



**YENİ SENTEZ EDİLEN PALLADYUM (II)  
BİLEŞİĞİNİN OTOFAJİ İNHİBİTÖRLERİ İLE  
KOMBİNASYONUNUN  
PROSTAT KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ  
SİTOTOKSİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Merve ERKISA**



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

**YENİ SENTEZ EDİLEN PALLADYUM (II) BİLEŞİĞİNİN  
OTOFAJİ İNHİBİTÖRLERİ İLE KOMBİNASYONUNUN  
PROSTAT KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ  
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Merve ERKISA**

Doç. Dr. Ferda ARI

İkinci Danışman: Prof. Dr. Engin ULUKAYA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BURSA-2016  
Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAYI

Merve Erkisa tarafından hazırlanan “ Yeni sentez edilen Palladyum (II) bileşğinin otofaji inhibitörleri ile kombinasyonunun prostat kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliğı ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Doç. Dr. Ferda ARI

**İkinci Danışman:** Prof. Dr. Engin Ulukaya

**Başkan:** Doç. Dr. Ferda ARI

Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye:** Prof. Dr. Engin Ulukaya

Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

**Üye:** Doç. Dr. Serap Çelikler Kasımoğulları

Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye:** Doç. Dr. Elif İlkay Armutak

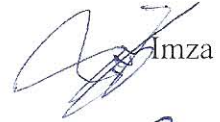
İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,

**Üye:** Yrd. Doç. Dr. Egemen Dere

Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı



İmza



İmza



İmza



İmza



İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr Ali Osman DEMİR

Enstitü Müdürü

03/06/2016

**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.**

**03/06/2016**

**Merve ERKISA**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### YENİ SENTEZ EDİLEN PALLADYUM (II) BİLEŞİĞİNİN OTOFAJİ İNHİBİTÖRLERİ İLE KOMBİNASYONUNUN PROSTAT KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

**Merve ERKISA**

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman:** Doç. Dr. Ferda ARI

**İkinci Danışman:** Prof. Dr. Engin ULUKAYA

Prostat kanseri dünyada erkeklerde en sık rastlanan ikinci kanser türüdür. Kemoterapi tedavisine karşı gelişen direnç bu kansere bağlı ölümlerin ana nedenlerinin başında gelmektedir. Bu nedenle prostat kanseri tedavisine yönelik olarak yeni terapötik hedeflerin araştırılması halen araştırmacıların ilgi odağı olup, bu hedeflerin etkileşime girdikleri hücresel sinyal yolları aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, kanser tedavisinde kullanılan metal bileşiklerin umut verici etkilerinden dolayı ilaç olarak kullanımının yaygınlaştığını göstermektedir. Çoğunlukla bir stres yanıtı ve hayatta kalma mekanizması olarak işleyen otofaji, kanser gelişimi ve tedavisi sürecinde önemli bir role sahiptir. Prostat kanseri üzerinde yapılan araştırmalar otofajinin genellikle bir hayatta kalma mekanizması olarak rol aldığını göstermektedir. Dolayısıyla bu tez çalışmasında, Palladyum (II) bileşiği  $[[Pd(bpma)(barb)]Cl.H_2O]$  ile otofaji inhibitörleri (3-Metiladenin ve klorokin) kombinasyonunun insan prostat kanseri hücre soyları (LNCaP, PC-3) ve sağlıklı prostat hücre soyu (PNT1A) üzerine sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Pd (II) bileşiğinin ve otofaji inhibitörlerinin hücre canlılığı üzerine olan etkileri MTT canlılık testi ile belirlenmiştir. Kombinasyon tedavisi (Pd (II) bileşiği ve otofaji inhibitörleri) için belirlenen dozların bu hücre soyları üzerine olan etkileri önce MTT testi ile belirlenmiştir. Daha sonra da bu etkiler ATP canlılık testi ile doğrulanmıştır. Kombinasyon tedavisinin sitotoksik etkilerinden sorumlu hücre ölümü (apoptozis/nekrozis/otofaji) mekanizmasının belirlenmesi amacıyla akım sitometri sistemi ve M30 antijen yöntemi kullanılmıştır. Hücrelerde apoptoz varlığı Hoechst 33342/Annexin-V/Propidyum İyodür üçlü boyama yöntemi ile asidik veziküler organellerin varlığı ise akrinin boyaması ile floresan mikroskopta görüntülenerek desteklenmiştir. Son olarak otofaji ve hücre ölümü ile ilişkili proteinlerin ekspresyon seviyeleri Lumineks uygulaması ve immunoblotlama yöntemi ile gösterilmiştir. Sonuç olarak, Pd (II) bileşiği ve otofaji inhibitörleri kombinasyonunun özellikle metastatik prostat kanseri hücre soyunda (PC-3) sitotoksik aktivitenin artışına ve apoptozise neden olduğu bulunmuştur. Pd (II) bileşiğinin otofaji inhibitörleri ile kullanımının yeni umut verici bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilceği öngörüsüyle ileri in vivo deneylerin yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Prostat kanseri, Apoptoz, Otofaji, Palladyum (II) bileşiği

**2016, xii + 150 sayfa.**

## **ABSTRACT**

Master's Thesis

### **CYTOTOXIC EFFECTS OF COMBINATION WITH NOVEL SYNTHESIS PALLADIUM COMPLEX WITH AUTOPHAGY INHIBITORS ON PROSTATE CANCER CELL LINES**

**Merve ERKISA**

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

**Supervisor:** Assoc. Prof. Dr. Ferda ARI  
**Second Supervisor:** Prof. Dr. Engin ULUKAYA

Prostate cancer is the second most common cancer in men worldwide. The development of resistance to chemotherapy is one of the main causes of cancer death. Therefore, the search for new therapeutic agents for the treatment of cancer is still the focus of researchers with an aim to understand cellular signaling pathways. Studies in recent years have shown the widespread use of metal complexes as it has promising potential in cancer treatment. Autophagy has an important role in cancer development and treatment often as a stress response and survival mechanism. Studies on prostate cancer have shown that autophagy usually works as a survival mechanism. In this research, the cytotoxic effects of combination of palladium (II) complex  $[[\text{Pd}(\text{bpma})(\text{barb})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}]$  and autophagy inhibitors (3-methyladenine and chloroquine) are investigated on human prostate cancer cell lines (LNCaP, PC-3) and healthy prostate cell line (PNT1A). Effects of Pd(II) complex and autophagy inhibitors on cell viability were determined separately by MTT viability assay. For the combinatorial treatment (Pd (II) complex and autophagy inhibitors), effects at indicated doses on cell lines were firstly determined by MTT viability assay. Then ATP viability assay was used to confirm MTT results. Flow cytometry and M30 antigen method was used to determine the mode of cell death (apoptosis/necrosis/autophagy) responsible for the cytotoxicity in combinatorial treatments. Apoptosis is supported by fluorescence images using triple staining method (Hoechst 33343, Annexin V, and Propidium iodide). Formation of acidic vesicular organelles was observed by fluorescence microscopy using acridine orange staining. Finally, protein expression levels associated to autophagy and cell death were determined by immunoblotting method and Luminex assay. As a conclusion, the combination of Pd (II) complex and autophagy inhibitors results to increased cytotoxic activity especially in metastatic prostate cancer cell line by inducing apoptosis. This combination may be a promising new treatment option. It was concluded that it is necessary to carry out further in vivo experiments.

**Keywords:** Prostate Cancer, Apoptosis, Autophagy, Palladium (II) Complex

**2016, xii + 150 pages.**

## **TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans çalışmalarım da danışmanlığımı yapan, eğitimimin düzenli işleyişi için büyük bir özveri gösteren ve her konuda desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ferda ARI'ya,

Yüksek lisans öğrenimimin 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. Arzu YILMAZTEPE ORAL, Sayın Doç. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI ve Sayın Yar. Doç. Dr. Egemen DERE'ye,

Tez çalışmam boyunca bilgi, deneyim ve önerilerini benimle paylaşarak bana yol göstermiş olan tüm çalışma arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca manevi anlamda her zaman yanımda olan benim canım dostlarım Burcu AZAK ve Burcu ÖZDAMAR GÜNGÖR'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, her zaman iyi ki benim babam dediğim sayın Hüseyin Nüvit ERKISA'ya, benim güleryüzlü her daim benimle olan canım annem İlknur ERKISA'ya ve yaşama daha sıkı tutunmamda en büyük payı olan benim en değerli canım kardeşim Begüm ERKISA'ya sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

**Merve ERKISA**

**03/06/2016**

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>1. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	<b>3</b>
1.1. Prostat Kanseri .....	<b>3</b>
1.1.1. Hormonal Etkiler.....	<b>5</b>
1.1.1.1. Androjen.....	<b>5</b>
1.1.1.2. Prostat Spesifik Antijen (PSA) .....	<b>6</b>
1.1.2. Diyet ve Çevresel Faktörler .....	<b>7</b>
1.1.3. Genetik Faktörler .....	<b>7</b>
1.2. Prostat Kanseri Tedavi Yöntemleri.....	<b>8</b>
1.3. Prostat Kanseri Moleküler Biyolojisi.....	<b>9</b>
1.4. Apoptozis .....	<b>10</b>
1.4.1. Apoptozis-Nekrozis .....	<b>11</b>
1.4.2. Kaspazların Apoptozis Sürecindeki Rolü .....	<b>14</b>
1.4.3. Mitokondrinin Apoptozis Sürecindeki Rolü .....	<b>16</b>
1.4.4. Bcl-2 Ailesinin Apoptozisdeki Rolü .....	<b>16</b>
1.4.5. Apoptozisin Mekanizmaları .....	<b>18</b>
1.4.5.1. Ekstrinsik (Dışsal) Yolak .....	<b>18</b>
1.4.5.2. İntrensik (İçsel) Yolak .....	<b>20</b>
1.4.5.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis Oluşturulması .....	<b>22</b>
1.5. Apoptozis-Karsinogenez İlişkisi .....	<b>22</b>
1.6. Otofaji .....	<b>24</b>
1.6.1. Otofajinin Fizyolojik ve Patolojik Görevleri .....	<b>26</b>
1.6.2. Otofajinin Moleküler Mekanizması .....	<b>27</b>
1.7. Otofaji-Apoptozis İlişkisi.....	<b>30</b>
1.8. Hücre Ölümü ve Sağ Kalımı ile İlişkili Sinyal Yolakları .....	<b>32</b>
1.8.1. mTOR Sinyal Yolağı.....	<b>32</b>
1.8.2. PI3K/Akt Sinyal yolağı.....	<b>33</b>
1.8.3. Otofaji ve Apoptotik Yolak Arasındaki Önemli Oyuncular: Bcl-2 ve Bcl-xL.....	<b>34</b>
1.9. Metal Bazlı Bileşikler .....	<b>35</b>
1.9.1. Palladyum (II) Bileşiklerinin Kansere Tedavisindeki Yeri .....	<b>35</b>
1.9.2. Palladyum (II) Bileşiklerinin DNA Üzerindeki Etki Mekanizması .....	<b>39</b>
1.9.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Palladyum (II) Bileşiğinin Biyokimyasal Yapısı .....	<b>40</b>
<b>2. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	<b>42</b>
2.1. Materyal .....	<b>42</b>
2.1.1. Kimyasal maddeler.....	<b>42</b>
2.1.2. Sarf malzemeler .....	<b>43</b>



2.1.3. Cihazlar .....	43
2.2. Yöntemler.....	44
2.2.1. Uludağ Üniversitesi Tarafından Sentez Edilen Pd (II) [[Pd(bpma)(barb)]Cl.H <sub>2</sub> O] Bileşiğinin Hazırlanması .....	44
2.2.2. İnhibitörlerinin Hazırlanması .....	44
2.2.3. Hücre kültürü .....	44
2.2.3.1. Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması .....	45
2.2.3.2. Hücre Soylarının Pasajlanması .....	45
2.2.3.3. Hücre Soylarının Stoklanması.....	46
2.2.3.4. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması .....	46
2.2.3.5. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı.....	46
2.2.4. MTT (Metiltiazotetrazolium) Canlılık Metodu.....	47
2.2.5. ATP (Adenozin Trifosfat) Canlılık Metodu.....	49
2.2.6. Floresan Boyama Yöntemi ile Ölüm Modunun Belirlenmesi .....	50
2.2.6.1. Anneksin-V Boyama Metodu .....	50
2.2.7. M30-Antijen Testi ile Ölüm Modunun Belirlenmesi.....	53
2.2.8. Akım Sitometri Analizleri.....	54
2.2.8.1. Kazpaz 3/7 Testi.....	54
2.2.8.2. Anneksin-V Testi .....	56
2.2.8.3. Mitokondri Membran Potansiyeli Testi .....	57
2.2.8.4. Gamma H2A.X Aktivasyonu ile DNA Hasarının Belirlenmesi .....	58
2.2.8.5. Oksidatif Stres Belirlenmesi .....	61
2.2.8.6. LC3-II Belirlenmesi .....	62
2.2.8.7. PI3K (Fosfatidilinositol 3 kinaz) Aktivasyonunun Belirlenmesi .....	64
2.2.9. Akridin Boyama .....	66
2.2.10. Lumineks uygulaması .....	67
2.2.11. Western Blot Analizi.....	67
2.2.10.1. Protein İzolasyonu.....	70
2.2.10.1.1. Çözeltiler .....	70
2.2.10.2. Proteinlerin Biçinkonik asit (BCA) Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi .....	70
2.2.10.2.1. Çözeltiler .....	70
2.2.10.2.2. BSA Standartlarının Hazırlanması .....	71
2.2.10.2.3. BCA Ölçümünün Yapılması .....	71
2.2.10.3. Western Blot Yöntemi ile Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarılması.....	71
2.2.10.3.1. Çözeltiler .....	71
2.2.10.3.2. Proteinlerin Yüklenmesi ve Jelde Yürütülmesi.....	72
2.2.10.3.3. Proteinlerin Transferi .....	72
2.2.10.3.4. Proteinlerinin Belirlenmesi .....	72
2.2.10.3.4.1. Bloklama .....	72
2.2.10.3.4.2. Birincil Antikor .....	73
2.2.10.3.4.3. İkincil Antikor .....	73
2.2.10.3.4.4. Görüntüleme.....	73
2.2.10.3.4.5. Birincil ve İkincil Antikorların Membrandan Uzaklaştırılması.....	73

2.2.11. İstatistiksel Analiz.....	74
3. BULGULAR.....	75
3.1. MTT Canlılık Testi Bulguları .....	75
3.2. ATP Canlılık Testi Bulguları .....	86
3.3. Anneksin-V Boyama Yöntemi Bulguları.....	89
3.4. M30 Antijen (Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18) Bulguları .....	95
3.5. Akım Sitometri Bulguları.....	97
3.5.1. Kaspaz 3/7 Testi.....	97
3.5.2. Anneksin-V Değerlendirilmesi .....	101
3.5.3. Mitokondri Membran Potansiyel Değişiklikleri .....	104
3.5.4. DNA Hasarının Belirlenmesi .....	105
3.5.5. Oksidatif Stresin (ROS) Belirlenmesi.....	107
3.5.6. Önemli Bir Otofaji Proteini Olan LC3-II Seviyesinin Belirlenmesi .....	109
3.5.7. PI3K Aktivasyonunun Değerlendirilmesi .....	110
3.6. Aktif Lizozom Boyaması (Akridin) .....	112
3.7. Lumineks Bulguları.....	114
3.8. Western Blot Bulguları .....	116
4. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	121
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	133
ÖZGEÇMİŞ .....	155

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

- (A-diol-g):** Androstenidol glukuronide
- 3-MA:**3-Metiladenin
- 5-FU:**5-Flurourasil
- 7-AAD :** 7-Aminoaktinomisin D
- AIF :** Apoptosis indükleyici faktör (Apoptosis inducing factor)
- Apaf-1 :**Apoptotik proteaz aktive eden faktör
- AR:**Androjen reseptörü
- ASAP:**Atipik küçük asiner proliferasyon
- ATP :**Adenozin trifosfat (Adenosine triphosphate)
- ATP:**Adenozin Trifosfat
- BCA:**Biçinkoninik asit
- BH:**Bcl-2 homoloji bölgeleri
- BSA:**Sığır serum albümin
- CAD :**Kaspaz aktive edici DNaz
- CK18:**Sitokeratin 18
- DAPK:**Ölüm ilişkili protein kinaz
- DD :**Ölüm alanı (Death domain)
- DHEA:**Dehidroepiandrosteron
- DHT:**Dihidrotestosteron
- DISC :**Ölüm indükleyici sinyal kompleksi (Death inducing signalling complex)
- DMSO:**Dimetilsulfoksit
- DNA :**Deoksi ribonükleik asit (Deoxyribonucleic acid)
- DNA-PK :**DNA bağımlı protein kinaz (DNA-dependent Protein Kinase)
- EDTA :**Etilen Diamin Tetraasetik Asit
- EGFR :**Epidermal büyüme faktör reseptörü(Epidermal growth factor receptor)
- ER:**Endoplazmik retikulum
- FADD :**Fas ilişkili ölüm alanı (Fas associated death domain)
- FBS :**Fetal sığır serumu (Fetal bovine serum)
- FITC :**Fluoresin izotiyosiyanat
- GST:**Glutasyon S-transferaz
- GTP :**Guanozin trifosfat
- ICAD :**Kaspazla aktive edilmiş

**IGF** :İnsülin benzeri büyüme faktörü  
**Kbp**:Klikobaz çifti  
**kDa**:KiloDalton  
**MOMP**:Mitokondri dış membran permeabilizasyonu  
**mTOR**:Rapamisin hedefi (Target of rapamycin)  
**MTT**:Metiltiazoldifeniltetrazolyum bromür  
**NAC**:N-asetil-L-sistein  
**PARP** :Poli(ADP-riboz)polimeraz (Poly ADP-ribose polymerase)  
**PBS** :Fosfat tuz tamponu (Phosphate buffered saline)  
**PBS**:Fosfat tamponlu tuz çözeltisi  
**PCR** :Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR; polymerase chain reaction)  
**Pd** :Palladyum  
**PerCP**: Peridinin klorofil  
**PI** :Propidyum iyodür (Propidium iodide)  
**PIN**:Prostatik epitelyal neoplazi  
**PS** :Fosfatidil serin (phosphatidylserine)  
**PSA**:Prostat spesifik antijen  
**Pt** :Platin  
**PTEN**:Fosfataz ve tensin homolog proteini  
**Rb** :Retinoblastoma  
**RNA** :Ribo nükleik asit (Ribonucleic acid)  
**ROCK1**:Rho ilişkili sarmal oluşturan kinaz 1  
**ROS**:Reaktif oksijen türleri  
**RPMI** :Roswell Park Memorial Institute Medium  
**SDS** :Sodyum dodesil sülfat (Sodium dodecyl sulfate)  
**SDS-PAGE**:SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi  
**SHBG**:Seks hormon bağlayıcı globülin  
**SRB** :Sulforhodamine B  
**TCA** :Trikloroasetik asit  
**TdT** :Terminal deoksinükleotidil transferaz  
**TNF** :Tümör nekrozis faktör  
**TRAIL** :TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand  
**VEGF**:Vasküler endotelyal büyüme faktörü  
**z-VAD-FMK**: Genel kaspaz inhibitörü

## ŞEKİLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 1.1. Prostat bezinin şematik görüntüsü .....	3
Şekil 1.2. Erkekler arasında yıla bağlı kanser ölüm oranları, Amerika Birleşik Devletleri, 1930-2007. ....	4
Şekil 1.3. Apoptotik hücre ile nekrotik hücrenin morfolojik açıdan farkı.....	12
Şekil 1.4. Apoptozis ve Nekrozun şematik karşılaştırılması .....	13
Şekil 1.5. Kaspazların aktifleşme mekanizması .....	14
Şekil 1.6. Başlatıcı ve efektör kaspazlar. ....	15
Şekil 1.7. Apoptozisin mitokondri yolunda yer alan Bcl-2 ailesi üyeleri.....	17
Şekil 1.8. Apoptozom oluşumu ve kaspaz aktivasyonu.....	18
Şekil 1.9. Reseptör aracılı kaspaz aktivasyonu.....	20
Şekil 1.10. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması.....	21
Şekil 1.11. Kanser hücrelerinin özellikleri.....	23
Şekil 1.12. Otofajinin gerçekleşme mekanizması.....	25
Şekil 1.13. Otofaji Mekanizmaları.....	26
Şekil 1.14. Otofajinin düzenlenmesi.....	29
Şekil 1.15. mTOR sinyal yolağı.....	33
Şekil 1.16. PI3K/AKT yolağı .....	34
Şekil 1.17. Palladyum (II) bileşiğinin kimyasal yapısı .....	41
Şekil 2.1. MTT reaksiyon şeması. ....	47
Şekil 2.2. ATP elde edilme reaksiyonu.....	49
Şekil 2.3. Apoptotik hücrelerde fosfotidil serin translokasyonu .....	52
Şekil 2.4. Kaspaz 3/7 Aktivitesinin Ölçülmesi .....	55
Şekil 2.5. Anneksin-V Boyama .....	57
Şekil 2.6. Mitokondri Membran Potansiyelinin Ölçülmesi .....	58
Şekil 2.7. DNA Hasarının ( $\gamma$ -H2AX) Ölçülmesi (Anonim 2013d). ....	60
Şekil 2.8. Oksidatif Stres Miktarının (ROS) Ölçülmesi .....	62
Şekil 2.9. LC-3 miktarının belirlenmesi .....	64
Şekil 2.10. PI3K/AKT sinyal yolağı.....	65
Şekil 2.11. p-Akt (Ser473) düzeyinin ölçülmesi.....	66
Şekil 2.12. Western Blot Aşamalarının Şematik Gösterimi .....	69
Şekil 3.1. PC-3 ve LNCaP hücre soylarının faz görüntüleri.....	75
Şekil 3.2. Pd (II) bileşiği uygulanan LNCaP (A), PC-3 (B) ve PNT1A (C) hücre soylarının canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. ....	77
Şekil 3.3. Otofaji inhibitörleri uygulanan LNCaP (A), PC-3 (B) ve PNT1A (C) hücre soylarının canlılık yüzdelerinin grafiği .....	81
Şekil 3.4. Rapamisin'in (0,3-20 $\mu$ M) LNCaP (A) ve PC-3 (B) insan prostat kanseri hücrelerinin canlılığa etkisinin doza bağlı olarak değişimi.....	82
Şekil 3.5. Pd(II) bileşiği, Klorokin, 3-MA ve inhibitörlerin Pd (II) bileşiği ile kombinasyon tedavisi sonucu LNCaP (A) ve PC-3 (B) hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği .....	86
Şekil 3.6. Pd (II) bileşiği, Klorokin, 3-MA ve inhibitörlerin Pd (II) bileşiği ile kombinasyon tedavisi sonucu LNCaP (A) ve PC-3 (B) hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği. ....	87

<b>Şekil 3.7.</b> Pd (II) bileşiği, Klorokin, 3-MA ve inhibitörlerin Pd (II) bileşiği ile kombinasyon tedavisi sonucu PNT1A hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği.....	88
<b>Şekil 3.8.</b> Pd (II) bileşiği, Klorokin, 3-MA ve inhibitörlerin Pd (II) bileşiği ile kombinasyon LNCaP hücrelerinde 12 saatlik tedavi sonrası floresan mikroskop görüntüleri.....	90
<b>Şekil 3.9.</b> Pd (II) bileşiği, Klorokin, 3-MA ve inhibitörlerin Pd (II) bileşiği ile kombinasyon LNCaP hücrelerinde 24 saatlik tedavi sonrası floresan mikroskop görüntüleri.....	91
<b>Şekil 3.10.</b> Pd (II) bileşiği, Klorokin, 3-MA ve inhibitörlerin Pd (II) bileşiği ile kombinasyon PC-3 hücrelerinde 12 saatlik tedavi sonrası floresan mikroskop görüntüleri.....	93
<b>Şekil 3.11.</b> Pd (II) bileşiği, Klorokin, 3-MA ve inhibitörlerin Pd (II) bileşiği ile kombinasyon PC-3 hücrelerinde 24 saatlik tedavi sonrası floresan mikroskop görüntüleri.....	94
<b>Şekil 3.12.</b> LNCaP ve PC-3 hücre soyları ile yapılan çalışmanın M30-Antijen standart eğri grafiği.....	95
<b>Şekil 3.13.</b> Pd(II) bileşiği, Klorokin, 3-MA ve inhibitörlerin Pd (II) bileşiği ile kombinasyon tedavilerinin 48 saatte LNCaP (A) ve PC-3 (B) hücre soylarında M30 seviyeleri üzerine etkisi.....	96
<b>Şekil 3.14.</b> Klorokin (5µM) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5 µM) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramları.....	98
<b>Şekil 3.15.</b> Klorokin (5µM) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve klorokin kombinasyonunun PC-3 prostat kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramları.....	99
<b>Şekil 3.16.</b> Pan-kaspaz inhibitörü ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5 µM) ve klorokin (5 µM) kombinasyonunun LNCaP (A) ve PC-3 (B) prostat kanseri hücrelerinde canlılık yüzdelerinin grafiği.....	101
<b>Şekil 3.17.</b> Klorokin (5 µM) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP prostat kanseri hücrelerinde Anneksin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramları.....	102
<b>Şekil 3.18.</b> Klorokin (5µM) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12.5µM) ve klorokin kombinasyonunun PC-3 prostat kanseri hücrelerinde Anneksin- V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramları.....	104
<b>Şekil 3.19.</b> Klorokin (5µM) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12.5µM) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP (A) ve PC-3 (B) prostat kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyel değişimi yüzde değerlerinin 12 saatlik histogramları.....	105
<b>Şekil 3.20.</b> Klorokin (5 µM) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5 µM) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP prostat kanseri hücrelerinde p-γH2AX yüzde değerlerinin 24 saatlik histogramı.....	106
<b>Şekil 3.21.</b> Klorokin (5 µM) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5 µM) ve klorokin kombinasyonunun PC-3 prostat kanseri hücrelerinde p-γH2AX yüzde	

değerlerinin 24 saatlik histogramı (Q1= $\gamma$ H2AX, Q2= p- $\gamma$ H2AX, Q3= $\gamma$ H2AX eksprese etmeyen).....	107
<b>Şekil 3.22.</b> Klorokin (5 $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5 $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP (A) ve PC-3 (B) prostat kanseri hücrelerinde ROS yüzde değerlerinin 24 saatlik histogramı. ....	108
<b>Şekil 3.23.</b> ROS süpürücüsü olarak bilinen N-asetil-L-sistein (NAC) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5 $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun PC-3 prostat kanseri hücrelerinde canlılık yüzdelerinin grafiği.....	109
<b>Şekil 3.24.</b> Klorokin (5 $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5 $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP (A) ve PC-3 (B) insan prostat kanseri hücrelerinde LC3-II ifadesinin 24 saatlik histogramı. ....	110
<b>Şekil 3.25.</b> Klorokin (5 $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5 $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP prostat kanseri hücrelerinde p-AKT yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramı (Q1=AKT, Q2=p-AKT, Q3=AKT eksprese etmeyen) .....	111
<b>Şekil 3.26.</b> Klorokin (5 $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5 $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP prostat kanseri hücrelerinde p-AKT yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramı (Q1=AKT, Q2=p-AKT, Q3=AKT eksprese etmeyen) .....	112
<b>Şekil 3.27.</b> Klorokin (5 $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5 $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP prostat kanseri hücrelerinde akridin boyama sonuçlarının 48 saatlik floresan mikroskop görüntüleri.....	113
<b>Şekil 3.28.</b> Klorokin (5 $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5 $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun PC-3 prostat kanseri hücrelerinde akridin boyama sonuçlarının 48 saatlik floresan mikroskop görüntüleri.....	114
<b>Şekil 3.29.</b> Klorokin (5 $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5 $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP ve PC-3 prostat kanseri hücrelerinde lumineks yöntemi ile CREB (A), p70s6K (B) ve p38 (C) protein seviyeleri.....	116
<b>Şekil 3.30.</b> LNCaP prostat kanseri hücrelerinde, klorokin (5 $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5 $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun 24 ve 48 saat sonrasında Atg5, p62, Beclin1 (BECN1), LC3-I ve LC3-II protein ekspresyonlarının Western blot yöntemiyle alınan sonuçları.....	117
<b>Şekil 3.31.</b> LNCaP prostat kanseri hücrelerinde, klorokin (5 $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5 $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun 24 ve 48 saat sonrasında RIP, P-JNK, P-c-JUN, Pro-kaspaz 8, Fas, Pro-kaspaz 3, PARP ve kırılmış PARP protein ekspresyonlarının Western blot yöntemiyle alınan sonuçları.....	118
<b>Şekil 3.32.</b> PC-3 prostat kanseri hücrelerinde, klorokin (5 $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5 $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun 24 ve 48 saat sonrasında Atg5, p62, Beclin1 (BECN1), LC3-I ve LC3-II protein ekspresyonlarının Western blot yöntemiyle alınan sonuçları .....	119
<b>Şekil 3.33.</b> PC-3 prostat kanseri hücrelerinde, klorokin (5 $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5 $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun 24 ve 48 saat sonrasında RIP, P-JNK, P-c-JUN, Pro-kaspaz 8, Fas, Pro-kaspaz 3, PARP ve kırılmış PARP protein ekspresyonlarının Western blot yöntemiyle alınan sonuçları .....	120

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Pd (II) bileşiği uygulanan hücre soylarında MTT canlılık testi sonuçlarına göre 48 saat tedavi süresindeki IC <sub>50</sub> ve IC <sub>90</sub> değerleri.....	77





## GİRİŞ

Günümüzde, mevcut ilaçlar ile kanser kemoterapisi yetersiz kalmakta ve birçok kanser türünde tam bir tedavi sağlanamamaktadır. Bu nedenle kanseri önleyici yeni ilaç geliştirme çalışmaları heyecan ve umut vaat eden bir alan olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yeni yaklaşımlar, kanser tedavisinin gelişmesi, yeni hedeflerin ve yaklaşımların çoğalması için yeni bir kapı açmıştır.

Prostat kanseri tedavilerindeki temel amaç sağ kalımı uzatmak ve hastaların sağlığı için yüksek yan etki oranlarını en aza indirmektir. Bu durum nedeniyle yeni kemoterapötik ajanlar ve hedefe yönelik tedaviler büyük bir merak ve araştırma konusu haline gelmektedir. Çeşitli kemoterapi tedavilerinin hormon dirençli prostat kanserinde sağ kalıma etkisinin gösterilmesiyle bir çok yeni kemoterapötik ajanın tek başlarına veya kombine olarak kullanımları araştırılmaya başlanmıştır.

Son yıllarda kanser tedavisinde kullanılan metal bileşiklerin çeşitli kanser türlerine karşı umut verici etkilerinden dolayı ilaç olarak kullanımı yaygınlaşmıştır (Abu-Surrah ve ark. 2008, Ferraz ve ark. 2009, Garoufis ve ark. 2009, Ulukaya ve ark. 2011b). Platin (Pt) ve palladyum (Pd) gibi metal bileşiği içeren antikanser ajanların DNA'da iplikler arası çapraz bağların, DNA adductlarının oluşumuna yol açarak sitotoksik ve apoptotik aktiviteyi modüle ettiği bildirilmektedir (Zhu ve ark. 2009). Bu metal bileşiklerden olan Pd; antifungal, antiviral, antitümör ve antibakteriyal etkilere sahiptir. Bu yapıdaki kimyasalların suda kolay çözünebilmeleri, membranlardan kolayca geçip ve hücre içerisine DNA'ya bağlanabilmeleri, ayrıca yan etkilerinin daha az olması tercih edilmelerine neden olmaktadır (Abu-Surrah ve ark. 2008). Yapılan çalışmalarda Pd (II) bileşiklerinin kanser hücrelerinde hücre ölümünü arttırarak apoptozise neden oldukları gösterilmiştir (Keter ve ark. 2008, Miklasova ve ark. 2009, Guney ve ark. 2011b, Ferraz ve ark. 2011). Pd (II) bileşiklerinin bu sitotoksik etkiyi DNA'da yüksek düzeyde hasarlar oluşturarak yaptıkları da belirtilmiştir (Miklasova ve ark. 2009).

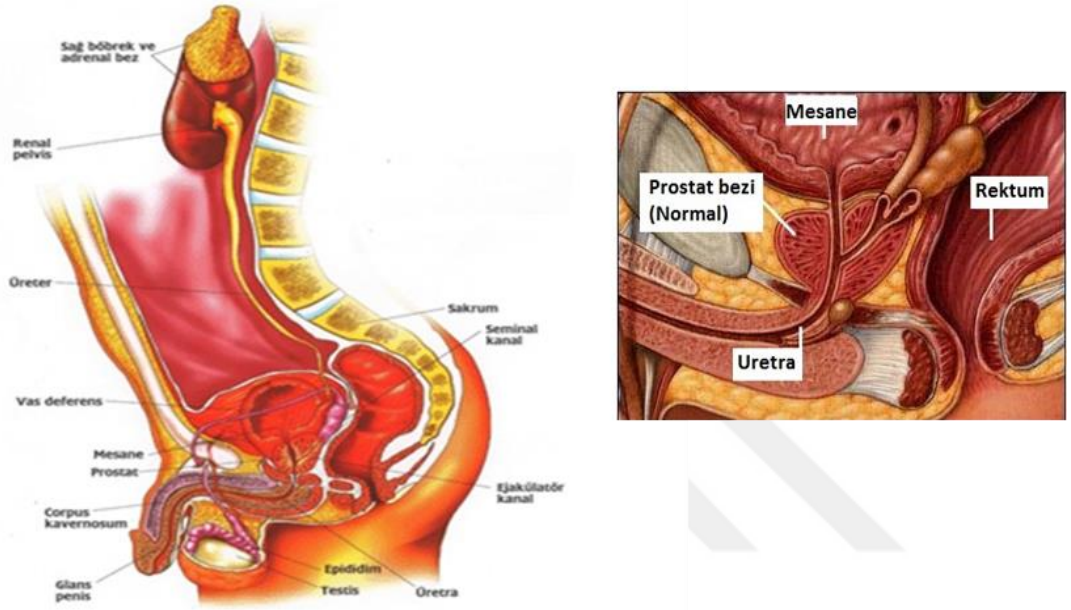
Otofajinin genellikle hücrenin hayatta kalımı ile ilgili bir mekanizma olduğu düşünülse de son yıllardaki çalışmalar otofajinin, hücre hayatta kalımı ve ölümü arasındaki karmaşık dengede önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Prostat kanseri hücreleri üzerinde yapılan araştırmalar otofajinin genellikle bir hayatta kalma mekanizması olarak rol aldığını göstermektedir (Hallgren ve ark. 2008). Otofaji tetikleyici veya inhibitörlerinin kemoterapötik ajanlarla birlikte kombine edildiği durumlarda kanser

tedavisinde daha etkili bir yaklaşımın gerekleştigi yapılan çalışmalarla gsterilmiştir (Bauvy ve ark. 2001, Cao ve ark. 2006, Herman- Antosiewicz ve ark. 2006, Li ve ark. 2009). HT-29 kolon kanser hücre soylarında otofaji inhibitörü olan 3-Metiladenin (3-MA)'nin 5-Florourasil (5-FU)'in tek başına olan etkisini arttırarak hücreleri apoptoza teşvik ettiği gsterilmiştir (Li ve ark. 2009). Başka bir çalışmada kolorektal kanser hücrelerinde otofaji inhibitör kullanımı ya da önemli otofaji proteinlerinin (BECN1, Atg5) susturulması ile oksaliptatinin sitotoksik aktivitesinin arttığı gzelelenmiştir (Selvakumaran ve ark. 2013). Metastatik prostat kanser hücrelerinde tirozin kinaz inhibitörlerini etkilerinin otofaji inhibitörü kullanılarak ya da genetik olarak önemli otofaji proteinlerin baskılanması ile arttığı bulunmuştur (Wu ve ark. 2010). Enzalutamid dirençli prostat kanser hücrelerinde otofajinin bloke edilmesinin hücre canlılığını azalttığı ve apoptotik hücre ölümüne neden olduğu gürölmüştür (Nguyen ve ark. 2014). Elde edilen bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasında, Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Faköltesi Kimya Bölümü Anorganik Araştırma Grubu tarafından sentezlenmiş Palladyum (II) bileşiğinin  $[[Pd(bpma)(barb)]Cl.H_2O]$  otofaji inhibitörleri ile olan kombinasyonunun LNCaP ve PC-3 insan prostat kanseri ve PNT1A sağlıklı prostat hücre soyları üzerindeki olası sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır.

## 1. KAYNAK ÖZETLERİ

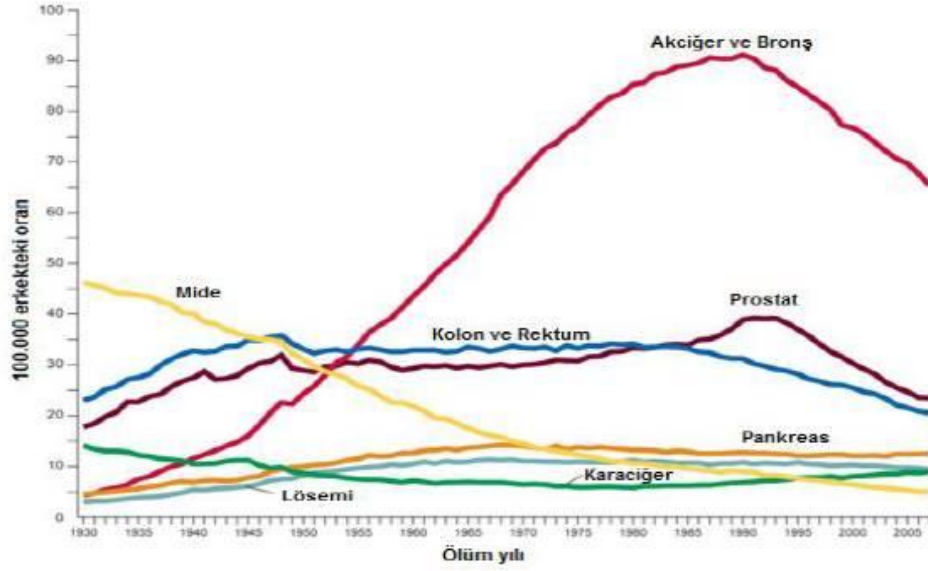
### 1.1. Prostat Kanseri

Prostat, erkeklerde mesanenin hemen alt kısmında bulunan 18-20 gr ağırlığındaki küçük bir salgı bezidir. Erkek üretrasını saran ve mesane boynu ile devam eden prostat bezi, 2.5 cm uzunluğunda, sıkıştırılmış ve ters yüz edilmiş konik bir yapıdadır (Şekil 1.1) (Anafarta 2007). Prostatın temel işlevi semen üretimine yardımcı olmaktır.



**Şekil 1.1.** Prostat bezinin şematik görüntüsü (Anonim 2016b).

Prostat kanseri ise, prostat bezindeki hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozularak, organ hacminin malign (kötü huylu) büyümesi olarak tanımlanabilir. Erkeklerin sağlığını önemli derecede etkileyen prostat kanseri dünyada görülen en yaygın altıncı kanser türüdür. Prostat kanseri insidansı yaş ile artabilen ve erkekler arasında akciğer kanserinden sonra kansere bağlı ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır (Şekil 1.2) (Gronberg 2003, Nahleh 2006). Türkiye’de sağlıklı bir istatistik sonucu bulunmama ile birlikte Sağlık Bakanlığı’nın yaptığı araştırmaya göre prostat kanserinin ülkemizde görülme sıklığı 6-7. Sıradadır (Kaygusuz ve ark. 2007).



**Şekil 1.2.** Erkekler arasında yıla bağlı kanser ölüm oranları, Amerika Birleşik Devletleri, 1930-2007 (Desantis ve ark. 2011).

Prostat kanseri pek çok tip göstermektedir. Bunlar; adenokarsinoma, musinöz adenokarsinoma, prostatik duktal adenokarsinoma, saf küçük hücreli adenokarsinoma, skuamoz ve adenoskuamoz kanserler, sarkomatid karsinoma (karsinosarkom), transizyonel hücreli kanserler, malign mezenşimal tümörler, prostatik epitelyal neoplazi (PIN), atipik küçük asiner proliferasyon (ASAP)'dır. Bunlardan en sık görüleni %98 görülme sıklığı ile adenokarsinomlardır (Baltacı 2007).

Epidemiyolojik gözlemlere dayanarak prostat kanserinde en azından 3 etiyolojik faktörden söz edilmektedir. Bunlar;

- Hormonal etkiler,
- Diyet ve çevresel faktörler,
- Genetik faktörler.

Prostat kanserinin neden ortaya çıktığı kesin olarak bilinmemekle beraber erkeklerde ileri yaşlarda görülen bir hastalık olup 40 yaşın altında nadiren görülmektedir. Yaş arttıkça prostat kanseri gelişme riski artmakta, % 85'i 65 yaşın üzerindeki erkeklerde saptanmaktadır. Prostat kanserinin küresel insidansına bakılacak olunursa siyah ırklarda beyaz ırklara göre prostat kanseri görülme olasılığı daha yüksektir (Dirican 2005). Sigara ve alkol kullanımının prostat kanseri üzerindeki etkisi açısından tam bir görüş birliği bulunmamaktadır. Ancak sigaranın tüm kanserler ile doğrudan %80 oranında

ilişkinin olduğu bilinmektedir. Bu konu ile ilgili pozitif ve negatif etkilerini bildiren prospektif çalışmalar bulunmaktadır (Reiter ve Dekernion 2005).

Fazla alkol tüketiminin testosteron düzeyini azalttığı bilinmektedir. Bu yüzden alkolün prostat kanseri riskini azaltabileceği öne sürülmektedir (Breslow ve ark. 1999).

Prostat kanseri hücrelerinin çoğu hormonlara karşı duyarlıdır ve erkek hormonlarının bulunduğu ortamda hızla çoğalır. 2004 yılında sıçanlarda yapılan bir çalışmada testosteron hormonun kanser oluşumunu teşvik ettiği de gösterilmiştir (Emil ve ark. 2004).

### **1.1.1. Hormonal Etkiler**

#### **1.1.1.1. Androjen**

Prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesi androjenler tarafından etkilenmektedir. Androjenler; testosteron, androstenedion, dihidrotestosteron (DHT), dehidroepiandrosteron (DHEA) gibi erkek cinsiyet hormon topluluğudur (Jonsson ve ark. 2009).

Testosteron (T), testislerden sentezlendikten sonra pasif difüzyon yolu ile hedef doku hücresine girer. Hücre içindeki testosteron, steroid  $5\alpha$ -redüktaz enzimi ile ya DHT'ye dönüşür ya da ekstradiole aromatize olur. Ortamdaki testosteron ve DHT hücre çekirdeğindeki transkripsiyon düzenleyici faktörlerinden steroid-tiroid-retinoid ailesinin üyesi olan reseptöre bağlanmak için bir yarışa girerler ve bunların reseptöre olan ilgisi aynıdır. Bu reseptör hormon kompleksi genin düzenleyici bölgesine bağlanarak transkripsiyonun düzenlenmesini sağlamaktadır. Testosteron ve DHT aynı reseptöre bağlanmasına rağmen bunların fizyolojik etkileri farklıdır (Miyamoto ve ark.1993).

Yapılan bir araştırmada, Afroamerikalılarda prostat kanseri insidansının yüksek olmasının, dolaşımdaki androjen seviyesi ile ilişkili olduğunu ileri sürülmüştür Ayrıca genç Afroamerikalıların Japon erkeklere göre  $3\alpha$ ,  $17\beta$ - androstenoidol glukuronide ve androstenidol glukuronide (A-diol-g) gibi androjen metabolitlerinin serumda daha yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir. Bu metabolitlerin, testosteronun  $5\alpha$ -redüktaz ile dihidrotestosteron (DHT)'a dönüşüm düzeyini yansıttığını inanılır ve total testosterona göre intraprostatik androjen aktivitesini göstermede daha iyi bir markır olabilecekleri düşünülmektedir (Ross ve ark. 1986).

Prostat kanseri riskinin yüksek androjen seviyesi ile ilişkili olup olmadığı hakkında çok sayıda çalışma yapılmıştır. Prostat kanser riski ile androjen seviyeleri üzerine prospektif

çalışmalar düzenlemiş ve testosteron, seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG) ya da 5 $\alpha$ -redüktaz ile prostat kanseri arasında bir ilişki bulunamamıştır (Barrett-Cannor ve ark. 1990, Guess ve ark. 1997). Bunun aksine, Gann ve ark. (1996), çalışmalarında testosteron seviyesindeki artış ile prostat kanserinde anlamlı bir artış gözlemlemişlerdir. Ayrıca bu araştırmacılar, prostat kanser riski ile SHBG arasında ciddi bir ters ilişki bulmuşlardır. Yine aynı çalışmacılar testosteron/DHT oranı ve androstenodiol glukuronide düzeyleri ile artmış 5 $\alpha$ -redüktaz aktivitesine sahip erkeklerde, prostat kanseri riskinde ciddi bir artış eğilimi olduğunu bildirilmişlerdir. Prostat kanserinin hormonal habercileri hakkında önceden yayınlanmış çalışmaların meta-analizi, total testosteron seviyesinin yüksek olduğu erkeklerde prostat kanseri gelişme olasılığının 2.34 misli yüksek olduğu sonucunu ortaya koymaktadır (Reiter ve Dekernion 2005). Fakat androjen ve androjen metabolitlerinin prostat kanser riskine katkısının derecesi halen tartışmalıdır. Bu çalışmalar, çok sayıda teknik ve teorik sorulardan etkilenmektedir. Birincil olarak, tüm androjen düzeyinin ölçümü, dolaşımda olan testosteron düzeyindeki ciddi değişikliklerle etkilenmektedir. İkincil olarak, prostatın karşı karşıya kaldığı androjen hormonların güvenilir şekilde ölçülmesi güçtür. Üçüncül olarak, bir erkeğin hayatı boyunca androjenlere erken ya da geç maruz kalmasının kritik olup olmadığı ya da konsantrasyonunda zamanla oluşan değişikliklerin önemi bilinmemektedir (Reiter ve Dekernion 2005). Prehn (1999) yaptığı çalışmada prostat kanserinin, düşük androjen seviyesi nedeni ile ya da yaşlanmaya bağlı androjen seviyesinde azalma sonucu ortaya çıkabileceğini ileri sürerken diğer çalışmacılar, androjen östrojen dengesinin prostat karsinogenezi için önemli olduğunu ileri sürmüşlerdir.

#### **1.1.1.2. Prostat Spesifik Antijen (PSA)**

PSA, prostat hücreleri tarafından salgılanan 33.000 dalton molekül ağırlığında bir glikoproteindir. Bir serin proteazdır ve semenin sıvılaşmasına yardımcı olmaktadır. PSA prostat kanseri tanısında, evrelemesinde ve hastaların izleminde kullanılan en önemli tümör belirleyicisidir (Gsur ve ark. 2003). Genç yetişkinlerde, PSA'nın normal değerleri 0-4 ng/ml arasındadır. Prostat kanserinde PSA üretimi değişkendir ve farklılaşmanın derecesine bağlıdır. İyi farklılaşmış kanser dokusu daha fazla, farklılaşmamış kanser dokusunda ise daha az miktarlarda PSA üretilmektedir (Emil ve ark. 2004). PSA her ne

kadar prostat organına özelleşmiş olsa da tüm prostat epitel hücreleri, normal-hiperplastik veya infekte, PSA salgılayabilir. Bu nedenlerle, prostat kanseri ile ilgili yeni bio-belirteçlerin bulunması ve geçerliliklerinin kanıtlanması gerekmektedir.

### **1.1.2. Diyet ve Çevresel Faktörler**

50 yaş üstü erkeklerde sıklıkla karşılaşılan prostat kanseri nedenleri arasında diyet önemli bir yer tutmaktadır. Örneğin, yüksek oranda yağ alımının prostat kanseri insidansını arttırdığı düşünülmektedir. Yüksek yağ tüketimi hem in vitro hem de in vivo olarak prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu uyarabilmektedir. Clinton ve ark. (1988) prostat kanserinde, yağsız diyetin androjene bağımlı tümör hücrelerinin büyümesini azaltabileceğini göstermiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise yüksek yağ içeren diyetin prostat kanser hücrelerinin büyümesine neden olduğunu ortaya koymuştur. Fakat tüm bu çalışmalara karşın yağın kansere yol açan asıl ajan olduğu kesin değildir. Bazı çalışmalarda yüksek kalsiyum tüketiminin prostat kanseri riskinde artışla ilişkili olduğu bulunmuştur. Fakat kalsiyumun prostat kanserine nasıl yol açtığı bilinmemekle beraber, yüksek kalsiyumun, vitamin-D üretimini azaltabileceği ve böylece hücre proliferasyonunu uyarabileceği hipotezi ortaya atılmıştır (Chan ve ark. 1998). Likopen, selenyum ve E vitamininin antioksidan etkileriyle kanserde potansiyel bir negatif faktör olduklarına dair çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Schaid 2004; Gann 2002). İn vitro çalışmalarda, vitamin E'nin, prostat kanseri hücreleri üzerinde apoptotik ve antiproliferatif etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Finlandiya'da yapılan ve vitamin E'nin, sigara içenlerdeki kanser insidansına olan etkisini inceleyen bir çalışmada, plasebo (yalancı ilaç) ile karşılaştırıldığında, prostat kanseri insidansında %32 ve mortalitesinde ise %41'lik bir azalma gösterilmiştir (Heinonen ve ark. 1998).

### **1.1.3. Genetik Faktörler**

Prostat kanseri görülme sıklığını etkileyen önemli faktörlerden biri de genetik yatkınlıktır. Prostat kanserinin ailevi yatkınlığı olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Babalarında ya da erkek kardeşlerinde prostat kanseri olan erkeklerin bu kansere yakalanma risklerinin oldukça fazla olduğu, meme ya da kolon kanserine

yakalanmış olan kişilerin aile yakınlarında da prostat kanseri riskinin yine daha fazla olduğu belirlenmiştir (Gsur ve ark. 2003).

Yapılan bazı çalışmalarda, bazı ailelerde prostat kanseri vakalarının daha fazla görüldüğü bilinmektedir. Prostat kanserine neden olan kuvvetli aday gen ya da genlerin (PTEN, AKT, P53, Bcl-2, E-Kaderin) hastalığın görülmesini %63-89 oranında artırdığı tespit edilmiştir (Gsur ve ark. 2003).

## **1.2. Prostat Kanseri Tedavi Yöntemleri**

Erken evre prostat kanseri tedavisinde; cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi tedaviye yanıt veren önemli tedavi yöntemleridir. Hasta için uygun olan tedavinin seçiminde; hastanın yaşam beklentisi, başka bir hastalığa sahip olup olmadığı, tümörün karakteristiği ve hastanın yaşam kalitesi gibi etmenler başlıca önemli rol oynamaktadır. Prostat dışına invazyonu gerçekleşmiş olan kanserler de ise en öncelikli olan lokal tedavi yöntemi radyoterapidir. Tüm bunların dışında prostat kanseri tedavisinde hormonal tedavilerin önemli bir rolü bulunmaktadır. Buradaki amaç, prostat kanserini tetikleyen hormonları baskılayarak, kanser hücrelerinin çoğalmasını önlemektir. Ancak bu tedavi yönteminin bir takım dezavantajları bulunmaktadır. Bu tedaviler tek başlarına kullanıldıklarında, kanser hücreleri bunlara karşı zaman içinde direnç geliştirerek yeniden çoğalmaya başlayabilmektedir. Bu nedenle, bu tedavi yöntemi, genellikle radyoterapi öncesi ve sırasında, tümörün küçültülmesini sağlamak amacıyla, metastaz gibi durumlarda tercih edilmektedir. Hormona dirençli metastatik hastalarda kemoterapi ve hedefe yönelik tedaviler önem arz etmektedir (De Bono ve ark. 2010). Yapılan bir faz III çalışmasında dosetaksel içeren kemoterapi rejiminin sağ kalımı uzatabileceği gösterilmiştir (Tannock ve ark. 2004). Bir diğer faz II çalışmasında kapasitabin ve dosetaksel kombinasyonunun hastalarda sağ kalımı önemli ölçüde uzattığı görülmüştür (Vaishampayan ve ark. 2009). Etki mekanizması tam anlaşılmamış olsa da DNA ile interkalasyona girerek DNA'nın biyosentezini engellediği düşünülen doksorubisin ile bir alkile edici ajan olan siklofosfamid ile kombinasyonunda başarılı sonuçlar verdiği belirtilmektedir (Fornari ve ark. 1994). Etoposid, pirarubisin ve sisplatin kombinasyonlarının da PSA yanıtını %70'lere çektiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Hudes ve ark. 1995, Small ve ark. 1996). Özellikle hormon dirençli prostat kanseri



vakalarında kemoterapötik ilaçlarla yeni kombinasyonları içeren tedavi rejimleri günümüzde gittikçe önem kazanmaktadır.

### **1.3. Prostat Kanseri Moleküler Biyolojisi**

Prostat kanserli hastaların yaklaşık %10'unun genetik geçişli, %90'ından fazlasının sporadik olduğuna inanılmaktadır. Yüksek riskli bazı genlerin varlığı ile çevresel faktörler kombine edildiğinde prostat kanserine olan yatkınlık değişmektedir.

Prostat karsinogenezini ile ilişkili genetik değişiklikler, normal hücre büyümesi kontrolünü sağlayan mekanizmalardan, tümör baskılayıcı ve apoptozisi sağlayan mekanizmalara kadar geniş bir alanda etki göstermektedir.

Normal hücre yaşlanma süreci kromozomların uçlarındaki telomer bölgelerinden progresif genetik materyal kaybıyla karakterizedir. Kök hücreler telomer kısalmasını bir revers transkriptaz olan telomeraz enzimi ile önler ve kayıp telomerik üniten yerini alır. Prostat kanserlerinin çoğunun telomerazı aşırı eksprese ettiği rapor edilmiştir (Sommerfeld ve ark. 1996).

Normal metabolizma sırasında, çevresel ya da diğer etkenler sonucu oluşan reaktif oksijen türleri (örn, serbest radikaller) oldukça mutajenik ve karsinojenik olabilirler. Reaktif oksijen türleri, glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi koruyucu enzimler tarafından inaktive edilirler. Bu enzimlerden biri olan GST-pi'nin ekspresyonunun, hemen hemen tüm prostat kanseri olguların kaybolduğu bildirilmiştir. Bu kayıp yeni mutasyonların gelişmesine neden olmakta ve bu durumun kanser gelişimine neden olabilmektedir. Bu genomik değişiklik prostat kanserinde en sık görülen ve hastalığı başlatıcı olaylardan biri olarak bildirilmiştir (Reiter ve Dekernion 2005).

Fosfataz ve tensin homolog proteini (PTEN)'deki değişiklikler hem lokalize hem de metastatik prostat kanserinde saptanmıştır. İleri evre tümörlerin yaklaşık yarısında PTEN allellerinde kayıp ya da mutasyon bulunmaktadır. Bazı çalışmalar, PTEN'in, Fosfatidilinositol 3 kinaz/ Protein Kinaz B (PI3 kinaz/AKT) sinyal yolunda negatif bir düzenleyici olduğunu göstermiştir (Stambolic ve ark. 1998). PI3 kinaz, epidermal büyüme faktörü düzenleyicisi (EGFR), İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) reseptörü ve her-2/neu gibi prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesinde rol oynayan bazı büyüme faktörlerinin "downstream" hedefidir. PTEN'in normal fonksiyonu PI3 kinazı

defosforile ve inaktive etmektedir. Prostat kanserinde, PTEN'in kaybı, PI3 kinaz ve sonrasında Akt ve onun "downstream" sinyallerinin aktivasyonuna bu durumda prostat kanserinin gelişimine yol açmaktadır (Reiter ve Dekernion 2005).

MYC onkogeni kromozom 8q24'de bulunur ve prostat kanserinin ilerlemesinde yer alan genlerden biridir. Bir çok metastatik prostat kanseri tümörlerinde fazla eksprese edildiği görülmüştür (Linja ve ark. 2001).

Bcl-2 apoptozisi önleyen bir onkogendir. Bcl-2 normal prostatda kök hücreler tarafından eksprese edilir. Aynı zamanda, özellikle androjen bağımsız tümörlerde oldukça fazla eksprese edildikleri gözlemlenmiştir (Raffo ve ark 1995). Bcl-2'nin inhibisyonunun prostat kanserinin potansiyel bir tedavi şekli olması açısından da araştırılmıştır (Reiter ve Dekernion 2005).

Önemli tümör süpresör genlerden biri olan p53 kaybı veya mutasyonu lokal ileri ve metastatik tümörlerde gösterilmiştir. Prostat kanserinde p53 protein ekspresyonu ile tanımlanan p53 mutasyonu, radyoterapi gören hastalarda kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (Reiter ve Dekernion 2005). Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF), kanserler tarafından salınan en aktif proangiogenik gendir. VEGF prostat kanserlerinin çoğunda eksprese edilmektedir ve ekspresyonunda artış, tümörün klinik yaygınlığı ile korelasyon gösterir. VEGF, androjen tarafından düzenlenmektedir; bu da androjenlerin prostat kanserinin etkilemeleri açısından potansiyel bir yol olduğu belirtilmektedir (Latil ve ark. 2001). Metalloproteinazlar, prostat kanserinin invaziv bir duruma dönüşüm sürecinde hücrel matriksin parçalanmasında ve anjiogenezin uyarılmasında rol oynamaktadırlar. Reiter ve Dekernion (2005) çalışmalarında insan prostat kanseri örneklerinde birçok metalloproteinaz tipinin aşırı eksprese edildiğini saptamışlardır. Adhezyon moleküllerinden biri olan E-kaderin ekspresyonu, özellikle kötü diferansiye tümörlerde olmak üzere prostat kanserlerinin ciddi bir bölümünde azalmıştır. Metastatik prostat kanserinde E-kaderin ekspresyonunun düzeltilmesi, tümör oluşumunun engellenmesi ile ilişkili bulunmuştur (Reiter ve Dekernion 2005)

#### **1.4. Apoptozis**

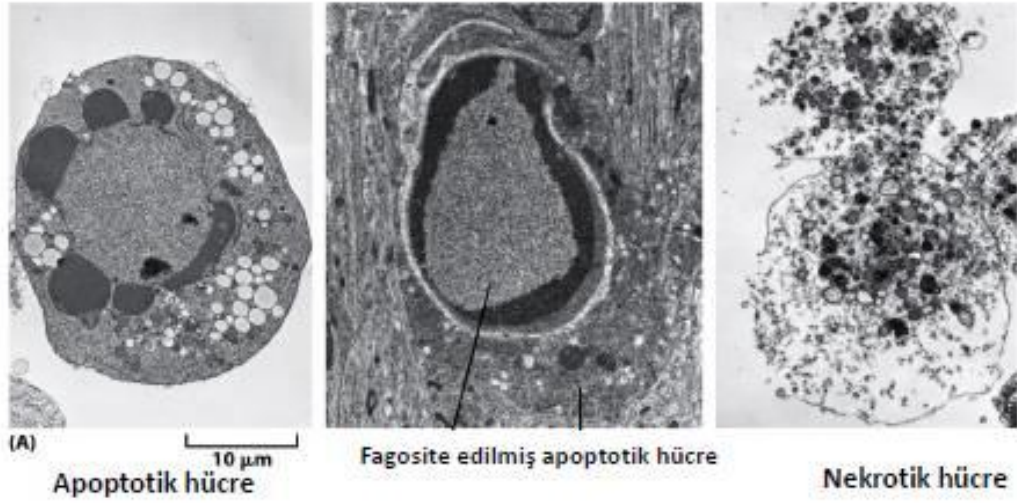
Ökaryotik organizma hücreleri doğarlar, belirli bir süre yaşamlarına devam ederler ve daha sonra ölürler (Bowen 1988). Bu yaşam süresi hücre tipine göre değişim göstermektedir. Örneğin, bağırsak hücreleri 3-5 günlük bir yaşam süresinden sonra

ölürlerken, deri hücreleri 20-25 günlük bir süreden sonra ölmektedirler. Bunun aksine, miyokard kası hücreleri veya nöronlar ömür boyunca yaşarlar. Nöronların ölmesi ancak sinapsların tam olarak oluşmadığı dönemden önce olur ve doğumda aşırı sayıda görülen nöronların sayısı uygun sinaptik ağına sağlanabilmesi için azalır. Bahsedilen bu hücre ölümleri apoptozisle gerçekleşir. Apoptozis terimi ilk olarak 1972'de nekrozdan farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli için tanımlanmıştır ve fizyolojik hücre ölümünü ifade etmektedir. Aynı zamanda zamanı gelince ölen hücreler daha önceden programlanmış bir şekilde öldüklerinden dolayı, apoptozis programlı hücre ölümü olarak da adlandırılır. Eski bir Yunan terimi olan apoptozis, kelime anlamı olarak da yaprakların ağaçtan, petallerin çiçekten doğal olarak düşmesi anlamına gelmektedir (Kerr ve ark. 1972).

