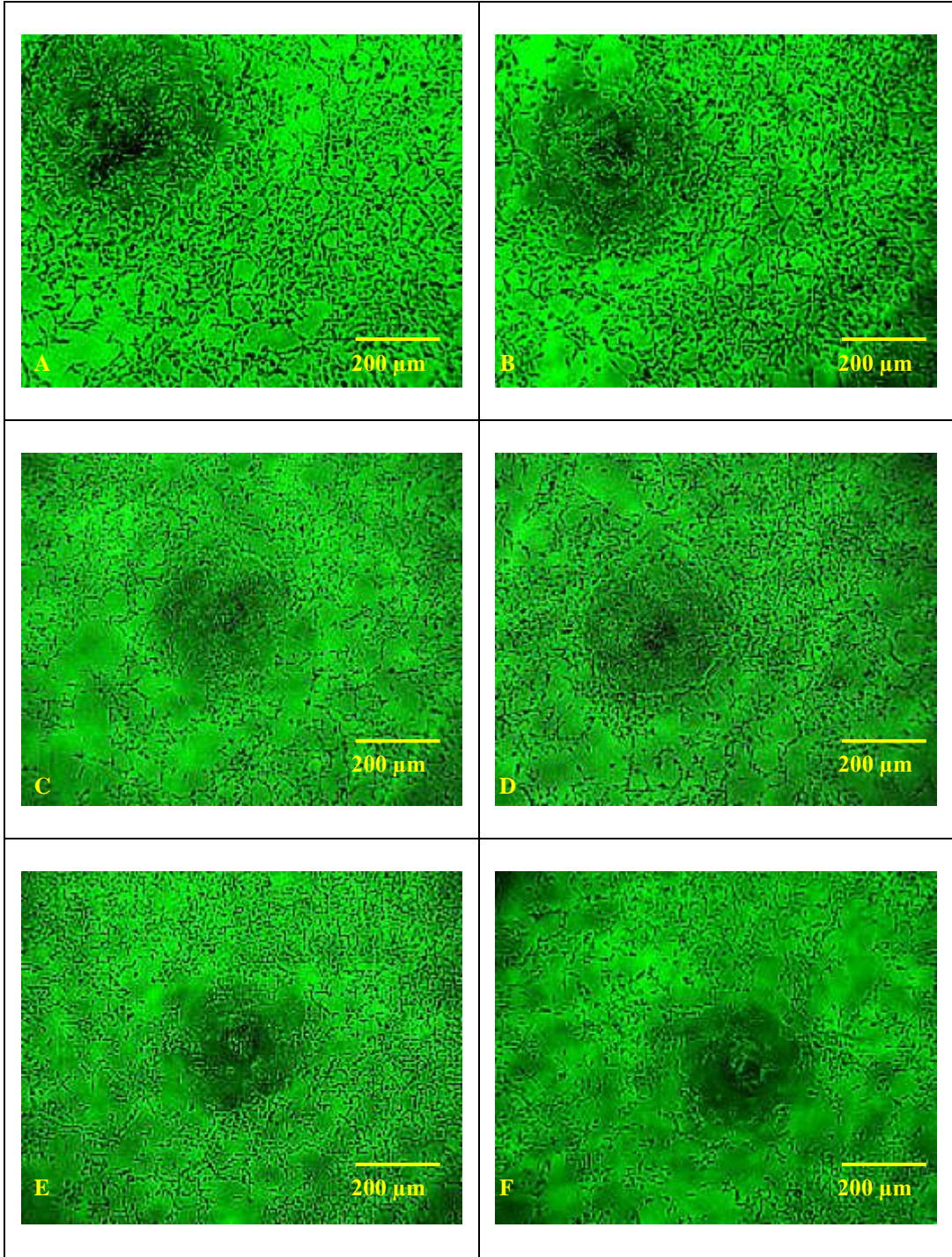
Şekil 3.3. Dipiridofenazin(dppz)-Au(III) kompleksinin, 5RP7 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



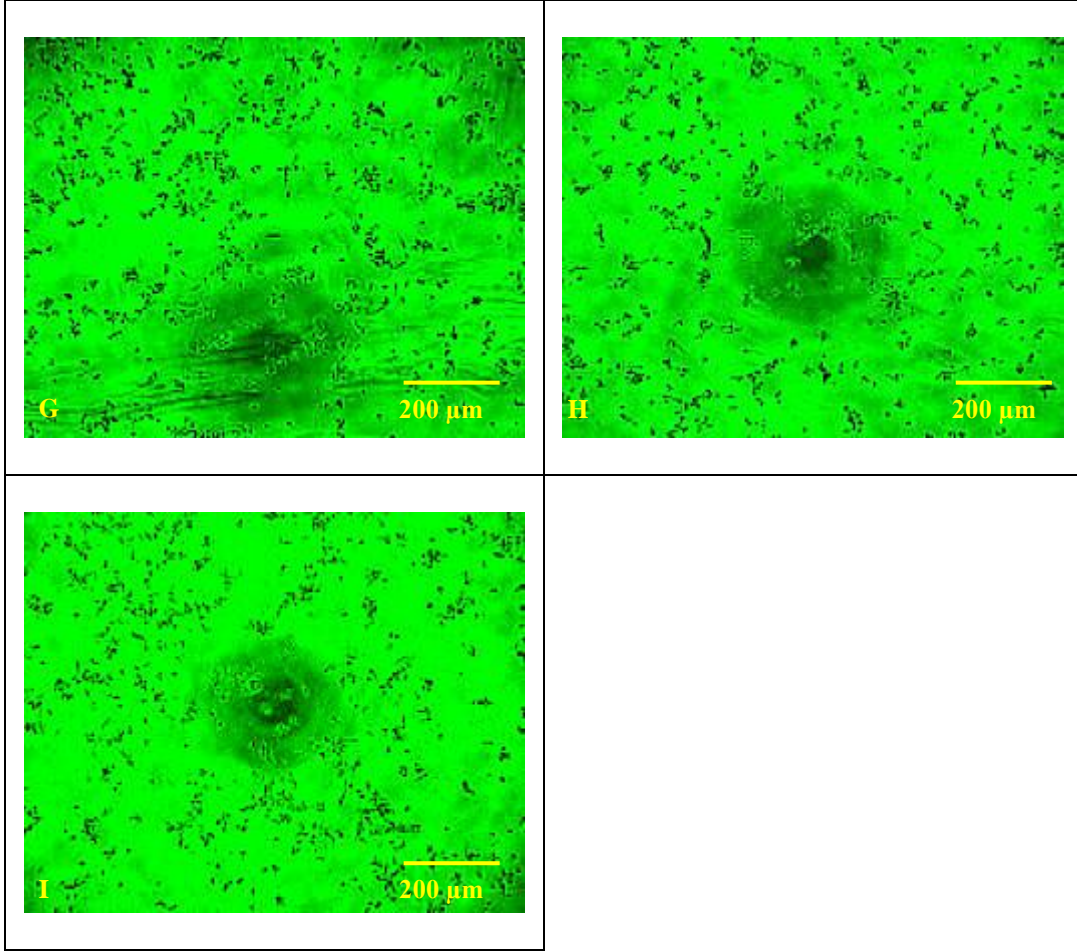
Şekil 3.4. Cisplatinin, 5RP7 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



Şekil 3.5. 5RP7 hücreleri üzerinde apoptotik etkinin DAPI boyama ile değerlendirilmesi, A: Kontrol, B: DMSO, C: Dipiridofenazin (10 μ M), D: Dipiridofenazin-Pt(II) kompleksi (10 μ M), E: Dipiridofenazin-Au(III) kompleksi (10 μ M), F: Cisplatin (10 μ M). Oklar apoptotik yapıları göstermektedir. Ölçü birimi 20 μ m

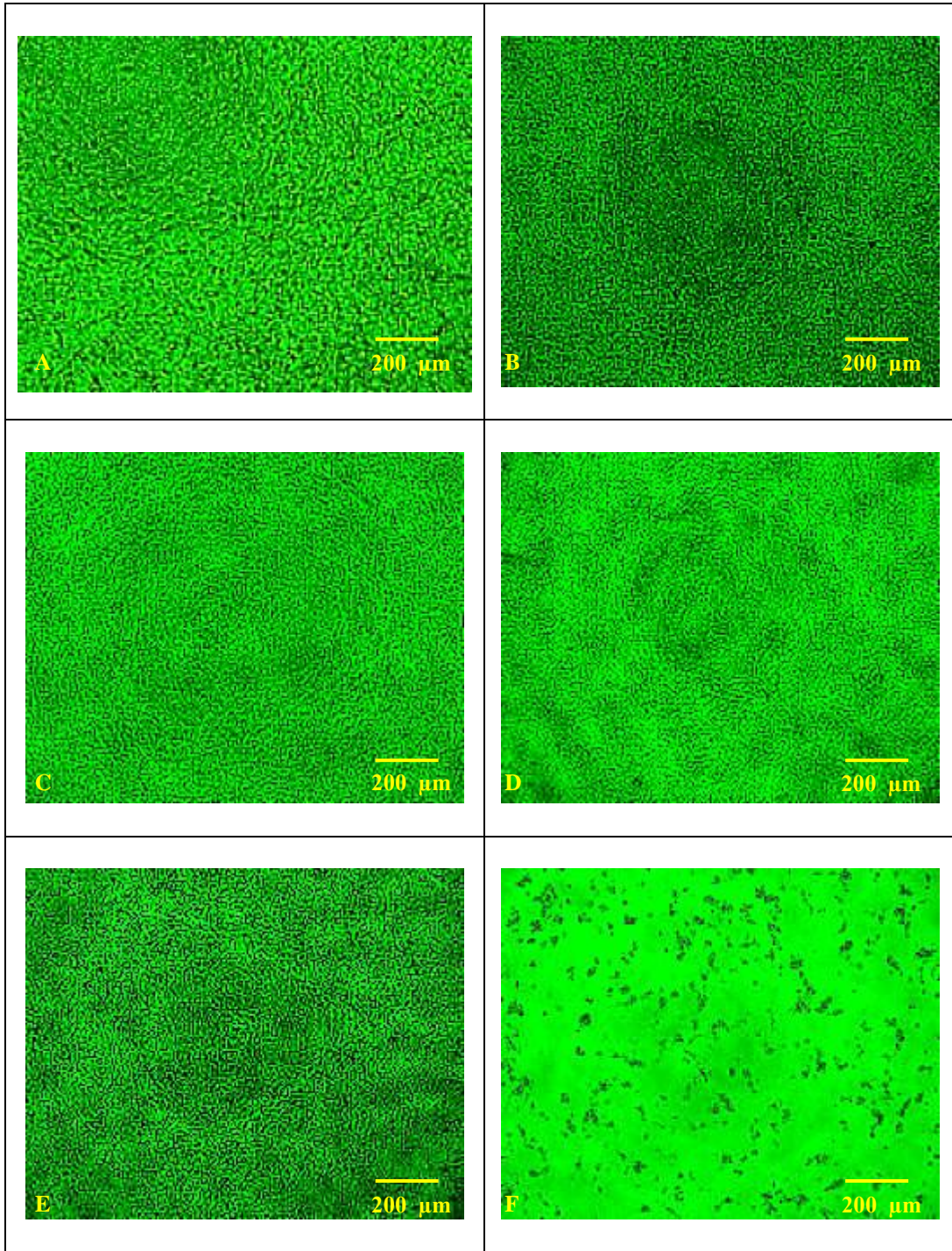


Şekil 3.6. Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazinin, 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (1.gün), A:Kontrol, B: DMSO, C:0,5 µM, D:1 µM, E:2 µM, F:5 µM, G:10 µM, H:20µM, İ:40µM. Ölçü birimi: 200µm

