



**Paladyum Karben Komplekslerinin Antikanser Etkilerinin
Hücre Kültüründe Araştırılması**

Edanur UĞUR

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet KOÇ**

Yüksek Lisans Tezi- 2026

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PALADYUM KARBEN KOMPLEKSLERİNİN ANTİKANSER ETKİLERİNİN
HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ARAŞTIRILMASI**

Edanur UĞUR

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet KOÇ**

**Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Ahmet KOÇ
Prof. Dr. Şengül YÜKSEL
Dr. Öğr. Üyesi Hüsniye Gül OTLU**

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından TYL-
2024-3569 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2026**

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK ve YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI

24 / 06 / 2026

İnönü Üniversitesi Lisansüstü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak, “Prof. Dr. Ahmet KOÇ” danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “Paladyum Karben Komplekslerinin Antikanser Etkilerinin Hücre Kültüründe Araştırılması” başlıklı Yüksek Lisans tezimde:

1. ETİK ve BİLİMSEL SORUMLULUKLARIM:

- Tezimde yer alan verileri, bilgileri ve belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Çalışmada yararlandığım tüm kaynaklara bilimsel kurallara uygun şekilde atıfta bulunduğumu ve kaynakça gösterimde APA 7. baskı kurallarına uyduğumu,
- Tezimin özgün olduğunu, çalışma ve yazım sürecinde patent ve telif haklarını ihlal edici hiçbir davranışta bulunmadığımı,
- Aksi bir durumda doğabilecek tüm hukuki ve akademik sonuçları kabul ettiğimi,

2. YAPAY ZEKÂ KULLANIMINA İLİŞKİN BEYANIM:

() Tez yazım sürecinde yapay zekâ tabanlı araçlardan **faydalanmadım.**

(X) Tez yazım sürecinde yapay zekâ tabanlı araçlardan **faydalandım.**

Bu durumda:

- Yapay zekâ araçlarını yalnızca bilimsel üretim sürecini desteklemek amacıyla kullandığımı,
- Kullanımın hipotez geliştirme, teorik tartışma ve yorumlama gibi üst düzey akademik becerileri içermediğini,
- Kullanımın tezin özgünlüğüne, bilimsel etik kurallarına ve ilgili mevzuata aykırı olmadığını,
- Usulsüz kullanımlara (kaynak göstermeksizin metin üretimi, yanıltıcı kaynak gösterimi, otomatik içeriklerin özgün eser gibi sunulması vb.) kesinlikle başvurmadığımı,
- Kullanılan yapay zekâ araçlarının ve işlevlerinin, danışmanımın bilgisi dâhilinde, ekte verilen tabloda şeffaf biçimde belirtildiğini,
- Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Faaliyetlerinde Üretken Yapay Zekâ Kullanımına Dair Etik Rehber’de belirtilen ilkelere riayet ettiğimi,

kabul ve taahhüt ederim.

İmza

Edanur UĞUR

EK: Yapay Zekâ Kullanım Tablosu (varsa)

EK: Yapay Zekâ Kullanım Tablosu

Bu tablo, tez çalışmanızda kullanılan üretken yapay zekâ araçlarının şeffaf biçimde beyan edilmesi amacıyla hazırlanmıştır. Her satırda kullanılan aracın adı, kullanım amacı, hangi bölümde kullanıldığı ve kullanım şekli belirtilmelidir. Tablo, danışman öğretim üyesinin bilgisi

dâhilinde doldurulmalı ve gerektiğinde ek belgelerle desteklenmelidir.

No	Üretken Yapay Zekâ Aracı	Kullanım Amacı	Kullanıldığı Bölüm	Kullanım Şekli
1	ChatGPT	Dil kontrolü	Materyal-Metot	Dil ve imla kontrolü
2				
3				
4				
5				

Üretken Yapay Zekâ Aracı: Kullanılan aracın adı (ör. ChatGPT, Grammarly, Zotero AI, Copilot vb.).

Kullanım Amacı: Aracın hangi amaçla kullanıldığı (ör. literatür özeti, dil kontrolü, kaynak önerisi, yazım denetimi vb.).

Kullanıldığı Bölüm: Tezin hangi bölümünde kullanıldığı (ör. Giriş, Literatür Taraması, Bulgular, Sonuç vb.).

Kullanım Şekli: Kullanım biçiminin niteliği (ör. öneri alma, metin taslağı oluşturma, dil ve imla kontrolü, kaynak listesi düzenleme, doğrudan alıntı vb.).

Bu tablo, tezde üretken yapay zekâ kullanımının şeffaf, izlenebilir ve etik kurallara uygun olmasını sağlamak için hazırlanmıştır. Araçların katkısı, tez metninin özgünlüğünü ve bilimsel sorumluluğu ortadan kaldıracak düzeyde olmamalıdır.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.2. Akciğer Kanserine Genel Bakış	4
2.3. Metal Bazlı İlaçlar	6
2.3.1. Metal Bazlı İlaçların Kanser Tedavisindeki Rolü	8
2.3.2. Metal Bazlı İlaçların Moleküler Mekanizması	10
2.4. N-Heterosiklik Karben (NHC) Ligandları ve Stabiliteye Etkileri	12
2.5. Paladyum Karben Kompleksleri ve Antikanser Potansiyeli	13
3. MATERYAL VE METOT	17
3.1. Kimyasal Sentez ve Karakterizasyonlar	17
3.1.1. N-heterosiklik karben (NHC) Öncü Ligandlarının Genel Sentez Yöntemi	17
3.1.2. Pd-PEPSI Komplekslerinin Genel Sentez Yöntemi	18
3.2. Hücre Kültürü	18
3.3. RNA İzolasyonu ve Gerçek Zamanlı qPCR Analizi	19
3.4. Protein İzolasyonu ve Western Blot Analizi	20
3.5. Apoptoz Analizi	21
3.6. Hücre Döngüsü Analizi	22
3.7. Migrasyon ve İnvazyon Analizi	22
4. BULGULAR	24
4.1. Kimyasal Sentez ve Karakterizasyonlar	24
4.1.1. Kompleks 44'ün ¹ H ve ¹³ C NMR Analizi ve Yapısal Gösterimi	24
4.1.2. Kompleks 54'ün ¹ H ve ¹³ C NMR Analizi ve Yapısal Gösterimi	26
4.1.3. Kompleks 59'un ¹ H ve ¹³ C NMR Analizi ve Yapısal Gösterimi	28
4.1.4. Kompleks 521'in ¹ H ve ¹³ C NMR Analizi ve Yapısal Gösterimi	30

4.1.5. Kompleks 522'nin ¹ H ve ¹³ C NMR Analizi ve Yapısal Gösterimi	32
4.1.6. Kompleks 523'ün ¹ H ve ¹³ C NMR Analizi ve Yapısal Gösterimi	34
4.2. Hücre Kültüründe Morfolojik Değişimlerin Analizi	36
4.3. RT-qPCR ile Gen İfadeleme Analizi	37
4.3.1. p53 Gen İfadeleme Analizi	37
4.3.2. CDK-4 Gen İfadeleme Analizi.....	38
4.3.3. BCL-2 Gen İfadeleme Analizi	39
4.4. Western Blot ile Protein İfadeleme Analizi	40
4.4.1. P53 Protein İfadeleme Analizi	40
4.4.2. CDK-4 Protein İfadeleme Analizi.....	41
4.4.3. BCL-2 Protein İfadeleme Analizi	42
4.4.4. P21 Protein İfadeleme Analizi	43
4.4.5. PUMA Protein İfadeleme Analizi.....	44
4.5. Apoptoz Analizi	45
4.6. Hücre Döngüsü Analizi.....	47
4.7. Migrasyon ve İnvazyon Deneyleri.....	49
4.7.1. Migrasyon	49
4.7.2. İnvazyon.....	50
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
KAYNAKLAR	61
EKLER.....	68
EK-1. Özgeçmiş	68
EK-2. Etik Kurul Onay Formu Gerektiğine Dair Yazı	69

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi, deneyim ve değerli katkılarıyla bana yol gösteren, desteğini her zaman hissettiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet KOÇ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Akademik bilgi birikimi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Şengül YÜKSEL ve Prof. Dr. Elif YEŞİLADA başta olmak üzere tüm anabilim dalı öğretim üyelerine ve tez çalışmamı değerlendiren değerli görüş ve önerileriyle katkıda bulunan sayın jüri üyem Dr. Öğr. Üyesi Hüsniye Gül Otlı'ya,

Çalışmam kapsamında kimyasal sentezlerin gerçekleştirilmesine ve laboratuvar olanaklarının sağlanmasına katkıda bulunan Prof. Dr. İsmail Özdemir ve bileşiklerin sentezinde emeği bulunan Enes Evren'e,

Tez çalışmam boyunca laboratuvar süreçlerinde desteklerini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum ekip arkadaşlarıma,

TYL-2024-3569 nolu yüksek lisans tez projeme maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Bu süreçte her zaman yanımda olan, desteği, anlayışı ve motivasyonu bana güç veren yol arkadaşım Taha Miraç KARAKUŞ'a,

Yüksek lisans sürecim boyunca her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen Elif Büşra IŞIK'a,

Hayatım boyunca sevgi ve destekleriyle her zaman yanımda olan, bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Paladyum Karben Komplekslerinin Antikanser Etkilerinin Hücre Kültüründe Araştırılması

Amaç: Bu çalışmanın amacı, N-heterosiklik karben (NHC) öncüllerini sentezleyerek palladyum kompleksleri hazırlamak ve bu bileşiklerin hücre kültürü modelinde biyolojik aktivitelerini incelemektir.

Materyal Metod: Bu çalışmada paladyum karben kompleksleri sentezlendi, yapısal karakterizasyonları doğrulandıktan sonra hücre kültürü deneylerinde değerlendirildi. Hücreler uygun koşullarda çoğaltılarak belirlenen konsantrasyonlarda bileşikler ve kontrol grupları ile muamele edildi. Tedavi sonrası hedef gen ekspresyonları RT-qPCR, protein düzeyleri ise Western blot ile analiz edildi. Hücre ölüm yanıtı Annexin V/PI boyaması ile akım sitometrisi kullanılarak, hücre döngüsü dağılımı ise PI boyaması ile belirlendi. Ayrıca, bileşiklerin etkileri migrasyon ve invazyon analizleri ile değerlendirildi. Elde edilen veriler uygun istatistiksel yöntemlerle analiz edilerek karşılaştırmalı olarak raporlandı.

Bulgular: A549 hücre hattında yapılan analizler, sentezlenen paladyum karben komplekslerinin hücresel düzeyde belirgin biyolojik etkiler oluşturduğunu göstermiştir. RT-qPCR sonuçlarında p53 gen ekspresyonunun arttığı ve proliferasyonla ilişkili genlerde değişimler olduğu belirlenmiştir. Western blot bulguları bu değişimleri desteklemiştir. Ayrıca, migrasyon ve invazyonun baskılandığı, apoptozun arttığı ve hücre döngüsü dağılımının etkilendiği gözlenmiştir.

Sonuçlar: Bu çalışmada, sentezlenen paladyum karben komplekslerinin hücresel düzeyde antikanser aktivite sergileyerek proliferasyonu baskıladığını, apoptozu indüklediğini ve hücre hareketliliğini azalttığını ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: NHC, Pd, A549, M-NHC, Pt

ABSTRACT

Investigation of the Anticancer Effects of Palladium Carbene Complexes in Cell Culture

Aim: The aim of this study is to synthesize N-heterocyclic carbene (NHC) precursors, prepare palladium complexes, and investigate their biological activities in a cell culture model.

Material and Method: In this study, palladium carbene complexes were synthesized and, after their structural characterizations were confirmed, they were evaluated in cell culture experiments. Cells were cultured under appropriate conditions and treated with the compounds at predetermined concentrations together with control groups. Following treatment, the expression levels of target genes were analyzed by RT-qPCR, while changes in the expression of related proteins were examined by Western blot analysis. The cellular death response was evaluated as part of apoptosis analysis using flow cytometry with Annexin V/propidium iodide (PI) staining, and cell cycle distribution was determined by cell cycle analysis using PI staining. In addition, to reveal the effects of the compounds on cellular behavior, migration and invasion capacities were analyzed using appropriate in vitro assays. The obtained data were evaluated using suitable statistical methods and the results were reported comparatively.

Results: Analyses performed on the A549 cell line demonstrated that the synthesized palladium carbene complexes exert significant biological effects at the cellular level. RT-qPCR results showed increased p53 gene expression along with alterations in proliferation-related genes. Western blot findings supported these changes. Additionally, migration and invasion were suppressed, apoptosis was increased, and cell cycle distribution was affected.

Conclusion: This study demonstrates that the synthesized palladium carbene complexes exhibit anticancer activity at the cellular level by suppressing proliferation, inducing apoptosis, and reducing cell motility.

Key words: NHC, Pd, A549, M-NHC, Pt

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACTB	: Actin, Beta
ADK	: Akciğer adenokarsinom
Ag	: Gümüş
ALK	: Anaplastik Lenfoma Kinaz
Au	: Altın
BAK	: Bcl-2 homolog antagonist/öldürücü protein
BAX	: Bcl-2 ile ilişkili X proteini
BCL-2	: B-hücreli lenfoma 2
BH3	: Bcl-2 Homoloji 3
Bi	: Bizmut
CDDP	: Cis-diamindikloroplatin(II)
CDK-4	: Siklin bağımlı kinaz 4
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
Ct	: Döngü eşiği
Cu	: Bakır
dd	: Çift dublet
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNase	: Deoksiribonükleaz
ECL	: Geliştirilmiş Kemilüminesans
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü
FBS	: Fetal Sığır Serum
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
Fe	: Demir
FITC	: Floresein izosiyanat

FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GSH	: Glutasyon
HCL	: Hidroklorik Asit
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
KHAK	: Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
KRAS	: Kirsten sıçan sarkoma virüsü onkogen homologu
Li	: Lityum
ml	: Mililitre
mM	: Millimolar
M-NHC	: Metal-N-heterosiklik karben
NaCl	: Sodyum Klorür
NHC	: N-heterosiklik karben
nm	: Nanometre
nM	: Nanomolar
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PC	: Polikarbonat
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Pd	: Paladyum
Pd-PEPPSI	: Piridin ile güçlendirilmiş önkatalizör hazırlığı, stabilizasyonu ve başlatılması.
PI	: Propidyum iyot
Pt	: Platin
PUMA	: Apoptozun p53 tarafından yukarı regüle edilen modülatörü
PVDF	: Poliviniliden florür
RB	: Retinoblastoma
RIPA	: Radyoimmünopresipitasyon analiz
RNA	: Ribonükleik asit
RNase	: Ribonükleaz
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
ROS1	: Onkogen reseptör tirozin kinaz
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RT-qPCR	: Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TBS	: Tris tamponlu tuz çözeltisi
TBST	: Tris-Tamponlu Tuzlu Çözelti ve Tween 20
TP53	: Tümör protein p53



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. 2022 yılında Birleşmiş Milletler tarafından tanımlanan dünya bölgelerine göre akciğer kanseri yeni vaka ve ölümlerinin dağılımı (21).....	4
Şekil 2.2. ABD ve/veya AB ülkelerinde onaylanan metalloilaçlar (38).	6
Şekil 2.3. Sisplatin, Karboplatin ve Oksaliplatin'in gelişimini gösteren zaman çizelgesi (38).	7
Şekil 2.4. Kanser karşıtı metal ilaçların genel etki mekanizması (49).	9
Şekil 2.5. Metal komplekslerinin en yaygın moleküler etki mekanizmaları ve bazı biyolojik etkileri (54).	11
Şekil 2.6. Padeliporfin kompleksinin kimyasal yapısı (56).....	14
Şekil 2.7. Metalloilaçlar tarafından hücre döngüsünün durdurulmasına ilişkin temsili şema (38).	15
Şekil 3.1. Genel deneysel akış şeması	17
Şekil 4.1. 44 kompleksine ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ve yapısal gösterimi	25
Şekil 4.2. 54 kompleksine ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ve yapısal gösterimi	27
Şekil 4.3. 59 kompleksine ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ve yapısal gösterimi	29
Şekil 4.4. 521 kompleksine ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ve yapısal gösterimi	31
Şekil 4.5. 522 kompleksine ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ve yapısal gösterimi	33
Şekil 4.6. 523 kompleksine ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ve yapısal gösterimi	35
Şekil 4.7. İlaç uygulamasından 24 saat sonra A549 hücrelerinin morfolojik görüntüleri	37
Şekil 4.8. İlaç gruplarının p53 gen ifadenmesi üzerine etkileri	38
Şekil 4.9. İlaç gruplarının CDK-4 gen ifadenmesi üzerine etkileri	39
Şekil 4.10. İlaç gruplarının BCL-2 gen ifadenmesi üzerine etkileri.....	40
Şekil 4.11. İlaç gruplarının P53 protein miktarı üzerine etkileri	41
Şekil 4.12. İlaç gruplarının CDK-4 protein miktarı üzerine etkileri	42
Şekil 4.13. İlaç gruplarının BCL-2 protein miktarı üzerine etkileri	43
Şekil 4.14. İlaç gruplarının P21 protein miktarı üzerine etkileri	44
Şekil 4.15. İlaç gruplarının PUMA protein miktarı üzerine etkileri.....	45
Şekil 4.16. A549 hücre hattında apoptoz analizinin sonuçları	46
Şekil 4.17. A549 hücre hattında hücre döngüsü analizinin sonuçları	48

Şekil 4.18. A549 hücre hattında ilaç gruplarının ve kontrol gruplarının migrasyon üzerindeki etkileri ve mikroskopik görüntüleri	50
Şekil 4.19. A549 hücre hattında ilaç gruplarının ve kontrol gruplarının invazyon üzerindeki etkileri ve mikroskopik görüntüleri	51



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. RT-qPCR analizinde kullanılan primer sekansları	20
Tablo 3.2. Western blot analizinde kullanılan antikor bilgileri	21
Tablo 4.1. 44 kompleksine ait ¹ H ve ¹³ C NMR verileri	26
Tablo 4.2. 54 kompleksine ait ¹ H ve ¹³ C NMR verileri	28
Tablo 4.3. 59 kompleksine ait ¹ H ve ¹³ C NMR verileri	30
Tablo 4.4. 521 kompleksine ait ¹ H ve ¹³ C NMR verileri	32
Tablo 4.5. 522 kompleksine ait ¹ H ve ¹³ C NMR verileri	34
Tablo 4.6. 523 kompleksine ait ¹ H ve ¹³ C NMR verileri	36

1. GİRİŞ

Kanser, dünya çapında her yıl en fazla ölüme neden olan hastalık olarak, hala insan toplumu için büyük bir tehdit olmaya devam etmektedir (1). Tanımlamak gerekirse kanser, programlanmış hücre ölümünden kaçma, genom instabilitesini ve mutasyonları teşvik etme ve proliferatif sinyalleme dahil olmak üzere hastalığın çeşitli ayırt edici özelliklerini kontrol eden genlerdeki mutasyonlarla karakterize olan karmaşık bir hastalıktır (2).

Kanser çeşitlerinden biri olan akciğer kanserinde büyük bir genetik çeşitlilik vardır ve bunlar tüm tümörler arasında en fazla genetik sapmaya sahip olanlardır (3). Akciğer kanserleri, özellikle büyümeyi teşvik eden yolların aktivasyonu ve tümör baskılayıcı yolların inhibisyonu olmak üzere birden fazla genetik ve epigenetik değişikliğin gelişimini içeren çok adımlı bir süreçle gelişmektedir (4). Akciğer kanserinin moleküler patogenezinde yer alan birden fazla biyokimyasal yolun daha iyi anlaşılması, moleküler sapmaları ve bunların aktive olmuş yollarını hedefleyebilen tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için çok önemlidir (3). Metal kompleksleri, yeni antikanser ilaçların geliştirilmesinde diğer birçok bileşiğe kıyasla çeşitli avantajlar sunmaktadır (5).

Metal komplekslerde, ligandların kimyası önemli bir rol oynamaktadır: diğerlerinin yanı sıra, N-Heterosiklik Karben (NHC) içeren metal bazlı ilaçlar, umut verici terapötik ajanlar olarak kendilerini kanıtlamıştır (6). N-heterosiklik karbenler (NHC), yüksek elektron donör kapasiteleri sayesinde metal merkezlerin stabilizasyonunda önemli rol oynayan, ayrıca yapısal olarak kolayca modifiye edilebilmeleri nedeniyle biyolojik hedefleme amacıyla farklı moleküler iskelelerin tasarlanmasına olanak tanıyan kararlı ligandlardır (7). Ayrıca, NHC ligandlarının sunduğu kimyasal çeşitlilik, biyolojik olarak aktif yeni organometalik komplekslerin geliştirilmesine ve çeşitli moleküler tasarım stratejilerine olanak tanımaktadır. İlgili metal merkezlerin özelliklerinin ve NHC ligandlarının koordinatif davranışlarının modifikasyonu yoluyla, farklı biyolojik aktivitelere sahip komplekslerin rasyonel, hızlı ve etkin bir şekilde tasarlanmasını ve optimize edilmesini mümkün kılmaktadır. Bu bağlamda, NHC-tabanlı komplekslerin yapısal özelliklerinin ve etki mekanizmalarının sistematik olarak araştırılması, daha seçici ve etkili antikanser ajanlarının geliştirilmesinin önünü açabilir (8).

1978'de Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan ve platin bazlı bir ilaç olan Sisplatin, kanser tedavisinde dünya çapında klinik kullanıma giren ilk metal bazlı ilaçtır (9). Sisplatin diğer adıyla sis-diamindikloroplatin (II), Deoksiribonükleik asit (DNA) ile kovalent bağlar oluşturarak transkripsiyon ve translasyon süreçlerinde bozulmalara yol açan; bu yolla hücre döngüsünü ve apoptoz mekanizmasını etkileyen güçlü bir antitümör ajandır (10,11).

Ancak kanser kemoterapisindeki merkezi rollerine rağmen, platin ilaçları, sınırlı antitümör aktivite spektrumu, sistemik dozla ilişkili toksisite ve sıklıkla ilaç direncinin indüklenmesi gibi ciddi dezavantajlara sahiptir ve bu da genellikle tedavi başarısızlığına yol açar. Bu gözlemler, etkili bir alternatif olarak platin olmayan metal bazlı ilaçların araştırılmasına yönelik güçlü bir ilgi uyandırmaktadır (12).

Paladyum (Pd) bazlı bileşikler, platin ve paladyum iyonları arasındaki yapı ve koordinasyon kimyasındaki benzerlikler nedeniyle platin kemoterapötiklerine umut vadeden analoglar olarak kabul edilmektedir (13). Organometalik ilaç araştırmalarının çoğu platin içeren bileşiklere odaklanmış olsa da, karben bazlı Pd bileşikleri düşük toksisite, kolay sentezlenmeleri, kararlılıkları ve sınırlı yan etkiye sahip olmaları nedeniyle organometalik ilaçlar sınıfında öne çıkmaktadır (14). Ancak Pd(II) komplekslerinin hücresel ya da organizma düzeyindeki metabolik adaptasyonları bozma veya tetikleme kapasitesi hakkında mevcut veriler sınırlı kalmaktadır. Oysa bu bilgi eksikliği, söz konusu bileşiklerin potansiyel antineoplastik etkilerinin sistem düzeyinde anlaşılmasını engellemektedir. Bu bağlamda, bu komplekslere maruz kalma sonucunda metabolik süreçlerde meydana gelebilecek bozulmaların ortaya konması amacıyla, daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (15).

Sonuç olarak, potansiyel alternatifler olarak, yeni Paladyum bazlı antikanser ilaçlar üzerinde araştırmalar yürütülmektedir. Tüm bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda yeni karben öncülleri sentezlenerek , karakterizasyonları ¹H NMR, ¹³C NMR, FT-IR, mikroanaliz teknikleri ile yapılacaktır. Hazırlanan bu karben öncülleri de uygun palladyum bileşikleri ile piridinli ortamda etkileştirilerek karşılık gelen Pd-PEPPSI kompleksleri hazırlanacaktır. Yeni hazırlanan bu komplekslerin yapıları spektroskopik tekniklerle aydınlatılacaktır. Sonrasında bu bileşiklerin insan akciğer adenokarsinom (A549) hücre hattında kontrol hücre grubuna kıyasla biyolojik aktivite yönünden hücre döngüsünün durması, apoptozun tetiklenmesi, migrasyon ve invazyonun engellenmesi gibi kanser fenotipleri bakımından incelenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, dünya çapında her yıl en fazla ölüme neden olan hastalıklardan biri olarak, hala insan toplumu için büyük bir tehdit olmaya devam etmektedir (1). Güncel epidemiyolojik verilere göre, hastalığa bağlı ölümlerin yaklaşık altıda biri kanser kaynaklıdır. Dahası, yaşam boyu kanser tanısı alma olasılığı erkeklerde her beş kişiden biri, kadınlarda ise her altı kişiden biri düzeyindedir. Buna paralel olarak, her sekiz erkekten biri ve her on bir kadından biri kanser nedeniyle yaşamını yitirmektedir (10). Güncel verilere dayanarak, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (UKAA), 2030 yılına kadar yaklaşık 13 milyon kanserle ilgili ölümün gerçekleşeceğini tahmin etmektedir (16).

