

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**STERİK ENGELLİ SALİSİLALDİMİNLERİN KANSER HÜCRE DİZİSİ
ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tuğba ÇOLAK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA

2013

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**STERİK ENGELLİ SALİSİLALDİMİNLERİN KANSER HÜCRE DİZİSİ
ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tuğba ÇOLAK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA

2013

Doç.Dr. Faruk SÜZERGÖZ danışmanlığında,Tuğba ÇOLAK'ın hazırladığı “Sterik Engelli Salisilaldiminlerin Kanser Hücre Dizisi Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması” konulu bu çalışma/...../ tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Üye :

Üye :

Bu Tezin Biyoloji Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

**Prof. Dr.
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 12201**

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.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
SİMGELER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Günümüzde Kullanılan Kimyasallar	3
2.1.1. Yeni sentezlenen kimyasalların biyolojik aktiviteleri	4
2.2. Schiff Bazları	5
2.2.1. Schiff bazlarının sentezi	8
2.2.2. Schiff bazlarının reaksiyonları	9
2.2.3. Koordinasyon kimyasında Schiff bazlarının önemi	10
2.3. Kanser	13
2.3.1. Lösemi	14
2.3.2. Kronik miyeloid lösemi	16
2.4. K562 Hücre Serisi	16
2.5. Sitotoksosite	17
2.6.1. Tripan mavisi ile boyama	23
2.6.2. Mitokondriyal aktiviteye dayalı MTT testi	23
2.6.3. Çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullandığımız 5Florourasil	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM	28
3.1. Yeni Sentezlenen Kimyasallar	28
3.2. Kimyasalların Sterilizasyonu	30
3.3. 5 Florourasil ve kimyasalların doz ayarlaması	30
3.4. 96 Kuyucuklu Kültür Plaklarının Hazırlanması	30
3.4.1. Hücre kültür ortamının hazırlanması	31
3.5. MTT testi	31
3.6. Kültür Plağı Kuyucuklarının Görüntülenmesi	32
3.7. İstatistiksel Analizler	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	33
4.1. Araştırma Bulguları	33
4.1.1. Kontrol grubunun OD değerleri	33
4.1.2. 5 Florourasil'in K562 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri	33
4.1.3. Bileşik 1'in K562 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri	35
4.1.4. Bileşik 2'nin K562 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri	39
4.1.5. Bileşik 3'ün K562 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri	41
4.1.6. Bileşik 4'ün K562 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri	44
4.2. Tartışma	48
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	58
ÖZET	59
SUMMARY	60

ÖZ

Yüksek Lisans Tezi

**STERİK ENGELLİ SALİSİLALDİMİNLERİN KANSER HÜCRE DİZİSİ ÜZERİNE
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tuğba ÇOLAK

**Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Faruk SÜZERGÖZ
Yıl: 2013, Sayfa: 60**

Kemoterapide birçok kimyasal kökenli ajandan yararlanılmakla birlikte başarılı bir kanser tedavisi için henüz etkinliği yüksek ve yan etkileri minimal düzeyde bir kemoterapotik ajan bulunamamıştır. Bu çalışmada, sentezi yapılan sterik engelli salisilaldimin bileşiklerinden [2,4-di-tert-butil-6-{{(2-metilfenil) imino} metil}-fenol], [2,4-di-tert-butil-6-{{(4-metilfenil) imino} metil}-fenol], 2,4-di-tert-butil-6-{{(4-metoksifenil) imino} metil}-fenol], [2,4-di-tert-butil-6-{{(4-ters-bütülfenil) imino} metil}-fenol] kronik miyeloid lösemi hücre soyundan kaynaklanan K562 hücrelerinin sitotoksik etkileri araştırılarak kemoterapotik ajan olabilme kapasitelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bileşiklerin kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkileri canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığıyla MTT tuzlarının indirgemesine dayanan kolorimetrik bir yöntem olan MTT yöntemi ile analiz edilmiştir. [2,4-di-tert-butil-6-{{(4-metilfenil) imino} metil}-fenol] ve [2,4-di-tert-butil-6-{{(4-ters-bütülfenil) imino} metil}-fenol] bileşiklerinin K562 hücreleri üzerinde önemli ölçüde sitotoksik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Salisilaldimin, Schiff bazları, K562, MTT,

ABSTRACT

MSc Thesis

CANCER CELL RESEARCH SERIES ON SALICYLALDIMINES HINDERED THE CYTOTOXIC EFFECTS OF

Tuğba ÇOLAK

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ

Year: 2013, Page: 60

Besides the use of many chemical agents in chemotherapy, a chemotherapeutic agent with minimal side effects and with high activity for treatment success in cancer hasn't been found yet. In this study, it was aimed to investigate cytotoxic effects of synthesized sterically hindered salicylaldimin compounds 2, 4-di-tert-butyl-6- { [(2- methylphenyl) imino] methyl } -phenol, 2, 4-di-tert-butyl-6- { [(4- methylphenyl) imino] methyl } -phenol, 2, 4-di-tert-butyl-6- { [4-Methoxyphenyl) imino] methyl } -phenol, [2, 4-di-tert-butyl-6- {[4-tert-butylphenyl) imino] methyl }-phenol on K562 cell originated from chronic myeloid leukemia cell strain and to determine the capacity of them to be a chemotherapeutic agent. Cytotoxic effects of compounds on cancer cells was analysed with colorimetric MTT method which is based on reducing MTT salts by means of mitochondria of viable cells. It was determined that 2, 4-di-tert-butyl-6- { [(4- methylphenyl) imino] methyl } -phenol and [2, 4-di-tert-butyl-6- {[4-tert-butylphenyl) imino] methyl }-phenol] compounds had not significant cytotoxic effect on K562 cells.

KEY WORDS: Salicylaldimine, Schiff base, K562, MTT.

TEŞEKKÜR

Akademisyenlik yolunu seçmemde en büyük destekçi ve en büyük yardımcımız olan, her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, danışmanım Sayın Doç. Dr. Faruk SÜZERGÖZ' e sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmamızda kullandığımız kimyasalları sentezleyip bize temin eden Doç. Dr. Veli KASIM'a, ayrıca ders döneminde yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç.Dr. Ebru UYAR Hocama teşekkür etmeyi borç bilirim.

Yürüdüğüm yolda yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Fatma TÜMEN'e teşekkür ederim.

Ekip arkadaşlarım uzman biyolog Meryem K DOĞAN' a ve Yusuf VARİŞ'a, dostlarım Zehra GÖKDOĞAN, Emine KAYA ve Hasret ALTAN' a teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen yanımda olan, tüm tezim sürecinde yaşadığım tüm zorluklara benimle beraber göğüs geren, benden her daim her türlü yardımını ve desteğini esirgemeyen, hayatımın en büyük hazineleri babam Emin ÇOLAK'a annem Ferdane ÇOLAK'a ablam Betül TUNÇ'a eniştem Mehmet TUNÇ'a kardeşlerim Yasin, Hürü, Hasibe ve Engin ÇOLAK'a ayrıca maddi manevi desteğini esirgemeyen nişanlım H.Hüseyin ERSU'ya sonsuz teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. K562 Hücre soyunun mikroskopik görüntüsü.....	17
Şekil 2.2. 96 kuyucuklu plaka görüntüsü	18
Şekil 2.3. 5 Florourasil'in yapısı	24
Şekil 2.4. 5 FU'nun DNA hasarı yapma mekanizması.....	26
Şekil 3.1. Bileşik 1	28
Şekil 3.2. Bileşik 2	29
Şekil 3.3. Bileşik 3	29
Şekil 3.4. Bileşik 4	30
Şekil 4.1. MTT öncesi 5 Florourasil'in kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri.....	35
Şekil 4.2.5Florourasil eklenerek sürdürülen kültürlerde K562 hücreleri tarafından üretilen MTT- formazana ait OD(A) ve sitotoksosite değerleri.(B).....	35
Şekil 4.3.MTT sonrası Bileşik 1 'in kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri	37
Şekil 4.4. 5 Florourasil eklenerek sürdürülen kültürlerde K562 hücreleri tarafından üretilen MTT formazana ait OD(A) ve sitotoksosite değerleri(B).....	37
Şekil 4.5. Bileşik 1 korelasyon grafiği	38
Şekil 4.6 MTT sonrası .Bileşik 2 ' nin kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri.....	39
Şekil 4.7. Bileşik 2 eklenerek sürdürülen kültürlerde K562 hücreleri tarafından üretilen MTT- formazana ait OD(A) ve sitotoksosite değerleri(B).....	40
Şekil 4.8. Bileşik 2'e ait korelasyon grafiği	41
Şekil 4.9. MTT sonrası Bileşik 3 'ün kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri.....	42
Şekil 4.10. Bileşik 3 eklenerek sürdürülen kültürlerde K562 hücreleri tarafından üretilen MTTformazana ait OD(A) ve sitotoksosite değerleri (B)	42
Şekil 4.11. Bileşik 3'e ait korelasyon grafiği	43
Şekil 4.12. MTT sonrası bileşik 4'ün kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri.....	44
Şekil 4.13. Bileşik 4' eklenerek sürdürülen kültürlerde K562 hücreleri tarafından üretilen MTT- formazana ait OD (A) ve sitotoksosite değerleri (B)	45
Şekil 4.14. Bileşik 4'e ait korelasyon grafiği	46
Şekil 4.15. Tüm bileşiklerin sitotoksik etkileri	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4. 1. 5 Florourasil'in K562 hücreleri üzerine % sitotoksik etkileri	36
Çizelge 4.2. Bileşik 1' in K562 hücreleri üzerine % sitotoksik etkileri	38
Çizelge 4.3. Bileşik 2' nin K562 hücreleri üzerine % sitotoksik etkileri	40
Çizelge 4.4 . Bileşik 3' ün K562 hücreleri üzerine % sitotoksik etkileri	43
Çizelge 4.5. Bileşik 4' ün K562 hücreleri üzerine % sitotoksik etkileri	45



SİMGELER DİZİNİ

FCS	: Fetal Calf Serum
DMSO	: Dimetilsülfoksit
IC ₅₀	: Hücrelerin % 50'sini Öldüren Doz
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği)
KML	: Kronik Myeloid Lösemi
MA	: Molekül ağırlığı
mM	: Millimolar
ml	: Mililitre
MTT	: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür)
5 FU	: 5 Florourasil



1. GİRİŞ

Kimyasal maddeler günümüzde çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Sağlık alanındaki gelişmeler beraberinde kimyasal maddelere duyulan ihtiyacı da artırmıştır. Kanser tedavisinde kimyasal maddeler özellikle kemoterapide önemli yer tutmaktadır. Kemoterapi kavramı ise ilk defa kanser ile ilgili olarak 1940 yıllarında ortaya atılmıştır. Kemoterapi, kanseri tedavi etmek, kontrol etmek ve kanserin yol açtığı belirtileri gidermek amacıyla kimyasal maddelerle yapılan tedavi şeklidir. Kemoterapide kullanılan ilaçlara genel olarak kemoterapötik adı verilir. Kemoterapide kullanılan kimyasal maddelerin uygun dozlarda kullanımı oldukça önemlidir.

Kemoterapinin bazı kanser türlerinde başarıyla uygulanmasına karşın bir kısım kanser türlerinde henüz etkin bir kemoterapötik ajan bulunamamıştır. Bu nedenle bitkisel ve kimyasal kaynaklardan yeni kemoterapötik ajan arayışı günümüzde de devam etmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız yeni sentezlenen sterik engelli Schiff bazlarının karakteristik özellikleri, yapılarında karbon ve azot çift bağı taşıyıcılarıdır. Schiff bazlarının çeşitli türevleri ve bunların metal kompleksleri antineoplastik, antiviral, antimikrobiyal, antimalarial gibi biyolojik etkinliklere sahip olmalarından dolayı kimya, biyoloji ve farmakoloji bilim dallarında büyük ilgi görmektedirler. Bu bileşiklerin farklı biyolojik etkilere sahip olmasından dolayı sentezlenen bileşiğin yapısı, konumu ve komplekslerde kullanılan metal atomunun özelliği büyük önem taşımaktadır (Çakmak, 2007).

Ayrıca Schiff bazlarının ve bazı metal komplekslerinin organizmalar için önemli α -aminoasitlerin elde edilmesi sırasındaki rolü, sahip olduğu antitümör ve antimikrobiyal aktiviteleri nedeni ile çok geniş biyolojik öneme sahiptirler (Grabaric ve ark., 1993). Özellikle thiosemicarbazaneların metallerle verdiği komplekslerin çok

geniş biyolojik özellik göstermesi bu tür ligandlara önemli yer kazandırmıştır (Franco ve ark., 2000).

Yapılan birçok araştırmada bazı Schiff bazlarının farklı oranlarda antimikrobiyal aktivite gösterdiği görülmüştür (Yılmaz, 2003). Örneğin, sterik hidrokarbonlu fenollerden özellikle 2,6-di-tert-butil fenol türevleri ve onların kompleks bileşenleri antioksidan olarak polimer ve gıda sanayiinde, eczacılıkta oksidasyon proseslerini engelleyen bir koruyucu olarak kullanılmaktadır (Donnelly, 1996). Bu tür fenollerin antikanser özelliği taşıdığı yapılan araştırmalarla ortaya çıkarılmıştır (Clarke ve ark., 1974).

Görüldüğü gibi Schiff bazı komplekslerinin antikanser aktivitesine sahip olmasından dolayı da tıp dünyasındaki önemi giderek artmakta ve kanserle mücadelede reaktif olarak kullanılması hedeflenmektedir.

Yeni sentezlerle elde edilen kimyasal ajanların kanser tedavisinde kullanılma potansiyelinin yüksek olduğu ve etkin sonuçlara ulaşıldığı açıktır. Çalışmamızda kullandığımız bileşikler Fakültemiz Kimya Bölümü, Anorganik Kimya Anabilim Dalında sentezlenen sterik engelli salisilaldiminlerin, miyeloid lösemnin blastik kriz evresinden kaynaklanan K562 hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile araştırılmıştır.

Bu çalışmayı takiben yapılması zorunlu olan diğer testlerle, ve *in vivo* çalışmaları ile kanser için yeni bir kimyasal ajan olma potansiyeline bakılmalıdır. Böylece bu bileşikler alternatif tıba kazandırılmış olabilecektir.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Günümüzde Kullanılan Kimyasallar

Kimyasalların sağlık alanında kullanımında öne çıkan isim 1493-1541 yılları arasında yaşamış İsviçreli bir hekim olan Paracelsus' tur. “ Her şey zehirdir. Zehirle ilacı ayıran dozdur” öngörüsü ile Paracelsus modern toksikolojinin temeli olan doz-cevap ilişkisine ilk dikkati çeken bilim öncülerinden biridir. Bu gelişmelerin temeli 1960' lar öncesi yeterli toksisite bilgisi olmadan her alanda yoğun kimyasal kullanımın başlaması, insan sağlığı ve çevre üzerindeki felaket boyutlarındaki zararların görülmesi ve bunların araştırılmasına dayanmaktadır.

Kimyasallar ile biyolojik sistemler arasındaki kimyasal madde kullanımı ise başlangıçta “zehir bilimi” olarak tanımlanan etkileşimlerin zararlı, sonuçlarını inceleyen bilim dalı” veya “kimyasalların zararsızlık limitlerini belirleyen bilim dalı” olarak tanımlanan toksikolojinin ortaya çıkmasını sağlamıştır.

Bu yüzyılın başına kadar kullanılan kimyasalların sayısı birkaç bin ile sınırlı idi. Bu kimyasalların büyük bölümünü bitkisel, hayvansal ve mineral kaynaklı doğal maddeler oluşturuyordu. 20. yüzyılda organik kimya biliminde dolayısıyla kimya endüstrisindeki hızlı gelişme, kullanılan kimyasalların sayısını hızla arttırmıştır. Bugün büyük bölümü sentetik olmak üzere 80.000'in üzerinde kimyasal madde çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır.

Bu kimyasalların başlıcaları;

- ✓ İlaç aktif maddesi (4.000),
- ✓ İlaç yardımcı maddesi (2.000),
- ✓ Kozmetik (3.000),
- ✓ Gıda katkı maddesi (2.600),
- ✓ Tarım ilacı (1.500) ve
- ✓ Endüstriyel kimyasal (48.000) olarak dağılım göstermektedir.

Kullanılan kimyasallara her yıl yaklaşık olarak 1.000 yeni kimyasalın eklendiği bilinmektedir. Ayrıca bu artışın yanı sıra miktar olarak bir artışın olduğu tespit edilmiştir. Birleşmiş Milletler Çevre Programı (UNEP)'in verilerine göre dünya kimyasal madde üretimi 1950 yılında 7 milyon ton iken, bu rakam 1970 yılında 63 milyon tona ve 1985 yılında 250 milyon tona yükselmiştir. Günümüzde ise bu rakamın 400 milyon tona ulaştığı tahmin edilmektedir.

Kimyasal kullanımındaki bu hızlı artış ‘toplumsal kemofobi’ olarak adlandırılan bir gelişmeyi de beraberinde getirmiştir. Ayrıca Kemofobinin oluşmasında kimyasal madde kullanımındaki artışın yol açtığı trajik olayların rolü de büyüktür. 1960'ların başında talidomit adlı sedatif ilacın yol açtığı 10.000'den fazla malformasyonlu doğum, bu trajik olayların başında gelir. Talidomit faciası boyutunda olmasa dahi ilaçların yol açtığı çok sayıda epidemik olay kimyasallara karşı insanlarda korkuya sebep olmaktadır.

Kimyasalların yarattığı tehlikeler ve modern yaşamın sürdürülmesinde gerekli olması ayrıca kimyasalların artan miktarlarda kullanılma gerekliliği kimyasalların üretim öncesi ve sonrası güvenilirlik limitlerini belirleyen toksikolojinin önemini arttırmıştır. Bilim ve teknolojideki özellikle son 30-40 yılda yaşanan hızlı gelişmeler metoksisite olarak adlandırılan, toksisite mekanizmalarının hücrel, biyokimyasal ve moleküller olarak aydınlatılmasına yardımcı olmaktadır.

İnsan organizmasına zararının minimuma indirilmesi için yeni sentezlenen her kimyasal hakkında yeterli araştırmaların yapılması ve işlevlerinin aydınlatılması gerekmektedir.