Her saniye yaklaşık bir milyon hücre apoptozisle vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Bunların yerine yenileri yapılmaktadır. Yapım (mitozis) ile yıkım (apoptozis) arasında kontrollü bir denge vardır. İşte bu dengenin apoptozisin lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patogenezinde katkıda bulunmaktadır. Apoptozisin gereksiz yere oluştuğu veya hızlandığı hastalıklara örnek olarak AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı tip 2 diyabet, hepatit C enfeksiyonu, miyokard enfarktüsü, ateroskleroz gibi hastalıklar verilebilirken apoptozisin yavaşladığı hastalıklara örnek olarak ise otoimmün hastalıklar ve kanser verilebilir (Fadell ve ark. 1999, Evan ve Vousden 2001, Gewis 2003).

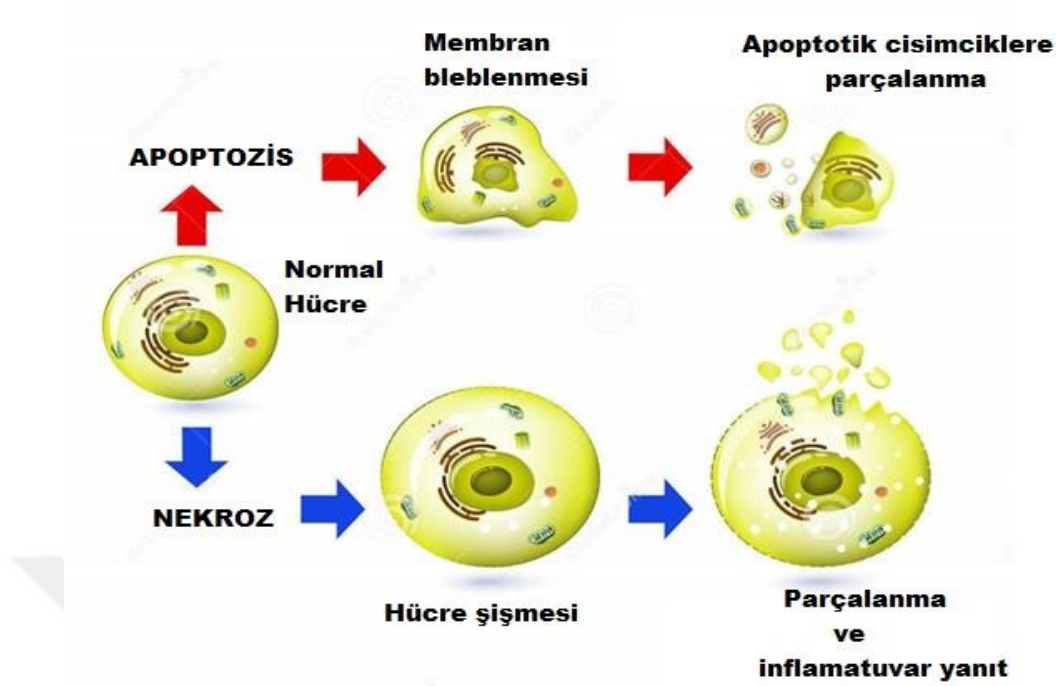
#### **1.4.1. Apoptozis-Nekrozis**

Apoptozis nekrozisden farklı bir ölüm şekli olup morfolojik olarak özgündür (Şekil 1.3). Nekrozis fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelmektedir.



**Şekil 1.3.** Apoptotik hücre ile nekrotik hücrenin morfolojik açıdan farkı (Fuchs ve ark. 2007).

Nekrozisde hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken “cell swelling”, apoptotik hücre tam tersine küçülür “cell shrinkage”. Nekrozisde kromatin patterni hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ama apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır “chromatin aggregation” ve kondanse olur “chromatin condensation”. Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cepcikler “membran blebs” oluşur (Şekil 1.4) (Ulukaya 2003).



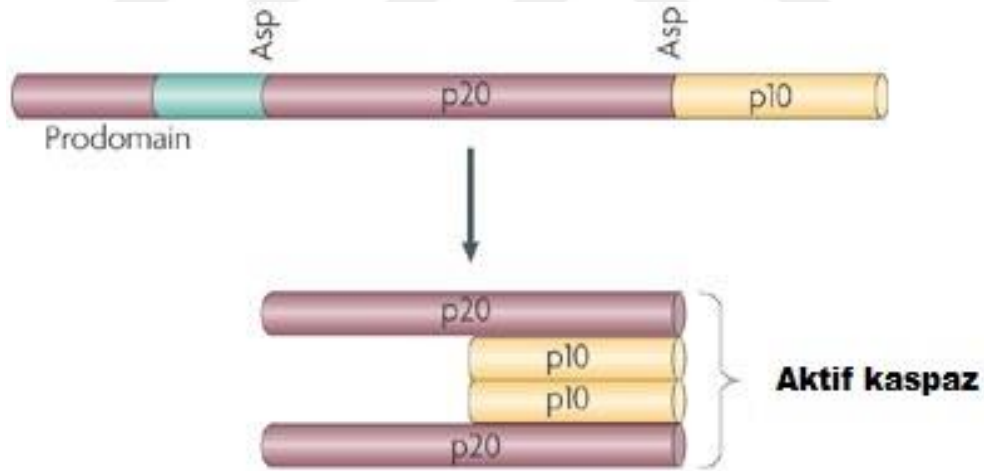
**Şekil 1.4.** Apoptozis ve Nekrozun şematik karşılaştırılması (Anonim 2016a)

Nekrotik hücreler lizise uğrarken apoptotik hücreler küçük cisimciklere “apoptotik bodies” parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır değişen miktarlarda nükleus veya diğer hücre içi yapılar içerirler. Nekrozisde hücre içeriği dış ortama salındığından dolayı inflamasyon uyarılır ama apoptozisde apoptotik hücre veya cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosit edildiklerinden inflamasyon oluşmaz. Apoptozisin en önemli özgün yönü DNA’nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının “ladder pattern” ortaya çıkmasına neden olur. Ama bu durum hücre tipine bağlı olarak değişebilir ya da sadece yaklaşık 50 kilo baz çifti (kbp) boyutunda bir DNA fragmentasyonu da görülebilir. DNA’yı parçalayan bir Ca/Mg-bağımlı endonükleazdır. Ayrıca, DNase I ve II’de DNA parçalanmasından sorumludur. Hangi parçalayıcı enzimin rol alacağı hücre tipine ya da uyarının özelliğine göre değişebilir. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin (PS)’in erken evrede membranın dış yüzüne doğru

transloke olmasıdır. Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlamaktadır (Ulukaya 2003).

#### 1.4.2. Kaspazların Apoptozis Sürecindeki Rolü

Kaspazlar, hücrede inaktif (zimojen) olarak bulunan sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağı kırarak proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Memelilerde şu ana kadar en az 14 kaspaz tanımlanmıştır. Filogenetik analiz sonucunda gen ailesinin ICE (Kaspaz-1) ile ilişkili ve Ced-3 benzeri olmak üzere iki alt grubu olduğu görülmektedir. Proenzimlerin kısa (Kaspaz 3, 6, 7) veya uzun prodomain barındırmalarına göre de kaspazları daha alt gruplara ayırmak mümkündür. Aktivasyonları ise zimojenlerin proteolitik kesimi sonucu büyük ve küçük alt birimlerin ayrılması ve “prodomain”lerin uzaklaştırılması ile olur (Şekil 1.5). Kaspazlar, substratlarında birbirini takip eden en az dört amino asit (P4–P3–P2–P1) yapısını tanırlar ve C-terminal rezidüsünden (P1) sonra kırarlar. Bu ise genellikle Asp (aspartik asit) rezidüsüdür (Fuentes-Prior ve ark. 2004, Timmer ve Salvasesen 2007).

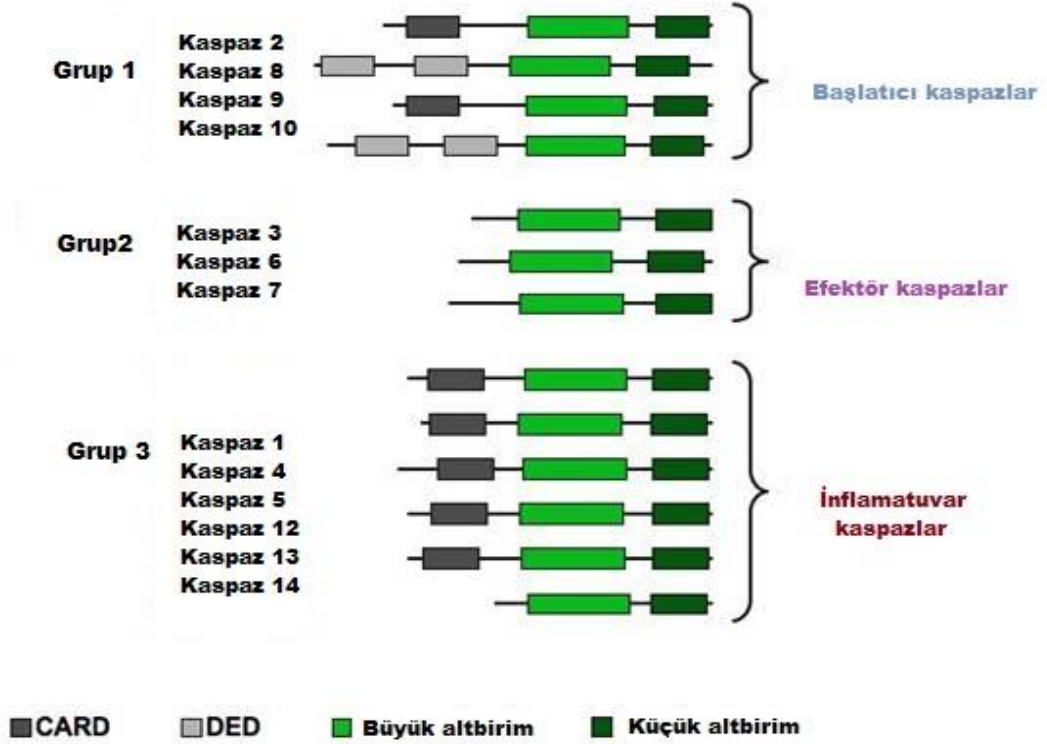


**Şekil 1.5.** Kaspazların aktifleşme mekanizması (Clarke 2009 değiştirilerek alınmıştır).

Kaspazların birçoğu apoptozis sürecinde önemli roller üstlenmektedir. Bazıları başlatıcı kaspazlar (2, 8, 9, 10) olarak bilinirken, bazıları da ilerletici (efektör) kaspazlar (3, 6, 7) olarak bilinir (Thornberry ve Lazebnik 1998 ).

Başlatıcı kaspazlar, protein-protein etkileşim motiflerini barındıran uzun bir “prodomain” içerir. Bu motifler, ya ölüm etkileyici alan (DED; “death effector

domain”) ya da kaspaz takviye alanıdır (CARD; “caspase recruitment domain”) (Şekil 1.6). Kaspazlar bu motifler sayesinde adaptör moleküllerle etkileşimlerini sağlarlar. İlerletici kaspazlar, kısa bir “prodomain” içerirler ve apoptozisin ilerlemesini sağlamak için çok çeşitli hücresel substratları kırarlar (Lamkanfi 2011).



Şekil 1.6. Başlatıcı ve efektor kaspazlar (Forro 2012 değiştirilerek alınmıştır).

Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir şelaleyi oluştururlar. Başlatıcı kaspazlar, ölüm sinyalini ilerletici kaspazlara iletirler. İlerletici kaspazların bazıları lamin, hücre içi iskelet ve çekirdek zarı proteinlerini parçalar. Kaspaz 3, DNA onarımında görevli olan PARP’ı kırarak inaktive eder ve DNA onarımını engeller. Bazıları ise bir dizi DNaz’ı aktive ederek DNA’nın parçalanmasına yol açar (Ulukaya 2001, Oliver ve Valette 2005). IAP’lar (apoptozis inhibitörleri) sitozolde bulunur ve kaspazların inaktif veya aktif formlarına bağlanarak fonksiyonlarını baskılar. Smac/DIABLO ise mitokondrinin iç zarında bulunur ve IAP bağlanma motifi içerir. Apoptozis sürecinde sitokrom-c ile beraber salınarak IAP’ları baskılar ve böylece kaspaz aktivasyonunu sağlar (Zimmermann ve ark. 2001, Zhang ve ark. 2003).

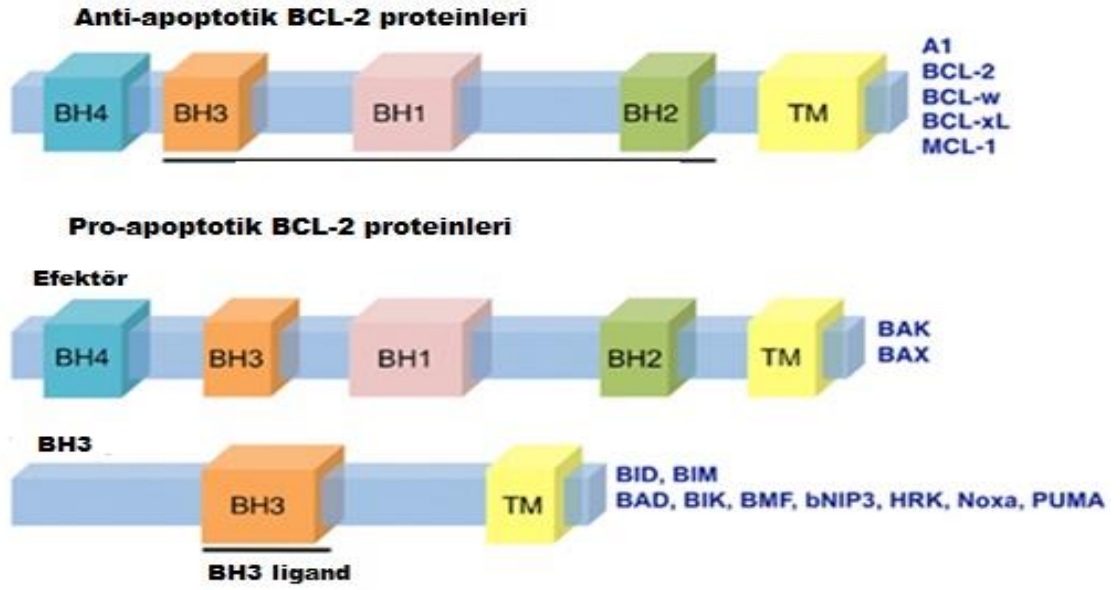
### **1.4.3. Mitokondrinin Apoptosis Sürecindeki Rolü**

Hücre ölümünün düzenlenmesinde mitokondrinin, apoptotik yolların kesiştiği önemli bir kavşak noktası olduğu görülmüştür. Bu yüzden mitokondrinin aktivasyonu (sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması) apoptotik süreçte geri dönüşümsüz noktayı gösterir (Kumar ve ark. 2005). Mitokondri, Apoptosis İndükleyici Faktör (AIF), Smac/DIABLO ve sitokrom c gibi birçok pro-apoptotik proteini içermektedir. Sitokrom c, elektron transport zincirine ve oksidatif fosforilasyona katılır. Sağlıklı hücrelerde sitokrom c, mitokondride membranlar arası boşlukta yer almaktadır (Hu 2003). Sitotoksik ilaçlar, büyüme faktörü eksikliği, reaktif oksijen türleri ve DNA hasarı gibi değişik hücrel stresler sitokrom c'nin salınmasını harekete geçirir. Sitokrom c'nin salınması, Bcl-2 ailesi üyeleri ile düzenlenir (Chang ve Yang 2000).

### **1.4.4. Bcl-2 Ailesinin Apoptosisdeki Rolü**

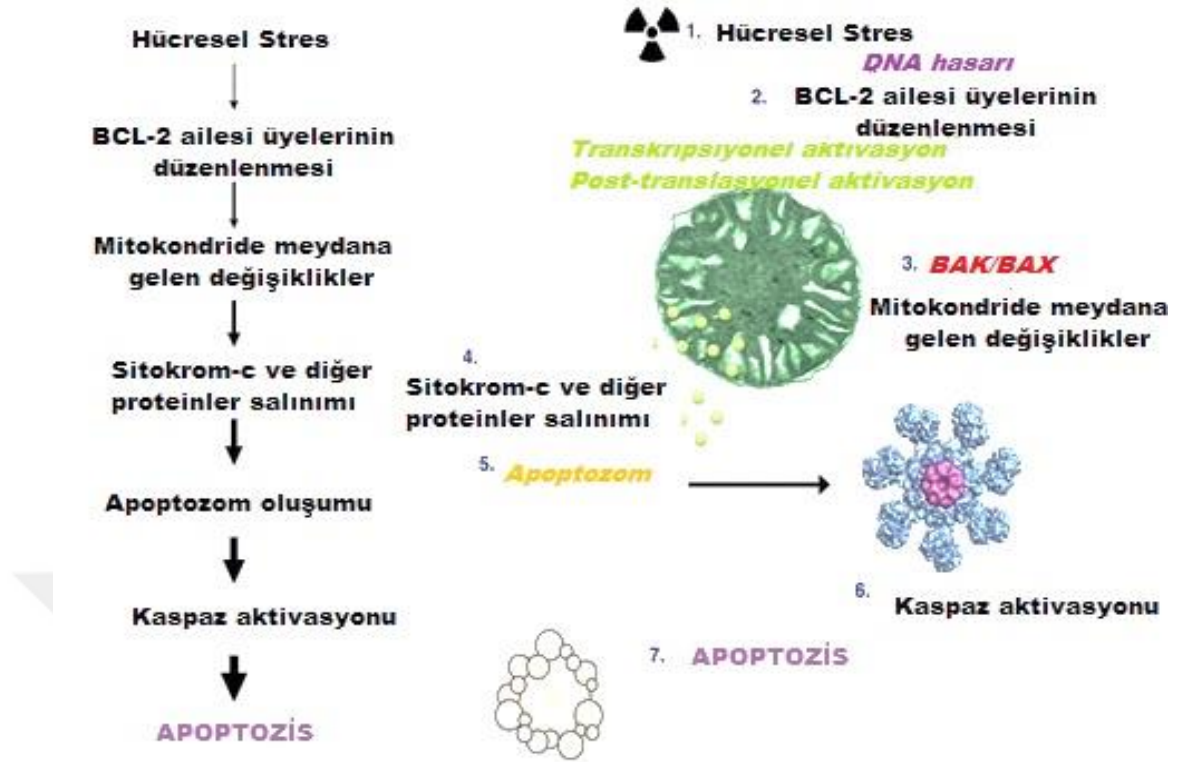
Bcl-2 ailesi, antiapoptotik ve proapoptotik üyelerden oluşan ve apoptozu düzenlemede en önemli role sahip olan onkoprotein grubudur (Altunkaynak ve Özbek 2008). Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkili iki gruptan oluşur. Bu grupların biri anti-apoptotik (Bcl-2 ve Bcl-XL gibi), diğeri ise pro-apoptotiktir (Bax, Bid gibi) (Şekil 1.7). Anti-apoptotik grup apoptozisi baskılayıcı, pro-apoptotik grup ise apoptozisi indükleyici etkiye sahiptir. Anti-apoptotik olanlar, sitokrom c'nin salınmasını engeller; pro-apoptotik olanlar ise sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasını indükler (Kumar ve ark. 2005). Hücrelerin apoptotik uyarıya hassaslığı pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri arasındaki dengeye bağlıdır (Burlacu 2003). Anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerin aşırı ekspresyonu apoptozisi baskılamak, pro-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonu apoptozise neden olur (Kumar ve ark. 2005).





**Şekil 1.7.** Apoptozisin mitokondri yolunda yer alan Bcl-2 ailesi üyeleri (Anvekar ve ark. 2011'den değiştirilerek alınmıştır).

Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki etkileşim, anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin normal fonksiyonunu bozar ve mitokondride porların oluşumuna, sitokrom c ve diğer pro-apoptotik moleküllerin zarlar arası bölgeden salınımına neden olur (Şekil 1.8). Bu da apoptozom oluşumu ve kaspaz kaskadı aktivasyonuna yol açmaktadır (Robertson ve Orrenius 2000, Fan ve ark. 2005).



**Şekil 1.8.** Apoptozom oluşumu ve kaspaz aktivasyonu (Anvekar ve ark. 2011'den değiştirilerek alınmıştır).

#### 1.4.5. Apoptozisin Mekanizmaları

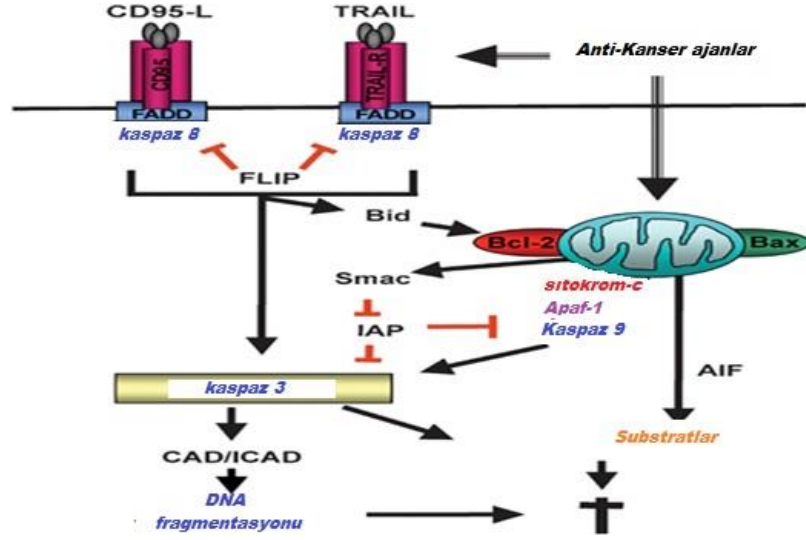
Apoptozisin aktivasyonunda üç sinyal yolunun rol aldığı bilinmektedir;

1. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile tetiklenme/ Ekstrinsik (dışsal) yolak
2. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması/İntrinsik (içsel) yolak
3. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis oluşturulması

##### 1.4.5.1. Ekstrinsik (Dışsal) Yolak

Bu yolak da, ölüm reseptörleri (DR) olarak bilinen ve Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü (TNFR) geni ailesinin üyesi olan; TNFR-1, Fas/CD95/APO-1 ve TNF-İlişkili Apoptozis İndükleyici Ligand (TRAIL) reseptörleri olan DR-3 (TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1) ve DR-5 (TRAIL-R2)'in ilgili ligandlarla etkileşime girmesi sonucunda apoptozis indüklenir. TNFR süper ailesi üyeleri, tip I transmembran proteinleri olup hepsi sistein bakımından zengin ekstrasellüler bölgeler (subdomainler) içermektedir ve bu özellik

TNFR süper ailesi üyelerinin kendilerine özgü ligandları tarafından tek tek tanınmasını sağlamaktadır. Ölüm reseptörleri ayrıca apoptotik sinyalin transdüksiyonu için gerekli olan 80 aminoasit uzunluğunda intraselüler Ölüm Bölgesi (DD) içerir. Ölüm reseptörlerine bağlanan ligandlar (FasL, TNF $\alpha$ , VE TRAIL) yapısal olarak reseptörler ile ilişkili proteinler olup TNF süper ailesine aittirler. Bu ölüm ligandları tip II transmembran proteinleri gibi eksprese edilirler. Bazı durumlarda, bu proteinler proteolitik kırılabilir ve serbest kalabilirler (Ghobrial ve ark. 2005, Guicciardi ve ark. 2009). Ölüm reseptörlerinin ligandları yani aktivatörleri reseptörlerin oligomerizasyonuna yol açarak aktifleşmelerine neden olmaktadır. Reseptörlerin aktivasyonu, Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi (DISC) denilen ve proteinlerden meydana gelen bir kompleks oluşumuna sebep olur. DISC, adaptör protein Fas ilişkili ölüm alanını (FADD) ve TNFR-1 ilişkili ölüm bölgesi proteinini (TRADD) içerir. Bu ölüm bölgeleri prokaspaz-8'i aktifleştirmektedir. DISC yapısında yer alan prokaspaz 8'in aktivasyonunu takiben kaspaz 8 sırasıyla kaspaz 3, 6 ve 7'nin aktive olduğu bir kaspaz kaskatını harekete geçirir. Kaspaz 8'in aktif hale geçmesi ayrıca Bid'in aktive olmasına neden olur. Kırılmış Bid (tBid) sonrasında mitokondriye geçer ve sitokrom c, SMAC (İkinci mitokondri türevli kaspaz aktivatörü) ve kalsiyum salınımını uyarır (Şekil 1.9) (Elmore 2007, Solakoğlu 2009, Dickens ve ark. 2012).

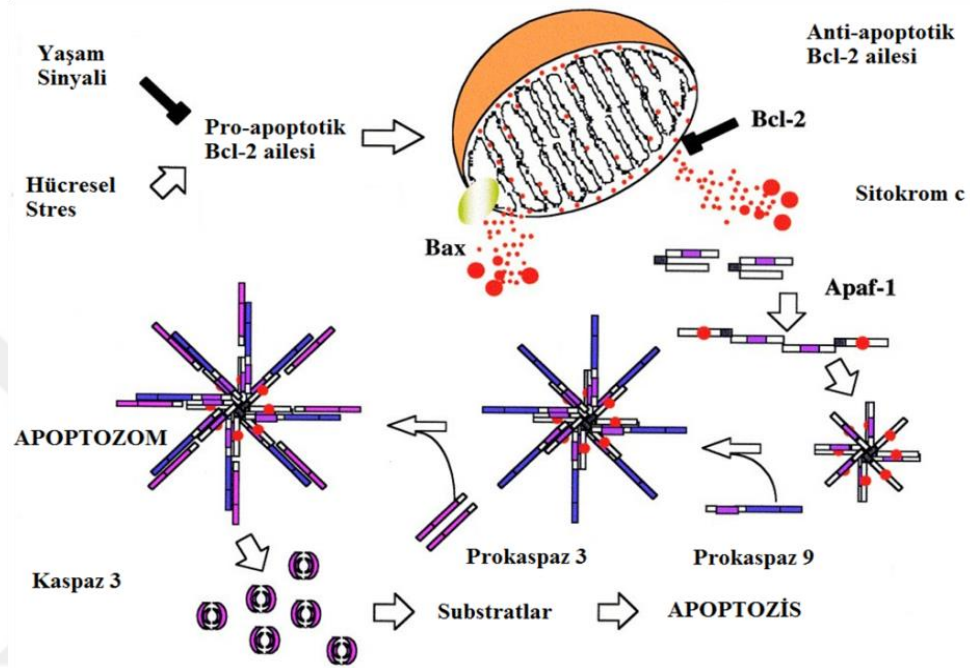


**Şekil 1.9.** Reseptör aracılı kaspaz aktivasyonu (Fulda ve Debatin 2006'dan değiştirilerek alınmıştır).

#### 1.4.5.2. İntrinsik (İçsel) Yolak

İçsel/mitokondriyal yolak, pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri olan Bcl-2/Bax gen ailesi ile düzenlenmekte olup uyarıldığında mitokondriden sitokrom-c salınımına ve böylece ölüm sinyaline sebep olur. İki yolak da (dışsal ve içsel), düzenleyici ve yapısal molekülleri kıran ve bunun sonucunda hücrenin ölümüne sebep olan kaspaz denilen proteaz kaskadının aktivasyonunu içeren ortak bir yolda birleşir (Ghobrial ve ark. 2005). Anti-apoptotik üyeler olan Bcl-2 ve Bcl-XL, kaspazların öncü formlarını durdurarak ya da apoptogenik faktörlerin mitokondriden salınımını engelleyerek hücrenin yaşamasını teşvik ederken; Bax, Bad, Bim, Bid gibi pro-apoptotik üyeler hücreyi apoptozise teşvik ederler. Normal durumda Bax ve Bak proteinleri Bcl-2 tarafından inaktif halde tutulur. Apoptotik sinyal oluştuğunda Bcl-2 inaktif hale geçerken aktifleşen Bax ve Bak mitokondri dış membranında porların oluşmasına ve zar potansiyelinde değişime neden olurlar. Mitokondriyal yolun kilit olayı mitokondri dış membran permeabilizasyonudur (MOMP) ve sonucunda; sitokrom c, mitokondri türevli kaspaz aktivatörü/IAP bağlayıcı protein Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, AIF ve endonükleaz D (EndoG) gibi mitokondri membran proteinleri sitozole salınır. Mitokondri iç membran yüzeyinden sitokrom c'nin sitozole salınması ile sitokrom c, sitoplazmik protein olan Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1 (Apaf-1)'e bağlanır ve onu aktive eder, dATP/ATP'nin de ortamda bulunması ile Apaf-1/sitokrom c

kompleksi heptamerik bir yapıya oligomerize olur. Bu yapının oluşması, prokaspaz 9'un Apaf-1 ile etkileşimini mümkün kılar ve apoptozom kompleksi oluşur (Şekil 1.10). Apoptozomun görevi, başlatıcı kaspaz olan kaspaz 9'u aktive etmektir ve aktif kaspaz 9, kaspaz-3'ü veya diğer ilerletici kaspazları aktive ederek kaspaz kaskadına aracılık eder.



**Şekil 1.10.** Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması (Zimmermann ve ark. 2001).

Aktif kaspaz 3, kaspazla aktive edilmiş DNaz inhibitörü (ICAD; “inhibitor of caspase-activated DNase”) poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP, DNA tamir enzimi), Rho ilişkili sarmal oluşturan kinaz I (ROCKI; “Rho-associated coiledcoil forming kinase I”), aktin, fodrin ve lamin gibi hüresel substratları kırarak apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlar. CAD normal hücrelerde ICAD'üne bağlı ve inaktif halde bulunur ve aktif hale geçtiğinde kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nükleozomal fragmentlere kesilmesine neden olur. Ayrıca kaspaz aktivitesini inhibe eden ve aktiviteleri Smac veya Omi/HtrA2 gibi fonksiyonel analoglar ile engellenmiş birçok IAP'lar (apoptozis inhibitörleri) vardır. Ölen hücrelerde Smac ve Omi/HtrA2 (mitokondriyel proteinler, pro-apoptotik proteinler) mitokondriden salındığında IAP'lar inaktifte olmakta ve böylece ilerletici kaspazların inhibisyonu engellenip hücrelerin apoptozise gitmeleri

sağlanmaktadır (Ulukaya 2001, Zhang ve ark. 2003, Riedl ve ark. 2007, Li ve Yuan 2008, Akşit ve Bildik 2008, Duprez ve ark. 2009).

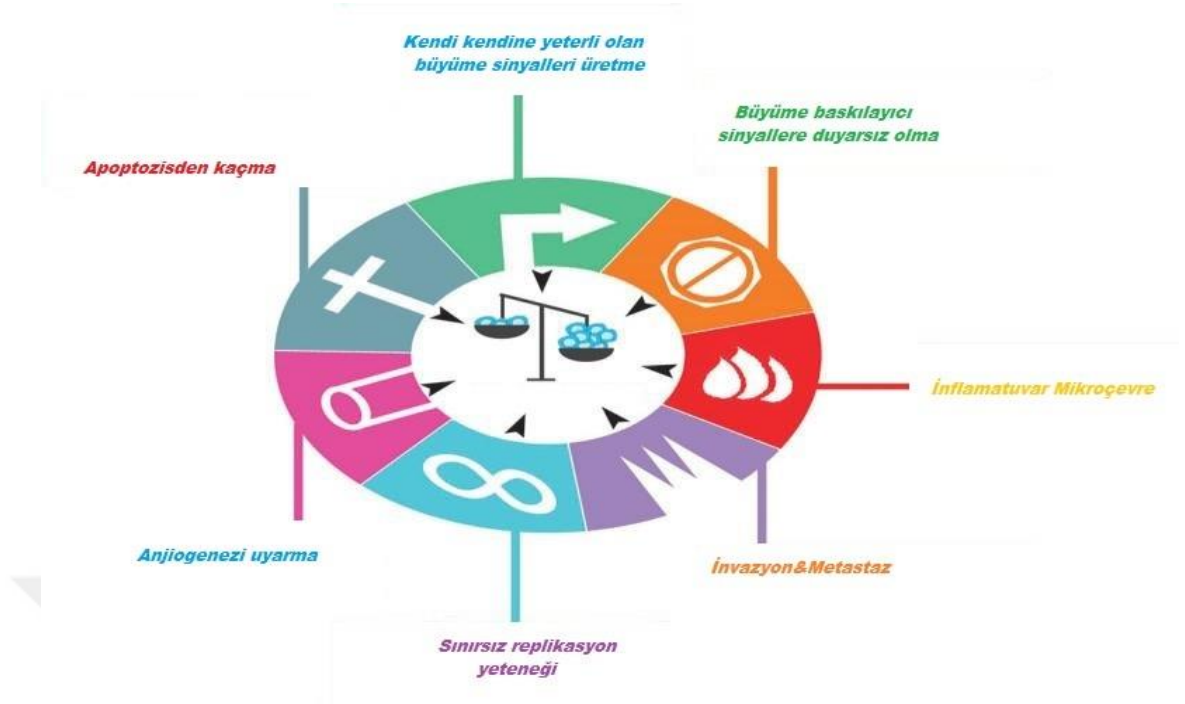
Bu içsel ve dışsal yol mekanizmaları kaspaz-bağımlı apoptozisi göstermektedir. Ayrıca kaspazlardan bağımsız olarak apoptozise neden olduğu düşünülen kaspaz aktivasyonunun gerçekleşmediği bir mekanizma da bulunmaktadır. Bu mekanizmada AIF mitokondriden salınıp nükleusa geçmekte ve nükleazları aktifleştirerek DNA hasarına yol açmaktadır. AIF, steroidler, granzyme B ve endonukleaz G kaspazlardan bağımsız olarak apoptozise neden olmaktadır (Ulukaya 2003, Dash 2007).

#### **1.4.5.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis Oluşturulması**

Son zamanlarda amiloid  $\beta$  nörotoksitesine katkıda bulunan kaspaz 12'ye bağımlı Endoplazmik Retikulum (ER) aracılı apoptotik yol tarif edilmiştir (Nakamura ve ark. 2000, Keane ve ark. 2001). Bu yol mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptör aracılı apoptozisten farklı bir yol olup kaspaz 12, ER membranında lokalize halde bulunur ve ER aracılı apoptozis için gerekli bir kaspazdır. Son çalışmalar göstermiştir ki  $Ca^{++}$  seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile prokaspaz 12 aktifleşir. Aktifleşen kaspaz 12 sitoplazmaya yönelerek kaspaz 9 ile etkileşir ve sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder (Rao ve ark. 2001).

#### **1.5. Apoptozis-Karsinogenez İlişkisi**

Karsinogenez süreci, homeostatik “feedback” mekanizmalara yanıt veren normal hücrelerin bu mekanizmaların kontrolundan çıkıp, kontrolsuz ve spontan olarak büyüeyebilen ve komşu dokulara invazyon yapabilen hücre şekillerine dönüşmelerini kapsayan süreç olarak tanımlanabilmektedir. Bu süreçte rol alan kanser hücrelerinin; kendi kendine yeterli olan büyüme sinyalleri üretme, büyüme baskılayıcı sinyallere duyarsız olma, hücre ölümüne direnç, sınırsız replikasyon potansiyeline sahip olma, anjiogenezi uyarma, invazyon ve metastazı uyarma gibi öne çıkan altı farklı biyolojik yeteneği vardır. Son yıllarda, enerji metabolizmasını yeniden programlama ve bağışıklık tahribinden kaçınma özellikleri de bu listeye eklenmiştir (Şekil 1.11) (Hanahan ve Weinberg 2011).



**Şekil 1.11.** Kanser hücresinin özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011'den değiştirilerek alınmıştır).

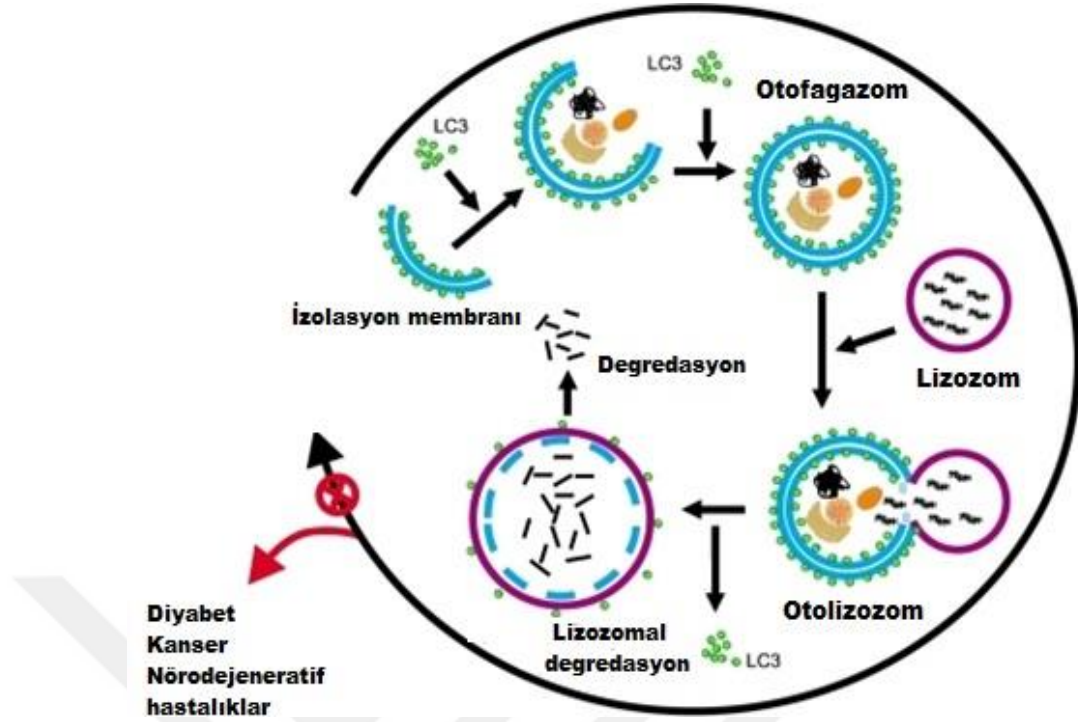
Apoptozisin gerçekleşmesi karsinogenez sürecinde kritik bir öneme sahiptir (Letai 2008). Tümör hücreleri örneğin DNA hasarına cevap olarak birçok sinyal üretir ve onkojenik aktivasyon meydana gelir ve bu durumda da apoptozis uyarılmaktadır. Bununla birlikte mutasyona uğrayan tümör hücreleri apoptotik cevaptan kaçabilir, sonuçta sağkalım olur ve hücreler çoğalırlar. Apoptozisten kaçma mutasyonların birikimine yol açar. Tümör hücreleri, normal hücrelere kıyasla birçok apoptozisi uyaran sinyal (örneğin oksidatif stres ve onkogen aktivasyonu) alır ve bu yüzden tümör hücreleri normal hücrelere oranla apoptotik cevabı tetiklemeye çok daha yatkındır. Bununla birlikte, apoptotik yol tümör hücrelerinde çoğu kez hatalıdır. Bu hatalar, tümör hücrelerine hipoksik koşullardan ve oksidatif stresten korunma sağlamış olur. Bu yüzden tümör hücrelerinde örneğin; p53'ü hedef alarak apoptotik yolun onarımı hedefleyen çalışmalar yeni kanser terapötiklerinin tasarımı açısından önemli bir değere sahiptir. Bunun yanı sıra Bcl-2'yi hedef alan yeni inhibitörlerin geliştirilmesi, PKB/Akt (Protein kinaz B) sinyalinin inhibisyonu ve fotodinamik tedavi gibi yeni stratejiler apoptozis ve hücre sağkalımının moleküler mekanizmalarının aydınlatılması kanser

tedavisinde yeni stratejilerinin gelişmesine olanak sağlamıştır (Anderson ve ark. 2016, Silva ve ark. 2016).

## **1.6. Otofaji**

Kerr, Wyllie ve Currie 1972'de yayınladıkları makalede iki farklı hücre ölüm modundan bahsederler; apoptoz, genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümü ve nekroz, programlanmamış ve kazara olan hücre ölümü (Kerr ve ark. 1972). 1990 tarihinde Clarke makalesinde doğal gelişimsel hücre ölümü ve toksin uygulanması sonrası oluşan 3 temel hücre morfolojisinden bahsetmiştir (Clarke 1990). Hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, çekirdek içinde bulunan DNA'nın bozulması ve "apoptotik cisimlerin" parçalara ayrılması özellikleriyle ayırt edilen apoptozis tip I hücre ölümü olarak tanımlamıştır. Clarke'ın tanımına göre Tip III hücre ölümü, lizozomal olmayan hücre ölüm şeklidir. Otofajik hücre ölümü Clarke tarafından tip II hücre ölümü olarak sınıflandırılmıştır. Tip II hücre ölümü otofaji, evrimsel olarak korunmuş fizyolojik bir süreç olup protein yıkımı ve organel geri dönüşümünü sağlayarak hücre içindeki homeostazinin dengede kalmasını sağlamaktadır (Ohsumi 2001). Hücre içerisinde uzun ömürlü ve kısa ömürlü proteinlerin parçalanma mekanizmaları değişmektedir; örneğin kısa ömürlü proteinler ubiquitin ile işaretlenerek parçalanırken, uzun ömürlü proteinler ve organeller lizozomlar tarafından otofaji mekanizması ile parçalanırlar, oluşan yapı taşları tekrar kullanılmak üzere hücre metabolizmasına katılır. Çeşitli hücre stres koşulları altında örneğin; açlık ve büyüme faktörü eksikliği gibi durumlarda otofaji hızlıca aktive olur ve hücreye yaşamını devam ettirebilmesi için gerekli yapıtaşlarını sağlar. Otofajik hücre ölümünde gözlenen en belirgin morfolojik değişiklik, sitoplazmada oluşan iki veya daha fazla katmanlı zarla çevrili, sitoplazma parçaları ve/veya mitokondri, endoplazmik retikulum (ER) gibi organelleri içeren veziküllerin varlığıdır. Bu veziküller lizozoma kaynaşıp, içlerinde taşıdıkları yüklerinin lizozomal enzimler tarafından parçalanmasını sağlarlar (Şekil 1.12). Bu biyolojik olay, kendini içten içe yemek anlamında, "otofaji" olarak adlandırılmıştır.



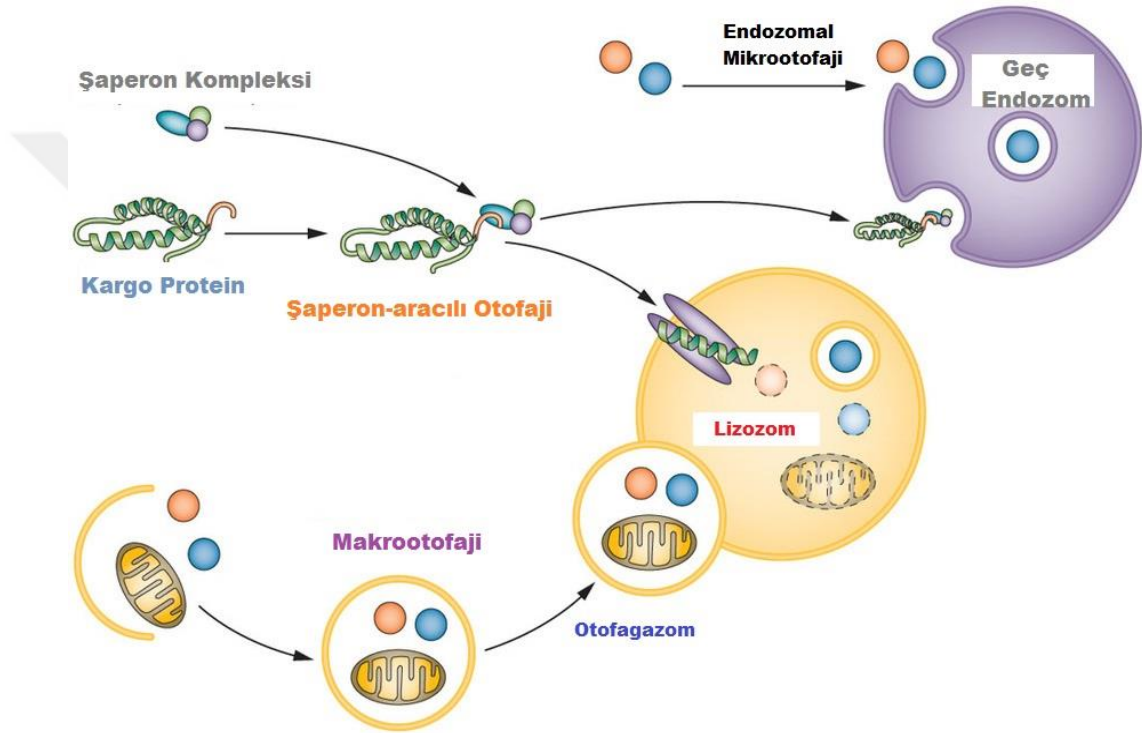


**Şekil 1.12.** Otofajinin gerçekleşme mekanizması (Rabinowitz ve White (2010) değiştirilerek alınmıştır).

Otofajik hücre ölümü, kaspaz etkinliğinden bağımsız olarak gerçekleşir ve apoptozisde gözlenen apoptotik cisim oluşumu ve DNA merdivenleri görüntüsü gözlenmemektedir. Ayrıca çekirdeğe özgü değişikliklerden olan kromatin kondensasyonu otofajik hücre ölümünde apoptozisten çok daha sonra görülmektedir (Gözüaçık ve Kimchi 2007). Otofajide ölü hücrelerin fagositoz tarafından temizlenmesi apoptozda görüldüğünden çok daha sonra ve çok daha rastgele bir biçimde olmaktadır (Gözüaçık ve Kimchi 2004).

Otofaji; makrotofaji, mikrotofaji, şaperon aracılıklı otofaji ve kanonik olmayan-alternatif (Atg5/7 bağımsız) makrotofaji şeklinde dört farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir (Klionsky ve Emr 2000). Metabolik stres sırasında aktif hale gelen şaperon aracılığı otofajide; KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) motifli proteinler, lizozomal reseptör molekülü ve lizozomal şaperonlar ile lizozom lümenine seçici olarak taşınmaktadır (Xie ve Klionsky 2007). Mikrotofaji, lizozomal zarların sitoplazmanın küçük parçalarını içlerine alarak sindirdiği hücre içi yapısal bir süreçtir. Kanonik olmayan-alternatif makrotofaji otofaji ilişkili proteinlerden olan Atg5 ve Atg7'den bağımsız olarak gerçekleşmektedir. Üzerinde en çok çalışılan ve gözlenen makrotofaji,

birçok hücrede bazal düzeyde gözlenmekte protein parçalarının ve hasar görmüş organellerin çift katlı zarlı kesecikler (otofagazom) içine hapsedilmesi bu veziküllerin lizozomla birleşmesi sonucunda lizozomal enzimlerce yıkılması ile ortaya çıkmaktadır (Kuma ve Mizushima 2010). Böylelikle hücre kendisi için gerekli olan yapıtaşlarını kullanarak enerji kaynağı olarak kullanılabilir mollekülleri sağlamaktadır (Şekil 1.13) (Gözüaçık ve Kimchi 2004).



**Şekil 1.13.** Otofaji Mekanizmaları (Makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon-aracılı otofaji (Schneider ve Cuervo 2014 değiştirilerek alınmıştır).

### 1.6.1. Otofajinin Fizyolojik ve Patolojik Görevleri

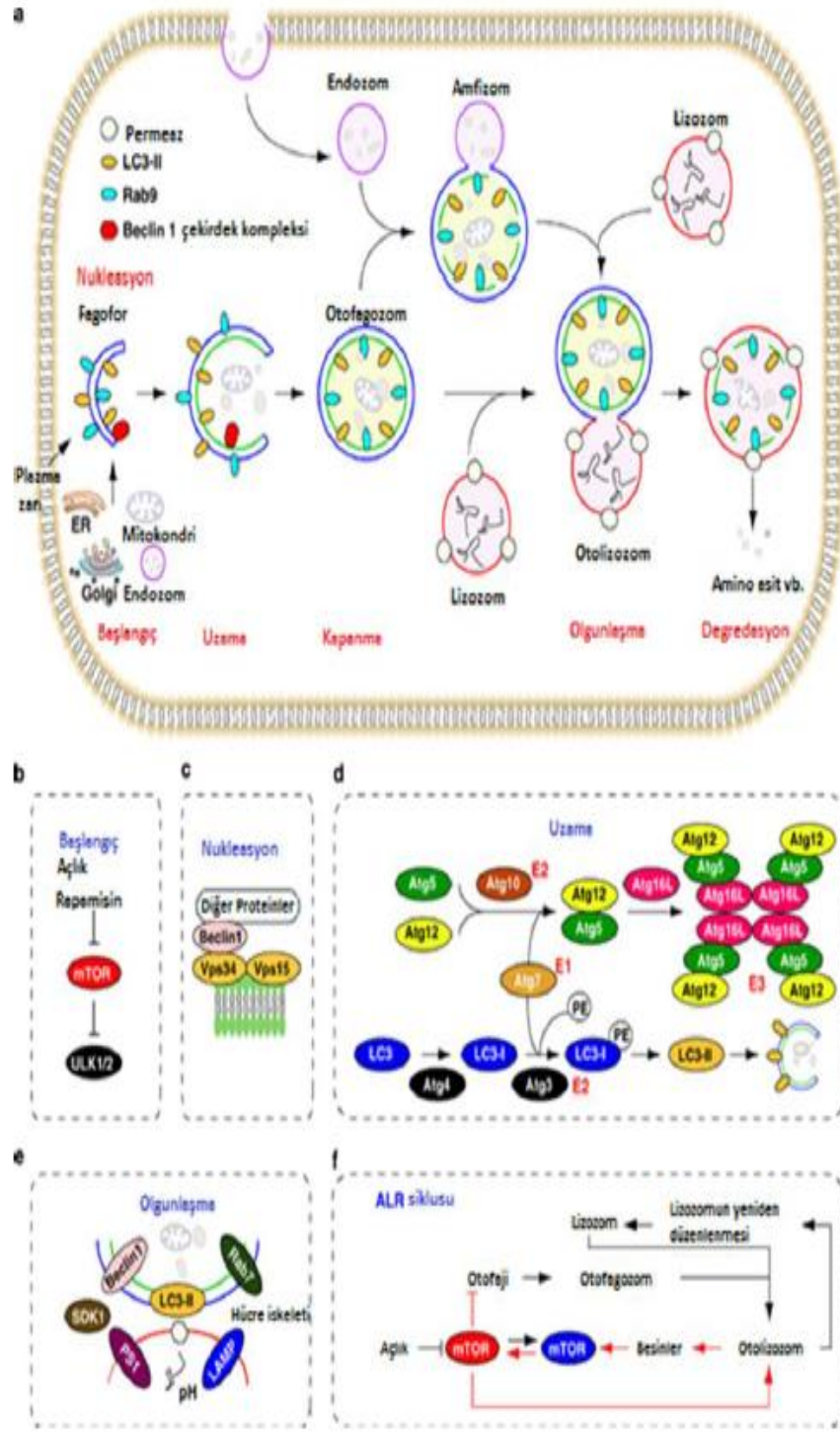
Son yıllarda artan çalışmalar otofajinin birçok fizyolojik ve patolojik olayda önemli rol oynadığını göstermektedir. Hasar görmüş ya da katlanması bozuk proteinlerin ve organellerin yok edilmesi otofaji yoluyla gerçekleşmektedir. Oksidatif strese karşı direnç sağlama, bazı enfeksiyon ve tümörlerin oluşumunu baskılama gibi fizyoloji ve patolojik yanıtlarda otofajinin rol oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Komatsu ve ark. 2007, Mathew ve ark. 2009, Hara ve ark. 2006, Komatsu ve ark. 2006). Açlık

(Scott ve ark. 2004), hipoksi (Bellot ve ark. 2009) ve stres (Chen ve ark. 2008) gibi çevresel etmenler karşısında otofaji hücrel dengeyi korur ve stres altındaki hücrelerin hayatta kalmasını sağlar. Otofajinin bu işlevlerini yerine getirememesi Alzheimer ve Huntington hastalığı (Martinez-Vicente ve ark. 2010, Matsuda ve Tanaka 2010) gibi nörodejeneratif hastalıklara, ateroskleroz (damar sertliği) (Martinet ve De Meyer 2009) ve yaşlılığa bağlı dejenerasyon (Melendez ve ark. 2003, Wang ve ark. 2009) gibi çeşitli rahatsızlıklar neden olmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar otofaji ve kanser arasındaki ilişki hakkında da önemli bilgiler sağlamıştır (Mathew ve ark. 2007).

### **1.6.2. Otofajinin Moleküler Mekanizması**

Otofaji sürecinde rol oynayan proteinlerin çoğu “otofaji bağlantılı proteinler” ya da kısaca Atg proteinleri şeklinde tanımlanmış olup, mayada yapılan çalışmalar sonucunda günümüzde 30’dan fazla Atg geni tanımlanmıştır (Xie ve Klionsky 2007). Bu proteinler, otofaji sırasında otofajik kese (otofagozom) çekirdeklenmesi, kese zarı uzaması-kapanması, taşınması, lizozomla kaynaşması, iç zar ve kargonun lizozomda yıkılması ve yapıtaşlarının sitoplazmaya taşınması gibi değişik aşamalarda rol oynamaktadır (Şekil 1.14a). Otofagozom oluşumunun en önemli düzenleyicileri Atg1/Ulk1-2 (Mayada Atg13 ve memelilerde Ulk1-2) ve Atg13 proteinleridir. Otofajik aktivitenin kontrolünde Tor protein kompleksi önemli bir rol oynamaktadır. Tor, ilk olarak mayada mantara karşı kullanılmak üzere geliştirilmiş bir ilaç olan rapamisinini hedefi olarak ortaya çıkarılmış ve ünlenmiştir. Tor, hücrede protein sentezi ve hücrel büyüme kontrol eden bir kinazdır. Memeli mTor ya da maya TOR protein kümesi bir hücrenin besin ve büyüme faktörü varlığını kontrol ederek otofajinin hücre için gerekli olup olmadığını kontrol eder. Memeli mTor ya da maya TOR protein kümesi mTor’a bağlanan raptor, mLST8, PRAS40 ve DEPTOR adlı ve mTOR etkinliğinin düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerden oluşur. Hücrede açlık durumunda mTORC1 baskılanır ve Ulk1 kompleksinden ayrılır; böylece otofagozomların oluşumu tetiklenir (Şekil 1.14b). Otofagozomların oluşumunda rol oynayan önemli bir diğer protein kompleksi III. sınıf phosphoinositol 3 fosfo (PI3P) kinaz Vps34’i içeren kümedir. Bu protein kümesinin aktivitesini düzenleyen en önemli protein memelilerde Beclin1/Atg6 proteinidir. PI3P, otofajik kese oluşumu için gerekli olan proteinlerin otofajik vezikül filizlenme bölgelerinde öbeklenmesinde rol oynar ve birçok protein için bir birleşme

platformu oluşturur (Obara ve Ohsumi 2008). Otofajik keseler (otofagazom) çift zarlı membrandan oluşur. Otofajik zarların ER, golgi, mitokondri dış zarı ve hatta hücre zarından köken alabileceği öne sürülmüştür. Otofajik kese uzaması ise übikitinlenme benzeri iki ayrı protein-protein kovalent eklenme tepkimesi ile gerçekleşmektedir. Bunlardan birincisinde, Atg12 proteininin Atg5 proteinine kovalent olarak bağlanması katalize edilir. Ardından Atg12'ye bağlanmış Atg5, Atg16 ile de birleşerek izolasyon membranının dış yüzeyine bağlanır. İkinci übikitin benzeri sistemde Atg8 (memelilerde MAP-LC3 ya da kısaca LC3) proteininin, bir fosfotidiletanolamin (FE) yağ molekülüne kovalent olarak bağlanmasıdır. Atg12-Atg5-Atg16 kompleksi, Atg8/LC3'ün FE'ye bağlanması için gereklidir. Atg8/LC3'ün FE'ye bağlanması, zar uzaması için gerekli bir olaydır (Şekil 1.14d). Ayrıca Atg4, kesecik oluşumu sonrasında görevi tamamlanan LC3 proteinlerini yağdan kopararak yeniden kullanılmalarına yol açmaktadır (Ohsumi 2001, Mehrpour ve ark. 2010). Atg9 ve döngü sistemi otofajik zardan otofagozom oluşumda rol oynamaktadır (Mehrpour ve ark. 2010). Oluşan otofagozom daha sonraki aşamada geç endozom veya lizozomla birleşerek taşıdığı kargonun parçalanmasına yol açar. Lizozomal enzimler tarafından kargonun yıkımı sonrasında, kargo (proteinler, organeller vb.) ortaya çıkan yapıtaşları (örn. aminoasitler, yağ asitleri, vb.) tekrar kullanılmak üzere hücreye kazandırılır (Şekil 1.14) (Ohsumi 2001, Mehrpour ve ark. 2010).



Şekil 1.14. Otofajinin düzenlenmesi (Kang ve ark. 2011 değiştirilerek alınmıştır).

## 1.7. Otofaji-Apoptozis İlişkisi

Otofajinin genellikle hücrenin hayatta kalımı ile ilgili bir mekanizma olduğu düşünülse de son yıllardaki çalışmalar otofajinin, hücre hayatta kalımı ve ölümü arasındaki karmaşık dengede önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Alternatif programlı hücre ölüm mekanizmalarından biri olan otofajik hücre ölümüne olan ilgi, maya otofaji genlerinin memeli karşılıklarını bulması ve çalışmalarının morfolojik tanımlardan çok moleküler düzeye inmesiyle artmış; sonuç olarak, otofaji, apoptoza ek veya alternatif olarak düşünülen temel ölüm yollarından birisi haline gelmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise bu iki hücre ölümünün farklı mekanizmalar tarafından kontrol edilmesine rağmen (apoptoz için kaspaz şelaleleri, otofaji için Atg protein sistemleri) bu iki programlı hücre ölümü arasında bir çeşit bağlantı bulunduğu dair elde edilen veriler artmaktadır (Levine ve Yuan 2005). Apoptozun engellendiği koşullar altında otofajinin baskın bir programlı ölüm mekanizması olarak ortaya çıkması da bu bağlantı ve iletişimin varlığına dair işaretlerden birisidir (Gözüaçık ve ark. 2008). Bcl-2 protein ailesinin Bcl-2 ve Bcl-XL gibi anti-apoptotik üyelerinin, yalnızca BH3 içeren proapoptotik proteinler (örn, Bad) yanında, en temel otofaji proteinlerinden birisi olan Beclin1 ile ilişkiye girdiği ve bu şekilde otofajiyi baskıladığı tanımlanmıştır (Patingre ve ark. 2005). Bu durumda Bcl-2 proteinleri hem anti-apoptotik, hem de anti-otofajik bir özellik göstermektedir ve otofaji ile apoptozu koordine etmektedir. DAPK (Death-associated protein kinase) ya da JNK1/2 adlı hücre stres ve hücre ölümü ile bağlantılı kinazların sırasıyla Beclin1 ve Bcl-2'yi fosforilemeleri sonrası Beclin1, Bcl-XL proteininin baskılayıcı etkisinden kurtulup otofajiyi aktive edebilir (Wei ve ark. 2008, Zalckvar ve ark. 2009). DAPK'ın hücre koşullara bağlı olarak apoptoz ya da otofajiye yol açtığı ve DAPK nakavt farelerde yapılan çalışmalarda DAPK'ın bu iki hücre ölümü arasında bir kesişim noktalarından biri olduğu bulunmuştur. (Gözüaçık ve ark. 2008). Son yıllarda apoptoz sırasında Beclin1' in kaspazlar tarafından kesilerek etkisiz hale getirildiği çalışmalar yayınlanmıştır. (Norman ve ark. 2010). Bu durum bize kaspaz aktivasyonu önemli bir otofajik proteini parçalayarak apoptoz sırasında otofajinin sınırlandırılabilceğini göstermektedir. Beclin1'e benzer şekilde, Atg4'ün de aralarında bulunduğu birçok Atg proteininin kaspazlar tarafından yıkıldığına dair veriler mevcuttur (Betin ve Lane 2009, Norman ve ark. 2010). Ayrıca, Atg5 adlı diğer bir otofaji proteininin kalpain proteazlar tarafından kesildiğini iddia eden bir çalışma

yayınlanmıştır (Yousefi ve ark. 2006). Kesildikten sonra ortaya çıkan otofaji protein parçalarının, BH3 yapısına benzer özellikler taşıyan bölgelerinin mitokondriye geçerek burada hücre ölümüne katkıda buldukları öne sürülmüştür. Yani, proteazlar tarafından kesilen otofaji proteinleri, proapoptotik proteinlere dönüşüp, mitokondrial apoptoza katkıda bulunabilmektedirler. Apoptoz ve otofaji arasında başka ilginç ve karmaşık bağlantılar da mevcuttur. Örneğin, otofaji proteini Atg5'in FADD adlı apoptoz adaptörü ile protein-protein ilişkisi içine girebileceği, bunun TNF- $\alpha$ 'ya yanıt veren ve RIPk1/2'yi içeren bir protein kompleksinin regülasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (Bell ve ark. 2008). Aslında RIPk'ın kendisi de kaspaz-8 tarafından kesilebilmekte ve böylece RIPk-JNK1/2 sinyal yolu tarafından otofaji aktivasyonunu önlenmektedir (Yu ve ark. 2004). Öte yandan kaspaz-8'in seçici otofajinin bir hedefi olduğu ve otofaji tarafından yıkıma uğratıldığı gösterilmiştir (Hou ve ark. 2010). Atg5-FADD ilişkisinin, gama-interferon uyarımı sonrası otofaji aktivasyonunda rol oynadığına dair veriler de mevcuttur (Blommaert ve ark. 1997). Tüm bu çalışmalar otofaji ve apoptoz arasında karmaşık ilişkiler bulunduğuna işaret etmektedir.