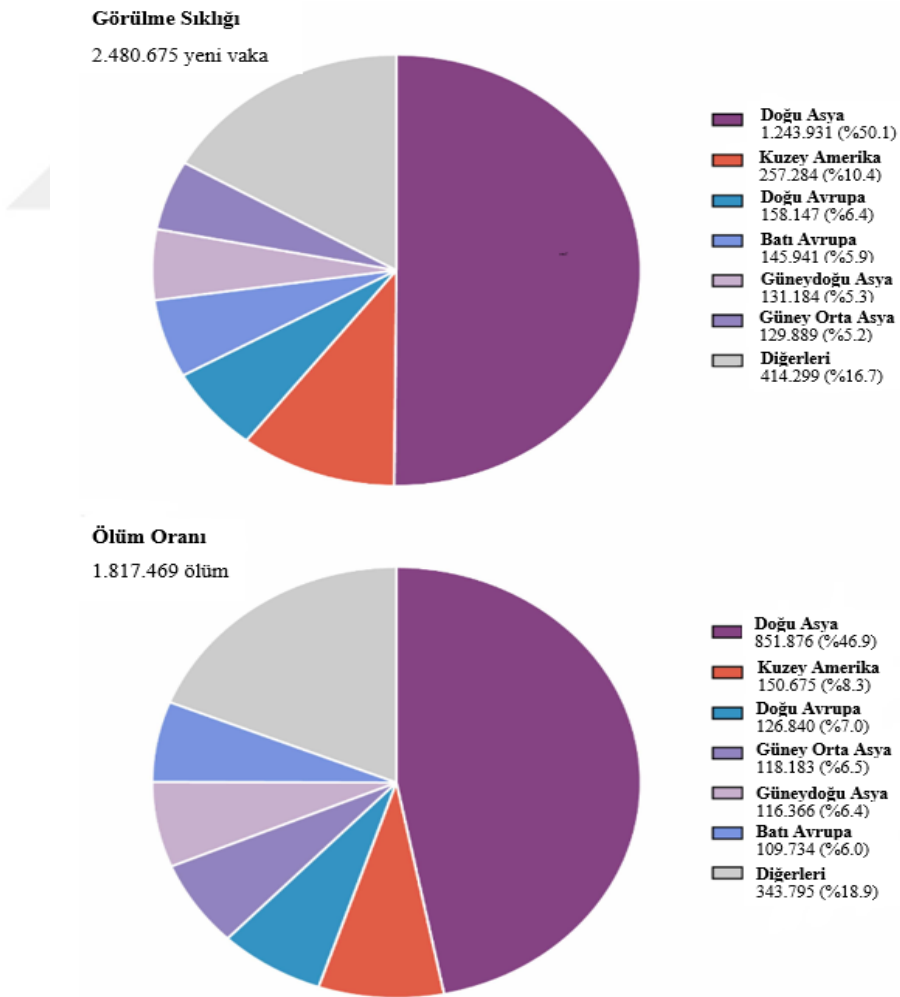
Kanser, hücresel DNA'daki genetik bilginin bozulması sonucu gelişen bir hastalık olup, bu bozulma anormal gen ekspresyon paternlerinin oluşmasına neden olur. Bu süreçte, hücre büyümesi, hayatta kalma, invazyon ve hareketlilik gibi temel biyolojik işlevleri düzenleyen genlerin aktivitesi artarken, bu süreçleri sınırlayan tümör baskılayıcı genlerin işlevi azalır ya da tamamen kaybolur. Genetik mutasyonlar bu dönüşümün temel nedeni olmakla birlikte, DNA metilasyonundaki değişikliklere bağlı olarak gelişen epigenetik yeniden programlama da, mutasyonlardan bağımsız bir mekanizma olarak kanserleşme sürecine önemli ölçüde katkı sağlar (17). Hücresel düzeyde düzenleyici mekanizmaların bozulması, birbirleriyle ilişkili ancak farklı biyolojik süreçlerde kendini göstermektedir. Bu bozulma; kontrolsüz hücre proliferasyonu, hücre göçü (invazyon ve metastaz), hücre dışı matriks özelliklerindeki değişimler, anjiyogenez ile birlikte metabolik, immünolojik ve endokrin düzenlemelerdeki bozulmalar gibi çok yönlü patolojik sonuçlara yol açar (18).

Kanserler, DNA'da meydana gelen ve belirli genlerin biyokimyasal işlevini ya da ekspresyon düzeyini etkileyen değişikliklerin, hücrelere genişleme ve hayatta kalma avantajı kazandırmasıyla ortaya çıkar. Bu durum genellikle, birden fazla genetik olayın kademeli olarak birikmesini içeren çok aşamalı bir süreçtir ve nihayetinde, mutasyon taşıyan hücrelerden türeyen bir hücre klonunun kontrolsüz çoğalmasıyla sonuçlanır (19). Normal hücrelerin giderek kötü huylu tümöre dönüşme sürecinin, genomdaki hasarın bir sonucu olarak ortaya çıkan mutasyonların ardışık edinimini gerektirdiği artık bilinmektedir. Bu hasar, DNA replikasyonundaki hatalar, belirli DNA bazlarının içsel

kimyasal dengesizliği veya metabolizma sırasında oluşan serbest radikallerin saldırısı gibi endojen süreçlerin sonucu olabilir (20). Sonuç olarak, tümör gelişimini yönlendiren genetik ve moleküler mekanizmaların anlaşılması, kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının ve erken teşhis olanaklarının geliştirilmesinde temel bir rol oynamaktadır (19).

2.2. Akciğer Kanserine Genel Bakış

Akciğer kanseri, dünya çapında en sık teşhis edilen ikinci kanser türü ve kansere bağlı ölümlerin birincil nedeni olarak önemli bir halk sağlığı sorunudur (21). Yüksek insidansı ve oldukça düşük sağkalım oranı nedeniyle, küresel çapta kritik bir hastalık türü olmaya devam etmektedir (22, 23). Akciğer kanserinin insidansı ve ölüm oranı, coğrafi bölgelere ve cinsiyete göre önemli ölçüde farklılaşmaktadır. Coğrafi bölgelere göre vaka ve ölüm oranını gösteren istatistik veriler Şekil 2.1’de (21) gösterilmiştir. Özellikle Asya ve erkek bireylerde yüksek bir yük söz konusudur (23, 24).



Şekil 2.1. 2022 yılında Birleşmiş Milletler tarafından tanımlanan dünya bölgelerine göre akciğer kanseri yeni vaka ve ölümlerinin dağılımı (21).

Akciğer kanseri histolojik olarak iki ana türe ayrılabilir: küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (25). Küçük hücreli akciğer karsinomu (KHAK), yuvarlak ila iğsi şekiller arasında değişen küçük hücrelerden oluşan, sitoplazması sınırlı, ince granüler nükleer kromatinden ve belirgin olmayan nükleollerden oluşan yüksek dereceli malign bir epitelyal tümördür (25). Bu kanser türü akciğer kanserlerinin yaklaşık %15–20'sini oluşturmaktadır ayrıca erken dönemde metastaz gelişimine yatkınlığı ve olumsuz prognoz ile karakterize edilmektedir (26).

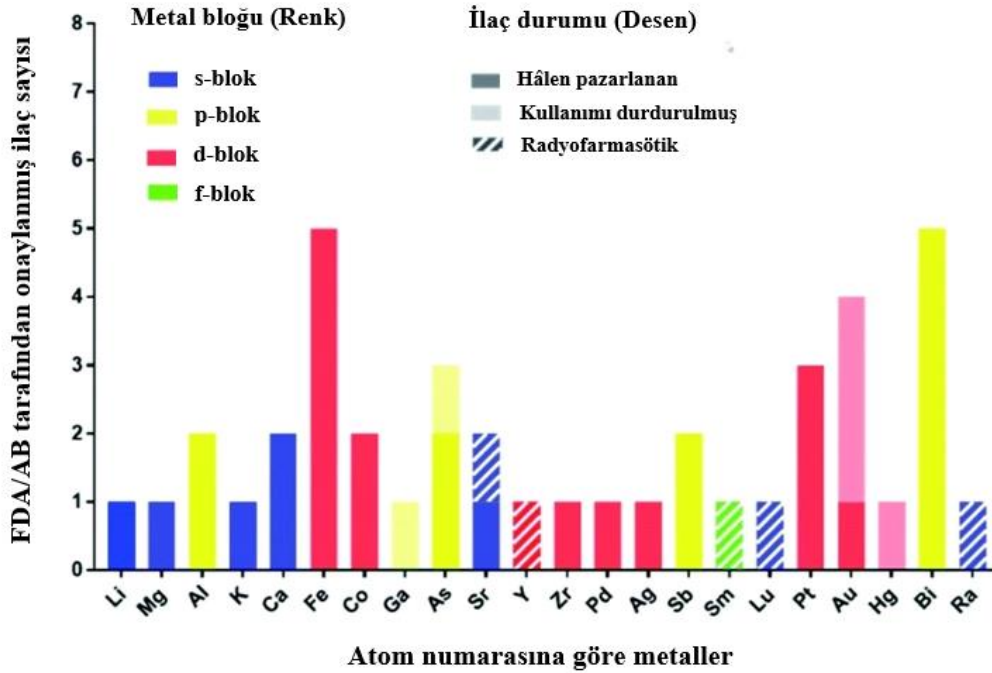
Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), akciğer kanserinin %80-85'ini oluşturur ve ilgili hücre tipine göre birkaç alt türe ayrılabilir (27). KHDAK'nin üç ana türü adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinomdur (28).

Akciğer kanseri yalnızca histolojik alt tipleri ile değil, aynı zamanda belirgin moleküler heterojenitesi ile de karakterize edilen kompleks bir malignitedir. Son yıllarda yapılan genomik ve transkriptomik çalışmalar, akciğer kanserinin patogeneğinde sürücü gen mutasyonlarının ve hücre döngüsü düzenleyicilerindeki bozulmaların kritik rol oynadığını ortaya koymuştur (29, 30). Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde (KHDAK) özellikle EGFR mutasyonları, ALK ve ROS1 gen yeniden düzenlenmeleri ile KRAS mutasyonları tümör proliferasyonu, invazyon ve metastaz süreçlerinde belirleyici moleküler olaylar olarak tanımlanmıştır (31, 32). Buna karşın küçük hücreli akciğer kanserinde (KHAK) TP53 ve RB1 gen inaktivasyonlarının oldukça yüksek oranlarda görüldüğü ve bu durumun kontrolsüz hücre döngüsü ilerlemesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (33).

Hücre döngüsü ve apoptoz mekanizmalarının düzenlenmesinde rol oynayan p53, p21, BCL-2, PUMA ve CDK-4 gibi moleküller, akciğer kanseri hücrelerinde proliferatif kapasitenin artışı ve tedaviye direnç gelişimi ile doğrudan ilişkilidir (34). Özellikle p53 tümör baskılayıcı genindeki mutasyonlar, DNA hasarına yanıtın bozulmasına ve apoptotik yanıtın azalmasına neden olarak tümör progresyonunu hızlandırmaktadır (35). Bu moleküler değişikliklerin tanımlanması, hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlamış ve kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının klinik uygulamaya girmesini mümkün kılmıştır (36). Bu nedenle günümüzde akciğer kanseri, yalnızca histopatolojik özellikleriyle değil, aynı zamanda moleküler profili ile birlikte değerlendirilmesi gereken çok boyutlu bir hastalık olarak kabul edilmektedir.

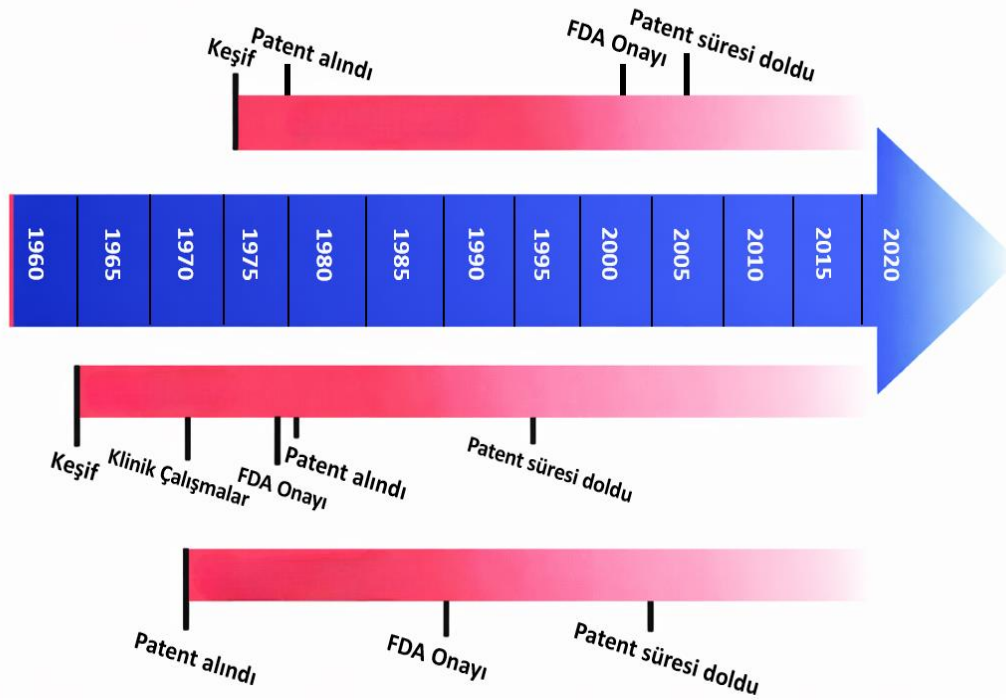
2.3. Metal Bazlı İlaçlar

Tarihsel olarak metal bileşiklerinin kullanımı, altın (Au), bakır (Cu) ve demir (Fe) gibi metallerin terapötik özelliklerinden yararlanıldığı antik uygarlıklara kadar uzanmakta olup, bu bileşikler tıbbın gelişiminde önemli bir rol oynamıştır (11). Örneğin bakır, yaraları ve enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılırken, demir anemi ile mücadele etmek için kullanılmıştır (37). Çeşitli terapötik yaklaşımlar arasında, metal bazlı ilaçların geliştirilmesi, kanserle mücadelede umut vadeden ve önemli potansiyele sahip bir araştırma alanı olarak öne çıkmaktadır (10). Metal kompleksleri, geniş koordinasyon sayıları ve geometrik çeşitlilikleri, termodinamik ve kinetik özellikleri, farklı redoks durumlarına erişilebilirlikleri ve yüksek lipofilisite yeteneği ile organik bileşikler veya doğal ürünlerle karşılaştırıldığında kendine özgü biyolojik ve terapötik etki mekanizmaları sergilemektedir (8). ABD ve/veya AB ülkelerinde onaylanan metalloilaçlar Şekil 2.2’de (38) gösterilmiştir. Son yıllarda kanser tedavisinde metal bazlı bileşiklere yönelik ilgi ve araştırmalar belirgin bir artış göstermektedir. Bu eğilim, yakın dönemde sentezlenen metal bazlı bileşiklerin in vitro ortamda yüksek düzeyde sitotoksik etki göstermesi ve mevcut kimyasal yapıların ligand süstitüsüyonu ile yapısal modifikasyonlara olanak tanınması sonucunda geniş bir bileşik yelpazesinin elde edilebilmesiyle ilişkilendirilmektedir (39).



Şekil 2.2. ABD ve/veya AB ülkelerinde onaylanan metalloilaçlar (38).

Barnett Rosenberg tarafından 1960 yılında sisplatinin keşfi, kanser tedavisinde metal bazlı bileşiklerin kullanımında önemli bir dönüm noktası olarak kabul edilmektedir. Bu keşif, metal bazlı antikanser ajanların modern döneminin başlangıcı olarak temsil edilmektedir (39). Sisplatinin keşfi, diğer metal bazlı kanser ilaçlarının geliştirilmesine ve sisplatin benzeri ilaçların ilerlemesine olanak sağlamıştır (40). 1978 yılında FDA tarafından sisplatinin testis malignitesinin tedavisi için kullanılmasına onay verilmiştir. Bunun başarısı, çeşitli kanser türleri için mevcut tedavi olanaklarını genişleten karboplatin ve oksaliplatin gibi yeni Pt bazlı bileşiklerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır (10). Bu bileşiklerin gelişimini gösteren zaman çizelgesi Şekil 2.3'te (38) gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Sisplatin, Karboplatin ve Oksaliplatin'in gelişimini gösteren zaman çizelgesi (38).

Platin bazlı ilaçlar DNA'daki pürin bazlarıyla, özellikle de guanin ile kovalent bağlar oluşturarak DNA eklentilerinin oluşmasına yol açar. Bu bağlanma DNA çift sarmalını bozar ve genetik bilginin transkripsiyonunu ve replikasyonunu engeller. Sonuç olarak, kanser hücreleri bölünemez ve çoğalamaz bunun sonucunda ise hücre, apoptoza veya hücre ölümüne uğrar (41).

Mevcut platin ilaçlarının başarılarının aksine bazı önemli dezavantajları vardır: yalnızca dar bir kanser spektrumunda etkilidir, bazı tümörler edinilmiş veya yapısal

olarak var olan dirence sahip olabilir ve genellikle mide bulantısı, kemik iliği baskılanması ve böbrek toksisitesi gibi ciddi yan etkilere neden olurlar (42). Platin bazlı metaloilaçlar pek çok kanser türünde terapötik etkinlik göstermesine rağmen, bu ajanların klinik kullanımını sınırlayan çeşitli sorunlar günümüzde hala devam etmektedir. Özellikle yüksek düzeyde nefrotoksiste, gastrointestinal ve hematolojik yan etkiler, glutatyon (GSH) aracılı hücre içi inaktivasyon sonucu gelişen ilaç direnci, DNA onarım mekanizmalarındaki değişiklikler ve apoptozisle ilişkili düzenleyici süreçlerin bozulması, bu ilaçların etkinliğini azaltan başlıca biyolojik engeller olarak tanımlanmaktadır (43). Platin ilaçlarıyla ilişkili sorunları ele alan güncel araştırmalar, bu ajanların yol açtığı sorunları aşmak amacıyla, farklı etki mekanizmaları gösteren alternatif metal kaynaklı terapötiklerin geliştirilmesine yönelmiş; ayrıca sisplatin kullanımına bağlı yan etkileri en aza indirmek için proilaç yaklaşımları ve hedefe yönelik ilaç taşıma stratejileri üzerinde yoğunlaşmıştır (42).

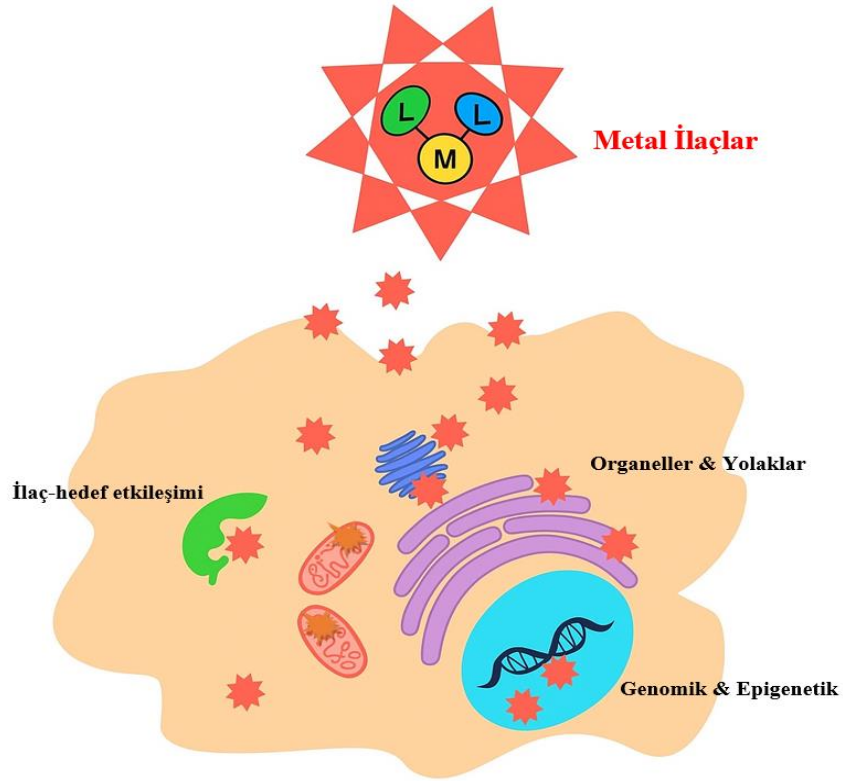
Son yıllarda, tümör hücre hatlarına karşı ümit verici aktiviteye sahip çok sayıda paladyum(II) (Pd) kompleksi sentezlenmiş ve yayınlanmıştır (44). Pt(II) ve Pd(II) iyonlarının yapısal ve kimyasal özellikler bakımından gösterdiği belirgin benzerlikler, Pd(II) komplekslerinin potansiyel antikanser ajanları olarak araştırılmasına yönelik ilgiyi önemli ölçüde artırmıştır (39-45). Pd (II) komplekslerinin suyla etkileşim (sulanma) ve ligand değişim hızlarının, Pt (II) türevlerine kıyasla yaklaşık 10^5 kat daha yüksek olduğu ve ayrıca daha iyi çözünürlük özellikleri gösterdiği bilinmektedir. Bu faktörler göz önünde bulundurulduğunda, en azından bazı Pd (II) komplekslerinin kanser tedavisinde değerlendirilmesi açısından dikkate değer bir potansiyel taşıdığı anlaşılmaktadır (39). Böylece, antikanser özellik gösteren çeşitli diğer geçiş metallerinin sunduğu birçok umut vadeden biyomedikal uygulamanın da ortaya çıkmasıyla, araştırma odağının son yıllarda Pt (II) temelli ajanların ötesine kaydığı görülmektedir (46). Mevcut veriler cesaret verici olsa da Pd (II) komplekslerinin klinik açıdan uygulanabilirliğini değerlendirebilmek için ve antikanser ilaç geliştirme sürecindeki yerinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha fazla bilimsel çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

2.3.1. Metal Bazlı İlaçların Kanser Tedavisindeki Rolü

Metaller, insanlığın bildiği çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde uzun zamandan beri kullanılmaktadır (47). Metal kompleksleri, özellikle geçiş metalleri içerenler, sahip oldukları benzersiz özellikler nedeniyle kanser karşıtı ajanlar olarak büyük ilgi görmektedirler (48). Bu kompleksler, yeni antikanser ajanların tasarımında organik

bileşiklere kıyasla önemli avantajlar sunmaktadır. Üç boyutlu koordinasyon yapıları sayesinde belirli moleküler hedeflere yönlendirilebilmekte ve bu bölgelerde etkili çapraz bağlanma gerçekleştirebilmektedirler (5). Ayrıca, metal kompleksleri geniş bir koordinasyon sayısı aralığı, çeşitli geometrik dizilimler ve farklı kinetik davranışlara olanak tanıyan esnek kimyasal özellikleriyle, özgün moleküler yapıların geliştirilmesi için zengin bir araştırma alanı sağlamaktadır (49).

Metal bazlı ilaçlar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu artırma, DNA ile etkileşim kurma ve çeşitli enzimatik süreçleri inhibe etme gibi birden fazla mekanizmayı içeren kapsamlı bir antikanser etkiye sahiptirler (50). Kanser karşıtı metal ilaçların genel etki mekanizması Şekil 2.4'te özetlenmiştir (49).



Şekil 2.4. Kanser karşıtı metal ilaçların genel etki mekanizması (49).

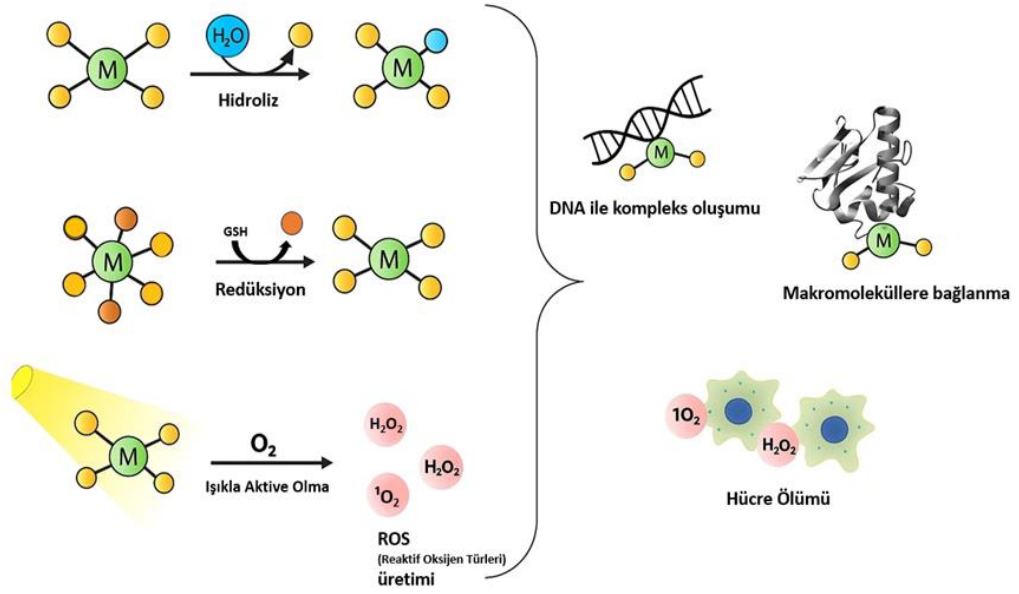
Esasen, metal iyonu (ve kararsız ko-ligandlar) kovalent olarak temel biyomoleküllere, örneğin DNA, proteinler, enzimler, vb. bağlanır, bunların işlevini inhibe eder ve farklı hücresel yollar (örneğin apoptozis ve nekroz) aracılığıyla hücre ölümüne yol açar (50). Metal komplekslerinin, özellikle de Pd (II) türevlerinin, hücresel ya da organizma düzeyinde metabolik adaptasyonları bozma veya tetikleme kapasitelerine ilişkin mevcut bilgi birikimi, bu bileşiklerin olası yeni antikanser ajanlar olarak taşıdığı geniş kapsamlı etkilerin anlaşılması açısından kritik önem taşımakla birlikte hâlâ yetersizdir (15).

Paladyum komplekslerinin, kanser hücrelerinde apoptozun tetiklenmesi ya da hücre döngüsünün durdurulması yoluyla tümör hücre proliferasyonunu baskılama kapasitesine sahip olduğu çeşitli çalışmalar tarafından desteklenmektedir (10). Daha da önemlisi, Pd komplekslerinin hücre çoğalmasını baskılayan (sitostatik) etkileri ile lipofilik özellikleri veya çözünürlükleri arasında belirgin bir ilişki olduğunun tespit edilmesidir. Ayrıca, platin temelli olmayan bu komplekslerin, kliniklerde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapi ajanı olan sisplatine kıyasla kanser hücreleri üzerinde güçlü antitümör etkiler gösterebildiği ve bunun yanı sıra daha düşük düzeyde yan etkiye sahip olabildiği de yakın dönemde yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur (44). Bu bulgular bir arada değerlendirildiğinde, Pd komplekslerinin sahip olduğu çok yönlü biyolojik etkilerin, metal bazlı tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine önemli ölçüde katkı sağlayabilecek nitelikte olduğunu ve bu alanda artan araştırma ilgisini bilimsel açıdan haklı çıkardığını göstermektedir.

2.3.2. Metal Bazlı İlaçların Moleküler Mekanizması

Metalloilaçlar, genellikle çok yönlü ve çok hedefli ilaçlar olup, Pt (kanser tedavisi), Lityum (Li) (zihinsel bozukluklar), Gümüş (Ag) (antimikrobiyal), Bizmut (Bi) (antibiyotik) ve Paladyum (Pd) (kanser tedavisi ve organik reaksiyonlar) komplekslerini içermektedirler (38-51, 52, 53). Genellikle, bu ilaçlar "ön ilaç" (aktif olmayan ilaç) formunda uygulanır ve bu form, ligandların yer değiştirmesi veya redoks reaksiyonları yoluyla "aktif ilaç" formuna dönüştürülebilir (38-54). Şekil 2.5'te bu ilaçların en yaygın etki mekanizmalarının bir şeması sunulmuştur (54).

