

**YENİ SENTEZ EDİLEN PALLADYUM BİLEŞİĞİNİN
KURKUMİN İLE KOMBİNASYONUNUN
AKCİĞER KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİ**

Duygu TUNÇ



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YENİ SENTEZ EDİLEN PALLADYUM BİLEŞİĞİNİN
KURKUMİN İLE KOMBİNASYONUNUN
AKCİĞER KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİ**

Duygu TUNÇ

Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE

İkinci Danışman: Prof. Dr. Engin ULUKAYA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BURSA-2016
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ ONAYI

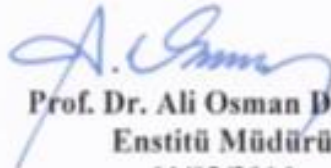
Duygu Tunç tarafından hazırlanan “Yeni sentez edilen Palladyum bileşiğinin Kurkumin ile kombinasyonunun akciğer kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Egemen Dere

- Başkan:** Prof. Dr. Engin Ulukaya
Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
- Üye** Yrd. Doç. Dr. Egemen Dere
Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı
- Üye** Doç. Dr. Ferda Arı
Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı
- Üye** Doç. Dr. Serap Çelikler Kasımoğulları
Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı
- Üye** Doç. Dr. Elif İlkay Armutak
İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Hekimliği Temel Bilimler Bölümü

İkinci Danışman: Prof. Dr. Engin Ulukaya, Uludağ Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım


Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü

11/02/2016

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

-tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,

-görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,

-başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,

-atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,

-kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,

-ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

11/02/2016

Duygu Tunç

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YENİ SENTEZ EDİLEN PALLADYUM BİLEŞİĞİNİN KURKUMİN İLE KOMBİNASYONUNUN AKCİĞER KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİ

Duygu TUNÇ

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE
İkinci Danışman: Prof. Dr. Engin ULUKAYA

Erkeklerde kanserden ölümlerin ana nedenlerinden olan akciğer kanserinin tedavisinde yaygın olarak metal bazlı bir kemoterapötik olan cisplatin kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar, yeni sentezlenen çeşitli metal bazlı bileşiklerin de cisplatine benzer sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle yeni metal bileşenleri yaygın olarak sentezlenmekte ve sitotoksik etkileri araştırılmaktadır. Zerdeçal (hintaşrafı) bitkisinden elde edilen kurkuminin de kanser tedavisinde umut vaat edici etkiye sahip olduğu çeşitli hücre soylarıyla yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu bilgilerin ışığında, bu çalışmada, Uludağ Üniversitesi Kimya bölümü tarafından sentez edilen Palladyum(II) (Pd) kompleksi ile kurkumin kombinasyonunun akciğer kanseri hücre soylarında sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada, Kurkumin ve Pd(II) kombinasyonunun H1299 akciğer kanseri hücre soyu üzerindeki apoptotik ve sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. Pd(II) ve kurkumin kombinasyonunun, bu ajanların tek başına uygulandığı gruplarla kıyasla artmış sitotoksik aktivite ve apoptozise neden olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, bu kombinasyon umut verici sitotoksik etkisinden dolayı akciğer kanseri tedavisi için etkili bir tedavi seçeneği olabilir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, İlaç Kombinasyon Tedavisi, Kurkumin, Akciğer Kanseri **2016, x + 82 sayfa.**

ABSTRACT

Master's Thesis

CYTOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF COMBINATION WITH NOVEL SYNTHESIS PALLADIUM COMPLEX WITH CURCUMIN ON LUNG CANCER CELL LINES

Duygu TUNÇ

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

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Egemen DERE
Second Supervisor: Prof. Dr. Engin ULUKAYA

Metal-based chemotherapeutics such as cisplatin are widely used treatment of lung cancer which is the most common cause cancer-related death in men. Recent studies demonstrated that novel metal-based compounds has strong cytotoxic activity in a similar way as cisplatin. Therefore, metal-based compounds has been synthesized and investigated their cytotoxic activities. It has been also reported curcumin, which has been derived from turmeric plant, has powerful cytotoxic effect on various cancer cell lines. In the light of these data, it has been investigated the cytotoxic effects of combination of curcumin and Pd(II) complex, which has been synthesized by Uludağ University, Department of Chemistry, against lung cancer cell lines. In this study, it has been investigated the cytotoxic and apoptotic activities of curcumin and its combination with Pd(II) complex against H1299 human lung cancer cell line. It has been found that combination of Pd(II) complex and curcumin caused increased cytotoxic activity and apoptosis compared to single use of each agents. In conclusion, the application of this combination may be regarded as a novel and effective approach for the treatment of lung cancer due to its promising cytotoxic effect.

Keywords: Apoptosis, Combination Drug Therapy, Curcumin, Lung Cancer
2016, x + 82 pages.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarında danışmanlığımı yapan, eğitimimin düzenli işleyişi için büyük bir özveri gösteren ve her konuda desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE'ye,

Yüksek lisans öğreniminin her aşamasında sonsuz anlayış ve desteğiyle hep yanımda olan, benim için çok değerli olan bilgi ve tecrübeleriyle bana her daim yol gösteren, ilgi ve yardımlarını benden hiç eksik etmeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya,

Çalışmalarım süresince bana her konuda yardımcı olan, sorularımı asla yanıtsız bırakmayan, hocalarım, Sayın Doç. Dr. Ferda ARI, Sayın Doç. Dr. Arzu YILMAZTEPE ORAL ve Sayın Doç. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI'na,

Tez çalışmam boyunca bilgi, deneyim ve önerilerini benimle paylaşarak bana yol göstermiş olan meslektaşlarım, Didem KARAKAŞ ve Buse CEVATEMRE'ye,

Tez çalışmam boyunca bana her konuda yardımcı olan, Pınar ALPER, Mehmet SARIMAHMUT, Merve ERKISA, Nazlıhan AZTOPAL, Selin ÖRCÜN, Şeyma AYDİNLİK ve Oğuzhan AKGÜN'e,

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen ve hayatım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayarak her zaman yanımda olan, bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi aile fertlerime sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Duygu Tunç

11 /02/2016

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
GİRİŞ.....	1
1. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
1.1.Kanser.....	3
1.1.1.Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	5
1.2.Akciğer Kanseri.....	6
1.2.1.Akciğer Kanseri ve Moleküler Biyolojisi.....	9
1.3.Apoptozis.....	10
1.3.1. Apoptozisin İndüklenmesi.....	11
1.3.2. Apoptozisin Mekanizmaları.....	12
1.3.3.Apoptotik Hücrede Görülen Morfolojik Değişiklikler.....	14
1.3.4. Apoptozis Ve Nekroz Arasındaki Farklar.....	15
1.3.5. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler.....	16
1.3.5.1.Morfolojik görüntüleme yöntemleri.....	17
1.3.5.2.Histokimyasal yöntemler.....	19
1.3.5.3.Biyokimyasal Yöntemler.....	19
1.3.5.4.İmmunolojik Yöntemler.....	20
1.4.Kurkumin.....	21
1.4.1.Kurkuminin Anti-kanser Etkisi.....	22
1.5.Yeni Sentez Edilen Palladyum (II) Bileşiği.....	25
1.5.1.Palladyum (II) Bileşiğinin Biyolojik Etki Mekanizmaları.....	25
1.5.2.Palladyum (II) Bileşiğinin Kanser Tedavisindeki Yeri.....	26
2.MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
2.1.Materyal.....	29
2.1.1.Kimyasal Maddeler.....	29
2.1.2.Sarf Malzemeler.....	29
2.1.3.Cihazlar.....	29
2.2.Yöntem.....	30
2.2.1. Kurkumin ve Pd (II) Hazırlanması.....	30
2.2.2.Hücre Kültürü.....	30
2.2.2.1.Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması.....	30
2.2.2.2.Hücre Soylarının Pasajlanması.....	31
2.2.2.3.Hücre Soylarının Stoklanması.....	31
2.2.2.4.Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması.....	31
2.2.2.5.Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı.....	32
2.2.3.SRB (Sulforhdamine B) Canlılık Metodu.....	32
2.2.4. Hoechst 33342, Propidiyum İyodür (PI) ile İkili Boyama yöntemi.....	34
2.2.5. Akım Sitometri Analizleri.....	35
2.2.5.1. Anneksin V & Ölü Hücre Boyama.....	36
2.2.5.2. Kazpaz 3/7 Testi.....	37
2.2.5.3. Gamma-H2AX Testi.....	38
2.2.6.Apoptotik Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi.....	40

2.2.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	40
2.2.6.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İşleminin Uygulama Aşamaları ve Prensipleri..	40
2.2.6.1.1.1. DNA'nın Denatürasyonu Aşamaları.....	41
2.2.6.1.1.2. Primerlerin Bağlanması (Hibridizasyon, Annealing) Aşamaları.....	41
2.2.6.1.1.3. Primerlerin Uzatılması (Polimerizasyon, Extention, Elongation) Aşamaları...	41
2.2.6.2. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	41
2.2.6.3. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu.....	43
2.2.6.4. İzole Edilen RNA'ların Kontrolü.....	43
2.2.6.5. cDNA Sentezinin Yapılması.....	43
2.2.6.6. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizinin Yapılması.....	44
2.2.7. Western Blot Analizi.....	45
2.2.7.1. Protein İzolasyonu	46
2.2.7.1.1. Çözeltiler	46
2.2.7.2. Proteinlerin Biçinkoninik Asit Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi ...	47
2.2.7.2.1. Çözeltiler	47
2.2.9.2.2. BSA Standartlarının Hazırlanması.....	47
2.2.7.2.3. Biçinkoninik Asit Ölçümünün Yapılması	48
2.2.9.3. Western Blot Yöntemi ile Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarılması.....	48
2.2.9.3.1. Çözeltiler	48
2.2.7.3.2. Proteinlerin Yüklenmesi ve Jelde Yürütülmesi	48
2.2.7.3.3. Proteinlerin Transferi.....	48
2.2.9.3.4. GAPDH Proteinlerinin Belirlenmesi.....	48
2.2.7.3.4.1. Bloklama	48
2.2.7.3.4.2. Birincil Antikor	49
2.2.7.3.4.3. İkincil Antikor	49
2.2.7.3.4.4. Görüntüleme.....	49
2.2.7.3.5. PARP Proteinlerinin Belirlenmesi	49
2.2.7.3.5.1. Birincil ve İkincil Antikorların Membrandan Uzaklaştırılması	49
2.2.7.3.5.2. Bloklama	49
2.2.7.3.5.3. Birincil Antikor	50
2.2.7.3.5.4. İkincil Antikor	50
2.2.7.3.5.5. Görüntüleme.....	50
2.2.8. İstatistiksel Analiz.....	50
3. BULGULAR.....	50
3.1. SRB Canlılık Testi Bulguları.....	51
3.2. Hoechst 33342, Propidyum İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi Bulguları.....	53
3.3. Akım Sitometri Bulguları.....	54
3.3.1. Anneksin V & Ölü Hücre Boyama Bulguları.....	54
3.3.2. Kazpaz 3/7 Testi Bulguları.....	55
3.3.3. Gamma-H2AX Testi Bulguları.....	56
3.4. Genlerin Ekspresyon Profilleri.....	58
3.5. Western Blot Bulguları.....	59
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	60
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	78

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

7-AAD : 7-Aminoaktinomisin D

AIF : Apoptosis indükleyici faktör (Apoptosis inducing factor)

Apaf-1 :Apoptotik proteaz aktive eden faktör

ATP :Adenozin trifosfat (Adenosine triphosphate)

CAD :Kaspaz aktive edici DNaz

CSF :koloni uyarıcı faktörler

DAPI :4',6-diamidino-2-phenylindole

DD :Ölüm alanı (Death domain)

DISC :Ölüm indükleyici sinyal kompleksi (Death inducing signalling complex)

DMEM :Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO :Dimetil sülfoksit (Dimethyl sulfoxide)

DNA :Deoksi ribonükleik asit (Deoxyribonucleic acid)

DNA-PK :DNA bağımlı protein kinaz (DNA-dependent Protein Kinase)

DTT :Dithiothreitol

EDTA :Etilen Diamin Tetraasetik Asit

EGFR :Epidermal büyüme faktör reseptörü(Epidermal growth factor receptor)

FADD :Fas ilişkili ölüm alanı (Fas associated death domain)

FBS :Fetal sığır serumu (Fetal bovine serum)

FITC : Fluoresin izotiyosiyanat

GAPDH :Glukoz-3-fosfat dehidrogenaz

GTP :Güanozin trifosfat

HE :Hematoksilen-eozin

IARC :Dünya Sağlık Örgütü Uluslar arası Kanser Araştırma Ajansı

ICAD :Kaspazla aktive edilmiş

IGF :İnsülin benzeri büyüme faktörü

KHAK :Küçük hücreli akciğer kanseri

KHDAK :Küçük hücreli dışı akciğer kanseri

KUR :Kurkumin

NGF :Nöron büyüme faktörü

PAGE :Poliakrilamid jel elektroforezi (Polyacrylamide gel electrophoresis)

PARP :Poli(ADP-riboz)polimeraz (Poly ADP-ribose polymerase)

PBS :Fosfat tuz tamponu (Phosphate buffered saline)

Pd :Palladyum

PI :Propidyum iyodür (Propidium iodide)

Pt :Platin

PS :Fosfatidil serin (phosphatidylserine)

PCR :Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR; polymerase chain reaction)

Rb :Retinoblastoma

RNA :Ribo nükleik asit (Ribonucleic acid)

RPMI :Roswell Park Memorial Institute Medium

SDS :Sodyum dodesil sülfat (Sodium dodecyl sulfate)

SRB :Sulforhodamine B

TCA :Trikloroasetik asit

TdT :Terminal deoksinükleotidil transferaz

TNF :Tümör nekrozis faktör

TRAIL :TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand (TNF-related apoptosis inducing ligand)

ŞEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
1.1. Tümör gelişim aşamaları.....	3
1. 2. Kanser yayılması.....	4
1.3. Kanserli hücrelerin özellikleri.....	6
1.4.a. İnsidans.....	7
1.4.b. Mortalite	7
1.5. İntrinsik (içsel) yolak ve Ekstrinsik (Dışsal) yolak.....	13
1.6. Apoptozom.....	13
1.7. Apoptozisin Morfolojik değişiklikleri.....	15
1.8. Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar.....	16
1.9. Kurkumunoidlerin kimyasal yapısı.....	22
1.10. Kurkuminin etkili olduğu kanser türleri.....	23
1. 11. Kurkuminin antikanser özellikleri	23
2.1. Srb'nin moleküler yapısı	32
2.2. Fosfotidilserinin translokasyonu ve Anneksin V'i bağlaması.....	36
2.3. Anneksin V ve Ölü Hücre Boyama Protokolü	37
2.4. Kaspaz 3/7 Testi Protokolü	38
2.5. Gamma-H2AX Testi Protokolü	39
2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Siklusunun Basamakları.....	40
3.1. Kurkumin, Pd(II) ve bu bileşiklerin kombinasyonları ile muamele edilen A549 ve H1299 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği.	51
3.2. H1299 hücrelerinin 12 ve 24 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri	53
3.3. Anneksin-V-FITC Boyama Bulguları	55
3.4. Kaspaz 3/7 Aktivitesi Bulguları	56
3.5. Gamma-H2A.X Testi Bulguları	57
3.6. H1299 hücre soyunda 18 saatlik kombinasyon muamelesinin, bazı apoptotik genlerin ekspresyonları üzerine olan etkisinin gösterimi.....	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1. cDNA Sentez Mix Hazırlanışı.....	44
Tablo 2. qPCR Master Mix'in Hazırlanışı.....	44



GİRİŞ

Akciğer kanseri, dünyada görülme oranı ve ölüm oranı en yüksek olan kanser türlerinden biridir. Her yıl dünyada yaklaşık 1,8 milyon insana yeni akciğer kanseri tanısı konmakta ve 1,6 milyon insan bu sebepten hayatını kaybetmektedir (Anonim 2015a).

Akciğer kanseri, tedavi, prognoz ve morfolojik görünümü bakımından küçük hücreli (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. KHDAK'nın kabul gören en iyi tedavi şekli cerrahi operasyondur. Genellikle kullanılan diğer tedaviler radyoterapi, kemoterapi ve adjuvan kemoterapidir (NCCC 2011).

Birçok metal bileşik, farklı kanserlerin tedavisinde kemoterapotik olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu amaçla ilk olarak Cisplatin sentezlenmiştir (Rebecca ve ark, 2006). Cisplatin, küçük hücreli dışı akciğer kanser hastalarının tedavisinde rutin olarak kullanılan bir kemoterapotiktir. Fakat ciddi toksik yan etkilere neden olur ve bazı hücrelerin cisplatine karşı doğal dirence sahiptir (Liao ve ark 2008; King ve ark. 2006). Bu nedenle, araştırmacılar cisplatine karşı direnç geliştiren tümörlere etkili olabilecek daha az yan etkiye sahip yeni metal kompleksler sentezlemeye yönelmişlerdir (Jolley ve ark. 2001).

Yapılan çalışmalarda standart platin türevli ilaçlara (cisplatin, karboplatin ve oxaliplatin gibi) benzer şekilde Palladyum (Pd) türevlerinin de akciğer ve meme kanseri hücre soylarında büyümeyi inhibe ederek ve apoptozisi indükleyerek sitotoksik etki yarattığı gösterilmiştir (Ulukaya ve ark. 2011a; Arı ve ark. 2014). Başka bir çalışmada da Pd bileşiklerinin sitotoksik etkiyi DNA'da yüksek düzeyde hasarlar oluşturarak yaptıkları gösterilmiştir (Ruiz ve ark. 2005; Miklasova ve ark. 2009).

Kurkumin (diferuloylmethane), *Curcuma longa linn.* bitkisinin tümerik rizomlarından ekstrakte edilen polifenolik yapıda bir komponenttir (Ammon ve Wahl 1991; Stoner ve Mukhtar 1995). Zerdeçal bitkisinin yaklaşık 6000 yıldır ağrı kesici, iltihap kurutucu, yara iyileştirici, ülser, kireçlenme ve cilt hastalıklarındaki tedaviye yardımcı özelliklerinden dolayı tıbbi amaçla kullanıldığı Ayurveda'da (Hint Tıp Sistemi) belgelenmiştir (Aggarwal 2003). Yapılan çalışmalarda kurkuminin anti-inflamatuar, anti-oksidan, anti-infeksiyon ve anti-kanser gibi birçok biyolojik etkinliği olduğu rapor

edilmiştir (Saikia ve ark. 2006; Chaudhri 1950). Artan çalışmalar, kurkuminin kanserin 3 aşamasının (başlama, ilerleme ve progresyon) tamamını baskıladığını göstermiştir. Kurkumin, normal dokuları kemoterapatiklerin toksik etkilerinden korurken tümörlerin kemoterapiye duyarlılığını artırır (Goel ve Aggarwal 2010). Birçok çalışmada kurkuminin akciğer kanser hücrelerinde apoptozisi indüklediği de gösterilmiştir (Chen ve ark. 2010; Pongrakhananon ark. 2010; Wu et al. 2010; Lee et al. 2011).

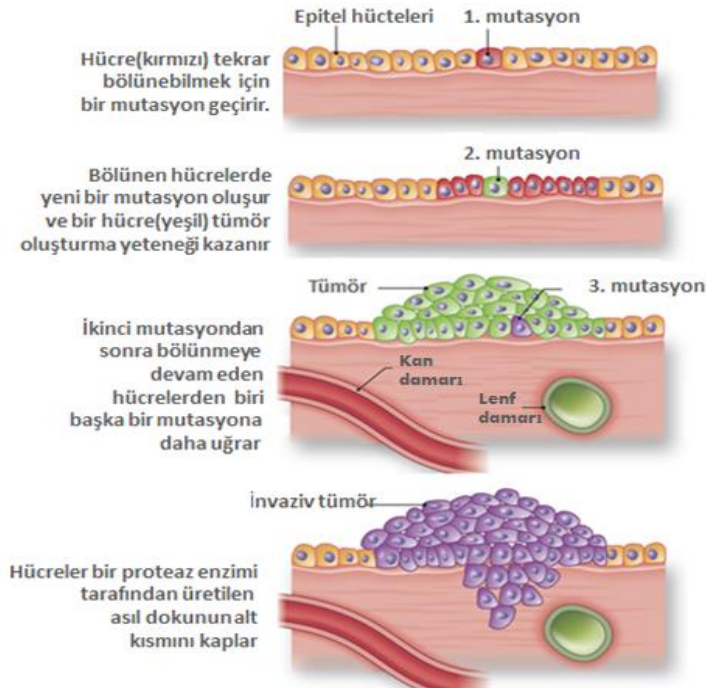
Elde edilen bilgiler doğrultusunda bu çalışmada, , Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Anorganik Araştırma Grubu tarafından sentezlenmiş Palladyum(II) kompleksi $[[Pd(bpma)(barb)]Cl.H_2O]$, kurkumin ve her ikisinin kombinasyonunun, A549 ve H1299 küçük hücreli dışı akciğer hücre soyları üzerindeki olası sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır.

1.KAYNAK ÖZETLERİ

1.1.Kanser

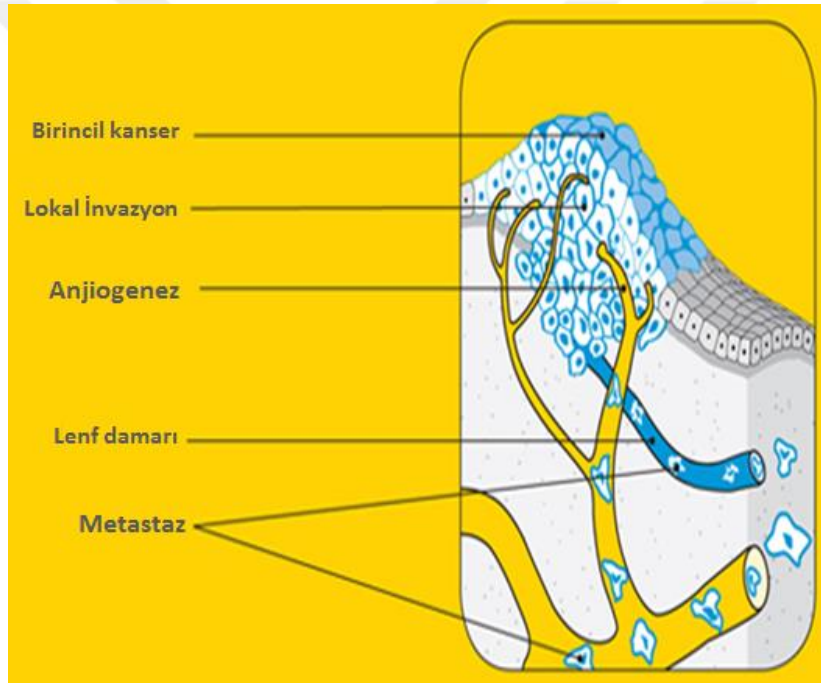
Hücrelerin aşırı ve kontrolsüz çoğalmaları ve immün sistemin gözetiminden kaçmaları sonucu oluşan, metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdikleri çok basamaklı süreç kanser olarak adlandırılır. Hücrelerdeki bu değişiklikler hücre proliferasyonunu ve yaşam süresini, çevredeki hücrelerle ilişkilerini ve immün sistemden kaçma kapasitelerini kontrol eden genetik programlardaki modifikasyonların birikmesiyle oluşmaktadır (Anonim 2012a).

Kanser sürecindeki ilk basamak olan tümör gelişiminin, benign veya malign olan tek bir hücrenin anormal çoğalmasına yol açan genetik değişikliklerin sonucu olduğu düşünülmektedir. Sonrasında ise hücre proliferasyonu, klonal şekilde oluşan tümör hücrelerinin popülasyonunun büyümesine neden olmaktadır ve bu hücrelerde oluşan ek mutasyonlar ile tümör gelişimi ilerlemektedir. Hücreye daha hızlı büyüme gibi seçici bir avantaj sağlayan mutasyonu taşıyan hücre soyu tümör popülasyonu içerisinde baskın bir hale gelmektedir. Bu süreç de klonal seleksiyon olarak adlandırılmaktadır. Tümörlerin sürekli daha hızlı büyümesi ve malign hale gelmesinin sebebi de klonal seleksiyonun tümör gelişimi boyunca devam etmesidir (Şekil 1.1) (Cooper 2000).



Şekil 1.1. Tümör gelişim aşamaları (Anonim 2008)

Hücrelerin kontrolsüzce proliferasyonu, invazyon (diğer sağlıklı dokuları istila etme) ve metastaz (dolaşıma geçerek sağlıklı başka dokulara yayılma) gibi malign özellikleri kanser hastalığının ortaya çıkmasında rol oynar (Hanahan ve Weinberg 2000). Tümör dokusu 2-3mm büyüklüğe ulaşana kadar çevre dokudan beslenebilir ancak daha büyük boyutlardaki tümörler çevre dokulardan beslenemez ve yeni damar ağı oluştururlar (Anjiogenez). Tümör hücreleri, farklı başka faktörlerin de etkisi ile yakınındaki kan ve lenf damarlarına geçer ve Dolaşım sistemi yoluyla uzak dokulara yerleşip burda da tümör oluşturabilir. Kanser hücreleri yüzey özellikleri, organların damar duvarındaki hücrelerin yüzey özelliklerine ve organın damar yapısı gibi özelliklere göre belirli organlara metastaz yapmaktadırlar (Şekil 1.2) (Aliustaoğlu 2009).



Şekil 1. 2. Kanser yayılması (Anonim 2015b)

Benign (iyi huylu) tümörleri oluşturan hücreler, yavaş proliferasyon gösteren ve başlangıç bölgeleriyle sınırlı kalan hücrelerdir. Benign tümörler vücudun diğer bölgelerine yayılma göstermeyen tümörlerdir ve tümör bulunduğu bölgeden cerrahi yöntem ile çıkarıldığında tekrar büyüme göstermez.

Malign (kötü huylu) tümörleri oluşturan hücreler ise hızlı proliferasyon gösteren anormal hücrelerdir ve genetik yapıları bozulmuş olduğundan anormal proteinler üretirler. Bu hücreler lenf veya kan damarlarına geçerek vücudun çeşitli bölgelerine yayılma özelliğine sahiptirler.

Her iki tümör tipi de meydana geldikleri hücre türüne göre sınıflandırılmaktadırlar. Örneğin; fibrosarkom, fibroblast hücrelerinden meydana gelmektedir. Kanser türleri üç ana gruba ayrılmaktadır;

Karsinomlar, insan kanserlerinin %90'ını içeren epitel hücrelerden köken alan malignitelerdir, sarkomlar ise bağ dokusu ya da kas hücrelerinden köken alan solid tümörlerdir. Kan yapıcı hücrelerden türeyen lösemiler ise bu iki ana katagoriye de girmezler (Cooper 2000).

1.1.1. Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Bazı kanser türleri tek bir anormal hücreden kaynaklanırken bazı kanser türleri ise tümör dokusunda birden fazla hücrenin karsinojene maruz kalmasından kaynaklanmaktadır (Klonal Orjin).

Normal hücrelerin bölünme sayısı sınırlıyken kanser hücrelerinin ise sınırsızdır (Şekil 1.3). Kanser hücrelerinin bu özelliği immortalite olarak adlandırılır. İmmortalitenin mekanizmalarından biri kromozom uçları olan telomerlerdir. Normal hücreler farklılaşırken telomeraz enzimi de programlı bir şekilde gittikçe azalır ve buna bağlı olarak telomerler kısalır. Dolayısıyla tamamen farklılaşmış bir hücre siklusun G₀ fazında durur (senesens) ve sonunda çoğalma kapasitesini yitirir. Oysa kanser hücrelerinde telomeraz enzimi etkinliğini sürdürür yani telomerlerin uzunluğu sabit kalır ve hücreler sınırsız bölünme yeteneği kazanır.

DNA tamirindeki veya DNA uygunsuzluğunda saptanan eksiklikler genetik instabiliteye neden olur ve buna bağlı olarak kanser hücreleri proliferasyon kontrol mekanizmalarına daha az yanıt verir. Yabancı çevrede yaşama yeteneğine sahip klonlar oluştururlar ve böylece metastaz yaparlar.

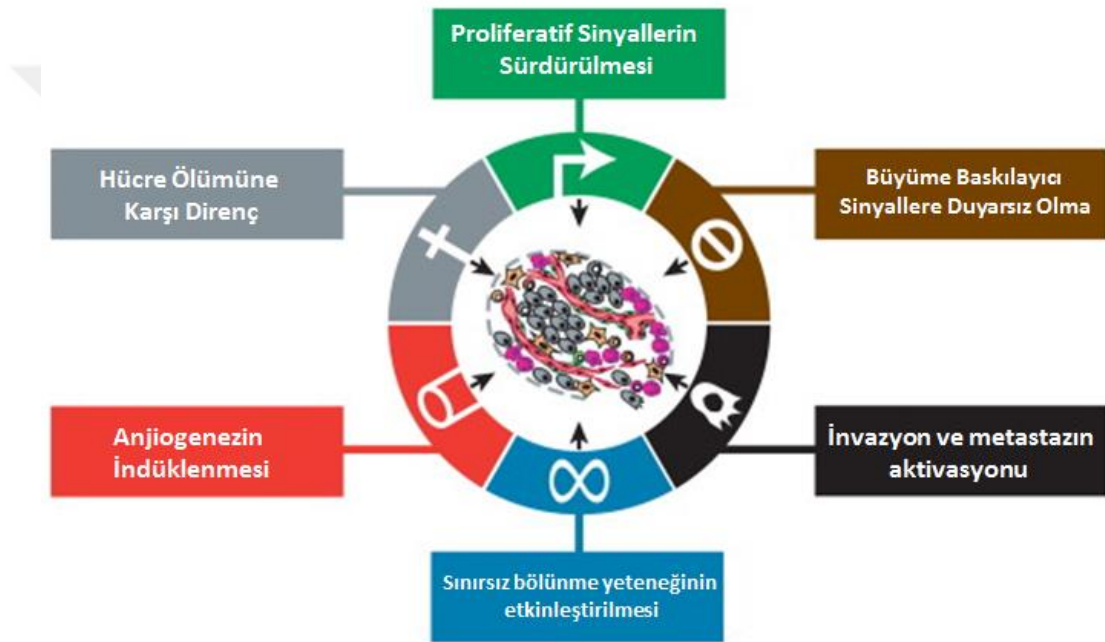
Kültür ortamında büyüyen normal hücreler, bulundukları kültür ortamında yüzeye yapışamazlarsa bölünemezler. Normal hücreler çoğalıp üzerinde büyüdükleri tüm yüzeyi tek tabaka halinde (monolayer) doldurduklarında ise besiyerleri bölünmeleri için gerekli tüm büyüme faktörleri ve diğer besin elemanlarını (nütrientleri) içerse bile bölünemezler. Kanser hücreleri ise, birden fazla tabaka oluşmasına rağmen bölünmeye devam edebilirler.

