

**YENİ SENTEZLENEN BENZİMİDAZOL TÜREVİ
LİGAND TAŞIYAN PLATİN (II) KOMPLEKSİNİN A549
AKCİĞER KANSER HÜCRE HATTINDA SİTOTOKSİK
AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**EVALUATION OF CYTOTOXIC ACTIVITY OF NEW
SYNTHESIZED PLATINUM (II) COMPLEX HAVING
BENZIMIDAZOLE DERIVATIVE LIGAND IN A549 LUNG
CARCINOMA CELL LINE**

MOHAMED MUBARAK HAMİD MOHAMED ALI

Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

YENİ SENTEZLENEN BENZİMİDAZOL TÜREVİ LİGAND TAŞIYAN PLATİN (II) KOMPLEKSİNİN A549 AKCİĞER KANSER HÜCRE HATTINDA SİTOTOKSİK AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

MOHAMED MUBARAK HAMİD MOHAMED ALI

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU

Haziran 2023, 70 Sayfa

Akciğer kanseri dünyada en yaygın görülen kanser türlerinden biridir. Akciğer kanserinin mortalite oranı oldukça yüksektir. Sigara içme oranlarının yüksek olduğu ülkelerde akciğer kanseri vakalarının artacağı tahmin edilmektedir. Akciğer kanserinin tedavisine yönelik birçok farklı ilaç kullanılmaktadır ancak tedavi hala zordur. Akciğer kanseri tedavisinde sisplatin, nedaplatin, karboplatin ve oksaliplatin yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Günümüzde tedavi amaçlı yeni ilaç geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Bu çalışmada yeni sentezlenen platin (II) komplekslerinin (1a, 2a ve 4a) A549 insan akciğer kanser hücre hattında sitotoksik aktivitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada hücre canlılığını belirlemek amacıyla MTT testi kullanılmıştır. MTT testi sonuçlarına göre 1a platin (II) kompleksi en etkin bulunmuştur. Diğer sitotoksik analizlerinde ise etkin bulunan 1a platin (II) kompleksinin (40 μ M ve 80 μ M) konsantrasyonuyla devam edilmiştir.

Çalışmada 1a platin (II) kompleksi uygulamasıyla oksidatif strese bağlı ortaya çıkan lipid peroksidasyon hasarı malondialdehit (MDA) seviyesinin ölçümü ve hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerinin ölçümüyle tespit edilmiştir. 1a platin (II) kompleksinin

konsantrasyonunun artışıyla MDA ve ROS miktarında artış olduğu görülmüştür. Ayrıca hücre ölüm tipini belirlemek için Akridin Oranj (AO)/Propidyum İyodit (PI) boyaması yapılmıştır. 1a platin (II) kompleksi konsantrasyonuna bağlı olarak normal hücre sayısı azalırken apoptotik hücre sayısının arttığı gözlenmiştir. Apoptoz tayini ise apoptozda rol oynayan kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 enzim aktivite ölçümüyle yapılmıştır. 1a platin (II) kompleksinin kaspaz enzim aktivitelerinde bir etkisi bulunmamıştır. Elde edilen sonuçlara göre 1a platin (II) kompleksinin A549 insan akciğer kanser hücre hattında sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: A549 insan akciğer kanser hücre hattı, Platin (II) kompleksleri, Sitotoksik aktivite, MTT testi, Oksidatif stres, Apoptoz

ABSTRACT

EVALUATION OF CYTOTOXIC ACTIVITY OF NEW SYNTHESIZED PLATINUM (II) COMPLEX HAVING BENZIMIDAZOLE DERIVATIVE LIGAND IN A549 LUNG CARCINOMA CELL LINE

MOHAMED MUBARAK HAMID MOHAMED ALI

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU

June 2023, Pages 70

Lung cancer is one of the most common types of cancer in the world. Lung cancer has a very high mortality rate. Lung cancer cases are predicted to rise in nations with high smoking rates. Treatment for lung cancer is still difficult. Many different drugs are used to treat lung cancer, but treatment is still difficult. Cisplatin, nedaplatin, carboplatin and oxaliplatin are commonly used drugs in the treatment of lung cancer. Studies are currently underway to develop new therapeutic drugs. Since a study on the cytotoxic activity of platinum (II) complexes (1a, 2a and 4a) in A549 human lung cancer cell line has not been found in the literature, it was aimed to evaluate the cytotoxic activity of platinum (II) compounds in A549 human lung cancer cell line in this study. MTT test was used to determine cell viability. According to the MTT test results, the 1a platinum (II) complex was found to be the most effective. Other analyzes continued with 1a (40 μ M and 80 μ M) concentrations.

In the study, lipid peroxidation damage due to oxidative stress with the application of 1a platinum complex was determined by measuring malondialdehyde (MDA) level and measuring intracellular reactive oxygen species (ROS) levels. It was observed that the amount of MDA and ROS increased with the increase of the concentration of the 1a platinum complex. In order to identify the type of cell death, Acridine Orange (AO)/Propidium Iodide (PI) staining was additionally carried out. It was observed that while the number of normal cells decreased, the number of apoptotic cells increased depending on the concentration of 1a platinum (II) complex. By monitoring the activities of the apoptosis-related enzymes caspase 3, caspase 8, and caspase 9, apoptosis was determined. No effect of 1a platinum (II) complex on caspase enzyme activities was found. According to the results obtained, 1a platinum (II) complex was found to have cytotoxic activity in A549 human lung cancer cell line.

Keywords: A549 human lung cancer cell line, Platinum (II) complexes, Cytotoxic activity, MTT test, Oxidative stress, Apoptosis.

TEŞEKKÜR

Öncelikle, yüksek lisans tezim sırasında bana sağladığı tüm destek ve tezimin her aşamasında bana tavsiyelerde bulunan sayın danışmanım Prof. Dr. Güldeniz Selmanoğlu'na ne kadar teşekkür etsem azdır.

Her zaman soru sorduğumda cevap veren, bütün deneysel çalışmalarımda bana destek veren, deneysel problemlerim olduğunda bana öneriler sunan sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif Karacaoğlu'na sonsuz teşekkür ederim.

Prof. Dr. Aysun Kılıç Süloğlu'na deneysel çalışmalarla ilgili sorularımı her zaman cevapladığı için, bana destek verdiği için teşekkür ederim.

Dr. Öğr. Üyesi Mahmut Gözelle'ye tez çalışması kapsamında kullandığım yeni sentezlenen platinum kompleksleri bana sağladığı için teşekkür ederim.

Tez çalışmasına finansal destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim (FHD-2022-19743 nolu proje).

Laboratuvar arkadaşım Deniz Tulumcuoğlu'na teze başlamadan önce beni laboratuvarı alıştırdığı için, deneysel çalışmalarla ilgili bana bilgi verdiği için teşekkür ederim. Laboratuvar arkadaşım Eda Nur İnkaya'ya her zaman bana yardım ettiği için, bilgilerini benimle paylaştığı için teşekkür ederim. Bütün laboratuvar arkadaşlarım Selen Sanin, Beliz Taşkonak, Ayşegül Bülbül, Merve Demir'e tez çalışması boyunca bana destek verdikleri için teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana destek veren ve arkamda duran anneme, babama ve kardeşlerime çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kanser.....	2
2.2. Kanser Türleri.....	2
2.3. Kanser Gelişimi	3
2.4. Kanser Belirtileri	3
2.5. Kanser Nedenleri	3
2.6. Kanseri Teşhisinde Kullanılan Bazı Yöntemler:	4
2.7. Kanser Tedavi Yöntemleri	5
2.7.1. Kemoterapi.....	5
2.7.2. Radyoterapi.....	5
2.7.3. Hedefli terapi.....	6
2.7.4. İmmünoterapi.....	7
2.7.5. Hormon tedavisi.....	7
2.8. Akciğer Kanseri.....	8
2.8.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (SCLC)	9
2.8.2. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri (NSCLC).....	9
2.8.3. A549 Hücre Hattı	9
2.9. Platin Bazlı İlaçlar ve Sınıfları	10
2.10. Hücre Canlılığı Testi.....	12
2.11. Oksidatif Stres Ölçümü.....	13
2.12. Lipid Peroksidasyonu Ölçümü.....	14
2.13. Ölüm Tipi Belirlenmesi.....	15
2.14. Apoptozun Belirlenmesi.....	15
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	16

3.1. Kimyasal Malzemeler	16
3.2. Hücre Kültürü.....	16
3.3. A549 Hücre Hattının Üretilmesi ve Pasajlanması.....	17
3.4. A549 Hücrelerinin Dondurulması ve Çözdürülmesi.....	18
3.5. Platin (II) Kompleksleri ve Kontrol Gruplarının Stok Çözeltilsinin Hazırlanması.....	18
3.6. Deney Planı.....	19
3.7. MTT Testi.....	21
3.8. DCFDA Testi ile ROS Ölçümü	22
3.9. TBARS Testi.....	23
3.10. Akridin Oranj (AO)/Propidium İyodit (PI) Boyama Testi.....	25
3.11. Kaspaz Testi.....	25
3.12. İstatiksel Analizler	26
4. SONUÇLAR	27
4.1. MTT Testi Sonuçları.....	27
4.2. ROS Ölçüm Sonuçları	31
4.3. Lipid Peroksidasyon Ölçüm Sonuçları	33
4.4. Akridin Oranj-Propidyum İyodit ile Hücre Ölüm Tipinin Belirlenmesi	34
4.5. Apoptoz Tayini Sonuçları	39
5.TARTIŞMA.....	40
6.YORUM.....	45
7.KAYNAKLAR.....	46
8.ÖZGEÇMİŞ.....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. A549 hücre hattı.....	10
Şekil 2.2. MTT'nin formazan kristallerine indirgenmesi [57].....	13
Şekil 2.3. DCFDA'nın floresan bir ürüne (DCF) dönüştürülmesi [58].....	14
Şekil 2.4. 2-tiyobarbitürik asit ve MDA arasındaki reaksiyon [61].....	15
Şekil 3.1. Platin (II) komplekslerinin kimyasal yapısı	16
Şekil 3.2. A549 hücrelerinin 11. pasaj inverted mikroskop görüntüsü	17
Şekil 3.3. Deney planının şematik olarak gösterimi. Şema BioRender uygulaması kullanılarak yapılmıştır.....	20
Şekil 4.1. A549 hücrelerine sisplatin, karboplatin, 1a, 2a ve 4a platin komplekslerinin farklı konsantrasyonlarının 24 saat uygulanması sonucu MTT hücre canlılık testi sonuçları. a: kontrol grubundan, b: sisplatin 40 µM grubundan, c: sisplatin 80 µM grubundan, d: karboplatin 80 µM grubundan, e: karboplatin 160 µM grubundan, f: karboplatin 320 µM grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklılık (p<0,05).....	29
Şekil 4.2. A549 hücrelerine sisplatin, karboplatin, 1a, 2a ve 4a platin komplekslerinin farklı konsantrasyonlarının 48 saat uygulanması sonucu MTT hücre canlılık testi sonuçları. a: kontrol grubundan, b: sisplatin 40 µM grubundan, c: sisplatin 80 µM grubundan, d: karboplatin 80 µM grubundan, e: karboplatin 160 µM grubundan, f: karboplatin 320 µM grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklılık (p<0,05).....	29
Şekil 4.3. A549 hücrelerine sisplatin, karboplatin, 1a, 2a ve 4a platin komplekslerinin farklı konsantrasyonlarının 72 saat uygulanması sonucu MTT hücre canlılık testi sonuçları. a: kontrol grubundan, b: sisplatin 40 µM grubundan, c: sisplatin 80 µM grubundan, d: karboplatin 80 µM grubundan, e: karboplatin 160 µM grubundan, f: karboplatin 320 µM grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklılık (p<0,05).....	30
Şekil 4.4. A549 hücrelerine sisplatin, karboplatin ve üç platin kompleksinin farklı konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saat uygulanması sonucu MTT hücre canlılık testi sonuçları. Her grup içinde a: 24 saat verilere göre, b: 48 saat verilere göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık (p<0,05).....	30
Şekil 4.5. A549 hücrelerinin 1a platin kompleksiyle 30 dakika inkübasyon ile hücre içi ROS ölçüm sonuçları. Değerler ortalama ± standard sapma şeklinde verilmiştir. a: kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı (p<0,05). b: 1a 40 µM grubundan istatistiksel olarak farklı	

(p<0,05).....	32
Şekil 4.6. A549 hücrelerinin 1a platin kompleksiyle 24 saat inkübasyonu ile hücre içi ROS ölçüm sonuçları. Değerler ortalama ± standard sapma şeklinde verilmiştir. a: kontrol grubundan , b: 1a 40 µM grubundan istatistiksel olarak farklı (p<0,05).....	32
Şekil 4.7. A549 hücrelerinde lipid peroksidasyon ölçüm sonuçları. a: kontrol grubundan , b: 1a 40 µM grubundan istatistiksel olarak farklı (p<0,05)	33
Şekil 4.8. A549 hücrelerinin 1a platin kompleksiyle 24 saat inkübasyon AO/PI boyama görüntüleri. A) kontrol grubu, B) 1a kompleksi 40 µM konsantrasyonu, C) 1a kompleksi 80 µM konsantrasyonu. Nekrotik hücreler (→) kırmızı ok ile gösterilmiştir.....	35
Şekil 4.9. A549 hücrelerinin 1a platin kompleksiyle 48 saat inkübasyon AO/PI boyama görüntüleri. A) kontrol grubu, B) 1a kompleksi 40 µM konsantrasyonu, C) 1a kompleksi 80 µM konsantrasyonu. Apoptotik hücreler (→) beyaz ok, nekrotik hücreler (→) kırmızı ok ile gösterilmiştir.....	36
Şekil 4.10. AO/PI boyama ile 24 saat inkübasyon hücre ölüm yüzdeleri. Değerler ortalama ± standard sapma şeklinde verilmiştir. a: kontrol grubundan, b: 1a 40 µM grubundan istatistiksel olarak farklı (p<0,05).....	37
Şekil 4.11. AO/PI boyama ile 48 saat inkübasyon hücre ölüm yüzdeleri. Değerler ortalama ± standard sapma şeklinde verilmiştir. a: kontrol grubundan, b:1a 40 µM grubundan istatistiksel olarak farklı (p<0,05).....	37
Şekil 4.12. AO/PI boyama ile 24 ve 48 saat inkübasyon hücre ölüm yüzdeleri. Değerler ortalama ± standard sapma şeklinde verilmiştir. (*) 48 saat verilerinden istatistiksel olarak farklı (p<0,05).....	38
Şekil 4.13. 1a platin (II) kompleksinin (A) kaspaz 8, (B) kaspaz 9 ve (C) kaspaz 3 enzim aktivitelerine etkisi. Değerler ortalama ± standard sapma şeklinde verilmiştir. *: (kontrol, 1a 40 µM, 1a 80 µM, cisplatin 80 µM) gruplarından istatistiksel olarak farklı (p<0,05).....	39

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

µM	Mikromol
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
°C	Santigrat Derece

Kısaltmalar

RPMI	Roswell's Park Memorial Institute
A549	Akciğer kanseri epitel hücre hattı
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
AO/PI	Akridin oranj/Propidium iyodür
MDA	Malondialdehit
ROS	Reaktif oksijen türleri
DCFDA	2',7'-dikloroflorosein diasetat
CT	Bilgisayarlı tomografi
DNA	Deoksiribonükleik asit
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
EGFR	Tahmini glomerüler filtrasyon hızı
LMIC	Düşük veya Orta Gelirli Ülkeler
NSCLC	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
FBS	Fötal Sığır Serumumu
PBS	Fosfat tamponu
TBA	Tiobarbitürik Asit
DMSO	Dimetil sülfoksit

1. GİRİŞ

Kanser önemli bir halk sağlığı sorunudur. Günümüzde kanserden ölümlerin sayısı inme veya koroner kalp hastalığı toplamından fazladır. Küresel demografik eğilimler, kanser insidansının önümüzdeki yıllarda artacağını göstermektedir [1]. Kanser türleri arasında akciğer kanserinin insidans ve mortalite oranı oldukça yüksektir [2]. En sık görülen kanserler arasında akciğer kanseri, nedeninin açıkça çevre ile ilişkili olması bakımından farklıdır. Akciğer kanserinin dünya çapında kansere bağlı hastalık yükünün en yaygın nedeni olmaya devam edeceği tahmin edilmektedir [3]. Akciğer kanseri vakalarının %90'ının sigaradan kaynaklandığı düşünülmektedir. Akciğer kanseri radon gazı, hava kirliliğine maruziyet ve tekrarlayan enfeksiyonlar gibi bir dizi başka faktör tarafından tetiklenebilmektedir [4].

Zamanla kemoterapi, radyasyon ve hedefe yönelik tedaviler dahil olmak üzere çeşitli akciğer kanseri tedavisi yöntemleri geliştirilmiştir [5]. Son 15 yılda moleküler ve tümör biyolojisiyle ilgili bilinenlerde artış olması kanser tedavisi paradigmasını önemli ölçüde değiştirmiştir. Önceden kanser yalnızca birkaç temel histomorfolojik ve nereden kaynaklandığı temel alınarak tanımlanıp tedavi edilmekteydi [6]. Platin bazlı kemoterapinin keşfi, sitotoksik kemoterapilerin terapötik faydasının anlaşılmasına yol açmıştır [7].

Sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin, insan neoplazmalarının tedavisi için yaygın olarak kullanılan platin bazlı antikanser ilaçlardır. Sisplatin, kanseri tedavi etmek için bilinen bir moleküler etki mekanizmasına sahip birinci basamak klinik platin anti-kanser ilaçlarından biridir. Ancak, yan etkilerinin fazla olması ve gelişen ilaç direnci nedeniyle klinik başarıları sınırlıdır. Kanser tedavisinde sisplatinin kullanılmaya başlanmasından sonra platin kompleksleriyle yapılan çalışmalara ilgi artmıştır. Yeni platin bazlı antikanser komplekslerinin geliştirilmesi için çok fazla araştırma yapılmış, ancak şimdiye kadar hiçbiri dünya çapında klinik uygulamaya ulaşamamıştır [8].

Yapılan bir çalışmada platin (II) komplekslerinin HeLa hücre hattında sitotoksik aktivitesi değerlendirilmiştir [9]. Platin (II) bazlı sentezlenen bileşiklerin A549 insan akciğer kanser hücre hattında sitotoksik aktivitesiyle ilgili bir çalışmaya literatürde rastlanmadığı için bu tez kapsamında benzimidazol türevi ligand içeren platin (II) bileşiklerinin A549 insan akciğer hücre hattında sitotoksik aktivitesi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser vücut hücrelerinin anormal bir şekilde çoğalması sonucunda meydana gelmektedir. Kanser hücreleri büyümeyi durdurma yeteneğini kaybetmiş küçük hücrelerden oluşur. Kanser türleri iki yüz milyon yıldan fazla çok hücreli canlıları etkilemektedir. Modern çağlardan itibaren kanser türlerinin bir milyon yıldan fazla geriye gittiğini gösteren kanıtlar vardır. Bulaşıcı hastalıklar ve parazitler çevresel yabancı kaynaklardan bulaşırken kanser hastalığı genler yoluyla ortaya çıkabilmektedir [10].

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre kanserler dünya çapında en büyük sağlık yükünü oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre kanserin 2018'de dünya çapında 9,6 milyon insanın ölümüne neden olduğu tahmin edilmiştir [11]. 2018 yılında en sık akciğer kanseri (2,09 milyon vaka), meme kanseri (2,09 milyon vaka) ve prostat kanseri (1,28 milyon vaka) olmak üzere toplam 18 milyon yeni vaka teşhis edilmiştir [12].

2008'de dünya çapında kanser insidansı erkeklerde kadınlardan daha yüksektir ve erkeklerdeki insidans oranı farklı bölgelerde hemen hemen 4 katı kadar değişmektedir. Dünyanın farklı bölgelerinde kadınlarda insidans oranlarında daha az farklılık vardır [13].

2.2. Kanser Türleri

Kanser türleri 5 grupta sınıflandırılmaktadır [14].

Karsinom: Karsinom en yaygın görülen kanser türüdür. Akciğer, meme ve pankreası etkilemektedir.

Melanom: Cildin pigment hücrelerinde ortaya çıkan bir kanser türüdür.

Lenfoma: lenfositleri veya beyaz kan hücrelerini etkilemektedir.

Lösemi: Bu kanser türü kan hücrelerini etkilemektedir.

Sarkom: Yumuşak veya bağ dokuları hedef almaktadır.