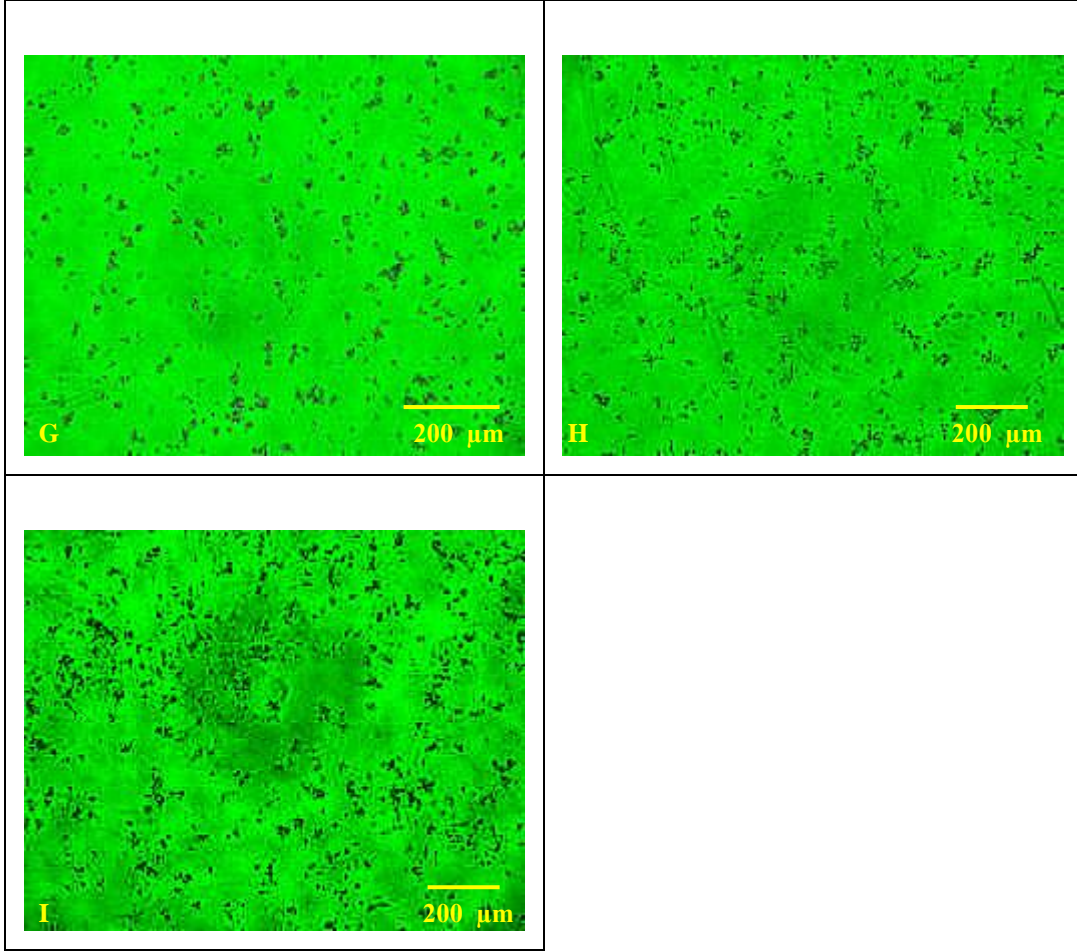


Şekil 3.6. (Devam) Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazinin, 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (1.gün), A:Kontrol, B: DMSO, C:0,5 µM, D:1 µM, E:2 µM, F:5 µM, G:10 µM, H:20µM, İ:40µM. Ölçü birimi: 200µm

5RP7 hücrelerinin inverted mikroskopta çekilmiş bu görüntülerinde, 5RP7 hücreleri üzerine denenmiş dipiridofenazin maddesinin, hücreler üzerindeki sitotoksitesinin, en düşük konsantrasyondan en yüksek konsantrasyona doğru arttığı gösterilmektedir. Düşük konsantrasyonlarda (0,5-1-2-5 µM) hücre sayısında azalma oranı birbirine yakın gözlenirken, yüksek konsantrasyonlarda (10-20-40 µM) hücre sayısında azalma oranı büyük oranda gözlenmiştir. Bu konsantrasyonlarda ölen hücreler, canlı halde iken sahip oldukları yıldızimsı şeklini kaybederek, yuvarlak bir hal alıp küme şeklinde bir araya toplandıkları görülmektedir.

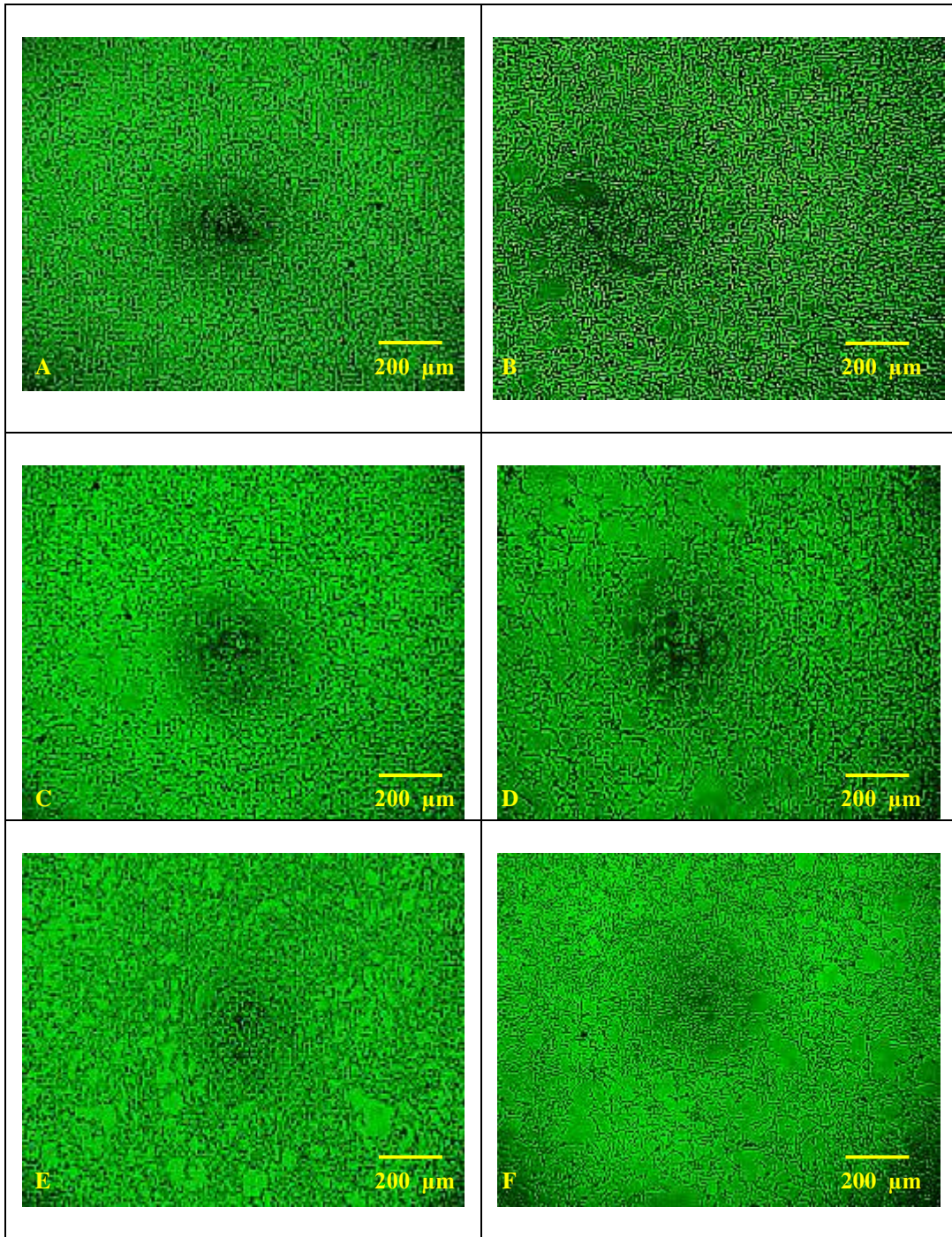


Şekil 3.7. Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazinin SRP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (2.gün). A:Kontrol, B: DMSO, C:0,5 µM, D:1 µM, E:2 µM, F:5 µM, G:10 µM, H:20µM, İ:40µM. Ölçü birimi: 200µm

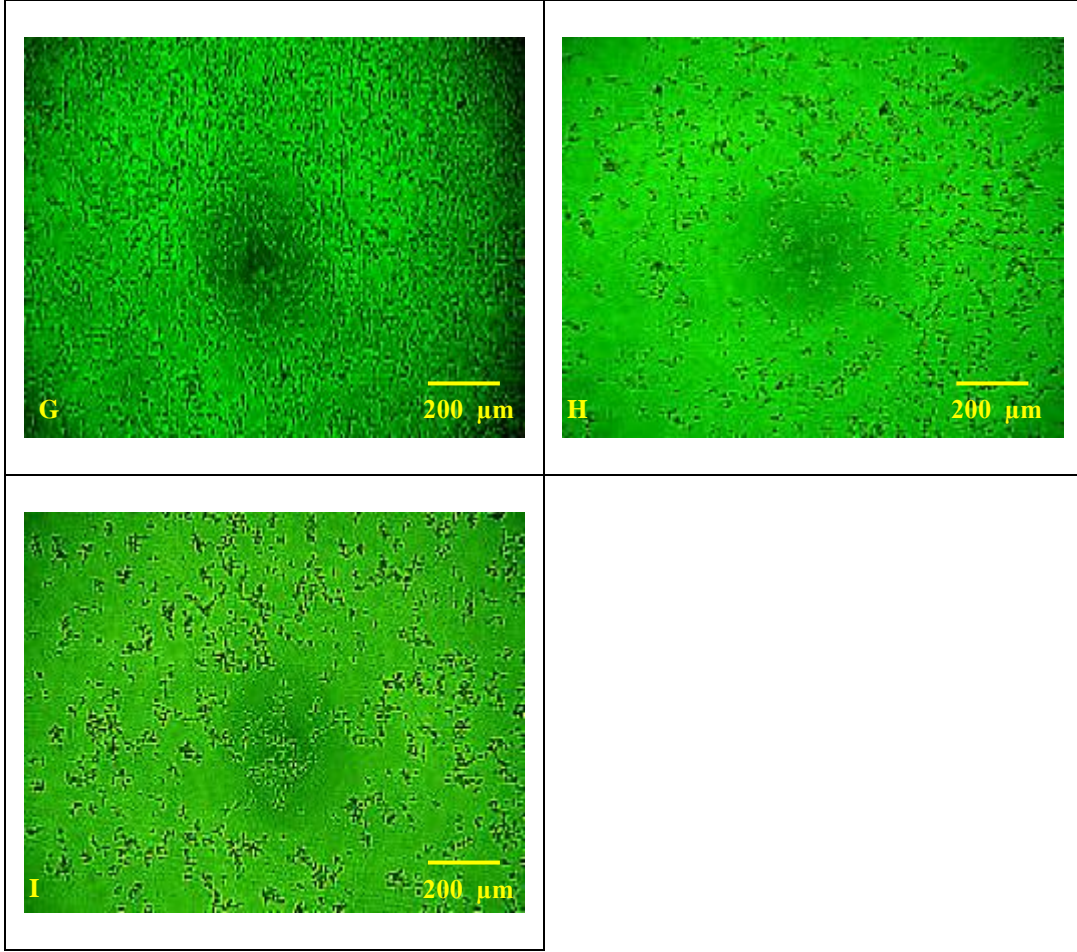


Şekil 3.7. (Devam) Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazinin 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (2.gün). A:Kontrol, B: DMSO, C:0,5 µM, D:1 µM, E:2 µM, F:5 µM, G:10 µM, H:20µM, İ:40µM. Ölçü birimi: 200µm

5RP7 hücrelerinin inverted mikroskopta çekilmiş bu görüntülerinde, 5RP7 hücreleri üzerine denenmiş dipiridofenazin maddesinin hücreler üzerindeki sitotoksitesinin, en düşük konsantrasyondan en yüksek konsantrasyona doğru arttığı gösterilmektedir. İkinci günde düşük konsantrasyonlar da görüntülenen hücre yoğunluğu birinci güne göre daha fazladır. Düşük konsantrasyonda (0,5-1-2-5 µM) gözlenen hücrelerde, kontrole göre azalma gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyondaki (10-20-40 µM) hücrelerde, hücre sayısındaki azalma oldukça belirgindir. Bu konsantrasyonlarda ölen hücreler, canlı halde iken sahip oldukları yıldızimsı şekli kaybederek, yuvarlak bir hal alıp küme şeklinde bir araya toplandıkları görülmektedir.