Otofajiyi baskılayan çok çeşitli kimyasallar vardır. 3 Metiladenin (3-MA), wortmannin, klorokin ve LY294002 gibi kimyasalların otofajiyi baskıladığının keşfedilmesi, otofajik hücre ölümünün analizinde bir dönüm noktası olmuştur (Seglen ve Gordon 1982). Farklı hücre tipleri ve farklı uyarıcılar kullanan birbirinden bağımsız grupların çalışmaları, otofajik vesiküller oluşturarak ve lizozomal aktiviteyi arttırarak ilerleyen ve yukarıda sıralanan kimyasallar tarafından baskılanabilen ve kaspazlardan bağımsız bir hücre ölümü varlığını göstermiştir. MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin östrojen reseptör antagonisti tamoksifen tarafından tetiklenen ölümü, lösemi hücrelerinin TNF- $\alpha$ 'ya bağlı ölümleri, mide ve glioma hücrelerinin aktive olmuş Ras tarafından öldürülmesi ve sinir hücrelerinin büyüme faktörü eksikliğinden dolayı ölümleri bu tür çalışmalara örnek gösterilebilir (Bursch ve ark. 1996, Jia ve ark. 1997, Chi ve ark. 1999, Xue ve ark. 1999). Otofaji tetikleyici veya inhibitörlerinin kemoterapötik ajanlarla birlikte iyi çalıştığı da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Herman-Antosiewicz ve ark. 2006, Bauvy ve ark. 2001; Cao ve ark. 2006). İnsan myeloid lösemi hücre soyunda (K562) krotoksinin indüklediği apoptotik hücre ölümünün 3-MA tarafından daha fazla tetiklendiği gösterilmiştir (Yan ve ark. 2006). HT-29 kolan kanser hücre soylarında otofaji inhibitörü 3-MA'nın apoptozu indükleyen 5-FU'nun etkisini arttırdığı hücre

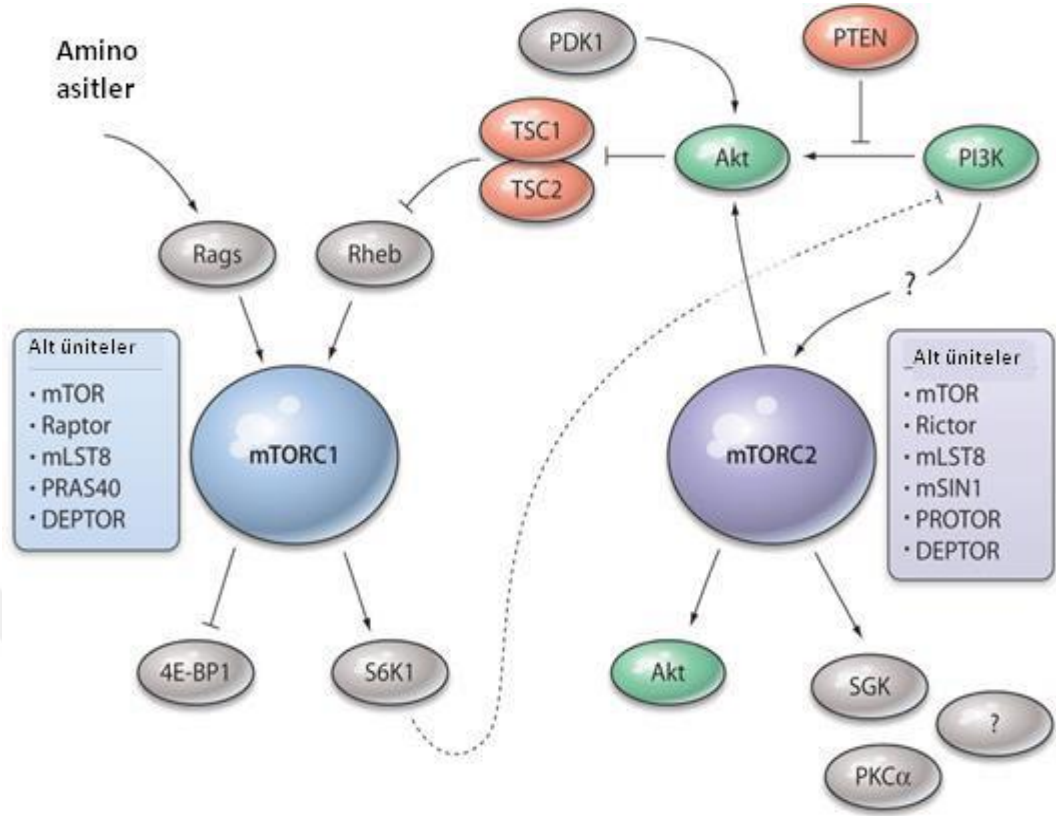
canlılığını azaltarak hücreleri apoptoza gitmeye teşvik ettiği gösterilmiştir (Li ve ark. 2009).

## **1.8. Hücre Ölümü ve Sağ Kalımı ile İlişkili Sinyal Yolakları**

### **1.8.1. mTOR Sinyal Yolağı**

Bir serin/treonin protein kinaz olan TOR hücre büyümesi, hücre döngüsü, hücre döngüsünün devamlılığı, besinlerin hücre içine alınımı, protein sentezi ve otofajik aktiviteyi düzenlemektedir (Arsham ve Neufeld 2006). Rapamisin antifungal bir ajan olmakla birlikte memeli hücrelerindeki analogu mTOR'dur (Hay ve Sonenberg 2004). mTOR, mTORC1 ve mTORC2 olmak üzere iki ayrı kompleksten oluşur. Besinin az bulunduğu bir ortamda otofaji indüksiyonu görülürken, besinin bol bulunduğu ortamda TOR proteinini Atg13'ü fosforile ederek otofajiyi baskılamaktadır. Açlık durumlarında ise TOR proteinin inaktivasyonu ile Atg13 defosforile hale gelir ve bir serin treonin kinaz olan Atg1'e bağlanır. Atg1 aktivasyonu doğrudan otofajini indüklenmesi ile ilişkilidir. Memelilerde bu kompleksin karşılığı ULK:Atg13: FIP200 (200 kDa fokal adezyon kinaz ailesi ile etkileşen protein) proteinleridir. Çok yakın zamanda ULK1 ve ULK2 proteinlerinin mTOR kinaz ve AMPK (adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz) ile direkt etkileşerek ve memelilerde otofajinin başlamasına eşlik ettiği gösterilmiştir (Shang ve Wang 2011). Bu durumun aksine Tor yolağında yer alan proteinlerden ribozomal S6 proteinin hedefi olan S6K proteinin fosforilasyonu ise otofajinin baskılanmasının bir işaretidir (Şekil 1.15) (Scott ve ark. 2004).

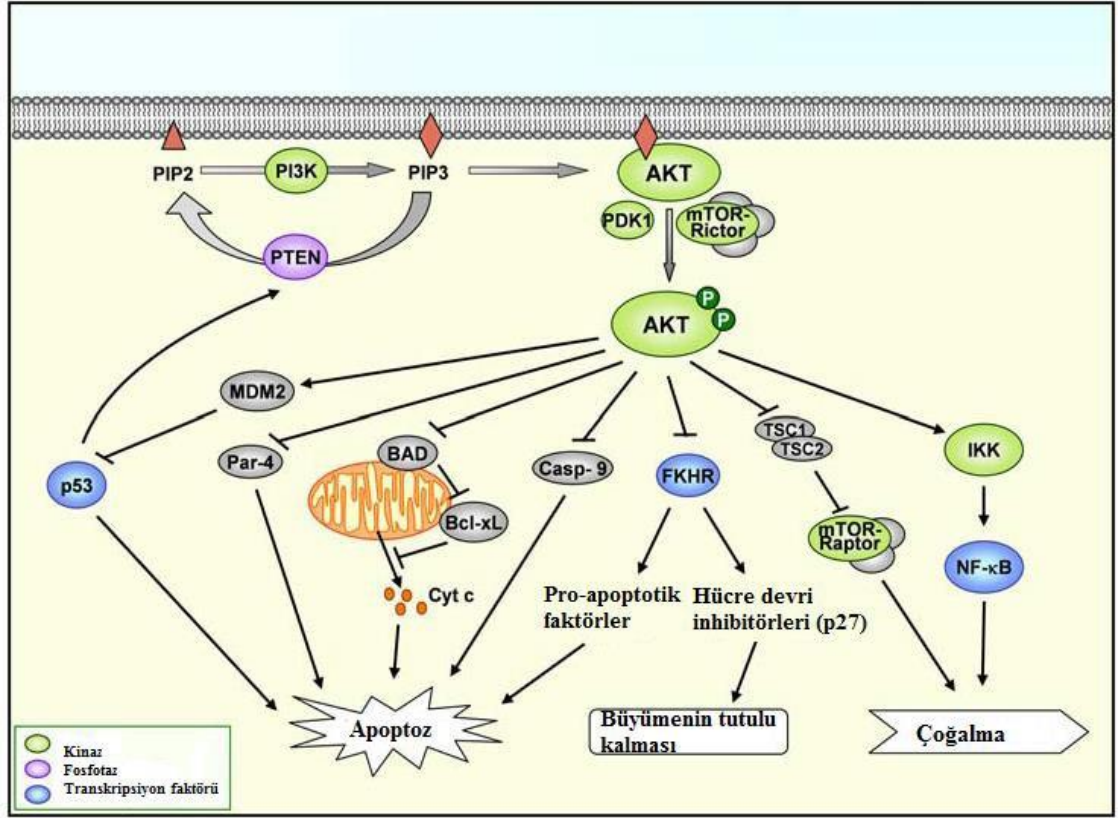




Şekil 1.15. mTOR sinyal yolağı (Anonim 2016).

### 1.8.2. PI3K/Akt Sinyal yolağı

PI3K/AKT sinyal iletim yolağı, hücre çoğalmasını uyarması ve apoptozu engellemesinden dolayı önemli bir role sahiptir (Franke ve ark. 2003). Bu yolağın farklı komponentleri insan kanser hücrelerinin büyük kısmında düzenlenmesinin azaldığı bulunmuştur. AKT serin/treonin kinaz ailesi son derece korunmuş üç üyeye sahiptir: AKT1, AKT2 ve AKT3. AKT'nin aktivasyonu membrana proteinin bağlanması ve iki farklı bölgede fosforilasyonunu sağlar. Bu işlemde, iki farklı kinaz vardır: PDK1 ve mTOR-Rictor kompleksi (Sarbasov ve ark. 2005). Tamamen aktif halde olan AKT plazma mebranından ayrılır ve sitoplazma ve nukleusta yer alan substratları hedef alır. AKT yolağının bileşenleri Şekil 1.16'de özetlenmiştir. Aktif haldeki Akt de TOR'u aktive ederek otofajiyi bloke etmektedir. Bir tümör baskılayıcı protein olan PTEN ise PI3K/Akt yolağı ile ters yönde çalışarak otofajinin arttırılmasında görev yapmaktadır. Nitekim PTEN molekülünde meydana gelen mutasyonların otofajiyi baskıladığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Arico ve ark. 2001).



Şekil 1.16. PI3K/AKT yolağı (Roviezzo ve ark. 2007 değiştirilerek alınmıştır).

### 1.8.3. Otofaji ve Apoptotik Yolak Arasındaki Önemli Oyuncular: Bcl-2 ve Bcl-xL

Otofaji ve apoptoz arasındaki ilişki farklı durumlarda özetlenebilir. Otofaji apoptozun baskılandığı durumlarda, hücrelerin ölümüne neden olabilirken, apoptozu baskılayarak hücrenin hayatta kalmasını sağlayabilir. Bir diğer durum ise, apoptoz için ön koşul olabilmesidir. Birer anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ve Bcl-xL apoptozu inhibe edebildiği gibi otofajiyi de otofagozom yapılarının oluşumunda görev alan proteinler ile bağlantı kurarak inhibe edebilmektedir. Otofagozom yapılarının oluşumunda önemli görevi olan Vps34 PI3K aktivasyonu, Atg6/Beclin tarafından kontrol edilir. Bcl-2 ve Bcl-xL, Beclin proteininin BH3 bölgesine bağlanır ve böylece otofajiyi inhibe eder (Levine ve ark. 2008). Bcl-xL, JNK tarafından fosforile edildiğinde inaktif forma geçer ve Beclin'e bağlanması engellenir, otofaji aktif formda kalır. Beclin yanında, Vps34 düzenleyici proteinlerden biri olan Bif-1 de hücre ölümü ile ilişkilidir. Bif-1, otofaji yanında, Bax/Bak aktivasyonu ile apoptozu da düzenlemektedir.

## 1.9. Metal Bazlı Bileşikler

### 1.9.1. Palladyum (II) Bileşiklerinin Kanser Tedavisindeki Yeri

Karsinogenez, sayısız genin, proteinlerin, sinyal yollarının ve hücre tiplerinin koordineli etkileşimini gerektiren karmaşık bir süreçtir. Bu yüzden kanser tedavisinde daha etkin tedavinin nasıl sağlanacağı halen araştırma konusudur. Günümüzde, özellikle tedavi imkanları içerisinde ilk sırayı alan kemoterapi, mevcut ilaçlar çerçevesinde yetersiz kalmakta ve birçok kanser türünde etkin bir tedavi sağlanamamaktadır. Bu nedenle son yıllarda yapılan kanseri önleyici yeni ilaç geliştirme çalışmaları heyecan ve umut vaadeden bir alan olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle kanser tedavisinde metal bileşiklerin çok çeşitli tümör hücre soylarına karşı umut verici etkilerinden dolayı ilaç olarak kullanımı yaygınlaşmıştır (Abu-surrah ve ark. 2008, Ferraz ve ark. 2009, Garoufis ve ark. 2009, Ulukaya ve ark. 2011a,b). Pt ve Pd gibi metal bileşiği içeren antikanser ajanların DNA'da iplikler arası çapraz bağların, DNA kalıntılarının oluşumuna yol açarak sitotoksik ve apoptotik aktiviteyi modüle ettiği bildirilmektedir (Zhu ve ark. 2009). Bu metal bileşiklerden olan Pd; antifungal, antiviral, antitümör ve antibakteriyal etkilere sahiptir. Bu yapıdaki kimyasalların suda kolay çözünebilmeleri, membranlardan kolayca geçip ve hücre içerisine DNA'ya bağlanabilmeleri, ayrıca yan etkilerinin daha az olması tercih edilmelerine neden olmaktadır (Abu-Surrah ve ark. 2008). Ayrıca yapılan çalışmalarda Pd (II) bileşiklerinin kanser hücrelerinde hücre ölümünü artırarak apoptozise neden oldukları gösterilmiştir (Keter ve ark. 2008, Guney ve ark. 2011a, Ferraz ve ark. 2011, Miklasova ve ark. 2009). Pd (II) bileşiklerinin bu sitotoksik etkiyi DNA'da yüksek düzeyde hasarlar oluşturarak yaptıkları da görülmüştür (Miklasova ve ark. 2009).

Platin bazlı anti-kanser ajanlar olarak bilinen sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin yaklaşık 30 yıldır; 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, Petrovic ve ark. 2007). Günümüzde başarılı metal bazlı ilaçlara ek olarak farklı etki mekanizmalarına sahip tümör inhibe edici metal bileşiklerin sentezi ve sayısı giderek artmaktadır. Pd türevlerinin; sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin gibi standart platin bazlı ilaçlara benzer şekilde sitotoksik aktivite gösterdiği, aynı zamanda diğer ağır metal anti-tümör bileşiklerine göre daha az yan etkiye sahip olduğu bilinmektedir.

Sisplatin, tüm dünyada kullanılan en etkili anti-tümör ilaç olarak bilinmesine rağmen; nefrotoksisite, nörotoksisite, kusma ve bulantıyı da içeren ciddi toksik yan etkilerinin olması hastalara verilen dozu sınırlamaktadır. Programlı hücre ölümü apoptozun inaktivasyonu gibi birtakım mekanizmalar ile kanser hücrelerinde kullanılan sisplatine karşı birçok kanser türü direnç geliştirebilmektedir (Mansouri-Torshizi ve ark. 2011, Zhang ve ark. 2011). Klinikte kullanılan ilk platin bazlı ilaç olarak kabul gören sisplatinin belirtilen bu yan etkilerden dolayı, 1985 yılında yerini dezavantajlarını azaltan karboplatin, 1966 yılının sonlarına doğru da üçüncü platin bazlı ilaç olan oksaliplatin klinikte kullanılmaya başlanmıştır (Starha ve ark. 2009). Pd (II) bileşiklerinin, kimyasal ve yapısal özellikleri bakımından Pt (II) bileşikleriyle benzerlik göstermesinden dolayı anti-tümör etkiye sahip oldukları tahmin edilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bazı Pd (II) bileşiklerinin standart platin bazlı ilaçlar (sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin) ile karşılaştırıldığında belirgin düzeyde *in vitro* sitotoksik etki gösterdiğini kanıtlamaktadır (Rau ve van Eldik 1996, Miklasova ve ark. 2009, Guney ve ark. 2011a). Ayrıca metal içeren antitümör ajanların önemli bir özelliği olarak, bazı Pd bileşiklerinin tedavide kullanılan sisplatin ilacına göre yüksek anti-tümör aktiviteye ve daha az böbrek toksisitesine neden oldukları gösterilmiştir (Divsalar ve ark. 2007, Ulukaya ve ark. 2011b). Ulukaya ve ark. (2011b) tarafından Pd (II) [Pd(sac)(terpy)](sac).4H<sub>2</sub>O bileşiğinin insan meme kanseri hücre soyları (MDA-MB-231 ve MCF-7) üzerine büyümeyi baskılayıcı/sitotoksik etkileri araştırılmış, doz ve zamana bağlı olarak Pd (II) bileşiğinin güçlü anti-büyüme etkisi *in vitro* olarak gösterilmiştir. Ayrıca bu etki, Balb/c farelerde *in vivo* olarak da doğrulanmıştır. Pd bileşiği MDA-MB-231 hücrelerinde anti-invazif etkiye sahip olduğunun göstergesi olarak matrijel üzerinde tübül formasyonunu etkili biçimde bozduğu gözlenmiştir. Yine bu çalışmada Pd (II) bileşiğinin apoptozisi DR4 ve DR5 isimli apoptozis hücre ölüm genleri aracılığı ile indüklediği gösterilmiştir. Ulukaya ve ark. (2011a) tarafından yukarıdaki çalışmaya ek olarak yeni Pt (II) ve Pd (II) bileşiklerinin büyüme inhibe edici etkilerini üç farklı akciğer kanseri hücre soyunda (A549, H1299 ve PC3) araştırılmıştır. Sonuç olarak, Pd (II) bileşiğinin ([PdCl(terpy)](sac).2H<sub>2</sub>O) mitozu inhibe ederek ve nekrotik hücre ölümünü uyararak bütün hücre soylarında büyüme inhibe edici etkisinin olduğunu ve bu büyüme karşıtı etkisinin sisplatinden (akciğer kanseri için standart kemoterapötik ajan) daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Matesanz ve ark. (1999)

tarafından yapılan bir çalışmada Pd (II) bis(tiyosemikarbazon) bileşiğinin sitotoksik etkilerini HeLa (insan serviks epitel karsinom hücresi), Pam 212 (normal fare keratinosit), Pam-ras (H-ras onkogen transforme edilmiş fare keratinosit ve sisplatin dirençli) ve Vero (transforme maymun böbrek fibroblast hücresi) hücre soyları üzerinde araştırılmıştır. Sonuç olarak, Pd (II) bileşiğinin bütün hücre soylarında klinikte kullanılan ilaçlara göre (sisplatin, etoposid ve adriamisin) IC50 değerinin daha düşük olduğu ve yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur. Budzisz ve ark. (2004); Pt (II) ve Pd (II) bileşiklerinin sitotoksitesini, alkilleyici etkisini, apoptozis indükleyici özelliğini ve DNA'ya bağlanma yeteneğini pirazol içeren ligandlar ile (1b: 5-(2-hydroxyphenyl)-1,3-dimethyl-4-methoxycarbonyl-1H]-2-pyrazole) test etmişlerdir. Pt (II) (cis-[Pt(1b)2Cl<sub>2</sub>] ) ve Pd (II) (trans-[Pd(1b)2Cl<sub>2</sub>]) bileşiklerinin lösemi hücre soylarına (HL-60 ve NALM-6) karşı yüksek sitotoksitate gösterdiği ayrıca kaspaz-3 aktivitesini indüklediği bulunmuştur. Szucova ve ark. (2006); Pt (II) ve Pd (II) bileşiklerinin ve CDK (Siklin bağımlı kinaz) inhibitörlerinin anti-tümör aktivitesi kronik miyeloid lösemi (K-562), meme kanseri (MCF-7), malign melanom (G-361) ve osteojenik sarkom (HOS) kanser hücre soylarında araştırılmıştır. Elde edilen sonuçların sisplatin için elde edilen değerler ile benzer ve oksaliplatin değerlerinden daha iyi olması nedeni ile umut verici bulunmuştur. Mansouri-Torshizi ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada, 2,2'-bipiridin ve ditiokarbamat ligandları içeren Pt (II) ve Pd (II) bileşiklerini sentezlemişlerdir. Bu bileşiklerin sitotoksik etkileri in vitro koşullarda K562 (insan kronik miyeloid lösemi) hücre soyunda değerlendirmişlerdir. Pd (II) (IC50: 18 µM) ve Pt(II) (IC50: 14,3 µM) bileşiklerinin %50 sitotoksik konsantrasyon değerlerinin sisplatininden (IC50 :154 µM) daha düşük olduğunu ve sisplatininden daha etkili olduğunu belirlemişlerdir. Keter ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada, Pd (II) ve Pt (II) pirazol bileşiklerinin kanser hücrelerinde apoptozise neden olarak hücre ölümünü arttırdıklarını göstermişlerdir. Bu çalışmada; Pt (II) dikloro-bis(pirazol) bileşiklerinin, insan servikal epiteloid karsinom hücre soylarında (CaSki ve HeLa) ve insan T-hücresi lösemi soyunda (Jurkat) diğer bileşiklere göre daha fazla pro-apoptotik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Apoptozis; fosfotidilserinin membran dış yüzeyine transloke olması, kaspaz-3 aktivasyonu, DNA fragmentasyonu yöntemleri ile gösterilmiştir. Miklasova ve ark. (2009) tarafından yeni sentez edilen Pd bileşikleri ile organoarsenik ligandların potansiyel anti-tümör etkisi ve genotoksitesisi insan tümör (MLS) ve normal

hücre (Hfl-1) soylarında araştırılmıştır. Pd bileşiklerinin normal hücrelerde olduğu gibi tümör hücrelerinde de 24 saat sonunda hücre canlılığını inhibe ederek anti-proliferatif etki gösterdiği bulunmuştur. Bu çalışmada Pd bileşikleri; insan tümör hücrelerinde (MLS), normal hücrelere (Hfl-1) göre daha yüksek sitotoksikite göstermiş ve öldürücü doz standart metal bazlı kemoterapötik ilaçlarla (karboplatin ve oksaliptin) karşılaştırılmıştır. Bütün bileşiklerde IC50 değerleri MLS hücrelerinde Hfl-1 hücrelerine göre daha düşük bulunmuştur. Farklı Pd bileşiklerinin DNA'da yüksek düzeyde hasarlar oluşturdukları ve apoptozisi indükledikleri belirlenmiştir. Bu bileşiklerden, Pd (II) [PdCl<sub>2</sub>L<sub>2</sub>](L:2-methoxyphenyl)-diphenylarsine) bileşiğinin tümör hücrelerinde apoptozisi indüklemeye önemli etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bu etkinin bileşiklerin DNA ikincil yapı ile etkileşimine bağlı olduğu belirtilmiştir. Ferraz ve ark. (2011) tarafından Pd (II)-2-Benzoil Piridin-N-(4)-tolil tiyosemikarbazon bileşiklerinin HepG2 (insan hepatoma), Jurkat, HL60 (insan promiyelositik lösemi) ve HL60.Bcl-XL hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. [Pd(2Bz4oT)Cl] ve [Pd(2Bz4mT)Cl] bileşiklerinin Jurkat ve HL60 hücrelerinde cisplatin benzer şekilde sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Bu çalışmada; Pd (II) bileşikleri [Pd(2Bz4oT)Cl] normal-tip HL60 ve Jurkat hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederken, dirençli HL60.Bcl-XL lösemi hücreleri Pd (II) bileşiğine [Pt(2Bz4oT)Cl] karşı dirençli bulunmuştur. Hücrelerde Bcl-XL proteininin aşırı ekspresyonunun, ilaçlar tarafından indüklenen çeşitli sitotoksik uyarılara direnç kazandırdığı bilinmektedir. Bu anti-apoptotik protein, membran potansiyelini ve mitokondrinin homeostazisini düzenlemektedir. Ayrıca hücrelerde apoptotik uyarılarla muamele edilmiş değişiklikleri inhibe etmekte ve apoptozis ile hücre ölümünü önleyerek hücre canlılığını desteklemektedir. Bu direnç apoptozis ile hücre ölümünde bulunan mitokondriyal yolun etkisinin inhibe edilmesine bağlıdır. Bu çalışmanın sonucunda, Pd (II) bileşiğinin, [Pd(2Bz4oT)Cl], HL60 hücrelerine karşı sitotoksik etkisinin apoptozis ile hücre ölümünün indüksiyonuna bağlı olduğu bulunmuştur. Nadeem ve ark. (2010) yılında yaptıkları çalışmada, bazı Pd (II) bileşiklerinin sitotoksik etkilerini insan prostat kanseri hücresinde (PC-3) göstermişlerdir. Araştırılan Pd (II) bileşiklerinin insan prostat kanseri hücreleri üzerindeki etkileri doksorubisin ile karşılaştırıldığında Pd (II) bileşiklerinin önemli sitotoksik aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak yapılan tüm bu çalışmalar kanser tedavisinin gelişmesi, yeni hedeflerin ve yaklaşımların çoğalması açısından önem arz etmektedir.

### **1.9.2. Palladyum (II) Bileşiklerinin DNA Üzerindeki Etki Mekanizması**

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

Sisplatin gibi metal bazlı ilaçların metal merkezleri pozitif yüklüdür ve DNA gibi negatif yüklü biyomoleküllere bağlanma yeteneğine sahiptirler. Hem Pt (II) hem de Pd (II) bileşiklerinin DNA ile etkileşimlerinin mekanizmaları araştırılmış ve 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 oluşturmasına dayanmaktadır. Küçük hacimli Pt (II) veya Pd (II) bileşikleri 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) bileşikleri DNA çift sarmalında araya girer (interkalasyon) ve DNA'ya hidrojen bağlarıyla bağlanarak hücre bölünmesini durdurur (Howe-Grant ve ark. 1976, Petrovic ve ark. 2007).

Sisplatin gibi platin bazlı antikanser ilaçlarının DNA hasarına yol açarak etki gösterdikleri düşünülmektedir. Pt 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. 1996).

Oksaliplatin, diğer bir platin bazlı ilaç olan sisplatin ile çeşitli mekanik özellikleri bakımından benzerdir. Sisplatin 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).

Sisplatin 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. 1996). Sonuç olarak sisplatin-DNA bağlantısının oluşumu DNA transkripsiyonu ve replikasyonunu bloke etmektedir (Keter ve ark. 2008).

Pd bileşiği 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) bileşikleri gibi DNA'da yüksek düzeyde hasar oluşturduğunu ve apoptozisi indüklediğini göstermiştir (Keter ve ark. 2008, Miklasova ve ark. 2009). Ulukaya ve ark. (2011b) yaptığı çalışmada ise Pd (II) bileşiğinin apoptozisi DR4 ve DR5 isimli apoptozis ölüm genleri üzerinden indüklediği bulunmuştur.

### **1.9.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Palladyum (II) Bileşiğinin Biyokimyasal Yapısı**

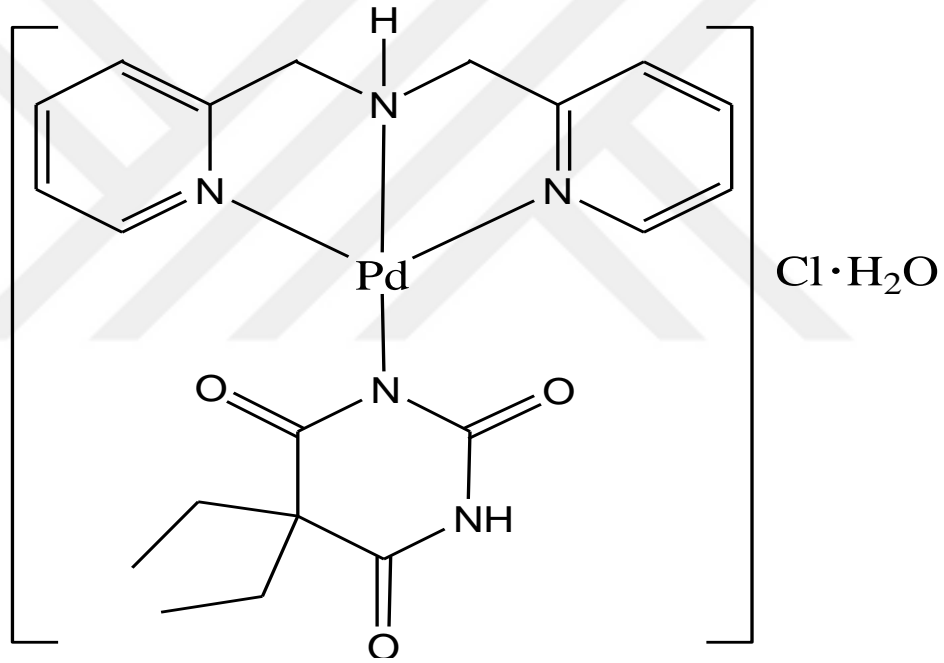
Bu tez çalışmasında kullanılan  $[Pd(bpma)(barb)]Cl \cdot H_2O$  olarak formüle edilen Pd (II) bileşiği, Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümü Prof. Dr. Veysel Turan Yılmaz ve ekibi tarafından sentezlenmiş, karakterizasyonu yapılmış ve yayınlanmıştır (İçsel ve ark. 2015). Pd (II) bileşiği sentezinde Pd (II) iyonları; barbitürik asit, Cl<sup>-</sup> ve su ile koordinasyonu sonucu oluşmaktadır. Pd (II) kompleksinin açık yapısı aşağıda verilmiştir (Şekil 1.17).

Barbitüratlar barbitürik (pirimidin- 2,4,6 (1H, 3H, 5H) -trion) asit türevleridir. Birçok barbitürat sakinleştirici ve uyku getirme amacıyla kullanılan ağır bir etki yaratabilen ve aynı zamanda anestezik amaçlı da kullanılabilen yapılarıdır. Ayrıca anksiyete, epilepsi ve diğer birçok psikiyatrik bozuklukların tedavisinde kullanılmaktadırlar (Willete ve



ark. 1987, Fillaut ve ark. 2002, Ashnagar ve ark. 2007). 5,5-Diethylbarbituric asit (Hbarb) ise tıpta kullanılan en eski barbitüratlardan olup barbital, veronal ve diemal olarak da bilinir (Doran 1959). Barbitüratlar vücutta yaygın bir şekilde dağılırlar. Fötal dolaşıma ve süte kolayca geçebilmektedirler.

Barbitüratlar, farklı metal iyonlarına karşı farklı koordinasyon yetenekleri gösterirler. Protonlanmış nitrojen ve karbonil oksijen atomlarının birisi veya her ikisinin aracılığıyla, mononuleer polimerlerden koordinasyon polimer formunda metal kompleksi oluştururlar. Barbitüratların süpermoleküller ve koordinasyon özellikleri üzerine son zamanlarda literatürde yapılmış çok sayıda çalışmalar mevcuttur (Mahmudov ve ark. 2014).



**Şekil 1.17.** Palladyum (II) bileşiğinin kimyasal yapısı [Pd(bpma)(barb)]Cl·H<sub>2</sub>O  
bpma: bis (2-pyridimetil) amin, barb: 5,5- Dietilbarbitürik asit, Pd:palladyum (İçsel ve ark. 2015).

## **2. MATERYAL ve YÖNTEM**

### **2.1. Materyal**

#### **2.1.1. Kimyasal maddeler**

- Palladyum (II) bileşiği, Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü
- Klorokin, Sigma, Almanya
- 3 Metil Adenin, Sigma, Almanya
- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid), Sigma, Almanya
- Adenosine 5'-triphosphate (ATP) bioluminescent somatic cell assay kit, Sigma, Almanya
- Muse® Annexin V & Dead Cell Assay Kit, Merck Millipore
- Muse® Caspase-3/7 Assay Kit, Merck Millipore
- Muse® Mitopotential Assay Kit, Merck Millipore
- Muse® Oxidative Stress Kit, Merck Millipore
- Muse® H2A.X Activation Dual Detection Kit, Merck Millipore
- Muse® PI3K Activation Dual Detection Kit, Merck Millipore
- Fetal sığır serumu (FBS), PAA, USA
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco, USA
- L-glutamin, Gibco
- Fosfat tuz tamponu (PBS), HyClone, Thermo Scientific, USA
- Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Lonza
- 0,05% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco, USA
- Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma, Almanya
- Triton X-100, Sigma, Almanya, İsrail
- Tripan mavisi (% 0,5), Biological Industries
- SDS Molecular Biology grade, BioChemica Applicham, Almanya
- Annexin V-Fluos, Roche
- Cell Viability Imaging kit, Roche, Almanya
- N-acetyl-L-cysteine (NAC), Sigma
- Z-Vad-fmk, pan-kaspaz inhibitörü, Enzo

### **2.1.2. Sarf malzemeler**

- 25cm<sup>2</sup> ve 75cm<sup>2</sup>'lik flask, Thermo Scientific
- 6 kuyulu plate, Costar
- 96 kuyulu flat plate, Costar
- 5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Genject
- 10µl'lik pipet uçları, Biohit
- 100µl'lik pipet uçları, Corning
- 1000µl'lik pipet uçları, Aysset
- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Millex, Millipore
- Steril santrifüj tüpleri (15ml), SPL
- Steril santrifüj tüpleri (50ml), SPL
- Thoma lamı, Bright –Line, Hausser Scientific Horsham, PA, USA
- Kriyovial, ATS
- 2 ml'lik cam pastör pipetler, Isolab
- 1 ml ve 5 ml'lik Kombi tip, Eppendorf, Almanya
- Otoklavlanabilir cam şişe, Isolab, Almanya

### **2.1.3. Cihazlar**

- Spektrofotometre (FLASHScan S12, Analytik Jena, Almanya)
- Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D
- Luminometre (FL×800 Mikroplate Floresans Okuyucu)
- Muse Cell Analyzer Cihazı, Merck
- CO<sub>2</sub> 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
- 10µl, 100µl ve 1000µl'lik pipet seti, Orange Scientific

- 0,5-5ml pipet, Brand
- 10ml pipet, Eppendorf
- 5-5µl Transferpipet, Thermo Scientific
- Pipet boy, ISO fill
- Luminex xMAP teknoloji
- 20-200µl Transferpipet, Brand, Almanya

## **2.2. Yöntemler**

### **2.2.1. Uludağ Üniversitesi Tarafından Sentez Edilen Pd (II) [[Pd(bpma)(barb)]Cl.H<sub>2</sub>O] Bileşiğinin Hazırlanması**

Uludağ Üniversitesi Kimya Bölümü tarafından yeni sentez edilen Pd (II) bileşiğinin stok çözeltisi (50 mM); 500 µl DMSO içerisinde 0,0136 g Pd (II) bileşiğinin çözülmesi ile hazırlandı.

### **2.2.2. İnhibitörlerinin Hazırlanması**

Çalışmalarda kullanılacak olan otofaji inhibitörlerinden 3-MA, ana stok 50 mM olacak şekilde 7,458 mg tartılarak 500 µl moleküler biyoloji su içerisinde, diğer bir inhibitör olan klorokin 1 ml moleküler biyoloji su içerisinde 0,0257 g tartılarak hazırlandı. Hazırlanan bu stoklar -20°C’de her deney için kullanılacak miktara göre porsiyonlanarak saklandı. Apoptozis analizleri için kullanılan pan-kaspaz inhibitörü Z-vad-fmk 46,7 mg tartılarak 10 ml DMSO içerisinde ana stok 10 mM olacak şekilde hazırlandı. ROS (Reaktif oksijen türleri) süpürücü olan bilinen N-asetil-L-sistein (NAC) ana stoğu 280 g tartılıp 1,148 µl moleküler biyoloji su içerisinde çözünmesi sağlanarak deneylerde kullanıldı.

### **2.2.3. Hücre kültürü**

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalında görev yapan Prof. Dr. Cumhur Gündüz’den temin edilen LNCaP (ATCC CRL 1740) ve PC-3 (ATCC CRL 1435) prostat kanseri hücre soyları ve PNT1A sağlıklı prostat hücre soyları kriyovial denen kaplar içerisinde -80°C dolaplarda saklandı. Kullanılan hücre soylarından LNCaP birincil tümörden türetilen iyi farklılaşmış prostat kanseri hücre soyudur. Karakteristik biyokimyasal bir belirleyici olan, prostat spesifik antijen salgılar ve buna

bağlı fonksiyonel androjen reseptörü açısından olarak androjene duyarlıdır. p53 ifadesi doğal tip olarak tanımlanmıştır. PC-3 (ATCC CRL 1435) hücre soyu gibi androjene duyarsızdır. PC-3 hücreleri p53 ve AR (Androjen reseptörü) ifadesinden yoksundur.

### **2.2.3.1. Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması**

Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere, kriyoviallerin içinde bulunan hücreler  $-80^{\circ}\text{C}$  den alınarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. Hücre süspansiyonu; falkon tüp içerisinde %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin (Gibco) bulunan 5 ml RPMI (“Roswell Park Memorial Institute Medium”) besiyerine alındı. 800 rpm’de 5 dk santrifüj edilen falkon tüpün üzerindeki süpernatant kısmı santrifüj sonrası aspire edildi ve hücre peleti 1 ml besiyeri ile sulandırılarak hücrelerin süspanse hale gelmesi sağlandı. Hücre süspansiyonu içerisinde 5 ml besiyeri bulunan  $25\text{ cm}^2$ ’lik flasklara (Thermo Scientific) alınarak  $37^{\circ}\text{C}$ ’de, %5  $\text{CO}_2$  içeren ortamda inkübe edildi.

### **2.2.3.2. Hücre Soylarının Pasajlanması**

Hücre soylarının, yoğunluğuna ve deneysel ihtiyaçlara bağlı olarak her 2-3 günde bir pasajları gerçekleştirildi. Öncelikle hücre soyları, flaskın yüzeyini %60-70 kapladıklarında (konfluent olduklarında) flask içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla  $25\text{ cm}^2$ ’lik flask içerisine 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0.5 ml %0.05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler  $37^{\circ}\text{C}$ ’de, %5  $\text{CO}_2$ ’li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda mikroskopla incelendiğinde yüzeyden ayrıldığı gözlenen hücreler, tripsinin inhibe olması için on katı besiyeri ile muamele edildi. Böylelikle tripsinin hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra hücre membranına zarar vermeye başlaması engellenmiş oldu. Flaskda bulunan hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15ml’lik falkon tüp içerisine alındı. 800 rpm’e 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre peleti 1 ml hücre besiyerinde çözüldükten sonra hücre süspansiyonu  $75\text{ cm}^2$ ’lik flasklara alınarak  $37^{\circ}\text{C}$ ’de, %5  $\text{CO}_2$  içeren ortamda inkübasyona bırakıldı.

### **2.2.3.3. Hücre Soylarının Stoklanması**

Flask içerisindeki hücreler konfluent olduklarında besiyeri aspire edilerek hücre artıkları uzaklaştırıldı. Hücreler 1X PBS ile yıkandıktan sonra PBS aspire edildi ve hücrelerin flaskın yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için %0.05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu ile muamele edildi. Mikroskopla bakıldığında flaskın yüzeyinden ayrıldığı gözlenen hücrelere tripsinin inhibe edilmesi için on katı besiyeri ilave edildi. Flaskda bulunan hücreler, içinde besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüp (Orange Scientific)'e alındı. 800 rpm'de 5 dk santrifüj edilen hücreler süpernantant kısmı aspire edilerek pelet üzerine her bir kriyovial için ışığa hassas olan 1.5 ml dondurucu medium (5 ml DMSO + 5 ml FBS + 40 ml DMEM) ilave edildi. Daha sonra hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine dağıtılarak -80°C'ye kaldırıldı.

### **2.2.3.4. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması**

PC-3, LNCaP ve PNT1A hücre soylarının büyümesi için gerekli besiyeri ortamı şu şekilde hazırlandı:

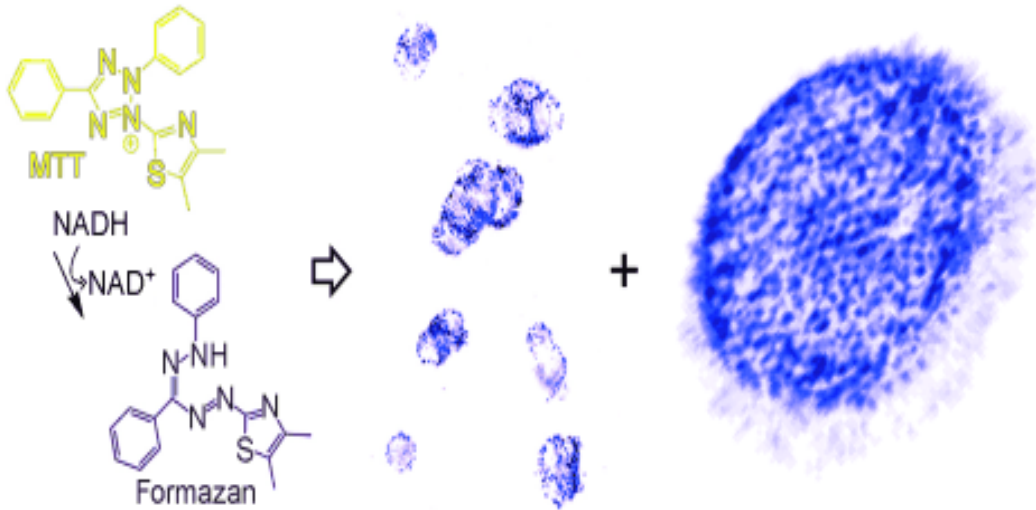
RPMI 1640 (Hyclone USA) besiyerine %10 Fetal Bovine Serum (Hyclone USA), %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin, Gibco) ve %1 L-glutamin (Gibco) ilave edildi.

### **2.2.3.5. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı**

Hücre sayımı yapabilmek amacıyla öncelikle hücrelere tripsinizasyon işlemi uygulandı. Elde edilen hücre süspansiyonundan 10 µl alındı ve 96 kuyucuklu bir hücre kültürü kabının boş bir kuyusuna eklendi. Üzerine eşit miktarda %0.5 tripan mavisi (Biological Industries, İsrail) konularak iyice karışması sağlandı. Bu karışımdan 10µl alınarak thoma lamına koyuldu ve mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplandı.

#### 2.2.4. MTT (Metiltiazotetrazolium) Canlılık Metodu

MTT metodu, 1983 yılında ilk olarak Mosmann ve ark. tarafından belirlenmiştir. Bu yöntemin temel prensibi, yaşayan hücrelerde gözlenen mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzim aktivitesinin kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Mossmann 1983). MTT maddesi (tetrazolyum (3-(4,5-dimetiltiyazol -2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid), sarı renkli suda çözünebilir tetrazolium tuzu olup canlı hücreler tarafından alınır ve mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimleri tarafından suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkli formazan kristallerine dönüştürülür (Şekil 2.1) Hücreler sitotoksik bir ajanla muamele edildiğinde hücre canlılığı, dolayısıyla MTT tetrazolium tuzunun formazana indirgenmesi azalmaktadır. Sonuç olarak; canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mavi-mor renkte boyanmakta, ölü veya mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücrelerde ise herhangi bir renk değişimi meydana gelmemektedir. Mitokondriyal süksinat dehidrogenaz aktivitesi ile oluşturulan formazan kristalleri SDS (%10 sodyum dodesil sülfat+steril distile su + 0.01N HCl ) kullanılarak suda çözünür hale getirilir ve oluşturdukları renk şiddeti 570 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülür. Ölçüm sonunda, ilaç uygulanmamış kontrol hücrelerindeki renk şiddeti ile ilaç ile muamele edilen hücrelerdeki renk şiddeti oranlanarak hücrelerin canlılık oranı (yüzdesi) hesaplanır.



Şekil 2.1. MTT reaksiyon şeması (Zhang ve ark. 2011 değiştirilerek alınmıştır).

MTT metodu için, ilk olarak  $5 \times 10^3$  hücre/kuyu 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında ekildikten sonra gece boyunca yapışmaları beklendi. Uygun doz seçimi yapabilmek amacıyla hücreler, Pd (II) bileşiği ile farklı konsantrasyonlarda (1,60-100  $\mu\text{M}$ ) 12, 24 ve 48 saat süreyle muamele edildi. Kullanılacak olan otofaji inhibitörleri 3-MA ve klorokin ise 0,63-40  $\mu\text{M}$  doz aralığında 6, 12 ve 24 saat süreyle hücrelerle muamele edildi. Hücrelerde, ölümün negatif kontrolü (maksimum canlılık) olarak sadece besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı. Kör için ayrılan kuyular içerisine ise 200  $\mu\text{l}$  besiyeri ilave edildi. Ardından hücreler, istenilen tedavi süreleri boyunca  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

İlk çalışmalar neticesinde ve yapılan literatür taramasına uygun olarak inhibitörlerin her ikisi için de 24 saat muamele sürecinde toksik olmayan uygun doz 5  $\mu\text{M}$  olarak belirlendi. Pd (II) bileşiği ile yapılan tedavi sonucunda, inhibitörlerle yapılacak olan kombinasyon çalışmaları için MTT canlılık metoduna göre 48 saat süresinde hücrelerin yüzde ellisini öldüren doz olarak 12,5  $\mu\text{M}$  dozu seçildi.

Otofaji inhibitörleriyle yapılacak olan kombinasyon çalışmaları için 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında  $5 \times 10^3$  hücre/kuyu ekildi. Ertesi gün yapışan hücreler, 5  $\mu\text{M}$  3-MA ve 5  $\mu\text{M}$  klorokin ile 24 saat boyunca muamele edildi. 24 saatlik uygulamanın ardından hücreler Pd (II) kompleksinin 12,5  $\mu\text{M}$  dozu ile 48 saat süresince tedavi edildi.

MTT kimyasalı, 5 mg/ml PBS tamponu içerisinde pH=7,2 olacak şekilde stok olarak hazırlandı. Hazırlanan MTT çözeltisi filtre edilerek steril hale getirildi. 48 saat sonunda her bir kuyucuğa 20  $\mu\text{l}$  MTT boyası eklendikten sonra hücreler  $37^\circ\text{C}$ 'de 4 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Oluşan formazan kristallerini çözünür hale getirmek için bütün kuyucukların üzerine %10'luk SDS solüsyonundan 100  $\mu\text{l}$  eklenerek 18 saat  $37^\circ\text{C}$ 'de %5'lik  $\text{CO}_2$ 'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerde oluşan renk şiddeti spektrofotometrede (FLASHScan S12, Jena, Almanya) 570 nm dalga boyunda ölçüldü ve okunan absorbanslar kullanılarak hücrelerin canlılık oranları belirlendi.

#### **% Canlılık hesabı:**

İlaç uygulanmamış kontrol hücre 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= $[100 \times (\text{Bileşik ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalaması}) / (\text{Kontrol hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalaması})]$  olarak hesaplandı.

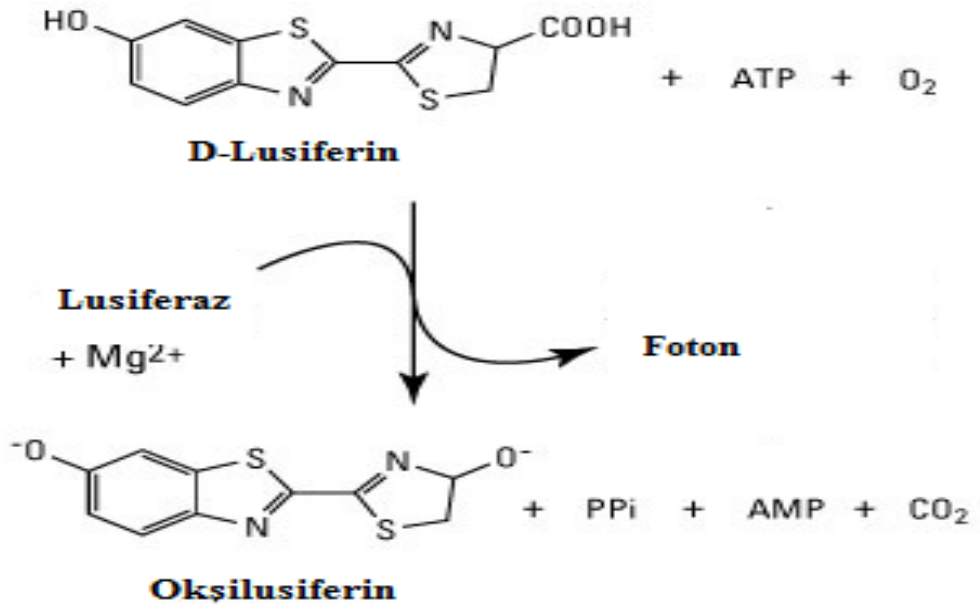


### 2.2.5. ATP (Adenozin Trifosfat) Canlılık Metodu

ATP yöntemi lüminesans bazlı metodolojiye bağlı olarak in vitro sitotoksite ölçümleri açısından MTT yöntemine göre çok daha hassas ve güvenilir olarak yapılabilmektedir. Hücre içerisindeki en önemli enerji deposu olan ATP; biyolojik sentez, sinyal iletimi, taşıma, hareket gibi önemli süreçler için kullanılmaktadır. Hücre ATP hücre canlılığını ölçmede en hassas uç noktadır. Bu yöntemin prensibi hücre kültüründe büyütülen kanser veya normal hücrelerdeki intraselüler ATP içeriğinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. İntrasellüler ATP içeriğinin seviyesi yaşayan hücrelerin sayısının belirlenmesinde kullanılan bir göstergedir (Andreotti ve ark. 1995, Dexter ve ark. 2003, Ulukaya ve ark. 2008).

Kemoterapötik ajanlar veya mitokondriyal toksinler ile muamele sonucu hücrelerde ATP seviyesi önemli ölçüde azalmaktadır. ATP yöntemi; lüsiferinin  $Mg^{2+}$  ve ATP varlığında lüsiferaz enzimi ile oksilüsiferine katalize olup lüminesans sinyal oluşturmasına dayanmaktadır (Şekil 2.2).

Lüminesans sinyal ve ATP konsantrasyonu veya hücre sayısı arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (Andreotti ve ark. 1995, Mueller ve ark. 2004, Wadhawan ve ark. 2010).



Şekil 2.2. ATP elde edilme reaksiyonu (Andreotti ve ark. 1995 değiştirilerek alınmıştır).

ATP yönteminde, otofaji inhibitörleri ile yapılan kombinasyon çalışmasını doğrulamak için 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında  $5 \times 10^3$  hücre/kuyu ekildi. Ertesi gün klorokin ve 3-MA'nın 5  $\mu$ M dozları 100  $\mu$ l içerisinde olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı. Hücreler 37<sup>0</sup>C'de % 5 'lik CO<sub>2</sub>'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik sürenin sonunda ortamdan inhibitörler uzaklaştırılarak Pd (II) bileşiğinin 12,5  $\mu$ M dozu 96 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücrelere uygulandı. Negatif kontrol (maksimum canlılık, tedavi edilmemiş hücre kontrolü) için 100  $\mu$ l besiyeri içerisine 100  $\mu$ l  $5 \times 10^3$  hücre ekildi. Kör için ayrılan kuyular içerisine ise 200  $\mu$ l besiyeri ilave edildi. Pozitif kontrol (minimum canlılık, % 100 öldüren doz) olarak 100  $\mu$ l hücre süspansiyonu içerisine 100  $\mu$ l hücre ölümünü % 100 indüklediği bilinen % 1'lik Triton X-100 ilave edildi. Hücreler 37<sup>0</sup>C'de % 5'lik CO<sub>2</sub>'li etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında intraselüler ATP içeriği ATP kiti kullanılarak belirlendi. İlk olarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarındaki her kuyudan 150  $\mu$ l atıldı. ATP kitinin içerisindeki hücre lizis tamponundan 50  $\mu$ l her kuyuya ilave edildi ve böylece hücre içerisindeki ATP'nin dışarı çıkması sağlandı. 20 dakikalık bekleme süresinin ardından hücre kültür süspansiyonundan 50  $\mu$ l beyaz renkli 96 kuyulu hücre kültür kaplarına aktarıldı. Ardından her kuyuya 50  $\mu$ l/kuyucuk lusiferin-lusiferaz enzimi içeren solüsyon ilave edildi.

Elde edilen ATP miktarı lusiferin-lusiferaz bioluminesans reaksiyonu yardımıyla ölçme zamanı 1 saniye olacak şekilde luminometre (FLx800 Mikroplate Floresans Okuyucu) kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar rölatif ışık ünitesi (RLU) olarak verilecektir. Böylece tedavi alan ve almayan hücrelerin RLU değerlerine göre yeni sentezlenmiş bileşiklerin sitotoksik/sitostatik etkileri hakkında bilgi edinilecektir.

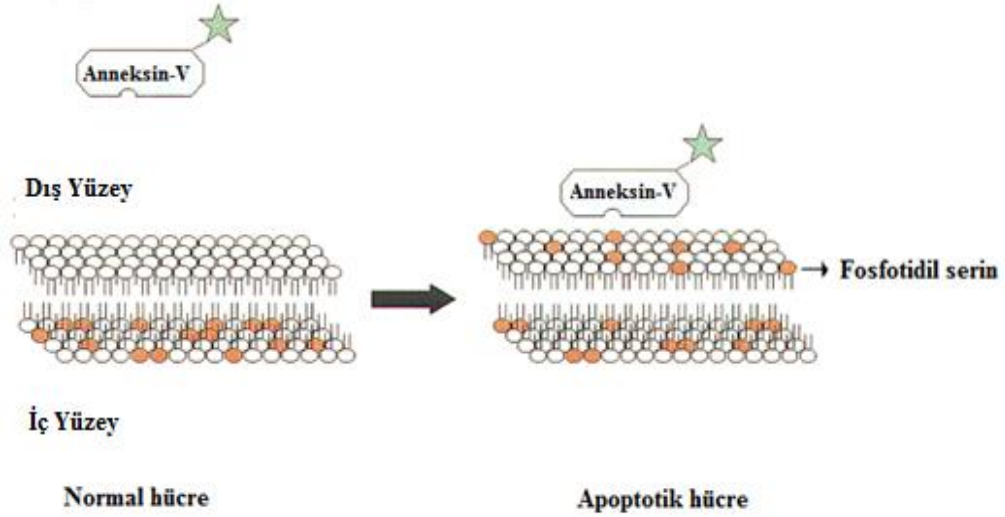
(%) Canlılık hesabı =  $[100 \times (\text{Bileşik ile tedavi edilen hücre absorbansı} - \text{kör ortalama}) / (\text{Kontrol hücre absorbansı} - \text{kör ortalama})]$  olarak hesaplanmaktadır.

## **2.2.6. Floresan Boyama Yöntemi ile Ölüm Modunun Belirlenmesi**

### **2.2.6.1. Anneksin-V Boyama Metodu**

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan PS bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozisle ölürse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar (Şekil 2.3). Bu yer değiştirme apoptotik hücrelerde henüz membran bütünlüğünün bozulmadığı yani ölümün erken

dönemlerinde meydana gelir (Ulukaya 2013). Anneksin-V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan PS'ye bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücreler görünür hale getirilir ve floresan mikroskopu ile incelenebilir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için yöntem çalışılırken ikinci boya olarak Propidyum iyodür (PI) eklenmektedir. PI, sadece membran hasarlı hücelere girebilen, dolayısıyla tüm ölü hücreleri (primer nekrotik veya geç apoptotik/sekonder nekrotik) boyayabilen floresan nükleik asit boyasıdır. Bu boya canlı hücreler tarafından dışarı atılmaktadır. Primer nekrozis (hücre hacminin artması fakat fragmente ya da piknotik nükleusların gözlenmemesi) toksik koşullar (hipoksi, iskemi, hipertermi vb.) altında gerçekleşen klasik ölüm şeklidir. Sekonder nekrozis ise, piknotik ya da fragmente nükleus ile karakterize olup, apoptozisin geç safhasıdır. Hücre kültürü ortamında apoptozise giden hücrelerin membranları intakt (erken apoptozda) 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. Sekonder nekroz geliştikten sonraki aşamalarda hücreler membran bütünlüklerinin bozulması ile non-vital boyalar ile boyanmaya başlarlar. Dolayısıyla PI pozitif ve Hoechst pozitif boyanmaktadır. Hücreler eş zamanlı olarak Anneksin-V-Fluorescein (yeşil floresan) ve non-vital boya olan propidyum iyodür (kırmızı floresan) ile boyanır. Canlı hücreler; FITC-/PI-, erken apoptotik hücreler; FITC+/PI- ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler; FITC+/PI+ boyanırlar ve bu şekilde birbirlerinden ayırt edilirler (Güleş ve Eren 2008, Ulukaya ve ark. 2011).



**Şekil 2.3.** Apoptotik hücrelerde fosfotidil serin translokasyonu (Van Engeland ve ark. 1998'den değiştirilerek alınmıştır).

PC-3 ve LNCaP prostat kanser hücreleri sayılarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 100  $\mu$ l içerisinde  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde (3 tekrarlı) ekim yapıldı. 24 saat  $37^{\circ}\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyonu takiben üzerlerine klorokin ve 3-MA'nın 5  $\mu\text{M}$  dozları 100  $\mu$ l içerisinde olacak şekilde uygulandı. Negatif kontrol kuyularından 100  $\mu$ l besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 100  $\mu$ l taze besiyeri ilave edildi. İnhibitör uygulamalarını takiden hücreler Pd (II) bileşiğinin 12,5  $\mu\text{M}$  dozu ile muamele edilerek 12 ve 24 saat süreyle  $37^{\circ}\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sürelerinin sonunda hücreleri zedelemeyen üzerlerinden tüm besiyeri (yaklaşık 180  $\mu$ l) uzaklaştırılarak Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche, Mannheim, Germany) içeriğine uygun olarak çalışıldı. 500  $\mu$ l Incubation Buffer içerisine 5  $\mu$ l Annexin-V-Fluorescein ve 5  $\mu$ l PI boyası pipetlendi. Ayrıca hücrelerin nükleus morfolojisini de incelemek amacıyla Hoechst 33342 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) boyası son konsantrasyonu 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  (40X sulandırılarak) olacak şekilde bu karışıma eklendi. Her kuyuya boya karışımından 30  $\mu\text{L}$  pipetlenerek yarım saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tedavilerin hücrelerde sebep olduğu ölüm şekli floresan mikroskop altında değerlendirildi.

### 2.2.7. M30-Antijen Testi ile Ölüm Modunun Belirlenmesi

Sitokeratinler (CK), kanser tanısında kullanılan intermediyat filament protein ailesine ait proteinlerdir. Apoptozis esnasında sitoskeletonin önemli bir protein olan CK18 sadece apoptotik hücrelerde aktifleşen bir enzim grubu olan kaspazların etkisiyle kırılarak, kırılmış CK18'i (CK18-Asp396) oluşturmaktadır (Leers ve ark. 1999). M30 monoklonal antikor, özellikle CK18'in Asp396'da kırılan fragmanını (M30 antijen) tanıyarak CK'lerin apoptotik bir belirteç olarak kullanımını sağlamaktadır (Ueno ve ark. 2003). Böylece apoptozise özgü bir belirteç olan kırılmış CK18, ELISA yöntemiyle saptanmaktadır. Bu özel CK18'i tanıyan M30 antikorunu, hücrelerin bulunduğu ortamlarla temas ettirilirse ve eğer ortamda apoptotik hücreler de var ise, apoptozisin varlığı gösterilmiş olur. ELISA metoduyla M30 Antijen fragmentini belirlemek için, PC-3 ve LNCaP prostat kanser hücreleri sayılarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 100 µl içerisinde  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde (3 tekrarlı) ekim yapıldı. 24 saat 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyonu takiben üzerlerine klorokin ve 3-MA'nın 5 µM dozları 100 µl içerisinde olacak şekilde uygulandı. Negatif kontrol kuyularından 100 µl besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 100 µl taze besiyeri ilave edildi. İnhibitör uygulamalarını takiden hücreler Pd (II) bileşiğinin 12,5 µM dozu ile muamele edilerek 48 saat süreyle 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Hücrelerde apoptozisin pozitif kontrolü olarak A549 hücrelerinde 12,5 µM sisplatin kullanıldı. İlaç uygulamalarını takiden hücreler 48 saat 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li 48 saatlik inkübasyon sonunda tüm kuyulara 10µl %10'luk NP-40 (Sigma, St. Louis, MO) ilave edildi. 15 dakika oda sıcaklığında 600 rpm çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Tüm kuyulardaki supernatant toplandı ve 2000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilip M30 Apoptosense ELISA (M30-Apoptosense ELISA kit, Peviva, Bromma, Sweden) kit içeriğine uygun olarak çalışıldı. Supernatantlar, kitin içerisinde yer alan CK18'i tanıyan fare monoklonal M30 antikorunu kaplı striplere 25 µl pipetlendi. Tüm örnekler üzerine 75 µl horseradish peroksidaz konjugatı eklendi. 4 saat boyunca 600 rpm çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda örnekler 250 µl yıkama solüsyonu ilave edilerek 5 kez yıkama yapıldı ve hemen ardından 200 µl TMB substratı ilave edilerek 20 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 50 µl stop çözeltisi ilave edildi ve oluşan renk şiddeti, spektrofotometrik olarak 450 nm'de (FLASHScan S12, Jena, Almanya) okundu.

