

**DİTİYOFOSFONİK ASİT KADMIYUM KOMPLEKSLERİNİN MEME
KANSERİNDE ANTİ TÜMORAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Hande GÜNER

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Emel ERGENE

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ocak 2022

Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen 19ADP046 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

ÖZET

DİTİYOFOSFONİK ASİT KADMIYUM KOMPLEKSLERİNİN MEME KANSERİNDE ANTİ TÜMORAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Hande GÜNER

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ocak 2022

Danışman: Doç. Dr. Emel ERGENE

Günümüzde kompleks bileşikler, kanserde hedefe özgü yeni ilaç arayışlarında ilaç öncü maddelerinin bulunması açısından büyük bir önem arz etmektedir. Tedavide kullanılan mevcut kemoterapötiklerin yan etkileri, hedefe spesifik olmamaları ve kullanımlarının sınırlanması sebebiyle yeni ilaç öncü maddelerinin keşfine yönelik araştırmalar hala popüler bir alandır. Bu tez çalışmasında; ilk defa sentezlenerek literatüre kazandırılan Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin olası anti-kanserojenik aktiviteleri tüm dünyada ve Türkiye’de kadınlar arasında görülme sıklığı ilk sırada yer alan meme kanserinde araştırılmıştır. Metastatik ve invazif meme kanseri hücre hatlarından olan MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri üzerinde Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin sitotoksiste, hücre proliferasyonu, metastatik ve apoptotik süreçler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Komplekslerin çalışılan bütün inkübasyon sürelerinde ve dozlarında anlamlı ve doz bağımlı etkiler bulunmuştur. Komplekslerin hücre proliferasyonunu inhibe ederek apoptotik mekanizmaları aktive ettiği gözlenmiştir. Sonuç olarak; Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin meme kanseri hücreleri üzerinde apoptotik mekanizmayı tetiklediğine dair bulgular elde edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Ditiyofosfonato Cd (II) kompleksi, meme kanseri, apoptoz, sitotoksiste

ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTI-TUMORAL ACTIVITIES OF DITHIOPHOSPHONIC ACID CADMIUM COMPLEXES IN BREAST CANCER

Hande GÜNER

Department of Biology

Programme in Molecular Biology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, January 2022

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emel ERGENE

Today, complex compounds are of great importance in terms of finding drug precursors for the search for new target-specific drugs in cancer. The discovery of new drug precursors is still a popular area in today's research, due to the side effects, non-target specificity and limited use of chemotherapeutics currently used in treatment. The use of metal-based drugs with anti-carcinogenic activity supports the studies in this field. In this thesis study, the possible anti-carcinogenic activities of Dithiophosphonato cadmium (II) complexes, which were synthesized for the first time and brought to the literature, were investigated in breast cancer, which is the first among women in the world and in Turkey. The cytotoxicity, cell proliferation, metastatic and apoptotic effects of Dithiophosphonato cadmium (II) complexes on metastatic and invasive breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 cells were investigated. Significant effects were found at all incubation times and doses of the complexes studied. The response of cancer cells to substances is dose dependent. In general, the complexes inhibited cell proliferation and activated apoptotic mechanisms. As a result, findings were obtained that Dithiophosphonato cadmium (II) complexes induce apoptotic mechanism on breast cancer cells.

Keywords: Dithiophosphonato Cd (II) complex, breast cancer, apoptosis, cytotoxicity..

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince desteğini, tecrübesini ve emeğini esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Emel ERGENE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımda kullandığım Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerini temin eden Doç. Dr. Ertuğrul Gazi SAĞLAM'a ayrıca teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca her türlü desteği sağlayan laboratuvar arkadaşlarım Esra SARI, Dr. Ece AKGÜN, Sinem DABAĞOĞLU PSAV ve Mahmoud ARAFAT'a teşekkür ederim. Ayrıca desteklerinden dolayı Zipprime Biyoteknoloji'ye ve her zaman yanımda olan, desteğini ve sevgisini esirgemeyen sevgili babam Şerif Kemal GÜNER'e, sevgili annem Neslihan GÜNER'e ve sevgili kardeşim Aylin GÜNER'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca destekleri, bilgileri ve pozitif enerjileri ile yanımda olan arkadaşlarım Gizem AKGÜN'e ve Gizem KAYALI'ya ayrıca teşekkür ederim.

Hande GÜNER

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Hande GÜNER

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
DANIŞMAN ONAYI	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser Tanımı ve Oluşum Mekanizmaları	3
2.1.1. Kanser tanımı	3
2.1.2. Kanserın temel özellikleri ve oluşum mekanizmaları	3
2.2. Meme Kanseri	5
2.2.1. Meme kanserinin dünya ve Türkiye epidemiyolojisi	5
2.2.2. Meme kanserinin moleküler sınıflandırması	6
2.2.3. Meme kanseri tedavisi ve ilaç direnci.....	8
2.3. Programlanmış Hücre Ölüm Mekanizmaları	9
2.3.1. Apoptotik hücre ölümü ve moleküler mekanizması	10
3. MATERYAL VE METOD	14
3.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi.....	14
3.1.1. Hücrelerin pasajlanması ve hücre sayısının belirlenmesi.....	14
3.1.2. Hücrelerin dondurularak saklanması	14
3.2. Test Maddelerinin Elde Edilmesi ve Hazırlanması	15
3.3. Hücre Proliferasyon ve Sitotoksik Aktivite Testleri	16

3.3.1. MTT testi.....	16
3.3.2. Hücre döngüsü analizi (cell cycle arrest)	16
3.4. Apoptoz Belirleme Testleri.....	18
3.4.1. Annexin V – FITC & PI boyama	18
3.4.2. Mitokondriyal membran potansiyel analizi (Mitoscreen JC-1 boyama)	19
3.4.3. Hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) ölçümü	20
3.4.4. Kaspaz 3/7 ölçümü.....	21
3.5. Western Blot	22
3.5.1. Total protein izolasyonu	22
3.5.2. Total protein miktar ölçümü	22
3.5.3. Proteinlerin bis-tris jelde yürütülmesi	23
3.5.4. Kuru sistem ile proteinlerin transferi.....	23
3.5.5. Membranların bloklanması ve antikor uygulaması.....	23
3.5.6. Kemüminesans görüntüleme.....	24
3.5.7. Dansitometrik analiz	24
4. BULGULAR.....	24
4.1. MTT Sitotoksikite Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	24
4.1.1. Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi	25
4.1.2. Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi	27
4.2. Hücre Döngüsü Analizi ile Proliferasyonun Belirlenmesi.....	29
4.2.1. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde Cd1 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi	29
4.2.2. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde Cd2 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi	31
4.2.3. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde Cd5 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi	33
4.2.4. MCF-7 hücre hattı üzerinde Cd1 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi.....	35

4.2.5. MCF-7 hücre hattı üzerinde Cd2 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi.....	37
4.2.6. MCF-7 hücre hattı üzerinde Cd5 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi.....	39
4.3. Annexin V – FITC & PI Boyama ile Apoptotik Aktivitenin Belirlenmesi	41
4.3.1. MDA-MB-231 hücre hattında Cd1 kompleksinin erken apoptotik etkisi.....	41
4.3.2. MDA-MB-231 hücre hattında Cd2 kompleksinin erken apoptotik etkisi.....	42
4.3.3. MDA-MB-231 hücre hattında Cd5 kompleksinin erken apoptotik etkisi.....	43
4.3.4. MCF-7 hücre hattında Cd1 kompleksinin erken apoptotik etkisi.....	45
4.3.5. MCF-7 hücre hattında Cd2 kompleksinin erken apoptotik etkisi.....	46
4.3.6. MCF-7 hücre hattında Cd5 kompleksinin erken apoptotik etkisi.....	47
4.4. JC-1 Boyama ile Mitokondriyal Membran Potansiyel Analizi.....	49
4.4.1. MDA-MB-231 hücrelerinde Cd1 kompleksinin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi.....	49
4.4.2. MDA-MB-231 hücrelerinde Cd2 kompleksinin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi.....	51
4.4.3. MDA-MB-231 hücrelerinde Cd5 kompleksinin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi.....	52
4.4.4. MCF-7 hücrelerinde Cd1 kompleksinin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi	54
4.4.5. MCF-7 hücrelerinde Cd2 kompleksinin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi	56
4.4.6. MCF-7 hücrelerinde Cd5 kompleksinin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi	57
4.5. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Ölçümü ile Apoptotik Aktivitenin Değerlendirilmesi.....	59
4.5.1. MDA-MB-231 hücrelerinde Cd1 kompleksinin ROS oluşumuna etkisi.....	59

4.5.2. MDA-MB-231 hücrelerinde Cd2 kompleksinin ROS oluşumuna etkisi.....	60
4.5.3. MDA-MB-231 hücrelerinde Cd5 kompleksinin ROS oluşumuna etkisi.....	61
4.5.4. MCF-7 hücrelerinde Cd1 kompleksinin ROS oluşumuna etkisi	62
4.5.5. MCF-7 hücrelerinde Cd2 kompleksinin ROS oluşumuna etkisi	63
4.5.6. MCF-7 hücrelerinde Cd5 kompleksinin ROS oluşumuna etkisi	64
4.6. Kaspaz 3/7 Aktivasyonu Ölçümü ile Apoptoz Belirleme.....	65
4.6.1. MDA-MB-231 hücrelerinde Cd1 kompleksinin kaspaz 3/7 enzim aktivitesine etkisi	65
4.6.2. MDA-MB-231 hücrelerinde Cd2 kompleksinin kaspaz 3/7 enzim aktivitesine etkisi	66
4.6.3. MDA-MB-231 hücrelerinde Cd5 kompleksinin kaspaz 3/7 enzim aktivitesine etkisi	66
4.7. Western Blot Analizi.....	67
4.7.1. Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin MDA-MB-231 hücrelerinde hedeflenen proteinler üzerindeki etkileri	68
4.7.2. Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin MCF-7 hücrelerinde hedeflenen proteinler üzerindeki etkileri	75
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	79
KAYNAKÇA.....	88
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1. Ditiyofosfonato kadmiyum (II) Kompleksleri açık isimleri.....	15
Tablo 3.2. Tez çalışmasında kullanılan primer antikörler.	24
Tablo 4.1. Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin MDA-MB-231 hücre hattında MTT testi ile belirlenen IC ₃₀ ve IC ₅₀ değerleri.	25
Tablo 4.2. Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin MCF-7 hücre hattında MTT testi ile belirlenen IC ₃₀ ve IC ₅₀ değerleri.....	28

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Kanserli hücrelerinin kazanmış olduğu 6 temel özellik.	4
Şekil 2.2. Apoptotik hücrelerde görülen morfolojik değişimlerin şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.3. Apoptozda intrinsik (iç) ve ekstrinsik (dış) yolağın uyarılması.....	13
Şekil 4.1. Cd1 kompleksinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi	26
Şekil 4.2. Cd2 kompleksinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi	26
Şekil 4.3. Cd5 kompleksinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi.	27
Şekil 4.4. Cd1 kompleksinin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi.....	28
Şekil 4.5. Cd2 kompleksinin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi.....	28
Şekil 4.6. Cd5 kompleksinin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi,.....	29
Şekil 4.7. MDA-MB-231 hücre hattında Cd1 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi.....	30
Şekil 4.8. MDA-MB-231 hücre hattında Cd2 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi.....	32
Şekil 4.9. MDA-MB-231 hücre hattında Cd5 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi.....	34
Şekil 4.10. MCF-7 hücre hattında Cd1 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi	36
Şekil 4.11. MCF-7 hücre hattında Cd2 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi	38
Şekil 4.12. MCF-7 hücre hattında Cd5 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi	40
Şekil 4.13. Cd1 kompleksinin 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hatlarında apoptotik etkisi, Annexin V- FITC boyama	42
Şekil 4.14. Cd2 kompleksinin 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hatlarında apoptotik etkisi	43
Şekil 4.15. Cd5 kompleksinin 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hatlarında apoptotik etkisi.	44
Şekil 4.16. Cd1 kompleksinin 48 saat süreyle MCF-7 hücre hatlarında apoptotik etkisi	46
Şekil 4.17. Cd2 kompleksinin 48 saat süreyle MCF-7 hücre hatlarında apoptotik etkisi, Annexin V-FITC boyama	47
Şekil 4.18. Cd5 kompleksinin 48 saat süreyle MCF-7 hücre hatlarında apoptotik etkisi	48
Şekil 4.19. Cd1 kompleksinin 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hattında mitokondriyal transmembran potansiyel üzerindeki etkileri, JC-1 boyama	50

Şekil 4.20. <i>Cd2 kompleksinin 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hattında mitokondriyal transmembran potansiyel üzerindeki etkileri, JC-1 boyama</i>	52
Şekil 4.21. <i>Cd5 kompleksinin 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hattında mitokondriyal transmembran potansiyel üzerindeki etkileri, JC-1 boyama.</i>	54
Şekil 4.22. <i>Cd1 kompleksinin 48 saat süreyle MCF-7 hücre hattında mitokondriyal transmembran potansiyel üzerindeki etkileri, JC-1 boyama</i>	55
Şekil 4.23. <i>Cd2 kompleksinin 48 saat süreyle MCF-7 hücre hattında mitokondriyal transmembran potansiyel üzerindeki etkileri, JC-1 boyama</i>	57
Şekil 4.24. <i>Cd5 kompleksinin 48 saat süreyle MCF-7 hücre hattında mitokondriyal transmembran potansiyel üzerindeki etkileri, JC-1 boyama</i>	58
Şekil 4.25. <i>Cd1 kompleksinin 24 ve 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hattında ROS oluşumu üzerindeki etkilerini gösteren yüzde bar grafiği</i>	59
Şekil 4.26. <i>Cd2 kompleksinin 24 ve 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hattında ROS oluşumu üzerindeki etkilerini gösteren yüzde bar grafiği.</i>	60
Şekil 4.27. <i>Cd5 kompleksinin 24 ve 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hattında ROS oluşumu üzerindeki etkilerini gösteren yüzde bar grafiği.</i>	61
Şekil 4.28. <i>Cd1 kompleksinin 24 ve 48 saat süreyle MCF-7 hücre hattında ROS oluşumu üzerindeki etkilerini gösteren yüzde bar grafiği</i>	62
Şekil 4.29. <i>Cd2 kompleksinin 24 ve 48 saat süreyle MCF-7 hücre hattında ROS oluşumu üzerindeki etkilerini gösteren yüzde bar grafiği</i>	63
Şekil 4.30. <i>Cd5 kompleksinin 24 ve 48 saat süreyle MCF-7 hücre hattında ROS oluşumu üzerindeki etkilerini gösteren yüzde bar grafiği</i>	64
Şekil 4.31. <i>Cd1 kompleksinin 24 ve 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hattında kaspaz 3/7 üzerindeki etkilerini gösteren yüzde bar grafiği</i>	65
Şekil 4.32. <i>Cd2 kompleksinin 24 ve 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hattında kaspaz 3/7 üzerindeki etkilerini gösteren yüzde bar grafiği.</i>	66
Şekil 4.33. <i>Cd5 kompleksinin 24 ve 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hattında kaspaz 3/7 üzerindeki etkilerini gösteren yüzde bar grafiği.</i>	67

Şekil 4.34. Ditiyofosfonato Kadmiyum (II) komplekslerinin MDA-MB-231 hücre hattında <i>p-AKT</i> protein seviyesi üzerine etkileri.	69
Şekil 4.35. Ditiyofosfonato Kadmiyum (II) komplekslerinin MDA-MB-231 hücre hattında <i>Siklin-E1</i> protein seviyesi üzerine etkileri.	70
Şekil 4.36. Ditiyofosfonato Kadmiyum (II) komplekslerinin MDA-MB-231 hücre hattında <i>Kaspaz-3</i> protein seviyesi üzerine etkileri.	71
Şekil 4.37. Ditiyofosfonato Kadmiyum (II) komplekslerinin MDA-MB-231 hücre hattında <i>Kaspaz-8</i> protein seviyesi üzerine etkileri.	72
Şekil 4.38. Ditiyofosfonato Kadmiyum (II) komplekslerinin MDA-MB-231 hücre hattında <i>p-mTOR</i> protein seviyesi üzerine etkileri.	73
Şekil 4.39. Ditiyofosfonato Kadmiyum (II) komplekslerinin MDA-MB-231 hücre hattında <i>Beclin-1</i> protein seviyesi üzerine etkileri.	74
Şekil 4.40. Ditiyofosfonato Kadmiyum (II) komplekslerinin MCF-7 hücre hattında <i>Siklin-E1</i> protein seviyesi üzerine etkileri.	76
Şekil 4.41. Ditiyofosfonato Kadmiyum (II) komplekslerinin MCF-7 hücre hattında <i>Kaspaz-8</i> protein seviyesi üzerine etkileri.	77
Şekil 4.42. Ditiyofosfonato Kadmiyum (II) komplekslerinin MCF-7 hücre hattında <i>Beclin-1</i> protein seviyesi üzerine etkileri.	78
Şekil 5.1. <i>Kanser metastazı, apoptoz ve otofajinin düzenlenmesinde PI3K/Akt/PTEN/mTOR sinyal yolağının şematik olarak gösterimi.</i>	86

1. GİRİŞ

Son yıllarda kanser teşhisi ve tedavisinde önemli bir gelişmeler olmasına rağmen, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansının (IARC) 2020 verilerine bakıldığında dünya çapında her 5 kişiden birisine kanser tanısı konulmakta ve her 8 erkekten biri ve her 11 kadından biri bu hastalıktan ölmektedir. Yayınlanan rapora göre yaklaşık 20 milyon yeni vaka ve 10 milyon ölümlerle kanser hastalığının tanıda ve tedavide uygulanan güncel yaklaşımlara rağmen yükseldiği görülmektedir.

Dünya çapında %48 insidans ve %14 mortalite ile kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanseri kadınlarda her yıl yaklaşık 2.5 milyon yeni vaka sayısı, her teşhis edilen 4 kanser türünden biri olması ve kansere bağlı ölümlerin 6'da birini oluşturması ile dikkat çekmektedir. Ülkemizdeki verilere bakıldığında ise yaklaşık %47 insidans ve %13 mortalite olarak yine kadınlarda en sık rastlanan kanser türü meme kanseridir. Günümüzde kanser teşhis ve tedavisinde yeni yaklaşımlar önemli gelişmeler gösterse de uygulanan kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi operasyonlar gibi klasik yöntemlerin hastalığın tekrar etme oranını düşürmediği ve ileri evrelerde düşük başarı yüzdesine sahip olduğu görülmektedir. Tedavide kullanılan kemoterapötik maddelerin kanserli hücreleri spesifik olarak hedefleyememesi ve sağlıklı hücreler üzerindeki yan etkileri dikkate alındığında yeni ilaç öncü maddelerin araştırılması önem arz etmektedir.

Metal bazlı anti-kanserojenik aktivite gösteren ilaçlar yıllar önce geliştirilmiştir. Kadmiyum (Cd), doğada yaygın olarak bulunan çevresel bir kirletici ve kanserojen etkili bir element olmasına rağmen, literatürde bulunan bazı çalışmalar bunun aksini göstermektedir. Kadmiyum bileşiklerinin kanser hücrelerinde spesifik bir şekilde apoptozu indüklediği, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve yine kanser hücrelerine spesifik proteozom inhibe edici aktivite gösterdiğine dair çalışmalar literatürde mevcuttur (Abyar vd., 2019). Kadmiyum'a uzun süreli maruziyet ile ilişkili olarak meme kanseri riskinin artabileceği öne sürülmüş olmakla birlikte meme kanseri insidansı ile ilgili olarak Cd'nin kanserojenik etkileri henüz tam olarak bildirilmemiştir (Zhang vd., 2013).

Kişinin çevresel bir kirletici olan Cd'a uzun süreli maruziyeti sonucu, hücre proliferasyonunda artış ve apoptotik süreçte inhibisyon gibi etkiler gösteren çalışmalarda literatürde mevcut olup Cd'nin hem kanserojenik hem de anti-kanserojenik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Pacini vd., 2009). Bu durumda Cd'un normal fizyolojik

koşullardaki hücreler ve kanser hücrelerindeki etkileri ve bu etki mekanizmalarının aydınlatılması ilgi çekici olmaktadır.

Literatürdeki çalışmalar incelediğinde Cd'nin mevcut formunun önemli olduğu dikkat çekerek, “Serbest halde bulunan Cd, bir protein ile bağlanarak kompleks oluşturulmuş Cd ya da yeni ligandlarla kompleks oluşturulmuş Cd, meme kanserinin de içinde bulunduğu pek çok kanser türünde olumlu ya da olumsuz etkiler gösterebilmektedir” yorumu ortaya çıkmaktadır. Literatürdeki farklı çalışmalar ve bu tez çalışmasının sonuçları göz önünde bulundurulduğunda Cd'un yeni ve doğru ligandlarla birlikte kompleks olarak sentezlendiğinde olumlu bir anti-kanserojenik aktivite göstereceği ve yeni ilaç öncü maddesi olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında, ilk defa Doç. Dr. Ertuğrul Gazi Sağlam ve ekibi tarafından sentezlenip literatüre katılan Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin (Sağlam vd., 2015) epitelyal kökenli meme kanseri hücre hatları (MDA-MB-231 ve MCF-7) üzerinde olası etkileri ilk defa araştırılmıştır. Epitelyal kanserlerin tedavisinde ilaç öncülü olacak bu yeni bileşiklerin anti-kanserojenik potansiyelleri ilk defa aydınlatılıp tıbbi literatüre katkı sağlanmıştır. Bunlara ilaveten, yüksek insidansa ve ölüm oranına sahip meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek, ülkemizde ucuz bir maliyetle üretilebilecek yeni kemoterapötik ilaçlarının geliştirmesi için potansiyel öncül bileşiklerin tanımlanması, çalışmanın özgün değerini oluşturmaktadır.

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında 5 farklı ligandla sentezlenen 5 kompleksin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerindeki sitotoksik aktiviteleri belirlenmiş ve aralarından potansiyel ilaç öncü maddesi olabilecek 3 kompleks seçilerek anti- proliferatif, apoptotik ve otofajik aktiviteleri ortaya çıkarılmıştır. Tamamlanan bu çalışma ile yeni bileşiklerin anti-kanserojenik potansiyelleri ile ilgili elde edilen bulguların tıbbi literatüre kazandırılması ve yeni kemoterapötik ilaçların geliştirilmesinde etkin moleküllerin tanımlanmasıyla, kanser tedavi yöntemlerine katkı sağlanması hedeflenmiştir.

Bu tez çalışması Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri komisyonu tarafından 19ADP046 no'lu proje ile desteklenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Tanımı ve Oluşum Mekanizmaları

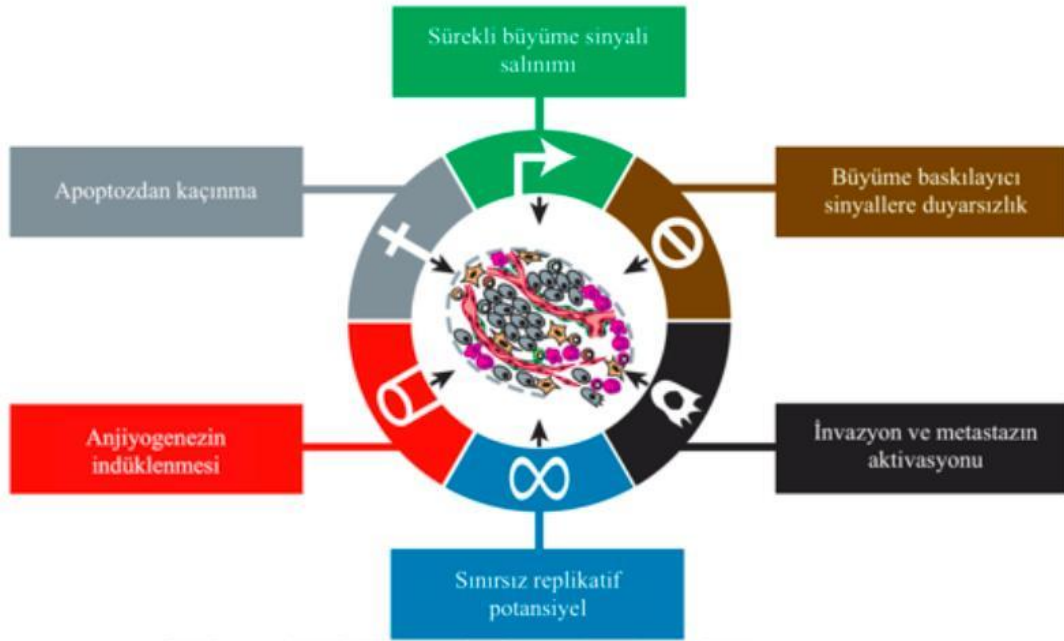
2.1.1. Kanser tanımı

Kanser, sınırsız ve kontrolsüz bölünme özelliği kazanmış hücrelerin tümörojenik yapılar oluşturarak vücuttaki farklı dokulara istila etme özelliği ile karakterize genetik ve çevresel faktörler sonucu meydana gelen heterojenik bir hastalık grubudur. Bu hastalık dünya çapında ölümlerin ikinci nedeni olarak bilinmektedir. Kısaca “hücrelerin sınırsız replikatif özellik kazanması” ile ortaya çıkan bu hastalık hakkında pek çok özellik bilinmesine rağmen hala bu hastalığın oluşmasında, tanı ve tedavide karşılaşılan zorlukların ardında aydınlatılamamış mekanizmalar bulunmaktadır. Bu sebeple; tanı, teşhis ve tedavi yaklaşımları sürekli olarak devam etmekte ve önem arz etmektedir.

2.1.2. Kanserin temel özellikleri ve oluşum mekanizmaları

Kanser hücreleri tarafından kazanılan temel özellikler, 2000 yılında Hanahan ve Weinberg’in ufuk açıcı makalesi ile 6 özellik olarak bir araya toplanmıştır. 2011 yılında yine aynı araştırmacılar tarafından yayınlanan bir diğer makalede kanser hücrelerine ait 2 özellik daha ortaya çıkarılarak, toplamda 8 özellik ile kanser hücrelerinin karmaşık oluşum ve direnç mekanizmaları kısaca özetlenmiştir. Bu özellikler aşağıda sıralanmıştır;

1. Büyüme baskılayıcı sinyallere duyarsızlık,
2. Dokuda invazyon ve metastazın aktivasyonu,
3. Sınırsız replikatif potansiyel,
4. Devamlı anjiyogenez,
5. Apoptozdan kaçma ve
6. Sürekli büyüme sinyal salınımı (Hanahan ve Weinberg, 2000).
7. Enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve
8. İmmün sistemden kaçınma (Hanahan ve Weinberg, 2011).



Şekil 2.1. Kanserli hücrelerinin kazanmış olduğu 6 temel özellik (Hanahan ve Weinberg., 2000).

Hücrelerin normal fizyolojik koşullarında, genetik kontrol sistemleri ile bölünme döngüsünü indükleyen ya da inhibe eden sinyallerin kontrolü ile hücre proliferasyonu ve programlı hücre ölümü arasındaki homeostazı sağlayarak bölünme döngüsü kontrol altında tutulmuş olur. Kanserli hücrelerde ise bölünme döngüsündeki kontrol mekanizmalarında meydana gelen bozulmalar sonrası, hücreler kontrolsüz biçimde bölünürler ve kanserli hücrelerin en belirgin özelliği kazanılmış olur (Lodish vd., 2011).

Normal hücrelerde, hücre döngüsündeki kontrol noktaları dışında, bölünme mekanizmasını düzenleyen proto-onkogen ve tümör baskılayıcı (supresör) genler de mevcuttur. Kanser hücrelerinde bu gen ailelerinin de mutasyona uğradığı bilinmektedir. Proto-onkogenler, mutasyon sonucu onkogene dönüşerek gen ekspresyonunun hızlanmasına ya da kodlanan proteinlerde kontrolsüz aktivite artışı ile anormal hücre çoğalmasına sebep olurlar. Tümör baskılayıcı genler ise normal hücrelerde onkogenlerin tam tersi aktivite ile hücre çoğalmasını inhibe ederken kanserli hücrelerde tümör baskılayıcı genlerinin inaktivasyonu ile hücre çoğalmasının negatif yöndeki regülasyonu ortadan kalkar ve kanser hücreleri bu kontrol mekanizmasını da atlamış olur (Shen vd., 2018; Wang vd., 2018).

Normal hücrelerdeki bir diğer mekanizma ise embriyogenezde de görülen ve apoptoz olarak bilinen programlı hücre ölüm mekanizmasıdır. Normal hücrelerde,

mitozdaki hatalar ya da DNA hasarı gibi anormallikler apoptotik mekanizmayı aktive ederek neoplastik hücre oluşumu engellenmiş olur. Bu durum, büyüme faktörlerinden ya da hücre dışı matriksden gelen apoptotik ölüm sinyallerine bağlıdır. Kanseri hücreler ise yine bu programlı hücre ölüm mekanizmasını atlayabilmek için birden fazla mekanizma geliştirmiştir hatta bu kaçış mekanizmaları kemoterapötik maddelere karşı direncinde sebebi olarak bilinmektedir. Kanser hücreleri, proliferasyon kontrol mekanizmalarının bozulması ve apoptozdan kaçınmanın yanı sıra telomeraz enziminin anormal ekspresyonu sayesinde de sınırsız replikatif özellik kazanarak anormal sağ kalım ve sınırsız çoğalma yeteneğine sahiptir (Cooper vd., 2003; Lodish vd., 2011).

Kanseri hücrelerde tümör oluşumu için sürekli aktif olan bir diğer mekanizması ise yine normal hücrelerde embriyogeneze görülen vasküler sistemin oluşmasında etkili anjiyogeneze mekanizmasıdır. Damar oluşumu olarak da bilinen anjiyogenenin sürekli aktif olmasıyla kanseri hücreler besin ve oksijen ihtiyacını karşılayabilmektedir. Tümörlerde malignite arttıkça bulundukları bölgeden farklı bölgelere yayılma özelliği kazanırlar. Bu yayılmanın ilk aşaması invazyon, ikinci aşaması ise metastaz olarak isimlendirilmektedir. Kanseri hücreler önce yakındaki primer dokulara yayılır bu durum invazyon olarak isimlendirilmiştir. Ardından vücuttaki farklı bölgelerdeki dokulara sekonder olarak yayılmaktadır bu sekonder yayılma ise metastaz olarak isimlendirilmiştir. Malignitesi yüksek tümörlerin en belirgin özelliklerinden olan invazyon ve metastaz mekanizmaları kanser tedavisinde karşılaşılan güçlüklerin en önemlisidir (Lambert vd., 2017; Karp., 2009).

2.2. Meme Kanseri

2.2.1. Meme kanserinin dünya ve Türkiye epidemiyolojisi

Meme kanseri, dünyada ve ülkemizde kadınlarda en sık gözlenen bir kanser türüdür. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansının (IARC) 2020 verilerine bakıldığında tüm kanser türleri arasında meme kanserinin ilk sırada olduğu görülmektedir. Yine kanser sebepli ölüm verilerine bakıldığında meme kanserinin diğer kanser türlerine göre %7'lik ölüm oranı dikkat çekmektedir. 2020 yılında 2.3 milyon yeni vaka tanısı ve 685 bin ölüm ile meme kanseri, kanser mortalitesinde önemli bir yere sahiptir (Anderson vd., 2021). GLOBOCAN verileri incelendiğinde 2020 yılında

Amerika Birleşik Devletleri'nde 253.465 kadına meme kanseri tanısı konulmuş ve 42.617 kadın ise meme kanseri sebebiyle hayatını kaybetmiştir.

Ülkemizde meme kanserinin demografik, klinik, patolojik ve tedaviye yönelik verileri bugüne kadar sistematik olarak ortaya konulamamış olup %47 insidans ve %13 mortalite oranı ile ülkemizde de kadınlarda en sık rastlanan kanser türüdür. Özmen'in bildirdiğine göre; hastaların ortalama yaşı 52 ($\pm 12,6$) olup, % 17'si 40 yaşından büyüktür ve % 45'i de menopoz öncesi evrededir (Özmen vd., 2013). Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı tarafından 2016 yılında yayınlanan kanser istatistik verilerine bakıldığında kadınlarda yaşa bağlı meme kanseri oluşma hızı 45.6/100.000 ile önemli bir orana sahip olduğu görülmektedir. Yine GLOBOCAN verileri incelendiğinde Türkiye'de 2020 yılında 24.175 kadın meme kanseri tanısı almış ve 7.161 kadın ise meme kanseri sebebiyle hayatını kaybetmiştir.

2.2.2. Meme kanserinin moleküler sınıflandırması

Tümörlerin büyük kısmı epitel dokuda ortaya çıkarak epitel kökenli kanser anlamına gelen karsinom adını almaktadır. Karsinomlar, kansere bağlı ölümlerin %80'ini oluşturmaktadır. Epitel doku, kendisini çevreleyen kanala ya da luminalara (boşluklara) salgı yapan hücreler içermektedir. Bu epitel hücrelerden köken alan kansere adenokarsinom adı verilmektedir. Bir adenokanser tipi olan meme kanseri, en çok lobül ile terminal duktus birleşme yerindeki epitelden köken alır (Aydıntuğ., 2004; Weinberg., 2013).

Meme kanseri histolojik olarak köken aldığı bölgenin yerine göre sınıflandırılmakta olup en yaygın görülen meme kanseri histolojisi invaziv duktal karsinomdur (%50-75). Takiben invaziv lobüler karsinoma (%5-15) ve diğer nadir histolojik tipler hastaların geri kalanını oluşturmaktadır (Harris vd., 2014; Sokolova vd., 2021).

Meme kanserinde yüksek riskli fenotiplerin belirlenmesinde iki ana moleküler belirteç belirlenerek etkin tedavi yöntemi seçilmektedir. Bu belirteçlerden ilki meme kanseri tiplerinin büyük çoğunluğunda (yaklaşık %70) eksprese olan invaziv östrojen reseptörü α (ER α)'dır. ER α bir büyüme faktörü olup östrojen ile aktive edildiğinde meme kanseri hücrelerinde proliferasyon yollarını sürekli aktive eder. ER α ile ilişkili progesteron reseptörünün (PR) ekspresyonu da ER α sinyalinin bir belirteci olup tümör hücrelerinin en az %1'inde bu reseptörlerin ekspresyonu ile ilişkili olarak tümör hücreleri,

hormon reseptörü pozitif (HR+) olarak sınıflandırılmaktadır (Hammond vd., 2010; Joshi ve Press., 2018).

İkinci ana moleküler belirteç ise, meme kanserlerinin yaklaşık %20'sinde aşırı ifade edilen ve kötü prognozla ilişkilendirilen bir büyüme faktörü reseptör ailesi üyesi, epidermal büyüme faktörü 2 (HER2, ERBB2 veya HER2/neu)'dir. Bu geni yüksek seviyede amplifiye eden tümörler HER2+ olarak adlandırılmaktadır (Piccart vd., 2005; Wolff vd., 2013).

Bu iki moleküler belirteç dışında HER2, ER ya da PR'nin eksprese edilmediği ve hormon reseptörü negatif olarak da bilinen üçlü negatif meme kanseri (TNBC) meme kanseri tümörlerinin yaklaşık %15'ini oluşturarak en agresif ve kötü prognozla ilişkili tip olarak bilinmektedir. Reseptörlerin negatif olması sebebiyle Anti-HER2 hedefli terapiler (trastuzumab, pertuzumab) ve sitotoksik kemoterapi bu alt tip için yetersiz olup bu tip tümörlerin uzak bir bölgede nüks etme oranı da oldukça yüksektir (Cho vd., 2011).

Tüm bunların yanında meme kanserlerinin biyolojik heterojeniteleri sebebiyle yukarıda açıklanan tipler ile tedavi seçimi için kullanılan ana parametreler yeterli olmayacağı düşünülerek detaylı gen ekspresyon analizlerine göre meme kanserinin intrinsik alt tipleri tanımlanmıştır. Gen ekspresyon profillerine göre meme kanseri her biri farklı prognoza sahip 4 moleküler alt tipe ayrılmaktadır. Bunlar; Luminal A, Luminal B, Bazal benzeri (triple negatif) ve HER2-zenginleştirilmiş tipleridir. Luminal A ve B tümörleri östrojen reseptörü ekspresyonu ile karakterize olup alt tipler içinde Luminal A invaziv meme kanserinin %30-40'ını oluştururken Luminal B %20-30'unu oluşturmaktadır (Johnson vd., 2021).

Luminal A tipindeki meme kanserinin gen ekspresyonu incelendiğinde PI3KCA, MAP3KI, GATA3, FOXA1 mutasyonları, ESR1, XBP1 genlerinin yüksek ifadesi, ER-pozitifliği ve yüksek PR ekspresyonu görülmektedir. Luminal B tipinde ise TP53, PIK3CA mutasyonları, Cyclin D1, MDM2 yüksek ifadesi, ATM geninde kayıp ve yine ER-pozitifliği Luminal A'ya göre daha düşük düzeyde PR ekspresyonu görülmektedir. Luminal A ve B tipini tanıma birbirinden ayırmak çok önemlidir. Çünkü Luminal B tipi tümörler daha agresif olup daha kısa sağkalım ve hastalıksız sağkalım ile ilişkilidir (Prat vd., 2013; Johnson vd., 2021).

HER2-zenginleştirilmiş tipteki invaziv meme kanserleri ise hastaların %12-20'sini oluşturmakta olup gen ekspresyon profilleri incelendiğinde HER2 amplifikasyonu, TP53, PIK3CA mutasyonları ve EGFR, FGFR4 gibi büyüme faktörlerinin genlerinde yüksek ekspresyon görülmektedir. HER2-zenginleştirilmiş tipteki tümörlerde östrojen (ER) ve progesteron (PR) reseptörlerinin pozitif ya da negatif olduğu fenotipleri vardır. HER2 pozitif meme kanserleri HER2 negatif tipe göre hastalarda daha kötü prognoza sahip olmasına rağmen günümüzde HER2 hedefli tedavilerin gelişmesiyle sonuçlar daha iyi hale gelmiştir (Harold vd., 2005; Prat vd., 2013).

Bazal benzeri (triple negatif, TNBC) tip ise invaziv meme kanserlerinin %15-20'sini oluşturarak diğer alt tiplere göre en agresif tip ve en kötü prognoza sahiptir. Bu tipteki tümörlerin nüks etme oranı da diğer tiplerle kıyaslandığında çok yüksek gradiente sahiptir. Ekspresyonları incelendiğinde ER, PR ve HER2 negatif olduğu görülmektedir. Tüm bu reseptörlerin negatif olması tedavide büyük güçlükler sebep olmaktadır. Çünkü bilindiği üzere günümüzde meme kanseri tedavilerinde kullanılan pek çok ilaç reseptör hedeflidir (Fragomeni vd., 2018; Johnson vd., 2021; Sokolova vd., 2021).

2.2.3. Meme kanseri tedavisi ve ilaç direnci

Meme kanseri tedavi yaklaşımları lokal ve sistemik tedavilerden oluşmaktadır. Bunlar, cerrahi tedaviler, radyoterapi, sistemik tedavi (kemoterapi), endokrin tedavi ve hedefe yönelik tedavilerdir. Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi günümüzde mevcut olarak kullanılan en yaygın tedavi yöntemleridir. Sıklıkla lokal tedavi sonrası sistemik tedavi uygulanarak lokal, bölgesel ya da uzak metastazların önlenmesi hedeflenir. Sistemik tedavide tümörlere ait patolojik bulgular, moleküler özellikler ve hastanın durumu (yaş, menopoz vb.) gibi faktörler değerlendirilerek uygun olan kemoterapötik tedavi protokolü seçilerek planlama yapılır. Cerrahi müdahalelerin yapılamadığı durumlarda ise diğer tedavi yöntemlerinin kombinasyonları kullanılmaktadır (Arruebo vd., 2011; Waks vd., 2019).

Tüm bu tedavi yöntemlerinin tümör hücrelerine spesifik olmaması, pek çok sınırlamasının ve yan etkilerinin olması sebebiyle meme kanseri tedavisinde kullanılan yöntemlerin etkinliklerine karşı tümör hücreleri meydan okumaktadır. Kanser hücrelerinin kemoterapötiklere karşı direnç kazanarak tedaviye cevap vermediği durumlar da bildirilmiştir. Bu durum, tedavinin sınırlayıcı olmasına sebep olmaktadır.

İmmünoterapi günümüzde umut vaat eden terapi yöntemlerinin arasında olup tümör hücrelerini spesifik olarak ortadan kaldırsa da hayati tehlikesi olan immün-ilişkili bozukluklar gibi ciddi yan etkiler göstererek tedavide kanser immünoterapisinin de sınırlanmasına sebep olmaktadır (Arruebo vd., 2011; Pezzella vd., 2019; Hegde vd., 2020).

