

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI



**BAZI Cu(II) VE Ni(II) KOMPLEKSLERİNİN SİTOTOKSİK VE
ANTİTÜMÖR ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

HAZAL NAZ TÜRKMEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. HATİCE YILDIRIM (Tez Danışmanı)
Prof. Dr. Rahşan ILIKÇI SAĞKAN
Dr. Öğr. Üyesi Berna SANÖN

BALIKESİR, OCAK-2025

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**Bazı Cu(II) ve Ni(II) Komplekslerinin Antitümör ve Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Hazal Naz TÜRKMEN

ÖZET

**BAZI CU(II) VE Nİ(II) KOMPLEKSLERİNİN SİTOTOKSİK VE ANTİTÜMÖR
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
HAZAL NAZ TÜRKMEN
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. HATİCE YILDIRIM)
BALIKESİR, OCAK - 2025**

Son yıllarda dünyada ve aynı zamanda ülkemizde kanser oldukça yaygın bir hastalıktır. Kanser hücreleri sağlıklı hücrelerdeki gibi kontrollü şekilde bölünmedikleri için yapılan çalışmaların büyük kısmında bu kontrolsüz bölünmenin önüne geçmek amaçlanmaktadır.

Çalışmamız kapsamında üç farklı kanser hücre hattı SW-480 (İnsan kolon kanseri), PC3 (İnsan prostat kanseri) ve Hep3B (İnsan karaciğer kanseri) ile ve bir adet kanser olmayan hücre hattı Huvec (insan endotel hücre hattı) kullanılmıştır. Daha önce sentezlenmiş olan ID1, ID2 ve ID3 olarak adlandırılmış Cu(II) ve Ni(II) komplekslerinin sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlenmiştir. Yara iyileşme analizi ve koloni formasyon analizleri ile ID1 bileşiğinin Hep3B hücrelerindeki antitümör etkileri belirlenmiştir. Yapılan canlılık testleri ile en yüksek sitotoksik etkinin ID1 bileşiğinin Hep3B karaciğer kanseri hücre hattında meydana getirdiği belirlenmiştir. ID2 bileşiği hiçbir hücre hattında sitotoksik etki göstermezken ID3 bileşiğinin yalnızca SW480 kolon kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonunda azalmaya neden olmuştur. Yara iyileşme analizi ve koloni formasyon testleri ile ID1 bileşiğinin anti tümör etkileri Hep3B hücrelerinde belirlenmiştir. Koloni formasyonunda 10 µM ID1 uygulamasının koloni oluşumunu azalttığı belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: MTT, sitotoksiste, hücre hattı, metal kompleksi

Bilim Kod / Kodları: 20610, 20606, 20326

Sayfa Sayısı : 28

ABSTRACT

DETERMINATION OF CYTOTOXIC AND ANTITUMOR EFFECTS OF SOME CU(II) AND NI(II) COMPLEXES

MSC THESIS

HAZAL NAZ TÜRKMEN

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS DEPARTMENT

(SUPERVISOR: PROF.DR. HATİCE YILDIRIM)

BALIKESİR, JANUARY - 2025

Cancer has become a very common disease in the world and also in our country. Since cancer cells do not divide in a controlled manner as in healthy cells, the aim of most of the studies is to prevent this uncontrolled division.

Within the scope of our study, three different cancer cell lines SW-480 (human colon cancer), PC3 (human prostate cancer) and Hep3B (human liver cancer) and one non-cancer cell line Huvec (human endothelial cell line) were used. The cytotoxic effects of previously synthesized Cu(II) and Ni(II) complexes named ID1, ID2 and ID3 were determined by MTT test. The antitumor effects of ID1 compound in Hep3B cells were determined by wound healing analysis and colony formation analyses. Viability tests determined that the highest cytotoxic effect of ID1 compound was in Hep3B liver cancer cell line. While ID2 compound did not show cytotoxic effect in any cell line, ID3 compound caused a decrease in cell proliferation only in SW480 colon cancer cells. Antitumor effects of ID1 compound were determined in Hep3B cells by wound healing assay and colony formation tests. It was determined that 10 μ M ID1 application reduced colony formation.

KEYWORDS: MTT, cytotoxicity, cell line, metal complex

Science Code / Codes : 20610, 20606, 20326

Page Number : 28

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	v
SEMBOL LİSTESİ	vi
ÖNSÖZ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1 Hücre Döngüsü	2
1.1.1 Sağlıklı Hücrelerde Siklin Kinazlar	4
1.1.2 Kanserle İlişkili Kontrol Noktası İnaktivasyonu	6
1.1.3 Proto-Onkogenler	6
1.1.4 Tümör Baskılayıcı genler.....	6
1.1.5 Çalışmada kullanılan koordinasyon bileşikleri.....	7
2. MATERYAL METOD	9
2.1 Çalışmanın Yapıldığı Ortamın ve Çalışmada Kullanılan Malzemelerin Temizliği ve Sterilizasyonu	9
2.2 MTT Stok Solüsyonunun Hazırlanması.....	9
2.3 Fetal Calf Serum (FCS) Hazırlanması	9
2.4 Hücre Kültürü	9
2.5 Hücrelerin Açılması ve Büyütülmesi	10
2.6 Hücrelerin Pasajlanması.....	10
2.7 Hücrelerin Dondurulması.....	11
2.8 Hücre sayımı.....	11
2.9 MTT Testi.....	12
2.10 Koloni Formasyon Deneyi.....	13
2.11 Yara İyileşme Deneyi.....	13
2.12 İstatistiksel Analiz.....	14
3. BULGULAR	15
3.1 ID1, ID2 ve ID3 bileşiklerinin Hep3B karaciğer kanseri hücre hattına sitotoksik etkileri.....	15
3.2 ID1, ID2 ve ID3 bileşiklerinin PC3 prostat kanseri hücre hattına sitotoksik etkileri.....	16
3.3 ID1, ID2 ve ID3 bileşiklerinin SW-480 kolon prostat kanseri hücre hattına sitotoksik etkileri.....	17
3.4 ID1, ID2 ve ID3 bileşiklerinin Huvec insan endotel hücre hattına sitotoksik etkileri.....	18
3.5 Yara iyileşme analizi (Scratch).....	19
3.6 Koloni Formasyon Testi	22
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	23
5. KAYNAKLAR	25
ÖZGEÇMİŞ	28

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Sağlıklı hücreden kanser gelişimi	1
Şekil 1.2: Hücre Döngüsü	4
Şekil 2.1: Deneyde Kullanılan Hücre Hatları	10
Şekil 3.1: Hep3B hücre hattında ID1, ID2 ve ID3 bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarının 48 saat uygulamasının sitotoksik etkileri	16
Şekil 3.2: PC3 hücre hattında ID1, ID2 ve ID3 bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarının 48 saat uygulamasının sitotoksik etkileri	17
Şekil 3.3: SW-480 hücre hattında ID1, ID2 ve ID3 bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarında 48 saat uygulamasının sitotoksik etkileri.....	18
Şekil 3.4.: Huvec hücre hattında ID1, ID2 ve ID3 bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarının 48 saat uygulamasının sitotoksik etkileri	19
Şekil 3.5: 0. Saat Hep3B yara iyileşme analiz sonuçları	20
Şekil 3.6: 6. Saat Hep3B yara iyileşme analiz sonuçları	20
Şekil 3.7: 24 Saat Hep3B yara iyileşme analiz sonuçları	21
Şekil 3.8: Yara iyileşme alanının kantitatif analizi.....	21
Şekil 3.9: Hep3B hücrelerinde ID1 bileşiğinin koloni oluşumu üzerine etkileri.....	22
Şekil 3.10: Koloni sayılarının kantitatif analizi.....	22

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1: ID1, ID2ve ID3 Bileşikleri	8
Tablo 2.2: MTT deneyi plaka düzeni	12

SEMBOL LİSTESİ

DMEM : Dulbecco's Modified Eagles Medium

FBS : Fetal Sığır Serum

MTT : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

ÖNSÖZ

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren hep yanımda olan her tökezlememde beni sakinleştirip bana güç veren bilgi birikimi ve deneyimleriyle yoluma ışık olan maddi manevi desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Hatice YILDIRIM'a

Laboratuvar çalışmalarım boyunca beni hep destekleyen ve moral veren hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullandığım bileşikleri sentezleyen Uzm. İlkay ERDURMAZLI ve danışman hocası Prof. Dr Çiğdem HOPA'ya teşekkür ederim.

Bu süreçte ellerini hep omzumda hissettiğim beraber gülüp beraber ağladığımız arkadaştan öte dostlarım olan Aylin TÜRKÖĞLU ve Aysu BOZKURT' a bu süreçte bana kol kanat gerip hiç yalnız bırakmadıkları için teşekkür ederim.

Manevi olarak hep yanımda olan beni hep destekleyen ben ne zaman çıkmazda hissetsem bana yol gösterip moral veren canım dostum Ayşenur ŞAHİN'e teşekkür ederim.

Ellerini hep omzumda hissettiğim bana güç veren bu süreci olabildiğince kolay atlatmam için çabalarını esirgemeyen canım annem Lale TÜRKMEN'e , canım babam Cemal TÜRKMEN'e ve kardeşim Ada Su TÜRKMEN'e ve aileme teşekkür ederim.