### 2.2.8. Akım Sitometri Analizleri

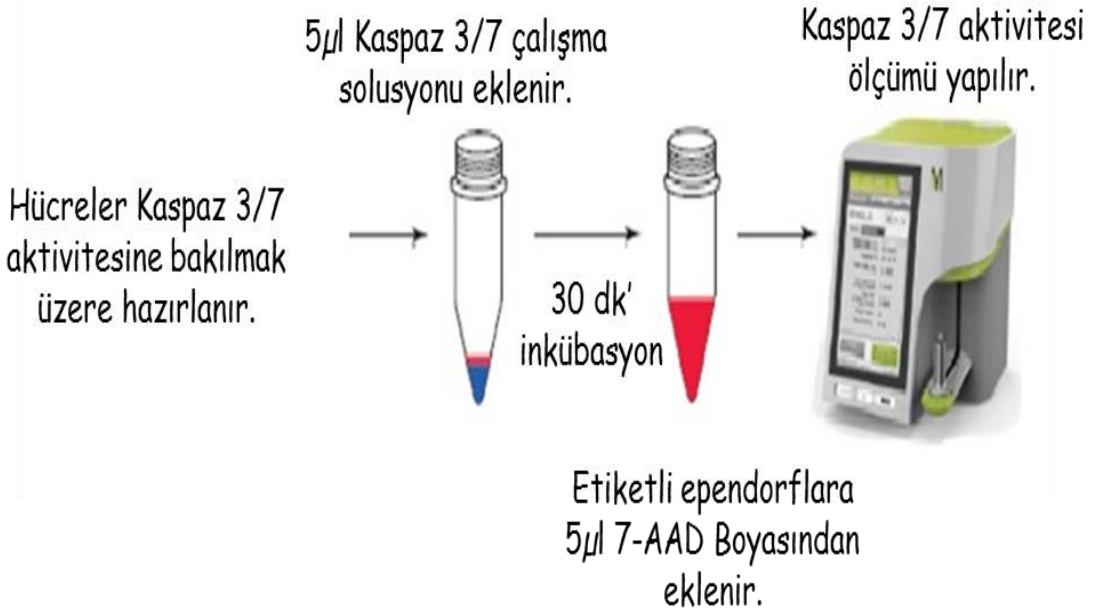
Akım sitometresindeki analizler için hücrelerin sıvı içinde süspansiyon halinde bulunması gerekmektedir. Ölçüm sırasında hücreler sıvı içerisinde tek tek askıda olmalı ve hücreleri içeren süspansiyon sürekli bir akıyla lazer ışını içinden geçmelidir. Akım sitometri cihazında bir saniyede binlerce hücre, 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. Hücreler yüzeylerindeki veya hücre içindeki proteinlere özgün antikolarla inkübe edilerek antijenlere bağlanmaları sağlanır. Her spesifik antikor FITC, PE, PerCP (Peridinin klorofil), 7-AAD (7-Aminoaktinomisin D) gibi floresan boyalarla işaretlenmiştir. Böylece belirli antijene sahip hücrelerin lazer ışını ile karşılaştığında verdiği floresan sinyalleri değerlendirerek o hücrenin hangi spesifik antijeni taşıdığı belirlenebilir (Karaboz ve ark. 2008).

#### 2.2.8.1. Kaspaz 3/7 Testi

Kaspazlar, programlı hücre ölümü olan apoptozis sürecinde merkezi bir öneme sahip sistein proteazlardır (Riedl ve ark. 2004). Apoptotik sinyal boyunca etkili olan efektör kaspazlardan: kaspaz 3/7 aktivasyonu membran integritesi ve hücre ölümü hakkında önemli bilgiler vermektedir.

Kaspaz 3/7 testi için PC-3 ve LNCaP hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına PC-3 1 ml içerisinde  $100 \times 10^3$  hücre LNCaP 1 ml içerisinde  $150 \times 10^3$  olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat  $37^{\circ}\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyonu takiben üzerlerine klorokin'nin 5  $\mu\text{M}$  dozu 1 ml besiyeri içerisinde olacak şekilde uygulandı. Negatif kontrol kuyularından 1 ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1 ml taze besiyeri ilave edildi. 24 saat süren inhibitör uygulamalarını takiden hücreler Pd (II) bileşiğinin 12,5  $\mu\text{M}$  dozu ile muamele edilerek 12 ve 24 saat süreyle  $37^{\circ}\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdaki aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0.5 ml

%0.05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda mikroskopla incelendiğinde yüzeyden ayrıldığı gözlenen hücreler, tripsinin inhibe olması için on katı besiyeri ile muamele edildi. Böylelikle tripsinin hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra hücre membranına zarar vermeye başlaması engellenmiş oldu. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve 1 ml'sinde 2x10<sup>4</sup>- 5x10<sup>5</sup> hücre olacak şekilde hücre peleti sulandırıldı. Tedavi gruplarını içeren etiketli ependorflara hücre süspansiyonundan 50 µl eklendi. Daha sonra kaspaz3/7 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<sub>2</sub>'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 5 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra muse cihazında kaspaz3/7 aktivitesi değerlendirildi (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** Kaspaz 3/7 Aktivitesinin Ölçülmesi (Anonim 2013a).

### 2.2.8.2. Anneksin-V Testi

Anneksin-V, PS için yüksek affinite ile  $Ca^{+2}$  bağlayıcı bir proteindir ve FITC gibi floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücreleri görünür hale getirilebilmektedir. PS moleküllerinin  $Ca^{+2}$  iyonu varlığında Anneksin-V-FITC kompleksi ile bağlanması sonucu apoptotik hücre ölüm yüzdesi belirlenmektedir. Bu yöntemde ayrıca 7-Aminoaktinomisin D (7-AAD) boyasında kullanılmaktadır. Bu boya DNA için güçlü affiniteye sahip floresans özellikte bir kimyasal bileşiktir. İntakt (sağlam) hücre zarından kolayca geçemez, bu nedenle zar bütünlüğü bozulmuş hücrelerde (geç apoptotik; nekrotik) çift zincirli DNA'nın GC bakımından zengin bölgelerine bağlanmaktadır.

Boyaların hangi aşamadaki hücrelerle nasıl yanıt verdiği aşağıda özetlenmiştir;

**Non-apoptotik hücreler:** Anneksin V (-) ve 7- AAD (-)

**Erken apoptotik hücreler:** Anneksin V (+) ve 7- AAD (-)

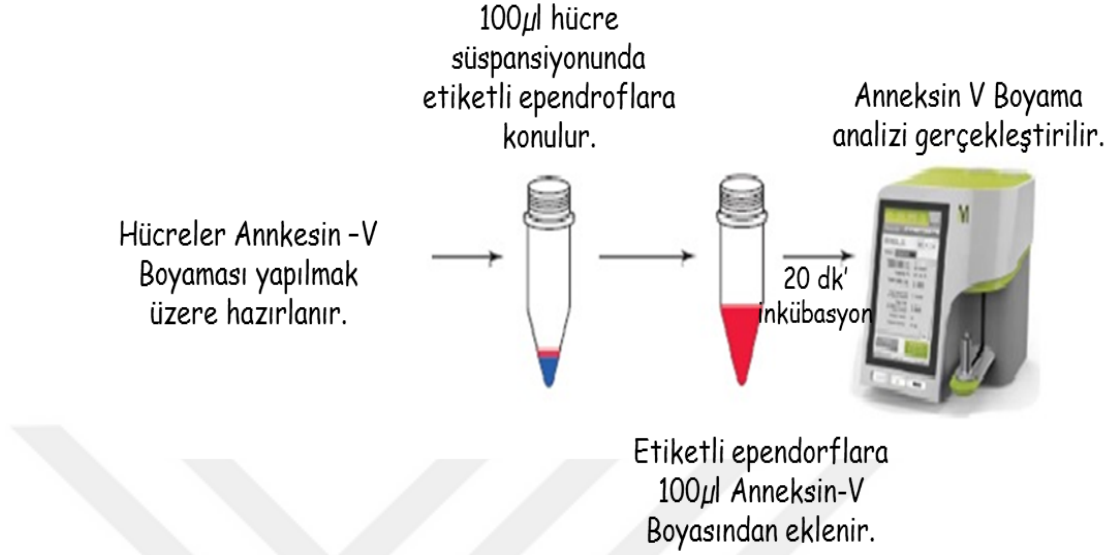
**Geç apoptotik hücreler ve ölü hücreler:** Anneksin V (+) ve 7- AAD (+)

**Çok fazla nükleer debris:** Anneksin V (-) ve 7- AAD (+)

Muse™ Annexin V & Dead Cell Kiti kullanmak için, PC-3 ve LNCaP hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına PC-3 1 ml içerisinde  $100 \times 10^3$  hücre LNCaP 1 ml içerisinde  $150 \times 10^3$  olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat  $37^\circ C$ , %5  $CO_2$ 'li ortamda inkübasyonu takiben üzerlerine klorokin'nin 5  $\mu M$  dozu 1 ml besiyeri içerisinde olacak şekilde uygulandı. Negatif kontrol kuyularından 1 ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1 ml taze besiyeri ilave edildi. 24 saat süren inhibitör uygulamalarını takiben hücreler Pd (II) bileşiğinin 12,5  $\mu M$  dozu ile muamele edilerek 12 ve 24 saat süreyle  $37^\circ C$ , %5  $CO_2$ 'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Tedavi süreleri sonunda kit bileşenleri oda sıcaklığına getirildi. İnkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15 ml'lik falkonlara toplandı ve negatif kontrol kuyularının süpernatantı uzaklaştırıldı. Hücreler tripsin ile kaldırıldı ve ilgili falkonlara toplandı ve 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve 100  $\mu l$  %1 FBS içeren besiyeri eklendi ve etiketli ependorflara 100 $\mu l$  hücre süspansiyonu alındı. Bu ependorflara 100 $\mu l$  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 2.5).



Şekil 2.5. Annkesin-V Boyama (Anonim 2013b).

### 2.2.8.3. Mitokondri Membran Potansiyeli Testi

Mitokondride meydana gelecek değişiklikler hücre sağlığı ve stresi hakkında bilgi veren önemli belirteçlerdendir Mitokondri apoptozis sürecinde önemli bir role sahip olan regülatörlerden biridir. Apoptotik yolların kesiştiği bir kavşak noktası olan mitokondri aktivasyonu (sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması) apoptotik süreçte geri dönüşümsüz noktayı gösterir (Finkel 2001). Bu yüzden apoptotik uyarıyı takiben, hücrelerde mitokondriyal bütünlüğün kaybı gözlemlenmektedir.

Mitokondri membran potansiyeli testi için PC-3 ve LNCaP hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına PC-3 1 ml içerisinde  $100 \times 10^3$  hücre LNCaP 1 ml içerisinde  $150 \times 10^3$  olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat  $37^{\circ}\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyonu takiben üzerlerine klorokin'nin 5  $\mu\text{M}$  dozu 1ml besiyeri içerisinde olacak şekilde uygulandı. Negatif kontrol kuyularından 1ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1ml taze besiyeri ilave edildi. 24 saat süren inhibitör uygulamalarını takiden hücreler Pd (II) bileşiğinin 12,5  $\mu\text{M}$  dozu ile muamele edilerek 24 saat süreyle  $37^{\circ}\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire

edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0,5 ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15 ml'lik falkonlara toplandı 800 rpm'de 5dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve %1 FBS içeren besiyeri ile hücre peletleri sulandırıldı. Ardından 95 µl çalışma soluyonu eklendi ve kısa bir pipetaj işleminin ardından hücreler 20 dk 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücrelere 5 µL 7-AAD boyası eklenerek orta hızda yaklaşık 5 saniye vorteks yapıldı ve örnekler 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı (Şekil 2.6).



**Şekil 2.6.** Mitokondri Membran Potansiyelinin Ölçülmesi (Anonim 2013c).

#### 2.2.8.4. Gamma H2A.X Aktivasyonu ile DNA Hasarının Belirlenmesi

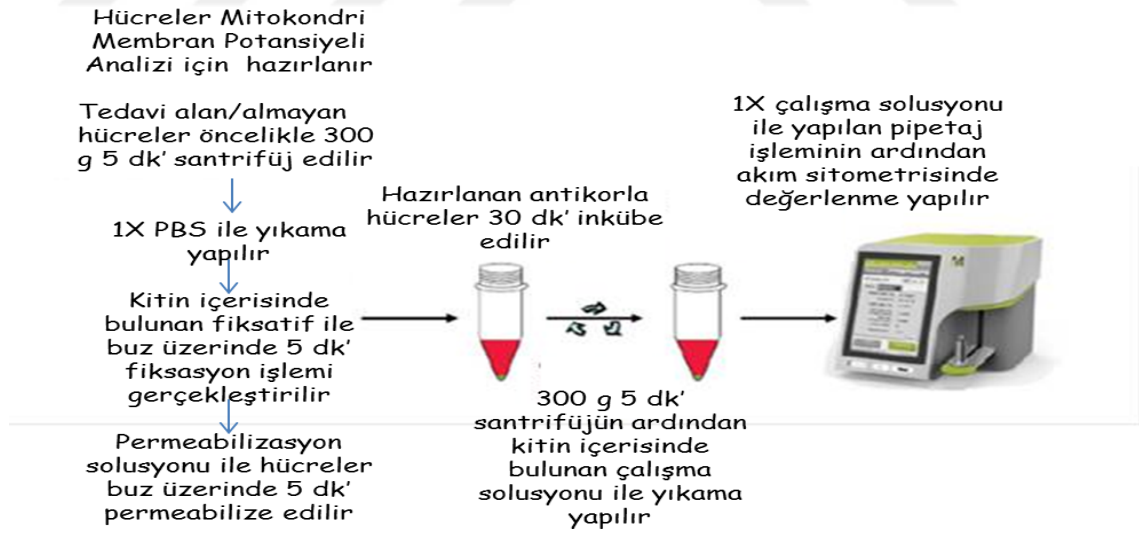
DNA molekülü sürekli olarak genotoksik strese yol açan çeşitli faktörlerin etkisi altındadır. Endojen ve ekzojen kökenli pek çok fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktör DNA zincir kırıklarının oluşumuna neden olan şeker-fosfat omurgasında kırılmalara yol açar. Özellikle DNA çift zincir kırıkları, hücrenin yaşamı boyunca sürekli olarak ortaya çıkabilen en tehlikeli lezyon türleridir ve bunların etkili bir şekilde onarılması hücrenin sağlıklı bir şekilde fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için son derece önemlidir. Çünkü tamir edilemeyen bu hasar; genomik kararsızlık, kanser gelişimi ve neoplastik

transformasyona yol açan mutasyonların oluşumuna neden olabilmektedir (Kuo ve Yang 2008, Podhorecka ve ark. 2010).

DNA tamirinin gerçekleştiği kromatinlerin yapısal ve işlevsel birimleri nükleozomlardır. Her nükleozom 147 baz çiftinden oluşan DNA zinciri ve bu zincirin etrafında sarıldığı dört çekirdek histonundan her birinin iki kopyasından oluşur. Nükleozom yapısını meydana getiren dört çekirdek histon ailesi H2A, H2B, H3 ve H4'tür. H2A histon protein ailesinin de H2A1, H2A2, H2AX ve H2AZ gibi varyantları vardır. Önemli bir H2A tipi olan H2AX proteini, hücre ve doku tipine bağlı olarak memeli H2A histon havuzunun %2-25'lik bir bölümünü oluşturur. Ayrıca karboksil kuyruk kısmında son derece korunmuş özel bir diziyeye sahip olduğu için H2AX proteini, ökaryotlarda önemli ölçüde korunmuş olan bir H2A histon tipidir. Diğer H2A histon ailesi üyeleri gibi, H2AX de fosforilasyon, asetilasyon ve ubikuitinasyona uğrayarak pek çok hücreyel olayın düzenlenmesini sağlar. Hasarlı bölgelerde görev alan bu histon tipi, DNA hasar tamiri sürecinde anahtar bir rol oynadığı için, hücre bölünmesi ve büyümesi, immüno-reseptörlerin düzenlenmesi gibi pek çok hücreyel olay, genomik kararsızlık ve DNA hasar tamiri ile ilgili sendromlarla yakından ilişkilidir (Kinner ve ark. 2008, Rakiman ve ark. 2008). H2AX, DNA hasarına yanıt yollarında görev alan ilk proteinlerden birisidir. Fosforile olmuş H2AX, gammaH2AX ( $\gamma$ H2AX) adını alır ve DNA çift zincir kırıkları oluştuğunda görülebilir nükleer odaklar oluşturur. Bu nedenle  $\gamma$ H2AX'nin ekspresyonu DNA çift zincir kırıklarının tespitinde hassas bir indikatör olarak son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır. DNA tamiri gerçekleştikten sonra  $\gamma$ -H2AX, protein fosfataz 2A tarafından defosforile edilir ve böylece hücredeki  $\gamma$ -H2AX seviyesi düzenlenir. Bu nedenle  $\gamma$ -H2AX 'in de fosforilasyonu DNA tamir çalışmaları için de çok uygun bir parametre oluşturur.

$\gamma$ -H2AX 'in fosforilasyonu belirlemek amacıyla Muse™ H2A.X Activation Dual Detection Kit kullanıldı. Bu amaçla öncelikle, PC-3 ve LNCaP hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına PC-3 1 ml içerisinde  $100 \times 10^3$  hücre LNCaP 1 ml içerisinde  $150 \times 10^3$  olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat  $37^{\circ}\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyonu takiben üzerlerine klorokin'nin 5  $\mu\text{M}$  dozu 1 ml besiyeri içerisinde olacak şekilde uygulandı. Negatif kontrol kuyularından 1ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1ml taze besiyeri ilave edildi. 24 saat süren inhibitör uygulamalarını takiden hücreler Pd (II) bileşiğinin 12,5  $\mu\text{M}$  dozu ile muamele edilerek 24 saat süreyle  $37^{\circ}\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'li

ortamda inkübasyona bırakıldı. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0,5ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C’de, %5 CO<sub>2</sub>’li ortamda 5dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler 300g 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda örnekler 1X PBS ile yıkandı. Fiksasyon aşaması için kit içerisindeki fiksatif kullanılarak örnekler buz üzerinde 5 dk fikse edildi. Daha sonra örnekler 300 g 5 dk santrifüj edildi ve supernatantlar atılarak hücreler permeabilizasyon için kit içerisindeki permeabilizasyon solüsyonu ile 5 dk buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler 300g 5 dk santrifüj edildi ve daha sonra supernatant kısmı atılarak kit içerisindeki antikolar ile hazırlanan çalışma solüsyonu ile 30 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler 300g 5 dk santrifüj edildi ve çalışma solüsyonu ile sulandırılarak DNA hasarının belirlenmesi üzerine Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı (Şekil 2.7).



**Şekil 2.7.** DNA Hasarının ( $\gamma$ -H2AX) Ölçülmesi (Anonim 2013d).

### 2.2.8.5. Oksidatif Stres Belirlenmesi

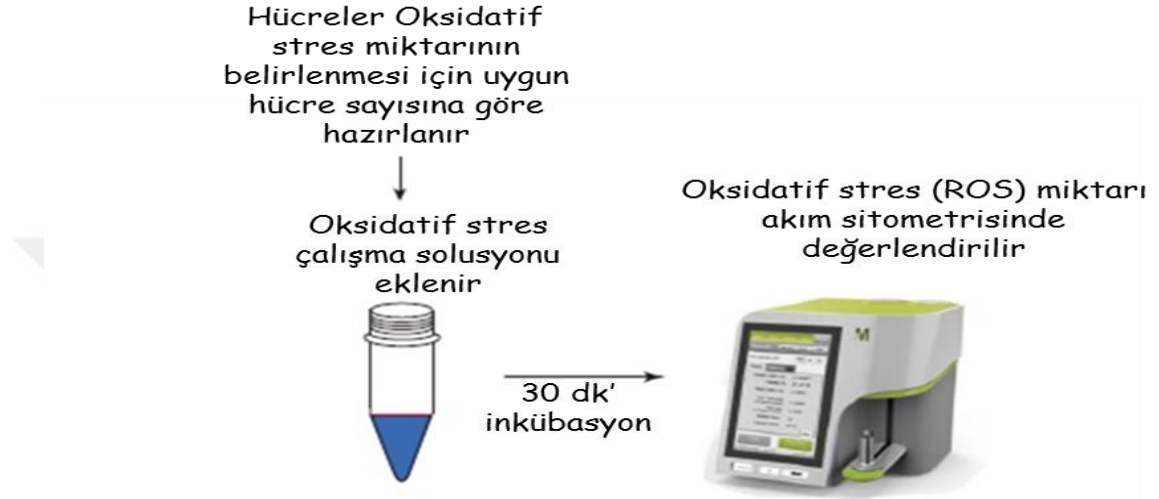
ROS (Reaktif oksijen türleri) normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ )'dir. ROS, çeşitli serbest radikallerin olduğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar. Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin aktif yerinde ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluşabilir. ROS oluşumu enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı ( $pO_2$ ), ozon ( $O_3$ ) ve azot dioksit ( $NO_2^{\cdot}$ ), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar ve hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Kanser, alzheimer, sepsis, diyabet ve kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi çeşitli patofizyolojik hastalıklarda önemli rol oynamaktadır (Dumont ve Beal 2011, Pelicano 2014).

Kullanılan Muse® Oksidatif Stres kiti de hücre içi superoksit radikallerini saptayarak hücrelerde görülen oksidatif stres yüzdesi hakkında bilgi vermektedir. Kit içeriğindeki oksidatif stress solusyonunda hücrelerdeki ROS seviyesini saptamaktadır.

Oksidatif stres testi için, PC-3 ve LNCaP hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına PC-3 1 ml içerisinde  $100 \times 10^3$  hücre LNCaP 1 ml içerisinde  $150 \times 10^3$  olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat  $37^{\circ}C$ , %5  $CO_2$ 'li ortamda inkübasyonu takiben üzerlerine klorokin'nin 5  $\mu M$  dozu 1ml besiyeri içerisinde olacak şekilde uygulandı. Negatif kontrol kuyularından 1ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1 ml taze besiyeri ilave edildi. 24 saat süren inhibitör uygulamalarını takiden hücreler Pd (II) bileşiğinin 12,5  $\mu M$  dozu ile muamele edilerek 24 saat süreyle  $37^{\circ}C$ , %5  $CO_2$ 'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdaki aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0,5ml %0,05 Trypsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler  $37^{\circ}C$ 'de, %5  $CO_2$ 'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15ml'lik falkonlara toplandı 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücre peleti ml'sinde  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  hücre olacak şekilde kit içeriğindeki oksidatif stres çalışma

solusyonu muamele edilerek kısa bir pipetaj işleminin ardından 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda örneklerin ölçümü Muse™ Cell Analyzer cihazı ile gerçekleştirildi (Şekil 2.8).



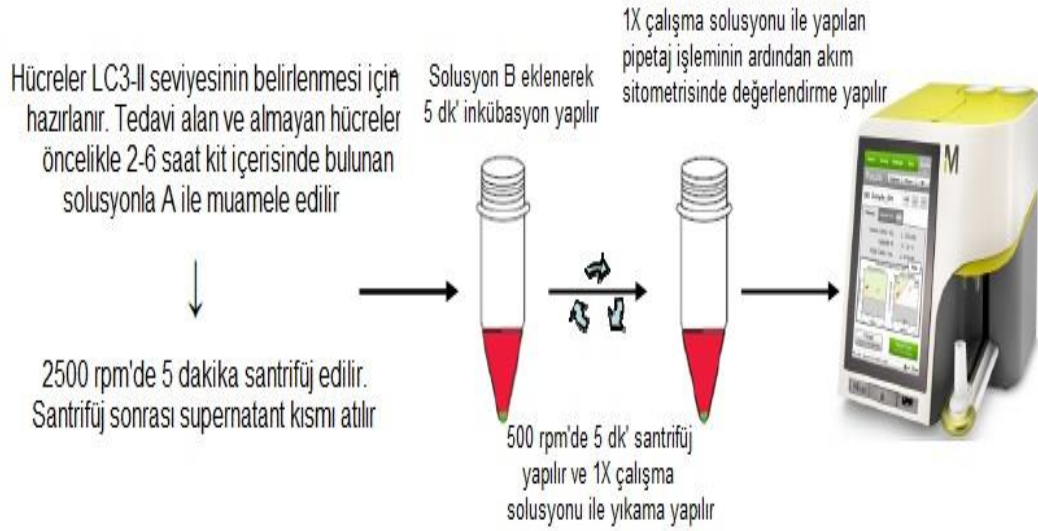
**Şekil 2.8.** Oksidatif Stres Miktarının (ROS) Ölçülmesi (Anonim 2014e).

#### 2.2.8.6. LC3-II Belirlenmesi

LC3, MAP1LC3 (“Microtubule-associated protein 1 light chain 3”, kısaca LC3) ya da mayada Atg8 adı verilen ve otofajik vezikül zar uzamasında rol oynayan önemli bir proteindir. Bütün hücrelerin kendi, endojen Atg8/LC3 protein ifadesi mevcuttur. Otofaji aktivasyonu sonrasında, LC3 proteini, bir yağ molekülü olan fosfatidiletanolamine kovalent olarak bağlanır, yağ moleküllerinin otofajik zarlara taşınmasına ve böylelikle zar uzamasına neden olmaktadır. Serbest LC3, LC3-I olarak adlandırılırken yağ molekülüne konjuge olmuş ve otofajik veziküllere bağlı LC3 ise LC3-II olarak adlandırılmaktadır. Otofaji uyarımı sonrası LC3-I’in LC3-II’ye dönüşmesi, bu olayın son yıllarda genel kabul gören bir otofaji belirteci olarak kullanılmasına neden olmuştur. Kullanılan Muse® LC3 kiti, hücrelerde otofajik veziküllere bağlı LC3-II yüzdesi hakkında bilgi vermektedir.

LC3-II testi için, PC-3 ve LNCaP hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına PC-3 1 ml içerisinde  $100 \times 10^3$  hücre LNCaP 1 ml içerisinde  $150 \times 10^3$  olacak şekilde

ekim yapıldı. 24 saat 37<sup>0</sup>C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyonu takiben üzerlerine klorokin'nin 5 µM dozu 1ml besiyeri içerisinde olacak şekilde uygulandı. Negatif kontrol kuyularından 1ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1 ml taze besiyeri ilave edildi. 24 saat süren inhibitör uygulamalarını takiden hücreler Pd (II) bileşiğinin 12,5 µM dozu ile muamele edilerek 24 saat süreyle 37<sup>0</sup>C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdaki aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0,5 ml %0,05 Trypsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37<sup>0</sup>C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15ml'lik falkonlara toplandı 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tedavi alan ve almayan hücre grupları kit içerisindeki otofaji solüsyonu A ile 2-6 saat arası inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant kısmı aspire edildi. Her bir hücre grubuna 100 µl otofaji solüsyonu B eklendi ve sonrasında 5 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücreler 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve 1X çalışma solüsyonu ile yıkama yapıldı. Çalışma solüsyonu ile yapılan pipetaj işleminin ardından örneklerin ölçümü Muse™ Cell Analyzer cihazı ile gerçekleştirildi (Şekil 2.9).



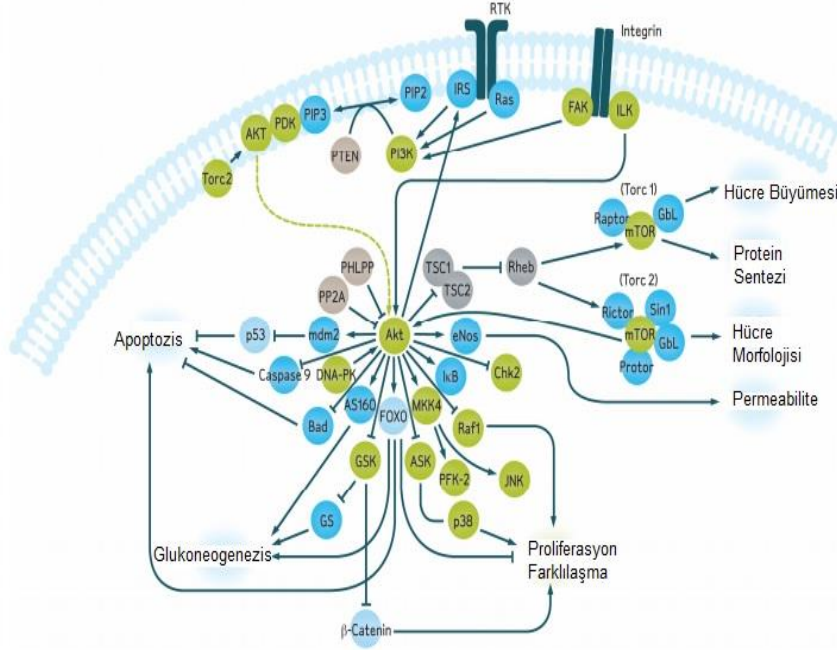
**Şekil 2.9.** LC-3 miktarının belirlenmesi (Anonim 2014f).

### 2.2.8.7. PI3K (Fosfatidilinositol 3 kinaz) Aktivasyonunun Belirlenmesi

Kanser hücrelerinde sinyal iletimi sıklıkla sitoplazmik kinazları (serin/tirozin kinazlar gibi) tetikleyen reseptör tirozin kinazların (RTK) aktivasyonunu içerir. Kanserde önemli olduğu saptanan en önemli sinyalizasyon yolu arasında PI3K/ AKT kinaz zinciri yer almaktadır. Önemli bir sinyal yolu olan PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı hücre siklusunun kontrolü, anjiogenez, farklılaşma, hücre büyümesi ve hücre proliferasyonu, metabolizma ve apoptozis gibi süreçlerinde önemli role sahiptir (Vara 2004, Jiang ve Liu 2008) (Şekil 2.10). PKB (Protein Kinaz B)/Akt'ın tam aktivasyonu, Thr 308 ve Ser 473'ün fosforilasyonuna ihtiyaç duyar. PKB/Akt tedavi olan hücrelerdeki platelet derivated growth faktör (PDGF), epidermal growth faktör (EGF), insülin, trombin ve nerve growth faktör (NGF)'ü içeren geniş yelpazedeki büyüme uyarıcıları ile aktive olur. PKB/Akt regülasyonunda lipid kinaz PI3K gerekmektedir. PI3K'nın aktive edilmiş formlarının sentezi, PKB/Akt uyarımı ile sonuçlanır. PI3K aktivasyonu sonrası membran-sınır lipid fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat(PIP3) sentezlenir ve PH alanına bağlanarak 3-fosfatidilinositol bağımlı kinaz (PDK1)'e katılır. IP3 ve fosfatidilinositol 3,4-bifosfat, PKB/Akt'ın PH alanı ile etkileşerek PKB/ Akt'ı plazma membranına katar. PDK1, PKB/Akt'ın Thr 308'ini ve PDK2 Akt'ın Ser 473'ünü fosforile eder. Her iki



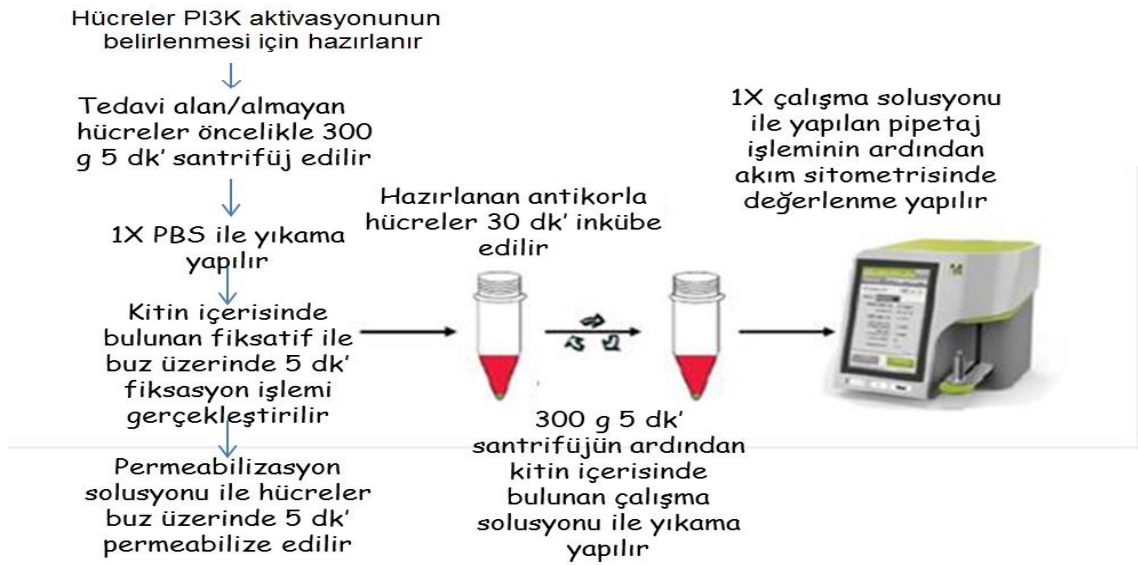
tarafında fosforilize edilen PKB/Akt aktif hale gelir ve hedef proteinleri fosforilize eder. Diğer taraftan mitojen aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) ve aktive edilmiş protein kinaz 2 (MAPKAP-kinaz 2) in vitro olarak Ser 473'ü fosforilize edebilir ve PKB/Akt'ın çeşitli hücrel stres durumlarında aktivasyonuna yol açabilmektedir (Horowitz ve ark. 2004).



**Şekil 2.10.** PI3K/AKT sinyal yolağı (Anonim 2013g).

PI3K 'ın fosforilasyonu belirlemek amacıyla Muse™ PI3K Activation Dual Detection Kit kullanıldı. Bu amaçla öncelikle, PC-3 ve LNCaP hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına PC-3 1 ml içerisinde  $100 \times 10^3$  hücre LNCaP 1 ml içerisinde  $150 \times 10^3$  olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat  $37^{\circ}\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyonu takiben üzerlerine klorokin'nin 5  $\mu\text{M}$  dozu 1 ml besiyeri içerisinde olacak şekilde uygulandı. Negatif kontrol kuyularından 1ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1ml taze besiyeri ilave edildi. 24 saat süren inhibitör uygulamalarını takiden hücreler Pd (II) bileşiğinin 12,5  $\mu\text{M}$  dozu ile muamele edilerek 24 saat süreyle  $37^{\circ}\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek

uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0,5 ml %0.05 Trypsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 5dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler 300 g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda örnekler 1X PBS ile yıkandı. Fiksasyon aşaması için kit içeriğindeki fiksatif kullanılarak örnekler buz üzerinde 5 dk fikse edildi. Daha sonra örnekler 300 g'de 5 dk santrifüj edildi ve supernatantlar atılarak hücreler permeabilizasyon için kit içerisindeki permeabilizasyon solüsyonu ile 5 dk buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler 300 g'de 5 dk santrifüj edildi ve daha sonra supernatant kısmı atılarak kit içerisindeki antikorlar ile hazırlanan çalışma solüsyonu ile 30 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler 300 g'de 5 dk santrifüj edildi ve çalışma solüsyonu ile sulandırılarak PI3K aktivasyonunun belirlenmesi üzerine Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı (Şekil 2.11).



**Şekil 2.11.** p-Akt (Ser473) düzeyinin ölçülmesi (Anonim 2013h).

### 2.2.9. Akridin Boyama

Otofajik veziküllerin hücre içi yıkım yerleri lizozomlar olduğu için, otofajinin aktive olduğu koşullarda otolizozomal etkinliğin uyarılması nedeniyle, hücre içi toplam lizozom etkinliği artmaktadır. Lizozomal belirteçler akridin portakal rengi (“acridin orange”) kullanılabilir. Bu boya, lizozomları pH'nin asit olduğu durumlarda boyamakta ve aktif lizozomları belirlemekte kullanılmaktadır. Bu amaçla öncelikle, PC-3 ve

LNCaP hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına PC-3 1 ml içerisinde  $100 \times 10^3$  hücre LNCaP 1 ml içerisinde  $100 \times 10^3$  olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat  $37^\circ\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyonu takiben üzerlerine klorokin'nin  $5 \mu\text{M}$  dozu 1 ml besiyeri içerisinde olacak şekilde uygulandı. Negatif kontrol kuyularından 1 ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1 ml taze besiyeri ilave edildi. 24 saat süren inhibitör uygulamalarını takiden hücreler Pd (II) bileşiğinin  $12,5 \mu\text{M}$  dozu ile muamele edilerek 48 saat süreyle  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda kuyu başına  $1 \mu\text{g/ml}$  olacak şekilde akridin boyası eklenerek sonuçlar floresan mikroskobu altında değerlendirildi.

### **2.2.10. Lumineks uygulaması**

Lumineks uygulaması için "MILLIPLEX MAP Human Multi-Pathway 9-plex Magnetic Bead Signalling" kiti kullanıldı. LNCaP ve PC-3 hücrelerinde Lumineks sistemi kullanılarak CREB, p70S6 kinaz ve p38 proteinlerindeki değişiklikler belirlendi. LNCaP ve PC-3 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 1 ml içerisinde  $10 \times 10^3$  hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Bu amaçla LNCaP ve PC-3 hücreleri klorokin'in  $5 \mu\text{M}$  dozu, Pd (II) bileşiğinin  $12,5 \mu\text{M}$  dozu ve bunların kombinasyonları ile 48 saat süreyle muamele edildi. Tedavi süresinin sonunda tedavi alan hücreler ve tedavi almayan kontrol hücreleri önce lizise uğratarak içlerindeki proteinlerin açığa çıkması sağlandı. Total protein konsantrasyonu BCA yöntemi ile spektrofotometrede okunarak belirlendi. Her lizat ( $20 \mu\text{g}$  total protein), "MILLIPLEX MAP Assay Buffer 2" ile sulandırıldı, üreticinin talimatlarına göre gece boyu  $4^\circ\text{C}$  de inkübasyona bırakıldı. Medyan floresan yoğunluğu (MFI) Lumineks sistemi ile ölçüldü.

### **2.2.11. Western Blot Analizi**

Hücrelerden elde edilen bir protein karışımında hedeflenen proteinin varlığını tespit etmek ve moleküler ağırlığını belirlemek amacıyla kullanılan özel yöntemlerden biri de western blot analizleridir.

İmmüno blotlama olarak da adlandırılan bu tekniğin uygulanabilmesi için öncelikle hedef proteini tanıyarak ona bağlanabilen bir antikor mevcut olmalıdır. Western blotlama temel olarak dört aşamada gerçekleştirilir:

- i. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemiyle örnek karışımında bulunan proteinlerin jel üzerinde birbirlerinden ayrılmaları sağlanır.
- ii. Jelde büyüklüklerine göre ayrılarak bantlar oluşturan protein molekülleri, elektrotransfer tekniği ile nitroselüloz membrana aktarılırlar.
- iii. Membrana sırasıyla, hedef proteine özgü antikor, bu antikoru tanıyan ve yapısına enzim ilave edilmiş ikincil bir antikor ile muamele uygulanır.
- iv. Son olarak söz konusu enzimin substratı ile muamelesi sonucunda meydana gelen ışık aracılığı ile hedef proteinin membran üzerinde görüntülenmesi sağlanır (Şekil 2.12).

Proteinlerin saflığının kontrolü ve moleküler ağırlıklarının saptanması amacıyla kullanılan SDS-PAGE yöntemi Western blot analizinin ilk aşamasını oluşturur. Western blot yönteminde toplayıcı jel ve ayırıcı jel olmak üzere iki farklı agaroz jel kullanılır. Toplayıcı jel hafif asidik (pH: 6,8) olup düşük akrilamid konsantrasyona sahiptir ve bu sayede gözenekli jel oluşur. Ayırıcı jel baziktir (pH:8,8) ve yüksek poliakrilamid içeriği ile jel gözenekleri daha dardır. Proteinler bu sayede büyüklüklerine göre ayrılır ve büyük proteinlere kıyasla küçük proteinler daha kolay ve hızlı 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 (Coşkun-Arı 2003, Mahmood ve Yang 2012).

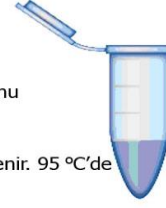
## Western blot

Örnek Hazırlanışı

Lizis buffer (Örn: RIPA) kullanarak örnekler lizis edilir

Protein konsantrasyonu belirlenir

Sample buffer (SDS ve  $\beta$ -merkaptoetanol) eklenir. 95 °C'de 5 dakika ısıtılır.

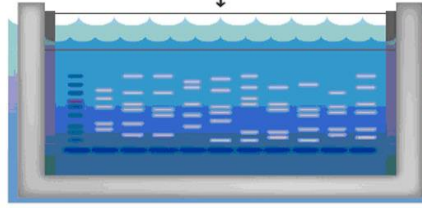


Jele Yükleme

20-30  $\mu$ g protein jele yüklenir

Jelde Yürütme

Küçük proteinler (negatif yüklü) katoda doğru daha hızlı hareket eder.



100V-150V, 50-90 dk

Jel yüzdesi proteinin büyüklüğüne bağlıdır.

4-40 kDa	20%
12-45 kDa	15%
10-70 kDa	12,5%
15-100 kDa	10%
25-200 kDa	8%

Proteinlerin jelden membrana aktarılması

Transfer buffer hazırlanır.



Sünger 100 V-60-120 dk, 4 °C

Filtre Kağıdı

Membran

Jel

Filtre Kağıdı

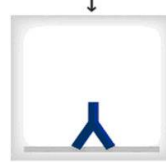
Sünger

Negatif yüklü proteinler pozitif katoda doğru hareket eder ve membrana geçer.

Bloklama

Membranı %5 süt veya BSA ile 1-2 saat inkübe et

Primer antikor inkübasyonu



Protein bandı

Membran primer antikorla 1-2 saat veya 4 °C'de overnight inkübe edilir.



Sekonder antikor inkübasyonu



Membran sekonder antikorla konjuge enzimle (Örn:HPR) 1-3 saat inkübe edilir.



Görüntüleme



Substrat

Işığa hassas ürün



Şekil 2.12. Western Blot Aşamalarının Şematik Gösterimi (Anonim 2010).

Toplam protein izolasyonu için PC-3 ve LNCaP hücreleri 1 ml'de  $2.5 \times 10^5$  hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekim yapıldı. 24 saat  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyonu takiben üzerlerine klorokin'nin  $5 \mu\text{M}$  dozu 1 ml besiyeri içerisinde olacak şekilde uygulandı. Negatif kontrol kuyularından 1ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1 ml taze besiyeri ilave edildi. 24 saat süren inhibitör uygulamalarını takiden hücreler Pd (II) bileşiğinin  $12,5 \mu\text{M}$  dozu ile muamele edilerek 24 ve 48 saat süreyle  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda bir sonraki aşama olan protein izolasyonuna geçildi.

### **2.2.10.1. Protein İzolasyonu**

#### **2.2.10.1.1. Çözeltiler**

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

Bu aşamada, ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, buz üzerinde tutulan falkonlara toplandı ve negatif kontrol kuyusunun süpernatantı uzaklaştırıldı. Kuyulara 1 ml 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 0.05 ml lizis tamponu pipetlendi. Falkonlar, karanlıkta 45 dakika buz üzerinde bekletildi ve bu esnada 10 dakikada bir sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. Süre bitiminde solüsyonlar 1.5 ml'lik tüplere aktarıldı ve  $+4^\circ\text{C}$ 'de 13.000g'de 15 dakika santrifüj edildi (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Süpernatantları 0.5ml'lik tüplere toplandı ve protein miktarları ölçüldü.

### **2.2.10.2. Proteinlerin Biçinkoninik asit (BCA) Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi**

#### **2.2.10.2.1. Çözeltiler**

Bicinchoninic Acid Kit (Sigma, St. Louis, MO)

Bovine Serum Albumin (BSA, Amresco, Solon, OH, USA) Standardı

### **2.2.10.2.2. BSA Standartlarının Hazırlanması**

BCA ile protein miktarlarını ölçebilmek için sığır serum albumin (BSA) proteininin değişik konsantrasyonları ultra saf dH<sub>2</sub>O ile hazırlanarak bir standart eğri grafiği çizildi. ml'sinde 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 mg BSA bulunan standartlar hazırlandı.

### **2.2.10.2.3. BCA Ölçümünün Yapılması**

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<sup>++</sup> iyonları Cu<sup>+</sup> 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 (Sigma, St. Louis, MO) ve 96 kuyuluk plate (Orange Scientific) kullanıldı. Her bir kuyuya 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 µl standart ve 10 µl konsantrasyonu bilinmeyen örnekler pipetlendi. Konsantrasyonu bilinmeyen örnekler 10 kere ultrasaf dH<sub>2</sub>O ile seyreltilerek ölçüm yapıldı, bu nedenle 10 µl örnekler 90 µl, standartlar ise 100 µl'ye tamamlanacak şekilde ultrasaf dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı ve bu seyreltme katsayısı, hesaplamalarda dikkate alındı. Kuyuların üzerine 200 µl çalışma ayırıcı pipetlendi ve plate 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda oluşan renk şiddeti, spektrofotometrede 570 nm'de (FLASHScan S12, Jena, Almanya) okundu.

### **2.2.10.3. Western Blot Yöntemi ile Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarılması**

#### **2.2.10.3.1. Çözeltiler**

MES SDS Running Buffer (Nu-PAGE, 20X, İnvitrogen, CA, USA): 30ml Running buffer, 570ml ultra saf H<sub>2</sub>O ile tamamlandı.

Nu-PAGE LDS Sample Buffer (4X, İnvitrogen, CA, USA)

Nu-PAGE Sample Reducing Agent (10X, İnvitrogen, CA, USA)

Nu-PAGE Antioksidant (İnvitrogen, CA, USA)

Kaleidoscope Prestained Standarts (Biorad, CA, USA)

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

10X pH:7,6 TBS-T (Tris-Buffer Saline-Tween20): Tris base 24,23g (Scharlau, Barcelona, Spain) NaCl (Merck, Darmstadt, Germany)

80,06g ve 5ml Tween20 (Dako, CA, USA) 1L ultrasaf H<sub>2</sub>O ile çözüldü.

Chemiluminescent Detection Kit, Mouse (Amersham, Buckinghamshire, UK)

Phototope<sup>®</sup>-HRP Western Blot Detection System (Cell signalling, MA, USA)

### **2.2.10.3.2. Proteinlerin Yüklenmesi ve Jelde Yürütülmesi**

Örnekler istenen hacimlerde toplam protein miktarı 20 µg (BCA yöntemiyle belirlenen) ve “sample buffer” ve “reducing agent” 1X olacak şekilde 0.5 ml’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 500 µl antioksidan eklendi. Marker, yüklenmeden önce 40<sup>0</sup>C’de 1 dakika bekletildi. Daha sonra marker (5 µl) ve örnekler kuyulara pipet yardımıyla belirlenen miktarlarda yüklendi. Yükleme işlemi sonunda 40 dakika 150V yürütme yapıldı.

### **2.2.10.3.3. Proteinlerin Transferi**

Transfer işlemi için I-Blot jel transfer cihazına (İnvitrogen, CA, USA) sırasıyla anot bakır (+), jel, filtre kağıdı (ultra saf H<sub>2</sub>O ile ıslatılır), katot bakır (-) ve sünger yerleştirildi. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda 8 dakika transfer işlemi gerçekleştirildi.

### **2.2.10.3.4. Proteinlerinin Belirlenmesi**

#### **2.2.10.3.4.1. Bloklama**

Uygun protein 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.



#### **2.2.10.3.4.2. Birincil Antikor**

Uygun birincil antikor 1:1000 olacak şekilde %5'lik BSA veya %5'lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı ve 18 saat +4°C'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

#### **2.2.10.3.4.3. İkincil Antikor**

İkincil antikor için, uygun Anti-Rabbit veya Anti-Mouse 1:2000, Anti-biotin 1:1000 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.

#### **2.2.10.3.4.4. 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 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.

#### **2.2.10.3.4.5. 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; 100 ml ultrasaf su içerisine 0,76g Tris-base (Scharlau, Barcelona, Spain), 2g SDS (Appllichem, Darmstadt, Germany) ve 700µl β-merkaptöetanol (Merck, Schuchard, Germany) eklendi (1X, pH:6,8). Membran 4 kez 5 dakika TBS-T ile yıkandıktan sonra stripping solüsyonu eklenerek 150-300rpm, 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon 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.

### 2.2.11. İstatistiksel Analiz

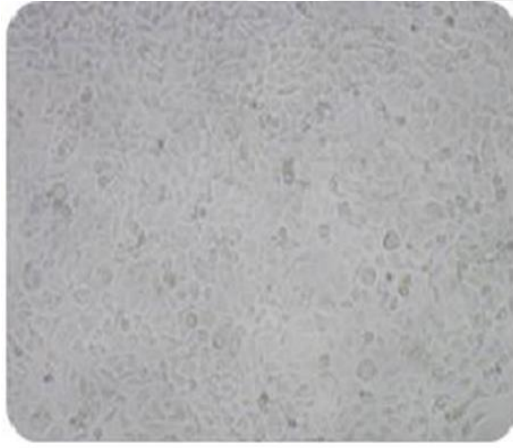
İstatistiksel analizler Graph Pad programı aracılığı ANOVA testi ile değerlendirildi. 3 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler  $p<0,05$ ,  $p<0,01$ ,  $p<0,001$  değerine göre belirlendi.



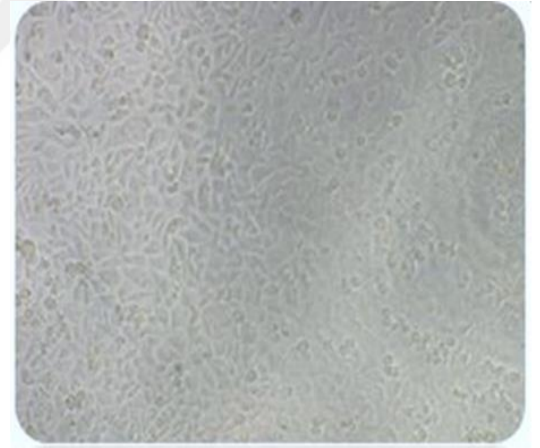
### 3. BULGULAR

#### 3.1. MTT Canlılık Testi Bulguları

Farklı genomik ve morfolojik özelliklere sahip LNCaP (AR +), ve PC-3 (AR -) prostat kanseri hücrelerine (Şekil 3.1) ve sağlıklı prostat hücresi olan PNT1A hücrelerine 12, 24 ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (1,6-100  $\mu$ M) Pd (II) bileşiği uygulandı. Aynı zamanda yapılacak olan kombinasyon çalışmaları için geç dönem otofaji inhibitörü klorokin ve erken dönem otofaji inhibitörü olan 3-MA'nin 6, 12 ve 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarının (0,6-40  $\mu$ M) hücre canlılığı üzerine etkisi MTT testi ile belirlendi. Pd (II) bileşiğinin uygulandığı hücre soylarında zamana ve doza bağlı olarak konsantrasyon arttıkça hücrelerin canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ). Hücre soylarında 12, 24, ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda Pd (II) bileşiği uygulaması sonrası ortaya çıkan sonuçlar Şekil 3.2 'de gösterildi.



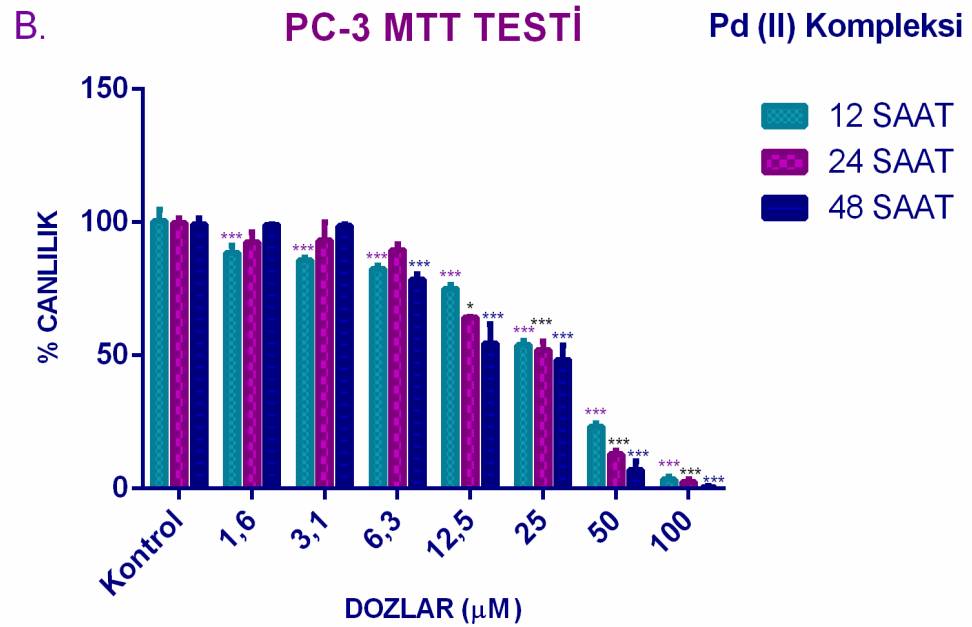
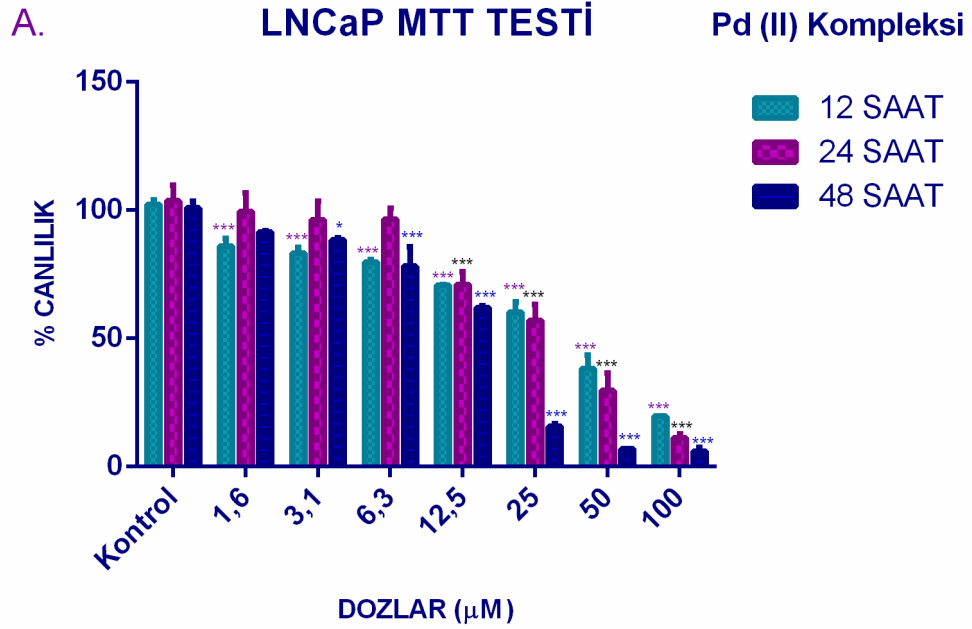
**PC-3 HÜCRE SOYU**  
**AR (-)**

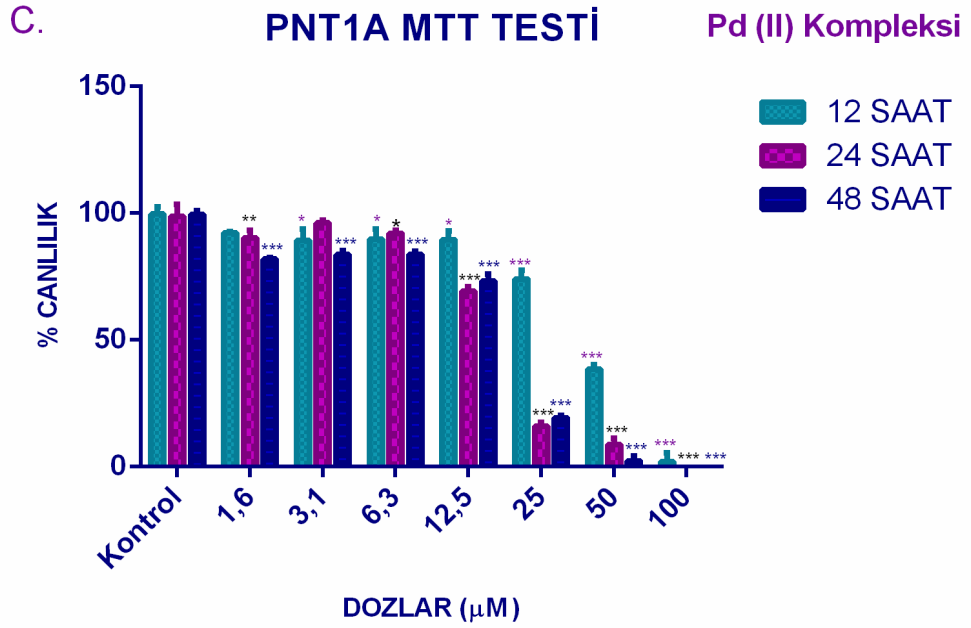


**LNCaP HÜCRE SOYU**  
**AR (+)**

**Şekil 3.1.** PC-3 ve LNCaP hücre soylarının faz görüntüleri.

Özellikle 100, 50 ve 25  $\mu\text{M}$  Pd (II) bileşiği uygulaması sonucu; zamana bağlı olarak LNCaP, PC-3 ve PNT1A hücrelerinde kontrole kıyasla hücre canlılığında anlamlı azalmalar gözlemlendi ( $p < 0,001$ ).





**Şekil 3.2.** Pd (II) bileşiği uygulanan LNCaP (A), PC-3 (B) ve PNT1A (C) hücre soylarının canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. \*Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (\*:  $p < 0,05$  \*\*:  $p < 0,01$  \*\*\*:  $p < 0,001$ ) ifade etmektedir.

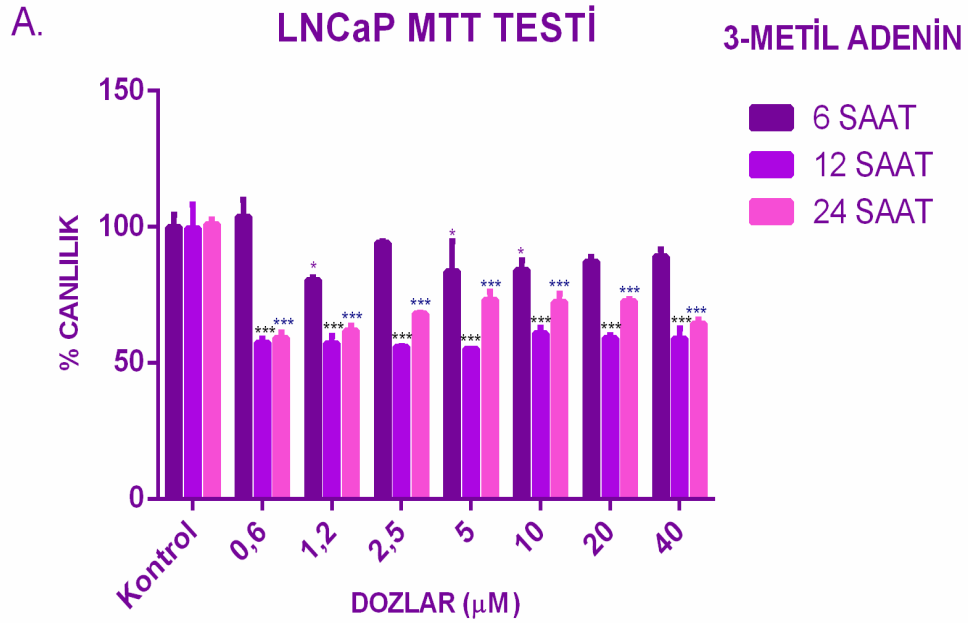
MTT verilerine göre; LNCaP ve PC-3 hücre soylarında Pd (II) bileşiğinin sitotoksik aktivitesinin gösterilmesinde önemli olan IC<sub>50</sub> (kontrol hücrelerine kıyasla Pd (II) bileşiği ile muamele sonrası hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) ve IC<sub>90</sub> (kontrol hücrelerine kıyasla Pd (II) bileşiği ile muamele sonrası hücrelerin %90'ını öldüren konsantrasyon) değerleri ise Çizelge 3.1' de verilmiştir.