Meme kanseri tedavisinde yalnızca tedavilerin etkisizliği ve yan etkileri sebebiyle değil aynı zamanda hastalarda tam iyileşme gerçekleşmemesi ve hastalığın nüks etmesi gerekçesiyle sürekli olarak yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda etkin, özgün ve yüksek oranda hedefli etkilere sahip yeni antikanserojenik maddelerin tanımlanmasına ihtiyaç vardır. Bu yüzden *de novo* ya da doğal yollarla türevlenerek sentezlenmiş daha spesifik, seçici, etkin ve daha az yan etkilere sahip yeni antikanser ilaçların araştırılması sürekli olarak aktif bir alan olmaya devam edecektir.

2.3. Programlanmış Hücre Ölüm Mekanizmaları

Programlanmış hücre ölümü, evrimsel süreçten bu yana korunmuş bir mekanizma olarak embriyonik gelişimde ve hasarlı olarak replike olmuş hücrelerin ortadan kaldırılarak homeostazisin sağlanmasında çok önemli bir yerdedir. Özellikle kanserli hücrelerde, programlanmış hücre ölüm mekanizmalarında ortaya çıkan değişimler sonucu bu yolağın inhibe olması kanser araştırmalarının ilgi odağı olmuştur. Kanser hücrelerinin özellikleri göz önünde bulundurulduğunda, proliferasyonun sürekli hale gelmesi için kazanılmış yetenekler sayesinde programlı hücre ölüm mekanizmalarından bir kaçış söz konusudur. Bu sebeple, tedavi stratejilerinde uygulanan kemoterapötikler ile programlı hücre ölüm mekanizmalarının aktive edilmesi, stratejiler arasında önemli bir yere sahiptir (Hanahan ve Weinberg., 2011).

Programlanmış hücre ölümü tanımı 1964'te Lockshin ve Williams tarafından yapılarak, “tesadüfi olmayan bir süreçle, bir seri kontrollü adımı izleyerek hücrelerin kendini yok etmesi için geliştirilen bir mekanizma” olduğu açıklanmıştır (Lockshin ve Williams, 1964).

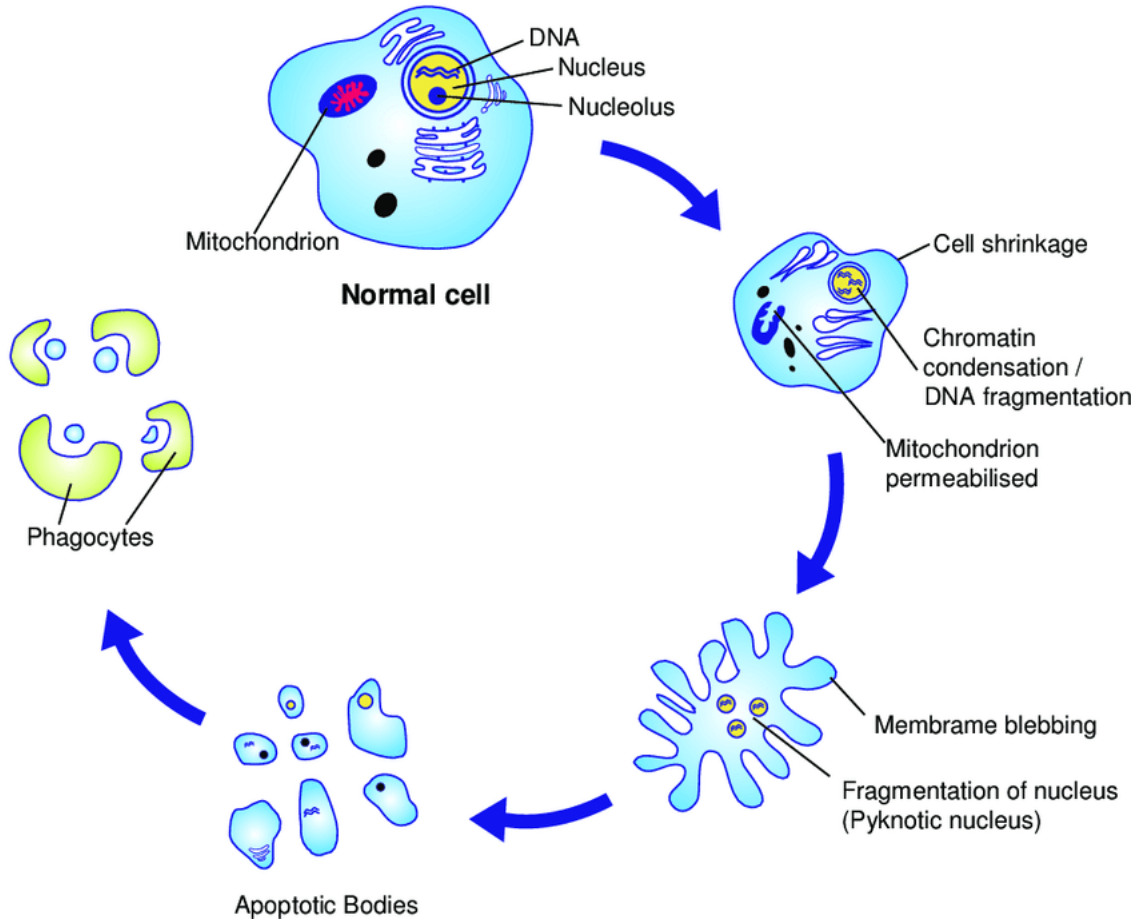
Onkogenlerin veya tümör baskılayıcı genlerin mutasyonu sonucu, sinyal yollarında meydana gelen değişimler ile karakterize, karmaşık genetik bir hastalık olan kanserin programlı hücre ölümü ile çok sayıda bağlantısı olduğu iyi bilinmektedir.

Kanserli hücrelerin özelliklerinin başında gelen hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengesizlik hem karsinogeneizde hem de tedavide önemli bir rol oynamaktadır. Apoptoz, otofaji ve programlanmış nekroz (nekroptoz) morfolojik ve fizyolojik farklılıklarıyla ayırt edilebilen 3 ana programlı hücre ölüm mekanizmasıdır (Lockshin ve Zakeri., 2004; Tan vd., 2009).

2.3.1. Apoptotik hücre ölümü ve moleküler mekanizması

Apoptozis terimi, programlı olarak hücrenin kendi kendini yok etmesi için morfolojik süreçleri kapsayan hücre ölümü olarak, ilk defa Kerr ve arkadaşları tarafından 1972 yılında ortaya konmuştur (Kerr vd., 1972). Gelişim, farklılaşma, hücre döngüsü gibi normal hücresel aktivitelerde ve genetik olarak hasarlı ya da strese maruz kalmış hücrelerde apoptotik mekanizma devreye girerek hücre kendi kendini yok eder. Hücrelerin gerçekleştirdiği bu programlı hücre ölümüne “apoptoz” adı verilir (Agrawal., 2019).

Apoptotik hücreler, hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşmasına bağlı olarak piknoz ve plazma zarının tomurcuklaşması (blebbing) gibi morfolojik değişimler ile karakterizedir. Tüm değişiklikler ile nükleer fragmentler, kondanse kromatin ve organelleri içeren “apoptotik body” adı verilen membranöz yapılar ortaya çıkar. Apoptotik cisimler daha sonra makrofajlar, parankimal hücreler ve neoplastik hücreler tarafından fagosite edilerek fagolizozomlar içinde degrade edilir. Böylece inflamatuvar bir yanıt gelişmemiş olur (Redd., 2000; Garg vd., 2010). Apoptotik süreçte hücrelerde morfolojik olarak meydana gelen değişimler Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Apoptotik hücrelerde görülen morfolojik değişimlerin şematik gösterimi (Guerin vd., 2006).

Apoptotik mekanizmada 3 temel biyokimyasal olay söz konusudur.

Bunlar;

- ✓ Kaspazların aktivasyonu,
- ✓ DNA ve protein yıkımı ve
- ✓ Katabolik hidrolazların aktivasyonu ile mitokondriyal membran permeabilizasyonu (MOMP)'dur (Marino vd., 2014).

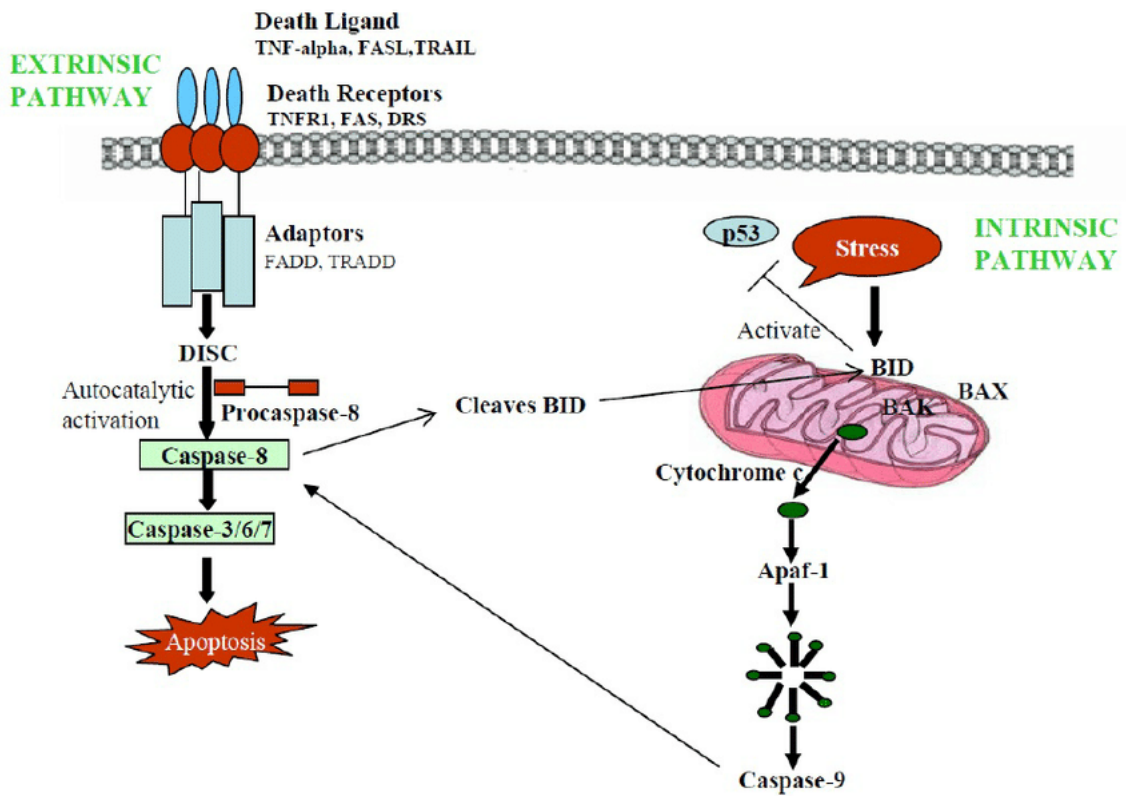
Apoptotik mekanizma temel olarak 2 yol ile çalışır. Bunlar “İntrinsik (içsel) ve Ekstrinsik (dışsal) Yolak” olarak adlandırılır. İntrinsik yolağı uyaran sinyal kaskadları oldukça çeşitlidir. Bu yolağın aktivasyonu kaspaz bağımlı ya da kaspaz bağımsız şekilde olabilir. Ekstrinsik yolak ise Fas (hücre yüzeyi ölüm reseptörü), TNF (tümör nekroz faktörü), TRAIL (TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand) gibi hücre dışı ölüm reseptörleri tarafından ya da hipoksi, onarılamaz genetik hasar, oksidatif stres ve yüksek sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonları gibi hücre içi uyaranlar ile aktif olabilir (Elmore., 2007).

Hücre ölümü ve enflamasyonu kontrol eden proteolitik enzimler (sistein-aspartik proteazlar) kaspazlar olarak bilinmekle birlikte, işleyişlerine göre sınıflandırılmıştır. Apoptotik süreçte yer alan kaspazlar Kaspaz-2, -3, -7, -8, -9 ve -10, enflamasyonda görev alan kaspazlar ise Kaspaz-1, -4, -5, -11 ve -12'dir. Apoptozda görev alan kaspazlar, başlatıcı ve sonlandırıcı (efektör) kaspazlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Apoptotik mekanizmada, başlatıcı kaspazların aktivasyonu iç yolakta (intrinsik), mitokondriyal ve Bcl-2 tarafından dış yolakta (ekstrinsik) ise ölüm reseptörleri tarafından gelen sinyal ile gerçekleşmektedir. Başlatıcı kaspazların aktivasyonu ile efektör kaspazlar (Kaspaz-3, -6 ve -7) aktive olurlar ve hücre apoptotik olarak ölüm yoluna girer (Enari vd., 1998; Shalini vd., 2015).

İntrinsik (iç) yolak ile aktifleşen apoptoz, DNA hasarı, büyüme faktörü ya da sitokin yoksunluğu gibi hücrel stres sonucu aktive olmaktadır. Hücrelerde bulunan Bcl-2 gen ailesine ait proteinler tarafından bu süreç yönlendirilmektedir. Bcl-2 ailesine ait bu proteinler, anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler olarak ikiye ayrılmaktadır. Anti-apoptotik proteinler; Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, CED-9, A1 ve Bfl-1 olarak bilinmekte olup pro-apoptotik proteinlere ise Bax, Bak, Bad, Bim, Noxa, PUMA ve Bcl-Xs olarak örnek verilebilir. Hücrelerde bir stres durumu söz konusu olduğunda, BH-3-only protein ailesinden olan anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri inhibe olur. Anti-apoptotik proteinlerin inhibisyonu sonrası pro-apoptotik proteinlerden BAK/BAX oligomerizasyonu gerçekleşerek mitokondrilerde transmembran potansiyelde bir kayıp gerçekleşir. Bu potansiyel değişiklik ile mitokondriden Sitokrom C (cyt C) salınımı indüklenir. Sitozole çıkan Sitokrom C, APAF-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1) ve pro-kaspaz9 ile bir kompleks (apoptozom) oluşturarak kaspaz-9'u aktive ederken aynı zamanda, SMAC, DIABLO ve IAP proteinlerini (apoptotik protein inhibitörleri) inhibe ederek Kaspaz-9 aktivasyonuna sebep olur. Ardından, efektör kaspazların (Kaspaz-3, 7 ve 6) aktivasyonu sonucu hücre ölümü indüklenmiş olur (Reed., 1997; Zaman vd., 2014; Kroemer vd., 2007).

Ekstrinsik (dış) yolak ile gerçekleşen apoptoz, transmembran ölüm reseptörü aracılı etkileşimler ile gerçekleşmekte olup bu reseptörler, TNF (Tumor necrosis factor) reseptör gen ailesi üyelerinin ürünüdür. Her ölüm reseptörüne karşılık gelen ve reseptörle spesifik bağlanan bir ölüm ligandı vardır. Bunlar; Fas Ligandı (FasL)/Fas Reseptörü (FasR), TNF- α /TNF Reseptörü 1 (TNFR1), Apo3 Ligand (Apo3L)/Ölüm Reseptörü 3 (DR3), Apo2

Ligand (Apo2L)/Ölüm Reseptörü 4 (DR4) ve Apo2 Ligand (Apo2L)/Ölüm Reseptörü 5 (DR5) olarak bilinmektedir. Dış yolda görev alan bu reseptör/ligand mekanizmalarından en iyi aydınlatılmış olanı FasL/FasR ve TNF- α /TNFR1 ikilileridir. FasR, DR4 ve DR5, FasL ya da TRAIL'in bağlanmasıyla aktive olarak, Fas ile ilişkili protein ölüm domaini (FADD) olarak bilinen bir adaptör proteini aktive eder. Benzer şekilde, TNFR1'a TNF- α ölüm ligandı bağlandığında ise yine TNFR1 ile ilişkili ölüm domaini (TRADD) olarak bilinen adaptör protein aktive olur. Gelen ölüm sinyaline bağlı olarak, FADD ya da TRADD proteinlerinin oluşması ile DISC (death-inducing signal complex) kompleksi uyarılarak başlatıcı kaspazlardan pro-kaspaz 8 ve ardından efektör kaspazların aktivasyonu ile hücre apoptotik olarak ölür (Locksley vd., 2001; Igney ve Krammer., 2002; Martinez vd., 2010). Apoptozda intrinsik (iç) ve ekstrinsik (dış) yolak Şekil 2.3'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Apoptozda intrinsik (iç) ve ekstrinsik (dış) yolağın uyarılması (Rampal vd., 2012).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi

Deneylerde kullanılan hücreler, yüksek derecede invazif ve metastatik özelliğe sahip insan adenokarsinom hücre hatlarıdır. Hormon bağımsız ve üçlü negatif (HER2-, ER-, PR-) MDA-MB 231 (HTB-26) ve östrojen reseptörü pozitif (ER+) olan MCF-7 (HTB- 22) hücreleri Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC)’ndan daha önceki projeler için satın alınmıştır ve Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunmaktadır. MDA-MB-231 hücre hattı; %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %1 Antibiyotik/Antimikotik Solüsyon (Penicillin, Streptomycin ve Amphotericin B) içeren RPMI-1640 besi yerinde ve MCF-7 hücreleri ise %10 FBS ve %1 Antibiyotik/Antimikotik Solüsyon içeren DMEM besi yerinde büyütülmüştür. Hücrelerin tamamı 37°C, %95 nem ve %5 CO₂ içeren ortamda kültüre edilmiştir (Price vd., 1999).

3.1.1. Hücrelerin pasajlanması ve hücre sayısının belirlenmesi

Hücreler %80 yoğunluğa (konfluent) ulaştıktan sonra, oda sıcaklığındaki PBS ile yıkanmış ve ardından Trypsin-EDTA ile flask yüzeyinden kaldırılarak ATCC’nin önerdiği oranda (1:2-1:4) yeni flasklara ekilmiştir (Price vd., 1999). Hücre sayımı için “Cedex XS Analyzer” (Roche, Innovatis) cihazı kullanılmıştır. Flask yüzeyinden kaldırılarak bir tüp içerisine toplanan hücre süspansiyonu, 1:1 oranda Trypan Blue çözeltisi ile boyanmış ve 10 µl hücre süspansiyonu 8 kuyulu slayt’ın bir kuyusuna (İbidi, Smart Slide) pipet ile aktarılmıştır. Ardından, ml’deki hücre sayısı Cedex XS hücre sayım cihazı ile hesaplanmıştır.

3.1.2. Hücrelerin dondurularak saklanması

Hücre devamlılığını sağlamak için alt kültürler cryo vialler içerisinde dondurularak saklanmıştır. Hücreler flask yüzeyinden tripsinlenerek kaldırılmış ardından 1500 rpm’de 5 dk. santrifüjlenerek tripsin ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücre süspansiyonu, ATCC’nin önerdiği oranda (~ %5) DMSO ile 1x10⁶ hücre/vial olacak şekilde stok viallerinde hazırlanarak öncelikle kademeli soğutucuya (Mr. Frosty) alınarak 1 gece -80°C’de bekletilmiştir.

Daha uzun süreli saklama sağlamak için hücreler 1 gün sonra sıvı azot tankına (-196°C) kaldırılmıştır. Hücreler tekrar kültüre alınacağı zaman, cryo vial azot tankından çıkarılarak hızlıca çözündürülmesi sağlanmıştır. Ardından, soğuk besiyeri içerisine alınan hücreler santrifüjlenmiş ve ortamdaki DMSO'nun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Hücre pelleti üzerine taze kültür besi yeri eklenerek flaska alınmış ve kültür koşullarında inkübe edilmiştir.

3.2. Test Maddelerinin Elde Edilmesi ve Hazırlanması

Yozgat Bozok Üniversitesi, Anorganik Kimya Anabilim Dalı Doç. Dr. Ertuğrul Gazi SAĞLAM ve Yüksek Lisans öğrencisi İbrahim DEMİREL tarafından ilk defa sentezlenip literatüre katılan 5 farklı Ditiyofosfonato kadmiyum (II) kompleksi Eskişehir Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarına gönderilmiş olup maddelerin açık isimleri Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Ditiyofosfonato kadmiyum (II) Kompleksleri açık isimleri.

Kompleks Açılımı	Kısaltma
$[Cd_2(\mu-L^1)_2(L^1)_2]$: Bis-{bis-[O-3-pentil-(4-metoksifenil)ditiyofosfonato]kadmiyum(II)}	Cd1
$[Cd_2(\mu-L^2)_2(L^2)_2]$: Bis-{bis-[O-1-fenil-1propil-(4-metoksifenil)ditiyofosfonato]kadmiyum(II)}	Cd2
$[Cd_2(\mu-L^3)_2(L^3)_2]$: Bis-{bis-[O-4-tert-bütilbenzil-(4-metoksifenil)ditiyofosfonato]kadmiyum(II)}	Cd3
$[Cd_2(\mu-L^4)_2(L^4)_2]$: Bis-{bis-[O-di-fenilmetil-(4-metoksifenil)ditiyofosfonato]kadmiyum(II)}	Cd4
$[Cd_2(\mu-L^5)_2(L^5)_2]$: Bis-{bis-[O-4-tert-butilsikloheksil-(4-metoksifenil)ditiyofosfonato]kadmiyum(II)}	Cd5

Beş farklı kompleks, DMF (Dimethyl Formamide) içerisinde çözündürülerek 10 mM ana stok hazırlanmış ve sitotoksite deneylerinde kullanılmak üzere belirlenen konsantrasyonlarda medyum ile dilüe edilmiş ve ara stoklar hazırlanmıştır. Hazırlanan tüm dozlardaki DMF konsantrasyonu finalde %0,1’in altında kalmıştır.

3.3. Hücre Proliferasyon ve Sitotoksik Aktivite Testleri

3.3.1. MTT testi

Kolorimetrik bir yöntem olan MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl] -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) canlılık testiyle, bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı, hızlı ve nicel olarak saptanabilmektedir. Yöntem, sağlıklı hücrelerin mitokondrilerindeki dehidrogenaz enziminin MTT boyasındaki tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ve formazan kristalleri oluşturması esasına dayanmaktadır (Kısmalı ve Sel, 2012; Mosmann, 1983).

Hücre hatları, 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekilmiş ve 24 saat kültür koşullarında inkübe edilmiştir. Daha sonra, NR Testi sonucu elde edilen konsantrasyon -cevap ilişkisine uygun şekilde dilüsyon aralıkları daraltılarak belirlenen yeni madde konsantrasyonlarını ve 1 µl/ml DMF içeren taze medyum hücrelere verilerek 24 ve 48 saat inkübasyona devam edilmiştir. İnkübasyon süreleri sonunda, her bir kuyuya final dilüsyonu 5mg/ml olacak şekilde 125 µl MTT solüsyonundan eklenmiştir ve karanlıkta, 37°C’de, %5 CO₂’li ortamda 2 saat inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda MTT içeren solüsyon uzaklaştırılmış, her bir kuyuya canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözülmesi için DMSO eklenmiş ve karanlıkta 15 dakika boyunca çalkalayıcı tablada (GFL-3012) bekletilmiştir. Formazan kristallerinin oluşturduğu renk şiddeti, Mikroplaka okuyucu (BioTek, Epoch 2) Spektrofotometre cihazında 570 nm dalga boyunda kolorimetrik olarak absorbansları ölçülmüştür (Mosmann, 1983).

Yapılan MTT ve NR sitotoksikite test sonuçları *IBM SPSS Statistics 21* programıyla değerlendirilmiştir. *In vitro* sitotoksikitenin tanımlanmasında çoğunlukla IC₅₀ değeri kullanılmaktadır. Bu değer, negatif kontrol grubuna kıyasla hücrelerin %50’sini öldüren test bileşiğinin konsantrasyon değeridir. MTT testi sonucuna göre; ileriki testlerde uygulanmak üzere her bir test bileşiğinin IC₅₀ ve IC₃₀ konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.3.2. Hücre döngüsü analizi (cell cycle arrest)

Hücre döngüsü analizi, DNA miktar değişimlerinin oranlanmasıyla hücrelerin döngüde hangi evrede (G1, S ve G2/M) olduğunun analiz edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Hücre proliferasyonunun kararı hücre döngüsünün G1 evresinde verildiği için kanser çalışmalarında antiproliferatif etkinin analizi önem arz etmektedir. Hücre döngüsü

analizi ile DNA sentezi tespiti, flouresan bir DNA interkalasyon boyası olan Propidyum Iyodür (PI) ile akış sitometri cihazı sayesinde tespit edilebilmektedir (Merkel, McGuire, 1990; Schönthal, 2004).

Bu yöntemin prensibi kısaca şu şekilde özetlenebilir; hücre iskeleti ve nükleer proteinler tripsin ile elimine edilir, hücre zarı lipidleri bir deterjanla (liziz tamponu) çözündürülür, hücrel RNA enzim ile parçalanır ve nükleer kromatin spermin ile stabilize edilir. DNA interkalasyon boyası olan PI, çekirdeklere sitokiyometrik olarak bağlanır ve PI ile boyanan hücre çekirdekleri 580 –650 nm arasındaki dalga boylarında flouresan ışık yayarak akış sitometrisinde analiz edilir.

Hücre proliferasyon tespit yöntemi olan hücre döngüsü analizi için Cycletest™ Plus DNA Kit (BD Biosciences, 340242) kullanılmış olup üretici firmanın önerdiği protokol uygulanmıştır. Kısaca, hücre hatları 3×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyulu plakalara ekilmiş, 24 saat inkübasyonun ardından belirlenen etkin bileşik konsantrasyonlarına 48 saat maruz bırakılmıştır. Maruziyet sonrası rekombinant tripsin enzimi (Gibco™, TrypLE™ Express Enzyme) ile tripsinize edilerek hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Ardından, hücre süspansiyonu 300 xg’de 5 dk. oda sıcaklığında santrifüj edilerek tripsinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Hücreler kit içeriğindeki tampon çözelti (1ml) ile resüspanse edilerek tekrar santrifüjlenmiştir. Bu basamak 2 kere tekrar edilmiş ve hücrelerin tampon çözelti ile yıkanması tamamlanmıştır. 600 µl tampon çözelti içinde resüspanse edilen hücreler öncelikle 250 µl “Solution A” ile karıştırılarak 10 dk. oda sıcaklığında, ardından 200 µl “Solution B” ile yine aynı koşullarda inkübe edilmiştir. En son, 200 µl “Solution C” eklenerek 10 dk. buz üzerinde ve karanlıkta son inkübasyon basamağı tamamlanmıştır. Boyama basamaklarının ardından, akış sitometrisi cihazı (BD, Accuri C6) ile her tüp içeriğinden ~ 20.000 adet tek hücre (single cell event) geçirilerek veriler toplanmıştır. Boyanmış hücre nukleusları tarafından 564 nm ile 606 nm arasında saçılan ışık, 585/40 bandpass filtre (FL2 detektör) ile tespit edilmiş ve ardından toplanan veriler, cihazın yazılımı (BD, Accuri C6 Software) ile analiz edilmiştir.

3.4. Apoptoz Belirleme Testleri

3.4.1. Annexin V – FITC & PI boyama

Apoptoz kısaca, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengeyi sağlayan, programlı hücre ölümüne denmektedir. Embriyonik gelişimde ve hücrelerin fizyolojik işleyişinde homeostazın sağlanmasında apoptozun önemli bir payı vardır. Özellikle kanserde ve diğer hastalıkların patogeneğinde hücrelerin apoptotik regülasyonunda bozulmalar meydana gelmektedir. Bu sebeple kanserde programlı hücre ölüm mekanizmalarından apoptozun anlaşılması ve apoptotik mekanizmanın hedeflenmesi kritik bir öneme sahiptir (Agrawal, 2019).

Apoptotik hücreler bazı morfolojik değişimler ile karakterize edilir. Plazma zarında gerçekleşen değişimler erken apoptozun tespit edilmesinde önemli bir yere sahiptir. Normal koşullarda hücre membranının dış katmanında fosfatidilkolin, sfingomiyelin gibi kolin fosfolipitleri ve iç katmanda ise aminofosfolipitlerin yer aldığı bir lipid tabaka söz konusudur. Hücreler apoptoza girdiği zaman membranın iç katmanında bulunan fosfatidilserinler (PS) membranın dış katmanına transloke olmaktadır. Annexin V, FITC (Fluorescein isothiocyanate) ile florokrom olarak işaretlenerek membranın dış katmanına transloke olan PS'lere yüksek affinite ile bağlanabilen bir protein olup apoptozun erken evrelerini akış sitometrisi ile tespit etmeyi sağlayan prob görevi görmektedir. Apoptozun ileri aşamasında ya da nekrozda hücrelerdeki membran bütünlüğü bozulmaktadır. Bu sebeple, erken apoptotik hücrelerin ayırımını sağlamak için hücreler vital bir boya olan PI (Propidium Iodide) ile boyanarak apoptozun evrelerinin tespiti sağlanmaktadır (Vermes vd., 1995; Engeland vd, 1996). Gerçekleştirilen tez kapsamında hücrelerin apoptotik evlerinin tespiti için BD Pharmingen™ FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit II kullanılmıştır. Üretici firmanın önerdiği protokol gerçekleştirilmiş olup kısaca, hücreler, 3×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyulu plakalara ekilmiş 24 saat inkübasyonun ardından belirlenen etkin bileşik konsantrasyonlarına 48 saat maruz bırakılmıştır. Madde maruziyeti sonrası hücreler, rekombinant tripsin ile tripsinize edilerek hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Hücreler soğuk (+4°C) PBS (Phosphate Buffered Saline) ile 2 kez yıkanarak kit içerisindeki 1X “Bağlanma Tamponu” ile 1×10^6 cells/ml olacak şekilde resüspanse edilmiştir. Ardından tüp içerisinden 100 µl (1×10^5 cells) hücre süspansiyonu alınarak yeni tüplere transfer edilmiştir. Tüplerin içerisine 5 µl FITC-Annexin V ve 5 µl PI eklenerek düşük hızda vortekslenmiş ve 15 dk. oda sıcaklığında ve

karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlanan tüplere 400 µl 1X “Bağlanma Tamponu” ilave edilerek akış sitometrisi cihazında analiz edilmiştir. Her örnekten ~20.000 adet tek hücre (single cell event) geçirilerek veriler toplanmıştır. Cihaz üzerindeki 488 nm lazer ile uyarılan FITC-Annexin V boyasından 530 nm’de saçılan ışık, 533/30 bandpass filtre (FL1 detektör) ile ve PI ile boyanmış hücre nükleusları tarafından 564 nm ile 606 nm arasında saçılan ışık, 585/40 bandpass filtre (FL2 detektör) ile tespit edilerek elde edilen veriler, cihazın yazılımı (BD, Accuri C6 Software) ile analiz edilmiştir.

3.4.2. Mitokondriyal membran potansiyel analizi (Mitoscreen JC-1 boyama)

Hücreler apoptoza girdiğinde mitokondriyal membran potansiyelinde gerçekleşen değişimler kritik bir öneme sahiptir. Mitokondride oksijenli solunum zincirindeki oksidasyon reaksiyonları sırasında açığa çıkan enerji mitokondriyal membran boyunca, negatif bir gradyan olarak depolanarak polarize bir membran potansiyeli ($\Delta\psi$) oluşturmaktadır. Apoptoz sırasında, mitokondriyal membran potansiyelinde gerçekleşen depolarizasyonun pro-kaspazların aktivasyonu ve sitokrom c salınımı gibi önemli apoptotik mekanizmaların başlatıcısı olduğu rapor edilmiştir. Apoptoza ek olarak, $\Delta\psi$ ’deki değişimler nekroz (depolarizasyon) ve hücre döngüsü tutuklanması (hiperpolarizasyon) ile de ilişkilendirilmiştir. Bu sebeple, mitokondriyal membran potansiyelindeki değişimlerin incelenmesi kanser çalışmalarında mitokondrinin rolünün aydınlatılması için önem arz etmektedir (Salvioli vd, 1997; Mantymaa vd, 2000).

Hücre zarından geçebilen lipofilik katyonik florokromlar $\Delta\psi$ tespitinde prob olarak kullanılmaktadır. JC-1 (5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolkarbosiyanin iyodür), $\Delta\psi$ durumunu değerlendirmek için kullanılan katyonik lipofilik florokromlardan biridir ve flouresan emisyon spektrumu mitokondriyal membran potansiyelinden kaynaklı olarak, boya konsantrasyonuna bağlıdır. Kısaca, normal fizyolojik koşullardaki hücrelerin membranları polarizedir ve JC-1 boyası mitokondriden geçerek birikir ve J-agregatı denen birikimler oluşturur. Bu agregatlar akış sitometrisinde 585/40 bandpass filtre (FL2 detektör)’den geçerek kırmızı ışığa verir. Apoptotik hücrelerde ise membran geçirgenliği azaldığından, $\Delta\psi$ depolarizedir ve J-agregatları oluşmaz. Akış sitometrisinde bu durum 533/30 bandpass filtre (FL1 detektör)’den geçerek yeşil bir ışığa sebep olur. Böylece, mitokondriyal membran potansiyeli değişimlerinin tespiti sağlamaktadır (Cossarizza vd, 1993).

Mitokondriyal membran potansiyelinin tespiti için BD Pharmingen™ Mitoscreen JC-1 kullanılmış olup üretici firmanın önerdiği protokol gerçekleştirilmiştir. Kısaca, hücreler 3×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyulu plakalara ekilmiş, 24 saat inkübasyonun ardından 48 saat süreyle belirlenen etkin bileşik konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Test bileşiklerine maruziyet sonrası hücreler tripsinize edilerek hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Hücreler 400 xg'de 5 dk. santrifüj edilerek ortamdaki tripsinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ardından 37°C PBS ile yıkanmıştır. Yıkama basamağı tamamlanan hücreler, 990 µl PBS içerisinde resüspanse edilerek, üretici firmanın önerdiği doğrultuda hazırlanan 10 µl “JC-1 Çalışma Solüsyonu” ile 37°C’de 25 dk. inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresi tamamlanan tüpler akış sitometrisi cihazında analiz edilmiştir. Her örnekten ~20.000 adet tek hücre (single cell event) geçirilerek veriler toplanmıştır. Cihaz üzerindeki 488 nm lazer ile uyarılan apoptotik hücrelerin depolarize membranlarından 530 nm’de saçılan ışık, 533/30 bandpass filtre (FL1 detektör)’yle; normal koşullarda polarize membranlardan geçen JC-1 boyasının oluşturduğu J-agregatları tarafından, 564 nm-606 nm arasında saçılan ışık da 585/40 bandpass filtre (FL2 detektör) ile tespit edilmiş ve elde edilen veriler, cihazın yazılımı (BD, Accuri C6 Software) ile analiz edilmiştir.

3.4.3. Hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) ölçümü

Normal hücrelerde serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri, in vivo olarak sürekli olarak üretilmektedir ve oksidatif hasara neden olmaktadır. Fakat bu durum, çoklu antioksidan aktivite ve onarım sistemlerinin varlığı ile kontrol altında tutulmaktadır. Kanseri patogeneze bakıldığında ise oksidatif stres artışı ile reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesi söz konusudur. ROS aktivitesinin hücre içi olarak ölçülmesi ile oksidatif stres indükleyicilerinin baskılanması tedavide çok önemli bir strateji olarak görülmektedir (Buskaran vd, 2021).

Bu yöntem için Cell Biolabs, “OxiSelect™ Intracellular ROS Assay Kit” kullanılmıştır. Kısaca kit prensibi şu şekildedir; hücreler zardan geçebilen flourojenik prob olan 2', 7'-Diklorodihidrofloresin Diasetat (DCFH-DA) ile inkübe edilir. Ardından, hücrelerdeki DCFH-DA, hücreler tarafından floresan olmayan 2', 7'-Diklorodihidrofloresin'e (DCFH) deasetillenir. Bu da hücre içindeki ROS tarafından floresan 2', 7'-Diklorodihidrofloresine (DCF) oksitlenir. Floresan yoğunluğu, hücre sitozolündeki ROS seviyeleri ile orantılı olarak artar ve flouresan bir mikropilaya okuyucu

ile hücre içi ROS seviyesi ölçümü sağlanır. Hücreler 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu ışık geçirmeyen siyah hücre kültür plakalarına ekilmiş ve 24 saat kültür koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi ardından kit içerisindeki 20X DCFH-DA solüsyonu medyum ile 1X olacak şekilde dilüe edilmiş ve her kuyuya 100µl olacak şekilde eklenerek 37°C’de 60 dk. inkübe edilmiştir. Ardından, DCFH-DA içeren solüsyon uzaklaştırılarak hücreler PBS ile yıkanmıştır. DCFH-DA ile muamele edilen hücrelerin üzerine, belirlenen dilüsyonlarda etkin bileşikler eklenerek 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından, 96 kuyulu plakalar flouresan plaka okuyucuda 480 nm/530nm dalga boyunda absorpsiyon değerleri ölçülmüş ve elde edilen değerler *IBM SPSS Statistics 21* programı ile analiz edilmiştir.

3.4.4. Kaspaz 3/7 ölçümü

Kaspazlar apoptotik mekanizmada görev alan proteaz grubu enzimlerdir. Normal koşullarda hücrelerde inaktif form olan prokaspaz olarak sentezlenirler ve hücrelere apoptotik sinyal geldiğinde aktif forma dönüşürler. Apoptotik ölüm sürecini başlatıcı ve sonlandırıcı kaspazlar vardır. Hücrelere ölüm reseptörleri aracılığıyla (ekstrinsik yoldan) ya da DNA hasarı sonucunda bir ölüm sinyali geldiğinde, sonlandırıcı kaspazlardan olan kaspaz 3/7 aktifleşir ve hücreler apoptotik yola girer. Bu sebeple, sonlandırıcı kaspazlardan olan kaspaz 3/7’nin hücre içi aktivasyon seviyesinin ölçümü, hücrelerin apoptotik süreçleri hakkında kritik bir öneme sahiptir (Sundquist vd, 2006).

Kaspaz 3/7 ölçümü Promega “Caspase-Glo® 3/7 Kit” ile gerçekleştirilmiştir. Kit prensibi kısaca şöyledir; hücrenin liziz edilmesinin ardından, pro-lusiferin, luminojenik kaspaz substratı (DEVD)’ni ortamdaki cleavage kaspaz varlığında, lusiferaz enzim reaksiyonu için amonolusiferine dönüştürerek ortama bir lüminesan sinyal üretir. Ardından bu sinyal bir luminometrede ölçülerek hücredeki kaspaz 3/7 seviyesi tespit edilir.

Kaspaz 3/7 ölçümü için kitin üretici firmasının önerdiği protokol uygulanmış olup, hücreler 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür plakalarına ekilmiş ve 24 saat kültür koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi ardından, ilgili bileşiklerin etkin dilüsyonlarını içeren besiyerleri hücrelere uygulanmış, 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir. Kit içerisindeki “Kaspaz-Glo 3/7 Tampon” ve “Kaspaz-Glo 3/7 Substrat” oda sıcaklığında karıştırılarak homojen bir solüsyon elde edilmiştir. Test

bileşiklerine maruziyet sonrası, her bir kuyuya 100µl olacak şekilde, Kaspaz Substrat-Tampon karışımı eklenmiş ve hücreler oda sıcaklığında 60 dk. substrat ile inkübe edilmiştir. Daha sonra, plakaların luminometrik plaka okuyucuda 490_{Ex} nm , 510-570_{Em} nm 'deki absorbans değerleri ölçülmüş ve veriler *IBM SPSS Statistics 21* programında analiz edilmiştir.

3.5. Western Blot

3.5.1. Total protein izolasyonu

Hücreler 25 cm²'lik flasklara 9x10⁵ hücre/flask olacak şekilde ekilerek 24 saat hücrelerin normal morfolojilerini kazanmaları beklenmiştir. Ardından, test bileşenlerinin etkin dozları hücrelere uygulanmış ve 48 saat inkübe edilmiştir. Hücre lizati hazırlama işlemlerinin tümü buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Test bileşenleriyle inkübasyonun ardından, medyum uzaklaştırılmış ve hücreler üzerine 1 ml soğuk PBS (+4°C) eklenerek 2 defa yıkama yapılmıştır. Flask başına 500 µl, 25 mM Tris-HCl pH: 7.6, 150mM NaCl, %1 NP-40, %1 Sodium deoxycholate ve %0,1 SDS içeren RIPA Lizis Tamponu ve final hacmi %1 olacak şekilde Halt™ Proteaz- fosfataz inhibitör kokteyli eklenerek 15 dk. buz üzerinde bekletilmiştir. Hücreler kazıyıcı (cell scraper) ile yüzeyden kaldırılarak santrifüj tüplerine toplanmıştır. Tüplerde bulunan hücre lizati, +4°C'de 15.000 xg'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant yeni tüplere aktararak kullanılacağı zamana kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir (Thermo Scientific, RIPA Lysis and Extraction Buffer Protocol).