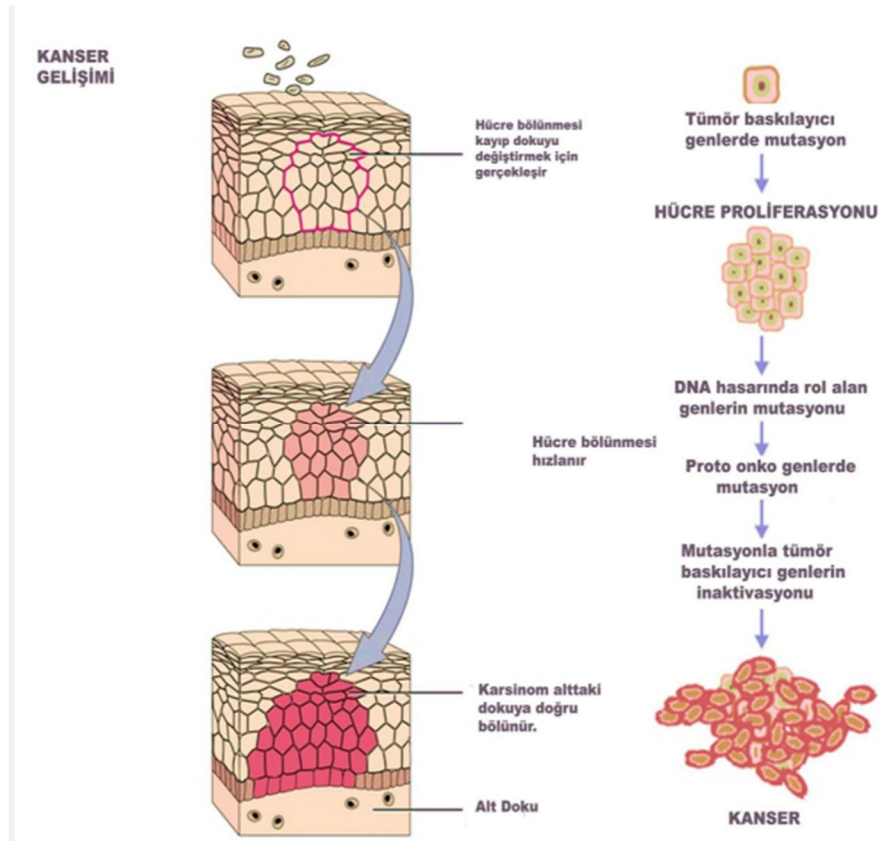
Bu süreç boyunca manevi olarak hep yanımda olan hep destek olup düştüğümde elini uzatan Alican BODUROĞLU'na teşekkür ederim.

Balıkesir, 2025

Hazal Naz Türkmen

1. GİRİŞ

Kanser tüm insanlığı etkileyen ve yaşamı tehdit eden ciddi bir sağlık problemdir. Sosyal ve ekonomik yaşamı zora sokması sebebiyle kitlesel bir tehdittir. Kanser hastalığında öncelik her ne kadar hastanın iyileşmesi odaklı olsa da bir o kadar önemli olan kısım hastalık sürecini mümkün olan en rahat ve yan etkisiz şekilde geçirmesidir. Bu sebeple birçok çalışma yapılmaktadır. Kanser aynı olsa bile hastadan hastaya yaşı, boyu, kilosu, yaşam şartları, genetik faktörler gibi birçok etmenden dolayı seyri değişiklik gösterebilmektedir. Kanser tüm dünyada ve ülkemizde son dönemlerde yapılan istatistiksel çalışmalar neticesinde çok ciddi boyuta ulaştığı belirlenmiştir. Öyle ki kardiyovasküler hastalıklardan hemen sonra gelmektedir. Ülkemizde en sık görülen kanser tipleri arasında akciğer, rektum, kalın bağırsak, mide, pankreas başta gelmektedir [1,2].



Şekil 1.1: Sağlıklı hücreden kanser gelişimi [10].

Kanser tedavisinde bölgesel olarak radyoterapi ve cerrahi müdahale ile bunu destekleyici nitelikte kemoterapi ve immünoterapi uygulanmaktadır. Ancak özellikle kemoterapi ve radyoterapinin oldukça fazla yan etkisi bulunmaktadır. Bu yan etkileri azaltmaya yönelik oldukça fazla çalışma yapılmaktadır. Kanser tanımı en basit haliyle kontrolsüz şekilde hücre çoğalmasdır. Kanser hücresinin bilinen en yaygın özellikleri arasında; sürekli çoğalma sinyali gönderebilirler, büyüme baskılayıcı sinyalleri göz ardı edebilirler, apoptozdan kaçabilirler, damar oluşturabilirler veya halihazırda bulunan damarları kullanabilirler, istila edebilirler, metastaz yapabilirler, hücrenin metabolizmasını yeniden programlayabilirler [9].

Kanser hastalığı kişinin yaşına, yaşam şartlarına, genetik yatkınlığına ve bunun yanı sıra yayılımına, evrelerine uygulanan tedavi çeşidine göre oldukça farklılık gösterir. Kanser dünyada ölümlerle sonuçlanan hastalıklar arasında üst sıralarda yer alması sebebiyle tedavisi için deneysel çalışma yapılan hastalıklar arasında en sık tercih edilendir. Kanser hücresinin en büyük özelliklerinden biri bölünme için sağlıklı hücreler gibi sinyallere ihtiyaç duymamasıdır. Hücre ölümünden yani apoptozdan kaçabilir. Sağlıklı hücrelerde bulunan çoğalmayı baskılayıcı sinyalleri göz ardı edebilir [3,4,5]. Kanser sebebiyle mutasyona uğrayan genler başlıca üç ana biyolojik yolağı etkiler bunlar; hücre döngüsü, apoptoz, farklılaşma [6]. Hücre döngüsünün kontrol noktalarında ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde oluşan mutasyonlar kanser gelişiminde çok önemlidir [7,8].

1.1 Hücre Döngüsü

Hücreler mitoz bölünmeler esnasında iki bölünme arasında geçen süreyi hücre döngüsüyle kontrol altında tutarlar.. Hücre döngüsünün mekanizması genler tarafından kontrol altında tutulur. Genlerin ifadelerinde oluşan azalma ve artma seviyesine göre hücre çoğalması gerçekleşir. Hücrenin sağlıklı şekilde çoğalması için hücrenin çoğalmasında etkili genin aktive olması ve hücre çoğalmasının durdurulmasında ise baskılayan genin aktive olması ve bunların bir denge içerisinde çalışması çok önemlidir [11].

Hücre döngüsü 4 evrede tamamlanır. Bunlar :

1. G1 evresi : Birinci evre DNA replikasyonundan önceki hazırlık dönemidir . Bu fazda, öncü nükleotidler ve replikasyon için gerekli tüm enzimler ve faktörler sentezlenir.

2. S evresi (aynı zamanda sentez evresi olarak adlandırılır) ; İkinci evre olan S fazında , DNA replikasyonu gerçekleşir. Nükleozomlar sentez ilerledikçe ayrışır ve DNA ile yakından ilişkili histonların ve diğer proteinlerin üretimi önemli ölçüde artar. Bu fazda DNA ve histon miktarı ikilenir. G2 evresi : Üçüncü faz olan G2 evresi hücrenin mitoz hazırladığı bir adımdır. Mitotik iğ ipliğinin mikrofibrillerini oluşturan bir protein olan tubulin sentezlenir.
3. M evresi (diğer ismi Mitoz) : Son fazda (M) hücre bölünmesi gerçekleşir .
4. G0 evresi : Hücrelerin dinlenme halinde olduğu evredir.

Mitozdan G1 evresine geçen hücrelerin bir kısmı gelen sinyaller ışığında bölünmeyi durdurur bir kısmı ise kaldığı yerden bölünmeye devam eder. G0 fazında bütün biyokimyasal ve metabolik olayları aktif ve sağlıklı şekilde devam eden hücrelere tekrar bölünme sinyali geldiğinde ise hücre döngüsüne G1 evresinden katılırlar. Hücre döngüsünün kontrollü şekilde devam etmesini sağlayan belli kontrol noktaları vardır. Bunlar : G1/S evresi, G2/M evresi ve Mitoz evresi olarak geçen M evresidir [5].

Hücre döngüsü esnasında bir evre sağlıklı ve kontrollü şekilde tamamlanmadan ardından gelen evreye geçiş olursa hücrenin genetik materyali tam ve olması gerektiği gibi kopyalanamayacağı için hücre hasarlı olabilir. Hücrede var olan kontrol noktalarından hücrenin döngüsüne devam edip edemeyeceğinin onayı verilir [12].

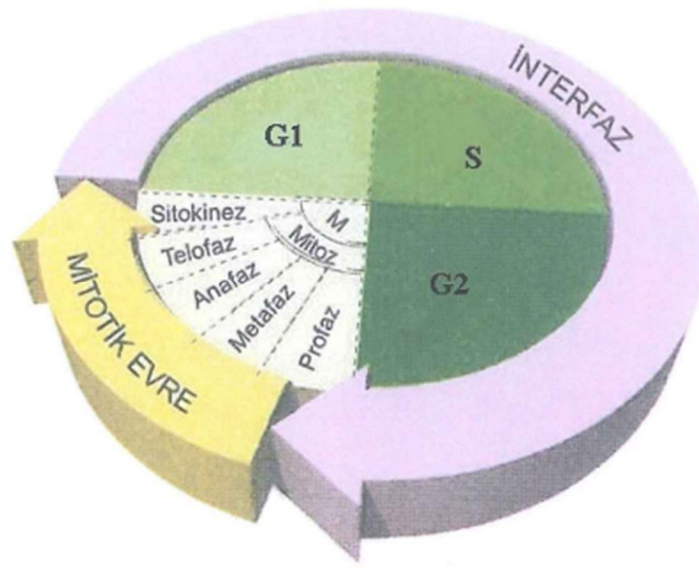
DNA hasar almış hücrelerde (mutasyon, toksik madde, radyasyon vb.) hücrede bulunan kontrol noktaları sayesinde hücre bölünmesi durdurulur. G1' de bulunan kontrol noktası S fazına geçişi engeller. G2'de bulunan kontrol noktası mitoz geçiş engel olur. Olası bir durumda DNA'da hasar veya mutasyon varsa DNA sentezi engellenir. DNA tam olarak sentezlenmemiş hücrelerde mitoz engellenir. Kinaz kompleksleri inaktive olmasıyla mitoz durdurulur [12].

Hücrenin döngüsünün sağlıklı bir şekilde tamamlanmasında onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olmak üzere iki gen grubu başlıca rol alır [13].

