

**BAZI HETEROSİKLIK LİGANDLARIN
AU(III), PT(II) DİNÜKLEER METAL
KOMPLEKSLERİNİN SAĞLAM VE
KANSERLİ HÜCRELER ÜZERİNDEKİ
APOPTOTİK VE ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİ**

Abdullah BARS
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Eylül, 2010

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Abdullah Bars'ın “ Bazı Heterosiklik Ligandların Au(III), Pt(II) Dinükleer Metal Komplekslerinin Sağlam ve Kanserli Hücreler Üzerindeki Apoptotik ve Antiproliferatif Etkileri” 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 TÜYLÜ

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

Enstitü Müdürü

ÖZET**Yüksek Lisans Tezi****BAZI HETEROSİKLİK LİGANDLARIN Au(III), Pt(II)
DİNÜKLEER METAL KOMPLEKSLERİNİN SAĞLAM VE KANSERLİ
HÜCRELER ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK VE ANTİPROLİFERATİF
ETKİLERİ****Abdullah BARS****Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı****Danışman: Doç.Dr. A.Tansu KOPARAL****2010, 68 Sayfa**

Metal temelli ilaçlar uzun zamandan beridir tıpta tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Sisplatin 19.yüzyılın başında ilk olarak keşfedilen metal temelli antikanser ilaçlarından birisidir. Dinükleer Au(III) ve Pt(II) kompleksleri antikanser özellikleri nedeniyle bir çok araştırmaya konu olmuştur.

Bu tezde A549, V79 379A (CHL) hücreleri üzerine değişik dozlarda bazı metal kompleksleri uygulanmıştır. Kullanılan metal kompleksleri Au(III) ve Pt(II)'dir. Mitokodri apoptoza yol açan süreçleri başlatır. A549 ve V79 379A hücrelerinde uygulanan metal komplekslerinin mitokondriyal bozulmaya bağlı olarak hücre çoğalmasına etkisi incelenirken, MTT deneyinden faydalanılmıştır.

Uygulanan test maddeleri doza ve zamana bağlı olarak hücre sayısında bir azalmaya neden olmuştur. Bu maddelerin apoptotik etkileri ise JC-1 boyama ile floresan mikroskopunda araştırılmıştır. Test maddeleri hem A549 hem de V79 379A hücreleri üzerinde apoptotik etki göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Metal Kompleksleri, MTT, JC-1, Apoptozis

ABSTRACT**Master Of Science Thesis****APOPTOTIC AND ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF SOME
HETEROCYCLIC LIGANDS Au(III), Pt(II)' S DINUCLEAR
METAL COMPLEXES ON HEALTY AND CANCEROUS CELL
LINE****Abdullah BARS****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program****Supervisor: Associate Prof. Dr. A.Tansu KOPARAL****2010, 68 Pages**

Metal based-drugs have long been used in medicine for therapeutic. Cisplatin is one of the first metal based-anticancer drugs discovered in the early 19th century. Dinuclear Au(III) and Pt(II) complexes have been subjects of many investigations for their anticancer properties.

In this thesis, some metal complexes were given to A549, V79 379A (CHL) cells with in different doses. Metal complexes which are used in this study are Au(III) ve Pt (II). The processes in which mitochondria initiate apoptosis are started. MTT was made use of while the effects of applied metal complexes on cell profilation because of mithochondrial disruption.

These test substances made remissions on cell number time and dose dependent. JC-1 painting and fluorescence microscope were used to investigate these substances effects on apoptosis. Substances which were used in the study showed apoptotic effects on both A549 and V79 379A (CHL) cells.

Key Words: Metal Complexes, MTT, JC -1, Apoptosis

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii

1. GİRİŞ	1
1.1. Hücre Kültürü.....	2
1.2. Kanser.....	3
1.2.1. Kanserin tanımı.....	4
1.2.2. Kanser ve hücre döngüsü.....	5
1.2.3. Kanser ve kemoterapi.....	6
1.3. Apoptoz.....	7
1.3.1. Apoptozda mitokondrinin işlevi.....	9
1.3.2. Mitokondriyal membran potansiyeli ve apoptoz.....	11
1.4. Metaller ve Kanser.....	12
1.4.1. Ligand-metal kompleksleri ve kanser.....	14
1.5. Çalışmada Kullanılan Hücrelerin Özellikleri.....	16
1.5.1. A549 hücreleri.....	16
1.5.2. V79 379A (CHL) hücreleri.....	16
1.6. Çalışmada Kullanılan Test Maddeleri.....	17
1.6.1. Antikanser ilaç hammaddesi olarak Au(Altın) ve Pt(Platin) kompleksleri.....	17
1.7. Çalışmada Kullanılan Yöntemler.....	19
1.7.1. Mitokondriyal aktiviteye bağlı MTT testi.....	19
1.7.2. Flouresan boyama ile morfolojik inceleme.....	19

2. MATERYAL VE YÖNTEM	21
2.1. Kullanılan İlaç Etken Maddeleri.....	21
2.1.1. Ligandların sentez yöntemleri.....	21
2.1.2. Metal komplekslerinin sentez yöntemleri.....	22
2.1.2.1. [Au(ip)(bipp)]PF ₆ bileşiğinin sentezi.....	24
2.1.2.2. [Au(pip)(bipp)]PF ₆ bileşiğinin sentezi.....	24
2.1.2.3. [Au(ip)(bipp)]PtCl ₂ bileşiğinin sentezi.....	25
2.1.2.4. [Au(pip)(bipp)]PtCl ₂ bileşiğinin sentezi.....	26
2.1.3. Sentezi yapılan bileşiklerin yapı aydınlatma çalışmaları.....	26
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	27
2.3. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	27
2.4. Kullanılan Aletler.....	27
2.5. Kullanılan Hücreler.....	28
2.5.1. A549 hücre kültürü.....	28
2.5.2. V79 379A (CHL) Hücre kültürü.....	28
2.6. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması.....	28
2.7. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması.....	28
2.8. Yöntem.....	29
2.8.1. Hücre kültürü.....	29
2.8.2. Hücrelerin testler için hazırlanması.....	29
2.8.3. MTT ölçümü.....	30
2.8.4. Floresan boyama ile morfolojik inceleme.....	30
2.8.5. Mikroskopi.....	31
2.8.6. Fotoğrafi.....	31
2.9. İstatistik Değerlendirme.....	31
3. BULGULAR	32
3.1. MTT Sonuçları.....	32
3.1.1. Cispt(II)'nin A549 ve V79 379A (CHL) hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri.....	32
3.1.2. [Au(ip)(bipp)]PF ₆ 'nın A549 ve V79 379A (CHL) hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri.....	34

3.1.3. [Au(pip)(bipp)]PF ₆ 'nin A549 ve V79 379A(CHL) hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri.....	36
3.1.4. [Au(ip)(bipp)]PtCl ₂ 'nin A549 ve V79 379A(CHL) hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri.....	39
3.1.5. [Au(pip)(bipp)]PtCl ₂ 'nin A549 ve V79 379A(CHL) hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri.....	41
3.2. Floresan Boyama ile Morfolojik İnceleme Sonuçları.....	43
3.2.1. Cispt(II)'nin A549 ve V79 379A (CHL) hücreleri üzerinde morfolojik incelemeleri.....	43
3.2.2. [Au(ip)(bipp)]PF ₆ 'nin A549 ve V79 379A (CHL) hücreleri üzerinde morfolojik incelemeleri.....	46
3.2.3. [Au(pip)(bipp)] PF ₆ 'nin A549 ve V79 379A(CHL) hücreleri üzerinde morfolojik incelemeleri.....	48
3.2.4. [Au(ip)(bipp)]PtCl ₂ 'nin A549 ve V79 379A(CHL) hücreleri üzerinde morfolojik incelemeleri.....	50
3.2.5. [Au(pip)(bipp)]PtCl ₂ 'nin A549 ve V79 379A(CHL) hücreleri üzerinde morfolojik incelemeleri.....	52
4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

2.1. Ligandların sentezlenmesine ait reaksiyon denklemleri.....	22
2.2. AuL_2Cl_2 , $[AuL_2K](PF_6)_2$ ve $[(AuL_2K)Pt]Cl_2$ komplekslerinin sentez yöntemlerine ait reaksiyon şeması.....	23
2.3. $[Au(ip)(bipp)]PF_6$ bileşiğinin denklemi.....	24
2.4. $[Au(pip)(bipp)]PF_6$ bileşiğinin denklemi.....	24
2.5. $[Au(ip)(bipp)]PtCl_2$ bileşiğinin denklemi.....	25
2.6. $[Au(pip)(bipp)]PtCl_2$ bileşiğinin denklemi.....	26
3.1. CisPt(II)'nin A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	32
3.2. CisPt(II)'nin V79 379A (CHL) hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	33
3.3. $[Au(ip)(bipp)]PF_6$ 'nın A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	34
3.4. $[Au(ip)(bipp)]PF_6$ 'nın V79 379A (CHL) hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	35
3.5. $[Au(pip)(bipp)]PF_6$ 'nın A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	36
3.6. $[Au(pip)(bipp)]PF_6$ 'nın V79 379A (CHL) hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	37
3.7. $[Au(ip)(bipp)]PtCl_2$ 'nin A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	39
3.8. $[Au(ip)(bipp)]PtCl_2$ 'nin V79 A379 (CHL) hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	40
3.9. $[Au(pip)(bipp)]PtCl_2$ 'nin A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	41
3.10. $[Au(pip)(bipp)]PtCl_2$ 'nin V79 379A (CHL) hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	42

3.11. Cis pt(II)'nin A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin JC-1 boyama ile değerlendirilmesi.....	43
3.12. Cis pt(II)'nin V79 379A (CHL) hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin JC-1 boyama ile değerlendirilmesi.....	44
3.13. [Au(ip)(bipp)] PF ₆ 'nın A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin JC-1 boyama ile değerlendirilmesi.....	46
3.14. [Au(ip)(bipp)] PF ₆ 'nın V79 379A (CHL) hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin JC-1 boyama ile değerlendirilmesi.....	47
3.15. [Au(pip)(bipp)] PF ₆ 'nın A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin JC-1 boyama ile değerlendirilmesi.....	48
3.16. [Au(pip)(bipp)] PF ₆ 'nın V79 379A (CHL) hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin JC-1 boyama ile değerlendirilmesi.....	49
3.17. [Au(ip)(bipp)]PtCl ₂ 'nin A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin JC-1 boyama ile değerlendirilmesi.....	50
3.18. [Au(ip)(bipp)]PtCl ₂ 'nin V79 379A (CHL) hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin JC-1 boyama ile değerlendirilmesi.....	51
3.19. [Au(pip)(bipp)]PtCl ₂ 'nin A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin JC-1 boyama ile değerlendirilmesi.....	52
3.20. [Au(pip)(bipp)]PtCl ₂ 'nin V79 379A (CHL) hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin JC-1 boyama ile değerlendirilmesi.....	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DMSO : Dimetil Sülfoksit

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EDTA : Etilen-diamin tetra asetik asit

FBS : Fetal Bovine Serum

JC-1 : (5,5', 6,6' - tetrachlo-1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide)

NaHCO₃ : Sodyum bikarbonat

PBS : Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate buffer saline)

1. GİRİŞ

Kanser, ölüm nedeni olarak, kalp ve damar hastalıklarından hemen sonra gelen ve önemi giderek artan bir sağlık ve yaşam sorunudur. Geçen yarım yüzyılda kanserin moleküler yapısının anlaşılmasında önemli gelişmeler yaşanmıştır. Kanseri başlatan ve ilerleten etkenler olarak çeşitli büyüme faktörleri, hormonlar, sitokinler, onkogenler, virüsler, bakteriler ve karsinojenler tanımlanmıştır. Aşırı hücre bölünmesi (hiperproliferasyon), invazyon, anjiyogenez ve metastaza sebep olan pek çok hücre içi mekanizma aydınlatılmıştır. 25.000 gen içeren tüm insan genomunun yapısı ve de bu genlerden tümör oluşumuna yol açan genlerin en azından bazıları günümüzde apaçık bilinmektedir. Kanserle ilgili bu müthiş gelişmelere rağmen kanserden korunma ve kanseri tedavi yöntemleri hala yetersizdir (Aggarwal ve ark. 2009). Kanserlin ilerlemiş dönemlerinin çoğu mevcut kemoterapi ilaçları ile tedavi edilemediğinden, yeni ilaçların geliştirilmesi kanserle mücadelede çok önemli bir rol oynamaktadır (Padron ve ark. 2000).

Kemoterapinin farklı biçimlerinin birtakım biyokimyasal hedefleri olmasına rağmen, genel olarak kemoterapinin programlı hücre ölümü veya apoptozisle sonuçlanan bir süreci başlatarak kanserli hücreleri öldürdüğüne inanılır (Zang ve ark. 2006).

Apoptozun başlatılması kanser tedavilerinde önemli bir yaklaşımdır. Programlı hücre ölümü olan apoptozis, doku gelişimi ve homeostazının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Kwon ve ark. 2007). Apoptozis; hücre yüzey çıkıntısı (membran blebbing), kromatin yoğunlaşması (kondensasyon), nüklear bozulma ve internükleozomal DNA parçalanması gibi belirli morfolojik değişimlerle tanımlanır (Yamamoto ve ark. 2000).

Tıpta metal bileşenlerin önemini, kanser tedavisinde metallerin yada metal içeren bileşenlerin tedavi aracı olarak kullanıldığını gösteren raporların 16.yüzyıla kadar dayanması ortaya koyar (Huang ve ark. 2005). Metal temelli antikanser ilaçlarına olan ilginin kökeni, sisplatinin testiküler ve yumurtalık kanseri tedavisi için geliştirilmiş en başarılı ilaç olmasına dayanır. Bu kullanım ve ikinci nesil platin ilacı olan karboplatinin kullanımı antineoplastik etkileri için geliştirilmiş çok çeşitli metal temelli ilaçların geliştirilmesine zemin hazırlamıştır.

Metalik bileşen temelli ilaçlar (Galyum, germanyum, tin ve bizmut), ön geçiş metal kompleksleri (titanyum, vanadyum, niobyum, molibdenum ve renyum) ve son geçiş metal komplekslerinin (rutenyum, rodyum, iridyum, platin, bakır ve altın) tümünün kemoterapide kullanılabilir potansiyele sahip oldukları görülmüştür. Çoğalan hücrelerin DNA'sına olan etkilerin yanısıra sisplatinin apoptozisle hücre ölümüne yol açtığı bilinen bir gerçektir (Ruiz ve ark. 2000).

Sisplatin kanser tedavisinde kullanılan etkin bir kemoterapötik olmasına rağmen, tümör hücrelerinin sisplatine karşı direnç geliştirmesi, yine siplatinin kullanımı esnasında ortaya çıkan bulantı, kusma ve böbrek zehirlenmesi gibi ağır yan etkiler bu ilacın yoğun dozlarda kullanılmasını engelleyip tedaviyi sınırlandırmaktadır. Bu nedenle de bu araştırma hem sisplatinden daha etkili sitotoksik etki gösterebilecek hem de daha hafif yan etkilerle sonuçlanacak ilaç etken maddelerinin belirlenmesi için yapılmıştır.

Araştırmada metal komplekslerinin kemoterapide kullanılabilir ilaç etken maddesi olabileceği gerçeğinden hareketle, bazı heteroksiklik ligandların Au(III) , Pt(II) dinükleer metal komplekslerinin sağlam (V79 379A) (CHL) ve kanserli (A549) hücreler üzerindeki apoptotik ve antiproliferatif etkileri ortaya konmuştur.

1.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin belirli koşullarda kontrollü olarak yetiştirilmesi sürecidir. Hücre kültürü, yaşam bilimlerinin pek çok alanı için vazgeçilmez bir teknoloji haline gelmiştir. Hücre çoğalması, hücre farklılaşması ve itinayla kontrol edilen şartlarda ürün oluşumu gibi olayları düzenleme olanağı sağlayan hücre kültürü, aynı zamanda neredeyse tüm insan genomunu tanımlayabilmek için gen ifadelerini düzenleyen hücre içi ve hücreler arası sinyal yollarını inceleyebilme olanağı sağlamıştır. Kökleri gelişimsel biyoloji ve patolojiye dayanmasına rağmen hücre kültürü günümüzde moleküler genetikçiler, immunologlar, cerrahlar biyomühendisler ve ilaç üreticileri için önemli bir araç haline gelmiştir (Freshney 2000).

Son 20 yılda memeli hücre kültüründe rekombinant teknolojilerin kullanılması, pekçok hastalığın tedavisi için alternatif çok sayıda ilaç üretilmesini

sağlamıştır (Hesse ve Wagner 2000). Araştırmaların ve gelişmelerin çoğunda örneğin *in vitro* modellerde, virüs substratlarının belirlenmesinde ve ilaç endüstrisinde teşhis ve tedavi amaçlı olarak geliştirilen ürünlerde hayvansal hücrelerden yararlanılır (Meleady ve O'Connor 2006).

Tümör anjiyonezi, tümör invazyonu, bağışıklık hücrelerinin etkileşimi, sitotoksik ve sitostatik antitümör ilaçlarının saptanması gibi kanser tedavisinde kullanılan pek çok alanda hücre kültüründen yararlanılmaktadır (Baguley ve ark. 2002).

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötiklerin belirlenmesinde de hücre kültüründen yararlanılmaktadır. Kanserli ve sağlam hücreler üzerinde bazı metal komplekslerinin denenmesiyle kanser tedavisinde etkili olabilecek kanser ilaçları üretilmektedir.

Günümüzde hücre kültürü rutin bir şekilde yeni antikanser ilaçlarını bulmak için kullanılmaktadır. 1990'dan beri Ulusal Kanser Kurumu (NCI), 60 kanserli insan hücre türünün oluşturduğu tabloya karşılık 60000'den fazla bileşik rapor etmiştir. Ulusal kanser kurumunun sahip olduğu 460000 den fazla bileşiği içeren veritabanı ileride antikanser ilacı olarak kullanılabilir potansiyele sahip adaylar olarak görülebilir (Aggarwal ve ark. 2009).

Hayvansal hücre kültürlerinin kanser ilaçlarının etkilerinin saptanmasında önemli bir rol oynadığı söylenebilir. Özellikle *in vitro* kültürlerde en sık yapılan uygulama ilaçların toksisitesini belirlemektir. Potansiyel aktif bileşiklerin tanımlanması, bileşiklerin toksik etkilerini ortaya çıkaran mekanizmanın belirlenmesi, antikanser aktivitelerin öngörülmesi, potansiyel hedef hücre popülasyonunun tanımlanması, toksik konsantrasyon alt – üst sınırının (aralığının) ortaya konması, konsantrasyonla maruz kalma süresi arasındaki ilişkinin belirlenmesi de hücre kültürü çalışmalarıyla belirlenmeye çalışılan hedefler arasındadır (Wilson 2000).

1.2. Kanser

Kalp ve damar hastalıkları, yaşam süresi artan günümüz toplumunda, en büyük ölüm riskini taşımaya devam ederken, kanser de çok büyük bir problem olarak önemini korumaktadır. Toplam nüfusun en az üçte birinde kanser

gelişeceği, dört erkekten birinin ve beş kadından birinin öleceği tahmin edilmektedir. Sadece bu tahmin bile kanserden korunmanın ya da en azından onu kontrol altında tutmanın önemini göstermektedir. Ancak kanser araştırmaları çok daha önemli bir role sahiptir. Çünkü kanser sadece insanlara ya da memeli hayvanlara özgü bir hastalık değildir. Hayvanları olduğu gibi bitkileri de dahil çok hücreli bütün canlıları etkilemektedir. Kanser, hücrenin büyümesine ve gelişmesine zarar verdiği için, hastalığın altında yatan süreci anlamak canlı hayatının temel mekanizmalarını anlamamıza yardımcı olacaktır (Franks 1998).

Kanser genellikle bir yığın hücrenin oluşturduğu bir tümör olarak ortaya çıksa da aslında hücrelerin bozulmasıdır. Görülebilir hale gelen tümör, hücrelerde yıllarca süren değişikliklerin sonucudur (Franks 1998).

1.2.1. Kanserın tanımı

Kanser, 100 farklı hastalığı isimlendirmek için kullanılan genel bir terimdir. Bütün bu hastalıklar anormal hücre büyümeleri ya da vücutta büyümeyi düzenleyen mekanizmalarda oluşan bozulmayla tanınır (Rodgers 1990).

Kanser, yaşanan çevrede karşılaşılan ve hücrede ortaya çıkan fiziksel, kimyasal yada biyolojik etkenlere maruz kalınması nedeniyle normal hücre DNA'sının değişime uğraması sonucu ortaya çıkan genetik bir hastalıktır. Normal hücre DNA'sının değişime uğraması mutasyon olarak adlandırılır. Örneğin böyle bir genetik değişiklik ultraviyole B ışınımına bağlı olarak p53 tümör baskılayıcı geni gibi hücre için önemli genlerin yapısını ve işlevini bozarak deri kanserine yol açabilir. Kansere yol açan mutasyonlar farklı çevresel etkenler sonucu ortaya çıkabildiği gibi anne ya da babadan kalıtım yolu ile de çocuklara geçebilmektedir. Çevresel ve kalıtsal faktörlerin kanser oluşumuna katkıları kanser türüne ve yaşanan çevreye göre değişmektedir. Sadece çevre etkisiyle ortaya çıkan kanser tipleri söz konusu iken sadece tek gende bozukluğa bağlı olarak ortaya çıkan kanser türleri de vardır (Yakıcıer ve Akarsu 2007).

1.2.2. Kanser ve hücre döngüsü

Hücrelerin bölünmesi, farklılaşması ve ölümü normal hücrelerle kanserli hücreler arasında benzerlik göstermektedir. Kanserli hücreleri normal hücrelerden ayıran, bu aşamaların düzenlenmesi ile ilgilidir. Kanserin biyolojisini öğrenebilmek için bu aşamaların normal hücrelerde nasıl kontrol edildiğini, kanserli hücrelerde ise nasıl kontrolsüz hale geldiğini öğrenmeyi gerektirir (Güzey 2007).

Ökaryotik hücrelerde hücre döngüsü, mitoz bölünme safhaları (profaz, metafaz, anafaz ve telofaz) arasında bir dizi olay ortaya koyar. Hücre döngüsünün süreci, mitoz (M fazı) sırasında iki nükleusa kromozom dağılımı için gerekli olan DNA replikasyon (S fazı) işleviyle devam etmektedir. Bu işlevin arasına boşluk olarak anılan, G1 ve G2 adı verilen iki basamak katılmıştır. G1, S ve G2 hep birlikte hücre döngüsünün interfaz bölümünü oluşturmaktadır. G1 basamağı mitozdan hemen sonra başlar, ribozomlar, enzimler, membran türevi organeler gibi pek çok sitoplazmik elementin sentezi bu zaman süreci içerisinde yapılmaktadır. S fazında, DNA replikasyonu her kromozomun kopyasını yaparak kromozom sayısının ikiye katlanmasını sağlamaktadır. G2 fazı, büyümenin ve sentezin ikinci dönemi olarak mitozun başlamasına öncülük etmektedir. Hücreler ayrıca, mitozdan sonra hücre döngüsünden çıkarak çoğalmanın olmadığı dinleme fazı olan G0'a girmektedir (Güzey 2007). Sonuç olarak genetik yönden birbirinin kopyası olan iki hücre meydana gelir.

Hücre döngüsü düzenindeki bozukluklar kanser oluşumunun büyümesine ve gelişimsel anormalliklere sebep olabilir. Bu nedenle hücre bölünmesindeki düzensizliklerin mekanizmalarını anlayabilmek, yeni antikanser ilaçları geliştirebilmek için de faydalıdır. Hücre döngüsünün ilerleyişi hücre büyümesini, hücre çoğalmasını ve ontogenezi düzenleyen DNA hasarlarının tamiriyle de yakından ilgili çok organize ve sıkı şekilde düzenlenen bir süreçtir (Maddika ve ark. 2007).

Hücre döngüsünün her evresi, hücre döngüsünün durdurulmasını ve tamir mekanizmalarının çalıştırılmasını sağlayan kontrol noktalarını içerir. Hücreler bu kontrol noktalarından geçtikten sonra geri döndürülemez bir şekilde sonraki evreye geçerler. Diğer kritik organelerin veya yapıların DNA hasarı görmesi ve

aksaması hücre döngüsünün durdurulmasına hatta hücrenin ölümüne neden olabilecek apoptotik yola sebep olabilir. Bu nedenle apoptotik sistem çok hücreli organizmaların bütünlüğünü korumakta ve istenmeyen ya da hasarlı hücrelerin seçilerek uzaklaştırılabilmesi için de hücre döngüsü kontrol noktaları için çok önemli bir eleman haline gelmektedir. (Maddika ve ark. 2007).