2.3. Kanser Gelişimi

Kanser, dokudaki klonal bir hücre grubu çoğaldığında gelişir. Kanseri gelişme süreci karsinogenez olarak bilinir. Hücre döngüsünün ilerlemesi, hücre dışı ve içi sinyallerle düzenlenir. Bu sinyaller bozulursa veya değiştirilirse hücreler etkilenebilir [15].

Kanseri gelişimi üç aşamaya ayrılır; başlama, gelişme ve ilerleme.

- I. Başlama: İlk hücre mutasyonunun gerçekleştiği aşamadır. Bu aşamada hücreler değişim gerçekleşir ve bu değişim hücre döngüsünden sorumlu genin aktivasyonunun bozulmasına yol açabilir.
- II. Gelişme: Bu aşamada, değiştirilmiş hücreler bölünmeye teşvik edilir. Hücre içi ve dışı ortam kanseri gelişimini etkileyebilir [16].
- III. İlerleme: Bu aşamada tümör içindeki heterojenite artar [17].

2.4. Kanseri Belirtileri

Kanseri hastalarında hastalık ilerledikçe çoklu semptomlar gelişebilir [18]. Fiziksel semptomlar (ağrı, mide bulantısı, ishal, yorgunluk ve halsizlik/kaşeksi) ve bilişsel semptomlar (hafıza, konsantrasyon) genellikle duygusal semptomlardan (anksiyete ve depresyon) ayrılır [19]. Sindirim sisteminin belirtileri olan mide bulantısı, kusma ve iştahsızlığın kanseri de belirtileri olduğu klinik deneylerle gözlemlenmiştir. Ayrıca özellikle akciğer kanserli hastalarda uyku bozukluklarına ek olarak nefes darlığı, öksürük, yorgunluk ve anksiyete kanseri belirtileri arasında yer alır [20].

Diğer belirti veya semptomlar şunları içerebilir; iştahsızlık veya kilo kaybı, kemiklerde veya vücudun diğer bölümlerinde sürekli kötüleşen, ancak önceki ağrılardan farklı olan yeni bir ağrı türü, olağan tedaviyle düzelmeyen tekrarlayan enfeksiyonlar [21].

2.5. Kanseri Nedenleri

Kanseri, anormal bir vücut hücresinin gelişmesine yol açabilen herhangi bir faktörden kaynaklanabilir. Bazı kanseri türlerinin nedenleri tanımlanamamaktadır. Bazı kanseri türlerinin ise çevresel veya yaşam tarzından kaynaklanan tetikleyicileri olduğu bilinmektedir. Kanseri bir kısmına sigara, radyasyon, aşırı alkol tüketimi ve genetik değişiklikler neden olabilir [22].

Kanserden etkilenebilecek üç tip gen vardır.

a) Proto-onkogenler: Hücre bölünmesine katkıda bulunan ve onkogenler olarak bilinen bu genler, belirli değişikliklere uğrarlarsa veya aşırı aktif hale gelirse kansere neden olabilirler.

b) Tümör Baskılayıcı Genler: Bu genler tarafından tümör baskılayıcı protein adı verilen ve hücre gelişimini düzenlemeye yardımcı olan bir protein salgılanır. Tümör baskılayıcı gen mutasyonları meydana geldiğinde hücreler kontrolsüz bölünürler.Çeşitli tipte tümör baskılayıcı genler geniş bir şekilde şu şekilde sınıflandırılabilir: hücre bölünmesini kontrol eden genler, DNA'yı tamir eden genler ve hücre intiharı kontrol eden genler.

c) DNA Onarım Genleri: Hasar görmüş DNA'nın düzeltilmesinde rol oynamaktadır. Bu genler kromozom modifikasyonlarına neden olur. Bazı mutasyonlar birleşirse hücreler kanser geliştirebilir. [23].

2.6. Kanseri Teşhisinde Kullanılan Bazı Yöntemler: Kansere hastalarının prognozu erken teşhis ile önemli ölçüde iyileşir [24]. Kansere tek bir testle kesin olarak teşhis edilemez. Bir kişinin kansere olup olmadığını değerlendirmek için çok sayıda test gereklidir [25].

1. **Laboratuvar Testleri:** Laboratuvar testleri ile vücudumuzda kansere neden olabilecek maddeler idrar, kan ve diğer vücut sıvılarını kullanarak değerlendirilir. Anormal laboratuvar bulguları her zaman kanserin göstergesi değildir [26].
2. **CT Taraması:** CT tarama görüntülemesi tıp alanındaki en iyi görüntüleme aracı olmasına rağmen, CT tarama görüntülerinden kansere yorumlamak ve saptamak klinisyenler için zor olabilir. Klinisyenlerin kanserli hücreleri kesin olarak saptaması için bilgisayar destekli teşhis yardımcı olabilir. CT görüntüleme, akciğer kansere teşhisi için güvenilir bir yöntemdir [27].
3. **MRI:** Kansere tespiti ve tedavisi için görüntüleme teknikleri, vücudun içinin fotoğrafları şeklinde görsel sunumlar sağlar [28].
4. **Sıvı Biyopsi:** "Sıvı biyopsi" terimi, katı olmayan biyolojik dokudan, çoğunlukla kandan, ayrıca tükürük, idrar, beyin omurilik sıvısı ve diğer vücut sıvılarından örnek alınmasını tanımlar. Kansere hastalarından sıvı biyopsinin birincil işlevi, dolaşımdaki tümör hücrelerinin alınmasıdır [29].

2.7. Kanser Tedavi Yöntemleri:

Cerrahi, genellikle ilk tedavi şekli olarak kullanılır ve erken malignitelere tedavi edici olabilir. Birinci ve ikinci evre malignitesi olan bireylerde ameliyat tercih edilir. Üçüncü ve dördüncü seviyelerde cerrahi tavsiye edilmez. Kemoterapi özellikle akciğer kanseri vakalarında sıklıkla tercih edilen bir seçenek olarak dikkat çekmektedir [30].

2.7.1 Kemoterapi

Kemoterapi genellikle akciğer kanseri olan hastalar için uygun bir tedavi yöntemidir. Olası bir terapi stratejisi, EGFR ve anjiyogenez yollarına odaklanmayı içerir. [30]. Kemoterapinin en bilinen tiplerinden biri el, kol veya göğüsteki bir damara yerleştirilen bir tüple uygulanan intravenöz kemoterapidir.

Primer tümörler için yaygın olarak kullanılmasına rağmen çoğunlukla yayılmış hastalığı yönetmek için kullanılır. Kanser hücreleri, aşırı aktif büyüme sinyal yollarına sahip olduklarından, büyüme sinyali veren molekülleri ve/veya hücre replikasyonu ve ekspresyona dahil olan süreçleri hedefleyen çeşitli ilaçlara karşı savunmasızdır [31].

Radyasyon tedavisi ve kemoterapi sıklıkla akciğer kanserini tedavi etmek için birleştirilir. Radyasyon ve kemoterapi, kanser hücrelerini öldürmek için birlikte kullanıldığında daha etkili olabilir. Bazı akciğer kanseri hastalarında tümörlerini küçültmek için radyasyon tedavisine ek olarak kemoterapi uygulanabilir. Ek olarak, radyasyon tedavisinden sonra kanser hücrelerinin yenilenmesini önleyebilir.

Sisplatin ve karboplatin, küçük olmayan hücre akciğer kanserini tedavi etmek için ya gemcitabine (Gemzar), docetaxel (Taxotere), pemetrexed (Alimta), paclitaxel (Taxol) ya da vinorelbine ile birlikte kullanılır [32].

2.7.2 Radyoterapi

Radyasyon tedavisi, kanser hastaları için yaygın bir tedavi seçeneğidir. Radyasyon tedavisi, kanser hastalarının yaklaşık %60'ını tedavi etmek için kullanılmaktadır. Radyasyon tedavisi, bazı durumlarda mevcut olan tek kanser tedavisi olabilir. Radyoterapi olarak da bilinen radyasyon tedavisinde, kanser hücrelerini yok etmek ve tümör boyutunu küçültmek için bir kanser tedavisi olarak yüksek dozlarda radyasyon kullanılmaktadır [33]. Radyasyon, vücudun içini görüntülemek ve görüntü almak için düşük dozlarda kullanılabilir. Dış ışın olarak bilinen, radyasyonu vücudun dışından kanser hücrelerine yönlendiren bir cihazdır. Dahili radyasyon tedavisi sırasında

radasyon tümörün içine veya çevresine dahili olarak enjekte edilir. Hastalar bazen her iki tip radasyon tedavisini alırlar [34].

Radyoterapiyi tek başına veya kemoterapi, cerrahi veya her ikisi ile birlikte kullanmak mümkündür. Kanseri tedavi etmek veya semptomları tedavi etmek (palyasyon) için uygulanabilir. Farklı kanser türleri nedeniyle, düşük ve orta gelirli ülkelerdeki kanser hastalarının daha büyük bir yüzdesinin yüksek gelirli ülkelere göre radyoterapiye ihtiyaç duyması muhtemeldir. Yerli hastalara, muhtemelen tüberküloz tarama programı kapsamında çekilen göğüs röntgenlerinin sonucunda daha erken aşamada akciğer kanseri ile teşhisi konulmuştur. Akciğer kanseri tipik olarak LMIC'lerde daha ileri aşamalarda tespit edilir. Akciğer kanseri evrelerinin dağılımı hakkında çok az rapor vardır; ancak Türkiye'de yapılan bir araştırma, vakaların %72'sinin evre III veya IV olduğunu ortaya koymuştur. İlerlemiş maligniteler için radyoterapi sıklıkla mevcut olan tek tedavidir [35].

Biyolojik süreçleri nasıl etkilediğine bağlı olarak, iyonlaştırıcı radasyon doğrudan iyonlaştırıcı veya dolaylı olarak iyonlaştırıcı olarak sınıflandırılabilir. Protonlar, nötronlar ve karbon iyonları, doğrudan iyonlaşan parçacık radasyon türlerinin çoğunu oluşturur; bu, yeterli kinetik enerjiye sahip herhangi bir bireysel parçacığın, soğurucu ortamın atomik yapısını doğrudan bozarak fiziksel, kimyasal ve biyolojik zarara neden olabileceği anlamına gelir. Buna karşılık, X ışını gibi elektromanyetik radasyon, madde radasyonun enerjisini emdiği ikincil elektronlara (yükü parçacıklar) neden olduğu için dolaylı olarak iyonlaştırıcıdır [36].

2.7.3 Hedefli Terapi

Hedefe yönelik tedavi ile belirli kanser hücresi alt tipleri kesin olarak belirlenebilir ve ilaçlarla veya diğer maddelerle kanser hücresiyle mücadele edilebilir. Hedefe yönelik tedavi, kanser hücresi çoğalmasını önleyebilir [37].

Hedefe yönelik tedavinin farklı türleri vardır:

- Anjiyogenez inhibitörleri: Bunlar, kanser hücrelerine besin sağlayan yeni kan damarlarının büyümesini durdurur.
- Monoklonal antikolar: Bunlar, bir kanser hücresini öldürmek için ilaçları, molekülleri veya kimyasalları taşıyabilir. Bazı monoklonal antikolar, aradıkları, bağlandıkları ve saldırdıkları belirli bir kanser hücresi hedefine sahip olduklarından bunlara hedefli tedaviler de denir. Bununla birlikte, bazı monoklonal antikolar,

bağışıklık sisteminin yanıtını geliştirerek vücudun kanser hücrelerini daha başarılı bir şekilde bulmasını ve ortadan kaldırmasını sağladığından, immünoterapiye benzer şekilde işlev görür.

- Proteazom inhibitörleri: Bunlar, düzenli hücre süreçlerine müdahale ederek kanser hücrelerini öldürür.
- Sinyal iletim inhibitörleri: Bunlar, hücre sinyallerini baskılayarak kanser hücrelerinin aktivitesini değiştirir [38].

2.7.4 İmmünoterapi

Bu kanser tedavisinde hastanın kendi bağışıklık sisteminden yararlanır. İmmünoterapi, tedavi için bağışıklık sisteminin işleyişini değiştirebilir [39].

Kanser immünoterapilerinin birincil kategorileri tipik olarak şunlardır:

Moleküler olarak klonlanmış antikorlar: Monoklonal antikorlar, meme kanseri ve lenfomalar (bu yüksek oranda eksprese edilen molekülleri hedefleyen laboratuvarda üretilen immün proteinler) dahil olmak üzere çeşitli tümörlerin yüzeyinde yüksek oranda eksprese edilen spesifik molekülleri hedefleyebilir.

T-hücre transfer tedavisi: İmmünoterapiler, tümör hücrelerine ek olarak doğrudan bağışıklık hücrelerini hedefler.

Bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri: Bağışıklık sistemi, fren veya durma sinyalleri ile donatılmıştır. Bu sayede bağışıklık sistemi kanser ile savaşabilmektedir.

Onkolitik virüs tedavisi: Kanser hastalarında bağışıklık sistemini uyarmak için bazı virüsler kullanılır. Bu onkolitik virüsler, bazı kanser hücrelerini doğrudan öldürmenin yanı sıra, diğer kanser hücrelerini ortadan kaldırmak için bağışıklık sistemini de uyarır.

Aşılar: kanser aşıları da dahil olmak üzere belirli hastalıklara karşı bir bağışıklık tepkisini tetiklemek için vücuda uygulanan maddelerdir [40].

2.7.5 Hormon Tedavisi

Hormon tedavisi, gelişimi hormonlara bağlı olan kanserin büyümesini durdurarak kanser tedavisinde kullanılabilir [41]. Radyasyon tedavisi alamayan prostat kanserli hastalar semptomlarını azaltmak için hormon tedavisinden yararlanabilirler [34].

Akciğer kanserini tedavi etmenin başka bir yöntemi:

Radyofrekans ile Ablasyon: Radyofrekans ablasyonu erken evrede olan küçük hücreli olmayan akciğer kanserini tedavi etmek için kullanılabilir. Radyo dalgaları, tümöre yerleştirildikten sonra iğne yoluyla iletilir. Bu dalgaların ürettiği ısı kanser hücrelerini yok eder.

Kriyoterapi: Malignite hava yollarında tıkanmaya neden olursa (endobronşiyal tıkanıklık) kriyoterapi yapılabilir. Solunum sorunları, öksürük ve kanama gibi semptomlara neden olabilir.

Dahili radyasyona benzer şekilde, kriyoterapi, radyoaktif bir kaynak yerine kriyoprob adı verilen bir cihazın tümöre uygulanmasını içerir. Kriyoprob aşırı düşük sıcaklık üretebilir, tümör küçülebilir.

Fotodinamik terapi (PDT): Erken evre akciğer kanseri için bir tedavi seçeneğidir, ayrıca hava yollarını tıkayan bir tümörü çıkarmak amacıyla da kullanılabilir [40].

2.8. Akciğer Kanseri

Dünyadaki tüm kanser ölümlerinin %18'ini oluşturan akciğer kanseri, en yaygın kanser türü olmaya devam etmektedir [42]. Akciğer kanseri, diğer kanser türleri ile karşılaştırıldığında hem erkekler hem de kadınlar için önde gelen küresel ölüm nedenidir. 1950'lerde tarama testleri başlamıştır. Ancak genel ölüm oranında herhangi bir iyileşme görülmemiştir [43].

Akciğer kanseri, kadınlarda en yaygın üçüncü kanser insidansına sahiptir ve erkeklerde ciddi kanser insidansı ve ölümlerinin en yaygın nedenidir [44].

Günümüzde, akciğer kanserinin kontrolü dünya çapında dikkatleri üzerine çekmektedir. Akciğer kanseri tedavisi bulunamadığı için halen zorlu bir hastalık olmaya devam etmektedir [45].

Akciğer kanseri vakalarının çoğuna, birincil veya metastatik hastalık veya paraneoplastik sendromlarla ilişkili semptomlar ortaya çıktığında teşhis konulmaktadır. Akciğer kanserli hastanın değerlendirilmesi; histolojik tanı için materyal elde etmeyi, Uluslararası TNM (Tumor, Node, and Metastasis) evreleme sistemini kullanarak bir hastanın vücudundaki kanser seviyesini ve yayılımını tanımlamayı, göğüs ve karın bilgisayarlı tomografi (BT) taramasını, rutin laboratuvar muayenelerini, akciğer fonksiyon testlerini içerir. Esnek fiberoptik bronkoskopi genellikle doğrudan büyük hava yollarına bakmak ve biyopsi materyali elde etmek için ince iğne ile BT kılavuzluğunda biyopsi yapılır. Küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) ve küçük hücreli

olmayan akciğer kanseri tipi (NSCLC) akciğer kanseri türlerindedir. Skuamöz ve SCLC esas olarak merkezi hava yollarından kaynaklanırken, adenomlar (bronşiyol ve alveolar karsinomlar dahil) periferde bulunur [46].

Son 50 yılda akciğer kanseri tedavisinde kullanılan tedavi yöntemleri cerrahi, radyoterapi veya kemoterapi ya da bunların kombinasyonu şeklindedir. Bu tedavi yöntemleri çok az değişmiştir. Son 50 yılda, cerrahi daha güvenli bir hale gelmiş ve tedavide birincil olarak tercih edilmeye devam etmiştir. Birincil akciğer kanseri, akciğerden kaynaklanan kanserin başka bir adıdır. Akciğer kanseri, kanser vücudun başka bir yerine ilerledikten sonra gelişirse ikincildir [43]. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri en yaygın çeşittir [47].

2.8.1. Küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC)

Akciğer kanserinin bu türü tipik olarak sigara içmekten kaynaklanır ve hızla yayılır. Nöroendokrin sistem hücrelerinde oluşan nöroendokrin tümörler (NET'ler), küçük hücreli akciğer kanserleri için başka bir terimdir [48].

2.8.2. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC)

Üç ana çeşidi vardır: adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinomdur.

a) Adenokarsinom: Vakaların %40'ını oluşturan en yaygın akciğer kanseri formu adenokarsinomdur.

b) Skuamöz hücre kanseri: Hava yollarının yüzeyini kaplayan hücrelerde ortaya çıkan bir türdür.

c) Büyük hücreli karsinom: Büyük hücreli karsinom sıklıkla akciğerlerde başlar, nadiren çevredeki lenf bezlerine, göğüs duvarına ve uzak organlara yayılır. Bu tipteki kanser hücreleri mikroskop altında büyük ve yuvarlak görünmektedir [49].

2.8.3. A549 Hücre Hattı

A549 hücreleri, insan akciğer kanseri epitel hücre hattıdır. Bu hücreler çok çeşitli araştırma çalışmalarında yaygın olarak kullanılan hücre hatlarından biridir. 1972 yılında ilk olarak D. J. Giard ve ekibi tarafından A549 hücre hattı geliştirilmiştir. A549 hücre hattı 58 yaşındaki bir erkekte karsinomlu akciğer dokusunun çıkarılması ve kültüre edilmesiyle elde edilmiştir. Alveollerden su ve elektrolitlerin difüzyonu skuamöz

hücreler olan A549 hücreleri tarafından gerçekleştirilir. *In vitro* olarak üretildiklerinde, bu hücreler kültür flasklarına yapışarak tek tabaka halinde çoğalırlar. Bu hücreler lesitini sentezleme yeteneğine sahiptir ve membran fosfolipidlerinin korunmasından sorumlu olan yüksek oranda doymamış yağ asitleri içerir. Bu adenokarsinom insan alveolar epitel hücre hattı, ilaç metabolizma çalışmalarında Tip II pulmoner epitel hücre modeli olarak kullanılmıştır [50].

Yeni sentezlenen komplekslerin sitotoksitesini ve metabolizmasını değerlendirmek için en popüler kanser hücre hattı A549'dur. [51]. Ayrıca A549 hücre hattının kullanıldığı diğer uygulamalar; adenovirüs üretimi, hastalık modelleme, ilaç geliştirme, enzimatik çalışmalardır.



Şekil 2.1. A549 hücre hattı.

2.9. Platin Bazlı İlaçlar ve Sınıfları

Platin bileşiklerinin, bakteri hücre bölünmesini engellediği gözlemlendikten sonra 1970'lerin başında deneysel bileşikler olarak tanıtılmıştır. Antikanser aktiviteye sahip olduğu keşfedilen ilk platin bileşiği sisplatin'dir. Sisplatinin kanser tedavisinde klinik uygulamaya girmesinin ardından diğer iki platin ilacı karboplatin ve oksaliplatin onay

almıştır [52]. İki platin bileşiği olan karboplatin ve sisplatin birçok kanser türünün tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır.