Kültür ortamındaki kanser hücrelerinin bir özelliği de büyüme faktörlerinden ve nütrientlerden bağımsız olarak proliferasyonun devamlı artmasıdır. Kanser hücreleri

beslenmeleri için gerekli besin faktörlerini tüketmelerine rağmen büyümeye devam ettiklerinden aslında kendi kendilerini öldürmektedirler.

Kanser hücreleri, ekstrasellüler büyüme faktörlerinin gereksinimlerini azaltmaktadır. Bu hücreler genellikle ekstrasellüler matriks bileşenlerini sindirecek proteazları yapısında bulundurmakta ve normal dokulara işgale izin vermektedir.

Kanser hücreleri, yeni kan damarlarının oluşumunu indükleyen büyüme faktörleri bulundurmaktadır ve tümör belli bir boyuta geldiğinde beslenmesini sağlamak amacıyla yeni kan damarları oluşturulur (Anjiyogenez) (Lowitz ve Casciato 2000; Cooper 2000).

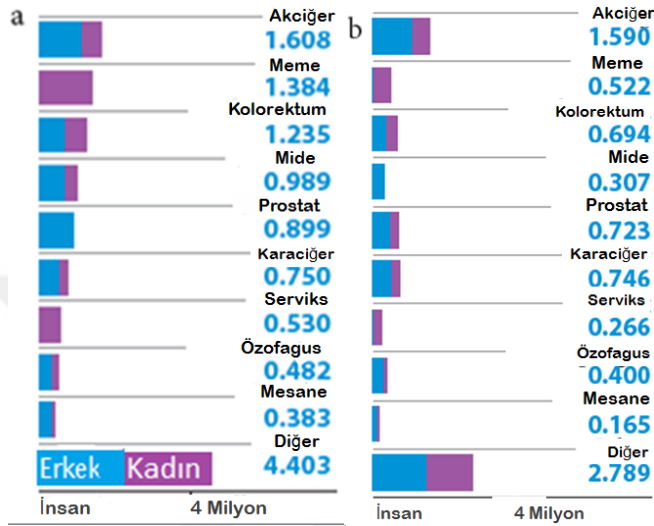


Şekil 1.3. Kanserli hücrelerin özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2000)

1.2. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, 20. yüzyılın başlarında çok sık görülmeyen bir hastalıkken 20. yüzyılın ikinci yarısından sonra görülme oranı gittikçe artmıştır (Spiro ve Porter 2002). Dünya Sağlık Örgütü Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafınca yayımlanan Globocan verilerine göre akciğer kanseri dünya genelinde en sık tanı konan ve en sık ölüme neden olan kanser türüdür. 2012 yılında 1,8 milyon kişiye akciğer kanseri tanısı konmuştur ve bu tüm kanser vakalarının %12,9'unu oluşturur (Anonim 2012b). Amerikan Kanser Derneği'nin akciğer kanseriyle ilgili yaptığı yayınlarında 2015'te Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık olarak 221.200 kişiye akciğer kanseri tanısı konmuştur ve yaklaşık olarak 158.040 kişi bu sebepten dolayı hayatını kaybetmiştir

(Anonim 2015c). Türkiye’de ise 2012 yılında her 100.000 yetişkin kanser hastasından %34,71’i akciğer kanseridir (Anonim 2012c). Akciğer kanseri hem kadın hem erkeklerde ölüm oranı (mortalitesi) bakımından birinci sırada yer alırken, görülme sıklığı (insidans) bakımından kadınlarda meme kanserinden sonra erkeklerde ise prostat kanserinden sonra ikinci sıradadır (Şekil 1.4 a,b)



Şekil 1.4. a. İnsidans b. Mortalite (Anonim 2014)

Akciğer kanserinin küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olmak üzere başlıca iki tipi vardır. KHDAK’da 5 yıllık hayatta kalma oranı sadece %17,3’tür. KHDAK’ye, KHAK’ye göre daha sık rastlanır ve tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık olarak %85’ini oluşturur. KHAK’ye göre daha yavaş metastaz yapar. KHDAK’nin kanser oluşumundaki hücre tiplerine göre isimlendirilen yassı, Skuamöz, epidermoid adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom olmak üzere üç tipi vardır. KHAK tüm akciğer kanseri vakalarının %16’sını oluşturur ve 5 yıllık hayatta kalma oranı sadece %6,2’dir (Travis ve ark. 2004; Wahbah ve ark. 2007).

Akciğer kanseri epidemiyolojinde çok sayıda faktör rol oynamaktadır. Akciğer kanserine neden olan başlıca faktör sigaradır ve vakalarda sigara içme oranı yaklaşık %90 olarak saptanmıştır (Göksel ve ark. 2010). 1939’da Oschsener ve De-Bakey’in yaptıkları çalışmalar akciğer kanseri vakalarındaki artışta sigaranın olası bir faktör olabileceğine dikkat çekmiştir. 1962 ve 1964 yıllarında ise akciğer kanseri insidansı ile sigara kullanımının ilişkisi gösterilmiştir (McErlean ve ark. 2011). Sigara dumanında 4000’den fazla kimyasal madde bulunur ve bunların 50’den fazlası insan ve hayvanlar

için kanserojendir. Sigara içen bir kişinin akciğer kanserinden ölme riski hayatı boyunca hiç sigara içmemiş bir kişinin akciğer kanserinden ölme riskinden 15 kat daha fazladır (Doll ve ark. 2005). Sadece aktif sigara içimi değil, son yıllarda yapılan çalışmalarda sigara dumanı maruziyetinin (pasif içicilik) de kanser riskini artırıcı etkisi üzerinde durulmaktadır. Yapılan çalışmalar pasif olarak sigara dumanına maruz kalan kişilerde bile akciğer kanseri gelişme riskinin %25 oranında arttığını göstermiştir (Taylor ve ark. 2007; Stayner ve ark. 2007). Her yıl yaklaşık 3000 pasif içici akciğer kanserinden hayatını kaybetmektedir. Sigara dışında akciğer kanserine sebep olan diğer etmenler; yaş, ırk, cinsiyet, meslek, hava kirliliği, diyet, genetikdir (Halilçolar ve ark. 1999).

Sigara kullanımı kadınlara göre erkeklerde daha yaygın olduğundan akciğer kanseri erkeklerde daha sık görülmektedir. Fakat kadınlarda sigara kullanımının yaygınlaşmasıyla insidans erkeklere göre daha hızlı artmaktadır (Spitz ve ark. 2007; Detterbeck ve ark. 2003). 50 yaş ve altındaki bireylerde akciğer kanseri görülme oranı ve mortalitesi giderek azalmaktayken 70 yaş ve üzerinde geçmişte sigara kullanımına bağlı olarak artmaktadır. Erkeklerde halen yaş ile birlikte akciğer kanseri insidansı kadınlardan daha fazladır, ancak erkeklerde azalan akciğer kanseri insidansı ile birlikte bu fark da azalmaktadır (Siegel ve ark. 2011; Jemal ve ark. 2008; Wingo ve ark. 2003). 2000 yılında tüm dünyada akciğer kanserine bağlı ölümlerin erkeklerde %10'undan, kadınlarda %5'inden mesleki karsinojenlerin neden olduğu hesaplanmaktadır (Driscoll ve ark. 2005). Asbest en sık mesleki akciğer kanseri sebebidir ve başlıca 2 tip fibröz mineralden (amfibol, serpentin) oluşur. 1940'lardan beri akciğer kanserine neden olduğu bilinmektedir (Hughes ve ark. 1994). Asbest ile mesleki maruziyet özellikle tersane ve liman işçileri, tesisatçılar, marangozlar, elektrikçiler, dökümhane çalışanları ve boru imalatında çalışanlarda olmaktadır (Scarselli ve ark. 2008; Consonni ve ark. 2010). Radon normal sıcaklıklarda radyumdan bozunmayla oluşan bir gazdır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, radon gazı etkisi altında kalan maden işçilerinde akciğer kanseri riskinin radon maruziyeti ile lineer bir ilişkisi olduğunu göstermektedir (Samet ve ark. 2006; Samet ve ark. 2000). Tüberküloz, pnömoni (zattüre), interstisyel akciğer hastalıkları, pulmoner emboli, akciğerde abse, KOAH gibi bazı akciğer hastalıkları da kanser gelişmesiyle ilişkilendirilebilir (Tatar ve ark. 2000). Beslenmenin akciğer kanseri gelişiminde %5 oranında etkili olduğu düşünülmektedir. Vitamin A ve β -karoten bakımında fakir beslenmenin akciğer kanseri riskini arttırdığı düşünülmektedir. Vitamin E ve selenyum benzer şekilde antioksidan etkileriyle riski azaltmaktadır. Yüksek yağ

içeren besinlerle beslenen sigara bağımlılarında da akciğer kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar yeşil cay tüketiminin de koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermiştir (İtil 2000). Yapılan çalışmalarda; sigara içmeyenler de dahil olmak üzere, akciğer kanseri aile öyküsü olmasının akciğer kanser riskini 2 kat artırdığını göstermektedir (Bailey-Wilson ve ark., 2004). Eğer birinci dereceden akrabaya 60 yaşından daha gençken tanı konduysa bu risk 5 kat artmaktadır (Cassidy ve ark. 2006). Genetik olarak kanser oluşumunda proto-onkogenler, tümör supresör genleri ve DNA tamir genlerindeki mutasyonlar da rol oynamaktadır (Spitz ve ark. 2007; Ursavaş 2001).

1.2.1. Akciğer Kanseri ve Moleküler Biyolojisi

Son 20 yıl içinde akciğer kanseri moleküler biyolojisinin aydınlatılmasına yönelik birçok gelişme olmuştur ve bu gelişmeler sayesinde akciğer kanseri daha iyi anlaşılmaya başlamıştır. Yapılan çalışmalarda onkogenlerin, tümör supresör genlerinin ve DNA tamirinden sorumlu genlerdeki bazı transformasyonların akciğer kanseri ile olan bağlantısı gösterilmiştir. Myc ailesi, Ras ailesi, p53 tümör supresör genlerin amplifikasyonu, 3 ve 11. kromozomlardaki DNA dizi kayıpları, kanser gelişiminde rol oynar (Economou ve ark. 1994, Rom ve ark. 2000, Alberg ve Samet 2003, Lynch ve ark. 2004).

Onkogenler, protonkogenlerin kromozomal translokasyon, amplifikasyon veya transkripsiyonel düzensizlik ile aktive olması sonucu gelişirler. Ras onkogen ailesi, H-ras, K-ras ve N-ras' tan oluşur. En sık K-ras mutasyonu görülür. H-ras mutasyonu daha seyrek olup, N-ras mutasyonu ise çok nadirdir (Mabry 1998). Kanser gelişiminde Ras geninde meydana gelen nokta mutasyonları rol oynar. Ras genleri GTPaz aktivitesine sahip olup GTP-Ras'ı hızlı bir şekilde inaktif formu olan GDP-Ras'a dönüştürerek sinyal sistemini kapatır. Spesifik Ras geni mutasyonları neredeyse tüm olgularda kodon 12, 13 ve 61'de saptanır. Bu mutasyonlar, GTPaz aktivitesinde azalmaya bağlı olarak GTP-Ras inaktivasyonunun yavaşlamasına neden olur ve bunun sonucu olarak sürekli sinyal aktiviteleri ortaya çıkar. Sinyal kaskadında oluşan bu mitojenik uyarılar, malign transformasyona neden olur (Jacobson 1999; Spivack ve ark. 1997; Mabry 1998).

Myc genleri, C-Myc, N-Myc ve L-Myc olarak adlandırılan ve DNA sentezinin başlamasında görevli, hücre proliferasyonu, diferansiyasyonunda etkili olan üç protein kodlar (Köktürk ve ark. 2003). Myc aktivasyonu, KHDAK'lerinin yaklaşık olarak %8-

20'sinde izlenir. C-myc amplifikasyonu olan hücrelerde büyüme faktörü gereksiniminde azalma görülür, hücre döngüsünde G1 fazında kısalma olması sonucunda proliferasyon oluşur. Bununla birlikte C-myc proteininin tümör büyüme hızında artış ve sağ kalımda kısalma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Groeger ve ark. 1997; Fong ve ark. 1999; Spivack ve ark. 1997; Mabry 1998).

Bir nükleer fosfoprotein olan p53, 17p13 lokusunda yerleşmiştir. DNA hasarı ile aktive olur ve bir dizi genin (p21, MDM2, BAX ve GADD45) regülasyonuna neden olur. Özellikle DNA hasarına cevap olarak hücre siklusunu, DNA sentezi ve onarımını, hücre farklılaşmasını ve apoptozisi kontrol eder. p53, özellikle DNA'da bir hasar oluştuğunda hücre siklusunu G1'de baskılar, dolayısıyla p53 mutasyonlarında hücre siklusu kontrol edilemez ve hücreler kontrolsüzce çoğalır (Köktürk ve ark. 2003).

G1 siklin bağımlı kinaz aktivitesini kontrol eden p16 ve normalde G1 siklin bağımlı kinazlar tarafından düzenlenen retinoblastom (Rb) tümör supresör genleri hücre siklusunun kontrolünde önemlidirler. p16, G1 fazında Rb'nin fosforlanmasını önler ve G1/S geçişini durdurur (Levin ve ark. 1994; Fong ve Minna 2002; Focchi ve ark. 2007; Sclafani ve ark. 1998). Bu gende oluşan fonksiyon bozukluğu sonucunda Rb fosforlanır ve inaktifleşir. Dolayısıyla hücre siklusu kontrol edilemez. Hücreler sürekli S fazına girer ve mitojenik aktivite ile sonlanır.

1.3. Apoptozis

Çok hücreli organizmalarda, yeni hücrelerin oluşumu ve hücre ölümü arasında daima bir denge bulunmaktadır. Bu denge organizmanın gelişimi ve doku homeostazisinin sağlanması açısından büyük önem taşır. Hergün yaklaşık olarak 1×10^{14} yeni hücre oluşturulurken milyarlarca hücre de ölmektedir böylece sabit denge sağlanmaktadır (Fischer ve Schulze-Osthoff 2005). Bu dengenin bozulması nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi patolojik durumları tetikleyebilir (Danial ve Korsmeyer 2004). Varolan hücreler, programlanmış hücre ölümü olan apoptozis ve patolojik hücre ölümü nekroz gibi çeşitli hücre ölüm tipleriyle yok olmaktadır.

Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr adlı bir patolog tarafından programlı hücre ölümünü tanımlamak için kullanılmıştır (Kerr ve ark. 1972). 1980 yılında Wyllie çalışmalarında, apoptozis için karakteristik olan agaroz jel elektroforezinde "ladder pattern" yapısını göstermiştir (Wyllie 1980). 1993 yılında Cohen timüs hücreleriyle

yaptığı çalışmalarla apoptozisin genler tarafından kontrol edilen bir ölüm modeli olduğunu göstermiştir (Cohen 1993a). Apoptozis genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regule edilir ve aynı zamanda organizmanın yaşam döngüsü için gereklidir.

Embriyonik dönemde insanlarda parmak aralarındaki perdenin ortadan kalkması, kurbağaların metamorfoz sırasında kuyruklarının kaybolması apoptozis ile gerçekleşir (Franz ve Kidson 1997). Postnatal dönemde kan hücrelerinin uzaklaştırılması, menstruasyon sırasında endometriyal hücrelerinin (uterusun iç katmanındaki epiteller) yıkımı, menstruel siklus sonunda genişleyen korpus luteumun tekrar eski haline dönmesi apoptozis ile gerçekleşir. Ayrıca immün sistemin önemli hücreleri olan T lenfositler timusda olgunlaşırlar. Bu hücrelerin etkisiz olanları veya organizmanın kendi dokularına karşı reaksiyon verme potansiyeli taşıyanları kan dolaşımına girmeden önce apoptozisle ölürlar (Marti ve ark. 2001; Ford 2001). Bazı patolojik durumlarda da apoptozis görülebilir. Örneğin İnsüline bağımlı tip diabet, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı, viral enfeksiyonlar, AIDS, tümör oluşumu, organ transplantasyonlarında hücreler apoptozisle ölebilir (Elmore 2007).

Apoptozis, hücrenin yuvarlaklaşması, pseudopodların retraksiyonu, hücresel hacmin azalması (piknoz), kromatin kondensasyonu, nükleer fragmentasyon (karyoreksis), sitoplazmik organellerin modifikasyonları, plazma membran blebilenmesi (bütünlük kaybı olmadan), in vivo fagositler tarafından yutulması ile karakterize edilmiştir (Baehrecke 2002; Barkla ve Gibson 1999; Roach ve Clarke 2000).

1.3.1. Apoptozisin İndüklenmesi

Hücrelerde apoptozisin gerçekleşebilmesi için hücre içi ya da dışından gelen bir uyarın ile ilgili genetik mekanizmanın harekete geçmesi gerekmektedir (Erdoğan 2003). Hücre içi uyarınlardan bazıları; hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, Bcl-2 ailesi, p53 geninin aktivasyonu, sitokinler, viral/bakteriyel enfeksiyonlar ve onkojenlerdir. Hücre dışı uyarınlardan bazıları ise; koloni uyarıcı faktörler (CSF), tümör nekrozis faktör (TNF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), nöron büyüme faktörü (NGF), IL-2, Fas/FasL, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar olarak sayılabilir. Bu faktörlerin yanında apoptozisi uyarın ya da düzenleyen çok sayıda gen de bulunmaktadır (Kaya 2007).

Mitokondri apoptozisin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Apoptotik süreçte apoptozis indükleyici faktör (AIF) ve sitokrom-c gibi birçok apoptotik faktör, mitokondriden sitoplazmaya salınır (Kumar ve ark. 2005). Bu proteinlerin sitoplazmaya salınmasında en önemli protein bcl-2 ailesidir (Chang ve Yang 2000). Bcl-2 ailesi proteinleri birbirine zıt etkili iki grup olan anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-1) ve pro-apoptotik (Bax, Bcl-X_s, Bad, Bim, Bak, Bid) üyelerden oluşur. Hücrenin apoptozisle ölüp ölmeyeceğini belirleyen bu proteinlerin rölatif oranıdır. Pro-apoptotik proteinler fazla eksprese edildiğinde hücreler apoptozis ise daha yatkın, anti-apoptotik proteinler daha fazla eksprese edildiğinde hücreler apoptozis ise daha dirençli olmaktadır (Kumar ve ark. 2005).

Bcl-2 proteinlerinin pro-apoptotik üyeleri sağlıklı hücrelerde sitozolde bulunmakta ve hücrel stres, serbest radikal hasarı veya büyüme faktörü yoksunluğu gibi apoptotik sinyaller sonucu anti-apoptotik proteinlerin bulunduğu mitokondri yüzeyine doğru yer değiştirmektedirler ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin normal işlevleri bozulur. Bunun sonuncu olarak da mitokondriyal membranda porlar oluşur ve sitokrom-c gibi pro-apoptotik moleküller zarlar arası bölgeden açığa çıkabilir. Bu da apoptozom oluşumu ve kaspaz kaskadı aktivasyonuna yol açmaktadır (Fan ve ark. 2005; Suh 2002).

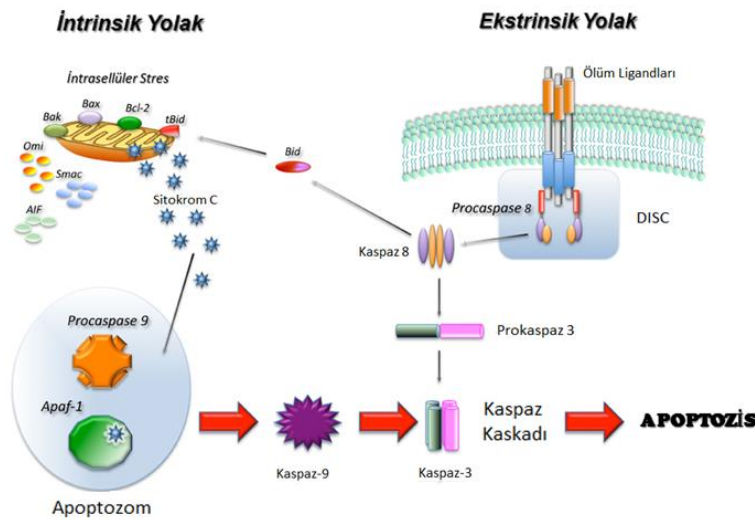
Kaspazlar, proteinleri aspartat kalıntılarından sonra kesen hücre içi sistein proteazlardır. Hatalı düzenlenen kaspaz aktivitesi, hücre için ölümcül olabilir, bu sebeple kaspazlar, prokaspazlar olarak sentezlendikten sonra belirli bir kısımları kesilip uzaklaştırılarak aktif kaspaz halini alırlar (Fischer ve ark. 2003; Solakoğlu 2009). Kaspazlar birbirlerini proteolitik olarak aktifleştirerek bir kaskada neden olurlar. Başlatıcı kaspazlar (Kaspaz 2, 8, 9, 10) apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara (Kaspaz 3, 6, 7) naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (Adams ve Cory S 2001; Adrain ve Martin 2001; Spierings ve ark. 2004).

1.3.2.Apoptozisin Mekanizmaları

apoptozisin gerçekleşmesinde görevli iki ana yolak vardır. Bunlardan biri hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine ligand bağlanması ile başlayan ekstrinsik (dışsal) yolak, diğeri ise mitokondriden sitokrom-c salınımıyla, ölüm sinyalinin aktive olduğu intrinsik (içsel) ya da mitokondriyal yolak olarak adlandırılan yolaktır (Kaufmann ve Earnshaw 2000).

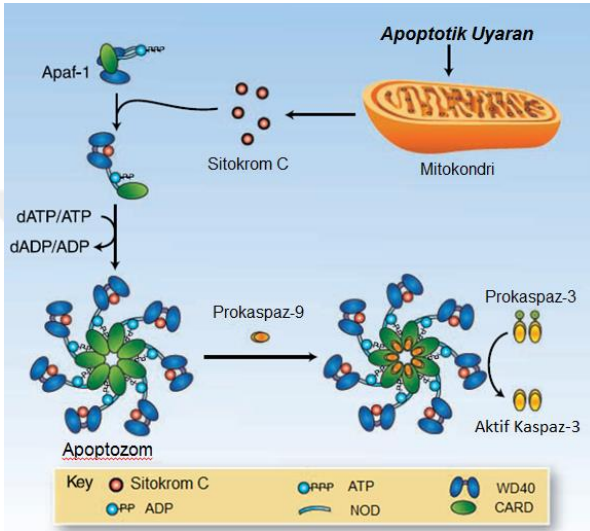
Ekstrinsik (Dışsal) yolak hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanan ölüm ligandıyla indüklenen kaspazlar tarafından kontrol edilir. Ölüm reseptörleri, apoptotik sinyalin iletimi için gerekli olan 80 amino asit uzunluğunda intraselüler ölüm domaini (Death Domain, DD) içerir. En iyi bilinen ölüm reseptörleri Fas (CD95/Apo-1), TNFR1, TRAIL-R1 (DR4) ve TRAIL-R2 (DR5/Killer/TRICK2)'dir. Ligand reseptör etkileşimi, Fas ile ilişkili ölüm domain proteini (Fas Associated Death Domain, FADD) gibi adaptör moleküllerin ve ardından prokaspaz-8'in bağlanmasına yol açar ve ölüm indükleyici sinyal kompleksi (Death Inducing Signaling Complex, DISC) adı verilen sitozoloik bir kompleks oluşturur. Bu durum prokaspaz-8'in aktivasyonuna yol açar (Call ve ark. 2008). Kaspaz-8, doğrudan kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi aktifleştirerek apoptozise neden olur (Şekil 1.5) (Kim 2005).

İntrinsik (içsel) yolak hücre içi sinyallerle apoptotik uyarı alınmasından sonra proapoptotik proteinlerden Bid; bir antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktive eder, Bax ve Bak'ı aktifleştirir. Aktifleşen Bax ve Bak mitokondriyon membranında por oluşumunu indükleyip zar potansiyelini değiştirir (Spierings ve ark. 2004). Zar potansiyelinin değişmesi sonucunda; sitokrom-c, Smac/DIABLO, HtrA2/Omi ve apoptozis indükleyici faktör (AIF) gibi mitokondri membran proteinlerinin sitozole salınımını uyarılır. Mitokondriyal porlardan salınan sitokrom-c, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve ATP'nin katılmasıyla sitozolde apoptozom denen bir kompleks oluşturur (Şekil 1.5) (Desagher ve ark. 1999 Griffiths ve ark. 1999; Strasser ve ark. 2000).



Şekil 1.5. İntrinsik (içsel) yolak ve Ekstrinsik (Dışsal) yolak (Favaloro ve ark. 2012).

Apoptozom, başlatıcı kaspaz olan kaspaz 9'u aktive eder. Aktif kaspaz 9, ilerletici kaspaz olan kaspaz-3'ü aktive ederek kaspaz kaskadına aracılık eder. Aktif kaspaz-3 de ICAD (İnaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ı inaktifleştirerek CAD (Kaspaz aktive edici DNaz)'ı serbestleştirir. CAD ise bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur (Şekil 1.6) (Adams ve Cory 2001; Palmer ve ark. 2000; Riedl ve ark. 2007; Duprez ve ark. 2009).



Şekil 1.6. Apoptozom (Ledgerwood ve Morison 2009)

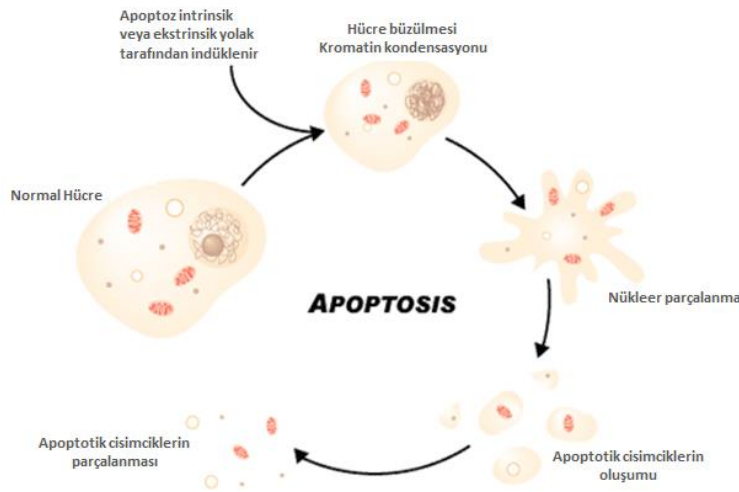
Bu apoptotik yollara ek olarak kaspazlardan bağımsız olarak apoptoze neden olduğu düşünülen kaspaz aktivasyonunun gerçekleşmediği mekanizma da bulunmaktadır (Vermeulen ve ark. 2005). Bu mekanizmada mitokondriden salınan AIF (apoptosis indükleyici faktör) nükleusa geçer ve nükleazları aktifleştirerek DNA hasarına yol açar. AIF, steroidler, granzim B ve endonükleaz G kaspazlardan bağımsız olarak apoptoze neden olmaktadır (Ulukaya 2003).

1.2.3. Apoptotik Hücrede Görülen Morfolojik Değişiklikler

Apoptotik hücrelerde morfolojik olarak ilk gözlenen değişiklik, hücrelerin mikrovillus gibi özel yüzey farklılaşma yapılarını kaybetmeleri, hücre yüzeyinin yuvarlaklaşması ve diğer hücrelerle temas yüzeylerini kaybetmeleridir (Wyllie 1980). Apoptotik hücreler, hücre büzülmesi, nüklear fragmentasyon, kromatin kondansasyonu, membran blebilenmesi ve apoptotik cisimciklerin oluşumu gibi morfolojik değişimler ile tanımlanır (Curtin ve Cotter 2003; Carmody ve Cotter 2001). Apoptotik hücre ölümünün son aşamasında hücre, organelleri içeren küçük parçalara bölünür ve apoptotik cisimcikler ortaya çıkar (Cohen 1993a; Ulukaya 2003). Apoptotik ölüm

sonucunda hücrenin membran bütünlüğünün korunduğundan hücre içeriği ortama dökülmemekte ve dolayısıyla inflamatuvar yanıt oluşmamaktadır (Şekil 1.7) (Cohen 1993b; Hotchkiss 2009).

Nekroz, bir hücre ölüm şeklidir. Rastgele gelişen, genler tarafından kontrol edilemeyen düzensiz bir süreçtir. Patolojik hücre ölümü olan nekrozun en yaygın nedeni oksijen yetersizliği anlamına gelen hipoksidir. Toksik maddeler ve ağır metaller nekroza neden olur (Schwartzman ve Cidlowski 1993). Nekroz sırasında mitokondriyal ROS üretimi artar, nonapoptotik proteazlar aktive olur, ATP üretimi azalır ve Ca^{++} kanalları açılır (Golstein ve Kroemer 2007; Nicotera 2004). Sonuç olarak hücre içerisine osmozla su girmesiyle hücre patlar, hücre membran bütünlüğü kaybolur ve inflamatuvar yanıt oluşur. DNA rastgele-düzensiz olarak parçalanır ve hücrenin mitokondrisi şişer (Chandra ve ark. 2000).



