

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ İMİDAZOLİDİNDİON TÜREVLERİNİN VE PLATİN
KOMPLEKSLERİNİN İNSAN KANSER HÜCRELERİNDE ANTI-
TÜMÖR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ESMA ERCİYAS BAYKAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2021

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ İMİDAZOLİDİNDİON
TÜREVLERİNİN VE PLATİN
KOMPLEKSLERİNİN İNSAN KANSER
HÜCRELERİNDE ANTİ-TÜMÖR
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ESMA ERCİYAS BAYKAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. TAMER YAĞCI

GEBZE
2021

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**INVESTIGATION OF THE ANTI-
TUMOR EFFECTS OF NEW
IMIDAZOLIDINEDIONE DERIVATIVES
AND PLATINUM COMPLEXES ON
HUMAN CANCER CELLS**

ESMA ERCİYAS BAYKAL
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. TAMER YAĞCI

GEBZE
2021



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 01/07/2021 tarih ve 2021/30 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 27/07/2021 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Esma ERCİYAS BAYKAL'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

: Prof. Dr. Ayşe GÜL GÜREK

ÜYE

: Doç. Dr. Meltem GÖKSEL ŞAHİN

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Cisplatin, 1978 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kanser tedavisinde kullanılmak üzere onaylanan ilk platin türevli ilaçtır. Uzun süredir kemoterapi alanında derin ve geniş kapsamlı bir etkiye sahip olduğu gösterilen cisplatinin, birçok kanser hastasının hayatta kalmasını önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. Bu keşfin ardından, çok sayıda platin varyantı hazırlanmış ve kanser hücrelerini öldürme ve tümör büyümesini inhibe etme yetenekleri açısından test edildi. Günümüzde, cisplatin tek başına veya diğer ilaçlarla birlikte kombine olarak birçok farklı kanser türüne karşı kullanılmaktadır. Ancak yan etkiler ve direnç oluşumu gibi çeşitli sınırlamalarla birlikte, yenilikçi ve daha etkili platin türevli ilaçların araştırılmasında, çok çeşitli antikanser aktiviteler sergileyen ve eş zamanlı olarak cisplatinin dezavantajlarının üstesinden gelen yeni analoglarının tasarımına ve sentezine büyük ilgi gösterildi. Bu çalışmalarda farklı tipte ligandların kullanılmasıyla birlikte imidazolidindion türevlerinin çalışmalarda güçlü antitümör etkisinin olduğu bilinmektedir.

Bu tez çalışmasında, yeni sentezlenen farklı imidazolidindion türevleri ve platin (II) komplekslerinin, MCF-12A, MCF-7, MDA-MB-231, HEK293, HeLa, PC3 ve LNCaP hücre hatlarında antikanser özellikleri incelenmesi amaçlanmaktadır. Bu kapsamda hücre proliferasyonu, apoptoz, hücre döngüsü analizlerine ek olarak, DNA hasarı, migrasyon ve invazyon analizleri gerçekleştirildi. Proliferasyon analizi ile hesaplanan IC₅₀ değerleri ile analizler gerçekleştirildi. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulgulara göre imidazolidindion türevli platin (II) komplekslerinin meme ve prostat kanseri hücre hatlarına farklı etkiler gösterdiği saptandı. **L_{2a}Pt-Bis**'in hücre proliferasyonunu düşürdüğü, cisplatine kıyasla meme kanseri hücrelerinde apoptozu ve DNA hasarını indüklediği tespit edildi. Ayrıca hücre döngüsünde duraklamaya neden olurken, hücrelerin migrasyon ve invazyon kapasitesini de önemli ölçüde azalttığı saptandı. Sonuç olarak, **L_{2a}Pt-Bis** meme kanseri tedavisinde tedavisinde umut verici kemoterapi ajanı olarak karşımızda durmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Cisplatin, İnhibisyon Konsantrasyonu (IC₅₀).

SUMMARY

Cisplatin is the first platinum-derived drug approved for use in cancer treatment by the US Food and Drug Administration (FDA) in 1978. Cisplatin has had a profound and far-reaching impact on chemotherapy and has significantly improved the survival of many cancer patients. Following this discovery, multiple platinum variants were prepared and tested for their ability to kill cancer cells and inhibit tumor growth. Today, cisplatin is used alone or in combination with other drugs against many different types of cancer. However, with various limitations such as side effects and resistance formation, in the search for innovative and more effective platinum-derived drugs, great attention has been paid to the design and synthesis of novel analogs of cisplatin that exhibit a wide range of anticancer activities and simultaneously overcome the disadvantages of cisplatin. It is known that imidazolidindione derivatives have strong antitumor effects in studies, together with the use of different types of ligands.

In this thesis, it is aimed to investigate the anticancer properties of newly synthesized different imidazolidinedione derivatives and platinum (II) complexes in MCF-12A, MCF-7, MDA-MB-231, HEK293, HeLa, PC3 and LNCaP cell lines. In this context, in addition to analyzes of cell proliferation, apoptosis, cell cycle, and DNA damage, migration, and invasion analyzes were performed. Analyzes were performed with IC₅₀ values calculated by proliferation analysis. According to the results of the studies, it was determined that imidazolidindione-derived platinum (II) complexes have different effects on breast and prostate cancer cell lines. It was found that **L_{2a}Pt-Bis** decreased cell proliferation, induced apoptosis and DNA damage in breast cancer cells compared to cisplatin. It was also found that while it caused arrest in the cell cycle, it also significantly reduced the migration and invasion capacity of cells. In conclusion, **L_{2a}Pt-Bis** stands out as a promising chemotherapy agent in the treatment of breast cancer.

Key Words: Cancer, Cisplatin, Inhibition Concentration (IC₅₀).

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında bana danışmanlığıyla destek veren, bilgi ve yorumlarını benimle paylaşan tez danışmanım Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullandığım ajanları sentezleyen Prof. Dr. Vefa AHSEN ve ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca çalışmalarımın yürütülmesindeki yardımlarından ve desteklerinden dolayı başta Uzm. Biyolog Dr. Pelin BALÇIK ERÇİN'e, bilgi birikimlerini ve tecrübelerini benimle paylaşan, her zaman yardım ve desteklerini hissettiğim Dr. İrem YALIM CAMCI, Dr. Görkem ODABAŞ ve Dr. Metin ÇETİN'e teşekkür ederim.

Sevgili laboratuvar arkadaşlarım Arş. Gör. Arzu AYSAN KILIÇ, Nazlı SALIK, Seyhan ÜNSAL GÜRSOY, Maide ŞEKER, Şevval DİK ve Melike BAHÇEKAPILI'ya en içten sevgilerimi sunuyorum.

Tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olan, hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan sonsuz sevgi ve anlayışlarıyla her türlü duygu durumunu benimle göğüsleyen sevgili annem Nuran Erciyas'a, babam Baki Erciyas'a ve kıymetli kardeşlerim Esra Erciyas'a ve Enes Erciyas'a ve ailemizin yeni üyesi Nefes'ime varlıkları ve sonsuz sevgileri için çok teşekkür ederim.

Son olarak bana her zaman destek olan, bütün zorlukları benimle göğüsleyen sevgili eşim Yaşar BAYKAL'a çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından Prof. Dr. Vefa AHSEN tarafından yürütücülüğünde gerçekleştirilen 118Z279 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xxii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Kanserin Ayırt Edici Özellikleri	4
2.2. Kanser Tedavileri	5
2.2.1. Cerrahi	5
2.2.2. Hormon Tedavisi	5
2.2.3. İmmünoterapi	6
2.2.4. Radyoterapi	6
2.2.5. Moleküler Hedeflendirilmiş Terapi	7
2.2.6. Kemoterapi	8
2.3. Platin Türevli Anti-kanser Terapi	9
2.3.1. Onaylanmış Platin Türevli İlaçlar	10
2.3.2. Platin Türevli İlaçların Yan Etkileri	13
2.4. Cisplatinin Etki Mekanizması	13
2.4.1. Cisplatinin Hücresel Birikimi	13
2.4.2. Cisplatinin Aktivasyonu	14
2.4.3. Cisplatin Tarafından Oksidatif Stres Oluşturulması	14
2.4.4. Cisplatin-DNA Bağlanması	15
2.4.5. Apoptoz Yoluyla Hücre Ölümü	16
2.4.6. Hücre Döngüsü Durdurması	16

2.4.7. Cisplatin ve p53	17
2.5. Cisplatin Direnci	17
2.5.1. Kan Dolaşımı Yoluyla İlaç Sirkülasyonu Sırasında Oluşan Direnç	18
2.5.2. İlacın Hücre Zarından İçeri Girmesi veya Dışarı Akması Sırasında Oluşan Direnç	18
2.5.3. Sitoplazmada Mevcutken Oluşan Direnç	19
2.5.4. DNA Bağlanması Sonra Oluşan Direnç	19
2.6. Yeni Kemoterapötik Ajanların Geliştirilmesi ve İmidazolidindion Bileşiğinin Kanser Tedavisindeki Yeri	19
3. GEREÇLER	21
3.1. Genel Kimyasallar	21
3.2. Cihazlar	21
3.3. Hücre Kültürü Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler	22
3.4. Çözelti ve Tamponlar	23
3.5. Antikorlar ve Boyalar	23
3.6. Maddeler	23
4. YÖNTEMLER	24
4.1. Hücre Kültürü ve Koşulları	24
4.2. Hücre Proliferasyonu Analizi	24
4.3. Apoptoz Analizi	25
4.4. Hücre Döngüsü Analizi	26
4.5. Hücrelerde DNA Kırıklarının Immunofloresan Analiz Yöntemiyle Tespiti	26
4.6. Hücre Migrasyon ve İnvazyon Analizi	27
4.6.1. Hücre Migrasyonu	27
4.6.2. Hücre İnvazyonu	27
4.7. İstatistiksel Analizler	28
5. BULGULAR	29
5.1. Bileşiklerin Sentezi	29
5.2. Bileşiklerin Antitümör Aktivitelerinin Ölçülmesi	30
5.2.1. Yüksek Konsantrasyonda Bileşiklerin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi	30

5.2.2. Platin Türevli Maddelerin Anti-Proliferatif Aktiviteleri	31
5.3. Annexin V/7-AAD Boyaması	38
5.4. Hücre Döngüsü Analizi	47
5.5. DNA Hasarının Görüntülenmesi	55
5.6. Gerçek Zamanlı Migrasyon ve İnvazyon Analizi	61
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	64
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	83
EKLER	84

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
μ l	: Mikrolitre
μ m	: Mikromolar
μ g	: Mikrogram
μ M	: Mikro Molar
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nM	: Nanomolar
L	: Litre
M	: Molar
ng	: Nanogram
Dk	: Dakika
γ	: Gama
AR	: Androjen Reseptör
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1
ATM	: Ataksi Telenjipektazi Mutasyona Uğramış Protein
ATR	: ATM ve RAD3 ile ilişkili protein
BSA	: Bovine Serum Albumin
CTR1	: Bakır Taşıyıcı Protein
Cyt C	: Sitokrom C
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	: N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin
FADD	: Fas İle İlişkili Ölüm Domaini
FBS	: Fetal Dana Serumu
FDA	: ABD Gıda ve İlaç Dairesi
FLIP	: Flice Benzeri İnhibitör Protein
gDNA	: Genomik DNA
GST	: Glutasyon S-Transferaz Enzimi
HMG	: Yüksek Mobilite Grubu

IC ₅₀	: Hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri
Kaderin-1	: Epitelyal Kaderin Geni
MMR	: Yanlış Eşleşme Eksizyon Tamiri
MPT	: Mitokondri Permeabilite Geçışı
MRP	: Çoklu İlaça Dirençli Proteinler
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
NaCl	: Sodyum Klorür
NEAA	: Esansiyel Olmayan Amino Asit
NER	: Nükleotid Eksizyon Tamiri
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltilisi
PS	: Fosfolipid Fosfatidilserin
PTEN	: Fosfataz Ve Tensin Homolog
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
Rpm	: Dakika Başına Dönüş
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute 1640
SFM	: Serum İçermeyen Besiyeri
Tris	: Tris (Hidroksimetil) Aminometan
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
7-AAD	: 7-Aminoaktinomisin D

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: GLOBOCAN 2020'ye göre, her iki cinsiyette, her yaşta Dünyada kanser sayısı ve yüzdesi.	4
2.2: Cisplatin.	10
2.3: Dünya çapında klinik onaylı platin kompleksleri: cisplatin (1), karboplatin (2), oksaliplatin (3).	10
2.4: Bölgesel sınırlı klinik uygulama ile platin kompleksleri: nedaplatin (4), heptaplatin (5), disikloplatin (6), lobaplatin (7) ve miriplatin (8).	11
2.5: Cisplatin antikanser aktivitesinin etki mekanizması.	13
2.6: Cisplatin ile DNA arasında oluşan çapraz bağlar.	15
5.1: Ligandların kimyasal yapıları (L_a , L_c , L_{1a} , L_{1c}).	29
5.2: Pt (II) kompleksleri (L_{1a}Pt-Bis , L_{1c}Pt-Bis , L_{2a}Pt-Bis , L₂Pt , EK-24 , EK-25).	29
5.3: Ajanların hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi. 50 µM konsantrasyonda MCF-7, MDA-MB-231, HeLa ve PC-3 hücreleri ile muamele edilen ajanların zamana bağlı hücre indeksi grafikleri. Kontrol: Sadece besiyeri, DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri.	30
5.4: MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde L_{1c}Pt-bis 'in hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi. a. L_{1c}Pt-bis ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen MCF-12A hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. b. MCF-7 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda L_{1c}Pt-bis uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. c. MDA-MB-231 hücrelerine farklı konsantrasyonda L_{1c}Pt-bis uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. Kontrol: Sadece besiyeri, DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.	32

- 5.5: HEK293, HeLa, PC-3 ve LNCaP hücrelerinde **L_{1c}Pt-bis**'in hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi. a. **L_{1c}Pt-bis** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen HEK293 hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. b. HeLa hücrelerine farklı konsantrasyonlarda **L_{1c}Pt-bis** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerlerinin grafiksel gösterimi. c. **L_{1c}Pt-bis** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen PC-3 32 hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. d. LNCaP hücrelerine farklı konsantrasyonda **L_{1c}Pt-bis** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerlerinin grafiksel gösterimi. Kontrol: Sadece besiyeri, DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.
- 5.6: MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde **L_{2a}Pt-Bis**'in hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi. a. **L_{2a}Pt-Bis** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen MCF-12A hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. b. MCF-7 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda **L_{2a}Pt-Bis** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerlerinin grafiksel gösterimi. c. 33 MDA-MB-231 hücrelerine farklı konsantrasyonda **L_{2a}Pt-Bis** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerlerinin grafiksel gösterimi. Kontrol: Sadece besiyeri, DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.
- 5:7 HEK293, HeLa, PC-3 ve LNCaP hücrelerinde **L_{2a}Pt-Bis**'in hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi. a. **L_{2a}Pt-Bis** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen HEK293 hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. b. HeLa hücrelerine farklı konsantrasyonlarda **L_{2a}Pt-Bis** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerlerinin grafiksel gösterimi. c. 34 **L_{2a}Pt-Bis** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen PC-3 hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. d. LNCaP hücrelerine farklı konsantrasyonda **L_{2a}Pt-Bis** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerlerinin grafiksel

gösterimi. Kontrol: Sadece besiyeri, DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

- 5.8: MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde **EK-24** kompleksinin hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi. a. **EK-24** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen MCF-12A hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. b. MCF-7 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda **EK-24** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. c. MDA-MB-231 hücrelerine farklı konsantrasyonda **EK-24** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. Kontrol: Sadece besiyeri, DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. 35
- 5.9: HEK293, HeLa, PC-3 ve LNCaP hücrelerinde **EK-24** kompleksinin hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi. a. **EK-24** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen HEK293 hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. b. HeLa hücrelerine farklı konsantrasyonlarda **EK-24** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. c. **EK-24** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen PC-3 hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. d. LNCaP hücrelerine farklı konsantrasyonda **EK-24** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. Kontrol: Sadece besiyeri, DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. 36
- 5.10: MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde **EK-25** kompleksinin hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi. a. **EK-25** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen MCF-12A hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. b. MCF-7 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda **EK-25** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. c. MDA-MB-231 hücrelerine farklı konsantrasyonda **EK-25** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin 37

grafiksel gösterimi. Kontrol: Sadece besiyeri, DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

- 5.11: HEK293, HeLa, PC-3 ve LNCaP hücrelerinde **EK-25** kompleksinin hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi. a. **EK-25** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen HEK293 hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. b. HeLa hücrelerine farklı konsantrasyonlarda **EK-25** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerlerinin grafiksel gösterimi. c. **EK-25** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen PC-3 hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. d. LNCaP hücrelerine farklı konsantrasyonda **EK-25** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerlerinin grafiksel gösterimi. Kontrol: Sadece besiyeri, DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

37

- 5.12: MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde **L_{1c}Pt-Bis** ve cisplatinin 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde Annexin V/7-AAD boyaması ile apoptotik etkisinin akım sitometresi ile gösterimi. a. Temsili dört kadranda hücre yüzdesi belirlendi: canlı hücreler, (Annexin-V-/7-AAD-, alt/sol kadrant); erken apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD-, alt / sağ kadrant); geç apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD +, üst / sağ kadrant); ve nekrotik hücreler (Annexin-V- / 7-AAD +, üst / sol kadrant). b. Canlı hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. c. Apoptotik hücrelerin bar grafiği ile gösterimi. d. Nekrotik hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

39

- 5.13: HEK293, PC-3 ve LNCaP hücrelerinde **L_{1c}Pt-Bis** ve cisplatinin 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde Annexin V/7-AAD boyaması ile apoptotik etkisinin akım sitometresi ile gösterimi. a. Temsili dört kadranda hücre yüzdesi belirlendi: canlı hücreler, (Annexin-V-/7-AAD-, alt/sol kadrant); erken apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD-, alt / sağ kadrant); geç apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD +, üst / sağ kadrant); ve nekrotik hücreler (Annexin-V- / 7-AAD +, üst

40

/ sol kadranda). b. Canlı hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. c. Apoptotik hücrelerin bar grafiği ile gösterimi. d. Nekrotik hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

5.14: MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatinin 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde Annexin V/7-AAD boyaması ile apoptotik etkisinin akım sitometresi ile gösterimi. a. Temsili dört kadranda hücre yüzdesi belirlendi: canlı hücreler, (Annexin-V-/7-AAD-, alt/sol kadranda); erken apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD-, alt / sağ kadranda); geç apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD +, üst / sağ kadranda); ve nekrotik hücreler (Annexin-V- / 7-AAD +, üst / sol kadranda). b. Canlı hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. c. Apoptotik hücrelerin bar grafiği ile gösterimi. d. Nekrotik hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

42

5.15: HEK293, PC-3 ve LNCaP hücrelerinde **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatinin 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde Annexin V/7-AAD boyaması ile apoptotik etkisinin akım sitometresi ile gösterimi. a. Temsili dört kadranda hücre yüzdesi belirlendi: canlı hücreler, (Annexin-V-/7-AAD-, alt/sol kadranda); erken apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD-, alt / sağ kadranda); geç apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD +, üst / sağ kadranda); ve nekrotik hücreler (Annexin-V- / 7-AAD +, üst / sol kadranda). b. Canlı hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. c. Apoptotik hücrelerin bar grafiği ile gösterimi. d. Nekrotik hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

43

5.16: MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde **EK-24** ve cisplatinin 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde Annexin V/7-AAD boyaması ile apoptotik etkisinin akım sitometresi ile gösterimi. a. Temsili dört kadranda hücre yüzdesi belirlendi: canlı hücreler, (Annexin-V-/7-AAD-, alt/sol kadranda); erken apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD-, alt / sağ kadranda); geç apoptotik hücreler

45

(Annexin-V + / 7-AAD +, üst / sağ kadran); ve nekrotik hücreler (Annexin-V- / 7-AAD +, üst / sol kadran). b. Canlı hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. c. Apoptotik hücrelerin bar grafiği ile gösterimi. d. Nekrotik hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

5.17: MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde **EK-25** ve cisplatinin 24 saat boyunca ilgili IC_{50} değerlerinde Annexin V/7-AAD boyaması ile apoptotik etkisinin akım sitometresi ile gösterimi. a. Temsili dört kadranda hücre yüzdesi belirlendi: canlı hücreler, (Annexin-V-/7-AAD-, alt/sol kadran); erken apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD-, alt / sağ kadran); geç apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD +, üst / sağ kadran); ve nekrotik hücreler (Annexin-V- / 7-AAD +, üst / sol kadran). b. Canlı hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. c. Apoptotik hücrelerin bar grafiği ile gösterimi. d. Nekrotik hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

46

5.18: 24 saat boyunca ilgili IC_{50} değerlerinde **L_{1c}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin hücre döngüsü analizi. a) Temsili akım sitometrisi histogramları. b) **L_{1c}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-12A hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. c) **L_{1c}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. d) **L_{1c}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

48

5.19: 24 saat boyunca ilgili IC_{50} değerlerinde **L_{1c}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen HEK293, PC-3 ve LNCaP hücrelerinin hücre döngüsü analizi. a) Temsili akım sitometrisi histogramları. b) **L_{1c}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen HEK293 hücrelerinin G1, S ve G2/M

49

fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. c) **L_{1c}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. d) **L_{1c}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen LNCaP hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * ^CP<0.05, ** ^BP<0.01, ***^AP<0.001.

- 5.20: 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin hücre döngüsü analizi. a) Temsili akım sitometrisi histogramları. b) **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-12A hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. c) **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. d) **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * ^CP<0.05, ** ^BP<0.01, ***^AP<0.001. 50
- 5.21: 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen HEK293, PC-3 ve LNCaP hücrelerinin hücre döngüsü analizi. a) Temsili akım sitometrisi histogramları. b) **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen HEK293 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. c) **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. d) **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen LNCaP hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * ^CP<0.05, ** ^BP<0.01, ***^AP<0.001. 51
- 5.22: 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde **EK-24** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin hücre döngüsü analizi. a) Temsili akım sitometrisi histogramları. b) **EK-24** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-12A hücrelerinin G1, S ve G2/M 52

fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. c) **EK-24** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. d) **EK-24** ve cisplatin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $^C P < 0.05$, ** $^B P < 0.01$, *** $^A P < 0.001$.

- 5.23: 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde **EK-25** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin hücre döngüsü analizi. a) Temsili akım sitometrisi histogramları. b) **EK-25** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-12A hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. c) **EK-25** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. d) **EK-25** ve cisplatin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $^C P < 0.05$, ** $^B P < 0.01$, *** $^A P < 0.001$. 54
- 5.24: 24 saat boyunca DMSO (üst satır), **L_{1c}Pt-Bis** (orta satır) ve cisplatin (alt satır) ile muamele edilmiş MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin γ -H2AX (yeşil) ekspresyonunun immunofloresans analizi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. Ölçek çubukları 20 μ m'yi gösterir. Tüm görüntüler immersion yağı ile 63X büyütmede çekildi. 56
- 5.25: 24 saat boyunca DMSO (üst satır), **L_{1c}Pt-Bis** (orta satır) ve cisplatin (alt satır) ile muamele edilmiş HEK293, PC-3 ve LNCaP hücrelerinin γ -H2AX (yeşil) ekspresyonunun immunofloresans analizi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. Ölçek çubukları 20 μ m'yi gösterir. Tüm görüntüler immersion yağı ile 63X büyütmede çekildi. 57
- 5.26: 24 saat boyunca DMSO (üst satır), **L_{2a}Pt-Bis** (orta satır) ve cisplatin (alt satır) ile muamele edilmiş MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin γ -H2AX (yeşil) ekspresyonunun immunofloresans analizi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. Ölçek çubukları 20 58

- µm'yi gösterir. Tüm görüntüler immersion yağı ile 63X büyütmede çekildi.
- 5.27: 24 saat boyunca DMSO (üst satır), **L_{2a}Pt-Bis** (orta satır) ve cisplatin (alt satır) ile muamele edilmiş HEK293, PC-3 ve LNCaP hücrelerinin γ-H2AX (yeşil) ekspresyonunun immunofloresans analizi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. Ölçek çubukları 20 µm'yi gösterir. Tüm görüntüler immersion yağı ile 63X büyütmede çekildi. 59
- 5.28: 24 saat boyunca DMSO (üst satır), **EK-24** (orta satır) ve cisplatin (alt satır) ile muamele edilmiş MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin γ-H2AX (yeşil) ekspresyonunun immunofloresans analizi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. Ölçek çubukları 20 µm'yi gösterir. Tüm görüntüler immersion yağı ile 63X büyütmede çekildi. 60
- 5.29: 24 saat boyunca DMSO (üst satır), **EK-25** (orta satır) ve cisplatin (alt satır) ile muamele edilmiş MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin γ-H2AX (yeşil) ekspresyonunun immunofloresans analizi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. Ölçek çubukları 20 µm'yi gösterir. Tüm görüntüler immersion yağı ile 63X büyütmede çekildi. 61
- 5.30: 24 saat boyunca DMSO ve IC₅₀ değeri ve alt konsantrasyonlarında **L_{1c}Pt-Bis**, **L_{2a}Pt-Bis**, **EK-24** ve **EK-25** ile muamele edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyon oranı. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. 62
- 5.31: 24 saat boyunca DMSO ve IC₅₀ değeri ve alt konsantrasyonlarında **L_{1c}Pt-Bis**, **L_{2a}Pt-Bis**, **EK-24** ve **EK-25** ile muamele edilmiş PC-3 ve LNCaP hücrelerinin migrasyon oranı. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. 62
- 5.32: 24 saat boyunca DMSO ve IC₅₀ değeri ve alt konsantrasyonlarında **L_{1c}Pt-Bis**, **L_{2a}Pt-Bis**, **EK-24** ve **EK-25** ile muamele edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinin invazyon oranı. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. 63
- 5.33: 24 saat boyunca DMSO ve IC₅₀ değeri ve alt konsantrasyonlarında **L_{1c}Pt-Bis**, **L_{2a}Pt-Bis**, **EK-24** ve **EK-25** ile muamele edilmiş PC-3 ve 63

LNCaP hücrelerinin migrasyon oranı. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No:

Sayfa

2.1: İnsanlarda Kullanım için Klinik Olarak Onaylanmış Platin Kemoterapötikler.	12
5.1: 24 saat muamele edilen komplekslerin MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde IC ₅₀ değerleri.	38
5.2: 24 saat muamele edilen komplekslerin HEK293, PC-3 ve LNCaP hücrelerinde IC ₅₀ değerleri.	38

1. GİRİŞ

Kanser, toplumda çok sık görülen ve hayat kalitesini en çok etkileyen hastalıklardan biridir. 2020 verilerine göre kanserli vakaların yaklaşık 20 milyon olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca 20 yıl içinde bu rakamın 28,8 milyon olacağı öngörülmektedir [1]. Bugüne kadar kemoterapi de dahil olmak üzere birçok farklı tedavi yöntemi çalışılmış olsa bile kanser tanısında önemli bir artış vardır.

Cisplatin 1978’de FDA tarafından onaylandıktan sonra birçok farklı kanser türünü tedavi etme yeteneğiyle birlikte, kanser hastalarının mortalitesinde önemli bir azalmaya sebep olmaktadır [35]. Fakat sonrasında cisplatin bazlı kemoterapide, nefrotoksisite, kümülatif periferik nörotoksisite, ototoksisite ve ayrıca bulantı ve kusma gibi ciddi yan etkiler açığa çıkmaktadır [15].

Son yıllarda, yenilikçi ve daha etkili platin türevli ilaçların araştırılmasında, çok çeşitli antikanser aktiviteler sergileyen ve eş zamanlı olarak cisplatinin dezavantajlarının üstesinden gelen yeni analoglarının tasarımına ve sentezine büyük ilgi gösterildi [84]. Yapılan çalışmalar sonucunda, kanser tedavisi için yalnızca iki ek platin bazlı ilaç (karboplatin ve oksaliplatin) FDA onayı aldı [36, 37] ve farklı ligandlar içeren platin türevli ilaçların araştırılmasına ilgi arttı. Ayrıca imidazolidindion türevlerinin çalışmalarda güçlü antitümör etkisinin olduğu bilinmektedir [109].

Bu bilgiler doğrultusunda; bu tez çalışması kapsamında farklı tipteki kanseri hücrelerinde yeni sentezlenen imidazolidindion türevli Pt (II) ajanları ve pozitif kontrol olarak kullanılan cisplatin kemoterapötik ajanın anti-proliferatif etkilerinin yanı sıra, apoptoz, hücre döngüsü, DNA hasarı, migrasyon ve invazyon kapasiteleri üzerine etkileri araştırıldı.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Önerilen bu tez çalışması kapsamında, Prof. Dr. Vefa AHSEN yürütücülüğünde sentezlenen imidazolidindion türevli Pt (II) ajanlarının antikanser etkilerinin *in vitro* araştırılması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında normal meme epiteli hücre hattı MCF-12A, Luminal A tipli meme kanseri hücre hattı MCF-7, üçlü negatif kemoterapi dirençli

meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231, normal embriyonik böbrek hücre hattı HEK293, serviks kanseri hücre hattı HeLa, androjene duyarsız prostat kanseri hücre hattı PC-3 ve androjen-bağımlı prostat kanseri hücre hattı LNCaP hücre hatları kullanıldı. İlk olarak sentezlenen ajanların hücre proliferasyonuna etkileri farklı alt dozlarda xCELLigence RTCA DP Analyzer sistemi kullanılarak incelendi ve ajanların hücreler üzerindeki IC₅₀ değerleri belirlendi. Hücre hatları belirlenen IC₅₀ değerlerinde platin kompleksleri ile muamele edilerek apoptoz ve hücre döngüsü belirteçleri analiz edildi. Bunun yanı sıra ajanların DNA hasarına etkileri γ -H2AX antikoru kullanılarak konfokal mikroskobu ile incelendi. Son olarak, yeni sentezlenen platin (II) komplekslerinin hücre migrasyon ve invazyon yetilerine olan etkileri CIM- plate kullanılarak xCELLigence RTCA DP Analyzer sistemi ile tespit edildi.

Bu tez çalışması sonucunda, cisplatinden daha etkili yeni platin (II) kompleksinin kanser tedavisinde kullanılma potansiyeli bulunmaktadır.

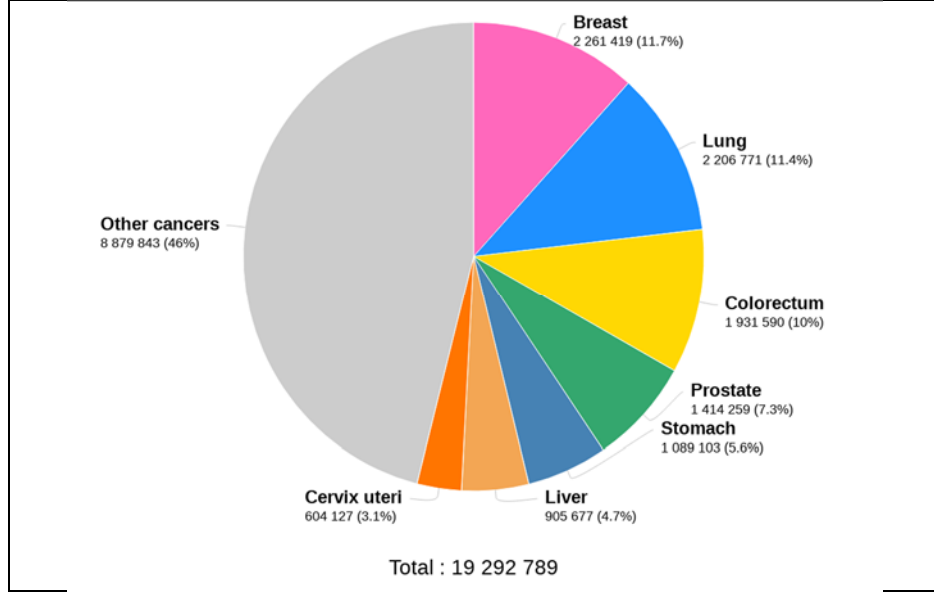
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Kanser

Kanser, modern toplumda en yaygın ve hayatı en çok etkileyen hastalıklardan biridir. GLOBOCAN 2020 verilerine göre, 2020'de yaklaşık 19,3 milyon kanser vakası ve 10 milyon kanser ölümünün olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca önümüzdeki 20 yıl içerisinde bu rakamın 30,2 milyon olacağı öngörülmektedir [1]. Kanser, vücudun hemen hemen her yerindeki dokuları ve organları istila etme ve yok etme kapasitesine sahip anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılmasıyla karakterize edilen bir grup hastalıktır. Kanserinin nedenleri belli olmamakla birlikte kanserlerin %90-95'inin tütün, diyet, obezite, enfeksiyonlar, radyasyon, stres, fiziksel aktivite eksikliği ve çevresel kirlleticiler gibi faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Kanserlerin yaklaşık %5-10'unun ise kişinin ebeveynlerinden miras kalan genetik kusurlardan kaynaklandığı bilinmektedir [2].

Vücudun diğer bölgelerine yayılmayan lokalize tümörler iyi huylu olarak adlandırılırken, yakın dokulara göç edip dokuları istila edebilen ve metastaz oluşturan tümörler kötü huylu tümörlerdir. 100'den fazla kanser türü vardır ve meydana geldikleri organa veya doku türüne göre kategoriler halinde gruplandırılıp adlandırılır. Bunlardan en yaygınları karsinoma (epitel dokusundan köken alır), sarkoma (bağ dokusundan köken alır), lösemi (kemik iliği gibi kan hücrelerini oluşturan dokularda ortaya çıkar ve çok sayıda kan hücresinin üretilip kan dolaşımına girmesine neden olur), lenfoma ve miyelom (kökenleri bağışıklık sistemi hücrelerindedir), merkezi sinir sistemi kanserleridir (beyin ve omurilik dokularında başlar) [3].

