



T. C.

ORDU ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YENİ SENTEZLENEN 4-AMİNO ANTİPİRİN TÜREVLİ
SCHIFF BAZI BAKIR (II) KOMPLEKSİNİN İNSANA AİT
NORMAL VE ADENOKARSİNOM MEME HÜCRE
HATLARI ÜZERİNDE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ VE KARŞILAŞTIRILMASI**

GAMZE DİNDAROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ORDU 2019

T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**YENİ SENTEZLENEN 4-AMİNO ANTİPİRİN TÜREVLİ SCHIFF BAZI
BAKIR (II) KOMPLEKSİNİN İNSANA AİT NORMAL VE
ADENOKARSİNOM MEME HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE SİTOTOKSİK
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ VE KARŞILAŞTIRILMASI**

GAMZE DİNDAROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORDU 2019

TEZ ONAY

Gamze DİNDAROĞLU tarafından hazırlanan “ YENİ SENTEZLENEN 4-AMİNO ANTİPİRİN TÜREVLİ SCHIFF BAZI BAKIR (II) KOMPLEKSİNİN İNSANA AİT NORMAL VE ADENOKARSİNOM MEME HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ VE KARŞILAŞTIRILMASI” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 03.09.2019 tarihinde yapılmış ve jüri tarafından oy birliği ile Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman
Doç. Dr. Vedat ŞEKEROĞLU

Jüri Üyeleri

Üye
Doç. Dr. Vedat ŞEKEROĞLU
Moleküler Biyoloji ve Genetik,
Ordu Üniversitesi

Üye
Prof. Dr. Birsen AYDIN
Biyoloji, Amasya Üniversitesi

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Aliye ERTÜRK
Kimya, Ordu Üniversitesi

İmza

09 / 09 / 2019 tarihinde enstitüye teslim edilen bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 13 / 09 / 2019 tarih ve 2019 / 620 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Enstitü Müdürü
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Sami GÜLER

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan ve kullanılan intihal tespit programının sonuçlarına göre; bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

GAMZE DİNDAROĞLU



Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün BY-1723 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

TEZ ADINIZI BURAYA GİRİNİZ
ADINIZI SOYADINIZI GİRİNİZ
ORDU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ, 80 SAYFA
(TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. VEDAT ŞEKEROĞLU)

Günümüzde en karmaşık ve tedavisi en zor hastalıklarından biri olan kanser, köken aldıkları hücre tipine bağlı olarak değişik davranışlar gösteren yüze yakın sayıdaki kompleks hastalığı kapsayan bir olgu olarak tanımlanır. Kanser, organizmanın savunmasından kaçan hücrelerin kontrolsüz ve zamansız çoğalması ve organizmanın başka dokularına da yayılarak meydana getirdiği değişiklikleri içeren farklı basamakları olan bir süreçtir.

Schiff bazları (imin), primer aminler ile karbonil bileşiklerin (aldehitler ve ketonlar) kondenzasyonu sonucu oluşmaktadır. $RCH=NR$ formülü ile gösterilen Schiff bazları ligand olarak kullanılır ve $C=N$ grubu içerirler. En önemli özellikleri biyolojik sistemlerdeki etkinlikleridir. Bu biyolojik etkinliklerin farklılığı sentezlenen bileşiğin yapısında bulunan farklı atom ya da gruplara, bunların konumuna ve komplekslerinde kullanılan metal atomunun özelliğine göre değişmektedir. Özellikle Schiff baz-bakır kompleksleri, biyolojik açıdan redoks özellikleri ve nükleazlar için yüksek afinitesi nedeniyle geniş çapta incelenmiştir. İnsan kaynaklı çeşitli normal ve kanser hücrelerinde, farklı model organizmalarda yapılan çalışmalarda, Schiff bazı-metal komplekslerinin sitotoksikite, apoptoz, DNA hasarı gibi yollarla antitümöral potansiyellerinin olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Bu amaçla çalışmamızda yeni sentezlenen 4-N-[(1-metilpiroliden)amino]antipirin Schiff bazı Cu(II) kompleksinin (NMPA-Cu), normal (hTERT-HME1) ve adenokarsinomlu (MCF-7) meme hücre hatlarında sitotoksik ve apoptotik etkinlikleri incelenmiştir. Hücre canlılığı ve apoptozis değişimlerinin sırasıyla MTT ve Akridin oranj/Etidyum bromür yöntemleri ile araştırıldığı deney verileri, yeni sentezlenen Schiff bazı-bakır kompleksinin her iki hücre tipinde de sitotoksikiteyi doza ve zamana bağlı bir şekilde arttırdığını göstermektedir. Hücre tiplerinin canlılık oranları karşılaştırıldığında ise özellikle düşük dozlarda ve uzun süre muamelede normal meme hücresinin (HME1) komplekse daha fazla direnç gösterdiği belirlenmiştir. Söz konusu kompleksin iyimser verilerine rağmen antikanser molekülü olarak umut vaat edebilmesi adına, farklı doz, süre ve hatta hücrelerle ve özellikle farklı yöntemler kullanılarak tekrar sınanması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptosis, hTERT-HME1, Hücre Canlılığı, MCF-7, Schiff Bazı Cu(II) Kompleksi.

ABSTRACT

DETERMINATION AND COMPARISON OF CYTOTOXIC EFFECTS OF A NOVEL SCHIFF BASE CU (II) COMPLEXES DERIVED 4-AMINO ANTIPYRINE ON HUMAN NORMAL AND ADENOCARCINOMA BREAST CELL LINES

GAMZE DİNDAROĞLU

ORDU UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETIC

MASTER THESIS, 80 OF PAGE

(SUPERVISOR: Assoc. Prof. Dr. VEDAT ŞEKEROĞLU)

Cancer, which is now one of the most complex and difficult to treat diseases, is defined as a case covering nearly one hundred complex diseases that behave differently depending on the cell type which they originated from. Cancer is a process with different steps including the uncontrolled and untimely proliferation of cells escaping from the defense of the organism and the changes caused by spreading to other tissues of the organism.

Schiff bases (imine) are made through a condensation process that primary amines and carbonyl compounds (aldehydes and ketones) are involved in. Schiff bases represented by the formula $RCH=NR$ are used as ligands and contain the $C=N$ group. Its most important properties are their activity in biological systems. The difference in these biological activities varies according to the different atoms or groups present in the structure of the synthesized compound, their position in the Schiff base and the property of the metal atom used in the complexes. Schiff base-copper complexes, in particular, have been extensively studied due to their biological redox properties and high affinity for nucleases. Schiff base-metal complexes have been revealed to have antitumoral potentials such as cytotoxicity, apoptosis, and DNA damage in various normal and cancer cells of human origin and in different model organisms.

Therefore, the study aimed to investigate the cytotoxic and apoptotic activity of a newly synthesized Schiff base-Cu (II) complex (4-N-[(1-methylpyrrolidine) amino] antipyrine) (NMPA-Cu) in both normal (hTERT-HME1) and adenocarcinoma (MCF-7) breast cell lines. Experimental data in which cell viability and apoptosis changes were investigated by MTT and Acridine orange / Ethidium bromide methods, respectively, have shown that the newly synthesized Schiff base-copper complex increases cytotoxicity in both cell types in a dose and time-dependent manner. In the comparison the viability of the cell types, it was determined that normal breast cell (HME1) showed more resistance to the complex, especially at low doses and long-term treatment. In spite of the obtained optimistic data, it is recommended that the complex should be repeatedly tested with different dosages, duration and perhaps with alternative cells and in particular using different methods to believe that the complex has anti-cancer properties.

Keywords: Apoptosis, Cell Viability, hTERT- HME1, MCF-7, Schiff Base Cu(II) Complex.

TEŞEKKÜR

Tez konunun belirlenmesi, alıőmamın yűrűtűlmesi ve yazımı esnasında baőta danıőman hocam Sayın Doç. Dr. Vedat ŐEKEROĐLU'na ve laboratuvar çalıőmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Zűlal ATLI ŐEKEROĐLU' na teőekkűr ederim.

Beni bu yaőa getiren ve her zaman arkamda olan annem Narii, babam Kalender, canım abilerim Levent ve Serkan'a yűrekte teőekkűrű bir borç bilirim.

Ayrıca, tez yazım sűrecinde her zaman destekleyen ve her daim beni yűreklendiren arkadaşlarım Emel GŪNAYDIN ve Dilan YARDİMCİEL' e teőekkűr ederim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ BİLDİRİMİ	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİL LİSTESİ	VII
ÇİZELGE LİSTESİ	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Kanser.....	4
2.1.1 Dünyada Kanser Epidemiyolojisi.....	4
2.1.2 Kanser Çeşitleri.....	7
2.1.3 Meme Kanseri.....	7
2.1.4 Meme Kanseri Epidemiyolojisi.....	9
2.1.5 Meme Kanserinde Risk Faktörleri.....	10
2.1.6 Meme Kanserinde Evreleme.....	11
2.1.7 Meme Kanseri Hücre Hatları.....	12
2.1.7.1 MCF-7.....	12
2.1.7.2 hTERT-HME1.....	13
2.1.8 Meme Kanserinde Moleküler Subgruplar.....	13
2.1.9 Meme Kanserinin Tedavisinde Kullanılan Yöntemler.....	14
2.2 Telomer.....	15
2.2.1 Telomeraz.....	16
2.2.2 Telomerler ve Kanser.....	17
2.3 Apoptoz.....	17
2.3.1 Apoptoz Mekanizması.....	18
2.3.2 Apoptoz ve Kanser.....	20
2.4 Schiff Bazları.....	20
2.4.1 Schiff Bazlarının Yapısı ve Genel Özellikleri.....	20
2.4.2 Schiff Bazlarının Kanserde Kullanımları.....	22
2.5 Bakır (Cu).....	24
2.6 Schiff Bazı Cu(II) Kompleksinin Sitogenetik Etkileri ve Yapılmış Çalışmalar..	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar.....	30
3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	30
3.1.1.1 Schiff Bazı Cu (II) Kompleksinin Sentezi.....	30
3.1.1.2 Kültür Medyumu.....	31
3.1.1.3 Dimetil Sülfoksit (DMSO).....	31
3.1.1.4 Tripsin-EDTA.....	31
3.1.1.5 TNS (Tripsin Nötralize Solüsyonu).....	32
3.1.1.6 PBS (Phosphate Buffered Saline).....	32
3.1.1.7 DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline).....	32
3.1.1.8 Trypan Blue.....	32
3.1.1.9 MTT Solüsyonu.....	32

3.1.1.10 Ethidium Bromide (EtBr) and Acridine Orange (AO).....	32
3.1.1.11 Sıvı Azot (LN)	32
3.1.2 Kullanılan Cihazlar	32
3.1.2.1 Hassas Terazi	32
3.1.2.2 Biyogüvenlik Kabini	32
3.1.2.3 CO ₂ 'li İnkübatör	33
3.1.2.4 Santrifüj.....	33
3.1.2.5 Hücre Sayım Cihazı	33
3.1.2.6 Vorteks Karıştırıcı.....	33
3.1.2.7 Su Banyosu	33
3.1.2.8 İvert Mikroskop.....	33
3.1.2.9 Mikroplaka Eliza Okuyucu	34
3.1.2.10 Floresan Filtreli Işık Mikroskobu	34
3.2 Hücre Kültürü	34
3.2.1 Hücrelerin Çözülmesi.....	35
3.2.2 Hücrelerin Pasajlanması.....	35
3.2.3 Hücrelerin Dondurulması.....	35
3.2.4 Hücre Sayımı.....	36
3.2.4.1 Deney Gruplarının Oluşturulması.....	36
3.3 Hücre Canlılığının Tespit Edilmesi ve Sitotoksisite	36
3.3.1 MTT Testi	36
3.3.2 Akridin Orange/ Ethidium Bromür İkili Boyaması	38
3.4 İstatistiksel Analiz.....	39
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	40
4.1 MTT Testi Sonuçları	42
4.2 Akridin Orange/Ethidium Bromür İkili Boyaması Sonuçları	55
4.3 Sitotoksisite ve Apoptoz	59
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	68
6. KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	81

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1	Kanser Hücrelerinin Metastaz Yapararak Kan veya Lenf Sistemine Geçiş...	1
Şekil 2.1	2018'den 2040'a kadar dünya çapında tahmini kanser insidansı ve mortalite yükü (tüm kanserler, her iki cinsiyet, her yaş).....	5
Şekil 2.2	Kadınlarda En Çok Görülen Kanser Türlerinin Yaşa Göre Hızları (Dünya standart nüfusu, 100.000 kişide)	5
Şekil 2.3	Erkeklerde En Çok Görülen Kanser Türlerinin Yaşa Göre Hızları (Dünya standart nüfusu, 100.000 kişide)	6
Şekil 2.4	Memedeki Lenf Damarlarının Lenf Sıvısını Taşıdığı Düğümler	8
Şekil 2.5	2012' de Dünyadaki Her İki Cinsiyet Arasında Anatomik Bölge ile Gösterilen Aşırı Vücut Kitle İndeksine Atfedilebilen Kanser Vakaları.....	9
Şekil 2.6	Kromozomlarda BRCA1 ve 2'nin Lokasyonu	11
Şekil 2.7	MCF-7 Hücre Hattı.....	12
Şekil 2.8	hTERT-HME1 Hücre Hattı	13
Şekil 2.9	Apoptoz Yolaklarının Gösterimi	18
Şekil 2.10	Pro-apoptotik Bcl-2 Proteininin İntrinsik Apoptotik Yolaktaki Rolü.....	19
Şekil 2.11	4-[(4-Hidroksi-3-floro-5-metoksi-benziliden)amino]-1,5-dimetil-2-fenil-1,2-dihidro-pirazol-3-on (I) Bileşiğinin Sentezi	21
Şekil 3.1	NMPA-Cu kompleksi (5) bileşiğinin sentezi	31
Şekil 4.1	Schiff Bazı Cu(II) Kompleksi ile 24 Saat Muamele Edilen MCF-7 Hücreleri ile Yapılan MTT Testi	43
Şekil 4.2	24 Saatlik Uygulama Sonrası NMPA-Cu Komplekslerinin Hücre Canlılığına Etkisi.....	48
Şekil 4.3	48 Saatlik Uygulama Sonrası NMPA-Cu Komplekslerinin Hücre Canlılığına Etkisi.....	50
Şekil 4.4	72 Saatlik Uygulama Sonrası NMPA-Cu Komplekslerinin Hücre Canlılığına Etkisi.....	51
Şekil 4.5	72 Saatlik NMPA-Cu Kompleksi Uygulaması Sonucu Her İki Hücre Tipi İçin Elde Edilen IC ₅₀ Değerleri.....	53
Şekil 4.6	NMPA-Cu ile Muamele Edilmiş MCF-7 Hücrelerinde Apoptoz.....	56
Şekil 4.8	NMPA-Cu 'nun MCF-7 Hücrelerindeki Tüm Zaman Noktalarında Apoptoz Göstergesi.....	58
Şekil 4.9	NMPA-Cu 'nun hTERT-HME1 Hücrelerindeki Tüm Zaman Noktalarında Apoptoz Göstergesi.....	58

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Meme kanserinde risk faktörleri.....	10
Çizelge 2.2 Meme kanseri moleküler alt tipler, özellikleri ve bu özelliklere sahip farklı hücre hatları (Prat ve ark., 2010).....	14
Çizelge 3.1 MTT Testinde Uygulanan NMPA-Cu Dozları.....	38
Çizelge 4.1 MCF-7 Hücrelerinde 24 Saatlik Uygulamada Dozlara Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri	43
Çizelge 4.2 hTERT-HME1 Hücrelerinde 24 Saatlik Uygulamada Dozlara Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri.....	44
Çizelge 4.3 MCF-7 Hücrelerinde 48 Saatlik Uygulamada Dozlara Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri	44
Çizelge 4.4 hTERT-HME1 Hücrelerinde 48 Saatlik Uygulamada Dozlara Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri.....	45
Çizelge 4.5 MCF-7 Hücrelerinde 72 Saatlik Uygulamada Dozlara Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri	45
Çizelge 4.6 hTERT-HME1 Hücrelerinde 72 Saatlik Uygulamada Dozlara Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri.....	46
Çizelge 4.7 MCF-7 Hücrelerine Uygulanan NMPA-Cu'nun 24 Saatlik Maruziyette Hücre Sağkalım Değerleri.....	47
Çizelge 4.8 hTERT-HME1 Hücrelerine Uygulanan NMPA-Cu 'nun 24 Saatlik Maruziyette Hücre Sağkalım Değerleri.....	48
Çizelge 4.9 MCF-7 Hücrelerine Uygulanan NMPA-Cu'nun 48 Saatlik Maruziyette Hücre Sağkalım Değerleri	49
Çizelge 4.10 hTERT-HME1 Hücrelerine Uygulanan NMPA-Cu 'nun 48 Saatlik Maruziyette Hücre Sağkalım Değerleri.....	49
Çizelge 4.11 MCF-7 Hücrelerine Uygulanan NMPA-Cu'nun 72 Saatlik Maruziyette Hücre Sağkalım Değerleri.....	50
Çizelge 4.12 hTERT-HME1 Hücrelerine Uygulanan NMPA-Cu 'nun 72 Saatlik Maruziyette Hücre Sağkalım Değerleri.....	51
Çizelge 4.13 MCF-7 ve hTERT-HME1 Hücrelerine Uygulanan NMPA-Cu 'nun 24, 48 ve 72 Saatlik Maruziyette Sitotoksosite Değerleri.....	52
Çizelge 4.14 NMPA-Cu Muameleleri Sonrası Hücre Kültüründeki % Apoptosis Değerleri	57

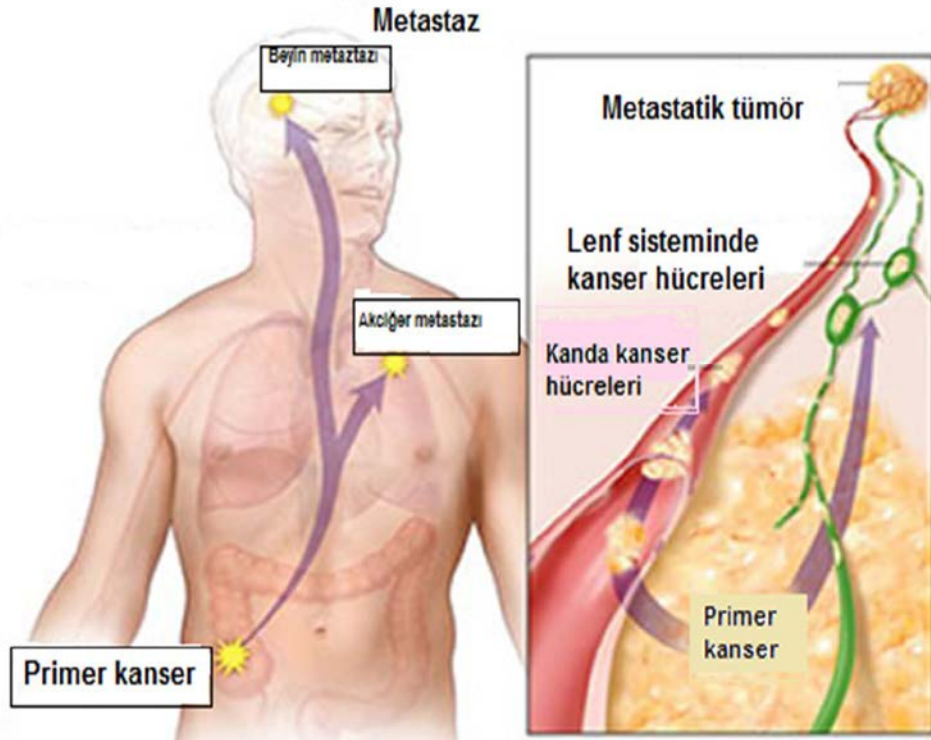
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

AO/EtBr	: Akridin Orange/Etidyum Bromür
BRCA 1,2	: Breast Cancer 1,2
CNS	: Merkezi Sinir Sistemi Tümörü
Cu	: Bakır
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ER	: Östrojen Reseptörü
Fe	: Demir
HTC-116	: İnsan Kolon Kanser Hücre Hattı
HeLa, Siha	: İnsan Rahim Kanser Hücre Hattı
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
hTERT-HME1	: İmmortal İnsan Meme Normal Hücre Hattı
IC₅₀	: Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
MCF-7	: İnsan Meme Adenokarsinom Hücre Hattı
MDA	: Melondialdehit
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol2-Yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromür; Thiazolyl blue
NMPA-Cu	: 4-N-[(1-metilpiroliden)amino]antipirin
Pd	: Paladyum
pH	: Power of Hydrogen
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RR	: Ribonükleotid Redüktaz Enzimi
SB	: Schiff Bazı
TSC	: Tiyosemikarbazon
UV	: Ultraviyole
Zn	: Çinko

1. GİRİŞ

Çağımızın en sıkıntılı hastalıklarından biri olan kanser, köken aldıkları hücre tipine bağlı olarak değişik davranışlar gösteren yüzden fazla sayıdaki kompleks hastalığı kapsayan bir olgu olarak tanımlanır. Kanser, bağışıklık sistemi savunmasından kaçabilen, yüksek hızda ve kontrolsüz çoğalan hücrelerin başka dokulara yayılmasına neden olan bir takım değişiklikleri içeren karmaşık ve çok basamaklı bir süreçtir.

M.Ö. 3000 yılına kadar uzanan kayıtlarda, kanser kelimesi Latince yengeç anlamına gelen “*carcinus*” veya “*cancer*” kelimelerinden türetildiği bildirilmiştir. “Tümör” terimi ilk kez Hippokrat tarafından M.Ö. 3. yüzyılda kullanılmış olup, tümör oluşumu çevresindeki damarların yengeç bacağına benzetilmesiyle literatüre girmiştir. Yunan doktor Galen, şişme anlamına gelen “*oncos*” terimini kullanmıştır (Baykara, 2016).



Şekil 1.1 Kanser Hücrelerinin Metastaz Yapararak Kan veya Lenf Sistemine Geçişi (American Cancer Society, 2018)

Apoptoz; kısaca programlı hücre ölümüdür. İşlevini yitirmiş veya ihtiyaç duyulmayan hücrelerin gen düzeyinde programlanmış bir şekilde ölüme götürülmesidir, sağlam hücre ve dokular bu işlemde zarar görmezler. Tek hücreli canlılarda hücre ölümü için yegane yol olan apoptoz (Altunkaynak ve Özbek, 2008), çok hücrelilerde ve gelişmiş canlılarda, hücreler arası etkileşimde olduğu gibi organizmanın iç dengesinin sağlanması ve kontrolünde anahtar rolü bulunmaktadır (Fecker ve ark., 2010).

Hücre döngüsü ile apoptoz arasında yakın bir ilişki vardır ve birlikte kanser hücrelerinin kemoterapiye duyarlılığında önemli bir rol oynamaktadır (Evan ve Vousden, 2011). Telomerik tekrar amplifikasyonu, birçok kanser hücresi tarafından sınırsız çoğalmayı sağlamak için kullanılan bir mekanizmadır (Herbert ve ark., 2001; Cerone ve ark., 2006). Telomeraz aktivitesi ile metastaz, tümör boyutu ve lenf nodu durumu arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Normal ve tümör hücrelerinde telomeraz aktivitesindeki farklılıklar, telomeraz inhibisyonunun daha kısa telomerlere yol açabileceği ve bu yöntemin uygun bir antikanser yaklaşımı olabileceği hipotezine yol açmıştır (Herbert ve ark., 2001; Huang ve ark., 2019).

Sitotoksik bileşiklerle veya küçük molekülü inhibitörlerle tedavi, yayılan aşamada insan kanserini tedavi etmek için önemli bir stratejidir. Bununla birlikte, ilaç direnci ve istenmeyen yan etkilerin ortaya çıkması, başarılı uzun süreli tedavinin önündeki en büyük engel olmaya devam etmektedir (Miller ve Larkin, 2009; Shen ve Cheng, 2010).

Halen mevcut antikanser ilaçları normal hücreler için toksiktir ve genellikle geçici saç dökülmesi, bulantı ve kusma gibi yan etkilere sebep olmaktadır (Wang ve ark., 2008). Bu nedenle güçlü aktivite ve minimal yan etkileri olan yeni ve etkili bir kemoterapötik ajan aramak esastır.

Bununla birlikte son yıllarda, antifungal, antibakteriyel, antimalariyal, antiproliferatif, anti-inflamatuar, antiviral, antikanser ve antipiretik özellikler içeren Schiff bazları ve onların metal kompleksleri geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahiptir (Przybylski, 2009). Bu tip bileşikler son zamanlarda özellikle antikanser araştırmalarında incelenmekte ve sitotoksik etkilerinin olduğu da görülmektedir. Yeni sentezlenen çeşitli imin türevlerinin melanoma, over kanseri ve lösemi

tedavisinde kullanılan hidroksilüre antikanser ilacından daha etkili olduğu ve kemoterapötik ajan olarak ümit vaat ettiği bildirilmiştir (Ren, 2002).

Çalışmamızda normal meme hücresi ve meme adenokarsinom hücreleri olmak üzere iki hücre tipi kullanılacaktır. 4-N-[(1-metilpiroliden)amino]antipirin Schiff baz'ı Cu (II) kompleksinin (NMPA-Cu) bu iki hücre tipindeki etkinlikleri karşılaştırmalı olarak incelenecek ve 3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) yöntemi ve akridin orange/ethidium bromür (AO/EtBr) yöntemi ile sitotoksik etkinlikleri belirlenecektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

2.1.1 Dünyada Kanser Epidemiyolojisi

Kanser, tüm dünyada insanları etkilemekte olup, yılda 14.000.000 kişiye kanser tanısı konmaktadır. Kansere yakalanan hastaların ölüm oranı 8,2 milyon/yıl'dır. Kanserin ortaya çıkma hızı böyle devam etmesi durumunda, 2030 yılında yıllık oranın 22 milyon olması beklenmektedir. Önümüzdeki yıllarda artacağı tahmin edilen kanser vakalarının önemli bölümünün az gelişmiş ülkelerde ortaya çıkacağı tahmin edilmektedir (Hacıkamiloğlu ve ark., 2017).

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından yapılan araştırma ve tahminlere göre, küresel kanser yükünün 2018 yılında 18.1 milyon yeni vakaya ve 9.6 milyon ölüme yükseldiği tahmin edilmektedir. Dünyada her 5 erkekten ve 6 kadından biri hayatları boyunca bir kez kansere yakalanmakta ve 8 erkekten ve 11 kadından biri bu hastalıktan ölmektedir. Etkili önleme çabaları ile gelişmiş ülkelerde insidans hızlarında azalma görülmektedir. Ancak, yeni veriler göstermiştir ki, birçok ülke hala teşhis, tedavi ve bakım gerektiren vakaların sayısında mutlak bir artış ile karşı karşıyadır.

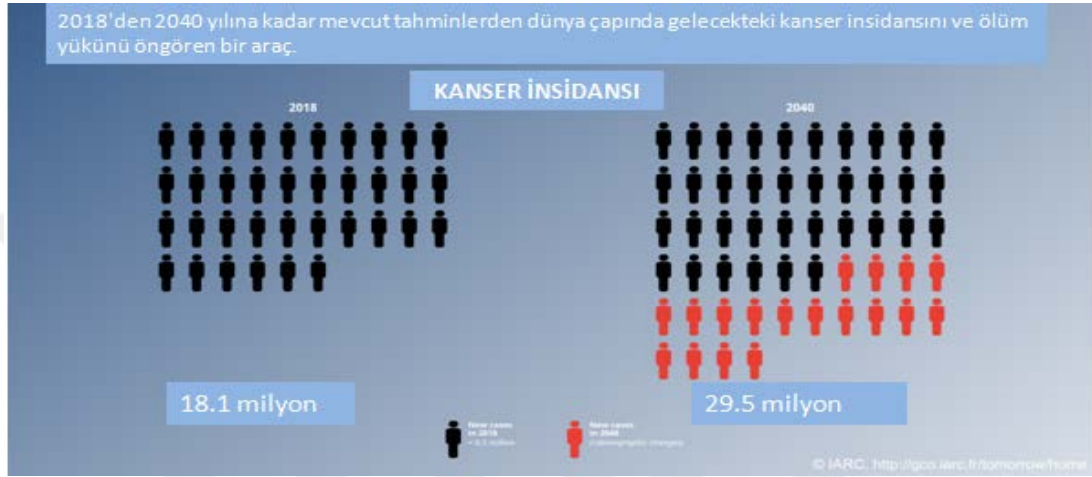
Küresel örnekler, erkek ve kadınların karma olduğu yeni vakaların yaklaşık yarısının ve küresel nüfusun yaklaşık %60' ına sahip olması nedeniyle 2018'de dünya çapında kanser ölümlerinin yarısından fazlasının Asya'da gerçekleşeceği tahmin edilmektedir. Küresel nüfusun yaklaşık %9.0' una sahip olmasına rağmen Avrupa, küresel kanser vakalarının %23.4' ünü ve kanser ölümlerinin %20.3' ünü oluşturmaktadır. Amerika nüfusu küresel nüfusun %13.3' ünü oluşturmakta ve dünya genelinde insidansın %21.0' ini ve ölüm oranının %14.4' ünü oluşturmaktadır.

Diğer dünya bölgelerinin tersine, Asya ve Afrika' daki kanser ölümlerinin oranı (sırasıyla %57.3 ve %7.3), vakaların oranlarından (sırasıyla %48.4 ve %5.8) daha yüksektir. Çünkü bu bölgeler, bir çok ülkede zamanında tanı ve tedaviye sınırlı erişime ek olarak, daha kötü prognoz ve daha yüksek ölüm oranları ile belirli kanser tiplerinin daha sık bir frekansına sahiptir.

