



**YENİ SENTEZLENEN BAKIR (II) KARIŞIK LİGAND  
KOMPLEKSİNİN [CU(5-NİTRO-1-10-FENANTROLİN) (L-  
GLUTAMİN)(H<sub>2</sub>O)]CLO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O SİTOTOKSİK ANTİKANSER  
VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN SAĞLIKLİ VE KANSER  
HÜCRE HATLARINDA BELİRLENMESİ**

**MERVE GÜLFİDANLI**



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YENİ SENTEZLENEN BAKIR (II) KARIŞIK LİGAND KOMPLEKSİNİN  
[CU(5-NİTRO-1-10-FENANTROLİN)(L-GLUTAMİN)(H<sub>2</sub>O)]CLO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O  
SİTOTOKSİK ANTİKANSER VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN  
SAĞLIKLI VE KANSER HÜCRE HATLARINDA BELİRLENMESİ**

MERVE GÜLFİDANLI

Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ  
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2016  
Her Hakkı Saklıdır

## TEZ ONAYI

Merve GÜLFİDANLI tarafından hazırlanan 'Yeni Sentezlenen Bakır (II) Karışık Ligand Kompleksinin [Cu(5-Nitro-1-10-Fenantrolin)(L-Glutamin)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O Sitotoksik Antikanser Ve Genotoksik Etkilerinin Sağlıklı Ve Kanser Hücre Hatlarında Belirlenmesi' adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Prof Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ

**Başkan** : Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ  
**İmza**

Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye** : Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ  
**İmza**

Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Gökçe TANER  
**İmza**

Bursa Teknik Üniversitesi Doğa Bilimleri, Mimarlık ve  
Mühendislik Fakültesi  
Biyomühendislik Bölümü

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR  
Enstitü Müdürü  
17.10.2016

**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 yararlanması 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.**

2016

**MERVE GÜLFİDANLI**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YENİ SENTEZLENEN BAKIR (II) KARIŞIK LİGAND KOMPLEKSİNİN [CU(5-NİTRO-1-10-FENANTROLİN) (L-GLUTAMİN)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O SİTOTOKSİK ANTİKANSER VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN SAĞLIKLI VE KANSER HÜCRE HATLARINDA BELİRLENMESİ

**Merve GÜLFİDANLI**

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ

Bu tez çalışmasında bakır (II) karışık ligand kompleksi [Cu(5-Nitro-1-10-Fenantrolin) (L-glutamin)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O ile MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı, Caco-2 insan kolon kanseri hücre hattı, A549 insan akciğer kanseri hücre hattı ve Beas-2B insan bronş epitel hücre hatlarında çalışılmıştır. XTT testi uygulanarak bakır (II) kompleksin özellikle MCF-7 hücrelerinde anti-kanser aktivitesi gösterilmiştir. Bakır(II) kompleksinin genotoksik etkisini göstermek amacıyla komet testi uygulanmıştır. Hücre içi serbest radikal seviyesi DCF-DA testi ile belirlenmiştir. Komet testi sonuçlarına göre bakır (II) kompleksi ile muamele edilen hücrelerde DNA zincir kırılmaları meydana geldiği görülmüştür. Meydana gelen DNA kırıklarının oksidatif hasar nedeniyle olduğu DCF-DA testi ile kanıtlanmaktadır. Yapılan XTT sonuçları ise bakır (II) kompleksinin MCF-7 hücre hatında umut verici bir anti-kanser ajanı olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** bakır, anti-kanser etkisi, L-glutamin, fenantrolin

**2016, x + 82 sayfa**

## ABSTRACT

MSc Thesis

DETERMINATION OF THE CYTOTOXIC ANTI-CANCER AND GENOTOXIC EFFECTS OF COPPER (II) MIXED LIGAND COMPLEX [CU(5-NITRO-1-10-PHENANTHROLINE)(L-GLUTAMINE)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O IN HEALTHY AND CANCER CELL LINES

**Merve GÜLFİDANLI**

Uludag University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology  
**Supervisor:** Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ

In this Thesis copper (II) mixed ligand complex [Cu(5-Nitro-1-10-phenanthroline)(L-glutamine) (H<sub>2</sub>O)] ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O was studied in MCF-7 human breast cancer cell line, Caco-2 human colon cancer cell line, A549 human lung cancer cell line and Beas-2B human bronchial epithelial healthy cell line. Copper (II) complexes was demonstrated anti-cancer activity especially in MCF-7 cells by XTT assay. The genotoxic effects of the copper complexes were evaluated by comet assay. Intracellular Reactive Oxygen species levels were determined by DCF-DA assay. The results of comet assay showed that exposure to copper complexes induced DNA fragmentation. DCF-DA assays confirmed that DNA fragmentation was due to oxidative damage. The results of XTT, cytotoxicity test, showed that copper (II) complex were found to be promising as anti-cancer agents.

**Key Words:** copper, anti-cancer effect, L-glutamine, phenanthroline

**2016, x + 82 pages**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda bilgi ve tecrübelerini paylaşan, insani ve ahlaki değerleri ile örnek aldığım, beni motive edip başaracağıma inandıran, çalışmaktan onur duyduğum Değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ'a teşekkür ederim.

Hem lisans eğitimimde, hem de yüksek lisans tez süresince her türlü tecrübe ve bilgi birikiminden yararlanırken, bitmek tükenmek bilmeyen tüm sorularıma karşı göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı hocam Doç. Dr. Özgür VATAN' a yardımları ve desteği nedeniyle teşekkür ederim.

Tezimde kullandığım kompleksi sentezleyen Uludağ Üniversitesi Kimya Ana Bilim Dalı'ndan Değerli Hocam Prof. Dr. Rahmiye AYDIN'a ve doktora öğrencisi Duygu İNCİ'ye,

Çalışma ortamımızı ev sıcaklığına çeviren, yardım ve desteklerini esirgemeyen, aynı ortamda çalışmaktan büyük keyif aldığım güzel yürekli laboratuvar arkadaşlarım Arş. Gör. Melika BEKTAŞ HORTOĞLU, Huzeyfe HURİYET ve Fawaz Muhammed ABDULLAH'a,

Sadece iyi günümde değil, her anımda yanımda olan, tüm zorluklara karşı birlikte durduğumuz, hedeflediğimiz yolda ilerlerken en büyük moral desteğim, kardeşten öte, değerli dostum Neylan ORAL'a ve güzel ailesine,

Desteğini her an hissettiren canım arkadaşım Sinem ŞENER'e,

Yüksek lisansım boyunca, ihmal ettiğim ve sabırla beni bekleyen birbirinden değerli tüm dostlarıma,

Bugünlere gelmemi sağlayan, hayatım boyunca verdiğim her kararı destekleyen, elimi bir an olsun bırakmayan, maddi manevi yanımda olan, annem, babam ve anneanneme,

Teşekkürü bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Kemoterapi.....	5
2.2.1. Kemoterapide Kullanılan Antineoplastik İlaçların Sınıflandırılması Ve Etki Mekanizmaları.....	5
2.2.2. Kemoterapide Kullanılan Antineoplastik İlaçların Yan Etkileri.....	7
2.2.3. Metal İçeren İlaçların DNA ile Etkileşimleri ve Redoks Yetenekleri.....	9
2.3. Bakır.....	14
2.3.1. Bakırın Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....	14
2.3.2. İnsan Sağlığında Bakırın Biyolojik Önemi.....	14
2.3.3. Bakırın Antikanser İlaç Potansiyeli.....	19
2.3.4. Bakır ve Fenantrolin.....	21
2.4. Glutamin.....	23
2.4.1. Glutaminin Biyolojik Önemi.....	23
2.4.2. Glutamin ve kanser.....	24
2.5. Anti-kanser Çalışmalarında Sitotoksisite, Genotoksisite ve Oksidatif Hasar Belirleme Metodları.....	27
2.5.1. Hücre Canlılık Testleri.....	27
2.5.2. Komet Testi.....	28
2.5.3. ROS Testi.....	30
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	34
3.1. Kullanılan Ekipmanlar, Sarf Malzemeler.....	34
3.2. Kullanılacak Hücre Hatları.....	35
3.2.1. Hücre Kültürü.....	35
3.3. Kullanılan Kompleksler.....	36
3.4. XTT Testi.....	37
3.5. Komet Testi.....	37
3.6. ROS Ölçümü.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. XTT Bulguları.....	40
4.1.1. Beas-2B hücre hattında elde edilen XTT bulguları.....	40
4.1.2. A549 Hücre hattında elde edilen XTT bulguları.....	40
4.1.3. Caco-2 Hücre hattında elde edilen XTT bulguları.....	40
4.1.4. MCF-7 Hücre hattında elde edilen XTT bulguları.....	41
4.2. Komet Testi Bulguları.....	43
4.2.1. Kuyruk Uzunluğu Bulguları.....	45
4.2.1.1. Beas-2B hücre hattında elde edilen komet kuyruk uzunluğu bulguları.....	46



4.2.1.2.	A549 hücre hattında elde edilen komet kuyruk uzunluğu bulguları.....	47
4.2.1.3.	Caco-2 hücre hattında elde edilen komet kuyruk uzunluğu bulguları.....	48
4.2.1.4.	MCF-7 hücre hattında elde edilen komet kuyruk uzunluğu bulguları.....	49
4.2.2.	Kuyruk % DNA Bulguları.....	50
4.2.2.1.	Beas-2B hücre hattında elde edilen kuyruk % DNA bulguları.....	51
4.2.2.2.	A549 hücre hattında elde edilen kuyruk % DNA bulguları.....	52
4.2.2.3.	Caco-2 hücre hattında elde edilen kuyruk % DNA bulguları.....	53
4.2.2.4.	MCF-7 hücre hattında elde edilen kuyruk % DNA bulguları.....	54
4.2.3.	OTM bulguları.....	55
4.2.3.1.	Beas-2B hücre hattında elde edilen OTM bulguları.....	56
4.2.3.2.	A549 hücre hattında elde edilen OTM bulguları.....	57
4.2.3.3.	Caco-2 hücre hattında elde edilen OTM bulguları.....	58
4.2.3.4.	MCF-7 hücre hattında elde edilen OTM bulguları.....	59
4.3.	ROS Bulguları.....	60
4.3.1.	Beas-2B hücre hattında elde edilen ROS bulguları.....	61
4.3.2.	A549 hücre hattında elde edilen ROS bulguları.....	62
4.3.3.	Caco-2 hücre hattında elde edilen ROS bulguları.....	63
4.3.4.	MCF-7 hücre hattında elde edilen ROS bulguları.....	64
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	65
	KAYNAKLAR.....	70
	ÖZGEÇMİŞ.....	82

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
H	Hidrojen
Cu	Bakır
mg	Miligram
mL	Mililitre
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
O	Oksijen
°C	Derece Santigrad
V	Volt
mA	Miliamper

<b>Kisaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetikasit
EtOH	Etanol
LMA	Low Melting Agarose
OTM	Olive Tail Moment
PBS	Phosphate Buffered Saline
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROS	Reactive Oxygen Species

## ŞEKİL DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.2.2	Kemoterapötik Ajanların Sistemik Yan Etkileri.....9
Şekil 2.3.2	Bakırın vücut içine alımı-atımı.....18
Şekil 2.3.3	1,10-fenantrolinin kimyasal yapısı.....22
Şekil 2.4.2	Sağlıklı ve kanser bireylerin organlarında glutamin metabolizması.....27
Şekil 2.5.1	XTT testi.....28
şekil 2.5.2	Komet testi genel basamakları.....30
Şekil 3.3	L-glutamin moleküler yapısı.....36
Şekil 3.3.1	Fenantrolin moleküler yapısı.....36
Şekil 3.3.2	[Cu(5-nitro-1,10-fenantrolin)(L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O kompleksinin kristal yapısı.....36
Şekil 4.1	Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hattında [Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O kompleksinin IC <sub>50</sub> değerleri.....41
Şekil 4.2	Beas-2B hücre hatının büyüme kontrolü, pozitif kontrol, IC <sub>75</sub> , IC <sub>50</sub> , IC <sub>25</sub> ve IC <sub>12,5</sub> dozlarından elde edilen mikroskopik görüntü örnekleri.....43
Şekil 4.3	A549 hücre hatının büyüme kontrolü, pozitif kontrol, IC <sub>75</sub> , IC <sub>50</sub> , IC <sub>25</sub> ve IC <sub>12,5</sub> dozlarından elde edilen mikroskopik görüntü örnekleri .....44
Şekil 4.4	Caco-2 hücre hatının büyüme kontrolü, pozitif kontrol, IC <sub>75</sub> , IC <sub>50</sub> , IC <sub>25</sub> ve IC <sub>12,5</sub> dozlarından elde edilen mikroskopik görüntü örnekleri .....44
Şekil 4.5	MCF-7 hücre hatının büyüme kontrolü, pozitif kontrol, IC <sub>75</sub> , IC <sub>50</sub> , IC <sub>25</sub> ve IC <sub>12,5</sub> dozlarından elde edilen mikroskopik görüntü örnekleri .....45
Şekil.4.6	[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O Kompleksinin IC <sub>75</sub> , IC <sub>50</sub> , IC <sub>25</sub> ve IC <sub>12,5</sub> dozları ile Beas-2B hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk uzunluğu değerleri (µm).....46
Şekil.4.7	[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O Kompleksinin IC <sub>75</sub> , IC <sub>50</sub> , IC <sub>25</sub> ve IC <sub>12,5</sub> dozları ile A549 hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk uzunluğu değerleri (µm).....47

Şekil.4.8	[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O Kompleksinin IC <sub>75</sub> , IC <sub>50</sub> , IC <sub>25</sub> ve IC <sub>12,5</sub> dozları ile Caco-2 hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk uzunluğu değerleri (µm).....48
Şekil.4.9	[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O Kompleksinin IC <sub>75</sub> , IC <sub>50</sub> , IC <sub>25</sub> ve IC <sub>12,5</sub> dozları ile MCF-7 hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk uzunluğu değerleri (µm).....49
Şekil.4.10	[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O Kompleksinin IC <sub>75</sub> , IC <sub>50</sub> , IC <sub>25</sub> ve IC <sub>12,5</sub> dozları ile Beas -2B hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk % DNA değerleri.....51
Şekil.4.11	[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O Kompleksinin IC <sub>75</sub> , IC <sub>50</sub> , IC <sub>25</sub> ve IC <sub>12,5</sub> dozları ile A549 hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk % DNA değerleri.....52
Şekil.4.12	[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O Kompleksinin IC <sub>75</sub> , IC <sub>50</sub> , IC <sub>25</sub> ve IC <sub>12,5</sub> dozları ile Caco-2 hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk %DNA değerleri.....53
Şekil.4.13	[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O Kompleksinin IC <sub>75</sub> , IC <sub>50</sub> , IC <sub>25</sub> ve IC <sub>12,5</sub> dozları ile MCF-7 hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk %DNA değerleri.....54
Şekil.4.14	[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O Kompleksinin IC <sub>75</sub> , IC <sub>50</sub> , IC <sub>25</sub> ve IC <sub>12,5</sub> dozları ile Beas-2B hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama OTM.....56
Şekil.4.15	[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O Kompleksinin IC <sub>75</sub> , IC <sub>50</sub> , IC <sub>25</sub> ve IC <sub>12,5</sub> dozları ile A549 hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama OTM.....57
Şekil.4.16	[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O Kompleksinin IC <sub>75</sub> , IC <sub>50</sub> , IC <sub>25</sub> ve IC <sub>12,5</sub> dozları ile Caco-2 hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama OTM.....58

Şekil.4.17	[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O Kompleksinin IC <sub>75</sub> , IC <sub>50</sub> , IC <sub>25</sub> ve IC <sub>12,5</sub> dozları ile MCF-7 hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama OTM.....	59
Şekil 4.18	[Cu(5-Nitro-1-10-Fenantrolin) (L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O bakır (II) kompleksinin IC <sub>12,5</sub> , IC <sub>25</sub> , IC <sub>50</sub> ve IC <sub>75</sub> dozları ile Beas-2B hücre hattına 1 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ROS değerleri.....	60
Şekil 4.19	[Cu(5-Nitro-1-10-Fenantrolin) (L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O bakır (II) kompleksinin IC <sub>12,5</sub> , IC <sub>25</sub> , IC <sub>50</sub> ve IC <sub>75</sub> dozları ile A549 hücre hattına 1 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ROS değerleri....	61
Şekil 4.20	[Cu(5-Nitro-1-10-Fenantrolin) (L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O bakır kompleksinin IC <sub>12,5</sub> , IC <sub>25</sub> , IC <sub>50</sub> ve IC <sub>75</sub> dozları ile Caco-2 hücre hattına 1 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ROS değerleri ....	62
Şekil 4.21	[Cu(5-Nitro-1-10-Fenantrolin) (L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O bakır (II) kompleksinin IC <sub>12,5</sub> , IC <sub>25</sub> , IC <sub>50</sub> ve IC <sub>75</sub> dozları ile MCF-7 hücre hattına 1 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ROS değerleri.....	63

## ÇİZELGE DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 2.3.2	Bazı bakır içeren enzimler ve fonksiyonları.....19
Çizelge 3.1	Çalışmalarda kullanılan ekipmanlar.....34
Çizelge 3.2	Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.....35
Çizelge 4.1	Bakır (II) kompleksinin Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hatlarında IC75 , IC50 , IC25 , IC12,5 dozları.....42
Çizelge 4.2	[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O Kompleksinin IC75, IC50, IC25 ve IC12,5 dozları ile Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hatlarına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk uzunluğu değerleri .....45
Çizelge 4.3	[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O Kompleksinin IC75, IC50, IC25 ve IC12,5 dozları ile Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hatlarına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama % DNA değerleri.....50
Çizelge 4.4	[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O Kompleksinin IC75, IC50, IC25 ve IC12,5 dozları ile Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hatlarına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen OTM değerleri.....55
Çizelge 4.5	[Cu(5-Nitro-1-10-Fenantrolin) (L-glutamin)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O Kompleksinin IC12,5, IC25, IC50 ve IC75 dozları ile Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hatlarına 1 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ROS değerleri.....64

## 1.GİRİŞ

Kanser, bakteriler, virüsler, radyasyon, kalıtım, çevresel faktörler, beslenme alışkanlığı ve kimyasallar gibi birçok etken nedeniyle değişikliğe uğramış hücrelerin, kontrolsüz büyüyüp çoğalması sonucu oluşan multifaktöriyel bir hastalıktır (Williams 1987).

Kanser tüm dünya da görülen en yaygın sağlık problemlerinin başında yer almaktadır. Son 5 yılda kalp hastalıklarından sonra kanserin ölüm nedenleri arasında en üst sırada yer aldığı belirtilmiştir (Rebecca 2005). Kanser tedavisinde mortaliteyi azaltmak için son yıllarda çok sayıda ilaç ve yeni tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlar cerrahi, radyoterapi, kemoterapi-hormon tedavisi, immunoterapi, sinyal ileti sistemi inhibitörleri, gen tedavisi ve anjiyogenez inhibitörleri olarak sayılabilir (Dellabona ve ark. 1999).

Kemoterapi, hücre bölünmesini engellemek, tümör gelişimini baskılamak veya anormal hücreleri yok etmek amacıyla neoplastik hastalıkların tedavisinde cerrahi ve radyo terapi gibi ek tedavilerle birlikte veya tek başına kullanılabilen bir tedavi yöntemidir. 20.yüzyılın ortalarında hardal gazının rastlantısal keşfi ile kanser tedavisinde kemoterapi uygulamaları yaygınlaşmış, hardal gazı ve benzeri ajanlarla yapılan çalışmalar artmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda günümüzde kemoterapide yararlanılan yüksek anti-tümör etkinliğine sahip antineoplastik ilaç geliştirilmiştir.

Antineoplastik ilaçlar etki mekanizmaları nedeniyle akilleyici ajanlar, antimetabolitler, antimikrotübüller, topoizomeras I ve topoizomeras II inhibitörleri ve diğerleri şeklinde sınıflandırılmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik özelliği yüksek bu ajanların özellikle vücutta hızla çoğalmakta olan kan, saç ve mukoza hücrelerini yok ettiği bilinmektedir. Bunun yanı sıra kardiyovasküler hasarlara yol açmaları, nörotoksisite, ototoksisite ve nefrotoksisite gibi birçok komplikasyonlara neden olmaları antineoplastiklerin kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu da hastalığın tedavisini veya hastanın kaliteli yaşam sürdürmesini engellemektedir. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların geliştirilmesinde en önemli nokta ilacın etkinliğini arttırırken, meydana gelebilecek yan etkileri azaltmaktır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda metal komplekslerinin DNA ile selektif bir etkileşim göstererek potansiyel antikanser ilaçlarında etkin olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Kaushik ve ark. 2011). Metal komplekslerinin kolayca redoks reaksiyonlarına katılmaları ve biyolojik moleküllerle reaksiyona girmeleri bu alandaki araştırmacılar tarafından oldukça ilgi çekmektedir (Petering 1980).

Sisplatinin klinik uygulamalarından daha başarılı, toksisitesi daha düşük platin temelli ya da platin temelli olmayan metal komplekslerinin antitümör özellikleri çalışılmaktadır. Platin temelli olmayan metal kompleksleri içerisinde, redoks reaksiyonlarındaki önemi, bağışıklık sistemindeki rolü ve birçok biyolojik olayda görev alan, yaşayan tüm canlılar için esansiyel olan bakır ile çalışmalar yapılmakta, yüksek antitümör etkisine sahip oluşu potansiyel ilaç olarak kullanımını göstermektedir.

Bu tez çalışmasında Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Anorganik Kimya Anabilim dalı tarafından sentezlenmiş  $[Cu(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(L\text{-glutamin})(H_2O)]ClO_4.H_2O$  karışık ligand kompleksinin MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı, Caco-2 insan kolon kanseri hücre hattı, A549 insan akciğer kanseri hücre hattı ve BEAS-2B insan bronş epitel hücre hattında sitotoksik etkilerini ölçmek için XTT testi ile  $IC_{50}$  değerleri belirlenmiştir. Hücre içi ROS seviyesi ROS testi ile değerlendirilmiştir. Bu bileşiklerin genotoksik etkilerini belirlemek için Komet testi yapılmıştır. Bakır komplekslerinin kanser hücrelerine kıyasla sağlıklı hücre hattı üzerinde daha az toksik olması bu komplekslerin umut verici metal içerikli kemoterapi ilaçları olabileceğini düşündürmektedir.



## 2.KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Kanser

Kanser farklı birçok etken nedeniyle değişikliğe uğramış hücrelerin, kontrolsüz büyüüp çoğalması sonucu oluşan hastalıklar grubudur. Normal hücreler büyüme faktörlerinin etkisiyle kontrol altında ve ihtiyaca göre çoğalırken, programlı hücre ölümü (apoptoz) ile yok olurlar.

Kanser (cancer) tanımı, ilk kez Yunan fizikçi Hippocrates (MÖ 460-370) tarafından oluşturulmuştur. Hippocrates “carcinoma” ve “carcinoma” terimlerini organizmanın şifa bulmayan yeni yapılanmaları için kullanmıştır. Galen (M.S. 2. Yüzyıl) ise kanser ağrısının, yengeç ısırması ile oluşan, ortadan çevreye doğru yayılan kemirici tarzdaki ağrıya benzerlik göstermesi nedeniyle “kanser” adını vermiştir (Sigerist 1960).

Büyümenin düzenlenmesini sağlayan proteinler olan protoonkogenlerin onkogenlere dönüşmesi kontrol mekanizmasının bozulmasına neden olmakta ve sonucunda da kontrolsüz hücre çoğalmaları ve büyümeleri meydana gelmektedir (Yokuş ve Çakır, 2012). Otonomi (bağımsız çoğalabilme), kontrolsüz çoğalma (kontakt inhibisyon kaybı), apoptozisin baskılanması, anjiyogenez, ölümsüzlük, invazyon ve metastaz yeteneği özelliklerine sahip hücrelerin çoğalması ile kanser hastalığı ortaya çıkmaktadır (Akbulut 2005).

Multifaktöriyel bir hastalık olan kanserin oluşumunda, bakteriler, virüsler, radyasyon, kalıtım, çevresel faktörler, beslenme alışkanlığı ve kimyasallar rol oynamaktadır (Williams 1987). Kanseri türlerinin %10-15'inin kalıtsal olduğu yani ebeveynlerden gelen genlerle aktarıldığı, %85-90'lık kısmının ise hücrelerdeki DNA'nın, mutajenlere maruz kalması, hücre DNA'sındaki değişiklikler ve replikasyonda hatalar oluşması ile şekillendiği bilinmektedir (Futreal ve ark. 2001).

Kanser tedavisinde mortaliteyi azaltmak için son yıllarda çok sayıda ilaç ve yeni tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlar cerrahi, radyoterapi, kemoterapi-hormon tedavisi, immunoterapi, sinyal ileti sistemi inhibitörleri, gen tedavisi ve anjiyogenez inhibitörleri olarak sayılabilir (Dellabona ve ark. 1999).

Kanser tüm dünyada görülen en yaygın sağlık problemlerinin başında yer almaktadır. Son 5 yılda kalp hastalıklarından sonra ölüm nedenleri arasında en üst sırada yer almaktadır (Rebecca 2005). Kanser kontrol altına alınması konusunda önceliklerin belirlenebilmesi için kanser yükünün insidans (ortaya çıkan yeni vakalar) ve ölüm sayısı cinsinden tahmin edilmesi gerekmektedir.

Dünyada kanser ölüm oranı verilerine göre, Lüksemburg en üst sırada yer alırken en düşük kanser ölüm oranının 100 000'de 38'le El Salvador olduğu rapor edilmiştir. ABD'de ise bu oran 100 000'de 217 olarak belirlenmiştir (National Center For Health Statistics 2004). Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre kanser görülme sıklığı Danimarka'da binde 3'ün üzerinde, Çekoslovakya, Almanya, İtalya ve İngiltere'de binde 2,5-3 arası, Fransa, Polonya ve Macaristan'da 2-2,5 arası, Romanya'da da 1,5-2 arasındadır. Türkiye'de kanser görülme sıklığı ise, en az 100 000'de 120 olarak tahmin edilmektedir (Cancer Statistics 2015).

Ülkemizde kanser 1981 yılında bildiri zorunlu hastalıklar listesine alınmış, 1982'de ise Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı kurulmuştur (Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayını 1983). Türkiye'de 2013 yılında yaşa göre kanser hızı erkeklerde yüzbinde 267,9 kadınlarda ise yüzbinde 186,5'dir. Toplamda kanser insidansı ise yüzbinde 227,2'dir. Türkiye'de toplam 174 000 kişiye yeni kanser teşhisi konulmuştur. Türkiye kanser insidansı, dünya insidansının üzerinde seyrederken, Avrupa Birliği ülkeleri ve Amerika gibi gelişmişlik düzeyi yüksek olan ülkelere göre kanser açısından hem kadınlarda hem de erkeklerde daha düşük bir hızda olduğu görülmektedir. Ülkemizde görülen ilk 5 kanser türünün dünyadaki ve diğer gelişmiş ülkelerdeki örüntü ile benzerlikler gösterdiği belirtilmektedir.

Erkeklerde trake, bronş ve akciğer kanseri (59,3/100000 kişide YSH), kadınlarda ise meme kanseri (45,9/100000 kişide YSH) en sık görülen kanser türleridir. Çocukluk çağı kanserlerinde ise çocukluk çağı lösemileri en sık görülen kanser türüdür. Çocukluk çağında her iki cinsiyette de lenfomalar ve merkezi sinir sistemi tümörleri lösemileri takip etmektedir. Gençlerde ise (15-24 yaş grubu) erkeklerde testis kanseri ve beyin sinir sistemi kanserlerinin, kadınlarda ise tiroid ve Hodgkin Hastalığının ön planda olduğu görülmektedir (Türkiye Kanser İstatistikleri 2016).

## **2.2. Kemoterapi**

Kemoterapi, hücre bölünmesini engellemek, tümör gelişimini baskılamak veya anormal hücreleri yok etmek amacıyla neoplastik hastalıkların tedavisinde cerrahi ve radyo terapi gibi ek tedavilerle birlikte veya tek başına kullanılabilen bir tedavi yöntemidir.

Kemoterapi terimi 1900'lerde Paul Ehrlich' in enfeksiyon hastalıklarını tedavi eden ilaç geliştirmesi ile ilk kez kullanılmıştır. Paul Ehrlich, kanser tedavisi için de özellikle alkilleyici ajanlarla çalışmalar yapmış, fakat olumlu sonuçlar elde edememiştir. 1935 yılında Murray Shear tarafından 3 000 den fazla bileşik test edilmiş, bunlardan sadece iki tanesinin tedavi edici özelliğe sahip olduğu belirlenmiş fakat kabul edilemez derecede toksik olmaları nedeniyle bu çalışma başarısızlıkla sonuçlanmıştır.

Kanserde kemoterapi kullanımı ise 20. yüzyılın ortalarında başlamıştır. Birinci dünya savaşı sonrasında yapılan araştırmalarda savaş boyunca kullanılan hardal gazına maruz kalan kişiler tespit edilmiş, buradan yola çıkılarak hardal gazının kan hücreleri gibi hızlı çoğalan hücreleri öldürücü etkisi olabileceği düşünülmüştür. Savaş sonrasında Alfred Gilman ve Louis Goodman tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda hardal gazının özellikle Non-Hodgkin Lenfoma üzerinde terapötik etkisi ortaya konulmuştur (DeVita 1978). Bu keşfin ardından hardal gazı ve benzeri ajanlarla yapılan çalışmalar artmış ve günümüzde kemoterapide kullanılan birçok antineoplastik ajan bulunmuştur.

### **2.2.1. Kemoterapide Kullanılan Antineoplastik İlaçların Sınıflandırılması ve Etki Mekanizmaları**

Alkilleyici ajanlar, kemoterapötiklerin içindeki en eski gruptur. İlk alkilleyici ajan I.Dünya Savaşı sonrasında bulunmuş ve kemoterapötik etkisi tespit edilmiştir. Günümüzde ise birçok alkilleyici ajan yer almaktadır (Corrie, Pippa 2008). Alkil grupları nedeniyle alkilleyici ajanlar olarak adlandırılmaktadırlar. Sahip oldukları aktif grubu DNA'ya kovalent bağlanarak antikanser etkisini meydana getirmektedir (Lind 2008). Alkilleyici ajanların, nitrojen mustardlar, nitrozoüreler, tetraziler aziridinler ve sisplatinler gibi, bazı alt grupları bulunmaktadır (Giorgi-Renault 1988). Nitrojen mustrad alt grubu, mekloretamin, siklofosfamid, melfatan, klorambusil, isofosfamid ve busulfan içerirken; Nitrozoüreazlar, karmustin, lomustin, semustin, streptozosin

içermektedir. Sisplatin ve türevleri ise sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin içermektedir (Damia 1998, Lind 2008).

Antimetabolitler, DNA ve RNA sentezini engelleyen moleküllerdir. DNA ve RNA'nın sentezlenmesini sağlayan substrat ve koenzim gibi rol oynayan doğal metabolitlerin benzerleridirler. Bu özellikleri nedeniyle enzim üzerinde kendilerine özgü noktalara karşı pürin ve pirimidinlerle yarışır ve bağlanmalarını inhibe ederek DNA ve RNA sentezini durdururlar. Döngüye özgü ilaçlardır. Antimetabolitler, anti-folatlar, fluoropirimidinler, deoksinükleosid analogları ve tiyopurin alt gruplarına ayrılmaktadır (Lind 2008). Fluoropirimidinler, flurourasil ve kapesitabin içerir. Deoksinükleosid analogları sitarabin, klofarabin, pentostatin ve desitabin içermektedir. Tiyopurin alt grupları ise tiyoguanin ve merkaptopurin içermektedir.