2.1.1.Yeni sentezlenen kimyasalların biyolojik aktiviteleri

Günümüzde tedavi amacıyla kullanılan ilaçlar arasında kemoterapötik etkili ilaçlar ilk sıralarda yer almasına rağmen zaman içerisinde mikroorganizmaların direnç kazanması veya istenilmeyen bazı yan etkilerinin bulunması bu ilaçların

kullanım alanlarını daraltmaktadır. Bu durum, araştırmacıları etkili ve geniş spektruma sahip yeni ilaçların bulunmasına yönlendirmektedir. Bilim insanları özellikle kemoterapötik ilaçlar bulmak için Schiff bazları üzerine son yıllarda birçok çalışma yapmışlardır. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmektedir.

Tiyosemikarbazon türevlerinin DNA ve RNA sentezini inhibe edici etkileri nedeniyle antineoplastik amaçla da kullanıldıklarını (Ergenç ve ark., 2010) ayrıca antitiroid aktivite gösterdiklerini belirtmişlerdir. Ayrıca tiyosemikarbazon ve Schiff bazı türevleri; antiviral, antimalarial, antifungal ve antibakteriyal özelliğinin bulunmasından dolayı birçok hastalıkta tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Patil ve ark., 2010).

Williams ve arkadaşları 4-metil-5-amino-1-formilkinolin tiyosemikarbazon (MAIQ)'nun bazı karaciğer enzimlerini *in vitro* olarak inhibe ettiğini ve tiyosemikarbazon-metal komplekslerinin aktif oksijen türleri gibi toksik etkiler oluşturduğunu da ileri sürmüşlerdir (Williams ve ark., 2010). Tümör gelişiminin inhibisyonunda tiyosemikarbazon-çinko bileşiklerinde önemli etkilere sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Tiyosemikarbazon türevi Schiff bazı olan 4-(1-fenil-1-metil siklobütil-3-il)-2-(2- hidroksibenziliden hidrazino) tiyazol ile çinko ve bakır komplekslerini oksidatif stres üzerine etkilerini ratlarda araştırmışlar ve çinko-ligand kompleksinin bir antioksidan gibi davrandığı, ligandın oksidatif stres oluşturmadığı, bakır-ligand kompleksinin oksidatif stres oluşturduğu rapor edilmiştir (Yılmaz ve ark., 2009).

Bu konudaki çalışmalar artarak devam etmekte ve güncelliğini korumaktadır.

2.2. Schiff Bazları

Schiff bazları, aldehit ve ketonların primer aminlerle verdiği kondensasyon ürünleridir. Bu reaksiyonlar sonucu oluşan karbon-azot çift bağına (-CH=N-) azometin veya imin bağı adı verilir. Karbonil bileşiği aldehit ise oluşan bağ azometin

veya aldimin, keton ise oluşan bağa imin veya ketimin adı verilir (Brown, 1995; Beyer, 1980; Atakol, 1986).

Schiff bazlarının oluşturduğu koordinasyon bileşikleri günümüzde kimyacılar tarafından çok yönlü araştırılmaktadır. Yüklü veya yüksüz grupların meydana getirdiği ligantlar merkez atomuna donör atomlarla bağlanarak koordinasyon bileşiklerini oluşturmakta ve Schiff bazı ligandları, yapılarında bulunan donör atomların sayısına bağlı olarak etkin bir şelat grubu oluşturmaktadırlar. Bu özellikler kompleks bileşikler vermelerini kolaylaştırmaktadır. Schiff bazıları hazırlanırken, ligant olarak azometin bağına komşu, ortopozisyonunda -OH, -SH, -NH₂ gibi grupların bulunmasına dikkat edilmektedir. Bu gruplar katyonla birlikte altılı halkalar oluşturdukları için dayanıklı kompleksler meydana getirmektedirler (Patai, 1970).

Günümüzde sıvı kristal teknolojisinin kullanım alanının yaygınlaşması, bu konuda yapılan çalışmaların artmasına sebep olmuştur. Sentezlenen Schiff bazlarının yapı aydınlatması ile ilgili çalışmalara 1940'lı yıllarda, asitlik sabitlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalara ise 1970'li yıllarda başlanmıştır.

1979 yılında yapılan bir çalışmada 2-aminopiridin, anilin, antranilik asit, o- aminofenol ve m- aminofenol'ün salisilaldehid ile oluşturdukları Schiff bazlarının protonasyon sabitleri %50 (v/v) alkol-su ortamında ve 30 °C de ölçülmüştür. Söz konusu Schiff bazlarının oluşum eğrilerinden yararlanılarak imin protonunun ve fenolik protonun basamaklı olarak dissosiyasyon oldukları belirtilmiştir (Bera, 1979).

1984 yılında yapılan bir çalışma ile çeşitli aminlerin salisilaldehid ve naftaldehid ile oluşturdukları Schiff bazlarının dissosiyasyon sabitleri değişik etanol-su ortamlarında potansiyometrik olarak tayin edilmiştir. Denge sabitlerinin hepsi, konsantrasyonun bir fonksiyonu olan stokiyometrik denge sabiti olarak hesaplanmış ve pK_a değerlerine süstitüentlerin ve ortamın etkisi incelenmiştir (Masoud ve ark., 1984).

Asitlik sabiti ile maddenin özellikleri, yapısı, tautomerik durumu, elde edilmesi ve oluşabilecek reaksiyonlar arasında ilişki bulunmaktadır. Asidik veya bazik özelliğe sahip bir molekülün stereokimyasal yapısının belirlenmesinde ve konformasyonel analizlerde asitlik sabitleri kullanılmaktadır. Ayrıca organik reaksiyonlarda elektrofilik ve nükleofilik atağın yönü, kuvveti, ara ürünlerinin kararlılığı ve gerekli aktivasyon enerjisinin büyüklüğü hakkında bilgiler elde edilebilmektedir (Brown ve ark. 1985; Chilton ve ark. 1962).

Bileşiklerin asitliği ve bazlığı üzerine asitlik sabitlerinin çözücü ve süstitüent etkisinin olup olmadığı hakkında önemli kuramsal temel sağlamaktadır. Biyokimyada, enzimlerin aktif merkezlerinin saptanmasında kullanılan maddelerin proton alma ve verme sabitliklerinin bilinmeside önem arz etmektedir (Frey ve ark., 1971). İlaç olarak kullanılan birçok maddenin zayıf asit veya baz özelliği göstermektedir. İlaç molekülünün zarlardan geçişi, dağılımı, taşınımı ve reseptörlere bağlanması olaylarında ise iyonlaşma sabitlerinin büyük etkisi bulunmaktadır.

Zayıf asit ve bazların sulu ortamda iyonize olma oranları, asitlik sabitleri ve ortamın pH' ı ile ilgilidir. Bu ilişki $pH = pK_a + \log C_T / C_A$ şeklinde ifade edilen Handerson– Hasselbach denklemi ile gösterilir (Öğretir ve ark., 1985; Öğretir, 1979).

Schiff bazları hidrojen bağı ve tautomerizim özellikleri açısından önemli bileşiklerdir. İmin grubuna orto pozisyonunda –OH grubuna sahip Schiff bazlarında tautomerizim, çözelti ve katı halde spektroskopi ve X–ray teknikleri kullanılarak araştırılmıştır (Hökelek ve ark. 2000; Salman ve ark. 1991). Bu tür Schiff bazlarında, O–H–N ve O–H–N molekül içi hidrojen bağlarının bulunması, enol–imin ve keto–amin formları arasındaki tautomerizim ile biyolojik olarak aktif özellik göstermelerine ayrıca biyolojik sistemlerde önemli rol oynamalarına sebep olmaktadır (Baumgrass ve ark., 2001; Quintana ve ark., 2000; Razakantoanina ve ark., 2000; Royer ve ark., 1995;).

Hidrojen bağının karakteri kullanılan aldehitin türüne, molekülün stereokimyasına ve azot atomuna bağlı fakat süstitue gruba bağlı değildir.

Rodopsin, bakteriyorodopsin ve halorodopsinde retinal molekül, lisinin NH₂ ucuna peptid vasıtasıyla bağlanırken ara ürün olarak Schiff bazını oluşturması örnek olarak verilebilir.

Schiff bazları biyolojik aktivitelerinden dolayı birçok kimyasal olayda önemli rol oynamaktadır (Walsh ve ark., 1987). Aynı zamanda Schiff bazları triptofan, transaminaz, transketolaz gibi birçok enzimde de gözlenmiştir (Wojciechowski ve ark., 2003). Biyolojik aktivitelerinden başka, fotokromik özelliği, görüntü sistemleri ve optikal bilgisayarlarda radyasyon yoğunluğunun ölçülmesi ve kontrolü (Elmalı ve ark., 2000), elektronik, optoelektronik ve fotonikler (Iwan ve ark., 2007) özelliklerinden dolayı birçok alanda uygulanması bu maddelere duyulan ilgiyi her geçen gün arttırmaktadır.

Schiff bazları ve metal komplekslerinin sentezi, yapılarının aydınlatılması ve kullanım alanları ile ilgili yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

2.2.1. Schiff bazlarının sentezi

Schiff bazlarının sentezinde en çok kullanılan karbonil bileşikleri, salisilaldehit, β diketonlar, fenoller, pridoksal, o-hidroksi naftaldehit, piridin-2-aldehit, diasetil piridin, 4-propanoil, prazolen, diformil fenol ve prüvik asitlerdir. Amin bileşikleri ise diaminler, alkil aminler, aminoasitlerdir.

Aldehitler çok kolay bir şekilde primer aminlerle reaksiyon verip, Schiff bazlarını oluştururken ketonlarda bu işlem o kadar kolay değildir ve birçok faktöre bağlıdır. Ketonlardan Schiff bazı elde etmek için; katalizör seçimi, uygun pH aralığı, reaksiyonlarda oluşacak su ile azeotrop karışım oluşturabilecek bir çözücünün seçilmesi ve uygun reaksiyon sıcaklığı gibi birçok faktörün göz önüne bulundurulması gerekmektedir.

Schiff bazları oluşum mekanizması iki temel basamaktan meydana gelmektedir. Birinci basamak, aldehitteki karbonil grubuna protonlanmamış amino

grubunun katılmasıyla bir tetra hedral karbonilamin ara ürünü oluşması, ikinci basamak ise azotun bir proton kaybetmesi ve oksijene bir proton bağlanması şeklindedir. İmin oluşum reaksiyonları, iki veya daha fazla sayıda organik bileşiklerin birleşmeleri sırasında suyun ya da başka küçük moleküllerin ayrılması ile sonuçlanan kondensasyon reaksiyonlarının örneklerinden biridir (Wade, 1999). Elektron çekici ve rezonansa uygun gruplar R gruplarına ne kadar ise imin bileşiği o kadar kararlıdır.

İmin oluşumu pH'a bağımlı bir tepkimedir. İlk basamak protonlanmış serbest aminin karbonil grubuna bağlanmasıdır. Çözelti çok asidik olursa, amin derişimi ihmal edilecek kadar azalır. Böyle olduğu durumlarda, normalde hızlı olan katılma basamağı yavaşlar ve tepkime dizisinde hız belirleyen basamak haline gelir. Tepkimedeki ikinci basamak, protonlanmış -OH grubunun su olarak ayrılmasıdır. Amin katılmasının aksine, asit derişiminin artması ikinci basamağın hızını arttırır.

Asitliğin yüksek olması, ikinci basamağın daha hızlı fakat birinci basamağın daha yavaş yürütmesine neden olur. Buna karşılık asitliğin azalmasıyla birinci basamak daha hızlı, ikinci basamak daha yavaş yürür. En uygun pH 3-4 civarındır. Uygun pH'ta aminin bir kısmı protonlanmıştır, ancak nükleofilik katılma tepkimesini başlatabilmek için yeterli miktarda serbest amin de bulunmaktadır. Bu pH'ta yeterli hızda ayrılmanın gerçekleşebilmesi için gerekli asit vardır.

Sekonder aminlerle aldehitler arasında gerçekleşen reaksiyon sonucunda da imin elde edilebilmektedir. İminler primer aminlerle oluşan Schiff bazlarından daha az kararlıdır. Bunlar dördüncül (kuaternar) azot atomu içerdiğinden immonyum tuzları olarak da isimlendirilirler.

2.2.2.Schiff bazlarının reaksiyonları

Küçük molekülü aldehitlerin Schiff bazları doymamış karakterli olduklarından polimerizasyona uğrar ve siklik trimer bileşiklerini meydana getirirler. Schiff bazları yani azometin bileşikleri kararlı iminlerdir. Bunlar $LiAlH_4$ ile etanol ortamında

katalitik hidrojenlenme sonucu indirgendiklerinde sekonder aminler meydana getirirler.

Schiff bazları alkalilere karşı kararlı oldukları halde, asitlerin etkisi ile hemen hidroliz olurlar. Aromatik aminler ile aldehitlerden oluşan Schiff bazları alifatik bileşiklerden oluşan ürünlerden daha kararlı ve hidrolize karşı dirençlidirler. Keto-amin halindeki *o*- ve *p*- süstitüe ketiminlerin hidroliz hızının yavaş olması, keto halinin hidrolize dayanıklı olmasından kaynaklanmaktadır. Orto ve para metoksi süstitüentli diaril ketiminlerde oldukça yavaş hidrolizlenir. Bu bileşiklerin tautomerleşmesi mümkün değildir. Rezonans yapabildikleri için hidrolize karşı dayanıklıdır.

R, R' ve R'' ne kadar elektron çekici ve rezonansa iştirak edebilen gruplar ise azometin bileşiği o kadar kararlıdır. Kondensasyon reaksiyonlarının mekanizması katılma ayrılma reaksiyonu üzerinden yürüdüğünden azometin bileşiklerinin meydana gelmesi ortamın pH'sı ile yakından ilgilidir.

Schiff bazları hidrolize yatkın olmaları sebebiyle, sentezleri sırasında susuz ortamda çalışılmalıdır. Reaksiyonda meydana gelen su ise azeotrop bir karışım oluşturabileceği bir çözücü ile uzaklaştırılmalıdır.

Mekanizmalardan da anlaşıldığı gibi reaksiyonlarda H⁺ önemli bir rol oynamaktadır. Ancak aşırısından da çekinmek gerektiği son reaksiyonda görülmektedir (Katalizör ve İnhibitör). Ayrıca asitler ve bazlar amfiprotik ortamlarda azometin bağlarını hidroliz ederek tekrar amin ve karbonil bileşenlerine dönüşmesini de sağlarlar. Bunun için asidin veya bazın derişiminin yüksek olması gerekir ve reaksiyonun kinetiği oluşum reaksiyonuna göre daha yavaştır.

2.2.3. Koordinasyon kimyasında Schiff bazlarının önemi

Koordinasyon bileşiklerini inceleyen bilim dalına koordinasyon kimyası denir. Bir metal katyonunun inorganik, organik iyon veya moleküllerle verdiği katılma

ürünlerine koordinasyon bileşikler denir. Aynı zamanda bu tür bileşikler kompleks veya metal kompleks şeklinde adlandırılır. Koordinasyon bileşiklerindeki katyona merkez atomu adı verilir. Koordinasyon bileşiklerinde katyon veya merkez atomuna bağlı olan yüklü ve yüksüz gruplara ise ligand denir. Yüklü ligandlara CN^- , Cl^- , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ gibi iyonlar, yüksüz ligandlara da H_2O , NH_3 , $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ gibi moleküller örnek verilebilir (Gündüz, 1998).

Organik ve inorganik bileşiklerin kaynaşması ile meydana gelen koordinasyon bileşikler, bu iki bilim dalı arasındaki sınırı ortadan kaldırmıştır. Bir metal iyonun, elektron verici özelliği olan ligant ile bağ yapmasıyla oluşan maddelerin konfigürasyonları, yapılarının aydınlatılması, koordinasyon kimyasının araştırma sahasına girer. Koordinasyon bileşikler, sayılarının fazlalığı, yapıları, renkleri, magnetik özellikleri ve kimyasal tepkimeleri nedeniyle anorganik kimyada çok önemlidir (Sarıkahya ve ark., 1987).

Schiff bazları azometin grubunu ($\text{RC}=\text{N}-$) içeren bileşiklerdir ve genellikle birincil aminin aktif bir karbonil bileşiği ile kondensasyonu sonucu oluşurlar (Sönmez ve ark., 2003). Koordinasyon kimyasında çoğunlukla ligant olarak kullanılan Schiff bazlarının O ve N atomları arasındaki intramoleküler hidrojen bağları, metal komplekslerinin oluşmasında önemlidir (Eleman ve ark., 2002).

Ayrıca çok sayıdaki Schiff bazları ve bunların kompleksleri sahip oldukları önemli özelliklerinden dolayı incelenmiştir. Bu özellikler arasında oksijeni ters yönde bağlama yetenekleri, olefinlerin hidrojenlenmelerindeki katalitik aktivitesi, hidroksilden (O) imin (N) atomlarına proton transferi ile katı halde fotokromizm ve termokromizm özelliği göstermesi, bazı toksik metallere karşı kompleksleşme yetenekleri sayılabilir. Ayrıca Schiff bazlarından elde edilen komplekslerin biyolojik aktivitelere katılma yetenekleri biyolojik model uygulamaları açısından umut vericidir (Khalil ve ark., 2005; Soliman ve ark., 2004;; Soliman, 2001).

Schiff bazlarının sterik ve elektronik özelliklerinin çok yönlülüğü, bu bileşiklerin metal kompleks oluşumlarında uygun birer ligant olarak

davranabilmelerini sağlamaktadır. Bu sistemlerin stereokimyasal özellikleri ve kimyasal stereo seçiciliği bir ya da daha fazla kiral merkezin koordinasyon küresine çok yakın bir şekilde dahil edilmesi ile daha da geliştirilebilir. Elde edilen sonuçlar koordinasyon geometrisinin önerilmesinde ve şelat halkalarının konformasyonel kiralitesi için kullanılabilir. Bu bahsedilen faktörler asimetrik katalizlenmelerde ve metalloprotein modellerinde önemli olmaktadır (Szlyk ve ark.,2005).

Schiff bazlarının uygulamadaki rahatlığı, pratik olarak uygunluğu ve polimer bağ enerjilerine göre ağır metallerle kompleks yapabilme özellikleri şelat etkisi gözlenen, çözünmeyen fonksiyonellendirilmiş polimerlerin sentezi ve kullanımına imkan sağlamaktadır. Günümüzde bu konuda hazırlanmış çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Şelat reçineleri üzerine çok sayıda çalışma olmasına rağmen, bunların multidentat türevleri üzerine çok az çalışma bildirilmiştir. Şelat halkalarının sayısının artması metal komplekslerinin kararlılığını arttırmaktadır. Bu sebeple multidentat ligandların polimer matrisine immobilize edilmesi ilgi görmektedir.