Akciğer, kolorektal ve kadın meme kanserleri, insidans açısından ilk üç sırada yer almış olup, mortalite açısından ilk beş sırada yer almaktadır (sırasıyla birinci, ikinci

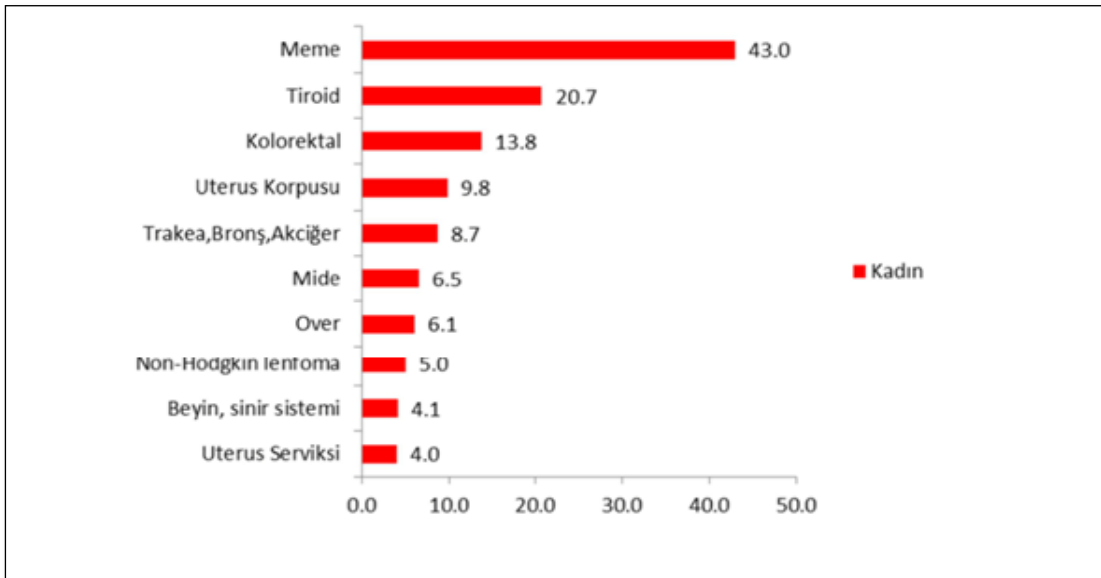
ve beşinci). Bu üç kanser türü, dünya çapında kanser insidansının ve ölüm oranının üçte birinden sorumludur.

Dünya çapında önde gelen kanser tipleri, yeni vaka sayısı bakımından akciğer ve kadın meme kanserleridir. Bu türlerin her biri için 2018' de yaklaşık 2.1 milyon teşhis öngörülmekte ve toplam kanser insidansının yaklaşık %11.6' sına katkıda bulunmaktadır (IARC, 2018).

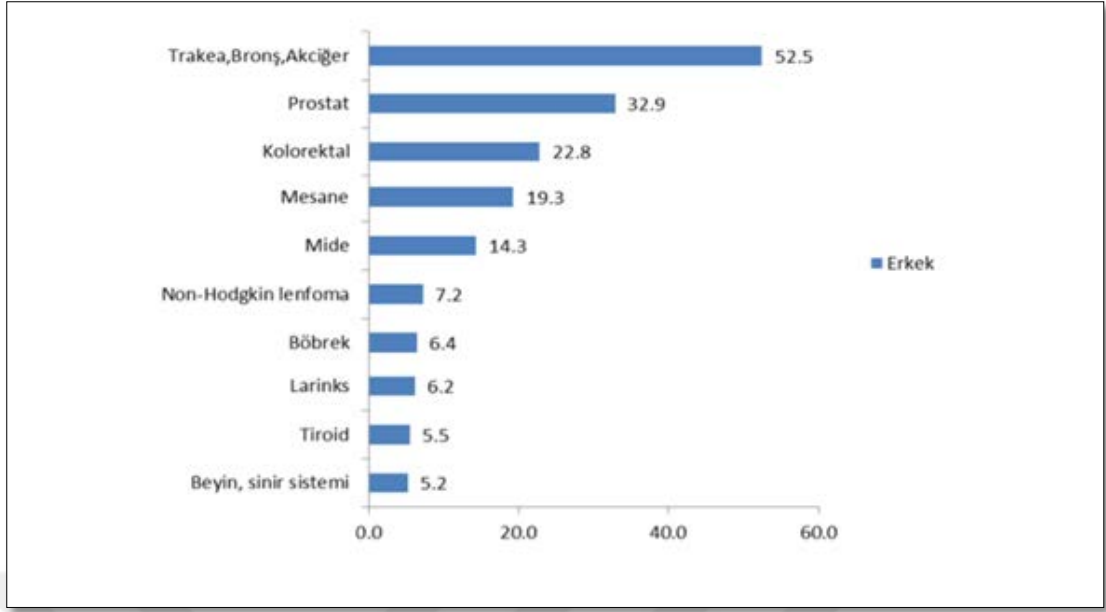


Şekil 2.1 2018'den 2040'a kadar dünya çapında tahmini kanser insidansı ve mortalite yükü (tüm kanserler, her iki cinsiyet, her yaş) (IARC, 2018)

Kanser Daire Başkanlığının 2014 verilerine göre, Türkiye’de kadın ve erkeklerde görülen kanser türleri ve yüzdeleri aşağıdaki grafikte verilmiştir.



Şekil 2.2 Kadınlarda En Çok Görülen Kanser Türlerinin Yaşa Göre Hızları (Özlüer, 2018) (Dünya standart nüfusu, 100.000 kişide)



Şekil 2.3 Erkeklerde En Çok Görülen Kanser Türlerinin Yaşa Göre Hızları (Özlür, 2018) (Dünya standart nüfusu, 100.000 kişide)

Bilimdeki gelişmelere rağmen kanser hala en önemli sağlık sorunlarından ve dünyadaki ölümlerin ana nedenlerinden biridir. Bu nedenle temel yaklaşım, DNA'yı hedef alan ilaçların keşfi, kanser tedavisi için yeni ilaçların geliştirilmesidir. Ayrıca kemoterapide kullanılan ilaçlara karşı oluşan direnç de önemli bir sorundur. Bu nedenle tedavide kullanılacak daha güvenli, daha etkili ve daha az yan etkilere sahip olan yeni ajan arayışları devam etmektedir. Araştırmacılar son yıllarda nükleik asitlerle etkileşebilen yeni moleküllerin araştırılması, tasarlanması ve etkin anti-tümör özellikli ilaç modellerinin geliştirilmesine yoğunlaşmıştır (Letafat ve ark., 2013). Gelişmiş ilaç endüstrisinin en önemli hedefi, yeni etken madde içeren orijinal ilaçlar üretebilmektir. Tümör hücrelerine karşı yüksek seçicilik gösteren bileşikler son yıllarda gelişen teknoloji sayesinde sentezlenmektedir. Yürütülen araştırmalar neticesinde yeni etken madde olmaya aday özgün bir kimyasal bileşik ortaya çıktığında, söz konusu etken maddenin etki yeterliliği ve güvenliği hakkında yeterli bilgi sağlandığında klinik çalışmaların başlatılmasına izin verilmektedir (Aki-Şener ve Yalçın, 2003).

2.1.2 Kanser Çeşitleri

Kanser çeşitleri orijinlerine göre gruplandırılmaktadır. Karsinomlar epitel hücrelerinden köken almaktadırlar ve kanser çeşitlerinin büyük çoğunluğunu oluştururlar. Karsinomlar buldukları epitel hücrelere göre özel isimler almaktadır (American Cancer Society, 2018).

- Adenokarsinomlar: Organ ve bezlerin iç yüzeyini zararlı etkilerden korumak amacıyla mukus adı verilen özel bir madde salgılanmaktadır. Mukus üretimi sırasında oluşan genetik, çevresel etkiler sonucunda oluşan bozukluklar mukusun salgı bezinin dışına çıkmasını engeller. Dışarı çıkamayan salgı ise bezlerde tümör oluşumuna neden olur. Akciğer kanseri, prostat kanseri, yemek borusu, kalın bağırsak kanseri, pankreas kanseri bunlara örnektir.
- Bazal hücre karsinomları: Epidermisin en derin tabakası olan bazal hücrelerde oluşan anormal kontrolsüz büyüme veya lezyonlardır.
- Transitional hücre karsinoması: Genellikle mesanenin içindeki hücrelerde görülür. Geçiş hücreleri, mesane dolu olduğunda genişler ve mesane boşaldığında azalır. Transitional hücre karsinoması en yaygın Amerika Birleşik Devletleri'nde görülmektedir.
- Sarkoma: Kemik, kıkırdak, bağ dokusu gibi kemik ve yumuşak doku kaynaklı kanserlerin genel adıdır. Osteosarkom en yaygın görülen kemik kanseridir.
- Lenfoma ve lösemi: Kan ve lenf sistemi kaynaklı kanserlerdir (Alpsoy, 2014). Bu kanserler diğer kanser türleri gibi katı tümörler oluşturmazlar. Kan dolaşımında çok sayıda akyuvar hücresinin birikmesi sonucu alyuvar hücrelerinin sayısı azalır ve lösemiye neden olurlar.

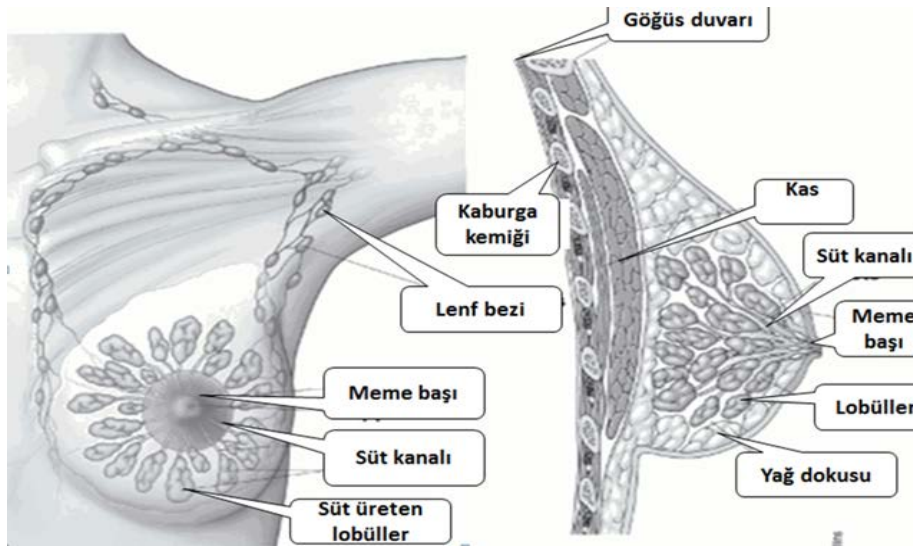
Lenfoma ise lenfositlerde meydana gelen kanserlerdir.

2.1.3 Meme Kanseri

Meme kanseri, tüm dünyada kadınlarında en sık görülen kanser türlerinden biridir. Maalesef, tümörler genellikle ameliyat sonrası kullanılan kemoterapi ilaçlarına direnç geliştirmektedir. Bu nedenle meme kanserini tedavi etmek için daha etkili tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır (Cerone ve ark., 2006). Meme hücrelerinin kontrolsüz çoğalması sonucu meme kanseri oluşur. Meme kanseri kompleks ve birkaç sebebe bağlı bir hastalıktır. Kalıtsal, sporadik ve ailesel olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır.

Ailede bir veya birden fazla bireyde meme kanseri görülmesi durumuna ailesel meme kanseri denilmektedir. Meme kanseri ile doğrudan ilişkisi bulunan BRCA1 ve BRCA2 genlerinde bulunan mutasyon, ailedeki kişilerde erken yaşta kanser ortaya çıkması, ailede erkek bireylerde de meme kanserinin ortaya çıkması hastalığın kalıtsal olduğuna göstermektedir. Kalıtsal meme kanserine sahip kişilerin yaşamlarında bu hastalığa yakalanma riskleri %85 gibi yüksek bir orandır. Ailesel ve kalıtsal bir bağlantısı olmayan kanser ise sporadik (rastlantısal/tesadüfi) meme kanserlerdir. Meme kanserlerinin büyük çoğunluğu sporadik vakalardır (American Cancer Society, 2018).

Tümörler, çevre dokulara doğru büyüyor veya vücudun uzak bölgelerine metastaz yapıyorsa malign tümör olarak adlandırılır. Meme kanseri memenin farklı yerlerinde başlayabilir. Kanser süt kanalından kaynaklanıyorsa duktal karsinoma, süt bezinden kaynaklanıyorsa lobuler karsinoma olarak adlandırılmaktadır. Meme yapısında çok geniş kan ve lenf damar ağları bulunmaktadır. Meme tümörü vakalarında, tümör hücreleri kanserli dokulardaki damar bozulmalarından yararlanarak kolayca lenf damarlarına girer ve lenf nodlarına ulaşarak burada çoğalmaya başlarlar (Özlüer, 2018).



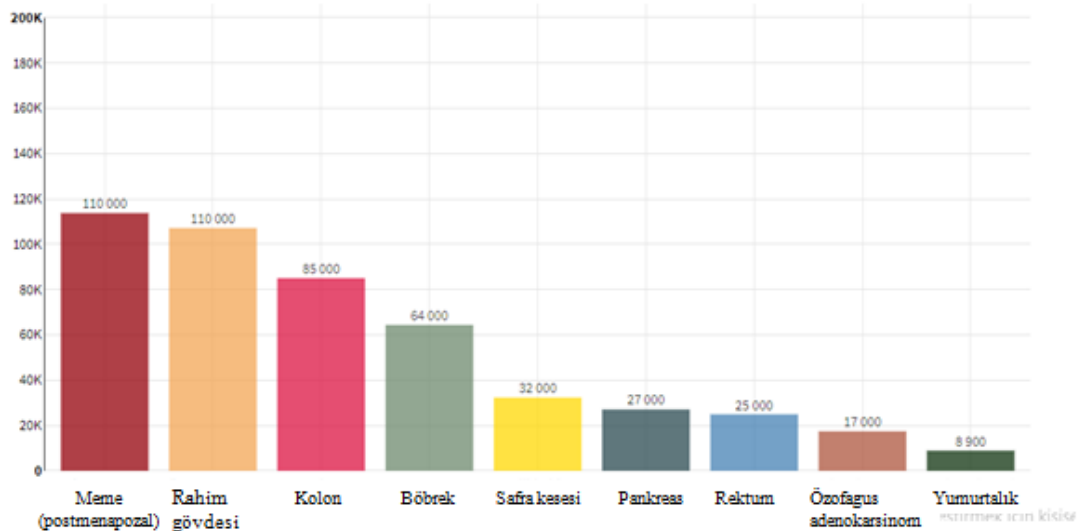
Şekil 2.4 Memedeki Lenf Damarlarının Lenf Sıvısını Taşıdığı Düğümler (Yetişir, 2018)

Meme kanserlerinin %95'inden fazlası, in situ (yerinde) karsinomlar ve invaziv (yayılmacı) karsinomlar şeklinde epitel hücrelerde ortaya çıkan adenokarsinomlardır (American Cancer Society, 2018). Eğer kanser hücreleri, lenf düğümlerine sıçramış ise lenfatik sistem boyunca taşınarak metastaz yapma olasılığı yüksektir. Meme karsinomlarında çoğunlukla kemik ya da akciğer metatazı söz konusudur (Shenouda ve Alahari., 2009). Ailesindeki kadınlarda meme kanseri hikayesi bulunan kadınlar normalden çok daha fazla risk taşımaktadır. Bu bireylerde hastalık 10-12 yıl daha erken çıkmaktadır (Özlüer, 2018).

2.1.4 Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Kadınlarda en sık görülen tür meme kanseridir. Kadın meme kanseri dünyada önde gelen beşinci ölüm nedenidir (627.000 ölüm, %66). Dünya genelinde kadınlarda teşhis edilen tüm yeni kanser vakalarının yaklaşık %24.2' si meme kanseridir ve 185 ülkenin 154' ünde en yaygın olanıdır (IARC, 2018).

2015 yılı içerisinde kadınlarda en yüksek sayıda ölüme neden olan kanser türüdür (3.853 kişi). Bu kanser türü tanı konulan her 4 kadın kanserinden biridir. Ülkemizde meme kanseri tanısı alan kadınların %40,4'ünün 25-49 yaş aralığında yer aldığı, %44,5'inin 50-69 yaş arasında olduğu görülmektedir (Hacıkamiloğlu ve ark., 2017).



Şekil 2.5 2012' de Dünyadaki Her İki Cinsiyet Arasında Anatomik Bölge ile Gösterilen Aşırı Vücut Kitle İndeksine Atfedilebilen Kanser Vakaları (Tüm Anatomik Bölgelerde) (Global Cancer Observatory, 2018)

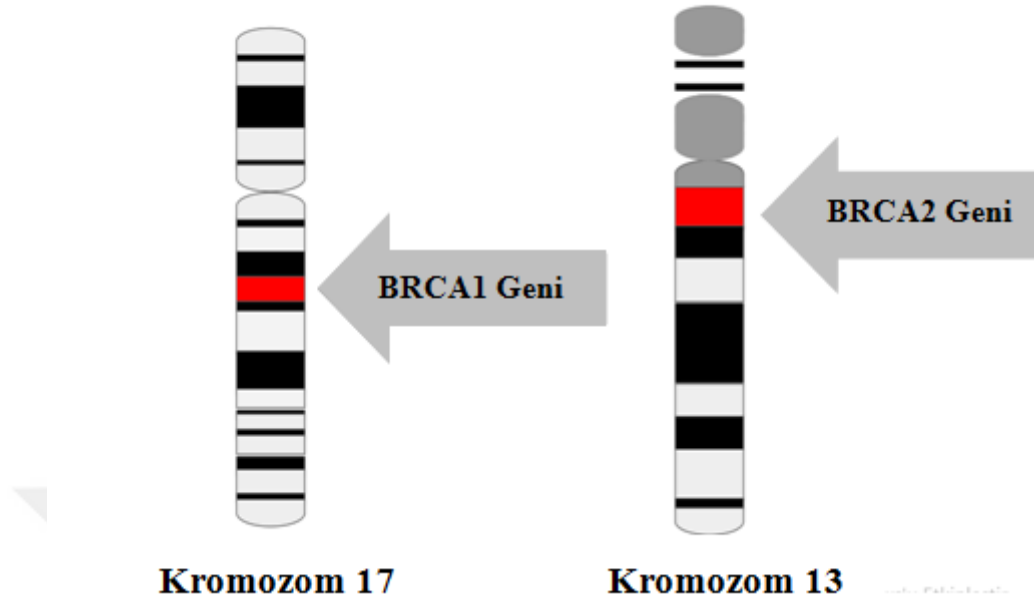
2.1.5 Meme Kanserinde Risk Faktörleri

Çizelge 2.1 Meme kanserinde risk faktörleri

1. Yaşam Tarzına Bağlı Risk Faktörleri	2. Değiştirilemeyecek Risk Faktörleri
i. Alkol kullanımı	i. Yaşlanma
ii. Obezite	ii. Genetik miras
iii. Fiziksel aktivitenin az oluşu	iii. Ailede meme kanseri öyküsü
iv. Çocuk sahibi olmamak yada 30 yaşından sonra doğum yapmak	iv. Menstrüasyon döngüsünün erken başlaması
v. Bebek emzirmemek	v. Yoğun meme dokusu
vi. Doğum kontrol yöntemleri	vi. Irk ve etnik köken
vii. Menapoz sonrası hormon tedavisi	vii. Radyasyona maruz kalmak

Özellikle obezite menapoz sonrasında, kadınlarda meme kanseri için risk faktörü oluşturmaktadır (Harvie ve ark., 2003). Kadınlarda östrojen hormonuna bağlı olarak meme kanseri görülme sıklığı artmıştır (Koyunoglu ve ark., 2013). Yüksek endojen östrojen seviyesinin memede menapoz sonrası karsinomanın ilerlemesini arttırdığı rapor edilmiştir. (Rose ve ark., 2004).

Meme kanserinde en çok ilişkilendirilen genler HER-2 ve ER genleri olmak üzere c-myc, ras ve Siklin D1 genleridir. Bu genlerde meydana gelen varyasyonlar meme kanseri oluşumuna neden olmaktadır. C-myc geni insan genomundaki genlerin %15'inin ekspresyonunu etkileyen fosfoprotein niteliğinde transkripsiyon faktörüdür. Myc proteini, hücre çoğalması yanında farklılaşma, apoptoz ve metabolizma gibi daha birçok işlevden de sorumludur. BRCA1 ve BRCA2 genleri meme kanserinde genetik yatkınlıktan sorumlu genlerdir. Tümör baskılayıcı genler, sağlıklı hücrelerde kontrolsüz hücre büyümesini engellemeye yardımcı olurlar. Tümör baskılayıcı genlerdeki genetik mutasyonlar, genlerin fonksiyonunu baskılayarak kalıtsal meme ve yumurtalık kanser gelişimi yatkınlığını arttırmaktadır (Öztürk, 2006).



Şekil 2.6 Kromozomlarda BRCA1 ve 2'nin Lokasyonu (Özlüer, 2018)

Irklar arası farklılıklar da meme kanseri mortalitesi için önemli bir faktördür. Amerika Birleşik Devletleri'nde Afro-Amerikan kadınlarda, Caucasians (Beyaz ırk) kadınlara göre daha agresif meme kanseri görülme sıklığının olduğu belirtilmektedir (Dunn ve ark., 2010).

2.1.6 Meme Kanserinde Evreleme

Evreleme, kanserin ne kadar büyük ve yayılmış olduğunun derecelendirilmesidir. Meme kanserinin evrelerini belirlemek için kullanılan en yaygın sistemi Uluslararası Kanser Kontrol Birliği- Amerika Birleşik Kanser Komitesi (UICC-AJCC)' ne ait TNM evreleme sistemidir.

TNM sisteminde:

T: Ana tümörün büyüklüğünü ve boyutunu belirtmektedir. 0' dan 4' e kadar derecelendirir. Ana tümöre primer tümörde denir.

N: Kanserli bölgeye yakın lenf nodlarının sayısını belirtmektedir. 0' dan 3' e kadar derecelendirilir.

M: Kanser metastazı olup olmadığını göstermektedir. 0 ve 1 olarak derecelendirilir (American Cancer Society, 2018).

2.1.7 Meme Kanseri Hücre Hatları

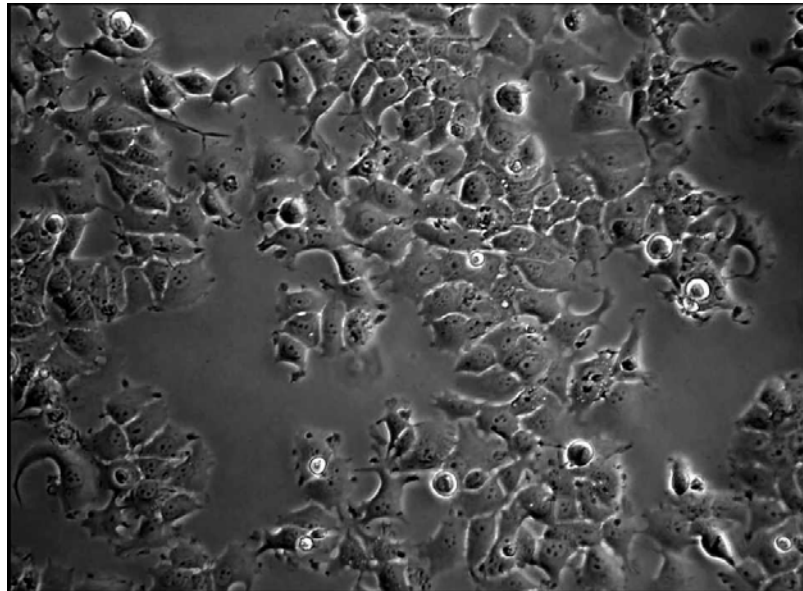
1900'lerin ortalarına doğru laboratuvarlarda hayvansal hücre kültürü teknikleri uygulanmaya başlanmış olsa da dokulardan alınarak özel ortamlarda ve kaplarda yaşaması sağlanan ve kültürü devam ettirilebilen hücre hatları 19. yy ortalarında karşımıza çıkmaktadır. 1951 yılında Baltimore laboratuvarında George Gey tarafından ilk kanser hücre hattı oluşturulmuştur (Gey ve ark., 1952; Dündar, 2018).

Bunun yanında hTERT ölümsüzleştirilmiş meme epitelyum hücre hattı da kontrol olarak kullanılmaktadır.

2.1.7.1 MCF-7

İnsan meme kanseri modellerinden biri olan MCF-7 hücre hattı, 1970 yılında 69 yaşındaki beyaz ırk bir kadından elde edilmiştir. MCF-7 hücre hattının ismi 1973' de Herbert Soule ve arkadaşları tarafından Detroit' de kurulan hücre hattı enstitüsüne ithafen Michigan Cancer Foundation-7' nin baş harflerinden gelmektedir. The Michigan Cancer Foundation şuan Barbara Ann Karmanos Cancer Institute olarak da bilinmektedir (Levenson ve Jordan, 1997).

MCF-7, büyük ölçüde östrojen reseptör luminal epitel hücre tipindedir. ER aracılığı ile hormon duyarlılığının olması sebebiyle hormonal yanıt çalışmalarında çokça kullanılan ideal bir model olarak büyük öneme sahiptir (Levenson ve Jordan, 1997).

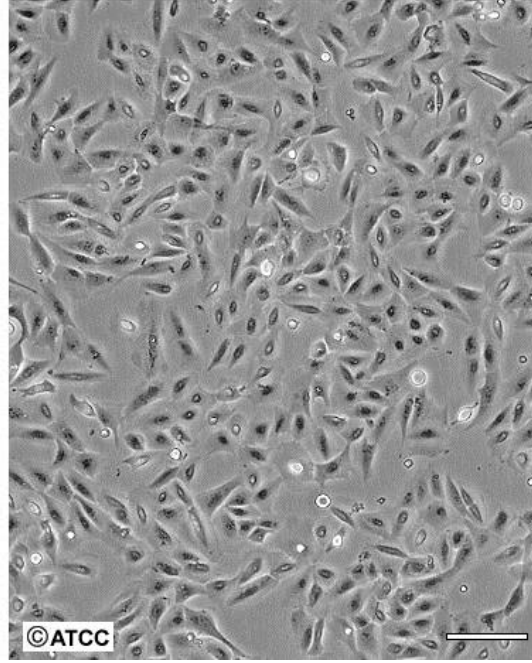


Şekil 2.7 MCF-7 Hücre Hattı (ATCC, 2018)

2.1.7.2 hTERT-HME1

İnsan telomeraz proteini RNA alt ünitesinden (insan telomeraz RNA (hTR) (Feng ve ark., 1995), bir protein bileşeni (human telomerase associated protein 1 (hTEP1)) (Harrington ve ark., 1997), ve katalitik alt ünite hTERT (human telomerase reverse transcriptase)' dan meydana gelen bir hücre hattıdır (Nakamura ve ark., 1997).

hTERT-HME1 normal memeli primer epitelyum hücrelerinden elde edilmiştir. Bu hücreler bir retroviral pBabepuro+HTERT vektörü ile enfekte edilmiştir ve ölümsüz klonlar seçilinceye kadar büyütme ortamında kültüre edilmiştir. hTERT-HME1 hücreleri bir çok çalışmada kontrol olarak kullanılmaktadır (Nakamura ve ark., 1997; Simonsson, 2003).



Şekil 2.8 hTERT-HME1 Hücre Hattı (ATCC, 2018)

2.1.8 Meme Kanserinde Moleküler Subgruplar

Meme kanseri klinik, histopatolojik vb. biyolojik özellikleri ve tedaviye verdikleri yanıtlara göre farklılık gösteren heterojen bir tümördür (Fulford ve ark., 2006). Meme kanserinin gruplandırılmış alt tipleri iki temel epitel hücre tipinde görülen gen ifade profiline göre isimlendirilmişlerdir. Lüminal epitel hücreler normal meme dokularında lobül veya kanalların lümenini kaplayan tek sıralı hücrelerdir. Lüminal hücreleri çevreleyen sekonder hücreler ise bazal miyoepitelyal hücrelerdir (Valentin ve ark., 2012).

Perou ve ark., (2000) tarafından yapılan kapsamlı ve çok etki yaratan gen ifade analizi çalışmalarıyla meme kanseri önce 4 gruba ayrılmıştır (Perou ve ark., 2000). Daha sonra luminal tip kendi arasında luminal A ve luminal B'ye ayrılarak sonuçta 5 alt tip oluşturulmuştur (Sorlie ve ark., 2003). Son olarak ise 2007 yılında yapılan çalışma ile claudin low bu alt tiplere eklenmiştir. Böylece moleküler özelliklere göre meme kanseri 6 alt tipe ayrılmıştır (Herschkowitz ve ark., 2007). Her bir alt tipin doğal seyri ve tedaviye verdiği yanıt kendine özgüdür.

Çizelge 2.2 Meme kanseri moleküler alt tipler, özellikleri ve bu özelliklere sahip farklı hücre hatları (Prat ve ark., 2010)

Sınıflandırma	Özellikleri	Örnek Hücre Hatları	Meme kanser yüzdesi
Lüminal A	Yüksek ER ekspresyonu, Genellikle kemoterapiye duyarlı	MCF-7, T47D, SUM185	%30
Lüminal B	Yüksek ER ekspresyonu, Kemoterapiye değişken olarak duyarlı	ZR-75, BT474	%20
Basal tip	Negatif ER ekspresyonu, genellikle kemoterapiye duyarlı	SUM190, MDA-MB-468	%10-25
Claudin-low	Negatif ER ekspresyonu, Orta derecede kemoterapiye duyarlı	MDA-MB-231, BT549	%5-7
HER2	Negatif ER ekspresyonu, Kemoterapiye duyarlı	MDA-MB-453, SKBR3	%15-20
Normal Meme Benzeri	Negatif ER ekspresyonu		%7

2.1.9 Meme Kanserin Tedavisinde Kullanılan Yöntemler

Günümüzde meme kanserinin tedavisinde 5 temel yöntem kullanılmaktadır. Bunlar kısaca şu şekilde sıralanmaktadır:

- Cerrahi müdahale: Sadece kanserli dokunun alınması veya mastektomi adı verilen memenin tamamının alındığı uygulamadır.
- Radyoterapi: X ışını, protonlar veya elektron demeti gibi radyasyon kaynakları kullanarak kanserli hücrelerin öldürülmesidir.
- Hormon Tedavisi: Bazı kanser türleri östrojen ve progesteron pozitif olabilirler. Kanserin östrojen pozitif olması, kanser hücrelerinin östrojen hormonuna bağlanan

reseptörleri bulunduğuna ve bu şekilde hormona bağlanarak büyüdükleri anlamına gelmektedir. Tamoksifen gibi bazı ilaçlar meme kanseri hücrelerindeki östrojen reseptörlerini bloke ederek kanserli hücrelerin çoğalmasını önlemektedir. Bazı hormon tedavilerinde ise direk kandaki östrojen hormon seviyesi düşürülerek kanserin büyümesi yavaşlatılarak ve tekrar etmesi önlenmektedir.

- Kemoterapi: Antikanser ilaçlar kullanılarak yapılan tedavidir. İlaçlar hastaya ağız veya damar yoluyla verilmektedir.

- Hedefe Yönelik Tedavi: Tedavi edici ajanlar direkt olarak kanser hücrelerindeki proteinlere bağlanırlar (Özlü, 2018).