Şekil 1.7. Apoptosis'in morfolojik değişiklikleri (Yau 2004)

1.2.4. Apoptosis ve Nekroz Arasındaki Farklar

Apoptosis ve Nekroz arasındaki farklar Şekil 1.8'de gösterilmiştir.

- 1- Nekroz bileşik hücre gruplarını etkilerken, apoptozisde tek tek hücreler etkilenir (Holdenrieder ve Stieber 2004).
- 2- Nekroz fizyolojik olmayan uyarılarla başlar, apoptozis hem fizyolojik hem de fizyolojik olmayan uyarılarla başlayabilir (Lu ve ark. 2000; Wyllie 1980).
- 3- Nekroza uğrayan hücre, çevreye yaydığı kemotaktik maddeler aracılığı ile çağrılan makrofajlar tarafından fagosite edilir. apoptozise uğrayan hücre ise çevreye kemotaktik

madde yaymaz; yanında bulunan epitel hücreleri veya makrofajlar aracılığı ile fagositoza uğrar (Lu ve ark. 2000; Wyllie 1980).

4- Nekrozla ölen bir hücrede kromatin yapısı hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir, ama apoptozisle ölen hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve yoğunlaşma (kromatin kondensasyonu) şekillenir (Ulukaya 2010).

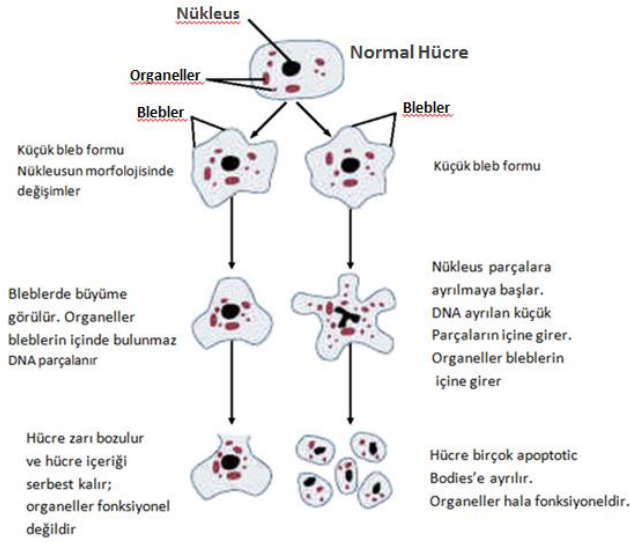
5- Nekrozda zar bütünlüğü bozulur, apoptozisde ise hücre apoptotik cisimciklere ayrılır fakat asla zar bütünlüğü bozulmaz. Dolayısıyla Nekrozda inflamatuvar cevap vardır, apoptozisde ise yoktur (Yılmaz 2005; Cummings ve ark. 1997; Spencer ve ark. 1996).

6- Nekrozda hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu sitoplazma ve mitokondride şişme görülürken (cell swelling) , apoptozisde ise tam tersine büzülme ve çekirdek yoğunlaşması görülür (cell shrinkage) (Ulukaya 2003).

7- Hücre içi ATP seviyesine göre hücrenin apoptozis veya nekroz ile ölür. Eğer hücre ciddi olarak zarar görmüşse apoptozis için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir. (Chandra ve ark. 2000).

8- Nekroz sırasında DNA'nın rastgele sindirimi mevcuttur. Oysa apoptozisde DNA'nın, intranükleozomal bölgelerinden 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanma mevcuttur. Bu da agaroz jel elektroforezde apoptozis için karakteristik “ladder pattern” denen merdiven şeklinde kırılmalar meydana getirir (Ulukaya 2003; Wyllie 1980).

9- Nekrozdan farklı olarak apoptotik hücrede normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin'in membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır. Membrandaki bu, apoptotik hücrenin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını ve fagosit edilmelerini sağlar (Ulukaya 2003).



Şekil 1.8. Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar (Goodlett ve Horn 2001)

1.3.5. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozis, ilk kez 1972 yılında, hücrenin morfolojik görünümüne göre belirlenmiştir, 80’li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlandı. 90’ların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metodlar kullanılmaya başlanmıştır, 90’ların sonuna doğru da fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlandı. Bu metodların tamamını, 2000’li yılların başlarında, sadece apoptotik epitelyal hücrelerde kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18’in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikorların kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etti.

Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler morfolojik görüntüleme yöntemleri, immunohistokimyasal yöntemler, biyokimyasal yöntemler, immunolojik yöntemler, moleküler biyoloji yöntemleri olarak sıralanabilir (Ulukaya 2003).

1.3.5.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

Işık Mikroskobu Kullanımı:

a. Hematoksilen-eozin boyama: Hematoksilen-eozin (HE) ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenir. HE boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir. Apoptozis özgü değişiklikler iyi bir boyama yapılmışsa kolayca gözlenebilir. Fakat yine de deneyim

gerektirmektedir. Çünkü bazı durumlarda mitotik hücreler ile apoptotik hücreler karıştırılabilir. Gözlenebilen değişiklikler şunlardır: hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatinin kondanse olması ve nukleus zarının periferinde toplanması, nukleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesi (Mountz ve Zhou 2001; Ulukaya 2003)

b. Giemsa boyama: Giemsa ile boyamada hematoksisilenle boyamada da olduğu gibi nukleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırları hematoksisilen boyamaya göre daha iyi seçilebilmekle birlikte hematoksisilen boyamaya belirgin bir üstünlüğü yoktur(Ulukaya 2003).

Floresan Mikroskopu / Lazerli Konfokal Mikroskop Kullanımı

Hoechst boyası, DAPI, propidium iyodür gibi floresan maddelerin kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Bu floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla da nukleusu görünür hale gelebilir. Bu yöntem, hücre kültürü çalışmalarında, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanıyan bir yöntemdir. Canlı ve ölü hücre ayırımını yapabilmek için, Hoechst boyası gibi canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya ile propidium iyodür gibi sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya beraber kullanılır. Bu boyama yöntemindeki prensip, canlılığın belirleyicisi, hücre zarının intakt olup olmadığıdır. Zarı intakt olan yani canlı hücreler propidium iyodür gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir boya ile boyanmazlarken, Hoechst boyası gibi ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen boyalar ise ortamdaki tüm hücreleri boyayarak ölü veya canlı hücre ayırımına olanak sağlarlar. Bu şekilde boyanan hücreler bir floresan mikroskopu ile tanınabilirler. Bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozisle veya nekrozisle ölüp ölmediklerinin ayırımı nukleus morfolojisine bakılarak yapılır. Hücrelerin apoptozisle veya nekrozla ölüp ölmediğinin ayırımı aşağıdaki kriterlere göre yapılır:

-Nekrozla ölen hücreler: Ölü oldukları belirlenen yani hem propidium iyodür hem de Hoechst boyası ile boyanan hücrelerin nukleuslarında apoptotik değişiklikler görülmez. Nukleus paterninde büyük değişiklik yoktur. Nukleusun başlangıçta daha küçük olduğu gözlenebilir ama ileri evrelerde normale göre biraz daha büyümüş görülebilir. Boya yoğunluğu başlangıçta daha fazla olabilir ama ileri evrelerde yoğunluk apoptotik hücrelere göre daha az bulunabilir.

- **Apoptozisle ölen hücreler:** Apoptotik hücrelerde hücre zarı eğer sekonder nekrozis gelişmemişse intakt olduğundan propidium iyodür ile boyanmaz ama Hoechst boyası ile boyanır. Yani propidium iyodür negatif ve Hoechst boyası pozitif boyanırlar. Fakat apoptozise özgü nukleus morfolojisi bu hücrelerde tanı koydurucudur. Nukleus fragmentasyonu en önemli bulgudur.

- **Normal (canlı) hücreler:** Propidium iyodür ile boyanmazken, Hoechst boyası ile boyanırlar ve nukleus normaldir (Ulukaya 2003).

Elektron Mikroskobu Kullanılarak Yapılan Yöntemler

Elektron mikroskopu ile değerlendirme apoptozisde en değerli yöntem olarak düşünülmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözleendiği yöntemdir. Üstelik mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nukleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi subsellüler detaylar da incelenebilir (Ulukaya 2003).

Faz Kontrast Mikroskobu Kullanılarak Yapılan Yöntemler

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Ölen hücreler yapıştıkları substratından ayrılacakları için besiyer içinde yüzmeye başlarlar. Bu hücreler faz kontrast mikroskopu ile gözlenebilirler. Mitozise giden hücreler de faz kontrast mikroskopuyla gözlenebilirler fakat bu hücreler aynı zamanda apoptotik hücrelerin erken evredeki görüntüleri ile karışabilirler. O yüzden ayrımları hemen hemen imkânsızdır. Gerek mitozisde gerekse apoptozisin erken evresinde hücreler üzerine yapıştıkları substratuma yayılmış halde değil, tam tersine yuvarlaklaşmış ve küçülmüş olarak görülürler (Ulukaya 2003).

1.3.5.2. Histokimyasal Yöntemler

Anneksin V Yöntemi

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Apoptotik süreçte normalde zarın iç yüzünde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Dış yüze transloke olan PS'ler, FITC gibi floresan bir madde ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilirler. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur (Ulukaya 2003).

TUNEL Yöntemi

DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlayan bir yöntemdir. Parafin kesitleri, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak yapılan işaretleme ardından floresan veya enzimatik görüntüleme ile apoptotik hücreler diğerlerinden ayrılır (Güleş ve Eren 2008).

M30 Yöntemi

M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir. Sadece sitokeratin 18'i eksprese eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitelyal kaynaklı dokulardır (Ulukaya 2003).

Kaspaz-3 Yöntemi

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama metoduyla belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptozise yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bunun bilindiği durumlarda apoptotik hücreler bu metodla tespit edilebilirler (Ulukaya 2003).

1.3.5.3. Biyokimyasal Yöntemler

Agaroz Jel Elektroforezi

DNA kırıklarının gösterilebildiği bir yöntemdir. Apoptozisde DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan yani internukleozomal bölgelerden kırıldığı için ip merdiven görüntüsü "ladder pattern" oluşur. Bu apoptozisin karakteristik özelliğidir ve diğer ölüm şekillerinde görülmez. O yüzden apoptozisi belirlemede faydalı yöntemlerden biridir (Ulukaya 2003).

Western Blotting

Bcl-2, kaspaz-3 gibi apoptozise özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının ya da kırılıp kırılmadıklarının saptanmasını, sitokrom-c'nin sitozole çıkıp çıkmadığının belirlenmesini sağlayan bir methodur. Yalnız, sitokrom-c tespitinde önce alt-fraksiyonlama yapılarak hücrelerin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılır. Normalde sitokrom-c sitoplazmik fraksiyonda bulunmaz. Ancak sitokrom-c'nin bu fraksiyonda tespit edildiğinde hücrelerin apoptozise gittikleri anlaşılır (Ulukaya 2003).

Akım sitometri

Akım sitometride farklı moleküller, hücreler ve parçacıklar, düşük ve dik açılı ışık yayılımı kullanılarak büyüklük ve şekil olarak ayrılabilir. Bu hücreler, moleküller veya parçacıklar 13- phycoerithrin, FITC ve rhodamine-GG gibi farklı özel floresan işaretleyicilerle veya boya işaretli antikorlarla işaretlenebilir. Akım sitometri yardımıyla, floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozisde eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir;

- a. Floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak,
- b. FITC gibi floresan bir madde ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak (Aral 1996).

1.3.5.4. İmmunolojik Yöntemler

Elisa Yöntemi

ELISA yönteminde, antijen-antikor kompleksine bir enzimle işaretli antiglobulinin ilave edilmesi ve sonra substratın eklenmesi ile eğer antijen veya antikor var ise renk oluşumunun gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Duyarlı spesifik ve çabuk sonuç veren bir testtir. apoptozisde görülen ilk olay, sitoplazma içine nükleozomların salınmasını takip eden DNA fragmentasyonudur. ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre popülasyonlarında, gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür (Overbeeke ve ark. 1998; Salgame ve ark. 1997; Ulukaya 2003).

Fluorimetrik Yöntem

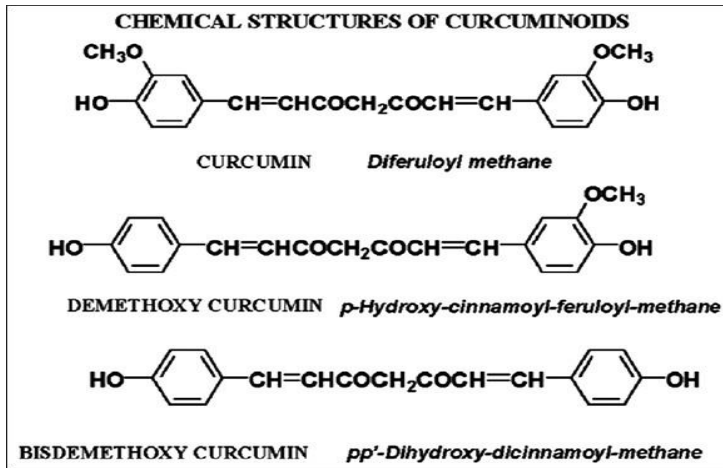
Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilgili kaspazın antikorunun bulunduğu hücre kültür kaplarına hücre lizatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur ve sonra ortama kaspazların parçaladığı ve kendisine floresan bir maddenin tutunduğu bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır (Ulukaya 2003).

1.4. Kurkumin

Zingiberaceae ailesinin bir üyesi olan *Curcuma longa* çok yıllık bir bitki olup ana vatanı Güney Asya'dır (Ammon ve Wahl 1991). Çoğunlukla Hindistan'da yetiştirilmekle

beraber Bangladeş, Çin, Endonezya, Karayip adaları ve Güney Amerika'nın birkaç ülkesinde de yetiştirilir (Thomas-Eapen 2009). Kurkumin, *Curcuma longa* rizomlarından ekstrakte edilen, yemeklerde aroması ve sarı rengi sebebiyle kullanılan baharatın (köri) üretiminde kullanılır (Goel ve ark. 2008). Kurkumin, gıda endüstrisinde renklendirici, koruyucu ve aroma olarak kullanılır. Ayrıca Japonya'nın çeşitli bölgelerinde çay olarak da tüketilmektedir (Sharma ve ark. 2005). Zerdeçal bitkisinin yaklaşık 6000 yıldır ağrı kesici, iltihap kurutucu, yara iyileştirici, ülser, kireçlenme ve cilt hastalıklarındaki tedaviye yardımcı özelliklerinden dolayı tıbbi amaçla kullanıldığı Ayurveda'da (Hint Tıp Sistemi) belgelenmiştir (Aggarwal ve ark. 2003). Ülkemizde ise Hint safranı, zerdeçal, zerdeçöp, safran kökü olarak adlandırılan kurkumin daha çok baharat olarak kullanılmaktadır. Safranbolu yöresinde yetişen zerdeçal ülkemizde de soğuk algınlığında, hazımsızlığı gidermede ve gaz söktürücü olarak kullanılır (Demircioğlu ve ark. 2007).

Zerdeçal bitkisinin özlerinde 3 farklı kurkuminoid mevcuttur; kurkumin, demetoksikurkumin, ve bis-demetoksikurkumin (Şekil 1.9). Kurkumin zerdeçalın en aktif bileşenidir ve zerdeçal baharatının yaklaşık %2-5'ini oluşturur (Lin ve Lin-Shiau 2001). Kurkumin molekülünün kimyasal formülü $C_{21}H_{20}O_6$, moleküler ağırlığı 368,37g/mol, erime noktası da $183^{\circ}C$ 'dir ve suda çözünmeyen fakat aseton, DMSO ve etanolde kolaylıkla çözünebilen bir moleküldür (Sharma ve ark. 2005).



Şekil 1.9. Kurkuminoidlerin kimyasal yapısı (Maheshwari ve ark. 2006)

Kurkumin, Hint tıbbında bir tonik ve kan temizleyicisi olarak kullanıma girmiş olup, deri hastalıklarının tedavisindeki rolü ve deriyi yumuşatıcı etkisinden dolayı, krem ve banyo sabunu yapımı gibi kozmetik alanında da kullanılmaktadır. Bunun yanında, halk

arasında kesik, yara ve yanıkların tedavisinde de ev ilacı olarak da yaygın bir kullanım alanına sahiptir (Limtrakul ve ark. 1997; Priyadarsini 1997; Piper ve ark. 1998). Bu kullanım alanlarının dışında, baharat, gıda katkı maddesi ve tekstil sanayinde kumaş boyası olarak da kullanılmaktadır (Aggarwal ve ark. 2007).

Son yıllarda kurkuminin biyolojik aktiviteleri ve farmakolojik etkilerini belirlemek için çok sayıda çalışma yapılmıştır ve bu çalışmalarda kurkuminin; antiinflamatuvar, antioksidan, antikarsinojenik, antimutajenik, antikoagülan, antidiyabetik, antibakteriyel, antifungal, antiprotozoal, antiviral, antiülser aktiviteleri içine alan geniş bir biyolojik etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir (Aggarwal ve ark. 2007; Kunnumakkara ve ark. 2008).

Bu özelliklerinin yanısıra diğer bir belirgin özelliği de Asya ülkelerinde yüzyıllardan beri kullanılmasına karşın kurkuminin herhangi bir toksik etkisinin tespit edilmemiş olmasıdır (Ammon ve Wahl 1991).

1.4.1. Kurkuminin Anti-kanser Etkisi

Kurkuminin lösemi-lenfoma, gastrointestinal sistem kanserleri, genitoüriner sistem kanserleri, meme kanseri, ovaryum kanseri, baş-boyun kanseri, akciğer kanseri, melanom, nörolojik kanserler ve sarkoma olmak üzere çok çeşitli kanserlerde etkili olduğu yapılan çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır (Şekil 1.10) (Anand ve ark. 2008).



Şekil 1.10. Kurkuminin etkili olduğu kanser türleri (Anand ve ark. 2008)

Hücre büyümesi veya apoptozis gibi kanser gelişim sürecinde rol oynayan birçok kemoterapötik faktörden farklı olarak kurkumin, onkogenlerin aktivasyonu (Singh ve Singh 2009), kanser hücrelerinin proliferasyonu (Simon ve ark. 1998), apoptozisten kaçma (Han ve ark. 1999) ve metastaz gibi kanser gelişiminin çeşitli aşamasında etkilidir (Şekil1.11).



Şekil 1. 11. Kurkuminin antikanser özellikleri

Kanser, çoğu tümör tipinde tanımlanan ras (Rajalingam ve ark. 2007) ve birçok genin ekspresyonunda rol alan *c-myc* gibi protoonkogenlerin mutasyona uğramasıyla ilişkilendirilir. Protoonkogenler mutasyona uğrayarak onkogenlere dönüşür ve kansere neden olurlar. İlginç bir şekilde, kurkuminin onkogenlerin aktivasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (Singh ve Singh 2009). Ayrıca kurkumin apoptozisin indüklenmesi ve hücre proliferasyonunun inhibe edilmesi gibi antikanser özelliklere de sahiptir. Kurkuminin antiproliferatif etkisi konsantrasyonuna, tedavi süresine ve hücre tipine bağlıdır. Düşük dozlarda Hücre siklus hasarına neden olurken yüksek dozlarda apoptozisi indükler. Hücre proliferasyonu, başta tümörjenezle ilişkilendirilen siklin ailesi ve siklin bağımlı kinazlar olmak üzere çeşitli hücre siklus proteinleri tarafından kontrol edilir(Kastan ve Bartek 2004; Diehl 2002). Kurkumin baş ve boyun skuamöz karsinoma hücrelerinde siklin D1 downregülasyonu yoluyla hücre siklusunu ve G1 fazından S fazına geçişi inhibe eder (Aggarwal ve ark. 2004) Bunun yanında p21

upregülasyonu ve siklin A'nın downregülasyonu yoluyla mesane kanser hücrelerinde proliferasyonu inhibe eder (Park ve ark. 2006).

2004 yılında akciğer hücre soyları A549 ve H1299 ile yapılan bir çalışmada, kurkuminle yapılan tedavinin bu hücre soylarında apoptozisi indüklediği ve hücre büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Pillai ve ark. 2004). Benzer şekilde 2013 yılında yine A549 hücreleriyle yapılan başka bir çalışmada kurkuminin Bcl-2/Bax ve sitokrom C yoluyla hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve apoptozisi mitokondriyal yolak üzerinde indüklediği gösterilmiştir (Li ve ark. 2013).

2009 yılındaki bir çalışmanın sonucuna göre; kurkuminin kanser üzerindeki etkisini hücrenin sinyal yolaklarını etkileyerek gerçekleştirdiğini ileri sürmektedir. Bu yolaklar arasında hücre proliferasyon yolağı (siklin D1, c-myc), hücre yaşam yolağı (Bcl-2, Bcl-xL), kaspaz aktivasyon yolağı (kaspaz-8, 3, 9), tümör süpressör yolağı (p53, p21) ölüm reseptör yolağı (DR4, DR5), mitokondriyal yolak ve protein kinaz yolağı yer alır (Ravindran ve ark. 2009).

2012'de yapılan bir çalışmada ise kurkuminin Sisplatin dirençli A549 hücre soyunda HIF-1 α ve kaspaz-3 mekanizmaları yoluyla apoptozisi indüklediği dolayısıyla ilaç direncini tersine çevirmede de etkili olduğu gösterilmiştir (Ye ve ark., 2012).

Bunların dışında kurkuminin, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan radyasyon veya kemoterapötik ajanların etkinliğini artırmada ve tedaviden kaynaklanan normal doku hasarını önlemede de etkili olduğunu gösteren pek çok çalışma yayınlanmıştır (Hatcher ve ark. 2009).

1.5. Yeni Sentez Edilen Palladyum(II) Bileşiğı

1.5.1. Palladyum(II) Bileşiğinin Biyolojik Etki Mekanizmaları

Pd metali ilk olarak 1803 yılında William Hyde Wollaston tarafından keşfedilmiştir. Atom numarası 46 ve atom ağırlığı 106,42g/mol'dür. Yapısal ve kimyasal özellikleri açısından Platin (Pt) metaline benzerdir. Pt ve Pd kompleksleri arasındaki benzerlik, Pd türevlerinin de potansiyel anti-kanser ilaçlar olarak araştırılmasını sağlamaktadır (Zhang ve ark. 2011).

Cisplatin gibi metal bazlı ilaçların metal merkezleri pozitif yüklüdür ve DNA gibi negatif yüklü biyomoleküllere bağlanma yeteneğine sahiptirler. Pt(II) ve Pd(II)

komplekslerinin her ikisinin de DNA'yı iki farklı mekanizma üzerinden etkiledikleri anlaşılmıştır.

Birinci mekanizma, Pt(II) veya Pd(II) iyonlarının DNA sarmalındaki amino uçlarına bağlanmasına ve bir koordinasyon molekülü oluşturmaya dayanmaktadır. Küçük hacimli Pt(II) veya Pd(II) kompleksleri DNA'yı oluşturan pürin bazları guanin ve adenin ile etkileşir ve bu uçlardan DNA sarmalına bağlanırlar. Pt(II) veya Pd(II) iyonlarının DNA'ya bağlanması sonucunda, hücre bölünmesi sırasında DNA sentezi imkânsız hale gelir ve DNA' sını tamir edemeyen hücre ölür (Petrovic ve ark. 2007).

İkinci mekanizmada ise, büyük hacimli ligandların bağlı olduğu Pt(II) veya Pd(II) kompleksleri DNA çift sarmalında araya girer (interkalasyon) ve DNA'ya hidrojen bağlarıyla bağlanarak hücre bölünmesini durdurur (Howe-Grant ve ark. 1976; Petrovic ve ark. 2007).

Cisplatin gibi platin bazlı antikanser ilaçlarının DNA hasarına yol açarak etki gösterdikleri düşünülmektedir. Platin bazlı ajanlar hücre duvarını aktif veya pasif difüzyonla geçtikten sonra DNA, RNA ve proteinlere bağlanırlar. DNA'ya bağlanma ile transkripsiyon ve replikasyon mekanizmalarının engellenir ve sonuçta kanser hücresi ölür. Platinli ajanlar DNA'da tek ya da çift zincir kırıklarına neden olmakta ve apoptozisi arttırmaktadırlar (Takahara ve ark. 1999).

Oksaliplatin, diğer bir platin bazlı ilaç olan cisplatin ile çeşitli mekanik özellikleri bakımından benzerdir. Cisplatin gibi oksaliplatin de esas olarak interstrand (zincirler arası, DNA'nın karşılıklı zincirlerinde) çapraz bağların ve aynı zamanda hücresel DNA'da intrastrand (zincir içi, tek DNA zincirinde) çapraz bağların ve DNA-protein çapraz bağların oluşumunu indükler. Tüm bu oksaliplatinin indüklediği DNA lezyonlarının hücre büyümesi inhibisyonunda rol oynaması muhtemeldir. Bağlantıların tipi, ilacın sitotoksitesiyle ilgilidir (Faivre ve ark. 2003).

Cisplatin DNA'ya bağlandığında başlangıçta, çift sarmalın genel yapısında bozulma olmamasına rağmen, bağlantı bölgesinde 35-40⁰'lik bir bükülme, platinin DNA' ya bağlandığı bölgede şeker-fosfat omurgasında ve daha sonra da genel yapıda konformasyonel değişikliklere neden olmaktadır. Replikasyon, DNA çift sarmal yapısının kromatinden çözülmesi, çift sarmal yapılarının ayrılması ve orijinal zincirlerin kalıp olarak kullanılıp yeni DNA sentezlenmesini içerir. Pt'nin DNA'ya bağlanması

DNA'nın yapısal düzenini değiştirir, dolayısıyla DNA sentezi için önemli bir enzim olan DNA polimerazın bağlanma bölgesi de değişikliğe uğramış olur (Takahara ve ark., 1999). Sonuç olarak Cisplatin-DNA bağlantısının oluşumu DNA transkripsiyonu ve replikasyonunu bloke etmektedir (Keter ve ark. 2008).

Palladyum kompleksi DNA'yı eşit olmayan iki parçaya ayırır ve hafif DNA parçası yerine ağır parçaya güçlü bir şekilde bağlanır (Mansouri-Torshizi ve ark. 2008). Yapılan çalışmalar Pt(II) kompleksleri gibi DNA'da yüksek düzeyde hasar oluşturduğunu ve apoptozisi indüklediğini göstermiştir (Miklasova ve ark. 2009; Keter ve ark. 2008). Ulukaya ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise Pd(II) kompleksinin apoptozisi DR4 ve DR5 isimli apoptozis ölüm genleri üzerinden indüklediği bulunmuştur (Ulukaya ve ark. 2011b).

1.5.2. Palladyum(II) Bileşiğinin Kanser Tedavisindeki Yeri

Kanser tedavisi için kullanıma giren ilaç sayısındaki hızlı artışa rağmen tedavide etkin bir başarı sağlanamaktadır. Bu nedenle, anti-tümör etkisi yüksek yeni metal komplekslerin sentezlenmesine gereksinim duyulmaktadır.

Metal bazlı bileşikler kanser tedavisinde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılmak amacıyla ilk olarak 1978 yılında Cisplatin sentezlenmiştir. Cisplatin, tedavi edilen hastalarda birçok olumsuz yan etkileri olmasına rağmen birçok kansertürünün tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır; 1985 yılında ikinci platinum bazlı ilaç olarak, antitümör aktiviteyi geliştiren ve cisplatinin dezavantajlarını azaltan karboplatin ve üçüncü platinum bazlı ilaç olarak da 1996 yılında oksaliplatin kullanılmaya başlanmıştır (Starha ve ark. 2009).

Platinum ilaçları metal bazlı anti-kanser ajanlar olarak kanser tedavisinde önemli role sahiptir. Özellikle cisplatin, karboplatin ve oksaliplatin içeren Pt kompleksleri uzun yıllardan beri; yumurtalık, testis, rahim, baş, boyun, küçük hücreli akciğer, kolorektal, serviks ve lenfomayı da içeren birçok kanser türünün tedavisinde klinik olarak kullanılmaktadır (Mansuri-Torshizi ve ark. 1992; Rabik ve Dolan 2007; Divsalar ve ark. 2007).

Cisplatin, *cis-diamminedichloroplatinum(II)(cis-DDP)*, anti-tümör ilaç olarak tüm dünyada çok yaygın kullanımına rağmen; nefrotoksisite, nörotoksisite ve emetojeniteyi de içeren ciddi toksik yan etkilerinin olması klinikte kullanılan dozu sınırlamaktadır.

Bununla birlikte birçok kanser türünde cisplatine karşı direnç gelişebilmektedir (Mansouri-Torshizi ve ark. 2011; Zhang ve ark. 2011).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, bazı Pd(II) komplekslerinin standart platin bazlı ilaçlar (cisplatin, karboplatin ve oksaliplatin) ile karşılaştırıldığında farkedilir düzeyde *in vitro* sitotoksik etki gösterdiğini kanıtlamaktadır (Rau ve van Eldik, 1996; Miklasova ve ark. 2009; Güney ve ark. 2011a). Ayrıca bazı Pd komplekslerinin cisplatin ilacına oranla daha yüksek anti-tümör aktiviteye ve daha az yan etkiye neden oldukları gösterilmiştir (Divsalar ve ark. 2007; Ulukaya ve ark. 2011b).

2010 yılında Gao ve ekibi tarafından yapılan çalışmada; insan serviks epiteloid karsinom hücreleri (HeLa), insan hepatoselüler karsinom hücreleri (Hep-G2), insan oral epitelyal kanser hücreleri (KB) ve insan akciğer kanseri hücrelerinde (AGZY-83a), Pd(II) kompleksi ve cisplatinin sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Pd(II) kompleksi HeLa ve Hep-G2 hücrelerine karşı cisplatin ile benzer şekilde sitotoksik etki gösterdiği buna karşın KB ve AGZY-83a hücrelerine karşı cisplatinin Pd(II) kompleksinden daha fazla etki gösterdiği bulunmuştur (Gao ve ark. 2010).

