



**Cu(II) FLAVONOİD KOMPLEKSİNİN AKCİĞER KANSERİ
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gölseven DÖNE



T.C.

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Cu(II) FLAVONOİD KOMPLEKSİNİN AKCİĞER KANSERİ
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Gülseven DÖNE
0000-0002-3656-994X

Prof. Dr. Ferda ARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2021

Her Hakkı Saklıdır.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Cu(II) FLAVONOİD KOMPLEKSİNİN AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gülseven DÖNE

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ferda ARI

Akciğer kanseri, dünya geneline bakıldığında en çok ölüme neden olan hastalıkların başında gelmektedir. Kanser tedavisinde tam olarak bir çözümün bulunmaması da yeni tedavi arayışlarına imkân vermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalara bakıldığında, kanser tedavisinde kullanılan metal bileşiklerin umut verici etkilerinden dolayı metal kompleksleri ile ilgili çalışmalar giderek artmaktadır. Bu tez çalışmasında, sentezi ve karakterizasyonları gerçekleştirilen Cu(II) flavonoid kompleksinin ([Cu(queH-1)Cl(phen)].2.5H₂O (queH=kuersetin, bpy=2,2'-bipiridin) antikanser etkinliği *in vitro* olarak araştırılmıştır. Cu(II) flavonoid kompleksinin sitotoksik aktivitesi insan akciğer kanseri hücre soyu A549 hücreleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

Cu(II) flavonoid kompleksinin, hücre canlılığı üzerine etkisi SRB ve MTT canlılık testleri ile analiz edilmiştir. Hücre canlılığı daha hassas ve güvenilir olan ATP canlılık testi ile doğrulanmıştır. Hücre ölüm modlarının (apoptoz/nekroz) belirlenmesi amacıyla Anneksin-V, PI (propidium iyodür) ve Hoechst üçlü floresan boyaması yapılmıştır. Sitotoksik etkilerinden sorumlu hücre ölümünün mekanizmasının (apoptozis/nekrozis/otofaji) belirlenmesi amacıyla akım sitometri sistemi Anneksin-V ölçümü, kaspaz 3/7 aktivitesi, oksidatif stres ölçümü, hücre siklusu analizi ve M30 antijen yöntemi kullanılmıştır.

Sonuç olarak, Cu(II) flavonoid kompleksinin A549 insan akciğer kanser hücrelerinde, doza ve zamana bağlı olarak hücre büyümesini engellediği ve kompleksin kanserli hücrelerde apoptozu indükleyerek, migrasyon yeteneklerinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Akciğer kanseri tedavisinde kullanılan cisplatin ile yeni sentez edilen Cu(II) flavonoid bileşiğinin hücre canlılığı üzerine olan etkinliği kıyaslanarak bakılmıştır. Yapılan çalışmaların sonucunda, Cu(II) flavonoid kompleksi akciğer kanseri tedavisinde umut verici bir ajan olarak kullanılabileceği öngörüsü ile ileri *in vivo* deneylerin yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Cu(II) flavonoid kompleksi, Sitotoksite, Akciğer kanseri, Apoptozis

2021, xii + 85 sayfa

ABSTRACT

Master's Thesis

INVESTIGATION INTO THE CYTOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF Cu(II) FLAVONOID COMPLEX ON LUNG CANCER CELLS

Gülseven DÖNE

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

Supervisor: Prof. Dr. Ferda ARI

Lung cancer is one of the diseases that cause the most death in the world. The lack of a complete solution in cancer treatment also enables new treatment searches. According to the studies conducted in recent years, studies on metal complexes are increasing gradually due to the promising effects of metal compounds used in cancer treatment. In this thesis study, the anticancer activity of the newly synthesized Cu(II) flavonoid complex ($[\text{Cu}(\text{queH-1})\text{Cl}(\text{phen})] \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (queH = quercetin, bpy = 2,2' – bipyridine) which synthesis and characterization performed was investigated in vitro. Cytotoxic activity of the Cu(II) flavonoid complex was evaluated in human lung cancer cell lines A549 cells. The effect of Cu(II) flavonoid complex on cell viability was analyzed by SRB and MTT viability tests. Cell viability was confirmed by the more sensitive and reliable ATP viability test.

Annexin-V, PI (propidium iodide) and Hoechst triple fluorescence staining was performed to determine the cell death modes (apoptosis/necrosis). Flow cytometry system (Annexin-V measurement) to determine the mechanism of cell death (apoptosis/necrosis/autophagy) responsible for its cytotoxic effects, caspase 3/7 activity, oxidative stress measurement, cell cycle analysis) and M30 antigen method were used. It was determined that it inhibits cell growth in individual cancer cells depending on the dose and time, and the complex induces apoptosis in cancer cells, causing a decrease in their migration abilities. The effectiveness of cisplatin used in the treatment of lung cancer and the newly synthesized Cu(II) flavonoid compound on cell viability was compared. As a result of the studies, it was concluded that further in vivo experiments should be carried out with the prediction that Cu(II) flavonoid complex could be used as a promising agent in the treatment of lung cancer.

Keywords: Cu(II) flavonoid complex; Cytotoxicity; Lung cancer; Apoptosis.

2021, xii + 85 page

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1. Kanser.....	4
2.1.1. Kanser hücrelerinin özellikleri.....	5
2.2. Akciğer Kanseri.....	6
2.2.1.Akciğer kanserinin histopatolojisi.....	7
2.2.2.Akciğer kanserinin moleküler biyolojisi.....	9
2.3. Hücre Ölüm Mekanizmaları.....	10
2.4. Kanser ve Apoptoz.....	12
2.4.1.Apoptozisin İndüklenmesi.....	13
2.4.2.Apoptozisin mekanizmaları.....	14
2.4.3. Ekstrinsik (Dışsal) yolak.....	14
2.4.4. İçsel (intrinsik)/mitokondriyal yolak.....	15
2.4.5.Endoplazmik retikulum aracılı yolak.....	17
2.5. Apoptozisin Düzenlenmesinde Görev Alan Genler.....	17
2.6. Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	24
2.7. Flavonoidler.....	24
2.8. Kuersetin.....	26
2.9. Flavonoid ve Metal Kompleksler İlgili Yaklaşımlar.....	28
2.10.Tez Çalışmasında Kullanılan Cu(II) Flavonoid Kompleksinin Biyokimyasal Yapısı.....	28
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	30
3.1. Materyal.....	30
3.1.1. Kimyasal maddeler.....	30
3.1.2. Sarf malzemeler.....	30
3.1.3. Cihazlar.....	30
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. Cu(II) flavonoid kompleksinin hazırlanması.....	32
3.3. Hücre Kültürü.....	33
3.3.1.Hücrelerin stoktan çıkartılması.....	33
3.3.2. Hücrelerin pasajlanması.....	33
3.3.3. Hücrelerin stoklanması.....	34
3.3.4.Kullanılan besiyerinin hazırlanması.....	34
3.3.5.Hemositometre ile hücrelerin sayımı.....	34
3.4.Sülforodamin B (SRB) Hücre Canlılık Testi.....	35

3.5.MTT (Metiltiazotetrazolium) Canlılık Metodu.....	36
3.6.ATP (AdenozinTrifosfat) Canlılık Metodu.....	38
3.7. Floresan Boyama Yöntemi ile Ölüm Modunun Belirlenmesi.....	40
3.7.1. Anneksin-V-FITC boyama yöntemi.....	41
3.8.M30 Antijen (Kaspazla kırılmış sitokeratin 18) Metodu.....	42
3.9.Akım Sitometri Analizi.....	43
3.9.1.Kaspaz 3/7 aktivitesi.....	43
3.9.2. Anneksin-V aktivitesi.....	45
3.9.3. Oksidatif stres aktivitesi.....	47
3.9.4. Hücre döngüsü analizi.....	49
3.10. İstatistiksel Analiz.....	49
4. BULGULAR.....	50
4.1. SRB Canlılık Testi Bulguları.....	50
4.2.MTT Canlılık Testi Bulguları.....	55
4.3. ATP Canlılık Testi Bulguları.....	56
4.4. M30 Antijen (Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18) Antijen Bulguları.....	58
4.5. Floresan Mikroskopu İle Yapılan Değerlendirmeler.....	59
4.6. Akım Sitometri Analizleri.....	61
4.6.1. Kaspaz3/7 ölçülmesinin akım sitometrisi ile değerlendirilmesi.....	64
4.6.2. Anneksin-V ölçülmesinin akım sitometrisi ile değerlendirilmesi.....	64
4.6.3. Oksidatif stresin değerlendirilmesi.....	65
4.6.4. Hücre döngüsünün değerlendirilmesi.....	66
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	68
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ.....	85

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
%	Yüzde
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
°C	Santigrat Derece

<u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
7-AAD	7-Aminoaktinomisin D
A549	İnsan akciğer kanser hücre soyu
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AIDS	Edinsel bağışıklık yetmezlik sendromu
AIF	Apoptosis indükleyici faktör
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive eden faktör
Apo-1	Fas ilişkili ölüm reseptörü
ATP	Adenozintrifosfat
BAX	Bcl-2 ilişkili X proteini
BCA	Biçinkoninik asit
BH	Bcl-2 homoloji bölgeleri
BSA	Sığır serum albumin
Bcl	Gen ailesi
Bcl	B hücre lenfoma geni1
Bcl2	B hücre lenfoma geni2
Bcl-XL	Bcl-2 ilişkili XL proteini
BEAS-2B	Sağlıklı akciğer hücre soyu
BH1-BH4	Bcl-2 homolog bölgesi
CAD	Kaspaz aktive edici Dnaz
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CDK-C	Siklin-siklin bağımlı kinaz
CDKI	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
CK18	Sitokeratin 18
C-MYC	Onkogen
CSF	Koloni uyarıcı faktör
DD	Ölüm domaini
DED	Kaspaz ölüm alanı
DISC	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DMEM	Dulbecco'sModified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNA-PK Kinase)	DNA bağımlı protein kinaz (DNA-dependent Protein Kinase)
DNMTDNA	Metil transferaz
DR	Ölüm reseptörü

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
EDTA	Etilen DiaminTetraasetik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü
Er	Östrojen hormon reseptörü
FADD	Fas ilişkili ölüm alanı
Fas	Gen
FasL	Gen
FBS	Fetal sığır serumu
kDa	KiloDalton
KHAK	Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
LC50	%50 letal konsantrasyon
LC70	%70 letal konsantrasyon
LNCaP	İnsan prostat kanser hücre soyu
MOMP	Mitokondri dışı membran permeabilizasyonu
mTOR	Rapamisin hedefi (Target of rapamycin)
MTT	Metill tiazol difenil tetrazolyum bromür
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NAC	N-asetil-L-sistein
NGF	Nöron büyüme faktörü
PARP	Poli(ADP-riboz)polimeraz (Poly ADP-ribosepolymerase)
PBS	Fosfat tuz tamponu (Phosphate buffered saline)
Pd	Palladyum
PI	Propidyum iyodür (Propidium iodide)
PS	Fosfatidil serin (phosphatidyl serine)
Pt	Platin
PTEN	Fosfataz ve tensin homolog proteini
RAS	Onkogen
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ribonükleik asit (Ribonucleic acid)
ROCK1	Rho ilişkili sarmal oluşturan kinaz 1

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
ROS	Reaktif oksijen türleri
RIP	Reseptör etkileşim protein
SRB	Sulforhodamine B
SDS	Sodyum dodesil sülfat (Sodium dodecyl sulfate)
TCA	Trikloroasetik asit
TNF	Tümör nekrozis faktör

Kısaltmalar**Açıklamalar**

TNFR	Tümör nekroz faktör reseptörü
TRADD	TNFR-1 ilişkili ölüm protein
TRAIL	TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
USA	United States of America
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin özellikleri	5
Şekil 2.2. Akciğer kanserinin histolojik olarak sınıflandırılması.....	8
Şekil 2.3. Apoptozis ve Nekrozun şematik karşılaştırılması	10
Şekil 2.4. Kaspaz Kaskatı	15
Şekil 2.5. Kaspaz aktivasyonunun mitokondriyal yolu	
A.Kaspaz aktivasyonu	
B.Apoptozom oluşum ve aktivasyonu.....	16
Şekil 2.6. Bcl-2 aile üyeleri.....	19
Şekil 2.7. p53 proteinin hücre siklusu ve apoptozis sürecindeki rolü.....	21
Şekil 2.8. Ras ailesi G-proteinlerin işlevsel döngüleri	23
Şekil 2.9. Flavonoidlerin temel halka yapısı.....	25
Şekil.2.10. Kuersetin Açık Yapısı.....	26
Şekil 2.11. Kuersetinin antikanser etkisiyle ilgili hücre içi proteinler ve yollar	27
Şekil 2.12. Cu(II) flavonoid kompleksinin kimyasal yapısı.....	29
Şekil 3.1. MTT reaksiyon şeması.....	37
Şekil 3.2. ATP Tepkimesi	39
Şekil 3.3. Sitokeratin 18'in kaspazlar aracılığıyla kesilmesi ve bölgenin M30 antikoruna ile tanınmasının şematik gösterimi	42
Şekil 3.4. Kaspaz 3/7 Aktivitesinin Ölçülmesi.....	45
Şekil 3.5. Anneksin V Boyama.....	47
Şekil 3.6. Oksidatif stresin ölçülmesi	48
Şekil 4.1. Cu(II) flavonoid kompleksi ile tedavi (1,56-50 µM) sonrası A549 hücrelerinin 48 saat mikroskop görüntüleri.....	50
Şekil 4.2. A549 insan akciğer kanser hücrelerinde 48-72 saat Cu(II) flavonoid kompleksi ile tedavi (1,56-50 µM) sonrası SRB testi yüzde (%) canlılık grafikleri.....	51
Şekil 4.3. A549 insan akciğer kanseri hücrelerinin 48-72 saat Cisplatin tedavisi (0,39- 25 µM) sonrası SRB testi sonuçları.....	53
Şekil 4.4. A549 insan akciğer hücrelerinin 48 saat flavonoid ligantları tedavisi sonrası SRB testi sonuçları.....	54
Şekil 4.5. A549 insan akciğer kanseri hücrelerinin 48-72 saat Cu(II) flavonoid kompleksi ile tedavi (1,56-50 µM) sonrası MTT testi sonuçları.....	55
Şekil 4.6. A549 insan akciğer kanseri hücrelerinin 48-72 saat Cu(II) flavonoid kompleksi ile tedavi (1,56-50 µM) sonrası ATP testi sonuçları.....	57
Şekil 4.7. A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde yapılan M30-Antijen çalışmasının standart eğri grafiği.....	58
Şekil 4.8. A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde Cu(II) flavonoid kompleksi ile tedavi (3,12- 25 µM) sonucu 48 saatte gözlenen M30 Antijen seviyesi.....	59

Şekil 4.9. A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde 24 saat Cu(II) flavonoid kompleksi tedavisi (3,12-25µM) sonrasında floresan boyama görüntüleri.....	61
Şekil 4.10. Cu(II) flavonoid kompleksi (6,25-12,5 µM) ile 24-48 saat tedavi alan A549 akciğer kanseri hücrelerinin akım sitometri analizi öncesinde mikroskopik görüntüleri.....	63
Şekil 4.11. Cu(II) flavonoid kompleksinin (6,25-12,5 µM) A549 akciğer kanseri hücrelerinin kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 ve 48 saatlik histogramları.....	65
Şekil 4.12. Pan-kaspaz inhibitörü ile ön tedavi sonrasında Cu(II) flavonoid (1,56-25 µM) kompleksi tedavisi sonrası akciğer kanseri hücrelerinde canlılık sonuçları.....	66
Şekil 4.13. Cu(II) flavonoid kompleksinin (6,25-12,5 µM) A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde Anneksin V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 ve 48 saatlik histogramları.....	67
Şekil 4.14. Cu(II) flavonoid kompleksinin (6,25-12,5 µM) A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde ROS miktarının değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 ve 48 saatlik histogramları.....	68
Şekil 4.15. Cu(II) flavonoid kompleksinin (3,12-6,25-12,5 µM) A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde hücre döngüsünün değerlendirilmesi ile elde edilen yüzde değerlerinin 18 ve 36 saatlik histogramları.....	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. A549 akciğer kanser hücresinin özellikleri.....	32
Çizelge 3.2. Anneksin V ve 7-AAD boyalarına, hücrelerin verdiği yanıtlar.....	46
Çizelge 4.1. A549 akciğer kanseri hücrelerinin Cu(II) flavonoid ile 48-72 saat tedavisi sonrası SRB canlılık yüzdelere göre IC ₅₀ ve IC ₉₀ değerleri.....	52
Çizelge 4.2. A549 insan akciğer kanseri hücrelerinin, Cisplatin ve flavonoidligantları (Kuersetin ve Bipiridin) tedavisi sonrası IC ₅₀ ve IC ₉₀ sonuçları.....	54
Çizelge 4.3. A549 insan akciğer kanseri hücrelerinin Cu(II) flavonoid ile 48-72 saat tedavisi sonrası MTT canlılık yüzdelere göre IC ₅₀ ve IC ₉₀ değerleri.....	56
Çizelge 4.4. A549 insan akciğer kanseri hücrelerinin Cu(II) flavonoidile 48-72 saat tedavisi sonrası ATP canlılık yüzdelere göre IC ₅₀ ve IC ₉₀ değerleri.....	57

1.GİRİŞ

Kanser, dünyadaki başlıca sağlık sorunlarından biridir; hastalık anormal hücre büyümesi ve invaziv davranış ile karakterizedir (Zhang ve ark. 2016). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından düzenlenen son verilere göre, yeni tanı alan kanser vakalarının ortalama sayısı yılda 14 milyonu aşmakta olup sonuç olarak %60'dan fazla ölüme neden olmaktadır (8,8milyon) (Russo ve ark. 2017). 2020 yılında Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın sonuçlarına göre, Dünyada her yıl yaklaşık 14 milyon kişinin yakalanıp, 8,2 milyon kişinin ölümüyle sonuçlanan kanser; herhangi bir ayırım yapmaksızın tüm insanlığı olumsuz yönde etkilemektedir. Kanserde seyir artmaya devam ettiği sürece, bu sayının 2030 yılında 22 milyona ulaşması beklenmektedir (Anonim 2020). Türkiye'de erkeklerde en fazla akciğer ve prostat kanseri görülürken, kadınlarda ise en fazla meme kanseri görülmektedir. Her 4 kadın kanser hastasından birine meme kanseri teşhisi konulmaktadır (Anonim 2020). Kanser hücreleri birikerek tümörleri (kitleleri) oluştururlar, tümörler normal dokuları sıkıştırıp içine sızabilirler ya da tahribata sebep olabilirler. Eğer bu hücreler oluştukları tümörden ayrılırsa, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Gittikleri yerlerde tümör kolonileri oluşturur ve büyürler. Kanser tedavisinde yer alan cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi uygulamalarındaki ilerlemelere rağmen kansere bağlı ölüm oranı hala yüksek seviyededir (Huang ve ark. 2017). Akciğer kanseri, en sık görülen malignitelerden biridir ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen sebeplerindendir (Leung ve ark. 2014; Huang ve ark. 2017). Diğer kanser türleriyle karşılaştırıldığında akciğer kanseri; tütün kullanımı, sigara dumanına maruz kalma, duman ve diğer olası nedenlerden dolayı hızla artmaktadır (Huang ve ark. 2017). Akciğer kanserine bağlı ölümlerin en büyük nedeni tütünlü ürünlerin kullanımıdır. WHO, sosyo ekonomik düzeyin kansere olan etkisinin fazla olduğunu ve bu bağlantının zaman içerisinde güçlendiğini söylenmektedir. Erken teşhis politikalarının devam ettirilmesi ise, milyonlarca insanın kanserden kurtulması için en önemli konu olmaktadır (Anonim 2020). Kanser hastalığının tedavisinde, hücre ölümü mekanizmaları ile yapılan çalışmalar yoğun ilgi görmektedir. Apoptoz, en çok bilinen ve araştırılan hücre ölüm yollarından biridir. Apoptozu anlamak tümör gelişim ve tedavi sürecinde daha iyi değerlendirmeler yapabilmek için önemlidir. Apoptoz yani "moleküler düzeyde gerçekleşen programlı hücre ölümü", genetik anlamda hasarlı hücreleri gelişim

sürecinde, DNA'ya ya da enfeksiyona bağılı olarak yok edebilmektedir (Kaplan ve ark. 2017). Hastalık durumunda apoptozu anlamak, patogeneze esnasında gözlenen ipuçları ile hastalığın tedavisine ilave bilgiler vereceğinden büyük önem kazanmaktadır. Bu nedenle, apoptozun moleküler mekanizmasının anlaşılması yeni ilaçlar ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için gerekmektedir (Kaplan ve ark. 2017). Kanser tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi yöntemler en sık başvurulmuş tedavi metodları olmakla birlikte, hormon terapisi ve biyolojik yöntemlerin kullanılması gibi farklı yaklaşımlar da diğer yöntemlere destek olacak şekilde birlikte ya da tek başına kullanılmaktadır. Her bir yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Ancak kanser kişiye özgü bir hastalıktır ve tedavi süreci de kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Bu yüzden kesin tedavi yönteminin varlığından bahsetmek imkânsızdır (Baykara 2016). Son zamanlarda kanser tedavisinde metal bileşiklerin önemi daha net anlaşılmakta ve deneysel çalışmalarda da görülmektedir. Kanserde metal içeren bileşiklerin tedavi edici etkisi üzerine yapılan en eski çalışmalar, 16.yüzyıla dayanmaktadır. Metal bileşik cisplatin, [cis-diamminedichloroplatinum(II)] 1965 yılında Rosenberg tarafından antiproliferatif etkisi ve 1978 yılında FDA tarafından onaylanıp, kemoterapötik bir ajan olarak çeşitli kanser türlerine (ovaryum, beyin ve boyun, mesane, testiküler ve akciğer kanserleri) karşı yüksek toksisite gösterdiği kanıtlanmıştır (Leung ve ark. 2014; Huang ve ark. 2017). Cisplatin bu başarısına rağmen, tıbbi kullanımında nörotoksikite, hepatotoksikite ve nefrotoksikite gibi ciddi yan etkiler göstermiştir. Tüm bunların sonucu olarak cisplatin kadar etkili ancak yan etkisi az veya olmadığı düşünülen metal içerikli güçlü kemoterapötiklere ilgi artmıştır. Metal bileşiklerinin tedavide başarısının artması ile şimdiye kadar göz ardı edilmiş metal temelli ilaçların gelişimine de öncelik vermektedir.

Kemoterapi ilaçları, akciğer kanserinin tedavisi için kombinasyonlarda ve hastaların tedaviye nasıl yanıt verdiğine bağılı olarak farklı tedavi çizgilerinde kullanılmaktadır (Peters ve ark. 2012). Bu komplekslerden biri olan Bakır (Cu) kompleksleri ile ilgili literatürde özellikle son yıllarda artan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. 2003 yılında Martínez ve ark. tarafından yapılan, 5-hidroksitriptofan içeren bir Cu(II) kompleksinin sentezi, karakterizasyonu ve biyolojik (antioksidan, antikanser, toksisite ve nöroprotektif) tayinleri yapılmış ve buna bir ligand eklenerek sitotoksik aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Bu kompleks A549, H1299 ve Hela hücre soylarında sitotoksik etki

gösterirken, sağlıklı akciğer fibroblastlarında toksik olmadığı belirlenmiştir. Metal kompleksler için potansiyel biyolojik hedefler DNA ve protein olduğundan, metal komplekslerinin DNA/protein ile olan etkileşimleri, bağlanma modunun ve kapsamının belirlenmesinde büyük ilgi görmüştür. Metal komplekslerinin hem kovalent hem de kovalent olmayan etkileşimler yoluyla DNA'ya bağlandığı bilinmektedir. Farklı metal bileşiği olan çinko(II) komplekslerinin sentezi ve karakterizasyonu, ayrıca DNA bağlanma afiniteleri ve yapısal özellikleri belirlenmiştir. (Yılmaz ve ark. 2016). Sonuçta antioksidan etkinliğe sahip güvenli antikanser ve nöroprotektif ilaçların geliştirilmesi için umut verici olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen bilgiler doğrultusunda mevcut tez çalışmasında, Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü tarafından sentezlenmiş Cu(II) flavonoid kompleksinin A549 akciğer kanseri hücresi üzerindeki olası sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Kanser

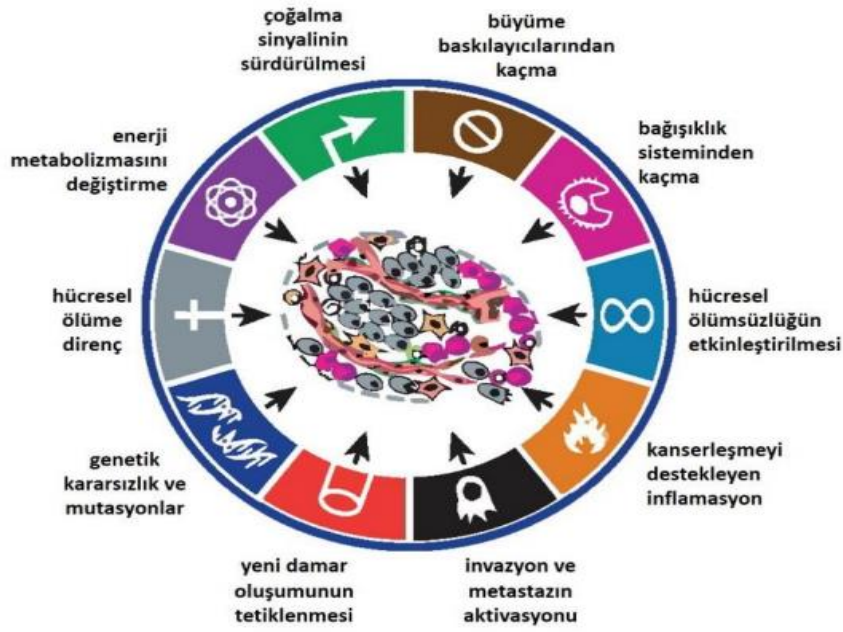
Kanser tanımı, ilk olarak Hipokrat tarafından (M.Ö. 460-377) organizmada tedavi edilemeyen yeni oluşumları anlatmak için kullanıldığı bilinmektedir. Hipokrat, vücut yüzeyinde gelişen, diğerlerinden farklı karakterde olan, kırmızı renkli ve daha yavaş büyüyen şişliklere “Carcinos” ya da “Carcinoma” demiştir (Ünal 2006). Hücrelerin çoğalması, sağkalımı ve farklılaşması organizmanın gereksinimlerine bağlı şekilde düzenlenmektedir. Kanser hücrelerinde bu olayların düzenlenmesinde etkili olan mekanizmaların aksaması veya ortadan kalkması söz konusudur. Bundan dolayı hücreler kontrolsüz bir şekilde bölünerek çoğalmaya başlar. Hücrelerin bu anormal çoğalma süreci ile ortaya çıkan tümör benign (iyi huylu) veya malign (kötü huylu) olabilmektedir (Cooper ve Hausmann, 2006). Benign tümörler çevredeki dokuya yayılmadan oluştuğu bölgede kalabilir. Ancak malign tümörler ilerleyen aşamalarda kan veya lenfatik sistem aracılığıyla vücuda metastaz yaparak organizmadaki mevcut doku ve organların işlevini değiştirmektedir (Cooper ve Hausmann, 2006). Kanser, son yıllarda hızla artış gösteren bir hastalıktır. Farklı tedavi yöntemleri denenmesine rağmen günümüzde kanseri tamamen ortadan kaldıracabilecek bir tedavi metodu henüz bulunmamıştır. Kanser, yüzyılın başlarında ölüme neden olan hastalıklar arasında arka sıralarda iken bugün birçok ülkede kardiyovasküler vakalardan sonra ikinci sırada bulunmaktadır. Erkeklerde en sık görülen kanser türleri akciğer, kolorektal ve prostat iken; kadınlarda meme, kolorektal ve akciğerde görülmektedir (Aktaş 2010). Kanser tedavisinde ölümü azaltmak ve sağ kalım oranını arttırmak için farklı tedavi yöntemleri de kullanılmaktadır. Cerrahi yöntemler, kemoterapi, radyoterapi, immunoterapi, hormon tedavisi, sinyal ileti sistemi inhibitörleri, gen tedavisi ve anjiyogenez inhibitörleri kanser tedavisinde kemoterapiye ek olarak kullanılan tedavi yöntemlerindendir. Kanser tedavisi için son yıllarda birçok ilaç ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilmiş olsa da günümüzde ilerlemiş kanser vakalarında henüz tedavi seçenekleri oldukça azdır. Bu durum, kanser gelişim sürecinin aydınlatılmasını ve gerekenden çok sayıda araştırmanın yapılması gerekliliğiyle açıklanabilir (Aktaş 2010).

Günümüzde en sık karşılaşılan kanser türü, akciğer kanseri olmaktadır. Tüm yeni kanser vakalarının %12,8'ini oluşturur ve her yıl sıklığı %3 artış göstermektedir. Tüm kanser ölümlerinin içinde, akciğer kanserinin, erkeklerde ve kadınlarda en fazla ölüm nedeni olduğu ve kansere bağlı ölümlerin %17,8'inden sorumlu olduğu bilinmektedir (Bakar 2017).

2.1.1.Kanser hücrelerinin özellikleri

Normal hücrelerin bölünme sayısı sınırlı olurken, kanser hücrelerinin ise sınırsızdır. Kanser hücrelerinin bu özelliği immortaliteolarak bilinmektedir. İmmortalitenin mekanizmalarından biri kromozom uçları olan telomerlerdir. Normal hücreler farklılaşırken telomeraz enzimi de programlı bir şekilde gittikçe azalır ve buna bağlı olarak telomerler kısalır. Böylece tamamen farklılaşmış bir hücre siklusun G0 fazında durur ve sonunda çoğalma kapasitesini kaybeder. Oysa kanser hücrelerinde telomeraz enzimi etkinliğini sürdürür yani telomerlerin uzunluğu sabit kalır. Bu sayede hücreler sınırsız bölünme yeteneği kazanır (Shay ve ark. 2001).