Tümör hücreleri, redoks dengesinin bozulmasına bağlı olarak genellikle artmış düzeylerde ROS üretir ve bu fazla ROS, oksidatif DNA hasarını tetikleyerek onkogenin ilerlemesine katkıda bulunabileceğinden, bu hücreler oksidatif strese karşı belirgin bir hassasiyet gösterir (55). Metal kompleksleri, hücrel redoks kimyasını, metal veya ligand bazlı redoks süreçleri yoluyla doğrudan veya hücrel redoks yollarında yer alan biyomoleküllerle etkileşime girerek dolaylı olarak etkileyebilir (56). Bu kapsamda, metallerin redoks olarak etkin yapıları, çeşitli koordinasyon geometrilerine uyum sağlayabilmeleri ve organik substratlarla özgün biçimde etkileşebilme kapasiteleri, bu komplekslerin kanser tedavisinde terapötik açıdan önemini daha da güçlendirmektedir (38).



Şekil 2.5. Metal komplekslerinin en yaygın moleküler etki mekanizmaları ve bazı biyolojik etkileri (54).

Bir metal iyonunun oksidasyon durumunun, ligand değişim kinetiği üzerinde belirleyici bir rol oynaması, onun biyolojik etkinliğini de doğrudan şekillendirir. Buna göre, metal iyonu belirli bir oksidasyon basamağında düşük reaktiviteye hatta etkisizliğe sahipken, farklı bir oksidasyon basamağına geçtiğinde daha yüksek reaktivite sergileyerek biyolojik olarak aktif hale gelebilir. Bu iki durum arasındaki fark biyolojik olarak erişilebilir bir aralıkta kaldığında, kompleks için içsel bir aktivasyon mekanizması niteliği kazanır. Başka bir ifadeyle, daha az aktif dolayısıyla daha az toksik formun hastaya uygulanması ve ardından oksidasyon veya indirgenme gibi bir dönüşümle aktif hâle gelmesi mümkündür. Metal komplekslerine özgü bu ayarlanabilir özellik, tedavi sırasında yan etki riskini azaltırken terapötik etkinliği artırma potansiyeli sunduğu için, özellikle kanser araştırmalarında kapsamlı biçimde ele alınmıştır (57, 58).

Diğer araştırmacıların da vurguladığı üzere, geçiş metal komplekslerinin üç boyutlu ve yapısal olarak çeşitlenebilir kompleks yapılarının sentezi, çoğu durumda organik moleküllerin sentezine kıyasla daha pratiktir. Bu yapısal esneklik, uygun elektronik özellikler ve ligand değişim davranışlarıyla birleştiğinde, enzimatik olmayan proteinler, belirli transkripsiyon faktörleri veya hücrel iskelet bileşenleri gibi geleneksel olarak ‘ilacı yapılamaz’ kabul edilen hedeflerin modülasyonunu mümkün kılan yeni terapötik ajanların geliştirilmesine olanak tanır. Bu yönüyle geçiş metal kompleksleri, biyolojik olarak zor ulaşılan hedeflerde bile etkili inhibitörlerin tasarlanabilmesi için önemli bir kimyasal avantaj sunmaktadır (59).

2.4. N-Heterosiklik Karben (NHC) Ligandları ve Stabiliteye Etkileri

Geçiş metal kimyasında N-heterosiklik karbenlerin (NHC'ler) ligand olarak önemi, 1991 yılına kadar hızla gelişen bir araştırma alanı hâline gelmiştir. Arduengo, NHC kristallerinin izole edilebilmesi, saklanabilirliği ve yüksek kararlılığına ilişkin önemli bir çalışma yayımlamıştır (60). 1991 yılından itibaren Arduengo, serbest karbenler üzerine yürüttüğü araştırmalarını azot içeren halkalı yapılara yönlendirmiş ve bu tür karbenler N-heterosiklik karbenler (NHC'ler) olarak tanımlanmıştır. Takip eden yıllarda, kararlı NHC'ler ve asiklik karbenler üzerine gerçekleştirilen çalışmalar bilim dünyasında geniş ilgi görmüş; özellikle metal-NHC (M-NHC) komplekslerinin katalitik aktiviteleri bu alanda öne çıkan araştırma konularından biri olmuştur (61-64). N-heterosiklik karben (NHC) ligandları, yüksek σ -elektron bağışlama kapasitesine sahip olmaları sayesinde pek çok geçiş metaliyle güçlü ve kararlı metal-karben bağlarının oluşumuna olanak tanır. Bunun yanı sıra, NHC ligandlarının düşük intrinsik toksisiteye sahip olmaları ve yapısal çeşitliliklerinin sentez yoluyla kolaylıkla modifiye edilebilmesi, bu bileşikleri metal komplekslerinin tasarımında cazip kılmaktadır (65).

Ligandlar, hücresel koşullara tabi tutulduğunda metal bazlı ilaçların bağlanma afinitesi ve reaksiyon kinetiğini etkilemede çok önemlidir (43). N-heterosiklik karben (NHC) ligandlarının diğer koordinasyon ligandlarına kıyasla tercih edilmesinin temel nedenlerinden biri, elektronik özellikleri sayesinde metal iyonlarının salınımını daha kontrollü ve yavaş bir biçimde gerçekleştirmeleridir. Bu durum, NHC içeren metal komplekslerinin hem katalitik sistemlerde hem de biyolojik uygulamalarda etkinliklerini daha uzun süre korumalarına olanak tanımaktadır (66). NHC'ler, kendilerine özgü elektronik özellikleri sayesinde koordine oldukları metal merkezleriyle yüksek derecede kararlı etkileşimler kurar ve bu durum, ligandın metalden ayrılmasını zorlaştırır. Halkadaki azot atomlarında bulunan ortaklanmamış elektron çiftlerinin π -etkileşim yoluyla karben karbonuna aktarılması ve metal merkezinden gerçekleşen π -geri bağlanma katkısı, M-NHC bağının hem dayanıklılığını hem de bağ kuvvetini belirgin biçimde artırmaktadır (67). Bu ligandların geçiş metali komplekslerini etkin biçimde stabilize edebilme yetenekleri ile M-NHC türevlerinin sentezine olanak tanıyan çok sayıda sentetik yaklaşımın bulunması birlikte değerlendirildiğinde (68), söz konusu σ -donör ligand sınıfının kataliz, malzeme bilimi ve tıbbi kimya alanlarında ilgi görmesine yol açmıştır (69).

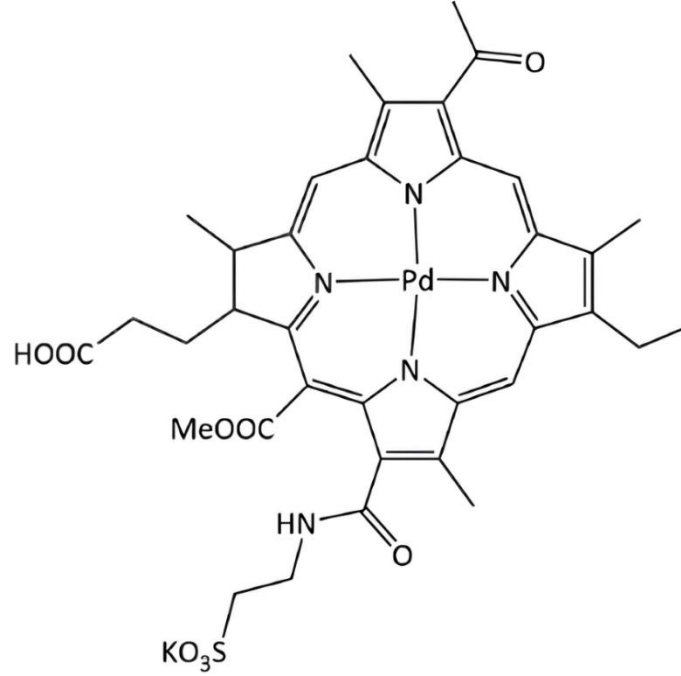
Metal merkezine koordine olan ligandların bilinçli ve stratejik olarak seçilmesi, paladyum temelli antikanser ajanların rasyonel tasarımında belirleyici bir unsur olarak öne çıkmaktadır. Bu doğrultuda gerçekleştirilen güncel çalışmalar, paladyuma güçlü bağlanma gösteren ligandların hidroliz kaynaklı kararsızlıkları önemli ölçüde azalttığını veya tamamen ortadan kaldırabildiğini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, NHC'ler dikkat çekici bir ligand sınıfı olarak değerlendirilmektedir (70). Bununla birlikte, Pd (II) türevlerinin önemli sınırlamalarından biri, yüksek ligand değişim hızları nedeniyle farmakolojik hedeflerine ulaşabilmek için gerekli olan yapısal kararlılığı yeterli süre boyunca sürdürememeleridir. Bu dezavantajı gidermek amacıyla araştırmacılar, Pd(II) komplekslerine hem termodinamik stabilite hem de yüksek kinetik kararlılık kazandırabilen NHC gibi güçlü ligandlardan yararlanmışlardır (43). Ek olarak, koordine olan metalin seçimi, büyük ölçüde ilgili temel biyolojik hedefi belirlemektedir. Bu komplekslerin biyolojik aktiviteleri yalnızca metal merkeze bağlı olmayıp, NHC ligandının yapısal özelliklerine bağlı olarak ayarlanabilir ve değiştirilebilir (71).

Ligandların metal komplekslerinin termodinamik ve kinetik özellikleri üzerindeki belirgin etkileri dikkate alındığında, ligandların yapısal olarak modifiye edilmesi veya değiştirilmesi metala ilaçların biyolojik aktivitelerinin hassas biçimde ayarlanmasına olanak tanımaktadır. Bu doğrultuda, moleküler yapıların sunduğu çeşitlilik ve ayarlanabilirlik, metal komplekslerini ilaç tasarımı açısından çok yönlü ve esnek bir platform hâline getirmektedir.

2.5. Paladyum Karben Kompleksleri ve Antikanser Potansiyeli

Yakın zamanda Paladyum bazlı bileşik Padeliporfin (ticari adı Tookad olarak bilinir) Avrupa İlaç Ajansı tarafından düşük riskli prostat kanseri olan hastalarda Fotodinamik Tedavi için Avrupa Birliği'nde onaylanmıştır (72). Padeliporfin kompleksinin kimyasal yapısı Şekil 2.6'da verilmiştir (56). Pd komplekslerinin klinik olarak kullanılan bazı kemoterapötiklere kıyasla önemli antikanser aktivitesinin yanı sıra daha düşük toksisiteye sahip olduğu bildirilmiştir (42). Dahası, antikanser aktiviteleri olan Pd (II) ve Pt (II) kompleksleri üzerinde yapılan hidrolitik ve DNA bağlama çalışmaları, paladyum komplekslerinin kinetik olarak kararsız olduğunu, DNA ile etkileşime girebilen yeni yüklü türler ürettiğini ve ayrıca platin komplekslerinden daha hızlı oranda DNA'ya bağlandığını göstermiştir (46). Her ne kadar Pd (II) kompleksleri, benzer Pt (II) komplekslerine kıyasla daha yüksek bir ligand değişim hızı sergilese de uygun bir kalkanlama etkisi sağlandığında merkezi Pd (II) iyonunun reaktivitesi belirgin

şekilde sınırlandırılabilir. Bu iyon, DNA ile etkileşime girerek çapraz bağ oluşumuna neden olabilir; böylece DNA sentezinin engellenmesine ve hücrede apoptozun tetiklenmesine katkıda bulunur (73).



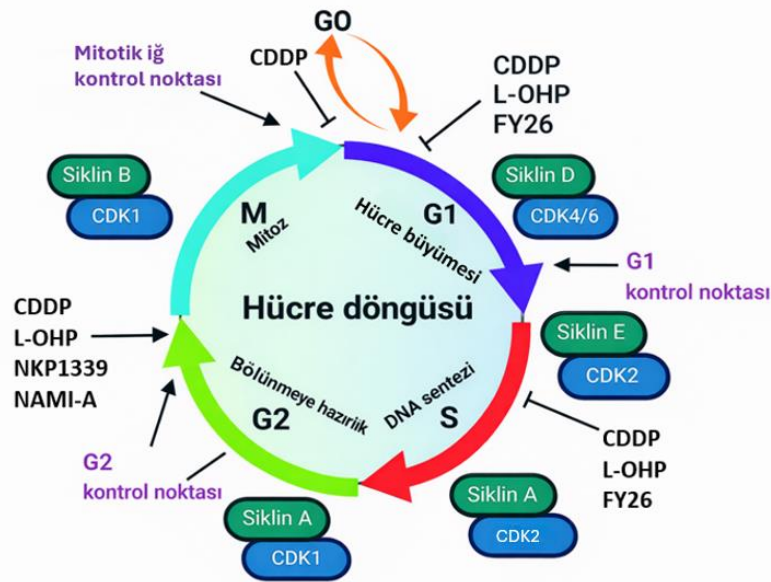
Şekil 2.6. Padeliporfin kompleksinin kimyasal yapısı (56).

Metal–N-heterosiklik karben (M–NHC) kompleksleri arasında öne çıkan Pd (II)–NHC kompleksleri, son yıllarda artan bir araştırma odağı hâline gelmiştir. Bu kompleksler, diğer M–NHC sistemleriyle karşılaştırıldığında özellikle katalitik reaksiyonlarda sergiledikleri yüksek etkinlik nedeniyle dikkat çekmektedir (74). Pd (II) antitümör komplekslerinin in vivo kararlılığı, güçlü şekilde koordine olan NHC ligandlarına ve makul derecede kararsız ayrılan gruba dayanır (15). Fizyolojik koşullar altında yüksek kararlılığa sahip antikanser metal komplekslerinin tasarlanması önem taşımaktadır; zira bu özellik, komplekslerin biyolojik etkinlikleri ve farmakokinetik davranışları üzerinde belirleyici olan türleşme süreçlerinin sınırlandırılmasına olanak sağlar. Metal–karbon bağlarının yüksek bağ enerjisi ile çok dişli ligand sistemlerinin kullanımı, metal merkezinin demetalasyonunu önlemede etkili bir strateji olarak öne çıkmaktadır (65).

M–NHC komplekslerinin antikanser ve tanı-tedavi amaçlı ajanlar olarak geliştirilmesine yönelik çalışmalarda son yıllarda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Özellikle altın, platin ve paladyum temelli NHC kompleksleri; kanser hücrelerinde

belirgin sitotoksik etki göstermeleri, hayvan modellerinde anlamlı antitümör aktivite sergilemeleri ve protein tiyolleri, DNA G-kuadrupteks (Guanin açısından zengin DNA bölgeleri) yapıları ile uyumsuz DNA bölgeleri gibi özgül moleküler hedeflerle seçici etkileşim kurabilecek şekilde rasyonel olarak tasarlanmıştır (7).

Pt (II) komplekslerinin antikanser etkileri, büyük ölçüde DNA'nın azotlu bazlarıyla çapraz bağlar oluşturmaları ve bu etkileşimler sonucunda replikasyon süreçlerini engelleyen, zincir kırıklarına ve hatalı baz eşleşmelerine yol açan DNA adüktlerinin meydana gelmesiyle ilişkilendirilmektedir. Bu hasarın hücresel yanıt olarak apoptozu tetiklediği, hücre döngüsünün kontrol noktalarında durdurulmasına yol açtığı ve aynı zamanda RNA ile protein sentezinin baskılanmasına neden olduğu kabul edilmektedir. (75). Metalolaçlar tarafından hücre döngüsünün durdurulmasına dair örnekler Şekil 2.7'de verilmiştir (38). Bununla birlikte, etkinliğini sınırladığı düşünülen ilaç direncinin varlığı nedeniyle platin kompleksleri ideal bir kemoterapötik ajan olarak değerlendirilememektedir. Ayrıca sisplatinin, kan hücrelerinin biyolojik fonksiyonlarında bozulma ile karakterize edilen oksidatif stres aracılı hematolojik toksisiteye yol açtığı gösterilmiştir. Buna ek olarak nefrotoksisite, ototoksisite, nörotoksisite, miyelotoksisite, periferik nöropati ve çeşitli hematolojik yan etkiler gibi çok sayıda dezavantaj ile ilişkilendirilmektedir (73).



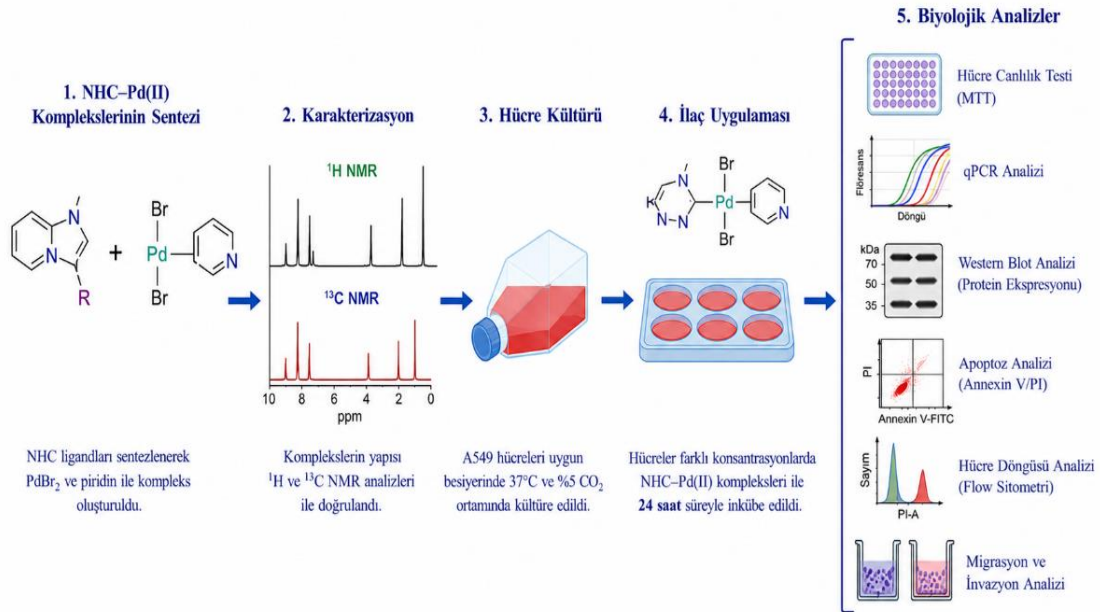
Şekil 2.7. Metalolaçlar tarafından hücre döngüsünün durdurulmasına ilişkin temsili şema (38).

Metal bazlı antikanser ajanlar, hücre döngüsünün farklı evrelerinde ilerlemeyi baskılayarak hücre proliferasyonunu sınırlandırmakta ve apoptozisin başlatılmasına katkıda bulunmaktadır. Hücre döngüsü boyunca fazlar arası geçişler, bir sonraki aşamaya ilerlemeyi belirleyen kontrol noktaları tarafından düzenlenirken, bu süreçte siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (CDK'lar) temel rol oynamaktadır. Bazı hücre alt popülasyonları ise hücre döngüsünden çıkarak G0 fazında durgun bir duruma geçebilmektedir. Sisplatin (CDDP, Pt1), oksaliplatin (L-OHP, Pt3), NAMI-A (Ru4), NKP1339 (Ru9) ve FY26 (Os4) gibi farklı metal komplekslerinin, hücre hattı, doz ve maruz kalma süresine bağlı olarak hücre döngüsünün farklı fazlarında duraklamaya yol açtığı gösterilmiştir (38).

Bu sınırlılıklar göz önünde bulundurulduğunda, daha yüksek etkinlik, seçicilik ve azaltılmış toksisite profili sergileyen yeni metal komplekslerinin tasarlanması ve bu komplekslerin moleküler etki mekanizmalarının ayrıntılı olarak aydınlatılmasına yönelik ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

3. MATERYAL VE METOT

Sentezlenen komplekslerin biyolojik aktiviteleri, hücre kültürü ortamında gerçekleştirilen farklı analizler ile incelendi. Çalışmanın genel deneysel akış şeması Şekil 3.1’de gösterildi.



Şekil 3.1. Genel deneysel akış şeması

3.1. Kimyasal Sentez ve Karakterizasyonlar

3.1.1. N-heterosiklik karben (NHC) Öncü Ligandlarının Genel Sentez Yöntemi

1-siklopentil-2,3-dihidro-1H-benzimidazol ve 1-(2-fenilpropan-2-il)-2,3-dihidro-1H-benzimidazol (1 eşdeğer), inert atmosfer altında damıtılmış toluen (15 mL) içerisinde çeşitli alkil halojenürler (1,05 eşdeğer) ile reaksiyona sokuldu. Kimyasalların ilavesinden önce Schlenk tüpü argon gazı ile dolduruldu ve reaksiyon karışımı 80 °C’de geri akış altında 72 saat süreyle gerçekleştirildi. Reaksiyon süresi sonunda karışım içerisinde veya eter ilavesi sonrasında beyaz çökelti oluşumu gözlemlendi. Elde edilen toz halindeki tuz, vakum altında kurutuldu.

3.1.2. Pd-PEPPSI Komplekslerinin Genel Sentez Yöntemi

Reaksiyon, benzimidazolium bazlı asimetrik N-heterosiklik karben tuzları (1 eşdeğer) ile PdCl₂ (1,05 eşdeğer) arasında gerçekleştirildi. Baz olarak potasyum karbonat (5 eşdeğer) kullanıldı. Schlenk tüpüne çözücü olarak asetonitril eklenmiş, ardından piridin ilave edilerek reaksiyon karışımı 80 °C’de 16 saat boyunca geri akış altında tutuldu. Belirlenen geri akış süresinin sonunda, reaksiyonun tamamlandığını gösteren koyu renk oluşumu gözlemlendi. Uçucu bileşenler vakum altında uzaklaştırıldı ve geriye kalan kalıntı n-pentan (3×3 ml) ile yıkandı. Filtrasyonun ardından çözücü uzaklaştırıldı ve ürün, DCM/eter (1:3) veya kloroform/n-pentan (1:3) karışımları kullanılarak yeniden kristallendirildi. Yeniden kristallendirme ve çözücülerin vakum altında uzaklaştırılmasından sonra çökelti elde edildi. Elde edilen PEPPSI komplekslerinin, pentan, hekzan ve eter gibi apolar çözücüler dışında DCM, kloroform, metanol, etanol, DMF ve DMSO gibi yaygın organik ve polar çözücülerde tamamen çözünmediği belirlendi. Tüm kompleksler orta ile iyi verim aralığında (%59–%85) izole edildi.

3.2. Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan A549 insan akciğer adenokarsinom hücre hattı, –80 °C’de kriyoviyaller içerisinde saklanmış olup deney öncesinde kültüre alındı. Hücreler çözündürülürken kriyoviyal içerisindeki hücre süspansiyonuna önceden 37 °C inkübatörde ısıtılmış Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco), %10 fetal sıgır serum (FBS, Capricorn) ve %1 penisilin–streptomisin içeren tam besiyeri yavaşça eklendi. Hücre süspansiyonu steril falkon tüplere aktarıldı ve 1000 rpm’de yaklaşık 7 dakika (Nüve NF800R) santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti taze kültür ortamı ile homojen şekilde süspanse edilerek 25 cm² kültür flasklarına (Greiner CELLSTAR®) ekildi. Hücreler, canlı hücre görüntüleme sistemi (JuLI™ Br, NanoEntek) ile kontrol edildikten sonra %5 CO₂ içeren nemli atmosferde 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Hücre yoğunluğu %70–80 konfluens seviyesine ulaştığında pasaj işlemi gerçekleştirildi. Pasaj sırasında kültür ortamı aspire edildi ve hücreler kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tamponlu salin (PBS) ile üç kez yıkandı. Ardından hücreleri yüzeyden ayırmak amacıyla 1,5 ml %0,25 Trypsin-EDTA (Gibco) eklendi ve flasklar yaklaşık 5 dakika süreyle %5 CO₂ inkübatöründe bekletildi. Hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandıktan sonra tripsin aktivitesini inhibe etmek amacıyla 3 ml taze besiyeri eklendi. Elde edilen hücre süspansiyonu steril tüplere aktarıldı ve 1000 rpm’de 7 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre

pelleti uygun hacimde besiyeri ile yeniden süspanse edilerek homojen bir hücre süspanسیونu elde edildi. Hazırlanan hücreler sonraki deneysel prosedürlerde kullanılmak üzere hazır hale getirildi.