Ulukaya ve arkadaşları Pd(II) kompleksinin, insan meme kanseri hücre soyları olan MDA-MB-231 ve MCF-7 üzerinde doz ve zamana bağlı olarak büyümeyi *in vitro* olarak baskıladığını göstermiştir ve Pd(II) kompleksinin bu etkisini, Balb/c farelerde *in vivo* olarak da doğrulamışlardır. Ayrıca Pd(II) kompleksinin apoptozisi DR4 ve DR5 isimli apoptozis hücre ölüm genleri aracılığı ile indüklediği de aynı çalışmada gösterilmiştir (Ulukaya ve ark. 2011b).

Aynı yıl içinde yine Ulukaya ve ark. Pt(II) ve Pd(II) bileşiklerinin büyüme inhibe edici etkilerini üç farklı akciğer kanseri hücre soyunda (A549, H1299, PC-3) araştırılmıştır. Sonuç olarak, Pd(II) kompleksinin mitoz bölünmeyi inhibe ederek ve nekrotik hücre ölümünü uyararak bütün hücre soylarında büyümeyi baskılayıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir (Ulukaya ve ark. 2011a).

Güney ve arkadaşları, bis(2-piridil metil) amin (bpma) ve sakkarinat (sac) içeren Pd(II) ve Pt(II) bileşiklerinin A549 (akciğer kanseri), C6 (sıçan beyin gliom hücresi) ve CHO (çin hamsteri yumurtalık hücresi) hücre soyları üzerindeki sitotoksik etkileri araştırmışlardır. Bu komplekslerin sitotoksik etkileri standart kemoterapötik ilaç olan cisplatin ile karşılaştırıldığında Pt(II) komplekslerinin bütün hücre soylarındaki etkisi az

olmasına rağmen, Pd(II) komplekslerinin duyarlı hücre soyları üzerinde önemli bir sitotoksikite gösterdiği belirlenmiştir (Güney ve ark. 2011b).

Kontek ve ark. (2011) tarafından, normal lenfositlerde, insan küçük hücreli dışı akciğer (A549) ve insan kolorektal adenokarsinom (HT29) hücrelerinde ligand olarak dietil (piridin-2-il-metil) fosfatları içeren trans-palladyum(II) kompleksinin apoptozisi ve nekrozu indüklediği bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar bu trans-palladyum(II) kompleksinin *in vitro* koşullarda A549 ve HT29 tümör hücrelerinde, normal hücrelere kıyasla daha fazla sitotoksik olduğu ve hücre büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir.

2014 yılında Arı ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da Pd(II) kompleksinin meme kanseri hücre soyları MCF-7 ve MDA-MB-231'e karşı güçlü anti-proliferatif aktivitesinin olduğu, apoptozisi indüklediği ve *in vivo* olarak tümör hücrelerinin büyümesini önemli derecede inhibe ettiği gösterilmiştir (Arı ve ark. 2014).

2015 yılında yapılan bir çalışmada dört farklı Pd(II) kompleksinin insan meme kanseri MDA-MB-231, insan akciğer kanseri A549 ve insan kronik lenfotik lösemi CLL hücre soyları üzerinde anti-tümör etkisi *in vitro* olarak araştırılmıştır ve tüm bileşiklerin kanser hücrelerinde canlılığı doza bağlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (Stojković ve ark. 2015).

2.MATERYAL VE YÖNTEM

2.1.Materyal

2.1.1.Kimyasal Maddeler

- Pd (II), Uludağ Üniversitesi Kimya Bölümü, Anorganik Kimya Anabilimdalı
- Kurkumin, Burg Apotheke,
- SRB, Santa Cruz
- Fetal sıgır serumu (FBS), Gibco
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin,10mg/ml streptomisin), Gibco
- Fosfat tuz tamponu (PBS), Lonza
- Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Lonza
- 0,05% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco
- Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma
- Tripanmavisi(%0,5), Biological Industries,
- L-glutamin, Gibco

2.1.2.Sarf Malzemeler

- 25cm² ve 75cm²'lik flask, Thermo Scientific
- 6 kuyulu hücre kültür kabı, Orange Scientific
- 96 kuyulu flat hücre kültür kabı, Costar
- 5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Ayset
- 2-20µl'lik pipet uçları, Axygen
- 200µl'lik pipet uçları, Axygen
- 1000µl'lik pipet uçları, Labosel
- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), TPP
- Steril santrifüj tüpleri (15ml), SPL
- Steril santrifüj tüpleri (50ml), SPL
- Thoma lamı, Bright –Line, Hausser Scientific Horsham, PA, USA
- Kriyovial, Corning
- Scraper, Corning

2.1.3.Cihazlar

- Spektrofotometre (FLASHScan S12, Analytik Jena, Almanya)
- Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D
- Luminometre (FL×800 Mikroplate Floresans Okuyucu)
- Muse® Cell Analyzer, Millipore, Almanya
- CO₂ inkübatörü, Sanyo, Japonya

- Mikroplate inkübatör ve çalkalayıcı, Heidolph, Almanya
- Buharlı sterilizatör (Otoklav), Nüve OT4060, Türkiye
- Steril kabin, ESCO, Singapur
- Multipipet cihazı, Multipette eppendorf, Hamburg, Almanya
- Inverted mikroskop, Olympus CKX41, Japonya
- Aspiratör, Rocker 300, Tayvan
- Kuru hava sterilizatörü, Elektro-mag M 420, Türkiye
- Santrifüj, Rotina 35R, Almanya
- 1-10µl, Orange Scientific
- 1-1000µl'lik pipet seti, Orange Scientific
- 0,5-5ml pipet, Eppendorf
- 10ml pipet, Eppendorf
- Pipet boy, Biohit
- 20-200µl Transferpipet, Orange Scientific

2.2.Yöntem

2.2.1.Kurkumin ve Palladyum'un Hazırlanması

Kurkumin bileşiğinin stok çözeltisi 15mg/ml olarak temin edildi; Pd(II) $[[Pd(bpma)(barb)]Cl.H_2O]$ ise 50mM olacak şekilde DMSO ile çözülmesi sağlandı. Kurkumin oda sıcaklığında, çözünmüş Pd(II) ise 0,5ml'lik tüplere; 25'er µl olacak şekilde alikotlandıktan sonra $-20^{\circ}C$ 'de saklandı. Çalışmalar için gerekli seyreltmeler ise besiyeri ile yapıldı.

2.2.2.Hücre Kültürü

Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında görev yapan Prof. Dr. Hakan Akça'dan temin edilen A549 (p53, doğal) ve H1299 (p53, yoksun) insan akciğer kanseri hücre soyları kriyovial denen kaplar içerisinde $-80^{\circ}C$ dolaplarda saklandı. Kullanılan hücre soylarının özellikleri aşağıda belirtilen şekildedir:

2.2.2.1.Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması

Hücreleri çoğaltmak amacıyla kriyovialler $-80^{\circ}C$ den alınarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözöldü. Hücre süspansiyonu; %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin içeren 5ml RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) besiyeri içerisine alındı. Falkon tüp 800rpm'de 5dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım aspire edildi ve hücre peleti üzerine 1ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon hale

gelmesi sağlandı ve hücre süspansiyonu içerisinde 5ml besiyeri bulunan 25cm²'lik flasklara alınarak 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi.

2.2.2.2.Hücre Soylarının Pasajlanması

Deneylerde kullanılan hücre soyları, flask yüzeyini tamamen kapladıklarında (konfluent olduklarında) flask içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücrelerin serumdan arındırılması için 25cm²'lik flask içerisine 2ml 1X PBS ilave edildi ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0.5ml %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 5dk inkübe edildi. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için en az iki katı kadar besiyeri ilave edildi. Böylece tripsinin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlaması engellenmiş oldu.

Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan (falkondaki toplam hacim tripsinin 10 katı olmalı) 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800rpm'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre peleti 1ml hücre besiyerinde çözündükten sonra 9ml besiyeri ilave edildi ve 10ml'lik hücre süspansiyonu 75cm²'lik flasklara alınarak 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde hücreler istenilen sayıya gelene kadar çoğalmaları sağlandı.

2.2.2.3.Hücre Soylarının Stoklanması

Hücreler flask yüzeyini tamamen kapladıklarında flask içerisindeki besiyeri aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 1X PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırıldı ve hücrelerin flask yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için %0.05 Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi. Hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 5dk inkübasyona bırakıldı. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için en az iki katı kadar besiyeri ilave edildi. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu içerisinde besiyeri bulunan 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800rpm'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve pelet üzerine her bir kriyovial için 1,5ml dondurucu medium (5ml DMSO + 5ml FBS + 40ml DMEM) karanlık ortamda ilave edildi. Hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine dağıtılarak -80°C'ye kaldırıldı.

2.2.2.4.Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

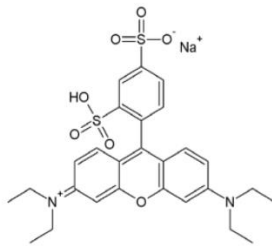
A549 ve H1299 hücre soyları için kullanılan besiyeri ortamı için %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), %1 L-glutamin içeren RPMI 1640 besiyeri kullanıldı.

2.2.2.5.Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 20µl 0,5ml'lik tüpe alındı ve üzerine eşit miktarda %0,5 tripan mavisi konarak iyice karışması sağlandı. Hematositometre distile su ile iyice temizlendi. Bu karışımdan 12µl alınarak thoma lamına koyuldu ve mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplandı.

2.2.3. SRB (Sulforhodamine B) Testi

Bir bileşiğin neden olduğu total hücresel proteindeki azalış hücre canlılığını belirlemede bir parametre olarak kullanılabilir (Sumantran 2011). Sulforhodamine B (SRB) testi, hücrelerin total protein içeriğini *in vitro* olarak ölçülmesine dayanan kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntem, Skehan ve öğrencileri tarafından 1985 yılında hücre proliferasyonu ve sitotoksitenin ölçülmesi amacıyla geliştirilmiştir (Skehan ve ark. 1990). SRB, elektrostatik ve pH bağımlı olarak proteinlere bağlanan, pembe renkli, katı ve suda çözünebilir bir boyadır (Papazisis ve ark. 1997; Vichai ve ark. 2006). SRB molekülünün açık yapısı Şekil 2.1'de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. SRB'nin moleküler yapısı (Anonim 2012d)

SRB Testi, hücresel proteinlerdeki bazik amino asitlere bağlanan Sülforodamin B (SRB) molekülünün gösterdiği spektrofotometrik değişikliğin ölçülmesine dayanmaktadır. Boya, zayıf asidik şartlar altında hücrelere bağlanırken; bazik şartlar altında hücrelerden ayrılabilir (Mathen ve Hardikar 2010). Renk oluşumu, hızlı ve stabildir. Fikse olan boya, çözündürme aşamasından sonra 560-580nm arasında

spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir. Yapılan kolorimetrik değerlendirme, Ölçüm değerleri total protein miktarını dolayısıyla da canlı hücrelerin oranını göstermektedir. (Papazisis ve ark. 1997)

SRB yöntemi; tetrazolyum tabanlı sitotoksosite testlerine göre daha duyarlı, basit, güvenilir ve düşük maliyetli olması, hücre sayısı ile daha iyi bir doğrusallık göstermesi ve zamana duyarlı ölçüm gerektirmeyen stabil bir son noktaya sahip olması gibi üstünlükleri nedeniyle son yıllarda çalışmalarda tercih edilmektedir (Rubinstein ve ark. 1990, Keepers ve ark. 1991, Monks ve ark. 1991, Perez ve ark. 1993).

Testin avantajları şöyle sıralanabilir:

Hücre sayısı ile daha iyi doğrusallığa ve daha yüksek duyarlılığa sahiptir. Doğru, basit, güvenilir ve tekrarlanabilir. Düşük maliyetlidir ve hızlıdır. Zaman duyarlılık ölçümü gerektirmeyen stabil bir son noktaya sahiptir. İlaç kaynaklı sitotoksositeyi ölçmek için uygundur. Klonojenitenin miktarını belirlemek için de yararlıdır. SRB testi, bu üstünlüklerin yanında birkaç dezavantaja da sahiptir. Özellikle, hücre fiksasyonu için TCA (trikloroasetik asit)'in ilave edildiği aşama oldukça kritiktir. TCA hücrelerin üzerine nazik bir şekilde eklenmediğinde hücreler fikse edilmeden zarar görebilmekte ve bu durum sonuçları etkileyebilecek olası hatalara yol açabilmektedir.

SRB testi için, Pd(II) bileşiğinin 50 µM ve kurkuminin 100 µM konsantrasyonları ve bu bileşiklerin kombinasyonları 3 tekrarlı ve 100µl olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı ve seri dilüsyon yapıldı. H1299 ve A549 hücreleri sayılarak 100µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde her bir kuyuya ilave edildi. Hücrelerde, ölümün negatif kontrolü (maksimum canlılık, MO) olarak sadece besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı. Kör için ayrılan kuyular içerisinde ise 200µl besiyeri ilave edildi. Ardından hücreler, 48 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

Tedavi süresi sonunda hücresel proteinleri fikse etmek için, her kuyuya %50'luk TCA'dan 50 µl eklenir ve +4°C'de en az 1 saat fikse edilir. Fiksasyon süresi sonunda TCA hücre kültür kabından uzaklaştırılır (hücre kültür kabı ters çevrilerek dökülür). TCA'yı uzaklaştırmak için kuyular 5 kez, deiyonize su ile yıkanır. Her yıkamanın sonunda hücre kültür kabı ters çevrilerek dökülür (Deiyonize su doğrudan şişeden kuyuların üzerine dökülerek yıkama işlemi gerçekleştirilir). Yıkama sonunda SRB solüsyonundan her kuyuya 50 µl eklenir ve 30 dk. Oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda SRB hücre kültür kabından dökülerek uzaklaştırılır.

Bağlanmamış boyayı uzaklaştırmak için kuyular, 5 kez %1'lik asetik asit ile yıkanır. Her yıkamanın sonunda hücre kültür kabı ters çevrilerek dökülür (Asetik asit doğrudan şişeden kuyuların üzerine dökülerek yıkama işlemi gerçekleştirilir). Yıkama sonunda hücre kültür kabı kuyular içerisinde hiç damla kalmayacak şekilde havada kurutulur. Proteinlere bağlanan boyanın çözünbilmesi için, 10 mM tris bazı (200µl/kuyu) eklenir. Boya solüsyonunu homojenize hale getirmek için, hücre kültür kabı en az 10 dk. çalkayıcıda inkübe edilir (600 rpm). Optik dansite ELISA reader'da 564 nm'de okunur.

% Canlılık hesabı:

İlaç uygulanmamış kontrol hücre (MO) canlılığı %100 olarak kabul edilerek, ilaç uygulanan hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı. Deney içerisinde her bir konsantrasyon birbirinden bağımsız üç farklı kuyuda tekrarlandı.

%Canlılık=[100×(Bileşik ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması-kör ortalama)/(Kontrol hücre absorbansı ortalaması-kör ortalama)] olarak hesaplandı.

2.2.4.Hoechst 33342, Propidiyum İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi

Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilmektedir. Hoechst 33342, DNA'ya bağlanabilen ve intakt membrandan geçebilen bir boyadır ayrıca canlı veya ölü (apoptotik / nekrotik) hücrelerin çekirdeklerini boyamak için kullanılmaktadır. Propidium iyodür (PI), sadece hasarlı hücre membranlarından geçebilen, geç apoptotik / sekonder nekrotik veya primer nekrotik olan tüm ölü hücreleri boyayabilen floresan nükleik asit boyasıdır.

Primer nekrozis (hücre hacminin artması fakat fragmente ya da piknotik nükleusların gözlenmemesi) toksik koşullar (hipoksi, iskemi, hipertermi, vb) altında gerçekleşen klasik ölüm şeklidir.

Sekonder nekrozis ise, piknotik nükleus ile karakterize olup, apoptozisin geç safhasıdır.

Hücre kültürü ortamında apoptozise giden hücrelerin membranları intakt (erken apoptoziste) olmasına rağmen daha ileri dönemlerde geç apoptozis/sekonder nekrozun gelişmesi ile hücrelerin membran bütünlükleri bozulmaktadır. Sekonder nekroz aşamasına kadar olan süre içinde hücreler non-vital boyalar denilen (PI) boyalar ile boyanacak olurlarsa apoptozis başlamış olmasına rağmen membran intakt olmasından dolayı bu boyalarla boyanamazlar. Yani PI negatif ve Hoechst boyası pozitif

boyanmaktadır. Sekonder nekroz geliştikten sonraki aşamalarda hücreler membran bütünlüklerinin bozulması ile non-vital boyalar ile boyanmaya başlarlar. Dolayısıyla PI pozitif ve Hoechst pozitif boyanmaktadır (Ulukaya ve ark. 2011c).

İkili boyama yöntemi kullanılarak bileşiklere maruz kalmış hücrelerin ölüm şekilleri, nükleus morfolojisine bakılarak yapılabilir. Apoptotik hücrelerde; çekirdeğin normal hücrelere göre daha küçük olma özelliği aranırken, nekrotik hücrelerde ise çekirdeğin normal hücrelerden biraz daha büyük olması ve daha az boya alması özelliği aranmaktadır. Bu amaçla, bileşiklerin hücre soyları üzerindeki etkilerinin morfolojik olarak floresan mikroskopta görüntülenebilmesi için ikili boyama yöntemi kullanıldı.

İkili boyama yöntemi için, H1299 hücreleri sayılarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 100µl içerisinde 5×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 16 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben 12,5 µM Kurkumin ile 6,25 µM Pd(II) bileşiği kombine edilerek 100µl içerisinde olacak şekilde kuyulara ilave edildi. Negatif kontrol kuyularına 100µl taze besiyeri ilave edildi. Ardından hücreler, 12 ve 24 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. İlaç uygulamasını takiben, kuyulardan besiyeri uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine PBS içerisinde konsantrasyonları 1mg/ml PI, 5mg/ml Hoechst 33342 olacak şekilde hazırlanan ikili boyama çözeltisinden 200µl pipetlendi ve karanlıkta 20 dakika 37°C'de inkübe edildi. Süre sonunda bileşiklerin hücrelerde sebep olduğu ölüm şekli floresan mikroskop altında değerlendirildi.

2.2.5.Akım Sitometri Analizleri

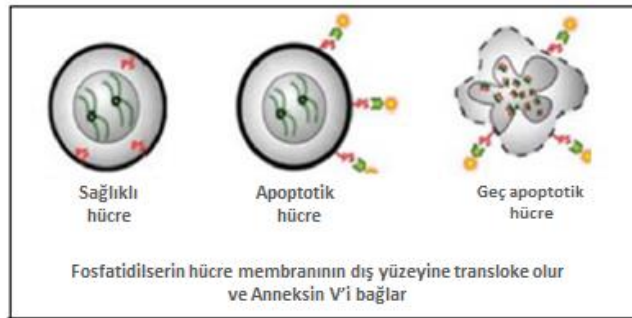
Akım sitometri ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geğerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Ölçüm sırasında hücreler sıvı içerisinde tek tek askıda olmalı ve hücreleri içeren süspansiyon sürekli bir akışla lazer ışını içinden geçmelidir. Akım sitometri cihazında bir saniyede binlerce hücre, lazer ışını ile karşılaştıkları flow cell adı verilen bölümden geçer ve hücreler lazer ışığı ile uyarılırlar. Her bir hücre lazer ışığının bir kısmını saptırır ve aynı zamanda lazer ışığı tarafından uyarıldıklarından yani ekstra enerji yüklenmiş olduğundan, floresan ışığı yayarlar. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli florokromlar (floresan özellikte boyalar) da olabilir. Hücreler yüzeylerindeki veya hücre içindeki proteinlere özđün antikorlarla inkübe edilerek antijenlere bağlanmaları sağlanır. Her spesifik antikor FITC, PE, PerCP,

7-AAD gibi floresan boyalarla işaretlenmiştir. Böylece belirli antijene sahip hücrelerin laser ışını ile karşılaştığında verdiği floresan sinyalleri değerlendirilerek o hücrenin hangi spesifik antijeni taşıdığı belirlenebilir (Macey 2007; Karaboz ve ark. 2008).

Akım sitometri ile floresan bir madde ile işaretlenmiş antikör kullanılarak apoptoziste eksprese olduğu bilinen herhangi bir yüzey proteini saptanabilmektedir. Kolay uygulanabilir olması, uzun zaman almaması ve kantitatif sonuçlar vermesi açısından klinikte apoptozisin saptanmasında oldukça kullanışlı bir yöntemdir (Ulukaya 2003).

2.2.5.1. Anneksin V ve Ölü Hücre Boyama

Apoptozis veya programlı hücre ölümü hücre büyümesi ve proliferasyon yollarının düzenlenmesinde aktif ve önemlidir. Hücrelerde apoptozis sürecinde karakteristik fizyolojik değişiklikler gözlemlenir. Bu değişimler arasında, normalde hücre membranının iç yüzünde bulunan ve bir membran fosfolipidi olan fosfatidilserinin membranın dış yüzüne transloke olması, spesifik hücre proteinlerinin degradasyonu veya kırılması, kromatin kondensasyonu ve apoptozisin geç evresinde membran bütünlüğünde bozulma sayılabilir. Fosfatidilserinin translokasyonu hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir (Şekil 2.2).



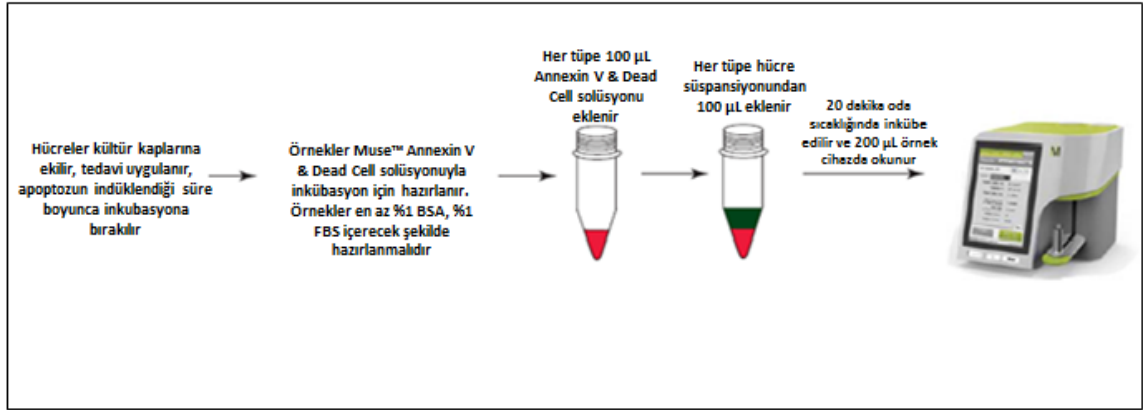
Şekil 2.2. Fosfatidilserinin translokasyonu ve Anneksin V'ye bağlanması (Anonim 2013a)

Anneksin-V, fosfatidilserin için yüksek affinite ile Ca^{+2} bağlayıcı bir proteindir ve FITC gibi floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir. Fosfatidilserin moleküllerinin Ca^{+2} iyonu varlığında Anneksin-V-FITC kompleksi ile bağlanması sonucu apoptotik hücre ölüm yüzdesi belirlenmektedir.

7-Aminoaktinomisin D (7-AAD), DNA için güçlü affiniteye sahip floresans özellikte bir kimyasal bileşiktir. İntakt hücre zarından kolayca geçemez, bu nedenle zar

bütünlüğü bozulmuş hücrelerde çift zincirli DNA 'nın GC bakımından zengin bölgelerine bağlanır (Liu ve ark. 1991).

- Non-apoptotik hücreler: Anneksin V (-) ve 7- AAD (-)
- Erken apoptotik hücreler: Anneksin V (+) ve 7- AAD (-)
- Geç apoptotik hücreler ve ölü hücreler: Anneksin V (+) ve 7- AAD (+)



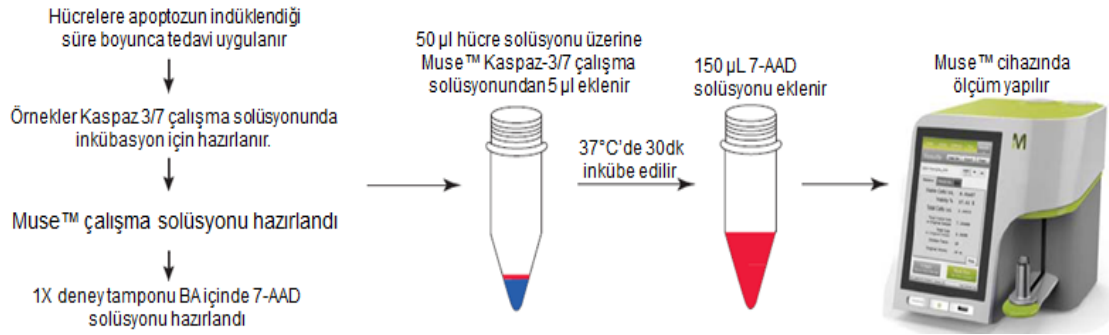
Şekil 2.3. Anneksin V ve Ölü Hücre Boyama Protokolü(Anonim 2013a)

Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit (Merck Millipore, Almanya) oda sıcaklığına getirildi. H1299 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 1ml içerisinde $2,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 16 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyonu takiben $12,5\mu\text{M}$ Kurkumin ile $6,25\mu\text{M}$ Pd(II) bileşiği kombine edilerek 1ml içerisinde olacak şekilde kuyulara ilave edildi. Negatif kontrol kuyularına 1ml taze besiyeri ilave edildi. 12 ve 24 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15ml'lik falkonlara toplandı ve negatif kontrol kuyularının süpernatantı uzaklaştırıldı. Hücreler tripsin ile kaldırıldı ve ilgili falkonlara toplandı ve 1000g 5dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve 100µl % 1 FBS içeren besiyeri eklendi ve 1,5ml tüpe 100µl hücre süspansiyonu alındı. Bu ependorflara 100µl Muse™ Annexin V & Dead Cell solüsyonu eklendi. Orta hızda yaklaşık 5 saniye vorteks yapıldı. Karanlık ortamda 20 dk oda ısısında inkübasyon sonunda Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı (Şekil 2.3).

2.2.5.2. Kaspaz 3/7 Testi

Kaspazlar, programlı hücre ölümü olan apoptosis sürecinde önemli bir rol oynayan sistein proteazlardır (Riedl ve ark. 2004). Bazı kaspazlar öncelikli olarak intraselüler kaskadın başlamasında rol oynarken, efektör kaspaz olarak adlandırılan kaspazlar ise apoptotik sürecin ileri aşamalarında rol alırlar. Efektör kaspazlar olan kaspaz 3/7

aktivasyonu apoptozisin ayırt edici özelliklerinden biridir. Bu efektör kaspazlar, kaspaz-3 ve kaspaz-7 gibi yapısal proteinlerin kırılması yoluyla hücresel yıkımda rol oynarlar (Portera ve ark. 1999).



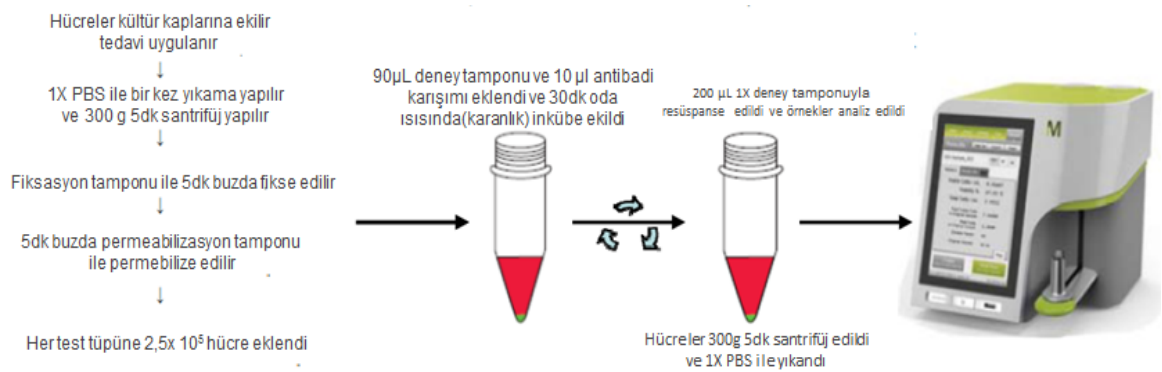
Şekil 2.4. Kaspaz 3/7 Testi Protokolü (Anonim 2013b).

Kaspaz 3/7 testi için Muse™ Caspase-3/7 Kit (Merck Millipore, Almanya) kullanıldı. Bu test için H1299 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 1ml içerisinde $2,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 16 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyonu takiben $12,5 \mu\text{M}$ Kurkumin ile $6,25 \mu\text{M}$ Pd(II) bileşiği kombine edilerek 1ml içerisinde olacak şekilde kuyulara ilave edildi. Negatif kontrol kuyularına 1ml taze besiyeri ilave edildi. 12 ve 24 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyon sonunda öncelikle kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2ml 1X PBS ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden tripsin ile ayrılması sağlandı ve yüzeyden ayrılan hücreler ilgili falkonlara toplandı ve 1000g 5dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve elde edilen pelet sulandırılarak tedavi gruplarını içeren etiketli ependorflara hücre süspansiyonundan 50 µl eklendi. Daha sonra kaspaz 3/7 çalışma solüsyonundan her bir tedavi grubunu içeren ependorflara 5 µl konuldu. Kısa bir pipetaj işleminin ardından ependorflar kapakları açık bir şekilde 37°C 'de, %5 CO_2 'li ortamda 30dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda ependorf içerisinde hücre süspansiyonlarına 150 µl DNA'ya bağlanabilen 7-AAD eklenerek kısa bir pipetaj gerçekleştirildi. Daha sonra oda sıcaklığından karanlıkta 5dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra Muse™ Cell Analyzer cihazında kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirildi (Şekil 2.4).