Anti-mikrotübüller, bitkisel kaynaklı, mikrotübül fonksiyonunu bozarak hücre bölünmesini engelleyen ajanlardır (Rowinsky, Donehower 1991). Mikrotübül disfonksiyonuna neden olan vinka alkaloidleri ve taksanlar gibi iki ana grup anti-mikrotübül ajan bulunmaktadır. Hücre bölünmesi sırasında metafazdaki hücreler üzerine spesifik etkileri vardır. *Vinca rosea*'dan elde edilen vinka alkaloidleri kanser hücrelerinin bölünmesinin tamamlanmasını engelleyerek, hücrenin apoptoza gitmesini sağlar (Lind 2008, Yue ve ark. 2010). Taksanlar grubundan kullanılan paclitaxel, *Taxus brevifolia*'dan, sınıfın en çok kullanılan ilacı docetaxel ise *Taxus baccata*'dan alınan ekstraktlardan üretilmektedir. Bu ilaçlar mikrotübülün stabilitesini sağlayarak, hücre bölünmesi sırasında kısıp, uzamasına engel olmaktadır. Ayrıca doctaxel S fazında, paclitaxel ise G<sub>2</sub> - M fazında etki göstermektedir (Yue ve ark. 2010).

Çeşitli mekanizmaları olan, bakterilerden elde edilen, sitotoksik etkiye sahip, birçok antibiyotik bulunmaktadır. Kemoterapide yaygın olan endikasyonları hücre bölünmesini engellemektir (Anonim 2008). Antrasiklin mekanizması, DNA interkalasyonu, serbest reaktif radikal üretimini ve topoizomeraaz inhibisyonunu içermektedir (Minotti 2004). Aktinomisin RNA sentezinin engellenmesine ve DNA interkalasyonuna neden olan, kompleks bir moleküldür (Sobell 1985). Bleomisin, *Streptomyces verticillus*'dan isole edilen, serbest radikal üreterek DNA hasarına yol açan bir glikopeptiddir. Mitomisin ise DNA'yı alkilleyebilme yeteneğine sahip sitotoksik bir antibiyotiktir (Verweij, Pinedo 1990).

### 2.2.2. Kemoterapide Kullanılan Antineoplastik İlaçların Yan Etkileri

Kanser kemoterapisinin esası; hastanın normal hücrelerine zarar vermeden tümör hücresinin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak, onları yok etmektir. Kanser tanısı konulan hastalarda, hastalığın seyrine göre bireysel tedavi şekilleri uygulanır. Hastalara ilaçlar intraarteriyel, intratekal, intraventiküler, intraplevral, intravesiküler, intravenöz ve oral yollar ile verilmektedir. Kemoterapide kullanılan ilaçlar farklı etki mekanizmasına sahip olduklarından bir ilaç yerine farklı ilaç kombinasyonları uygulanarak hem daha etkili bir tedavi gerçekleştirilmesi hem de oluşabilecek muhtemel yan etkilerin minimuma indirilmesi sağlanmaktadır (Dow ve Bamicle 1996).

Malign hücre ile normal insan hücresi arasında kalitatif bakımdan değil daha çok kantitatif yönden fark vardır. Bu nedenle antineoplastik ilaçların kanser hücresine karşı olan seçicilikleri, antibiyotiklerin bakteri hücresine karşı olan seçiciliklerinden daha azdır. Antineoplastik ilaçlar vücutta patolojik biçimde çoğalmakta olan kanser hücrelerini yok ettikleri gibi, hızlı biçimde çoğalan kan, saç, mukoza hücrelerini de yok ederler. Bu özelliklerinden dolayı kanser ilaçlarının normal hücre ve kan dokusu üzerinde birçok yan etkisi vardır.

Böbrek hücreleri, kan hücreleri gibi yüksek bölünme hızına sahip olmamasına rağmen, yüksek kan akımı ile karşılaşması, medüller interstisyumda toksinleri konsantre etme yeteneği nedeniyle toksik zedelenmeye oldukça duyarlıdır (Boogaard 1990). Sisplatin, siklofosfamid gibi kemoterapötik ajanların yüksek nefrotoksik etkileri bilinmektedir. Yaygın olarak kullanılan kanser ilaçlarının nefrotoksik etkisi; serum elektrolit dengesizliği, serum kreatinin artışı, glomerül filtrasyon hızının (GFH) azalması ve kalıcı böbrek yetmezliğine kadar ciddi boyutta olabilir (Fillastre 1998). Özellikle sisplatinin klinik kullanımını kısıtlayan en önemli yan etkisi nefrotoksisitesidir (Anand 1993). Bir çalışmada uygulanan sisplatinin ilk tedavi küründen sonra %25-35 akut tübüler nekroz geliştiği ve kümülatif renal yetmezlik oranının %20-25 olduğu bildirilmiştir. 12 aydan uzun süreli sisplatin tedavisinin sonucunda ise kalıcı böbrek hasarına yol açabileceğini bildirilmiştir (Dentino 1978). Bir diğer nefrotoksisiteye sahip olan ilaç, nitrojen mustard (azotlu hardal) tipi alkilleyici ilaçlardan Siklofosfamid'tir. DNA'ya bağlanıp alkilleşerek DNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunu bozar.

Hemorajik sistit, siklofosfamidin en önemli yan etkisidir. Uzun süreli veya yüksek doz siklofosfamid kullanımı sonrasında hastaların %40'ında hemorajik sistit geliştiği rapor edilmiştir (McEvoy 20014).

Kemoterapi nedeniyle hastaların %5-10'unda tedaviye bağlı akciğer hastalığı oluşmaktadır (Kalemci, Can, Sözen 2014). Bleomisin, en çok lenfomalar ve baş-boyun kanserlerinde kullanılan sitostatik bir antibiyotiktir. Deri ve akciğerde birikmesi nedeniyle genellikle tedaviden 1-6 ay sonra %3-40 oranında akciğer hasarı gelişimine neden olmaktadır (Lazo 1984). Mitomisin, pulmoner toksik reaksiyona sebep olma oranı % 3-12 arasında değişen alkilleyici sitotoksik bir antibiyotiktir. Vinka alkaloidler ile birlikte kullanımında akut bronkospazm gelişimi kaydedilmiştir (Castro ve ark. 1996). Siklofosfamid hematolojik malignitelerin, malign lenfomaların ve bazı solid tümörlerin tedavisinde kullanılan alkilleyici sitotoksik bir ajandır. Pulmoner toksisite oranı %1' den az olmasına rağmen, radyasyon veya diğer kemoterapötikler ile birlikte kullanımı toksisiteyi arttırmaktadır (Hamada ve ark. 2003).

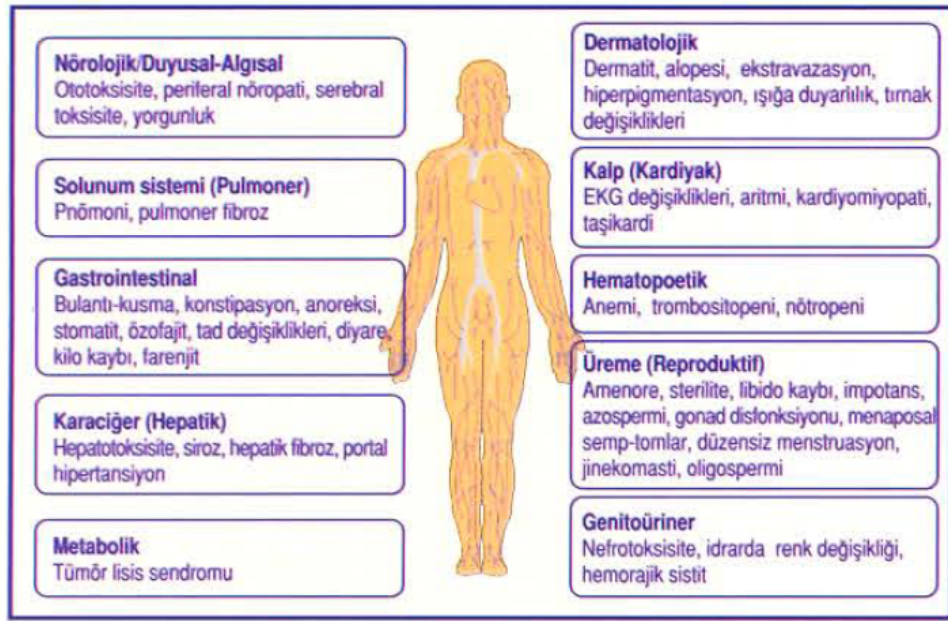
Deri hücreleri hızlı bölünme yeteneğine sahip hücreler olduğundan kemoterapötiklere karşı oldukça duyarlıdırlar. Kematerapötikler, deride %40-78 oranı ile en çok sitomatit ve alopesiye neden olmaktadır. Doksorubisin, mitomisin ve vinka alkaloidlerinin ciltte yüksek toksisiteye neden olduğu bilinmektedir (Alexandrescu ve ark. 2006).

Anti-kanser tedavisi sürecinde ortaya çıkan en ciddi komplikasyonlardan biri de kardiyovasküler toksisitedir. Antrasiklinler, mitksantron, siklofosfamid, ifosfamid, trozin kinaz inhibitörleri ve yeni monoklonal antikorlar kardiyovasküler sistem üzerine etkili en önemli kemoterapötiklerdendir. Bu ajanlar ciddi kardiyovasküler toksisiteye neden olmaktadır. Antrasiklin EKG değişiklikleri, ritim bozuklukları ve ventrikül disfonksiyonuna neden olabilmektedir (Alexandrescu ve ark. 2006, Kurkjian ve Özer 2008).

Kemoterapi uygulanan hastalarda periferik nöropatiye çok sık rastlanır. Vinkristinle yapılan kemoterapi hastalarında motor nöropati gözlenmiştir. Derin tendon refleksi kaybı, duyu hissinin azalması ve yanma distezisi de kemoterapötiklerin nörotoksik etkileri olarak ifade edilmektedir (Hildebrand 2006).

Siklofosfamidin bulanık görmeye neden olduğu bilinmektedir. Busulfanın uzun süreli kullanımında katarakt oluşabilmektedir. Lösemi tedavisinde kullanılan vinkristinin de korneal hipotezi ve optik nöropati gelişimine neden olduğu belirtilmiştir (Alexandrescu ve ark. 2006).

Bleomisin yüksek doz sisplatin ve karboplatin alan hastalarda trombotik mikroanjyopati gözlenmiştir. Miyeloma ve lenfoma tedavisinde kullanılan siklofosfamid, doksorubin gibi kemoterapötiklerin de trombotik ve embolik durumlara neden olduğu bilinmektedir (Alexandrescu ve ark. 2006).



**Şekil 2.2.2.** Kemoterapötik Ajanların Sistemik Yan Etkileri (Hemşirelik Eğitim ve Araştırma Dergisi, 2005)

### 2.2.3. Metal İçeren İlaçların DNA İle Etkileşimleri ve Redoks Yetenekleri

Metal iyonları ve kompleks bileşikler hücre bölünmesi, gen baskılaması, toksisite, kanserojenite gibi birçok biyokimyasal gelişmelerde anahtar rol oynamakta ve bu süreçleri etkilemektedir (Reedijk 2003). Metal komplekslerinin kimya ana bilim dallarındaki geniş kullanım alanlarının yanı sıra kompleks bileşiklerin tekstil sanayinde, endüstrideki kullanımı, tıpta, hastalıkların teşhisi ve tedavisinde kullanımı günümüzde oldukça yaygınlaşmıştır.

Birçok metal kompleksinin anti-viral, anti-bakteriyel ve anti-tümör etkisi olduğu bilinmektedir. Bu nedenle başta kanser tedavisinde olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde metal kompleksleri kullanılmaktadır. Farmakolojik çalışmalarda metal iyonların bazı maddeler ile oluşturdukları komplekslerin hem ilacın aktivitesini arttırdığı hem de ilacın olası yan etkisini azalttığı saptanmıştır.

Vücutta toksik düzeyde bulunan metallerin vücuttan atılması için de uygun ligandlar ile oluşturdukları komplekslerden yararlanılmaktadır (Arslan 2005). Metal bileşiklerinin tıp alanında kullanımı Mısırlıların 5000 yıl öncesinde suyun sterilizasyonunda bakırdan yararlanmalarına kadar gitmektedir (Sun ve ark. 2009). Ayrıca Çin'de de arsenik trioksit gibi arsenik içeren ilaçların romatoid hastalıklarda, frengi ve sedef hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Tapio ve Grosche 2006, Dilda ve Hogg 2007). 18. ve 19. yüzyıllarda arsenik trioksidin anti-kanser etkisi keşfedilip, özellikle lösemi tedavisinde ana etken olarak kullanılmıştır.

Modern anti-kanser ilaç potansiyeli bulunduran metal komplekslerinin keşfi 1960'larda Barnett Rosenberg'in platinum komplekslerinin hücre bölünmesini engellediğini bildirmesi ve potansiyel anti-kanser etkisinin ortaya konulmasıyla hız kazanmıştır (Rosenberg 1969). Platinum kompleksleri içerisinde özellikle sisplatin, karboplatin ve oksaplatinin özellikle testis, rahim, baş ve boyun, mesane ve akciğer kanserleri üzerindeki kemoterapötik yeteneği dikkat çekmektedir (Kelland 2007).

1940 ile 1953 yılları arasında Erwin Chargraff, Maurice Wilkins, Rosalind Franklin, Linus Pauling gibi birçok araştırmacı tarafından DNA'nın yapısını çözmek için araştırmalar yapılmıştır. 1953 yılında Watson ve Crick DNA'nın yapısına ait çalışmalarını yayınlamışlardır. Çalışmalarının sonucunda DNA'nın iki uzun polinükleotid zinciri, merkez eksen etrafında kıvrılarak sağ el ikili sarmal yapısını oluşturduklarını, antiparalel olan iki zincirin üzerinde hidrojen bağları ile bağlı azotlu bazlar yer aldığını, molekülün herhangi bir bölümünde eksen üzerinde sıra ile daha geniş olan büyük (majör) oluklar ve dar olan küçük (minör) oyuklar bulunduğunu belirtmişlerdir. DNA, tüm canlı organizmalarda ve bazı virüslerde biyolojik olayların gerçekleşmesini sağlayan bilgileri taşıyan bir makromoleküldür.



DNA, büyük ve karmaşık yapısı nedeniyle birçok potansiyel bağlanma bölgesine sahiptir. Küçük moleküllerin DNA'ya bağlanmalarının araştırılması son yıllarda ilgi çekmektedir (Maheswari 2004). Spesifik DNA hedefli ilaçların üretilmesi amacıyla sentezlenen moleküllerin DNA'ya bağlanma türünü belirlenmesi önem taşımaktadır. Moleküller DNA'ya interkalasyon, kovalent bağ, boşluk bağlayıcı ve elektrostatik olarak bağlanabilmektedir (Miao ve ark. 2009).

Platin-DNA etkileşiminin şekli ilk kez Roberts ve Pascoe tarafından ifade edilmiştir. Sisplatinin DNA etkinliğinin keşfedilmesinden sonra birçok platin kompleksi sentezlenmiş ve DNA etkileşimleri araştırılmıştır. Platin ve DNA arasındaki bu etkileşim sadece sisplatin kompleksleri için değil, tüm metal kompleksleri için de geçerli görülmektedir.

Anti-tümör etkinliği nedeniyle sıklıkla kullanılan sisplatin enjeksiyon ile hastanın kanına verilmektedir. Pasif difüzyon ile hücre içerisine taşınabilen sisplatin hücre içi klor derişimi sayesinde kolaylıkla hidroliz olabilmektedir (Gately ve Howell 1993). Hidroliz sonucu meydana gelen  $[Pt(NH_3)_2(OH)(OH_2)]^+$  iyonları DNA, RNA, protein gibi birçok hücrenel bileşen ile etkileşime girmektedir. Yapılan çeşitli araştırmalar DNA'nın sisplatinin en önemli hedefi olduğunu göstermektedir (Jamieson ve ark. 1999).

Platin türleri DNA ile koordinasyona girmekte ve özellikle guanin bölgesi ile etkileşime oluşan etkileşim sonucu DNA'nın yapısında 35-40°'lik bir bükülme olmaktadır (Takahara ve ark. 1996). Bunun sonucunda da DNA polimeraz ilerlemesi engellenmekte ve kanserli hücre ya da doku ölümü gerçekleşmektedir (Gelasco ve ark. 1998, Esteban-Fernandez ve ark. 2008).

Platin içeren ilaçların, aktif bir hidrolizasyon ürünü oluşturabilmeleri ve serum proteinlerine ya da kükürt içeren aminoasit/peptidlerle etkileşime girerek inaktif hale gelmemeleri DNA ile koordinasyon yapabilmeleri açısından çok önemlidir (Michalke 2010). Sisplatin başarılı sonuçlarının ardından inorganik kimyadan medikal alana oldukça sık yararlanılmaktadır. Cis-dikloroiddiamin platinum(II) kompleksinin uzun yıllardır en iyi kanser ilacı olarak kullanıldığı bilinmektedir. Platin içerikli ilaçların kanser tedavisinde kullanılması bu tür komplekslerin anti-tümör ajan olarak kullanılmasına öncülük etmiştir.

Kanser terapisinde kullanılan platinin yanı sıra, galyum ve arsenik kompleksleri, altın kompleksleri, bizmut kompleksleri ile yapılan çalışmalar da göze çarpmaktadır (Orvig 1999, Lippard 2006). Özellikle bakır içeren 1,10-fenantrolin metal komplekslerinin DNA ve RNA polimeraz aktivitesini inhibe ederek antitümör etki gösterdiği bilinmektedir.(Walaa ve ark. 2014).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ruthenium, altın, titanyum, bakır, paladyum, vanadium ve kobalt gibi metallere anti-kanser etkileri test edilmiş ve iyi sonuçlar elde edilmiştir (Eastman 1987, Clarke ve ark. 1999, Hartinger ve ark. 2006, Kostova 2006).

Kükürt içeren metal komplekslerinin fareler üzerinde yapılan in vivo araştırmalarda ascites carcinoma virüsüne karşı anti-kanser aktivitesinin oldukça yüksek olduğunu göstermiştir (Patel ve ark. 1989).

Titanium IV ve vanadium V kompleksleri yüksek aktiviteleri ve toksisiteyi azaltma yetenekleri nedeniyle anti-kanser ajanı olarak umut vaat etmektedir. Titanyum IV komplekslerinin hidrolitik kararsızlığı istenilen sonucun elde edilememesine neden olmaktadır. Bunu ortadan kaldırmak için su dayanıklılığı olan yüksek anti-kanser aktivitesine sahip ajanlar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Son yıllardaki çalışmalar da palladium (II) türevlerinin anti-tümör, DNA parçalama, DNA bağlama, anti-diyabetik, antioksidan özellikleri sayesinde anti-kanser aktivitesi gösterdiğini ortaya koymuştur (Caires 2007).

Caki-2, MCF-7, CaSki, NCI-H322M ve Co-115 insan kanser hücre hatlarında çinko (II) komplekslerinin DNA ya bağlandığını ve hidrojen peroksit varlığında DNA parçalanma aktivitesini etkilediği görülmektedir. Ayrıca anti-proliferasyon etkisi olduğu ve potansiyel antikanser ilacı olabileceği ön görülmektedir.

Düşük toksisiteye sahip olan bizmutun tıbbi alanda kullanımı dikkat çekmektedir. 17. yüzyılda frengi, 19. yüzyılda ise sindirim kanalı hastalıklarının tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan son çalışmalarda sentezlenen bizmut bileşikleri, in vitro koşullarda toksisiteye dirençli olan insan kanser hücreleri HeLa ve MCF-7 üzerinde uygulanmış ve etkili sonuçlar elde edilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada ise Gümüş (Ag) ve Altın(Au) bileşiklerinin anti-proliferatif etkisinin antineoplastik bir ajan olarak sıklıkla kullanılan 5-Fluorourasil (5FU)'in anti-proliferatif etkisinden daha yüksek olduğunu ve sitotoksik olarak daha etkili olduğu gösterilmiştir.

K562 lösemi hücreleri, ECV 304 endothelial hücreleri ve MNC normal mononükleer hücrelerine aynı dozlarda demir (III) ve nikel (II) kompleksleri uygulanarak yapılan çalışma sonucunda uygulanan demir (III) ve nikel (II)'nin K562 hücreleri için sitotoksik olduğu, diğer hücre hatları için sitotoksik olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar demir ve nikelin DNA'ya bağlanma yetenekleri nedeniyle seçici anti-lösemi etkileri olduğunu ve ilaç potansiyeli olabileceğini göstermektedir (Demirci ve ark.2015).

Çalışılan fosfin metal komplekslerinin  $[(PdCl_2(CH_2OH)_2PCH_2)_2NCH_3]$ ,  $[RuCl_2((CH_2OH)_2PCH_2)_2NCH_3)_2]$ ,  $[PtCl_2(Ph_2PCH_2)_2NCH_3]$  (timin)<sub>2</sub> K562 ve A549 hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri MTT testi ile araştırılmış, çalışma sonunda süreye ve doza bağlı sitotoksik etki gözlenmiş, apoptotik yola etki ettiği ortaya konmuş ve yeni fosfin komplekslerinin antitümör ajanı olma potansiyeli belirlenmiştir (Saygıdeğer ve ark. 2014).

Yeni sentezlenen bu potansiyel ilaçların sisplatine kıyasla daha yüksek verimli olması, tümör dokusuna karşı seçiciliğinin daha yüksek olması, geniş spektrumlu olması, toksisitesinin düşük olması, tümör hücresinin ilaca direncinin olmaması ve ağız yolu ile alımı gibi farmakolojik özelliklerinin iyileştirilmiş olması beklenmektedir.

Metal iyonlarının koordinasyon oluşturma ve redoks yeteneklerinin belirlenmesi metal içerikli ilaçların gelişmesini sağlamıştır (Rosenberg 1969). Metallerin en önemli karakteristik özelliklerinin başında redoks sürecinde yer almaları gelmektedir. Özellikle geçiş metal iyonları oksidasyon durumunu değiştirebilmektedir. Bu nedenle metal ve redoks dengesi sağlık ve yaşam için oldukça önemlidir.

Kanser hücreleri ile sağlıklı hücrelerin redoks metabolizmaları arasında belirgin fark bulunmaktadır. Tümör hücrelerinde yüksek miktarda ROS oluşumu, hipoksi ve yüksek metabolik aktivite gözlenmektedir (Trachootham 2009). Bu nedenle kanser hücrelerindeki redoks homeostasinin düzenlenmesi kanser tedavisinde önemli bir yaklaşım olarak yer almaktadır (Gupte ve Mumper 2009).

Kullanılan ve çalışılan kemoterapötik ilaçların çoğunda da hücrel redoks dengesi ile doğrudan etkileşim halinde olabilme potansiyeline sahip metal içerikli kompleksler tercih edilmektedir (Choi ve ark.1998, Alvarez ve ark. 2010).

## **2.3. Bakır**

### **2.3.1. Bakırın Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri**

Bakır, periyodik cetvelin 1B grubunda yer alan 29 atom numarasına sahip geçiş elementlerinden biridir. Dünyanın her yerinde yaygın olarak bulunan bakırın özellikle Kıbrıs'ta yoğun olarak elde edilmesi nedeniyle adının 'cyprium' kelimesinden türettiği bilinmektedir.

Araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar bakırın M.Ö. 8000 yılından beri varlığının bilindiğini göstermektedir. M.Ö. 3700 yıllarından sonra bakırdan tunç yapılmaya başlanmıştır.

Aktif bir metal olmadığından doğada serbest halde bulunabilen bakır, kırmızı renkte ve kolayca işlenebilir özelliktedir. Normal şartlar altında bakır kuru havadan etkilenmez fakat ısıtıldığında nem ve karbondioksitin katalitik etkisi sonucu oksitlenir, yüzeyinin zehirli ve yeşil renkli bakır karbon tabakası kaplayarak dış etkenlerden kendini koruyabilmektedir. Bakırın; alaşım oluşturabilmesi, elektriği iyi iletmesi ve dünyanın her yerinde bulunması en dikkat çekici özellikleri arasında gösterilmektedir.

### **2.3.2. İnsan Sağlığında Bakırın Biyolojik Önemi**

Bakır tüm canlılar için esansiyeldir. Yapılan çalışmalar sonucunda bakırın insan ve hayvanlar için önemi anlaşılmıştır. Doğada oldukça fazla bulunan bu elementin alımı için insanlar mekanizmalar geliştirmişlerdir.

Bakır vücutta üretilip, depolanmadığından vücudun günlük bakır gereksinimi besin ve sudan sağlanmaktadır. Bazı besinler özellikle fındık, kaju fıstığı, haşhaş ve ayçiçeği tohumları ve nohut bakır bakımından oldukça zengindir. Bu tür tahıl, et ve balık içeren dengeli beslenme ile vücudun bakır dengesi korunabilmektedir.

Vücuttaki bütün hücreler bakıra ihtiyaç duymaktadır. Bakır, demir ve çinkodan sonra vücutta bulunan üçüncü en önemli esansiyel elementtir (Cavdar 2000). Demir ve çinko ile birlikte bakır da vücudumuzun homeostazisini sağlayan en önemli elementlerden biridir. Cuprous ( $Cu^{+1}$ ) ve cupric form ( $Cu^{+2}$ ) olmak üzere insan vücudunda iki farklı formda bulunmaktadır (Aksoy 2008, Gropper ve ark. 2009).

Fetal gelişimden yaşlılığa kadar bakır vücut sağlığı için hayati önem taşır. Bakır olmadan beyin, sinir sistemi ve kardiyovasküler sistemin fonksiyonlarını yerine getiremeyeceği bilinmektedir (Rajeswari ve Swaminathan 2014).

Bakır özellikle hamile kadınlar, fetüs gelişimi ve yeni doğan bebekler içinde önemli bir besindir. Sağlıklı yetişkin bir insanda (yaklaşık 70 kg) ortalama 100 mg bakır bulunur (Bonham 2002). Bakır, protein veya organik bileşiklere bağlı olarak bulunup insan vücudundaki tüm organ ve dokularda görev almaktadır. Vücutta en fazla böbrek, karaciğer, beyin ve kalpte bakır bulunmaktadır. Bunun yanı sıra çinko gibi saçta da yer aldığı bilinmektedir (Aksoy 2008, Baysal 2007, King 2000, Luza ve Speisky 1996). Terleme ile kaybedilen günlük bakır miktarı 0,3 mg dır (Jacob 1981).

Tavsiye edilen günlük bakır ihtiyacı yetişkinler için 1-2 mg, çocuklar içinse 0,5-1 mg arasındadır. Bu değerler kişilerin yaşına, yaptıkları egzersizlere ve beslenme alışkanlıklarına göre değişebilmektedir (Underwood 1971). Yemeklerden elde edilen organik bakır karaciğer tarafından işlenir ve taşınır (Şekil 2.3.2). İçilen sudan veya bakır takviyelerinden alınan inorganik serbest bakır karaciğere uğramadan doğrudan kana ulaşır (Brewer ve ark. 2009). Ortalama 1,5 mg civarında olan günlük bakır alımının %50'si mide ve ince bağırsak tarafından absorbe edilir. Absorbe edilen bakır portal kanda bağlı olan albümine taşınır ve seruloplazmine bağlı olarak periferel dokulara iletilir (Gaw ve ark. 2008).

İnsan ve hayvanlar için esansiyel bir element olan bakır birçok redoks enzimi için kofaktör görevi yaparken, seruloplazmin yapısına da katılır (Çizelge 2.3.2.). Ayrıca antioksidan mekanizması, nöropeptid sentezi ve immün sistemindeki fonksiyonları gibi birçok biyolojik süreçte yer alır (Uriu-Adams 2005). 1928 yılında sağlıklı farelerin hemoglobin sentezi için bakır ve demir gerekli olduğu keşfedilmiştir (Hart 1928). 1936 da Tompsett tarafından bildirilen ilk bakır denge çalışmasında insanlardan dışkı, idrar deri ve tükürük olarak günde yaklaşık 2- 2,5 mg bakır atıldığı belirlenmiştir.

Addison hastalığı, aplastik anemi, bazı karsinomalar, merkezi sinir sistemi bozuklukları, kollajen hasarları, diyabet, hodgkin hastalığı, hipertiroidizm, şizofreni ve talasemi gibi birçok hastalığın bakır seviyeleri, insan sağlığında bakırın önemini göstermektedir (Haris 1983).

Bakır bağışıklık sisteminin gelişimi ve etkinliği açısından oldukça önemlidir. Eksikliğinde başta insan olmak üzere fare, sığır ve koyunlarda bağışıklık sistemi sorunlarına neden olduğu belirtilmiştir (Hagenfeldt 1972). Bakır, hemoglobin değişimleri, ilaç metabolizması, karbonhidrat metabolizması, kollajen, elastin ve keratin çapraz bağlanması ve antioksidan savunma mekanizmasında yer alan birçok metalloenzim yapısında yer alır (Brewer 2009).

Bakır içeren enzimlerin biyolojik fonksiyonları bakırın canlılar için önemini ortaya koymaktadır. Bakır içeren enzimler, oksijen ve elektron taşınması kataliz tepkimeleri ve oksijen radikallerinin oluştuğu hasara karşı hücrenin korunması gibi birçok metabolik olayda yer almaktadır (Harris 1983). Ayrıca sitokrom c oksidaz, süper oksitdismutaz, monoamin oksidaz ve dopamin beta monoksidaz gibi bakır bağımlı enzimler reaktif oksijen türevlerinin azaltılmasına olanak verir. Sitokrom c oksidaz biyokimyasal reaksiyonlar için gerekli olan enerjinin üretiminde görev almaktadır. Dopamin beta hidroksilaz, dopaminin sinir uyarılarının iletiminde hayati önemi olan nöradrenaline dönüşmesini sağlamaktadır. Lizil oksidaz enzimi, bağ dokusunun yapı, bakım veya onarımında rol oynayan kollagen ve elastin polipeptidlerinin çapraz bağlanmasını sağlamaktadır (Harris 1980). Süperoksit dizmutaz enziminin insanda Cu-Zn ve Mn içeren iki izomer tipi yer almaktadır. Süperoksit serbest radikalının hidrojen peroksit ve oksijene dönüşmesini sağlayarak lipid peroksidasyonu gibi reaksiyonlara karşı hücreyi korumaktadır (Hosni 1980). İnsanlarda bakır eksikliği semptomların arasında hipokromik anemi, lökopeni ve osteoporosis yer alır (Tapiero ve ark. 2003).

Bakır ayrıca DNA hasar onarımını inhibe edici rol oynayabilmektedir (Rouzer 2010). Cu aynı zamanda ROS u arttırarak, lipid, DNA ve proteinlerde oksidatif hasar oluşturur (Hedera 2009). Birçok etki membran veya makromoleküllerdeki oksidatif hasar ile ilişkilidir. Esansiyel bir metal olmasına rağmen yüksek miktarda bakır kolaylıkla fenton redoks reaksiyonuna girip hücrelerde oksidatif hasar meydana getirebilir (Turnlund 2005).

Bakırın büyük miktarda reaktif oksijen türevleri üretme kapasitesi göz önüne alındığında, oksidatif stres kaynaklı sağlık bozukluklarına bakırın neden olduğu sonucuna ulaşmak mümkündür (Gaetke ve Chow 2003).

Bakırın homeostatik mekanizmalarda rolü olmasına rağmen karaciğer böbrek hasarlarına ve anemiye neden olduğu ve immünotoksik etkileri olduğu bilinmektedir (Bonham ve ark. 2002). Özellikle bakır ve çinko gibi elementlerin testesteron sentezini etkilediği bilinmektedir (Chang ve ark. 2011). Hipgonadizm testesteron eksiliği sonucu meydana gelmektedir.