3.3. RNA İzolasyonu ve Gerçek Zamanlı qPCR Analizi

A549 hücreleri deneysel uygulamalardan 48 saat sonra analiz amacıyla toplandı. Altı kuyucuklu plakalarda bulunan hücrelerin kültür ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler iki kez PBS ile yıkandı. Ardından her kuyucuğa 500 µL %0,25 Tripsin-EDTA eklenerek hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı ve plaklar 37 °C’de yaklaşık 5 dakika inkübe edildi. Yüzeyden ayrılan hücreler 1 ml taze besiyeri ile nötralize edilerek steril Eppendorf tüplere aktarıldı. Hücre süspanسیونları 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi (Sigma 1-14 mikro santrifüj). Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen hücre pelletlerinden toplam RNA izolasyonu, üretici firma protokolüne uygun olarak EcoPure Total RNA Kit kullanılarak gerçekleştirildi. İzole edilen RNA’nın miktar ve saflık değerlendirmesi Denovix DS-11 FX+ spektrofotometre/fluorometre cihazı ile yapıldı. Elde edilen toplam RNA’dan tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi, OneScript® Plus cDNA Synthesis Kit kullanılarak gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı qPCR reaksiyonu için her örnekte: 100 ng cDNA, 10 µL 2× GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), 200 nM ileri (forward) primer, 200 nM geri (reverse) primer karıştırıldı ve DNaz/RNaz içermeyen su eklenerek toplam reaksiyon hacmi 20 µL’ye tamamlandı. Primerlerin optimum bağlanma sıcaklıkları, primer dokümantasyonunda belirtilen sıcaklığın ± 5 °C aralığında gradient PCR yöntemi ile belirlendi. Çalışmada hücre proliferasyonu ve apoptoz ile ilişkili gen ekspresyonlarının değerlendirilmesi amacıyla p53, CDK-4 ve BCL-2 genleri analiz edildi. Referans (housekeeping) gen olarak ACTB (β -aktin) kullanıldı. Kullanılan primer dizileri Tablo 3.1’de verilmiştir. RT-qPCR analizleri StepOnePlus™ Real-Time PCR Sistemi (Applied Biosystems) kullanılarak gerçekleştirildi. PCR döngü koşulları şu şekilde uygulandı: 95 °C’de 10 dakika başlangıç denatürasyonu, 40 döngü boyunca 95 °C’de 10–20 saniye denatürasyon, 60 °C’de 30 saniye bağlanma/uzama. Elde edilen Ct (Eşik Döngü Sayısı) değerleri StepOne™ Plus v2.3 yazılımı kullanılarak analiz edildi. Hedef genlerin relatif ekspresyon düzeyleri, referans gen olarak ACTB kullanılarak Livak yöntemi ($2^{-\Delta\Delta CT}$) ile hesaplandı (76). Deney ve kontrol grupları arasındaki gen ekspresyon farklılıkları karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

Tablo 3.1. RT-qPCR analizinde kullanılan primer sekansları

Gen	İleri Primer (5' → 3')	Geri Primer (5' → 3')
p53	CAGCACATGACGGAGGTTGT	TCATCCAAATACTCCACACGC
CDK-4	ATGGCTACCTCTCGATATGAGC	CATTGGGGACTCTCACACTCT
BCL-2	ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT	GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC
ACTB	CACCATTGGCAATGAGCGG TTC	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT

3.4. Protein İzolasyonu ve Western Blot Analizi

A549 hücreleri deneysel uygulamalardan 48 saat sonra protein analizi amacıyla toplandı. Altı kuyucuklu plakalarda bulunan hücrelerin kültür ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler iki kez PBS ile yıkandı. Hücrelerin yüzeyden ayrılması amacıyla her kuyucuğa 500 µL %0,25 Trypsin-EDTA eklendi ve hücreler 37 °C'de yaklaşık 5 dakika inkübe edildi. Yüzeyden ayrılan hücreler 1 mL taze besiyeri ile nötralize edilerek mikro santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüpler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi (Sigma 1-14). Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelletleri PBS ile bir kez daha yıkandı ve tekrar santrifüj edildi. Protein ekstraksiyonu için hücre pelletleri, proteaz ve fosfataz inhibitörleri (Thermo Fisher) içeren 1X RIPA lizis tamponu (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, %1 NP-40, 1 mM EDTA, %0,5 sodyum deoksikolat ve %0,1 SDS; PanReac AppliChem, pH 7,4) içerisinde süspanse edildi. Hücre lizatı buz üzerinde inkübe edilerek protein ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Western blot analizinde her örnekten 25 µg toplam protein kullanıldı. Protein örnekleri, 2X Laemmli örnek tamponu (0,125 M Tris base, %20 gliserol, %4 SDS, %10 2-merkaptoetanol) ile karıştırıldı ve 95 °C'de 5 dakika denatüre edildi. Proteinler SDS-PAGE jelinde 100 V'da yaklaşık 100 dakika süreyle ayrıştırıldı (Mini PROTEAN Tetra Cell sistemi). Elektroforez sonrası protein transferi yarı-kuru transfer yöntemi ile gerçekleştirildi. Transfer tamponu (1X semi-dry transfer buffer; 47,6 mM Tris-base, 39,3 mM glisin ve %20 metanol) ile ıslatılmış transfer kâğıdı üzerine PVDF membran (GVS) yerleştirildi ve jel ile birlikte transfer sistemi (Thermo Scientific™ Pierce™ Power Blotter) kullanılarak 25 V ve 1,3 A'da 8 dakika transfer işlemi gerçekleştirildi. Transfer sonrası membranlar, 1X TBST (%0,1 Tween-20 içeren 25 mM Tris-base ve 150 mM NaCl; pH 7,6) içerisinde hazırlanmış %5 yağsız süt çözeltisinde oda sıcaklığında 1 saat (47 rpm) bloklandı. Ardından primer antikorlar (p53,

p21, PUMA, CDK-4 ve BCL-2) 1:1000 dilüsyonda %5 süt içeren 1X TBST içerisinde hazırlanarak membranlar 4 °C’de gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membranlar TBST ile yıkandı ve uygun sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Protein bantlarının immünokimyasal tespiti ECL (Enhanced Chemiluminescence, Geliştirilmiş Kemilüminesans) yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bant yoğunlukları GeneTools (Syngene) yazılımı ile analiz edildi. Protein ekspresyon düzeyleri, iç yükleme kontrolü olarak kullanılan β -aktin (ACTB) ile normalize edilerek farklı deney grupları arasında karşılaştırıldı. Western blot analizinde kullanılan antikorlara ait detaylı bilgiler Tablo 3.2’de sunulmuştur.

Tablo 3.2. Western blot analizinde kullanılan antikor bilgileri

Antikor	Firma	Katalog Numarası
Anti-p53	Abcam	ab131442
Anti-CDK-4	Elabscience	E-AB-13989
Anti-BCL-2	Elabscience	E-AB-15522
Anti-p21	Elabscience	E-AB-66357
Anti-PUMA	Elabscience	E-AB-67059
Anti- β -aktin	Elabscience	E-AB-40338

3.5. Apoptoz Analizi

A549 hücreleri deneysel uygulamadan 48 saat sonra apoptoz analizi amacıyla toplandı. Kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra her deney grubundaki hücreler iki kez PBS ile yıkandı. Hücrelerin yüzeyden ayrılması için her kuyucuğa 500 μ L %0,25 Trypsin-EDTA eklendi ve hücreler 37 °C’de kısa süre inkübe edildi. Yüzeyden ayrılan hücrelerin toparlanması amacıyla 1 ml taze besiyeri eklendi ve hücre süspansiyonu 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelletleri Annexin V bağlanma tamponu içerisinde süspanse edildi. Apoptotik hücre popülasyonlarının belirlenmesi Annexin V-FITC/PI Apoptosis Kit (E-CK-A211, Elabscience) kullanılarak gerçekleştirildi. Her örnek için 100 μ L hücre süspansiyonu analiz tüplerine aktarıldı. Ardından tüplere 5 μ L Annexin V-FITC (90 μ g/mL) ve 10 μ L propidium iodide (PI, 0,5 mg/mL) eklendi. Örnekler nazikçe karıştırıldı ve boyama reaksiyonunun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında, ışık almayan ortamda 15 dakika inkübe edildi. Boyama işlemi sonrasında her tüpe 400 μ L Annexin V bağlanma tamponu eklendi. Veri toplama işlemi BD Accuri™ C6 Plus akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Floresan

sinyalleri FITC için FL1 kanalında (533/30 nm) ve PI için FL2 kanalında (585/40 nm) ölçüldü. Veri analizi ve apoptotik hücre popülasyonlarının yüzdesel dağılımı BD Accuri™ C6 Plus yazılımı kullanılarak hesaplandı. Erken apoptoz (Annexin V⁺/PI⁻), geç apoptoz (Annexin V⁺/PI⁺) ve nekrotik hücre popülasyonları ayrı ayrı değerlendirilerek deney ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldı.

3.6. Hücre Döngüsü Analizi

A549 hücrelerinde deneysel uygulamadan sonra kültür ortamı aspire edilerek uzaklaştırıldı ve her kuyucuk iki kez PBS ile yıkandı. Hücrelerin yüzeyden ayrılması amacıyla tripsin eklendi ve 37 °C’de 5 dakika inkübe edildi. Hücreler toplandıktan sonra tripsin aktivitesini nötralize etmek için 1 ml taze besiyeri eklendi ve hücre süspansiyonu tüplere aktarıldı. Hücreler 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek pellet haline getirildi. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve tüplere damla damla 500 µL %70 etanol eklenirken tüpler hafif vortekslendi. Etanol ile fikse edilen hücreler 4 °C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücreler tekrar 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve bir kez PBS ile yıkandı. Pelletler 400 µL PBS içerisinde süspanse edildi ve DNA’daki RNA kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla 0,1 mg/ml RNase A ile 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi. RNase işlemi sonrasında örnekler 0,05 mg/ml propidium iodide (PI) eklendi, örnekler nazikçe karıştırıldı ve ışık almayan ortamda 15 dakika inkübe edildi. Akım sitometrik analiz, BD Accuri™ C6 Plus (BD Life Sciences) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. PI sinyali 585/40 nm bant geçiren filtre ile ölçüldü. Her deney grubuna ait veriler BD Accuri™ C6 Plus yazılımı kullanılarak analiz edildi ve DNA içerik dağılımına göre hücreler G0/G1, S ve G2/M fazları açısından değerlendirildi.

3.7. Migrasyon ve İnvazyon Analizi

A549 hücrelerinde deneysel uygulama sonrasında kültür ortamı aspire edilerek uzaklaştırıldı ve her kuyucuk iki kez PBS ile yıkandı. Hücrelerin yüzeyden ayrılması amacıyla her kuyucuğa 500 µL %0,25 tripsin çözeltisi eklendi ve hücreler 37 °C’de 5 dakika inkübe edildi. Ardından tripsin aktivitesini durdurmak için 1 ml taze besiyeri eklendi ve hücre süspansiyonu 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen hücre pelletleri serum içermeyen kültür ortamında süspanse edildi. Migrasyon ve invazyon analizleri Boyden odacık sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Deneylerde polikarbonat membranlı hücre kültür insertleri (Transwell® Permeable Supports, Polycarbonate (PC) Membrane, 3428) kullanıldı. İnvazyon analizi için polikarbonat membran yüzeyine 1 ml

ekstrasellüler matriks çözeltisi (Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix, 354234) yayıldı ve 37 °C’de 30 dakika polimerizasyon için inkübe edildi. Jel katılaştıktan sonra insertlerin alt bölmesine serum içeren besiyeri eklendi. Serum içermeyen ortamda hazırlanan hücre süspansiyonundan her insertin üst haznesine 1×10^5 hücre eklendi. Plaklar 37 °C ve %5 CO₂ içeren standart kültür koşullarında 48 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda membranı geçerek alt yüzeye ulaşan hücreler değerlendirmeye alındı. Membranın alt yüzeyine geçen hücreler %100 metanol ile 4 °C’de 1 saat fikse edildi. Fiksasyon sonrası metanol uzaklaştırıldı ve membranlar oda sıcaklığında 1 saat boyunca %0,5 kristal viyole ile boyandı. Ardından fazla boya uzaklaştırılncaya kadar membranlar distile su ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan membranların alt yüzeyinde bulunan hücreler ışık mikroskobu altında sayıldı. Migrasyon ve invazyon kapasitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı: "Migrasyon-İnvazyon (%) = [(her uygulama grubunda zarı geçen hücre sayısı) / (kontrol grubunda zarı geçen hücre sayısı)] x 100". Elde edilen değerler kullanılarak gruplar arası migrasyon ve invazyon farklılıkları karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

4.1. Kimyasal Sentez ve Karakterizasyonlar

4.1.1. Kompleks 44'ün ^1H ve ^{13}C NMR Analizi ve Yapısal Gösterimi

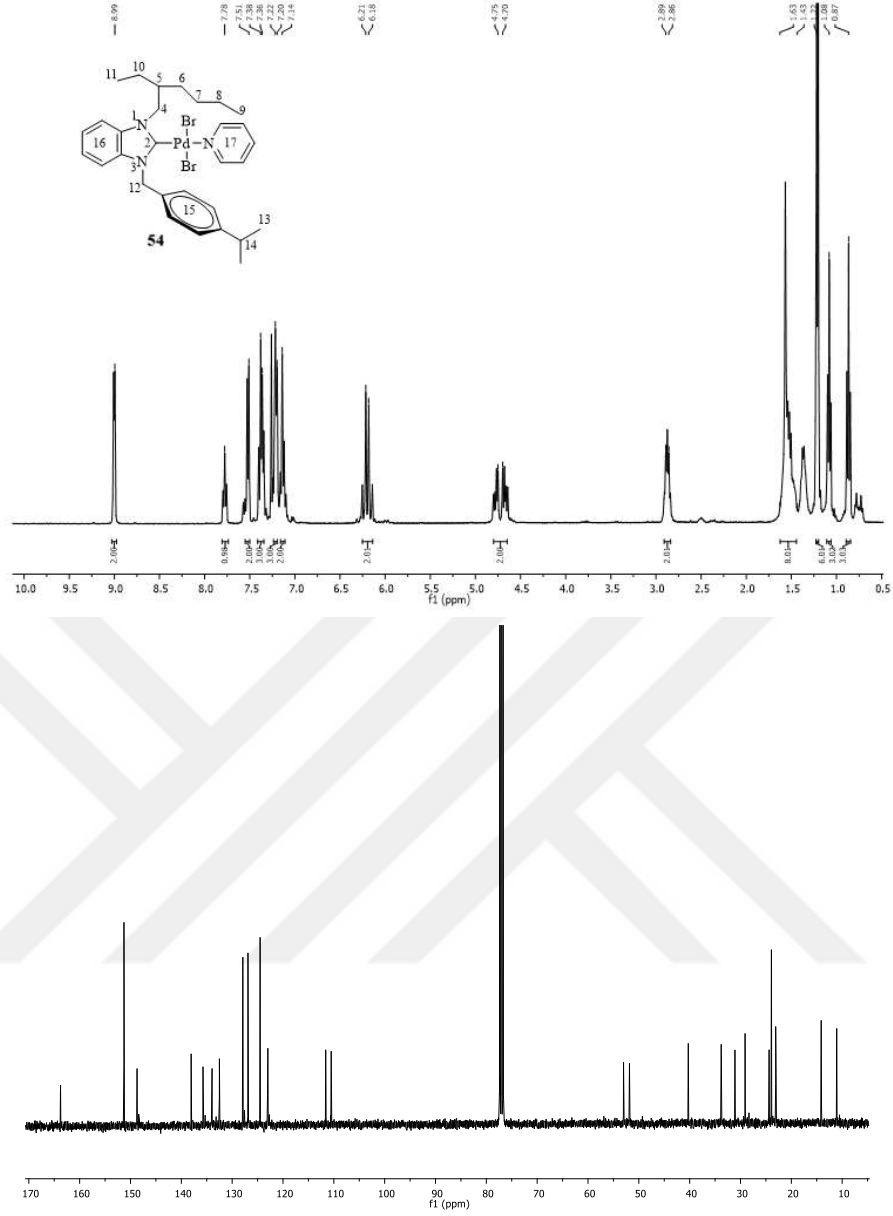
44 numaralı kompleksin yapısı ^1H ve ^{13}C NMR analizleri ile doğrulandı. ^1H NMR spektrumunda, benzimidazol iskeletine ait karakteristik sinyaller ile birlikte aromatik protonlara karşılık gelen pikler 7.12–7.77 ppm aralığında gözlemlendi. Benzil grubuna ait proton sinyalleri 6.18–6.21 ppm aralığında çift dublet (dd) şeklinde tespit edildi. Alifatik zincire ait proton sinyalleri ise 0.86–1.61 ppm aralığında multipler ve triplet formunda gözlemlendi. Ayrıca metil grubuna ait singlet sinyalinin 2.31 ppm’de ortaya çıktığı belirlendi. ^{13}C NMR spektrumunda karben karbonuna ait karakteristik sinyal 163.8 ppm’de gözlemlendi ve bu değer kompleks oluşumunu destekledi. Aromatik karbon sinyalleri 110.5–132.1 ppm aralığında, alifatik karbon sinyalleri ise 11.0–40.2 ppm aralığında tespit edildi. Elde edilen NMR sonuçları Şekil 4.1 ve Tablo 4.1’de gösterildi. Sentezlenen kompleksin beklenen yapısı ile uyumlu olduğu görüldü.

Tablo 4.1. 44 kompleksine ait ^1H ve ^{13}C NMR verileri

Konum	^1H NMR (δ ppm)	^{13}C NMR (δ ppm)	J (Hz)
2	-	163.8	-
4	4.70 ve 4.75 (dd, 2H)	51.8	8
5	2.88 (sept., 1H)	23.0	6
6,7,8,10	1.47-1.61 (m, 8H)	24.4, 29.1, 31.1, 40.2	-
9	0.86 (t, 3H)	14.1	8
11	1.08 (t, 3H)	11.0	8
12	6.18 ve 6.21 (dd, 2H)	53.0	12 ve 16
13	2.31 (s, 3H)	21.1	-
14,15	7.12-7.38 (m, 8H)	110.5, 111.5, 123.0, 132.1	-
16	7.45 (d, 2H), 7.77 (t, 1H), 9.01 (d, 2H)	124.5, 129.5, 151.3	-

4.1.2. Kompleks 54'ün ^1H ve ^{13}C NMR Analizi ve Yapısal Gösterimi

54 numaralı kompleksin yapısı ^1H ve ^{13}C NMR analizleri ile doğrulandı. ^1H NMR spektrumunda, benzimidazol iskeletine ait karakteristik sinyaller ile birlikte aromatik protonlara karşılık gelen pikler 7.14–7.78 ppm aralığında gözlemlendi. Benzil grubuna ait proton sinyalleri 6.18–6.21 ppm aralığında çift dublet (dd) şeklinde tespit edildi. İzopropil grubuna ait proton sinyalleri 1.22 ppm'de dublet (d, 6H) ve 2.89 ppm'de multiyet (m, 1H) olarak belirlendi. Alifatik zincire ait proton sinyalleri ise 0.87–1.63 ppm aralığında triplet ve multiyet formunda gözlemlendi. ^{13}C NMR spektrumunda karben karbonuna ait karakteristik sinyal 163.7 ppm'de gözlemlenmiş olup bu değer kompleks oluşumunu destekledi. Aromatik karbon sinyalleri 110.5–138.0 ppm aralığında, alifatik karbon sinyalleri ise 14.1–40.2 ppm aralığında tespit edildi. Elde edilen NMR sonuçları Şekil 4.2 ve Tablo 4.2'de gösterildi. Sentezlenen kompleksin beklenen yapısı ile uyumlu olduğu görüldü.



Şekil 4.2. 54 kompleksine ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ve yapısal gösterimi

Tablo 4.2. 54 kompleksine ait ^1H ve ^{13}C NMR verileri

Konum	^1H NMR (δ ppm)	^{13}C NMR (δ ppm)	J (Hz)
2	-	163.7	-
4	4.70 ve 4.75 (dd, 2H)	51.8	4 ve 8
5	2.86 (sept., 1H)	23.0	4.6
6,7,8,10	1.43-1.63 (m, 8H)	29.1, 31.0, 33.7, 40.2	-
9	0.87 (t, 3H)	14.1	8
11	1.08 (t, 3H)	11.0	8
12	6.18 ve 6.21 (dd, 2H)	53.0	12 ve 16
13	1.22 (d, 6H)	23.9	8
14	2.89 (m, 1H)	24.3	-
15	7.20 (d, 2H), 7.38 (d, 2H)	110.5, 111.6, 122.9, 123.0, 126.8, 127.9	-
16	7.14 (d, 2H), 7.22 (t, 1H), 7.36 (t, 1H)	132.5, 133.9, 135.7, 138.0	-
17	7.51 (d, 2H), 7.78 (t, 1H), 8.99 (d, 2H)	124.5, 148.7, 151.2	-

4.1.3. Kompleks 59'un ^1H ve ^{13}C NMR Analizi ve Yapısal Gösterimi

59 numaralı kompleksin yapısı ^1H ve ^{13}C NMR analizleri ile doğrulandı. ^1H NMR spektrumunda, benzimidazol iskeletine ait karakteristik sinyaller ile birlikte aromatik protonlara karşılık gelen pikler 7.09–7.76 ppm aralığında gözlemlendi. Benzil grubuna ait proton sinyalleri 6.14–6.19 ppm aralığında çift dublet (dd) şeklinde tespit edildi. Tersiyer-bütil grubuna ait proton sinyalinin 1.29 ppm’de singlet (s, 9H) olarak ortaya çıktığı belirlendi. Alifatik zincire ait proton sinyalleri ise 0.89–1.62 ppm aralığında triplet ve multipliket formunda gözlemlendi. ^{13}C NMR spektrumunda karben karbonuna ait karakteristik sinyal 163.7 ppm’de gözlemlenmiş olup bu değer kompleks oluşumunu destekledi. Aromatik karbon sinyalleri 110.4–137.8 ppm aralığında, alifatik karbon sinyalleri ise 14.1–39.9 ppm aralığında tespit edildi. Elde edilen NMR sonuçları Şekil 4.3 ve Tablo 4.3’te gösterildi. Sentezlenen kompleksin beklenen yapısı ile uyumlu olduğu görüldü.

29

Tablo 4.3. 59 kompleksine ait ^1H ve ^{13}C NMR verileri

Konum	^1H NMR (δ ppm)	^{13}C NMR (δ ppm)	J (Hz)
2	-	163.7	-
4	4.63 ve 4.72 (dd, 2H)	52.3	4 ve 8
5	3.01 (sept., 1H)	23.1	6.6
6,7,8,10	1.39-1.62 (m, 8H)	24.4, 29.1, 34.5, 39.9	-
9	0.89 (t, 3H)	14.1	8
11	1.08 (t, 3H)	11.1	8
12	6.14 ve 6.19 (dd, 2H)	53.6	16 ve 20
13	1.29 (s, 9H)	31.3	-
14	-	31.1	-
15	7.38 (m, 4H)	110.4, 111.6, 122.8, 125.7	-
16	7.09 (d, 2H), 7.21 (t, 1H), 7.36 (t, 1H)	127.7, 132.0, 134.1, 136.1, 137.8	-
17	7.52 (d, 2H), 7.76 (t, 1H), 9.02 (d, 2H)	124.5, 150.9, 152.5	-

4.1.4. Kompleks 521'in ^1H ve ^{13}C NMR Analizi ve Yapısal Gösterimi

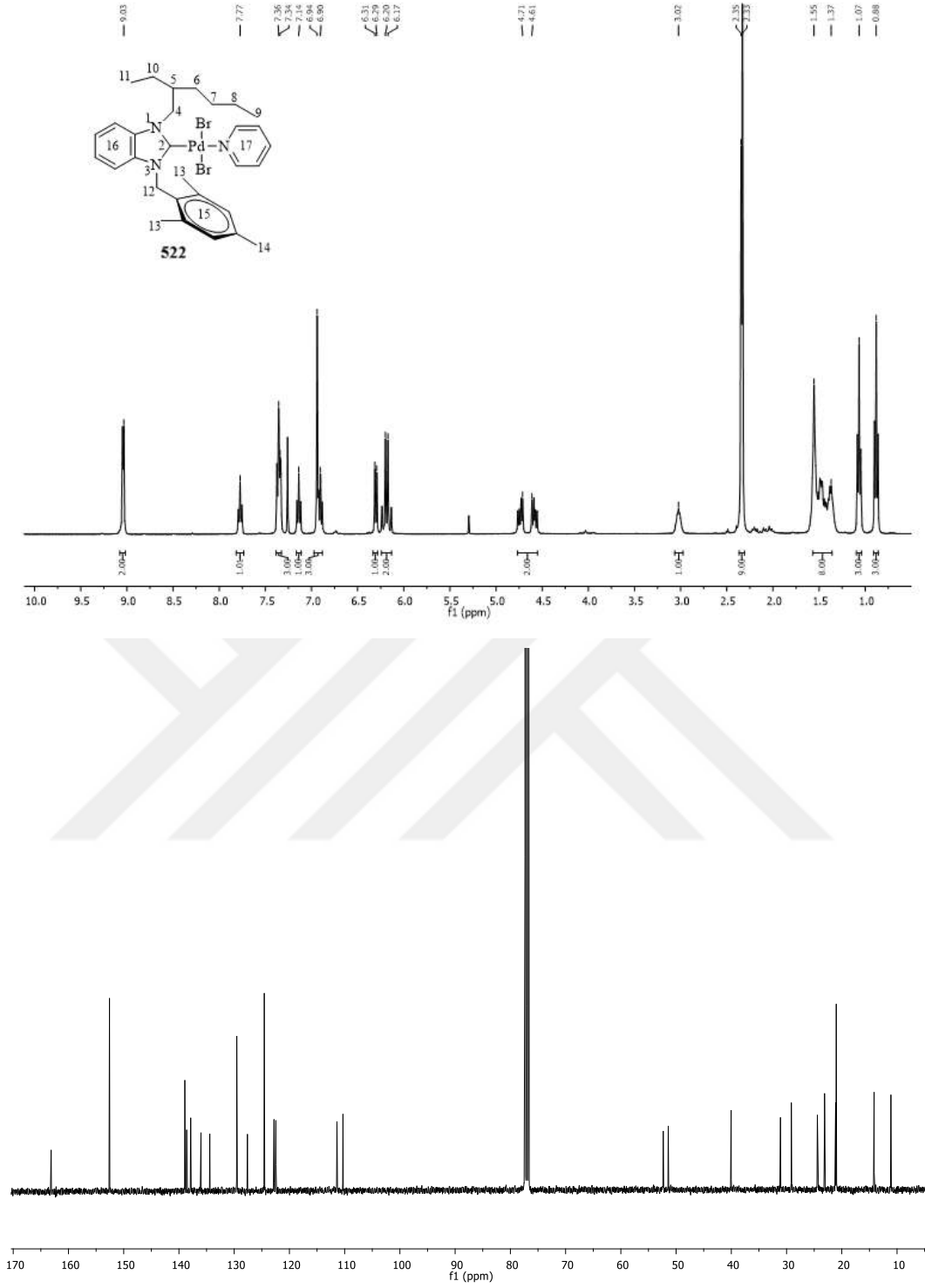
521 numaralı kompleksin yapısı ^1H ve ^{13}C NMR analizleri ile doğrulandı. ^1H NMR spektrumunda, benzimidazol iskeletine ait karakteristik sinyaller ile birlikte aromatik protonlara karşılık gelen pikler 7.06–7.75 ppm aralığında gözlemlendi. Benzil grubuna ait aromatik proton sinyalleri 7.06–7.33 ppm aralığında multipler ve dublet formunda tespit edildi. Benzil grubuna bağlı metilen protonlarına ait sinyaller ise 6.17–6.22 ppm aralığında çift dublet (dd) şeklinde gözlemlendi. Alifatik zincire ait proton sinyalleri 0.89–1.56 ppm aralığında triplet ve multipler formunda belirlendi. ^{13}C NMR spektrumunda karben karbonuna ait karakteristik sinyal 163.6 ppm'de gözlemlenmiş olup bu değer kompleks oluşumunu destekledi. Aromatik karbon sinyalleri 110.5–137.9 ppm aralığında, alifatik karbon sinyalleri ise 11.0–39.9 ppm aralığında tespit edildi. Elde edilen NMR sonuçları Şekil 4.4 ve Tablo 4.4'te gösterildi. Sentezlenen kompleksin beklenen yapısı ile uyumlu olduğu görüldü.