Son yıllarda bir çok çalışma yapılmış olup, kavramsal ilerlemeyle birlikte enerji metabolizmasını yeniden programlama ve bağışıklık tahribinden kaçınma özellikleride kanser hücrelerinin özelliklerine eklenmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.2. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri; WHO 2014 yılı verilerine göre 2 093 876 (%11,6) vaka insidansı ile en sık görülen kanser türüdür. Kansere bağlı ölümlerde de 1 761 007 (%18,4) ile ilk sırada yer almaktadır. Cinsiyete bağlı dağılımına bakıldığında akciğer kanseri erkeklerde kanser sebebi ile gerçekleşen ölümlerde ve insidansda birinci sırada yer almaktadır. Kadınlarda ise insidansı meme ve kolorektal kanserlerden sonra 3. Sırada olmasına rağmen, kansere bağlı ölümlerde meme kanserinden sonra 2. sırada bulunmaktadır (Ferlay ve ark. 2014). Ülkemizdeki duruma bakıldığında insidans ve mortalite de akciğer kanseri ilk sırada yer alırken; kadınlarda mortalite meme kanseri ile neredeyse eşitlenecek düzeyde 2. sırada yer almaktadır. 2015 verilerine göre insidans meme, tiroid, kolorektal, uterus kanserinden sonra 5. sırada yer almakta. Erkeklerde ise insidans ve mortalite de akciğer kanseri ilk sırada gözlenmektedir (Ferlay ve ark. 2014).

Türk Toraks Derneği'nin yapmış olduğu "Türkiye'nin akciğer kanseri haritası" projesinde her yıl Türkiye'de 29,314 yeni akciğer kanseri vakası ortaya çıktığı bulunmuştur. Bu vakaların %80,7'si küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), %16,4'ü küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve %2,9'u ise diğer alt tiplerden

oluşmaktadır. Türkiye’de akciğer kanserine yakalanan hastaların yaş ortalaması 60 olup, %90,4’ü erkektir (Ferlay ve ark. 2014).

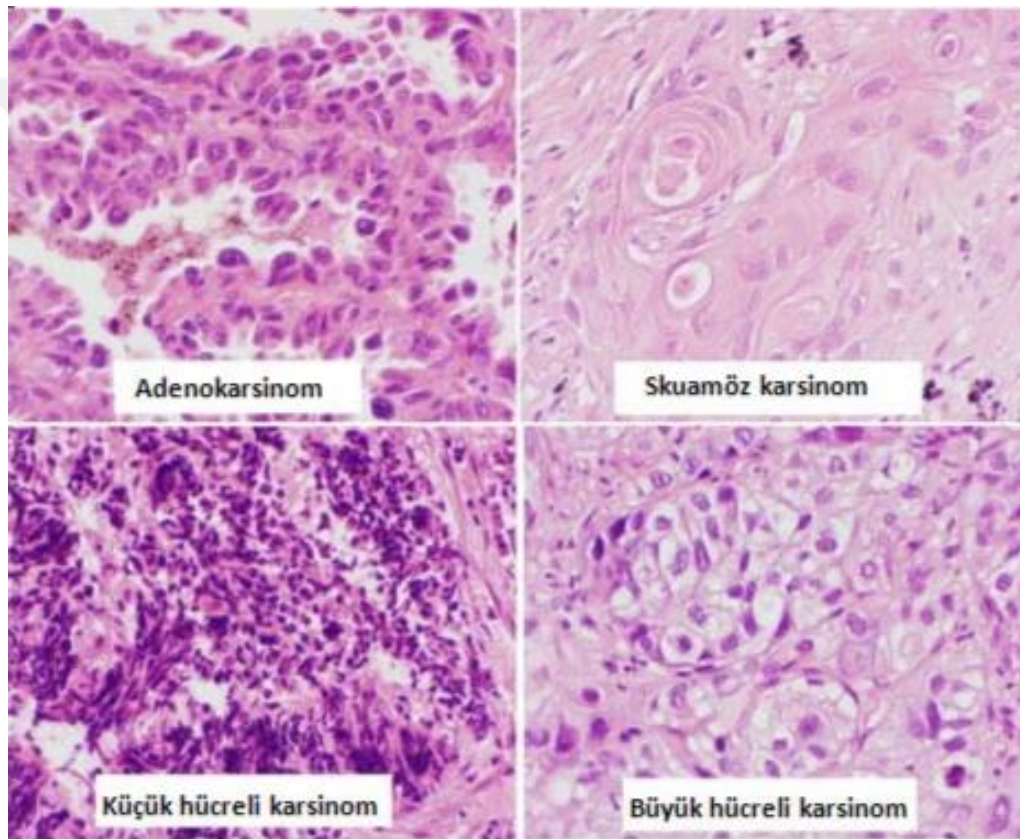
En sık rastlanan tip ise skuamöz olmayan hücreli iken 45 yaş altı popülasyonda ve kadınlarda en sık adenokarsinom saptanmaktadır. Olguların tanı konduğu esnada %47 gibi büyük çoğunluğu metastatik evrede iken, %37’si lokal ileri evrede, sadece %16’sı operasyona elverişli olan evrede yakalanmaktadır (Şencan ve Keskinlik 2015). Akciğer kanseri insidansı coğrafik varyasyon göstermektedir ve yaygın olarak gelişmiş ülkelerde görülürken, Afrika gibi gelişmekte olan ülkelerde insidans daha düşük seyretmektedir (Gilliland ve Samet 1994).

Akciğer kanserinde en önemli etiyolojik faktörlerden biri de sigaradır ve sigara içenlerde akciğer kanseri riski, içmeyenlerden 30 kat daha fazladır. Pasif sigara içiminde de akciğer kanseri riski 3,5 kat artmaktadır. Çünkü etrafa yayılan sigara dumanında da tüm zararlı bileşenler aynı şekilde bulunur ve sigara filtresinden de geçmediğinden çok daha tehlikeli bir hal almaktadır. Yaş, cinsiyet, mesleki ve çevresel karsinojenler, ırk, sosyoekonomik durum, geçirilmiş akciğer hastalıkları ve genetik faktörler geri kalan önemli etiyolojik faktörlerdir (Nam ve ark.2016). Asbest, bazı metaller (nikel, arsenik, kadmiyum vb.), radon ve iyonize radyasyona mesleki maruziyetin arttırdığı bilinen faktörler arasındadır (Economou ve ark. 1994). Özellikle asbest, arsenik ve radonun akciğer kanseri riskini sigara ile birlikte sinerjik olarak arttırabileceği öne sürülmektedir (Anonim 1998, Anonim 1987). Akciğer kanserine neden olan diğer dışsal sebepler arasında ise kromatlar, klorometil eterler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar eklenebilir (Samet 1989). Diyetin bilinen tüm kanserlerin yaklaşık %30’undan sorumlu olduğu ileri sürülmektedir(Willett ve Trichopoulos 1996). Birçok rapor, diyet faktörlerinin akciğer kanseri riskine katkıda bulunduğunu göstermektedir (Ruanov ve ark. 2000). Örneğin, A, C ve E vitaminleri gibi antioksidanların düşük serum konsantrasyonlarının akciğer kanserinin gelişim riskini arttırdığı gözlenmektedir(Boone ve ark. 1990,Woodson 1999).

2.2.1.Akciğer kanserinin histopatolojisi

Akciğer kanseri, mikroskop ile bakıldığında etkilenen hücre popülasyonunun büyüklüğüne bağlı olarak KHAK ve KHDAK olmak üzere iki tipe ayrılır. Küçük

hücreli akciğer kanseri sıklıkla beyin, kemik, karaciğer ve adrenal bezlere metastaz yapar. Tanıdan sonra, küçük hücreli akciğer kanseri olan çoğu insan yaklaşık bir yıl hayatta kalırken; %7'den azı beş yıl hayatta kalmaktadır (Bakar 2017). Kanser başlıca hücre tipleri KHAK ve KHDAK olup, ikinci kategori birkaç histolojik alt tip içerir, bunların başlıcaları skuamöz hücre kanseri, adenokarsinom ve büyük hücre kanseridir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Akciğer kanserinin histolojik olarak sınıflandırılması (Motadi ve ark. 2007).

Adenokarsinom, akciğerler boyunca yer alan küçük hava keselerini tutan terminal bronşiyolepitel hücrelerinden köken almaktadır. Skuamöz hücreli karsinom, nefes borusundan akciğerlere uzanan bu noktada bulunan skuamöz hücrelerden kaynaklanır. Büyük hücreli karsinom, akciğerleri hizalayan epitelyal hücrelerden kaynaklanmaktadır. Büyük hücreli karsinom, adenokarsinom veya skuamöz hücreli karsinom gibi

görünmeyen küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerini kapsar (Özercan ve Şimşek 2017).

2.2.2.Akciğer kanserinin moleküler biyolojisi

Karsinogenez, genetik hasar ile oluşabilmektedir. Genetik hasarın öncelikli hedefi olan genler; büyümeyi uyaran protoonkogenler, büyümeyi inhibe eden kanser baskılayıcı gen ve hasara uğrayan DNA'nın onarımını düzenleyen genlerdir. Akciğer karsinogenezinde rol alan moleküler mekanizmalar şöyle sıralanabilir;

- Onkogenlerin aktivasyonu,
- Tümör baskılayıcı genlerdeki aktivasyon kaybı,
- Hücre döngüsü düzenlenmesinde genler arasındaki farklılıklar,
- DNA onarımından sorumlu olan genlerde görülen değişiklikler,
- Büyüme faktörleri ve reseptörlerine ilişkin farklılıklar şeklinde sıralanmaktadır (Fong ve Minna 2002).

Gerçekleştirilen bu moleküler çalışmalar ile onkogenler, tümör supresör genleri ve DNA tamirinden sorumlu genlerde meydana gelen bazı değişikliklerin akciğer kanseri ile olan ilişkisi ortaya konulmuştur. 3 ve 11. kromozomların kısa kolundaki DNA sekans kayıpları, Ras ailesi (K-Ras, H-Ras, N-Ras), Myc ailesi (C-Myc, N-Myc ve L-Myc) ve p53 tümör supresör genlerin amplifikasyonu kanser gelişiminde genetik faktörler olarak gösterilemektedir (Economou ve ark. 1994, Rom ve ark. 2000, Alberg ve Samet 2003).

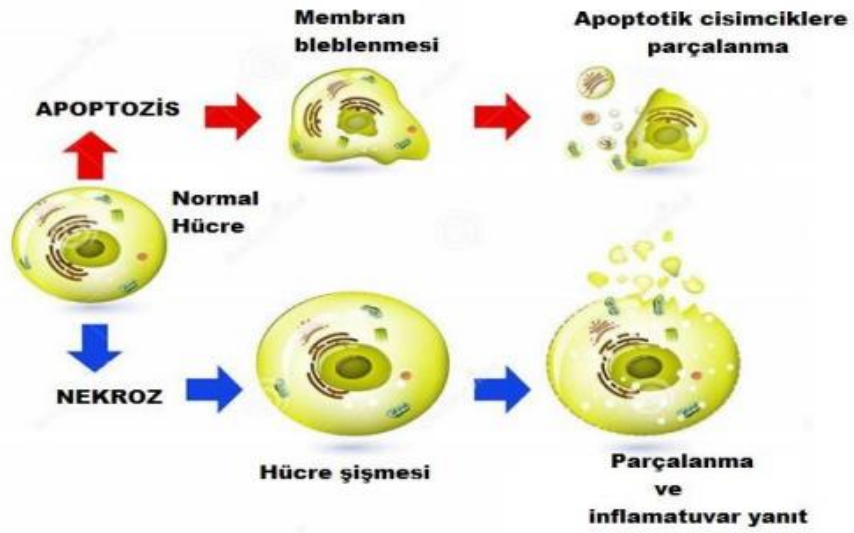
Ras ailesini oluşturan H-Ras, K-Ras ve N-Ras genlerindeki nokta mutasyonlar GTPase aktivitesini değiştirerek sürekli olarak sinyal aktiviteleri ortaya çıkarır ve malign dönüşüme sebep olur. KHDAK'ın %15-50'si K-Ras mutasyonu içerirken, sağkalımda azalma görülür (Jacobson 1999).

Myc ailesi, C-myc, N-myc ve L-myc'den oluşur ve hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında etkili olup DNA sentezinin başlamasında rol almaktadırlar. Myc genleri, sinyal artışı ve transkripsiyonel bozukluklar ile onkogen haline dönüşmektedir. KHAK'nin %18-31'i, KHDAK'lerinin ise %8-20'sinde Myc aktivasyonu bulunmaktadır. C-myc'in, tümör büyüme hızında artış ve sağkalımda kısalma ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir (Mabry 1998).

p53 proteini ise TP53 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Genom mutasyonlarını önleyerek genomun stabilitesini korur ve bundan dolayı “genomun koruyucusu” olarak adlandırılan p53, çok hücreli organizmalarda kritik bir önem arz eder. p53, hücre döngüsünü düzenlerken, kansere karşı koruyucu olarak tümör baskılayıcı bir görev yapmaktadır (Read ve Strachan 1999). KHDAK’lerinin %50’sinde p53 mutasyona uğramıştır (Rom ve ark. 2000). Aynı zamanda p53 proteini, hücre döngüsünü G1/S fazında inhibe eden bir transkripsiyon faktörüdür. p53 mutasyona uğradığında hücre döngüsü süreci kontrolsüz şekilde devam eder, dolayısıyla hücre proliferasyonunda artış meydana gelir. Ayrıca p53, proapoptotik bir protein olan Bax’ı indükleyerek apoptozise katkıda bulunabilir (Prives 1998).

2.3.Hücre Ölüm Mekanizmaları

İnsan organizmasında 200’den fazla farklı tipte hücre bulunmaktadır ve her bir hücrenin yaşam döngüsü; doğum, farklılaşma, işlev görme ve ölüm evrelerinden oluşmaktadır. Aynı zamanda hücrelerin ömürleri birbirinden farklıdır; yaşam süreleri örneğin nötrofiller için dokuda 4 gün, eritrositler için kanda 120 gün, sinir hücreleri için ise yaklaşık 50-100 yıl kadardır. Özellikle embriyonik gelişimde büyük önem arz eden hücre ölümü erişkin organizmada da etkinliğini sürdürür; çünkü dokuda hücreSEL doğum ve ölümler arasındaki dengenin devamlı şekilde sürdürülmesi gerekir. Canlı organizmada bilinen iki ana hücre ölüm biçiminden söz edilebilir: nekroz (nekrotik ölüm) ve apoptozis (apoptotik ölüm) (Anonim 2016)(Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Apoptozis ve nekrozun şematik karşılaştırılması (Anonim 2016).

Nekroz, hücrenin çeşitli sebeplerle zarar görmesi sonucu hücrenin şişip patlamasıyla meydana gelen ölüm şeklidir. Nekroz esnasında hücrenin yapı bütünlüğü bozulur ve dağılan içerik çevre hürelere de zarar verir ve bu tablo inflamasyona işaret eder.

Nekrotik süreç hücrenin kontrolsüz ölmesi olarak adlandırılırken, nekrozdan daha farklı bir ölüm şekli olan apoptoziste ise hücre kendi ölümü sırasında aktif rol alarak bu süreci programlı, denetimli ve düzenli biçimde sürdürür. Apoptotik ölümden inflamasyon gözlenmez ve çevre hücreler zarar görmeden fagositoz yoluyla hücre apoptotik cisimcikler haline dönüşür.

Hücreler görülen başka alternatif ölüm şekli ise “otofaji” dir (Nishida ve ark. 2008). Otofaji, hücrelerde organel ve hücresel bileşen kalıntılarının otofajikvakuoller (otofagozom) içine alınması ve sonrasında otofagolizozom kompleksi içinde parçalanması şeklinde gerçekleşir. Hücre bileşenlerini kendi içinde sindirir, bu nedenle bu ölüm modeline “kendini içten yemek” anlamına gelen otofaji denilmiştir. Otofaji de esasen programlı bir hücre ölüm şeklidir ve uyarının türü, süresi, şiddeti vb değişkenlere bağlı olarak gelişirken, apoptozun mümkün olmadığı durumlarda ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Hatta, minimal düzeyde mitokondriyal stresin otofajik, orta şiddetteki stresin apoptotik, çok şiddetli stresin ise nekrotik ölüme neden olduğu belirtilmektedir (Nishida ve ark. 2008).

Hücre ölüm mekanizmaları biyokimyasal, morfolojik ve fonksiyonel özelliklerine bakılarak sınıflandırılabilir. Bakıldığında “atipik hücre ölüm modelleri” adı altında toplanabilen daha pek çok farklı ölüm şeklinin tanımlaması yapılmıştır (Galluzzi ve ark. 2018). Esasen önerilen tüm ölüm modellerinin (tanımlarının) “nekrotik ve apoptotik” olarak bu iki ana yolağın bileşenleri ile gerçekleştiği belirtilmektedir. Nitekim, apoptoz, nekroz ve otofaji bu üç ana yolda görev olan genler ve hücre ölüm mekanizmaları bütünüyle birbirinden farklı değildir. Bu yollarda ortak çalışan genler bulunur ve yollar arasında karşılıklı etkileşimler “cross talk” gözlenir (Galluzzi ve ark. 2018).

2.4. Kanser ve Apoptoz

Apoptoz, çok hücreli organizmalarda doku homeostazının gelişiminde ve korunmasında önemli rol oynayan evrimsel olarak korunmuş ve genetik olarak düzenlenmiş bir hücre intihar şeklidir (Webb 1997, Wyllie 1997). İnsan gibi karmaşık organizmalarda, hücresel proliferasyon, bakım, onarım ve büyüme için bir ihtiyaçtır. Bununla birlikte, hücre proliferasyonunu düzenleyen genler, birkaç faktöre bağlı olarak mutasyona uğrarsa, kanser tehdidi kontrolsüz büyümenin bir sonucu olarak ortaya çıkar (Prendergast 1999). Hücre, ölüm ve büyüme arasındaki dengeyi korumalıdır. Bu dengenin sağlanması için hücresel proliferasyon ve apoptoz mekanizmaları birleştirilir. Hücre apoptozunu aktive eden farklı tetikleyiciler vardır. DNA hasarı, stres sinyalleri ve hipoksi dış etkenlere örnektir, FasL, TNF ve TRAIL gibi ölüm ligandları iç başlatıcılardır (Prendergast 1999). Bu uyarıların bazıları yeni başlayan tümörlerde de gözlenir. Hücre büyümesi ve mutasyonunun tetikleyicilerinin de apoptotik uyarıları indüklediği ve bunların engellenmediği takdirde, etkilenen hücrelerin otomatik olarak apoptoz ile çıkarıldığı iddia edilmektedir. Apoptozun bir sonucu olarak mutasyona uğramış hücreler vücuttan atılır. Bununla birlikte, tümör hücreleri ve bunların başlangıcı apoptoza karşı genellikle çoklu seviyelerde güçlü bir direnç sahiptir. Bu nedenle, kanser hücreleri, temel özellikleri olan apoptozdan kaçınabilir. Hem apoptozis hem de buna direnç oranının artması olan kanser dokuları hakkında ilginç bir gerçek var. Bu

anomalinin nedeni, etkilenen hücrelerin ölüme gitmeleri için büyük bir baskı ve hayatta kalabilmeleri için gösterdikleri dirençtir. Apoptoz 150'den fazla gen içeren oldukça karmaşık etkileşimli bir ağdır (Shivapurkar ve ark. 2002). Programlanabilir hücre ölümünü düzenleyen bir kaspaz ailesi vardır. Bunlar başlatıcı ve efektörkaspaz olarak sınıflandırılabilir. Başlatıcı kaspazlar CASP8, CASP9 ve CASP10 içerir. Bunlar proapoptik tetikleyiciler tarafından uyarılır ve CASP3, CASP6 ve CASP7 gibi efektörkaspazları etkin hale getirir. Apoptoz için iki ana yol vardır. Bunlardan biri CASP8, diğeri ise CASP9 tarafından başlatılmıştır (Shivapurkar ve ark. 2002). Bu yollar sırasıyla dışsal yol (ekstrinsik yol) ve içsel yol (intrinsik yol) olarak adlandırılır. Ekstrinsik yol, ölüm reseptörleri tarafından başlatılır ve intrinsik yol, mitokondriyal uyaranlarla aktive edilir.

2.4.1. Apoptozisin indüklenmesi

Hücrelerde apoptozis mekanizmasının çalışması için hücre içi ya da dışından gelen bir uyaranın, genetik mekanizmayı harekete geçirmesi gerekmektedir (Erdoğan 2003). Hücre içi uyaranlardan; hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, Bcl-2 gen ailesi, p53 geninin aktivasyonu, sitokinler, viral veya bakteriyel enfeksiyonlar ve onkojenlerdir. Hücre dışı uyaranlardan bir kısmı; koloni uyarıcı faktörler (CSF), tümör nekrosis faktör (TNF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), nöron büyüme faktörü (NGF), IL-2, Fas/FasL, radyasyon ve ilaçlar olarak bahsedilebilir. Bu faktörlerin yanında apoptozisi uyaran ya da düzenleyen çok sayıda gen de bulunmaktadır (Kaya 2007). Mitokondri apoptozisin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Apoptotik süreçte, apoptozis indükleyici faktör (AIF) ve sitokrom-c gibi birçok apoptotikfaktör, mitokondriden sitoplazmaya salınmaktadır (Kumar ve ark. 2005). Bu proteinlerin sitoplazmaya salınmasında görevli önemli protein Bcl-2 ailesidir. Bcl-2 ailesi proteinleri birbirine zıt etkili iki grup olan anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-1) ve proapoptotik (Bax, Bcl-Xs, Bad, Bim, Bak, Bid) üyelerden oluşur. Hücrenin apoptozisle ölüp ölmeyeceğini belirleyen bu proteinlerin rölatif oranıdır. Proapoptotik proteinler fazla eksprese edildiğinde hücreler apoptozis ise daha yatkın, antiapoptotik proteinler fazla miktarda eksprese edildiğinde hücreler apoptozise daha dirençli olmaktadır (Kumar ve ark. 2005). Proapoptotik ve antiapoptotik üyeleri olan Bcl-2 ailesi, mitokondri üzerindeki etkilerini iki farklı (zıt) şekilde göstermektedir. Bcl-2, ya sitokrom c'nin sitozole salınmasını

sağlayıp apoptozisi uyararak ya da sitokrom c salınımına engel olup apoptozisi baskılayarak gösterir (Palmer ve ark. 2000, Suh 2002).

Bu mekanizmada görev alan bir başka yapı da kaspaz aktivitesidir. Kaspazların aktivasyonu da apoptozun indüklenmesinde görev yapmaktadır. Kaspazlar, proteinleri aspartat kalıntılarının ardından bölen hücre içi sisteinproteazlardır. Hatalı düzenlenen kaspaz aktivitesi, hücre için ölümcül olabilmektedir, bu sebeple kaspazlar, prokaspazlar olarak sentezlendikten sonra belirli bölgeleri kesilerek uzaklaştırılır ve aktif kaspaz halini alırlar (Fischer ve ark. 2003, Solakoğlu 2009). Kaspazlar birbirlerini proteolitik olarak aktifleştirerek bir kaskada neden olurlar. Bu konuyla ilgili detaylı bilgi, apoptozis mekanizmaları konusunda detaylı olarak verilmektedir. Başlatıcı kaspazlar (Kaspaz 2, 8, 9, 10) apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektörkaspazlara (Kaspaz 3, 6, 7) naklederler.

Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (Adams ve Cory 2001, Adrain ve Martin 2001, Spierings ve ark. 2004).

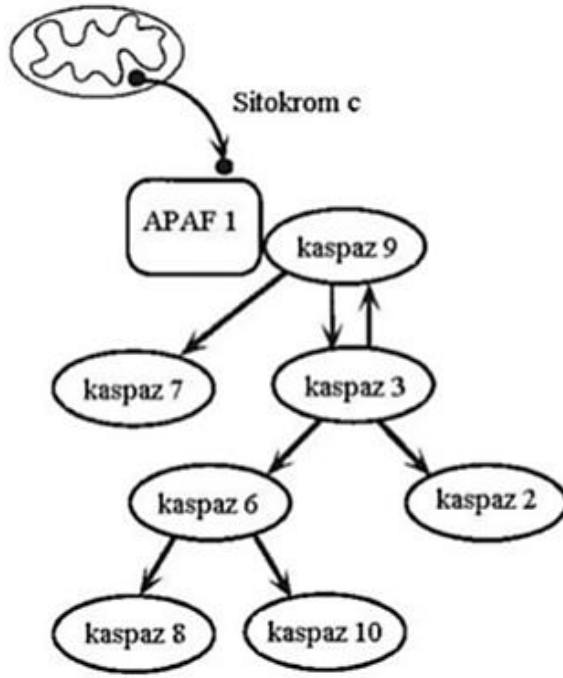
2.4.2.Apoptozisin mekanizmaları

Kaspazları aktifleştirmek suretiyle, apoptozu gerçekleştiren üç ana yolak olduğu ileri sürülmektedir. Bunlar; içsel (intrinsik) yolak, dışsal (ekstrinsik) yolak ve ER stresi bağımlı yolaklardır.

2.4.3. Ekstrinsik (Dışsal) yolak

Ölüm reseptörleri (DR) olarak bilinen ve Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü (TNFR) geni ailesinin üyesi olan; TNFR-1, Fas/CD95/APO-1 ve TNF-İlişkili Apoptozis İndükleyici Ligand (TRAIL) reseptörleri olan DR-3 (TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1) ve DR-5 (TRAIL-R2)'in ilgili ligandlarla etkileşime girmesi sonucunda apoptozis indüklenmektedir. TNFR ailesi üyeleri, tip I transmembran proteinleri olup hepsi sistein bakımından zengin ekstrasellülersubdomainler içermektedirler. Bu özellik TNFR süper ailesi üyelerinin kendilerine özgü ligandları tarafından tanınmasını sağlamaktadır. Ölüm

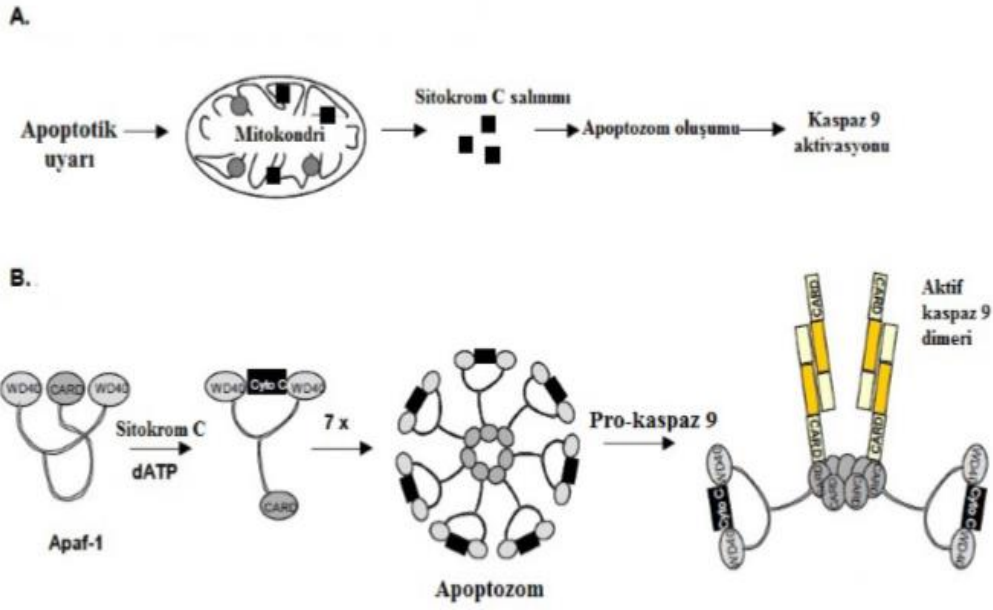
reseptörleri ayrıca apoptotik sinyalin transdüksiyonu için gerekli olan 80 aminoasit uzunluğunda intraselüler Ölüm Domaini (DD; “Death Domain”) içerir. Ölüm reseptörlerine bağlanan ligandlar (FasL, TNF α , VE TRAIL) yapısal olarak reseptörler ile ilişkili proteinler olup TNF süperaillesine aittir. Bu ölüm ligandları tip II transmembran proteinleri gibi eksprese edilirler. Bazı durumlarda, bu proteinler proteolitik kırılabilir ve serbest kalabilirler (Ghobrial ve ark. 2005, Guicciardi ve ark. 2009). Ölüm reseptörlerinin ligandları yani aktivatörleri reseptörlerin oligomerizasyonuna yol açarak aktifleşmelerine neden olmaktadır. Reseptörlerin aktivasyonu, Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi (DISC) denilen ve proteinlerden meydana gelen bir kompleks oluşumuna sebep olur. DISC, adaptör protein Fas ilişkili ölüm alanını (FADD) ve TNFR-1 ilişkili ölüm bölgesi proteinini (TRADD) içerir. Bu bölgeler, prokaspaz-8’i aktifleştirmektedir. DISC yapısında bulunmakta olan prokaspaz 8’in aktivasyonu sonrasında kaspaz 8 sırasıyla kaspaz 3, 6 ve 7’nin aktive olduğu bir kaspazkaskadını harekete geçirir (Şekil 2.4). Kaspaz 8’in aktif hale geçmesi ayrıca Bid’in aktive olmasına neden olur. Kırılmış Bid (tBid) sonrasında mitokondriye geçer ve sitokrom c, SMAC ve kalsiyum salınımını uyarır (Elmore 2007, Solakoğlu 2009, Dickens ve ark. 2012).



Şekil 2.4.Kaspaz Kaskatı (Atagün 2011).

2.4.4. İçsel (intrinsik)/mitokondriyal yolak

Uyarı aldığımızda, mitokondriden sitokrom-c salınımını sağlar ve ölüm sinyaline sebep olur. İki yol da, düzenleyici ve yapısal molekülleri kıran ve sonucunda hücrenin ölümüne sebep olan kaspaz denilen proteazkaskadının aktivasyonunu içeren orta yolda birleşir (Ghobrial ve ark. 2005). Mitokondriyal yolun en önemli olayı ise mitokondri dışı membranpermeabilizasyonudur. Permeabilizasyon sonucunda; sitokrom c, mitokondri türevli kaspazaktivatörü/IAP bağlayıcı protein Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, AIF ve endonükleaz D (EndoG) gibi mitokondri membranproteinlerisitozole salınır. Mitokondri içi membran yüzeyinden sitokrom c'nin sitozole salınması ile sitokromc, sitoplazmik protein Apaf-1(apoptotikproteaz aktive edici faktör-1)'e bağlanır ve onu aktive eder, dATP/ATP'nin de ortamda bulunması ile Apaf-1/sitokrom c kompleksi heptamerik şekilde yapıya oligomerize olur. Bu yapı, prokaspaz 9'un Apaf-1 ile etkileşimini mümkün kılar ve apoptozom kompleksi oluşur (Şekil 2.5).