2.2 Telomer

Kromozomların uçlarında bulunan, DNA ve protein içeren bölgelere “Telomer” adı verilir. Sahip oldukları DNA dizilimi ile ve ayrıca işlev bakımından kromozomların diğer bölgelerinden ayrılırlar. Telomeraz ilgili kromozomal bölgenin sentezinden sorumlu enzimdir (Atlı, ve Bozcuk, 2002). Telomer kavramı, 1930’lu yıllardan beri bilinmektedir. Bu yıllarda Barbara Mc Clintock *Zea mays* ve Hermann J. Müler *Drosophila melanogaster* kromozomları üzerinde çalışmışlardır. Müler, X ışını radyasyonu uygulamasından sonra kromozomal yapı değişiklikleri ve bunların frekanslarını incelediği çalışma sonucunda, terminal bölgelerdeki inversiyon ve delesyonların çok az görüldüğü sonucuna varmıştır. Araştırmalardan yeni bilgiler elde edildikçe, normal kromozomlarda bulunan telomer yapılarının oldukça kararlı olduğu, kırık uçlu kromozomların aksine hem kırık uçlu kromozomların uçları ile hem de diğer telomerlerle birleşmediği anlaşılmıştır. Bu bilgiler ışığında genomik kararlılığı sağlayan kromozom uçlarındaki yapıların varlığı keşfedilmiştir (Atlı ve Bozcuk, 2002; Blosco, 2005). Kromozomların uç bölgelerinin bütünlüğün korunmasında telomeraz enzimi sayesinde gerçekleşen telomer sentezi büyük bir öneme haizdir. Telomerik DNA organizmalarda az miktarda bulunmaktadır, bu oran toplam DNA içeriğinin yaklaşık 1 milyonda 3’üdür.

Organizmalarda GT ve CA ikili nükleotid tekrarlarının bolca bulunduğu telomerik DNA, insanda özellikle üreme hücrelerinde kromozomların terminal kısımlarında 10 kb’lık AGGGTT şeklinde telomerik tekrarları oluşturmaktadır. Birbirinden farklı

organizmalarda, telomerlerinin uzunluk ve tekrar dizilerinde farklılıklar görülmektedir (Güneş, 2003).

Telomerler kromozomları yıkım, rekombinasyon ve füzyon gibi anormal olaylara karşı korumaktadır. Kromozomlara bütünlük ve stabilite sağlarlar. Aynı zamanda kromozomların belirli bir pozisyonu koruması için nükleus zarına tutunmaktadırlar (Güneş, 2003).

2.2.1 Telomeraz

Kromozomların uçlardaki TTAGGG DNA dizi tekrarları sentezleyen ve özel bir DNA polimeraz enzimi olan Telomeraz, ribonükleoprotein yapıdadır. İlk defa 1970'lerde *Tetrahymena*'da tanımlanan telomeraz enzimi, daha sonraki yıllarda insan HeLa hücrelerinde keşfedilmiştir. Yetişkin kök hücreleri ve embriyonik hücreler de aktif olan telomeraz enzimi, normal somatik hücrelerde bulunamamakta, kanser hücrelerinde ise yeniden aktive olmaktadır (Morin, 1997).

Uzun süre yapılan araştırmalar sonunda telomeraz enziminin protein alt birimi olan telomeraz revers transkriptaz (TERT) bulunmuştur. Bu protein çeşitli canlı gruplarında farklı isimler almaktadır. Örneğin; *Homo sapiens*'de hTERT, *Tetrahymena thermophila*'da Tt-TERT, *Mus musculus*'da MTERT, *Oxytricha trifallax*'da Ot-TERT, *Saccharomyces cerevisiae*'de Sc-Est2p, ve *Euplotes aediculatus*'da EA-p123 adını almaktadır (Griffith, 1999).

Ters transkriptaz inhibitörleri (RTIs) ağırlıklı olarak, HIV enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılmaktadır. Telomerazın RNA-bağımlı DNA polimeraz aktivitesinden dolayı insan telomeraz ters transkriptaz katalitik alt ünitesinin aktivitesini bloke edebilmektedir (White ve ark., 2001; Rossi ve ark., 2009). Önceki çalışmalar, bazı RTIs'lerin birkaç insan kanser hücresindeki RT aktivitesini inhibe edebildiğini, hücre büyüme hızını azalttığını ve farklılaşmayı indükleyebildiğini göstermektedir (Carlini ve ark., 2010). Telomeraz inhibisyon tedavisi, kemoterapi, radyasyon veya diğer hedeflenmiş terapötiklerle kombinasyon halinde kullanıldığında en etkili olabilmektedir (Buseman ve ark., 2012). Bu nedenle, RTIs'lar yeni antikanser terapötiklerinin geliştirilmesinde bir hedef olabilmektedirler.

2.2.2 Telomerler ve Kanser

Kanser vakaları ile hücredeki kromozomların telomer uzunluğu ve hücrenin telomeraz etkinliği arasındaki ilişki incelendiğinde önemli sonuçlara ulaşılmıştır. *In vivo* ortamda telomeraz aktivitesi ve tümör oluşumunun ilişkili olduğuna dair ipuçları bulunmaktadır. Telomeraz etkinliğinin olmadığı Bening tümörlerde ve hücre bölünmesinin artmasıyla kısalan telomerleri sayesinde tümörlerin erken dönem oluşumlarına döndükleri belirlenmiştir. Daha agresif ilerleyen metastatik tümörlerde ise yüksek telomeraz aktivitesi bulunmaktadır (Atlı ve Bozcuk, 2002).

Nakatani ve arkadaşları'nın normal ve tümörlü beyin dokusundaki araştırmasında, normal beyin dokusunda tespit edilemeyen telomeraz aktivitesinin malign tümörlerde %81, metastatik tümörlerde ise %100 olarak ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Telomeraz aktivitesine sahip olan ve olmayan hastaları karşılaştıran araştırmacılar, aktiviteye sahip hastaların daha kötü prognozlara ve daha kısa yaşam sürelerine maruz kaldıklarını rapor etmiş, telomeraz aktivitesinin beyin tümörlerinin teşhis edilmesinde ve prognoz belirlemede kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (Nakatani ve ark., 1997).

Endometrium kanseri, ABD'li kadınlarda sık görülen bir kanser türü olup, özellikle menapozdan sonraki dönemde pik yaptığı görülmektedir. Kyo ve arkadaşları çalışmalarında, hücrelerin çoğalma kapasitesi ile endometriumdaki telomeraz aktivitesinin bağlantılı olduğunu ve hTERT ekspresyonunun menstrüel döngü fazlarında karakteristik olarak farklılaştığını bildirmişlerdir (Kyo ve ark., 1997). Bu nedenle telomeraz aktivitesinin, menapoz sonrası dönemde olan kadınlarda, endometrial kanserin erken dönem teşhisinde belirleyici olması mümkün görülmektedir.

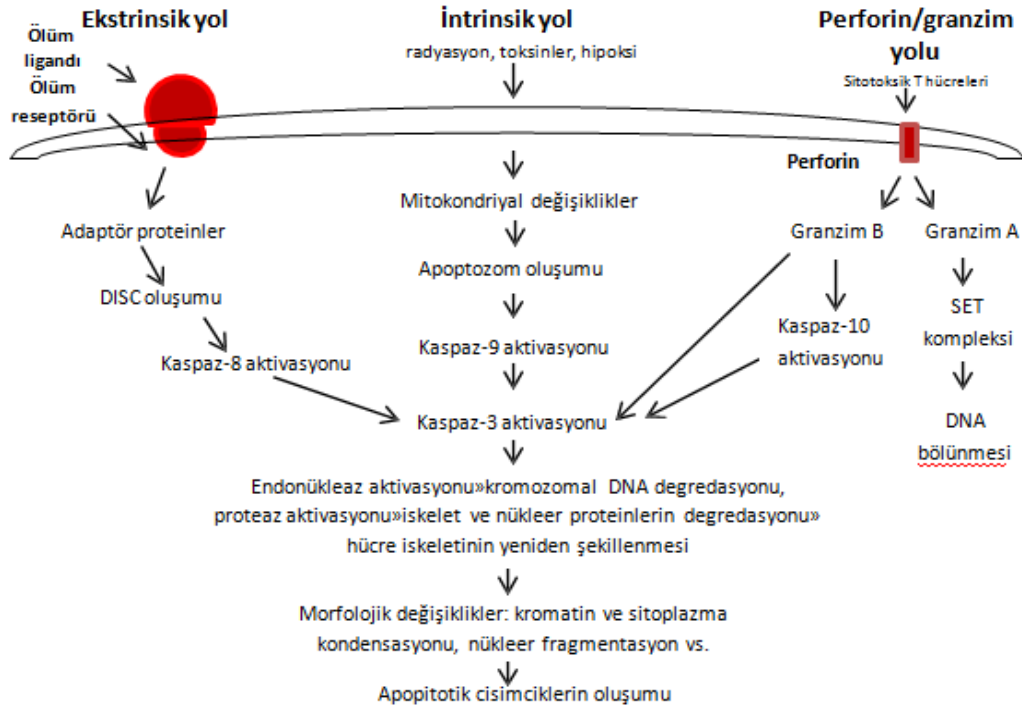
2.3 Apoptoz

Programlı hücre ölümü kavramı 1965 yılında böceklerin başkalaşımının gözlenmesiyle gündeme gelmiş, fakat "apoptoz" terimi ilk defa 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 'fizyolojik hücre ölümü' olarak tanımlanmıştır (Kerr ve ark., 1972; Bakır, 2018). Apoptoz ilk kez yine Kerr ve Wyllie tarafından, glukokortikoidler ile muamele edilen timus hücreleri ile yapılan çalışmada gösterilmiştir. Fizyolojik olarak ölen hücrelerin nükleuslarında kromatin parçalarını ve diğer organellerin iyi bir şekilde korunduğunu gözlemlediklerinden dolayı bu

olaya 'büzüşme nekrozu' denilmektedir (Akşit ve Bildik, 2008). Hücrelerin apoptoza gidip gitmeyeceği bir uyarın ile mümkündür ve uyarının derecesi ile tipi bu aşamada belirleyici faktör olmaktadır (Eröz ve ark., 2012).

2.3.1. Apoptoz Mekanizması

Başlıca iki ana apoptotik yol bulunmaktadır: Ekstrinsik (dış) ve intrinsik (iç/mitokondriyal) yol. Bu iki yol birbiriyle bağlantılı olmakla birlikte, bir yolda rol alan moleküller diğer yolu da etkilemektedir. Bu iki ana apoptotik yol dışında ek olarak perforin-granzim bağımlı hücre ölümünü ve T-hücre aracılı sitotoksisiteyi içeren bir başka yol daha bulunmaktadır. Apoptotik yollar şekil 10'da gösterilmiştir (Elmore, 2007). Bu üç yol, farklı mekanizmalarla başlayıp asıl efektör olan apoptotik yolda (kaspaz 3 aktivasyonu) birleşerek apoptotik cisimler oluşturmaktadır.

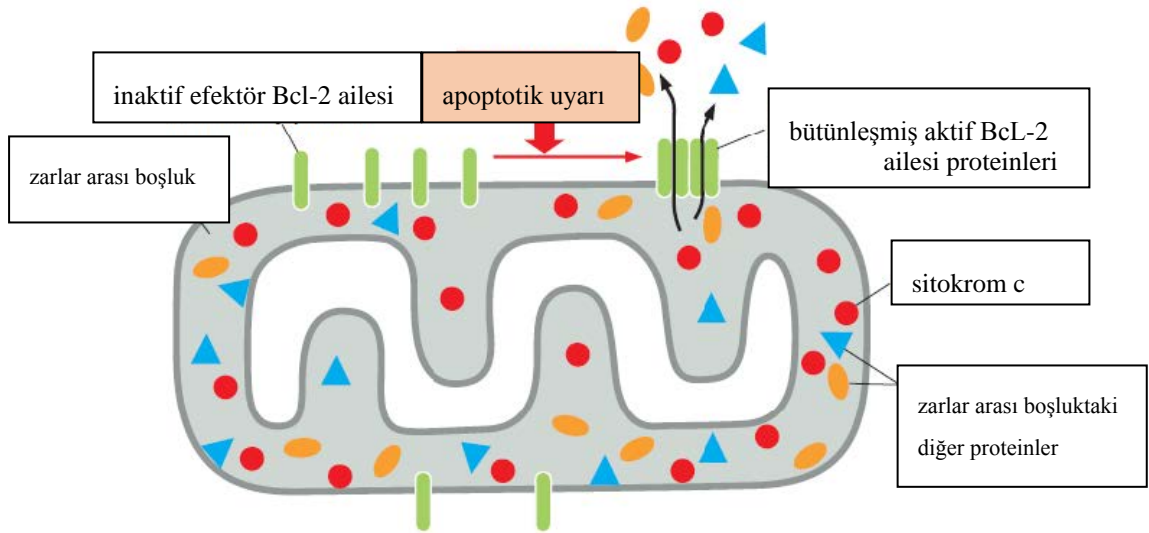


Şekil 2.9 Apoptoz Yolaklarının Gösterimi (Elmore, 2007)

Ekstrinsik yol; apoptozun zarlar arası reseptör aracılı etkileşimlerle başladığı yoldur. Bu sinyal yolunda ölüm reseptörlerini içeren TNF reseptör gen ailesinin üyeleri rol oynamaktadır (Eröz ve ark., 2012).

İntrinsik yol; bu yolda apoptozu başlatan mitokondriyal olaylardır. Radyasyon, toksinler, hipertermi, hipoksi, serbest radikaller ve viral infeksiyonlar çeşitli uyaranlardandır (Elmore, 2007).

BcL-2 protein ailesi üyeleri, apoptozun intrinsik yolağındaki genlerin ayarlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bu proteinler hücre içi apoptotik yolu endonükleaz G, sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AİF) gibi diğer zarlar arası mitokondriyal proteinlerin sitozole salınmasını kontrol ederek düzenlemektedirler (Şekil 11). Bu proteinler mitokondriyal zar geçirgenliğini kontrol ederek apoptozu indükleyebilmekte veya inhibe edebilmektedirler. Dolayısıyla BcL-2 protein ailesinin bu iki sınıfının aktivitesi arasındaki denge, memeli hücresinin hücre içi yolla apoptozu uğrayıp uğramayacağını belirlemektedir (Elmore, 2007; Akşit ve Bildik, 2008; Eröz ve ark., 2012; Alberts ve ark., 2015).



Şekil 2.10 Pro-apoptotik BcL-2 Proteininin İntrinsik Apoptotik Yolaktaki Rolü (Alberts ve ark., 2015)

p53, bir tümör baskılayıcı genidir. Hücrede bir gen hasarı oluştuğunda transkripsiyon düzenleyici gen olan p53 geni aktive olmaktadır. Bu protein ürünü doğrudan DNA'ya bağlanmakta ve hücreye özgü bir şekilde hücre döngüsünü G1 fazında durdurarak tamir mekanizmalarını aktive etmek için hücreye vakit kazandırmakta veya hücre hasarı onarılamayacak durumda ise hücreyi apoptozu yönlendirmektedir (Suliman ve ark., 2015).

Perforin/granzim yolu; salgısal apoptotik bir yoldur. Patojenle enfekte olan hücrelerin veya tümör hücrelerinin öldürülmesinde etkilidir. Perforinler ve granzimler, NK ve CTL hücrelerinin sitoplazmik salgı granüllerinin içinde bulunmaktadır (Elmores, 2007).

2.3.2 Apoptoz ve Kanser

Hücre bölünmesi, büyümesi, farklılaşması ve bunun kontrolü temelde genler ile sağlandığı için kanser bu genlerde oluşmaktadır. Tümör baskılayıcı genler, onkogenler ve DNA tamir genleri kanserde temel rolü olan gen gruplarıdır. Normal şartlarda hücre büyümesi ve farklılaşmasından sorumlu olan protoonkogenler mutasyon vb. durumlar ile onkogen haline dönüşebilmektedirler. Ras, Erk, Myc genleri bilinen onkogenlerdir. Eğer DNA tamir genlerinde herhangi bir işlev kaybı söz konusu ise, hücre onarılamayacağı için hücreyi ölüme (apoptoz, nekroz) götürmektedir. Tümör baskılayıcı genler ise herhangi bir şekilde (mutasyon, delesyon vb.) işlevlerini yitirirlerse hücre döngüsü bozulmakta ve kanser gelişebilmektedir. p53 geni en iyi bilinen tümör baskılayıcı genlerden biridir (Baykara, 2016). Apoptozda çokça mühim rolü olan p53 tümör baskılayıcı geninde meydana gelen mutasyonlar ve Bcl-2 gen ailesi proteinlerindeki değişiklikler kanser hücrelerindeki apoptoz mekanizmalarının bozulmasında rol oynamaktadır (Eröz ve ark., 2012).

İnsanlarda görülen kanser vakalarında en sık rastlanan mutant genlerden biri olan p53 tümör baskılayıcı gen, kanser oluşumunda büyük önem arz etmektedir. Bu gen aynı zamanda hücre döngüsünün düzenlenmesinde etkilidir. Ayrıca apoptozun indüklenmesinde ve inhibisyonunda rol oynayan bir çok gen ifadesini de düzenlemektedir. DNA'da herhangi bir hasar meydana geldiği zaman p53 proteini sentezlenmekte ve hücre siklusu durmaktadır. Bu aşamada eğer mümkünse DNA onarılır, mümkün değilse apoptoz başlatılmaktadır (Sancar ve ark., 2004).

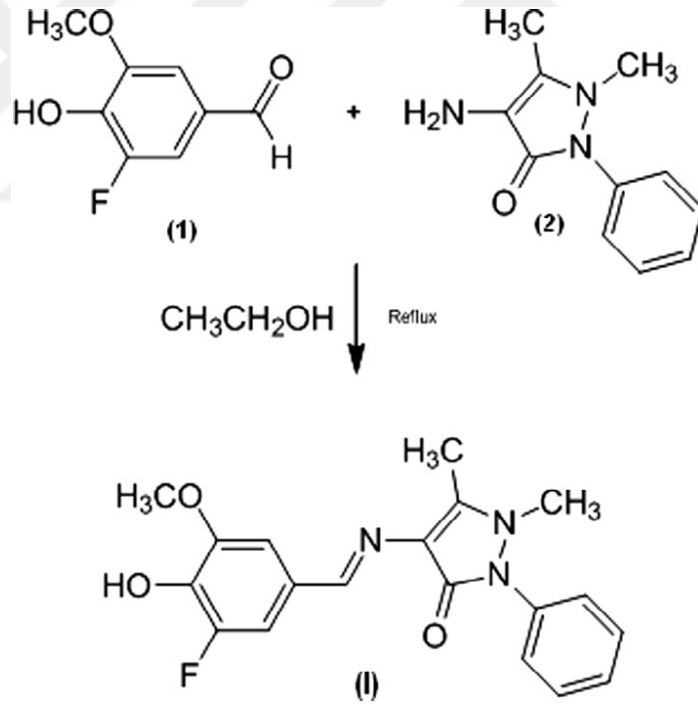
2.4 Schiff Bazları

2.4.1 Schiff Bazlarının Yapısı ve Genel Özellikleri

İlk kez 1864'te Alman kimyacı Schiff tarafından bir aktif karbonil ve bir primer amin grubunun kondenzasyon reaksiyonu sonucu elde edilen ve azometin grubu içeren bileşiklere "Schiff Bazları" denilmektedir (Prakash ve Adhikari, 2011). $RCH=NR'$ formülüyle gösterilir. İlk kez Pfeiffer ve arkadaşları, azometin grubu

içeren çeşitli Schiff bazı sentezleyerek ligand amacıyla kullanmışlardır. Çalışma grubu ayrıca bu tür Schiff bazlarının bakır komplekslerini de sentezlemişlerdir (Köksal, 1996).

Schiff bazları (imin), primer aminler ile karbonil bileşiklerin (aldehitler ve ketonlar) kondenzasyonu sonucu oluşmaktadır. $RCH=NR$ formülü ile gösterilen Schiff bazları ligand olarak kullanılır ve $C=N$ grubu içerirler. Sentezi başlıca iki basamaktan oluşmaktadır. Birinci basamakta, bir primer amin ve bir karbonil grubu birleşerek karbonil amin ara bileşiğini oluştururlar. Birinci basamakta oluşmuş karbonil amin ara bileşiği dehidratasyona uğradığında Schiff bazının olduğu ikinci basamak gerçekleşir. Özellikleri arasında en önemlisi biyolojik sistemlerdeki etkinlikleridir. Bu biyolojik etkinliklerin farklılığı sentezlenen bileşiğin yapısında bulunan farklı atom ya da gruplara, bunların konumuna ve komplekslerinde kullanılan metal atomunun özelliğine göre değişmektedir (Savalia ve ark., 2013).



Şekil 2.11 4-[(4-Hidroksi-3-floro-5-metoksi-benziliden)amino]-1,5-dimetil-2-fenil-1,2-dihidro-pirazol-3-on (I) Bileşiğinin Sentezi (Alpaslan ve ark., 2015)

Schiff baz kompleksleri, hazırlayıcı erişilebilirlik ve yapısal çeşitlilik nedeniyle ana grupta ve geçiş metal koordinasyon kimyasında en önemli stereokimyasal modeller arasında sayılmaktadır (Prakash ve Adhikari, 2011).

2.4.2 Schiff Bazlarının Kanserde Kullanımları

Schiff bazları (SB) ve türevleri hücre çoğalmasında kritik konumdaki DNA artışı ve ayrıca RNA sentezini engellemektedirler. Bu özellikleri onları ribonükleotitleri indirgeyerek deoksiribonükleotit sentezine yardımcı olan ve hücre çoğalması ile tümör oluşumu ve gelişiminde çok önemli bir yere sahip olan ribonükleotit redüktaz (RR) denen enzimin en önemli ve güçlü inhibitörleri olarak konumlandırmaktadır (Alvero ve ark., 2006).

Metal bazlı antikanser ilaçlarına olan ilgi, antikanser ilaçlardan biri olan cisplatin geliştikten sonra artmıştır (Abrams ve Murrer, 1993). Cisplatin kullanımında toksisite ve diğer ciddi klinik sorunlar gözlemlendiğinden (Alderden ve ark., 2006), daha spesifik antikanser etkileri üretebilecek diğer metal ve ligandların araştırılması devam etmektedir.

Schiff bazları ve onların metal kompleksleri antifungal, antibakteriyal, antimalariyal, antiproliferatif, anti-inflamatuar, antiviral, antikanser, antipiretik ve herbisidal özellikler içeren geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahiptir (Przybylski, 2009; Holla ve ark., 2003).

Hücre bölünmesini yakından ilgilendiren ve DNA metabolizmasında rol oynayan kimyasal nükleazlardan en etkilisi, aktif bölgelerinde, redoks aktif Cu, Fe ya da redoks-inaktif Zn gibi geçiş metal iyonları içermektedir. En kapsamlı incelenen kimyasal nükleazlar arasında olan Cu(II) komplekslerinin, DNA'nın hidrolizi veya oksidatif bölünmesini indüklemeye yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Genellikle Cu(II) komplekslerinin DNA bölünme aktivitesi, oksitleyici ve indirgeyici ko-reaktantların varlığında gözlenmektedir (Pachon ve ark., 2004).

Bakır(II) komplekslerinin aracılık ettiği sitotoksisite mekanizması, hücre döngüsü durdurma ve apoptoza veya reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna ve daha sonra hücre ölümüne yol açan DNA'yı bağlama ve parçalama yeteneklerinden kaynaklanabilmektedir (Jamieson ve Lippard, 1999).

Bakır kompleksleri, biyolojik açıdan redoks özellikleri ve nükleazlar için yüksek afinitesi nedeniyle geniş çapta incelenmiştir (Humphreys ve ark., 2002; Koichiro ve ark., 2004; Chen ve ark., 2007). Bunların oksidatif, hidrolitik ve fotolitik nükleaz aktiviteleri sergilediği bildirilmiştir (García-Giménez ve ark., 2009; Dhar ve ark., 2003; Zhang ve ark., 2004). Sitotoksik ve antiviral faaliyet gösteren bis(salisilat) bakır(II) kompleksleri için kurkumin diketiminler gibi antioksidan moleküller ile sinerjik etki bildirilmektedir (Annaraj ve ark., 2005). Bundan başka, bakır konjuge edilmiş glisin T hücreleri akut lenfoblastik lösemi (CEM) hücrelerinde ilaca direnci tersine çevirdiği gösterilmektedir (Majumder ve ark., 2006).

$>C=N$ bağıyla karakterize edilen ve Schiff bazlarını da kapsayan imin bileşikleri biyolojik sistemlerde önemli uygulamalara sahiptir. İmin yapısında olan bileşikler ve onların metal kompleksleri antifungal, antibakteriyal, antiviral, antitümoral, antiproliferatif, antiinflamatuvar, antipiretik, antineoplastik ve antioksidan özellikler içeren geniş bir biyolojik aktivite göstermektedirler ve bu tip farmakolojik aktivitelerinden dolayı büyük ölçüde araştırılmaktadırlar (Pires dos Santos ve ark., 1998; Yang ve ark., 2000; Przybylski ve ark., 2009).

İminodihidrotriazoller ise rahim kanser hücrelerinde (HeLa, Siha) *in vitro* antiproliferatif aktivite göstermektedir (Shi ve ark., 2011). 2-imino- dihidropiridin-3-karbonitril türevleri ise anti-inflamatuvar aktivite gösterirken, serinin bazı üyeleri güçlü antipiretik etkinlik sergilemektedir (Eissa ve ark., 2009). Suda çözünebilen isoindolokinoksalin imin türevlerinin de çok hedefli sitotoksik aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir (Parrino ve ark., 2015).

Bu tip bileşikler özellikle antikanser araştırmalarında incelenmekte ve sitotoksik etkilerinin olduğu da görülmektedir. Ayrıca metal kompleksli türevlerin etkinliğinin daha yüksek olduğu (Parashar ve ark., 1990) ve DNA-RNA sentezini durdurucu etkilerinin bulunduğu ve bu etkilerini ribonükleotit redüktaz enzimini inhibe ederek gerçekleştirdikleri görülmektedir (Pignatello ve ark., 1994; Cory ve ark., 1995). Yeni sentezlenen çeşitli imin türevlerinin melanoma, over kanseri ve lösemi tedavisinde kullanılan hidroksilüre antikanser ilacından daha etkili olduğu ve kemoterapötik ajan olarak ümit vaat ettiği bildirilmiştir (Ren ve ark., 2002).

2.5 Bakır (Cu)

Bakır, insan metabolizmasında önemli bir eser elementtir. Bir geçiş metali olan Bakır'ın, Cu^0 , Cu^{+1} ve Cu^{+2} şeklinde oksidasyon formları bulunmaktadır. Bununla beraber sınıflandırmada, yoğunluğu 5 g/cm^3 'ün üzerinde olduğu için ağır metal olarak da geçmektedir (Kiaune ve Singhasemanon, 2011). Bakır vücutta önemli fonksiyonlara sahip olup özellikle derinin esnek bölümlerinin ve bazı iç organların yanında kemik ve saç gibi yapıların temel bileşenidir. Yetişkin insan vücudunda ortalama 50-120 mg bulunmaktadır. Bu bakırın %90 kadarı kas, kemik ve karaciğerde depolanmış halde bulunmaktadır (Özbolet ve Tuli, 2016).

Bakır ayrıca, vücutta demir'in düzenli bir şekilde kullanılması için de elzemdir. Bakır insan vücudundaki tüm doku ve organlarda bulunmaktadır. Karaciğerde, kalp, beyin, bağırsak ve midenin çeşitli kısımlarında yüksek derişimlerde bulunmaktadır. Bakır olmazsa demir hemoglobine bağlanamaz. Vücutta ince bağırsaklardan emilen bakır esansiyel bir element olduğu gibi aynı zamanda toksik özellik de gösterebilir. Emilen bakır aminoasitlere ve serum albüminine gevşek şekilde bağlanarak tüm vücuda dağılmaktadır. Memeli plazmasındaki bakırın yaklaşık %90' ı bakır metalloproteini ve seruloplazmin formundadır (Ranjan ve ark., 2006).

Bakır, tümör anjiyogenez işlemleri için gerekli olan bir kofaktör iken, diğer geçiş metalleri değildir (Theophanides, 2002). Sürekli olarak, birçok insan kanseri türünde yüksek düzeyde bakır bulunmuştur (Zhong ve ark., 2006).

$Cu(II)$ kompleksleri genellikle daha az toksiktir ve bazıları nörotransmisyon, hücresel solunum gibi önemli hücresel etkilere sahiptir. Diğer geçiş metalleriyle karşılaştırıldığında Cu^{+2} iyonu, DNA ayrılma aktivitesini indüklemek için nispeten güçlü Lewis asiditesine ve yüksek nükleobaz afinitesine sahip olduğu görülmektedir. Metal komplekslerinin elektrostatik bağlanma, oluk bağlanma ve ara bağlantı gibi kovalent olmayan yollarla DNA ile etkileşime girdiği belgelenmiştir (Kumar ve ark., 2012).

Ma ve ark., (2012), Schiff bazı bakır(II) kompleksi (kompleks I) ve kontrol grubu olarak cisplatin kullandıkları çalışmada, bakır(II) kompleksinin ve cisplatinin MCF-7 hücrelerine sitotoksik olduğunu ve doz-zamana bağlı bir şekilde hücrelerin büyümesini önlediğini göstermiştir.

2.6 Schiff Bazı Cu(II) Kompleksinin Sitogenetik Etkileri ve Yapılmış Çalışmalar

Benzofenon iminlerin metallerle yaptığı komplekslerin meme (MDA-MB- 231 ve MCF-7) ve kolon (HCT-116) kanser hücrelerine karşı cisplatinden dört kat daha etkin oldukları, antibakteriyel etkinliklerinin ise ticari antibiyotiklerden cefixime ve roxithromycin'in arasında yer aldığı ve cisplatinle benzer şekilde DNA'nın tersiyer yapısını değiştirdikleri belirtilmektedir (Albert ve ark., 2014).

Silveira ve ark., (2008) rapor ettikleri verilere göre, tüm kompleksler içinde en aktif olanı $[Cu(isaepy)_2]^{2+}$ **1**, daha önce çalışılmış olmasına rağmen, insan nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerine karşı önemli bir toksisite göstermiştir. Bu sonuçlar aynı zamanda, bu özelliğin sadece bakır(II) iyonunun varlığıyla değil, imin ligandının yapısı tarafından modüle edildiğini göstermektedir.