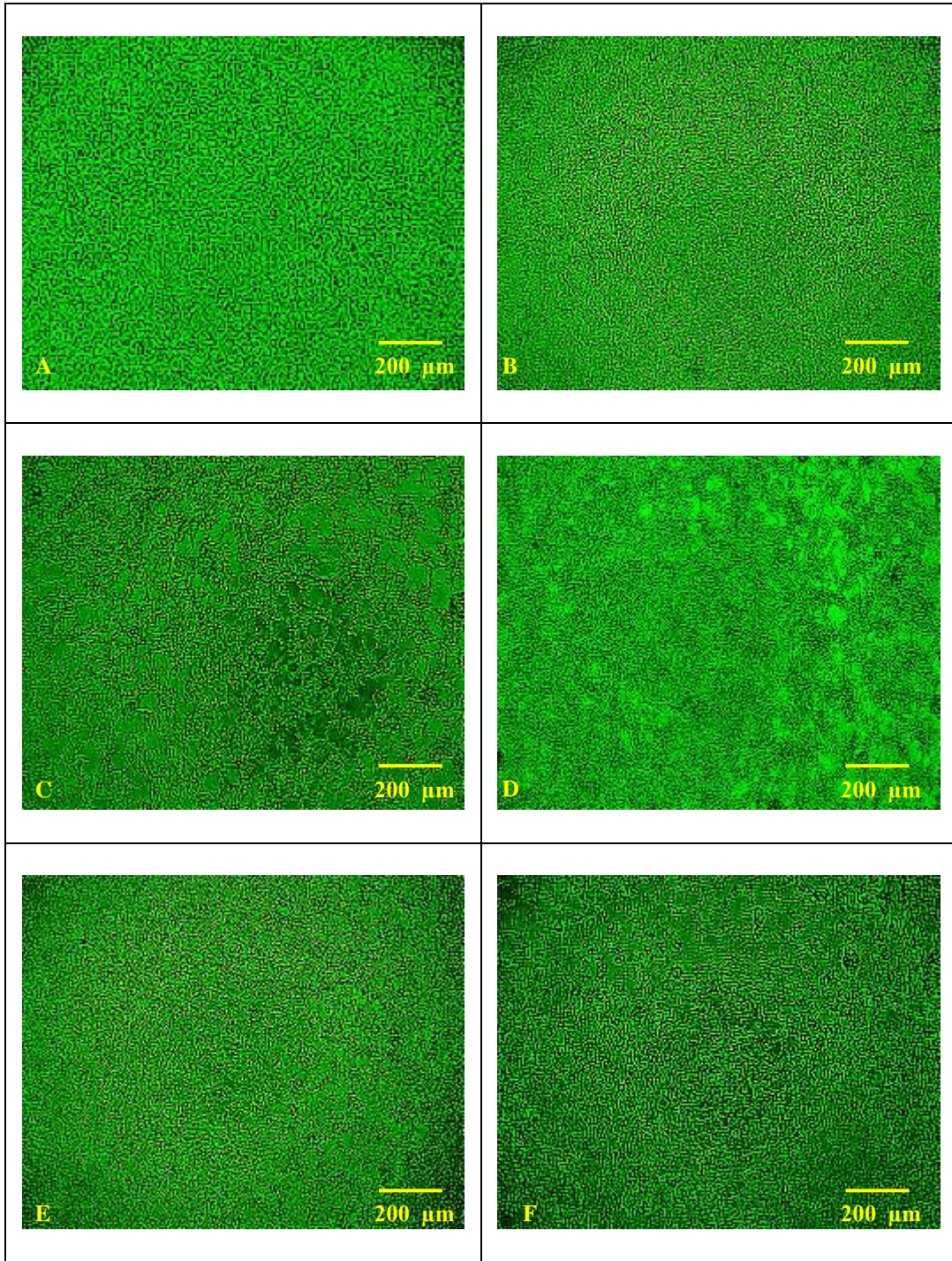


Şekil 3.8. Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazın Pt(II) kompleksinin ($[Pt(dppz)Cl_2]$), 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (1.gün) A:Kontrol, B: DMSO, C:0,5 µM, D:1 µM, E:2 µM, F:5 µM, G:10 µM, H:20µM, İ:40µM. Ölçü birimi: 200µm

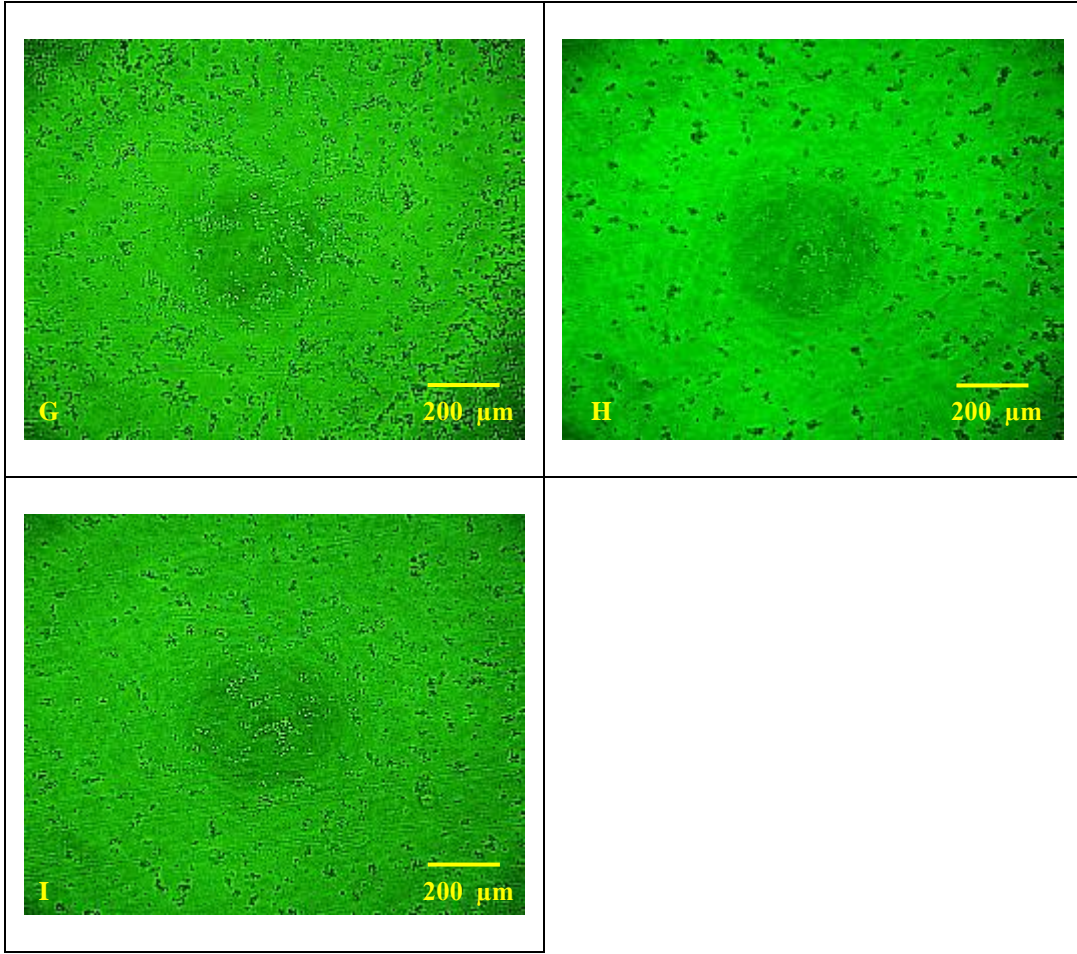


Şekil 3.8. (Devam) Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazin Pt(II) kompleksinin ($[Pt(dppz)Cl_2]$), 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (1.gün) A:Kontrol, B: DMSO, C:0,5 μM , D:1 μM , E:2 μM , F:5 μM , G:10 μM , H:20 μM , I:40 μM . Ölçü birimi: 200 μm

5RP7 hücrelerinin inverted mikroskopta çekilmiş bu görüntülerinde, 5RP7 hücreleri üzerine denenmiş dipiridofenazin-platin(II) kompleksinin hücreler üzerindeki sitotoksitesinin, en düşük konsantrasyondan en yüksek konsantrasyona doğru arttığı gösterilmektedir. Düşük konsantrasyonlarda (0,5-1-2-5 μM) hücre sayısında azalma oranı birbirine yakın gözlenirken, yüksek konsantrasyonlarda (10-20-40 μM) hücre sayısında azalma oranı büyük oranda gözlenmiştir. Bu konsantrasyonlarda ölen hücreler canlı halde iken sahip oldukları yıldızimsı şeklini kaybederek yuvarlak bir hal alıp küme şeklinde bir araya toplandıkları görülmektedir.

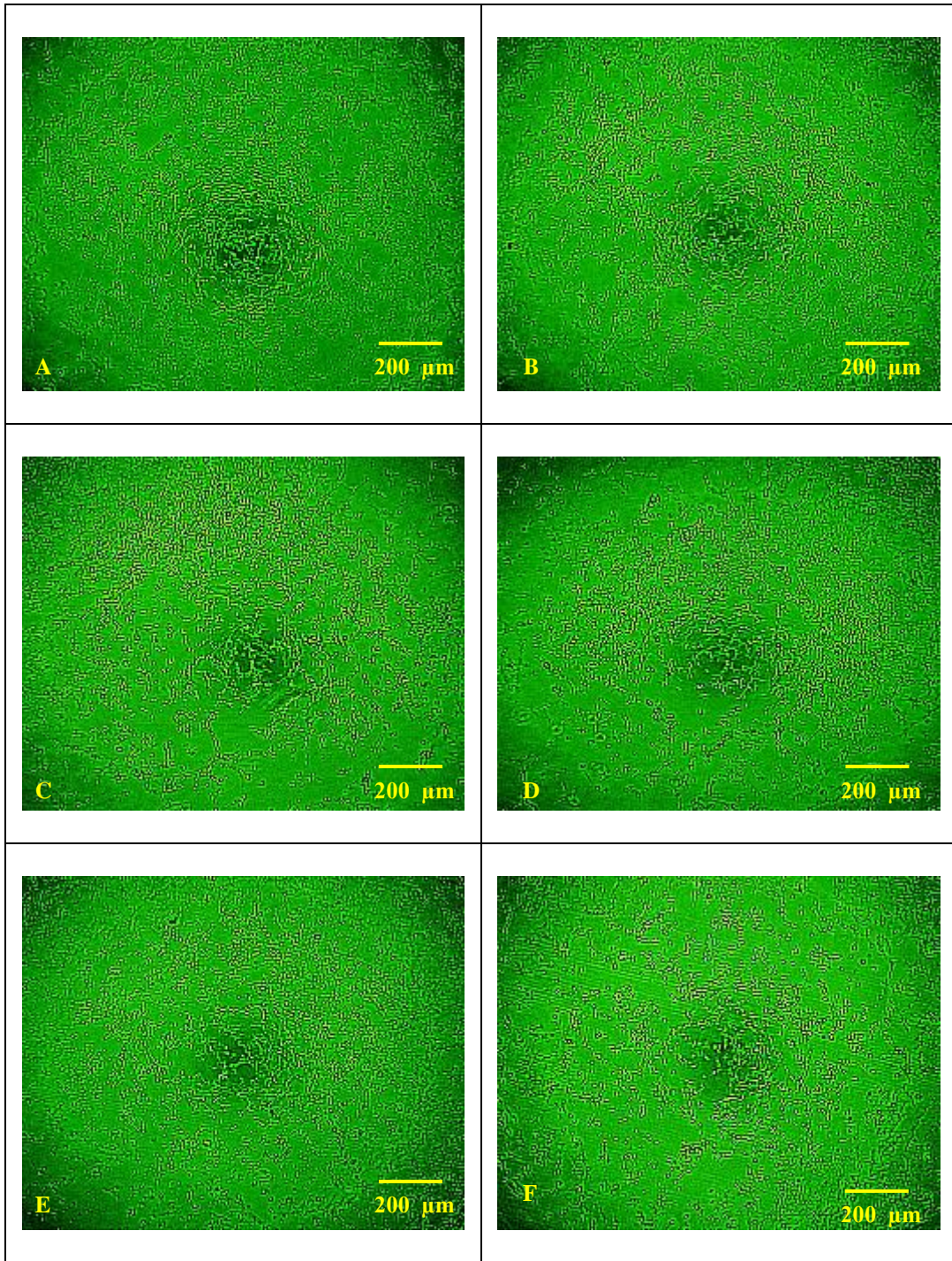


Şekil 3.9. Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazın Pt(II) kompleksinin ($[Pt(dppz)Cl_2]$), 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (2.gün) A:Kontrol, B: DMSO, C:0,5 μM , D:1 μM , E:2 μM , F:5 μM , G:10 μM , H:20 μM , İ:40 μM . Ölçü birimi: 200 μm