3.5.2. Total protein miktar ölçümü

İzole edilen total protein miktarını belirlemek amacıyla; lizatlardaki protein konsantrasyonu (µg/µl), Qubit® 3.0 Fluorometer cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Bu yöntem için temin edilen "Qubit™ Protein Assay Kit" içerisinde bulunan solüsyonlar uygun dilüsyonlarda hazırlanmış ve ölçüm yapılacak protein lizati ile karıştırılmıştır. Yine cihazda kullanılacak olan standartlar, üretici firmanın önerdiği protokole göre hazırlanmış ve floresan ölçümlerinin ardından, her bir örnekteki total protein miktarı ölçülerek proteinlerin jele yükleme konsantrasyonları (µg/µl) hesaplanmıştır (Thermofisher, Qubit Protein Assay Protocol).

3.5.3. Proteinlerin bis-tris jelde yürütülmesi

Miktarı belirlenen proteinlerin jele yükleme konsantrasyonları hesaplandıktan sonra, Bolt™ LDS Örnek Tamponu (4X), Bolt™ Örnek İndirgeme Ajanı (10x) ve protein örneği uygun dilüsyonlarda ependorf tüp içerisinde karıştırılmış ve proteinlerin denatürasyonu için su banyosunda 75°C’de 10 dk. kaynatılmıştır. Sürenin sonunda, ependorf tüpler buz üzerine alınmıştır. %4-12’lik Bis-Tris Jel, elektroforez tankına yerleştirilmiş 1X Bolt™ MES SDS Yürütme Tamponu jel üzerine dökülmüştür. Proteinlerin moleküler ağırlıklarının belirlenmesi için kullanılan 10 µl marker “E-PAGE See Blue™ Plus2 Prestained” ve 20 µl hazırlanan örnekler jelde sırasıyla kuyulara yüklenmiştir. Örnekler kuyucuklardan inene kadar 200 volt’da 30 dk. oda sıcaklığında yürütülmüştür (Thermofisher, Protocol:Bolt™ Bis-Tris Mini Gels).

3.5.4. Kuru sistem ile proteinlerin transferi

Yürütme işlemi sonunda tanktan çıkarılan jel, ultra saf su içerisinde bekletilerek jelde bulunan proteinlerin PVDF membrana transferi yapılmak üzere “iBlot®2 Dry Gel Transfer, Thermo Scientific” cihazında, üretici firmanın (ThermoFisher-Scientific, Western Workflow) protokolü doğrultusunda sandviç modeli oluşturularak, PVDF membran üzerine yerleştirilmiş ve 10 dk. 20 volt’da oda sıcaklığında transfer işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.5.5. Membranların bloklanması ve antikor uygulaması

PVDF membran 1X TBS-T (20 mM Trisbase, 137 mM NaCl, %0,1 Tween 20 pH: 7.6) solüsyonunda 5 dk. boyunca çalkalamalı tabla üzerinde yıkanmış, 1X TBS-T içerisinde %5 oranında hazırlanmış BSA (Bovine Serum Albumin) içeren bloklama tamponunda 60 dk. süreyle oda sıcaklığında bloklanmıştır. Bloklama işleminden sonra membran 5 dk. boyunca 1X TBS-T tamponu ile 3 defa yıkanmıştır. Ardından, membranlar bloklama tamponu içinde 1:1000 oranında hazırlanmış primer antikor ile gece boyunca +4°C’de orbital çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi biten membranlar tekrar 5 dk. boyunca 1X TBS-T tamponu ile 3 defa yıkanmış ve 1:2000 oranında HRP (horse radish peroxidase) işaretli sekonder antikor ile 60 dk. oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Antikor muamelesi tamamlanan membranlar 1X TBS-T ile 3 kere 5 dk. yıkanmıştır. Western Blot çalışmalarında kullanılan antikorların listesi Tablo 3.2’de gösterilmiştir (Cell Signaling Technologies, Santa Cruz Biotechnology).

Tablo 3.2. Tez çalışmasında kullanılan primer antikörler.

Hedef Protein	Görev Aldığı Yolak	Büyüklik (kDa)	Köken
β -Aktin	House keeping protein	45	Rabbit IgG
p-AKT	Proliferasyon	60	Rabbit IgG
Siklin E1	Proliferasyon	48	Rabbit IgG
Kaspaz 3	Apoptoz	35, 19, 17	Rabbit IgG
Kaspaz 8	Apoptoz	10,57	Rabbit IgG
p-mTOR	Apoptoz, Otofaji	289	Mouse IgG
Beclin 1	Apoptoz, Otofaji	60	Rabbit IgG

3.5.6. Kemülüminesans görüntüleme

Kemülüminesans görüntüleme tamponu, (Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent) içerisinde çıkan Solüsyon A ve Solüsyon B, üretici firmanın önerdiği protokole göre hazırlanmıştır. Membran, substrat solüsyonu ile 5 dakika, karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. “LI-COR C-Digit Kemülüminesans tarayıcı” ile protein bantları tespit edilmiş ve membrandaki protein bantları fotoğraflanmıştır. Western Blot deneyi sonucunda elde edilen bantların yoğunlukları *Image Studio Lite* Ver 5.2 programı kullanılarak ölçülmüştür.

3.5.7. Dansitometrik analiz

Image Studio Lite Ver 5.2 programında bulunan moleküler görüntüleme analiz yazılımı kullanılarak dansitometrik analiz gerçekleştirilmiştir. Western blot sonunda elde edilen efektör protein bantlarının yoğunlukları house keeping protein olan β -aktin bant yoğunluklarına oranlanmıştır ve verilerin ortalaması hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. MTT Sitotoksikite Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

5 farklı ligandla sentezlenen 5 farklı bileşiğin hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri çalışılmıştır, Cd3 kompleksinin uygulanan tüm dilüsyonları hücreler üzerinde yüksek toksisite göstermiştir ve hücreler üzerindeki öldürmeyen değer belirlenemediğinden, ileri testler için tez çalışması kapsamından çıkarılmıştır. Cd4 kompleksi ise moleküler ağırlığı çok düşük olduğundan ve yaşanan çözünme problemleri dolayısıyla kaybedilerek ileri testlerde kullanılamamıştır. Bu sebeplerden dolayı aralarından potansiyel ilaç öncü

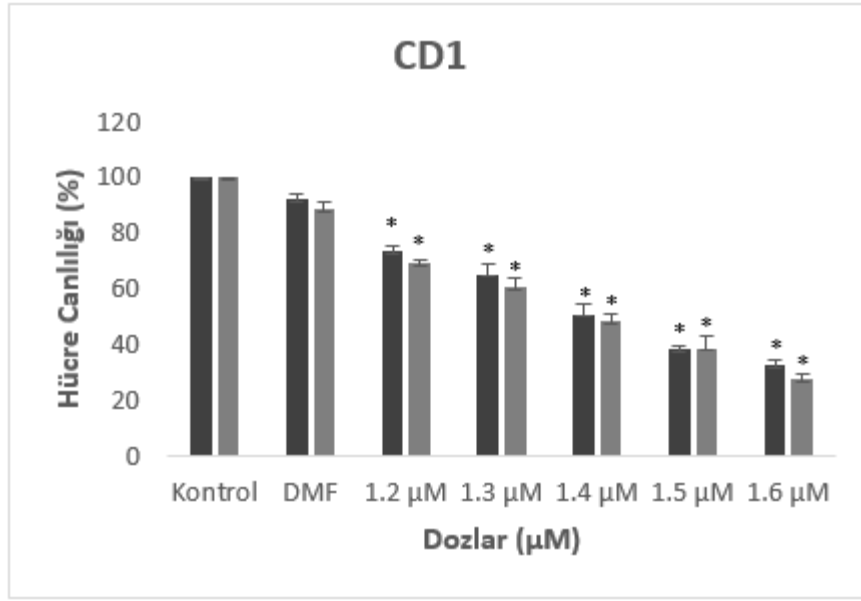
maddeyi olabilecek Cd1, Cd2 ve Cd5 kompleksi seçilmiş ve anti- proliferatif ve apoptotik aktiviteleri ortaya çıkarılmıştır.

4.1.1. Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

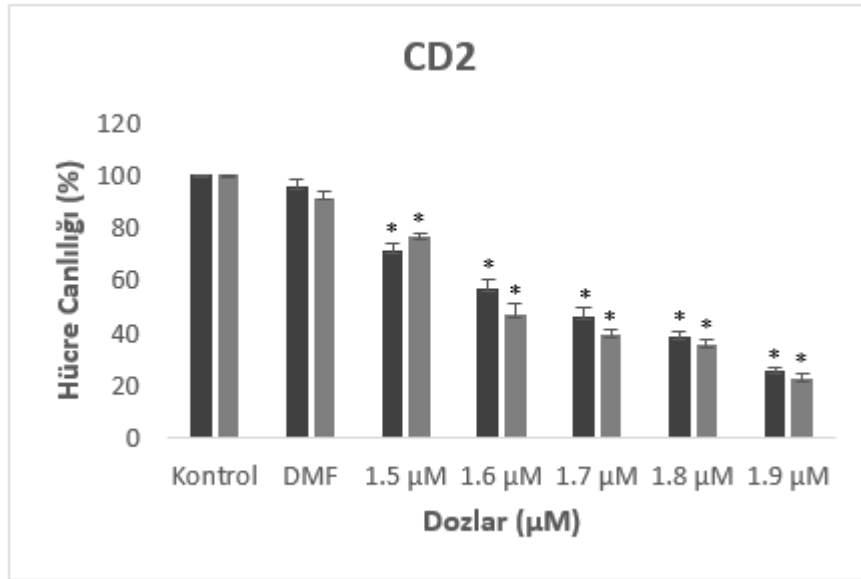
Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin MDA-MB-231 hücre hattında, hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkisi ve etkin doz aralıkları 24 ve 48 saatlik süreler sonunda MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Komplekslerin sitotoksik etkileri, uygulanan test bileşenlerinin konsantrasyonu ve inkübasyonu süresi ile paralel şekilde artmıştır ve doz ve süre bağımlı bir sitotoksik cevap olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar, *IBM SPSS Statistics 21* programında “One Way Anova” testi ile ve %95 güven aralığında istatistiksel olarak analiz edilmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında; Cd1, Cd2 ve Cd5 komplekslerinin MTT analizinin sonucunda belirlenen, 48 saatlik IC₃₀ ve IC₅₀ değerleri Tablo 4.1’de, her bir kompleksin doza ve süreye bağlı sitotoksitesini gösteren grafikler de Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3’te sunulmuştur. Bu sonuçlara göre, MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik aktivitesi en güçlü kompleks Cd5 olarak tespit edilirken, Cd1 ve Cd2’nin sitotoksik aktivitesinin birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.1. Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin MDA-MB-231 hücre hattında MTT testi ile belirlenen IC₃₀ ve IC₅₀ değerleri.

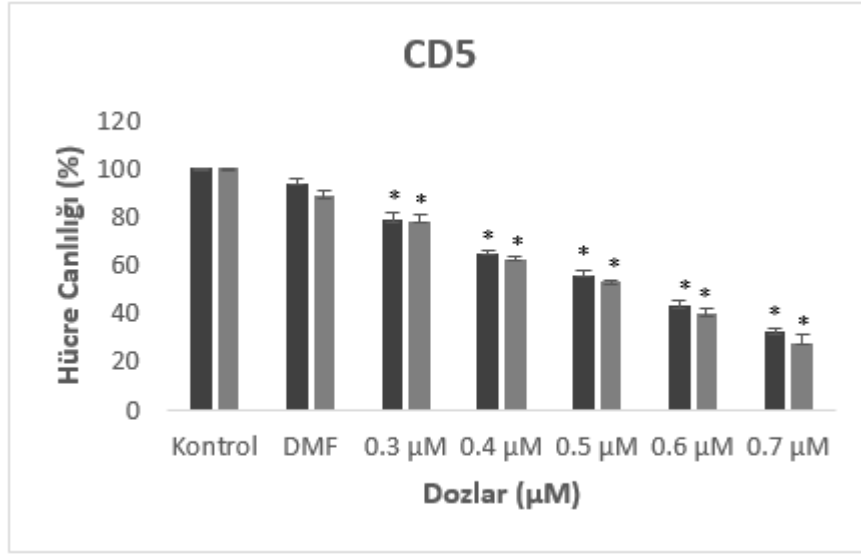
MDA-MB-231 hücrelerinde Ditiyofosfonato kadmiyum (II) kompleksleri	IC ₃₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)
Cd1	1,3	1,4
Cd2	1,6	1,7
Cd5	0,4	0,6



Şekil 4.1. *Cd1* kompleksinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi, * $p < 0.001$.



Şekil 4.2. *Cd2* kompleksinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi, * $p < 0.001$.



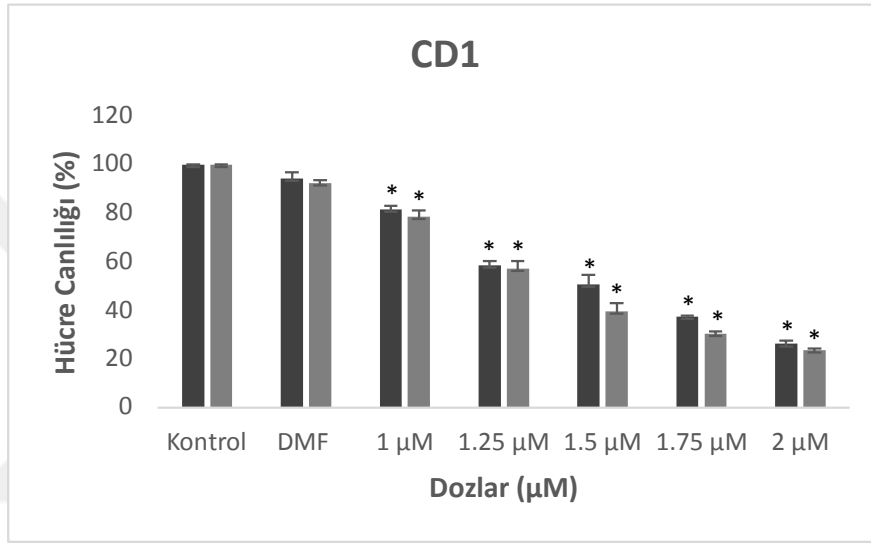
Şekil 4.3. Cd5 kompleksinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi, * $p < 0.001$.

4.1.2. Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

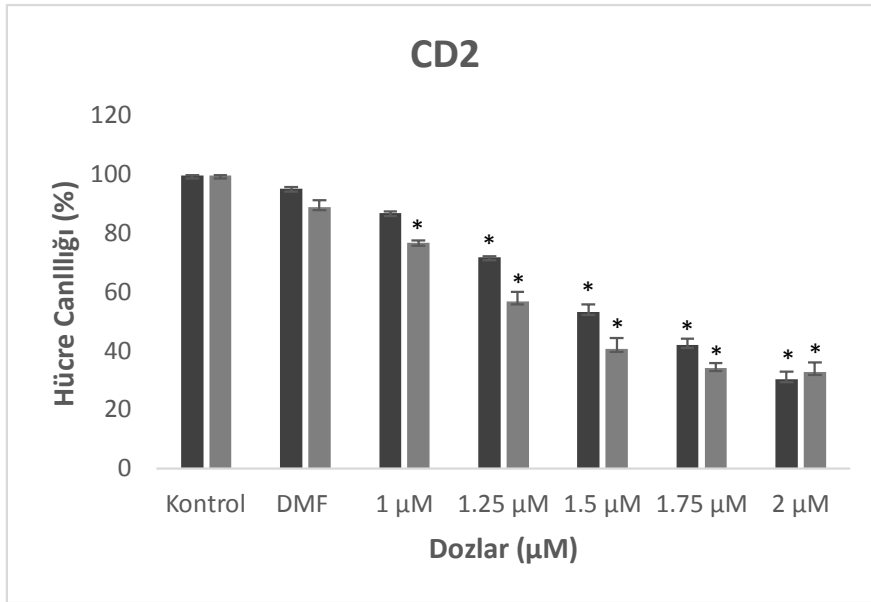
Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin MCF-7 hücre hattında, hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkisi ve etkin doz aralıkları 24 ve 48 saatlik süreler sonunda MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Komplekslerin sitotoksik etkileri uygulanan test bileşenlerinin dilüsyonu ve inkübasyon süresi ile doğru orantılı olacak şekilde artmıştır. Konsantrasyona ve süreye bağlı bir sitotoksik yanıt olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar, *IBM SPSS Statistics 21* programında “One Way Anova” testi ve %95 güven aralığında istatistiksel olarak analiz edilmiştir. MCF-7 hücre hattında, Cd1, Cd2 ve Cd5 komplekslerinin sitotoksikite analizi sonucu, 48 saatlik IC_{30} ve IC_{50} değerleri Tablo 4.2’de, her bir kompleksin doza ve süreye bağlı sitotoksikitesini gösteren grafikler de Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6’da sunulmuştur. Bu sonuçlara göre, MCF-7 hücrelerinde sitotoksik aktivitesi en güçlü kompleks Cd5 olarak tespit edilirken, Cd1 ve Cd2’nin sitotoksik aktivitesinin birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.2. Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin MCF-7 hücre hattında MTT testi ile belirlenen IC₃₀ ve IC₅₀ değerleri.

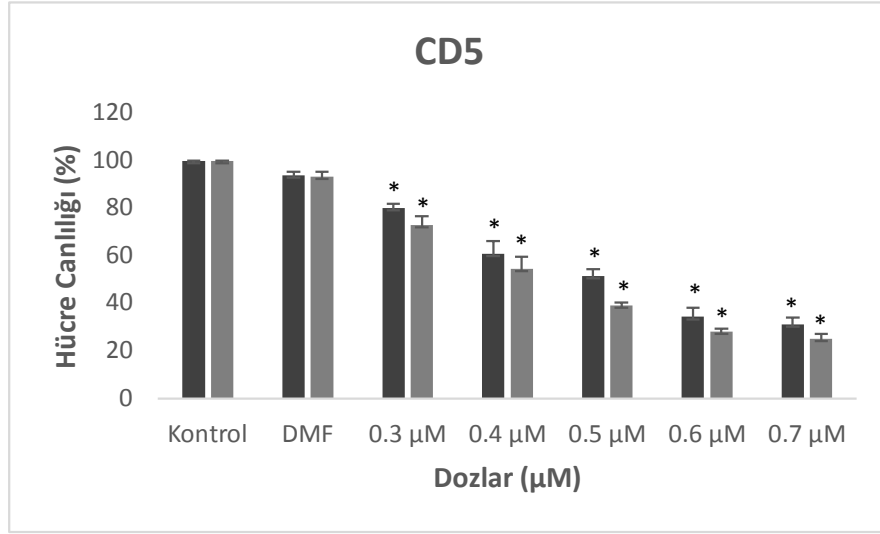
MCF-7 hücrelerinde Ditiyofosfonato kadmiyum (II) kompleksleri	IC ₃₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)
Cd1	1,3	1,5
Cd2	1,2	1,4
Cd5	0,5	0,6



Şekil 4.4. Cd1 kompleksinin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi, * $p < 0.001$.



Şekil 4.5. Cd2 kompleksinin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi, * $p < 0.001$.



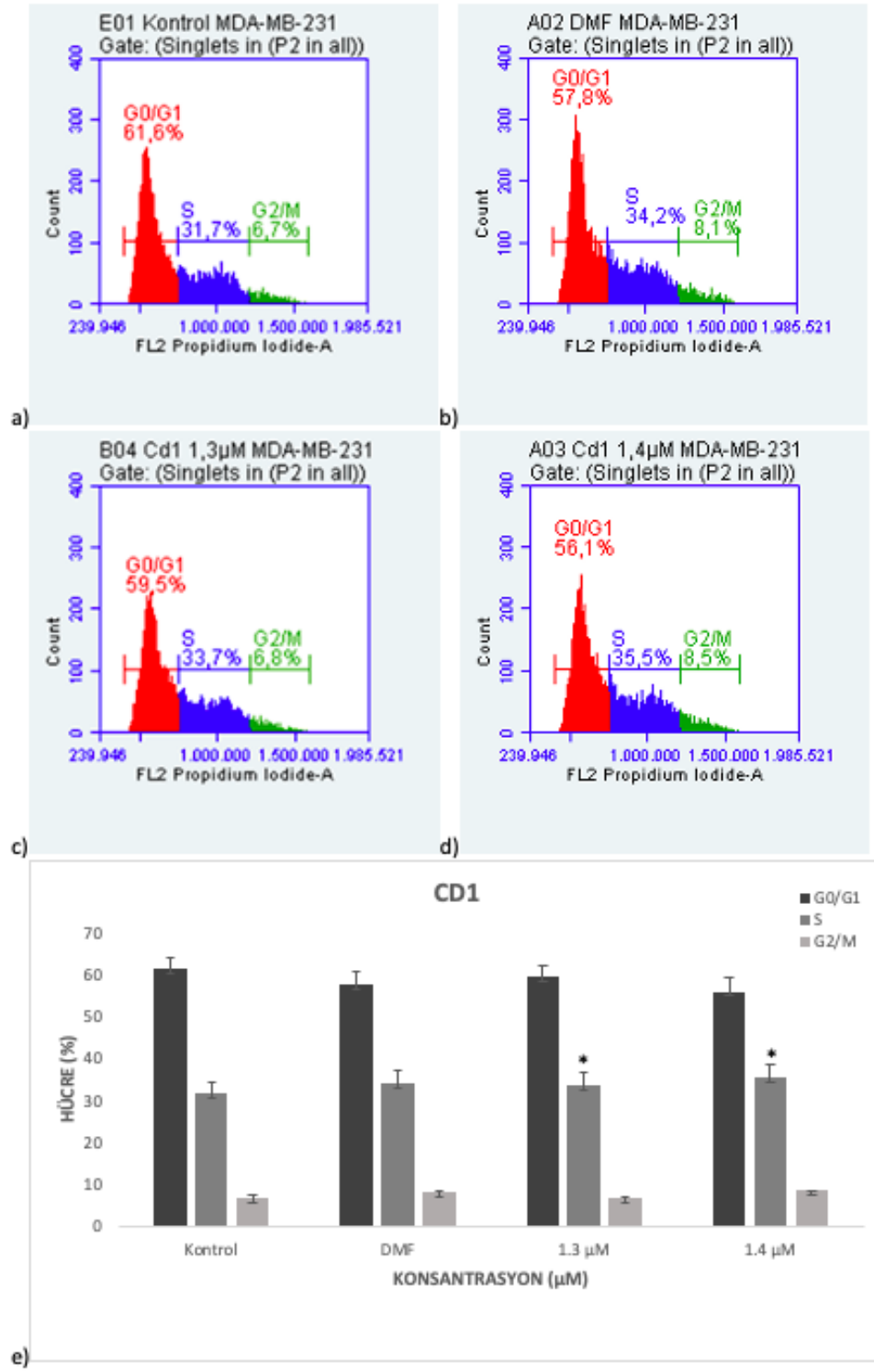
Şekil 4.6. Cd5 kompleksinin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi, * $p < 0.001$.

MTT testi sonuçlarına göre, ileriki deneylere tüm test bileşenlerinin IC₃₀ ve IC₅₀ konsantrasyonları ile devam edilmiştir.

4.2. Hücre Döngüsü Analizi ile Proliferasyonun Belirlenmesi

4.2.1. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde Cd1 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi

48 saat boyunca bileşiklerin IC₅₀ ve IC₃₀ ve çözücü (DMF)'nin %0,1 konsantrasyonları MDA-MB-231 hücrelerine uygulanmıştır. Ayrıca, test bileşeni içermeyen medium içerisinde büyütülen hücreler (negatif kontrol) de aynı koşullarda deneye alınmıştır. Sürenin sonunda; negatif kontrol grubundaki hücrelerin %61,6'sı G0/G1 fazında, %31,7'si S fazında ve %6,7'si de G2/M fazında olduğu tespit edilmiştir. DMF grubundaki hücrelerin; %57,8'i G0/G1 fazında, %34,2'si S fazında ve %8,1'i de G2/M fazında olduğu belirlenmiştir. Kadmiyum (II) kompleksinin MDA-MB-231'in hücre döngüsünde tutuklanmasına etkisi değerlendirildiğinde; konsantrasyona bağımlı olarak, S fazında duraklayan hücrelerin oranında negatif kontrole kıyasla anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir. Her bir komplekse özgü uygulanan dilüsyon-cevap grafikleri Şekil 4.7'de verilmiştir.

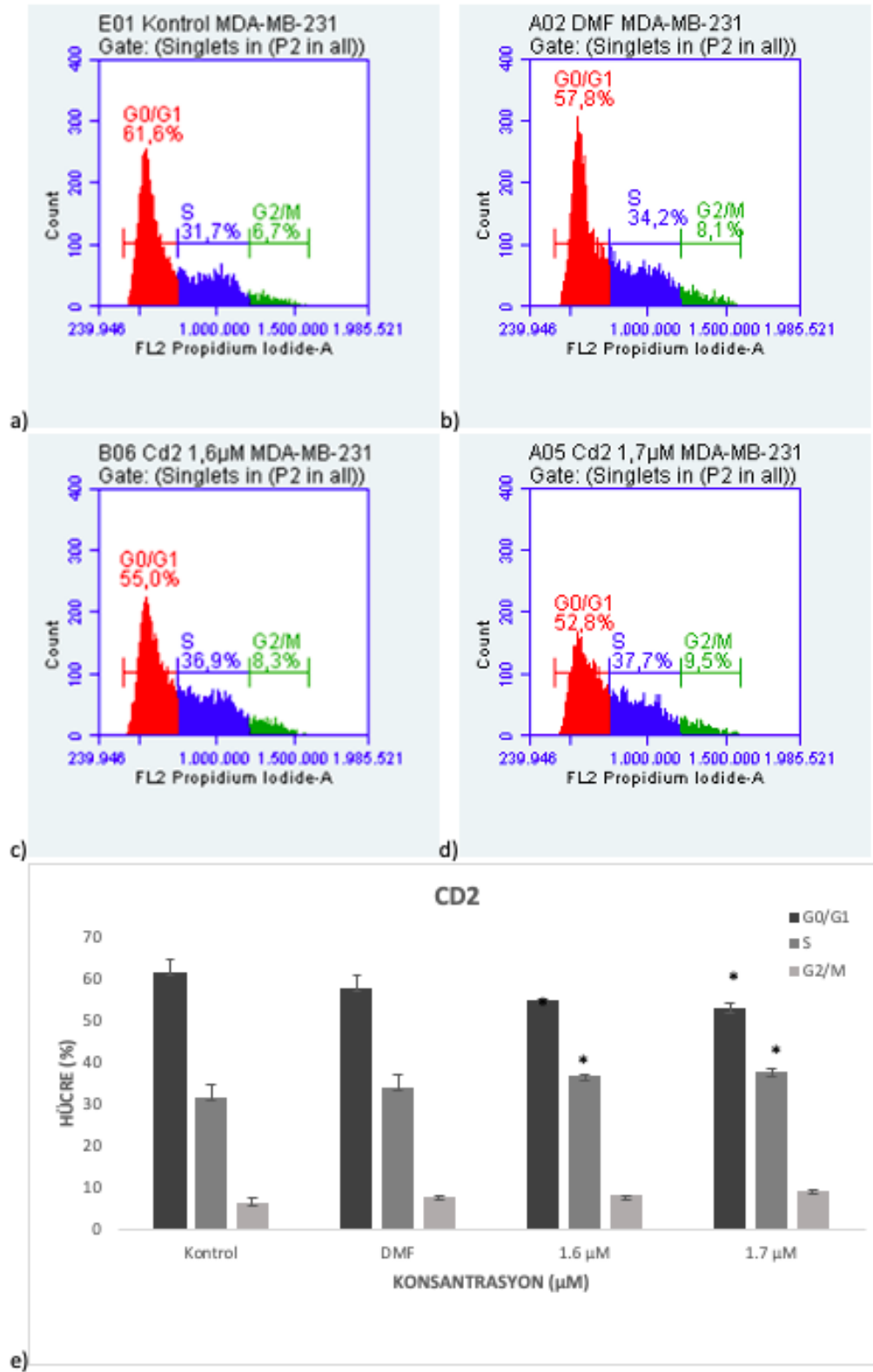


Şekil 4.7. MDA-MB-231 hücre hattında Cd1 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi, a) Kontrol grubu, b) DMF, c) 1.3 µM, d) 1.4 µM, e) hücrelerin G0/G1, S, G2/M hücre döngüsü evrelerinde bulunma yüzdeleri gösteren bar grafiği. *p<0.001.

4.2.2. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde Cd2 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi

MDA-MB-231 hücrelerine 48 saat boyunca Cd2 kompleksinin IC₅₀ ve IC₃₀ konsantrasyonları, çözücü (DMF)'nin %0,1 konsantrasyonu ve kültür mediumu uygulanmıştır. Sürenin sonunda; negatif kontrol grubundaki hücrelerin %61,6'sı G0/G1 fazında, %31,7'si S fazında ve %6,7'si de G2/M fazında olduğu tespit edilmiştir. DMF grubunda ise hücrelerin; %57,8'i G0/G1 fazında, %34,2'si S fazında ve %8,1'i de G2/M fazında olduğu bulunmuştur. IC₅₀ ve IC₃₀ konsantrasyonlarının uygulandığı hücrelerde ise S fazındaki tutuklanma oranının, konsantrasyona bağlı olarak, anlamlı şekilde arttığı görülmüştür. Her bir komplekse özgü konsantrasyon-cevap grafikleri Şekil 4.8'de verilmiştir.



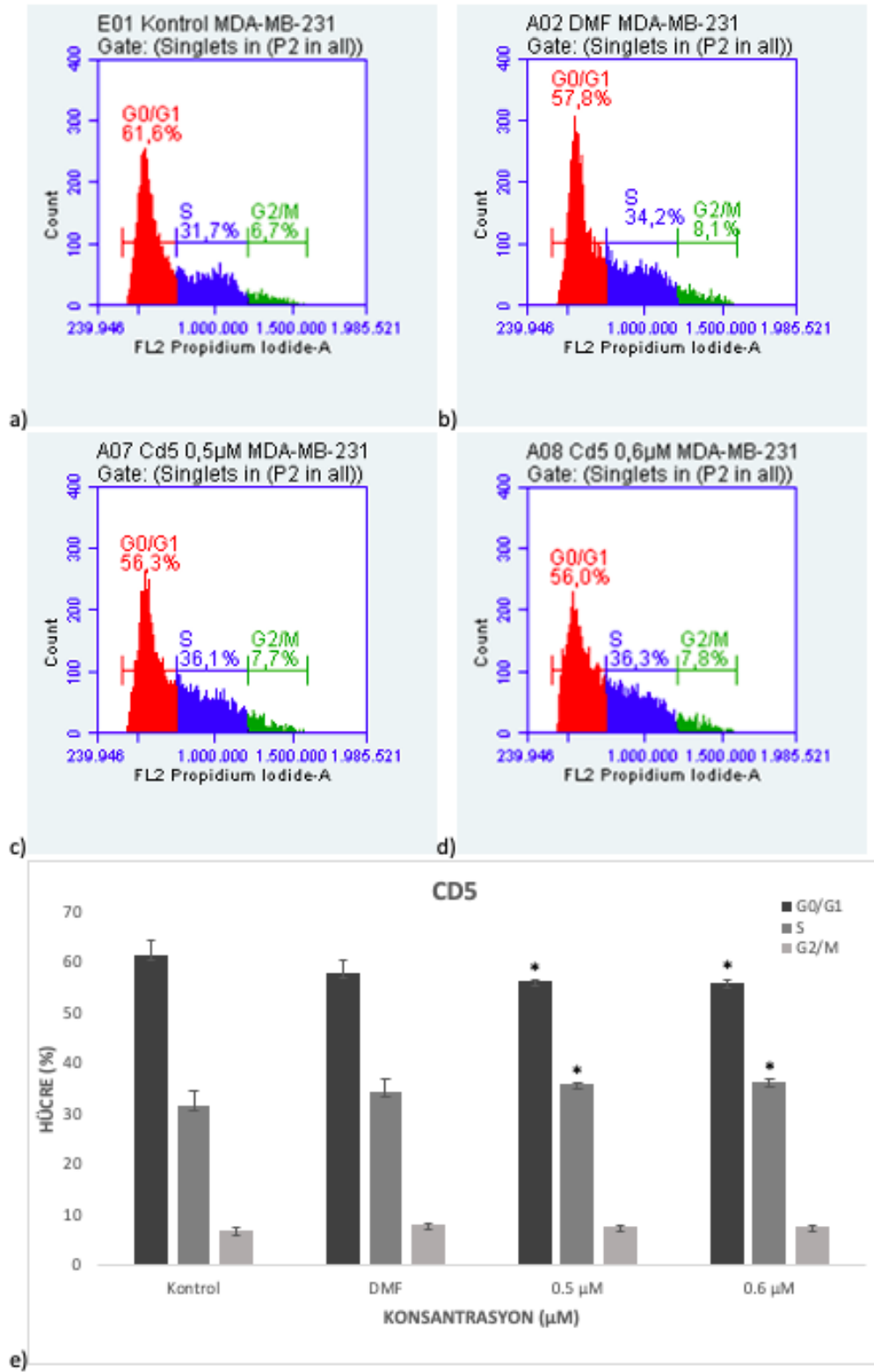


Şekil 4.8. MDA-MB-231 hücre hattında Cd2 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi, a) Kontrol grubu, b) DMF, c) 1.6 µM, d) 1.7 µM, e) hücrelerin G0/G1, S, G2/M hücre döngüsü evrelerinde bulunma yüzdeleri gösteren bar grafiği. * $p < 0.001$.

4.2.3. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde Cd5 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi

Cd5 kompleksinin IC₅₀ ve IC₃₀ konsantrasyonları, %0,1 DMF ve kültür mediumu 48 saat boyunca MDA-MB-231 hücrelerine uygulanmıştır. Negatif kontrol grubunun %61,6'sı G0/G1 fazında, %31,7'si S fazında ve %6,7'si de G2/M fazında tespit edilirken, çözücü kontrol (%0,1 DMF) grubunda ise hücrelerin; %57,8'i G0/G1 fazında, %34,2'si S fazında ve %8,1'i de G2/M fazında olduğu belirlenmiştir. Kadmiyum (II) kompleksleri uygulanan hücrelerde ise yine konsantrasyona bağlı olarak hücrelerin S fazında tutulmasının istatistiksel olarak anlamlı olduğu dikkat çekmiştir. Her bir komplekse özgü konsantrasyon-cevap grafikleri Şekil 4.9'da verilmiştir.



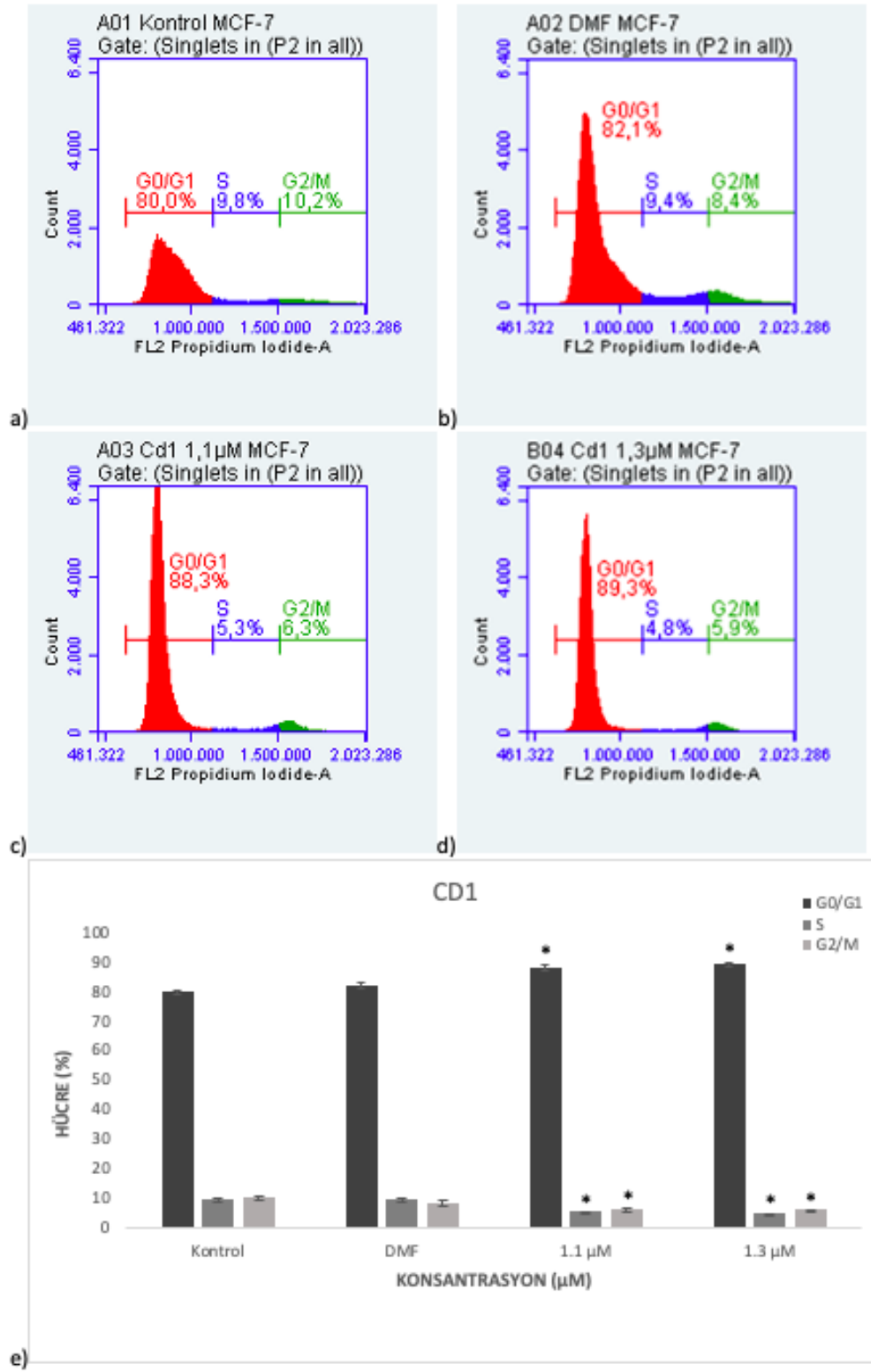


Şekil 4.9. MDA-MB-231 hücre hattında Cd5 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi, a) Kontrol grubu, b) DMF, c) 1.6 μM, d) 1.7 μM, e) hücrelerin G0/G1, S, G2/M hücre döngüsü evrelerinde bulunma yüzdeleri gösteren bar grafiği, *p<0.001.

4.2.4. MCF-7 hücre hattı üzerinde Cd1 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi

Cd1 kompleksinin IC₅₀ ve IC₃₀ konsantrasyonları, %0,1 DMF ve kültür mediumu 48 boyunca MCF-7 hücrelerine uygulanmıştır. Negatif kontrol grubu hücrelerinin, %80'i G0/G1 fazında, %9,8'i S fazında ve %10,2'si de G2/M fazında olduğu tespit edilmiştir. Çözücü kontrol (%0,1 DMF) grubunda ise hücrelerin; %82,1'i G0/G1 fazında, %9,4'ü S fazında ve %8,4'ü de G2/M fazında tespit edilmiştir. Kontrole göre kadmiyum (II) kompleksi uygulanan gruplar kıyaslandığında, konsantrasyona bağımlı olarak hücrelerin G0/G1 fazında tutulduğu buna bağlı olarak S ve G2/M fazında azalış olduğu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde görülmüştür. Her bir komplekse özgü uygulanan dozlar ve doz-cevap grafikleri Şekil 4.10'da verilmiştir.