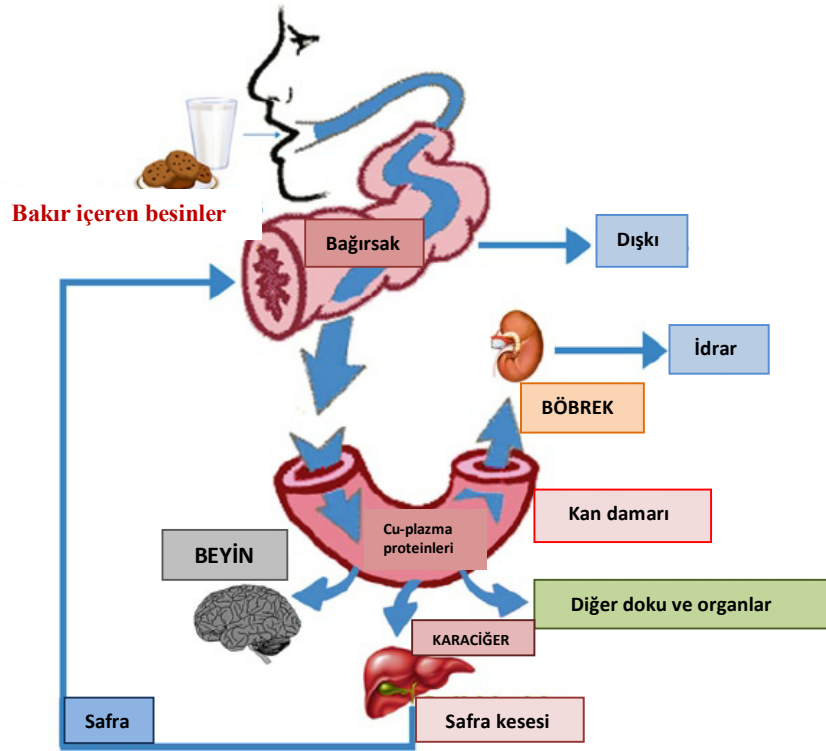
Orta ve ileriki yaşlarda ortaya çıkan alzheimer hastalığının nedeni tam olarak bilinmese de kalıtsal faktörler, düşük sosyal yaşam, kafa travması sebepleri üzerinde durulmaktadır. Metallerin de hastalığın oluşumunda etkisi olduğu bilinmektedir (Choo ve ark. 2013). Özellikle serbest radikal oluşumunda etkili olan bakırın alzheimer hastalığının patogenezinde önemli rolü olduğu kanıtlanmıştır. Serbest bakırın ortamın asit-baz dengesiyle bağlantılı olarak beta-amiloid agregasyonunu indüklediği ve alzheimer hastalığında patolojik yapıların yoğun olduğu bölgelerde özellikle amiloid plakların çevresinde bakır düzeylerinin arttığı saptanmıştır.

Bakır eksikliğine bağlı oluşan en bilinen durumlardan biri de Wilson hastalığıdır. Karaciğerden safra kanalına bakır transferinde rol oynayan ATP7B gende oluşan mutasyon nedeniyle karaciğerdeki bakır seviyesinin artmasına ve serumdaki bakır seviyesinin düşmesine neden olarak karaciğer ve beyinde bakır birikimine sebebiyet veren kalıtsal bir hastalıktır. Genetik testlerle tanısı oldukça zor olmaktadır. Fakat son yıllarda Relative Exchangeable Cooper (REC) Wilson hastalığı için oldukça güvenilir bir marker olarak tanımlanmaktadır (Schmitt ve ark. 2013).

Anemi, nötropeni ve kemik iliği displazi etiyolojisinde bakır eksikliğinin etkili olduğu bilinmektedir. Bakır eksikliği hematopoetik progenitör hücrelerin kendini yenilemesi ve farklılaşmasının engellemesine neden olur. Birçok lökopeni ve anemi teşhisi sırasında bakır seviyesi ölçülmektedir (Lazarchick 2012). Gastrointestinal hastalıkları olan hastalarda bakır seviyesi ölçülmüş ve bakır takviyesinden önce progenitör hücre miktarının oldukça korunduğu gözlenmiştir (Hirase ve ark. 1992, Thomas ve ark. 2007). Yine de nötropeni ve anemi üzerindeki bakır eksikliğinin mekanizması yeterli kadar rapor edilmediğinden tam olarak bilinmemektedir.

Karaciğer sirozu ve komplikasyonlarının patogeneğinde eser elementlerin rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Buna rağmen çinko, manganez, magnezyum ve bakır gibi eser elementlerin karaciğer sirozu ve komplikasyonları ile ilgisinin araştırılmasına devam edilmektedir. Birçok bilim adamı tarafından bakırın oksidatif hasara neden olduğu kabul edilmektedir. Manganez üre metabolizmasında önemli rol oynayan bir enzim olan arginazın yapısal bir parçasıdır. Özellikle krebs döngüsünde yer alan çok sayıda enzimin aktivatörü olarak görev yapmaktadır.

Karaciğerdeki bakır ve idrar yolu ile demir, çinko ve bakır atılımı kronik alkolik karaciğer hastalığının şiddeti ile ilişkilendirilmektedir. Düşük manganez atılımının karaciğerde manganez birikimine neden olduğu bilinmektedir. Kronik alkoliklerde yetersiz beslenme görülmektedir. Hem yetersiz beslenme hem de etanol alımı çinko ve bakır metabolizmasında değişikliklere neden olmaktadır (Rodríguez-Moreno ve ark. 1997).



Şekil 2.3.2. Bakırın vücut içine alımı-atılımı (anonim).



ENZİM / PROTEİN	FONKSİYON
Sitokrom c oksidaz	Enerji üretimi
Süperoksid dismutaz (Cu- Zn SOD)	Serbest radikal hasarına karşı koruma
Lizil oksidaz	Kollajen ve elastinin çapraz bağlanması
Dopamin beta mono- oksijenaz	Nörotransmisyon
Amin oksidaz	Hormon removal
Mono- oksijenaz	Melanin oluşumu
Askorbat oksidaz	Askorbatın oksidasyonu
Serüloplazmin	Bakır ve demir transportu
Galaktoz oksidaz	Primer alkollerin aldehite oksidasyonu
Tirosinaz	Pigmentasyon

**Çizelge 2.3.2.** Bazı bakır içeren enzimler ve fonksiyonları (Balamurugan ve Schaffner 2006, Zatta ve Frank 2007).

### 2.3. Bakırın Antikanser İlaç Potansiyeli

Spesifik hedeflere karşı yüksek aktiviteye sahip olduğu bilinen çeşitli metal komplekslerinin ilaç olarak kullanımı çalışılmaktadır (Moriuchi ve ark. 1999). Yaygın olarak çalışılan metal komplekslerinden olan bakır biyoesansiyel ve biyo-uygun bir metaldir (Fei ve ark. 2014). Çeşitli metaloenzimlerin kofaktörü olması nedeniyle bakır (II) insan metabolizması için oldukça önemlidir. Bütün biyolojik sistemde yaygın olarak bulunan bakırın, sentezlenen bakır komplekslerinin de biyolojik etkinliği bakımından geniş spektruma sahip olduğu bilinmektedir.

Kanser hücre membranlarının seçici geçirgen özelliği nedeniyle tümör hücrelerinde bakır birikir. Bu nedenle birçok bakır kompleksinin antikanser aktivitesi çalışılmaktadır (Marzano ve ark. 2009). Birçok araştırma bakır komplekslerinin hücrel aktiviteyi inhibe etme potansiyelini ve apoptozu teşvik ettiğini göstermektedir (Marzano 2006, 2008, 2009).

Bazı araştırmacılar bakır komplekslerinin sadece solid tümörlerin büyümesini ve metastazını inhibe ederek tedavi etmesinin yanında aynı zamanda hayatta kalma olasılığını da arttırdığını ortaya koymuşlardır (Cerchiaro 2005). Yapılan birçok araştırmaya göre bakır (II) komplekslerinin antikanser ve sitotoksik etkileri, bakır (II) komplekslerinin kanser tedavisinde umut vaat edici bir aday olduklarını ortaya

koymaktadır. İnsan göğüs kanser hücreleri MCF-7 (Puszyńska-Tuszkano 2011), insan karaciğer kanser hücreleri Hep-G2 (Thati 2007), insan böbrek kanser hücreleri A-498 (Ma 2010), insan rahim ağzı kanser hücreleri Hela (Kumbhar 2012) gibi insan kanser hücreleri ile gerçekleştirilen araştırmalar bakırın antitümör aktivitesini göstermektedir.

Gokhale ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada, sentezlenen cis-[dikloro(N1-(2-benzyloxybenzylidene)pyridine-2-carboxamidrazone) bakır (II)] kompleksinin doğal kristal yapısını incelemiştir. Bakır kompleksinin antitümör aktivitesi insan göğüs kanser hücre hattında (MCF-7) MTT testi ile belirlenmiştir. Düşük konsantrasyonlarda kompleks hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu çalışmada bakır kompleksinin IC<sub>50</sub> değeri ligandın değerinden dört kat daha az olarak 3 µM bulunmuştur. Bu sonuç, bakır bağlı ligand kompleksinin potansiyel antiproliferatif aktivitesini göstermektedir.

Zhao ve ark., CoNHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N=CHPy (L) (Py = pyridine) schiff bazlı liganda Pt(II), Pd(II), Hg(II) ve Cu(II) bağlanmış komplekslerin iki insan kanser hattı T-lenfositik lösemi hücreleri MOLT-4 ve insan göğüs kanseri hücreleri MCF-7 üzerindeki antikanser potansiyelini araştırmışlardır. Çalışılan bileşikler içerisinde bakır kompleksinin antikanser aktivitesine sahip olduğu ve sudaki yüksek çözünürlüğü gösterilmiştir. Yapılan deney sonucuna göre MCF-7 hücre hattındaki IC<sub>50</sub> değeri 73,1 µM olarak bulunmuş ve bu değerın sisplatinin IC<sub>50</sub> değerinden (125µM) daha düşük olduğu belirlenmiştir. Çalışmaya göre bakır kompleksinin antikanser potansiyeli olduğu ve sitotoksik aktivitesinin sisplatin ile kıyaslanabilir düzeyde olduğu gösterilmiştir.

Puszko ve arkadaşları 2-Methyl-4-nitropyridine N-oxide (L1); 2,6-dimethyl-4-nitropyridine N-oxide (L2); 2,3,6-trimethyl-4-nitropyridine N-oxide (L3) olmak üzere üç farklı ligand bağlı mononükleer bakır(II) kompleksi sentezlemiş ve çalışmıştır. Sentezlenen serbest ligand ve bakır komplekslerinin antiproliferatif aktiviteleri MCF-7 ve SW-707 hücre hatlarında in vitro olarak test edilmiştir. Elde edilen IC<sub>50</sub> sonuçlarına göre metil gruplarının sayısındaki artış komplekslerin ve serbest ligandların aktivitelerinde düşüşe neden olmaktadır. Bu sonuçlar metil grubu içersin ya da içermesin komplekslerin dikkat çekici sitotoksik etkileri olduğunu göstermektedir.

Ghosh ve ark., [Cu(Pyimpy)(H<sub>2</sub>O)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, [Cu(Pyimpy)<sub>2</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, [Cu(Pyimpy)(Cl)<sub>2</sub>].2H<sub>2</sub>O, [Cu(Pyimpy)(N<sub>3</sub>)(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] ve [Cu(Pyimpy)(SCN)(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>]

olmak üzere beş farklı bakır kompleksi sentezlemiş ve MCF-7, PC-3, HEK-293 hücre hatları üzerinde araştırmalar yapmıştır. Suda çözünebilen kompleks 1 ve 3'ün süperoksit engelleme özelliği incelenmiştir. Çalışılan beş kompleksin de sitotoksik etkisinin sisplatine göre daha yüksek olduğu, kompleksler içinde ise kompleks 3'ün MCF-7, PC-3 ve HEK-293 üzerinde en yüksek etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Zhong-Ying ve ark.  $[\text{CuII}(5\text{-Cl-pap})(\text{OAc})(\text{H}_2\text{O})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  genel formülüne sahip bir bakır kompleksi sentezlemiş ve hücre canlılığını insan göğüs kanseri hücre hattı (MCF-7) üzerinde MTT testi uygulayarak araştırmışlardır. 24 ve 48 saat sonunda elde edilen  $\text{IC}_{50}$  değerleri sırasıyla 20.7  $\mu\text{M}$  ve 9.8  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur. Aynı hücre hattında sisplatinin 24 ve 48 saat sonundaki  $\text{IC}_{50}$  değerleri ise sırasıyla 25.0  $\mu\text{M}$  ve 10.8  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar bakır kompleksinin MCF-7 hücrelerini inhibe ettiğini ifade etmektedir. Sentezlenen bakır kompleksinin MCF-7 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisi klonojenik test ile değerlendirilmiş ve MCF-7 hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği belirlenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda bu çalışma bakır kompleksinin MCF-7 göğüs kanseri hücreleri üzerinde anti-tümör etkisi olabileceğini göstermektedir.

Lin ve ark.(2015) Hela ve Hep-G2 hücrelerinde sentezledikleri 1,2-Bisbenzimidazole-phenyl Cu(II) kompleksinin anti-kanser aktivitesini in vitro olarak çalışmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre bakır (II) kompleksinin güçlü derecede hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir.

### 2.3.3. Bakır ve Fenantrolin

Fenantrolin organik çözücülerde çözülebilen heterosiklik organik bir bileşiktir (Luman ve Castellano 2003). Yıllardır fenantrolinden, yapısal ve kimyasal özelliklerin en iyi kombinasyonunu oluşturmak için kimyasal çok amaçlı bir esas kısım olarak yararlanılmaktadır (Sammes ve Yahioğlu, 1994). 1,10-fenantrolin şelat yapıcı olarak görev yapan bir N-heterosiklidir. 1,10-fenantrolinin metal şelat özellikleri dışında, metaloenzimlerin uygulamalarında, supramoleküler ve anti-kanser özellikler gösteren metal kompleksler hazırlamak için yapılan yeni çalışmalara da olanak sağlamaktadır.

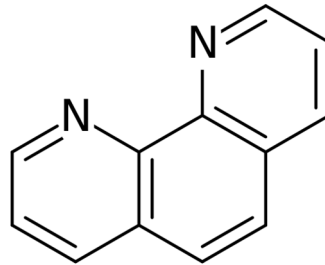
1,10-fenantrolin çok dişli ligand özelliği gösterdiğinden, geçiş metalleri ve alkali metallerin pek çoğu ile kararlı koordinasyon bileşikleri oluşturduğundan literatürde çok sık çalışılmaktadır. 1,10-fenantrolin ve türevleri ligand olarak biyokimya

çalışmalarında, metaloenzimlerin inhibisyonlarında, yüksek oksidasyon-redüksiyon potansiyeline sahip olmaları nedeniyle analitik kimyada yaygın olarak kullanılmakta ve özellikle demir iyonlarını tanımda reaktif olarak ve biyo-organik araştırmaların gelişimi için yararlanılmaktadır (Chao, H. 1999). Fenantrolin içeren bileşiklerin crown eter gibi makrosiklik özellikteki yapılarla birleştirilmeleri sonucunda değişik metallere bu ligandların oluşturdukları kompleksler redoks, fotoredoks ve katalizör olarak başlatıcı özellik taşımaktadır (Angeloff, A. 2000).

Son yıllarda yapılan çalışmalar içerisinde en çok dikkati kimyasal nükleaz fonksiyonu nedeniyle 1,10-fenantrolin ile bakır (II) metal kompleksleri çekmektedir. 1,10-fenantrolinin sahip olduğu düzeysel yapı ona DNA ve RNA'ya bağlanmayı kolaylaştırmaktadır. Sigman ve ark. göre,  $[Cu(1,10-phen)_2]^{2+}$ , tiyol veya  $H_2O_2$  varlığında  $Cu^{+}$  ya indirgenerek, ROS oluşumunu katalize eder ve DNA'nın tesadüfi kesilmesine sebep olur.

$Cu^{+2}$  1,10-fenantrolin içeren komplekslerin tedavi edici potansiyeli sürekli geliştirilmektedir (Tardito ve Marchio, 2009). Spesifik bir bakır şelatörü olan 2,9-Dimetil-1,10-fenantrolin (2,9-DMP), ile yapılan in vitro çalışmada L1210 hücrelerine karşı sitotoksik potansiyeli olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda ise bakır-2,9-DMP'nin P388 murin lenfoma'ya karşı etkileyici bir kemoterapötik aktivitesi olduğu gösterilmiştir (Mohindru 1983).

Ayrıca bakır ve fenantrolin kompleksleri ve benzer türevleri anti-tümör, anti-viral ve kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi gibi önemli özellikleri nedeniyle çalışılmaya devam edilmektedir (Roy, S. 2010).



**Şekil 2.3.3.** 1,10-fenantrolinin kimyasal yapısı.

## 2.4. Glutamin

### 2.4.1. Glutaminin Biyolojik Önemi

Vücutta en bol bulunan aminoasit glutamindir. Glutamin, bir amino ve bir amid grubundan oluşur (Souba 1987). Glutamin sentetaz (GS) enzim aktivitesi sayesinde glutamat ve amonyak birleşimiyle meydana gelmektedir (Austgen ve ark. 1992). Memelilerin kanında 0,6-09 mmol/l, iskelet kasında ise en fazla 20 mmol/L glutamin bulunabilmektedir. Glutamin serbest olarak kanda, iskelet sisteminde depo edilmiş formda ve küçük miktarlarda da akciğer ve beyin gibi organlarda bulunmaktadır (Newsholme ve ark. 2003). İskelet kası içerisindeki serbest aminoasit havuzunun %60'ını glutamin oluşturmaktadır (Bergstrom ve ark. 1974). Geleneksel batı diyetinde günlük alınması gereken glutamin miktarı 10g'dan az olmamalıdır. Çeşitli hastalıklar, stres, kanser gibi glutamin üretimini etkileyecek bir etken olmadığı durumlarda vücuttaki glutamin konsantrasyonu belirli bir seviyede tutulmaktadır. Böyle durumlarda alınacak glutamin miktarı 20-40 g arasında değişebilmektedir (Ziegler ve ark. 1990). Bu seviyenin korunmasında glutamin alımı ve atılımı vücuttaki çeşitli organlar tarafından sağlanmaktadır. İnce bağırsak, post-absorpsiyonda glutamin alımından birincil sorumlu organdır. Karaciğer, glutamin üretici veya tüketici olarak görev yapabilmektedir. Böbreklerde ise glutamin tüketimi sadece asidoz sırasında kayda değer seviyeye gelmektedir.

Glutamin, protein sentezi, hücresel enerji homeostazisi, purin sentezi, sitrik ve trikarboksilik ait (TCA) döngüsü gibi çeşitli biyokimyasal fonksiyonların merkezinde yer almaktadır. Glutamin, transaminasyon boyunca diğer amino asitlerden alfa amino nitrojenin ayrılması için gereklidir. Glikojen sentezinin sitümulasyonunda rol almaktadır (Berman ve ark. 1998, Hubbard ve Cohen 1993). Ayrıca glutamin, hücre ve dokuların büyümesini sağlayan oksidatif bir yakıttır (newsholme ve ark. 2003). Amonyagin periferel dokulardan organlara taşınmasında bir araç gibi görev yapmaktadır. Fizyolojik olarak glutamin ince bağırsakta ve böbrek epitelyum hücrelerinde asit-baz dengesini düzenlemek için kullanılır (Brosnan 2003). Fakat bağışıklık sisteminde yer alan hücrelerin ve kanser hücrelerinin çeşitli metabolik aktiviteleri için büyük miktarda glutamin kullanıcıları olduğu bilinmektedir (Yuneva ve ark. 2007).

Hepatositler, vücudun metabolik olaylarında kullanılması için glutamin üretmektedirler (Brosnan 2003). Glutamin, glutasyon seviyesini yükselterek antioksidan savunma mekanizmasında ve reaktif oksijen türevlerini (ROS) azaltarak hücrelerin oksidatif stresten korunmasında kullanılmaktadır (Hu ve ark. 2010, Le ve ark. 2012).

Son yıllarda yoğun fiziksel aktivitelerde, vücut geliştirmede kas kütlesinin artmasını sağlamak için takviye besin olarak alınmaktadır. Ayrıca bağışıklık sisteminin korunması, sindirim sisteminin düzgün çalışması, pürin pirimidin sentezine öncü olmaları kas üretiminin sağlanması ve diğer vücut fonksiyonlarında görev almaktadır. Glutamin eksikliğinin özellikle bağışıklık sistemini olumsuz etkilediği ve enfeksiyonlara karşı vücut direncini azalttığı bilinmektedir. Crohn hastalığı, ülser gibi bağırsak iç çeperi zarar gören hastalarda tedavi amacıyla kullanılmaktadır.

#### **2.4.2. Glutamin ve kanser**

Kanser hücre metabolizması, büyüme ve proliferasyon olarak ifade edilmektedir. 1920'li yıllarda Otto Warburg tarafından kanser hücre metabolizması ile normal hücre metabolizması arasındaki fark belirlenmiştir (Kroemer ve Pouyssegur 2008). Sonraki yıllarda bu iki hücre metabolizması arasındaki fark 'Warburg Fenomeni' olarak adlandırılmıştır. Warburg fenomenine göre, normal hücreler sadece anaerobik şartlarda glikolizis yolağını kullanarak laktat üretmektedir. Tümör hücreleri ise temel besin olarak glukozu kullanıp, aerobik şartlar altında glikolizis yaparak laktat üretmektedir. Birçok tümör hücresi aerobik glikolizi kullanmasına rağmen, bazı tümör hücreleri de besinleri oksidatif fosforilasyonla metabolize eder (VanderHeiden 2011). Bu yollarla kullanılan glukozun kanser hücreleri için tek besin kaynağı olmadığı, yapılan çalışmalarla kanserli hücrelerin glutamini kullandıkları belirlenmiştir.

Sanford Burnham Tıp Araştırmaları Enstitüsü'nde yapılan bir çalışmada araştırmacılar yeterli glutamin bulunmadığında melanom hücrelerinin çoğalmasının durduğunu ve öldüklerini keşfetmişlerdir. Bu çalışma ile araştırmacılar ilk kez glutaminin, melanom hücreleri tarafından nasıl metabolize edildiğini ve glutamine karşı isteklerinin TCA döngüsüyle nasıl ilerlediğini göstermişlerdir. Glutamin, TCA döngüsünün bir bileşeni olan  $\alpha$ -ketoglutarat'a metabolize olmaktadır. Enerji elde edebilmek için sitoplazmadaki

glukolizis dzenlenmesi ve mitokondrideki oksidatif metabolizmasının tmr hcrelerinde nasıl dengelendiği tam olarak bilinmemektedir (Wang 2010).

Normal hcrelerdeki glutaminin sahip olduğu fizyolojik ve metabolik rolleri, neoplastik transformasyon ve kanser sreci iin yol gsterici olmaktadır. Kanser hcrelerindeki glutamin metabolizmasının çalışılması ve aydınlatılması, kanser araştırmaları içerisinde en aktif alanlardan biri olarak yer almaktadır. Son zamanlarda yapılan araştırmalara göre kanser hcrelerinin enerji metabolizmaları ve hcre içi glutamin kullanımındaki değişiklikler malignant bir fenotipi işaret etmektedir. Melanom hcrelerinin glutamine duydukları ihtiyaç normal melanositlerin besin gereksinimlerinden farklıdır ve sağlıklı melanositleri tmrrijenik hale gelecek şekilde dönüştüren BRAF, NRAS ve p53 gibi DNA mutasyonlarından tamamen bağımsızdır. Yapılan alışma ile melanom hcre dizileri ile metabolomik teknolojinin kombinasyonunu kullanarak glutamin ve glutamin türevlerinin TCA döngüsüne hem giriş hem de çıkışını yöneten ana enzim yolları ortaya konmuştur. Bu bulgular, potansiyel olarak besinsel müdahaleler veya glutamin alım inhibitörleri yoluyla tmrlere glutamin rezervini sınırlayan bir tedavi stratejisi için rasyonel gerekçeyi ortaya koymaktadır.

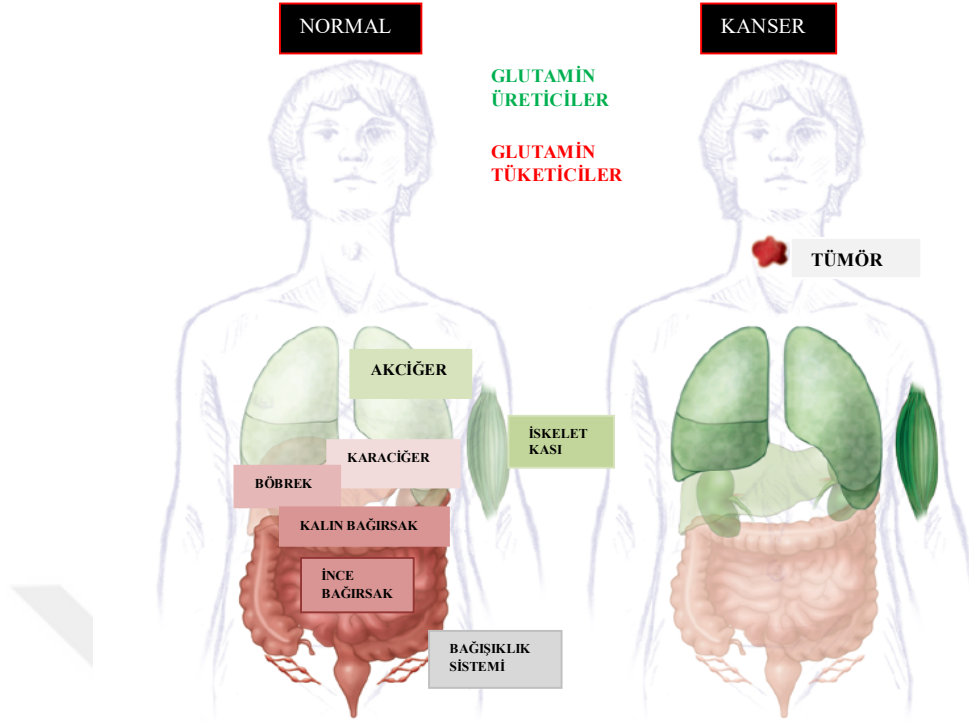
oğalmakta olan kanser hcreleri normal hcreler ile glutamin için rekabet etmektedir (Medina ve ark. 1992). Bu da glutamin metabolizmasındaki belirgin değişikliklerin tmr gelişimine işaret olabileceğini göstermektedir. Hastalığın erken teşhisi ve hastaya doğru tedavi uygulanmasına olanak vermektedir. Normal hcre ve kanser hcreleri arasındaki glutamin için yapılan rekabet ve in vitro kültürde büyüyen kanser hcrelerinin glutamin gereksinimi, kanser hcre proliferasyonunda glutaminin ana enerji kaynağı rolü olduğuna dair ampirik kanıt niteliği taşımaktadır. Fibrosarkomalarla yapılan in vivo çalışmalarda normal hcrelere kıyasla kanser hcrelerinin 5-10 kat yüksek glutamin tüketimi olduğu gösterilmiştir (Bode ve ark. 1995). Kanser hcrelerinde metabolizmanın yeniden programlanması glutamin alımını ve kullanımını kolaylaştırmaktadır. Hcre replikasyonu ve büyümesi için gerekli metabolik ara maddelerin üretilmesinin ilk adımlarından biri glutamini, glutamat ve amonyağa dönüştüren fosfat bağlı glutaminaz'dir. Glutaminolizisin meydana gelmesini sağlayan çoğalan kanser hcreleri için gerekli metabolik ara maddelerin üretimini teşvik etmektedir. Hcresel uyarıların A dizisi, kanser hcrelerine glutamin bulunmasını sağlamaktadır. Bu sistemler membran taşıyıcı sistemleri, sistem A, sistem alanin serin

ve sistein (ASC) normal hücreleri rekabetinde kanser hücrelerin glutamin transferinde öncül rol oynamaktadır (Christensen 1990, Souba ve Pacitti 1992). Normal hücrelerde sistem a glutamin taşıyıcısının normal represyonu neoplastik trasformasyondan sonra baskılanması durmaktadır (Boerner ve Saier 1985).

Hayvan deneylerinde hızla büyüyen kanser hücreleri ile kandaki glutamin konsantrasyonu düşüşü arasında ters bir ilişki vardır (Rivera ve ark.1988, Pacitti ve ark.1992). Çoğalmakta olan kanser hücrelerinin glutamini orantısız kullanması özellikle glutamin dengesinin sağlandığı iskelet kasları, bağırsak, karaciğer ve akciğer gibi organlarda adaptif değişikliklere neden olur (Şekil 2.4.2). Örneğin artan tümör yükünün neden olduğu kandaki düşük glutamin seviyesi GS enziminin aktivitesinin artmasına neden olur. Mekanizmanın dengesindeki böyle bir değişim iskelet kasında önemli miktarda glutamin eksikliğine neden olur.

Son yıllarda kanser hücresinin metabolik yollarında bulunan moleküller ile yapılan çalışmaların kanser tanı ve tedavisi bakımından oldukça önemi olduğu bilinmektedir. Özellikle aerobik glikolizisin anahtar metabolik kontrol noktalarının hedef alınması, efektif kanser tedavisine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Nükleer magnetik rezonans (NMR) spektroskopik analiz ile yapılan bir çalışmada glioblastoma hücre kültürüne izotop işaretli glukoz ve glutamin eklenmiş ve kanser hücrelerinde TCA için anaplerotik karbon kaynağının glutamin olduğu tespit edilmiştir (Deberardinis ve ark. 2007). Bir kemoterapi ajanı olan paclitaxel periferal nöropatiye halsizliğe yol açabilmektedir. Vahdat ve ark. (2001), yaptıkları çalışmada, 4 gün süresince 45 kanser hastasına günde 3 kez 10 gr glutamin takviyesi yapmışlardır. Glutamin takviyesi alan hastalar ile almayan hastalar karşılaştırıldığında, alan hastalarda periferal nöropatide önemli bir azalma görülmüştür. Uyuşma ve motor becerilerindeki zayıflamalarda gerileme, günlük aktivitelerde ise başarı kaydedilmiştir. Bu çalışma ile glutaminin kemoterapötiklerin meydana getirdiği komplikasyonlara karşı da etkili olduğu gösterilmektedir. Neoplastik transformasyonun desteklenmesindeki ve kanser sürecindeki glutamin metabolizmasının kritik rolü araştırmacılar tarafından ilgi çekmektedir. Glutamin ve glutamin metabolize edici enzimleri kanser hücrelerinin kontrolsüz bölünmesini desteklemesi ve enerji üretiminin merkezinde yer alması nedeniyle antikanser terapisinde umut vaat edici olarak gösterilmektedir.