Bazı platin kompleksleri gibi aktif antikanser ilaçları hem insanlar hem de hayvanlar üzerinde kullanılmaktadır. Bir elektrik alanının bakteri büyümesi üzerindeki etkisinin incelenmesi, bu yeni kemoterapi ilaçları ailesinin keşfedilmesine yol açmıştır. Deney sırasında, platin elektrotlar elektrolize edilmiş ve bakteriyel hücre bölünmesini tamamen durduran bir platin kompleksi serbest bırakılmıştır [53].

Rosenberg'in sisplatinin [cis-diamindikloroplatin (II)] antiproliferatif etkisini tesadüfen keşfetmesi nedeniyle, antikanser ilaçları olarak platin kompleksleri çok dikkat çekmiştir. Çeşitli katı tümörler, sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin gibi platin bazlı ilaçlarla tedavi edilir. Platinden yapılan ilaçların genellikle iki dezavantajı vardır: Kemorezistansa neden olabilirler ve sadece kanser hücrelerine karşı etkili değildirler. Bu durum zararlı yan etkilere yol açar [54].

Sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin, antineoplastik etkilerini DNA bazlarına bağlanarak DNA sentezinin, transkripsiyonunun bozulmasına ve sonuçta apoptoza neden olan iplik içi ve iplikler arası çapraz bağlar üreterek meydana getirirler. Platin kompleksleri, sarkomlar ve testis, yumurtalık, mesane, akciğer, beyin, baş ve boyun ve diğer tümörleri içeren çok sayıda malignite için çok ajanlı kemoterapi uygulamalarının önemli bileşenleridir. Analogların geliştirilmesi, platin antikanser komplekslerinin etki tarzı dikkatli bir şekilde değerlendirilerek yapılmıştır. Yüksüz cis yapılı kare düzlemsel platin(II) kompleksleri, klinik ortamlarda test edilen platin bileşiklerinin büyük çoğunluğunu oluşturur [55].

Bazı platin antikanser komplekslerinin sınıfları

1. Sterik olarak engellenmiş platin kompleksleri: Kükürt içeren peptit ve proteinlerle platin ilaçların geliştirilmiş sitozolik deaktivasyonu, kanser hücrelerinin direnç mekanizmalarından biridir. Bu tür platinde platin bileşiklerine büyük bir taşıyıcı ligand eklenerek kanser hücrelerinin reaktivitesi azaltmaya çalışılır.

2. Biyolojik olarak aktif ligandlarla Platin(II) kompleksleri:

Bu platin bileşiği, HMG1 miktarını artırmak için östrojeni indükler. HMG1 proteini, platin-DNA eklentilerinin onarımını önler ve sisplatinin sitotoksitesini artırır.

3. Trans geometri Platinum(II) kompleksleri:

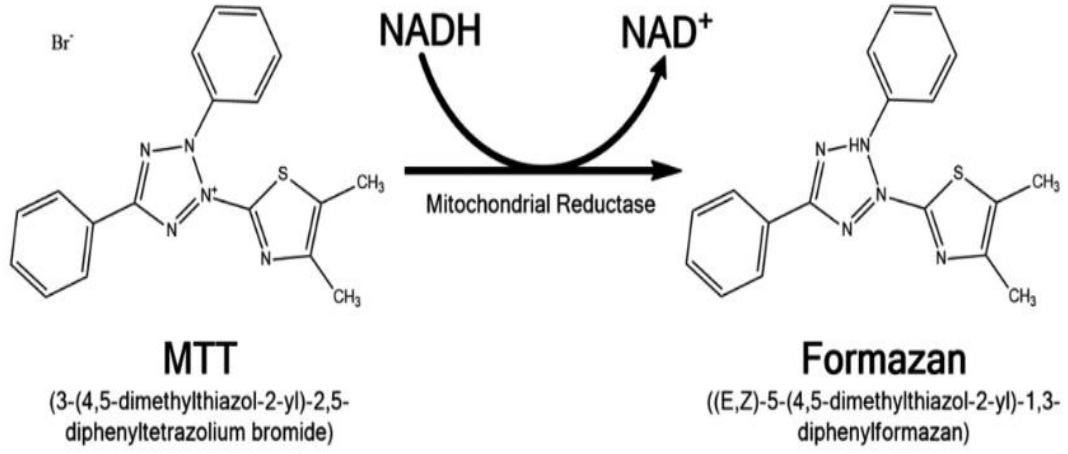
Çok uzun bir süre cis-geometri olmadan platin bileşiklerinin antikanser etkisinin olmayacağı varsayılmıştır. Bununla birlikte, dirençli hücrelerin platin kaynaklı DNA hasarını onarma yeteneğinin artması, araştırmacıların dikkatini yapısal olarak farklı DNA adductları oluşturabilen platin komplekslerine odakladı. Geleneksel platin ilaçları tarafından oluşturulan çapraz bağlarla karşılaştırıldığında, bu yeni adductların hücresel mekanizma tarafından farklı şekilde işlenmesi bekleniyordu. Transplatin kompleksleri, şekilleri nedeniyle DNA ile cis-karşıtlarından farklı bir şekilde etkileşime girmeye yatkındır.

4. Polinükleer platin kompleksleri

Çok çekirdekli platin kompleksleri olarak bilinir. Azolato-köprülü çift çekirdekli platin kompleksleri, antikanser polinükleer platin bileşiklerinin ilgi çekici bir sınıfıdır [56].

2.10. Hücre canlılığı testi

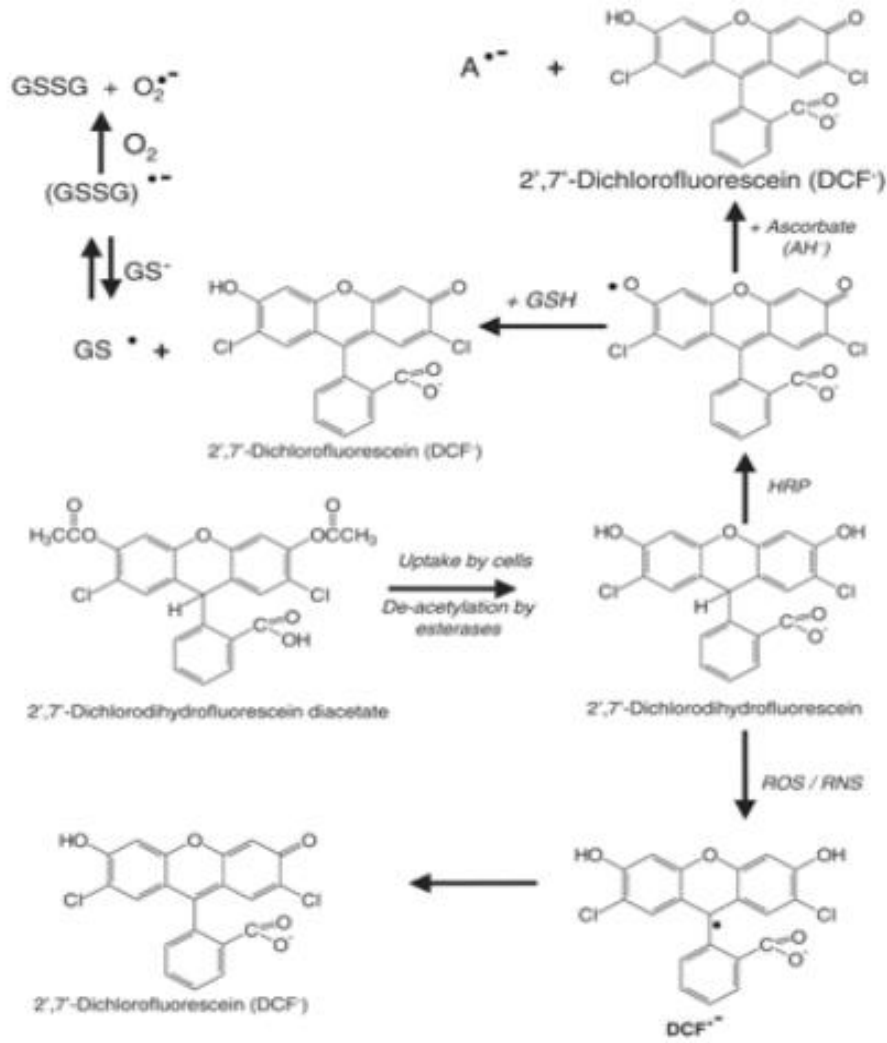
MTT testi, hücre canlılığını değerlendirmek için kullanılan kolorimetrik bir testtir. MTT testi, mitokondriyal solunuma bağlıdır, bu nedenle dolaylı olarak bir hücrenin hücresel enerji kapasitesi değerlendirilmektedir. Mitokondriyal solunum sırasında, süksinat dehidrogenaz enzimi, 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ile mor renkli MTT-formazan kristalleri oluşturmaktadır. Formazan ürünü, DMSO'da çözüldükten sonra spektrofotometrik olarak (550 nm) analiz edilir, nanopartikül uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerin spektrumları sitotoksosite derecesinin bir tahminini vermektedir [57].



Şekil 2.2. MTT'nin formazan kristallerine indirgenmesi [58].

2.11. Oksidatif Stres Ölçümü

Tipik koşullar altında, aerobik solunum, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesiyle sonuçlanır. O_2 ve H_2O_2 gibi serbest radikaller, ROS örnekleridir. Hücrelerde serbest radikal oluşumunu ölçmek için çeşitli yöntemler kullanılabilir [59]. Dichlorofluorescein-diacetate (DCFDA), hücre içindeki reaktif oksijen türlerini (ROS) ölçmek için kullanılan en florojenik boyalardan biridir. DCFDA hücreye girdikten sonra floresan olmayan bir bileşiğe deasetillenir. Hücre içi esterazlar, DCFH-DA'yı iki ester bağlantısından parçalayarak nispeten polar ve hücre zarından geçirmeyen ürün H₂DCF'yi oluşturur. Bu floresan olmayan madde oksitlenerek yüksek floresan DCF'yi üretir. DCF, floresan spektroskopisi ile tespit edilen floresan bileşiktir. Dolayısıyla spektroskopideki floresan okuma, hücre içindeki ROS varlığının göstergesidir [60].

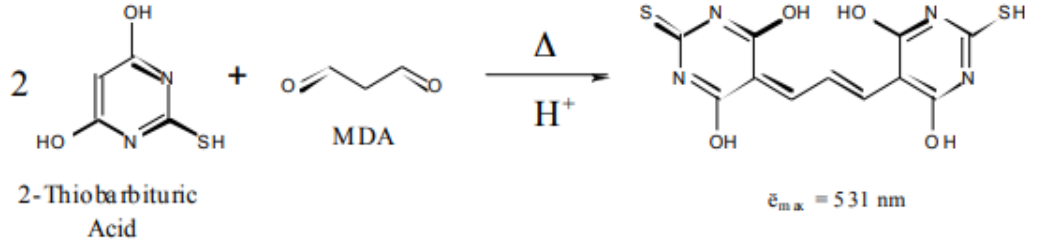


Şekil 2.3. DCFDA'nın floresan bir ürüne (DCF) dönüştürülmesi [59].

2.12. Lipid peroksidasyonu ölçümü

TBARS testi, lipid peroksidasyonunu ölçmek için en yaygın kullanılan testlerden biridir. Bu testte lipid substratlarının oksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit (MDA) seviyesi ölçülerek lipid peroksidasyona bağlı hücre zarı hasarı değerlendirilir [61].

TBARS testi, MDA ile 2-tiyobarbitürik asit adı verilen kromojenik bir reaktifin etkileşimine dayanır. Bir MDA molekülü, iki 2-tiyobarbitürik asit molekülü ile birleşerek 532-535 nm'de maksimum absorbanlı bir kromofor üretir [62].



Şekil 2.4. 2-tiyobarbitürük asit ve MDA arasındaki reaksiyon [62].

2.13. Ölüm tipi belirlenmesi

Akridin oranj ve propidyum İyodit (AO/PI), hücre canlılığını ve hücre ölüm tipini ölçmek için kullanılan nükleik asit bağlayıcı boyalardır. Akridin oranj (AO) boyasına hücre geçirgendir, canlı ve ölü hücrelere girebilir, bu nedenle yeşil floresan oluşturmak için tüm çekirdekli hücreleri boyar. PI, yalnızca zarar görmüş zarları olan hücrelere girer ve bu nedenle kırmızı floresan oluşturmak için tüm ölü nekrotik çekirdekli hücreleri boyar. Böylece tüm canlı çekirdekli hücreler yeşil ve tüm ölü çekirdekli hücreler kırmızı floresan boyama verir [63].

2.14. Apoptozun belirlenmesi

Apoptoz tayini, apoptozda rol oynayan kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 enzimlerinin aktiviteleri ölçülerek yapılabilir. Kaspaz aktivasyonu, hücre apoptozu için yaygın olarak kabul edilen bir göstergedir [64].

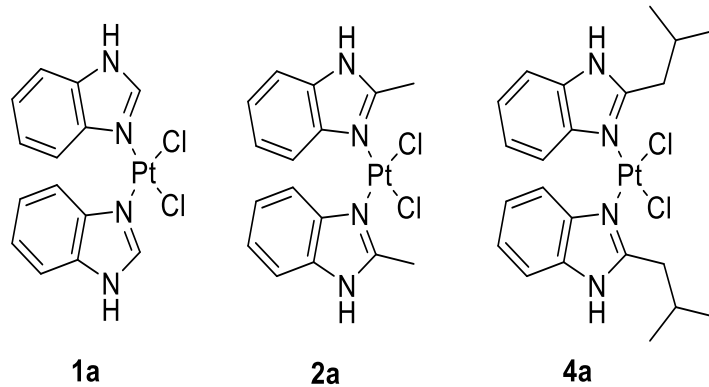
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasal Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan üç dikloro-platin (II) kompleksi (1a, 2a ve 4a) Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Gozelle ve ark.'nın, (2019) yaptıkları çalışmada sentezledikleri platin (II) komplekslerinden seçilen 1a, 2a ve 4a'nın yapısı Şekil 3.1'de verilmiştir. Platin (II) komplekslerin hücre canlılık testi MTT (Sigma, 475989) testi ile yapılmıştır. MTT deneylerinde pozitif kontrol olarak sisplatin (Sigma 15663-27-1) ve karboplatin (Sigma C2538) kullanılmıştır. Platin (II) kompleksleri % 0,1'lik dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözdürülmüştür. Deneyler öncesinde hücreleri saymak amacıyla tripan mavisi boyası (Hyclone, Logan, UT) kullanılmıştır. Hücre içi ROS miktarı 2',7'-dikloroflorosein diasetat boyası (DCFDA, sc 359840, Santa Cruz) kullanılarak yapılmıştır. Oksidatif strese bağlı olarak hücre zarındaki lipid peroksidasyonu belirlemek için TBARS Kiti (Cayman, 10009055) kullanılarak MDA ölçümü yapılmıştır. Hücre ölüm tipini belirlemek amacıyla Akridin oranj (Sigma, A6014-10G) ve Propidyum iyodit (Applichem, 01A2261,0025) boya kullanılmıştır. Tez çalışmasında apoptoz tayini için apoptozda rol oynayan kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 enzim aktivite ölçümünde multiplex aktivite test kiti (Abcam, ab219915) kullanılmıştır.

3.2. Hücre kültürü

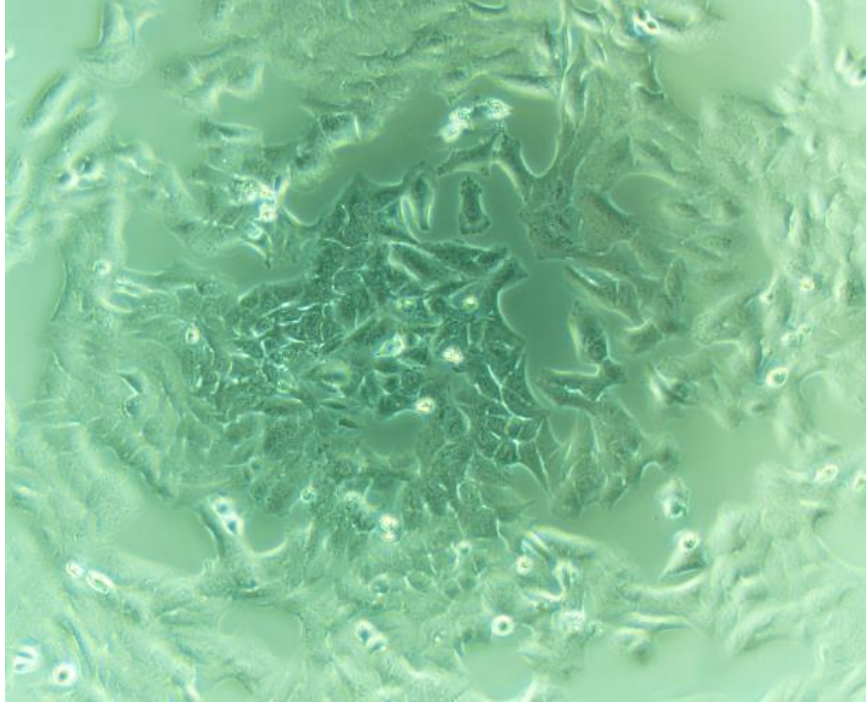
Çalışmada insan akciğer kanser hücre hattı olan A549 hücre hattı kullanılmıştır. A549 hücreleri adherent özellik göstermektedirler. A549 hücreleri %10 fetal sıgır serumu, penisilin ve streptomisin içeren RPMI (Roswell Park Memorial Institute) besiyerinde kültüre edilmiş ve ardından %5 CO₂ içinde 37°C'de inkübe edilmiştir.



Şekil 3.1. Platin (II) komplekslerinin kimyasal yapısı.

3.3. A549 Hücree Hattının Üretilmesi ve Pasajlanması

A549 hücre hattı %1 Penisilin/streptomisin içeren ve %10 fotal sığır serumu (FBS) RPMI (Roswell Park Memorial Institute) besiyerinde %5 CO₂ içeren etüvde 37 C°'de inkübe edilerek 25 cm² ve 75 cm²'lik flasklarda üretilmiştir. A549 hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü Şekil 3.2.'de verilmiştir. Hücreler konfluent hale geldikten sonra tripsin/EDTA eklenerek ve etüvde 37 °C'de birkaç dakika bekletilerek hücreler flask yüzeyinden kaldırılmıştır.Daha sonra hücrelerin üzerine RPMI besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Süspanse hale getirilmiş hücreler çoğalması için yeni flasklara bölünmüş ve hücreler 37°C etüvde inkübe edilmiştir. Hücreler iki günde bir pasajlanmıştır. Yapılan bütün analizlerde pasaj 9 ve pasaj 17 arasındaki A549 hücreleri kullanılmıştır.



Şekil 3.2. A549 hücrelerinin 11.pasaj inverted mikroskop görüntüsü.

3.4. A549 Hücrelerinin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Üretilen A549 hücreleri daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere dondurularak sıvı azotta saklanmıştır. Hücrelerin dondurulması için %10 DMSO ve %90 fetal sığır serumu içeren dondurma vasatı hazırlanmıştır.

Tripsin/EDTA eklenerek hücreler flask yüzeyden kaldırılmış ve süspanse hücreler 800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak pelet üzerine dondurma vasatı eklenerek kriyotüplere paylaştırılıp -80°C derin dondurucuya, daha sonra da sıvı azota alınarak muhafaza edilmiştir.

Dondurulmuş olan hücreler 1 dk 37°C'de su banyosunda çözdürülmüş ve 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant atılmış ve pelette kalan hücrelere 1ml RPMI besiyeri eklenmesiyle flaslara aktarılmıştır. Hücreler besiyerinde %5 CO₂ ve 37°C etüv içerisinde inkübe edilmiştir.

3.5. Platin (II) Kompleksleri ve Kontrol Gruplarının Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Ana stok hazırlamak için tuz platin (II) kompleksleri ve pozitif kontrol grupları (sisplatin ve karboplatin) tartılıp üzerine 40 µl dimetilsulfoksit (DMSO) eklenerek ve su banyosunda bekletilerek çözdürülmüştür. Daha sonra 10 ml serum içermeyen RPMI besiyeri eklenerek ana stoklar hazırlanmıştır.

Hazırlanan ana stoklar kabin içinde steril ortamda 0.22 µM filtre ile süzülerek steril hale getirilmiştir. Her deney öncesinde taze olarak platin (II) kompleksleri ve kontrol grupları için sispaltin ve karboplatin ana stokları hazırlanmıştır. Deneylerde uygulanacak konsantrasyonlar ana stoktan hazırlanmıştır.