1.2.3. Kanser ve kemoterapi

Kanser tedavisinde genellikle 3 ana tedavi yöntemi kullanılır. Bunlar cerrahi, ışın (radyoterapi) ve kimyasal tedavi (kemoterapi) yöntemleridir.

Kemoterapi, özellikle çoğalan hücrelere karşı seçici öldürücü etkileri olan, doğal veya sentetik kimyasal, biyolojik ajanlar ve hormonlarla yapılan tedavi şeklidir. 1960'lara kadar kemoterapi palyatif amaçla, bazı klinik bulguların azaltılması ve hastanın yaşamını biraz daha uzatmak amacıyla kullanılmıştır. Ancak 1960'lı yıllardan itibaren hücre kinetiği bilgileri ve kinetik kavramları kemoterapi protokollerinde uygulanmaya başlanmıştır. Hücre kinetiği hakkında bilgiler arttıkça yeni ilaçlar laboratuvarlarda antikanser aktiviteleri açısından araştırılmaya başlanmıştır (Akyol 2004).

Sistemik kemoterapi ameliyat edilemeyen tümörler, ikincil kanserler, radyoterapi dirençli tümörler, dolaşıma katılan tümör hücreleri ve metaztatik lezyonların tedavisinde kullanılır. Genellikle de ameliyat ve radyoterapiyle birlikte adjuvan veya neoajduvan kemoterapi olarak işe koşulur. Adjuvan kemoterapi, cerrahi veya radyoterapötik müdahalelerden sonra arta kalan tümör hücrelerini yok ederek tümörün tekrarlamasını önlemeye yönelik iken neoadjuvan kemoterapi, ameliyat veya radyoterapiden önce tümör kitlesinin büyüklüğünü düşürmeye yöneliktir (Lammers 2010).

Tümör hücrelerinin kemoterapi duyarlılığının moleküler mekanizması; ilaç taşınımı ve metabolizması, DNA tamiri ve apoptoz gibi birden çok süreci içeren karmaşık bir süreçtir. Hücrenin yaşam ve ölümünü ayarlayan hücresel sinyal yolları, kanser hücrelerinde farmakolojik yanıtların saptanmasında önemli rol oynar. Bu yüzden, kanser hücrelerinin yaşam yollarının bloke edilmesi veya ölüm yollarının aktive edilmesine yönelik müdahaleler, kanser hücrelerini

kemoterapötik kaynaklı ölümlere duyarlı hale getirir ve bu hücrelerin kimyasal direnç göstermesini de engeller (He ve ark. 2010).

Aslında kanser hücreleri ve normal hücreler benzer hücre sikluslarına sahiptirler. Kanser hücresiyle normal hücre arasındaki en önemli fark, kanser hücrelerinde çoğalmayı frenleyen mekanizmanın bulunmaması ve organizmayı ölüme götüren duraksız bir çoğalma içerisinde olmasıdır. Kemoterapötik ajanlar en fazla hücreler çoğalma dönemde iken etkilidirler. Bu bilgi ilaçların geliştirilmesi sırasında önem taşımaktadır. Çünkü yaşam döngüsünün bir fazına spesifik etki eden ilaçlar (faz spesifik ilaçlar) ya da bütün fazlara etkili (faz spesifik etkili olmayan ilaçlar) geliştirilebilir (Akyol 2004).

Son on yılda çok hücreli organizmaların, gereksiz ve potansiyel olarak zararlı hücrelere karşı apoptoz adı verilen oldukça karmaşık bir programla korunduğu ortaya çıkmıştır. Kanserın büyümesinde ve direncinde apoptotik hücre ölümünü kontrol eden ve yürüten mekanizmaların hedef haline gelmesi de kanser tedavisinde yeni ilaçların geliştirilebilmesi için çığır açmıştır (Vasilejva ve Turk 2007).

1.3. Apoptoz

Hücre homeostazı, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasında hassas bir dengeyi gerektirir. Vücutta bazı hücreler mitoz süreciyle çoğalarak sürekli devinim halinde iken istenmeyen hücreler de belli zamanlarda ya da apoptozun karşı sürecinde belli uyarıcılara verdiği tepkilerle yok olurlar. Bu süreçler hücre sel homeostazının devam etmesinde önemli bir rol oynasa da mitotik ve apoptotik arızalar çok çeşitli hastalıklara sebep olur (Bortner 2004).

Programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz, embriyonun gelişmesinde, özellikle morfogenez, seksüel farklılaşma ve bağışıklık sistemi gibi iki çok önemli sistemin organizasyonu süreçlerinde çok önemli roller oynar. Öte yandan erişkin organizmalarda da programlı hücre ölümü dokuların homeostazı, hasar görmüş ya da bozulmuş hücrelerin eliminasyonu ve enfeksiyonlarla savaşında kilit bir konumdadır. Bu önemli ve merkezi mekanizmanın düzensizliği ise kanser, ottoimmün hastalıklar ve çeşitli enfeksiyonlardan, nörodejeneratif

hastalıklara kadar uzanan geniş bir spektrumda yer alan hastalıkları tetikler (Ozansoy ve Başak 2006).

Apoptoz; hücre küçülmesi (büzüşmesi), kromatin yoğunlaşması, çekirdek içi DNA parçalanması (fregmantasyon), plazma membran kabarcıklanması (membran blebbing) ve nihai apoptotik badi oluşumunu da içeren belirli morfolojik ve biyokimyasal özelliklerle tanımlanır. Tüm bu özelliklerin apoptozu tanımlamasına rağmen ilginç olan durum bu özelliklerin tümünün apoptoz geçiren hücrelerde görülmeyebilmesidir. Ancak apoptozun en bilinen özelliği hücrede görülen hacim kaybıdır. Buna ek olarak hücre büzülmesi rastlantısal olarak meydana gelen hücre ölüm şekli olan nekrozdan, fizyolojik hücre ölümü olan apoptozu ayırmada anahtar rol oynamıştır (Bortner 2004).

Apoptotik hücre ölümü, herhangi bir hasar sonucu nekrotik ölüm denilen hücre ölümünden farklı bir süreç izlemektedir. Apoptotik ölümün ilk başlangıcında, ölmek üzere komut almış hücreyi normal hücreden morfolojik olarak ayırt etmek mümkün değildir. Yaklaşık iki saat sonra, komut almış hücrenin kromatini yoğunlaşmaya başlar ve belirli bölgelerde sıkıştıkları izlenir. Sitoplazma yoğunlaşmaya ve hücrenin boyutları küçülmeye başlar. İkinci saatin sonunda apoptozise uğrayan hücrelerde yeni değişiklikler ortaya çıkar ve hücre apoptotik cisimcik denilen daha küçük parçalara bölünür. Bu parçacıkların en büyük özelliği, fragmante olmuş nükleusların ve parçalanmış hücreye ait tüm yapıların plazma membranı ile kaplanarak immün sistemi enflamasyon yönünde uyarımasıdır. Apoptotik cisimcikler, yüzeylerinde yeni sinyal yapıları ortaya çıkarır ve bu sinyalin uyarısı ile yandaki hücre tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılır. Tüm bu süreç yaklaşık 5 saatte tamamlanır (Konca 2005).

Nekrotik ölüm ise çoğunlukla bir hücre hasarı ile ortaya çıkar. Hasarlanan hücre önce şişer ve sonra parçalanır. Hücrelerin parçalanması sonucu ortaya çıkan prostoglandinler, lökotrienler, serotonin, histamin gibi vazodilatör aminler, hasara en yakın damar endotelini uyarır. Damar endotelisi ise selektin yapısını uyarır. Selektin plazma membranının dış yüzeyine yapışır ve lökositlerin burada yavaşlaması ve yapışmasını sağlar. Daha sonra integrin ligandları aynı hücre parçalanma ürünleri ile uyarılır ve lökositler hücre hasarının olduğu bölgeye doğru çekilmeye başlar. Bu sürecin ardından iltihaplanma denilen kızarıklık, ödem ve ağrı ile tanımlanan enflamatuar reaksiyonları başlar (Konca 2005).

Burada dikkat edilmesi gereken birinci nokta apoptotik hücre ölümlerinde enflamasyona ait klinik septomların olmaması, ikincisi immün sistemi uyarmadığı için bu tarz hücre ölümlerinde otoimmün cevapların ortaya çıkmaması, üçüncüsü de apoptotik hücre ölümlerinin enerji bağımlı olmasıdır (Konca 2005).

Hücrelerde apoptoza yol açan tek bir mekanizma olmamakla birlikte pek çok hücre tipinde erken apoptozda sitoplazmanın iyonize kalsiyumunun arttığı izlenmiştir. Apoptozda en önemli biyokimyasal olay endojen endonükleaz enziminin aktivasyonu ile DNA'nın kırılmasıdır. Bu enzim Ca ve Mg bağımlı olduğundan aktivasyonu için hücre içi kalsiyumun artması gerekmektedir. Enzim DNA'yı 200 baz çiftlik parçalara ayırarak kırılmalar oluşturur ve jel elektroforezinde merdiven paterninin oluşmasına yol açar (Turgut ve ark. 2006).

Memelilerde apoptozu tetikleyen 2 yol bulunur. Birincisi hücre yüzeyinde TNF (Tümör nekroz faktör) ailesinin aracılık ettiği ölüm reseptörleridir ki bu yol dışsal yol diye nitelendirilir. İkincisi de mitokondrinin aracılık ettiği içsel yoldur. Dışsal yol hücre yüzeyinde sitokinle başlatılan ölüm reseptörü aracılığıyla önce kaspaz 3 ve kaspaz 7'i sonra da kaspaz 8'i aktive ederek başlatır. İçsel yol, sitokrom c'nin yayılmasına sebep veren mitokondriyal işlev bozukluğuyla ortaya çıkar ve bu bozukluğu sırasıyla apoptozom oluşumu, kaspaz 9'un aktive oluşu ve kaspaz 3 ile kaspaz 7'nin aktive oluşu takip eder. Uygulayıcı kaspazlar da denen sonraki kaspazlar apoptoz sırasında membran kabarcıkları, hücre büzüşmesi ve DNA parçalanmasını da içeren morfolojik değişikliklerden sorumludur (Vasiljeva ve Turk 2007).

Görüldüğü üzere apoptoz'un içsel ve dışsal yolları mitokondri noktasında keşişmektedir ve apoptozun bundaki sonraki aşamaları, kaspazların aktivasyonu gibi her iki yolda da ortakır.

1.3.1. Apoptozda mitokondrinin işlevi

Mitokondriler bir hücrenin yaşam ve ölümü için enerji dönüştürme, kaskad sinyalizasyonu ve apoptozda görev alan çok önemli organellerdir (Wasilewski ve Scorrano 2009).

Mitokondriler, prokaryot hücrelere soyca ve yapıca benzerlikleri olan ve ökaryot hücrelerde bulunan organellerdir. Mitokondriler, mitokondriyal iç zar ve mitokondriyal dış zar denilen iki zarın çevrelediği bir matriksi içerir. Krista adı verilen iç zar, küçük moleküllere ve iyonlara karşı geçirgen değildir. Oksijenli koşullar altında elektron taşıma sisteminin proteinleri de içzarda yer alırlar ve trikarboksilik zincirinden ve glikolizden türeyen NADH ve FADH₂'yi kullanarak elektron taşıma sistemiyle oksijeni adım adım suya indirgerler. Sonuç olarak mitokondri ADP ve fosfattan ATP sentezler ve bu reaksiyonlar oksidatif fosforilasyon reaksiyonları olarak adlandırılır (Toogood 2008).

İç zarın aksine mitokondri dış zarı küçük moleküllere daha geçirgendir ve iç zar boşluğu küçük molekül içeriğiyle sitozole benzer. Ancak bunun yanında iç zar boşluğu sitokrom c, smack/diablo gibi proteinleri ve AIF (apoptosis induce factor)'ı ayırır. AIF, sitozole salındığında kaspazı aktive ederek apoptozu başlatan faktördür (Toogood 2008).

Apoptozu başlatan yolların kesiştiği noktanın mitokondri olduğu anlaşılmıştır. Bu yüzden mitokondrinin aktivasyonu (sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya verilmesi) apoptotik süreçte geri dönülmez noktayı gösterir. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör bcl-2 ailesidir. Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle ya sitokrom c'nin sitoplazmaya verilmesi gerçekleşir (apoptozisin başlaması) veya sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesi baskılanır (apoptozisin inhibasyonu). Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki grupdan oluşur. Bu yüzden pro ve anti- apoptotik üyelerin dengesi yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği belirler. Anti –apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonların apoptozisi baskıladığı oysa pro-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonun ise hücreleri öldürdüğü görülmektedir. Anti –apoptotik bcl-2 ailesi üyelerinin en iyi bilinenleri; bcl-2, bcl-Xl, Mcl-1 iken, pro-apoptotik olanları ise; bax, bcl-Xs, Bad, Bim,Bak,Bok,Bid'dir (Ulukaya 2003).

Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi kaspazların aktivasyonuna yol açar. Kaspazlar, sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağını kırarlar. Hücrede inaktif (zimojen) olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Böylece bir kaskad şeklinde işlerler (Ulukaya 2003).

1.3.2. Mitokondriyal membran potansiyeli ve apoptoz

Mitokondriler, apoptozun anahtar araçlarıdır. Öncelikli olarak apoptozda mitokondri transmembranı çöker (Griffioen ve ark. 2004).

Yüksek enerjili fosfatın üretilmesinde mitokondriler başlıca organellerdir. Elektron taşınması sırasında protonlar, mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) oluşturarak matriksten zarlararası boşluğa salınır. Proton pompalanması hızına bağlı olarak değişmekle birlikte bu potansiyel yaklaşık olarak -150 mV civarındadır. Matrikstekki kutuplaşmayı tamponlayabilmek için matrikstekki negatif yükün gücüyle kalsiyum matrikse giriş yapar. Sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonunu çok sıkı bir şekilde düzenleyen mitokondrinin kalsiyum tamponu gibi hareket ettiği belirlenmiştir. Bu tampon sisteminin bozulması kalsiyum da patolojik bir artışı tetikleyebilir, buna da kalsiyum deregölasyonu denir. Bunun sebebi mitokondriyal membranın kutuplaşması olabilir ve bu olay matriksten sitoplazmaya kalsiyum akışını ve beraberinde gelen sodyum dengesini tetikler, son olarak da hücre ölümü gerçekleşir. Bu yüzden, mitokondriyal membran potansiyeli, hücreler arası iyonik dengede ve bunu takip eden apoptotik kaskatın başlatılmasında önemli bir rol oynar (Iijima 2006).

Mitokondriyal membran potansiyelinin değişmesi sonucunda mitokondriyal membran potansiyelinin kaybolmasının, mitokondri bağlantılı apoptozu başlattığı kabul edilir. Membran potansiyelinin kaybolması ATP sentezinin azalması ile sonuçlanır. Bu da apoptojenik faktörlerin salınmasına yol açar. Böylece sitokrom c, AIF (apoptoz başlatan faktör) ve smac/DIABLO mitokondriden sitoplazmaya geçer ve hücreyi ölüme götürür (Caruso ve ark. 2006).

Sitokrom c'nin salınması apoptozun başlatılmasında önemli bir olgudur. Bu salınma genellikle mitokondriyal geçirgenlik transisyon porunun açılmasıyla ve mitokondriyal membran potansiyelinin kaybolmasıyla aynı zamana denk gelir. (Griffioen ve ark. 2004).

1.4. Metaller ve Kanser

Metaller antik çağlardan beri insanlar tarafından kullanılmıştır. İnsanlar tarafından kullanımı metallerin çevreye küresel dağılımına sebep olmuştur. İnsanlar, hayvanlar ve bitkiler doğada çeşitli yollarla (yiyecek, su, toprak) metallerle karşılaşır. Metaller biyobozulmaya (bakterilerle ayrışmaya) uğramamaları sebebiyle doğada uzun süre kalırlar ve ciddi ekotoksikolojik problemlere yol açarlar. Bunun yanısıra çinko, bakır, kalsiyum, krom ve demir gibi pek çok metal bileşikleri, canlı hayat için vazgeçilmezdir ve komplike biyokimyasal zincirler oluşturmuşlardır. Başlıca elementler gen transkripsiyonunun kontrolü, sinir iletkenliği, oksijen taşınması ve enzimlerin aktif merkezi olmak gibi pek çok kritik görevler üstlenmişlerdir. Bu yüzden, gen ekspresyonu, hücre çoğalması ve hücre ölümü gibi hücre içinde meydana gelen olaylarda az miktarları dahi etkili olmaktadır (Rana 2008).

Mineraller ve metaller binlerce yıldır çeşitli şekillerde tıbbi tedavilerde kullanılmaktadır. Antik Yunan ve Mısır'da, ayuverdik tıpta ya da Aztekler tarafından yalın bir şekilde, tuz ya da farmakolojik olarak etkin bazı bileşiklerin, bitkilerden alınması yoluyla kullanılmışlardır. Bu maddeler esas olarak da antienflamatuar özellikleri için kullanılmışlardır. Metallerin tıpta kullanımının yeniden gündeme gelmesi de rönesansda olmuştur. Metal veya metal içeren bileşenlerin tedavi amaçlı kullanımı ile ilgili en erken bilgi ülser, kanser ve lösemiye ilişkin kullanımlarda 6.yy'a kadar uzanır. Pek çok yeni araştırma çeşitli metal bileşenlerin özgün niteliklerini, kullanımlarını veya etkilerinin varsayılan özelliklerini izah etmektedir (Lange ve ark. 2008). Araştırmacılar tarafından tedavi edici olarak saptanmış metal içeren bileşenlerin listesi platini (antikanser), gümüşü (antimikrobiyal), altını (antiartritik), bizmutu (antiülser), antimonu (antiprotozoal), vanadyumu (antidiyabetik) ve demiri (antimalaryal) kapsamaktadır (Huang ve ark. 2005).

Metal ve metal içeren bileşenlerin kullanılması ile ilgili çalışmalarda önemli hedeflerden birisi de kanser tedavisi için ilaç geliştirilmesidir.

Bir çok kanser türünün sisplatin tarafından tedavi edilmesi, alternatif metal ilaçların sürekli olarak araştırılmasını teşvik etmiştir (Tiekink 2002).

Sisplatin, germ hücreli tümörler, yumurtalık, akciğer, baş – boyun, mesane kanserleri gibi solid tümörlerin tedavi edilmesinde kullanılan en etkili antitümör ilaçlardan biridir (Bakalova ve ark. 2007). Genel olarak sisplatinin sitotoksik etkisini apoptozu başlatarak ve DNA ile etkileşiminin sonucu olarak hücre döngüsünü bloke etmesiyle gösterdiği kabul edilmiştir (Muscella ve ark. 2007). Kemoterapötik ilaç olarak kullanılmasına rağmen sisplatin nefrotoksisite, nörotoksisite, ototoksisite, bulantı ve kusma gibi çok ağır yan etkiler gösterir ki bu yan etkiler yoğun doz kullanımını engelleyerek tedaviyi sınırlandırır (Bakalova ve ark. 2007). Ayrıca tümör hücrelerinin sisplatin tedavisine direnç geliştirdiği de bilinmektedir (Ortiz ve ark. 2007).

Antikanser ilacı olarak sisplatinin bu dezavantajlarından dolayı en az sisplatin kadar veya ondan daha etkin ancak daha az yan etki gösteren metal veya metal içeren bileşenler antikanser ilacı olarak araştırılmaya başlanmıştır (Deegan ve ark. 2006).

Daha fazla antikanser aktivitesi gösteren bir ajanın bulunması için değişik metal koordineli bileşiklerle çalışılmaktadır. Bunun içinde titanyum, rodyum, renyum, rutenyum, galyum, altın, kalay, kobalt ve bakırlı metal temelli bileşenler sentezlenmiş ve onların çoğu *in vitro* olarak ümit vadeden anti kanser sonuçlar göstermiştir (Ortiz ve ark. 2007).

Kemoterapötik ajanlar tarafından başlatılan apoptoz pek çok kanserli hücre grubunda iyi anlaşılmış bir hücre ölüm şeklidir. Yeni bir bakır temelli kemoterapötik ajan olan Casiopenia II, (CH1) insan rahim kanserli hücrelerinde ve (L1210) murin lösemide apoptozla hücre ölümü başlatabilmiştir. Bu aktiviteyi de hem sisplatine duyarlı hem de sisplatine karşı direnç geliştirmiş hücre gruplarında gerçekleştirmiştir (Ruiz ve ark. 2000). Yine Vessieres ve ark. (2009) tarafından titanyum temelli ajanlarla yapılan çalışmalarda solid tümörlere karşı kayda değer bir potansiyel bulunmuştur.

Galyum, platinden sonra kanser tedavisinde kullanılmış olan ikinci metal iyondur. Galyum nitratın antitümör etkileri uzun zaman önce ortaya konmuştur. Radyoaktif Galyum 67 ve Galyum 68'de kemik kanserinde umut vericidir (Collery ve ark. 2001).

Pozitif yüklü olan metal merkezleri, negatif yüklü olan biyomoleküllere bağlanma eğilimi gösterirler. Protein ve nükleik asid bileşenleri metal iyonlara

bağlanmak için mükemmel ligandlar gösterirler. Bu yüzden metal kompleksleri ilaç geliştirilmesi için mükemmel potansiyele sahiptirler (Zhang ve Lippard 2003).

Yeni metal temelli ilaçların tasarımını yetersiz çözünürlük ve hidrolitik kararsızlık gibi fizikokimyasal özellikler tehdit etmektedir. Bu özellikler onların *in vivo*'da dağılımını, kararlılığını ve sonunda da belirli (özgül) etkiler göstermesini güçleştirmektedir. (Lange ve ark, 2008).

1.4.1. Ligand –metal kompleksleri ve kanser

Kimyada bir ligand, merkezi bir metale bağlanan bir atom, iyon yada moleküldür. Bu bağ genelde bir veya birkaç elektron verilmesiyle oluşur, iyonik veya kovalent olabilir. Bir kompleks oluşturan ligandlar merkez metalin reaktivitesini belirler. Çoğu uygulamalı sahada, örneğin biyoorganik kimya, tıbbi kimya ve çevre kimyasında, ligand seçimi çok önemlidir. (Cotton ve Wilkinson 1988).

Heterosiklik bileşikler halka içi atomlarından en az biri hetero-atom [O,N,S) olan halkalı bileşiklerdir (Altınışik 2006).

Fenatrolin heterosiklik organik bir bileşiktir. Formları birçok metal iyonla güçlü kompleksler oluşturur. İmidazol alkaloid olarak sınıflandırılan bir aromatik heterosiklik bileşiktir (Anonim).

Özellikle metal bileşiklerin 1,10- fenantrolinle bağlanması pek çok araştırmanın ilgi odağı haline gelmiştir (Kumar ve ark. 2007). 1,10-fenantrolin düzlemsel yapısının bir sonucu olarak DNA'ya bağlanır. 1,10- fenantrolin içeren bazı metal komplekslerinin DNA'ya eklem yapacak şekilde bağlandığı bilinir. Aynı zamanda 1,10- fenantrolin türevlerinin metal komplekslerinin antitümör aktiviteleri de bilinmektedir (Zhao ve ark. 1998).

İmidazol fenantrolin ligandlarını hazırlamak ve değiştirmek kolay olduğundan yeni metal bileşenlerin sentezlenmesi son zamanlarda çok fazla ilgi görmüştür. Özellikle de DNA eklentisi birim olarak kullanılmıştır (Shavaleev ve ark 2007).

Metal iyon içeren bakır, rutenyum ve kobaltın 1,10-fenantrolinle birlikte kullanılmaları antikanser etkinliklerini artırmıştır. Özellikle vanadyumun 1,10-

fenantrolin türevleriyle komplekslerinin *in vitro* ve *in vivo* olarak hücre döngüsünü sonlandırdığı ve apoptozu başlattığı belirlenmiştir (Heffeter ve ark. 2006).

1,10- fenantrolin ligandının bakır (II) kompleksleri, yüksek nükleolitik etkinlik, antitümör, antikandida ve antimikrobiyal etkilerinden dolayı dikkatleri üzerine çekmiştir (Kumar ve Arunachalam 2009).