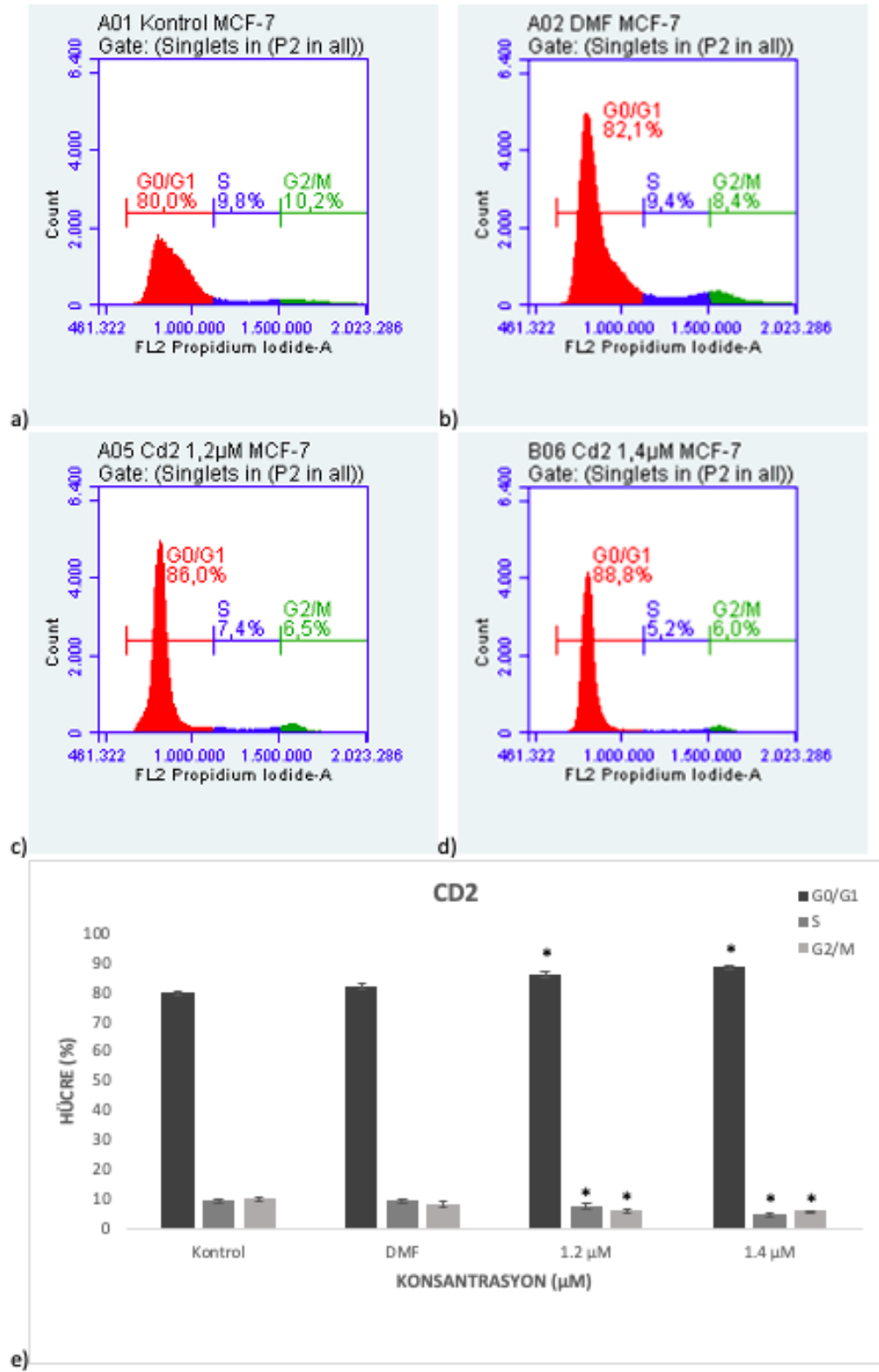


Şekil 4.10. MCF-7 hücre hattında Cd1 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi, a) Kontrol grubu, b) DMF, c) 1.1 µM, d) 1.3 µM, e) hücrelerin G0/G1, S, G2/M hücre döngüsü evrelerinde bulunma yüzdelerini gösteren bar grafiği, *p<0.001.

4.2.5. MCF-7 hücre hattı üzerinde Cd2 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi

MCF-7 hücrelerine Cd2 kompleksinin IC₅₀ ve IC₃₀ konsantrasyonları, %0,1 DMF ve kültür mediumu 48 saat boyunca uygulanmıştır. Negatif kontrol grubu hücrelerinin %80'i G0/G1 fazında, %9,8'i S fazında ve %10,2'si de G2/M fazında bulunduğu belirlenmiştir. Çözücü kontrol (%0,1 DMF) grubunda ise hücrelerin, %82,1'i G0/G1 fazında, %9,4'ü S fazında ve %8,4'ü de G2/M fazında tespit edilmiştir. Kontrole göre Cd2 kompleksi uygulanan gruplar kıyaslandığında, yine Cd1 kompleksi ile aynı etki görülmüş olup konsantrasyona bağımlı olarak hücrelerin G0/G1 fazında tutulduğu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde görülmüştür. Her bir komplekse özgü konsantrasyon-cevap grafikleri Şekil 4.11'de verilmiştir.

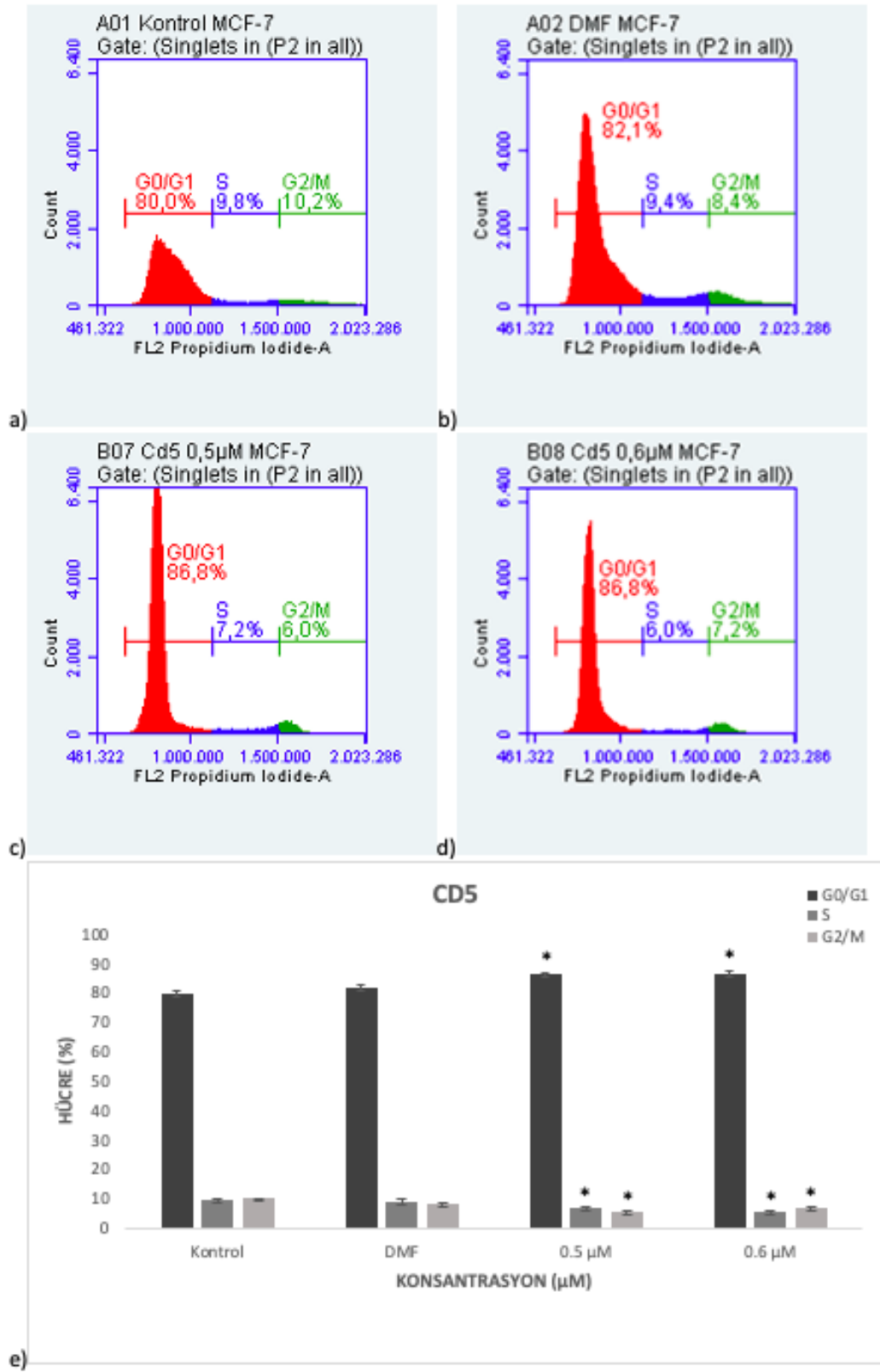




Şekil 4.11. MCF-7 hücre hattında Cd2 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi, a) Kontrol grubu, b) DMF, c) 1.1 µM, d) 1.3 µM, e) hücrelerin G0/G1, S, G2/M hücre döngüsü evrelerinde bulunma yüzdelerini gösteren bar grafiği. * $p < 0.001$

4.2.6. MCF-7 hücre hattı üzerinde Cd5 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi

48 saat boyunca MCF-7 hücrelerine Cd5 kompleksinin IC₅₀ ve IC₃₀ konsantrasyonları, %0,1 DMF ve kültür mediumu uygulanmıştır. Negatif kontrol grubu hücrelerinin; %80'i G0/G1 fazında, %9,8'i S fazında ve %10,2'si de G2/M fazında tespit edilmiştir. Uygulanan çözücü kontrol (%0,1 DMF) grubunda ise hücrelerin; %82,1'i G0/G1 fazında, %9,4'ü S fazında ve %8,4'ü de G2/M fazında tespit edilmiştir. Negatif kontrole göre Cd5 kompleksi uygulanan gruplar kıyaslandığında, IC₅₀ ve IC₃₀ konsantrasyonu uygulanan hücrelerin %86,8'inin G0/G1 evresinde durduğu görülmüş olup istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Cd5 kompleksinin uygulanan her iki konsantrasyonunda da etki aynı şekilde görülmüş olup konsantrasyon bağımlı olmadığı bulunmuştur. Her bir komplekse özgü konsantrasyon-cevap grafikleri Şekil 4.12'de verilmiştir.



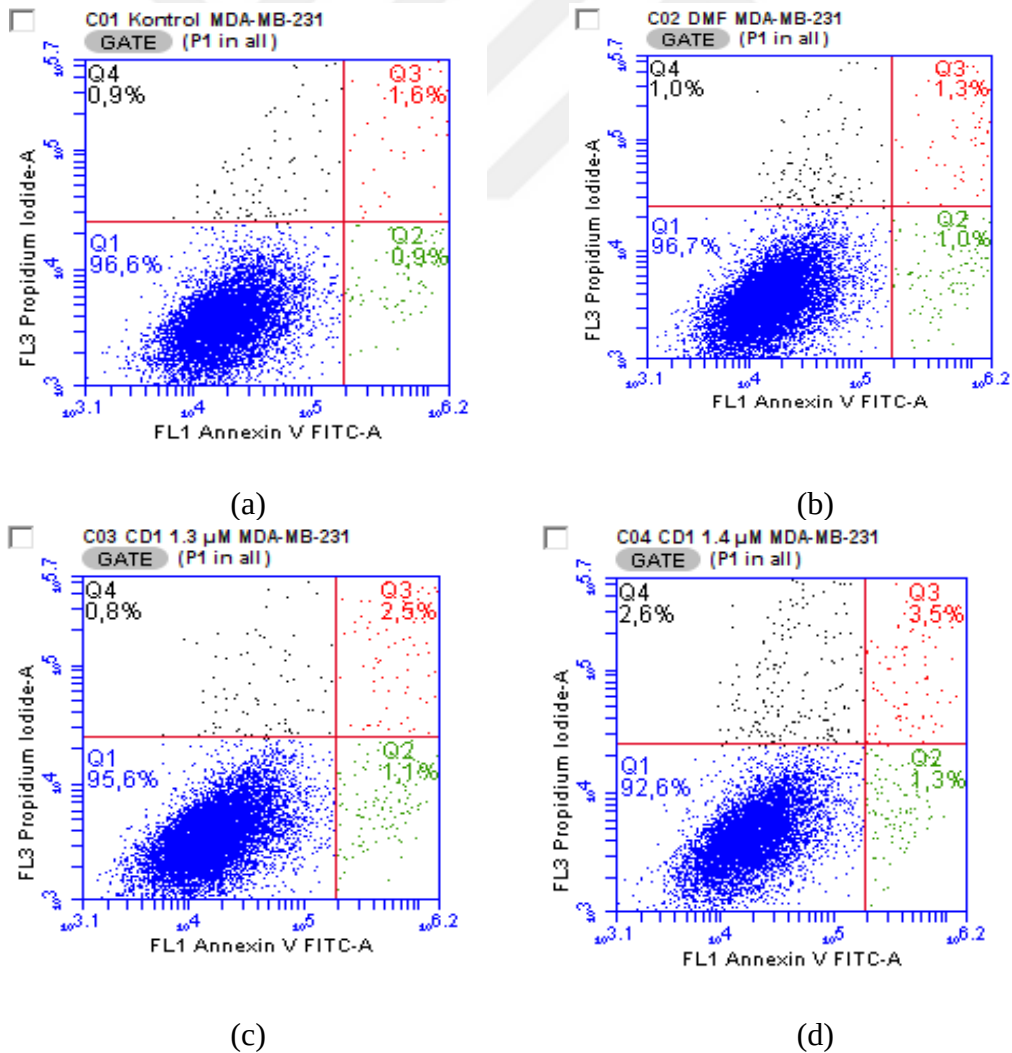
Şekil 4.12. MCF-7 hücre hattında Cd5 kompleksinin hücre döngüsüne etkisi, a) Kontrol grubu, b) DMF, c) 1.1 µM, d) 1.3 µM, e) hücrelerin G0/G1, S, G2/M hücre döngüsü evrelerinde bulunma yüzdelerini gösteren bar grafiği. * $p < 0.001$.

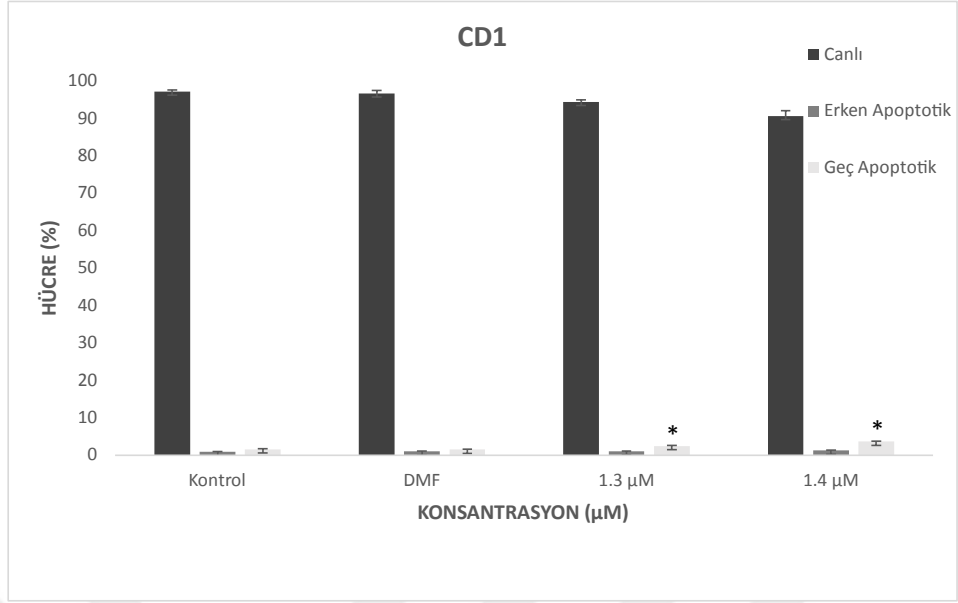
4.3. Annexin V – FITC & PI Boyama ile Apoptotik Aktivitenin Belirlenmesi

Hücrelerde erken ve geç apoptoz oranını belirlemeye yönelik yapılan Annexin V-FITC/PI analizi için akış sitometrisi sonuçlarına göre, Q1 kadranı; iki boya ile boyanmamış canlı hücreleri, Q2 kadranı; yalnızca Annexin V – FITC ile boyanan erken apoptotik hücreleri, Q3 kadranı; Annexin V-FITC ve PI ile boyanan geç apoptotik hücreleri ve Q4 kadranı ise yalnızca PI ile boyanan nekrotik hücreleri temsil etmektedir.

4.3.1. MDA-MB-231 hücre hattında Cd1 kompleksinin erken apoptotik etkisi

Cd1 kompleksinin 48 saat süre ile uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinde, Annexin V-FITC/PI analizinin sonuçları incelendiğinde, özellikle konsantrasyona bağlı olarak geç apoptotik hücrelerde (Q3) kontrol grubuna göre zayıf bir artış görülmektedir. Cd1 kompleksi konsantrasyonlarına maruz kalmış hücrelerde Annexin V-PI analizine ait akış sitometri grafikleri Şekil 4.13’de gösterilmiştir.



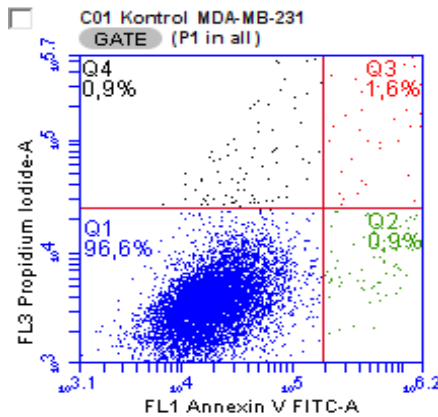


(e)

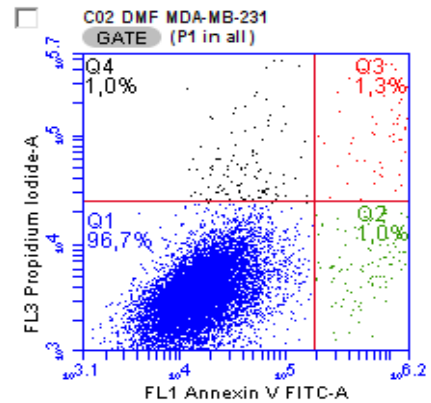
Şekil 4.13. *Cd1 kompleksinin 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hatlarında apoptotik etkisi, Annexin V-FITC boyama, a) Kontrol, b) DMF, c) 1.3 µM, d) 1.4 µM, e) hücrelerin apoptoz evrelerinde bulunma yüzdeleri bar grafiği, *p<0.001.*

4.3.2. MDA-MB-231 hücre hattında Cd2 kompleksinin erken apoptotik etkisi

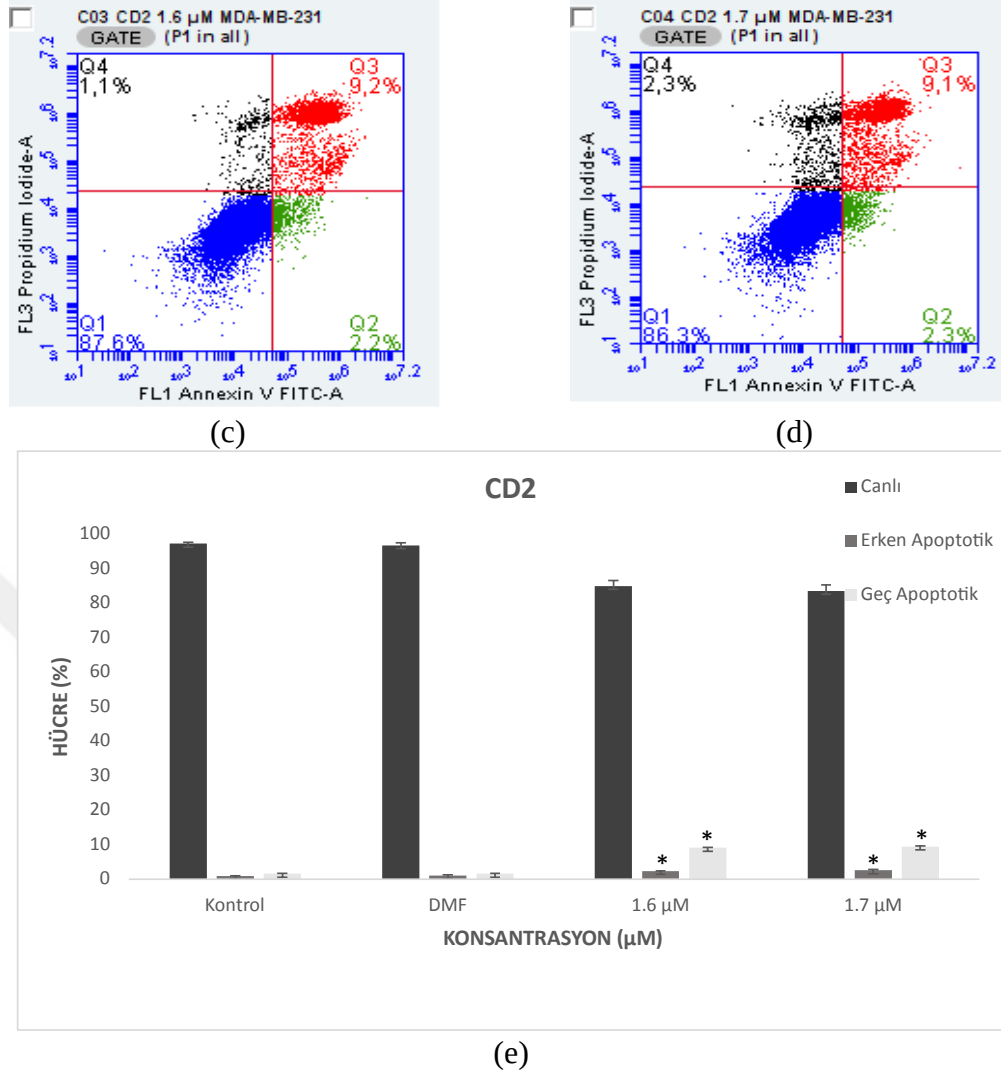
MDA-MB-231 hücrelerine Cd2 kompleksinin 48 saat boyunca uygulanmasının ardından Annexin V-PI analizinin sonuçları incelendiğinde, özellikle konsantrasyona bağlı olarak hem erken hem de geç apoptotik hücrelerde kontrole göre anlamlı bir artış görülmektedir. Cd2 kompleksine ait konsantrasyonlara maruz kalmış hücrelerde Annexin V-FITC/PI analizine ait akış sitometri grafikleri Şekil 4.14’de gösterilmiştir.



(a)



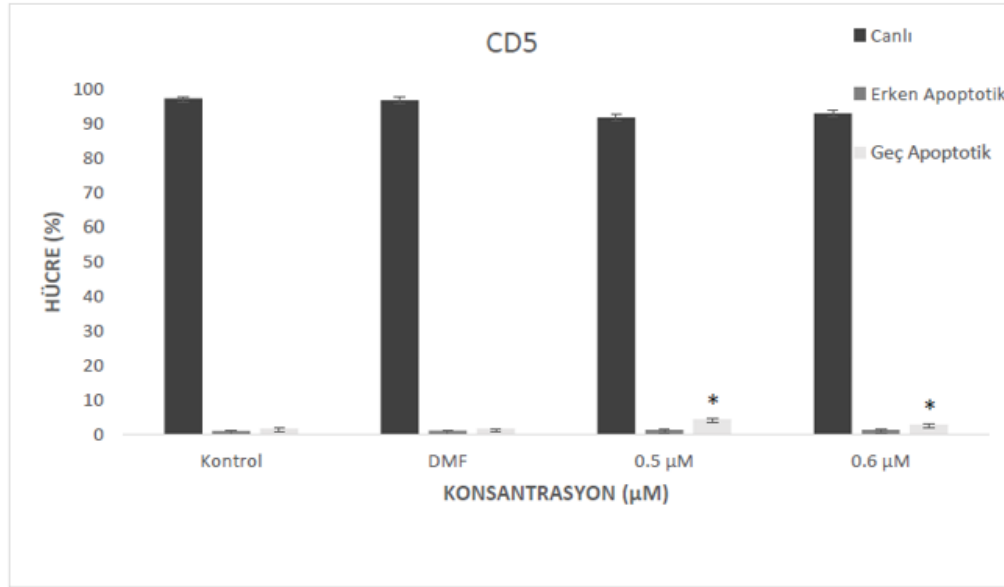
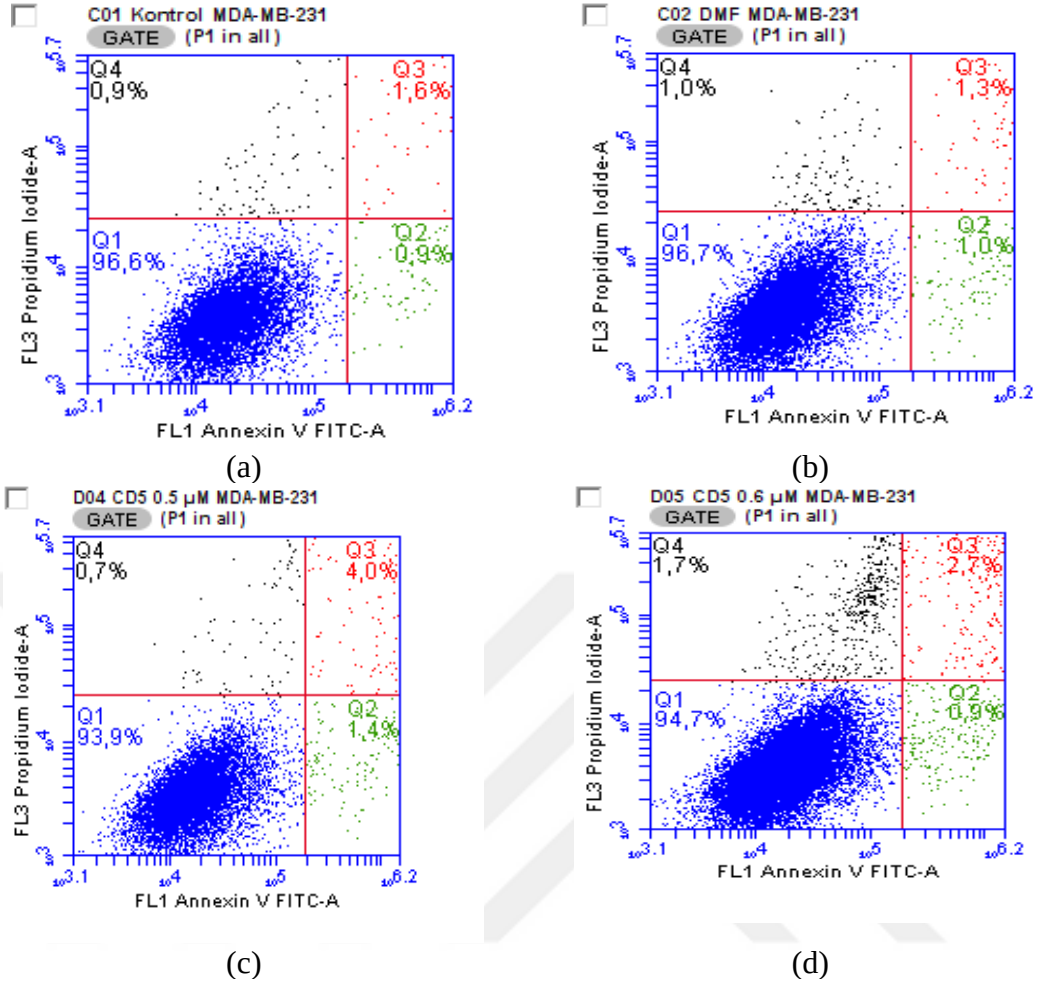
(b)



Şekil 4.14. Cd2 kompleksinin 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hatlarında apoptotik etkisi, Annexin V-FITC boyama, a) Kontrol, b) DMF, c) 1.6 μ M, d) 1.7 μ M, e) hücrelerin apoptoz evrelerinde bulunma yüzdeleri bar grafiği, * $p < 0.001$.

4.3.3. MDA-MB-231 hücre hattında Cd5 kompleksinin erken apoptotik etkisi

Annexin-PI analizinde akış sitometrisi sonuçlarına göre, 0,5 μ M Cd5 kompleksi ile 48 saat muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin geç apoptotik yüzdeleri kontrolle göre 2,5 katlık bir artış görülmektedir. 0,6 μ M Cd5 kompleksi uygulanan hücrelerde ise geç apoptoz oranında zayıf bir artış gözlenirken erken apoptoz oranında her iki dozda da anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Cd5 kompleksine özgü uygulanan konsantrasyonlara ait Annexin V-PI analizi akış sitometri grafikleri Şekil 4.15’de verilmiştir.

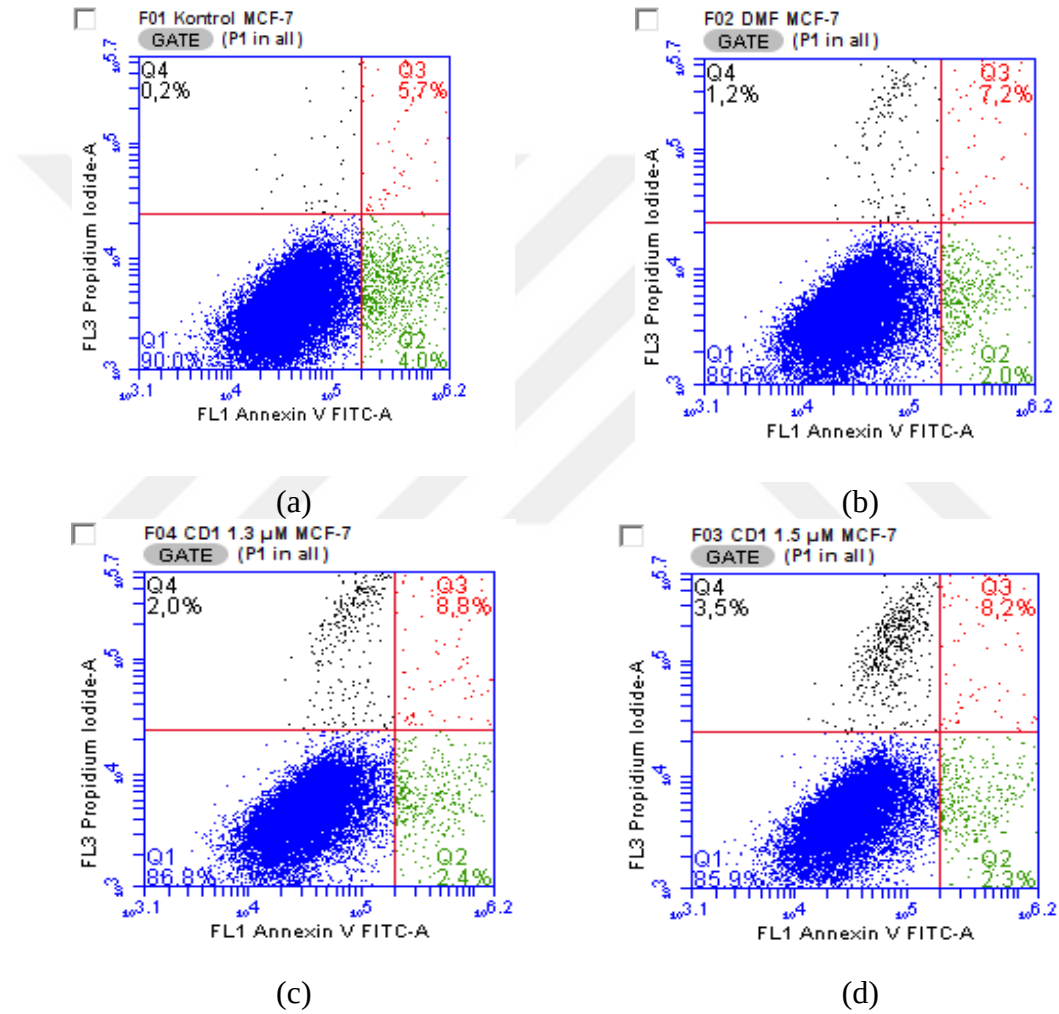


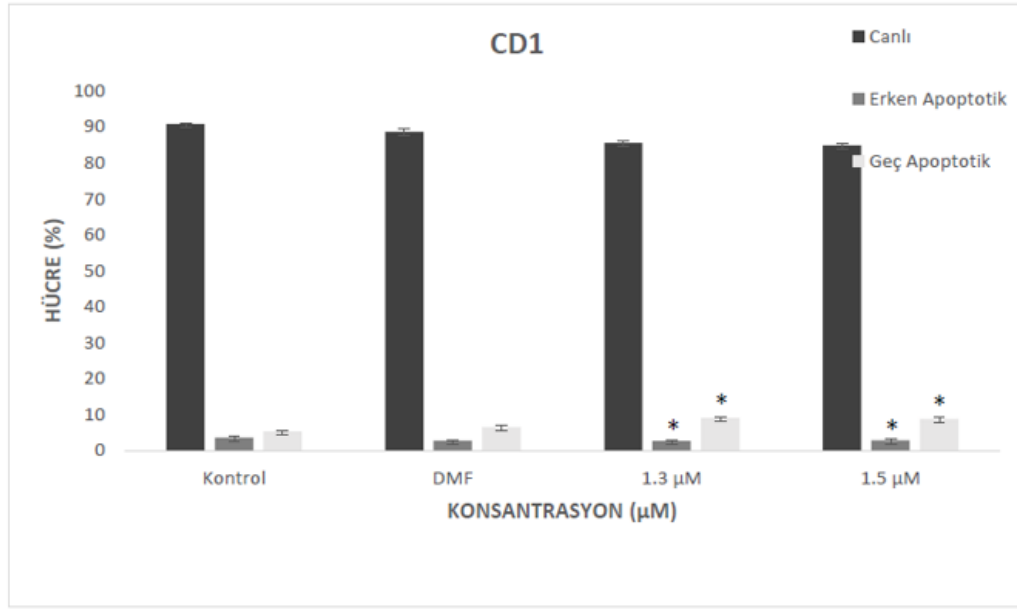
(e)

Şekil 4.15. Cd5 kompleksinin 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hatlarında apoptotik etkisi, Annexin V-FITC boyama, a) Kontrol, b) DMF, c) 0.5 μ M, d) 0.6 μ M, e) hücrelerin apoptoz evrelerinde bulunma yüzdeleri bar grafiği, * $p<0.001$.

4.3.4. MCF-7 hücre hattında Cd1 kompleksinin erken apoptotik etkisi

48 saat Cd1 kompleksinin etkin dozları ile muamele edilen MCF-7 hücre hattında kontrol grubu ile kıyaslandığında konsantrasyon bağımlı olarak özellikle geç apoptotik hücrelerin oranında anlamlı bir artış bulunmuştur. 1,3 μ M Cd1 kompleksine maruz kalmış hücrelerde, geç apoptotik hücre oranında 10 kat, 1,5 μ M Cd1 konsantrasyonunda ise 17,5 kat artış dikkat çekmiştir. Cd1 kompleksine özgü uygulanan konsantrasyonlara ait Annexin V-PI analizi akış sitometri grafikleri Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



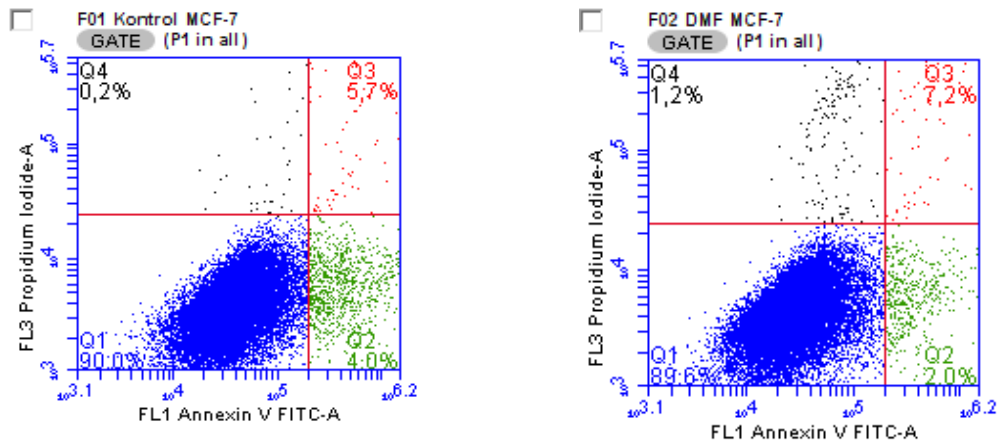


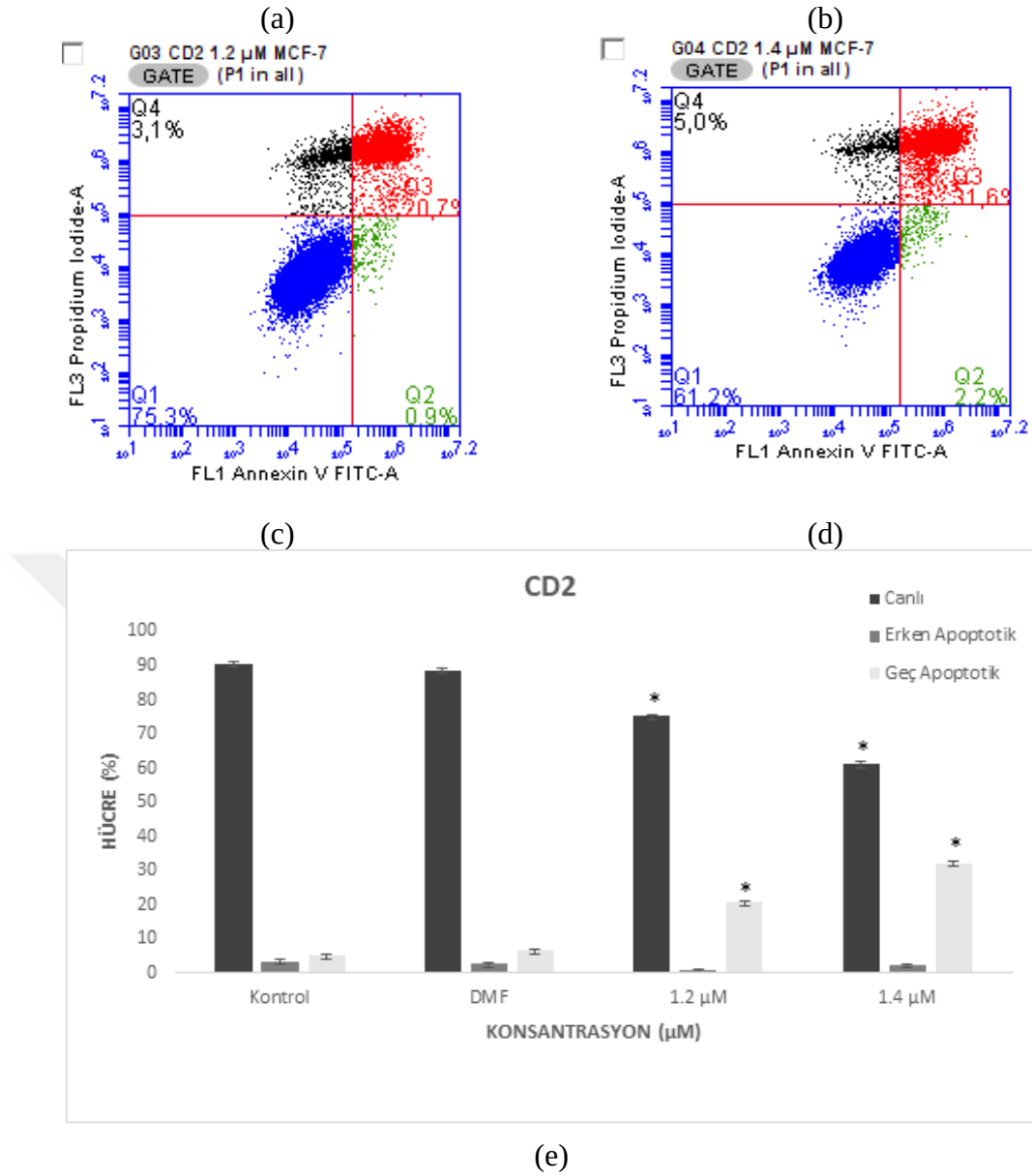
(e)

Şekil 4.16. Cd1 kompleksinin 48 saat süreyle MCF-7 hücre hatlarında apoptotik etkisi, Annexin V-FITC boyama, a) Kontrol, b) DMF, c) 1.3 µM, d) 1.5 µM, e) hücrelerin apoptoz evrelerinde bulunma yüzdeleri bar grafiği, *p<0.001.

4.3.5. MCF-7 hücre hattında Cd2 kompleksinin erken apoptotik etkisi

48 saat Cd2 kompleksinin IC₅₀ konsantrasyonu ile muamele edilen MCF-7 hücre hattında, geç apoptoz oranı kontrole göre 6 kat artarken, nekroz oranı 25 kat artmıştır. Diğer yandan, IC₃₀ konsantrasyonunda ise geç apoptoz oranında 4 kat ve nekroz oranında ise 15 katlık bir artış görülmüştür. Cd2 kompleksinin konsantrasyonlarına ait Annexin V-PI analizi akış sitometri grafikleri Şekil 4.17’de gösterilmiştir.