Tablo 4.4. 521 kompleksine ait ^1H ve ^{13}C NMR verileri

Konum	^1H NMR (δ ppm)	^{13}C NMR (δ ppm)	J (Hz)
2	-	163.6	-
4	4.64 ve 4.72 (dd, 2H)	53.8	4 ve 8
5	3.01 (sept., 1H)	23.1	6
6,7,8,10	1.36-1.56 (m, 8H)	24.4, 29.1, 31.1, 39.9	-
9	0.89 (t, 3H)	14.1	8
11	1.08 (t, 3H)	11.0	8
12	6.17 ve 6.22 (dd, 2H)	52.3	16 ve 20
13	7.06 (t, 2H), 7.21(t, 1H), 7.33 (d, 2H)	110.5, 111.4, 122.8, 128.7	-
14	7.37-7.37 (m, 4H)	134.0, 136.1, 135.0, 137.9	-
15	7.56 (d, 2H), 7.75 (t, 1H), 9.01 (d, 2H)	124.5, 128.0, 152.5	-

4.1.5. Kompleks 522'nin ^1H ve ^{13}C NMR Analizi ve Yapısal Gösterimi

522 numaralı kompleksin yapısı ^1H ve ^{13}C NMR analizleri ile doğrulandı. ^1H NMR spektrumunda, benzimidazol iskeletine ait karakteristik sinyaller ile birlikte aromatik protonlara karşılık gelen pikler 6.90–7.77 ppm aralığında gözlemlendi. Trimetilbenzil grubuna ait aromatik proton sinyali 6.94 ppm'de singlet (s, 2H) olarak tespit edildi. Metil gruplarına ait proton sinyalleri ise 2.33 ppm (s, 6H) ve 2.35 ppm (s, 3H) değerlerinde gözlemlendi. Benzil grubuna bağlı metilen protonları 6.20 ppm civarında çift dublet (dd) şeklinde belirlenirken, alifatik zincire ait proton sinyalleri 0.88–1.55 ppm aralığında triplet ve multipler formunda gözlemlendi. ^{13}C NMR spektrumunda karben karbonuna ait karakteristik sinyal 163.1 ppm'de gözlemlenmiş olup bu değer kompleks oluşumunu destekledi. Aromatik karbon sinyalleri 110.3–138.9 ppm aralığında, alifatik karbon sinyalleri ise 11.1–40.0 ppm aralığında tespit edildi. Elde edilen NMR sonuçları Şekil 4.5 ve Tablo 4.5'te gösterildi. Sentezlenen kompleksin beklenen yapısı ile uyumlu olduğu görüldü.



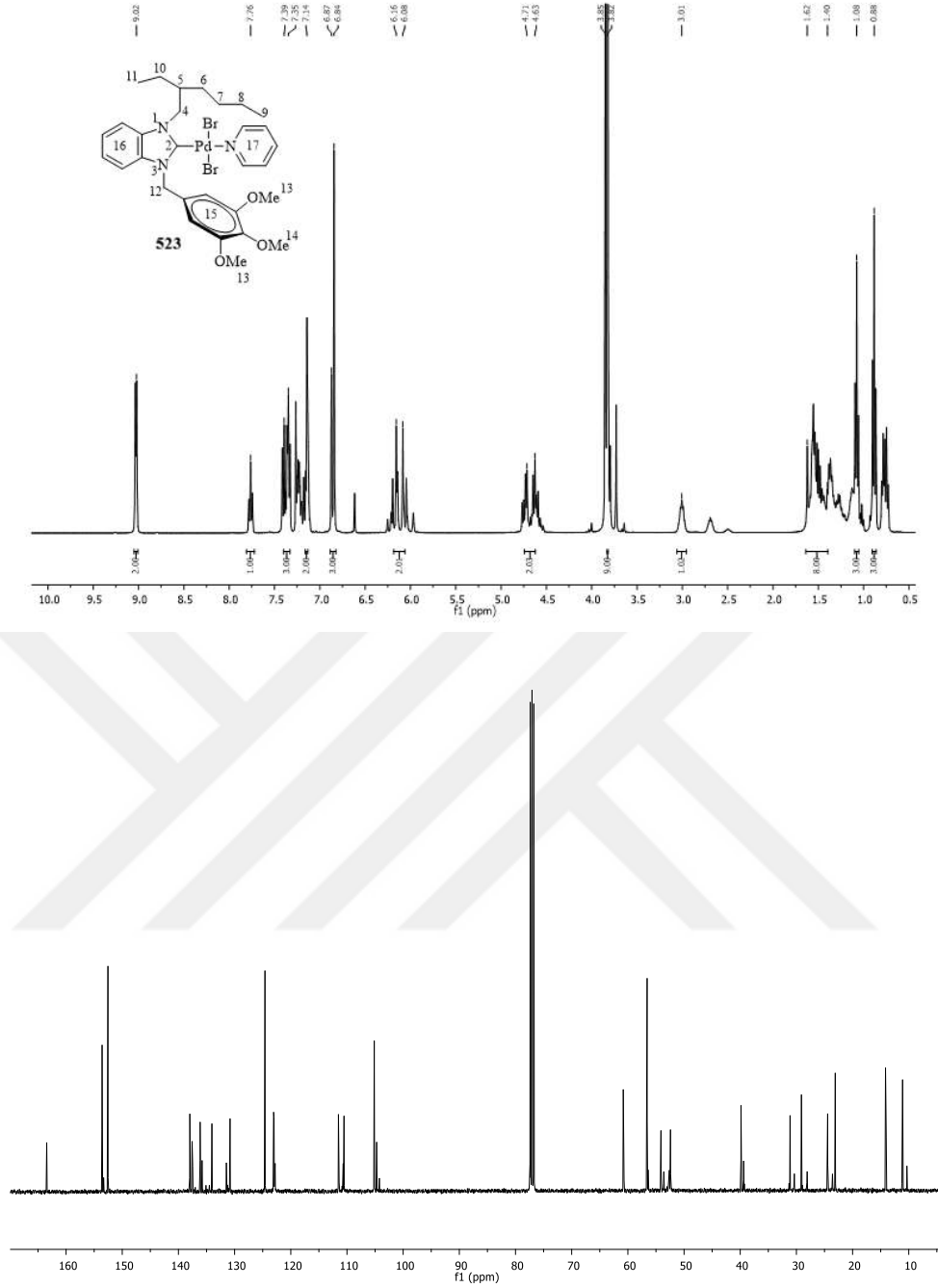
Şekil 4.5. 522 kompleksine ait ¹H ve ¹³C NMR spektrumları ve yapısal gösterimi

Tablo 4.5. 522 kompleksine ait ¹H ve ¹³C NMR verileri

Konum	¹ H NMR (δ ppm)	¹³ C NMR (δ ppm)	<i>J</i> (Hz)
2	-	163.1	-
4	4.61 ve 4.71 (dd, 2H)	51.4	4 ve 8
5	3.02 (sept., 1H)	23.1	7.3
6,7,8,10	1.37-1.55 (m, 8H)	24.4, 29.1, 31.1, 40.0	-
9	0.88 (t, 3H)	14.1	8
11	1.07 (t, 3H)	11.1	8
12	6.20 (dd, 2H)	52.3	12 ve 16
13	2.33 (s, 6H)	21.0	-
14	2.35 (s, 3H)	21.1	-
15	6.94 (s, 2H)	110.3, 111.3, 122.4, 122.7, 127.6	-
16	6.29 (d, 1H), 6.90 (t, 1H), 7.14 (t, 1H), 7.34 (d, 1H)	134.4, 136.0, 137.8, 138.6, 138.9	-
17	7.36 (d, 2H), 7.77 (t, 1H), 9.03 (d, 2H)	124.5, 129.5, 152.5	-

4.1.6. Kompleks 523'ün ¹H ve ¹³C NMR Analizi ve Yapısal Gösterimi

523 numaralı kompleksin yapısı ¹H ve ¹³C NMR analizleri ile doğrulandı. ¹H NMR spektrumunda, benzimidazol iskeletine ait karakteristik sinyaller ile birlikte aromatik protonlara karşılık gelen pikler 6.84–7.76 ppm aralığında gözlemlendi. Trimetoksibenzil grubuna ait metoksi proton sinyalleri 3.82 ppm’de singlet (s, 6H) ve 3.85 ppm’de singlet (s, 3H) olarak tespit edildi. Benzil grubuna bağlı metilen protonları 6.08–6.16 ppm aralığında çift dublet (dd) şeklinde belirlenirken, alifatik zincire ait proton sinyalleri 0.88–1.62 ppm aralığında triplet ve multipler formunda gözlemlendi. ¹³C NMR spektrumunda karben karbonuna ait karakteristik sinyal 163.4 ppm’de gözlemlenmiş olup bu değer kompleks oluşumunu destekledi. Aromatik karbon sinyalleri 105.1–153.5 ppm aralığında, alifatik karbon sinyalleri ise 11.1–39.8 ppm aralığında tespit edildi. Elde edilen NMR sonuçları Şekil 4.6 ve Tablo 4.6’da gösterildi. Sentezlenen kompleksin beklenen yapısı ile uyumlu olduğu görüldü.



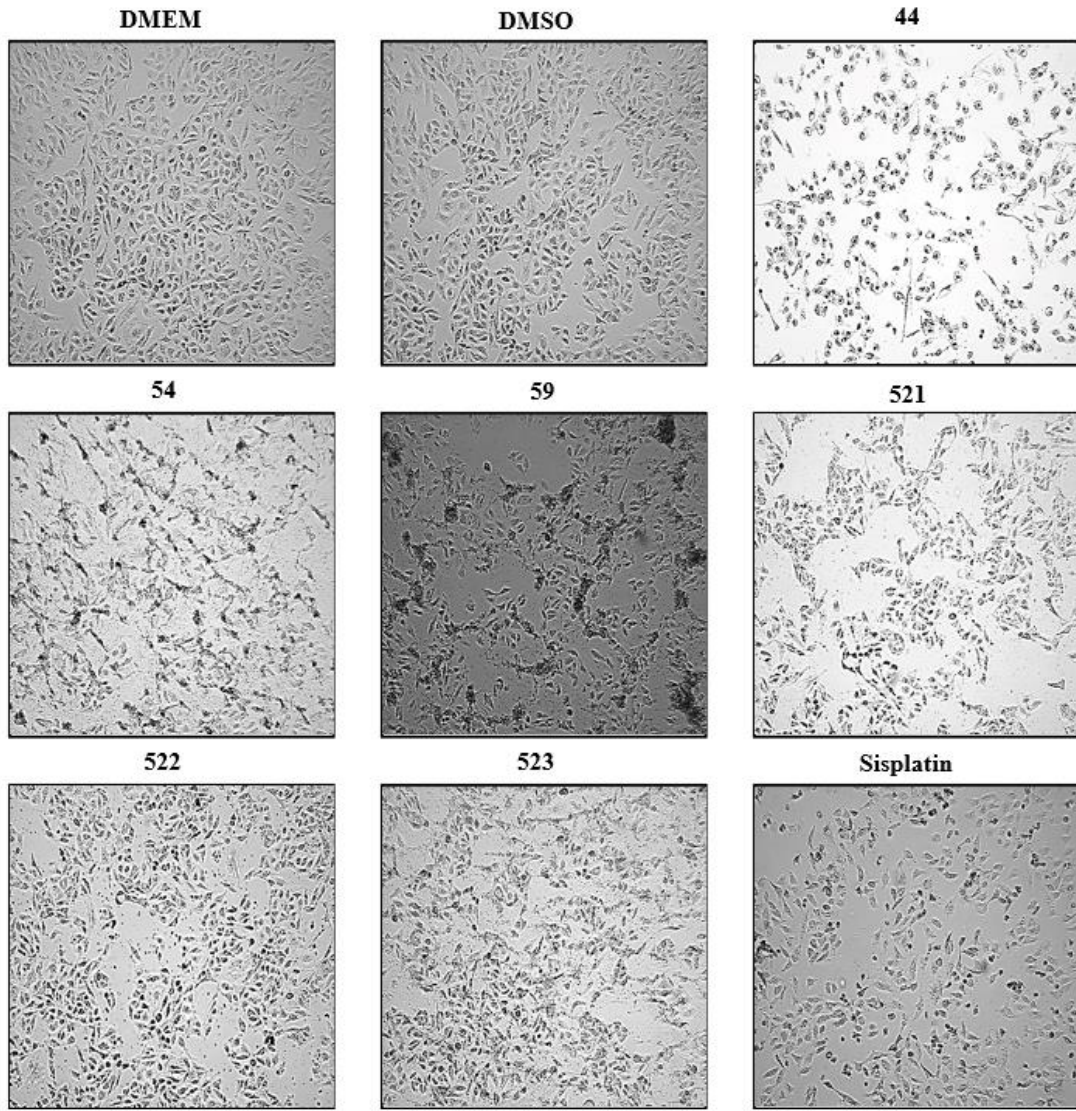
Şekil 4.6. 523 kompleksine ait ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları ve yapısal gösterimi

Tablo 4.6. 523 kompleksine ait ¹H ve ¹³C NMR verileri

Konum	¹ H NMR (δ ppm)	¹³ C NMR (δ ppm)	<i>J</i> (Hz)
2	-	163.4	-
4	4.63 ve 4.71 (dd, 2H)	52.4	8
5	3.01 (sept., 1H)	23.0	6.6
6,7,8,10	1.40-1.62 (m, 8H)	24.4, 29.1, 31.1, 39.8	-
9	0.88 (t, 3H)	14.1	8
11	1.08 (t, 3H)	11.1	8
12	6.08 ve 6.16 (dd, 2H)	54.1	16 ve 32
13	3.82 (s, 6H)	56.5	-
14	3.85 (s, 3H)	60.8	-
15	6.84 (s, 2H)	105.1, 110.5, 111.5, 123.0	-
16	6.87 (s, 1H), 7.14 (s, 2H), 7.35 (s, 1H)	130.8, 134.0, 136.1, 137.9	-
17	7.39 (d, 2H), 7.76 (t, 1H), 9.02 (d, 2H)	124.5, 152.5, 153.5	-

4.2. Hücre Kültüründe Morfolojik Değişimlerin Analizi

Çalışmada kullanılan A549 hücre hattının morfolojik görüntüleri, ilaç uygulamasını takiben 24 saat sonra JuLI™ Br hücre görüntüleme cihazı ile 1X büyümede gözlemlendi. Kontrol gruplarında (DMEM ve %1 DMSO içeren DMSO grubu) hücrelerin tipik epitel benzeri morfolojilerini koruduğu, homojen dağılım gösterdiği ve yüksek hücre yoğunluğuna sahip olduğu gözlemlendi. DMSO grubunun DMEM ile benzer morfolojik özellikler sergilediği belirlendi. İlaç uygulanan gruplarda ise hücre morfolojisinde belirgin değişiklikler gözlemlendi. Özellikle bazı gruplarda hücrelerde yuvarlaklaşma, hücreler arası bağlantıların zayıflaması ve yüzeyden ayrılma eğilimi dikkat çekti. Bu değişiklikler Şekil 4.7’de gösterildi.



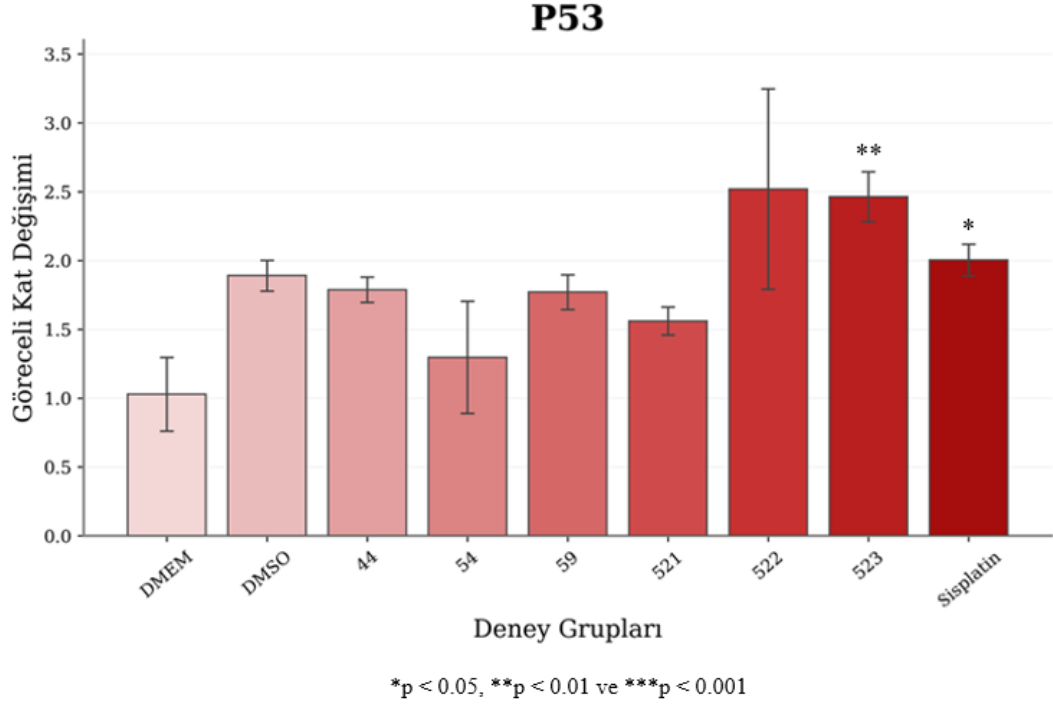
Şekil 4.7. İlaç uygulamasından 24 saat sonra A549 hücrelerinin morfolojik görüntüleri

4.3. RT-qPCR ile Gen İfadelenme Analizi

4.3.1. p53 Gen İfadelenmesi

P53 gen ekspresyon düzeyleri RT-qPCR analizi ile değerlendirildiğinde, veriler DMEM kontrol grubuna göre normalize edildi (DMEM=1) ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.8’de gösterildi. DMSO grubunda p53 ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 1,89 kat arttığı gözlemlendi. DMSO grubu referans alınarak yapılan karşılaştırmada, 44 grubunda p53 ekspresyonunun yaklaşık 0,94 kat, 54 grubunda 0,68 kat, 59 grubunda 0,94 kat ve 521 grubunda 0,83 kat düzeyinde olduğu belirlenmiş olup, bu değişimlerin DMSO’ya kıyasla anlamlı olmadığı görüldü. Buna karşılık 522 grubunda p53 ekspresyonunun yaklaşık 1,33 kat, 523 grubunda 1,30 kat ve sisplatin grubunda 1,06 kat arttığı saptandı. İstatistiksel analiz sonucunda, 523 grubundaki artışın anlamlı olduğu

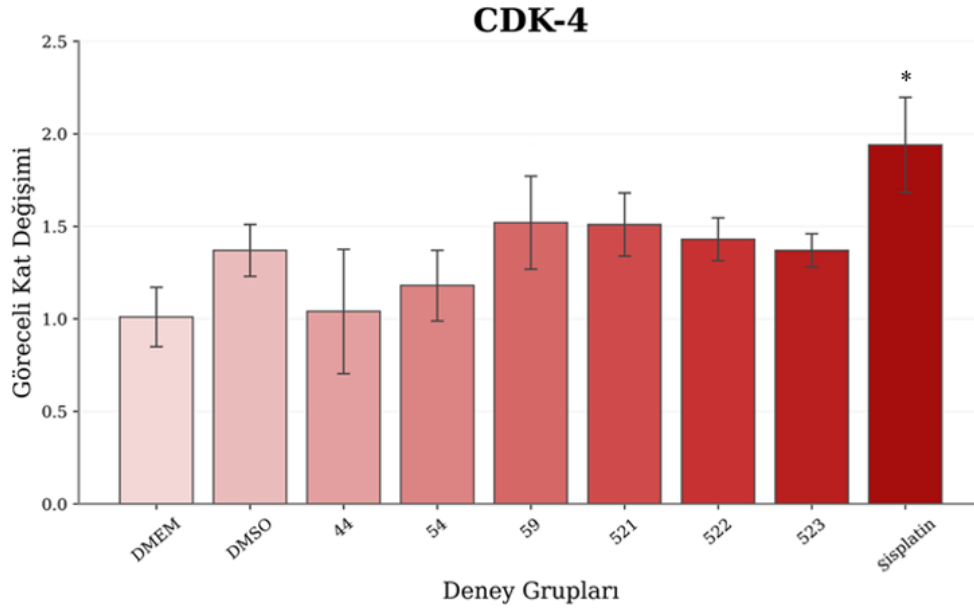
($p < 0.01$), sisplatin grubunda ise p53 ekspresyonunun DMSO grubuna kıyasla anlamlı düzeyde arttığı ($p < 0.05$) belirlendi. Genel olarak elde edilen bulgular, özellikle 522 ve 523 numaralı bileşiklerin p53 gen ekspresyonunu artırma eğiliminde olduğunu gösterdi.



Şekil 4.8. İlaç gruplarının p53 gen ifadenmesi üzerine etkileri

4.3.2. CDK-4 Gen İfadenmesi

CDK-4 gen ekspresyon düzeyleri RT-qPCR analizi ile değerlendirildiğinde, veriler DMEM kontrol grubuna göre normalize edildi (DMEM=1) ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.9’da gösterildi. DMSO grubunda CDK-4 ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 1,37 kat arttığı gözlemlendi. DMSO grubu referans alınarak yapılan karşılaştırmada, 44 grubunda CDK-4 ekspresyonunun yaklaşık 0,76 kat, 54 grubunda 0,86 kat, 59 grubunda 1,10 kat, 521 grubunda 1,10 kat, 522 grubunda 1,04 kat ve 523 grubunda 1,00 kat düzeyinde olduğu belirlenmiş olup, bu değişimlerin DMSO’ya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Buna karşılık sisplatin grubunda CDK-4 ekspresyonunun yaklaşık 1,42 kat arttığı gözlemlendi ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.05$).

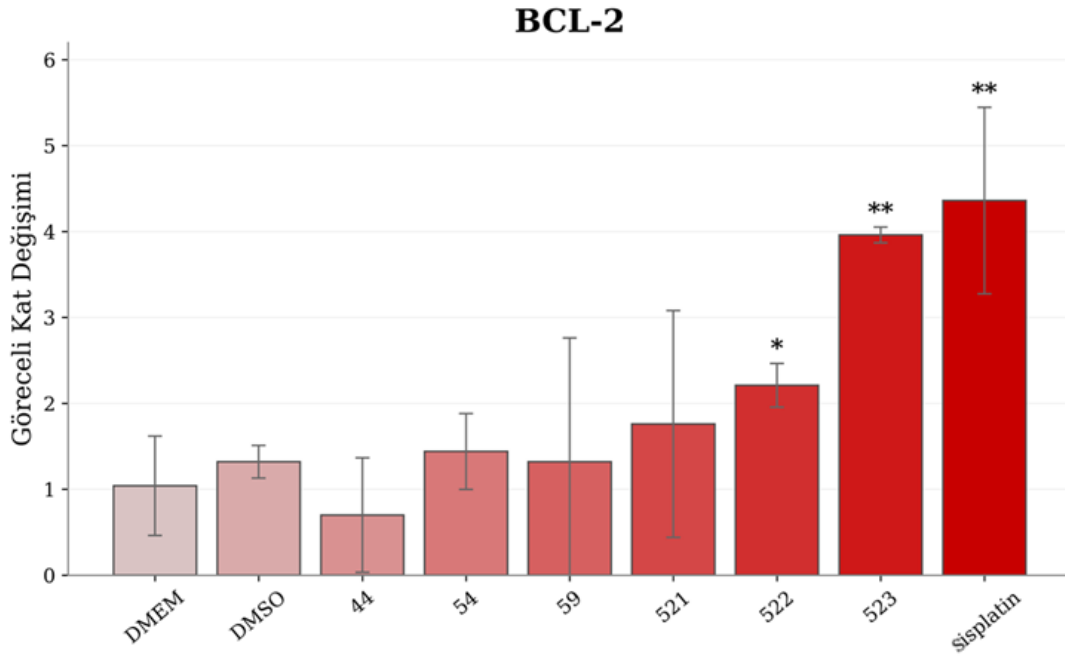


*p < 0.05, **p < 0.01 ve ***p < 0.001

Şekil 4.9. İlaç gruplarının CDK-4 gen ifadenmesi üzerine etkileri

4.3.3. BCL-2 Gen İfadenmesi

BCL-2 gen ekspresyon düzeyleri RT-qPCR analizi ile değerlendirildiğinde, veriler DMEM kontrol grubuna göre normalize edildi (DMEM=1) ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.10'da gösterildi. DMSO grubunda BCL-2 ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 1,32 kat arttığı gözlemlendi. DMSO grubu referans alınarak yapılan karşılaştırmada, 44 grubunda BCL-2 ekspresyonunun yaklaşık 0,53 kat azaldığı, 54 grubunda 1,09 kat, 59 grubunda 1,00 kat ve 521 grubunda 1,33 kat düzeyinde olduğu belirlenmiş olup, bu değişimlerin DMSO kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Buna karşılık 522 grubunda BCL-2 ekspresyonunun yaklaşık 1,67 kat, 523 grubunda 3,00 kat ve sisplatin grubunda 3,30 kat arttığı belirlendi. İstatistiksel analiz sonucunda, 522 grubundaki artışın anlamlı olduğu ($p < 0.05$), 523 ve sisplatin gruplarındaki artışın ise daha ileri düzeyde anlamlı olduğu ($p < 0.01$) saptandı.