**Şekil 2.4.2.** Sağlıklı ve kanser hastası bireylerin organlarında glutamin metabolizması (Hensley ve ark.2013)

## 2.5. Anti-kanser Çalışmalarında Sitotoksisite, Genotoksisite ve Oksidatif Hasar Belirleme Metodları

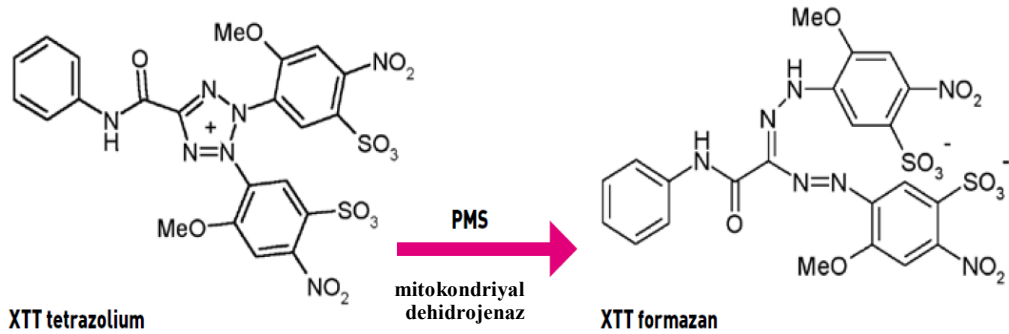
### 2.5.1. Hücre Canlılık Testleri

Hücre canlılık ve sitotoksisite testleri, ilaçlarla yapılan çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Son yıllarda hücre kültürlerinde hücre canlılığı ve proliferasyonu çalışmalarında kullanılmak amacıyla birçok metot geliştirilmiştir (Cook ve Mitchell 1989). Büyük miktardaki örneklerin doğru, hassas ve kaliteli ölçülebilmesi için geliştirilen bu metodlarda radyoaktif materyallerin kullanımı büyük dezavantaj olarak görülmektedir.

1950'lerde tetrazolium keşfedilmiştir (Goodwin ve ark. 1995). 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-Karboksimehtoksiphenil)-2-(4-sulfophenil)-2h-tetrazolium (MTS), sodyum 4-(3-(4-İodophenil)-2-(4-nitrophenil)-2h-5-tetrazolium)-1,3-benzen disulfonat (WST-1) ve Sodyum 2,3-bis-(2-methoksi-4-nitro-5-sulfophenil)- 2h-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT), 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-diphenil-2h-tetrazolium bromid (MTT) gibi

çeşitli tetrazolium tuzları tanımlanmıştır (Goodwin ve ark. 1995, Hamasaki ve ark. 1996). Tetrazolium tuzları, uzun yıllardır histokimyasal çalışmalarda ve hücre biyolojisi testlerinde kullanılmaktadır (Atman 1976, Berridge ve ark. 2005). XTT hücre proliferasyon testi ilk olarak 1988 yılında Scudiero ve ark. tarafından kanser hücre hatlarında keşfedilmiştir (Scudiero ve ark. 1988). XTT, hücre proliferasyonunda, sitotoksite ve apoptosis testlerinde etkili olarak kullanılmaktadır. Parlak turuncu rengi almadan önce XTT, renksiz ya da hafif sarı renkte bir bileşiktir. Bu renk değişimi pozitif yüklü dördüncül tetrazol halkasının parçalanması ile gerçekleşmektedir (Berridge ve ark. 2005).

Canlılık ve proliferasyon, canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrojenaz enzim varlığına dayanmaktadır (Şekil 2.5.1.) Bu enzim varlığında, MTT testinde oluşan formazan mor (Abe ve Matsuki 2000), XTT testinde üretilen formazan turuncu renk vermektedir (Roehm ve ark. 1991). Formazan oluşumu için ihtiyaç duyulan elektron eşleşmesi için genelde fenazin methosulfate (PMS) kullanılmaktadır (Roehm ve ark. 1991). Üretilen formazan miktarı spektrofotometre ile ölçülerek hücre canlılığı belirlenmektedir (Zhu ve ark. 2004).



Şekil 2.5.1. XTT testi (anonim 2010).

### 2.5.2. Komet Testi

Kromozom ve DNA yapısında, genotoksinlerin meydana getirdiği hasarlar genetik toksisite olarak ifade edilmektedir. Gen mutasyonları, kromozom anormallikleri veya DNA kırıkları şeklinde hasarlar oluşabilmektedir. Meydana gelen bu hasarların

infertilite, doğum defektleri, kanser gibi birçok genetik ve multifaktöriyel hastalığın oluşmasına neden olduğu bilinmektedir.

Genotoksisite testleri, kimyasal ve fiziksel ajanların mutajenitelerinin belirlenmesi ve bu ajanların karsinojenik potansiyellerinin tahmin edilebilmesi için kullanılmaktadır. İlk olarak 1970'lerde kullanılmaya başlanan genetik toksisite testleri çeşitleri günümüze kadar oldukça geliştirilmiştir (Bedir ve ark. 2004). Karsinojenik ve mutajenik potansiyele sahip maddelerin tespitinde ames testi, komet testi, kromozom anormallikleri (KA) testi, kardeş kromatit değişimi (KKD) testi ve mikronükleus (MN) testi en yaygın kullanılan genetik toksisite testleridir.

İlk kez 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından spesifik hücrelerde DNA hasarı belirlenmiştir. Alkali şartlar altında lam üzerinde bulunan agaroz gömülü hücrelerin lize edildikten sonra nötralize edilip, akridin oraj ile DNA boyanması ve oluşan kırmızı-yeşil floresans oranının hesaplanması ile gerçekleştirilen bu teknik çok fazla kullanılmamıştır (Fairbain ve ark. 1995). Bu teknik 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından geliştirilerek "Microgel Electrophoretic Technique" olarak ifade edilmiştir. "Single Cell Gel Electrophoresis" (SCGE) tekniği ya da "Komet Testi" olarak da adlandırılmaktadır.

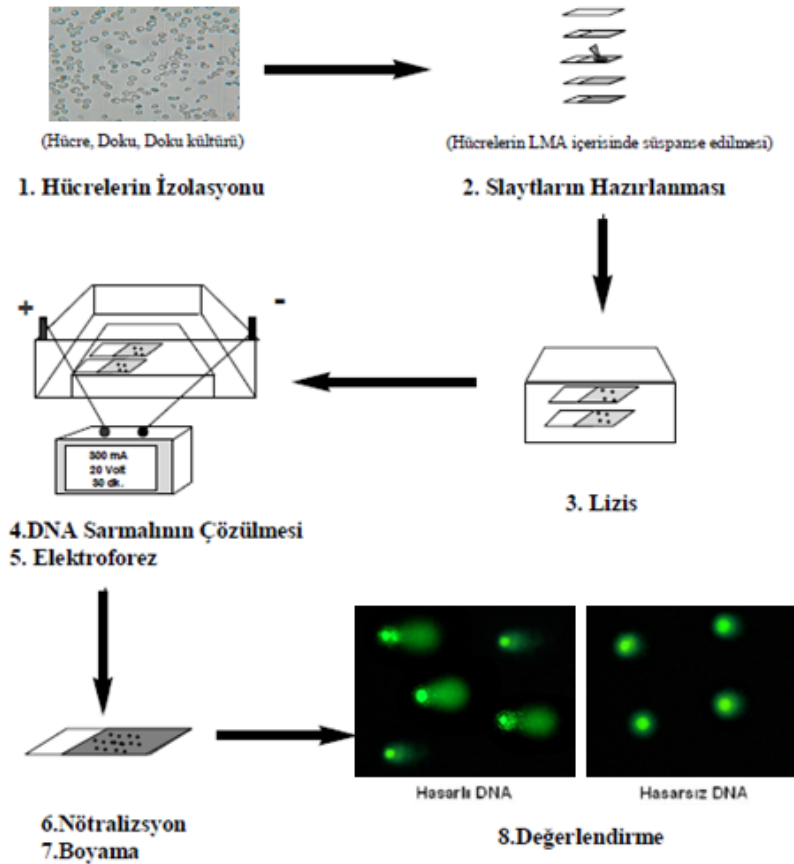
Geliştirilen bu teknikte agaroz kaplı lamın içerisine hücreler gömüldükten sonra yoğun tuz ve deterjan bulunduran lizis çözeltisinde membranların parçalanması sağlanır. Sonrasında nötr pH'a sahip ortamda elektroforez uygulanır. Zincir kırığı bulunduran DNA, sağlam DNA'ya göre daha hızlı göç eder ve etidyum bromür ile boyandıktan sonra floresan yoğunluğu, floresan mikroskobu ile değerlendirilir.

Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda nötr pH ortamında gerçekleştirilen elektroforezin sadece çift sarmal kırıklarının tespit ettiği, tek sarmal kırıklarının tespit edilemediği anlaşılmıştır. Bu sorunu 1988 yılında Singh ve ark. elektroforezi kuvvetli alkali ortamda (pH >13) uygulayarak ortadan kaldırmışlardır. Böylece günümüzde yaygın olarak kullanılan genotoksisite testleri arasında yer alan, tek ve çift zincir kırıklarının tamamını tanıyabilen alkali komet testi ortaya çıkmıştır (Singh ve ark. 1988).

Eğer DNA kırık içeriyorsa, gevşemiş ve kırılmış DNA fragmanları nedeni ile elektrik yük kazanmış olan DNA, çekirdekten anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız görünümünü oluşturmaktadır, bu nedenle hasarlı hücelere komet adı verilmektedir. (Ertürk 2001).

Mutajenlerin neden olduğu DNA hasarının belirlenmesinde, kanser hastalarındaki DNA hasarının derecesinin belirlenmesinde ve birçok hastalığın prenatal tanısında kullanılmaktadır. Tüm ökaryotik hücrelerde kullanılabilir olması, hızlı ve ucuz bir yöntem olması, fazla ekipman gerektirmemesi, düşük hasar seviyelerini bile ölçebilmesi gibi avantajları komet testinin yaygın olarak kullanılmasına neden olmaktadır (Östling ve Johanson 1984, Choy 2001).

Komet testinde yapılan işlemler çalışılan laboratuarlara göre farklılık gösterse de Tice ve ark. (2000) komet testinin genel basamaklarını hücrelerin izolasyonu, lamaların hazırlanması, lizis, DNA sarmalının çözülmesi, elektroforez, nötralizasyon, boyama ve değerlendirme olarak sıralamışlardır (Şekil 2.5.2.).



Şekil 2.5.2. Komet testi genel basamakları (Tice ve ark. 2001)

### 2.5.3. ROS Testi

Yapısında en az bir tane eşleşmemiş elektron bulunduran reaktif karakterdeki atom veya moleküller serbest radikaller olarak ifade edilmektedir (Özdem 1994, Onat 2006). Bu eşleşmemiş elektron büyük bir reaktivlik kazanarak protein, lipid, DNA ve nükleotid, koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermektedir. Meydana gelen bu hasarların yaşlanma, kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olduğu bilinmektedir (Diplock 1998). Serbest radikaller, vücutta metabolizma sırasında meydana gelen son derece etkin kimyasal ürünlerdir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir ve bunlara reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species, ROS) adı verilmektedir (Gülbahar 2007). Vücuda alınan oksijenin yaklaşık %3-5'i oksijen serbest radikallerine çevrildiği için ROS hücrede devamlı üretilmektedir (Colleen ve ark. 2007).

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklara bağlı olarak meydana gelmektedirler. Endojen kaynaklı etmenler, organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları ile oluşmaktadırlar. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında stres, virüsler, enfeksiyon, parakuat, alloksan gibi kimyasalların etkisi altında kalma, pestisidler, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler, sisplatin, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, hiperbarik oksijen, trisiklik antidepresanlar, demir, bakır, kadmiyum, nikel, krom, civa gibi metal iyonları, asbest lifleri, mineral tozlar, ozon, karbon monoksit, silika, aflatoksin B1 ve poliklorlubifenil (PCB)'ler sayılabilmektedir (Fraga ve ark. 1990, Halliwell 2000, Williams ve Jeffrey 2000, Ates ve ark. 2004, Burçak ve Andican 2004, Siomek ve ark. 2006).

Serbest radikaller normalde radikal parçalayan antioksidan sistemlerle ortadan kaldırılmaktadır. Fakat hem antioksidan mekanizmaların yetersiz kalması sonucu hem de çeşitli nedenlerle reaktif oksijen türlerinin artması, oksidatif stres adı verilen bir dizi patolojik olayı meydana getirmektedir. Oksidatif stresin, farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım lezyonlara neden olarak hasara yol açtığı bilinmektedir (Williams ve Jeffrey 2000, Cooke ve ark. 2003).

Çekirdek DNA'sı gibi mitokondriyal DNA (mtDNA)'da da oksidatif hasar oluşabildiği bilinmektedir. Çekirdek DNA'sının tersine mtDNA mitokondride serbest radikal oluşturan bölgelere çok yakın yerleşim gösterir ve histonlar tarafından korunmaz (Lim ve ark 2005). Memeli hücrelerindeki en önemli ROS kaynaklarından biri mitokondriyal elektron taşıma zinciridir (Hofmann ve ark. 2003).

Oksidatif DNA hasarı birçok yöntemle belirlenebilmektedir. Ancak bu tekniklerin çoğu ile yalnızca bir hasar ürünü ölçülebilmekte, bunun yanında kütle spektrometrik tekniklerle ise hem tanımlama hem de oluşan baz hasar ürünlerinin miktar tayini yapılabilmektedir (Dizdaroğlu ve ark. 2002).

Son yıllarda hücre DNA'larında gerçekleşen oksidatif baz hasarını tanımlamak amacıyla çok sayıda kimyasal ve biyokimyasal test geliştirilmiştir. Çeşitli DNA hasarlarının ölçümünde analitik teknikler, immunokimyasal teknikler, kapiller elektroforez, tek hücre jel elektroforezi (Komet Testi), alkalın elüsyon testi ve kromatografik teknikler (HPLC-ECD, GC-MS, LC-MS, LC-MS-MS) kullanılmaktadır.

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi - Elektrokimyasal Detektör (HPLC-ECD) kullanılarak kantitatif 8-OHdG analizi, oksidatif DNA hasarının tespitinde son derece duyarlı, seçici ve laboratuvarlarda en sık kullanılan yöntemlerde biri olarak yer almaktadır. Bu teknik DNA'daki enzim hidrolizini takiben oluşan 8-OHGua ve 8-OHdG nükleozidlerini ölçmektedir. Bu metod ile 8-OHdG 20 fmol (femtomol)'e kadar ölçülebilmektedir (Guetens ve ark. 2002, Shigenaga ve Ames 1991).

Serbest radikallerin neden olduğu DNA baz hasarları tespitinde yaygın olarak kullanılan diğer bir kromatografik teknik ise Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)'dir. Kullanılan ölçümler içerisinde GC-MS, in vitro ya da hasara uğramış DNA'da ve doğrudan kromatinin kendisinde, dört bazda da oluşan hasar ürünlerinin belirlenmesine olanak sağlayan tek teknik olarak yer almaktadır (Yokuş ve Çakır 2002). Ayrıca GC-MS, DNA onarım enzimlerinin eksizyon kinetiğini ve hücresel DNA onarım düzeyini ölçmede kullanılabilir. GC-MS ile analizde öncelikle DNA, sağlam ve modifiye bazları elde etmek için asitle hidrolize edilmeli veya sağlam ve modifiye nükleozidler elde etmek için endo ve ekzonükleazlarla muamele edilmesi gerekmektedir. Elde edilen hidrolizatlar trimetilsilil çözültüsüyle türevlendirilip uçucu formlarına dönüştürülerek analizleri yapılmaktadır. GC-MS' in, türevlendirme işlemi

sırasında guaninin de aralarında bulunduğu bazlardan bir bölümünde yapay oksidasyonların oluşmasına neden olması dezavantajı olarak bilinmektedir.

Hücrelerde bulunun serbest radikali ölçmek için çeşitli metotlar bulunmaktadır. En basit uygulanabilir tekniklerde kemilüminesans luminol (Mellqvist ve ark. 2000) ve lusigenin (Gyllenhammar 1987), sitokrom c (Dahlgren ve Karlsson 1999), demir iyon oksidasyon-xylenol turuncu (Nourooz-Zadeh 1999) ve DCFH-DA (Ottonello 2001), gibi hücre membranını da geçebilen floresanslar ve kemilüminesans probolar kullanılmaktadır. Bu tekniklerden en çok kullanılanı ise hücrenin redoks durumunu doğrudan ölçebilmeyi sağlayan 2'-7'- diklorodihidrofloresan diasetat (DCFH-DA)'tır. İlk olarak Valkonen ve Kuusi tarafından geliştirilen bu tekniğin birçok avantajı bulunmaktadır (Valkonen ve Kuusi 1997). Uygulaması kolay, ucuz, hücrenin redoks durumuna karşı oldukça duyarlı olması ve zamana bağlı ROS değişikliklerinin takip edilmesine olanak vermesi testin en önemli avantajları arasında yer almaktadır. DCFH-DA, hücre membranından kolayca geçebilen, non-floresan, oksidatif stres için kullanılan hücre içi bir maddedir (Bass ve ark. 1983). DCFH-DA ile serbest radikalın oksidasyon reaksiyonu sonucu DCFH-DA diklorofloresin (DCF)'e dönüşmektedir. DCF yaklaşık 504nm'de absorbanası olan yüksek bir floresandır. 480 nm'de uyarılıp 526 nm'de emisyon yapmaktadır. Bu özelliği DCF'ye hem florometrik hem de spektrometrik olarak ölçülebilme avantajı sağlamaktadır (Royall ve Ischiropoulos 1993).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada yeni sentezlenen bakır (II) kompleksinin, [Cu (5-nitro-1-10-fenantrolin) (L-glutamin) (H<sub>2</sub>O)] ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, Beas-2B insan bronş epitel hücre hattı, A549 insan akciğer kanseri hücre hattı, Caco-2 insan kolon kanseri hücre hattı ve MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında XTT testi ile anti-kanser aktiviteleri gösterilmiştir. Bakır kompleksinin genotoksik etkileri komet testi ile değerlendirilmiştir. Hücre içi ROS seviyesi ROS testi ile değerlendirilmiştir.

#### 3.1. Kullanılan Ekipmanlar, Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.1’de, sarf malzemelerine ilişkin bilgiler ise Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Çalışmalarda kullanılan ekipmanlar.

<b>Ekipman</b>	<b>Marka/Model</b>
Etüv	BINDER – CB 150
Soğutmalı santrifüj	SIGMA-2-16PK
Laminar akım kabini	BERNER
Hassas terazi	SHIMADZU-AUW220D
Kaba terazi	RADWAG-WTB2000
Pastör fırını	Elektro.mag-M3025P
İnvert mikroskop	SOIF
Floresan mikroskop	NIKON-ECLIPSE 80i
Işık mikroskopu	NIKON-ECLIPSE E100
Komet yazılımı	Kameram 21
Elektroforez güç kaynağı	PeqLab-Reqpower 300
Elektroforez tankı	Cleaver Scientific
Mikroplaka okuyucu	Bio Tek, ELx800 U.S.A
Azot tankı	INT. CRYOGENICS – IC 20R
Ph metre	HANNA – HI 221
+4 buzdolabı	REGAL
Manyetik Karıştırıcı	ISOTEX
-20 derin dondurucu	ALASKA – ADF 06 V
-80 derin dondurucu	ELCOLD
-80 derin dondurucu	ELCOLD
Karıştırıcı-ısıtıcı	M TOPS MS300HS
Hücre sayım cihazı	CEDEX XS
Distile su cihazı	MP MINI PURE – DEST UP



**Çizelge 3.2.** Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.

<b>Sarf Malzeme</b>	<b>Firma/ Katalog No</b>
Serolojik pipet	COSTAR
Serolojik pipet tabancası	BIOHIT-MIDI PLUS/ Dragon MED Levo plus
Steril 15 ml'lik tüpler	ISOLAB
Steril flasklar (T-12,5, T-25 ve T-75)	NEST BIOTECHNOLOGY
RPMI-1640 (500 ml)	PAN BIOTECH/ P04-22100
Penisilin-Streptomisin	SIGMA/ P0781
L-Glutamin (100 ml)	SIGMA/ RNBB4386
Fetal-Bovine serum	PANBIOTECH/ P30-1985
Sodyum pirüvat (100 ml)	PANBIOTECH/ P04-43100
EDTA disodium salt	CARLO ERBA/ 303201
DPBS	PANBIOTECH/ P04-36500
Etanol	MERCK
NaCl	MERCK/ 7647-14-5
NaOH	SIGMA/ S8045-1 KG
Triton X-100	GERBU/ 34021300
Lowmelting Agaroz	SIGMA/ A9414-25G
Normal Agaroz	SIGMA/ A9539-100G
DMSO	MERCK/ K39661843
Tripsin-EDTA	GIBCO/ 1304898
DCFH-DA ( ROS Kit)	Cell Biolabs'OxiSelect™ / 59342021
Hücre proliferasyon kiti	BIOLOGICAL INDUSTRIES/1548576

### **3.2. Kullanılacak Hücre Hatları**

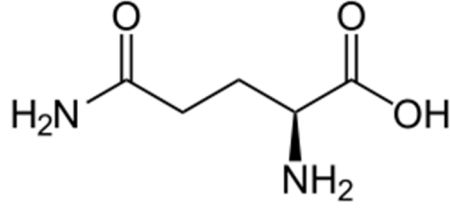
Tez çalışmasında Beas-2B insan bronş epitel hücre hattı, A549 insan akciğer kanseri hücre hattı, Caco-2 insan kolon kanseri hücre hattı ve MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır.

#### **3.2.1. Hücre Kültürü**

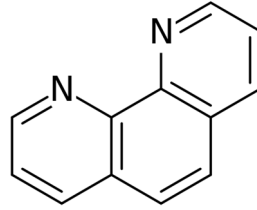
Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hatları 75 cm<sup>2</sup> kültür flasklarında, RPMI-1640 medyum (içerisine 50ml FCS, 6ml penisilin, 3ml L-glutamin ve 6ml sodyum pirüvat ilave edilerek hazırlanan) ile beslenmiştir. Karbondioksitli inkübatörde (%5 CO<sub>2</sub> + %95 O<sub>2</sub>), 37°C'de ve nemli ortamda tutulan hücrelerin medyumları haftada iki defa değiştirilmiştir. Hücreler konfluent olduğunda, çalışma öncesinde tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak flasklardan kaldırılan hücreler, çalışılacak test için uygun hale getirilmiştir.

### 3.3. Kullanılan Kompleksler

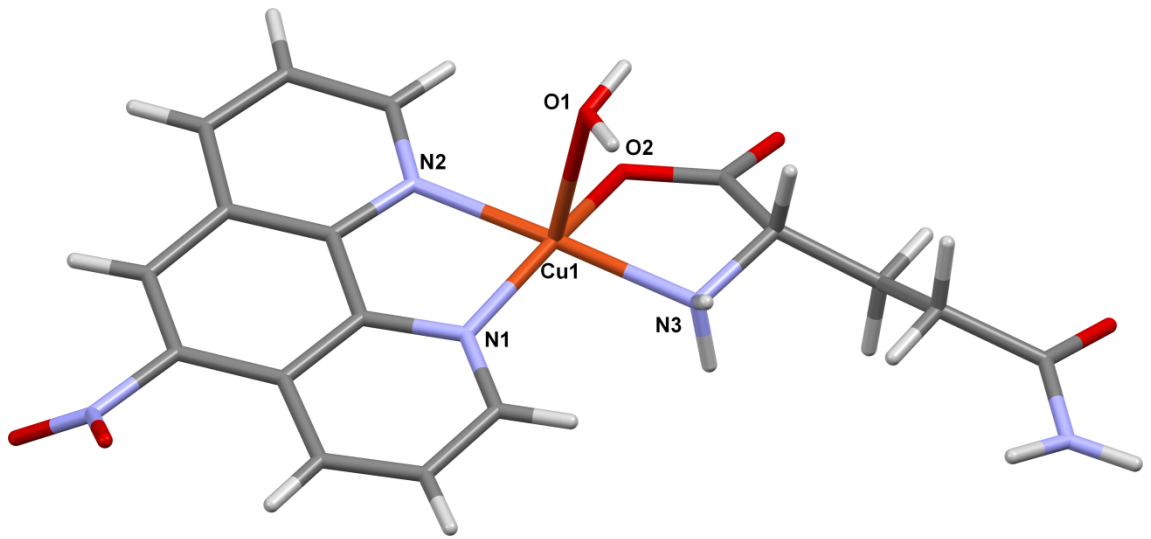
Bu çalışmada yeni sentezlenen bakır (II) kompleksi,  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1,10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kullanılmıştır. Kompleksler hazırlanan besiyerinde çözülmüştür. Bu bakır komplekslerinin yapısına katılan ligant ve bakır kompleksinin yapısı Şekil 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.3. L-glutamin moleküler yapısı



Şekil 3.3.1. Fenantrolin moleküler yapısı



Şekil 3.3.2.  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1,10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin kristal yapısı.

### 3.4. XTT Testi

Hücreler 75-cm<sup>2</sup>'lik flasklarda yaklaşık 1 hafta boyunca çoğaltılmıştır. Üreyen hücreler 96 kuyucuklu platalere ekilmiştir. A549 ve Beas-2B hücre hatları için her bir kuyucuğa 5x10<sup>3</sup> hücre, Caco-2 ve MCF-7 hücre hatları için her bir kuyucuğa 8x10<sup>3</sup> hücre ekilmiştir. 37 °C ve %5 CO<sup>2</sup> ortama sahip inkübatörde 24 saat inkübe edildikten sonra 0,1 µM ile 25,6 µM arasında değişen konsantrasyonlardaki bakır kompleksi hücrelere ekilmiştir. 24 saat maruziyetten sonra inkübatörden alınarak besiyeri aspire edilmiş ve 100 µL yeni besiyeri eklenmiştir. Her bir kuyucuğa karanlık ortamda aktive olmuş 50 µL XTT solüsyonu eklenmiş ve 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda mikropilaya okuyucu ile 450nm'de absorbans ölçülmüştür. Blankler çıkarıldıktan sonra IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>12,5</sub> dozları (1- A muamele grubu / A kontrol) x 100 formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Y eksenine doz, X eksenine canlılık olan dağılım grafiği çizilmiştir. Daha sonra grafik üzerinde doğrusal 3 nokta seçilerek eğilim çizgisi eklenmiştir. Eğilim çizgisinin formülünde y yerine 75, 50, 25 ve 12,5 yazılarak sırası ile IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>12,5</sub> dozları hesaplanmıştır.

#### Kimyasalların Hazırlanması:

Kullanılacak kimyasallar deneyden hemen önce su banyosunda 37 °C'de ısıtılmıştır. XTT ölçüm solüsyonunu hazırlamak için XTT aktivatörüne, elektron bağlama solüsyonu eklenmiştir (1:50 hacim oranında). 96 kuyucuklu plate için 5000 µL XTT solüsyonuna ve 100 µL elektron bağlama solüsyonu eklenmiştir.

### 3.5. Komet testi

Komet testi, hücrelerin low-melting agaroz solüsyonuna gömülmesi, hücrelerin lizisi, alkali ortamda (pH > 13) çift zincirli DNA'nın zincirlerinin ayrılması ve elektroforez aşamalarından meydana gelmektedir.

#### Lamların agaroz jel ile kaplanması:

100ml distile suda 0,75g normal agaroz kaynatıldıktan sonra mikroskop lamları bu çözeltide 30 saniye bekletilmiştir. Sonra çıkarılıp altları temizlenip kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan lamlar rodajlı kısımlarından etiketlenmiş ve kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Komet testi protokolü:

1. İçerisinde 3 ml besi yeri bulunduran 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda bulunan hücreler 24 saat boyunca farklı dozlarda bakır (II) kompleksine maruz bırakılmıştır. 24 saatlik maruziyet sonunda hücrelerin tripsin ile yüzeyden kaldırılması sağlanmış 3-5 dakika içerisinde 3ml besiyeri eklenerek tripsin nötralize edilmiştir. Flasklardaki hücreler falcon tüplerine alınarak 5'er dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası pellet olarak kalan hücreler iyice karıştırılmıştır.
2. Hücreleri jel içine gömmek için, düşük erime noktası olan agaroz (lma) kullanılarak jel hazırlanmıştır. 0,065 gr LMA tartılmış ve 10 ml PBS içinde ısıtılarak jel haline getirilmifitir.
3. Eppendorf tüplere 250 şer l lma aktarılmıştır. Bu eppendorf tüpler 37 C'de bekleyen sıcak su banyosuna yerleştirilmifitir.
4. Seyreltilen hücre pelletlerinden 100 l çekilmiş, su banyosunda bekleyen ve içinde 250 l lma jeli bulunan eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Jel ve hücre süspansiyonu iyice pipetaj yaparak karıştırılmıştır.
5. Karıştırılan jel ve hücre karışımından 50 l çekilmiş ve lam üzerine yayılmıştır. Her alışma grubu kendi lamının üzerine yayılmıştır.
6. zerine karışım koyulan lamlar hemen lamelle kapatılmış ve buz üzerine konulmuştur.
7. Yayma işlemi bittikten sonra lamlar 15 dakika +4 C'de bekletilmifitir.
8. 15 dakika sonunda lamlar üzerindeki lameller çıkarılmıştır.
9. Lizis işlemi başlatılmıştır. Lamelleri ıkmiş olan lamlar alüminyum folyo ile sarılı şalelere dizilmifitir ve şaleler lizis solüsyonuna ile doldurulmuştur. Lamlar şaleler içinde 1 gece boyunca karanlıkta ve +4 C'de bekletilmifitir.
10. Ertesi gün lamlar lizis solüsyonundan çıkarılmış ve elektroforez tankına dizilmifitir.
11. Tanklar yürütme tamponu ile doldurulmuş ve lamlar 30 dakika elektroforez tamponu içinde bekletilmifitir. Bu aşamada DNA sarmallarının açılmasını sağlamaktadır.
12. Yürütme işlemi 450 mA ve 25V'da, 30 dakika gerekleştirilmifitir.
13. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra lamlar tanktan çıkarılıp alüminyum folyo ile sarılı şalelere konulan nötralizasyon tamponuna daldırılmıştır ve 5 dakika lamlar tampon içerisinde bekletilmifitir.

14. Nötralizasyon işlemi sonrasında lamalar tampondan çıkarılıp komet için +4 °C'de soğutulan distile suya daldırılıp yıkanmış ve kuruması beklenmiştir.

#### Boyama işlemi

20 µg/ml konsantrasyonlu etidyum bromür boya solüsyonundan enjektör ile 0,05 ml çekilerek ve 40 ml distile su olan falcona eklenmiştir. Her bir lam hazırlanan boya içerisinde 1 dakika bekletilmiştir. Boya damlatıldıktan sonra lamalar lamellerle kapatılıp, mikroskopik inceleme için hazırlanmıştır.

#### Mikroskopik inceleme

Sayım ve değerlendirme işlemleri sırasında florsan mikroskop kullanılmış ve kameram 21 programından yararlanılmıştır. Boyanan lamlara mikroskopta bakılmış ve her farklı dozdan 100 tane hücre elde edecek şekilde fotoğrafları çekilmiştir. Bağımsız iki tekrar halinde yapılan testte kameram 21 analiz programı kullanılarak komet uzunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruk moment uzunluğu verileri elde edilmiştir. Elde edilen veriler SPSS IBM 23 istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

### 3.6. ROS Testi

Hücreler 200 µl besiyeri eklenen siyah plateler ekilmiş ve 24 saat kültüre edilmiştir. 24 saat sonunda besiyeri aspire edilip her bir kuyucuk 200 µl PBS ike iki kez yıkanmıştır. Hücrelere besiyeri içerisinde çözdürülen DCFH-DA çözeltisinden 100 µl eklenerek 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler ikişer kez PBS ile yıkanmış ve her bir kuyucuğa 200 µl sadece RPMI konulmuştur. Çalışan bakır kompleksinin IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozları ile muamele edilmiştir. Platenin dört bir tarafına hazırlanan DCF standartları ve 3 kuyucuğa da inkübasyon sürecinde hücrelerin kurumasını önlemek amacı ile steril su eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılmıştır. Absorbanslar 480nm/530nm'de florometrik plaka okuyucuda okunmuştur. ROS değerleri standartlardan yararlanılarak çizilen dağılım grafiğinin eğim formülü ile hesaplanmıştır. Deneysel ikişer tekrarlı gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS IBM 23 istatistik programı kullanılarak Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir.