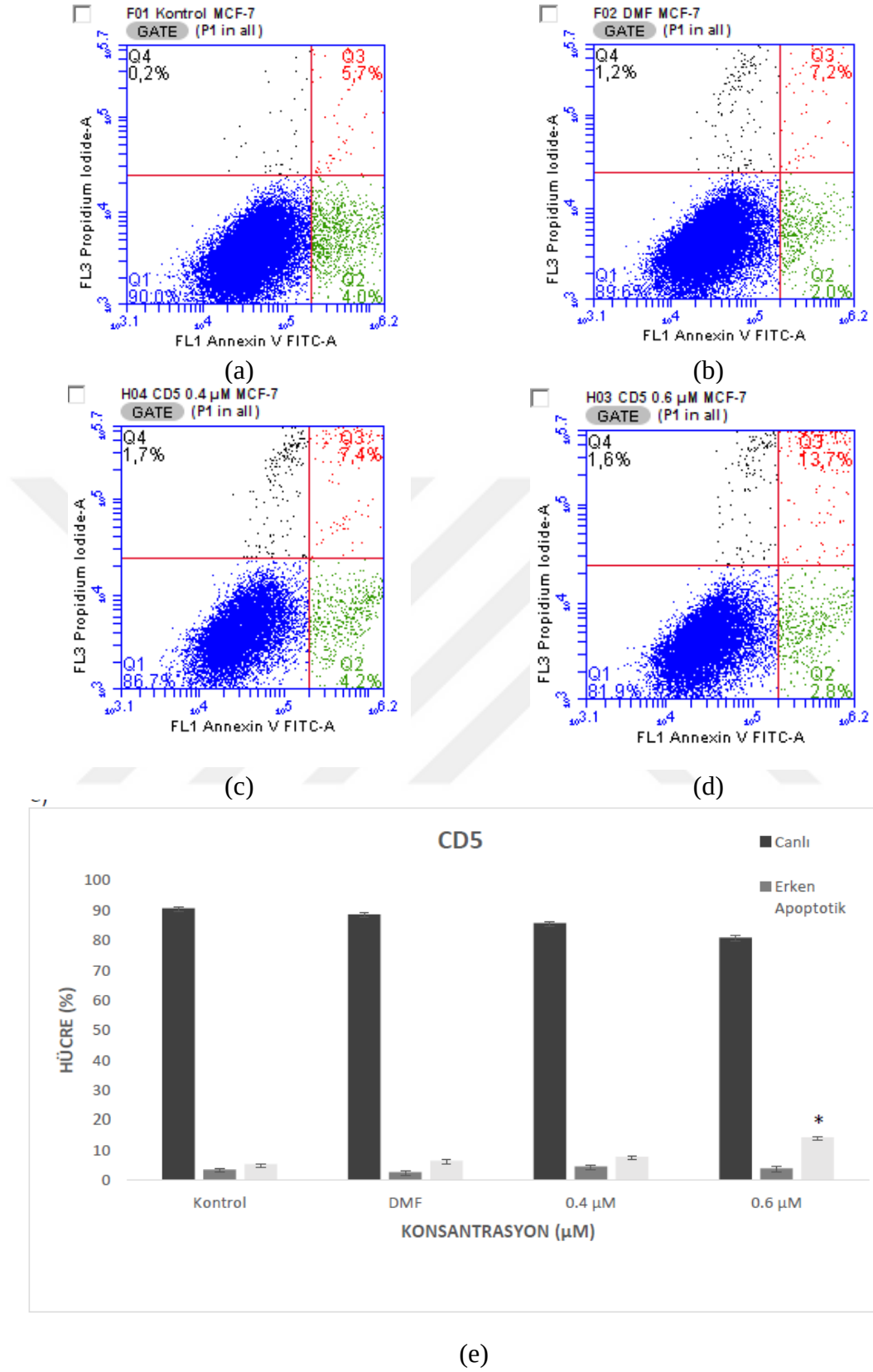




Şekil 4.17. Cd2 kompleksinin 48 saat süreyle MCF-7 hücre hatlarında apoptotik etkisi, Annexin V-FITC boyama, a) Kontrol, b) DMF, c) 1.2 μ M, d) 1.4 μ M, e) hücrelerin apoptoz evrelerinde bulunma yüzdeleri bar grafiği, * $p < 0.001$.

4.3.6. MCF-7 hücre hattında Cd5 kompleksinin erken apoptotik etkisi

48 saat Cd5 kompleksinin etkin dozları ile muamele edilen MCF-7 hücre hattında, Cd5 kompleksinin 0,4 μ M konsantrasyonunda erken ve geç apoptoz oranlarında anlamlı bir artış görülmemiş olmakla beraber, 0,6 μ M konsantrasyon uygulanmış hücrelerde, geç apoptotik hücrelerin oranında yaklaşık 2,5 kat artış görülmüştür. Cd5 kompleksinin konsantrasyonlarına ait Annexin V-PI analizi akış sitometri grafikleri Şekil 4.18'de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Cd5 kompleksinin 48 saat süreyle MCF-7 hücre hatlarında apoptotik etkisi, Annexin V-FITC boyama, a) Kontrol, b) DMF, c) 0.4 μM, d) 0.6 μM, e) hücrelerin apoptoz evrelerinde bulunma yüzdeleri bar grafiği, * $p < 0.001$.

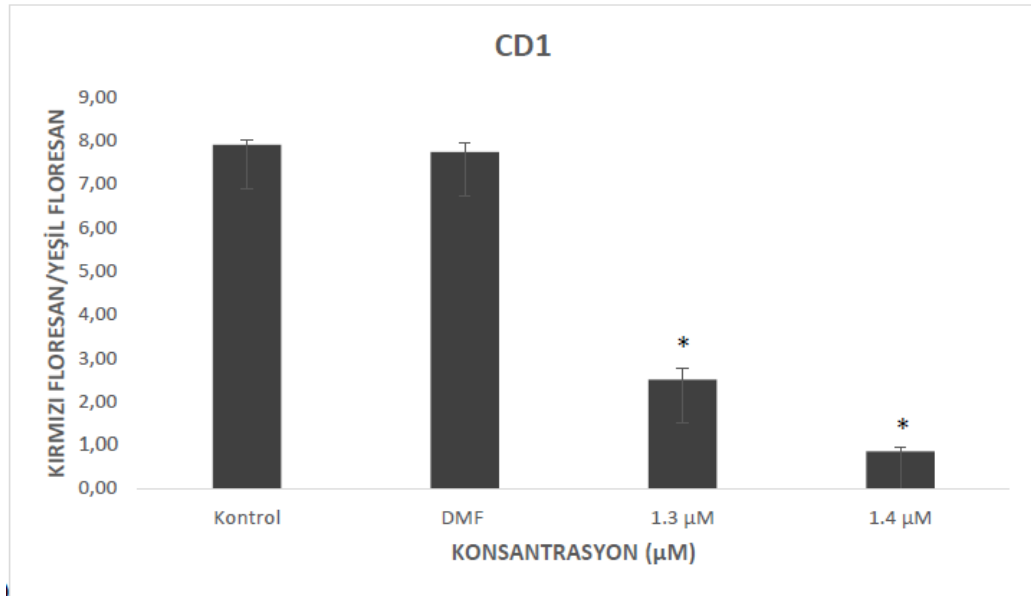
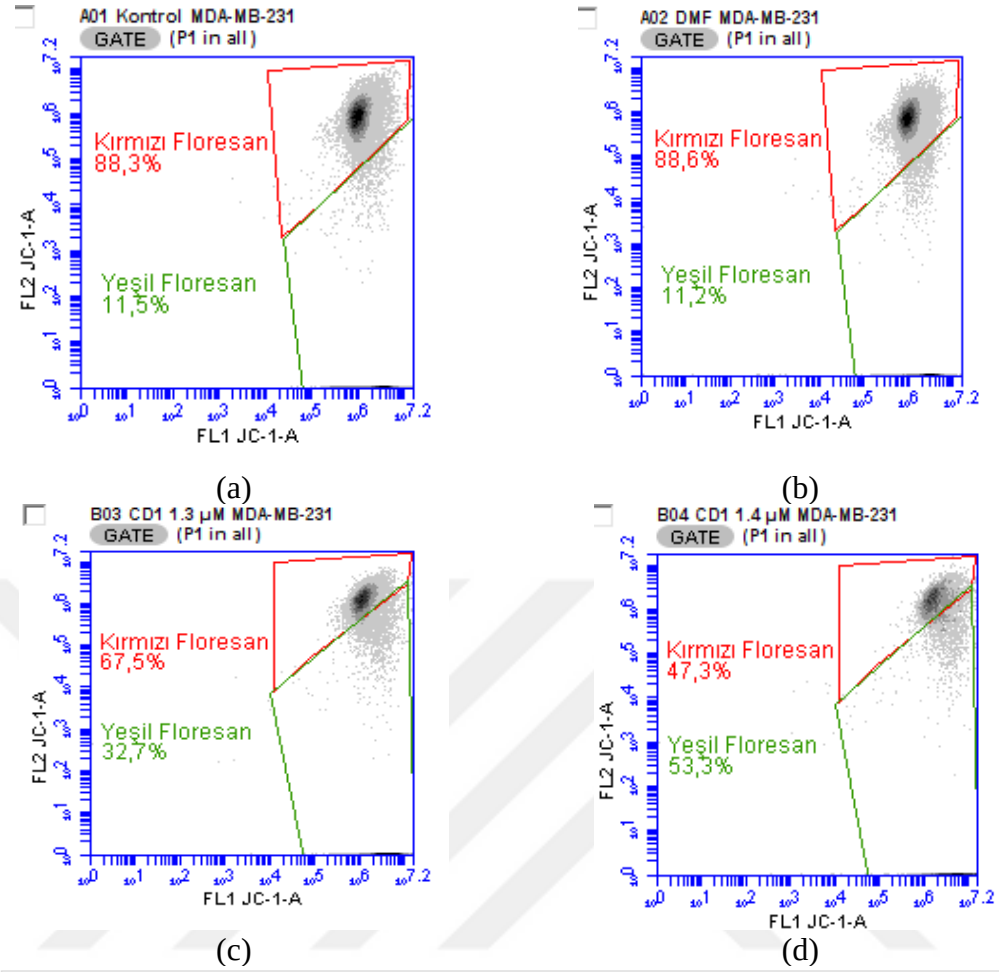
4.4. JC-1 Boyama ile Mitokondriyal Membran Potansiyel Analizi

Mitokondri membran potansiyelinin belirlenmesi için hücreler, JC-1 boyası ile boyanmış ve floresan filtreler ile akış sitometrisinde analiz edilmiştir. Bu analizin değerlendirilmesinde dikkat edilecek kriterler şöyledir: Normal fizyolojik koşullardaki hücrelerin membranları polarizedir ve JC-1 boyası mitokondriden geçer ve J-agregatı denen birikimler oluşturur. Bu agregatlar akış sitometrisinde 585/40 bandpass filtre (FL2 detektör)'de kırmızı ışıma verir. Apoptotik hücrelerde ise membran geçirgenliği azaldığından, $\Delta\psi$ depolarizedir ve J-agregatları oluşmaz. Akış sitometrisinde bu durum 533/30 bandpass filtre (FL1 detektör)'de yeşil bir ışıma sebeptir olur. Böylece, mitokondriyal membran potansiyeli değişimlerinin tespiti sağlanmaktadır (Cossarizza vd, 1993). Her bir örnek JC-1 ile boyanıp analiz edildikten sonra, mitokondri transmembran polarizasyon oranı şu formül ile hesaplanmıştır.

Mitokondri Transmembran Polarizasyon Oranı: Kırmızı floresans / Yeşil floresans

4.4.1. MDA-MB-231 hücrelerinde Cd1 kompleksinin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi

48 saat süre ile Cd1 kompleksinin etkin dilüsyonlarına maruz bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde JC-1 boyama ile mitokondri transmembran potansiyelinde meydana gelen değişimler akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Kontrol grubundaki hücrelerin %88,3'ünde kırmızı floresan (sağlıklı, polarize mitokondri membranı), %11,5'inde ise yeşil floresan (geçirgen, depolarize mitokondri membranı) ışıma tespit edilmiştir. Diğer yandan, yeşil floresan oranında (geçirgen, depolarize mitokondri membranı); 1,3 μ M Cd1 kompleksi uygulanan hücrelerde kontrole kıyasla 3 kat, 1,4 μ M Cd1 kompleksi uygulanan hücrelerde ise 5 kat artış dikkat çekmiştir. Bar grafikleri, kırmızı floresans/yeşil floresans oranı (mitokondri transmembran polarizasyon oranı) hesaplanarak oluşturulmuştur. Sonuç olarak, Cd1 kompleksinin iki konsantrasyonunda da mitokondri membran polarizasyonu konsantrasyon bağımlı olarak anlamlı şekilde azalmıştır. Cd1 kompleksine ait konsantrasyonların mitokondriyal transmembran potansiyel grafiği Şekil 4.19'da gösterilmiştir.

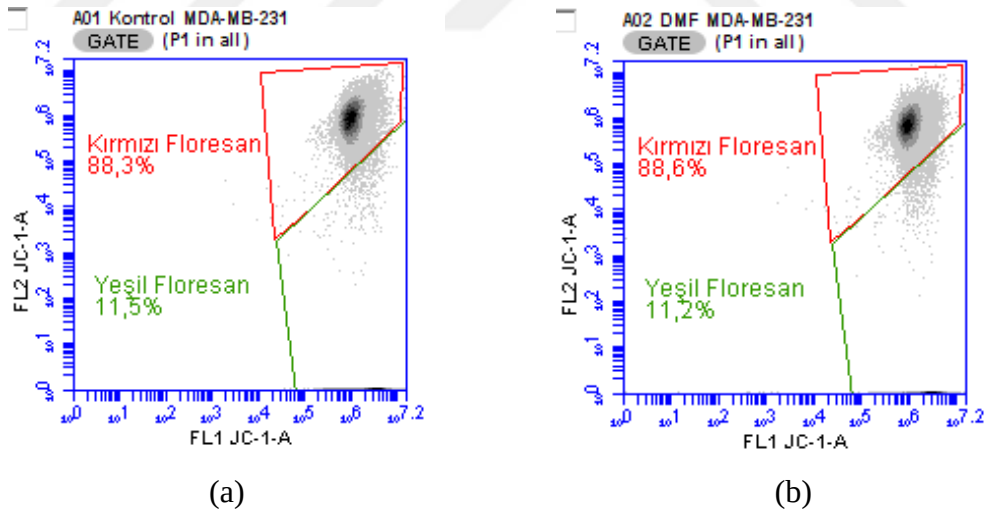


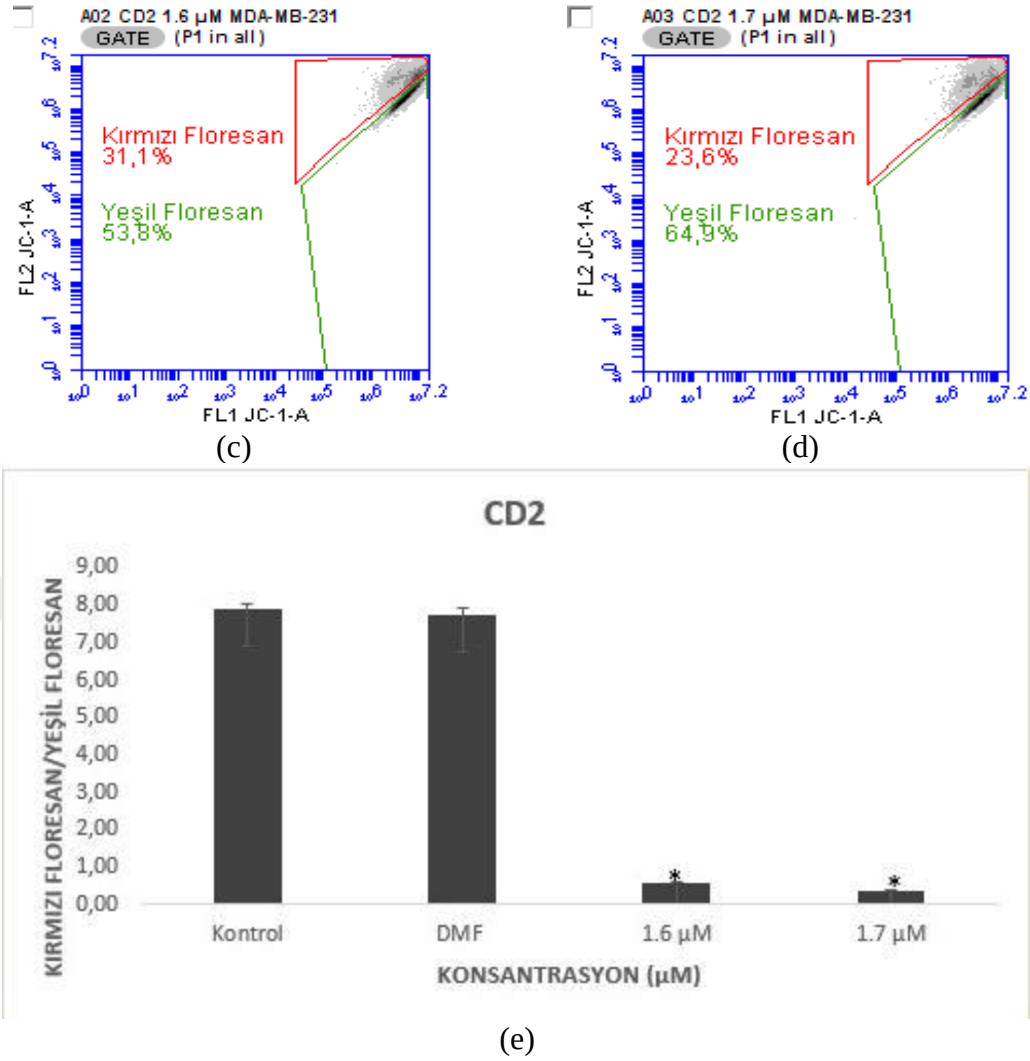
(e)

Şekil 4.19. Cd1 kompleksinin 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hattında mitokondriyal transmembran potansiyel üzerindeki etkileri, JC-1 boyama, a) Kontrol, b) DMF, c) 1.3 μ M, d) 1.4 μ M, e) hücrelerin transmembran potansiyel oranları bar grafiği, * $p < 0.001$.

4.4.2. MDA-MB-231 hücrelerinde Cd2 kompleksinin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi

MDA-MB-231 hücreleri, 1,6 μ M ve 1,7 μ M Cd2 kompleksine 48 saat maruz bırakıldıktan sonra, JC-1 boyama ile mitokondri transmembran potansiyelinde meydana gelen değişimler akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Kontrol grubundaki hücrelerin %88,3'ünde kırmızı floresan (sağlıklı, polarize mitokondri membranı), %11,5'inde ise yeşil floresan (geçirgen, depolarize mitokondri membranı) ışıma ölçülmüştür. Sonuçlar değerlendirildiğinde, 1,6 μ M Cd2 kompleksi uygulanan hücrelerde kontrole kıyasla yaklaşık 5 kat, 1,7 μ M Cd2 kompleksi uygulanan hücrelerde ise yaklaşık 6,5 kat artış görülmüştür. Cd2 kompleksine özgü uygulanan dozlar ve mitokondriyal transmembran potansiyel grafiği Şekil 4.20'de gösterilmiştir. Bar grafikleri, kırmızı floresans/yeşil floresans oranı (mitokondri transmembran polarizasyon oranı) hesaplanarak oluşturulmuştur. Sonuç olarak, Cd2 kompleksinin iki konsantrasyonu da mitokondri membran polarizasyonunu konsantrasyon bağımlı olarak anlamlı biçimde azaltmıştır. Cd2 kompleksine ait konsantrasyonların mitokondriyal transmembran potansiyel grafiği Şekil 4.20'de gösterilmiştir.



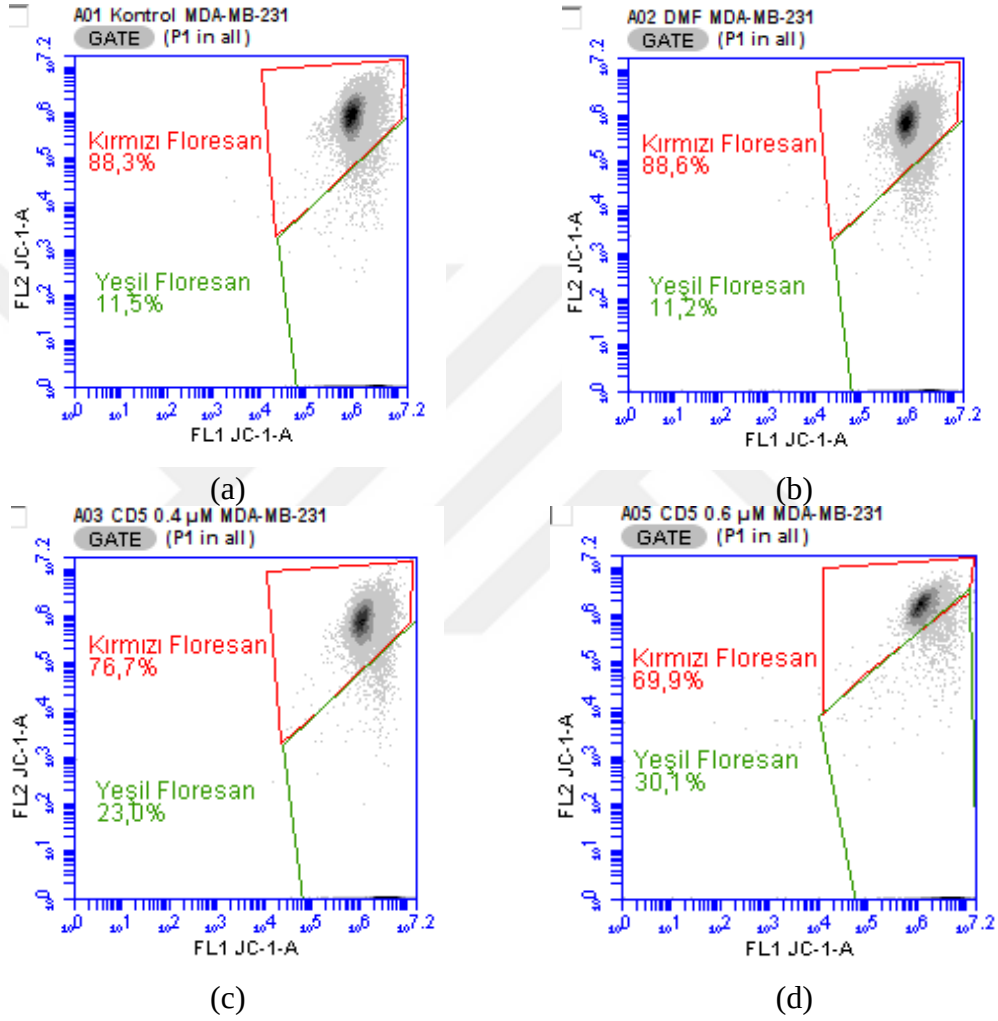


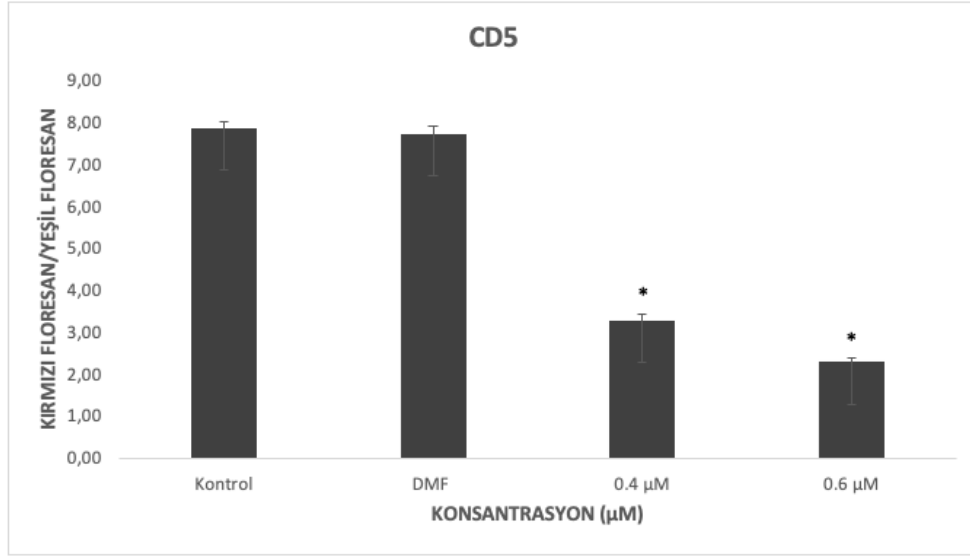
Şekil 4.20. Cd2 kompleksinin 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hattında mitokondriyal transmembran potansiyel üzerindeki etkileri, JC-1 boyama, a) Kontrol, b) DMF, c) 1.6 μM, d) 1.7 μM, e) hücrelerin transmembran potansiyel oranları bar grafiği, * $p < 0.001$.

4.4.3. MDA-MB-231 hücrelerinde Cd5 kompleksinin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi

MDA-MB-231 hücreleri 0,4μM ve 0,6μM Cd5 kompleksine 48 saat maruz bırakıldıktan sonra, JC-1 boyama ile mitokondri transmembran potansiyelinde meydana gelen değişimler akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Kontrol grubundaki hücrelerin %88,3'ünde kırmızı floresan (sağlıklı, polarize mitokondri membranı) ve %11,5'inde ise yeşil floresan (geçirgen, depolarize mitokondri membranı) ışına ölçülmüştür. Sonuçlar değerlendirildiğinde, 0,4μM Cd5 kompleksi uygulanan hücrelerde kontrole kıyasla yaklaşık 2 kat, 0,6μM Cd5 kompleksi uygulanan hücrelerde ise yaklaşık 3 kat artış belirlenmiştir. Bar grafikleri, kırmızı floresans/yeşil floresans oranı (mitokondri

transmembran polarizasyon oranı) hesaplanarak oluşturulmuştur. Sonuç olarak, Cd5 kompleksinin iki konsantrasyonu da mitokondri membran polarizasyonunu konsantrasyon bağımlı olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır. Cd5 kompleksine ait konsantrasyonların mitokondriyal transmembran potansiyel grafiği Şekil 4.21’de gösterilmiştir.



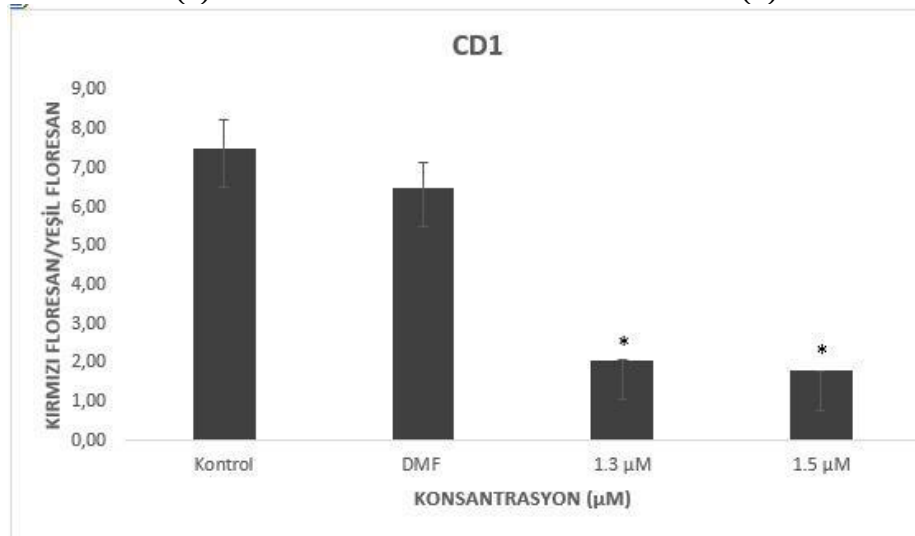
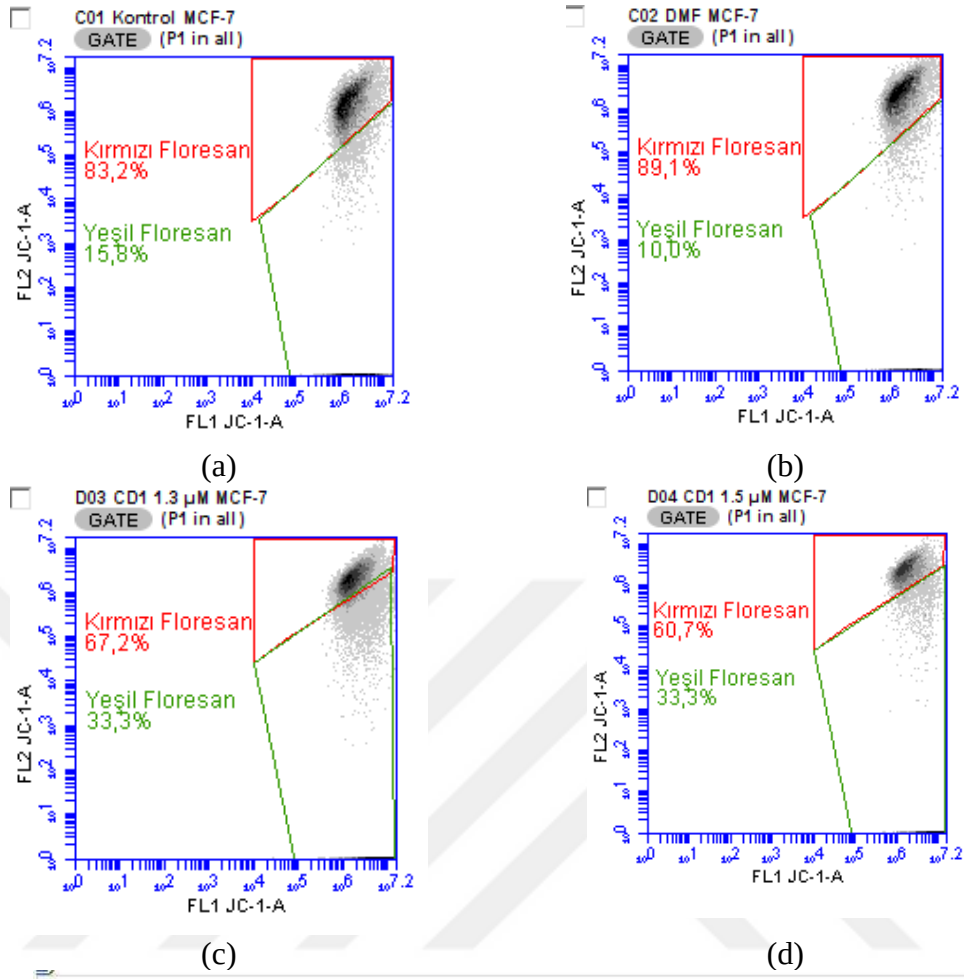


(e)

Şekil 4.21. Cd5 kompleksinin 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hattında mitokondriyal transmembran potansiyel üzerindeki etkileri, JC-1 boyama, a) Kontrol, b) DMF, c) 0.4 µM, d) 0.6 µM, e) hücrelerin transmembran potansiyel oranları bar grafiği, *p<0.001.

4.4.4. MCF-7 hücrelerinde Cd1 kompleksinin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi

1,3µM ve 1,5µM Cd1 kompleksine 48 saat maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde, JC-1 boyama yapılmış, mitokondri transmembran potansiyelinde meydana gelen değişimler akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Kontrol grubundaki hücrelerin %83,2'sinde kırmızı floresan (sağlıklı, polarize mitokondri membranı), %15,8'inde ise yeşil floresan (geçirgen, depolarize mitokondri membranı) ışıma ölçülmüştür. Genel olarak sonuçlara bakıldığında, Cd1 kompleksinin her iki konsantrasyonu uygulanan hücrelerde de yeşil floresan oranında 2 kat artış belirlenmiştir. Sonuç olarak, Cd1 kompleksi uygulanan MCF-7 hücrelerinde mitokondri transmembran potansiyeli, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır (depolarizasyon artmıştır). Bar grafikleri, kırmızı floresans/yeşil floresans oranı (mitokondri transmembran polarizasyon oranı) hesaplanarak oluşturulmuştur. Cd1 kompleksine ait konsantrasyonların mitokondriyal transmembran potansiyel grafiği Şekil 4.22'de gösterilmiştir.

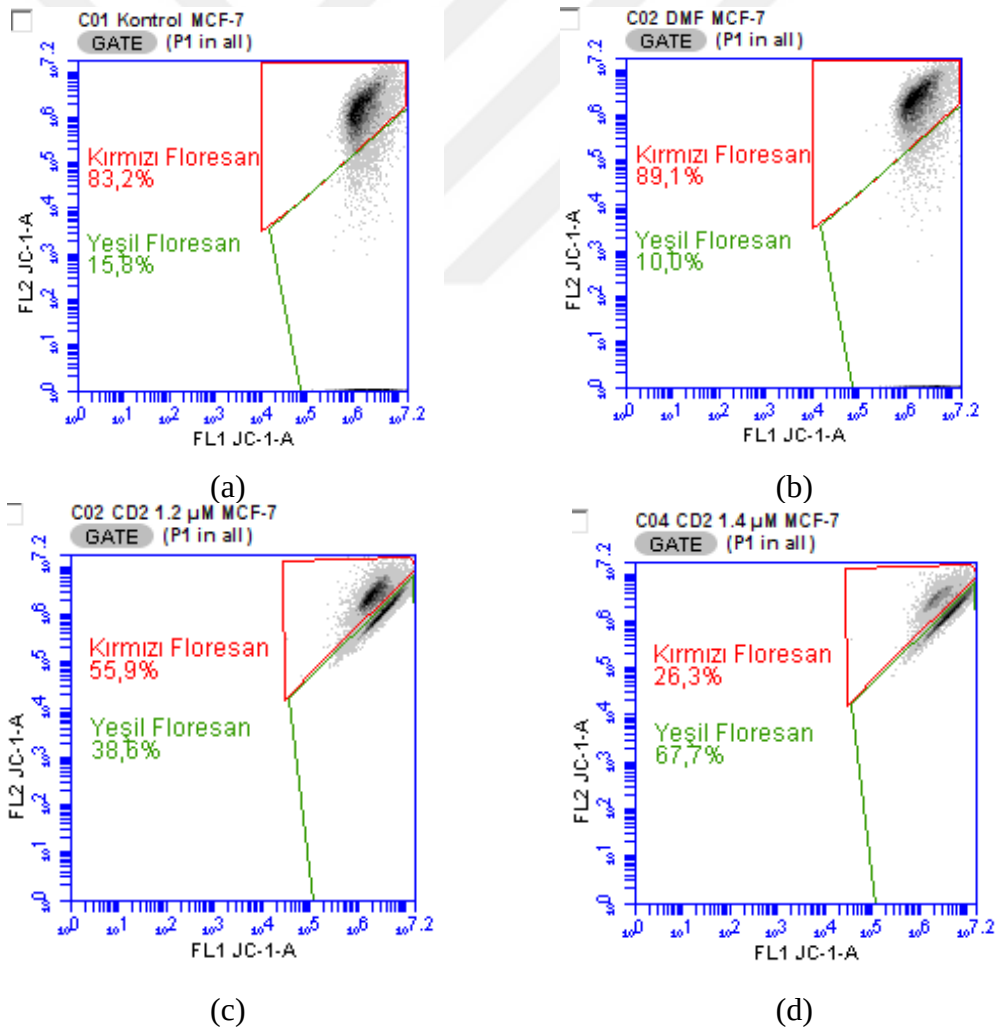


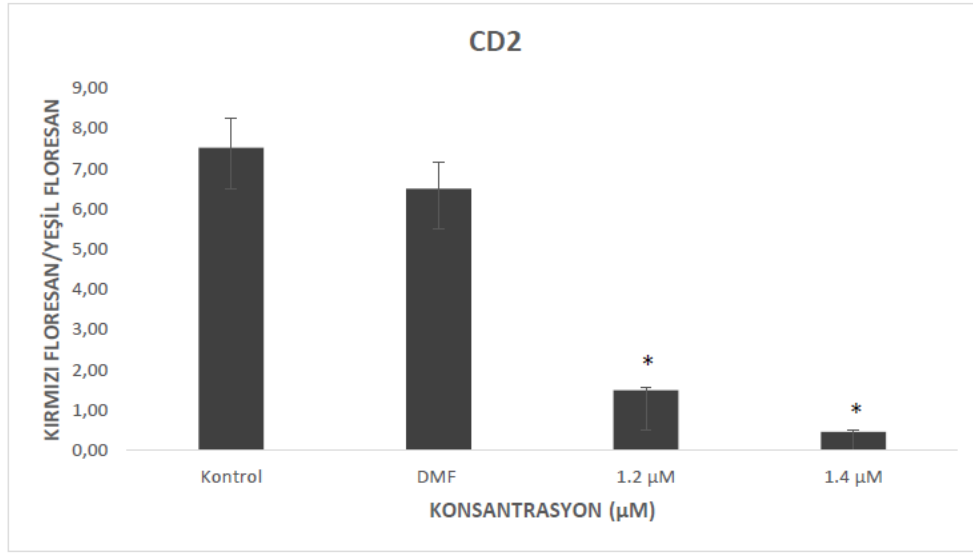
(e)

Şekil 4.22. Cd1 kompleksinin 48 saat süreyle MCF-7 hücre hattında mitokondriyal transmembran potansiyel üzerindeki etkileri, JC-1 boyama, a) Kontrol, b) DMF, c) 1.3 μ M, d) 1.5 μ M, e) hücrelerin transmembran potansiyel oranları bar grafiği, * $p < 0.001$.

4.4.5. MCF-7 hücrelerinde Cd2 kompleksinin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi

Aynı şekilde Cd2 kompleksinin etkin dozlarına 48 saat süre ile maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde mitokondri transmembran potansiyelinde meydana gelen değişimler JC-1 boyama ile akış sitometrisinde analiz edilmiştir. Yeşil floresan ışıma oranı 1,2 μ M konsantrasyonda kontrole göre 2,5 kat ve 1,4 μ M konsantrasyonda ise yaklaşık 4,5 kat artış göstermiştir. Sonuç olarak, Cd2 kompleksinin IC₃₀ ve IC₅₀ konsantrasyonları uygulanan hücrelerde, mitokondri transmembran potansiyelinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma, depolarizasyon görülmüştür. Cd2 kompleksine ait konsantrasyonların mitokondriyal transmembran potansiyel grafiği Şekil 4.23'de gösterilmiştir.