3.6. Deney Planı

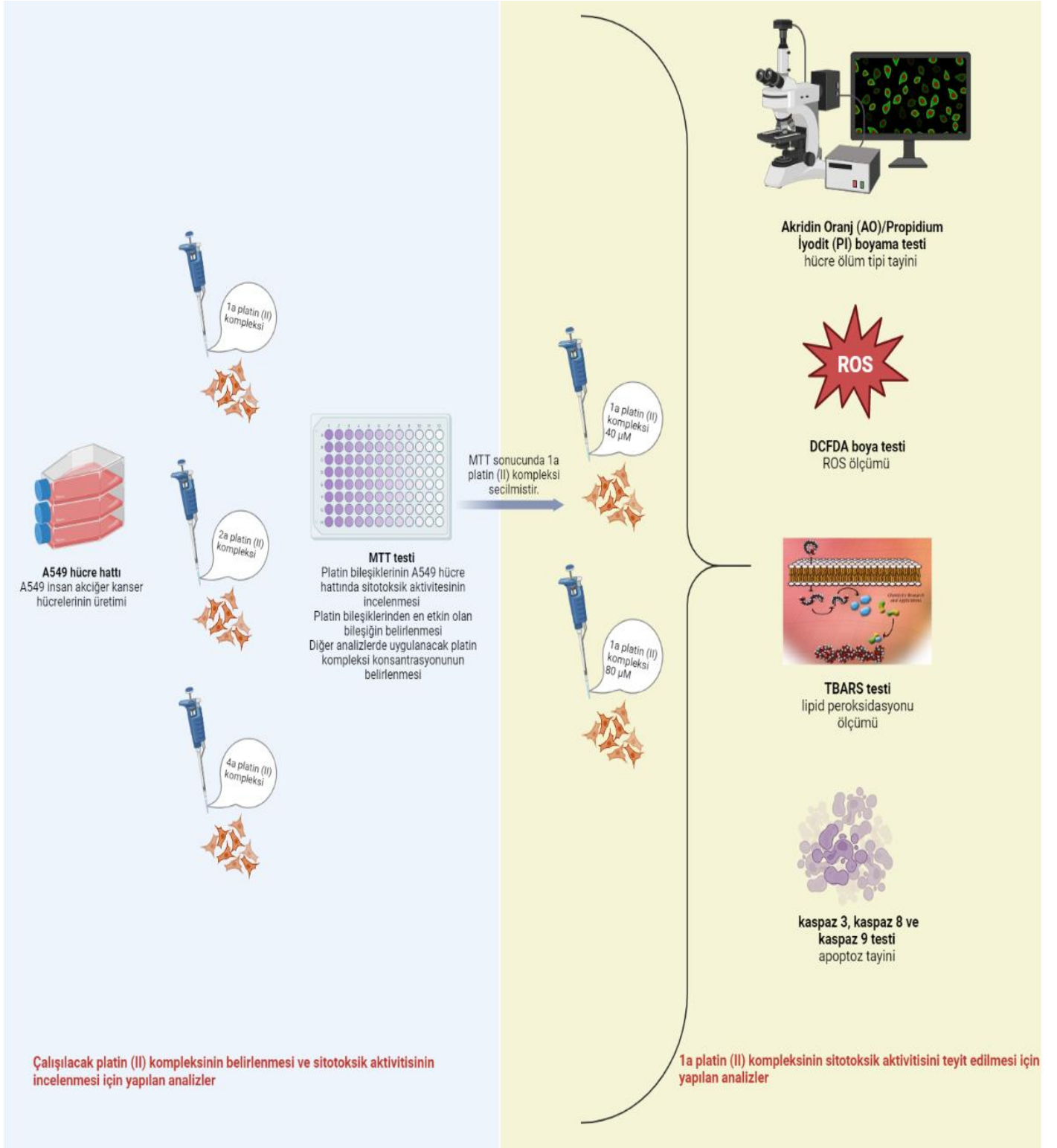
Tez çalışmasının ilk aşamasında A549 insan akciğer kanser hücreleri üretilmiştir. Daha sonra MTT testi ile 1a, 2a ve 4a platin (II) komplekslerinin A549 hücre hattında sitotoksik aktivitesi incelenmiştir. MTT testi sonucunda platin (II) komplekslerinden en etkin olan 1a platin (II) kompleksi seçilmiş ve diğer analizlerde en etkin bulunan 1a platin (II) kompleksi kullanılmıştır. Deney planı Şekil 3.3.'de verilmiştir. Ön çalışmada farklı konsantrasyon aralığında (10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 μ M) platin (II) kompleksleri ve pozitif kontrol olarak kullanılacak sisplatin ve karboplatin ile deneyler yapılmış ve ön çalışmadan elde edilen sonuçlara göre aşağıda yer alan konsantrasyonlar seçilerek çalışma gerçekleştirilmiştir.

MTT testinde yer alan deney grupları aşağıda verilmiştir:

1. Grup: Kontrol
2. Grup: DMSO çözücü kontrol
3. Grup: 40 μ M sisplatin
4. Grup: 80 μ M sisplatin
5. Grup: 80 μ M karboplatin
6. Grup: 160 μ M karboplatin
7. Grup: 320 μ M karboplatin
8. Grup: 40 μ M (1a, 2a ve 4a platin (II) kompleksleri)
9. Grup: 80 μ M (1a, 2a ve 4a platin (II) kompleksleri)
10. Grup: 160 μ M (1a, 2a ve 4a platin (II) kompleksleri)
11. Grup: 320 μ M (1a, 2a ve 4a platin (II) kompleksleri)

MTT testi sonuçlarına göre diğer analizlerde yer alan deney grupları aşağıda verilmiştir.

1. Grup: Kontrol
2. Grup: 1a platin (II) 40 μ M
3. Grup: 1a platin (II) 80 μ M



Şekil 3.3. Deney planının şematik olarak gösterimi. Şema BioRender uygulaması kullanılarak yapılmıştır.

3.7. MTT Testi

Sitotoksiteyi veya hücre canlılığını belirlemek için MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi, en yaygın kullanılan kolorimetrik testlerden biridir. Bu test, hücre canlılığını tespit etmek için süksinat dehidrojenaz gibi mitokondriyal enzimlerin aktivitesini ölçer [65].

MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] testi platin (II) komplekslerinin A549 akciğer kanser hücre hattında sitotoksik aktivitesinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır.

1. İlk olarak A549 hücreleri 5×10^4 /ml olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekilmiş ve 24 saat 37°C %5 CO_2 'li etüvde inkübe edilmiştir.
2. Sonraki gün 96 kuyucuklu plaklardaki RPMI besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra üç farklı dikloro-platin (II) kompleksi, 1a, 2a ve 4a'nın ($40 \mu\text{M}$, $80 \mu\text{M}$, $160 \mu\text{M}$ ve $320 \mu\text{M}$) ve pozitif kontrol olarak sisplatinin ($40 \mu\text{M}$ ve $80 \mu\text{M}$) ve karboplatinin ($80 \mu\text{M}$, $160 \mu\text{M}$ ve $320 \mu\text{M}$) farklı doz konsantrasyonları hazırlanıp hücrelere uygulanarak 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyondan sonra RPMI besiyeri ortamı uzaklaştırılıp her kuyucuğa $100 \mu\text{l}$ RPMI besiyeri ve $13 \mu\text{l}$ /kuyucuk olacak şekilde MTT çözeltisi konulmuş ve 3 saat 37°C %5 CO_2 'li etüvde inkübe edilmiştir.
4. Daha sonra MTT boyası ortamdaki uzaklaştırılmıştır.
5. Formazan kristallerinin çözülmesi amacıyla her kuyucuğa $100 \mu\text{l}$ /kuyucuk olacak şekilde %5 amonyak içeren DMSO konulmuştur.
6. Absorbanslar 550 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu kullanılarak ölçülmüştür.
7. MTT testi en az 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonucunda elde edilen veriler aşağıdaki formül kullanılarak hücre canlılığı hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = (\text{Ortalama örnek OD} / \text{Ortalama kontrol OD}) \times 100$$

3.8. DCFDA testi ile ROS Ölçümü

Dihidrodiklorofloresin (H₂DCF-DA), hücrel oksidatif stresi ölçmek için sıklıkla kullanılan bir testtir. Bu lipofilik ve floresan olmayan molekül, plazma zarını geçtikten sonra bir hidrofilik alkole (H₂DCF) deesterifiye edilir; bu daha sonra tipik olarak reaktif oksijen türlerini (ROS) içeren bir işlemde floresan DCF üretmek için oksitlenebilir [66].

Tez çalışması kapsamında oksidatif strese bağlı olarak ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücreiçi miktarı 2',7'-dikloroflorosein diasetat (DCFDA) ölçümüyle yapılmıştır. DCFDA ölçümleri iki farklı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemlerde izlenen basamaklar aşağıda detaylı bir şekilde açıklanmıştır. DCFDA 24 saat inkübasyon süresinde hızlı parçalanabildiği için ayrıca 30 dakika inkübe edilerek iki yöntemle ölçüm yapılmıştır.

Yöntem 1

1. RPMI besiyeri ile hazırlanan A549 hücreleri 10×10^4 hücre/ml olacak şekilde siyah 96 gözlü plaklara her kuyucuğa 100 µl hücre süspansiyonu olacak şekilde ekilmiştir.
2. Hücrelerin tutunması amacıyla 24 saat boyunca etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
3. Daha sonra plaklardaki besiyeri dökülüp serum ve fenol red içermeyen RPMI besiyeri ile hazırlanan 1a platin (II) kompleksinin konsantrasyonları (40 ve 80 µM) hücrelere uygulanmıştır.
4. 1a platin bileşiğinin konsantrasyonları uygulandıktan sonra hücreler ile 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
5. Ertesi gün serum ve fenol red içermeyen besiyeri plaklardan uzaklaştırılıp her kuyucuğa 100 µl PBS eklenerek yıkama yapılmıştır.
6. Daha sonra PBS plaklardan uzaklaştırılıp 40 µM konsantrasyonda hazırlanan 100 µl DCFDA hücrelere eklenmiştir.
7. Hücreler 45 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
8. İnkübasyondan sonra hücrelerin üzerindeki DCFDA dökülüp 100 µl PBS ile tekrar yıkama yapılmıştır.

9. 485-535 nm dalga boyunda Biotek Synergy H1 Hibrit Reader florimetrik spektrofotometride ölçümler yapılmıştır.

Yöntem 2

1. RPMI besiyeri ile hazırlanan A549 hücreleri 10×10^4 hücre/ml olacak şekilde siyah 96 gözlü plaklara her kuyucuğa 100 µl hücre süspansiyonu olacak şekilde dağıtılmıştır.
2. Hücrelerin tutunması amacıyla 24 saat boyunca etüv içinde bırakılmıştır.
3. Hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılıp 100 µl PBS ile yıkama yapılmıştır.
4. Daha sonra PBS plaklardan uzaklaştırılıp 40 µM konsantrasyonda hazırlanan 100 µl DCFDA hücrelere eklenmiştir.
5. 30 dakika hücreler inkübasyona bırakılmıştır.
6. İnkübasyon sonrasında plaklardaki DCFDA uzaklaştırılıp 100 µl PBS ile yıkama yapılmıştır.
7. PBS ile yıkama yapıldıktan sonra hazırlanan 1a platin (II) kompleksinin konsantrasyonları (40 ve 80 µM) hücrelere uygulanmıştır.
8. Tekrar 30 dakika hücreler etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
9. 485-535 nm dalga boyunda Biotek Synergy H1 Hibrit Reader florimetrik spektrofotometride ölçümler yapılmıştır.

3.9. TBARS testi

TBARS (Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler) testi, oksidatif stresin sonucu oluşan lipid peroksidasyonunu ölçmek amacıyla kullanılmaktadır. Lipid hidroperoksitler, hücresel ortamda oksidatif stresin bir sonucu olarak üretilir. Malondialdehit (MDA), çoklu doymamış yağ asitlerinin tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girmesiyle oluşturulur. Malondialdehit (MDA) tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek MDA-TBA2 oluşur. Oluşan MDA-TBA2 kolorimetrik olarak ölçülebilir [67].

Tez çalışması kapsamında lipid peroksidasyonu ölçmek için Cayman TBARS Assay kiti kullanılmıştır.

TBARS testi için ilk önce A549 hücre lizatları aşağıda açıklandığı gibi hazırlanmıştır.

1. A549 hücreleri RPMI besiyeri kullanılarak 2×10^7 hücre/ml olacak şekilde 1x175 ml flasklara ekilmiştir.
2. Ertesi gün 175 cm²'lik flasklardaki RPMI besiyeri uzaklaştırılıp serum içermeyen RPMI besiyeri ile hazırlanan 1a platin (II) kompleksinin konsantrasyonları (40 ve 80 µM) hücrelere uygulanmıştır.
3. 1a platin (II) kompleksinin konsantrasyonlarının uygulanmasından 24 saat sonra 175 cm²'lik flasklardaki besiyeri uzaklaştırılıp 2 ml PBS hücrelere eklenerek yıkama yapılmıştır.
4. Daha sonra PBS dökülüp hücre lizatları hazırlanmak amacıyla 2 ml PBS hücrelere eklenmiştir ve scraper ile A549 hücreleri kazınmıştır.
5. A549 hücreleri 15 ml lik tüplere aktarılmıştır.
6. Daha sonra hücreler 800 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
7. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatantlar atılıp tüplerin dibinde kalan pellet üzerine 400 µl PBS eklenip iyice pipetlenmiştir.
8. Hücreler 2 ml'lik santrifüj tüplerine alınıp 10000 rcf'ta 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
9. Santrifüj sonrası süpernatantlar alınarak başka 2 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Her gruptan 3'er örnek hazırlanmıştır.
10. Hücre lizatları -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Daha sonra kit içerisindeki reaktifler ve standartlar hazırlanmış ve TBARS testi aşağıda yazıldığı gibi yapılmıştır.

1. Standartlar ve örnekler cam deney tüplerine 100 µl olacak şekilde koyulmuştur.
2. Daha sonra her cam tüpe 100 µl SDS solüsyonu eklenip vortekslenmiş ve 4 ml renk reaktifi eklenmiştir.
3. Standartların ve örneklerin cam tüpleri 100 °C'de su banyosunda reaksiyonu başlatmak amacıyla 1 saat boyunca inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon süresi bitiminde hızlı bir şekilde standartları ve örnekleri su banyosundan alınıp reaksiyonu durdurmak için 10 dakika buz üstüne koyulmuştur.

5. Reaksiyonun durdurulmasından sonra standartlar ve örnekler 15 ml'lik falcon tüplere aktarılarak 10 dakika 1600 g, 4°C'de santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatantlar 100 µl/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara dağıtılmış ve 530-550 nm dalga boyunda Biotek Synergy H1 Hibrit Reader florimetrik spektrofotometride okutulmuştur.

3.10. Akridin Oranj (AO)/Propidium İyodit (PI) Boyama Testi

Akridin Oranj (AO) ve Propidium İyodit (PI) canlı ve cansız hücreleri saymak için kullanılan nükleik asit boyalarıdır. Canlı hücreler yeşil renkte, normal çekirdeklere ve normal kromatine sahiptir. Erken apoptotik hücre, yeşil bir renge sahiptir ve kromatini yüksek oranda yoğunlaştırılmış veya parçalanmıştır. Nekrotik hücre kırmızı renkte normal çekirdeklere ve normal kromatine sahiptir. Erken nekrotik hücre kırmızı renktedir ve kromatini oldukça kondanse veya parçalıdır [68].

1. A549 hücreleri 5×10^4 /ml olacak şekilde 24 kuyucuklu plaklara ekilmiştir.
2. 24 ve 48 saat 37°C'de %5 CO₂ koşullarındaki etüvde inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon sonrasında plaklardaki besiyeri ortamı uzaklaştırılıp 500 µl 40 ve 80 µM konsantrasyonlarında olacak şekilde 1a platin kompleksi hücrelere uygulanmıştır. Kontrol kuyucuklara ise 500 µl serum içermeyen RPMI besiyeri konulmuştur.
4. 1a platin (II) kompleksi uygulanmasından 24 saat sonra plaklardaki besiyeri uzaklaştırılıp 300 µl PBS ile yıkama yapılmıştır.
5. Daha sonra 1:1 oranında hazırlanan AO/PI (10 µg/ml AO: 10 µg/ml PI) 200 µl kuyucuklara eklenmiştir.
6. Hücrelerin boyanması için boya ile 30 saniye bekletilmiştir.
7. Plaklardaki boyayı uzaklaştırılıp 300 µl PBS ile tekrar yıkama yapılmıştır.
8. PBS ile yıkama yapıldıktan sonra plaklardaki PBS çekilmeden A549 hücreleri inverted mikroskopta (Olympus IX71, Japonya) görüntüleme yapılmıştır.

3.11. Kaspaz testi

Tez çalışması kapsamında apoptoz tayini, apoptozda rol oynayan kaspaz 3, kaspaz 8, ve kaspaz 9 enzim aktivite ölçümleriyle yapılmıştır. Başlatıcı kaspazlar (kaspaz 8 ve kaspaz 9) efektör kaspaz'ı (kaspaz 3) aktive ederek apoptozu tetikler. MTT testi

sonucuna göre sitotoksik aktivite açısından en etkin bulunan 1a platin (II) kompleksi uygulanarak A549 hücrelerinde apoptoz varlığı florimetrik olarak ölçülmüştür. Sisplatin ve karboplatin pozitif kontrol gruplarına ilave olarak literatürde kaspaz enzim aktivitelerinde oldukça hassas olan kamptotesin de pozitif kontrol grup olarak kullanılmıştır [69]. Kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 enzim aktivite ölçümünde multiplex aktivite testi (ab219915, Abcam) kullanılmıştır. Kısaca bu kit apoptozla ilgili kaspazlar 3, 8 ve 9'u aynı anda izlemek için tasarlanmıştır. Sırasıyla kaspaz 8, kaspaz 3, ve kaspaz 9 için florojenik belirteçler olarak IETD-R110, DEVD-ProRed™, ve LEHD-AMC kullanılır. Kaspaz bölünmesiyle üç farklı flüorofor yayılır: R110 (yeşil floresans), ProRed™ (kırmızı floresans) ve AMC (mavi floresans) [70].

Kaspaz aktivite ölçümü ticari olarak temin edilen kit direktifleri doğrultusunda yapılmıştır.

1. A549 hücreleri 2×10^4 hücre/90 μ L olacak şekilde siyah 96 gözlü plaklara ekilmiş ve 24 saat boyunca %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
2. Ertesi gün siyah 96 gözlü plaklar 800 rpm 4°C'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
3. Santrifüj süresi bitiminde 1a platin (II) kompleksinin konsantrasyonları 10 μ L (son konsantrasyon 40 ve 80 μ M olacak şekilde) hücrelere uygulanmıştır.
4. Doz grupları uygulamasından 4 saat sonra 100 μ L kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 substratlar hücrelere uygulanmıştır.
5. Örnekler üç spesifik dalga boyunda florimetride okunmuştur; kaspaz 3 (535-620 nm), kaspaz 8 (490-525 nm) ve kaspaz 9 (370-450 nm).
6. Sonuçlar kaspaz 3, 8 ve 9 aktivitesinin ortalama floresan yoğunluğu şeklinde verilmiştir.

3.12. İstatiksel analizler

Tez çalışmasında bütün deneyler en az 3 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen veriler SPSS istatistik programı ile analiz edilmiştir. P <0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR

4.1. MTT Testi Sonuçları

MTT testi kullanılarak A549 hücre hattında platin (II) komplekslerinin (1a, 2a ve 4a) sitotoksik aktivitesi tespit edilmiştir. 1a, 2a ve 4a platin (II) kompleksi farklı konsantrasyon aralığında (40, 80, 160 ve 320 μM) A549 hücrelerine uygulanarak 1a platin (II) kompleksi en etkin bulunmuştur. 1a platin (II) kompleksinin IC_{50} değeri 24 saat için 63,1 μM , 48 saat için 53,7 μM , 72 saat için ise 48,7 μM hesaplanmıştır. Hesaplamalardan sonra yapılacak diğer analizler için 1a platin (II) kompleksinin konsantrasyonu 40 μM ve 80 μM olarak seçilmiştir.

Şekil 4.1.'de görüldüğü gibi 24 saat inkübasyon sonucunda konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında azalma görülmüştür. 2a ve 4a platin (II) kompleksleri uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamışken, 1a platin (II) grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmuştur. Deneyde pozitif kontrol olarak kullanılan sisplatin grupları, 1a 80 ve 160 μM grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmazken, diğer gruplarında anlamlı fark bulunmuştur.