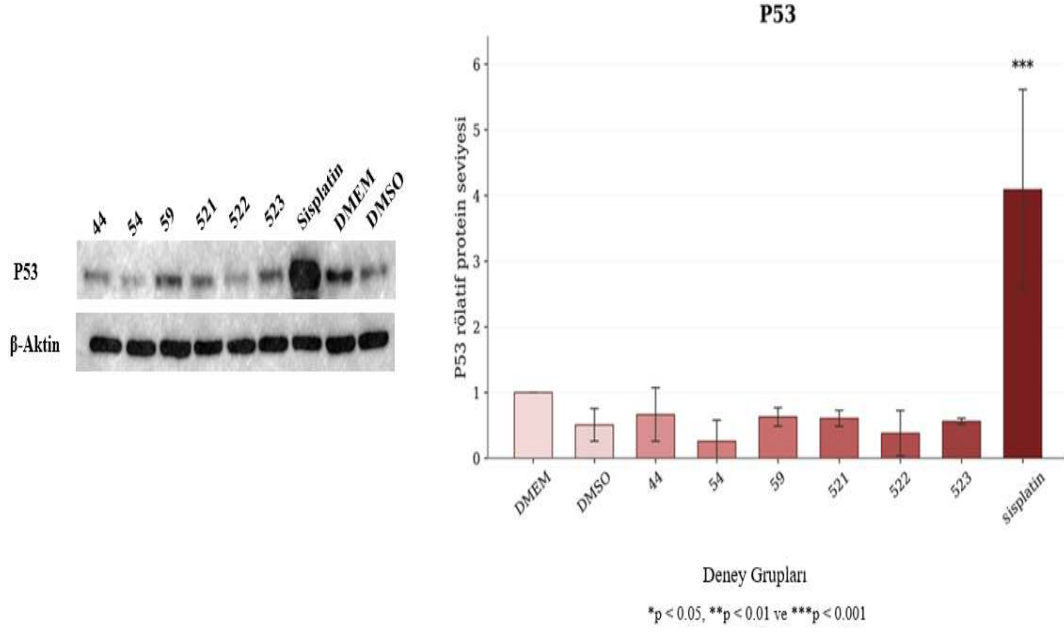


Şekil 4.10. İlaç gruplarının BCL-2 gen ifadenmesi üzerine etkileri

4.4. Western Blot ile Protein İfadenme Analizi

4.4.1. P53 Protein İfadenme Analizi

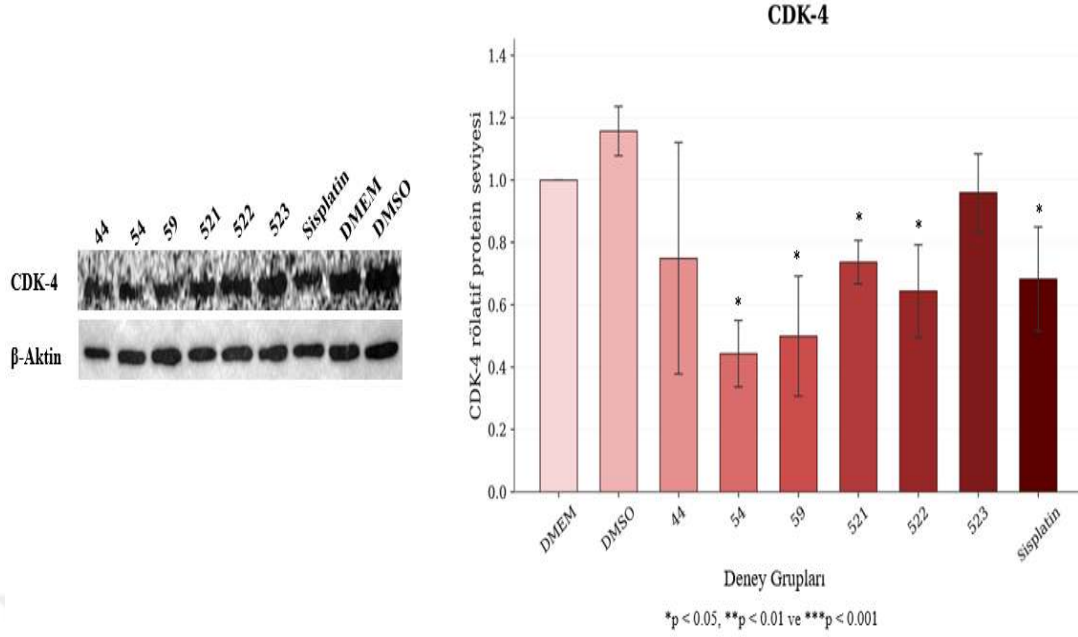
A549 hücre hattında gerçekleştirilen p53 Western blot analizi sonuçlarına göre, DMEM grubu 1 kabul edilerek normalize edildi ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.11’de gösterildi. DMSO grubu referans alınarak yapılan karşılaştırmada; 44 (~0,6 kat), 54 (~0,3 kat), 59 (~0,5 kat), 521 (~0,5 kat), 522 (~0,3 kat) ve 523 (~0,4–0,5 kat) gruplarında P53 protein seviyelerinde azalma gözlemlendi. Özellikle 54 ve 522 gruplarında bu azalmanın daha belirgin olduğu dikkat çekti. Buna karşın, cisplatin uygulanan grupta P53 protein düzeyinin DMSO grubuna göre yaklaşık 8 kat arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0.001$) belirlendi.



Şekil 4.11. İlaç gruplarının P53 protein miktarı üzerine etkileri

4.4.2. CDK-4 Protein İfadelenme Analizi

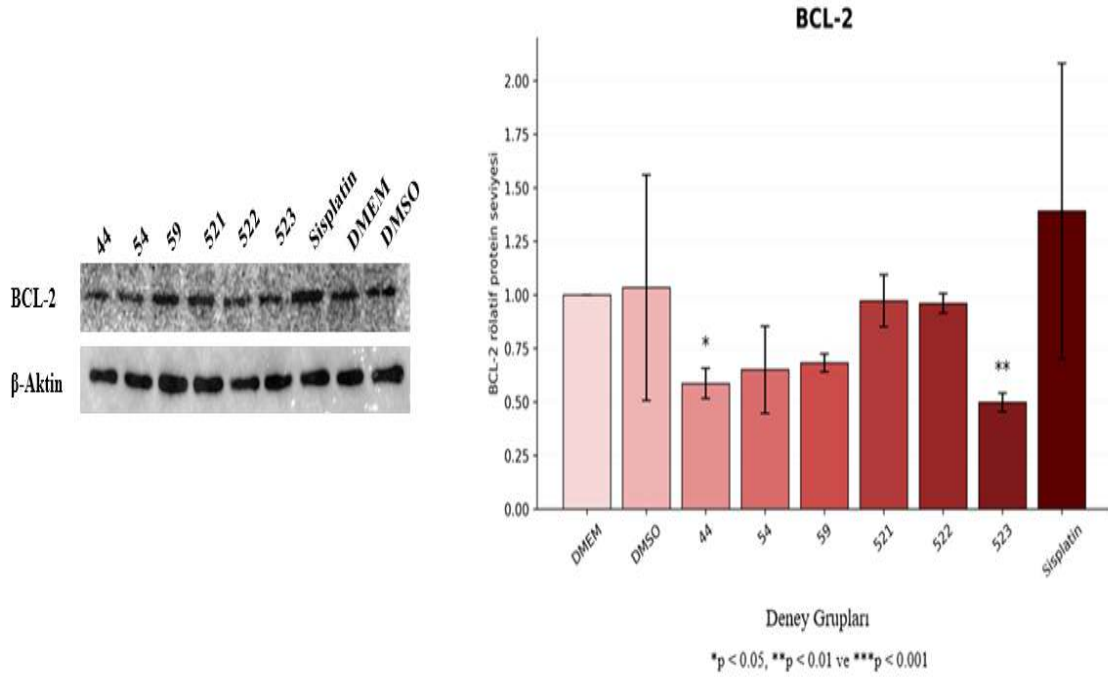
A549 hücre hattında gerçekleştirilen CDK-4 Western blot analizi sonuçlarına göre, kontrol grupları (DMEM ve DMSO) ile karşılaştırıldığında bazı tedavi gruplarında CDK-4 protein düzeylerinde azalma gözlemlendi. DMSO grubunun DMEM grubuna göre hafif bir artış gösterdiği belirlendi. 44 numaralı bileşik grubunda CDK-4 ekspresyonunda sınırlı bir azalma gözlenirken, 54 ve 59 numaralı bileşiklerin uygulandığı gruplarda CDK-4 protein düzeylerinde daha belirgin düşüşler tespit edildi. Bu gruplarda CDK-4 ekspresyonunun yaklaşık olarak kontrol grubuna kıyasla daha düşük seviyelere indiği ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0.05$). 521 ve 522 numaralı bileşiklerde de CDK-4 düzeylerinde azalma eğilimi devam etmekte olup, bu azalmanın kontrol grubuna göre anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Buna karşılık 523 numaralı bileşik grubunda CDK-4 ekspresyonunda belirgin bir değişiklik gözlenmedi. Siplatin uygulanan grupta ise CDK-4 protein düzeyinde orta düzeyde bir azalma tespit edildi ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0.05$). Elde edilen sonuçlar Şekil 4.12’de gösterildi.



Şekil 4.12. İlaç gruplarının CDK-4 protein miktarı üzerine etkileri

4.4.3. BCL-2 Protein İfadelenme Analizi

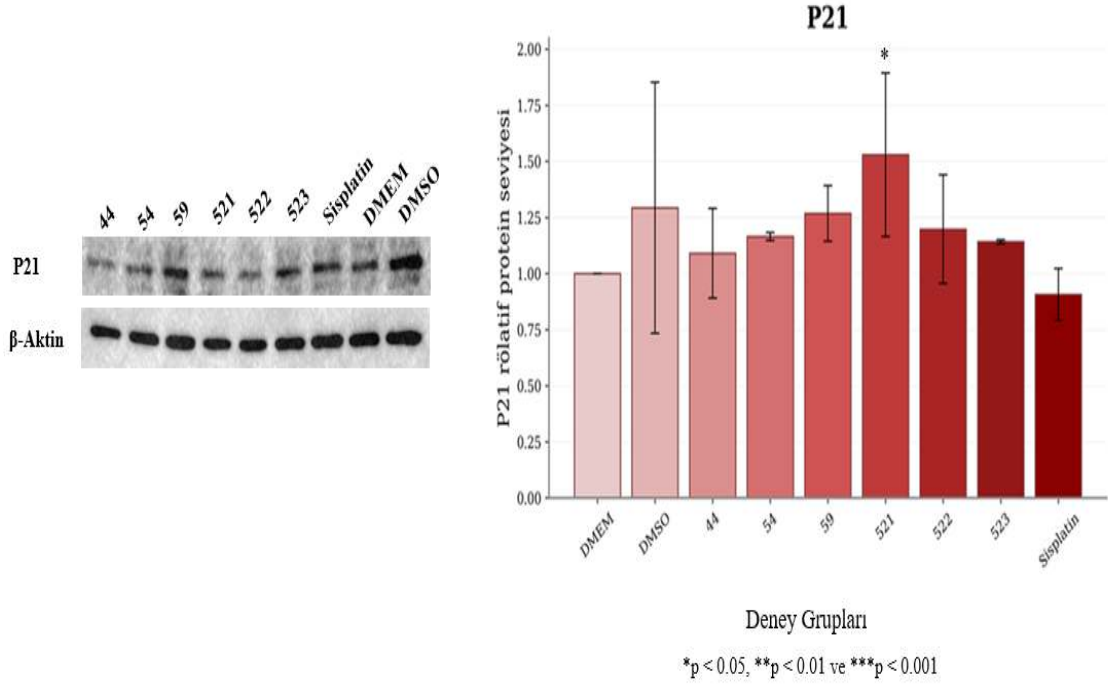
A549 hücre hattında gerçekleştirilen BCL-2 Western blot analizi sonuçlarına göre, DMEM grubu 1 kabul edilerek normalize edildi ve değerlendirmeler DMSO grubuna göre yapıldı. DMSO grubunda BCL-2 protein düzeyinin DMEM grubuna oldukça yakın olduğu görüldü. DMSO grubuna kıyasla 44 (~0,6 kat), 54 (~0,6–0,7 kat) ve 59 (~0,7 kat) gruplarında BCL-2 protein seviyelerinde azalma eğilimi gözlemlendi. Bu azalmanın özellikle 44 grubunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0.05$). 521 ve 522 gruplarında ise BCL-2 protein düzeyleri kontrol gruplarına yakın seyretti ve belirgin bir azalma gözlemlenmedi. Buna karşılık 523 grubunda BCL-2 ekspresyonunun yaklaşık 0,5 kat seviyesine düştüğü ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.01$). Sisplatin grubunda BCL-2 protein düzeyinde artış eğilimi gözlemlenmekle birlikte, yüksek standart sapma nedeniyle bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.13'te gösterildi.



Şekil 4.13. İlaç gruplarının BCL-2 protein miktarı üzerine etkileri

4.4.4. P21 Protein İfadelenme Analizi

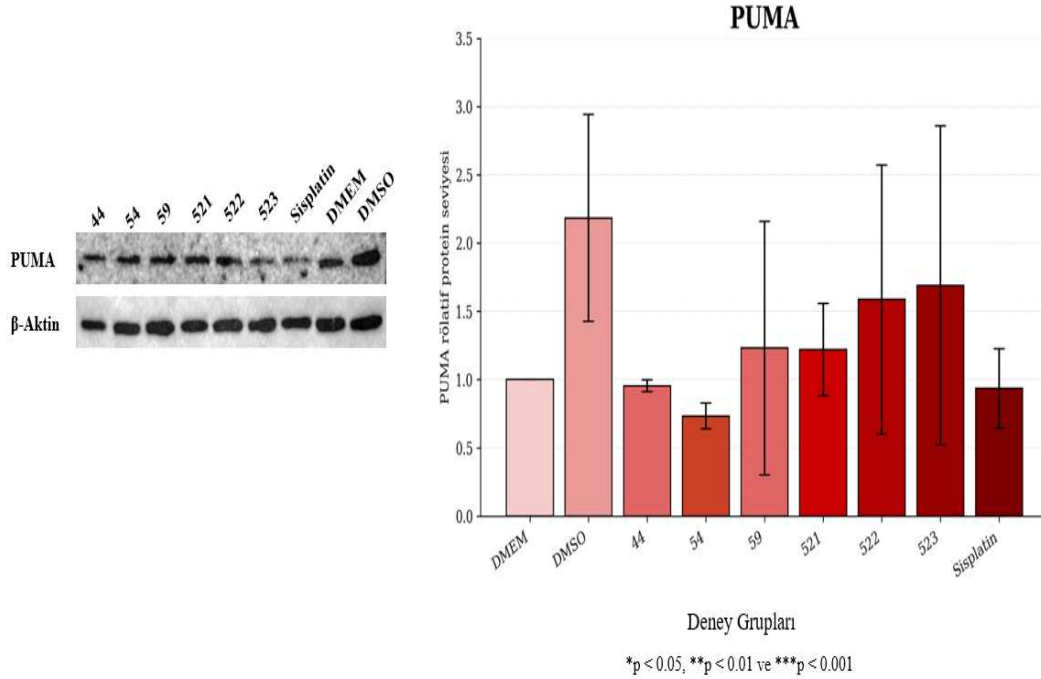
A549 hücre hattında gerçekleştirilen P21 Western blot analizi sonuçlarına göre, veriler DMEM grubu 1 kabul edilerek normalize edildi ve istatistiksel değerlendirmeler DMSO grubuna göre yapıldı. DMSO grubunda P21 protein düzeyinin DMEM'e kıyasla yaklaşık 1,3 kat arttığı görüldü. DMSO grubu referans alındığında 44, 54, 59, 522 ve 523 gruplarında P21 protein düzeyleri DMSO'ya yakın seyretmiş olup belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. 521 numaralı bileşik uygulanan grupta ise P21 protein düzeyinin DMEM'e göre yaklaşık 1,5 kat, DMSO'ya göre ise yaklaşık 1,2 kat arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Sisplatin grubunda P21 protein düzeyinin DMSO grubuna kıyasla azalma eğiliminde olduğu, ancak bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.14'te gösterildi.



Şekil 4.14. İlaç gruplarının P21 protein miktarı üzerine etkileri

4.4.5. PUMA Protein İfadelenme Analizi

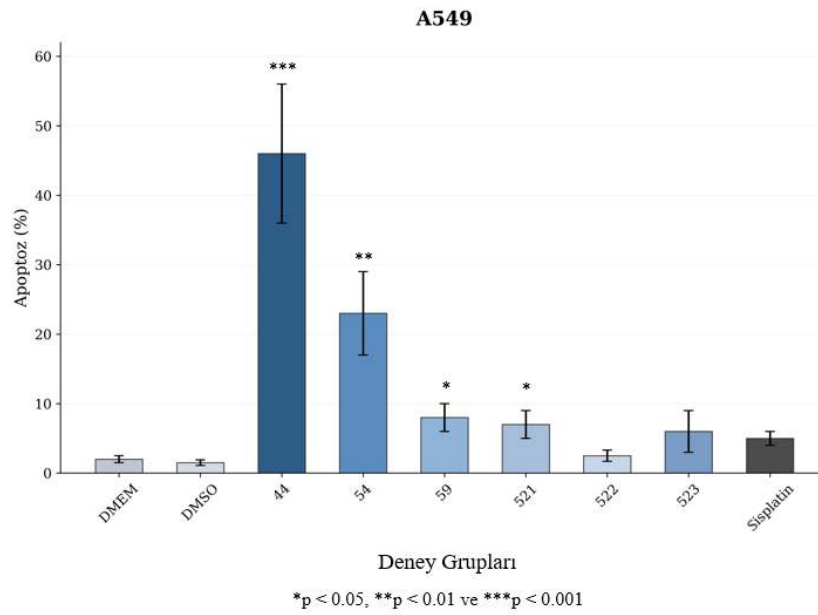
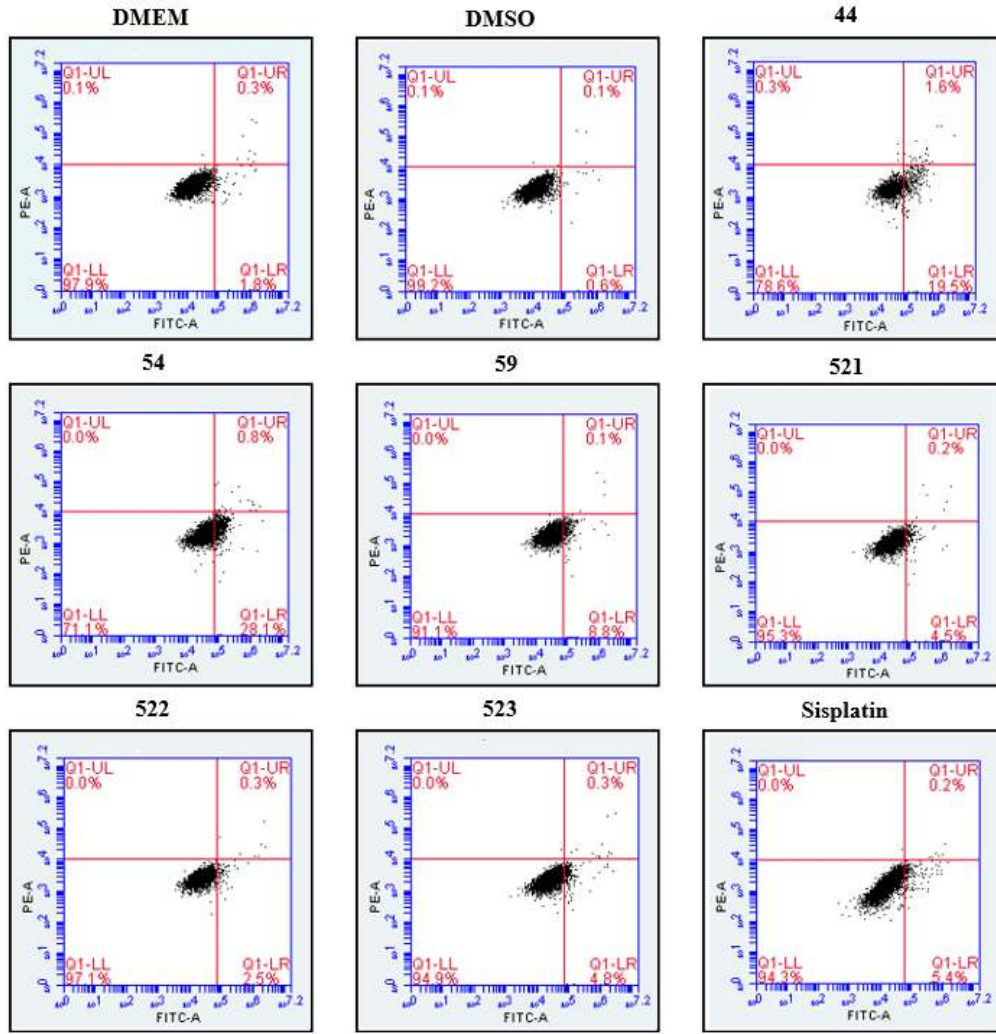
PUMA Western blot analizi sonuçlarına göre, veriler DMEM grubu 1 kabul edilerek normalize edildi ve istatistiksel değerlendirmeler DMSO grubuna göre yapıldı. DMSO grubuna kıyasla 44 (~0,9 kat) ve 54 (~0,7 kat) gruplarında PUMA protein düzeylerinde azalma eğilimi görüldü. 59 ve 521 gruplarında PUMA düzeylerinin DMSO'ya göre daha düşük olmakla birlikte DMEM'e yakın veya hafif artış gösterdiği gözlemlendi. Buna karşılık 522 (~1,5–1,6 kat) ve 523 (~1,6–1,7 kat) gruplarında PUMA protein düzeylerinin arttığı görülmekle birlikte, bu artışların yüksek varyasyon nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı olmadığı anlaşıldı. Sisplatin grubunda ise PUMA düzeyinin yaklaşık ~0,9 kat seviyesinde olduğu ve kontrol gruplarına yakın seyrettiği belirlendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.15'te gösterildi.



Şekil 4.15. İlaç gruplarının PUMA protein miktarı üzerine etkileri

4.5. Apoptoz Analizi

A549 hücre hattında gerçekleştirilen apoptoz analizi sonuçlarına göre, kontrol gruplarında (DMEM ve DMSO) apoptoz oranlarının düşük seviyelerde olduğu ve her iki grubun benzer dağılım gösterdiği belirlendi. Elde edilen sonuçlar  ekil 4.16'de gösterildi. DMSO grubuna kıyasla 44 numaralı bileşik grubunda apoptoz oranının belirgin şekilde arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olduğu görüldü (p<0.001). 54 numaralı bileşik grubunda da apoptoz oranında artış gözlendi ve bu artışın anlamlı olduğu belirlendi (p<0.01). 59 ve 521 gruplarında apoptoz oranında daha sınırlı artışlar tespit edilmiş olup bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p<0.05). Buna karşılıklı 522 grubunda apoptoz oranının kontrol gruplarına yakın olduğu ve belirgin bir değişiklik göstermediği gözlendi. 523 grubunda ise apoptoz oranında hafif bir artış eğilimi bulunmakla birlikte bu değişimin anlamlı olmadığı görüldü. Siplatin grubunda apoptoz oranında artış gözlendi ancak bu artışın yüksek varyasyon nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi.



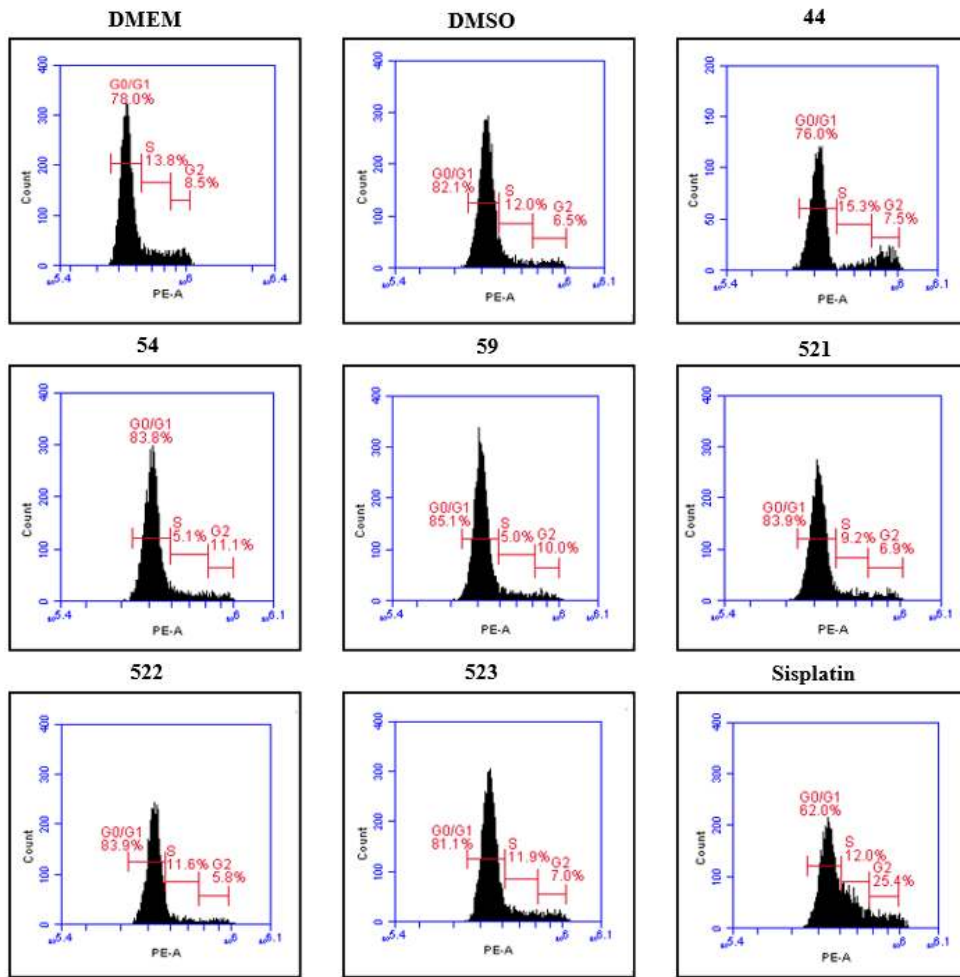
Şekil 4.16. A549 hücre hattında apoptoz analizinin sonuçları

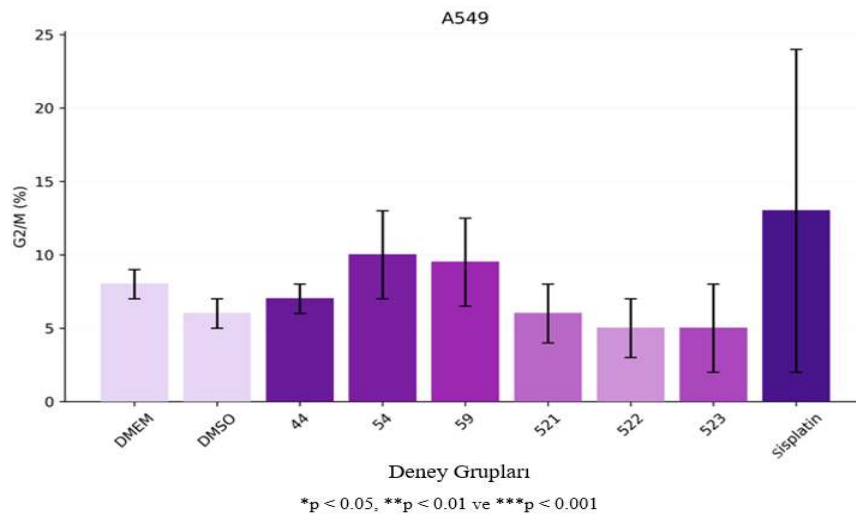
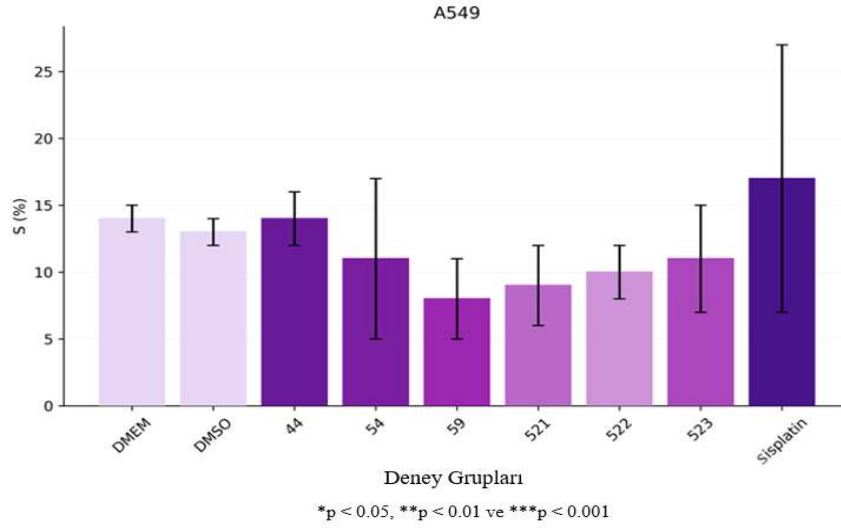
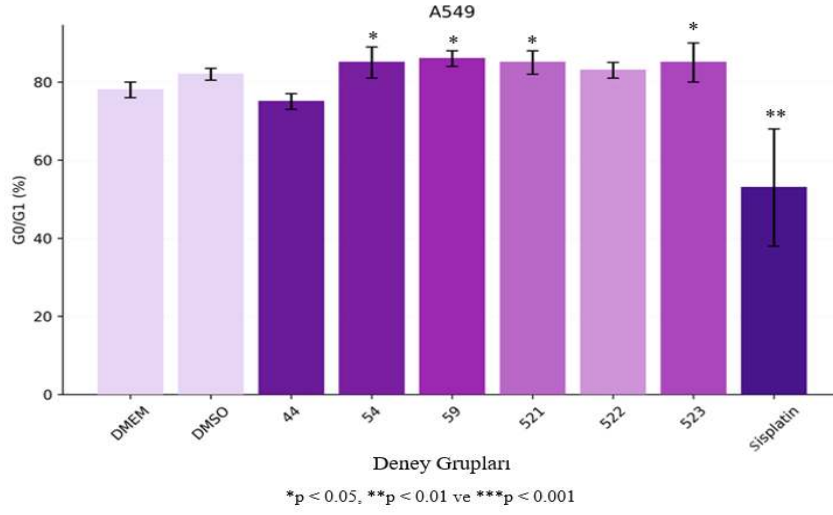
4.6. Hücre Döngüsü Analizi

A549 hücre hattında gerçekleştirilen hücre döngüsü analizi sonuçlarına göre, kontrol gruplarında (DMEM ve DMSO) hücrelerin büyük çoğunluğunun G0/G1 fazında bulunduğu ve her iki grubun benzer hücre döngüsü dağılımı sergilediği gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.17’de gösterildi. 44 numaralı bileşik grubunda hücre döngüsü dağılımının kontrol gruplarına benzer olduğu belirlendi. 54, 59, 521, 522 ve 523 numaralı bileşiklerin uygulandığı gruplarda G0/G1 fazındaki hücre oranında artış gözlenirken, bu artışın bazı gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.05$).