## 4.BULGULAR

### 4.1. XTT Bulguları

XTT testinden elde edilen bulgular Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir. Sentezlenen bakır (II) kompleksinin  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  0,1  $\mu\text{M}$  ile 25,6  $\mu\text{M}$  arasında değişen konsantrasyonları ile Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hatları 24 saat muamele edilmiştir. Sentezlenen kompleksin Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hatlarına ait  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$ ,  $\text{IC}_{12,5}$  belirlenmiştir.

#### 4.1.1. Beas-2B hücre hattında elde edilen XTT Bulguları

Beas-2B hücre hattının  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  ile 24 saat muamele edilmesi sonucu XTT testinden elde edilen  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$ ,  $\text{IC}_{12,5}$  bulguları Çizelge 4.1'de, Şekil 4.1'de  $\text{IC}_{50}$  değeri gösterilmiştir.

Bakır (II) kompleksinin Beas-2B hücre hattındaki  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$ ,  $\text{IC}_{12,5}$  değerleri sırasıyla  $12,71 \pm 0,27 \mu\text{M}$ ;  $8,47 \pm 0,18 \mu\text{M}$ ;  $4,23 \pm 0,09 \mu\text{M}$ ;  $2,11 \pm 0,05 \mu\text{M}$  şeklindedir.

#### 4.1.2. A549 hücre hattında elde edilen XTT Bulguları

A549 hücre hattının  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  ile 24 saat muamele edilmesi sonucu XTT testinden elde edilen  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$ ,  $\text{IC}_{12,5}$  bulguları Çizelge 4.1'de, Şekil 4.1'de  $\text{IC}_{50}$  değeri gösterilmiştir.

Bakır (II) kompleksinin A549 hücre hattındaki  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$ ,  $\text{IC}_{12,5}$  değerleri sırasıyla  $3,93 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ;  $2,62 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ;  $1,31 \pm 0,008 \mu\text{M}$ ;  $0,65 \pm 0,004 \mu\text{M}$  şeklindedir.

#### 4.1.3. Caco-2 hücre hattında elde edilen XTT Bulguları

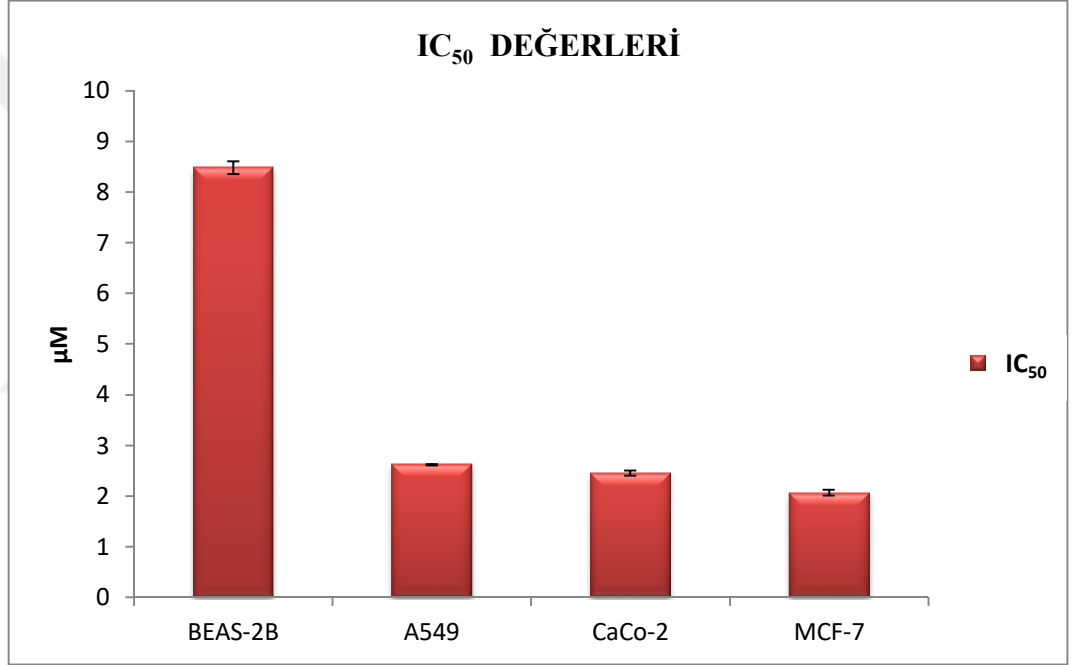
Caco-2 hücre hattının  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  ile 24 saat muamele edilmesi sonucu XTT testinden elde edilen  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$ ,  $\text{IC}_{12,5}$  bulguları Çizelge 4.1'de, Şekil 4.1'de  $\text{IC}_{50}$  değeri gösterilmiştir.

Bakır (II) kompleksinin Caco-2 hücre hattındaki  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$ ,  $\text{IC}_{12,5}$  değerleri sırasıyla  $3,67 \pm 0,10 \mu\text{M}$ ;  $2,45 \pm 0,06 \mu\text{M}$ ;  $1,22 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ;  $0,61 \pm 0,01 \mu\text{M}$  şeklindedir.

#### 4.1.4. MCF-7 hücre hattında elde edilen XTT Bulguları

MCF-7 hücre hattının  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ile 24 saat muamele edilmesi sonucu XTT testinden elde edilen  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$ ,  $\text{IC}_{12,5}$  bulguları Çizelge 4.1’de, Şekil 4.1’de  $\text{IC}_{50}$  değeri gösterilmiştir.

Bakır (II) kompleksinin MCF-7 hücre hattındaki  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$ ,  $\text{IC}_{12,5}$  değerleri sırasıyla  $3,10 \pm 0,12 \mu\text{M}$ ;  $2,07 \pm 0,08 \mu\text{M}$ ;  $1,03 \pm 0,04 \mu\text{M}$ ;  $0,51 \pm 0,02 \mu\text{M}$  şeklindedir.



Şekil 4.1. Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hattında  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{50}$  değerleri verilmiştir (μM).

**Çizelge 4.1.** Bakır (II) kompleksinin Beas-2B, A549, CaCo-2 ve MCF-7 hücre hatlarında IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>12,5</sub> dozlarını, ±; standart sapmayı ifade etmektedir.

<b>HÜCRE HATLARI</b>	<b>Yeni Sentezlenen [Cu (5-nitro-1-10-fenantrolin) (L-glutamin) (H<sub>2</sub>O)] ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O kompleksi</b>			
	<b>IC<sub>75</sub> (µM)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µM)</b>	<b>IC<sub>25</sub> (µM)</b>	<b>IC<sub>12,5</sub> (µM)</b>
<b>Beas-2B</b>	12,71 ± 0,27	8,47 ± 0,18	4,23 ± 0,09	2,11 ± 0,05
<b>A549</b>	3,93 ± 0,02	2,62 ± 0,01	1,31 ± 0,008	0,65 ± 0,004
<b>Caco-2</b>	3,67 ± 0,10	2,45 ± 0,06	1,22 ± 0,02	0,61 ± 0,01
<b>MCF-7</b>	3,10 ± 0,12	2,07 ± 0,08	1,03 ± 0,04	0,51 ± 0,02

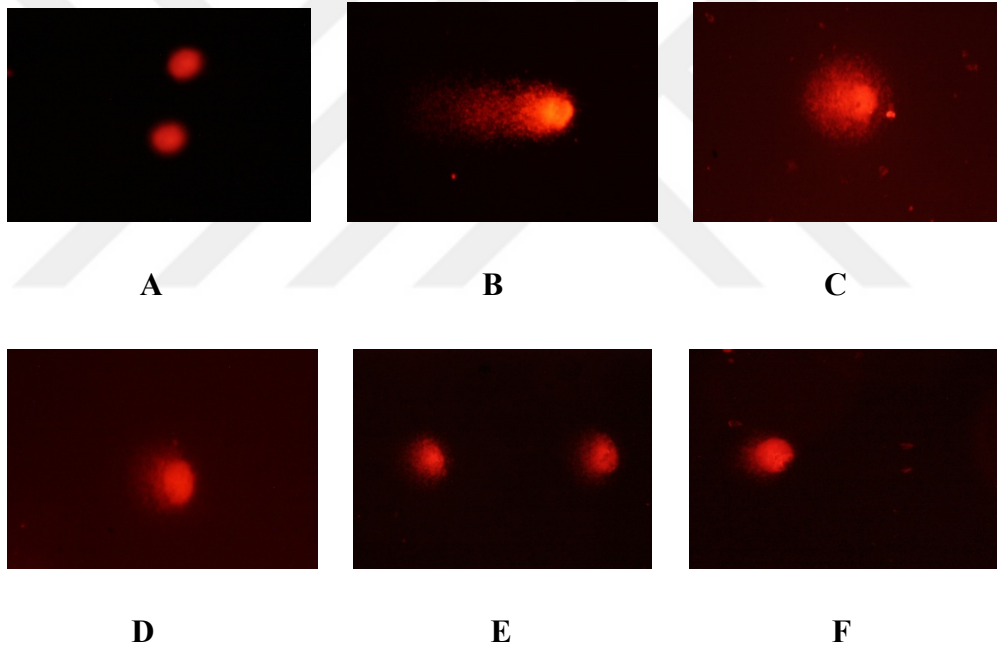


## 4.2. Komet Bulguları

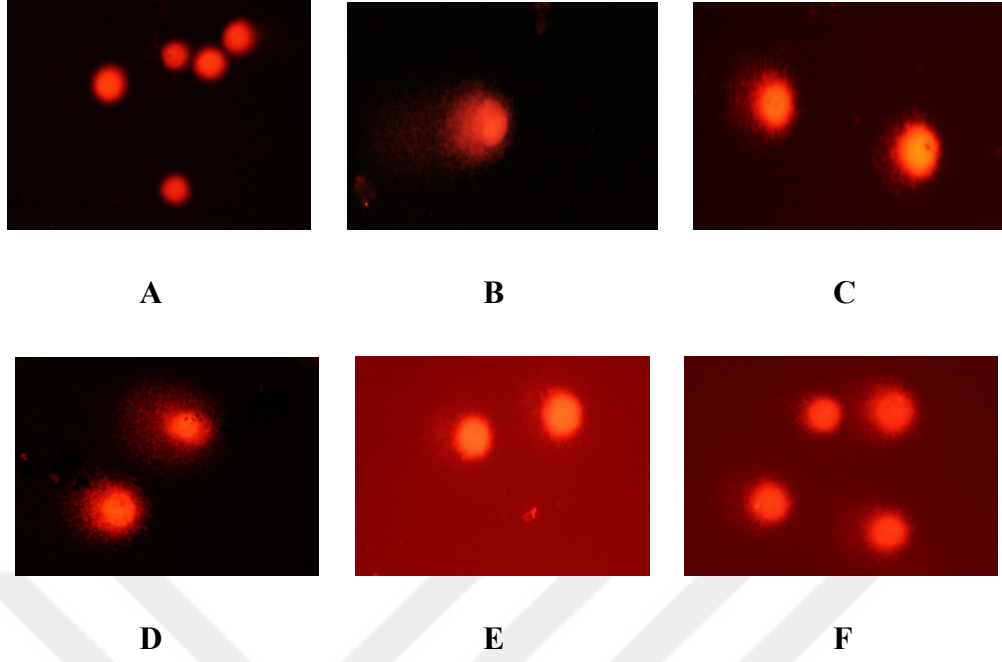
[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O kompleksinin IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozları Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hatlarına 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Maruziyet sonrası hücrelerin mikroskopik görüntüleri NIKON – ECLIPSE 80i floresan mikroskobu ile çekilmiştir.

Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hatlarının büyüme kontrolü, pozitif kontrol, IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozlarından elde edilen mikroskopik görüntü örnekleri şekil 4.2, şekil 4.3, şekil 4.4 ve şekil 4.5'te gösterilmiştir.

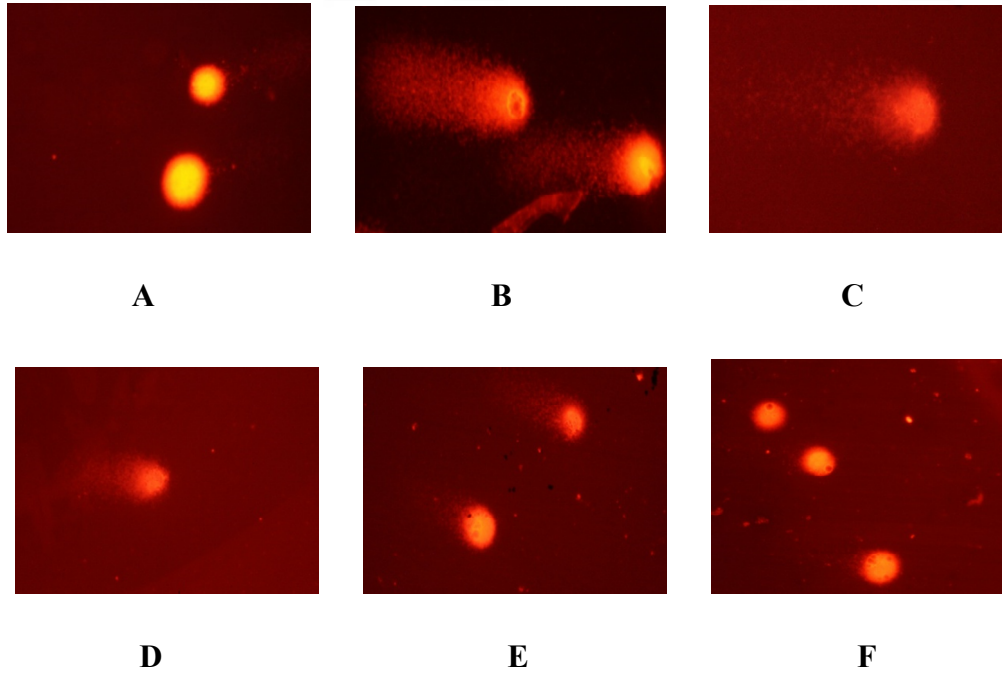
Değerlendirme kameram 21 komet sayım programı ile yapılmıştır. Kuyruk uzunluğu, Olive kuyruk moment ve kuyruk % DNA verileri elde edilmiştir.



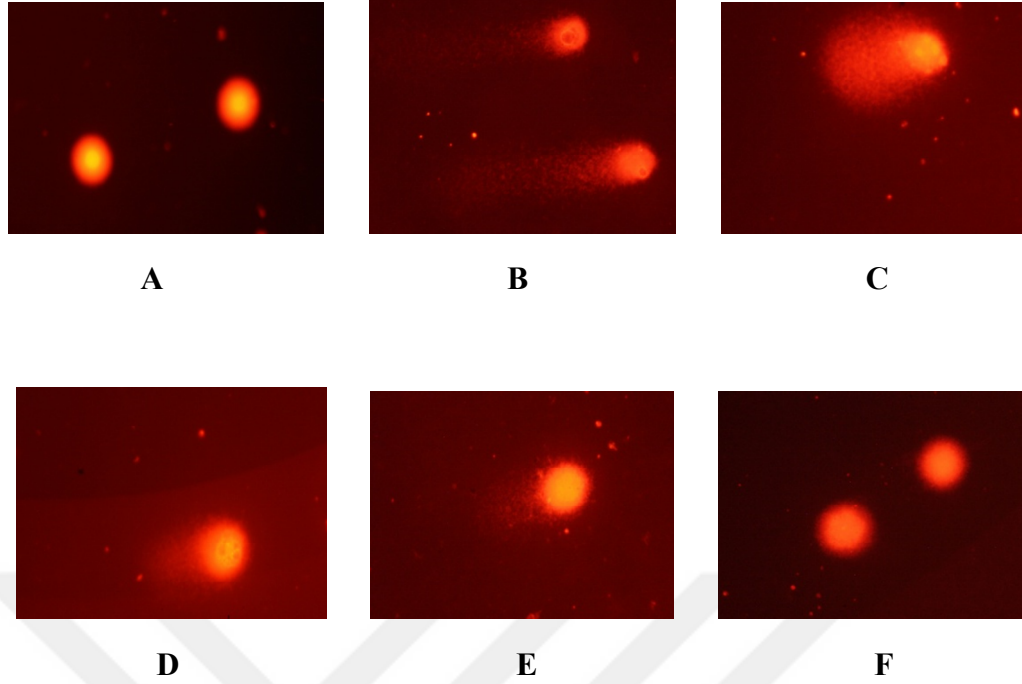
**Şekil 4.2.** Beas-2B hücre hatının büyüme kontrolü, pozitif kontrol, IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozlarından elde edilen mikroskopik görüntü örnekleri (A; büyüme kontrolü, B; pozitif kontrol, C; IC<sub>75</sub>, D; IC<sub>50</sub>, E; IC<sub>25</sub>, F; IC<sub>12,5</sub> ifade etmektedir)



**Şekil 4.3.** A549 hücre hatının büyüme kontrolü, pozitif kontrol, IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozlarından elde edilen mikroskobik görüntü örnekleri (A; büyüme kontrolü, B; pozitif kontrol, C; IC<sub>75</sub>, D; IC<sub>50</sub>, E; IC<sub>25</sub>, F; IC<sub>12,5</sub> ifade etmektedir)



**Şekil 4.4.** Caco-2 hücre hatının büyüme kontrolü, pozitif kontrol, IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozlarından elde edilen mikroskobik görüntü örnekleri (A; büyüme kontrolü, B; pozitif kontrol, C; IC<sub>75</sub>, D; IC<sub>50</sub>, E; IC<sub>25</sub>, F; IC<sub>12,5</sub> ifade etmektedir)



**Şekil 4.5.** MCF-7 hücre hatının büyüme kontrolü, pozitif kontrol, IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozlarından elde edilen mikroskopik görüntü örnekleri (A; büyüme kontrolü, B; pozitif kontrol, C; IC<sub>75</sub>, D; IC<sub>50</sub>, E; IC<sub>25</sub>, F; IC<sub>12,5</sub> ifade etmektedir)

#### 4.2.1. Kuyruk Uzunluğu Bulguları

[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O kompleksinin IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozları Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hatlarına 24 saat boyunca muamele edilmiştir. 24 saatlik maruziyetin sonunda elde edilen kuyruk uzunluğu (µm) değerleri çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri SPSS programı ile analiz edilmiştir.

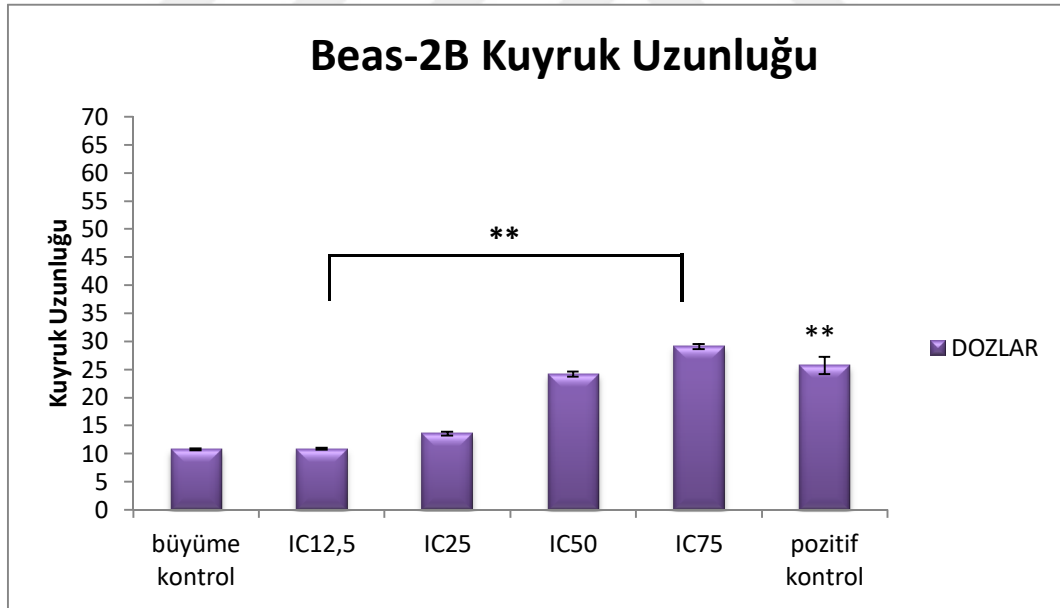
**Çizelge 4.2.** [Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O Kompleksinin IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozları ile Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hatlarına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk uzunluğu değerleri (µm), ±; standart sapmayı ifade etmektedir, büyüme kontrolü ile karşılaştırılmıştır \*\*: p≤ 0,001

<b>Kuyruk Uzunluğu ± Standart sapma</b>				
<b>HÜCRE HATTI</b>	<b>Beas-2B</b>	<b>A549</b>	<b>Caco-2</b>	<b>MCF-7</b>
<b>Büyüme kontrol</b>	10,81 ± 2,24	7,10 ± 2,73	10,01±2,41	12,03 ± 2,21
<b>Pozitif kontrol</b>	25,75 ± 21,94**	18,05 ± 13,91**	71,11 ± 49,51**	79,77 ± 50,68**
<b>IC<sub>75</sub></b>	29,10 ± 6,86**	17,88 ± 8,50**	49,98 ± 39,20**	32,89 ± 20,54**
<b>IC<sub>50</sub></b>	24,20 ± 6,74**	17,29 ± 9,48**	35,38 ± 29,77**	26,47 ± 15,35**
<b>IC<sub>25</sub></b>	13,58 ± 4,31**	13,74 ± 5,75**	18,15 ± 9,21**	13,98 ± 3,53**
<b>IC<sub>12,5</sub></b>	10,84 ± 2,45**	11,00 ± 3,57**	11,21 ± 3,15**	12,11 ± 3,48

#### 4.2.1.1. Beas-2B Hücre Hattındaki Kuyruk Uzunluğu Bulguları

Beas-2B hücrelerinde ortalama kuyruk uzunluğu büyüme kontrolü grubunda  $10,81 \pm 2,24$  ve pozitif kontrol grubunda  $25,75 \pm 21,94$  olarak belirlenmiştir. Beas hücre hattına  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin 24 saat muamele edilmesi sonucu  $\text{IC}_{75}$  ( $12,71 \mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{50}$  ( $8,47 \mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{25}$  ( $4,23 \mu\text{M}$ ) ve  $\text{IC}_{12,5}$  ( $2,11 \mu\text{M}$ ) dozlarından elde edilen ortalama kuyruk uzunluğu değerleri sırasıyla  $29,10 \pm 6,86$ ;  $24,20 \pm 6,74$ ;  $13,58 \pm 4,31$  ve  $10,84 \pm 2,45$  şeklindedir ve çizelge 4.2’de şekil 4.6’da verilmiştir.

$[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  gruplarının ortalama değerleri büyüme kontrolü ile kıyaslandığında tüm dozlardaki değerlerin Mann-Whitney U testi uygulanarak istatistiki olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p \leq 0,001$ ).

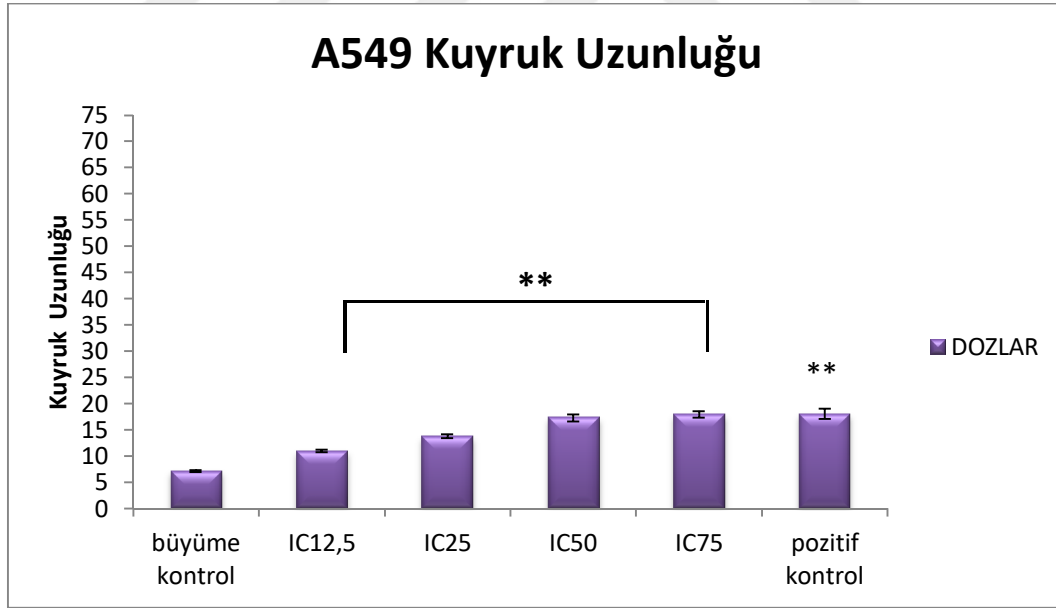


**Şekil 4.6.**  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  dozları ile Beas-2B hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk uzunluğu değerleri ( $\mu\text{m}$ ), büyüme kontrolü ile karşılaştırılmıştır \*\*:  $p \leq 0,001$

#### 4.2.1.2. A549 Hücre Hattındaki Kuyruk Uzunluğu Bulguları

A549 hücrelerinde ortalama kuyruk uzunluğu büyüme kontrolü grubunda  $7,10 \pm 2,73$  ve pozitif kontrol grubunda  $18,05 \pm 13,91$  olarak belirlenmiştir. A549 hücre hattına  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin 24 saat muamele edilmesi sonucu  $\text{IC}_{75}$  ( $3,93 \mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{50}$  ( $2,62 \mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{25}$  ( $1,31 \mu\text{M}$ ) ve  $\text{IC}_{12,5}$  ( $0,65 \mu\text{M}$ ) dozlarından elde edilen ortalama kuyruk uzunluğu değerleri sırasıyla  $17,88 \pm 8,50$ ;  $17,29 \pm 9,48$ ;  $13,74 \pm 5,75$  ve  $11,00 \pm 3,57$  şeklindedir ve çizelge 4.2'de şekil 4.7'de verilmiştir.

$[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  gruplarının ortalama değerleri büyüme kontrolü ile kıyaslandığında tüm dozlardaki değerlerin Mann-Whitney U testi uygulanarak istatistiki olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p \leq 0,001$ ).

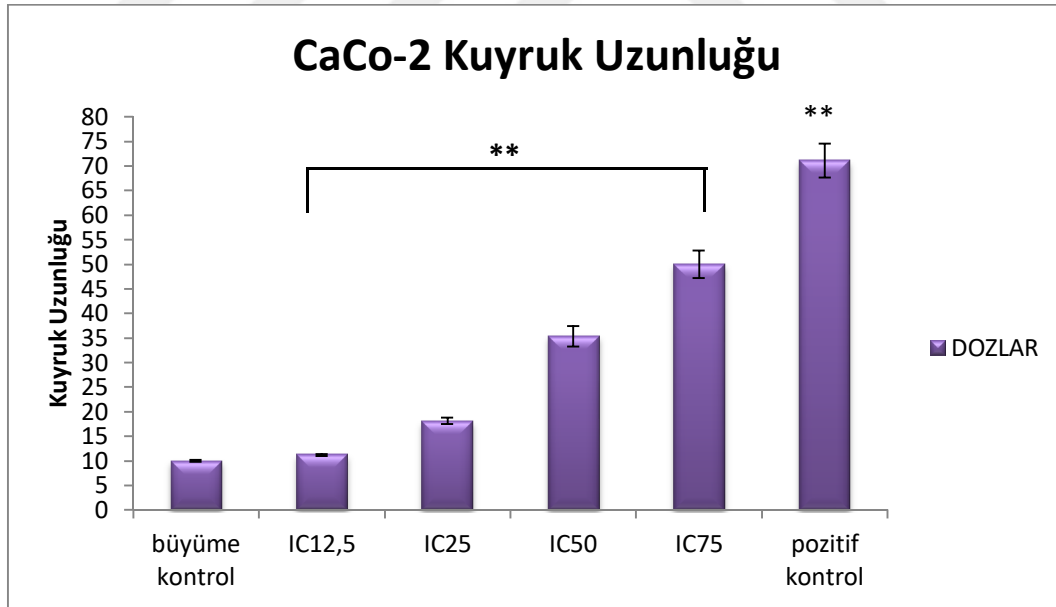


**Şekil 4.7.**  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  dozları ile A549 hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk uzunluğu değerleri ( $\mu\text{m}$ ), büyüme kontrolü ile karşılaştırılmıştır \*\*;  $p \leq 0,001$

#### 4.2.1.3. Caco-2 Hücre Hattındaki Kuyruk Uzunluğu Bulguları

Caco-2 hücrelerinde ortalama kuyruk uzunluğu büyüme kontrolü grubunda  $10,01 \pm 2,41$  ve pozitif kontrol grubunda  $71,11 \pm 49,51$  olarak belirlenmiştir. Caco-2 hücre hattına  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin 24 saat muamele edilmesi sonucu  $\text{IC}_{75}$  ( $3,67 \mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{50}$  ( $2,45 \mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{25}$  ( $1,22 \mu\text{M}$ ) ve  $\text{IC}_{12,5}$  ( $0,61 \mu\text{M}$ ) dozlarından elde edilen ortalama kuyruk uzunluğu değerleri sırasıyla  $49,98 \pm 39,20$ ;  $35,38 \pm 29,77$ ;  $18,15 \pm 9,21$  ve  $11,21 \pm 3,15$  şeklindedir ve çizelge 4.2’de şekil 4.8’de verilmiştir.

$[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  gruplarının ortalama değerleri büyüme kontrolü ile kıyaslandığında tüm dozlardaki değerlerin Mann-Whitney U testi uygulanarak istatistiki olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p \leq 0,001$ ).

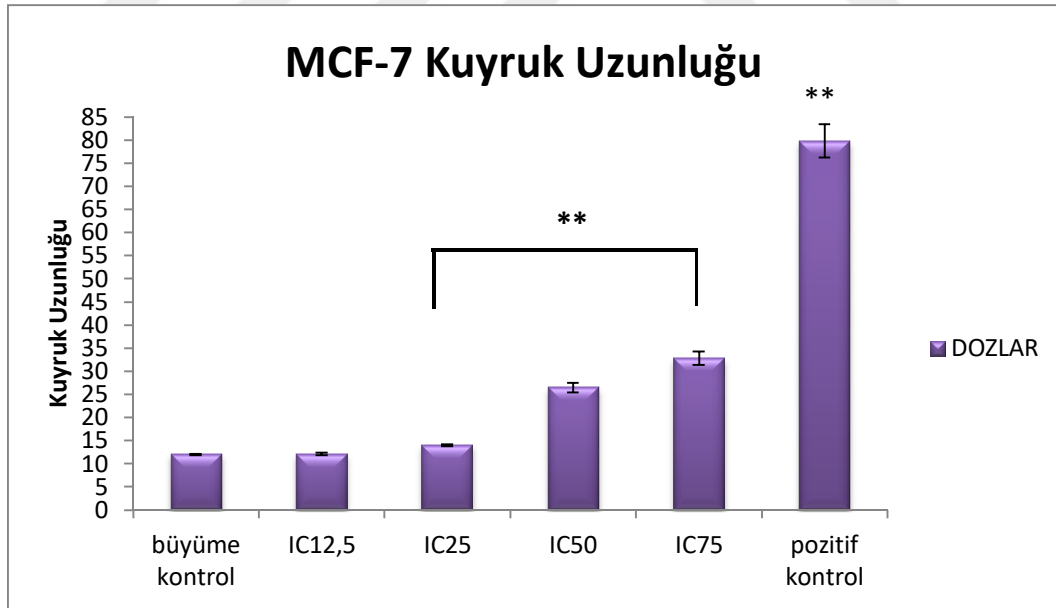


**Şekil 4.8.**  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  dozları ile Caco-2 hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk uzunluğu değerleri ( $\mu\text{m}$ ), büyüme kontrolü ile karşılaştırılmıştır \*\*;  $p \leq 0,001$

#### 4.2.1.4. MCF-7 Hücre Hattındaki Kuyruk Uzunluğu Bulguları

MCF-7 hücrelerinde ortalama kuyruk uzunluğu büyüme kontrolü grubunda  $12,03 \pm 2,21$  ve pozitif kontrol grubunda  $79,77 \pm 50,68$  olarak belirlenmiştir. MCF-7 hücre hattına  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin 24 saat muamele edilmesi sonucu  $\text{IC}_{75}$  ( $3,10 \mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{50}$  ( $2,07 \mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{25}$  ( $1,03 \mu\text{M}$ ) ve  $\text{IC}_{12,5}$  ( $0,51 \mu\text{M}$ ) dozlarından elde edilen ortalama kuyruk uzunluğu değerleri sırasıyla  $32,89 \pm 20,54$ ;  $26,47 \pm 15,35$ ;  $13,98 \pm 3,53$  ve  $12,11 \pm 3,48$  şeklindedir ve çizelge 4.2'de şekil 4.9'da verilmiştir.