GLOBOCAN 2020 verilerine göre kadınlarda en sık teşhis edilen kanser türü meme kanseridir, akciğer ve prostat kanseri ise erkeklerde en yaygın olanıdır. Genel olarak, dünyada kanser ölümlerinde birinci sırada meme (%11,7), ikinci olarak ise akciğer (%11,4) kanseri bulunmaktadır (Şekil 2.1) [1].



Şekil 2.1: GLOBOCAN 2020'ye göre, her iki cinsiyette, her yaşta Dünyada kanser sayısı ve yüzdesi.

2.1.1. Kanserin Ayırt Edici Özellikleri

Kanser hücreleri, altı benzersiz özellik ile normal hücrelerden ayırt edilebilir. Bunlar;

- i) H-Ras onkogenini tetikleyerek kalıcı büyüme sinyali sağlar. Hücre bölünmesi ve kanser hücresinin çoğalması için mitojenik büyüme sinyali gerekli değildir [4, 5].
- ii) Retinoblastoma proteinini kaybederek tümör baskılamaya dirençli hale gelir. Retinoblastoma proteini, neoplazm ilerlemesini baskılar, böylece bu protein yokluğunda tümör sürekli olarak büyür [6, 7].
- iii) İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF'ler) üreterek programlanmış hücre ölümünden (apoptoz) kurtulur. IGF'ler hücre çoğalmasını kolaylaştırır ve doğal hücre ölümünü engelleyerek ölümsüz hale gelir, bu da vücuttaki hücre sayısının artmasına neden olur [8].
- iv) Kanser hücrelerine kendiliğinden büyüme ve çoğalma yeteneği sağlayan terminal transferaz (telomeraz) aktivitesini uyararak sonsuz replikasyon yeteneği kazanır [9, 10].

- v) Vasküler endotelyal büyüme faktörünü (VEGF) uyararak sürekli kan damarı oluşumunu sağlar. Böylece yeni kan damarı, hücrenin sürekli bölünmesi için besinleri ve uygun faktörleri sağlar [11].
- vi) Epitelyal kaderin genini (cadherin-1) devre dışı bırakarak metastazı sağlar. Hücreler arası bağ cadherin-1'in aktivitesine bağlıdır, aktivitesinin kaybı kanser hücrelerinin istilasına ve metastaza neden olur [12, 13].

2.2. Kanser Tedavileri

Deneyisel ve klinik çok sayıda gelişme yaşanmasına karşın ve tıpta çok ilerleme kaydedilmiş olmasına rağmen, halen kanser dünya çapında milyonlarca ölümden sorumludur. Güncel olarak kanserin türü, moleküler karakteristiği ve ilerleme hızına bağlı olan çeşitli kanser tedavisi seçenekleri bulunmaktadır.

Kanserde tedavi yaklaşımları şunlardır:

2.2.1. Cerrahi

Cerrahi, kanserli hücrelerin ve dokuların çıkarılmasına dayanan kanser tedavilerinden biridir. Cerrahi tedaviye, kalan kanser hücrelerini ortadan kaldırmak, tümör yükünü küçültmek veya kanserin büyümesini, yayılmasını veya tekrar oluşmasını önlemek için kemoterapi veya radyasyon tedavisinin eşlik etmesi gerekebilir [14].

Kemoterapi ve radyoterapiye kıyasla çevre dokulara en az zararı sağladığı için cerrahi, birçok iyi huylu ve kötü huylu tümörün en umut verici ve geleneksel tedavilerinden biri olarak düşünülmektedir. Cerrahiyi tercih edilen tedavi seçeneği olarak değerlendirmenin bir başka nedeni de gereksiz doku hasarı riski olmadan tümörün çıkarılabilmesidir [15].

2.2.2. Hormon Tedavisi

Hormonlar, endokrin sistemin belirli organları tarafından üretilen kimyasal habercilerdir ve orijinlerinden uzaktaki hedeflere etki eder. Steroid hormonlar, gen ekspresyonunun ve hücre proliferasyonunun güçlü düzenleyicileridir. Bu nedenle,

yüksek düzeyde belirli hormonlar, kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açar ve neoplastik dönüşüm riskini artırır. Hormona bağlı habisliklerin örnekleri arasında meme, endometriyal ve prostat adenokarsinomları ve rahim sarkomaları yer alır.

Hormonal terapi, hormon üretimine veya reseptörlerin aktivitesine müdahale ederek endokrin sistemi manipüle etmek için hormona bağlı bir malignitede ekzojen hormonların uygulanmasını içerir. Ek olarak, kortikosteroidler gibi bazı hormonlar, genleri azaltarak düzenleme (downregulate) ve apoptozu indükleme yeteneklerinden dolayı genel antiproliferatif etkilere sahiptir [16]. Kemoterapi ve hedefe yönelik tedavi gibi, hormonal terapi de neoadjuvan, adjuvan ve metastatik dönemler dahil olmak üzere çeşitli zaman noktalarında maligniteleri yönetmek için kullanılabilir. Görüntüleme, tedaviye yanıtı izlemek ve tedaviye bağlı yan etkileri saptamak için kanser hastalarının bakımında rutin olarak kullanılmaktadır. Hormonal tedaviye yanıt genellikle tümör boyutunda görüntülemeye yakalanabilen azalmalarla sonuçlanır.

2.2.3. İmmünoterapi

Kanser immünoterapisi, hastanın kendi immün sistemini uyarır ve kanser tedavisi için immün sisteminin gücünü ve özgüllüğünü kullanmaya çalışır [17, 18]. Kansere karşı immünoterapiler, efektör mekanizmaları uyarmaktan, inhibe edici ve baskılayıcı mekanizmaları önlemeye kadar çeşitli yaklaşımlardan oluşur [19]. İmmün sistemi hakkındaki bilgilerin hızla artışıyla birlikte, küçük moleküller, peptitler, rekombinant antikorlar, aşılar ve hücresel terapötik tedavi yöntemleri, immün yanıtı manipüle etmek için uygulanmaktadır. Halen, immünoterapiler kansere karşı dikkate değer faydalar sağlamaktadır [20]. İmmün kontrol noktası blokajı gibi kanser immünoterapilerindeki son klinik başarılar, malignitelerin önlenmesi ve ortadan kaldırılmasında konakçı immün sisteminin önemini yeniden teyit etmiştir [21].

2.2.4. Radyoterapi

Kanser tedavisinde radyasyon, kanser hücrelerini öldürmek için kullanılan fiziksel araçtır. Terapide kullanılan radyasyon türü iyonlaştırıcı radyasyondur. Tesadüfen oluşan radyasyon biyolojik cisimlerdeki parçacıkların elektriksel olarak yüklenmesine neden olur; bu nedenle terim “iyonlaştırıcıdır” ve enerji bu şekilde ışıklardan içinden

geçtiği vücut hücrelerine aktarılır. Bu enerji ya kanser hücrelerini doğrudan öldürebilir ya da onları genetik olarak değiştirerek apoptoza ve hücre ölümüne yol açabilir [22].

Radyasyonla tedavi edilen hücrelerdeki genetik değişikliklerin altında yatan mekanizma, hasarlı DNA'nın onarılamaması ve dolayısıyla hücre bölünmesinin durdurulması ve bunun da hücrelerin ölmesine neden olmasına bağlıdır. Radyasyon tedavisinin olumsuz etkisi, ana tümörlü kitlenin çevresindeki normal hücrelere de etki etmesidir. Ancak, kanser hücrelerinin etkin onarım sistemlerinden yoksun olması nedeniyle, normal hücrelerin normal işlevini kanser hücrelerinden daha hızlı geri kazanmasına ek olarak, kanser kütesinin doğru hedeflenmesine yönelik iyileştirilmiş görüntüleme teknikleri ve girişimler, radyasyonun neden olduğu net hasarı en aza indirir [23].

2.2.5. Moleküler Hedeflendirilmiş Terapi

Moleküler hedeflendirilmiş terapi, kanser hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını engellemek için belirli molekülleri hedefleyen ilaçların veya diğer maddelerin kullanımını ifade eder.

Kanserde moleküler hedefli tedavilerin başarılı bir şekilde geliştirilmesi için ideal hedeflerin belirlenmesi gereklidir. Kanser oluşumunun temellerinden biri, hücrenin hayatta kalmasını ve çoğalmasını teşvik eden proteinlerde ve reseptörlerde mutasyon olması veya değişikliklere yol açan genetik profilin değişmesidir. Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayırabilen bu 2 spesifik genetik değişiklik, bu tür ilaçların geliştirilmesinde moleküler hedefler olarak kullanılabilir [24].

Araştırmacılar, kanserdeki spesifik moleküler hedeflerin fizyolojisini ve özelliklerini anlayarak, tümör büyümesini ve ilerlemesini engellemek için potansiyel moleküler stratejileri belirleyebilirler. Kanser belirteçleri, araştırmacıların normal ve kötü huylu hücrelerin genlerini ve protein ekspresyonlarını karşılaştırarak ekspresyonlarındaki değişiklikleri belirlemelerine olanak tanıyan genom dizileme kullanılarak belirlenebilir [25]. Sekanslama teknolojisi sayesinde, bir bireydeki kötü huylu ve normal hücreler arasındaki genetik heterojenliği ortaya çıkarmak için çeşitli kanser genomları sekanslanabilir. Bu, ilaç geliştirme için potansiyel moleküler hedefleri belirlemede önemlidir [26, 27]. Moleküler hedeflendirilmiş terapi için seçilen hedefler, büyüme faktörlerini, sinyal moleküllerini, hücre döngüsü

proteinlerini, apoptoz modölatörlerini ve anjiyogenezi destekleyen molekülleri içerir [28].

2.2.6. Kemoterapi

Kemoterapi, kanser hücrelerini öldürerek veya bölünmelerini durdurarak kanserin ilerlemesini durduran ilaçların kullanıldığı tedavi yöntemidir. Aksine, tümör hücreleri, apoptoz tarafından kontrol edilmedikleri için artan bir bölünme kapasitesine ve ölümsüzlüğe sahiptir. Bu nedenle, fizyolojik koşullarda hücre çoğalması hücre ölümü ile dengelenirken, kanserli kitlelerde hücre çoğalmasının hücre ölümüne oranı yüksektir. Kemoterapi, tümör hücrelerinde büyümeyi durdurmaları veya ölmeleri için değişikliklere neden olur; bu nedenle kemoterapötik ilaçların iki farklı türü sırasıyla sitostatik ve sitotoksiktir [29].

FDA onaylı birçok kemoterapötik ilaç bulunmaktadır. Bu ilaçlar, tümör hücrelerini hedeflemek ve bunları genotoksik etkiyle, yani reaktif oksijen türlerinin üretimi ile öldürmek üzere tasarlanmıştır. Bununla birlikte, bir dereceye kadar vücudun normal hücreleri de bu ilaçlardan etkilenir [30]. Tek başına veya kombinasyon tedavilerinde kullanılabilen 100'den fazla kemoterapötik ilaç olduğu bilinmektedir. Her ilacın farklı bir kimyasal yapısı ve bileşimi vardır [15]. Kemoterapide kullanılan ilaçları kimyasal yapılarına, kökenlerine, etki mekanizmalarına, hücre döngüsü faz özgüllüklerine vb. göre gruplandırmanın farklı yolları vardır. Örneklendirilmiş kısa bir sınıflandırma aşağıda gösterilmiştir [31, 32]:

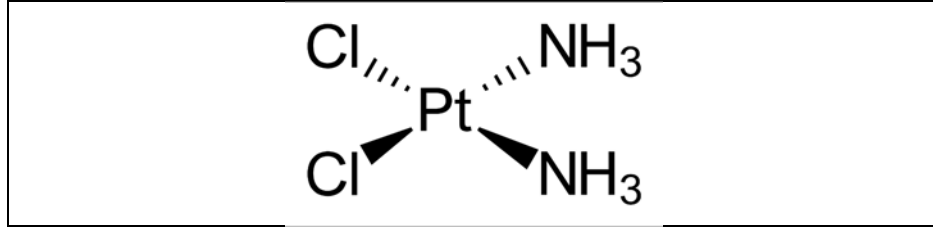
- i) Alkile edici ve metalleştirici ajanlar - nükleofilik DNA grupları ile doğrudan reaksiyona girer:
 - Nitrojen mustards (melphalan, chlorambucil, ifosfamide)
 - Nitrosourea (dacarbazine, carmustine)
 - Diğer alkilleyici ajanlar (busulfan)
 - Platin kompleksleri (cisplatin, karboplatin, oksaliplatin)
- ii) Antitümör antibiyotikler ve türevleri - DNA interkalatörleri, reaktif oksijen türlerinin üretimi (ROS), topoizomera II inhibitörleri:
 - antrasiklinler (daunorubicin, doxorubicin)
 - sentetik analoglar (mitoxantrone)

- glikopeptitler (bleomycin)
- iii) Antimetabolitler - DNA sentezinde rol oynayan enzimleri inhibe eder; S fazına özgü ajanlar:
- dihidrofolat redüktaz inhibitörleri (methotrexate)
 - ribonükleotid redüktaz inhibitörü (hydroxycarbamide)
 - pirimidin antagonistleri (gemcitabine, 5-fluorouracil)
 - pürin antagonistleri (6-mercaptopurine, 6-thioguanine)
- iv) Bitki köken ve türevlerinden antitümör ajanlar - hücre döngüsüne özgü ajanlar:
- topoizomeraz inhibitörleri (podophyllotoxins, camptothecins)
 - tubulin polimerizasyon inhibitörleri (Vinca alkaloids, cryptophycins)
 - tubulin depolimerizasyon inhibitörleri – taxanes
- v) Hormon bazlı tedaviler - hormona bağlı kanserler için kullanılır:
- antiandrojenler (flutamide)
 - antiöstrojenler (tamoxifen)
 - aromataz inhibitörleri (anastrozole, letrozole)
- vi) Sinyal yolları inhibitörleri - protein kinaz inhibitörleri ve diğerleri
- vii) Diğer sitotoksik ajanlar (Asparaginase, As_2O_3)

2.3. Platin Türevli Anti-kanser Terapi

Platin türevli tedavinin başlangıcı, 1965 yılında Rosenberg [33] tarafından yapılan deneyler sırasında beklenmedik bir şekilde keşfedilmiştir. Elektroliz deneyleri sırasında platin elektrotunun *E. coli* kültürlerinde hücre bölünmesini inhibe etmesinin tesadüfen keşfine dayanmaktadır. Daha sonra elektroliz ortamındaki maddenin cisplatin olduğu ve antikanser aktivitesinin olduğu keşfedilmiştir (Şekil 2.2) [34].

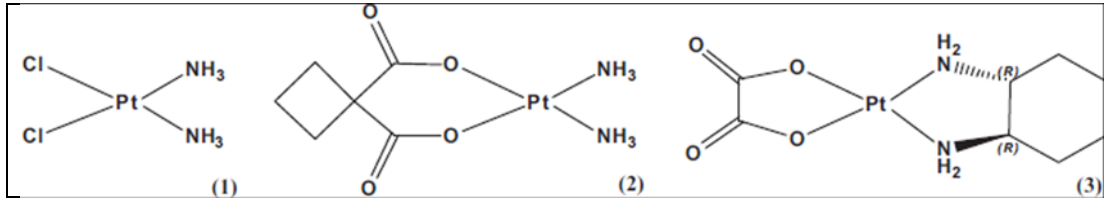
Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin (FDA) cisplatini antikanser bileşiği olarak 1978 yılında onaylamıştır. Cisplatin kemoterapi alanında derin ve geniş kapsamlı bir etkiye sahip olmuştur ve birçok kanser hastasının hayatta kalmasını önemli ölçüde artırmıştır [35]. Bu keşfin ardından, çok sayıda platin varyantı hazırlanmış ve kanser hücrelerini öldürme ve tümör büyümesini inhibe etme yetenekleri açısından test edilmiştir. Günümüzde, cisplatin tek başına veya diğer ilaçlarla birlikte kombine olarak birçok farklı kanser türüne karşı kullanılmaktadır.



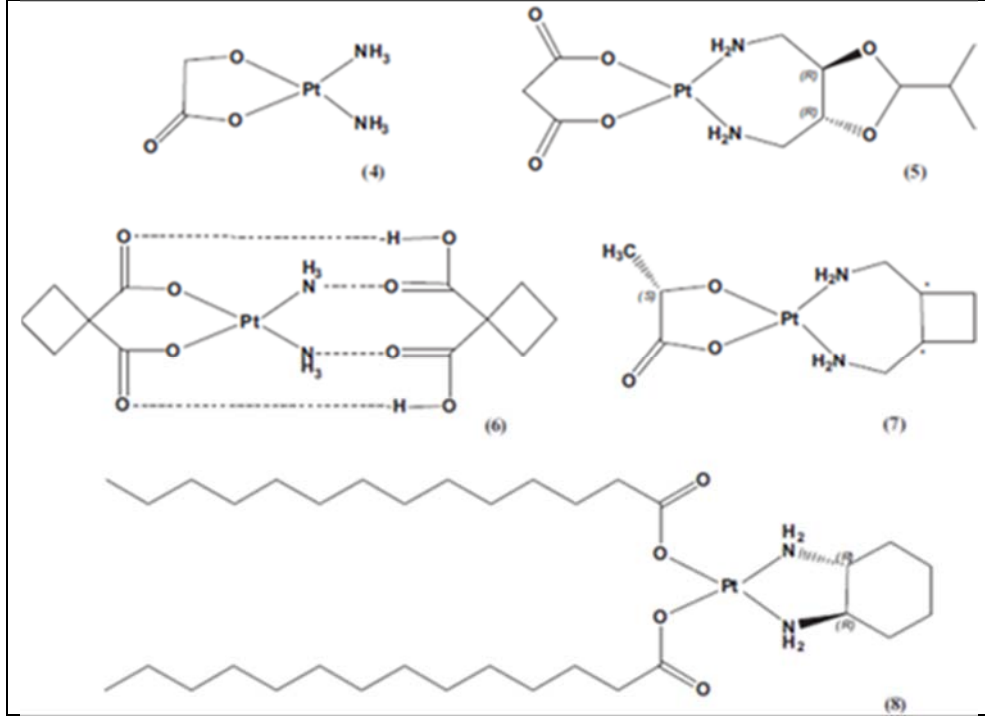
Şekil 2.2: Cisplatin.

2.3.1. Onaylanmış Platin Türevli İlaçlar

FDA, cisplatin ve türevleri karboplatin ve oksaliplatin tek ajan olarak veya kombine kemoterapinin bir parçası olarak onaylamıştır (Şekil 2.3) [36, 37]. Ayrıca diğer beş platin türevi de bölgesel onaylıdır (nedaplatin, lobaplatin, heptaplatin, miriplatin ve disikloplatin) (Şekil 2.4) [38]. Cisplatin ve türevlerinin klinik başarısına rağmen, doz sınırlayıcı toksik yan etkiler ve onaylanmış platin bileşiklerine karşı doğal ve edinilmiş direnç, yeni nesil antitümör ajanların geliştirilmesine yol açmıştır [39, 40, 41].



Şekil 2.3: Dünya çapında klinik onaylı platin kompleksleri: cisplatin (1), karboplatin (2), oksaliplatin (3).



Şekil 2.4: Bölgesel sınırlı klinik uygulama ile platin kompleksleri: nedaplatin (4), heptaplatin (5), disikloplatin (6), lobaplatin (7) ve miriplatin (8).

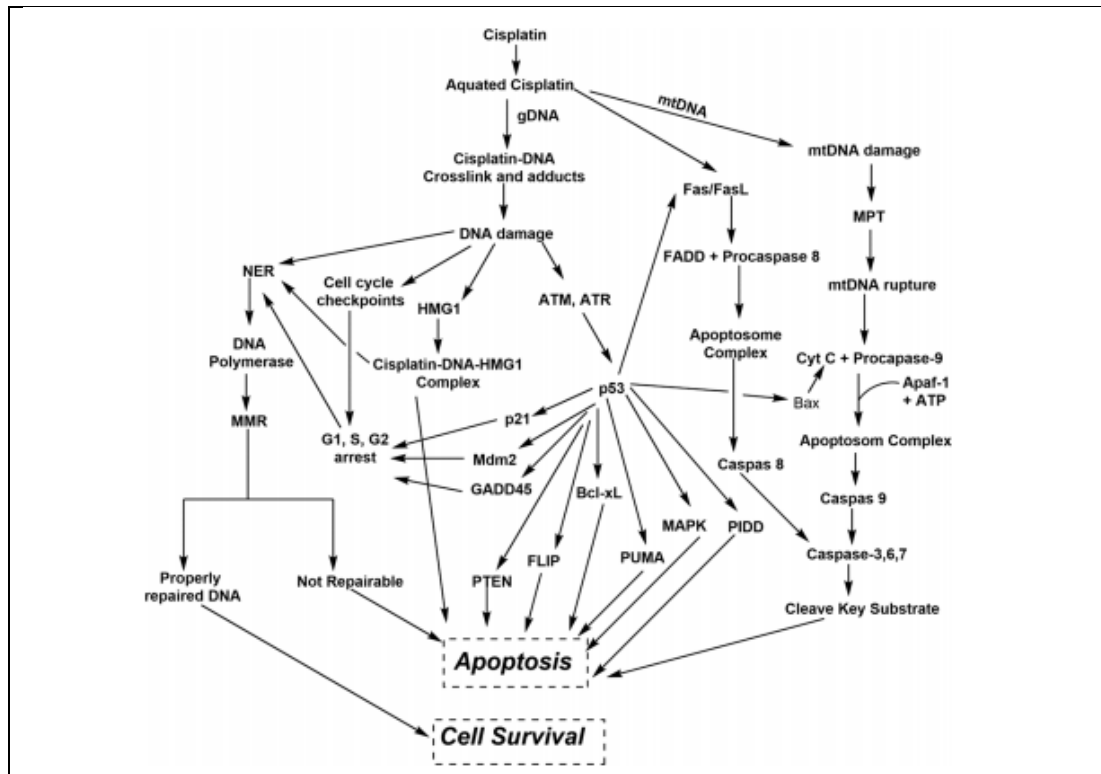
Tablo 2.1: İnsanlarda Kullanım için Klinik Olarak Onaylanmış Platin Kemoterapötikler.

İlaç	Onay Yılı	Pazar Durumu	Klinik Kullanımı	Doz Sınırlayıcı Toksisite
Cisplatin	1979	Dünya	Akciğer, yumurtalık, testis, meme ve beyin kanseri sarkomaları, lenfomaları	Nefrotoksisite
Karboplatin	1989	Dünya	İleri yumurtalık kanseri, baş ve boyun kanseri, akciğer kanseri	Miyelosupresyon
Oksaliplatin	2002	Dünya	Metastatik kolorektal kanseri, ileri mide ve yumurtalık kanseri	Nefrotoksisite
Nedaplatin	1996	Japonya	Küçük ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, baş ve boyun, özofagus kanseri, mesane, yumurtalık ve serviks kanseri	Miyelosupresyon
Lobaplatin	2004	Çin	Meme, testis, küçük hücreli akciğer, mide ve yumurtalık kanseri, kronik miyeloid lösemi	Trombositopeni
Heptaplatin	2005	Kore	Mide kanseri	Nefrotoksisite /intraabdominal kanama

2.3.2. Platin Türevli İlaçların Yan Etkileri

Cisplatin, kanser tedavisinde çok başarılı olmasına rağmen, çok sayıda toksik yan etkiye neden olur [42]. Bu yan etkiler doza bağlı olarak görülebilir [43]. Yoğun kemoterapi tedavisinin bir sonucu olarak, hastaların bağışıklığı bozulur ve bu durum karmaşık enfeksiyonlara ve dolayısıyla ölüme neden olabilir. Cisplatinin başlıca yan etkileri nefrotoksisite, ototoksisite, hepatotoksisite, gastrointestinal toksisitedir.

2.4. Cisplatinin Etki Mekanizması



Şekil 2.5: Cisplatin antikanser aktivitesinin etki mekanizması.

2.4.1. Cisplatinin Hücresel Birikimi

Cisplatin hastalara intravenöz steril salin solüsyonu olarak verilmektedir [44]. Kan dolaşımı yoluyla tüm vücutta dolaşmaya devam eder. Plazma proteinleri albümin, transferin, sistein cisplatin ile güçlü bir şekilde bağlanabilir ve cisplatinin deaktivasyonuna neden olabilir [45,46]. Cisplatinin %65-95'inin, uygulamanın hemen ardından 24 saat içinde kan plazma proteinine bağlanabileceği bildirilmektedir [47].

Kalan cisplatin, plazma membranını kullanarak pasif difüzyon yoluyla tümör hücrelerine taşınabilir [45,48,49]. Çalışmalar, bakır taşıyıcı protein CTR1'in cisplatin alımından da sorumlu olduğunu ortaya koymaktadır [50]. Cisplatin, CTR1 konsantrasyonunun bozulmasına neden olabilir. Yüksek CTR1 ekspresyonuna sahip hücreler daha yüksek cisplatin birikimine sahip olabilir ve bu da cisplatine daha yüksek duyarlılık sağlar [51].

2.4.2. Cisplatinin Aktivasyonu

Cisplatin hücreye girdiğinde, klorür ligandlarından birini su ligandına (mono-aquation) dönüştürerek aktive olmaktadır. Cisplatinin bu aktivasyonu, sitoplazmadaki klorür konsantrasyonunun nispeten düşük olması ve güçlü elektrofil olmaları nedeniyle oluşmaktadır. Sülfhidril protein grupları ve nükleik asitlerin nitrojen donör atomları gibi bir dizi nükleofil ile reaksiyona girebilirler [51] çünkü su klorürden daha iyi ayrılan gruptur [42]. In vitro çalışmalar, mono-aquated platinin DNA bağlanmasına karşı diaquated platinden daha reaktif olduğunu doğrulamıştır [50].

2.4.3. Cisplatin Tarafından Oksidatif Stres Oluşturulması

Oksidatif stres, cisplatin sitotoksitesinde çok yaygın bir mekanizmadır. Hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türleri (ROS), cisplatin konsantrasyonuna ve maruz kalma süresine bağlı olarak süperoksit oluşturarak oksidatif stresi indükler [52].

Mitokondri, oksidatif stresin en önemli hedeflerinden biridir ve ROS, mitokondriyal solunum fonksiyonunu etkileyebilir ve hücrel disfonksiyona neden olabilir [53]. Bax (Bcl2 ile ilişkili X) ve Ca^{2+} ile birlikte ROS, mtDNA hasarına neden olur ve mitokondrinin yırtılmasını kolaylaştıran MPT'de (mitokondri permeabilite geçişi) [54] düşüşe neden olur [55].

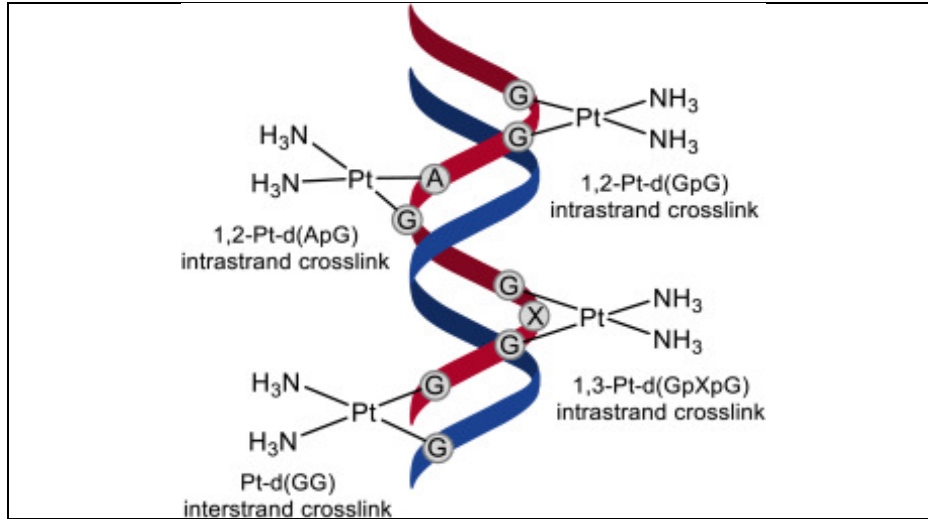
Mitokondri yırtılması, kaspaz-9'u aktive eden bir apoptozom kompleksi oluşturmak için sitosolik Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör 1) ve ATP (adenozin trifosfat) ile bağlanan Cyt C (sitokrom C) ve procaspase-9'u (kaspaz, sistein aspartata özgü proteinazdır) serbest bırakır [42]. Aktive edilmiş kaspaz-9 daha sonra diğer kaspazlarla etkileşime girerek kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'yi aktive eder ve

bu da anahtar substratların bölünmesi yoluyla apoptoza yol açar (Şekil 2.5) [56]. Apoptoz, ATP'ye bağlı programlanmış hücre ölümüdür [57].

2.4.4. Cisplatin-DNA Bağlanması

DNA, cisplatinin antikanser aktivite göstermesi için ana hedeftir [58, 59]. Çekirdeğe giren mono veya dihidratlanmış platin, DNA bazlarıyla reaksiyona girecek kadar savunmasızdır. Yapılan in vitro çalışmalar guaninin imidazol halkasının N7 pozisyonunun, adenin veya DNA'da bulunan diğer bazlara (yani sitozin ve timin) göre daha çok tercih edildiği bildirilmiştir [60,61,62]. Cisplatin ve DNA bazları arasında, intra-strand ve inter-strand çapraz bağlar gibi farklı tipte eklentiler oluşturulabilir.

Cisplatin, 1, 2-intrastrand DNA (GpG) eklentileri ve 1,2-intrastrand DNA (ApG) eklentileri oluşturmak için adenin ve guanin üzerindeki nükleofilik N7 reaktif merkezlerine bağlanır (Şekil 2.6). Eklentilerin %90'ı 1, 2-intrastrand DNA (GpG) iken, yaklaşık %10'u 1,2-intrastrand DNA'dır (ApG) [51]. Bu eklentiler, DNA transkripsiyonunu ve replikasyonunu inhibe eder. Dolayısıyla, DNA'ya zarar verir ve programlanmış hücre ölümüne neden olur [63].



Şekil 2.6: Cisplatin ile DNA arasında oluşan çapraz bağlar.

2.4.5. Apoptoz Yoluyla Hücre Ölümü

Cisplatin ayrıca hücre zarından hücre apoptozunu indükleyebilir [64]. Tip II transmembran proteini ve Fas ligandı (FasL), Fas reseptörünü aktive eder ve bu daha

sonra FADD (Fas ile ilişkili ölüm domaini) ve prokaspaz-8'den apoptozom kompleksi oluşturmayı kolaylaştırır [42]. Bu apoptozom kompleksi, daha sonra kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'yi aktive eden kaspaz-8'i aktive eder, bu da nihayetinde anahtar substratı böler ve hücre apoptozuna yol açar (Şekil 2.5).

Cisplatinin ana hedefi genomik DNA'dır (gDNA) ancak genellikle çok az miktarda (~%1) interselüler cisplatin gDNA'ya bağlanır [65]. HMG (yüksek mobilite grubu) proteinleri gibi çeşitli proteinler, cisplatin-DNA bağlarını kolayca tanıyabilir. HMG1 proteini seçici olarak 1,2-cisplatin-DNA eklentisini tanır, bunlara bağlanır [66] ve onarıma karşı koruyabilir [67]. Cisplatin-DNA-HMG1 kompleksi üç farklı yolu izleyebilir. İlk yol, DNA'nın onarımını sağlamak için NER (nükleotid eksizyon tamiri) mekanizmasıdır ve hücre hayatta kalır. İkinci yol, HMG proteininin cisplatin-DNA eklentilerini DNA onarım enzimleri tarafından tanınmaktan koruyabileceği varsayıldığı "onarım koruma modeli" dir [42]. Üçüncüsü, "kaçırma modeli", SSRP1 gibi HMG proteinlerinin, DNA hasarından sonra hücre döngüsü olaylarını modüle edebileceğini ve hücre ölümünü tetikleyebileceğini ortaya koyar (Şekil 2.5) [42,68].

DNA onarım mekanizması, cisplatin sitotoksitesinin en önemli kısımlarından biridir. DNA onarımı ile ilgili proteinler NER (nükleotid eksizyon tamiri) ve MMR (yanlış eşleşme eksizyon tamiri) proteinleridir. NER sistemi, Pt-DNA intra-strand çapraz bağlarını tanıyan ve daha sonra 20-29 baz çiftine kadar DNA dizilerini kesen 17 farklı protein içerir [69]. DNA polimeraz ise kalan boşlukları doldurur [70]. MMR, iki bitişik guanin arasındaki intra-strand eklentisinin karşısındaki hasar görmemiş ipliğe doğru nükleotidi girmeye çalışacaktır [45,71]. Hasarlar tamir edemediğinde ise hücre apoptozu meydana gelir (Şekil 2.5).

2.4.6. Hücre Döngüsü Durdurması

Hücre apoptozu cisplatinin neden olduğu hücre döngüsü duraksaması (G1, S ve G2 fazı) yoluyla da mümkündür [72]. Bu duraksamalar, DNA sentezinden önce hasarlı DNA'nın onarılması için zaman tanır. Cisplatin, G ve S fazı duraksamasından sorumlu olan kontrol noktası kinazları Chk1 ve Chk2'yi aktive eder [73]. Bu duraksamaların ortadan kaldırılması, kanser hücrelerini onarılmamış DNA hasarı ile birlikte hücre döngüsüne erken girmeye zorlayarak ölmelerine neden olabilir [74] (Şekil 2.5).