2.2.5.2. Gamma-H2A.X Testi

Nükleozom yapısı, DNA zinciri ve bu zincirin etrafında sarıldığı dört çekirdek histonundan her birinin iki kopyasından oluşur. Nükleozomu oluşturan dört çekirdek histon ailesi H2A, H2B, H3 ve H4'tür. Bu histon proteinlerinden H2A ailesinin de H2A1, H2A2, H2AX ve H2AZ gibi varyantları vardır. Önemli bir H2A tipi olan H2AX proteini, DNA hasar tamiri sürecinde anahtar bir rol oynar, dolayısıyla hücre bölünmesi ve büyümesi, immüno-reseptörlerin düzenlenmesi gibi pek çok hücresel olay, genomik kararsızlık ve DNA hasar tamiri ile ilgili sendromlarla yakından ilişkilidir (Kuo ve Yang 2008; Kinner ve ark. 2008; Rakiman ve ark. 2008).

H2AX proteini, DNA hasar yolağında görev alan en önemli proteinlerden birisidir. DNA çift zincirinde kırık oluştuğunda H2AX, korunmuş olan C-terminal kuyruk bölgesindeki serin 139 pozisyonundan, PI-3 (Phosphoinositol-3) kinaz ailesi üyeleri olan ATM, ATR ve DNA-PK'ler tarafından hızla fosforillenir. ATM ve DNA-PK'ler genellikle iyonize radyasyon sonrası H2AX'in fosforilasyonunda rol alırken, ATR replikasyon çatalını yavaşlatır ya da duraklatır. H2AX proteini, fosforlandıktan sonra gamma H2AX (γ H2AX) adını alır (Yuan ve ark. 2010; Podhorecka ve ark. 2010; Avondoglio ve ark. 2009; An ve ark. 2010). Birçok çalışma, DNA zincir kırıklarının sayısı ile ilişkili olarak γ H2AX seviyesinin akım sitometri yöntemi ile kantitatif olarak belirlenebildiğini göstermiştir (Muslimovic ve ark. 2008).



Şekil 2.5. Gamma-H2AX Testi Protokolü (Anonim 2012e)

Gamma-H2AX Testi için Muse™ H2A.X Activation Dual Detection Kit (Merck Millipore, Almanya) kullanıldı. H1299 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 1ml içerisinde $2,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 16 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben 12,5 µM Kurkumin ile 6,25 µM Pd(II) bileşiği

kombine edilerek 1ml içerisinde olacak şekilde kuyulara ilave edildi. Negatif kontrol kuyularına 1ml taze besiyeri ilave edildi. 12 ve 24 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyon sonunda sonunda tedavi uygulanan kuyuların süpernatantları, 15ml'lik falkonlara toplandı ve negatif kontrol kuyularının süpernatantı uzaklaştırıldı. Hücreler tripsin ile kaldırıldı, ilgili falkonlara toplandı ve 300g 5dk santrifüj edildi. Süpernatantlar uzaklaştırıldıktan sonra her 100,000 hücre süspansiyonu için 50µL 1X deney tamponu ile hücreler resüspanse edildi. Üzerine 50µL fiksasyon tamponu eklendi ve buzda 5dk inkübe edildi. Inkübasyon sonunda 300g 5dk santrifüj yapıldı ve süpernatantlar uzaklaştırıldı. 250µL soğuk permeabilizasyon tamponu ile resüspanse edildi ve 300g 5dk santrifüj yapıldı, süpernatantlar uzaklaştırıldı. Her test tüpü deney tamponu ile resüspanse edildi. Tüplere boyama için 5µL anti-Histone H2A.X/PECy5 antibadi eklendi. Sinyali çoğaltmak için antifosfo-Histon H2A.X ve anti-Histone H2A.X,PECy5'i içeren antibadi çalışma solüsyonundan 10µL her test tüpüne ekledi. 30dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda 100µL 1x deney tamponu eklendi ve 300g 5dk santrifüj yapıldı, süpernatant uzaklaştırıldı. 200µL 1x deney tamponu ile tekrar süspanse edildi. Örneklerle Muse™ Cell Analyzer cihazında ölçüm yapıldı (Şekil 2.5).

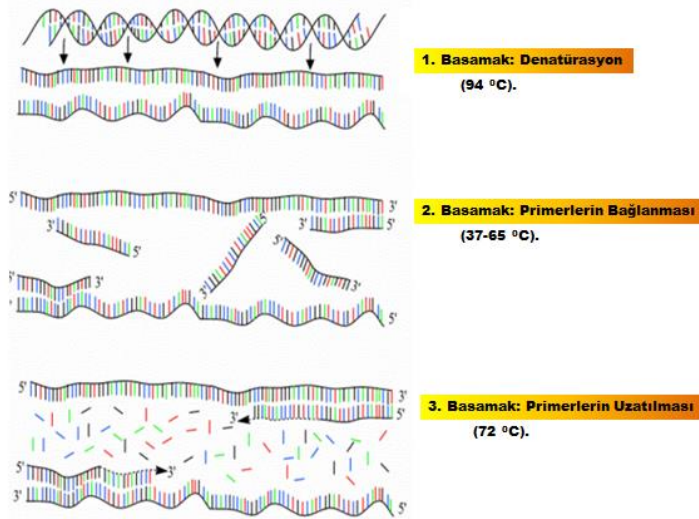
2.2.6.Apoptotik Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi

2.2.6.1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bu yöntem, nükleik asitlerin, uygun *in vitro* koşullar altında çoğaltılmasına dayanmaktadır.

2.2.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İşleminin Uygulama Aşamaları ve Prensipleri

PCR reaksiyonu; DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklıkla birbirinden ayrılmasını (denatürasyon), sonra sırasıyla sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyon), zincirin uzamasını (polimerizasyon, çift iplikçikli DNA'ların sentezi), ve tüm bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasını kapsamaktadır (Şekil 2.6). PCR tekniğinin otomasyonu, her bir siklus esnasındaki ısıtma ve soğutma işlemlerini yazılım programları doğrultusunda gerçekleştiren “thermocycler” adı verilen PCR cihazları yardımıyla sağlanmaktadır. Bu cihazlarda sıcaklık +4°C ile 100°C'ler arasında programlanabilmekte ve reaksiyon işlemlerinin sona ermesiyle +4°C'ye ayarlanarak tüpler uzun süre bu sıcaklıkta tutulabilmektedir (Arda 1980; Erol ve ark. 1990).



Şekil 2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Siklusunun Basamakları (Vierstrate 1999)

2.2.6.2.1.DNA'nın Denatürasyonu Aşaması

Bu aşamada çift zincirli hedef DNA'nın birbirinden ayrılması sağlanmaktadır. Denatürasyon aşamasında, sıcaklık yaklaşık 93-96 °C'ye kadar çıkarılır, bu sayede çift sarmallı DNA, hidrojen bağlarının kopmasıyla iki eş zincir birbirinden ayrılır. Bu sıcaklıkların uygulanmasıyla DNA'nın denatürasyonu "Thermocycler" cihazlarında gerçekleştirilmektedir. Bunun yanı sıra denatürasyon sıcaklığının çok yüksek veya süresinin uzun olması enzim aktivitesinin olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır (Erllich ve ark. 1991).

2.2.6.2.2.Primerlerin Bağlanması (Hibridizasyon, Annealing) Aşaması

PCR işlemlerinin bu aşamasında, primer olarak adlandırılan ve çoğaltılması istenen DNA için spesifik olan oligonükleotidler, denatürasyon aşamasında elde edilen DNA tek sarmalı üzerinde kendisine komplementer olan diziye bağlanmaktadır. DNA zincirlerinin eşleşmesi veya yeniden bağlanması daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşmektedir (37-65 °C). Primerlerden birinin kendine ait olan 5' ucu, hedef DNA'lardan birinin 3' ucuyla, diğer primer de ikinci tek iplikçik DNA'nın anti paralel olan diğer ucunda bulunan 3' ucuna DNA polimerazın çalışma yönüne (5' →3') uygun olarak bağlanırlar (Erol ve ark. 1990; Aldemir ve ark. 2001).

2.2.6.2.3.Primerlerin Uzatılması (Polimerizasyon, Extention, Elongation) Aşaması

Primerlerin bağlanması aşaması tamamlandıktan sonra, primerlerin hibritleştiği tek sarmalların karşılığı DNA polimeraz (genellikle Taq polimeraz) tarafından sentezlenir. Taq Polimerazın optimum çalışma sıcaklığı 72°C'dir. Taq polimeraz enzimi 5'→3'

yönünde aktivite göstererek, primerlerin 3' uçlarından başlamak üzere ortamdaki nükleotidleri kullanarak hedef DNA dizisinin birebir kopyasını yapmaktadır (Caner ve ark. 2001; Birben 2006).

2.2.6.3.Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Nükleik asit çoğalmasıyla eşzamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle, kısa sürede kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir. Ticari olarak geliştirilmiş üç tipi bulunmaktadır. Bunlar; LightCyler (Roche), TaqMan (PE Biosystem) ve iCycler (BIO-RAD)'dır.

LightCycler sisteminin uygulanmasında; yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (Syber green 1) kullanılarak, çoğalmaya bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarıyla ölçülmektedir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan Syber green 1 miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir (Heid ve ark. 1996; Grove 1999; Kubista ve ark. 2006). Bu uygulamada, floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü çift sarmal DNA'ya entegre olan Syber green 1 ortamda hedef moleküller olmadığında primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar (primer dimer) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü gidermek için amplifikasyon ürünlerinin melting curve (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Her çift sarmal DNA, kendine özgü melting temperature (T_m , çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale gelmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir. PCR çoğalmasının ardından sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrılmaya başlayınca Syber green 1 boya serbest kalmakta ve floresans miktarı azalmaktadır. Denatürasyon olduğunda floresans sinyal aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak ampikonun T_m derecesi saptanabilmektedir. İncelenen örneğe ait T_m derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün T_m derecesiyle karşılaştırılarak, PCR sonucunun doğru veya hatalı olduğuna karar verilmektedir.

LightCycler'in diğer bir uygulama şekli, hedefe özgül problemler kullanmaktır. Burada problemlerle testin özgüllüğü artırılmıştır. Problemlerden biri 3' ucundan floresans boyayla işaretli (donör boya), diğeri 5' ucundan alıcı boyayla (acceptor dye) işaretlenmiştir. Problemler, hedef ampikonlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotid uzaklıkta) yere

bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji, ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır. FRET (Fluoresance resonance energy transfer) olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine, diğer bir ifadeyle PCR siklusu süresince oluşan ampikonların miktarına bağlı olarak artmaktadır (Holland ve ark. 1991; Livak ve ark. 1995).

Eş zamanlı PCR, kısa sürede kantitatif sonuç verebilmektedir. Tüpler açılmadan tanıya gidildiği için kontaminasyon riski düşüktür. Elektroforeze gerek kalmadan çoğalma esnasında sonuç alınabilmektedir. Ayrıca floresan veren problemler kullanılarak hedef nükleik asitteki mutasyonlar saptanabilmektedir (Morris ve ark. 1996).

H1299 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 1ml içerisinde 2×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 16 saat 37^0C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyonu takiben 12,5µM Kurkumin ile 6,25µM Pd(II) bileşiği kombine edilerek 1ml içerisinde olacak şekilde kuyulara ilave edildi. Negatif kontrol kuyularına 1ml taze besiyeri ilave edildi. 18 saat 37^0C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyon sonunda, total RNA izolasyonu yapıldı.

2.2.6.4. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu Total RNA Purification Kit (Jena Bioscience) kullanılarak yapıldı. Bu aşamada ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, buz üzerinde tutulan 15ml'lik falkonlara toplandı ve negatif kontrol kuyularının süpernatantı uzaklaştırıldı. Kuyulara 2ml soğuk PBS ilave edilip hücreler %0,05 Tripsin-EDTA ile kaldırıldı ve ilgili falkonlara aktarıldı. Süspansiyon $+4^0\text{C}$ 'de 1000g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 250µl lizis tamponu eklenerek 10sn vortex yapıldı. Vortex yapıldıktan sonra falkonda bulunan hacmin 0,6 katı kadar (yaklaşık 180µl) izopropanol eklendi. Kitin içerisinde yer alan filtre tüpler, koleksiyon tüpler ile birleştirdi ve filtre tüplerin içine 100µl aktivasyon buffer pipetlendi. Daha sonra birleştirilen filtre tüpler ve koleksiyon tüpler 10000g'de 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonunda koleksiyon tüplerde biriken sıvı uzaklaştırıldı. Örneklerin bulunduğu falkonlardan tüm hacim filtre tüplere aktarıldı ve 10.000g'de 30saniye santifüj edilip alta geçen sıvı uzaklaştırıldı. Filtre tüplere 500µl primer yıkama solüsyonu pipetlendi ve 10000g'de 30saniye santrifüj edildi, santrifüj sonunda koleksiyon tüplerde biriken sıvı uzaklaştırıldı. Daha sonra filtre tüplere 500µl

sekonder yıkama solüsyonu pipetlendi ve 10.000g'de 30saniye santrifüj edildi. Son olarak tüpler 10.000g'de 2 dakika santrifüj edildi. Daha sonra filtreli tüpler kapaklı tüplere yerleştirildi ve membranın tam üstüne 50µl elüsyon buffer eklenerek 1 dakika oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 10.000g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpte bulunan RNA çözeltilerinin konsantrasyonları ölçüldü.

2.2.6.5. İzole Edilen RNA'ların Kontrolü

İzolasyonu gerçekleştirilen RNA'ların kalitesi ve miktarları Nanodrop™ cihazı ile ölçüldü. RNA örneklerinden 2µl alındı ve suya karşı kör alınan cihaz ile ölçümler yapıldı. RNA miktarları 50ng/µl ile 600ng/µl arasında bulundu.

2.2.6.6. cDNA Sentezinin Yapılması

Elde edilen total RNA örnekleri, SCRITPT cDNA Sentez Kiti (Jena Bioscience) ile cDNA'ya çevrildi. Çevrim için, kullanılacak RNA örnek sayısından 1 örnek fazla olacak şekilde “1 çevrim” sütunundaki hacimler (RNA hariç) bu sayı ile çarpılarak bir karışım (cDNA Sentez karışımı) hazırlandı (Tablo 1).

Tablo 1. cDNA Sentez Karışımı Hazırlanışı

Bileşen	Stok Konsantrasyonu	Final Konsantrasyon	1 çevrim (20 µL)
RNase-free su	-	-	20 µl'ye tamamla
RNA	-	Total RNA: 10 pg- 5µg Ya da mRNA: 10 pg-500 ng	x µl
Primer	100 µM	Oligo-dT: 500 pmol (300 ng) Hexamer: 50 pmol (300 ng)	0,1-0,2 µl 0,5 µl 0,5 µl
SCRIPT RT Tampon	5x	1x	4 µl
dNTP Karışımı	10 mM (her biri)	500 µM (her biri)	1 µl
DTT Stok Çözeltisi	100 mM	5 mM	1 µl
RNase inhibitör	40 ünite/µl	40 ünite	1 µl
SCRIPT Reverse Transkriptaz	200 ünite/µl	100 ünite	0,5 µl

Bu karışım buz üzerinde Etiketli PCR tüplerine eşit şekilde dağıtıldı ve son olarak da RNA konsantrasyonları eşit olacak şekilde pipetlendi. Reaksiyonun gerçekleşmesi için tüpler, 42°C'de 10 dakika sıcaklık döngü cihazında inkübe edildi. Reverse transkriptaz

enzimini inaktive etmek için tüp, 50°C’de 60 dakika sıcaklık döngü cihazında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, reaksiyonu durdurmak için tüpler hızlı bir şekilde buz üzerine alındı ve eş zamanlı PCR analizi için kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

2.2.6.7. Eş Zamanlı Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizinin Yapılması

Literatür araştırmaları sonucunda apoptozis (FAS, TNFRSF10B), nekroptozis (PARP1, RIPK1) ve otofaji (ATG3, ATG5, BECN) ile ilişkili sinyal yollarında etkili olan önemli genler belirlendi. Bu genlerin primerleri kullanılarak qPCR master karışımı hazırlandı (Tablo 2).

Tablo 2. qPCR Master Karışımı’nın Hazırlanışı

Bileşen	20 µl mix için	180 µl mix için (8 gen için +1 fazla örnek; 9 örnek)	Final konsantrasyon
qPCR Green-Master with UNG	10 µl	90 µl	1x
Primer (Forward)	0,6 µl	5,4 µl	300 nM
Primer (Reverse)	0,6 µl	5,4 µl	300 nM
PCR-Grade Su	7,3 µl	65,7 µl	-
Toplam Mix	18,5 µl	166,5 µl	-

Hazırlanan bu karışımdan 18,5µl PCR platelerinin örnek kuyucuklarına dağıtıldı. Üzerlerine cDNA’lardan 1,5µl pipetlendi. Plate LightCycler 480 (Roche) cihazına yerleştirildi. Aşağıda verilen program ayarlanarak PCR tamamlandı. Sonuçlar $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak LightCycler Software 4.0 ile değerlendirildi.

1 siklus	50°C’de 2 dakika
45 siklus	95°C’de 15 saniye 52°C’de 20 saniye 72°C’de 30 saniye
1 siklus	95°C’de 1 dakika
(Melting Curve)	55°C’de 30 saniye 95°C’de 30 saniye
1 siklus (Cooling)	40°C’de 2 dakika

2.2.7. Western Blot Analizi

1975 yılında, jel elektroforezi ile ayrılmış spesifik DNA fragmentlerini nitroselüloz membran filtreleri kullanarak southern blotlama yöntemi tanımladı. Bundan kısa bir süre sonra, RNA molekülünün filtre matrikslerde immobilize edilerek analizini sağlayacak yeni bir teknik geliştirildi. Bu teknik de Northern blotlama ismini aldı. 1979 yılında ise bulunan yeni tekniğe protein blotlama ya da birçoğumuzun bildiği yaygın ismi ile Western blotlama ismi verildi (Karaaslan 2008).

Western Blot analizi hücrelerden elde edilen bir protein karışımında, aranan (hedef) proteinin varlığını göstermek ve molekül ağırlığını belirlemek amacıyla kullanılan özel bir protein-protein hibridizasyon tekniğidir. İmmünoiblotlama olarak da adlandırılan tekniğin uygulanabilmesi için öncelikle hedef proteini tanıyarak ona bağlanabilen bir antikor mevcut olmalıdır. Western blotlama temel olarak üç aşamada gerçekleştirilir:

- i. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemiyle örnek karışımında bulunan proteinlerin jel üzerinde birbirlerinden ayrılması sağlanır.
- ii. Jelde büyüklüklerine göre ayrılarak bantlar oluşturan protein molekülleri, elektrotransfer tekniği ile nitroselüloz membrana aktarılırlar.
- iii. Membranın sırasıyla, hedef proteine özgü antikor, bu antikoru tanıyan ve yapısına enzim ilave edilmiş ikincil bir antikor ve son olarak söz konusu enzimin substratı ile muamelesi sonucunda meydana gelen ışık aracılığı ile hedef proteinin membran üzerinde görüntülenmesi sağlanır.

Proteinlerin saflığının kontrolü ve moleküler ağırlıklarının saptanması amacıyla kullanılan SDS-PAGE yöntemi western blot analizinin ilk aşamasını oluşturur. Elektrik akımı etkisiyle proteinlerin büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlayan ortam akrilamid ve N-N'-metilen bis-akrilamid monomerlerinin polimerleşmesiyle oluşan jel matriksidir. Poliakrilamid jel matriksi farklı büyüklükte kanallar (porlar) içerdiğinden denatüre protein karışımı jele yüklenip elektroforez uygulandığında, proteinlerin bu kanallardan geçiş hızı tamamen büyüklüklerine bağlıdır. Küçük proteinler jelde hızlı, büyük proteinler ise yavaş ilerler. SDS-PAGE yöntemi ile ayrılmak istenilen proteinlerin sadece büyüklüklerine göre ayrımını sağlamak için önce ısı ile denatüre edilmeleri ve sonra Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ile muamele edilmeleri gereklidir. Anyonik bir deterjan olan SDS, proteinlere bağlanıp negatif yüklü hale getirerek lineer forma dönüşmelerini sağlar. SDS sayesinde negatif yük ile yüklenen proteinler elektroforez sırasında anoda göç ederler. Elektroforez işlemi tamamlandığında farklı büyüklükteki proteinler jel boyunca ilerlerken ayrılarak farklı protein bantları halinde odaklanırlar. SDS-PAGE işleminden sonra jeldeki protein bantlarının görüntülenmesi için kemiluminesans prensibinden yararlanılır. Akrilamid ve bisakrilamid oranı jelin ayırıştırma kapasitesini belirler. Boyutları ayarlanabilen gözenekli yapıları nedeniyle proteinleri molekül ağırlıkları veya kütleleri ile orantılı olarak moleküllerin göçünü

yavaşlatan bir moleküler elek olarak davranır. Bu nedenle ayırım hem moleküler eleme hem de elektroforetik mobilité temeline dayanmaktadır. Düşük derişimde hazırlanan jellerin gözenekleri daha büyük olup, büyük molekül ağırlıklı biyomoleküllerin ayırımında kullanılırlar (Coşkun-Arı 2003).

H1299 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 4×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 16 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyonu takiben $12,5\mu\text{M}$ Kurkumin ile $6,25\mu\text{M}$ Pd(II) bileşiğı kombine edilerek kuyulara ilave edildi. Negatif kontrol kuyularına 1ml taze besiyeri ilave edildi. 6, 12 ve 24 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyon sonunda protein izolasyonu aşamasına geçildi.

2.2.7.1. Protein İzolasyonu

2.2.7.1.1. Çözeltiler

Lizis tamponu: 3ml lizis tamponu (RIPA lysis buffer, Santa Cruz, ABD) için $30\mu\text{l}$ 200mM PMSF (Santa Cruz, ABD), $30\mu\text{l}$ 100mM sodyum ortovanadat (Santa Cruz, ABD), $45\mu\text{l}$ proteaz inhibitör kokteyl (Santa Cruz, ABD) eklendi. Solüsyon karanlıkta hazırlandı.

Bu aşamada, ilaç uygulanan flaskların süpernatantları, buz üzerinde tutulan 15ml 'lik falkonlara toplandı ve negatif kontrol flaskının süpernatantı uzaklaştırıldı. Flasklara 10ml soğuk PBS ilave edilip hücreler“scraper” (Corning) ile kaldırıldı ve ilgili falkonlara aktarıldı. Süspansiyon $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 1000g 'de 5 dakika santrifüj (Hettich Zentrifugen, Almanya) edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve pelet üzerine $0,5\text{ml}$ lizis tamponu pipetlendi. Falkonlar, karanlıkta 30 dakika buz üzerinde bekletildi ve bu esnada 10 dakikada bir pipetaj yapılarak karıştırıldı. Süre bitiminde solüsyonlar $1,5\text{ml}$ 'lik tüplere aktarıldı ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de $10,000\text{g}$ 'de 10 dakika santrifüj edildi (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Süpernatantları $0,5\text{ml}$ 'lik tüplere toplandı ve protein miktarları ölçüldü.

2.2.7.2. Proteinlerin Biçinkoninik Asit Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

2.2.7.2.1. Çözeltiler

Biçinkoninik Asit Kit (Sigma-Aldrich)

Bovine Serum Albumin (BSA, Amresco) Standardı

2.2.9.2.2.BSA Standartlarının Hazırlanması

BCA ile protein miktarlarını ölçebilmek için sığır serum albumin (BSA) proteininin değişik konsantrasyonları RIPA ile hazırlanarak bir standart eğri grafiği çizildi. ml'sinde 2, 1,8, 1,6, 1,4, 1,2, 1 mg BSA bulunan standartlar hazırlandı.

2.2.7.2.3. Biçinkoninik Asit Ölçümünün Yapılması

Biçinkoninik asit (BCA) protein tayin yönteminde bakır sülfat, BCA solüsyonuna eklendiğinde oluşan kompleks elma yeşili bir renk alır. Bu solüsyon, protein solüsyonuna ilave edildiğinde, proteinin peptit bağları ile etkileşir ve Cu^{++} iyonları Cu^+ iyonlarına dönüşür. Neticesinde kompleksin rengini mora çevirir. Bu yöntem hızlı, hassas ve kesindir ancak deterjan ve organik solventlerle etkileşimlerine dikkat etmek gerekmektedir.

Ölçüm için Biçinkoninik Asit Kit ve 96 kuyuluk hücre kültür kabı kullanıldı. Her bir kuyuya 10µl standart ve 10µl konsantrasyonu bilinmeyen örnekler pipetlendi. Kuyuların üzerine 190µl çalışma ayırıcı pipetlendi ve plate 30 dakika inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda oluşan renk şiddeti, spektrofotometrede 570nm'de okundu.

2.2.9.3.Western Blot Yöntemi ile Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarılması **2.2.9.3.1.Çözeltiler**

MES SDS Running Buffer (Nu-PAGE, 20X, Invitrogen): 30ml Running buffer, 570 ml ultra saf H₂O ile tamamlandı.

Nu-PAGE LDS Sample Buffer (4X,Invitrogen)

Nu-PAGE Sample Reducing Agent (10X,Invitrogen)

Nu-PAGE Antioksidant (Invitrogen)

Kaleidoscope Prestained Standarts (Biorad)

%4-12 gradient, NuPAGE Bis-Tris Mini Gels, 1mm, 12 kuyucuk (Invitrogen)

10X pH:7,6 TBS-T (Tris-Buffer Saline-Tween20):Tris base 24,23g NaCl (Merck) 80,06g(Scharlau) ve 5ml Tween20 (Dako) 1L ultrasaf H₂O ile çözüldü.

Western Breeze Chemiluminescent Immunodetection System, Rabbit (Invitrogen)

2.2.7.3.2.Proteinlerin Yüklenmesi ve Jelde Yürütülmesi

Örnekler istenen hacimlerde toplam protein miktarı 50µg (BCA yöntemiyle belirlenen) ve sample buffer ve reducing agent 1X olacak şekilde 0,5ml'lik tüplere pipetlendi.

Ardından tüpler su banyosunda bekletildi. Bu esnada jel, elektroforez tankına yerleştirildikten sonra SDS running buffer, doluluk sınırına kadar eklendi. Hazır jelde bulunan koruma sıvısı pipet yardımıyla al-ver yapılarak uzaklaştırıldıktan sonra 500µl antioksidan eklendi. Marker, yüklenmeden önce 40°C’de 1 dakika bekletildi. Daha sonra marker (5µl) ve örnekler kuyulara pipet yardımıyla belirlenen miktarlarda yüklendi. Yükleme işlemi sonunda 60 dakika 150V yürütme yapıldı.

2.2.7.3.3. Proteinlerin Transferi

Transfer işlemi için I-Blot jel transfer cihazına (Invitrogen) sırasıyla anot bakır (+), jel, filtre kağıdı (ultra saf H₂O ile ıslatılır), katot bakır (-) ve sünger yerleştirildi. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda 8 dakika transfer işlemi gerçekleştirildi.

2.2.9.3.4. GAPDH Proteinlerinin Belirlenmesi

2.2.7.3.4.1. Bloklama

GAPDH için, TBS-T içerisinde %5’lik süt (Santa Cruz, CA, USA) çözeltisi hazırlandı ve 60 dakika oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

2.2.7.3.4.2. Birincil Antikor

Anti-GAPDH antikor (Cell signalling, MA, USA), 1:1000 olacak şekilde %5’lik BSA çözeltisi içerisinde hazırlandı ve 18 saat +4°C’de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

2.2.7.3.4.3. İkincil Antikor

GAPDH için, Anti-Rabbit (Cell Signaling, MA, USA) 1:2000 olacak şekilde %5’lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı ve çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

2.2.7.3.4.4. Görüntüleme

Görüntüleme için; Lumiglo reagent A (20X, Cell Signaling, MA, USA) ve Peroksidaz reagent B (20X, Cell Signaling, MA, USA) iki kat seyreltilerek kullanıldı. Membranlar hazırlanan solüsyon ile 1 dakika inkübe edildikten sonra açığa çıkan kemiluminesans sinyal, Fusion FX-7 (Vilber Lourmat, Torcy, France) cihazı kullanılarak görüntülendi.

Bu şekilde nitroselüloz membran üzerine transfer edilmiş olan proteinlere bağlanan antikorlar görüntülendi.

2.2.7.3.5.PARP Proteinlerinin Belirlenmesi

2.2.7.3.5.1.Birincil ve İkincil Antikorların Membrandan Uzaklaştırılması

Birincil ve ikincil antikorları membrandan uzaklaştırmak (Stripping) için üretici firmanın (Cell Signaling, MA, USA) Western blot yeniden işaretleme (reprobing) protokolü kullanıldı. Stripping solüsyonu hazırlamak için; 100ml ultrasaf su içerisine 0,76g Tris-base (Scharlau, Barcelona, Spain), 2g SDS (Applichem, Darmstadt, Germany) ve 700µl β-merkaptoetanol (Merck, Schuchard, Germany) eklendi (1X, pH:6,8). Membran 4 kez 5 dakika TBS-T ile yıkandıktan sonra stripping solüsyonu eklenerek 150-300rpm, 37⁰C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresi sonunda 2 kez 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı ve membranda sinyal olup olmadığını kontrol etmek amacıyla görüntüleme yapıldı. Görüntüleme sonunda membranlarda sinyal yoksa 4 kez 5 dakika TBS-T ile yıkama yapılarak bloklama aşamasına geçildi.