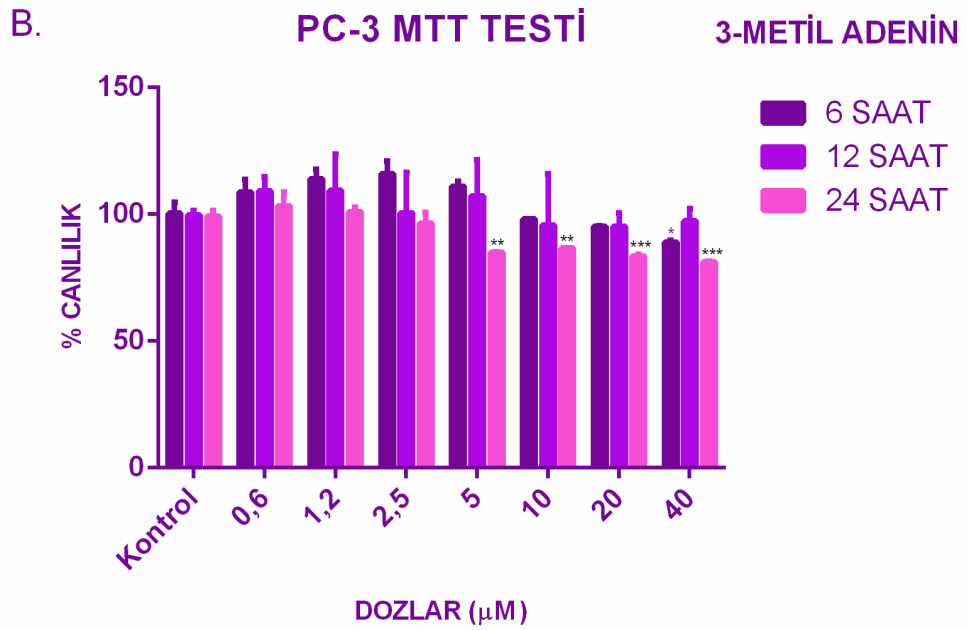
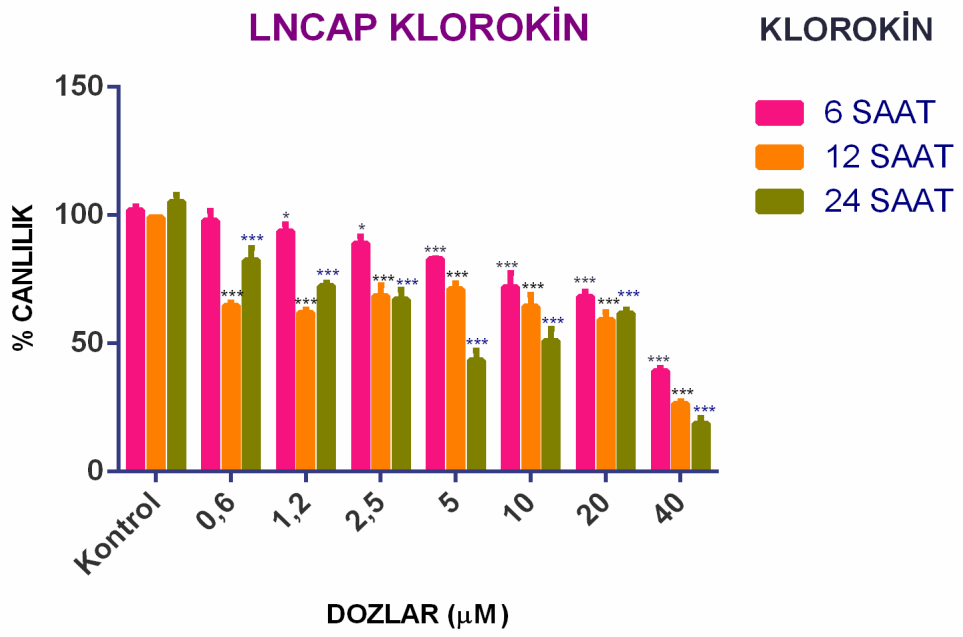
**Çizelge 3.1.** Pd (II) bileşiği uygulanan hücre soylarında MTT canlılık testi sonuçlarına göre 48 saat tedavi süresindeki IC<sub>50</sub> ve IC<sub>90</sub> değerleri.

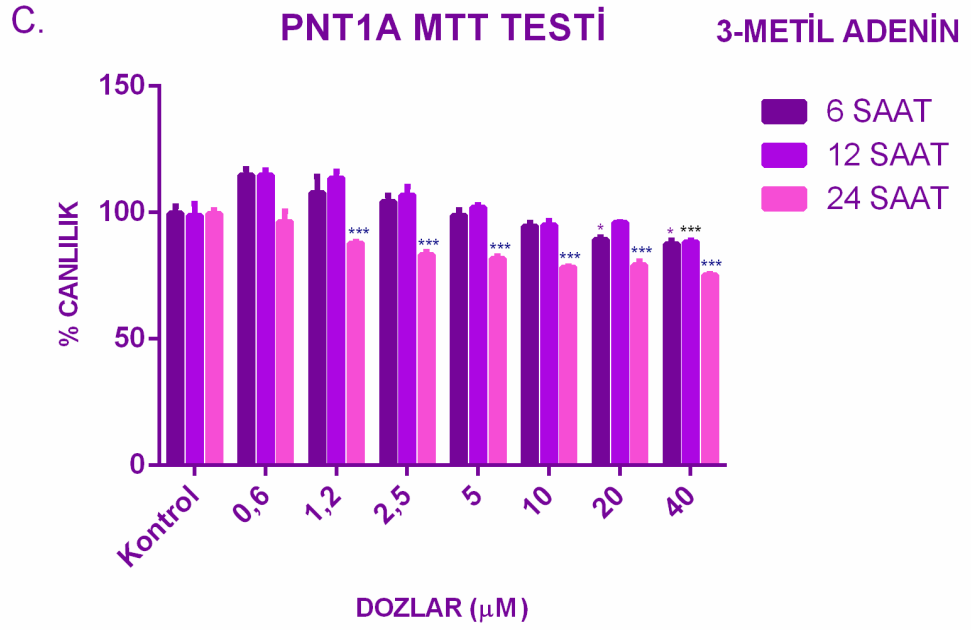
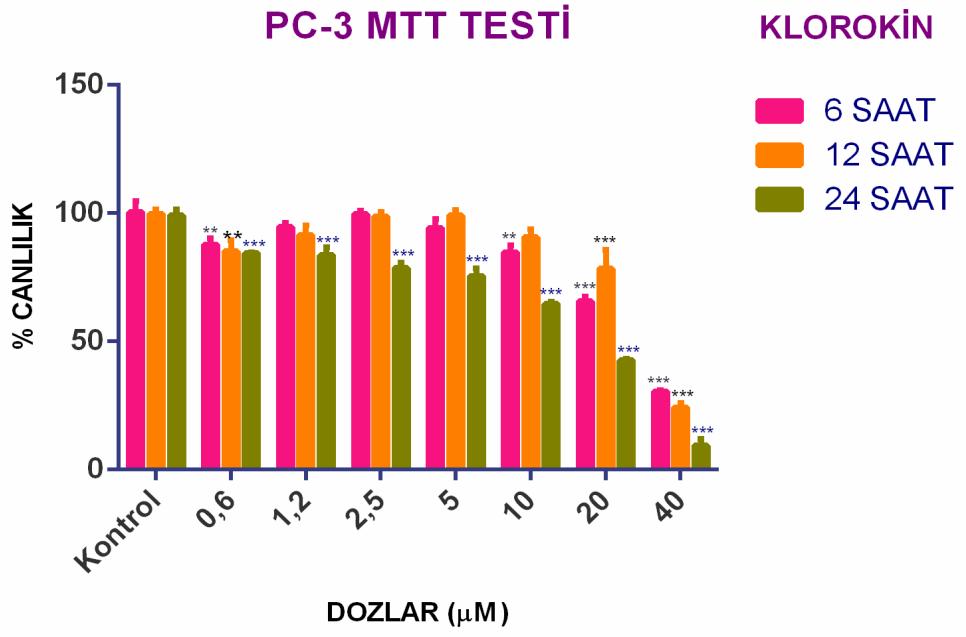
Doz (µM)	LNCaP	PC-3
IC <sub>50</sub>	15,75	15,88
IC <sub>90</sub>	41,31	48,24

Otofaji inhibitörleri klorokin ve 3-MA'nın 6, 12 ve 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarının (0,6-40 µM) hücre canlılığı üzerine etkisi MTT testi ile belirlendi. MTT hücre canlılığı sonuçlarına göre, LNCaP prostat kanser hücrelerine uygulanan

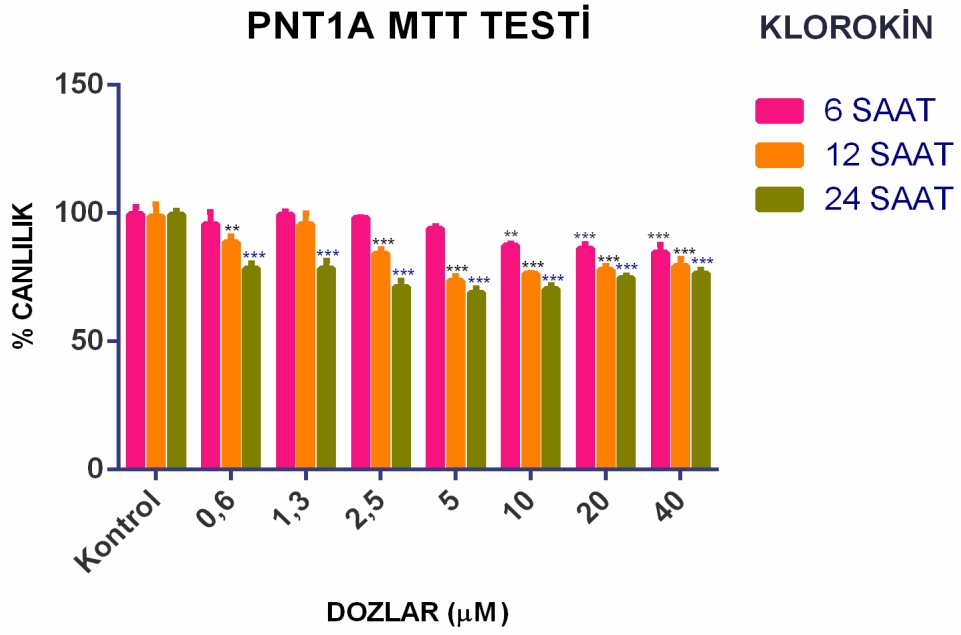
3-MA'nın, 12 ve 24 saat tedavi süresi boyunca hücre canlılığında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalmalara neden olduğu bulundu ( $p<0,001$ ). 6, 12 ve 24 saat klorokin tedavisi sonucunda bu hücrelerde doza bağlı olarak kontrole kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi ( $p<0,05$ ;  $p<0,001$ ) (Şekil 3.3A). PC-3 hücrelerinde 3-MA uygulaması sonucu 24 saatte 5, 10, 20 ve 40  $\mu\text{M}$  dozları hücre canlılığında azalmaya neden olurken ( $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,001$ ) bu hücrelere klorokin uygulaması sonucu 24 saatte tüm dozlarda (0,6-40  $\mu\text{M}$ ) kontrole kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü ( $p<0,01$ ;  $p<0,001$ ) (Şekil 3.3B). Sağlıklı prostat hücre soyu olan PNT1A'da ise 3-MA'nin 24 saat uygulaması sonucu hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar olduğu görüldü. Bu hücrelere 6, 12 ve 24 saat klorokin uygulaması sonucu 10, 20 ve 40  $\mu\text{M}$  dozlarında kontrole kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar bulundu ( $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,001$ ) (Şekil 3.3C).





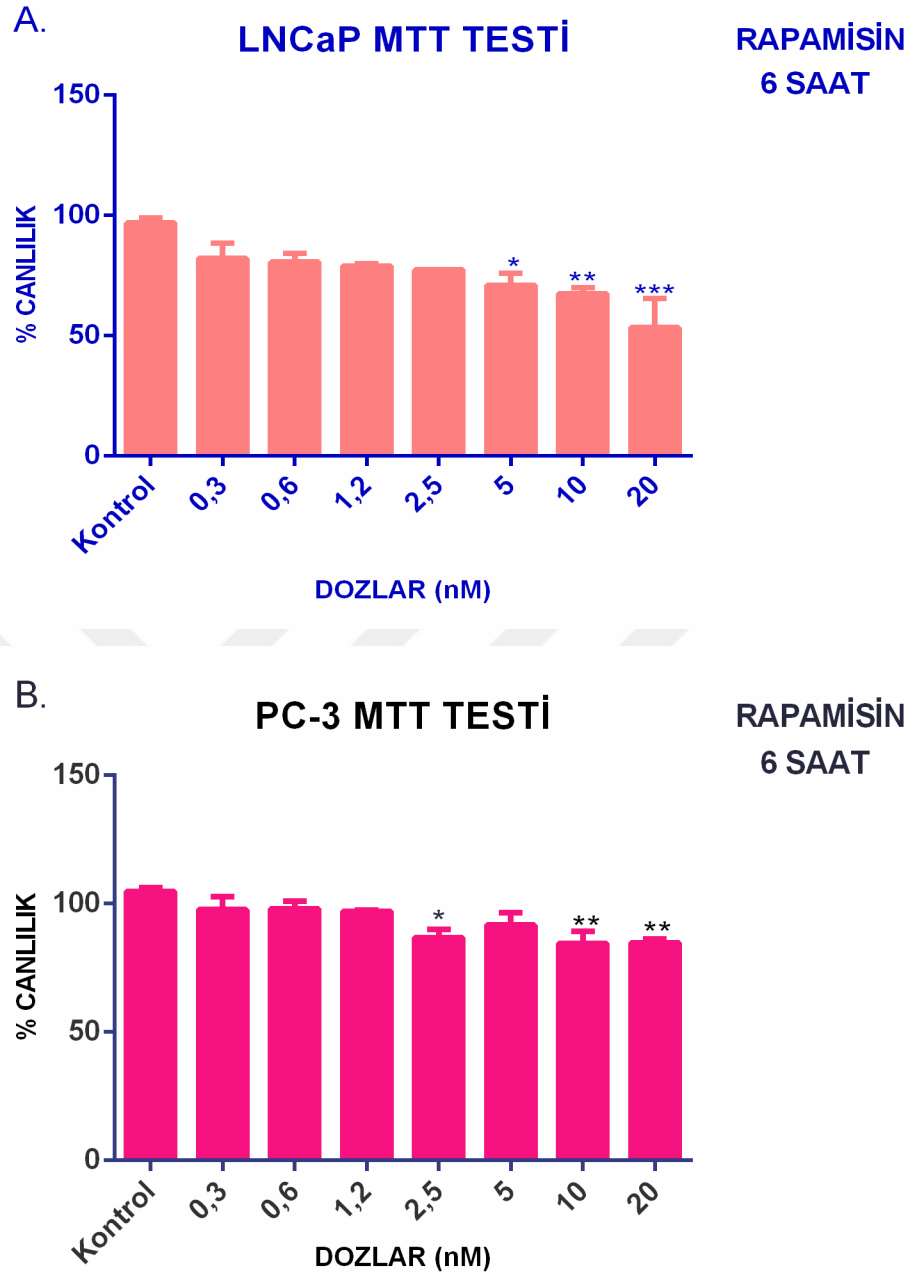






**Şekil 3.3.** Otofaji inhibitörleri uygulanan LNCaP (A), PC-3 (B) ve PNT1A (C) hücre soylarının canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. \*Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (\*:  $p<0,05$  \*\*: $p<0,01$  \*\*\*: $p<0,001$ ) ifade etmektedir.

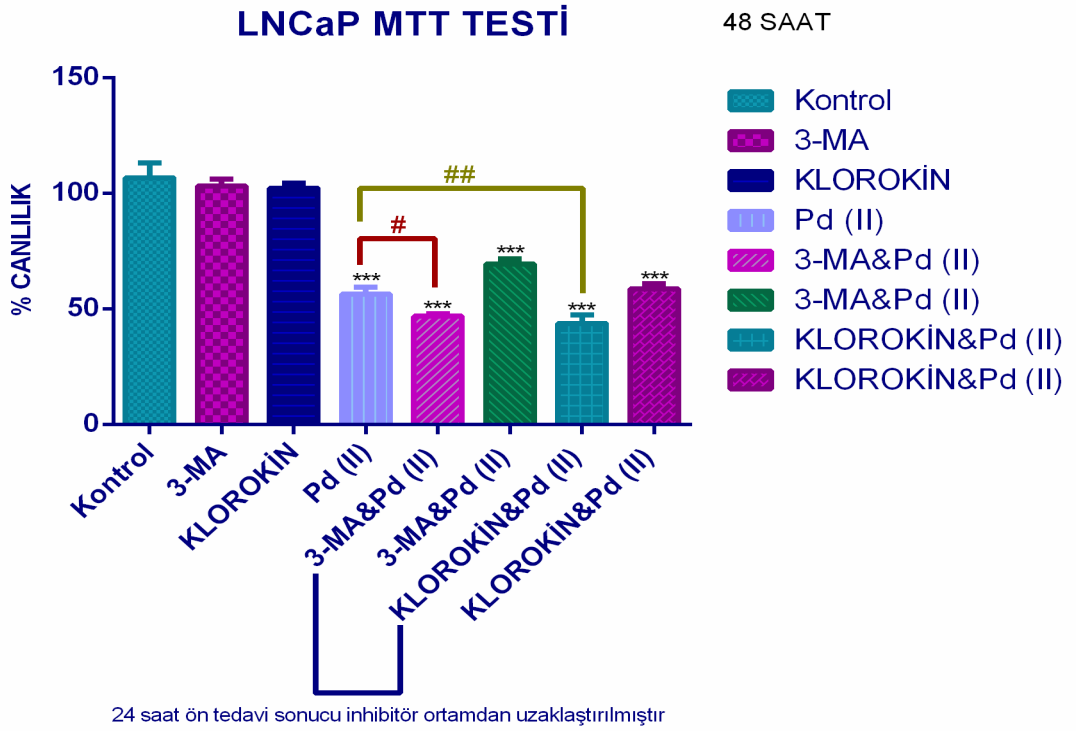
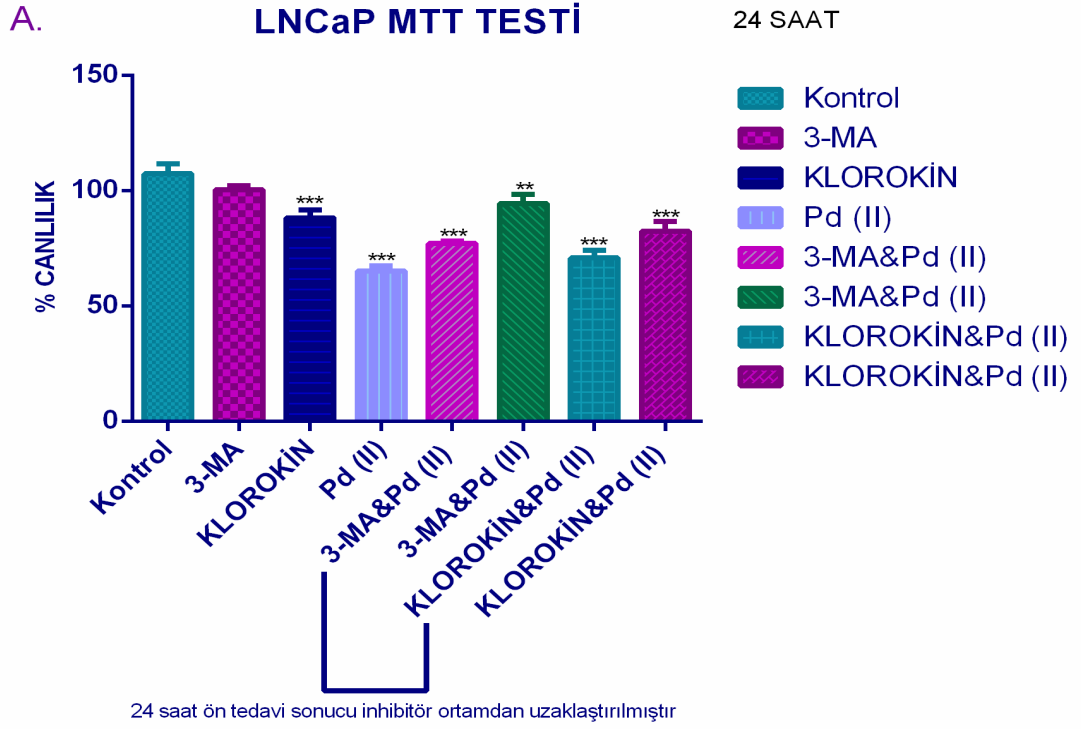
LNCaP ve PC-3 prostat kanseri hücrelerine 6 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0,3-20 nM) deneylerde pozitif kontrol olarak kullanmak amacıyla, otofaji uyarıcı ajan rapamisin uygulandı. Rapamisinin, LNCaP hücrelerinde 5, 10 ve 20 nM dozlarında kontrole kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalmalara neden olduğu bulundu( $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,001$ ) (Şekil 3.4A). PC-3 hücrelerinde ise 10 ve 20 nM dozlarında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalmalara neden olduğu görüldü ( $p<0,05$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,001$ ) (Şekil 3.4B).



**Şekil 3.4.** Rapamisin'in (0,3-20  $\mu$ M) LNCaP (A) ve PC-3 (B) insan prostat kanseri hücrelerinin canlılığa etkisinin doza bağlı olarak değişimi. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir \*Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (\*:  $p < 0,05$  \*\*:  $p < 0,01$  \*\*\*:  $p < 0,001$ ) ifade etmektedir.

Kombinasyon çalışmaları için, Pd (II) bileşiğinin her üç hücre soyunda da yaklaşık olarak hücre canlılığının %50 olduğu konsantrasyona yakın bir doz olan 12,5 µM dozu seçildi. Otofaji inhibitörleri için ise literatür verileri ve sonuçlarımızla uyumlu olarak toksik olmayan 5 µM dozu ile 24 saat ön tedavi uygulanmasına karar verildi. Yapılan doz seçimleri sonrası klorokin ve 3-MA için belirlenen inhibitör konsantrasyonları (5 µM) ile Pd (II) bileşiği (12,5 µM) kombinasyonun hücre canlılığına olan etkisini belirleyebilmek için MTT canlılık testi yapıldı. Aynı zamanda bu etkide inhibitörle 24 saat muamele sonucu bu inhibitörlerin ortamdaki uzaklaştırılmasının yapılacak olan kombinasyon çalışmasına da etkisi incelendi. Yapılan MTT hücre canlılığı testi sonuçlarına göre; LNCaP prostat kanseri hücrelerinde Pd (II) bileşiğinin klorokin ve 3-MA ile olan kombinasyonda, 24 saat süreyle yapılan tedavide yalnızca Pd (II) bileşiğine kıyasla inhibitörlerle yapılan kombinasyon tedavisinde hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya rastlanmadı (Şekil 3.5A). Fakat 48 saat süren Pd (II) bileşiği uygulaması sonucu her iki inhibitör ile olan kombinasyonda da tek başına Pd (II) bileşiği kullanımına kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ( $p < 0,001$ ) (Şekil 3.5A). İnhibitörlerle yapılan 24 saatlik ön tedavi sonucu, tedavi süresinin bitiminde inhibitörlerin ortamdaki uzaklaştırılmalarının kimyasalların özellikle de Pd (II) bileşiğinin etkisinin bozulduğu sonucuna varılması nedeniyle deneylerde inhibitörler 24 saat ön tedavi süresinin sonunda ortamdaki uzaklaştırıldı.

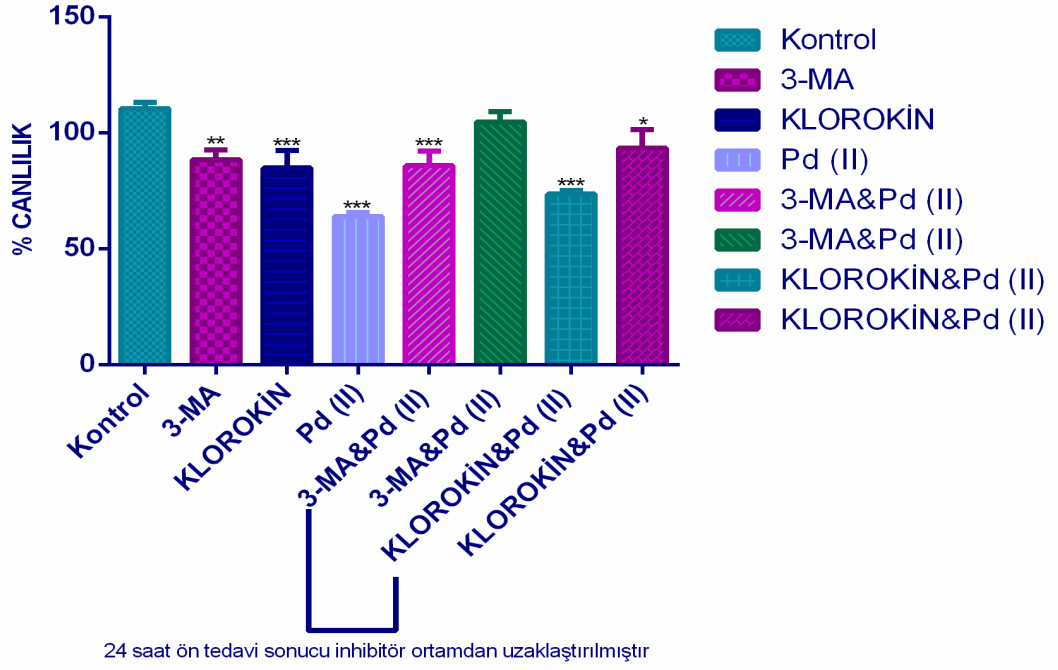
PC-3 prostat kanseri hücrelerinde yapılan çalışmada; 24 saat süren Pd (II) bileşiği tedavisi sonucu tek başına uygulanan Pd (II) bileşiğine kıyasla inhibitörler ile yapılan kombinasyonda istatistiksel olarak hücre canlılığında anlamlı bir azalma gözlemlenmedi (Şekil 3.5B). Otofaji inhibitörleri ile yapılan 24 saat ön tedavi sonucu ortamdaki inhibitörlerin uzaklaştırılmaması diğer hücre soyunda olduğu gibi Pd (II) bileşiğinin etkisinin azalmasına neden olduğu gözlemlendi. 48 saat süren tedavi sonucunda, Pd (II) bileşiğinin tek başına etkisine kıyasla her iki otofaji inhibitörü ile kombine edildiğinde hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğu görüldü ( $p < 0,001$ ) (Şekil 3.5B).



B.

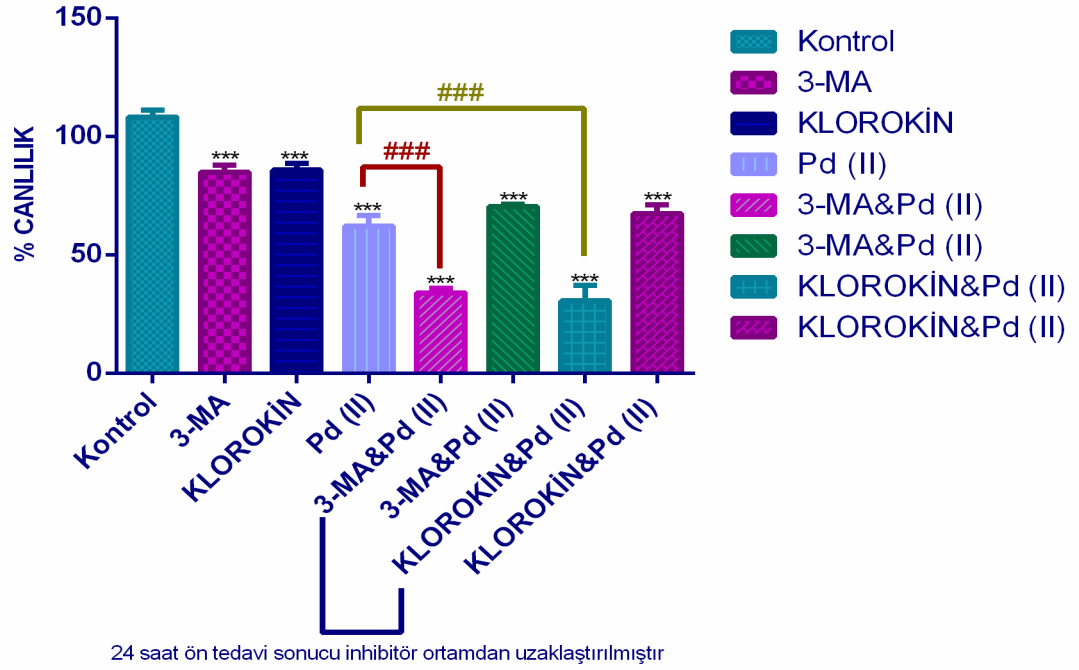
### PC-3 MTT TESTİ

24 SAAT



### PC-3 MTT TESTİ

48 SAAT

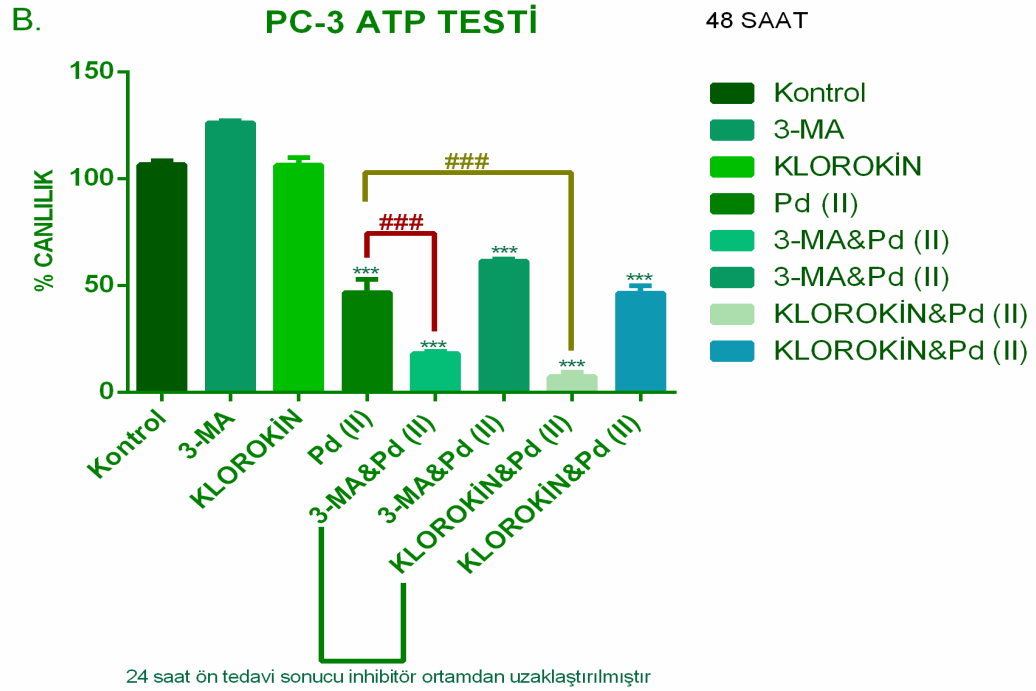
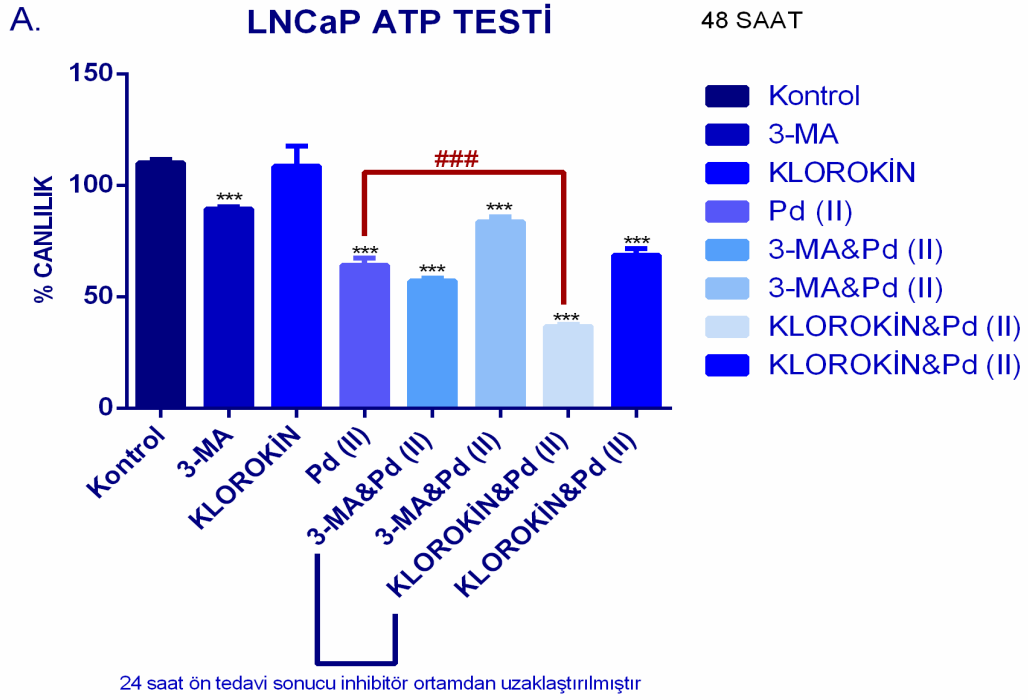


**Şekil 3.5.** Pd(II) bileşiği, Klorokin, 3-MA ve inhibitörlerin Pd (II) bileşiği ile kombinasyon tedavisi sonucu LNCaP (A) ve PC-3 (B) hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. \*Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (\*:  $p<0,05$  \*\*: $p<0,01$  \*\*\*: $p<0,001$ ) Pd (II) bileşiğine göre (#: $p<0,05$  ##: $p<0,01$  ###: $p<0,001$ ) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

### **3.2. ATP Canlılık Testi Bulguları**

ATP canlılık testi ile hücrelerde canlılığın bir göstergesi olan intrasellüler ATP miktarı belirlendi. Otofaji inhibitörleri ile 24 saat ön tedavi uygulaması sonrası 12,5  $\mu$ M hazırlanan Pd (II) bileşiğinin 48 saat süren tedavisi, LNCaP ve PC-3 prostat kanseri hücre soylarında ki intrasellüler ATP miktarına olan etkisi gösterildi (Şekil 3.6).

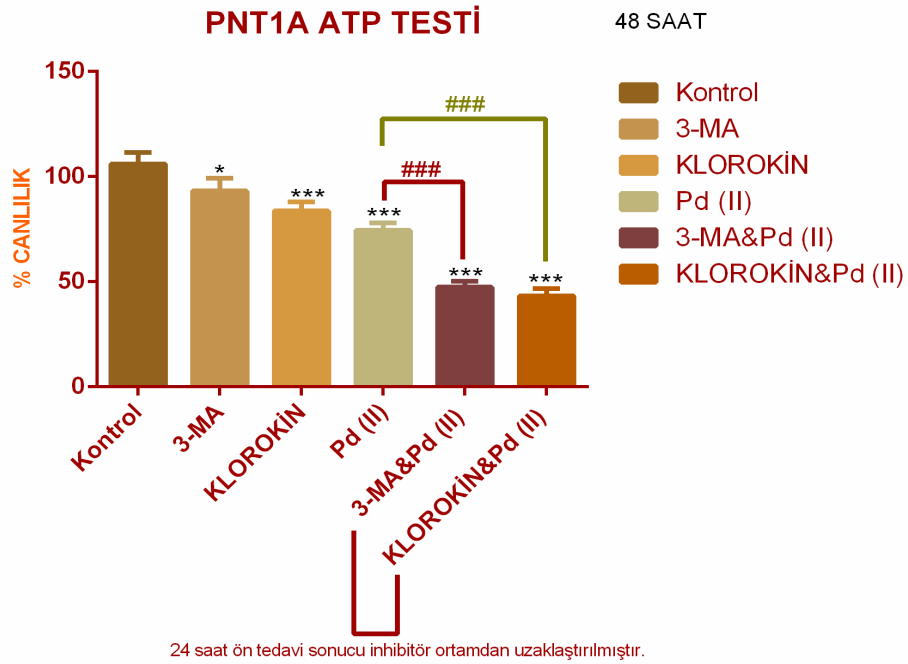
ATP canlılık testi MTT testine göre daha hassas bir metod olduğu için hem tek başına Pd (II) bileşiğinin hemde otofaji inhibitörleri ile kombinasyonunun hücre canlılığı değerleri ATP testinde daha düşük bulundu (Şekil 3.6). LNCaP hücrelerinde Pd (II) bileşiğinin klorokin ile kombinasyonu, tek başına Pd (II) bileşiğine kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalmalara neden olduğu belirlendi ( $p<0,001$ ) (Şekil 3.6A). PC-3 hücrelerinde Pd (II) bileşiğinin hem klorokin hem de 3-MA ile kombinasyonun güçlü bir sitotoksik etkiye sahip olduğu hücre canlılığını Pd (II) bileşiğine kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalttığı belirlendi ( $p<0,001$ ) (Şekil 3.6B). Alınan sonuçlar MTT verilerimizi destekler niteliktedir.



**Şekil 3.6.** Pd (II) bileşiği, Klorokin, 3-MA ve inhibitörlerin Pd (II) bileşiği ile kombinasyon tedavisi sonucu LNCaP (A) ve PC-3 (B) hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. \*Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (\*:  $p < 0,05$  \*\*:  $p < 0,01$  \*\*\*:  $p < 0,001$ ) Pd (II) bileşiğine göre (#:  $p < 0,05$  ##:  $p < 0,01$  ###:  $p < 0,001$ ) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

Yapılan MTT ve ATP canlılık testleri sonucu göre, ileri analizlerde otofaji inhibitörleri ile 24 saat ön tedavi uygulanması sonrası inhibitörlerin ve Pd (II) bileşiğinin birbirlerinin etkilerini bozması nedeni ile inhibitörlerin 24 saat sonrasında ortamdan uzaklaştırılmasına ve sonrasında 48 saat süreyle Pd (II) bileşiği tedavisi uygulanmasına karar verildi.

Otofaji inhibitörleri ile 24 saat ön tedavi uygulaması sonrası 12,5 µM hazırlanan Pd (II) bileşiğinin 48 saat süren tedavisi sağlıklı prostat kanseri hücre soyu olan PNT1A üzerine etkisi ATP canlılık testi ile gösterildi (Şekil 3.7). 48 saat boyunca tedavi uygulanan hücrelerde ATP hücre canlılığı analizi sonuçlarına göre, PNT1A sağlıklı prostat hücrelerine uygulanan Pd (II) bileşiği, LNCaP ve PC-3 prostat kanseri hücrelerine oranla hücre canlılığında daha düşük seviyede azalmaya neden olduğu bulundu. PNT1A'da Pd (II) ve klorokin kombinasyonu, Pd (II) bileşiği ve 3-MA kombinasyonu kontrole kıyasla hücre canlılığında yaklaşık olarak %50, yalnızca Pd (II) bileşiği uygulamasına kıyasla yaklaşık olarak %20 oranında istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olduğu görüldü ( $p<0,001$ ) (Şekil 3.7).

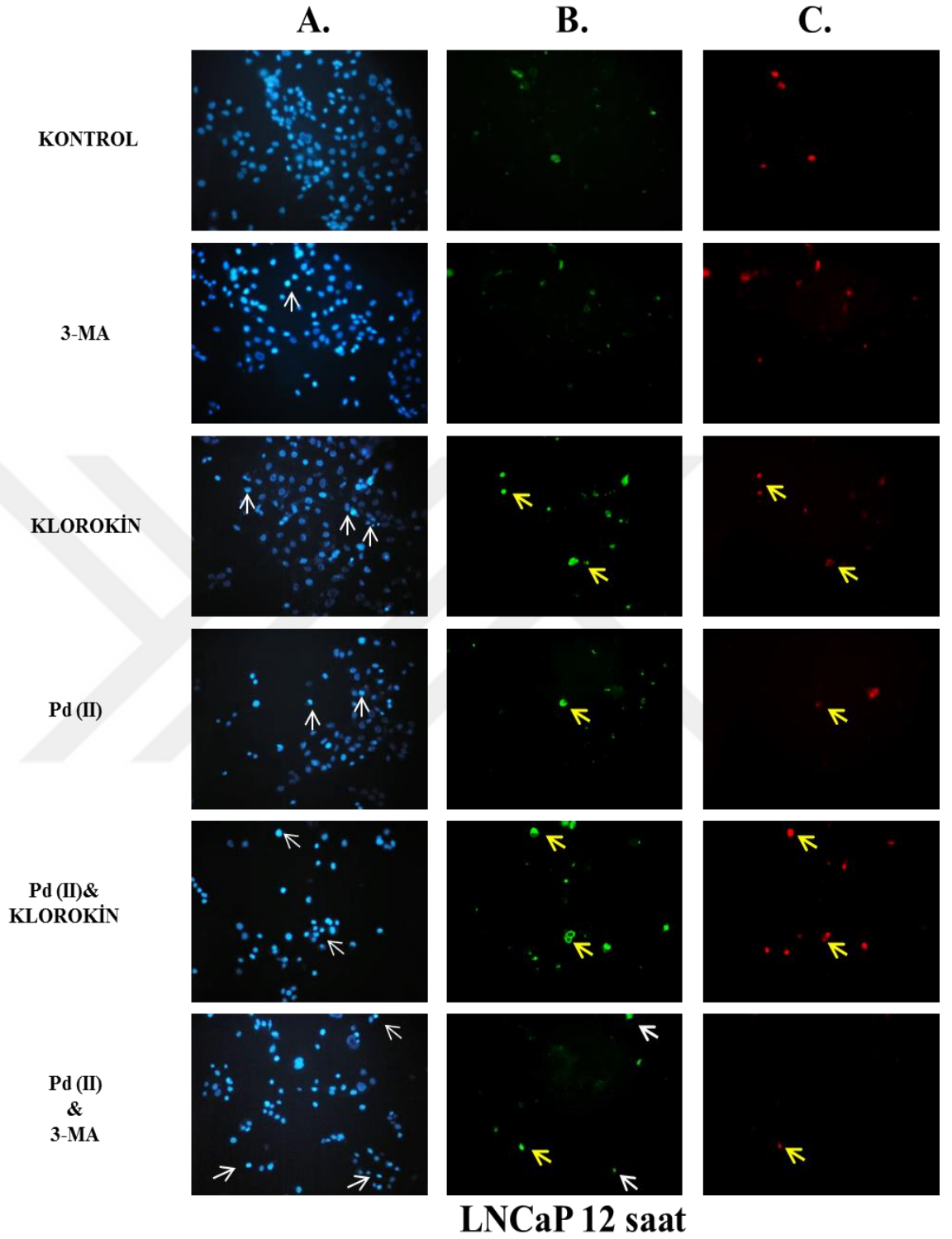


**Şekil 3.7.** Pd (II) bileşiği, Klorokin, 3-MA ve inhibitörlerin Pd (II) bileşiği ile kombinasyon tedavisi sonucu PNT1A hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası ve 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. \* Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (\*:  $p<0,05$ ; \*\*\*: $p<0,001$ ) Pd (II) bileşiğine göre (###: $p<0,001$ ) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

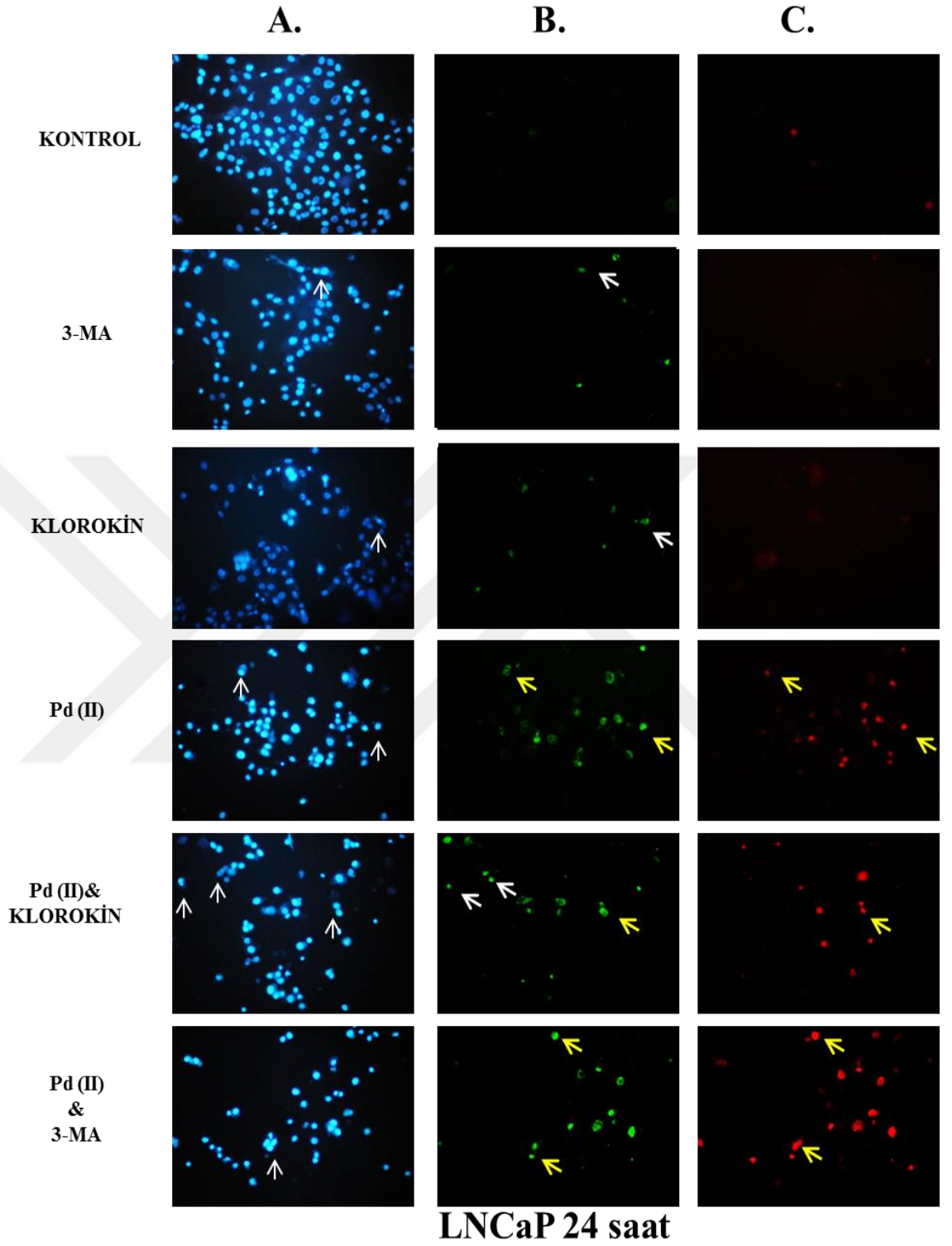


### 3.3. Anneksin-V Boyama Yöntemi Bulguları

Anneksin-V, apoptozisin erken dönemlerinde hücrenin dış yüzeyine transloke olan PS'ye bağlanabilen bir proteindir ve floresan bir madde ile işaretlendiğinde apoptotik hücreler görünür hale getirilerek floresan mikroskopu ile incelenir. Ayrıca nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için yöntem çalışılırken ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Hücreler Anneksin-V Fluorescein (yeşil floresan) ve non-vital boya olan propidyum iyodür (kırmızı floresan) ile eş zamanlı olarak boyandığında; canlı hücreler Annexin-V negatif/ PI negatif, erken apoptotik hücreler Annexin-V pozitif/PI negatif ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler Anneksin-V pozitif/ PI pozitif sonuç verir. LNCaP ve PC-3 hücrelerine Pd (II) bileşiğinin 12,5 µM, klorokin ve 3-MA'nın 5 µM ve bunların kombinasyon dozları uygulandı. 12 ve 24 saat ilaç uygulamasını takiben üçlü boyama yöntemi (Hoechst 33342+Anneksin-V+PI) uygulanarak floresan mikroskop altında değerlendirme yapıldı. Pd (II) bileşiğinin tek başına ve inhibitörler ile 12 saat süren kombinasyon tedavisi sonucu LNCaP hücre soyunda hücre yoğunluğunun kontrole kıyasla azaldığı ve apoptozise özgü olan piknozis yani nükleusun kontrole kıyasla küçüldüğü gözlemlendi. Hücrelerin çoğunun Anneksin-V pozitif/ PI pozitif olması hücrelerde geç apoptozis/sekonder nekrozis geliştiği söylenebilir (Şekil 3.8). 24 saat süren tedavi sonrası Pd (II) bileşiğinin inhibitörle kombinasyon sonucu Anneksin-V pozitif alanların çok daha yoğun olduğu ve hücrelerde Anneksin-V pozitif/ PI pozitif belirlenmesi geç apoptozis/sekonder nekrozis geliştiğini göstermektedir (Şekil 3.9). Ayrıca LNCaP hücre soyunda otofaji inhibitörleriyle olan kombinasyonda 24 saat süren tedavi sonrası hücre sayısında kontrole kıyasla azalmalar gözlemlendi.



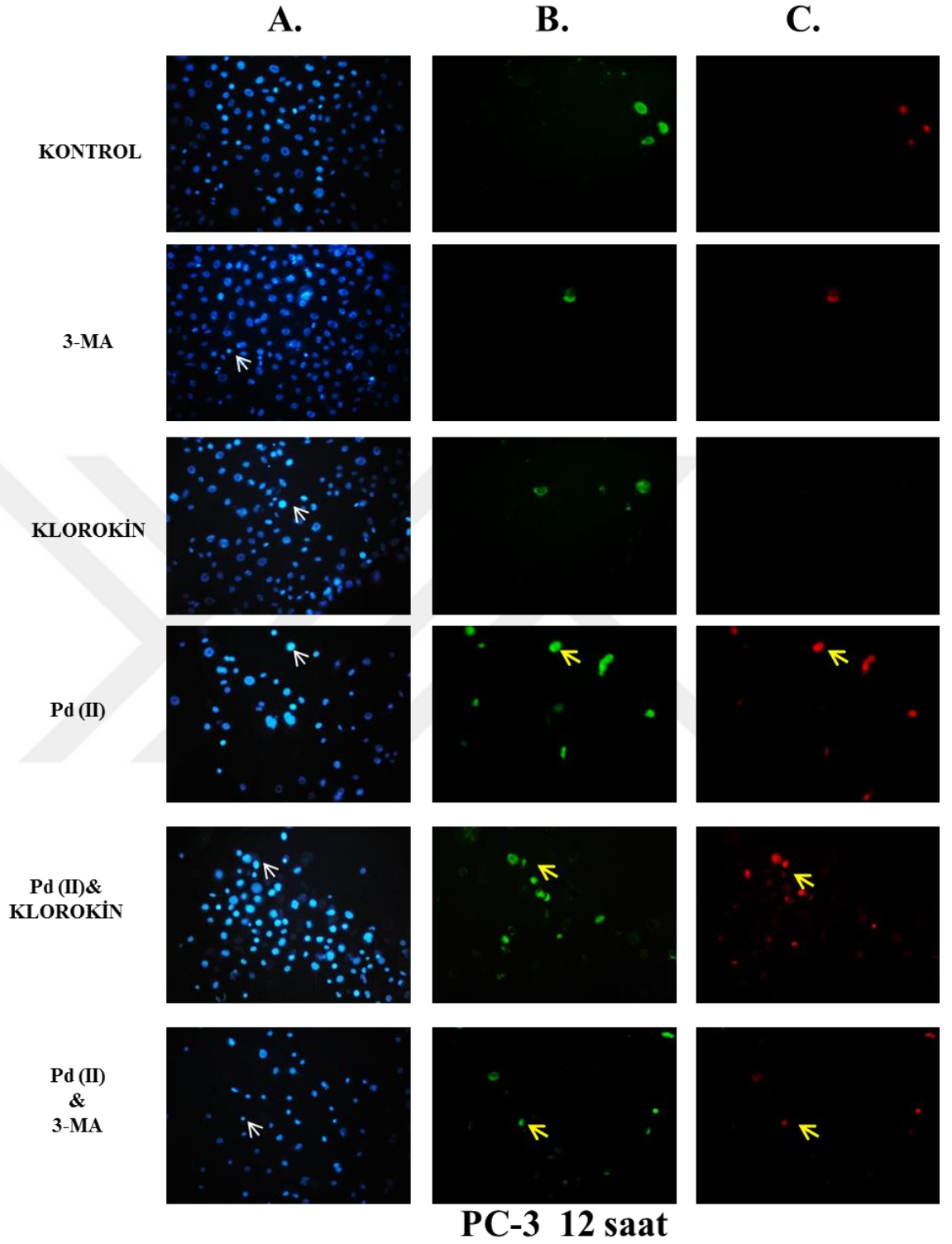
**Şekil 3.8.** Pd (II) bileşiği, Klorokin, 3-MA ve inhibitörlerin Pd (II) bileşiği ile kombinasyon LNCaP hücrelerinde 12 saatlik tedavi sonrası floresan mikroskop görüntüleri. **A:** Hoechst 33342 ile boyama (Mavi), **B:** Annexin-V (Yeşil), **C:** Propidyum iyodür ile boyama (Kırmızı). İnce beyaz ok: Piknotik veya kondanse nukleus; kalın beyaz ok: Annexin-V, pozitif PI negatif; kalın sarı ok: Annexin-V, pozitif PI pozitif alanları göstermektedir.



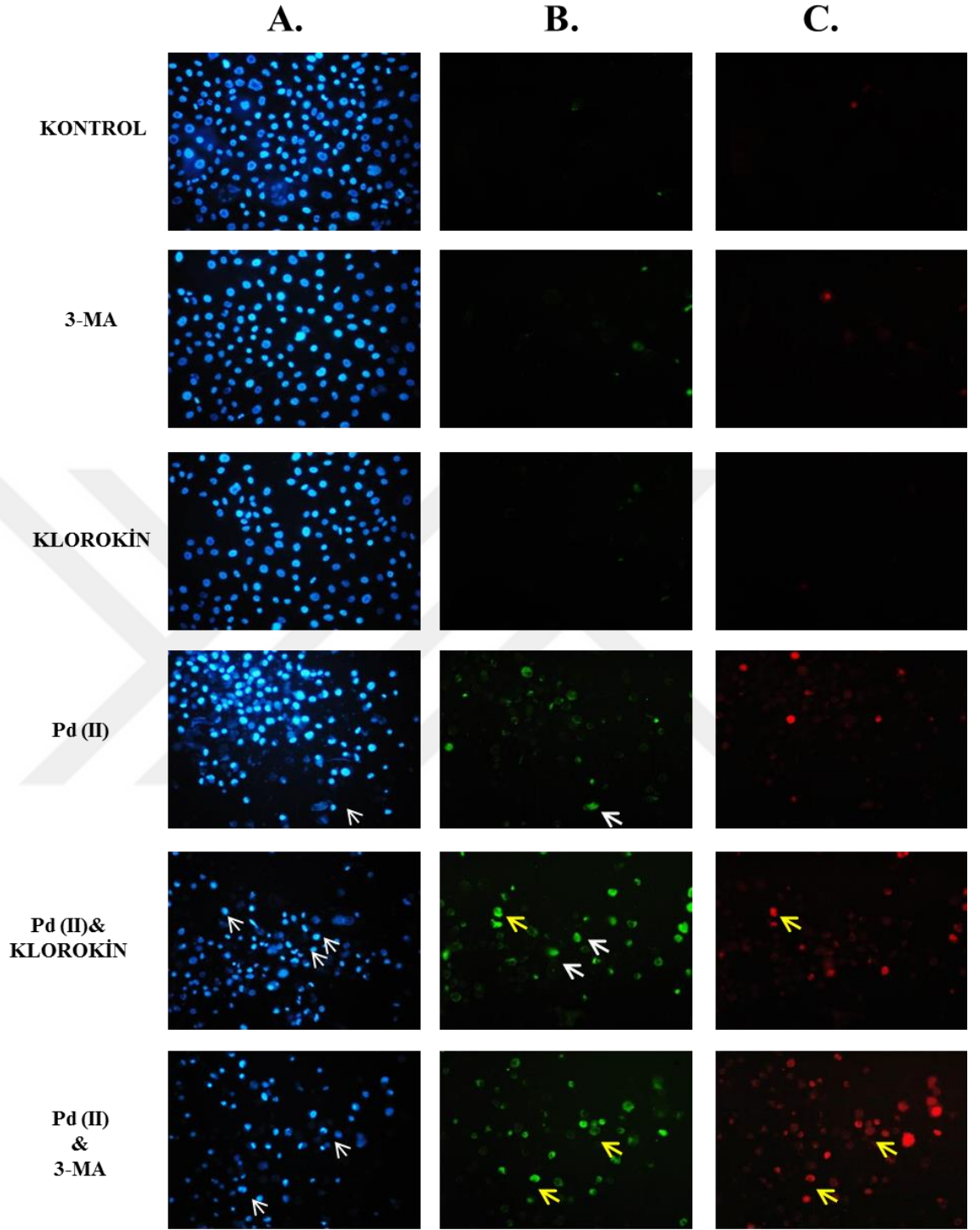
**Şekil 3.9.** Pd (II) bileşiği, Klorokin, 3-MA ve inhibitörlerin Pd (II) bileşiği ile kombinasyon LNCaP hücrelerinde 24 saatlik tedavi sonrası floresan mikroskop görüntüleri. **A:** Hoechst 33342 ile boyama (Mavi), **B:** Annexin-V (Yeşil), **C:** Propidyum iyodür ile boyama (Kırmızı). İnce beyaz ok: Piknotik veya kondanse nukleus; kalın beyaz ok: Annexin-V, pozitif PI negatif; kalın sarı ok: Annexin-V, pozitif PI pozitif alanları göstermektedir.

PC-3 hücrelerinde, Pd (II) bileşiminin tek başına ve inhibitörler ile 12 saat süren kombinasyon tedavisi sonucu hücre yoğunluğunun kontrole kıyasla azaltığı ve piknotik nükleusların varlığı belirlendi. Hücrelerin çoğunun Anneksin-V pozitif/ PI pozitif olmasından dolayı hücrelerde geç apoptozis/sekonder nekrozis geliştiği söylenebilir (Şekil 3.10). PC-3 hücrelerinde, 24 saat süren tedavi sonrası Pd (II) bileşiminin inhibitörle kombinasyonu sonrası hücre sayısında kontrole kıyasla azalmalar gözlemlendi. Hücrelerde özellikle kombinasyon tedavilerinde Anneksin-V pozitif alanların çok daha yoğun olduğu ve Anneksin-V pozitif/ PI pozitif belirlenmesi geç apoptozis/sekonder nekrozis geliştiğini göstermektedir (Şekil 3.11).





**Şekil 3.10.** Pd (II) bileşiği, Klorokin, 3-MA ve inhibitörlerin Pd (II) bileşiği ile kombinasyon PC-3 hücrelerinde 12 saatlik tedavi sonrası floresan mikroskop görüntüleri. **A:** Hoechst 33342 ile boyama (Mavi), **B:** Annexin-V (Yeşil), **C:** Propidyum iyodür ile boyama (Kırmızı). İnce beyaz ok: Piknotik veya kondanse nukleus; kalın beyaz ok: Annexin-V, pozitif PI negatif; kalın sarı ok: Annexin-V, pozitif PI pozitif alanları göstermektedir.



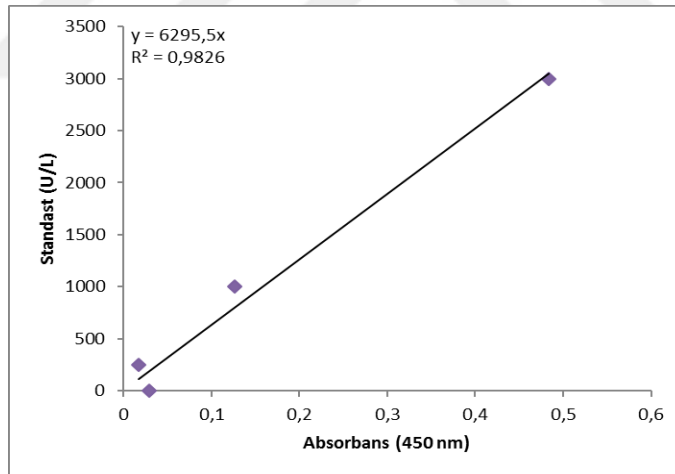
### PC-3 24 saat

**Şekil 3.11.** Pd (II) bileşiği, Klorokin, 3-MA ve inhibitörlerin Pd (II) bileşiği ile kombinasyon PC-3 hücrelerinde 24 saatlik tedavi sonrası floresan mikroskop görüntüleri. **A:** Hoechst 33342 ile boyama (Mavi), **B:** Annexin-V (Yeşil), **C:** Propidyum iyodür ile boyama (Kırmızı). İnce beyaz ok: Piknotik veya kondanse nukleus; kalın beyaz ok: Annexin-V, pozitif PI negatif; kalın sarı ok: Annexin-V, pozitif PI pozitif alanları göstermektedir.