Ma ve ark., (2012) Schiff bazı bakır(II) kompleksi (kompleks I) ve kontrol grubu olarak cisplatin kullandıkları çalışmada, bakır(II) kompleksinin ve cisplatinin MCF-7 hücrelerine sitotoksik olduğunu ve doz-zamana bağlı bir şekilde hücrelerin büyümesini önlediğini göstermektedir. Aynı çalışmada, nükleer parçalanma, kompleks 1 tarafından indüklenen büyüme inhibisyonunun apoptoz sonucu olup olmadığını belirlemek için Hoechst 33342 boyaması ve Annexin V-FITC/PI boyaması kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, kompleks 1'in MCF-7 hücrelerinde doza bağımlı bir şekilde apoptozisi etkin bir şekilde uyardığı görülmektedir. Comet testi ile yapılan çalışmada ise, kompleks 1'in MCF-7 hücrelerinde doza bağımlı bir şekilde ciddi DNA fragmentasyonunu indüklediği gösterilmektedir.

Qiao ve ark., (2011) yaptıkları çalışmada, Schiff baz bakır kompleksi uygulanmasından sonra Kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesinin, HeLa hücrelerinde kayda değer bir şekilde arttığı ve hem kaspaz-3 hem de kaspaz-9 aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir. HeLa hücrelerinin apoptozisinin, kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivasyonuna bağlı olarak intrinsik mitokondriyal apoptotik yol ile bakır kompleksi tarafından indüklendiğini göstermişlerdir. Ayrıca Schiff baz kompleksinin, HeLa hücrelerinin sitopatolojik etkileri ve apoptozisin hücre döngüsünün S fazında durdurduğunu belirtmektedirler.

Bagihalli ve ark., (2008) yaptıkları çalışmalarda kumarinden türetilen Schiff bazları ile metal komplekslerinin, antienflamatuar, antioksidan, antitrombotik, antialerjik, hepatoprotektif, antiviral ve antikarsinojenik aktivitelere sahip olduğunu göstermektedirler.

Liu ve ark., (2010) yaptıkları bir çalışmada, sentezlenen üç yeni 2-okso-kinolin-3-karbaldehit Schiff baz ve bunların Cu(II) komplekslerinin karşılaştırmalı sitotoksik aktivitelerine göre; üç Cu(II) kompleksinin HL-60 ve HeLa hücrelerine karşı ligandlardan daha etkili sitotoksik aktivite sergilediğini belirtmektedirler.

Zou ve ark., (2013) insan meme kanseri MCF-7 hücreleri, prostat kanseri PC-3 ve insan meme kanseri MDA-MB-231 hücreleri üzerinde, dört bakır kompleksinin etkileri için yaptıkları çalışmalarda, kompleks C1 ve C3' ün doza bağımlı bir şekilde büyümeyi inhibe ettiğini belirtilmektedir. Ayrıca bu kanser hücrelerinde, 5 µM kadar düşük bir değerde kompleks C1 ve C3 ile muamele edildiğinde, apoptoza bağlı morfolojik değişikliklerin gözlemlendiği bildirilmektedir.

1,2,4 triazol türevlerinden elde edilmiş bazı yapıların kanser önleyici etkileri olduğu bildirilmektedir. Bir seri 3-sübstitüe- 4-[5- (4-metoksi- 2-nitrofenil)-2-furfuriliden]amino- 5-merkapt- 1-2- 4-triazollerin çeşitli sekonder aminler ve formaldehit ile aminometilasyonu ile sentezlenen Mannich bazlarının yedi farklı kanser türüne (kolon, akciğer, lösemi, yumurtalık, melanom, renal, ve CNS) karşı antikanser aktivitelerinin olduğu belirtilmektedir (Holla ve ark., 2003).

Shabani ve ark., (2008) yaptıkları bir çalışmada azot ihtiva eden bazı iminlerin K562 (insan kronik myeloid lösemi) hücreleri ve Jurkat (insan T lenfosit karsinoma) hücrelerine karşı antitümör aktivite gösterdiği tespit edilmiş ve metal kompleksli iminler ve CDP (6-(sikloheksilamino)-1,3-dimetil-5(2-piridil)furo[2,3-d]pirimidin-2,4-(1*H*,3*H*)-dion) ligandı kullanımı ile kemoterapi için umut ışığı olabilecek yeni bulgular ortaya çıktığı belirtilmektedir.

Guo ve ark., (2010) yaptıkları bir çalışma ile üçlü bakır kompleksli salisilaldehit-amino bileşiklerinin BGC823 (insan gastrit kanser hücre serisi) hücrelerinin proliferasyonu üzerinde etkili olduğunu, apoptozisi uyardığı ve hücre siklusunda değişikliklere sebep olduğunu ortaya koymaktadırlar (Ali ve ark., 2012).

Osoyole ve ark., (2012) bazı metal kompleksli nitrofenol iminlerin antikanser ve antimikrobiyal etkilerini araştırdıkları çalışmalarında *in vitro* şartlarda Pd(II) kompleksinin MCF-7 hücre serisi üzerinde güçlü antikanser aktiviteye sahip olduğunu belirtmektedirler.

Jesmin ve ark., (2010) ehrlich asit tümörlü 6-8 haftalık Sweiss albino farelerle gerçekleştirdikleri bir çalışmada; PDH [N-(1- fenil-2- hidroksi-2- fenil etiliden)-2', 4'-dinitrofenil hidrazin], PHP [N-(1- fenil, 2-hidroksi- 2-fenil etilidin)-2'- hidroksi fenil imin] ve HHP [N-(2- hidroksi benzilidin)-2'- hidroksi fenil imin], bileşiklerinin antitümör ajan olabilecekleri bildirilmiştir. Sentezlenen [CuII(5-Cl-pap)(OAc)(H₂O)]2H₂O Schiff bazının HeLa hücre serisinde apoptoza yol açtığı ve bölünmeyi S fazında durdurduğu (Qiao ve ark., 2011) bildirilmektedir. Vanillin semikarbazon' un EAC (ehrlich asit tümör)' l Swiss albino fareleri (5-7 haftalık) zerinde dikkate değer antikanser etkilerinin olduğu bildirilmektedir (Ali ve ark., 2012).

Prostat kanseri hücre hattı eşitleri olan PC-3 ve LNCaP'de Schiff bazı-Cu komplekslerinin proteozom aktivitesini inhibe ederek, apoptotik süreci doza bağlı başlattığı ve hücre çoğalmasını yine doza bağlı baskıladığı rapor edilmiştir (Adsule ve ark., 2006).

Kraicheva ve ark., (2012) alışmaları hem *in vitro* hem de genotoksisite ve antiproliferatif aktivite için ICR farelerinde *in vivo* olarak gerçekleştirmişlerdir. 9-antiliden-furfurilamin ve [N-metil(dietoksifosfonil)-1-(9antril)] furfurilamin, kolon karsinom hücre hattı HT-29' a karşı en güçlü sitotoksik ajanlar olduğu görülmektedir. Ayrıca [N-metil(dietoksifosfonil)-1-(9antril)] furfurilamin HBL-100, MDA-MB-231 ve 647-V hücrelerine antiproliferatif aktivite sergilemiştir. Aminofosfonat[N-metil(dietoksifosfonil)-1-(9antril)]-p-toluidin ve 9-antriden-p-toluidin, HBL-100 ve HT-29 tümör hücre dizilerine sırasıyla sitotoksik olduğu bulunmuştur. Tüm bileşikler, MCF-7, Hep-G2 ve HeLa kanser hücre dizileri test edildikten sonra referans olarak kullanılan antikanser ilacının etken maddesi Doxorubicin ile karşılaştırıldığında daha az aktif olduğu bulunmuştur.

Beytur ve ark., (2011) androjen duyarlı (LNCaP) ve androjen duyarsız (PC3) olarak iki farklı prostat kanseri hücre kültürü kullanarak yaptıkları çalışmada, test edilen

ajanların (ligand, ligand-Cu, ligand-Co, ligand-Ni), LNCaP hücreleri üzerinde antitümör aktiviteye sahip olduğu ve bu etkilerini androjen reseptörü varlığında DNA hasarına sebebiyet vererek ortaya koyduğu gösterilmektedir.

Zhang ve ark., (2008) yapılan çalışmada tümör proteasomunun yeni bir taurin Schiff baz bakır kompleksinin hedefi olduğu tespit edilmiştir. Bu bileşik tarafından proteasomal aktivitenin inhibisyonunun, kültürlenmiş meme kanseri ve lösemi hücrelerinde apoptozu kuvvetle indükleyebileceği belirtilmektedir

Gossypol denilen Schiff bazı ile ilgili yapılan çalışmalarda, insan normal kemik iliği hücreleri (Benz ve ark., 1987), normal meme epitel hücreleri (Jaroszewski ve ark., 1990), köpek ve kanguru böbrek epitel hücreleri ve fare 3T3 fibroblast hücrelerinde (Tanphaichitr & Fitzgerald, 1989) rasemik gossypolün etkisinin, sitotoksik olarak 7 kat daha güçlü olduğu gösterilmektedir. Ek olarak, gossypolün l-enantiyomerinin, kültürde büyüyen normal hematopoietik kök hücrelere kıyasla kanser hücresi soylarına karşı 5-10 kat daha fazla antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu görülmektedir (Benz ve ark., 1990).

Shelley ve ark., (1999) yaptıkları çalışmalarda, mikromolar aralıktaki rasemik gossypol ve onun oksidatif ürünü olan gossypolone'nin, araştırılan hücre hatları üzerinde benzer sitotoksik etkilere sahip olduğunu göstermektedir; gossypolün l-enantiyomeri, d-enantiyomerinden ve klinik olarak yararlı birçok antikanser ajanından önemli ölçüde daha sitotoksik olduğu belirtilmiştir; ön çalışma, l-gossypolün hücre büzülmesini, hücre yapışmasının kaybını, membran kabarcıklanmayı ve DNA parçalanmasını indüklediğini göstermektedir.

Xiao ve ark., (2008) yaptıkları bir çalışmada MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde, GVC (L-glutamine-o-vanilin complex) 'nin proteozomal aktiviteyi inhibe ederek ve konsantrasyona bağlı olarak apoptozun indüklendiğini belirtmektedirler. Aynı çalışmada, GVC 'nin diğer insan kanseri hücrelerini de öldürebildiğini test etmek için, insan lösemi Jurkat T hücreleri, çeşitli konsantrasyonlarda GVC (L-glutamine-o- vanilin complex), GV (L-glutamine-o-vanilin) ve $CuCl_2$ ile ayrı ayrı muamele edilmiş ve aynı konsantrasyonda GV veya $CuCl_2$ 'nin hiçbir etkisi olmadığı halde $50\mu M$ GVC ile yapılan muamelenin %90' dan fazla hücre ölümüne yol açtığı belirtilmektedir.

Ellis ve ark., (2006) yaptıkları bir çalışmada, Schiff bazından türetilen yeni bir kinolin serisinin, HIV-1 virüsüne karşı güçlü inhibisyon aktivite gösterdiği ve birçok nükleozid olmayan ters transkriptaz inhibitörüne (NNRTI) karşı gelecek vaad eden etkinlik sergilediği bildirilmektedir.

Wang ve ark., (2006) yeni bir Narinenin Schiff baz ligandı ve La(III) kompleksi ile yaptıkları çalışmada, 10^{-9} mol L⁻¹ konsantrasyonda La(III) kompleksi, insan lösemi hücresi HL-60'a karşı %50'nin üzerinde bir inhibisyon oranı gösterdiği belirtilmektedir. Akciğer adenokarsinoma A-549 hücre hattı için La(III) kompleksi, 10^{-5} ila 10^{-8} mol L⁻¹ 'lik konsantrasyonda, cisplatinden daha güçlü bir inhibe edici etki gösterdiği bulunmuştur.

Lu ve ark., (2012) oksidovanadyum kompleksleri ile yaptıkları bir çalışmada, kompleks [VO (hntdtsc)(phen)] (1), diğer test edilen komplekslerle karşılaştırıldığında, iki hücre hattına karşı en güçlü inhibe edici etkiye sahip olduğu gösterilmektedir. Sisplatininkine çok yakın olan IC₅₀ değeri, insan miyelom hücresi (Ag8.653) ve gliomas hücresi (U251)' e karşı çok sitotoksik olduğu görülmektedir.

Yapılan literatür taramasında lösemi hücreleri, karaciğer hücresi, insan meme ve prostat kanser hücresi, serviks karsinoma HeLa hücresi, insan böbrek hücre hattı, fare embriyo hücresi, fare melanoma ve fare fibroblast hücreleri, sıçan meme kanseri hücreleri, tavuk embriyosu, buzağı timus DNA'sı (CT-DNA) ve çeşitli bakteri hücreleri kullanıldığı görülmektedir.

Hücre canlılığı çalışmalarının deneysel yöntemlerinde MTT, MTS, XTT, WST, LDH, MDA, GSH, akridin orange/ethidium bromür yöntemi, Alamar mavisi flouresans testi, ATP biyoluminesans testi, SRB (sülfürhodamin B), klonojenik test, disk difüzyon yöntemi ve umu test sistemi gibi metotlar kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışmada ise yeni sentezlenmiş bir Schiff bazının anti-tümoral özelliklerinin belirlenmesi amacıyla MTT testi, apoptozu belirlemek için akridin orange-ethidium bromür ikili boyaması yöntemine başvurulmuştur ve sitotoksik etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmamızda etken madde olarak antipirin türevli Schiff bazı Cu(II) kompleksi kullanılmıştır.

3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.1.1 Schiff Bazı Cu (II) Kompleksinin Sentezi

➤ **4-N-[(1-metilpiroliden)amino]antipirin (3) bileşiğinin sentezi [denk I]:**

15 mL etanol içerisinde 5 mmol bileşik (2), 5 mmol aminoantipirin (1) ve katalitik miktarda glasiyel asetik asit oda sıcaklığında 1 saat karıştırılır. Oluşan sarı çökelek (3) süzülür ve etanolden kristallendirilir. Erime Noktası: 153.7-155.5 °C. Verim: %74

FTIR (ATR, ν cm⁻¹): 3074, 2989, 2939, 1639, 1597, 1573, 1481, 1292, 1053, 956, 759.

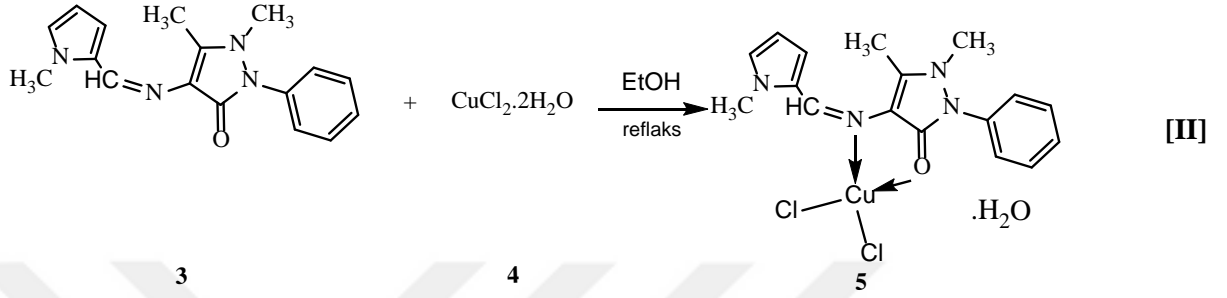
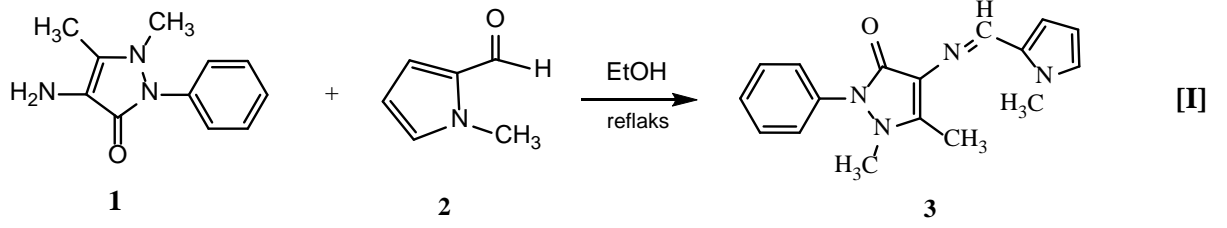
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, δ , ppm): 8.70 (s, 1H); 7.52 (m, 2H); 7.38 (d, 2H); 7.35 (m, 1H), 7.15 (d, 1H); 6.79 (d, 1H); 6.22 (m, 1H); 3.91 (s, 3H); 3.17 (s, 3H); 2.44 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz, δ , ppm): 160, 150, 148, 134, 132, 129, 124, 123, 110, 109, 38, 35, 13.

➤ **4-N-[(1-metilpiroliden)amino]antipirin Cu(II) kompleksi (5) bileşiğinin sentezi [denk II]:**

1 mmol (0.294 g) bileşik (3), 1 mmol (0.170 g) CuCl₂.2H₂O bileşiği (4) 30 mL etanolde 6 saat geri soğutucu altında ısıtılır. Çözelti evaporatör ile konsantre edilir. Çökmesi için buzlukta bekletilir. Çöken kırmızı-kahve katılar (5) süzülür. Dietil eter ve etanolle yıkanıp, vakumda kurutulur. Erime Noktası: > 250°C. Verim: %60.

FTIR (ATR, ν cm⁻¹): 3332, 3066, 2978, 2927, 1604, 1489, 1357, 1315, 817, 756, 694, 493.



Şekil 3.1 NMPA-Cu kompleksi (5) bileşiğinin sentezi

3.1.1.2 Kültür Medyumu

Deneyleerde, MCF-7 hücre hattının hücrelerini büyötmek, çoğaltmak, dondurarak saklamak vb. kültür uygulamalarında ve kültür ortamı olarak EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) besiyeri kullanılmıştır. hTERT HME1 hücrelerinin kültür uygulamalarında ise MEGM (Mammary Epithelial Cell Growth Medium) besiyeri kullanılmıştır. EMEM besiyeri ATCC'den, MEGM besiyeri ise Lonza'dan temin edilmiştir.

3.1.1.3 Dimetil Sülfoksit (DMSO)

Etken maddelerin değişik konsantrasyonlarının hazırlanmasında çözücü ve aynı zamanda çözücü kontrol grubu olarak kullanılmıştır. DMSO, Merck'ten temin edilmiştir.

3.1.1.4 Tripsin-EDTA

Kültürü yapılan hücrelerin alt-kültür (pasajlanması) işlemlerinde veya deney yönteminin uygulanması sırasında hasatı yapılacak hücreleri monolayer (tek-tabaka) oluşturdukları yapıları kültür kabı yüzeyinden ayırmak için kullanılmıştır. Tripsin-EDTA, Thermofisher'den temin edilmiştir.

3.1.1.5 TNS (Tripsin Nötralize Solüsyonu)

Tek tabaka oluşturan hücreleri kültür kabından ayırmak için kullanılan Tripsin'i solüsyonda etkisizleştirmek amacıyla reaksiyonu sonlandırmak için kullanılmıştır. TNS, Lonza'dan temin edilmiştir.

3.1.1.6 PBS (Phosphate Buffered Saline)

Ca ve Mg iyonlarını içeren bu tampon, MTT testi protokolünde MCF-7 hücre hatlarında yıkama işlemleri için kullanılmıştır. PBS, Gibco'dan temin edilmiştir.

3.1.1.7 DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)

Ca ve Mg iyonları içermeyen tampon çözelti, MTT testi protokolünde hTERT HME1 hücre hatlarında yıkama işlemleri için kullanılmıştır. DPBS, Gibco'dan temin edilmiştir.

3.1.1.8 Trypan Blue

Hücre kültüründe pasajlama ve deney setleri için başlangıç hücre ekimleri işlemlerinde hücreleri boyayarak canlı hücre oranı ve sayılarının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Trypan blue, Gibco'dan temin edilmiştir.

3.1.1.9 MTT Solüsyonu

MTT solüsyonu genellikle sitotoksitenin ve hücre proliferasyonunun kantitasyonunu belirlemede kullanılır. MTT solüsyonu, Sigma'dan temin edilmiştir.

3.1.1.10 Ethidium Bromide (EtBr) and Acridine Orange (AO)

Sigma'dan temin edilmiştir.

3.1.1.11 Sıvı Azot (LN)

Dondurularak saklanmak istenen hücreler uygun küçük tüplere aktarılarak sıvı azot içerisinde buhar fazında tutulmuştur.

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

3.1.2.1 Hassas Terazî

Çalışmamızda kullanılan kimyasalların tartılması amacıyla, Radwag marka AS 220 R2 model terazî kullanılmıştır.

3.1.2.2 Biyogüvenlik Kabini

Test solüsyonlarının hazırlanması, steril kültür kaplarına hücre ekiminin yapılması ve test solüsyonlarının kültür kaplarına ilave edilmesinin steril şartlarda

gerçekleşebilmesi için kullanılmıştır. Çalışmamızda ESCO marka Class-II biyogüvenlik kabini kullanılmıştır.

3.1.2.3 CO₂'li İnkübatör

Hücrelerin çoğaltılması ve kültürün devam ettirilmesi için kullanılmıştır. Çalışmamızda Memmert Une 400 model CO₂ inkübatörü kullanılmıştır. İnkübatörün neminin, içerisinde steril su bulunan bir kabin sayesinde sürekli sabit kalması sağlanmıştır.

3.1.2.4 Santrifüj

Çalışmamızda kültür kaplarından tüplere aktarılan hücre süspansiyonlarındaki hücreleri çöktürmek amacıyla Centrifuge MPW-351R marka kullanılmıştır.

3.1.2.5 Hücre Sayım Cihazı

Kültürde çoğaltılan hücreler pasajlanma sırasında veya deney başlangıçlarında Tripan mavisi ile boyanarak hazırlanan preparatlarda boya almamış canlı hücre, boyanmış cansız hücre, toplam hücre sayılarını ve oransal hücre canlılığı belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Hücreler İnvitrogen Cell Counter marka MP10227 model hücre kültür sayımı cihazı ile sayılmıştır.

3.1.2.6 Vorteks Karıştırıcı

Çalışmamızda hazırlanan hücre solüsyonlarının uygulama öncesinde homojenize etmek ve tüplere alınan hücre süspansiyonlarını dairesel salınımlı hareketler ile karıştırmak amacıyla Stuart marka SA8 model vorteks karıştırıcı kullanılmıştır.

3.1.2.7 Su Banyosu

Hücre kültürü uygulamaları boyunca solüsyonların uygulama sıcaklığına ulaştırılması ve donmuş hücrelerin hızlı bir şekilde çözünmesini sağlamak için Daihan marka WB22 ve JSR JSWB model su banyosu kullanılmıştır.

3.1.2.8 İnvirt Mikroskop

Kültür kaplarının, çok kuyucuklu plakaların ve bölmeli lamaların incelenerek hücre özelliklerinin ve kültürün izlenmesi amacıyla Leica marka DM IL LED model invert mikroskop kullanılmıştır.

3.1.2.9 Mikroplaka Eliza Okuyucu

MTT testi uygulamasında kolorimetrik olarak sitotoksosite belirlemek amacıyla çok kuyucuklu plakalardaki hücre varlıklarının absorbands değerleri ölçülmüştür. BioTek marka Elx800 model okuyucu kullanılmıştır.

3.1.2.10 Floresan Filtreli Işık Mikroskobu

Apoptozu ölçmek amacıyla uygulanan akridin orange/ethidium bromür ikili boyaması immünofloresan yöntem uygulanan ve floresan filtrelerle görünür kılınan hücrelerin görüntülenmesi ve sayımı için kullanılmıştır. Leica marka DM2500 model floresan mikroskop kullanılmıştır.

3.2 Hücre Kültürü

İnsan hücre kültürleri kullanılarak pek çok ajanın genotoksik etkileri etkili bir şekilde araştırılabilir. Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü, kanser araştırmalarında insan kanser hücre kültürleri üzerinde yeni kimyasal maddelerin anti-kanser etkinliğini araştırabilmekte, hücre kültürlerinden alınan sonuçların daha gerçekçi ve spesifik olduğu ifade edilmektedir. Çeşitli pestisitlere solunum yoluyla maruz kalmanın akciğer kanserine yol açabileceği belirtilmektedir. Ayrıca pek çok akciğer tümörü, solunum epitelindeki bir seri ilerleyici patolojik değişiklikler sonucu gelişmektedir (Vineis ve Husgafvel-Pursiainen, 2005).

Çalışmamızda insana ait iki hücre hattı kullanılmıştır. Bunlar, meme adenokarsinom (MCF-7) ve immortal normal meme hücre (hTERT-HME) hatlarıdır. Bir bakıma, MCF-7 hücreleri iki sebepten ötürü anti-kanser ilaçlarının taranmasında mükemmel bir modeli ifade eder. Bunlardan birincisi, MCF-7 östrojen reseptörü pozitif bir hücre hattıdır. İkincisi, rapor edildiğine göre, meme kanser örneklerinin %75'i kaspaz-3 ifadesinden yoksundur (Devarajan ve ark., 2002). Bu nedenle çalışmamızda insan normal ve adenokarsinom meme hücre hatları kullanılmıştır.

MCF-7 insan meme kanseri hücre hatları ve hTERT-HME1 immortal meme hücre hatları American Type Culture Collection (ATCC)' den temin edilmiştir. MCF-7 hücreleri, %10 fetal bovine serum, 100u/ml penicilin ve 100µg/ml streptomycin takviye edilmiş EMEM ortamında kültürlenmiş, hTERT-HME1 hücreleri ise, protokolde tarif edildiği şekilde kültürlenmiştir. Tüm hücre hatları, %5 CO₂'li

inkübatörde, 37 °C'de ve % 95 nemli ortamda inkübasyona bırakılmış ve hücrelerin besiyerleri iki günde bir değiştirilerek invert mikroskopta gelişimleri izlenmiştir.

3.2.1 Hücrelerin Çözülmesi

Tüm hücre hatları -196°C sıvı azot bulunan tankta, buhar fazı içinde muhafaza edilmiştir. Kültür zamanı geldiğinde, sıvı azottan çıkarılan hücreler çözünmesi için 1 dk. süre ile 37°C'lik su banyosunda bekletilmiştir. Gerekli sıcaklığa ulaşan hücreler pipetlenerek içerisinde besiyeri bulunan flask içine alınmış ve 15 dakika boyunca, %5 CO₂'li inkübatörde, 37 °C'de ve % 95 nemli ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.2 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler konfluent olduğunda flask yüzeyinden kaldırmak için tripsin solüsyonu kullanılmıştır. Tripsinin, sıcaklık arttıkça etki mekanizması arttığı için hücreler 4-5 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Tripsin hücre kültür ortamında uzun süre kaldığında hücrelere zarar vereceği için, süre sonunda hücrelerin üzerine eklenen tripsin etkisini baskılamak için tripsin ile eşit miktarda besiyeri eklenerek seyreltme işlemi yapılmıştır. Hücre süspansiyonu falkon tüpüne alınarak 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiş ve hücrelerin dibe çökmesi sağlanmıştır. Süpernatant atılarak, hücre sayımı için üzerine 1-2 ml solüsyon eklenerek süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonunun 10 µl'si eşit hacimde tripan mavisi ile karıştırılarak hücre sayım lamlarına yüklenmiş ve hücre sayım cihazında mililitre solüsyon içerisindeki hücre sayısı ve canlılık oranı tespit edilmiştir. Ayrıca sonraki çalışmalar için yeni flasklara tekrar hücre ekimi yapılmıştır. Deney için gerekli hücre sağlanıncaya kadar bu işlem devam edilmektedir. İleride kullanılmak üzere kalan hücreler ise dondurularak sıvı azot buhar fazında saklanmıştır.

3.2.3 Hücrelerin Dondurulması

Hücrelerin pasajlanması amacıyla elde edilen ve hücre sayımı yapılan hücre süspansiyonu, hazırlanan DMSO dondurma ortamı ile karıştırılmış ve Cryo-vial dondurma tüpleri içerisine her tüpte 1 ml dondurma ortamı olan DMSO içinde 1 milyon hücre olacak şekilde dondurulmuştur. Hazırlanan tüpler ilk önce -80°C'ye alınarak bir gece bekletilmiş, süre sonunda tüm tüpler -196 °C sıvı azot tankına transfer edilmiştir.

3.2.4 Hücre Sayımı

Hücreler tripan mavisi [$C_{34}H_{28}N_6O_{14}S_4$] adında negatif yüklü bir boya ile boyanmıştır. Hücre zarı sağlıklı olan hücrelerde tripan mavisi, hücre içerisine giremez. Cansız olan hücreler, boyayı absorbe ettikleri için, maviye boyanırlar. Çalışmalarımızda 10 µl hücre süspansiyonu, 10 µl %0.4'lük tripan mavisiyle karıştırılmış ve bu karışımın 10 µl'si hücre sayım lamına aktararak ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sonucunda canlı hücre, cansız hücre, toplam hücre ve hücre canlılık oranları belirlenmiştir. Çalışmamızda deney grupları her iki hücre hattı için ayrı ayrı olmak üzere oluşturulmuştur:

3.2.4.1 Deney Gruplarının Oluşturulması

- **Negatif (Çözücü) Kontrol Grubu:** Negatif Kontrol grubu hiçbir etkinin beklenmediği gruptur. Bu gruptaki hücreler, %2 DMSO içeren besiyeri içerisinde tutulmuştur. DMSO, etken maddenin sebep olabileceği etkilerden ayırt edilmesine yardımcı olmaktadır. Kültüre etken maddelerimizin çözücüsü olan DMSO ilave edilmiştir.
- **NMPA-Cu Grupları (hTERT-HME1 ve MCF-7):** Yapılan ön çalışma ile belirlenen kompleks bileşiğin 15 farklı konsantrasyonu kültürlerle ilave edilmiştir. Daha sonra kültürler 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

Süre sonunda sitotoksisteyi belirlemek amacıyla her iki gruba da protokolde tarif edildiği gibi MTT testi uygulanmıştır. Deneyler her grup için 3 kez tekrarlanmıştır.

3.3 Hücre Canlılığının Tespit Edilmesi ve Sitotoksiste

3.3.1 MTT Testi

Kolorimetrik yöntem için kullanılan temel parametre canlı hücrelerin metabolik aktiviteleridir. MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) testi bu aktiviteye dayalı hücre canlılığını ve proliferasyonunu, dolaylı olarak da sitotoksisteyi kantitatif olarak tespit eder.

Tetrazolium tuzunun yalnızca metabolik aktivitesi olan hücreler tarafından mor renkli formazanlara indirgenmesinden ötürü bu yöntem sadece canlı hücreleri saptamaktadır. Çoğalan hücreler proliferasyon göstermeyen hücrelere göre metabolik olarak daha fazla aktivite gösterdiği için, bu yöntemle sadece hücre canlılığı ve sitotoksiste

değil aynı zamanda hücre proliferasyonu ve aktivasyonu da belirlenmektedir. Kültür ortamındaki mitokondriyal aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantasyonu sağlanır. MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzudur ve fenol kırmızısı içermeyen besi ortamı veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımtırak bir solüsyon oluşturur. Tetrazolium halkasının dehidrojenaz enzimleri tarafından parçalanması sonucu MTT mor renkli çözünmeyen formazana dönüşmektedir. Oluşan bu formazan izopropanol, DMSO veya başka bir çözücü yardımı ile çözünebilir hale getirilir ve oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunup kantite edilir (Doyle ve Griffiths, 1998).