2.2.7.3.5.2.Bloklama

PARP için, TBS-T içerisinde %5’lik süt (Santa Cruz, CA, USA) çözeltisi hazırlandı ve 60 dakika oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

2.2.7.3.5.3.Birincil Antikor

Anti-PARP antikor (Cell Signalling, MA, USA), 1:1000 olacak şekilde %5’lik BSA çözeltisi içerisinde hazırlandı ve 18 saat +4⁰C’de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

2.2.7.3.5.4.İkincil Antikor

PARP için, Anti-Rabbit (Cell Signaling, MA, USA) 1:2000 olacak şekilde %5’lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı ve çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

2.2.7.3.5.5.Görüntüleme

Görüntüleme için; Lumiglo reagent A (20X, Cell Signaling, MA, USA) ve Peroksidaz reagent B (20X, Cell Signaling, MA, USA) iki kat seyreltilerek kullanıldı. Membranlar

hazırlanan solüsyon ile 1 dakika inkube edildikten sonra açığa çıkan kemiluminesans sinyal, Fusion FX-7 (Vilber Lourmat, Torcy, France) cihazı kullanılarak görüntülendi. Bu şekilde nitroselüloz membran üzerine transfer edilmiş olan proteinlere bağlanan antikorlar görüntülendi.

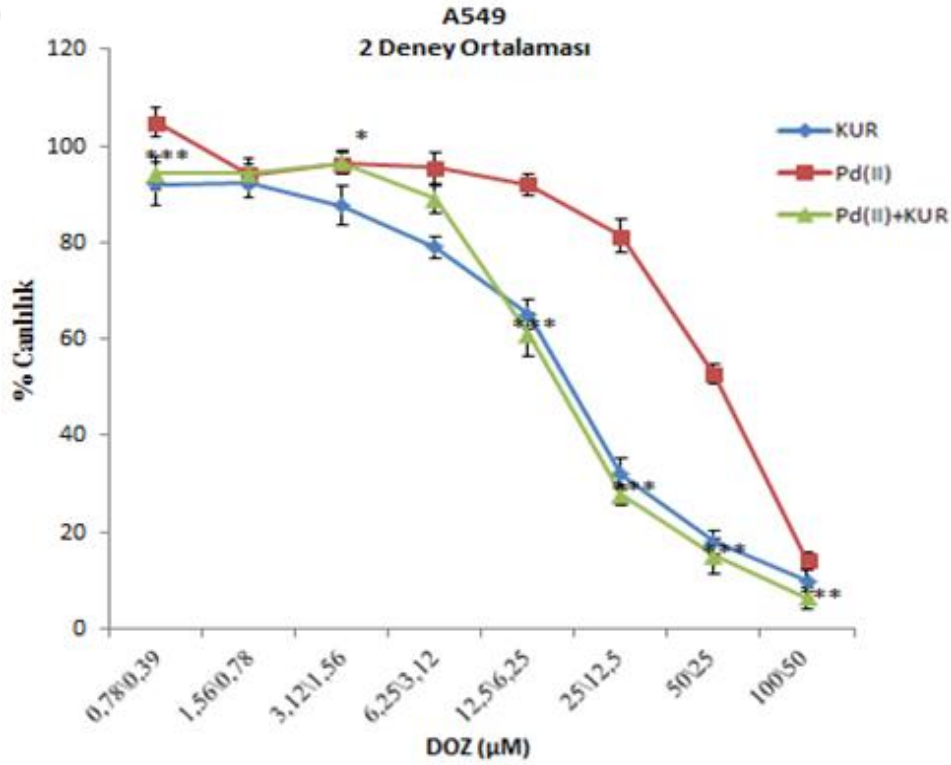
2.2.8. İstatistiksel Analiz

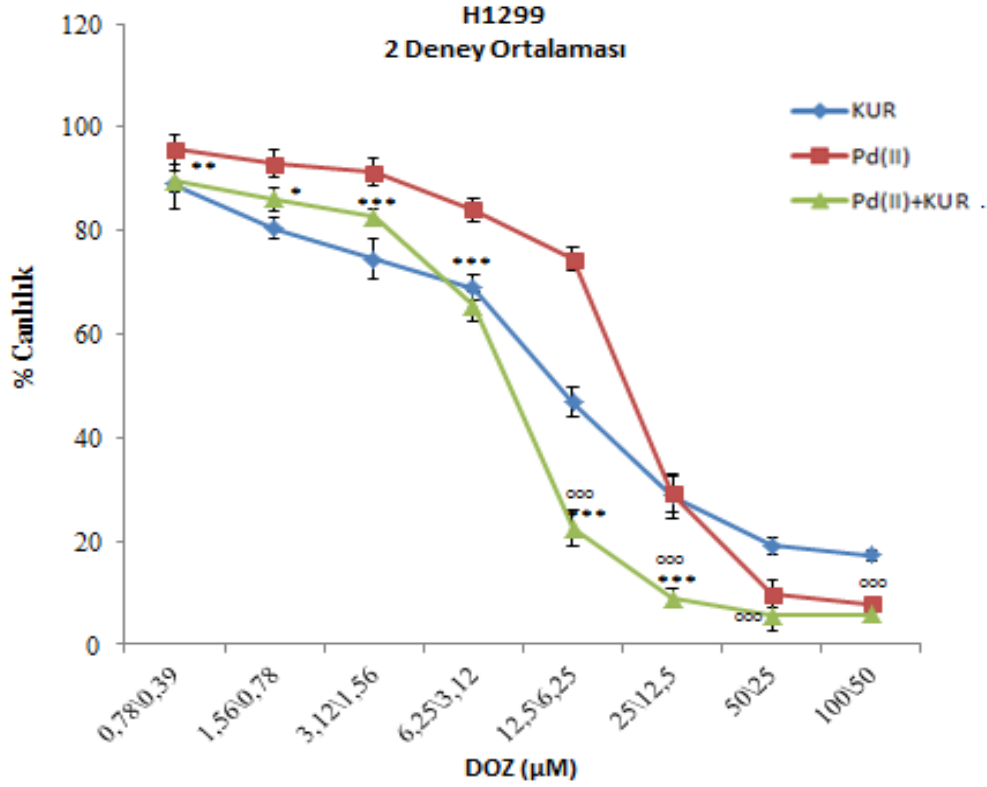
Tüm istatistiksel analizler Microsoft Excel t-Test ile hazırlanmıştır. 3 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p < 0,05$ değerine göre belirlendi. IC50 değerleri Microsoft Excel ve CI (combination index) değerleri, CalcuSyn Version 2.1 (Biosoft, Cambridge, U.K.) yazılımı kullanılarak hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1.SRB Canlılık Testi Bulguları

Kurkumin, Pd(II) ve bu bileşiklerin kombinasyonlarının 1:2 dilüe sekiz farklı konsantrasyonunun (Kurkumin için 0,78-100 μ M ve Pd(II) için 0,39-50 μ M) A549 ve H1299 hücre soylarının canlılığı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için SRB canlılık testleri yapıldı. Hücre soylarına 48 saat süre ile söz konusu bileşikler uygulandığında ortaya çıkan sonuçlar Şekil 3.1’de gösterildi. Bileşiklerin uygulandığı hücre soylarında konsantrasyon arttıkça hücrelerin canlılık yüzdesinde, uygulanan konsantrasyonlarda, istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi ($p<0,05$, $p<0.01$, $p<0.001$).





Şekil 3.1. Kurkumin, Pd(II) ve bu bileşiklerin kombinasyonları ile muamele edilen A549 ve H1299 hücrelerinin canlılık yüzdelilerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ve 2 bağımsız deneyin ortalamasını temsil etmektedir.

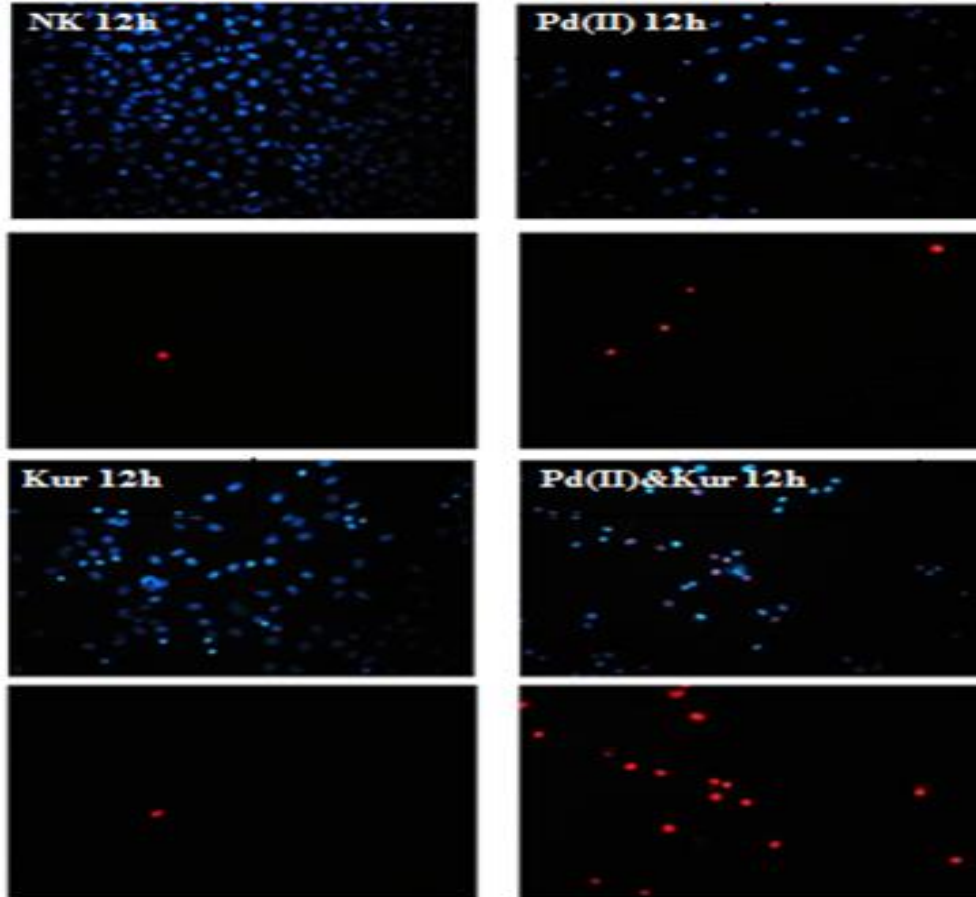
- Kurkuminin tek başına muamelesi ile kombinasyon karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0.05$) ifade etmektedir.
- Kurkuminin tek başına muamelesi ile kombinasyon karşılaştırıldığında yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılığı ($p < 0.01$) ifade etmektedir.
- Kurkuminin tek başına muamelesi ile kombinasyon karşılaştırıldığında çok yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılığı ($p < 0.001$) ifade etmektedir.
- * Pd(II)'nin tek başına muamelesi ile kombinasyon karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0.05$) ifade etmektedir.
- ** Pd(II)'nin tek başına muamelesi ile kombinasyon karşılaştırıldığında yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılığı ($p < 0.01$) ifade etmektedir.
- *** Pd(II)'nin tek başına muamelesi ile kombinasyon karşılaştırıldığında çok yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılığı ($p < 0.001$) ifade etmektedir.

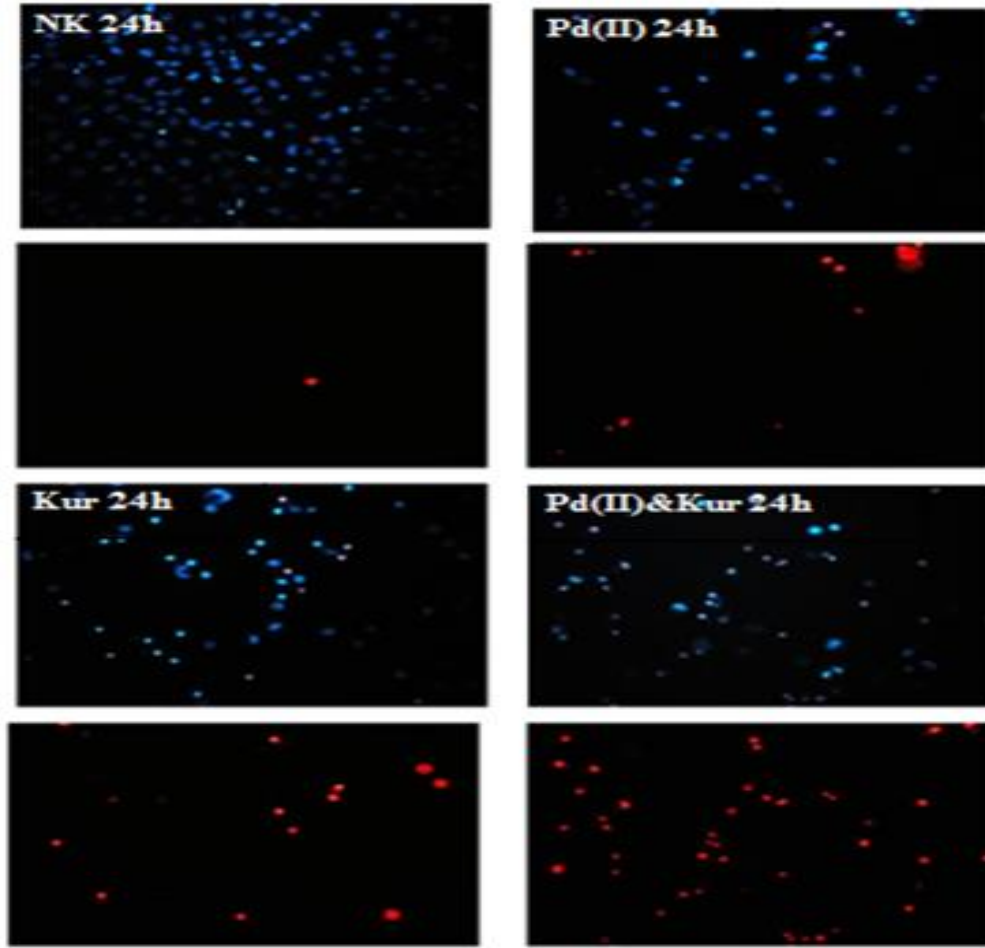
Bileşiklerin sitotoksik aktivitesinin gösterilmesinde önemli olan IC₅₀ (kontrol hücrelerine kıyasla bileşikle muamele sonrası hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) değerleri her iki hücre soyu için de SRB testi sonuçlarına göre CalcuSyn yazılımı ile hesaplandı. Her iki hücre soyunda uygulanan kurkumin ve Pd(II) kombinasyonunun IC₅₀ değerlerindeki CI (combination index) değerleri yine CalcuSyn yazılımı kullanılarak belirlendi. CI değeri 1'den az hesaplanırsa ($CI < 1$) sinerjistik, 1'den fazla hesaplanırsa ($CI > 1$) antagonistik ve 1'e eşit hesaplanırsa ($CI = 1$) additif etkiyi göstermektedir. IC₅₀ değerlerindeki CI değerlerinden yola çıkarak, kombinasyon

muamelesinin yalnızca H1299 hücreleri için güçlü sinerjistik etki gösterdiği bulunmuştur (A549 için CI değeri 1,01 iken H1299 için 0,83 bulundu). Her iki hücre soyu için IC50 dozu; Kurkumin için 12,5µM, Pd(II) için 6,25µM ve kombinasyon için 12,5 + 6,25µM olarak bulundu.

3.2. Hoechst 33342, Propidium İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi Bulguları

H1299 hücrelerine kurkuminin 12,5µM, Pd(II)'nin 6,25µM ve bunların kombine konsantrasyonları uygulandı. 12 ve 24 saat ilaç uygulamasını takiben ikili boyama yöntemi uygulanarak floresan mikroskopta değerlendirme yapıldı. Kurkumin ve Pd(II) uygulanması sonucunda, Hoechst 33342 boyası ile H1299 hücre soyunda gözlenen nükleer fragmentasyon varlığı ve/veya piknozis, aynı bölgeler için propidyum iyodür ile boyama sonucunda pozitif görüldüğünden, hücrelerin ölüm şeklinin geç apoptozis (sekonder nekrozis) olduğu bulundu (Şekil 3.2). Kombinasyon ile muamele edilen hücrelerin ölüm şeklinin ise, bileşiklerin yalnız başına uygulanmasıyla gözlenen ölüm şekline benzer olduğu görüldü. Ayrıca, sitotoksikite bulgularına paralel olarak kombinasyon muamelesinin, Kurkumin ve Pd(II)'nin tek başlarına muamelesine oranla, sekonder nekrozun arttığı bulundu.





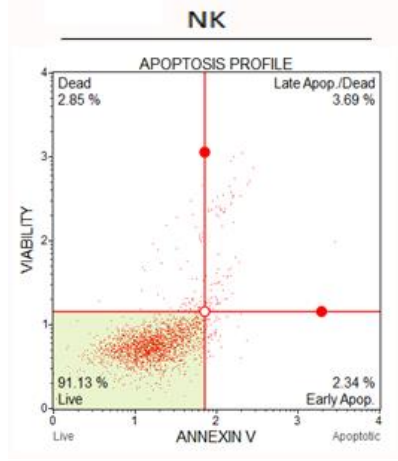
Şekil 3.2. H1299 hücrelerinin 12 ve 24 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri

A: Hoechst 33342 ile boyama (Mavi), **B:** Propidyum iyodür ile boyama (Kırmızı)

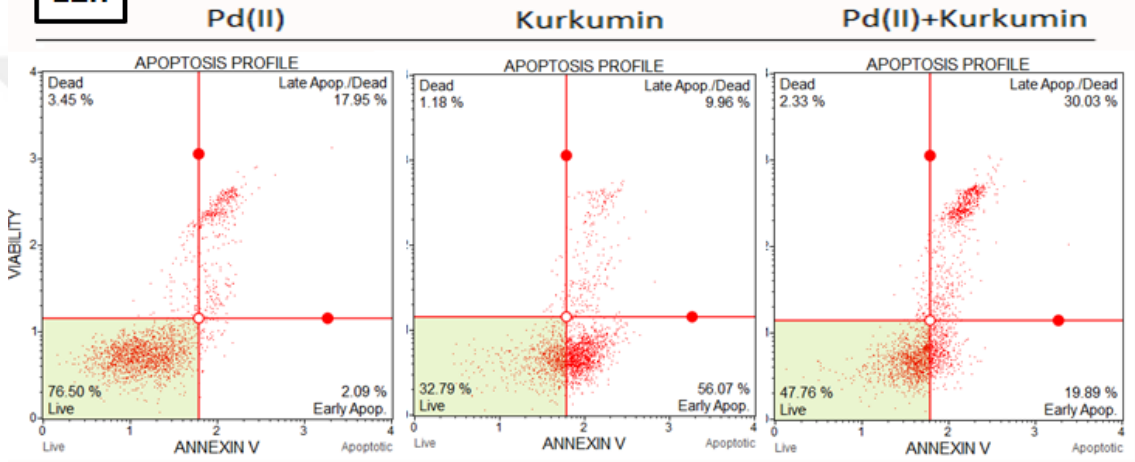
3.3. Akım Sitometri Bulguları

3.3.1. Anneksin V & Ölü Hücre Boyama Bulguları

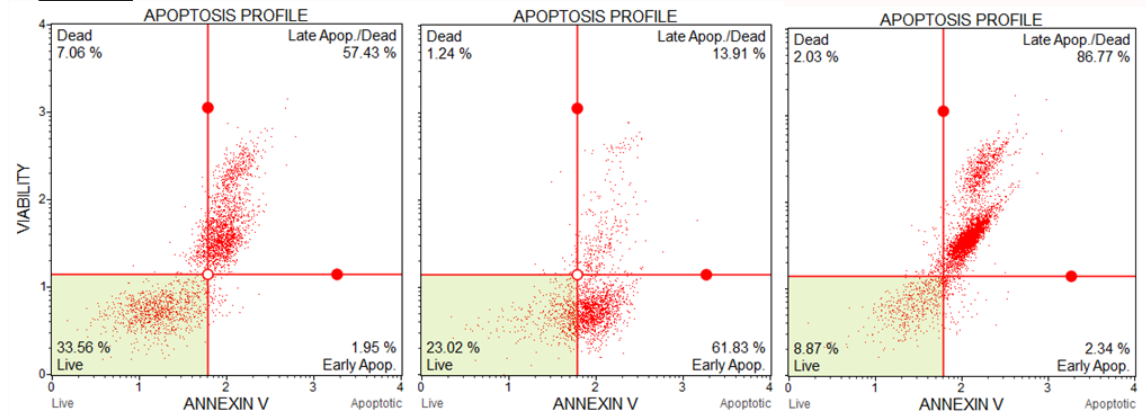
Kurkumin ve Pd(II) ve bunların kombinasyonlarının H1299 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisine bakıldığında 12. ve 24. saatlerde kombinasyonda, kurkumin ve Pd(II)'ye oranla geç apoptozis yüzdesinde belirgin bir artma olduğu gözlemlendi. Ayrıca zamana bağlı olarak da kurkumin, Pd(II) ve kombinasyonda canlılık yüzdesinde azalma görülürken apoptozis yüzdesinde artma gözlemlenmiştir (Şekil 3.3).



12h



24h

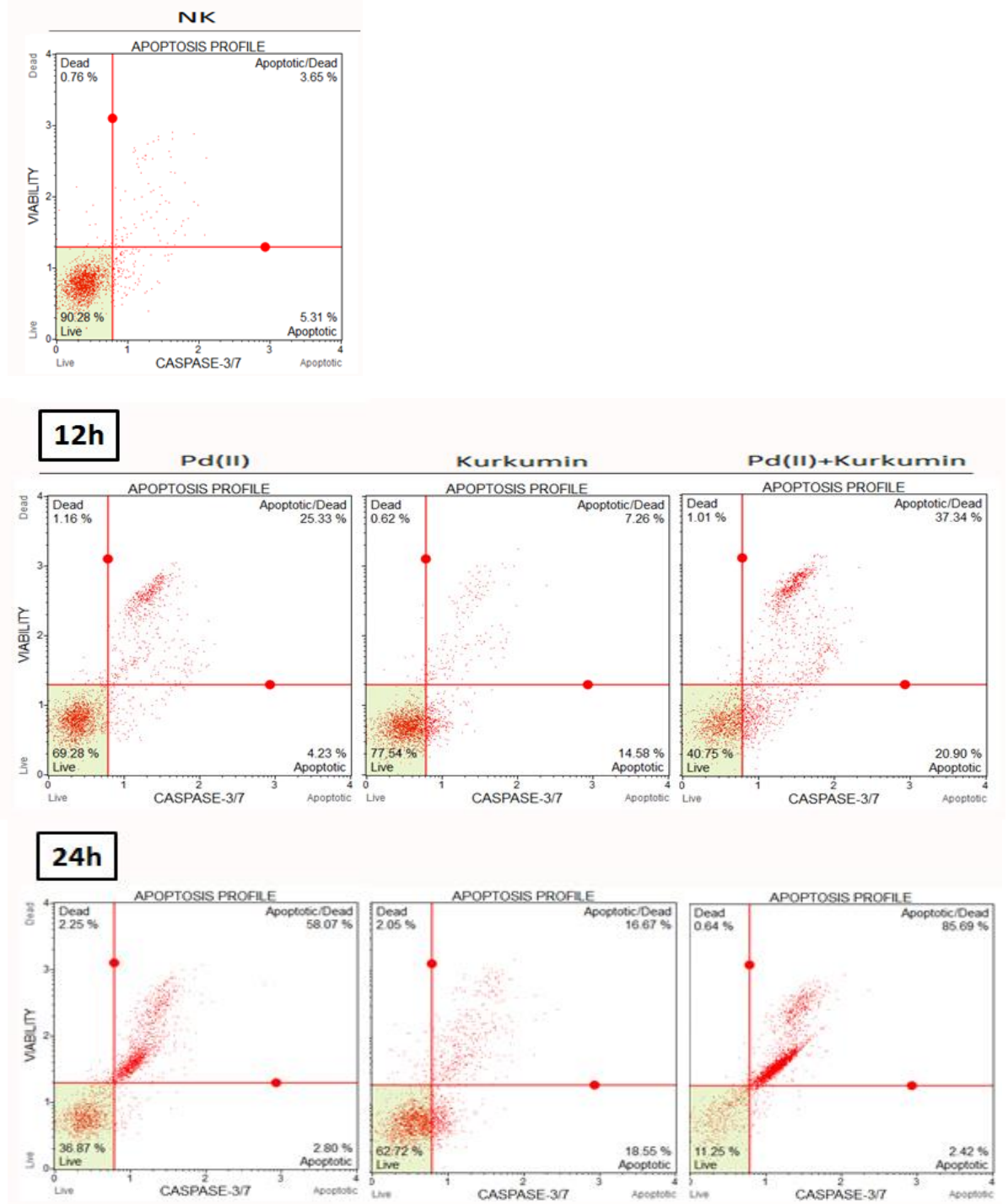


Şekil 3.3. Anneksin-V-FITC Boyama Bulguları

3.3.2. Kaspaz 3/7 Aktivitesi Bulguları

Apoptotik hücre ölümü, kaspaz proteazların aktifleşmesi sayesinde gerçekleşir. H1299 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisine bakıldığında 12. ve 24. saatlerde kombinasyonda, kurkumin ve Pd(II)'ye oranla kaspaz 3/7 aktivitesinde belirgin bir

artma olduğu gözlemlendi. Ayrıca ilaçların hem tek başına muamelesi hem de kombinasyonlarında zamana bağlı olarak kaspaz 3/7 aktivitesinde 2 kattan fazla artış gözlemlenmiştir (Şekil 3.4).

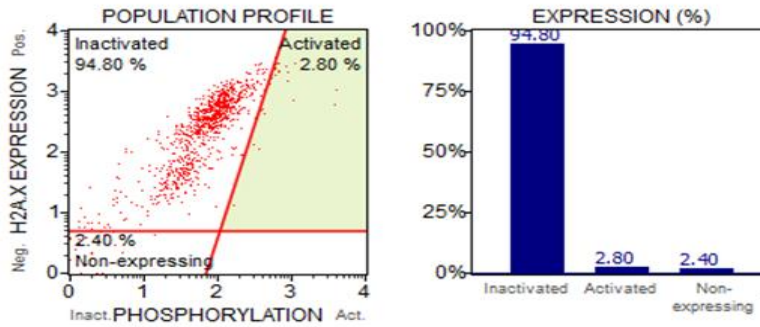
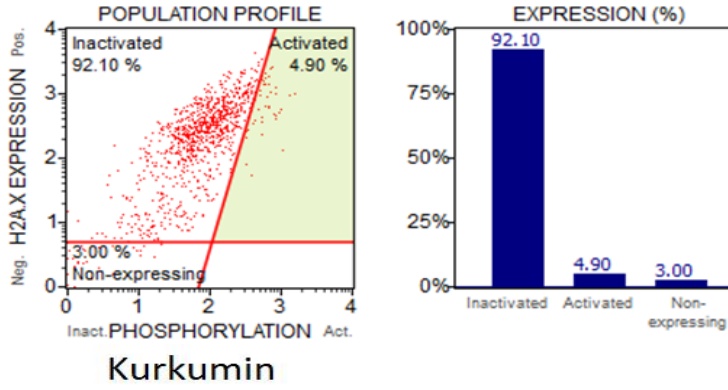
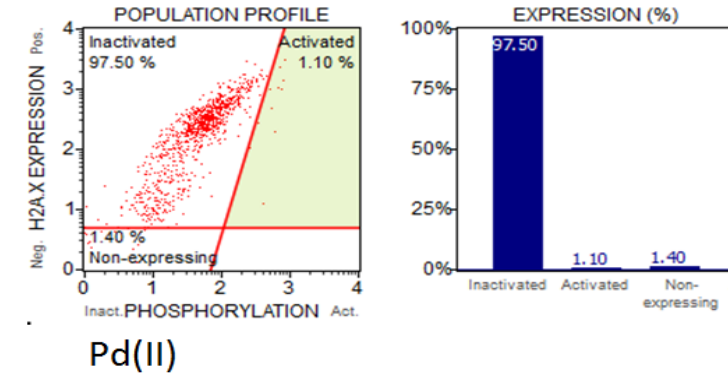


Şekil 3.4. Kaspaz 3/7 Aktivitesi Bulguları

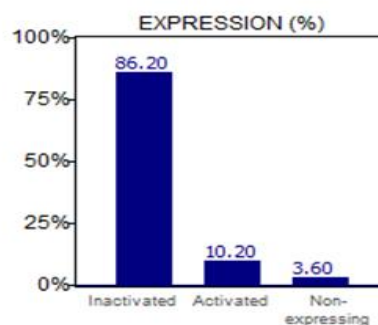
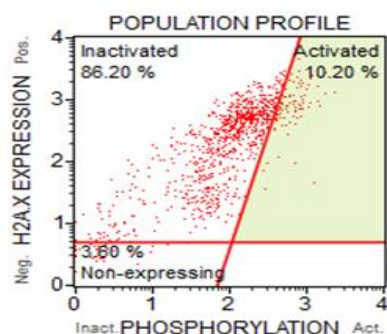
3.3.3. Gamma-H2A.X Testi Bulguları

Kurkumin, Pd(II) ve bunların kombinasyonlarının H1299 hücre soyunda 12. ve 24. saatlerde sebep olduğu DNA hasarı yüzdesinin ilaçların tek başına muamelelerine göre kombinasyonda arttığı görülmüştür. Ayrıca bu etkinin zamana bağlı olarak arttığı da Şekil 3.5’da gösterilmiştir.

