



**BAKIR (II) İYONUNUN KARIŞIK LİGAND KOMPLEKSLERİNİN  
İN VİTRO SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN  
SAĞLIKLI VE KANSER HÜCRE HATLARINDA BELİRLENMESİ**

**Muhammed Fawaz ABDULLAH**



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAKIR (II) İYONUNUN KARIŞIK LİGAND KOMPLEKSLERİNİN İN VİTRO  
SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN SAĞLIKLI VE KANSER  
HÜCRE HATLARINDA BELİRLENMESİ**

**Muhammed Fawaz ABDULLAH**

Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ  
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2017


**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAYI


Muhammed Fawaz ABDULLAH tarafından hazırlanan "Bakır (II) iyonunun karışık ligant komplekslerinin in vitro sitotoksik ve genotoksik etkilerinin sağlıklı ve kanser hücre hatlarında belirlenmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman :** Prof. Dr. Nilüfer ÇINKILIÇ

**Başkan :** Prof. Dr. Nilüfer ÇINKILIÇ  
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Bölümü

 İmza


**Üye :** Prof. Dr. Rahmiye AYDIN  
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Kimya Bölümü

 İmza

**Üye :** Yrd. Doç. Dr. Gökçe TANER  
Bursa Teknik Üniversitesi Doğa Bilimleri  
Biyomühendislik Bölümü

 İmza

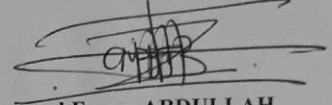
Yukarıdaki sonucu onaylarım

  
Prof. Dr. Ali BAYRAM  
Enstitü Müdürü  
7...12.2017

**U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
  - görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
  - başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
  - atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
  - kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
  - ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı
- beyan ederim.**

07.07.2017



**Muhammed Fawaz ABDULLAH**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### BAKIR (II) İYONU KARIŞIK LİGAND KOMPLEKSLERİNİN SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN SAĞLIKLI VE KANSER HÜCRE HATLARINDA BELİRLENMESİ

**Muhammed Fawaz ABDULLAH**

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

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

Bakır, hem sağlıkta hem de patolojide temel rol oynayan önemli bir eser element olup giderek çok sayıda kanser tipinin moleküler patogeneğinde rol oynamaktadır. Günümüzde genel kemoterapötik uygulamalarda koordinasyon komplekslerinde cisplatin'in yerini alma konusunda uygunluğu gösterilmiştir. Bu çalışmada iki yeni suda çözünebilen bakır (II) karışık ligand kompleksi ile adenokarsinomik insan alveoler bazal epitel, A549 ve kanserli olmayan insan bronşiyal epitel, BEAS-2B hücre hatlarında antikanser etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bunun için XTT testi (sitotoksosite), Komet testi (genotoksosite) ve DCFH-DA (ROS) testleri kullanılmıştır. A549'da kompleks 1'in istatistiksel olarak önemli antiproliferatif aktiviteleri gözlenmiştir. Comet ve DCFH-DA analizlerinde, kompleks 2 kompleks 1'e göre kanser hücresinde daha genotoksik etki gösterdiği ve ayrıca kanser hücresinde de yüksek ROS oluşumu indüklerken normal hücrelerde anlamsız derecede düşük bir ROS artışı saptanmıştır. Bu sonuçlar ancak ön hazırlık niteliğindedir ve daha iyi tedavi uygulaması için, bu ajanların hücresel etkisi ve işlevsel etkileşimlerini daha iyi bir şekilde anlamamız için ileri çalışmalar gereklidir.

**Anahtar Kelimeler:** Bakır (II), Kemoterapi, Karışık ligand kompleksleri, Antikanser etkileri, Sitotoksosite, Genotoksosite, XTT test, KOMET test, ROS, DCFH-DA test

**2017, vii + 63 sayfa**

## ABSTRACT

MSc Thesis

THE CYTOTOXIC, GENOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF MIXED  
LIGAND COMPLEXES OF COPPER (II) ION IN HEALTHY AND CANCER CELL  
LINES *IN VITRO*

**Muhammed Fawaz ABDULLAH**

Uludag University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

**Supervisor:** Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ

Copper is an essential metalloelement that plays key fundamental roles in both health and pathology, and is increasingly been implicated in molecular pathogenesis of a lot of cancer types and has shown promise as a replacement to cisplatin in coordination complexes presently in mainstream chemotherapeutic practices. In this study two novel water-soluble ternary copper (II) mixed ligand complexes; complex 1: (Cu(4-mphen)(tyr)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub>·2H<sub>2</sub>O) and complex 2: (Cu(5-mphen)(tyr)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub>·2H<sub>2</sub>O where (4-m = 4-methyl; 5-m = 5 - methyl; phen - 1, 10 = phenanthroline; tyr = tyrosine)), were investigated on adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cell, A549 and non-cancerous human bronchial epithelial cell, BEAS-2B for their anticancer effects using the XTT assay (cytotoxicity), Comet assay (genotoxicity) and DCFH-DA assay (ROS) tests. A more statistically significant antiproliferative activities of complex 1 was observed in A549. In Comet and DCFH-DA assays, complex 2 showed more genotoxic potency than complex 1 and further indicated a significantly higher ability to induce ROS formation in the cancer cell, but a minimal insignificant ROS rise in normal cells. These results can only be preliminary and further studies are necessary to better understand the cellular effects and functional interactions of these agents, for better therapeutic application.

**Keywords:** Copper, Chemotherapy, Mixed ligand complexes, Anticancer Effects, Cytotoxicity, Genotoxicity, XTT Test, Comet test, DCFH-DA assay, ROS

**2017, vii + 63 pages**

## TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım boyunca bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum değerli Sayın Hocam Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ'a,

Bu süreçte ilgisi ve pozitif enerjisi ile her zaman bana destek olan sevgili hocam Prof. Dr. Tolga Çavaş'a ve Prof. Dr. Serap Ç. Kasımoğulları'ya

Deneylerimizde kullandığımız bakır kompleksleri sentezleyen sevgili hocam Prof. Dr. Rahmiye AYDIN ve Doktora öğrencisi Duygu İNCİ

Tez deneylerimde, deneyimlerimden ve yardımlarımdan faydalandığım, deney aşamasında yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen sevgili hocam Doç. Dr. Özgür VATAN'a

Deney aşamasında yardımcı olan sevgili arkadaşım Huzeyfe HURİYET'e,

Tüm bu önemli süreçte destek ve yardımlarını devamlı üzerimde hissettiğim, evlatları olmaktan büyük gurur ve mutluluk duyduğum sevgili örneğim bu hayatta ve canım Rahmetli babam'a ZAKARIYYA YAKUBU, annem HASSANA YUSSIF'e ve daima canım ailem ve kardeşlerime.

Her an yanımda olup bu süreçte sevgisi ve ilgisi ile bana destek olmak için elinden geleni yapan biricik Hocalarım Bulent ALBAYRAK'a, Mehmet AYDEMİR'e ve Salih YAZICI'ya, ve tüm TÜRKİYEM'e ve GANA'ya

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1. Kanser küresel istatistikler ve Türkiye'nin durumu.....	4
2.2. Kanserde Kemoterapi: Geçmişten anlayışlar ve Gelecek Yönleri.....	5
2.3. Bakır ve Bakır Kompleksleri – Moleküler Biyolojik Yaklaşım.....	7
2.4. 1, 10–Fenantrolin İçeren Bakır (II) Kompleksleri .....	10
2.5. DNA'yı hedefleyen bakır kompleksleri.....	14
2.5.1. Proteazomu inhibe eden Bakır Kompleksleri.....	15
2.5.2. Bakır komplekslerinin DNA üzerindeki dolaylı etkileri.....	18
2.6. Hücre-Temelli Canlılık Testleri.....	23
2.6.1. Tetrazolyum İndirgenme Testleri.....	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
3.1. Kullanılan Ekipmanlar, Sarf Malzemeler.....	26
3.2. Kullanılan Hücre Hatları.....	28
3.2.1. Hücre Kültürü Şartları.....	28
3.3. Kullanılan Kompleksler.....	28
3.4. XTT Testi.....	28
3.5. Komet Testi.....	29
3.6. ROS Ölçümü .....	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. XTT Bulguları.....	33
4.2. Komet Testi Bulguları.....	35
4.2.1. Kuyruk Uzunluğu Bulguları.....	35
4.2.2. Kuyruk %DNA Bulguları.....	39
4.2.3. OTM (Olive Kuyruk Momenti) Bulguları.....	43
4.3. ROS Bulguları.....	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	51
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	64



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

$\mu\text{L}$

$\mu\text{m}$

Cu

H

Fe

mg

mL

NaCl

NaOH

$^{\circ}\text{C}$

V

mA

### Açıklama

Mikrolitre

Mikrometre

Bakır

Hidrojen

Demir

Miligram

Mililitre

Sodyum Klorür

Sodyum Hidroksit

Selsius Derece

Volt

Miliamper

### Kisaltmalar

DMSO

DNA

EDTA

EtOH

LMA

OTM

PBS

RNA

ROS

Phen

### Açıklama

Dimetil Sülfoksit

Deoksiribo Nükleik Asit

Etilen Diamin Tetra Asetikasit

Etanol

Low Melting Agarose

Olive Tail Moment

Phosphate Buffered Saline

Ribo Nükleik Asit

Reactive Oxygen Species

Fenantrolin

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Türkiye’de 2006 sık görülen kanser türlerinin cinsiyete göre dağılımı.....	4
Şekil 2.2.	Oksijen Biyokimyasındaki Bakırın Rolü.....	9
Şekil 2.3.	Fenantrolin, Bipiridin ve Terpiridin.....	11
Şekil 2.4.	[Cu(phen) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> in DNA’yı kesme mekanizması.....	13
Şekil 2.5.	Bakır’ın proteazom inhibisyonu.....	18
Şekil 2.6.	Bakır’ın ROS oluşumu.....	20
Şekil 2.7.	Bakır-Mitokondriyel DNA ilişkisi.....	22
Şekil 2.8.	Hücre’deki XTT tuzu değişimin reaksiyonu.....	24
Şekil 4.1.	kompleks 1 ve 2’nin A549 BEAS-2B IC <sub>50</sub> değer’in (µM) çubuk grafiği.....	34
Şekil 4.2.	Kompleks 1’in A549 BEAS-2B KU bulguları çubuk grafiği.....	36
Şekil 4.3.	Kompleks 2’nin A549 BEAS-2B KU bulguları çubuk grafiği.....	38
Şekil 4.4.	Kompleks 1’in A549 BEAS-2B kuyruk %DNA bulguları çubuk grafiği.....	40
Şekil 4.5.	Kompleks 2’nin A549 BEAS-2B kuyruk %DNA bulguları çubuk grafiği.....	42
Şekil 4.6.	Kompleks 1’in A549 BEAS-2B OTM bulguları çubuk grafiği.....	44
Şekil 4.7.	Kompleks 2’nin A549 BEAS-2B OTM bulguları çubuk grafiği .....	46
Şekil 4.8.	Kompleks 1’in A549 BEAS-2B hücre hatlarında elde edilen ROS bulguların kıyaslama çubuk grafiği .....	49
Şekil 4.9.	Kompleks 2’nin A549 BEAS-2B hücre hatlarında elde edilen ROS bulguların kıyaslama çubuk grafiği .....	50

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelgeler	sayfa
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan ekipman.....	26
Çizelge 3.11. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.....	27
Çizelge 4.1. A549 BEAS-2B hücre hatlarında IC <sub>50</sub> konsantrasyonun bulguları.....	33
Çizelge 4.2. A549 Beas-2B Kompleksi 1 ve 2'nin KU bulguları.....	35
Çizelge 4.3. A549 Beas-2B Kompleksi 1 ve 2'nin kuyruk %DNA bulguları.....	39
Çizelge 4.4. A549 Beas-2B Kompleksi 1 ve 2'nin OTM bulguları.....	43
Çizelge 4.5. A549 Beas-2B Kompleks 1 ve 2'nin ROS bulguları.....	47

## 1.GİRİŞ

Biyomedikal İnorganik Kimya (Elemental Tıp) kimyanın yeni ve hızlı gelişen alanıdır ve antikanser tedavisinde de önemli fırsat ve potansiyellere sahiptir. Terapötik ve teşhis tıbbi alanlarda yaşanan bu gelişmeler hastalıkları daha iyi anlayabilmek ve tedavi yaklaşımları için önemli ipuçları sunmaktadır. Bu alanın metalloproteinler veya metal iyonu dengeleşimine bağlı hastalıklarınbiyolojik mekanizmasının açıklanmasında tıba önemli katkısı bulunmaktadır. Metal iyonlarıyla veya metalloproteinler ile ilgili hastalıklar amitrofik lateral skleroz (Lou Gehrig hastalığı: Cu/Zn süperoksit dismutaz), Wilson ve Menkes hastalığı (Bakır proteinleri), Alzheimer hastalığı (B-amiloid: Alüminyum, Bakır, Çinko, Demir) ve Creutzfeldt-Jakob hastalığı (diğer adıyla 'Deli İnek' hastalığı: Prion Proteini, Bakır) olarak sıralanabilir (Tisato ve ark. 2010).

Sağlığımız için önemli metal kompleksleri endojen (içsel) (Metaloproteinlerde bulunanlar gibi) ve ekzojen olarak ikiye ayrılır. Ekzojen metal kompleksleri kontrollü bir şekilde bilinçli olarak ilaç veya teşhis ajanı şeklinde veya kontrolsüz olarak istemeden hava veya diyetdeki kirleticiler yoluyla vücuda alınabilir. Bazı organik ilaç ajanları veya kirleticiler vücuttaki metal hedeflere yönelir ya da işlevsel olmaları için metal ile bağlanması gerekli olabilir. Örneğin antikanser ajan bleomisin, demir ve dioksijen ile bağlanmalıdır. Metal komplekslerin farmakolojik aktivitesi metale, ligandlarına ya da her ikisine bağlıdır. Tıbbi uygulama için metal komplekslerinin ya da ligandların tasarımında termodinamik stabilite ve selektivite çok önemli iki faktördür (Ruiza-Azuara ve ark. 2010).

Periyodik tablodaki metal iyonları sadece ilginç reaktivite ve spektroskopik özelliklere sahip değildir aynı zamanda çok çeşitli bağlama modu ve geometri gösterirler. Bağlama modu inert veya labile bağları oluşturabilen, birden onikiye kadar koordinasyon sayıları arasında kalan ve çok sayıda geometrisi; doğrusal, trigonal düzlemsel, tetrahedral, oktahedral ve diğerleri de olan metallerdir. Böylece karbon bazlı bileşikler ile olmayan terapötik molekülleri, çok farklı şekil ve yapıda metal iyonları ile tasarlayarak tedavi edici moleküller oluşturulabilmektedir (Ruiza-Azuara ve ark. 2010).

Tarihsel olarak, metal içerikli maddeler anti-tümör potansiyeli açısından test edilmiştir. Metal içerikli ilaçta en önemli keşif Cisplatin (Cis-diamminedichloroplatinum (II), Cis-DDP, CDDP) 'dir. Biyo-İnorganik Tıbbi Kimya açısından cisplatin başarısı özellikle

önemlidir; çünkü (i) ilaç gerçekten inorganiktir ve (ii) bu bileşik en az bir tür kanseri (testis kanseri) tedavi edebilmiştir. Bu sebeple araştırmacılar zamanla kullanılan platin bileşiklerinin farmakolojik özellikleri daha üstün yeni analoglarını (karboplatin ve oksaliplatin) tasarlamışlardır, (Navarro ve ark. 1999, Kelland 2000).

Antitümör ajanların seçici toksisiteye sahip olmaları beklenir ki klinikte kullanıma uygun olsun. Çoğu yüksek aktiviteye ve birçok ilginç özelliğe sahip antitümör bileşiklerin ilaç haline dönüşmemiş olmasının nedeni de eksik fizikokimyasal özelliklerinden, örneğin düşük suda çözünürlük, suda instabilite, çözücü, nem, ışık veya havaya maruz kalma sonunda ayrışmalarından kaynaklanmaktadır. Seçici toksisite ve farmakolojik özellikleri kontrol etme karmaşıklığı yüzünden araştırmacılar metal bazlı ilaçları geliştirmede tereddüt etmektedirler. Sonuç olarak metal içerikli ilaçlar organik ilaçlara göre önemli oranda in vitro olarak düşük dozda sitotoksik olmasına rağmen, in vivo tümör modellerinde ayrıntılı araştırılmamıştır (Huang ve ark. 2005). Örneğin klinikte kullanılan 48 antineoplastik ajandan sadece üç metal bazlı ilaç; Cisplatin, karboplatin ve Oksaliplatin dünya çapında kullanımdadır (Kelland 2007).

Huang R. ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yayınlanan son çalışmalarında, Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute) veri tabanına ait 1100'den fazla metaloid veya metal bazlı bileşiğin sitotoksisite profilleri ve antitümör potansiyeli analiz edilerek sınıflandırılmıştır. Bileşikler moleküler özellikleri ve reaktivitesi, metalin özelliği, ligandları ve tümör hücre büyümesini inhibe etmesine göre analiz edilmiştir. Metal bazlı bileşikler etki mekanizmalarına göre (i) sülfidril grubu (SH) bağlanma tercihi; (ii) şelatör ve metal kompleksleri; (iii) reaktif oksijen türlerini (ROS) ve oksidatif stresi oluşturması ve (iv) lipofilik iyon üretimi olarak dört grupta sınıflandırılabilir (Huang ve ark. 2005).

Metal-bazlı anti-kanser ilaç tasarımında (DNA'yı hedef alan klasik ilaçlardan tiol içerikli proteinler ve redoks süreci de dahil olmak üzere alternatif yeni moleküler hedefleri olan ilaçlar gibi) çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır (Fricker 2007). Ayrıca ilaçların tasarlanması ve gelişmesinde tümörlerin hücresel süreçleri ve kontrollü dışsal aktivasyon (ışık ile aktivasyon gibi) ilacın seçici olarak aktive edilmesi için kullanılmaktadır, yani pro-ilaç olarak tasarlanmaktadır (Van ve ark. 2009, Ronconi ve ark. 2007).

Biyolojik sistemlerdeki bakır iyonunun gerekliliği eskiden beri bilinmektedir (Uauy ve ark. 1998). Birçok kritik proteinin yapısının içeriği olan bakır iyonu, katalitik

faaliyetlerde yer almaktadır ve düzenleyici işlevler için çok önemlidir. İnsan vücudunda ortalama bakır içeriği yaklaşık 100 mg olarak bilinmektedir. Fakat hücrelerde neredeyse hiç serbest bakır iyonu bulunmamaktadır (Rae ve ark. 1999). Ayrıca bakır iyonu biyolojik sistemlerde genellikle 2 oksidasyon durumunda mevcuttur; Kupros ( $\text{Cu}^{1+}$ , indirgenmiş) ve kuprik ( $\text{Cu}^{2+}$ , oksitlenmiş) halinde (Uauy ve ark. 1998). Birçok protein, bakırın redoks aktivitesinden faydalanıp azot, oksijen ve kükürt gibi çeşitli ligantları bağlayarak biyomolekülleri etkileyebilecek çok çeşitli kompleksleri oluşturmaktadır. Bakır ya temel bir eser element olarak ya da insanlarda çeşitli eksojen bileşiklerin içinde yer alarak önemli ölçüde biyokimyasal etki göstermektedir.

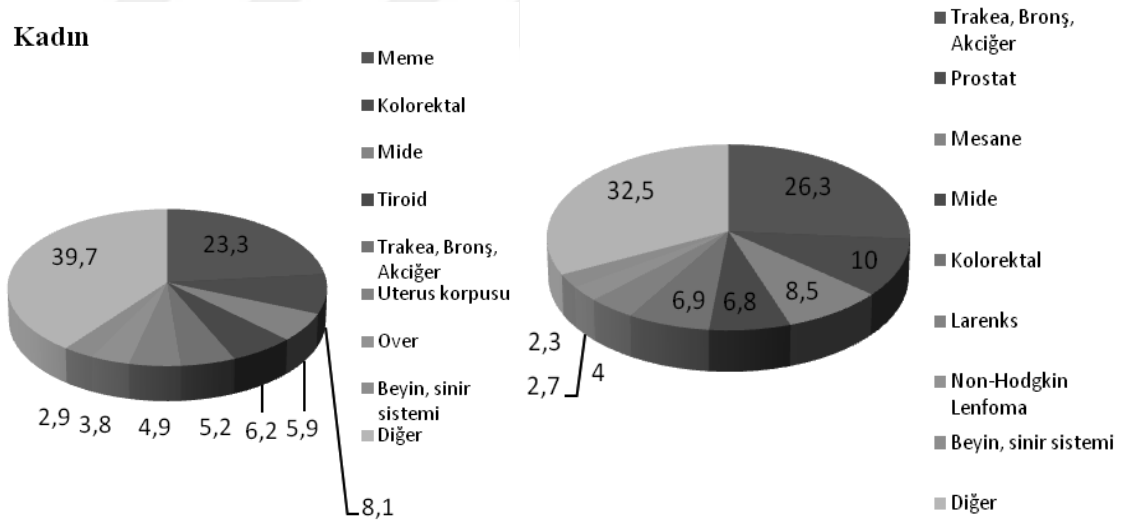
Birçok çalışma bakır homeostazının demir metabolizması (Arredondo ve ark. 2005) ile ilişkisinin yanı sıra insan fizyolojisi ve patolojisi ile ilgili biyolojik süreçlerde bakırın rolünü göstermektedir (Uriu-Adams ve ark. 2005, Crisponi ve ark. 2010). Bakır homeostazının bozulması patolojik olup, nörolojik dejeneratif (Waggoner ve ark. 1999, Cerpa ve ark. 2005), kardiyovasküler yapısal ve işlevsel kusurları (Nath 1997, Klevay 2000), kemik metabolizma bozukluğu (Strause ve ark. 1986, Eaton-Evans ve ark. 1996), kas sistem hastalıkları (Vonk ve ark. 2008, Rayman ve ark. 2008) ve inflamatuvar cevapların deregülasyonu (Rayman ve ark. 2008, Brewer 2005) gibi ciddi sağlık sorunlarının nedenidir.

Son zamanlarda, bakır (II) karışık ligant kompleksleri CASIOPEINAS® adında patentli bir terapötik ilaç geliştirilmiştir.

## 2. Literatür Özeti

### 2.1. Kanserin küresel istatistikleri ve Türkiye'nin durumu

Türkiye’de erkeklerde en sık görülen kanser türü akciğer kanseri olup, tüm kanserlerin %26’sını oluşturmaktadır. Akciğer kanserinden sonra ikinci sırada prostat kanseri (%10) bulunmakta, bunu mesane (%8,5), kolorektal (%6,9) ve mide kanserleri (%6,8) izlemektedir. Kadınlarda ise meme kanseri ilk sırada yer alır iken (%23,3), kolorektal (%8,1), tiroid (%6,2), mide (%5,9) ve akciğer (%5,2) kanserleri yaygın görülen diğer kanser türleridir. 2010 yılında aktif metotla veri toplayan ve elverişli bütünlük ve geçerliliğe ulaştığı belirlenen İzmir, Antalya, Bursa, Eskişehir, Samsun, Trabzon, Edirne ve Erzurum nüfus tabanlı kanser kayıt merkezinin 2006 yılı verilerine dayanarak Türkiye’de her sene erkeklerde 91000, kadınlarda 61000 olmak üzere toplam 152000 yeni kanser vakası ortaya konmaktadır. Erkek ve kadınlarda en sık görülen kanserler Şekil 2.1’de sunulmuştur (Eser ve ark, 2010).