PBS tamponu (pH=7) içerisinde %5'lik MTT solüsyonu hazırlanmıştır. Çözelti ışığa duyarlı olduğu için -4 °C'de karanlıkta saklanmıştır.

Çalışmamızda kullanacağımız hücreler; 96 oyuklu plakalara üçlü gruplar halinde ekilmiş ve %70-80 konfluansa ulaşana kadar büyütülmüştür. 24, 48, 72 saat süreyle ve 10-2000 µM aralığında değişen ve artan konsantrasyonlarda NMPA-Cu ile muameleleri yapıp, 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her kuyucuğa steril PBS içerisinde hazırlanan stok MTT solüsyonundan 20µL eklenerek, 4 saat süre ile tekrar inkübe edilmiştir. Süre sonunda MTT ile oluşan formazan kristallerini çözmek için kuyucuklara 100'er µL DMSO eklenerek 15 dk daha inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda ELİSA cihazında, 540 nm dalga boyunda okutulmuştur.

Kontrol kuyucuklarından elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması %100 canlı hücre olarak kabul edilmiştir. Çözücü ve ajan madde uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri de kontrol değerlere oranlanarak yüzde canlılık olarak kabul edilmiş ve okunan absorbans değerlerine göre sitotoksikite düzeyi belirlenmiştir. MTT deneyleri farklı zamanlarda 3 kez tekrarlanmış ve ajan maddelerin meme kanser hücreleri ve normal meme hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

Çizelge 3.1 MTT Testinde Uygulanan NMPA-Cu Dozları

	NMPA-Cu
1. DOZ	10 µM
2. DOZ	12.5 µM
3. DOZ	25 µM
4. DOZ	50 µM
5. DOZ	75 µM
6. DOZ	100 µM
7. DOZ	125 µM
8. DOZ	250 µM
9. DOZ	500 µM
10. DOZ	750 µM
11. DOZ	1000 µM
12. DOZ	1250 µM
13. DOZ	1500 µM
14. DOZ	1750 µM
15. DOZ	2000 µM

3.3.2 Akridin Orange/ Ethidium Bromür İkili Boyaması

Antipirin türevli Schiff bazı Cu(II) kompleksi ile muamele edilmiş hücrelerde apoptozun morfolojik kanıtlarını saptamak için akridin orange / etidyum bromür (AO/EtBr) ikili boyaması yapılmıştır. MCF-7 ve hTERT-HME1 hücreleri, 96 oyuklu plakalarda tohumlanmış ve 24, 48 ve 72 saat boyunca ayrı ayrı işlenmiştir (1 x 10⁶ hücre / oyuk). PBS ile yıkandıktan sonra, her bir oyuğa 25 µl tripsin-EDTA eklenmiştir. 5 dakika sonra, her bir oyuğa, tripsin ile eşit miktarda büyüme ortamı ilave edilmiştir. 2 µg AO / EtBr boyası (100 µg / ml AO ve PBS içinde 100 µg / ml EtBr), 50 µl işleme tabi tutulmuş ve kültürlenmiş hücre süspansiyonlarına eklenmiş ve süspansiyonlar mikroskop lamalarına aktarılmıştır. Hücreler floresan mikroskobu (Leica DM2500) kullanılarak incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. Apoptotik hücrelerin morfolojisi incelenmiştir. Hücrelerin yüzdesini hesaplamak için 100 hücre sayılmış ve apoptotik hücreler aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Apoptosis} = \frac{\text{apoptotik hücreler}}{\text{toplam hücre sayısı}} \times \%100$$

Yeşil floresan, normal nükleer kromatine sahip canlı hücreleri gösterirken turuncu-kırmızı floresan, parçalanmış nükleer kromatin içeren apoptotik hücreleri göstermektedir (Krishnasamy ve ark., 2014).

3.4 İstatistiksel Analiz

MTT testi ve AO / EtBr boyaması üçer kez tekrarlanmıştır. Tüm veriler ortalama \pm standart hata (SE) olarak ifade edilmiştir. Grup ortalamalarını karşılaştırmak için Student t testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Kemoterapide kullanılan ilaçların etkinliğini sınırlayan birçok faktör vardır. Bu nedenle kanser tedavisinde kullanılacak ve yan etkileri en aza indirilmiş olan yeni ajan arayışları devam etmektedir. Nükleik asitlerle etkileşime girebilen yeni moleküllerin araştırılması, tasarlanması ve yeni antikanser ilaçların geliştirilmesi günümüzde araştırmacıların üzerinde çok çalıştığı konulardan biridir. Halen mevcut antikanser ilaçları normal hücreler için toksiktir ve genellikle geçici saç dökülmesi, bulantı ve kusma gibi yan etkilere sebep olmaktadır (Wang ve ark., 2008). Bu nedenle güçlü aktivite ve minimal yan etkileri olan yeni ve etkili bir kemoterapötik ajan aramak esastır.

Bakır, tümör anjiyogenez işlemleri için gerekli olan bir kofaktör iken, diğer geçiş metalleri değildir (Theophanides, 2002). Sürekli olarak, birçok insan kanseri türünde yüksek düzeyde bakır bulunmuştur (Zhong ve ark., 2006).

Chakraborty ve ark., (2010), tarafından comet testi ve akridin orange ile yaptıkları *in vitro* deneylerde, [Cu(Pyimpy)Cl₂] bileşiğinin, MCF-7 hücrelerinde DNA fragmentasyonuna neden olduğu bulunmuştur. Bu bileşik sıçan meme tümör modelleri üzerinde daha ileri düzeyde test edilerek, tümör büyümesini inhibe ettiği belirtilmiştir. MCF-7 hücreleri iki sebepten ötürü antikanser ilaçlarının taranması için mükemmel bir modeli ifade eder; bunlardan birincisi, MCF-7 östrojen pozitif bir hücre hattıdır ve ikinci olarak, meme kanseri örneklerinin %75'inin kaspaz-3 ekspresyonu olmadığı bildirilmiştir (Devarajan ve ark., 2002). Bakır, tümör anjiyogenez işlemleri için gerekli olan bir kofaktördür, vücutta bulunan diğer iz elementlerin olması ise şart değildir (Theophanides, 2002). Hücrel bakırın proteine bağlı olmadığı ve membranlarda depolanabileceği bulunmuştur (Stockert ve ark., 1986). Bu nedenle bakır bazlı ilaçların kanser tedavilerinde potansiyel olarak kullanımı mevcuttur.

Cu(II) kompleksleri genellikle daha az toksiktir ve bazılarının nörotransmisyon, hücrel solunum gibi önemli hücrel etkilere sahip olduğu görülmektedir. Diğer geçiş metalleriyle karşılaştırıldığında Cu⁺² iyonu, DNA ayrılma aktivitesini indüklemek için nispeten güçlü Lewis asiditesine ve yüksek nükleobaz afinitesine sahiptir. Metal komplekslerinin elektrostatik bağlanma, oluk bağlanma ve ara

bağlantı gibi kovalent olmayan yollarla DNA ile etkileşime girdiği belgelenmiştir (Kumar ve ark., 2012).

Ma ve ark., (2012), Schiff bazı bakır(II) kompleksi (kompleks I) ve kontrol grubu olarak cisplatin kullandıkları çalışmada, bakır(II) kompleksinin ve cisplatinin MCF-7 hücrelerine sitotoksik olduğunu ve doz-zamana bağlı bir şekilde hücrelerin büyümesini önlediğini göstermektedir.

Lai ve ark., (2015)'de yaptıkları çalışmada, A549 hücreleri , 0.5 ve 1.0 μ M Ru1 ile 24 saat boyunca muamele edilmiş ve Hoechst 33258 ile lekelenmiş, nükleer büzülme ve kromatin yoğunlaşması gibi apoptotik özellikler gözlenmiştir. Bu sonuçlar Ru1'in A549 hücrelerinde apoptozu indükleyebileceğini göstermektedir.

Krishnasamy ve ark., (2014) yaptıkları çalışmada I. aspalatoidlerden sentezlenen gümüş nanoparçacıkların, apoptozun indüklenmesi, hücre çoğalması ve anjiyogenezinin inhibe edilmesi yoluyla *in vitro* HEP3B hücre çizgileri üzerinde önemli sitotoksik etki sergilediği belirtilmiştir.

Bu çalışmada, bakır kompleksinin etki mekanizmasını incelemek için yeni sentezlenen antipirin türevli bir Schiff bazı Cu(II) kompleksi, insan meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve insan meme hücre hattı hTERT-HME1 üzerinde karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Sentezlenen Schiff bazları antineoplastik, antiproliferatif, antibakteriyal, antiviral, antifungal gibi alanlarda geniş kullanıma sahiptir. Cu(II) Schiff bazlarının *in vitro* sitotoksik etkileri, kanser hücre hatlarına karşı taranmış ve tümör hücrelerinin yaşayabilirliği MTT testi kullanılarak doğrulanmıştır. Bakır kompleksi ile muameleden sonra MCF-7 ve hTERT-HME1 hücrelerinin morfolojik değişimini daha iyi anlayabilmek için hücreler farklı zaman noktalarında akridin orange/ethidium bromüre (AO/EtBr) ikili boyaması ile gözlemlenmiştir.

İmin ve türevlerinin çok çeşitli biyolojik aktivitelerinin yanı sıra antitümoral etkilerinin de bulunduğunu belirten değişik çalışmalar, bu bileşiklerin kemoterapotik ajan potansiyeline de sahip olabileceklerini göstermektedir. Potansiyel ajanlar olmaları nedeniyle hastalıklarla mücadelede yeni ilaçların geliştirilebilmesi için bu tip bileşiklerin araştırılması oldukça önemlidir.

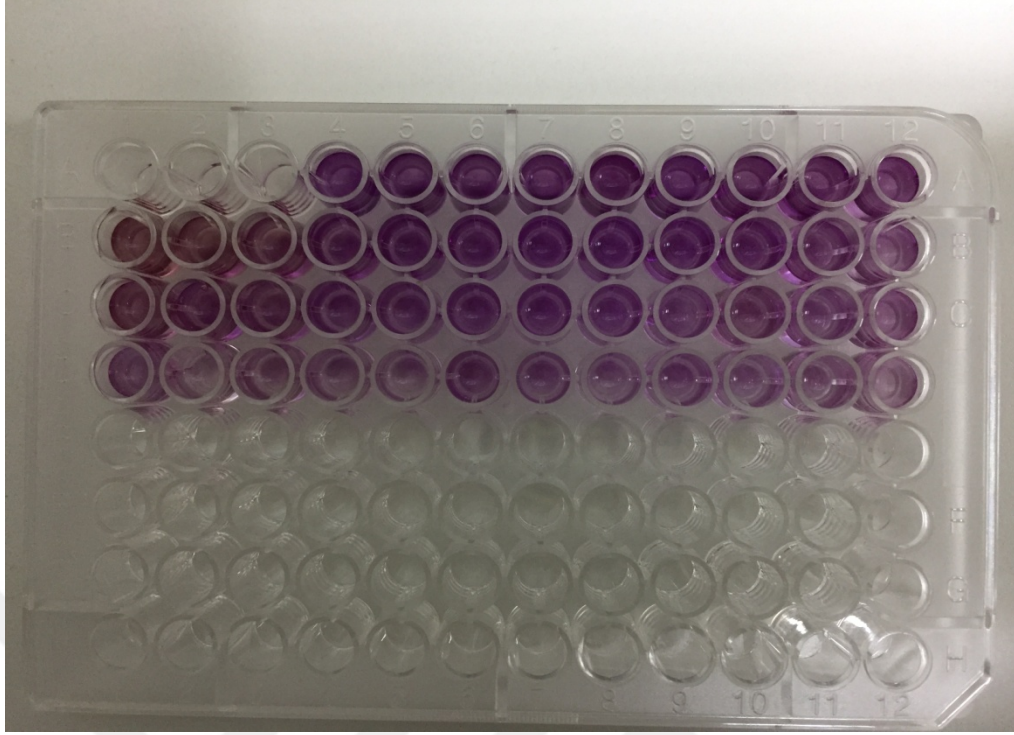
Bu amaçla NMPA-Cu etken maddesi DMSO+PBS içerisinde çözülmüş ve daha sonra EMEM besiyeri kullanılarak seyreltileri hazırlanmıştır. Stok çözeltiler, μM cinsinden hesaplanarak hazırlanmıştır. NMPA-Cu stoklarının, seyreltme yöntemi ile μM cinsinden ayrı ayrı doz serileri elde edilmiştir.

Hazırlanan doz serisi kullanılarak sitotoksitenin ölçümü için kullanılacak olan MTT hücre canlılığı testi ve apoptozis tespitinde kullanılacak olan akridin orange/ethidium bromür testinde kullanılacak dozlar belirlenmiştir. Bu deneylerden elde edilen veriler tablo ve grafik biçiminde aşağıda verilmiş ve istatistiksel analizler kullanılarak yapılan değerlendirmeler sonucunda veriler yorumlanmıştır.

4.1 MTT Testi Sonuçları

MTT testinde sitotoksiste uygulaması sonrasında, kuyucuklarda bulunan canlı hücrelerin oranı belirlenmektedir. Bu amaçla 96 kuyucuklu kültür kaplarına besiyeri içerisinde, her kuyucukta 1×10^4 MCF-7 ve 7.5×10^3 HME1 hücresi olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Hücreler, 24, 48 ve 72 saat boyunca Schiff bazı Cu(II) kompleksine (NMPA-Cu) (10-2000 μM arasındaki 15 doz) maruz bırakılmıştır.

Hücreler her bir kuyucuğa üç tekrarlı olarak ekilmiştir. Ekimden sonra hazırlanan NMPA-Cu kompleks dozları kuyucuklar içerisine eklenmiştir. Hücreler 24, 48 ve 72 saat süreyle 37°C 'de, %5 CO_2 'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Sürelerin sonunda, MTT protokolü uyarınca işlemler gerçekleştirilmiş ve mikropilaka okuyucu ile 570 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Okunan absorbans değerlerinin ortalamaları alınarak, bunlardan blank değeri çıkarılıp normalizasyon gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6). Uygulama gruplarının hücre canlılık yüzdesi kontrol grubuna göre analiz edilmiştir. Konsantrasyonların logaritmik ifadesi ve hücre canlılık yüzdesi kullanılarak hazırlanan grafik ile etken maddenin IC_{50} değeri saptanmıştır. Konsantrasyonlara bağlı hücre canlılık verileri (Çizelge 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 ve 4.12), deney gruplarındaki canlı hücre sayısının, kontrol grubuna oranı analiz edilerek belirlenmiştir. Deneyler üç kez tekrarlanmış ve ortalamaları alınmıştır.



Şekil 4.1 Schiff Bazı Cu(II) Kompleksi ile 24 Saat Muamele Edilen MCF-7 Hücreleri ile Yapılan MTT Testi

Çizelge 4.1 MCF-7 Hücrelerinde 24 Saatlik Uygulamada Dozlara Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri

Konsantrasyon (μM)	OD 570nm \pm SE	Veri Doğrulama (Veri-Blank)= Normalizasyon
Kontrol	0.769 \pm 0.19	0.703
10 μM	0.665 \pm 0.08	0.589
12,5 μM	0.603 \pm 0.03	0.537
25 μM	0.597 \pm 0.04	0.513
50 μM	0.462 \pm 0.05	0.396
75 μM	0.443 \pm 0.01	0.377
100 μM	0.395 \pm 0.04	0.329
125 μM	0.36 \pm 0.003	0.294
250 μM	0.210 \pm 0.03	0.144
500 μM	0.185 \pm 0.006	0.120
750 μM	0.173 \pm 0.02	0.107
1000 μM	0.162 \pm 0.01	0.096
1250 μM	0.160 \pm 0.01	0.095
1500 μM	0.156 \pm 0.01	0.091
1750 μM	0.151 \pm 0.01	0.085
2000 μM	0.144 \pm 0.08	0.078
Blank	0.066 \pm	0.000

Çizelge 4.2 hTERT-HME1 Hücrelerinde 24 Saatlik Uygulamada Dozlara Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri

Konsantrasyon (μM)	OD 570nm\pmSE	Veri Doğrulama (Veri-Blank)= Normalizasyon
Kontrol	0.814 \pm 0.15	0.736
10 μM	0.788 \pm 0.13	0.710
12,5 μM	0.731 \pm 0.13	0.653
25 μM	0.708 \pm 0.06	0.630
50 μM	0.610 \pm 0.04	0.532
75 μM	0.559 \pm 0.03	0.481
100 μM	0.494 \pm 0.01	0.416
125 μM	0.435 \pm 0.02	0.357
250 μM	0.373 \pm 0.04	0.295
500 μM	0.264 \pm 0.06	0.186
750 μM	0.241 \pm 0.005	0.163
1000 μM	0.205 \pm 0.03	0.127
1250 μM	0.201 \pm 0.02	0.123
1500 μM	0.181 \pm 0.04	0.103
1750 μM	0.163 \pm 0.02	0.085
2000 μM	0.153 \pm 0.006	0.755
Blank	0.078 \pm	0.000

Çizelge 4.3 MCF-7 Hücrelerinde 48 Saatlik Uygulamada Dozlara Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri

Konsantrasyon (μM)	OD 570nm\pmSE	Veri Doğrulama (Veri-Blank)= Normalizasyon
Kontrol	0.697 \pm 0.06	0.639
10 μM	0.533 \pm 0.04	0.475
12,5 μM	0.522 \pm 0.02	0.464
25 μM	0.454 \pm 0.07	0.396
50 μM	0.43 \pm 0.07	0.372
75 μM	0.386 \pm 0.06	0.328
100 μM	0.311 \pm 0.01	0.253
125 μM	0.305 \pm 0.01	0.247
250 μM	0.195 \pm 0.05	0.137
500 μM	0.148 \pm 0.005	0.090
750 μM	0.121 \pm 0.007	0.063
1000 μM	0.125 \pm 0.009	0.067
1250 μM	0.139 \pm 0.01	0.082
1500 μM	0.123 \pm 0.008	0.066
1750 μM	0.119 \pm 0.008	0.062
2000 μM	0.083 \pm 0.007	0.025
Blank	0,058 \pm	0.000

Çizelge 4.4 hTERT-HME1 Hücrelerinde 48 Saatlik Uygulamada Dozlara Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri

Konsantrasyon (µM)	OD 570nm±SE	Veri Doğrulama (Veri-Blank)= Normalizasyon
Kontrol	1.383±0.006	1.317
10 µM	1.264±0.08	1.198
12,5 µM	1.185±0.16	1.119
25 µM	0.998±0.05	0.932
50 µM	0.871±0.04	0.805
75 µM	0.812±0.10	0.746
100 µM	0.668±0.11	0.602
125 µM	0.558±0.07	0.492
250 µM	0.353±0.01	0.287
500 µM	0.279±0.02	0.213
750 µM	0.226±0.01	0.160
1000 µM	0.194±0.02	0.128
1250 µM	0.181±0.02	0.115
1500 µM	0.154±0.01	0.088
1750 µM	0.161±0.004	0.095
2000 µM	0.145±0.02	0.079
Blank	0.066	0.000

Çizelge 4.5 MCF-7 Hücrelerinde 72 Saatlik Uygulamada Dozlara Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri

Konsantrasyon (µM)	OD 570nm±SE	Veri Doğrulama (Veri-Blank)= Normalizasyon
Kontrol	0.782±0.10	0.716
10 µM	0.641±0.10	0.575
12,5 µM	0.521±0.04	0.455
25 µM	0.482±0.03	0.416
50 µM	0.441±0.05	0.375
75 µM	0.399±0.07	0.333
100 µM	0.337±0.03	0.271
125 µM	0.273±0.03	0.207
250 µM	0.191±0.01	0.125
500 µM	0.161±0.01	0.095
750 µM	0.119±0.003	0.054
1000 µM	0.129±0.01	0.063
1250 µM	0.109±0.008	0.043
1500 µM	0.111±0.01	0.045
1750 µM	0.104±0.01	0.039
2000 µM	0.083±0.004	0.017
Blank	0.066±	0.000

Çizelge 4.6 hTERT-HME1 Hücrelerinde 72 Saatlik Uygulamada Dozlara Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri

Konsantrasyon (µM)	OD 570nm±SE	Veri Doğrulama (Veri-Blank)= Normalizasyon
Kontrol	1.177±0.22	1.104
10 µM	1.067±0.20	0.994
12,5 µM	0.987±0.01	0.914
25 µM	0.932±0.008	0.859
50 µM	0.826±0.01	0.753
75 µM	0.647±0.08	0.574
100 µM	0.591±0.11	0.518
125 µM	0.526±0.10	0.453
250 µM	0.346±0.02	0.273
500 µM	0.33±0.07	0.257
750 µM	0.265±0.01	0.192
1000 µM	0.238±0.0007	0.165
1250 µM	0.213±0.01	0.14
1500 µM	0.164±0.007	0.091
1750 µM	0.153±0.01	0.080
2000 µM	0.117±0.01	0.044
Blank	0.073	0.000

24, 48 ve 72 saatlik uygulama süresi için hücre canlılığı ve sitotoksosite değerleri aşağıdaki formül ile hesaplanarak belirlenmiştir.

$$\text{Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Ortalama Doğrulanmış İlaçlı Kuyucuğun Absorbans Değeri}}{\text{Ortalama Doğrulanmış Kontrol Kuyucuğun Absorbans Değeri}} \times 100$$

Bu değerlere göre, 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sürelerinde NMPA-Cu'nun test edildiği insan normal ve adenokarsinom meme hücrelerinde hücre canlılık verileri ayrı ayrı çizelgelerde ve eldeki bulgulara dayanarak çizilen grafiklerde gösterilmiştir.

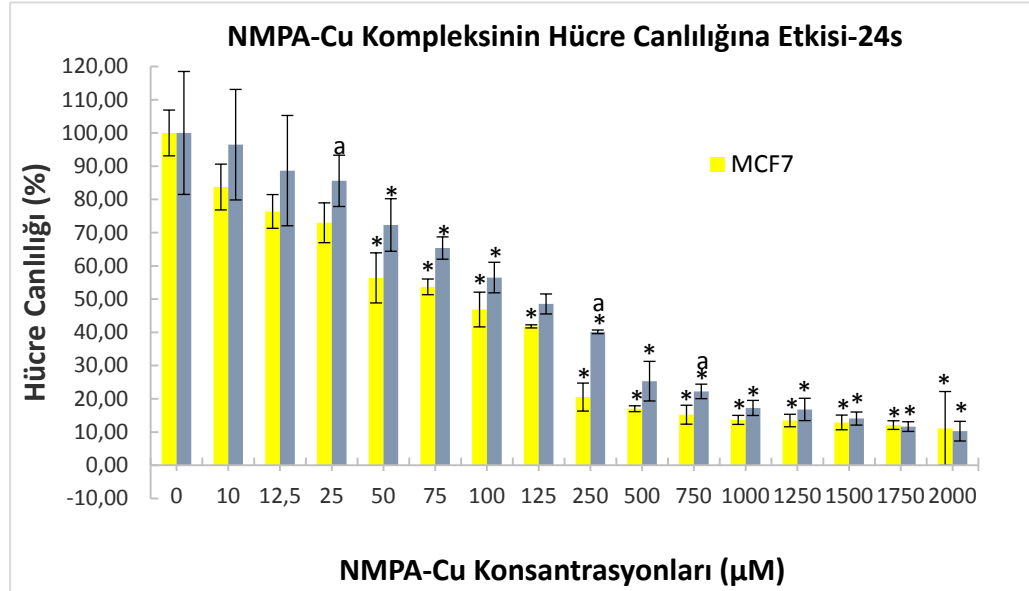
Çizelge 4.7 MCF-7 Hücrelerine Uygulanan NMPA-Cu'nun 24 Saatlik Maruziyette Hücre Sağkalım Değerleri

24 Saatlik Maruziyet (MCF-7)	
Konsantrasyonlar (μM) NMPA-Cu	Hücre Sağkalımı (%) \pmSE
---	100.00 \pm 16.68
10 μM	83.72 \pm 10.24
12.5 μM	76.38 \pm 4.94
25 μM	72.97 \pm 5.8
50 μM	56.38 \pm 7.07
75 μM	53.68 \pm 2.11
100 μM	46.86 \pm 4.77
125 μM	41.79 \pm 4.18
250 μM	20.52 \pm 3.16
500 μM	17.01 \pm 0.62
750 μM	15.21 \pm 1.93
1000 μM	13.65 \pm 0.88
1250 μM	13.46 \pm 1.21
1500 μM	12.89 \pm 9.19
1750 μM	12.08 \pm 1.29
2000 μM	11.09 \pm 6.55

Çizelge 4.8 hTERT-HME1 Hücrelerine Uygulanan NMPA-Cu 'nun 24 Saatlik Maruziyette Hücre Sağkalım Değerleri

24 Saatlik Maruziyet (hTERT-HME1)	
Konsantrasyonlar (μM) NMPA-Cu	Hücre Sağkalımı (%) \pm SE
---	100.00 \pm 18.5
10 μM	96.47 \pm 16.63
12.5 μM	88.66 \pm 16.6
25 μM	85.58 \pm 7.72
50 μM	72.30 \pm 7.91
75 μM	65.36 \pm 3.36
100 μM	56.48 \pm 4.6
125 μM	48.54 \pm 3.01
250 μM	40.14 \pm 0.55
500 μM	25.30 \pm 5.96
750 μM	22.22 \pm 2.18
1000 μM	17.24 \pm 2.27
1250 μM	16.79 \pm 3.36
1500 μM	14.05 \pm 1.97
1750 μM	11.63 \pm 1.46
2000 μM	10.25 \pm 2.96

24 saatlik uygulama sonrası NMPA-Cu kompleksinin her iki hücre tipi için hücre canlılığına etkisi aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 24 Saatlik Uygulama Sonrası NMPA-Cu Komplekslerinin Hücre Canlılığına Etkisi

[*] çözücü kontrole ve [a] MCF-7'ye göre farkların önemini ifade eder ($p < 0.05$)

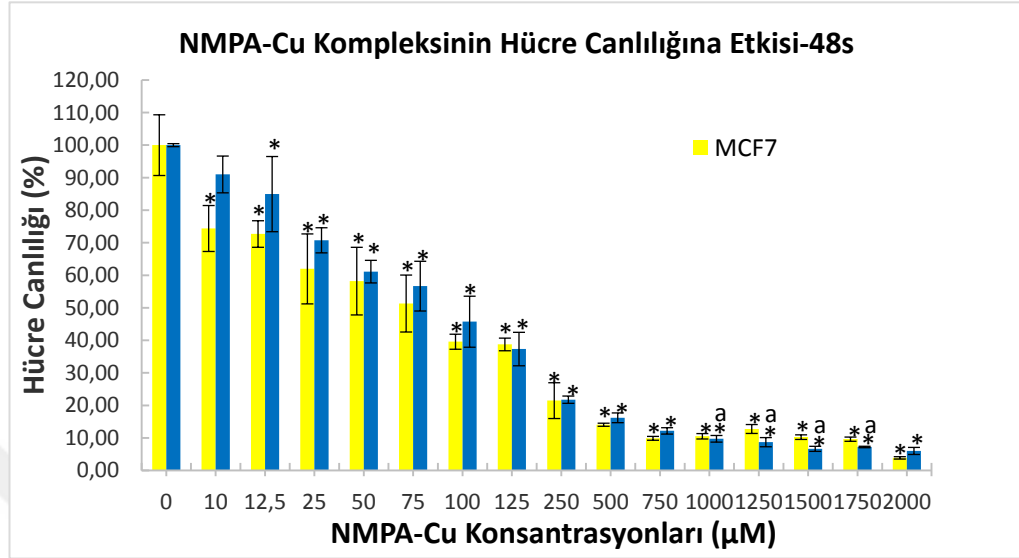
Çizelge 4.9 MCF-7 Hücrelerine Uygulanan NMPA-Cu'nun 48 Saatlik Maruziyette Hücre Sağkalım Değerleri

48 Saatlik Maruziyet (MCF-7)	
Konsantrasyonlar (μM) NMPA-Cu	Hücre Sağkalımı (%)\pmSE
---	100.00 \pm 9.33
10 μM	74.39 \pm 6.86
12.5 μM	72.69 \pm 4.08
25 μM	61.97 \pm 10.75
50 μM	58.22 \pm 10.39
75 μM	51.33 \pm 8.75
100 μM	39.59 \pm 2.31
125 μM	38.76 \pm 1.94
250 μM	21.49 \pm 5.5
500 μM	14.08 \pm 0.47
750 μM	9.91 \pm 0.59
1000 μM	10.54 \pm 0.83
1250 μM	12.87 \pm 1.37
1500 μM	10.28 \pm 0.70
1750 μM	9.65 \pm 0.65
2000 μM	3.91 \pm 0.35

Çizelge 4.10 hTERT-HME1 Hücrelerine Uygulanan NMPA-Cu 'nun 48 Saatlik Maruziyette Hücre Sağkalım Değerleri

48 Saatlik Maruziyet (hTERT-HME1)	
Konsantrasyonlar (μM) NMPA-Cu	Hücre Sağkalımı (%)\pmSE
---	100.00 \pm 0.46
10 μM	91.00 \pm 6.34
12.5 μM	84.96 \pm 11.55
25 μM	70.76 \pm 3.86
50 μM	61.13 \pm 3.47
75 μM	56.67 \pm 7.64
100 μM	45.74 \pm 7.84
125 μM	37.34 \pm 5.14
250 μM	21.28 \pm 1.12
500 μM	16.22 \pm 1.50
750 μM	12.19 \pm 0.98
1000 μM	9.77 \pm 1.02
1250 μM	8.73 \pm 1.41
1500 μM	6.68 \pm 0.77
1750 μM	7.25 \pm 0.22
2000 μM	6.03 \pm 1.08

48 saatlik uygulama sonrası NMPA-Cu kompleksinin her iki hücre tipi için hücre canlılığına etkisi aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 48 Saatlik Uygulama Sonrası NMPA-Cu Komplekslerinin Hücre Canlılığına Etkisi

[*] çözücü kontrole ve [a] MCF-7'ye göre farkların önemini ifade eder ($p<0.05$)

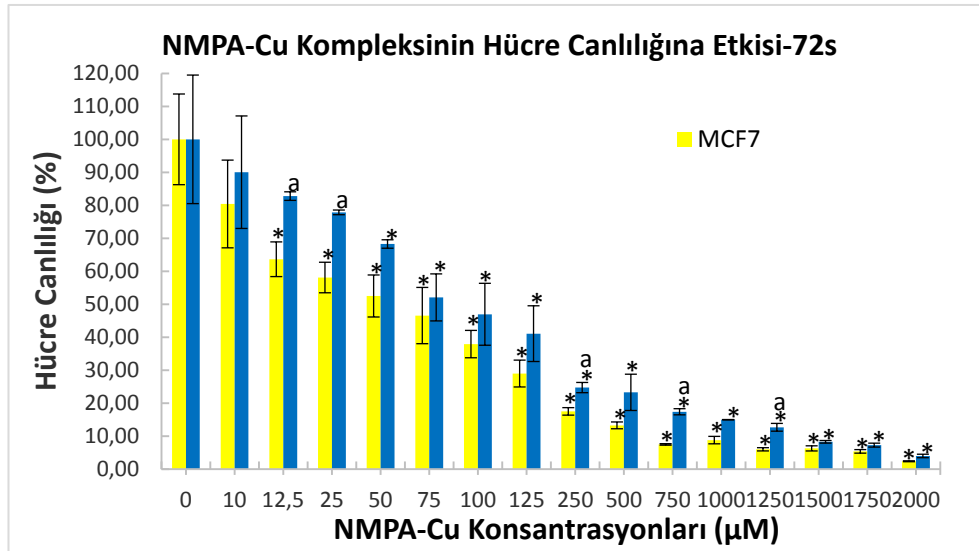
Çizelge 4.11 MCF-7 Hücrelerine Uygulanan NMPA-Cu'nun 72 Saatlik Maruziyette Hücre Sağkalım Değerleri

72 Saatlik Maruziyet (MCF-7)	
Konsantrasyonlar (µM) NMPA-Cu	Hücre Sağkalımı (%)±SE
---	100.00±13.75
10 µM	80.40±13.3
12.5 µM	63.64±5.26
25 µM	58.10±4.63
50 µM	52.50±6.37
75 µM	46.56±8.53
100 µM	37.91±4.15
125 µM	28.98±4.07
250 µM	17.50±1.13
500 µM	13.27±1.03
750 µM	7.50±0.22
1000 µM	8.80±1.13
1250 µM	6.01±0.49
1500 µM	6.28±0.78
1750 µM	5.38±0.54
2000 µM	2.37±0.13

Çizelge 4.12 hTERT-HME1 Hücrelerine Uygulanan NMPA-Cu 'nun 72 Saatlik Maruziyette Hücre Sağkalım Değerleri

72 Saatlik Maruziyet (hTERT-HME1)	
Konsantrasyonlar (μM) NMPA-Cu	Hücre Sağkalımı (%) \pm SE
---	100.00 \pm 19.49
10 μM	90.04 \pm 17.06
12.5 μM	82.79 \pm 1.3
25 μM	77.85 \pm 0.71
50 μM	68.26 \pm 1.28
75 μM	52.07 \pm 7.13
100 μM	46.95 \pm 9.39
125 μM	41.08 \pm 8.49
250 μM	24.73 \pm 1.55
500 μM	23.28 \pm 5.5
750 μM	17.39 \pm 0.93
1000 μM	14.99 \pm 0.04
1250 μM	12.68 \pm 1.18
1500 μM	8.29 \pm 0.39
1750 μM	7.28 \pm 0.59
2000 μM	3.99 \pm 0.53

72 saatlik uygulama sonrası NMPA-Cu kompleksinin her iki hücre tipi için hücre canlılığına etkisi aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.4).