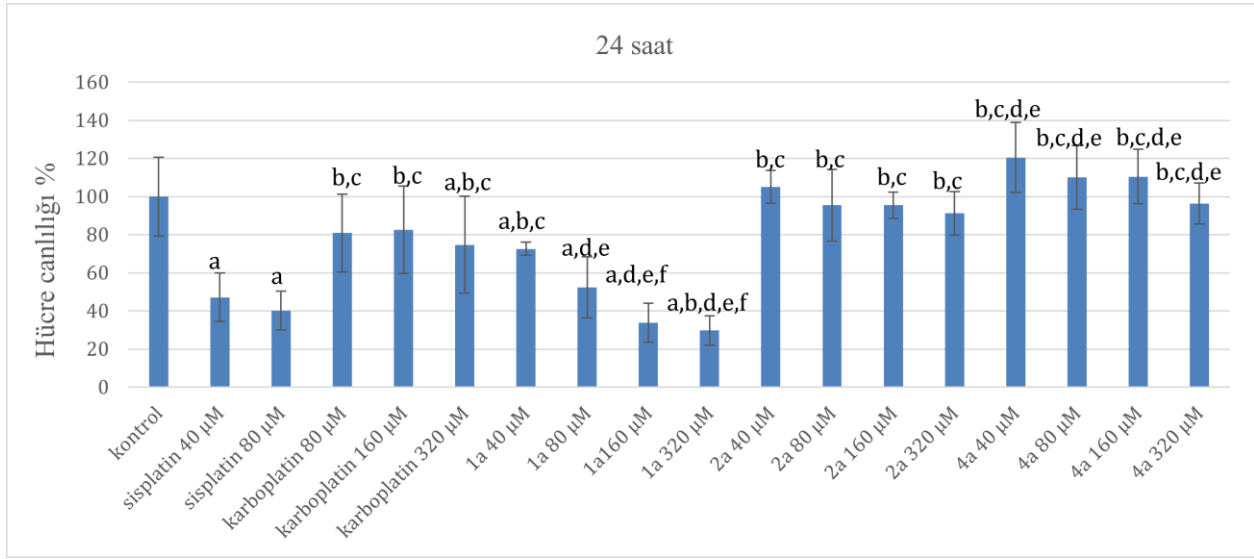
Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.'de görüldüğü gibi 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda elde edilen MTT sonuçlarına göre 1a platin konsantrasyon grupları ve pozitif kontrol grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmuştur. 2a ve 4a platin (II) konsantrasyon grupları en yüksek konsantrasyon grubu hariç kontrol grubuna göre anlamlı fark bulunamamıştır.

Şekil 4.3.'de görüldüğü gibi 72 saatlik inkübasyonda 1a platin kompleksinin 160 ve 320 μM konsantrasyon gruplarının, sisplatinin her iki konsantrasyon grupları ve karboplatin 320 μM grupları arasında fark bulunmamış ve A549 hücrelerinin canlılığında 1a platin (II) kompleksinin etkisinin pozitif kontrol sisplatin ve karboplatine yakın derecede olduğu bulunmuştur.

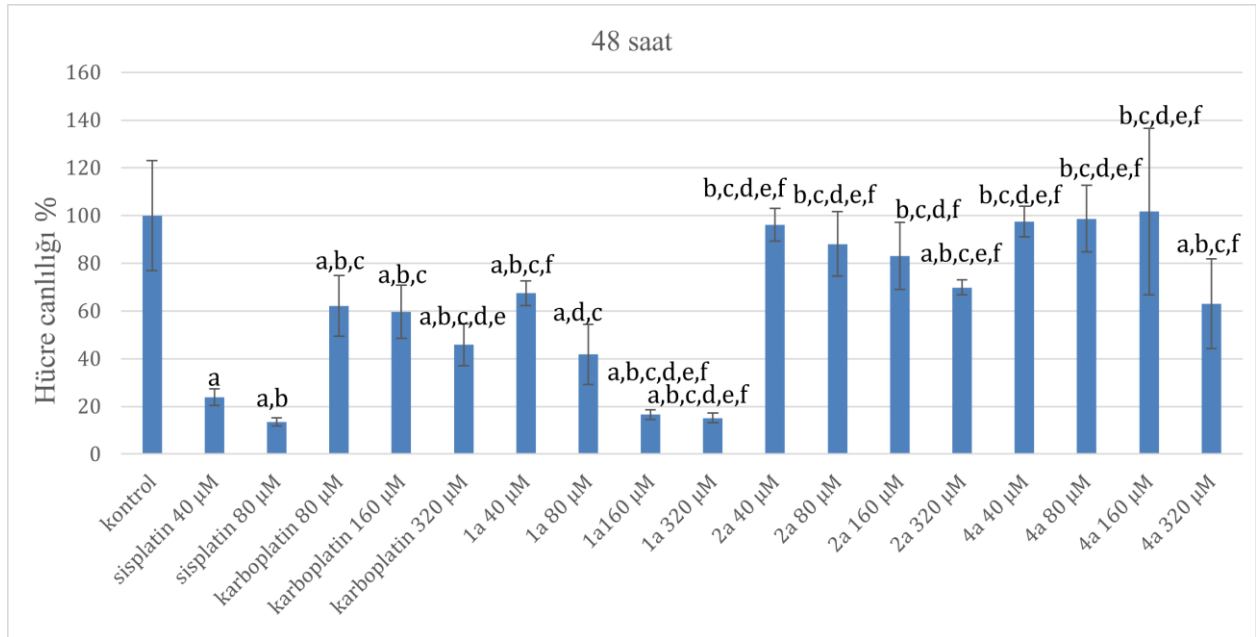
1a, 2a ve 4a platin (II) kompleksinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyon ile MTT testi sonuçları Şekil 4.4.'de verilmiştir. DMSO (negatif kontrol) MTT sonuçlarının kontrol grubuna benzer olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı için grafiklerde verilmemiştir. Şekil 4.4.'de görüldüğü gibi MTT sonuçlarına göre hücre

canlılığının hem inkübasyon süresine hem de konsantrasyona bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir.

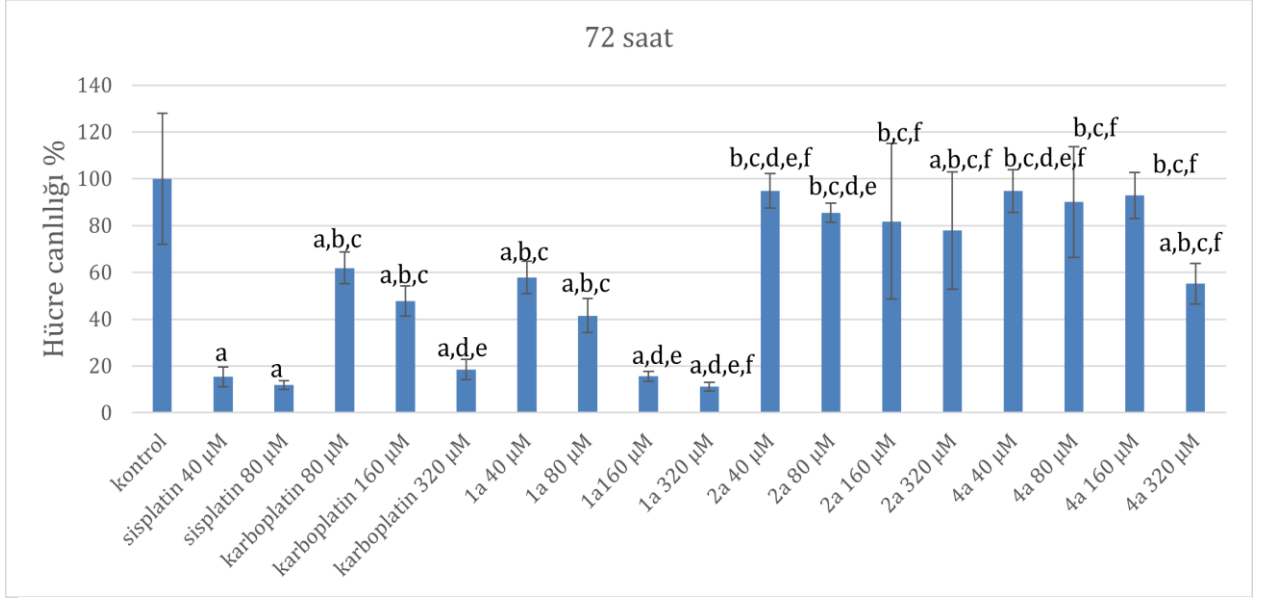
1a platin (II) kompleksi grubunun, pozitif kontrol ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklı ($p < 0,05$) olduğu ve test edilen üç platin kompleksi arasında en etkin olarak bulunmuştur.



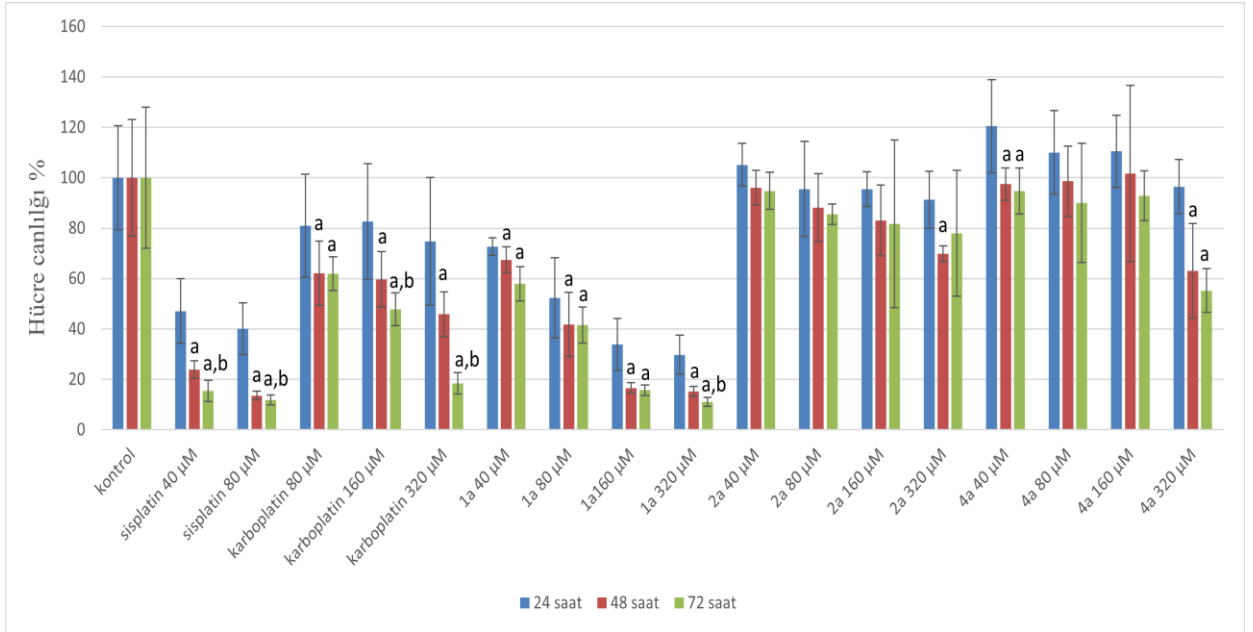
Şekil 4.1. A549 hücrelerine sisplatin, karboplatin, 1a, 2a ve 4a platin komplekslerinin farklı konsantrasyonlarının 24 saat uygulanması sonucu MTT hücre canlılık testi sonuçları. a: kontrol grubundan, b: sisplatin 40 µM grubundan, c: sisplatin 80 µM grubundan, d: karboplatin 80 µM grubundan, e: karboplatin 160 µM grubundan, f: karboplatin 320 µM grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklı ($p < 0,05$).



Şekil 4.2. A549 hücrelerine sisplatin, karboplatin, 1a, 2a ve 4a platin komplekslerinin farklı konsantrasyonlarının 48 saat uygulanması sonucu MTT hücre canlılık testi sonuçları. a: kontrol grubundan, b: sisplatin 40 µM grubundan, c: sisplatin 80 µM grubundan, d: karboplatin 80 µM grubundan, e: karboplatin 160 µM grubundan, f: karboplatin 320 µM grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklı ($p < 0,05$).



Şekil 4.3. A549 hücrelerine sisplatin, karboplatin, 1a, 2a ve 4a platin (II) komplekslerinin farklı konsantrasyonlarının 72 saat uygulanması sonucu MTT hücre canlılık testi sonuçları. a: kontrol grubundan, b: sisplatin 40 µM grubundan, c: sisplatin 80 µM grubundan, d: karboplatin 80 µM grubundan, e: karboplatin 160 µM grubundan, f: karboplatin 320 µM grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklı ($p<0,05$).

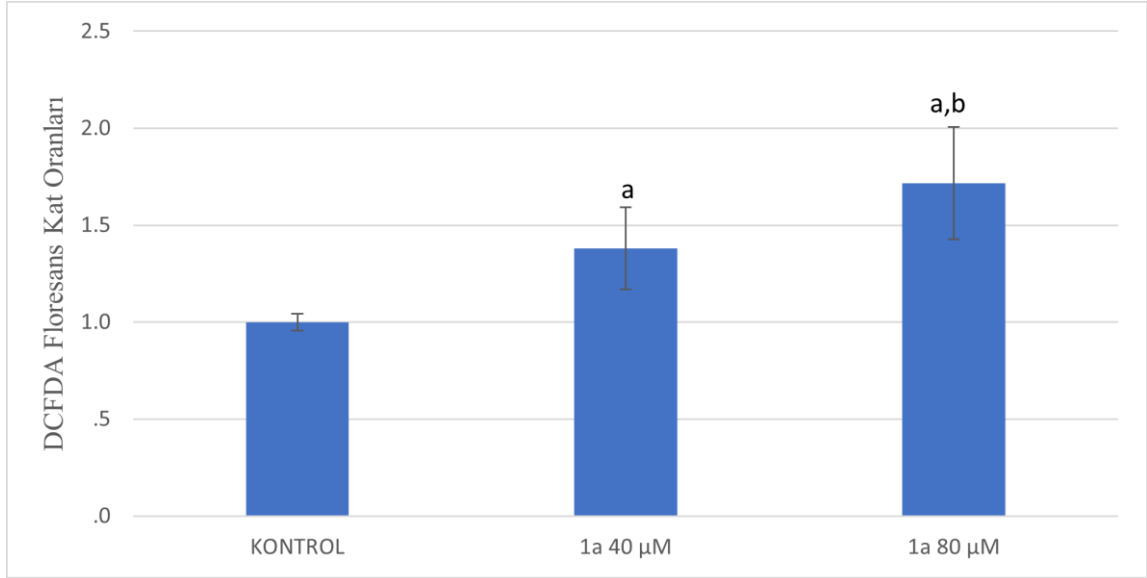


Şekil 4.4. A549 hücrelerine sisplatin, karboplatin ve üç platin (II) kompleksinin farklı konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saat uygulanması sonucu MTT hücre canlılık testi sonuçları. Her grup içinde a: 24 saat verilere göre, b: 48 saat verilere göre istatistiksel olarak anlamlı farklı ($p<0,05$).

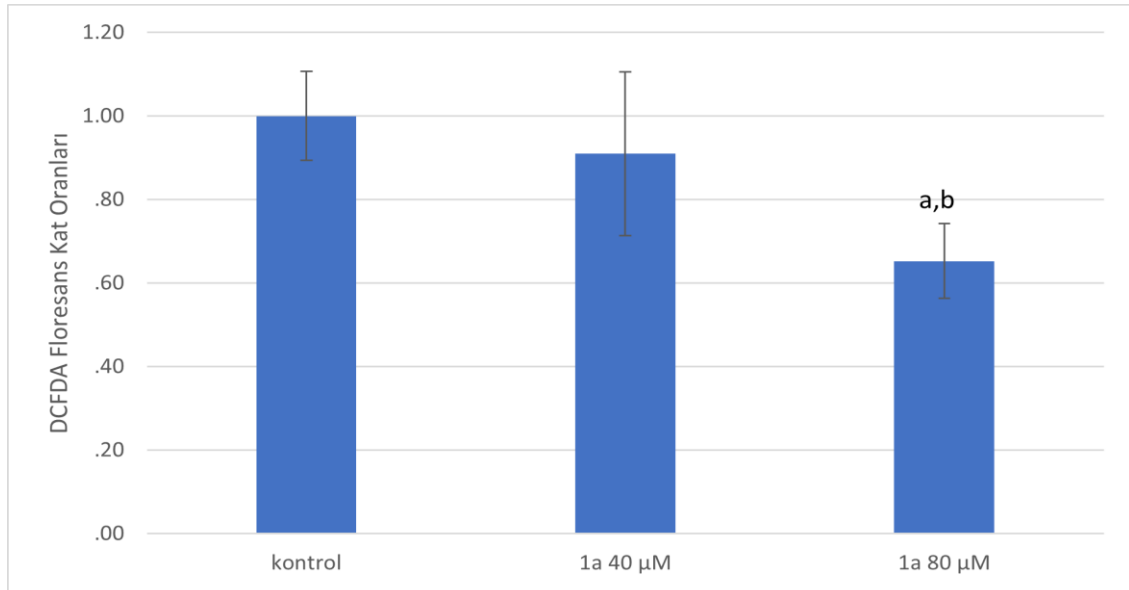
4.2. ROS Ölçüm Sonuçları

Tez çalışmasında A549 hücrelerinde ROS ölçümü DCFDA boyama ile yapılmıştır. A549 hücreleri 24 saat ve 30 dakika 1a platin (II) kompleksi ile inkübe edilerek ROS ölçümü iki farklı yöntem kullanılarak yapılmış ve farklı sonuç elde edilmiştir. Elde edilen DCFDA verileri kontrol grubuyla karşılaştırılarak kat oranları hesaplanmıştır. 30 dakika inkübasyon ile hücre içi ROS ölçüm sonuçları şekil 4.5.'de verilmiştir. 24 saat inkübasyon ile hücre içi ROS ölçüm sonuçları şekil 4.6.'da verilmiştir. Şekil 4.5.'de görüldüğü gibi 1a platin konsantrasyonuna bağlı olarak ROS miktarı artmıştır. 1a platin (II) grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$). ROS ölçümünden elde edilen sonuçlarına göre 1a platin 40 μM ve 80 μM gruplarının ROS miktarı kontrol grubuna göre sırasıyla 1.4 ve 1.7 kat oranları bir artış olduğu gözlenmiştir. 1a platin (II) 40 μM ve 80 μM gruplarının ROS sonuçları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

24 saatlik inkübasyon ile ROS miktarının 1a platin (II) konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığı görülmüştür (Şekil 4.6.). 1a platin 40 μM grubunun ROS miktarı kontrol grubunun ROS miktarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken, 1a platin (II) 80 μM grubunun ROS miktarıyla anlamlı farklı bulunmuştur.



Şekil 4.5. A549 hücrelerinin 30 dakika inkübasyon ile hücreiçi ROS ölçüm sonuçları. Değerler ortalama \pm standard sapma şeklinde verilmiştir. a: kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı ($p < 0,05$). b: 1a 40 µM grubundan istatistiksel olarak farklı ($p < 0,05$).