Şekil 2.5.Kaspaz aktivasyonunun mitokondriyal yolu, A.Kaspaz aktivasyonu. B.Apoptozom oluşum ve aktivasyonu (Gewis 2004).

Apoptozom, başlatıcı kaspaz olan kaspaz 9'u aktive etmektedir. Aktif olan kaspaz 9, kaspaz 3'ü ya da diğer ilerletici kaspazları aktive ederek kaspazkaskadına aracılık eder. Ayrıca kaspaz aktivitesini inhibe eden ve aktiviteleri Smac veya Omi/HtrA2 gibi fonksiyonel analoglar ile engellenmiş birçok IAPs (apoptosis inhibitörleri) vardır. Ölen hücrelerde Smac ve Omi/HtrA2 (mitokondriyal proteinler, proapoptotik proteinler) mitokondriden salındığında IAPsinaktifte olmakta ve böylece ilerletici kaspazlarıninhibisyonu engellenerek hücrelerin apoptozise gitmeleri sağlanır (Ulukaya 2003, Riedl ve Shi 2004, Li ve ark. 2012, Duprez ve ark. 2009).

Her iki yolda mekanizmaları gereği, kaspazbağımlıapoptozisi göstermektedir. Ayrıca kaspazlardan bağımsız olarak apoptoza neden olduğu düşünülen kaspaz aktivasyonunun gerçekleşmediği mekanizmada bulunmaktadır.

Bu mekanizmada AIF mitokondriden salınıp nükleusa geçer ve nükleazları aktifleştirerek DNA hasarına yol açmaktadır. AIF, steroidler, granzyme B ve endonukleaz G kaspazlardan bağımsız olarak apoptozise sebebiyet verir (Ulukaya 2003).

2.4.5. Endoplazmik retikulum aracılı yolak

Amiloid β nörotoksisitesine katkıda bulunan kaspaz 12'ye bağımlı Endoplazmik Retikulum (ER) aracılı apoptotik bir yol tarif edilmiştir (Nakamura ve ark. 2000, Keane ve ark. 2001). Bu yolda mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptörü, apoptozisten ayrı bir yol olup kaspaz 12, ER membranında lokalize halde bulunur ve ER aracılı apoptozis için gerekli bir kaspazdır. Son çalışmalar göstermiştir ki Ca^{++} seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin ER'yi etkilemesi ile prokaspaz 12 aktifleşir. Aktifleşen bu kaspaz 12 sitoplazmaya gider ve kaspaz 9 ile etkileşir. Sonuç olarak sitozolik kaspaz kaskadını aktifleştirir (Rao ve ark. 2001).

2.5. Apoptozisin Düzenlenmesinde Görev Alan Genler

Apoptozis kontrol mekanizmasında çok sayıda protein, gen rol oynamaktadır ve apoptotik yollarda üstlendikleri görevler baz alınarak sınıflandırılırlar. Çeşitli uyaranlar bir takım ölüm yollarının düzenleyicilerini aktifleştirirler ve bir kaskad başlatırlar. Apoptozis, “geri dönülemez” olan noktaya hedef proteinleri enzimatik olarak kıran kaspazların aktifleşmesiyle gerçekleşir (Ola ve ark. 2011). Bcl-2 ailesi, kaspaz aktivasyonunu ya negatif ya da pozitif (örneğin Bax) yönde düzenler. Diğer bazı apoptozis düzenleyicileri biraz daha ileri aşamalarda rol alır ve bazı kaskadları aktifleştirirler. Bu düzenleyiciler, apoptozisi aktive eden ve tümörjenez ya da kanser terapilerinde önem teşkil eden c-myc gibi onkogenler veya p53 gibi tümör baskılayıcı genler olarak bilinir.

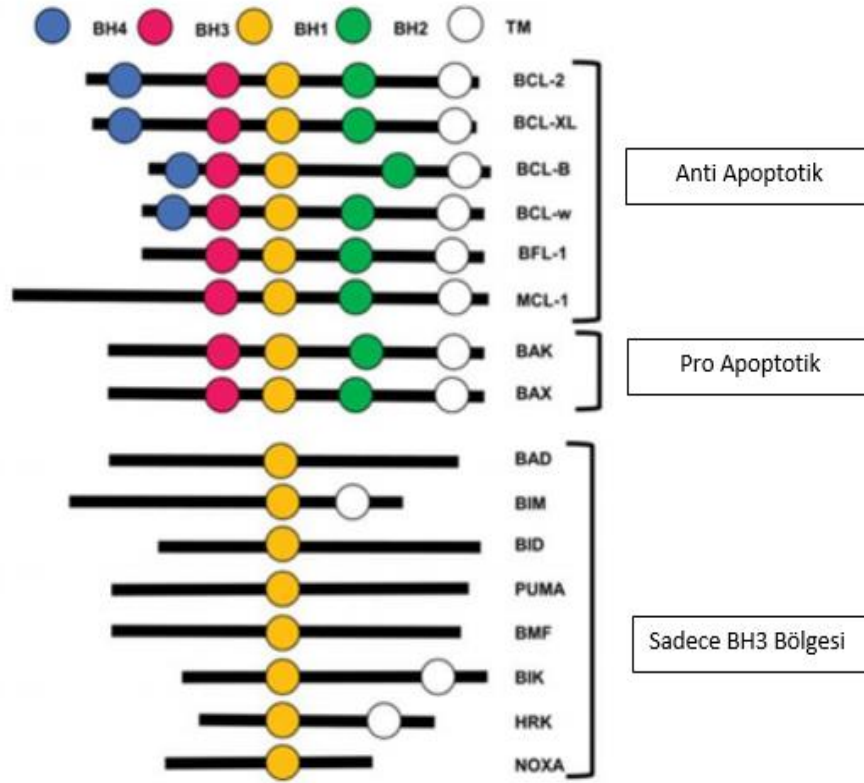
Apoptozun geçmişine bakıldığında, ilk kez *C.elegans* isimli nematodunda çalışılmıştır ve *C.elegans*' ta tanımlanan ilgili genler Ced-3 ve Ced-4'tür. Ced-3 bir sistein proteazıdır ve bunlar memeli organizmada sistein proteazlarla benzerlik gösterir (Ola ve ark. 2011). Diğer bir gen Ced-9 ise apoptozu durdurmaktadır ve insanda bulunan homoloğu Bcl-2' dir. Apoptozda rol oynayan genler bulunmaktadır ve bir kısmı hücre yüzeyinde, bir kısmı ise hücre içi sinyal iletim yollarında görevlidir. Apoptoziste görev alan en önemli gen grubu Bcl-2 ailesidir ve apoptoz ilişkili genleri şu şekilde sıralanabilir;

- Bcl-2 ailesi proteinleri
- Transkripsiyon Faktörleri (p53, myc,)
- Proteazlar, Kaspazlar, • Fas, TRAIL, TNF (reseptör ve ligandlar)
- Kinaz grubu (RIP3, CAP, AKT, PKA, MAPK)
- Mitokondriyal proteinler (sit c, AIF, SMAC, VDAC, ANT)
- Kaspaz düzenleyicileri (IAP/Survivin, Apaf-1)
- Diğerleri (FADD, TRADD, DAD1)

Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 proteinleri, apoptozun kilit kontrol noktalarında görevlidir. Ailenin kurucu üyesi Bcl-2' dir ve B-hücre lenfomasında tanımlandığı için adını bu şekilde almıştır ('B cell lymphoma/leukemia-2').

Bu aile üyelerinden (Şekil 2.6) bazıları apoptozisi hızlandırırken "pro-apoptotikler", bazıları inhibe eder "anti-apoptotikler". Bcl-2 proteinleri genelde pro-apoptotik ve anti-apoptotik özelliklerine göre ya da Bcl-2 homoloji (BH) domainlerine göre (BH1-BH4) iki farklı şekilde sınıflandırılmaktadır (Ola ve ark.2011).



Şekil 2.6. Bcl-2 aile üyeleri (Pohl ve ark. 2018).

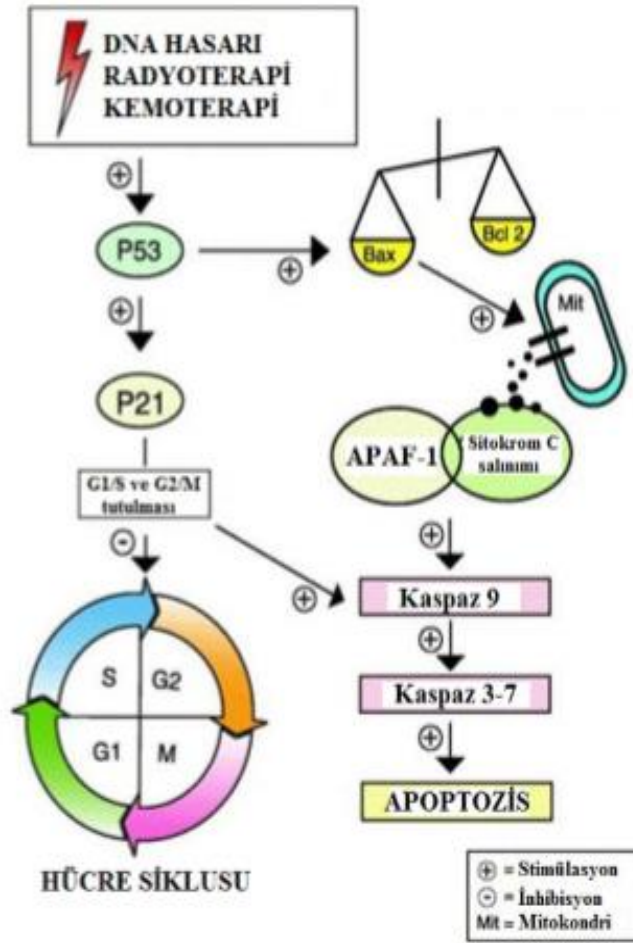
p53Geni

Hücrel stres durumunda apoptozu tetikleyen p53 geni, en önemli tümör baskılayıcı gen olarak bilinmektedir (Li ve ark. 2012). Başta Bcl-2 ailesi olmak üzere apoptoz sürecinde rol oynayan pek çok gen vardır ve p53 hedef genleri arasında yer almaktadır. p53 hedef genleri;

- Bcl-2 proteinleri
- Ölüm reseptörleri
- Adaptör proteinler
- Diğerleri (p53AIP1, p53DINP1, Peg3, PERP, PIG1).

DNA hasar durumu olmadan, stres altında bulunmayan hücrelerde sitoplazmik p53'ün transkripsiyon amaçlı nukleusatranslokasyonu engellenir ve hücredeki konsantrasyon

düzeyi de oldukça düşüktür. p53'ün apoptoziste iki farklı rolü vardır. Biri transkripsiyon bağımlı bir diğeri ise transkripsiyon bağımsız şeklindedir. DNA hasarı varlığında mdm2 inhibisyonundan kurtulan p53 hasar tamiri için siklusu durdurur; ancak tamir mümkün olmaz ise Bcl-2 ailesinden pro-apoptotik olan proteinlerden Bax/bak' ın direkt aktivasyonunu sağlar ve mitokondri aracılığıyla hücrenin apoptozunu başlatır (Li ve ark. 2012). Ya da dolaylı olarak mitokondride Bcl-2/Bcl-XL proteinlerine bağlı BH-3-only proteinleri serbestleşmesini sağlar ve Baxoligomerizasyonunu sağlar. Bu şekilde de apoptozu indüklemiş olur. p53 geni hücrenin apoptozundamajor rol oynayan genlerden birisidir ancak Bax/bak aktivasyonu ile hücrenin ölümü p53 ve diğer pro-apoptotik proteinlerin yokluğunda da gerçekleşebilir (Zhang ve ark. 2016). Hücre ölümünün aksine, hücrede canlılığının sürdürülebilmesini sağlayan iki ana yolak tanımlanmıştır; Biri PI3-Kinaz/Akt yolağı diğeri ise NF-kB yolağıdır. Bunların dışında Ras/Raf/MAP kinaz yolağı da hücrenin hayatta kalımını teşvik etmektedir. Hücre canlılığının devam etmesi ya da olası bir apoptoza gitmesi için birden fazla yolak bulunmakta ve birçok gen kontrolünde gerçekleşmektedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. P53 proteinin hücre siklusu ve apoptozis sürecindeki rolü (Gillham ve ark., 2007).

Myc

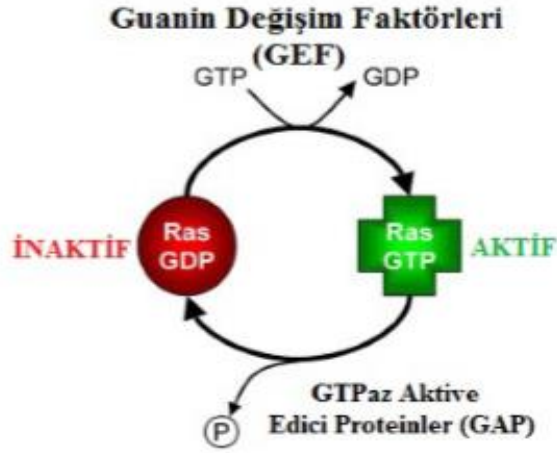
Transkripsiyon faktörü olan c-Myc, pek çok insan tümöründe anormal düzenlenmekte ve apoptozisin kontrolünde büyük önem taşımaktadır. İnsan c-Myc proteini 439 amino asitten oluşmaktadır. Nükleusta bulunur ve kısa ömürlüdür. c-Myc; metabolizmada, hücre siklusunun düzenlenmesi, protein biyosentezi, apoptozis, hücre adezyonu ve sitoskelet yapısını sağlayan belirli gen sınıflarıyla düzenli olarak etkileşimde bulunmaktadır. Protoonkogen olan c-myc'nin hatalı düzenlenmesi, hücre proliferasyonunu ve neoplastik transformasyonu teşvik eder (El-Deiry ve ark. 1993, Cachot ve ark., 1998). Bu hatalı düzenlenme ayrıca besin ve büyüme faktörü eksikliğinde apoptotik genleri aktif hale getirir. Myc, Wnt, Shh, ve EGF gibi çeşitli mitojenik sinyallerle aktive edilir. Bu hedef genlerin ekspresyonlarını

düzenleyerek, Mycaktivasyonu birtakım biyolojik etkilerle sonuçlanır (El-Deiry ve ark. 1993, Cachot ve ark., 1998).

Ras

Rasonkogen gen ailesi memelilerde p21s olarak adlandırılan molekül ağırlığı 21 kDa olan proteinleri kodlayan üç üyeden (H-, K- ve N-Ras) oluşmaktadır. p21s, membranla ilişkili proteinler olup GTP (guanintrifosfat) bağlayıcı proteinler olarak bilinmektedir. Ras ailesi proteinleri GTP ya da GDP bağlı formları, bu iki yapı arasında geçişleriyle hücre içerisindeki bazı proteinlerin yapılarının değişmesine ve fosforilenmelerine yol açarak hücre içi sinyal iletimini tetiklemektedir. Ras'ın bağlanan GTP'yi hidrolizinin ardından, proteine bağlı kalan GDP'nin uzaklaştırılması için Guanin Değişim Faktörlerine (GEF) gerek duyulmaktadır (Quincoces ve ark. 1997; Lowitz ve Casciato 2000; Martinez ve ark. 2003; Telkoparan ve Tazebay 2011). GEF proteinleri Ras-GDP ile etkileşir ve GDP'nin proteinden uzaklaşır ve Ras'ın hücre içi derişimi daha fazla olan GTP'yibağlayabilmesine olanak tanırırlar. Bağlanan GTP Ras'ın içsel GTPaz aktivitesi ile hidrolize uğrar (Şekil 2.8)

Ras'ın GTP bağlı olan formu, bu proteinin bağlandığı sinyal iletiminin daha alt basamağında bulunan efektörlerin fosforillenerek sinyal iletimine katılmalarına sebep olmaktadır. GTPaz bozuk olması molekülün GTP formunun devamlı olarak aktif kalmasına yol açtığından nükleus proteinleri ve DNA transkripsiyonu devamlı olacaktır (Quincoces ve ark. 1997; Lowitz ve Casciato 2000; Martinez ve ark. 2003; Telkoparan ve Tazebay.2011).



Şekil 2.8.Ras ailesi G-proteinlerin işlevsel döngüleri (Telkoparan ve Tazebay2011).

Rb

Rb geni, insanda 13. kromozomun üzerinde yer alan tümör baskılayıcı gen olarak bilinmektedir. Rb proteini, Rb gen ürünü olup hücre siklusunu düzenlemede önemli role sahip nükleer bir fosfoproteindir. Rb proteini, S fazında hücresel replikasyonda yer alan nükleer transkripsiyon faktörü olan E2F proteini ile etkileşmektedir. Bu etkileşim E2F'nin transkripsiyon faktörü olarak işlev görmesini önlemektedir. Rb proteininin fosforile hali inaktif formdayken, defosforile olan hali ise aktiftir (Kopnin 2000, Hanahan ve Weinberg 2000). Fosforlanmamış Rb, E2F tarafından kontrol edilen genlerdeki transkripsiyonu baskılamak amacıyla, E2F'ye bağlanır. Rb'nin G1'in sonunda fosforlanması, E2F'den ayrılmasına neden olur. Hücre döngüsünün devamı için gerekli proteinleri kodlayan hedef genlerin ekspresyonunu uyarmaktadır. Rb mutantlar (yapısal fosforile olmuş ve E2F bağlanmamış), S fazı restriksiyon bölgesinde kontrolsüz hücre bölünmesine neden olur ve devamında hücrelerde tümörojenik olabilmektedir (Kopnin 2000, Hanahan ve Weinberg2000).

2.6. Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

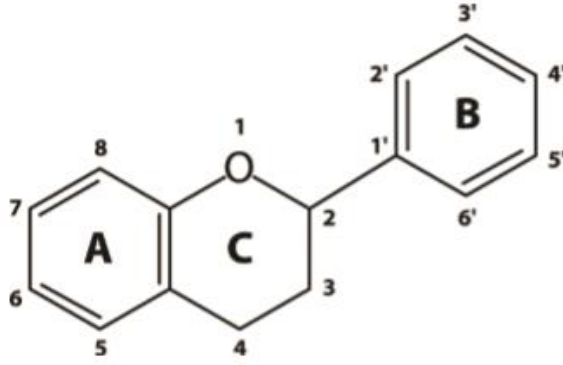
Apoptozis terimi, 1972 yılında ilk kez kullanıldığında hücrenin dış görünümüne göre karar veriliyordu. İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptozis, 80'li yılların sonunda DNA kırıklarının oluştuğu ve oluşan bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle tayin edilmeye başlanmıştır. 90'lı yıllarda ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktivasyonu ile ilgili bulguların ortaya çıkmasıyla apoptozis, kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metodlarla tayin edilebilmiştir. 90'ların sonunda ise fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemler apoptozis belirlemede kullanılmıştır.

Apoptozisin tayin edilmesine yönelik geliştirilen bu metodları, 2000'li yılların başlarında geliştirilen, sadece apoptotik hücrelerde kaspaz aktivitesiyle kırılan keratin 18 proteini, kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikörlerin kullanımı ile daha spesifik olarak saptanması takip etti. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler ve analizler genel hat itibari ile şöyledir;

- Morfolojik görüntüleme yöntemleri
- İmmunohistokimyasal analizler
- Biyokimyasal analizler
- İmmünolojik analizler
- Moleküler biyoloji yöntemleri (Ulukaya 2003, Akşit ve Bildik 2008, Güleş ve Eren 2008).

2.7. Flavonoidler

Flavonoidler, polifenollerin en büyük grubunu oluştururken, izoflavonlar, flavanoller, antosiyaninler, flavonlar ve flavanonlar olmak üzere alt sınıfları bulunmaktadır. Yapılarında iki benzen halkası ile bunları birbirine bağlayan üç karbonlu zincir yer alır (Şekil 2.9.). Yapıda yer alan iki fenolik benzen halkası (A ve B) bir heterosiklik piren halkası (C) ile bağlanmıştır (Kroft 1998). Kısmen polarize olan molekülün üç halkası da düzlemseldir. Flavonoidlerin-OH grupları kolayca glikozitleşme özelliğindedir.



Şekil 2.9.Flavonoidlerin temel halka yapısı(Kahraman ve ark. 2002).

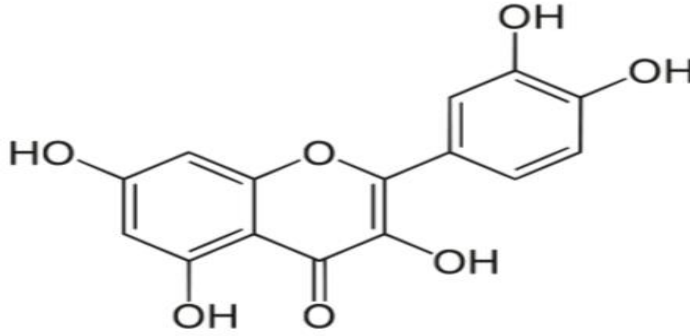
Doğada 5000 üzerinde flavonoid yapısında bileşik vardır. Bunlar bitkilerdeki renkli olan kırmızı, mavi ve sarı pigmentleri oluştururlar. Başlıca flavonoid kaynakları elma, limon gibi meyveler ile soğan ve karnabakar gibi sebzelerdir (Manach ve ark. 2004). Ayrıca, kahve ve çay gibi bitkisel kaynaklı içecek kategorisinde yer alırlar. Polifenollerin ve flavonoidlerin diğer antioksidan molekül ve enzimlerle birlikte, antioksidan savunma sistemine katkı sağlayarak pek çok hastalığa karşı koruma görevi üstlenmektedir (Rodrigo ve ark. 2014). Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri ve antioksidanlar arasındaki dengesizlikten kaynaklanan bir durumdur (Yalçın 1998). Oksidatif stresin ateroskleroz, kanser, yaşlanma ve nörodejeneratif bozukluk ve hastalık ile ilişkisi bulunmaktadır (Yalçın 1998, Aktan ve Yalçın, 1998). Flavonoidlerin antioksidan kapasitesi molekül yapısına bağlı olurken, serbest radikal süpürücü aktivitelerinin olmasında hidroksil gruplarının konumuyla alakalı olduğu bildirilmiştir (Kroft 1998). Bu moleküllerin antiviral, antialerjik, antikoagülan, antiinflamatuvar etkileri üzerinden terapötik potansiyelleri de mevcuttur (Wang 2000). Flavonoidler güçlü antikanser ajanları olarak bilinirler. Bu özellikleri antimutajenik ve antiproliferatif etkilerinden ve anjiogenez ile hücre sinyal iletimi ve hücre siklusunun kontrolündeki rollerinden ileri gelmektedir (Chahar 2011).

Flavonoidlerin antioksidan ve poliferasyonu önleyici işlevlerine ilaveten apoptozu tetikleme, hücre farklılaşması ve hücre döngüsünü düzenleme gibi özelliği bulunur (Choi ve ark. 2008).

2.8.Kuersetin

Kuersetinin antioksidan, antiinflamatuvar, antiagregan ve vazodilatatör etkileri olduğu bilinmekle birlikte çoğunun etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Antioksidan etkinin serbest metallerin bağlanması, serbest radikallerin temizlenmesi, enzim inhibisyonu ve koruyucu enzimlerin ekspresyonunun indüklenmesi gibi farklı kaynakları olduğu düşünülmektedir. Çalışmalar kuersetinin biyoyararlanımını arttıracak stratejiler üzerine yoğunlaşmaktadır (Nam ve ark. 2016).

Kuersetinin biyolojik aktivitesi metal iyonlarının varlığı ile etkilenmektedir. Kuersetin yapısında bulunan hidroksi- ve oxo- gruplarının varlığı (Şekil 2.10) çeşitli metal iyonları ile kompleksler oluşturma kabiliyeti sağlar (Misiak ve Chruscinskça 2010).

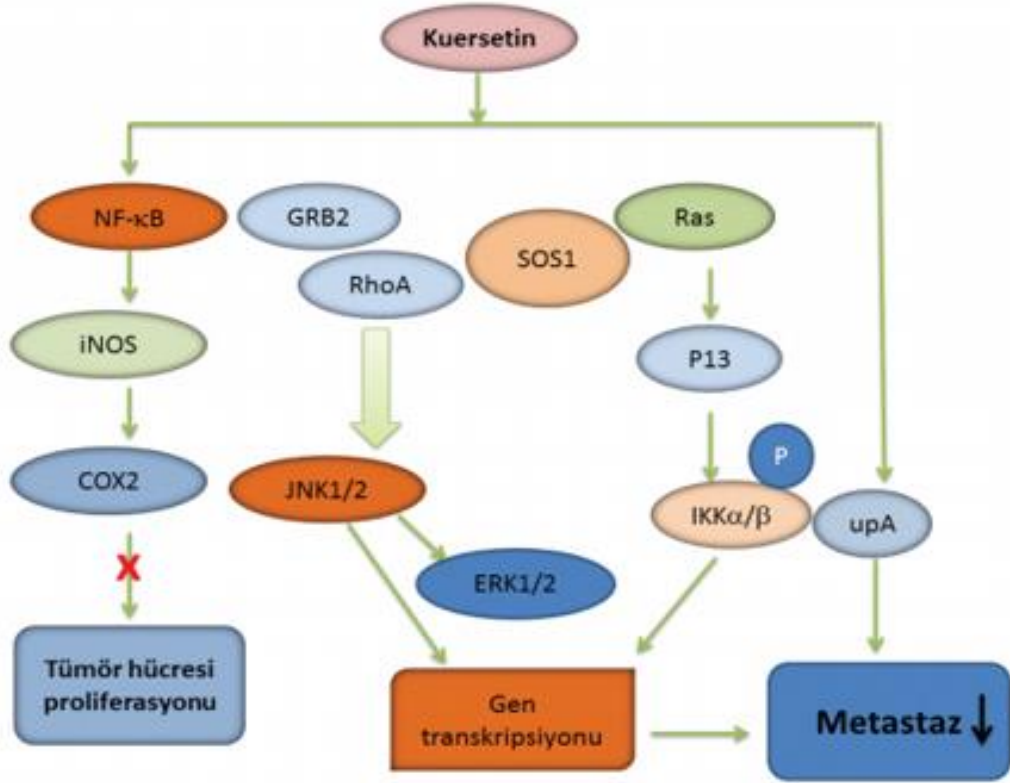


Şekil 2.10.Kuersetin açık yapısı (Li ve ark.2016).

Kuersetin potansiyel bir antikanser ajan olarak güçlü etkinlikleri bulunmaktadır. Farklı kanser hücre hatlarında apoptozu aktive ettiği, farklı hücre soylarında da apoptotik hücre popülasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Vidya ve ark. 2010).

Yapılan bütün çalışmalardan elde edilen sonuçlara bakıldığında, kuersetinin kanser hücreleri için toksik, normal hücreler için daha az toksik veya toksik olmayan bir etki gösterdiği ve kanser tedavisinde kullanılma potansiyeli olduğu gösterilmektedir (Moretti ve ark. 2016). Ancak, antikanser etki ve mekanizmaların ortaya çıkarmak ya da hedef dokuya ulaşması için yeni arayış ve girişimlere gereksinim vardır.

Kuersetin nanopartikülleri ile yapılan çalışmalar kullanılan dozun düşürülmesi, biyoyararlanımının artması ve antikanser etkisinde artış gibi sonuçlara neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.11) (Khan ve ark. 2016).



Şekil 2.11.Kuersetinin antikanser etkisiyle ilgili hücre içi proteinler ve yolaklar (Khan ve ark. 2016).

2.9. Flavonoid ve Metal Komplekslerin Kansere Tedavisinde Kullanımları

Metal bileşikler geçmişten günümüze bakıldığında kanser tedavisinde oldukça büyük bir başarı göstermektedir. Çalışmalarda sıklıkla yer verilen bu metal bileşikler etkinliklerinden dolayı da tercih edilmektedir. Bakıldığında, kanser ve lösemide metal ve metal içeren bileşiklerin terapötik (tedavi edici) kullanımı 16. yüzyıla dayandığı görülmektedir (Warra 2011). Metal bileşik içeren antikanser ilaç cisplatinin, 1965 yılında Rosenberg tarafından antiproliferatif etkisinin keşfi ve 1978 yılında FDA

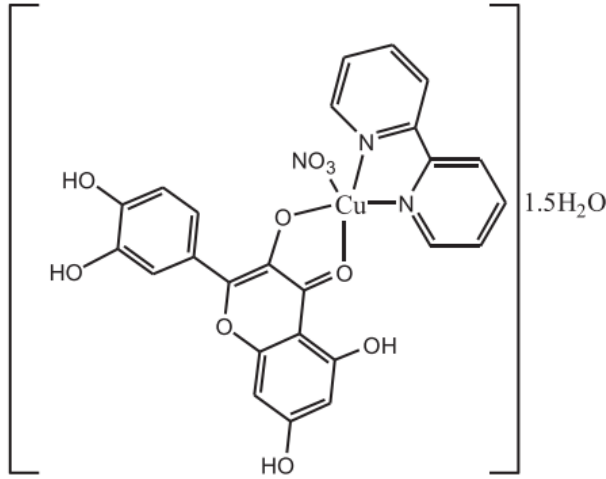
tarafından onaylanması ile kemoterapötik bir madde olarak çeşitli kanser türlerine karşı yüksek etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Rafique ve ark. 2010). Cisplatin her ne kadar başarılı olsa da henüz önlenemez yan etkileri de bulunmaktadır (Florea ve Büsselberg, 2011).

Flavonoid-metal kompleksleri yeni ilaç geliştirme çalışmalarında ön plana çıktığı gözlenmiştir. Bunun nedeni mevcut kanser ilaçlarının tedavi sürecinde yeterli başarı sağlamamasından kaynaklanmaktadır. Flavonoidler, metal bileşiklerle kombine edildiğinde, yan etkilerini azalttığı ve tedavi etkinliğini artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca, flavonoidler yapılarındaki karbonil ve hidroksil grupları ile metal iyonlarını koordine edebilir ve metal kompleksleri oluşturabilirler (Kasprzak ve ark. 2015).