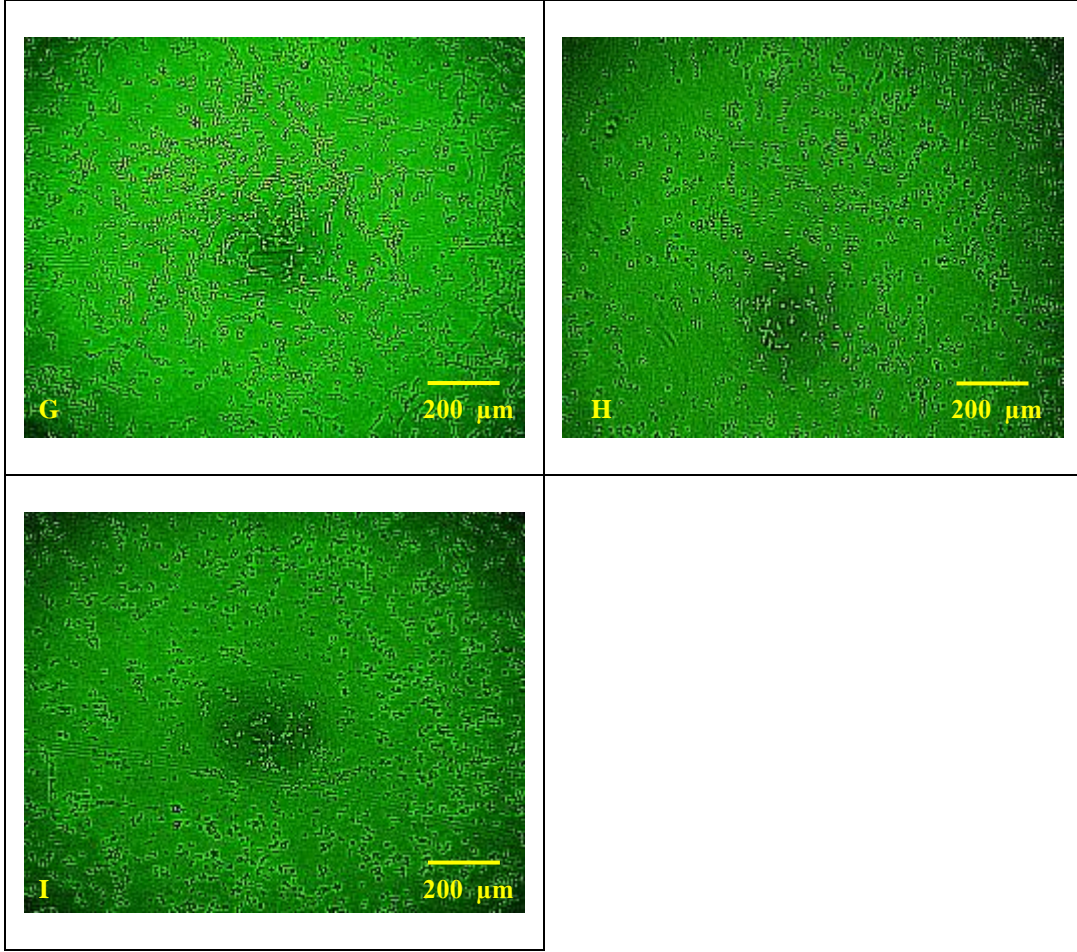


Şekil 3.9. (Devam) Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazin Pt(II) kompleksinin ($[Pt(dppz)Cl_2]$), 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (2.gün) A:Kontrol, B: DMSO, C:0,5 μ M, D:1 μ M, E:2 μ M, F:5 μ M, G:10 μ M, H:20 μ M, I:40 μ M. Ölçü birimi: 200 μ m

5RP7 hücrelerinin inverted mikroskopta çekilmiş bu görüntülerinde, 5RP7 hücreleri üzerine denenmiş dipiridofenazin-platin(II) kompleksinin hücreler üzerindeki sitotoksitesinin, en düşük konsantrasyondan en yüksek konsantrasyona doğru arttığı gösterilmektedir. İkinci günde düşük konsantrasyonlar da görüntülenen hücre yoğunluğu birinci güne göre daha fazladır. Düşük konsantrasyonlar da (0,5-1-2-5 μ M) gözlenen hücrelerde, kontrole göre azalma gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyondaki (10-20-40 μ M) hücrelerde, hücre sayısındaki azalma oldukça büyük orandadır. Bu konsantrasyonlarda ölen hücreler, canlı halde iken sahip oldukları yıldızimsı şeklini kaybederek yuvarlak bir hal alıp küme şeklinde bir araya toplandıkları görülmektedir.

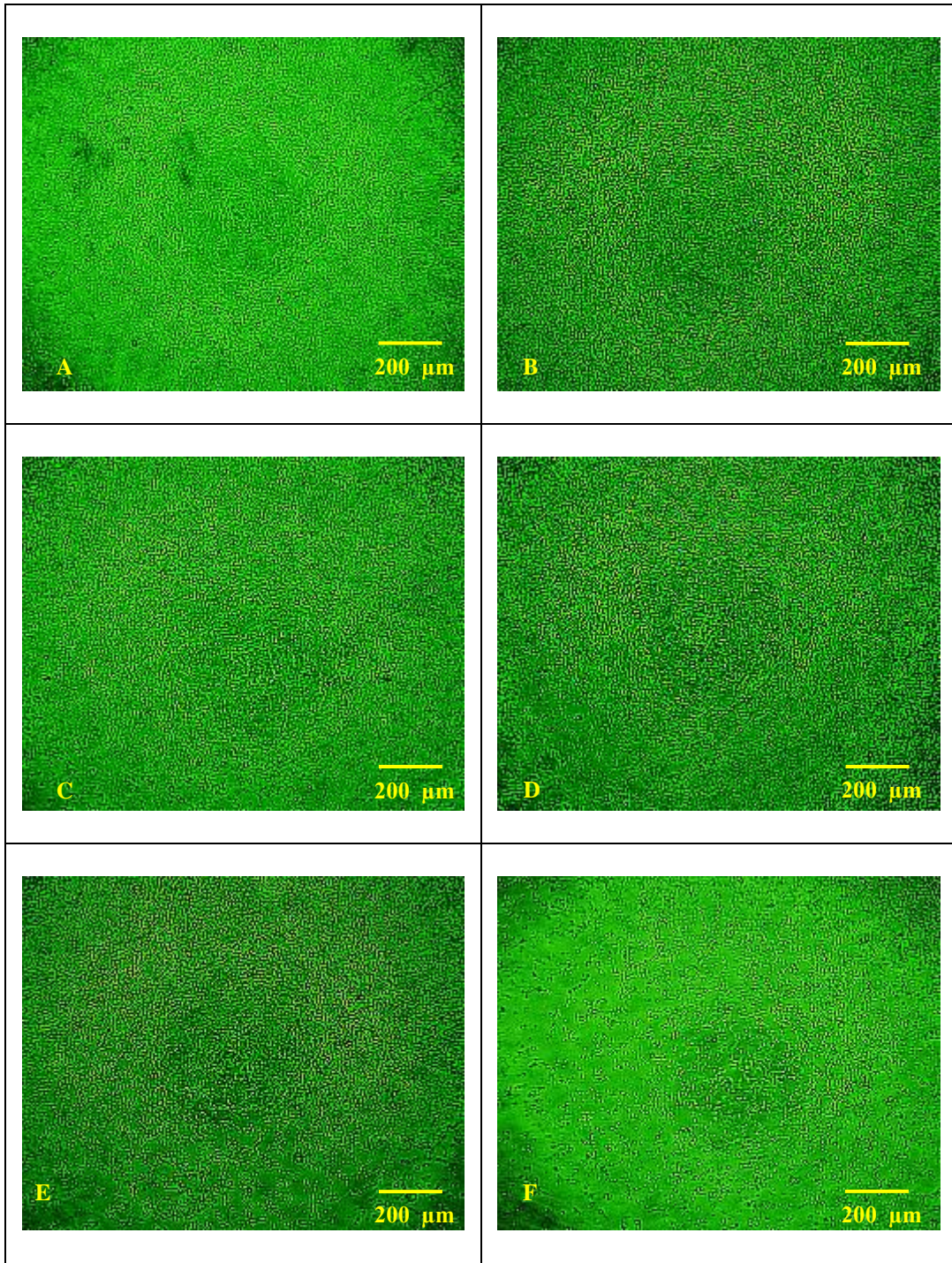


Şekil 3.10. Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazın Au(III) kompleksinin $[\text{Au}(\text{dppz})\text{Cl}_2]\text{Cl}$, 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (1.gün) A:Kontrol, B: DMSO, C:0,5 μM , D:1 μM , E:2 μM , F:5 μM , G:10 μM , H:20 μM , İ:40 μM . Ölçü birimi: 200 μm

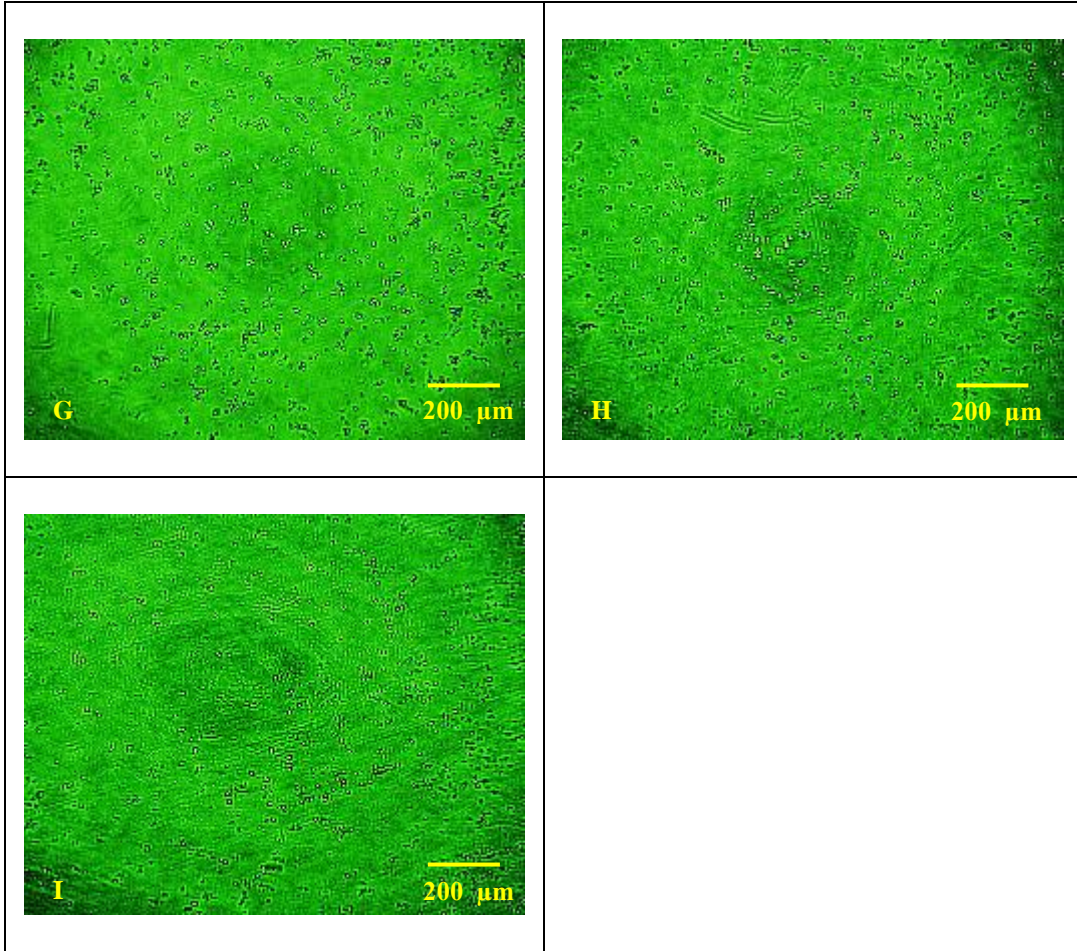


Şekil 3.10. (Devam) Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazinin Au(III) kompleksinin $[\text{Au}(\text{dppz})\text{Cl}_2]\text{Cl}$, 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (1.gün) A:Kontrol, B: DMSO, C:0,5 μM , D:1 μM , E:2 μM , F:5 μM , G:10 μM , H:20 μM , I:40 μM . Ölçü birimi: 200 μm