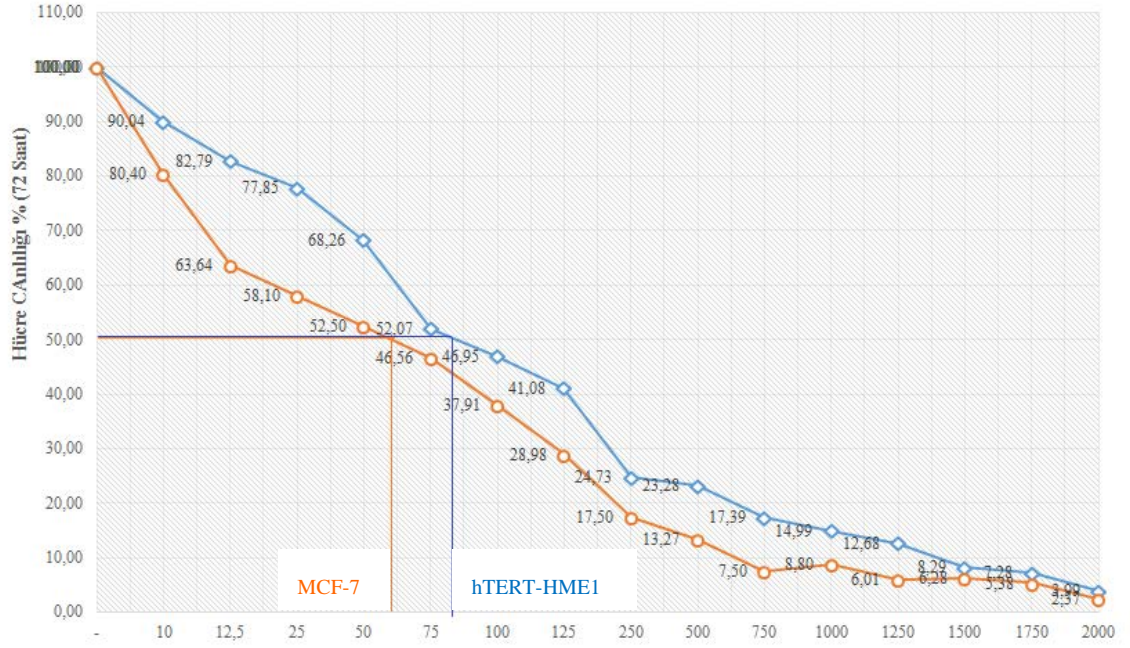
Şekil 4.4 72 Saatlik Uygulama Sonrası NMPA-Cu Komplekslerinin Hücre Canlılığına Etkisi

[*] çözücü kontrole ve [a] MCF-7'ye göre farkların önemini ifade eder ($p < 0.05$)

Bununla birlikte, yüzde olarak hesaplanan hücre canlılık verilerinden elde edilen sitotoksosite değerleri tüm süreler için belirlenip ortak bir çizelgede ele alınmıştır (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13 MCF-7 ve hTERT-HME1 Hücrelerine Uygulanan NMPA-Cu 'nun 24, 48 ve 72 Saatlik Maruziyette Sitotoksosite Değerleri

KONSANTRASYON (μ M)	24s		48s		72s	
	sitotoksosite(%)		sitotoksosite(%)		sitotoksosite(%)	
	MCF-7	hTERT- HME1	MCF-7	hTERT- HME1	MCF-7	hTERT- HME1
Kontrol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10 μ M	16.28	3.53	25.61	9.00	19.60	9.96
12,5 μ M	23.62	11.34	27.31	15.04	36.36	17.21
25 μ M	27.03	14.42	38.03	29.24	41.90	22.15
50 μ M	43.62	27.70	41.78	38.87	47.50	31.74
75 μ M	46.32	34.64	48.67	43.33	53.44	47.93
100 μ M	53.14	43.52	60.41	54.26	62.09	53.05
125 μ M	58.21	51.46	61.24	62.66	71.02	58.92
250 μ M	79.48	59.86	78.51	78.22	82.50	75.27
500 μ M	82.99	74.70	85.92	83.78	86.73	76.72
750 μ M	84.79	77.78	90.09	87.81	92.50	82.61
1000 μ M	86.35	82.76	89.46	90.23	91.20	85.01
1250 μ M	86.54	83.21	87.22	91.27	93.99	87.32
1500 μ M	87.11	85.95	89.72	93.32	93.72	91.71
1750 μ M	87.92	88.37	90.35	92.75	94.62	92.72
2000 μ M	88.91	89.75	96.09	93.97	97.63	96.01



Şekil 4.5 72 Saatlik NMPA-Cu Kompleksi Uygulamasını Sonucu Her İki Hücre Tipi İçin Elde Edilen IC₅₀ Değerleri

(Kırmızı çizgi MCF-7 hücrelerini temsil ederken, mavi çizgi hTERT-HME1 hücrelerini temsil etmektedir).

Hazırlanan NMPA-Cu kompleksinin tüm dozlarının muamelesi sonrası yapılan MTT testi sonucu, her iki hücre tipinde de hücre canlılığının doza ve zamana bağlı olarak düştüğü belirlenmiştir. 24, 48 ve 72 saat uygulamalarında MCF-7 hücreleri ile HME1 hücreleri karşılaştırıldığında, 48 saatlik MTT sonuçları her iki hücrede de birbirine yakın sitotoksik değerleri göstermiştir (Şekil 4.3). 24 ve 72 saatlik maruziyetlerde HME1 hücrelerinde MCF-7'ye göre hücre canlılığı daha fazla bulunmuştur (Şekil 4.2 ve 4.4).

24 saatlik MTT uygulaması sonucu her iki hücrede de sağkalım kontrole göre doza bağlı şekilde düşüş göstermiş olup bu düşüşler 50 μ M'dan itibaren istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). MCF-7 ve HME1 hücrelerinin sitotoksikite seviyeleri yüksek dozlarda daha yüksek tespit edilmiştir. İki hücre birbiriyle karşılaştırıldığında, düşük ve orta dozlarda HME1 hücrelerinin sağkalım seviyeleri belirgin bir şekilde yüksektir. Bu dozlarda MCF-7 hücreleri NMPA-Cu kompleksine daha duyarlı görünse de HME1'in hücre canlılığı farkı sadece üç dozda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.2). Bu dozlar sırasıyla 25 μ M, 250 μ M ve 750 μ M'dır ($p < 0.05$).

NMPA-Cu kompleksinin 15 dozu ile 48 saatlik maruziyet süresi sonunda her iki hücre tipinde de doza bağlı olarak ve birbirine yakın sitotoksosite artışları tespit edilmiştir. MCF-7 hücrelerinde ilk dozdan (10 μ M) itibaren bütün dozlarda anlamlı bir şekilde sitotoksosite belirlenmiş olup, HME1 hücrelerinde ise ikinci dozdan itibaren (12.5 μ M) kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik artış görülmüştür ($p<0.05$). 48 saatlik uygulamanın diğer deney süreleri düşünüldüğünde düşük dozlarda dahi her iki hücre tipinde daha yüksek sitotoksik etki ortaya çıkardığı belirlenmiştir. Her iki hücre tipinde de 125 μ M'lık dozdan itibaren ciddi şekilde sitotoksik artış gözlemlenmiştir. MCF-7 ve HME1 hücre canlılığı seviyelerindeki bu düşüş istatistiksel olarak karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farklar tespit edilmemiştir ($p<0.05$). İlginç bir şekilde 24 ve 72 saat uygulamasından farklı olarak 48 saatlik muamele HME1 hücrelerinde hücre canlılığında daha yüksek toksik etki ortaya çıkarmıştır. Öyle ki, HME1'deki bu sitotoksosite değişimi tüm deneyler dikkate alındığında sadece bu zaman noktasında ve en yüksek doz (1000 μ M, 1250 μ M, 1500 μ M ve 1750 μ M) grubunda MCF-7'den daha fazla olmuştur (Şekil 4.3).

Yukarıda 48 saatlik uygulama için söz edilen durum, en yüksek muamele süresi olmasına rağmen 72 saatlik muamelede değişmiştir. NMPA-Cu kompleksinin MCF-7 ve HME1 hücrelerine 72 saat süre ile uygulanması sonucu sitotoksik etkisinin belirlenmesi için yapılan MTT testi ile doza bağlı şekilde sitotoksosite artışı gözlenirse de bu artış özellikle HME1 hücrelerinde 48 saatten daha düşük olmuştur. Hücre canlılığı MCF-7 hücrelerinde 12.5 μ M'lık dozdan başlayarak anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0.05$). HME1 hücrelerin sağkalımları ise 24 saatlik uygulamada olduğu gibi 50 μ M'a kadar düşük seviyede etkilenmiş olup bu doz sonrası canlılıktaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). HME1 hücrelerinde ortaya çıkan sitotoksik etkinin MCF-7 ile kıyaslandığında istatistiksel anlamda farklı olduğu dozlar mevcuttur. Bu dozlar deneyde kullanılan doz skalasının genelde düşük ve orta gruplarında yer almaktadır. Hücre canlılığının HME1'de MCF-7'den önemli derecede fazla olduğu dozlar düşük doz grubunda 12.5 μ M ve 25 μ M, orta doz grubunda 250 μ M ve 750 μ M olup, 1250 μ M'lık dozda da sağkalım anlamlı derecede HME1 lehine gözlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.4).

Aynı zamanda en uzun uygulama süresi ve kronik muamele modeli olması nedeniyle söz konusu hücrelerde IC_{50} ($IC=$ İnhibisyon Konsantrasyonu 50, hücre sayısını yarıya indiren doz) değeri de 72 saatlik uygulamada belirlenmiştir. Bu zaman noktasında MCF-7 hücrelerindeki hücre canlılığı, diğer zaman noktalarına kıyasla dramatik şekilde azalmıştır. Yine MCF-7 hücrelerinde kontrole kıyasla hücre canlılığında ani düşüşler tespit edilmiştir. Hücre canlılığındaki bu azalma orta dozlarda %50 seviyesine ulaşmış olup, MCF-7 hücrelerinde $75\mu M$, HME1 hücrelerin de ise $125\mu M$ 'lık uygulamalarda hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü belirlenmiştir. Şekil 4.5'te gösterilen logaritmik analiz sonucu, IC_{50} değerleri, MCF-7 için $59\mu M$ ve HME1 için $83\mu M$ olarak belirlenmiş olup, 72 saatlik maruziyette test edilen doz skalasında MCF-7 için 4. ve 5. dozlar arasında, HME1 için ise 5. ve 6. dozlar arasında yer almaktadır. Elde edilen sonuçlar, söz konusu deney koşullarında tahlil edilen NMPA-Cu kompleksinin MCF-7 ve HME1 hücreleri üzerinde sitotoksik potansiyeli olduğunu ortaya koymakla beraber, HME1 hücre hattının NMPA-Cu Schiff bazına özellikle 72 saatlik kronik maruziyette daha dirençli olduğunu göstermektedir.

Tezimizde üç zaman noktası için uygulanan NMPA-Cu konsantrasyonlarının sitotoksikite seviyeleri ve 72 saatlik uygulama sonucu belirlenen IC_{50} değeri dikkate alındığında; MCF-7 için $50\mu M$ ve HME1 için $75\mu M$ NMPA-Cu konsantrasyonu, AO/EtBr testi için en yüksek doz olarak belirlenmiştir. Ayrıca, yüksek doza ek olarak $25\mu M$, $100\mu M$, $125\mu M$ ve $250\mu M$ şeklinde dört doz daha apoptoz deneyleri için seçilmiştir. Belirlenen bu dozlarda apoptoz belirteci olan akridin orange/ethidium bromür (AO/EtBr) testi de 3 kez tekrarlanarak uygulanmıştır.

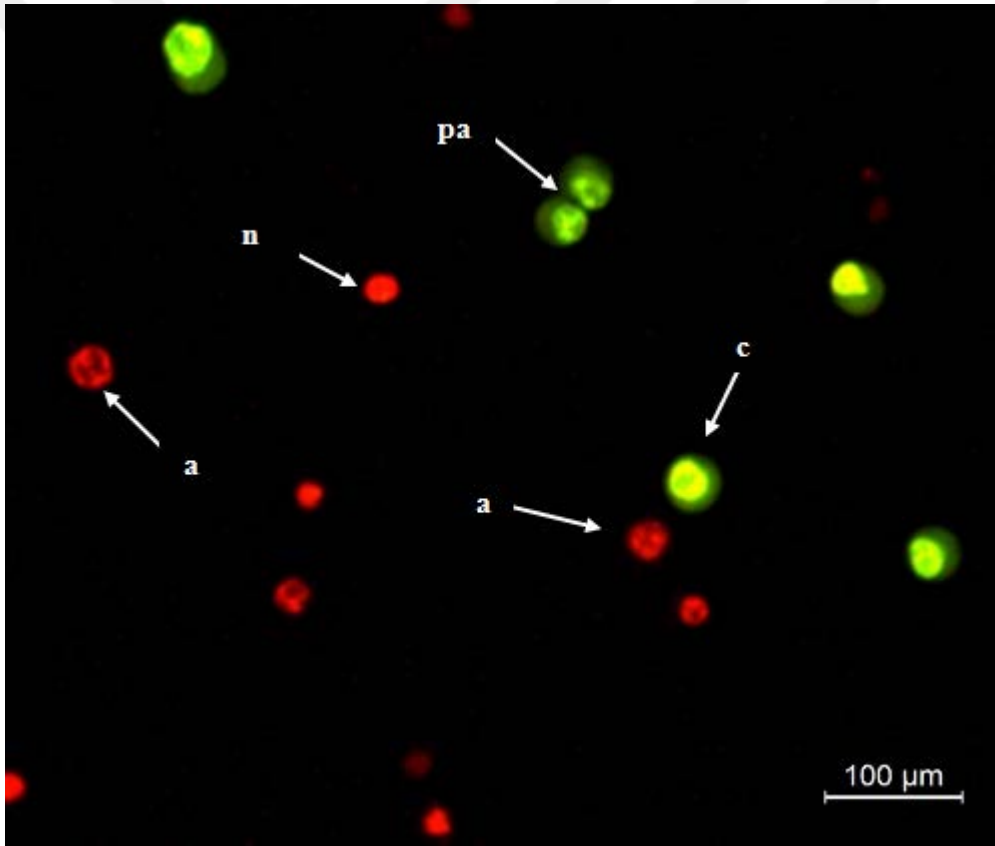
4.2. Akridin Orange/Ethidium Bromür İkilili Boyaması Sonuçları

Apoptoz, membran kabarcıklaşması, hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve DNA bozunması gibi morfolojik değişiklikler ve ardından hücre döküntülerinin komşu hücreler tarafından hızlı bir şekilde sarılmaları ile karakterize edilir (Kerr ve ark., 1972). Kanser hücrelerinde apoptozis indüksiyonu antikanser ilaç gelişimi için faydalı stratejilerden biridir (Hu ve Kavanagh, 2003). Bu nedenle çalışmamızda, NMPA-Cu 'nun apoptozis indüksiyonu yoluyla MCF-7 ve HME1 hücrelerinde sitotoksikiteyi indükleyip indüklediği incelenmiştir.

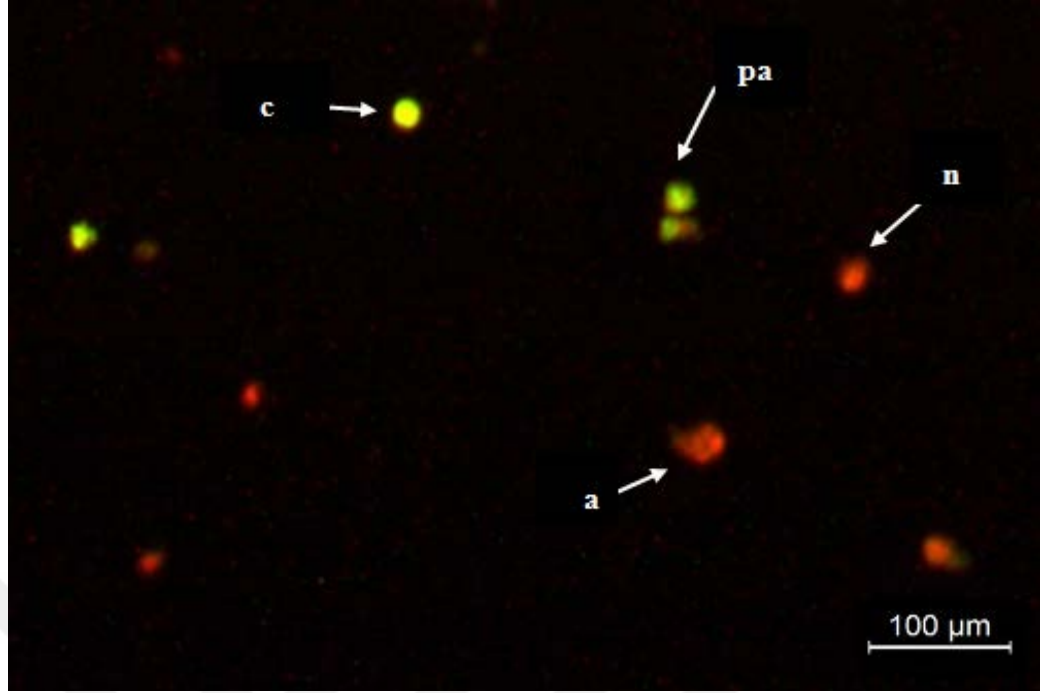
Apoptoz yüzdesi şu formülle hesaplanmıştır:

$$\frac{\text{preapoptotik h.} + \text{apoptotik h.}}{\text{canlı h.} + \text{preapoptotik h.} + \text{apoptotik h.} + \text{nekrotik h.}} \times 100$$

Akridin orange hem canlı hem de ölü hücreleri boyayan vital bir boyadır, oysa etidyum bromür membran hasarı meydana geldiğinde hücreleri lekeler. Normal nükleer kromatine sahip canlı hücreler (yeşil), erken apoptotik hücreler (yeşil, sarı veya turuncu), parçalanmış nükleer kromatin içeren geç apoptotik hücreler (turuncu veya kırmızı) ve normal nükleer kromatine sahip fragmentsiz nekrotik hücreler AO / EtBr boyamasından sonra tespit edilmiştir.



Şekil 4.6 NMPA-Cu ile Muamele Edilmiş MCF-7 Hücrelerinde Apoptoz



Şekil 4.7 NMPA-Cu ile Muamele Edilmiş hTERT-HME1 Hücrelerinde Apoptoz

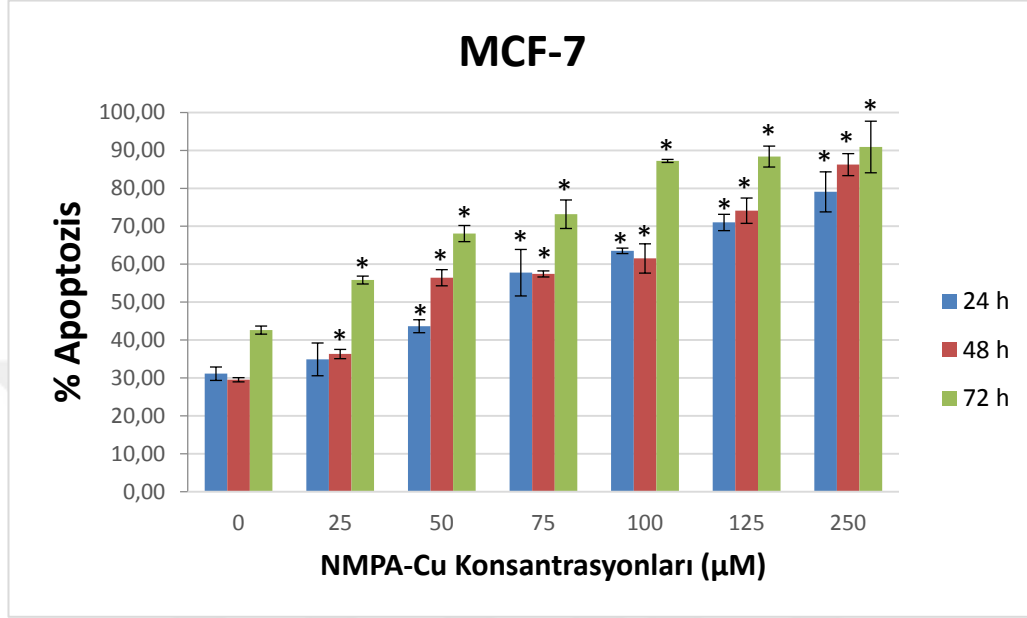
Yapılan MTT testi sonucunda belirlenen altı doz kullanılarak, 24, 48 ve 72 saat süreyle NMPA-Cu'ya maruz bırakılan hücrelerde bu kompleksin apoptoza etkisi incelenmiştir. Çizelge 4.14 'de NMPA-Cu ile muamele edilmiş MCF-7 ve HME1 hücrelerinin apoptoz oranları gösterilmektedir. 24, 48 ve 72 saat süren NMPA-Cu muameleleri, hem MCF-7 hem de HME1 hücrelerinde apoptotik hücrelerin yüzdesini kontrol grubuna oranla doza ve zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($p < 0.05$).

Çizelge 4.14 NMPA-Cu Muameleleri Sonrası Hücre Kültüründeki % Apoptosis Değerleri

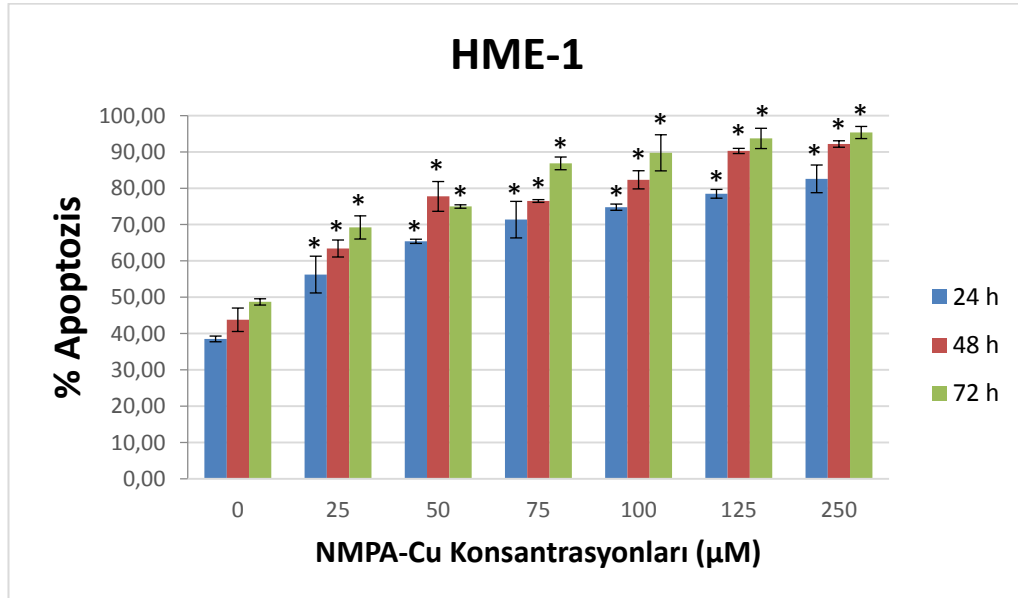
	Apoptosis (%)					
	MCF-7			hTERT-HME1		
	24 saat	48 saat	72 saat	24 saat	48 saat	72 saat
0	31.14±1.77	29.54±0.56	42.64±1.07	38.54±0.79	43.81±3.23	48.72±0.86
25μM	34.92±4.32	36.33±1.22	55.83±1.04	56.25±5.06 ^a	63.42±2.34 ^a	69.22±3.19 ^a
50μM	43.66±1.71	56.44±2.13	68.09±2.13	65.40±0.58 ^a	77.76±4.10 ^a	74.98±0.47 ^a
75μM	57.77±6.13	57.44±0.80	73.19±3.76	71.37±5.03 ^a	76.50±0.38 ^a	86.86±1.75 ^a
100μM	63.53±0.72	61.52±3.86	87.24±0.40	74.80±0.86 ^a	82.33±2.50 ^a	89.76±4.97
125μM	71.01±2.15	74.12±3.34	88.39±2.76	78.48±1.21 ^a	90.27±0.71 ^a	93.72±2.79
250μM	79.08±5.28	86.26±2.90	90.92±6.80	82.60±3.81	92.19±0.89 ^a	95.35±1.67

[a] MCF-7'ye göre farklılığı göstermektedir ($p < 0.05$)

Çizelgelerde belirtilen veriler kullanılarak, NMPA-Cu kompleksinin 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalar sonunda apoptoza olan etkileri, MCF-7 ve HME1 hücreleri için ayrı ayrı grafiklerle gösterilmiştir (Şekil 4.8 ve 4.9).



Şekil 4.8 NMPA-Cu 'nun MCF-7 Hücrelerindeki Tüm Zaman Noktalarında Apoptoz Göstergesi
[*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p < 0.05$)



Şekil 4.9 NMPA-Cu 'nun hTERT-HME1 Hücrelerindeki Tüm Zaman Noktalarında Apoptoz Göstergesi
[*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p < 0.05$)

Yapılan AO / EtBr ikili boyamasında NMPA-Cu konsantrasyonu ile hazırlanan doz grubunun üç farklı zaman noktasında MCF-7 ve HME1 hücre hatlarında doza ve zamana bağlı olarak apoptotik hücre oranını arttırdığı tespit edilmiştir. Test edilen tüm dozlarda % apoptoz kontrole göre önemli derecede artmıştır ($p<0.05$) (Çizelge 4.14).

MCF-7 hücrelerinde 24 saatlik maruziyette, en düşük doz (25 μM) hariç diğer bütün dozlarda apoptoz oranı yükselmiş olup kontrole kıyaslandığında bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 4.8). HME1 hücrelerinde ise tüm dozlarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artışlar gözlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.9). Apoptotik hücre oranı bakımından iki hücre grubu karşılaştırıldığında, HME1 yüksek doz (250 μM) hariç daha duyarlı bir durum sergilemiştir. Yüksek dozda birbirine yakın apoptoz seviyeleri belirlenmişken, diğer tüm dozlarda daha yüksek apoptoz oranı HME1’de gözlenmiştir. MCF ile arasındaki bu farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$) (Çizelge 4.14).