Hidrazid'ler ve Hidrazon'ların birkaç tane koordinasyon bölümlerine sahip olmaları ilginç ligant özellikleri bulunmaktadır. Şelat geçiş metallerine karşı sahip oldukları kuvvetli eğilim, kimyasal ve farmakolojik özellikleri; antineoplastik, antiviral, antienflamatuar ve antitümör ajanları olarak potansiyel uygulamaları yüzünden büyük ilgi çekmiş ve geniş çapta araştırma yapılmıştır (Singh ve Kumar, 2006). Yüksek bağlanma kapasitesine sahip olmaları nedeni ile arilhidrazon'lar potansiyel ligandlardır.

Ayrıca hem keto hemde enol tautomerik formda metalleri koordine edebilme yetenekleri arilhidrazonları ligand olarak çekici hale getirmektedir. 1,10-fenantrolin (phen), koordinasyon kimyasında karışık ligand kompleksleri hazırlamak için klasik N,N'-bidendat ligand olarak büyük oranda kullanılmaktadır. Birçok ligandın ortamdaki varlığı bağlanmada ayrıca spektral özelliklerde ve koordinasyon bileşiklerinin geometrisinde değişiklikler neden olmaktadır (Gup ve ark., 2006). Arilhidrazonlar güçlü farmakolojik özelliklere sahiptirler. Bu bileşiklerin geçiş

metalleri ile katalizlenen birçok enzimatik reaksiyonu engelledikleri bildirilmiştir. Örneğin salisilaldehit benzoilhidrazonların bakır(II) kompleksinin DNA sentezinde ve hücre büyümesinde etkili bir inhibitör olduğu tespit edilmiştir. Şelat oluşturabilen ligandları içeren dinükleer metal komplekslerin koordinasyon kimyası üzerine birçok çalışma bulunmaktadır.

Dinucleating ligandlar terimi 1970 yılında ilk olarak Rabson tarafından polidentat şelat oluşturabilen ligandlar sınıfını tanımlamak için kullanılmıştır. Bu ligandlar eş zamanlı olarak iki metal iyonuna birden bağlanabilmektedir. O tarihten beri, bu çeşit ligandlardan çok sayıda tasarlanmıştır ve bunların koordinasyon bileşikleri araştırılmıştır. Birçok farklı çeşit dinucleating ligand arasından en çok fenol-tabanlı compartmental ligandlar bilim insanlarının ilgisini çekmektedir. “Compartmental” terimi iki komşu fakat benzer olmayan koordinasyon bölümleri içeren bir ligandı belirtmek için kullanılmıştır. Bu çeşit ligandlara duyulan ilginin temel nedeni bunların dimetalik biyolojik kısımlarının asimetrik doğalarının fark edilmesinden kaynaklanmaktadır. Herbir metal iyonunun, metaloenzimlerin dinükleer bölümlerinde farklı fonksiyon gösterebilme yetenekleri, büyük miktarlarda asimetrik ligandların dizayn edilmesine yol açmıştır (Krishnapriya ve ark., 2005).

2.3. Kanser

Çevresel veya genetik faktörlerin etkisiyle normal hücrelerde nükleer ya da sitoplazmik onkogenlerin aktifleşmesi, transkripsiyonu düzenleyen sinyal moleküllerin etkilenmesi, tümör supressör genlerinin aktivitesinin baskılanması sonucu hücrelerin kontrol dışı çoğalmasıyla oluşan kitlesel artışa kanser denir (Sadıqov, 2001).

Kanserler, hematolojik ve solid doku kanserleri olmak üzere iki grup altında incelenirler. Hematolojik kanserlerde kendi içerisinde lösemi ve malign lenfomalar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Şencan, 2006).

2.3.1. Lösemi

Lösemi kemik iliği ve kan kanseri olarak adlandırılmaktadır. 19. yy'da Avrupalı hekimler, beyaz kan hücrelerinin önemli oranda arttığı hastaları gözlemlediklerinde bu hastalığı 'beyaz kan' olarak adlandırmışlardır. Daha sonraki çalışmalarda da anlamı 'beyaz' olan Yunanca'da 'Leukos' kelimesini, 'kan' anlamına gelen 'haima' kelimesiyle birleştirerek 'leukemia (lösemi)' olarak isimlendirildi

Hücre tipine göre lösemiler 'myeloid' ve 'lenfositik' olarak ikiye ayrılır. Miyeloid ve lenfositik lösemilerin her biri 'akut' veya 'kronik' olarak adlandırılmaktadır.

Bu özelliklerine göre lösemiler dört gruba ayrılmaktadır:

1. Akut Lenfositik (Lenfoblastik) Lösemi (ALL)
2. Akut Miyeloid Lösemi (AML)
3. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)
4. Kronik Miyeloid Lösemi (KML) (Reyhani, 2011).

AML ve ALL' de hücreler normal fonksiyon gösterememektedir. Ayrıca kemik iliğinde normal hücrelere yer bırakmamakta ve bu yüzden kemik iliğinde yeni oluşan normal hücrelerin sayısında azalma görülmektedir. Bu durum kırmızı kan hücrelerinin azalmasıyla sonuçlanmaktadır.

KML' de hücreler normal hücreye benzer fonksiyon gösteren kan hücreleri (eritrositler, lökositler ve kan pulcukları) yapmaktadır. Alyuvarların sayısı genellikle normalin altındadır ve anemiye neden olmaktadır. Fakat birçok akyuvar ve bazen de kan pulcuğu üretimi devam etmektedir. Akyuvarların çalışmaları normale yakın olsa da sayıları yüksektir ve artmaya devam etmektedir. Hasta tedavi edilmezse bu durum ciddi problemlere neden olabilmektedir. Eğer tedavi yapılmazsa, beyaz hücre sayısı kan akışını yavaşlatacak kadar yükselebilir ve şiddetli anemi gelişebilir. KLL' de

lösemi hücresi fonksiyon göstermeyen çok sayıda lenfosit oluşturur. Bu hücreler kemik iliği ve lenf nodlarındaki normal hücrelerin yerini alır. Lenfositlerin normal çalışmasına müdahale etmekte ve bu sebeple hastanın immün cevabı zayıflamaktadır. Ayrıca kemik iliğinde oluşan çok sayıda lösemi hücresi beyaz küre (nötrofil) ve trombosit sayılarının düşmesine de neden olmaktadır.

Erişkinlerde en sık görülen lösemi tipler AML ve KLL'dir. ALL lösemisinin çocuklarda en yaygın görülen şeklidir (Reyhani, 2011).

Sitogenetik çalışmalarda lösemilerin yaklaşık yarısında sık tekrarlayan translokasyonlar, inversiyonlar ve delesyonlar şeklinde kromozom anormalliklerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Etkilenen bölgelerde bulunan genler incelendiğinde hematopoetik sistemin gelişimi ve normal işlevi sırasında olduğu belirtilmektedir.

Lösemilerin moleküler biyolojisi hakkında bugüne kadar yapılmış olan çalışmalar sonucunda şu genel bilgiler ulaşılmıştır.

- ✓ Somatik dokularda kromozom anomalisi sonucu gen ifadesi kontrol mekanizmalarının bozulması ya da kesilmesiyle özel bir hematopoetik farklılaşma hattının gelişimi lösemiyle sonuçlanabilmektedir.
- ✓ Gen düzenlenmesinin kesilmesi ya da bozulmasıyla oluşan lösemi hücrelerinde farklı kromozomlardaki genlerin birleşmesiyle kimerik gen bölgelerinin olduğu tespit edilmiştir. Bu gen bölgelerinin malign dönüşümüne etken olabileceği tespit edilmiştir.
- ✓ Hücrede normal transkripsiyonu kontrol eden bir genin başka bir genin kontrolüne girmesiyle oluşan anormal gen aktivasyonları oluşmaktadır.

Bunun sonucunda lenfositte kromozomal translokasyonlar meydana gelir ve gen ifadesinin kontrolü bozulur. Ayrıca nokta mutasyonları, gen delesyonları ve epigenetik değişiklikler de lösemilerin başlaması ya da ilerlemesinde etkili olduğu görülmektedir.

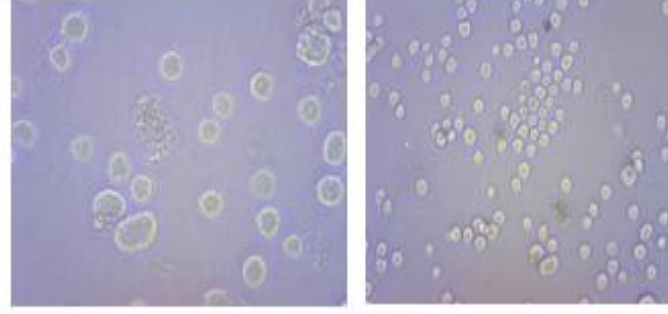
- ✓ Lösemiler monoklonal çoğalırlar. Translokasyonların bir kısmı, hematopoetik farklılaşmada rol oynayan transkripsiyon faktörlerini etkiler.
- ✓ Bazı lösemiler, lösemiye farklılaşmış “lösemi kök hücrelerinden gelişmektedir.

2.3.2. Kronik miyeloid lösemi

Kronik miyeloid lösemi miyeloid, eritroid ve megakaryositik hücrelerinin çoğalmasıyla oluşan klonal bir hastalıktır. Kemik iliğinde aşırı çoğalma, periferel kanda olgun miyeloid hücrelerden oluşan yüksek lökosit sayısı ile karakterize edilmektedir. Kronik miyeloid lösemi hücreleri farklılaşma yeteneklerini kaybetmemişlerdir akut lösemide ise görülen patolojik durumun aksine farklılaşma yeteneklerini kaybetmişlerdir.

2.4. K562 Hücre Serisi

K562 hücreleri kronik miyeloid lösemisinin blastik kriz evresinden kaynaklanan miyeloid seri hücre dizileridir (Lozzio ve ark., 1975). Elektron mikroskopunda bakıldığında K562 hücreleri kolay bağıntılı, düzgün şekilli, kısa mikrovillüslü, farklılaşmış lösemik hücrelerine benzer şekilde görülebilir. Giemsa ile hazırlanmış preparatlarda K562 hücreleri yaklaşık 20 µm çapında iki ya da daha fazla parçalı nükleuslu farklılaşmamış blast hücreleri olarak tanımlanabilir. Bazofilik sitoplazmaları hiç granül içermez (Klein ve ark., 1976; Koeffler ve ark., 1980). Kültür mediumunda süspansiyon olarak büyüyen K562 hücrelerinin iki kat artma süreleri ortalama 12 saattir (Lowry ve ark., 1951; Singhal ve ark., 1999). K562 hücrelerinde, normal kromozom sayısının yaklaşık 1,5 katı kromozom bulunur. Bundan dolayı bu hücre serisinde abl/bcr füzyon geni ekspresyonu nedeniyle apoptozise karşı dirençlidir.



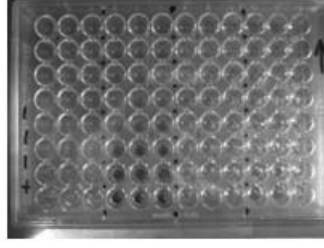
Şekil 2.1.K562 Hücre soyunun mikroskobik görüntüsü
(Harran Üniversitesi, Kanser ve Kök Hücre Araştırma Laboratuvarı)

Normal hücrelerin uzun süre kültürde tutulması oldukça zordur. Bu nedenle hücre kültüründe kolayca çoğaltılabilen K562 hücrelerinin sitotoksikite ve apoptosiz için kullanımı yaygındır. Kültürde spontan olarak apoptosize gitmeyen K562 hücrelerinde farklı maddelerle apoptosizi indüklemek başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlar (Şencan, 2006). K562 hücreleri gen ekspresyonu, hematopoetik düzenlemenin anlaşılması için yapılan çalışmalarda oldukça kullanışlıdır (Koeffler ve ark., 1980).

Kanser ilaçlarının çoğu etkilerini kanser hücrelerinin proliferasyon ve bölünme hızlarını etkileyerek gösterirler. Bazı kemoterapötik ajanlar bazı spesifik hücrelerde olumlu sonuç verirken diğer kanser hücrelerinde etkileri sınırlı olmaktadır (Oktar, 2009). Bu nedenle farklı sitotoksik maddelerin, farklı hücrelerdeki etkilerinin tam olarak aydınlatılması oldukça önem arz etmektedir.

2.5. Sitotoksikite

Geçmişten bugüne hücre kültürü çalışmalarında hücre canlılığını ve çoğalmasını belirlemek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en kullanışlı olanlar, 96 kuyucuklu plakaların kullanıldığı modern deneylerdir.



Şekil 2.2. 96 kuyucuklu plaka görüntüsü

Böylece birçok örnek aynı anda ve hızlı analiz edilebilmektedir. Sitotoksosite deneyleri değişik parametreleri kullanarak hücre ölümünü ve çoğalmasını belirler (Weyermann ve ark., 2005).

Sitotoksik etki, hücre yapısı ya da fonksiyonunda hasar oluşturan kimyasal bileşiğin sıklıkla bölünmekte olan hücreleri selektif olarak ortadan kaldırmak için kullanılan antineoplastik ilaçları tanımlamak için kullanılmaktadır.

Sitotoksosite kimyasalların hücreler ve dokular üzerindeki aktivasyon mekanizmasının anlaşılmasında önemli bir faktördür. Sitotoksitenin karsinogenesis ve inflasyonun da içinde bulunduğu patolojik proseslerde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Sitotoksosite serbest radikaller, irritantlar ve genotoksinlerinde içinde bulunduğu diğer ajanların aktivitelerinde etkilidir.

Sitotoksik deneylerle balık hücre hatlarını kullanarak farklı ağır metallerin ve organik fosin bileşiklerin de içinde bulunduğu birçok çevresel kimyasalın sitotoksik etkisi de belirlenebilir (Fent, 2001). *In vitro* sitotoksosite testleri hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, membran bütünlüğü, DNA sentezi ya da hücre metabolizma gibi çeşitli parametrelerin ölçülmesiyle temel hücre toksisitesinde belirlemektedir. Bu parametreleri ölçen çeşitli sitotoksosite deneyleri vardır. En çok kullanılan yöntemler neqtral red uptake deneyi (hücre canlılığı için), Lowry Coomassie Blue ve Kenacid blue deneyleri (toplam hücre proteini ve hücre proliferasyonunu belirlemek için), MTT (mitokondriyal aktivite ve hücre metabolizmayı belirlemek için) ve intraselüler laktat dehidrogenaz (LDH) aktivite testidir (Gad, 2000).

Kimyasalların sitotoksitesitesi hücre ölümünün, canlılığının, hücre yapısının, morfolojisinin, enerji metabolizmasının ve hücre çoğalmasının ölçülmesi gibi çeşitli farklı noktalarla belirlenebilir. Bir bileşiğin sitotoksik etkisi test edilirken hücrelerin genel mekanizması ve hücre tiplerine özgü mekanizmalar göz önünde tutulmalıdır (Putnam ve ark., 2002). Hücre canlılığının belirlenmesi mutagenesiz, malignan transformasyon, apoptosis, hücre patoloji ve farmosötik toksisiteyi değerlendirmede oldukça önemlidir. (Komissarova ve ark., 2005).

Sitotoksitenin *in vitro* testler ile belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu sayede toksisite testleri için kullanılan hayvan sayısını en aza indirilmektedir. *İn vitro* testlerin bir diğer avantajı hücre ya da organın toksik etkiye karşı mekanizmasının belirlenebilmesidir. Yeni ürünlerin toksisitesinin *in vitro* yöntemlerle üretiminin erken evrelerinde belirlenebilmesi, harcanan para, zaman ve deney hayvanı sayısından kazanç sağlamaktadır.

Çalışmamızla paralellik gösteren çalışmalar aşağıda bulunmaktadır.

Metal komplekslerinin çeşitli biyolojik proseslerde önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Son yıllarda ise DNA'nın bazı metal komplekslerinden etkilendiğinin farkına varılmıştır. (Matsubara ve ark., 2002).

Demir iyonu pek çok enzim ve proteinlerde bulunması nedeniyle hücrelerde de mevcuttur. Geçiş elementi olan demirin iyonik halleri enzimlerde katalitik redoks reaksiyonları verir. Aşırı demir yüklemesi sonucu DNA zarar görmekte ve böbrek, karaciğer kanserlerine neden olabilmektedir (Zhao ve ark., 2002).

Schilf ve çalışma arkadaşları (2004) tris(2-aminoetil) amin ile farklı aldehitlerden yedi adet Schiff bazı elde etmişler ve bileşiklerdeki H bağı oluşumu ve tautomerik dengeyi katı ve çözelti fazında incelemişlerdir. Düşük sıcaklıklarda genellikle -NH- formunun daha baskın olduğunu belirtmişlerdir.

Shrivastava ve çalışma arkadaşları (2004) bir $[\text{Cr}(\text{salen})(\text{OH}_2)_2] +$ kompleksi olan transdiaqua $[\text{N},\text{N}'\text{etilenbis}(\text{salisilidenimin})\text{krom(III)perklorat}]$ 'ın *Sigella* dizanterisinin (maymunlarda ve insanlarda dizanteriye sebep olan *Sigella* türlerinden olan) gelişmesine karşı inhibitör etkisini incelemişlerdir.

Mandal ve çalışma arkadaşları (2004) yeni bir o-hidroksi Schiff bazı olan 2-(Nbenzil- α iminoetil) naftol'u sentezlemişler ve proton transfer tepkimesini absorpsiyon spektroskopisi ve kararlı hal floresans spektroskopisi ile farklı çözücülerde, oda sıcaklığında ve düşük sıcaklıkta (77 K) incelemişlerdir.

Vanco ve çalışma arkadaşları (2004) bazı aminoasit Schiff bazlarını ve tiyoüre ile pürivik asitten türeyen Cu(II) komplekslerini elde etmişlerdir. Bileşiklerin antiradikal aktivitelerini in-vitro ve in-vivo yöntemleriyle incelemişlerdir.

Zhao ve çalışma arkadaşları (2004) bir tür bitkisel polifenol olan verbascoside'ler yardımı ile DNA'nın Fenton tepkimesinden korunmasını araştırmışlardır. Fenton tepkimesi hidrojen peroksit'in demir ve bakır gibi geçiş elementleri varlığında indirgenmesi olup, DNA hasarları sonucu kanser ve yaşlanmaya sebep olan oksidanların oluşmasına neden olur.