$[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  gruplarının ortalama değerleri büyüme kontrolü ile kıyaslandığında  $\text{IC}_{12,5}$  dozundaki artış anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ),  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$  ve  $\text{IC}_{25}$  dozlardaki değerlerin Mann-Whitney U testi uygulanarak istatistiki olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p \leq 0,001$ ).



**Şekil 4.9.**  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  dozları ile MCF-7 hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk uzunluğu değerleri ( $\mu\text{m}$ ), büyüme kontrolü ile karşılaştırılmıştır \*\*;  $p \leq 0,001$

#### 4.2.2. Kuyruk %DNA Bulguları

[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O Kompleksinin IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozları ile Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hatlarına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen kuyruk %DNA değerleri Çizelge 4.3'te verilmiştir. Kuyruk %DNA değerlerinin istatistiksel analizi veriler normal dağılım göstermediği için Mann-Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4.3.** [Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O Kompleksinin IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozları ile Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hatlarına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama %DNA değerleri (µm), ±; standart sapmayı ifade etmektedir, büyüme kontrolü ile karşılaştırılmıştır \*; p<0,05,\*\*; p< 0,001

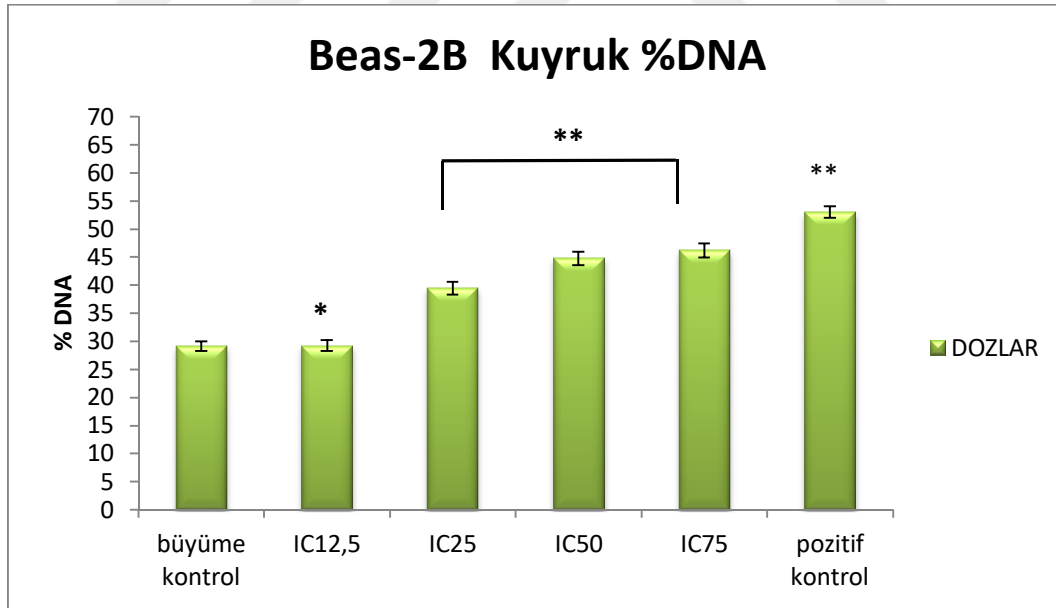
%DNA ± Standart sapma				
HÜCRE HATTI	Beas-2B	A549	Caco-2	MCF-7
Büyüme kontrol	29,09 ± 11,97	16,17 ± 14,81	30,28 ± 12,34	32,90 ± 10,93
Pozitif kontrol	53,05 ± 14,20**	35,37 ± 22,25**	51,80 ± 23,02**	56,50 ± 20,66**
IC <sub>75</sub>	46,15 ± 17,57**	42,63 ± 16,63**	55,42 ± 21,25**	52,25 ± 18,63**
IC <sub>50</sub>	44,71 ± 17,01**	34,93 ± 15,21**	49,13 ± 21,12**	46,07 ± 19,03**
IC <sub>25</sub>	39,50 ± 16,02**	33,29 ± 13,90**	37,68 ± 15,89**	40,83 ± 17,93
IC <sub>12,5</sub>	29,24 ± 14,13*	28,61 ± 15,01**	31,81 ± 13,94	34,19 ± 15,78



#### 4.2.2.1. Beas-2B hücre hattında elde edilen kuyruk %DNA bulguları

Beas-2B hücrelerine ortalama kuyruk %DNA değerleri büyüme kontrolü grubunda  $29,09 \pm 11,97$  ve pozitif kontrol grubunda  $53,05 \pm 14,20$  şeklindedir. Beas-2B hücrelerine  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{75}$  ( $12,71 \mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{50}$  ( $8,47 \mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{25}$  ( $4,23 \mu\text{M}$ ) ve  $\text{IC}_{12,5}$  ( $2,11 \mu\text{M}$ ) dozları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk %DNA değerleri sırasıyla  $46,15 \pm 17,57$ ;  $44,71 \pm 17,01$ ;  $39,50 \pm 16,02$  ve  $29,24 \pm 14,13$  şeklindedir ve çizelge 4.3'te şekil 4.10'da verilmiştir.

$[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  gruplarının kuyruk %DNA değerleri büyüme kontrolü ile kıyaslandığında tüm dozlardaki kuyruk %DNA değerlerinin Mann-Whitney U testi uygulanarak istatistiki olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p \leq 0,001$ ).

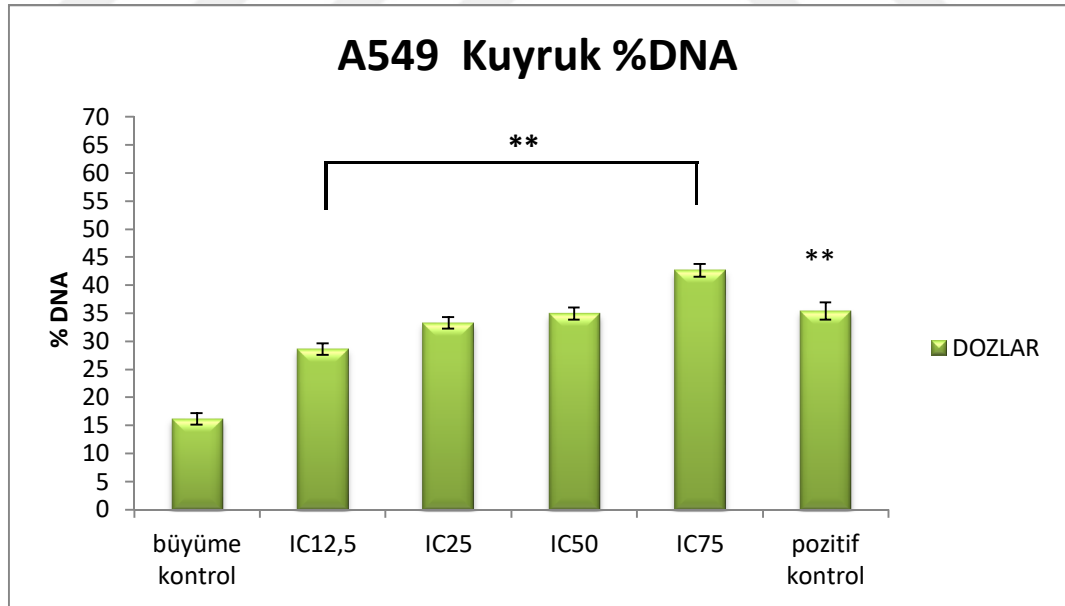


**Şekil 4.10.**  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  Kompleksinin  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  dozları ile Beas -2B hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk %DNA değerleri, büyüme kontrolü ile karşılaştırılmıştır \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,001$

#### 4.2.2.2. A549 hücre hattında elde edilen kuyruk %DNA bulguları

A549 hücrelerine ortalama kuyruk %DNA değerleri büyüme kontrolü grubunda  $16,17 \pm 14,81$  ve pozitif kontrol grubunda  $35,37 \pm 22,25$  şeklindedir. A549 hücrelerine  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{75}$  ( $3,93 \mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{50}$  ( $2,62 \mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{25}$  ( $1,31 \mu\text{M}$ ) ve  $\text{IC}_{12,5}$  ( $0,65 \mu\text{M}$ ) dozları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk %DNA değerleri sırasıyla  $42,63 \pm 16,63$ ;  $34,93 \pm 15,21$ ;  $33,29 \pm 13,90$  ve  $28,61 \pm 15,01$  şeklindedir ve çizelge 4.3'te şekil 4.11'de verilmiştir.

$[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  dozlarının ortalama kuyruk %DNA değerleri büyüme kontrolü ile kıyaslandığında  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  dozlarının kuyruk %DNA değerini istatistiki olarak anlamlı düzeyde yükselttiği belirlenmiştir ( $p \leq 0,001$ ).

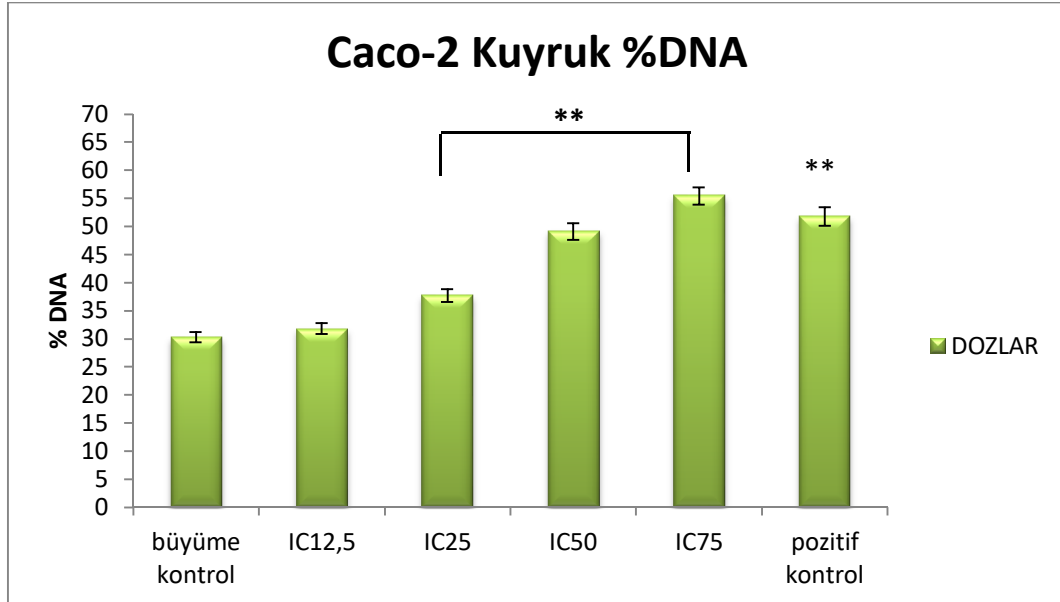


**Şekil 4.11.**  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  Kompleksinin  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  dozları ile A549 hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk %DNA değerleri, büyüme kontrolü ile karşılaştırılmıştır \*;  $p \leq 0,05$ , \*\*;  $p \leq 0,001$

#### 4.2.2.3. Caco-2 hücre hattında elde edilen kuyruk %DNA bulguları

Caco-2 hücrelerine ortalama kuyruk %DNA değerleri büyüme kontrolü grubunda  $30,28 \pm 12,34$  ve pozitif kontrol grubunda  $51,80 \pm 23,02$  şeklindedir. Caco-2 hücrelerine  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{75}$  ( $3,67 \mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{50}$  ( $2,45 \mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{25}$  ( $1,22 \mu\text{M}$ ) ve  $\text{IC}_{12,5}$  ( $0,61 \mu\text{M}$ ) dozları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk % DNA değerleri sırasıyla  $55,42 \pm 21,25$ ;  $49,13 \pm 21,12$ ;  $37,68 \pm 15,89$  ve  $31,81 \pm 13,94$  şeklindedir ve çizelge 4.3'te şekil 4.12'de verilmiştir.

$[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  dozlarının ortalama kuyruk % DNA değerleri büyüme kontrolü ile kıyaslandığında  $\text{IC}_{12,5}$  dozunun kuyruk %DNA değerini istatistiki olarak anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ),  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$  ve  $\text{IC}_{25}$  dozlarının kuyruk %DNA değerini istatistiki olarak anlamlı düzeyde yükselttiği belirlenmiştir ( $p \leq 0,001$ ).

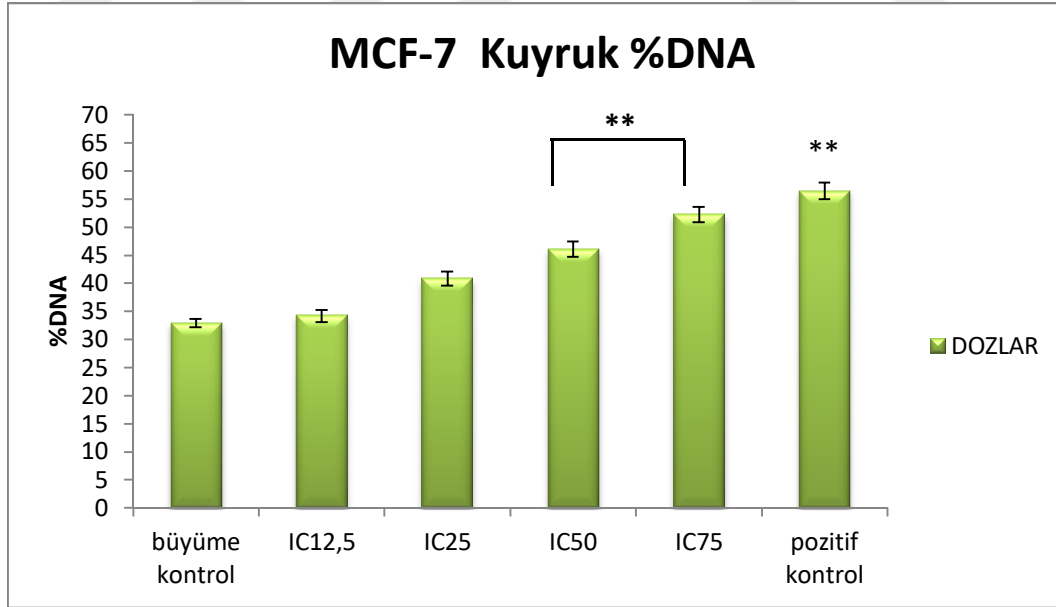


**Şekil 4.12.**  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  Kompleksinin  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  dozları ile Caco-2 hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk %DNA değerleri, büyüme kontrolü ile karşılaştırılmıştır \*;  $p \leq 0,05$ , \*\*;  $p \leq 0,001$

#### 4.2.2.4. MCF-7 hücre hattında elde edilen kuyruk %DNA bulguları

MCF-7 hücrelerine ortalama kuyruk %DNA değerleri büyüme kontrolü grubunda  $32,90 \pm 10,93$  ve pozitif kontrol grubunda  $56,50 \pm 20,66$  şeklindedir. MCF-7 hücrelerine [Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O kompleksinin IC<sub>75</sub> (3,10 µM), IC<sub>50</sub> (2,07 µM), IC<sub>25</sub> (1,03 µM) ve IC<sub>12,5</sub> (0,51 µM) dozları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk %DNA değerleri sırasıyla  $52,25 \pm 18,63$ ;  $46,07 \pm 19,03$ ;  $40,83 \pm 17,93$  ve  $34,19 \pm 15,78$  şeklindedir ve çizelge 4.3'te şekil 4.13'te verilmiştir.

[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O kompleksinin IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozlarının ortalama kuyruk %DNA değerleri büyüme kontrolü ile kıyaslandığında IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozlarının kuyruk %DNA değerini istatistiki olarak anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ), IC<sub>75</sub> ve IC<sub>50</sub> dozlarının kuyruk %DNA değerini istatistiki olarak anlamlı düzeyde yükselttiği belirlenmiştir ( $p \leq 0,001$ ).



**Şekil 4.13.** [Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O Kompleksinin IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozları ile MCF-7 hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk %DNA değerleri, büyüme kontrolü ile karşılaştırılmıştır \*;  $p \leq 0,05$ , \*\*;  $p \leq 0,001$

#### 4.2.3. OTM bulguları

[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O Kompleksinin IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozları ile Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hatlarına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen OTM değerleri Çizelge 4.4'te verilmiştir. OTM değerlerinin istatistiksel analizi veriler normal dağılım göstermediği için Mann-Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

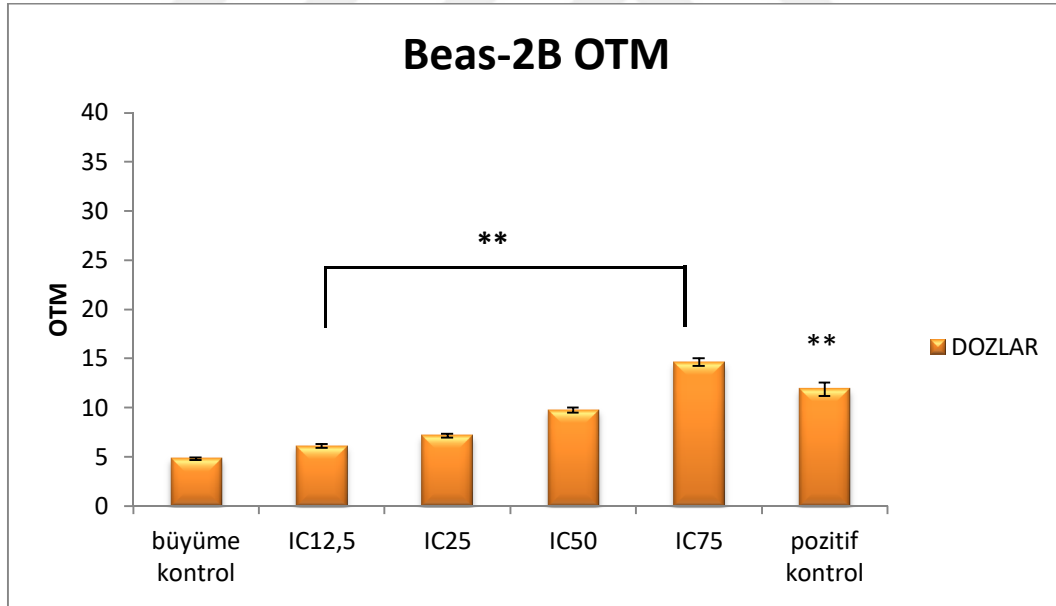
**Çizelge 4.4.** [Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O Kompleksinin IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozları ile Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hatlarına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen OTM değerleri, ±; standart sapmayı ifade etmektedir, büyüme kontrolü ile karşılaştırılmıştır \*; p≤ 0,05, \*\*; p≤ 0,001

<b>Olive toplam moment (OTM) ± Standart sapma</b>				
<b>HÜCRE HATTI</b>	<b>Beas-2B</b>	<b>A549</b>	<b>Caco-2</b>	<b>MCF-7</b>
<b>Büyüme kontrol</b>	4,80 ± 1,83	2,15 ± 1,55	4,54 ± 1,76	5,67 ± 1,75
<b>Pozitif kontrol</b>	11,87 ± 9,98**	7,26 ± 7,3**	29,93 ± 25,32**	33,39 ± 23,60**
<b>IC<sub>75</sub></b>	14,62 ± 5,60**	8,32 ± 5,11**	23,76 ± 20,36**	16,50 ± 11,49**
<b>IC<sub>50</sub></b>	9,76 ± 3,51**	7,28 ± 5,00**	16,49 ± 15,44**	10,62 ± 6,92**
<b>IC<sub>25</sub></b>	7,13 ± 2,85**	5,77 ± 3,07**	7,82 ± 4,81**	7,62 ± 5,40
<b>IC<sub>12,5</sub></b>	6,10 ± 3,18**	5,24 ± 3,24**	5,15 ± 2,18**	6,32 ± 2,31

#### 4.2.3.1. Beas-2B hücre hattında elde edilen OTM bulguları

Beas-2B hücrelerine ortalama OTM değerleri büyüme kontrolü grubunda  $4,80 \pm 1,83$  ve pozitif kontrol grubunda  $11,87 \pm 9,98$  şeklindedir. Beas-2B hücrelerine [Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O kompleksinin IC<sub>75</sub> (12,71 µM), IC<sub>50</sub> (8,47 µM), IC<sub>25</sub> (4,23 µM) ve IC<sub>12,5</sub> (2,11 µM) dozları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama OTM değerleri sırasıyla  $14,62 \pm 5,60$ ;  $9,76 \pm 3,51$ ;  $7,13 \pm 2,85$  ve  $6,10 \pm 3,18$  şeklindedir ve çizelge 4.4'te şekil 4.14'te verilmiştir.

[Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O kompleksinin IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozlarının ortalama OTM değerleri büyüme kontrolü ile kıyaslandığında IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozlarının OTM değerini istatistiki olarak anlamlı düzeyde yükselttiği belirlenmiştir ( $p \leq 0,001$ ).

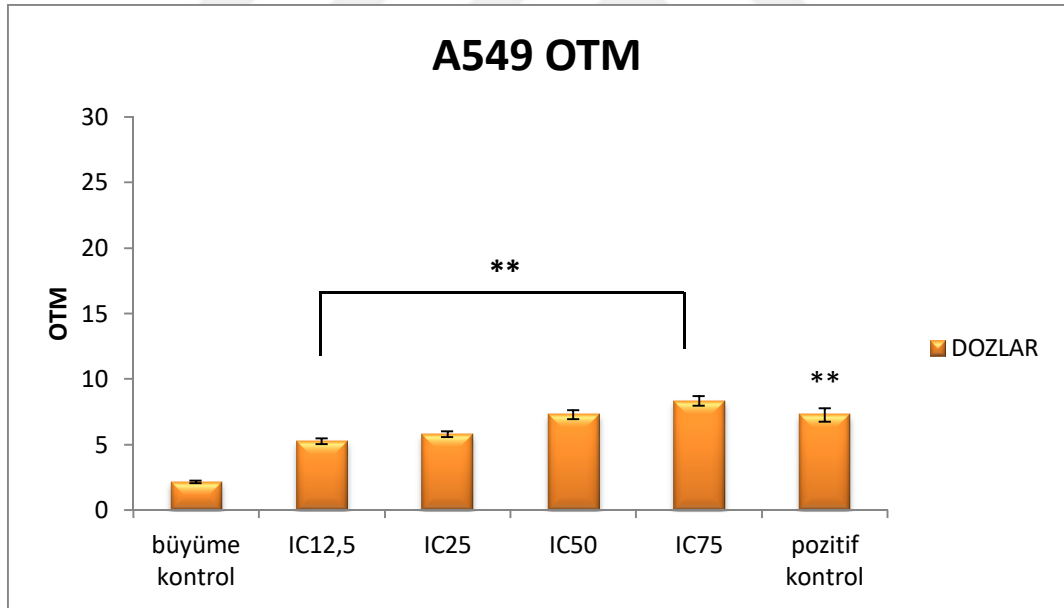


**Şekil 4.14.** [Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O Kompleksinin IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozları ile Beas-2B hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama OTM değerleri, büyüme kontrolü ile karşılaştırılmıştır \*;  $p \leq 0,05$ , \*\*;  $p \leq 0,001$

#### 4.2.3.2. A549 hücre hattında elde edilen OTM bulguları

A459 hücrelerine ortalama OTM değerleri büyüme kontrolü grubunda  $2,15 \pm 1,55$  ve pozitif kontrol grubunda  $7,26 \pm 7,3$  şeklindedir. A549 hücrelerine  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{75}$  ( $3,93 \mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{50}$  ( $2,62 \mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{25}$  ( $1,31 \mu\text{M}$ ) ve  $\text{IC}_{12,5}$  ( $0,65 \mu\text{M}$ ) dozları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama OTM değerleri sırasıyla  $8,32 \pm 5,11$ ;  $7,28 \pm 5,00$ ;  $5,77 \pm 3,07$  ve  $5,24 \pm 3,24$  şeklindedir ve çizelge 4.4'te şekil 4.15'te verilmiştir.

$[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  dozlarının ortalama OTM değerleri büyüme kontrolü ile kıyaslandığında  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  dozlarının OTM değerini istatistiki olarak anlamlı düzeyde yükselttiği belirlenmiştir ( $p \leq 0,001$ ).

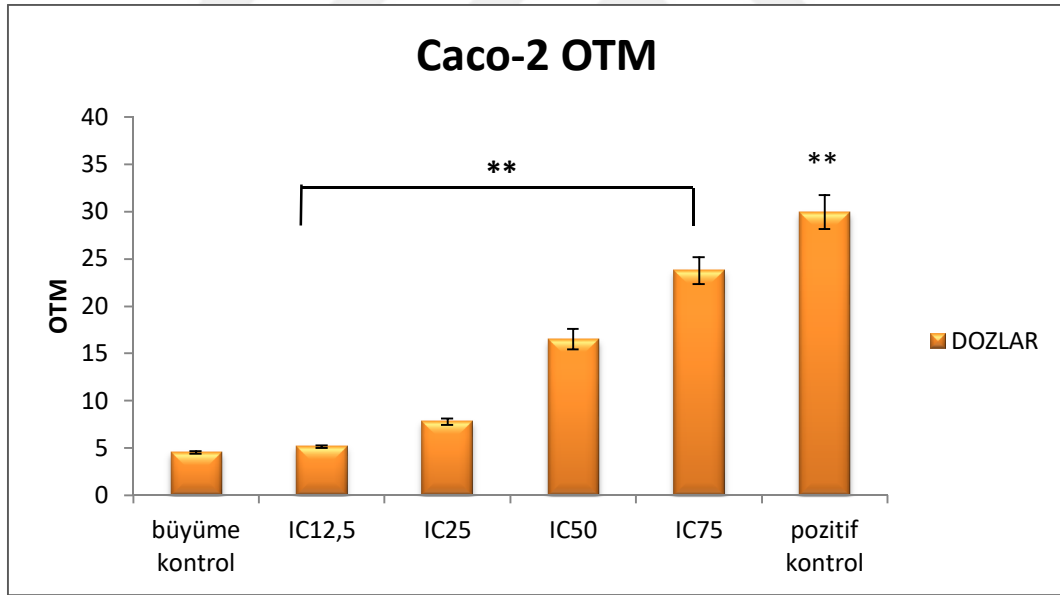


**Şekil 4.15.**  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  Kompleksinin  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  dozları ile A549 hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama OTM değerleri, büyüme kontrolü ile karşılaştırılmıştır \*;  $p \leq 0,05$ , \*\*;  $p \leq 0,001$

#### 4.2.3.3. Caco-2 hücre hattında elde edilen OTM bulguları

Caco-2 hücrelerine ortalama OTM değerleri büyüme kontrolü grubunda  $4,54 \pm 1,76$  ve pozitif kontrol grubunda  $29,93 \pm 25,32$  şeklindedir. Caco-2 hücrelerine  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{75}$  ( $3,67 \mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{50}$  ( $2,45 \mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{25}$  ( $1,22 \mu\text{M}$ ) ve  $\text{IC}_{12,5}$  ( $0,61 \mu\text{M}$ ) dozları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama OTM değerleri sırasıyla  $23,76 \pm 20,36$ ;  $16,49 \pm 15,44$ ;  $7,82 \pm 4,81$  ve  $5,15 \pm 2,18$  şeklindedir ve çizelge 4.4'te şekil 4.16'da verilmiştir.

$[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  dozlarının ortalama OTM değerleri büyüme kontrolü ile kıyaslandığında  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  dozlarının OTM değerini istatistiki olarak anlamlı düzeyde yükselttiği belirlenmiştir ( $p \leq 0,001$ ).



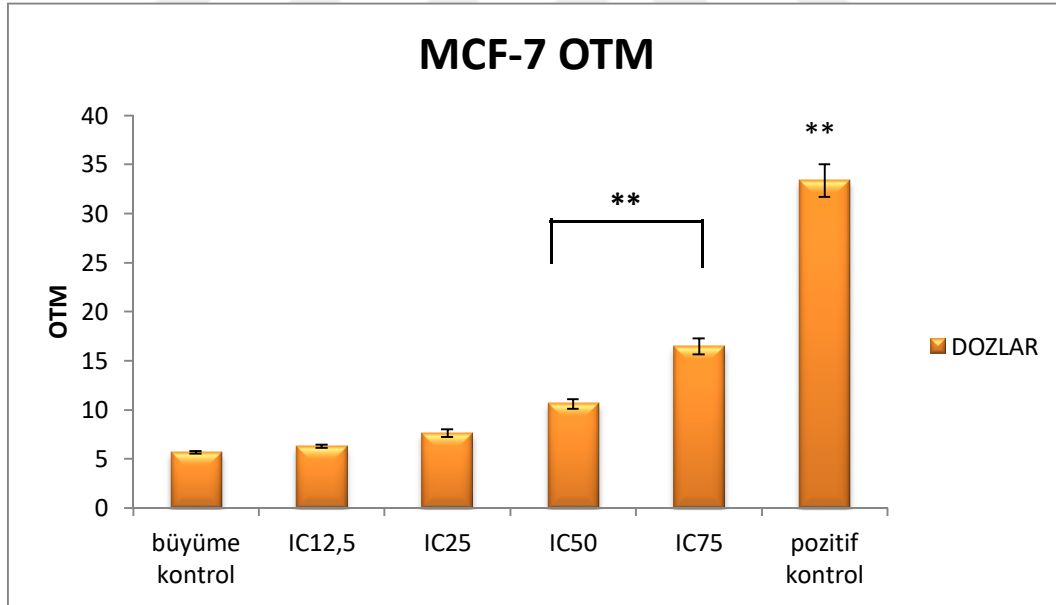
**Şekil 4.16.**  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  Kompleksinin  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  dozları ile Caco-2 hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama OTM değerleri, büyüme kontrolü ile karşılaştırılmıştır \*;  $p \leq 0,05$ , \*\*;  $p \leq 0,001$



#### 4.2.3.4. MCF-7 hücre hattında elde edilen OTM bulguları

MCF-7 hücrelerine ortalama OTM değerleri büyüme kontrolü grubunda  $5,67 \pm 1,75$  ve pozitif kontrol grubunda  $33,39 \pm 23,60$  şeklindedir. MCF-7 hücrelerine  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{75}$  ( $3,10 \mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{50}$  ( $2,07 \mu\text{M}$ ),  $\text{IC}_{25}$  ( $1,03 \mu\text{M}$ ) ve  $\text{IC}_{12,5}$  ( $0,51 \mu\text{M}$ ) dozları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama OTM değerleri sırasıyla  $16,50 \pm 11,49$ ;  $10,62 \pm 6,92$ ;  $7,62 \pm 5,40$  ve  $6,32 \pm 2,31$  şeklindedir ve çizelge 4.4'te şekil 4.17'de verilmiştir.