Metal temelli ilaçların bir çok hastalığın teşhisinde ve tedavisinde başarılı bir şekilde kullanıldığını gösteren pek çok çalışma olmuştur. Platin temelli bileşiklerin kanserin sistemik tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmıştır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki 1,10- fenantrolin içeren krom (III) bileşikleri mikromolar aralıkta *in vitro* da önemli antitümör aktiviteleri göstermiştir. Ayrıca hücre ölümünün apoptoz sonucunda meydana geldiği de belirlenmiştir. Dahası, antitümör aktivitesinin de apoptotik hücre ölümünün başlatılmasına bağlı olduğu ortaya çıkmıştır (Thati ve ark. 2009).

Pek çok araştırma, fenantrolinin metal türevlerinin *in vitro* da kanser hücrelerini öldürebildiğini göstermiştir. Özellikle bakır fenantrolin bileşiğinin *in vitro* da güçlü bir çoğalmayı engelleyici ajan olduğu belirlenmiştir. Bir başka çalışmada da lantanyum fenantrolin bileşiğinin insan türevli hücre gruplarında apoptozu başlatabildiği görülmüştür (Thati ve ark. 2009).

Ayrıca titanyum, bakır, rutenyum, kalay ve rodyum gibi metalleri içeren yeni metal temelli bileşiklerin kemoterapötik potansiyellerinin umut verici olduğu bildirilmiştir. Bu yeni bileşiklerin platin temelli ilaçlardan daha farklı mekanizmalara sahip oldukları belirlenmiştir (Devereux ve ark. 2007).

Devereux ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmalarda 1,10-fenantrolin ve 1,10-fenantrolin-5,6 dionun bir dizi bakır (II), Mangan (II) ve Gümüş (I) karboksilat komplekslerinin sisplatinden daha etkili antikanser ilaçları olduğu seçilmiş olan kanser hücreleri üzerinde ortaya konmuştur.

1.5. Çalışmalarda Kullanılan Hücrelerin Özellikleri

1.5.1. A549 hücreleri

Akciğer kanseri dünya genelindeki en yaygın kanser çeşididir ve kanserle alakalı ölümlerin başlıca sebebidir (Vos ve ark. 2010). Akciğer kanseri tanı ve tedavi tekniklerindeki gelişmelere rağmen günümüzde en amansız kanser olmaya devam etmektedir (Zhan ve ark. 2010). Dünya genelinde son on yılda akciğer kanserinin vaka ve ölüm oranı da giderek artmıştır (Kawai ve ark. 2004). Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık olarak %80-85'ini oluşturur (Kim ve ark. 2010). A549 kanser hücreleri tip II alveolar epitel özellikteki insan akciğer hücre hattıdır (Jumarie, 2002). A549 hücre hattı 1972 yılında D.J: Giant ve ekibi tarafından 58 yaşında bir Caucasian erkekten alınan akciğer tümöründen üretilmiştir ve 1976 yılında, altmış sekizinci pasajı M: Lieber tarafından American Type Culture Collection'da stok edilmiştir. Japanese Cancer Research Resource Cell Bank (JCRB) ve Riken Cell Bank (RCB) ATCC'den hücreyi almış ve stoklamış daha sonrada birçok Japon araştırmacıya dağıtmıştır. A549 hücreleri Institute of Fermentation Osaka (Japonya)'dan satın alınmıştır.

1.5.2. V79 379A (CHL) hücreleri

Chinese Hamster Akciğer fibroblast benzeri hücrelerdir. Bu hücreler sitotoksosite, toksisite ve mutajenite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu hücre hattının *in vivo* ortamda alınan cevaplara benzerlik gösterdiği bilinmektedir (Kaya 2007). V79 379A hücreleri Institute of Fermentation Osaka (Japonya)'dan satın alınmıştır.

1.6. Çalışmada Kullanılan Test Maddeleri

1.6.1. Antikanser ilaç hammaddesi olarak Au(Altın) ve Pt(Platin) kompleksleri

Geçen yüzyılda, altın bileşenlerinin medikal etkinlikleri Koch tarafından tüberküloz tedavisi için altın (I)'in keşfi ile başlamış ve zaman içinde giderek altının etkinliği ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda, altın (I) bileşenleri romatoid artridin tedavi edilmesinde de uzun zamandan beri tıbbi ilaç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca altın (I) ve altın (III) bileşikleri uzun zamandan beri kanser tedavisi için üzerinde çalışılan metallerdir (Wai ve Chi 2009).

Son yirmi yıldır toplanan bulgular gösteriyor ki altın kompleksleri kanser hücreleri üzerinde dikkate değer etkiler ortaya koymakta ve bazı transplante *in vivo* tümör modellerinde antitümör aktivitesi sergileyebilmektedir. Özellikle altın (I) monofosfin türevi olan “auranofin” *in vitro* olarak P338 murin lösemi, B16 murin melanom ve kültür edilmiş insan kanser hücrelerinde çoğalmayı önleyici etkiler göstermiştir (Caruso ve ark. 2006).

Nötral ve lineer olarak iki bağımsız sınıfa ayrılmış olan altın (I) fosfin kompleksleri antikanser ilaçları olarak umut verici durumdadırlar. Bu iki sınıfın antitümör etkinliklerinin mekanizmaları farklı olmasına rağmen ikisi de mitokondriyal işlev bozukluklarına yol açarak hücre ölümüne sebep olur (Rackham ve ark. 2007).

Altın kompleksleri, antitümör ajanları olarak etkindirler. Tetrahedral (dört yüzlü) Au (I) kompleksleri 1,2-bis etan ve 1,2- bis etan ligandlar ile birlikte özellikle bazı sisplatin dirençli hücrelerde geniş spektrumlu bir antitümör aktivitesi gösterir. Teknik çalışmalar gösteriyor ki sisplatinin aksine bu bileşiklerin öncelikli hedefi DNA değildir. Daha çok mitokondriyal fonksiyonu değiştirerek ve protein sentezini inhibe ederek sitotoksik etkiler yaparlar. Çok kısa bir süre önce yapılan çalışmalarda bir hidrofilik tetraksik altın (I) kompleksinin pek çok tümör hücresi üzerinde sitotoksik etkisi olduğu aktarılmıştır. Hem monofosfin hem de difosfin ligandları olan Au(I) kompleksinin pek çok tümör hücresi üzerinde yüksek derecede sitotoksik etki yarattığı son zamanlarda ortaya konmuştur (Zhang ve Lippard 2003).

Melanom en kötü huylu deri tümörüdür ki bu tümörler alışlagelmiş kanser tedavileri ile değişikliğe uğratılamaz. Caruso ve ark. (2006) tarafından yapılan bir araştırmada altın bileşiklerinin melanom hücrelerinde doza bağlı olarak apoptozu başlattığı ortaya konmuştur. Bu başlatım en çok kaspaz 9 sayesinde olmuştur. Artan *in vitro* katalitik aktivitesiyle ortaya çıkan kaspaz 9 ve kaspaz 3 aktivasyonu ilaçlar tarafından başlatılan mitokondriyal zararın sonucudur. Mitokondriye verilen bu zarar mitokondriyal membran potansiyelinin çökmesine ve sitokrom c ve apoptojenik faktör smac/DIABLO' nun salınmasına sebep olmuştur. Sitokrom c'nin apoptotik proteaz aktive edici faktör -1 (Apaf-1)' e bağlandığı ve onu aktive ettiği bilinmektedir. Bu aktivasyonlarda multiprotein kaspaz aktive edici bileşiklerin toplanmasına (apoptozom) kaspaz 9'un aktivasyonuna ve proteaz kaskad başlatımına sebep olmuştur.

Sisplatinin başarısından dolayı potansiyel antikanser ilacı olarak pek çok araştırma platin kompleksleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Kanser tedavisinde en çok kullanılan ilaçlardan biri olan sisplatin, pek çok kanser çeşidinin tedavisinde özellikle de %90'ların üzerinde bir oranla testis kanserinde etkilidir. Sisplatinin sitotoksitesi de DNA'ya bağlanarak kovalent çapraz-bağlanmaları oluşturabilmesinden kaynaklanır (Zhang ve Lippard 2003).

Kemoterapötik ilaçlardan beklenen ilaçların sadece neoplastik hücrelere odaklanıp normal hücrelere asgari kollateral hasar vererek tümörlü hücrelerdeki sitotoksik ya da sitostatik etkileri azaltarak tümör sorununu azaltmasıdır (Kosmider ve ark. 2004).

Yapılan çalışmalar klinikte kullanılan sisplatin maddesine oranla daha yüksek antitümör aktivitesi ve daha düşük toksik etkiler gösteren platin bileşiklerinin sentezine yönelmiştir. Bu çalışmalar biyolojik olarak aktif olan moleküllere paralel olan en az bir ya da daha fazla sisplatin kökenli yeni platin bileşiklerinin tasarlanmasına yol açmıştır. Dahası *in vivo* olarak ortaya çıkan, sisplatine karşı direnç gösterme kapasitesine sahip pek çok tümörlü hücreden dolayı Pt (II)'den daha değişik oksidasyon seviyesine sahip metalik kökenli yeni moleküller tasarlamaya yönelik de çok fazla çaba olmuştur. Bu yüzden sisplatine oranla bazı farmakolojik avantajlar göstermesiyle Pt(IV) merkezli çok sayıda bileşik sentezlenmektedir. Bununla birlikte, şu anda platin (III)'ün oksidasyon durumunun anlaşılmasında karşılaşılan içsel güçlüklerden dolayı birkaç platin

(III) kompleksi sentezlenmiş ki bunlarında biyolojik olarak test edilmesi sınırlıdır (Gonzalez ve ark. 2000).

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ilaçlara çok az cevap veren bir grup tümörü içerir. Buna rağmen sisplatinde üretilmiş polikemoterapi kanserin ilerlemiş aşamalarında tedavi edici olarak kullanılır (Kosmider ve ark. 2004).

1.7. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

1.7.1. Mitokondriyal aktiviteye bağlı MTT testi

Sitotoksosite deneyleri *in vitro* olarak toksikoloji çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Fotakis ve Timbrell 2005). *In vitro* da sitotoksisiteyi hızlı ve doğru bir biçimde ölçen bir takım deneyler geliştirilmiştir (Abe ve Matsuki 2000). Bu deneylerden biri de MTT testidir. MTT testleri sitotoksosite, hücre canlılığı ve canlı hücrelerin proliferasyonunun ölçülmesinde etkin bir biçimde kullanılmaktadır (Vellonen ve ark. 2004).

(3-[4,5-Dimetiltiazol-2-y1]-2,5-difeniltetrazolyum bromid) (MTT), sarı renkte suda çözünebilir bir tetrazol tuzudur. Bu boya canlı hücrelerin aktif mitokondriyelerinin süksinat dehidrojenaz sistemi ve NADH redüktaz enzimleri tarafından suda çözünmeyen mor formazan kristallerine dönüştürülür ve bu formazan kristalleri spektrofotometrik olarak ölçülebilir (Hengwei ve ark. 2010).

MTT içeren medyum uzaklaştırıldıktan sonra hücredeki formazan kristalleri bir organik çözücü olan dimetilsülfoksit (DMSO) ile çözündürülür ve absorbansı gözlenir. Çözülmüş formazanın absorpsiyonu metabolik olarak sağlam olan hücrelerin sayısı ile orantılı olarak kabul edilir (Ulukaya ve ark. 2008).

1.7.2. Flouresan boyama ile morfolojik inceleme (JC-1)

Apoptoz, biyokimyasal ve morfolojik özelliklerle belirlenen iyi tanımlanmış bir hücre ölümü yöntemidir. Apoptoz, çok çeşitli fiziksel, kimyasal ve patolojik uyarıcı ile başlatılabilir (Dispersyn ve ark. 1999).

Bazı çalışmalar mitokondriyal geçirgenlik transisyon por açıklığının apoptoza yol açan süreçler için önemli bir kanıt olduğunu göstermiştir (Dispersyn

ve ark. 1999). Apoptozda mitokondriyal bozukluğu içeren iki önemli kanıt ortaya konmuştur. Bu kanıtlardan biri mitokondri zarının geçirgenliğinin değişmesi ve bunu takip eden membran potansiyelinin kaybolması ikincisi de, mitokondrinin i membran boşluğundan sitozole AIF, smac ve sitokrom c gibi apoptotik proteinlerin salınmasıdır (Chen ve ark. 2008).

Mitokondriyal membran potansiyelinin kanıtı olarak, katyonik voltaj bağımlı bir boya olan JC-1 (5,5', 6,6'- tetrachlo-1,1', 3,3'- tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) den faydalanılır. Bu boya mitokondriyal membran potansiyeli'nin polarizasyon durumunu gösteren eşsiz özellikte bir boyadır (Iijima ve ark. 2007).

Mitokondriyal membran potansiyelinin kaybolması apoptozun bir göstergesidir. JC-1, hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelini ler. Sağlıklı hücrelerde JC-1 mitokondriyi kırmızıya boyar. Apoptotik hücrelerde ise mitokondriyal membran potansiyeli çöker. JC-1 mitokondrilerin içinde birikemez. Bu hücrelerde JC-1 sitoplazmada yeşil floresan monomerik yapısında kalır (Yao ve ark. 2007; Sebastian ve Thampan 2007).

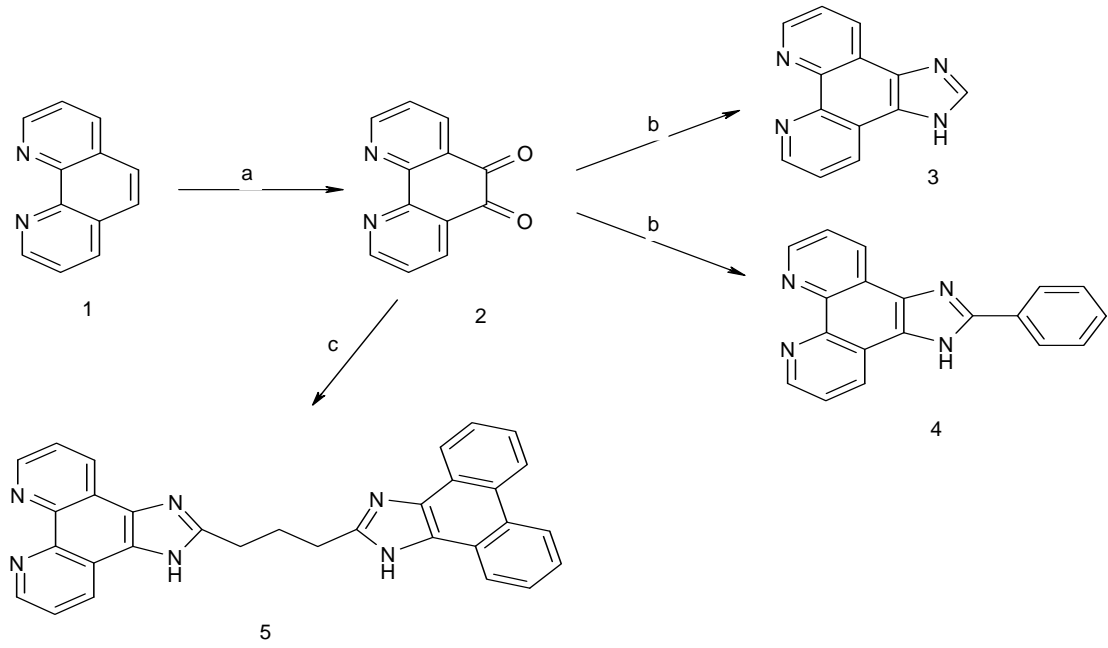
2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan İlaç Etken Maddeleri

Çalışmalarda bazı aromatik ve heterosiklik ligandlar kullanılarak elde edilen metal kompleksleri $[Au(ip)(bipp)]PF_6$, $[Au(pip)(bipp)]PF_6$, $[Au(ip)(bipp)]PtCl_2$, $[Au(pip)(bipp)]PtCl_2$ kullanılmıştır. Bu komplekslerin sentezlenmesinde ligand olarak; 1,10-fenantrolin (phen) (L1), 1,10-fenantrolin-5,6-dion (dp) (L2), [4,5-f][1,10]fenantrolin (ip) (L3), 2-fenilimidazo[4,5-f][1,10]fenantrolin (pip) (L4); köprü bileşiği olarak ise bis-1,3-di(imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolin) propan (bipp) (K) kullanılmıştır. Ara ürünlerin ve sonuç ürünlerinin yapı aydınlatma çalışmalarında 1H -NMR, IR, Kütle Spektroskopisi ve elemental analiz yöntemlerinden faydalanılmıştır. Bu maddelerin elde edilmesiyle ilgili tüm veriler Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimyaya Anabilim Dalı'ndan elde edilmiştir.

2.1.1. Ligandların sentez yöntemleri

Ligand olarak kullanılan dp, ip, pip daha önce yayınlanan prosedürlere göre sentezlenmiştir^{62,84}. Köprü bileşiği olan bipp'in sentezi için (yine literatür yöntemine benzer şekilde); dp ve NH_4OAc derişik asetik asitte çözülmüş, bu karışım üzerine, oda ısısında, karıştırılarak glutarildialdehid damla damla ilave edilmiştir. İlave işlemi tamamlandıktan sonra karışım buzlu su üzerine dökülerek NH_4OH ile nötralize edilip bekletilmiştir. Oluşan çökelek süzölmüş, su ile yıkanmış ve su-EtOH karışımından kristallendirilmiştir.

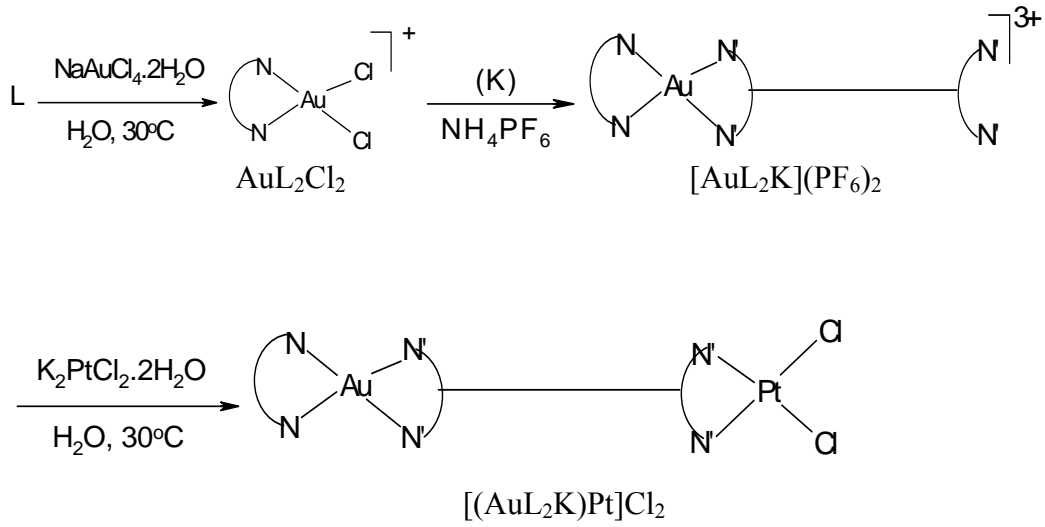


Şekil 2. 1. Ligandların sentezlenmesine ait reaksiyon denklemleri

(a :H₂SO₄, NaBr, HNO₃, NaOH ; b: NH₄Oac, glac. AcOH, formaldehid/bezaldahid; c: NH₄Oac, glac. AcOH, glutarildialdehid)

2.1.2. Metal komplekslerinin sentez yöntemleri

1,10-fenantrolin (phen), 1,10-fenantrolin-5,6-dion (dp), imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolin (ip), 2-fenilimidazo[4,5-f][1,10] fenantrolin (pip) ligandları ile bu bileşiklerin önce mononükleer Au(III) kompleksleri sentezlenmiş, daha sonra bu kompleksler bis-1,3-di(imidazo[4,5-f][1,10]-fenantrolin) propan (bipp) köprü bileşiği ile birleştirilmiştir. Son olarak K₂PtCl₄ ile dinükleer kompleksler elde edilmiştir (Şekil 2.2). Reaksiyonlar İTK yöntemi ile izlenmiş ve temiz ürünler elde edildiği gözlenmiştir.

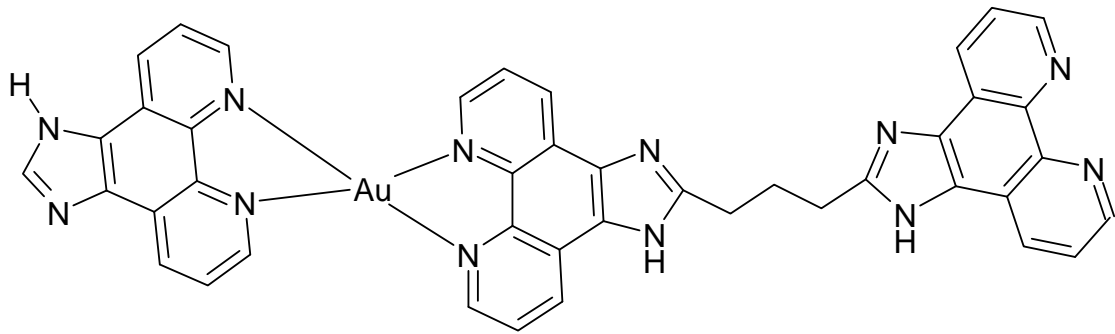


Şekil 2. 2. AuL_2Cl_2 , $[\text{AuL}_2\text{K}](\text{PF}_6)_2$ ve $[(\text{AuL}_2\text{K})\text{Pt}]\text{Cl}_2$ komplekslerinin sentez yöntemlerine ait reaksiyon şeması

Uygun ligand ve NaAuCl_4 , H_2O -EtOH içerisinde, geri çeviren soğutucu altında 8 saat ısıtılmış, reaksiyon karışımı soğutulduktan sonra, aseton ilave edilerek karışım bir gece 0°C 'de bekletilmiştir. Çökelek süzülerek, birkaç defa su ve dietileter ile yıkandıktan sonra vakumlu desikatörde kurutularak AuL_2Cl_2 kompleksleri elde edilmiştir.

$\text{Au}(\text{L})_2\text{bipp}](\text{PF}_6)_2$ komplekslerinin elde edilmeleri için; $\text{Au}(\text{L})_2\text{Cl}_2$ ve bipp MeOH içerisinde 8 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtılmış, karışım oda ısısında soğutulduktan sonra MeOH'ün yarıdan fazlası evapore edilmiştir. NH_4PF_6 'ün sudaki doymuş çözeltisi eklendiğinde elde edilen turuncu-kahverengi çökelek süzülerek su ve dietileter ile yıkanıp kurutulmuştur.

2.1.2.1. [Au(ip)(bipp)]PF₆ bileşğinin sentezi



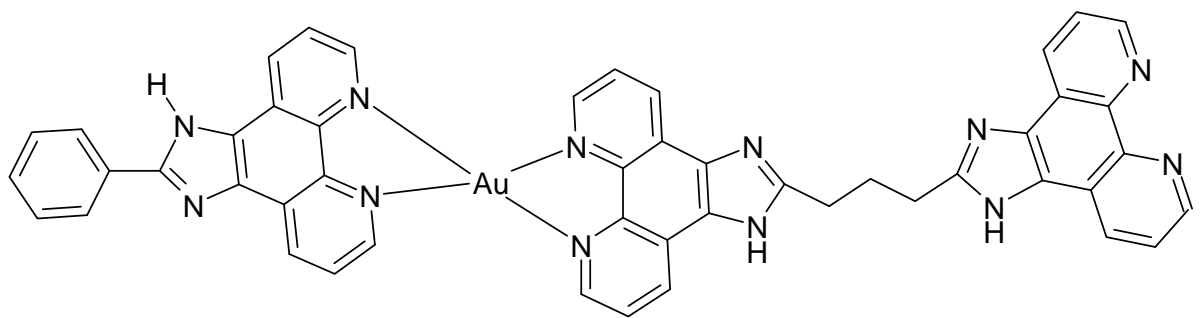
Şekil. 2. 3. [Au(ip)(bipp)]PF₆ bileşğinin denklemi

IR (KBr) $v_{maks}(cm^{-1})$: 3420, 3140, 3107, 3076 (aromatik N-H, C-H gerilim bantları), 2988, 2945 (alifatik C-H gerilim bantı), 1609, 1433, 1398 (C=N ve C=C gerilim bantları), 315 (M-Cl), 271 (M-N).