48 ve 72 saatlik maruziyette hem MCF-7 hem de HME1 hücrelerinde % apoptoz oranı doza bağlı olarak yükselmiştir. MCF-7 hücrelerinde 48 saatlik uygulamada artan % apoptoz seviyeleri, 72 saatlik muamelede düşük dozlardan itibaren hem 24 saat hem de 48 saate göre daha yüksek olmuştur. MCF-7 grubunda apoptotik hücre miktarındaki bu artışlar tüm dozlarda kontrolden istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 4.8, 4.9). MCF-7 grubuna kıyasla HME1 hücrelerinde 48 saat zaman noktasında tüm dozlarda % apoptoz oranı daha yüksek gerçekleşmiştir. Bu fark istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Ayrıca 72 saatlik uygulamada ilk üç dozda (25 μM , 50 μM , 75 μM) HME1 hücrelerinde MCF-7’ye göre istatistiksel olarak da anlamlı olan daha yüksek apoptoz seviyeleri görülürken, son üç dozda (100 μM , 125 μM , 250 μM) ise benzer apoptoz seviyeleri tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.14). Deney verileri, tüm zaman noktalarında NMPA-Cu ile muamele edilen HME1 hücrelerinde apoptoza MCF-7 hücrelerinden daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

4.3. Sitotoksikite ve Apoptoz

Yeni sentezlenen çeşitli imin türevlerinin melanoma, over kanseri ve lösemi tedavisinde kullanılan hidroksilüre antikanser ilacından daha etkili olduğu ve

kemoterapötik ajan olarak ümit vaat ettiği bildirilmektedir (Ren, 2002). Elde edilen bu sonuçlar söz konusu Schiff bazlarının memeli hücrelerindeki sitotoksik potansiyeline işaret etmektedir. Örneğin, Shabani ve ark., (2008), yaptıkları bir çalışmada azot ihtiva eden bazı iminlerin K562 (insan kronik myeloid lösemi) hücreleri ve Jurkat (insan T lenfosit karsinoma) hücrelerine karşı antitümöral aktivite gösterdiğini tespit etmiş ve metal kompleksli iminlerin kullanımı ile kemoterapi için umut ışığı olabilecek yeni bulgular ortaya çıkarmışlardır. Bakır(II) komplekslerinin aracılık ettiği sitotoksisite mekanizması, hücre döngüsü durdurma ve apoptoza veya reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna ve daha sonra hücre ölümüne yol açan DNA'yı bağlama ve parçalama yeteneklerinden kaynaklanabilmektedir. Bakır(II) kompleksinin aracılık ettiği böyle olası mekanizmaların hücreyi apoptoza yönlendirdiği tahmin edilmektedir (Jamieson ve Lippard, 1999). Şüphesiz bakır çeşitli metaloenzimlerin kofaktörü (örn: Cu, Zn-SOD⁴ ve sitokrom c oksidaz) olarak işlev gördüğünden, hücre sağkalımı için gerekli olan bir elementtir. Fakat aynı zamanda yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu toksik olduğu bir gerçektir (Gaetke ve Chow, 2003). Bakırın uzun bir tıbbi uygulama geçmişi vardır, ancak potansiyel antitümör özellikleri sadece son birkaç yılda araştırılmıştır (Filomeni ve ark., 2007).

Verilen literatür bilgilerinde de belirtildiği gibi önceki araştırma bulguları çalışmamızın amaç ve hedeflerini doğrulamaktadır. Yukarıdaki çalışmaların öncesinde ve sonrasında, uzun yıllardır kanser tedavisi için uygun kimyasal ajanların keşfi adına yeni reaktif moleküllerin sentezlendiği ve test edildiği pek çok araştırma bilim dünyasında yer almıştır. Aşağıda böyle çalışmalara örnekler verilmiş ve çalışmamızın kapsamı ve sonuçlarıyla ilişkilendirilmek üzere karşılaştırılmıştır.

Öncelikle genel olarak Schiff bazı türevlerinin, temel anlamda sitotoksik, ayrıca antiproliferatif ve apoptotik etkilerini gözler önüne seren, bazı imino grubu türevleri ve farklı molekül yapısına sahip başka Schiff bazlarıyla yapılan çalışmalardan örnekler paylaşılmıştır.

Pirano tiyazol Schiff bazlarının MCF-7 (İnsan meme kanseri hücre serisi) hücre hattı üzerinde doksorubisinden daha etkili sitotoksik etki gösterdiği belirtilmektedir (Ghorab ve ark., 2012). Aynı hücre hattı fakat farklı bir molekül grubuyla yürütülen

çalışmamızda da özellikle yüksek dozlarda artan sitotoksikite seviyeleri tespit edilmişse de yukarıdaki çalışmada yapılan bir Schiff bazının başka bir anti-tümöral etken ile karşılaştırılmasına benzer bir yol izlenmemiştir.

Çalışmamızda kullanılan Schiff bazı-Cu kompleksi gibi imino grubu moleküllerin farklı dokulara ait kanser hücre hatlarındaki etkilerinin incelendiği araştırmalarda; iminodihidrotyazollerin rahim kanser hücrelerinde (HeLa, Siha) *in vitro* antiproliferatif aktivite gösterdiği (Shi ve ark., 2011), suda çözünebilir isoindolokinoksalin imin türevlerinin osteokarsinom (U2OS) hücre hattında 24, 48 ve 72 saatlik muamelelerde, G1 safhası apoptotik popülasyonunun artması, DNA ile etkileşim, tübülün polimerizasyonunun indirgenmesi ve topoizomeraaz I'in inhibe edilmesi gibi çok hedefli sitotoksik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Parrino ve ark., 2015). Benzer molekül grubu ile yaptığımız, kanser ve normal hücre hatları üzerine etkilerini araştırdığımız çalışmamızdan elde edilen sonuçlar NMPA-Cu kompleksinin anti-tümöral potansiyelinin olduğunu göstermiştir. Fakat aynı seviyede olmasa da normal hücre hattında da sitotoksik ve hatta apoptotik özelliğinin ortaya çıkması, molekülün bu yapısı ve özellikleri ile sadece kanser hücrelerinin oluşturduğu tümörün hedef alınamayacağı fikrini akla getirmektedir.

Cerchiaro ve ark.'nın 2005'te yayımladığı, isatin'in imin türevleri ve bunların Cu kompleksleriyle yapılan çalışma sonuçlarına göre, bu moleküllerden bazılarının insan promonosit lenfoma (U937) hücreleri ve insan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre hattında hücre canlılığı üzerine ve pro-oksidant niteliği bakımından farklı davranışlar sergilemişlerdir. Bazıları her iki hücrede de hiç bir etki göstermezken, bazıları her iki hücre tipinde de proliferasyonu düşürmüştür. Bunu yanında, bileşiklerden bazıları zamana bağlı olarak (24, 48 saat muameleler) SH-SY5Y hücrelerinde apoptozu değişen oranlarda indüklerken, isaepy-Cu türevi U937 hücre hattında 24 saat uygulamasında bile apoptozu diğer hücre hattına göre daha yüksek seviyede dramatic bir şekilde arttırmıştır. Yazarlar, böyle değişken etkiler sayesinde, kanser kemoterapisinde en ilgi çekici yönü sunabilecek olan, ileride sentezlenecek moleküllerin farklı hücre özgüllüklerine sahip olacaklarının öngörülebileceğini ifade etmişlerdir. Bu bakış açısıyla, çalışmamızda yeni sentezlenen Schiff bazı-Cu kompleksinin testleri, aynı dokunun normal ve kanserli iki farklı hücre tipi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, molekülün normal hücrelere

olumsuz etkilerinin olmayacağı ya da kanser hücrelerindeki seviyelerden çok daha düşük olacağı beklentimizi sitotoksosite açısından *in vitro* kronik uygulamada bazı dozlarda kısmen karşılamıştır. Apoptoz seviyeleri karşılaştırıldığında ise bu farklılık beklenen seviyelerde olmamıştır.

Osoyole ve Akpan, (2012), yaptıkları bir çalışmada, metal kompleksli bazı iminlerin *in vitro* ortamda antikanser ve antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlar, Pd(II) ve Cu(II) komplekslerinin MCF-7 (insan meme adenokarsinoma) hücrelerine karşı, Pd(II) kompleksinin de HT-29 (kolon karsinoma) hücrelerine karşı önemli ölçüde etki gösterdiğini bildiren çalışma sonuçları, çalışmamızdaki sitotoksosite verileri ile uyumludur. Aynı hücre hattında farklı ve yeni sentezlenen bir kompleks ile benzer bir sonuca ulaşılmışsa da normal hücre hattında da toksik etki potansiyeli bazı zaman noktalarında bir kaç doz dışında düşük çıkmıştır.

Guo ve ark., (2010), yaptıkları bir çalışmada üçlü bakır kompleksli salisilaldehit-amino bileşiklerinin BGC823 (insan gastrit kanser hücre serisi) hücrelerinin proliferasyonu üzerinde etkili olduğunu, apoptozisi uyardığı ve hücre siklusunda değişikliklere sebep olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu sonuçlar, bir liganda bakır bağlayarak elde ettiğimiz kompleksin MCF-7 hücre hattında apoptozu arttırdığı çalışmamızın verileriyle paralellik göstermekte ve Schiff bazı Cu(II) kompleksinin apoptozisi uyardığına dair bulgularımızı desteklemektedir. Çalışmamızda kullanılan Schiff bazı Cu(II) kompleksi aynı zamanda HME1 normal meme hücre hattında da apoptotik hücre artışını indüklemektedir.

Schiff bazı bakır(II) kompleksi ile yapılan ve kontrol grubu olarak cisplatin'in kullanıldığı bir çalışmada, bakır(II) kompleksinin MCF-7 hücrelerine sitotoksik olduğu ve doz-zamana bağlı bir şekilde hücrelerin büyümesini önlediği gösterilmiştir. Hoechst 33342 ve Annexin V-FITC/PI boyamalarının kullanıldığı apoptoz potansiyelinin tespitinden elde edilen sonuçlar, kompleksin MCF-7 hücrelerinde doza bağlı olarak apoptozisi etkin bir şekilde uyardığını gözler önüne sermiştir (Ma ve ark., 2012). Söz konusu çalışmanın farklı yöntemlerle belirlenen sitotoksosite ve apoptozis sonuçları, MCF-7 hücre hattında MTT ile tespit edilen hücre canlılığı ve AO/EtBr yöntemiyle belirlenen apoptotik hücre oranları sonuçlarımızla paralellik göstermektedir.

İnsan meme kanseri MCF-7 hücreleri, prostat kanseri (PC-3) ve insan meme kanseri (MDA-MB-231) hücreleri ile yapılan çalışmada, sentezlenen çeşitli Schiff bazı-bakır komplekslerinden bazılarının 24 saat muamelesi sonunda hücrelerde apoptoza bağlı morfolojik değişiklikler gözlemlenmiştir (Zou ve ark., 2013). Araştırmacılar, söz konusu komplekslerin proteazom yolağının inhibisyonuna ve p53 deaktivasyonuna müdahil olarak apoptozu teşvik ettikleri ihtimali üzerinde durmaktadırlar. Benzer bir çalışmada HeLa hücrelerinin apoptozisinin, kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivasyonuna bağlı olarak intrinsik mitokondriyal apoptotik yol ile bakır kompleksi tarafından indüklendiğinin görülmesi apoptotik süreci teşvik edici bir potansiyele işaret etmektedir. Ayrıca Schiff bazı-Cu kompleksinin, HeLa hücrelerinde sitopatolojik etkilerini ve hücre döngüsünün S fazında durdurarak apoptozisi teşvik ettiği de belirtilmektedir (Qiao ve ark., 2011). Aynı molekül grubunun farklı veya aynı kanser hatlarında apoptozis potansiyelini işaret eden bu çalışmalar, farklı hücre ve yöntemle elde ettiğimiz verilerle benzerlik göstermektedir. Genel bir bakışla, çalışmamızda kullanılan doz ve muamele süreleri hesaba katıldığında benzer apoptotik etkiler görülmüştür. Fakat çalışmamızda düşük dozlarda ve sürelerde bu etkinin sınırlı seviyede olduğu belirlenmiştir.

Lai ve ark., (2015)'de yaptıkları çalışmada, A549 hücrelerini 24 saat boyunca Polipiridil-Ru kompleksi ile muamele etmişlerdir. Bu çalışmada MTT sonucu düşük IC₅₀ değeri ve yüksek sitotoksosite tespit edilmiştir. Ayrıca AO/EtBr boyamasıyla apoptoz artışı gözlenmiştir. Araştırmacılar bu sonuçları, hücre döngüsünün inhibisyonu, reaktif oksijen türleri aracılığıyla mitokondri işlev bozukluğu, nükleer büzüşme ve kromatin yoğunlaşması, apoptotik proteinlerin ekspresyonu gibi verilerle desteklemişlerdir. Çalışmamızda aynı yöntemlerle benzer sonuçlar elde edilmiş olup, daha yüksek IC₅₀ değerlerine ek olarak ve belirlenen toksik potansiyeller görece daha yüksek dozlarda ortaya çıkmıştır. Bu farklılığın olağan sebebi çalışmamızın farklı bir hücre hattına imin türevi-bakır kompleksi muamelesini içermesidir. Yukarıdaki etki mekanizmalarından başka; nekroz, otofaji, proteazom inhibisyonu gibi farklı mekanizmaların da çalışmamızda elde edilen sonuçların ortaya çıkışına sebep olma ihtimalleri bulunmaktadır. Çalışmamızda, HME1 hücre hattının sınıanan kompleks moleküle MCF-7'den hafifçe daha dirençli olmasına rağmen, söz konusu sonuçların kanserli ve normal hücre hatları tarafından paylaşılması tezimize konu Schiff bazı-

Cu kompleksinin anti-tümöral anlamda umut verici bir ajan olmasının önünde bir engel oluşturması muhtemeldir.

4 farklı kiral Schiff bazı-Cu komplekslerinin meme adenokarsinom hücre hattı olan MDA-MB-231 hücreleri, HeLa ve A549 hücre hatlarında denendiği çalışma, tüm moleküllerin bütün hücrelerde üst seviyede sitotoksikite meydana getirdiğini göstermiştir. Ayrıca özellikle iki molekülün G₂/M fazı gecikmesine sebep olduğu ve MDA-MB-231 hücrelerinde ROS oluşumu ve kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptozu ve hücre ölümünü arttırdığı rapor edilmiştir (Zhou ve ark., 2016).

Piridin ve pirol temelli Schiff bazı-Cu komplekslerinin test edildiği çalışmada (Seth ve ark., 2016) serviks karsinom hücre hattı HeLa ve akciğer fibroblast normal hücre hattı WI-38 kullanılmıştır. MTT testi ile hücre çoğalmasına ve akış sitometrisi ile apoptoza etkileri incelenmiştir. Araştırmacılar, sentezledikleri moleküllerden bir tanesinin hücre çoğalması üzerine seçici bir inhibisyona sahip olduğunu ve WI-38'de %85 olan hücre canlılığını HeLa'da %39 seviyelerine düşürdüğünü rapor etmişlerdir. Akış sitometrisi sonuçları, bu molekülün HeLa'da hücre ölümünü artırarak proliferasyonu düşüren etkisinin nekrozdan ziyade apoptozis olduğunu göstermiştir. Söz konusu Schiff bazı-Cu kompleksinin ortaya çıkan kanser ve normal hücreler arasındaki bu seçici inhibisyon özelliği, etkili bir antitümör ilaç olmanın temel kriterlerinden birini karşılaması açısından önemlidir. Çalışmamızda kanser ve normal meme hücresi hatlarında benzer bir hareket tarzı MTT testi ile özellikle 72 saatlik uygulamada ve düşük-orta dozlarda tespit edilmiştir. Apoptotik popülasyon seviyelerinde ise bu seçicilik gözlenmemiştir. Kimyasal ajanların hücreler üzerinde sahip oldukları sitotoksik potansiyelleri (nekroz, otofaji, ROS oluşumu, organel işlevsizliği, biyomoleküllerin sentez-yıkım dengesinin değişimi gibi) çok farklı tarzlarda ortaya çıkarabildikleri düşünüldüğünde, molekül için başka bir hareket tarzı varlığı ihtimali düşünülebilir.

MCF-7 ile birlikte iki kanser hattı ve bir normal hücre hattı MRC-5 ile yapılan çalışmada 20 tane ligand ve çeşitli metallerle hazırlanmış komplekslerin antikanser aktivitesi doksorubisin standardı ile karşılaştırılarak araştırılmıştır (Devi ve ark., 2018). Deneysel sonuçlardan; bazı komplekslerin kanser hatlarında önemli sitotoksik seviyeler gösterirken, normal hücredeki IC₅₀ değerlerinin standarttan 10 kata kadar

daha fazla olduğu dolayısıyla normal hücreye karşı çok daha az toksik olduğu anlaşılmıştır. Bu yeni kompleksler arasında Cu metali içerenlerin etkinliği sırasıyla Zn, Ni ve Co içeren komplekslerin ulaştığı seviyede olmamıştır. Bu sebeple özellikle Zn içeren kompleksler araştırmacılar tarafından antitümöral potansiyelli bileşikler olarak tanımlanmış ve umut verici sitotoksik ilaç olarak önerilmiştir. Çalışmamızda da benzer bir yol izlenmiş olup antitümöral potansiyeli incelenen yeni bir bileşiğin sitotoksik özellikleri kanserli ve normal hücre hatlarında incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. Devi ve ark.'nın farklı hücre tiplerindeki değişken IC₅₀ değerleri terapötik indeks (TI) açısından önemlidir. Normal hücredeki yüksek inhibitör konsantrasyonu ile kanser hücreindeki düşük IC₅₀ arasındaki fark (TI= normal hücrenin IC₅₀ / kanser hücrelerinin IC₅₀) terapötik indeks değerini artıracaktır ki bu, antikanser ajanı olarak kullanılabilme güvenirlilik oranını yükseltebilir. Bununla birlikte çalışmamızda iki farklı hücre hattının IC₅₀ değerlerinin birbirine görece yakın çıkması araştırmamızda kullanılan kompleksin antitümöral özelliğinin zayıf olduğunu düşündürebilir.

Gouda ve ark. 2018 yılında yayımladıkları çalışmanın sonucunda pirrolizin ligandı ve Cu komplekslerinin iki tanesinin kanser hatları ve normal hücre hattı arasında gösterdiği yüksek seçici sitotoksikite ve erken apoptotik hücre popülasyonunu 2-3 kata kadar arttırması sebebiyle ileri *in vitro* ve *in vivo* araştırmalar için temel oluşturacağını savunmuşlardır. Bu çalışmada, insana ait 3 adenokarsinom hücre hattı MCF-7 (meme), A2780 (yumurtalık) ve HT29 (kolon), ayrıca bir tane de normal hücre hattı MRC5 (akciğer fibroblast) kullanılmıştır. Tüm hücreler Schiff bazı-Cu komplekslerine MTT ile sitotoksikite incelemesi için 72 saat, Annexin V yöntemi ile apoptozun belirlenmesi için ise 24 saat süre ile maruz bırakılmıştır.

Son yıllarda, farklı ligandlar ve onların değişik metallere hazırlanan kompleks bileşikleriyle yapılmış pek çok çalışma vardır. Bunlardan birinde, Hu ve ark. (2017) sentezledikleri Cu kompleksinin HeLa hücrelerindeki sitotoksik aktivitesinin cisplatinle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu hücrelerde hücre döngüsü Schiff bazı-Cu kompleksi tarafından G₂'de durdurulmuştur. Diğerinde Koley ve ark. (2018) iki farklı Cu kompleksinin 24 saat muamele sonunda, MTT ile MCF-7 ve A549 kanser hatlarında düşük IC₅₀, yüksek sitotoksikite, normal embriyonik hücresi L132'de ise yüksek IC₅₀ ve düşük

sitotoksosite tespit etmişlerdir. AO/PI (Propidyum iyodür) testi sonucunda ise A549 hattında apoptotik ve nekrotik hücreler bulunduğunu, aynı dozda L132 hücrelerinde hiç veya çok az DNA fragmentasyonu bildirmişlerdir. Çalışmamızda kullanılan imin türevi liganda benzer bir molekül ve onların Cu kompleksleri ile, yine bu tezde kullanılan aynı dokuya ait kanser tipinin farklı bir hücre hattı MDA-MB-231 ile sıçan normal myoblastı L6 hücrelerinde, aynı iki yöntemi kullanarak yapılan başka bir çalışmanın (Rafi ve ark., 2018) sonuçları standart bir kemoterapi ilaç olan cisplatinden daha yüksek bir etkisi olduğu yönündedir. Schiff bazı-Cu komplekslerine 24 saat maruz bırakılan iki hücre tipinin hücre canlılıkları MTT ve Klonojenik test ile değerlendirildiğinde elde edilen IC₅₀ değerleri göstermiştir ki bazı kompleksler normal hücreye cisplatinden daha az toksik kanser hücrelerine ise cisplatinden daha fazla toksik olmuştur. Bu seçiciliğin kimyasal bir ajan için kemoterapide kullanılabilir olması adına önemli bir avantaj olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda olumlu bir yön olarak değerlendirilebilecek bu özellik hafifçe tespit edilmiştir, bunun yanında etkisi bilinen bir molekülün ya da kemoterapötik bir ajanın karşılaştırmada kullanılmaması çalışmamız açısından olumsuz bir yön olarak düşünülebilir. Hela (serviks), MCF-7 (meme), A549 (akciğer), HepG2 (karaciğer) adenokarsinomları ve HUVEC (umbilikal ven) normal hücresinde beş amin türevi ligand ve Cu kompleksleri ile yapılan 2018 tarihli bir çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiştir (Zhao ve ark. 2018). Ligandlardan ikisi HepG2 hücreleri üzerine doksorubisinden yüksek sitotoksositeye sahipken hücre sağkalımını normal hücreye göre 180 kat fazla inhibe etmiştir. Ayrıca, bu moleküller düşük konsantrasyonlarda yine HepG2’de apoptozisi teşvik etmiştir.

Bunların yanında, yeni sentezlenen komplekslerin ağırlıklı kimyasal analizlerinin ve antifungal-bakteriyel özelliklerinin belirlendiği bir çalışma da bu yıl yayımlanmıştır. Bu çalışmada Schiff bazı ligandı ve Cu kompleksi sadece meme kanser hücresi (MCF-7) kullanılmış ve bir pozitif kontrol olmaksızın, tek uygulama süresinde (24 saat) test edilmiştir (Alothman ve ark., 2019). Yazarlar, MTT ve AO/EtBr boyaması sonrası elde edilen hücre sağkalım inhibisyonu, apoptoz indüksiyonu ve ROS oluşumu sonuçlarının, kompleks 1’in MCF-7 üzerinde sitotoksik etkisini desteklediğini ve söz konusu molekülün antikanser ajan olarak potansiyeline işaret ettiğine inandıklarını bildirmişlerdir.

Yine bu yıl yayımlanan bir çalışmada, nano ölçekte yeni sentezlenen amino türevi Schiff bazı-Cu kompleksi bileşiklerinin insan gastrik kanser hücre (MGC-803) ve insan normal embriyonik böbrek hücre (HEK-293) hatlarına 24 saat muamelesi sonrasında hücre sayım kiti ile proliferasyon, Anneksin V boyasıyla ve Kaspaz aktivitesiyle apoptotik hücre ve apoptoz oranı, hücre içi ROS ölçümü ile oksidatif stres etkisi incelenmiştir (Qi ve ark., 2019). Pozitif kontrol Okzaliptatin ile kıyaslandığında komplekslerden biri MGC-803 kanser hücrelerinde hücre canlılığı üzerine doza bağlı olarak pozitif kontrolden daha yüksek inhibitör etki gösterirken, normal HEK-293 hücrelerinde ise herhangi bir inhibisyon gözlenmemiştir. Kaspaz aktivasyonu ve Anneksin V yöntemleri sonucu aynı kompleks apoptotik hücre ölümünü pozitif kontrol cisplatin seviyesinde indüklemiştir. Araştırmacılar hücre içi ROS ölçümü sonucunun kompleksin bu antikanser aktivitesini desteklediğini bildirmişlerdir. Yukarıda da bahsedildiği gibi, potansiyel bir antitümöral molekülün mitokondri disfonksiyonu, proteozom inhibisyonu, topoizomeraz inhibisyonu, ROS oluşumu, kaspaz aktivitesi gibi mekanizmalarda kanser hücresi üzerine seçici özellikte olması temel kıstaslardan biridir. Bir diğeri de bu etkileri normal hücrelerde hiç göstermemesi ya da telafisi mümkün kabul edilebilecek seviyelerde göstermesidir. Bu çalışmada hücre canlılığı dışında uygulanan diğer yöntemlerde böyle bir veri bulunmamaktadır. Çalışmamızda hücre sağkalımı dışında bu veri apoptotik hücre oranını veren AO/EtBr boyamasından elde edilmişse de normal HME1 hücre hattındaki oran tatmin edici seviyede olmamıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bilimdeki gelişmelere rağmen kanser hala dünyadaki en önemli sağlık sorunlarından ve ölümlerin ana nedenlerindedir. Bu nedenle DNA'yı hedef alan ilaçların keşfi, kanser tedavisi için yeni ilaçların geliştirilmesi temel yaklaşımdır. Ayrıca kemoterapide kullanılan ilaçlara karşı oluşan direnç de ciddi bir sorundur. Bu nedenle bilim insanlarını tedavide kullanılacak daha güvenli, daha etkili ve daha az yan etkilere sahip olan yeni ajan arayışlarına yönlendirmektedir.

Yaptığımız çalışmada, NMPA-Cu kompleksinin 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarında kontrollere kıyasla hücre sağkalımının önemli derecede azalması, bu Schiff bazı-Cu kompleksinin MCF-7 insan meme adenokarsinom hücrelerinde sitotoksik potansiyeli olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu potansiyel MCF-7 hücrelerinde IC_{50} civarında %60 seviyelerinde apoptotik hücre popülasyonu belirlenmesiyle desteklenmiştir. NMPA-Cu kompleksinin bu sitotoksisite potansiyeli meme adenokarsinom hücrelerinde doza ve zamana bağlı bir şekilde ortaya çıkmıştır. Günümüzde terapötik bir ajan olabilmenin kıstaslarından biri; normal doku ve hücre üzerine sitotoksik etki göstermeme veya tölere edilebilecek seviyelerde kalmasıdır. Bu paralelde, çalışmamızın kontrol hücre hattı olan HME1'de düşük sitotoksisiteye işaret edecek çok daha yüksek bir IC_{50} değeri tahmini karşılık bulmamıştır. Her ne kadar HME1 ile MCF-7 IC_{50} değerleri arasında yaklaşık %50 oranında bir fark gözlenmişse de, benzer moleküllerin etkinliğinin araştırıldığı literatürlerde moleküllerin normal hücre ile tümör hücresindeki etkinlik veya IC_{50} seviyeleri arasındaki 10-200 katlık farklar ile kıyaslandığında tatmin edici bir antikanser aktivitesi olarak değerlendirilemeyecektir. Ayrıca hedef hücredeki seçici inhibisyona karşılık gelen bu özelliğe ek olarak genelde bu tür moleküllerin umut verici potansiyelleri kanser hücrelerindeki çok daha düşük IC_{50} konsantrasyonları ile anlamlı olmaktadır. Herhangi bir araştırmada böyle bir potansiyelin belirmesi durumunda da etkisi bilinen başka bir molekül ya da mevcut bir kemoterapötik ile karşılaştırılması gerekmektedir. Söz konusu pozitif kontrol karşılaştırması, çalışmamızda iki hücre kıyası ile ortaya çıkabilecek bir potansiyel sonrasına bırakıldığı için dahil edilememiştir.

Çözelti içerisinde kompleks madde içerecek şekilde sentezlenmiş olan antipirin türevli NMPA-Cu etken maddesi, MCF-7 ve hTERT-HME1 hücre hatlarında sitotoksikite ölçümleri ilk kez ve karşılaştırmalı olarak bu çalışmada araştırılmıştır. Çalışmamızın sonuçlarına bağlı olarak, bu bileşiğin antitümör ve kemoterapotik ajan olabilme potansiyeli hakkında ilk bilgiler elde edilmiştir. Bu çalışma NMPA-Cu bileşiği özelinde veya çeşitli kimyasal modifikasyonlarla çeşitlendirilecek ligand veya komplekslerin mutlaka hücre seçiciliğine dayanması gereken antikanser aktivitelerinin belirleneceği yeni yaklaşımlara önderlik edebilecektir.

Literatürlerde benzer çalışmalar moleküllerin pek çok türevleri ve farklı metal kompleksleriyle gerçekleştirilmiştir. Dahası, bu çeşitli türev ve komplekslerin etkileri bol miktarda, farklı karakterdeki ve morfolojide hücrelerde sınanmıştır. Biyolojik sistemleri oluşturan hücrelerin farklı davranışları, farklı hücresel yanıtları ve ihtiyaçları düşünüldüğünde, tez çalışmamıza konu Schiff bazı-Cu kompleksinin başka hücrelerde ve hatta farklı yöntemlerle de sınanması bir gereklilik olarak önümüzde durmaktadır. İleride bu fikir, molekülün kimyasal alternatifleriyle ve farklı başka metallere çeşitlendirilmesi ile geliştirilerek amaca yönelik olasılık artırılabilir. Bu bizleri daha fazla ve farklı ligand ya da komplekslerin, başka ve çeşitli hücre hatlarında, güncel, hassas ve güvenilir farklı yöntemlerle test edileceği yeni araştırmalara yönlendirecektir.

Çalışmamız ve benzerleri sayesinde oldukça önemli bir sağlık problemi olan kanserin tedavisinde kullanılmak üzere, tümör hücrelerine yüksek sitotoksik potansiyele sahip ama normal hücrelere hiç ya da en az düzeyde etki edecek yeni moleküllerin keşfi ile umut verici ilaçların tasarımı gerçekleştirilebilecek ve yeni tedavi stratejileri geliştirilebilecektir.

6. KAYNAKLAR

- Abrams, M.J., & Murrer, B.A. (1993). Metal compounds in cancer therapy and diagnosis. *Science*, 261, 725-730.
- Adsule, S., Barve, V., Chen, D., Ahmed, F., Dou, Q.P., Padhye, S., & Sarkar, F.H. (2006). Novel Schiff base copper complexes of quinoline-2 carboxaldehyde as proteasome inhibitors in human prostate cancer cells. *J Med Chem*, 49, 7242-7246.
- Aki-Şener, E., & Yalçın, İ. (2003). Farmasötik ve medisinal kimyada ilaç etken madde tasarım yöntemleri -1, kantitatif yapı-etki ilişkileri analizleri (QSAR). *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, 40,181.
- Akşit, H., & Bildik, A. (2008). Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 19(1):55-63.
- Albert, J., D'Andrea, L., Granell, J., Pla-Vilanova, P., Quirante, J., Khosa, M.K., Calvis, C., Messeguer, R., Badía, J., Baldomà, L., Font-Bardia, M., & Calvet, T., (2014). Cyclopalladated and cycloplatinated benzophenone imines: Antitumor, antibacterial and antioxidant activities, DNA interaction and cathepsin B inhibition. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 140, 80-88.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., & Roberts, K. (2015). *Molecular Biology of THE CELL*. Garland Science, 6th ed, New York.
- Alderden R.A, Hall M.D & Hambley T.W. (2006). The discovery and development of cisplatin. *Journal of Chemical Education*, 83, 728-734.
- Ali, S.M.M., Azad, M., Jesmin, M., Ahsan, S., Rahman, M.M., Khanam, J.A., İslam, M.N., & Shahriar, S.M.S. (2012). *In Vivo* anticancer activity of vanillin semicarbazone. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(6), 438-442.
- Allothman, A.A., Al-Farraj, E.S., Al-Onazi, W.A., Almarhoon, Z.M., & Al-Mohaimed, A.M. 2019. Spectral characterization, electrochemical, antimicrobial and cytotoxic studies on new metal (II) complexes containing N2O4 donor hexadentate Schiff base ligand. *Arabian Journal of Chemistry*. doi.org/10.1016/j.arabjc.2019.02.003.
- Alpsoy, A., (2014). *The Roles of Protein Kinase D2 in Chemoresistant Breast Cancer Cell Lines*. Yüksek Lisans Tezi, Middle East Technical University, Doğal ve Uygulamalı Bilimler Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Altunkaynak, B. & Özbek, E. (2008). Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir. *Tıp Araştırmaları Dergisi*. 6(2):93-104.
- Alvero, A.B., Chen, W., Sartorelli, A.C., Schwartz, P., Rutherford, T., & Mor, G. (2006). Triapine (3-amino- 2-carboxaldehyde thiosemicarbazone) Induces Apoptosis in Ovarian Cancer Cells. *Journal of the Society Gynecology Investigation*, 13, 145–152.
- American Cancer Society (2018). <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/hormone-therapy-for-breast-cancer.html> - (Erişim tarihi 21.02.2019).