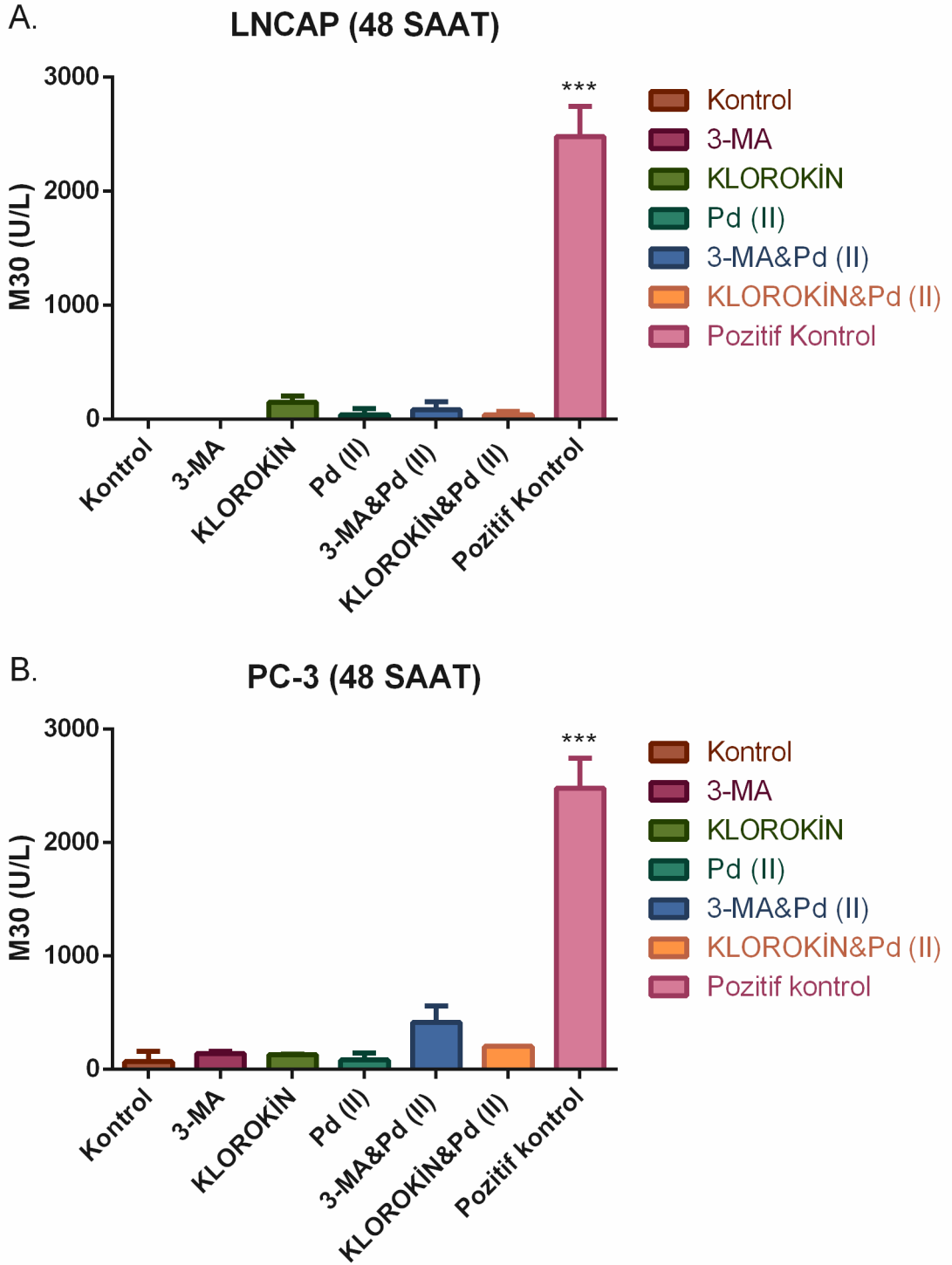
### 3.4. M30 Antijen (Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18) Bulguları

Pd (II) bileşiğinin otofaji inhibitörleri ile kombinasyonunun hücreler üzerinde sitotoksik aktivite gösterdiği belirlendikten sonra hücre ölüm modunu araştırmak amacıyla apoptozise özgü bir belirteç olan kaspazla-kırılmış CK18 (M30) düzeylerine bakıldı. M30-Antijen ölçümlerinin değerlendirilmesi için standart eğri grafiği hazırlandı. LNCaP ve PC-3 hücreleri ile yapılan çalışmanın standart eğri grafiği Şekil 3.12’te gösterilmiştir. Ölçülen absorbanslar standart eğri grafiği yardımıyla belirlenen formüller üzerinden değerlendirilerek M30 miktarları U/L cinsinden hesaplandı (Şekil 3.13).

Şekil 3.13’de, 12,5 µM Pd (II) bileşiği ve 5 µM otofaji inhibitörleri (klorokin ve 3-MA) ile muamelelerinin 48 saatte LNCaP ve PC-3 hücrelerinde, bir apoptozis belirteci olan M30 seviyesine olan etkisi gösterilmektedir. Her iki hücre soyunda da M30 seviyelerinde herhangi bir değişimin olmadığı belirlendi (Şekil 3.13A ve Şekil 3.13B). çalışmada pozitif kontrol olarak A549 akciğer kanseri hücre soyunda sisplatinin 12,5 µM dozu kullanıldı.



Şekil 3.12. LNCaP ve PC-3 hücre soyları ile yapılan çalışmanın M30-Antijen standart eğri grafiği.



**Şekil 3.13.** Pd(II) bileşiği, Klorokin, 3-MA ve inhibitörlerin Pd (II) bileşiği ile kombinasyon tedavilerinin 48 saatte LNCaP (A) ve PC-3 (B) hücre soylarında M30 seviyeleri üzerine etkisi. Pozitif kontrol: A549 hücrelerinde 12,5 µM sisplatin. \*Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı \*\*\*:p<0,001) ifade etmektedir.

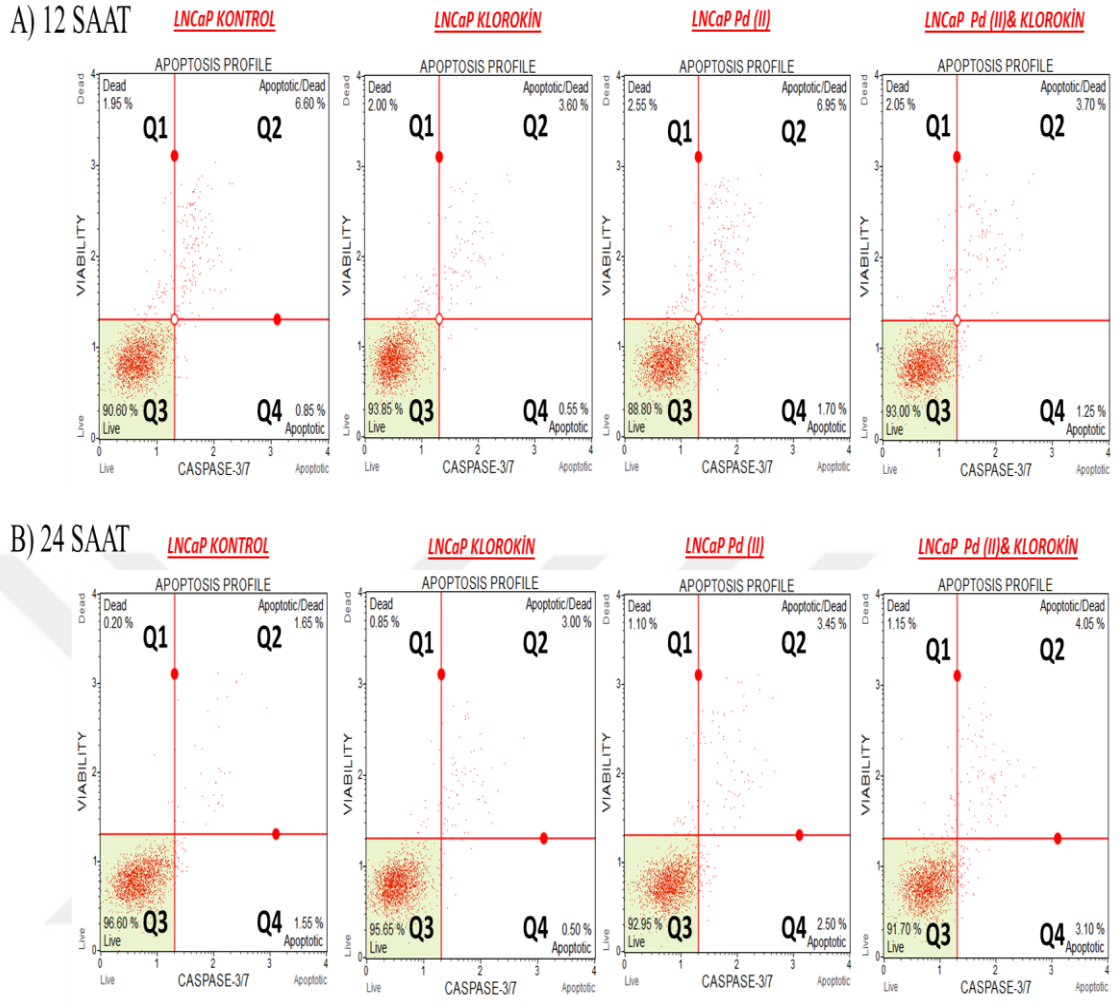


### 3.5. Akım Sitometri Bulguları

#### 3.5.1. Kaspaz 3/7 Testi

Yapılan canlılık testleri ve floresan boyama sonuçları her iki otofaji inhibitörünün de (klorokin ve 3-MA) Pd (II) bileşiği ile kombine edildiği zaman benzer sonucu gösterdiği bulundu. Bu yüzden sonraki çalışmalarda hem stabilitesi hemde klinik öncesi faz çalışmalarında etkinliği ve güvenilirliğinin kanıtlanması nedeniyle otofaji inhibitörü olarak klorokin kullanımına karar verildi. Apoptotik sinyal boyunca etkili olan efektör kaspazlardan: kaspaz 3/7 aktivasyonu membran integritesi ve apoptotik hücre ölümü hakkında önemli bilgiler vermektedir. Apoptotik hücre ölümü, kaspaz proteazların aktifleşmesi sayesinde gerçekleşmektedir.

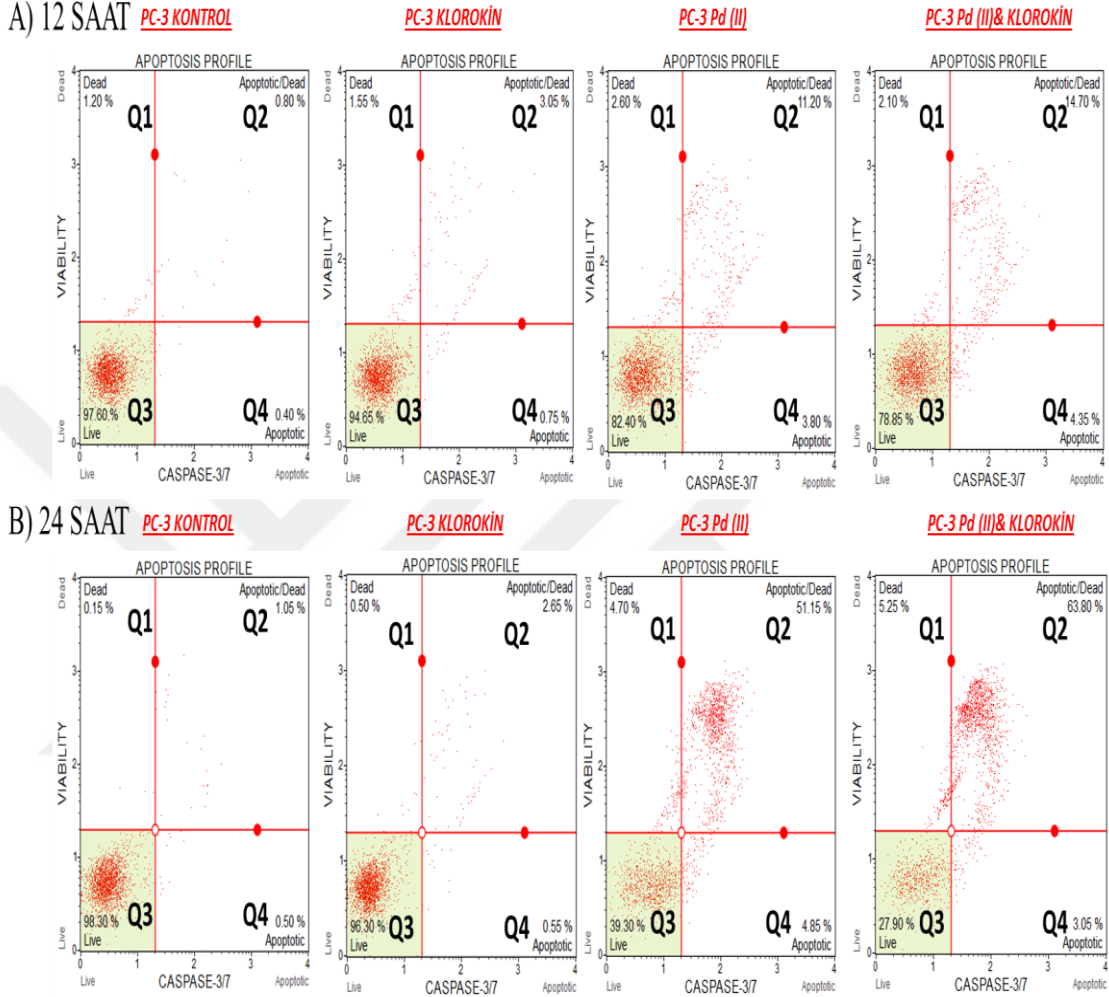
Apoptotik hücre ölüm mekanizmasının akım sitometrisinde Kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirilmesi sonucunda; LNCaP hücrelerinin 12 saatlik tedavi sonrasında, klorokin tek başına uygulandığında apoptotik oran %4,15 (Q2+Q4), Pd (II) bileşiği tek başına %8,65 (Q2+Q4) iken kombinasyon grubunda (klorokin+Pd (II) bileşiği) apoptotik oran %4,95 (Q2+Q4) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.14A). Alınan verilerde, kombinasyon tedavisinin apoptotik oranında (kaspaz 3/7 aktivitesini) anlamlı değişiklik gözlenmedi. 48 saat tedavi sonucunda ise, kombinasyon tedavisinde total apoptotik hücre yüzdesi %7,15 (Q2+Q4); iken tek başına Pd (II) kompleksi ile tedavisi sonucu apoptotik hücre yüzdesi %5,95 (Q2+Q4), tek başına klorokin uygulamasında oran %3,50 (Q2+Q4) bulundu (Şekil 3.14B). Bu sonuçlara göre 48 saat süren tedavi sonucu kombinasyon tedavisinin hücrelerinde Pd (II) bileşiğine oranla kaspaz 3/7 aktivitesini değişmediği gözlemlendi.



**Şekil 3.14.** Klorokin (5 $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5  $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramları (Q1=Nekroz, Q2=Geç Apoptoz, Q3=% Canlılık, Q4=Erken Apoptoz)

MTT ve ATP canlılık testlerinde hem tek başına Pd (II) bileşiğine hemde otofaji inhibitörleri (klorokin ve 3-MA) kombinasyon tedavilerinde daha duyarlı sonuçlar veren PC-3 hücre soyunda 12 saatlik tedavi sonrasında, klorokin tek başına uygulandığında apoptotik oran %3,80 (Q2+Q4), Pd (II) bileşiği tek başına %15 (Q2+Q4) iken kombinasyon grubunda (klorokin+Pd (II) bileşiği) apoptotik oran %19,05 (Q2+Q4) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.15A). Kombinasyon tedavisinin apoptotik oranında (kaspaz 3/7 aktivitesini) az miktarda artış görüldü. 48 saat tedavi sonucunda ise, kombinasyon tedavisinde total apoptotik hücre yüzdesi %69,85 (Q2+Q4); iken tek başına Pd (II) kompleksi ile tedavisi sonucu apoptotik hücre yüzdesi %56 (Q2+Q4), tek başına klorokin uygulamasında oran %3,10 (Q2+Q4) bulundu (Şekil 3.15B). Bu

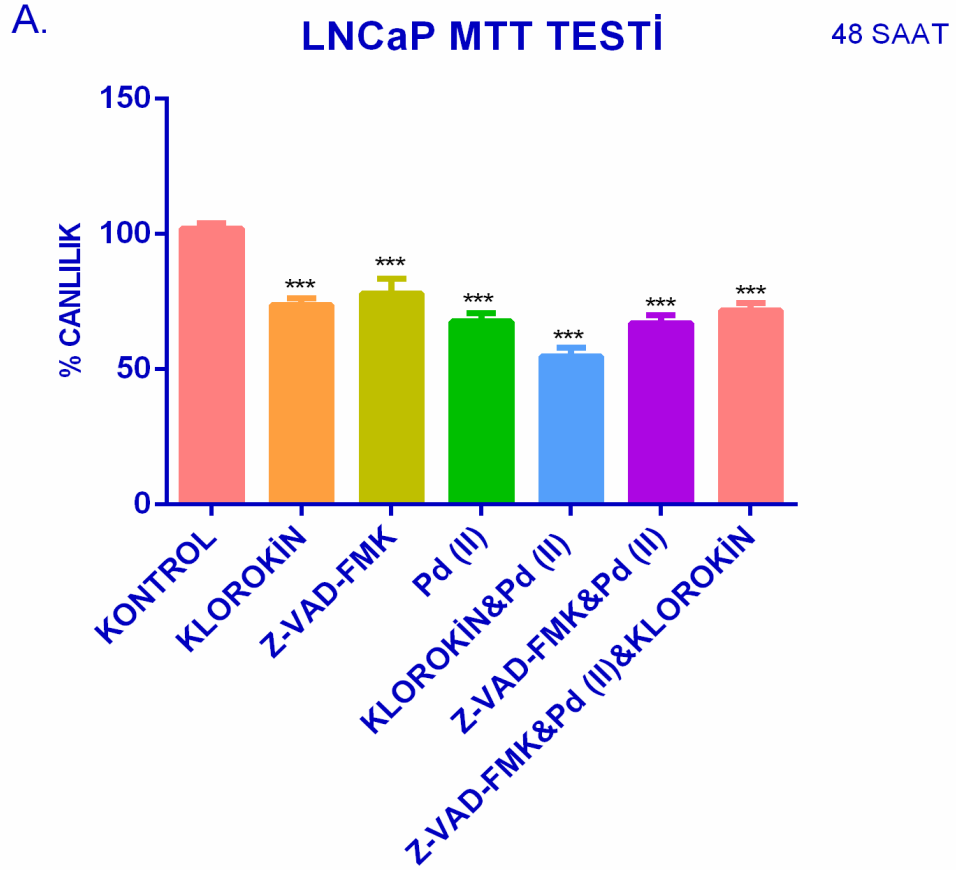
sonuçlara göre 48 saat süren tedavi sonucu kombinasyon tedavisinin hücrelerinde hem Pd (II) bileşiğine hem kontrole oranla kaspaz 3/7 aktivitesinde artış meydana geldiği görüldü.



**Şekil 3.15.** Klorokin ( $5\mu\text{M}$ ) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği ( $12,5\mu\text{M}$ ) ve klorokin kombinasyonunun PC-3 prostat kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramları (Q1=Nekroz, Q2=Geç Apoptoz, Q3=% Canlılık, Q4=Erken Apoptoz)

Bu verileri desteklemek üzere kaspaz aktivitesini baskılamak amacıyla, hücrelere ön uygulama ile (24 saat)  $20\mu\text{M}$  pan-kaspaz inhibitörü (z-VAD-FMK) uygulandı. Ardından ilaçlar tek tek veya kombine olarak uygulandı. Bu süreçte kaspaz inhibitörünün etkisi MTT hücre canlılığı tespiti ile incelendi. Elde edilen sonuçlara göre, LNCaP hücrelerinde, kaspaz inhibitörleri uygulandığında ilaçların sitotoksik etkilerinin devam etmediği görüldü (Şekil 3.16A). Özellikle PC-3 hücre soyunda hem Pd (II) bileşiği ile pan-kaspaz inhibitörü ön uygulaması hem de Pd (II) bileşiği, klorokin

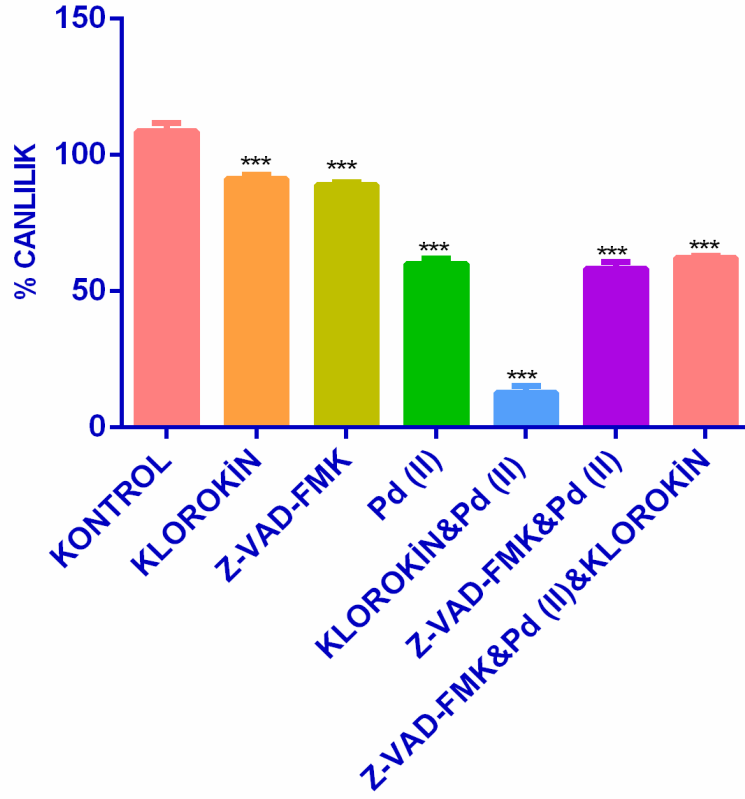
ve pan-kaspaz inhibitörü uygulaması sonucu canlı hücre sayısında artış görüldü (Şekil 3.16B). Pan-kaspaz inhibitörü her iki hücre soyunda da hem tek başına ilaç hem de kombinasyon tedavilerinin hücre canlılığını baskılayıcı etkisini ortadan kaldırdığı gözlemlendi. Bu durum hücrelerde görülen apoptozisin kaspaz bağımlı olduğunu göstermektedir.



B.

## PC-3 MTT TESTİ

48 SAAT



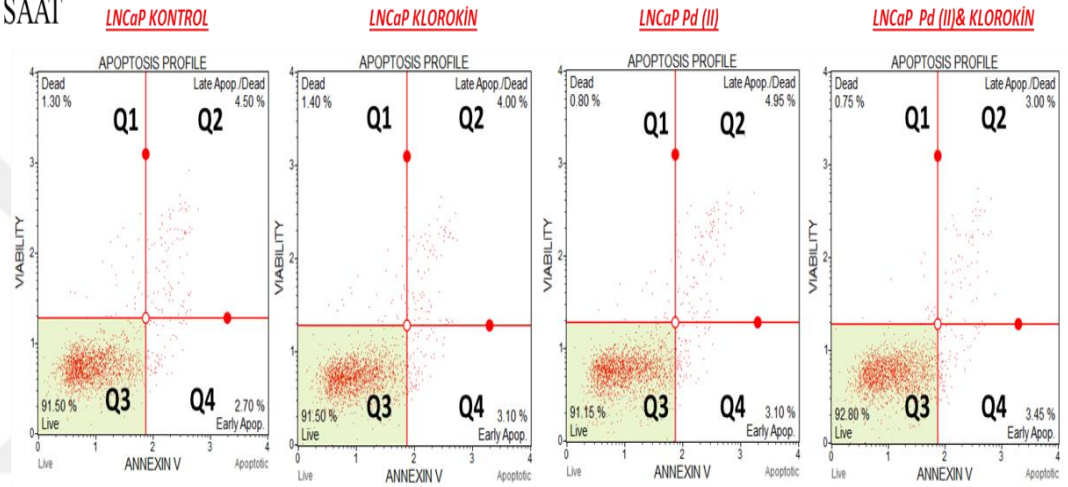
**Şekil 3.16.** Pan-kaspaz inhibitörü ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5  $\mu$ M) ve klorokin (5  $\mu$ M) kombinasyonunun LNCaP (A) ve PC-3 (B) prostat kanseri hücrelerinde canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir \*Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (\*:p<0,05 \*\*:p<0,01 \*\*\*:p<0,001) ifade etmektedir.

### 3.5.2. Anneksin-V Değerlendirilmesi

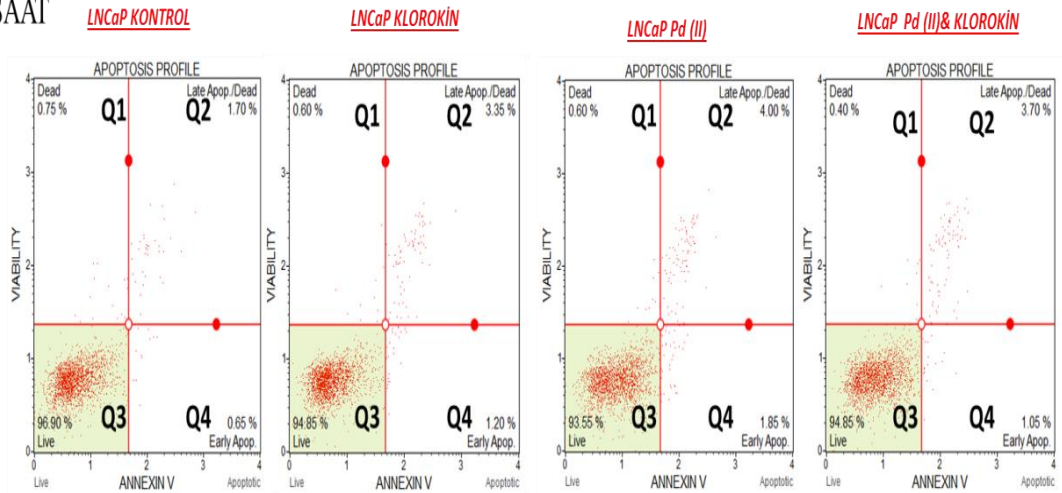
Apoptotik hücre ölüm mekanizmasının akım sitometrisinde Anneksin-V değerlendirilmesi sonucunda; LNCaP hücre soyunda 12 saatlik tedavi sonrasında, klorokin tek başına uygulandığında apoptotik oran %7,10 (Q2+Q4), Pd (II) bileşiği tek başına %8,05 (Q2+Q4) iken kombinasyon grubunda (klorokin+Pd (II) bileşiği) apoptotik oran %6,45 (Q2+Q4) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.17A). Kombinasyon tedavisinin apoptotik oranında (Anneksin-V pozitifliği) anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. 48 saat tedavi sonucunda ise, kombinasyon tedavisinde total apoptotik hücre yüzdesi %4,75 (Q2+Q4); iken tek başına Pd (II) kompleksi ile tedavisi sonucu

apoptotik hücre yüzdesi %5,85 (Q2+Q4), tek başına klorokin uygulamasında oran %4,55 (Q2+Q4) bulundu (Şekil 3.17B). Bu sonuçlara göre 48 saat süren tedavi sonucu kombinasyon tedavisinin hücrelerinde Pd (II) bileşiğine oranla apoptotik hücre sayısının değişmediği gözlemlendi. Annexin V-FITC ve 7-AAD (negatif olan bölge canlı hücreleri (Q3), Annexin V-FITC ve 7-AAD pozitif olan bölge geç apoptotik hücreleri (Q2), Annexin V-FITC pozitif ve 7-AAD negatif olan bölge erken apoptotik hücreleri (Q4), Annexin V-FITC negatif ve 7-AAD pozitif olan bölge ise nekrotik hücrelerin yüzde değerlerini göstermektedir.

A) 12 SAAT



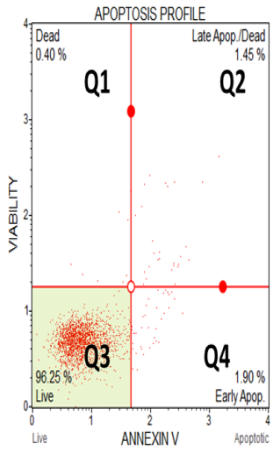
B) 24 SAAT



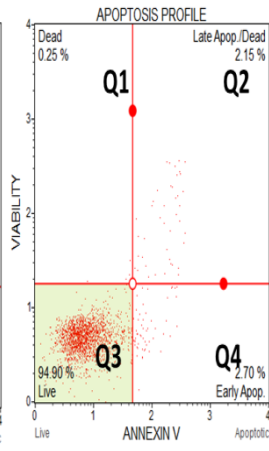
**Şekil 3.17.** Klorokin (5 µM) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5µM) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP prostat kanseri hücrelerinde Anneksin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramları (Q1=Nekroz, Q2=Geç Apoptoz, Q3=% Canlılık, Q4=Erken Apoptoz)

Kaspaz 3/7 aktivitesinde anlamlı sonuçlar görülen PC-3 hücre soyunda 12 saatlik tedavi sonrasında, klorokin tek başına uygulandığında apoptotik oran %4,85 (Q2+Q4), Pd (II) bileşiği tek başına %15,15 (Q2+Q4) iken kombinasyon grubunda (klorokin+Pd (II) bileşiği) apoptotik oran %15,70 (Q2+Q4) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.18A). Kombinasyon tedavisinin apoptotik oranında kontrole kıyasla artış görülürken tek başına Pd (II) bileşiğine kıyasla anlamlı bir artış görülmedi. 48 saat tedavi sonucunda ise, kombinasyon tedavisinde total apoptotik hücre yüzdesi %70.90 (Q2+Q4); iken tek başına Pd (II) kompleksi ile tedavisi sonucu apoptotik hücre yüzdesi %64.60 (Q2+Q4), tek başına klorokin uygulamasında oran %3.70 (Q2+Q4) bulundu (Şekil 3.18B). Bu sonuçlara göre 48 saat süren tedavi sonucu kombinasyon tedavisinin hücrelerinde hem Pd (II) bileşiğine hem kontrole oranla apoptotik hücrelerin sayısında artış meydana geldiği görüldü. Yapılan Annexin-V floresans boyama görüntüleri de bu sonucu destekledi.

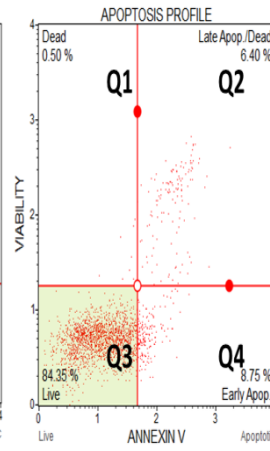
A) 12 SAAT PC-3 KONTROL



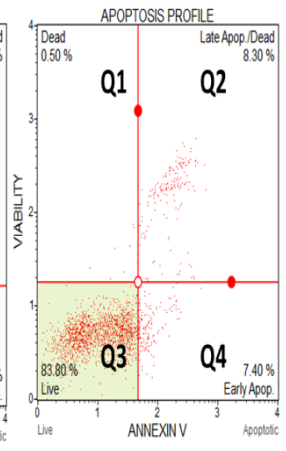
PC-3 KLOROKİN



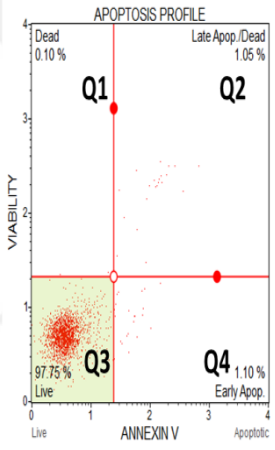
PC-3 Pd (II)



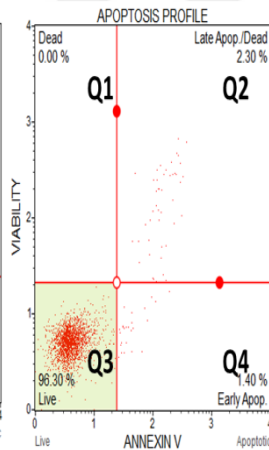
PC-3 Pd (II)& KLOROKİN



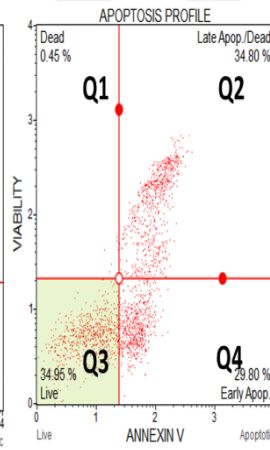
B) 24 SAAT PC-3 KONTROL



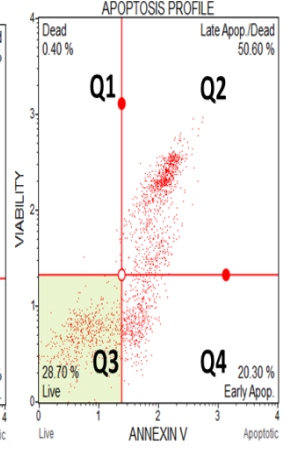
PC-3 KLOROKİN



PC-3 Pd (II)



PC-3 Pd (II)& KLOROKİN



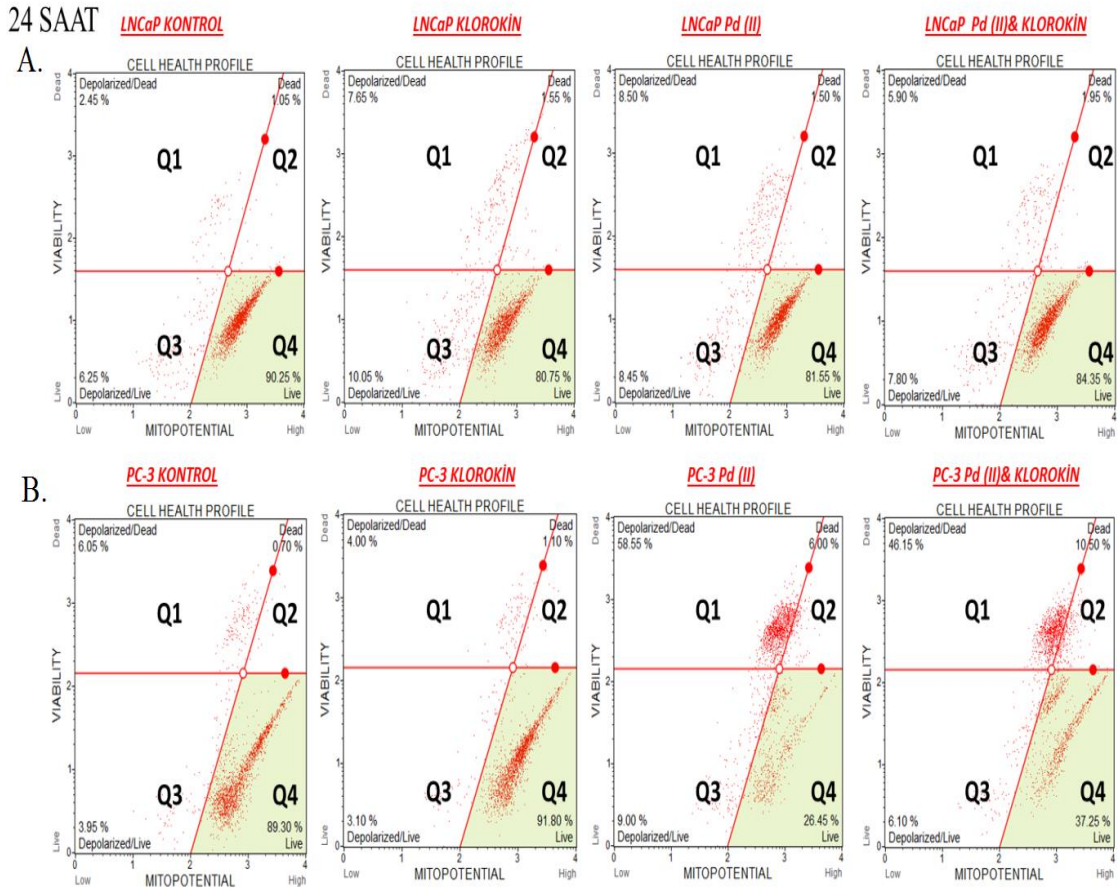
**Şekil 3.18.** Klorokin (5µM) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12.5µM) ve klorokin kombinasyonunun PC-3 prostat kanseri hücrelerinde Anneksin- V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramları (Q1=Nekroz, Q2=Geç Apoptoz, Q3=% Canlılık, Q4=Erken Apoptoz).

### 3.5.3. Mitokondri Membran Potansiyel Değişiklikleri

Mitokondriyal membran permeabilitesinin değişimi apoptotik süreçte gözlenen önemli değişikliklerdendir. Şekil 3.19’da görüldüğü üzere; LNCaP prostat kanseri hücrelerinde 24 saat süren tedavi sonucu tek başına Pd (II) bileşiğinde mitokondrisi depolarize olan hücrelerin total yüzdesi %16,95 (Q1+Q3) iken klorokin ile kombinasyon sonucu bu oranın %12,70 (Q1+Q3) olduğu görüldü (Şekil 3.19A). 24 saat süren tedavide kontrole kıyasla hem tek başına Pd (II) bileşiği hem de klorokin ile olan kombinasyon tedavisinde depolarize olan hücrelerin total yüzdesinin daha fazla olduğu



görüldü. Fakat tek başına Pd (II) bileşiği uygulaması ile kombinasyon uygulanması arasında anlamlı bir artış görülmedi. PC-3 prostat kanseri hücre soyunda ise, tek başına Pd (II) bileşiğinde mitokondrisi depolarize olan hücrelerin total yüzdesi %67,55 (Q1+Q3), klorokin %7,10 (Q1+Q3) iken kombinasyon sonucu bu oranın %52,25 (Q1+Q3) olduğu belirlendi (Şekil 3.19B). Kombinasyon tedavisinde depolarize olan hücrelerin yüzdesinde kontrole göre anlamlı fakat tek başına Pd (II) bileşiğiye kıyasla anlamlı bir artış gözlemlenmedi.



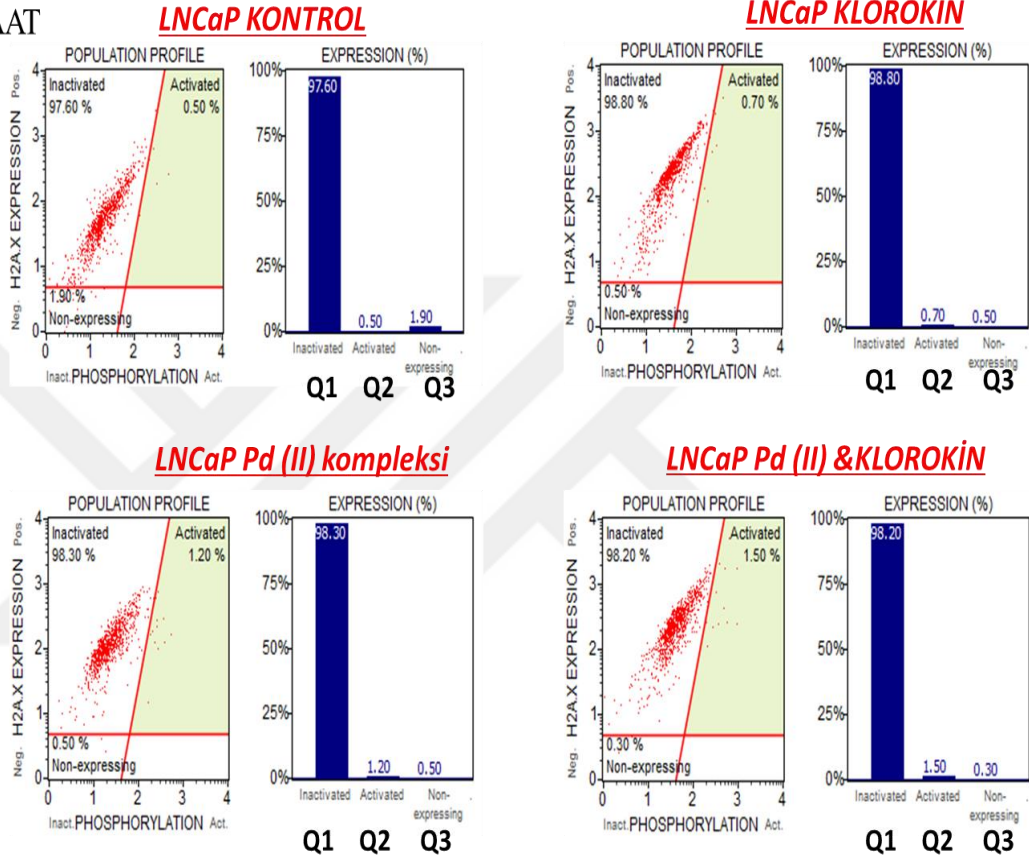
**Şekil 3.19.** Klorokin (5 $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12.5 $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP (A) ve PC-3 (B) prostat kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyel değişimi yüzde değerlerinin 12 saatlik histogramları (Q1=Depolarize/Ölü, Q2= Ölü, Q3=Depolarize/Canlı, Q4= Canlı)

### 3.5.4. DNA Hasarının Belirlenmesi

$\gamma$ H2AX'nin ekspresyonu DNA çift zincir kırıklarının tespitinde hassas bir belirteçdir. Akım sitometrisinde p- $\gamma$ H2AX'nin değerlendirilmesi sonucu 24 saat sonra Pd (II) bileşiğinin kontrole kıyasla LNCaP hücrelerinde %1,20 (Q2) DNA hasarına neden

olduğu bulundu. Klorokin tek başına uygulandığında bu oran %0,70 (Q2) olarak kaydedildi. Pd (II) bileşiğinin klorokin ile kombine edilmesi sonucu bu hasar %1,50 (Q2) bulundu (Şekil 3.20). Sonuç olarak kombinasyon tedavisinin LNCaP hücrelerinde DNA hasarında anlamlı bir artışa neden olmadığı belirlendi.

24 SAAT

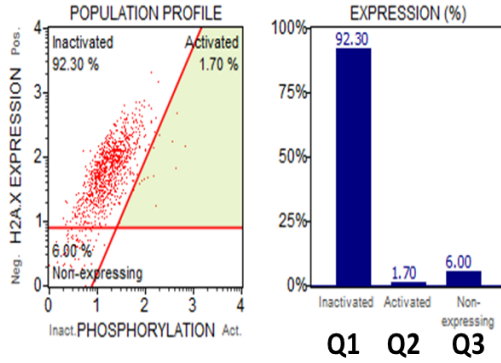


**Şekil 3.20.** Klorokin (5  $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5  $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP prostat kanseri hücrelerinde p- $\gamma$ H2AX yüzde değerlerinin 24 saatlik histogramı (Q1=  $\gamma$ H2AX, Q2= p- $\gamma$ H2AX, Q3=  $\gamma$ H2AX ekspresyon)

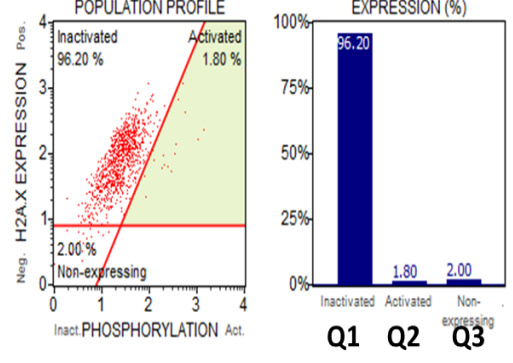
24 saat tedavi sonrası Pd (II) bileşiğinin kontrole kıyasla PC-3 hücrelerinde %54,50 (Q2) DNA hasarına neden olduğu bulundu. Klorokin tek başına uygulandığında bu oran %1,80 (Q2) olarak kaydedildi. Pd (II) bileşiğinin klorokin ile kombine edilmesi sonucu bu hasar %36,60 (Q2) bulundu (Şekil 3.21). Sonuç olarak PC-3 prostat kanseri hücre soyunda kombinasyon tedavisi sonucu DNA hasarında tek başına Pd (II) bileşiğine kıyasla anlamlı bir azalma meydana geldiği görüldü.

24 SAAT

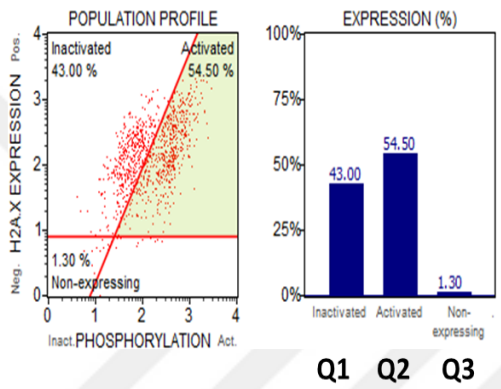
### ***PC-3 KONTROL***



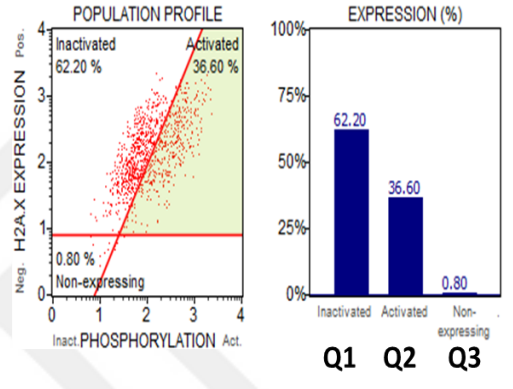
### ***PC-3 KLOROKİN***



### ***PC-3 Pd (II) kompleksi***



### ***PC-3 Pd (II) & KLOROKİN***

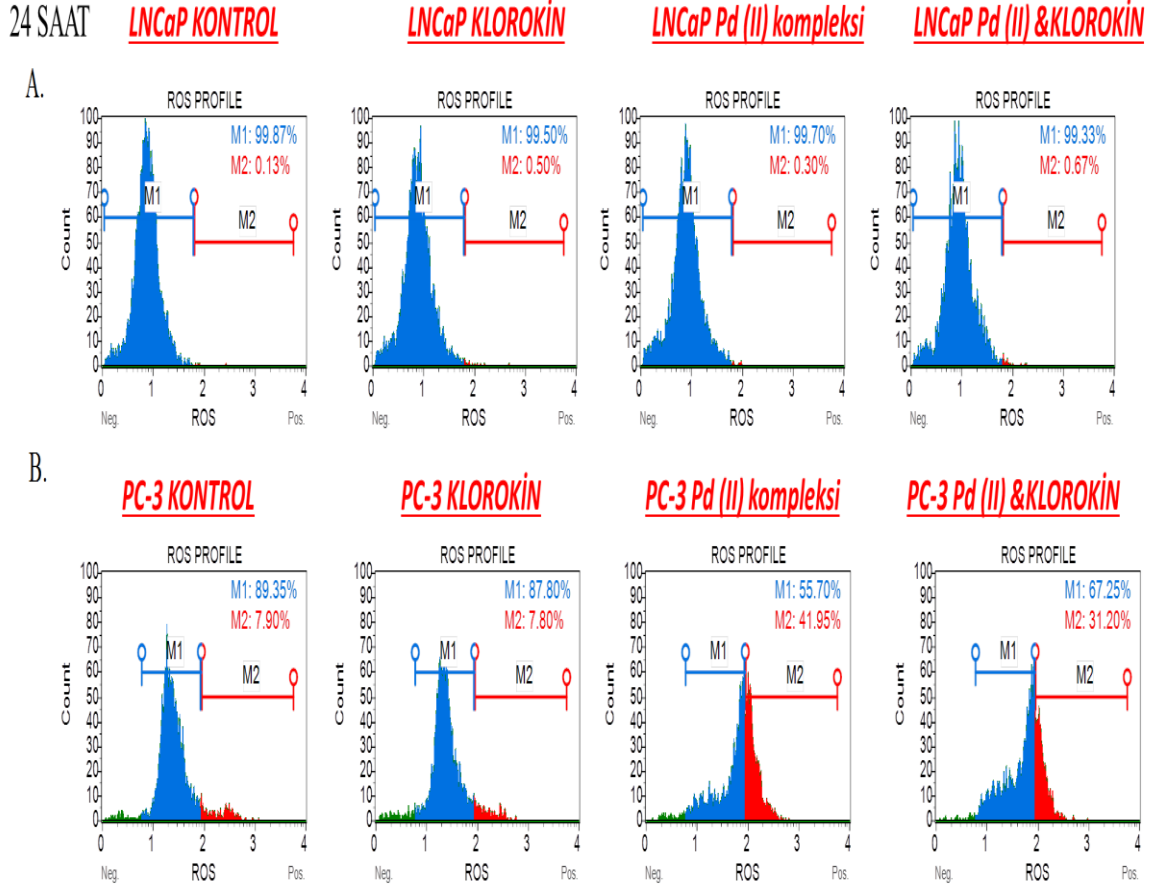


**Şekil 3.21.** Klorokin (5  $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5  $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun PC-3 prostat kanseri hücrelerinde p- $\gamma$ H2AX yüzde değerlerinin 24 saatlik histogramı (Q1=  $\gamma$ H2AX, Q2= p- $\gamma$ H2AX, Q3=  $\gamma$ H2AX ekspresyon)

### **3.5.5. Oksidatif Stresin (ROS) Belirlenmesi**

DNA hasarının ROS kaynaklı mı yoksa değil mi sorusuna yanıt olarak akım sitometrisinde ROS miktarı incelendi (Şekil 3.22). LNCaP hücrelerinde klorokin, Pd (II) bileşiği ve kombinasyon tedavisi uygulamasının kontrole kıyasla ROS miktarında bir değişime neden olmadığı görüldü (Kontrol ROS miktarı: % 0,13; Klorokin ROS miktarı: %0,30; Pd (II) bileşiği ROS miktarı: %0,50; Pd (II) bileşiği ve klorokin kombinasyonun ROS miktarı: %0,67) (Şekil 3.22A). PC-3 hücrelerinde ise Pd (II) bileşiğinin tek başına tedavisinin kontrole kıyasla ROS miktarını arttırdığı görüldü (Kontrol ROS miktarı: %7,990; Pd (II) bileşiği ROS miktarı: %41,95). Pd (II) bileşiğinin klorokin ile kombinasyonu sonucu kontrole kıyasla ROS miktarını arttırdığı görüldü (Kontrol ROS miktarı: %7,99; Pd (II) bileşiği ve klorokin kombinasyonu ROS

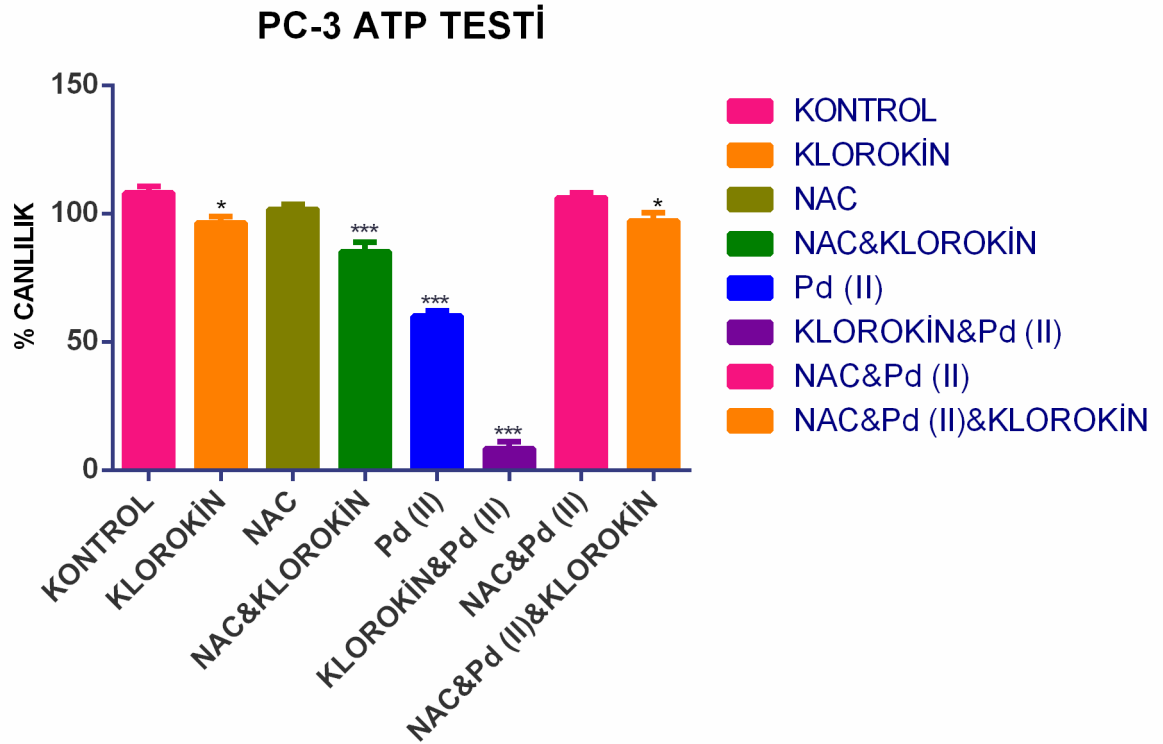
miktarı: %31,20). Alınan sonuçlara göre; Pd (II) bileşiği tek başına uygulandığında klorokin ile kombinasyonuna kıyasla ROS miktarının önemli derecede artmış olduğu görüldü (Şekil 3.22B).



**Şekil 3.22.** Klorokin (5  $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5  $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP (A) ve PC-3 (B) prostat kanseri hücrelerinde ROS yüzde değerlerinin 24 saatlik histogramı. M1: ROS negatif hücreler(-); M2: ROS pozitif hücreler ROS(+)

PC-3 hücre soyunda alınan bu sonuçları desteklemek için, ROS süpürücüsü olarak bilinen N-asetil-L-sistein (NAC) kullanılarak yapılan deneyin doğrulanması sağlandı. Öncelikle PC-3 hücreleri 10 mM NAC ile 3 saat ön tedavi yapıldı. Ardından ilaçlar tek tek veya kombine olarak uygulandı. NAC ve diğer ilaçların etkisi ATP hücre canlılığı testi ile incelendi. Elde edilen sonuçlara göre, ROS süpürücüsü olarak bilinen NAC uygulandığında ilaçların sitotoksik etkilerinin devam etmediği görüldü. PC-3 hücrelerinde hem Pd (II) bileşiği ile NAC inhibitörü ön uygulaması hem de Pd (II) bileşiği, klorokin ve NAC uygulanan hücrelerde canlı hücre sayısında artış görüldü (Şekil 3.23). ROS süpürücüsü olarak bilinen NAC, PC-3 hücrelerinde hem tek başına

Pd (II) bileşiğinin hem de kombinasyon tedavisinin hücre canlılığını baskılayıcı etkisini ortadan kaldırdığı gözlemlendi (Şekil 3.23). ROS seviyesindeki azalmanın ve NAC kullanımı ile canlılığın baskılayıcı etkisinin ortadan kalkması apoptoz ile otofaji arasındaki denge/geçiş sürecinide oksidatif stresin önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

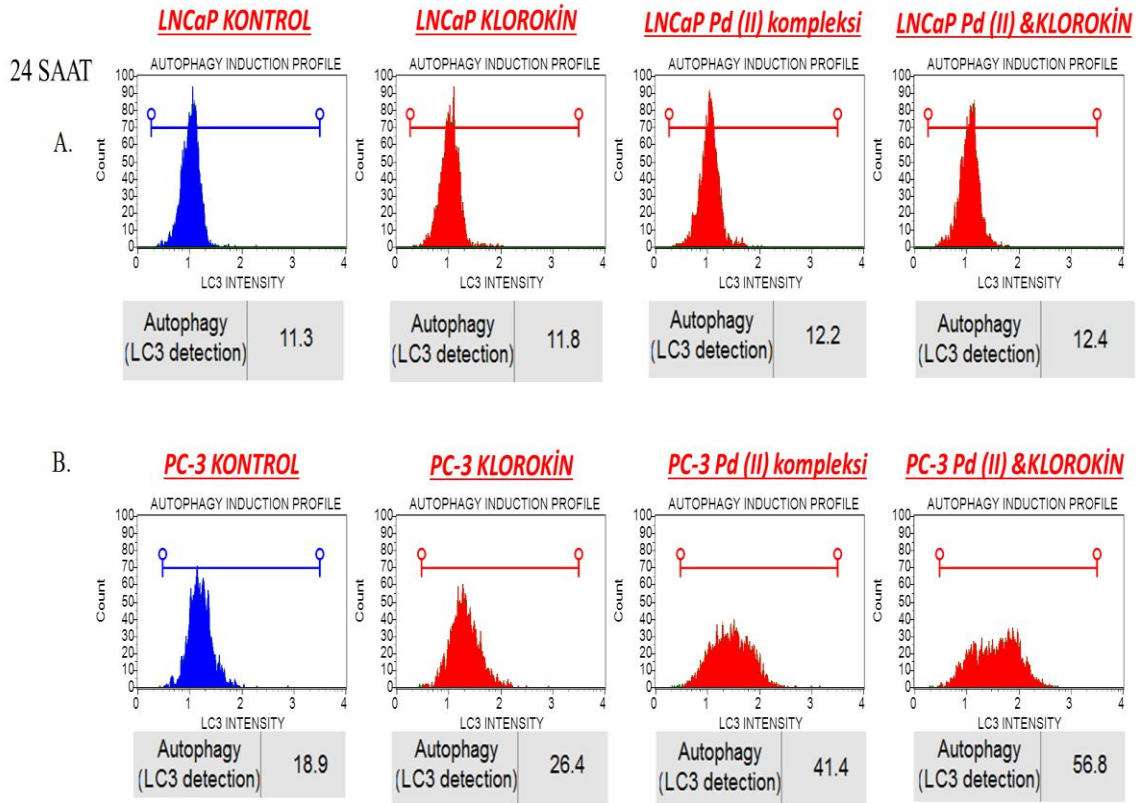


**Şekil 3.23.** ROS süpürücüsü olarak bilinen N-asetil-L-sistein (NAC) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5  $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun PC-3 prostat kanseri hücrelerinde canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir \*Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (\*:p<0,05 \*\*:p<0,01 \*\*\*:p<0,001) ifade etmektedir.

### 3.5.6. Önemli Bir Otofaji Proteini Olan LC3-II Seviyesinin Belirlenmesi

Otofajik belirteçlerin taranmasına yönelik olarak yapılan akım sitometrisinde önemli bir otofaji proteini olan LC3-II ifadesine bakıldı. Şekil 3.24A'da görülen sonuçlara göre LNCaP hücrelerinde klorokin, Pd (II) bileşiği ve kombinasyon tedavisi uygulamasının kontrole kıyasla otofagozom yapısında görev alan LC3-II proteini ifadesinde önemli bir değişiklik saptanmadı (kontrol LC3-II yoğunluğu: 11,3; klorokin LC3-II yoğunluğu: 11,8; Pd (II) bileşiği LC3-II yoğunluğu: 12,2; Pd (II) bileşiği ve klorokin

kombinasyonun LC3-II yoğunluğu: 12,4). PC-3 hücrelerinde ise Pd (II) bileşiğinin tek başına tedavisinin kontrole kıyasla LC3-II proteini ifadesinin arttırdığı görüldü (kontrol LC3-II yoğunluğu: 18,9; Pd (II) bileşiği LC3-II yoğunluğu: 41,40). Pd (II) bileşiğinin klorokin ile kombinasyonu sonucu kontrole LC3-II proteini ifadesinin arttırdığı görüldü (kontrol LC3-II yoğunluğu: 18,9; Pd (II) bileşiği ve klorokin kombinasyonu LC3-II yoğunluğu: 56,8) (Şekil 3.24B).



**Şekil 3.24.** Klorokin (5  $\mu\text{M}$ ) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5  $\mu\text{M}$ ) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP (A) ve PC-3 (B) insan prostat kanseri hücrelerinde LC3-II ifadesinin 24 saatlik histogramı.