P53 tümör baskılayıcı geni işlevsiz hale gelebilecek bir mutasyona uğrarsa yada bir hasar alırsa hücre bölünmesinin kontrolü olmaz. DNA tamiri yapılamadan hücre normal seyrinde bölünme döngüsüne devam eder. Sağlıklı bir hücre DNA'sında hasar meydana gelirse p53

geni hücre bölünmesinin hücrenin kontrol noktalarından birinin de olduğu G1 evresinde durdurur. Hücrenin hasarının giderilebilmesi için hücreye vakit kazandırır. Eğer hasar tamir edilemeyecek boyuttaysa hücre apoptoz evresine geçer [12,13].

Hücrelerin büyüme sinyali diğer hücrelerden büyüme faktörlerinin salgılanmasıyla başlar. Büyüme faktörleri farklı sağlıklı hücrelerden salınmasıyla birlikte hücrede bulunan özgül reseptörlere bağlanır. Sinyaller hücre içerisinde bulunan sitoplazma reseptörlerine ulaştırılır. Salgılanan bu sinyaller çekirdekteki transkripsiyon faktörlerinin salgılanmasına ve hücrenin hücre döngüsüne katılımını sağlar [14,15].



Şekil 1.2: Hücre Döngüsü [22].

1.1.1 Sağlıklı Hücrelerde Siklin Kinazlar

Sağlıklı bir hücrenin döngüsü siklinler, siklin bağımlı kinazlar ve aynı zamanda siklin bağımlı kinaz inhibitörleri tarafından kontrol altında tutulur. Bu protein yapılı bileşiklerin kontrolleri hücre döngüsünün farklı yerlerinde değişiklik gösterir [12,13,16]. Siklin bağımlı kinazlar protein fosforilasyonu yapar ve aynı zamanda DNA'nın açılmasında da rol oynar. Hücre döngüsü esnasında DNA sadece bir kez replike olur [17,18].

Siklin bağımlı kinazlar siklin'e bağlandığı esnada aktif hale gelir. Aktif siklin- siklin bağımlı kinaz kompleks yapısı meydana gelir, bu yapının düzenleyen birimi siklinler, katalitik alt biri ise siklin bağımlı kinazlardır [19]. Siklin bağımlı kinazların katalitik alt birimleri birbirinden farklı düzenlemede görevli alt birimle bir araya gelir. Hücre döngüsünün

başlangıcından bitişine kadar geçen sürede kinaz kompleks yapılarının düzeyi değişir. Bu sebeple hücre döngüsü boyunca DNA yalnızca bir kez replikasyona uğrar. Siklinler hücre döngüsünün kimi evresinde oluşurken kimi evresinde yıkıma uğrarlar [13,16].

Siklinlerden her bir tanesi kendine özgü fazda maksimum değere ulaşır ve sonrasında hemen yıkıma başlar. Siklinlerin yıkımında kullanılan yolak ubiqitin yolağıdır [20].

Hücre bölünmesini kontrol altında tutan genlerden bir tanesinde oluşan ifade bozukluğu kanserin oluşumuna katkı sağlayabilir. Hücre döngüsünün kontrol noktalarından biri olan G1/S kontrol noktasında ki gende problem varsa hücre normalde DNA anormalliğini fark edip durması gereken yerde durmayıp döngü normal seyrinde devam edebilir. Böyle talihsiz bir durum genelde genin içerisinde mutasyonun birikimine ve bu sebeple hücrenin kontrol edilemez bir şekilde çoğalmasına ve sonuç olarak metastazına sebebiyet verebilir [20].

Olası bir durumda DNA da bir hata olursa hücreler bölünme evresinde hangi evrede kaldırsa bir süreliğine bu bölünmeyi durdururlar. Koşullar normalleşene kadar bur süreç devam etmezler. Bunun en büyük artlarından biri hücrede oluşan anormallikler çoğalmaz. Şayet ki DNA hasarı ya da kromozomda oluşan hasar onarılamaz derecedeysen hücre hatalı bölünme devam etmesin diye kendine farklı bir savunma yolu bulabilir. Bunun sonucu hücrenin programlı ölümüdür yani apoptoz [22].

Apoptoz sadece DNA anormallerinde düzeltilemeyecek durumda ki kromozom anormallerinde hücrenin kullandığı bir yöntem değildir, bunun yanında apoptoz aynı zamanda yüksek yapılı canlılar son aşamaya gelinceye kadar hücrenin gelişimine pek de katkısı olmayan hücrelerin yaşamlarına son vermek için de başlatılabilir [23,24].

Apoptoz genel basamaklarıyla : DNA parçalanır, hücrenin içinde ki yapılar değişime uğrar, hücre isimleri apoptotik cisimler olarak adlandırılan parçalara ayrılır, bu oluşan apoptotik cisimcikler bağışıklık sisteminde halihazırda var olan fagositik hücreler ile yok edilirler [23].

1.1.2 Kanserle İlişkili Kontrol Noktası İnaktivasyonu

Gen üzerinde oluşan anormalilerden dolayı G1-S evresinde ki oluşan değişimler kansere sebebiyet verebilir. Tümörleşme gösteren hücrelerin en belirgin özelliklerinden bir tanesi ise sürekli bölünme sinyalinin bağımsız şekilde G1 evresine tekrar girebilmesidir.

Hücrenin içerisinde normal olması gerekenden farklı olarak fazla sentriol var ise hücre bölünme esnasında anafaz evresinde iken kromozomların hatalı bir şekilde ayrılmasına sebep olabilir. Yapılan araştırmalar gösteriyor ki bazı kanser türlerinde sentriollerin duplikasyon yaptığı gözlemlenmiştir [12,15].

1.1.3 Proto-Onkogenler

Proto-onkogenler mutasyona maruz kaldığında yapısı değişip onkogen haline gelebilen genlere verilen genel isimdir. Hücre bölünmesini ve hücrenin büyümesini sağlayan genlerden birine proto-onkogen adı verilir. Bu yaptığı işi hücrenin bölünmesi esnasında hücre döngüsünün kontrollü şekilde sağlanmasında görev alan hücre döngü düzenleyicileri adı verilen düzenleyicileri kodlama görevini yaparlar.

Proto-onkogenler hücrenin içerisinde çeşitli kısımlarda bulunur. Hücrenin içerisinde ki aktiviteleri birçok yolla kontrol edilmektedir. Hücreler döngüsünü tamamlayıp bölünmeye devam etmediği dönemde proto-onkogenlerin de ifadeleri sentezlenmelerini durdurabilmek adına baskılanır. Kansere hücrelerinde bu duruma bakacak olursak proto-onkogenler değiştirilmiş olduğunu görürüz. Aktiviteleri kontrol altında değildir. Proto-onkogen mutasyon sonucunda sağlıklı bir protein ortaya çıkmaması olabilir. Mutasyon sonucunda değişen proto-onkogenler hücreyi bölünmesi için sürekli uyarabilirler [25].

1.1.4 Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler hücrenin döngüsü esnasında hücre döngüsünün kontrol noktalarının düzenlenmesinde görev alan ve apoptoz sürecinde rol alan genlerdir. Tümör baskılayıcı genler olası bir durumda mutasyona uğradıkları durumda yada aktif olmadıklarında hücre döngüsü esnasında hücre döngüsü kontrol noktalarında düzenleyici olarak görev yapamazlar. Olası bir durumda hücrenin apoptoza gitmesi gerektiğinde görev alamazlar. Bunun sonucunda ise hücre, hücre döngüsüne katılmaması gereken noktada durmaz ve döngüye katılmaya devam eder, hücrenin ölümü gerçekleşmesi gereken noktada ise hücre ölümü gerçekleşemez. Halihazırda yapılan çalışmalar neticesinde oldukça fazla tümör baskılayıcı gen vardır [26,27].

1.1.5 Çalışmada Kullanılan Koordinasyon Bileşikleri

Antikanser tedavisinin en önemli problemleri ilaç direnci ve ilaç toksisitesidir. Antitümör ajanları olarak test edilen çok sayıdaki ilaç türevleri, doğal ürünler veya yeni sentezlenmiş orijinal bileşiklerin çoğu toksisite nedeniyle reddedilmiştir. Örneğin cisplatin uzun süredir kemoterapide kullanılan ve etkili olan bir ajandır. Daha yüksek etkili, ilaç direnci oluşturmayan, toksisitesi daha düşük veya daha az yan etki oluşturan yeni cisplatin analoglarının sentezi amacıyla çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Ancak test edilen 3000 cisplatin türevinden çoğu yine toksisite nedeniyle uygun bulunmamıştır [29].

Koordinasyon bileşikleri yine birçok farklı alanlarda öneme sahip bileşiklerdir. Genel olarak endüstriyel uygulamalarda kullanılan farklı koordinasyon bileşikleri, çalışmamız kapsamında farklı hücre hatlarındaki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmıştır [29].

Bu tez çalışmasında kullanılan ID1, ID2 ve ID 3 bileşikleri, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı yüksek lisans tezi kapsamında Uzman İlkay ERDURMAZLI tarafından sentezlenmiştir [30]. Bileşikler DMSO içinde çözülerek hazırlanmış ve hücrelerdeki DMSO son konsantrasyonu %0,01 altında tutulmuştur.

Tablo 2.1. ID1, ID2 ve ID3 Bileşikleri [30].

Kompleks Bileşiklerin Kodları	Çıkış Maddeleri
ID1	Ligandlar: DAP-OH ve dca Metal Tuzu: $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
ID2	Ligandlar: DAP-DM ve dca Metal Tuzu: $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
ID3	Ligandlar: DAP ve dca Metal Tuzu: $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

ID1, ID2 ve ID3 bileşiklerinin sentezinde de ligand olarak kullanılan propan diamin ve diaminopropan ligandları kullanılarak sentezlenen koordinasyon bileşikleri ve

karakterizasyonları hakkında literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır [30]. Aynı zamanda diamino propan ligandı ile sentezlenen platinum Pt(II) kompleksi ve antitümör aktivitesi hakkında da literatürde çalışmalar mevcuttur. Yeni sentezlenen ID1, ID2 ve ID3 bileşiklerinin antitümör etkisinin olup olmadığı çalışmamız kapsamında araştırılmıştır.