Metal komplekslerinin biyokimyasal ve farmakolojik aktiviteleri serbest ligandlarla karşılaştırıldığında artmıştır (Dolatabadi, 2011). Flavonoid metal komplekslerinin antikanser etkileri in vitro olarak insan servikal karsinomu (Durgo ve ark. 2011), insan hepatomu ve osteoblast karsinoması üzerinde kanıtlanmıştır (Etcheverry ve ark. 2008). Bu nedenle literatürde son yıllarda bu bileşiklerin sentezi ve uygulaması ile ilgili çalışmalar yer almaktadır.

2.10. Tez Çalışmasında kullanılan Cu(II) Flavonoid Kompleksinin Biyokimyasal Yapısı

Bu tez çalışmasında kullanılan $[Cu(queH-1)Cl(phen)].2.5H_2O$ (queH = kuersetin, bpy = 2,2'-bipyridin), (molekül ağırlığı: 625,5 g/mol) şeklinde formüle edilen Cu(II) flavonoid kompleksi Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümü Doç. Dr. Hasene Mutlu Gençkal ve ekibi tarafından sentezlenmiş, karakterizasyonu yapılmış ve yayınlanmıştır (Alper ve ark. 2019).



Şekil 2.12. Cu(II) flavonoid kompleksinin kimyasal yapısı, [Cu(queH1)Cl(phen)].2.5H₂O(queH = kuersetin, bpy = 2,2'-bipyridin)] (Alper ve ark. 2019).

Flavonoidler metal iyonlarıyla kompleks oluşturabilmektedir. Flavonoidlerin metal iyonlarıyla şelat yapma yetenekleri, kapsamlı bir farmakolojik etkinlik katmaktadır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, flavonoid metal kompleksi etkinliğinin, tek başına flavonoid etkinliğinden daha fazla olduğunu göstermektedir (Afanas'eva ve ark. 2001).

Yapılan bir çalışmada, kuersetin-Cu kompleksinin DNA ile etkileşimi incelenmiş ve kompleksin antitümör özellik gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmada, kompleksin antitümör mekanizmasının, yalnızca reaktif oksijen türleri oluşumu ile ilgili değil aynı zamanda kompleksin DNA üzerine spesifik etkinlik gösterdiği bulunmuştur (Tan ve ark. 2009b).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal maddeler

- Cu(II) Flavonoid Kompleksi, Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

-MTT tuz (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid), Sigma, Almanya

-Adenosine 5'-triphosphate (ATP) bioluminescent somatic cell assay kit, Sigma, Almanya

-Muse® Annexin V &Dead Cell Assay Kit, Merck Millipore

-Muse® Caspase-3/7 Assay Kit, Merck Millipore

-Muse® OxidativeStress Kit, Merck Millipore

-Muse® Cell CycleAssay Kit MCH100106, Merck, Almanya

-Fetal sıgır serumu (FBS), Gibco

-Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin,10mg/ml streptomisin), Gibco

-Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco

-Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Gibco

-Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Gibco

-0,05% Tripsin-Etilen Diamin Tetra asetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco

-Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma

-Triton X-100, Sigma

-Adenosine 5'-triphosphate (ATP) Chemosensitivity Assay, Dcs Innovative DiagnosticSysteme, Hamburg, Almanya

-Tripanmavisi (%0,5), Biological Industries

-Hoechst 33342 62249, Thermo Fisher Scientific, ABD

-Tris bazı TRS001, Bio Shop, Kanada

-TCA T6399, Sigma, ABD

-Sülforodamin B sc-253615A, Santa Cruz, ABD

-Asetik asit 100063, Merck, Almanya

3.1.2. Sarf malzemeler

- 25cm² ve 75cm²'lik flask, Sunub
- 6 kuyulu plate, Sunub
- 96 kuyulu flatplate, Sunub
- 96 kuyulu beyaz pleyt 3917, Corning, ABD
- 5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Set inject
- 10µl'lik pipet uçları, Expell
- 100µl'lik pipet uçları, Expel
- 200µl'lik pipet uçları, Expell
- 1000µl'lik pipet uçları, Expell
- 10 ml hacimli serolojik pipet, Sunub
- 25 ml hacimli serolojik pipet, Sunub
- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Non-pyrogenic
- Steril santrifüj tüpleri (15ml), Sunub Steril santrifüj tüpleri (50ml), Sunub
- Thoma lamı, Marienfeld, Almanya
- Kriyovial, Sarstedt, Almanya
- 1 ml'lik cam pastör pipetler, ISOLAB, Almanya
- Otoklavlanabilir cam şişe, Isolab, Almanya

3.1.3. Cihazlar

- Aspiratör, Rocker 300, Tayvan
- Kuru hava sterilizatörü, Elektromag M 420, Türkiye
- Santrifüj, NF 800R, Türkiye
- 10µl, 100µl ve 1000µl'lik pipet seti, Orange Scientific
- 0,5-5ml pipet, Brand
- 10ml pipet, Eppendorf
- 5-50µl Transfer pipet, Thermo Scientific
- Pipet boy, ISO fill
- 20-200µl Transfer pipet, Brand, Almanya

3.2. Yöntem

3.2.1. Cu(II) flavonoid kompleksinin hazırlanması

Cu(II) flavonoid kompleksinin, [Cu(queH-1)Cl(phen)].2.5H₂O (queH = kuersetin, bpy = 2,2'-bipyridin)], (molekül ağırlığı: 625.5 g/mol) stok çözeltisi 100 mM olacak şekilde 62.55 mM DMSO ile hazırlandı. Çözülen kompleks, 0,5ml'lik tüplere 25'şer µl olacak şekilde alıktlandı ve -20°C'de saklandı. Her deney için kullanılacak miktara göre seyreltmeler ise kültür besiyerinde yapıldı.

3.3. Hücre Kültürü

Kullanılan A549 insan akciğer kanseri hücreleri -80°C' de muhafaza edilmekte olup hücrelerin karakteristik özellikleri çizelge 3.1.' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. A549 İnsan Akciğer Kanseri Hücresinin Özellikleri

A549	EGFR, Yabani Tip
Adenokarsinom	PTEN, aberasyon yok
P53, yabani tip	K-Ras,mutasyon (Ser12)
Rb, aberasyon yok	p16,homozigot delesyon

3.3.1.Hücrelerin stoktan çıkartılması

Hücreleri çoğaltmak amacıyla kullanılan kriyotüpler, -80°C'de muhafaza edilen dolaptan alınarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. Çözünmüş hücre süspansiyonu; %10 FBS (Fetal sığır serumu), %1 penisilin-streptomisin ve L-glutamin içeren 5 ml RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) besiyeri içeren 15 ml'lik santrifüj tüplere aktarıldı. Santrifüj tüp 1.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra

süpernatant kısım aspire edildi ve hücre peleti üzerine 1 ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı.

Süspansiyon üzerine 4 ml besiyeri daha ilave edildi ve tüm hacim 25 cm²'lik flaska aktarıldı. Ardından flask; 37°C ve %5 CO₂ koşullara sahip inkübatöre kaldırıldı.

3.3.2.Hücrelerin pasajlanması

Kullanılan hücre soyları, flask yüzeyini %70-90 kapladıkların flask içerisindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı. Hücrelerin serumdan arınması için flaska 2ml 1X PBS ilave edildi ve hücrelerin yüzeylerinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edildikten sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0,5ml %0,05 Trypsin-EDTA solüsyonu eklendi ve hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 5 dk inkübe edildi. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrılan hücelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı kadar besiyeri ilave edildi. Böylece tripsinin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlaması engelleyecektir. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 1.000 rpm'e 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre peleti 1ml hücre besiyerinde çözüldükten sonra hücre süspansiyonu 75cm²'lik flasklara alınarak 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin deneylerde gereksinimine göre çoğalmaları sağlandı.

3.3.3.Hücrelerin stoklanması

Hücreler konfluent olduklarında flask içerisindeki besiyeriaspire edildi. Ardından hücreler 1X PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırıldı ve hücrelerin flask yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için %0,05 Trypsin-EDTA solüsyonu eklendi. Hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 5dk inkübe edildi. Mikroskop gözlemi yapıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı kadar besiyeri ilave edildi.

Flask içerisindeki hücre süspansiyonu içerisinde besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 1.000 rpm'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve pelet üzerine her bir kriyovial için 1,5ml dondurucu medium (5ml DMSO + 5ml FBS + 40ml DMEM) karanlık ortamda ilave edildi. Hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine homojen şekilde dağıtılarak -80°C'ye kaldırıldı.

3.3.4.Kullanılan besiyerinin hazırlanması

A549 hücreleri için kullanılan besiyeri ortamı, %10 FBS (Hyclone USA), %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/mlpeni-silin, 10mg/ml streptomisin, Gibco), %1 L-glutamin (Gibco) içeren RPMI 1640 (Hyclone USA) besiyeri kullanıldı.

3.3.5.Hemositometre ile hücrelerin sayımı

Hücrelerin sayılması amacıyla hücrelerin kaldırılması(tripsinizasyon) işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 10 µl 0,5ml'lik tüpe alındı ve üzerine aynı miktarda %0,5 tripan mavisi konarak iyice karıştırıldı. Hematositometre distile su ile iyice temizlendi. Bu karışımdan 10 µl alınarak thoma lamına koyuldu ve mikroskopta lam üzerinde görülen beş alanda parlak görünümlü hücrelerin sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplandı.

3.4.Sülforodamin B (SRB) Hücre Canlılık Testi

Sulforhodamine B (SRB) testi 1990 yılından beri hücre protein içeriğinin ölçümüne dayanan hücre canlılığı/yoğunluğunu belirlemek için kullanılan bir yöntemdir (Skehan ve ark. 1990). Hücrelerin canlılığını gösteren ergonomik bir uygulamadır. Bu metod, asidik koşullar altında proteinlere sitokiometrik olarak bağlanan SRB boyasının özelliğine dayanmaktadır (Vichai ve Kirtikara, 2006).

SRB, asidik koşullar altında çalışırken, bazik amino asit kalıntılarına bağlanan ve bazik koşullar altında ayrılan iki sülfonik gruba sahip parlak pembe bir boyadır ve bağlı boyanın miktarı hücre kütlesini temsil eder. Bu metod, 96 kuyucuklu pleyt içinde

yapışan hücrelerde bileşiklerin toksisite taraması için optimize edilmiş bir yöntemidir. Bu amaçla inkübasyon periyodundan sonra hücreler %50 (w/v) soğuk trikloraasetik asit (TCA) ile fikse edilir ve 30 dk %1 asetik asit içinde %0,4 (w/v) SRB ile boyanır. Fazla boya 5 kere %1 (v/v) asetik asit ile yıkanarak uzaklaştırılır. Protein bağlayıcı boya 10 mM Tris baz solüsyonu ile çözülür ve optik yoğunluk (absorbans) 564 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçümü yapıldı. Çalışmada, kullanılacak olan bileşiğin hücre proliferasyonuna bir etkisi olup olmadığı SRB canlılık testi ile ölçüldü. İlk olarak uygun doz seçimi, Cu(II) flavonoid kompleksi ile 6 farklı konsantrasyonda (1,56-50 µM) hazırlanarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına eklendi. Eş zamanlı bir şekilde gerçekleştirilen hücre ekimi, sayımı yapılarak 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Hücreler 48 ve 72 saat süreyle bileşik ile muamele edildikten sonra hücre sayımından sonra belirlenmiş olan doz sıralamasına uygun olarak, 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına eş zamanlı şekilde ekildi. Günümüzde akciğer kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan sisplatin çalışmada pozitif kontrol olarak kullanıldı. Ayrıca Cu(II) flavonoid kompleksini oluşturan ligandların (kuersetin ve bipiridinflavonoidleri) 0,78-50 µM konsantrasyonlarda kullanılarak değerlendirildi. Tedavi süreleri sonunda her bir kuyuya fiksasyon için 50 µl TCA eklendi ve yaklaşık bir saat +4°C de bırakıldı.

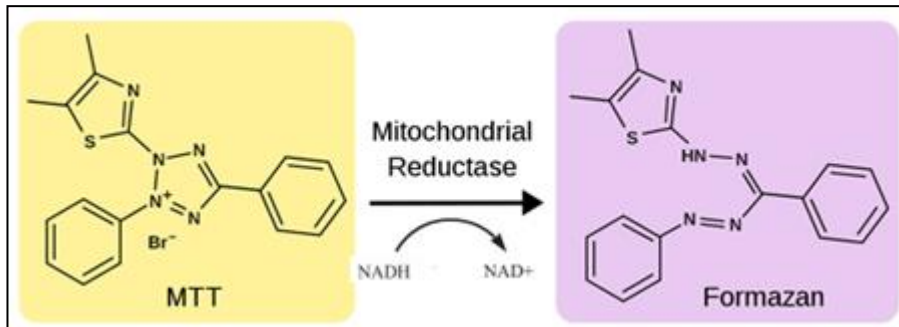
Fiksasyon sonunda kuyular distile su ile en az 5 kere yıkandı ve pleyt kurumaya bırakıldı. Ardından SRB boyası her bir kuyuya 50 µl olacak şekilde eklendi ve 30dk karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda fazla boyanın uzaklaştırılması için %1 asetik asit ile kuyular yıkandı ve pleyt tekrar kurumaya bırakıldı. SRB boyasının çözülmesi için her bir kuyuya 150 µl 10 mM Tris baz solüsyonu eklendi ve en az 10dk çalkalayıcıda boyanın çözünmesi beklendi. Oluşan renk şiddeti 564 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda (FLASH Scan S12, AnalytikJena, Almanya) ölçüldü ve elde edilen Optik Dansite (O.D) değerleri kullanılarak yüzde canlılık hesaplaması yapıldı.

% Canlılık aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

%Canlılık = $[100 \times (\text{Cu(II) flavonoid kompleksi ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalama}) / (\text{Kontrol hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalama})]$ olarak hesaplandı.

3.5.MTT (Metiltiazotetrazolium) Canlılık Metodu

MTT metodu ilk kez Mosmann ve ark. tarafından 1983 yılında yapılmış ve hücre kültüründeki hücrelerin mitokondriyel dehidrogenaz enzim aktivitesinin kolorimetrik ölçümü esasına dayanan bir canlılık testi olmuştur (Mossmann 1983). Bu enzim aktivitesi yaşayan hücrelerde gözlenirken, ölen hücrelerde gözlenmemektedir. Ortama konulan bileşiğe yanıt olarak hücreler ölürse, enzim aktivitesinin azaldığı veya kaybolduğu söylenebilmektedir. Bu nedenle hücreler mitokondriyel dehidrogenaz enziminin değişime uğrattığı MTT maddesine maruz bırakılırlar. MTT, sarı renkli suda çözünebilen tetrazolium tuzudur ve sadece canlı hücreler tarafından alınmaktadır. Mitokondriyel süksinat dehidrogenaz enzimi ile formazan kristallerine dönüştürülür (Thom 1993). Sonuç olarak; canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmayan hücreler mavi-mor renkte boyanmakta ancak ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler ise boyanmamaktadır. Daha sonra oluşan bu formazan kristalleri SDS (%10 sodyum dodesilsülfat+steril distile su + 0,01N HCl) kullanılarak suda çözünür hale getirilir ve oluşturdukları renk şiddeti 570nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülür. Sonuç olarak; başlangıçta aynı sayıda ekilmiş ve ilaç uygulanmamış kontrol hücrelerindeki renk şiddeti ile ilaca maruz bırakılan hücrelerdeki renk şiddeti birbirine oranlanır ve ilaca maruz bırakılmış hücrelerdeki canlılık yüzde şeklinde hesaplanmış olur (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. MTT reaksiyon şeması (Barltrop ve ark.1991).

MTT testi için, Cu(II) flavonoid kompleksinin farklı konsantrasyonları (1,56-50 μ M) hazırlanarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı. A549 hücreleri sayılarak 100

μl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde her bir kuyuya ilave edildi. Hücrelerde, ölümün negatif kontrolü (maksimum canlılık, MO) olarak sadece besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı. Ardından hücreler, 48 ve 72 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

MTT kimyasalı, $\text{pH}=7,2$ olacak şekilde 5mg/ml PBS tamponu içerisinde stok hazırlandı. Ardından MTT çözeltisi filtre edilerek steril hale getirildi. 48 ve 72 saat tedavi sonunda, ekim kabının kuyucuklarının her birine $20 \mu\text{l}$ MTT boyası konuldu. Hücreler 37°C 'de 4 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

Oluşan formazan kristallerini çözünür hale getirmek için bütün kuyucuklara %10'luk SDS solüsyonundan $100 \mu\text{l}$ eklenerek 18 saat 37°C 'de %5'lik CO_2 'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerde oluşan renk şiddeti spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda ölçüldü ve absorbans değerleri ile hücrelerin canlılık yüzdeleri belirlendi.

% Canlılık hesabı:

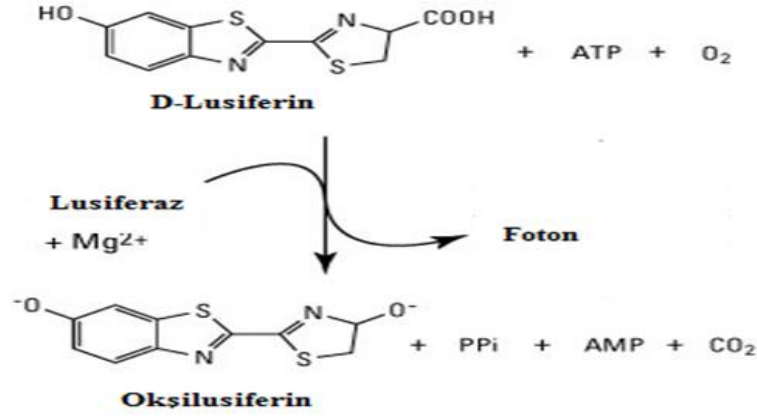
İlaç uygulanmamış kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, kompleks uygulanan hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$\% \text{Canlılık} = [100 \times (\text{Cu(II) flavonoid kompleksi ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalama}) / (\text{Kontrol hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalama})]$ olarak hesaplandı.

3.6.ATP (AdenozinTrifosfat) Canlılık Metodu

ATP yöntemi, lüminesans bir yöntemdir ve diğer in vitrositotoksisite ölçümlerine göre çok daha hassas ve güvenilir yapabilmektedir. ATP hücre içerisinde biyolojik sentez, sinyal iletimi, taşıma, hareket gibi süreçler için kullanılmaktadır. Hücresel ATP, hücre canlılığını ölçmede en hassas parametrelerden biridir. Bu yöntemin prensibi hücre kültüründe büyütülen kanser veya normal hücrelerdeki intrasellüler ATP içeriğinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. İntrasellüler ATP içeriğinin miktarı, yaşayan hücrelerin sayısının belirlenmesinde kullanılan bir göstergedir (Maehara ve ark. 1987, Andreotti ve ark. 1995, Dexter ve ark. 2003, Ulukaya ve ark. 2008).

ATP yöntemi; lüsiferinin Mg^{+2} iyonları ve ATP varlığında lüsiferaz enzimi ile oksilüsiferine katalize olup lüminesans sinyal oluşturmaya dayanmaktadır (Şekil 3.2). Lüminesans sinyal (ATP konsantrasyonu) ile hücre sayısı arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (Andreotti ve ark., 1995; Mueller ve ark., 2004).



Şekil 3.2. ATP tepkimesi (Andreotti ve ark. 1995 değiştirilerek alınmıştır).

ATP testi için, Cu(II) flavonoid kompleksinin farklı konsantrasyonları (1.56 - 50 μM) hazırlanarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı. A549 hücreleri sayılarak 100 μl besiyeri içerisinde 1×10^4 hücre olacak şekilde her bir kuyuya ilave edildi. Ardından hücreler, 48 ve 72 saat $37^{\circ}C$, %5 CO_2 'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresinin bitiminde her kuyudan 150 μl atılarak 50 μl ATP kitinin (Sigma FLASC- 1KT Adenosine 5' triphosphate bioluminescent somatic cell assay kit, St. Louis, MO) içinde yer alan hücre lizis tamponu (2X) eklendi ve hücre içerisindeki ATP'nin hücre dışına çıkması sağlandı. 20 dakikalık bekleme süresini takiben, 50 μl hücre süspansiyonu beyaz renkli 96 kuyucuklu ekim kaplarına aktarıldı ve ardından 50 μl /kuyucuklülüsiferin-lüsiferaz enzimi içeren solüsyon ilave edildi. Reaksiyon sonunda oluşan ATP miktarı (lüsiferin-lüsiferaz bioluminesans reaksiyonu yardımıyla) luminometre (BioTek, Winooski, USA) kullanılarak ölçüldü. Böylece bileşiklerle muamele edilen ve edilmeyen hücrelerin RLU değerlerine göre, bileşiklerin sitotoksik/sitostatik etkileri hakkında bilgi edinildi.

% Canlılık aşağıdaki formüle göre tayin edildi:

%Canlılık = $[100 \times (\text{Cu(II) flavonoid kompleksi ile muamele edilen hücre absorbanısı ortalaması} - \text{kör ortalama}) / (\text{Kontrol hücre absorbanısı ortalaması} - \text{kör ortalama})]$ olarak hesaplandı.

3.7. Floresan Boyama Yöntemi ile Ölüm Modunun Belirlenmesi

Floresan boyalar, DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatinini yani nükleusunu görünür hale getirmektedir. Bu da hücreler üzerinde mikroskopik olarak incelemeler yapmamıza olanak sağlamaktadır. Hoechst 33342, hücre membranından geçebilen ve DNA'ya kolaylıkla bağlanabilen bir boyadır. Canlı ve ölü (apoptotik/nekrotik) hücrelerin nükleuslarını boyamak için kullanılmaktadır. Propidiyum iyodür (PI) ise yalnızca membranı hasarlı hücrelere girebilen, dolayısıyla primer nekrotik veya geç apoptotik/sekonder nekrotik hücreleri boyayabilen floresan nükleik asit boyasıdır.

Bu boya canlı hücreler tarafından dışarı atılmaktadır. Primer nekrozis (hücre hacminin artması fakat fragmente ya da piknotik nükleusların gözlenmemesi) toksik koşullar (hipoksi, iskemi, hipertermi, vb.) altında gerçekleşen klasik ölüm şeklini göstermektedir. Sekonder nekrozis ise, piknotik ya da fragmente nükleus ile karakterize olup, apoptozisin geç safhası olarak bilinmektedir.

Hücre kültüründe, apoptozise giden hücrelerin membranları intakt (erken apoptozda) olmasına rağmen daha ileri dönemlerde geç apoptozis / sekonder nekrozun gelişmesi ile hücrelerin membran bütünlükleri tamamen bozulmaktadır. Sekonder nekroz aşamasına kadar olan süre içinde hücreler non-vital boyalar denilen (PI) boyalar ile boyanacak olurlarsa apoptozis başlamış olmasına rağmen membran yapısının bozulmasından dolayı bu boylarla boyanamazlar. Yani PI negatif ve Hoechst boyası pozitif boyanır. Sekonder nekroz geliştikten sonraki aşamalarda hücreler membran bütünlüklerinin bozulması ile non-vital boyalar ile boyanmaya başlarlar. Dolayısıyla PI pozitif ve Hoechst pozitif boyanmaktadır (Ulukaya ve ark. 2011). Boyama yapılması için önce, 96 kuyulu hücre ekim kapları içerisine 100 μM besiyeri eklendi. Hazırlanmış Cu(II) flavonoid kompleksinin belirlenen doz aralığında 4 dozu (25-3,12 μM) sırasıyla

kuyucuklara eklendi. Ardından A549 hücreleri de eklenerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat ilaç uygulamasını takiben hücelere zarar vermeden üzerlerinden 50 µl uzaklaştırıldı. 5 µl Hoechst (Cell Viability Imaging Kit; nucleidye, Roche, Mannheim, Germany) 5 ml PBS içerisine pipetlendi ve kısa bir vorteks yapıldı. Her kuyuya 50 µl hazırlanmış olan bu karışımdan ilave edildi ve hücreleri kaldırmamaya dikkat edilerek pipetaj yapıldı. 37°C, %5 CO₂'li ortamda 30 dk inkübasyon sonrasında floresan mikroskop altında değerlendirildi.

3.7.1. Anneksin-V-FITC boyama yöntemi

Hücreleri, hücre zarının sitoplazmaya bakan yüzeyinden, özel membranı lipidlerinden fosfotidilserin bulunmaktadır. Hücre apoptozise gittiğinde, bu fosfotidilserinler membranda yerlerini değiştirerek hücre zarının dış kısmına yerleşmektedir. Bu erken apoptotik evrede gerçekleşirken, hücrenin de bütünlüğünün bozulmadığını göstermektedir (Overbeeke ve ark. 1998, Tesarik ve ark. 1998, Zhang ve ark. 2016). Buradaki anneksin-V, fosfotidilserine bağlanır, görüntülemenin sağlanması adına floresan madde kullanılmaktadır. Apoptotik hücrelerin görünür hale gelmesini sağlayan bu yöntem, hücre kültüründe kullanılmaktadır (Kockx ve ark. 1998, Overbeeke ve ark. 1998, Tesarik ve ark. 1998, Ulukaya ve ark. 2011).

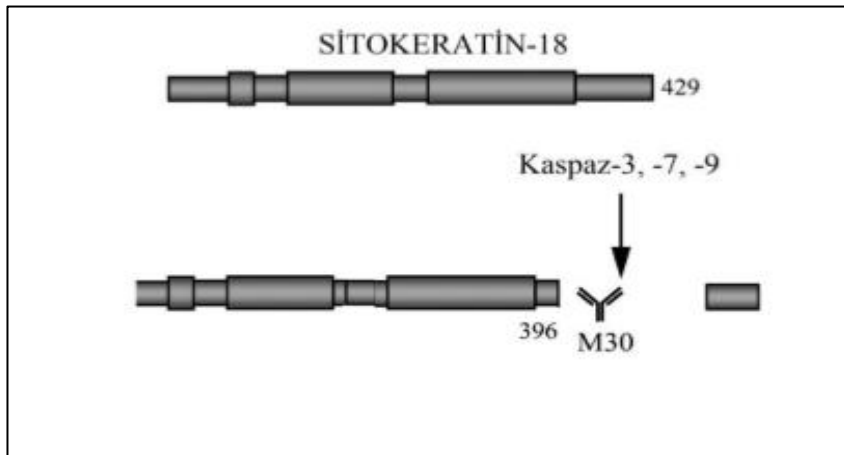
Boyama için 96 kuyulu hücre kültür kaplarına besiyeri ve Cu(II) flavonoid kompleksinin hesaplanan 4 doz (25-3,12 µM) uygulandı. Ardından A549 hücreleri sayılarak 200 µl içerisinde 1×10^4 hücre olacak şekilde 3 tekrarlı ekildi. İlaç uygulamalarını takiben hücreler 24 saat süreyle 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sürelerinin sonunda hücreleri zedelemekten üzerlerinden tüm besiyeri (yaklaşık 180 µl) uzaklaştırılarak Anneksin-V-FLUOS Staining Kit (Roche, Mannheim, Germany) içeriğine uygun olarak çalışıldı. 500 µl Incubation Buffer içerisine 5 µl Anneksin-V-Fluorescein ve 5 µl PI boyası pipetlendi. Ayrıca hücrelerin nükleus morfolojisini de bakmak amacıyla Hoechst 33342 (200 µg/ml) boyası son konsantrasyonu 5 µg/ml (40X sulandırılarak) olacak şekilde bu karışıma eklendi. Her kuyuya boya karışımından 30 µL pipetlenerek yarım saat oda sıcaklığında inkübasyona

bırakıldı. İnkübasyon sonunda ekstraktın hücrelerde sebep olduğu ölüm şekli floresan mikroskop altında değerlendirilmesi yapıldı.

3.8.M30 Antijen (Kaspazla kırılmış sitokeratin 18) Metodu

Sitokeratinler (CK), kanser tanısında çoğunlukla kullanılan intermediat filament protein ailesine ait özel proteinlerdir. Apoptozis sırasında ise sitoiskeletin önemli bir protein olan CK18 sadece apoptotik hücrelerde aktif olan bir enzim grubu olan kaspazların etkisi ile kırılarak, kırılmış CK18'i (CK18-Asp396) oluşturmaktadır (Leers ve ark. 1999). M30 monoklonal antikor, özellikle CK18'in Asp396'da kırılan fragmanını (M30 antijen) tanıyarak CK'lerin apoptotik bir belirteç olarak kullanımını sağlamaktadır (Şekil 3.3) (Ueno ve ark. 2003). Böylece apoptozise özgü bir belirteç olan kırılmış CK18, ELISA yöntemiyle saptanmış olmaktadır. Özel olan CK18'i tanıyan M30 antikoru, hücrelerin bulunduğu ortamla temas ettirildiğinde, ortamda apoptotik hücreler de var ise, apoptozisin varlığı kanıtlanmış olmaktadır.



Şekil 3.3. Sitokeratin 18'in kaspazlar aracılığıyla kesilmesi ve bölgenin M30 antikoru ile tanınmasının şematik gösterimi (Micha ve ark. 2008).

A549 hücrelerinin ekimi yapıldı ardından Cu(II) flavonoid kompleksi ile muamele edilerek (3,12-25 μ M) 48 saatlik inkübasyon sonunda tüm kuyulara 10 μ l %10'luk NP-40 (Sigma, St. Louis, MO) ilave edildi. 15 dk oda sıcaklığında 600 rpm çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Tüm kuyulardaki supernatant toplandı ve 2000 rpm'de 30 saniye

santrifüj edilip M30 Apoptosense ELISA kit içeriğine uygun olarak çalışıldı. Supernatantlar, kitin içerisinde yer alan CK18'i tanıyan fare monoklonal M30 antikoru kaplı striplere 25 µl pipetlendi.

Örneklerin hepsinin üzerine 75 µl horseradish peroksidaz konjugatı eklenip, 4 saat boyunca 600 rpm çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi bitiminde örneklerle 250 µl yıkama solüsyonu ilave edilerek 5 kez yıkama yapıldı ve ardından 200 µl TMB substratı eklendi. 20 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için 1N H₂SO₄ içeren 50 µl stop çözeltisi ilave edildi ve oluşan renk şiddeti, 450nm'de spektrofotometrede okuma yapıldı.