5RP7 hücrelerinin inverted mikroskopla çekilmiş bu görüntülerinde, 5RP7 hücreleri üzerine denenmiş dipiridofenazinin-altın(III) kompleksinin, hücreler üzerindeki sitotoksitesinin, en düşük konsantrasyondan en yüksek konsantrasyona doğru arttığı gösterilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda (0,5-1-2-5 μM) hücre sayısında azalma oranı birbirine yakın gözlenirken, yüksek konsantrasyonlarda (10-20-40 μM) hücre sayısında azalma büyük oranda gözlenmiştir. Bu konsantrasyonda ölen hücreler, canlı halde iken sahip oldukları yıldızimsı şeklini kaybederek yuvarlak bir hal alıp küme şeklinde bir araya toplandıkları görülmektedir.



Şekil 3.11. Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazin Au(III) kompleksinin $[\text{Au}(\text{dppz})\text{Cl}_2]\text{Cl}$, 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (2.gün) A:Kontrol, B: DMSO, C:0,5 µM, D:1 µM, E:2 µM, F:5 µM, G:10 µM, H:20µM, İ:40µM. Ölçü birimi: 200µm



Şekil 3.11. (Devam) Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazin Au(III) kompleksinin $[\text{Au}(\text{dppz})\text{Cl}_2]\text{Cl}$, 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (2.gün) A:Kontrol, B: DMSO, C:0,5 μM , D:1 μM , E:2 μM , F:5 μM , G:10 μM , H:20 μM , I:40 μM . Ölçü birimi: 200 μm

5RP7 hücrelerinin inverted mikroskopla çekilmiş bu görüntülerinde, 5RP7 hücreleri üzerine denenmiş dipiridofenazin-altın(III) kompleksinin hücreler üzerindeki sitotoksitesinin, en düşük konsantrasyondan en yüksek konsantrasyona doğru arttığı gösterilmiştir. İkinci günde düşük konsantrasyonlar da görüntülenen hücre yoğunluğu, birinci güne göre daha fazladır. Düşük konsantrasyonlar da (0,5-1-2 μM) gözlenen hücrelerde, kontrole göre azalma gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyondaki (5-10-20-40 μM) hücrelerde, hücre sayısındaki azalma oldukça belirgindir. Bu konsantrasyonlarda ölen hücreler, canlı halde iken sahip oldukları yıldızimsı şeklini kaybederek yuvarlak bir hal alıp küme şeklinde bir araya toplandıkları görülmektedir.

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Bir zamanlar tedavi edilemez bir hastalık olduğu düşünülen kanser, dünya genelinde temel bir sağlık problemidir. Fakat bugün erken safhada teşhis edilen çoğu hasta hayatta kalmaktadır (Patra ve ark., 2010). Son 10 yıldır DNA ile etkileşim gösteren transisyon metal kompleksleri, teşhis problemleri, antikanser veya tedavi edici maddeler olarak kullanılmaktadır ve genom araştırmasında da büyük ilgi görmüşlerdir. Barton ve arkadaşları bir transisyon metal olan dipiridofenazin ligandının büyük aromatik yapısından dolayı DNA eklenme yeteneğine sahip olduğunu göstermişlerdir (Terenzi ve ark., 2009). DNA molekülü boyunca spesifik bölgelerine bağlanan küçük moleküllerin potansiyel kemoterapötik ajanlar olduğu düşünülmektedir. Çok sayıda DNA etkileşimli heterosiklik bileşikler değerlendirilmiştir. Bunlar arasında transisyon metallerle kompleks olan dipiridofenazin de bulunmaktadır (Szczeapanik ve ark. 2009). Metal iyonlar ya tedavi ya da teşhis amaçlı olarak bir biyolojik sistemde uygulanabilmektedir. Metal bileşiğin aktivite göstermesinde, hangi bölümünün etkin olduğuna yönelik metalin kendisi mi, ligand madde mi, yoksa metal-ligand kompleksi mi soruları önemlidir. Uygun hale getirilen çok fonksiyonlu metal temelli ilaç ligandlar, çok fazla merak konusudur.

Organometalik kimya uygulamalarında, biyoloji ve ilaca karşı artan bir ilgi vardır. Organometalik kimya 20.yy'ın ikinci yarısında hızla gelişmiştir, organometalik kompleksler, antikanser ajanlar olarak yoğun ilgi görmektedir. Özellikle bir metal grubu ile bileşik yapan dipiridofenazin gibi ligand maddeler araştırılmaktadır (Ronconi ve Sadler, 2007). Bununla birlikte metal kompleksler, DNA problemleri gibi kullanılmışlardır. Sadece platin ailesi bileşikleri yaygın şekilde kemoterapötik ajanlar olarak kullanılmaktadır (Granger ve ark., 2005). Platin(II)'nin DNA merkezine bağlanması ile ya nekrozis ya da apoptozis meydana gelerek, hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Cisplatin ve platin temelli bileşikler çeşitli tümörlere karşı yüksek aktivite göstermektedir. Bu özellik yeni antitümör ajanların araştırılması için önemlidir (Aguirre ve ark., 2009). Altın(III) koordinasyonu, Pt(II) ile izoelektroniktir ve bu benzerlikten dolayı altın(III) kompleksleri, antikanser ilaçlar olarak test edilmek ve geliştirilmek için iyi

adaylar olarak gösterilmektedir. Bazı çalışmalarda yeni altın(III) bileşiklerinin hem *in vitro* da hem *in vivo* da uygun antitümör özellikler gösterdiği rapor edilmiştir. Organoaltın(III) bileşiklerinin sitotoksitesisi ve antitümör özellikleri DNA zararıyla sonuçlanmaktadır (Carotti ve ark., 1998).

Etkili kanser tedavileri, hücrelerin DNA'larına zarar vererek ya da apoptozisi tetikleyerek kanser hücrelerinin çoğalmasını yok eder. Hücre döngüsünün bozulması tümör hücrelerinin ayırıcı bir özelliği olarak bilinmektedir. DNA zararına karşı hücre sel cevap çoğunlukla hücre döngüsünün G1 ve G2 fazında durdurulmasıdır. Hücre döngüsünün durdurulması, DNA replikasyonu için, hücre S fazına girmeden önce zararın onarılması için hücrelere izin verir. DNA zararının onarımı sırasındaki başarısızlık, mutasyonlara ve sonuçta hücrenin ölümüne neden olacaktır (Feng ve ark., 2010).

Apoptozis (programlı hücre ölümü), normal gelişimde önemli fizyolojik bir süreçtir ve apoptozisin tetiklenmesi, kanser kontrolü için tedavi edici bir strateji olarak son derece uygun görülen bir yöntemdir (Kim ve ark., 2006). Apoptozis genetiksel olarak kontrol edilebilir ve gelişim süresince gereksiz hücreleri ortadan kaldırmak için önceden programlanmıştır. Apoptozis, radyasyon zararı, viral enfeksiyon veya onkogenler tarafından tetiklenen anormal hücre gelişimine acil bir yanıt olarak kullanılır. Apoptozis ve nekrozis, ökaryotik hücre ölümünün iki bilinen mekanizmasıdır. Bu mekanizmaları anlamak yeni terapötik stratejilere öncülük edebilir (Chen ve ark., 2010).

Apoptozis, kanser hastalığının gelişiminde temel bir bileşen olarak kabul edilmiştir. Kanser kökeni, apoptotik ürünlerin baskılanmasını ve hücre sel çoğalmayı kontrol dışı bırakmayı içerir. Kontrolsüz hücre çoğalması ve hücre apoptozisi, tümör hücreleri ve normal hücreler arasındaki ayırıcı farktır. Bununla birlikte apoptozis artışı, tümör gelişimini durdurur ve bir dizi antitümör gelişim tedavileri, tümör hücre apoptozisini tetiklemeyi amaçlar (Ge ve ark., 2009). Kanser tedavisindeki temel sorun p53, BCL ailesi proteinleri veya kaspaz sinyalleri gibi apoptotik genlerinde mutasyon taşıyan tümör hücreleridir (Kim ve ark., 2006). Apoptotik uyarıcı, DNA'nın fragmentasyonunda temel etkisi olan kaspazların (sistein proteazlar) kademeli bir etkileşimi olarak bilinmektedir (Eguchi ve ark., 2009).

Sitotoksositeyi belirlemek için hücre hatları kullanılarak *in vitro* testler uygulanmaktadır. İlaç gelişim sistemleri için özellikle bölgesel toksisite önemli bir kaygıdır. Laboratuvar hayvanları ile güvenli çalışma alanı sağlamak için *in vitro* hücre kültürü modelleri son zamanlarda daha fazla önem kazanmıştır (Zange ve Kissel, 1997).

Bu tez çalışmasında, dipiridofenazın (dppz) ligand madde, bu ligand maddenin Pt(II) ve Au(III) metal komplekslerinin, 5RP7 (*h-ras* onkogeni transforme edilmiş sıçan embriyo fibroblastı) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT testi ve fluoresan boyama (DAPI) yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmamızda kullanılan dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazın, 2,2'-bipiridin ve fenazın halkalarının kimyasal olarak formüle edilip birleşmesinden ya da 1,10-phenanthroline ve quinoxaline'nin kimyasal olarak formüle edilmesinden oluşmaktadır (Arancibia ve ark., 2001).

Yapılan bir çalışmada, HL-60 (insan akut promiyositik lösemi kanseri) hücreleri üzerine, dppz ligandı ile vanadilin kombine edilmiş kompleksi ve cisplatinin, 24 saat sonundaki IC₅₀ (hücre canlılığını %50 inhibe eden konsantrasyon) değerleri kıyaslanmıştır. IC₅₀ değeri düşük olan maddenin HL-60 hücrelerine karşı daha hızlı sitotoksik etki gösterdiği şeklinde yorum getirilmiştir. Bu çalışmada dppz-V (dipiridofenazın-vanadil) kompleks maddesinin cisplatinden daha düşük IC₅₀ değerine sahip olduğu görülmüştür (Benitez ve ark., 2009).

Scharwitz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 96 saat sonunda MCF-7 (göğüs kanseri) ve 72 saat sonunda HT-29 (kolon kanseri) hücreleri üzerine dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazın ligand maddesinin ve pozitif kontrol maddesi cisplatinin sitotoksik etkileri gözlenmiştir. Dipiridofenazın ligandının IC₅₀ değeri, yukarıda verilen hücre sırasına göre 0,8(0,6) µM ve 1,8(0,2) µM'dır. Cisplatinin IC₅₀ değerleri sırasıyla 2(0,3) µM ve 7,0(2,0) µM'dır. Dipiridofenazın ligandının, cisplatinden daha düşük IC₅₀ değerine sahip olduğu görülmüştür. (Scharwitz ve ark., 2008). Bu da dipiridofenazın ligandının, cisplatinden daha etkili bir madde olduğu yönünde düşünülebilir.