**Şekil 2.1.** Türkiye’de 2006 yılında sık görülen kanser türlerinin cinsiyete göre dağılımı (Anonim 2012a)

Türkiye’de 2014 yılında yaşa standardize kanser hızı erkeklerde yüz binde 246,8 kadınlarda ise yüz binde 173,6’dır. Toplamda kanser insidansı ise yüz binde 210,2’dir. Türkiye’de toplam 163417 kişiye yeni kanser teşhisi konulmuştur. Son 5 yıl verileri değerlendirildiğinde; hem kadınlarda hem de erkeklerde istatistiksel açıdan kanser sıklığında herhangi bir artış ya da azalış olmadığı söylenebilir (Anonim 2016).

Türkiye’de ise kadınlardaki kanser ölümlerinin en sık görülen ilk iki nedeni akciğer/larinks kanserleriyle meme kanseridir. Erkelerde kansere bağlı ölümlerin en büyük kısmını (%42) akciğer ve larinks kanserleri oluşturmaktadır. (Anonim 2012b; Anonim 2012a).

Dünyada nadir görülmesine karşın Türkiye açısından önem taşıyan bir kanser türü de malign mezotelyomdur. Genellikle mesleki asbest maruziyetine bağlı olarak gelişen malign mezotelyom, Türkiye’de bazı bölgelerde, özellikle kırsal alanlarda, jeolojik yapıdaki ak toprak” veya “çorak toprak” olarak adlandırılan erionit içeren toprağın, ısı ve su yalıtımı amacıyla evlerin çatısında örtü, duvarlarında sıva-badana amacıyla yaygın olarak kullanılmasına bağlı olarak çevresel maruziyet nedeniyle endemik olarak ortaya çıkmaktadır. Bu durum ilk olarak otuz yıl önce İzzettin Barış ve arkadaşlarının, Kapodokya’dan gelen malign mezotelyom hastalarının dikkatlerini çekmesi ile başladıkları epidemiyolojik çalışmalarla ortaya konmuştur (Barış ve ark. 1978; Barış ve ark. 1988).

Sonuç olarak ülkemizde en sık görülen kanser türlerinin önlenabilir nitelikte olduğu söylenebilir. Bu durum, Türkiye’de kanser kontrol faaliyetlerinin başarısı için koruyucu ve önleyici halk sağlığı müdahalelerine öncelik verilmesi, sağlık hizmetlerine erişimin önündeki engellerin ortadan kaldırılarak erken tanı ve tedavi olanaklarının artırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır (Anonim 2016).

## **2.2. Kanserde Kemoterapi: Geçmişten anlayışlar ve Gelecek Yönleri**

Paul Ehrlich tarafından 1900'lerin başında enfeksiyon hastalıkları için kimyasal bir ilacın geliştirilerek hastalık tedavisinde kullanımına 'kemoterapi' terimini ortaya çıkmıştır. Ehrlich daha sonra 1908 yılında, tavşan modelinde sifiliz tedavisi için arsenik içeren kimyasal maddeler geliştirmiştir. Kanser tedavisinde kullanılacak kimyasalların potansiyel farmakolojik aktivelere belirlenmesi için hayvan (tavşan) test modeli kullanarak etkinliğini ilk belgeleyen kişi olmuştur ve bu kanser ilacı geliştirmede önemli bir başarıdır. Kanser tedavisinde anilin boyalarını (ilk ilkel alkilleyici ajan) ilk kez test etmiştir (DeVita ve ark. 2008). Sonraki yıllar Roswell Park Memorial Enstitüsünde George Clowes tarafından kemirgenlerde ilk transplante tümör sisteminin geliştirilmesi ve test modeli sisteminin standardizasyonundan sonra, sarkom 37 (S37), Sarkom 180 (S180), Walker 256 ve Ehrlich's asites tümör (farelerde tüm kanserojen-kaynaklı



tümörler) gibi ideal kanser ilacı test modelleri belirlenmiştir. Bunlar sayesinde çok sayıda anti-kanser kimyasalın taranması mümkün olmuştur (Goldin ve ark. 1979; Hirschberg E. 1963; Shear ve ark. 1947; Zubrod ve ark. 1966; Boyland E. 1938; Yoshida T. 1949). Ardından 1939 yılında, Charles Huggins meme kanseri üzerindeki östrojenin etkilerinin erken gözlenmesine dayanarak hormon ile prostat kanseri olan erkekleri tedavi ederek asit fosfataz seviyelerinde azalma yanıtı belirlemiştir. Bu ise hormon terapisi için değerli bir başlangıçtır (Huggins ve Hodges 1941).

On yıllık bir dizi model geliştirme çalışması süresince kanser kemoterapisinde kullanılan birçok antikanser ajanı; Gustaf Lindskog's Non-Hodgkin lenfoma'da azot gazı, Farber's çocukluk Lösemisi ve Pediyatrik tümörlerde Aktinomisin D (antitümör antibiyotik), Heidelberg tarafından kolorektal kanserlerde (ve diğer katı tümörler) floropirimidin 5-florourasil (5-FU), Hitchings ve Elion akut lösemide 6-thioquanine ve 6-merkaptopurin olarak ortaya konmuştur (DeVita ve ark. 2008). 20. yüzyılın ikinci yarısında kanserin tedavisinin araştırılması çabaları yukarıdaki ve daha fazla sayıda sitotoksik ajanın keşfedilmesini sağlamıştır. Bu keşifler, üç (3) temel prensibi sorgulamak üzere kurgulanmaktaydı: i. bu ajanlar tarafından kanser hücreleri ve tümörlü doku nasıl öldürülmektedir, ii. ajan normal hücre yerine kanserli hücreyi niye tercih eder, iii. son olarak ileride kanser hücrelerinin direnç gelişme mekanizması nasıl önlenir? C. Heidelberg ve arkadaşları tarafından sıçan hepatokarsinoma kanser hücrelerinde normal dokulara göre urasil daha yüksek bir alım ve kullanım önceliği gösterdiğinin belirlenmesi üzerine bir florun urasil 5-C konumuna eklenip floropirimidin 5-fluorourasil (5-FU) sentezlenmesi hedefli tedavide bir ilk olmuştur. Halen bu maddenin katı tümör kanserlerinde, özellikle kolorektal kanserde geniş spektrumlu etkileri vardır (Heidelberg ve ark. 1957).

Yukarıdaki sorular kanser biyolojisinde daha kapsamlı bir çalışma döneminin başlangıcı olarak daha yeni moleküllerin tasarlanmasına yol açmıştır. Kanser hücrelerinde oluşan moleküler bozukluklar hakkında bilgi elde edilmeye başlanınca genel bir tarama yerine belirli kritik moleküler hedeflere karşı tarama yapılması tercih edilmiştir. Monoklonal antikörlerin ortaya çıkması kemoterapinin etkinliğini arttırmıştır. Her ne kadar kendi başına kemoterapi ajanı olmasalar da, meme kanserinde trastuzumab, kolorektal kanserde setuksimab ve bevacizumab ve non-Hodgkin lenfomada rituksimab gibi monoclonal

antikorların kemoterapi ile birlikte kullanıldığında iyi sonuç verdiği görülmektedir (DeVita ve ark. 2008).

### **2.3. Bakır ve Bakır Kompleksleri – Moleküler Biyolojik Yaklaşım**

Bakır (Cu), temel bir eser elementtir, bakterilerden memeli organizmalara değin hayatta kalmak için gereklidir. Bakır iyonu belirgin redoks durumu gösterir (oksitlenmiş Cu [II] veya indirgenmiş Cu [I]) çünkü biyolojik aktivitesini gerçekleştiren enzimin bir katalitik kofaktörüdür, böylece hücre fizyolojisinde çok önemli bir rol oynar. Bakır mitokondriyal solunum (sitokrom-c oksidaz), demir Emilimi, pigmentasyon, nöropeptit işleme, kolajen ve elastin çapraz bağlanma (lisil oksidaz) ve serbest radikal süpürücü (süperoksit dismutaz) olarak önemli bir kofaktördür. Yani bakır sitokrom c oksidaz (CcO), bakır-çinko dismutaz (Cu, Zn-SOD), dopamine B-hidrolaz (DBH), prion protein (PrP), tironaz, X-bağlı apoptoz proteinin inhibitör (XIAP), lisil oksidaz, metalloprotein (MT), seruplazmin gibi çeşitli kritik bakır-bağlı proteinlerin aktivitesini regüle ederek canlı organizmalarda geniş rol üstlenmektedir (Kim ve ark. 2008).

Erişkin insanlar vücudun her kilogram başına 1,4 – 2,1 mg arası bakır içermektedir. Çocuklarda bu miktar 3 kat daha fazladır. Aynı şekilde dokuların bakır içerik miktarı bakırı gerektiren metabolik sürecin sayısı ve çeşidiyle ilişkilidir. Bu bağlamda, karaciğer dışında beyin ve kalp en çok bakır depolayan dokulardır. Atılım sürecinde oynadığı rolünden anlaşıldığı gibi, safra kesesi ve safra büyük miktarda bakır içermektedir. Böbrek bakır içeriği oldukça fazladır; idrardaki ise çok azdır, yani böbrek depolayıcı rolü üstlenmektedir. Kalan diğer dokular ise daha düşük bakır içermektedir.

İnsan normal metabolizmasında (hematopoez'de demir dışında) bakırın da gerekli olduğu 1928 yılında Hart ve ark. tarafından tespit edilmiştir, sonra bakır ile tedavi edilmiş "Tuz hastalığı" (Neal ve ark. 1931) ve bakır yetmezliği bulunan toprakta yetiştirilen sığır ve kuzunun Neonatal ataksia hastalığı (Bennetts ve Chapman, 1937) keşfedilmiştir. Deney hayvanlarında ataksia ile ilgili çalışmalar sitokrom c oksidaz yoluyla enerji metabolizmasında bakırın temel gereksinimi ve bağ dokusunda bakırın işlevleri, özellikle de hücre dışı lisil oksidaz tarafından elastin ve kollajenin (O'Dell ve ark. 1961) çapraz bağlanmasıyla ilgili bir işlevi olduğu ortaya konmuştur. Melanin pigmenti oluşumu için gerekli olan tirozinaz (koyun yününde, hayvanlarda ve insanlarda) dahil olmak üzere birçok başka bakır içeren enzimler keşfedilmiştir; katekolamin üretimi ve dolayısıyla sinir

ve metabolik fonksiyon için gerekli olan dopamin P-hidroksilaz; normal metabolik reaksiyonlarda üretilen potansiyel olarak zararlı radikallerin yok edilmesine yardımcı Süperoksit dismutaz; fotosentez için elektron nakline dahil bitki kloroplastlarında plastosiyanin; potansiyel bir hücre dışı serbest radikal süpürücü olan seruloplazmin ve yanı sıra kan plazması ve diğer hücre dışı sıvılarda bir ferroksidaz; bitkilerde ve hayvanlarda triptofan oksijenaz, askorbat oksidaz ve lakkaz gibi diğer daha özel enzimler gibi. Bakır içeren, enzimatik olmayan proteinler de tanımlanmıştır ve bakırın amino asitlerle, küçük peptitlerle ve muhtemelen diğer metabolitlerle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Linder 1998).

Redoks halindeki değişikliklere kolayca erişilebilen bakır karboksilat oksijen, imidazol azot, sistein tiyolat ve metiyonin tiyoeter sülfürü ve daha az miktarda fosfin dahil olmak üzere çeşitli ligandları koordine edebilir. İyonik bakırla bağlanabilen diğer ligandlar özellikle yüksek bir afiniteye sahip olmalıdır. Bakır bileşiklerinin ana işlevi oksidasyon-indirgeme reaksiyonu içermekte, böylece bakır içeren biyolojik molekülleri dioksijenle doğrudan reaksiyona girerek serbest radikaller üretilmesini sağlamaktadır (Halliwell ve Gutteridge 1990; Aust ve ark. 1985; Rae ve ark. 1999). Bunun bir sonucu olarak, biyolojik sistemlerde ölçülebilecek bakırın tümü ya kompleks halinde ya da sistemin organik bileşenine bağlı bakır içerikli şelatlar halinde bulunmaktadır. Biyokimyasal olarak bakır elementi hem kinetik hem redoks etkilere sahip olarak elektron transfer reaksiyonunda önemli bir rol oynamaktadır. İn vivo oksijen kimyası bakır içeren proteinlere bağlı olup dioksijen tüm indirgenme sürecinde bakır proteinleri ve ilgili bakır bileşiklerine bağlanmaktadır (L-O Klotz ve ark. 1998, Şekil 2.3). Bu sebeple, serbest hücresel bakır konsantrasyonları son derece düşük seviyelerde kalmaktadır (Turnlund ve ark. 1989, Wang ve Gou. 2006). Canlı organizmalarda bakır homeostazı hem transkripsiyonel kontrol ile, hem de benzersiz sistein, metionin ve histidin içeren bir korunmuş protein grubu vasıtasıyla regüle edilmektedir (Linder 2002).

REDUCTION STATE OF DIOXYGEN	RELEVANCE OF COPPER
<b>O<sub>2</sub> (dioxygen)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- dioxygen transport in molluscs and arthropods (hemocyanin)</li> <li>- substrate for copper dependent oxygenations (e.g. tyrosinase, dopamine β monooxygenase)</li> <li>- substrate for a multitude of copper-dependent oxidases</li> </ul>
↓ + e <sup>-</sup>	
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (superoxide)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- superoxide dismutation (Cu,Zn-superoxide dismutase, copper complexes)</li> </ul>
↓ + e <sup>-</sup> / 2 H <sup>+</sup>	
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hydrogen peroxide)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- product of copper-dependent superoxide dismutation</li> <li>- product of oxidations catalyzed by "non-blue" oxidases (e.g. galactose oxidase, copper-dependent amine oxidase)</li> </ul>
↓ + e <sup>-</sup> / H <sup>+</sup> - H <sub>2</sub> O	
<b>HO<sup>•</sup> (hydroxyl radical)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- product of hydrogen peroxide reduction via copper-dependent Fenton reactions</li> </ul>
↓ + e <sup>-</sup> / H <sup>+</sup>	
<b>H<sub>2</sub>O (water)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- product of a variety of copper-dependent oxidations (e.g. cytochrome oxidase, "blue" oxidases)</li> </ul>

**Şekil 2.2.** Oksijen biyokimyasında bakırın rolü. Biyolojik sistemlerde, herhangi bir moleküler oksijenin indirgenmesi düşük molekül kütleli bakır bileşikleri veya bakır proteinlere bağlıdır. (L-O Klotz ve ark. 1998)

Hemostaz, iç ve dış ortamın değişikliklerine yanıt olarak sabit bir iç ortam sağlamaktadır. Homeostatik bakım hem hücrelerde hem de organizmada bakır alımı, dağıtımı ve geri emiliminden oluşmaktadır. Bozulmuş bakır düzeyi çeşitli hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir ve sırasıyla Menkes hastalığı ve Wilson's hastalığında olduğu gibi organizmada bakırın eksikliği veya fazla yüklenmesi ile karakterize edilmektedir (Bull ve Cox 1999). Menkes ve Wilson bozukluklarına odaklanan çalışmalar bakır homeostazı alanında yeni anlayışlara yol açmıştır ve özellikle hücre içi bakır işlenmesi ve dağılımı, hücrel sinyal yolları, gen ifadesi ve kanser hücrelerinin proliferasyonunda bakır ve bakır metabolizma proteinlerinin potansiyel yeni fonksiyonlarının belirlenmesi üzerine yoğunlaşmıştır (Turski ve Thiele. 2009). Kanser hücreleri tarafından bakırın anormal

oranda biriktirilmesi transforme ve sağlıklı hücrelerde ayırt edici bir özellik olarak belirlenmiştir ve yeni oluşturulacak kemoterapötik ajanlar için hedef olabileceklerini göstermektedir (Daniel ve ark. 2004).

Bakır şelatörler biyolojik sistemlerde bakır ve bakır-bağlı proteinlerin moleküler temelini anlaşılmaması, bakır metabolizmasındaki değişiklikten kaynaklanan hastalıkların tedavisi ve bakır metabolizması bozuklukları için teşhis ve uygulama gibi üç farklı durumda kullanılmaktadır (Ding ve ark. 2011).

Bakır komplekslerinde güncel ilgi antimikrobiyal, antiviral, anti-enflamatuar, anti-tümör ajanlar, enzim inhibitörleri ya da kimyasal nükleaz olarak potansiyel kullanımına dayanmaktadır. Kanser hücrelerinde membranının seçici geçirgenliği nedeniyle bakır biriktiği gösterilmiştir. Çok sayıda bakır kompleksi anti-kanser aktivite yönünden incelenerek bazıları hem in vivo (fare tümör modellerinde) hem de in vitro (kültürdeki kanser hücre hatları üzerinde) olarak etkili bulunmuştur. Ayrıca, bakır (II) kompleksi antikanser tedavisi için umut verici bir aday olarak görünmektedir ki bu noktada bakır (II) komplekslerinin sentezi ve sitotoksik aktivitesini tanımlayan çok sayıda araştırma vardır (Ding ve ark. 2011, Iakovidis ve ark. 2011).

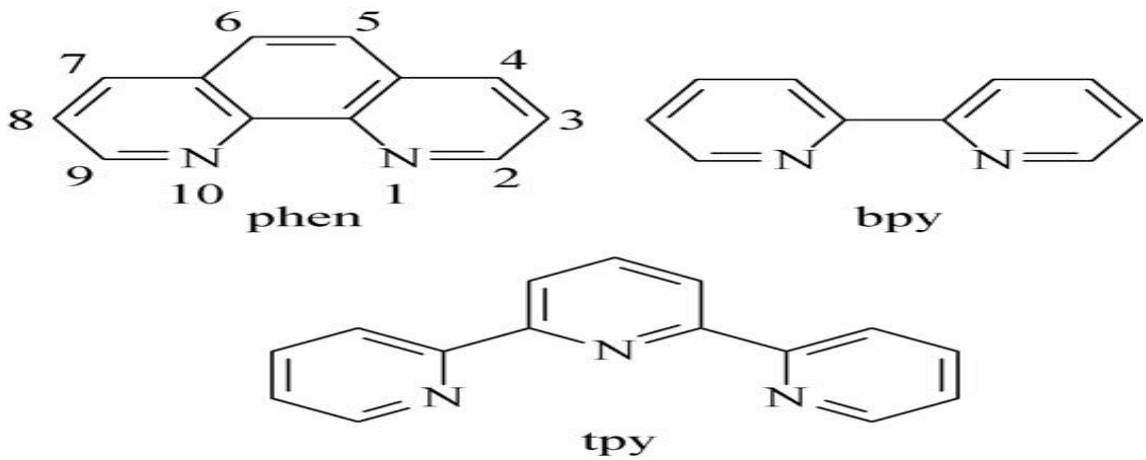
#### **2.4. 1, 10 – Fenantrolin İçeren Bakır (II) Kompleksleri**

Metal iyonlarını bağlayabilen ve aynı zamanda hedefleme, teşhis ve genel etkinliğin artırılması gibi belirli özelliklere sahip ligandlar hastalık teşhis ve tedavisi alanında gelişmelere açıktır. Terapötik bileşiklerin gücünü artırarak yan etkilerinin sınırlandırılması tıbbi kimya alanında yaygın bir hedeftir. Bu amaçla hastalık bölgesini hedefleyen ya da hastalığa özgü bir biyolojik işlem ile aktive edilen bileşikler geliştirilmektedir. Fonksiyonel hedefleme ve/veya biyo-aktif ligant içeren metal kompleksler, aynı zamanda spesifik enzimler tarafından aktive edilen ajanlar ilaç geliştirme için yeni ligandlar araştırılmasına yol açmaktadır.

Çok sayıda biyolojik çalışmada DNA antikanser ve antiviral tedavi için ana hedef olarak belirtilmiştir. Özellikle bipyridine ve 1,10-fenantrolin çeşitli işlevleri nedeniyle en ilgi çekenleridir. 1,10-fenantrolin (phen) ve türevleri, anti-viral, antifungal ve antimikoplasmal aktiviteler sergilemektedir (Ding ve ark. 2011).

Metal kompleksleri–DNA etkileşiminde üç kovalent olmayan ilişki vardır; interkalatif etkileşim, DNA oluk bağlayıcı ve elektrostatik çekim. Dayanıklı bis-fenil komplekslerinin, DNA ya da RNA polimeraz aktivitesini inhibe ederek indirgeyici ajanlar varlığında (tiyol ya da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) DNA'nın şerit şeklinde kesilmesine neden olduğu rapor edilmiştir (Santini ve ark. 2014).

1,10-fenantrolin (phen) Şekil 2.3'te verildiği gibi klasik iki dişli şelat oluşturuç liganttır ve geçiş metal iyonları için ve koordinasyon kimyasının gelişiminde önemli bir rol oynamıştır ve organik, anorganik ve supramoleküler kimyası için başlangıç malzemesi olarak hala özel ilgi olmaya devam etmektedir. Fenantrolin düzlemsel, hidrofobik, elektron-fakir heteroaromatik sistemdir. Bu yapısal özellikleri metal iyonu ile karşı koordinasyonun eğilimini belirler. Ana 2,2-bipiridin (bpy) ve 2,2'; 6,6'-terpiridin (tpy) sistemine göre, fenantrolin içerikli metal kompleksleri tipik olarak [Cu(phen)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, DNA'nın omurgasını yarabilmektedir ve günümüzde moleküler biyoloji'de [Cu(phen)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> DNA kesme reaktifi olarak yaygın kullanılır. DNA/RNA'nın omurgasını keserek etkileşim gerçekleştiren metal-fenil komplekslerinden en çok incelenmiş olanı bakır/fenantrolin sistemidir. 1979 yılında Sigman tarafından 3-merkaptotiyol asit kullanılarak Cu<sup>2+</sup> kompleksinin indirgenmesiyle DNA'nın omurgasını kesen [Cu(phen)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> kompleksi keşfedilmiştir (Sigman ve ark. 1979). Bu reaksiyon, sadece H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında ilerlemektedir ve bir deoksiriboz birimini okside ederek bir sabitleştirilmiş furan türevi oluşumuyla gerçekleşir (Sigman ve ark. 1979).



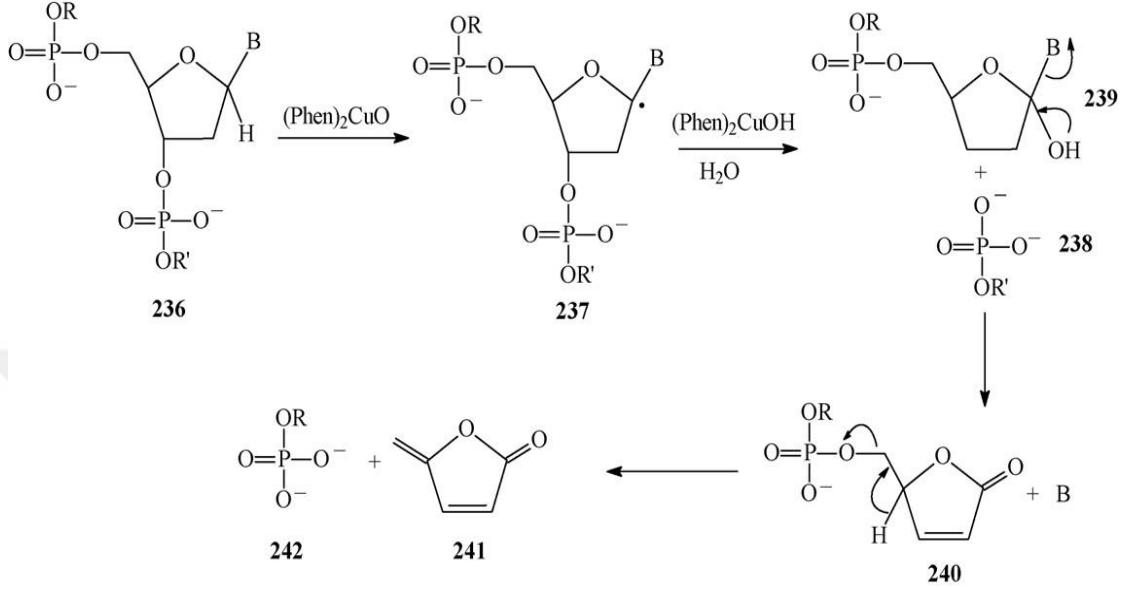
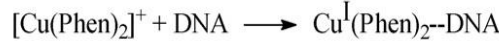
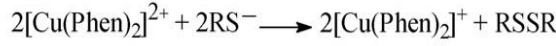
**Şekil 2.3.** Fenantrolin(*phen*), bipiridin (*bpy*) ve terpiridin (*tpy*)

Fenantrolin geçiş metal katyonları için gözle görülür bir koordinasyon yeteneği gösterir. Fenantrolin sulu çözeltilerde birinci sıra geçiş metal katyonlarıyla oktahedral kompleks türü;  $[M(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ ,  $[M(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$  ve  $[M(\text{phen})_3]^{2+}$  oluşturmaktadır.  $[M(\text{phen})]^{2+}$  komplekslerin kararlılığı Irving-Williams sırasını izlemektedir.