3.9.Akım Sitometri Analizi

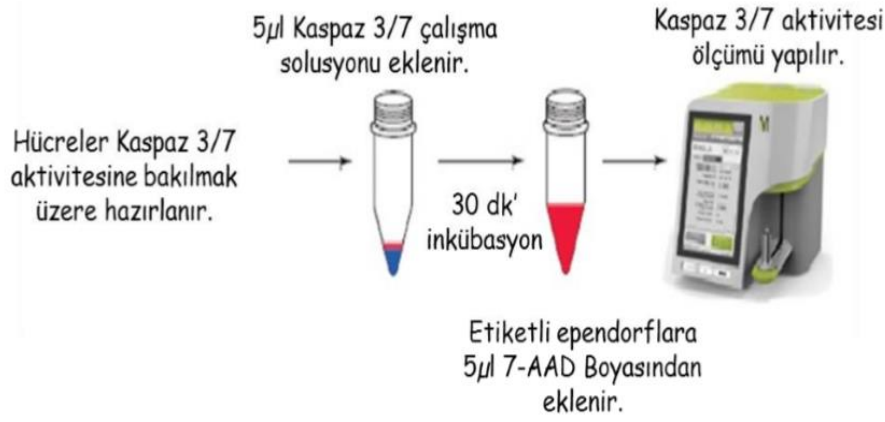
Flowsitometri tek bir hücrenin optiksel ve floresan karakteristiklerini ölçmeyi sağlayan bir yöntemdir. Floresan boyalar DNA, RNA gibi farklı hücresel bileşenlere bağlanmaktadır. Ayrıca floresan boylarla konjuge olmuş antikorlar, hücre membranlarında ya da hücrenin içerisindeki belirli proteinlere bağlanabilmektedir. Her bir özel antikor FITC, PE, 7-AAD (7- Aminoaktinomisin D) gibi floresan boylarla işaretlenmiştir. İşaretlenmiş hücreler ışık kaynağından geçtiklerinde floresan moleküller daha yüksek bir enerji durumuna geçmektedir. Kendi dinlenme halini aldıklarında, yüksek dalga boyunda florokromlar ışık enerjisi yayarlar. Her biri benzer uyarma dalga boyu ve farklı emisyon dalga boyundaki çoklu florokromların kullanımı, çeşitli hücre özelliklerinin aynı anda ölçülmesine izin verir. Propidyum iyodür, fikoeritrin ve fluoresin gibi sıklıkla kullanılan boylardır. İnternal floresan rezonans enerjisi transferi sayesinde ikili boylar daha uzun dalga boyu ve daha çok renk oluştururlar (Michels ve ark. 2000).

3.9.1.Kaspaz 3/7 aktivitesi

Kaspazlar, apoptozis olarak adlandırılan süreçte, merkezi bir öneme sahip sistein-aspartik proteazlardır. Apoptotik sinyal sırasında etkinlik gösteren kaspaz 3/7 aktivasyonu, hücre ölümü konusunda bilgi vermektedir (Riedl ve Shi 2004). Kaspaz 3, DNA onarımında görevli olan PARP'ı kırar ve inaktive eder ve DNA onarımını engeller. Bazıları ise bir dizi DNaz'ı aktive ederek DNA'nın parçalanmasına neden olur

(Ulukaya 2001, Oliver ve Valette 2005). Cu(II) flavonoid kompleksi dozları 6,12 μM ve 12,5 μM olacak şekilde hesaplandı ve 6 kuyulu hücre kültür kaplarına hazırlandı.

Kuyulara 150×10^3 hücre olacak şekilde A549 hücreleri ekimi yapıldı. 24 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresi 24 ve 48 saat olarak belirlendi. Tedavi süreleri bittiğinde öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyerispire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkandı. PBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden kaldırılması için 0,5 ml %0,05 Trypsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C 'de, %5 CO_2 'li ortamda 5 dk bekletildi. İnkübasyon sonunda mikroskopla incelendiğinde yüzeyden ayrılan hücreler, tripsinin inhibe olması için on katı besiyeri ile muamele edildi. Böylelikle tripsinin hücre membranına zarar vermesi engellenmiş oldu. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edilerek çıkarıldı ve 1 ml'sinde 2×10^4 - 5×10^5 hücre olacak şekilde hücre peleti sulandırıldı. Tedavi gruplarını içeren etiketli ependorflara hücre süspansiyonundan 50 μl eklendi. Daha sonra kaspaz 3/7 solüsyonundan her bir tedavi grubunu içeren ependorflara 5 μl konuldu. Kısa bir pipetaj işleminin ardından ependorflar kapakları açık bir şekilde 37°C 'de, %5 CO_2 'li ortamda 30dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda ependorf içerisinde hücre süspansiyonlarına 150 μl DNA'ya bağlanabilen 7-AAD eklenerek kısa bir pipetaj gerçekleştirildi. Daha sonra oda sıcaklığında karanlıkta 5 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra muse cihazında kaspaz3/7 aktivitesi değerlendirildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4.Kaspaz 3/7 aktivitesinin ölçülmesi (Anonim 2013a).

3.9.2. Anneksin-V aktivitesi

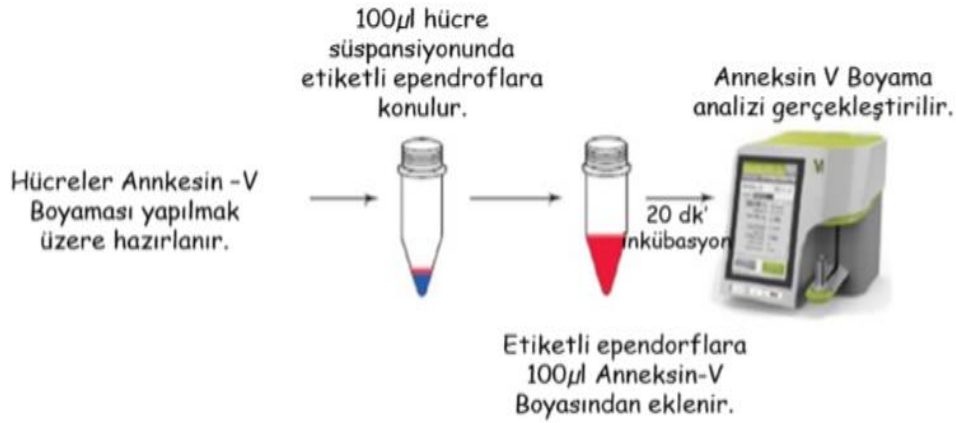
Apoptotik hücrede karakteristik olan özelliklerden biri de membranı iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserinlerin, membranın dış yüzeyine geçiş yapmalarıdır. Bu süreçte, spesifik olan hücresel proteinlerin parçalanması, kromatin yoğunlaşması ve apoptozun geç evresinde membran bütünlüğünün bozulması da gözlenmektedir. Fosfatidilserinin translokasyonu, hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelmektedir (Güleş ve Eren 2008). Anneksin-V, fosfatidilserin için yüksek affinite ile Ca^{+2} bağlayıcı bir proteindir ve FITC gibi floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücreleri görünür hale getirilebilmektedir. Bu yöntemde ayrıca 7-AAD boyası da kullanılmaktadır. Bu boya DNA için güçlü affiniteye sahip floresans özellikte bir kimyasal bileşiktir (Güleş ve Eren 2008).

Boya, sağlam hücre zarından kolayca geçemez, bundan dolayı zar bütünlüğü bozulan hücrelerde (geç apoptotik; nekrotik) çift zincirli DNA'nın GC bakımından zengin bölgelerine bağlanmaktadır. Boyaların hücrelere verdiği yanıtlar Çizelge 3.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.2.Anneksin V ve 7-AAD boyalarına, hücrelerin verdiği yanıtlar.

Hücre	Anneksin	7- AAD
Non-apoptotik	-	-
Erken apoptotik	+	-
Geç apoptotik ve ölü	+	+
Çok fazla nükleer debris	-	+

Cu(II) flavonoid kompleksi dozları 6,12 μM ve 12,5 μM olacak şekilde hesaplandı ve 6 kuyulu hücre kültür kaplarına hazırlandı. Kuyulara 150×10^3 hücre olacak şekilde A549 hücrelerinin ekimi yapıldı. 24 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi 24 ve 48 saat olarak belirlendi. Tedavi süreleri bittiğinde öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. İlaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15 ml'lik falkonlara toplandı ve negatif kontrol kuyularının süpernatantı uzaklaştırıldı. Hücreler tripsin ile kaldırıldı ve etiketli olan falkonlara toplandı ve 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve 100 μl %1 FBS içeren besiyeri eklendi ve etiketli ependorflara 100 μl hücre süspansiyonu alındı. Bu ependorflara 100 μl Muse™ Annexin V & Dead Cell solüsyonu eklendi. Orta hızda yaklaşık 5 saniye vorteks yapıldı. Karanlık bir ortamda 20 dk oda ısısında inkübasyon sonunda Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı. (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Anneksin V boyama (Anonim 2013b).

3.9.3. Oksidatif stres aktivitesi

Reaktif oksijen türleri(ROS), normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^\bullet$) olarak bilinmektedir. ROS, serbest radikallerin oluşturduğu zincir reaksiyonlarını başlatabilir ve hücrede karbon merkezli çeşitli serbest radikallerin oluşumuna sebebiyet verirler. Hücrede normal metabolik yollarda da enzimlerin aktif yerinde ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluşabilir (Dumont ve Beal 2011, Pelicano 2004). ROS oluşumu inflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı (pO_2), ozon (O_3) ve azot dioksit ($NO_2^\bullet$), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı etkenler ile artar ve hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki edebilmektedir. Kanseri, nörodejeneratif hastalıklar, sepsis, diyabet ve kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi çeşitli patofizyolojik hastalıklarda önemli rol oynamaktadır (Dumont ve Beal 2011, Pelicano 2004). Kullanılan kit, hücre içerisindeki süperoksit radikallerini tayin ederek, oksidatif stres hakkında bilgi vermektedir.

Cu(II) flavonoid kompleksi dozları 6,12 μM ve 12,5 μM olacak şekilde hesaplandı ve 6 kuyulu hücre kültür kaplarına hazırlandı. Kuyulara 150×10^3 hücre olacak şekilde A549 hücrelerinin ekimi yapıldı. 24 saat $37^\circ C$, %5 CO_2 'li ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi 24 ve 48 saat olarak belirlendi. Tedavi süresi sonunda kitin

bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyerispire edilerek uzaklaştırıldı. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0.5 ml %0,05 Trypsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C’de, %5 CO₂’li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15ml’lik falkonlara toplandı 800 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücre peleti ml’inde 1×10^6 - 1×10^7 hücre olacak şekilde kit içeriğindeki oksidatif stres çalışma solüsyonu muamele edilerek kısa bir pipetaj işleminin ardından 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda örneklerin ölçümü Muse™ Cell Analyzer cihazı ile gerçekleştirildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6.Oksidatif stresin ölçülmesi (Anonim 2013c).

3.9.4. Hücre döngüsü analizi

Hücre döngüsü analizi “Muse® Cell CycleAssay Kit” kullanılarak yapıldı. Bu amaçla, A-549 hücreleri 2×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyulu pleytlere ekildikten sonra, 18 ve 36 saat boyunca muamele edildi veya hücre senkronizasyonu gerçekleştirildi. Süre sonunda, hücreler üzerindeki besiyeri 15 ml santrifüj tüplere toplandı. Ardından, hücreler soğuk 1X PBS ile yıkandı ve tekrar aynı tüplere toplandı. Hücreleri yüzeyden

kaldırmak amacıyla, kuyu başına 0,5 ml %0,05 Tripsin-EDTA ilave edildi ve hücreler 37°C’de, %5 CO₂’li ortamda 5 dk inkübe edildi. Süre sonunda, mikroskopla pleyt yüzeyinden kalktığı doğrulanan hücreler üzerine 5 ml besiyeri ilave edilerek aynı 15 ml’lik santrifüj tüplere toplandı ve +4°C’de 300 g’de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant aspire edildi ve pelet üzerine 500 µl %70’lik etanol (PBS ile hazırlanan) eklenerek, içerik 1,5 ml’lik santrifüj tüplere aktarıldı, 5 saniye vorteks yapıldı ve -20°C’de 3 saat boyunca fikse edildi. Fiksasyon sonunda, hücre süspansiyonu +4°C’de 300 g’de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, süpernatant aspire edildi. Etanolü uzaklaştırmak amacıyla, hücreler üzerine 500 µl 1X PBS eklendi ve 5 saniye vorteks sonrası tekrar 300 g’de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, süpernatant aspire edildi ve µl’inde 300 hücre olacak şekilde hücreler üzerine “Cell Cycle Reagent” pipetlendi, 5 saniye vorteks yapıldı ve hücreler oda sıcaklığında, karanlıkta 20 dk inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, hücrelerin döngü fazlarındaki dağılımları, 5000 event ile Muse® cihazında değerlendirildi.

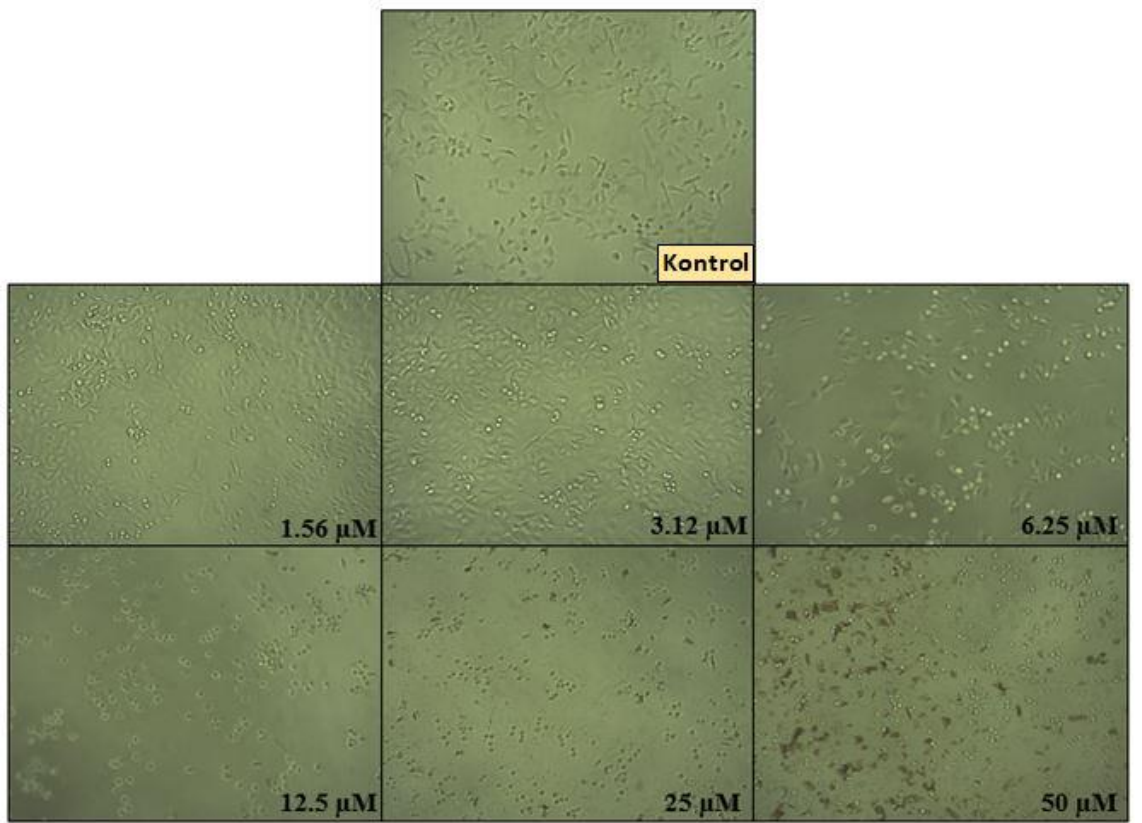
3.10. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler GraphPad programı , ANOVA testi ile değerlendirildi. 3 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ değerine göre belirlendi.

4.BULGULAR

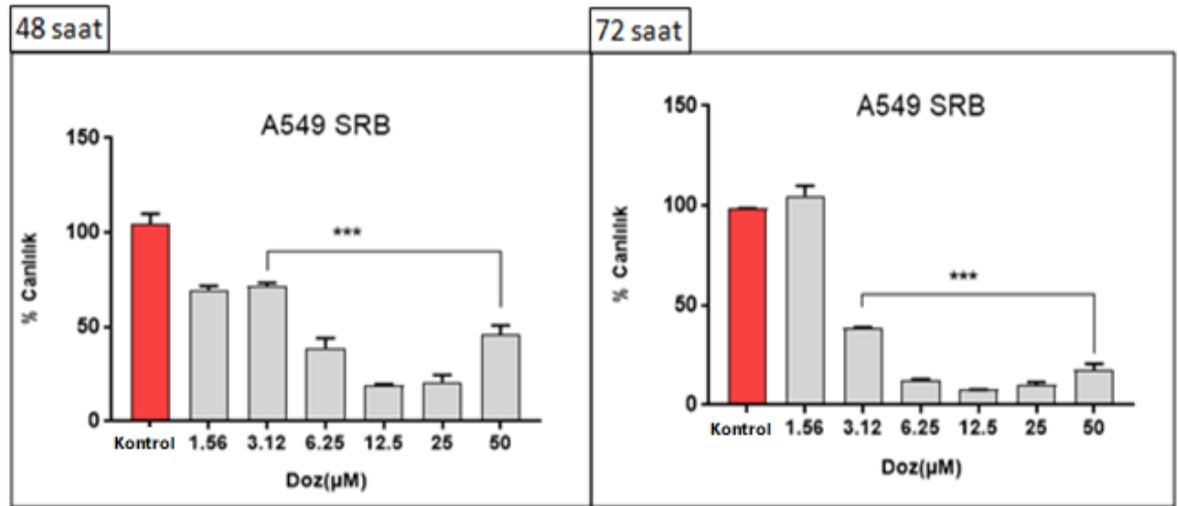
4.1.SRB Canlılık Testi Bulguları

Cu(II) flavonoid kompleksinin farklı konsantrasyonları (1,56-50 μ M), sitotoksik etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla A549 akciğer kanser hücrelerine uygulandı. Tedavi süresi 48 ve 72 saat olarak belirlendi. A549 hücrelerinde sitotoksik etkileri mikroskopik olarak değerlendirildi (Şekil 4.1). Mikroskopik gözlemde, doz artışına bağlı olarak hücre ölümünün arttığı gözlemlendi. Özellikle 50-6,25 μ M Cu(II) flavonoid bileşiği uygulaması sonucu doza bağlı olarak A549 hücrelerinde kontrole kıyasla hücre canlılığında yüksek oranda azalmalar görülmektedir. 1,56 ve 3,12 μ M dozlarında ise 48 saatte kontrole göre hücre ölümünün olduğu görülmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Cu(II) flavonoid kompleksi ile tedavi (1.56-50 μ M) sonrası A549 hücrelerinin 48 saat mikroskop görüntüleri.

Cu(II) flavonoid kompleksinin A549 akciğer kanseri hücreleri üzerine etkisi değerlendirildiğinde, 48 ve 72 saatte 50-3,12 μM ve üzerindeki dozlarında, istatistiksel olarak hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir azalmaya neden olduğu gözlemlendi ($p < 0,001$, Şekil 4.2). Alınan sonuçlara bakıldığında, Cu(II) flavonoid kompleksinin, A549 hücrelerinde 48 saatte 6,25-12,5- 25 μM dozlarında %50 altında, 1,56 ve 3,12 μM dozunda ise %70-80 oranında hücre canlılığı görüldü. 72 saate bakıldığında 6,25-12,5- 25 μM dozlarında hücre canlılığı %20'lere düşmektedir. Doz artışına bağlı olarak azalmalar görülmektedir (Şekil 4.2). 1,56 ve 3,12 μM dozlarında ise hücre canlılığı %50'nin altına düşmüştür. Mikroskopik gözlemlerde ölüm görülmesine rağmen (Şekil 4.1), canlılık grafiğinde %40 oranında görülen canlılık, SRB testinin farklı canlılık testleri ile doğrulanmasını gerektirmektedir.



Şekil 4.2. A549 insan akciğer kanser hücrelerinde 48-72 saat Cu(II) flavonoid kompleksi ile tedavi (1.56-50 μM) sonrası SRB testi yüzde (%) canlılık grafikleri. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (***) $p < 0,001$ ifade etmektedir.

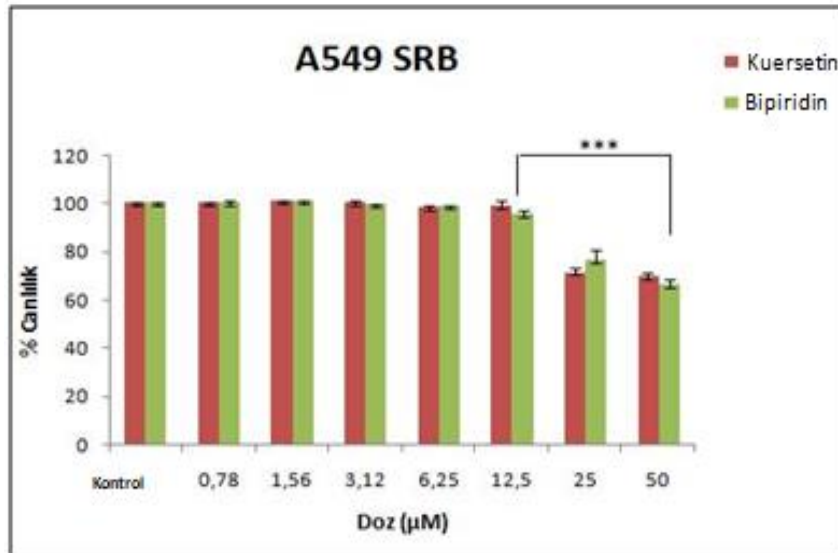
Cu(II) flavonoid kompleksi uygulanan A549 akciğer kanser hücrelerinin IC_{50} (kontrol hücrelerine kıyasla kompleksle muamele sonrası hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) ve IC_{90} (kontrol hücrelerine kıyasla kompleksle muamele sonrası hücrelerin %90'ını öldüren konsantrasyon) değerleri Çizelge 4.1 de verilmiştir.

IC₅₀ değerleri incelendiğinde, 48 saatte >50 µM iken 72 saatte 2,80 µM olduğu gözlemlendi. IC₉₀ değerlerine bakıldığında 48 saatte >50 µM iken, 72 saatte 9,41 µM olarak belirlendi.

Çizelge 4.1. A549 insan akciğer kanseri hücrelerinin Cu(II) flavonoid ile 48-72 saat tedavisi sonrası SRB canlılık yüzdelere göre IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri.

	A549	
	IC ₅₀	IC ₉₀
48 saat	>50	>50
72 saat	2,80	9,41

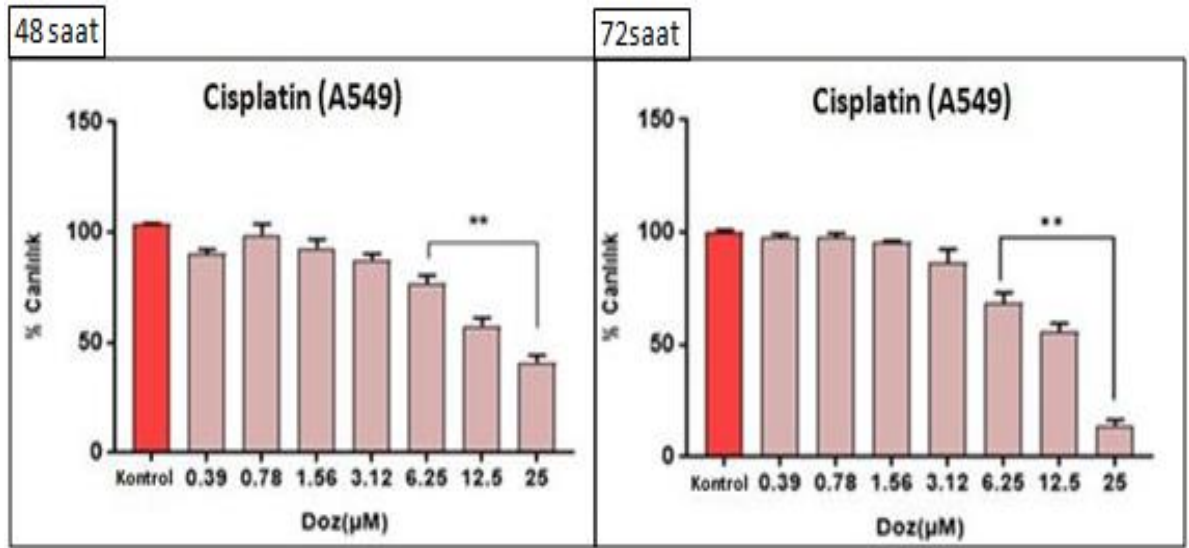
Çalışmada kullanılan Cu(II) flavonoid kompleksinin flavonoid içeriği olarak yani ligand olarak bipiridin ve kuersetin kullanılarak sentezlenmiştir. Hücre canlılığı üzerine olan etkinliğin flavonoidlerden mi yoksa bakır kompleksi kaynaklı mı olup olmadığını anlamak için kuersetin ve bipiridin flavonoidlerinin etkinlikleri de hücrelerde değerlendirildi. Hücrelere belirlenen dozlarında (0,78-50 µM) 48 saatlik tedavi uygulandı. Hücre canlılığı üzerine olan etkinliği anlamak için SRB testi yapıldı. Flavonoidlerin yüksek dozlarda (25 ve 50 µM) hücre canlılığı üzerine etkisi % 60'ın altına olmadığı görüldü (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. A549 insan akciğer kanser hücrelerinde 48 saat flavonoidligantları tedavisi sonrası SRB testi sonuçları. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını

temsil etmektedir.*Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (***:p<0,001) ifade etmektedir.

Kullanmış olduğumuz Cu(II) kompleksinin etkinliğini karşılaştırmak amacıyla anti kanser bir ilaç olan ve akciğer kanserinin tedavisinde kullanılan cisplatinin 0,39- 25 μ M konsantrasyonları kullanılarak A549 hücreleri üzerindeki etkileri SRB testi ile değerlendirildi.Canlılık sonuçları Şekil 3.4’de verildi. Tedavi sonrasında hücreler, 48 saatte 12,5 μ M dozunda %50 oranında ölüm görülürken, 72 saatte 12,5 μ M dozunda hücre canlılığının azaldığı gözlemlendi. Cisplatin, zaman ve doz artışına bağlı hücre canlılığını düşürmektedir. Ancak Cu(II) flavonoid kompleksi, aynı dozlarda hücre canlılığı üzerinde Cisplatin bileşiğinden daha etkili sonuçlar göstermiştir (Şekil 3.2). Cisplatin düşük dozlarda hücre canlılığını değiştirmez iken Cu(II) flavonoid kompleksinin canlılık grafiklerinde daha etkili olduğu görülmüştür.



Şekil 4.4. A549 insan akciğer hücrelerinin 48-72 saat Cisplatin tedavisi (0,39- 25 μ M) sonrası SRB testi sonuçları. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir.*Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: p<0,05 **:p<0,01 ***:p<0,001) ifade etmektedir.

Cu(II) flavonoid kompleksinde kullanılan kuersetin ve bipyridin flavonoidlerinin IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.2’de verilmiştir. Aynı zamanda Cisplatin antikanser ilacının da IC₅₀ ve IC₉₀ parametreleri değerlendirilmiştir. 48 saatlik

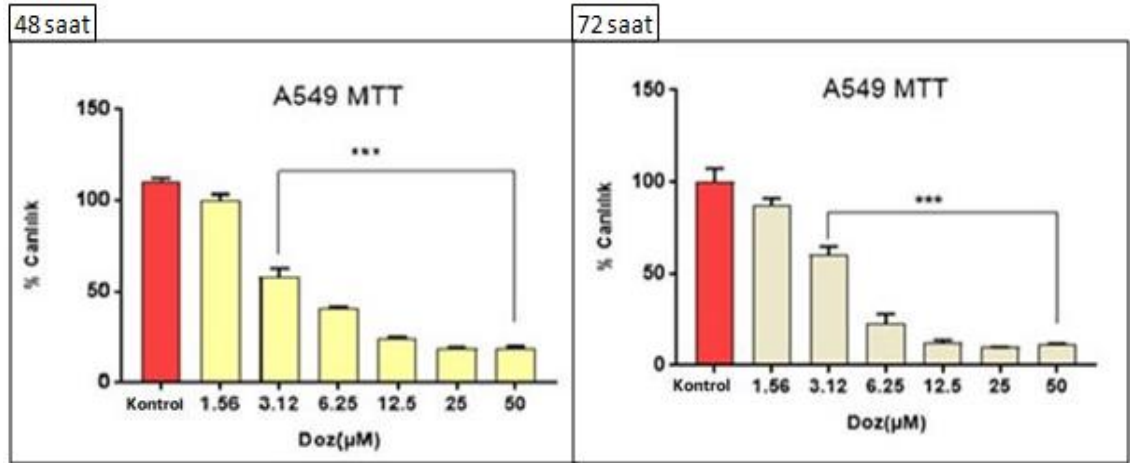
tedavi sonrasında, Cisplatin IC₅₀ değeri 17,96 µM, Kuersetin ve Bipiridin>50 µM şeklinde olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.2). SRB canlılık testi verilerine bakıldığında kompleksin etkinliği yalnızca flavonoidlerden kaynaklandığını doğrulamaktadır.

Çizelge 4.2. A549 insan akciğer kanseri hücrelerinin, Cisplatin ve flavonoidligantları (Kuersetin ve Bipiridin) tedavisi sonrası IC₅₀ ve IC₉₀ sonuçları.