¹H-NMR(300 MHz) (DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 3.30-3.33 (2H, m), 4.00-4.05 (4H, m), 6.90 (1H, s), 7.05 (1H, s), 7.20 (1H, s), 7.65-8.10 (9H, m), 8.35-8.90 (8H, m), 9.00-9.20 (8H, m), 10.20 (1H, d), 10.45 (1H, s).

MS (ES): m/z: 942 [M+1].

2.1.2.2. [Au(pip)(bipp)]PF₆ bileşğinin sentezi



Şekil. 2. 4. [Au(pip)(bipp)]PF₆ bileşğinin denklemi

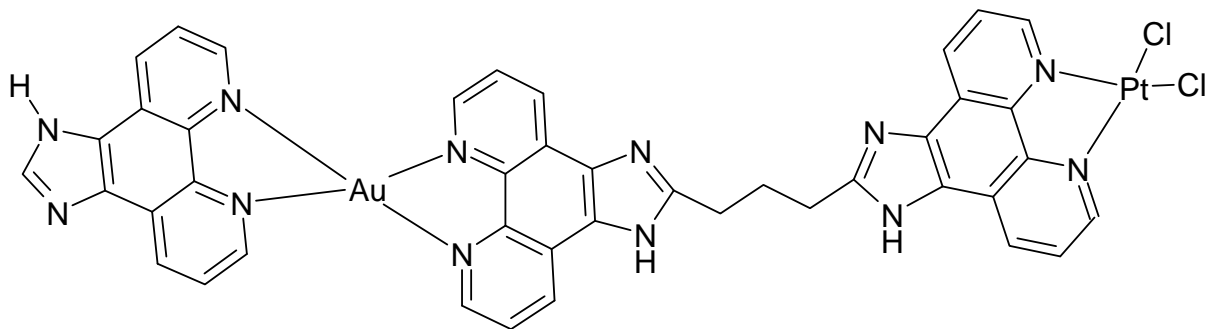
IR (KBr) $v_{maks}(cm^{-1})$: 3420, 3140, 3107, 3076 (aromatik N-H, C-H gerilim bantları), 2988, 2945 (alifatik C-H gerilim bantı), 1609, 1433, 1398 (C=N ve C=C gerilim bantları), 315 (M-Cl), 271 (M-N).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz) (DMSO- d_6) δ (ppm) : 3.30-3.33 (2H, m), 4.00-4.05 (4H, m), 6.90 (1H, s), 7.05 (1H, s), 7.20 (1H, s), 7.65-8.10 (9H, m), 8.35-8.90 (8H, m), 9.00-9.20 (8H, m), 10.20 (1H, d), 10.45 (1H, s).

MS (ES): m/z: 942 [M+1].

$[\text{Au}(\text{L})_2\text{bipp}](\text{PF}_6)_2$ 'in EtOH'daki ve K_2PtCl_4 'ın H_2O 'daki çözeltileri oda ısısında 12 saat karıştırılmıştır. Çökelek süzölmüş, birkaç defa su ve dietileter ile yıkandıktan sonra vakumlu desikatörde kurutularak $[(\text{Au}(\text{L})_2\text{bipp})\text{Pt}]\text{Cl}_2$ kompleksleri elde edilmiştir.

2.1.2.3. $[\text{Au}(\text{ip})(\text{bipp})]\text{PtCl}_2$ bileşiğinin sentezi



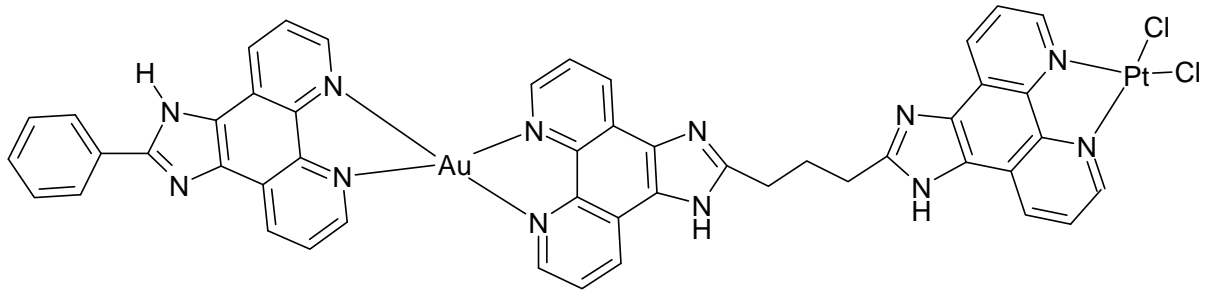
Şekil. 2. 5. $[\text{Au}(\text{ip})(\text{bipp})]\text{PtCl}_2$ bileşiğinin denklemi

IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}) : 3425, 3148, 3110, 3080 (aromatik N-H, C-H gerilim bantları), 2996, 2949 (alifatik C-H gerilim bantı), 1615, 1453, 1413 (C=N ve C=C gerilim bantları), 321 (M-Cl), 299 (M-N).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz) (DMSO- d_6) δ (ppm) : 3.35-3.38 (2H, m), 4.07-4.15 (4H, m), 7.60-9.20 (22H, m), 9.55-9.75 (6H, m), 10.25 (1H, d), 10.50 (1H, s).

MS (ES): m/z: 1096 [M+1].

2.1.2.4. [Au(pip)(bipp)]PtCl₂ bileşığının sentezi



Şekil. 2. 6. [Au(pip)(bipp)]PtCl₂ bileşığının denklemi

IR (KBr) $\nu_{\text{maks}}(\text{cm}^{-1})$: 3425, 3148, 3110, 3080 (aromatik N-H, C-H gerilim bantları), 2996, 2949 (alifatik C-H gerilim bantı), 1615, 1453, 1413 (C=N ve C=C gerilim bantları), 321 (M-Cl), 299 (M-N).

¹H-NMR(300 MHz) (DMSO-*d*₆) $\delta(\text{ppm})$: 3.35-3.38 (2H, m), 4.07-4.15 (4H, m), 7.60-9.20 (22H, m), 9.55-9.75 (6H, m), 10.25 (1H, d), 10.50 (1H, s).

MS (ES): m/z: 1096 [M+1].

2.1.3. Sentezi yapılan bileşiklerin yapı aydınlatma çalışmaları

Sentezlenen bileşiklerin erime noktalarının saptanması, toz edilen maddenin, bir ucu açık kapiller borulara ½ cm kadar doldurularak erime noktası tayini cihazında yapılmış ve bulunan değerler düzeltilmemiştir.

Sentezlenen bileşiklerin IR spektrumları, potasyum bromür içinde hazırlanan tabletleri kullanılarak, Shimadzu 8400 FTIR Infrared Spektrofotometresi'nde; NMR spektrumları ise, TMS referans maddesine karşı, maddenin dimetilsülfoksit (DMSO-*d*₆) içindeki çözeltisi hazırlanarak, Bruker DPX300 Nükleer Magnetik Rezonans Spektrometresi'nde alınmıştır.

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

JC-1 boyası (Sigma), RPMI 1640 (Sigma) , Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma), Penicillin-Streptomycin (Biological Industries), Tripsin-EDTA solution (Biological Industries), Etanol (Riedel de Haen), Sodyum bikarbonat (Sigma), Dimethyl Sulfoxide (Carlo Erba), KCl (Sigma), NaCl (Merck), KH_2PO_4 (Merck), Na_2HPO_4 (Merck), EDTA (Merck), MTT (Sigma), Sıvı Azot.

2.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

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

2.4. Kullanılan Aletler

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 cihazı (Bio-Tek, ELx808-IU), Olympus BX50 fluoresan mikroskobu, Inverted mikroskop (Olympus IX71), 12 kanallı mikropipet (eppendorf), dağıtıcı pipet (eppendorf).

2.5. Kullanılan Hücreler

2.5.1. A549 hücre kültürü

A549 hücreleri inaktif hale getirilmiş %10'luk Fetal Bovine Serum RPMI 1640 Medium, Penicillin – Streptomycin ve %7,5 NaHCO₃ içeren besiyerinin bulunduğu 25 cm²'lik flasklarda %95'lik hava ve % CO₂'li gaz ortamında, 37 °C'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmiştir.

2.5.2. V79 379A (CHL) hücre kültürü

V79 379A hücreleri, inaktif hale getirilmiş %10'luk Fetal Bovine Serum/Fetal Calf Serum, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Penicillin-Streptomycin ve %9,5 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

[Au(ip)(bipp)]PF₆, [Au(pip)(bipp)]PF₆, [Au(ip)(bipp)]PtCl₂, [Au(pip)(bipp)]PtCl₂; dimetil sülfoksit (DMSO; Carlo Erba) içinde çözülerek 1,25 µM, 2,5 µM ve 5 µM, 10µM, 20µM, 40µM, 80µM'lık dozlar hazırlanmıştır. Daha sonraki dilüsyonlar ise taze kültür vasatları kullanılarak hazırlanmıştır. [Au(ip)(bipp)]PF₆, [Au(pip)(bipp)]PF₆, [Au(ip)(bipp)]PtCl₂, [Au(pip)(bipp)]PtCl₂, DMSO içinde çözüldüğü için; negatif kontrol olarak çözücü madde olan DMSO kullanılmıştır. Stok[Au(ip)(bipp)]PF₆, [Au(pip)(bipp)]PF₆, [Au(ip)(bipp)]PtCl₂, [Au(pip)(bipp)]PtCl₂ oda sıcaklığında saklanmıştır.

2.7. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan bazı cam ve plastik malzemeler ile sıvı solüsyonlar alüminyum folyolara sarılı olarak otoklavda 121 °C, 1,5 atm/Hg

basınçta 20 dakika, bazı cam ve metal malzemeler de alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180 °C’de 2 saat süre ile steril edilerek kullanılmıştır. Kullanılan bazı sıvı kimyasallar 0,2µm aralıklı selüloz nitrat filtreden geçirmek suretiyle steril edilerek kullanılmıştır.

2.8. Yöntem

2.8.1. Hücre kültürü

A549 ve V79 379A hücreleri uygun besiyerinde ve 25 cm²’lik flasklarda yetiştirilmiş ve %95 hava ve %5 CO₂’li gaz ortamında ve 37°C’deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmişlerdir.

2.8.2. Hücrelerin testler için hazırlanması

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak MTT testi için 96 kuyucuklu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğunda belirlenen sayıda (V79 379A için 1000, A549 için 5000) hücre olacak şekilde % 10 FBS içeren besiyerinde süspansiyon haline getirildikten sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına 0,1 ml hücre süspansiyonu aktarılmıştır. 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 ve 72 saat 37°C’de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.

[Au(ip)(bipp)]PF₆, [Au(pip)(bipp)]PF₆, [Au(ip)(bipp)]PtCl₂, [Au(pip)(bipp)]PtCl₂’in belirlenen dozları hazırlanmıştır. Bu maddeler için çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. DMSO oranı %1’i geçmeyecek şekilde ve final konsantrasyonları; [Au(ip)(bipp)]PF₆, [Au(pip)(bipp)]PF₆, [Au(ip)(bipp)]PtCl₂, [Au(pip)(bipp)]PtCl₂ ‘nin 1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40, 80 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

2.8.3. MTT ölçümü

Test maddeleri ile 24, 48 ve 72 saat muamele edilen hücrelerden inkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 5 mg/ml^{-1} MTT solüsyonu ile canlı hücrelerin mitokondrial metabolik aktiviteleri sonucu MTT boyasının suda çözünmeyen formazan tuzuna dönüşebilmesi için 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmıştır. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözünmesi için her bir kuyucuğa 0,1 ml DMSO ilave edilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılık oranı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test her bir madde için iki hücre grubunda 3'er defa olmak üzere toplam 30 defa yapılmıştır.

2.8.4. Floresan boyama ile morfolojik inceleme

6'lı plakalara yerleştirilen steril lameller üzerine ekilen A549 ve V79 379A hücreleri 24 saat lamellerin üzerine yapışmaları için 37°C 'de %5 CO_2 içeren inkübatörde kültüre edilmişlerdir. Metal komplekslerinin sitotoksikite testleri sonucunda belirlenen 5,10, 20, ve $40\mu\text{M}$ 'lık dozları lameller üzerine yapışan hücrelere 24 saat süresince uygulanmıştır. Bu süre sonunda plakaların içerisinde bulunan medyum ortamdan vakumla çekilerek uzaklaştırılmıştır. Daha önce hazırlanmış olan JC-1 (5,5', 6,6'-tetrachlo-1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) boyama solüsyonu ile hücreler boyanmışlardır. Kuyucuklar 30 dakika inkübatörde bekletilmiş ve boyanın etkisini göstermesi sağlanmıştır. Bu süre sonunda PBS ile yıkanan lameller fotoğraflanmıştır.

2.8.5. Mikroskopi

Hücreler Olympus BX50 floresan mikroskobu altında, immunohistokimyasal yapıları Olypus U-UHK floresan mikroskobunda incelenmişlerdir.

2.8.6. Fotoğrafi

Kültür hücrelerinin mikroskop altında saptanan uygun görüntüleri Olympus DP71 kullanılarak fotoğraflanmıştır.

2.9. İstatistiki Değerlendirme

MTT deneylerinin sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesinde (Statistical Package for the Social Sciences) SPSS 13.0 programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

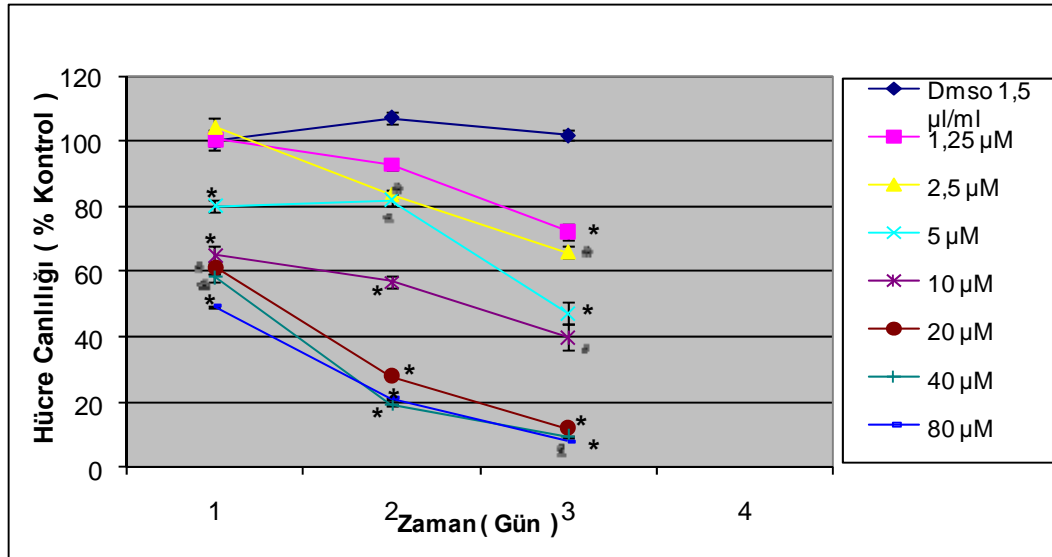
3. BULGULAR

Çalışmada kullanılan test maddelerinin çoğalmayı engelleyici etkilerinin belirlenmesi amacıyla, bu maddelerin belirlenen dozları A549 ve V79 379A hücreleri üzerine uygulanmış, uygulama sonrasında hücreler MTT ile muamele edilmiş ve ELISA plate okuyucusunda sonuçlar değerlendirilmiştir.

Kullanılan test maddelerinin, MTT sonuçlarına göre belirlenen dozlarının apoptoza yol açıp-açmadığını belirlemek amacıyla A549 ve V79 379A hücreleri üzerine bu maddeler denenmiş ve JC -1 boyaması yapılmıştır. Daha sonra elde edilen sonuçlar Olympus BX50 floresan mikroskobu ile incelenmiş ve Olympus DP71 ile fotoğraflanmıştır.

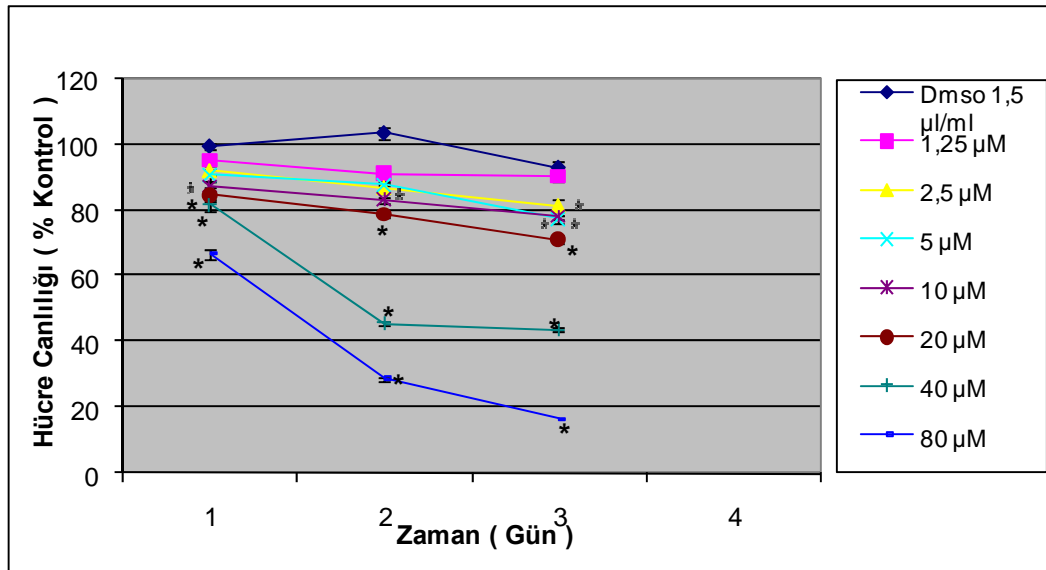
3.1. MTT Sonuçları

3.1.1. CisPt(II)'nin A549 ve V79 379A (CHL) hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri



Şekil 3.1. CisPt(II)'nin A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Cispt(II)'nin uygulandığı A549 hücreleriyle yapılan MTT testi sonucunda, maddenin en küçük dozları olan 1,25 μ M ve 2,5 μ M'lık dozların hücre sayısında ilk günde bir değişiklik yapmadığı, 2.gün hücre sayısını %5-20 arasında azalttıkları, 3.gün ise sitotoksik etkilerini artırarak hücre sayısını %25- 35 arasında azalttıkları saptanmıştır. 5 μ M'lık dozun ise 1 ve 2.gün hücre sayısını azalttığı, en yüksek sitotoksik etkisini 3.günde gösterdiği ve hücre sayısını yaklaşık %60 oranında düşürdüğü gözlenmiştir. Etkili olan 10 μ M, 20 μ M ,40 μ M ve 80 μ M'lık dozların ise ilk günden itibaren sitotoksik etki gösterdiği hücre sayısını yaklaşık olarak %35-55 arasında değiştirdikleri, 2.gün ise 10 μ M'lık dozun etkisinde önemli bir değişiklik olmadığı ancak diğer dozların hücre sayısını %70-80 oranında azalttığı görülmüştür. Bu dozlardan 10 μ M'lık dozun 3.gün hücre sayısını %60 oranında azalttığı, diğer etkili dozların ise neredeyse tüm hücreleri öldürdüğü belirlenmiştir.



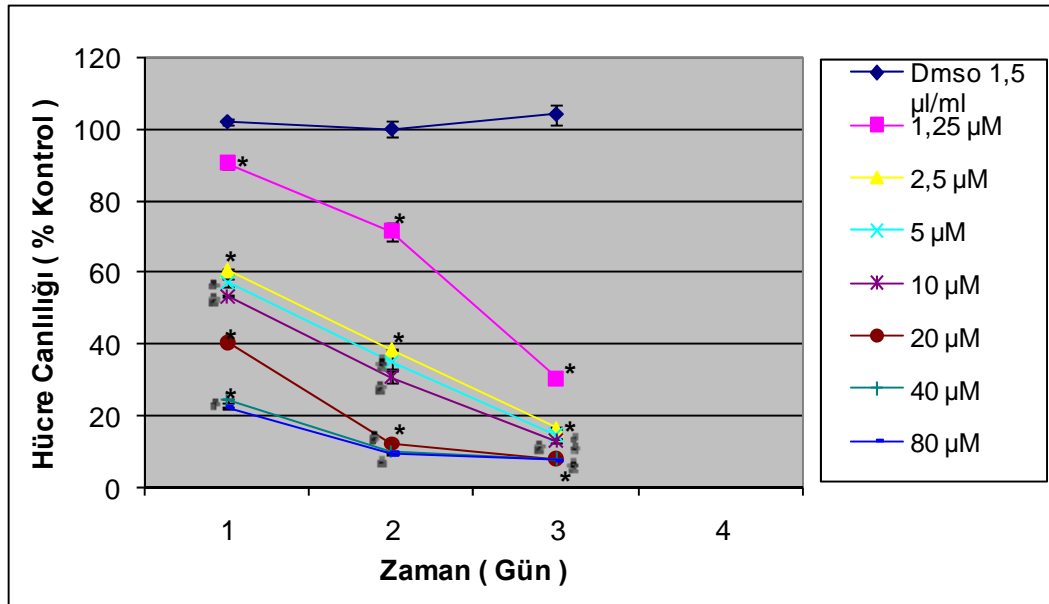
Şekil 3.2. CisPt(II)'nin V79 379A hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.

(*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Cispt(II)'nin uygulandığı V79 379A hücreleriyle yapılan MTT testi sonucunda, maddenin en küçük dozu olan 1,25 μ M'lık dozun hücre sayısında ilk günde bir değişiklik yapmadığı, 2.gün hücre sayısını %10 oranında azaltmasına rağmen 3.gün sitotoksik etkisinin azaldığı görülmüştür. 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M,

20 μ M'lık dozların ise sitotoksik etkilerinin birbirine benzer olduğu, 1.gün hücre sayısını yaklaşık olarak %5-15 oranında azalttıkları, 2.gün bu etkilerinin biraz daha arttığı ve bu oranın %10-20 arasına çıktığı 3.günde ise %20-30 oranında hücre sayısını azalttıkları belirlenmiştir. Etkili dozlardan olan 40 μ M ve 80 μ M'lık dozlar ise 1.gün hücre sayısını %20-35 oranında azaltmış, ikinci gün sitotoksik etkilerinin daha da arttığı ve hücre sayısını %55-75 oranında azalttıkları 3.gün de ise 40 μ M'lık dozun etkisinde neredeyse bir değişme olmadığı ancak 80 μ M'lık dozun neredeyse tüm hücreleri öldürerek %85 oranında hücre sayısını azalttığı belirlenmiştir.