1,10-fenantrolin ve türevlerini içeren bakır kompleksleri anti-tümör, anti-Candida, antibakteriyel ve anti-mikrobiyal aktivite gibi çok sayıda biyolojik aktivite sergilediğinden büyük ilgi uyandırmaktadır. Fenantrolin komplekslerinin DNA'yı interkale edici madde ve yapay nükleazlar olarak kullanılması üzerine yoğun ilgi görmüştür. Bis (1,10-fenantrolin) - copper (II) 'nin tiyol ve hidrojen varlığında etkin bir DNA bölünme (çentik) aktivitesi gösterdiği iyi bilinmektedir (Iakovidis ve ark. 2011).

Başlangıç kompleksi ( $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ ) kompleksinin bir elektronluk indirgenmesini askorbat (Gandin ve ark. 2012), tiyol, 3-merkaptopropionik asit (Santini ve ark. 2011; Gandin ve ark. 2012; Zanella ve ark. 2011; Lazarou ve ark. 2010), 2-merkaptotanol (Gandin ve ark. 2012) gibi farklı redüktörlerle veya süperoksit üretici ksantin / ksantin oksidaz kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir.  $\text{H}_2\text{O}_2$  ise ya dışsal olarak eklenebilir veya moleküler oksijenle  $\text{Cu}^+$  kompleksinin oksidasyonu sırasında üretilen süperoksit anyonları asıl yerinde (in situ) oluşturulabilmektedir (Marshall ve ark.1981). Bazı araştırmacılar oksidan türevleri olarak Fenton reaksiyonu aracılığıyla  $\text{Cu}^+$  tarafından oluşturulan hidroksil radikallerini önermesine rağmen,  $[\text{CuO}]^+$  veya  $[\text{CuOH}]^{2+}$  türevlerinin olduğu en yaygın kabul edilen mekanizmadır (Hahn ve ark. 2008; Balakrishna ve ark. 2010; Starosta ve ark. 2011).

Çentiklenme mekanizmasının ilk aşamasında DNA minör oluğu içinde  $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$  kompleksinin tersini bağlanması ile esansiyel kovalent olmayan bir ara madde meydana gelmektedir. UV-vis ölçümleri, vizkometrik denemeler ve DFT hesaplamaları sayesinde küçük oluktaki bağlanmanın baz çiftlerinin arasında bir fenantrolin parçasının kısmen interkalasyonu ile olduğu sanılmaktadır. Daha sonra  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile  $\text{Cu}^+$  reaksiyonu bir oksobakır türevi, muhtemelen  $[\text{CuO}]^+$  veya  $[\text{CuOH}]^{2+}$  oluşturup çentiklenme sürecini başlatan doğrudan sorumlu olan reaktif türevlerdir (Johnson ve ark. 1987, Yamamoto ve ark. 1989).



**Şekil 2.4.**  $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$  in DNA'yı kesme mekanizması (Bencini ve ark. 2010)

$\text{H}_2\text{O}^{18}$  kullanılarak gerçekleştirilen oksijen etiketleme çalışmaları 5-metilen-2-furanon karbonil oksijenin çözümden geldiğini göstermiştir (Hahn ve ark. 2008; Starosta ve ark. 2011). H-1'in soyutlanmasının asıl molekülün yarıma mekanizması olduğu kabul edilmesine rağmen, bakır kompleksi H-4 soyutlanmasıyla da minör olukta DNA kırılabilir.  $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$  kompleksi ve DNA önerilen etkileşim modunda küçük oluktan H-4 hidrojene kolayca ulaşabilir. Hatta H-5 soyutlanmasıyla bölünme başlayabileceğini bazı araştırmacılar son zamanlarda belirtmiştir (Merces ve Albrecht, 2010).

DNA yarıma ajan olarak  $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{+}$  in etkilerinin oluşmasında DNA'nın farklı ikincil yapıları ve B-DNA formundaki primer DNA dizi belirleyicidir. B-DNA  $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{+}$ 'nin yıkıcı etkisine en hassas ikincil yapısıdır. Kompleks A-DNA formunu B-DNA'dan daha az etkili bir şekilde keser (Ehrenfeld ve ark. 1987; Santini ve ark. 2011; Zanella ve diğerleri. 2011). Z-DNA konformasyonu çok daha küçük ya da hiç bir oluşu olmadığından neredeyse yarılmaz bir yapıdır. Ayrıca, kompleks çift iplikli DNA'yı tek iplikliden daha etkili bir şekilde kesmektedir. RNA'da ise tam tersi bulunmuştur. Aslında,  $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$  tek sarmallı RNA'yı çift RNA'ya göre daha etkili bir biçimde keser (Ehrenfeld ve ark. 1987).



[Cu(phen)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> DNA'daki tüm sekans pozisyonunu aynı oranda kesmemesine rağmen, primer sekans için belirgin bir özgülüğü görünmemektedir. Özellikle zincirin kesimine en hassas sekans TAT tripleti olurken ilgili sekanslar TGT, TAAT, TAG ve CGAT'ı orta derecede tercih etmektedir (Veal ve ark. 1988, Veal ve ark. 1989).

## 2.5. DNA hedefleyen Bakır Kompleksler

Kovalent olmayan DNA etkileşimleri, metal komplekslerinin majör veya minör DNA oluşu boyunca bağlanması, interkalatif ve elektrostatik bağları içermektedir. Çoğu durumda metal, biyoaktif molekülün organik omurgasının inorganik modifikatörü gibi davranmaktadır ve ligand ise DNA afinitesi ve özgünlüğü kazandırır. Bu çerçevede, yüksek DNA etkileşim kabiliyeti ve in vitro antitümör etkinliği nedeniyle N-verici ligandların oluşturduğu bakır (II) kompleksleri özellikle dikkat çekmiştir. 1,10-fenantrolin ve ilgili diimin şelatları içeren bakır türevleri, submikromolar aralığında IC<sub>50</sub> değeri ortaya çıkaran güçlü sitotoksik maddeler olarak tarif edilmiştir. Bu bağlamda, bidentat diimin ligandı (NN = phen, bipy veya türevleri) ve ikincil ligandlar (örn., Salisilik asit, tetrasiklin, terpiridin, imidazolidin-2-tione, oksamidobenzoat, kinolin, oksamit, sülfonamid, antracene, amin, cumarin, ve fitalat) kombinasyonuna dayanan üçlü bakır (II) kompleksleri hakkında birçok yeni çalışma bulunmaktadır (Santini ve ark. 2014). Genel olarak, düzlemsellik, hidrofobiklik ve diiminin boyutu, ikincil ligandın doğası ve metal kompleksin koordinasyon geometrisi gibi fizikokimyasal özelliklerin hepsinin DNA'ya bakır komplekslerinin bağlanma/interkalasyon modunun belirlenmesinde önemli roller oynadığını gösterilmiştir. Metil halkanın kısmen interkalasyonu engellemeyi yanı sıra phen halkasında metil gruplarının varlığının DNA yüzeyiyle daha güçlü hidrojen bağlama etkileşimlerine izin verdiği ve DNA zincirinin bükülmesine (kinklanması-çentiklenmesi) yol açtığı vurgulanmıştır (Selvakumar ve ark. 2006).

DNA interkalasyonu, DNA yapısının bozulmasına ve DNA bölünme işlemlerine katkıda bulunmaktadır. Aslında, bu yeni antineoplastik bakır metalo-ilaçlar nükleobaz oksidasyonu, fosfat ester hidrolizi ve deoksiriboz şeker oksidasyonu gibi çeşitli yollarla "kimyasal nükleazlar" olarak davranmaktadır. Birçok çalışma, bakır komplekslerinin fizyolojik koşullarda bir oksidatif yolak yoluyla plazmid DNA bölünmesini arttırdığını ortaya koymuştur (Arjmand ve ark. 2011). Bakır kompleksleri tarafından teşvik edilen

DNA bozunumunun bir Fenton tipi reaksiyon yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu reaksiyon, hidroksil radikali veya farklı metal bazlı ara madde ( $\text{CuOH}^{2+}$  veya  $\text{CuO}^+$  türleri) gibi bir ROS kaynağıdır, bu da, DNA polinükleotit zincirlerinin hem direkt oksidasyonuna hem de bölünmesine neden olur (Koppenol. 2001; Kremer. 1999; Fleming ve ark. 2011). Yazarlar tarafından "moleküler makas" (klasik kimyasal nükleazlar) olarak tekli ya da çift sarmal kopmalarla DNA'yı parçalayabilen diğer bakır kompleksleri tanımlanmıştır. DNA hasarını takiben hücresel tepki (bozulmalar) çeşitli tamir mekanizmalarının aktivasyonunu kapsar ve eğer onarım başarısız olursa hücreler hücre ölümüne uğramaktadır. DNA tamir mekanizmaları tarafından daha az kolaylıkla onarıldığından, DNA'daki çift iplik kırıkları, tek iplikli kırılmalardan daha önemli hücre ölüm kaynaklarıdır (Povirk ve Austin, 1991).

DNA üzerinde bakır kompleksleri tarafından indüklenen hasar türüne bağlı olarak, hücresel işlem, hücreyi apoptoz sinyal iletim yollarının aktivasyonuna itebilir. Pek çok bakır kompleksinin, DNA hasarının bir sonucu olarak apoptotik hücre ölümünü tetiklediği bulunsa da, çok az makale, bakır kompleksleri ile muamele edilen hücrelerde aktive edilen sinyal iletim moleküler determinantları üzerine sonuçlar içermektedir. Bazı durumlarda, bakır kompleksleri, apoptozun indüksiyonu ile tutarlı olan, proapoptotik proteinlerin upregülasyonunu veya antiapoptotik proteinlerin aşağı regülasyonunu sağlamaktadır. Caco-2 hücrelerinde ( $\text{Cu}(\text{N9-ABS})(\text{phen})_2$ ] ( $\text{H2N9-ABS} = \text{N}-(9\text{H-pürin-6-il benzensülfonamid})$ ) ile indüklenen apoptozun, *p53* protein seviyesinde bir artış ve bir *Bcl-2* ifadesinin azalması ile sonuçlandığı belirlenmiştir (Garcia-Gimenez ve ark. 2009). Ayrıca, bakır kompleksi aracılığıyla hücre ölümünde kaspaz aktivasyonunun tutulumu tam olarak aydınlatılamamıştır. Çok az bakır türevinin, kanser hücrelerinde caspase-3 ve/veya kaspaz-9 aktivasyonunun tutulumu yoluyla apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Tan ve ark. 2009; Chakraborty ve ark. 2010).

### **2.5.1. Proteazomu inhibe eden Bakır Kompleksleri**

Proteazom hem çekirdekte hem de sitoplazmada bulunan hücre içi proteinleri seçici olarak modüle eden ve parçalayan büyük bir çoklu protein kompleksidir. Ökaryotik 26S proteazomu bir 20S proteolitik çekirdek parçacık yapısı ve iki adet 19S düzenleyici kap içerir. Çekirdek boştur ve proteinlerin bozunduğu kapalı bir boşluk sağlar. Çekirdek parçacığın her ucu, birden fazla ATPaz aktif bölgesi ve ubikuitin bağlama

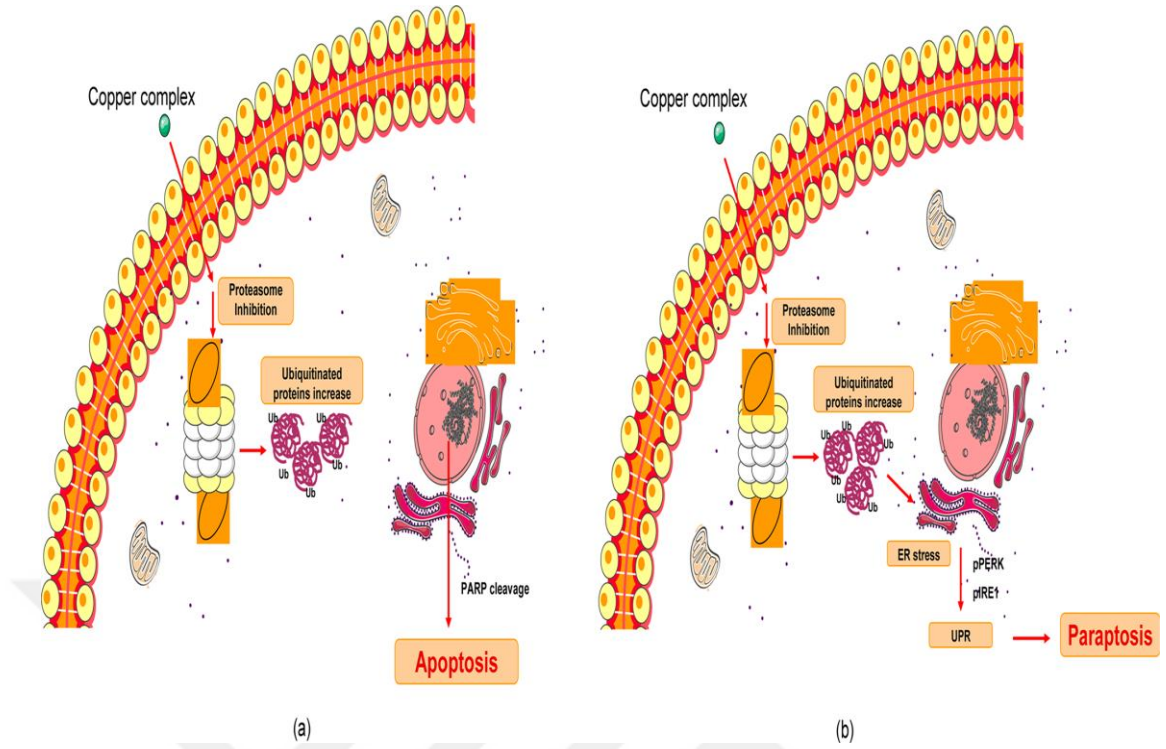
bölgesi içeren bir 19S düzenleyici alt-birimiyle ilişkilidir. Proteazom tarafından tanınması ve işlenmesi için bir protein substratı ubikuitine bağlanmalıdır (Peters ve ark. 1994). Poliubiquitinated (ubikutin ekleyerek proteinin yapısını değiştirme) proteinin tanınmasından sonra, birden fazla peptidaz aktivitesi içeren 20S çekirdeğine transfer edilir; bunlar arasında kimotripsin benzeri (hidrofobik (CT-L) olarak bölünme), Triptin benzeri (bazik (TL) kalıntıdan sonra bölünme) ve kaspaz benzeri (asidik kalıntıdan bölünme, C-L) aktivitesi bulunmaktadır (Goldberg, 1995). Proteazom, hücrenin belirli bir düzeyde protein konsantrasyonu ve stabilitesini düzenleyen bir ana mekanizmanın parçasıdır (Örn., Siklinler, *Bcl-2* ailesi ve **p53**) ve katlanmayan proteinleri ayrıştırır. Ubikuitin proteazomuna bağlı parçalanma sistemi, proliferasyon, apoptoz, anjiyojenez ve metastaz oluşumu gibi karsinogenezde en önemli süreçler de dahil olmak üzere birçok hücre fonksiyon için esastır (Dou ve ark. 2003). Normal ve malign hücrelerde hücre büyümesi, hücre döngüsü ilerlemesi ve apoptozis gibi birçok önemli hücre prosesi için önemli olan protein seviyelerini kontrol eder (Adams 2004, Tisato ve ark. 2010).

Proteazom inhibisyonu, antikanser tedavisi için potansiyel olarak yararlı bir stratejidir. Proteazom, ökaryotik hücrelerde bol bulunan katalitik bir protein kompleksidir ve artık gerekli olmayan, yanlışlıkla katlanmış veya hasar görmüş hücre içi proteinleri parçalamaktadır. Her ne kadar proteazom inhibisyon mekanizması iyi anlaşılmamış olsa da, ampirik kanıtlar çeşitli kanser hücrelerinin normal hücrelere göre daha fazla proteazom inhibisyonuna duyarlı olduğunu göstermesi nedeniyle, ubikuitin-proteazom yolu hedeflemesine uygun oldukları görülmektedir (Adams 2004). Birçok doğal ve sentetik organik bileşik, proteazomu inhibe edebilir ve şu anda yeni anti kanser ajan olarak proteazom inhibitörlerinin geliştirilmesi yoğun bir şekilde incelenmektedir. Buna rağmen, sadece bortezomid ve daha iyi ikinci kuşak carfilzomid, klinik tedavi ve daha çok multipl miyelom için onaylanmıştır (Pevzner ve ark, 2013). Ne yazık ki, her iki tedavide de direnç, hematolojik ve nörolojik komplikasyonlar gibi çok sayıda yan etki görülmektedir (Pevzner ve ark, 2013), Bortezomid ile tedavi edilen hastalardaki toksisitesi normal ve kanser hücrelerindeki aktivitesinin seçicilik yetersizliğine bağlanabilir (Kazi ve ark. 2009).

Bununla birlikte, bakır içeren bileşikler, antikanser ajanlar olarak geliştirilmesinin sadece erken klinik faz basamağında bulunmaktadır. Dou ve Goldfarb tarafından proteasom fonksiyonunu inhibe eden bakır kompleks bildirilmiştir (Dou ve Goldfarb 2002). 2004

yılında, bakır (II) tuzu ( $\text{CuCl}_2$  veya  $\text{CuBr}_2$ ) ve iki dişli (ClioQuinol (CQ), phen, ve DTC ailesi dahil 8-OHQ ailesi) ligandı karışımından türetilmiş CT-L proteazom aktivitesini güçlü inhibe eden "bakır karışımı" tanımlanmıştır. Proteazomu inhibe etmesinden dolayı bu bakır karışımları seçici olarak normal hücrelerde değil sadece kanserli olanlarda apoptotik hücre ölümünü indükleyebilmektedir ve in vivo tümör modelinde çok etkilidir (Daniel ve ark. 2005). Örneğin özellikle  $[\text{Cu}(\text{L32c})_2]$  insan kanserli meme (MDA-MB-231) hücresi ile kanser olmayan (MCF-10A) arasında potansiyel bir selektif anti-kanser etkisi göstererek iki hücre arasında ayırım yapmaktadır (Daniel ve ark. 2005). Tüm bu çalışmalar, karışımda bakırın proteazom önleyici aktiviteyi sağlamakta çok temel bir rol oynadığını önermektedir ancak koordinat türü bileşimi hakkında çok az bilgi vardır. Bakır aracılı proteazomu engelleyici faaliyet uygun iki dişli ligandı seçilmesiyle arttırılabilir. Xiao ve arkadaşları yakın zamanda Bakır Cu (I) ve Cu (II) 'nin oksidasyon durumunun proteazom aktivitesini inhibe etme üzerine etkisini araştırmıştır. Cu (I) veya Cu (II) bir bakır bağlayıcı bileşik olan Neocuproine (NC) ile proteazom CT-L aktivitesini inhibe edebilmekte ve tümör hücrelerinde apoptozu indükleyebilmektedir (Xiao ve ark. 2010).

Dou ve ark. Bis (8-hidroksikuinolin) bakır (II),  $[\text{Cu}(\text{8OHQ})_2]$  ve diğer bakır (II) bileşiklerinin proteazomu inhibe edebildiği ve apoptozu indükleyebildiğini bulmuştur. Ligandın seçiminin proteazomu inhibe edici aktivite için çok önemli olduğu görülmektedir (Dou ve ark. 2003).



**Şekil 2.5.** Bakır bileşiklerinden kaynaklanan proteazom inhibisyonunda rol oynayan hüresel yol şemaları. (A) DTC bakır (II) kompleksleri tarafından tetiklenen apoptoz. (B) Fosfin bakır (I) ve tioksotriazol bakır (II) komplekslerinin neden olduğu paraptoz (Santini ve ark. 2014).

Daha yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada, iki moleküllü indol 3-asetik veya 3-propiyonik asit koordine edilmiş bakır (II) kompleksi üçüncü ligand olarak -phen olunca insan kanser hücrelerine karşı orijinal proteazom inhibitör ve apoptoz indüktörü etkisi gösterdiği bildirilmiştir. -Phen kanser hücre içine bakır taşımada önemli rol oynayan ve doğrudan proteazom etkileşim/ inhibisyonuna ve/veya proteazom tarafından bakır oksidasyonuna yol açarak sonuçta çoklu protein kompleksinin deaktivasyonuna neden olan bir ligand olarak önerilmiştir (Zhang ve ark. 2012).

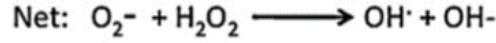
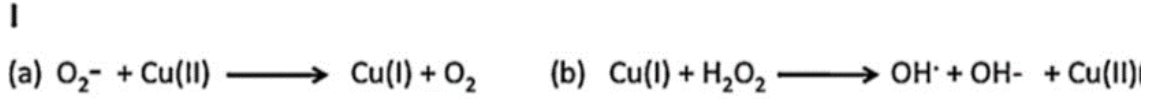
### 2.5.2. Bakır komplekslerinin DNA üzerindeki dolaylı etkileri

Bakır iyonunun, askorbat veya glutatyon gibi indirgeyici ajanlar varlığında DNA'da çeşitli hasarlara neden olduğu ve ayrıca bakır iyonunun ROS üretim yoluyla, DNA ve kromatin'e zarar verdiği kanıtlanmıştır (Buchtik ve ark. 2011; Ruiz ve ark. 2010; Cao ve Wang 2007). Bakır komplekslerinin oluşturabileceği hasarlar özellikle guanin bazının oksidasyonu ve 8-oksoguanini oluşturması, bitişik bazlar, özellikle G ve metillenmiş-C

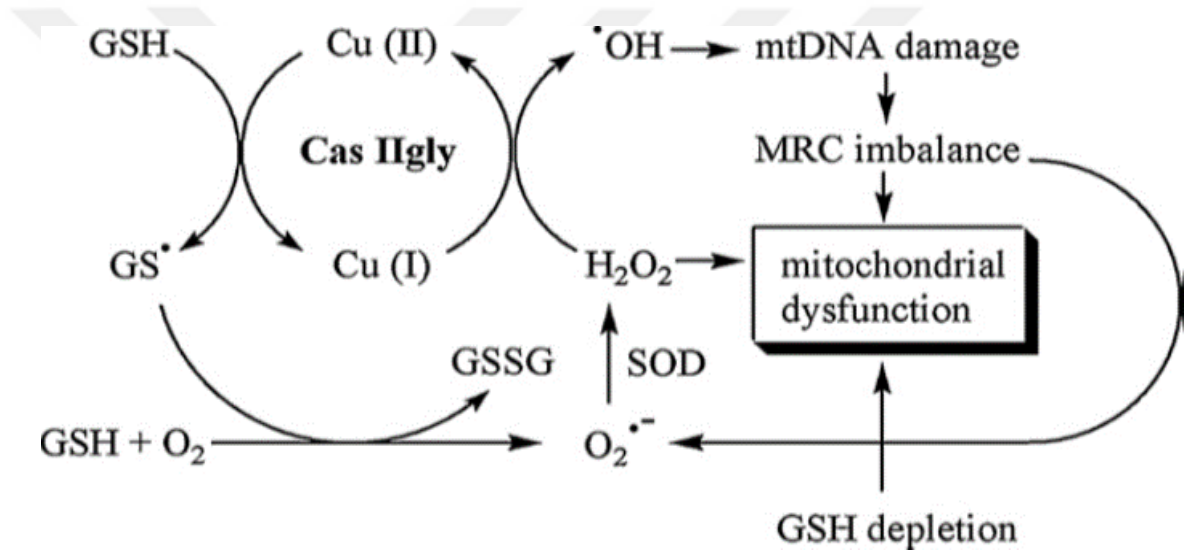
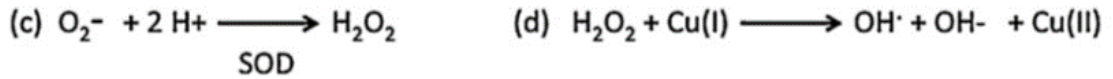
arasında çapraz bağların oluşturulması, Cu (II) ve yalnızca indirgeyici ajanlarla meydana gelen DNA'daki çift ve tek sarmal kırıkları olarak sıralanabilir. (Bar-Or ve ark. 2006).