$[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kompleksinin  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  dozlarının ortalama OTM değerleri büyüme kontrolü ile kıyaslandığında  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  dozlarının OTM değerini istatistiki olarak anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ),  $\text{IC}_{75}$  ve  $\text{IC}_{50}$  dozlarının OTM değerini istatistiki olarak anlamlı düzeyde yükselttiği belirlenmiştir ( $p \leq 0,001$ ).



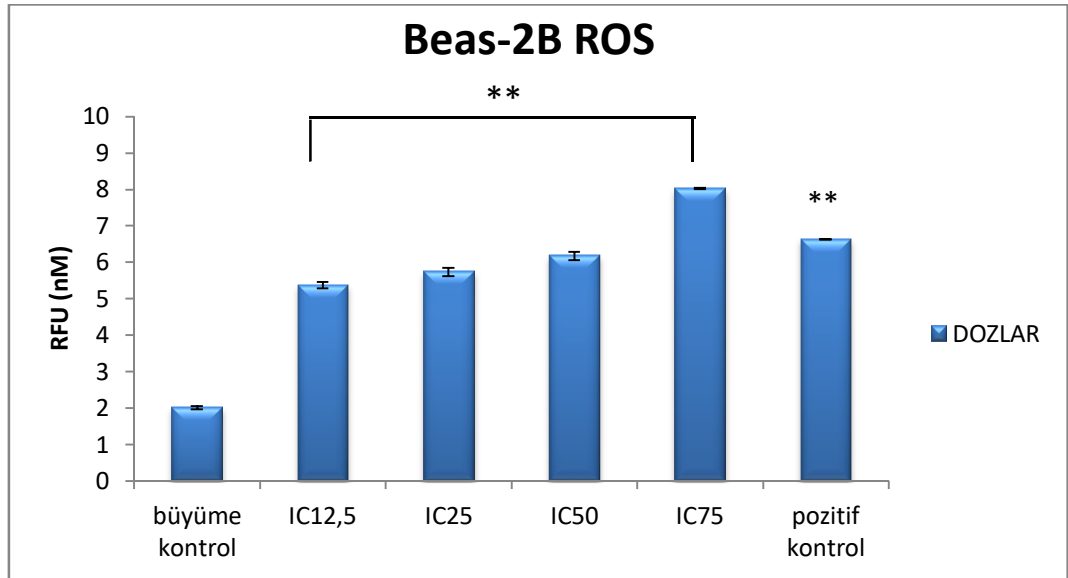
**Şekil 4.17.**  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  Kompleksinin  $\text{IC}_{75}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{25}$  ve  $\text{IC}_{12,5}$  dozları ile MCF-7 hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama OTM değerleri, büyüme kontrolü ile karşılaştırılmıştır \*;  $p \leq 0,05$ , \*\*;  $p \leq 0,001$

### 4.3. ROS Bulguları

[Cu(5-Nitro-1-10-Fenantrolin) (L-glutamin)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O bakır (II) karışık ligand kompleksinin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> dozları ile Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hatlarına 1 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ROS değerleri (relatif floresan değeri; RFU, nM) Çizelge 4.5'te verilmiştir. ROS değerlerinin istatistiksel analizi Mann-Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### 4.3.1. Beas-2B hücre hattında elde edilen ROS Bulguları

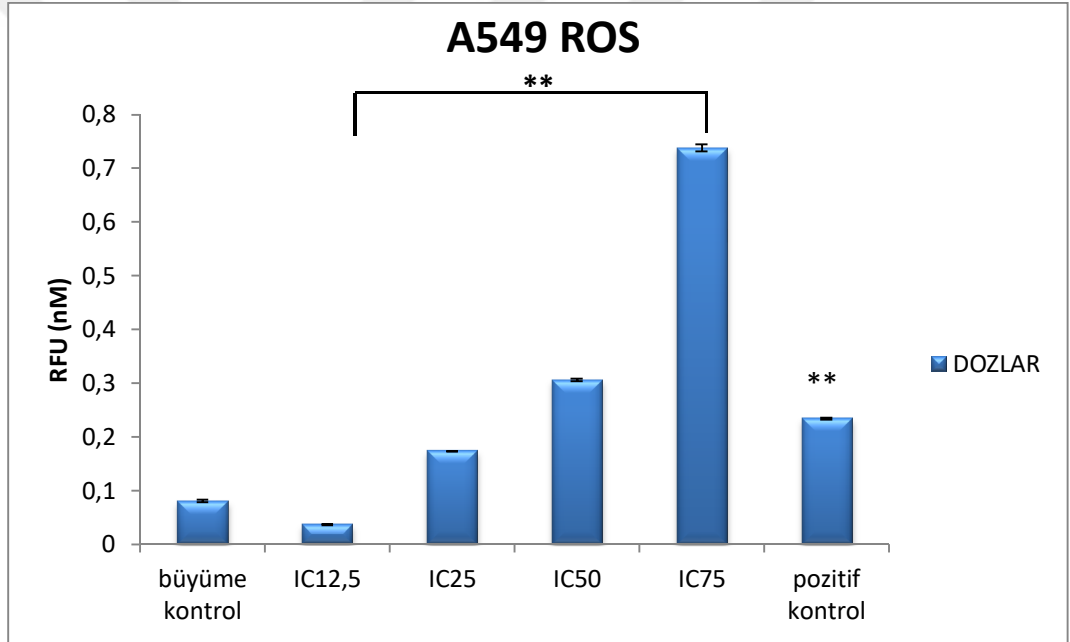
Beas-2B hücrelerine ortalama ROS büyüme kontrol grubunda  $2,01 \pm 0,05$  ve pozitif kontrol grubunda  $6,62 \pm 0,01$  olarak belirlenmiştir. Beas-2B hücrelerine bakır kompleksinin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama ROS değerleri sırasıyla  $5,38 \pm 0,11$ ;  $5,74 \pm 0,16$ ;  $6,17 \pm 0,16$  ve  $8,02 \pm 0,02$  şeklindedir, Çizelge 4.5'te ve Şekil 4.18'de gösterilmiştir. Bakır kompleksinin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> gruplarının ortalama ROS değerleri büyüme kontrol ile kıyaslandığında IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> dozlarının neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlıdır ( $p \leq 0,001$ ).



**Şekil 4.18.** [Cu(5-Nitro-1-10-Fenantrolin) (L-glutamin)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O bakır (II) kompleksinin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> dozları ile Beas-2B hücre hattına 1 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ROS değerleri (RFU, nM), büyüme kontrolü ile karşılaştırılmıştır \*;  $p \leq 0,05$ , \*\*;  $p \leq 0,001$

#### 4.3.2. A549 hücre hattında elde edilen ROS Bulguları

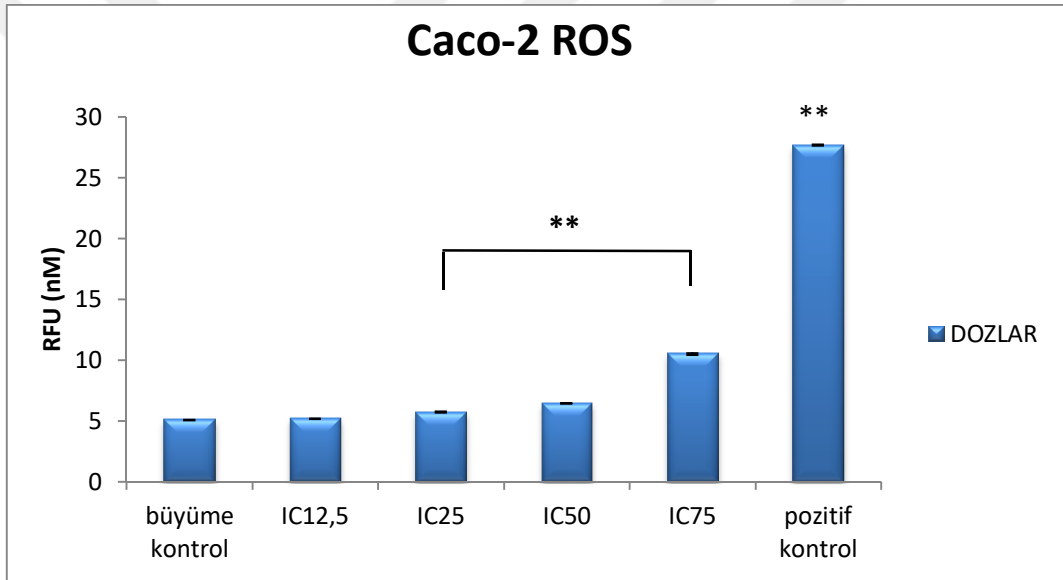
A549 hücrelerine ortalama ROS büyüme kontrol grubunda  $0,08 \pm 0,003$  ve pozitif kontrol grubunda  $0,23 \pm 0,002$  olarak belirlenmiştir. A549 hücrelerine bakır kompleksinin  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama ROS değerleri sırasıyla  $0,03 \pm 0,001$ ;  $0,17 \pm 0,0004$ ;  $0,30 \pm 0,002$  ve  $0,73 \pm 0,009$  şeklindedir, Çizelge 4.5'te ve Şekil 4.19'da gösterilmiştir. Bakır kompleksinin  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  gruplarının ortalama ROS değerleri büyüme kontrol ile kıyaslandığında  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  dozlarının neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlıdır ( $p \leq 0,001$ ).



**Şekil 4.19.**  $[Cu(5\text{-Nitro-1-10-Fenantrolin})(L\text{-glutamin})(H_2O)]ClO_4.H_2O$  bakır (II) kompleksinin  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  dozları ile A549 hücre hattına 1 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ROS değerleri (RFU, nM), büyüme kontrolü ile karşılaştırılmıştır \*;  $p \leq 0,05$ , \*\*;  $p \leq 0,001$

### 4.3.3. Caco-2 hücre hattında elde edilen ROS Bulguları

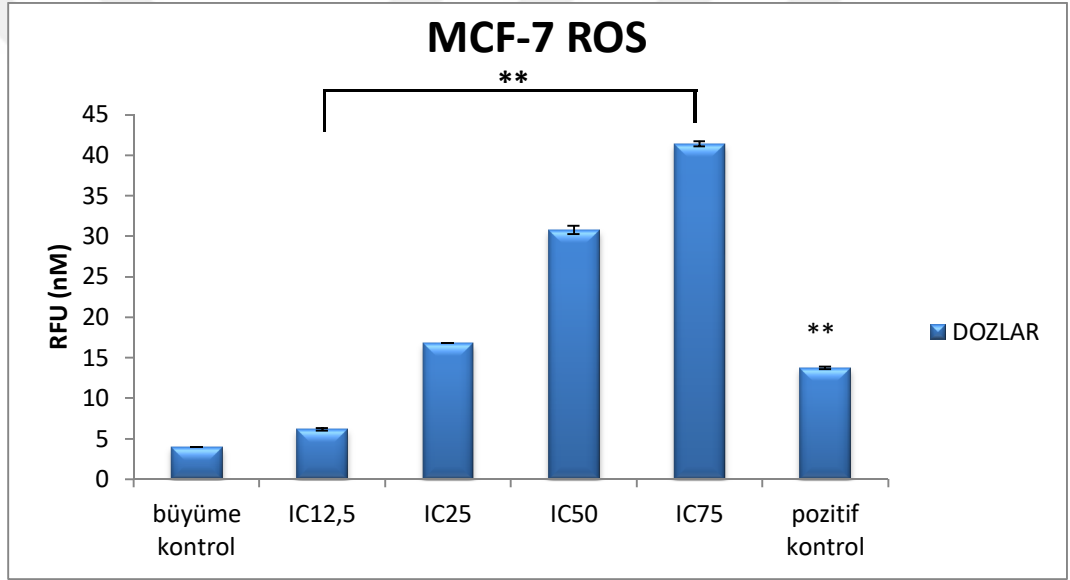
Caco-2 hücrelerine ortalama ROS büyüme kontrol grubunda  $5,07 \pm 0,04$  ve pozitif kontrol grubunda  $27,68 \pm 0,07$  olarak belirlenmiştir. Caco-2 hücrelerine bakır kompleksinin  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama ROS değerleri sırasıyla  $5,18 \pm 0,03$ ;  $5,72 \pm 0,09$ ;  $6,45 \pm 0,04$  ve  $10,51 \pm 0,11$  şeklindedir, Çizelge 4.5'te ve Şekil 4.20'de gösterilmiştir. Bakır kompleksinin  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  gruplarının ortalama ROS değerleri büyüme kontrol ile kıyaslandığında  $IC_{12,5}$  dozunun neden olduğu artışın istatistiki olarak anlamlı değilken ( $p > 0,05$ ),  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  dozlarının neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlıdır ( $p \leq 0,001$ ).



**Şekil 4.20.**  $[Cu(5\text{-Nitro-1-10-Fenantrolin})(L\text{-glutamin})(H_2O)]ClO_4.H_2O$  bakır (II) kompleksinin  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  dozları ile Caco-2 hücre hattına 1 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ROS değerleri (RFU, nM), büyüme kontrolü ile karşılaştırılmıştır \*;  $p \leq 0,05$ , \*\*;  $p \leq 0,001$

#### 4.3.4. MCF-7 hücre hattında elde edilen ROS Bulguları

MCF-7 hücrelerine ortalama ROS büyüme kontrol grubunda  $3,95 \pm 0,01$  ve pozitif kontrol grubunda  $13,78 \pm 0,21$  olarak belirlenmiştir. MCF-7 hücrelerine bakır kompleksinin  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  dozları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama ROS değerleri sırasıyla  $6,16 \pm 0,26$ ;  $16,81 \pm 0,01$ ;  $30,76 \pm 0,73$  ve  $41,42 \pm 0,43$  şeklindedir, Çizelge 4.5'te ve Şekil 4.21'de gösterilmiştir. Bakır kompleksinin  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  gruplarının ortalama ROS değerleri büyüme kontrol ile kıyaslandığında  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  dozlarının neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlıdır ( $p \leq 0,001$ ).



**Şekil 4.21.**  $[Cu(5\text{-Nitro-1-10-Fenantrolin})(L\text{-glutamin})(H_2O)]ClO_4.H_2O$  bakır (II) kompleksinin  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  dozları ile MCF-7 hücre hattına 1 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ROS değerleri (RFU, nM), büyüme kontrolü ile karşılaştırılmıştır \*;  $p \leq 0,05$ , \*\*;  $p \leq 0,001$

**Çizelge 4.5.** [Cu(5-Nitro-1-10-Fenantrolin) (L-glutamin)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O bakır (II) kompleksinin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> dozları ile Caco-2, MCF-7, A549 ve Beas-2B hücre hatlarına 1 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ROS değerleri (nM), ±; standart sapmayı ifade etmektedir, büyüme kontrolü ile karşılaştırılmıştır \*; p≤ 0,05, \*\*; p≤ 0,001

Hücre Hattı	Beas-2B	A549	Caco-2	MCF-7
<b>Büyüme Kontrol</b>	2,01 ± 0,05	0,08 ± 0,003	5,07 ± 0,04	3,95 ± 0,01
<b>Pozitif Kontrol</b>	6,62 ± 0,01**	0,23 ± 0,002**	27,68 ± 0,07**	13,78 ± 0,21**
<b>IC<sub>75</sub></b>	8,02 ± 0,02**	0,73 ± 0,009**	10,51 ± 0,11**	41,42 ± 0,43**
<b>IC<sub>50</sub></b>	6,17 ± 0,16**	0,30 ± 0,002**	6,45 ± 0,04**	30,76 ± 0,73**
<b>IC<sub>25</sub></b>	5,74 ± 0,16**	0,17 ± 0,0004**	5,72 ± 0,09**	16,81 ± 0,01**
<b>IC<sub>12,5</sub></b>	5,38 ± 0,11**	0,03 ± 0,001**	5,18 ± 0,03	6,16 ± 0,26**

## 5. TARIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında yeni sentezlenen bakır (II) kompleksi [Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O nin etkileri incelenmiştir. Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hatlarında bakır (II) kompleksinin anti-proliferatif etkileri XTT testi, genotoksik etkileri komet testi ve oksidatif hasar ROS testi ile araştırılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol ajanı olarak hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) kullanılmıştır.

Son yıllarda bakır (II) komplekslerinin anti-proliferatif ve anti-kanser etkileri üzerine birçok çalışma yapılmıştır.

Bakır kompleksleri, etki mekanizmalarının moleküler temelleri hakkında çok az bilgi olmasına rağmen platin içeren ilaçlara kıyasla daha az yan etkiye sahip oluşu ile dikkatleri üzerine çekmiştir (Guo 2006). Bakır (II) kompleksleri ayrıca bakır DNA'nın minör ve majör oyuklarına interkalasyon yeteneklerinin yüksek oluşu ve anti-tümör etkilerinden dolayı da büyük ilgi görmüştür. 1,10-fenantrolin içeren bakır türevleri potansiyel sitotoksik ajanlar olarak ifade edilmiştir ve IC<sub>50</sub> değerleri altmikromolar aralıkta yer almaktadır (Santini ve ark. 2014).

Çalışmamızda Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü tarafından sentezlenmiş [Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin) (L-glutamin) (H<sub>2</sub>O)] ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O bakır (II) kompleksinin Beas-2B sağlıklı hücre hattı ve A549, Caco-2, MCF-7 kanser hücre hatlarında ve hattındaki sitotoksitesi XTT testi ile gösterilmiştir ve büyüme kontrolü ile kıyaslanmıştır. Beas-2B, A549, Caco-2 ve MCF-7 hücre hattında [Cu(5-nitro-1-10-fenantrolin)(L-glutamin)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O kompleksinin IC<sub>50</sub> değerleri sırası ile 8,47 ± 0,18 µM ; 2,62 ± 0,01 µM; 2,45 ± 0,06 µM ve 2,07 ± 0,08 µM olarak bulunmuştur.

Bakır (II) kompleksinin tüm kanser hücre hatlarında yüksek sitotoksite gösterdiği gözlenmiştir. Kanser hücre hatları arasında bakır (II) kompleksine en duyarlı hücre hattının MCF-7 olduğu tespit edilmiştir. MCF-7'yi takiben sırasıyla Caco-2 ve A549 hücre hatlarının da yüksek sitotoksiteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bakır kompleksinin Beas-2B sağlıklı hücre hattına diğer hücre hatlarına kıyasla daha az zarar verdiği tespit edilmiştir.

Çeşitli araştırmalarda benzer şekilde MCF-7 hücre hattında farklı bakır (II) komplekslerinin sitotoksik etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

Gokhale ve ark. tarafından cis-[dichloro (N1-(2-benzyloxybenzylidene)pyridine-2-carboxamidrazone) copper(II)] bakır (II) kompleksinin anti-tümör etkisi insan meme kanser hücre hattı MCF-7 üzerinde çalışılmıştır. MTT testi sonuçlarına göre IC<sub>50</sub> değeri 3 µM olarak tespit edilmiş ve güçlü anti-proliferatif aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Gokhale ve ark. 2011). Mefenamik asit içeren Mn, Co, Ni ve Cu komplekslerinin aktiviteleri MCF-7, A549, L-929 ve T24 hücre hatlarında çalışılmış, MTT test sonuçlarına göre bakır (II) kompleksinin MCF-7 hücre hattında IC<sub>50</sub> değeri 2,51 µM olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kıyaslandığında bakır (II) kompleksinin MCF-7 hücre hattına karşı güçlü anti-kanser potansiyeli dikkat çekmiştir (Kovala-Demertzi ve ark. 2009). Zhong-Ying ve ark. [CuII(5-Cl-pap)(OAc)(H<sub>2</sub>O)]·2H<sub>2</sub>O bakır(II) kompleksini MCF-7 hücre hattında çalışmıştır. Elde edilen MTT sonuçlarına göre 24 saat sonunda IC<sub>50</sub> değeri 20.7 µM, 48 saat sonunda IC<sub>50</sub> değeri 9.8 µM olarak bulunmuştur. 24 ve 48 saat sonunda cisplatinin IC<sub>50</sub> değerleri de sırasıyla 25.0 µM and 10.8 µM'dır. Bu sonuçlar bakır kompleksinin MCF-7 hücrelerini inhibe ettiğini ifade etmektedir. Ayrıca sonuçlar MCF-7 hücre hattında cisplatine göre bakır (II) kompleksinin anti-proliferatif etkisinin özellikle 48. saatte daha yüksek olduğunu göstermektedir (Zhong-Ying ve ark. 2012). Çalışmamızda kullandığımız bakır (II) kompleksine en duyarlı hücre hattı MCF-7 olarak belirlenmiştir ve bu bulgu diğer bakır (II) kompleksleri ile gerçekleştirilmiş çalışmalarla uyumlu görünmektedir.

Tez çalışmasında kullanılan bakır kompleksinin sitotoksitesine neden olan mekanizmaları aydınlatmak için oksidatif hasar belirleme testi ROS ve DNA tek ve çift iplik kırıklarını belirleme amaçlı komet testleri gerçekleştirilmiştir.

Zue ve ark. (2005) tarafından bakır komplekslerinin DNA'ya yüksek affinite ile bağlanabildiği ve redoks katalizörü olarak fonksiyonu olduğu bildirilmiştir. Redoks özellikleri nedeniyle bakır (II) kompleksleri genellikle DNA'nın oksidatif parçalanması için ajanların geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Bakır kompleksleri tarafından meydana gelen DNA degradasyonunun Fenton tipi reaksiyonlar aracılığı ile oluştuğu tahmin edilmektedir. Bakır içeren bu reaksiyon önemli bir ROS kaynağıdır ve hem oksidasyona



hem de DNA zincir kırılmasına neden olmaktadır (Kremer 1999). Kanser hücreleri oksidatif strese karşı oldukça duyarlıdır. Bu yüzden ROS meydana getiren ajanlar kanser hücrelerini öldürebilmektedir (Huang ve ark. 2000).

Çalışmada kullanılan  $[Cu(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(L\text{-glutamin})(H_2O)]ClO_4.H_2O$  bakır (II) kompleksinin DNA'ya bağlanma afinitesinin yüksek olduğu önceden gerçekleştirilmiş bir çalışma ile gösterilmiştir (İnci ve ark. 2016). Kristal kompleksin hücre kültüründe neden olduğu hücre içi serbest radikal miktarı Caco-2, MCF-7, A549 ve Beas-2B hücre hatlarında DCFH-DA testi ile ölçülmüştür. Hücre hatlarına bakır (II) kompleksinin  $IC_{75}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{25}$  ve  $IC_{12,5}$  dozları ile 1 saat süresince muamele edilmiştir. Caco-2 hücre hattında bakır (II) kompleksinin  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  gruplarının ortalama ROS değerleri büyüme kontrol ile kıyaslandığında  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  dozlarının neden olduğu artışın istatistiki olarak anlamlı olduğu görülmektedir. A549, Beas-2B ve MCF-7 hücre hatlarında ise bakır (II) kompleksinin  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  gruplarının ortalama ROS değerleri büyüme kontrol ile kıyaslandığında tüm dozlarının neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlıdır. En yüksek ROS oluşumu MCF-7 hücre hattında ölçülmüştür. MCF-7 hücre hattında gözlenen yüksek ROS oluşumu bakır (II) kompleksinin meme kanseri için anti-kanser ajanı potansiyelini ortaya koymaktadır.

Bulgularımızı destekleyen bir çalışmada Casiopeina serisinden  $[Cu(\text{glycinate})(4,7\text{-dimethyl-1,10-phenanthroline})(H_2O)](NO_3)$  (Cas II-gly)' nin hücre içi ROS miktarını arttırarak, nükleer fregmentasyonu tetiklediği bilinmektedir (Kachadourian ve ark. 2010). Bir diğer çalışmada  $[Cu(\text{phen})(aa)(H_2O)]NO_3 \cdot xH_2O$  1-4 (phen = 1,10-phenanthroline; aa = gly (1), DL-ala (2), sar (3), C-dmg (4)) komplekslerinin MDA-MB-231 kanser ve MCF-10A sağlıklı meme hücrelerinde 6 ve 24 saat muamele edildiğinde oluşan ROS miktarı çalışılmıştır. Yüksek dozların 6 saatlik muamelesinde MDA-MB-231 kanser hücre hatlarında ROS seviyesinde kontrole kıyasla anlamlı bir artış olurken MCF-10A sağlıklı meme hücre hatlarında ROS seviyesinde anlamlı bir artış olmamıştır. Bu durum bakır komplekslerinin kanser hücre hatlarında ROS seviyesini arttırırken sağlıklı hücre hattında ROS seviyesini anlamlı şekilde değiştirmediyi göstermiştir (Kong ve ark. 2014). Hücre içi serbest radikal oluşumu çeşitli sebepler ile artabilir. Bu çalışmada kullanılan bakır (II) kompleksinin ve genel olarak tüm bakır kökenli kristal komplekslerin hücre içi ROS düzeyini arttırma

eğilimleri olduğu bilinmektedir (Guo ve ark. 2009). Bu sebeple kanser hücre hatlarında gözlemediğimiz ROS düzeylerindeki artış literatür ile uyumludur.

Tez çalışmasında kullandığımız bakır kristalinin DNA' da tek ve çift iplik kırıkları oluşturma eğilimi komet testi ile belirlenmeye çalışılmıştır. Buna göre A549, Caco-2, MCF-7 ve Beas-2B hücre hatları 24 saat bakır (II) kompleksinin IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozları ile muamele edildikten sonra komet testi gerçekleştirilmiştir. Komet testi sonuçları kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve Olive kuyruk momenti parametreleri ile değerlendirilmiştir.

A549, Caco-2 ve Beas-2B hücre hatlarının tüm doz gruplarında, MCF-7 hücre hattının ise IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>25</sub> dozlarında büyüme kontrolüne kıyasla kuyruk uzunluğunda anlamlı bir artış gözlenmiştir. Kuyruk % DNA değerleri büyüme kontrolü ile kıyaslandığında A549 ve Beas-2B hücre hatlarının tüm dozlarında, MCF-7 hücre hattının IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub> dozlarında ve Caco-2 hücre hattının IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>25</sub> kuyruk % DNA değerlerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir.

Olive kuyruk momenti verileri değerlendirildiğinde A549 ve Beas-2B hücre hatlarının tüm dozlarında, MCF-7 hücre hattının IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub> dozlarında ve Caco-2 hücre hattının IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>25</sub> olive kuyruk momenti değerlerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Sonuçlar kompleksin kanser hücrelerinde DNA kırıklarına neden olduğunu göstermektedir. Artan hücre içi serbest radikal düzeylerinin DNA tek ve çift iplik kırık oranlarını arttırdığı bilinmektedir. Çalışmada belirlenen yüksek ROS seviyelerinin komet testinde gözlemlenen artmış DNA kırık oranlarından sorumlu olabileceğini düşünmekteyiz.

Bu konuda daha önce gerçekleştirilmiş bir çalışmada Zhong-ying ve ark. (2012) tarafından [CuII(5-Cl-pap)(OAc)(H<sub>2</sub>O)]·2H<sub>2</sub>O bakır (II) kompleksinin MCF-7 hücre hattında antitümör potansiyelini üzerinde araştırılmıştır. Yapılan komet testine göre bakır (II) kompleksine 24 saat maruziyeti sonunda MCF-7 hücrelerinde DNA hasar oranının arttığı görülmüştür.

Reyes-Perez ve ark. casiopeinas'ların DNA'ya verdiği hasarı HeLa ve insan lenfosit hücrelerinde komet testi uygulayarak araştırmışlardır. HeLa hücreleri ile lenfosit hücrelerin karşılaştırmasında HeLa hücrelerinin daha hassas olduğu belirlenmiştir.

HeLa hücrelerinin hızlı bölünmesi ve MnSOD enzim eksikliği nedeni ile yüksek genotoksisiteye sahip olduğu düşünülmüştür. Tüm casiopeinas uygulamalarının hücrelerde DNA fragmentasyonu oluşturduğu ve konstantrasyon arttıkça kırılmaların çoğaldığı rapor edilmiştir (Reyes-Perez ve ark 2011).