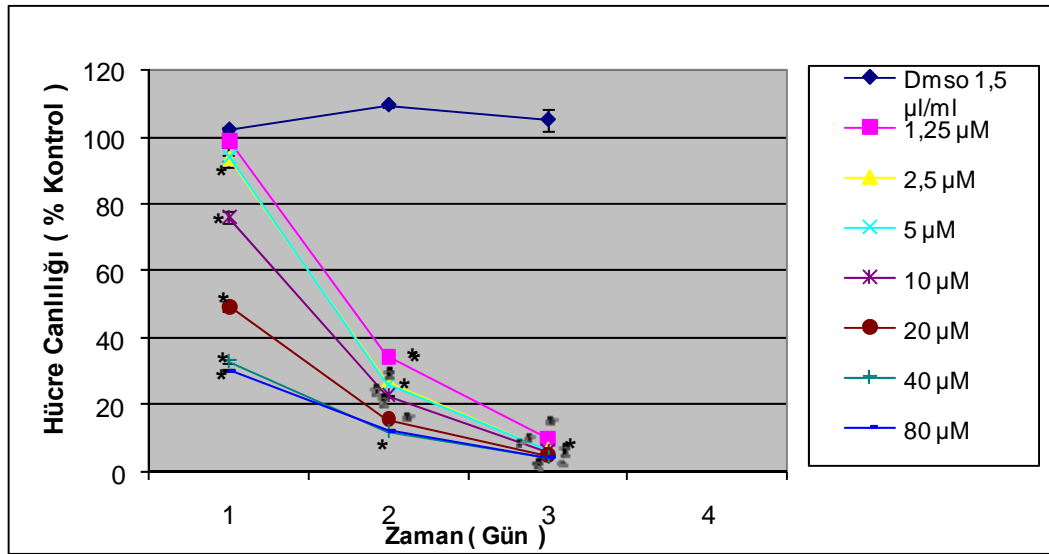
3.1.2. [Au(ip)(bipp)]PF₆'nın A549 ve V79 379A(CHL) hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri



Şekil 3.3. [Au(ip)(bipp)]PF₆'nın A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p< 0,05

[Au(ip)(bipp)]PF₆'nın uygulandığı A549 hücreleriyle yapılan MTT testi sonucunda, uygulanan maddenin tüm dozlarında zamana ve doza bağlı olarak ilk günde A549 hücre sayısında belirgin bir azalma gözlenmiş, bu azalma miktarı diğer günlerde de artarak devam etmiştir. 1,25 μ M'lık en küçük dozun hücre

canlılığını 1.gün yaklaşık olarak %10, 2.gün %25, 3.gün ise %75 oranında azalttığı gözlemlenmiştir. 2,5 μM , 5 μM , 10 μM 'lık dozların hücre canlılığına olan etkilerinin birbirlerine benzediği görülmektedir. Bu dozların ilk günden itibaren hücre sayısı üzerinde kontrole göre anlamlı farklılıklar gösterdiği gözlenmektedir. Bu dozların 2. ve 3.gün sonuçları da birbirine benzemekte ve 3.gün sonunda hücre sayısını yaklaşık olarak %80-85 azaltıkları görülmektedir. En etkili dozlar olan 20 μM , 40 μM ve 80 μM 'lık dozların ilk günden itibaren hücre sayısında yaklaşık olarak %60-80 oranında bir azalma meydana getirdiği, 2. günde de bu etkinin arttığı ve %90'lara ulaşarak neredeyse tüm hücreleri öldürdüğü gözlenmiştir. 3.günde ise bu dozların etkisinde bir değişme meydana gelmediği saptanmıştır. Bu maddenin tüm dozlarının, doza ve zamana bağlı olarak kontrole göre anlamlı farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir.

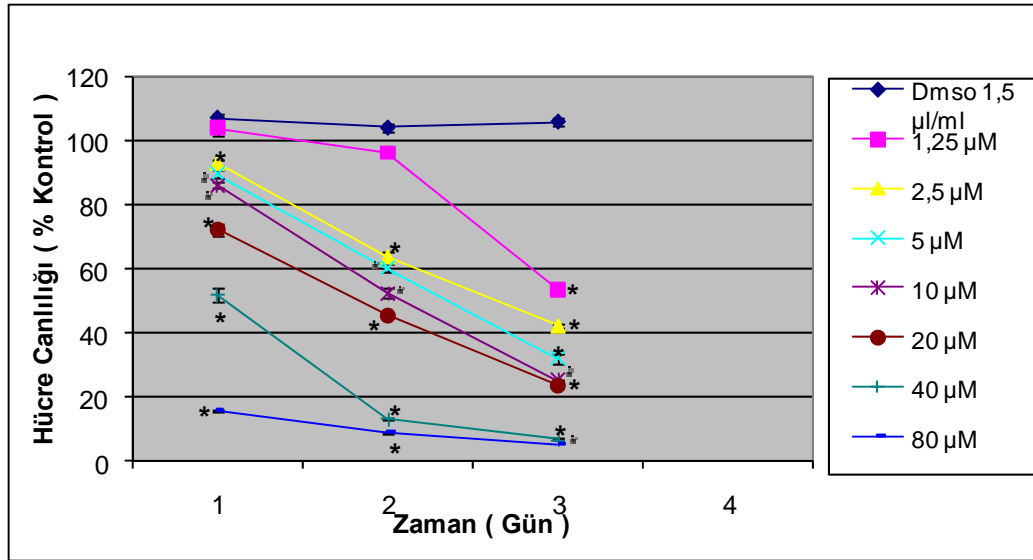


Şekil 3.4. [Au(ip)(bipp)]PF₆'nın V79 379A hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p < 0,05

[Au(ip)(bipp)]PF₆ uygulanarak yapılan MTT deneyi sonucunda V79 379A hücreleri üzerinde zamana ve doza bağlı olarak 3 günde hücre sayısında önemli miktarda azalma gözlenmiştir. Bu maddenin 1,25 μM , 2,5 μM , 5 μM 'lık dozlarının etkisi neredeyse aynı şekilde seyretmiştir. Buna göre bu dozlar, 1.günde hücre sayısında azalma meydana getirmemiş, 2.günde hücrelere olan

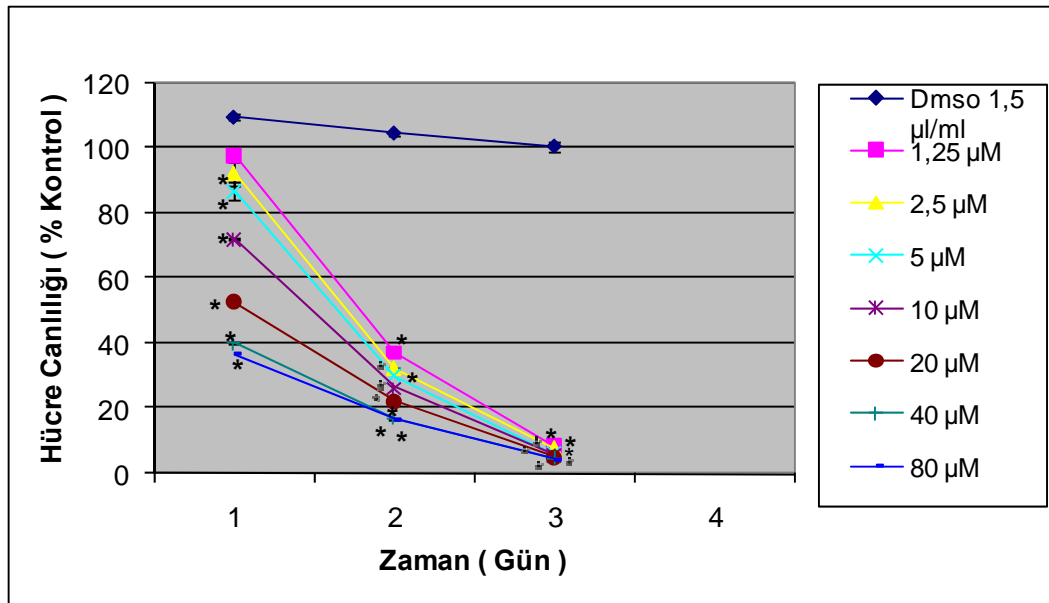
sitotoksik etkilerinin önemli derecede arttığı ve yaklaşık olarak %65-75 civarında hücre sayısını azalttıkları, 3 günde de neredeyse tüm hücreleri öldürerek sitotoksik etki göstermişlerdir. Bu maddenin 10 μ M'lık dozunun ise 1.gün hücre sayısında %20 civarında azalma meydana getirdiği 2.günde ise sitotoksik etkisinin müthiş bir şekilde arttığı ve hücre sayısını %80 civarında azalttığı gözlemlenmiştir. 3.günde ise etkisini diğer tüm maddeler gibi neredeyse tüm hücreleri yok ederek göstermiştir. Etkili dozlardan olan 20 μ M'lık doz ise 1.gün hücre sayısını %65 civarlarında azalttığı görülmektedir. Bu maddenin diğer dozlarının ise diğer tüm tozlar gibi sitotoksik etkisinin diğer günlerde giderek arttığı gözlemlenmiştir. En etkili dozlar olan 40 μ M ve 80 μ M'lık dozlar ise 1.günden itibaren %70 oranında hücre sayısını azaltmış, 2. ve 3. günlerde de bu etkilerini artırarak devam ettirmişlerdir. 2.ve 3.günde neredeyse tüm hücreleri öldürmüşlerdir. Bu maddenin ilk üç dozunun 1.günü hariç diğer tüm dozları doza ve zamana bağlı olarak kontrole göre anlamlı farklılıklar göstermiştir.

3.1.3. [Au(pip)(bipp)]PF₆'nın A549 ve V79 379A(CHL) hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri



Şekil 3.5. [Au(pip)(bipp)]PF₆'nın A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p < 0,05

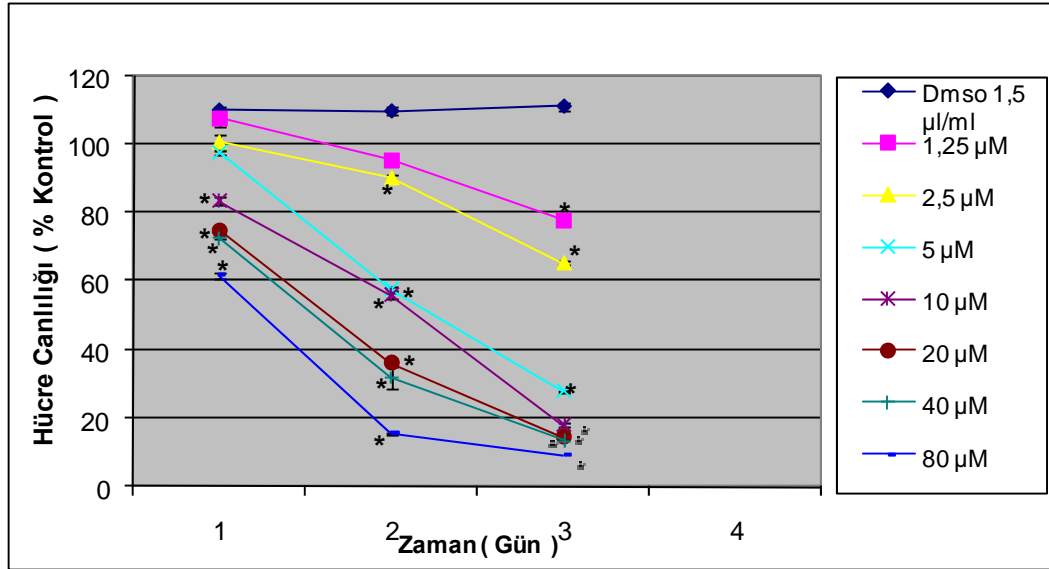
[Au(pip)(bipp)]PF₆'nın A549 hücrelerine uygulanarak yapılan MTT testi sonucunda en küçük doz olan 1,25µM'lık dozun 1.günde hücrelere hiçbir öldürücü etki göstermediği, 2.günde ise hücre sayısında azda olsa belirli bir azalma meydana getirdiği, 3.günde ise hücre sayısında yaklaşık olarak %45 oranında da kontrole göre anlamlı bir azalma meydana getirdiği gözlenmiştir. Bu maddenin 2,5µM, 5µM, 10µM ve 20µM'lık dozlarının ise hücre canlılığına bağlı olarak hücre sayısında benzer düşüşler meydana getirdiği görülmüştür. Bu dozlar 1.gün %10-30 arasında hücre sayısını azaltmış, 2.günde %35 -55 arasında bir azalma meydana getirmiş, 3.günde ise bu azalma artarak devam etmiştir. En etkili dozlar olan 40µM ve 80µM'lık dozlar ise ilk günden itibaren hücre sayısında büyük azalmalar meydana getirmiştir. 80µM'lık dozun ilk günde %85'lere civarında hücre sayısında azalmalar meydana getirdiği, diğer günlerde de etkisini artırarak neredeyse tüm hücreleri öldürdüğü gözlenmiştir. 40µM'lık dozun 2.ve 3.gündeki etkileri bakımından 80µM'lık doza benzer etki yaptığı görülmüştür. 1,25µM'lık dozun 1.ve 2.gün yaptığı etki dışında diğer tüm dozların tüm gün sonuçlarının kontrole göre anlamlı farklılıklar gösterdiği ortaya çıkmıştır.



Şekil 3.6. [Au(pip)(bipp)]PF₆'nın V79 379A hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p< 0,05

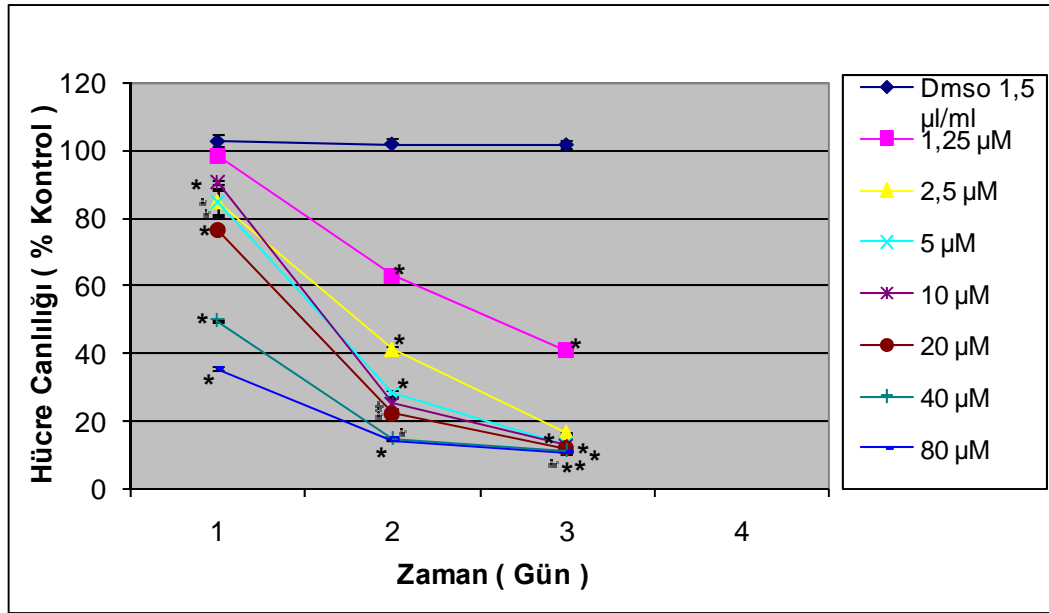
[Au(pip)(bipp)]PF₆ uygulanarak yapılan MTT deneyi donucunda V79 379A hücreleri üzerinde zamana ve doza bağlı olarak 3 günde hücre sayısında önemli miktarda azalma gözlenmiştir. Bu maddenin tüm dozlarının hücreler üzerinde bütün günlerde giderek artan sitotoksik etki yaptığı görülmektedir. 1,25µM'lık doz hücre sayısında 1.gün anlamlı bir azalma meydana getirmemiş 2.gün ise çok yüksek sitotoksik etki göstererek hücre sayısını %60 oranında azaltmış bu etkisini 3.günde devam ettirerek neredeyse tüm hücreleri öldürmüştür. 2,5µM, 5µM, 10µM, dozlar ise birbirine benzer şekilde hücreler üzerinde etkili olmuştur. 1.günde hücre sayısını %10-30 oranında azaltmış 2.günde %70, 3.günde ise %90 oranında hücre sayısında azalma meydana getirdikleri belirlenmiştir. Etkili dozlar olan 20 µM, 40µM ve 80µM'lık dozların ise 1.günde %45-60, ikinci günde %80, 3.günde ise %95 oranında hücre sayısında azaltma meydana getirmiştir. Bu maddenin tüm dozları 3.günde aynı yüksek sitotoksik etkiyi göstererek neredeyse hücrelerin tümünü öldürmüştür. Bu maddenin ilk dozunun 1.günü hariç diğer tüm dozlarının doza ve zamana bağlı olarak kontrole göre anlamlı farklılıklar göstermiştir.

3.1.4. [Au(ip)(bipp)]PtCl₂'nin A549 ve V79 379A(CHL) hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri



Şekil 3.7. [Au(ip)(bipp)]PtCl₂'nin A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p< 0,05

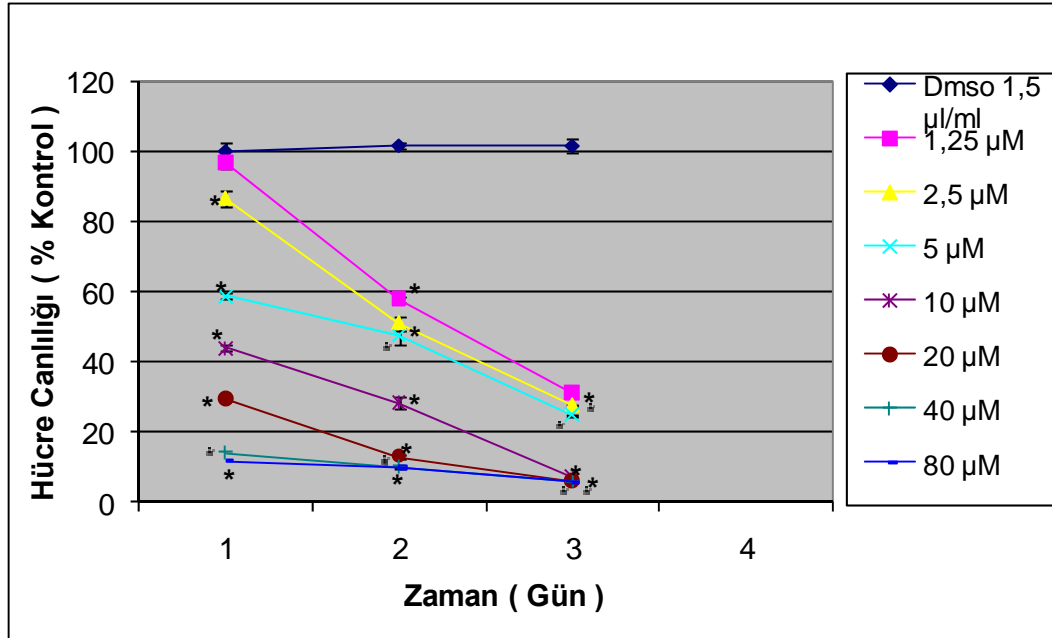
[Au(ip)(bipp)]PtCl₂'ün kullanılmasıyla yapılan MTT test sonuçlarına göre bu maddenin en küçük dozları olan 1.25µM, 2,5µM ve 5µM'lık dozların A549 hücreleri üzerinde 1.günde herhangi bir sitotoksik etki yaratmayıp hücre sayısında azalmaya yol açmadığı belirlenmiştir. 1,25µM'lık dozun 2.günde çok az sayıda hücreye etki ettiği, 3.günde ise %20 oranında hücre sayısını azalttığı görülmüştür. 2,5µM'lık doz ise 2.ve 3.günlerde gittikçe artan oranda hücre sayısını azaltmıştır. 5µM'lık doz ise 2.ve 3.günlerde düzenli bir şekilde artan oranlarda hücre sayısında azalma meydana getirmiştir. Bu doz 2.gün %40, 3.gün ise %75'lere varan oranlarda hücre sayısını azalttığı görülmüştür. 10µM, 20µM, 40µM ve 80µM'lık dozlar ise 1.günden itibaren hücre sayılarında anlamlı derecede azalmaya sebep olmuş, 2. ve 3.günlerde de artan oranlarda hücre sayılarını azaltmaya devam etmişlerdir. Bu dozlar 1.gün %20-40, 2.gün %60-80, 3.gün ise %80-90 oranında hücre sayılarında azalmaya neden olmuşlardır.



Şekil 3.8. [Au(ip)(bipp)]PtCl₂'nin V79 379A hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p< 0,05

[Au(ip)(bipp)]PtCl₂'ün kullanılmasıyla yapılan MTT test sonuçlarına bu maddenin en küçük dozu olan 1,25µM'lık dozun 1.gün hariç diğer tüm dozlar zamana ve doza bağlı olarak V79 379A hücre canlılığı üzerinde sitotoksik etki göstermiştir. En küçük doz olan 1,25µM,'lık dozun 1.gün kontrol grubuna göre anlamlı bir fark yaratmamıştır. Bu dozun diğer günlerde giderek artan oranlarda hücre sayısını azalttığı görülmektedir. 2,5µM, 5µM, 10µM, 20µM'lık dozlar ise birbirine benzer etkiler göstermiştir. Bu dozlar 1.gün %10-20 arasında hücre sayısında azalma meydana getirirken 2.gün çok yüksek miktarda sitotoksik etki yaratmışlardır. 2.gün %60 ile %80 arasında hücre sayısında azalma meydana getirirken bu dozlar 3.günde neredeyse tüm hücreleri öldürmüşlerdir. 3.gün hücre sayısındaki azalma %90 oranında olmuştur. Etkili dozlardan olan 40µM ve 80µM'lık dozlar ise 1.günden itibaren çok yüksek sitotoksik etki göstererek hücre sayılarında ciddi oranlarda azalmaya meydana getirmişlerdir. 1.gün %50-65 arasında hücre sayısında azalma meydana gelirken, 2.gün bu oran giderek artmış ve %85'lere çıkmıştır. 3.gün ise hücrelerin neredeyse tümü ölmüştür.

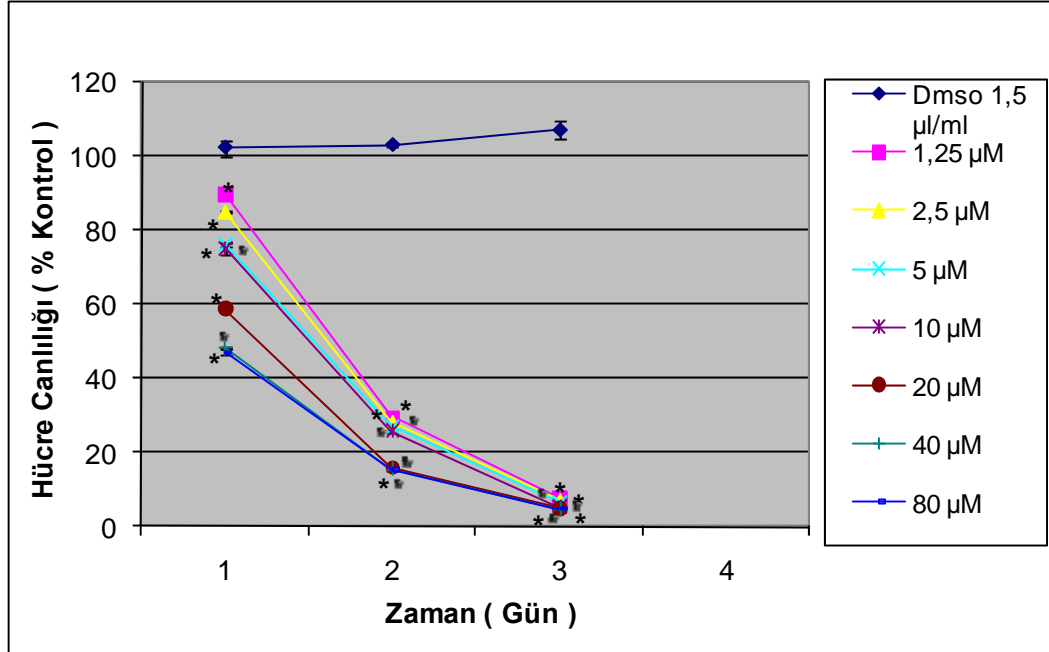
3.1.5. [Au(pip)(bipp)]PtCl₂'nin A549 ve V79 379A(CHL) hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri



Şekil 3.9. [Au(pip)(bipp)]PtCl₂'nin A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p< 0,05

[Au(pip)(bipp)]PtCl₂'ün farklı dozlarının A549 hücrelerine uygulanmasıyla elde edilen MTT sonuçlarına göre bu maddenin en küçük dozu olan 1,25µM'lık dozun 1.gün hücre sayısında herhangi bir azalma meydana getirmediği görülmüştür. Bunun dışında kalan diğer tüm dozların, zamana ve doza bağlı olarak hücreler üzerinde sitotoksik etki yarattığı belirlenmiştir. 1,25µM'lık dozun 2.gün ve 3.gün hücre sayısında ciddi azalmalara yol açtığı, 2.günde hücre sayısını %40, 3.günde ise %65 oranında azalttığı gözlemlenmiştir. 2,5µM'lık doz ise 1.gün hücre sayısını %10, 2.gün %45, 3.gün ise % 75 oranda azaltmıştır. 5µM'lık doz ise 1.gün hücre sayısını %40, 2.gün %55, 3.gün ise %75 oranda azaltmıştır. 10µM, 20µM, 40µM ve 80µM'lık dozlar hücreler üzerinde 1.günden itibaren yüksek oranda sitotoksik etki göstermişlerdir. Bu dozlar 1.gün hücre sayısını %65-85 oranında azaltırken, 2.gün bu etki %75-90 seviyelerine yükselmiştir. 3.gün de ise bu dozların tümü neredeyse tüm hücreleri yok etmiştir. Bu maddenin en etkili dozları olan 40µM ve 80µM'lık dozlar, 1.günden itibaren

yüksek sitotoksik etki göstermişlerdir. Bu dozlar 1.gün %90'lara varan oranlarda hücre sayılarını azaltmış, etkilerini diğer günlerde devam ettirmişlerdir.