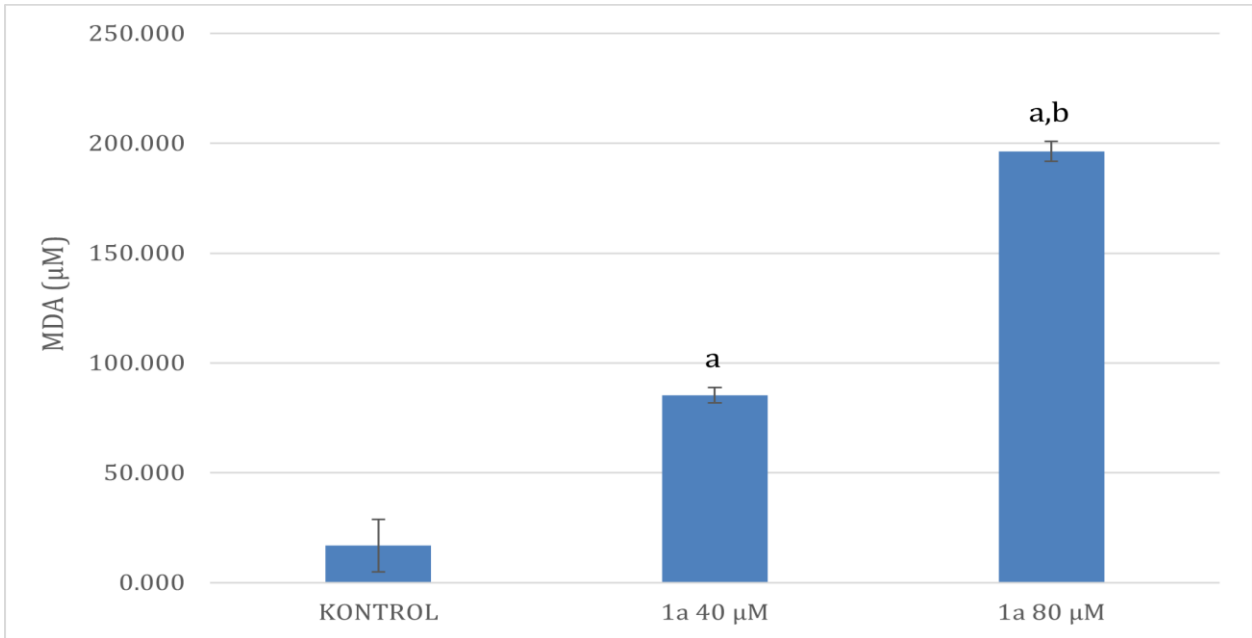


Şekil 4.6. A549 hücrelerinin 1a platin kompleksiyle 24 saat inkübasyonu ile hücreiçi ROS ölçüm sonuçları. Değerler ortalama \pm standard sapma şeklinde verilmiştir. a: kontrol grubundan , b: 1a 40 µM grubundan istatistiksel olarak farklı ($p < 0,05$).

4.3. Lipid peroksidasyon ölçüm sonuçları

Çalışmada lipid peroksidasyon sonucu oluşan MDA miktarı TBARS testi ile tespit edilmiştir. A549 hücrelerinde lipid peroksidasyon ölçüm sonuçları şekil 4.7.'de verilmiştir.

Deney sonuçlarına göre 1a platin (II) kompleksinin konsantrasyonunun artışıyla MDA miktarında artış olduğu görülmüştür. 1a platin (II) 40 ve 80 μM gruplarının MDA miktarı kontrol grubu MDA miktarıyla ve kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p < 0,05$).



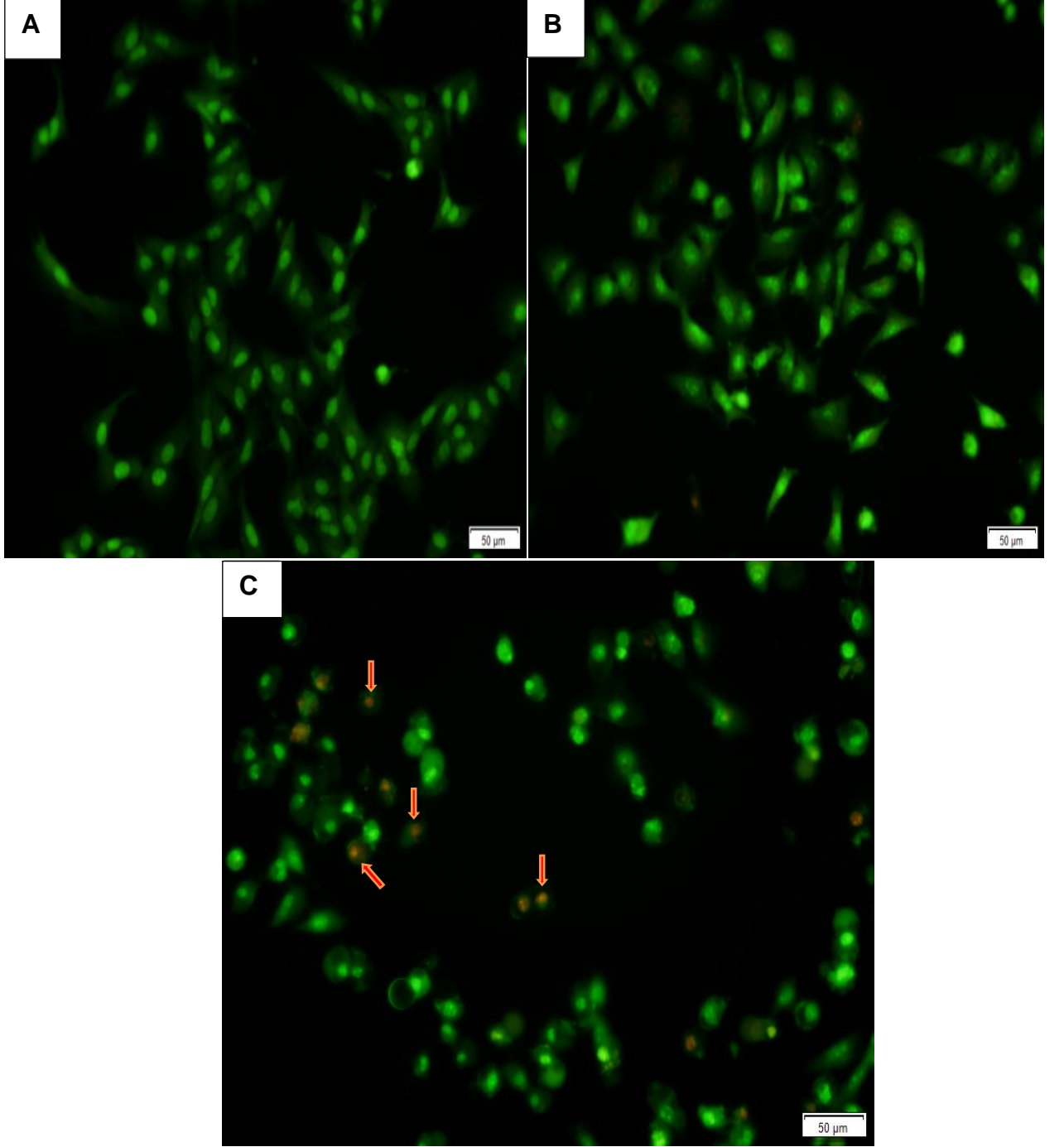
Şekil 4.7. A549 hücrelerinde lipid peroksidasyonu ölçüm sonuçları. a: kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı ($p < 0,05$). b: 1a 40 μM grubundan istatistiksel olarak farklı ($p < 0,05$).

4.4. Akridin Oranj-Propidyum İyodit ile Hücre Ölüm Tipinin Belirlenmesi

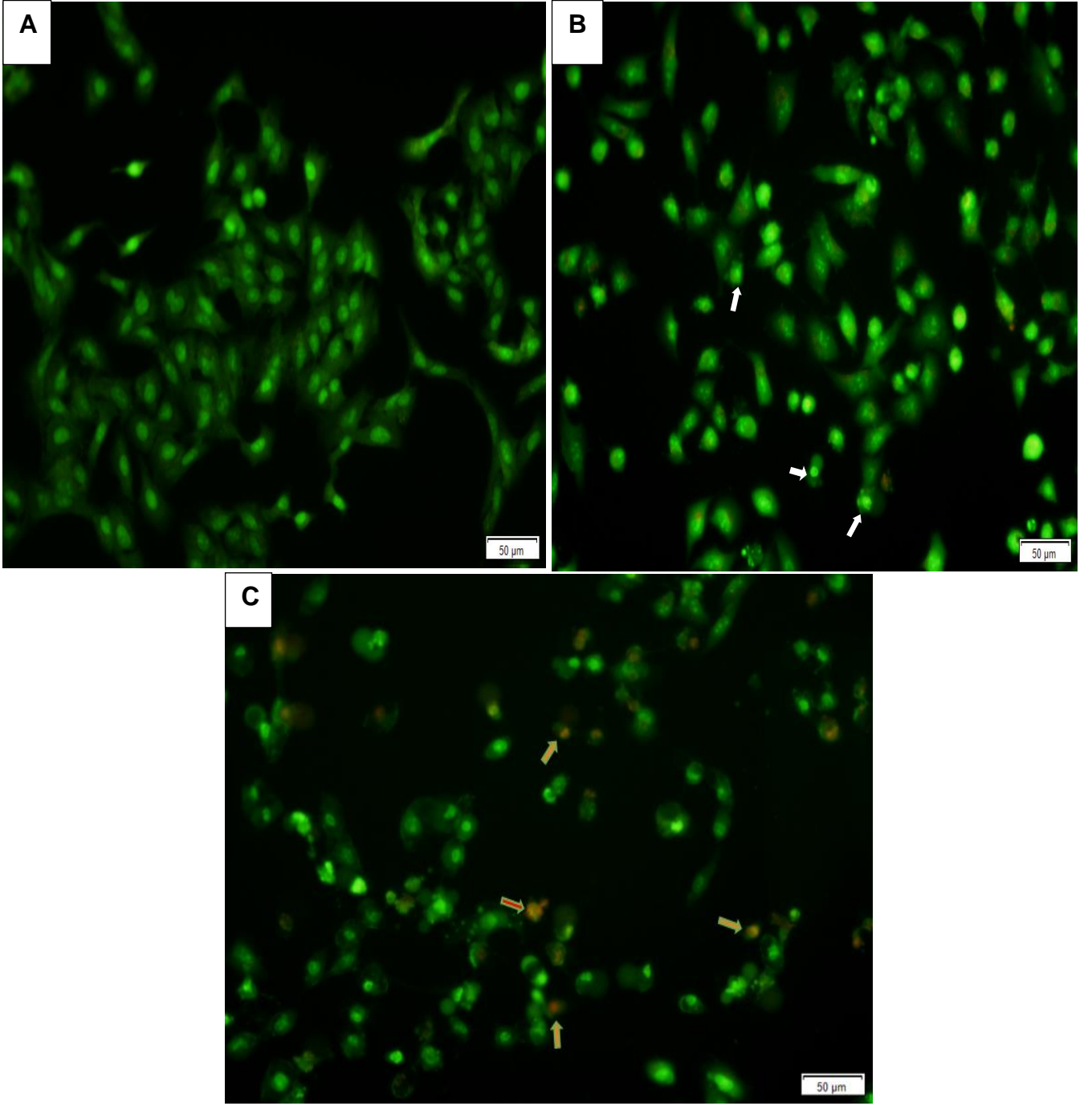
MTT sonuçlarına göre en etkin bulunan 1a platin (II) kompleksi A549 akciğer kanser hücrelerine uygulanarak hücre ölüm tipini belirlemek için Akridin Oranj/Propidyum İyodit boyama yapılmış ve hücreler mikroskop altında incelenmiştir.

1a platin (II) kompleksiyle 24 saat inkübasyon sonucu hücre ölüm yüzdeleri şekil 4.10.'da ve 48 saat inkübasyon hücre ölüm yüzdeleri şekil 4.11.'de verilmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda AO/PI boyama ile belirlenen hücre ölümü yüzdeleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.12.).

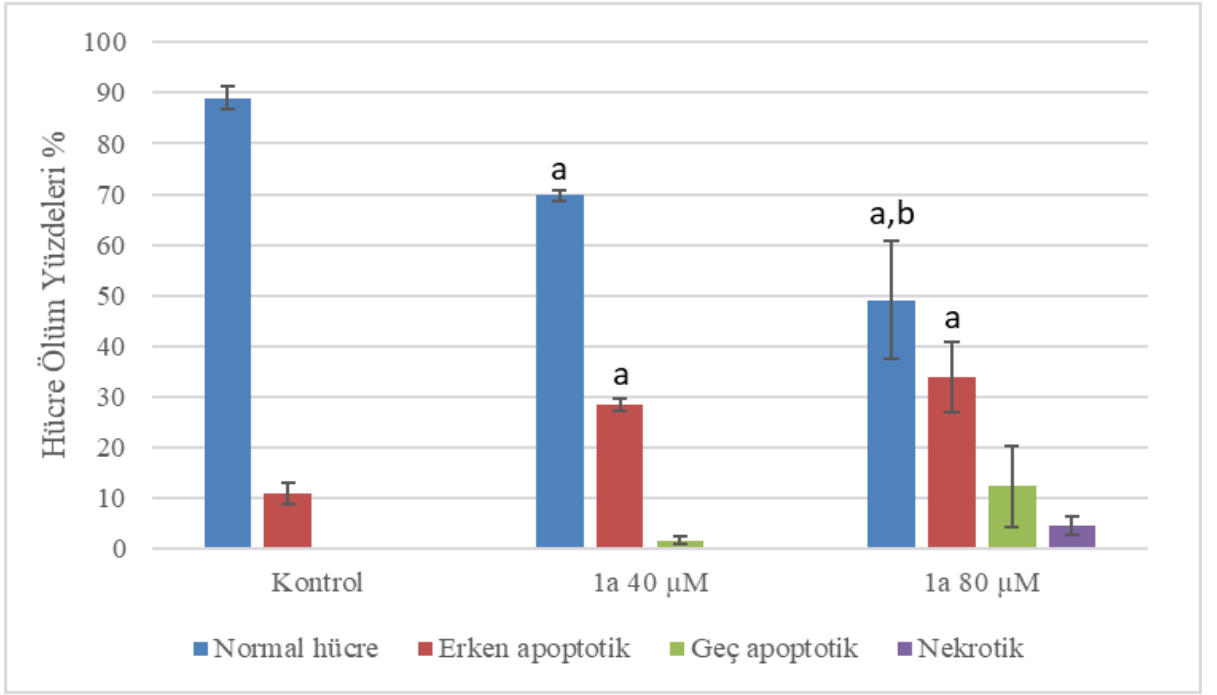
1a platin (II) kompleksi konsantrasyonundaki artışla normal hücre sayısı azalırken apoptotik hücre sayısı artmıştır. 24 ve 48 saatlik inkübasyonda 80 µM grubunda normal hücre sayısı 40 µM ve kontrol grubuna göre azalmış olup istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (Şekil 4.10. ve 4.11.). 24 saatlik inkübasyonda 40 ve 80 µM gruplarında erken apoptotik hücre ölümünde anlamlı bir fark bulunmamışken, kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.10.). Nekrotik hücreler sadece 1a platin (II) 80 µM konsantrasyon grubunda görülmüştür (Şekil 4.10. ve 4.11.). 80 µM grubunda nekrotik hücre ölümü gözlenirken kontrol grubunda sadece normal ve erken apoptotik hücre ölüm tipi görülmüştür (Şekil 4.10. ve 4.11.).



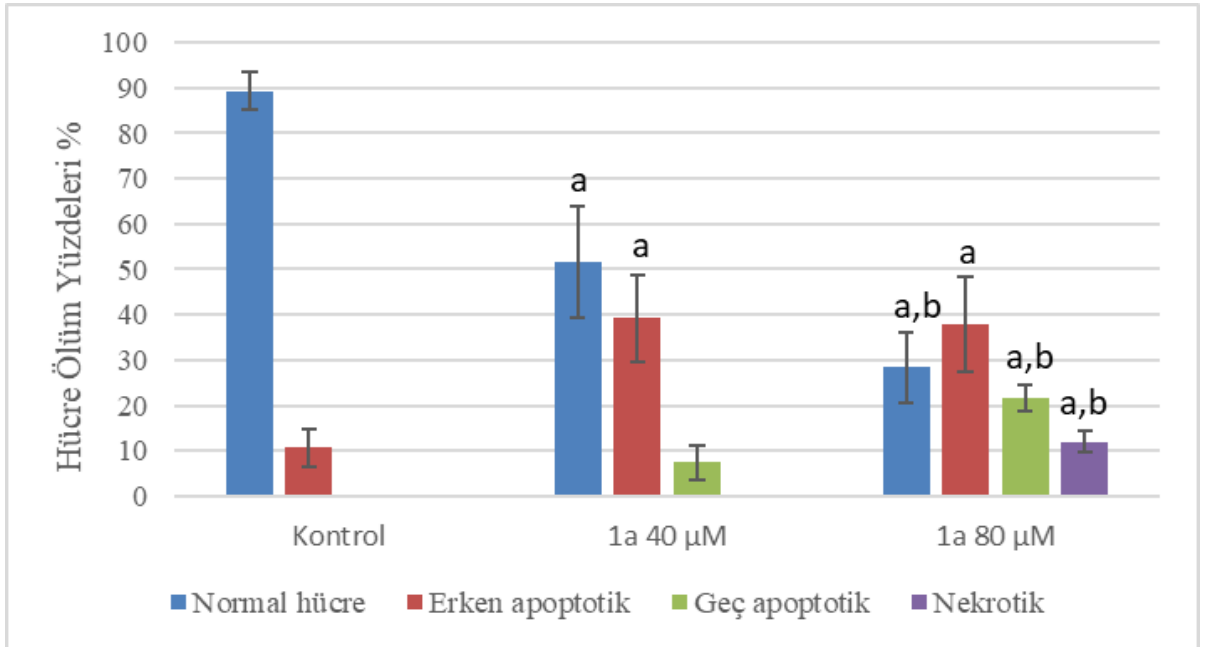
Şekil 4.8. A549 hücrelerinin AO/PI boyama ile 24 saat inkübasyon görüntüleri. A) kontrol grubu, B) 1a kompleksi 40 µM konsantrasyonu, C) 1a kompleksi 80 µM konsantrasyonu. Nekrotik hücreler (→) kırmızı ok ile gösterilmiştir.



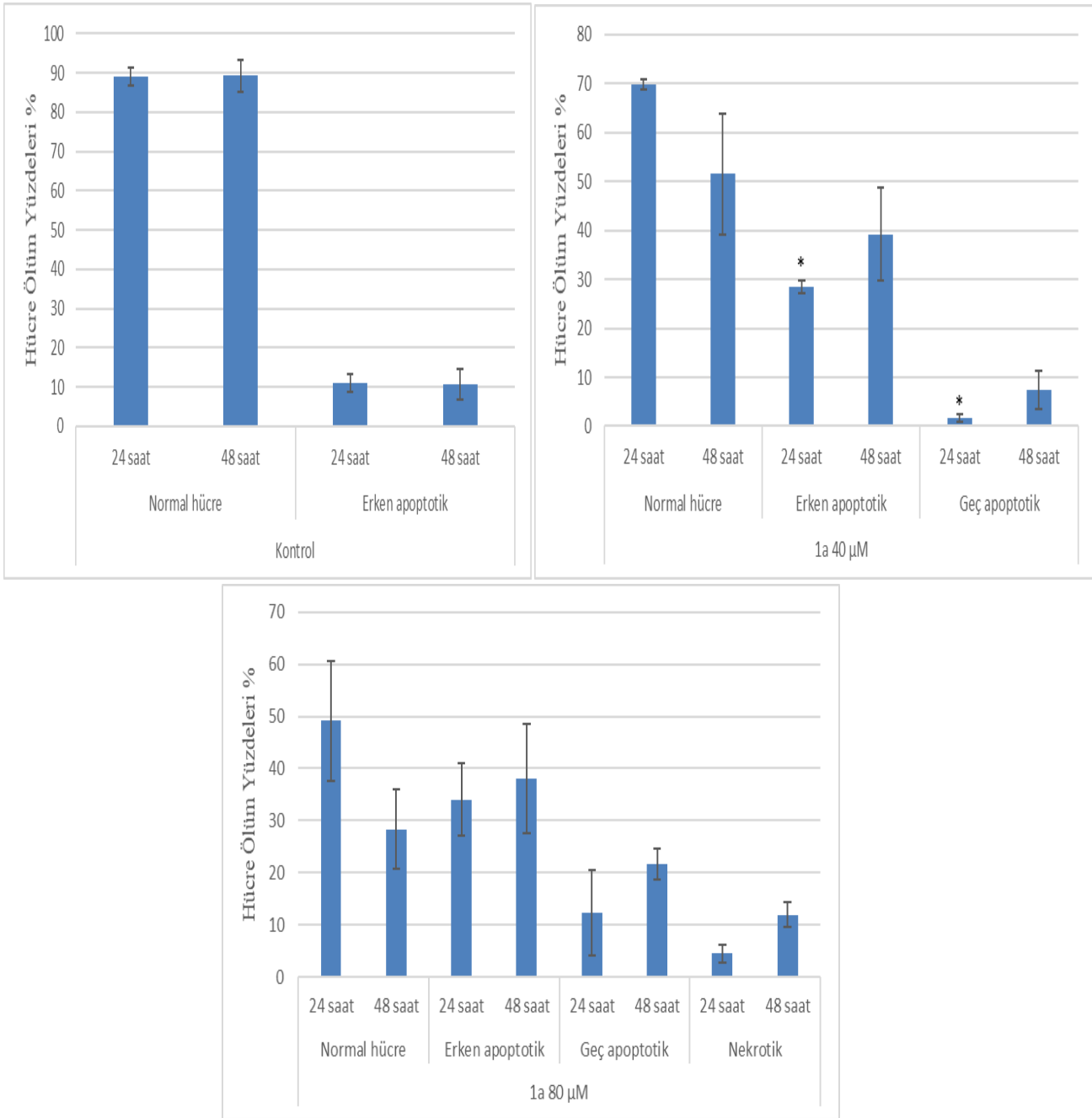
Şekil 4.9. A549 hücrelerinin AO/PI boyası ile 48 saat inkübasyon görüntüleri. A) kontrol grubu, B) 1a kompleksi 40 μ M konsantrasyonu, C) 1a kompleksi 80 μ M konsantrasyonu. Apoptotik hücreler (→) beyaz ok, nekrotik hücreler (→) kırmızı ok ile gösterilmiştir.