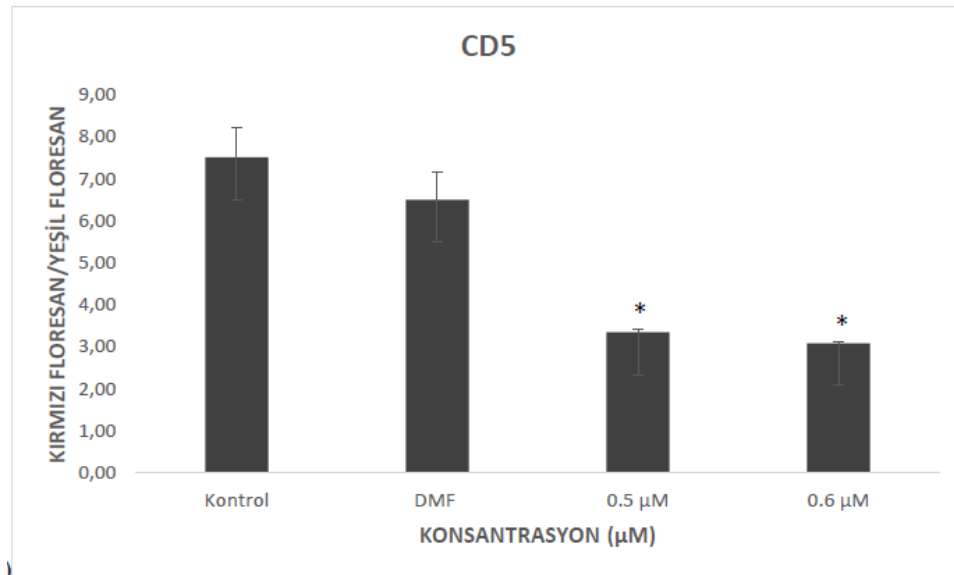
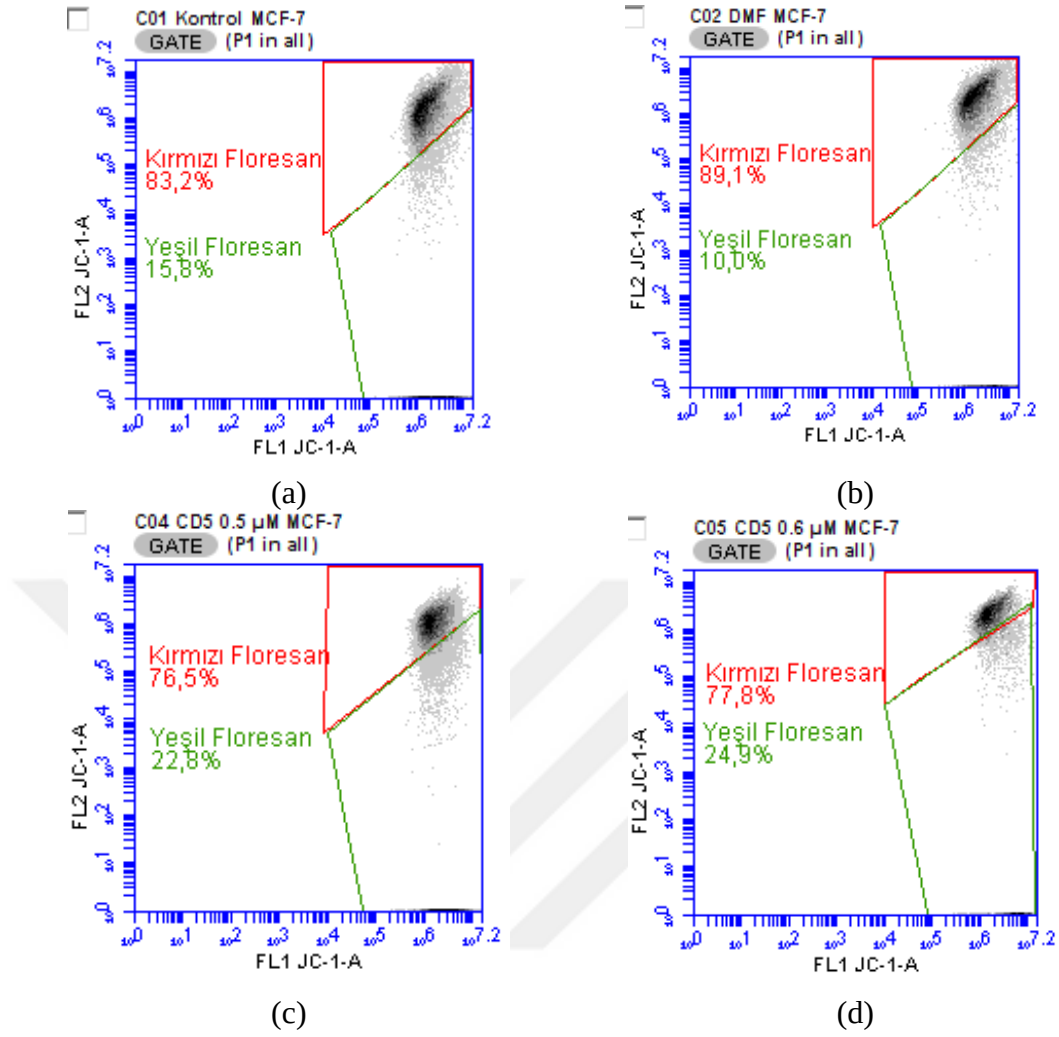


(e)

Şekil 4.23. Cd2 kompleksinin 48 saat süreyle MCF-7 hücre hattında mitokondriyal transmembran potansiyel üzerindeki etkileri, JC-1 boyama, a) Kontrol, b) DMF, c) 1.2 µM, d) 1.4 µM, e) hücrelerin transmembran potansiyel oranları bar grafiği, *p<0.001.

4.4.6. MCF-7 hücrelerinde Cd5 kompleksinin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi

Son olarak Cd5 kompleksinin etkin dozlarına 48 saat süre ile maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde mitokondri transmembran potansiyelinde meydana gelen değişimler, JC-1 boyama ile akış sitometrisinde analiz edilmiştir. Yeşil floresan ışıma oranı, 0,5µM ve 0,6µM konsantrasyonlarda kontrole göre yaklaşık 1,5 kat artış göstermiştir. Sonuç olarak, Cd5 kompleksinin IC₃₀ ve IC₅₀ konsantrasyonları uygulanan hücrelerde, mitokondri transmembran potansiyelinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma, depolarizasyon dikkati çekmiştir. Cd5 kompleksine ait mitokondriyal transmembran potansiyel grafiği Şekil 4.24’de gösterilmiştir.



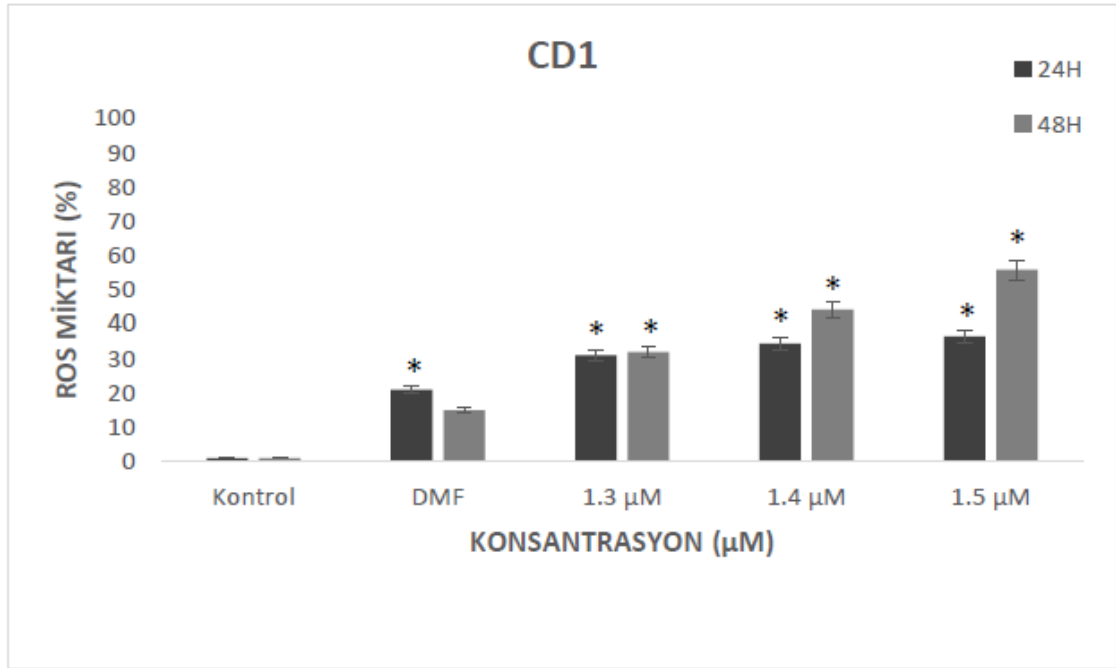
(e)

Şekil 4.24. Cd5 kompleksinin 48 saat süreyle MCF-7 hücre hattında mitokondriyal transmembran potansiyel üzerindeki etkileri, JC-1 boyama, a) Kontrol, b) DMF, c) 0.5 μ M, d) 0.6 μ M, e) hücrelerin transmembran potansiyel oranları bar grafiği, * $p < 0.001$.

4.5. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Ölçümü ile Apoptotik Aktivitenin Değerlendirilmesi

4.5.1. MDA-MB-231 hücrelerinde Cd1 kompleksinin ROS oluşumuna etkisi

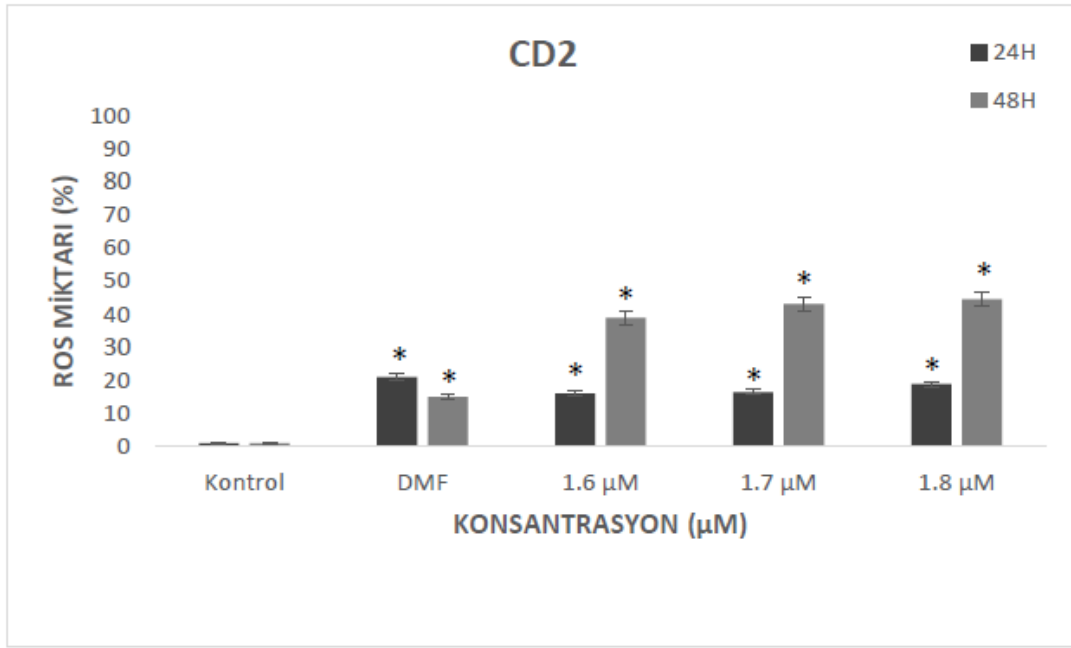
24 ve 48 saat süre ile Cd1 kompleksinin etkin dozlarına maruz bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde, ROS (Reaktif Oksijen Türleri) miktar ölçümü flourometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarında, ROS miktarında kontrole oranla istatistiksel derecede anlamlı, doza bağlı bir artış görülmüştür. Cd1 kompleksinin 1,3 μ M, 1,4 μ M ve 1,5 μ M konsantrasyonları uygulanan hücrelerde ROS seviyesi hem konsantrasyona hem de inkübasyon süresine doğru orantılı olarak artmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, negatif kontrol hücrelerinde sıfır olan ROS düzeyi, çözücü olan %0,1 DMF de yaklaşık %15-20 düzeyinde, test bileşeni uygulanmış tüm hücrelerde %30-55 seviyelerinde ölçülmüştür. Cd1 kompleksine ait konsantrasyonların uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinde ROS miktarlarını gösteren grafik Şekil 4.25’de gösterilmiştir.



Şekil 4.25. Cd1 kompleksinin 24 ve 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hattında ROS oluşumu üzerindeki etkilerini gösteren yüzde bar grafiği. * $p < 0.001$.

4.5.2. MDA-MB-231 hücrelerinde Cd2 kompleksinin ROS oluşumuna etkisi

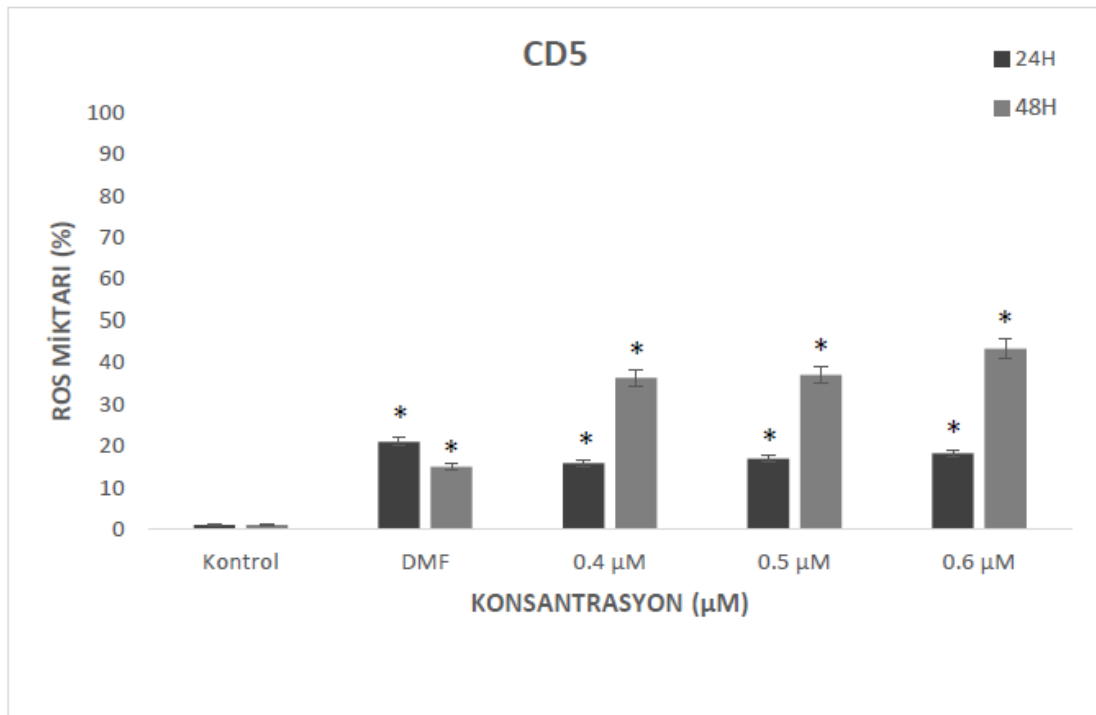
24 ve 48 saat süre ile Cd2 kompleksinin etkin dozlarına maruz bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde, ROS miktar ölçümü flourometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarında, ROS miktarlarında kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı, doza bağlı bir artış görülmüştür. Cd2 kompleksinin 1,6 μ M, 1,7 μ M ve 1,8 μ M konsantrasyonları uygulanan hücrelerde ROS seviyesi hem konsantrasyon hem de inkübasyon süresi ile paralel olarak artmıştır. 48 saatlik inkübasyon sonunda, negatif kontrol grubu hücrelerinde sıfır olarak ölçülen ROS seviyeleri, %0,1 DMF uygulanan hücrelerde %15-20 düzeyinde ve test bileşeni uygulanan hücrelerde ise %40-45 seviyelerinde ölçülmüştür. Cd2 kompleksine ait konsantrasyonların uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinde ROS miktarlarını gösteren grafik Şekil 4.26'da gösterilmiştir.



Şekil 4.26. Cd2 kompleksinin 24 ve 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hattında ROS oluşumu üzerindeki etkilerini gösteren yüzde bar grafiği. * $p < 0.001$.

4.5.3. MDA-MB-231 hücrelerinde Cd5 kompleksinin ROS oluşumuna etkisi

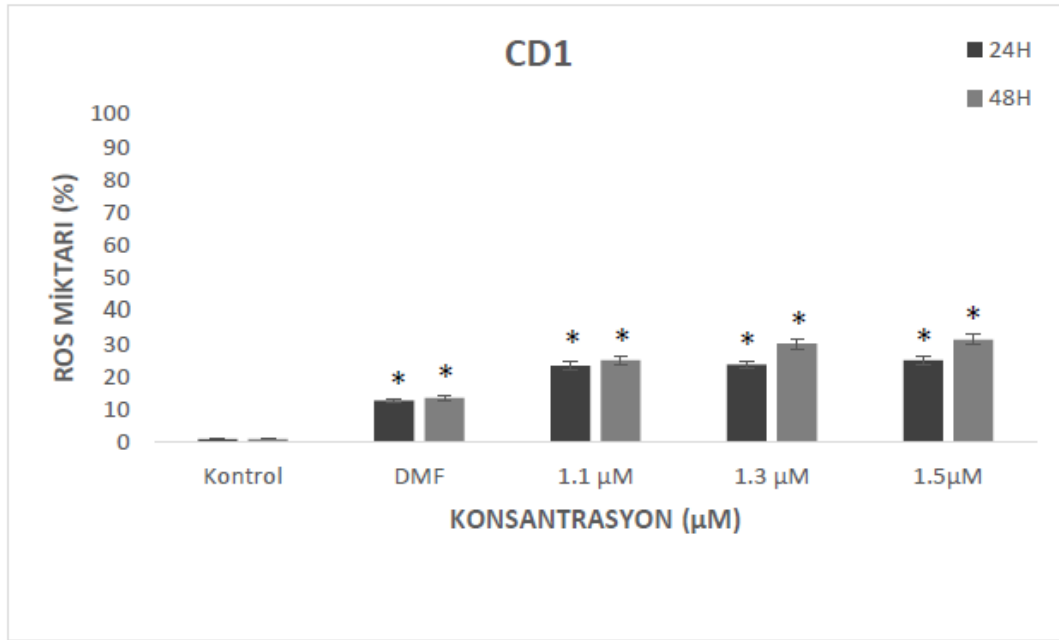
24 ve 48 saat süre ile Cd5 kompleksinin etkin dozlarına maruz bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde, ROS miktar ölçümü flourometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarında, ROS miktarının kontrole oranla ve doza bağlı olarak istatistiksel derecede anlamlı düzeyde yükseldiği görülmüştür. Cd5 kompleksinin 0,4 μ M, 0,5 μ M ve 0,6 μ M konsantrasyonları uygulanan hücrelerde ROS seviyesi hem konsantrasyon ile hem de inkübasyon süresi ile doğru orantılı olarak artmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, negatif kontrol hücrelerinde sıfır olan ROS seviyesi, çözücü olan %0,1 DMF de yaklaşık %15-20 düzeyinde, test bileşeni uygulanmış tüm hücrelerde %35-45 seviyelerinde ölçülmüştür. Cd5 kompleksine ait konsantrasyonların uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinde ROS miktarlarını gösteren grafik Şekil 4.27’de gösterilmiştir.



Şekil 4.27. Cd5 kompleksinin 24 ve 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hattında ROS oluşumu üzerindeki etkilerini gösteren yüzde bar grafiği. * $p < 0.001$.

4.5.4. MCF-7 hücrelerinde Cd1 kompleksinin ROS oluşumuna etkisi

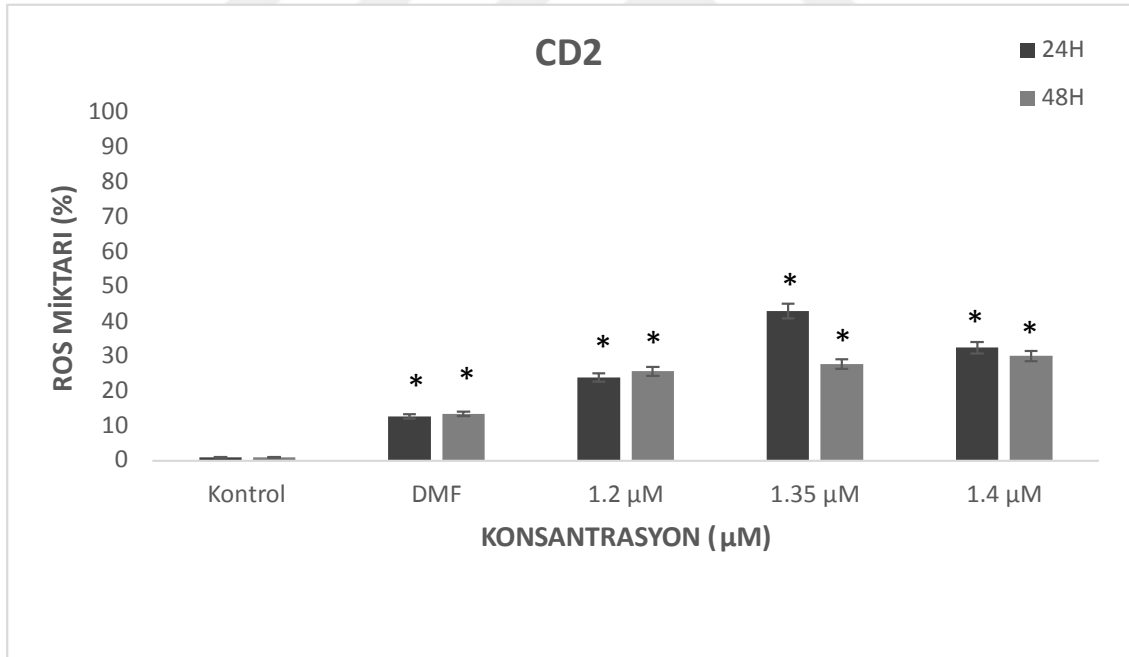
24 ve 48 saat süre ile Cd1 kompleksinin etkin dozları ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde, ROS miktar ölçümü flourometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarında, ROS miktarında kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı, doza bağlı bir artış görülmüştür. Cd1 kompleksinin 1,1 μ M, 1,3 μ M ve 1,5 μ M konsantrasyonları uygulanan hücrelerde ROS seviyesi hem konsantrasyona hem de inkübasyon süresine bağlı olarak artış göstermiştir. 48 saatlik inkübasyon süresi ardından, negatif kontrol grubu hücrelerinde sıfır olarak ölçülen ROS seviyeleri, çözücü kontrol grubunda %10 ve test bileşenlerinin uygulandığı tüm hücre gruplarında ise %22-32 seviyelerinde ölçülmüştür. Cd1 kompleksine ait konsantrasyonların uygulandığı MCF-7 hücrelerinde ROS miktarlarını gösteren grafik Şekil 4.28’de gösterilmiştir.



Şekil 4.28. Cd1 kompleksinin 24 ve 48 saat süreyle MCF-7 hücre hattında ROS oluşumu üzerindeki etkilerini gösteren yüzde bar grafiği. * $p < 0.001$.

4.5.5. MCF-7 hücrelerinde Cd2 kompleksinin ROS oluşumuna etkisi

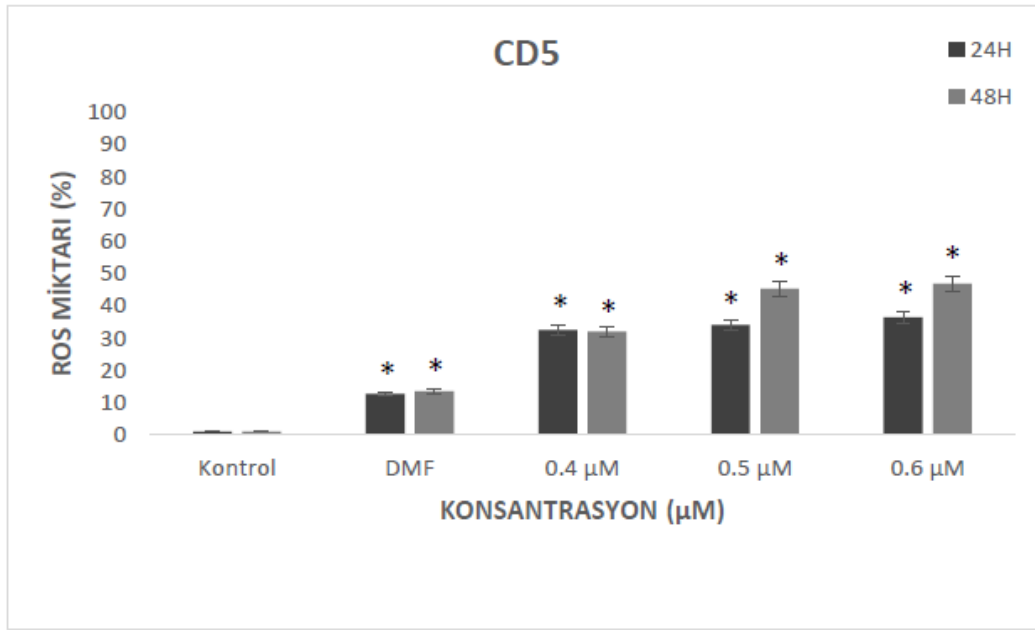
24 ve 48 saat süre ile Cd2 kompleksinin etkin dozları ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde, ROS miktar ölçümü flourometrik olarak ölçülmüştür. Deney gruplarında, ROS miktarında kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı ve doza bağlı bir artış görülmüştür. Cd2 kompleksinin 1,2µM, 1,35µM ve 1,4µM konsantrasyonları uygulanan hücrelerde ROS seviyesi hem konsantrasyon hem de inkübasyon süresi ile paralel olarak artmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, negatif kontrol hücrelerinde sıfır olan ROS düzeyi, çözücü olan %0,1 DMF de yaklaşık %10 düzeyinde ve test bileşeni uygulanmış tüm hücrelerde %25-35 seviyelerinde ölçülmüştür. Genel olarak konsantrasyonlarda süreyle bağlı bir artış gözlenirken, 1,35µM Cd2 kompleksi uygulanan hücrelerde, farklı olarak 24 saat ROS seviyesi %50'lerde bulunmuş ancak 48 saat sonunda yaklaşık %28 seviyelerine düşmüştür. Cd2 kompleksine ait konsantrasyonların uygulandığı MCF-7 hücrelerinde ROS miktarlarını gösteren grafik Şekil 4.29'da gösterilmiştir.



Şekil 4.29. Cd2 kompleksinin 24 ve 48 saat süreyle MCF-7 hücre hattında ROS oluşumu üzerindeki etkilerini gösteren yüzde bar grafiği *p<0.001.

4.5.6. MCF-7 hücrelerinde Cd5 kompleksinin ROS oluşumuna etkisi

24 ve 48 saat süre ile Cd5 kompleksinin etkin dozlarına maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde, ROS miktar ölçümü flourometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarında, ROS miktarında kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı, doza bağlı bir artış görülmüştür. Cd5 kompleksinin 0,4 μ M, 0,5 μ M ve 0,6 μ M konsantrasyonları uygulanan hücrelerdeki ROS seviyesi hem konsantrasyon hem de inkübasyon süresi ile doğru orantılı olarak artmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, negatif kontrol hücrelerinde sıfır olan ROS düzeyi, %0,1 DMF de yaklaşık %10 düzeyinde ve test bileşeni uygulanan tüm hücrelerde ise %30-40 seviyelerinde ölçülmüştür. Cd5 kompleksine ait konsantrasyonların uygulandığı MCF-7 hücrelerinde ROS miktarlarını gösteren grafik Şekil 4.30'da verilmiştir.



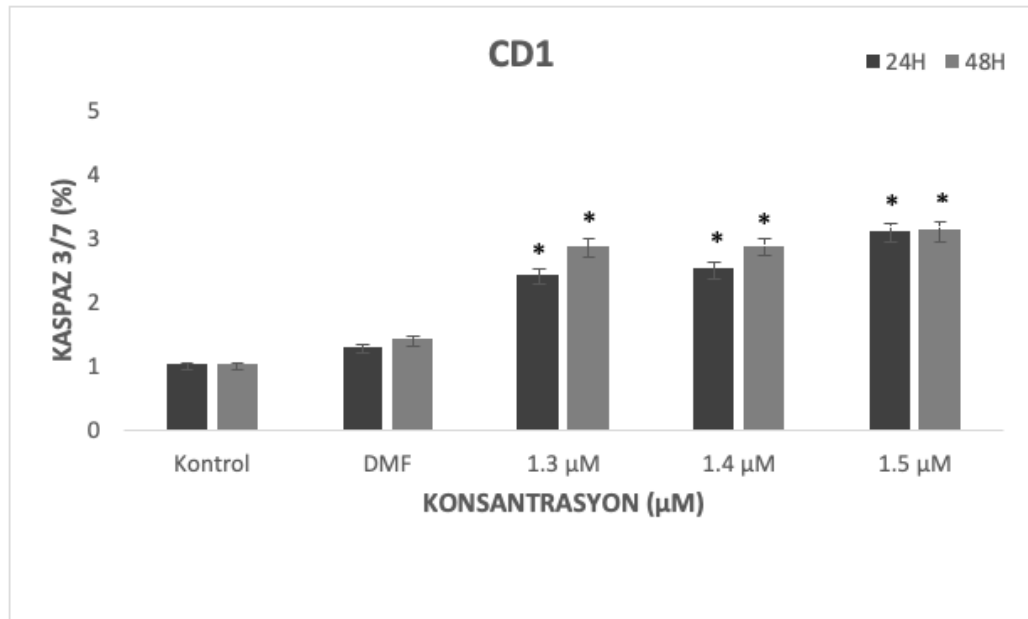
Şekil 4.30. Cd5 kompleksinin 24 ve 48 saat süreyle MCF-7 hücre hattında ROS oluşumu üzerindeki etkilerini gösteren yüzde bar grafiği * $p < 0.001$.

4.6. Kaspaz 3/7 Aktivasyonu Ölçümü ile Apoptoz Belirleme

4.6.1. MDA-MB-231 hücrelerinde Cd1 kompleksinin kaspaz 3/7 enzim aktivitesine etkisi

24 ve 48 saat süre ile Cd1 kompleksinin etkin dozları ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, kaspaz 3/7 enzim ölçümü flourometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarında, kontrole oranla aktif Kaspaz 3/7 oranında, istatistiksel olarak anlamlı doza bağlı artış görülmüştür. Negatif kontrol hücrelerinde 48 saatlik Kaspaz 3/7 aktivasyon oranı %1 iken, çözücü %0,1 DMF uygulanmış hücrelerde bu oran yaklaşık %1,4 civarında ölçülmüştür. 1,3 μ M ve 1,4 μ M Cd1 kompleksi uygulandığında ise Kaspaz 3/7 enzim aktivasyon oranı yaklaşık 2,5 kat artış gösterirken, 1,5 μ M Cd1 kompleksi uygulanan hücrelerde ise bu oran 3 kat yükselmiştir.

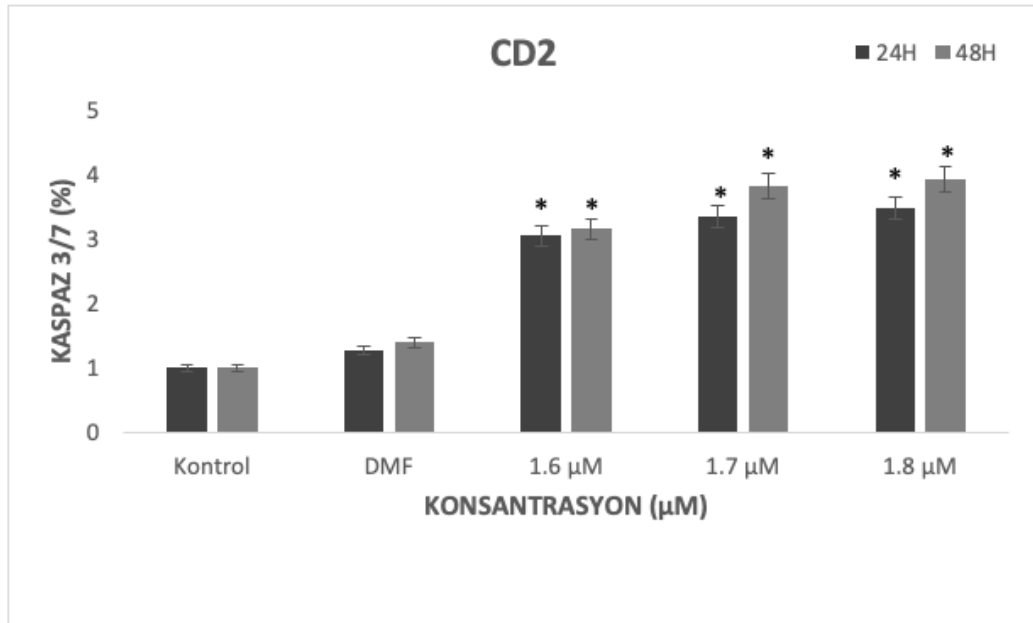
Cd1 kompleksine ait konsantrasyonların Kaspaz 3/7 aktivasyonu yüzde grafiği Şekil 4.31’de gösterilmiştir.



Şekil 4.31. Cd1 kompleksinin 24 ve 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hattında kaspaz 3/7 üzerindeki etkilerini gösteren yüzde bar grafiği * $p < 0.001$.

4.6.2. MDA-MB-231 hücrelerinde Cd2 kompleksinin kaspaz 3/7 enzim aktivitesine etkisi

24 ve 48 saat süre ile Cd2 kompleksinin etkin dozları ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, Kaspaz 3/7 enzim ölçümü flourometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarında, kontrole oranla aktif Kaspaz 3/7 oranında, istatistiksel olarak anlamlı doza bağlı artış görülmüştür. Negatif kontrol hücrelerinde 48 saatlik Kaspaz 3/7 enzim aktivasyonu oranı %1 olarak ölçülürken, çözücü %0,1 DMF uygulanmış hücrelerde bu oran %1,4'tür. Kaspaz 3/7 enzim aktivasyon oranı, 1,6 μ M Cd2 kompleksi uygulanan hücrelerde yaklaşık 3 kat artış göstermiş olup 1,7 μ M ve 1,8 μ M Cd2 kompleksi ile muamele edilen hücrelerde ise yaklaşık 4 katlık bir artış görülmüştür. Cd2 kompleksine ait konsantrasyonların Kaspaz 3/7 enzim aktivasyonu yüzde grafiği Şekil 4.32'de gösterilmiştir.

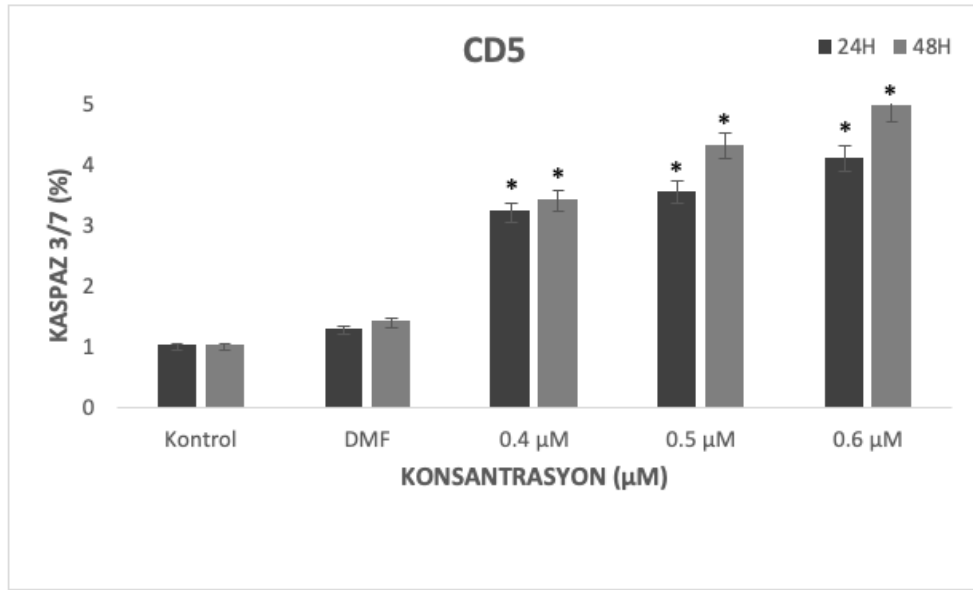


Şekil 4.32. Cd2 kompleksinin 24 ve 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hattında kaspaz 3/7 üzerindeki etkilerini gösteren yüzde bar grafiği * $p < 0.001$.

4.6.3. MDA-MB-231 hücrelerinde Cd5 kompleksinin kaspaz 3/7 enzim aktivitesine etkisi

24 ve 48 saat süre ile Cd5 kompleksinin etkin dozları ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, Kaspaz 3/7 enzim ölçümü flourometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarında, kontrole oranla aktif Kaspaz 3/7 oranında, istatistiksel olarak anlamlı

doza bağılı artış görülmüştür. Negatif kontrol hücrelerinde 48 saatlik Kaspaz 3/7 enzim aktivasyonu %1 iken, %0,1 DMF uygulanan hücre gruplarında enzim aktivasyonu yaklaşık %1,4 olarak ölçülmüştür. 0,4µM Cd5 kompleksi uygulanan hücrelerde Kaspaz 3/7 enzim aktivasyonunda yaklaşık 3,5 katlık bir artış belirlenmiştir. 0,5µM ve 0,6µM Cd5 kompleksi uygulanan hücrelerde ise enzim aktivasyon oranının yaklaşık 5 kat arttığı görülmüştür. Cd5 kompleksine ait konsantrasyonların Kaspaz 3/7 enzim aktivasyonu yüzde grafiği Şekil 4.33’de gösterilmiştir.



Şekil 4.33. Cd5 kompleksinin 24 ve 48 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hattında kaspaz 3/7 üzerindeki etkilerini gösteren yüzde bar grafiği * $p < 0.001$.

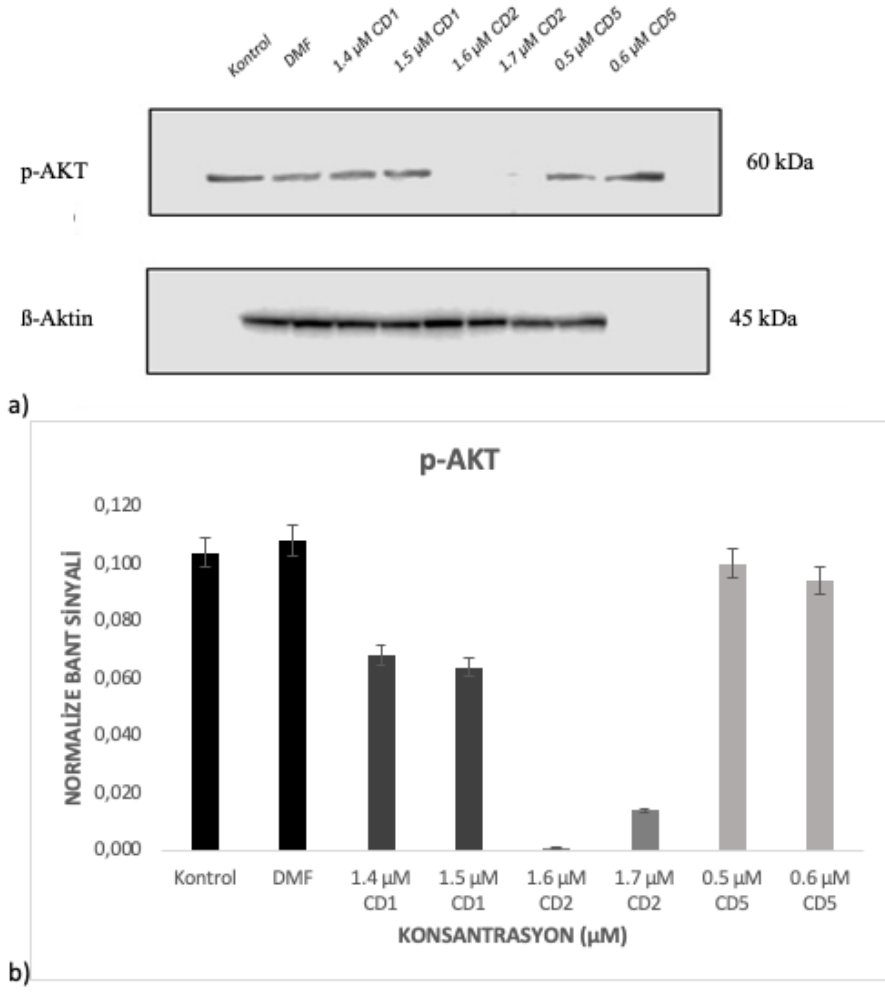
4.7. Western Blot Analizi

Tez çalışmasının bu aşamasında belirlenen genlerin rol aldığı yollarda efektör olarak rol alan proteinlerin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin hücre hatları üzerindeki fonksiyonel etkilerinin moleküler seviyede aydınlatılması amacıyla, her biri farklı bir moleküler yolda rol alan 6 adet efektör proteinin ekspresyon seviyelerindeki değişimler western blot analizi ile araştırılmıştır (tez çalışmasında kullanılan efektör proteinler Tablo 2’de gösterilmiştir). Çalışma kaynaklarının sınırlı olması ve tez deneyleri için kullanılması gereken sürenin sona ermesi sebebiyle her bir protein için sadece bir tekrar gerçekleştirilmiştir.

48 saat süre ile Cd1, Cd2 ve Cd5 kompleksinin IC₃₀ ve IC₅₀ konsantrasyonları ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, p-AKT, Siklin-E1, Kaspaz-3 (aktif ve inaktif), Kaspaz-8, p-mTOR, Beclin-1 proteinleri; MCF-7 hücrelerinde Siklin-E1, Kaspaz-8 ve Beclin-1 proteinleri ve “Housekeeping” protein olan β -Aktin’in ekspresyon seviyeleri Western blot yöntemi ile analiz edilmiştir. Protein bantlarının dansitometrik ölçümünden elde edilen absorbans değerleri, efektör protein sinyali/housekeeping protein sinyali formülü ile proteinlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimler hesaplanmış ve bar grafikleri oluşturulmuştur.