DNA'ya zarar veren çeşitli ROS türleri ve OH• radikalleri, Şekil 2.6'da görüldüğü gibi bakır seri reaksiyonunun ürünleridir. Süperoksit, mitokondriler tarafından üretilir ve hücreler tarafından solunan oksijenin % 3-4 kadarının elektronlarla aşırı yüklendiği tahmin edilmektedir. Ayrıca, Süperoksit Cu (I) ile O<sub>2</sub>'nin reaksiyonu ile de üretilebilir ve Cu/Zn ve Mn-SOD'ler bunu peroksit haline getirir. Birlikte, peroksit ve süperoksit ROS formlarının en reaktif türünü, yani OH• radikalini oluşturmaktadır. Bu radikaller ya bazları oksitlemekte, çapraz bağlarla sonuçlanan diğer radikalleri üretmekte ya da DNA'daki spesifik nükleotidler arasındaki fosfodiester bağlarını parçalamaktadır. Yarıma, sadece bir tek veya çift ipliğin üzerinden gerçekleşebilmektedir (Tawa ve ark. 1997). CpG dizilerinde C'nin metilasyonu, daha fazla çapraz bağ ve baz oksitlenmesi ile sonuçlanmasına rağmen plazmid DNA da gösterildiği gibi bu tür metilasyonlar DNA'nın hassasiyetini azaltabilir.

Glutasyon sistemi, glutasyon (GSH), glutasyon redüktaz, glutasyon peroksidaz (GPX) ve glutasyon S-transferaz (GST) içerir. Glutasyon, sistein sitoplazmik proteinin disülfür bağlarını indirgeyerek hücreleri oksidatif stresden korur. Glutasyon S-transferaz detoksifikasyon enzimidir ve GSH'nın çeşitli dışsal ve endojen elektrofilik bileşiklere bağlanmasını katalizler (Townsend ve ark. 2003). Çeşitli tümörlerde GST aşırı eksprese edilmekte ve MAPK yolak düzenlenmesi için ve kemoterapötiklere karşı direnç gelişmesinde rol oynamaktadır (Townsend ve ark. 2003).



II



**Şekil 2.6.** Bakır ile reaksiyon sonucunda reaktif oksijen türlerinin oluşumu. I ve II'de, Haber-Weiss (I) ve Fenton (II) kimyasına göre, OH radikal de dahil olmak üzere çeşitli ROS ara ürünlerinin oluşumuyla sonuçlanan redoks-aktif bakır iyonu içeren reaksiyon serisi gösterilmektedir. Süperoksit iyon ( $O_2^-$ ) muhtemelen oksidatif fosforilasyondan mitokondri tarafından kolaylıkla üretilir. Glutatyon (GSH), 5-20 mM aralığında çoğu hücre bölümünde bol miktarda bulunmaktadır ve ayrıca radikal oluşumu için ekstra elektron verebilmektedir. Enzimatik olarak (SOD vasıtasıyla) oluşan peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksitle reaksiyona girebilerek OH radikal ve  $OH^-$  'yi oluşturmaktadır. (Linder M. (2012); Kachadourian ve ark. (2010))

Hücrelerde oksidatif hasar (DNA'yı ve kromatin/kromozomları hedef alan) ve kanser arasında kuvvetli bir bağlantı vardır (Zeich ve ark. 2011, Fragou ve ark. 2011, Tudek ve ark. 2010). Guanin ve diğer bazların oksidatif modifikasyonu DNA'da baz dizilimi değişikliği (yani mutasyonlar) ile sonuçlanarak ROS'a yanıt olarak programlanmış hücre

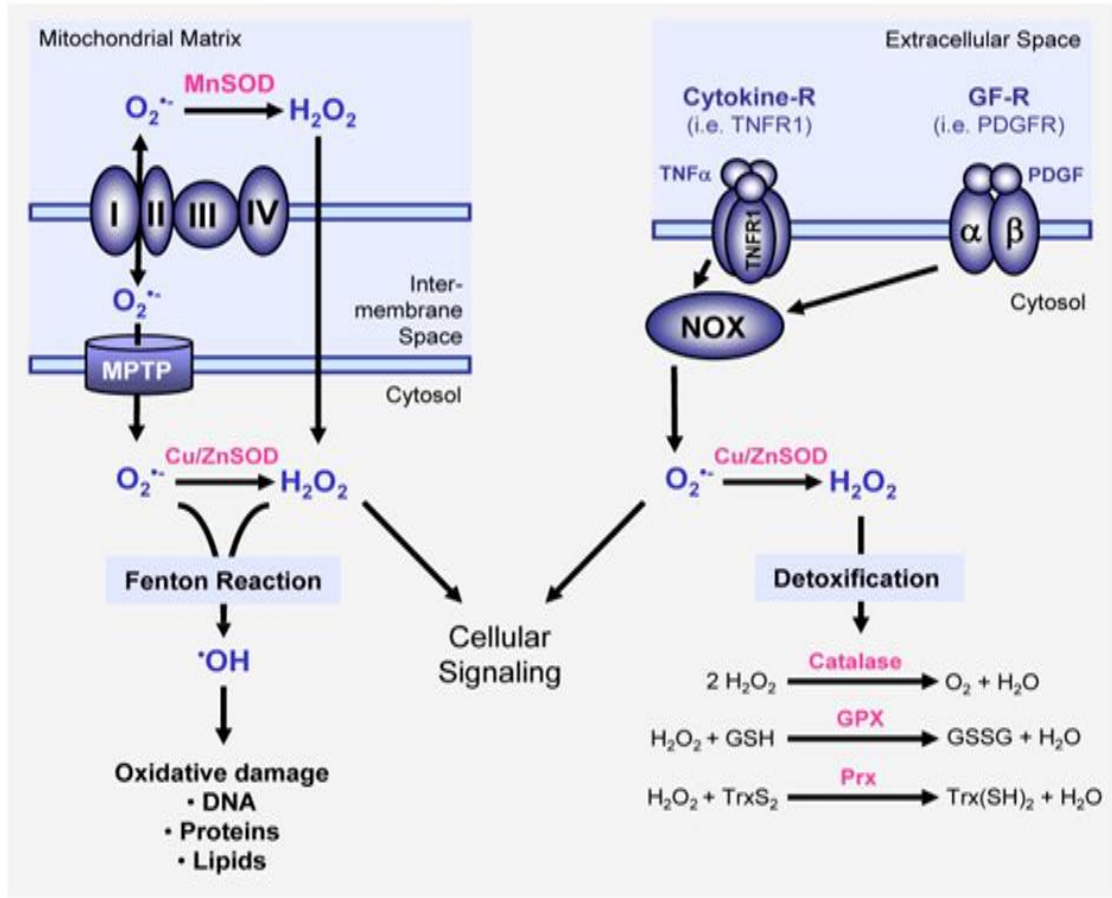
ölümünü (apoptoz) teşvik eden veya normal hücrelerdeki DNA hasarını azaltabilen p53 gibi tümör süpresör genin ekspresyonunda veya işlevinde kalıcı değişikliğe neden olabilmektedir (Zeich ve ark. 2011, Fragou ve ark. 2011).

Genellikle bu oksidatif DNA hasarının çoğu veya tamamı, aşırı ifade edilmediği sürece, doğal mekanizmalar tarafından onarılmaktadır. ROS sadece mutasyona değil, çift ve tek iplik kırılmaları nedeniyle aynı zamanda genomik dengesizlik ve kromozom kaybına yol açmaktadır. Aslında, kromozomların kaybı ve yeniden düzenlenmesi (anöploidi) malignite özelliği taşır (Duesberg ve ark. 2006, 2011). DNA metilasyonu ve histon asetilasyonunda ROS ile indüklenen değişiklik epigenetik mekanizmalar kanser gelişimine katkıda bulunabilir ve yeni anti-kanser ilaçlarının hedefi olarak lanse edilmektedir. Çoğu normal DNA'nın kodlanmayan bölgeleri hipometillenmiştir (Fragou ve ark. 2011). Kanserde ise bu bölgeler hipermetillenmiş olup genomik instabilite ile birlikte kromozomal yeniden düzenlenmelere neden olmaktadır (Zeich ve ark. 2011, Fragou ve ark. 2011).

Kanserli hücre artmış ROS düzeyine karşı daha savunmasızdır (Kachadourian ve ark. 2010). Örneğin sisplatinin pro-oksidan etkisi; tioredoksin redüktazın inhibisyonunu ve mitokondride yüksek ROS üretimini kapsamaktadır (Pelicano ve ark. 2003). Sisplatin ile indüklenen ROS'un aşırı üretilmesinin muhtemel bir nedeni, mitokondriyal solunum zincirindeki apoprotein ekspresyonu dengesizliğine neden olan mitokondriyal DNA'nın (mtDNA) bozulmasıdır ve bu da süperoksidin ( $O_2^{\cdot-}$ ) "sızıntısına" yol açar (Kachadourian ve ark. 2010).

MtDNA hasarının bir sonucu solunum zinciri komplekslerinin dengesizliğidir ve artan " $O_2^{\cdot-}$  sızıntısı" ile ilişkilidir (Wallace, 1999).





**Şekil 2.7.** Bakır-Mitokondriyel DNA ilişkisi. Süperoksit ( $O_2^{\bullet-}$ ) kökleri elektron taşıma zincirinin bir yan ürünü olarak mitokondri iç zarında üretilir ve daha sonra mitokondriyal geçirgenlik geçiş deliği (MPTP) yoluyla mitokondriyal matriste veya sitoplazmada serbest bırakılır. Süperoksit, örneğin büyüme faktörü reseptörüne (GF-R) veya sitokin reseptör aktivasyonuna yanıt olarak NADPH oksidaz'ın (NOX) aktivasyonu yoluyla üretilir. Mitokondriyal matristeki MnSOD veya sitozolde Cu/ZnSOD gibi SOD enzimleri, süperoksiti  $H_2O_2$ 'ye indirgemektedir. Katalaz, glutatyon peroksidaz (GPX) ve peroksiredoksin (Prx) içeren çeşitli sitosolik antioksidan sistemleri, hidrojen peroksitten suya indirgeyerek hücreyi detoksifiye eder. Hem hidrojen peroksit hem de süperoksit hücresel sinyal'da katkıda bulunur, ancak aynı zamanda hidroksil radikalleri ( $\bullet OH$ ) oluşturabilir. Hidroksil kökleri, Fenton reaksiyonunda  $O_2^{\bullet-}$  ve  $H_2O_2$ 'den üretilir ve protein, DNA ve lipid'i bozmaktadır.

## 2.6. Hücre-Temelli Canlılık Testleri

Hücre temelli testler moleküllerin hücre çoğalması üzerine etkileri olup olmadığını belirlemek veya sonunda hücre ölümüne yol açan sitotoksik etkileri gösterecek şekilde bileşikler taramak için kullanılır. Hücre temelli test ayrıca, reseptör bağlanmasının ölçülmesi ve genetik ekspresyonu içeren çeşitli sinyal iletim olaylarını ölçmek, hücresel bileşenlerin taşınımını veya organel fonksiyonunu izlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Kullanılan hücre-temelli test tipine bakılmaksızın, deneyin sonunda kaç canlı hücrenin kaldığını bilmek önemlidir. Canlı ökaryotik hücrelerin sayısını tahmin etmek için kullanılacak çeşitli test yöntemleri vardır. Verilerin bir plaka okuyucu kullanılarak kaydedildiği çok kanallı plaka kullanılan tetrazolyum indirgeme, resazurin redüksiyonu, proteaz işaretleyici ve ATP algılama bazı temel yöntemlerdir (Anonim 1983).

Tetrazolyum indirgeme, resazurin indirgeme ve proteaz aktivite testleri, genel metabolizmanın bazı yönlerini veya canlı hücrenin bir işareti olarak enzimatik aktiviteyi ölçmektedir. Deneylerin tümü, bir substratın bir plaka okuyucu ile tespit edilebilen renkli veya flüoresan bir ürüne dönüştürülmesi için canlı bir hücre popülasyonu ile bir reaktifin inkübe edilmesini gerektirir. Çoğu standart kültür koşulunda, substratın canlı hücrelerle inkübe edilmesi mevcut hücrelerin sayısı ile orantılı bir sinyal üretmeye neden olacaktır. Hücreler ölünce, substratı ürüne dönüştürme yeteneğini hızla kaybederler. Bu fark, yaygın olarak kullanılan hücre yaşayabilirlik testlerinin çoğunun temelini oluşturmaktadır (Berridge ve ark. 2005).

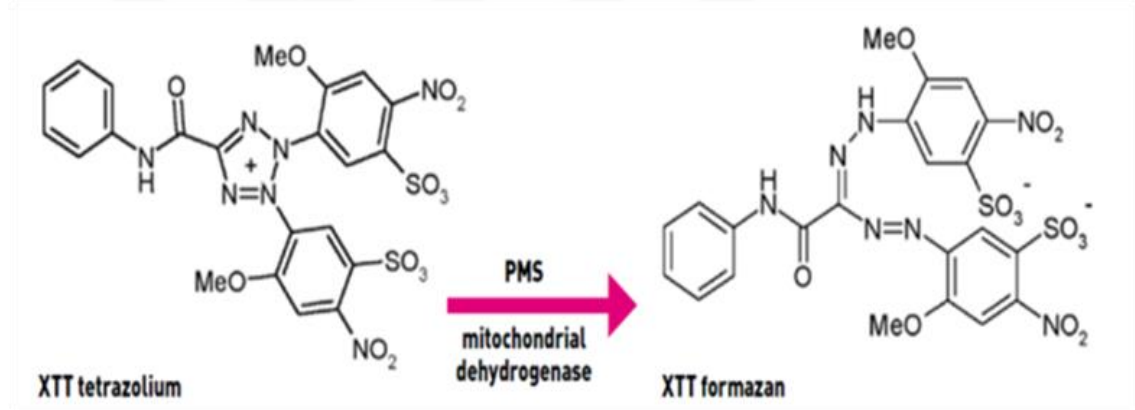
### 2.6.1. Tetrazolyum İndirgenme Testleri

Tetrazolyum tuzları, histokimyasal lokalizasyon çalışmaları ve hücre biyolojisi deneylerinde uzun yıllardır saptama reaktifleri olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Altman. 1976, Berridge. 2005). Birçok tetrazolyum bileşiği hücrelerin canlılığının belirlenmesi için kullanılmıştır. En çok kullanılan bileşikler MTT, MTS, XTT ve WST-1'dir. Bu bileşikler iki temel sınıfa ayrılabiliriz:

- (1) pozitif yüklü ve kolaylıkla canlı ökaryotik hücrelerinin içine giren MTT ve
- (2) kolaylıkla hücre içine girmeyen ve negatif yüklü MTS, XTT ve WST-1.

İkinci sınıf (MTS, XTT, WST-1) tipik olarak, tetrazolyumun renkli formazan ürününe indirgenmesini kolaylaştırmak için sitoplazma veya plazma membranından elektronları aktarabilen bir ara elektron alıcısı ile kullanılır (Anonim 1983).

İkinci generasyon tetrazolium boya (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide salt (XTT)) hücre proliferasyon, sitotoksisite ve apoptoz testlerinde etkili olarak kullanabilmektedir (Berridge. 2005, Scudiero 1988, Marshall ve ark. 1999). XTT hücre proliferasyon testi ilk kez 1988'de Scudiero ve arkadaşları tarafından tümör hücre hatlarındaki hücre büyümesini ve ilaç hassasiyetini ölçmek için etkili bir yöntem olarak tarif edilmiştir (Scudiero ve ark. 1988). Karışık hücresel etkiler renksiz veya hafif sarı olan XTT indirgenirken parlak turuncu rengi değişmektedir. Bu renk değişikliği, pozitif yüklü kuaterner tetrazol tuzunu parçalayarak gerçekleştirilir. XTT indirgeme sonucunda çözünebilen Formazan gerçek zamanlı testlerde kullanılabilir.



Şekil 2.8. Hücre'deki XTT tuzu değişimin reaksiyonu

XTT'nin, net negatif yüklü olduğundan dolayı hücrenin dışında bırakıldığı düşünülmektedir (Berridge 2005). XTT boya redüksiyonunun trans-plazma membran elektron taşıma tarafından kolaylaştırıp hücre yüzeyi üzerinde gerçekleştiğini gösteren önemli kanıtlar bulunmaktadır. Mitokondriyal oksidoredüktazların indirgeyicileri plazma zarına transfer ederek XTT tepkimesine büyük ölçüde katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Şekil 2.8'de). XTT testinin aslında, hücrelerin piridin nükleotid redoks durumunu ölçtüğü ileri sürülmüştür (Berridge 2005, Marshall ve ark. 1999).

XTT, bir tespit reaksiyonu olarak tek başına kullanılabilir, ancak sonuçlar optimal değildir. XTT ile bir ara elektron alıcısı, örneğin PMS (N-metil dibenzopirazin

metilsulfat) birlikte kullanıldığında XTT analiz sonuçları büyük ölçüde gelişmiştir. PMS, XTT Hücre Proliferasyon test setinde bulunan etkinleştirme reaktifidir. PMSnin hücre yüzeyinde veya plazma membranındaki kolaylıkla erişilebilen bölgeden elektronları toplayarak XTT indirgemesi aracılığıyla bir reaktif ara madde oluşturduğu ve daha sonra XTT'yi yüksek pigmentli formazan ürününe indirgediği ortaya konmuştur.



### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasında iki yeni bakır (II) karışık ligant kompleksinin, Kompleks 1: [Cu(4-metil-1,10-fenantrolin) (tirozin) (H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub> ve Kompleks 2: [Cu<sub>2</sub> (5-metil-1,10-fenantrolin)<sub>2</sub> (tirozin)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]·(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) ve insan bronşiyal epitel hücre hattında (BEAS-2B) sitotoksik etkileri XTT testi ile, intraselular hücre içi ROS düzeyi ise DFCD-DA testi ile ve genotoksik etkileri Komet testi ile değerlendirilmiştir. Bakır (II) karışık ligant kompleksleri (Kompleks 1 ve Kompleks 2) Uludağ Üniversitesi Kimya Bölümü, Anorganik Kimya Araştırma Laboratuvarında doktora öğrencisi Duygu İnci ve öğretim üyesi Prof. Dr. Rahmiye Aydın tarafından sentezlenmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (İnci ve ark. 2017)

#### 3.1. Kullanılan Ekipmanlar, Sarf Malzemeler

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

**Çizelge 3.1.** Çalışmada kullanılan cihazlar

Ekipman	Marka/Model
Etüv	BINDER – CB 150
Soğutmalı Santrifüj	SIGMA-2-16PK
Laminar akım kabini	BERNER
Hassas terazi	SHIMADZU-AUW220D
Kaba terazi	RADWAG-WTB2000
Pastör fırını	Elektromag-M3025P
İnvert mikroskop	SOIF
Floresan mikroskop	NIKON-ECLIPSE 80i
Işık mikroskobu	NIKON-ECLIPSE E100
Komet yazılımı	Kameram 21
Elektroforez güç kaynağı	PeqLab-Reqpower 300
Elektroforez tankı	Cleaver Scientific
Mikroplaka okuyucu	Bio Tek, ELx800 U.S.A
Azot tankı	INT. CRYOGENICS – IC 20R

Ph metre	HANNA – HI 221
+4 buzdolabı	REGAL
-20 derin dondurucu	ALASKA – ADF 06 V
-80 derin dondurucu	ELCOLD
Karıştırıcı-ısıtıcı	M TOPS MS300HS
Hücre sayım cihazı	CEDEX XS
Distile su cihazı	MP MINI PURE – DEST UP
Su banyosu	NÜVEBATH NBS

**Çizelge 3.2.** Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

<b>Sarf Malzeme</b>	<b>Firma/Katalog No</b>
Serolojik pipet	COSTAR
Steril 15 ml’lik tüpler	ISOLAB
Steril flasklar (T-12,5, T-25 ve T-75)	NEST BIOTECHNOLOGY
RPMI-1640 (500 ml)	PAN BIOTECH/ P04-22100
Penisilin-Streptomisin	SIGMA/ P0781
L-Glutamin (100 ml)	SIGMA/ RNBB4386
Fetal-Bovine serum	PANBIOTECH/ P30-1985
Sodyum pirüvat (100 ml)	PANBIOTECH/ P04-43100
EDTA disodium salt	CARLO ERBA/ 303201
DPBS	PANBIOTECH/ P04-36500
Etanol	MERCK
NaCl	MERCK/ 7647-14-5
NaOH	SIGMA/ S8045-1 KG
Triton X-100	GERBU/ 34021300
Lowmelting Agaroz	SIGMA/ A9414-25G
Normal Agaroz	SIGMA/ A9539-100G
DMSO	MERCK/ K39661843
Tripsin-EDTA	GIBCO/ 1304898

DCFH-DA ( ROS Kiti)	Cell Biolabs'OxiSelect™ / 59342021
XTT Hücre proliferasyon kiti	BIOLOGICAL INDUSTRIES/1548576

### 3.2. Kullanılan Hücre Hatları

Tez çalışmasında BEAS-2B (sağlıklı insan bronşiyal epitel) hücre hattı ve A549 (insan akciğer kanseri) hücre hattı kullanılmıştır.

#### 3.2.1. Hücre Kültürü Şartları

Hücre kültürü havalandırılmalı T75 flasklar içinde 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub> ortama sahip inkübatörde yapılmıştır. Flasklara konulacak besiyeri: 500 ml RPMI Medium + 60 ml FBS (fetal bovine serum) + 3 ml L- glutamine, 6 ml penisilin-streptomisin, 6 ml sodyum pirüvattan oluşmaktadır.

### 3.3. Kullanılan Kompleksler

Bu çalışmada suda çözünebilir, yeni bakır (II) karışık ligant kompleksleri kullanılmıştır. Kompleksler; 4 - metil-1, 10, - fenantrolin ve 5 – metil – 1, 10 – fenantrolin, tirozin lidandlarından Uludağ Üniversitesi Kimya Anorganik Kimya Araştırma Laboratuvarında sentezlenmiş olup Kompleks 1 ve Kompleks 2 şeklinde adlandırılmıştır. Komplekslerin yapıları hazırlanan bir makalede ayrıntılı bir şekilde verilmiştir (İnci ve ark. 2017).

### 3.4. XTT Testi

XTT bir sitotoksikite testidir. Sitotoksikite testleri sayesinde toksik konsantrasyon aralığının tanımlanabilmesi, maruz kalma-konsantrasyon ilişkisinin belirlenmesi ve antikanser aktivitenin tahmin edilebilmesi gibi durumlar mümkündür. XTT testinin mantığı, XTT ayırıcında bulunan tetrazolium halkasının canlı hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak kırmızı renkli formazan kristalleri oluşturmasına dayanmaktadır.