2.4.7. Cisplatin ve p53

Tümör baskılayıcı protein p53, cisplatin kaynaklı apoptozda merkezi bir rol oynayan kısa ömürlü bir proteindir. Genom mutasyonunu önleyerek stabiliteyi korumadaki rolü nedeniyle "genomun koruyucusu" olarak da bilinir [75]. p53, iki farklı kinaz ATM (ataksi telenjipektazi mutasyona uğramış protein) ve ATR (ATM ve RAD3 ile ilişkili protein) tarafından aktive edilir. Cisplatin önce ATR kinazı [76] aktive eder ve daha sonra serin-15'i fosforile ederek p53'ü aktive eder [77]. p53, hücre döngüsünün durmasından sorumlu olan p21, Mdm2 ve GADD45 genlerini aktive eder ve DNA onarımı yoluyla apoptoza yol açar [45]. p53, FLIP'in bozulması (flice benzeri inhibitör protein), Bcl-xL'nin (B-hücreli lenfoma-ekstra-büyük) antiapoptotik fonksiyonuna doğrudan bağlanma ve antiapoptotik işlevine karşı koyma, PTEN'nin aşırı ekspresyonu (fosfataz ve tensin homolog) gibi farklı mekanizmalarla doğrudan apoptoza neden olur [51,78]. Yine p53, hücre apoptozundan sorumlu olan PUMA [79], PIDD [80] ve MAPK protein ailesini [51] aktif hale getirir. Apoptoz Bax'ın (sitozolde bulunur) aktive edilerek mitokondriyal yolun tetiklenmesiyle mümkündür [81]. Ayrıca p53'ün, kaspaz 8, kaspaz 3 yoluyla apoptoza yol açan Fas / FasL etkileşimine olanak sağladığı da bildirilmiştir (Şekil 2.5) [52].

2.5. Cisplatin'in Direnci

Cisplatin tedavisinin en ciddi dezavantajı kanser hücrelerinin gösterdiği ilaç direncidir. Cisplatin direnci kanser türlerine bağlıdır. Örneğin, testis kanseri, yumurtalık kanseri, baş ve boyun kanseri ve küçük hücreli akciğer kanseri cisplatine çok duyarlı iken küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve kolorektal kanser cisplatine çok dirençlidir [41,82]. İki tür direnç vardır: içsel direnç ve edinilmiş direnç. İçsel direnç, ilaçla tedavinin başlangıcından itibaren ortaya çıkan direnç iken, edinilmiş dirençte ilaç başlangıçta aktiftir ancak zamanla inaktif hale gelmektedir [83]. Cisplatin direnci, ilacın hücresel alımını azaltarak, dışarı akışını artırarak, ilaç hedefini değiştirerek veya DNA'nın onarımı ile mümkün olabilir [84, 85, 86].

Cisplatin direncinin dört farklı anda oluşabileceği kabul edilmektedir: Kan dolaşımı yoluyla ilaç sirkülasyonu sırasında, ilaç alımı ve hücre zarından dışarı akış sırasında, sitoplazmada mevcutken ve son olarak DNA bağlanmasından sonra.

2.5.1. Kan Dolaşımı Yoluyla İlaç Sirkülasyonu Sırasında Oluşan Direnç

Cisplatin intravenöz olarak uygulanır ve bu nedenle kanser hücrelerine girmeden önce kan yoluyla dolaşır. Kan dolaşımında bulunan proteinler, özellikle insan serum albümini ve sistein gibi tiyol grubuna sahip olanlar cisplatin ile bağlanabilir. Bu protein bağlanması, cisplatinin deaktivasyonundan sorumludur [87]. Daha önce cisplatinin %65-95'inin bir günlük uygulamadan hemen sonra plazma proteinine bağlandığı belirtilmiştir [47].

2.5.2. İlacın Hücre Zarından İçeri Girmesi veya Dışarı Akması Sırasında Oluşan Direnç

Azalan cisplatin girişi ve artan cisplatin çıkışı, kanser hücrelerinde daha düşük ilaç birikimine neden olur [88]. Azalmış cisplatin birikiminin, artan ilaç çıkışından çok, azalmış ilaç alımına bağlı olduğu gösterilmiştir [41]. Pasif difüzyon ve bakır taşıma proteini Ctrl'in cisplatin girişinden sorumlu olduğu bilinmektedir. Cisplatin varlığı Ctrl konsantrasyonunda bozulmaya neden olur ve bu nedenle cisplatin girişi önemli ölçüde azalır ve bu da ilaca dirençle sonuçlanır [51, 65]. Bir membran proteini TMEM205 de cisplatine hücresel dirençten sorumludur [51]. Diğer iki bakır taşıyıcı ATP7A ve ATP7B, cisplatinin hücreden dışarı aktarılmasına yardımcı olur ve dirence yol açar [89]. Ayrıca literatürde, çoklu ilaca dirençli proteinlerin (MRP) tercihen cisplatini sülfat, glukuronat veya GSH ile konjugasyon yoluyla hücre dışına aktardığı görülmektedir [51,90].

2.5.3. Sitoplazmada Mevcutken Oluşan Direnç

Cisplatin direncinin en önemli mekanizmalarından biri, cisplatinin glutatyon ve metalotiyoninlerle bağlanarak hücre içi inaktivasyonudur. GSH ve cisplatin kompleksi daha sonra bir GS-konjuge dışarı pompası ile atılır [91]. Ya glutatyon S-transferaz

enziminin (GST) bu reaksiyona yardımcı olduğu ya da kendiliğinden meydana geldiği bildirilmektedir [92].

2.5.4. DNA Bağlanması Sonra Oluşan Direnç

NER, cisplatin direncini indüklemek için DNA lezyonlarını ortadan kaldırmanın en iyi yoludur [93]. NER sistemi, her iki sarmaldaki hasarlı nükleotidleri çıkarır ve daha sonra genin bütünlüğünü yeniden oluşturmak için DNA'yı sentezler [94]. NER proteinlerinin aşırı ekspresyonu olan hücreler cisplatine çok düşük duyarlılık göstermektedir [95]. MMR proteini, genellikle DNA-cisplatin lezyonunu onarmaya çalışan çok önemli bir proteindir. Onarım başarısız olursa apoptoza yol açar [71]. Ama DNA'yı mükemmel şekilde onarırsa hücre hayatta kalır. c-fos, H-ras, c-abl ve c-myc gibi onkogenlerin ekspresyonundaki değişikliklerin ve p53 gibi tümör baskılayıcı genin cisplatine karşı hücresel direnç yaratabileceği iyi bilinmektedir [96]. Cisplatin direnci, ilaca bağlı mikroRNA fonksiyonundaki düzensizlik nedeniyle de mümkündür [83]. MikroRNA'nın bu düzensizliği, hücre sinyalleşmesinde, DNA metilasyonunda ve invazivlikte veya hücrelerin hayatta kalmasında sorunlara neden olabilir ve bu da cisplatin direnciyle sonuçlanır [97].

2.6. Yeni Kemoterapötik Ajanların Geliştirilmesi ve İmidazolidindion Bileşiğinin Kansere Tedavisindeki Yeri

Cisplatinin yaygın kullanımı, ilaç direnci ve nefrotoksisite, nörotoksisite, ototoksisite gibi ciddi doz sınırlayıcı yan etkiler nedeniyle kısıtlanmıştır [41, 82, 83]. Bu nedenle, yenilikçi ve daha etkili metal bazlı ilaçların araştırılmasında, çok çeşitli antikanser aktiviteleri sergileyen ve eşzamanlı olarak cisplatin dezavantajlarını ortadan kaldıran yeni cisplatin analoglarının tasarımına ve sentezine büyük ilgi gösterilmiştir [98, 99].

Şimdiye kadar çok sayıda cisplatin benzeri kompleks veya bunların trans analogları araştırılmıştır. Çoğu durumda, platin kompleksleri piridin veya türevleri [100, 101], imidazoller [102, 103], tiyazol [104], pirazoller [105, 106], kinolin ve izokinolin [107], tetrazoller ve triazoller gibi farklı ligandları içermektedir [108].

Son zamanlarda kullanılan farklı imidazolidin ve imidazolidindion türevlerinin çalışmalarda güçlü antitümör, antimikrobiyal, antimalaryal etkisinin olduğu bildirilmektedir [109, 110, 111, 112, 113, 114, 115].

Ayrıca Nilutamide gibi ticari olarak prostat kanseri tedavisinde kullanılan imidazolidindion türevi bulunmaktadır [116]. Buna ek olarak kanser türlerinde aşırı ekspresse olan Bcl-2 proteini için farklı imidazolidindion türevlerinin Bcl-2 inhibitörü olarak geliştirildiği bildirilmiştir [117]. Genellikle çalışmalarda kullanılan imidazolidindion halkasındaki iki karbonil gurubu 2 ve 4 konumundadırlar. Bu tez kapsamında Prof. Dr. Vefa AHSEN ve ekibi tarafından sentezlenen imidazolidindion bileşiklerinde ise bu gruplar 2 ve 3 konumuna taşınmıştır. Böylece farklı konumlandırılmış gruplar ile sentezlenen imidazolidindion türevleri ile birlikte bu imidazolidindion bileşiklerinin oksim türevleri ve bunların platin komplekslerinin anti-kanser aktivitesi tez çalışması kapsamında ele alınmıştır.

3. GEREÇLER

3.1. Genel Kimyasallar

- i) EDTA (Merck)
- ii) DMSO (Merck)
- iii) Etanol (Riedel de Haen)
- iv) RNaz A Çözeltilisi (Promega), Metanol (Fischer)
- v) Gliserol (Fischer Scientific)
- vi) Tris (Fischer Scientific)
- vii) HCL (Fischer Scientific)
- viii) NaCL (Fischer Scientific)

3.2. Cihazlar

- i) Sıvı Azot tankı (Arpege 140)
- ii) Laminar Kabin, Class II Tip (PMV Clean Air)
- iii) Soğutmalı Mikrosantrifüj (Beckman Coulter microfuge 22R)
- iv) Santrifüj (Nüve, NF400)
- v) -80°C Derin Dondurucu (Thermo, Forma -86°C ULT Freezer)
- vi) Buharlı sterilizatör (Otoklav) (Hirayama, Hiclave HVE-50)
- vii) +4°C Buzdolabı (Ariston)
- viii) -20°C Derin Dondurucu (Bosch)
- ix) Buz Makinesi (BAR-LINE BF85)
- x) Soğutmalı santrifüj (Heraeus Instruments Function Line)
- xi) Su Banyosu (TECHNE, TE-10A Tempette)
- xii) Karbondioksit İnkübatörü (Labogene, Scancell)
- xiii) Vortex (DragonLabs, MX-S)
- xiv) xCELLigence DP (ACEA)
- xv) LSM 880 Airyscan Konfokal Mikroskop (ZEISS)
- xvi) Accuri C6 (Becton Dickinson)
- xvii) Şarjlı pipetleyici (Thermo Fisher Scientific)
- xviii) Floresan ataşmanlı ışık mikroskobu (Nikon)
- xix) Soğutmalı Santrifüj (Labogene, Scanspeed 1580R)
- xx) Hassas terazi, 0,1 mg hassasiyetli (Sartorius BL210S)
- xxi) Manyetik karıştırıcı (Denville Scientific)

- xxii) Mikrodalga fırın (Kumtel)
- xxiii) Inverted mikroskop (Olympus CKX41)

3.3. Hücre Kültürü Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler

- i) Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium Mix with L-glutamine, Gibco, New York, ABD
- ii) Dulbecco's Modification of Eagle's Medium Mix with L-glutamine, Gibco, New York, ABD
- iii) Fötal sığır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS), Gibco, New York, ABD
- iv) Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (100X), Gibco, New York, ABD
- v) Non-essential amino acid (100X) Gibco, New York, ABD
- vi) Epidermal büyüme faktörü Sigma, St. Louis, MO, ABD
- vii) Hidrokortizon Sigma, St. Louis, MO, ABD
- viii) İnsülin Sigma, St. Louis, MO, ABD
- ix) Fosfat tuz tamponu (PBS), Sigma, ABD
- x) Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco, New York, ABD
- xi) Dimetil sülfoksit (DMSO), AMRESCO, Solon, ABD
- xii) Annexin V-PE (BD Biosciences)
- xiii) 7-AAD-APC Viability Staining Solution (Biolegend)
- xiv) RNaz A Çözeltisi (Promega)
- xv) APC Rat Anti-Mouse CD44 (BD)
- xvi) PE Mouse Anti-Human CD24 (BD)
- xvii) Cisplatin (Sigma)
- xviii) Anti-fosfo-Histon H2A.X (Ser139) (Merck)
- xix) Alexa Fluor® 488 Conjugate (Cell Signaling)
- xx) RTCA CIM-plate (ACEA)
- xxi) E-PLATE VIEW (ACEA)
- xxii) Matrigel (CORNING)
- xxiii) Bovine Serum Albumin (BSA) (Merck)

3.4. Çözelti ve Tamponlar

- i) 10X PBS: 80 g NaCl, 2 g KCl, 17,8 g Na₂HPO₄.2H₂O, 2,4 g KH₂PO₄ bir litreden az miktarda ddH₂O içerisinde çözülür. Daha sonra pH:7.4'ye ayarlanır ve sonra hacim ddH₂O ile bir litreye tamamlanır.
- ii) 10X TBS: 30g Tris, 88g NaCl, 2g KCl belirli miktarda ddH₂O içerisinde çözünlöp pH:7.5'ye ayarlandıktan sonra hacim ddH₂O ile bir litreye tamamlanır.
- iii) TBS-T: 1X TBS ve %5 Tween-20.
- iv) 10X Bağlanma Tamponu: 10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl ve 2.5 mM CaCl₂.
- v) Hücre Dondurma Solüsyonu: %90 FBS ve %10 DMSO.
- vi) %2 BSA/TBS-T: 2g BSA tartılıp son hacmi 100 ml olacak şekilde 1X TBS-T içerisinde çözülür.

3.5. Antikorlar ve Boyalar

Annexin V-PE (BD Biosciences), 7-AAD-APC Viability Staining Solution (Biolegend), PE Mouse Anti-Human CD24, Anti-fosfo-Histon H2A.X (Ser139) (Merck), Alexa Fluor® 488 Conjugate (Cell Signalling).

3.6. Maddeler

L_a, L_c, L_{1a}, L_{1c}, L_{1a}Pt-Bis, L_{1c}Pt-Bis, L_{2a}Pt-Bis, L₂Pt, EK-24, EK-25

4. YÖNTEMLER

4.1. Hücre Kültürü ve Koşulları

Çalışmalar için beş kanser hücre hattı ve iki normal hücre hattı kullanıldı. Meme kanseri MCF-7 ve MDA-MB-231, serviks kanseri HeLa, prostat kanseri LNCaP ve PC3 ve kontrol amaçlı insan embriyonik böbrek HEK293 hücre hattı ve normal meme epitelini temsil eden MCF-12A hücre hattı kullanıldı. Tüm hücreler rutin olarak nemlendirilmiş, %5 CO₂ ile zenginleştirilmiş bir ortamda tek tabakalı kültürler olarak 37° C'de tutuldu. MCF-7 ve MDA-MB-231, HeLa ve HEK293 hücre hatları %10 fetal dana serumu, %1 penisilin-streptomisin ve %1 non-essential aminoasit ile zenginleştirilmiş yüksek glukoz içeren DMEM besiyerinde, LNCaP ve PC-3 hücre hatları %10 fetal dana serumu, %1 penisilin-streptomisin ve %1 non-essential aminoasit ile zenginleştirilmiş RPMI1640 besiyerinde kültüre edildi. MCF-12A ise %10 fetal sığır serumu, %1 penisilin-streptomisin, %1 non-essential aminoasit, 20 ng/mL EGF, 0.5 µg/mL hidropokortizon ve 10 µg/mL insulin ile zenginleştirilmiş yüksek-glukoz içeren DMEM besiyeri ile kültürlendi. Tüm deneyler, sınıf II laminar hava akış kabini (PMV Clean Air) aseptik bir ortamda gerçekleştirildi.

Kültüre edilen hücreler hücre büyüme kaplarında (petri) %80-90'a ulaştıktan sonra kültürün devamı için pasajlandı. Hücrelerdeki eski besiyeri uzaklaştırıldı ve 1X DPBS ile hücreler yıkandı. Yüzeye tutunan hücreleri kaldırmak için Tripsin-EDTA (2X) uygulandı. İnkübatörde 2-3 dakika bekletip hücrelerin kalkması sağlandı. Farklı pasaj oranlarına uygun miktarda dilüsyon yaparak taze besiyeri ilave edildi ve yeni petri kabına alındı. Hücre gelişimi için hücreler 37°C'de %5 CO₂ koşullarında inkübasyona bırakıldı.

4.2. Hücre Proliferasyonu Analizi

MCF-12A, MCF-7, MDA-MB-231, PC3, LNCaP, HeLa ve HEK293 hücre hatları E-Plate 96'ya (Acea Biosciences, San Diego, CA) hücrelerin türüne göre kuyu başı 100 µL'lik bir hacimde 7×10^3 - 10×10^3 olacak şekilde sayılıp ekildi. Hücreler çoğaldıkça, kuyuda bulunan elektronik sensörler tarafından algılandı ve veriler gerçek-zamanlı olarak cihaz tarafından her 15 dakikada bir 72 saat boyunca kaydedildi. Hücrelerin adaptasyonunu sağlamak için 24 saat inkübe edildikten sonra kuyulara 50 µl hacimde maddelerin farklı konsantrasyonları ilave edildi. Tüm inkübasyonlar 200 µl hacimde, 37° C'de ve %5 CO₂'de bir hücre kültürü inkübatöründe tutulurken

xCELLigence RTCA MP sisteminde (Acea BioSciences) gerçekleştirildi. Sonuçlar tedavinin başlangıç noktasından itibaren hücre indeksine normalize edildi.

İnhibitör konsantrasyon 50, IC₅₀ değerleri, RTCA Software 2.0'ın (Acea Biosciences) DRC (bir zaman periyodunda eğrinin altında alan - konsantrasyon) fonksiyonu kullanılarak belirlendi. Analiz, replike oyukların ortalama değerine dayalı olarak gerçekleştirildi. Her deneyde analiz için seçilen zaman çerçevesi, bileşiklerin eklenmesinin ardından alınan ilk tarama ile her bir deneyin son taraması arasındaydı.

4.3. Apoptoz Analizi

L_{1c}Pt-Bis, **L_{2a}Pt-Bis**, **EK-24** ve **EK-25** ile devam edildi. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara kuyu başı 3 x10⁵ olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra her bir hücre için etkili olan IC₅₀ konsantrasyonlarında madde ve pozitif kontrol olarak cisplatin (Sigma) verildi. Hücreler 24 saat madde ile inkübe edildikten sonra toplandı ve soğuk PBS ile iki kez yıkandı ve daha sonra 100 ul 1X Bağlama Tamponu içinde yeniden süspanse edildi. 5 µl Annexin V-PE (BD Biosciences) ve 5µl 7-AAD-APC Viability Staining Solution (Biolegend) ile oda sıcaklığında karanlıkta 15 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, her bir tüpe 400 ul 1X bağlama tamponu ilave edildi. Apoptotik ve canlı hücre hücre yüzdesi Accuri C6 akım sitometresi cihazı ile analiz edildi.

- Canlı hücre popülasyonu: Anneksin V (-) ve 7- AAD (-)
- Erken apoptotik hücre popülasyonu: Anneksin V (+) ve 7- AAD (-)
- Geç apoptotik hücre popülasyonu: Anneksin V (+) ve 7- AAD (+)
- Nekrotik hücre popülasyonu: Anneksin V (-) ve 7- AAD (+)

4.4. Hücre Döngüsü Analizi

Maddelerin hücre döngüsü üzerindeki etkisi 7-AAD-APC Viability Staining Solution (Biolegend) kullanılarak akım sitometri cihazı ile analizi ile gerçekleştirildi.

Analiz **L_{1c}Pt-Bis**, **L_{2a}Pt-Bis**, **EK-24** ve **EK-25** maddeleri için gerçekleştirildi. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara kuyu başı 3 x10⁵ olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra her bir hücre için etkili olan IC₅₀ konsantrasyonlarında madde ve pozitif kontrol olarak cisplatin (Sigma) verildi. Hücreler 24 saat madde ile inkübe edildikten sonra toplandı

ve soğuk PBS ile iki kez yıkandı. Ardından gece boyunca -20° C'de bekletilmiş 1 ml %70 etanol ile hücreler fiks edildi. Analizden önce hücreler, PBS içinde yeniden süspanse edildi, 10 µg / ml RNaz A Çözeltilisi (Promega) ile işleme tabi tutuldu ve 5µl 7-AAD-APC Viability Staining Solution (Biolegend) ile boyandı. Sonuçlar Accuri C6 akım sitometresi cihazı ile analiz edildi.

4.5. Hücrelerde DNA Kırıklarının Immunofloresan Analiz Yöntemiyle Tespiti

Analiz, maddelerin hücreler üzerinde oluşturduğu DNA hasarına bakmak için gerçekleştirildi. Hücreler (1.5×10^5) lamel üzerine ekildi ve gece boyunca yapışmaya bırakıldı. Ardından hücrelere 24 saat boyunca maddeler ve cisplatin (Sigma) her bir hücrenin belirlenen IC₅₀ konsantrasyonunda uygulandı. İşlemden sonra ortam aspire edildi ve hücreler, bir saat boyunca fiksasyon ajanı metanol ile buzda fiks edildi. Bloklama tamponu %2 BSA/TBS eklenip 1 saat boyunca bloklama yapıldı. Bloklama işleminin ardından 2 µg/mL primer antikör anti-fosfo-Histon H2A.X (Ser139) (Merck) ile 90 dakika inkübasyon yapıldı. TBS ile 5 dakika yıkanıp, bloklama tamponuna sekonder antikör Alexa Fluor® 488 Conjugate (Cell Signalling) 1:1000 sulandırarak eklendi ve karanlıkta 1 saat inkübe edildi. Hücreler 5 kez TBS ile yıkandıktan sonra 15 dakika DAPI (1:1000) içerisinde inkübe edildi. Son olarak distile su ile yıkanan lameller sabitleme ajanı (%80 gliserol) yardımıyla lam üzerine 45° açı ile ters çevrilerek kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Zeiss LSM 880 Airyscan Konfokal Mikroskop ile görüntülenip fotoğraflandı.

4.6. Hücre Migrasyon ve İnvazyon Analizi

4.6.1. Hücre Migrasyonu

Migrasyon, madde uygulanmış ve uygulanmamış hücreler arasında fonksiyonel farklılıkları test etmek için xCELLigence yöntemi kullanılarak değerlendirildi. xCELLigence sistemi (xCELLigence RTCA DP Instrument) hücre göçünü gerçek zamanlı olarak ölçer. Cihaz, xCELLigence analizör platformunu (ACEA Biosciences,

San Diego) kullanarak her biri modifiye edilmiş bir Boyden chamber içeren 16 kuyudan oluşan bir CIM-plate'i analiz eder. Plaka, üst bölmeye ekilen hücrelerin mikro gözenekli membrandan bir kemoatraktan (%10 FBS) içeren, alt bölmeye doğru göç ettiği iki ayrılabilir bölümden oluşur. Plakalar, hücre göçünü veya bir polietilen tereftalat membranın 8 µm gözeneklerinden membranın alt tarafındaki altın elektrotlar üzerindeki göçünü ölçmek için kullanılabilir. Mikroelektrot sensörlerine yapışan hücreler, empedanstaki artışla ölçülür.

MDA-MB-231, PC3 ve LNCaP hücreleri 6 kuyucuklu plakalara kuyu başı 3×10^5 olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra hücrelere hem IC_{50} dozunda hem de bu dozun 1:2, 1:5 ve 1:10 oranlarında madde uygulandı ve 24 saat boyunca inkübe edildi.

%10 FBS (uyaran) içeren besiyeri, 160 µl'lik bir hacimde bir CIM-plate'in alt bölmesindeki her oyuğa ilave edildi. Üst bölme kapatılıp bağlandı ve 1 saat boyunca inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonunda her kuyuya 50 µL SFM eklendi. RTCA DP cihazında blank ölçümü alındı. Hücreler SFM ile toplandı ve thoma lamı ile sayıldı. Kuyu başı 4×10^4 hücre olacak şekilde 100 µL içinde ilave edildi. Plaka, hücre bağlanmasına izin vermek için oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi, ardından plate, %5 CO₂ içinde 37°C'de RTCA analizörüne yerleştirildi. Hücre empedansı 40 saat boyunca her 15 dakikada bir ölçüldü.

4.6.2. Hücre İnvazyonu

Tüm invazyon tahlillerinde CIM-plate'in üst odacıkları soğuk SFM'de seyreltilmiş 800 µg/mL'de matrigel (CORNING) ile kaplanmıştır. Analiz 4.6.1'de açıklandığı gibi xCELLigence Sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir üst bölmeye 50 µl 'de Matrigel ilave edildi, bunun 30 µl 'si kuyularda eşit bir matrigel kaplaması sağlamak için hemen çıkarıldı. Üst bölme daha sonra matrigelin polimerizasyonuna izin vermek için 4 saat boyunca 37 °C'ye yerleştirildi. İnvazyon deneyleri 40 saat inkübasyon süresince takip edildi.

4.7. İstatistiksel Analizler

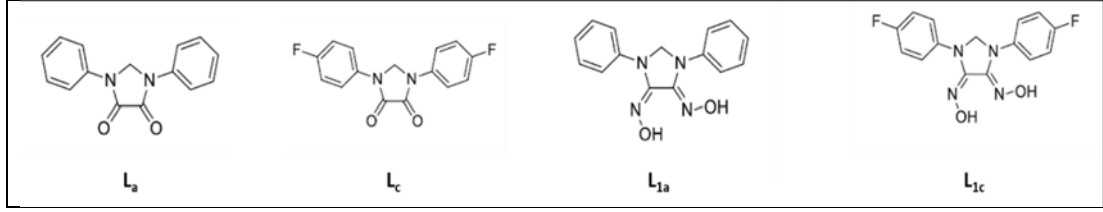
Görüntü analizleri ZEN Black Edition programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analiz için Graphpad Prism Yazılımı (Sürüm 6) kullanıldı. Hücre dizileri arasındaki

tedavi etkinliğini karşılaştırmak için iki yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Bonferroni'nin çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. İnvazyon ve migrasyon analizlerinde tek yönlü karşılaştırma analizi (ANOVA) testi ve ardından Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. 0.05'in altındaki *P* değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm deneyler üç tekrar halinde yapıldı.

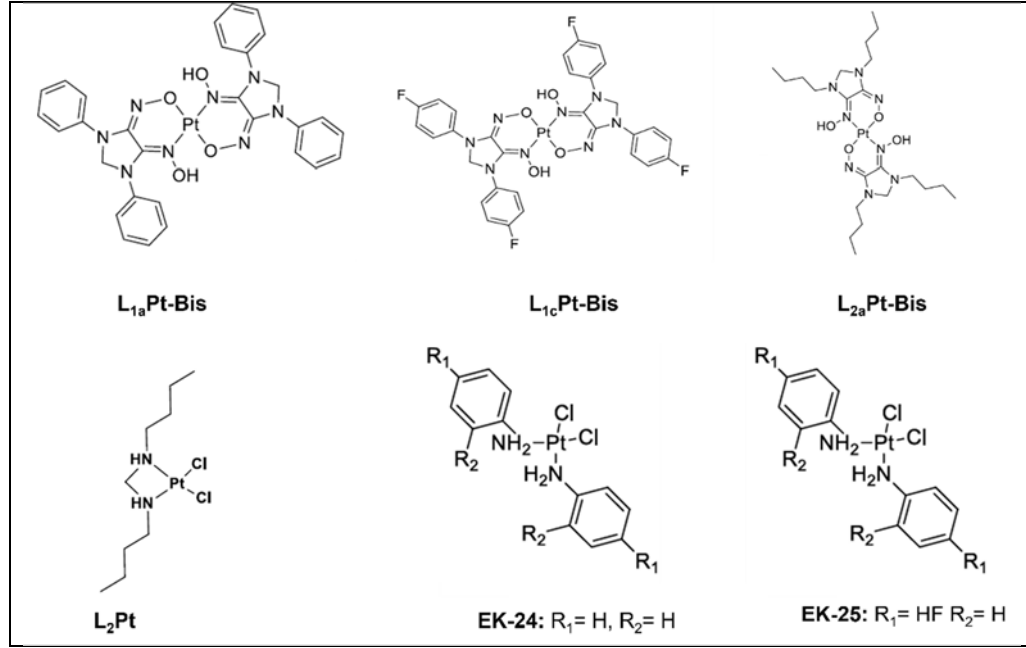
5. BULGULAR

5.1. Bileşiklerin Sentezi

Önerilen tez çalışmasında kullanılan dion türevleri **L_a**, **L_c**, dionların dioksim türevleri **L_{1a}**, **L_{1c}** (Şekil 5.1) ve bu ligandların farklı platin (II) kompleksleri olan **L_{1a}Pt-Bis**, **L_{1c}Pt-Bis**, **L_{2a}Pt-Bis**, **L₂Pt**, **EK-24** ve **EK-25** (Şekil 5.2) Prof. Dr. Vefa AHSEN ve ekibi tarafından sentezlenmiştir.



Şekil 5.1: Ligandların kimyasal yapıları (L_a , L_c , L_{1a} , L_{1c}).



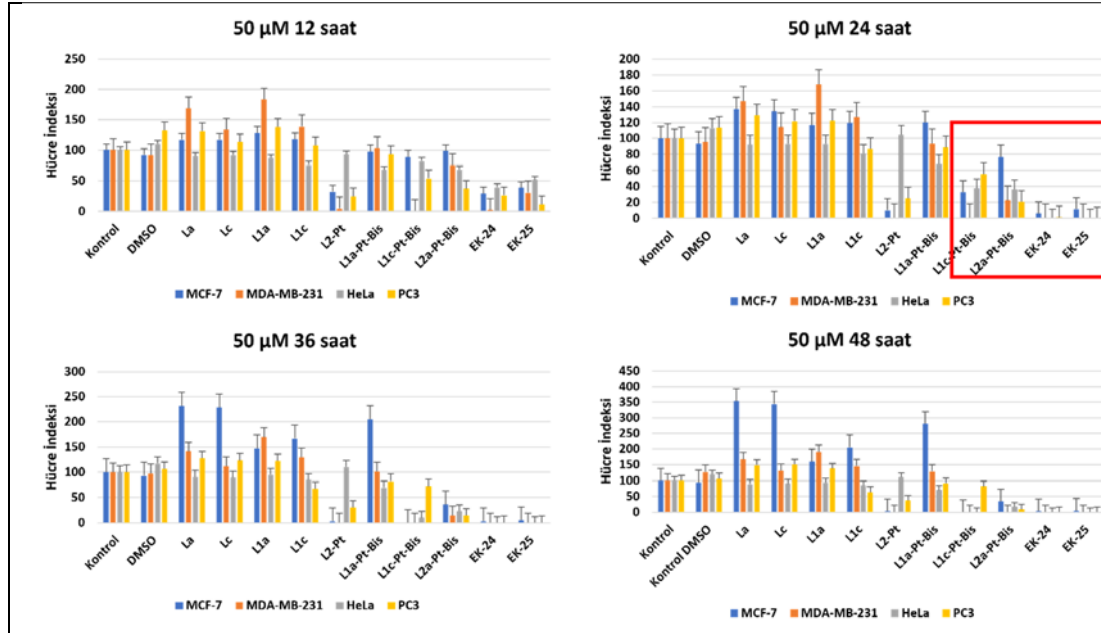
Şekil 5.2: Pt (II) kompleksleri ($L_{1a}Pt-Bis$, $L_{1c}Pt-Bis$, $L_{2a}Pt-Bis$, L_2Pt , EK-24, EK-25).

5.2. Bileşiklerin Antitümör Aktivitelerinin Ölçülmesi

5.2.1. Yüksek Konsantrasyonda Bileşiklerin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Çalışmada ilk olarak Prof. Dr. Vefa AHSEN ve ekibi tarafından sentezlenen ajanlar xCELLigence gerçek zamanlı analiz sistemi ile 50 μM konsantrasyonda MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, PC-3 hücre hatlarına hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini görmek için uygulandı. 50 μM konsantrasyon uygulandıktan sonra 24. saatten başlayarak $L_{1c}Pt-Bis$, $L_{2a}Pt-Bis$, EK-24 ve EK-25 komplekslerinin bütün

hücre hatlarında anti-proliferatif etki yaptığı gözlemlendi (Şekil 5.3). Daha ileri çalışmalara bu komplekslerle devam edildi.



Şekil 5.3: Ajanların hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi. 50 µM konsantrasyonda MCF-7, MDA-MB-231, HeLa ve PC-3 hücreleri ile muamele edilen ajanların zamana bağlı hücre indeksi grafikleri. Kontrol: Sadece besiyeri, DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri.

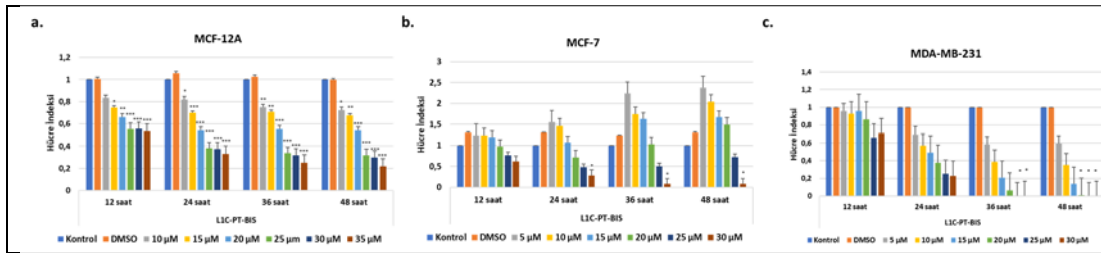
5.2.2. Platin Türevli Maddelerin Anti-Proliferatif Aktiviteleri

50 µM konsantrasyonda etkin olduğu görülen **L_{1c}Pt-Bis**, **L_{2a}Pt-Bis**, **EK-24**, **EK-25**'in antiproliferatif aktiviteleri, xCELLigence gerçek zamanlı analiz sistemi ile MCF-12A, MCF-7, MDA-MB-231, HEK293, HeLa, PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında belirlendi.