Gnanasoundari ve Natarajan (2004) ligant olarak kullandıkları salisilaldehit ve naftaldehit'in çeşitli anilinlerle oluşturduğu Schiff bazları ile Ph_3P içeren metal komplekslerini sentezlemişlerdir. Metal iyonu olarak Fe(III), Co(II), Ni(II) ve Cu(II) kullanmışlardır. Elde ettikleri komplekslerin aromatik yerdeğiştirme tepkimelerinde katalizör olarak kullanımını araştırmışlar ve Ni(II) kompleksinin en yüksek katalitik aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Winter ve çalışma arkadaşları (2004) 2,6-bis(hidroksimetil)piridin'in farklı Co(II) ve Ni(II) tuzları ile ML_2 yapısındaki kompleksini sentezlemişlerdir. Co ve Ni tuzları olarak Cl^- , SCN^- , NO_3^- , SO_4^{2-} kullanmışlardır. Komplekslerin yapılarını X-ışınları ile aydınlatmışlardır. Cl^- komplekslerinde hidrasyon suyu bulmuşlar,

SCN-'nin ligant olarak bağlandığını belirlemişler ve tüm komplekslerin altı koordinasyonlu olduğunu bildirmişlerdir.

Popova ve çalışma arkadaşları (2005) ferrosen karbaldehit ile valin ve losin aminoasitlerin etilesterlerini kullanarak Schiff bazları elde etmişlerdir. Bileşikleri asetik asit ile etkileştirerek N-süstitüe aminoasitler'e dönüştürmüşler ve yapılarını endüstrümental metotlarla belirlemişlerdir.

Kuz'min ve çalışma arkadaşları (2005) moleküler yapı ile antikanser aktivitesi arasındaki ilişkiyi araştırmak üzere makrosiklik piridinofan Schiff bazlarının 4DQSAR ile moleküler yapılarını incelemişlerdir. Bazı molekül bölümlerinin antikanser etkisini arttırırken bazı bölümlerin ise azalttığını belirlemişler ve sonucun yeni antikanser ilaçlarının sentezinde kullanışlı olacağını söylemişlerdir.

Guo ve çalışma arkadaşları (2005) çitosan ve karboksimetil çitosan'ın 2-hidroksi- 5-klorbenzaldehit ve 2-hidroksi-5-nitrobenzaldehit ile Schiff bazlarını elde etmişlerdir. Sentezledikleri çitosan ve karboksimetil çitosan Schiff bazlarının aktiviteleri arasında belirgin farklılıklar olduğunu gözlemlemişlerdir.

Koikawa ve çalışma arkadaşları (2005) o-hidroksimetilanilin ile salisilaldehitten oluşturdukları Schiff bazı H_2L_1 ve bileşiğin imin grubunu indirgeyerek oluşturdukları H_2L_2 üç dişli ligantlarının komplekslerini hazırlayarak yapılarını X ışınları ve manyetik ölçümlerle aydınlatmışlardır. H_2L_1 ligantı ile dört çekirdekli Ni_4 11 kompleksini, H_2L_2 ligantı ile ise dört çekirdekli dimerin dimeri olarak tanımladıkları $Ni_2 Mn_2$ komplekslerini sentezlemişlerdir.

Mohamed ve arkadaşları (2006) tarafından 2,6-piridindikarboksialdehitbis(p-hidroksifenilimin) ve 2,6-piridindikarboksialdehitbis(o-hidroksifenilimin)'den türeyen bazı Schiff bazı ligantları ve metal kompleksleri [Fe(III), Co(II), Ni(II), Zn(II)] sentezlenmiş, yapıları ve bakteri türleri karşısındaki antibakteriyel aktiviteleri incelenmişlerdir.

Zhong ve çalışma arkadaşları (2006) 2,3-bütandion ve tiyosemikarbazit'ten hazırladıkları bis Schiff bazı ligantının Cu(II), Mn(III), Co(II), Ni(II) ve Zn(II) komplekslerini sentezleyerek yapılarını aydınlatmışlar ve antitümör etkilerini araştırmışlardır. Ayrıca Cu(II) kompleksinin en yüksek aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Sarı ve çalışma arkadaşları (2006) 5-kloro ve 5-bromo salisilaldehit'in DL-glisin ve DL-alanin aminoasitleri ile Schiff bazlarını hazırlayarak Cu(II) ve Ni(II) komplekslerini sentezlemişler ve bileşiklerin potansiyometrik kararlılık sabitleri ile antimikrobiyal aktiviteleri arasındaki ilişkileri incelemişlerdir (Sarı ve ark., 2006). Gloria, ve çalışma arkadaşları amin olarak o-, m-, p- toluidin ve 4- hidroksianilin, aldehit olarak ise 2-piridinkarboksaldehit'i kullanarak Schiff bazları hazırlamışlar ve Pd(II) ile Pt(II) komplekslerini elde etmişlerdir. Komplekslerin yapılarını spektroskopik yöntemlerle aydınlatmışlardır. Sentezledikleri komplekslerin DNA ile etkileşmelerini dairesel dikroizm ve elektroforetik hareketlilik ile incelemişler ve süstitüent etkisi konusunda da çalışmalar yapılmıştır.

Sun ve çalışma arkadaşları (2006) taç eterler ve salisilaldehit türevleri içeren Schiff bazlarının Co komplekslerinin, dioksijen ilgileri ile katalitik oksidasyon aktivitelerini piridin ortamında ve farklı sıcaklıklarda incelemişlerdir. Komplekslerin denge sabitleri ile termodinamik parametrelerini hesaplamışlardır. Schiff bazlarındaki taç eter halkasının dioksijen ilgisini ve katalitik etkiyi arttırdığını gözlemlemişlerdir.

Kannaphan ve çalışma arkadaşları (2006) 1,5,8,12-tetraazododekan ile salisilaldehit ve 3-metoksisalisilaldehit'in oluşturduğu 6 dişli N_4O_2 ligantlarının Fe(III) komplekslerini elde etmişlerdir. Karşıt iyon olarak ClO_4 ve BF_4 kullanmışlardır. Komplekslerin yapılarını ise X-ışınları, EPR, dönüşümlü voltametri ve spektroskopik yöntemlerle belirlemişlerdir.

Mei Wang ve çalışma arkadaşları (2006) demiroksijenaz'a model bileşik olarak iki tane tek çekirdekli ve bir tane iki çekirdekli Fe kompleksi sentezlemişlerdir.

Kristal çalışmalarında tek çekirdekli Fe kompleksinin beş dişli ligant ve bir klorür iyonu ile sekizyüzlü yapıda olduğunu belirlemişlerdir.

Wang ve arkadaşları (2006) tarafından bissalisilaldimin ligantları ile transbis(trifenilfosfin)fenilnikel(II)klorür kullanarak çift çekirdekli kare düzlem nikel kompleksleri sentezlemişlerdir. Elde ettikleri komplekslerin etilen polimerleşmesinde katalizör olarak davranışlarını incelemişlerdir.

Atakol ve çalışma arkadaşları (2006) dört dişli N,N'-bis(salisiliden)-1,3-propandiaminato ligantını ve Mn(II), Co(II) ve Ni(II) komplekslerini DMF ve nitrit anyonu varlığında elde etmişlerdir. Ni-Co-Ni üç çekirdekli komplekslerin yapılarını X-ışınları ile aydınlatmışlar ve manyetik özelliklerini incelemişlerdir.

Sirbu ve çalışma arkadaşları (2006) N ve P donör atomları içeren dört ligant sentezlemiş ve Pd ve Ni komplekslerini elde etmişlerdir. Ligantlardan biri ile Pd kompleksinin yapısını X-ışınları ile aydınlatmışlar ve komplekslerin etilen ve stirenin kopolimerizasyonuna karşı katalitik aktivitesini incelemişlerdir.

2.6.1. Tripan mavisi ile boyama

Tripan mavisi yöntemi ile canlı hücre yüzdesi belirlenmektedir. Hücreler canlılıklarını kaybetmemiş iseler membran bütünlükleri ve permeabiliteleri bozulmadığı için boyayı hücre içine almamaktadırlar. Membran bütünlüğü bozulmuş ise boyayı hücre içine almaktadırlar. Bu özelliklerine dayanarak boyanmış ve boyanmamış hücre oranı ile hücre canlılığı % olarak hesaplanabilmektedir (Şencan, 2006).

2.6.2. Mitokondriyal aktiviteye dayalı MTT testi

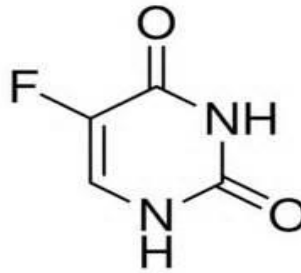
Kültürdeki yaşayan hücre sayısını belirlemek için direkt ve indirek olmak üzere iki yöntem vardır. Direkt yöntemde tüm hücreler sayılırken indirek yöntem ise yaşayan hücrelerin kültür parametrelerindeki değişikliklerine dayanır

(Genç ve ark., 2002). MTT deneyi, sık sık hücre poliferasyonunu ölçen indirek indikatör olarak kullanılmasına rağmen aslında MTT mitokondriyal aktivasyonu ölçen bir indikatördür (Wu ve ark., 1999).

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) kullanılan sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olup sağlam mitokondrilerde süksinatdehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlandığında suda çözünmeyen mavi mor formazan tuzları oluşturur (Shi ve ark., 2006; Langdon, 2004; Korkmaz, 2002). Oluşan formazan kristalleri DMSO, izopropanol ya da formazan ürünlerinin çözülebildiği ve rapor edilen diğer uygun çözücülerde çözüldükten sonra çözünen boyanın konsantrasyonu spektrofotometrik olarak ölçülebilir (Barile, 1994; Subhashini, 2005). Oluşan formazan tuzlarının miktarı direk olarak hücre sayısının oranını gösterir (Holst ve ark., 2005). Bu teknik düşük maliyetli, hızlı, hassas, güvenilir ve çok sayıda örnekle çalışma imkânı sağladığından tercih edilmektedir (Collier ve ark., 2003; Yano ve ark., 2005).

2.6.3. Çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullandığımız 5 Florourasil

5-Florourasil (5-FU), yapısının C-5 pozisyonunda hidrojen yerine bir florin atomu içeren, bir urasil analogudur. İlk kez, Duchinsky ve Heidelberger tarafından sentezlenmiştir.



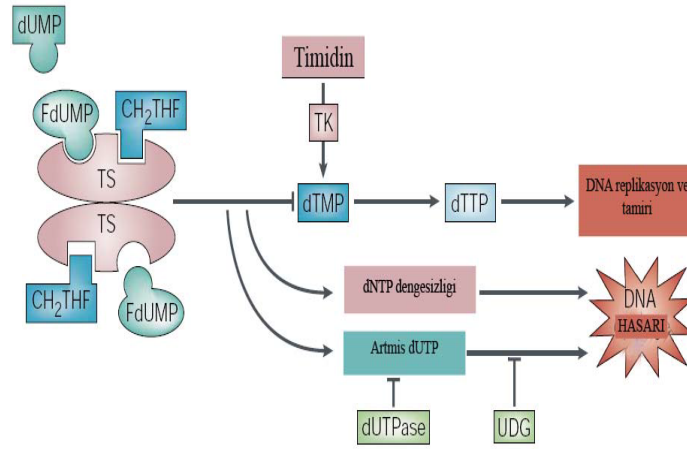
Şekil 2.3. 5 Florourasil'in yapısı

5- FU, urasilin hücre içine transport yollarını kullanarak, rahatça hücre içine girer. Hücre içinde aktif metabolitlerine dönüştürülür. Bunlar: florodeoksiuridin monofosfat (FdUMP), florodeoksiuridin trifosfat (FdUTP) ve florouridin trifosfattır

(FUTP). Bu aktif metabolitler, timidilat sentaz (TS) aktivitesini ve RNA sentezini bozarlar. 5-FU, hücre içinde dihidroprimidin dehidrogenaz (DPD) tarafından dihidroflorourasil'e (DHFU) dönüştürülerek inaktive etmektedir bu işlemde özellikle karaciğerde meydana gelmektedir.

Kemoterapide, özellikle kolorektal kanserlerin tedavisinde kullanılan 5-FU'nun hem DNA hem de RNA sentezine etkisi olduğu bilinmektedir. Bu etkilerini hem timidilat sentaz enzimini inhibe ederek, hem de DNA ve RNA yapısıyla birleşip fonksiyonlarını bozarak yerine getirirler. Timidilat sentaz, metil vericisi olarak 5,10 methylenetetrahydrofolate (CH_2THF) kullanarak dUMP'nin dTMP'ye metilasyonunu katalizleyen bir enzimdir. 5-FU'nun metaboliti olan FdUMP, bu enzim üzerindeki nükleotid bağlayıcı kısma stabil bir şekilde bağlanarak, normal substratı olan dUMP'nin enzime bağlanması engeller. Bu, dTMP sentezinin engellenmesine neden olur. dTMP sentezinin engellenmesi, ileri aşamada dTTP sentezinin engellenmesine neden olur.

Bu, diğer deoksिनükleotidlerin (dATP, dGTP, dCTP) miktarında bir artışa yol açar. Deoksिनükleotid havuzunun dengesindeki bozulma (özellikle dATP/dDTP oranının bozulması) DNA sentez ve onarımını bozarak, DNA üzerinde ölümcül bir hasara yol açar. TS inhibisyonu aynı zamanda dUTP miktarındaki artmayı da beraberinde getirir. Hem dUTP, hem de bir 5-FU metaboliti olan FdUTP, DNA ile yanlış biçimde birleşerek DNA hasarına yol açar.



Şekil 2.4. 5-FU'nun DNA hasarı yapma mekanizması

5-FU'nun etki mekanizmalarından biri de RNA üretim ve fonksiyonunun bozulmasıdır. 5-FU'nun bir metaboliti olan FUTP, RNA ile birleşerek, normal RNA fonksiyonunun bozulmasına yol açar. 5-FU'nun, fibroblastlar üzerinde proliferasyon azaltıcı etkisi olduğu gösterilmiştir ve glokom cerrahisi sonrası skar oluşumunu ve buna bağlı rekürrensi engellemek için kullanılmıştır. Diğer çalışmalarda, 5-FU'nun etkisini sadece fibroblast proliferasyonunu engelleyerek değil, aynı zamanda migrasyon, büyüme faktörlerinin, kollajen ve fibronektin proteinlerinin üretimi gibi fibroblast fonksiyonlarını inhibe ederek de ortaya koyduğu gösterilmiştir. Bulstrode, Dupuytren hastalarından ve normal bireylerden alınan fibroblast hücre kültürleri üzerinde yürüttüğü bir çalışmada, 5-FU'nun kollajen sentezini selektif olarak inhibe edebildiğine dair bulgulara rastlamıştır. Kollajen sentezindeki bu azalışa, diğer nonkollajenez proteinlerin üretiminde azalma eşlik etmemiş ve 5-FU'ya maruz kalan fibroblast hücre kültürleriyle, 5-FU ile tedavi edilmemiş hücre kültürleri arasında fibroblast hücre sayıları arasında bir farklılığa rastlanmamıştır.

Canter, yaptığı deneysel çalışmada silikon implantlar etrafında kapsül oluşumunun engellenmesinde 5-FU'nun etkinliğini araştırmış ve olumlu sonuçlar elde etmiştir. 5-FU'nun glokom cerrahisi sonrası skar oluşumunun engellenmesi üzerindeki etkinliği ve güvenilirliğinin, çok merkezli ve uzun dönemli klinik

çalışmalarla gösterilmesi, hipertrofik skar ve keloidlerin tedavisinde de 5-FU'dan yararlanılabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır.

Kontochristopoulos'un 20 hasta üzerinde yaptığı başka bir çalışmada ise, hastaların tamamında ağrı ve hiperpigmentasyon, % 30'unda (6 hasta) ülserasyon görülmüştür. Bu yapılan çalışmalarda, hastalarda, 5-FU'nun anemi, lökopeni, trombositopeni gibi sistemik yan etkilerine rastlanmamıştır. 5-FU'nun topikal preparatları BCC ve aktinik keratoz tedavisinde kullanılmaktadır (Beyhan, 2008).



3. MATERYAL ve YÖNTEM

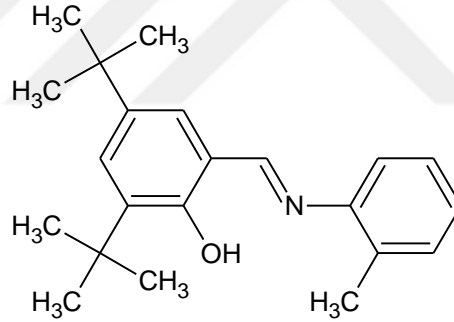
Çalışmamızda yeni sentezlenen sterik engelli salisilaldiminlerin miyelositik lösemi hücre dizisi olan K562 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

3.1. Yeni Sentezlenen Kimyasallar

Kimyasallar Harran Üniversitesi Kimya Bölümü Anorganik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Veli KASIM tarafından sentezlenmiştir.

Bileşik 1: 2,4-di-tert-butil-6-[[2-metilfenil] imino] metil-fenol (IUPAC 'a göre)

(MA: 323. 4 g/mol)

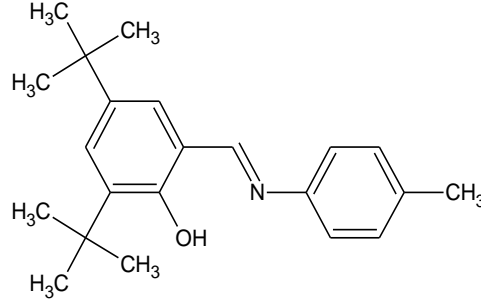


Şekil 3.1. Bileşik 1

Şekil 3.1'de Bileşik 1'in açık formülü görülmektedir.

Bileşik 2: 2,4-di-tert-butil-6-[[4-metilfenil] imino] metil}-fenol (IUPAC'a göre)

(MA: 323.4 g/mol)

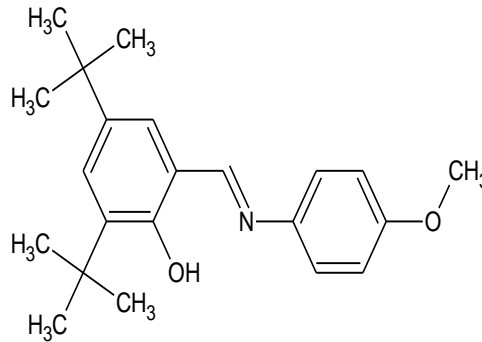


Şekil 3.2. Bileşik 2

Şekil 3.2'de Bileşik 2'nin açık formülü görülmektedir.