Tez çalışmamızın verileri, sentezlenen  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  bakır (II) kompleksinin ROS üreterek ve/veya DNA zincirlerini kırarak DNA hasarına neden olduğuna işaret etmektedir. Veriler doğrultusunda tez çalışmasında kullanılan  $[\text{Cu}(5\text{-nitro-1-10-fenantrolin})(\text{L-glutamin})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  bakır (II) kompleksinin Caco-2, MCF-7 ve A549 kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif etki gösterdiği ve sağlıklı Beas-2B hücre hatlarına karşı daha az toksik olduğu tespit edilmiştir. MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki yüksek sitotoksik etki dikkat çekmektedir. Bakır (II) kompleksinin A549 kanser hücre hattında yüksek anti-proliferatif etkiye sahip olmasına rağmen Beas-2B sağlıklı hücre hattıyla karşılaştırıldığında düşük genotoksisiteye sahip olduğu ve bu hücre hattında anti-kanser aktivitesinin bulunmadığı anlaşılmaktadır. Genotoksisite sonuçlarına göre bakır (II) kompleksinin kanser hücre hatlarında DNA hasarı meydana getirirken Beas-2B insan sağlıklı bronşiyal epitel hücrelerinde bu hasarın diğer hücre hatlarına göre daha düşük oranda olduğu görülmektedir. Özellikle ROS ve komet testinden elde edilen sonuçlara göre MCF-7 hücre hattının başarılı sonuçları in vivo çalışmalarda da olumlu sonuçlar alındığı takdirde anti-kanser ilacı olarak umut verici bulunmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Aksoy, M. 2008.** Beslenme Biyokimyası. Hatiboğlu yayınevi, Ankara.
- Alexandrescu, D.T., Wiernik, P.H., Dutcher, J.P. 2006.** Chemotherapy
- Ali Ezadyar, S., Kumbhar, A. S., Kumbhar, A. A., Khan, A. 2012.** Binuclear ruthenium(II) polypyridyl complexes: DNA cleavage and mitochondria mediated apoptosis induction. *Polyhedron*. 36, 45–55.
- Altman, F. P. 1976.** Tetrazolium salts and formazans. *Prog. Histochem. Cytochem*. 9, 1-56
- Alvarez, H.M., Xue, Y., Robinson, C.D., Canalizo-Hernandez, M.A., Marvin, R.G., Kelly, R.A., Mondragon, A., Penner-Hahn, J.E., O'Halloran, T.V. 2010.** Tetrathiomolybdate inhibits copper trafficking proteins through metal cluster formation. *Science*. 327:331–334.
- Anand, A.J., Bashey, B. 1993.** Newer insights into cisplatin nephrotoxicity. *Ann Pharmacother*. 23: 1519-1527.
- Anonim, 2008.** Antineoplastic Agents in Encyclopedia of Molecular Pharmacology. *Springer*. 155.
- Arslan, A. 2005.** Geçiş Metallerinin Kompleksleri Halinde Analizi. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Ates, I., Suzen, H.S., Aydın, A., Karakaya, A. 2004.** The oxidative DNA base damage in testes of rats after intraperitoneal cadmium injection. *Biometals*, 17 (4): 371-7.
- Austgen, T.R., Chakrabarti, R., Chen, M.K. 1992.** Adaptive regulation in skeletal muscle glutamine metabolism in endotoxin-treated rats. *J Trauma*. 32:600-6.
- Baldemirci, T., Congur, G. 2015.** Iron(III) and nickel(II) complexes as potential anticancer agents: synthesis, physicochemical and structural properties, cytotoxic activity and DNA interactions. *NewJ.Chem*. 39,5643.
- Bass, D.A., Parce, J.W., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C., Thomas, M. 1983.** Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol*. 130:1910
- Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B.Ş., Alvur, M. 2004.** DNA hasarı analizinde  $\mu$ - FADU ve Komet yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*. (3): 2, 97-103.
- Berman, H.K., O'Doherty, R.M., Anderson, P. 1998.** Overexpression of protein targeting to glycogen (PTG) in rat hepatocytes causes profound activation of glycogen synthesis independent of normal hormone- and substrate-mediated regulatory mechanisms. *J Biol Chem*. 273:26421-5.
- Berridge, M.V., Herst, P.M., Tan, A.S. 2005.** Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*. 11, 127-152.
- Bode, B.P., Kaminski, D.L., Souba, W.W. 1995.** Glutamine transport in isolated human hepatocytes and transformed liver cells. *Hepatology*. 21:511-20

- Boerner, P., Saier, M.H. Jr. 1985.** Adaptive regulatory control of System A transport activity in a kidney epithelial cell line (MDCK) and in a transformed variant (MDCK-T1). *J Cell Physiol.* 122:308-15.
- Boogaard, P.J., Nagelkerke, J.F., Mulder, G.J. 1990.** Renal proximal tubular cells in suspension or in primary culture as in vitro models to study nephrotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* 76: 281-291.
- Brosnan ,J.T. 2003.** Interorgan amino acid transport and its regulation. *J Nutr.* 133:68-72.
- Burçak, G., Andıcan, G. 2004.** Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpasa J Med,* 35 (4): 159-169.
- Caires, A. C. F. 2007.** Anti-Cancer Agents. *Med Chem.* 7: 484.
- Can, Ç., Sözen, H., Kalemci, S. 2014.** Kemoterapötik Ajanlara Bağlı Oluşan Akciğer Hasarı. *Haseki Tıp Bülteni.* 52: 248-50.
- cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews.* 56 (2): 185– 229.
- Castro, M., Veeder, M.H., Mailliard, J.A. 1996.** A prospective study of pulmonary function in patients receiving mitomycin. *Chest.* 109:939,44.
- Cerchiaro, G., Aquilano, K., Filomeni, G. 2005.** Isatin-Schiff base copper(II) complexes and their influence on cellular viability. *J. Inorg. Biochem.* 99, 1433-1440.
- Chang, C.S., Choi, J.B., Kim, H.J., Park, S.B. 2011.** Correlation between serum testosterone level and concentrations of copper and zinc in hair tissue. *Biol Trace Elem Res.* 144: 264-71.
- Chao, H., Ye, B.H., Zhang, Q.L., Ji, L.N. 1999.** A Luminescent pH Sensor Based on a Diruthenium(II) Complex: ‘off-on-off’ Switching Via The Protonation/Deprotonation of an Imidazole-Containing Ligand. 2: 338-340.
- Choi, S., Filotto, C., Bisanzo, M., Delaney, S., Lagasee, D., Whitworth, J.L., Jusko, A., Li, C.R., Wood, N.A., Willingham, J., Schwenker, A., Spaulding, K. 1998.** Reduction and anticancer activity of platinum(IV) complexes. *Inorg Chem.* 37:2500–2504.
- Choo, X.Y., Alukaidey, L., White, A.R., Grubman, A. 2013.** Neuroinflammation and Copper in Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers.* 145:345.
- Choy,W.N. 2001.** Genetic toxicology and cancer risk assessment. New York, 29-187.
- Christensen, H.N. 1990.** Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Review.* 70:43-77.
- Clarke, M.J., Zhu, F., Frasca, D.R. 1999.** Non-Platinum Chemotherapeutic Metallo pharmaceuticals. *Chem Rev.* 99:2511–2533.
- Colleen, S., Marks, A.D., Lieberman, M. 2007.** Temel Tıbbi Biyokimyası “Klinik Yaklaşım”. 2. Baskı, Ankara: Güneş Tıp Yayınları.
- Cook, J.A., Mitchell, J.B., 1989.** Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal. Biochem.* 179, 1–7.

**Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroğlu, M., Lunec, J. 2003.** Oxidative DNA damage: Mechanism, mutation and disease. *FASEB J*, 17(10): 1195- 214.

**Corrie, P.G., Pippa, G. 2008.** Cytotoxic chemotherapy clinical aspects. *Medicine*. 36 (1): 24–28.

**Dahlgren, C., Karlsson, A. 1999.** Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol*

**Damia, G., D'Incalci, M. 1998.** Mechanisms of resistance to alkylating agents. *Cytotechnology*. 27 (1-3): 165– 73.

**DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S. 2007.** Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci*. 104(49):19345-50.

**Demertzi, D.K., Litina, D.H., Staninska, M., Primikiri, A., Kotoglou, C., Demertzis, M.A. 2009.** Anti-oxidant, in vitro, in vivo anti-inflammatory activity and antiproliferative activity of mefenamic acid and its metal complexes with manganese(II), cobalt(II), nickel(II), copper(II) and zinc(II). *J Enzyme Inhib Med Chem*.24(3): 742–752.

**Dentino, M., Luft, F.C., Moo, N. Y. 1978.** Long term effect of cis-diamminedichloride platinum (CDDP) on renal function and structure in man. *Cancer*. 41:1247-1251.

**DeVita, V.T. 1978.** The evolution of therapeutic research in cancer. *N Engl J Med*. 298:907–10.

**Dilda, P.J., Hogg, P.J. 2007.** Arsenical-based cancer drugs. *Cancer Treat Rev*. 33:542–564.

diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci. Res*. 38, 325–329.

**Diplock, A. 1998.** Healthy lifestyles nutrition and physical activity. ILSI Europe concise monograph series, Belgium. 59 p.

**Dizdaroğlu, M. 1998.** Facts about the artifacts in the measurement of oxidative DNA base damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Free Radic Res*, 29 (6): 551-63.

**Dow, K.H., Barnicle, M.M. 1996.** Nursing care in patient management and quality of life. *Lippincott- raven*. 951-62.

**Eastman, A. 1987.** Cross-linking of glutathione to DNA by cancer chemotherapeutic platinum coordination complexes. *Chem Biol Interact*. 61:241–248.

**Ertürk, Ş. 2001.** Sevofluranın DNA Hasarı Üzerine Etkilerinin Bening Ve Malign Olgularda Comet Assay Yöntemi İle Değerlendirilmesi” Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji Ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi.

**Esteban-Fernandez, D., Montes-Bayon, M., Gonzales, E.B., Gomez Gomez M.M., Palacios, M.A., Sanz-Medel, A. 2008.** Atomic (HPLC–ICP-MS) and molecular mass spectrometry (ESI-Q-TOF) to study cis-platin interactions with serum proteins. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 23: 378-84.

- Fairbain D.W., Olive P.L., O'Neill, K.L. 1995.** The Comet Assay: A Comprehensive Review. *Mutation Res.* 339: 37-59.
- Fei,B.L., Xu, W.S., Tao, H.W., Li,W., Zhang, Y., Long, J.Y., Liu, Q.B., Xia, B., Sun, W.Y. 2014.** Effects of copper ions on DNA binding and cytotoxic activity of a chiral salicylidene Schiff base. *J. Photochem. Photobiol.* 132 : 36–44.
- Fillastre, J.P., Godin, M. 1998.** Drug-induced nephropathies. *Oxford Textbook of Clinical Nephrology.* New York: Oxford University Press. 2645-2657.
- Fong,T., Vij, R., Vijayan,A., DiPersio, J., Blinder, M. 2007.** Copper deficiency: an important consideration in the differential diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Haematol.* 92, 14-29.
- Fraga, C.G., Shinenaga, M.K., Park, J.W., Degan, P., Ames, B.N. 1990.** Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'- deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87 (12): 4533-7.
- Futreal, P.A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, .JC., Wooster, R., Stratton, M. 2001.** Cancer and genomics. *Nature* . 6822: 850-2
- Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.C., Lee, Y.S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K.I., De Marzo, A.M., Van Eyk, J.E., Mendell, J.T., Dang, C.V. 2009.** c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature.* 458:762–765.
- Gately, D.P., Howell, S.B. 1993.** Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *British Journal of Cancer.* 67: 1171-1176.
- Gelasco, A., Lippard, S.J. 1998.** NMR solution structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis-diammineplatinum(II) d(GpG) intra strand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Biochemistry.* 37: 9230–9239.
- Giorgi-Renault, S., Renault, J., Baron, M., Gebel-Servolles, P., Delic, J., Cros, S., Paoletti, C. 1988.** Heterocyclic quinones XIII. Dimerization in the series of 5,8-quinazolinediones: Synthesis and anti tumor effects of bis(4-amino-5,8-quinazolinediones). *Chem. Pharm.Bull.* 36 (10): 3933–3947.
- Gokhale, N., Padhye, S., Rathbone, D., Billington, D., Lowe, P., Schwalbe, C., Newton, C. 2001.** The crystal structure of first copper(II) complex of a pyridine-2-carboxamidrazone - a potential antitumor agent. *Inorg. Chem. Commun.* 4: 26-29.
- Gokhale, N., Padhye, S., Rathbone, D., Billington, D., Lowe, P., Schwalbe, C., Newton, C. 2001.** The crystal structure of first copper(II) complex of a pyridine-2-carboxamidrazone - a potential antitumor agent. *Inorg. Chem. Commun.* 4: 26-29.
- Goodwin, C.J., Holt, S.J., Downes, S., Marshall, N.J. 1995.** Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *J. Immunol. Methods.* 179, 95-103.
- Gupte, A., Mumper, R.J. 2009.** Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev.* 35:32–46.
- Gülbahar, Ö. 2007.** Protein oksidasyonunun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilişkisi. *Turkish Journal of Geriatrics*, 10 (1): 43-48.

- Gyllenhammar, H. 1987.** Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. *J Immunol Methods*. 97:209.
- Hagenfeldt, K. 1972.** Intrauterine contraception with the copper-T device: Effect on trace elements in the endometrium, cervical mucous and plasma. *Contraception*, 6, 37-54.
- Halliwell, B. 2000.** Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come?. *Am J Clin Nutr*, 72 (5): 1082-7.
- Hamada, K., Nagai, S., Kitaichi, M. 2003.** Cyclophosphamide-induced
- Hande, K.R. 2009.** Chapter 73: Principles and pharmacology of chemotherapy, (Ed.): Greer, J.P. *Wintrobe's Clinical Hematology*, Philadelphia, 1694-1720.
- Harris, E. D. 1976.** Copper induced activation of aortic lysyl oxidase with copper. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 73, 371-374.
- Harris, E. D. 1983.** Trace Elements in Health: Copper in human and animal health. (Ed.): Rose, J. Butterworths, London. p.44
- Harris, E. D., Rayton, J. K., Balthrop, I. E., Di Silvestro, R. A. and Garcia-de-Quevedo, M. 1980.** Copper and the synthesis of elastin and collagen in Biological Roles of Copper. *Ciba Foundation Symposium*, 1979, Excerpta Medica, Amsterdam.
- Hart, E. B., Steenbock, H., Waddell, J., Elvehjem, C. A. 1928.** Iron in Nutrition. VII. Copper as a supplement to iron for haemoglobin building in the rat. *J. Biol. Chem.* 77,797-812.
- Hartinger, C.G., Zorbas-Seifried, S., Jakupec, M.A., Kynast, B., Zorbas, H., Keppler, B.K. 2006.** Preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans- [tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate (III)] (KP1019 or FFC14A). *Inorg Biochem*. 100: 891–904.
- Hildebrand, J. 2006.** Neurological complications of cancer chemotherapy. *Curr Opin Oncol*. 18: 321-324.
- Hirase, N., Abe, Y., Sadamura, S., Yufu, Y., Muta, K., Umemura, T., Nishimura, J., Nawata, H., Ideguchi, H. 1992.** Anemia and neutropenia in a case of copper deficiency: role of copper in normal hematopoiesis. *Acta Haematol.* 87, 195-7.
- Hoffmann, S., Spitkovsky, D., Radicella, P., Epe, B., Wiesner, R.J. 2003.** Reactive oxygen species derived from the mitochondrial respiratory chain are not responsible for the basal levels of oxidative base modifications observed in nuclear DNA of mammalian cells. *Free Radic Biol Med*, 36 (6): 765-773.
- Hosni, M. H. 1980.** Superoxide dismutase in Biological Roles of Copper. *Ciba Foundation Symposium*, 1979, Excerpta Medica, Amsterdam.
- Hu, W., Zhang, C., Wu, R., Sun, Y., Levine, A., Feng, Z. 2010.** Glutaminase 2 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc Natl Acad Sci*. 107:7455–7460.
- Huang, P., Feng, L., Oldham, E. A., Keating, M. J., Plunkett, W. 2000.** Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature*. 407: 390–95.



**Hubbard, M.J., Cohen, P. 1993.** On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci.* 18:172-7.

**İnci, D., Aydın, R., Sevgi, T., Zorlu, Y., Demirkan, E. 2016.** Synthesis, crystal structure, stability studies, DNA/albumins interactions and antimicrobial activities of two novel Cu(II) complexes with amino acids and 5-nitro-1,10-phenanthroline. (basımda).

**Jacob, R. A., Sandstead, H. H., Munoz, J. M., Klevay, L. M. 1981.** Whole body Surface loss of trace metals in normal males. *Am. J. Clin. Nutr.* 34,1379-1383.

**Jamieson, E.R., Lippard, S.J. 1999.** Structure, Recognition and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chemical Reviews.* 99:2467-2498, 1999.

**Kachadourian, R., Brechbuhl, H.M., Ruiz-Azuara L., Gracia-Mora, I., Day, B.J. 2010.** Casiopeina II gly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology.* 268:176-83.

**Kaushik, G., Pramod, K., Nidhi, T., Singh, U.P., Nidhi, G., Ajanta, C., Partha, R., Maria, C.B. 2011.** DNA interaction, superoxide scavenging and cytotoxicity studies on new Copper(II) complexes derived from a tridentate ligand. *Polyhedron.* 30: 2667–2677.

**Kelland, L. 2007.** The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 7:573–584.

**Kintzel, P.E. 2001.** Anticancer drug-induced kidney disorders. Incidence, prevention and management. *Drug Safety.* 24:19-38.

**Kostova, I. 2006.** Gold coordination complexes as anticancer agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 6:19–32.

**Kurkjian, D.C., Özer, H. 2008.** Chapter 63: Management of adverse effects of treatment, (Ed.): Devita, V.T., Hellman, T.S., Rosenberg's, S.A. *Cancer*, Philadelphia, 2617-2638.

late-onset lung disease. *Intern Med.* 42:82,7.

**Lazarchick, J. 2012.** Update on anemia and neutropenia in copper deficiency. *Curr Opin Hematol.* 19: 58-60.

**Lazo, J.S., Merrill, W.W., Pham, E.T. 1984.** Bleomycin hydrolase activity in pulmonary cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 231:583,8.

**Le, A., Lane, A.N., Hamaker, M., Bose, S., Gouw, A., Barbi, J., Tsukamoto, T., Rojas, C.J., Slusher, B.S., Zhang, H., Zimmerman, L.J., Liebler, D.C., Slebos, R.J., Lorkiewicz, P.K., Higashi, R.M., Fan, T.W., Dang, C.V. 2012.** Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metab.* 15:110–121.

**Leith, L. C. 1975.** Changes in the ultrastructure of cardiac muscle in steers deprived of copper. *Res. Vet. Sci.* 18, 282-287.

**Lewis, C. 1999.** Chemoprotectants: a review of their clinical pharmacology and therapeutic efficacy. *Drugs* 57:293-308.

- Lim, K.S., Jeyaseelan, K., Whiteman, M., Jenner, A., Halliwell, B. 2005.** Oxidative damage in mitochondrial DNA is not extensive. *Ann N Y Acad Sci*, 1042, 210-20.
- Lin, J., Meng, F., LI, X. 2015.** Synthesis, Crystal Structure and in vitro Anticancer Studies of 1,2-Bis-benzimidazole-phenyl Copper(II) Complex. *Chinese J. Struct. Chem.* Vol. 34, No.1,41–48.
- Lind, M.J. 2008.** Principles of cytotoxic chemotherapy. *Medicine*. 36 (1): 19–23.
- Lippard, S.J. 2006.** The inorganic side of chemical biology. *Nature Chemical Biology*, 2:504-507.
- Luman, C.R., Castellano, F.N. 2003.** Phenanthroline Ligands in Comprehensive Coordination Chemistry. Elsevier.
- M. Bonham, J.M., O'Connor, B.M., Hannigan, J.J. 2002.** The immune system as a physiological indicator of marginal copper status. *Br. J. Nutr.* 87 (5): 393–403.
- Ma, Q., Zhu, M. L., Yuan, C. X. 2010.** A molecular helix: self-assembly of coordination polymers from *d*10 metal ions and 1,10-phenanthroline-5,6-dione (pdon) with the bridges of SCN<sup>-</sup> and Cl<sup>-</sup> anions. *Cryst. Growth Des.* 10, 1706–1714.
- Ma, Z.Y., Qiao, X., Xie, C.Z., Shao, J., Xu, J.Y., Qiang, Z.Y., Lou, J.S. 2012.** Activities of a novel Schiff Base copper(II) complex on growth inhibition and apoptosis induction toward MCF-7 human breast cancer cells via mitochondrial pathway. *J. Inorg. Biochem.* 117: 1–9.
- Ma, Z.Y., Qiao, X., Xie, C.Z., Shao, J., Xu, J.Y., Qiang, Z.Y., Lou, J.S. 2012.** Activities of a novel Schiff Base copper(II) complex on growth inhibition and apoptosis induction toward MCF-7 human breast cancer cells via mitochondrial pathway. *J. Inorg. Biochem.* 117: 1–9.
- Marzano, C., Gandin, V., Pellei, M., Colavito, D., Papini, G., Lobbia, G. G., Giudice, E. D., Porchia, M., Tisato, F., Santini, C. 2008.** In vitro antitumor activity of the water soluble copper(I) complexes bearing the tris(hydroxymethyl)phosphine ligand. *J. Med. Chem.* 51, 798–808.
- Marzano, C., Pellei, M., Alidori, S., Brossa, A., Lobbia, G. G., Tisato, F., Santini, C. 2006.** New copper(I) phosphane complexes of dihydridobis(3-nitro-1,2,4-triazolyl)borate ligand showing cytotoxic activity. *J. Inorg. Biochem.* 100, 299–304.
- Marzano, C., Pellei, M., Colavito, D., Alidori, S., Lobbia, G. G., Gandin, V., Tisato, F., Santini, C. 2006.** Synthesis, characterization, and in vitro antitumor properties of tris (hydroxymethyl) phosphine copper(I) complexes containing the new bis(1,2,4-triazol-1yl) acetate ligand. *J. Med. Chem.* 49, 7317–7324.
- Marzano, C., Pellei, M., Tisato, F., Santini, C. 2009.** Copper complexes as anticancer agents. *Anticancer Agents Med. Chem.* 9: 185–211.
- Masood, Md.A., Hodgson, DJ., Inorg. 1993.** Chem. 32,4839-4844.
- McEvoy, G.K. 2004.** AHFS 2004 Drug Information. American Society of Health-System. Pharmacists. 929-952.
- Medina, M.A., Sanchez-Jimenez, F., Marquez, J. 1992.** Relevance of glutamine metabolism to tumor cell growth. *Mol Cell Biochem.* 113:1-15.

- Mellqvist, U.H., Hansson, M., Brune, M., Dahlgren, C., Hermodsson, S., Hellstrand, K. 2000.** Natural killer cell dysfunction and apoptosis induced by chronic myelogenous leukemia cells: role of reactive oxygen species and regulation by histamine. *Blood*. 96:1961.
- Michalke, B., 2010.** Platinum speciation used for elucidating activation or inhibition of Pt-containing anti-cancer drugs. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 24: 69-77.
- Mills, C. F., Dalgarno, A. C. Wenham, G. 1976.** Biochemical and pathological changes in tissues of Friesian cattle during the experimental induction of copper deficiency. *Br. J. Nutr.* 38, 309-331.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L. 2004.** Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and
- Mohindru, A., Joyce, M. , Rabinovitz, M. 1983.** 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthroline (neocuproine): a potent, copper-dependent cytotoxin with anti-tumor activity. *Biochemical Pharmacology*, Volume 32, Issue 23, Pages 3627-3632.
- Moriuchi, T., Nomoto, A., Yoshida, K., Hirao, T. 1999.** Characterization of ferrocene derivatives bearing podand dipeptide chains (-l-Ala-l-Pro-OR). *J. Organomet. Chem.* 589: 50-58.
- National Center for Health Statistics. 2014.** Division of Cancer Control and Population Sciences, Surveillance Research Program.
- Newsholme, P., Lima, M.M., Procopio, J. 2003.** Glutamine and glutamate as vital
- Ng, C.H., Kong, S.M., Tiong, Y.L., Maah, M.J., Sukram, N., Ahmade, M., Khoo, A.S.B. 2014.** Selective anticancer copper(II)-mixed ligand complexes: targeting of ROS and proteasomes. *Metallomics*. 6:892-906.
- Nourooz-Zadeh, J. 1999.** Ferrous ion oxidation in presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxides in plasma. *Methods Enzymol.* 300:58.
- O'Dell, B. L. 1976.** Biochemistry and Physiology of Copper in Vertebrates: Trace Elements in Human Health and Disease Volume 1 Zinc and Copper, (Ed.) Prasad, A. S. Academic Press, New York.
- O'Dell, B. L., Hardwick, B. C., Reynolds, G., Savage, J. E. 1961.** Connective tissue defect in chicks resulting from copper deficiency. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 108, 402-408.
- Okan, O.T., Varlıbaş, H., Öz, M., Deniz, İ. 2013.** Antioksidan Analiz Yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Antioksidan Kaynağı Olarak Kullanılabilecek Odun Dışı Bazı Bitkisel Ürünler. *Kastamonu Üni. Orman Fakültesi Dergisi*. 13 (1): 48-59.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y. 2006.** İnsan biyokimyası. Palme Yayıncılık, Ankara.
- Orvig, C., Abrams, M.J. 1999.** Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction, *Chemical Reviews*, 99:2201-2204.

- Ottonello, L., Frumento, G., Arduino, N., Dapino, P., Tortolina, G., Dallegrì, F. 2001.** Immune complex stimulation of neutrophil apoptosis: investigating the involvement of oxidative and nonoxidative pathways. *Free Radic Biol Med.* 30:161–169.
- Özdem, S.S., Şadan, G. 1994.** Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve klinik açıdan önemi. *Akdeniz Üniv Tıp Fak Dergisi.* 11: 63-71.
- Pacitti, A.J., Chen, M.K., Bland, K.I. 1992.** Mechanisms of accelerated hepatic glutamine efflux in the tumour-bearing rat. *Surg OncoL.* 1:173-82
- Puszeko, A., Brzuszkiewicz, A., Jezierska, J., Adach, A., Wietrzyk, J., Filip, M., Pelczynska, M., Cieslak, G. 2011.** Systematic coordination chemistry and cytotoxicity of copper(II) complexes with methyl substituted 4-nitropyridine N-oxides. *J. Inorg. Biochem.* 105: 1109–1114.
- Puszyńska-Tuszkano, M., Grabowski, T., Daszkiewicz, M. 2011.** Silver(I) complexes with hydantoins and allantoin: Synthesis, crystal and molecular structure, cytotoxicity and pharmacokinetics. *J. Inorg. Biochem.* 105, 17–22.
- Rajeswari, S., Swaminathan, S. 2014.** Role of copper in health and diseases. *Int J Curr Sci.* 10, 94-107.
- Reedijk, J. 2003.** New clues for platinum antitumor chemistry: Kinetically controlled metal binding to DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 100:3611-3616.
- Rivera, S., Azcon-Bieto, J., Lopez-Soriano, F.J. 1988.** Amino acid metabolism in tumour-bearing mice. *Biochem J.* 249:443-9.
- Rodríguez-Moreno, F., González-Reimers, E., Santolaria-Fernández, F., Galindo-Martín, L., Hernandez-Torres, O., Batista-López, N., Molina-Perez, M. 1997.** Zinc, copper, manganese, and iron in chronic alcoholic liver disease. *Alcohol.* 14, 39-44.
- Roehm, N.W., Rodgers, G.H., Hatfield, S.M., Glasebrook, A.L., 1991.** An improved
- Roehm, N.W., Rodgers, G.H., Hatfield, S.M., Glasebrook, A.L. 1991.** An improved
- Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J.E., Mansour, V.H. 1969.** Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature.* 222:385–386.
- Rouzer, C.A. 2010.** Metals and DNA repair. *Chemical Research in Toxicology.* 23:151–1518.
- Rowinsky, E.K., Donehower, R.C. 1991.** The clinical pharmacology and use of antimicrotubule agents in cancer chemotherapeutics. *Pharmacology & Therapeutics.* 52 (1): 35–84.
- Roy, S., Saha, S., Majumdar, R., Dighe, R.R. 2010.** Chakravarty, A.R. DNA photocleavage and anticancer activity of terpyridine Cu(II) complexes having phenanthroline bases. *Polyhedron* 29, 2787–2794.
- Royall, J.A., Ischiropoulos, H. 1993.** Evaluation of 2'-7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys.* 302:348–355

- Rucker, R. B., Parker, H. E., Rogler, J. C. 1969.** Effect of copper deficiency on chick bone collagen and selected bone enzymes. *J. Nutr.* 98, 57-63.
- Schmitt, F., Podevin, G., Poupon, J., Roux, J., Legras, P., Trocello, J.M., Woimant, F., Laprévotte, O., Nguyen, T.H., Balkhi, S.E. 2013.** Evolution of Exchangeable Copper and Relative Exchangeable Copper through the Course of Wilson's Disease in the Long Evans Cinnamon Rat. *PLoS One.* e8: 23-23.
- Scudiero, D.A. 1988.** Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48, 4827-4833.
- Serment-Guerrero, J., Cano-Sanchez, P., Reyes-Perez, E., Velazquez-Garcia, F., Bravo-Gomez, M.E., Ruiz-Azuara, L. 2011.** Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas. *Toxicology in Vitro.* 1376–1384.
- Siegel, R., Kimberly, L., Miller D. 2015.** Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin* 2015;65:5–29
- Sigel, A., Siegel, H. (Eds.). 1996.** Metal Ions in Biological Systems; Marcel Dekker Inc.: New York, NY, USA. Volumes 32, 33.
- Sigerist, H. E. 1960.** The historical development of the pathology and therapy of cancer On the history of medicine. *New York: MD Publications Inc;* p. 59-65.
- Sigman, D. S., Graham, D. R., Aurora, V. Stern, A.M. 1979.** Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline cuprous complex. Inhibition of Escherichia coli DNA polymerase I. *J. Biol. Chem.* 254, 12269–12272.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. 1988.** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175(1):184-91.
- Siomek, A., Tujakowski, J., Gackowski, D., Rozalski, R., Foksinski, M., Dziaman, T., Roszkowski, K., Olinski, R. 2006.** Severe oxidatively damaged DNA after cisplatin treatment of cancer patients. *Int J Cancer,* 119 (9): 2228-30.
- Souba, W.W., Pacitti, A.J. 1992.** How amino acids get into cells: mechanisms, models, menus, and mediators. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 16:569-78.
- Sun, X., Tsang, C.N., Sun, H. 2009.** Identification and characterization of metallodrug binding proteins by (metallo)proteomics. *Metallomics.* 1:25-31.
- 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.* 118:12309-12312.
- Tapio, S., Grosche, B. 2006.** Arsenic in the aetiology of cancer. *Mutat Res.* 612:215–246.
- Thati, B., Noble, A., Creaven, B. S. 2007.** In vitro anti-tumour and cyto-selective effects of coumarin-3-carboxylic acid and three of its hydroxylated derivatives, along with their silver-based complexes, using human epithelial carcinoma cell lines. *Cancer Letters.* 248, 321–331.

**Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F. 2000.** Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35:206-221.

**Tompsett, S. L. 1934.** The excretion of copper in urine and faeces and its relation to the copper content of the diet. *Biochem. J.* 28, 2088-2091.

**Trachootham, D., Alexandre, J., Huang, P. 2009.** Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach. *Nat Rev Drug Discov.* 8:579–591.

**Turnlund, J.R., Keyes W.R., Kim, S.K., Domek, J.M. 2005.** Long-term high copper intake: effects on copper absorption, retention, and homeostasis in men. *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (4): 822–828.

**Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayını. 1983.** Saydam Matbaası. Ankara.

**Türkiye Kanser İstatistikleri. 2016.** Ankara.

**Underwood, E. J. 1971.** Copper in Trace Elements in Humans and Animals. Academic Press, New York.

**Uriu-Adams, J.Y., Keen, C.L. 2005.** Copper, oxidative stress, and human health. *Mol. Aspects Med.* 26 (4–5): 268–298.

**Vahdat, L., Papadopoulos, K., Lange, D. 2001.** Reduction of paclitaxel-induced peripheral neuropathy with glutamine. *Clin Cancer Res.* 7:1192-1197.

**Valkonen, M., Kuusi, T. 1997.** Spectrophometric assay for total radical-trapping antioxidant potential in human serum. *Journal of Lipid Research.* 38:823-833.

**Verweij, J., Pinedo, H.M. 1990.** Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations. *Anti-Cancer Drugs.* 1 (1): 5–13.

**Walaa, H., Gehad, G., Maher, M.I. 2014.** Synthesis, Characterization and in vitro Biological Activity of Mixed Transition Metal Complexes of Lornoxicam with 1,10-phenanthroline. *Int. J. Electrochem. Sci.* 9 :1415 – 1438.

**Wang, J.B., Erickson, J.W., Fuji, R., Ramachandran, S., Gao, P., Dinavahi, R., Wilson, K.F., Ambrosio, A.L., Dias, S.M., Dang, C.V., Cerione, R.A. 2010.** Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell.* 18:207–219.

**Williams, G.M. 1987.** Definition of a human cancer hazard. In: Nongenotoxic Mechanisms in Carcinogenesis. Cold Spring Harbor Laboratory. New York: Banbury Report 2. 367–80.

**Williams, G.M., Jeffrey, A.M. 2000.** Oxidative DNA damage: Endogenous and chemically induced. *Regul Toxicol Pharmacol.* 32 (3): 283-92.

**Yokuş, B., Çakır, D.Ü. 2012.** Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniv Vet Fak Dergi.* 1:7-18.

**Lin, J., Meng, F., Li, X. 2015.** Synthesis, Crystal Structure and in vitro Anticancer Studies of 1,2-Bis-benzimidazole-phenyl Copper(II) Complex. *Chinese J. Struct. Chem.* Vol. 34, No.1, 41–48.

**Yue, Q.X., Liu, X., Guo, D.A. 2010.** Microtubulebinding natural products for cancer therapy. *Planta Medica*. 76 (11): 1037–43.

**Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P. 2007.** Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol*. 178: 93-105.

**Zhong-Ying, M., Xin, Q., Cheng-Zhi, X. 2012.** Activities of a novel Schiff Base copper(II) complex on growth inhibition and apoptosis induction toward MCF-7 human breast cancer cells via mitochondrial pathway. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 117: 1–9.

**Zhu, X., Chen, J., Scheideler, L., Reichl, R., Geis-Gerstorf, J., 2004.** Effects of

**Ziegler, T., Benfell, K., Smith, R. 1990.** Safety and metabolic effects of L-glutamine administration in humans. *J PEN*.14: 137–146.



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Merve GÜLFİDANLI

Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa / 1989

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Bursa Kız Lisesi / 2003-2007

Lisans : Uludağ Üni. Fen – Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü / 2008-2013

Yüksek Lisans : U.Ü. F.B.E. Biyoloji A.B.D. Genel Biyoloji B.D./ 2014-2016.

İletişim (e-posta) : biyolog89@hotmail.com

İletişim (Telefon) : 05359749243