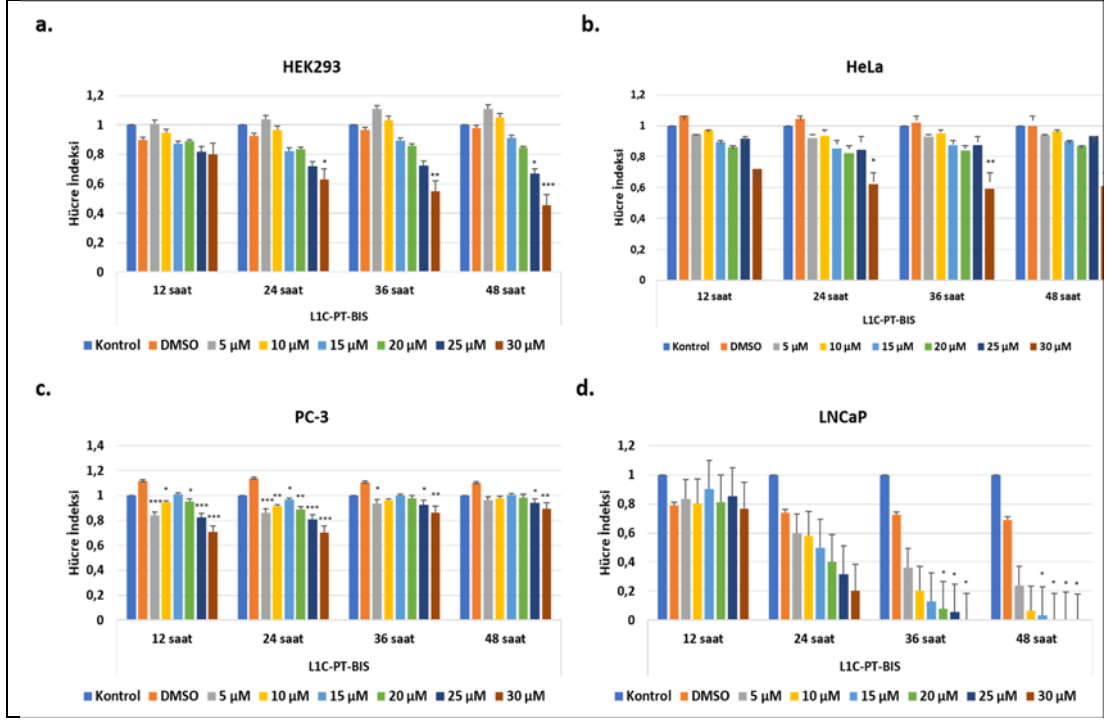
Analiz sonuçlarına göre **L_{1c}Pt-Bis**, **L_{2a}Pt-Bis**, **EK-24**, **EK-25** uygulanan MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 24. saatten itibaren hücre proliferasyonunun baskılandığı ve baskılanmanın kontrol MCF-12A hücresine oranla meme kanseri hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi (Şekil 5.4).

HEK293, HeLa, PC-3 ve LNCaP hücre hatları **L_{1c}Pt-Bis** ve **L_{2a}Pt-Bis** ile muamele edildiğinde ise 24. saatten itibaren proliferasyonun 5 µM konsantrasyondan itibaren PC-3 ve LNCaP hücrelerde sağlıklı HEK293 hücrelerine oranla daha fazla baskılandığı gözlemlendi. HeLa hücreleri **L_{1c}Pt-Bis** ve **L_{2a}Pt-Bis** muamelesinden sonra 24. saatte HEK293 hücrelerine kıyasla anti-proliferatif etki göstermedi (Şekil 5.5). **L_{1c}Pt-Bis**'in hücrelere uygulanmasıyla birlikte 24. saatten itibaren anti-proliferatif etki yaptığı görüldü. MDA-MB-231 hücrelerinde 12 saat 20 µM ve 24 saat 5 µM madde uygulanması sonrası hücre çoğalmasında azalma belirlendi. Diğer yandan, MCF-7 hücrelerinin madde uygulamasına daha dirençli olduğu ve 12 saatlik muamelede ancak en yüksek dozlar olan 25 ve 30 µM, 24. saat sonuçlarında ise 20 µM konsantrasyondan itibaren anti-proliferatif etkinin gerçekleştiği rapor edildi (Şekil 5.4). **L_{1c}Pt-Bis** PC-3 hücrelerinin proliferasyonunda 12 saat 5 µM madde uygulaması sonrasında anlamlı fakat az bir düşüşe yol açarken (Şekil 5.5), HEK293, HeLa ve LNCaP hücrelerinde 12 saat madde uygulanan en yüksek dozlarda bile anti-proliferatif etki gözlemlenmedi. 24. saatte de sadece PC-3 hücrelerinde 5 µM konsantrasyondan itibaren hücrelerin proliferasyonlarında kontrol hücre grubuna göre baskılama tespit edildi (Şekil 5.5).

L_{1c}Pt-Bis için 24. saatteki IC₅₀ değerleri MCF12-A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri için sırasıyla 16.3, 19 ve 9.8 µM olarak hesaplanırken (Tablo 5.1), HEK293, PC-3 ve LNCaP hücreleri için 24, 10.2 ve 29 µM olarak hesaplandı (Tablo 5.2).



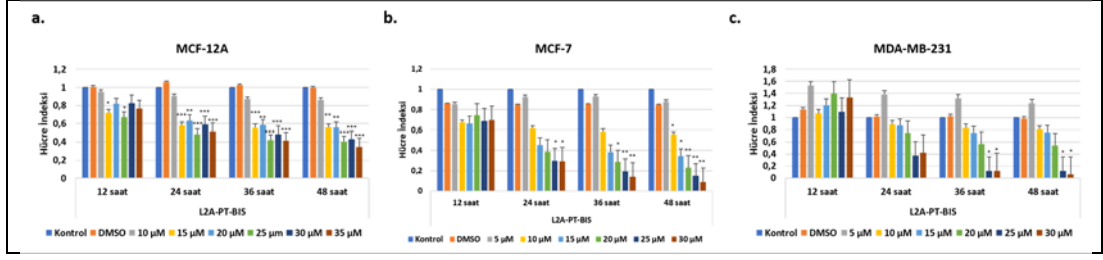
Şekil 5.4: MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde **L_{1c}Pt-bis**'in hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi. a. **L_{1c}Pt-bis** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen MCF-12A hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. b. MCF-7 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda **L_{1c}Pt-bis** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerlerinin grafiksel gösterimi. c. MDA-MB-231 hücrelerine farklı konsantrasyonda **L_{1c}Pt-bis** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerlerinin grafiksel gösterimi. Kontrol: Sadece besiyeri, DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * P<0.05, ** P<0.01, ***P<0.001.



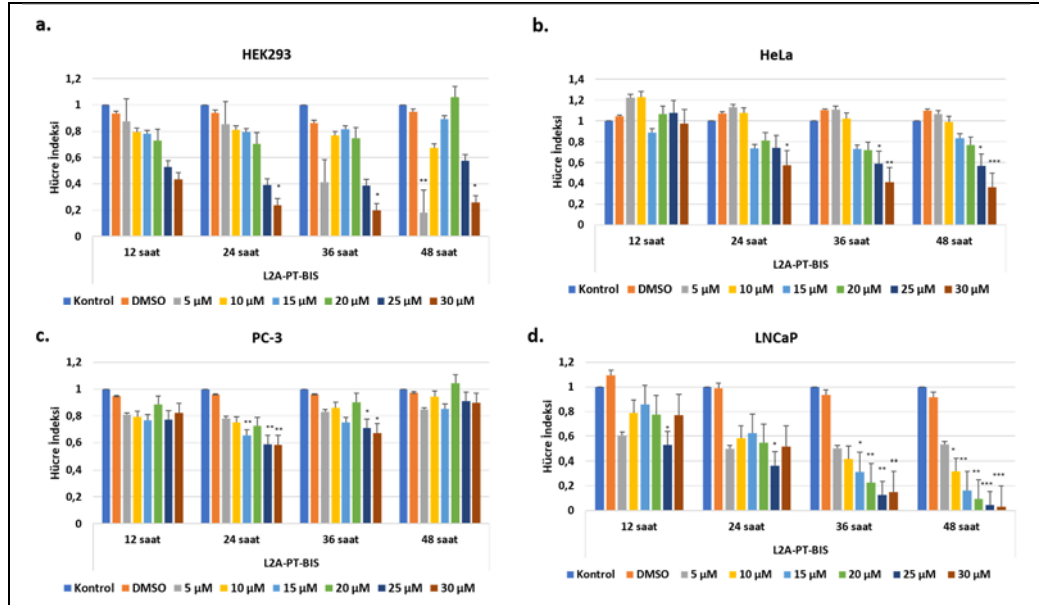
Şekil 5.5: HEK293, HeLa, PC-3 ve LNCaP hücrelerinde **L_{1c}Pt-bis**'in hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi. a. **L_{1c}Pt-bis** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen HEK293 hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. b. HeLa hücrelerine farklı konsantrasyonlarda **L_{1c}Pt-bis** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. c. **L_{1c}Pt-bis** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen PC-3 hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. d. LNCaP hücrelerine farklı konsantrasyonda **L_{1c}Pt-bis** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. Kontrol: Sadece besiyeri, DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

MCF12-A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına **L_{2a}Pt-Bis** uygulandığı zaman 24. saatte hücre proliferasyonun kontrol hücrelerine oranla kanser hücrelerinde azaldığı görüldü (Şekil 5.6). Ayrıca **L_{2a}Pt-Bis** kompleksi HEK293, HeLa, PC-3 ve LNCaP hücrelerine uygulandığı zaman 24. saatten itibaren hücre proliferasyonunda kontrol hücrelerine oranla sadece LNCaP hücre hattında 5 µM konsantrasyondan itibaren zamana bağımlı düşüş meydana geldi (Şekil 5.7). **L_{2a}Pt-Bis** PC-3 hücrelerinde ise ancak 15, 25 ve 30 µM konsantrasyonda hücre proliferasyonunda anlamlı bir düşüşe neden oldu.

L_{2a}Pt-Bis için 24. saatteki IC₅₀ değerleri MCF12-A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri için sırasıyla 16.7, 13.6 ve 17 µM olarak hesaplanırken (Tablo 5.1), HEK293, PC-3 ve LNCaP hücreleri için 10.4, 24 ve 19.4 µM olarak hesaplandı (Tablo 5.2).



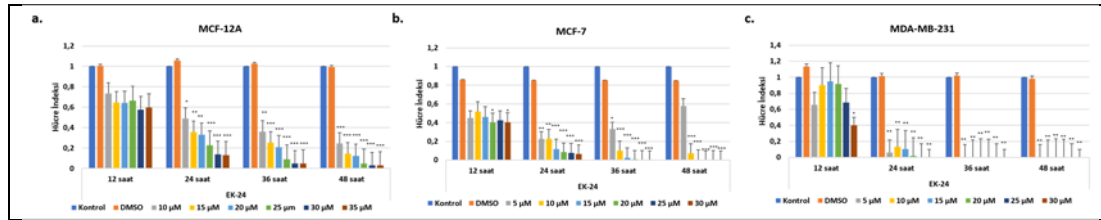
Şekil 5.6: MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde **L_{2a}Pt-Bis**'in hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi. a. **L_{2a}Pt-Bis** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen MCF-12A hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. b. MCF-7 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda **L_{2a}Pt-Bis** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. c. MDA-MB-231 hücrelerine farklı konsantrasyonda **L_{2a}Pt-Bis** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. Kontrol: Sadece besiyeri, DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.



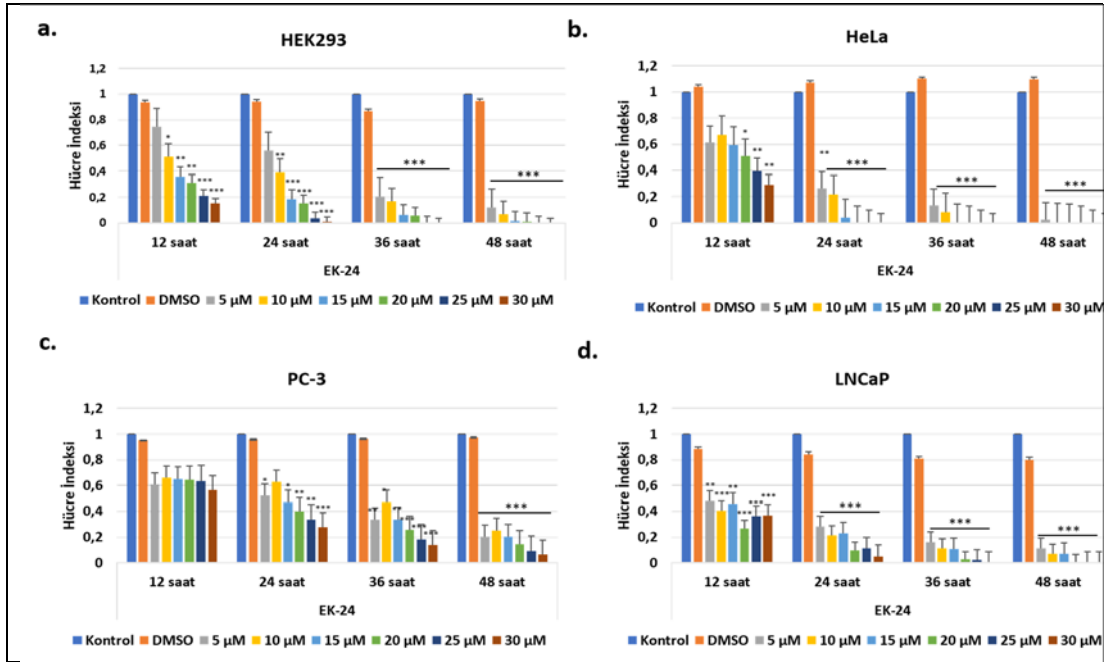
Şekil 5.7: HEK293, HeLa, PC-3 ve LNCaP hücrelerinde **L_{2a}Pt-Bis**'in hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi. a. **L_{2a}Pt-Bis** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen HEK293 hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. b. HeLa hücrelerine farklı konsantrasyonlarda **L_{2a}Pt-Bis** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. c. **L_{2a}Pt-Bis** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen PC-3 hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. d. LNCaP hücrelerine farklı konsantrasyonda **L_{2a}Pt-Bis** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. Kontrol: Sadece besiyeri, DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

EK-24 kompleksi 48 saat hücrelere uygulandıktan sonra MCF-7 hücre hattında 12. saatten itibaren hücrelerde belirgin bir şekilde anti-proliferatif etki yaptığı rapor edildi (Şekil 5.8). Kemoterapi dirençli meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücre hattında ise 24. saatten itibaren hücrelerin proliferasyonunda belirgin baskılama görüldü (Şekil 5.8). **EK-24** kompleksi meme kanseri hücreleriyle birlikte kontrol hücre grubunda da proliferasyonda baskılama gerçekleştirdi. Fakat 24. saat hücre indeks değerleri sırasıyla MCF-12A, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri için 0.49, 0.13 ve 0.22 olarak tespit edildi. Kompleks HeLa, PC-3, LNCaP ve kontrol hücre hattı HEK293 hücrelerine uygulandığı zaman ise HeLa hücre hattının proliferasyonunun baskılamasına karşın benzer baskılama profilinin kontrol hücre hattında da gerçekleştiği tespit edildi (Şekil 5.9). Ayrıca **EK-24** maddesinin anti-proliferatif etkisinin PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında da kontrol hücresi HEK293'e göre daha az olduğu tespit edildi (Şekil 5.9).

EK-24 kompleksinin etkin olduğu düşünülen MCF12-A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde 24. saatteki IC₅₀ değerleri, 14.1, 10.6 ve 12.7 µM olarak saptandı (Tablo 5.1).



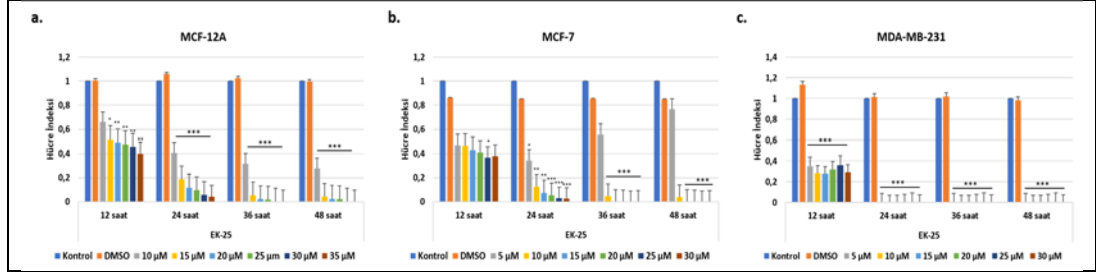
Şekil 5.8: MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde **EK-24** kompleksinin hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi. a. **EK-24** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen MCF-12A hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. b. MCF-7 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda **EK-24** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. c. MDA-MB-231 hücrelerine farklı konsantrasyonda **EK-24** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. Kontrol: Sadece besiyeri, DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.



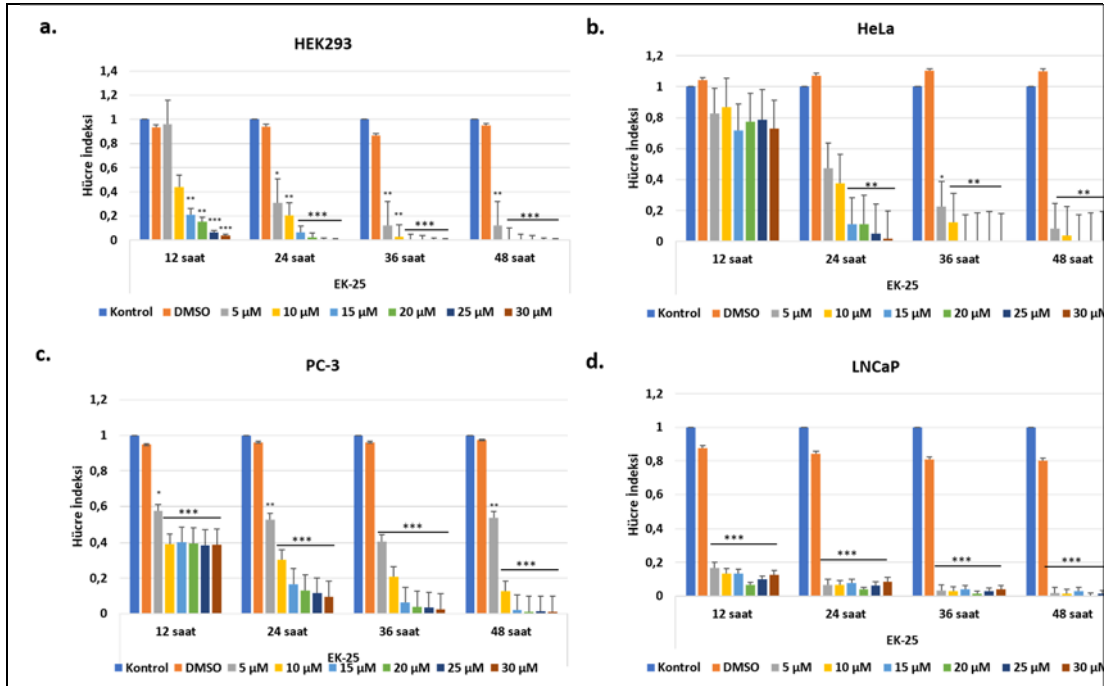
Şekil 5.9: HEK293, HeLa, PC-3 ve LNCaP hücrelerinde **EK-24** kompleksinin hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi. a. **EK-24** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen HEK293 hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. b. HeLa hücrelerine farklı konsantrasyonlarda **EK-24** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. c. **EK-24** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen PC-3 hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. d. LNCaP hücrelerine farklı konsantrasyonda **EK-24** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. Kontrol: Sadece besiyeri, DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

EK-25 kompleksinin analiz sonuçlarına göre bileşiğin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde belirgin proliferasyon baskılaması gerçekleştirdiği belirlendi. Hücrelerin 12 saat 10 µM **EK-25** ile muamelesi sonrasında, MCF-7 %54, MDA-MB-231 %72 ve MCF-12A %35 oranında hücre çoğalmasında inhibisyon gösterdi. Hücrelerin 24 saat 10 µM **EK-25** ile inkübasyonu sonrası MCF-7’de %88, MDA-MB-231’de %99 ve MCF12A’da %60 anti-proliferatif etki saptandı (Şekil 5.10). Kontrol hücresi HEK293 hücresinde ise **EK-25** kompleksinin kanser hücrelerine göre daha az konsantrasyonlarda anti-proliferatif etki gösterdiği tespit edildi (Şekil 5.11).

EK-25 kompleksinin MCF12-A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde 24. saatteki IC_{50} değerleri ise sırasıyla 13.9, 8.1 ve 5.3 µM olarak hesaplandı (Tablo 5.1).



Şekil 5.10: MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde **EK-25** kompleksinin hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi. a. **EK-25** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen MCF-12A hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. b. MCF-7 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda **EK-25** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. c. MDA-MB-231 hücrelerine farklı konsantrasyonda **EK-25** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. Kontrol: Sadece besiyeri, DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.



Şekil 5.11: HEK293, HeLa, PC-3 ve LNCaP hücrelerinde **EK-25** kompleksinin hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi. a. **EK-25** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen HEK293 hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. b. HeLa hücrelerine farklı konsantrasyonlarda **EK-25** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. c. **EK-25** ile farklı konsantrasyonlarında muamele edilen PC-3 hücrelerinin 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeksi değerleri. d. LNCaP hücrelerine farklı konsantrasyonda **EK-25** uygulaması sonrasında tespit edilen 12, 24, 36 ve 48. saat hücre indeks değerlerinin grafiksel gösterimi. Kontrol: Sadece besiyeri, DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Tablo 5.1: 24 saat muamele edilen komplekslerin MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde IC₅₀ değerleri.

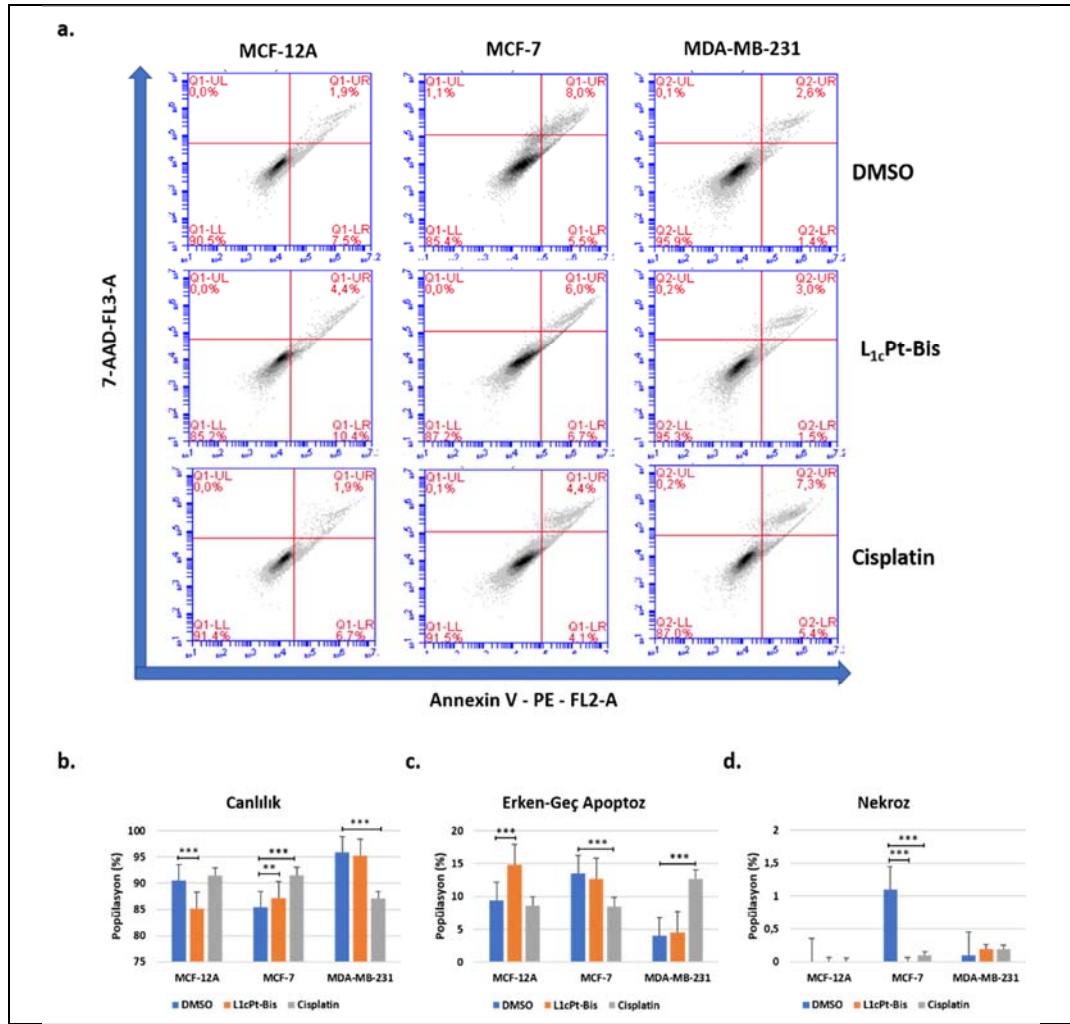
	IC ₅₀ (μM)		
	MCF-12A	MCF-7	MDA-MB-231
L _{1c} Pt-Bis	16,3	19	9,8
L _{2a} Pt-Bis	16,7	13,6	17
EK-24	14,1	10,6	12,7
EK-25	13,9	8,1	5,3

Tablo 5.2: 24 saat muamele edilen komplekslerin HEK293, PC-3 ve LNCaP hücrelerinde IC₅₀ değerleri.

	IC ₅₀ (μM)		
	HEK293	PC-3	LNCaP
L _{1c} Pt-Bis	24	10,2	29
L _{2a} Pt-Bis	10,4	24	19,4

5.3. Annexin V/7-AAD Boyaması

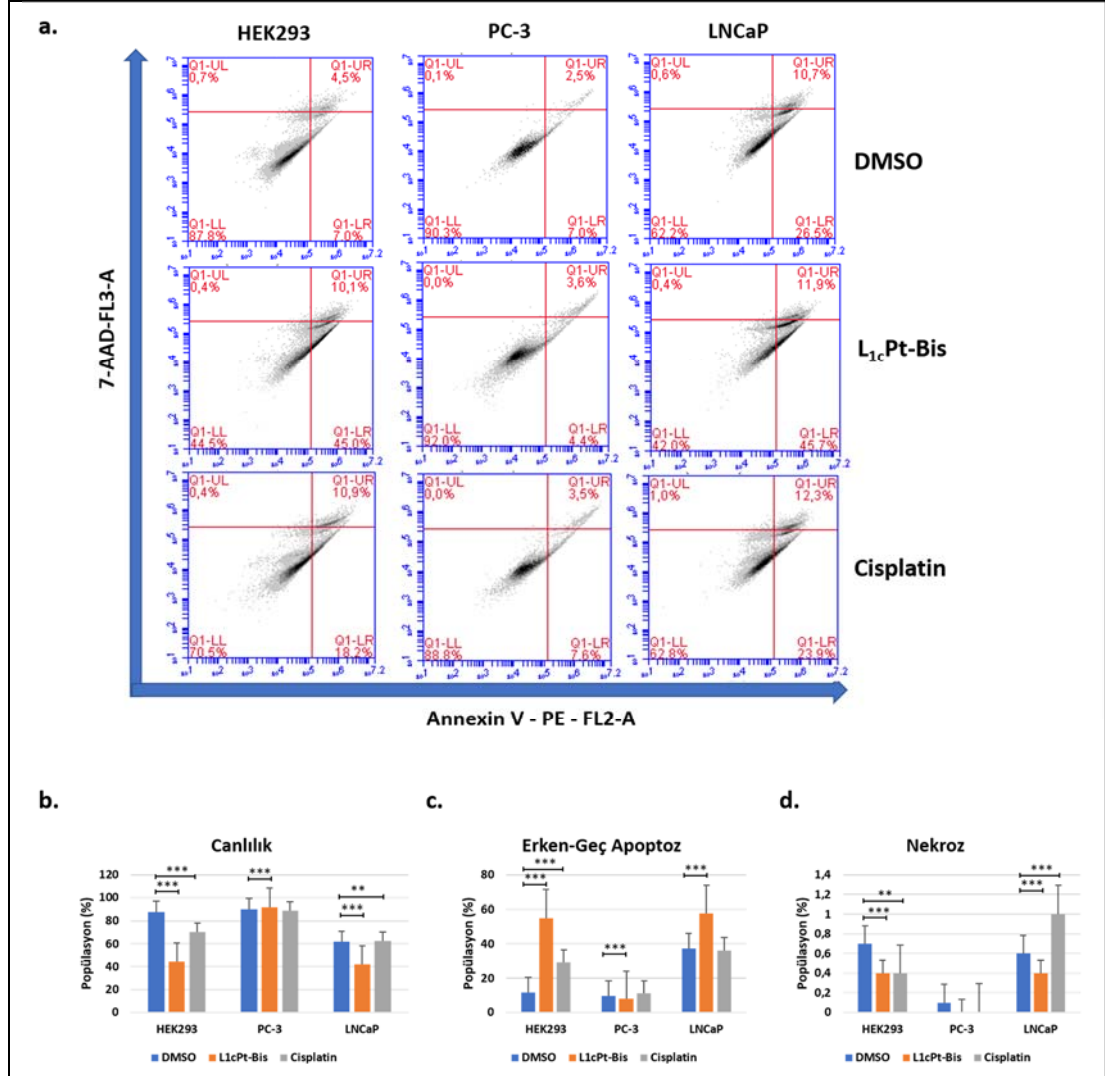
MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine 24 saat IC₅₀ değerinde **L_{1c}Pt-Bis** uygulaması sonrasında MCF-12A hücrelerinde cisplatine kıyasla erken ve geç apoptoz uyarılırken (p <0.001) MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde önemli bir apoptotik etki görülmemiştir (p> 0.05). Kemoterapi dirençli meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücre hattında cisplatin uygulaması sonrasında apoptotik hücre oranının **L_{1c}Pt-Bis** uygulanan hücre grubuna oranla daha fazla olduğu görüldü (p <0.001) (Şekil 5.12.c).



Şekil 5.12: MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde **L_{1c}Pt-Bis** ve cisplatinin 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde Annexin V/7-AAD boyaması ile apoptotik etkisinin akım sitometresi ile gösterimi. a. Temsili dört kadranda hücre yüzdesi belirlendi: canlı hücreler, (Annexin-V-/7-AAD-, alt/sol kadrant); erken apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD-, alt / sağ kadrant); geç apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD +, üst / sağ kadrant); ve nekrotik hücreler (Annexin-V- / 7-AAD +, üst / sol kadrant). b. Canlı hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. c. Apoptotik hücrelerin bar grafiği ile gösterimi. d. Nekrotik hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

L_{1c}Pt-bis kompleksi HEK293, PC-3 ve LNCaP hücrelerine 24 saat IC₅₀ değerinde uygulandığı zaman, hücrelerin erken ve geç apoptoz oranını anlamlı bir şekilde artırdı ($p < 0.001$). En yüksek apoptotik hücre oranı ise prostat kanseri hücrelerine kıyasla sağlıklı hücre hattı olan HEK293 hücrelerinde görüldü. Prostat kanseri hücrelerinde ise apoptotik hücre oranı cisplatine kıyasla daha fazla olduğu tespit edildi ($p < 0.001$) (Şekil 5.13.c). Ayrıca **L_{1c}Pt-bis** uygulanan HEK293 ve LNCaP hücrelerinin canlılığı cisplatin uygulananlara kıyasla daha çok azalırken, **L_{1c}Pt-bis**

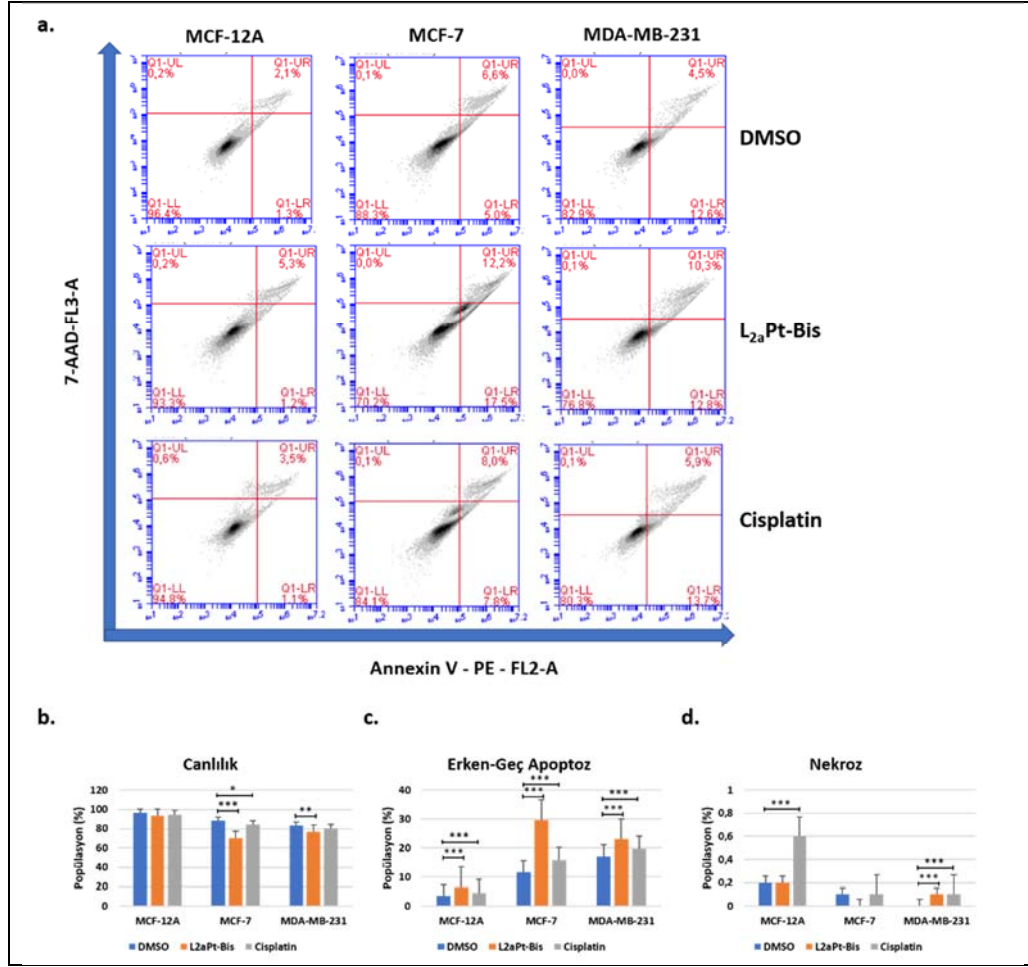
PC-3 hücrelerine uygulandığında hücrelerin canlılığında küçük ama anlamlı bir artış meydana geldi ($p < 0.001$). Cisplatin ise PC-3 hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde etkilemedi ($p > 0.05$) (Şekil 5.13.b).