S fazı incelendiğinde, 54 ve 59 gruplarında hücre oranında azalma gözlenirken, diğer gruplarda kontrol gruplarına yakın değerler elde edildi.

G2/M fazı değerlendirildiğinde ise tedavi gruplarının çoğunda kontrol gruplarına benzer oranlar gözlenirken, sisplatin grubunda G0/G1 fazındaki hücre oranında azalma ile birlikte G2/M fazında hücre oranında artış tespit edildi.



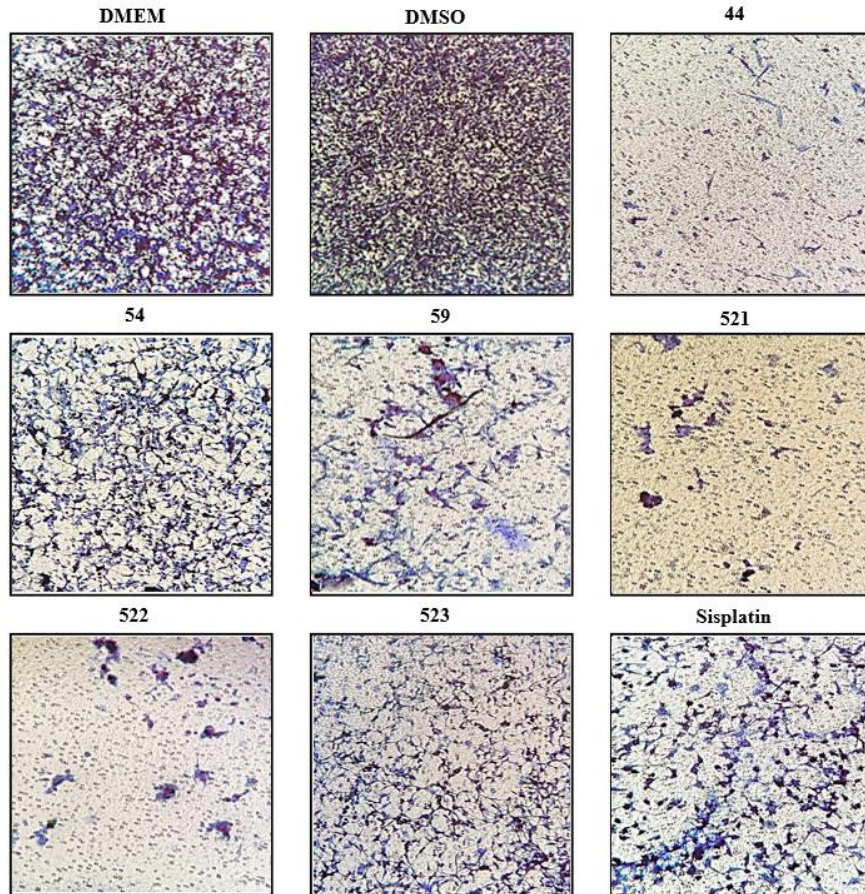


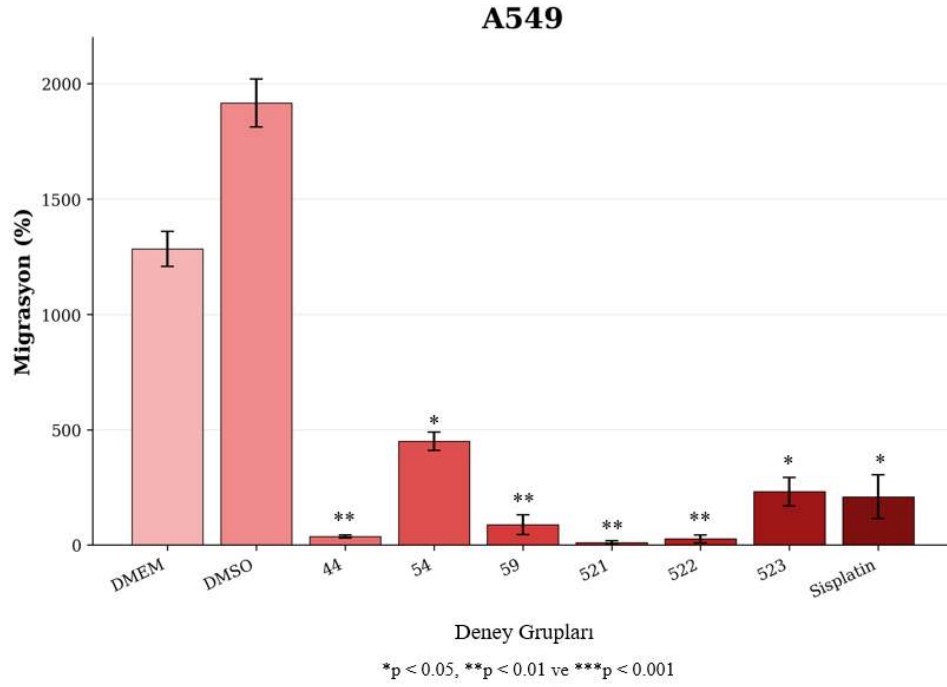
Şekil 4.17. A549 hücre hattında hücre döngüsü analizinin sonuçları

4.7. Migrasyon ve İnvazyon Deneyleri

4.7.1. Migrasyon

A549 hücre hattında gerçekleştirilen migrasyon analizi sonuçlarına göre, kontrol gruplarında (DMEM ve DMSO) hücre migrasyonunun yüksek düzeyde olduğu ve DMSO grubunda migrasyon oranının DMEM grubuna kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlendi. DMSO grubu referans alındığında, tüm tedavi gruplarında hücre migrasyonunda azalma meydana geldiği belirlendi. 44, 59, 521 ve 522 gruplarında migrasyonun belirgin şekilde baskılandığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0.01$). 54 grubunda migrasyon oranının diğer tedavi gruplarına kıyasla daha yüksek olmakla birlikte DMSO grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi ($p < 0.05$). 523 ve sisplatin gruplarında ise migrasyonun orta düzeyde baskılandığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0.05$). Elde edilen sonuçlar Şekil 4.18’de gösterildi.

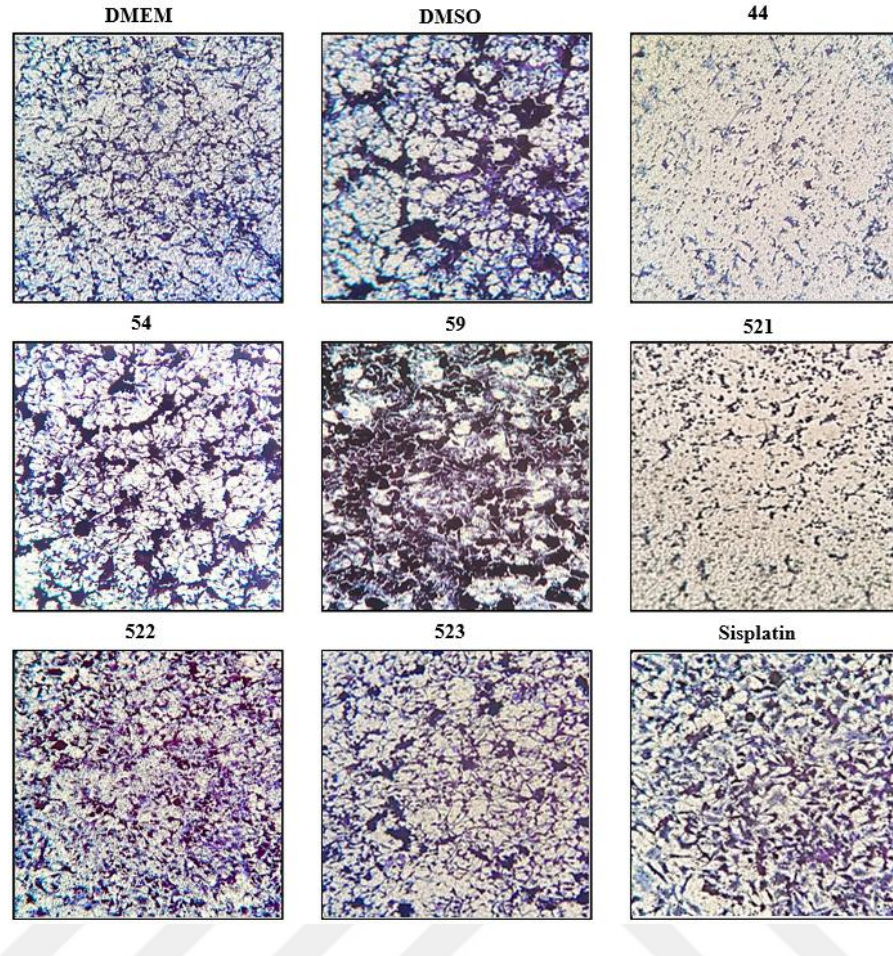




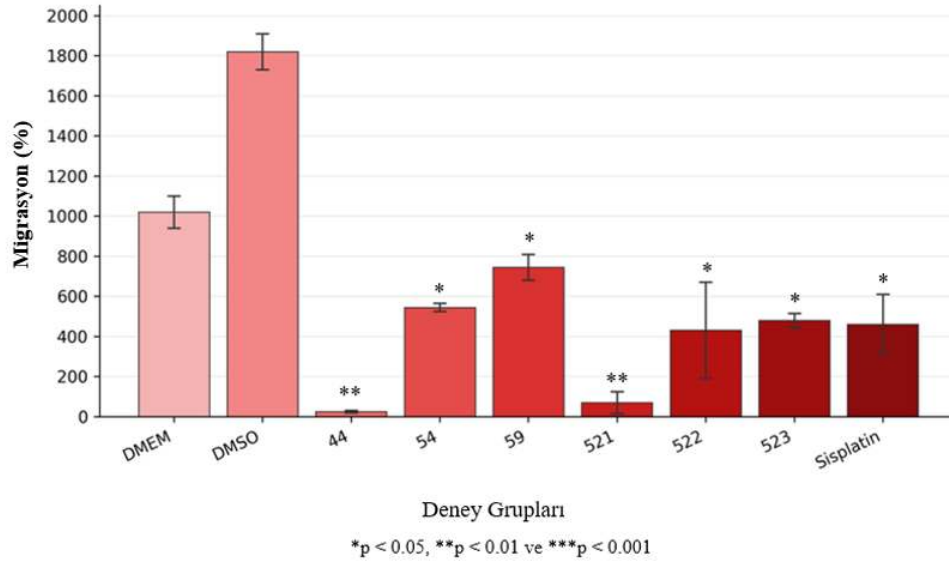
Şekil 4.18. A549 hücre hattında ilaç gruplarının ve kontrol gruplarının migrasyon üzerindeki etkileri ve mikroskopik görüntüleri

4.7.2. İnvazyon

A549 hücre hattında gerçekleştirilen invazyon analizi sonuçlarına göre, kontrol gruplarında (DMEM ve DMSO) hücre invazyonunun yüksek düzeyde olduğu ve özellikle DMSO grubunda invazyon oranının DMEM grubuna kıyasla daha fazla olduğu gözlemlendi. DMSO grubu referans alındığında, test edilen ilaç gruplarında hücre invazyonunda belirgin azalmalar meydana geldiği belirlendi. Özellikle 44, 59, 521 ve 522 gruplarında invazyonun ciddi düzeyde baskılandığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0.01$). 54 grubunda invazyon oranında azalma gözlenmekle birlikte bu azalmanın orta düzeyde olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu belirlendi ($p < 0.05$). 523 ve sisplatin gruplarında ise invazyonun kontrol gruplarına göre azaldığı, ancak baskılanmanın diğer bazı gruplara kıyasla daha sınırlı olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). Elde edilen sonuçlar Şekil 4.19’da gösterildi.



A549



Şekil 4.19. A549 hücre hattında ilaç gruplarının ve kontrol gruplarının invazyon üzerindeki etkileri ve mikroskopik görüntüleri

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada sentezlenen paladyum karben komplekslerinin A549 insan akciğer adenokarsinom hücre hattı üzerindeki biyolojik etkileri; morfolojik değişim, gen ekspresyonu, protein ekspresyonu, hücre döngüsü, apoptoz, migrasyon ve invazyon analizleri ile çok yönlü olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, paladyum karben komplekslerinin A549 hücrelerinde yalnızca tek bir biyolojik yanıt oluşturmadığını; aksine proliferasyon, hücre döngüsü kontrolü, apoptotik yanıt ve hücre hareketliliği gibi kanser biyolojisi açısından kritik süreçleri farklı düzeylerde etkilediğini göstermektedir. Tez bulgularında RT-qPCR ile p53, CDK-4 ve BCL-2 genleri; Western blot ile p53, CDK-4, BCL-2, p21 ve PUMA proteinleri; ayrıca apoptoz, hücre döngüsü, migrasyon ve invazyon analizleri değerlendirilmiştir.

Metal bazlı antikanser ajanların organik moleküllerden farklı olarak çok merkezli ve çok hedefli etki gösterebilmesi, bu bileşiklerin kanser tedavisinde alternatif ajanlar olarak araştırılmasının temel nedenlerinden biridir. Literatürde metal komplekslerinin DNA, proteinler, enzimler ve redoks dengesi gibi farklı biyolojik hedeflerle etkileşebildiği; bu etkileşimlerin hücre döngüsü durması, oksidatif stres ve apoptoz gibi sonuçlara yol açabildiği belirtilmektedir (77). Bu yönüyle çalışmamızda gözlenen p53/p21/PUMA eksenindeki değişimler, CDK-4 protein düzeyindeki azalma, apoptotik hücre popülasyonlarındaki artış ve migrasyon-invazyon kapasitesindeki baskılanma, Pd-NHC komplekslerinin çok yönlü antikanser etki gösterebileceğini desteklemektedir.

Çalışmanın ilk aşamasında sentezlenen komplekslerin ^1H NMR ve ^{13}C NMR verileri ile yapısal karakterizasyonları değerlendirilmiş ve özellikle karben karbonuna ait karakteristik sinyallerin gözlenmesi kompleks oluşumunu desteklemiştir. NHC ligandlarının güçlü σ -donör karakteri, metal merkez ile kararlı metal-karben bağlarının oluşmasına katkı sağlar ve bu özellik biyolojik ortamlarda kompleks stabilitesi açısından önemlidir. NHC-metal komplekslerinin antikanser ajanlar olarak tasarımında, NHC ligandının metal merkez stabilitesini artırması ve biyolojik hedeflerle etkileşim kapasitesini modifiye edebilmesi önemli bir avantaj olarak değerlendirilmektedir (7). Bu nedenle, çalışmada sentezlenen komplekslerin yapısal olarak doğrulanmış olması, daha sonra elde edilen biyolojik etkilerin doğrudan bu Pd-NHC yapılarına bağlanabilmesi açısından önemlidir.

Morfolojik analizlerde kontrol gruplarında A549 hücrelerinin epitel benzeri morfolojisini koruduğu, ilaç uygulanan bazı gruplarda ise hücre yoğunluğunda azalma, yuvarlaklaşma, yüzeyden ayrılma ve hücreler arası bağlantılarda zayıflama gibi değişiklikler gözlenmiştir. Bu morfolojik değişimler, kanser hücrelerinde sitotoksik etki ve apoptotik sürecin erken görsel göstergeleri olarak değerlendirilebilir. Apoptoz sırasında hücrelerin büzüşmesi, membran değişiklikleri ve adezyon kaybı sık görülen morfolojik olaylardır; bu nedenle çalışmada özellikle 44, 54, 59, 521 ve 522 gruplarında gözlenen morfolojik bozulmalar, akım sitometrisi ve protein ekspresyon bulguları ile birlikte değerlendirildiğinde biyolojik anlam taşımaktadır.

RT-qPCR analizinde p53 gen ekspresyonu bakımından en belirgin artışın 522 ve 523 numaralı bileşiklerde gözlenmesi, bu bileşiklerin hücresel stres yanıtını aktive edebileceğini düşündürmektedir. p53, DNA hasarı, hipoksi, onkogen aktivasyonu ve oksidatif stres gibi hücresel stresler karşısında aktive olan temel tümör baskılayıcı proteinlerden biridir. p53 aktivasyonu sonucunda hücre kaderi, hasarın derecesine ve hücresel bağlama bağlı olarak hücre döngüsü durması, DNA onarımı, hücresel yaşlanma veya apoptoz yönünde şekillenebilir (78). Bu nedenle 522 ve 523 gruplarında p53 mRNA düzeyinin artması, bu komplekslerin A549 hücrelerinde stres yanıtını tetiklediğini göstermesi bakımından önemlidir.

Ancak p53 gen ekspresyonu ile p53 protein ekspresyonu birlikte değerlendirildiğinde, tüm gruplarda doğrudan paralel bir artış olmadığı görülmektedir. RT-qPCR düzeyinde 522 ve 523 gruplarında p53 artışı belirgin iken, Western blot analizinde sispaltin grubunda p53 protein düzeyinin çok daha güçlü arttığı; bazı Pd-NHC gruplarında ise p53 protein seviyesinin kontrol gruplarına göre düşük ya da sınırlı düzeyde kaldığı görülmektedir. Bu durum, mRNA düzeyindeki artışın her zaman protein düzeyine aynı yönde yansımayaabileceğini göstermektedir. Gen ekspresyonu ile protein ekspresyonu arasındaki uyumsuzluk; translasyonel kontrol, protein yıkımı, post-translasyonel modifikasyonlar ve protein stabilitesi gibi süreçlerden kaynaklanabilir. p53 özelinde de protein düzeyi yalnızca transkripsiyonla değil, aynı zamanda MDM2 aracılı yıkım ve stres yanıtına bağlı stabilizasyon mekanizmalarıyla düzenlenmektedir (78). Bu nedenle tez bulgularında p53 mRNA ve protein sonuçlarının birebir aynı yönde olmaması, deneysel bir çelişki olarak değil, p53 regülasyonunun çok katmanlı yapısı ile açıklanabilecek biyolojik bir durum olarak yorumlanmalıdır.

CDK-4 sonuçları hücre döngüsü açısından değerlendirildiğinde, özellikle Western blot analizinde 44, 54, 59, 521 ve 522 gruplarında CDK-4 protein düzeyinin azalması

dikkat çekicidir. CDK-4, siklin D ile birlikte G1 fazından S fazına geçişte görev alan temel düzenleyicilerden biridir ve CDK4/6 aktivitesinin baskılanması hücre döngüsünde G1 fazında durmaya yol açabilir (79). Bu çalışmada bazı Pd-NHC komplekslerinde CDK-4 protein düzeyinin azalması, hücrelerin proliferatif kapasitesinin baskılandığını ve hücre döngüsü ilerleyişinin yavaşladığını düşündürmektedir.

p21 protein ekspresyonunun özellikle 521 grubunda anlamlı şekilde artması, bu bileşiğin p53/p21 aracılı hücre döngüsü kontrolünü daha belirgin etkileyebileceğini düşündürmektedir. p21, p53 tarafından düzenlenen temel hedeflerden biridir ve siklin-CDK komplekslerini inhibe ederek hücre döngüsünün ilerlemesini sınırlar. p53 aktivasyonunun önemli hedeflerinden biri olan p21'in siklin/CDK komplekslerini negatif yönde düzenleyerek hücre döngüsü durdurulmasına katkı sağladığı bildirilmektedir (80). Bu nedenle 521 grubunda p21 artışı ile birlikte hücre döngüsü analizinde G0/G1 fazındaki artışın gözlenmesi, bu bileşiğin proliferasyonu baskılayıcı etkisinin hücre döngüsü kontrol noktaları üzerinden gelişebileceğini desteklemektedir.

Hücre döngüsü analizinde 54, 59, 521, 522 ve 523 gruplarında G0/G1 fazındaki hücre oranında artış gözlenmesi, bu bileşiklerin hücre döngüsünü erken fazda yavaşlatabileceğini göstermektedir. Özellikle CDK-4 protein düzeyindeki azalma ve p21 artışı ile birlikte değerlendirildiğinde, 59, 521 ve 522 gruplarında hücre döngüsü baskılanmasının daha belirgin olduğu görülmektedir. CDK4/6 inhibisyonunun G1 fazında arrest oluşturduğu ve bu etkinin tümör hücre proliferasyonunu sınırladığı literatürde açıkça gösterilmiştir (81). Sisplatin grubunda ise G0/G1 oranının azalması ve S/G2-M fazlarında artış eğilimi görülmesi, sisplatinin DNA hasarı oluşturarak hücreleri farklı kontrol noktalarında durdurabilen klasik mekanizmasıyla uyumludur. Sisplatinin DNA adüktleri oluşturarak replikasyon ve transkripsiyonu bozduğu, bunun sonucunda hücre döngüsü durması ve apoptoz oluşturduğu bilinmektedir (77).

RT-qPCR analizinde özellikle 522, 523 ve sisplatin gruplarında BCL-2 gen ekspresyonunun arttığı, buna karşın Western blot analizinde 523 grubunda BCL-2 protein düzeyinin anlamlı şekilde azaldığı görülmektedir. BCL-2 ailesi mitokondriyal apoptozun temel düzenleyicilerindendir ve anti-apoptotik BCL-2 proteinlerinin azalması mitokondriyal dış membran geçirgenliğini artırarak apoptotik süreci kolaylaştırabilir (82). Bu nedenle 523 grubunda BCL-2 protein azalması, bu bileşiğin apoptotik yatkınlığı artırabileceğine işaret etmektedir ancak aynı grupta apoptoz oranındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmaması, bu etkinin tek başına hücre ölüm yanıtına dönüşmediğini veya 48 saatlik değerlendirme zamanında sınırlı kaldığını göstermektedir.

Çalışmamızda bazı gruplarda BCL-2 gen ekspresyonu ile protein düzeyleri arasında tam bir paralellik gözlenmemesi, apoptotik yanıtın yalnızca transkripsiyonel düzeyde düzenlenmediğini düşündürmektedir. Hücresel stres koşullarında BCL-2 ekspresyonunda meydana gelen değişimlerin, protein stabilitesi, translasyonel kontrol mekanizmaları ve pro-apoptotik proteinlerle olan etkileşimlerden etkilenebileceği bilinmektedir. Ayrıca BCL-2 ailesinin apoptotik yanıtı yalnızca tek bir genin ekspresyonuna bağlı değildir; BCL-2, BAX, BAK, PUMA, NOXA ve diğer BH3-only proteinler arasındaki denge hücre ölüm kararında belirleyicidir (83).

PUMA protein düzeyinde özellikle 522 ve 523 gruplarında artış eğilimi gözlenmesi, p53 aracılı mitokondriyal apoptotik yolun bu gruplarda aktive olabileceğini düşündürmektedir. PUMA, p53 tarafından düzenlenen BH3-only pro-apoptotik proteinlerden biridir ve anti-apoptotik BCL-2 ailesi üyelerini baskılayarak BAX/BAK aracılı mitokondriyal dış membran geçirgenliğini artırabilir (83). Ancak çalışmada PUMA artışının yüksek varyasyon nedeniyle istatistiksel anlamlılığa ulaşmaması, bu yorumun dikkatli yapılmasını gerektirir. Bu nedenle 522 ve 523 için “PUMA aracılı apoptoz kesin olarak aktive olmuştur” demek yerine, “PUMA artış eğilimi bu bileşiklerde mitokondriyal apoptotik yanıtın katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir” ifadesi daha bilimsel ve güvenli olacaktır.

Apoptoz analizinde en belirgin etkinin 44 numaralı bileşikte görülmesi, bu bileşiğin A549 hücrelerinde güçlü bir apoptotik yanıt oluşturduğunu göstermektedir. 44 grubunda apoptoz oranının kontrol gruplarına kıyasla belirgin ve ileri derecede anlamlı artması, bu bileşiğin hücre ölümünü doğrudan tetikleyen bir etki profiline sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgu, morfolojik değişimler ve CDK-4 protein azalması ile birlikte değerlendirildiğinde 44 bileşiğinin sitotoksik/apoptotik etkisinin güçlü olduğunu desteklemektedir. Literatürde Pd komplekslerinin A549 gibi kanser hücrelerinde apoptozu ROS artışı, mitokondriyal stres, DNA hasarı veya hücre döngüsü kontrol noktalarının etkilenmesi yoluyla tetikleyebildiği bildirilmiştir (84).