### 3.5.7. PI3K Aktivasyonunun Değerlendirilmesi

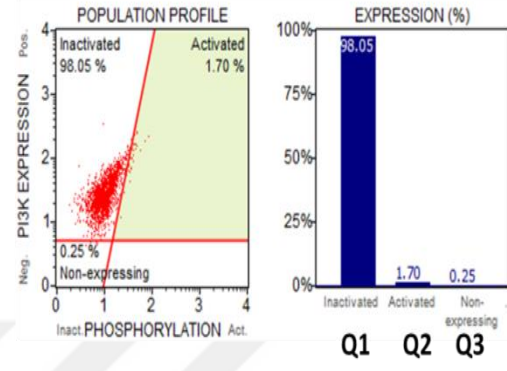
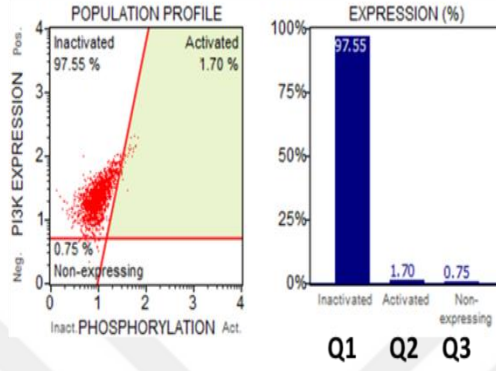
Klorokin (5  $\mu\text{M}$ ) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5  $\mu\text{M}$ ) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP ve PC-3 prostat kanseri hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolağı üzerindeki etkisini belirlemek üzere akım sitometrisi ile p-AKT ifade düzeyleri incelendi. Şekil 3.25'de görülen sonuçlara göre LNCaP hücrelerinde klorokin, Pd (II) bileşiği ve kombinasyon tedavisi uygulamasının kontrole kıyasla p-AKT ifadesinde

önemli bir değişiklik saptanmadı (kontrol p-AKT oranı: %1,70; klorokin p-AKT oranı: %1,70; Pd (II) bileşęi p-AKT oranı: %4,15; Pd (II) bileşęi ve klorokin kombinasyonun p-AKT oranı: %5,70).

48 SAAT

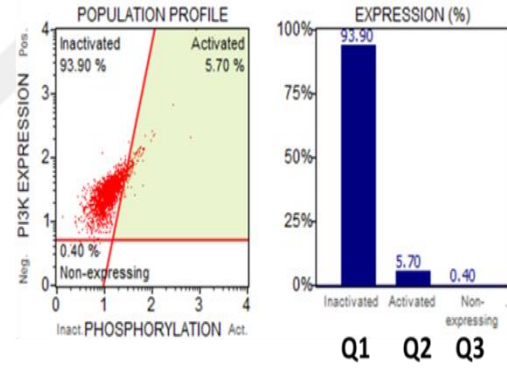
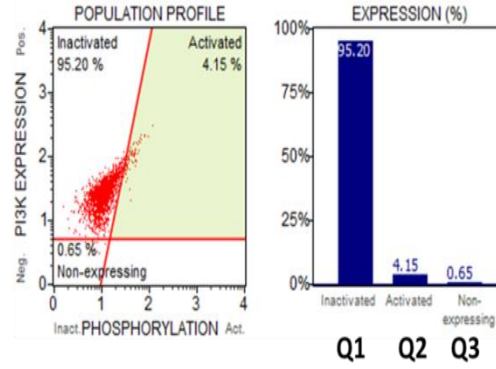
***LNCaP KONTROL***

***LNCaP KLOROKİN***



***LNCaP Pd (II) kompleksi***

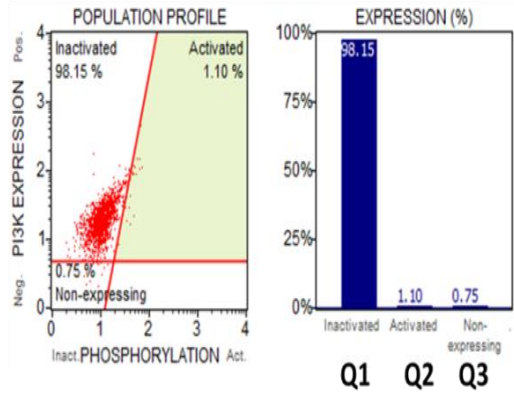
***LNCaP Pd (II) & KLOROKİN***



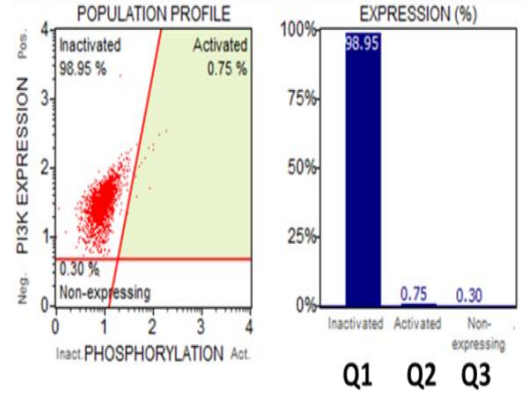
**Şekil 3.25.** Klorokin (5 µM) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşęi (12,5 µM) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP prostat kanseri hücrelerinde p-AKT yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramı (Q1=AKT, Q2=p-AKT, Q3=AKT eksprese etmeyen)

PC-3 hücrelerinde ise, Pd (II) bileşęinin tek başına tedavisinin kontrole kıyasla p-AKT ifade düzeyleri arttırdığı görüldü (kontrol p-AKT oranı: %1,10; Pd (II) bileşęi p-AKT oranı: %6,40). Pd (II) bileşęinin klorokin ile kombinasyonu sonucu p-AKT ifadesinin arttırdığı görüldü (kontrol p-AKT oranı: %1,10; Pd (II) bileşęi ve klorokin kombinasyonu p-AKT oranı: %53,80) (Şekil 3.26).

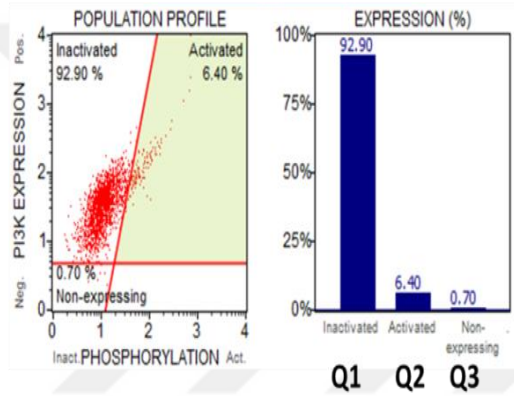
48 SAAT **PC-3 KONTROL**



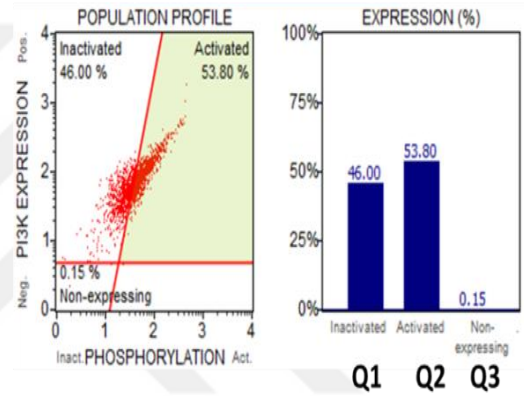
**PC-3 KLOROKİN**



**PC-3 Pd (II) kompleksi**



**PC-3 Pd (II) & KLOROKİN**



**Şekil 3.26.** Klorokin (5  $\mu\text{M}$ ) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5  $\mu\text{M}$ ) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP prostat kanseri hücrelerinde p-AKT yüzde değerlerinin 48 saatlik histogramı (Q1=AKT, Q2=p-AKT, Q3=AKT ekspres etmeyen)

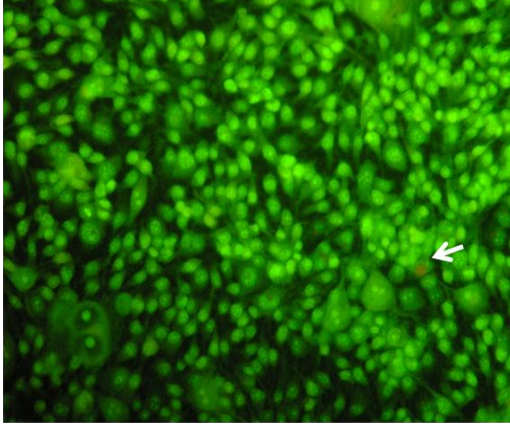
### 3.6. Aktif Lizozom Boyaması (Akridin)

Otofajik düzenlenmenin son evresi otofajik veziküllerin lizozomlar ile birleşerek otolizozomları oluşturma evresi olduğu için hücre içi toplam lizozom etkinliğinin artmasına yönelik olarak akridin turuncu ile boyama gerçekleştirildi.

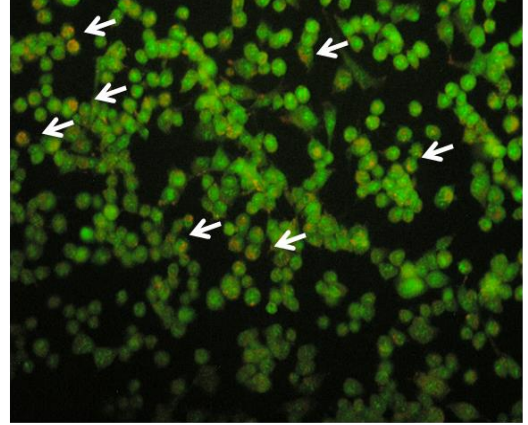
LNCaP hücrelerine klorokin (5  $\mu\text{M}$ ) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5  $\mu\text{M}$ ) ve klorokin kombinasyonunun uygulanması sonucunda aktif lizozomlar turuncu renkte gösterildi (Şekil 3.27). Kontrol hücrelerine kıyasla yapılan tedavilerin turuncu renkli lizozomal veziküllerde artışa neden olduğu görüldü (Şekil 3.27).



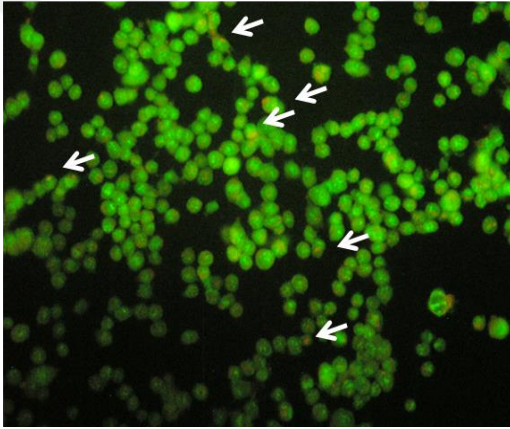
48 SAAT LNCaP KONTROL



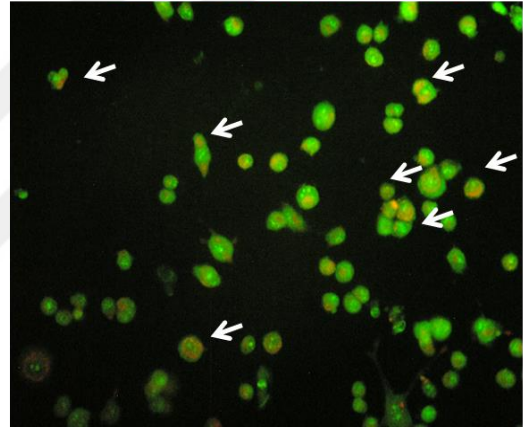
LNCaP KLOROKİN



LNCaP Pd (II) kompleksi



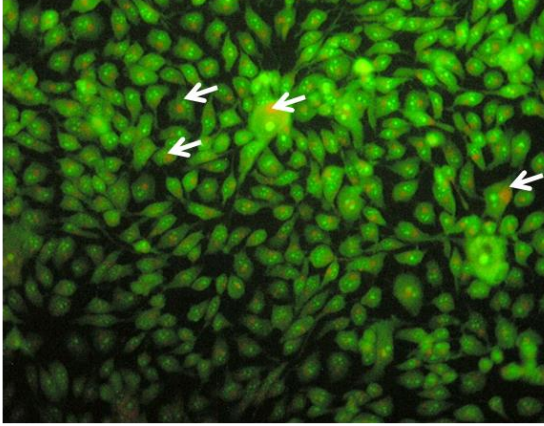
LNCaP Pd (II) & KLOROKİN



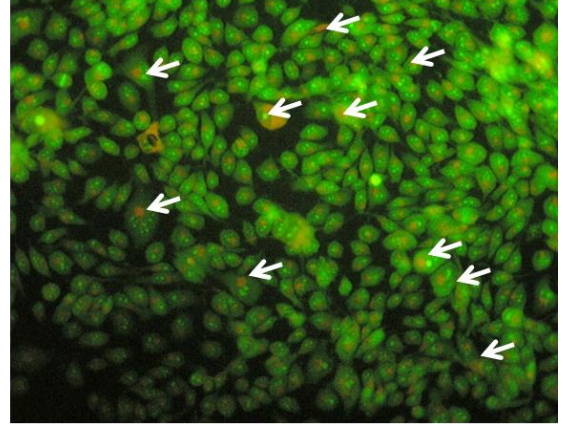
**Şekil 3.27.** Klorokin ( $5 \mu\text{M}$ ) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği ( $12,5 \mu\text{M}$ ) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP prostat kanseri hücrelerinde akridin boyama sonuçlarının 48 saatlik floresan mikroskop görüntüleri

PC-3 hücrelerine klorokin ( $5 \mu\text{M}$ ) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği ( $12,5 \mu\text{M}$ ) ve klorokin kombinasyonunun uygulanması sonucunda aktif lizozomlar gösterildi. Kontrol hücrelerine kıyasla yapılan tedavilerin turuncu renkli lizozomal vesiküllerde artışa neden olduğu görüldü (Şekil 3.28). LNCaP hücrelerine kıyasla PC-3 hücrelerinde aktif lizozomlarının varlığının daha fazla olduğu görüldü.

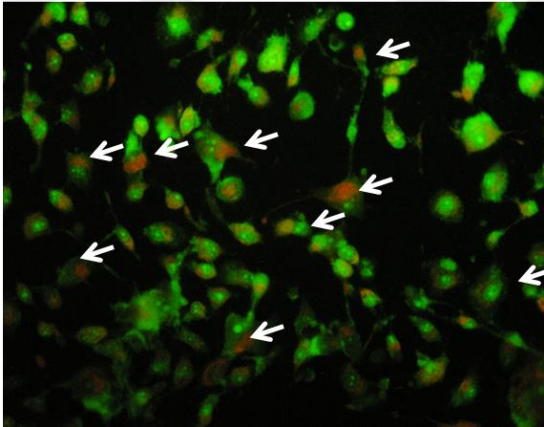
48 SAAT **PC-3 KONTROL**



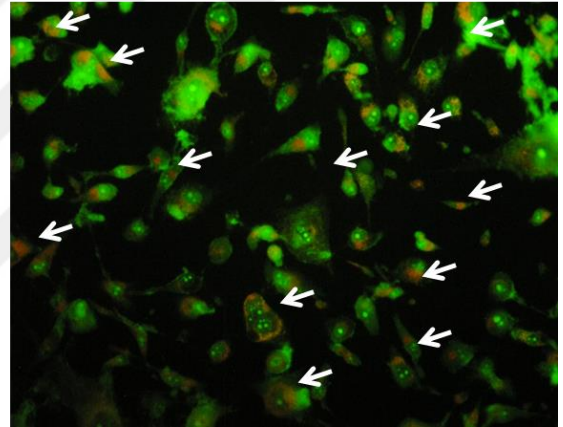
**PC-3 KLOROKİN**



**PC-3 Pd (II) kompleksi**



**PC-3 Pd (II) & KLOROKİN**

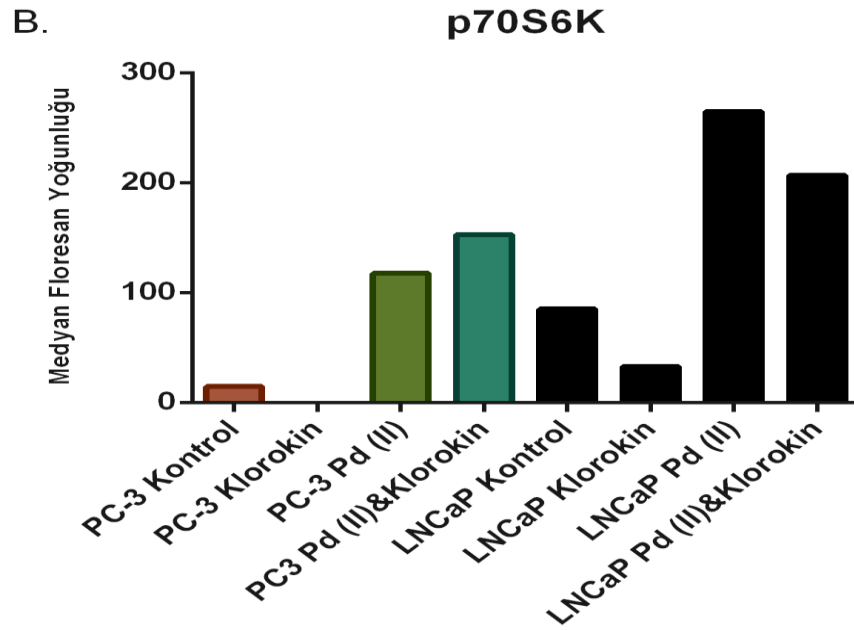
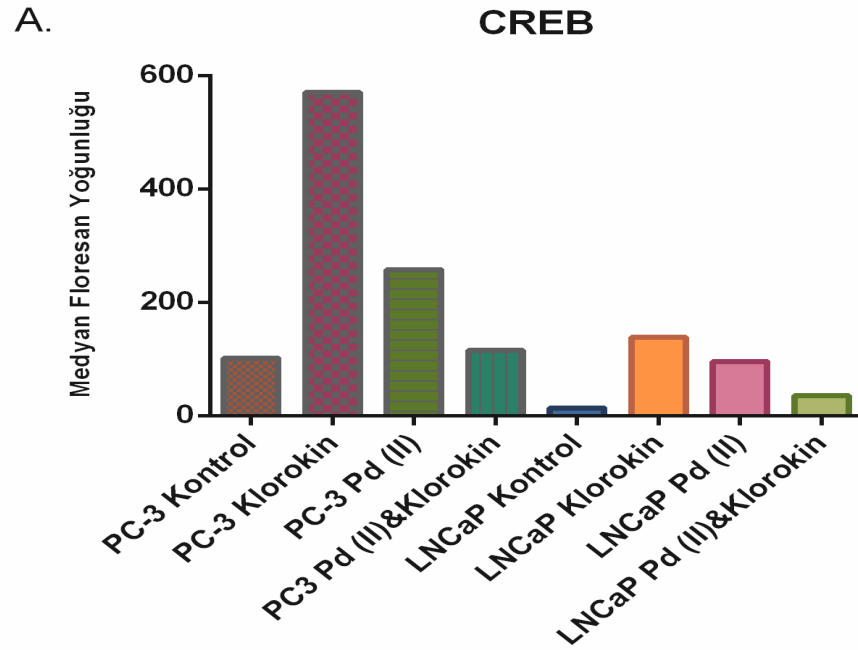


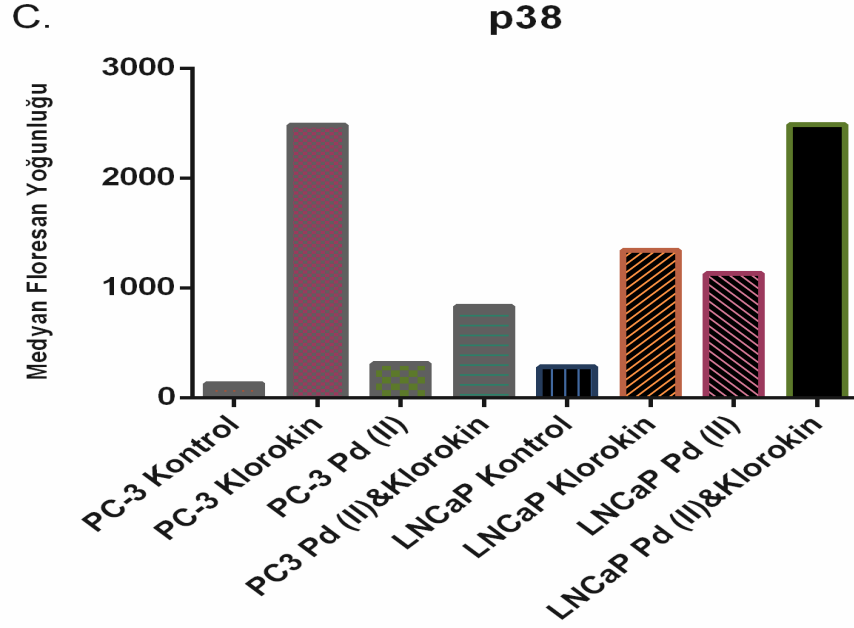
**Şekil 3.28.** Klorokin (5  $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5  $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun PC-3 prostat kanseri hücrelerinde akridin boyama sonuçlarının 48 saatlik floresan mikroskop görüntüleri

### **3.7. Lumineks Bulguları**

Hücre büyümesi ve metabolizmasında önemli sinyal yollarında biri PI3K/Akt/mTOR/p70S6K'dır. Bu sinyal yolağının hem otofaji hem de apoptozis sürecindeki rolünü araştırmak amacıyla Lumineks uygulaması sonucu önemli moleküllerin ifade durumları incelenmiştir. Elde edilen verilere göre PC-3 hücrelerinde 48 saat tedavi sonrasında tek başına Pd (II) kompleksine kıyasla kombinasyon tedavisinde; bir çok hücre tipinde hücre proliferasyonu, farklılaşma, adaptasyon ve yaşam gibi faktörlerde önemli rol oynayan, Akt sinyal yolağının downstream nükleer hedeflerinden birisi olan CREB seviyesinde azalma, mTOR proteininin alt sinyal yolağında hücre çoğalması ile ilgili proteinlerin sentezinde görev alan p70s6k ve

apoptoz/otofaji sürecinde önemli bir role sahip p38 protein seviyelerinde artış meydana geldiği görüldü (Şekil 3.29B ve Şekil 3.29C). LNCaP hücre soyunda ise kombinasyon tedavisinde CREB ve p70s6k seviyesinin azaldığı, p38 seviyesinde ise artış meydana geldiği görüldü (Şekil 3.29B ve Şekil 3.29C).





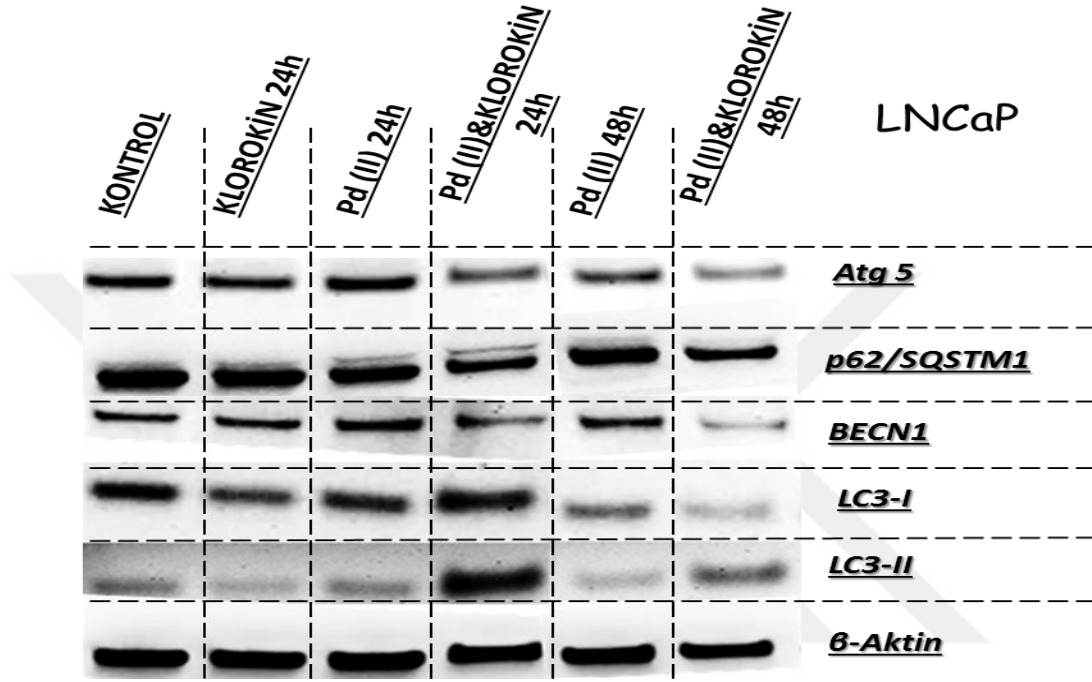
**Şekil 3.29.** Klorokin (5  $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5  $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun LNCaP ve PC-3 prostat kanseri hücrelerinde lumineks yöntemi ile CREB (A), p70s6K (B) ve p38 (C) protein seviyeleri

### 3.8. Western Blot Bulguları

LNCaP ve PC-3 prostat kanseri hücreleri %70-80 doluluk oranına ulaştıklarında klorokin (5  $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5  $\mu$ M) ve klorokin ile Pd (II) bileşiğinin kombinasyonu uygulandı ve 24, 48 saat sonunda protein izolasyonu aşamasına geçildi. Elde edilen lizatların protein konsantrasyonlarını belirlemek üzere BSA kullanılarak bir standart eğri grafiği hazırlandı. Örneklerin protein konsantrasyonları bu grafikten elde edilen formül yardımıyla hesaplandı. Western blot analizi, 20  $\mu$ g protein lizatı ve kontrol olarak da anti aktin antikörleri kullanılarak gerçekleştirildi.

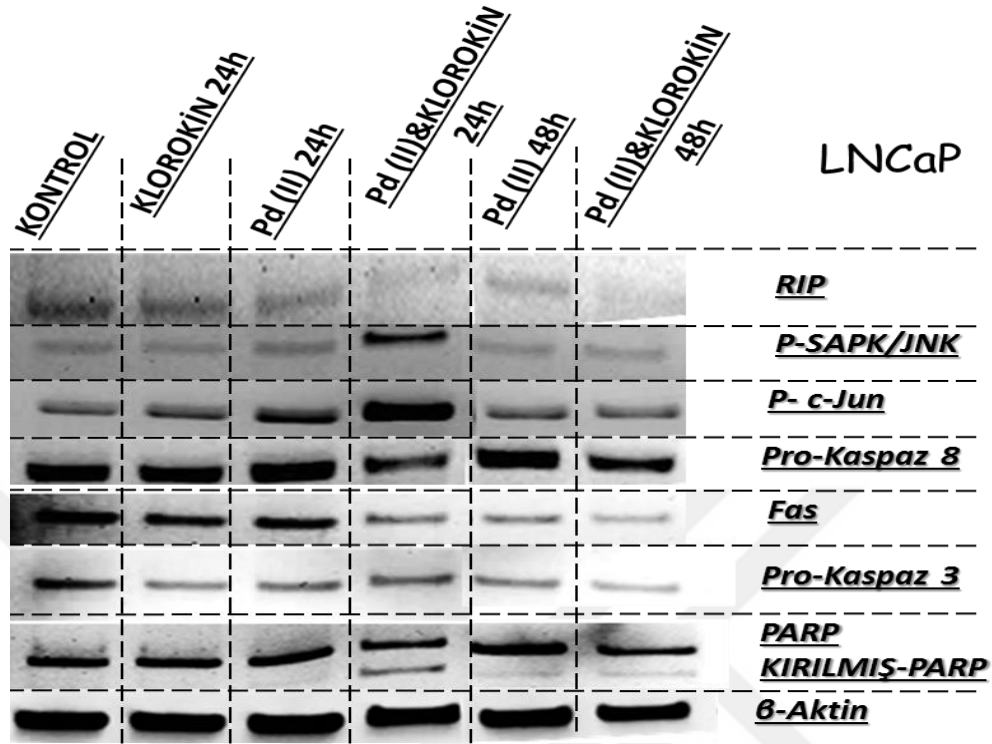
LNCaP prostat kanseri hücrelerinde otofajiye özgü Atg5, p62, Beclin1 (BECN1), LC3-I ve LC3-II gibi moleküllerinin ifade düzeyleri incelendi. Şekil 3.30'da görülen immünoiblotlama sonuçlarına göre; 24 saat Pd (II) bileşiği uygulandığında kontrole göre Atg5 ve BECN1 ifadeleri artarken, p62, LC3-I ifade düzeyleri azaldı. LC3-II ifade düzeyinde ise herhangi bir değişiklik saptanmadı. 24 saat kombinasyon tedavisi sonuçlarına göre; Atg5, BECN1 ve p62 ifade düzeyleri azalırken, LC3-I ve LC3-II ifade

düzeylerinde artış bulundu. Sonuç olarak 24 saatte Pd (II) bileşiği uygulaması sonrası görülen Atg5 ve BECN1 ifade düzeyleri artışları otofaji inhibitörü klorokin uygulanması sonucu azaldığı görüldü. 48 saatte Pd (II) bileşiği ve klorokin uygulaması sonucu tek başına Pd (II) bileşiği uygulanmasına göre Atg5, BECN1, LC3-I ifade düzeyleri azalırken, p62 ve LC3-II ifade düzeylerinde artış bulundu (Şekil 3.30).



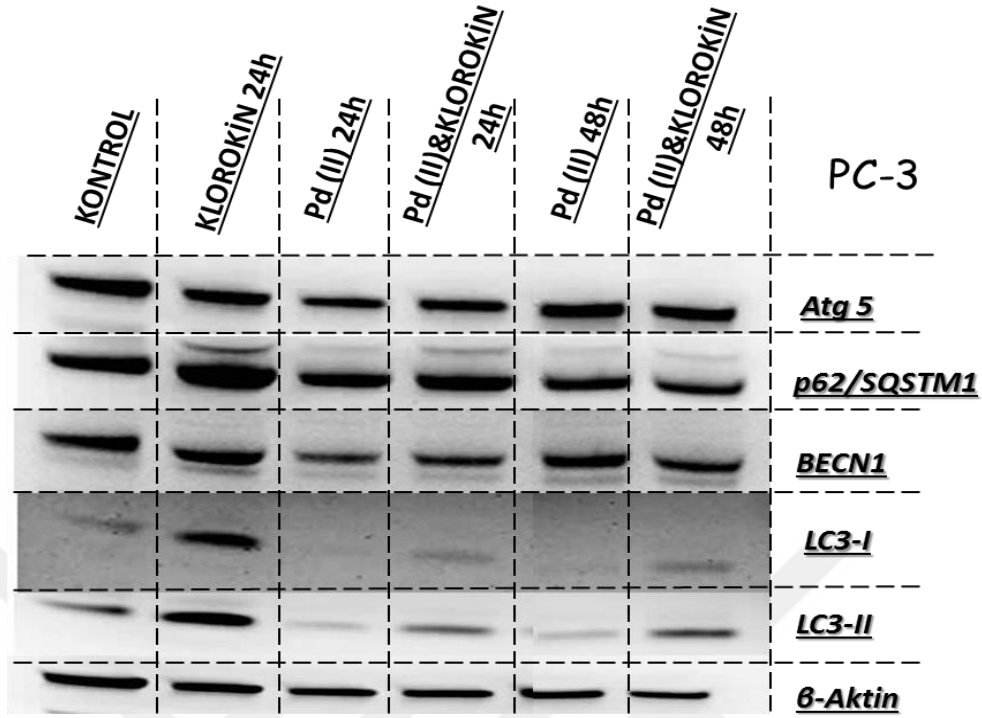
**Şekil 3.30.** LNCaP prostat kanseri hücrelerinde, klorokin (5 µM) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5 µM) ve klorokin kombinasyonunun 24 ve 48 saat sonrasında Atg5, p62, Beclin1 (BECN1), LC3-I ve LC3-II protein ekspresyonlarının Western blot yöntemiyle alınan sonuçları

LNCaP prostat kanser hücrelerinde RIP, P-JNK, P-c-JUN, Pro-kaspaz 8, Fas, Pro-kaspaz 3, PARP, kırılmış PARP ve aktinin protein düzeyleri araştırıldı. Şekil 3.31’de görülen immünoiblotlama sonuçlarına göre 24 saatte Pd (II) bileşiği ve klorokin kombinasyonunda tek başına Pd (II) bileşiği uygulamasına kıyasla RIP, pro-kaspaz 8, Fas moleküllerinin ifade düzeylerinde azalma görülürken, P-JNK, P-c-JUN ifade düzeylerinde artış saptandı. Pro-kaspaz 3 ifadesinde ise belirgin bir değişim gözlenmedi. Bu tedavide Pd (II) bileşiğine kıyasla belirgin bir PARP kırılması görüldü. 48 süren tedavi sonrası kombinasyon tedavisinde tek başına Pd (II) bileşiğine kıyasla RIP, pro-kaspaz 8 ve Fas azalması gözlenirken, P-JNK ve P-c-JUN ifade düzeylerinde belirgin bir değişiklik saptanmadı (Şekil 3.31).



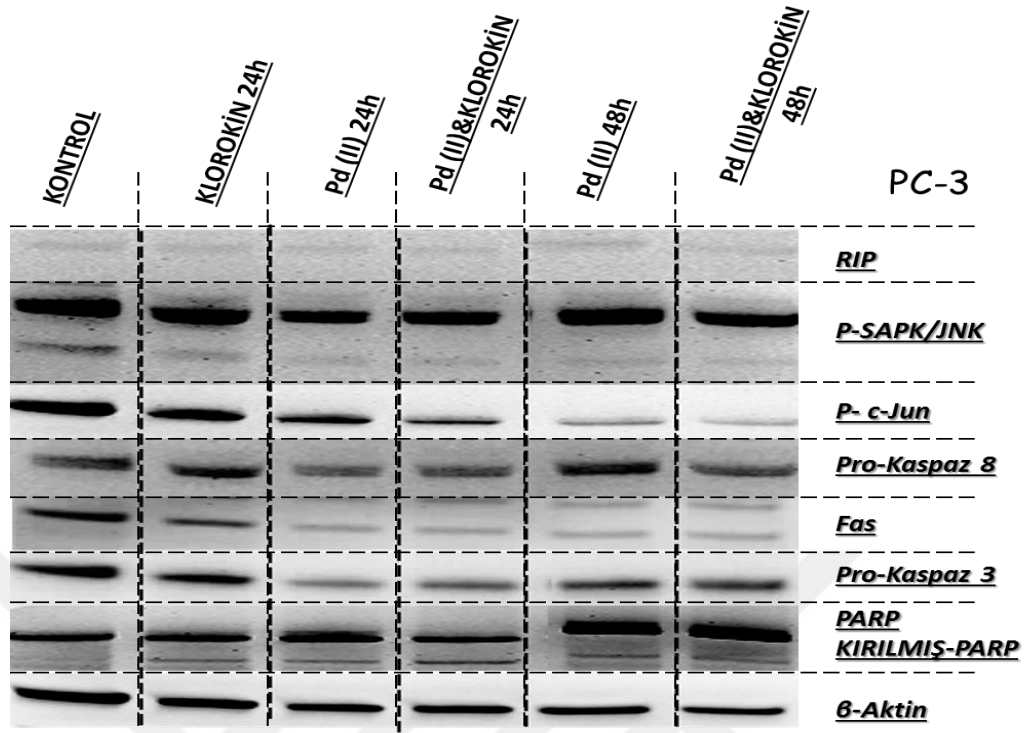
**Şekil 3.31.** LNCaP prostat kanseri hücrelerinde, klorokin (5 µM) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5 µM) ve klorokin kombinasyonunun 24 ve 48 saat sonrasında RIP, P-JNK, P-c-JUN, Pro-kaspaz 8, Fas, Pro-kaspaz 3, PARP ve kırılmış PARP protein ekspresyonlarının Western blot yöntemiyle alınan sonuçları

PC-3 prostat kanseri hücrelerinde otofajiye özgü Atg5, p62, Beclin1 (BECN1), LC3-I ve LC3-II gibi proteinlerin ifade düzeyleri incelendi. Şekil 3.32’de görülen immünoiblottlama sonuçlarına göre; 24 saat Pd (II) bileşiği uygulandığında kontrole göre Atg5, BECN1, p62, LC3-I ve LC3-II ifade düzeylerinde azalmalar saptandı. 24 saat kombinasyon tedavisi sonuçlarına göre; Atg5, BECN1 ve LC3-I ifade düzeyleri azalırken p62 ifade düzeylerinde artış bulundu. LC3-II ifade düzeyinde ise kontrole kıyasla anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Sonuç olarak 24 saatte Pd (II) bileşiği uygulaması sonrası görülen LC3-II ifade azalması otofaji inhibitörü klorokin uygulanması sonucu belirgin derece arttığı görüldü. 48 saatte Pd (II) bileşiği ve klorokin uygulaması sonucu tek başına Pd (II) bileşiği uygulanmasına göre BECN1 ifade düzeyinde azalma görülürken, LC3-II ifade düzeyinde artış bulundu (Şekil 3.32).



**Şekil 3.32.** PC-3 prostat kanseri hücrelerinde, klorokin (5  $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5  $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun 24 ve 48 saat sonrasında Atg5, p62, Beclin1 (BECN1), LC3-I ve LC3-II protein ekspresyonlarının Western blot yöntemiyle alınan sonuçları

PC-3 prostat kanser hücrelerinde aynı deney düzeneği bu kez RIP, P-JNK, P-c-JUN, Pro-kaspaz 8, Fas, Pro- kaspaz 3, PARP ve aktinin ifade düzeylerinin araştırılması için kuruldu. Şekil 3.33'de görülen immünoiblottama sonuçlarına göre 24 saatte Pd (II) bileşiği kontrole kıyasla kıyasla P-JNK, P-c-JUN, pro-kaspaz 8, Fas moleküllerinin ifade düzeylerinde azalma görülürken aynı zamanda bu tedavide PARP kırılması saptandı. RIP ifadesinde ise belirgin bir değişim gözlenmedi. Kombinasyon tedavisinde ise kontrole kıyasla P-c-JUN, pro-kaspaz 8, Fas ifadelerinin azaldığı ve PARP kırılması görüldü. 24 saat kombinasyon tedavisinde tek başına Pd (II) bileşiğine kıyasla daha belirgin bir PARP kırılması ve P-c-JUN azalması saptandı. 48 süren tedavi sonrası kombinasyon tedavisinde tek başına Pd (II) bileşiğine kıyasla pro-kaspaz 8 ve P-c-JUN ifadesinde belirgin bir azalma belirlendi (Şekil 3.33).



**Şekil 3.33.** PC-3 prostat kanseri hücrelerinde, klorokin (5  $\mu$ M) ile ön tedavi sonrasında Pd (II) bileşiği (12,5  $\mu$ M) ve klorokin kombinasyonunun 24 ve 48 saat sonrasında RIP, P-JNK, P-c-JUN, Pro-kaspaz 8, Fas, Pro-kaspaz 3, PARP ve kırılmış PARP protein ekspresyonlarının Western blot yöntemiyle alınan sonuçları



#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanser günümüzün en önemli sağlık problemlerinden birisidir ve her yıl milyonlarca insan kanserden yaşamını kaybetmektedir. Yapılan istatistiksel araştırmalara göre 2030 yılında kanser tanısı konulacak vaka sayısının ikiye katlanacağı öngörülmektedir (Uluslararası Kanser Araştırmaları Merkezi raporu 2007). Günümüzde kanser tedavisinde, kemoterapide kullanılan 60'dan fazla sitotoksik ilaç bulunmaktadır. Tedavi sürecinde ve sonrasında karşılaşılan en önemli sorun ise kanser hücresinin bu ilaçlara karşı gösterdiği dirençtir. Bu nedenle, kemoterapi rejimlerinde bu direnç mekanizmalarını hedeflemek, araştırmacılar için son derece sıcak bir araştırma konusu haline gelmiştir.

Otofaji uzun ömürlü proteinlerin, organellerin ve sitoplazmik parçacıkların parçalanmasından sorumlu fizyolojik bir süreçtir. Otofajinin genellikle hücrenin hayatta kalımı ile ilgili bir mekanizma olduğu düşünülse de son yıllardaki çalışmalar otofajinin hücre hayatta kalımı ve ölümü arasındaki karmaşık dengede önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Codogno ve Meijer 2005). Son yıllarda yapılan çalışmalarla otofaji mekanizmasının, kanser hücresinin ilaçlara karşı direncini artıran bir savunma mekanizması olarak işlev gördüğünü göstermektedir (Chen ve ark. 2010). Bu nedenle, anti-otofajik maddelerle anti-kanser ilaçların kombine edilmesinin etkili bir yaklaşım olduğunu düşündüren çalışmalar çıkmaya başlamıştır. Hatta Amerika'daki Ulusal Kanser Enstitüsünün bu kombinasyona dayalı klinik çalışmalar planladığı görülmektedir (Vogl ve ark. 2014).

Prostat kanseri, prostat bezindeki hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozularak, organ hacminin malign büyümesi olarak tanımlanır. Dünyada 55 yaş ve üzeri erkeklerde akciğer kanserinden sonra en sık rastlanan ve yüksek mortalite oranına sahip kanser türüdür. Prostat kanseri üzerinde yapılan araştırmalar otofajinin genellikle bir hayatta kalma mekanizması olarak rol aldığını göstermektedir (Hallgren ve ark. 2008). Yapılan çalışmalar, prostat kanseri tedavisinde en büyük sorun haline gelen direnç/hayatta kalma mekanizmasının klorokin, wortmannin ve LY294002 gibi otofajiyi baskılayan kimyasallarla kemoterapi ilaçlarının birlikte kullanımının umut verici yeni bir tedavi seçeneği olacağını göstermektedir (Li ve ark. 2013).

Metal bileşikler klinikte anti-kanser ilaç olarak kullanılmaktadır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan, platin grubu bir kemoterapötik ajan olan sisplatinin tek başına veya

farklı ilaçlarla kombine edilerek kullanımı birçok kanser türünde başarılı sonuçlar vermesine rağmen yol açtığı ciddi yan etkiler ve hücrelerde gelişen platin direnci araştırmacıları yeni metal bileşiklerin sentezine yöneltmiştir (Reedijk 2003, Alderden ve ark. 2006, Dasari ve ark. 2014). Pd (II) bileşiklerinin antifungal, antiviral, antitümör ve antibakteriyal aktivitelere sahip olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olmakla birlikte özellikle önemli anti-tümör aktivite sergilemeleri ve sisplatine kıyasla daha düşük yan etkilere sahip olmaları dikkate alındığında, son yıllarda sıklıkla sentezlenmekte ve etkileri araştırılmaktadır (Gao ve ark. 2010). Pek çok çalışmada Pd (II) bileşiklerinin, farklı kanser hücrelerinde yüksek sitotoksik aktivite göstererek apoptotik hücre ölümünü indüklediği ve bu toksisitenin DNA'da yüksek düzeyde hasarlar oluşturmalarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Szucova ve ark. 2006, Mansouri-Torshizi ve ark. 2008, Abu-Surrah ve ark. 2010, Güney ve ark. 2011b).

Bu tez çalışmasında, otofaji inhibitörleri (klorokin ve 3-MA) ile Kimya Bölümü Anorganik Kimya Araştırma Grubu tarafından sentezlenen bir Pd (II) bileşiklerinin [[Pd(bpma)(barb)]Cl.H<sub>2</sub>O] insan prostat kanseri hücreleri ve sağlıklı prostat hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın en önemli özelliği kullanılan Pd (II) bileşiği ve bu bileşiğin otofaji inhibitörleri ile olan kombinasyonun metastatik prostat kanseri hücre soyunda (PC-3) daha güçlü bir sitotoksik aktiviteye sahip olması, bunun yanı sıra sağlıklı prostat kanseri hücreleri üzerinde daha az bir sitotoksik etkiye sahip olduğunun görülmesidir. MTT canlılık testi sonuçlarına göre, LNCaP hücrelerinde 12, 24 ve 48 saat Pd (II) uygulaması sonucu 12,5, 25, 50 ve 100 µM dozlarında kontrole kıyasla hücre canlılığında istatistiksel açıdan anlamlı azalmalar görüldü (p<0,05). Aynı şekilde PC-3 hücre soyunda da 12, 24 ve 48 saat Pd (II) uygulaması sonucu 12,5, 25, 50 ve 100 µM dozlarında kontrole kıyasla hücre canlılığında istatistiksel açıdan anlamlı azalmalar belirlendi (p<0,05). Sağlıklı prostat hücre soyu olan PNT1A'da ise 25, 50 ve 100 µM dozlarında 24 ve 48 saat Pd (II) bileşiğinin uygulaması sonucu hücre canlılığında kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı azalmalara neden oldu (p<0,05). Daha önce yapılan çalışmalarda da farklı yapıda olan Pd (II) bileşiklerinin; farklı kanser hücrelerinde (lösemi, sarkom, deri, meme, karaciğer, akciğer, over, prostat, beyin, böbrek, kolon) yüksek oranda sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Abu-Surrah ve ark. 2002, Budzisz ve ark. 2004, Divsalar ve ark. 2007, Tusek-Bozic ve ark. 2008, Garoufis ve ark. 2009, Ferraz ve ark. 2009, Abu-Surrah ve ark. 2010 Güney ve

ark. 2011b, Karaküçük-İyidoğan ve ark. 2011, Ghani ve Mansour, 2012). Literatürde yer alan çalışmalarda, Pd (II) bileşiklerinin IC50 değerleri arasındaki farklılık bileşiğin yapısı ve biyolojik aktivitesi arasındaki ilişkiye dayanarak açıklanabilmektedir. Güney ve ark. (2011b) tarafından Pd (II) bis(2-piridilmetil) amin bileşiğinin farklı hücre hatlarında farklı IC50 değerleri ile sitotoksik etkiye neden olduğu belirlenmiştir. Bir başka çalışmada Pd (II) bileşiğinin K562 (miyeloid lösemi), HeLa (insan serviks adenokarsinomu) hücre soylarına karşı sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Pd (II) bileşiğinin aktivitesi, K562 hücrelerinde (IC50: 55,9 µM); üç standart kemoterapötik ilaca göre (sisplatin IC50: 16,3 µM, karboplatin: 32,9 µM ve oksaliplatin: 0,5 µM) daha az etkili bulunmuştur. HeLa hücrelerinde Pd (II) bileşiğinin (IC50 :86,1 µM) ve 3 standart kemoterapötik ilacın (sisplatin 94,3 µM, karboplatin 104,3 µM ve oksaliplatin 71,3 µM) benzer etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Abu-Surrah ve ark. 2002). MTT yöntemi ile elde ettiğimiz bulgular ışığında bu tez çalışmasında kullanılan [Pd(bpma)(barb)]Cl·H<sub>2</sub>O olarak formüle edilen Pd (II) bileşiğinin IC50 dozu LNCaP hücreleri için 15,75 µM, PC-3 hücreleri için ise 15,88 µM olarak belirlenmiştir. Yukarıda verilen farklı Pd (II) bileşiklerine ait IC50 değerlerine bakıldığında LNCaP ve PC-3 hücrelerinde bizim kullandığımız Pd (II) bileşiği ile muamele sonrasında daha düşük değerler saptanmıştır. IC50 değerleri arasındaki değişkenlik Pd (II) bileşiğinin yapısının çalışmalarda farklı olmasının yanı sıra farklı hücre türlerinin kullanılması ile de ilişkili olabildiği görüşüne varılmaktadır. Bu çalışmada LNCaP hücreleride kullanılan otofaji inhibitörleri klorokin ve 3-MA'nın ön tedavi için seçilen 24 saat 5 µM dozu canlılığı sırasıyla yaklaşık %30 ve %20 oranında azaltmıştır. PC-3 hücre soyunda ise sırasıyla %15 ve %20 oranında ve sağlıklı prostat hücre soyu olan PNT1A'da ise sırasıyla %20 ve %25-30 oranında hücre canlılığında azalma saptanmıştır. Kullanılan bu inhibitörlerin her bir hücre soyu üzerindeki etkisinin farklı olduğu sonucuna varılmıştır. Son zamanlarda kanser tedavisinde de kullanılan mTOR inhibitörü rapamisinin özellikle 40 nM dozu LNCaP hücrelerinde hücre canlılığını yaklaşık olarak %40 oranında azaltırken, PC-3 prostat kanseri hücre soyunda ise belirgin bir azalmaya neden olmamıştır. Rapamisinin zamana bağlı olarak U937 lösemi hücre hattında da toksik bir etkisine rastlanmadığı yapılan başka bir çalışmada gösterilmiştir (Hahn ve ark. 2005). Kanser tedavisinde son yıllarda kombinasyon tedavilerinin büyük önem taşıması nedeniyle birçok farklı kanser türü üzerine bu tedaviler uygulanmaktadır. Bu çalışmada

otofaji inhibitörleri ile Pd (II) bileşiğinin kombinasyonun etkisi öncelikle MTT canlılık testi ile belirlenmiştir. Yapılan kombinasyon tedavisinde inhibitörlerin ve Pd (II) bileşiğinin ortamda birlikte bulunmalarının birbirlerinin etkilerini baskıladıkları düşüncesiyle inhibitörlerle ön tedavi uygulaması yapılmasına karar verilmiştir. 24 saat otofaji inhibitörleri (5 µM) ile ön tedavi sonucu Pd (II) bileşiği (12,5 µM) uygulaması hem LNCaP hücrelerinde hem de PC-3 hücrelerinde tek başına Pd (II) bileşiğine kıyasla 24 saat süren tedavi sürecinde sinerjistik bir etki göstermemiştir. 48 saat süren kombinasyon tedavisinde ise hem LNCaP hem de PC-3 hücre soyunda sadece Pd (II) bileşiğine kıyasla 3-MA ve klorokin ile yapılan kombinasyonun hücre canlılığını önemli derece azalttığı görülmüştür. Aynı zamanda metastatik potansiyeli daha yüksek olan PC-3 hücre soyunun kombinasyon tedavisinin hücre canlılığına yanıtının daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Kombinasyonun etkinliği kanser tipine göre değişmektedir. Kolon kanseri hücre soyu HT-29 ile yapılan bir çalışmada 5-FU'nun otofaji inhibitörü klorokin ile kombinasyonunun bu hücreler üzerinde hücre canlılığını azaltıp 5-FU'nun tek başına olan etkisini arttırdığı görülmüştür (Sasaki ve ark. 2010). Başka bir çalışmada Colon26 ve HT-29 insan kolon kanseri hücre soylarında 5-FU'nun otofaji inhibitörü 3-MA ile kombine edilmesi bu hücrelerde 5-FU'un neden olduğu sitotoksik etkiyi arttırdığı gözlenmiştir (Li ve ark. 2009).

ATP yöntemi kullanılarak MTT canlılık testinden alınan sonuçlar doğrulanmış ve otofaji inhibitörleri ile Pd (II) bileşiğinin 48 saat süren kombinasyon tedavisi LNCaP, PC-3 ve PNT1A hücre soylarında intraselüler ATP miktarında azalmalara neden olduğu belirlenmiştir. MTT canlılık testinde hücre canlılığı üzerine olan etki, dehidrogenaz enzim aktivitesi miktarına göre belirlenirken, ATP testinde ise intraselüler ATP düzeylerine göre belirlenmektedir. Her iki canlılık testi de hücrelerdeki metabolik aktiviteyi göstermesine rağmen, elde edilen sonuçlar birbirinden farklı olabilmektedir. Özellikle için ATP testiyle belirlenen IC50 değerleri MTT testiyle belirlenen değerlere kıyasla belirgin şekilde düşüktür. ATP seviyesindeki azalmaya bağlı olarak gözlenen hücre canlılığındaki düşüşün MTT testi sonuçlarında gözlenenden daha fazla olması, hücrelerin ölüyor olmasına rağmen halen dehidrogenaz içeriğini devam ettirdiğini göstermektedir. Bu farklılık kullanılan ilacın etki mekanizmasına bağlı olarak (örneğin; enerji kaynakları, sinyal molekülleri, DNA) değişmektedir (Ulukaya ve ark. 2008). PC-3 hücrelerinin bu kombinasyona LNCaP ve PNT1A hücrelerine kıyasla daha duyarlı

olduğu yapılan ATP canlılık testi ile de görülmüştür. Yalnız hem tek başına Pd (II) bileşiminin hemde otofaji inhibitörleri ile olan kombinasyonunun sağlıklı prostat hücre soyu olan PNT1A hücrelerinde kanser hücre soyları olan LNCaP ve PC-3 göre daha az toksik olduğu belirlenmiştir. Bu durum günümüz kanser tedavilerinde asıl amaçlanan konulardan biridir. Bu açıdan çalışmamızda tasarladığımız Pd (II) bileşiminin otofaji inhibitörleri ile kombine edilmesinin etkin ve seçici bir tedavi seçeneği olduğunu da göstermektedir.

Pd (II) bileşiminin 3-MA ve klorokin ile kombinasyonu tarafından tetiklenen hücre ölüm modunu belirlemek amacıyla apoptotik belirteçler araştırılmıştır. Öncelikle bir apoptozis belirteci olan Anneksin-V-FITC boyaması yapıldı ve floresan mikroskopu altında değerlendirildi. Anneksin-V boyama yöntemi ile erken dönem apoptotik hücreler belirlenebilmektedir. Bunun nedeni Anneksin-V bağlanması membran hasarlanmadan önce nükleer kondensasyon safhasına denk gelmektedir (Koopman ve ark. 1994, Boersma ve ark. 1996, Zhang ve ark. 1997). Ancak hücreler membran bütünlüğünü kaybetmeye başladığında (geç apoptosis/sekonder nekrozis veya primer nekrozis) Anneksin-V intraselüler fosfolipidlerine bağlanarak pozitif sonuç verir. Bu nedenle membranı hasarlı hücreleri belirleyebilmek için propidyum iyodür ile birlikte kullanılır (Hammill ve ark. 1999). LNCaP hücrelerinin Pd (II) bileşimi ve inhibitörler olan kombinasyonunun 12 saat muamelesi sonrasında, özellikle klorokin ile olan kombinasyonunda Anneksin-V pozitif boyanan bölgelerde PI'de pozitif sonuç vermiştir. 3-MA ile yapılan kombinasyon sonucu aynı alanda hem Anneksin-V pozitif boyanan hücreler hem de PI'de pozitif boyanan hücrelerin yanında sadece Anneksin-V pozitif boyanan hücrelerin olduğu görülmüştür. Bu hücrelerde 24 saat süren tedavi sonucu her iki inhibitör kombinasyonunda Anneksin-V pozitif boyanan bölgelerde PI'de pozitif sonuç vermiştir. PC-3 hücrelerinin Pd (II) bileşimi ve inhibitörler olan kombinasyonunun 12 ve 24 saat muamelesi sonrasında genellikle Anneksin-V pozitif boyanan bölgelerde PI'de pozitif sonuç verdiği gözlenmiştir. Bu durum hücrelerde membran hasarına bağlı olarak primer nekrozis ya da sekonder nekrozis geliştini gösterir. Bu ayrımı daha net yapabilmek açısından yöntem çalışılırken ortama Hoechst boyası eklenerek nükleus morfolojisine de bakıldı. Kontrole kıyasla hücrelerin nükleuslarının küçüldüğu (piknotik) gözlendi. Primer nekrozis hücre hacminin artması fakat fragmente ya da piknotik nükleusların gözlenmemesi ile karakterize iken,

sekonder nekrozis piknotik ya da fragmente nükleus ile karakterize olup, apoptozisin geç safhasıdır (Ulukaya 2011). Ayrıca iki hücre grubunda da hücrelerin kombinasyon tedavisi sonrası ile tek başına Pd (II) bileşiğine kıyasla özellikle 24 saatte hücre yoğunluğunun azaldığı ve piknotik nükleus varlığı gözlenmiştir. Dolayısıyla floresan mikroskop görüntülerine göre söz konusu hücrelerin membran bütünlüğünün bozulduğu ve sekonder nekrozisle öldüğü yani apoptozisin geç safhasında oldukları sonucuna varılmıştır. Çalışmanın bir sonraki kısmında, hücrelerin ölüm modunu belirlemek amacıyla apoptozis belirteci olan kaspazla-kırılmış sitokeratin 18 (M30) düzeylerine bakılmıştır. Bu durumda M30 testi, sadece sitokeratin 18'i eksprese eden hücrelerde çalışmaya uygundur. LNCaP ve PC-3 hücrelerinde otofaji inhibitörleri, Pd (II) bileşiği ve bu bileşiğin inhibitörler ile olan kombinasyonunun M30 düzeylerinde herhangi bir artışa neden olmadığı gözlemlendi. Yalnızca her iki hücre soyunda da kullanılan pozitif kontrolde yaklaşık 2500 U/L düzeyinde artış görüldü. LNCaP ve PC-3 hücrelerinde herhangi bir artış olmaması bu hücrelerde sitokeratin 18 ekspresyonunun az ya da hiç olmadığı söylenebilir. Bu durumun hücrelerin genomik durumundan kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür. LNCaP ve PC-3 hücreleri ile yapılan bir çalışmada özellikle PC-3 hücre soyunda M30 seviyesi düşük bulunmuştur (Hostanska ve ark. 2005). Bu hücrelerdeki M30 seviyesinin düşük bulunmasının nedeni olarak hücre siklusunda ve özellikle de apoptozis sürecinde önemli bir role sahip olan p53 geni ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan LNCaP hücreleri p53 geni bakımından yabani tip, PC-3 hücreleri ise P53 bakımından mutanttır. Bu sonuçlardan yola çıkıldığında özellikle PC-3 hücrelerinde M30 seviyelerinde artış bulunmamasının sitokeratin 18 ekspresyonunun az olmasından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Klorokin çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan anti malarial bir ilaçtır. Son zamanlarda klorokinin lizozomal proteazları ve otofagozom-lizozomal füzyon olaylarını inhibe ederek otofajiyi bloklama yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur (Mizushima 2007, Amaravadi ve ark. 2011). Melanom, multipl myelom, renal hücreli karsinom, kolon kanseri, prostat kanseri, meme kanseri ve diğer farklı maligniteleride, hidrosiklorokini kapsayan Faz I ve Faz II klinik çalışmaları başlatılmakta veya planlanma aşamasındadır. Çalışmaların çoğunun başlangıç niteliğindeki sonuçları son derece umut vericidir (Wolpin ve ark. 2014). Klinik deneylerde hidrosiklorokin veya klorokin bazı kanser ilaçlarıyla birlikte kullanımının tümör büyümesini inhibe ettiği

gözlenmiştir (Rangwala ve ark. 2014). Bu nedenle tez kapsamında bu aşamadan sonraki deneyler tek bir otofaji inhibitörü klorokin ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Klorokin, Pd (II) bileşiği ve kombinasyonlarının LNCaP hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi kaspaz 3/7 testi ile akım sitometride değerlendirildiğinde; 12 ve 24 saat tedavilerin sonunda Pd (II) bileşiğine kıyasla kombinasyon tedavisinde hem hücre canlılık yüzdesinde azalma, hem de apoptotik hücre oran yüzdesinde artış belirlenmemiştir. Bunun aksine PC-3 hücreleri üzerindeki kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirildiğinde 24 saat süren tedavi sonunda kombinasyon tedavisinde geç apoptotik hücre oran yüzdesinde anlamlı bir artış belirlenmiştir.

Bu verileri desteklemek üzere pan-kaspaz inhibitörü z-VAD kullanılmıştır. Yapılan MTT canlılık testi sonuçlarına göre kullanılan kaspaz inhibitörünün PC-3 hücrelerinde Pd (II) bileşiği ve klorokin kombinasyonunun sitotoksik etkisini önlediği belirlendi. LNCaP hücrelerinde ise belirgin bir farklılığa rastlanmadı. Yapılan çalışmada metal komplekslerin hücreleri kaspaz bağımlı yolak üzerinden apoptozise teşvik ettiği ve bunun z-VAD kullanımı ile desteklendiği görülmüştür (De Vizcaya-Ruiz ve ark. 2000). Klorokin, Pd (II) bileşiği ve kombinasyonlarının LNCaP hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi Anneksin-V testi ile akım sitometride değerlendirildiğinde; 12 ve 24 saat tedavilerin sonunda Pd (II) bileşiğine kıyasla kombinasyon tedavisinde hem hücre canlılık yüzdesinde azalma, hem de apoptotik hücre oran yüzdesinde artış belirlenmemiştir. PC-3 hücrelerinde ise 12 saat süren tedavi sonunda belirgin bir apoptotik hücre oran yüzdesinde artış görülmezken, 24 saat süren tedavi sonunda tek başına Pd (II) bileşiğine kıyasla kombinasyon tedavisinde hem hücre canlılık yüzdesinde azalma hem de geç apoptotik hücre oran yüzdesinde artış belirlenmiştir. Bu sonuç PC-3 hücre soyunda Hoechst 33342, Anneksin-V, Propidyum iyodür boyama yöntemi sonucu elde edilen görüntüleri de destekler niteliktedir.

Bu çalışmaları takiben her iki hücre soyunda da klorokin, Pd (II) bileşiği ve kombinasyonlarının mitokondri membran potansiyelindeki değişimler incelenmiştir. LNCaP hücrelerinde kombinasyon tedavisi sonunda mitokondri membran potansiyelinde değişim görülmezken, PC-3 hücrelerinde ise kombinasyon tedavisi tek başına Pd (II) bileşiğine kıyasla mitokondri membran potansiyeli kaybının azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar LNCaP hücre soyunda apoptozun mitokondriyal yolak aracılığıyla ile tetiklenmediğini düşündürmüştür. Yapılan çalışmalarda metal

komplekslerinin hem ekstrinsik (dışsal) yolak hem de mitokondriyal yolak aracılığıyla apoptozisi tetiklediği gösterilmektedir (Tan ve ark. 2010, Arı ve ark. 2013).