Şekil 5.13: HEK293, PC-3 ve LNCaP hücrelerinde **L1cPt-Bis** ve cisplatinin 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde Annexin V/7-AAD boyaması ile apoptotik etkisinin akım sitometresi ile gösterimi. a. Temsili dört kadranda hücre yüzdesi belirlendi: canlı hücreler, (Annexin-V-/7-AAD-, alt/sol kadrant); erken apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD-, alt / sağ kadrant); geç apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD +, üst / sağ kadrant); ve nekrotik hücreler (Annexin-V- / 7-AAD +, üst / sol kadrant). b. Canlı hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. c. Apoptotik hücrelerin bar grafiği ile gösterimi. d. Nekrotik hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

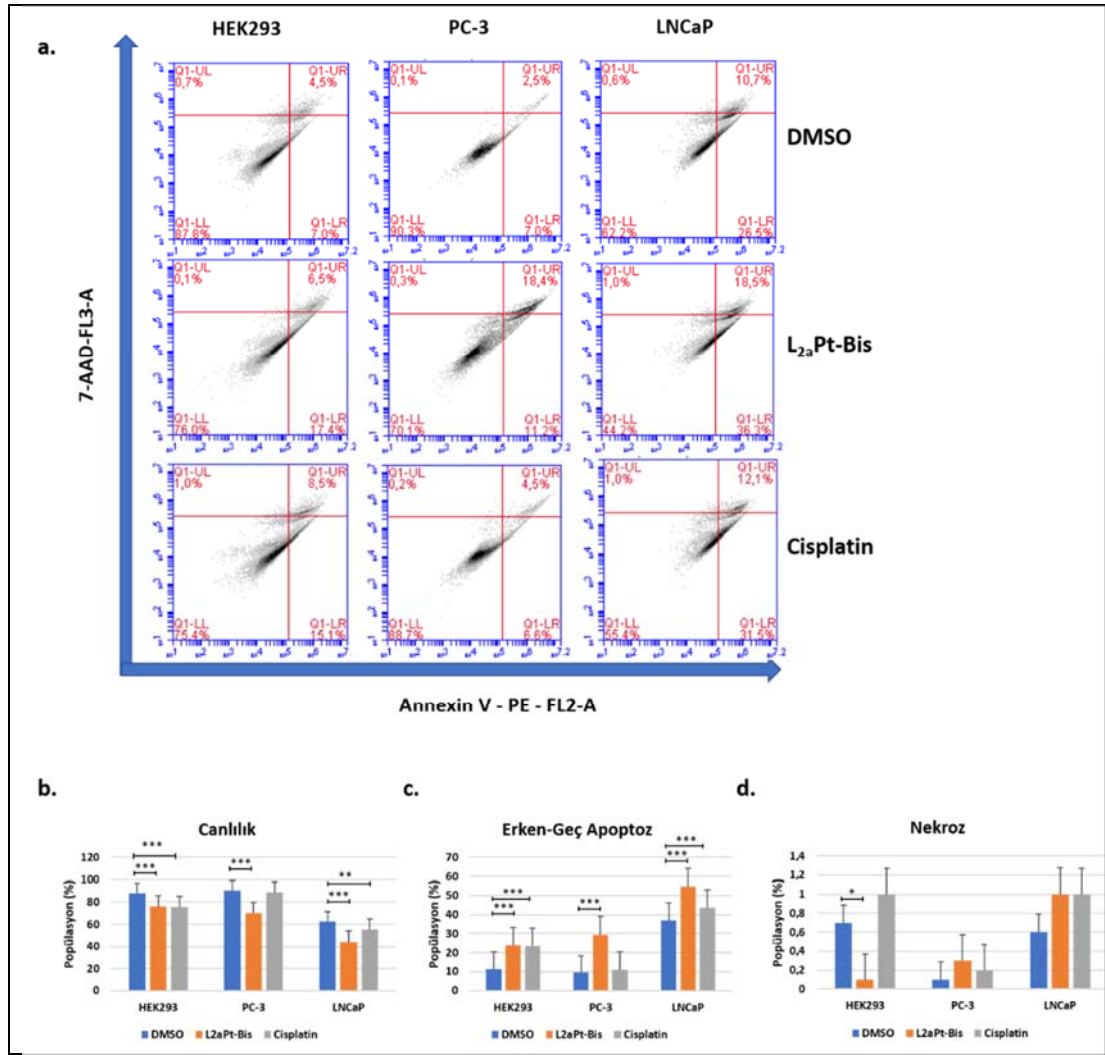
Hücre hatları arasındaki karşılaştırmalara bakıldığında, **L_{1c}Pt-Bis**, cisplatine kıyasla LNCaP ($P<0.001$) hücrelerinde en yüksek apoptoz oranına sahip olduğu saptandı. Ayrıca sağlıklı hücre grubu HEK293 hücrelerine kıyaslandığında da **L_{1c}Pt-Bis**'in LNCaP hücrelerinde daha yüksek apoptoz oranına neden olduğu saptandı. Fakat **L_{1c}Pt-Bis** MCF-7, MDA-MB-231 ve PC-3 hücrelerinde, MCF-12A ve HEK293 sağlıklı hücre gruplarına oranla daha düşük apoptoz oranına sahip olduğu görüldü. Sonuç olarak **L_{1c}Pt-Bis** tedavisinin androjen bağımlı prostat kanserinin modeli olan LNCaP hücrelerinde daha yüksek apoptoz oranlarına yol açtığı tespit edildi.

L_{2a}Pt-bis kompleksi 24 saat IC₅₀ değerinde muamele edildiğinde MCF-12A ($p<0.001$), MCF-7 ($p<0.001$) ve MDA-MB-231 ($p<0.001$) hücrelerinde erken ve geç apoptozu önemli ölçüde artırdığı saptanırken kanser hücreleri MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde bu oranın MCF-12A hücrelerine oranla daha fazla olduğu görüldü. Cisplatin ile tedavi sonrasında da apoptotik hücre oranının anlamlı bir şekilde arttığı saptandı. Fakat bu artış, MCF-7 ($p<0.001$) ve MDA-MB-231 ($p<0.001$) hücrelerinde **L_{2a}Pt-bis** uygulandığında daha fazla iken, MCF-12A hücrelerinde cisplatin uygulandığında daha fazla olduğu saptandı (Şekil 5.14.c). Ayrıca hem **L_{2a}Pt-bis** kompleksi hem de cisplatin uygulanan MCF-7 hücre hattında nekroz oranı önemli ölçüde değişmezken ($p>0.05$), MDA-MB-231 hücrelerinde nekroz seviyesini anlamlı bir şekilde artırdığı saptandı ($p<0.001$). MCF-12A hücrelerinde ise cisplatinin **L_{2a}Pt-bis** kompleksine göre nekroz seviyesini oldukça artırdığı görüldü ($p<0.001$) (Şekil 5.14.d).



Şekil 5.14: MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatinin 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde Annexin V/7-AAD boyaması ile apoptotik etkisinin akım sitometresi ile gösterimi. a. Temsili dört kadranda hücre yüzdesi belirlendi: canlı hücreler, (Annexin-V-/7-AAD-, alt/sol kadrant); erken apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD-, alt / sağ kadrant); geç apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD +, üst / sağ kadrant); ve nekrotik hücreler (Annexin-V- / 7-AAD +, üst / sol kadrant). b. Canlı hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. c. Apoptotik hücrelerin bar grafiği ile gösterimi. d. Nekrotik hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

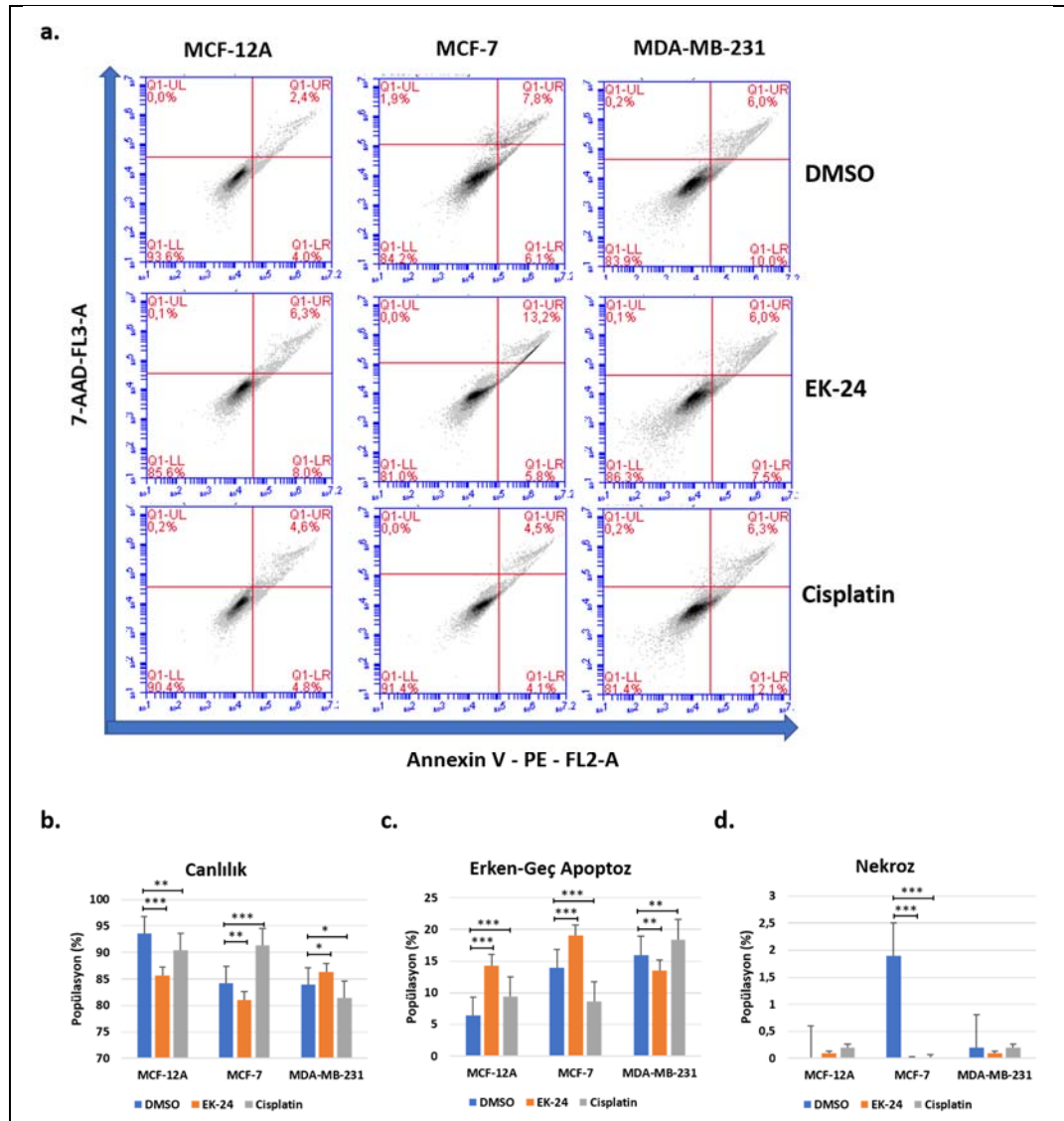
L_{2a}Pt-bis kompleksi 24 saat ilgili IC₅₀ değerinde uygulandığı zaman hücrelerin canlılığında anlamlı ($P < 0.001$) azalışa sebep olduğu görülürken, cisplatinin PC-3 ($p > 0.05$) ve LNCaP ($P < 0.01$) hücrelerinde **L_{2a}Pt-bis** kadar hücre canlılığını düşürmediği tespit edildi (Şekil 5.15.b). **L_{2a}Pt-bis** hem PC-3 hem de LNCaP hücrelerinde cisplatine oranla erken ve geç apoptozu önemli ölçüde artırırken, HEK293 hücrelerinde **L_{2a}Pt-bis** kompleksinin cisplatin kadar erken ve geç apoptozu artırdığı görüldü (Şekil 5.15.c). Ayrıca sadece **L_{2a}Pt-bis** ile muamele edilen HEK293 hücrelerinin nekroz seviyelerinde anlamlı bir azalma meydana geldiği tespit edildi ($P < 0.05$) (Şekil 5.15.d).



Şekil 5.15: HEK293, PC-3 ve LNCaP hücrelerinde **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatinin 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde Annexin V/7-AAD boyaması ile apoptotik etkisinin akım sitometresi ile gösterimi. a. Temsili dört kadranda hücre yüzdesi belirlendi: canlı hücreler, (Annexin-V-/7-AAD-, alt/sol kadrant); erken apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD-, alt / sağ kadrant); geç apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD +, üst / sağ kadrant); ve nekrotik hücreler (Annexin-V- / 7-AAD +, üst / sol kadrant). b. Canlı hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. c. Apoptotik hücrelerin bar grafiği ile gösterimi. d. Nekrotik hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

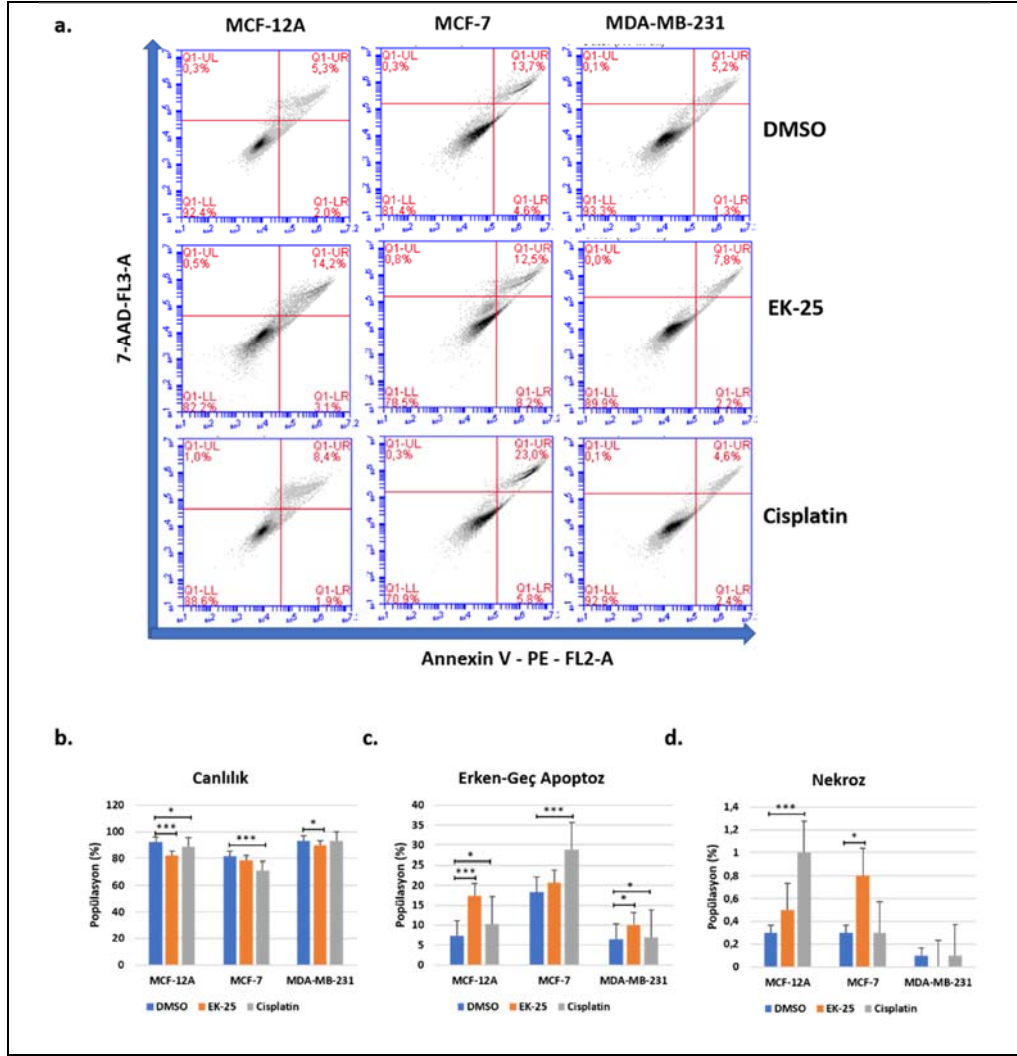
L_{2a}Pt-Bis ile tedavi sonrasında hücre hatları arasındaki kıyaslamalara bakıldığında ise MCF-7 hücrelerinin en yüksek apoptotik hücre popülasyonuna sahip olduğunu ve aynı zamanda MCF-12A hücrelerinin hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla önemli ölçüde daha düşük apoptoza sahip olduğu görüldü (Şekil 5.14.c). Prostat kanseri hücrelerinde de **L_{2a}Pt-Bis** benzer etki göstererek cisplatine kıyasla apoptotik hücre oranını artırdığı tespit edildi. Ancak, sağlıklı hücre grubunda cisplatin ve **L_{2a}Pt-Bis** benzer oranda apoptozu artırdı.

EK-24 uygulanan MCF-12A ($p < 0.001$) ve MCF-7 ($p < 0.01$) hücrelerinin canlı popülasyonlarında anlamlı miktarda düşme görülürken kompleksin MDA-MB-231’de apoptotik etkiye sebep olmadığı tespit edildi (Şekil 5.16b). Hücrelere aynı miktarda cisplatin uygulandığında ise MCF-12A ($p < 0.001$) ve MCF-7 ($p < 0.001$) hücrelerinde çok daha az apoptotik etki görülürken MDA-MB-231 hücrelerinde cisplatin **EK-24**’ten daha iyi apoptotik etki gösterdi ($p < 0.01$) (Şekil 5.16.c). Ayrıca **EK-24** cisplatine kıyasla sağlıklı hücre grubunda az miktarda nekrozu artırdı ($p > 0.05$) (Şekil 5.16d).



Şekil 5.16: MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde **EK-24** ve cisplatinin 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde Annexin V/7-AAD boyaması ile apoptotik etkisinin akım sitometresi ile gösterimi. a. Temsili dört kadranda hücre yüzdesi belirlendi: canlı hücreler, (Annexin-V-/7-AAD-, alt/sol kadrant); erken apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD-, alt / sağ kadrant); geç apoptotik hücreler (Annexin-V + / 7-AAD +, üst / sağ kadrant); ve nekrotik hücreler (Annexin-V- / 7-AAD +, üst / sol kadrant). b. Canlı hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. c. Apoptotik hücrelerin bar grafiği ile gösterimi. d. Nekrotik hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

EK-25 uygulanan tüm hücre hatlarında canlılık kontrol gruplarına kıyasla düşerken, cisplatin **EK-25** kompleksine kıyasla MCF-7 ($P<0.001$) hücrelerinde canlılık oranını diğer hücre hatlarından daha çok düşürmüştür (Şekil 5.17.b). **EK-25**, MCF-7 hücre hattında apoptozu indüklemeyenken MDA-MB-231 hücre hattında apoptozu küçük ama anlamlı bir şekilde artırdı ($P<0.05$). Diğer yandan **EK-25** MCF-12A hücrelerinde apoptotik hücre oranını oldukça artırdı ($p<0.001$) (Şekil 5.17b). **EK-25**, MCF-7 hücrelerinde cisplatine kıyasla nekrozu indükledi ($P<0.05$), ancak MDA-MB-231 hücrelerinde nekrozu etkilemediği görüldü ($P>0.05$). Sağlıklı hücre grubu MCF-12A hücrelerinde ise cisplatinin ($P<0.001$) **EK-25** kompleksinden çok daha fazla nekroz seviyelerini indüklediği görüldü.

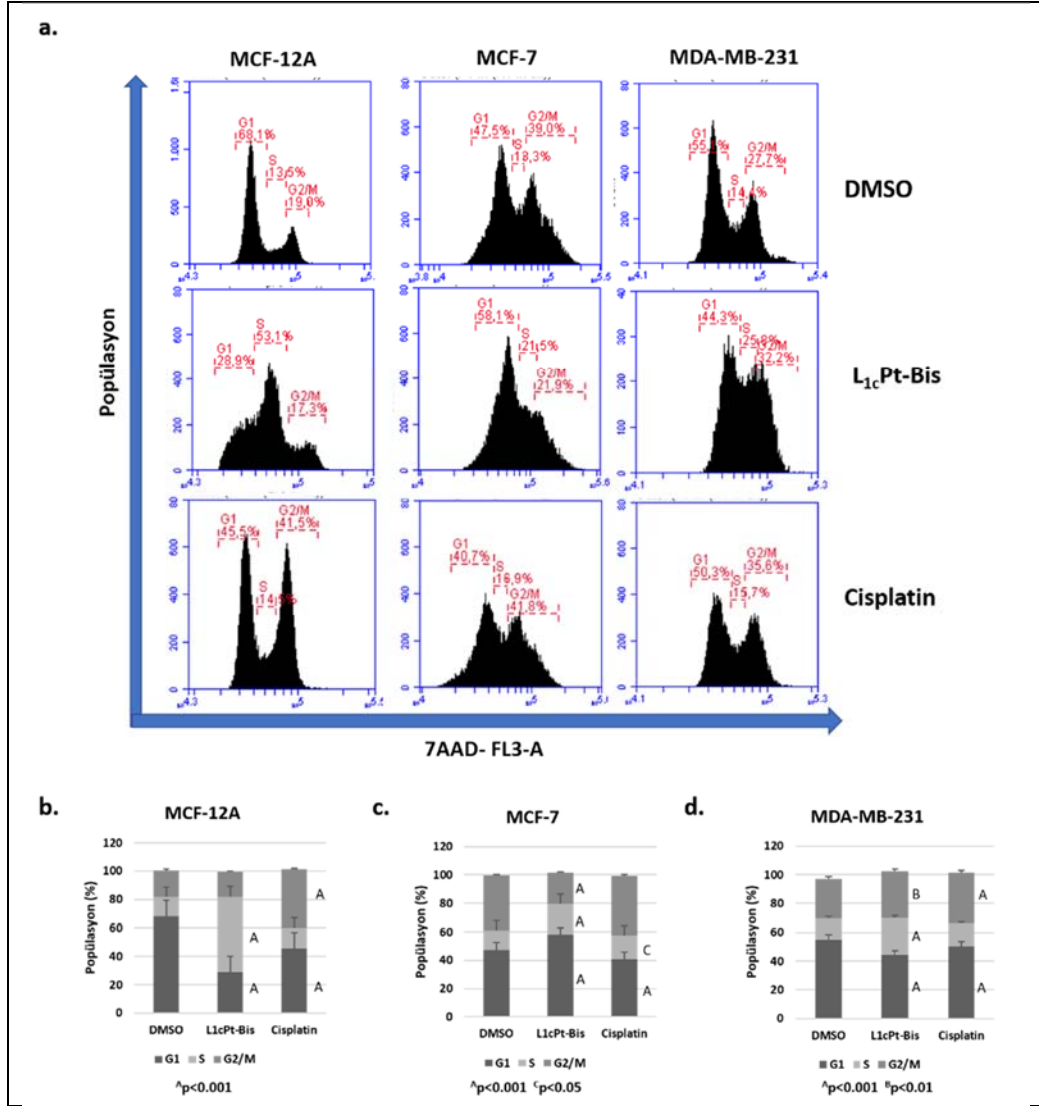


Şekil 5.17: MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde **EK-25** ve cisplatinin 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde Annexin V/7-AAD boyaması ile apoptotik etkisinin akım sitometresi ile gösterimi. a. Temsili dört kadranda hücre yüzdesi belirlendi: canlı hücreler, (Annexin-V-/7-AAD-, alt/sol kadrant); erken apoptotik hücreler (Annexin-V+/7-AAD-, alt/sağ kadrant); geç apoptotik hücreler (Annexin-V+/7-AAD+, üst/sağ kadrant); ve nekrotik hücreler (Annexin-V-/7-AAD+, üst/sol kadrant). b. Canlı hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. c. Apoptotik hücrelerin bar grafiği ile gösterimi. d. Nekrotik hücrelerin bar grafiği ile gösterilmesi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

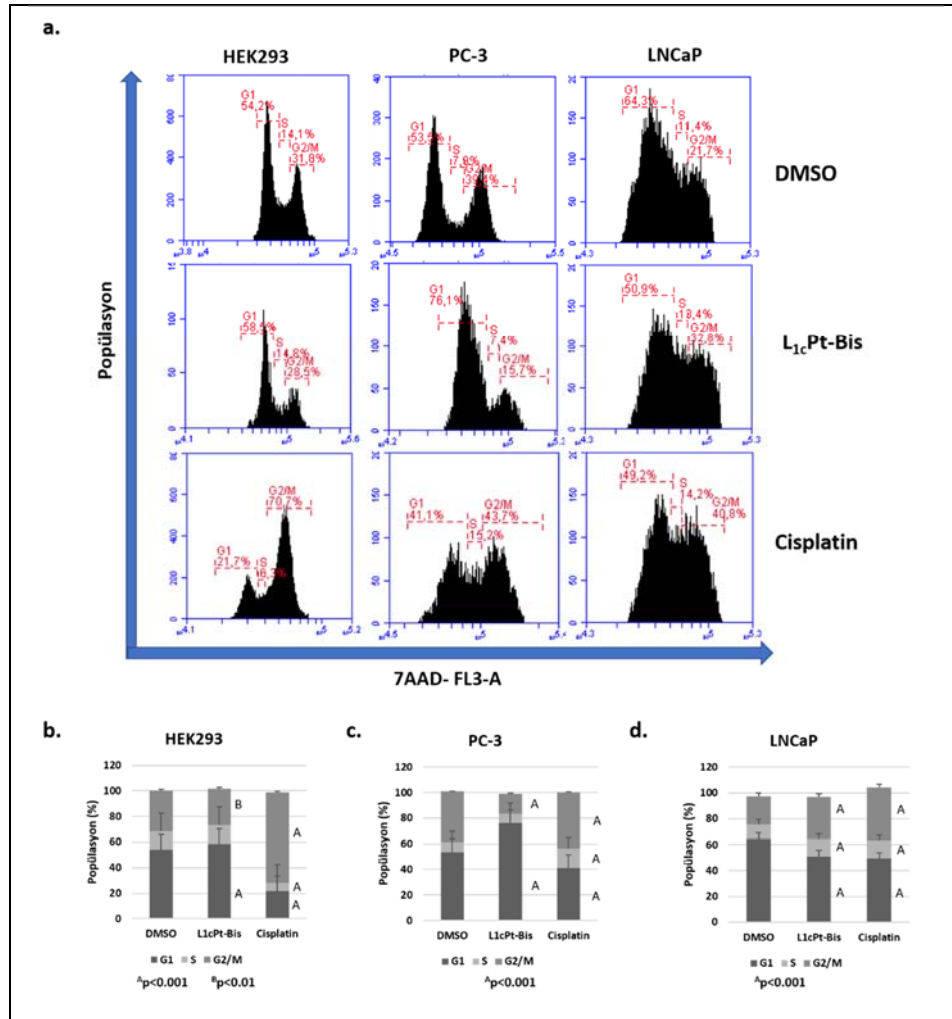
5.4. Hücre Döngüsü Analizi

Komplekslerin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin moleküler mekanizmasını araştırmaya başlamak için nükleer DNA'nın 7-AAD ile etiketlenmesinden sonra akım sitometrisi ile hücre döngüsü analizi gerçekleştirildi.

24 saat **L_{1c}Pt-Bis** tedavisi MCF-12A hücrelerinde G0/G1 fazında önemli ölçüde azalmaya yol açtı ($P<0.001$). S fazında ($P<0.001$) ise anlamlı bir artışa neden olurken cisplatin tedavisinin G2/M fazı duraklamasına neden olduğu saptandı ($P<0.001$) (Şekil 5.18b). **L_{1c}Pt-Bis** MCF-7 hücrelerinde G0/G1 fazında duraksamaya ($P<0.001$), MDA-MB-231 hücrelerinde ise G2/M fazında ($P<0.01$) duraksamaya yol açtı. Buna bağlı olarak her iki hücre hattında S fazında ($P<0.001$) azalma görüldü. Cisplatin, MDA-MB-231 hücre hattında G2/M fazında duraksamaya neden olurken ($P<0.001$), MCF-7 hücre hattında G2/M fazında anlamlı bir değişikliğe neden olmadı (Şekil 5.18c-d). HEK293 ve PC-3 hücreleri **L_{1c}Pt-Bis** ile muamele edildiğinde G0/G1 fazını ($P<0.001$) arttırdığı, S fazını değiştirmedığı ($P>0.05$) ve G2/M fazını ise azaltarak (sırasıyla $P<0.01$, $P<0.001$) G0/G1 fazında duraksamaya neden olduğu tespit edildi (Şekil 5.19.b). Aksine cisplatinin her iki hücrede de G0/G1 fazını ($P<0.001$) anlamlı ölçüde azalttığı, G2/M fazını ($P<0.001$) ise artırarak G2/M fazında duraksamaya neden olduğu görüldü. LNCaP hücrelerinde ise hem **L_{1c}Pt-Bis** hem de cisplatinin G0/G1 fazını ($P<0.001$) anlamlı ölçüde azalttığı, S ($P<0.001$) ve G2/M fazını ($P<0.001$) ise artırarak G2/M fazında duraksamaya neden olduğu görüldü (Şekil 5.19).



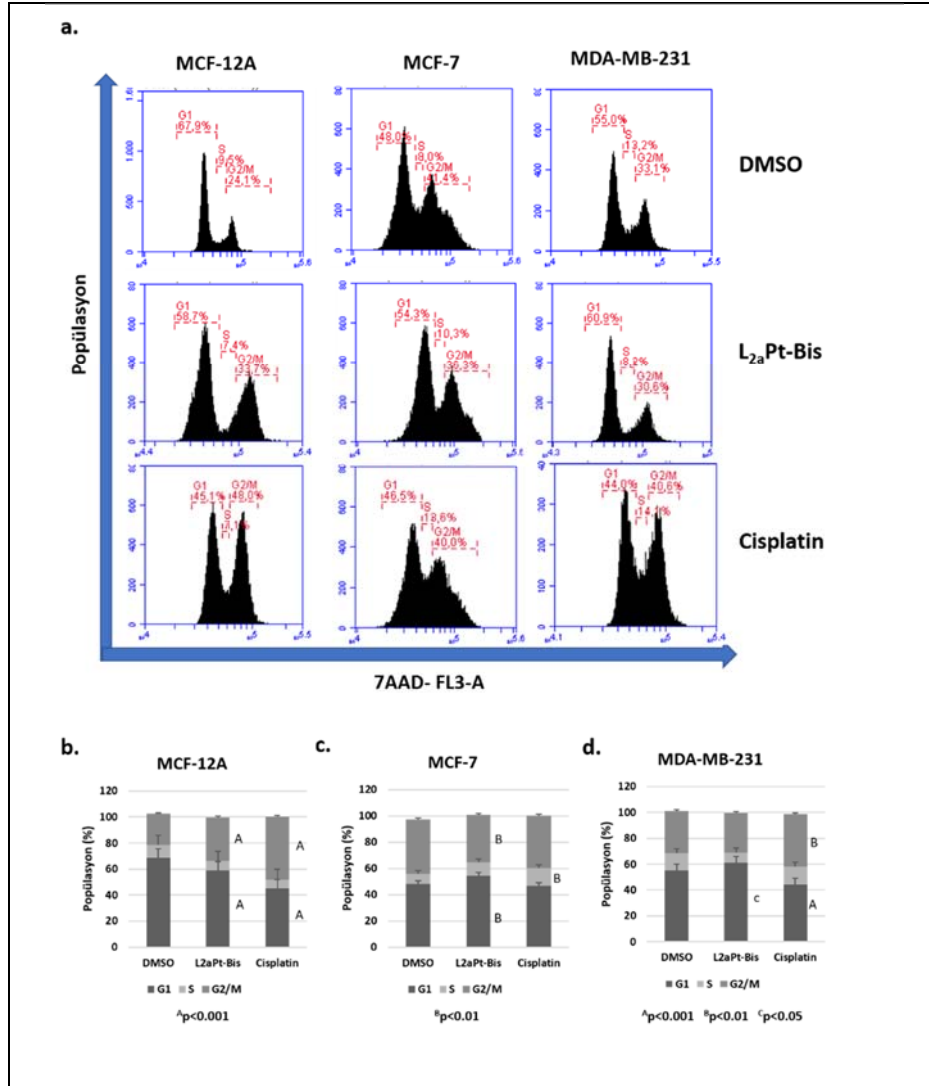
Şekil 5.18: 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde **L_{1c}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin hücre döngüsü analizi. a) Temsili akım sitometrisi histogramları. b) **L_{1c}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-12A hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. c) **L_{1c}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. d) **L_{1c}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * ^CP<0.05, ** ^BP<0.01, ***^AP<0.001.