Bu amaçla özetle;

- Ü Sentezlenen ID1, ID2 ve ID3 bileşikleri DMSO içinde 0,1 M konsantrasyonda hazırlandı ve 0,22 µ steril filtreden geçirilerek hücelere uygulama yapıldı.
- Ü İnsan hepatoselüler karsinom hücre hattı Hep3B, insan prostat kanseri hücre hattı PC3, İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı olan SW480 ve İnsan göbek kordonu endoteli hücre hattı Huvec hücrelerinde ID1, ID2 ve ID 3 bileşiklerinin sitotoksik etkileri belirlendi.
- Ü En yüksek sitotoksik etki gösteren ID1 bileşiğinin en yüksek sitotoksik etki gözlenen Hep3B hücrelerindeki tümörojenik özelliklere etkisi yara iyileşme analizi ve koloni formasyon analizleri ile belirlendi.

2. MATERYAL METOD

2.1 Çalışmanın yapıldığı ortamın ve çalışmada kullanılan malzemelerin temizliği ve sterilizasyonu

Isı ve basınca dayanıklı malzemeler 121°C de otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Hücre kültürü laboratuvarı ise her hafta rutin olarak alkol ve çamaşır suyu ile temizlenmiş ve ardından UV lamba ile laboratuvarın havası sterilize edilmiştir.

2.2 MTT Stok Solüsyonu Hazırlanması

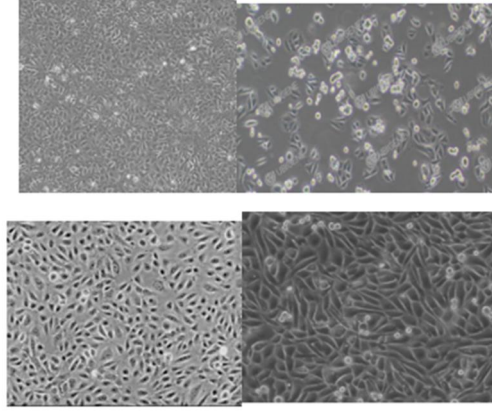
Toz halde alınan MTT ((3-(4, 5- dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) son konsantrasyon 5 mg/ml olacak şekilde önceden otoklavlanmış ağzı açılmamış steril PBS içine eklenip manyetik karıştırıcı üzerinde bir gece ağzı kapalı halde karıştırılmıştır. Ertesi gün toz MTT'nin eridiğinden emin olununca manyetik karıştırıcının üzerinden alınıp sterilizasyon için 0,22 µm filtreden geçirilip 1.5 ml hacimde steril ependorfların içerisine alikotlanmıştır. -20°C de saklanmıştır.

2.3 Fetal Calf Serum (FCS) Hazırlanması

FCS taşıması soğuk zincir ile gerçekleşen ve bozulup kontamine olmaması için -20 °C de saklanmıştır. FCS kullanılmadan önce 56 °C de 1 saat inaktive edilmiştir. Alikotlanmadan önce 0,22 µm filtreden geçirilmiş ve 50 ml hacime sahip steril falconların içerisine alikotlanarak ağzı parafilmlelenerek -20 °C de saklanmıştır.

2.4 Hücre Kültürü

Çalışmamız kapsamında Hep3B, Huvec, , PC3 ve SW480 hücre hatları kullanıldı. Hücreler daha önce stoklanarak -80 °C derin dondurucuda saklanan hücreler kullanılmıştır. Hücre kültürü deneylerinde ticari olarak temin edilen Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) kullanılmıştır. Glutamin içeren bu medyuma son konsantrasyonu %10 olacak şekilde Fetal Sığır Serum (FBS) ilave edilmiştir.



Şekil 2.1 Deneyde kullanılan hücre hatları. 1: Hep3B, 2:SW480, 3:Huvec, 4: PC3

2.5 Hücrelerin Açılması ve Büyütülmesi

-80 °C dondurucudan çıkarılan hücreler 37 °C'deki su banyosuna konulmuş ve hücrelerin hızlıca çözülmesi sağlanmıştır. %10 FCS içeren DMEM besiyerine ilave edilen çözülmüş hücreler 5 dakika 1000 rpm de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet %10 FCS içeren besiyeri ile çözülerek flasklara ve/veya hücre kültürü petrilere paylaştırılmış ve . Sonrasında %5 CO₂ içeren 37 °C ortam sıcaklığına sahip inkübatöre konulmuştur. Hücreler %10 FCS içeren DMEM ile haftada 3 pasaj yapılarak büyütüldü.

2.6 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler rutin olarak her gün mikroskop ile kontrol edilerek petrilere yüzey alanını kaplama durumuna göre (%90) pasajlama yapıldı. Buna göre yeterli doluluğa ulaşan petrilere ilk olarak petri içerisinden medyum çekildi. Hücreler steril PBS ile bir kez yıkandı. Daha sonra PBS uzaklaştırıldı. 2 ml Tripsin-EDTA eklendi ve inkübatöre konuldu. Ara ara kontrol edilerek hücrelerin kontrollü bir şekilde kalkması beklendi. Hücrelerin tamamının kalktığından emin olduktan sonra Tripsin-EDTA'nın 2 katı olacak şekilde %10 FCS içeren DMEM eklendi. (4 ml) Tripsin-EDTA etkisiz hale getirildi. 15 ml hacime sahip falconların içine alındı. 5 dk 1000 rpm de santrifüj ile hücrelerin dibe çökmesi sağlandı. Üstte kalan süpernatant steril pastör pipeti ile dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Dipte kalan hücreler yoğunluğu baz alınarak petrilere yine son hacim 10 ml olacak şekilde bölündü. Dikkatli bir şekilde inkübatöre yerleştirildi.

2.7 Hücrelerin Dondurulması

%80-90 oranında alanı kaplamış olan hücreler deneylerde kullanılmayacaksa dondurma işlemi yapılır. , Kısaca hücrelerin medyumunu uzaklaştırılır. . PBS ile bir defa yıkanır. Hücreler Tripsin-EDTA ile muamele edilir. İnkübatöre konulup kontrollü bir şekilde hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlanır. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıklarından emin olduğumuzda üzerine içerisine koyduğumuz Tripsin-EDTA'nın iki katı kadar medyum konulur. 15 ml ' lik falcon içerisine alınır. 1000 rpm de 5 dk santrifüj yapılır. süpernatant uzaklaştırılır Dipte kalan hücre pelleti %10 DMSO içeren 1 ml FCS ile çözülüp 1.5 ml 'lik cryoviallere veya ependorflara alınıp etiketlenir ve -80 °C derin dondurucuda saklanır.

2.8 Hücre Sayımı

Hücreler deney kurulabilecek yoğunluğa ve uygun pasaj sayısına ulaştıktan sonra üzerlerinde ki medyum uzaklaştırılır ve aynı pasaj yapar gibi PBS ile yıkanıp hücrelerin üzerlerinde ki metabolik artıklar ve medyum kalıntıları uzaklaştırılır. Tripsin-EDTA eklenip hücrelerin petrinin tabanından ayrılması için inkübatöre konur ve bir süre beklenir. Hücrelerin kalktığından emin olduğunda %10 FCS içeren DMEM bulunan 15 mL hacme sahip falcon içerisine alınır ve 1000 rpm de 5 dk santrifüj edilir. Üzerinde kalan süpernatant uzaklaştırılır hücre pelleti ise total hacim 4 mL olacak şekilde %10 FCS içeren DMEM içerisine çözülür. Yeterince homojen bir karışım elde ettiğimizden emin olduğumuzda ise 1 mL steril pastör pipeti ile 1.5 mL hacimli ependorfa alınır. Ependorf içerisinden tekrar pipetaj yapıp homojen karışım elde edilir buradan da 200 µl çekilip farklı bir ependorf içerisine alınır. 200 µl de tripan mavisi çekilip 200 µl hücre bulunan ependorf içerisine eklenip tekrar pipetaj ile homojen bir karışım elde edilir.

Hücre sayımı için Thoma Lamı kullanılır. (Thoma lamı 25 küçük kareden oluşur ve 1 mm² alana ve 0,1 mm derinliğe sahiptir.) Ependorfun içerisinden 10 µl çekilir ve Thoma lamına konulur. Sayım işlemi yapılır. Cansız hücreler mavi renkte görüneceğinden onlar sayıma katılmaz.

2.9 MTT Testi

Hücrenin canlılığının ölçümü ve sitotoksikite ölçümünde kullanılır. Tetrazolium tuzunu yani MTT'yi canlı olan hücreler formazan kristallerine dönüştürür. Formazan kristallerine dönüşen tetrazolium tuzu spektrofotometrede ölçülür.

MTT testi 96 kuyucuklu plakalarda ve her kuyucukta 30.000 hücre olacak şekilde yapıldı. Kısaca hücreler 2.9 da belirtildiği şekilde sayıldı 30.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara paylaştırıldı ve bir gece 37 °C 'de %5 CO₂ li ortamda inkübe edildi. Ertesi gün hazırlanan bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda (100 µM, 10 µM, 1 µM, 0.1 µM, 0.01 µM) uygulaması yapıldı. Kontrol grubuna hiçbir uygulama yapılmadı, aracı kontrol olan gruba ise %0,01 oranında DMSO uygulaması yapıldı. 48 saat sonunda MTT testi yapılarak ID1, ID2 ve ID3 bileşiklerinin etkisi belirlendi.

48 saat sonunda son konsantrasyonu 0,5 mg/mL olacak şekilde MTT solüsyonu tüm kuyucuklara eklendi ve 4 saat 37 °C 'de %5 CO₂ li ortamda inkübe edildi. 4 saat sonunda hücrelerin medyumunu uzaklaştırıldı ve 200 µl son konsantrasyonu 0,004N HCl içeren izopropanol her kuyuya eklenerek oluşan kristallerin çözünmesi sağlandı. 550 nm de spektrofotometrede ölçüm alındı. İnsan hepatoselüler karsinom hücre hattı Hep3B, insan prostat kanseri hücre hattı PC3, insan kolon adenokarsinoma hücre hattı olan SW480 ve insan göbek kordonu endoteli hücre hattı Huvec hücrelerinde MTT testi gerçekleştirildi ve çalışılan tüm konsantrasyonlar en az 6 tekrarlı olarak yapıldı. Her bir hücre hattında deney en az iki tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 2.1 MTT Deneyi Plaka Düzeni.