Yapılan çalışmalarda Pd (II) bileşiklerinin; farklı kanser hücrelerinde (akciğer, over, serviks, kolorektal, meme, epitel, karaciğer) DNA'da yüksek düzeyde hasar oluşturdukları (Miklasova ve ark. 2009, Miklasova ve ark. 2012) ve apoptozisi indükledikleri belirlenmiştir (Malesevic ve ark. 2006; Keter ve ark. 2008, Miklasova ve ark. 2009, Ulukaya ve ark. 2011a, Ulukaya ve ark., 2011b, Kontek ve ark. 2011, Ferraz ve ark. 2011, Miklasova ve ark. 2012). Bu çalışmada da LNCaP hücrelerinde belirgin bir DNA hasarı bulunmazken, PC-3 hücrelerinde tek başına Pd (II) bileşiğinin kontrole kıyasla DNA'da yüksek seviyede hasar oluşturduğu görülmüştür. Fakat bu hasarın etkisinin kombinasyon tedavisinde azaldığı belirlenmiştir. Oksidatif stresin, farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, abazik bölgeler, DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım lezyonlara neden olarak hasara yol açtığı bilinmektedir (Williams ve Jeffrey 2000, Cooke ve ark. 2003). Özellikle PC-3 hücrelerinde görülen DNA hasarının oksidatif stres kaynaklı mı sorusuna yanıt olarak akım sitometrisinde ROS miktarı saptanmıştır. LNCaP hücrelerinde ROS miktarında bir değişim gözlenmezken PC-3 hücre hattında Pd (II) kompleksinde kontrole kıyasla ROS miktarının belirgin derecede arttığı görülmüştür. Pd (II) bileşiği bu hücrelerde ROS artışına neden olurken, klorokin ile kombinasyon sonucu ROS oluşumunu azalmıştır. Bu deney aynı zamanda bir ROS süpürücüsü olarak kullanılan NAC ile yapılan MTT canlılık testi ile doğrulanmıştır. Yapılan MTT canlılık testi sonuçlarına göre kullanılan ROS süpürücüsü NAC'ın PC-3 hücrelerinde Pd (II) bileşiği ve klorokin kombinasyonunun sitotoksik etkisini önlediği belirlendi. Bu nedenle ROS'un güçlü bir otofaji inhibitörü varlığında Pd (II) bileşiği tarafından tetiklenen ölüm (apoptoz) sürecini etkilediği düşünülmektedir. ROS'un, otofajik kesenin oluşumunda ve otofajinin hücre ölümü ya da hayatta kalımı üzerindeki rolünün düzenlenmesinde etkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Wang ve ark. 2012). Hücre içerisindeki yüksek ROS miktarı apoptozun uyarılmasına yol açarken; düşük düzeydeki ROS miktarı ise bir sinyal ileti molekülü gibi görev yaparak hücrenin büyümesini ve hayatta kalımını düzenlemektedir (Wong ve ark. 2010). ROS'un otofajiyi düzenlemesi, otofagozom oluşumunda önemli olan Atg4 üzerinden gerçekleşmektedir (Scherz-Shouval ve ark. 2007). Sonuç olarak ROS oluşumu direkt ya da dolaylı olarak



otofaji aktivasyonuna yol açmaktadır (Scherz-Shouval ve Elazar 2011). Bu durumda çalışmada; PC-3 hücrelerinde Pd (II) ve klorokin kombinasyonunda görülen ROS seviyesindeki azalmanın nedeni hücrelerde görülen otofaji inhibisyonu olabilir.

Otofajinin'nin Pd (II) uygulaması sonrasında hücrelerde bir hayatta kalma mekanizması olarak rol oynadığını, kısacası otofajiyi aktive ettiğini göstermek amacıyla otofagazom yapılarının oluşumunda önemli role sahip olan LC3-II proteinin seviyesi akım sitometrisi ile incelenmiştir. LNCaP hücrelerinde tedavi sonrasında herhangi bir değişiklik görülmezken, PC-3 hücrelerinde Pd (II) bileşiği uygulaması sonucu kontrole kıyasla LC3-II seviyesinin belirgin derecede arttığı gözlemlenmiştir. Otofaji inhibitörü kullanılması durumunda LC3-II seviyesinde kontrole göre belirgin bir artış bulunmuştur. Bu otofajinin inhibe edilmediği anlamına gelmemektedir. Klorokin, 3-MA'nın aksine otofaji sürecinde daha geç dönemde rol oynayan bir inhibitördür. Otofagazom ve lizozom kaynaşmasını önlemektedir. Nitekim bu durumda ortamda halen otofagazom yapılarının bulunması ve bu yapılarda önemli rol oynayan LC3-II proteinlerinin Pd (II) ve klorokin kombinasyonunda saptanması doğru bir sonuçtur. Klorokin ile HT-29 hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada da LC3-II seviyesinin kemoterapötik ajanla kombine edilmesi durumunda da artış gösterdiği bunun nedeninin klorokinin otofagozom oluşumunu inhibe etmediği bu yapıların lizozomla kaynaşmasını inhibe etmesinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Sasaki ve ark. 2010). Bu çalışma yapılan akridin boyaması ile de doğrulanmıştır. Asidik veziküller organellerin (otofagozom, otolizozom) hem Pd (II) bileşiği hem de klorokin ile kombinasyonu sonrası artış gösterdiği görülmüştür. HT-29 hücrelerinde yapılan bir çalışmada 5-FU'nun otofajiyi indüklediği gösterilmiş ve klorokin ile kombinasyonun hücre canlılığını azaltıp hücreleri apoptoza teşvik ettiği belirtilmiştir. Bu çalışmada yapılan akridin boyaması sonrası hem tek başına 5-FU hem de klorokin ile birlikte uygulaması sonucu akridin ile boyanan turuncu bölgelerin arttığı görülmüştür (Sasaki ve ark. 2010).

Hücre büyümesi ve metabolizmasında önemli moleküllerinden biri rapamisin protein bileşiğinin memeli hedef molekülü olan mTOR'dur ve çevresel stres faktörleri varlığında otofaji ve büyüme arasındaki dengeyi sağlamaktadır (Liu ve ark. 2009, Levine ve Kromer 2009). mTOR proteini, PI3K ve Akt proteinlerinin yer aldığı bir dizi kinaz kaskadı tarafından düzenlenmektedir. AKT/ mTOR sinyal yolağı otofajinin negatif düzenleyicisidir. Akt sinyal yolağındaki işlevsizliğin otofajinin indüklenmesine

neden olduğu daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Wang ve ark. 2010, Le ve ark. 2010, Mujumdar ve ark. 2010, Vucicevic ve ark. 2011, Wang ve ark. 2011). Bu sinyal ileti molekülleri ve yolları sadece otofajiye özgün değildir. Aynı zamanda apoptozis sürecinde de önemli rol oynamaktadırlar (Franke ve ark. 2003). PI3K/Akt/mTOR/p70S6K sinyal yolağının hem otofaji hem de apoptozis sürecindeki rolünü araştırmak amacıyla akım sitometrisi ve Lumineks uygulaması sonucu önemli moleküllerin ifade durumları incelenmiştir. Akt, PI3K'ın alt sinyal yolağındaki önemli bir protein olup, hem PDK1 tarafından tirozin-308, hem de mTOR2 kompleksi tarafından serin-473 amino asidinden fosforile olmaktadır. Akım sitometrisi sonuçlarında LNCaP ve PC-3 hücrelerinde serin-473 amino asidinden fosforile olmuş AKT düzeyleri incelenmiştir. LNCaP hücrelerinde belirgin bir artış ya da azalma gözlenmezken, PC-3 hücrelerinde Pd (II) bileşiği ve klorokin kombinasyonunun p-Akt (Ser473) seviyesinde belirgin bir artışa neden olduğu görülmüştür. Nitekim bu durum yapılan bazı çalışmalarda da gözlenmiştir. Over (yumurtalık) kanserinde yapılan çalışmada p-AKT düzeyinin artmasının hücre ölümü ile ilişkili olduğu görülmüştür (Learly ve ark. 2013). Otofajinin bir yaşam mekanizması olarak görev aldığı başka bir çalışmada hücre ölümünde p-AKT düzeyi artarken total AKT düzeyinde azalma gözlenmiştir (Li ve ark. 2013). Bir çok hücre tipinde hücre proliferasyonu, farklılaşma, adaptasyon ve yaşam gibi faktörlerde önemli rol oynayan, Akt sinyal yolağının downstream nükleer hedeflerinden birisi olan CREB ifadesi her iki hücre soyunda da kontrole kıyasla Pd (II) bileşiği ile tedavisi sonucu artış göstermiştir. Klorokin ile kombinasyon sonucu her iki soyunda da Pd (II) bileşiğine kıyasla protein ifadesi azalmıştır. Yapılan çalışmalarda CREB proteininin önemli otofajik proteinler ile etkileşime girerek onların ifade düzeylerini artırdığı ve hücrelerde otofajinin bir yaşam mekanizması olarak tetiklenmesinde rol oynadığı görülmüştür (Wyrsh ve ark. 2012, Seok ve ark. 2014). Bu çalışmada da otofajinin indüklenmesine neden olan Pd (II) bileşiğinde CREB ifadesinde artış gözlenirken klorokin ile kombinasyon sonucu otofaji inhibisyonunda bu ifadenin azalması literatür çalışmalarını ve diğer çalışma sonuçlarımızıda destekler niteliktedir. mTOR yolağında yer alan bir diğer protein ribozomal S6 proteininin hedefi olan S6K proteininin fosforilasyonu ise otofajinin baskılanmasının bir işaretidir (Scott ve ark. 2004). Bu çalışmada LNCaP hücrelerinde kombinasyon tedavisi sonucunda p-70S6K ifadesi tek başına Pd (II) bileşiğine göre

azalmıştır. Oysa ki PC-3 hücrelerinde kombinasyon tedavisi sonucu p-70S6K ifadesi artmıştır. Tek başına Pd (II) bileşiğinin her iki hücre soyunda da kontrole kıyasla p-70S6K seviyesinin artmasına neden olması hücrelerde otofajinin aktif olması şeklinde yorumlanabilir. PC-3 hücrelerinde ise kombinasyon tedavisi sonucu bu ifadenin daha da artış göstermesi, artmış mTOR aktivasyonu sonucu baskılanan bir otofaji mekanizmasının olduğunu göstermektedir.

MAP kinazlar, "Mitogen-activated protein kinases" süper ailesinde yer alırlar (Liem ve ark. 2002). Ökaryotik hücrelerin tümünde mevcut olan bu proteinler hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında çok önem taşımaktadır. Bu sinyal iletimi kaskadları, embriyogenezis, yaşama, çoğalma, diferansiasyon ve apoptozis işlevlerinin düzenlenmesinde rol almaktadır. (Platanias 2003). MAP kinazlar ailesini oluşturan en önemli proteinlerden biri de p38'dir. Bu proteinin çeşitli hücrel stres koşullarında, mitokondri fonksiyonunda ve kaspaz bağımlı apoptozisde rol oynadığı bilinmektedir (Choi ve ark. 2006). Bu çalışmada da p-p38 ifadesi tek başına Pd (II) bileşiğine kıyasla klorokin ile olan kombinasyon tedavisinde her iki hücre soyunda da artış göstermiştir. Yapılan çalışmalarda otofajinin baskılandığı durumlarda p-p38 ifadesindeki artış p38'in otofaji sürecinde de önemli rol oynadığını göstermektedir (Qiang ve ark. 2013). Bu durumda her iki hücrede kombinasyon tedavisi sonucu görülen p-p38 artışı bu hücrelerde hem apoptotik hem de otofajik süreçte bu proteinin önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir.

Klorokin, Pd (II) bileşiği ve klorokin ile olan kombinasyonun LNCaP ve PC-3 hücre soyları üzerine etkisi Western blot yöntemiyle çalışılmıştır. Öncelikle bu kombinasyonun hücreler üzerinde sağkalım mekanizması olarak görülen otofajik süreci nasıl etkilediği otofajik belirteçler yardımıyla aydınlatılmıştır. LNCaP hücrelerinde 24 saatte ATG5, 24 ve 48 saatte Beclin1 proteinleri ekspresyonunda kontrole kıyasla görülen artış, bunun aksine klorokin ile kombinasyonu sonucu 24 ve 48 saatte bu protein ekspresyonlarında azalmalar bu hücrelerde otofajinin Beclin1 bağımlı olarak indüklendiğini ve otofaji inhibitörü klorokin kullanımı sonucu bu proteinlerin baskılandığı göstermektedir. PC-3 hücrelerinde ise 24 ve 48 saatte görülen p62 ekspresyonunda ki azalma bu hücrelerde otofajinin p62 bağımlı olarak gerçekleştiğini gösterir. Daha önce p38 ifadesinde görülen değişiklikler bu hücrelerde görülen p62 degradasyonu açıklamaktadır. Yapılan çalışmalarda p38 proteinin aktivasyonunun

otofaji sürecinde degradesyona uğrayan p62 ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Qiang ve ark. 2012). Her iki hücre soyunda da LC3-II ekspresyonunun klorokin kombinasyonu ile artış göstermesi daha önceki akım sitometrisi sonucunu doğrular niteliktedir. Daha sonra bu hücreler üzerinde hücre ölüm mekanizmasının aydınlatılmasına ilişkin belirteçler bakılmıştır. LNCaP hücrelerinde stres ilişkili p-JNK ve p-c-Jun ifadeleri artmış, FAS ekspresyonu azalmış, pro-kaspaz 3 ekspresyonunda hiçbir değişiklik gözlenmezken pro-kaspaz 8 ekspresyonunda azalma görülmüştür. 24 saat kombinasyon tedavisi sonucu gözlenen PARP kırılması ve diğer sonuçlarla birlikte bu hücrelerde meydana gelen apoptozisin hücre ölüm reseptörleri üzerinden (dışsal yolak) gerçekleştiğini göstermektedir. PC-3 hücrelerinde kontrole kıyasla kombinasyon tedavisinde FAS ekspresyonunun azalması, pro-kaspaz 3 ve pro-kaspaz 8 azalması ve 24 saatte gözlenen PARP kırılması bu hücrelerde de ölüm reseptörleri üzerinde giden bir apoptozis varlığına işaret etmektedir. Hücre dışından gelen ölüm sinyallerinin, hücre yüzey ölüm reseptörlerini aktive ettiği kaspaz-8 üzerinden ilerleyen dışsal apoptotik yolakta, aktiveşen kaspaz-8 direkt olarak kaspaz-3'ün aktivasyonuna neden olabilir. Diğer bir yandan aktif kaspaz-8, Bcl-2 pro- apoptotik protein ailesi üyelerinden olan Bid'i de kırabilir. Kaspaz-8, Fas ölüm reseptörüyle aktive olabilmektedir (Thornberry ve Lazebnik 1998). Ayrıca hem kaspaz- 8 hem de Bid'in aktivasyonu, diğer hücre yüzey reseptörleri olan TNF ve TRAIL tarafından gerçekleştirilebilir (Ulukaya 2003). Bu tez çalışmasının sonuçlarından yola çıkarak, Pd (II) bileşiği ve klorokin kombinasyonunun insan prostat hücre soylarında (LNCaP ve PC-3) güçlü bir apoptotik etkiye neden olduğu, aynı zamanda moleküler düzeyde hücrenin sağkalım ve ölüm süreçlerinde farklı moleküler hedefleri etkiledikleri görülmüştür. Bu çalışma; Pd (II) bileşiğinin klorokin ile kombinasyonunun hücrelerde bir direnç mekanizması olarak görev yapan otofajinin inhibe edilmesi aracılığıyla yeni bir terapötik hedef olabileceğini açıkça ortaya koymuştur. Bir sonraki inceleme basamağı olarak bu kombinasyonun kliniğe uyarlanabilmesi için *in vivo* olarak araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abu-Surrah, A. S., Al-Sa'doni, H. H., Abdalla, M. Y. 2008.** Palladium-based chemotherapeutic agents: Routes toward complexes with good antitumor activity. *Cancer Therapy*, 6: 1-10.
- Akşit, H., Bildik, A. 2008.** Apoptozis. *YYÜ Vet. Fak. Dergisi*, 19(1): 55-63.
- Alderden, R. A., Mellor, H. R., Modok, S., Hambley, T. W., Callaghan, R. 2006.** Cytotoxic efficacy of an anthraquinone linked platinum anticancer drug. *Biochemical Pharmacology*, 71(8): 1136-1145.
- Altunkaynak. B.Z., Özbek E. 2008.** Programmed Cell Death: What is the Apoptosis? *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6(2): 93 -104.
- Amaravadi, R. K., Lippincott-Schwartz, J., Yin, X. M., Weiss, W. A., Takebe, N., Timmer, W., White, E. 2011.** Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clinical Cancer Research*, 17(4): 654-666.
- Anafarta, K., Arıkan, N., Bedük, Y. 2007.** Ürogenital organların anatomik ve histolojik yapısı. *Temel Üroloji*, Üçüncü baskı Günes Kitapevleri, 1-19.
- Anderson J. 2003.** Treatment of prostate cancer-The role of primary hormonal therapy. *EAU Update series*, 1: 32-9.
- Anderson, M. A., Deng, J., Seymour, J. F., Tam, C., Kim, S. Y., Fein, J., Majewski, I. J. 2016.** The BCL2 selective inhibitor venetoclax induces rapid onset apoptosis of CLL cells in patients via a TP53 independent mechanism. *Blood*, 2016.
- Andreotti, P.E., Cree, I.A., Kurbacher, C.M., Hartmann, D.M., Linder, D., Harel, G. 1995.** Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Research*, 55(22): 5276-5282.
- Anonim, 2010.** Protocol Books. <http://docs.abcam.com/pdf/misc/abcam-protocols-book-2010.pdf> (Erişim tarihi: 04.07.13).
- Anonim, 2016a.** <http://www.dreamstime.com/stock-illustration-apoptosis-necrosis-difference-apoptotic-versus-necrotic-morphology-form-cell-death-structural-changes-cells-image>. Erişim tarihi:20.07.2015.
- Anonim, 2016b.** <http://www.uroloji-laparoskopi.com/prostatnedir-prostatnedir.html>. Erişim tarihi:20.07.2015.
- Anonim, 2013a.** Muse™ Caspase-3/7 Kit El Kitapçığı. Almanya, Erişim tarihi: 30.10.2015.

**Anonim, 2013b.** Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit El Kitapçığı. Almanya. Erişim tarihi:19.06.2015.

**Anonim, 2013c.** Muse™ Mitopotential Kit El Kitapçığı. Almanya. Erişim tarihi:19.06.2015.

**Anonim, 2012d.** Muse™ H2A.X Activation Dual Detection Kit El Kitapçığı. Almanya. Erişim tarihi:20.07.2015.

**Anonim, 2013e.** Muse™ Oxidative stress El Kitapçığı. Almanya. Erişim tarihi:19.06.2015.

**Anonim, 2013f.** Muse™ LC3-II El Kitapçığı. Almanya. Erişim tarihi:19.06.2015.

**Anonim, 2013g.** Muse™ PI3K Activation Dual Detection El Kitapçığı. Almanya. Erişim tarihi:19.06.2015.

**Anonim, 2013h.** Muse™ PI3K Activation Dual Detection El Kitapçığı. Almanya. Erişim tarihi:19.06.2015.

**Anvekar, R. A., Ascioffa, J. J., Missert, D. J., Chipuk, J. E. 2011.** Born to be alive: a role for the BCL-2 family in melanoma tumor cell survival, apoptosis, and treatment. *Frontiers in Oncology*, 1(34).

**Ari, F., Ulukaya, E., Sarimahmut, M., Yilmaz, V. T. 2013.** Palladium (II) saccharinate complexes with bis (2-pyridylmethyl) amine induce cell death by apoptosis in human breast cancer cells in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(11): 3016-3021.

**Arico, S., Petiot, A., Bauvy, C., Dubbelhuis, P. F., Meijer, A. J., Codogno, P., Ogier-Denis, E. 2001.** The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276(38): 35243-35246.

**Arsham, A. M., Neufeld, T. P. 2006.** Thinking globally and acting locally with TOR. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(6): 589-597.

**Ashnagar, A., Sheeri, B. 2007.** Novel synthesis of barbiturates. *Chinese Journal of Chemistry*, 25(3): 382-384.

**Balk, S. P., Knudsen, K. E. 2008.** AR, the cell cycle, and prostate cancer. *Nuclear Receptor Signalling*, 6(6): 001.

**Baltacı, S. 2007.** Prostat Kanseri, *Temel Üroloji*, 3. baskı, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 740-766.

**Barrett-Connor, E., Garland, C., McPhillips, J. B., Khaw, K. T., Wingard, D. L. 1990.** A prospective, population-based study of androstenedione, estrogens, and prostatic cancer. *Cancer Research*, 50(1): 169-173.

**Bauvy, C., Gane, P., Arico, S., Codogno, P., Ogier-Denis, E. 2001.** Autophagy delays sulindac sulfide-induced apoptosis in the human intestinal colon cancer cell line HT-29. *Experimental Cell Research*, 268(2): 139-149.

**Bell, B. D., Leverrier, S., Weist, B. M., Newton, R. H., Arechiga, A. F., Luhrs, K. A., Walsh, C. M. 2008.** FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 105(43): 16677-16682.

**Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J., Mazure, N. M. 2009.** Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Molecular and Cellular Biology*, 29(10): 2570-2581.

**Betin, V. M., Lane, J. D. 2009.** Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *Journal of Cell Science*, 122(14): 2554-2566.

**Blommaart, E. F., Krause, U., Schellens, J. P., Vreeling-Sindelárová, H., Meijer, A. J. 1997.** The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *European Journal of Biochemistry*, 243(1-2): 240-246.

**Boersma, A. W. M., Nooter, K., Oostrum, R. G., Stoter, G. 1996.** Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate-labeled Annexin V in Chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. *Cytometry*, 24: 123–130.

**Bowen, I. D. 1988.** Proportions of mitotic and apoptotic cells in a range of untreated experimental tumours. *Cell Proliferation*, 21(1): 45-49.

**Breslow, R. A., Wideroff, L., Graubard, B. I., Erwin, D., Reichman, M. E., Ziegler, R. G., Ballard-Barbash, R. 1999.** Alcohol and prostate cancer in the NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. *Annals of Epidemiology*, 9(4): 254-261.

**Budzisz, E., Krajewska, U., Rozalski, M., Szulawska, A., Czyz, M., Nawrot, B. 2004.** Biological evaluation of novel Pt (II) and Pd (II) complexes with pyrazole-containing ligands. *European Journal of Pharmacology*, 502(1): 59-65.

**Burlacu, A. 2003.** Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 7(3): 249-257.

- Bursch, W., Ellinger, A., Kienzl, H., Török, L., Pandey, S., Sikorska, M., Hermann, R. S. 1996.** Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis*, 17(8): 1595-1607.
- Cao, C., Subhawong, T., Albert, J. M., Kim, K. W., Geng, L., Sekhar, K. R., Lu, B. 2006.** Inhibition of mammalian target of rapamycin or apoptotic pathway induces autophagy and radiosensitizes PTEN null prostate cancer cells. *Cancer Research*, 66(20): 10040-10047.
- Chan, J. M., Giovannucci, E., Andersson, S. O., Yuen, J., Adami, H. O., Wolk, A. 1998.** Dairy products, calcium, phosphorous, vitamin D, and risk of prostate cancer (Sweden). *Cancer Causes & Control*, 9(6): 559-566.
- Chang, H. Y., Yang, X. 2000.** Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4): 821-846.
- Chen, S., Rehman, S. K., Zhang, W., Wen, A., Yao, L., Zhang, J. 2010.** Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1806(2): 220-229.
- Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S. J., Gibson, S. B. 2008.** Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death & Differentiation*, 15(1): 171-182.
- Chi, S., Kitanaka, C., Noguchi, K., Mochizuki, T., Nagashima, Y., Shirouzu, M., Himeno, M. 1999.** Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene*, 18(13).
- Choi SY, Kim MJ, Kang CM. 2006.** Activation of Bak and Bax through c-abl-protein kinase Cdelta-p38 MAPK signaling in response to ionizing radiation in human non-small cell lung cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 7049–7059.
- Clarke, P. G. 1990.** Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and Embryology*, 181(3): 195-213.
- Clarke, P., Tyler, K. L. 2009.** Apoptosis in animal models of virus-induced disease. *Nature Reviews Microbiology*, 7(2): 144-155.
- Clinton, S. K., Palmer, S. S., Spriggs, C. E., Visek, W. J. 1988.** Growth of Dunning transplantable prostate adenocarcinomas in rats fed diets with various fat contents. *Journal of Nutrition*, 118(7): 908-914.
- Codogno, P., Meijer, A. J. 2005.** Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death & Differentiation*, 12: 1509-1518.



- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. 2003.** Oxidative DNA damage: Mechanism, mutation and disease. *FASEB Journal*, 17(10): 1195-214.
- Coşkun-Arı, F.F. 2003.** Western Blotlama Yöntemi ile Protein Tespiti: Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kurs Kitabı, Isparta Türkiye, 189-198.
- Dasari, S., Tchounwou, P. B. 2014.** Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740: 364-378.
- Dash, P. 2007.** Apoptosis. <http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/dash/apoptosis> (Erişim tarihi:12 Mayıs 2013).
- Daskivich TJ, Oh WK. 2006.** Recent progress in hormonal therapy for advanced prostate cancer. *Current Opinion Urology*, 6: 173-8
- De Bono, J. S., Oudard, S., Ozguroglu, M., Hansen, S., Machiels, J. P., Kocak, I., Roessner, M. 2010.** Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *The Lancet*, 376(9747): 1147-1154.
- De Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Muller, A., Ruiz-Ramirez, L., Kass, G. E. N., Kelland, L. R., Orr, R. M., Dobrota, M. 2000.** Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, casiopeina II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicology In Vitro*, 14(1): 1-5.
- Dekernion, J. B. 2005.** Reexamination of current staging for renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*, 173(3): 680-680.
- Desantis, C., Siegel, R., Bandi, P., Jemal, A. 2011.** Breast cancer statistics, 2011. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(6): 408-418.
- Dexter, S.J., Camara, M., Davies, M., Shakesheff, K.M. 2003.** Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomaterials Journal*, 24: 27-34.
- Dickens, L. S., Boyd, R. S., Jukes-Jones, R., Hughes, M. A., Robinson, G. L., Fairall, L., MacFarlane, M. 2012.** A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. *Molecular Cell*, 47(2): 291-305.
- Dirican, B. 2005.** İleri Radyasyon Terapisi Ders Notları. Ankara.
- Divsalar, A., Saboury, A.A., Mansoori-Torshizi, H., Ahmad, F. 2010.** "Design, synthesis, and biological evaluation of a new palladium(II) complex: beta-lactoglobulin and K562 as targets," *The Journal of Physical Chemistry B*, 114: 3639-3647.

**Divsalar, A., Saboury, A.A., Yousefi, R., Moosavi-Movahedi, A.A.ve Mansoori-Torshizi, H. 2007.** “Spectroscopic and cytotoxic studies of the novel designed palladium(II) complexes:  $\beta$ -Lactoglobulin and K562 as the targets,” *International Journal of Biological Macromolecules*, 40: 381–386.

**Doran, W. J. 1959.** Medicinal Chemistry. Barbituric Acid Hypnotics, John Wiley and Sons, New York, 5.

**Dumont, M., Beal, M. F. 2011.** Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5): 1014-1026.

**Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T. V., Vandenabeele, P. 2009.** Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection*, 11(13): 1050-1062.

**Elmore, S. 2007.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4): 495-516.

**Emil, A., Tanogho, J., Mcannch, J.W. 2004.** Prostat Kanseri ve Benign Prostat Hiperplazisi, Genel Üroloji, 16. baskı, Nobel Kitabevleri, İstanbul, 410-418.

**Evan, G. I., Vousden, K. H. 2001.** Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411(6835): 342-348.

**Fadeel, B., Gleiss, B., Högstrand, K., Chandra, J., Wiedmer, T., Sims, P. J., Samali, A. 1999.** Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266(2): 504-511.

**Faivre, S., Chan, D., Salinas, R., Woynarowska, B., Woynarowski, J. M. 2003.** DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 66(2): 225-237.

**Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S., Liang, J. 2005.** Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11): 719-727.

**Ferraz, K. S., Ferandes, L., Carrilho, D., Pinto, M. C., de Fátima Leite, M., Souza Fagundes, E. M., Beraldo, H. 2009.** 2-Benzoylpyridine-N (4)-tolyl thiosemicarbazones and their palladium (II) complexes: cytotoxicity against leukemia cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(20): 7138-7144.

**Ferraz, K. O., Cardoso, G. M., Bertollo, C. M., Souza-Fagundes, E. M., Speziali, N., Zani, C. L., Beraldo, H. 2011.** N (4)-tolyl-2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their palladium (II) and platinum (II) complexes: Cytotoxicity against human solid tumor cells. *Polyhedron*, 30(2): 315-321.

- Fillaut, J. L., de los Rios, I., Masi, D., Romerosa, A., Zanobini, F., Peruzzini, M. 2002.** Synthesis and structural characterization of (carbene) ruthenium complexes binding nucleobases. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2002(4): 935-942.
- Finkel E. 2001.** The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science*. 292: 624-626.
- Fornari, F. A., Randolph, J. K., Yalowich, J. C., Ritke, M. K., Gewirtz, D. A. 1994.** Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Molecular Pharmacology*, 45(4): 649-656.
- Franke, T. F., Hornik, C. P., Segev, L., Shostak, G. A., Sugimoto, C. 2003.** PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene*, 22(56): 8983-8998.
- Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Zychlinsky, A. 2007.** Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*, 176(2): 231-241.
- Fuentes-Prior, P., Salvesen, G. S. 2004.** The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochemical Journal*, 384(2): 201-232.
- Fulda, S., Debatin, K. M. 2006.** Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34): 4798-4811.
- Gabriella forro. 2012.** <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/forro-gabriella-2009-12-02/HTML/chapter2.html>. (Erişim tarihi: 04.09.13).
- Gann, P. H., Hennekens, C. H., Ma, J., Longcope, C., Stampfer, M. J. 1996.** Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 88(16): 1118-1126.
- Gann, P.H. 2002.** Risk factors for prostate cancer. *Reviews In Urology*, 4: 3-10.
- Garoufis, A., Hadjikakou, S.K., Hadjiliadis N. 2009.** "Palladium coordination compounds as anti-viral, anti-fungal, anti-microbial and anti-tumor agents", *Coordination Chemistry Reviews*, 253: 1384–1397.
- Gewis, A. 2003.** Introduction to Apoptosis. *ApoReview*, 1-26.
- Ghani, N. T. A., Mansour, A. M. 2012.** Novel palladium (II) and platinum (II) complexes with 1H-benzimidazol-2-ylmethyl-N-(4-bromo-phenyl)-amine: Structural studies and anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*: 47, 399-411.
- Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., Adjei, A. A. 2005.** Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55(3): 178-194.
- Gözüaçık, D., Kimchi, A. 2004.** Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 23(16): 2891-2906.

- Gözüaçık, D., Kimchi, A. 2007.** Autophagy and cell death. *Current Topics In Developmental Biology*, 78: 217-245.
- Gözüaçık, D., Bialik, S., Raveh, T., Mitou, G., Shohat, G., Sabanay, H., Kimchi, A. 2008.** DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. *Cell Death & Differentiation*, 15(12): 1875-1886.
- Gözüaçık, D., Kimchi, A. 2004.** Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 23(16): 2891-2906.
- Gronberg, H. 2003.** Prostate cancer epidemiology. *The Lancet*, 361(9360): 859-864.
- Gsur, A., Feik, E., ve Madersbacher, S., 2003.** Genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *World Journal of Urology* , 10: 345-378.
- Guess, H. A., Friedman, G. D., Sadler, M. C., Stanczyk, F. Z., Vogelman, J. H., Imperato-McGinley, J., Orentreich, N. 1997.** 5 alpha-reductase activity and prostate cancer: a case-control study using stored sera. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 6(1): 21-24.
- Guicciardi, M. E., Gores, G. J. 2009.** Life and death by death receptors. *The FASEB Journal*, 23(6): 1625-1637.
- Güney, E., Kaya, Y., Yilmaz, V.T. ve Gumus, S. 2011a.** “Synthesis, experimental and theoretical characterization of palladium(II) and platinum(II) saccharinate complexes with 2-(2-pyridyl)benzimidazole,” *Spectrochimica Acta Part A*, 79: 1171– 1178.
- Güney, E., Yilmaz, V. T., Ari, F., Buyukgungor, O., 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.
- Güleş Ö., Eren Ü. 2008.** Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 2: 73-78.
- Hahn, M., Li, W., Yu, C., Rahmani, M., Dent, P., Grant, S. 2005.** Rapamycin and UCN-01 synergistically induce apoptosis in human leukemia cells through a process that is regulated by the Raf-1/MEK/ERK, Akt, and JNK signal transduction pathways. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4: 457-470.
- Hallgren, O., Aits, S., Brest, P., Gustafsson, L., Mossberg, A. K., Wullt, B., Svanborg, C. 2008.** Apoptosis and tumor cell death in response to HAMLET (human  $\alpha$ -lactalbumin made lethal to tumor cells). *In Bioactive Components of Milk*, 217-240.

**Hammill, A. K., Uhr, J. W., Scheuermann, R. H. 1999.** Annexin V staining due to loss of membrane asymmetry can be reversible and precede commitment to apoptotic death. *Experimental Cell Research*, 251(1): 16-21.

**Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2011.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5): 646-674.

**Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Mizushima, N. 2006.** Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441(7095): 885-889.

**Hay, N., Sonenberg, N. 2004.** Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development*, 18(16): 1926-1945.

**Heinonen, O. P., Koss, L., Albanes, D., Taylor, P. R., Hartman, A. M., Edwards, B. K., Rautalahti, M. 1998.** Prostate cancer and supplementation with  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene: incidence and mortality in a controlled trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(6): 440-446.

**Herman-Antosiewicz, A., Johnson, D. E., Singh, S. V. 2006.** Sulforaphane causes autophagy to inhibit release of cytochrome C and apoptosis in human prostate cancer cells. *Cancer Research*, 66(11): 5828-5835.

**Horowitz, J. C., Lee, D. Y., Waghray, M., Keshamouni, V. G., Thomas, P. E., Zhang, H., Thannickal, V. J. 2004.** Activation of the pro-survival phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway by transforming growth factor- $\beta$ 1 in mesenchymal cells is mediated by p38 MAPK-dependent induction of an autocrine growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 279(2): 1359-1367.

**Hostanska, K., Nisslem, T., Freudenstein, J., Reichling, J., Saller, R. 2005.** Apoptosis of human prostate androgen-dependent and-independent carcinoma cells induced by an isopropanolic extract of black cohosh involves degradation of cytokeratin (CK) 18. *Anticancer Research*, 25(1A): 139-147.

**Hou, W., Han, J., Lu, C., Goldstein, L. A., Rabinowich, H. 2010.** Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy*, 6(7): 891-900.

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

**Hu, X. 2003.** Proteolytic signaling by TNF $\alpha$ : caspase activation and I $\kappa$ B degradation. *Cytokine*, 21(6): 286-294.

**Hudes, G. R., Kosierowski, R., Greenberg, R., Ramsey, H. E., Fox, S. C., Ozols, R. F., Giantonio, B. J. 1995.** Phase II study of topotecan in metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Investigational New Drugs*, 13(3): 235-240.

**Icel, C., Yilmaz, V. T., Kaya, Y., Durmus, S., Sarimahmut, M., Buyukgungor, O., Ulukaya, E. 2015.** Cationic Pd (II)/Pt (II) 5, 5-diethylbarbiturate complexes with bis (2-pyridylmethyl) amine and terpyridine: Synthesis, structures, DNA/BSA interactions, intracellular distribution, cytotoxic activity and induction of apoptosis. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 152: 38-52.

**Jesenberger, V., Jentsch, S. 2002.** Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(2): 112-121.

**Jia, L., Dourmashkin, R. R., Allen, P. D., Gray, A. B., Newland, A. C., Kelsey, S. M. 1997.** Inhibition of autophagy abrogates tumour necrosis factor  $\alpha$  induced apoptosis in human T-lymphoblastic leukaemic cells. *British Journal of Haematology*, 98(3): 673-685.

**Jiang, B. H., Liu, L. Z. 2008.** PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1784(1): 150-158.

**Jonsson, J. G., Sissung, T., Figg, W. D. 2009.** A genomic strategy for predicting androgen receptor activity in prostate tumors. *Cancer Biology & Therapy*, 8(21): 2002-2003.

**Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., Tang, D. 2011.** The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 18(4): 571-580.

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

**Karaküçük-İyidoğan, A., Taşdemir, D., Oruç-Emre, E. E., Balzarini, J. 2011.** Novel platinum (II) and palladium (II) complexes of thiosemicarbazones derived from 5-substitutedthiophene-2-carboxaldehydes and their antiviral and cytotoxic activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(11): 5616-5624.

**Kaygusuz, G., Tulunay, O., Baltaci, S., Gogus, O. 2007.** Microvessel density and regulators of angiogenesis in malignant and nonmalignant prostate tissue. *International Urology and Nephrology*, 39(3): 841-850.

**Keane, R. W., Kraydieh, S., Lotocki, G., Bethea, J. R., Krajewski, S., Reed, J. C., Dietrich, W. D. 2001.** Apoptotic and Anti-Apoptotic Mechanisms Following Spinal Cord Injury. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 60(5): 422-429.

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

**Keter, F. K., Kanyanda, S., Lyantagaye, S. S., Darkwa, J., Rees, D. J. G., Meyer, M. 2008.** In vitro evaluation of dichloro-bis (pyrazole) palladium (II) and dichloro-bis (pyrazole) platinum (II) complexes as anticancer agents. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63(1): 127-138.

**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

**Klionsky, D. J., & Emr, S. D. 2000.** Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290(5497): 1717-1721.

**Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J. I., Tanida, I., Tanaka, K. 2006.** Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 441(7095): 880-884.

**Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y. S., Ueno, T., Hara, T., Hamazaki, J. 2007.** Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, 131(6): 1149-1163.

**Koopman, G., Reutelingsperger, C. P. M., Kuijten, G. A. M., Keehnen, R. M. J., Pals, S. T., van Oers, M. H. J. 1994.** Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84: 1415–1420

**Kuma, A., Mizushima, N. 2010.** Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: with an emphasis on nutrient metabolism. *In Seminars in Cell & Developmental Biology*. 21(7): 683-690

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

**Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., Aster, J. C. 2014.** Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Elsevier Health Sciences.

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

**Lamkanfi, M. 2011.** Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nature Reviews Immunology*, 11(3): 213-220.

- Latil, A. G., Azzouzi, R., Cancel, G. S., Guillaume, E. C., Cochan-Priollet, B., Berthon, P. L., Cussenot, O. 2001.** Prostate carcinoma risk and allelic variants of genes involved in androgen biosynthesis and metabolism pathways. *Cancer*, 92(5): 1130-1137.
- Le XF, Mao W, Lu Z, Carter BZ and Bast RC. 2010.** Jr: Dasatinib induces autophagic cell death in human ovarian cancer. *Cancer*. 116:4980–4990.
- Learly, A., Auclin, E., Pautier, P., Lhomme, C. 2013.** The PI3K/Akt/mTOR Pathway in Ovarian Cancer: Biological Rationale and Therapeutic Opportunities. Ovarian cancer-a clinical and translational update. *Croatia: InTech*, 275-302.
- Leers, M.P., Kölgen, W., Björklund, V., Bergman, T., Tribbick, G., Persson, B., Björklund, P., Ramaekers, F.C., Björklund, B., Nap, M., Jörnvall, H., Schutte, B. 1999.** Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *The Journal of Pathology*, 187: 567-72.
- Letai, A. G. 2008.** Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 8(2): 121-132.
- Levine, B., Yuan, J. 2005.** Autophagy in cell death: an innocent convict?. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(10): 2679-2688.
- Levine, B., Kroemer, G. 2009.** Autophagy in aging, disease and death: the true identity of a cell death impostor. *Cell Death and Differentiation*, 16: 1-2.
- Levine, B., Sinha, S. C., Kroemer, G. 2008.** Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 4(5): 600-606.
- Li, J., Yuan, J. 2008.** Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48): 6194-6206.
- Li, J., Hou, N., Faried, A., Tsutsumi, S., Takeuchi, T., Kuwano, H. 2009.** Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells. *Annals of Surgical Oncology*, 16(3): 761-771.
- Li, Y., Zhang, J., Ma, H., Chen, X., Liu, T., Jiao, Z., Zeng, X. 2013.** Protective role of autophagy in matrine-induced gastric cancer cell death. *International Journal of Oncology*, 42(4): 1417-1426.
- Li, Y., Zhu, H., Zeng, X., Fan, J., Qian, X., Wang, S., Ju, D. 2013.** Suppression of autophagy enhanced growth inhibition and apoptosis of interferon- $\beta$  in human glioma cells. *Molecular Neurobiology*, 47(3): 1000-1010.



- Liem, A. A., Chamberlain, M. P., Wolf, C. R., Thompson, A. M. 2002.** The role of signal transduction in cancer treatment and drug resistance. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 28(6): 679-684.
- Lin, H. P., Lin, C. Y., Hsiao, P. H., Wang, H. D., Jiang, S. S., Hsu, J. M., Chuu, C. P. 2013.** Difference in protein expression profile and chemotherapy drugs response of different progression stages of LNCaP sublines and other human prostate cancer cells. *PLoS one*, 8(12): e82625.
- Linja, M. J., Savinainen, K. J., Saramäki, O. R., Tammela, T. L., Vessella, R. L., Visakorpi, T. 2001.** Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Research*, 61(9): 3550-3555.
- Liu, Q., Thoreen, C., Wang, J., Sabatini, D., Gray, N.S. 2009.** mTOR Mediated Anti-Cancer Drug Discovery. *Drug Discovery Today*, 6: 47-55.
- Mahmood, T., Yang, P. 2012.** Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9): 429-434.
- Mahmudov, K. T., Kopylovich, M. N., Guedes da Silva, M. F. C., Pombeiro, A. J. 2014a.** Interplay between Resonance-Assisted Hydrogen Bonding and Coordination in Sulfo-Functionalized Arylhydrazones of Active Methylene Compounds. *ChemPlusChem*, 79(10): 1523-1531.
- Mansouri-Torshizi, H., Mahboubé, I., 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): 9616-9625.
- 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: 405-422
- 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.
- Martinet, W., De Meyer, G. R. 2009.** Autophagy in Atherosclerosis A Cell Survival and Death Phenomenon With Therapeutic Potential. *Circulation research*, 104(3): 304-317.
- Martinez-Vicente, M., Tallozy, Z., Wong, E., Tang, G., Koga, H., Kaushik, S., Cuervo, A. M. 2010.** Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nature Neuroscience*, 13(5): 567-576.

**Matesanz, A. I., Pérez, J. M., Navarro, P., Moreno, J. M., Colacio, E., Souza, P. 1999.** Synthesis and characterization of novel palladium (II) complexes of bis (thiosemicarbazone). Structure, cytotoxic activity and DNA binding of Pd (II)-benzyl bis (thiosemicarbazone). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 76(1): 29-37.

**Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., White, E. 2007.** Role of autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(12): 961-967.

**Mathew, R., Karp, C. M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H. Y., DiPaola, R. S. 2009.** Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell*, 137(6): 1062-1075.

**Matsuda, N., Tanaka, K. 2010.** Does impairment of the ubiquitin-proteasome system or the autophagy-lysosome pathway predispose individuals to neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease?. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19(1): 1-9.

**Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I., Codogno, P. 2010.** Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell research*, 20(7): 748-762.

**Melendez, A., Tallozy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E. L., Hall, D. H., Levine, B. 2003.** Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science*, 301(5638): 1387-1391.

**Miklasova, N., Fischer-Fodor, E., Lönnecke, P., Schrepler, M. P., Virag, P., Tatomir, C., Silaghi-Dumitrescu, L. 2009.** Antiproliferative effect and genotoxicity of novel synthesized palladium complexes with organoarsenic ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(12): 1739-1747.

**Miyamoto, K. K., McSherry, S. A., Dent, G. A., Sar, M. A. D. H. A. B. A. N. A. N. D. A., Wilson, E. M., French, F. S., Mohler, J. L. 1993.** Immunohistochemistry of the androgen receptor in human benign and malignant prostate tissue. *The Journal of Urology*, 149(5): 1015-1019.

**Mizushima, N. 2007.** Autophagy: process and function. *Genes & Development*, 21(22): 2861-2873.

**Mossman, T. 1983.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2): 55-63.

**Mueller, H., Kassack, M.U., Wiese, M. 2004.** Comparison of the usefulness of the MTT, ATP and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *Journal of Biomolecular Screening*, 9: 506-515.

- Mujumdar N, Mackenzie TN, Dudeja V. 2010.** Triptolide induces cell death in pancreatic cancer cells by apoptotic and autophagic pathways. *Gastroenterology*, 139: 598–608.
- Nadeem, S., Bolte, M., Ahmad, S., Fazeelat, T., Tirmizi, S. A., Rauf, M. K., Haider, S. Z. 2010.** Synthesis, crystal structures and, antibacterial and antiproliferative activities in vitro of palladium (II) complexes of triphenylphosphine and thioamides. *Inorganica Chimica Acta*, 363(13): 3261-3269.
- Nahleh, Z. A. 2006.** Hormonal therapy for male breast cancer: a different approach for a different disease. *Cancer Treatment Reviews*, 32(2): 101-105.
- Nakamura, K., Bossy-Wetzell, E., Burns, K., Fadel, M. P., Lozyk, M., Goping, S., Michalak, M. 2000.** Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 150(4): 731-740.
- Nguyen, H. G., Yang, J. C., Kung, H. J., Shi, X. B., Tilki, D., Lara, P. N., Evans, C. P. 2014.** Targeting autophagy overcomes Enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cells and improves therapeutic response in a xenograft model. *Oncogene*, 33(36): 4521-4530.
- Norman, J. M., Cohen, G. M., Bampton, E. T. 2010.** The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases. *Autophagy*, 6(8): 1042-1056.
- Obara, K., Ohsumi, Y. 2008.** Dynamics and function of PtdIns (3) P in autophagy. *Autophagy*, 4(7): 952-954.
- Ohsumi, Y. 2001.** Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(3): 211-216.
- Oliver, L., Vallette, F. M. 2005.** The role of caspases in cell death and differentiation. *Drug resistance updates*, 8(3): 163-170.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Levine, B. 2005.** Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122(6): 927-939.
- Pelicano, H., Carney, D., Huang, P. 2004.** ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*, 7(2): 97-110.
- Petrovic, D., Stojimirović, B., Petrović, B., Bugarčić, Z. M., Bugarčić, Ž. D. 2007.** Studies of interactions between platinum (II) complexes and some biologically relevant molecules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(12): 4203-4211.
- Platanias LC. 2003.** Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood*. 101: 4667-7914

**Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P. 2010.** H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *Journal of Nucleic Acid*, 1-9.

**Prehn, R. T. 1999.** On the prevention and therapy of prostate cancer by androgen administration. *Cancer Research*, 59(17): 4161-4164.

**Qiang, L., Wu, C., Ming, M., Viollet, B., He, Y. Y. 2013.** Autophagy controls p38 activation to promote cell survival under genotoxic stress. *Journal of Biological Chemistry*, 288(3): 1603-1611.

**Qiang, L., Wu, C., Ming, M., Viollet, B., He, Y. Y. 2013.** Autophagy controls p38 activation to promote cell survival under genotoxic stress. *Journal of Biological Chemistry*, 288(3): 1603-1611.

**Rabik, C.A. ve Dolan, M.E. 2007.** “Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents,” *Cancer Treatment Reviews*, 33: 9– 23.

**Rabinowitz, J. D., White, E. 2010.** Autophagy and metabolism. *Science*, 330(6009): 1344-1348.

**Raffo, A. J., Perlman, H., Chen, M. W., Day, M. L., Streitman, J. S., Buttyan, R. 1995.** Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Research*, 55(19): 4438-4445.

**Rakiman I, Chinnadurai M, Baraneedharan U, FDP Solomon, Venkatachalam P. 2008.**  $\gamma$ -H2AX assay: a technique to quantify DNA double strand breaks. *Tools & Techniques - Advanced Biotechnology*, 39-41.

**Rangwala, R., R. Leone, Y. C. Chang, L. A. Fecher, L. M. Schuchter, A. Kramer, et al. 2014.** Phase I trial of hydroxychloroquine with dose-intense temozolomide in patients with advanced solid tumors and melanoma. *Autophagy*, 10:1369–1379.

**Rao, R. V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Ellerby, L. M., Ellerby, H. M., Bredesen, D. E. 2001.** Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program mechanism of caspase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36): 33869-33874.

**Rau T, van Eldik, R. 1996.** “In metal ions in biological systems. In: Sigel H, Sigel A (eds) Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy. *Marcel Dekker, New York*, 31: 339–378.

**Reedijk, J. 2003.** New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7): 3611-3616.

- Reiter R.E., Dekernion, J.B. 2005.** Epidemiology of prostate cancer, etiology and prevention, Patrick, C., Walsh, M.D., Campbell's Urology, 8. baskı, Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, 3003-3019.
- Riedl, S. J., Salvesen, G. S. 2007.** The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 8(5): 405-413.
- Riedl, S.J., Shi, Y., 2004.** Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(11): 897-907.
- Robertson, J. D., Orrenius, S. 2000.** Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Critical Reviews in Toxicology*, 30(5): 609-627.
- Ross, R., Bernstein, L., Judd, H., Hanisch, R., Pike, M., Henderson, B. 1986.** Serum testosterone levels in healthy young black and white men. *Journal of The National Cancer Institute*, 76(1): 45-48.
- Roviezzo, F., Cuzzocrea, S., Di Lorenzo, A., Brancalone, V., Mazzon, E., Di Paola, R., Cirino, G. 2007.** Protective role of PI3-kinase-Akt-eNOS signalling pathway in intestinal injury associated with splanchnic artery occlusion shock. *British Journal of Pharmacology*, 151(3): 377-383.
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., Sabatini, D. M. 2005.** Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307(5712): 1098-1101.
- Sasaki, K., Tsuno, N. H., Sunami, E., Tsurita, G., Kawai, K., Okaji, Y., Kaneko, M. 2010.** Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. *BMC Cancer*, 10(1): 370.
- Schaid, D. J. 2004.** The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Human Molecular Genetics*, 13(1): R103-R121.
- Scherz-Shouval, R., Elazar, Z. 2011.** Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(1): 30-38.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., Elazar, Z. 2007.** Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO Journal*, 26(7): 1749-1760.
- Schneider, J. L., Cuervo, A. M. 2014.** Liver autophagy: much more than just taking out the trash. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(3): 187-200.
- Scott, R. C., Schuldiner, O., Neufeld, T. P. 2004.** Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body. *Developmental Cell*, 7(2): 167-178.

- Seglen, P. O., Gordon, P. B. 1982.** 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(6): 1889-1892.
- Selvakumaran, M., Amaravadi, R. K., Vasilevskaya, I. A., O'Dwyer, P. J. 2013.** Autophagy inhibition sensitizes colon cancer cells to antiangiogenic and cytotoxic therapy. *Clinical Cancer Research*, 19(11): 2995-3007.
- Seok, S., Fu, T., Choi, S. E., Li, Y., Zhu, R., Kumar, S., Ma, J. 2014.** Transcriptional regulation of autophagy by an FXR-CREB axis. *Nature*, 516(7529): 108-111.
- Shang, L., Wang, X. 2011.** AMPK and mTOR coordinate the regulation of Ulk1 and mammalian autophagy initiation. *Autophagy*, 7(8): 924-926.
- Silva, L. C., Ferreira-Strixino, J., Fontana, L. C., Gonsalves, A. M. D. A. R., Serra, A. C., Pineiro, M., Canevari, R. A. 2016.** Molecular analysis of apoptosis pathway after photodynamic therapy in breast cancer: Animal model study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 14: 152-158.
- Small, E. J., Srinivas, S., Egan, B., McMillan, A., Rearden, T. P. 1996.** Doxorubicin and dose-escalated cyclophosphamide with granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of hormone-resistant prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 14(5): 1617-1625.
- Solakoğlu, Z. 2009.** Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. *Klinik Gelişim*, 22(3): 20-25.
- Sommerfeld, H. J., Meeker, A. K., Piatyszek, M. A., Bova, G. S., Shay, J. W., Coffey, D. S. 1996.** Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Research*, 56(1): 218-222.
- Stambolic, V., Suzuki, A., De La Pompa, J. L., Brothers, G. M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Mak, T. W. 1998.** Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*, 95(1): 29-39.
- 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: 978-988.
- Szucova, L., Trávníček, Z., Zatloukal, M., Popa, I. 2006.** Novel platinum (II) and palladium (II) complexes with cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis, characterization and antitumour activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(2): 479-491.

**Takahara, P. M., Frederick, C. A., Lippard, S. J. 1996.** Crystal structure of the anticancer drug cisplatin bound to duplex DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 118(49): 12309-12321.

**Tan, C., Lai, S., Wu, S., Hu, S., Zhou, L., Chen, Y., Ji, L. 2010.** Nuclear permeable ruthenium (II)  $\beta$ -carboline complexes induce autophagy to antagonize mitochondrial-mediated apoptosis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(21), 7613-7624.

**Tannock, I. F., de Wit, R., Berry, W. R., Horti, J., Pluzanska, A., Chi, K. N., Rosenthal, M. A. (2004).** Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 351(15), 1502-1512.

**T-Arpaci, O., Özdemir, A., Yalcin, I., Yıldız, I., Akı-Şener, E., Altanlar, N. 2005.** Synthesis and antimicrobial activity of some 5-[2-(Morpholin-4-yl) acetamido] and/or 5-[2-(4-substituted piperazin-1-yl) acetamido]-2-(p-substituted phenyl) benzoxazoles. *Arch. Pharm Chem. Life Science*, 338: 105-111.

**Thornberry, N. A., Lazebnik, Y. 1998.** Caspases: enemies within. *Science*, 281(5381): 1312-1316.

**Timmer, J. C., Salvesen, G. S. 2007.** Caspase substrates. *Cell Death & Differentiation*, 14(1): 66-72.

**Ueno, T., Toi, M., Bivén, K., Bando, H., Ogawa, T., Linder, S. 2003.** Measurement of an apoptotic product in the sera of breast cancer patients. *European Journal of Cancer*, 39: 769-74.

**Ulukaya, E. 2001.** Akciğer Kanserleri, Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar: Hücre Siklusu ve Apoptozis. Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul.

**Ulukaya, E. 2003.** Apoptozis ders notları. Erişim:[<http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozisdersnotu>]. (Erişim tarihi, 2007).

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

**Ulukaya, E., Ari, F., Dimas, K., Ikitimur, E. I., Guney, E., 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): 4957-4963.

**Ulukaya, E., Ari, F., Dimas, K., Sarimahmut, 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): 1425-1434.

**Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Yilmaztepe-Oral, A., Demirci, M. 2008.** The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology In Vitro*, 22: 232–239.

**Uluslararası Kanser Araştırmaları Merkezi raporu. 2007.** [http://kanser.gov.tr/Dosya/ca\\_istatistik/2009kanser\\_raporu.pdf](http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/2009kanser_raporu.pdf). (Erişim tarihi: 21.05.16).

**Vaishampayan, U. N., Marur, S., Heilbrun, L. K., Cher, M. L., Dickow, B., Smith, D. W., Eliason, J. 2009.** Phase II trial of capecitabine and weekly docetaxel for metastatic castrate resistant prostate cancer. *The Journal of Urology*, 182(1): 317-323.

**Van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., Reutelingsperger, C. P. 1998.** Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31(1): 1-9.

**Vara, J. Á. F., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., González-Barón, M. 2004.** PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 30(2): 193-204.

**Vogl, D. T., Stadtmauer, E. A., Tan, K. S., Heitjan, D. F., Davis, L. E., Pontiggia, L., Paul, T. M. 2014.** Combined autophagy and proteasome inhibition: a phase 1 trial of hydroxychloroquine and bortezomib in patients with relapsed/refractory myeloma. *Autophagy*, 10(8): 1380-1390.

**Vucicevic L, Misirkic M, Janjetovic K. 2011.** Compound C induces protective autophagy in cancer cells through AMPK inhibition-independent blockade of Akt/mTOR pathway. *Autophagy*, 7: 40–50.

**Wadhawan, T., McEvoy, J., Prüß, B.M., Khan, E. 2010.** Assessing tetrazolium and ATP assays for rapid in situ viability quantification of bacterial cells entrapped in hydrogel beads. *Enzyme and Microbial Technology*, 47: 166–173.

**Wang K, Liu R, Li J. 2011.** Quercetin induces protective autophagy in gastric cancer cells: involvement of Akt-mTOR- and hypoxia-induced factor 1alpha-mediated signaling. *Autophagy*, 7:966–978.

**Wang N, Feng Y, Zhu M. 2010.** Berberine induces autophagic cell death and mitochondrial apoptosis in liver cancer cells: the cellular mechanism. *Journal Cell Biochemistry*, 111: 1426–1436. 2010.

**Wang, A. L., Lukas, T. J., Yuan, M., Du, N., Tso, M. O., Neufeld, A. H. 2009.** Autophagy and exosomes in the aged retinal pigment epithelium: possible relevance to drusen formation and age-related macular degeneration. *PloS one*, 4(1): e4160.



- Wang, Y., Nartiss, Y., Steipe, B., McQuibban, G. A., Kim, P. K. 2012.** ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy. *Autophagy*, 8(10): 1462-1476.
- Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., Levine, B. 2008.** JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Molecular Cell*, 30(6): 678-688.
- Willete, R. E., Delgado, J. N., Remers, W. A. 1987.** Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry.
- Williams GM, Jeffrey AM. 2000.** Oxidative DNA damage: Endogenous and chemically induced. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32 (3): 283-92.
- Wolpin, B. M., Rubinson, D. A., Wang, X., Chan, J. A., Cleary, J. M., Enzinger, P. C., Schrag, D. 2014.** Phase II and pharmacodynamic study of autophagy inhibition using hydroxychloroquine in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma. *The Oncologist*, 19(6): 637-638.
- Wong, C. H., Iskandar, K. B., Yadav, S. K., Hirpara, J. L., Loh, T., Pervaiz, S. 2010.** Simultaneous induction of non-canonical autophagy and apoptosis in cancer cells by ROS-dependent ERK and JNK activation. *PloS one*, 5(4): e9996.
- Wu, Z., Chang, P. C., Yang, J. C., Chu, C. Y., Wang, L. Y., Chen, N. T., Lam, K. S. 2010.** Autophagy blockade sensitizes prostate cancer cells towards Src family kinase inhibitors. *Genes & Cancer*, 1(1): 40-49.
- Wyrsh, P., Blenn, C., Bader, J., Althaus, F. R. 2012.** Cell death and autophagy under oxidative stress: roles of poly (ADP-ribose) polymerases and Ca<sup>2+</sup>. *Molecular and Cellular Biology*, 32(17), 3541-3553.
- Xie, Z., Klionsky, D. J. 2007.** Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, 9(10): 1102-1109.
- Xue, L., Fletcher, G. C., Tolkovsky, A. M. 1999.** Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 14(3): 180-198.
- Yan, C. H., Liang, Z. Q., Gu, Z. L., Yang, Y. P., Reid, P., Qin, Z. H. 2006.** Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CrTX-induced death of K562 cells. *Toxicol*, 47(5): 521-530.
- Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Simon, H. U. 2006.** Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature Cell Biology*, 8(10): 1124-1132.

**Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Lenardo, M. J. 2004.** Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*, 304(5676): 1500-1502.

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

**Zalckvar, E., Berissi, H., Mizrachy, L., Idelchuk, Y., Koren, I., Eisenstein, M., Kimchi, A. 2009.** DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Reports*, 10(3): 285-292.

**Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R., Yan, G. 1997.** Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V. *Biotechniques*, 23: 525–531.

**Zhang, J. H., Zhang, Y., Herman, B. 2003.** Caspases, apoptosis and aging. *Ageing Research Reviews*, 2(4), 357-366.

**Zhang, J., Li, L., Ma, L., Zhang, F., Zhang, Z., 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): 5711-5716.

**Zhang, X., Ling, M. T., Wong, Y. C., Wang, X. 2007.** Evidence of a novel antiapoptotic factor: Role of inhibitor of differentiation or DNA binding (Id-1) in anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer science*, 98(3): 308-314.

**Zhang, Y., Cai, X., Wang, Y., Zhang, C., Li, L., Choi, S. W., Xia, Y. 2011.** Noninvasive photoacoustic microscopy of living cells in two and three dimensions through enhancement by a metabolite dye. *Angewandte Chemie*, 123(32): 7497-7501.

**Zhu, J., Lin, M., Fan, D., Wu, Z., Chen, Y., Zhang, J., Guo, Z. 2009.** The role of bridging ligands in determining DNA-binding ability and cross-linking patterns of dinuclear platinum (II) antitumour complexes. *Dalton Transactions*, (48): 10889-10895.

**Zimmermann, K. C., Bonzon, C., Green, D. R. 2001.** The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics*, 92(1): 57-70.

## **ÖZGEÇMİŞ**

**Adı Soyadı:** Merve ERKISA

**Doğum Yeri ve Tarihi:** İzmir, 11 Nisan 1990

**Yabancı Dili:** İngilizce

**Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)**

**Lise:** Fatma Saygın Anadolu Lisesi (2004-2008)

**Lisans:** Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2008-2012)

**Yüksek Lisans:** Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı (2013-2016)

**İletişim (e-posta):** merveerkisa@gmail.com