#### XTT Testi Protokolü

Hücrelerin 75-cm<sup>2</sup>lik flasklarda 1 hafta boyunca büyümesi beklenmiştir. Büyüyen hücreler 96 kuyucuklu plakelere ekilmiştir. A549 ve Beas-2B hücre hatları için her bir kuyucuğa 5×10<sup>3</sup> hücre ve yine her bir kuyucuğa 200'er µL besi yeri konulmuştur. 37 °C

ve %5 CO<sub>2</sub> ortamlı inkübatörde 24 saat inkübe edildikten sonra besi yeri değiştirilmiştir ve 0,1'den 20,0 µM arasında değişen konsantrasyonlarda bakır kompleksi ile dozlanmıştır. 24 saat muameleden sonra kuyucuklar PBS ile yıkanmış ve 100 µL yeni besiyeri eklenmiştir. Her bir kuyucuğa aktive olmuş XTT solüsyonu eklenmiş ve 3-4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda mikropilaka okuyucu ile 450nm'de absorbanans ölçülmüştür ve proliferasyon eğrisi çizilmiştir. Blankler çıkarıldıktan sonra IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> konsantrasyonları **(1- A muamele grubu / A kontrol) x100** formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Y eksenine doz, X eksenine canlılık olan dağılım eğrisi çizilmiştir.

Daha sonra grafik üzerinde doğrusal 3 nokta seçilerek eğilim çizgisi eklenmiştir. Eğilim çizgisinin formülünde y yerine 75, 50, 25 ve 12,5 yazılarak sırası ile IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> konsantrasyonları hesaplanmıştır.

#### **Kimyasalların Hazırlanması:**

1. Kimyasallar deneyden hemen önce 37 °C'de ısıtılarak eritilmiştir.
2. XTT ölçüm solüsyonunu hazırlamak için XTT kimyasalına 1:50 hacim oranında elektron bağlama solüsyonu eklenmiştir. Örneğin 96 kuyucuklu platete 5000 µL XTT solüsyonu için 100 µL aktive edici ajana ihtiyaç duyulmaktadır.

#### **3.5. Komet Testi**

Komet testi ya da tek hücre jel (SCG) elektroforez testi, DNA hasarı ve onarım çalışmaları için yararlı bir tekniktir. Komet deneyi daha önce in vitro ve in vivo olarak çeşitli hücrelerde farklı ajanlar tarafından oluşturan DNA hasarını ve onarım değerlendirmesi nedeniyle pek çok çalışmada kullanılmıştır. Test genotoksisite testi, DNA hasarı ve onarımı, çevre biyoizleme ve insan nüfusu izlemesinde yaygın olarak uygulanmaktadır.

Bu testin alkali versiyonunda DNA'nın iplik kırıkları ve alkali - duyarlı siteleri görünür ve DNA göçü miktarını hücredeki DNA hasarının miktarı belirtmektedir. Komet testi sitogenetik testlerin tipik tek hücreli yaklaşımı ve DNA tek sarmal kırık ve / veya alkali - duyarlı bölgeleri tespit eden biyokimyasal tekniklerin basitliğini birleştirmektedir. SCG testin avantajları; basit ve hızlı performans, DNA hasarını tespit duyarlılığı, bireysel hücre düzeyinde verilerin analizi, son derece küçük numune kullanılması, ve hemen hemen tüm ökaryot hücre popülasyonuna uygulanabilmesidir. Görüntüleme analizi



büyük ölçüde kolaylaştırıp komet ölçümleri olanaklarını artırması yanında, testin gerçekleştirme maliyeti son derece düşüktür.

Komet testi alkali olarak 1988'de Singh ve arkadaşları tarafından tanıtıldı. Elektroforez pH> 13.0' de sürdüğünde, DNA tek iplikli kırılmalar ve alkali- dayanıksız bölgelerin tespitini sağlamaktadır. Olive tarafından daha sonra geliştirmiş testin diğer versiyonunda alkali içinde erimesi, sonrasında izleyen elektroforez ile ya nötr ya da hafif alkali (pH 12.1) koşullarında DNA çift iplikli veya tek iplikli kırıkları sırasıyla bulması ile geliştirilmiştir. Genotoksik ajanların çoğunluğu çift iplik kırılmasından daha çok tek iplik kırıkları ve alkali-dayanıksız bölgeleri uyarır alkalın versiyonu da (pH> 13.0) DNA hasar saptamada yüksek hassasiyete sahiptir. 1996 yılında Klaude ve arkadaşları tarafından tanıtılan yeni test prosedürünün önemli yönleri agaroz-ön kaplamalı slayt ve kurutma jeli ile birlikte kullanımı ve kometin fiksasyonu ile test kullanımı çok daha basitleştirilmiştir.

### **Komet Testi Protokolü**

Hücreler 25-cm<sup>2</sup>'lik flasklara bölünmüş ve çoğalması için inkübatörde bekletilmiştir. Çoğalan hücreler IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> konsantrasyonlarında bakır kompleksi ile 24 saat muamele edilmiştir. Dozlanan hücreler 24 saat sonra tripsinlenerek kaldırılmıştır ve santrifüj edilmiştir.

- 1) Bu aşamada kullanılan tüm solüsyonları soğuktur. Bu prosedür karanlıkta gerçekleştirilmelidir. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra kalan hücreler 1 mL PBS ile seyreltilmiş ve iyice karıştırılmıştır.
- 2) Hücreleri jel içine gömmek için, düşük erime noktalı agaroz (LMA) kullanılmıştır. 0,065 g LMA tartılmış ve 10 mL PBS içinde ısıtılarak jel haline getirilmiştir.
- 3) Eppendorf tüplere 250'şer µL LMA aktarılmıştır. Bu eppendorf tüpler 37 °C de bekleyen sıcak su banyosuna yerleştirilmiştir.
- 4) Hücre pelletlerinden 100 µL çekilmiş, su banyosunda bekleyen ve içinde 250 µL LMA jeli bulunan eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Jel ve hücre süspansiyonu pipetaj yoluyla karıştırılmıştır.
- 5) Bu karışımdan 80 µL çekilmiş ve lam üzerine yayılmıştır. Her çalışma grubu kendi lamının üzerine yayılmıştır.

- 6) Üzerine karışım koyulan lamalar hemen lamelle kapatılmış ve buz üzerine kaldırılmıştır.
- 7) Yayma işlemi bittikten sonra lamalar 15 dakika +4 °C de bekletilmiştir.
- 8) 2 dakika sonra lamalar üzerindeki lameller çıkarılmıştır.
- 9) Lamelleri çıkmış olan lamalar şalelere dizilmiş ve şaleler lizis solüsyonu ile doldurulmuştur. Lamalar şaleler içinde 1 gece boyunca karanlıkta ve +4 °C de bekletilmiştir.
- 10) Ertesi gün lamalar lizis solüsyonundan çıkarılmış ve elektroforez tankına dizilmiştir.
- 11) Tanklar yürütme tamponu ile doldurulmuş ve 30 dakika yürütme tamponu içinde akım verilmeden bekletilmiştir.
- 12) Yürütme işlemi 500 mA, 25V'da, yarım saatte gerçekleştirilmiştir.
- 13) Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra lamalar tanktan çıkarılıp nötralizasyon tamponuna daldırılmıştır ve 5 dakika lamalar tampon içerisinde karanlıkta bekletilmiştir.
- 14) Nötralizasyon işlemi sonrasında lamalar tampondan çıkarılıp soğuk distile suya daldırılıp yıkanmış ve kuruması beklenmiştir.
- 15) Kuruduktan sonra lamalar absöü etanol içinde 5 dakika fikse edilmiştir.

### **Boyama İşlemi**

20 µg/mL konsantrasyonlu EtBr boya solüsyonundan enjektör ile 0,2 mL çekilir ve lamlara damlatılır. Boya damlatıldıktan sonra lamalar lamellerle kapatılıp, mikroskopik inceleme için hazırlanır.

### **Lamların mikroskopta incelenmesi**

Sayım ve değerlendirme aşamalarında floresan mikroskop kullanılmıştır. Boyanılan lamlara mikroskopta bakılmış ve her lamdan 100 tane hücre sayılmıştır. Değerlendirme kameram 21 komet sayım programı ile yapılmıştır. Komet uzunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruk moment uzunluğu verileri değerlendirilmiştir. Test iki bağımsız tekrar halinde yapılmıştır.

### 3.6. ROS Ölçümü

Bakır kompleksinin hücre içi ROS oluşumuna etkisi DCF-DA maddesinin RPMI mediumda çözülmesi ile değerlendirilmiştir. 2',7' -dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) boyası kendisi floresan özellik göstermez. Hücre içine difüzyonla girer.

DCFH hücresel esterazlarına hidrolize olmaktadır. DCFH ise ROS varlığında hızlı şekilde oksidize olarak yüksek seviyede floresan etkisi olan 2',7' dichlorodihydrofluorescein (DCF) oluşturmaktadır.

#### ROS Testi Protokolü

ROS testi için hücreler 75-cm<sup>2</sup>'lik flasklarda üretilmiştir. Büyüyen hücreler 96 kuyucuklu siyah plakelere iki tekrarlı şekilde ekilmiştir ve 24 saat inkübe edilmiştir. Kültür sonunda besiyeri değiştirildikten sonra hücreler 2 kez PBS ile yıkanmıştır. Hücrelere 1X DCFH-DA/besiyeri çözeltisinden 100'er µL eklenmiş ve 37 °C'de 120 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler 2 kez PBS ile tekrar yıkanmıştır. DCFH-DA yüklenmiş hücrelere 2 saat bakır kompleksinin IC<sub>75</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> ve IC<sub>12,5</sub> dozları ile muamele edilmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin IC<sub>50</sub> dozu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Konsantrasyonu 0 µM – 10 µM arasında değişen DCF standartlarının 1:10 seyreltme serisi 1mM DCF stok solüsyonunun besiyeri ile seyreltilmesi ile hazırlanır (tüp dilüsyon yöntemi). DCF stoğundan 10 µL alınıp 990 µL RPMI medium bulunan 1 numaralı standarta eklenir ve daha sonra standart 1'den diğer standartlara zincirleme şekilde 100'er µL alınıp seyreltme işlemi yapılır. Absorbansı 480 nm/530 nm'de florometrik plaka okuyucuda plakeler 24 saat belirli aralıklarla okunmuştur. ROS değerleri çizilen dağılım grafiğinin eğim formülü ile hesaplanmıştır. Deney iki tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS 24 paket program kullanılarak Mann-Withney U testi ile yapılmıştır.

Konsantrasyonu 0 µM – 10 µM arasında değişen DCF standartlarının 1:10 seyreltme serisi 1mM DCF stok solüsyonunun besiyeri ile seyreltilmesi ile hazırlanır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. XTT Bulguları

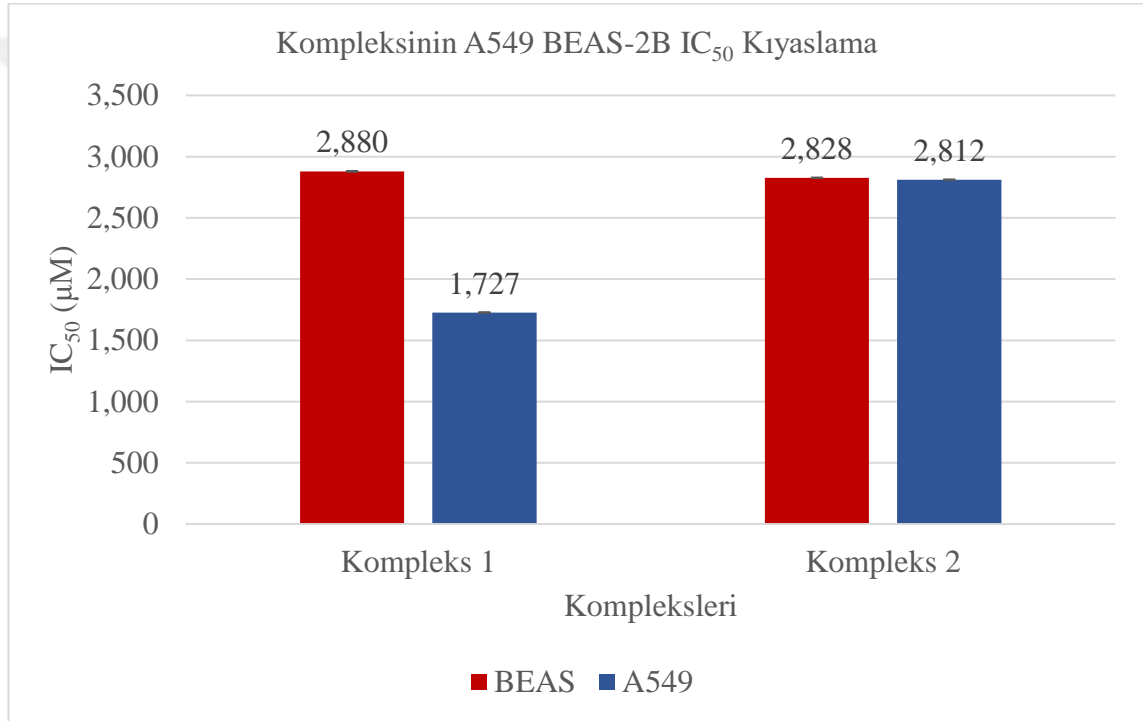
XTT testinden elde edilen bulgular Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Kompleks 1 ve 2'nin 0,1'den 20 µM arasında değişen konsantrasyonları ile A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına 24 saat muamele edilmiştir. Kompleks 1 ve 2'nin A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında IC<sub>50</sub> konsantrasyonu verilmiştir.

**Çizelge 4.1:** A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında IC<sub>50</sub> konsantrasyonu verilmiştir

Hücre Hattı	Kompleks 1		Kompleks 2	
	A549	BEAS-2B	A549	BEAS-2B
IC <sub>50</sub> (µM) ± SH	1,727 ± 0,190*	2,880 ± 0,299*	2,812 ± 0,24	2,828 ± 0,253
R <sup>2</sup> ± SH	0,975 ± 0,003	0,993 ± 0,004	0,997 ± 0,001	0,984 ± 0,007

#### 4.1.1. Kompleks 1 ve 2'nin A549 BEAS-2B IC<sub>50</sub> Kıyaslama

A549 ve BEAS-2B hücre hatlarının Kompleks 1'in 0,1'den 20 µM arasında değişen konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu XTT testinden elde edilen IC<sub>50</sub> bulgu Çizelge 4.1 ve şekil 4.1'da gösterilmiştir. Kompleks 1'in A549 ve BEAS-2B hücre hatlarındaki IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 1,727 ± 0,190\* µM; 2,880 ± 0,299\* µM olarak belirlenmiştir. Kompleks 1'in A549 ve BEAS-2B hücre hattındaki IC<sub>50</sub> değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmuştur (p ≤ 0,05). BEAS-2B'e göre Kompleks 1'in A549 hücre hattının üzerinde daha etkili olup yüksek sitotoksitesi göstermiştir.



**Şekil 4.1.** Kompleks 1 ve 2'nin A549 BEAS-2B IC<sub>50</sub> değerleri verilmiştir (µM).

A549 ve BEAS-2B hücre hatlarının Kompleks 2'nin 0,1'den 20 µM arasında değişen konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu XTT testinden elde edilen IC<sub>50</sub> bulgu Çizelge 4.1 ve şekil 4.1'da gösterilmiştir. Kompleks 2'nin A549 ve BEAS-2B hücre hatlarındaki IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 2,812 ± 0,24 µM; 2,828 ± 0,253 µM olarak belirlenmiştir. Kompleks 2'nin A549 ve BEAS-2B hücre hattındaki IC<sub>50</sub> değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı bulunmuştur (p ≥ 0,05). Kompleks 2'nin A549 ve BEAS-2B hücre hatlarının üzerinde etkisi hemen hemen aynı

(2,812 ± 0,24 µM ~ 2,828 ± 0,253 µM) olup, BEAS-2B hücre hattına beklenmediğinden çok yüksek sitotoksitesi göstermiştir.

#### 4.2. Komet Testi Bulguları

Komet testinde Kuyruk uzunluğu (K.U.) (µm), Kuyruk %DNA (K.%DNA) ve Olive Kuyruk Momenti (OTM; Olive Tail Moment) parametreleri değerlendirilmiştir. IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen yukarıdaki parametrelerin değerleri sırayla Çizelge 4.2; 4.3; ve 4.4'te verilmiştir. İstatistiksel analiz değerlendirilmesi için veriler normal dağılım göstermediği için Mann-Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

##### 4.2.1. Kuyruk Uzunluğu (KU) Bulguları

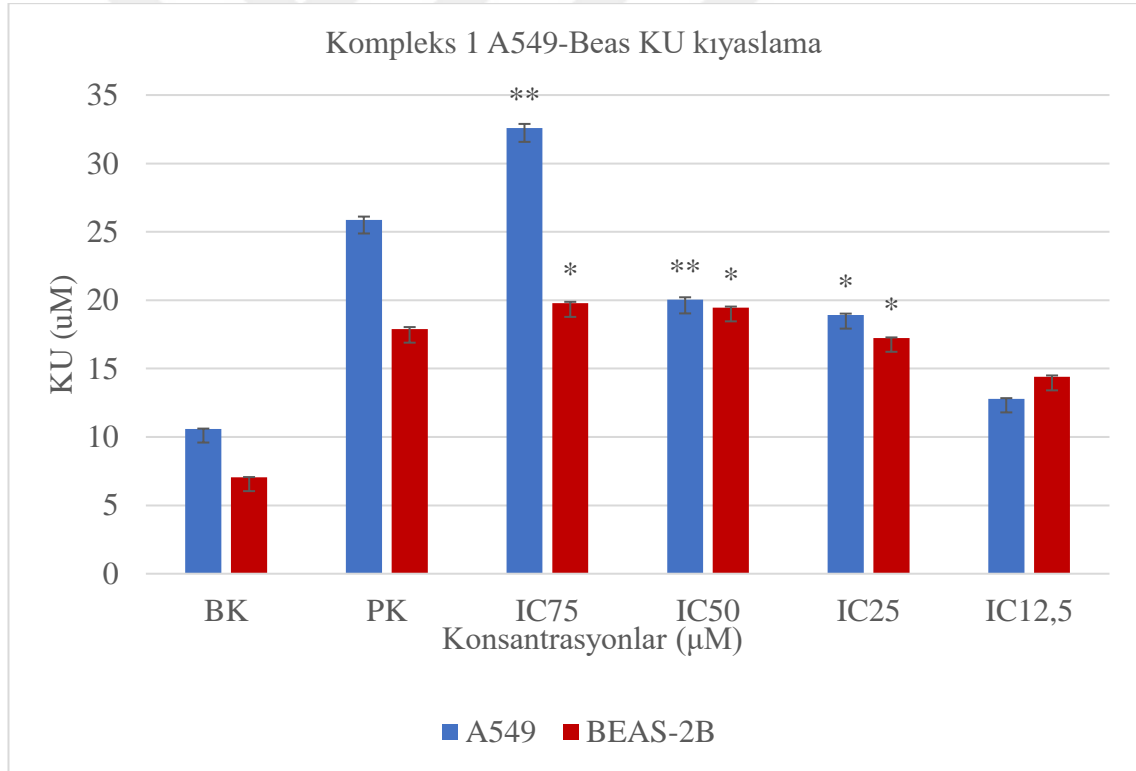
Kompleks 1 ve Kompleks 2'nin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri (µm) Çizelge 4.2'de verilmiştir. KU değerlerinin istatistiksel analizi veriler normal dağılım göstermediği için Mann-Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Kompleks 1 ve 2'nin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama KU değerleri (µm), ±; standart hatayı ifade etmektedir, ilgili büyüme kontrol ile karşılaştırılmıştır \*; p ≤ 0,05, \*\*; p ≤ 0,01 a; Kompleks 1 ile kompleks 2 nin kendi aralarında Kuyruk uzunluğu açısından karşılaştırma sonuçları, p ≤ 0,001.

Konsantrasyonlar	Kompleks 1		Kompleks 2	
	A549	BEAS-2B	A549	BEAS-2B
BK	10,591 ± 0,02	7,039 ± 0,028	10,591 ± 0,02	7,039 ± 0,028
PK	25,879 ± 0,235	17,894 ± 0,14	25,879 ± 0,235	17,894 ± 0,14
IC <sub>75</sub>	32,578 ± 0,313**	19,779 ± 0,103*	70,313 ± 0,46**a	22,04 ± 0,118*
IC <sub>50</sub>	20,034 ± 0,178**	19,454 ± 0,081*	54,459 ± 0,321**a	20,544 ± 0,122*
IC <sub>25</sub>	18,922 ± 0,098*	17,228 ± 0,051*	37,758 ± 0,326**a	18,782 ± 0,099*
IC <sub>12,5</sub>	12,795 ± 0,043	14,408 ± 0,09	21,491 ± 0,193*a	14,706 ± 0,051*

#### 4.2.1.1. Kompleks 1 A549 BEAS-2B KU kıyaslama

Kompleks 1 ile A549 hücrelerinde ortalama K.U. büyüme kontrol grubunda  $10,59 \pm 0,02$  ve pozitif kontrol ( $H_2O_2$ ) grubunda  $25,879 \pm 0,235$  olarak belirlenmiştir (çizelge 4.2 ve Şekil 4.2). A549 hücrelerine Kompleks 1'in  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  konsantrasyonları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk uzunluğu değerleri sırasıyla  $12,795 \pm 0,043$ ;  $18,922 \pm 0,098$ ;  $20,034 \pm 0,178$ ;  $32,578 \pm 0,313$   $\mu m$  olarak biçimindedir. K.U. değerleri normal dağılım çıkmadığından istatistiksel analizi Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Kuyruk uzunluğu bakımından tüm konsantrasyon grupları kendi aralarında karşılaştırılmış ve konsantrasyon artışının kuyruk uzunluğu değerini istatistiki olarak anlamlı düzeyde yükselttiği belirlenmiştir ( $p \leq 0,01$ ). Büyüme kontrol ve pozitif kontrol da kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ( $p \leq 0,01$ ).



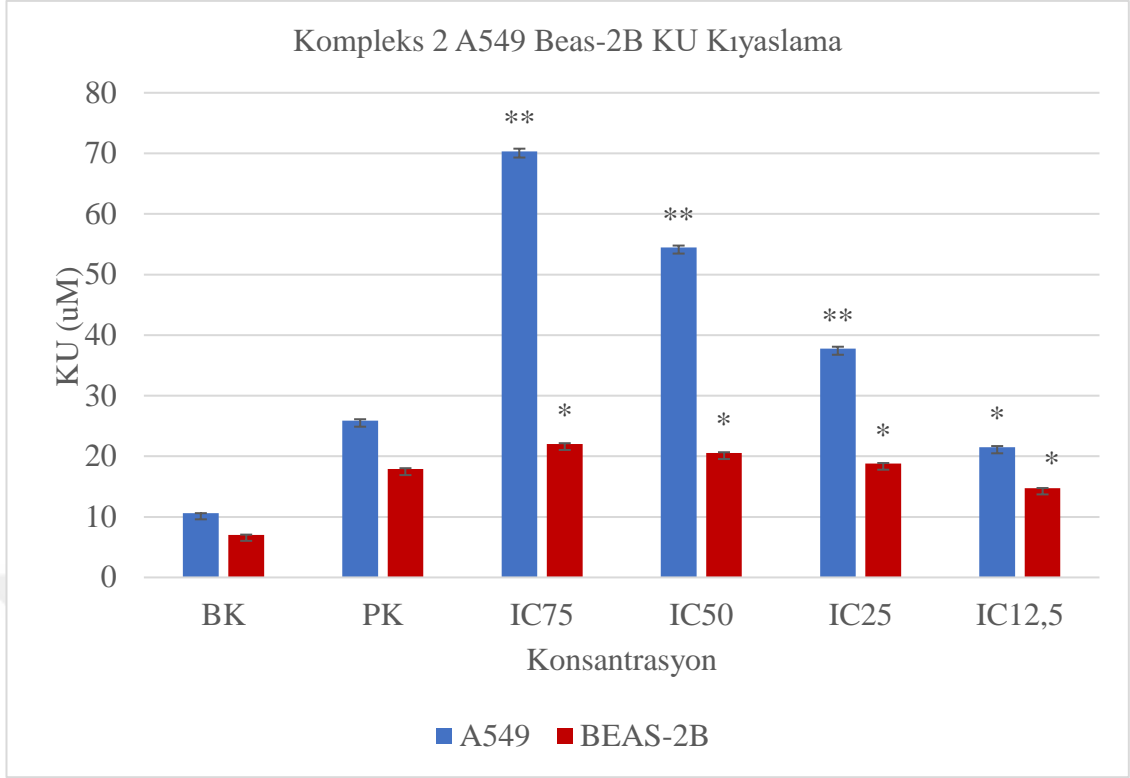
**Şekil 4.2.** Kompleks 1'in  $IC_{12,5}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$  ve  $IC_{75}$  konsantrasyonları ile A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama KU değerleri ( $\mu m$ ), ilgili büyüme kontrol ile karşılaştırılmıştır \*;  $p \leq 0,05$ , \*\*;  $p \leq 0,01$ .