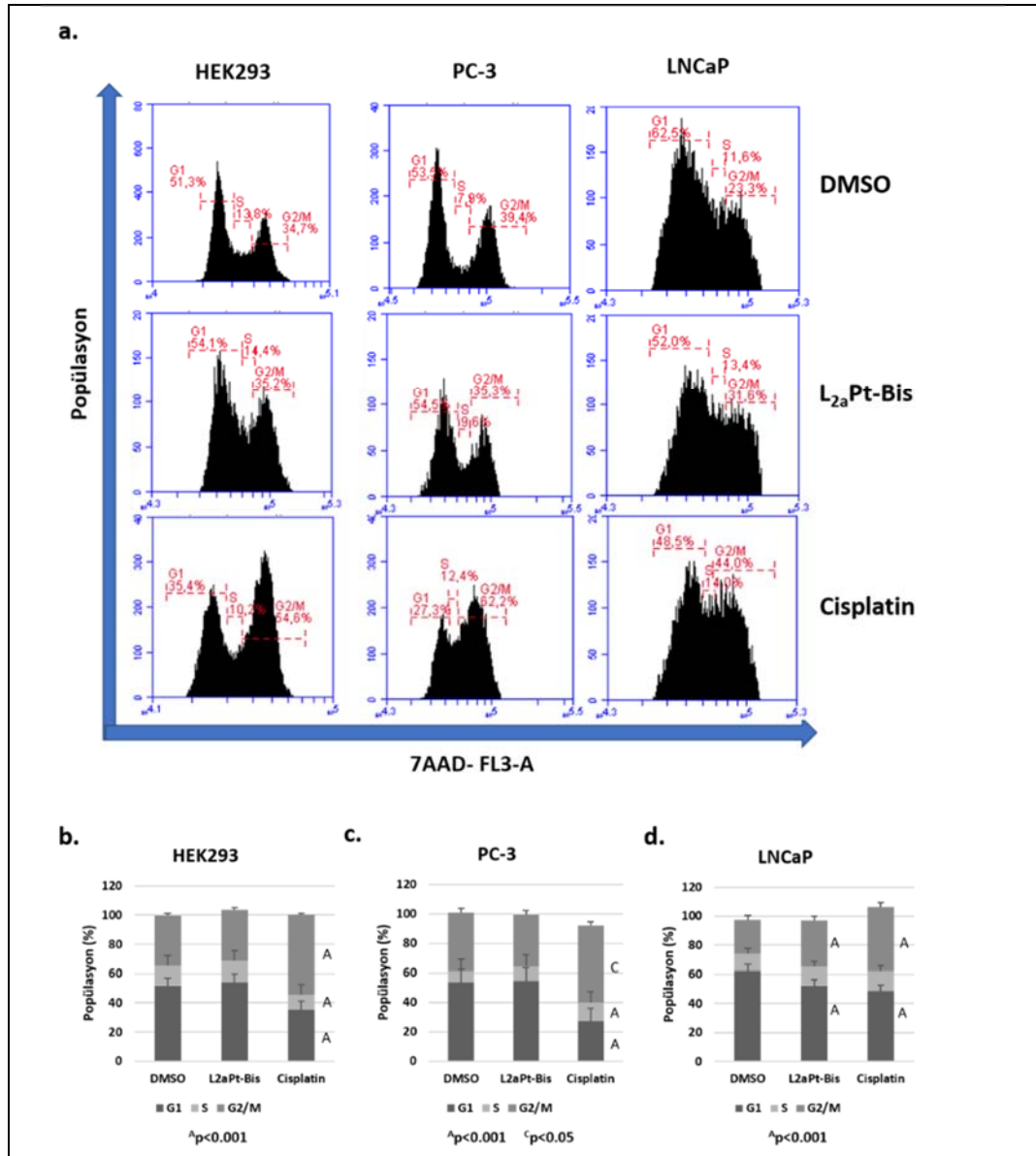
Şekil 5.19: 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde **L_{1c}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen HEK293, PC-3 ve LNCaP hücrelerinin hücre döngüsü analizi. a) Temsili akım sitometrisi histogramları. b) **L_{1c}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen HEK293 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. c) **L_{1c}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. d) **L_{1c}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen LNCaP hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * ^CP<0.05, ** ^BP<0.01, ***^AP<0.001.

Hem **L_{2a}Pt-Bis** hem de cisplatin MCF12A hücrelerinde G2/M fazını önemli ölçüde artırıp aynı profili sergiledi ($P<0.001$), kontrol ile karşılaştırıldığında G0/G1 ($P<0.001$) ve S ($P>0.05$) fazlarında azalma meydana geldi (Şekil 5.20b). **L_{2a}Pt-Bis**, MCF-7 ($P<0.01$) ve MDA-MB-231 ($P<0.05$) hücrelerinde G0/G1 fazını artırarak G0/G1 fazı durdurmasına neden olduğu düşünülürken, cisplatin MDA-MB-231 ($P<0.01$) hücrelerinde G2/M fazının, MCF-7 ($P<0.01$) hücrelerinde ise S fazının durmasına neden oldu (Şekil 5.20b-c). **L_{2a}Pt-Bis**, HEK293 ve PC-3 hücrelerinde hücre döngüsü durmasını indüklemedi. Cisplatinin ise her iki hücrede de G0/G1 fazını

azaltıp, G2/M fazının artmasına neden olduğu tespit edildi (Şekil 5.21b-c). LNCaP hücre hattında ise **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatinin G0/G1 fazını anlamlı bir şekilde azaltıp ($P<0.001$), G2/M fazının artmasına ($P<0.001$) neden olduğu saptandı. Kontrole kıyasla LNCaP hücrelerinde iki uygulama sonrasında S fazında fark gözlemlenmedi ($P<0.05$) (Şekil 5.21d).



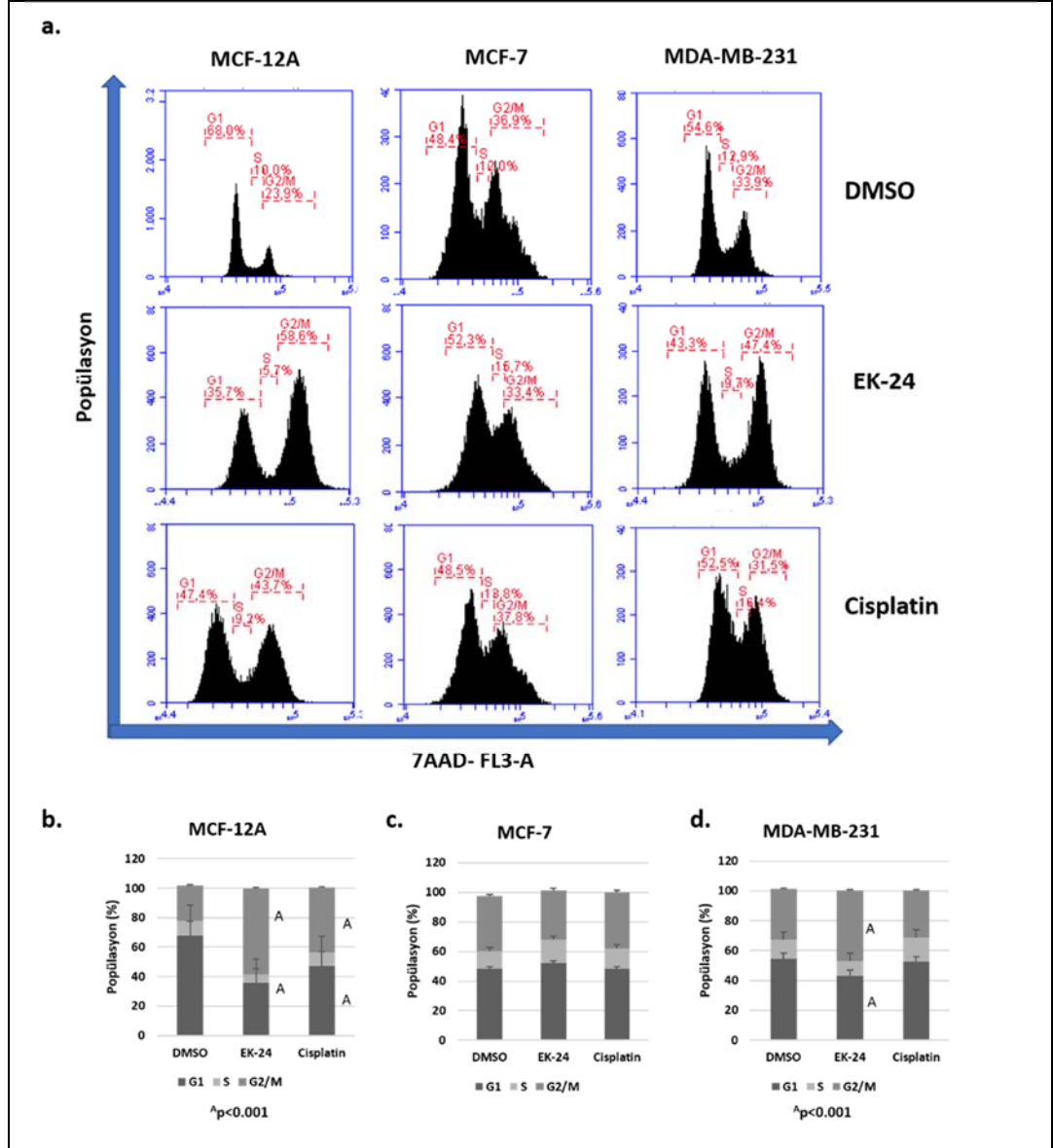
Şekil 5.20: 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin hücre döngüsü analizi. a) Temsili akım sitometrisi histogramları. b) **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-12A hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. c) **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. d) **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.



Şekil 5.21: 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen HEK293, PC-3 ve LNCaP hücrelerinin hücre döngüsü analizi. a) Temsili akım sitometrisi histogramları. b) **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen HEK293 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. c) **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. d) **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatin ile muamele edilen LNCaP hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * ^CP<0.05, ** ^BP<0.01, ***^AP<0.001.

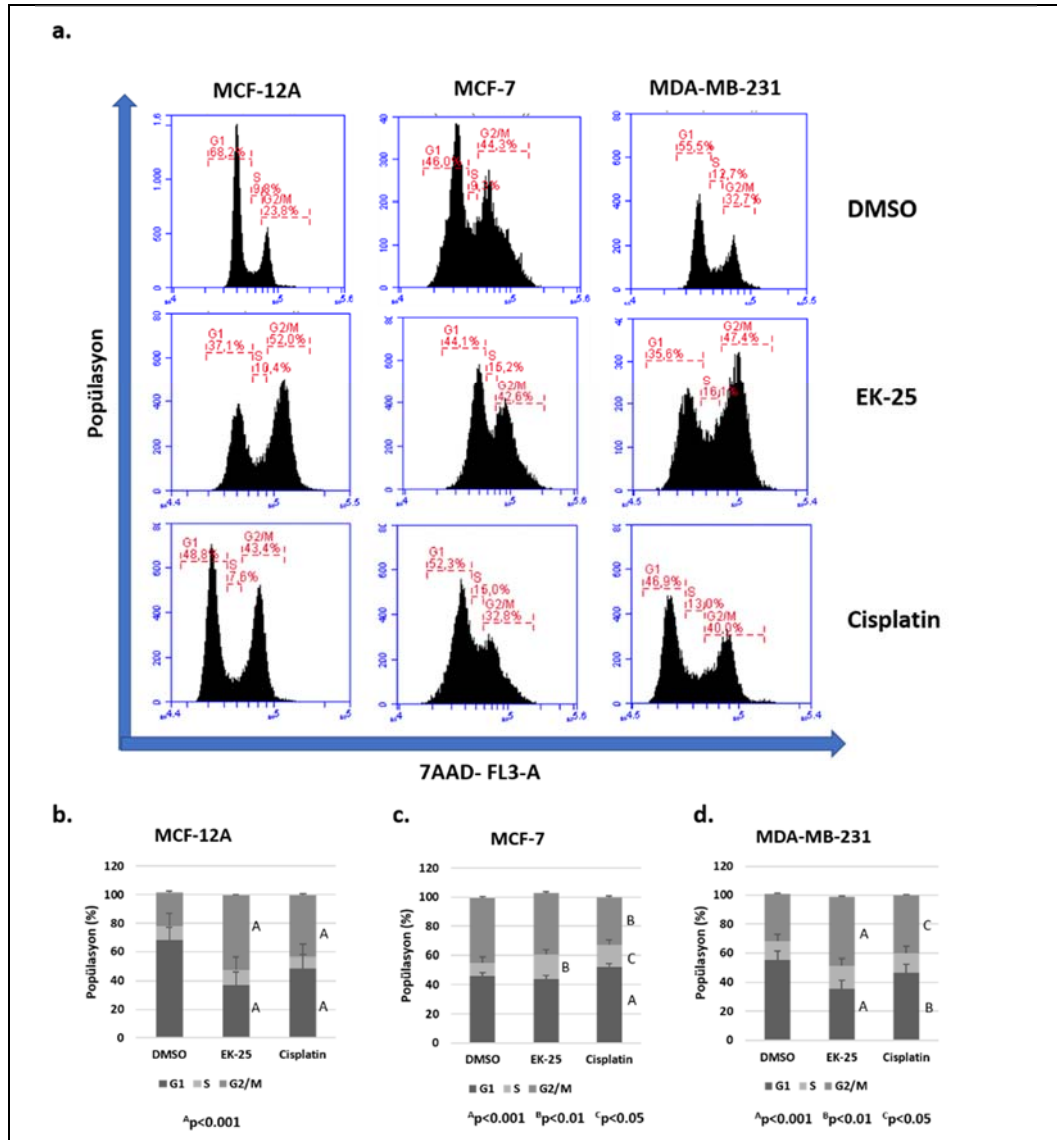
MCF-12A hücrelerine 24 saat IC₅₀ değerinde hem **EK-24** hem de cisplatin uygulandığı zaman G0/G1 fazında anlamlı bir azalma olurken ($P<0.001$), G2/M-fazında duraksama gözlemlendi ($P<0.001$). Hem **EK-24** kompleksi hem de cisplatin ile tedavi sonrasında MCF-7 hücrelerinde önemli bir farklılık saptanmadı (Şekil 5.22c).

MDA-MB-231 hücrelerinde **EK-24** G2/M-fazı duraksamasına sebep olurken, MDA-MB-231 hücrelerine cisplatin uygulandığında ise önemli bir değişiklik görülmedi (Şekil 5.22d).



Şekil 5.22: 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde **EK-24** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin hücre döngüsü analizi. a) Temsili akım sitometrisi histogramları. b) **EK-24** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-12A hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. c) **EK-24** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. d) **EK-24** ve cisplatin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * ^CP<0.05, ** ^BP<0.01, ***^AP<0.001.

EK-25 ve cisplatin, MCF-12A hücrelerinde G0/G1 fazında anlamlı bir azalmaya yol açarken ($P<0.001$), özellikle **EK-25** uygulanmış hücrelerde daha fazla G2/M-fazı duraksamasına neden oldu ($P<0.001$) (Şekil 5.23b). MDA-MB-231 hücre hattında **EK-25** ($P<0.001$) G2/M fazında duraksamaya sebep olurken, MCF-7 hücrelerinde S fazında ($P<0.01$) artış görüldü. MCF-7 hücreleri cisplatin ile tedavi edildiği zaman ise G2/M fazının azalmasıyla birlikte G0/G1 ($P<0.001$) ve S ($P<0.05$) fazlarında anlamlı bir artış gözlemlenirken aksine MDA-MB-231 hücreleri cisplatinle tedavi edildiği zaman G0/G1 fazının ($P<0.01$) azalması ile birlikte G2/M fazında ($P<0.05$) anlamlı bir artış görüldü (Şekil 5.23c-d).



Şekil 5.23: 24 saat boyunca ilgili IC₅₀ değerlerinde **EK-25** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin hücre döngüsü analizi. a) Temsili akım sitometrisi histogramları. b) **EK-25** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-12A hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. c) **EK-25** ve cisplatin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. d) **EK-25** ve cisplatin ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarının yüzde dağılımlarının bar grafiği ile gösterimi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * ^CP<0.05, ** ^BP<0.01, ***^AP<0.001.

Sonuç olarak, cisplatin tüm hücre hatlarında G2/M fazı duraksamasına yol açarken sadece MCF-7 hücrelerinde S fazı duraksamasına yol açtı. Yapılan hücre döngüsü analizlerinde **EK-24** ve **EK-25** meme kanseri hücre hatlarında ve MCF-12A sağlıklı meme epiteli hücrelerinde cisplatine benzer bir profil sergiledi. Öte yandan, **L_{1c}Pt-Bis** ve **L_{2a}Pt-Bis** MCF-7 hücrelerinde G0/G1 birikimini indüklerken LNCaP

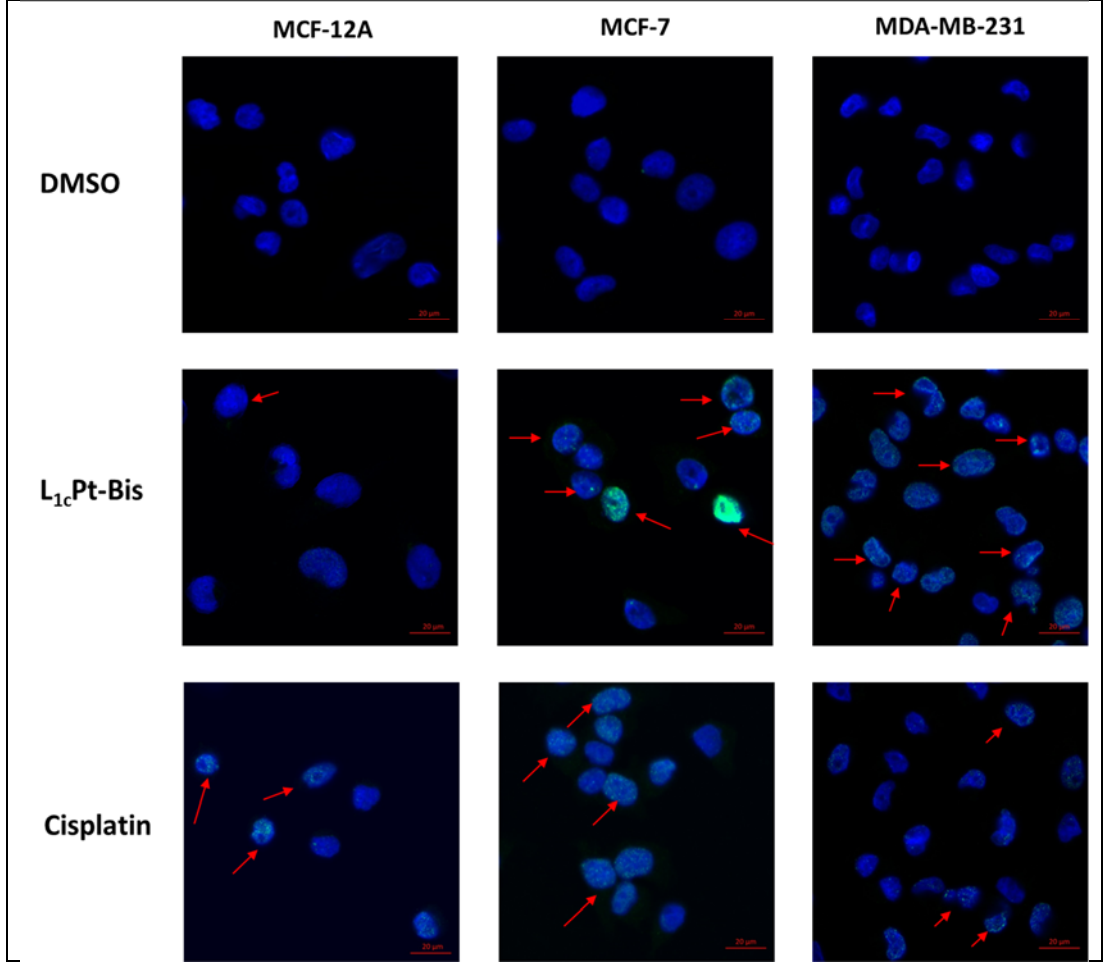
hücrelerinde G2/M fazı duraksamasına neden oldu. Bileşiklerin hepsi MCF-12A hücrelerinde G2/M duraksamasına neden olurken, **L_{1c}Pt-Bis** S fazı duraksamasına neden oldu. **L_{2a}Pt-Bis** ise HEK293 ve PC-3 hücrelerinde hücre döngüsü duraksamasına neden olmadı.

5.5. DNA Hasarının Görüntülenmesi

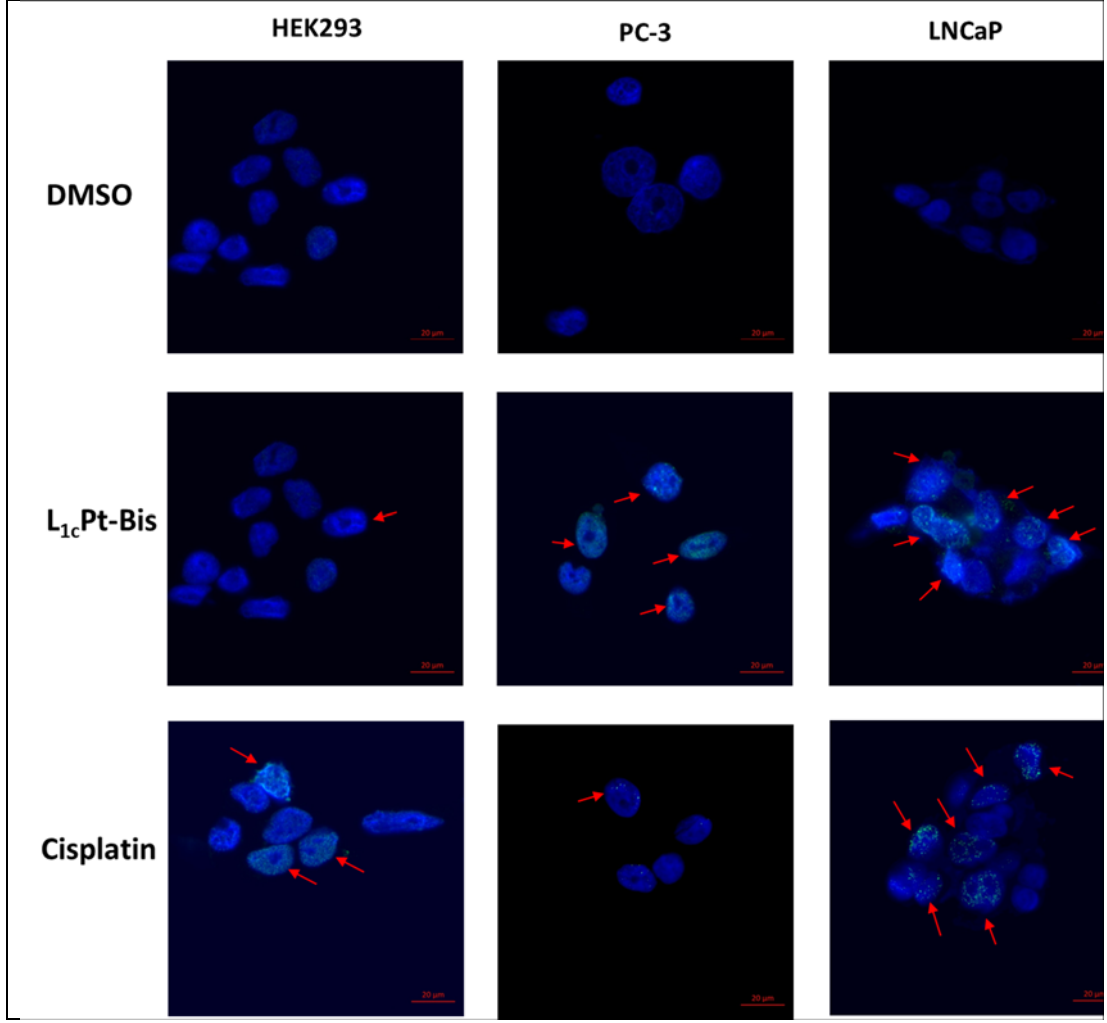
Cisplatin ve farklı kompleksler ile tedavi edilen hücrelerin, histon γ -H2AX boyamasını saptamak için konfokal mikroskobu kullanarak 24 saat IC₅₀ değerinde hasarlı DNA sinyali verip vermediği araştırıldı.

L_{1c}Pt-Bis ile tedavi edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde DNA hasarı seviyesinin cisplatine kıyasla çok daha yüksek seviyede olduğu γ -H2AX boyaması (yeşil) ile gözlemlendi. MCF-12A hücrelerinde ise **L_{1c}Pt-Bis** DNA hasarını ind klemezken aynı konsantrasyonda cisplatinle muamele edildiğinde DNA hasarının indüklendiği görüldü (şekil 5.24).

PC-3 hücrelerinde **L_{1c}Pt-Bis** uygulandığı zaman oluşan hasarın cisplatin uygulamasına kıyasla daha fazla olduğu görüldü. LNCaP hücrelerine **L_{1c}Pt-Bis** ve cisplatin uygulaması sonrasında DNA hasarı eşit seviyelerde görüldü. Kontrol hücre grubu HEK293 hücrelerinde ise **L_{1c}Pt-Bis** hücre hasarına neden olmazken cisplatin tedavisi DNA hasarını indükledi (şekil 5.25).



Şekil 5.24: 24 saat boyunca DMSO (üst satır), **L_{1c}Pt-Bis** (orta satır) ve cisplatin (alt satır) ile muamele edilmiş MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin γ -H2AX (yeşil) ekspresyonunun immunofloresans analizi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. Ölçek çubukları 20 μ m'yi gösterir. Tüm görüntüler immersion yağı ile 63X büyütmede çekildi.

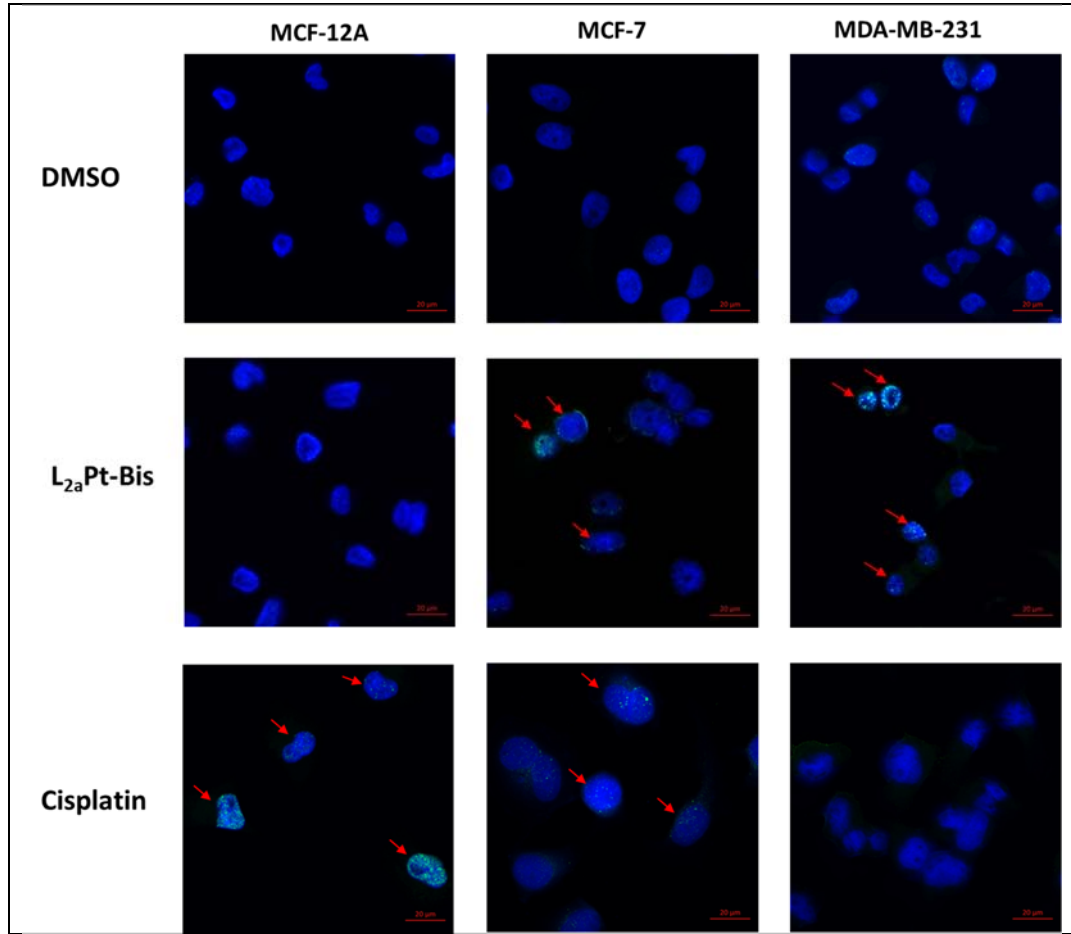


Şekil 5.25: 24 saat boyunca DMSO (üst satır), **L_{1c}Pt-Bis** (orta satır) ve cisplatin (alt satır) ile muamele edilmiş HEK293, PC-3 ve LNCaP hücrelerinin γ -H2AX (yeşil) ekspresyonunun immunofloresans analizi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. Ölçek çubukları 20 μ m'yi gösterir. Tüm görüntüler immersion yağı ile 63X büyütmede çekildi.

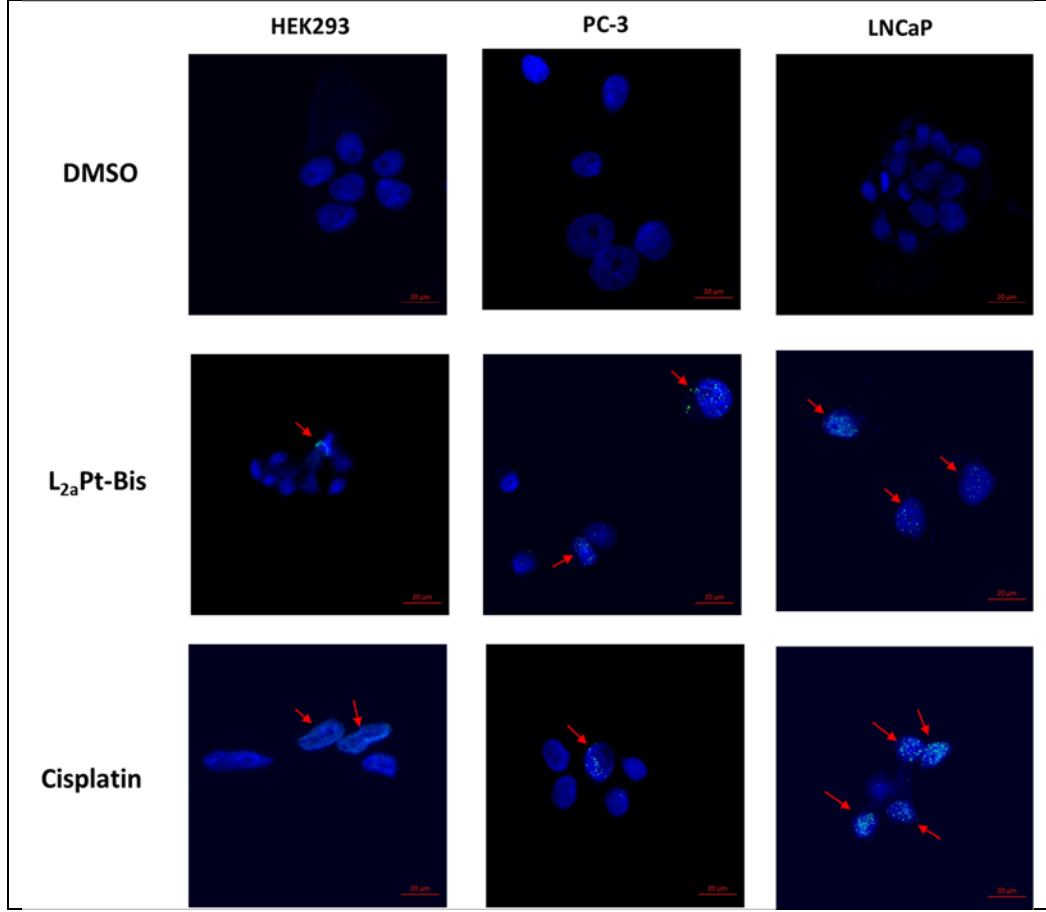
L_{2a}Pt-Bis kompleksi hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücrelerinde DNA hasarına neden olurken MDA-MB-231 hücrelerinde hasarının daha yüksek seviyede olduğu görüldü. Her iki kanser hücresinde de cisplatin hasara neden olurken **L_{2a}Pt-Bis** daha yüksek DNA hasarını indükledi. MCF-12A hücrelerinde ise cisplatin, aynı miktarda uygulanan **L_{2a}Pt-Bis** kompleksine oranla DNA hasarını daha fazla indükledi (Şekil 5.26).

PC-3 ve LNCaP hücrelerinde **L_{2a}Pt-Bis** ve cisplatin tedavisi sonrasında hücrelerde DNA hasarının indüklendiği görüldü. PC-3 hücrelerinde γ -H2AX boyaması eşit seviyelerde görülürken LNCaP hücrelerinde γ -H2AX boyamasının cisplatin uygulandığı zaman çok daha fazla olduğu tespit edildi. HEK293 hücre

grubunda ise hem **L_{2a}Pt-Bis** hem de cisplatin DNA hasarını az oranda indükledi (Şekil 5.27).