Bileşik 3: 2,4-di-tert-butil-6-[[4-metoksifenil] imino] metil}-fenol (IUPAC'a göre)

(MA: 339.4 g/mol)

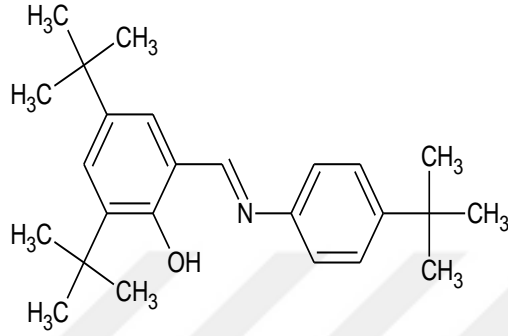


Şekil 3.3. Bileşik 3

Şekil 3.3'te Bileşik 3'ün açık formülü görülmektedir.

Bileşik 4: 2,4-di-tert-butil-6-[[4-(ters-bütilfenil) imino] metil]-fenol
(IUPAC 'a göre)

(MA: 365.5 g/ mol)



Şekil 3.4. Bileşik 4

Şekil 3.4'te Bileşik 4' ün açık formülü görülmektedir.

3.2. Kimyasalların Sterilizasyonu

Kimyasalların formülleri yazılıp, ağırlıkları hassas terazide hesaplandıktan sonra 1µM olacak şekilde alkolde çözüldükten sonra 20 µm por çaplı enjektör tipi filtre ile (Minisart®, Biotech, 16534, USA) sterilize edilerek stok solüsyonlar hazırlandı.

3.3. 5 Florourasil ve Kimyasalların Doz Ayarlaması

Pozitif kontrol olan 5 Florourasil ve kimyasallar 15.6 µM, 31.2 µM, 62.5 µM, 125 µM, 250 µM, 500 µM, 1000 µM olacak şekilde alkol içerisinde dilüe edilerek stok solüsyonları hazırlandı

3.4. 96 Kuyucuklu Kültür Plaklarının Hazırlanması

96 kuyucuklu kültür plaklarının ilk sırasına sadece çözücü olarak kullanılan

alkol eklenmiştir. Pozitif kontrol ve bileşikler 15.6 μM , 31.2 μM , 62.5 μM , 125 μM , 250 μM , 500 μM ve 1000 μM olacak şekilde 10 μl hacimlerde (final hacim 100 μl) üçlü düzende (triple) eklendi.

3.4.1. Hücre kültür ortamının hazırlanması

Seri pasajları yapılan K562 kronik myeloid lösemi hücre dizisi kültürlerinden alınan örnekler 2000 rpm 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılarak hücreler % 10 fetal dana serumu (FCS) ve antibiyotik içeren RPMI-1640 içerisinde yeniden süspanse edildi.

Hücrelerin canlılığını test etmek için “Trypan Blue Exclusion Test” uygulandı. Bu amaçla 100 μl hücre süspansiyonu 100 μl Tripan mavisinde (%10) sulandırılıp thoma lamında sayıldı. Boya almayan canlı hücrelerin oranı %97 olarak belirlendi. Sayım işleminden sonra kültür plağına ekim için hücreler 10^5 hücre/ml olacak şekilde RPMI-1640 medyum ile sulandırılmıştır.

3.5. MTT Testi

Triple düzende 5 Florourasil ve bileşiklerin değişen dozlarda (15.6 μM , 31.2 μM , 62.5 μM , 125 μM , 250 μM , 500 μM ve 1000 μM) ekilmiş olduğu 96 kuyucuklu kültür plaklarına K562 hücre süspansiyonu her bir kuyucuğa 10^4 hücre / 90 μl gelecek şekilde dağıtıldı.

Kültür flaskları 37 °C’ de % 5 CO₂ içeren inkübatörde (Heal Force, HF 212 UV, Çin), nemli ortamda 72 saat inkübasyona bırakıldı. Kültürün 72. saatinde % 0.5’ lik MTT solüsyonu ([3- (4,5-dimetiltiyazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolium], Sigma, M2128-1G, USA) solüsyonundan her bir kültür kuyucuğuna 10 μl eklenip 4 saat daha inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda kültür plakları 3000 rpm de 10 dk. santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı.

Canlı hücreler tarafından MTT' nin MTT formazana çevrilmesiyle meydana formazan kristallerini çözmek için kültür kuyucuklarının her birine 100 µl izopropanol eklendi. Çözünen MTT-formazan miktarının belirlenmesi amacıyla kültür plakları ELİZA mikropalak okuyucuda (MD Spectramax, M5, USA) 570 nm dalga boyunda okutuldu.

Kontrol ve test kuyucuklarından elde edilen optik dansite (OD) değerlerinden solvent körü kuyucuklarının OD değerleri çıkarılmıştır. Kontrol ve test kuyucuklarına ait OD değerleri grafikler halinde sunulmuştur. Bileşiklerinin gösterdiği sitotoksik etki düzeyleri aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\% \text{ sitotoksosite} = 100 - \frac{\text{ortalama OD (test)}}{\text{ortalama OD (kontrol)}} \times 100$$

3.6. Kültür plağı kuyucuklarının görüntülenmesi

MTT ile inkübasyon sonunda kültür plaklarının kuyucukları invert mikroskopta (Motic, AE31, ÇİN) incelenerek, hücreler sitoplazmalarında MTT-formazan kristalleriyle görüntülendi. Görüntüleme işlemi kültürün 76. saatlerinde gerçekleştirildi.

3.7. İstatistiksel Analizler

Elde edilen OD değerleri ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir. Verilerin analizlerinde pozitif kontrol (5 Florourasil) ve bileşiklerin sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması ANOVA testi ile gerçekleştirilmiştir. ANOVA testi sonucunda anlamlı bulunan pozitif kontrol ve bazı fosfazen bileşiklerinin değişen dozlarının sitotoksik etkinlikleri 'post hoc' testlerden olan 'TUKEY' testi ile gerçekleştirilmiştir. Her bir bileşiğin pozitif kontrol ile karşılaştırılmasında pearson korelasyonu kullanılmıştır. "p" değerinin 0.05 ten küçük bulunması durumunda veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Her bir kimyasalın IC₅₀ degerleri

Graphpad Prism version 6 for Windows kullanılarak non-lineer regresyon, doz inhibisyon analizi hesaplanmıştır.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1.Araştırma Bulguları

Çalışmada sterik engelli salisilaldiminlerin kanser hücre dizisi üzerindeki sitotoksik yanıtları 5-Florourasil pozitif kontrol olarak baz alınıp incelenmiştir.

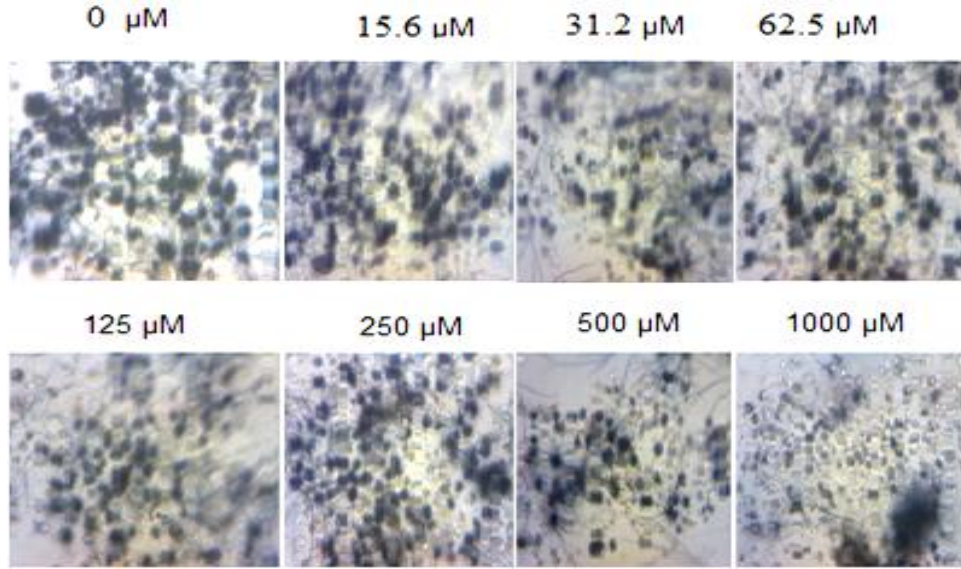
4.1.1. Kontrol grubunun OD değerleri

Çözücü olarak kullanılan alkolün eklendiği kontrol kuyucuklarının OD değeri $0,521 \pm 0,012$ olarak belirlenmiştir.

4.1.2.5 Florourasil'in K562 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

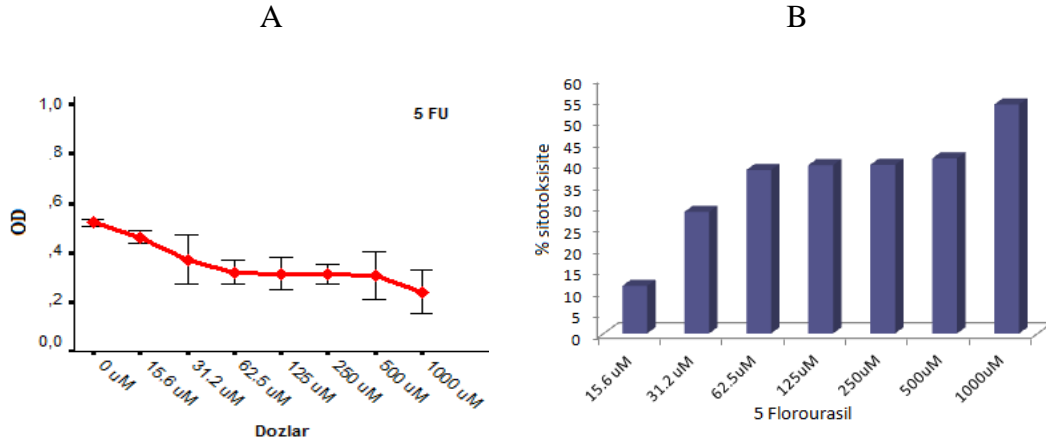
5 Florourasil'in değişen dozları ($15.6 \mu\text{M}$, - $1000 \mu\text{M}$) kullanılarak gerçekleştirilen kültürlerinden elde edilen ve canlı hücreler tarafında oluşturulan MTT-formazana ait görüntüler Şekil 4.1 sunulmaktadır.

5 Florourasil'in $15.6 \mu\text{M}$, $32.1 \mu\text{M}$, $62.5 \mu\text{M}$, $125 \mu\text{M}$, $250 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$, $1000 \mu\text{M}$ dozlarına karşılık gelen kültürlerden elde edilen OD değerleri ve bunların kontrol OD değerleri ile karşılaştırması sonucu elde edilen istatistiksel anlamlılık düzeyleri sırasıyla; $0,463 \pm 0,020$ [$p < 0,847$], $0,372 \pm 0,087$ [$p < 0,062$], $0,321 \pm 0,040$ [$p < 0,008$], $0,315 \pm 0,058$ [$p < 0,006$], $0,314 \pm 0,034$ [$p < 0,006$], $0,306 \pm 0,075$ [$p < 0,006$], $0,240 \pm 0,100$ [$p < 0,005$], (ANOVA $p < 0,001$ olarak belirlenmiştir).



Şekil 4.1.MTT öncesi 5 Florourasil'in kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri

5 Florourasil'in değişen dozlarda K562 hücreleriyle 76 saat inkübasyonu sonunda hücrelerin ürettiği MTT formazana ait OD değerleri (Şekil 4.2 A) ve elde edilen OD değerlerinin kontrol grubu OD değerleri ile karşılaştırılması sonucu gözlenen % sitotoksisite değerleri (Şekil 4.2 B) grafikler halinde sunulmuştur.



Şekil 4. 2. 5 Florourasil eklenerek sürdürülen kültürlerde K562 hücreleri tarafından üretilen MTT-formazana ait OD(A) ve sitotoksisite değerleri(B)

5 Florourasil'in K562 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelendiğinde en yüksek sitotoksik etkinliğin 1000 µM dozunda uygulanmasıyla % 53.8 olarak ve en düşük sitotoksik etkinin 15,6 µM dozunda uygulanmasıyla % 11.1. elde edildiği Çizelge 4. 1 de gözlenmektedir.

Çizelge 4.1. 5 Florourasil'in K562 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

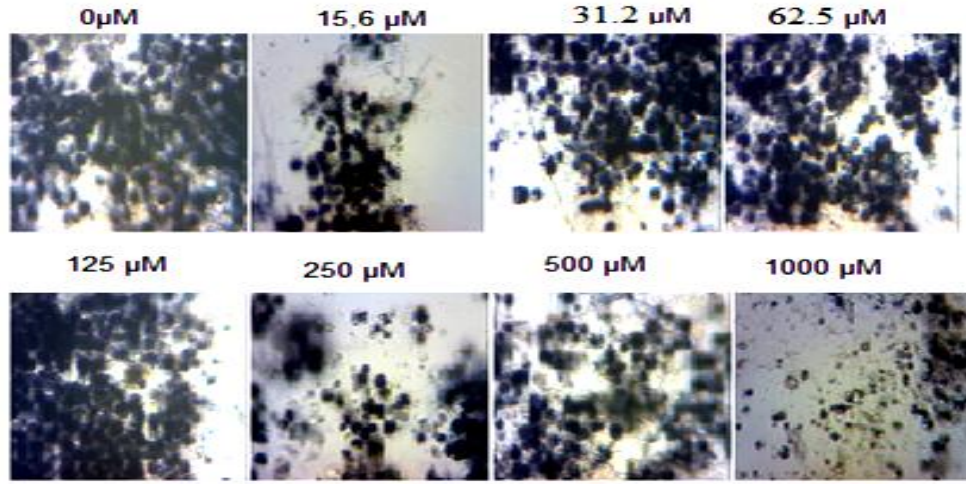
	Kimyasal Dozları (µM)							ANOVA
	15.6	31.2	62.5	125	250	500	1000	
% sitotoksosite	11,1	28,5	38,4	39,5	39,6	41,1	53,8	0,001
IC₅₀: 25 µM								

Elde edilen optik dansite değerlerinden hesaplanan sitotoksik yanıtların doz bağımlı olarak değerlendirilmesi ile 5 Florourasil'in IC₅₀: 25 µM olarak bulunmuştur.

4.1.3. Bileşik 1' in K562 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

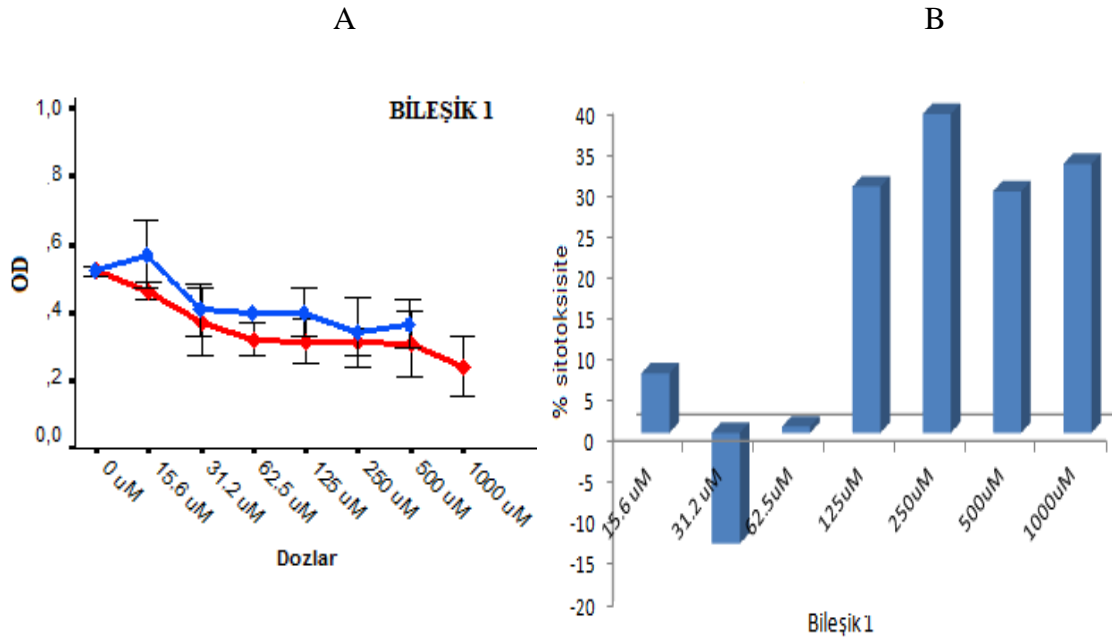
Bileşik 1' in değişen dozları (15.6 µM, - 1000 µM) kullanılarak gerçekleştirilen kültürlerinden elde edilen ve canlı hücreler tarafında oluşturulan MTT-formazana ait görüntüler Şekil 4.3' te sunulmaktadır.

5 Florourasil'in 15.6 µM, 32.1 µM, 62.5 µM, 125 µM, 250 µM, 500 µM, 1000 µM dozlarına karşılık gelen kültürlerden elde edilen OD değerleri ve bunların kontrol OD değerleri ile karşılaştırması sonucu elde edilen istatistiksel anlamlılık düzeyleri sırasıyla; 0,246±0,017 [p<0,001], 0,218±0,022 [p<0,001], 0,224±0,044 [p<0,001], 0,222±0,046 [p<0,001], 0,227±0,059 [p<0,001], 0,218±0,064 [p<0,001], 0,190±0,065 [p<0,001], (ANOVA; p<0,001) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.3. MTT sonrası Bileşik 1'in kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri

Bileşik 1' in değişen dozlarda K562 hücreleriyle 76 saat inkübasyonu sonunda hücrelerin ürettiği MTT formazana ait OD değerleri (Şekil 4.4 A) ve elde edilen OD değerlerinin kontrol grubu OD değerleri ile karşılaştırılması sonucu gözlenen % sitotoksisite değerleri (Şekil 4.4 B) grafikler halinde sunulmuştur.



Şekil 4.4. Bileşik 1 eklenerek sürdürülen kültürlerde K562 hücreleri tarafından üretilen MTT-formazana ait OD(A) ve sitotoksisite değerleri(B).