12h NK

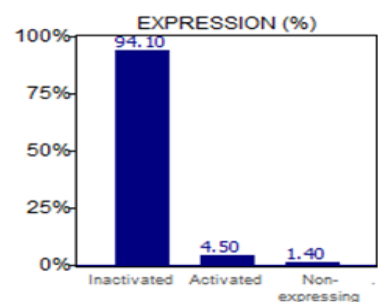
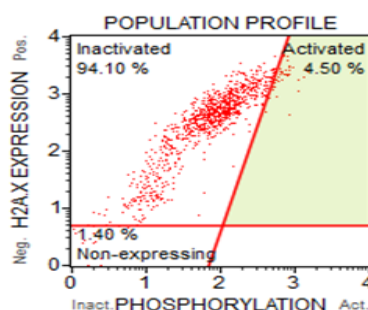


Pd(II)+Kurkumin

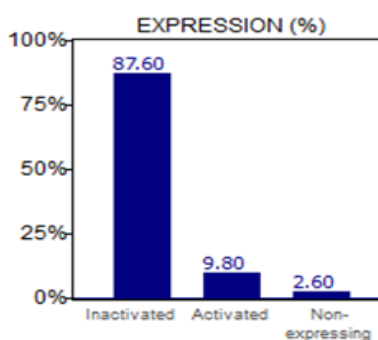
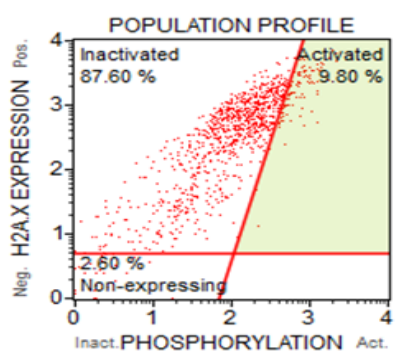


24h

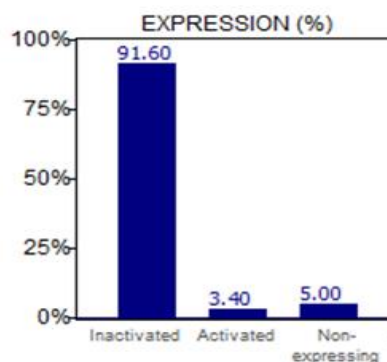
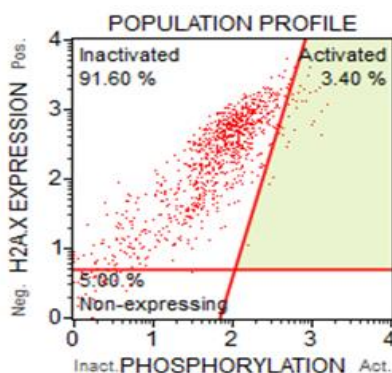
NK



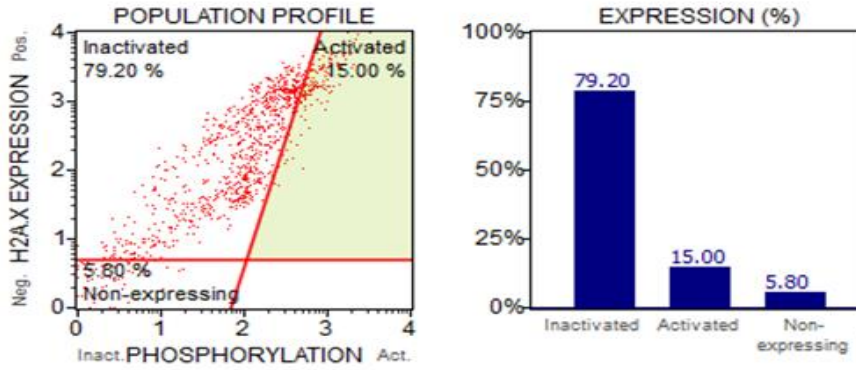
Pd(II)



Kurkumin



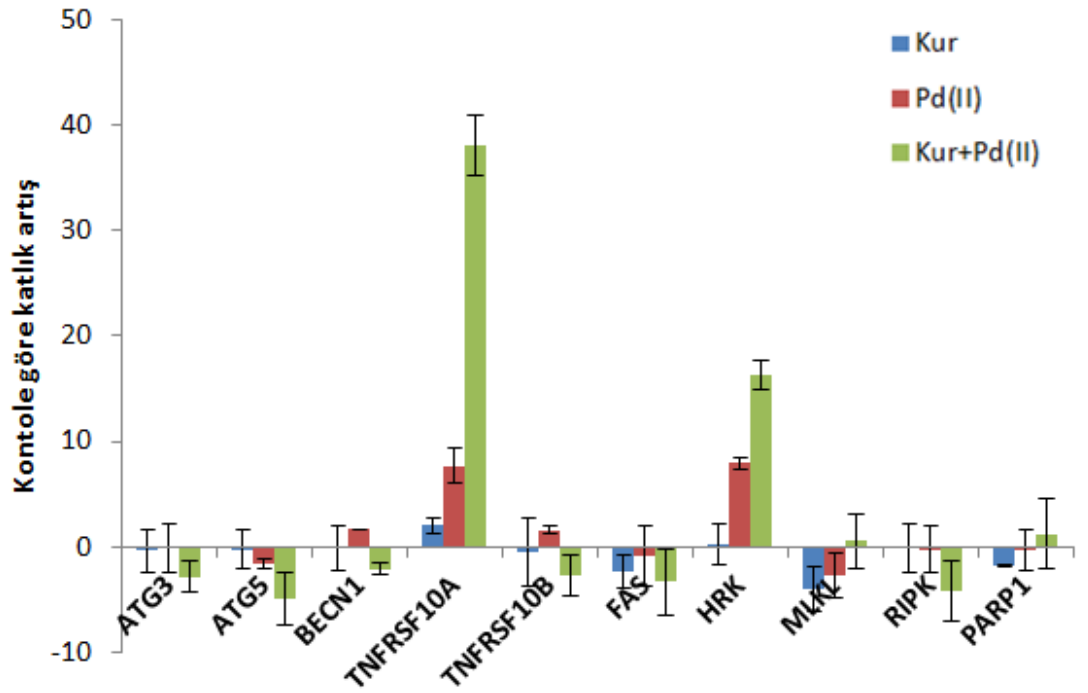
Pd(II)+Kurkumin



Şekil 3.5. Gamma-H2A.X Testi Bulguları

3.4. Genlerin Ekspresyon Profilleri

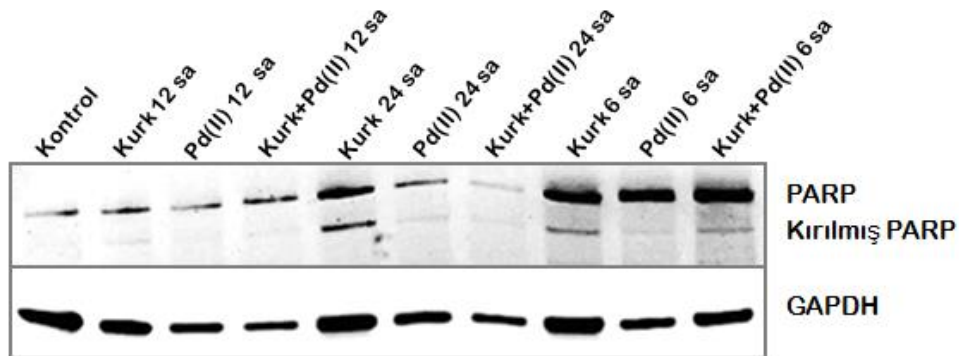
Gen ekspresyonlarında 2 kattan fazla artışlar, anlamlı artış olarak kabul edilmiştir. H1299 hücre soyunda gözlenen hücre ölümünü gen düzeyinde doğrulamak amacıyla, 18 saatlik Kurkumin (12,5µM), Pd(II) (6,25µM) ve kombinasyon (12,5µM Kurkumin+6,25µM Pd(II)) muamelesinin, bazı hücre ölüm genlerin (ATG3, ATG5, BECN1, TNFRSF10A, TNFRSF10B, FAS, HRK, MLKL, RIPK, PARP1) ekspresyonları üzerine olan etkisine bakıldı. TNFRSF10A (DR4 veya TRAIL-R1), HRK (pro-apoptotik bir gen) ekspresyonunlarında kurkuminle tek başına muamele edildiğinde anlamlı bir artma veya azalma olmazken Pd(II) uygulandığında kontrole göre her iki genin ekspresyonunda da yaklaşık 8 kat artış görülmüştür. Aynı genlerin ekspresyonları kombinasyonla muamelede sırasıyla yaklaşık 40-kat ve 16-kat arttığı bulunmuştur. ATG3, FAS, ATG5 ve RIPK ekspresyonlarında ise sadece kombinasyon ile muamelede anlamlı azalma görülmüştür. İncelenen diğer genlerin ekspresyonlarında ise azalma görülmesine rağmen bu azalma anlamlı değildir(Şekil 3.6).



Şekil 3.6. H1299 hücre soyunda 18 saatlik kombinasyon (Kurkumin 12,5µM ve Pd(II) 6,25µM) muamelesinin, bazı apoptotik genlerin ekspresyonları üzerine olan etkisinin gösterimi. Her bir veri noktası 2 bağımsız deneyin ortalamasını temsil etmektedir.

3.5. Western Blot Bulguları

Western blot analizi, 10µg protein lizatu ve kontrol olarak da anti-GAPDH antikoru kullanılarak gerçekleştirildi. Yapılan deney sonucunda; kurkumin, Pd(II) ve kombinasyon muameleleriyle 12. saatte PARP kırılması görülmezken 24. ve 6. saatlerde PARP'ın kırıldığı bulunmuştur (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Anti GAPDH ve anti PARP antikoru ile yapılan western blot sonucu bant profilleri

TARTIŞMA VE SONUÇ

Curcuma longa Linn. bitkisinin antikanser özelliklerinin anlaşılmasına yönelik çalışmalar 1985 yılından itibaren yapılmaya başlanmıştır. Özellikle son yıllarda bu konuyla ilgili çalışmalar artış göstermiştir. Bu bitkiden ekstrakte edilen kurkumin komponentinin antikanser etkisi birçok kanser tipinde (deri, meme bezi, ağız, özafagus, mide, bağırsak, kolon, akciğer ve karaciğer) *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiştir (Kuttan ve ark. 1985; Singh ve ark. 1995; Lin ve ark. 2001; Odot ve ark. 2004; Aggarwal ve ark. 2006; Kunnumakkara ve ark 2008). Zhao ve arkadaşlarının 2007 yılında HeLa hücrelerinde yaptığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, kurkumin sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmış, kurkumin sitotoksitesinin doz ve zamana bağlı olarak çoğalmayı inhibe ettiği ve bu etkinin apoptozis sonucunda olduğu gösterilmiştir (Zhao ve ark. 2007). 2009 yılında yapılan bir çalışmada da kurkuminin küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre soyu olan H460' da anti-apoptotik Bcl-2 proteininin degradasyonu yoluyla apoptozise neden olduğu gösterilmiştir (Chanvorachote ve ark. 2009).Yapılan bir başka çalışmada kurkumin, miRNA mekanizması boyunca A549 ve A549/DDP(cisplatin dirençli A549) hücrelerinde apoptozisi arttırdığı, az da olsa adjuvan kemoterapatik ajanlara karşı oluşan direnci giderebildiği ve akciğer kanserinde kemoterapatiklerin etkisini arttırdığı gösterilmiştir (Ye ve ark. 2012). 2013 yılındaki başka bir çalışmada ise, kurkuminin A549 hücre soyunda büyümeyi baskıladığı ve apoptotuzu mitokondriyal yolak üzerinden indüklediği gösterilmiştir (Li ve ark. 2013)

Son yıllarda kanser tedavisinde Pd(II) ve Pt(II) bazlı bileşikler sitotoksik ajanlar olarak sıkça kullanılmaktadır. Bazı Pd(II) kompleksleri, cisplatin, karboplatin ve oksaliplatin gibi standart platin bazlı ilaçlar ile karşılaştırıldığında dikkate değere düzeyde *in vitro* sitotoksik etki göstermektedir (Keter ve ark. 2008; Güney ve ark. 2011b; Ulukaya ve ark. 2011a; Miklasova ve ark. 2012). Bu nedenle Pd(II) bileşikleri, sıklıkla sentezlenmekte ve etkileri araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalar Pd(II) bileşiklerinin; lösemi, sarkoma, deri, meme, karaciğer, akciğer, over, prostat, beyin, böbrek, kolon gibi birçok kanser hücre soyunda yüksek oranda sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Abu-Surrah ve ark. 2002; Garoufis ve ark. 2009; Abu-Surrah ve ark. 2010; Khan ve ark. 2011; Divsalar ve ark. 2007; Guney ve ark. 2011b). 2002 yılında yapılan bir çalışmada Pd(II) bileşiğinin ((*trans*-bis{(R)-(+)-bornylamino} palladyum (II) diklorür) K562, HeLa ve L929 hücre soylarına karşı sitotoksik etkisi araştırılmış ve Pd(II) bileşiğinin aktivitesi, K562 (miyeloid lösemi) hücrelerinde; cisplatin, karboplatin

ve oksaliplatine göre daha az etkili bulunmuş, HeLa hücrelerinde ise bu standart kemoterapötik ilaçlarla benzer etki gösterdiği bulunmuştur (Abu-Surrah ve ark. 2002). Çalışmamızda, Kurkumin ve Pd(II) ile ilgili bu bilgilerden esinlenerek, Kurkumin ve Uludağ Üniversitesi Kimya Bölümü tarafından sentezlenen Pd(II) bileşiğinin hem tek başına hem de kombinasyonlarının, A549 ve H1299 akciğer kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri değerlendirilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda, Kurkumin ve Pd(II) bileşiğinin önceki kullanımlarına göre daha düşük konsantrasyonlarda yalnız başlarına kullanımlarına kıyasla kombinasyon muamelesinde daha güçlü bir sitotoksik etki yarattığı gösterilmiştir. Literatürde bu bileşenlerin kombine halde kullanılması ile ilişkili bir çalışma bulunmadığından, bu çalışma, söz konusu bileşenlerle yapılan kombinasyon muamelesinin daha iyi bir sitotoksik aktiviteye yol açtığını gösteren ilk çalışmadır.

Bu çalışmada, SRB canlılık testi sonuçlarına göre, her iki hücre soyunda da konsantrasyon artışına bağlı olarak canlılık yüzdesinde anlamlı azalmalar bulunmuştur. Yine bu testin sonuçlarına göre, Kurkumin'in ve Pd(II)'nin kombinasyonlarının muamelesinde A549 hücre soyunda antagonistik bir etki gözlemlenirken, H1299 hücre soyunda güçlü sinerjistik etki gözlemlendiğinden deneylere H1299 hücre soyu ile devam edilmiştir. Bu hücre soyunda Pd(II), kurkumin ve bunların kombinasyon muamelelerinin yol açtığı ölüm şeklini belirlemek için ikili boyama yöntemi yapılmıştır ve Hoechst pozitif bölgelere bakıldığında 12 ve 24. saatlerde kontrole kıyasla hücre yoğunluğunun tek başına muamelelerine göre kombinasyon muamelesinde azaldığı ve piknotik nükleus varlığı gözlemlenmiştir. Piknotik nükleus varlığı apoptozisi işaret etmektedir. Ayrıca hücre yoğunluğu zamana bağlı olarak da azalma göstermiştir. H1299 hücrelerinde probidyum iyodür pozitif bölgeler ise kombinasyon muamelesinde zamana bağlı olarak artmıştır. Bu da hücrelerde membran hasarına bağlı olarak apoptozisin geç evresinin geliştiğini göstermiştir. Pd(II), kurkumin ve bunların kombinasyon muamelelerinin H1299 hücre soyu üzerindeki etkisi aneksin V-FITC ve kaspaz 3/7 aktivitesi ile akım sitometride değerlendirildiğinde her iki yöntemde de zamana bağlı olarak, kombinasyon muamelesinin, Pd(II) ve kurkuminin tek başlarına muamelelerine göre, hücre canlılık yüzdesinde daha fazla azalmaya ve apoptotik hücre oran yüzdesinde daha fazla artışa neden olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde apoptotik süreçte fosforlanan gamma-H2A.X proteininin aktifleşme yüzdesi, zamana bağlı olarak kombinasyon muamelesinde, Pd(II) ve kurkuminin tek başlarına muamelelerine göre

daha fazla artış göstermiştir. Dolayısıyla bu hücre soyunda geç apoptozis kantitatif olarak da ölçülmüş ve boyama sonuçlarını desteklediği görülmüştür. Kurkumin ve Pd(II)'nin bu etkisini doğrulamak için gen ekspresyonu çalışması yaptığımız da kombinasyon muamelesi sonucunda otofajik ve nekrotik genlerin (ATG3, ATG5, BECN ve MLKL, RIPK, PARP1) ekspresyonları aşağı regüle olurken, apoptotik genler olan TNFRSF10A ve HRK'nın ekspresyonları sırasıyla yaklaşık olarak 40 ve 16 kat artmıştır. Bu gen ekspresyonlarındaki artışta ölüm çeşidinin apoptozis olduğunu doğrulamıştır. Pd(II), Kurkumin ve bunların kombinasyon muamelelerinin PARP kırılması üzerine etkisi Western blot yöntemiyle çalışılmıştır. Çalışma sonucunda söz konusu hücrelerde kontrole kıyasla hem kurkuminin ve Pd(II)'nin tek başına muamelelerinde hem de kombinasyon muamelesinde PARP kırılması gözlemlenmiştir. Bu bilgi doğrultusunda, yapılan diğer yöntemlerin sonuçları gibi bu yöntem sonucunda da hücrelerin apoptozisle öldüğü gösterilmiştir.

Bu çalışma sonucunda; Pd(II), kurkumin kombinasyon muamelesinin insan küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre soyları (H1299) üzerinde güçlü sinerjistik etki yaratarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Pd(II), kurkumin kombinasyonunun sitotoksik etkilerinin ilk defa bu çalışma sayesinde gösterilmesi ile literatür bilgisine katkıda bulunulmuştur. Sonuç olarak, bu in vitro çalışmanın ümit verici bulgularından dolayı kombinasyon etkisi ile ilgili olarak hayvan çalışmalarının yapılmasının faydalı olabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abu-Surrah, A.S., Al-Allaf, T.A.K., Rashan, L.J., Klinga, M. ve Leskela, M., 2002.** Synthesis, crystal structure and initial biological evaluation of the new enantiomerically pure chiral palladium(II) complex trans-bis{endo-(1R)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]-heptan-2-amino}palladium(II)dichloride. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 37(11):919-22.
- Abu-Surrah, A.S., Safieh, K.A., Ahmad, I.M., Abdalla, M.Y., Ayoub, M.T., Qaroush, A.K. ve Abu-Mahtheieh, A.M., 2010.** New palladium(II) complexes bearing pyrazole-based Schiff base ligands: Synthesis, characterization and cytotoxicity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(2):471-5.
- Adams, J.M., Cory, S. 2001.** Life or death decions by the Bcl-2 family. *Trends. Biochem Sci*, 26:61-6
- Adrain, C., Martin, S.J. 2001.** The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci*, 26:390-7.
- Aggarwal, B.B., Kumar, A., Bharti, A.C. 2003.** Anticancer Potential of Curcumin: Preclinicaland Clinical Studies, *Anticancer Research*, 23(1A):363-98.
- Aggarwal, B., Bhatt, I.D., Ichikawa, H., Ahn, K.S., Sethi, G., Sandur, S.K. Natarajan, C., Seeram, N., Shishodia, S., 2006.** Curcumin Biological and Medicinal Properties. 7034_book.fm. p. 297-367.
- Aggarwal, B.B., Surh, Y.J., Shishodia, S. 2007.** The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease, *Adv Exp Med Biol.*, 595:1-75.
- Aggarwal, S., Takada, Y., Singh, S., Myers, J.N., & Aggarwal, B.B. 2004.** Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling. *International Journal of Cancer*, 111(5):679-92.
- Alberg, A.J., Samet, J.M. 2003.** Epidemiology of lung cancer. *Chest*, 123(1 Suppl):21S-49S.
- Aldemir, O. S., Uçan, U. S., 2001.** Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Temel Prensipler. Hayvancılık Araştırma Dergisi, 11 (1): 53-59.
- Aliustaoğlu, M., 2009.** *Temel Kanser Fizyopatolojisi.* Türkiye, http://www.klinikgelisim.org.tr/eskisayi/kg22_3/8.pdf(Erişim tarihi: 01.09.2015).
- Ammon, H.P.T., Wahl, MA., 1991.** Pharmacology of Curcuma longa. *Plant med.*, 57(1):1-7.
- An, J., Huang, Y.C., Xu, Q.Z., Zhou, L.J., Shang, Z.F., Huang, B., Wang, Y., Liu, X.D., Wu, D.C., Zhou, P.K. 2010. DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. *BMC Molecular Biology* 11:18.
- Anand, P., Sundaram, C., Jhurani, S., Kunnumakkara, A.B., Aggarwal, B.B. 2008.** Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. *Cancer Lett.*, 267(1):133-64.

Anonim, 2008. Cancer: A Failure of Genetic Control. USA, <http://legacy.hopkinsville.kctcs.edu/instructors/Jason-Arnold/VLI/m1DNAfunction/m1DNAfunction4.html> (Erişim tarihi: 01.09.2015).

Anonim, 2011. The Diagnosis and Treatment of Lung Cancer (Update). National Collaborating Centre for Cancer. İngiltere.

Anonim, 2012a. What you need to know about lung cancer. National Cancer İnstitute, <http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/lung> (Erişim tarihi: 24.06.2015).

Anonim, 2012b. Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Fransa, http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx (Erişim tarihi: 01.09.2015).

Anonim, 2012c. Worldwide cancer incidence statistics. İngiltere, (Erişim tarihi: 27.10.2015). <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/world/incidence/>

Anonim, 2012d. CytoScan™ SRB Cell Cytotoxicity Assay. G-Biosciences, USA.

Anonim, 2012e. Muse™ H2A.X Activation Dual Detection Kit El Kitapçığı. Almanya, http://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/Muse-H2A.X-Activation-Dual-Detection-Kit,MM_NF-MCH200101?bd=1#anchor_BRO. Erişim tarihi:20.07.2015.

Anonim, 2013a. Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit El Kitapçığı. Almanya, [http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/musekits/protocols/MCH100105%204600-3384MAN%20\[B\]%20%20ANNEXIN%20V%20&%20DEAD%20CELL%20KIT%20100%20TEST%20USER'S%20GUIDE.pdf](http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/musekits/protocols/MCH100105%204600-3384MAN%20[B]%20%20ANNEXIN%20V%20&%20DEAD%20CELL%20KIT%20100%20TEST%20USER'S%20GUIDE.pdf). Erişim tarihi:19.06.2015.

Anonim, 2013b. Muse™ Caspase-3/7 Kit El Kitapçığı. Almanya, [http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/musekits/protocols/MCH100108%204600-3402MAN%20\[B\]%20MUSE%20CASPASE-3_7%20KIT%20USER%20GUIDE.pdf](http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/musekits/protocols/MCH100108%204600-3402MAN%20[B]%20MUSE%20CASPASE-3_7%20KIT%20USER%20GUIDE.pdf). Erişim tarihi: 30.10.2015.

Anonim, 2014. World cancer factsheet. İngiltere, http://publications.cancerresearchuk.org/downloads/product/CS_REPORT_WORLD.pdf (Erişim tarihi: 01.09.2015).

Anonim, 2015a. Lung Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Fransa. http://globocan.iarc.fr/Pa+ges/fact_sheets_cancer.aspx (Erişim tarihi: 30.07.2015).

Anonim, 2015b. What is cancer?. Avustralya, <http://www.cancer.org.au/about-cancer/what-is-cancer/> (Erişim tarihi: 01.09.2015).

Anonim, 2015c. Cancer Facts & Figures 2015., Atlanta, <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-044552.pdf> (Erişim tarihi: 01.09.2015).

Aral, H. 1996. Apoptotik hücrelerin tanınma yöntemleri. *Sendrom*, 38-42.

Arda, M., 1980. Hastalıkların Teşhisinde Biyoteknolojik Yöntemlerin Kullanılması. Kükem Derneği Bilimsel YayınlarıNo: 1, Ankara.

Arı, F., Cevatemre, B., Armutak, E.I., Aztopal, N., Yilmaz, V.T., Ulukaya, E. 2014. Apoptosis-inducing effect of a palladium(II) saccharinate complex of terpyridine on human breast cancer cells in vitro and in vivo, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(17):4948-54.

Avondoglio, D., Scott, T., Kil, W.J., Sproull, M., Tofilon, P.J., Camphausen, K. 2009. High throughput evaluation of gamma- H2AX. *Radiation Oncology* 4: 31.

Baehrecke, E.H. 2002. How death shapes life during development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:779–787.

Bailey-Wilson, J.E., Amos, C.I., Pinney, S.M., Petersen, G.M., de Andrade, M., Wiest, J.S., Fain, P., Schwartz, A.G., You, M., Franklin, W., Klein, C., Gazdar, A., Rothschild, H., Mandal, D., Coons, T., Slusser, J., Lee, J., Gaba, C., Kupert, E., Perez, A., Zhou, X., Zeng, D., Liu, Q., Zhang, Q., Seminara, D., Minna, J., Anderson, M.W. 2004. A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25. *Am J Hum Genet*; 75(3):460-74.

Barkla, D.H., Gibson, P.R. 1999. The fate of epithelial cells in the human large intestine. *Pathology*;31:230–238.

Birben, E., 2006. Polimeraz zincir reaksiyonu. *Astım Allerji İmmünoloji*, 4(2):92-94.

Call, J.A., Eckhardt, S.G., Camidge, D.R. 2008. Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment, *Lancet Oncol* 9, 1002-1011.

Caner, V., Çarlı, K.T., 2001. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Bazı Tavuk İnfeksiyonlarındaki Yeri. *U. Ü. J. Fac. Vet. Med.* 20: 137-145.

Carmody, R.J., Cotter, T.G. 2001. Signalling apoptosis: a radical approach, *Redox Rep* 6(2):77-90.

Cassidy, A., Myles, J.P., Duffy, S.W., Liloglou, T., Field, J.K. 2006. Family history and risk of lung cancer: age-at-diagnosis in cases and firstdegree relatives. *Br J Cancer*, 95(9):1288-1290.

Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S. 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress, *Free Radic Biol Med*, 29(3-4):323-33.

Chang, H.Y., Yang, X. 2000. Proteases for Cell Suicide: functions and Regulation of Caspases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4): 821-846.

Chanvorachote, P., Pongrakhananon, V., Wannachaiyasit, S., Luanpitpong, S., Rojanasakul, Y., Nimmannit, U., 2009. Curcumin sensitizes lung cancer cells to cisplatin-induced apoptosis through superoxide anion-mediated Bcl-2 degradation. *Cancer Invest.* 27, 624–635.

Chaudhri, K.R. 1950. Turmeric, haldi or haridra, in eye diseases., *Antiseptic.* 47(1):67.

- Chen, Q.Y., Lu, G.H., Wu, Y.Q., Zheng, Y., Xu, K., Wu, L.J., Jiang, Z.Y., Feng, R., Zhou, J.Y. 2010.** Curcumin induces mitochondria pathway mediated cell apoptosis in A549 lung adenocarcinoma cells. *Oncol Rep.*, 23(5): 1285–1292.
- Cohen, J.J. 1993a.** Apoptosis. *Immunol Today* 14: 126-130.
- Cohen, J.J. 1993b.** Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract*, 15: 35-43.
- Consonni, D., De Matteis, S., Lubin, J.H., Wacholder, S., Tucker, M., Pesatori, A. C., Caporaso, N. E., Bertazzi, P. A, Landi, M.T. 2010.** Lung cancer and occupation in a populationbased casecontrol study. *Am J Epidemiol*; 171(3): 323–333.
- Cooper, G.M., 2001.** The Cell: A Molecular Approach Second Edition. *Yale J Biol Med.*, 74(5): 3.
- Coşkun-Arı, F.F., 2003.** Western Blotlama Yöntemi ile Protein Tespiti. Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kurs Kitabı. Isparta Türkiye. s. 189-198.
- Cummings, M.C., Winterford, C.M., Walke,r N.I. 1997.** Apoptosis. *Am J Surg Pathol.*, 21:88-101.
- Curtin, J.F., Cotter, T.G. 2003.** Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis, *Cell Signal*, 15(11):983-92.
- Danial, N.N., Korsmeyer, S.J., 2004.** Cell death: critical control points, *Cell*, 116, 205-219.
- Demircioğlu, Y., Yaman, M., Şimşek, I. 2007.** Kadınların baharat kullanım alışkanlıkları üzerine bir araştırma. *Türk Silahlı Kuvvetleri Koruyucu Hekim Bülteni*, 6(3):161-168.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., and Martinou, J. C. 1999.** Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis, *J Cell Biol*, 144, 891-901.
- Detterbeck, F.C., Decamp, M.M., Kohman, L.J., Silvestri, G.A. 2003.** Lung cancer. Invasive staging: the guidelines. *Chest*, 123:167S–175.
- Diehl, J.A. 2002.** Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biology & Therapy*, 1(3):226-31.
- Divsalar, A., Saboury, A.A., Yousefi, R., Moosavi-Movahedi, A.A., Mansoori-Torshizi, H. 2007.** Spectroscopic and cytotoxic studies of the novel designed palladium(II) complexes: β -Lactoglobulin and K562 as the targets. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40(4):381-6.
- Doll, R., Peto, R., Boreham, J., Sutherland, I. 2005.** Mortalityfromcancer in relationtosmoking: 50 yearsobservations on British doctors. *Br J Cancer* 92(3):426-429.
- Driscoll, T., Nelson, D.I., Steenland, K., Leigh, J., Concha-Barrientos, M., Fingerhut, M., Prüss-Ustün, A. 2005.** The global burden of disease due to occupational carcinogens. *Am J Ind Med*, 48(6):419-31.

- Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T.V., Vandenabeele, P. 2009.** Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection*. 11(13):1050-62.
- Economou, P., Samet, J.M., Lechner, J.F. 1994.** Familial and genetic factors in the pathogenesis of lung cancer: Epidemiology of lung cancer, Editörler: Samet, J.M., Marcel Dekker Inc, New York, 353-396.
- Elmore, S. 2007.** Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.*, 35(4): 495–516.
- Erdoğan, B.B. 2003.** Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-faslı bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi*, 4: 165-174.
- Erllich, H.A., Gelfand, D., Sninsky, J., 1991.** Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*. 252: 1643-1651.
- Erol, İ., Yurtyeri, A., Hildebrandt, G., Kieer, J., 1990.** Polimeraz Zincir Reaksiyonu. Seminer Notu, yayımlanmamış, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara.
- Faivre, S., Chan, D., Salinas, R., Woynarowska, B. ve Woynarowski, J.M. 2003.** DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochemical Pharmacology* 66(2):225-37.
- Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., Liang, J. 2005.** Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37: 719–727.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., De Laurenzi, V. 2012.** Role of Apoptosis in disease, *Aging*(Albany NY), 4(5):330-49.
- Fischer, U., Schulze-Osthoff, K. 2005.** Apoptosis-based therapies and drug targets, *Cell Death and Differentiation*, 12, 942-961.
- Fischer, U., Janicke, R.U., Schulze-Osthoff, K. 2003.** Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*; 10:76–100.
- Focchi, G.R., Silva, I.D., Nogueira-de-Souza, N.C., Dobo, C., Oshima, C.T., Stavale, J.N. 2007.** Immunohistochemical expression of p16(INK4A) in normal uterine cervix, nonneoplastic epithelial lesions, and low-grade squamous intraepithelial lesions. *J Low Genit Tract Dis*, 11:98-104.
- Fong, K.M., Minna, J.D. 2002.** Molecular biology of lung cancer: clinical implication. *Clinics In Chest Medicine*, 23:83-101.
- Fong, K.W., Sekido, Y., Minna, J.D. 1999.** Molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 118:1136-1152.
- Ford, W.C.L. 2001.** Biological mechanisms of male infertility. *The Lancet*. 357:21.1223-1224.
- Franz, T.A., Kidson, S.H. 1997.** Mapping of interdigital apoptosis in the chick and duck hindlimb. *Embryology*. 93(2):85-94.

Gao, E.J., Wang, K.H., Zhu, M.C. ve Liu, L. 2010. Hairpin-shaped tetranuclear palladium(II) complex: Synthesis, crystal structure, DNA binding and cytotoxicity activity studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(7):2784-90.

Garoufis, A., Hadjikakou, S.K. ve Hadjiliadis, N. 2009. Palladium coordination compounds as anti-viral, anti-fungal, anti-microbial and anti-tumor agents. *Coordination Chemistry Reviews*, 253, 1384–1397.

Goel, A., Aggarwal, B.B. 2010. Curcumin, the golden spice from Indian Saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. *Nutr. Cancer*, 62(7):919-30.

Goel, A., Kunnumakkara, A.B., Aggarwal, B.B. 2008. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic, *Biochemical Pharmacology*, 75(4):787- 809.

Golstein, P., Kroemer, G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci*; 32(1):37-43.

Goodlett, C.R. ve Horn K.H., 2001. Mechanisms of Alcohol- Induced Damage to the Developing Nervous System. *Alcohol Res Health.*, 25(3):175-84.

Göksel, T., Yıldız, P., Altın, S., Başer, S., Bayız, H., Görgüner, M., Yurdakul, A.S. 2010. Türkiye’de Temel Akciğer Sağlığı Sorunları ve Çözüm Önerileri. *Türk Toraks Derneği Beyaz Kitap*, 2010:55-70.

Griffiths, G.J., Dubrez, L., Morgan, C.P., Jones, N.A., Whitehouse, J., Corfe, B.M., Dive, C., Hickman, J.A. 1999. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis, *J Cell Biol* 144, 903-914.

Groeger, A.M., Esposito, V, Mueller, MR, Caputi, M., Kaiser, H.E., Giordano, A. 1997. Advances in the understanding of lung cancer. *Anticancer Research*, 17: 2519-2522.

Grove, D. S., 1999. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the core facility using Taqman and the Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division 7700 Sequence Detector. *Journal of Biomolecular Techniques*. 10(1): 11–16.

Güleş, Ö., Eren, Ü. 2008. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*,(2):73-78.

Güney, E., Kaya, Y., Yılmaz, V.T., Gümüş, S. 2011a. Synthesis, experimental and theoretical characterization of palladium(II) and platinum(II) saccharinate complexes with 2-(2-pyridyl)benzimidazole. *Spectrochimica Acta Part A*, 9(5):1171-8.

Güney, E., Yılmaz, V.T., Ari, F., Büyükgüngör, O. ve Ulukaya, E. 2011b. Synthesis, characterization, structures and cytotoxic activity of palladium(II) and platinum(II) complexes containing bis(2-pyridylmethyl)amine and saccharinate. *Polyhedron*, 30(1):114-122.

Halilçolar, H., Tatar, D., Ertuğrul, G., Çakan, A., Acıtaş, M.G., Kömürcüoğlu, B. 1999. Epidemiyoloji: Akciğer kanseri multidisipliner yaklaşım, Akkoçlu A., Öztürk C., Toraks Kitapları, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 17-22.

Han, S.S., Chung, S.T., Robertson, D.A., Ranjan, D., Bondada, S. 1999. Curcumin causes the growth arrest and apoptosis of B cell lymphoma by downregulation of egr-1, cmyc, bcl-XL, NF- kappa B, and p53. *Clinical Immunology*, 93(2):152-61.

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

Hatcher, H., Planalp, R., Cho, J., Torti, F.M., Torti, S.V. 2009. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cell Mol Life Sci* 2008;65: 1631-52. 14. Akpolat M, Kanter M, Uzal MC. Protective effects of curcumin against gamma radiation-induced ileal mucosal damage. *Arch Toxicol*, 83: 609-17.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P. M., 1996. Real-time quantitative PCR. *Gen. Res.* 6(10):986-94.

Holdenrieder, S., Stieber, P. 2004. Apoptotic markers in cancer, *Clinical Biochemistry*, 37: 605-617.

Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., Gelfand, D. H., 1991. Detection of spesific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88(16): 7276-7280.

Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E. ve Swanson, P.E. 2009. Cell Death. *N Engl J Med.*, 361(16):1570-83.

Howe-Grant, M., Wu, K.C., Bauer, W.R. ve Lippard, S.J. 1976. Binding of platinum and palladium metalointercalation reagents and antitumor drugs to closed and open DNAs. *Biochemistry*, 15(19):4339-4346.

Hughes, J.M., Weill, H. 1994. Potency versus importance in fiber pathogenicity. *Am J Ind Med*, 25(4):609-10.

İtil, O. 2000. Akciğer kanserlerinin epidemiyolojisi ve etyolojisi: Akciğer kanserleri: Tanı ve tedavi, Editör: Haydaroğlu A., Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 15-34.

Jacobson, D.R. 1999. Lung tumors fundamental biology and clinical management: Ras mutations in lung cancer. Editörler: Brambilla C, Brambilla E, New York, Marcel Dekker Inc., 139-156.

Jemal, A., Thun, M.J., Ries, L.A., Howe, H.L., Weir, H.K., Center, M.M., Ward, E., Wu, X.C., Ehemann, C., Anderson, R., Ajani, U.A., Kohler, B., Edwards, B.K. 2008. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst*, 100(23):1672-94.

Jolley, JN., Yanovsky, A.I., Kelland, L.R., Nolan, K.B. 2001. Synthesis and antitumour activity of platinum(II) and platinum(IV) complexes containing ethylenediamine-derived ligands having alcohol, carboxylic acid and acetate substituents. Crystal and molecular structure of [PtL₄CL₂].H₂O where L₄ is ethylenediamine-N,N'-diacetate. *J Inorg Biochem.*, 83(2-3):91-100.

Karaaslan, Ç., 2008. “Western Blott” Tekniği. *Astım Allerji İmmünoloji*, Ankara;6(1):38-40.

Karaboz, İ., Kayar, E., Akar S. 2008. Flow Sitometri ve Kullanım Alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 06(2): 01-18.

Kastan, M.B., Bartek, J. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432(7015):316-23.

Kaufmann, S.H., Earnshaw, W.C. 2000. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy, *Exp Cell Res* 256, 42-49.

Kaya, M. 2007. Bazı monoterpen ve uçucu yağların, hücre çoğalmasında apoptozis üzerine etkilerinin memeli hücre kültürleriyle araştırılması. Y.Lisans Tezi, AÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.

Keepers, Y.P., Pizao, P.E., Peters, G.J., van Ark-Otte, J., Wino-grad, B., Pinedo, H.M. 1991. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium MTT assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur. J. Cancer*, 27(12):897.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer*, 26(4):239-57.

Keter, F.K., Kanyanda, S., Lyantagaye, S.S.L., Darkwa, J., Rees, D.J.G. ve Meyer, M. 2008. In vitro evaluation of dichloro-bis(pyrazole)palladium(II) and dichloro-bis(pyrazole)platinum(II) complexes as anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol*, 63(1):127-38.

Khan, H., Badshah, A., Murtaz, G., Said, M., Rehman, Z.U., Neuhausen, C., Todorova, M., Jean-Claude, B.J. ve Butler, I.S. 2011. Synthesis, characterization and anticancer studies of mixed ligand dithiocarbamate palladium(II) complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(9):4071-7.

Kim, R. 2005. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy, *Cancer* 103, 1551-1560.

King, M., McConkey, C., Latief, T.N., Hartley, A. Fernando, I. 2006. Improved survival after concurrent weekly cisplatin and radiotherapy for cervical carcinoma with assessment of acute and late side-effects. *Clinical Oncology*, 18(1):38-45.

Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., Iliakis, G. 2008. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research*, 36: 5678-5694.

Kontek, R., Matlawska-Wasowska, K., Kalinowska-Lis, U., Kontek, B. ve Ochocki, J. 2011. Evaluation of cytotoxicity of new trans-palladium (II) complex in human cells in vitro. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 68(1):127-36.

Köktürk, N., Kırıçoğlu, C.E., Öztürk, C. 2003. Akciğer kanseri moleküler biyolojisi. *Solunum*, 5: 127-138.

Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjogreen, J., Strombom, L., Stahlberg, A., Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 27(2-3):95-125.

Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. 2005. Cellular adaptations, cell injury, and cell death: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th, Editörler: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Philadelphia: Elsevier Saunders, p.3-46.

Kunnumakkara, A.B., Anand, P., Aggarwal, B.B. 2008. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins, *Cancer Lett.* 269(2):199-225.

Kuo, L.J., Yang, L.X. 2008. Gamma-H2AX-A novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* 22: 305-310.

Kuttan, R., Bhanumathy, P., Nirmala, K., George, M.C., 1985. Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer Lett.* 29(2):197-202.

Ledgerwood, E.C., Morison, I.M. 2009. Targeting the Apoptosome for Cancer Therapy, *Clin Cancer Res*,15(2):420-4.

Lee, J.Y., Lee, Y.M., Chang, G.C., Yu, S.L., Hsieh, W.Y., Chen, J.J., Chen, H.W., Yang, P.C. 2011. Curcumin induces EGFR degradation in lung adenocarcinoma and modulates p38 activation in intestine: the versatile adjuvant for gefitinib therapy. *Plos One*, 6(8):e23756.

Levin, W.J., Casey, G., Ramos, J.C., Arboleda, M.J., Reissmann, P.T., Slamon, D.J. 1994. Tumor suppressor and immediate early transcription factor genes in nonsmall cell lung cancer. *Chest*, 106 (Suppl):372S-376S.

Li, Y., Zhang, S., Geng, J.X., Hu, X.Y. 2013. Curcumin Inhibits Human Non-small Cell Lung Cancer A549 Cell Proliferation Through Regulation of Bcl-2/Bax and Cytochrome C. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 14(8):4599-602.

Liao, Y., Lu, X., Lu, C., Li, G., Jin, Y., Tang, H., 2008. Selection of agents for prevention of cisplatin-induced hepatotoxicity. *Pharmacol Res.*, 57(2):125-31.

Limtrakul, P., Lipigorngoson, S., Namwong, O., Apisariyakul, A., Dunn, F.W. 1997. Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. *Cancer Lett*, 116: 197-203.

Lin, J.K., Lin-Shiau, S.Y. 2001. Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. *Proc Natl Sci Counc Repub China B*, 25 (2): 59-66.

Liu, X., Chen, H., Patel, D. 1991. Solution structure of actinomycin-DNA complexes: drug intercalation at isolated G-C sites. *J Biomol NMR*, 1(4): 323-47.

Livak, K.J., Flood, S.J.A., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K., 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Gen. Res.*, 4(6):357-62.

Lowitz, B.B. ve Casciato, D.A., 2000. Principles of Medical Oncology and Cancer Biology Manual of Clinical Oncology, Dennis A., Casciato, Barry B. Lowitz. Philadelphia.

Lu, J., Ashwell, K., Ken, W.S., Waite, P. 2000. Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine*. 25:1859-1866.

Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska,

F.G., Louis, D.N., Christiani, D.C., Settleman, J., Haber, D.A. 2004. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small cell lung cancer to gefitinib. *N. Eng. J. Med.*, 350: 2129-2139.

Mabry, M. 1998. Activating oncogenes in lung cancer: Biology of lung cancer, Editörler: Kane, M.A., Bunn, P.A., New York, Marcel Dekker Inc. 391-412

Macey, M.G. 2007. Flow Cytometry: Principles and Applications, Editör: Macey, M.G. Humana Press, Totowa, NJ, 304.

Maheshwari, R.K., Singh, A.K., Gaddipati, J., Srimal, R.C. 2006. Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sci.*, 78:2081-7.

Mai, S., Mushinski, J.F. 2003. c-Myc-induced genomic instability. *Journal of Environmental Pathology. Toxicology and Oncology*, 22(3):179-99.

Mansouri-Torshizi, H., I-Moghaddam, M., Divsalar, A., Saboury, A.A. 2008. 2,2'-Bipyridinebutyldithiocarbamatoplatinum(II) and palladium(II) complexes: Synthesis, characterization, cytotoxicity, and rich DNA-binding studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(21):9616-25.

Mansouri-Torshizi, H., Saedifar, M., Divsalar, A. ve Saboury, A.A. 2011. Binding studies of a novel antitumor palladium (II) complex to calf thymus DNA. *Nucleosides. Nucleotides and Nucleic Acids*, 30(6):405-22.

Mansuri-Torshizi, H., Srivastava, T.S., Chavan, S.J. ve Chitnis, M.P. 1992. Cytotoxicity and DNA binding studies of several platinum (II) and palladium (II) Complexes of the 2,2'-bipyridine and an anion of 2-pyridinecarboxylic/2-pyrazinecarboxylic acid. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 48(1):63-70.

Marti, A., Ritter, P.M., Jager, R. 2001. Mouse mammary gland involution is associated with cytochrome-c release and caspase activation. *Mech Dev.* 104(1-2):89-98.

Mathen, C., Hardikar, B.P. 2010. A Method for Photomicrography of Cytotoxicity in 96-Well Plates. *Asian Journal of Biotechnology*, 2(4):232-238.

McErlean, A., Ginsberg, M.S. 2011. Epidemiology of lung cancer. *Semin Roentgenol*, 46:173-7.

Miklasova, N., Fischer-Fodor, E., Lönnecke, P., Schrepler, M.P., Virag, P., Tatomir, C., Cernea, V.I., Hey-Hawkins, E., Silaghi-Dumitrescu, L. 2009. Antiproliferative effect and genotoxicity of novel synthesized palladium complexes with organoarsenic ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(12):1739-47.

Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Cambell, H., Munne-Bosch, S., Schwarz, K., Alegre, L. 1992. Response of abietane diterpenes to stress in *Rosmarinus officinalis* L. new insights into the function of diterpenes in plants. *Free Rad. Res.*, 31: 107-112.

- Morris, T., Robertson, B., Gallagher, M., 1996.** Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. *J. Clin. Microbiol.*, 34(12):2933-6.
- Mountz, J.D., Zhou, T. 2001.** Arthritis and allied conditions A Textbook of Rheumatology: Apoptosis and autoimmunity, Editör Kopman, W.J. *Lippincott-Williams&Wilkins*, 53.
- Muslimovic, A., Muslimovic, A., Ismail, I.H., Gao, Y., Hammarsten, O. 2008.** An optimized method for measurement of gamma-H2AX in blood mononuclear and cultured cells. *Nat Protoc.*, 3(7):1187-93.
- Nicotera, P., Bernassola, F., Melino, G. 2004.** Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*, 23(16):2757-65.
- Odot, J., Albert, P., Carlier, A., Tarpin, M., Devy, J., Madoulet, C., 2004.** In vitro and in vivo anti-tumoral effect of curcumin in against melanoma cells. *Int. J. Cancer*. 111(3):381-7.
- Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., Hanen, C. 1998.** Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 3: 115.
- Palmer, A.M. Greengrass, P.M., Cavalla D. 2000.** The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News & Perspectives*, 43:95-118.
- Papazisis, K.T., Geromichalos, G.D., Dimitriadis, K.A., Kortsaris, A.H. 1997.** Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods*, 208(2):151-8.
- Park, C., Kim, G.Y., Kim, G.D., Choi, B.T., Park, Y.M., & Choi, Y.H. 2006.** Induction of G2/M arrest and inhibition of cyclooxygenase-2 activity by curcumin in human bladder cancer T24 cells. *Oncology Reports*, 15(5):1225-31.
- Perez, R.P., Godwin, A.K., Handel, L.M., Hamilton, T.C. 1993.** A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines. *Eur. J. Cancer*, 29A(3):395-9.
- Petrovic, D., Stojimirovic, B., Petrovic, B., Bugarcic, Z.M. ve Bugarcic, Z.D. 2007.** Studies of interactions between platinum(II) complexes and some biologically relevant molecules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(12):4203-11.
- Piper, J.T., Singhal, S.S., Salameh, M.S., Torman, R.T., Awasthi, Y.C., Awasthi, S. 1998.** Mechanisms of anticarcinogenic properties of curcumin: the effect of curcumin on glutathione linked detoxification enzymes in rat liver. *Int J Biochem Cell Biol*, 30: 445-56.
- Podhorecka, M., Skladanowski, A., Bozko, P. 2010.** H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *Journal of Nucleic Acids*, 1-9.
- Pongrakhananon, V., Nimmannit, U., Luanpitpong, S., Rojanasakul, Y., Chanvorachote, P. 2010.** Curcumin sensitizes non-small cell lung cancer cell anoikis

through reactive oxygen species-mediated Bcl-2 downregulation. *Apoptosis* 15(5):574–585.

Portera, A.G., Janicke, R.U. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*, 6:99-104.

Priyadarsini, K.I. 1997. Free radical reactions of curcumin in membrane models. *Free Radic Biol Med*, 23: 838-43.

Rabik, C.A., Dolan, M.E. 2007. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews*, 33(1):9-23.

Radhakrishna Pillai, G., Srivastava, A.S., Hassanein, T.I., Chauhan, D.P., Carrier, E. 2004. Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin, *Cancer Lett.* 28;208(2):163-70.

Rajalingam, K., Schreck, R., Rapp, U.R., Albert, S. 2007. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773(8):1177-95.

Rakiman, I., Chinnadurai, M., Baraneedharan, U., Solomon, F.D.P., Venkatachalam P. 2008. γ -H2AX assay: a technique to quantify DNA double strand breaks. *Tools & Techniques - Advanced Biotech* 39-41.

Rau, T., van Eldik, R. 1996. Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy: In metal ions in biological systems, Editörler: Sigel, H., Sigel, A., Marcel Dekker, New York, 339–378.

Ravindran, J., Prasad, S., Aggarwal, B.B. 2009. "Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively?", *The AAPS journal*, 11(3): 495– 510.

Riedl, S.J., Salvesen, G.S. 2007. The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 8:405-413.

Riedl, S.J., Shi, Y., 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(11):897-907.

Roach, H.I., Clarke, N.M. 2000. Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. *J Bone Joint Surg Br*, 82:601–613.

Rom, W.N., Hay, J.G., Lee, T.C., Jiang, Y., Tchou-Wong, K.M. 2000. Molecular and Genetic Aspects of Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, 161(4 Pt 1):1355-67.

Rubinstein, L.V., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Simon, R.M., Tosini, S., Skehan, P., Scudiero, D.A., Monks, A., Boyd, M.R. 1990. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82 (13):1113-1117.

Ruiz, J., Cutillas, N., Vicente, C., Villa, M. D., Lopez, G., Lorenza, J., Aviles, F. X., Moreno, V., Bautista, D. 2005. New palladium(II) and platinum(II) complexes with the model nucleobase 1-methylcytosine: antitumor activity and interactions with DNA. *Inorg. Chem.*, 44(21):7365-76.

- Saikia, A.P., Ryakala, V.K., Sharma, P., Goswami, P., Bora, U. 2006.** Ethnobotany of medicinal plants used by Assamese people for various skin ailments and cosmetics. *J Ethnopharmacol*, 106(2):149-57.
- Salgame, P., Varadhachary, A.S., Primiano, L.L., Fincke, J.E., Muller, S., Monestier, M. 1997.** An ELISA for detection of apoptosis. *Nucleic Acids Research*, 25(3): 680–681.
- Samet, J.M. 2006.** Residential radon and lung cancer: end of the story?. *J Toxicol Environ Health A*, 69(7):527-31.
- Samet, J.M., Eradze, G.R. 2000.** Radon and lung cancer risk: taking stock at the millenium. *Environ Health Perspect*; 108(Suppl 4): 635–641.
- Scarselli, A., Scano, P., Marinaccio, A. 2008.** Occupational exposure and lung cancer in Italy: estimating the number of workers potentially at risk. *Acta Biomed* ; 79(suppl 1): 2433.
- Schwartzman, R.A., Cidlowski, J.A. 1993.** Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Review*; 14(2):133-51.
- Sclafani, R.A., Schaurer, I.E., Langan, T.A. 1998.** Alterations in cell cycle conyrol in lung cancer: Biology of lung cancer. Editörler: Kane, M.A., Bunn, P.A., New York, Marcel Dekker Inc. 295-315.
- Sharma, R.A., Gescher, A.J., Steward, W.P. 2005.** Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer*, 41 (13): 1955-1968.
- Siegel, R., Ward, E., Brawley, O., Jemal, A. 2011. Cancer statistics, 2011.** The impact of eliminating socioeconomic and racial dispa-rities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin*, 61(4):212-36.
- Simon, A., Allais, D.P., Duroux, J.L., Basly, J.P., Durand-Fontanier, S., & Delage, C. 1998.** Inhibitory effect of curcuminoids on MCF-7 cell proliferation and structure-activity relationships. *Cancer Letters*, 129(1):111-6.
- Singh, S., Aggarwal, B.B. 1995.** Activation of Transcription Factor NF-kB Is Suppressed by Curcumin (Diferulolylmethane). *The Journal of Biological Chemistry*. 270 (42): 24995-25000.
- Singh, M., Singh, N. 2009.** Molecular mechanism of curcumin induced cytotoxicity in human cervical carcinoma cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 325(1-2):107-19.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., and Boyd, M. R. 1990.** New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1107–1112.
- Solakoğlu, Z. 2009.** Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. *Klinik Gelişim*, 22 (3): 20-25.
- Spencer, S., Cataldo, N.A., 1996.** Jaffe, R.B. Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstet Gynecol Survey.*, 5:314-323.

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

Spiro, S.G., Porter, J.C., 2002. Lung cancer-Where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 166(9):1166-96.

Spitz, M.R., Hong, W.K., Amos, C.I., Wu, X., Schabath, M.B., Dong, Q., Shete, S., Etzel, C.J. 2007. A risk model for prediction of lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 99(9):715-26.

Spivack, S.D., Fasco, M.J., Walker, V.E., Kaminsky, L.S. 1997. The molecular epidemiology of lung cancer. *Crit Rev Toxicology*, 27:319-365

Starha, P., Travnicek, Z. ve Popa, I. 2009. Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity of the first palladium(II) oxalato complexes involving adenine-based ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(7):978-88.

Stayner, L., Bena, J., Sasco, A.J., Smith, R., Steenland, K., Kreuzer, M., Straif, K., 2007. Lung cancer risk and work place exposure to environmental tobacco smoke. *Am J PublicHealth*, 97(3):545-551.

Stojković, D.Lj., Jevtić, V.V., Radić, G.P., Todorović, D.V., Petrović, M., Zarić, M., Nikolić, I., Baskić, D., Trifunović, S.R. 2015. Stereospecific ligands and their complexes. XXII. Synthesis and antitumor activity of palladium(II) complexes with some esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-(2,2'-di(4-hydroxy-benzyl))-acetic acid. *J Inorg Biochem.*, 143:111-6.

Stoner, G.D., Mukhtar, H. 1995. Polyphenols as cancers chemopreventive agents. *Cell biochem suppl*. 22: 169-80.

Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V.M. 2000. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*, 69:217-45.

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

Sumantran, V.N. 2011. Cellular Chemosensitivity Assays: An Overview: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols, Second Edition, Methods in Molecular Biology, Editörler: Cree, I.A., Humana Press, Portsmouth, UK, 219-236.

Takahara, P.M., Frederick, C.A., Lippard, S.J. 1996. Crystal structure of the anticancer drug cisplatin bound to duplex DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, 118(49):12309–12321.

Tatar, D., Ertuğrul, G., Çırak, A.K., Özdoğan, Y., Özacar R., Halilçolar, H. 2000. Tanıda güçlük çekilen akciğer tüberkülozlu olgularımız. *Akciğer Arşivi*, 11: 212-6.

Taylor, R., Najafi, F., Dobson, A. 2007. Meta-analysis of studies of passive smoking and lung cancer: effects of study type and continent. *Int J Epidemiol* 36(5):1048-1059.

Thomas-Eapen, N. 2009. Turmeric: The intriguing yellow spice with medicinal properties. *Explore*, 5(2):114-15.

Torun, E. 2005. Küçük hücreli akciğer kanserinde tedavi öncesi prognostik faktörler ve tedavi sonuçları. Uzmanlık Tezi, Keah, Göğüs Hastalıkları Kliniği, İstanbul.

Travis, W.D., Brambilla, E., Müller-Hemerlink, H.K., Harris, C.C., 2004. Pathology and genetics of tumors of the lung, pleura, thymus and heart. In: World Health Organization classification of tumors. IARC press, 9-144.

Ulukaya, E. 2003. Apoptozis Ders Notları. http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf. Erişim tarihi: 09.09.2015. 23, 36.

Ulukaya, E. 2010. Hücre siklusu ve apoptozis: Akciğer Kanserleri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar, İstanbul, <http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf>. (Erişim tarihi: 12.09.2015).

Ulukaya, E., Arı, F., Dimas, K., Sarımahmut, M., Guney, E., Sakellaridis N., Yilmaz, V.T. 2011a. Cell death-inducing effect of novel palladium(II) and platinum(II) complexes on non-small cell lung cancer cells in vitro. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137(10):1425-34.

Ulukaya, E., Arı, F., Dimas, K., Ikitimur, E.I., Güney, E. ve Yilmaz, V.T. 2011b, Anti-cancer activity of a novel palladium(II) complex on human breast cancer cells in vitro and in vivo. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(10):4957-63.

Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y. 2011c. Apoptosis: Why and how does it occur in biology? *Cell Biochem Func.* 29: 468-480.

Ursavaş, A. 2001. Akciğer Kanserleri: Akciğer hastalıkları el kitabı 2. Cilt, Editör: Özyardımcı N., Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi, 456-92.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., and Berneman, Z. N. 2005. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer, *Ann Hematol* 84(10):627-39.

Vichai, V., Kirtikara, K. 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protocols*, 1(3):1112-1116.

Vierstrate, A., 1999. Principle of the PCR. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>. (Erişim tarihi: 23 Temmuz 2015).

Wahbah, M., Boroumand, N., Castro, C., El-Zeky, F., Eltorky, M. 2007. Changing trends in the distribution of the histologic types of lung cancer: a review of 4,439 cases. *Ann Diagn Pathol*, 11:89-96.

Wingo, P.A., Cardinez, C.J., Landis, S.H., Greenlee, R.T., Ries, L.A., Anderson, R.N., Thun, M.J. 2003. Long-term trends in cancer mortality in the United States, 1930-1998. *Cancer*, 103(12):2658.

Wu, S.H., Hang, L.W., Yang, J.S., Chen, H.Y., Lin, H.Y., Chiang, J.H., Lu, C.C., Yang, J.L., Lai, T.Y., Ko, Y.C., Chung, J.G. 2010. Curcumin induces apoptosis in human non-small cell lung cancer NCI-H460 cells through ER stress and caspase cascade- and mitochondria-dependent pathways. *Anticancer Res.*, 30(6):2125–2133.

Wyllie, A.H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 284(5756):555-6.

Yau, P., 2004. Apoptosis. Kaliforniya, <http://www.scq.ubc.ca/apoptosis/> Erişim tarihi: 23.06.2015.

Ye, M.X., Zhao, Y.L., Li, Y., Miao, Q., Li, Z.K., Ren, X.L., Song, L.Q., Yin, H., Zhang, J. 2012. Curcumin reverses cis-platin resistance and promotes human lung adenocarcinoma A549/DDP cell apoptosis through HIF-1 α and caspase-3 mechanisms. *Phytomedicine*, 19(8-9):779-87.

Yılmaz, İ., 2005. Erişkin Ratlarda Deneyisel Varikosel Oluşturulması Sonrası Testislerde Germ Hücrelerinde Apoptozis Düzeylerinin Yükselmesi; Ve Yükselmiş Olan Apoptozisin Varikosektomi Sonrası Gerileme Düzeyi Ve Süresinin Tunel Yöntemi İle Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Taksim EAH, Üroloji Kliniğı, İstanbul.

Yuan, J., Adamski, R., Chen, J. 2010. Focus on histone variant H2AX: to be or not to be. *FEBS Letters* 584: 3717-3724.

Zhang, J., Li, L., Ma, L., Zhang, F., Zhang, Z. ve Wang, S. 2011. Synthesis, characterization and cytotoxicity of mixed-ligand complexes of palladium(II) with 2, 2'-biquinoline/1, 4-diaminobutane and 4-toluenesulfonyl-L-amino acid dianion. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(11):5711-6.

Zhao, J., Zhao, Y., Zhang, Y., Chen, W., 2007. Anti-tumor effect of curcumin on human cervical carcinoma HeLa cells in vitro and in vivo, *Chinese Journal of Cancer Research*, 19(1): 32-36.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Duygu TUNÇ

Doğum Yeri ve Tarihi: Bursa, 16 Kasım 1988

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Bursa Erkek Lisesi (2003-2006)

Lisans: Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2007-2013)

Yüksek Lisans: Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı (2014-2015)

İletişim (e-posta): duygutunc1988@gmail.com