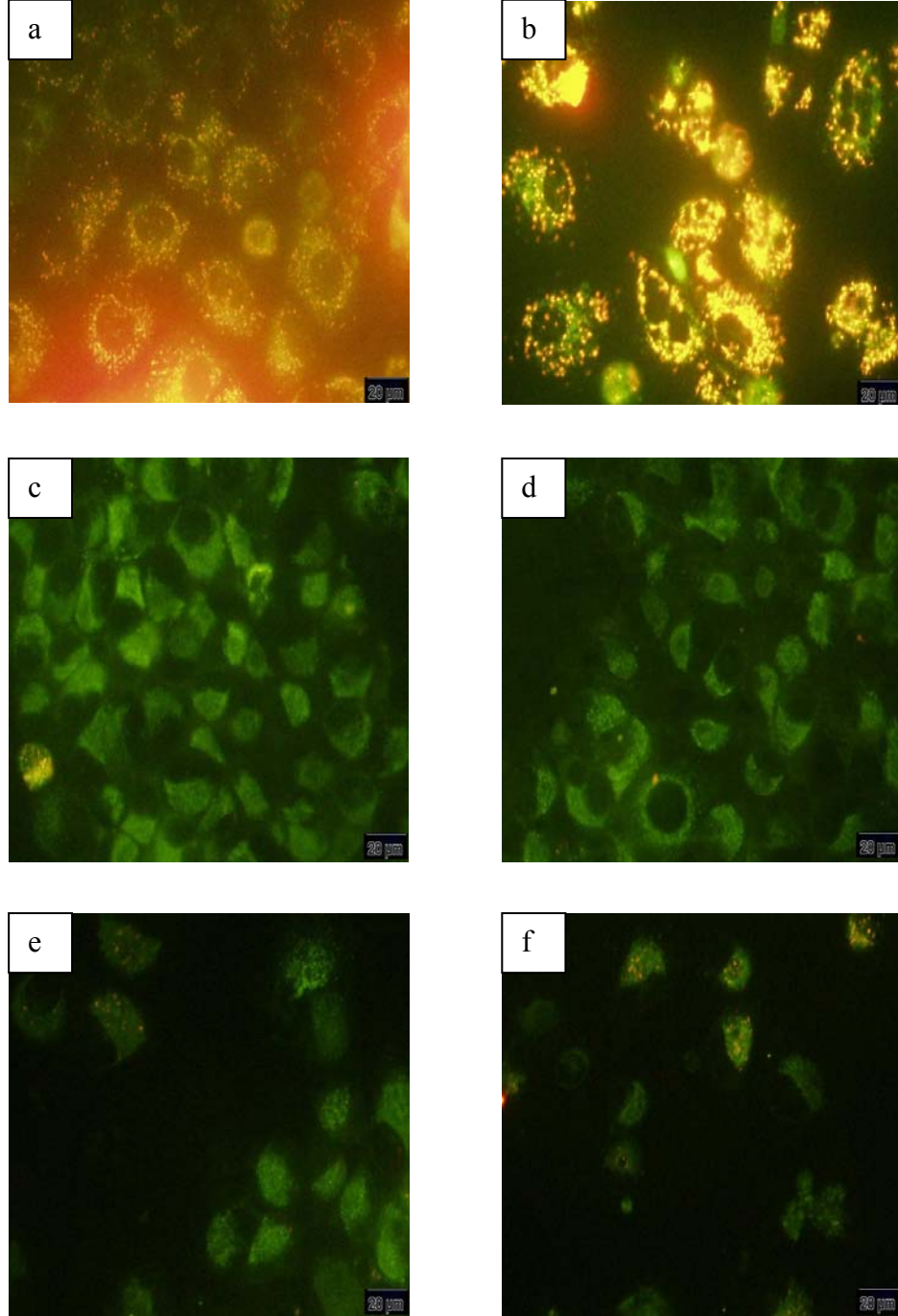


Şekil 3.10. [Au(pip)(bipp)]PtCl₂'nin V79 A379 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p< 0,05

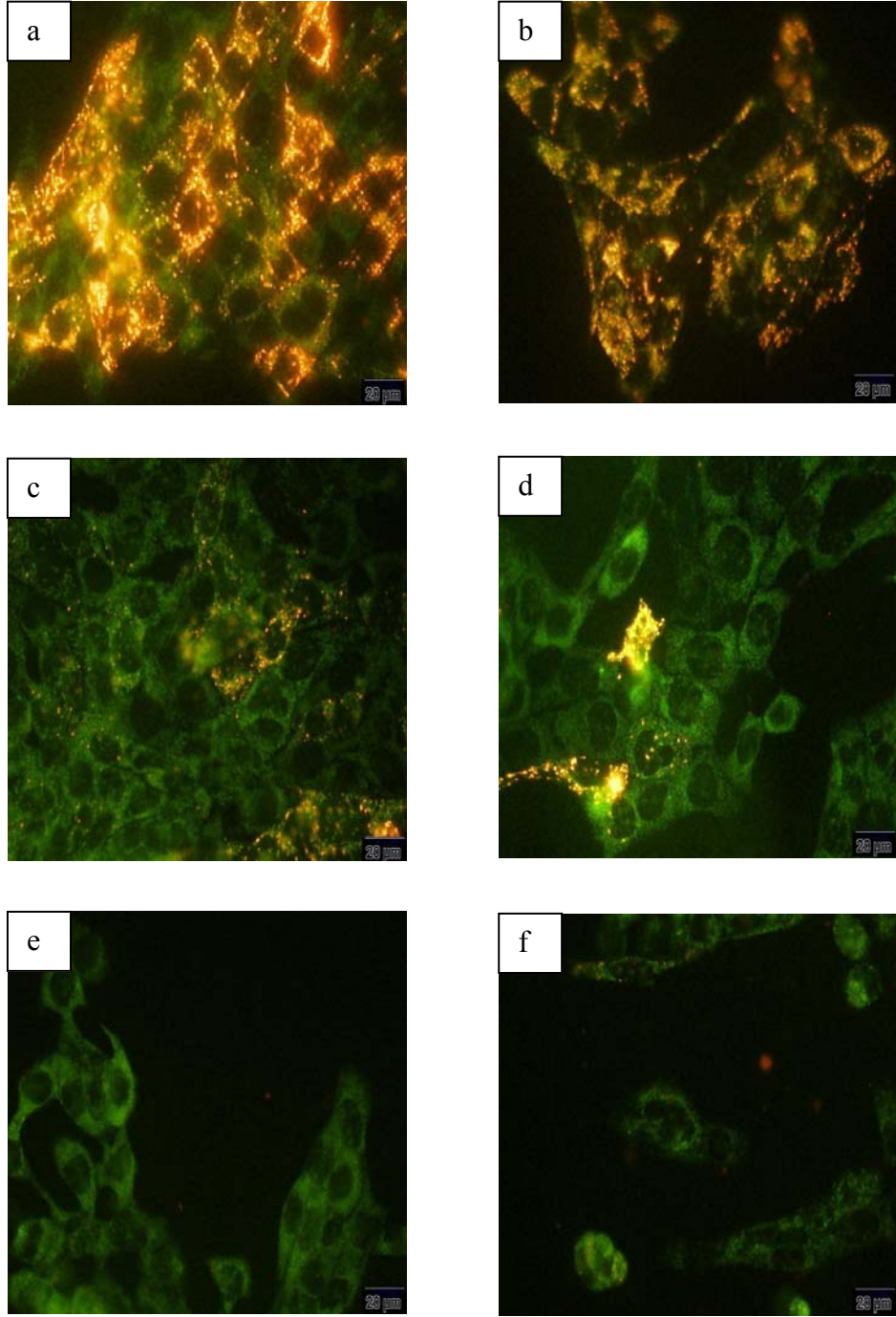
[Au(pip)(bipp)]PtCl₂'ün farklı dozlarının V79 379A hücrelerine uygulanmasıyla elde edilen MTT sonuçlarına göre bu maddenin tüm dozlarının zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik etki yaptığı görülmüştür. Bu maddenin 1,25µM, 2,5µM, 5µM, 10µM'lık dozlarının 1.gün hücre sayısında %10-25 oranında bir azalma meydana getirdiği, 2.ve 3.gün ise hücre sayısında ciddi bir şekilde artan oranlarda bir azalma meydana getirdikleri görülmüştür. Özellikle bu dozların 2.gün hücre sayısını %75 oranında azalttığı, 3.günün sonunda da neredeyse tüm hücreleri yok ettiği belirlenmiştir. Bu maddenin etkili dozları olan 20µM, 40µM ve 80µM'lık dozların 1.gün hücre sayısını %40-50 oranında azalttığı, 2.gün %80 ve 3.günde %95 oranlarda hücre sayılarını azalttığı saptanmıştır. Bu maddenin tüm dozları 3.gün aynı oranda etkili olmuş ve hücrelerin neredeyse tamamını öldürmüştür.

3.2. Floresan Boyama ile Morfolojik İnceleme Sonuçları

3.2.1. Cispt(II)'nin A549 ve V79 379A hücreleri üzerinde morfolojik incelemeleri



Şekil 3.11. Cispt(II)'nin A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin JC-1 boyama ile değerlendirilmesi. a:kontrol, b:DMSO, c:5 μM 'lık doz, d: 10 μM 'lık doz, e:20 μM 'lık doz, f:40 μM 'lık doz



Şekil 3.12 . Cispt(II)'nin V79 379A hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin JC-1 boyama ile değerlendirilmesi. a:kontrol, b:DMSO, c:5 μM 'lık doz, d: 10 μM 'lık doz, e:20 μM 'lık doz, f:40 μM 'lık doz

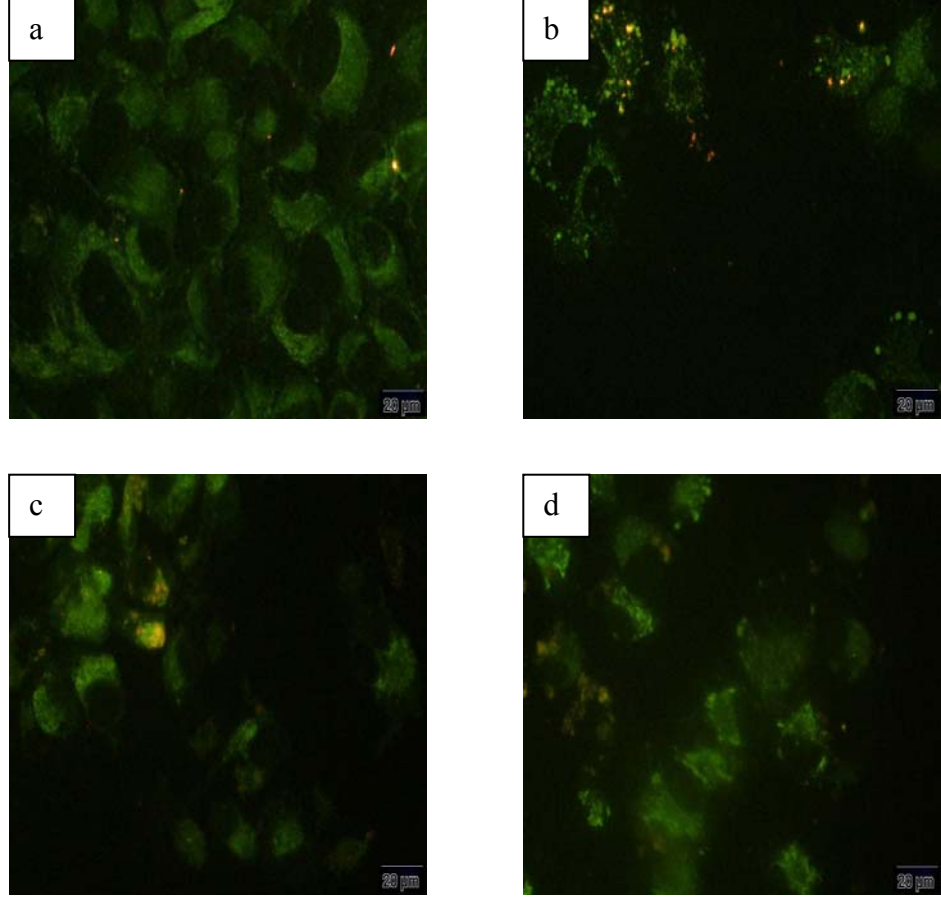
Kanser ilacı olarak yaygın bir şekilde kullanılan sisplatinin apoptoza neden olarak bu etkisini gösterdiği bilinmektedir. Çalışmamızda sisplatin pozitif kontrol amaçlı olarak kullanılmıştır. Morfolojik inceleme için de JC-1 boyası kullanılmıştır. JC-1 mitokondriyal membran potansiyelinin kaybını göstermek

için kullanılan katyonik bir boyadır. Mitokondriyal potansiyel farkının kaybı apoptotik kaskada neden olur. Sağlıklı hücrelerde bu boya mitokondriyi parlak kırmızıya boyar. Apoptotik hücrelerde ise mitokondriyal membran potansiyeli çöktüğü için JC-1 mitokondrinin içinde birikemez. Bu hücrelerde JC-1 sitoplazmada yeşil monomerik yapısında kalır.

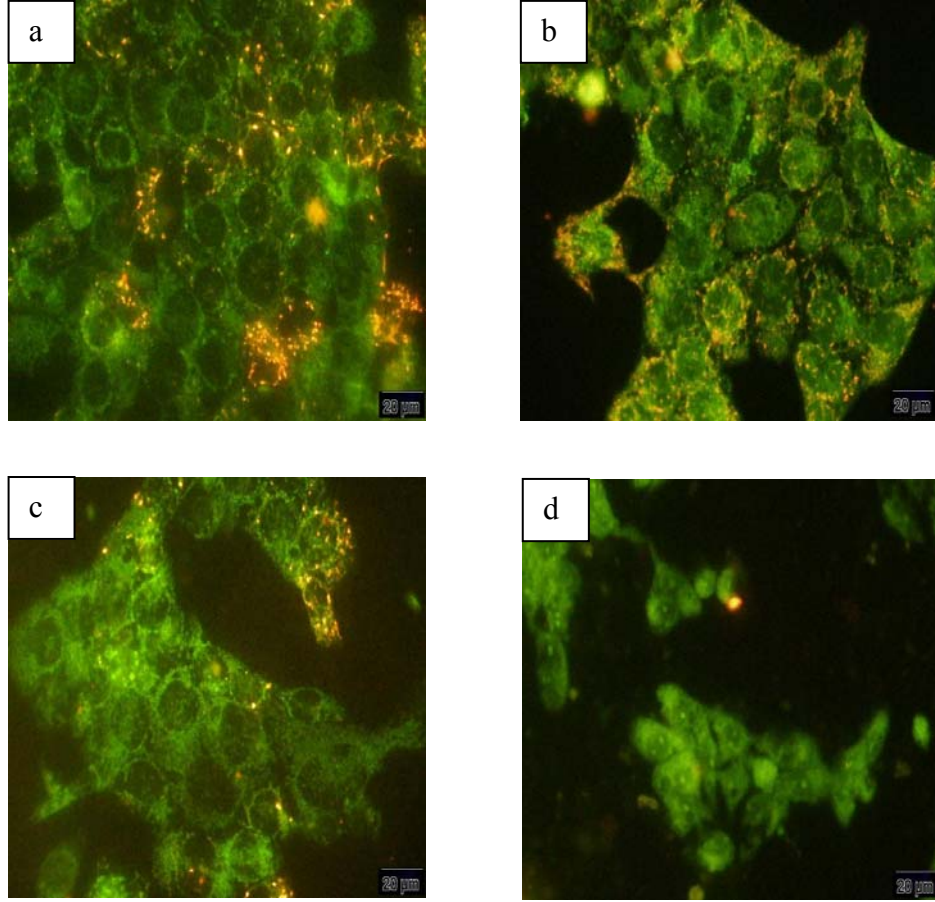
Şekil 3.11 incelendiğinde sisplatinin A549 hücreleri üzerinde ilk dozdan itibaren apoptotik etki gösterdiği görülmektedir. Çünkü kontrol ve negatif kontrol olarak kullanılan DMSO verilmiş hücrelerin mitokondrileri yoğun bir şekilde parlak kırmızıya boyanmıştır. Bu etkinin artan doz miktarı ile birlikte daha da arttığı, ayrıca hücre sayısında doza bağımlı olarak bir azalma meydana getirdiği göze çarpmaktadır.

Şekil 3.12 incelendiğinde sisplatinin V79 379A hücreleri üzerindeki etkisinin A549 hücreleri üzerindeki etkisine benzer olduğu görülmektedir. Sisplatin bu hücrelerde de ilk dozdan itibaren apoptotik etki göstermiş, ancak özellikle 20 ve 40 μ M'lık dozlarda hücre sayısında ciddi azalmalar meydana getirmiştir.

3.2.2. [Au(ip)(bipp)]PF₆'nın A549 ve V79 379A hücreleri üzerinde morfolojik incelemeleri



Şekil 3.13. [Au(ip)(bipp)]PF₆'nın A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin JC-1 boyama ile değerlendirilmesi. a:5 μM'lık doz, b: 10μM'lık doz, c:20 μM'lık doz, d:40μM'lık doz

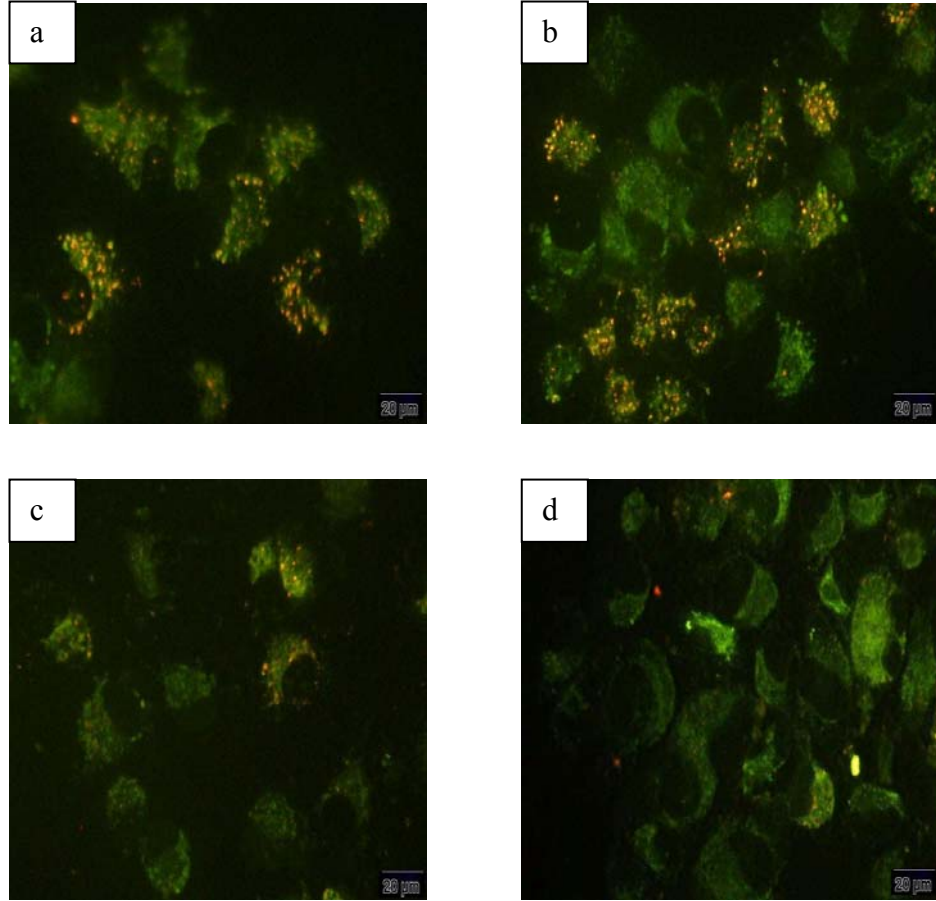


Şekil 3.14. $[\text{Au}(\text{ip})(\text{bipp})]\text{PF}_6$ 'nın V79 379A hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin JC-1 boyama ile değerlendirilmesi. a: $5 \mu\text{M}$ 'lık doz, b: $10 \mu\text{M}$ 'lık doz, c: $20 \mu\text{M}$ 'lık doz, d: $40 \mu\text{M}$ 'lık doz

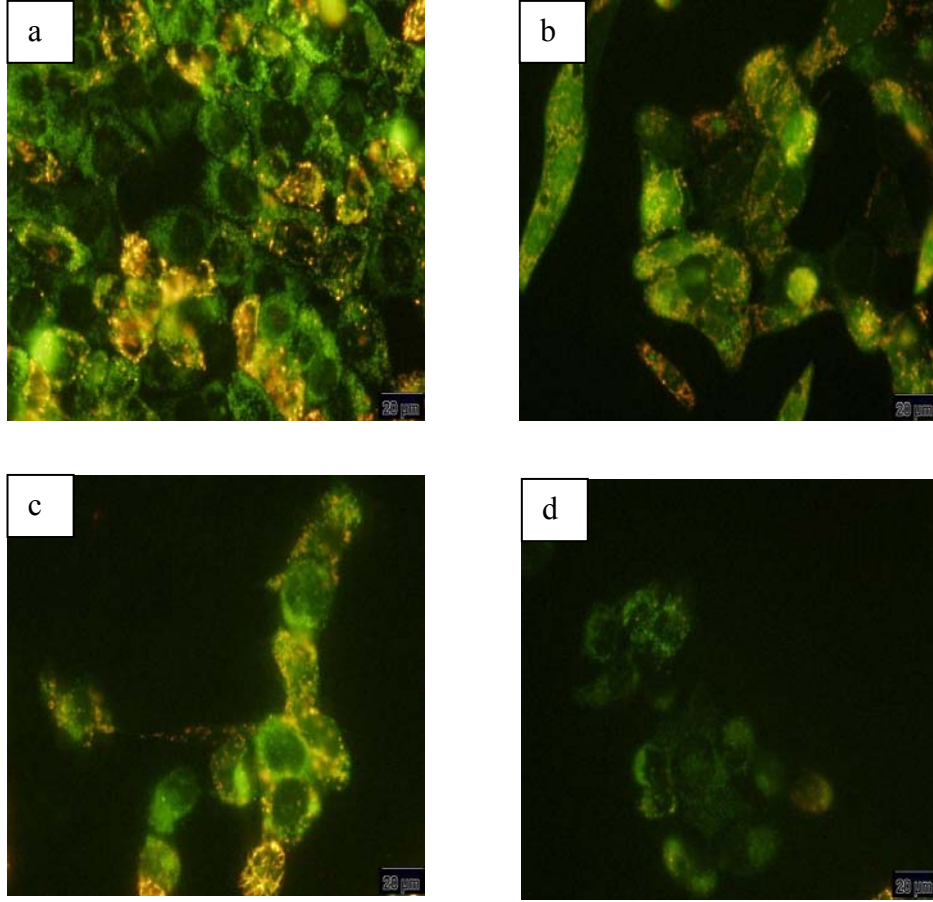
Şekil 3.13 incelendiğinde $[\text{Au}(\text{ip})(\text{bipp})]\text{PF}_6$ 'nın A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi ilk dozdan itibaren görülmeye başlamıştır. Ayrıca hücre sayısında doza bağımlı olarak bir azalma göze çarpmaktadır. Bu hücreler neredeyse hiç kırmızıya boyanmamış bu da mitokondriyal membran potansiyelinin kaybolduğunu göstermektedir.

Şekil 3.14 incelendiğinde $[\text{Au}(\text{ip})(\text{bipp})]\text{PF}_6$ 'nın V79 379A hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi ilk dozdan itibaren görülmeye başlamıştır. Ancak $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ ve $20 \mu\text{M}$ 'lık dozların hücrelerde benzer etki yaptığı görülmektedir. Bu dozlarda hücre sayılarının birbirine yakın olduğu da görülmektedir. Ancak $40 \mu\text{M}$ 'lık dozda hem apoptotik etki daha da artmış hem de hücre sayısındaki azalma daha fazla olmuştur. Genel olarak maddenin kullanılan bu dozlarının A549 hücreleri üzerinde daha fazla etkili olduğu anlaşılmaktadır.