Kompleks 1 ile Beas-2B hücrelerinde ortalama KU büyüme kontrol grubunda  $7,039 \pm 0,028$  ve pozitif kontrol grubunda  $17,894 \pm 0,14$  olarak elde edilmiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2). BEAS-2B hücrelerine Kompleks 1'in IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk uzunluğu değerleri sırasıyla  $14,408 \pm 0,09$ ;  $17,228 \pm 0,051$ ;  $19,454 \pm 0,081$ ;  $19,779 \pm 0,103$  biçimindedir. KU değerleri normal dağılım çıkmadığından istatistiksel analizi Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Kompleks 1'in BEAS-2B IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonlar gruplarının ortalama KU değerleri büyüme kontrol ile kıyaslandığında KU değerini istatistiki olarak anlamlı seviyede arttırdığı belirlenmiştir ( $p \leq 0,05$ ). Büyüme kontrol ve pozitif kontrol da kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ( $p \leq 0,05$ ).

#### **4.2.1.2. Kompleks 2 A549 BEAS-2B KU kıyaslama**

Kompleks 2 ile A549 hücrelerinde ortalama K.U büyüme kontrol grubunda  $10,591 \pm 0,02$  ve pozitif kontrol (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) grubunda  $25,879 \pm 0,235$  olarak belirlenmiştir (çizelge 4.2 ve Şekil 4.3). A549 hücrelerine Kompleks 2'nin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk uzunluğu değerleri sırasıyla  $21,491 \pm 0,193$ ;  $37,758 \pm 0,326$ ;  $54,459 \pm 0,321$ ;  $70,313 \pm 0,46$  olarak belirlenmiştir. KU değerleri normal dağılım göstermediğinden istatistiksel analizi Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Kuyruk uzunluğu bakımından tüm doz grupları kendi aralarında karşılaştırılmış ve doz artışının kuyruk uzunluğu değerini istatistiki olarak anlamlı düzeyde yükselttiği belirlenmiştir ( $p \leq 0,01$ ). Büyüme kontrol ve pozitif kontrol da kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ( $p \leq 0,01$ ). Kompleks 1 ve 2'nin ortalama KU değerlerini kıyaslandığında istatistiksel olarak kompleks 2'nin daha anlamlı seviyede artışa yol açtığı gözlenmiştir ( $p \leq 0,001$ ).





**Şekil 4.3.** Kompleks 2'nin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama KU değerleri (µm), ilgili büyüme kontrol ile karşılaştırılmıştır \*; p ≤ 0,05, \*\*; p ≤ 0,01.

Kompleks 2 ile Beas-2B hücre hatına IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri (µm) çizelge 4.2 ve Şekil 4.3'te verilmiştir. Beas-2B hücrelerinde ortalama KU büyüme kontrol grubunda  $7,039 \pm 0,028$  ve pozitif kontrol grubunda  $17,894 \pm 0,14$  olarak elde edilmiştir. Beas-2B hücrelerine Kompleks 2'nin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk uzunluğu değerleri sırasıyla  $14,706 \pm 0,051$ ;  $18,782 \pm 0,099$ ;  $20,544 \pm 0,122$ ;  $22,04 \pm 0,118$  biçimindedir. Kompleks 2'nin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları gruplarının ortalama KU değerleri büyüme kontrol ile kıyaslandığında her dört konsantrasyonun da KU değerini istatistiki olarak anlamlı düzeyde arttırdığı belirlenmiştir (p ≤ 0,05). Büyüme kontrol ve pozitif kontrol da kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (p ≤ 0,05).

#### 4.2.2. Kuyruk %DNA Bulguları

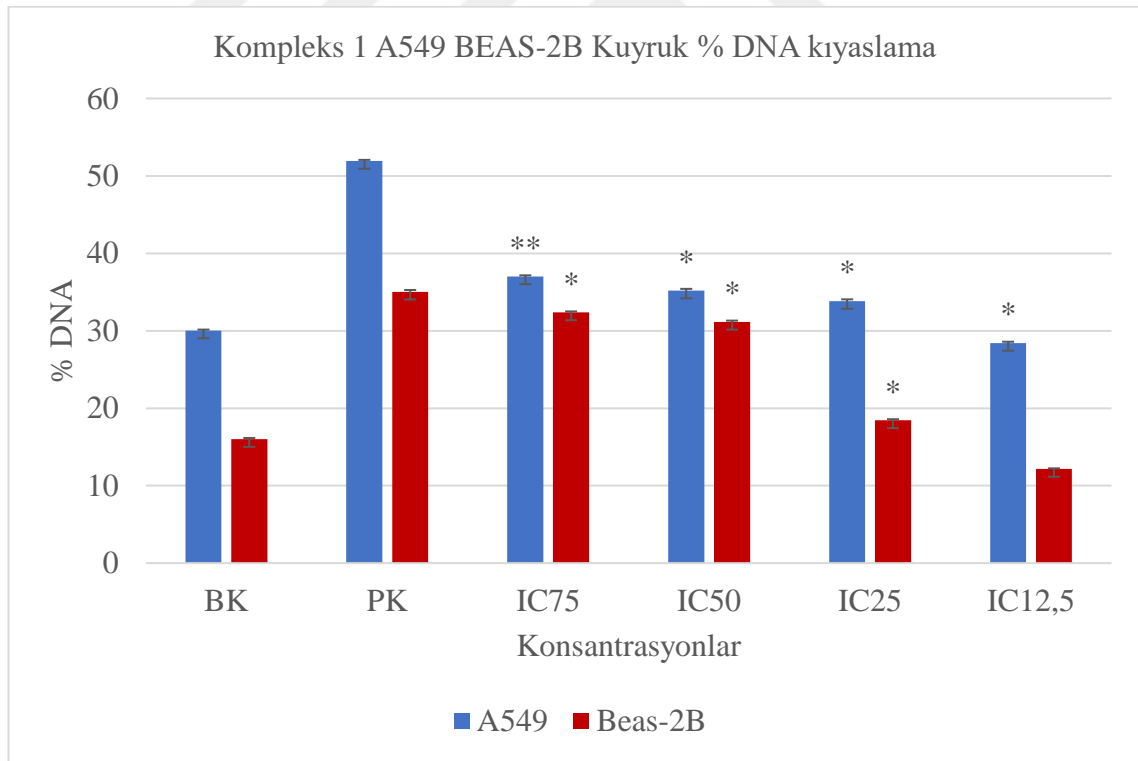
Kompleks 1 ve 2'nin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen kuyruk %DNA değerleri Çizelge 3.3'te verilmiştir. Kuyruk %DNA değerlerinin istatistiksel analiz verileri normal dağılım göstermediği için Mann-Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Kompleks 1 ve 2'nin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama Kuyruk %DNA değerleri,  $\pm$ ; standart hatayı ifade etmektedir, ilgili büyüme kontrol ile karşılaştırılmıştır \*;  $p \leq 0,05$ , \*\*;  $p \leq 0,01$  a; Kompleks 1 ile kompleks 2 nin kendi aralarında Kuyruk %DNA açısından karşılaştırma sonuçları,  $p \leq 0,001$ .

Konsantrasyonlar	Kompleks 1		Kompleks 2	
	A549	BEAS-2B	A549	BEAS-2B
BK	30,039 $\pm$ 0,12	16,018 $\pm$ 0,149	30,039 $\pm$ 0,12	16,018 $\pm$ 0,149
PK	51,927 $\pm$ 0,148	35,045 $\pm$ 0,224	51,927 $\pm$ 0,148	35,045 $\pm$ 0,224
IC <sub>75</sub>	37,023 $\pm$ 0,141**	32,375 $\pm$ 0,131*	62,633 $\pm$ 0,283**a	38,673 $\pm$ 0,175**
IC <sub>50</sub>	35,197 $\pm$ 0,223*	31,153 $\pm$ 0,165*	59,719 $\pm$ 0,25**a	34,309 $\pm$ 0,203*
IC <sub>25</sub>	33,845 $\pm$ 0,221*	18,434 $\pm$ 0,151*	43,632 $\pm$ 0,2*a	32,203 $\pm$ 0,237*
IC <sub>12,5</sub>	28,434 $\pm$ 0,157*	12,168 $\pm$ 0,073	26,808 $\pm$ 0,145*	27,707 $\pm$ 0,160*

#### 4.2.2.1. Kompleks 1 A549 BEAS-2B Kuyruk % DNA kıyaslama

Kompleks 1 ile A549 hücre hattında IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen kuyruk % DNA değerleri çizelge 4.3. ve Şekil 4.4'te verilmiştir. A549 hücrelerine ortalama kuyruk % DNA değerleri büyüme kontrol grubunda 30,039 ± 0,12 ve pozitif kontrol grubunda 51,927 ± 0,148 olarak elde edilmiştir. A549 hücrelerine Kompleks 1'in IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk %DNA değerleri sırasıyla 28,434 ± 0,157; 33,845 ± 0,221; 35,197 ± 0,223; ve 37,023 ± 0,141 biçimindedir. kuyruk % DNA değerleri normal dağılım göstermediğinden istatistiksel analizi Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Kuyruk %DNA açısından bakıldığında tüm konsantrasyonlar büyüme kontrol ile karşılaştırılınca, konsantrasyonlar artışının kuyruk %DNA değerini istatistiki olarak anlamlı düzeyde yükselttiği belirlenmiştir (p≤0,01). Büyüme kontrol ve pozitif kontrol da kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (p≤0,01).

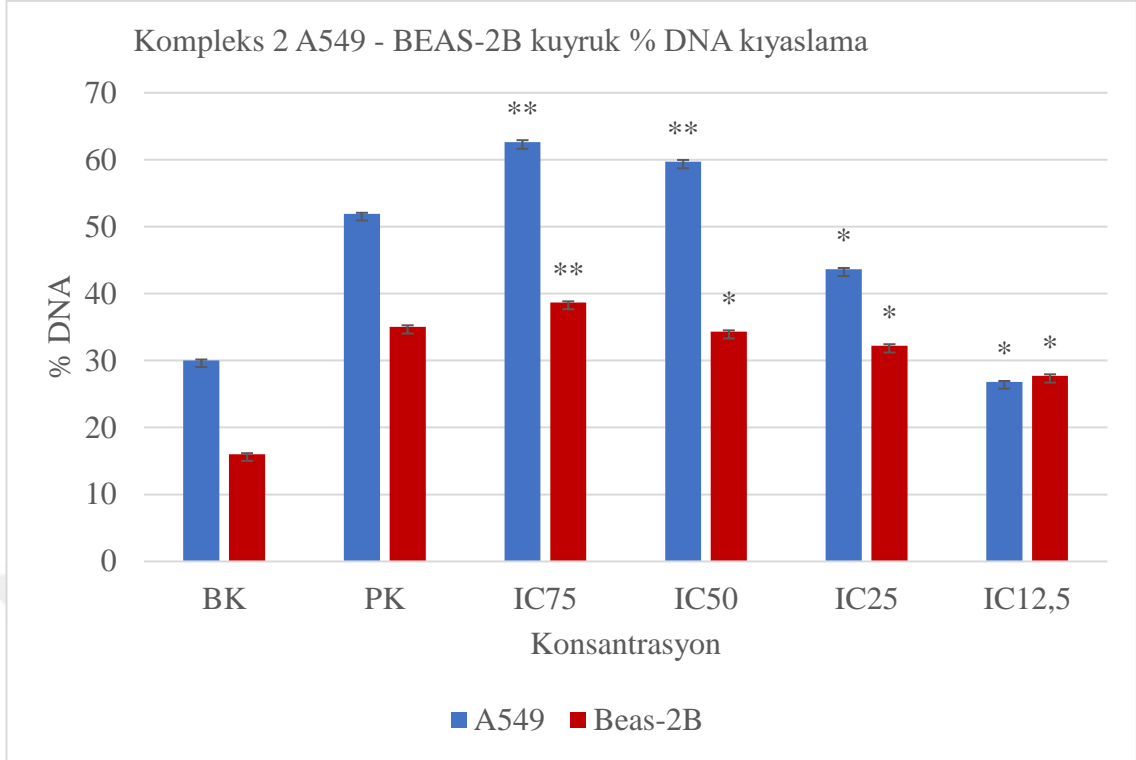


**Şekil 4.4.** Kompleks 1'in IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama Kuyruk % DNA değerleri, ilgili büyüme kontrol ile karşılaştırılmıştır \*; p≤ 0,05, \*\*; p≤ 0,01.

Kompleks 1'in BEAS-2B hücre hattına IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen kuyruk %DNA değerleri çizelge 4.3. ve Şekil 4.4'te verilmiştir. BEAS-2B hücrelerinde ortalama kuyruk %DNA değerleri kontrol grubunda  $16,018 \pm 0,149$  ve pozitif kontrol grubunda  $35,045 \pm 0,224$  biçimindedir. BEAS-2B hücrelerinde Kompleks 1'in IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk %DNA değerleri sırasıyla  $12,168 \pm 0,073$ ;  $18,434 \pm 0,151$ ;  $31,153 \pm 0,165$ ; ve  $32,375 \pm 0,131$  şeklindedir. Kompleks 1 BEAS-2B'in konsantrasyonları gruplarının ortalama kuyruk %DNA değerleri büyüme kontrol ile kıyaslandığında IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonlarda kuyruk %DNA değerini istatistiki olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı belirlenmiştir ( $p \leq 0,01$ ). Büyüme kontrol ve pozitif kontrol da kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ( $p \leq 0,01$ ).

#### **4.2.2.2 Kompleks 2 A549 BEAS-2B Kuyruk % DNA kıyaslama**

Kompleks 2 ile A549 hücre hattında IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen kuyruk %DNA değerleri çizelge 4.3. ve Şekil 4.5'te verilmiştir. A549 hücrelerinde ortalama kuyruk % DNA değerleri büyüme kontrol grubunda  $30,039 \pm 0,12$  ve pozitif kontrol grubunda  $51,927 \pm 0,148$  olarak elde edilmiştir. A549 hücrelerine Kompleks 1'in IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama kuyruk %DNA değerleri sırasıyla  $26,808 \pm 0,145$ ;  $43,632 \pm 0,2$ ;  $59,719 \pm 0,25$ ; ve  $62,633 \pm 0,283$  biçimindedir. Kuyruk %DNA değerleri normal dağılım göstermediği için istatistiksel analizi Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Kuyruk %DNA açısından bakıldığında konsantrasyonlar grupları büyüme kontrol ile karşılaştırılınca, konsantrasyonları artışının kuyruk %DNA değerini istatistiki olarak anlamlı düzeyde yükselttiği belirlenmiştir ( $p \leq 0,01$ ). Büyüme kontrol ve pozitif kontrol da kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p \leq 0,01$ ).



**Şekil 4.5.** Kompleks 1'in IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile BEAS-2B hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama Kuyruk % DNA değerleri, ilgili büyüme kontrol ile karşılaştırılmıştır \*; p ≤ 0,01.

Kompleks 2 ile BEAS-2B hücre hattına IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen kuyruk %DNA değerleri çizelge 4.3. ve Şekil 4.5'te verilmiştir. BEAS-2B hücrelerine ortalama Kuyruk %DNA büyüme kontrol grubunda  $16,018 \pm 0,149$  ve pozitif kontrol grubunda  $35,045 \pm 0,224$  olarak elde edilmiştir. BEAS-2B hücrelerine Kompleks 2'nin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama Kuyruk % DNA değerleri sırasıyla  $27,707 \pm 0,160$ ;  $32,203 \pm 0,237$ ;  $34,309 \pm 0,203$ ; ve  $38,673 \pm 0,175$  biçimindedir. Kompleks ortalama Kuyruk % DNA değerleri büyüme kontrol ile kıyaslandığında her dört konsantrasyonun da Kuyruk % DNA değerini istatistiki olarak anlamlı düzeyde yükselttiği belirlenmiştir (p ≤ 0,05 ve p ≤ 0,01). Büyüme kontrol ve pozitif kontrol da kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (p ≤ 0,01).

#### 4.2.3. Olive Kuyruk Momenti (OTM) bulguları

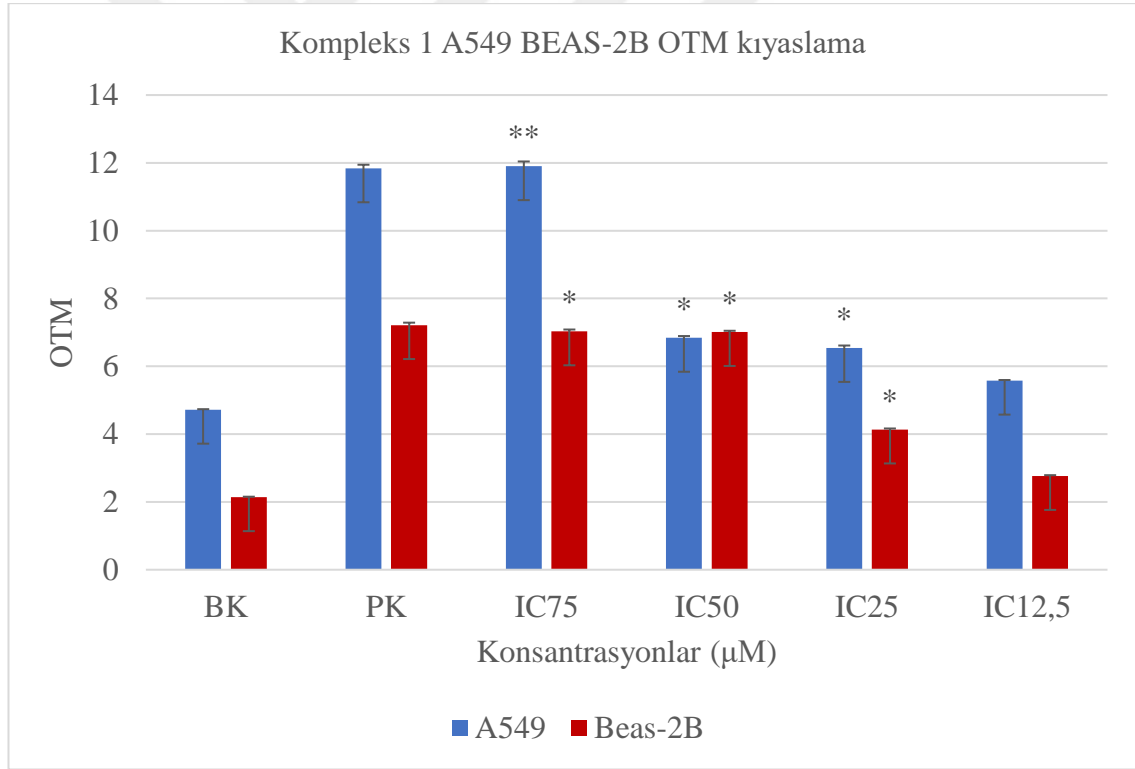
Kompleks 1 ve 2'nin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen OTM değerleri Çizelge 3.4'te verilmiştir. OTM değerlerinin istatistiksel analizi veriler normal dağılım göstermediği için Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

**Çizelge 4.4.** Kompleksi 1 ve 2'nin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama OTM değerleri ( $\mu$ m),  $\pm$ ; standart hatayı ifade etmektedir, ilgili büyüme kontrol ile karşılaştırılmıştır a; p $\leq$  0,05, b; p $\leq$ 0,01 c; p $\leq$  0,001

Konsantrasyon-lar	Kompleks 1		Kompleks 2	
	A549	BEAS-2B	A549	BEAS-2B
BK	4,718 $\pm$ 0,017	2,138 $\pm$ 0,016	4,718 $\pm$ 0,017	2,138 $\pm$ 0,016
PK	11,838 $\pm$ 0,107	7,214 $\pm$ 0,073	11,838 $\pm$ 0,107	7,214 $\pm$ 0,073
IC <sub>75</sub>	11,901 $\pm$ 0,14**	7,03 $\pm$ 0,055*	34,057 $\pm$ 0,249**	8,871 $\pm$ 0,070*
IC <sub>50</sub>	6,839 $\pm$ 0,053*	7,01 $\pm$ 0,038*	25,108 $\pm$ 0,175**	8,602 $\pm$ 0,083*
IC <sub>25</sub>	6,54 $\pm$ 0,073*	4,135 $\pm$ 0,031*	14,966 $\pm$ 0,147*	7,647 $\pm$ 0,061*
IC <sub>12,5</sub>	5,575 $\pm$ 0,02	2,764 $\pm$ 0,025	6,5785 $\pm$ 0,078*	4,812 $\pm$ 0,023

#### 4.2.3.1. Kompleks 1 A549 BEAS-2B OTM kıyaslama

Kompleks 1'in A549 hücre hattına IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen OTM verileri çizelge 4.4 ve Şekil 4.6'da verilmiştir. A549 hücrelerinde ortalama OTM değerleri büyüme kontrol grubunda  $4,718 \pm 0,017$  ve pozitif kontrol grubunda  $11,838 \pm 0,107$  olarak elde edilmiştir. A549 hücrelerine Kompleks 1'in IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama OTM değerleri sırasıyla  $5,575 \pm 0,02$ ;  $6,54 \pm 0,073$ ;  $6,839 \pm 0,053$ ; ve  $11,901 \pm 0,14$  şeklindedir. Kompleks IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyon gruplarının ortalama OTM değerleri büyüme kontrol ile mukayese edildiğinde IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttığı gözlenmiştir ( $p \leq 0,01$ ). Büyüme kontrol ve pozitif kontrol da kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p \leq 0,01$ ).



**Şekil 4.6.** Kompleks 1'in IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile A549 hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama OTM değerleri, ilgili büyüme kontrol ile karşılaştırılmıştır \*;  $p \leq 0,05$ , \*\*;  $p \leq 0,01$ .