Roy ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada MTT testi kullanılarak, A498 (insan karaciğer adenokarsinoması), EVSA-T (göğüs kanseri), H226 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri), IGROV-1 (ovaryum kanseri), M19-MEL

(melanoma kanseri), MCF-7 (cisplatin duyarlı göğüs kanseri), WIDR (kolon kanseri), A2780 (cisplatin duyarlı ovaryum kanseri), A2780R (cisplatin dirençli ovaryum kanseri) hücreleri üzerine DMSO'da çözülmüş dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazin ligandı ve pozitif kontrol maddesi cisplatinin sitotoksik etkilerine bakılmış ve dipiridofenazin (dppz) ligandının 48 saat sonunda 9 hücre kültüründen sadece dördüne (A498, H226, A2780 ve A2780R) karşı cisplatinden daha düşük IC₅₀ değerine sahip olduğu gözlenmiştir. Çünkü dppz IC₅₀ değerleri A498'de 4,01 µM, H226'da 3,28 µM, A2780'de 2,18 µM, A2780R'de 1,33 µM'dır. Ancak cisplatin IC₅₀ değerleri A498'de 7,5 µM, H226'da 10,9 µM, A2780'de 5,22 µM, A2780R'de 8,41 µM'dır. Bu dört hücre içinde cisplatin dirençli ovaryum hücresi de mevcuttur. Sonuç olarak, dört hücreye karşı dppz ligandının, cisplatinden daha fazla sitotoksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Dipiridofenazin ligandın, spesifik bir antitümör ilacı geliştirmek için uygun potansiyele sahip olduğu rapor edilmiştir (Roy ve ark., 2008).

Çalışmamızda elde edilen deney sonuçları incelendiğinde dipiridofenazin ligandının 24 saat sonundaki IC₅₀ değerinin (5-10 µM), cisplatinin IC₅₀ değerinden (20-40 µM) düşük olduğu belirlenmiştir. Ligand maddemizin 48 saat sonundaki IC₅₀ değeri (2 µM), cisplatinin aynı süre sonundaki IC₅₀ değerinden (2,5 µM) yine düşük olarak saptanmıştır. Buna göre ligand maddemizin cisplatinden daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduğu düşünülebilir. Ligand maddemizin uygulandığı tüm konsantrasyonlarda hücreler üzerine sitotoksik etki gözlenmiştir. Ancak düşük konsantrasyonlarda düşük oranda sitotoksik etki gözlenirken, yüksek konsantrasyonlarda büyük oranda sitotoksik etki görülmektedir. Yapılan MTT sitotoksikite testine göre, dppz ligandın 10, 20 ve 40 µM lık dozlarında hücre canlılığını ilk gün %30 ile ikinci gün %3 arasında değişen seviyeye kadar düşürdüğü, bu dozların sitotoksik etki gösterdiği ve hücre sayısında büyük oranda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. 0,5-1-2-5 µM 'lık konsantrasyonlarında hücre sayısında zamana ve doza bağlı olarak bir azalma gözlenmiştir. Ancak 10, 20 ve 40 µM'lık konsantrasyonlarında zamana bağlı bir azalma gözlenirken, doza bağlı bir azalma gözlenmemiştir.

Roy ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada MTT testi kullanılarak, A498 (insan karaciğer adenokarsinoması), EVSA-T (göğüs kanseri), H226 (küçük

hücreli olmayan akciğer kanseri), IGROV-1 (ovaryum kanseri), M19-MEL (melanoma kanseri), MCF-7 (cisplatin duyarlı göğüs kanseri), WIDR (kolon kanseri), A2780 (cisplatin duyarlı ovaryum kanseri), A2780R (cisplatin dirençli ovaryum kanseri) hücreleri üzerine DMSO'da çözülmüş Pt(dppz)Cl₂ ve pozitif kontrol maddesi cisplatinin sitotoksik etkilerine bakılmıştır ve 48 saat sonunda, Pt(dppz)Cl₂'nin, 9 hücre kültürü üzerinde de cisplatinin IC₅₀ değerlerine kıyasla daha büyük IC₅₀ değerlerine sahip olduğu gözlenmiştir Çünkü Pt(dppz)Cl₂ kompleksinin IC₅₀ değerleri A498'de 33,8 µM, EVSA-T'de 16,4 µM, H226'da 39,8 µM, IGROV-1'de 43,8 µM, M19-MEL'de 20,5 µM, MCF-7'de 21,3 µM, WIDR'de 45,9 µM, A2780'de 13,2 µM, A2780R'de 19,3 µM'dır. Ancak cisplatinin IC₅₀ değerleri A498'de 7,5 µM, EVSA-T'de 1,4 µM, H226'da 10,9 µM, IGROV-1'de 0,5 µM, M19-MEL'de 1,85 µM, MCF-7'de 2,32 µM, WIDR'de 3,22 µM, A2780'de 5,22 µM, A2780R'de 8,41 µM'dır. Bu durum, yapılan bu çalışmada kompleks maddenin, hücreler üzerine cisplatin kadar sitotoksik olmadığına kanıtı olarak düşünülebilir (Roy ve ark., 2008).

Bizim çalışmamızda yukarıda ifade edilen aynı madde dipiridofenazin-platin(II) [Pt(dppz)Cl₂] kompleksinin, 5RP7 hücreleri üzerine MTT testi ile sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir ve 24 saat sonunda IC₅₀ değeri (20 µM), cisplatinin IC₅₀ değerinden (20-40 µM) daha düşük değere sahip olduğu gözlenmiştir. Pt(dppz)Cl₂ kompleksinin, hücreler üzerine cisplatin'den daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduğu düşünülebilir. Ancak 48 saat sonundaki IC₅₀ değerlerini kıyaslırsak cisplatin, kompleks maddeden daha fazla sitotoksiktir. Çünkü cisplatinin IC₅₀ değeri 2,5 µM iken, kompleks maddemizin IC₅₀ değeri 5 µM olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazin-platin(II) [Pt(dppz)Cl₂] kompleksinin, 5RP7 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesini dipiridofenazin ligandı ile kıyaslırsak, her iki gün sonunda da ligand madde daha etkilidir. Pt(dppz)Cl₂, tüm konsantrasyonlarda zamana ve doza bağlı bir azalma sağlamıştır.

Çalışmamızda kullanılan dipiridofenazin-altın(III) [Au(dppz)Cl₂]Cl kompleksinin, 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesine bakılmıştır ve 24 saat sonundaki IC₅₀ değeri (10 µM), cisplatinin IC₅₀ değeri (20-40 µM) ile kıyaslandığında daha düşük değere sahip olduğu görülmüştür. Bu durum,

kompleks maddemizin cisplatinden daha etkili olduğu yönünde düşünülebilir. Her iki maddenin 48 saat sonundaki IC₅₀ değerlerine bakarsak cisplatin, kompleks maddeden daha fazla sitotoksiktir diyebiliriz. Çünkü cisplatinin IC₅₀ değeri 2,5 µM iken, kompleks maddenin IC₅₀ değeri 2-5 µM olarak belirlenmiştir. Dipiridofenazin-altın(III) kompleksinin IC₅₀ değerini, diğer maddelerimiz ile karşılaştırırsak, ligand madde ile aynı oranda sitotoksik ya da ondan daha az sitotoksik olabileceği düşünülebilir. Ancak dipiridofenazin-platin(II) kompleksinden çok daha fazla sitotoksik olduğu söylenebilir. [Au(dppz)Cl₂]Cl maddemizin, 10, 20 ve 40 µM'lık konsantrasyonlarda hücre canlılığını ilk gün %48 ile ikinci gün %10 arasında değişen değerlere düşürdüğü gözlenmiştir. Hücre sayısında büyük oranda azalmaya neden olduğu görülmektedir. Düşük konsantrasyonlarda (0,5-1-2-5 µM) doza ve zamana bağlı bir azalma gözlenirken, yüksek konsantrasyonlarda (10-20-40 µM) ikinci gün sonunda doza bağlı bir azalma gözlenmemiştir.

Son olarak Roy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaların bulgularına göre pozitif kontrol madde cisplatin, dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazin ligandı ve dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazin-platin(II) [Pt(dppz)Cl₂] kompleksinin 48 saat sonundaki IC₅₀ değerlerini, çalışmamız sonucu elde edilen IC₅₀ değerleri ile kıyaslırsak bizim deneylerimizdeki IC₅₀ değerleri daha düşüktür (sadece ligand maddesinin denendiği A2780R hücresi hariç). Bunun nedeni olarak kullanılan hücre hatlarının farklı oluşu düşünülebilir.

DAPI kullanılarak yapılan floresan boyamada, dört maddenin de, MTT testleri ile belirlenmiş olan sitotoksik dozunun (10 µM) uygulanmasıyla 5RP7 hücrelerini apoptozise götürdüğü tespit edilmiştir. Apoptozis sonucu meydana gelen morfoloji, hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, sitoplazmik cepçik ve DNA fragmentasyonu şeklinde görülmüştür. Maddelerimizin uygulandığı konsantrasyonda (10 µM) hücrelerin apoptozisinin yanı sıra hücre sayısındaki azalma da belirlenmiştir. Apoptotik hücrelerin morfolojisi, kontrol hücrelerinin morfolojisi ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasında kullanılan ligand madde, her iki gün sonunda cisplatinden daha sitotoksik olarak belirlenmiştir. Ligand maddenin altın(III) ve platin(II) kompleksleri hücreler üzerine ilk gün sonunda cisplatinden daha

sitotoksik iken, ikinci gün sonunda cisplatin bu iki maddeden daha sitotoksik olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak ligand madde başta olmak üzere, her üç maddenin de kemoterapötik ilaç gelişiminde kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbate, F., Orioli, P., Bruni, B., Marcon, G., Messori, L. (2000), "Crystal structure and solution chemistry of the cytotoxic complex 1,2-dichloro(*o*-phenanthroline)gold(III) chloride," *Inorganica Chimica Acta* **311**, 1–5.
- Adams, J.M., Cory, S. (2002), "Apoptosomes: engines for caspase activation," *Current Opinion in Cell Biology*, **14**:715–720.
- Aggarwal, B.B., Danda, D., Gupta, S., Gehlot, P. (2009), "Models for prevention and treatment of cancer: Problems vs promises," *Biochemical Pharmacology*, **78**, 1083-1094.
- Aguirre, J.D., Angeles-Boza, A.M., Chouai, A., Turro, C., Pellois, J.P., Dunbar, K.R. (2009), "Anticancer activity of heteroleptic diimine complexes of dirhodium: A study of intercalating properties, hydrophobicity and *in cellulosa* activity," *Dalton Trans.*, 10806–10812.
- Alama, A., Tasso, B., Novelli, F., Sparatore, F. (2009), "Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotin as antitumor agents," *Drug discovery today*, Volume 14, 500-508.
- Alamdari, D.H., Kostidou, E., Paletas, K., Sarigianni, M., Konstas, A.G.P., Karapiperidou, A., Koliakos, G. (2005), "High sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for measuring protein carbonyl in samples with low amounts of protein," *Free Radical Biology & Medicine*, **39**, 1362 – 1367.
- Arancibia, A., Concepcion, J., Daire, N., Leiva, G., Leiva A.M., Loeb, B., Del Rio, R., Diaz, R., Francois, A., Saldivia, M. (2001), "Electronic effects of donor and acceptor Substituents On dipyrido(3,2-A:2',3'-C)phenazine (dpzz)," *J. Coord. Chem.*, Vol. 54, pp. 323-336.
- Arnoult, D. (2008), "Apoptosis-associated mitochondrial outer membrane permeabilization assays," *Methods*, **44**, 229–234.
- Benitez, J., Guggeri, L., Tomaz, I., Pessoa, J.C., Moreno, V., Lorenzo, J., Aviles, F.X., Garat, B., Gambino, D. (2009) "A novel vanadyl complex with a polypyridyl DNA intercalator as ligand: A potential anti-*protozoa* and anti-tumor agent," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **103**, 1386-1394.