3.2.3. [Au(pip)(bipp)]PF₆'nın A549 ve V79 379A hücreleri üzerinde morfolojik incelemeleri



Şekil 3.15. [Au(pip)(bipp)]PF₆' A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin JC-1 boyama ile değerlendirilmesi. a:5 μM'lık doz, b: 10μM'lık doz, c:20 μM'lık doz, d:40μM'lık doz

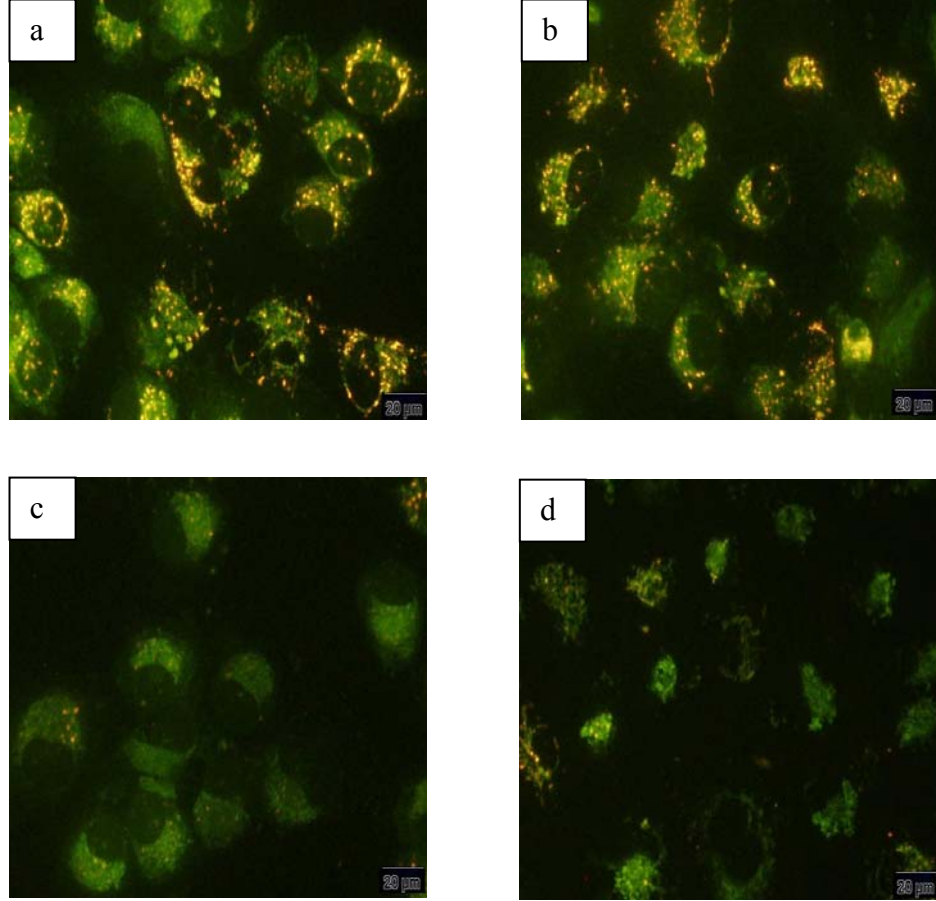


Şekil 3.16. $[\text{Au}(\text{pip})(\text{bipp})]\text{PF}_6$ 'nın V79 379A hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin JC-1 boyama ile değerlendirilmesi. a: $5 \mu\text{M}$ 'lık doz, b: $10 \mu\text{M}$ 'lık doz, c: $20 \mu\text{M}$ 'lık doz, d: $40 \mu\text{M}$ 'lık doz

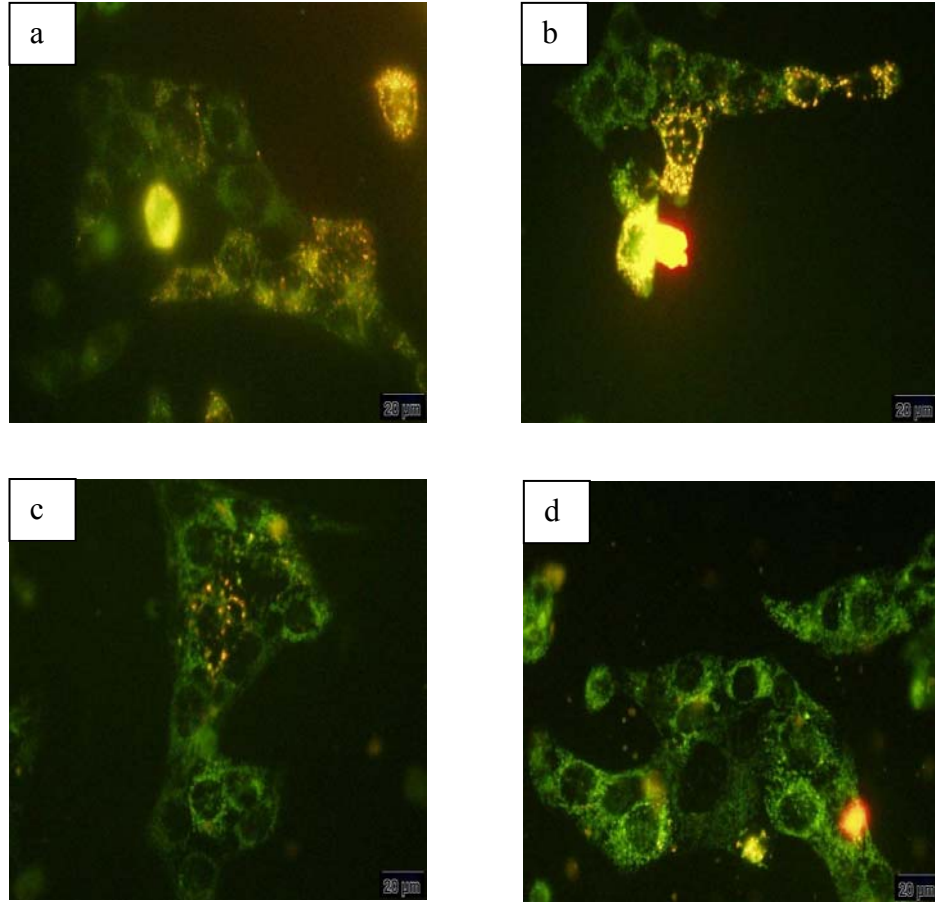
Şekil 3.15 incelendiğinde $[\text{Au}(\text{pip})(\text{bipp})]\text{PF}_6$ 'nın A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi ilk dozdan itibaren görülmeye başlamıştır. Ayrıca hücre sayısında özellikle 20 ve $40 \mu\text{M}$ 'lık dozlarda belirgin bir azalma gözle çarpılmaktadır. Bu hücrelerde de kontrole göre daha az kırmızıya boyanmış bölgeler bulunmaktadır. Bu da bu hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelinin kaybolduğunu göstermektedir.

Şekil 3.16 incelendiğinde $[\text{Au}(\text{pip})(\text{bipp})]\text{PF}_6$ 'nın V79 379A hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin A549 hücrelerine göre daha az olduğu ancak $40 \mu\text{M}$ 'lık dozun bu hücrelerde de ciddi etkiler yaptığı görülmektedir. Ayrıca doza bağlı olarak hücre sayısında belirgin bir azalma da meydana gelmiştir.

3.2.4. $[\text{Au}(\text{ip})(\text{bipp})]\text{PtCl}_2$ 'nin A549 ve V79 379A(CHL) hücreleri üzerinde morfolojik incelemeleri



Şekil 3.17. $[\text{Au}(\text{ip})(\text{bipp})]\text{PtCl}_2$ 'nin A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin JC-1 boyama ile değerlendirilmesi. a:5 μM 'lık doz, b: 10 μM 'lık doz, c:20 μM 'lık doz, d:40 μM 'lık doz



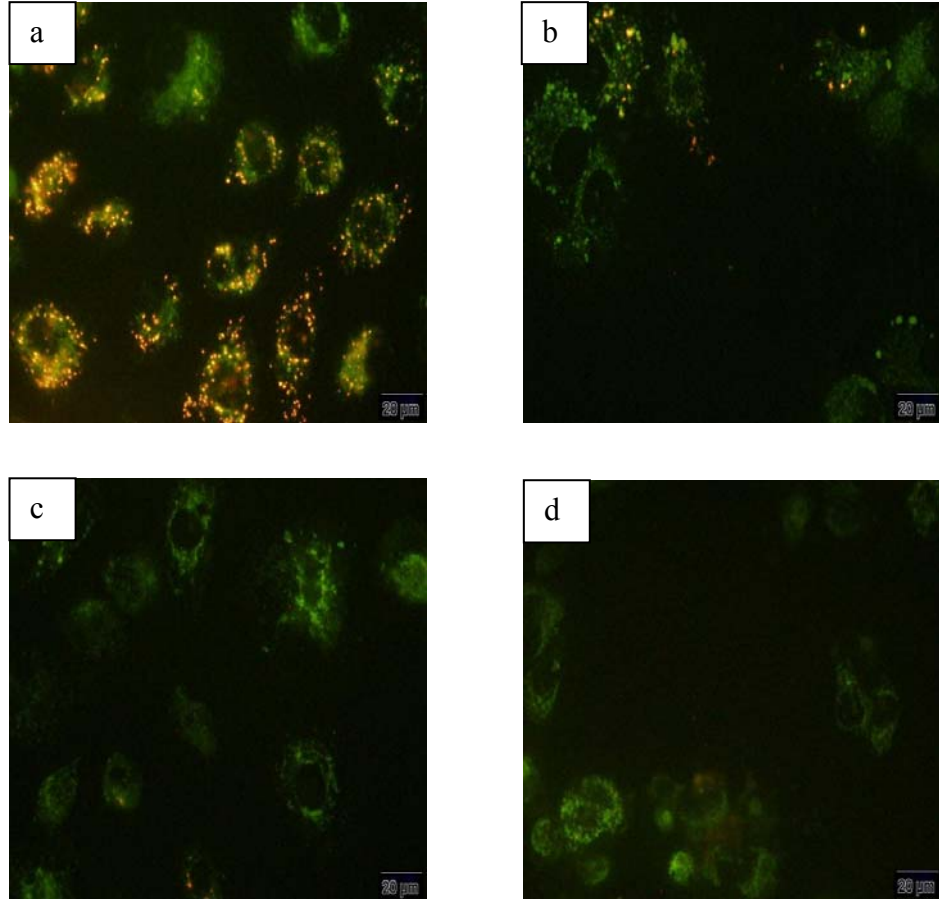
Şekil 3.18. $[\text{Au}(\text{ip})(\text{bipp})]\text{PtCl}_2$ 'nin V79 379A hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin JC-1 boyama ile değerlendirilmesi. a: $5 \mu\text{M}$ 'lık doz, b: $10 \mu\text{M}$ 'lık doz, c: $20 \mu\text{M}$ 'lık doz, d: $40 \mu\text{M}$ 'lık doz

Şekil 3.17 incelendiğinde $[\text{Au}(\text{ip})(\text{bipp})]\text{PtCl}_2$ 'nin A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi ilk dozdan itibaren görülmeye başlamıştır. Özellikle apoptotik etkinin 20 ve $40 \mu\text{M}$ 'lık dozlarda daha fazla olduğu, hücre sayısında da özellikle 20 ve $40 \mu\text{M}$ 'lık dozlarda belirgin bir azalmanın meydana geldiği gözle çarpılmaktadır. Bu hücrelerde de kontrole göre daha az kırmızıya boyanmış bölgeler bulunmaktadır. Bu sonuç da bu hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelinin kaybolduğunu ve boyanın mitokondrilerde birikmediğini gösterir.

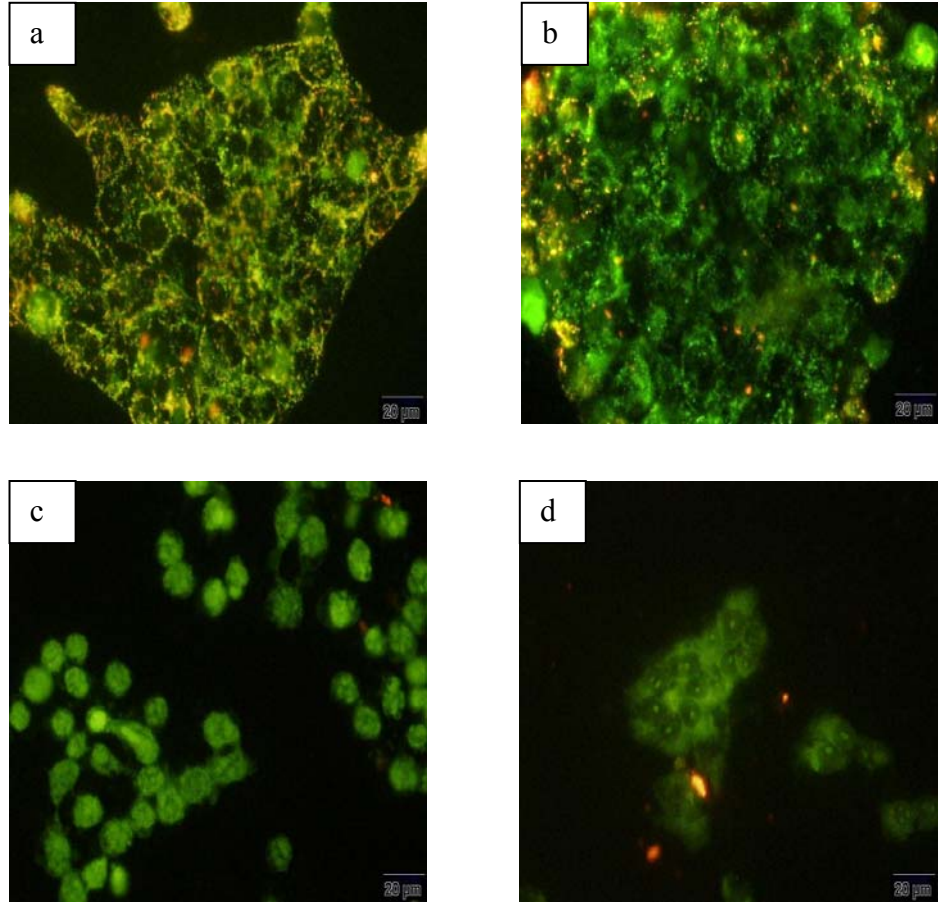
Şekil 3.18 incelendiğinde $[\text{Au}(\text{ip})(\text{bipp})]\text{PtCl}_2$ 'nin V79 379A hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin de doza bağlı olarak arttığı görülmektedir. Özellikle 20 ve $40 \mu\text{M}$ 'lık dozlarda neredeyse hiç kırmızıya boyanmış bölge olmadığı ve buralarda mitokondriyal membran potansiyeli çöktüğü için boyanın

mitokondrilerde birikmediği anlaşılmaktadır. Hücre sayısında da tüm dozlarda kontrole göre bir azalma gözlenmektedir.

3.2.5. $[\text{Au}(\text{pip})(\text{bipp})]\text{PtCl}_2$ 'nin A549 ve V79 379A(CHL) hücreleri üzerinde morfolojik incelemeleri



Şekil 3.19. $[\text{Au}(\text{pip})(\text{bipp})]\text{PtCl}_2$ 'nin A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin JC-1 boyama ile değerlendirilmesi. a:5 μM 'lık doz, b: 10 μM 'lık doz, c:20 μM 'lık doz, d:40 μM 'lık doz



3.20. $[\text{Au}(\text{pip})(\text{bipp})]\text{PtCl}_2$ 'nin V79 379A hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin JC-1 boyama ile değerlendirilmesi. a: $5 \mu\text{M}$ 'lık doz, b: $10 \mu\text{M}$ 'lık doz, c: $20 \mu\text{M}$ 'lık doz, d: $40 \mu\text{M}$ 'lık doz

Şekil 3.19 incelendiğinde $[\text{Au}(\text{pip})(\text{bipp})]\text{PtCl}_2$ 'nin A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi ilk dozdan itibaren görülmeye başlamıştır. Ancak bu etkinin özellikle ilk doz hariç diğer dozlarda çok belirgin olduğu görülmektedir. Hücre sayısında da doza bağlı olarak belirgin bir azalmanın meydana geldiği gözle çarpılmaktadır. Bu hücrelerde de kontrole göre daha az kırmızıya boyanmış bölgeler bulunmaktadır. 10 ve $20 \mu\text{M}$ 'lık dozlarda neredeyse hiç kırmızıya boyanmış hücre bulunmamaktadır. Bu da bu hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelinin kaybolduğunu ve boyanın mitokondrilerde birikmediğini gösterir.

Şekil 3.20 incelendiğinde $[\text{Au}(\text{pip})(\text{bipp})]\text{PtCl}_2$ 'nin V79 379A hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin de doza bağlı olarak arttığı görülmektedir. $5 \mu\text{M}$ 'lık dozda bu etkinin çok belirgin olmadığı ancak diğer dozlarda özellikle de 20 ve $40 \mu\text{M}$ 'lık dozlarda neredeyse hiç kırmızıya boyanmış hücre olmadığı ve buralarda mitokondriyal membran potansiyeli çöktüğü için boyanın

mitokondrilerde birikemediği anlaşılmaktadır. Ayrıca bu dozlarda hücre morfolojisinin değiştiği, apoptozun bir diğer göstergesi olan hücre hacminde de küçülme meydana gelmiştir. Aynı zamanda bu dozlarda hücre sayısının kontrole göre ciddi oranda azaldığı da gözlenmektedir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akciğer kanseri dünya çapında temel bir sağlık sorunudur ve kanser ölümlerinin başlıca nedenidir (Blinman ve ark. 2010). Akciğer kanserlerinin yaklaşık olarak %85'i küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olarak sınıflandırılır. Bu kanserler yassı hücreli (skuamöz) kanser, büyük hücreli kanser ve adenokanseri içerir (Winget ve ark. 2010).

Kemoterapi akciğer kanseri olan hastalarda hem daha uzun yaşamayı hem de yaşam kalitesini artırmayı sağlayabilir (Jacob ve ark. 2010) ve yine kemoterapi ilerlemiş küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde standart olarak ilk tercih edilen tedavi seçeneğidir (Zhong ve ark. 2010).

Apoptozun başlatılması kemoterapik ilaçların sitotoksik etkisinin sık rastlanan bir mekanizmasıdır ve hücre ölümünün iyi düzenlenmiş bir şeklidir (Gruber ve ark. 2004).

Mitokondrinin programlı hücre ölümü (apoptoz)'nün düzenlenmesinde ve dolayısıyla kanser gibi anormal apoptotik yanıtların verildiği hastalıklarda temel bir rol oynadığına inanılır. MPT (Mitokondrial permeability transition) poru tarafından düzenlenen mitokondriyal membran geçirgenliğinin, mitokondri tarafından başlatılan apoptozun merkezinde yer aldığı kabul edilir. Sonuç olarak yeni kemoterapötik ajanlar geliştirmek için yapılan çalışmalarda mitokondriyal hücre ölüm yolu ilgi odağı haline gelmektedir (Barnard ve ark. 2004).

Birçok kanser türünün sisplatin tarafından tedavi edilmesi, alternatif metal ilaçların sürekli olarak araştırılmasını teşvik etmiştir (Tiekink 2002).

Metal temelli antikanser ilaçlarının başlıca türleri platin, rutenyum, altın (I) ve altın (III) bileşenlerini kapsar. Metal komplekslerinin sitotoksik etkilerinin genellikle DNA'ya bağlanmaları sonucu oluştuğuna inanılır. Amaç, belirli bir biçimde kanser hücrelerinde DNA hasarına sebep olmak ve hücreyi ölüme götürmektir (Ying ve ark. 2007).

Platin bir çok antikanser ilacı için temel metaldir. Platin temelli antikanser ilaçları hala çoğunlukla kansere karşı kullanılan etkili farmasötiklerdir. Onlar etki biçimlerini DNA ile etkileşime girmek yoluyla DNA polimerazın ilerlemesini engelleyerek gösterir. Böylelikle de tümör hücrelerini apoptoza sürüklerler (Michalke 2010).

İlaçlarda Altın kullanımı antik çağda Arap ve Çinli bilimadamlarının çeşitli hastalıkların tedavisinde altından hazırladıkları ilaçları kullanmalarına kadar dayanır. Günümüze daha yakın zamanlarda ise Koch'un $Au(CN)_2$ 'nin bakteriyostatik etkiler göstermesiyle gelişmeler yaşanmıştır. Bu araştırma altın bileşiklerinin farmakolojik çalışmalarda kullanılması için bilimsel temeli oluşturmuş ve altın romatoid artritinin tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Bunu takiben, altın bileşiklerinin antitümör aktiviteleri son zamanlarda da anti hiv aktivitelerine olan etkileri sıklıkla araştırılmaktadır (Tiekink 2002).

Bazı çalışmalarda altın ile hazırlanan platin komplekslerinin de klinik denemeleri yapılmış ve başarılı sonuçlara ulaşılmıştır (Casini ve ark. 2006; Monlien ve ark. 2002).

Farklı mono- ve di-nukleer geçiş metal komplekslerinin sentez ve aktiviteleri üzerinde de çalışmalar yapılmıştır. Polinükleer Pt komplekslerinin potansiyel anti kanser ajan özellikleri ve Cisplatin'e direnç geliştirmiş tümörler üzerindeki aktiviteleri araştırılmıştır (Jansen ve ark. 2002; Tu ve ark. 2004).

1,10- fenantrolin ve onun yerine gelebilen türevleri hem serbest olarak hem de geçiş metallerine koordine edilmiş ligandlar olarak, pek çok biyolojik sistemin işlevlerinde bozukluklar yapar (Deegan ve ark. 2006).

MTT deney sonuçları ve floresan boyama deneyleri, kullanılan dört maddenin de hücreler üzerinde sitotoksik etki yaparak hücrelerin çoğalmasını engellediğini göstermiştir.

$[Au(ip)(bipp)]PF_6$ 'nin A549 ve V79 379A(CHL) hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri incelendiğinde bu maddenin her iki hücre grubu üzerinde de çok etkili olduğu belirlenmiştir. Ancak bu maddenin en düşük dozu olan $1,25\mu M$ 'lık doz hariç diğer dozlarının kanserli A549 hücreleri üzerinde, sağlam V79 379A hücrelerine oranla az miktarlarda olsa bile daha toksik olduğu görülmektedir. Yine bu maddenin, günümüzde kanser tedavisinde etkin bir şekilde kullanılan cisplatin ile karşılaştırılmasıyla elde edilen bulgularından, maddenin kanserli

A549 hücreleri üzerindeki etkisinin sisplatine oranla tüm dozlarda daha etkili sitotoksik yanıtlar oluşturduğu saptanmıştır. Sonuç olarak bu maddenin belirtilen dozlardaki konsantrasyonlarının (A549) küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde kullanılabilir olduğu ve başka kanserli hücre grupları üzerinde denenebilir olduğu söylenebilir.

[Au(pip)(bipp)]PF₆'nin A549 ve V79 379A(CHL) hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri incelendiğinde bu maddenin her iki hücre grubu üzerinde doza bağlı olarak etkili sitotoksik yanıtlar oluşturduğu görülmüştür. Ancak bu maddenin en yüksek dozu olan 80µM'lık doz dışındaki diğer dozların sağlam V79 379A (CHL) hücreleri üzerinde, A549 kanserli hücrelerine oranla daha toksik etkiler gösterdiği saptanmıştır. Yine bu maddenin, günümüzde kanser tedavisinde kullanılan sisplatin ile karşılaştırılmasıyla elde edilen bulgularından, maddenin kanserli A549 hücreleri üzerindeki etkisinin sisplatine oranla 20 µM'lık doz hariç diğer tüm dozlarda daha etkili sitotoksik yanıtlar oluşturduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak bu maddenin en yüksek dozunun (A549) küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde kullanılabilir olduğu söylenebilir. Ayrıca sisplatine göre daha etkili bir madde olduğu için de kanserli hücre grupları üzerinde de denenebileceği önerilir.