NT	DMSO	100 µM	10 µM	1 µM	0.1 µM	0.01 µM	100 µM	10 µM	1 µM	0.1 µM	0.01 µM

2.10 Koloni Formasyon Deneyi

Koloni formasyon deneyi genelde sitotoksik etkiye sahip ajanların ve antikanser yapısına sahip terapötiklerin hücre hatları üzerinde ki etkilerinin hücrelerin koloni oluşturabilme yeteneklerinin anlaşılabilmesi amacıyla kullanılmaktadır.

%10 FBS içeren DMEM içerisinde büyütülen hücreler %80-90 doluluğa ulaştığında Tripsin-EDTA ile kaldırıldı ve hücre sayımı yapıldı. Sayılan hücreler 6 kuyucuklu plakalara 3.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde paylaştırıldı ve bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün kontrol grubundaki hücrelere uygulama yapılmazken, deney grubundaki hücrelere 100 µM konsantrasyonda ID1 bileşik uygulaması yapıldı. 10 gün koloni formasyonu için inkübe edilen hücreler, süre sonunda medyum uzaklaştırılıp PBS ile yıkandıktan sonra gluteraldehit ile fikse edildi. Daha sonra kristal viyole boyası eklenerek 15 dakika süresince boyama yapıldı. Kristal viyoleyi uzaklaştırmak için kuyular yıkandı ve boyanan koloniler fotoğraflandı. Koloni sayımı ImageJ programı kullanılarak yapıldı. Koloni formasyon deneyleri Hep3B hücre hattında ve ID1 bileşiğinin uygulanması ile iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.11 Yara İyileşme Analizi (SCRATCH)

Hücre-matris ve hücre-hücre etkileşimlerinin hücre göçü üzerindeki etkilerini incelemek için uygun bir yöntem olan scratch analizi, tek tabaka olarak büyüyen hücrelerde bir “çizik” ile yara oluşturmayı ve çizik yapıldıktan hemen sonra ve hücrelerin çizilerek oluşturulan yara alanını kapatmak için geçirdikleri süreçte belirli aralıklarla görüntü almayı kapsayan bir yöntemdir.

%10 FBS içeren DMEM içerisinde büyütülen hücreler %80-90 doluluğa ulaştığında Tripsin-EDTA ile kaldırıldı ve hücre sayımı yapıldı. Sayılan hücreler 6 kuyucuklu plakalara 500.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde paylaştırıldı ve bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün gelinip hücreler mikroskopta kontrol edildiğinde yüzeyi tamamen kapladığından emin olduğumuzda deney başlatıldı. Yüzeye artı şeklinde steril beyaz uç ile bir çizgi çekilerek yara oluşturuldu. 6 kuyucuklu plakanın her kuyucuğu için aynı işlem uygulandı. Ölü hücrelerin uzaklaştırılması için dikkatli bir şekilde medyum değişikliği yapıldı. Kontrol

gruplarına son hacim 2 mL olacak şekilde %10 FCS içeren DMEM eklenirken, deney gruplarına 100 µM konsantrasyonda ID1 bileşik içeren %10 FCS içeren DMEM eklendi. 1. Hemen fotoğraflandı ve 0. Saat olarak adlandırıldı. Takip eden 6. Saatte ve 24. Saatte yine tüm kuyucuklar fotoğraflandı ve ImageJ programı kullanılarak analiz edildi. Yara iyileşme deneyleri Hep3B hücre hattında ve ID1 bileşiğinin uygulanması ile iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.12 İstatistiksel Analiz

Deney sırasında elde edilen veriler kontrol grubu ile karşılaştırılarak ve deney gruplarında kullanılan farklı konsantrasyonların birbirileri ile karşılaştırılması suretiyle değerlendirildi. Farklı kanser hücre hatlarında (SW480, PC3 ve Hep3B) ve kanser olmayan hücre hattı olan Huvec hücrelerinde ID1, ID2 ve ID3 bileşiklerinin sitotoksik etkisi ve ID1 bileşiğinin Hep3B hücrelerinin tümörejenik özelliklerine etkilerinin değerlendirilmesi için istatistiksel analizler yapılmıştır. İstatistiksel farklılıklar ANOVA (one-way analysis of variance) Tukey test ile belirlenmiştir. $p \leq 0,05$ durumunda farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edilmiştir.

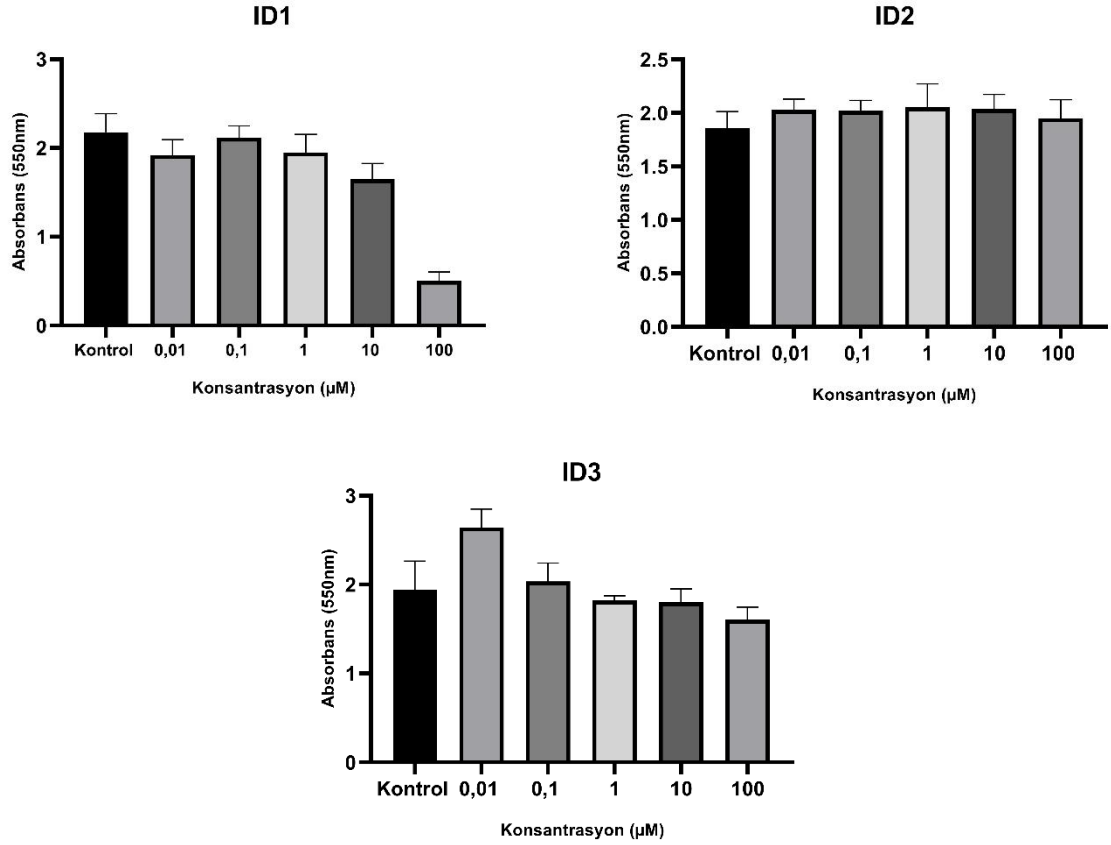
3. BULGULAR

3.1 ID1, ID2 ve ID3 Bileşiklerinin Hep3B Karaciğer Kanseri Hücre Hattına Sitotoksik Etkileri

Hep3B hücre hattında ID1 bileşiğinin 48 saat uygulamasının antiproliferative etkisi incelendiğinde kontrol grubu ile en düşük konsantrasyon olan 0,01 µM uygulanan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ($p=0,046$). Yine 10 ve 100 µM uygulanan gruplar ile kontrol grubu ve diğer konsantrasyonlar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu (Şekil 3.1.).

Hep3B hücre hattında ID2 bileşiğinin 48 uygulamasının antiproliferative etkisi incelendiğinde ise kontrol grubu ile uygulama yapılan gruplar arasında anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. Grupların kendi arasında değerlendirilmesi sonucunda da istatistiksel olarak anlamlı bir azalma veya artış gözlenmemiştir (Şekil 3.1.).

Hep3B hücre hattında ID3 bileşiğinin 48 uygulamasının antiproliferative etkisi incelendiğinde kontrol grubu ile 0,01 µM konsantrasyonda uygulama yapılan grup arasında anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ve hücre proliferasyonun arttığı gözlenmiştir. Kontrol grubu ile en yüksek 100 µM konsantrasyonda uygulama yapılan grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ve en yüksek dozun kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunu azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.1.).