Şekil 4.10. AO/PI boyama ile 24 saat inkübasyon hücre ölüm yüzdeleri. Değerler ortalama \pm standard sapma şeklinde verilmiştir. a: kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı ($p < 0,05$). b: 1a 40 μ M grubundan istatistiksel olarak farklı ($p < 0,05$).



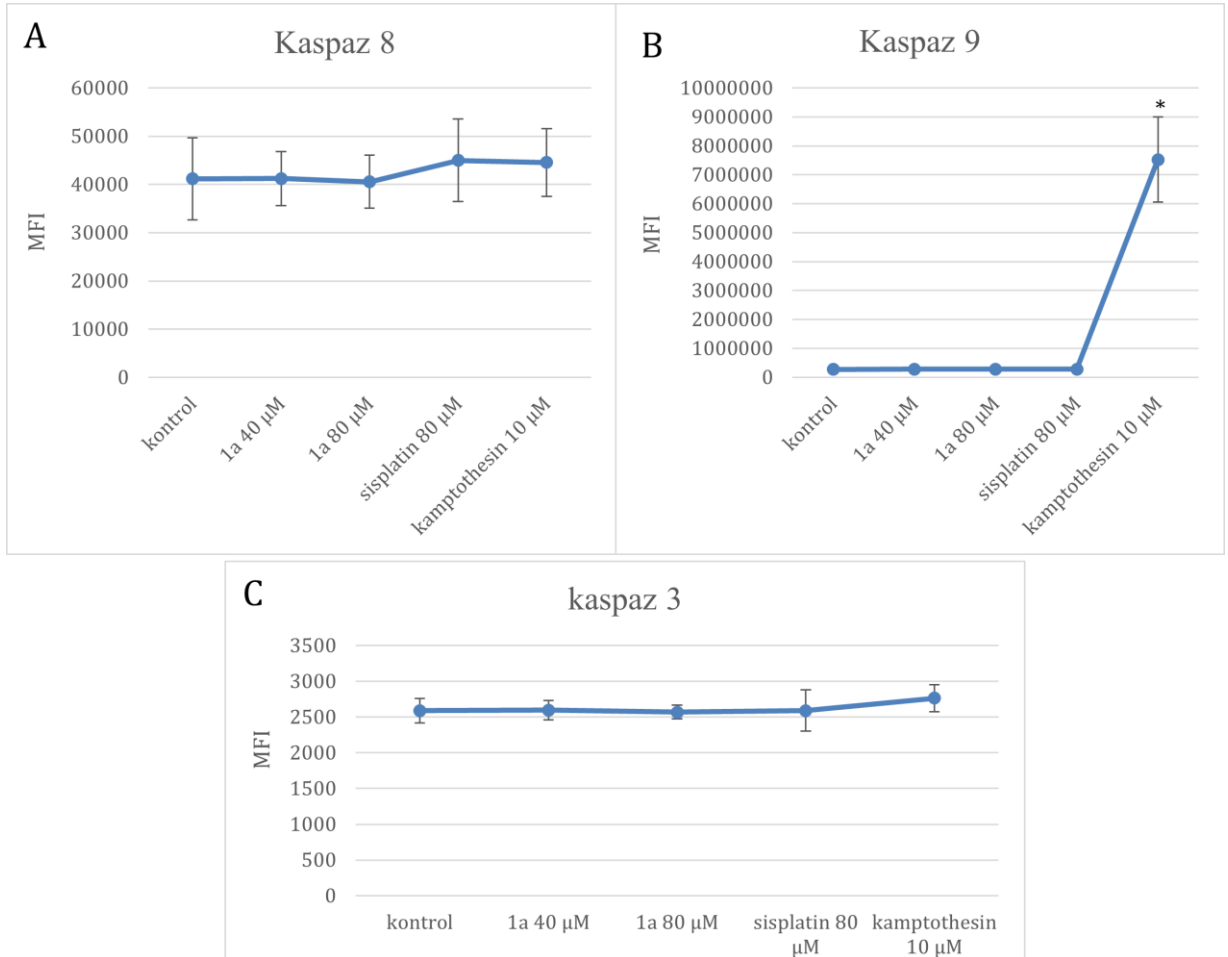
Şekil 4.11. AO/PI boyama ile 48 saat inkübasyon hücre ölüm yüzdeleri. Değerler ortalama \pm standard sapma şeklinde verilmiştir. a: kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı ($p < 0,05$). b: 1a 40 μ M grubundan istatistiksel olarak farklı ($p < 0,05$).



Şekil 4.12. AO/PI boyama ile 24 ve 48 saat inkübasyon hücre ölüm yüzdeleri. Veriler ortalama ± standard sapma şeklinde verilmiştir. (*) 48 saat verilerinden istatistiksel olarak farklı (p<0,05).

4.5. Apoptoz tayini sonuçları

Tez çalışmasında apoptoz tayini kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 assay testi ile yapılmıştır. A549 hücrelerine 1a platin (II) kompleksinin uygulanması sonucu kaspaz 3, 8 ve 9 enzim aktivite sonuçları ortalama floresans yoğunluğu olarak şekil 4.13.'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlarına göre 1a platin 40 ve 80 μM gruplarının kaspaz 3, 8 ve 9 enzim aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kaspaz enzim aktivite ölçümünde pozitif kontrol olarak kullanılan sisplatin ve kamptotesin gruplarının kaspaz 3, 8 ve 9 enzim aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bir artış olduğu görülmüştür. Kamptotesin grubu kaspaz 9 enzim aktivitesi kontrol, 1a platin (II) ve sisplatin gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur.



Şekil 4.13. 1a platin (II) kompleksinin (A) kaspaz 8, (B) kaspaz 9 ve (C) kaspaz 3 enzim aktiviteleri üzerine etkisi. Veriler ortalama \pm standard sapma şeklinde verilmiştir.*: (kontrol, 1a 40 μM , 1a 80 μM , sisplatin 80 μM) gruplarından istatistiksel olarak farklı ($p < 0,05$).

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri, insan sağlığını ciddi şekilde etkileyen, yüksek morbidite ve mortaliteye sahip küresel bir hastalıktır. Akciğer kanseri, diğer kanser türlerine göre en yüksek ölüm oranına neden olmaktadır. Akciğer kanseri erkeklerde en sık görülen dördüncü, kadınlarda ise yedinci kanser türüdür [71]. Sigara kullanımı akciğer kanserinin ana nedenlerinden biridir. Sigara kullanımına ek olarak diyet ve genetik yatkınlık da akciğer kanserine neden olmada rol oynar. Akciğer kanseri tedavisinde kullanılan en önemli tedaviler radyoterapi ve kemoterapidir [72].

Akciğer kanseri, tipine ve evresine bağlı olarak cerrahi, kemoterapi veya diğer ilaçlar, radyasyon tedavisi, lazer tedavisi gibi lokal tedaviler veya tedavilerin bir kombinasyonu ile tedavi edilebilir. Bir hastanın lokal olarak ilerlemiş küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin tedavisinde radyoterapi etkisiz olduğunda genellikle kemoterapi kullanılır. Kemoterapi tedavilerinde sıklıkla sisplatin, karboplatin, oksaliplatin, nedaplatin ve lobaplatin gibi platin bazlı antikanser ilaçları kullanılır. Platin ilaçların, klinik çalışmalarda çok önemli olduğu kabul edilmektedir. Literatürdeki çalışmalara göre platin bazlı kemoterapinin akciğer kanseri tedavisinde birçok durumda olumlu etkisi vardır. Akciğer kanserini tedavi etmek için birçok denemede diğer ilaçlarla birlikte sisplatin ve karboplatin kullanılmıştır, ancak hem sisplatin hem de karboplatinin toksisitesi ve doğal direnç nedeniyle kullanımları sınırlıdır. Bu faktörler nedeniyle tedavi için yeni platin kompleksleri araştırılmaktadır [73].

Kanser tedavisinde sisplatinin kullanılmaya başlanmasından sonra platin kompleksleriyle yapılan çalışmalara ilgi artmıştır. Sisplatinin yan etkilerinin olması kullanımını sınırladığı için toksisitesi daha düşük, etkinliği daha fazla ve yan etkileri azaltılmış yeni bileşiklerin geliştirilmesi önem kazanmaktadır.

Platin (II) komplekslerinden sentezlenen 1a, 2a ve 4a komplekslerinin A549 insan akciğer kanser hücre hattında sitotoksik aktivitesiyle ilgili bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu bilgi dikkate alınarak tez çalışmasında yeni sentezlenen benzimidazol türevi ligand içeren platin (II) komplekslerinin (1a, 2a ve 4a) A549 insan akciğer kanser hücre hattında sitotoksik aktivitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. MTT testi sonuçlarına göre en etkin bulunan platin kompleksinin oksidatif stres açısından değerlendirilmesi için MDA ve hücreiçi ROS seviyeleri ölçülmüş, hücre ölüm tipini tespit etmek için Akridin Oranj (AO)/Propidium İyodit (PI) boyaması yapılmıştır.

Hücrelerdeki apoptoz varlığı ise kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 enzim ölçümleri yapılarak tespit edilmiştir.

Çalışmalarda bir maddenin sitotoksik aktivitesini değerlendirmede ve hücre canlılığının ölçümünde MTT testi en yaygın kullanılan testtir [74]. Daha önce yapılan bir çalışmada, platin (II) komplekslerinin farklı bir hücre hattı olan HeLa serviks kanseri hücrelerinde sitotoksitesini incelenmiştir [9]. Mahmut ve ark.'nın yaptıkları çalışmada çeşitli platin (II) komplekslerinden 1a, 2a ve 4a komplekslerinin sitotoksitesini HeLa serviks kanseri hücrelerinde MTT testi yaparak araştırmışlardır. Çalışmada seçilen 1a, 2a ve 4a platin (II) komplekslerinin ve kullanılan pozitif kontrol sisplatinin ve karboplatinin konsantrasyonları 10, 20, 40, 80 ve 160 μM şeklinde uygulanmıştır. Elde edilen MTT sonuçlarına göre 1a kompleksinin sitotoksik aktivitesi çalışmada test edilen diğer komplekslerden orta derecede ve karboplatine göre daha etkin bulunmuştur. 1a, 2a ve 4a platin (II) komplekslerinin 10 ve 20 μM konsantrasyonlarının kullanılan hücre hatlarında etkisi düşük bulunmuştur [9].

Mahmut ve ark.'nın [9] çalışma sonuçları dikkate alınarak çalışmamızda 1a, 2a ve 4a platin (II) komplekslerinin 40, 80, 160 ve 320 μM konsantrasyonları A549 hücrelerine uygulanarak MTT testi yapılmıştır. Yapılan MTT testi sonuçlarına göre A549 hücrelerinde platin (II) komplekslerinin hem konsantrasyonlarına hem de inkübasyon süresine bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı görülmüştür. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonda 1a platin 160 ve 320 μM konsantrasyon gruplarının, sisplatin 40 ve 80 μM gruplarıyla karşılaştırıldığında hücre canlılığındaki azalmanın benzer derecede olduğu gözlenmiştir. MTT testi sonuçlarına göre etkinliği değerlendirilen üç platin kompleksinden 1a platin (II) kompleksi, pozitif kontrol sisplatinine ve karboplatine göre en etkin olarak bulunmuştur. 1a platin (II) kompleksi IC_{50} değeri 24, 48 ve 72 saat için sırasıyla 63.1, 53.7 ve 48.7 μM olarak hesaplanmıştır. IC_{50} değeri hesaplandıktan sonra yapılacak diğer analizler için 1a platin (II) kompleksinin konsantrasyonu 40 μM ve 80 μM olarak belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen MTT sonuçları Mahmut ve ark.'nın MTT sonuçları ile uyumluluk göstermektedir.

Özçelik ve ark.'nın [75] yaptıkları çalışmada iki platin (II) kompleksinin HeLa ve MCF-7 hücre hattında sitotoksik aktivitesi değerlendirilmiştir. Benzimidazol taşıyıcı ligandın 2. pozisyonunda p-klorofenil grubuna sahip kompleks çalışmada kullanılan pozitif kontrol karboplatine göre daha etkin bulunmuştur.

Akridin Oranj (AO)/Propidium İyodit (PI) boyama testi, hücre ölüm tipini belirlemede en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Yapılan bir çalışmada Akridin Oranj (AO)/Propidium İyodit (PI) boyama ile platin nanopartiküllerin insan meme kanseri MCF-7 hücre hattında apoptotik hücre oranı % 90.9 bulunmuştur [76]. Petrovic ve ark.'ı yaptıkları çalışmada yeni sentezlenen platin (IV) butyl-P kompleksinin A549 hücre hattında annexin V-FITC/7-AAD apoptoz analizi yapmışlardır. Apoptotik hücre oranı nekrotik hücre oranından daha yüksek belirlenmiştir. 24 saat ve 48 saat inkübasyonda apoptotik hücre oranı sırasıyla % 21,90 ve % 29,66 bulunmuştur [77].

Bendale ve Paul (2017) yaptığı çalışmada platin nanopartiküllerin Akridin Oranj/Etidyum Bromür (AO/EB) boyama ile kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesini değerlendirmişlerdir. Kontrol grubunda hücre ölümü gözlenmemiş olup platin nanopartiküllerin konsantrasyonu arttıkça apoptotik ve nekrotik hücre ölümünün arttığını bulmuşlardır [78]. Çalışmamızın sonunda A549 hücresinde AO/PI boyaması ile elde edilen görüntülere göre erken apoptotik hücre sayısı, geç apoptotik ve nekrotik hücre sayısına göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. AO/PI boyaması ile 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri sonunda elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında 40 µM grubu hariç istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen 1a platin (II) kompleksi konsantrasyonlarına bağlı olarak apoptotik ve nekrotik hücre ölümünde bir artış olduğu görülmüştür. AO/PI boyama ile çalışmamızdan elde edilen sonuçlar annexin V-FITC/7-AAD ile yapılan çalışmanın sonuçları ile benzerlik göstermiştir.

Tez çalışması kapsamında DCFDA boyası kullanılarak oksidatif stres ölçümü yapılmıştır. İki farklı yöntem kullanılarak yapılan ölçümlerde farklı sonuç elde edilmiştir. Birinci yöntemde 1a platin (II) kompleksi A549 hücrelerine uygulandıktan sonra hücreler 24 saat inkübasyona bırakılırken, ikinci yöntemde 30 dakika inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonda 1a platin (II) kompleksinin konsantrasyonu arttıkça ROS miktarının azaldığı görülürken, 30 dakikalık inkübasyonda ROS miktarının arttığı görülmüştür.

Yapılan bir çalışmada A549 hücre hattında 3-arilkumarin türevlerinin in vitro sitotoksik aktivitesi değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan 3-arilkumarin türevlerinden olan 8-(acetyloxy)-3-(4-methanesulfonyl phenyl)-2-oxo-2H-chromen-7-yl acetate kompleksinin DCFDA boyama ile hücreSEL ROS seviyesi ölçülmüştür. Çalışmada 3-arilkumarin türevinin 50 µM ve 75 µM konsantrasyonlarıyla 30 dakika inkübe edilen A549 hücrelerinde ROS üretiminin sırasıyla % 136,6 ve % 146,0 arttığı bulunmuş, ROS

üretiminin konsantrasyon artışına bağlı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir [79]. Tez çalışması kapsamında yapılan DCFDA boyama sonuçlarına göre 30 dakika inkübasyonda 1a platin (II) kompleksinin konsantrasyonu arttıkça ROS miktarının arttığı gözlenmiştir. 40 ve 80 μM grubu ROS miktarı kontrol grubu ROS miktarı ile karşılaştırıldığında anlamlı farklı bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan aynı hücrelerle yapılan 3-arilkumarin türevinin araştırıldığı çalışmanın DCFDA boyama sonuçları çalışmamızdan elde edilen DCFDA boyama sonuçları ile uyumluluk göstermektedir.

Yapılan başka bir çalışmada lobaplatinin A549 insan akciğer hücre hattında ROS oluşumu, floresan boya DCFDA kullanılarak incelenmiştir. A549 hücrelerine lobaplatinin 24 μM konsantrasyonu 30 dakika ve 1, 2, 4, 6 ve 12 saat uygulanmıştır. Çalışmada elde edilen DCFDA boyama sonuçlarına göre kontrol grubuna göre 30 dakika ve 6 saat inkübasyona kadar ROS üretiminin arttığı, 12 saat inkübasyonda ise ROS üretiminin azaldığı bulunmuştur [80]. Bu sonuçlar çalışmamızdan elde edilen DCFDA boyama sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Tez çalışması kapsamında TBARS testi kullanılarak MDA miktarı ölçümüyle lipid peroksidasyon incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 1a platin (II) kompleksinin konsantrasyon artışıyla MDA miktarının arttığı görülmüştür. Yapılan bir çalışmada LNCaP prostat kanseri hücre hattında grafen oksit-platin nanopartikülünün etkisi araştırılmıştır. TBARS testi kullanılarak LNCaP prostat kanseri hücre hattında grafen oksit-platin nanopartikülünün MDA miktarı üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmada grafen oksit-platin nanopartikülün IC_{50} değeri 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre grafen oksit-platin nanopartikülünün MDA miktarında önemli derecede artışa neden olduğunu tespit etmişlerdir [81]. Yapılan başka bir çalışmada ise platin nanopartiküllerin (PtNPs) ve retinoik asitin (RA) SH-SY5Y insan nöroblastom kanser hücre hattında antikanser etkileri araştırılmıştır. Çalışmada uygulanacak platin nanopartiküllerin ve retinoik asitin IC_{25} konsantrasyonu sırasıyla 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 12,5 μM bulunmuştur. Elde edilen TBARS testi sonuçlarına göre platin nanopartikül grubu, retinoik asitin grubu ve platin nanopartiküllerin + retinoik asitin grubunda MDA miktarında önemli bir artış gözlemlenmiştir [82]. Elde edilen TBARS testi sonuçları tez kapsamında yapılan TBARS testi sonuçları ile karşılaştırıldığında kullanılan hücre hattının ve uygulanan platin kompleksi ve konsantrasyonlarının aynı olmamasına rağmen platin komplekslerinin kanser hücrelerinde lipid peroksidasyonu artışında benzerlik göstermektedir.

Tez çalışmasında apoptoz tayini amacıyla kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 assay testi yapılmıştır. Kaspaz enzim aktivite ölçüm sonuçlarına göre 1a platin (II) kompleksi bu analizde pozitif kontrol olarak kullanılan kamptotesin ile karşılaştırıldığında kaspaz enzim aktivitelerinde büyük oranda değişikliğe neden olmadığı bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada platin (II) komplekslerinin ([Pt(HL3)Cl] \cdot H₂O ve [Pt(HL4)Cl] \cdot H₂O) MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında sitotoksik etkileri araştırılmıştır. MTT testi kullanılarak platin (II) komplekslerinden kompleks 4 (Pt(HL3)Cl] \cdot H₂O) en etkin bulunmuştur. Kompleks 4'ün IC₅₀ değeri 42,2 μ M olarak belirlenmiştir. Çalışmada 12 ve 24 saat inkübasyonda MDA-MB-231 hücrelerine kompleks 4'ün IC₅₀ konsantrasyonu uygulanarak kaspaz 3, 6, 8 ve 9'un aktiviteleri değerlendirilmiştir. Elde edilen kaspaz enzim aktivite sonuçlarına göre 12 ve 24 saat inkübasyonda platin kompleksi uygulanmamış hücrelerle karşılaştırıldığında aktif kaspaz 3, 6, 8 ve 9'un seviyelerinde önemli bir artışa neden olduğunu bulmuşlardır [83].