54 grubunda apoptoz oranının anlamlı şekilde artması, bu bileşiğin de apoptotik süreç üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Buna karşılık 59 ve 521 gruplarında apoptoz artışı daha sınırlı olmakla birlikte anlamlı bulunmuştur. 522 ve 523 gruplarında ise p53 ve/veya PUMA ekseninde artış eğilimleri görülmesine rağmen apoptoz oranlarının anlamlı düzeyde artmaması, bu bileşiklerin etkisinin doğrudan hücre ölümünden çok hücre döngüsü baskılanması veya hareketlilik azalması üzerinden gerçekleşebileceğini düşündürmektedir. p53 aktivasyonunun her zaman apoptoz ile

sonuçlanmadığı; hücre tipi, hasar düzeyi, maruz kalma süresi ve eşlik eden moleküler sinyallere göre hücre döngüsü durması veya onarım yanıtı ile de sonuçlanabileceği bilinmektedir (78). Bu nedenle 522 ve 523 gruplarında p53 artışı ile apoptoz arasında tam paralellik görülmemesi biyolojik olarak kabul edilebilir bir durumdur.

Sisplatin grubunda p53 protein düzeyinin güçlü şekilde artmasına rağmen apoptoz oranındaki artışın sınırlı kalması da dikkat çekicidir. Sisplatin DNA hasarı oluşturarak p53 aktivasyonuna yol açabilen klasik bir metal bazlı antikanser ajandır; ancak apoptotik yanıtın büyüklüğü doz, süre, hücre hattının genetik yapısı ve DNA onarım kapasitesine bağlı olarak değişebilir (77). Bu nedenle çalışmada sisplatinin güçlü p53 protein artışı oluşturmaması, pozitif kontrol olarak beklenen moleküler yanıtı desteklerken; apoptoz oranının çok yüksek olmaması, deney koşullarındaki süre ve dozla ilişkili olabilir.

Migrasyon analizinde özellikle 44, 59, 521 ve 522 gruplarında hücre göçünün belirgin şekilde baskılanması, bu komplekslerin metastatik fenotip üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Kanser progresyonunda hücre migrasyonu ve invazyonu, metastaz gelişiminin temel basamakları arasında yer alır. Metal komplekslerinin yalnızca sitotoksikite değil, aynı zamanda hücre hareketliliği, adezyon ve invazyon kapasitesi üzerinde de etkili olabildiği bildirilmektedir (85). Bu bağlamda çalışmada 44 ve 521 gruplarında hem migrasyon hem de invazyonun baskılanması, bu bileşiklerin anti-metastatik potansiyel açısından daha dikkat çekici olduğunu göstermektedir.

İnvazyon analizinde 44 ve 521 kodlu bileşiklerin membranı geçen hücre sayısını belirgin şekilde azaltması, bu iki kompleksin ekstrasellüler matriks benzeri bariyerden geçiş kapasitesini baskılayabildiğini göstermektedir. İnvazyon, migrasyondan farklı olarak hücrelerin matriks bariyerini aşma kapasitesini de yansıttığı için, 44 ve 521 gruplarında gözlenen azalma yalnızca hücre hareketliliğinin değil, aynı zamanda invaziv fenotipin de baskılandığını düşündürmektedir. Literatürde bazı metal komplekslerinin tümör hücrelerinde migrasyon ve invazyonu azaltabildiği ve bunun antimetastatik etki açısından önemli olduğu bildirilmektedir (7). Bu nedenle çalışmanın migrasyon ve invazyon bulguları, Pd-NHC komplekslerinin yalnızca hücre canlılığı/apoptoz ekseninde değil, tümör yayılımı ile ilişkili fonksiyonel süreçlerde de etkili olabileceğini desteklemektedir.

Bileşikler ayrı ayrı değerlendirildiğinde 44 numaralı kompleksin en güçlü apoptotik yanıtı oluşturduğu ve aynı zamanda migrasyon ile invazyonu belirgin biçimde baskıladığı görülmektedir. Bu durum, 44 bileşiğinin hem sitotoksik/apoptotik hem de

anti-migratuvar özellikler taşıyan güçlü bir aday olduğunu düşündürmektedir. 521 numaralı bileşik ise p21 protein artışı, G0/G1 fazında artış ve migrasyon-invazyon baskılanması ile daha çok hücre döngüsü ve hareketlilik üzerinde etkili bir profil göstermektedir. 522 ve 523 numaralı bileşiklerde p53 gen ekspresyonu ve PUMA protein düzeyinde artış eğilimi görülmesine rağmen apoptoz yanıtının sınırlı kalması, bu bileşiklerin daha geç zaman noktalarında veya farklı dozlarda daha belirgin apoptotik etki gösterebileceğini düşündürmektedir. p53 aktivasyonunun oluşturduğu hücresel yanıt, hücresel stresin düzeyine ve hücrenin moleküler özelliklerine bağlı olarak değişebilmekte; bazı durumlarda apoptotik hücre ölümünü tetiklerken, bazı durumlarda ise hücre döngüsünün baskılanması ile sonuçlanabilmektedir (78).

Bu çalışma sonuçları literatürde bildirilen Pd ve NHC temelli metal komplekslerinin antikanser potansiyeli ile genel olarak uyumludur. Palladyum NHC komplekslerinin biyolojik tiyoller varlığında stabil kalabildiği ve kanser hücrelerinde güçlü sitotoksik etki oluşturabildiği bildirilmiştir (65). Ayrıca metal-NHC komplekslerinin altın, platin ve paladyum merkezleriyle tasarlanarak güçlü sitotoksiste, antitümör aktivite ve belirli biyolojik hedeflerle etkileşim gösterebildiği rapor edilmiştir (7). Bu çalışmalar sentezlenen Pd-NHC komplekslerinin A549 hücrelerinde apoptoz, hücre döngüsü ve hücre hareketliliği üzerinde oluşturduğu etkilerle paralellik göstermektedir.

Bununla birlikte, çalışmanın bulguları her bileşiğin aynı mekanizma üzerinden etki göstermediğini ortaya koymaktadır. 44 bileşiği güçlü apoptoz ve migrasyon-invazyon baskılanması ile öne çıkarken, 521 bileşiği p21 artışı ve hücre döngüsü etkisiyle dikkat çekmektedir. 522 ve 523 bileşikler p53/PUMA ekseninde moleküler yanıt oluşturmalarına rağmen fonksiyonel apoptoz düzeyinde daha sınırlı etki göstermiştir. Bu farklılıklar, NHC ligand yapısındaki küçük değişikliklerin metal komplekslerinin hücresel hedeflerini, hücre içine alımını, stabilitesini ve biyolojik yanıtlarını değiştirebileceğini düşündürmektedir. NHC-metal komplekslerinde ligand yapısının biyolojik aktiviteyi belirgin şekilde etkileyebildiği ve metal merkez-ligand kombinasyonunun antikanser etkinlik açısından kritik bir öneme sahip olduğu bildirilmektedir (7).

Elde edilen bulgular, paladyum karben komplekslerinin antikanser etkisinin tek bir moleküler olayla sınırlı olmadığını; p53 yanıtı, p21 aracılı hücre döngüsü kontrolü, CDK-4 protein düzeyinde azalma, BCL-2/PUMA dengesi, apoptotik hücre ölümü ve migrasyon-invazyon baskılanması gibi birbiriyle ilişkili süreçlerin katkısıyla ortaya

çıkıldığını göstermektedir. Literatürde metal bazlı antikanser ajanların çok hedefli etki göstermesi önemli bir avantaj olarak değerlendirildiğinden, bu çalışma Pd-NHC komplekslerinin akciğer kanseri hücreleri üzerinde ileri araştırmalara değer aday moleküller olabileceğini ortaya koymaktadır (15).



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada sentezlenen paladyum N-heterosiklik karben (Pd-NHC) komplekslerinin A549 insan akciğer adenokarsinom hücre hattı üzerindeki antikanser etkileri çok yönlü olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, bu komplekslerin hücre düzeyde belirgin biyolojik etkiler oluşturduğunu ve farklı mekanizmalar üzerinden antikanser potansiyel sergilediğini ortaya koymuştur.

Deneysel sonuçlar, Pd-NHC komplekslerinin hücre morfolojisini etkileyerek hücre yoğunluğunu azalttığını ve hücre adezyon özelliklerini zayıflattığını göstermiştir. Gen ve protein ekspresyon analizleri birlikte değerlendirildiğinde, bazı gruplarda gözlenen p53 ekspresyon değişimleri ile özellikle p21 protein düzeyindeki artış ve CDK-4 protein düzeyindeki azalma, bu komplekslerin hücre döngüsünü baskılayıcı yönde etkilediğini düşündürmektedir. Hücre döngüsü analizlerinde bazı gruplarda G0/G1 fazında hücre birikimi gözlenmesi, bu bulguları destekler niteliktedir.

Apoptoz analizleri, komplekslerin etkisinin bileşiğe bağlı olarak değiştiğini ortaya koymuştur. Özellikle 44 ve 54 numaralı bileşiklerin apoptotik hücre oranını anlamlı şekilde artırdığı belirlenirken, bazı bileşiklerde apoptotik etkinin sınırlı kaldığı ancak hücre döngüsü baskılanması gibi alternatif mekanizmaların ön plana çıktığı görülmüştür. Bu durum, Pd-NHC komplekslerinin tek bir hücresel yolak üzerinden değil, çoklu biyolojik mekanizmalar aracılığıyla etki gösterdiğini düşündürmektedir.

BCL-2, PUMA ve p53 sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, bazı gruplarda gen ve protein düzeyleri arasında tam bir uyum olmadığı gözlenmiştir. Bu durum, hücresel yanıtların yalnızca transkripsiyonel düzeyde değil, aynı zamanda post-transkripsiyonel ve post-translasyonel mekanizmalarla da düzenlendiğini göstermektedir.

Migrasyon ve invazyon analizleri, Pd-NHC komplekslerinin hücre hareketliliğini baskılayabildiğini ortaya koymuştur. Özellikle 44 ve 521 numaralı bileşiklerin hem migrasyon hem de invazyon kapasitesini belirgin şekilde azaltması, bu komplekslerin potansiyel anti-metastatik özellikler taşıyabileceğini göstermektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, bu çalışmada sentezlenen Pd-NHC komplekslerinin; hücre proliferasyonunun baskılanması, hücre döngüsünün durdurulması, apoptotik süreçlerin indüklenmesi ve hücre hareketliliğinin azaltılması gibi birbiriyle ilişkili mekanizmalar üzerinden antikanser etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca farklı komplekslerin farklı biyolojik yanıtlar oluşturmaları, yapı-aktivite ilişkisinin bu sistemlerde kritik bir rol oynadığını ortaya koymaktadır.

Bu çalışma in vitro koşullarda tek bir hücre hattı ile sınırlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulguların doğrulanması ve biyolojik etkinin daha kapsamlı değerlendirilmesi amacıyla, bu komplekslerin farklı kanser hücre hatlarında ve normal hücre hatlarında test edilmesi önerilmektedir. Ayrıca doz ve zaman bağımlı çalışmaların yapılması, apoptotik mekanizmaların detaylandırılması ve özellikle kaspaz aktivitesi, mitokondriyal yollar ve oksidatif stres parametrelerinin incelenmesi, etki mekanizmasının daha net ortaya konmasına katkı sağlayacaktır. Bunun yanı sıra in vivo çalışmalar ile bu komplekslerin biyoyararlanım ve toksisite profillerinin değerlendirilmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak, Pd-NHC komplekslerinin akciğer kanseri hücreleri üzerinde umut verici antikanser ve potansiyel anti-metastatik etkilere sahip olduğu gösterilmiş olup, bu bileşiklerin yeni nesil metal bazlı antikanser ajanlar olarak geliştirilmesine yönelik ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Kumar A, Naaz A, Prakasham A, Gangwar MK, Butcher RJ, Panda D, et al. Potent anticancer activity with high selectivity of a chiral palladium N-heterocyclic carbene complex. *ACS Omega*. 2017;2(8):4632-46.
2. Sinkala M. Mutational landscape of cancer-driver genes across human cancers. *Sci Rep*. 2023;13(1):12742.
3. Larsen JE, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin Chest Med*. 2011;32(4):703-40.
4. Cooper WA, Lam DC, O'Toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. *J Thorac Dis*. 2013;5(Suppl 5):S479.
5. Lucaciu RL, Hangan AC, Sevastre B, Oprean LS. Metallo-drugs in cancer therapy: past, present and future. *Molecules*. 2022;27(19):6485.
6. Liu W, Gust R. Metal N-heterocyclic carbene complexes as potential antitumor metallodrugs. *Chem Soc Rev*. 2013;42(2):755-73.
7. Zou T, Lok CN, Wan PK, Zhang ZF, Fung SK, Che CM. Anticancer metal-N-heterocyclic carbene complexes of gold, platinum and palladium. *Curr Opin Chem Biol*. 2018;43:30-6.
8. Zhao Q, Han B, Peng C, Zhang N, Huang W, He G, et al. A promising future of metal-N-heterocyclic carbene complexes in medicinal chemistry: the emerging bioorganometallic antitumor agents. *Med Res Rev*. 2024.
9. Mjos KD, Orvig C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. *Chem Rev*. 2014;114(8):4540-63.
10. Nath S, Datta A, Das A, Adhikari S. Metal-based drugs in cancer therapy. *Int J Exp Res Rev*. 2024;37:159-73.
11. Norn S, Permin H, Kruse E, Kruse PR. Mercury—a major agent in the history of medicine and alchemy. *Dansk medicinhistorisk årbog*. 2008;36:21-40.
12. Gamberi T, Hanif M. Metal-based complexes in cancer treatment. *MDPI*. 2022;2573.
13. Vojtek M, Gonçalves-Monteiro S, Šeminská P, Valova K, Bellon L, Dias-Pereira P, et al. Pd2Spermine complex shows cancer selectivity and efficacy to inhibit growth of triple-negative breast tumors in mice. *Biomedicines*. 2022;10(2):210.
14. Slimani I, Boubakri L, Özdemir N, Mansour L, Özdemir I, Gürbüz N, et al.

- Substituted N-heterocyclic carbene PEPPSI-type palladium complexes with different N-coordinated ligands: involvement in the direct C-H bond activation of heteroarenes derivatives with aryl bromide and their antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant activities. *Inorg Chim Acta*. 2022;532:120747.
15. Carneiro TJ, Martins AS, Marques MPM, Gil AM. Metabolic aspects of palladium (II) potential anti-cancer drugs. *Front Oncol*. 2020;10:590970.
 16. Yu P, Guo S, Xu R, Ye T, Li S, Sim MR, et al. Cohort studies of long-term exposure to outdoor particulate matter and risks of cancer: a systematic review and meta-analysis. *Innovation (Amst)*. 2021;2(3).
 17. Nenclares P, Harrington K. The biology of cancer. *Medicine*. 2020;48(2):67-72.
 18. Motofei IG, editor. Biology of cancer: from cellular and molecular mechanisms to developmental processes and adaptation. *Semin Cancer Biol*. 2022.
 19. Furney SJ, Higgins DG, Ouzounis CA, López-Bigas N. Structural and functional properties of genes involved in human cancer. *BMC Genomics*. 2006;7:1-11.
 20. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med*. 2000;21(6):167-223.
 21. Zhou J, Xu Y, Liu J, Feng L, Yu J, Chen D. Global burden of lung cancer in 2022 and projections to 2050: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Cancer Epidemiol*. 2024;93:102693.
 22. Lu T, Yang X, Huang Y, Zhao M, Li M, Ma K, et al. Trends in the incidence, treatment, and survival of patients with lung cancer in the last four decades. *Cancer Manag Res*. 2019:943-53.
 23. Li Y, Yan B, He S. Advances and challenges in the treatment of lung cancer. *Biomed Pharmacother*. 2023;169:115891.
 24. Li C, Lei S, Ding L, Xu Y, Wu X, Wang H, et al. Global burden and trends of lung cancer incidence and mortality. *Chin Med J (Engl)*. 2023;136(13):1583-90.
 25. Lee JY, Bhandare RR, Boddu SH, Shaik AB, Saktivel LP, Gupta G, et al. Molecular mechanisms underlying the regulation of tumour suppressor genes in lung cancer. *Biomed Pharmacother*. 2024;173:116275.
 26. Rudin CM, Brambilla E, Faivre-Finn C, Sage J. Small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):3.
 27. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR, editors. Non-small cell lung cancer: epidemiology, screening, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2019.
 28. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JH, Beasley MB, et al.

- The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *J Thorac Oncol*. 2015;10(9):1243-60.
29. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*. 2018;553(7689):446-54.
 30. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014;511(7511):543.
 31. Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*. 2011;12(2):175-80.
 32. Skoulidis F, Heymach JV. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(9):495-509.
 33. George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretić L, Kong G, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*. 2015;524(7563):47-53.
 34. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88(3):323-31.
 35. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(1):a001008.
 36. Pirker R, Filipits M. Targeted therapies in lung cancer. *Curr Pharm Des*. 2009;15(2):188-206.
 37. Rosenberg B. Some biological effects of platinum compounds. *Platinum Met Rev*. 1971;15(2):42-51.
 38. Anthony EJ, Bolitho EM, Bridgewater HE, Carter OW, Donnelly JM, Imberti C, et al. Metallodrugs are unique: opportunities and challenges of discovery and development. *Chem Sci*. 2020;11(48):12888-917.
 39. Ndagi U, Mhlango N, Soliman ME. Metal complexes in cancer therapy—an update from drug design perspective. *Drug Des Devel Ther*. 2017:599-616.
 40. Farooq MA, Aquib M, Farooq A, Haleem Khan D, Joelle Maviah MB, Sied Filli M, et al. Recent progress in nanotechnology-based novel drug delivery systems in designing of cisplatin for cancer therapy: an overview. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2019;47(1):1674-92.
 41. Zorbas H, Keppler BK. Cisplatin damage: are DNA repair proteins saviors or traitors to the cell? *Chembiochem*. 2005;6(7):1157-66.
 42. Lazarević T, Rilak A, Bugarčić ŽD. Platinum, palladium, gold and ruthenium

- complexes as anticancer agents: current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. *Eur J Med Chem.* 2017;142:8-31.
43. Zhang YF, Yin YK, Zhang H, Han YF. Metal N-heterocyclic carbene complexes as potential metallodrugs in antitumor therapy. *Coord Chem Rev.* 2024;514:215941.
 44. Ulukaya E, Ari F, Dimas K, Ikitimur EI, Guney E, Yilmaz VT. Anti-cancer activity of a novel palladium (II) complex on human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Eur J Med Chem.* 2011;46(10):4957-63.
 45. Zhu M, Cui X, Zhang S, Liu L, Han Z, Gao E. The structures, cytotoxicity, apoptosis and molecular docking controlled by the aliphatic chain of palladium (II) complexes. *J Inorg Biochem.* 2016;157:34-45.
 46. Ray S, Mohan R, Singh JK, Samantaray MK, Shaikh MM, Panda D, et al. Anticancer and antimicrobial metallopharmaceutical agents based on palladium, gold, and silver N-heterocyclic carbene complexes. *J Am Chem Soc.* 2007;129(48):15042-53.
 47. Mbugua SN, Sibuyi NR, Njenga LW, Odhiambo RA, Wandiga SO, Meyer M, et al. New palladium (II) and platinum (II) complexes based on pyrrole Schiff bases: synthesis, characterization, X-ray structure, and anticancer activity. *ACS Omega.* 2020;5(25):14942-54.
 48. Sánchez-López E, Gomes D, Esteruelas G, Bonilla L, Lopez-Machado AL, Galindo R, et al. Metal-based nanoparticles as antimicrobial agents: an overview. *Nanomaterials.* 2020;10(2):292.
 49. Temesgen A, Ananda Murthy HC, Enyew AZ, Revathi R, Venkatesha Perumal R. Emerging trends in metal-based anticancer agents: drug design to clinical trials and their mechanism of action. *ChemistrySelect.* 2023;8(48):e202302113.
 50. Boros E, Dyson PJ, Gasser G. Classification of metal-based drugs according to their mechanisms of action. *Chem.* 2020;6(1):41-60.
 51. Silva MJ, Gois PM, Gasser G. Unveiling the potential of transition metal complexes for medicine: translational in situ activation of metal-based drugs from bench to in vivo applications. *ChemBioChem.* 2021;22(10):1740-2.
 52. Barry NP, Sadler PJ. 100 years of metal coordination chemistry: from Alfred Werner to anticancer metallodrugs. *Pure Appl Chem.* 2014;86(12):1897-910.
 53. Chen Y, Hu L. Design of anticancer prodrugs for reductive activation. *Med Res Rev.* 2009;29(1):29-64.

54. La Manna S, Marasco D. Insights into molecular mechanisms of metallodrugs using metallomic studies. *Inorg Chim Acta*. 2024;560:121816.
55. Montero AJ, Jassem J. Cellular redox pathways as a therapeutic target in the treatment of cancer. *Drugs*. 2011;71:1385-96.
56. Murillo MI, Gaiddon C, Le Lagadec R. Targeting of the intracellular redox balance by metal complexes towards anticancer therapy. *Front Chem*. 2022;10:967337.
57. Graf N, Lippard SJ. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(11):993-1004.
58. Wang X, Wang X, Jin S, Muhammad N, Guo Z. Stimuli-responsive therapeutic metallodrugs. *Chem Rev*. 2018;119(2):1138-92.
59. Allardyce CS, Dyson PJ. Metal-based drugs that break the rules. *Dalton Trans*. 2016;45(8):3201-9.
60. Aktaş A. Platin ve bakır temelli N-heterosiklik karben (NHC) komplekslerinin antikanser özellikleri ve etki mekanizmaları. *Bitlis Eren Univ J Sci*. 2019;8(2):713-24.
61. Sarı Y, Aktaş A, Barut Celepci D, Gök Y, Aygün M. Synthesis, characterization and crystal structure of new 2-morpholinoethyl-substituted bis-(NHC) Pd(II) complexes and catalytic activity in direct arylation reaction. *Catal Lett*. 2017;147:2340-51.
62. Gök Y, Aktaş A, Erdoğan H, Sarı Y. New 4-vinylbenzyl-substituted bis(NHC)-Pd(II) complexes: synthesis, characterization and catalytic activity in direct arylation reaction. *Inorg Chim Acta*. 2018;471:735-40.
63. Erdoğan H, Aktaş A, Gök Y, Sarı Y. N-propylphthalimide-substituted bis-(NHC) PdX₂ complexes: synthesis, characterization and catalytic activity in direct arylation reactions. *Transit Met Chem*. 2018;43:31-7.
64. Aktaş A, Akkoç S, Gök Y. Palladium catalyzed Mizoroki–Heck and Suzuki–Miyaura reactions using naphthalenomethyl-substituted imidazolidin-2-ylidene ligands in aqueous media. *J Coord Chem*. 2013;66(16):2901-9.
65. Fong TTH, Lok CN, Chung CYS, Fung YME, Chow PK, Wan PK, et al. Cyclometalated palladium (II) N-heterocyclic carbene complexes: anticancer agents for potent in vitro cytotoxicity and in vivo tumor growth suppression. *Angew Chem Int Ed*. 2016;55(39):11935-9.
66. Haque RA, Hasanudin N, Hussein MA, Ahamed SA, Iqbal MA. Bis-N-heterocyclic carbene silver (I) and palladium (II) complexes: efficient antiproliferative agents

- against breast cancer cells. *Inorg Nano-Met Chem.* 2017;47(1):131-7.
67. Kühl O. Functionalised N-heterocyclic carbene complexes. Wiley; 2010.
 68. Scattolin T, Nolan SP. Synthetic routes to late transition metal–NHC complexes. *Trends Chem.* 2020;2(8):721-36.
 69. Scattolin T, Voloshkin VA, Visentin F, Nolan SP. A critical review of palladium organometallic anticancer agents. *Cell Rep Phys Sci.* 2021;2(6).
 70. Scattolin T, Caligiuri I, Mouawad N, El Boustani M, Demitri N, Rizzolio F, et al. Synthesis and in-depth studies on anticancer activity of palladacyclopentadienyl complexes stabilized by NHC ligands. *Eur J Med Chem.* 2019;179:325-34.
 71. Liu W, Gust R. Update on metal N-heterocyclic carbene complexes as potential anti-tumor metallodrugs. *Coord Chem Rev.* 2016;329:191-213.
 72. Coleman J, Sjoberg D, Demac Q, Odea C, McGill M, Tracey A, et al. Mp46-04 results of the PCM-204 phase 2b trial of partial-gland ablation for men with intermediate-risk prostate cancer with Padeliporfin vascular-targeted photodynamic therapy. *J Urol.* 2021;206(Suppl 3):e814-5.
 73. Malinowska K, Kaczmarczyk D, Zajdel R, et al. Antioxidative assessment of new trans-palladium (II) complexes in head and neck cancer. 2020.
 74. Türker F, Gürses C, Barut Celepci D, Aktaş A, Ateş B, Gök Y. New morpholine-liganded palladium (II) NHC complexes: synthesis, characterization, crystal structure, and DNA-binding studies. *Arch Pharm.* 2019;352(12):1900187.
 75. Ortega E, Vigueras G, Ballester FJ, Ruiz J. Targeting translation: a promising strategy for anticancer metallodrugs. *Coord Chem Rev.* 2021;446:214129.
 76. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
 77. Kapdi AR, Fairlamb IJ. Anti-cancer palladium complexes: PdX₂L₂, palladacycles and related complexes. *Chem Soc Rev.* 2014;43(13):4751-77.
 78. Chen J. The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(3):a026104.
 79. Gulappa T, Reddy RS, Suman S, et al. Molecular interplay between CDK4 and p21 dictates G0/G1 cell cycle arrest. *Cancer Lett.* 2013;337(2):177-83.
 80. Wu W, Wei T, Li Z, Zhu J. p53-dependent apoptosis in thyroid carcinoma. *Int J Med Sci.* 2021;18(14):3197.
 81. Crozier L, Foy R, Mouery BL, et al. CDK4/6 inhibitors induce replication stress. *EMBO J.* 2022;41(6):e108599.

82. Vogler M, Braun Y, Smith VM, et al. The BCL2 family: from apoptosis to targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2025;10(1):91.
83. Yu J, Zhang L. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene.* 2008;27(Suppl):S71-83.
84. Demirbağ B, Büyükaşar K, Kaya H, et al. Anticancer effect of palladium Schiff base complexes in NSCLC. *Biochem Biophys Res Commun.* 2024;735:150658.
85. González-Ballesteros MM, Mejía C, Ruiz-Azuara L. Metallodrugs against invasion and metastasis in cancer treatment. *FEBS Open Bio.* 2022;12(5):880-99.



EKLER

EK-1. Özgeçmiş



EK-2. Etik Kurul Onay Formu Gerekmediğine Dair Yazı