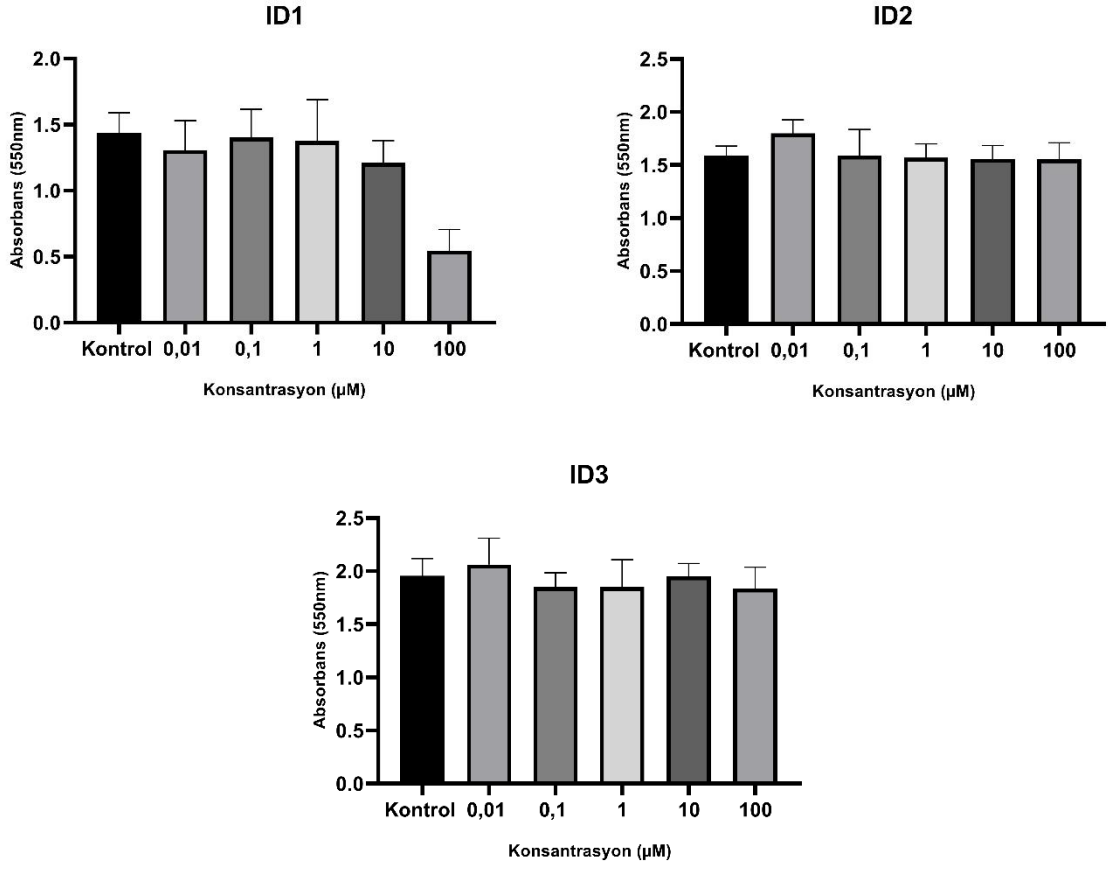


Şekil 3.1. Hep3B hücre hattında ID1, ID2 ve ID3 bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarının 48 saat uygulamasının sitotoksik etkileri.

3.2 ID1, ID2 ve ID3 Bileşiklerinin PC3 Prostat Kanseri Hücre Hattına Sitotoksik Etkileri

PC3 hücrelerinde hücre viabilitesi 48 saat ID1 uygulama sonunda 100 µM uygulanan gruptaki hücreler haricinde tüm konsantrasyonlarda kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. 100 µM uygulanan gruptaki hücreler ile diğer tüm gruplar arasındaki farklılıklar ise 100 µM ID1 uygulamasının hücre proliferasyonunda azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.2.).

PC3 hücre hattında ID2 ve ID3 bileşiklerinin 48 uygulamasının antiproliferative etkisi incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Kontrol grupları ile uygulama yapılan gruplar arasında anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. Grupların kendi arasında değerlendirilmesi sonucunda da istatistiksel olarak anlamlı bir azalma veya artış gözlenmemiştir (Şekil 3.2.).



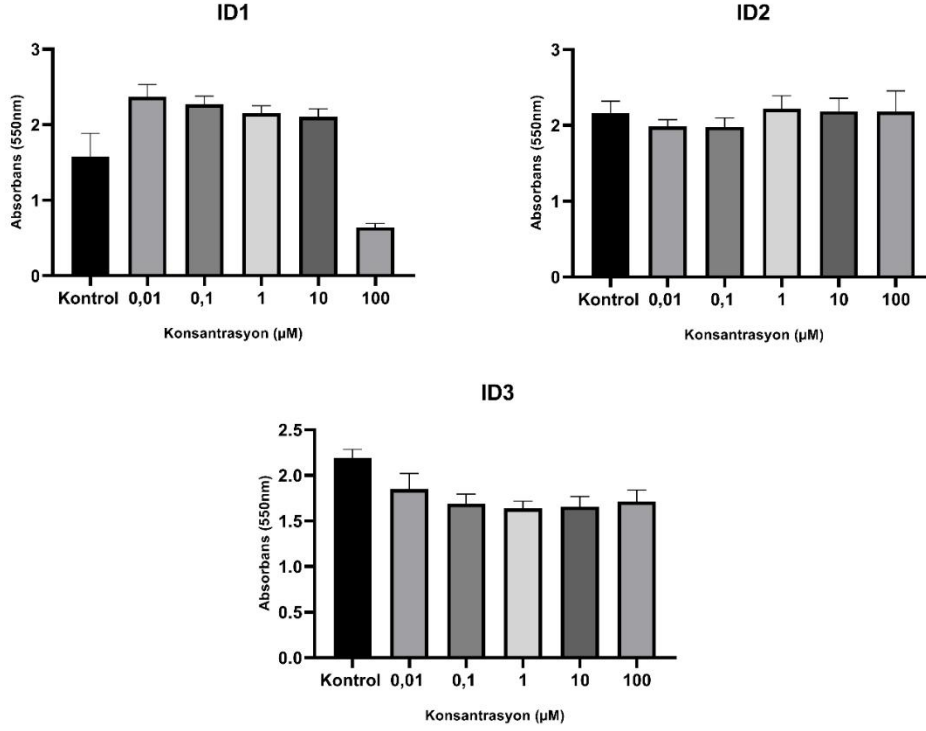
Şekil 3. 2. PC3 hücre hattında ID1, ID2 ve ID3 bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarının 48 saat uygulamasının sitotoksik etkileri.

3.3 ID1, ID2 ve ID3 Bileşiklerinin SW-480 Kolon Prostat Kanseri Hücre Hattına Sitotoksik Etkileri

İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı olan SW480 hücrelerinde ID1 bileşiğinin hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde yine 48 saat sonucunda en yüksek konsantrasyonda hücrelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olurken diğer tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulunan bir hücre proliferasyonuna neden olmuştur (Şekil 3.3.).

İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı olan SW480 hücrelerinde ID2 bileşiğinin hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde ise anlamlı bir artış veya azalma görülmemiştir (Şekil 3.3.).

ID3 bileşiminin SW 480 hücreleri üzerindeki etkisi incelendiğinde ise kontrol grubu ile uygulanan tüm konsantrasyonlar arasındaki hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. Uygulama yapılan gruplar arasındaki farklılıklar ise anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.3.).



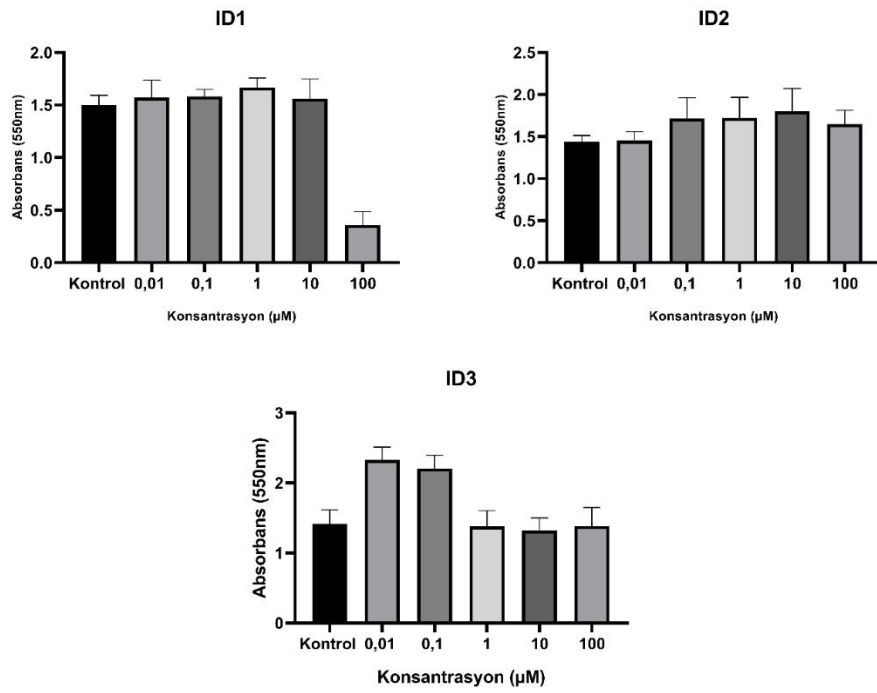
Şekil 3.3. SW-480 hücre hattında ID1, ID2 ve ID3 bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarının 48 saat uygulamasının sitotoksik etkileri.

3.4 ID1, ID2 ve ID3 Bileşiklerinin HUVEC İnsan Endotel Hücre Hattına Sitotoksik Etkileri

İnsan göbek damarı endotel hücreleri olan HUVEC hücre hattı çalışmamızda kanser olamayan hücrelerde ID1, ID2 ve ID3 bileşiklerinin etkisinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. 48 saat süre ile ID1 uygulanan gruplar ile kontrol karşılaştırıldığında, yalnız en yüksek konsantrasyon olan 100 µM hücre grubundaki, hücre viabilitesindeki azalma için istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Diğer konsantrasyonlarda kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. 100 µM uygulanan grup haricinde diğer konsantrasyonlarda uygulama yapılan gruplar arasındaki farklar yine istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 3.4.).

ID2 bileşiği uygulandığında 48 saatte tüm uygulanan konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunda artışa neden olmuştur. Yalnızca 10 µM uygulanan grup ile kontrol grubu arasındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, gruplar arasındaki değişimler anlamlı değildi (Şekil3.4.).