Bu yüksek lisans tezi çalışması kapsamında üç platin (II) kompleksinin A549 insan akciğer kanser hücre hattında sitotoksik aktiviteleri MTT testi kullanılarak araştırılmış ve 1a platin (II) kompleksi en etkin bulunmuştur. 1a platin (II) kompleksinin IC₅₀ değeri hesaplanarak 40 ve 80 μ M konsantrasyonları diğer analizler için uygun bulunmuştur. Çalışma sonucunda elde edilen hücre ölüm tipi, oksidatif stres ve lipid peroksidasyon ölçümleri ve kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 enzim aktivite sonuçlarına göre 1a platin (II) kompleksinin A549 insan akciğer kanser hücrelerinde sitotoksik aktiviteye sahip olduğu söylenebilir.

6. YORUM

Akciğer kanser tedavisinde çeşitli ilaçlar kullanılmaktadır. Platin bazlı antikanser ilaçları akciğer kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Günümüzde tedavi amaçlı yeni ilaç geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Bu tez çalışması kapsamında dikloro-platin (II) kompleksinin A549 insan akciğer kanser hücre hattında sitotoksik aktivitesi araştırılmıştır.

Tez çalışması sonunda elde edilen sonuçlara göre 1a platin (II) kompleksinin A549 insan akciğer kanser hücre hattında sitotoksik aktiviteye sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Böylece yeni geliştirilen bir bileşiğin kanser tedavisi için ilaç geliştirme çalışmalarına katkı sağlanması beklenmektedir. Çalışmada kullanılan 1a, 2a ve 4a platin (II) komplekslerinin A549 insan akciğer kanser hücrelerinde sitotoksik etkisiyle ilgili çalışma olmadığından bu çalışma özgün bir çalışmadır.

MTT sonuçlarına göre üç platin (II) kompleksinden 1a platin (II) kompleksi en etkin bulunmuştur. 1a platin (II) kompleksinin konsantrasyonuna bağlı olarak A549 hücre canlılığında azalma görülmüştür.

Hücre ölümü belirlenmesi için yapılan AO/PI boyama testi sonuçlarına göre 1a platin (II) kompleksinin konsantrasyonu arttıkça normal hücre sayısı azalırken apoptotik hücre sayısı artmıştır.

Lipid peroksidasyon ölçümü için yapılan TBARS testi sonuçlarına göre 1a platin (II) kompleksinin konsantrasyonunun artışıyla MDA miktarında artış olduğu görülmüştür. DCFDA testi sonuçlarına göre 30 dakika inkübasyonda 1a platin konsantrasyonuna bağlı olarak ROS miktarı artmıştır.

Kaspaz enzim aktivite ölçüm sonuçlarına göre 1a platin (II) kompleksi bu analizde pozitif kontrol olarak kullanılan kamptotesin ile karşılaştırıldığında kaspaz enzim aktivitelerinde büyük oranda değişikliğe neden olmadığı bulunmuştur.

Tez çalışmasında yapılan deney sonuçlarına göre 1a platin (II) kompleksinin A549 insan akciğer kanser hücre hattında sitotoksik aktivite göstermesiyle bu bileşiğin akciğer kanser tedavisi için aday molekül olması söz konusu olabilir. Ayrıca bu çalışmadan elde edilen veriler farklı kanser türlerinin tedavi yaklaşımına katkı vermesi beklenmektedir.

7. KAYNAKLAR

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, Cancer incidence and mortality worldwide : Sources , methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, 386 (2015).
- [2] H.R. Shin, Global activity of cancer registries and cancer control and cancer incidence statistics in Korea, *J. Prev. Med. Public Heal.* 41 (2008) 84–91.
- [3] S. Benitez Majano, L. Ellis, B. Rachet, Epidemiology of Lung Cancer, *Encycl. Respir. Med. Second Ed.* 4 (2021) 663–672.
- [4] H. Lemjabbar-alaoui, O.U.I. Hassan, Y. Yang, P. Buchanan, *Biochimica et Biophysica Acta Lung cancer: Biology and treatment options*, *BBA - Rev. Cancer.* 1856 (2015) 189–210.
- [5] J.G.B. Alvarez, M. González-cao, N. Karachaliou, M. Santarpia, S. Viteri, Advances in immunotherapy for treatment of lung cancer, *Cancer biology & medicine*, 1 (2015) 209–222.
- [6] J. Zugazagoitia, C. Guedes, S. Ponce, I. Ferrer, S. Molina-pinelo, L. Paz-ares, Current Challenges in Cancer Treatment, *Clin. Ther.* 38 (2016) 1551–1566.
- [7] J.H. Schiller, D. Harrington, C.P. Belani, C. Langer, A. Sandler, J. Krook, J. Zhu, D.H. Johnson, Comparison of Four Chemotherapy Regimens for Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer, *N. Engl. J. Med.* 346 (2002) 92–98.
- [8] C. Zhang, C. Xu, X. Gao, Q. Yao, Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies, *Theranostics.* 12 (2022) 2115–2132.
- [9] G. Selmanoğlu, N. Ramazanoğlu, L. Açıık, M. Gozelle, A.K. Süloğlu, Studies on the synthesis, characterization, cytotoxic activities and plasmid DNA binding of platinum (II) complexes having 2-substituted benzimidazole ligands, *Polyhedron*, 161 (2019) 298–308.
- [10] Hausman, Daniel M. "What Is Cancer?" *Perspectives in Biology and Medicine* 62, no. 4 (2019) 778-784.
- [11] Yin, Wen, Jialing Wang, Linling Jiang, and Y. James Kang. "Cancer and stem cells." *Experimental Biology and Medicine* 246, no. 16 (2021) 1791-1801.
- [12] C. Mattiuzzi, G. Lippi, Current Cancer Epidemiology glossary, *J. Epidemiol. Glob. Health.* 9 (2019) 217–222.
- [13] G. Mathur, S. Nain, P. Sharma, Cancer : an overview *Cancer : An Overview*, *Acad. J. Cancer Res.* 8 (2015) 1–9.

- [14] P. Nenclares, K.J. Harrington, *The biology of cancer*, Med. (United Kingdom). 48 (2020) 67–72.
- [15] Nahoum, S. R, *Why cancer and inflammation*. *Yale J Biol Med* 79, 3-4 (2006) 123-130.
- [16] E.N.B. Press, *McArdle Laboratory for Cancer Research , The Medical School , Departments o f Oncology and I . Introduction It has been known for many years that a latent period exists between the administra- tion of a carcinogen to an organism and the actual appearance , 605 (1979).*
- [17] S. Sarkar, G. Horn, K. Moulton, A. Oza, S. Byler, S. Kokolus, M. Longacre, *Cancer development, progression, and therapy: An epigenetic overview*, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 21087–21113.
- [18] C.S. Cleeland, *Cancer-Related Symptoms*, *In Seminars in radiation oncology* 3 (2000) 175–190.
- [19] C.S. Cleeland, G.J. Bennett, R. Dantzer, P.M. Dougherty, A.J. Dunn, C.A. Meyers, A.H. Miller, R. Payne, J.M. Reuben, X.S. Wang, B.N. Lee, *Are the symptoms of cancer and cancer treatment due to a shared biologic mechanism? A cytokine-immunologic model of cancer symptoms*, *Cancer.* 97 (2003) 2919–2925.
- [20] K.L. Kwekkeboom, *Cancer Symptom Cluster Management Kristine*, *Physiol. Behav.* 32 (2016) 373–382.
- [21] L. Becker, and Glauco R. Souza. *Using space-based investigations to inform cancer research on Earth*. *Nature Reviews Cancer* 13 (2013) 315-327. [22] A. Jadhav, V. Babar, *Journal of Nuclear Medicine & Radiation Therapy*, 12 (2021).
- [23] *Monograph, Chemicals , Cancer , and You*, Agency Toxic Subst. Dis. Regist. (2010) 1–12.
- [24] D. Weller, P. Vedsted, G. Rubin, F.M. Walter, J. Emery, S. Scott, C. Campbell, R.S. Andersen, W. Hamilton, F. Olesen, P. Rose, S. Nafees, E. Van Rijswijk, S. Hiom, C. Muth, M. Beyer, R.D. Neal, *The Aarhus statement: Improving design and reporting of studies on early cancer diagnosis*, *Br. J. Cancer.* 106 (2012) 1262–1267.
- [25] *Pan American Health Organization, Early Diagnosis of Childhood Cancer*, 2014.
- [26] Beckles, Michael A., Stephen G. Spiro, Gene L. Colice, and Robin M. Rudd. *Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes*. *Chest* 123, 1 (2003) 97S-104S.

- [27] S. Makaju, P.W.C. Prasad, A. Alsadoon, A.K. Singh, A. Elchouemi, Lung Cancer Detection using CT Scan Images, *Procedia Comput. Sci.* 125 (2018) 107–114.
- [28] S.H. Malik, T.A. Lone, S.M. k Quadri, Imaging Techniques for Cancer Diagnosis and Scope for Enhancement, *Int. J. Image, Graph. Signal Process.* 8 (2016) 83–91.
- [29] F. Castro-Giner, S. Gkoutela, C. Donato, I. Alborelli, L. Quagliata, C.K.Y. Ng, S. Piscuoglio, N. Aceto, Cancer diagnosis using a liquid biopsy: Challenges and expectations, *Diagnostics.* 8 (2018) 1–18.
- [30] J.R. Molina, P. Yang, S.D. Cassivi, S.E. Schild, A.A. Adjei, Non-small cell lung cancer: Epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship, *Mayo Clin. Proc.* 83 (2008) 584–594.
- [31] Y.A. Luqmani, Mechanisms of Drug Resistance in cancer chemotherapy. *Medical principles and practice*, 14 (2005) 35–48.
- [32] N. Patel, R. Adatia, A. Mellempgaard, R. Jack, H. Møller, Variation in the use of chemotherapy in lung cancer, *British journal of cancer* 96 (2007) 886–890.
- [33] D. De Ruyscher, C. Faivre-finn, U. Nestle, C.W. Hurkmans, *Journal of clinical oncology European Organisation for Research and Treatment of Cancer Recommendations for Planning and Delivery of High-Dose , High-Precision Radiotherapy for Lung Cancer*, 28 (2014).
- [34] National Cancer Institute, *Radiation Therapy and You: Support for People With Cancer*, 2016.
- [35] J. Sonke, J. Belderbos, *Adaptive Radiotherapy for Lung Cancer*, *YSRAO.* 20 (2010) 94–106.
- [36] Y. Wang, Q.M. Tao, H.Y. Zhao, F. Tsuda, R. Nagayama, K. Yamamoto, T. Tanaka, H. Tokita, H. Okamoto, Y. Miyakawa, M. Mayumi, Hepatitis C virus RNA and antibodies among blood donors in Beijing, *J. Hepatol.* 21 (1994) 634–640.
- [37] M. Yuan, L. Huang, J. Chen, J. Wu, Q. Xu, The emerging treatment landscape of targeted therapy in non- small-cell lung cancer, *Signal transduction and targeted therapy* 4.1 (2019) 61.
- [38] American Cancer Society, *How Targeted Therapies Are Used to Treat Cancer*, *Target. Ther.* (2020) 1–16.
- [39] A.N. Steven, S.C.A. Fisher, B.R.W. Robinson, *INVITED REVIEW SERIES :*

- Immunotherapy for lung cancer, (2016) 821–833.
- [40] British Society for Immunology, Cancer Immunotherapy - Policy Briefing, (2016).
- [41] S. Devi, Hormone therapy for cancer treatment, *Underst. Cancer From Basics to Ther.* (2022) 247–256.
- [42] Y. Xue, L. Wang, Y. Zhang, Y. Zhao, Y. Liu, Air pollution: A culprit of lung cancer, *J. Hazard. Mater.* 434 (2022) 128937.
- [43] S.C. Spiro, G.A. Silvestri, One hundred years of lung cancer, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172 (2005) 523–529.
- [44] W.D. Travis, Pathology of Lung Cancer Pathology, Lung cancer Pathologic classification, *Clin. Chest Med.* 32 (2011) 669–692.
- [45] R.P. Molatlhegi, A. Phulukdaree, K. Anand, R.M. Gengan, C. Tiloke, A.A. Chuturgoon, Cytotoxic effect of a novel synthesized carbazole compound on A549 lung cancer cell line, *PLoS One.* 10 (2015).
- [46] R.L. Carafaro, Focus on Lung Cancer Research, *Cancer Cell.* 1 (2002) 49–52.
- [47] P. Perez-moreno, E. Brambilla, R. Thomas, J. Soria, Squamous Cell Carcinoma of the Lung : Molecular Subtypes and Therapeutic Opportunities, (2012) 2443–2451.
- [48] F. Koinis, A. Kotsakis, V. Georgoulis, Small cell lung cancer (SCLC): no treatment advances in recent years, *Translational lung cancer research,* 5 (2016) 39–50.
- [49] C. Zappa, S.A. Mousa, Non-small cell lung cancer : current treatment and future advances, *Translational lung cancer research,* 5 (2016) 288–300.
- [50] G.S. Foster, R.J. Rousseau, W.L. Nance, Eastern cottonwood clonal mixing study: Intergenotypic competition effects, *For. Ecol. Manage.* 112 (1998) 9–22.
- [51] M. Arsenijevic, M. Milovanovic, V. Volarevic, A. Djekovic, T. Kanjevac, N. Arsenijevic, S. Dukic, Z. D. Bugarcic, Cytotoxicity of gold(III) Complexes on A549 Human Lung Carcinoma Epithelial Cell Line, *Med. Chem. (Los. Angeles).* 8 (2012) 2–8.
- [52] E. Grimley, Discovery and identification of the first platinum anticancer compound, *Inorganica Chim. Acta.* 495 (2019) 1–5.
- [53] B. Rosenberg, Platinum complexes for the treatment of Cancer, *Interdiscip. Sci. Rev.* 3 (1978) 134–147.
- [54] S. Utku, F. Gumus, S. Tezcan, M.S. Serin, A. Ozkul, S. Utku, F. Gumus, S.

- Tezcan, M.S. Serin, A. Ozkul, Binding of some new platinum (II) and platinum (IV) complexes with benzimidazole ligands Synthesis, characterization, cytotoxicity, and DNA binding of some new platinum (II) and platinum (IV) complexes with benzimidazole ligands, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 25.4 (2010) 502-508.
- [55] M. Galanski, Recent Developments in the Field of Anticancer Platinum Complexes, *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* 1 (2008) 285–295.
- [56] S. Dilruba, G. V. Kalayda, Platinum-based drugs: past, present and future, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 77 (2016) 1103–1124.
- [57] M. Ghasemi, T. Turnbull, S. Sebastian, I. Kempson, The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021).
- [58] S. Kamiloglu, G. Sari, T. Ozdal, E. Capanoglu, Guidelines for cell viability assays, (2020) 332–349.
- [59] E. Eruslanov, S. Kusmartsev, Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry, *Advanced protocols in oxidative stress II* (2010) 57-72.
- [60] L. Foucaud, M.R. Wilson, D.M. Brown, V. Stone, Measurement of reactive species production by nanoparticles prepared in biologically relevant media, *Toxicol. Lett.* 174 (2007) 1–9.
- [61] K.D. Oakes, G.J. Van Der Kraak, Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent, *Aquatic Toxicology.* 63 (2003) 447–463.
- [62] Zhang, Yimin, Benjamin WB Holman, Eric N. Ponnampalam, Matthew G. Kerr, Kristy L. Bailes, Ashleigh K. Kilgannon, Damian Collins, and David L. Hopkins. "Understanding beef flavour and overall liking traits using two different methods for determination of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS). *Meat Science* 149 (2019) 114-119.
- [63] www.LogosBios.com, Acridine Orange / Propidium Iodide Stain Directions for Use, 33 (2018) 59650.
- [64] J. Drogosz-stachowicz, D. Angelika, K. Gach-janczak, A. Jaskulska, T. Janecki, A. Janecka, Chemico-Biological Interactions Molecular mechanisms of apoptosis induced by a novel synthetic quinolinone derivative in HL-60 human leukemia cells, *Chemico-Biological Interactions* 320 (2020) 109005.

- [65] Ö.S. Aslantürk, In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays : Disadvantages In Vitro Cytotoxicity and Viability Assays : Principles, Advantages and Disadvantages, Genotoxicity-A predictable risk to our actual world 2 (2018) 64-80.
- [66] C. Frennesson, What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show?." Biochemical Journal (2010).
- [67] Azizi, S., Shahrissa, A., Khoubnasabjafari, M., Ansarin, K., Khoubnasabjafari, M., Soleymani, J., & Jouyban, A possible reason for the low reproducibility of malondialdehyde determinations in biological samples. Bioanalysis, 8(21) (2016) 2179-2181.
- [68] Martin, David, and Michael Lenardo. Morphological, biochemical, and flow cytometric assays of apoptosis. Current protocols in molecular biology 49.1 (2000) 14-13.
- [69] S. Lee, H. Lee, M. Baek, D. Lee, Y. Bang, H. Cho, Y. Lee, J. Ha, H. Kim, D. Jeoung, Molecules MAPK Signaling Is Involved in Camptothecin-induced Cell Death, Springer Science & Business Media BV 14 (2002) 348–354.
- [70] R.B. Pereira, N.F.S. Pinto, C.M.M. Coelho, M. Jos, G. Fernandes, Eugenol β - Amino / β -Alkoxy Alcohols with Selective Anticancer Activity, International Journal of Molecular Sciences 23.7 (2022) 3759.
- [71] Herbst, Roy S., Daniel Morgensztern, and Chris Boshoff. The biology and management of non-small cell lung cancer. Nature 553.7689 (2018): 446-454.
- [72] T. Sethi, Lung cancer Introduction, Thorax 57.11 (2002) 992–993.
- [73] J. Cosaert, E. Quoix, Platinum drugs in the treatment of non-small-cell lung cancer, Br. J. Cancer. 87 (2002) 825–833.
- [74] M. V. Berridge, P.M. Herst, A.S. Tan, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction, Biotechnol. Annu. Rev. 11 (2005) 127–152.
- [75] A.B. Özçelik, F. Gümüş, A.K. Süloğlu, G. Selmanoğlu, Cytotoxic activity studies of some platinum(II) complexes with 2-substitutedbenzimidazole ligands, Rev. Roum. Chim. 64 (2019) 829–834.
- [76] A.S. Abed, A. Mishaal Mohammed, Y.H. Khalaf, Novel photothermal therapy using platinum nanoparticles in synergy with near-infrared radiation (NIR) against human breast cancer MCF-7 cell line, Results in Chemistry 4 (2022) 100591.

- [77] M. Petrovic, S. Popovic, D. Baskic, M. Todorovic, P. Djurdjevic, A. Ristic-Fira, O. Keta, V. Petkovic, L. Koricanac, D. Stojkovic, V. Jevtic, S. Trifunovic, D. Todorovic, The effects of newly synthesized platinum(IV) complexes on cytotoxicity and radiosensitization of human tumour cells in vitro, *Anticancer Res.* 40 (2020) 5001–5013.
- [78] Y. Bendale, V. Bendale, S. Paul, Evaluation of cytotoxic activity of platinum nanoparticles against normal and cancer cells and its anticancer potential through induction of apoptosis, *Integr. Med. Res.* 6 (2017) 141–148.
- [79] Musa, M. A., Joseph, M. Y., Latinwo, L. M., Badisa, V., & Cooperwood, J. S. In vitro evaluation of 3-arylcoumarin derivatives in A549 cell line. *Anticancer research*, 35.2 (2015) 653-659.
- [80] H. Zhang, R. Chen, X. Wang, H. Zhang, X. Zhu, J. Chen, Lobaplatin-induced Apoptosis Requires p53-mediated p38MAPK Activation through ROS Generation in Non-small-cell Lung Cancer, *Front. Oncol.* 9 (2019) 1–12.
- [81] S. Gurunathan, M. Jeyaraj, M.H. Kang, J.H. Kim, Graphene oxide-platinum nanoparticle nanocomposites: A suitable biocompatible therapeutic agent for prostate cancer, *Polymers (Basel)*. 11 (2019).
- [82] S. Gurunathan, M. Jeyaraj, M.H. Kang, J.H. Kim, Anticancer properties of platinum nanoparticles and retinoic acid: Combination therapy for the treatment of human neuroblastoma cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1–32.
- [83] L.L.F. Maciel, M.B. Silva, R.O. Moreira, A.P. Cardoso, C. Fernandes, A. Horn, J.C. de Aquino Almeida, M.M. Kanashiro, In Vitro and In Vivo Relevant Antineoplastic Activity of Platinum(II) Complexes toward Triple-Negative MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line, *Pharmaceutics*. 14 (2022) 2013.