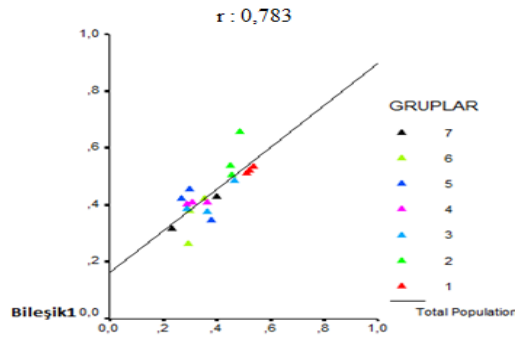
Bileşik 1' in K562 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelendiğinde en yüksek sitotoksik etkinliğin 500 µM dozunda uygulanmasıyla % 27.6 olarak ve en düşük sitotoksik etkinin 15.6 µM dozunda uygulanmasıyla % - 8.5 elde edildiği Çizelge 4.2' de gözlenmektedir.

Çizelge 4. 2. Bileşik 1'in K562 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

	Kimyasal Dozları (µM)							ANOVA
	15.6	31.2	62.5	125	250	500	1000	
% sitotoksosite	-8,5	20,3	21,8	21,4	31,9	27,6	---	0,001
IC₅₀:2078 µM								

Elde edilen optik dansite değerlerinden hesaplanan sitotoksik yanıtların doz bağımlı olarak değerlendirilmesi ile bileşik 1'in IC₅₀: 2078 µM olarak bulunmuştur.

Pozitif kontrol olarak kullanılan 5 Florourasil ile Bileşik 1'in OD değerlerinin karşılaştırılmasıyla elde edilen korelasyonu gösteren grafik Şekil 4.5' te sunulmaktadır.



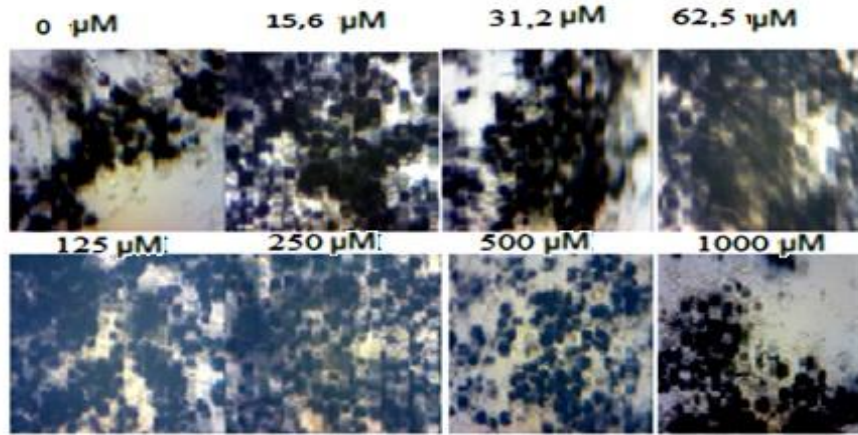
Şekil 4.5 Bileşik 1 korelasyon grafiği

Bileşik 1 ile pozitif kontrol olarak kullanılan 5 Florourasil arasında doz-yanıt ilişkisi açısından bir anlamlı pozitif bağıntının bulunduğu (r: 0,783 p<0.001) gözlenmiştir.

4.1.4. Bileşik 2' nin K562 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

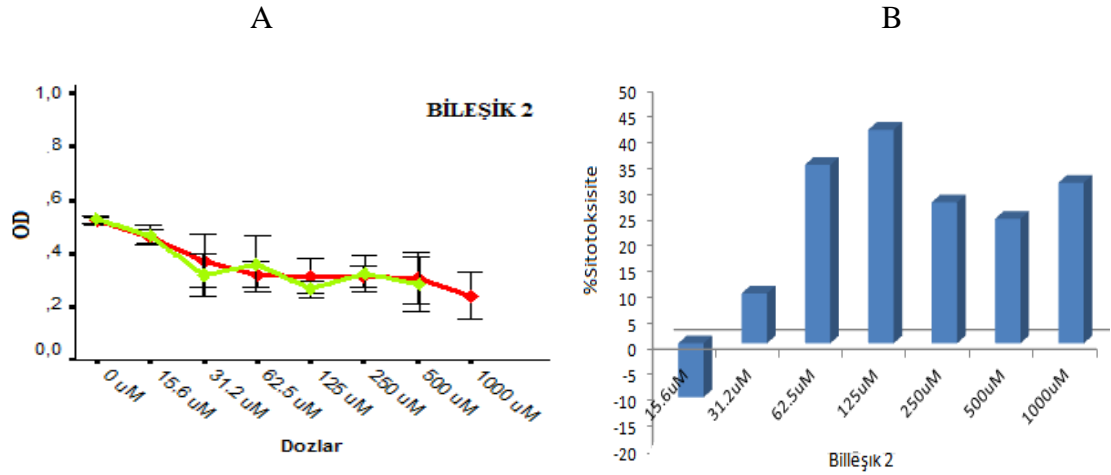
Bileşik 2' nin değişen dozları (15.6 μ M, - 1000 μ M) kullanılarak gerçekleştirilen kültürlerinden elde edilen ve canlı hücreler tarafında oluşturulan MTT-formazana ait görüntüler Şekil 4.6' da sunulmaktadır.

Bileşik 2' nin 15.6 μ M, 32.1 μ M, 62.5 μ M, 125 μ M, 250 μ M, 500 μ M, 1000 μ M dozlarına karşılık gelen kültürlerden elde edilen OD değerleri ve bunların kontrol OD değerleri ile karşılaştırması sonucu elde edilen istatistiksel anlamlılık düzeyleri sırasıyla; OD değeri 0,466 \pm 0,029 [p<0,887], 0,327 \pm 0,029 [p<0,013], 0,366 \pm 0,085 [p<0,057], 0,278 \pm 0,026 [p<0,002], 0,332 \pm 0,053 [p<0,016], 0,295 \pm 0,083 [p<0,004], (ANOVA p<0.001) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6. MTT sonrası Bileşik 2' nin kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri

Bileşik 2' nin değişen dozlarda K562 hücreleriyle 76 saat inkübasyonu sonunda hücrelerin ürettiği MTT formazana ait OD değerleri (Şekil 4.7 A) ve elde edilen OD değerlerinin kontrol grubu OD değerleri ile karşılaştırılması sonucu gözlenen % sitotoksisite değerleri (Şekil 4.7 B) grafikler halinde sunulmuştur.



Şekil 4. 7. Bileşik 2 eklenerek sürdürülen kültürlerde K562 hücreleri tarafından üretilen MTT-formazana ait OD(A) ve sitotoksosite değerleri(B)

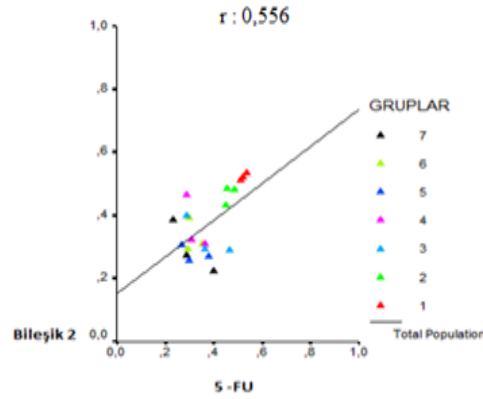
Bileşik 2' nin K562 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelendiğinde en yüksek sitotoksik etkinliğin 125 µM dozunda uygulanmasıyla % 46.6 olarak ve en düşük sitotoksik etkinin 15.6 µM dozunda uygulanmasıyla % 10.5 elde edildiği Çizelge 4. 3' te gözlenmektedir.

Çizelge 4.3. Bileşik 2' nin K562 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

	Kimyasal Dozları (µM)							
	15.6	31.2	62.5	125	250	500	1000	
% sitotoksosite	10, 5	37, 2	29, 7	46, 6	36. 1	36, 1	43, 3	ANOVA 0,001
IC₅₀:703 µM								

Elde edilen optik dansite değerlerinden hesaplanan sitotoksik yanıtların doz bağımlı olarak değerlendirilmesi ile Bileşik 2' nin IC₅₀: 703 µM olarak bulunmuştur.

Pozitif kontrol olarak kullanılan 5 Florourasil ile Bileşik 2' den elde edilen OD değerlerinin karşılaştırılmasıyla elde edilen korelasyonu gösteren grafik Şekil 4. 8'de sunulmaktadır.



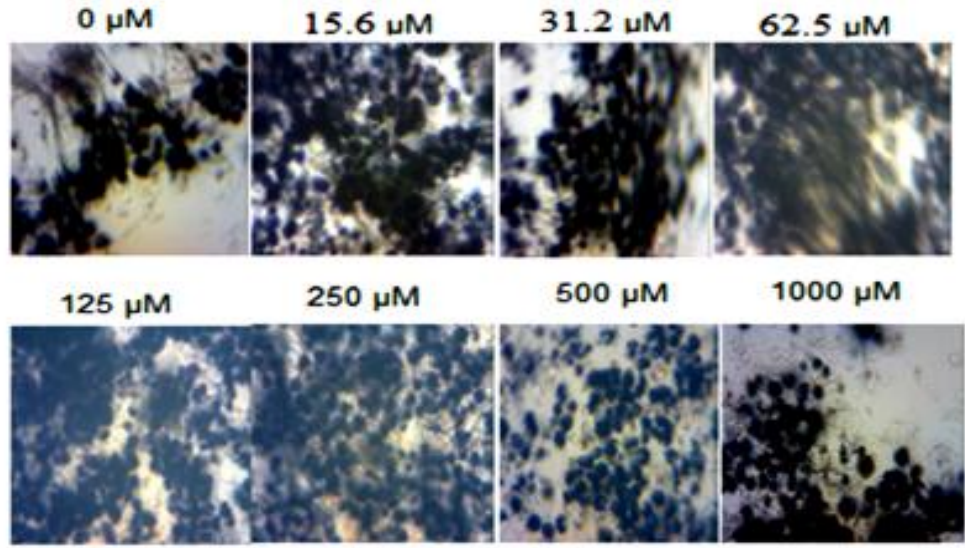
Şekil 4.8. Bileşik 2 korelasyon grafiği

Bileşik 2 ile pozitif kontrol olarak kullanılan 5 Florourasil arasında doz-yanıt ilişkisi açısından orta derecede pozitif bağıntının bulunduğu ($r: 0,556$ $p < 0,009$) gözlenmiştir.

4.1.5. Bileşik 3' ün K562 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

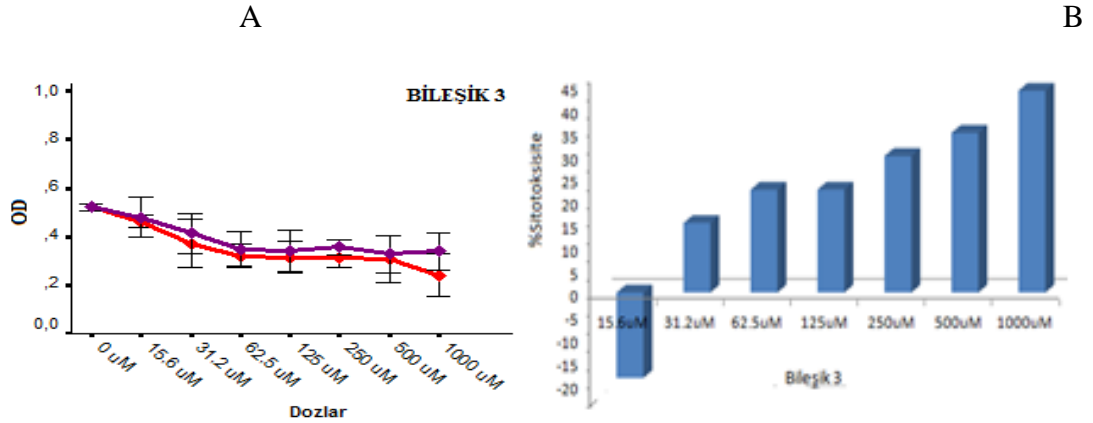
Bileşik 3' ün değişen dozları ($15,6 \mu\text{M}$, - $1000 \mu\text{M}$) kullanılarak gerçekleştirilen kültürlerinden elde edilen ve canlı hücreler tarafında oluşturulan MTT-formazana ait görüntüler Şekil 4.9' da sunulmaktadır.

Bileşik 3' ün $15,6 \mu\text{M}$, $32,1 \mu\text{M}$, $62,5 \mu\text{M}$, $125 \mu\text{M}$, $250 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$, $1000 \mu\text{M}$ dozlarına karşılık gelen kültürlerden elde edilen OD değerleri ve bunların kontrol OD değerleri ile karşılaştırması sonucu elde edilen istatistiksel anlamlılık düzeyleri sırasıyla; $0,481 \pm 0,066$ [$p < 0,986$] 31 $0,421 \pm 0,066$, [$p < 0,418$], $0,361 \pm 0,058$ [$p < 0,051$], $0,355 \pm 0,069$ [$p < 0,041$] $0,367 \pm 0,0026$ [$p < 0,064$], $0,340 \pm 0,063$ [$p < 0,022$], $0,351 \pm 0,061$ [$p < 0,034$] (ANOVA; $p < 0,008$) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.9. MTT sonrası Bileşik 3' ün kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri

Bileşik 3' ün değişen dozlarda K562 hücreleriyle 76 saat inkübasyonu sonunda hücrelerin ürettiği MTT formazana ait OD değerleri (Şekil 4.10 A) ve elde edilen OD değerlerinin kontrol grubu OD değerleri ile karşılaştırılması sonucu gözlenen % sitotoksosite değerleri (Şekil 4.10 B) grafikler halinde sunulmuştur.



Şekil 4. 10. Bileşik 3 eklenerek sürdürülen kültürlerde K562 hücreleri tarafından üretilen MTT-formazana ait OD(A) ve sitotoksosite değerleri(B)

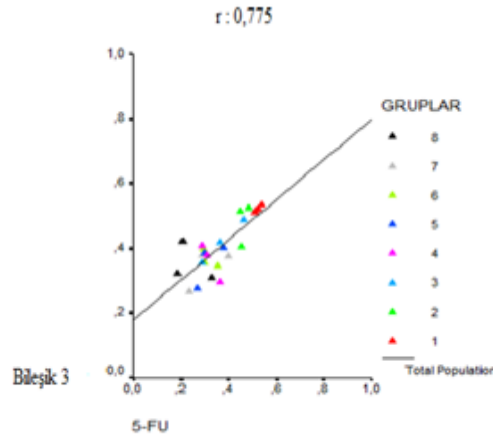
Bileşik 3' ün K562 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelendiğinde en yüksek sitotoksik etkinliğin 500 μM dozunda uygulanmasıyla % 34.6 olarak ve en düşük sitotoksik etkinin 15.6 μM dozunda uygulanmasıyla % 7.6 elde edildiği Çizelge 4.4' te gözlenmektedir.

Çizelge 4. 4. Bileşik 3'ün K562 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

	Kimyasal Dozları (μM)							ANOVA
	15.6	31.2	62.5	125	250	500	1000	
% sitotoksosite	7.6	19,2	30,6	31.7	29.5	34,6	32.5	0,001
IC₅₀:7517 μM								

Elde edilen optik dansite değerlerinden hesaplanan sitotoksik yanıtların doz bağımlı olarak değerlendirilmesi ile Bileşik 3'ün IC₅₀: 7517 μM olarak bulunmuştur.

Pozitif kontrol olarak kullanılan 5 Florourasil ile Bileşik 3' ten elde edilen OD değerlerinin karşılaştırılmasıyla elde edilen korelasyonu gösteren grafik Şekil 4.11'de sunulmaktadır.



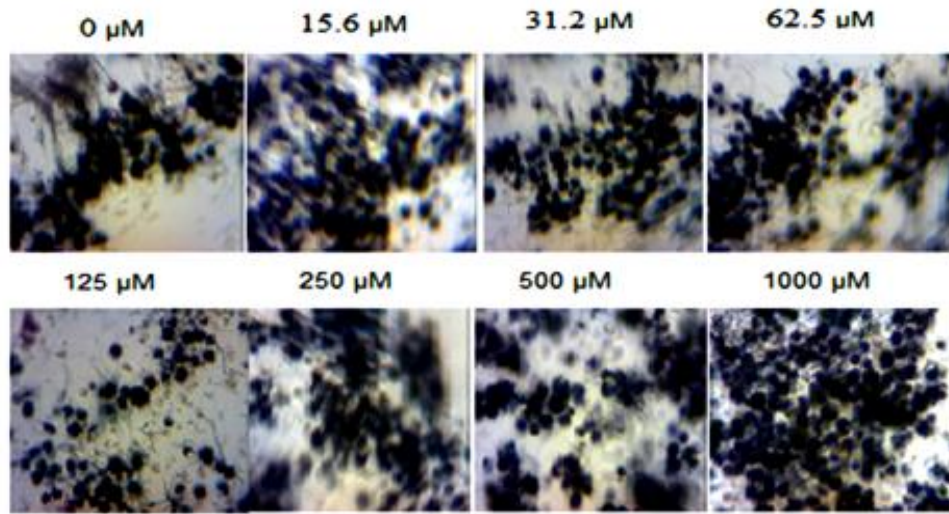
Şekil 4.11 Bileşik 3 korelasyon grafiği

Bileşik 3 ile pozitif kontrol olarak kullanılan 5 Florourasil arasında doz-yanıt ilişkisi açısından pozitif bir bağıntının bulunduğu ($r: 0,775$ $p < 0,001$) gözlenmiştir.

4.1.6. Bileşik 4' ün K562 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

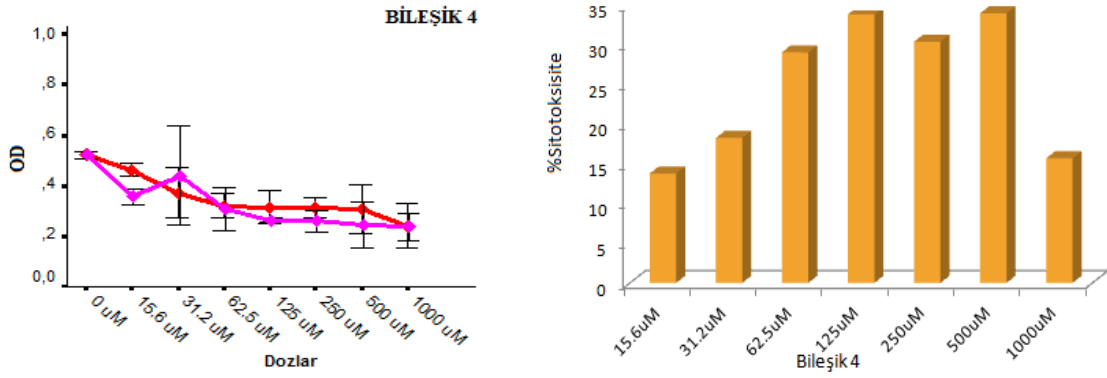
Bileşik 4' ün değişen dozları (15.6 μ M, - 1000 μ M) kullanılarak gerçekleştirilen kültürlerinden elde edilen ve canlı hücreler tarafında oluşturulan MTT-formazana ait görüntüler Şekil 4.12'de sunulmaktadır.