- Annaraj, J., Srinivasan, S., Ponvel, K.M., & Athappan, P.R., (2005). Mixed ligand copper(II) complexes of phenanthroline/bipyridyl and curcumin diketimines as DNA intercalators and their electrochemical behavior under Nafion® and clay modified electrodes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99, 669–676.
- Atlı, K., & Bozcuk, A.N. (2002). Telomerler ve Hücresel Yaşlanma. *Geriatri*, 5: 111-4.
- Bagihalli, G.B., Avaji, P.G., Patil, S.A., & Badami, P.S. (2008). Synthesis, spectral characterization, in vitro antibacterial, antifungal and cytotoxic actives of Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes with 1,2,4-triazole Schiff bases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 2639-2649.
- Bakır, E. (2018). Flurbiprofenin Sitotoksik, Genotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Programı, Ankara.
- Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165.
- Benz, C., Hollander, C., Keniry, M., James, T.L., & Mitchell, M. (1987). Lactic dehydrogenase isoenzymes, 31P-magnetic resonance spectroscopy and in vitro antimitochondrial tumour toxicity with gossypol and rhodamine-123, *The Journal of Clinical Investigation*, 79, 517.
- Benz, C.C., Keniry, M.A., Ford, J.M., Townsend, A.J., Cox, F.W., Palayoor, S., Matlin, S.A., Hait, W.N., & Cowan, K.H. (1990). Biochemical correlates of the antitumor and antimitochondrial properties of gossypol enantiomers. *Molecular Pharmacology*, 37, 840-847.
- Beytur, A., Tekin, S., Keleştimur, T., Ergin, Z., & Sandal, S. (2011). Yeni sentezlenen bir tiyosemikarbazon türevinin prostat kanseri hücre kültürleri üzerine antikarsinogenik özelliklerinin belirlenmesi: *In vitro* bir çalışma. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*, 25(1), 25-32.
- Blasco, M.A. (2005). Telomeres and Human Disease: Aging, Cancer and Beyond. *Nature Reviews Genetics*, 6: 611-22.
- Buseman, C.M., Wright, W.E., & Shay, J.W. (2012). Is telomerase a viable target in cancer? *Mutation Research*, 730, 90-97.
- Carlini, F., Ridolfi, B., Molinari, A., Parisi, C., Bozzuto, G., Toccaceli, L., Formisano, G., De Orsi, D., Paradisi, S., Grober, O.V., Ravo, M., Weisz, A., Arcieri, R., Vella, S., & Gaudi, S. (2010). The reverse transcription inhibitor abacavir shows anticancer activity in prostate cancer cell lines. *PLoS ONE* 5(12): e14221.
- Cerchiaro, G., Aquilano, K., Filomeni, G., Rotilio, G., Ciriolo, M.R., & Ferreira, A.M.D.D. (2005). Isatin-Schiff base copper(II) complexes and their influence on cellular viability, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99 (2005) 1433–1450.
- Cerone, M.A., Londoño-Vallejo, J.A., & Autexier, C. (2006). Telomerase inhibition enhances the response to anticancer drug treatment in human breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(7):1669-1675.

- Chakraborty, A., Kumar, P., Ghosh, K., & Roy, P. (2010). Evaluation of a Schiff base copper complex compound as potent anticancer molecule with multiple targets of action. *European Journal of Pharmacology*, 647,1-12.
- Chen, J., Wang, X., Show, Y., Zhu, J., Li, Y., Xu, Q., & Guo, Z. (2007). A trinuclear copper (II) complex of 2, 4, 6-tris (di-2-pyridylamine)-1, 3, 5-triazine shows prominent DNA cleavage activity. *Inorganic Chemistry*, 46, 3306–3312.
- Cory, J.G., Cory, A.H., Rappa, G., Lorico, A., Liu, M.C., Lin, T.S., & Sartorelli, A.C. (1995). Structure-function relationships for a new series of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones on ribonucleotide reductase activity and tumour cell growth in culture and *in vivo*. *Advances in Enzyme Regulation*, 35, 55-68.
- Creaven, B.S., Duff, B., Egan, D.A., Kavanagh, K., Rosair, G., Thangella, V.R., & Walsh, M. (2010). Anticancer and antifungal activity of copper(II) complexes of quinoil-2(1H)-one-derived Schiff bases. *Inorganica Chimica Acta*, 363, 4048-4058.
- Devarajan, E., Sahin, A.A., Chen, J.S., Krishnamurthy, R.R., Aggarwal, N., Brun, A.M., Sapino, A., Zhang, F., Sharma, D., Yang, X.H., Tora, A.D., & Mehta, K., (2002). Downregulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism of chemoresistance. *Oncogene*, 21, 8843–8851.
- Devi, J., Yadav, M., Kumar, D., Naik, L.S., & Jindal, D.K. (2018). Some divalent metal(II) complexes of salicylaldehyde-derived Schiff bases: Synthesis, spectroscopic characterization, antimicrobial and *in vitro* anticancer studies. *Applied Organometallic Chemistry*, e4693.
- Dhar, S., Senapati, D., Das, P.K., Chattopadhyay, P., Nethaji, M., & Chakravarty, A.R. (2003). Ternary copper complexes for photocleavage of DNA by red light: direct evidence for sulfur-to-copper charge transfer and d–d band involvement. *Journal of the American Chemical Society*, 125(40), 12118–12124.
- Doyle, A., & Griffiths, J.B. (1998). Cell quantification. *Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures in Biotechnology*, 76-81.
- Dunn, B.K., Agurs-Collins, T., Browne, D., Lubet, R., & Johnson, K.A. (2010). Health disparities in breast cancer: biology meets socioeconomic status. *Breast Cancer Research and Treatment*, 121(2), 281–292.
- Dündar, B. (2017). Glut-1 (Slc2a1) ve Glut-3 (Slc2a3) Genlerinin Ve Bu Genleri Hedefleyen Mikrorna Ekspresyonlarının Farklı Meme Kanseri Hücre Hatlarında (Skbr-3, MDA-MB-231, MCF-7, hTERT) Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Bursa.
- Eissa, A.A.M., Farag, N.A.H., & Soliman, G.A.H. (2009). Synthesis, biological evaluation and docking studies of novel benzopyranone congeners for their expected activity as anti-inflammatory, analgesic and antipyretic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 5059–5070.

- Ellis, D., Kuhen, K.L., Anaclerio, B., Wu, B., Wolff, K., Yin, H., Bursulaya, B., Caldwell, D., Karanewsky, D., & He, Y. (2006). Design, synthesis, and biological evaluations of novel quinolones as HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16, 4246-4251.
- Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 35(4):495-516.
- Eröz, R., Karataş, A., Alkoç, O.A., Baltacı, D., Oktay, M., & Çolakoğlu, S. (2012). Apoptozis hakkında bilinenler (literatür taraması). *Düzce Medical Journal*. 14(2).
- Evan, G.I., & Vousden, K.H. (2011). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411:342-348.
- Farha, A. K., Geetha, B.S., Mangalam, S.N., Dhanya, S.R., Latha P.G., & Andremani, P. (2013). Apoptosis mediated cytotoxicity induced by isodeoxyelephantopin on nasopharyngeal carcinoma cells. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, Vol 6, Suppl 2, 51-56.
- Fecker, L.F., Stockfleth, E., Braun, F.K., Rodust, P.M., Schwarz, C., & Köhler, A. (2010). Enhanced death ligand-induced apoptosis in cutaneous SCC cells by treatment with diclofenac/hyaluronic acid correlates with downregulation of c-FLIP. *Journal of Investigative Dermatology*. 130(8): 2098-109.
- Feng, J., Funk, W.D., Wang, S.S., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., & Yu, J. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science*, 269(5228): 1236-1241.
- Filomeni, G., Cerchiero, G., Da Costa Ferreria, A.M., De Martino, A., Pedersen, J.Z., Rotilio, G., & Ciriolo, M.R. (2007). Pro-apoptotic Activity of Novel Isatin Schiff Base Copper (II) Complexes Depends on Oxidative Stress Induction and Organelle-selective Damage. *The Journal of Biological Chemistry*, 16, 12010-12021.
- Gaetke, L.M., & Chow, C.K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189,147-163.
- García-Giménez, J.L., González-Álvarez, M., Liu-González, M., Macías, B., Borrás, J., & Alzuet, G., (2009). Toward the development of metal-based synthetic nucleases: DNA binding and oxidative DNA cleavage of a mixed copper(II) complex with N-(9Hpurin- 6-yl)benzenesulfonamide and 1, 10-phenantroline. Antitumor activity in human Caco-2 cells and Jurkat T lymphocytes. Evaluation of p53 and Bcl-2 proteins in the apoptotic mechanism. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103, 923–934.
- Gey, G.O., Coffman, W.D., & Kubicek, M.T. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research*, 12: 264-265.
- Ghorab, M.M., Shaaban, M.A., Refaat, H.M., Heiba, H.I., & İbrahim, S.S. (2012). Anticancer and radiosensitizing evaluation of some new pyranothiazole-

- Schiff bases bearing the biologically active sulfonamide moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 403-407.
- Gouda, A.M., El-Ghamry, H.A., Bawazeer, T.M., Farghaly, T.A., Abdalla, A.N., & Aslam, A. (2018). Antitumor activity of pyrrolizines and their Cu(II) complexes: Design, synthesis and cytotoxic screening with potential apoptosis-inducing activity, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 145, 350-359.
- Griffith, D.J., Corneau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Mossus, H., & De Lange, T. (1999). Mammalian Telomeres an in A Large Duplex Loop. *Cell*, 97:503-514.
- Güneri Yıldız, M., Aras, S., & Cansaran Duman, D. (2010). Telomerlerin Yaşlanma ve Kansere İlişkisindeki Rolü. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 66(4): 187-195.
- Güneş, H.V. (2003). Moleküler Hücre Biyolojisi. Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, 1. Baskı, 75-82.
- Hacıkamiloğlu, E., Gültekin, M., Boztaş, G., Dündar, S., Utku, E., Ergün, A., Sevinç, A., Tütüncü, S., & Seymen, E. 2017. Türkiye Kansere İstatistikleri. Ankara, http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/2014-RAPOR.pdf - Erişim Tarihi: (29.05.2017).
- Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Bass, M.B., Arruda, I., & Robinson, M.O. (1997). A mammalian telomerase-associated protein. *Science*, 275(5302): 973-977.
- Harvie, M., Hooper, L., & Howell, A.H. (2003). Central obesity and breast cancer risk: a systematic review. *Obesity Reviews*, 4: 154-173.
- Herbert, B.S., Wright, W.E., & Shay, J.W. (2001). Telomerase and breast cancer. *Breast Cancer Research*, 3(3): 146–149.
- Holla, B.S., Veerendra, B., Shivananda, M.K., & Poojary, B. (2003). Synthesis characterization and anticancer activity studies on some Mannich bases derived from 1, 2, 4-triazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38: 759-767.
- Hu, W., & Kavanagh, J. (2003). Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *The Lancet Oncology*, 4: 721-729.
- Hu, K., Li, F., Zhang, Z. & Liang, F. (2017). Synthesis of two potential anticancer copper(II) complex drugs: their crystal structure, human serum albumin/DNA binding and anticancer mechanism. *New Journal of Chemistry*. 41, 2062–2072.
- Huang, L., Jin, K., & Lan, H. (2019). Luteolin inhibits cell cycle progression and induces apoptosis of breast cancer cells through downregulation of human telomerase reverse transcriptase. *Oncology Letters*, 17(4):3842-3850.
- Humphreys, K.J., Karlin, K.D., & Rokita, S.E.J., (2002). Targeted strand scission of DNA substrates by a tricopper (II) coordination complex. *Journal of the American Chemistry Society*, 124, 8055–8066.

- IARC, (2018). Latest Global Cancer Data 2018. International Agency for Research on Cancer (IARC), Yayın no: 263, Geneva, Switzerland.
- Jamieson, E.R., & Lippard, S.J. (1999). Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts. *Chemical Reviews*, 99, 2467-2498.
- Jaroszewski, J.W., Kaplan, O., & Cohen, J.S. (1990). Action of gossypol and rhodamine 123 on wild type and multidrug-resistant MCF-7 human cancer cells: ³¹P nuclear magnetic resonance and toxicity studies. *Cancer Research*, 50, 6936-6943.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., & Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 26(4):239.
- Kiaune, L., & Singhasemanon, N. (2011). Pesticidal copper (I) oxide: environmental fate and aquatic toxicity. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 213:1-26.
- Koichiro, J., Mamoru, M., Hidekazu, A., Ichiro, K., Yasuyuki, I., Tomohiro, O., & Hideki, M., (2004). Characteristics of pyrimidine nucleobases through inter-base interactions on the crystals of the ternary copper (II). *Chemistry Letters*, 33, 1302–1303.
- Koley, M.K., Parsekar, S.U., Durairandy, N., Kiran, M.S., Varghese, B., Manoharan, P.T., & Koley, A.P. (2018). DNA binding and cytotoxicity of two Cu(II) complexes containing a Schiff base ligand along with 1,10-phenanthroline or imidazole as a coligand, *Inorganica Chimica Acta*, 478, 211-221.
- Koyunoğlu, F., Tekin, S., Konar, V., & Sandal, S. (2013). İnsan meme kanseri hücre serileri (MCF-7) üzerine Apelin-13'ün etkilerinin araştırılması: *In Vitro* bir çalışma. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1, 23-28.
- Köksal, H. (1996). Geçiş metallere ait naftilsalisilaldiminlerle kompleks bileşiklerinin sentezi, yapı ve spektral özelliklerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü., Kahramanmaraş.
- Kraicheva, I., Tsacheva, I., Vodenicharova, E., Tashev, E., Tosheva, T., Kril, A., Toposhka-Ancheva, M., Iliev, I., Gerasimova, Ts., & Troev. K. (2012). Synthesis, antiproliferative activity and genotoxicity of novel anthracene-containing aminophosphonates and a new anthracene-derived Schiff base. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20,117-124.
- Krishnasamy, L., Ponmurugan, P., Jayanthi, K., & Magesh, V. (2014). Cytotoxic, Apoptotic Efficacy Of Silver Nanoparticles Synthesized From Indigofera Aspalathoids. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6, 8, 245-248.
- Kyo, S., Takakura, M., Kohama, T., & Inoure, M. (1997). Telomerase Activity in Human Endometrium. *Cancer Research*, 57: 610-4.
- Lai, S.H., Jiang, G.B., Yao, J.H., Li, W., Han, B.J., Zhang, C., & Liu, Y.J. (2015). Cytotoxic activity, DNA damage, cellular uptake, apoptosis and western blot

- analysis of ruthenium (II) polypyridyl complex against human lung decarcinoma A549 cell. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 152, 1-9.
- Letafat, B., Shakeri, R., Emami, S., Noushini, S., Mohammadhosseini, N., Shirkavand, N., Ardestani, S.K., Safavi, M., Samadizadeh, M., Letafat, A., Shafiee, A., & Foroumadi, A. (2013). Synthesis and *in vitro* cytotoxic activity of novel chalcone-like agents. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16, 1155-1162.
- Levenson, A.S., & Jordan, V.C. (1997). MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Research*, 57:3071–3078.
- Liu, Z.C., Wang, B.D., Li, B., Wang, Q., Yang, Z.Y., Li, T.R., & Li, Y. (2010). Crystal Structures, DNA-binding and cytotoxic activities studies of Cu(II) complexes with 2-oxo-quinoline-3-carbaldehyde Schiff bases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 5353-5361.
- Lu, J., Guo, H., Zeng, X., Zhang, Y., Zhao, P., Jiang, J., & Zang, L. (2012). Synthesis and characterization of unsymmetrical oxidovanadium complexes: DNA-binding, cleavage studies and antitumor activities. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 112, 39-48.
- Ma, Z.Y., Qiao, X., Xie, C.Z., Shao, J., Xu, J.Y., Qiang, Z.Y., & Lou, J.S. (2012). Activities of a novel Schiff base copper(II) complex on growth inhibition and apoptosis induction toward MCF-7 human breast cancer cells via mitochondrial pathway. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 117, 1-9.
- Majumder, S., Dutta, P., Mookerjee, A., & Choudhuri, S.K., (2006). The role of a novel copper complex in overcoming doxorubicin resistance in Ehrlich ascites carcinoma cells in vivo. *Chemico-Biological Interactions*, 159, 90–103.
- Miller, R.E., & Larkin, J.M. (2009). Combination systemic therapy for advanced renal cell carcinoma. *The oncologist*, 14(12), 1218-1224.
- Mohankumar, K., Pajaniradje, S., Sridharan, S., Singh, V.K., Ronsard, L., Banerjea, A.C., Benson, C.S., Coumar, M.S., & Rajagopalan, R. (2014). Mechanism of apoptotic induction in human breast cancer cell, MCF-7, by an analog of curcumin in comparison with curcumin – An in vitro and in silico approach. *Chemico-Biological Interactions*, 210, 51-63.
- Morin, G.B. (1997). Telomere Control of Replicative Lifespan. *Experimental Gerontology*, 32: 375-82.
- Nakamura, T.M., Morin, G.B., Chapman, K.B., Weinrich, S.L., Andrews, W.H., Lingner, J., Harley, C.B., & Cech, T.R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*, 277(5328): 955-959.
- Nakatani, K., Yoshimi, N., Mori, H., Yoshimura, S., Sakai, H., Shinoda, J., & Sakai, N. (1997). The significant role of Telomerase Activity in Human Brain Tumors. *Cancer*, 80(3): 471-6.
- Osowole, A.A., & Akpan, E.J. (2012). Synthesis, spectroscopic characterisation, in-vitro anticancer and antimicrobial activities of some metal (II) complexes of

- 3-{4, 6-Dimethoxy Pyrimidinyl} Iminomethyl Naphthalen-2-Ol. *European Journal of Applied Sciences*, 4, 14-20.
- Özbolet, G., & Tuli, A. (2016). Ağır metal toksisitesinin insan sağlığına etkileri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 25(4), 502-521.
- Özlu, B. (2018). Meme kanseri tedavisinde doksorubisin yüklü melanin nanoparçacıkların kullanımı. Yüksek Lisans Tezi, TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
- Özluer, Ö. (2018). Meme kanseri ve meme normal hücre hatlarında, kadmiyum ve çinko'nun etkisinin moleküler düzeyde incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İleri Teknolojiler Anabilim Dalı, Kırşehir.
- Öztürk, M. (2006). Meme Kanserinin Genetiği ve Risk Faktörleri. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitim Etkinlikleri, 15-26.
- Pachon, L.D., Golobic, A., Kozlevcar, B., Gamez, P., Kooijman, H., Spek, A.L., & Reedijk, J. (2004). Intramolecular oxidation of the ligand 4-methyl-2-N-(2-pyridylmethyl)aminophenol (Hpyramol) upon coordination with iron(II) chloride and manganese(II) perchlorate. *Inorganica Chimica Acta*, 357, 3697-3702.
- Parashar, R.K., Sharma, R.C., & Mohan, G. (1990). Biological-activity of some schiff bases and their metal-complexes. *Biological Trace Element Research*, 23, 145-150.
- Parrino, B., Carbone, A., Ciancimino, C., Montalbano, B.V.S.A., Barraja, P., Cirrincione, G., Diana, P., Sissi, C., Palumbo, M., Pinato, O., Pennati, M., Beretta, G., Folini, N.M., Matyus, P., Balogh, B., & Zaffaroni, N. (2015). Water-soluble isoindolo [2,1-a]quinoxalin-6-imines: In vitro antiproliferative activity and molecular mechanism(s) of action. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 94, 149-162.
- Pignatello, R., Pacino, A., Mazzone, P., Pinizzotto, M.R., Garozzo, A., & Furneri, P.M. (1994). Schiff bases of N-hydroxy-N'-aminoguanidines as antiviral, antibacterial and anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 29, 781-785.
- Pires dos Santos, M.L., Faljoni-Alairo, A., Mangrich, A.S., & Ferreira, A.M.C. (1998). Antioxidant and Prooxidant Properties of some di-Schiff Base Copper(II) Complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 71, 71-78.
- Prakash, A., & Adhikari, D. (2011). Application of Schiff bases and their metal complexes-A Review. *International Journal of ChemTech Research*, 3(4), 1891-1896.
- Przybylski, P., Huczynski, A., Pyta, K., Brzezinski, B. & Bartl, F. (2009). Biological properties of Schiff bases and azo derivatives of phenol. *Current Organic Chemistry*, 13, 124-148.
- Qiao, X., Ma, Z.Y., Xie, C.Z., Xue, F., Zhang, Y.W., Xu, J.Y., Qiang, Z.Y., Lou, J.S., Chen, G.J., & Yan, S.P. (2011). Study on potential antitumor

- mechanism of a novel Schiff Base copper (II) complex: Synthesis, crystal structure, DNA binding, cytotoxicity and apoptosis induction activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105, 728-737.
- Qi, X.H., Wu, Z.M., Wang, S.B., Wang, B.X., Wang, L.L., Li, H. & Guo, Q. (2019). Three novel Schiff base transition metal(II) complexes induce gastric cancer cell death through ROS-mediated apoptotic pathway. *Journal of Coordination Chemistry*. doi.org/10.1080/00958972.2019.1647535.
- Rafi, U.M., Mahendiran, D., Devi, V.G., Doble, M., & Rahiman, A.K. (2018). Pyridazine-based heteroleptic copper(II) complexes as potent anticancer drugs by inducing apoptosis and S-phase arrest in breast cancer cell. *Inorganica Chimica Acta*, 482, 160-169.
- Ranjan, R., Naresh, R., Patra, R.C., & Swarup, D. (2006). Erythrocyte lipid peroxides and blood zinc and copper concentrations in acute undifferentiated diarrhoea in calves. *Veterinary Research Communications*. 30:249-54.
- Ren, S., Wang, R., Komatsu, K., Bonaz-Krause, P., Zyrianov, Y., Mckenna, C.E., Csipke, C., Tokes, Z.A., & Lien, E.J. (2002). Synthesis, biological evaluation, and quantitative structure-activity relationship analysis of new Schiff bases of hydroxysemicarbazide as potential antitumor agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (2), 410-419.
- Rose, D.P., Komnionou, D., & Stephenson, G.D. (2004). Obesity, adipocytokines and insulin resistance in breast cancer. *Obesity Reviews*, 5:153-165.
- Rossi, A., Russo, G., Puca, A., La Montagna, R., Caputo, M., Mattioli, E., Lopez, M., Giordano, A., & Pentimalli, F. (2009). The antiretroviral nucleoside analogue Abacavir reduces cell growth and promotes differentiation of human medulloblastoma cells. *International Journal Cancer*, 125, 235-243.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1):39-85.
- Savalia, R.V., Patel, A.P., Trivedi, P.T., Gohel, H.R., & Khetani, D.B. (2013). Rapid and Economic Synthesis of Schiff Base of Salicylaldehyde by Microwave Irradiation. *Research Journal of Chemical Sciences*, 3, 97-99.
- Seth, B.K., Saha, A., Haldar, S., Chakraborty, P.P., Saha, P. & Basu, S. (2016). Structure dependent selective efficacy of pyridine and pyrrole based Cu(II) Schiff base complexes towards in vitro cytotoxicity, apoptosis and DNA-bases binding in ground and excited state. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 162, 463-472.
- Shabani, F., Ghammamy, S., Mehrani, K., Teimouri, M.B., Soleimani, M., & Kaviani, S. (2008). Antitumor activity of 6-(cyclohexylamino)-1,3-dimethyl-5(2pyridyl)furo[2,3-d]pyrimidine-2, 4(1H,3H)-dione and its Ti(IV), Zn(II), Fe(III), and Pd(II) complexes on K562 and Jurkat cell lines. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 5.
- Shelly, M.D., Hartley, L., Fish, R.G., Groundwater, P., Morgan, J.J.G., Mort, D., Mason, M., & Evans, A. (1999). Stereo-specific cytotoxic effects of gossypol

- enantiomers and gossypolone in tumour cell lines. *Cancer Letters*, 135, 171-180.
- Shen, Y.C., Hsu, C., & Cheng, A.L. (2010). Molecular targeted therapy for advanced hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives. *Journal of Gastroenterology*, 45(8), 794-807.
- Shenouda, S.K., & Alahari, S.K. (2009). MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Reviews*, 28(3-4): 369-378.
- Shi, H.-B., Zhang, S.-J., Lin, Y.-F., Hu, W.-X., & Cai, C.N.-M. (2011). Study on condensation of N-Aryl thioureas with 3-bromoacetylacetone: synthesis of aminothiazoles and iminodihydrothiazoles, and their in vitro antiproliferative activity on human cervical cancer cells. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 48, 1061-1066.
- Silveira, V.C., Luz, J.S., Oliveira, C.C., Graziani, I., Ciriolo, M.R., & Ferreira, A.M.C. (2008). Double-strand DNA cleavage induced by oxindole-Schiff base copper(II) complexes with potential antitumor activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102, 1090-1103.
- Simonsson, T. (2003). A substrate for telomerase. *Trends in Biochemical Sciences*, 28: 632–628.
- Stockert RJ, Grushoff PS, Morell AG, & Bentley, G.E. (1986). Transport and intracellular distribution of copper in a human hepatoblastoma cell line, HepG2. *Hepatology*, 6, 60-64.
- Suliman, F.A., Khodeer, D.M., Ibrahiem, A., Mehanna, E.T., El-Kherbetawy, M.K., & Mohammad, H.M. (2018). Renoprotective effect of the isoflavonoid biochanin A against cisplatin induced acute kidney injury in mice: Effect on inflammatory burden and p53 apoptosis. *International Immunopharmacology*. 61:8-19.
- Tanphaichitr, N., & Fitzgerald, L.M. (1989). Incorporation of gossypol and formation of its protein conjugates in mouse transformed Sertoli (TM4) cells, *Journal of Andrology*, 10, 195-201.
- Theophanides T & Anastassopoulou J. (2002). Copper and carcinogenesis. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology*, 42, 57-64.
- Türkiye Meme Hastalıkları Dernekleri Federasyonu. (2019). <http://www.tmhdf.org.tr/>, (Erişim tarihi 25.02.2019).
- Vineis, P., & Husgafvel-Pursiainen, K. (2005). Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis*, 1846–1855.
- Wang, L.Y., Bai, L.M., Tokunaga, D., Watanabe, Y., Hasegawa, T., Sakai, J., Tang, W.X., Bai, Y.H., Hirose, K., & Yamori, T. (2008). The polar neutral and basic taxoids isolated from needles and twigs of *Taxus cuspidata* and their biological activity. *Journal of Wood Science*, 54(5): 390-401.
- White, L.K., Wright, W.E., & Shay, J.W. (2001). Telomerase inhibitors. *Trends Biotechnology*, 19(3): 114-20.

- Xiao, Y., Bi, C., Fan, Y., Cui, C., Zhang, X., & Dou, Q.P. (2008). L-glutamine Schiff base copper complex as a proteasome inhibitor and an apoptosis inducer in human cancer cells. *International Journal of Oncology*, 33, 1073-1079.
- Yang, Z.Y., Yang, R.D., Li, F.S., & Yu, K.B. (2000). Crystal structure and antitumor activity of some rare earth metal complexes with Schiff base. *Polyhedron*, 19, 2599-2604.
- Yılmaz Miroğlu, Y., Diraman, E., & Eren, Z. (2011). Telomer ve Telomeraz. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 4(2): 41-48.
- Zhang, S., Zhu, Y., Tu, C., Wei, H., Yang, Z., Lin, L., Ding, J., Zhang, J., & Guo, Z., (2004). A novel cytotoxic ternary copper(II) complex of 1, 10-phenanthroline and l-threonine with DNA nuclease activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98, 2099–2106.
- Zhang, X., Bi, C., Fan, Y., Cui, Q., Chen, D., Xiao, Y., & Dou, Q.P. (2008). Induction of tumor cell apoptosis by taurine Schiff base copper complex is associated with the inhibition of proteasomal activity. *International Journal of Molecular Medicine*, 22, 677-682.
- Zhao, F., Wang, W., Lu, W., Xu, L., Yang, S., Cai, X.M., Zhou, M., Lei, M., Ma, M., Xu, H.J., & Cao, F. (2018). High anticancer potency on tumor cells of dehydroabietylamine Schiff-base derivatives and a copper(II) complex. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 146, 451–459.
- Zhong, X., Yi, J., Sun, J., Wei, H.L., Liu, W.S., & Yu, K.B. (2006). Synthesis and crystal structure of some transition metal complexes with a novel bis-Schiff base ligand and their antitumor activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41, 1090-1092.
- Zhou, X.-Q., Li, Y., Zhang, D.-Y., Nie, Y., Li, Z.-J., Gu, W., Liu, X., Tian, J.-L., & Yan, S.-P. (2016). Copper Complexes Based on Chiral Schiff-base Ligands: DNA/BSA Binding Ability, DNA Cleavage Activity, Cytotoxicity and Mechanism of Apoptosis, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 114, 244-256.
- Zou, J., Bi, C., Fan, Y., Buac, D., Nardon, C., Daniel, K.G., & Dou, Q.P. (2013). Cellular and computational studies of proteasome inhibition and apoptosis induction in human cancer cells by amino acid Schiff base–copper complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 118, 83–93.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Gamze DİNDAROĞLU
Doğum Yeri	Sivas
Doğum Tarihi	09.04.1991
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	gamze.dindaroglu@gmail.com
Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Fakülte	Fen-Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	2014
Yüksek Lisans	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Mezuniyet Tarihi	2019