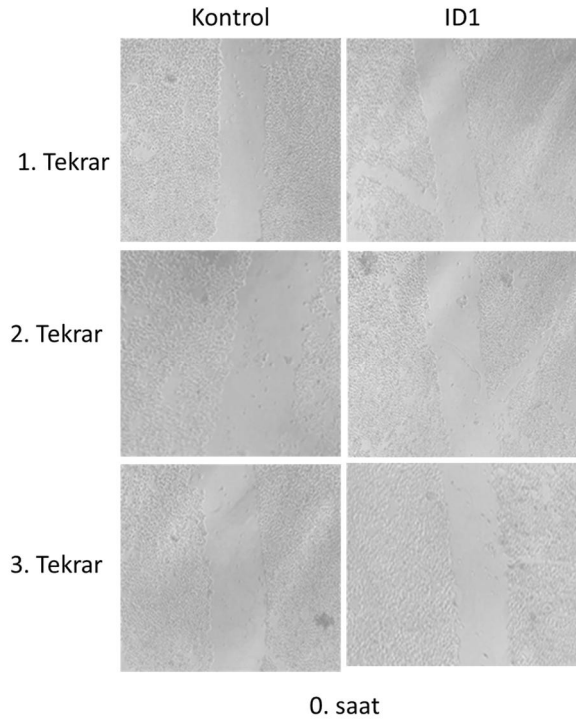
48 saat ID3 bileşiğinin uygulandığı MTT testi sonuçları analiz edildiğinde ise 1 µM altındaki konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunda anlamlı bir artışa neden olurken, 1 µM ve üstündeki konsantrasyonlar hücre proliferasyonunda anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.4.).



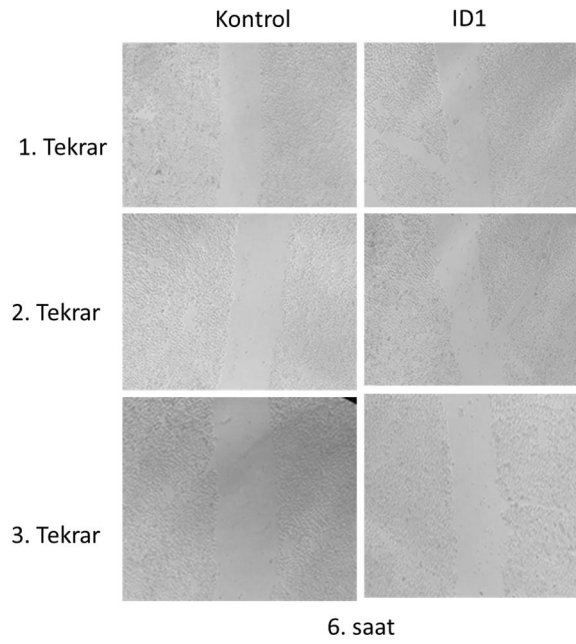
Şekil 3.4. HUVEC hücre hattında ID1, ID2 ve ID3 bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarının 48 saat uygulamasının sitotoksik etkileri.

3.5 Yara İyileşme Analizi (SCRATCH)

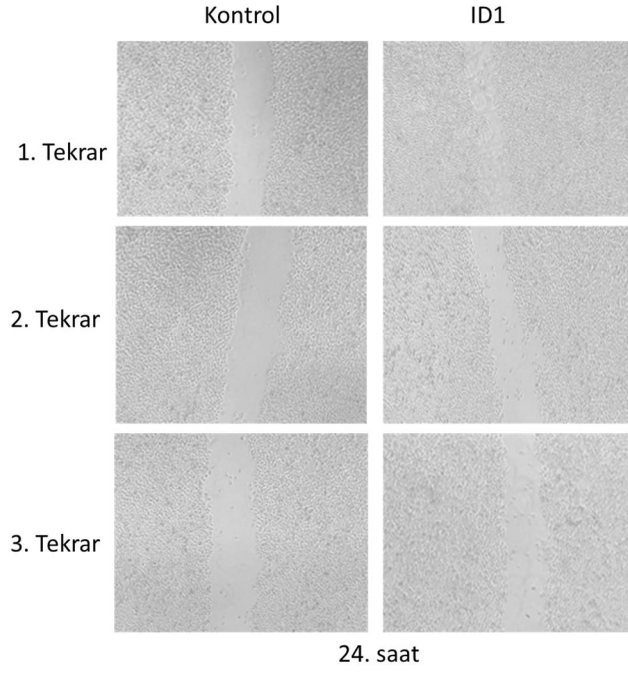
ID1 bileşiğinin Hep3B karaciğer kanseri hücrelerinin göçü üzerindeki etkileri yara iyileşme analizi ile belirlendi. Şekil 3.5'te 0.Saatte 3 tekrarlı olacak şekilde yapılan yara iyileşme testi, Şekil 3.6'da 6. Saatte 3 tekrarlı olacak şekilde yapılan yara iyileşme testi ve Şekil 3.7'de 24. Saatte 3 tekrarlı olacak şekilde yapılan yara iyileşme testi sonuçları verilmiştir.



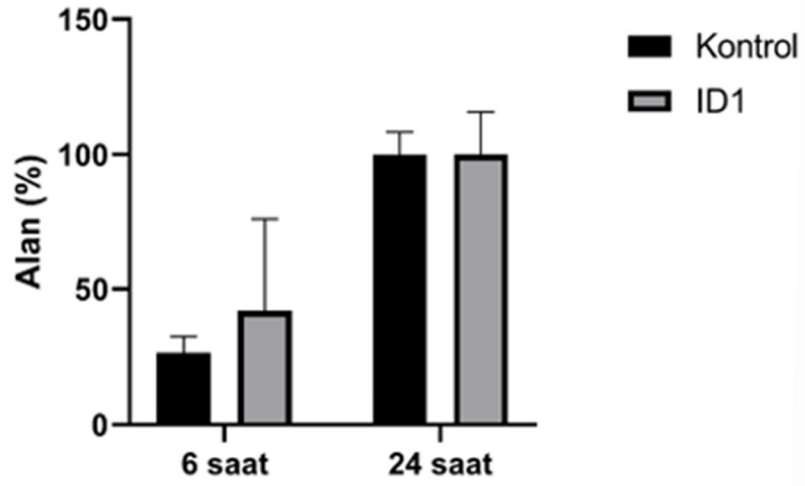
Şekil 3.5. 0. Saat Hep3B yara iyileşme analiz sonuçları.



Şekil 3.6. 6. Saat Hep3B yara iyileşme analiz sonuçları.



Şekil 3.7. 24. Saat Hep3B yara iyileşme analizi sonuçları.

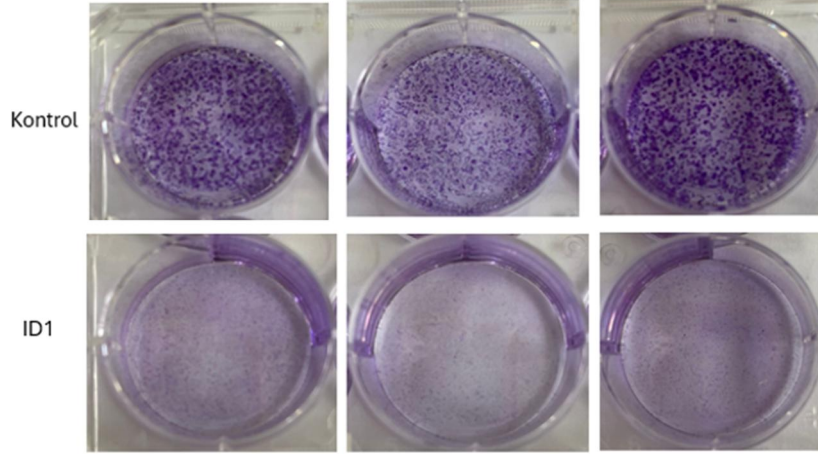


Şekil 3.8. Yara iyileşme alanının kantitatif analizi.

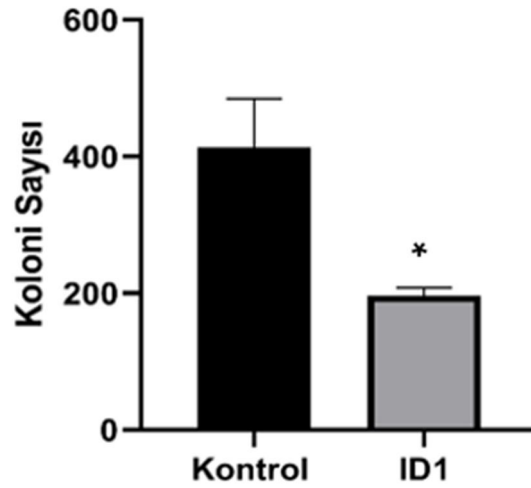
Deney sonucunda 24 saatte kontrol grubu ve ID1 uygulanan grup ile arasında hücre migrasyonu ve kapanan alan açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır.

3.6. Koloni Formasyon Testi

ID1 bileşiminin Hep3B karaciğer kanseri hücrelerinin koloni formasyonu üzerindeki etkileri belirlendi. Şekil 3.8’de 10 gün koloni formasyonu için inkübe edilen hücrelerin kristal viyole ile boyanarak elde edilen görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.9. Hep3B hücrelerinde ID1 bileşiminin koloni oluşumu üzerine etkileri.



Şekil 3.10. Koloni sayılarının kantitatif analizi.

Kontrol grubu ile ID1 bileşimi uygulanan grup arasında koloni sayıları kantitatif analiz sonucunda ID1 uygulamasının koloni sayısında anlamlı bir azalmaya neden olduğu görülmüştür.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Yeni bileşiklerin tasarımı ve kullanımı kimyasal araştırmanın önemli bir parçasıdır. Koordinasyon kompleksleri, katalizden kanser karşıtı ilaçlara kadar geniş bir yelpazede teknolojik ve endüstriyel uygulama çeşitliliğine sahiptir. Bu bileşiklerde, metal atomunun kendisi, koordinasyon geometrisine, oksidasyon durumuna ve manyetik, elektronik veya fotokimyasal davranışına bağlı olarak bir dizi role sahip olabilir. Temel metal olan komplekslerin temel metal olmayanlara oranla daha az toksisite gösterebileceği bakış açısı dolayısıyla azaltılmış toksisite için yeni ilaç çalışmaları büyük öneme sahiptir [30].

Bu tez çalışmasında Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı yüksek lisans tezi kapsamında Uzman İlkey ERDURMAZLI tarafından sentezlenen ID1, ID2 ve ID3 bileşiklerinin sitotoksik ve antitümör etkileri belirlenmiştir. Tek kristal olarak elde edilen 3 bileşiğin yapı analizleri ve kayıt bilgileri “Farklı diamin türevi ligandlar ile disiyanamid içeren Cu(II) ve Ni(II) komplekslerinin sentezi ve karakterizasyonu” başlıklı yüksek lisans tezinde verilmiştir [29].