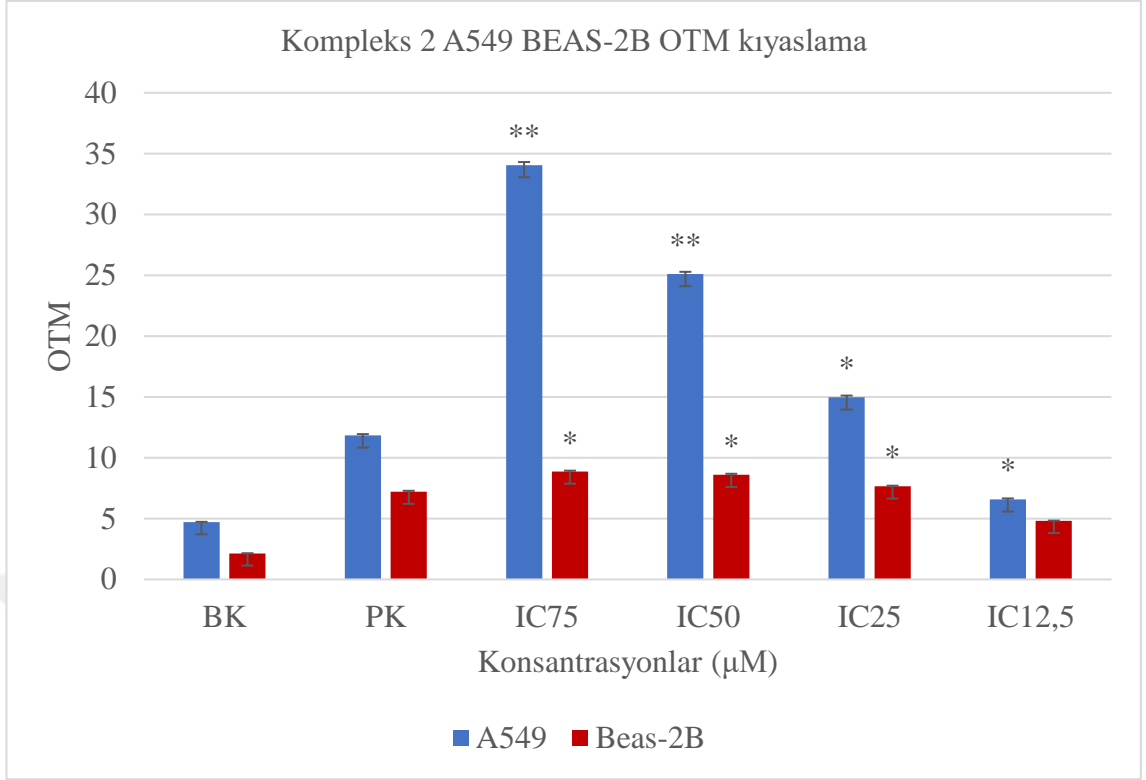
Kompleks 1 ile BEAS-2B hücre hatına IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen OTM değerleri çizelge 4.4 ve Şekil 4.6'da verilmiştir. BEAS-2B hücrelerinde ortalama OTM değerleri büyüme kontrol grubunda

2,138 ± 0,016 ve pozitif kontrol grubunda 7,214 ± 0,073 olarak elde edilmiştir. Kompleks 1'in IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama OTM değerleri sırasıyla 2,764 ± 0,025; 4,135 ± 0,031; 7,01 ± 0,038; ve 7,03 ± 0,055 şeklinde saptanmıştır. BEAS-2B hücrelerine Kompleks 1'in IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyon gruplarının ortalama OTM değerleri büyüme kontrol ile mukayese edildiğinde IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonunda OTM değerini istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttırdığı gözlenmiştir (p≤0,05). Büyüme kontrol ve pozitif kontrol da kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (p≤0,01).

#### **4.2.3.2. Kompleks 2 A549 BEAS-2B OTM kıyaslama**

Kompleks 2 ile BEAS-2B hücre hatına IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen OTM değerleri çizelge 4.4 ve Şekil 4.7'de verilmiştir. BEAS-2B hücrelerinde ortalama OTM büyüme kontrol grubunda 2.138 ± 0.016 ve pozitif kontrol grubunda 7.214 ± 0.073 olarak elde edilmiştir. BEAS-2B hücrelerine Kompleks 2'nin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen OTM değerleri sırasıyla 4.812 ± 0.023; 7.647 ± 0.061; 8.602 ± 0.083; ve 8.871 ± 0.070 biçimindedir. Kompleks 2'nin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyon gruplarının ortalama OTM değerleri büyüme kontrol ile mukayese edildiğinde IC<sub>12,5</sub> hariç diğer konsantrasyonlarda OTM değerini istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttırdığı belirlenmiştir (p≤0,01). Büyüme kontrol ve pozitif kontrol da kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (p≤0,01).





**Şekil 4.7.** Kompleks 1'in IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile BEAS-2B hücre hattına 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama OTM değerleri, ilgili büyüme kontrol ile karşılaştırılmıştır \*; p≤ 0,05.

Kompleks 2 ile A549 hücre hattına IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen OTM değerleri çizelge 4.4 ve Şekil 4.7'de verilmiştir. A549 hücrelerinde ortalama OTM değerleri büyüme kontrol grubunda  $4.718 \pm 0.017$  ve pozitif kontrol grubunda  $11.838 \pm 0.107$  olarak elde edilmiştir. BEAS-2B hücrelerine Kompleks 2'nin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama OTM değerleri sırasıyla  $6.5785 \pm 0.078$ ;  $14.966 \pm 0.147$ ;  $25.108 \pm 0.175$ ; ve  $34.057 \pm 0.249$  şeklindedir. Kompleks 2'nin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları gruplarının ortalama OTM değerleri büyüme kontrol ile mukayese edildiğinde OTM değerini istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttırdığı belirlenmiştir (p≤0,05'ten p≤0,01'e). Büyüme kontrol ve pozitif kontrol da kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (p≤0,01).

### 4.3. ROS Bulguları

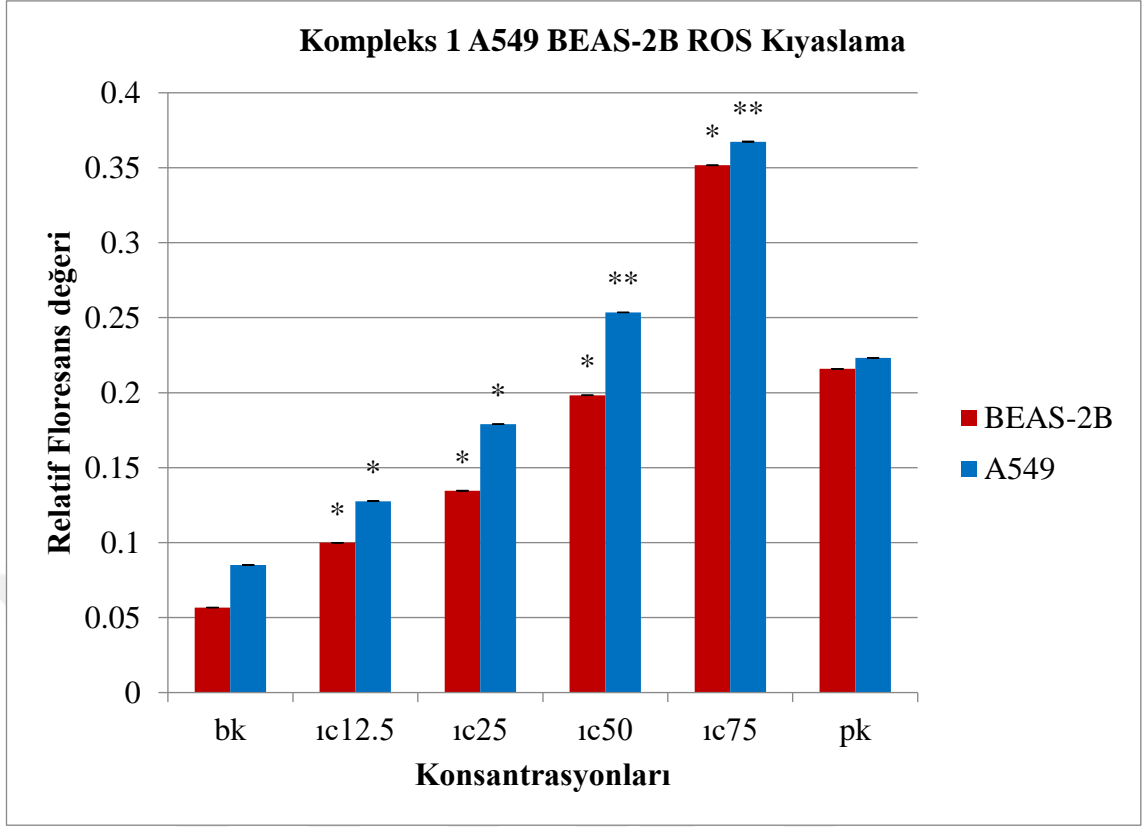
Kompleks 1 ve 2'nin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına 2 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ROS değerleri (relatif floresan değeri; RFU, nM) çizelge 4.5 ve ilgili komplekslerin değerlerinin karşılaştırılması şekil 4.8 ve 4.9'da sırasıyla verilmiştir. Pozitif kontrol olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılmıştır. ROS değerlerinin istatistiksel analizi Mann-Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4.5.** Kompleks 1 ve Kompleks 2'nin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına 2 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ROS değerleri (nM), ±; standart hatayı ifade etmektedir, ilgili büyüme kontrol ile karşılaştırılmıştır a; p≤ 0,05, b; p≤0,01 c; p≤ 0,001

HÜCRE HATTI	KOMPLEKS 1		KOMPLEKS 2	
	A549	BEAS-2B	A549	BEAS-2B
BÜYÜME KONTROL	0,085104102 ± 1,07346E-04	0,056705235 ± 1,27564E-04	0,056705235 ± 0,010734596	0,085104102 ± 0,012756383
PK (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	0,215911896 ± 7,66814E-05	0,223149545 ± 1,17206E-05	0,223149545 ± 0,007668145	0,215911896 ± 0,00117206
IC <sub>75</sub> (20 µM)	0,3673 ± 2,661*	0,3516 ± 1,258*	0,7076 ± 0,0628**	0,6636 ± 0,045**
IC <sub>50</sub> (13.3 µM)	0,2535 ± 9,213**	0,1982 ± 1,0155*	0,3522 ± 0,0153*	0,3318 ± 0,015**
IC <sub>25</sub> (6.6 µM)	0,1789 ± 7,417*	0,1346 ± 1,804*	0,2137 ± 0,0065*	0,2143 ± 0,007*
IC <sub>12,5</sub> (3.3 µM)	0,1276 ± 3,300	0,0999 ± 1,0129	0,1618 ± 0,0039	0,1391 ± 0,05239E-03

Kompleks 1 ile A549 hücre hattına IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ROS değerleri (RFU – Relative Floresans değeri) çizelge 4.5 ve Şekil 4.8’de verilmiştir. A549 hücrelerine ortalama ROS kontrol grubunda  $0,0851 \pm 1,0734$  ve pozitif kontrol grubunda  $0,2159 \pm 7,668$  olarak elde edilmiştir. A549 hücrelerine Kompleks 1’in IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama ROS değerleri sırasıyla  $0,1276 \pm 3,300$ ;  $0,1789 \pm 7,417$ ;  $0,253 \pm 9,213$ ; ve  $0,3673 \pm 2,661$  şeklindedir. Kompleks 1’in A549 hücre hatlarında IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyon gruplarının ortalama ROS değerleri pozitif kontrol ile mukayese edildiğinde IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonlarında ROS değerini istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttırdığı gözlenmiştir ( $p \leq 0,01$ ).

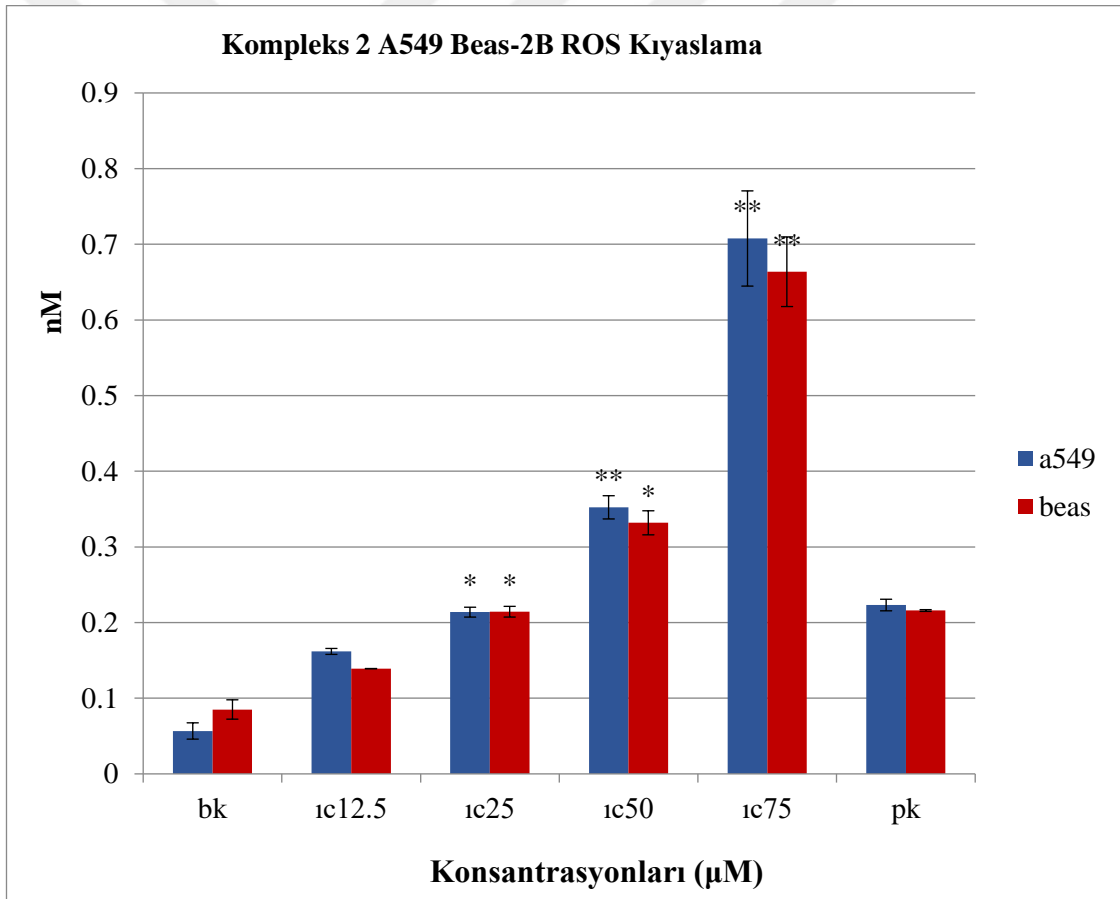
Kompleks 1 ile BEAS-2B hücre hattına IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile 2 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ROS değerleri (nM) çizelge 4.5 ve Şekil 4.8’de verilmiştir. BEAS-2B hücrelerinde ortalama ROS kontrol grubunda  $0,0567 \pm 1,275$  ve pozitif kontrol grubunda  $0,2231 \pm 1,172$  olarak elde edilmiştir. BEAS-2B hücrelerine Kompleks 1’in IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonlarda verilmesi sonucunda elde edilen ortalama ROS değerleri sırasıyla  $0,0999 \pm 1,012$ ;  $0,1346 \pm 1,804$ ;  $0,1982 \pm 1,015$ ; ve  $0,3516 \pm 1,258$  olarak belirlenmiştir. Kompleks 1’in IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonlarının ortalama ROS değerleri pozitif kontrol ile kıyaslandığında her dört konsantrasyon için istatistiksel olarak anlamlı artmıştır ( $p \leq 0,01$ ). Aynı anda IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyon grupları kendi aralarında mukayese edildiğinde IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonlar artışının ROS değerini istatistiki olarak anlamlı seviyede arttırdığı tespit edilmiştir ( $p \leq 0,01$ ).



**Şekil 4.8.** Kompleksi 1'nin BEAS-2B ve A549 hücre hattında elde edilen ROS Bulgularının kıyaslama

Kompleks 2 ile BEAS-2B hücre hattına IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ROS değerleri çizelge 4.5 ve Şekil 4.9'da verilmiştir. BEAS-2B hücrelerinde ortalama ROS düzeyi kontrol grubunda  $0,0851 \pm 0,0127$  ve pozitif kontrol grubunda  $0,2159 \pm 0,0011$  olarak elde edilmiştir. BEAS-2B hücrelerine Kompleks 2'nin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama ROS değerleri sırasıyla  $0,1391 \pm 0,05239$ ;  $0,2143 \pm 0,007$ ;  $0,3318 \pm 0,0159$ ; ve  $0,6636 \pm 0,0459$  biçimindedir. Kompleks 2'nin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyon gruplarının ortalama ROS değerleri pozitif (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) kontrol ile kıyaslandığında IC<sub>12,5</sub> hariç istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p \leq 0,01$ ). Aynı anda IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyon grupları kendi aralarında mukayese edildiğinde IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonlarında ROS değerininin artışının istatistiki olarak anlamlı seviyede olduğu tespit edilmiştir ( $p \leq 0,01$ ).

Kompleks 2 ile A549 hücre hattına IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonlarında 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ROS değerleri (nM) çizelge 4.5 ve Şekil 4.9’da verilmiştir. A549 hücrelerine ortalama ROS değerleri büyüme kontrol grubunda 0.0567± 0.0107 ve pozitif kontrol grubunda 0.2231 ± 0.0076 olarak elde edilmiştir. A549 hücrelerine Kompleks 2’nin IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyonları ile muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama ROS değerleri sırasıyla 0.1618 ± 0.0039; 0.2137 ± 0.0065; 0.3522 ± 0.0153; ve 0.7076 ± 0.0628 biçimindedir. Kompleks 2 ile A549 hücrelerinde IC<sub>12,5</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>75</sub> konsantrasyon gruplarının ortalama ROS değerleri pozitif kontrol ile mukayese edildiğinde IC<sub>12,5</sub> hariç ROS değerleri istatistiksel olarak anlamlıdır ve konsantrasyon arttıkça ROS değerini istatistiki olarak anlamlı seviyede arttırdığı tespit edilmiştir (p≤0,01).



Şekil 4.9. kompleksi 2’nin BEAS-2B ve A549 hücre hattında elde edilen ROS Bulguların kıyaslama

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında yeni sentezlenen iki yeni bakır (II) karışık ligant kompleksi kullanılmıştır. Kompleksler; 4 - metil-1, 10, - fenantrolin ve 5 – metil – 1, 10 – fenantrolin, tirozin lidandlarından Uludağ Üniversitesi Kimya Bölümü, Anorganik Kimya Araştırma Laboratuvarında doktora öğrencisi Duygu İnci ve öğretim üyesi Prof. Dr. Rahmiye Aydın tarafından sentezlenmiş ve yapıları aydınlatılmıştır. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında bakır (II) karışık ligant komplekslerinin antiproliferatif etkileri XTT testi ile genotoksik etkileri komet testi ile ve oksidatif hasar ROS testi ile incelenmiştir.

Potansiyel bir ilacın etkinliğinin artırılması ve zararlı yan etkilerinin azaltılması, antikanser ilaç geliştirmesinde önemli bir konudur. Antikanser ilaçların normal hücreleri de öldürmesi, yan etkilerinin önemli bir nedenidir. Sisplatin başarılı bir anti-kanser ilaç olmasına rağmen hücre direnç gelişimi ve toksik yan etkileri nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadır. Dolayısıyla, kanser hücrelerine karşı seçici özelliğe sahip yeni metal içeren anti-kanser ajanlara ihtiyaç vardır.

Kompleksler 1 ve 2, XTT testi kullanılarak A549 ve Beas-2B hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivitesi için değerlendirilmiştir. Hücreler 24 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda (1,25 - 6,25  $\mu$ M) komplekslere maruz bırakılmıştır. Kompleksler 1 ve 2, sırasıyla (1,727  $\pm$  0,190) ve (2,812  $\pm$  0,24) IC<sub>50</sub> değerleri ile A549 hücre hatlarında sitotoksik etkiyi göstermiştir. En düşük IC<sub>50</sub> değerleri kompleks 1 için ölçülmüştür ve bu kompleksin daha yüksek bir sitotoksikite gösterdiği anlaşılmaktadır. Bileşiklerin antiproliferatif aktivitesi karşılaştırıldığında kompleks 1'in kompleks 2'ye göre daha kuvvetli olduğunu ortaya koymaktadır (sırasıyla IC<sub>50</sub> = (1,727  $\pm$  0,190) > (2,812  $\pm$  0,24)). BEAS-2B sağlıklı akciğer epitel hücrelerinde ise kompleks 1 ve 2 için sırayla (2,880  $\pm$  0,299) ve (2,828  $\pm$  0,253) IC<sub>50</sub> değerleri saptanmıştır ve kompleks 2 çok küçük bir farkla daha yüksek sitotoksikite göstermiştir. Bu sebeple komplekslerin A549 ve Beas-2B hücre hatlarının proliferasyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde kompleks 1'in kompleks 2'ye göre daha kuvvetli olduğu ve iki kompleksin de A549 hücrelerine daha sitotoksik olduğu anlaşılmaktadır. Cisplatinin, yakın dönemde yapılmış bir çalışmada A549 ve BEAS-2B hücre dizilerinde (sırayla 22.2  $\pm$  0.4 ve 18.9  $\pm$  0.9) IC<sub>50</sub> değerine sahip olduğu gösterilmiştir (İnci ve ark. 2015). İlginç bir şekilde, tez çalışmasındaki komplekslerimiz 1 ve 2, aynı hücre dizisi için Cisplatin'e göre daha düşük IC<sub>50</sub> değerlerine sahiptir ve bu

da bu komplekslerin etkili metal bazlı antikanser ilaçları gibi davranma potansiyeline sahip olduklarını gösterir. Yakın dönemde Fei ve arkadaşları tarafından yapılmış bir çalışmada (2016), N-(pyridin-2-ylmethylene) dehydroabietylamin ligandı ile bakır (II) komplekslerinin anti-kanser etkileri incelenmiştir. HeLa, SiHa, HepG-2 ve A431 kanser hücre hatlarında gerçekleştirilen bu çalışmada kompleksin cisplatine göre çok yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Fei ve ark. 2016). Özellikle HeLa hücrelerini apoptotik yol ile öldürdüğü de ortaya konmuştur. Bakır (II)'nin [Cu(L-tyr)(diimine)]ClO<sub>4</sub>, 1,10-fenantrolin, dimethyl-1,10-fenantrolin ve dipyridoquinoxaline ligandları ile karışık komplekslerinin anti-kanser etkilerinin incelendiği bir çalışmada NCI-H460 akciğer kanser hücre hatları kullanılmıştır (Ramakrishnan ve ark. 2009). Üç kompleksin de IC<sub>50</sub> değerleri 900-4900 nM düzeylerinde tespit edilmiştir. Bu değerler bizim IC<sub>50</sub> bulgularımızla uyumludur.

Komet testi bulguları için genel olarak araştırmacıların arasında kabullenilmiş 3 önemli olan parametre: Kuyruk uzunluğu, Kuyruk %DNA ve Olive Kuyruk Momenti değerlendirilmiştir. Komet testi için Kompleks 1 ve 2 ile BEAS-2B hücre hatlarına konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiştir.