	Cisplatin		Kuersetin		Bipiridin	
	IC50	IC90	IC50	IC90	IC50	IC90
48 saat	17,96	>25	>50	>50	>50	>50
72 saat	13,77	>25	>50	>50	>50	>50

4.2.MTT Canlılık Testi Bulguları

SRB analizinde alınan sonuçları doğrulamak amacıyla farklı bir canlılık testi olan MTT canlılık testi yapıldı. Bu testin uygulanması için A549 hücreleri, Cu(II) flavonoid kompleksinin farklı konsantrasyonları (1,56-50 µM) ile muamele edildi. 48 ve 72 saat olarak belirlenen iki farklı zamanda hücrelerin yüzde canlılık değerleri hesaplandı. Cu(II) flavonoid kompleksinin uygulandığı hücre soylarında zamana ve doza bağlı olarak konsantrasyon arttıkça hücrelerin canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi (p<0,001). Sonuç olarak 12,5 ile 50 µM arasındaki dozlarda 48 saatte %30 oranında gözlenen ölüm, 72. saatte %15 oranında gözlemlendi. 6,25 µM dozunda 48 saatte %50 canlılık görülürken bu değer 72 saatte %30 oranında düştü. Hücrelerdeki 48-72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda Cu(II)flavonoidkompleksi uygulaması sonrası ortaya çıkan sonuçlar Şekil 4.5’de gösterildi.Sonuçlar, SRB testinde boyanın kimyasala bağlandığı ve bundan dolayı yüksek dozlarda çökmüş olan kimyasaldan dolayı bir canlılık yüzdesi verdiğini gösterdi. MTT testine göre, yüksek dozlarda ölüm görülmekte ve zamana bağlı olarak yüzde canlılık azalmaktadır (***:p<0,001).



Şekil 4.5. A549 akciğer kanseri hücrelerinin 48-72 saat Cu(II) flavonoid kompleksi ile tedavi (1.56-50 µM) sonrası MTT testi sonuçları. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (***:p<0,001) ifade etmektedir.

Cu(II) flavonoid kompleksi uygulanan A549 insan akciğer kanser hücrelerinin IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri Çizelge 4.3’de verilmiştir. IC₅₀ değerleri incelendiğinde, 48 saatte 3,87 µM iken 72 saatte 3,81 µM olduğu gözlemlendi. IC₉₀ değerlerine bakıldığında 48 saatte >50 µM iken, 72 saatte 25,48 µM’dır.

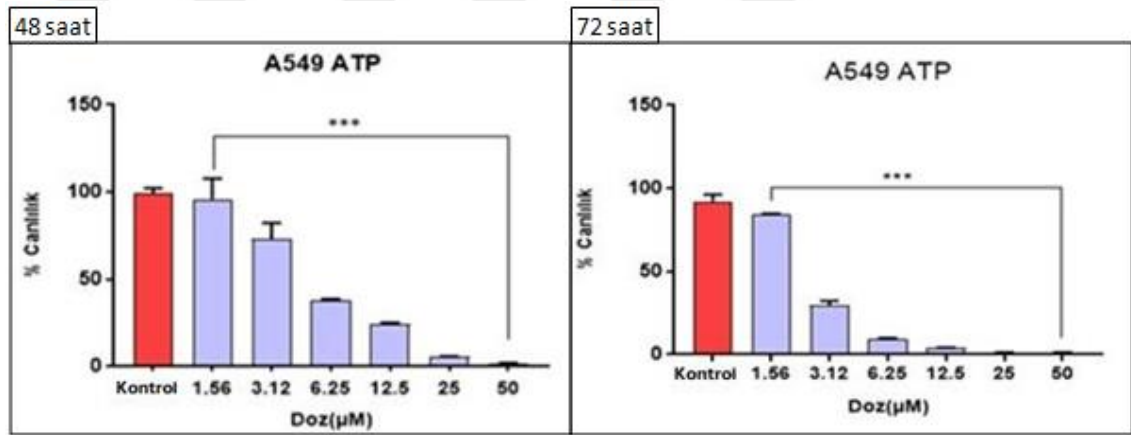
Çizelge 4.3. A549 akciğer kanseri hücrelerinin Cu(II) flavonoid ile 48-72 saat tedavisi sonrası MTT canlılık yüzdelerine göre IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri.

	A549	
	IC ₅₀	IC ₉₀
48 saat	3,87	>50
72 saat	3,81	25,48

4.3.ATP Canlılık Testi Bulguları

Cu(II) flavonoid kompleksinin farklı konsantrasyonlarının (1,56-50µM) A549 hücrelerinin intrasellüler ATP miktarına olan etkisini belirleyebilmek için ATP canlılık testi yapıldı. ATP testi, SRB ve MTT canlılık testlerine göre daha hassas ve güvenilir bir canlılık yöntemidir. A549 hücrelerine 48-72 saat süre ile kompleksin uygulamasını takiben elde edilen sonuçlar Şekil 4.6’da gösterildi. Kompleksin, konsantrasyonundaki

artışa bağlı olarak uygulandığı hücre soylarında intraselüler ATP miktarında azalmalara neden olduğu belirlendi. Cu(II) flavonoid kompleksinin 50 μM konsantrasyonunun bütün hücre soyları üzerinde sitotoksik etki gösterdiği gözlemlendi. Kompleksin 1,56 μM ile 50 μM dozlarının hücre soyları üzerine olan etkileri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmaları (***: $p<0,001$) olduğu bulundu. 48 saatte yüksek dozlarda (12,5-50 μM) hücre canlılığı %10 lara kadar düşerken, 72 saatte yüksek dozlarda %5 e düştüğü görüldü. 6,25 dozunda canlılık yaklaşık olarak %50 altına inerken, 72 saatte aynı dozda canlılık %20'lere düşmüştür. 72 saatte 3,12 μM dozunda %50 altında canlılık görüldü. (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. A549akciğer kanseri hücrelerinin 48-72 saat Cu(II) flavonoid kompleksi ile tedavi (1,56-50 μM) sonrası ATP testi sonuçları. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (***: $p<0,001$) ifade etmektedir.

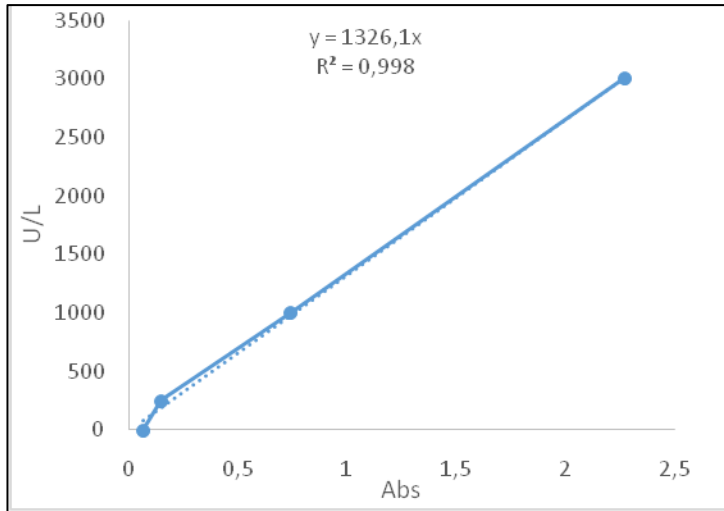
Cu(II) flavonoid kompleksi uygulanan A549 insan akciğer kanser hücrelerinin IC_{50} ve IC_{90} değerleri Çizelge 4.3 de verilmiştir. IC_{50} değerleri incelendiğinde, 48 saatte 4,94 μM iken 72 saatte 2,26 μM olduğu gözlemlendi. IC_{90} değerlerine bakıldığında 48 saatte 22,02 μM iken, 72 saatte 5,86 μM 'dır(Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. A549 insan akciğer kanseri hücrelerinin Cu(II) flavonoid ile 48-72 saat tedavisi sonrası ATP canlılık yüzdelere göre IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri.

	A549	
	IC ₅₀	IC ₉₀
48 saat	4,94	22,02
72 saat	2,26	5,86

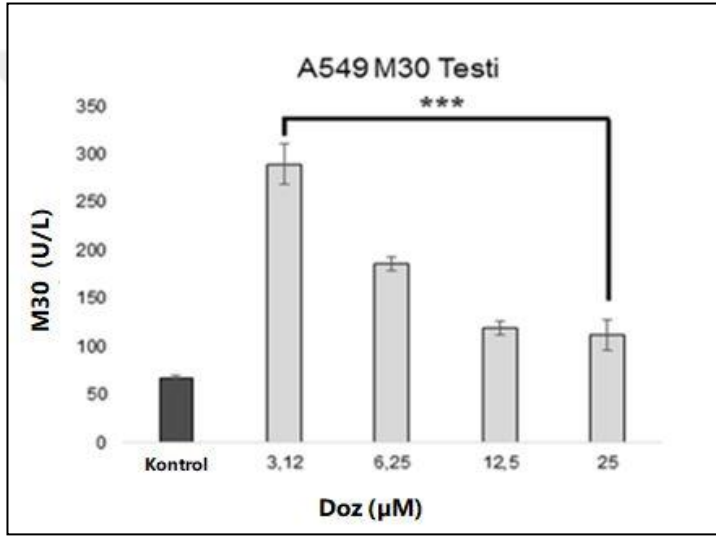
4.4. M30 Antijen (Kırılmış Sitokeratin 18) Antijen Bulguları

Cu(II) flavonoid kompleksinin (3,25-25 µM) dozlarında hücreler üzerine sitotoksik aktivite gösterdiği belirlendikten sonra hücre ölüm modunu araştırmak amacıyla apoptozise özgü bir belirteç olan kaspazlar kırılmış CK18 düzeylerine bakıldı. M30 antijen ölçümlerinin değerlendirilmesi için standart eğri grafiği hazırlandı. A549 hücrelerinde yapılan çalışmanın standart eğri grafiği Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. A549 akciğer kanseri hücrelerinde yapılan M30-Antijen çalışmasının standart eğri grafiği.

Ölçülen absorbanslar standart eğri grafiği yardımıyla belirlenen formüller üzerinden değerlendirilerek M30 antijen miktarları U/L cinsinden hesaplandı (Şekil 4.7). A549 hücrelerinde canlılık analizlerimizden yola çıkarak hücreler üzerinde etkili olan 3,12- 25 μ M doz seçimi yapılmıştır. Çalışılan tüm konsantrasyonlarda kontrole oranla M30-antijen seviyesinin istatistiksel olarak arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.8, ***:p<0.001). Azalan doza doğru hücrelerde M30-antijen seviyesinin de arttığı belirlenmiştir. Dozun arttıkça toksisitesinin artmasından dolayı bu azalmalar gerçekleşmiştir. Özellikle 3,12 μ M dozunda kırılmış sitokeratin 18 seviyesini arttırması hücrelerde apoptozisin indüklendiğini göstermektedir.



Şekil 4.8. A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde Cu(II) flavonoid kompleksi ile tedavi (3,12- 25 μ M) sonucu 48 saatte gözlenen M30 Antijen seviyesi. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (***:p<0,001) ifade etmektedir.

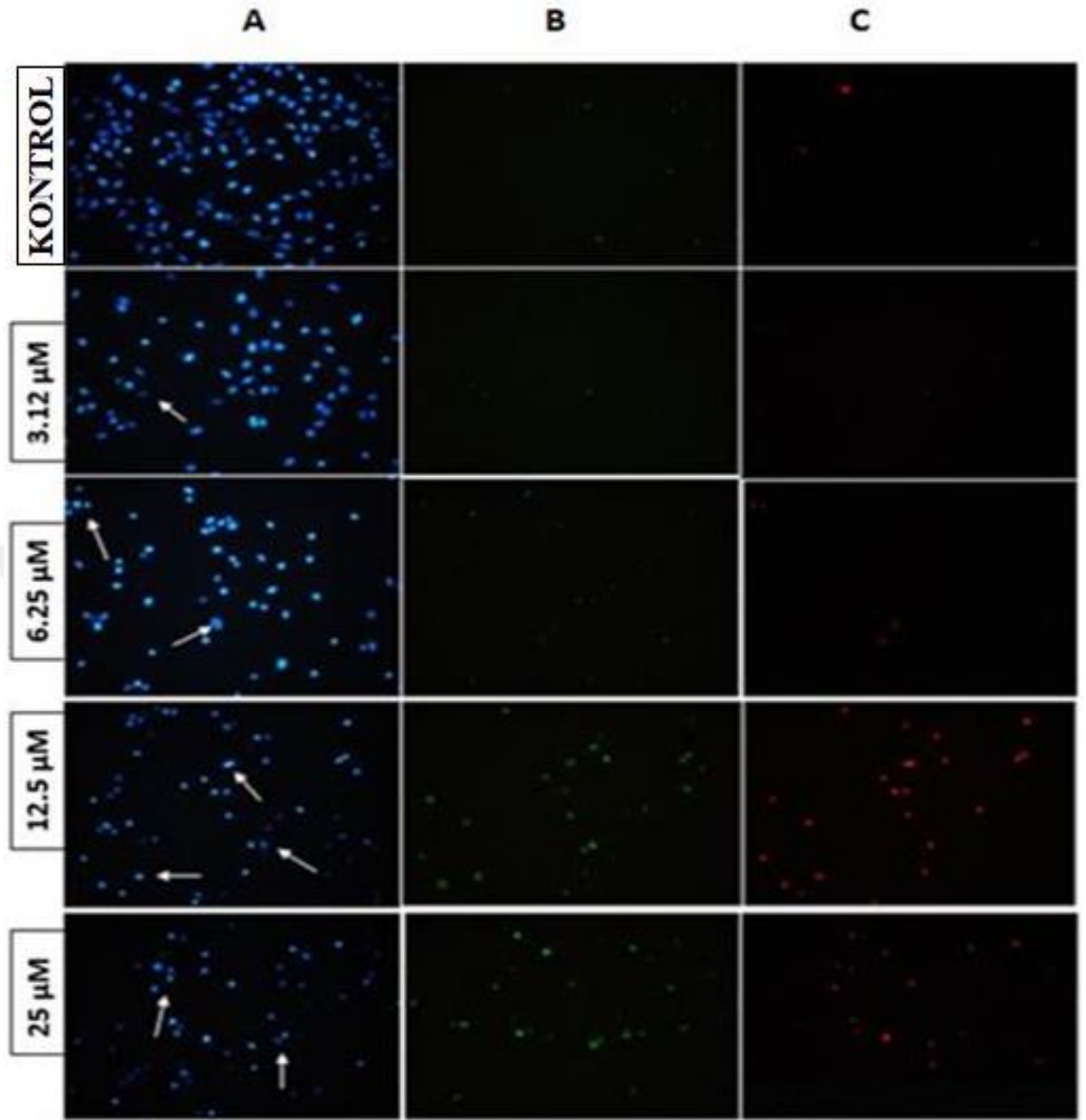
4.5. Floresan Mikroskobu İle Yapılan Değerlendirmeler

Cu(II) flavonoid kompleksinin 3,12-25 μ M olarak belirlenen dozların 24.saatte A549 hücrelerinin nükleus morfolojisi üzerine olan etkisi Hoechst boyama yöntemi uygulanarak floresan mikroskopta değerlendirildi. Apoptotik hücrelerde; nükleusun normal hücrelere göre daha küçük olma özelliği aranırken, nekrotik hücrelerde nükleusun normal hücrelerden biraz daha büyük olması ve daha az boya alması özelliği arandı. Cu(II) flavonoid kompleksi ile muamele sonucunda, Hoechst boyası ile boyanan

hücrelerde kontrole kıyasla hücre yoğunluğunun belirgin şekilde azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.9.) Hücrelerin nükleus morfolojilerinin de değiştiği, kontrole kıyaslandığında piknotik nükleusların varlığı tespit edildi.

Anneksin-V, apoptozisin erken dönemlerinde hücrenin dışına translokeolan fosfatidilserine bağlanabilen bir proteindir ve floresan bir madde ile işaretlendiğinde apoptotik hücreler görünür hale getirilerek incelenmesi sağlanmaktadır. Ayrıca nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için yöntem çalışılırken ikinci boya olarak propidyum iyodür eklendi. Hücreler Anneksin-V floresan (yeşil floresan) ve non-vital boya olan propidyum iyodür (kırmızı floresan) ile eş zamanlı olarak boyandığında; canlı hücreler Annexin-V negatif/PI negatif, erken apoptotik hücreler Annexin-V pozitif/PI negatif ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler Anneksin-V pozitif/PI pozitif sonuç verir. Cu(II) flavonoid kompleksinin 3,12-25 μM konsantrasyonunun A549 hücreleri üzerine 24 saatteki etkisi Anneksin-V yöntemi kullanılarak floresan mikroskobu altında değerlendirildi.

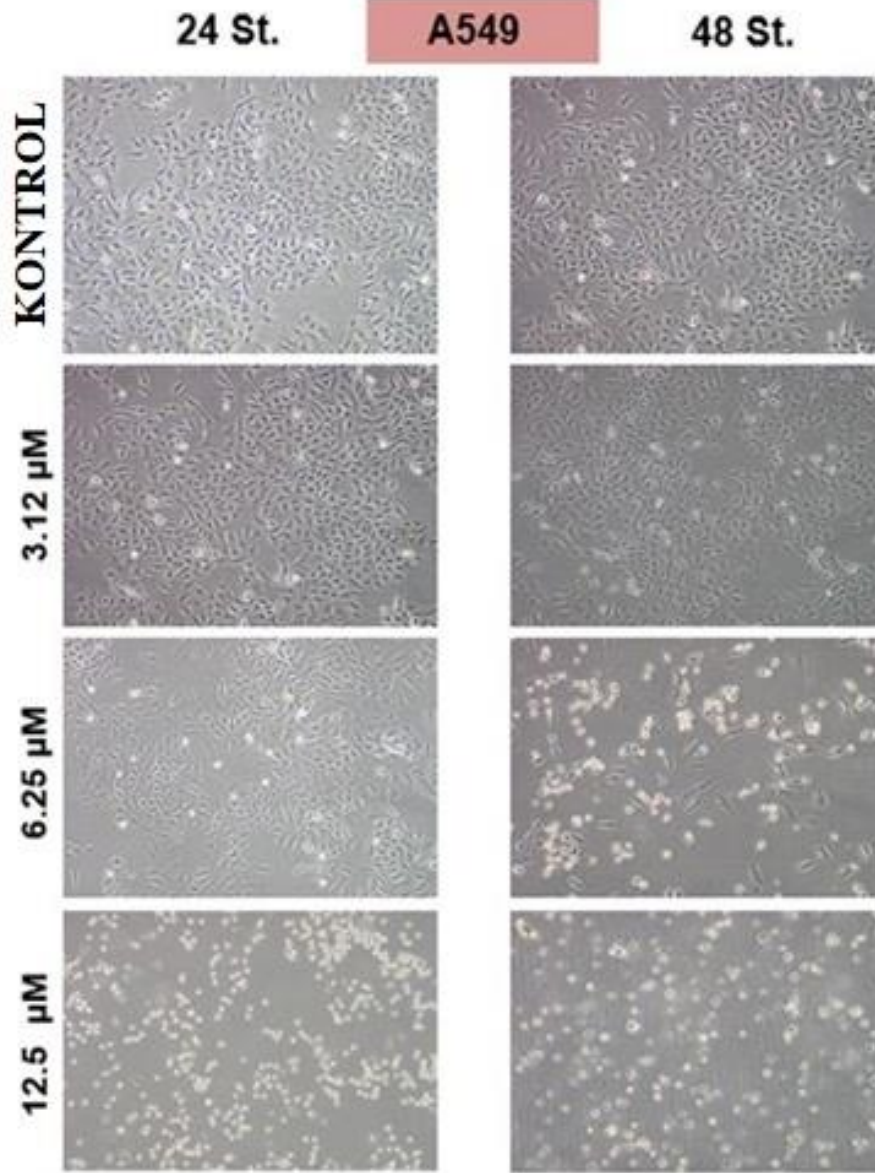
Cu(II) flavonoid kompleksi ile 24 saat tedavi sonrasında A549 hücreleri kontrole kıyasla hücre canlılığında azalmalar gözlemlendi (Şekil 4.9). A549 hücrelerinde 3,12 μM dozunda kontrole kıyasla bariz bir farklılık görülmemektedir. 6,12 μM dozundan itibaren hücre canlılığında azalmalar başlamıştır. Anneksin-V pozitif alanlardaki hücre artışları da gözlenmiştir. 12,5 μM dozunda Anneksin-V pozitif alanda artış olmuştur. 25 μM dozunda Anneksin-V pozitif/PI pozitif alanlardaki artış artmaktadır. Bu pozitif belirlenmesi, geç apoptozis/sekonder nekrozis geliştiğini göstermektedir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde 24 saat Cu(II) flavonoid kompleksi tedavisi (3,12-25µM) sonrasında floresan boyama görüntüleri;
A. Hoechst 33342 boyaması;
B. Annexin-V boyaması;
C. Propidyum İyodür boyaması
→ Hücrelerdeki ölüm modununapoptotik olduğunu simgelemektedir (piknotiknükleus, yarım ay görünümü).

4.6. Akım Sitometri Analizleri

Cu(II) flavonoid kompleksi ile 24 ve 48 saat tedavi olan (12,5- 6,25- 3,12 μ M) A549 hücreleri, tedavi süresinin sonunda doz belirlenmesi amacıyla mikroskopik olarak incelendi ve buna istinaden akım sitometri analizleri yapıldı (Şekil 4.10). A549 hücreleri kontrol amaçlı tedavi uygulanmadan ekimi yapılarak mikroskopik inceleme yapıldı. Sağlıklı görünen hücrelere doz değerlendirilmesi yapıldı. A549 hücrelerinde morfolojik değişiklikler 6,25 μ M dozunda başladığı gözlemlendi. Etki görülen 6,25 ve 12,5 μ M dozları seçilerek, bu dozlar üzerinde akım sitometri analizleri gerçekleştirildi.

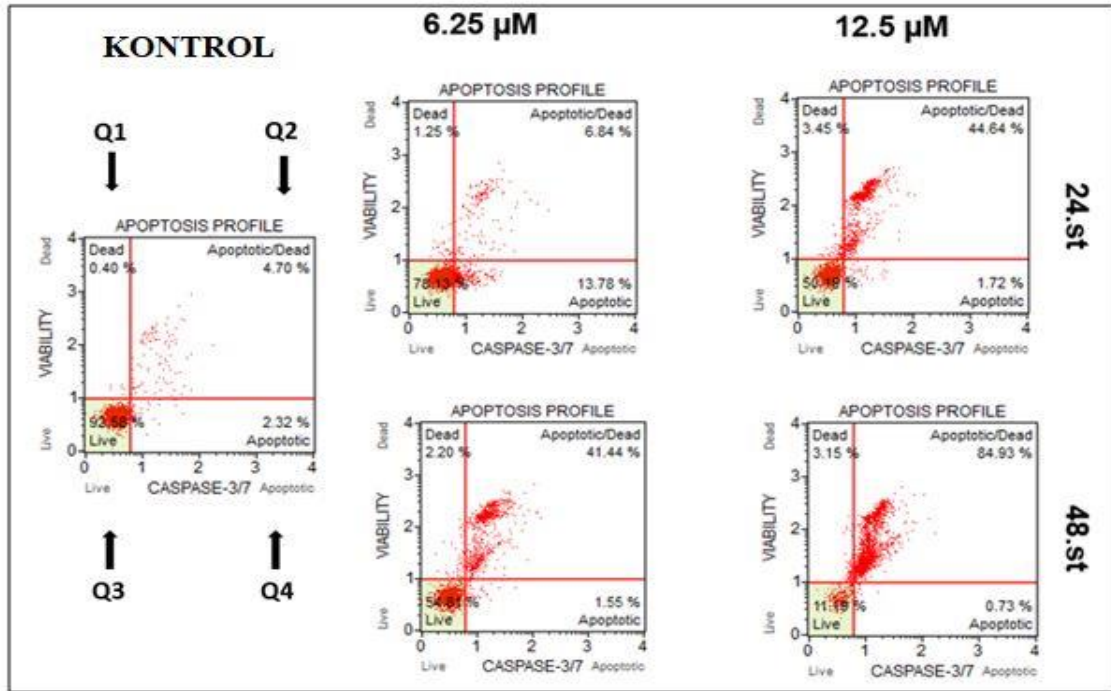


Şekil 4.10. Cu(II) flavonoid kompleksi (6,25-12,5 µM) ile 24-48 saat tedavi alan A549 insan akciğer kanseri hücrelerinin akım sitometri analizi öncesinde mikroskopik görüntüleri.

4.6.1. Kaspaz 3/7 ölçülmesinin akım sitometrisi ile değerlendirilmesi

Annexin V-Cy3 boyama sonuçlarına göre, özellikle 12,5 µM hücrelerin apoptoz yolu ile öldüğü gözlemlendi. Apoptotik hücre ölümü kaspazların aktivasyonu ile gerçekleştiğinden, kaspaz 3/7 aktivasyonu apoptotik hücre ölümü ile ilgili daha net bir bilgi vermektedir. Apoptotik hücre ölüm mekanizmasının akım sitometrisinde kaspaz 3/7 aktivitesi

değerlendirilmesi sonucunda; A549 hücrelerinde 24 saatte kontrolde apoptotik oran (Q2+Q3) %7,02, 6,25 μ M dozunda (Q2+Q3) %20,32, 12,5 μ M dozunda ise %46,36 olduğu görülmektedir. 48 saat sonraki apoptotik oranlara bakıldığında 6,25 μ M dozunda %42,99 olurken, 12,5 μ M dozunda bu oran %88,66 ya yükselmiştir. Doz artışına bağlı olarak artış gösteren apoptotik oran, zamana bağlı da anlamlı şekilde artış göstermektedir (Şekil 4.11).

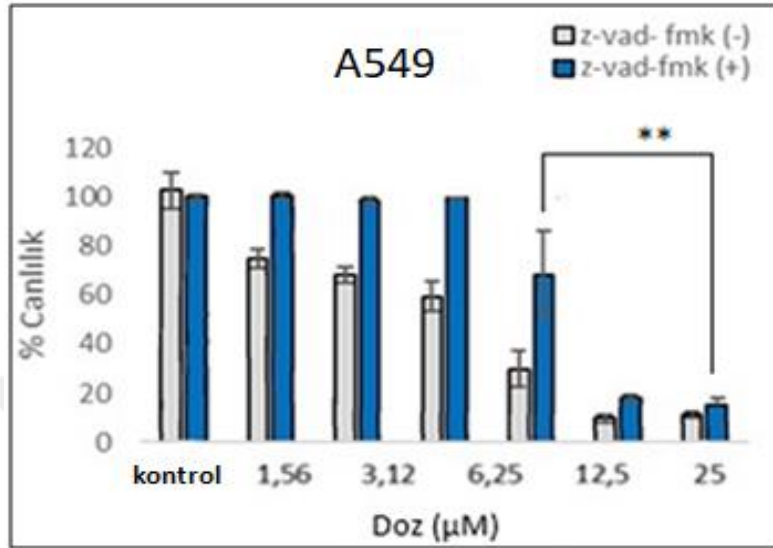


Şekil 4.11. Cu(II) flavonoid kompleksinin (6,25-12,5 μ M) A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 ve 48 saatlik histogramları.

*(Q1=Nekroz, Q2=Geç Apoptoz, Q3=% Canlılık, Q4=ErkenApoptoz).

Bu verileri desteklemek üzere kaspaz aktivitesini baskılamak için, hücrelere ön uygulama ile (24 saat) 20 μ M pan-kaspaz inhibitörü (z-VAD-FMK) uygulandı. Kaspaz aktivitesinin baskılanmasındaki amaç, apoptozun kaspaz bağımlı olduğunu göstermektir. Ardından belirlenen dozlarda Cu(II) flavonoid kompleksi (1,56- 25 μ M) uygulandı. Bu süreçte kaspaz inhibitörünün etkisi SRB hücre canlılığı tespiti ile incelendi. Elde edilen sonuçlara göre, A549 hücrelerinde 6,25-25 μ M dozunda pan-

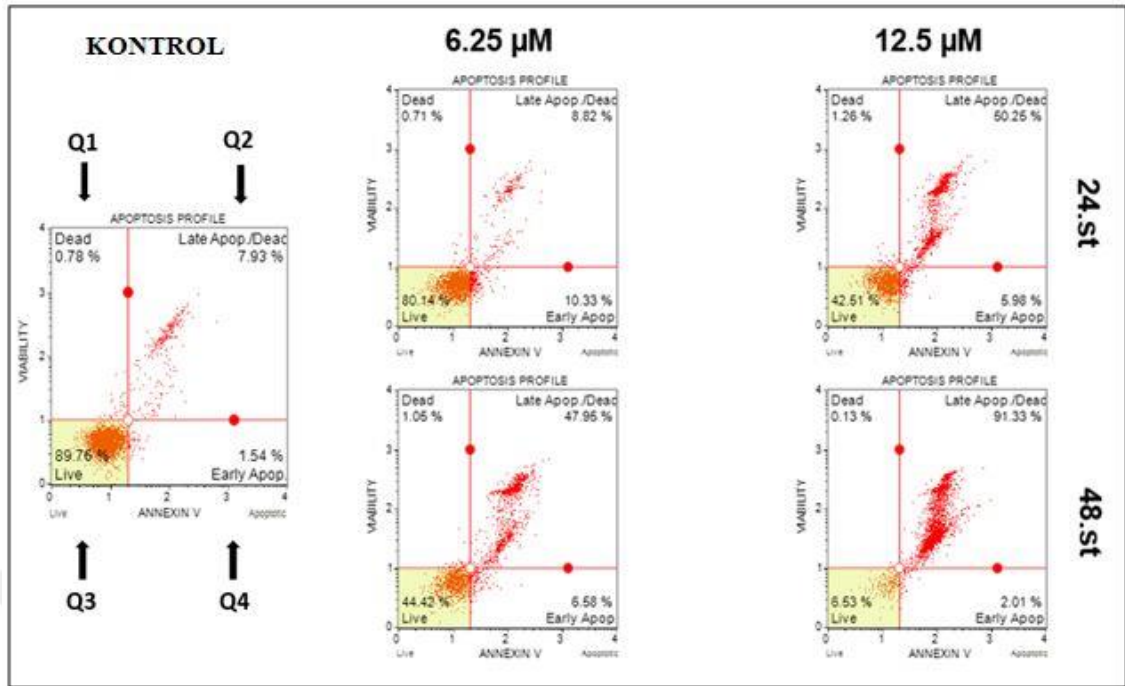
kaspaz inhibitörü uygulaması sonucu canlı hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü (**:p<0,01) (Şekil 4.12). Bu durum, hücrelerde görülen apoptozisin kaspaz bağımlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.12. Pan-kaspaz inhibitörü ile ön tedavi sonrasında Cu(II) flavonoid (1,56-25 µM) kompleksi tedavisi 48 saat sonrası A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde canlılık sonuçları. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (**:p<0,01) ifade etmektedir.