4.7.1. Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin MDA-MB-231 hücrelerinde hedeflenen proteinler üzerindeki etkileri

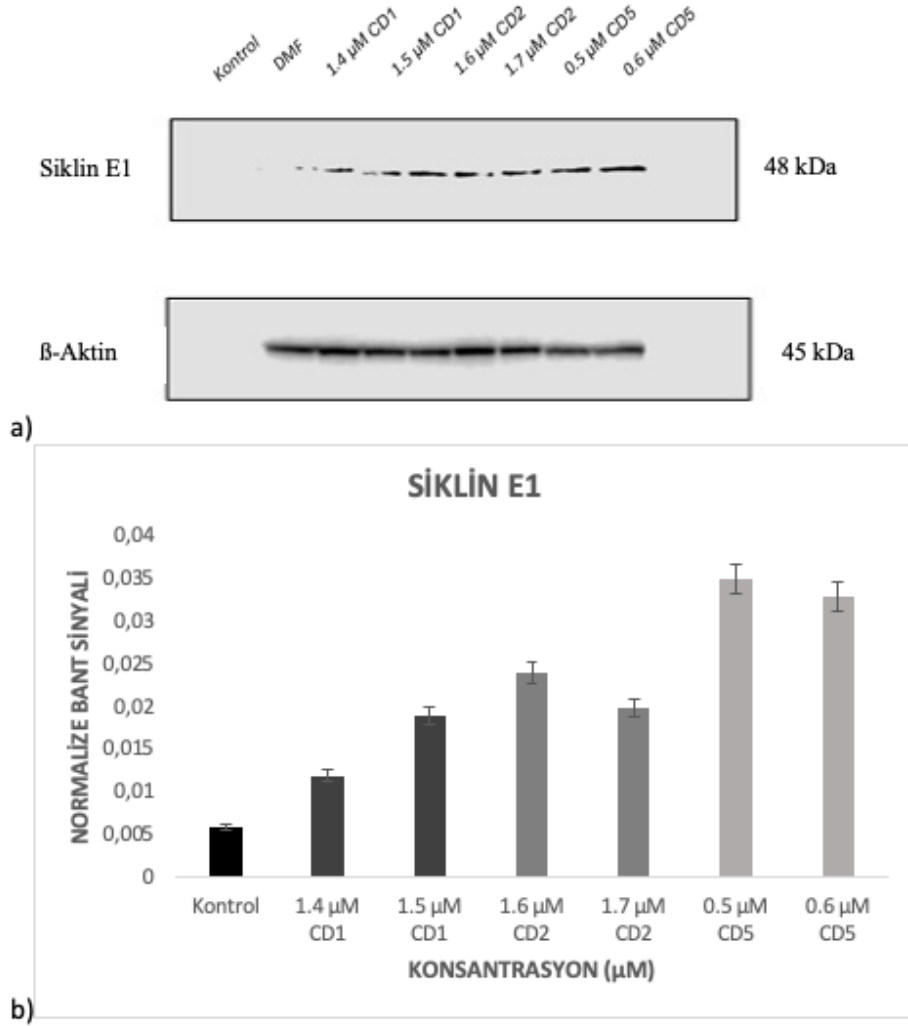
48 süre ile Cd1, Cd2 ve Cd5 komplekslerinin belirlenen konsantrasyonları ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde p-AKT protein ekspresyon seviyesi konsantrasyona bağlı olarak azalmıştır. Özellikle, 1,7 μ M Cd2 kompleksi p-AKT protein ekspresyonunu yaklaşık %80 oranında azaltmıştır. 1,6 μ M konsantrasyonu uygulanmış hücrelerde ise bir bant gözlenmemiştir. Cd1 kompleksi konsantrasyonlarının ise yaklaşık %40 oranında protein ekspresyon seviyesini düşürdüğü görülmüş olup, p-AKT ifadesi üzerindeki en düşük etki Cd5 kompleksi uygulanan hücrelerde görülmüştür. Cd1, Cd2 ve Cd5 kompleksine ait konsantrasyonların p-AKT protein ekspresyon seviyesine ait bar grafiği Şekil 4.34’de gösterilmiştir.



Şekil 4.34. Ditiyofosfonato Kadmiyum (II) komplekslerinin MDA-MB-231 hücre hattında p-AKT protein seviyesi üzerine etkileri. a) Sırasıyla; kontrol, DMF, 1.4 μM Cd1, 1.5 μM Cd1, 1.6 μM Cd2, 1.7 μM Cd2, 0.5 μM Cd5 ve 0.6 μM Cd5 uygulaması sonrası p-AKT (üstte) ve aynı membranda B-Aktin (altta) ekspresyonu. b) MDA-MB-231 hücre hattı için p-AKT proteininin, B-aktine göre hesaplanmış ve kontrol grubuna göre normalize edilmiş protein ekspresyon seviyelerini gösteren bar grafiği (bant sinyal yoğunlukları üzerinden hesaplanmıştır).

MDA-MB-231 hücreleri, 48 saat süre ile Cd1, Cd2 ve Cd5 komplekslerinin IC₃₀ ve IC₅₀ konsantrasyonları ile muamele edilmiş hücrelerden izole edilen Siklin-E1'nin ekspresyon seviyesi, aynı membran üzerindeki β-Aktin'e göre analiz edildiğinde; Siklin-E1 protein ifadesinin kontrol grubuna oranla arttığı görülmüştür. Özellikle Cd5 kompleksinin konsantrasyonları, Siklin-E1 protein ekspresyon seviyesi üzerinde yaklaşık 8 katlık bir artışa sebep olmuştur. Cd2 kompleksi konsantrasyonlarının ise protein ekspresyon seviyesini yaklaşık 5 kat yükselttiği görülmüş olup Siklin-E1 ifadesi üzerindeki en düşük etki Cd1 kompleksi uygulanan hücrelerde (yaklaşık üç buçuk kat'lık

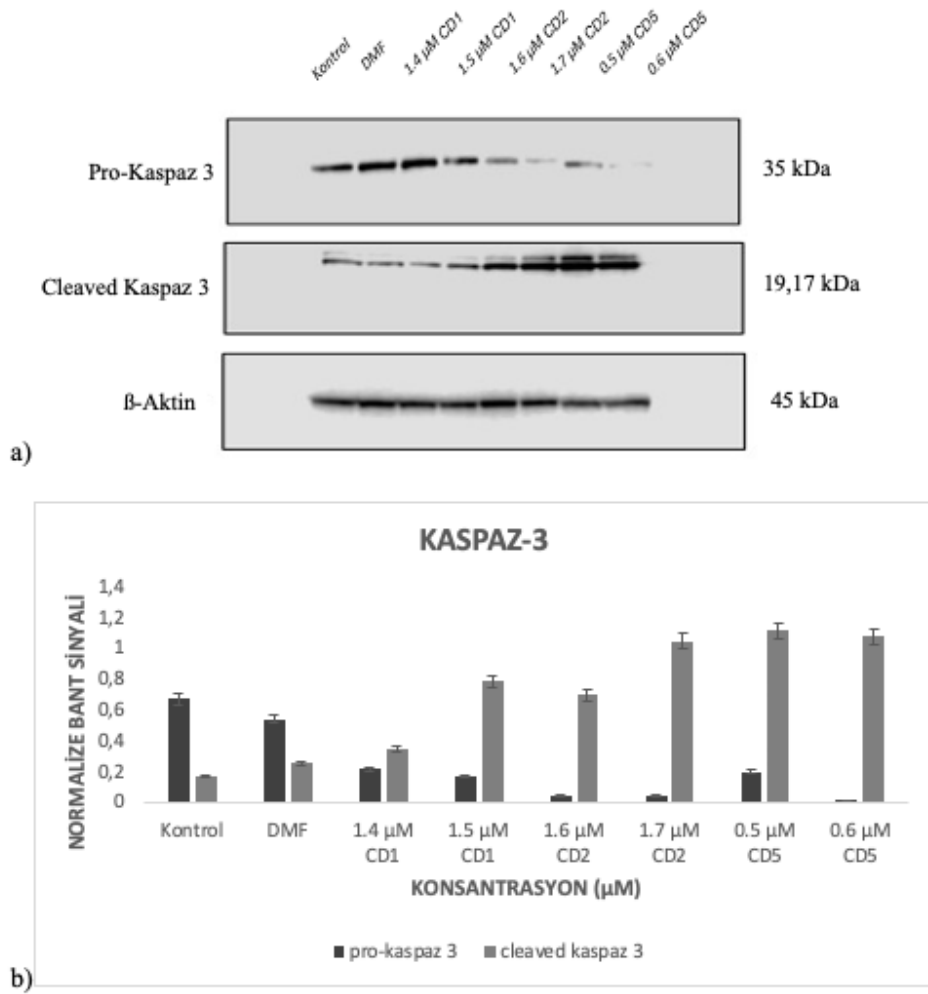
bir azalma) görülmüştür. Cd1, Cd2 ve Cd5 kompleksine ait konsantrasyonların Siklin-E1 protein ekspresyon seviyesine ait bar grafiği Şekil 4.35’de gösterilmiştir.



Şekil 4.35. Ditiyofosfonato Kadmiyum (II) komplekslerinin MDA-MB-231 hücre hattında Siklin-E1 protein seviyesi üzerine etkileri. a) Sırasıyla; kontrol, DMF, 1.4 μM Cd1, 1.5 μM Cd1, 1.6 μM Cd2, 1.7 μM Cd2, 0.5 μM Cd5 ve 0.6 μM Cd5 uygulaması sonrası Siklin-E1 (üstte) ve aynı membranda B-Aktin (altta) ekspresyonu. b) MDA-MB-231 hücre hattı için Siklin-E1 proteininin, B-aktine göre hesaplanmış ve kontrol grubuna göre normalize edilmiş protein ekspresyon seviyelerini gösteren bar grafiği (bant sinyal yoğunlukları üzerinden hesaplanmıştır).

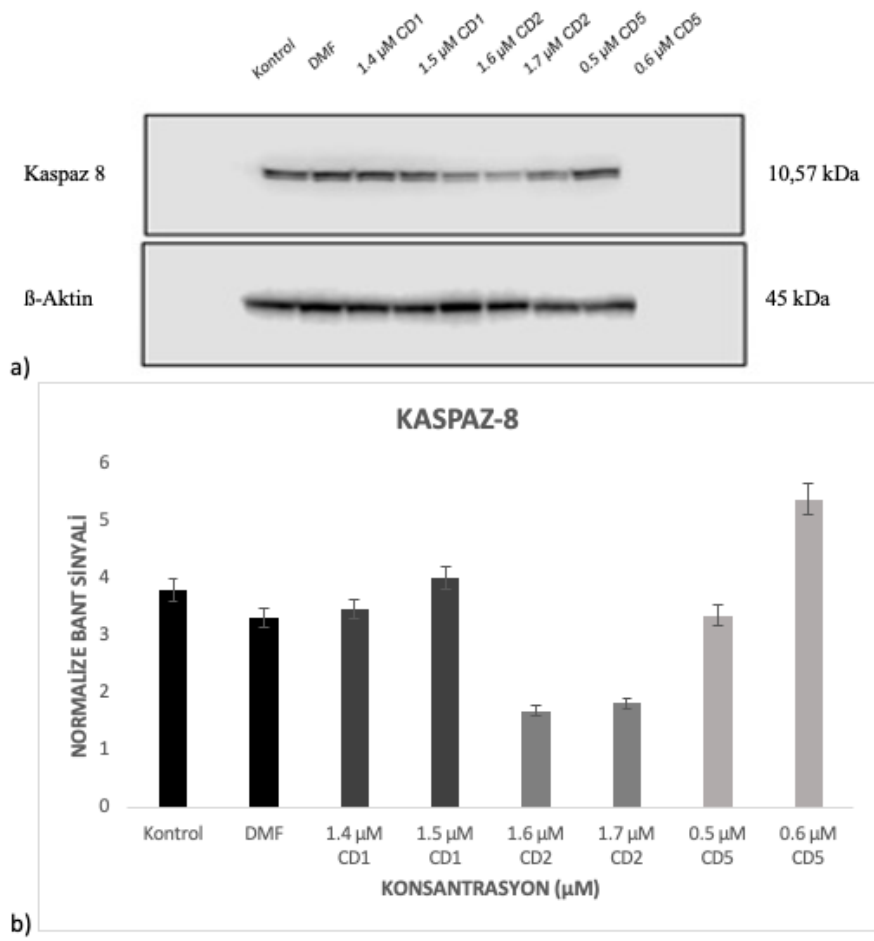
MDA-MB-231 hücreleri, 48 saat süre ile Cd1, Cd2 ve Cd5 komplekslerinin IC₃₀ ve IC₅₀ konsantrasyonları ile muamele edilmiş hücrelerden izole edilen Kaspaz-3 proteinin aktif ve inaktif fomlarının seviyesi, aynı membran üzerindeki β-Aktin’e göre analiz edildiğinde; genel olarak pro-kaspaz 3 (inaktif form) protein ifadesinin kontrol grubuna

oranla yaklaşık 3 katı azaldığı ve buna bağlı olarak cleaved kaspaz 3 (aktif form) seviyesinin de aynı oranda yükseldiği görülmüştür. Flourometrik olarak ölçülen aktif Kaspaz 3/7 seviyeleri ile western blot'dan elde edilen Kaspaz 3 protein ekspresyon seviyelerinin birbirini destekler nitelikte olduğu belirlenmiştir. Cd1, Cd2 ve Cd5 kompleksine ait konsantrasyonların Kaspaz 3 protein ekspresyon seviyelerine ait bar grafiği Şekil 4.36'da gösterilmiştir.



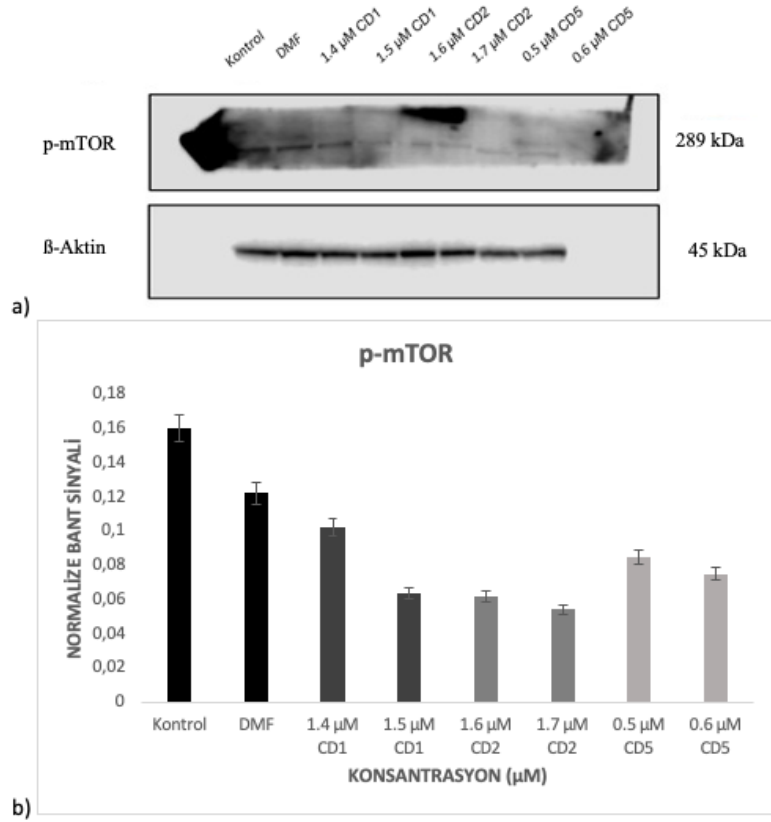
Şekil 4.36. Ditiyofosfonato Kadmiyum (II) komplekslerinin MDA-MB-231 hücre hattında Kaspaz-3 protein seviyesi üzerine etkileri. a) Sırasıyla; kontrol, DMF, 1.4 μ M Cd1, 1.5 μ M Cd1, 1.6 μ M Cd2, 1.7 μ M Cd2, 0.5 μ M Cd5 ve 0.6 μ M Cd5 uygulaması sonrası prokaspaz-3 (üstte), cleaved kaspaz-3 (altta) ve aynı membranda B- Aktin (altta) ekspresyonu. b) MDA-MB-231 hücre hattı için Kaspaz-3 proteininin, B-aktine göre hesaplanmış ve kontrol grubuna göre normalize edilmiş protein ekspresyon seviyelerini gösteren bar grafiği (bant sinyal yoğunlukları üzerinden hesaplanmıştır).

MDA-MB-231 hücrelerinde Kaspaz 8 protein seviyesi aynı membran üzerindeki β -Aktin seviyesiyle kıyaslandığında; Kaspaz 8 protein ekspresyon seviyesinin, Cd1 kompleksi konsantrasyonu uygulanan hücrelerde negatif kontrol grubuna göre zayıf bir artış gösterdiği, Cd2 kompleksi uygulanan hücrelerde ise 2 kat azaldığı belirlenmiştir. 0,6 μ M Cd5 kompleksi uygulanan hücrelerde yaklaşık 1 kat yükselirken 0,5 μ M Cd5 kompleksi uygulandığında ise zayıf bir azalma görülmüştür. Cd1, Cd2 ve Cd5 kompleksine ait konsantrasyonların Kaspaz-8 protein ekspresyon seviyesine ait bar grafiği Şekil 4.37’de gösterilmiştir.



Şekil 4.37. Ditiyofosfonato Kadmiyum (II) komplekslerinin MDA-MB-231 hücre hattında Kaspaz-8 protein seviyesi üzerine etkileri. a) Sırasıyla; kontrol, DMF, 1.4 μ M Cd1, 1.5 μ M Cd1, 1.6 μ M Cd2, 1.7 μ M Cd2, 0.5 μ M Cd5 ve 0.6 μ M Cd5 uygulaması sonrası kaspaz-8 (üstte) ve aynı membranda B-Aktin (altta) ekspresyonu. b) MDA-MB-231 hücre hattı için Kaspaz-8 proteininin, B-aktine göre hesaplanmış ve kontrol grubuna göre normalize edilmiş protein ekspresyon seviyelerini gösteren bar grafiği (bant sinyal yoğunlukları üzerinden hesaplanmıştır).

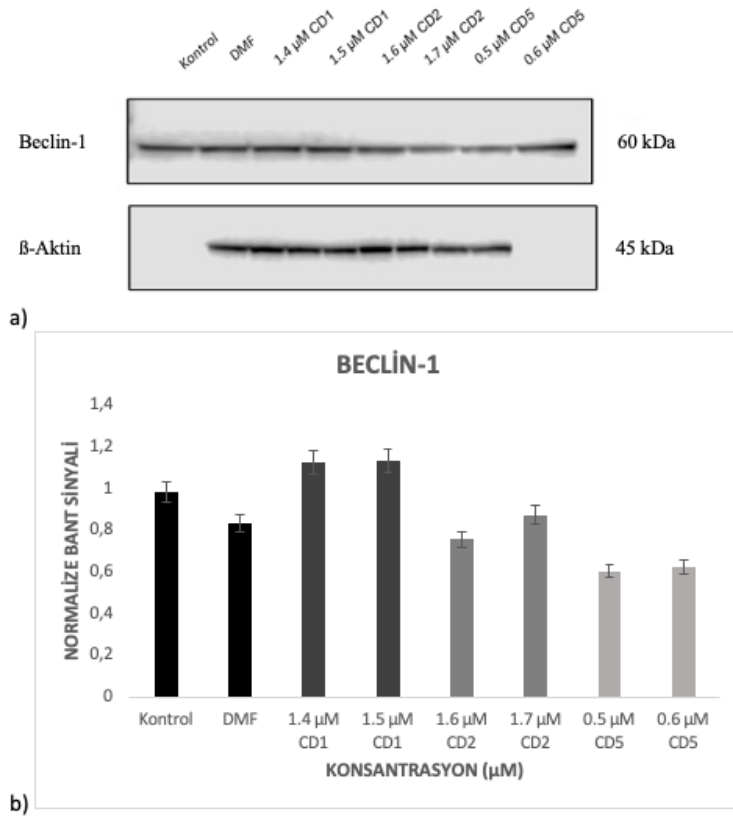
MDA-MB-231 hücreleri, 48 saat süre ile Cd1, Cd2 ve Cd5 komplekslerinin IC₃₀ ve IC₅₀ konsantrasyonları ile muamele edilmiş ve ardından aynı membran üzerindeki p-mTOR ve β -Aktin protein seviyeleri kıyaslanmıştır. Genel olarak; p-mTOR protein ifadesinin kontrol grubuna oranla azaldığı görülmüştür. Özellikle Cd2 kompleksinin konsantrasyonları, p-mTOR protein ekspresyon seviyesi üzerinde yaklaşık 3,5 katlık bir düşüşe sebep olmuştur. Cd1 kompleksi uygulandığında yaklaşık bir buçuk kat, Cd5 uygulandığında ise 2 kat'lık artış dikkat çekmektedir. Cd1, Cd2 ve Cd5 kompleksine ait konsantrasyonların p-mTOR protein ekspresyon seviyesine ait bar grafiği Şekil 4.38'de gösterilmiştir.



Şekil 4.38. Ditiyofosfonato Kadmiyum (II) komplekslerinin MDA-MB-231 hücre hattında p-mTOR protein seviyesi üzerine etkileri. a) Sırasıyla; kontrol, DMF, 1.4 μ M Cd1, 1.5 μ M Cd1, 1.6 μ M Cd2, 1.7 μ M Cd2, 0.5 μ M Cd5 ve 0.6 μ M Cd5 uygulaması sonrası p-mTOR (üstte) ve aynı membranda β -Aktin (altta) ekspresyonu. b) MDA-MB-231 hücre hattı için p-mTOR proteininin, β -aktine göre hesaplanmış ve kontrol grubuna göre normalize edilmiş protein ekspresyon seviyelerini gösteren bar grafiği (bant sinyal yoğunlukları üzerinden hesaplanmıştır).

MDA-MB-231 hücrelerinde kadmiyum kompleksleri uygulamasının ardından , aynı membran üzerinde efektör protein olan Beclin-1 ve “Housekeeping” protein olan β -Aktin

ekspresyon seviyeleri Western blot yöntemi ile analiz edilmiştir. Protein bantlarının ölçümünden elde edilen sinyaller, efektör proteininin ekspresyon seviyesindeki değişimlerin analiz edilmesi amacıyla, efektör protein sinyali/housekeeping protein sinyali formülasyonu ile hesaplanarak bar grafikleri oluşturulmuştur. 48 süre ile Cd1, Cd2 ve Cd5 komplekslerinin belirlenen konsantrasyonları ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, Beclin-1 ifadesinin belirgin bir şekilde değişmediği görülmüştür. Cd1 kompleksi konsantrasyonu uygulanan hücrelerde, Beclin-1 seviyesinde hafif bir yükseliş, Cd2 ve Cd5 komplekslerine ait konsantrasyonların uygulandığı hücrelerdeki Beclin-1 seviyesinde ise negatif kontrol grubuna oranla protein ifadesinin azaldığı görülmüştür. Cd1, Cd2 ve Cd5 kompleksine ait konsantrasyonların Beclin-1 protein ekspresyon seviyesine ait bar grafiği Şekil 4.39'da gösterilmiştir.

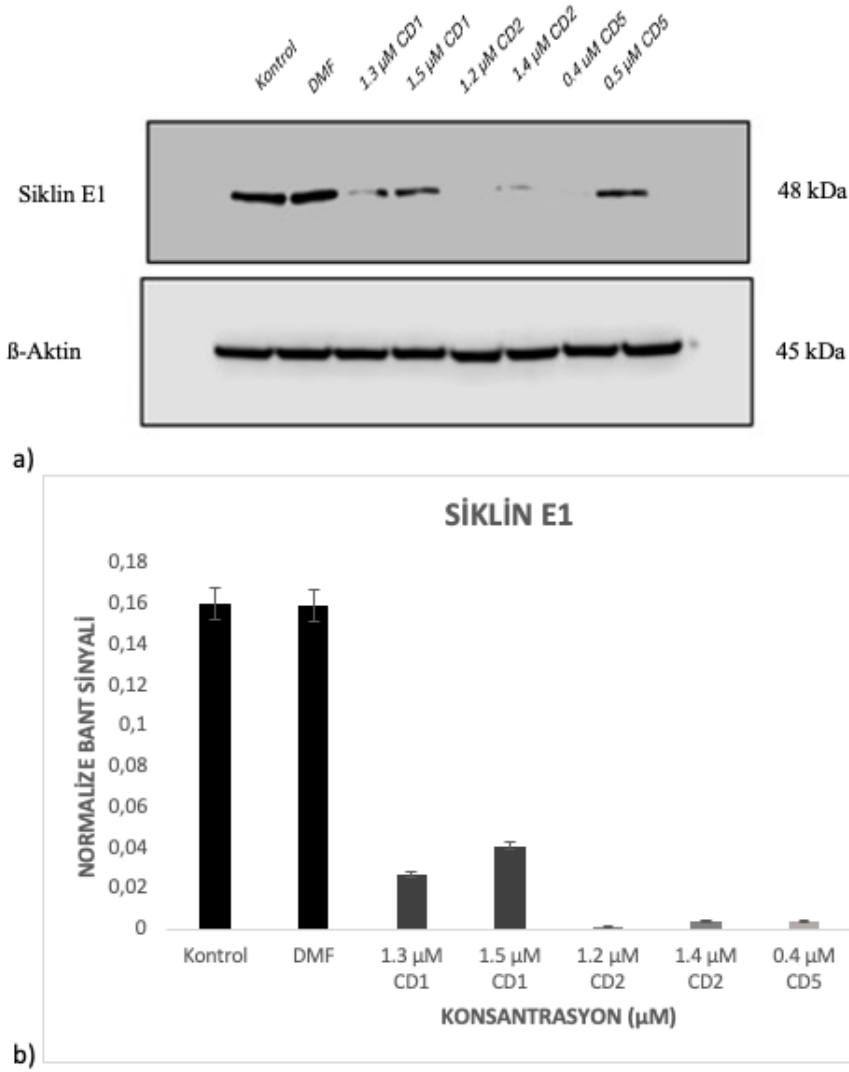


Şekil 4.39. Ditiyofosfonato Kadmiyum (II) komplekslerinin MDA-MB-231 hücre hattında Beclin-1 protein seviyesi üzerine etkileri. a) Sırasıyla; kontrol, DMF, 1.4 μM Cd1, 1.5 μM Cd1, 1.6 μM Cd2, 1.7 μM Cd2, 0.5 μM Cd5 ve 0.6 μM Cd5 uygulaması sonrası Beclin-1 (üstte) ve aynı membranda β-Aktin (altta) ekspresyonu. b) MDA-MB-231 hücre hattı için Beclin-1 proteininin, β-aktine göre hesaplanmış ve kontrol grubuna göre normalize edilmiş protein ekspresyon seviyelerini gösteren bar grafiği (bant sinyal yoğunlukları üzerinden hesaplanmıştır).

4.7.2. Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin MCF-7 hücrelerinde hedeflenen proteinler üzerindeki etkileri

Ditiyofosfonato Kadmiyum (II) komplekslerinin hücre hatları üzerindeki fonksiyonel etkilerinin moleküler seviyede aydınlatılması amacıyla, her biri farklı bir moleküler yolda rol alan 3 adet efektör proteinin (Siklin-E1, Kaspaz-8, Beclin-1) ekspresyon seviyelerindeki değişimler western blot analizi ile MCF-7 hücre hattı üzerinde araştırılmıştır. Çalışma kaynaklarının sınırlı olması ve tez deneyleri için kullanılması gereken sürenin sona ermesi sebebiyle her bir protein için sadece bir tekrar gerçekleştirilebilmiştir. Aşağıdaki şekillerde sonuçları verilen 3 protein dışında kalan 2 proteinin (p-mTOR ve p-AKT) ekspresyonu tespit edilememiştir.

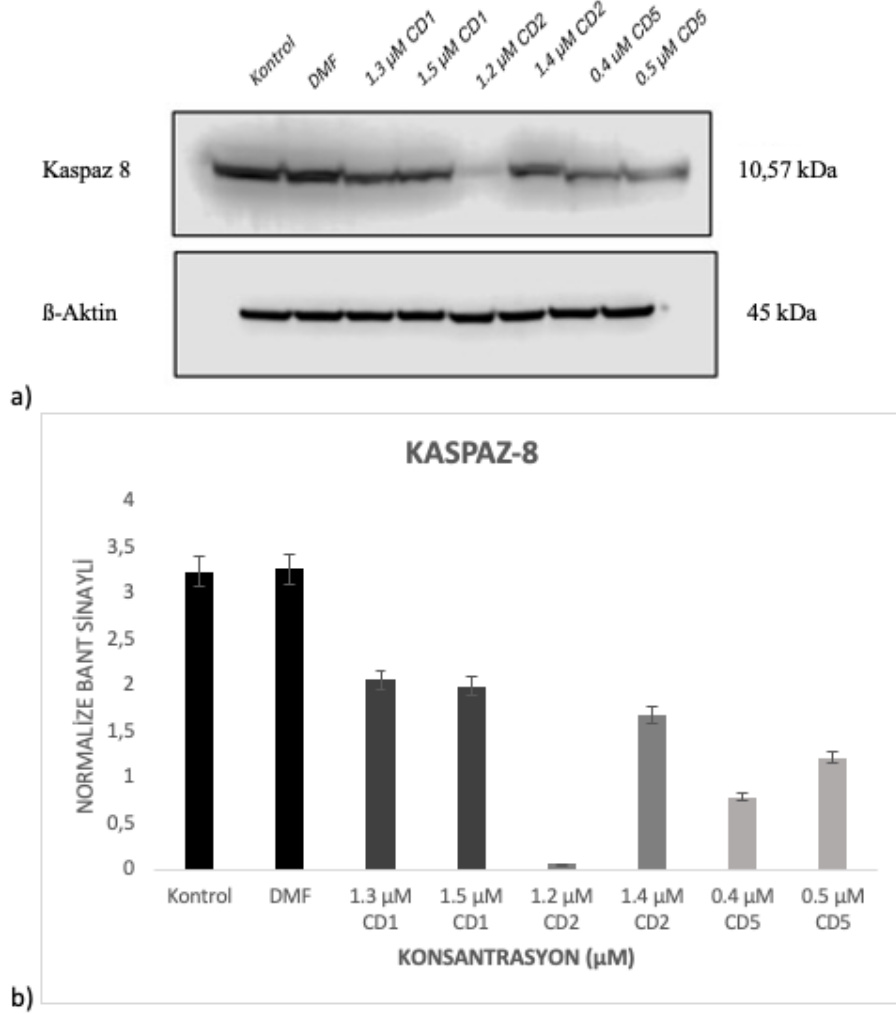
MCF-7 hücrelerinde, 48 saat süre ile Cd1, Cd2 ve Cd5 komplekslerinin IC₃₀ ve IC₅₀ konsantrasyonları ile muamele edilmiş ve aynı membran üzerindeki Siklin-E1 ve β -Aktin proteinlerinin ekspresyon seviyeleri kıyaslanmıştır. Cd2 ve Cd5 kompleksi uygulanan hücrelerde, Siklin-E1 protein ekspresyon seviyesi kontrol grubuna oranla yaklaşık 16 kat azalmıştır. Cd1 kompleksi konsantrasyonlarının ise Siklin-E1 protein ekspresyonu üzerinde yaklaşık 5 katlık bir azalışa sebep olduğu görülmüştür. Cd1, Cd2 ve Cd5 kompleksine ait konsantrasyonların Siklin-E1 protein ekspresyon seviyesine ait bar grafiği Şekil 4.40'da gösterilmiştir.



Şekil 4.40. Ditiyofosfonato Kadmiyum (II) komplekslerinin MCF-7 hücre hattında Siklin-E1 protein seviyesi üzerine etkileri. a) Sırasıyla; kontrol, DMF, 1.3 μM Cd1, 1.5 μM Cd1, 1.2 μM Cd2, 1.4 μM Cd2, 0.4 μM Cd5 ve 0.5 μM Cd5 uygulaması sonrası Siklin-E1 (üstte) ve aynı membranda B-Aktin (altta) ekspresyonu. b) MCF-7 hücre hattı için Siklin-E1 proteininin, B-aktine göre hesaplanmış ve kontrol grubuna göre normalize edilmiş protein ekspresyon seviyelerini gösteren bar grafiği (bant sinyal yoğunlukları üzerinden hesaplanmıştır).

MCF-7 hücrelerinde, 48 saat süre ile Cd1, Cd2 ve Cd5 komplekslerinin IC₃₀ ve IC₅₀ konsantrasyonları ile muamele edilmiş ve aynı membran üzerindeki Kaspaz-8 ve β-Aktin proteinlerinin ekspresyon seviyeleri kıyaslanmıştır. Cd2 ve Cd5 kompleksi uygulanan hücrelerde, Kaspaz 8 protein ekspresyon seviyesinin genel olarak negatif kontrol grubuna kıyasla azaldığı görülmüştür. Protein ekspresyon seviyesinde, özellikle Cd2 ve Cd5 kompleksi konsantrasyonu uygulanan hücrelerde, sırasıyla 2 buçuk ve 2 kat azalma görülürken, Cd1 kompleksi etkisiyle Kaspaz-8 protein seviyesinde bir buçuk kat'lık bir

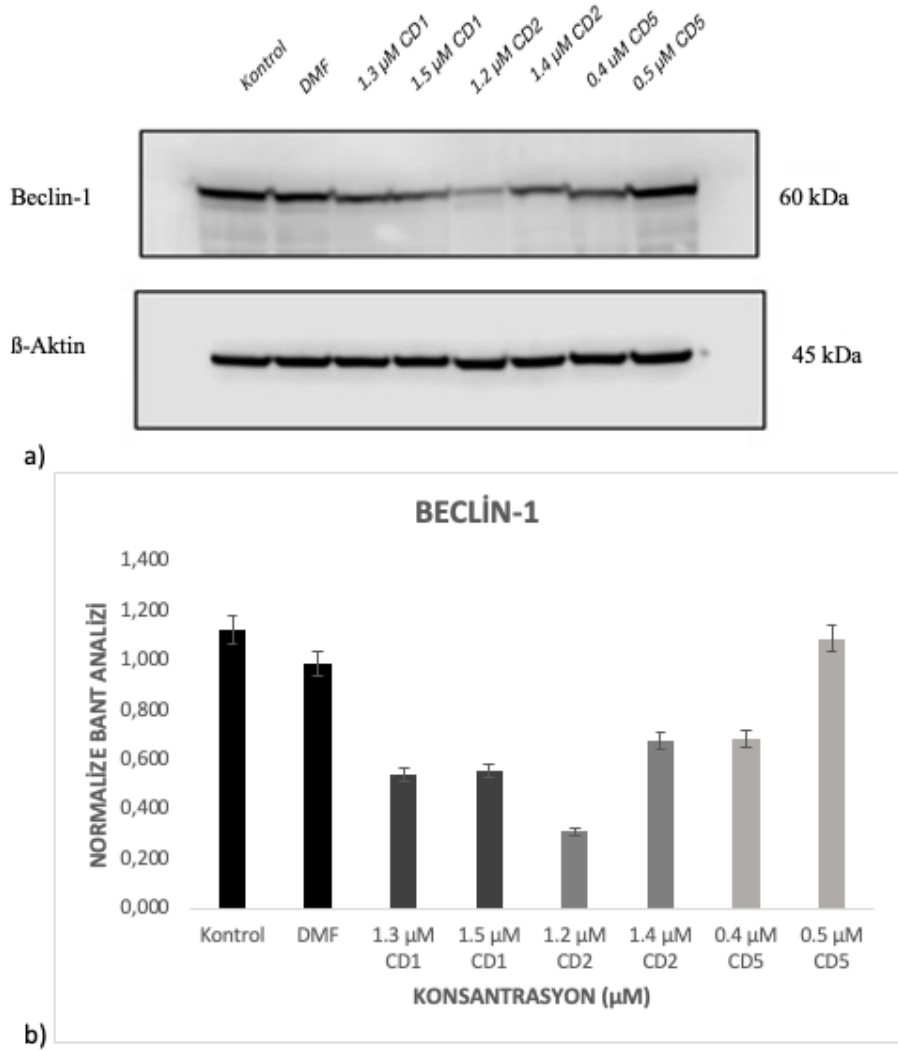
azalma tespit edilmiştir. Cd1, Cd2 ve Cd5 kompleksine ait konsantrasyonların Kaspaz-8 protein ekspresyon seviyesine ait bar grafiği Şekil 4.41’de gösterilmiştir.



Şekil 4.41. Ditiyofosfonato Kadmiyum (II) komplekslerinin MCF-7 hücre hattında Kaspaz-8 protein seviyesi üzerine etkileri. a) Sırasıyla; kontrol, DMF, 1.3 µM Cd1, 1.5 µM Cd1, 1.2 µM Cd2, 1.4 µM Cd2, 0.4 µM Cd5 ve 0.5 µM Cd5 uygulaması sonrası Kaspaz-8 (üstte) ve aynı membranda B-Aktin (altta) ekspresyonu. b) MCF-7 hücre hattı için Kaspaz-8 proteininin, B-aktine göre hesaplanmış ve kontrol grubuna göre normalize edilmiş protein ekspresyon seviyelerini gösteren bar grafiği (bant sinyal yoğunlukları üzerinden hesaplanmıştır).

48 saat süre ile Cd1, Cd2 ve Cd5 komplekslerinin IC₃₀ ve IC₅₀ konsantrasyonları ile muamele edilmiş olan MCF-7 hücrelerinde, aynı membran üzerindeki Beclin-1 ve β-Aktin proteinlerinin ekspresyon seviyeleri incelenmiş, Cd1 kompleksi uygulanan hücrelerde, Beclin-1 ifadesinin negatif kontrol grubuna kıyasla 2 kat azaldığı, Cd2

kpmpleksi etkisiyle de konsantrasyona bağılı olarak yaklaşık 3 buçuk ve 2 kat azaldığı görülmüştür. Cd5 kompleksinin IC₅₀ konsantrasyonu uygulanan hücrelerde Beclin-1 seviyesindeki yükseliş dikkat çekmiştir. Cd1, Cd2 ve Cd5 kompleksine ait konsantrasyonların Beclin-1 protein ekspresyon seviyesine ait bar grafiği Şekil 4.42’de gösterilmiştir.



Şekil 4.42. Ditiyofosfonato Kadmiyum (II) komplekslerinin MCF-7 hücre hattında Beclin-1 protein seviyesi üzerine etkileri. a) Sırasıyla; kontrol, DMF, 1.3 μM Cd1, 1.5 μM Cd1, 1.2 μM Cd2, 1.4 μM Cd2, 0.4 μM Cd5 ve 0.5 μM Cd5 uygulaması sonrası Beclin-1 (üstte) ve aynı membranda B-Aktin (altta) ekspresyonu. b) MCF-7 hücre hattı için Beclin-1 proteininin, B-aktine göre hesaplanmış ve kontrol grubuna göre normalize edilmiş protein ekspresyon seviyelerini gösteren bar grafiği (bant sinyal yoğunlukları üzerinden hesaplanmıştır).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ditiyofosfonik Asitlerin geniş biyolojik uygulamaları mevcuttur. Bu yapıları ayrıcalıkla hale getiren ve geniş biyolojik uygulama alanı sağlayan özellikleri kısaca, elektrostatik etkileşimler oluşturma yetenekleri, hidrojen bağları, çeşitli metal iyonlarla koordinasyon kapasitesi ve aminoasit yan zincirlerini birleştirme yetenekleri olup bu özellikleri sayesinde güçlü ve seçici biyoaktif moleküllerin keşfi için sağlam bir temel oluşturmaktadırlar (Caldwell vd., 1996; Mucha vd., 2011). Bu özellikleri ile enzimlere ait güçlü inhibitörler tasarlamak için fosfonik asit bileşik sınıfı başarıyla uygulanmıştır (Collinsova ve Jiracek., 2000).

Fosfonik asit bazlı moleküllerin biyolojik aktiviteleri ve hastalık tedavisindeki uygulamaları önemli bir ilerleyiş göstermekte olup ilaç öncü madde çalışmaları için sıklıkla kullanılmaktadırlar. Fosfonik asitler, anti-inflamatuar, anti-parazitik, anti-hepatit, anti-HIV ve anti-proliferatif gibi pek çok hastalığa karşı önemli farmakolojik aktiviteye sahiptir. Bu sebeple bu bileşik sınıfı günümüzde olduğu gibi gelecekte de önemini yitirmeyecektir (Abdou vd., 2019).

Kadmiyum, doğada bulunan ve kanserojenik olarak bilinen bir bileşik olmasına rağmen metal bazlı antikanserojenik aktivite gösteren ilaçların keşfi ile yeni ilaç öncü madde arayışları sırasında kadmiyum komplekslerinin de bilinenin aksine antikanserojenik aktivite gösterdiği günümüzde pek çok çalışma ile ortaya çıkarılmıştır. Kadmiyum'un kanserojenik ya da antikanserojenik olarak gösterdiği etkilerin bulunduğu forma bağlı olduğu hakkında pek çok hipotez öne sürülmüştür. Antikanserojenik aktivite göstererek tümör hücresi proteozomunu inhibe ederek proliferasyonu baskılayan ve apoptozu indükleyen metal bazlı organik bakır, çinko ve altın bazlı kompleksler ile gerçekleştirilmiş çalışmalar yeni metal bazlı ilaç arayışlarında büyük umut vaat etmektedir (Kenyon vd., 2005; Xiao vd., 2008; Zhang vd., 2008; Milacic vd., 2008; Milacic vd., 2006).