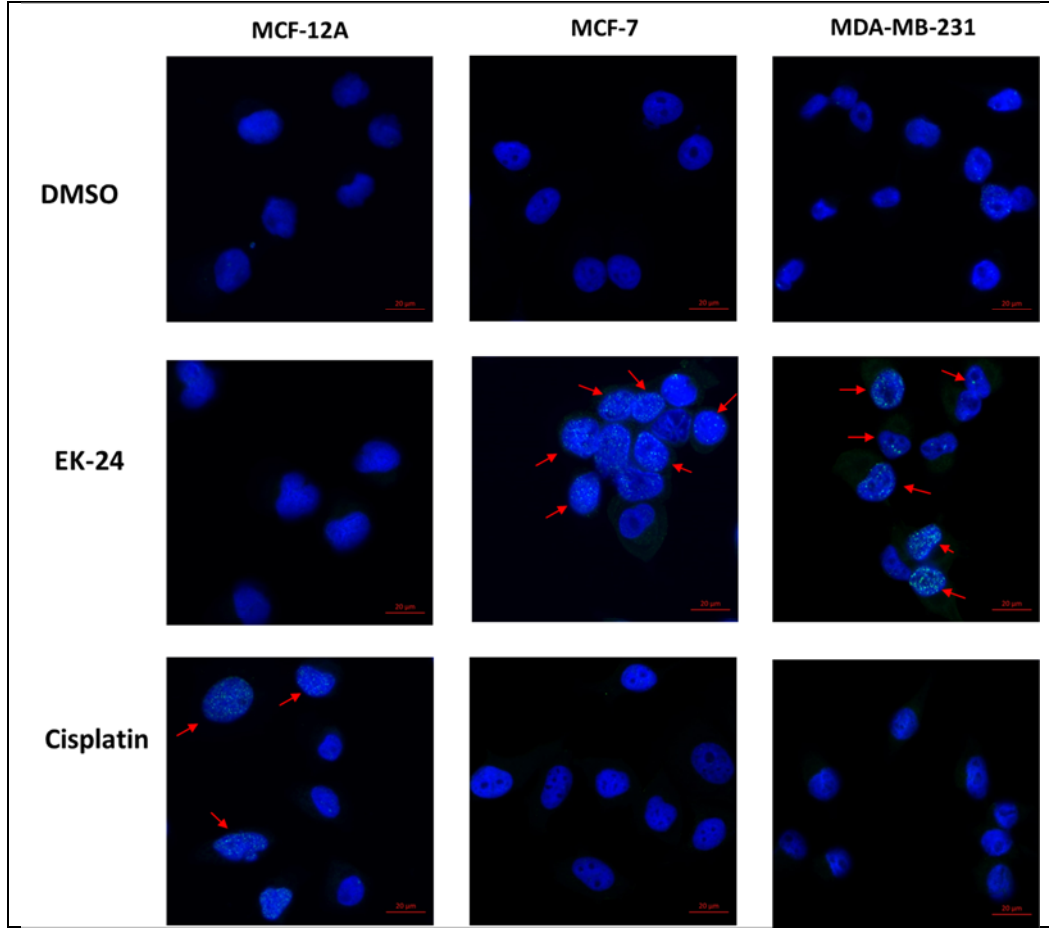


Şekil 5.26: 24 saat boyunca DMSO (üst satır), **L_{2a}Pt-Bis** (orta satır) ve cisplatin (alt satır) ile muamele edilmiş MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin γ -H2AX (yeşil) ekspresyonunun immunofloresans analizi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. Ölçek çubukları 20 μ m'yi gösterir. Tüm görüntüler immersion yağı ile 63X büyütmede çekildi.



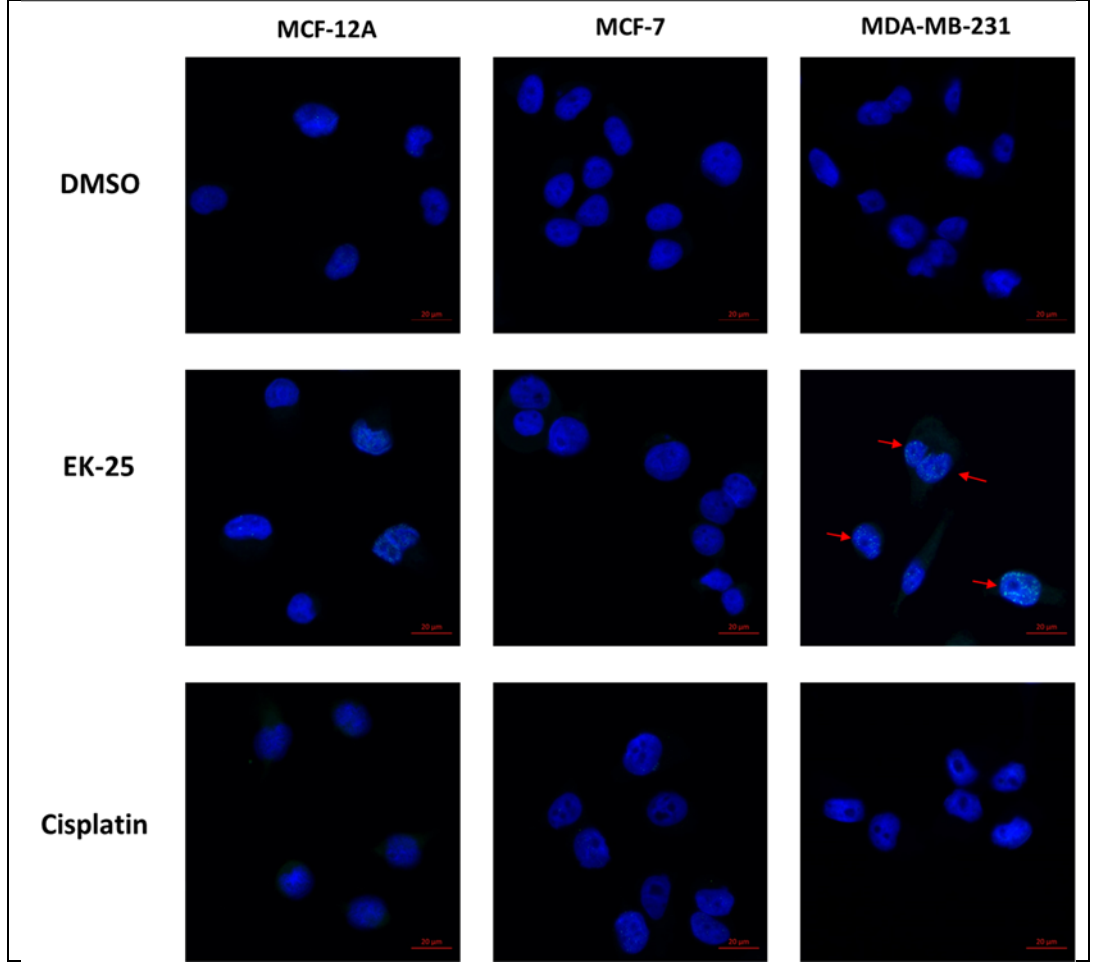
Şekil 5.27: 24 saat boyunca DMSO (üst satır), **L_{2a}Pt-Bis** (orta satır) ve cisplatin (alt satır) ile muamele edilmiş HEK293, PC-3 ve LNCaP hücrelerinin γ -H2AX (yeşil) ekspresyonunun immunofloresans analizi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. Ölçek çubukları 20 μ m'yi gösterir. Tüm görüntüler immersion yağı ile 63X büyütmede çekildi.

Hücreler **EK-24** kompleksi ile tedavi edildiğinde hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücrelerinde γ -H2AX seviyesinin yüksek seviyelerde olduğu görülürken MCF-12A hücresinde DNA hasarının indüklenmediği tespit edildi. Hücrelere cisplatin ile muamele edildiğinde ise MCF-12A hücrelerinde DNA hasarına neden olurken, hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücrelerinde DNA hasarı gözlemlenmedi (Şekil 5.28).



Şekil 5.28: 24 saat boyunca DMSO (üst satır), **EK-24** (orta satır) ve cisplatin (alt satır) ile muamele edilmiş MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin γ -H2AX (yeşil) ekspresyonunun immunofloresans analizi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. Ölçek çubukları 20 μ m'yi gösterir. Tüm görüntüler immersion yağı ile 63X büyütmede çekildi.

Hücrelere **EK-25** kompleksi uygulandığında ise cisplatine kıyasla sadece MDA-MB-231 hücrelerinde DNA çift iplik kırıklarının oluştuğu tespit edildi. Diğer hücrelerde ise hem **EK-25** hem de cisplatin ayrı ayrı uygulandığında DNA hasarı indüklenmedi (Şekil 5.29).



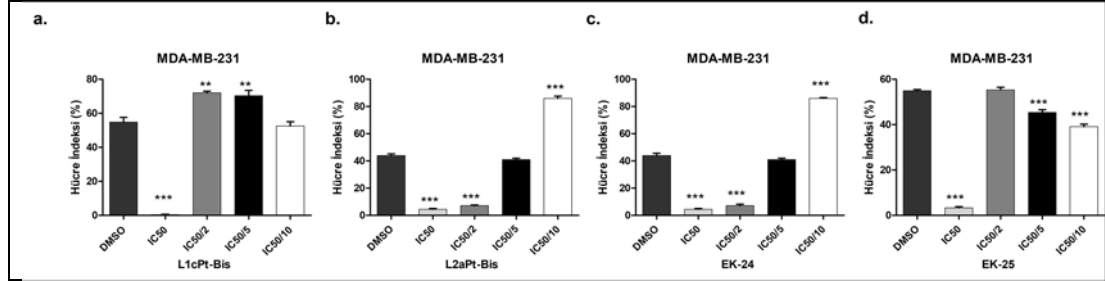
Şekil 5.29: 24 saat boyunca DMSO (üst satır), **EK-25** (orta satır) ve cisplatin (alt satır) ile muamele edilmiş MCF-12A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin γ -H2AX (yeşil) ekspresyonunun immunofloresans analizi. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. Ölçek çubukları 20 μ m'yi gösterir. Tüm görüntüler immersion yağı ile 63X büyütmede çekildi.

5.6. Gerçek Zamanlı Migrasyon ve İnvazyon Analizi

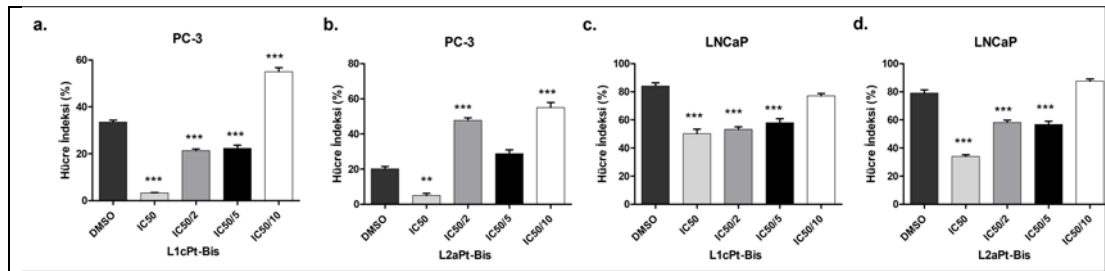
Platin türevli ajanların kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyonuna etkilerini incelemek için invaziv özellikleri bilinen MDA-MB-231, LNCaP ve PC3 hücreleri gerçek zamanlı olarak CIM-Plate ile analiz edildi. Kompleksler hücrelere hem IC₅₀ dozunda hem de bu dozun 1:2, 1:5 ve 1:10 oranlarında uygulandı.

Bütün kompleksler (**L_{1c}Pt-Bis**, **L_{2a}Pt-Bis**, **EK-24** ve **EK-25**), yüksek oranda invaziv insan üçlü negatif meme adenokarsinomu MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyon kapasitesini IC₅₀ değerinde önemli ölçüde azaltırken ($P < 0.001$), **L_{2a}Pt-Bis** ve **EK-24** komplekslerinin IC₅₀/2 ($P < 0.001$) konsantrasyonda da migrasyon kapasitesini önemli ölçüde azalttığı görüldü (Şekil 5.30). **L_{1c}Pt-Bis** ve **L_{2a}Pt-Bis**

kompleksleri PC-3 ve androjen bağımlı prostat kanseri hücre hattı LNCaP hücre hatlarında benzer profili sergiledi. İki kompleksin de IC₅₀ değerinde uygulandığında hücrelerin migrasyon kapasitesini düşürdüğü saptandı (Şekil 5.31).

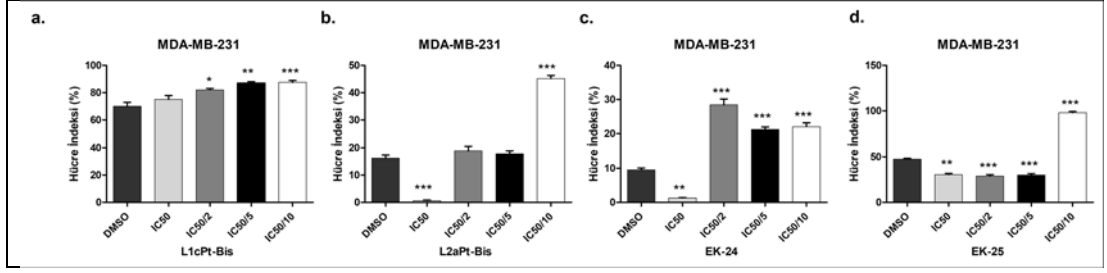


Şekil 5.30: 24 saat boyunca DMSO ve IC₅₀ değeri ve alt konsantrasyonlarında **L_{1c}Pt-Bis**, **L_{2a}Pt-Bis**, **EK-24** ve **EK-25** ile muamele edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyon oranı. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

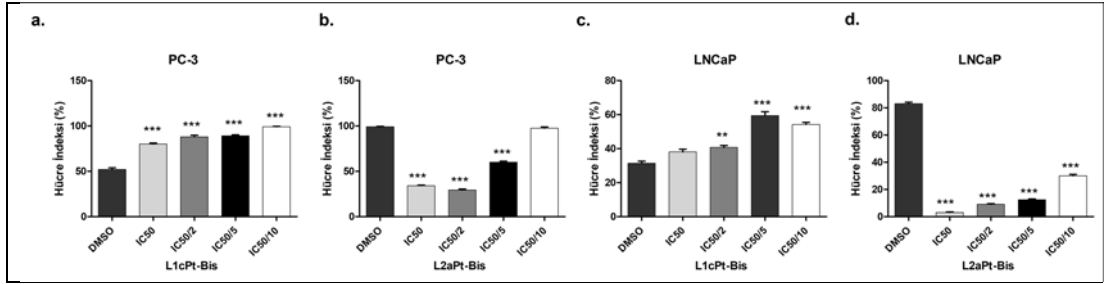


Şekil 5.31: 24 saat boyunca DMSO ve IC₅₀ değeri ve alt konsantrasyonlarında **L_{1c}Pt-Bis**, **L_{2a}Pt-Bis**, **EK-24** ve **EK-25** ile muamele edilmiş PC-3 ve LNCaP hücrelerinin migrasyon oranı. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

IC₅₀ değerinde **L_{2a}Pt-Bis** ($P < 0.001$) ve **EK-24** ($P < 0.01$) ile tedavi edilen yüksek oranda invaziv kemoterapi dirençli MDA-MB-231 hücrelerinin invazyon kapasitesinin önemli ölçüde azaldığı saptandı. MDA-MB-231 hücrelerinin **L_{1c}Pt-Bis** (IC₅₀) ($P > 0.05$) ile tedavisi hücre invazyonunu önemli ölçüde etkilemedi, ancak **EK-25** ile tedavi MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonunu hem IC₅₀ değerinde hem de daha alt konsantrasyonlarda önemli ölçüde azalttı (Şekil 5.32). **L_{2a}Pt-Bis**, PC-3 ve LNCaP hücrelerinde aynı eğilimi gösterip hücre invazyon kapasitesini IC₅₀ dozu ve alt konsantrasyonlarda anlamlı bir şekilde inhibe etti (Şekil 5.33). **L_{1c}Pt-Bis** tedavisi ise invaziv özellikli PC-3 ve LNCaP hücrelerinde bir etki göstermedi ($P > 0.05$) (Şekil 5.33).



Şekil 5.32: 24 saat boyunca DMSO ve IC₅₀ değeri ve alt konsantrasyonlarında **L1cPt-Bis**, **L2aPt-Bis**, **EK-24** ve **EK-25** ile muamele edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinin invazyon oranı. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.



Şekil 5.33: 24 saat boyunca DMSO ve IC₅₀ değeri ve alt konsantrasyonlarında **L1cPt-Bis**, **L2aPt-Bis**, **EK-24** ve **EK-25** ile muamele edilmiş PC-3 ve LNCaP hücrelerinin migrasyon oranı. DMSO: 1/1000 oranında DMSO içeren besiyeri. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hücrelerin kontrolsüz büyümesi olan kanser, tüm dünyada hayatı en çok etkileyen hastalıklardan biridir ve önemli bir ölüm nedenidir. 2020'de dünya çapında ~ 10 milyon insanın kanserden öldüğü tahmin edilmektedir [1]. Son verilere göre kadınlarda en çok görülen kanser türü meme kanseri iken akciğer ve prostat kanseri ise erkeklerde en yaygın olanıdır. Genel olarak, dünyada her iki cinsiyet için de kanser ölümlerinin önde gelen nedeni meme kanseridir (%11,7) [1].

Kansere birçok farklı tedavi türü geliştirilmekle birlikte anti-kanser ilaçların en önemli hedefi DNA'dır. Platin türevli tedavilerin anti-kanser aktivite göstermeleri için temel olarak ana hedefi DNA'dır [58, 59]. Bu ajanlar DNA'da farklı eklentiler oluşturarak DNA transkripsiyonunu ve replikasyonunu inhibe eder. Dolayısıyla, DNA'ya zarar verir ve programlanmış hücre ölümüne neden olur [63]. Bu nedenle son zamanlarda DNA'nın hedef alındığı yeni platin türevli ilaç adayları sentezlenmektedir [118]. Çoğu durumda, platin kompleksleri farklı ligandları içermektedir [108]. Son zamanlarda kullanılan farklı imidazolidin ve imidazolidindion türevlerinin çalışmalarda güçlü antitümör, antimikrobiyal, antimalaryal etkisinin olduğu bildirilmektedir [109, 110, 111, 112, 113, 114, 115]. Bu tez çalışmasında temel olarak imidazolidindion türevli Pt (II) kompleksleri kullanılmıştır. Farklı Pt (II) kompleksleri meme kanseri hücre hatlarından MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerinde incelenmiş ve komplekslerin cisplatine kıyasla daha güçlü anti-prolifereatif etkilerinin olduğu gösterilmiştir [119]. Yine başka bir çalışmada farklı platin komplekslerinin cisplatine kıyasla serviks (HeLa) ve prostat (LNCaP ve PC3) kanseri hücre hatlarında sitotoksik özellik gösterdiği tespit edilmiştir [120, 121]. Birçok çalışmada platin türevli ajanların DNA'da hasarlar oluşturarak anti-proliferatif etkiye neden olduğu ve bununla birlikte apoptotik hücre ölümünün uyarıldığı bildirilmiştir [121, 122, 123].

Bu tez çalışmasında, yeni sentezlenen bileşikler beş farklı kanser hücre hattında (MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, PC-3 ve LNCaP) ve iki farklı sağlıklı hücre hattında (MCF-12A ve HEK293) test edildi. Bileşiklerin öncelikle anti-proliferatif etkisi incelenerek kanser hücrelerinde çoğalmayı etkileyen bileşiklerin IC₅₀ değerleri belirlendi. Belirlenen IC₅₀ değeri ile daha sonra ileri çalışmalar yapıldı ve ajanların hücreler üzerindeki apoptotik etkisi, hücre döngüsüne olan etkisi ve DNA hasarı

incelendi. Daha sonra ise ajanların, migrasyon ve invazyon kapasitelerine olan etkileri araştırıldı.

Öncelikle imidazolidindion türevleri ve platin (II) kompleksleri insan meme (MCF-7 ve MDA-MB-231), serviks (HeLa) ve prostat (PC-3 ve LNCaP) kanseri hücre hatları üzerinde xCELLigence gerçek zamanlı analiz sistemi yöntemiyle araştırıldı. Kanser hücre hatlarının her birine kompleksler son konsantrasyonu 50 μM olacak şekilde verildiği zaman sadece platin türevli **L_{1c}Pt-Bis**, **L_{2a}Pt-Bis**, **EK-24** ve **EK-25** ajanlarının 24. Saatten itibaren anti-proliferatif etkisinin olduğu saptandı. Daha sonra bu ajanların farklı alt konsantrasyonları ile her birinin IC₅₀ değerleri tespit edildi.

Elde edilen sonuçlara göre **L_{1c}Pt-Bis**, **L_{2a}Pt-Bis**, **EK-24**, **EK-25** ajanları ile tedavi sonrasında 24. saatten itibaren MCF-12A hücrelerine oranla MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunun daha fazla baskılandığı görüldü. **L_{1c}Pt-Bis** ve **L_{2a}Pt-Bis** komplekslerinin ise PC-3 ve LNCaP hücrelerinde HEK293 hücrelerine oranla daha fazla hücre proliferasyonunu baskılandığı tespit edildi. HeLa hücrelerinde ise **L_{1c}Pt-Bis** ve **L_{2a}Pt-Bis** muamelesinden sonra 24. saatte HEK293 hücrelerine kıyasla anti-proliferatif etki görülmediği için çalışmanın devamında HeLa hücreleri kullanılmadı. 24 saat **L_{1c}Pt-Bis** ile tedavi sonrasında, MCF12-A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri için IC₅₀ değerleri sırasıyla 16.3, 19 ve 9.8 μM olarak tespit edilirken, HEK293, PC-3 ve LNCaP hücreleri için 24, 10.2 ve 29 μM olarak tespit edildi. 24 saat **L_{2a}Pt-Bis** ile muameleden sonra, MCF12-A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri için IC₅₀ değerleri sırasıyla 16.7, 13.6 ve 17 μM olarak tespit edilirken, HEK293, PC-3 ve LNCaP hücreleri için 10.4, 24 ve 19.4 μM olarak saptandı. **EK-24**, 24 saat uygulandığında IC₅₀ değerleri MCF12-A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri için sırasıyla 14.1, 10.6 ve 12.7 μM olarak tespit edilirken, **EK-25** için bu değerler 13.9, 8.1 ve 5.3 μM olarak saptandı. Literatürde bulunan farklı çalışmalarda, cisplatinin 24 saat in vitro uygulamasından sonra IC₅₀ değerleri MCF12-A, MCF-7, MDA-MB-231, HEK293, PC-3 ve LNCaP hücrelerinde sırasıyla 1.1, 14.1, 82, 7.8, 75, 85.8 μM olarak tespit edilmiştir [124, 125, 126, 127, 128, 129]. Çalışmalarda bulunan IC₅₀ değerleri arasındaki farklılıklar, hücre hatları arasındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır.

Apoptoz, istenmeyen veya potansiyel olarak zararlı hücreleri ortadan kaldırarak normal hücresel homeostazın korunması için gerekli olan sıkı bir şekilde düzenlenmiş hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptotik yollardaki düzensizlikler, kanser dahil çeşitli patolojik durumlarla ilişkilidir [130]. Apoptoz, platin türevli antikanser ilaçlar

için ana yolaklardan biridir [51]. Yapılan çalışmalarda cisplatinin apoptoz yoluyla hücre ölümünü indüklediği ve apoptotik yolaklardaki bir kusurun da cisplatin direncine neden olabileceği gösterilmiştir [51]. Her bir hücre için hesaplanan IC₅₀ değeri ile tedavi sonrasında **L_{1c}Pt-Bis**, meme kanseri hücrelerinde apoptotik ve nekrotik bir yanıt başlatmadığı, aksine kontrol hücrelerinde önemli ölçüde apoptozu uyardığı tespit edildi. HEK293, PC-3 ve LNCaP hücrelerinde **L_{1c}Pt-Bis** tedavisi, nekrotik bir yanıt başlatmadan apoptozu teşvik ederek tüm hücre dizilerinde apoptozu önemli ölçüde artırdı. Fakat kontrol hücre grubundaki apoptoz oranındaki artışın kanser hücrelerine kıyasla daha fazla olduğu görüldü. HEK293, PC-3 ve LNCaP hücreleri cisplatin ile muamele edildiğinde ise apoptotik yanıt oluşmadan, sadece LNCaP hücrelerinde nekrotik yanıt görüldü. **L_{2a}Pt-Bis** bütün hücrelerde kontrol gruplarına kıyasla canlılığın azalmasına sebep olurken, bütün hücrelerde kontrol gruplarına kıyasla apoptozu teşvik etti. Kanser hücrelerinde **L_{2a}Pt-Bis** cisplatine kıyasla apoptozun artmasına daha çok sebep olurken, sağlıklı hücre gruplarında benzer etkiler görüldü. Cisplatin sağlıklı hücre gruplarında nekroz yolağını etkilerken **L_{2a}Pt-Bis**'in hem MCF-12A hem de MCF-7 hücrelerinde nekroz yolağını etkilemediği tespit edildi. MDA-MB-231 hücrelerinde ise cisplatin **L_{2a}Pt-Bis**'e kıyasla daha az nekrozu uyardı. **EK-24** muamelesi sonrasında MCF-12A ve MCF-7 hücrelerinde apoptoz oranı cisplatine kıyasla artarken, MDA-MB-231 hücrelerinde sadece cisplatinin apoptozu indüklediği görüldü. **EK-25** ise sağlıklı hücre gruplarında apoptoz yolağını tetiklerken kanser hücrelerinde bu etkinin görülmediği, buna karşın cisplatinin apoptoza neden olduğu saptandı. MCF-7 hücrelerinde ise hem sağlıklı hücre grubunda hem de cisplatinle muamele edilenlere göre nekrozu artırdığı saptandı. Hem **L_{1c}Pt-Bis** hem de **EK-25**'in kontrol gruplarına kıyasla meme kanseri gruplarında apoptozu başlatmada etkili olmadığı saptanırken nekroz yolağını cisplatine kıyasla MCF-7 hücrelerinde sadece **EK-25** uyardı. Platin türevleri arasındaki karşılaştırmalar sonucunda, **L_{2a}Pt-bis** tedavisinin cisplatine ve kontrol hücre gruplarına kıyasla apoptozu indüklemeye açısından en etkili olduğu tespit edildi.

Hücre döngüsü akım sitometrisi analizi, hücrelerin G0/G1 (replikasyon öncesi hücreler), S (bölünen hücreler) ve G2/M (post replikatif ve mitotik hücreler) boyunca sahip olduğu DNA miktarındaki farklılıklara dayanmaktadır. Apoptoz ve hücre döngüsü duraksaması çeşitli yollarla birbirine bağlanan iki prosestir. G2/M fazı duraksaması, apoptozun uyarılması için olası mekanizmalardan biridir. Öte yandan, G0/G1 fazının duraksaması ise genellikle hücrelerin çoğalmasını durdurur, ancak

hücrelere, antikanser ajanların neden olduğu kusurları onarma olanağı sağlar [131]. S-fazındaki hücre döngüsü duraksaması ise, tümör hücrelerinde DNA sentezinin inhibe edilebileceğini düşündürür. Bazı kompleksler tarafından indüklenen S-fazında hücre döngüsü durmasının, DNA hasarı aracılı p53 fosforilasyonuna bağlanabileceği bildirilmiştir [132]. Daha önce yapılan çalışmalarda cisplatin ve platin türevli ajanların, farklı hücre hatları üzerinde G1/G0 [133, 134], S [135] ve G2/M [136, 137] fazlarında hücre döngüsü duraksamasını indüklediği gösterildi. Bu çalışmada da cisplatinin MCF-7 hariç diğer hücre hatlarında G2/M fazında duraksamaya, MCF-7 hücresinde ise S fazı duraksamasına neden olduğu görüldü. Yeni sentezlenen platin (II) komplekslerinden **EK-24** ve **EK-25**'in sağlıklı hücre grubu MCF-12A ve kemoterapi dirençli meme kanseri MDA-MB-231 hücre hatlarında G2/M fazı duraksamasını indüklediği görüldü. **L_{1c}Pt-Bis** MCF-12A hücre grubunda S fazı duraksamasına neden olurken, HEK293, MCF-7 ve PC-3 hücrelerinde G1/G0, MDA-MB-231 ve LNCaP hücrelerinde ise G2/M fazı duraksamasını teşvik ettiği tespit edildi. **L_{2a}Pt-Bis** ise MCF-12A hücrelerinde G2/M duraksamasına neden olurken MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde G1/G0 fazı duraksamasına neden olduğu saptandı. **L_{2a}Pt-Bis** kompleksinin sağlıklı hücre grubu HEK293 ve androjene duyarsız prostat kanseri hücre hattı PC-3 hücrelerinde hücre döngüsü duraksamasını indüklediği görüldü. **L_{2a}Pt-Bis** ile tedavi sonrasında androjen-bağımlı prostat kanseri hücre hattı LNCaP hücrelerinde ise G2/M duraksamasının indüklendiği görüldü. Aynı kompleksin farklı hücre hatlarında test edilmesi sonucunda, hücre döngüsü kontrol noktası proteinleri kanserde yaygın olarak düzensiz olduğundan farklı sonuçlara yol açabilmektedir [138].

γ -H2AX'ın (fosforile edilmiş histon H2A varyantı) immünofloresan analizi, DNA'daki çift zincir kırıklarının (DSB'ler) hem görselleştirilmesi hem de nicelenmesi için yaygın olarak kullanılan bir araçtır [139, 140, 141, 142]. Literatürde yer alan çalışmalarda platin türevli ajanlar, serin 139 (γ -H2AX) üzerinden H2AX fosforilasyonunu uyarır [143]. γ -H2AX oluşumu, DNA onarım aktivitelerinin koordinasyonu için önemli olan DNA hasarındaki en erken kromatin modifikasyon olaylarından biridir [144]. **L_{1c}Pt-Bis**'in **L_{2a}Pt-Bis** ve **EK-24** ajanlarının hem cisplatine hem de sağlıklı hücrelere kıyasla DNA hasarını önemli ölçüde indüklediği konfokal mikroskop kullanılarak görülürken sadece **L_{2a}Pt-Bis** ile tedavi edilen LNCaP hücrelerinde cisplatine kıyasla daha az DNA hasarı tespit edildi. MCF-7 hücreleri hem **EK-25** hem de cisplatin ile tedavi edildiğinde DNA hasarı görülmezken, kemoterapi

dirençli hücre dizisi MDA-MB-231’de cisplatine kıyasla DNA hasarının daha fazla indüklendiği saptandı. Literatürdeki bilgilere göre hücre döngüsünün duraksaması ve apoptozun aktivasyonu, DNA hasarına verilen hücrel tepkilerdir [145]. Hücre döngüsü duraksaması ve artan apoptoz ile açıkça ilişkili olan ajanların hücrelere uygulanmasını tedavisini takiben γ -H2AX'te belirgin bir artış gözlemlendi.

Kanserle tedavide hücre göçünü hedeflemek, kanserin metastatik yayılmasını kontrol etmek için destekleyici bir strateji sunabilir. Bu nedenle, platin türevli komplekslerin hücre göçü ve *in vitro* invazyon üzerindeki etkisi bu çalışmada incelendi. Üçlü negatif meme kanseri MDA-MB-231, PC-3 ve LNCaP invaziv ve metastatik nitelikte olduğundan [146, 147], platin türevli komplekslerin, hücrel migrasyon ve invazyon davranışı üzerindeki etkilerini bu hücrelerde araştırdık. Sonuçlarımız platin türevli ajanların tedavisinin agresif meme kanseri MDA-MB-231, androjene duyarsız prostat kanseri PC-3 ve androjene duyarlı prostat kanseri LNCaP hücreleri üzerinde doğrudan bir etkisi olduğunu gösterdi. **L_{2a}Pt-Bis**, **EK-24** ve **EK-25** ajanlarının tedavisinin MDA-MB-231 hücrelerinin göçünü ve invazyonunu baskıladığı görüldü. **L_{1c}Pt-Bis** tedavisinin ise sadece hücre göçünü inhibe ettiği fakat hücre invazyonuna etkisinin olmadığı tespit edildi. LNCaP hücreleri AR (androjen reseptör) için pozitifdir, hormona duyarlıdır ve düşük metastatik potansiyele sahiptir. PC-3 hücreleri ise, AR için negatif, hormona dirençlidir ve daha yüksek metastatik ve malign özelliklere sahiptir [147]. Bu nedenle **L_{2a}Pt-Bis** ajanının hem hücre migrasyonunu hem de invazyonunu LNCaP hücrelerinde PC-3 hücrelerinden daha düşük konsantrasyonlarda, daha fazla inhibe edildiği tespit edildi.

Yapılan tüm bu çalışmalar ile yeni sentezlenen imidazolidindion türevli platin (II) komplekslerinin meme ve prostat kanseri hücre hatlarına farklı etkiler gösterdiği saptandı. Bununla birlikte, özellikle **L_{2a}Pt-Bis**’in hücre proliferasyonunu düşürdüğü, sağlıklı hücre grubuna kıyasla meme kanseri hücrelerinde apoptozu ve DNA hasarını indüklediği ve cisplatinden daha fazla apoptotik etki gösterdiği açıkça görülmektedir. Ayrıca hücre döngüsünde duraksamaya neden olurken, hücrelerin migrasyon ve invazyon kapasitesini de önemli ölçüde azalttığı tespit edildi. Sonuç olarak, en sık görülen kanser türü olan meme kanseri ve farklı alt tiplerinde bu platin (II) türevinin etkinliği *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiş olup, **L_{2a}Pt-Bis**’in meme kanseri tedavisine yönelik öncül ilaç adayı olabileceği düşünülmüştür. *in vivo* tümör modellerinde gerçekleştirilecek ileri çalışmalar ile bu kompleksin bir ilaç adayı olarak etkinliğinin ve değerliliğinin daha iyi anlaşılabilmesi mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Web 1, (2020), <http://globocan.iarc.fr/>, (Erişim Tarihi: 25.06.2021).