4.6.2. Anneksin-V ölçülmesinin akım sitometrisi ile değerlendirilmesi

Apoptotik hücre ölüm mekanizmasının boyama dışında ayrıca akım sitometrisinde Anneksin-V değerlendirilmesi sonucunda; A549 hücrelerinde 24 saatte kontrol dozunda apoptotik oran (Q2+Q3) %9,47, 6,25 µM dozunda (Q2+Q3) %19,15, 12,5 µM dozunda ise %56,23 olduğu görülmektedir. 48 saat sonraki apoptotik oranlara bakıldığında 6,25 µM dozunda %54,53 olurken, 12,5 µM dozunda bu oran %93,34 e yükselmiştir. Kontrole oranla, apoptotik hücre sayısında (Anneksin-V pozitif hücrelerde) anlamlı artış gözlenmektedir. Yapılan Anneksin-V-Cy3 floresans boyama görüntüleri de bu sonucu desteklemektedir (Şekil 4.13).

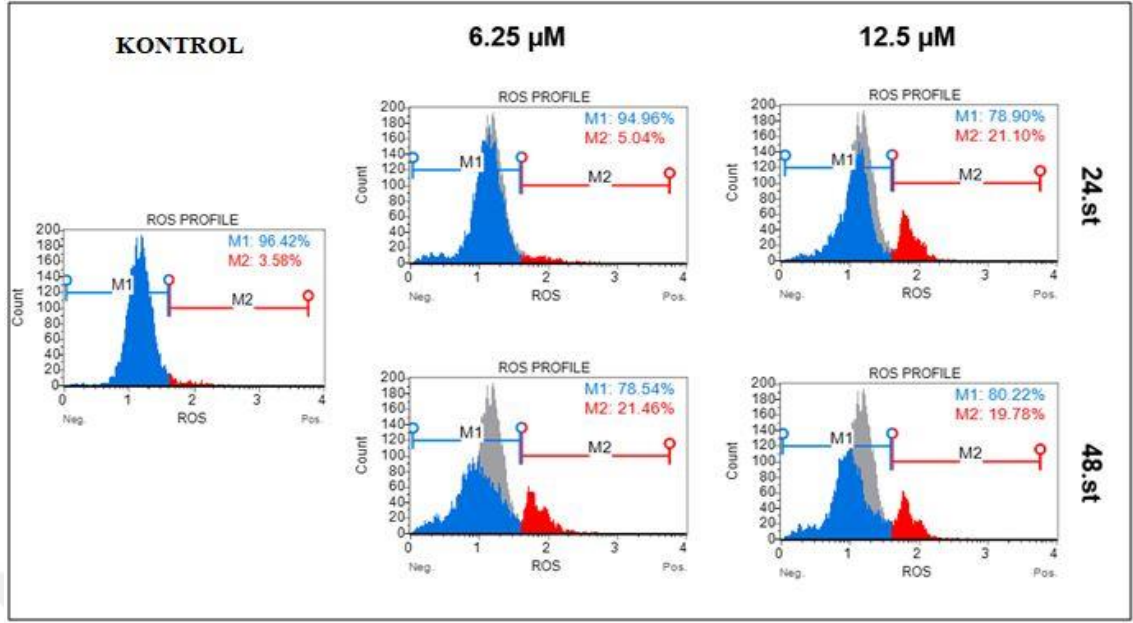


Şekil 4.13. Cu(II) flavonoid kompleksinin (6.25-12.5 µM) A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde Anneksin V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 ve 48 saatlik histogramları.

*(Q1=Nekroz, Q2=Geç Apoptoz, Q3=% Canlılık, Q4=Erken Apoptoz).

4.6.3. Oksidatif stresin değerlendirilmesi

Hücrelerde gerçekleşen ölümün DNA hasarına bağlı olup olmadığını kontrol etmek için hücrelerde oksidatif stresin bir göstergesi olan ROS üretimi akım sitometri ile değerlendirildi. A549 hücrelerinde 24 saatlik tedavi sonrasında ROS miktarı kontrol dozunda %3,58, 6,25 µM dozunda %5,04, 12,5 µM dozunda %21,10 olduğu gözlenmiştir. 48 saatlik tedavi sonrasında bakılan ROS seviyelerinde, 6,25 µM dozunda %21,46 olurken 12,5 µM dozda %19,78 olarak belirlenmiştir. A549 hücrelerinde kontrole kıyasla artan ROS seviyesinin doza ve zamana bağlı olarak arttığı bulunmuştur (Şekil 4.14).

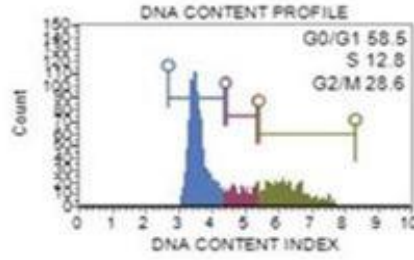
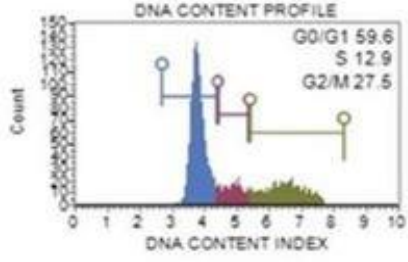
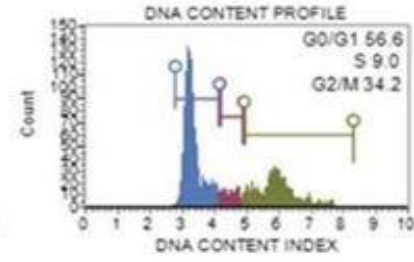
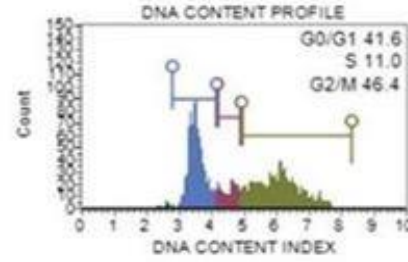
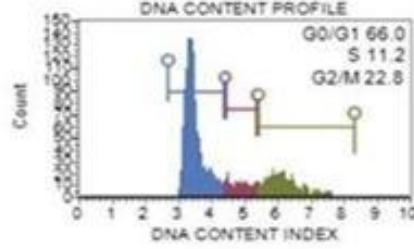
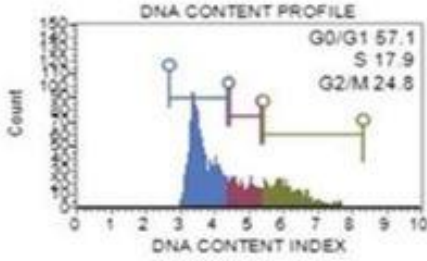
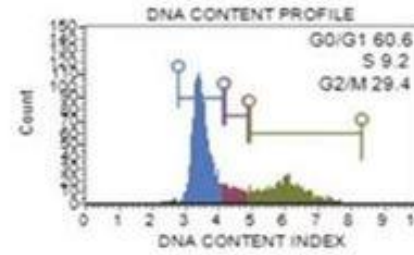
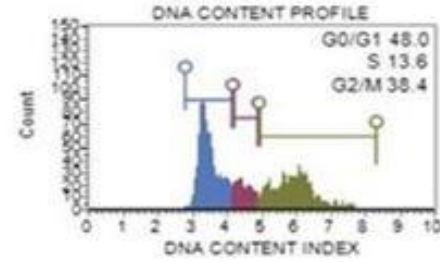


Şekil 4.14. Cu(II) flavonoid kompleksinin (6,25-12,5 µM) A549 A549 insan akciğer kanseri ROS miktarının değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 ve 48 saatlik histogramları.

M1: ROS negatif hücreler (-); M2: ROS pozitif hücreler ROS (+).

4.6.4. Hücre döngüsü analizinin değerlendirilmesi

Cu(II) flavonoid kompleksinin akciğer kanseri hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkileri değerlendirildiğinde; A549 hücrelerinde 18 saatlik uygulama sonrasında kontrol grubunda hücre siklus oranları G0/G1: %89,6, S: %12,9, G2/M: %27,5 olarak belirlenmiştir. Cu(II) flavonoid kompleksinin 3,12 µM dozunda G0/G1: %58,5, S: %12,8, G2/M: %28,6; 6,25 µM dozunda G0/G1: %57,1, S: %17,9, G2/M: %24,8; 12,5 µM dozunda G0/G1: %66,1, S: %11,2, G2/M: %22,8 olarak belirlenmiştir. 36 saatlik hücre döngüsü değerlendirilmesinde kontrol grubunda hücre siklus oranları G0/G1: %41,6, S: % 11,0, G2/M: % 46,5 olarak bulunmuştur. Cu(II) flavonoid kompleksinin 3,12 µM dozunda G0/G1: %56,6, S: %9,0, G2/M: %46,5, 6,25 µM dozu G0/G1: %48,0, S: %13,6, G2/M: %38,4, 12,5 µM dozu G0/G1: %60,6, S: %9,2, G2/M: %29,4 dür. Doz ve zamana bağlı olarak bir farklılık gözlenmezken 18 ve 36 saatlik sonuçlarda hücreler G0/G1 de tutulmaktadır (Şekil 4.15). A549 hücrelerinin faz spesifik olmadığı gözlenmiştir.

A**Kontrol****3,12 μ M****18 st****36 st****B****6,25 μ M****12,5 μ M****18 st****36 st**

Şekil 4.15. Cu(II) flavonoid kompleksinin A549 insan akciğer kanseri hücre döngüsünün değerlendirilmesi ile elde edilen yüzde değerlerinin, **A.** Kontrol doz ve 3,25 μ M dozlarının 18-36 saatlik hücre döngüsü histogramı **B.** 6,25 ve 12,5 μ M dozlarının 18-36 saatlik hücre döngüsü histogramı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanser yaşantımızda gözlenen başta gelen sağlık sorunlarından biridir ve her yıl milyonlarca insan kanser nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Kanser hücreleri ilaç tedavilerine karşı direnç geliştirerek bağışıklık sisteminden kaçmaktadır. Aynı zamanda kontrolsüz çoğalmaları ve metabolizmaları gereği farklı davranış şekilleri göstererek etki gösterebilmektedir. Kanser tedavisi için farklı stratejiler uygulanmaktadır. Cerrahi tedavi, en iyi seçenek olmaya devam etmektedir, ancak yalnızca erken evre kanserlerde uygulanabilmektedir. Radyoterapi ve antikanser ilaçların kombinasyonları cerrahiye alternatif olarak kullanılmaktadır. Antikanser ilaçların çoğunluğu DNA sentezini hedef almaktadır. Bu ilaçların aynı zamanda sağlıklı hücreleri de hedef alarak ciddi komplikasyonlara ve yaşamı tehdit edici yan etkilere neden olmaktadır. Kanser tedavisi ile ilgili bu ciddi komplikasyonlar, yeni kanser çalışmaları için yeni stratejilere yol açmaktadır (Alison 2001). Kanser tedavisinde moleküler hedeflere yönelik birçok kemoterapik ilaç kullanılmasına rağmen henüz beklenen oranda tedaviye yanıt vermemektedir. Bu nedenle geleneksel tedavilerde kullanılan doğal ürünlerin bilimsel tedavilerin yanında kullanılışı giderek artmaktadır (Sezgin 2010). Akciğer kanseri, dünya geneline bakıldığında 8,8 milyon ölüme sebep olan, en kompleks ve ölümcül hastalıklardan biridir. Kontrolsüz hücre çoğalmasıyla karakterize olan kanserlerin %13'ünü akciğer kanseri oluşturmaktadır (TUIK 2012).

Akciğer kanseri, sağlıklı akciğer dokusu hücrelerinin kontrolsüz poliferasyonu (çoğalması) ile kitle oluşturduğu bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Tüm dünyada mortalitesi ve insidansı en yüksek kanser türü olan akciğer kanseri, kanserden ölüm nedenleri arasında erkeklerde birinci sırada, kadınlarda ikinci sırada yer almaktadır (TUIK 2012). Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların sağlıklı hücreler üzerindeki toksik etkinliğinin bilinmesi ve klinikte kullanımlarının oldukça maliyetli olması düşünüldüğüzaman, destekleyici tedaviler ile bu ilaçların etkinliğinin arttırılması büyük önem kazanmaktadır. Bu alanda yeterli çalışmanın olmaması, klinikte kullanılmalarını da ertelemektedir. Bu amaçla, birçok organik molekülün yanı sıra geçiş metal kompleksleri de sıklıkla çalışılmaktadır (Desoize 2004).Günümüzde antikanser özellik gösteren birçok metal bazlı bileşik sentezlenmekte ve tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Metal komplekslerinin, DNA'ya bağlanarak antitümör etki gösterme yeteneğine sahip olduğu, bu şekilde kanserli hücrede DNA çoğalmasını bloke ederek, tümör hücrelerinin

büyümesini inhibe ettiği bilinmektedir (Tan ve ark. 2009b). Metal içeren antikanser ilaçlar klinikte sıklıkla tercih edilmektedir. Günümüzde ise yaygın olarak kullanılan, platin grubu bir kemoterapötik ajan olan cisplatinin, tek başına veya farklı ilaçlarla birlikte kullanımı birçok kanser türünde başarılı sonuçlar vermesine rağmen yol açtığı ciddi yan etkileri olduğu bilinmektedir. Hücrelerdeki bu platin direnci varlığı, araştırmacıları yeni metal bileşiklerin sentezine yöneltmiştir (Tan ve ark. 2009b). Antitümör ajan olarak kullanılan geçiş metali kompleksler bulunmaktadır. Bunlardan nikel (II), kobalt (II), bakır (II), rutenyum (III) ve rutenyum (IV) içeren geçiş metali komplekslerinin tedavi edici etkinliği kanser hücreleri üzerinde çalışılmıştır. Özellikle Bakır (II) kompleksleri, bir antitümör ajan olarak başarılı sonuçlar göstermiştir. Farklı çalışmalar metal bileşiklerin hem ekstrinsik hem de intrinsik yolak aracılığı ile apoptozu uyardığını göstermektedir (Tan ve ark. 2010, Arı ve ark. 2013). Cu(II) neringenin kompleksi ile yapılan bir çalışmada, MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde Cu(II) neringenin kompleksinin Cu kompleksinin tek başına kullanımına göre hücre canlılığını azalttığı apoptozu aktive ederek hücre poliferasyonuna engel olduğu belirlenmiştir (Filho ve ark. 2014). Yapılan bir başka çalışmada, yeni sentezlenen manganez (Mn) kompleksi prostat kanseri hücre soylarında (PC3, LNCAP, DU145) apoptozis indüksiyonuna sebep olarak hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir (Hernroth 2018). Aynı şekilde Cu(II), Ni(II) ve Zn(II) metallerinin farklı komplekslerinin, antikanser potansiyele sahip oldukları tespit edilmiştir (Topkaya 2014). Doğal ürünlerin en büyük sınıflarından biri olan flavonoidler kanser tedavisinde başarı şansını arttırmak için tedavi alternatifi olarak çalışılmaktadır. Flavonoidler bitkilerin içeriğinde görülen polifenolik bileşiklerdir. Flavonoidlerin kanser koruyucu etkisi çeşitli hayvan kanser modelleriyle gösterilmiş ve flavonoid türevlerinin antikanser ilaç olarak kullanımına ilgi giderek artmıştır (Judith ve ark. 2003). Flavonoidler, hücre büyümesini, hücre döngüsü kontrolünü ve apoptosisi düzenleyen bu sinyal yollarındaki kinazlar ile ilişki içerisinde olduğu gösterilmiştir (Judith ve ark. 2003). Bu yaygın kullanım, flavonoidlerin araştırılmasını ve farklı kombinasyonlarla kullanılması gerektiğini göstermiştir. Hesperetin, naringenin ve apigeninin gibi flavonoidlerin Cu kompleksleri test edilmiş ve bu komplekslerin serbest flavonoidlere göre kanser hücrelerinin büyümesini daha iyi inhibe ettiği belirtilmiştir (Tan ve ark. 2009b). Yine kuersetin ile Co(II), Ni(II) ve Cu(II) komplekslerinin antikanser etkinliği A549, PC-3, HeLa ve

MCF-7 hücreleri üzerinde araştırılmıştır. Cu(II) kuersetin kompleksin hücre soyları üzerinde sitotoksik olduğu ve hücrelerde apoptozisi indüklediği belirlenmiştir (Gençkal ve ark 2020). 2014 yılında Filho ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada Cu(II) kompleksinin, flavonoid olan naringenin ve bipyridin ile kombine edilmiş ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücreleri üzerinde antikanser aktivitesi değerlendirilmiştir. Cu(II) kompleksinin tek başına Cu(II) kompleksine oranla antikanser potansiyelinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Filho ve ark. 2014). Kuersetin, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2 kompleksinin A549 hücre soyunda antitumor aktivitesi incelenmiş ve Cu(II) kuersetin kompleksinin, antikanser ve apoptoz indükleyici aktivitelerinin önemli bir mekanizması olan oksidatif DNA hasarını indükleyebileceği gösterilmiştir (Tan ve ark. 2009a).Yapılan literatür araştırmalarının ışığında, metal bileşiklerinin doğal antioksidan moleküller ile kombinasyonunun kanser tedavisinde umut verici olmasından dolayı bu tez çalışmasında, sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilen Cu(II) flavonoid kompleksinin sitotoksik etkinliği ve ölüm yolları A549 insan akciğer kanser hücrelerinde araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca Cu(II) flavonoid kompleksinin ilgili ligandlarınsitetoksik potansiyeli değerlendirilerek kompleks ile karşılaştırılmıştır. Cu(II) flavonoid kompleksinin klinikte kullanılan ilaçlara göre potansiyelini gösterebilmek amacıyla akciğer kanseri tedavisinde mevcut kullanılan cisplatin ilacı ile etkinliği kıyaslanmıştır (Şekil 4.4). Cu(II) flavonoid kompleksinin sitotoksik etkinliğine öncelikle SRB canlılık testi ile bakılmıştır. 1,56-50 μ M olmak üzere altı farklı doz ile çalışılmıştır. Cu(II) flavonoid kompleksinin, doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılık oranlarında anlamlı azalmalar gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan SRB testinde A549 hücrelerinde 50 μ M kompleks ile muamele sonucunda, yüzde canlılıkta belirlenen artışın mikroskopik analizler ile uyumlu olmadığı gözlenmiştir. SRB gibi klorometrik canlılık analizleri bazı bileşiklerle yüksek dozlarda yalancı pozitif yanıt verebilmektedir (Karakaş ve ark. 2017). Bu durum özellikle bitkisel kaynaklı bileşiklerde yüksek dozlarda kimyasala SRB boyasının bağlanmasında kaynaklanabilmektedir. Bu yüzden yüksek dozda (50 μ M), hücrede pozitif bir canlılık belirlenmiştir(Şekil 4.2). Bu durumun doğrulanması amacıyla farklı bir canlılık testi olan MTT uygulamasına gidilmiştir. MTT tuzu hücreler tarafından alınarak, mitokondriyel süksinat dehidrogenaz enzimi ile suda çözünmeyen koyu mavi formazan kristallerine dönüştürülmektedir. Ölü hücrelerde, MTT tetrazolium formazana indirgenmesi gerçekleşmez. MTT testi

sonuçlarımıza göre, Cu(II) flavonoid kompleksi tedavi sonrası A549 hücrelerinde, 6,25-50µM ölüm hücre canlılığı %50 altına düştüğü görülmektedir (Şekil 4.5). Ayrıca hücre canlılığını değerlendirmek amacıyla daha hassas ve güvenli olan ATP canlılık testi uygulanmıştır (Ulukaya ve ark. 2008). Bu test diğer canlılık testlerine göre daha kesin sonuçlar verirken daha hassas bir yöntemdir. Çok az sayıda hücrenin canlılık aktivitesinin de saptanmasında kullanılmaktadır. ATP test sonuçlarımızda Cu(II) flavonoid kompleksinin kanser A549 hücreleri üzerinde doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği doğrulandı. Kompleksin 3,12 µM ile 50 µM dozlarının hücre üzerine olan etkileri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azalmalara neden olduğu bulundu (***:p<0,001) (Şekil 4.6).

Çalışmanın bir sonraki kısmında, hücrelerin ölüm modunu belirlemek amacıyla apoptozis belirteci olan kaspazla kırılmış sitokeratin-18 (M30-antijen) düzeylerine bakılmıştır. A549 hücre soyunda 25-3,12 µM Cu(II) flavonoid kompleksi uygulamasının M30-antijen seviyelerine artışa neden olduğu gözlenmiştir. Özellikle 3,12 µM dozunda M30-antijen düzeyi diğer dozlara oranla 2 kattan fazla artış göstermiştir (***:p<0.001). Bu durum bize düşük dozlarda apoptozisin gözlemlendiği yönünde fikir vermektedir (Şekil4.7-Şekil4.8). Hücrelerde gözlenen apoptozisi doğrulamak amacıyla floresan boyalar kullanıldı. Bir apoptozis belirteci olan Anneksin-V-FITC boyaması yapıldı ve floresan mikroskobu altında hücrelerin görüntüleri değerlendirildi. A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde 24 saat Cu(II) flavonoid kompleksi tedavisi (3,12-25µM) sonrasında floresan boyama görüntüleri değerlendirildiğinde 3,12 µM dozundan itibaren Anneksin-V pozitif alanlar görülmeye başlamıştır. Bu durum hücrelerin erken apoptotik ölümünü göstermektedir (Şekil 4.9). Anneksin-V boyama yöntemi ile erken dönem apoptotik hücreler belirlenebilmektedir. Bunun nedeni Anneksin-V bağlanması membran hasarlanmadan önce nükleer kondensasyon safhasına denk gelmektedir (Koopman ve ark. 1994, Boersma ve ark. 1996, Zhang ve ark. 2016). Hoechst 33342 boyası, hem canlı hem de ölü hücreleri göstermektedir. Boyamada mikroskobik gözlem yaparken hücrelerin farklılıklarını rahatlıkla kıyaslayabilmemiz için Hoechst 33342, Anneksin-V, Propidyum iyodür boyalarının birlikte uygulanması gerekmektedir.

Boyama sonuçlarımızda 25 ve 12,5 µM Cu(II) flavonoid kompleksinin hücrelerde Anneksin-V ve PI pozitif boyamaya neden olduğu bulunmuştur.

Bu bilgilerin ışığında Cu(II) flavonoid kompleksinin etkisini daha ayrıntılı belirlemek amacıyla kaspaz 3/7, anneksin V, oksidatif stres ve hücre döngüsü akım sitometri analizleri gerçekleştirildi. Kaspaz-3/7 aktivitesi apoptozun bir belirteci olup apoptoz mekanizmasının kaspaz aracılı olup olmadığını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Çalışmamızda Cu(II) flavonoid kompleksinin A549 hücrelerinde kaspaz-3/7 aktivitesinin %7,02'den 24. saatte %46,36'ya 48. saat sonrası %85,66'ya yükseldiği belirlenmiştir. Bu verileri desteklemek üzere kaspaz aktivitesini baskılamak için, hücrelere ön uygulama ile (24 saat) 20 μ M pan-kaspaz inhibitörü (z-VAD-FMK) uygulandı. Ardından ilaçlar belirlenen dozlarda (1,56- 25 μ M) uygulandı. A549 hücrelerinde 6,25-25 μ M dozunda pan-kaspaz inhibitörü uygulaması sonucu canlı hücre sayısında artış belirlenmiştir (Şekil 4.12). Bu durum hücrelerde görülen apoptozisinkaspaz bağımlı olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmada metal komplekslerin hücreleri kaspaz bağımlı yolak üzerinden apoptozise teşvik ettiği ve bunun z-VAD kullanımı ile desteklendiği görülmüştür (De Vizcaya-Ruiz ve ark. 2000). Bu durumda apoptozis sürecinin de kaspaz bağımlı yolak üzerinden gerçekleştiği, ortamda pan-kaspaz inhibitörü bulunduğu hücre canlılığının (***) $p < 0.001$) anlamlı şekilde korunmasıyla doğrulandı.

Çalışmamızda Cu(II) flavonoid kompleksinin A549 hücre soyunda 24 saatlik tedavi sonrasında Anneksin V seviyesini 6,25 μ M dozunda %18, 48 saatte ise %55 oranında arttırdığı belirlenmiştir. 12,5 μ M dozunda ise Anneksin V seviyesinin 24 saatte %57,48 saatte %93'e yükseldiği görülmüştür. Yapılan çalışmalarda metal komplekslerinin hem ekstrinsik (dışsal) yolak hem de mitokondriyal yolak vasıtasıyla, apoptozisi teşvik ettiği gösterilmektedir (Tan ve ark. 2010, Arı ve ark. 2013). Birkaç çalışma, kuersetin, naringenin ve flavonoid-metal komplekslerinin apoptozu indükleyebileceğini göstermektedir (Andrades ve ark. 2015, Jin ve ark. 2011). Boyama sonuçlarımız da akım sitometri analizlerini doğrular niteliktedir. Hücrelerde gerçekleşen ölümün DNA hasarına bağlı olup olmadığını kontrol etmek için hücrelerde oksidatif stresin bir göstergesi olan ROS üretimi değerlendirildi. Hücre içerisindeki yüksek ROS miktarı apoptozun uyarılmasına yol açarken; düşük düzeydeki ROS miktarı ise bir sinyal ileti molekülü gibi görev yaparak hücrenin büyümesini ve hayatta kalımını düzenlemektedir (Wong ve ark. 2010). Flavonoidlerin mitokondri aktivasyonundan sonra apoptozu indükleyen ROS birikimine yol açtığı gösterilmiştir (Galati ve O'brien, 2004.).

Çalışmamızda da A549 hücrelerinde Cu(II) flavonoid kompleksinin 6,25 μ M dozunda 24 saatte ROS miktarının %5 iken 48 saatte %21,46'ya çıktığı belirlenmiştir. 12,5 μ M dozunda ise ROS artışının 24 saatte %21 iken 48 saatlik sürede %19,78 olduğu gözlenmiştir. Tan ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, Kuersetin-Cu kompleksinin DNA üzerinde yıkıcı etkisinin olduğu belirtilmiştir (Tan ve ark. 2009a). Mekanizmada kuersetin-Cu(II) kompleksinin DNA'ya verdiği hasar ve ROS artışı kompleksteki Cu^{+2} iyonlarının Cu^{+1} haline dönüşmesi sırasında oluşan radikaller sebebiyle gerçekleşmektedir (Tan ve ark. 2009a). Yapılan bir diğer çalışmada, schiff bazlarının; kobalt, çinko ve bakır gibi geçiş metalleri ile oluşturdukları komplekslerin, DNA ile etkileşimleri göz önünde bulundurulmuş ve antikanser aktiviteleri araştırılmıştır (Yousuf ve Arjmand 2016). Farklı geçiş metallerini içeren komplekslerinin; DNA'nın morfolojik yapısında değişikliklere yol açtığı ve lösemi (HL60), rahim kanseri (HeLa), meme kanseri (MCF-7) gibi hücre hatları üzerinde oksidatif hasara sebep olarak, sitotoksik aktivite sergiledikleri gözlenmiştir (Yousuf ve Arjmand 2016). Cu(II) flavonoid kompleksinin hücreler üzerindeki ROS miktarında artışa sebep olması, potansiyel bir antikanser ajan olabileceğini düşündürmektedir.

Flavonoidlerin farklı sinyalleri tetikler ve dallanmalı bir şekilde düzenleyici yolları başlatabilir. Siklinler ve sikline bağımlı kinazlar, hücre bölünmesinin kilit düzenleyicileridir. Siklinler ve sikline bağımlı kinazlar, hücre döngüsünün aşamasına ve söz konusu olan hücrenin tipine bağlı olarak farklı bir rol üstlenirler. Hücre siklusunun belirli bir safhada tutulumuna yol açarlar (Bendris ve ark. 2015, Malumbres ve Barbacid 2009). Çalışmamızda Cu(II) flavonoid kompleksinin hücre siklusunda faz spesifik olup olmadığı değerlendirilmiştir. Cu(II) flavonoid kompleksi uygulaması sonrasında hücre siklusunun 18. saattinde hücrelerin G0/G1 de tutulduğu bulunmuştur. 36. saatte ise hücreler G2/M fazında tutulduğu belirlenmiştir. Yapılan in vivo ve in vitro araştırmalarda, kuersetinin apoptozu teşvik etmede, metastazı inhibe etmede ve hücre döngüsünü ve tümör anjiyogenezini düzenleme yeteneğinde güçlü bir rolü olduğunu göstermiştir (Kim ve ark. 2019).

Bu tez çalışması sonucunda; Cu(II) flavonoid kompleksinin, insan akciğer kanseri hücresi olan A549 üzerinde sitotoksik etkiye neden olduğu ve apoptozisi indükleyerek hücrelerin büyümesini baskılayabildiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında Cu (II) flavonoid kompleksinin, bir sonraki inceleme basamağı olan *in vivo* araştırmaların yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.