- Budzisz, E., Krajewska, U., Rozalski, M., Szulawska, A., Czyz, M., Nawrot, B. (2004), "Biological evaluation of novel Pt(II) and Pd(II) complexes with pyrazole-containing ligands," *European Journal of Pharmacology*, **502**, 59-65.
- Bradley, P.M., Angeles-Boza, A.M., Dunbar, K.R., Turro, C. (2004), "Direct DNA Photocleavage by a New Intercalating Dirhodium(II/II) Complex: Comparison to Rh₂(*i*-O₂CCH₃)₄," *Inorg. Chem.*, **43**, 2450-2452.
- Brink, A., Schulz, B., Kobras, K., Lutz, W.K., Stopper, H. (2006), "Time-dependent effects of sodium arsenite on DNA breakage and apoptosis observed in the comet assay," *Mutation Research*, **603**, 121-128.
- Bruijninx, P.C.A., Sadler, P.J. (2008), "New trends for metal complexes with anticancer activity," *Current Opinion in Chemical Biology*, **12**:197-206.
- Bruin, E.C., Medema, J.P. (2008), "Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response," *Cancer Treatment Reviews*, **34**, 737-749.
- Calamai, P., Guerri, A., Messori, L., Orioli, P., Speroni, G.P. (1999), "Structure and DNA binding properties of the gold(III) complex [AuCl₂(esal)]," *Inorganica Chimica Acta*, **285**, 309-312.
- Carotti, S., Guerri, S., Mazzei, T., Messori, L., Mini, E., Orioli, P. (1998), "Gold(III) compounds as potential antitumor agents: cytotoxicity and DNA binding properties of some selected polyamine-gold(III) complexes," *Inorganica Chimica Acta*, **281**, 90-94.
- Casas, J.S., Castano, M.V., Cifuentes, M.C., Garcia-Monteagudo, J.C., Sanchez, A., Sordo, J., Abram, U. (2004), "Complexes of dichloro[2-(dimethylaminomethyl)phenyl-C¹, N]gold(III), [Au(damp-C¹,N)Cl₂], with formylferrocene thiosemicarbazones: synthesis, structure and cytotoxicity," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **98**, 1009-1016.
- Castellanos, A., Vicente-Duenas, C., Campos-Sanchez, E., Cruz, J.J., Garcia-Criado, F.J., Garcia-Cenador, M.B., Lazo, P.A., Perez-Losada, J., Sanchez-Garcia, I. (2010), "Cancer as a reprogramming-like disease: Implications in tumor development and treatment," *Seminars in Cancer Biology*, **20**, 93-97.

- Chan, H.C., Kuo, S.C., Liu, S.C., Liu, C.H., Hsu, S.L. (2002), "4-Fluoro-N-butylphenylacetamide: a synthetic phenylacetate derivative that upregulates Bcl-Xs, activates caspase cascade and induces apoptosis in human squamous lung cancer CH27 cells," *Cancer Letters*, **186**, 211-221.
- Che, C.-M., Yang, M., Wong, K.-H., Chan, H.-L., Lam, W. (1999), "Platinum(II) Complexes of Dipyridophenazine as Metallointercalators for DNA and Potent Cytotoxic Agents against Carcinoma Cell Lines," *Chem. Eur. J.*, **5**, No.11.
- Chen, P.-C., Wu, J.-L., Her, G.M., Hong, J.-R. (2010), "Aquatic birnavirus induces necrotic cell death via the mitochondria-mediated caspase pathway," *Fish & Shellfish Immunology*, **28**, 344-353.
- Darzynkiewicz, Z., Pozarowski, P., Juan, G. (2006), "Cell Cycle Analysis by Flow and Laser-Scanning Cytometry," *Cell Biology*, Copyright 2006, Elsevier Science (USA), All rights reserved, 279-289.
- Denecker, G., Doms, H., Loo, G.V., Vercammen, D., Grooten, J., Fiers, W., Declercq, W., Vandenabeele, P. (2000), "Phosphatidyl serine exposure during apoptosis precedes release of cytochrome c and decrease in mitochondrial transmembrane potential," *FEBS Letters*, **465**, 47-52.
- Doğan, A., Doğan A.L., Canpınar, H., Demirpençe, E. (2004) "Hidroksiürenin Lökositlerin Mikrobisid Fonksiyonlarına Etkileri," *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem]*; **29 (3)**; 232-236.
- Eguchi, R., Tone, S., Suzuki, A., Fujimori, Y., Nakano, T., Kaji, K., Ohta, T. (2009), "Possible involvement of caspase-6 and -7 but not caspase-3 in the regulation of hypoxia-induced apoptosis in tube-forming endothelial cells," *Experimental Cell Research*, **315**, 327-335.
- Elmore, S. (2007), "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death," *Toxicol Pathol*, **35(4)**: 495-516.
- Feng, B., Guo, Y.W., Huang, C.G., Li, L., Chen, R.H., Jiao, B.H. (2010), "2'-epi 2'-O-Acetylthevetin B extracted from seeds of *Cerbera manghas* L. Induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells," *Chemico-Biological Interactions*, **183**, 142-153.

- Feng, S.S., Chien, S. (2003), "Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases," *Chemical Engineering Science*, **58**, 4087–4114.
- Franco, O.E., Shaw, A.K., Douglas, W.S., Hayward, S.W. (2010), "Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis," *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **21**, 33-39.
- Formigari, A., Irato, P., Santon, A. (2007), "Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects," *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 146, 443–459.
- Fotakis, G., Timbrell, J.A. (2006) "In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride," *Toxicology Letters*, **160**, 171-177.
- Galani, V., Tatsaki, E., Bai, M., Kitsoulis, P., Lekka, M., Nakos, G., Kanavaros, P. (2010), "The role of apoptosis in the pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): An up-to-date cell-specific review," *Pathology Research and Practice*, **206**, 145–150.
- Garbisa, S., Pozzatti, R., Muschel, R.J., Saffiotti, U., Ballin, M., Goldfarb, R.H., Khoury, G., and Liotta, L.A. (1987) "Secretion of type IV collagenolytic protease and metastatic phenotype: induction by transfection with c-Ha-ras but not c-Ha-ras plus Ad2-E1a," *Cancer Res.*, **47**: 1523-1528.
- Garza-Ortiz, A. (2008), *Design, synthesis, characterization and biological studies of ruthenium and gold compounds with anticancer properties*, doctoral thesis, Leiden Institute of Chemistry, Faculty of Science, Leiden University, in Dutch.
- Gazi, C., Tapul, L. (2006) "C6 sıçan glioma hücreleri üzerine Aloe emodin ve cisplatinin etkilerinin iki ve üç boyutlu hücre kültür modellerinde incelenmesi," *İst.Tıp Fak. Derg.*; **69**; 110-116.
- Ge, Y.-L., Zhang, X., Zhang, J.-Y., Hou, L., Tian, R.-H. (2009), "The mechanisms on apoptosis by inhibiting VEGF expression in human breast cancer cells," *International Immunopharmacology*, **9**, 389–395.

- Gichner, T., Mukherjee, A., Wagner, E.D., Plewa, M.J. (2005), "Evaluation of the nuclear DNA Diffusion Assay to detect apoptosis and necrosis," *Mutation Research*, **586**, 38–46.
- Granger, R.M., Davies, R., Wilson K.A., Kennedy, E., Vogler, B., Nguyen, Y., Mowles, E., Blackwood, R., Ciric, A., White, P.S. (2005), "A New *Cis*-Platin Analog? The Synthesis, Characterization, Selective Cytotoxicity And Dna Binding Studies Of Tetrachloro(1,10-Phenanthroline-5,6-Dione) Platinum(IV); X-Ray Structure Analysis Of Dichloro(1,10-Phenanthroline-5,6-Dione) Platinum(II)," *Journal of Undergraduate Chemistry Research*, **2**, 47.
- Günes, D.A., Florea, A., Splettstoesser, F., Büsselberg, D. (2009), "Co-application of arsenic trioxide (As₂O₃) and cisplatin (CDDP) on human SY-5Y neuroblastoma cells has differential effects on the intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) and cytotoxicity," *Neurotoxicology*, **30**, 194-202.
- Hakumaki, J.M., Liimatainen, T. (2005), "Molecular imaging of apoptosis in cancer," *European Journal of Radiology*, **56**, 143–153.
- Han, Z.B. (2006) "Di- μ -chloro-bis[chloro(dipyridophenazine- κ^2 N,N')copper(II)]," *Acta Cryst.*, **E62**, m2059-m2060.
- He, Y.K., Han, Z.B. (2006) "Di- μ -sulfato-bis[aqua(dipyridophenazine)-copper(II)]dihydrate," *Acta Cryst.*, **E62**, m2676-m2677.
- Holden, N.S., Tacon, C.E. (2010), "Principles and problems of the electrophoretic mobility shift assay," *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, JPM-05907, 1-8.
- Holst, C.M., Oredsson, S.M. (2005), "Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell lines," *Toxicology in Vitro* **19**, 379–387.
- Hornof, M., Toropainen, E., Urtti, A. (2005), "Cell culture models of the ocular barriers," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **60**, 207–225
- Huerta, S., M.D., Goulet, E.J., B.S., Huerta-Yepey, S., Ph.D., Livingston, E.H., M.D., F.A.C.S. (2007), "Screening and Detection of Apoptosis," *Journal of Surgical Research*, **139**, 143–156.

- Huveneers-Oorsprong, M.B.M., Hoogenboom, L.A.P., Kuiper, H.A. (1997), "The Use of the MTT Test for Determining the Cytotoxicity of Veterinary Drugs in Pig Hepatocytes," *Toxicology in Vitro* **11**, 385-392.
- Kaufmann, S.H., Lee, S.H., Meng, X.W., Loegering, D.A., Kottke, T.J., Henzing, A.J., Ruchaud, S., Samejima, K., Earnshaw, W.C. (2008), "Apoptosis-associated caspase activation assays," *Methods*, **44**, 262–272.
- Kiechle, F.L., Zhang, X. (2002), "Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications," *Clinica Chimica Acta*, **326**, 27–45.
- Kim, M.-J., Kim, Y.-J., Park, H.-J., Chung, J.-H., Leem, K.-H., Kim, H.-K. (2006), "Apoptotic effect of red wine polyphenols on human colon cancer SNU-C4 cells," *Food and Chemical Toxicology*, **44**, 898–902.
- Kitamura, Y., Ihara, T., Shirasaka, Y., Mitsuru, T., Tazaki, M., Jyo, A. (2003) "Highly enhanced duplex stability of dipyrido [3,2-a:2',3'-c] phenazine-modified oligonucleotide conjugate," *Oxford University Press, Nucleic Acids Research Supplement No.3*, 95-96.
- Krishan, A., Dandekar, P.D. (2005), *DAPI Fluorescence in Nuclei Isolated from Tumors*, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, Volume 53(8): 1033-1036.
- Krysko, D.V., Berghe, T.V., D'Herde, K., Vandenabeele, P. (2008), "Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis," *Methods*, **44**, 205–221
- Laken, H.A., Leonard, M.W. (2001), "Understanding and modulating apoptosis in industrial cell culture," *Current Opinion in Biotechnology*, **12**:175–179.
- Lange, T.S., Kwang Kim, K., Singh, R.K., Strongin, R.M., McCourt, C.K., Brard, L. (2008), "Iron(III)-Salophene: An Organometallic Compound with Selective Cytotoxic and Anti-Proliferative Properties in Platinum-Resistant Ovarian Cancer Cells," *PLoS ONE* 3(5): e2303. doi:10.1371/journal.pone.0002303, 1-10.
- Li, H.N., Nie, F.F., Liu, W., Dai, O.S., Lu, N., Qi, Q., Li, Z.Y., You, Q.D., Guo, Q.L. (2009), "Apoptosis induction of oroxylin A in human cervical cancer HeLa cell line in vitro and in vivo," *Toxicology*, **257**, 80–85.