- [2] Anand P., Kunnumakkara A. B., Sundaram C., Harikumar K. B., Tharakan S. T., Lai O. S., Sung B., Aggarwal B. B., (2008), "Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes", *Pharmaceutical Research*, 25 (9), 2097-116.
- [3] Web 2, (2021), <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>, (Erişim Tarihi: 05.05.2021).
- [4] Lemmon M. A., Schlessinger J., (2010), "Cell signaling by receptor tyrosine kinases", *Cell*, 141 (7), 1117-34.
- [5] Witsch E., Sela M., Yarden Y., (2010), "Roles for growth factors in cancer progression", *Physiology (Bethesda)*, 25 (2), 85-101.
- [6] Burkhardt D. L., Sage J., (2008), "Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene", *Nature Reviews Cancer*, 8 (9), 671-82.
- [7] Deshpande A., Sicinski P., Hinds P. W., (2005), "Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective", *Oncogene*, 24 (17), 2909-15.
- [8] Junttila M. R., Evan G. I., (2009), "p53—a Jack of all trades but master of none", *Nature Reviews Cancer*, 9 (11), 821-9.
- [9] Ince T. A., Richardson A. L., Bell G. W., Saitoh M., Godar S., Karnoub A. E., Iglehart J. D., Weinberg R. A., (2007), "Transformation of different human breast epithelial cell types leads to distinct tumor phenotypes", *Cancer Cell*, 12 (2), 160-70.
- [10] Artandi S. E., DePinho R. A., (2010), "Telomeres and telomerase in cancer", *Carcinogenesis*, 31 (1), 9-18.
- [11] Ferrara N., (2009), "Vascular endothelial growth factor", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29 (6), 789-91.
- [12] Curto M., Cole B. K., Lallemand D., Liu C. H., McClatchey A. I., (2007), "Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin", *Journal of Cell Biology*, 177 (5), 893–903.
- [13] Hanahan D., Weinberg R. A., (2011), "Hallmarks of cancer: the next generation", *Cell*, 144 (5), 646-674.
- [14] Malmström P., Holmberg L., Anderson H., Mattsson J., Jönsson P. E., Tennvall-Nittby L., Balldin G., Lovén L., Svensson J. H., Ingvar C., Möller T., Holmberg E., Wallgren A., (2003), "Breast conservation surgery, with and without radiotherapy, in women with lymph node-negative breast cancer: a randomized clinical trial in a population with access to public mammography screening", *European Journal of Cancer*, 39 (12), 1690-7.
- [15] Bhosle J., Hall G., (2009), "Principles of cancer treatment by chemotherapy", *Surgery Oxford*, 27 (4), 173-177.

- [16] Schmidt S., Rainer J., Ploner C., Presul E., Riml S., Kofler R., (2004) "Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance", *Cell Death and Differentiation*, 11, 45-55.
- [17] Sharma P., Wagner K., Wolchok J. D., Allison J. P., (2011), "Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps", *Nature Reviews Cancer*, 11 (11), 805-12.
- [18] Waldmann T. A., (2003), "Immunotherapy: Past, present and future", *Nature Medicine*, 9 (3), 269-77.
- [19] Farkona S., Diamandis E. P., Blasutig I. M., (2016), "Cancer immunotherapy: The beginning of the end of cancer?", *BMC Medicine*, 5, 14:73.
- [20] Marin-Acevedo J. A., Dholaria B., Soyano A. E., (2018), "Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges", *Journal of Hematology & Oncology* volume, 15, 11 (1):39.
- [21] Schreiber R. D., Old L. J., Smyth M. J., (2011), "Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion", *Science*, 331 (6024), 1565-70.
- [22] Baskar R., Lee K. A., Yeo R., Yeoh K. W., (2012), "Cancer and radiation therapy: current advances and future directions", *International Journal of Medical Sciences*, 9 (3), 193-9.
- [23] Goldblum J. R., Weiss S. W., Folpe A. L., (2013), "Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors E-Book", Elsevier Health Sciences.
- [24] Røsland G. V., Engelsen A. S. T., (2015), "Novel points of attack for targeted cancer therapy", *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 116 (1), 9-18.
- [25] Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V. E., Zhou S., Diaz L. A., Kinzler K. W., (2013), "Cancer genome landscapes", *Science*, 339 (6127), 1546-58.
- [26] De Palma M., Hanahan D., (2012), "The biology of personalized cancer medicine: facing individual complexities underlying hallmark capabilities", *Molecular Oncology*, 6 (2), 111-27.
- [27] Padma V. V., (2015), "An overview of targeted cancer therapy", *Biomedicine (Taipei)*, 5 (4), 19.
- [28] Chabner B. A., Roberts Jr T. G., (2005), "Chemotherapy and the war on cancer", *Nature Reviews Cancer*, 5 (1), 65-72.
- [29] DeVita V. T., Chu E., (2008), "A history of cancer chemotherapy", *Cancer Research*, 68 (21), 8643-8653.
- [30] Rodgers G. M., (2012) "Cancer-and chemotherapy-induced anemia", *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 10 (5), 628-653.

- [31] Bertram K., Susan. M., Antony T., (2009), "Basic and Clinical Pharmacology", 11th Edition. McGraw-Hill Medical Company.
- [32] Patrick G. L., (2008), "An Introduction to Medicinal Chemistry", 4th Edition. Oxford university press.
- [33] Rosenberg B., Van Camp L., Krigas T., (1965), "Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Eletrolysis Products from a Platinum Electrode", *Nature*, 13;205:698-9.
- [34] Rosenberg B., VanCamp L., Trosko J. E., Mansour V. H., (1969), "Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents", *Nature*, 222 (5191), 385-386.
- [35] Johnstone T. C., Wilson J. J., Lippard S. J., (2013), "Monofunctional and higher-valent platinum anticancer agents", *Inorganic Chemistry*, 52 (21), 12234–49.
- [36] Cvitkovic E., (1998), "Cumulative toxicities from cisplatin therapy and current cytoprotective measures", *Cancer Treatment Reviews*, 24 (4), 265–281.
- [37] Wheate N. J., Walker S., Craig G. E., Oun R., (2010), "The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials", *Dalton Transactions*, 39 (35), 8113-27.
- [38] Yang Q., S. Q., Yu J., (2012), "Cellular and Clinical Sudies of Dicycloplatin, a New Platinum Compound Approved by Chinese FDA for Prostate Cancer Chemotherapy", 11th Edition. International Symposium on Platinum Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy, Verona, Italy, p 35.
- [39] Aris S. M., Farrell N. P., (2009) "Towards Antitumor Active trans-Platinum Compounds", *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2009 (10), 1293-1302.
- [40] Kelland L., (2007), "The Resurgence of Platinum-based Cancer Chemotherapy", *Nature Reviews*, 7 (8), 573-584.
- [41] Fuertes M. A., Alonso C., Perez J. M., (2003), "Biochemical Modulation of Cisplatin Mechanisms of Action: Enhancement of Antitumor Activity and Circumvention of Drug Resistance", *Chemical Reviews*, 103 (3), 645-662.
- [42] Fuertes M. A., Castilla J., Alonso C., Pérez J.M., (2002), "Novel concepts in the development of platinum antitumor drugs", *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 5 2 (4), 539-51.
- [43] Laura A., Sara G., Valeria G., Milvia C., Edi S., Elena O., Giorgio L., Alessandro M., (2013), "Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: A retrospective evaluation", *Oncology Reports*, 29 (4), 1285–1292.

- [44] Ghosh S., (2019), "Cisplatin: The first metal based anticancer drug" *Bioorganic Chemistry*, 88:102925.
- [45] Rebecca A. A., Matthew D. H., Trevor W. H., (2006), "The discovery and development of cisplatin", *Journal of Chemical Education*, 83 (5), 728–734.
- [46] Nagai N., Okuda R., Kinoshita M., Ogata H., (1996), "Decomposition kinetics of cisplatin in human biological fluids", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 48 (9), 918-24.
- [47] Ivanov A. I., Christodoulou J., Parkinson J. A., Barnham K. J., Tucker A., Woodrow J., Sadler P. J., (1998), "Cisplatin binding sites on human albumin", *Journal of Biological Chemistry*, 273 (24), 14721–30.
- [48] Marija P., Danijela T., (2016), "Biochemical and molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer cells", *Medicine and Biology*, 18 (1), 12–18.
- [49] Gately D. P., Howell S. B., (1993), "Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review", *British Journal of Cancer*, 67 (6), 1171–1176.
- [50] Davies M. S., Berners-Price S. J., Hambley T. W., (2000), "Slowing of cisplatin aquation in the presence of DNA but not in the presence of phosphate: improved understanding of sequence selectivity and the roles of mono-aquated and diaquated species in the binding of cisplatin to DNA", *Inorganic Chemistry*, 39 (25), 5603-13.
- [51] Dasari S., Tchounwou P. B., (2014), "Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action", *European Journal of Pharmacology*, 5 740, 364-78.
- [52] Brozovic A., Ambriović-Ristov A., Osmak M., (2010), "The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin", *Critical Reviews in Toxicology*, 40 (4), 347-59.
- [53] Saad S. Y., Najjar T. A., Alashari M., (2005), "Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin induced nephrogonadal toxicity in rats", *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 31 (12), 862-7.
- [54] Kroemer G., Zamzami N., Susin S. A., (1997) "Mitochondrial control of apoptosis", *Immunology Today*, 18 (1), 44–51.
- [55] Green D. R., (1998), "Apoptotic pathways: the roads to ruin.", *Cell* 94 (6), 695–698.
- [56] Reed J. C., (2002), "Apoptosis-based therapies", *Nature Reviews Drug Discovery*, 1 (2), 111–121.
- [57] Elmore S., (2007), "Apoptosis: a review of programmed cell death", *Toxicologic Pathology*, 35 (4), 495–516.

- [58] Zorbas H., Keppler B. K., (2005), "Cisplatin damage: are DNA repair proteins saviors or traitors to the cell?", *ChemBioChem*, 6 (7), 1157–1166.
- [59] Rabik C. A., Dolan M. E., (2007), "Molecular mechanism of resistance and toxicity associated with platinating agents", *Cancer Treatment Reviews*, 33 (1), 9–23.
- [60] Fichtinger-Schepman A. M., van der Veer J. L., den Hartog J. H., Lohman P. H., Reedijk J., (1985), "Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation", *Biochemistry*, 24 (3), 707–713.
- [61] Oun R., Moussa Y. E., Wheate N.J., (2018), "The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists", *Dalton Transactions*, 47 (19), 6645-6653.
- [62] Baik M. H., Friesner R. A., Lippard S. J., (2003), "Theoretical study of cisplatin binding to purine bases: why does cisplatin prefer guanine over adenine?" *Journal of the American Chemical Society*, 125 (46), 14082–14092.
- [63] Cepeda V., Fuertes M. A., Castilla J., Alonso C., Quevedo C., Pérez J. M., (2007), "Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity." *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 7 (1), 3-18.
- [64] Rebillard A., Lagadic-Gossman D., Dimanche-Boitrel M. T., (2008), "Cisplatin cytotoxicity: DNA and plasma membrane targets", *Current Medicinal Chemistry*, 15 (26), 2656–2663.
- [65] Lin X., Okuda T., Holzer A., Howell S. B., (2002), "The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*", *Molecular Pharmacology*, 62 (5), 1154-9.
- [66] Imamura T., Izumi H., Nagatani G., Ise T., Nomoto M., Iwamoto Y., Kohno K., (2001), "Interaction with p53 enhances binding of cisplatin-modified DNA by high mobility group 1 protein", *Journal of Biological Chemistry*, 276 (10), 7534–7540.
- [67] Zamble D. B., Mikata Y., Eng C. H., Sandman K. E., Lippard S. J., (2002), "Testis-specific HMG-domain protein alters the responses of cells to cisplatin", *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91 (3), 451–462.
- [68] Brown S. J., Kellett P. J., Lippard S. J., (1993), "Ixr1, a yeast protein that binds to platinated DNA and confers sensitivity to cisplatin", *Science* 261 (5121), 603–605.
- [69] Moggs J. G., Szymkowski D. E., Yamada M., Karran P., Wood R. D., (1997), "Differential human nucleotide excision repair of paired and mispaired cisplatin-DNA adducts", *Nucleic Acids Research*, 25 (3), 480–491.
- [70] Reardon J. T., Vaisman A., Chaney S. G., Sancar A., (1999), "Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and Bis-aceto-amine-dichloro-cyclohexylamineplatinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts", *Cancer Research*, 59 (16), 3968–3971.

- [71] Vaisman A., Varchenko M., Umar A., Kunkel T. A., Risinger J. I., Barrett J. C., Hamilton T. C., Chaney S. G., (1998), "The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts", *Cancer Research*, 58 (16), 3579–3585.
- [72] Wagner J. M., Karnitz L. M., (2009), "Cisplatin-induced DNA damage activates replication checkpoint signaling components that differentially affect tumor cell survival", *Molecular Pharmacology*, 76 (1), 208–214.
- [73] Pabla N., Huang S., Mi Q. S., Daniel R., Dong Z., (2008), "ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis", *Journal of Biological Chemistry*, 283 (10), 6572–6583.
- [74] Shen H., Perez R. E., Davaadelger B., Maki C. G., (2013) "Two 4N cell-cycle arrests contribute to cisplatin-resistance", *PLoS ONE*, 8 (4), e59848.
- [75] Lane D. P., (1992), "Cancer. p53, guardian of the genome", *Nature*, 358 (6381), 15–16.
- [76] Damia G., Filiberti L., Vikhanskaya F., Carrassa L., Taya Y., D'incalci M., Broggin M., (2001), "Cisplatin and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation", *Neoplasia* 3 (1), 10–16.
- [77] Appella E., Anderson C. W., (2001), "Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses", *European Journal of Biochemistry*, 268 (10), 2764–2772.
- [78] Basu A., Krishnamurthy S., (2010), "Cellular responses to cisplatin-induced DNA damage", *J. Nucleic Acids*, 8, 2010, 201367.
- [79] Jeffers J. R., Parganas E., Lee Y., Yang C., Wang J., Brennan J., MacLean K. H., Han J., Chittenden T., Ihle J. N., McKinnon P. J., Cleveland J. L., Zambetti G. P., (2003), "Puma is an essential mediator of p53-dependent and –independent apoptosis pathways", *Cancer Cell*, 4 (4), 321–328.
- [80] Lin Y., Ma W., Benchimol S., (2000), " Pidd a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis", *Nature Genetics*, 26 (1), 122–127.
- [81] Makin G. W., Corfe B. M., Griffiths G. J., Thistlethwaite A., Hickman J. A., Dive C., (2001), " Damage-induced Bax N-terminal change, translocation to mitochondria and formation of Bax dimers/complexes occur regardless of cell fate.", *The EMBO Journal*, 20 (22), 6306–6315.
- [82] Muggia F. M., Los G., (1993), "Platinum resistance: laboratory findings and clinical implications", *Stem Cells*, 11 (3), 182–193.

- [83] Florea A. M., Büsselberg D., (2011), "Cisplatin as an anti-tumor drug: Cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects", *Cancers*, 3 (1), 1351–1371.
- [84] Brabec V., Kasparkova J., (2005), "Modifications of DNA by platinum complexes. Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs", *Drug Resistance Updates*, 8 (3), 131–146.
- [85] Sedletska Y., Giraud-Panis M. J., Malinge J. M., (2005), "Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways", *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*, 5 (3), 251–265.
- [86] Kartalou M., Essigmann J. M., (2001), "Mechanisms of resistance to cisplatin", *Mutation Research*, 478 (1-2), 23–43.
- [87] Lempers E. L. M., Reedijk J., (1991), "Interactions of platinum amine compounds with sulfur-containing biomolecules and DNA fragments", *Advances in Inorganic Chemistry*, 37, 175–217.
- [88] Wang K., Lu J., Li R., (1996), "The events that occur when cisplatin encounters cells", *Coordination Chemistry Reviews*, 151, 53–88.
- [89] Nakayama K., Miyazaki K., Kanzaki A., Fukumoto M., Takebayashi Y., (2001), "Expression and cisplatin sensitivity of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) in human solid carcinoma cell lines", *Oncology Reports*, 8 (6), 1285–1287.
- [90] Uchiumi T., Hinoshita E., Haga S., Nakamura T., Tanaka T., Toh S., Furukawa M., Kawabe T., Wada M., Kagotani K., Okumura K., Kohno K., Akiyama S., Kuwano M., (1998), "Isolation of a novel human canalicular multispecific organic anion transporter, cMOAT2/MRP3, and its expression in cisplatin-resistant cancer cells with decreased ATP-dependent drug transport", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 252 (1), 103–110.
- [91] Ishikawa T., Wright C.D., Ishizuka H., (1994), "GS-X pump is functionally overexpressed in cis-diamminedichloroplatinum (II)-resistant human leukemia HL-60 cells and down-regulated by cell differentiation", *Journal of Biological Chemistry*, 269 (46), 29085–29093.
- [92] Wang W., Ballatori N., (1998), "Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions", *Pharmacological Reviews*, 50 (3), 335–356.
- [93] Wood R. D., Araújo S. J., Ariza R. R., Batty D. P., Biggerstaff M., Evans E., Gaillard P. H., Gunz D., Köberle B., Kuraoka I., Moggs J. G., Sandall J. K., Shivji M. K., (2000), "DNA damage recognition and nucleotide excision repair in mammalian cells", *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 65, 173–182.

- [94] Gillet L. C., Schärer O. D., (2006), "Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair", *Chemical Reviews*, 106 (2), 253–276.
- [95] Selvakumaran M., Pisarcik D. A., Bao R., Yeung A. T., Hamilton T. C., (2003), "Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines", *Cancer Research*, 63 (6), 1311–1316.
- [96] Galluzzi L., Senovilla L., Vitale I., Michels J., Martins I., Kepp O., Castedo M., Kroemer G., (2012), "Molecular mechanisms of cisplatin resistance", *Oncogene*, 31 (15), 1869-83.
- [97] Pogribny I. P., Filkowski J. N., Tryndyak V. P., Golubov A., Shpyleva S. I., Kovalchuk O., (2010), "Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin", *International Journal of Cancer*, 127 (8), 1785–1794.
- [98] Johnstone T. C., Suntharalingam K., Lippard S. J., (2016), "The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs", *Chemical Reviews*, 116 (5), 3436-86.
- [99] Wilson J. J., Lippard S. J., (2014), "Synthetic methods for the preparation of platinum anticancer complexes", *Chemical Reviews*, 114 (8), 4470-95.
- [100] Farrell N., Kelland L. R., Roberts J. D., Van Beusichem M., (1992), "Activation of the trans geometry in platinum antitumor complexes: a survey of the cytotoxicity of trans complexes containing planar ligands in murine L1210 and human tumor panels and studies on their mechanism of action" *Cancer Research*, 52 (18), 5065-72.
- [101] Roy S., Westmaas J. A., Buda F., Reedijk J., (2009), "Platinum(II) compounds with chelating ligands based on pyridine and pyrimidine: synthesis, characterizations, DFT calculations, cytotoxic assays and binding to a DNA model base" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103 (9), 1278-87.
- [102] Gümüş F., Eren G., Açık L., Celebi A., Oztürk F., Yilmaz S., Sagkan R. I., Gür S., Ozkul A., Elmalı A., Elerman Y., (2009), "Synthesis, cytotoxicity, and DNA interactions of new cisplatin analogues containing substituted benzimidazole ligands" *Journal of Medicinal Chemistry*, 52 (5), 1345-57.
- [103] Massai L., Pratesi A., Bogojeski J., Banchini M., Pillozzi S., Messori L., Bugarčić Ž. D., (2016), "Antiproliferative properties and biomolecular interactions of three Pd(II) and Pt(II) complexes" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 165, 1-6.
- [104] Şahin Ö., Özdemir Ü. Ö., Seferoğlu N., Genc Z. K., Kaya K., Aydın B., Tekin S., Seferoğlu Z., (2018), "New platinum (II) and palladium (II) complexes of coumarin-thiazole Schiff base with a fluorescent chemosensor properties: Synthesis, spectroscopic characterization, X-ray structure determination, in vitro anticancer activity on various human carcinoma cell lines and computational studies", *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 178, 428-439.

- [105] Budzisz E., Krajewska U., Rozalski M., Szulawska A., Czyz M., Nawrot B., (2004), "Biological evaluation of novel Pt(II) and Pd(II) complexes with pyrazole-containing ligands", *European Journal of Pharmacology*, 502 (1-2), 59-65.
- [106] Keter F. K., Kanyanda S., Lyantagaye S. S., Darkwa J., Rees D. J., Meyer M., (2008), "In vitro evaluation of dichloro-bis(pyrazole)palladium(II) and dichloro-bis(pyrazole)platinum(II) complexes as anticancer agents", *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63 (1), 127-38.
- [107] Ruiz M. C., Resasco A., Di Virgilio A. L., Ayala M., Cavaco I., Cabrera S., Aleman J., León I. E., (2019), "In vitro and in vivo anticancer effects of two quinoline-platinum(II) complexes on human osteosarcoma models", *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 83 (4), 681-692.
- [108] Serebryanskaya T. V., Yung T., Bogdanov A. A., Shchebet A., Johnsen S. A., Lyakhov A. S., Ivashkevich L. S., Ibrahimova Z. A., Garbuzenco T. S., Kolesnikova T. S., Melnova N. I., Gaponik P. N., Ivashkevich O. A., (2013) "Synthesis, characterization, and biological evaluation of new tetrazole-based platinum(II) and palladium(II) chlorido complexes--potent cisplatin analogues and their trans isomers", *Journal of Inorganic Biochemistry*, 120, 44-53.
- [109] Rajic Z., Zorc B., Raic-Malic S., Ester K., Kralj M., Pavelic K., Balzarini J., De Clercq E., Mintas M., (2006), "Hydantoin derivatives of L- and D-amino acids: synthesis and evaluation of their antiviral and antitumoral activity", *Molecules*, 11 (11), 837-48.
- [110] Alanazi A. M., El-Azab A. S., Al-Swaidan I. A., (2013), "Synthesis, single-crystal, in vitro antitumor evaluation and molecular docking of 3-substitued 5,5-diphenylimidazolidine-2,4-dione derivatives", *Medicinal Chemistry Research*, 22, 6129–6142.
- [111] Parthiban P., Pallela R., Kim S. K., Park D. H., Jeong Y. T., (2011), "Synthesis of polyfunctionalized piperidone oxime ethers and their cytotoxicity on HeLa cells", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21 (22), 6678-86.
- [112] Sallam A. A., Mohyeldin M. M., Foudah A. I., Akl M. R., Nazzal S., Meyer S. A., Liu Y. Y., El Sayed K. A., (2014), "Marine natural products-inspired phenylmethylen hydantoins with potent in vitro and in vivo antitumor activities via suppression of Brk and FAK signaling", *Organic and Biomolecular Chemistry*, 12 (28), 5295-303.
- [113] Vinaya K., Kavitha R., Ananda Kumar C. S., Benaka Prasad S. B., Chandrappa S., Deepak S. A., Nanjunda Swamy S., Umesha S., Rangappa K. S., (2009), "Synthesis and antimicrobial activity of 1-benzhydryl-sulfonyl-4-(3-(piperidin-4-yl) propyl)piperidine derivatives against pathogens of *Lycopersicon esculentum*: a structure-activity evaluation study", *Archives of Pharmacal Research*, 32 (1), 33-41.
- [114] Peretto I., Forlani R., Fossati C., Giardina G. A., Giardini A., Guala M., La Porta E., Petrillo P., Radaelli S., Radice L., Raveglia L. F., Santoro E., Scudellaro R.,

- Scarpitta F., Bigogno C., Misiano P., Dondio G. M., Rizzi A., Armani E., Amari G., Civelli M., Villetti G., Patacchini R., Bergamaschi M., Delcanale M., Salcedo C., Fernández A. G., Imbimbo B. P., (2007), "Discovery of diaryl imidazolidin-2-one derivatives, a novel class of muscarinic M3 selective antagonists (Part 1)", *Journal of Medicinal Chemistry*, 50 (7), 1571-83.
- [115] Kus C., Sözüdönmez F., Altanlar N., (2009), "Synthesis and antimicrobial activity of some novel 2-[4-(substituted piperazin-/piperidin-1-ylcarbonyl)phenyl]-1H-benzimidazole derivatives", *Arch Pharm (Weinheim)*, 342 (1), 54-60.
- [116] Trasi N. S., Fanwick P. E., Taylor L. S., (2012), "Nilutamide", *Acta Crystallogr Section E*, 68 (Pt 3), o591.
- [117] Girgis A. S., (2009), "Regioselective synthesis and stereochemical structure of anti-tumor active dispiro[3H-indole-3,2'-pyrrolidine-3',3"-piperidine]-2(1H),4"-diones", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44 (3), 1257-64.
- [118] Salerno D., Beretta G. L., Zanchetta G., Brioschi S., Cristofalo M., Missana N., Nardo L., Cassina V., Tempestini A., Giovannoni R., Cerrito M.G., Zaffaroni N., Bellini T., Mantegazza F., (2016), "Platinum-Based Drugs and DNA Interactions Studied by Single-Molecule and Bulk Measurements", *Biophysical Journal*, 110 (10), 2151-61.
- [119] Agnieszka G., Ewa A., Anna B., Krzysztof B., Monika C., Elżbieta S., (2014), "Dinuclear berenil-platinum (II) complexes as modulators of apoptosis in human MCF-7 and MDA-MB231 breast cancer cells", *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 14 (8), 1179-86.
- [120] Ma J., Wang Q., Yang X., Hao W., Huang Z., Zhang J., Wang X., Wang PG., (2016), "Glycosylated platinum(IV) prodrugs demonstrated significant therapeutic efficacy in cancer cells and minimized side-effects", *Dalton Transactions journal*, 45 (29), 11830-8.
- [121] Kaluđerović G. N., Mijatović S. A., Zmejkovski B. B., Bulatović M. Z., Gómez-Ruiz S., Mojić M. K., Steinborn D., Miljković D. M., Schmidt H., Stošić-Grujičić S. D., Sabo T. J., Maksimović-Ivanić D. D., (2012), "Platinum(II/IV) complexes containing ethylenediamine-N,N'-di-2/3-propionate ester ligands induced caspase-dependent apoptosis in cisplatin-resistant colon cancer cells", *Metallomics*. 4 (9), 979-87.
- [122] Karakas D., Cevatemre B., Oral A. Y., Yilmaz V. T., Ulukaya E., (2019), "Unfolded Protein Response is Involved in Trans-Platinum (II) Complex-Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells via ROS Accumulation", *Anti-Cancer Agents In Medicinal Chemistry*, 19 (9), 1184–1195.
- [123] Marković N., Zarić M., Živković M. D., Rajković S., Jovanović I., Arsenijević N., Ninković S., (2019), "Novel Platinum(II) Complexes Selectively Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Breast Cancer Cells In Vitro", *ChemistrySelect*, 4 (44), 12971–12977.

- [124] Abudabbus A., Badmus J. A., Shalaweh S., Bauer R., Hiss D., (2017), "Effects of Fucoidan and Chemotherapeutic Agent Combinations on Malignant and Non-malignant Breast Cell Lines", *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 18 (9), 748-757.
- [125] Subhendu K., Kallol P., Saptarshi C., and Arindam M., (2016), "Anticancer activity of a cis-dichloridoplatinum (ii) complex of a chelating nitrogen mustard: insight into unusual guanine binding mode and low deactivation by glutathione", *Dalton Transactions*, 45, 3599-3615.
- [126] Yin L. L., Wen X. M., Lai Q. H., Li J., Wang X. W., (2018), "Lenalidomide improvement of cisplatin antitumor efficacy on triple-negative breast cancer cells in vitro", *Oncology Letters*, 15 (5), 6469-6474.
- [127] Alejandro Z., Ana L. R., Sonia Y. S., Miguel A. A., Crystel A. S., (2020), "Effect of sodium dichloroacetate as single agent or in combination with cisplatin in normal and human cervical cancer cell lines", *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, March, 19 (3), 467-474.
- [128] Balvan J., Gumulec J., Raudenska M., Krizova A., Stepka P., Babula P., Kizek R., Adam V., Masarik M., (2015), "Oxidative Stress Resistance in Metastatic Prostate Cancer: Renewal by Self-Eating", *PLoS One*, 10 (12), e0145016.
- [129] Watanabe J., Nishiyama H., Matsui Y., Ito M., Kawanishi H., Kamoto T., Ogawa O., (2006), "Dicoumarol potentiates cisplatin-induced apoptosis mediated by c-Jun N-terminal kinase in p53 wild-type urogenital cancer cell lines", *Oncogene*, 25 (17), 2500-8.
- [130] Singh R., Letai A., Sarosiek K., (2019), "Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20 (3), 175-193.
- [131] Čanović P., Simović A. R., Radisavljević S., Bratsos I., Demetri N., Mitrović M., Zelen I., Bugarčić Ž. D., (2017), "Impact of aromaticity on anticancer activity of polypyridyl ruthenium(II) complexes: synthesis, structure, DNA/protein binding, lipophilicity and anticancer activity", *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 22 (7), 1007-1028.
- [132] Wu J., (2013), "DNA damage and tumorigenesis", *Journal of Molecular Cell Biology*, 5 (3), 155-6.
- [133] Czarnomysy R., Surazyński A., Muszynska A., Gornowicz A., Bielawska A., Bielawski K., (2018), "A novel series of pyrazole-platinum(II) complexes as potential anti-cancer agents that induce cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer cells", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33 (1), 1006-1023.
- [134] Luo X. J., Qin Q. P., Li Y. L., Liu Y. C., Chen Z. F., Liang H., (2014), "Three platinum(II) complexes of 2-(methoxy-phenyl)-imidazo-[4,5-f]-[1,10]

phenanthroline: cell apoptosis induction by sub-G1 phase cell cycle arrest and G-quadruplex binding properties”, *Inorganic Chemistry Communications*, 46, 176–179.

- [135] Nguyen H. N., Sevin B. U., Averette H. E., Perras J., Ramos R., Donato D., Ochiai K., Penalver M., (1993), “Cell cycle perturbations of platinum derivatives on two ovarian cancer cell lines”, *Cancer Investigation*, 11 (3), 264-75.
- [136] Huang X., Wang M., Wang C., Hu W., You Q., Yang Y., Yu C., Liao Z., Gou S., Wang H., (2019), “Dual-targeting antitumor conjugates derived from platinum(IV) prodrugs and microtubule inhibitor CA-4 significantly exhibited potent ability to overcome cisplatin resistance”, *Bioorganic Chemistry*, 92, 103236.
- [137] Rimoldi I., Facchetti G., Lucchini G., Castiglioni E., Marchianò S., Ferri N., (2017), “In vitro anticancer activity evaluation of new cationic platinum(II) complexes based on imidazole moiety”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25 (6), 1907-1913.
- [138] Gordon E. M., Ravicz J. R., Liu S., Chawla S. P., Hall F. L., (2018), “Cell cycle checkpoint control: The cyclin G1/Mdm2/p53 axis emerges as a strategic target for broad-spectrum cancer gene therapy - A review of molecular mechanisms for oncologists”, *Molecular and Clinical Oncology*, 9 (2), 115-134.
- [139] Fernandez-Capetillo O., Lee A., Nussenzweig M., Nussenzweig A., (2004), “H2AX: the histone guardian of the genome. DNA Repair (Amst)”, 3 (8-9), 959-67.
- [140] Rothkamm K., Horn S., (2009), “gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure”, *Ann Ist Super Sanita*, 45 (3), 265-71.
- [141] Rothkamm K., Löbrich M., (2003), “Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses”, *PNAS*, 100 (9), 5057-62.
- [142] Pilch D. R., Sedelnikova O. A., Redon C., Celeste A., Nussenzweig A., Bonner W. M., (2003), “Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites”, *Biochemistry and Cell Biology*, 81 (3), 123-9.
- [143] Imai R., Komeda S., Shimura M., Tamura S., Matsuyama S., Nishimura K., Rogge R., Matsunaga A., Hiratani I., Takata H., Uemura M., Iida Y., Yoshikawa Y., Hansen J. C., Yamauchi K., Kanemaki M. T., Maeshima K., (2016), “Chromatin folding and DNA replication inhibition mediated by a highly antitumor-active tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complex”, *Scientific Reports*, 20, 6, 24712.
- [144] Wang L., Xiang S., Williams K. A., Dong H., Bai W., Nicosia S. V., Khochbin S., Bepler G., Zhang X., (2012), “Depletion of HDAC6 enhances cisplatin-induced DNA damage and apoptosis in non-small cell lung cancer cells”, *PLoS One*. 7 (9), e44265.

- [145] Schmitt E., Paquet C., Beauchemin M., Bertrand R., (2007), “DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis” *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 8 (6), 377-97.
- [146] Liu Y., Cao W., Zhang B., Liu Y. Q., Wang Z. Y., Wu Y. P., Yu X. J., Zhang X. D., Ming P. H., Zhou G. B., Huang L., (2013), “The natural compound magnolol inhibits invasion and exhibits potential in human breast cancer therapy” *Scientific Reports*, 14, 3, 3098.
- [147] Seim I., Jeffery P. L., Thomas P. B., Nelson C. C., Chopin L. K., (2017), “Whole-Genome Sequence of the Metastatic PC3 and LNCaP Human Prostate Cancer Cell Lines”, *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7 (6), 1731-1741.

ÖZGEÇMİŞ

Esma ERCİYAS BAYKAL, 1994 yılında Tokat'ta doğdu. 2018 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden mezun oldu. Aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Tamer Yağcı danışmanlığında yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek Lisans eğitimi boyunca TÜBİTAK 1001 projesinde proje asistanı olarak çalıştı. Nisan 2021 tarihinden itibaren İskefe Holding Kazlıçeşme AR-GE Merkezi ve Test Laboratuvarı'nda Hücre Kültürü Birim Sorumlusu olarak görev yapmaktadır.

EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Erciyas Baykal E., Balçık Erçin P., Küçükpolat C., Gürek A., Ahsen V., Yağcı T., “A newly synthesized platinum complex of imidazolidinedione induces apoptosis of breast cancers”, 2021, 5. GTÜ Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu 2021.