KAYNAKLAR

- Adams, J.M., Cory, S. 2001.** Life or death decisions by the Bcl-2 family. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1):61-66.
- Afanas'eva, I.B., Ostrakhovitch, E.A., Mikhal'chik, E.V., Ibragimova, G.A., Korkina, L.G. 2001.** Enhancement of antioxidant and antiinflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochemical Pharmacology*, 61(6):677-684.
- Adrain, C., Martin, S.J. 2001.** The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome *c*. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(6): 390-397.
- Alberg, A.J., Samet, J.M. 2003.** Epidemiology of lung cancer. *Chest*, 123: 21-49.
- Alison, M.R. 2001.** Cancer. *Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing Group.
- Akşit, H., Bildik, A., 2008.** Apoptozis. *Yeni Yüzyıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(1); 55-63.
- Aktan, A.Ö., Yalçın, A.S. 1998.** Ischemia-reperfusion injury, reactive oxygen metabolites, and the surgeon. *Journal of Medicine Sciences*, 28:1-5.
- Aktaş, S.H. 2010.** Kemoterapinin Kolon Kanseri, Meme Kanseri ve Mide Kanseri ve Vegf Düzeylerine Etkisinin İn Vivo Ve İn Vitro İncelemesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Alper, P., Erkisa, M., Genkal, H.M., Sahin, S., Ulukaya, E., Ari, F. 2019.** Synthesis, characterization, anticancer and antioxidant activity of new nickel(II) and copper(II) flavonoid complexes. *Journal of Molecular Structure*, 1196:783–792.
- Andrades, Ikeda., N.E., Novak, E.M., Maria, D.A., Velosa, A.S., Silva Pereira, R.M. 2015.** Synthesis, characterization and biological evaluation of Rutin–zinc(II) flavonoid–metal complex. *Chemico-Biological Interactions*, 5; 239:184-91.
- Andreotti, P.E., Cree, I.A., Kurbacher, C.M., Hartmann, D.M., Linder, D., Harel, G. 1995.** Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Research*, 55(22): 5276-5282.
- Anonim 1987.** International Agency for Research on Cancer. Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs volumes 1–42. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, supplement 7. IARC press, Lyon.
- Anonim, 1998.** National Research Council. Committee on health risk of exposure to radon, Board on radiation effects research: health effects of exposure to radon (BEIR VI). DC: *National Academy Press*, Washington.
- Anonim, 2016.** <http://www.dreamstime.com/stock-illustration-apoptosis-necrosis-difference-apoptotic-versus-necrotic-morphology-form-cell-death-structural-changes-cells-image>. Erişim tarihi: 20.07.2015.
- TUIK, 2012.** TUIK, Küresel yetişkin tütün araştırması. <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=13142>.
- Anonim, 2013a.** Muse™ Caspase-3/7 Kit El Kitapçığı. Almanya, Erişim tarihi: 30.10.2015.
- Anonim, 2013b.** Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit El Kitapçığı. Almanya. Erişim tarihi: 19.06.2015.

- Anonim, 2013c.** Muse™ Oxidativestress El Kitabçığı. Almanya. Erişim tarihi: 19.06.2015.
- Anonim, 2020.** Kanser istatistikleri. www.saglik.gov.tr.
- Arı, F., Ulukaya, E., Sarımahmut, M., Yılmaz, V.T. 2013.** Palladium (II) saccharinate complexes with bis (2-pyridylmethyl) amine induce cell death by apoptosis in human breast cancer cells in vitro. *Bioorganic&Medicinal Chemistry*, 21(11): 3016- 3021.
- Atagün, G., Eren, Z., Gürkanlı, İ. 2011.** Apoptoziste Mitokondrinin Rolü.
- Bakar, C. 2017.** Dünyada ve Türkiye'de Kanser Epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri*, 2(2):49-59.
- Barltrop, J.A., Owen, T.C., Cory, A.H., Cory, J.G., 1991:** 5-(3- carboxymethoxy-phenyl)-2-(4,5- dimethylthiazolyl)-3- (4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple watersoluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, 1, 11, 611-614.
- Baykara, O. 2016.** Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *BalikesirSaglik Bilimleri Dergisi*, 154:5-3.
- Bendris, N., Lemmers, B., Blanchard, J.M. 2015.** Cell cycle, cytoskeleton dynamics ve beyond: the many functions of cyclins ve CDK inhibitors. *Cell Cycle*, (14), s. 1786-1798.
- Boersma, A.W.M., Nooter, K., Oostrum, R.G., Stoter, G. 1996.** Quantification of apoptotic cells with fluoresce in isothio cyanate labeled Annexin-V in Chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. *Cytometry*, 24: 123–130.
- Boone, C.W., Kelloff, G.J., Malone, W.E. 1990.** Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal model sand human clinical trials: a review. *Cancer Research*, 50(1): p. 2-9.
- Cachot, J., Galgani, F. Vincet, F. 1998.** cDNA cloning and expression analysis of flounder p53 tumour suppressor gene. *Comparative Biochemistry and Physiology PartB*, 121(3): 235-242.
- Chahar, M.K., Sharma, N., Dobhal, M.P., Joshi, Y.C. 2011.** Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacognosy Review*; 5: 1–12.
- Choi, B.H., Kim, W., Wang, Q.C., Kim, D.C., Tan, S.N., Yong, J.W., Kim. K.T., Yoon, H.S. 2008.** Kinetin ribosi depreferentially induces apoptosis by modulating Bcl-2 family proteins and caspase-3 in cancer cells. *Cancer Letters*; 1: 37-45.
- Cooper, G.M., Hausmann R.E., 2006.** “Hücre: Moleküler Yaklaşım”, Üçüncü Baskı, Sakızlı M., Atabey N., ISBN 9944-5148-0-2, İzmir Tıp Kitabevi.
- Dey, T., Dutta, P., Kalita, J., Boruah, H. P. D., Kalita, M., Unni, B. 2015.** Glutathione S-transferase gene polymorphism and lung cancer in Indian population: a meta-analysis of case-control studies. *Current Science*, 109(3), 536-540.
- Desoize, B. 2004.** Metals and Metal Compounds in Cancer Treatment. *Anticancer Research*, 24: 1529-1544.
- De Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Muller, A., Ruiz-Ramirez, L., Kass, G. E. N., Kelland, L. R., Orr, R. M., Dobrota, M. 2000.** Induction of apoptosis by a novel copper-based anti cancer compound, casiopeina II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicology In Vitro*, 14(1): 1-5.
- Dexter, S.J., Camara, M., Davies, M., Shakesheff, K.M. 2003.** Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomaterials Journal*, 24: 27–34.

- Dickens, L.S., Boyd, R.S., Jukes-Jones, R., Hughes, M.A., Robinson, G.L., Fairall, L., Schwabe, J.W., Cain, K., Macfarlane, M. 2012. A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. *Molecular Cell* 47(2): 291-305.
- Dolatabadi, J. 2011. Molecular aspects on the interaction of quercetin and its metal complexes with DNA. *International Journal of Biological Macromolecules* 48: 227-233.
- Dumont, M., Beal, M.F. 2011. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5):1014-1026.
- Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T.V., Vandenabeele, P. 2009. Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection*. 11(13): 1050-1062.
- Durgo, K., Halec, I., Sola, I., Franekic, J. 2011. Cytotoxic and genotoxic effects of the quercetin/lanthanum complex on human cervical carcinoma cells in vitro. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 62: 221-227.
- Economou, P., Samet, J.M., Lechner, J.F. 1994. Familial and genetic factors in the pathogenesis of lung cancer: *Epidemiology of lung cancer*, Editorler: Samet, J.M., Marcel Dekker Inc, New York, 353-396.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathology*, 35(4): 495-516.
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, P.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Merceur, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75(4):817.
- Etcheverry, S.B., Ferrer, E.G., Naso, L., Rivadeneira, J., Salinas, V., Williams, P.A. 2008. Antioxidant effects of the VO(IV) hesperidin complex and its role in cancer chemoprevention. *Journal Biological Inorganic Chemistry*, 13: 435-447.
- Erdoğan, B.B. 2003. Apoptosis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-faslı bağımlı apoptosis. *Akciğer Arşivi*, 4:165-174.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Filho JCC, Sarria ALF, Becceneri, A.B., Fuzer, A.M., Batalhão JR, da Silva, C.M.P. 2014. Copper (II) and 2,2'-Bipyridine Complexation Improves Chemopreventive Effects of Naringenin against Breast Tumor Cells. *PLoS ONE* 9(9): e107058.
- Filho, J. C., Sarria, A. L., Becceneri, A. B., Fuzer, A. M., Batalhão, J. R., da Silva, C. M., Carlos, R. M., Vieira, P. C., Fernandes, J. B., Cominetti, M. R. 2014. Copper (II) and 2,2'-bipyridine complexation proves chemopreventive effects of naringenin against breast tumor cells. *PloSone*, 9(9), e107058.
- Fischer, U., Janicke, R.U., Schulze-Osthoff, K. 2003. Many cutstoriun: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation*, 10(1): 76- 100.
- Florea, A.M., Büsselberg, D. 2011. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*, 3, 1351-1371.
- Fong, K.M., Minna, J.D. 2002. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clinics Chest Medicine*, 23(1):83-101.
- Galati, G., O'Brien, P.J. 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anti cancer properties. *Free Radial Biology Medicine*, 37(3):287-303.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A.V., Arama, E., Baehrecke, E.H., Barlev, N.A., Bazan, N.G., Bernassola, F., Bertrand, M.J.M., Bianchi, K., Blagosklonny, M.V., Blomgren, K.,

Borner, C., Boya, P., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Carmona-Gutierrez, D., Cecconi, F., Chan, F.K.M., Chandel, N.S., Cheng, E.H., Chipuk, J.E., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Cohen, G.M., Conrad, M., Cubillos-Ruiz, J.R., Czabotar, P.E., D'Angiolella, V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K.M., DeBerardinis, R.J., Deshmukh, M., DiDaniele, N., DiVirgilio, F., Dixit, V. M., Dixon, S. J., Duckett, C. S., Dynlacht, B. D., El-Deiry, W.S., Elrod, J.W., Fimia, G.M., Fulda, S., García-Sáez, A.J., Garg, A.D., Garri-do, C., Gavathiotis, E., Golstein, P., Gottlieb, E., Green, D.R., Greene, L.A., Gronemeyer, H., Gross, A., Hajnoczky, G., Hardwick, J.M., Harris, I.S., Hengartner, M.O., Hetz, C., Ichijo, H., Jäättelä, M., Joseph, B., Jost, P.J., Juin, P.P., Kaiser, W.J., Karin, M., Kaufmann, T., Kepp, O., Kimchi, A., Kitsis, R.N., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kumar, S., Lee, S.W., Le-masters, J.J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S.A., Lockshin, R.A., López-Otín, C., Lowe, S.W., Luedde, T., Lugli, E., MacFarlane, M., Ma-deo, F., Malewicz, M., Malorni, W., Manic, G., Marine, J.-C., Martin, S. J., Martinou, J.-C., Medema, J. P., Mehlen, P., Meier, P., Melino, S., Miao, E.A., Molkentin, J.D., Moll, U.M., Muñoz-Pinedo, C., Nagata, S., Nuñez, G., Oberst, A., Oren, M., Overholtzer, M., Pagano, M., Panaretakis, T., Pasparakis, M., Penninger, J.M., Pereira, D.M., Pervaiz, S., Peter, M.E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J.H.M., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Rehm, M., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M.P., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Ryan, K.M., Sayan, E., Scorrano, L., Shao, F., Shi, Y., Silke, J., Simon, H.U., Sistigu, A., Stockwell, B.R., Strasser, A., Szabadkai, G., Tait, S.W.G., Tang, D., Tavernarakis, N., Thorburn, A., Tsujimoto, Y., Turk, B., Van-den Berghe, T., Vandenabeele, P., VanderHeiden, M.G., Villunger, A., Virgin, H.W., Vousden, K.H., Vucic, D., Wagner, E.F., Walczak, H., Wallach, D., Wang, Y., Wells, J.A., Wood, W., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Zitvogel, L., Melino, G. and Kroemer, G. 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486–541.

Gençkal, H. M., Erkisa, M., Alper, P., Sahin, S., Ulukaya, E., Ari, F. 2020. Mixed ligand complexes of Co (II), Ni (II) and Cu(II) with quercetin and diiminoligands: synthesis, characterization, anticancer and antioxidant activity. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 25(1), 161-177.

Gewis, A. 2004. Introduction to Apoptosis. *Toxicol Pathol*, 1-26.

Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., Adjei, A.A. 2005. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *A Cancer Journal for Clinicians*, 55: 178–194.

Gillham, C.M., Reynolds, J., Hollywood, D. 2007. Predicting the response of localized oesophageal cancer to neoadjuvant chemoradiation. *World Journal of Surgical Oncology*, 5:97.

Gilliland, F.D., Samet, J.M. 1994. Lung cancer. *Chest Journal*. 20: 175–195.

Guicciardi, M. E., Gores, G. J. 2009. Life and death by death receptors. *The FASEB Journal*, 23(6): 1625-1637.

Güleş, Ö., Eren, Ü. 2008. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Yeni Yüzyıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2, 73-78.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 100(1): 57-70.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144: 646-674.

Hernroth, B., Holm, I., Gondikas, A., Tassidis, H. 2018. Manganese Inhibits Viability of Prostate Cancer Cell. *Anticancer Research*, 38: 137-154.

- Huang, T., Zhang, P., Li, W., Zhao, T., Zhang, Z., Chen, S., Yang, Y., Feng, Y., Li, F., Shirley, Liu., X. 2017.** G9A promotes tumor cell growth and invasion by silencing CASP1 in non-small-cell lung cancer cells. *Cell death&disease*.8:e2726.
- Li, Y.,Yao,J.,Han, C., Yang, J.,Chaudhry, M.T., Wang, S., Liu, H., Yin, Y. 2016.** Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*.8(3): 167.
- Jacobson, D.R. 1999.** Ras mutations in lung cancer. Editors: Brambilla, C., Brambilla, E. Lung tumors fundamental biology and clinical management. New York, *Marcel DekkerInc*, pp: 139-156.
- Jin,C.Y. C. Park, H.J. Hwang, G.Y. Kim, Choi,B.T. Kim, W.J. Choi, Y.H. 2011.** Neringenin upregulates the expression of death receptor 5 and enhances TRAIL-induced apoptosis in human lung cancer A549 cells. *Molecular Nutriation Food Research*, 55;300-309.
- Judith, B., Jim, O'Prey., Harrison, P.R. 2003.** Enhanced sensitivity of human oral tumours to the flavonol, morin, during cancer progression: involvement of theAkt and stres skinase pathways, *Carcinogenesis*, 24(2) :171–177.
- Kahraman, A., Serteşer, M., Köken,T. 2002.** Flavonoidler. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 3,01.08.
- Kasprzak, M.M., Erxleben, A., Ochocki, J. 2015.** Properties and applications of flavonoid metal complexes. *RSC Advances*, 5: 45853-45877.
- Karakaş, D., Ari, F., Ulukaya, E. 2017.** The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilitie salt hough the cells are killed by someplant extracts. *Turkish Journal of Biology*. 18;41(6):919-925.
- Kaya, M. 2007.** Bazı monoterpen ve uçucu yağların, hücre çoğalması ve apoptozis üzerine etkilerinin memeli hücre kültürleriyle araştırılması. Y.Lisans Tezi, AÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı,Eskişehir.
- Kaplan, A., Çiftçi, A.G., Kutlu. M. H. 2017.** Titanyum dioksitin A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*. 6:38-54.
- Keane, R.W., Kraydieh, S., Lotocki, G., Bethea, J.R., Krajewski, S., Reed, J.C., Dietrich, W. D. 2001.** Apoptotic and antiapoptotic mechanisms following spinal cordinjury. *Journal of Neuropatholy and Experimental Neurology*, 60: 422-429.
- Kim, D.H., Khan, H., Ullah, H., Hassan, S.T.S., Smejkal, K. Efferth, T., Mahomoodally, M.F., Xu, S., Habtemariam, S., Filosa, R., Lagoa, R., Rengasamy, K.R. 2019.** MicroRNA targeting by quercetin in cancer treatment and chemoprotection. *Pharmacolgy Research*. 147. Article 104346.
- Kockx, M., Muhring, J., Knaapen, M.W.M., de Meyer, G.R.Y. 1998.** RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situendla beling techniques used to detect apoptosis. *American Journal Pathology*, 152: 885-888.
- Khan, F., Niaz K., Maqbool, F., Hassan, F.I., Abdollahi, M., Venkata, K.C.N., Nabavi, S.M., Bishayee, A. 2016.** Moleculartargetsunderlyingtheanticancereffects of quercetin: an update. *Nutrients*; 8: E529.
- Koopman, G., Reutelingsperger, P., Kuijten, A., Keehnen, M., Pal, T. 1994.** Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells under going apoptosis. *Blood*. 1;84: 1415-1420.
- Kopnin, B.P. 2000.** Targets of Oncogenes and Tumor Suppressors: Key for Understanding Basic Mechanisms of Carcinogenesis. *Biochemistry(Moscow)*. 65, 2-27.
- Kroft, K.D. 1998.** The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the Newyork Academy of Sciences*; 854: 435-42.

- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. 2005.** Cellular adaptations, cell injury, and cell death: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th, Editörler: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Philadelphia: Elsevier Saunders, p.3-46.
- Leung, C.C., Porcel, J.M., Takahashi, K., Restrepo, M.I., Lee, P., Wainwright, C. 2014.** Year in review 2013 Lung cancer, respiratory infections, tuberculosis, cysticfibrosis, pleural diseases, bronchoscopic intervention and imaging. *Respirology*, 19: 448- 460.
- Leers, M.P., Kölgen, W., Björklund, V., Bergman, T., Tribbick, G., Persson, B., Björklund, P., Ramaekers, F.C., Björklund, B., Nap, M., Jörnvall, H., Schutte, B. 1999.** Immuno cytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo epitope exposed during early apoptosis. *Journal Pathology*. 187: 567-72.
- Li, W., Laskar, A., Sultana, N., Osman, E., Ghosh, M., Li, Q. Yuan, X.M. 2008.** Cell death induced by 7-oxysterols via lysosomal and mitochondrial pathways is p53-dependent. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(11), 2054–2061.
- Lowitz, B.B., Casciato, D.A. 2000.** Medical oncology & principles of cancer biology , Cancer Biology and Oncogenes. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. One complexes designed to enhance anticancer activity, *European Journal Medicine Chemistry*, 156:368-380.
- Mabry, M. 1998.** Activating oncogenes in lung cancer: Biology of lung cancer, Editörler: Kane, M.A., Bunn, P.A., Marcel Dekker Inc., New York, 391-412.
- Maehara, Y., Anai, H., Tamada, R., Sugimachi, K. 1987.** The ATP assay is more sensitive than the succinate-dehydrogenase inhibition test for predicting cell Viability. *European Journal Cancer Clinical Oncology*, 23: 273–27
- Malumbres, M., Barbacid, M. 2009.** Cell cycle, CDKs ve cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, (9), s. 153.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, I. 2004.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal Clinical Nutrition*, 79: 727-47.
- Martinez, J.D., Parker, M.T., Fultz, K.E., Ignatenko, N.A. ve Gerner, E.W. 2003.** Cancer-Related Genes. *Molecular Biology of Cancer*. (Ed: Abraham, D.J.), John Wiley & Sons, Inc, 21-26.
- Martínez, Medina, J.J., Naso, L.G., Pérez, A.L., Rizzi, A., Okulik, N.B., Val-carcel, M., Salado. C., Ferrer. E.G., Williams, P.A.M. 2019.** Synthesis, characterization, the oretical studies and biological (antioxidant, anticancer, toxicity and neuroprotective) determinations of a copper(II) complex with 5-hydroxytryptophan, *Biomed Pharmacother*. 111:414-426.
- Michels, K. B., Giovannucci, E., Joshipura, K. J., Rosner, B. A., Stampfer, M. J., Fuchs, C. S., Colditz, G.A., Speizer, F.E., Willett, W. C. 2000.** Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(21): 1740–1752.
- Micha, D., Cummings, J., Shoemaker, A., Elmore, S., Foster, K., Greaves, M., Ward, T., Rosenberg, S., Dive, C. & Simpson, K. 2008.** Circulating biomarkers of cell death after treatment with the BH-3 mimetic ABT-737 in a preclinical model of small-cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*. Vol. 14, no. 22, pp. 7304–7310
- Misiak, M., Chruscinska E.L. 2010.** Interactions of flavonoids with transition metal ions. *Pharma Chemistry*; 39-42.
- Moretti, E., Mazzi, L., Bonechi, C., Salvatic, M.C., Iacoponi, F., Rossi, C., Collodel, G. 2016.** Effect of quercetin-loaded liposomes on induced oxidative stress in human spermatozoa. *Reprod Toxicol*; 60: 140–7.

- Mossman, 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.
- Motadi, L.R., Misso, N.L., Dlamini, Z., Bhoola, K.D. 2007.** Molecular genetic and mechanisms of apoptosis in carcinomas of the lung and pleura: Therapeutic targets. *International Immunopharmacology*, 14: 1934–1947.
- Mueller, H., Kassack, M.U., Wiese, M. 2004.** Comparison of the usefulness of the MTT, ATP and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *Journal of Biomolecular Screening*, 9: 506–515.
- Nakamura, K., Bossy-Wetzel, E., Burns, K., Fadel, M. P., Lozyk, M., Goping, S., Opas, M., Bleachy, R.C., Green, D.R., Michalak, M. 2000.** Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *The Journal of cell biology*, 150(4): 731-740.
- Nam, J.S., Sharma, A.R., Nguyen, L.T., Chakraborty, C., Sharma, G., Lee, S.S. 2016.** Application of bioactive quercetin in oncotherapy: from nutrition to nanomedicine. *Molecules*; 21: E108.
- Nishida, K., Yamaguchi, O., Otsu, K. 2008.** Cross talk between autophagy and apoptosis in heart disease. *Circulation Research*, 103(4), 343–351.
- Ola, M.S., Nawaz, M., Ahsan, H. 2011.** Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 351(1–2), 41–58.
- Oliver, L., Vallette, F.M. 2005.** The role of caspases in cell death and differentiation. *Drug Resistance Updates*, 8: 163-170.
- Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., Hanen, C. 1998.** Early features of apoptosis detected by four different flowcytometry assays. *Apoptosis*, 3: 115-121.
- Özercan, İ.H., Şimşek, S. 2017.** “Akciğer Kanserinin Histopatolojik Özellikleri. *Türkiye Klinikleri*, 8(1):14-8.
- Palmer, A.M., Greengrass, P.M., Cavalla, D. 2000.** The role of mitochondria in apoptosis. *Drug news&Perspectives*, 13(6): 378-384.
- Pelicano, H., Carney, D., Huang, P. 2004.** ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*, 7(2):97-110.
- Peters, S., Adjei, A.A., Gridelli, C., Reck, M., Kerr, K., Felip, E.O. 2012.** Metastatic nonsmall cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guide lines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 23(suppl 7), pp.vii56-vii64.
- Pohl, S.O.G., Agostino, M., Dharmarajan, A., Pervaiz, S. 2018.** Cross-talk between cellular redox state and the anti-apoptotic protein Bcl-2. *Antioxidants&Redox Signaling*, (in press), 1-65.
- Prendergast, G.C. 1999.** Mechanisms of apoptosis by c-Myc. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Oncogene*, 18(19), 2967-2987. doi: 10.1038/sj.onc.1202727.
- Prives, C. 1998.** Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell*, 95: 1437–1443.
- Quincoces, A.F., Polanco, I., Thomson, T., Leon, J. 1997.** Positive auto regulation of ras genes expression in fibroblasts. *FEBS Letters*, 416: 317-323.
- Rafique S, Idrees M, Nasim A, Akbar H, Athar A. 2010.** Transition metal complexes as potential therapeutic agents. *Biotechnol. Molecular Biology Review*, 5(2); pp. 38-45.
- Rao, R. V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Ellerby, L. M., Ellerby, H. M., Bredesen, D.E. 2001.** Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death

program mechanism of caspase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36): 33869-33874.

Read, A. P., Strachan, T. 1999. Human molecular genetics 2. Wiley, New York, ISBN 0-471-33061-2. Chapter 18.

Riedl, S.J., Shi, Y., 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(11): 897-907.

Rodrigo, R., Libuy, M., Feliu, F., Hasson, D. 2014. Polyphenols in disease: From diet to supplements. *Curr Pharm Biotechnol*; 15: 304-17.

Rom, W.N., Hay, J.G., Lee, T.C., Jiang, Y., Tchou-Wong, K.M. 2000. Molecular and Genetic Aspects of Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Medicine*, 161: 1355–1367.

Ruanov-Ravina, A., Figueiras, A., Barros-Dios, J.M. 2000. Diet and lung cancer: a new approach. *European Journal of Cancer Prevention*. 9(6): p. 395-400.

Russo, G.L., Tedesco, I., Spagnuolo, C., Russo, M. 2017. Antioxidant polyphenols in cancer treatment: Friend, foe or foil? *Semin Cancer Biol*, 46: 1-13.

Samet, J.M. 1989. Radon and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 81: 745–757.

Sezgin, C. 2010. Kanserde bitkilerle tedavide örnek uygulamalar. Bitkilerle Tedavi Sempozyumu, 5-6 Haziran 2010, Zeytinburnu, İstanbul.

Shay, J. W., Zou, Y., Hiyama, E., & Wright, W. E. 2001. Telomerase and cancer. *Human Molecular Genetics*, 10(7): 677-685.

Shivapurkar, N., Reddy, J., Matta, H., Sathyanarayana, U. G., Huang, C. X., Toyooka, S., Gazdar, A., F. 2002. Loss of expression of death-inducing signaling complex (DISC) components in lung cancer cell lines and the influence of MYC amplification. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Oncogene*, 21(55), 8510-8514. doi: 10.1038/sj.onc.1205941

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*, 82(13):1107–1112.

Spierings, D.C., de Vries, E.G., Vellenga, E., van den, Heuvel, F.A., Koornstra, J.J., Wesseling, J., Hollema, H., de Jong, S. 2004. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52(6): 821- 831.

Suh, Y. 2002. Cell signaling in aging and apoptosis. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123: 881-890.

Solakoğlu, Z. 2009. Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. *Klinik Gelişim*, 22 (3): 20-25.

Şencan, İ., Keskinlik, B. 2015. Türkiye Kanseri İstatistikleri. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara.

Tan, J., Wang, B., Zhu, L. 2009a. DNA binding and oxidative DNA damage induced by a quercetin copper(II) complex: potential mechanism of its antitumor properties. *Journal of Inorganic Chemistry*. 14(5):727-39.

Tan, M., Zhu, J., Pan, Y., Chen, Z., Liang H., Liu, H. Wang, H. 2009b. Synthesis, cytotoxic activity, and DNA binding properties of copper (II) complexes with hesperetin, naringenin, and apigenin. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2009 article ID 347872.

Tan, C., Lai, S., Wu, S., Hu, S., Zhou, L., Chen, Y., Ji, L. 2010. Nuclear permeable ruthenium (II) β -carboline complexes induce autophagy to antagonize mitochondrial-

- mediated apoptosis. *Journal of Medicinal Chemistry*. 53(21): 7613-7624.
- Telkoparan, P., Tazebay, U. H. 2011.** Ras Protein Ailesi: Hücresel İşlevi, Moleküler Kontrolü, Onkogenezdaki Rolü. *Turkish Journal of Biochemistry*, 36 (4); 367–373.
- Tesarik, J., Greco, E., Cohen-Bacrie, P., Mendoza, C. 1998.** Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Molecular Human Reproduction*, 4: 757.
- Thom, S.M., Horobin, R.W., Seidler, E., Barer, M.R. 1993.** Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity. *Journal of Applied Bacteriology*. 1993;74(4):433–443
- Topkaya, G.C. 2014.** Synthesis and characterisation of Cu(II), Ni(II), and Zn(II) complexes of furfural derived from aryl hydrazones bearing aliphatic groups and their interactions with DNA. *Chemical Papers*, 10: 1293-1303.
- Ueno, T., Toi, M., Bivén, K., Bando, H., Ogawa, T., Linder, S. 2003.** Measurement of an apoptotic product in the sera of breast cancer patients. *European Journal of Cancer*, 39:769-74.
- Ulukaya, E. 2001.** Akciğer Kanseri, Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar: Hücre Siklusu ve Apoptozis. Ed: Engin, K., Özyardımcı, N., Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul, Bölüm III.
- Ulukaya, E. 2003.** Apoptozis ders notları. http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozisders_notu.pdf. (Erişim tarihi: 12 Mayıs 2011).
- Ulukaya, E., Acilan, C., Yilmaz, Y. 2011.** Apoptosis: Why and how does it occur in Biology. *Cell Biochemistry and Function*, 29: 468-480.
- Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Yilmaztepe-Oral, A., Demirci, M. 2008.** The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology In Vitro*, 22: 232–239.
- Ünal, H., 2006.** “Meme Kanserin Tanı ve Tedavisinin Tarihsel Gelişimi”, İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Meme Kanseri Sempozyumu Dizisi No:54; 9-13.
- Vichai, V., Kirtikara, K. 2006.** Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*, 1(3):1112-1116.
- Vidya, Priyadarsini, R., Senthil-Murugan, R., Maitreyi, S., Ramalingam, K., Karunakaran, D., Nagini, S. 2010.** The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NFκB inhibition. *European Journal Pharmacol*; 649: 84–91.
- Wang, H.K. 2000.** The therapeutic potential of flavonoids. *Expert Opin Investig Drugs*; 9: 2103–19.
- Warra, A.A. 2011.** Transition metal complexes and their application in drugs and cosmetics. *Journal Chemical Pharmacy Research*; 3(4):951-958.
- Webb, S. J., Harrison, D. J., & Wyllie, A. H. 1997.** Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Advances Pharmacol*, 41, 1-34.
- Willett, W.C., Trichopoulos, D. 1996.** Nutrition and cancer: a summary of the evidence. *Cancer Causes & Control*, 7(1): p. 178-180.
- Woodson, K., 1999.** Serum α-tocopherol and subsequent risk of lung cancer among male smokers. *Journal of the National Cancer Institute*. 91(20): p. 1738-1743.
- Wong, C.H., Iskandar, K. B., Yadav, S.K., Hirpara, J.L., Loh, T., Pervaiz, S. 2010.** Simultaneous induction of non-canonical autophagy and apoptosis in cancer cells by ROS-dependent ERK and JNK activation. *PloSone*, 5(4): e9996.

Wyllie, A.H. 1997. Apoptosis: an overview. [Review]. *British Medical Bulletin*, 53(3), 451-465.

Yalçın, A.S. 1998. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim*, 11: 342-6.

Yılmaz, V., Icel, C., Suyunova, F., Aygun, M., Aztopal, N., Ulukaya, E. 2016. Ni(II)/Cu(II)/Zn(II) 5,5-diethylbarbiturate complexes with 1,10-phenanthroline and 2,2'-dipyridylamine: synthesis, structures, DNA/BSA binding, nuclease activity, molecular docking, cellular uptake, cytotoxicity and the mode of cell death. *Dalton Transactions*, 45:10466-10479.

Yousuf, I., Arjmand, F. 2016. In vitro DNA binding profile of enantiomeric dinuclear Ni(II)/Cu(II) complexes derived from L-/D-histidine-terephthalaldehyde derived Schiff base as potential chemotherapeutic agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B :Biology*, 164: 83-95.

Zhang, J., Huang, K., O'Neill, K.L., Pang, X. Luo, X. 2016. Bax/Bak activation in the absence of Bid, Bim, Puma, and p53. *Cell death & Disease*, 7 (6): e2266.