Tez çalışmamız kapsamında ID1, ID2 ve ID3 bileşiklerinin 3 farklı kanser hücre hattı ve non-kanser insan endotel hücre hattındaki sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlenmiştir. Buna göre ID2 bileşiğinin kullanılan tüm kanser hücre hatlarında (Hep3B, PC3 ve SW 480) istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya veya artışa neden olmadığı belirlenmiştir. Yalnızca insan endotel hücre hattı Huvec hücrelerinde hücre proliferasyonunu artırdığı ve bu artışın 10 µM uygulanan konsantrasyon için kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olduğu belirlenmiştir.

ID3 bileşiğinin sitotoksik etkilerinin belirlendiği çalışmalar sonucunda Hep3B ve PC3 hücrelerinde uygulanan tüm konsantrasyonlar için hücre proliferasyonunda anlamlı bir azalma gözlenmemiştir. Sw480 kolon kanseri hücrelerinde ise uygulanan tüm konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunun anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Huvec hücrelerinde ise 1 µM, 10 µM ve 100 µM konsantrasyonlarında önemli bir değişikliğe neden olmazken, 0,01 µM ve 0,1 µM konsantrasyonlardaki uygulamanın hücre proliferasyonunda anlamlı bir artışa neden olduğu belirlenmiştir.

ID1 bileşiminin 100 µM konsantrasyonda 48 saat uygulandığında tüm kanser hücre hatlarında sitotoksik etkisi anlamlı bulunmuştur. Özellikle karaciğer kanseri hücre hattı olan Hep3B hücrelerinde daha düşük konsantrasyonlarda da sitotoksik etki gösterdiği ve hücre proliferasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya sebep olduğu tespit edildi. PC3 hücrelerinde 100 µM altındaki konsantrasyonlarda anlamlı bir değişikliğe neden olmazken, SW480 kolon kanseri hücrelerinde 48 saat ID1 uygulaması 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM ve 10 µM konsantrasyonlarında sitotoksik etki göstermemiş aksine hücre proliferasyonunu artırarak istatistiksel olarak anlamlı bir hücre çoğalmasına neden olmuştur.

SW480 hücrelerinde 100 µM ID1 uygulaması ise sitotoksik etki göstermiş ve hücre proliferasyonunu azaltmıştır. Kanser olmayan insan endotel hücre hattı olan Huvec hücrelerinde 48 saat ID1 uygulaması sadece 100 µM konsantrasyonda hücrelerde sitotoksik etkiye neden olurken diğer konsantrasyonlarda anlamlı bir artış veya azalışa neden olmamıştır. Bu durum 100 µM altı konsantrasyonlarda sağlıklı hücrelerde sitotoksik etki göstermeyen ID1 bileşiminin, 100 µM altında sitotoksik etki görülen Hep3B hücreleri için önemli bir bileşik olduğu sonucuna götürmüştür. Amacımız kanser hücreleri için sitotoksik olan ancak kanser olmayan hücrelerde sitotoksik olmayan ajanların belirlenmesi ve daha ileri araştırmalar için potansiyellerinin değerlendirilmesi olduğundan, Hep3B hücrelerinde ID1 bileşiminin yara iyileştirme ve koloni formasyonu üzerine etkileri de tezimiz kapsamında belirlenmiştir.

5. KAYNAKLAR

- [1] B. Bozkurt, Z.T. Selçuk, P. Fırat, A.F. Kalyoncu, M. Artvinli, “1972-2002 Döneminde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’nde Akciğer Kanseri Tanısı Konulan Hastaların Histolojik ve Epidemiyolojik Değerlendirilmesi”, *Toraks Dergisi*, vol. 5, no. 3, pp. 148-153, Jul, 2004.
- [2] Ö. Özensoy, “Kanser İlişkili Karbonik anhidraz IX ve XII izoenzimlerinin (CAIX, CA-XII) Ekspresyonu, Safılaştırılması ve Bazı Bileşiklere Karşı İnhibasyon Etkilerinin Araştırılması”, Doktora Tezi, Balıkesir Üniv., Balıkesir, 2006.
- [3] D.M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay, P. Pisani “Global cancer statistics, 2002”, *CA Cancer J Clin.*, vol. 55, no. 2, pp. 74-108, Mar-Apr, 2005.
- [4] E. Fabian-Estrada, “Breast cancer in males, case presentation and literature review”, *Rev Med Ins Mex Seguro Soc*, vol. 56, no. 4, pp. 424-428, Nov, 2018.
- [5] B. Yokuş, D.Ü. Çakır, “Kanser Biyokimyası”, *Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, vol. 1, no. 2, pp. 7-18, 2012.
- [6] P. G. Corn, W.S. El-Deiry “Derangement of growth and differentiation control in onkogenesis”, *Bioessays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, vol. 24, no. 1, pp. 83-90, Jan, 2002.
- [7] B. Pucci, A. Giordano, “Cell cycle and cancer”, *La Clinica terapeutica*, vol. 150, no. 2, pp. 135-41, Mar-Apr, 1999.
- [8] A. Ho, S.F. Dowdy, “Regulation of G1 cell – cycle progression by onkogenes and tumor suppressor genes”, *Current opinion in genetics & development*, vol. 12, no. 1, pp. 47-52, Feb, 2002.
- [9] D. Hanahan, R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: the next generation”. *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646-674, Mar, 2011.
- [10] J. G. Betts, K. A. Young, J. A. Wise, E. Johnson, B. Poe, D. H. Kruse, O. Korol, E. J. Johnson, M. Womble, P. DeSaixBetts, *Anatomy and Physiology 2e*, OpenStax, Houston, Texas, 2016.
- [11] G. T. Pack, “The Definition of Inoperability of Cancer”, *Annals Of Surg*, vol. 127, no. 6, pp. 1105-1118, Jun, 1948.
- [12] K. Vermeulen, Z. N. Berneman, D. R. V. Bockstaele, “Cell cycle and apoptosis” *Cell Proliferation*, vol. 36, no. 3, pp. 165-75, Jun, 2003.

- [13] I. Foster, "Cancer: A cell cycle defect", *Radiography*, vol. 14, no. 2, pp. 144-149, May, 2008.
- [14] W. X. Zong, C. B. Thompson, "Necrotic death as a cell fate", *Genes & development*, vol. 20, no. 1, pp. 1-15, Jan, 2006. 10.1101/gad.1376506.
- [15] W. G. Kearns, J. M. Liu, "Cell cycle checkpoint genes and aneuploidy: A short review", *Current Genomics*, vol. 2, no. 2, pp. 171-80, 2001.
- [16] K. Vermeulen, D. R. V. Bockstaele, Z. N. Berneman, "The cell cycle : a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer", *Cell Prolif.*, vol. 36, no. 3, pp. 131- 149, Jun, 2003.
- [17] T. J. Kelly, G. W. Brown, "Regulation of chromosome replication", *Annual review of biochemistry*, vol. 69, no. 829, pp. 80, 2000.
- [18] S. G. Prasanth, J. Mendez, K. V. Prasanth, B. Stillman, "Dynamics of pre-replication complex proteins during the cell division cycle", *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B*, vol. 359, no. 1441, pp. 7-16, Jan, 2004.
- [19] P. M. Flatt, J. A. Pietsenpol, "Mechanisms of cell-cycle checkpoints: at the cross roads of carcinogenesis and drug discovery", *Drug metabolism reviews*, vol. 32, no. 3-4, pp. 283-305, Aug-Nov, 2000.
- [20] E. R. Fearson, "Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer", *Science*, vol. 278, no. 5340, pp. 1043- 50, Nov, 1947.
- [21] S. Gülinay, "Karaciğer (HEP3B), Prostad (PC3) ve Meme (MCF7) Kanseri Hücre Hatlarında TGF- β ve TNF- α Sitokinlerinin Tümör İlişkili CAIX ve CAXII Ekspresyonuna Etkileri", Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, 2011.
- [22] W. K. Cavenee, R. L. Write, "The genetic basic of cancer", *Scientific American*, vol. 272, no. 3, pp. 72-79, Mar, 1995.
- [23] M. O. Hengartner, "The biochemistry of apoptosis", *Nature*, vol. 407, no. 6805, pp. 770, Oct, 2000. 10.1038/35037710.
- [24] S. L. Fink, B. T. Cookson, "Apoptosis, pyroptosis. And necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells", *Infect Immun.*, vol. 73, no. 4, pp. 1907- 1916, Apr, 2006.
- [25] M. A. Brown, "Tumor suppressor genes and human cancer", *Advances in genetics*, vol. 36, no. 45, pp. 135, 1997.
- [26] C. Lengauer, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, "Genetic insability in colorectal cancer", *Nature*, vol. 386, no. 6625, pp. 623-27, Apr, 1997.

- [27] B. Vogelstein, K. W. Kinzler, “The multistep nature of cancer”, *Trends in Genetic*, vol. 9, no. 4, pp. 138-41, Apr, 1993. 10.1016/0168-9525(93)90209-z.
- [28] H. Pfister, P. G. Fuchs, “Anatomy, taxonomy and evolution of Papillomaviruses”, *Intervirolology*, vol. 37, no.3-4, pp. 143-149, 1994.
- [29] İ. Erdurmazlı, “Farklı Diamin Türevi Ligandlar ile Disiyanamid İçeren Cu(II) ve Ni(II) Komplekslerinin Sentezi ve Karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, 2023.
- [30] S.P. Devi, N. S. Devi, L. J. Singh, R. K. B. Devi, W. R. Devi, “Spectroscopic and DNA interaction studies on mixed ligand copper(II) complexes of dicyanamide with ethylenediamine or 1,3-diaminopropane”, *Inorg. Nano-Met. Chem.*, vol. 47, no. 2, pp. 223-233, Jul, 2016.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Hazal Naz Türkmen

Doğum tarihi ve yeri :

e-posta :

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2025
Lisans	Balıkesir Üniversitesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik	2021
Lise	Rahim Usta Anadolu Lisesi	2013