- Li, Y., Ma, C., Wang, Z., Chen, G., Ahn, K., Lazarus, P., Wu, R. (2010), "A disequilibrium model for detecting genetic mutations for cancer," *Journal of Theoretical Biology*, **265**, 218–224.
- Ma, D.L., Che, C.M., Yan, S.C. (2009), "Platinum(II) Complexes with Dipyrrophenazine Ligands as Human Telomerase Inhibitors and Luminescent Probes for G-Quadruplex DNA," *J. AM. CHEM. SOC.*, **131**, 1835–1846.
- Marcon, G., Messori, L., Orioli, P., Cinellu, M.A., Minghetti, G. (2003), "Reactions of gold(III) complexes with serum albumin," *Eur.J.Biochem.* **270**, 4655–4661.
- Maruyama, K., Mishima, Y., Minagawa, K., Motonaka, J. (2001), "Electrochemical and DNA-binding properties of dipyrrophenazine complexes of osmium(II)," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **510**, 96–102.
- Marzano, C., Trevisan, A., Giovagnini, L., Fregona, D. (2002), "Synthesis of a new platinum(II) complex: anticancer activity and nephrotoxicity in vitro," *Toxicology In Vitro*, **16**, 413-419.
- McGowan, P.C. (2005), *Metal complexes as pharmaceuticals*, Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. A, **101**, 631-648, School of Chemistry, University of Leeds, Leeds, UK LS2 9JT.
- Michalke, B. (2010), "Platinum speciation used for elucidating activation or inhibition of Pt-containing anti-cancer drugs," *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 1-9.
- Miernicka, M., Szulawska, A., Czyz, M., Lorenz, I.P., Mayer, P., Karwowski, B., Budzisz, E. (2008), "Cytotoxic effect, differentiation, inhibition of growth and theoretical calculations of an N,N-donor ligands and its platinum(II), palladium(II) and copper(II) complexes," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **102**, 157–165.
- Milacic, V., Ping Dou, Q. (2009) "The tumor proteasome as a novel target for gold(III) complexes: Implications for breast cancer therapy," *Coordination Chemistry Reviews*, **253**, 1649–1660.

- Miranda, F.S., Signori, A.M., Vicente, J., Souza, B., Priebe, J., Szpoganicz, B., Gonçalves, N.S., Neves, A. (2008), "Synthesis of substituted dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazines and a new heterocyclic dipyrido[3,2-f:2',3'-h]quinoxalino[2,3-b]quinoxaline," *Tetrahedron*, **64**, 5410-5415.
- Monlien, F.J., Helm, L., Abou-Hamdan, A., Merbach, A.E. (2002), "Cyanide and chloride exchange on homoleptic gold(III) square-planar complexes: variable pressure kinetic investigation by heteronuclear NMR," *Inorganica Chimica Acta*, **331**, 257–269.
- Omori, T., Mihara, H., Kurihara, T., Esaki, N. (2009), "Occurrence of phosphatidyl-D-serine in the rat cerebrum," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **382**, 415–418
- Otsuki, Y., Li, Z., Shibata, M.A. (2003), "Apoptotic Detection Methods from Morphology to Gene," *Progr. Histochem. Cytochem.* Vol. 38 No. 3, 275-340.
- Ozban, N. (1988), *Hücre*, Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 37-38.
- Palanichamy, K., Ontko, A.C. (2006), "Synthesis, characterization, and aqueous chemistry of cytotoxic Au(III) polypyridyl complexes," *Inorganica Chimica Acta*, **359**, 44-52.
- Pasetto, L.M., D'Andrea, M.R., Brandes, A.A., Rossi, E., Monfardini, S. (2006), "The development of platinum compounds and their possible combination," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **60**, 59–75.
- Patra, C.R., Bhattacharya, R., Mukhopadhyay, D., Mukherjee, P. (2010), "Fabrication of gold nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer," *Advanced Drug Delivery Reviews*, **62**, 346–361.
- Perkins, E., Calvert, J., Lancon, J.A., Parent, A.D., Zhang, J. (2003), "Inhibition of H-ras as a treatment for experimental brain C6 glioma," *Molecular Brain Research*, **111**, 42-51.
- Pizarro, A.M., Sadler, P.J. (2009), "Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes," *Biochimie*, **91**, 1198-1211.
- Plasier, B., Lloyd, D.R., Paul, G.C., Thomas, C.R., Al-Rubeai M. (1999), "Automatic image analysis for quantification of apoptosis in animal cell culture by annexin-V affinity assay," *Journal of Immunological Methods*, **229**, 81–95

- Portier, B.P., Ferrari, D.C., Tagliatela, G. (2006), "Rapid assay for quantitative measurement of apoptosis in cultured cells and brain tissue," *Journal of Neuroscience Methods*, **155**, 134–142.
- Pucci, D., Albertini, V., Bloise, R., Bellusci, A., Cataldi, A., Catapano, C.V., Ghedini, M., Crispini, A. (2006), "Synthesis and anticancer activity of cyclopalladated complexes containing 4-hydroxy-acridine," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **100**, 1575–1578.
- Putnam, K.P., Bombik, D.W., Doolittle, D.J. (2002), "Evaluation of eight *in vitro* assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate," *Toxicology In Vitro*, **16**, 599-607.
- Rieger, A.M., Hall, B.E., Luong, L.T., Schang, L.M., Barreda, D.R. (2010), "Conventional apoptosis assays using propidium iodide generate a significant number of false positives that prevent accurate assessment of cell death," *Journal of Immunological Methods*, **358**, 81–92.
- Ronconi, L., Sadler, P.J. (2007), "Using coordination chemistry to design new medicines," *Coordination Chemistry Reviews*, **251**, 1633–1648.
- Roy, S., Hagen, K.D., Maheswari, P.U., Lutz, M., Spek, A.L., Reedijk, J., Wezel, G.P. (2008), "Phenanthroline Derivatives with Improved Selectivity as DNA-Targeting Anticancer or Antimicrobial Drugs," *Chem. Med. Chem.*, **3**, 1427 – 1434.
- Rozenfeld-Granot, G., Toren, A., Amariglio, N., Brok-Simoni, F., Rechavi, G. (2001), "Mutation analysis of the FAS and TNFR apoptotic cascade genes in hematological malignancies," *Experimental Hematology*, **29**, 228–233.
- Sandvik, A.K., Alsberg, B.K., Norsett, K.G., Yadetie, F., Waldum, H.L., Laegreid, A. (2006), "Gene expression analysis and clinical diagnosis," *Clinica Chimica Acta*, **363**, 157 – 164.
- Saygı, Ş. (2003) "Deneysel Toksikolojide Toksikite Testleri ve Test Sonuçlarının Önemi," *Gülhane Tıp Dergisi*, **45 (3)** : 291-298.
- Scharwitz, M.A., Ott, I., Gust, R., Kromm, A., Sheldrick, W.S. (2008), "Synthesis, cellular uptake and structure-activity relationships for potent cytotoxic trichloridoiridium(III) polypyridyl complexes," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **102**, 1623–1630.

- Schmidt, M., Bastians, H. (2007), "Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs," *Drug Resistance Updates*, **10**, 162-181.
- Schröterova, L., Kralova, V., Voracova, A., Haskova, P., Rudolf, E., Cervinka, M. (2009), "Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: Comparison of different cytotoxicity assays," *Toxicology in Vitro*, **23**, 1406–1411.
- Schutte, B., Nuydens, R., Geerts, H., Ramaekers, F. (1998), "Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells," *Journal of Neuroscience Methods*, **86**, 63–69.
- Sharma, S.V., Settleman, J. (2010), "Exploiting the balance between life and death: Targeted cancer therapy and oncogenic shock," *Biochem Pharmacol*, 1-8.
- Shemarova, I.V. (2010), "Signaling mechanisms of apoptosis-like programmed cell death in unicellular eukaryotes," *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 155, 341–353.
- Sherman, S.E., Lippard, S.J. (1987), "Structural Aspects of Platinum Anticancer Drug Interactions with DNA," *Chem. Rev.*, **87**, 1153-1181.
- Shiraishi, H., Okamoto, H., Hara, H., Yoshida, H. (2010), "Alternative cell death of Apaf1-deficient neural progenitor cells induced by withdrawal of EGF or insulin," *Biochimica et Biophysica Acta* **1800**, 405–415.
- Szczepanik, W., Kucharczyk-Klaminska, M., Stefanowicz, P., Staszewska, A., Szewczuk, Z., Skała, J., Mysiak, A., Jezowska-Bojczuk, M. (2009), "DNA Oxidative Cleavage Induced by the Novel Peptide Derivatives of 3-(quinoxalin-6-yl)alanine in Combination with Cu(II) or Fe(II) Ions," Hindawi Publishing Corporation, *Bioinorganic Chemistry and Applications*, Article ID 906836, 1-10.
- Terenzi, A., Barone, G., Silvestri, A., Giuliani, A.M., Ruggirello, A., Liveri, V.T. (2009), "The interaction of native calf thymus DNA with FeIII-dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine," *Journal of Inorganic Biochemistry* **103**, 1–9.
- Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Yilmaztepe Oral, A., Demirci, M. (2008), "The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP

- assay depending on the chemotherapeutic drugs tested,” *Toxicology in Vitro*, **22**, 232–239.
- Valentini, A., Pucci, D., Crispini, A., Federici, G., Bernardini, S. (2006), “Acridine Orange based platinum(II) complexes inducing cytotoxicity and cell cycle perturbation in spite of *GSTP1* up-regulation,” *Chemico-Biological Interactions*, **161**, 241-250.
- Vellonen, K.S., Honkakoski, P., Urtti, A. (2004) “Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **23**, 181–188.
- Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C. (2000), “Flow cytometry of apoptotic cell death,” *Journal of Immunological Methods*, **243**, 167–190.
- Voorhoeve, P.M. (2010), “MicroRNAs: Oncogenes, tumor suppressors or master regulators of cancer heterogeneity?,” *Biochimica et Biophysica Acta* **1805**, 72–86.
- Wang, F. (2003), “Cancer Cell Culture-Methods and Protocols,” *In Vitro Cell. Dev. Biol.* (Langdon, S.P.), Methods in Molecular Medicine Series, Human Press, Totowa, New Jersey, , 39:476.
- Warford, A., Flack, G., Conquer, J.S., Zola, H., McCafferty, J. (2007), “Assessing the potential of immunohistochemistry for systematic gene expression profiling,” *Journal of Immunological Methods*, **318**, 125–137.
- Wooster, R., Bachman, K.E. (2010), “Catalogue, cause, complexity and cure; the many uses of cancer genome sequence,” *Current Opinion in Genetics & Development*, **20**:336–341.
- Yaka, E., Yüksel Eğrilmez, M., Keskinoglu, P., Çavdar, Z., Genç, Ş., Genç, K., İyilikçi, L., Yener, G.G. (2006), “Alzheimer Hastalığında Beyin Omurilik Sıvısında (Bos)Biyolojik Belirteçler ve Bos’un PC12 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine İnvitro Etkisinin Değerlendirilmesi,” *Turkish Journal of Geriatrics*; **9** (1): 1-7.
- Young, F.M., Phungtamdet W., Sanderson, B.J.S. (2005), “Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS,” *Toxicology in Vitro*, **19**, 1051–1059.

- Zange, R., Kissel, T. (1997), "Comparative in vitro biocompatibility testing of polycyanoacrylates and poly(D,L-lactide-co-glycolide) using different mouse fibroblast (L929) biocompatibility test models," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **44**, 149-157.
- Zeni, O., Palumbo, R., Bernini, R., Zeni, L., Sarti, M., Scarfi, M.R. (2008) "Cytotoxicity Investigation on Cultured Human Blood Cells Treated with Single-Wall Carbon Nanotubes," *Sensors*, **8**, 488-499.
- Zucker, R.M., Hunter III, E.S., Rogers, J.M. (1999), "Apoptosis and Morphology in Mouse Embryos by Confocal Laser Scanning Microscopy," *Methods*, **18**, 473-480 .