Bileşik 4'ün 15.6 μ M, 32.1 μ M, 62.5 μ M, 125 μ M, 250 μ M, 500 μ M, 1000 μ M dozlarına karşılık gelen kültürlerden elde edilen OD değerleri ve bunların kontrol OD değerleri ile karşılaştırması sonucu elde edilen istatistiksel anlamlılık düzeyleri sırasıyla OD değeri 0,367 \pm 0,025 [p<0,193], 0,446 \pm 0,158 [p<0,878], 62,5 0,324 \pm 0,068 [p<0,050], 0,282 \pm 0,009 [p<0,012], 0,277 \pm 0,035 [p<0,010], 0,264 \pm 0,071 [p<0,007], 0,238 \pm 0,043, [p<0,005], (ANOVA p< 0,002 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.12. MTT sonrası Bileşik 4' ün kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri

Bileşik 4'ün değişen dozlarda K562 hücreleriyle 76 saat inkübasyonu sonunda hücrelerin ürettiği MTT formazana ait OD değerleri (Şekil 4.13 A) ve elde edilen OD değerlerinin kontrol grubu OD değerleri ile karşılaştırılması sonucu gözlenen % sitotoksosite değerleri (Şekil 4.13 B) grafikler halinde sunulmuştur.



Şekil 4. 13. Bileşik 4 eklenerek sürdürülen kültürlerde K562 hücreleri tarafından üretilen MTT-formazana ait OD(A) ve sitotoksosite değerleri(B)

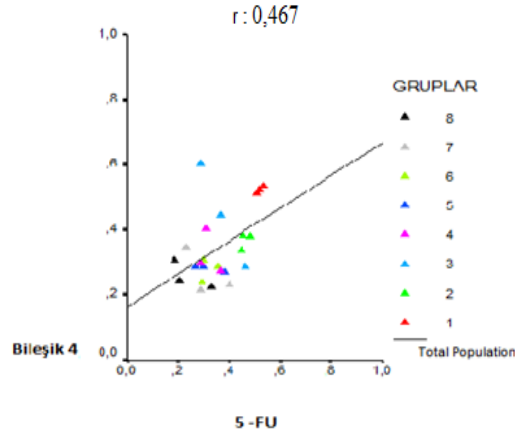
Bileşik 4'ün K562 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelendiğinde en yüksek sitotoksik etkinliğin 1000 µM dozunda uygulanmasıyla % 49.4 olarak ve en düşük sitotoksik etkinin 31.2 µM dozunda uygulanmasıyla % 14.4 elde edildiği Çizelge 4.5'te gözlenmektedir.

Çizelge 4.5 Bileşik 4' ün K562 hücreleri üzerine % sitotoksik etkileri

	Kimyasal Dozları (µM)							
	15.6	31.2	62.5	125	250	500	1000	
% sitotoksosite	29.6	14.4	37.8	45.8	46.7	49.2	49.4	ANOVA
								0,001
	IC₅₀: 568 µM							

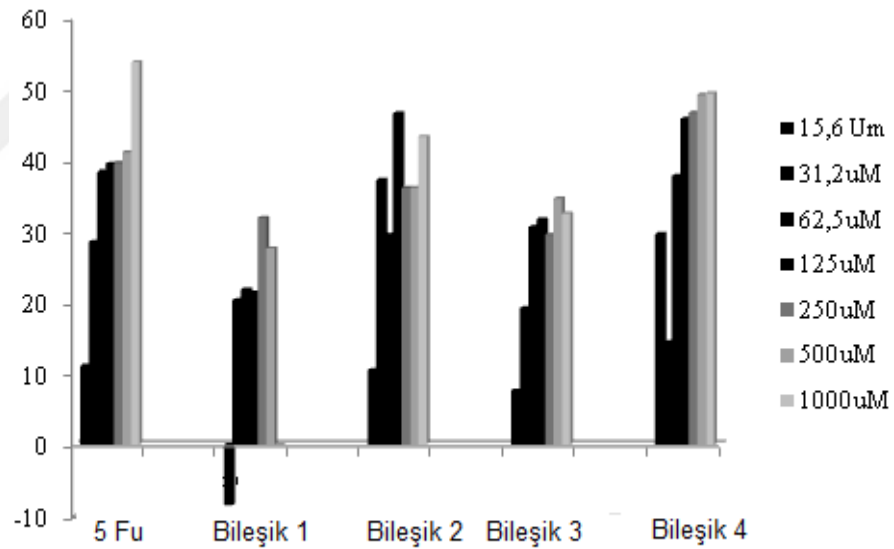
Elde edilen optik dansite değerlerinden hesaplanan sitotoksik yanıtların doz bağımlı olarak değerlendirilmesi ile Bileşik 4'ün IC₅₀: 568µM olarak bulunmuştur.

Pozitif kontrol olarak kullanılan 5 Florourasil ile Bileşik 4' ten elde edilen OD değerlerinin karşılaştırılmasıyla elde edilen korelasyonu gösteren grafik Şekil 4.14' te sunulmaktadır.



Şekil 4.14 Bileşik 4 korelasyon grafiği

Bileşik 4 ile pozitif kontrol olarak kullanılan 5 Florourasil arasında doz-yanıt ilişkisi açısından orta derecede bir pozitif bağıntının bulunduğu ($r: 0.467$, $p<0.21$) gözlenmiştir.



Şekil 4.15. Tüm bileşiklerin sitotoksik etkileri

Şekil 4.15' te görüldüğü gibi kimyasallarımız arasında en yüksek sitotoksosite Bileşik 2' de daha sonra ise Bileşik 4' de görülmüştür. Bileşik 4 referans pozitif kontrolümüze en yakın sonucu veren bileşiğimizdir. Bileşiklerimiz arasında en düşük etkide bileşik 1'de gözlenmiştir. Fakat genel olarak referans ilacımıza yakın

sitotoksik etki saptanmış olup referans ilacımızdan daha yüksek bir sitotoksik etkiye rastlanmamıştır.



4.2 Tartışma

Hayatımızı devam ettirebilmemiz için hücrelerimizin sürekli yenilenmesi gerekmektedir. Hücrelerin yenilenmesi ve vücuttan atılması genlerin kontrolü altındadır. Bazı genler hücrelerin bölünüp çoğalmasını sağlarken, bazıları da aşırı hücre üremesini önlerler. Bazen hücreler, çevresel faktörlerin çok basamaklı bir süreç içinde, hücre DNA'sında ve kromozomların fonksiyonel birimleri olan genlerde oluşturduğu değişiklikler neticesinde kontrolsüz olarak bölünmeye başlarlar ve normalde olmayan bir oluşum meydana getirirler. Bu oluşum komşu dokulara ve uzak organlara yayılabilir. Bu anormal hücrelerin kontrolsüz büyüme ve yayılma özelliğine sahip olması ile gelişen büyük bir grup hastalığa kanser adı verilir.

Kanser insanlar üzerinde sosyal ve ekonomik etkilere sahip ciddi bir problemdir. Her yıl milyonlarca hastayı etkilemekte ayrıca dünyadaki ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Bu hastalığın tedavisinde, kemoterapi sıklıkla başvurulan bir yöntemdir.

Günümüzde antikanser araştırmalarında kullanılmak üzere kanserli hastalardan ve dokulardan izole edilmiş onlarca hücre serisi bulunmaktadır. Çalışmamız için seçtiğimiz K562 hücre serisi KML' nin blastik kriz evresinden kaynaklanan hücre dizileridir (Lozzio ve ark., 1975). Glutatyon sistemi, oksidatif stres, eritroid farklılaşma ve anti-kanser tedavilerinin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Koeffler ve ark., 1980; Nakajima ve ark., 1993).

Elektron mikroskopunda bakıldığında K562 hücreleri kolay bağıntılı, düzgün şekilli, kısa mikrovillüslü, farklılaşmış lösemik hücrelerine benzer şekilde görülebilir (Klein ve ark., 1976). Giemsa ile hazırlanmış preparatlarda K562 hücreleri yaklaşık 20 µM çapında iki ya da daha fazla parçalı nükleuslu farklılaşmamış blast hücreleri olarak tanımlanabilir (Klein ve ark., 1976; Koeffler ve ark., 1980).

Hücre kültürü çalışmaları, *in vivo* şartlarda mümkün olmayan, kısa zaman aralığında gerçekleştirilmesi istenen fiziksel ve kimyasal etkenlerin incelenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Anıl, 1986; Bilir, 2010).

Çalışmamızda kemoterapötik ajan olarak düşündüğümüz sterik engelli salisilaldiminlerin kanser hücre dizisi üzerine sitotoksik etkilerinin araştırılması ve sitotoksik etkisi çalışmamızca ortaya konulmuştur.

Kuz'min ve çalışma arkadaşları moleküler yapı ile antikanser aktivitesi arasındaki ilişkiyi araştırmak üzere makrosiklik piridinofan Schiff bazlarının 4DQSAR ile moleküler yapılarını incelemişlerdir. Bazı molekül bölümlerinin antikanser etkisini artırırken bazı bölümlerin ise azalttığını belirlemişler ve sonucun yeni antikanser ilaçlarının sentezinde kullanışlı olacağını söylemişlerdir (Kuz'min ve ark., 2005). Bu çalışma bizlere schiff bazlı maddelerin antikanser ilaçlara alternatif olabileceğini göstermiş ve bu çalışmada yön gösterici olmuştur.

Berkarda ve arkadaşlarının çalışmasına ışık tutmak amacıyla bir eritrolösemik hücre soyu olan K562 hücrelerinde ilacın çeşitli dozlarıyla oksidatif stres ve hücre sitotoksitesi oluşturma özelliği araştırıldı (Berkarda ve ark., 1992). Bu çalışma da sitotoksitesi belirleme, farklı dozlardaki etkiyi gözleme ve K562 hücre soyu üzerinde çalışmasıyla bizim çalışmamızla benzer özellik taşımaktadır.

Çalışmamızda kullandığımız sterik engelli salisilaldiminlerin yeni sentezlenmiştir bu nedenle daha önce hiçbir çalışmada kullanılmamıştır. Bu yönüyle çalışmamız özgün bir niteliğe sahiptir.

Çalışmamızda MTT yöntemi kullanılarak, K562 hücre dizisinde yeni sentezlenmiş dört bileşiğin anti tümöral etkinliğinin ortaya konması amaçlanmıştır. Yeni sentezlenen bu dört bileşik kompleksinden sadece Bileşik 2 ve Bileşik 4 olarak adlandırılmış olan bileşiklerde kompleks en yüksek konsantrasyonuna paralel olmak üzere antitümöral sitotoksik etkinin ortaya çıktığı saptanmıştır. Diğer yeni sentezlenen bileşiklerde de antitümöral etkiye rastlanmıştır. Ancak Bileşik 1,ve

Bileşik 3 'te ortaya çıkardığımız sitotoksik etkinin çok zayıf olması sebebiyle olası antikanser etkisinin araştırılması için gereken deneysel hayvan modeli araştırması için ümit verici değildir.

Diğer maddelerimizden farklı olarak Bileşik 4 farklı dozlarda farklı sitotoksik etki göstermiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada K562 hücre dizisinde sitotoksik etkisini belirlediğimiz ve değişen konsantrasyonlarda paralel bir şekilde bu etkiyi saptadığımız en ümit verici bileşik olarak Bileşik 2 ve Bileşik 4 'ü saptadık. Bu bileşik ile ilgili olarak K562 hücre dizisi ile hayvanlarda oluşturulacak deneysel kanser ile etkisinin incelenmesi, *in vivo* etkisinin gösterilebilmesiyle anlamlı bir aşamaya gelebileceğini düşünmekteyiz.

5.SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmamızda kullandığımız pozitif kontrol olan 5 Florourasil' e paralel fakat daha düşük düzeylerde sitotoksik aktiviteler Bileşik 2 ve Bileşik 4' te görülmüştür.

Bileşik 4 de ise en yüksek doz 1000 μ M kendi doz grubu arasında en yüksek etkiyi ortaya koymuştur. Bu sonuç ışığında farklı dozlarda farklı sitotoksik etkilerin görülebileceğini ve yüksek doz uygulamalarının her zaman yüksek sitotoksik etki oluşturamayacağını göstermektedir.

- ❖ Kullandığımız MTT yöntemi kolorimetrik bir yöntem olduğundan seçeceğimiz kimyasalların renksiz olmasına özen gösterilmelidir.
- ❖ Çalışmada sadece kanserli hücrelerin kullanılmasının yerine, kimyasallarımızın sağlıklı hücreler üzerinde denenmesi gereklidir.
- ❖ Çalışmamızda K562 hücre soyu kullanılmıştır. Literatürde farklı hücre soylarının aynı kimyasala karşı farklı cevaplar oluşturabildiği gösteren çalışmalara rastlanmaktadır. Bu nedenle elde ettiğimiz veriler kullandığımız bileşiklerin değişik hücre soylarına veya kanser tiplerine karşı cevabını yansıtmayabilir. Bileşikleri farklı hücre soyları üzerinde test ederek farklı sonuçlara ulaşabilmemiz olasıdır.
- ❖ Çalışmamızda DNA fragmentasyonu yöntemi kullanılmamıştır. Bu yöntem kullanılıp hücre ölümlerinin apoptosiz den kaynaklanıp kaynaklanmadığını ortaya konmalıdır.
- ❖ Bileşiklerin *in vivo* şartlarda deney hayvanları üzerinde denenerek sitotoksik yada farklı biyolojik etkilerin gözlenebilmesi olasıdır.

KAYNAKLAR

- ATAKOL, O., BOCA, R., ERCAN, I., ERCAN, F., FUESS, H., HAASE, W., and HERCHEL, R., 2006. Magnetic Properties of Trinuclear Ni-M-Ni Complexes, M: Mn, Co and N. Chem. Phys. Lett., 423:192-196.
- ALEMİ, A. A., and SHAABANİ, B., 2000. Synthesis Of Schiff Base Ligands Derived From Condensation Of Salicylaldehyde Derivatives And Synthetic Diamine Acta. Chim. Slov. 47: 363-369.
- ANDERSON, B. M., and JENCKS, W. P., 1960. Semicarbazone formation from pyridoxal, pyridoxal phosphate and their Schiff bases J. Am. Chem. Soc, 82-1773.
- ANDERSON, O. P., COUR, A. L., FINDEISEN, M., HENNIG, L., SIMONSEN, O., TAYLOR, L. and TOFTLUND, H., 1997. Zinc (II) N₂S₂ Schiff-base complexes incorporating pyrazole, syntheses, characterization, tautomeric equilibria and racemization kinetics. J. Chem. Soc., Dalton Trans. III.
- BARILE, F. A., 1994. Introduction to in vitro cytotoxicology mechanisms and methods, CRC Pres, Florida, USA, 189-208.
- BAUMGRASS, R., WEIWAD, M., and EDMANN, F., 2001. Reversible inhibition of calcineurin by the polyphenolic aldehyde gossypol. J. Biol. Chem, 276- 47914.
- BEYER, H., 1980. Lehrbuch der Organischen Chemie. S. Hirzel Verlag, 18. Auflage, Stuttgart, 16-17.
- BEYHAN, Ş., 2008. "Kollajen sentezi inhibitörlerinden 5-florourasil ve halofuginon'un yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 68s.
- BROWN, H. C., DANIEL, O. H., MC., and HAFLINGER, O., 1985. Determination of organic structure by physical methods. Academic Press, New York.
- BROWN, W. H., 1995. Organic Chemistry. Saunders College Publishing, 674-675.
- COLLIER, A. C., and PRITSOS, C. A., 2003. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT. 66: 281-287.
- COLLIER, M., NARDİN, G., and RANDACCIO, L., 1972. Reactions of silylated Schiff bases with trichloro(cyclopentadienyl)-titanium, dichloro(cyclopentadienyl)methoxytitanium, and dichloro-bis(methoxy)titanium Coord. Chem. Rev. 7-385.
- CLARKE, E.G.C. 1974. Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-modern material. The Pharmaceutical Press, 452.
- ÇAKMAK, H., 2007. 1,2-Bis(P-Aminofenoksi)Etan Türevi Schiff Bazları Ve Metal Komplekslerinin Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi. Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, Elazığ, 121s.
- DONELLY, T. H. 1996. The origins of use of antioksidants in foods. J. Of Chemical Education, 73, (2): 158-162.
- ERGENÇ, N., ATEŞ, Ö., ve GÜRSOY, A., 1990. Eczacılar için Organik Kimya, İstanbul, No:3596: 256-258.