[Au(ip)(bipp)]PtCl₂'nin A549 ve V79 379A(CHL) hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri incelendiğinde bu maddenin her iki hücre grubu üzerinde doza bağlı olarak etkili sitotoksik yanıtlar oluşturduğu görülmüştür. Ancak bu maddenin tüm dozları sağlam V79 379A (CHL) hücreleri üzerinde, A549 kanserli hücrelerine oranla daha toksik etkiler gösterdiği saptanmıştır. Yine bu maddenin, kanser tedavisinde kullanılan sisplatin ile karşılaştırılmasıyla elde edilen bulgularından sadece 5 ve 10µM'lık dozlarının sisplatine oranla kanserli A549 hücrelerinde daha etkili olduğu görülmüştür.

[Au(pip)(bipp)]PtCl₂'nin A549 ve V79 379A(CHL) hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri incelendiğinde bu maddenin her iki hücre grubu üzerinde doza bağlı olarak etkili sitotoksik yanıtlar oluşturduğu tespit edilmiştir. Ancak bu maddenin düşük konsantrasyonlu dozları hariç diğer dozlarının(10µM, 20µM, 40µM ve 80µM) kanserli A549 hücreleri üzerinde, sağlam V79 379A hücrelerine oranla daha toksik olduğu görülmektedir. Yine bu maddenin, kanser tedavisinde etkin bir şekilde kullanılan sisplatin ile karşılaştırılmasıyla elde edilen

bulgularından, maddenin kanserli A549 hücreleri üzerindeki etkisinin cisplatine oranla tüm dozlarda daha etkili sitotoksik yanıtlar oluşturduğu saptanmıştır. Sonuç olarak bu bulgulara göre bu maddenin belirtilen dozlardaki konsantrasyonlarının (A549) küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde kullanılabilir olduğu ve başka kanserli hücreler üzerinde denenebilir olduğu söylenebilir.

A549 hücreleri insandan ve V79 379A hücreleri Çin hamsterinden elde edilmişlerdir. A549 epitel benzeri, V79 379A hücreleri ise fibroblast benzeri hücrelerdir. Test maddelerinin sağlıklı hücreler olan V79 379A hücreleri üzerinde de en az A549 hücreleri üzerinde meydana getirdiği etkiler gibi etkiler meydana getirmesi bu nedenle olabilir.

Wang ve arkadaşlarının (2007) yaptığı bir çalışmada Au (III)'ün sitotoksik ve apoptotik etkisi memeli hücre kültürü yöntemiyle araştırılmıştır. SUNE 1 (insan üst yutak kanseri) hücreleri kullanılarak Au (III)'ün toksik etkisi NBB boyası kullanılarak tespit edilmiş ve maddenin bu hücrelerde cisplatinden daha etkili sitotoksik yanıtlar ortaya koyduğu tespit edilmiştir. Ayrıca akış sitometrisinde Au (III)'ün apoptotik etki gösterdiği de belirlenmiştir. Bu veriler bizim çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir.

En ve arkadaşları (2010) 2-9 dimetilphenantrolin ligandı içeren Pt(II) kompleksleri ile yaptıkları bir çalışmada HeLa, Hep-G2, KB, ve AGZY-83a kanserli hücre gruplarını kullanmışlardır. Maddenin bu hücreler üzerindeki antiproliferatif ve sitotoksik etkisini MTT testi yaparak belirlemişlerdir. Sonuç olarak maddenin bu hücreler üzerinde özellikle de HeLa hücrelerinde etkili sitotoksik yanıtlar oluşturduğunu gözlemlemişlerdir.

Çalışmalarımızın devamında apoptozisi belirlemek amacıyla JC-1 boyama yöntemi kullanılmıştır. Boyamanın ardından genel hücre biçimlerini belirleyebilmek için öncelikle mikroskopik inceleme, ardında da fotoğraf çekimleri yapılmıştır. Şekil 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19 ve 3.20' de görüldüğü gibi her iki maddenin de en düşük dozlardan itibaren hem sağlıklı hem kanserli hücreleri apoptozise sürüklediği, hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelinin kaybolmasına bağlı olarak apoptozun başladığı, membran potansiyelinin kaybolması sonucu JC-1'in apoptoz olan hücrelerde mitokondrinin içinde birikmediği ve sitoplazmada yeşil floresan monomerik

yapısında kaldığı, kontrol amaçlı kullanılan hücrelerde ise mitokondriyal potansiyel farkına bağlı olarak mitokondriyi parlak kırmızıya boyadığı saptanmıştır. Ayrıca apoptoza giden hücrelerde hücre sayılarının da doza bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak $[\text{Au}(\text{ip})(\text{bipp})]\text{PF}_6$ ve $[\text{Au}(\text{pip})(\text{bipp})]\text{PtCl}_2$ 'nin küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde antikanser ilaç etken maddesi olarak ümit verici olabileceği söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Abe, K., Matsuki, N. (2000), "Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT," *Neuroscience Research*, **38**, 325-329.
- 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.
- Akyol, H. (2004), "Kemoterapinin temel ilkeleri," *XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Hemşire Programı*, 159-163,
http://www.tpog.org.tr/pdf/hem_1.pdf
- Altınışik, M. (2006), *Aksilik, Aromatik ve Heterosiklik bileşikler II*
<http://www.mustafaaltinisik.org.uk/67-1-1-13.ppt#1>.
- Anonim (2010), <http://en.wikipedia.org/wiki/Phenanthroline>.
- Baguley, B.C., Hicks, K.O., Wilson, W.R. (2002), "Tumor cell cultures in drug development," *Anticancer drug development*, Academic Press, Auckland, Yeni Zelanda, 269-284.
- Bakalova, A., Varbanov, H., Buyukliev, R., Momekov, G., Ferdinandov, D., Konstantinov, S., Ivanov, D. (2008), "Synthesis, characterization and biological activity of Pt(II) and Pt (IV) complexes with 5- methyl -5(4-pyridyl)- 2,4-imidazolidenedione," *European Journal of Medicinal Chemistry*, **43**, 958-965.
- Barnard, P.J., Baker, M.V., Berners-Price, S.J., Day, D.A. (2004), "Mitochondrial permeability transition induced by dinuclear gold (I) – carbene complexes: potential new antimitochondrial antitumour agents," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **98**, 1642-1647.
- Blinman, P., Alam, M., Duric, V., McLachan, S.A., Stocker, M.R. (2010), "Patientes' preferences for chemotherapy in non-small-cell lung cancer: A systematic review," *Lung Cancer*, **69**, 141-147.
- Bortner, C.D. (2004), "Apoptotic volume decrease and nitric oxide," *Toxicology*, **208**, 213-221.

- Caruso, F., Villa, R., Rossi, M., Pettinari, C., Francesco P., Marzia P., Daidone, M.G., Zaffaroni, N. (2006), "Mitochondria are primary targets in apoptosis induced by the mixed phosphine gold species chlorotriphenylphosphine -1, 3-bis (diphenylphosphino)propanegold(I) in melanoma cell lines," *Biochemical pharmacology*, **73**, 773-781.
- Casini A., Cinellu M.A., Minghetti, G., Gabbiani, C., Coronello, M., Mini, E., Messori, L. (2006), "Structural and solution chemistry, antiproliferative effects, and DNA and protein binding properties of a series of dinuclear gold(III) compounds with bipyridyl ligands," *J.Med.Chem*, **49:18**, 5524-5531.
- Chen, T.K., Ming, J.H., Bing, C.C., Chien, C.C., Che, M.T., Shiow, L.P., Chien, H.L. (2008), "Denbinobin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells via Akt inactivation, Bad activation, and mitochondrial dysfunction," *Toxicology Letters*, **177**, 48-58.
- Collery, P., Keppler B., Madoulet C., Desoize, B. (2002), " Gallium in cancer treatment," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **42**, 283-296.
- Cotton F.A., Wilkinson, G. (1988), *Advanced Inorganic Chemistry*, [http://tr.wikipedia.org/wiki/Ligand_\(kimya\)](http://tr.wikipedia.org/wiki/Ligand_(kimya)).
- Deegan, C., Coyle, B., McCann, M., Devereux, M., Egan, D.A. (2006), "In vitro anti-tumor effect of 1,10-phenanthroline -5,6-dione(phendione), [Cu(phendione)₃] (ClO₄)₂·4H₂O and [Ag(phendione)₂] ClO₄ using human epithelial cell lines," *Chemico-Biological Interactions*, **164**, 115-125.
- Devereux, M., O Shea, D., Kellet, A., McCann, M., Walsh, M., Egan, D., Deegan, C., Kedziora, K., Rosair, G., Bunz, H.M. (2007), "Synthesis, X-ray crystal structures and biomimetic and anticancer activities of novel copper (II) benzoate complexes incorporating 2-(4'-thiazolyl)benzimidazole (thiabenzazole), 2-(2-pyridyl) benzimidazole and 1,10 -phenanthroline as chelating nitrogen donor ligands," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **101**, 881-892.
- Dispersyn, G., Nuydens, R., Connors, R., Borgers, M., Geerts, H. (1999), "Bcl-2 protects against FCCP-induced apoptosis and mitochondrial membrane potential depolarization in PC12 cells," *Biochimica et Biophysica Acta*, **1428**, 357-371.

- En, J.G., Wang, L., Ming, C.Z., Lei, L., Wan, Z.Z. (2010), "Synthesis, characterization, interaction with DNA and cytotoxicity in vitro complexes [M(dmphen)(CO₃)]·H₂O [M= Pt(II), Pd(II)]," *European Journal of Chemistry*, **45**, 311-316.
- Fotakis, G., Timbrell, J.A. (2005), "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.
- Franks, L.M. (1990), "What is cancer?," *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*, Oxford University Press, Oxford, İngiltere, 1-19.
- Freshney, R.I. (2000), "Introduction to basic principles," *Animal Cell Culture* (Ed: Masters, J.R.W.), Oxford University Press, Oxford, İngiltere., 1-18.
- Gonzalez, V.M., Fuertes, M.A., Perez, M.J., Cervantes, G., Moreno, V., Alonso, C., Perez, J.M. (2000), "Induction of Apoptosis by the bis -Pt(III) Complex [Pt₂ (2-Mercaptopyrimidine)₄Cl₂]," *Biochemical Pharmacology*, **60**, 371-379.
- Griffioen, K.J.S., Ghribi, O., Fox, N., Savory, J., De Witt, D.A. (2004), "Aluminum Maltolate -Induced Toxicity in NT₂ Cells Occurs Through Apoptosis and Includes Cytochrome c Release," *Neuro Toxicology*, **25**, 859-867.
- Gruber, C., Henkel, M., Budach, W., Belka, C., Jendrossek, V. (2004), "Involvement of tyrosine kinase p56/Lck in apoptosis induction by anticancer drugs," *Biochemical Pharmacology*, **67**, 1859-1872.
- Güzey, G. (2007), *A549, Hela ve NIH3T3 Hücre kültürlerinde Hypericum perforatum, Hypericum montbretti ve Hypericum organum türlerinin sitotoksik ve antiproliferatif etkileri*, Doktora tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- He, H.N., Wang, X., Zheng, X.L., Sun, H., Shi, X.W., Zhong, Y.J., Huang, B., Yang, L., Li, J.K., Liao, L.C., Zhang, L., Hu, L.N., Lin, Y. (2010), "Concurrent blockade of the NF-κB and Akt pathways potently sensitizes cancer cells to chemotherapeutic -induced cytotoxicity," *Cancer Letters*, **295**, 38-43.

- Heffeter, P., Jakupcek, M.A., Körner, W., Wild, S., Keyserlingk, N.G.V., Elbling, L., Zorbas, H., Korynevskaya, A., Knasmüller, S., Sutterlüty, H., Micksche, M., Keppler B. K., Berger, W. (2006), “Anticancer activity of the lanthanum compound [tris (1,10-phenanthroline) lanthanum (III) trithiocyanate (KP772;FFC24),” *Biochemical Farmakology*, **71**, 426-440.
- Hengwei, W., Hairong, C., Fengqing, W., Dongzhi W., Xuedong, W. (2010), “ An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of Escherichia coli cells,” *Journal of Microbiological Methods*, **xxx**, xxx-xxx.
- Hesse, F., Wagner, R. (2000), “Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures,” *Tibtech*, **18**, 173-180.
- Huang, R., Wallqvist, A., Covell, D.G. (2005), “Anticancer metal compounds in NCI’s tumor-screening database: putative mode of action,” *Biochemical pharmacology*, **69**, 1009-1039.
- Iijima, T., Mishima, T., Akagawa K., Iwao, Y. (2006), “Neuroprotective effect of propofol on necrosis and apoptosis following oxygen-glucose deprivation-Relationship between mitochondrial membrane potential and mode of death,” *Brain Research*, **1099**, 25-32.
- Iijima, T. (2006), “Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death,” *Neuroscience Research*, **55**, 234-243.
- Jakob, S., Hovey, E., Ng, W., Vinod, S., Delaney, G.P., Barton, M.B. (2010), “Estimation of an optimal chemotherapy utilisation rate for lung cancer: An evidence –based benchmark for cancer care,” *Lung Cancer*, **69**, 307-314.
- Jansen, B.A.J., Wieleard, P., Dulk, H.D., Brouwer, J., Reedik, J. (2002), “Oxa-aza crown ethers as ligands for mixed-ligand cisplatin derivatives and dinuclear platinum anticancer drugs,” *Eur.J.Inorg.Chem*, **9**, 2375-2379.
- Jumarie, C. (2002), “Cadmium transport through type II alveolar cell monolayers: Contribution of transcellular and paracellular pathways in the rat AT II and the human A549 Cells,” *Biochimica et Biophysica Acta*, **1564**, 487-499.
- Kaya, M. (2007), *Bazı monoterpen ve uçucu yağların, hücre çoğalması ve apoptozis üzerine etkilerinin memeli hücre kültürleriyle araştırılması*, Yüksek lisans tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

- Kawai, H., Teda, A., Kawahara, M., Nakai, K., Maeda H., Saitou, R., Iwami, F., Ishikawa K., Fukai, S., Komatsu, H. (2004), "Smoking history before surgery and prognosis in patients with stage IA non-small- cell lung cancer – a multicenter study," *Lung Cancer*, **49**, 63-70.
- Kim, Y.K., Yoh, K., Niho, S., Goto, K., Ohmatsu, H., Kubota, K., Nishiwaki, Y. (2010), "Trends in chemotherapy for elderly patients with advanced non-small- cell lung cancer," *Respiratory Medicine*, **104**, 434-439.
- Konca, M. (2005), *Endometriozisli hastaların menses kanında apoptozis*, Uzmanlık tezi, Şişli Etfal eğitim ve araştırma hastanesi, İstanbul.
- Kosmider, B., Zyner, E., Osiecka, R., Ochocki, J. (2004), "Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP," *Mutation Research*, **563**, 61-70.
- Kumar, R.S., Arunachalam, S., Periasamy, V.S., Preethy, C.P., Riyasdeen, A., Akbarsha, M.A. (2008), "Synthesis, DNA binding and antitumor activities of some novel polymer-cobalt (III) complexes containing 1,10-phenanthroline ligand," *Polyhedron*, **27**, 1111-1120.
- Kumar, R.S., Arunachalam, S. (2009), "DNA binding and antimicrobial studies of polymer-copper (II) complexes containing 1,10 –phenanthroline and L-phenylalanine ligands," *European Journal of Medicinal Chemistry*, **44**, 1878-1883.
- Kwon, H.J., Bae, S.Y., Kim, K.H., Han, C.H., Cho, S.H., Nam, S.W., Choi, Y.H., Kim, B.W. (2007), "Induction apoptosis in HeLa Cells by ethanolic extract of *Corallina Pilulifera*," *Food Chemistry*, **104**, 196-201.
- Lammers, T. (2010), "Improving the efficacy of combined modality anticancer therapy using HPMA copolymer-based nanomedicine formulations," *Advanced Drug Delivery Reviews*, **62**, 203-230.
- Lange, T.S., Kim, K.K., Singh, R.K., Srongin, R.M., McCourt, C.K., Brard, L. (2008), "Iron (III) Salophene: An Organometallic Compound with Selective Cytotoxic ve Anti-Proliferative Properties in Platinum-Resistant Ovarian Cancer Cells," *Plos ONE*, **3**.

- Maddika, S., Ande, S.R., Panigrahi, S., Paranjothy, T., Weglarczyk, K., Zuse, A., Eshraghi, M., Manda, K.D., Wiechec, E., Los, M. (2007), "Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancer therapy," *Drug Resistance Updates*, **10**, 13-29.
- Meleady, P., O'Connor, R. (2006), "General Procedures for Cell Culture," *Cell and Tissue Culture: Assorted Techniques*, Elsevier Science, A.B.D., 13-20.
- 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*, **24**, 69-77.
- Monlien, F.J., Helm, L., Abou-Hamd, A., Merbach, A. E. (2002), "Cyanide and chloride Exchange on homoleptic gold(III) square-planar complexes; variable pressure kinetic investigation by heteronuclear NMR," *Inorg. Chim. Acta*, **331**, 257-269.
- Muscella, A., Calabriso, N., De Pascali, S.A., Urso, L., Ciccicarese, A., Fanizzi, F.P., Migoni, D., Marsigliante, S. (2007), "New Platinum (II) complexes containing both an O, O'-chelated acetylacetonate ligand and a sulfur ligand in the platinum coordination sphere induce apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells," *Biochemical Pharmacology*, **74**, 28-40.
- Ortiz, A.G., Dulk, H.D., Brouwer, J., Kooijman, H., Spek, A.L., Reedijk, J. (2007), "The synthesis, chemical and biological properties of dichlorido(azpy)gold(III) chloride (azpy= 2-(phenylazo)pyridine) and the gold-induced conversion of the azpy ligand to the chloride of the novel tricyclic pyrido [2,1-c][1,2,4]benzotriazin -11-ium cation," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **101**, 1922-1930.
- Ozansoy, M., Başak, A.N. (2006), "Parkinson Hastalığında programlanmış hücre ölümü," *Parkinson Hastalığı ve Hareket Bozuklukları dergisi*, **9**, 54-61.
- Padron, J.M., Wilt, C.L., Smid, K., Wilms, E.S., Backus, H.H.J., Pizao, P.E., Giaccone, G., Peters, G.J. (2000), "The multilayered postconfluent cell culture as a model for drug screening," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **36**, 141- 157.

- Rackham, O., Nichols, S.J., Leedman, P.J., Berners-Price, S.J., Filipovska, A. (2007), "A gold (I) phosphine complex selectively induces apoptosis in breast cancer cells: Implications for anticancer therapeutics targeted to mitochondria," *Biochemical Pharmacology*, **74**, 992-1002.
- Rana, S.V.S. (2008), "Metals and apoptosis: Recent developments," *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **22**, 262-284.
- Rodgers, J.E. (1990), *Cancer*, Chelsea House Publishers, New York, A.B.D.
- Ruiz, A.D.V., Muller, A.R., Ramirez, L.R., Kass, G.E.N., Kelland, L.R., Orr, R.M. ve Dobrota, M. (2000), "Induction of Apoptosis by a Novel Copper-based Anticancer compound, Casiopeina II, in L1210 Murine Leucaemia and CH1 Human Ovarian Carcinoma Cells," *Toxicology in Vitro*, **14**, 1-5.
- Sebastian, K.S., Thampan, R.V. (2007), "Differential effects of soybean and fenugreek extracts on the growth of MCF-7 cells," *Chemico-Biological Interactions*, **170**, 135-143.
- Shavaleev, N.M., Adams, H., Weinstein, J.A. (2007), "Platinum (II) imidazo [4,5-f]-1,10-phenanthroline chloride and thiolate complexes: Synthesis and crystal structures," *Inorganica Chimica Acta*, **360**, 700-704.
- Thati, B., Noble, A., Creaven, S.B., Walsh, M., McCann, M., Devereux, M., Kavanagh, K., Egan, D.A. (2009), "Role of cell cycle events and apoptosis in mediating the anti-cancer activity of a silver(I) complexes of 4-hydroxy-3-nitro -coumarin-bis(phenanthroline) in human malignant cancer cells," *European Journal of Pharmacology*, **602**, 203-214.
- Tiekink, E.R.T. (2002), "Gold derivatives for the treatment of cancer," *Critical Reviews in Oncology/ Hematology*, **42**, 225-248.
- Toogood, P.L. (2008), "Mitochondrial drugs," *ScienceDirect*, **12**, 457-463.
- Tu, C., Wu, X., Liu, Q., Wang, X., Xu, Q., Guo, Z. (2004), "Crystal structure, DNA- binding ability and cytotoxic activity of platinum (II) 2,2'-dipyridylamine complexes," *Inorg. Chim. Acta*, **357**, 95-102.
- Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Yilmaztepe Oral, A., Demirci, M. (2007), "The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested," *Toxicology in Vitro*, **22**, 232-239.

- Ulukaya, E. (2003), "Apoptozis ders notları," Uludağ Üniversitesi, Bursa, biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf.
- Vasiljeva, O., Boris, T. (2007), "Dual Constrasting roles of cysteine chathepsins in cancer progression: Apoptosis versus tumour invasion," *Biochimie*, **90**, 380-386.
- 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.
- Vessieres, A., Plamont, M.A., Cabestaing, C., Claffey, J., Dieckman, S., Hogan, M., Bunz, H.M., Strohfeltd, K., Tacke, M. (2009), "Proliferative and anti-proliferative effects of titanium-and iron –based metallocene anti-cancer drugs," *Journal of Organometallic Chemistry*, **694**, 874-879.
- Vos, M.S., Putter, H., Houwelingen H.C., Haes, H.C.J.M. (2010), "Denial and Physical outcomes in lung cancer patients a longitudinal study," *Lung Cancer*, **67**, 237-243.
- Wilson, A.P. (2000), "Cytotoxicity and viability assays," *Animal Cell Culture* (Ed: Masters, J.R.W.), Oxford University Press, Oxford, İngiltere, 175-219.
- Yakıcıer, C., Akarsu, A.A. (2007), "Kanser epidemiyolojisinde ailesel kanserlerin rolü," *Türkiye’de Kanser Kontrolü*, (Ed: Tuncer, A.M.), T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı, Ankara, 155-161.
- Yamamoto, T., Yoneda, K., Ueta, E., Doi, S., Osaki, T. (2000), "Enhanced apoptosis of squamous cell carcinoma cells by interleukin-2- activated cytotoxic lymphocytes combined with radiation and anticancer drugs," *European Journal of Cancer*, **36**, 2007-2017.
- Yao, G., Ling, L., Luan, J., Ye, D., Zhu, P. (2007), "Nonylphenol induces apoptosis of Jurkat cells by a caspase-8 dependent mechanism," *International Immunopharmacology*, **7**, 444-453.
- Wai, Y.S., Chi, M.C. (2009), "The anti-cancer properties of gold (III) compounds with dianionic porphyrin and tetradentate ligands," *Coordination Chemistry Reviews*, **253**, 1682-1691.

- Wang, Y., Qing, Y.H., Raymond Wai, Y.S., Chi, M.C., Jen, F.C. (2007), "Cellular pharmacological properties of gold(III) porphyrin Ia, a potential anticancer drug lead," *European Journal of Pharmacology*, **554**, 113-122.
- Winget, M., Fleming, J., Li, X., Gao, Z., Butts, C. (2010), "Uptake and tolerance of adjuvant chemotherapy in early stage NSCLC patients in Alberta, Canada," *Lung Cancer*, **xxx**, xxx-xxx.
- Zhan, P., Wang, J., Zhang, Y., Li, X.Q., Su, F.Z., Qian, Q., Shu, Z.W., Li, K.Y., Yong, S. (2010), "CYP2E1 Rsa I/Pst I polymorphism is associated with long cancer risk among Asians," *Lung Cancer*, **69**, 19-25.
- Zhang, C.X., Lippard, S.J. (2003), "New metal complexes as potential therapeutics," *Elsevier*, **7**, 481-489.
- Zhang, X.D., Wu, J.J., Gillespie, S., Borrow, J., Hersey, P. (2006), "Cross resistance of melanoma to trail-induced apoptosis and chemotherapy," *update on cancer therapeutics*, **1**, 435-441.
- Zhao, G., Sun, H., Lin, H., Zhu, S., Su, X., Chen, Y. (1998), "Palladium (II) complexes with N,N'-Dialkyl-1,10-phenanthroline-2,9-dimethanamine:synthesis, characterization and cytotoxic activity," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **72**, 173-177.
- Zhong, M., Ma, X., Sun, C., Chen, L. (2010), "MicroRNAs reduce tumor growth and contribute to enhance cytotoxicity induced by gefitinib in non-small cell lung cancer," *Chemico-Biological Interactions*, **184**, 431-438.