Kadmiyum'un meme kanseri riskini artırabileceği öne sürülmüş olmakla birlikte meme kanseri insidansı ile ilgili Cd'nin kanserojenik etkileri henüz belirlenmemiştir ve devam eden bir çalışma alanıdır (Siewit vd., 2010). Literatürde Kadmiyum'un kanserojen olduğuna dair pek çok çalışma bulunsa da yapılan bir çalışmada Cd'nin insan prostat kanseri hücrelerinde p53'e bağlı apoptozu ve XIAP'nin down regülasyonunu indüklediği

bildirilmiştir (Golovine vd., 2010). Buna benzer olarak Meclofenamik Asit-Kadmiyum kompleksleri ile gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise bu komplekslerin, meme kanseri hücre hattı MCF-7, mesane kanseri hücre hattı T24 ve küçük hücreli olmayan akciğer karsinom hücre hattı A549’da antiproliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir (Kovala vd., 2011). Yine Kadmiyum ve Disülfiram kompleksinin, insan meme kanseri hücrelerinde proteozom aktivitesini normal hücrelere göre seçici olarak inhibe ederek apoptotik mekanizmanın indüklendiği 2008 yılında Li ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (Li vd., 2008).

Günümüzde kanser tedavilerinde kullanılan kemoterapötiklerin yan etkileri, hedefe spesifik olmamaları, kullanımlarının sınırlayıcı olması, kanserli hücrelerin kazandıkları ilaç direnci ve hastalığın nüks etme oranı söz konusu olduğundan hedefe özgü yeni ilaç öncü madde arayışları sürmektedir.

Ditiyofosfonik asitler ve Cd’nin tüm bu etkileri göz önünde bulundurulduğunda Yozgat Bozok Üniversitesi, Anorganik Kimya Anabilim Dalı Doç. Dr. Ertuğrul Gazi SAĞLAM ve Yüksek Lisans öğrencisi İbrahim DEMİREL tarafından ilk defa sentezlenip literatüre kazandırılan 5 farklı Ditiyofosfonato kadmiyum (II) kompleksi’nin anti-kanserojenik aktivite göstereceği düşünüldükten bu tez çalışması kapsamında tarafımızca bu komplekslerin anti- kanserojenik bulguları paylaşılmıştır (Sağlam vd., 2020).

Tamamlanan bu tez çalışmasında; 3 farklı Ditiyofosfonato kadmiyum (II) kompleks’inin metastatik ve invazif özellikte olan MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatları anti-kanserojenik etkileri çalışılmış olup komplekslerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi MTT hücre canlılık testiyle, hücre proliferasyonuna etkisi hücre döngüsü ve western blot analiz yöntemiyle, apoptotik etkisi mitokondri transmembran potansiyeli belirleme yöntemi, Annexin V- FITC& PI boyama, Kaspaz-3/7 enzim aktivitesi ve ROS ölçümü ile anti-metastatik aktivitesi ise western blot yöntemi ile çalışılmıştır.

2021 yılında E. Gazi Sağlam ve ekibi tarafından yayınlanan bir çalışmada 10 farklı Ditiyofosfonato Ni (II) kompleksleri sentezlenerek 3 farklı kanser hücre hattında sitotoksik aktiviteleri belirlenmiştir. Özellikle meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerindeki sitotoksikite incelendiğinde IC₅₀ değeri 50µM olarak bildirilmiştir (Sağlam E. vd., 2021). Gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise aralarında kadmiyumun

da bulunduğu 8 farklı metal kompleksi sentezlenmiş ve sitotoksik aktiviteleri meme kanseri hücre hatlarından olan, MCF-7 ve MDA-MB-231’de çalışılmıştır. $[CdL](ClO_4)$ kompleksi uygulanan meme kanseri hücre hatlarında IC_{50} değeri $<10\mu M$ olarak bildirilmiştir (Rezaeivala vd., 2019). Literatürdeki çalışmalar ve tamamlanan tez çalışmasındaki bulgular birlikte ele alındığında sentezlenen komplekslerin göstermiş olduğu sitotoksik aktivitenin kadmiyum kaynaklı olduğu görülmektedir. Tamamlanan tez çalışmasındaki bulgular incelendiğinde, gerçekleştirilen MTT sitotoksikite testi sonucuna göre MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde bütün dozlar ve inkübasyon sürelerinde anlamlı bir etki olduğu görülmüştür. Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği ve IC_{50} değerleri $<2\mu M$ olduğu bildirilmiştir.

Her ne kadar MCF-7 hücre hattı bu komplekslere karşı daha fazla hassasiyet göstermiş gibi görünse de triple negatif olarak bilinen daha agresif ve metastatik hücre hattı olan MDA-MB-231 hücre hattı için belirlenen dozlar MCF-7 hücre hattı için belirlenen dozlar ile çok yakındır. Direnç mekanizması gelişmiş olan bu agresif hücre hattında (MDA-MB-231) komplekslerin kullanımı sınırlanmamış olup bu durum umut vaat etmektedir. Kompleksler arasından en etkin olan Ditiyofosfonato kadmiyum (II) kompleks’i sitotoksikite sonuçlarına göre Cd5 kompleksi olarak tespit edilmiştir.

Hücre döngüsü, normal koşullardaki hücrelerin bir gelişme süreci olup hücrenin büyüdüğü, DNA’sını çoğalttığı ve bölündüğü bir mekanizmadır. Bu mekanizma bir dizi sinyal yolları tarafından düzenlenmekte olup bu süreçte oluşabilecek hataları kontrol eden ve düzeltilmesini sağlayan mekanizmaları da içermektedir. Bu süreçte düzeltilemeyen bir hata söz konusu olduğunda hücreler programlı bir şekilde apoptotik olarak ölür. Fakat kanserli hücrelerde bu düzenleyici süreçte meydana gelen değişimler sonucu kontrolsüz bir proliferasyon olduğu bilinmektedir. Hücre döngüsü, hücre büyümesinin gerçekleştiği G1 evresi, DNA replikasyonunun gerçekleştiği S evresi, hücrenin bölünmesi için hazırlandığı G2 evresi ve hücrenin bölündüğü M (mitoz) evresinden oluşmaktadır. Bunun yanında hücreler döngüden ayrılıp durağan faz denen G0 evresine de girebilmektedirler. Döngünün kontrollü bir şekilde ilerlemesi siklinler (A, B, D, E) ve siklin bağımlı protein kinazlar (CDK) tarafından regüle edilmektedir. Siklin D, CDK4 ve CDK6’yı aktive ederek hücrenin döngüye girmesini ve G1 fazına ilerlemesini ve Siklin E, CDK2’yi aktive ederek hücrenin G1 fazından S fazına ilerlemesini sağlamaktadır. Siklin A, CDK1 ile kompleks oluşturarak hücrenin G2

fazından M fazına girmesini ve son olarak Siklin B, CDK1'i aktive ederek hücrenin M fazında ilerlemesini sağlamaktadır. Hücre proliferasyonu yukarıda kısaca bahsedilen bu mekanizma ile kontrollü olarak düzenlenmektedir (Vermeulen vd., 2003; Lim ve Kaldis, 2013; Filho vd., 2017).

MCF-7 hücre hattı üzerinde anti-kanserojenik etkisi araştırılan [CdL](ClO₄) bileşiğinin doz bağımlı olarak proliferasyonu inhibe ettiği, cyclin A, D1, D3, CDK4, CDK6 protein ekspresyonlarında azalma bununla ilişkili olarak p21, p27, p53 indüksiyonu ve sonuç olarak hücre döngüsünün S fazında tutulduğu bildirilmiştir. Diğer yandan, apoptozu destekleyecek şekilde kaspaz aktivasyonu ve DNA fragmentasyonu olduğu belirlenmiştir. Bileşiğin tetiklediği hücre döngüsü tutulumunun apoptotik cevaptan önce gerçekleştiği vurgulanmıştır (Chen ve Wong, 2008).

Tez çalışması kapsamında akış sitometrisi ile gerçekleştirilen hücre döngüsü analizleri sonuçlarına göre, Cd1, Cd2 ve Cd5 komplekslerinin etkin dozlarına maruz kalan MDA-MB-231 hücrelerinin, S fazında bulunma yüzdeleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır ve buna bağlı olarak, G0/G1 fazındaki hücre oranında azalma olduğu görülmüştür. MCF-7 hücre hattında ise Cd1, Cd2 ve Cd5 komplekslerinin etkin dozları kontrol grubu ile kıyaslandığında hücrelerin, G0/G1 fazında bulunma yüzdeleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir. Kadmiyum Kompleksleri, MDA-MB-231 hücre hattında doz bağımlı olarak S fazında tutulmaya, MCF-7 hücre hattında ise yine doz bağımlı olarak G0/G1 evresinde tutulmaya sebep olmuştur. Siklin-E1 hücre döngüsünde G0/G1 fazından S fazına geçişi regüle eden bir proteindir. Western blot yöntemi ile gerçekleştirilen Siklin-E1 proteininin ekspresyon seviyesi bulguları hücre döngüsü yöntemi bulguları ile uyumlu olup birlikte ele alındıklarında MDA-MB-231 hücre hattına uygulanan komplekslerde doza bağımlı olarak anlamlı şekilde yükselen Siklin-E1 seviyesi ve MCF-7 hücre hattında ise anlamlı şekilde düşen Siklin-E1 protein ekspresyonu cell cycle'daki tutulmaları destekler nitelikte olup komplekslerin anti-proliferatif etkileri olduğu tespit edilmiştir. Literatürde bulunan benzer bir çalışmada ise bileşik {1} (Cd(CH₃COO)₂.2H₂O + HL1) ve bileşik {2} (Cd(CH₃COO)₂.2H₂O + HL2) olarak adlandırılan 2 farklı yeni sentezlenen kadmiyum kompleksi ile MCF-7 hücre hattında çalışılmış ve her iki kompleksinde MCF-7 hücre hattında S fazı tutulmasına sebep olduğu bildirilmiştir. S fazı tutulmasıyla birlikte baskılanan G2/M fazı olduğu belirlenerek kadmiyum içerikli bileşiklerin DNA hasarına

yol açtığı tespit edilmiştir (Abyar vd., 2019). Benzer şekilde tamamlanan tez çalışmasında Ditiyofosfonato kadmiyum (II) kompleksleri MDA-MB-231 hücre hattında, hücre döngüsünün S fazında hücrelerin tutulmasına sebep olarak G2/M fazına geçişi bloke etmiş ve hücrelerin mitozaya girişini engellemiştir. MCF-7 hücre hattında ise Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin, hücre döngüsüne giriş oranını azalttığı gözlenmiştir.

Hücreler normal fizyolojik koşullar altında, membranın sitozolik kısmına bakan fosfatidilserin (PS) ile asimetrik olarak fosfolipit dağılımına sahiptirler. Bu membran asimetrisi, erken apoptoz sırasında membranda herhangi bir bütünlük kaybı olmaksızın kaybolur. Kaybolan membran asimetrisi sonucunda fosfatidilserinler hücre membranının dış katmanına transloke olurlar. Böylelikle ölmekte olan hücreler fagositoz yoluyla sindirilmek üzere tanınmaktadırlar. Hücre zarının dış katmanında bulunan PS'ler FITC ile işaretlenmiş Annexin V boyası ile tespit edilebilmektedir. Annexin V ve PI boyası birlikte kullanılarak canlı (normal fizyolojik koşullar), erken apoptotik ve geç apoptotik ya da nekrotik hücrelerin ayrımı yapılabilmektedir. Annexin V ve PI ile boyanmayan hücreler canlı, yalnızca Annexin V ile boyanan hücreler erken apoptotik, Annexin V ve PI ile boyanan hücreler ile geç apoptotik hücre olarak nitelendirilirler. (Schutte ve ark.,1998). Kontrol grubu ile kıyaslandığında, MDA-MB-231 hücrelerinin Ditiyofosfonato kadmiyum (II) kompleksleri ile 48 saat muamele edilmesi, erken apoptotik hücre oranında ve geç apoptotik-nekrotik hücre oranında artışa sebep olmuştur. MCF-7 hücrelerinde ise kontrole kıyasla, erken apoptotik hücre oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmamış olup geç apoptotik/nekrotik hücre oranında anlamlı bir artış görülmüştür. Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin hücre membranlarında PS translokasyonuna olan etkisi kıyaslandığında, her iki hücre hattında da apoptotik hücre oranı yükselmiş olmakla birlikte MCF-7 hücre hattının komplekslere karşı daha fazla hassasiyet gösterdiği bulunmuştur.

2 farklı kadmiyum kompleksi ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde Annexin V/PI boyaması ile hem erken hem de geç apoptotik hücrelerin olduğunu gösterilmiştir. Yeni sentezlenen ve bileşik {1} ve bileşik {2} olarak adlandırılan kadmiyum kompleksleri için apoptozun 24 saatte gerçekleştiği ve hatta bileşik {2} uygulanan MCF-7 hücrelerinin 12 saat içerisinde apoptotik olarak öldüğü bildirilmiştir (Abyar vd., 2019). Tamamlanan tez çalışmasında ise Annexin V/PI boyaması, 48 süre ile uygulanan

kompleks dozlarının ardından gerçekleştirilmiş olup her iki hücre hattında da (MDA-MB-231 ve MCF-7) erken apoptotik hücre tespit edilememiş olup geç apoptotik ve nekrotik hücre oranlarının yüksek seviyelerde görüldüğü ve uygulanan komplekslere bağlı olarak apoptozun 48 saatten daha kısa sürede gerçekleştiği düşünülmektedir.

Hücrelerde apoptotik sürecin yönetilmesinde görev alan kaspazlar, Kaspaz-2, -8, -9, -10 olan başlatıcı kaspazlar ve Kaspaz-3, -6, -7'nin bulunduğu efektör kaspazlar olarak iki gruba ayrılmaktadır. Hücreler apoptoza girdiğinde efektör kaspazın aktivasyonu başlatıcı kaspaz tarafından gerçekleştirilir. Aktive olan efektör kaspazlar, hedef moleküllerin proteolitik parçalanmasını sağlayarak hücreyi ölüme götürür ve bu yol kaspaz bağımlı apoptoz olarak adlandırılır (Shi, 2002). Apoptotik etkinin belirlenebilmesi ve Ditiyofosfonato kadmiyum (II) kompleksinin MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoz mekanizmasını hangi yoldan başlattığını gösterebilmek için Kaspaz-3/7 enzim aktivasyonu çalışılmıştır. Kaspaz-3/7 enzim aktivasyonunda, kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı, doza bağlı bir artış görülmüştür. Apoptotik ölümün kaspaz aracılı mekanizma ile gerçekleştiği bu hücre hattında daha belirgin olarak tespit edilmiştir.

Normal fizyolojik koşullar altındaki hücrelerde serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri sürekli olarak üretilmekte olup hücrelerde oksidatif hasara sebep olmaktadır. Fakat hücrelerdeki antioksidan aktivite ve onarım sistemleri ile bu durum kontrol altında tutulmaktadır. Hücre içerisindeki yüksek ROS seviyeleri lipitlere, proteinlere ve DNA'ya zarar vermektedir. ROS bağımlı bu durum, antikanser strajelerinin arasında yer almaktadır (Perillo vd., 2020). Tamamlanan tez çalışmasında Ditiyofosfonato kadmiyum (II) kompleksinin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarına uygulanması sonucu hücre içerisindeki ROS seviyeleri ölçülmüş ve kontrol grupları ile kıyaslandığında hücre içi ROS seviyesinin yükseldiği tespit edilmiştir. Artan ROS seviyesi ile hücrelerde oksidatif strese kaynaklı apoptotik mekanizmaların indüklendiği düşünülmektedir.

MDA-MB-231 hücre hattında kadmiyum komplekslerin apoptotik mekanizma üzerindeki etkileri akış sitometrisi ile gerçekleştirilen yöntemler incelendiğinde; kontrol grubu ile kıyaslandığında geç apoptotik hücre oranında anlamlı artış, mitokondriyal transmembran potansiyelinde ise azalış anlamlı düzeyde bulunmuştur. Bu iki yöntemin bulguları birbiri ile uyumludur. Doz bağımlı olarak hücre içi ROS seviyelerindeki artış

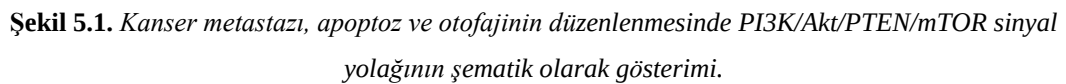
ve kaspaz 3/7 aktivitesinde görülen artış yine akış sitometrisi ile bulunan sonuçları destekler niteliktedir.

Hücrelerde apoptotik mekanizma, çeşitli indükleyiciler tarafından aktive edilen birkaç kompleks protein tarafından kontrol edilmektedir. Apoptotik hücre ölümü iki ana yolla gerçekleşmektedir. DNA hasarı, büyüme faktörü ya da sitokin yoksunluğu gibi hücresel stres etkenleri tarafından bir uyarı geldiğinde mitokondriden Sitokrom C salınımı ve ölüm sinyallerinin aktivasyonu ile “intrinsik yolak” veya “mitokondriyal yolak” olarak adlandırılan apoptotik mekanizma aktive olur ve programlı hücre ölümü gerçekleşir. İkinci yol ise “dış yolak” veya “sitoplazmik yolak” olarak isimlendirilir ve tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör süper ailesinin bir üyesi olan “FAS ölüm reseptörleri” tarafından aktive olur. Her iki yolak da düzenleyici ve yapısal molekülleri parçalayan kaspazların aktivasyonunu içerir ve hücre ölümüyle sonuçlanır (Agrawal, 2019).

Son olarak; protein ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, kadmiyum komplekslerinin hücrelerde doz bağımlı olarak prokaspaz-3 seviyesini düşürdüğü, aktif kaspaz-3 seviyesini arttırdığı ve kaspaz-8 protein seviyesini de arttırdığı belirlenmiştir ve bu bulgu tüm sonuçlar ile uyumlu olup “Ditiyofosfonato kadmiyum (II) kompleksleri MDA-MB-231 hücrelerinde intrinsik yolla apoptotik mekanizmayı indükleyebilir” sonucu çıkarılmıştır.

MCF-7 hücre hattında ise benzer şekilde akış sitometrisi ile gerçekleştirilen yöntemler incelendiğinde, kontrol grubu ile kıyaslandığında geç apoptotik hücre oranında anlamlı bir artış tespit edilmiş olup yine aynı şekilde kompleks dozları ile muamele edilen gruplarda mitokondriyal transmembran potansiyel azalışı anlamlı düzeyde bulunmuştur. Doz bağımlı olarak hücre içi ROS seviyelerinde artış tespit edilmiş fakat kaspaz-8 ekspresyonunda anlamlı bir bulguya ulaşılamamıştır. Ditiyofosfonato kadmiyum (II) kompleksleri MCF-7 hücrelerinde apoptotik mekanizmayı indüklediği sonucu çıkarılmış olup hangi yol ile bu mekanizmanın aktive edildiği hakkında kesin yorum yapılamamaktadır. Komplekslerin uygulandığı MCF-7 hücrelerinde tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin, hücreleri S fazında tutuklayarak oksidatif stres kaynaklı bir DNA hasarına sebep olduğu ve bununla birlikte apoptotik mekanizmayı aktive ettiği düşünülmektedir. Kaspaz-8 ekspresyonu bulguları apoptotik mekanizmanın “ölüm reseptörü (dış yolak)” aracılı olmadığını göstermektedir.

PI3K/Akt yolağı insan solid tümörlerinde hücre proliferasyonunu, hücre döngüsü ilerlemesini ve sitotoksik tedavilere direnci desteklediği bilinen en önemli hayatta kalma sinyal mekanizmalarından biridir. Apoptozu inhibe etmek için bilinen PI3K/Akt yolağının aktivasyonu, mTOR'un da inhibisyonu sonucuyla otofajiyi de baskılar. Akt kinazın up-regüle aktivitesi, tümör büyümesi, metastaz ve anjiyogenez ile karakterize edilen malign transformasyon ile ilişkilidir. Akt/mTOR yolağı hem apoptoz hem de otofajinin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır (Kondo vd., 2005; Takeuchi vd., 2005; Mathew vd., 2007).



MDA-MB-231 hücre hattında uygulanan komplekslerin metastatik mekanizma üzerindeki etkileri için p-AKT ve p-mTOR protein ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin etkin dozları uygulanmış hücreler kontrol grubu ile kıyaslandığında p-AKT ve p-mTOR ekspresyonunu azalttığı hatta bir miktar baskıladığı görülmüştür. Bunun yanında, otofaji proteinlerinden olan Beclin-1 protein ekspresyonunda bir değişikliğe yol açmamıştır. Bu bulgulara göre, kadmiyum kompleksleri MDA-MB-231 hücrelerinde otofajik yolla bağımsız olarak apoptotik yolağı aktive etmiştir. Aynı zamanda; p-AKT ve p-mTOR protein ekspresyonu seviyelerindeki azalış göz önünde bulundurulduğunda anti-metastatik ve anti-proliferatif aktivite gösterebilmektedir düşüncesi ortaya çıkmıştır.

MCF-7 hücre hattında ise p-AKT ve p-mTOR ekspresyonları tespit edilememiş olup yalnızca Beclin-1 protein ekspresyonu analiz edilmiştir. Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin Beclin-1 protein sentezini baskıladığı bulunmuştur. Bu bulgular kadmiyum komplekslerin otofajiyi aktive etmediğini, hücre proliferasyonunu baskıladığını ve oksidatif stres kaynaklı apoptotik mekanizmayı aktive ettiğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak; tamamlanan bu çalışmada MDA-MB-231 hücrelerinde Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin, sitotoksik, anti-proliferatif, apoptotik ve anti-metastatik etkileri olduğu bulunmuştur. MCF-7 hücrelerinde ise Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin, sitotoksik, anti-proliferatif ve apoptotik etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin umut verici ilaç öncü madde olabileceğini ve ileri araştırmalara değer olduğunu göstermektedir. İlk defa sentezlenerek literatüre kazandırılan Ditiyofosfonato kadmiyum (II) komplekslerinin bu tez çalışması sonucunda ilk defa meme kanserinde anti-kanserojenik aktivileri tarafımızca belirlenmiş olarak literatüre kazandırılması hedefimiz gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKÇA

- Abdou, M. M., O'Neill, P. M., Amigues, E., & Matziari, M. (2019). Phosphinic acids: current status and potential for drug discovery. *Drug discovery today*, 24(3), 916-929.
- Abyar, S., Khandar, A. A., Salehi, R., Abolfazl Hosseini-Yazdi, S., Alizadeh, E., Mahkam, M., ... & Janssen, M. J. (2019). In vitro nephrotoxicity and anticancer potency of newly synthesized cadmium complexes. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
- Agrawal, S. N. (2019). The Vital Phenomena of Apoptosis: A Review. *South Asian Res. J. Med. Sci*, 1(1), 15-193.
- Anderson, B. O., Ilbawi, A. M., Fidarova, E., Weiderpass, E., Stevens, L., Abdel- Wahab, M., & Mikkelsen, B. (2021). The Global Breast Cancer Initiative: a strategic collaboration to strengthen health care for non-communicable diseases. *The Lancet Oncology*, 22(5), 578-581.
- Arruebo, M., Vilaboa, N., Sáez-Gutierrez, B., Lambea, J., Tres, A., Valladares, M., & González-Fernández, Á. (2011). Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers*, 3(3), 3279-3330.
- Aydınтуğ, S. (2004). Meme kanserinde erken tanı. *Sted*, 13(6), 226-228.
- Burstein, H. J. (2005). The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *New England Journal of Medicine*, 353(16), 1652-1654.
- Buskaran, K., Bullo, S., Hussein, M. Z., Masarudin, M. J., Mohd Moklas, M. A., & Fakurazi, S. (2021). Anticancer Molecular Mechanism of Protocatechuic Acid Loaded on Folate Coated Functionalized Graphene Oxide Nanocomposite Delivery System in Human Hepatocellular Carcinoma. *Materials*, 14(4), 817.
- Caldwell, C. G., Sahoo, S. P., Polo, S. A., Eversole, R. R., Lanza, T. J., Mills, S. G., ... & Hagmann, W. K. (1996). Phosphinic acid inhibitors of matrix metalloproteinases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 6(3), 323-328.

- Chen, T. and Wong, Y.-S., 2008, Selenocystine induces s-phase arrest and apoptosis in human breast adenocarcinoma mcf-7 cells by modulating erk and akt phosphorylation, *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 22, 10574-10581.
- Cho, E. Y., Chang, M. H., La Choi, Y., Lee, J. E., Nam, S. J., Yang, J.-H., Park, Y. H., Ahn, J. S. and Im, Y.-H., 2011, Potential candidate biomarkers for heterogeneity in triple-negative breast cancer (tnbc), *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 68, 3, 753-761.
- Collinsova, M., & Jiracek, J. (2000). Phosphinic acid compounds in biochemistry, biology and medicine. *Current medicinal chemistry*, 7(6), 629-647.
- Cooper, G. M., Hausman, R. E., & Hausman, R. E. (2007). *The cell: a molecular approach* (Vol. 4, pp. 649-656). Washington, DC: ASM press.
- Cossarizza, A., Baccaranicontri, M., Kalashnikova, G., & Franceschi, C. (1993). A new method for the cytofluorometric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochemical and biophysical research communications*, 197(1), 40-45.
- Cuervo, A. M., & Wong, E. (2014). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell research*, 24(1), 92-104.
- Dirican E., Kaya Z., Güllü G., Peker E., Özmen T., Güllüoğlu B., ve ark., (2014). Meme Kanserinde PIK3CA Gen Mutasyonlarının HRM Yöntemiyle Belirlenmesi ve IGFBP-5 Ekspresyon Düzeyi ile İlişkisi, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Poster Sunumu
- El-Aouar Filho, R. A., Nicolas, A., De Paula Castro, T. L., Deplanche, M., De Carvalho Azevedo, V. A., Goossens, P. L., Taieb, F., Lina, G., Le Loir, Y. and Berkova, N., 2017, Heterogeneous family of cyclomodulins: Smart weapons that allow bacteria to hijack the eukaryotic cell cycle and promote infections, *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 208.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.

- Fragomeni, S. M., Sciallis, A., & Jeruss, J. S. (2018). Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surgical Oncology Clinics*, 27(1), 95-120.
- Garg, A. D., Nowis, D., Golab, J., Vandenabeele, P., Krysko, D. V., & Agostinis, P. (2010). Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1805(1), 53- 71.
- Golovine, K., Makhov, P., Uzzo, R. G., Kutikov, A., Kaplan, D. J., Fox, E., & Kolenko, V. M. (2010). Cadmium down-regulates expression of XIAP at the post-transcriptional level in prostate cancer cells through an NF- κ B-independent, proteasome- mediated mechanism. *Molecular cancer*, 9(1), 1-10.
- Grasso, D., & Vaccaro, M. I. (2014). Macroautophagy and the oncogene-induced senescence. *Frontiers in endocrinology*, 5, 157.
- Green, D. R., & Levine, B. (2014). To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate. *Cell*, 157(1), 65-75.
- Guerin, M. B., McKERNAN, D. P., O'Brien, C. J., & Cotter, T. G. (2002). Retinal ganglion cells: dying to survive. *International Journal of Developmental Biology*, 50(8), 665-674.
- Hammond, M. E. H., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K. L., Badve, S., Fitzgibbons, P. L., Francis, G., Goldstein, N. S., Hayes, M., Hicks, D. G., Lester, S., Love, R., Mangu, P. B., McShane, L., Miller, K., Osborne, C. K., Paik, S., Perlmutter, J., Rhodes, A., Sasano, H., Schwartz, J. N., Sweep, F. C. G., Taube, S., Torlakovic, E. E., Valenstein, P., Viale, G., Visscher, D., Wheeler, T., Williams, R. B., Wittliff, J. L. and Wolff, A. C., 2010, American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 28, 16, 2784-2795.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Harris, J. R., Lippman, M. E., & Morrow, M. (2014). Pathology of invasive breast cancer. *Diseases of the Breast*.

Hegde, P. S., & Chen, D. S. (2020). Top 10 challenges in cancer immunotherapy. *Immunity*, 52(1), 17-35.

<https://www.iarc.who.int> (15 Ocak 2022'de erişildi.)

<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/western-blotting/sample-preparation.html> (20 Aralık 2021'de erişildi.)

https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Qubit_Protein_Assay_UG.pdf (20 Aralık 2021'de erişildi.)

<https://datasheets.scbt.com/sc-293133.pdf> (20 Aralık 2021'de erişildi.)

<https://datasheets.scbt.com/sc-47778.pdf> (20 Aralık 2021'de erişildi.)

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/iblot2_device_man.pdf (20 Aralık 2021'de erişildi.)

<https://www.scbt.com/scbt/product/goat-anti-mouse-igg-hrp> (20 Aralık 2021'de erişildi.)

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EA0375BOX>
[MAN0009818_NuPAGE_TrisAcetate_Mini_Gel.pdf](#) (20 Aralık 2021'de erişildi.)

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/LC5602>
[MagicMarkXPWesternProteinStd_man.pdf](#) (20 Aralık 2021'de erişildi.)

https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/LC5700epageseeblue_man.pdf (20 Aralık 2021'de erişildi.)

https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/NP0008/MAN0007891_NuPAGE_BisTris_MiniGels.pdf (20 Aralık 2021'de erişildi.)

<https://gco.iarc.fr> (15 Ocak 2022'de erişildi.)

Johnson, K. S., Conant, E. F., & Soo, M. S. (2021). Molecular subtypes of breast cancer: a review for breast radiologists. *Journal of Breast Imaging*, 3(1), 12-24.

Joshi, H. and Press, M. F., 2018, Molecular oncology of breast cancer, *Journal*, Issue, 282- 307. e285.

- Karp, G. (2009). *Cell and molecular biology: concepts and experiments*. John Wiley & Sons.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239-257.
- Kısmalı, G., Sel T, (2012). Paraquat İle Oluşturulmuş Oksidatif Stresin HepG2 Hücrelerinde Apoptozis Üzerine Etkisinin Araştırılması, F.Ü. Sağ. Bil.Vet.Derg., 26 (2), 79 - 85.
- Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R., & Kondo, S. (2005). The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nature Reviews Cancer*, 5(9), 726-734.
- Kovala-Demertzi, D., Staninska, M., Garcia-Santos, I., Castineiras, A., & Demertzis, M. A. (2011). Synthesis, crystal structures and spectroscopy of meclofenamic acid and its metal complexes with manganese (II), copper (II), zinc (II) and cadmium (II). Antiproliferative and superoxide dismutase activity. *Journal of inorganic biochemistry*, 105(9), 1187-1195.
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging biological principles of metastasis. *Cell*, 168(4), 670-691.
- Li, L., Yang, H., Chen, D., Cui, C., & Dou, Q. P. (2008). Disulfiram promotes the conversion of carcinogenic cadmium to a proteasome inhibitor with pro-apoptotic activity in human cancer cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 229(2), 206-214.
- Lim, S. and Kaldis, P., 2013, Cdks, cyclins and ckis: Roles beyond cell cycle regulation, *Development*, 140, 15, 3079-3093.
- Liu, B., Bao, J. K., Yang, J. M., & Cheng, Y. (2013). Targeting autophagic pathways for cancer drug discovery. *Chinese journal of cancer*, 32(3), 113.
- Lockshin, R. A., & Williams, C. M. (1964). Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmooths. *Journal of Insect Physiology*, 10(4), 643-649.

- Lockshin, R. A., & Zakeri, Z. (2004). Apoptosis, autophagy, and more. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(12), 2405-2419.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., ... & Matsudaira, P. (2006). Molecular cell biology.
- Mäntymaa, P., Siitonen, T., Guttorm, T., Säily, M., Kinnula, V., Savolainen, E. R., & Koistinen, P. (2000). Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase confers resistance to apoptosis in acute myeloblastic leukaemia cells exposed to etoposide. *British journal of haematology*, 108(3), 574-581.
- Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., & Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(2), 81-94.
- Martinez, M. M., Reif, R. D., ve Pappas, D. (2010). Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Analytical methods*, 2(8), 996-1004.
- Merkel, D. E., & McGuire, W. L. (1990). Ploidy, proliferative activity and prognosis. DNA flow cytometry of solid tumors. *Cancer*, 65(5), 1194-1205. Role of
- Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., & White, E. (2007). Role of autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(12), 961-967.
- Merkel, D. E., & McGuire, W. L. (1990). Ploidy, proliferative activity and prognosis. DNA flow cytometry of solid tumors. *Cancer*, 65(5), 1194-1205.
- Milacic, V., Chen, D., Giovagnini, L., Diez, A., Fregona, D., & Dou, Q. P. (2008). Pyrrolidine dithiocarbamate-zinc (II) and-copper (II) complexes induce apoptosis in tumor cells by inhibiting the proteasomal activity. *Toxicology and applied pharmacology*, 231(1), 24-33.
- Milacic, V., Chen, D., Ronconi, L., Landis-Piwowar, K. R., Fregona, D., & Dou, Q. P. (2006). A novel anticancer gold (III) dithiocarbamate compound inhibits the activity of a purified 20S proteasome and 26S proteasome in human breast cancer cell cultures and xenografts. *Cancer research*, 66(21), 10478-10486.

- Morselli, E., Galluzzi, L., Kepp, O., Vicencio, J. M., Criollo, A., Maiuri, M. C., & Kroemer, G. (2009). Anti-and pro-tumor functions of autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1793(9), 1524-1532.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65 (1–2), 55–63.
- Mucha, A., Kafarski, P., & Berlicki, L. (2011). Remarkable potential of the α -aminophosphonate/phosphinate structural motif in medicinal chemistry. *Journal of medicinal chemistry*, 54(17), 5955-5980.
- Pacini, S., Punzi, T., Morucci, G., Gulisano, M., & Ruggiero, M. (2009). A paradox of cadmium: a carcinogen that impairs the capability of human breast cancer cells to induce angiogenesis. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 28(1).
- Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., ... & Migliaccio, A. (2020). ROS in cancer therapy: The bright side of the moon. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(2), 192-203.
- Pezzella, F., Tavassoli, M., & Kerr, D. J. (Eds.). (2019). *Oxford textbook of cancer biology*. Oxford University Press.
- Piccart-Gebhart, M., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R. and Jackisch, C., 2005, The herceptin adjuvant trial study t, 2005. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in her2-positive breast cancer, *N. Engl. J. Med*, 353.
- Prat, A., Cheang, M. C. U., Martín, M., Parker, J. S., Carrasco, E., Caballero, R., ... & Perou, C. M. (2013). Prognostic significance of progesterone receptor–positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 31(2), 203.
- Price J-T, Tiganis, T., Agarwal, A., Djakiew, D., Thompson, E-W. (1999). Epidermal Growth Factor Promotes MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Migration through a Phosphatidylinositol 3*-Kinase and Phospholipase C-dependent Mechanism. *Cancer Research* 59, 5475–5478.

- Pyo, J. O., Nah, J., & Jung, Y. K. (2012). Molecules and their functions in autophagy. *Experimental & molecular medicine*, 44(2), 73-80.
- Rampal, G., Khanna, N., Thind, T. S., Arora, S., & Vig, A. P. (2012). Role of isothiocyanates as anticancer agents and their contributing molecular and cellular mechanisms. *Med. Chem. Drug Discovery*, 3, 79-93.
- Reed, J. C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *The American journal of pathology*, 157(5), 1415-1430.
- Rezaeivala, M., Ahmadi, M., Captain, B., Şahin-Bölükbaşı, S., Dehghani-Firouzabadi, A. A., & William Gable, R. (2020). Synthesis, characterization, and cytotoxic activity studies of new N4O complexes derived from 2-({3-[2-morpholinoethylamino]-N3-([pyridine-2-yl] methyl) propylimino} methyl) phenol. *Applied Organometallic Chemistry*, 34(2), e5325.
- Sağlam, E. G., Akkoç, S., Zorlu, Y., Bulat, E., & Akgün, A. (2021). New phenanthroline nickel (II) organodithio-phosphorus complexes: Syntheses, structural characterizations and in vitro cytotoxic activity studies. *Polyhedron*, 199, 115097.
- Sağlam, E. G., Bulat, E., Nurcan, A. C. A. R., & Demirel, İ. (2020). New Homodinuclear Alkyl and Aryl Dithiophosphonato Cd (II) and Hg (II) complexes: Syntheses and Characterizations. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 7(1), 49-64.
- Sağlam, E. G., Ebinç, A., Zeyrek, C. T., Ünver, H., & Hökelek, T. (2015). Structural studies on some dithiophosphonato complexes of Ni (II), Cd (II), Hg (II) and theoretical studies on a dithiophosphonato Ni (II) complex using density functional theory. *Journal of Molecular Structure*, 1099, 490-501.
- Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C., & Cossarizza, A. (1997). JC-1, but not DiOC6 (3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\Psi$ changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS letters*, 411(1), 77-82.

- Scheuber, P. H., Mossmann, H. O. R. S. T., Beck, G. E. O. R. G., & Hammer, D. K. (1983). Direct skin test in highly sensitized guinea pigs for rapid and sensitive determination of staphylococcal enterotoxin B. *Applied and environmental microbiology*, 46(6), 1351-1356.
- Schönthal, A. H. (Ed.). (2004). *Checkpoint controls and cancer* (Vol. 2). Los Angeles, CA, USA: Humana Press.
- Schutte, B., Nuydens, R., Geerts, H., Ramaekers, F. (1998). Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. *Journal of neuroscience methods*, 86(1), 63-69.
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death & Differentiation*, 22(4), 526-539.
- Shen, L., Shi, Q., & Wang, W. (2018). Double agents: genes with both oncogenic and tumor-suppressor functions. *Oncogenesis*, 7(3), 1-14.
- Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular cell*, 9(3), 459-470.
- Shimizu, S., Yoshida, T., Tsujioka, M., & Arakawa, S. (2014). Autophagic cell death and cancer. *International journal of molecular sciences*, 15(2), 3145-3153.
- Sokolova, A., & Lakhani, S. R. (2021). Lobular carcinoma in situ: diagnostic criteria and molecular correlates. *Modern Pathology*, 34(1), 8-14
- Sundquist, T. E. R. R. I., Moravec, R., Niles, A. N. D. R. E. W., O'Brien, M. A. R. T. H. A., & Riss, T. (2006). Timing your apoptosis assays. *Cell Notes*, 16, 18-21.
- Takeuchi, H., Kondo, Y., Fujiwara, K., Kanzawa, T., Aoki, H., Mills, G. B., & Kondo, S. (2005). Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer research*, 65(8), 3336-3346.
- Tan, M. L., Ooi, J. P., Ismail, N., Moad, A. I. H., & Muhammad, T. S. T. (2009). Programmed cell death pathways and current antitumor targets. *Pharmaceutical research*, 26(7), 1547-1560.

- Vakifahmetoglu-Norberg, H., Kim, M., Xia, H. G., Iwanicki, M. P., Ofengeim, D., Coloff, J. L., ... & Yuan, J. (2013). Chaperone-mediated autophagy degrades mutant p53. *Genes & development*, 27(15), 1718-1730
- Van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry*. 1996; 24(2):131-139. (Biology).
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutellingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *Journal of immunological methods*, 184(1), 39-51.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. and Berneman, Z. N., 2003, The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, *Cell proliferation*, 36, 3, 131-149.
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast cancer treatment: a review. *Jama*, 321(3), 288-300.
- Wang, L. H., Wu, C. F., Rajasekaran, N., & Shin, Y. K. (2018). Loss of tumor suppressor gene function in human cancer: an overview. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(6), 2647-2693.
- Wang, S. Y., Yu, Q. J., Zhang, R. D., & Liu, B. (2011). Core signaling pathways of survival/death in autophagy-related cancer networks. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(9), 1263-1266.
- Weinberg, R. A., & Hanahan, D. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57- 70.
- Weinberg, R. A., 2013, The biology of cancer, City: Garland science.
- Wolff, A., Hammond, M., Hicks, D., Dowsett, M., McShane, L., Allison, K., Allred, D., Bartlett, J., Bilous, M. and Fitzgibbons, P., 2013, College of american pathologists recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American society of clinical oncology/college of american pathologists clinical practice guideline update, *J Clin Oncol*, 31, 31, 3997-4013.

Zaman, S., Wang, R., ve Gandhi, V. (2014). Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. *Leukemia & lymphoma*, 55(9), 1980-1992.

Zhang, Z., Bi, C., Buac, D., Fan, Y., Zhang, X., Zuo, J., ... & Dou, Q. P. (2013). Organic cadmium complexes as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells. *Journal of inorganic biochemistry*, 123, 1-10.

Zhang, Z., Bi, C., Fan, Y., Zhang, N., Deshmukh, R., Yan, X., ... & Dou, Q. P. (2015). l-Ornithine Schiff base-copper and-cadmium complexes as new proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 20(1), 109-121.