- ELMALI, A., KABAK, M., KAVLAKOĞLU, E., and ELERMAN, Y. 2000. Tautomeric Properties, Conformations and Structure of N-(2-hydroxy-5-clorophenyl) salicylaldimine. *J. Mol* , 510-207.
- FENT, K., 2001, Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples, *Toxicology in vitro*, 15: 477-488.
- FREY, P. A., KOKESH, F. O., and WESTHEIMER, F. H., 1971. Reporter group at the active site of acetoacetate decarboxylase. I. Ionization constant of the nitrophenol. *J. Amer. Chem. Soc.*, 93: 7266-7270.
- GAD, S.C., 2000. *In vitro toxicology*, Second Edition, Taylor & Francis, New York.
- GENÇ, S., AKHISAROĞLU, M., ve GENÇ, K., 2002. Eritropoetin'in PC12 hücre Hattında Amiloid-Beta peptid ile oluşturulan nörotoksisiteye karşı koruyucu etkisi, *Turkish Journal of Geriatrics*.
- GUO, Z., XING, Z., LIU, S., YU, S., and WANG, P., LI, C., LI, P., 2005. The synthesis and antioxidant of the Schiff bases of chitosan and carboxymethyl chitosan, *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 15: 4600-4603.
- GUP, R., and KIRKAN, B., 2005. Synthesis and Spectroscopic Studies of Copper(II) and Nickel(II) Complexes Containing Hydrazonic Ligands and Heterocyclic Coligand. *Spectrochim. Acta Part A*, 62: 1188-1195.
- GNANASOUNDARI, V. G., and NATARAJAN, K., 2004. Synthesis, characterisation and catalytic studies of iron(III), cobalt(II), nickel(II) and copper(II) complexes containing N, O donor ligands and triphenylphosphine. *Trans. Met. Chem.*, 29: 511-515.
- HOLST, C.M., and OREDSSON, S.M., 2005. Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell lines. *Toxicology in Vitro*, 19: 379-38.
- HÖKELEK, T., AKDURAN, N., YILDIZ, M. ve KILIÇ, Z., 2000. Crystal structure of 1,5-di[N-2-oxyphenyl-salicylidene]-3-oxapentane. *Anal. Sci*, 16: 553-554.
- JOHNSON, M.G., KIYOKAWA, H., TANI, S., and KOYAMA, J., 1997. Antitumor agents-CLXVII. Synthesis and structure-activity correlations of the cytotoxic anthraquinone 1,4- bis-(2,3-epoxypropylamino)-9,10-anthracenedione, and of related compounds. *Bioorg. Med. Chem*, 5: 1469-1479.
- KANNAPHAN, R., TANASE, S., MUTIKAINEN, I., TYRPEINEN, U., and REEDIJK, J., 2006. Low-spin iron(III) Schiff-bases complexes with symmetric hexadentate ligands: Synthesis, crystal structure, spectroscopic and magnetic properties, *Polyhedron*, 25: 1646-1654.
- KUZ'MIN, V. E., ARTEMENKO, A. G., LOZYTSKA, R. N., FEDTCHEOUK, A. S., LOZITSKY, V. P., MURATOV, E. N., and MESCHERIAKOV, A. K., 2005. Investigation of anticancer activity of macrocyclic Schiff bases by means of 4D-QSAR based on simplex representation of molecular structure, SAR and QSAR in Environmental Research, 16 (3): 219-230.
- KORKMAZ, S., 2002, Paklitaxel, kesretin, ve berberinin A549, HeLa, HT-29 NIH3T3 hücre kültürlerinde sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi. Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Eskişehir.
- KOEFLER, HP., and GOLD, DWW., 1980. Human myeloid leukemia cell lines. *Blood* , 56 (3).

- KOIKAWA, M., OHBA, M., and TOKII, T., 2005. Synthesis, structures and magnetic properties of tetranuclear Ni₄ and Ni₂ Mn₂ complexes with ONO tridentate ligands, *Polyhedron*, 24: 2257-2262.
- KLEIN, E., BEN-BASSAT, H., NEUMANN, H., RALPH, P., ZEUTHEN, J., POLLIACK, A., and VÁNKY, F., 1976. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer*. 18(4): 421-31.
- KHALIL, M., M. H., ABOALY, M. M., and RAMADAN, R. M., 2005. Salicylideneimine-2 tiofenolün Schiff bazı spektroskopik ve rutenyum elektrokimyasal çalışmaları ve osmiyum. *Spectrochim Acta* 61, 157.
- LOWRY, OH., ROSBROUGH, NJ., FARR, AL., and RANDALL, RS., 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *T. Biol Chem*. 193: 265-275.
- MANDAL, A., FITZMAURICE, D., WAGHORNE, E., KOLL, A., FLAROWSKI, A., QUINN, S., and MUKHERJEE, S., 2004. Proton transfer reaction of a new orthohydroxy Schiff base at a temperature and 77 K, *Spectrochimica Acta Part A*, 60: 805- 813.
- MATSUBARA, T. and HIRAO, K., 2002. Density functional study of the binding of the cyclen-coordinated M(II) (M : Zn, Cu, Ni) complexes to the DNA base. Why is Zn better to bind, *J. Mol. Struct.*, 581:203-213.
- MEI WANG, F. L., MA, C., GAO, A., CHEN, H., and SUN, L., 2006. Mono- and binuclear complexes iron(II) and iron(III) with an N4O ligand: synthesis, structures and catalytic properties in alkane oxidation. *Dalton Trans.*, 10:2427-2434.
- MOHAMED, S.M., RAHMANI, M., WIART, C., DHALIWAL, J.S. and YUSOFF, K., 2000. Apoptotic and necrotic cell death manifestations in leukemic cells treated with methylgerambullin a sulphone from *Glycosmis calcicola*. *J. Biochem. Mol. Biol. & Biophys*, 4:253–261s.
- NARTOP, D., 2006. Aromatik Nitro Bileşiklerinin İndirgenmesiyle Hazırlanan Aminlerden Yeni Schiff Bazlarının ve Metal Komplekslerinin Sentezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, 172s.
- OKTAR, N., 2009. K562 hücre dizisinde fosfin bileşiklerinin sitotoksik etkisinin mtt (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolylBlue) le araştırılması. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 47s.
- ÖĞRETİR, C., 1979. Değişik Pirolo [3,4-d] Piridazin Türevlerinin Asitlik Sabitlerinin Bulunması ve Değerlendirilmesi, Doçentlik Tezi.
- ÖZÇELİK, A., 2011. Şanlıurfa Yöresine Ait Bazı Endemik Bitkilerin Antineoplastik Özellikleri. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 71s.
- ÖĞRETİR, C., and DEMİRAYAK, S., 1985. Bazı Benzimidazol Türevlerinin Sentezi ve Fizikokimyasal Özelliklerin İncelenmesi, TBAG-578 Nolu Proje.
- PATAI, S., 1970. Chemistry' of the carbon-nitrogen double bond, Wiley, New York.
- PATİL, M., HUNOOR, R., and GUDASI, K., 2010. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45: 2981-2986.
- PRAKASH, C. R., MEENAKSHI, K., and SHANMUGAPANDIYAN, P., 2010. Synthesis and pharmacological evaluation of novel schiff base analogues of 3-(4-amino) phenylimino) 5-fluoroindolin-2-one. *J. Young Pharm*, 2(2): 162-168.

- QUINTANA, P. J. E., PEYSTER, DE A., KLATZKE, S., and PARK, H. J., 2000. Gossypol-induced DNA breaks in rat lymphocytes are secondary cytotoxicity Toxicol. Lett. 117.
- ROYER, R.E., DECK, L.M., JAGT, T.J.V., MARTINEZ, F.J., MILLS, R.G., YOUNG, S.A. and JAGT, D.L.V., 1995. Synthesis and Anti-HIV Activity of 1,1' Dideoxygossypol and Related Compounds J. Med. Chem. 38: 2427-32.
- SALMAN, S.R., FORRONT, R.D. and LINDON, J.C., 1991. Studies of automerism in 2-Hydroxynaphthaldehyde Schiff Bases by Multinuclear Magnetic Resonance Spektrosc. Lett, 24(9): 1071- 1078.
- SARI, N., GÜRKAN, P., ÇETE, S., ve ŞAKIYAN, I., 2006. Synthesis, Potentiometric and antimicrobial activity studies on DL-amino acids-Schiff bases and their complexe, J. Coord. Chem., 32(7):511-517.
- SARIKAHYA, Y., GÜLER, Ç., ve SARIKAHYA, F., 1987. Genel Kimya II, Büyük Basımevi, Bornova/İZMİR.
- SEDAGHAT. T., MENATI, S., 2004. Synthesis and spectroscopic of new adducts of diorganotin(IV) dichlorides with an asymmetric schiff base ligand, Inorg. Chem. Com, 7:760-762.
- SİNGH, P. K., and KUMAR, D.N., 2006. Spectral studies on cobalt(II), nickel(II) and copper(II) complexes of naphthaldehyde substituted aroylhydrazones Spectrochimica Acta Part A, 64: 853-858.
- SINGHAL, SS., AWASTHI, S., OANDYA, U., PIPER, JT., JOHN, SMK., CHENG, JZ., and AWASTHI, YC., 1999. The effect of Curcumin on glutathione-linked enzymes in K562 human leukemia cells. Toxicology letters, 109: 87-95.
- SIRBU, D., CONSIGLIO, G., and GISCHIG, S., 2006. Palladium and nickel complexes of (P,N)-ligands based on quinolines. Catalytic activity for polymerization and oligomerization. J. Org. Chem, 69:1143-1150.
- SHI, L., GE, H.-M., TAN, S.-H., LI, H.-Q., SONG, Y.-C., ZHU, H.-L. and TAN, R.-X., 2007. Synthesis and antimicrobial activities of Schiff bases derived from 5-chloro-salicylaldehyde Eur. J. Med. Chem, 42(4):558-64.
- SUN. B., CHEN, J., HU, J., and LI, X., 2006. Dioxygen affinities and activities of cobalt complexes with Schiff bases containing crown ether. J. Inorg. Bio, 100:1308-1313.
- SUBHASHINI, J., MAHIPAL, S.V.K. and REDDANNA, P., 2005. Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia *in vitro*, Cancer Letters, 224(1), 31-43.
- SHRIVASTAVA, H. Y., DEVAREJ, S. N., and NAIR, B. U., 2004. A Schiff base complex of chromium(III): an efficient inhibitor for the pathogenic and invasive potential of Shigella dysenteriae, J. Inorg. Bio, 98:387-392.
- SOLİMAN, A. A., 2001. Thermogravimetric and Spectroscopic Studies on Cadmium Complexes With Two Salicylidene Thiophenol Schiff Bases. J. Therm. Anal. Calorim, 63: 221-31.
- SÖNMEZ, M., LEVENT, A., ve ŞEKERCİ, M., 2003. Synthesis and characterization of Cu(II), Co(II), Ni(II), and Zn(II) complexes of a Schiff base derived from 1-amino-5-benzoyl-4-phenyl-1H-pyrimidine-2-one 3-hydroxysalicylaldehyde Synth. React. Inorg. Met.:Org. Chem. 33:1747-61.

- SZLYK, E. BARWIOLEK, M., KRUSZYŃSKI, R., and BARTCZAK, T. J., 2005. Synthesis and spectroscopic studies of the optically active copper(II), cobalt(II) and nickel(II) complexes with Schiff bases *N,N'*-(1*R*,2*R*)(-)-1,2-cyclohexylenebis(3-methoxybenzylideneiminato), *N,N'*-(1*R*,2*R*)(-)-1,2-cyclohexylenebis(5-methoxybenzylideneiminato) and X-ray diffraction structure of the [Cu(II)(1*R*,2*R*)(-)]₂chxnbis(5-methylbenzylideneiminato)₂. *Inorganica Chimica Acta*, 35: 3642-3652.
- SOLİMAN, A. A., and MOHAMED, G. G., 2004. Study of the ternary complexes of copper with salicylidene-2-aminothiophenol and some amino acids in the solid state. *J. Thermochim. Acta*, 421: 151-59.
- SCHILF, W., KAMIENSKI, B., KOLODJIEZ, B., and GRECH, E., 2004. The NMR study of hydrogen bond formation in some tris(((salicylidene)amino)ethyl)amine derivatives in solution and in the solid state. *J. Molecular Structure*, 708:33-38.
- ŞENCAN, S., 2006. Warfarin' in Sitotoksik Etkisinin K562 Lösemik Hücre Soyunda Çalışılması. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 56s.
- VANCO, J., SVAJLENOVA, O., RACANSKA, E., MUSELIK, J., and VALENTOVA J., 2004. Antiradical activity of different copper(II) Schiff base complexes and their effect on alloxan-induced diabetes, *J. Trace Elements in Medicine and Biology*, 18:155-161.
- YANO, C.L. and MARCONDES, M.C.C.G., 2005, Cadmium chloride-induced oxidative stress in skeletal muscle cells in vitro. *Free Radical Biology & medicine*, 39(10): 1378-1384.
- YILDIZ, M., KILIÇ, Z. ve HÖKELEK, T., 1998. Intramolecular hydrogen bonding and tautomerism in Schiff bases. Part 1. Structure of 1,8-di[N-2-oxyphenyl-salicylidene]-3,6-dioxaoctane *J. Mol. Struct.*, 441: 1.
- YILMAZ, İ. 2003. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of the Schiff bases derived from 2,4-disubstituted thiazoles and 3-methoxysalicylaldehyde, and their cobalt(II), copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes. *Transition Metal Chemistry*, 28(4), 399 – 404.
- YILDIZ, M., ÜNVER, H., DÜLGER, B., ERDENER, D., OCAK, N., ERDÖNMEZ, A. ve DURLU, T.N., 2005. Spectroscopic study, antimicrobial activity and crystal structures of N-(2-hydroxy-5-nitrobenzalidene)4-aminomorpholine and N-(2-hydroxy-1-naphthylidene)4-aminomorpholine. *J. Mol. Struct.*, 738: 253-260.
- ZHAO, C., DODIN, G., YUAN, C., CHEN, H., ZHENG, R., JIA, Z., and FAN, B. - T., 2004. "In vitro protection of DNA from Fenton reaction by plant polyphenol verbascoside", *Biochimica Biophysica Acta*, 1723:114-123.
- WADE, L. G., 1999. *Organik Chemistry*, 4th edi., Prentice Hall PTR, USA,1256.
- WALSH, C.T., 1995. Orme-Johnson, *Biochemistry*, 26, 4901 1987 substituted 2-hydroxy-1-naphthylideneanilines in dioxan-water mixtures. *Talanta*, 42: 1875-1882.
- WINTER, S., SEICHTER, W., and WEBER, E., 2004. Syntheses and crystal structures of cobalt and nickel complexes of 2,6-bis(hydroxymethyl)pyridine. *J. Coord. Chem*, 57(12):997-1014.

- WANG, W. W., and JIN, G. -X., 2006. Binuclear neutral nickel complexes bearing bis(bidentate) salicylaldiminato lidands: Synthesis, structure and ethylene polymerization behavior. *Inorg. Chem. Com.*, 9:548-550.
- WOJCIECHOWSKI. G., PRZYBYLSKI, P., SCHILF, W. KAMIEN'SKI, B. and BRZEZIŃSKI, B., 2003. Spectroscopic studies of Schiff bases of 2,2'-dihydroxybiphenyl-3-carbaldehyde and *para* substituted anilines. *J. Molecular Structure* 649:197-205.
- WEYERMANN, J., LOCHMANN, D.,and ZIMMER, A., 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays, *International Journal of Pharmaceutics*, 288: 369-376.



ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Hatay'da doğdu. Hatay' da başladığı ilköğretimini Kahramanmaraş'ta tamamladı. Liseye Kahramanmaraş' ta devam etti ve mezun oldu. Harran Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde 2007' de başladığı lisans eğitimini 2011 yılında tamamladı. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı' nda yüksek lisans eğitimine başladı ve devam etmektedir.

İletişim Bilgileri;

tubamelekolak@hotmail.com.



ÖZET

Günümüzde kanser tedavisinde kimyasal ve bitkisel kaynaklı kemoterapötik ajanların başarıyla kullanılmasının yanında henüz ideal sayılabilecek kemoterapötik bir ajan bulunmamaktadır. Yapılan birçok çalışmada Schiff bazlarının antimikrobiyal ve antitümöral etkisinin olduğu bilinmektedir. Yeni kemoterapötik ajan araştırmalarına katkıda bulunmak amacıyla, çalışmamızda sterik engelli salisilaldiminlerin K562 kanser hücre dizisi üzerine sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Bileşikler ve kontrol olarak kullanılan 5-Fluorourasil 15.6 µM, 31.2 µM, 62.5 µM, 125 µM, 250 µM, 500 µM, 1000 µM dozlarında K562 hücre dizisi üzerine uygulanmıştır. Tripın Blue yöntemi ile canlı hücre yüzdesi belirlenmiştir. Sterik engelli salisilaldimin 2,4-di-tert-butil-6-[[2-metilfenil] imino] metil}-fenol, 2,4-di-tert-butil-6-[[4-metilfenil] imino] metil}-fenol, 2,4-di-tert-butil-6-[[4-metoksifenil] imino] metil}-fenol, 2,4-di-tert-butil-6-[[4-terts-bütülfenil] imino] metil}-fenol, bileşikleri sitotoksikite belirlenmesinde kolorimetrik bir yöntem olan MTT yöntemi kullanılmıştır. Bileşiklerin % sitotoksisiteleri, istatistiksel analizleri ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. En yüksek sitotoksik etkinlik Bileşik 4' ün 1000 µM dozunda (%49.4) saptanmıştır. Aynı zamanda Bileşik 2' nin 125 µM dozunda (%46.6) sitotoksik etkinlik bulunmuştur. En düşük doz olan 15.6 µM dozu için en düşük sitotoksik etki % -8.5 bulunmuş olup bu dozda en yüksek etki ise % 29.6 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar çalışmamızda kullanılan bileşiklerin değişen dozlarda kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Fakat farklı doz uygulamalarında dahi referans ilacımızdan daha yüksek bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu söyleyemeyiz. Kemoterapötik ajan adayı olabilecek bu bileşiklerin farklı hücre serileri üzerine denemesinin yararlı olacağına inanmaktayız.

SUMMARY

Today there is no chemotherapeutic agent which may be regarded as ideal besides successful use of chemical and herbal chemotherapeutic agents in treatment of cancer. Several studies demonstrated antimicrobial and antitumor effect of Schiff bases. In our study cytotoxic effects of sterically hindered salicylaldimines on K562 cancer cell line was investigated with the aim of contributing new chemotherapeutic agent researches. Compounds and 5 Fluorouracil used as control was administered on K562 cell line at 15.6 μM , 31.2 μM , 62,5 μM , 125 μM , 250 μM , 500 μM , 1000 μM doses. Trypan Blue method was used to determine percentage of viable cells. MTT colorimetric method was used to measure cytotoxicity of sterically hindered salicylaldimine 2, 4-di-tert-butyl-6- { [(2- methylphenyl) imino] methyl } –phenol, 2, 4-di-tert-butyl-6- { [(4- methylphenyl) imino] methyl } –phenol, 2, 4-di-tert-butyl-6- { [4-methoxyphenyl) imino] methyl } –phenol, 2, 4-di-tert-butyl-6- {[4-tert-butylphenyl) imino] methyl }-phenol compounds. Percentage of cytotoxicity, statistical analysis and IC_{50} values of compounds are calculated. The highest cytotoxic effect is determined at 1000 μM dose of Compound 4 (49.4 %). Also cytotoxic effect was determined at 125 μM dose of Compound 2 (46.6 %). The lowest cytotoxic effect for 15.6 μM , which was the lowest dose, was determined as -8,5 % and highest effect for this dose was determined as 29,6 %. These results demonstrated that compounds in various doses used in our study had cytotoxic effect on cancer cells. But even in different dose applications we cannot say that it had a higher cytotoxic effect then our reference drug. We believe that it will be useful to test these compounds, which may be chemotherapeutic agent candidates, on different cell lines.