Hücreler kompleks 1 ve 2'ye maruz bırakıldıktan sonra doza bağımlı DNA hasarı gözlenmiştir. Kompleksler 1 ve 2 tarafından indüklenen DNA kuyruk uzunluğu (DNA kafasından DNA kuyruğuna olan uzaklığı), OTM ve kuyruk % DNA'da elde edilen verilerden anlaşıldığı gibi en düşük dozda bile istatistiksel anlamlı bir şekilde DNA hasarı gözlenmiştir. Bu DNA hasar oranı doza bağımlı olarak da artış göstermiştir. Bu hasar her iki hücre hattında da gözlemlenmiştir ancak istatistiksel olarak BEAS-2B hücrelerinde düşüktür ve anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Tez çalışmasında komet sonuçlarına göre kompleks 2 yüksek IC<sub>50</sub> ye sahip olmasına rağmen, A549 akciğer kanser hücre hattında kompleks 1'den daha genotoksik etkiye sahiptir ve istatistiksel olarak daha yüksek DNA hasarı oluşturduğu anlaşılmaktadır. Ancak BEAS-2B sağlıklı akciğer epitel hücrelerinde beklenildiği gibi her iki kompleks de daha düşük genotoksik hasar meydana getirmiştir. Kullandığımız bakır (II) karışık ligand kompleksleri DNA'da interkalasyon yaparak etkileşime girebilen kuaterner yapıda düzlemsel bileşiklerdir (İnci ve ark. 2015). Bu yapıda bileşiklerin DNA ile etkileşime girerek DNA tek ve çift iplik kırıkları oluşturduğu bilinmektedir (İnci ve ark. 2015). Böylece tez çalışmasında komet testi sonucu belirlenen DNA hasar oranı bileşiklerin DNA ile interkalasyon yoluyla etkileşime girerek hasar

oluşturduğunu desteklemektedir. Ayrıca bu bileşikler hücreler arası ROS düzeyini de yükseltebilmektedir (Inoue ve Hirobe 1986). Oksidatif hasarın karsinogenezde rol oynadığı genel olarak kabul edilmektedir. Öte yandan artan bilgiler, oksidatif stresin bir takım anti-kanser ilaçlar, özellikle alkilleyici ajanlar için önemli bir etki mekanizması olduğunu düşündürmektedir. Kanserli hücrelerin artmış bir oksidatif durumda bulunduğuna dair çalışmalar mevcuttur ve bu nedenle artmış düzeyde ROS oluşumuna karşı daha savunmasızdırlar (Kachadourian 2010). Örneğin sisplatinin pro-oksidan etkisi tioredoksin redüktazın inhibisyonu ve mitokondrideki artmış ROS üretimini içermektedir (Pelicano ve ark. 2003). Sisplatin tarafından indüklenen aşırı ROS'un üretilmesinin muhtemel nedeni mitokondriyal DNA' nın (mtDNA) bozulmasıdır. Böylece mitokondriyal solunum zincirindeki apolipoprotein ekspresyonunda dengesizliğe neden olup süperoksidin ( $O_2^{\cdot-}$ ) sızmasına yol açar.

Kanser hücrelerinde yüksek bakır seviyesi ve yüksek oksidatif stres nedeniyle, redoks sürecini hedefleyen ve dolayısıyla hücre içi ROS düzeyini modüle eden bileşiklerin faydalı olabileceği bildirilmiştir. Aslında, bakır kompleksleri, redoks özelliği ve ROS üretimi açısından iyi bilinmektedir. Bununla birlikte, çoğu çalışma sadece hücre dışı sistemleri içermektedir. Akciğer (Beas-2B ve A549) sağlıklı ve kanser hücre hatlarında 1 ve 2 kompleksleri tarafından muhtemel ROS' un üretilmesini inceleme amacıyla her iki hücre hattı da çeşitli konsantrasyonlarda muamele edilmiştir. Genel olarak kompleks 2'nin kompleks 1'e göre daha yüksek bir anlamlı ROS üretimine neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca A549'daki ROS değeri Beas-2B'dan daha yüksek bir seviyede gözlemlenmiştir. Bu durum yine bir anti-kanser ajandan beklenen bir özelliktir. Burada en dikkat çeken Beas-2B'de her iki kompleksin neredeyse hemen hemen eşit düzeylerde ROS üretimidir. Bu bulgular komplekslerin hücre içi ve hücreler arası oksidatif hasarı yükseltme özelliklerine sahip olduklarını ve sağlıklı hücrelerde daha az oksidatif hasara yol açtıklarını göstermektedir.

Kanserde ROS düzeylerinin artışında üretilmiş radikal türü, radikalın bulunduğu bölge ve yerel konsantrasyon önemlidir. A549'daki gözlenen yüksek ROS seviyesi, çeşitli kanser hücrelerinde genelde gözlenen anormal olarak yükseltilmiş ROS seviyesine dair kanıtları desteklemektedir. Kanser birçok türünde hücre büyüme/proliferasyonu, farklılaşma, protein sentezi, glikoz metabolizması, hücre sağ kalımı ve inflamasyona katılan ROS duyarlı sinyal yolları da sürekli yükselmektedir. Reaktif oksijen türleri,



özellikle hidrojen peroksit, hücrel sinyalizasyonda ikinci ulak olarak görev yapabilmektedir.  $H_2O_2$ , protein tirozin fosfatazları, protein tirozin kinazları, reseptör tirozin kinazları ve transkripsiyon faktörleri gibi hedefin reversibl oksidasyonu ile protein aktivitesini düzenlemektedir.

Kanserli hücrelerde yüksek ROS seviyesinin artmış metabolik aktivitesi, mitokondriyal disfonksiyon, peroksizom aktivitesi, artmış hücrel reseptör sinyali, onkogen aktivite, artmış Oksidaz, siklooksijenaz, lipoksijenaz ve timidin fosforilaz aktivitesi ya da çapraz-karışma yoluyla infiltre olan bağışıklık hücreleri ile iletişime neden olmaktadır. Tümör hücresi antioksidan protein ifade seviyesini arttırarak kendisini ROS'dan detoksifiye etmiş olup kendisinin emniyetini sağlamaktadır. Böylece kanser hücresinin fonksiyonu için hücre içi ROS düzeylerinin hassas bir dengesinin gerekli olduğu düşünülmektedir. Örneğin: kanser hücresi, glutatyon (GSH) ve heme oksijenaz-1 (HO-1) gibi hücre içi antioksidanları arttırarak yükseltmiş ROS seviyesine adapte olabilmektedir (Kachadourian 2010).

Bu tez çalışmasında sonuç olarak yeni sentezlenmiş iki bakır (II) karışık ligand kompleksinin akciğer kanser (A549) ve sağlıklı akciğer hücre hatlarında (BEAS-2B) sitotoksik, genotoksik ve oksidatif hasar oluşturma etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu iki kompleksten kompleks 1'in akciğer kanser hücrelerinde seçici olarak daha sitotoksik etkiye sahip olduğu ancak kompleks 2 ye göre daha düşük genotoksik etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur. Beklenildiği gibi her iki kompleksi ile de kanser hücre hatlarında daha yüksek genotoksik etki ve ROS düzeyleri gözlenirken sağlıklı hücrelerde genotoksik etkileri ve ROS düzeyleri daha düşük görülmüştür. Bu sonuçlar, ilaç adaylarının geleceğinin her ne kadar umut verici olsa da ilaç adayının seçiciliğinin, ana hedefinin ve etki tarzının ve geniş hücre hatlarında uygulanabilirliğinin aydınlatılması ve canlı vücudunda in vivo etkilerinin belirlenebilmesi için halen çok ileri çalışmalara gereksinim olacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Adams J., 2004.** The proteasome: a suitable antineoplastic target, *Nat. Rev. Cancer*, 4(5): 349-60.
- Altman FP., 1976.** Tetrazolium salts and formazans. *Prog Histochem Cytochem.*, 9(3): 1-56
- Anonim 2012a.** Halk Sağlığı Uzmanları Derneği Türkiye Halk Sağlığı Raporu, Türkiye Sağlık Raporu -2012, Türkiye
- Anonim, 1971.** Chelating agents in medicine. *Br. Med. J.*, 2:270–2.
- Anonim, 1983.** Terry L.R. et al.1983. Cell Viability Assays: NCBI Assay Guidance Manual, Ed: Mosmann T., USA.
- Anonim, 2012b.** GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide 2012, [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx) (27.05.2017)
- Anonim, 2016.** Turkey Cancer Control Programme Report 2016, Ankara - Turkey
- Arjmand, F., Muddassir, M., 2011.** A mechanistic approach for the DNA binding of chiral enantiomeric L- and D-tryptophan-derived metal complexes of 1,2-DACH: cleavage and antitumor activity. *Chirality*, 23(3): 250-9
- Arredondo M., Núñez M.T., 2005.** Iron and copper metabolism. *Mol. Aspects Med.*, 26(4-5): 313-27.
- Aust S.D., Morehouse L.A., Thomas C.E., 1985.** Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free Radic. Biol. Med.*, 1: 3–25.
- Balakrishna M.S., Suresh D., Rai A., Mague J.T., Panda D., 2010.** Dinuclear copper(I) complexes containing cyclodiphosphazane derivatives and pyridyl ligands: synthesis, structural studies, and antiproliferative activity toward human cervical and breast cancer cells. *Inorg. Chem.*, 49(19): 8790-801.
- Baris Y.I., Bilir N., Artvinli M., Sahin A.A., Kalyoncu F., Sebastien P., 1988.** An epidemiological study in an Anatolian village environmentally exposed to tremolite asbestos. *Br. J. Ind. Med.* 45: 838–840.
- Baris Y.I., Sahin A.A., Ozesmi M., Kerse I., Ozen E., Kolacan B., Altinörs M., Göktepeli A., 1978.** An outbreak of pleural mesothelioma and chronic fibrosing pleurisy in the village of Karain/Urgup in Anatolia. *Thorax*, 33: 181–192.
- Bar-Or D., McDonald M.C., Thiemermann C., 2006.** Reduction of infarct size in a rat model of regional myocardial ischemia and reperfusion by the synthetic peptide DAHK, *Crit. Care Med.*, 34: 1955–1959.
- Bencinia A., Lippolis V., 2010.** 1,10-Phenanthroline: A versatile building block for the construction of ligands for various purposes. *Coordination Chemistry Reviews*, 254: 2096–2180.

**Bennetts, H. W., Chapman, F. E., 1937.** Copper deficiency in sheep in Western Australia: A preliminary account of the etiology of enzootic ataxia of lambs and an anemia of ewes, *Aust. Vet. J.* 13: 138-149.

**Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S., 2005.** Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction: A comprehensive and highly recommended review of tetrazolium-based assays. *Biotechnology Annual Review*, 11: 127-152.

**Boyland E., 1938.** Experiments on the chemotherapy of cancer: The effects of certain antibacterial substances and related compounds. *Biochem J.*, 32: 1207–13.

**Brewer, G.J., 2005.** Anticopper therapy against cancer and diseases of inflammation and fibrosis. *Drug Discovery Today.*, 10: 1103–1109.

**Buchtik R., Trávníček Z., Vančo J., Herchel R., Dvořák Z., 2011.** Synthesis, characterization, DNA interaction and cleavage, and in vitro cytotoxicity of copper(II) mixed-ligand complexes with 2-phenyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolinone. *Dalton Trans.*, 40: 9404-12

**Bull P.C., Cox D.W., 1994.** Wilson disease and Menkes disease: new handles on heavy-metal transport. *Trends Genet.*, 10(7): 246-52.

**Cao H., Wang Y., 2007.** Quantification of oxidative single-base and intrastrand crosslink lesions in unmethylated and CpG-methylated DNA induced by Fenton-type reagents, *Nucleic Acids Res.*, 35: 4833–4844.

**Cerpa W., Varela-Nallar L., Reyes A.E., Minniti A.N., Inestrosa N.C., 2005.** Is there a role for copper in neurodegenerative diseases? *Mol Aspects Med.*, 26(4-5): 405-20.

**Chakraborty A, Kumar P, Ghosh K, Roy P., 2010.** Evaluation of a Schiff base copper complex compound as potent anticancer molecule with multiple targets of action. *Eur. J. Pharmacol.*, 647(1-3):1-12.

**Crisponi G., Nurchi V.M., Fanni D., Gerosa C., Nemolato S., Faa G., 2010.** “Copper-related diseases: from chemistry to molecular pathology,” *Coordination Chemistry Reviews*, 254(7-8): 876–889

**Daniel K. G., Gupta P., Harbach R. H., Guida W. C., Dou Q. P., 2004.** Organic copper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 67(6): 1139–1151.

**Daniel K.G., Chen D., Orlu S, Cui QC, Miller FR, Dou QP. 2005.** Clioquinol and pyrrolidine dithiocarbamate complex with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.*, 7(6): R897-908.

**DeVita V.T. Jr., Chu E., 2008.** A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 68(21): 8643-53.

**Ding X., Xie H., Kang Y.J., 2011.** The significance of copper chelators in clinical and experimental application. *J. Nutr. Biochem.*, 22(4): 301-10

**Dou Q.P., Smith D.M., Daniel K.G., Kazi A., 2003.** Interruption of tumor cell cycle progression through proteasome inhibition: implications for cancer therapy. *Prog. Cell Cycle Res.*, 5: 441-6.

- Dou QP, Goldfarb RH., 2002.** Bortezomib (Millennium Pharmaceuticals). *Drugs.*, 5: 828–34. [PubMed]
- Duesberg P., Li R., Fabarius A., Hehlmann R., 2006.** Aneuploidy and cancer: from correlation to causation. *Contrib. Microbiol.*, 13: 16–44.
- Eaton-Evans, J., McIlrath, E.M., Jackson, W.E., McCartney, H., and Strain, J.J., 1996.** Copper supplementation and the maintenance of bone mineral density in middle-aged women. *J. Trace Elem. Exp. Med.*, 9: 87–94.
- Ehrenfeld G.M., Shipley J.B., Heimbrook D.C., Sugiyama H., Long E.C., van Boom J.H., van der Marel G.A., Oppenheimer N.J., Hecht S.M., 1987.** Copper-dependent cleavage of DNA by bleomycin. *Biochemistry*, 26(3): 931-42.
- Eser S., Yakut C., Özdemir R., Karakiliç H., Özalan S., Marshall S.F., Karaoğlanoğlu O., Anbarcioğlu Z., Üçüncü N., Akin Ü., Özen E., Özgül N., Anton-Culver H., Tuncer M., 2010.** Cancer incidence rates in Turkey in 2006: a detailed registry based estimation. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 11(6): 1731-9.
- Fei, Bao-Li; Yin, Bin; Li, Dong-Dong; Xu, Wu-Shuang; Lu, Yang. 2016.** Enantiopure copper(II) complex of natural product rosin derivative: DNA binding, DNA cleavage and cytotoxicity. *J. Biol. Inorg. Chem.* 21(8):987-996.
- Fleming, A. M., Muller, J. G., Ji, I., Burrows C. J., 2011.** Characterization of 2'-deoxyguanosine oxidation products observed in the Fenton-like system Cu(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/reductant in nucleoside and oligodeoxynucleotide contexts. *Org. Biomol. Chem.*, 9(9): 3338-48.
- Fragou D., Fragou A, Kouidou S., Njou S., Kovats L., 2011.** Epigenetic mechanisms in metal toxicity (Review), *Toxicol. Mech. Methods*, 21: 343–352.
- Fricker S.P., 2007.** Metal based drugs: from serendipity to design. *Dalton Trans.*, (43):4903-17.
- Garcia-Gimenez J.L., González-Alvarez M., Liu-González M, Macías B., Borrás J., Alzuet G. J., 2009.** Toward the development of metal-based synthetic nucleases: DNA binding and oxidative DNA cleavage of a mixed copper(II) complex with N-(9H-purin-6-yl) benzenesulfonamide and 1,10-phenantroline. Antitumor activity in human Caco-2 cells and Jurkat T lymphocytes. Evaluation of p53 and Bcl-2 proteins in the apoptotic mechanism. *Inorg. Biochem.* 103(6): 923-34
- Goldberg A.L., 1995.** Functions of the proteasome: the lysis at the end of the tunnel. *Science.*, 268(5210): 522-3.
- Goldin A., Schepartz S.A., Venditti JM, DeVita V.T., 1979.** Historical development and current strategy of the National Cancer Institute Drug Development Program: Methods in cancer research V16(A), Editors: Busch H., DeVita V.T., New York, Academic Press, pp. 165–245.
- Hahn F.E., Jahnke M.C., 2008.** Heterocyclic carbenes: synthesis and coordination chemistry. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 47(17): 3122-72.
- Halliwell B., Gutteridge J.M., 1990.** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.*, 186:1–85.

**Heidelberger C., Chaudhuri N.K., Danneberg P., Mooren D., Griesbach L., Duschinsky R., Schnitzer R.J., Plevin E., Scheiner J., 1957.** Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature.*, 179(4561): 663-6.

**Hirschberg E., 1963.** Patterns of response of animal tumors to anticancer agents. *Cancer Res.*, 23: 521-980. *Cancer Res.*, 23(5 Pt 2):521-980.

**Huang R., Wallqvist A., Covell D.G., 2005.** Anticancer metal compounds in NCI's tumor-screening database: putative mode of action. *Biochem Pharmacol.*, 69(7): 1009-39.

**Huggins C., Hodges C. V., 1941.** Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of oestrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Journal of Urology*, 167(2 Pt 2): 948-51, discussion 952.

**Iakovidis I, Delimaris I, Piperakis SM., 2011.** Copper and its complexes in medicine: a biochemical approach. *Mol Biol Int.* 2011: 594529.

**İnci D, Aydın R., Vatan Ö., Huriyet H., Zorlu Y., Zorlu Y., Coşut B., Çinkılıç N., 2017.** The Effect of methyl substitution on biomolecular interactions, cytotoxicities and ROS generation of new ternary copper (II) complexes (Basılmamış makale)

**İnci D, Aydın R., Vatan Ö., Yılmaz D., Gençkal H.M., Zorlu Y., Cavaş T., 2015.** Binary and ternary new water-soluble copper(II) complexes of l-tyrosine and substituted 1,10-phenanthrolines: Effect of substitution on DNA interactions and cytotoxicities. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 145: 313-324

**Inoue H. and Hirobe M. 1986.** Superoxide dismutase mimetic activity of cytokinin-copper(II) complexes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol., 137(1): 372-377,

**Johnson G. R. A., Nazhat N. B., 1987.** Kinetics and mechanism of the reaction of the bis(1, 10 – phenanthroline) Cu(I) ion with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 109: 1990-94.

**Kachadourian R., Brechbuhl H.M., Ruiz-Azuara L., Gracia-Mora I., Day B.J., 2010.** Casiopéina IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology.*, 268(3): 176-83.

**Kazi A., Lawrence H., Guida W.C., McLaughlin M.L., Springett G.M., Berndt N., Yip R.M., Sebti S.M., 2009.** Discovery of a novel proteasome inhibitor selective for cancer cells over non-transformed cells. *Cell Cycle.*, 8(12): 1940-51.

**Kelland L., 2007.** The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, 7(8): 573-84.

**Kelland L.R., 2000.** Preclinical perspectives on platinum resistance. *Drugs.*, 59 Suppl 4: 1-8; discussion 37-8.

**Kim B, Nevitt T, Thiele DJ., 2008.** Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol* 4: 176-85.

**Klevay L.M., 2000.** Cardiovascular disease from copper deficiency--a history. *J Nutr.*, 130(2S Suppl): 489S-492S.

- Klotz L.O., Weser U., 1998.** Biological Chemistry of Copper Compounds: Copper and Zinc in Inflammatory and Degenerative Diseases, Editors: Rainsford K.D. et al., Kluwer Academic publishers, pp: 19-46.
- Koppenol W. H., 2001.** The Haber-Weiss cycle-70 years later. *Redox Rep.* 6(4): 229-34.
- Kremer M. L., 1999.** Mechanisms of the Fenton reaction. Evidence for a new intermediate. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 1: 3595-3605.
- Linder, M. C., 2012.** The relationship of copper to DNA damage and damage prevention in humans. *Mutation Research*, 733: 83-91
- Linder, M.C., 1998.** Biochemistry of Copper, Ch. 1. Plenum Press, New York, pp. 1-11.
- Linder, M.C., 2002.** Biochemistry and Molecular Biology of Copper in Mammals: Handbook of Copper Pharmacology and Toxicology, Ed.: Massaro E.J., pp 3-32.
- Lippert, B., 1999.** Cisplatin-Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug; Verlag Helvetica Chimica Acta, Wiley-VCH: Zürich.
- Litwin JA, Völkl A, Müller-Höcker J, Hashimoto T, Fahimi HD., 1987.** Immunocytochemical localization of peroxisomal enzymes in human liver biopsies. *Am. J. Pathol.*, 128(1): 141–50.
- Liu GY, Yang J, Dai F, Yan WJ, Wang Q, Li XZ, Ding DJ, Cao XY, Zhou B., 2012.** Cu (II) ions and the stilbene-chroman hybrid with a catechol moiety synergistically induced DNA damage, and cell cycle arrest and apoptosis of HepG2 cells: an interesting acid/base-promoted prooxidant reaction. *Chemistry.*, 18(35): 11100-6.
- Luczkowski M, Kozlowski H., 2005.** Interaction of the human prion PrP (106–126) sequence with copper(II), manganese(II), and zinc(II): NMR and EPR studies. *J. Am. Chem. Soc.*, 127: 996–1006.
- Mancin F., Scrimin P, Tecilla P, Tonellato U., 2005.** Artificial metallonucleases. *Chem Commun (Camb).*, 20: 2540-8.
- Marín-Hernández A., Gracia-Mora I., Ruiz-Ramírez L., Moreno-Sánchez, R., 2003.** Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas) on mitochondrial functions. *Biochem. Pharmacol.*, 65: 1979–1989.
- Marshall L.E., Graham D.R., Reich K.A., Sigman D.S., 1981.** Cleavage of deoxyribonucleic acid by the 1,10-phenanthroline-cuprous complex. Hydrogen peroxide requirement and primary and secondary structure specificity. *Biochemistry*, 20(2): 244-50.
- Marshall N.J., Goodwin C.J., Holt S.J., 1999.** A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regulation*, 5(2):69-84.
- Mercs L., Albrecht M., 2010.** Beyond catalysis: N-heterocyclic carbene complexes as components for medicinal, luminescent, and functional materials applications. *Chem. Soc. Rev.*, 39: 1903.

**Nath R., 1997.** Copper deficiency and heart disease: molecular basis, recent advances and current concepts. *Int J Biochem Cell Biol.*, 29(11):1245-54.

**Navarro J.A., Janik M.B., Freisinger E., Lippert B., 1999.** [(Ethylenediamine)Pt(uracilate)](4), a Metal Analogue of Calix[4]arene. Coordination and Anion Host-Guest Chemistry Related to Its Conformational Dynamics. *Inorg Chem.*, 38(3): 426-432.

**Neal, W. M., Becker, R. B., and Shealy, A. L., 1931.** A natural copper deficiency in cattle rations, *Science*, 74:418-419.

**O'Dell B. L., Hardwick B. C., Reynolds G., Savage J. E., 1961.** Connective tissue defect in the chick resulting from copper deficiency, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 108: 402.

**Pelicano H., Feng L., Zhou Y., Carew J.S., Hileman E.O., Plunkett W., Keating M.J., Huang P., 2003.** Inhibition of mitochondrial respiration: A novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by an ROS-mediated mechanism. *J. Biol. Chem.*, 278: 37832-37839.

**Peters J.M., Franke W.W., Kleinschmidt J.A., 1994.** Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.*, 269(10):7709-18.

**Pevzner Y., Metcalf R., Kantor M., Sagaro D., Daniel K., 2013.** Recent advances in proteasome inhibitor discovery. *Expert Opin. Drug Discov.*, 8(5): 537-68.

**Povirk L.F., Austin M.J., 1991.** Genotoxicity of bleomycin. *Mutat Res.*, 257(2): 127-43.

**Rae T.D., Schmidt P.J., Pufahl R.A., Culotta V.C., O'Halloran T.V., 1999.** Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science.*, 284: 805-808.

**Ramakrishnan S., Rajendiran V., Palaniandavar M., Periasamy V.S., Srinag B.S., Krishnamurthy H., Akbarsha M. A., 2009.** Induction of Cell Death by Ternary Copper(II) Complexes of L-Tyrosine and Diimines: Role of Coligands on DNA Binding and Cleavage and Anticancer Activity. *Inorg. Chem.*, 48, 1309-1322.

**Rayman, M.P. and Pattison, D.J., 2008.** Dietary manipulation in musculoskeletal conditions. *Best Prac. Res. Clin. Rheum.*, 22: 535-561.

**Ronconi, L.; Sadler, P.J., 2007.** Using coordination chemistry to design new medicines. *Coordin. Chem. Rev.*, 251: 1633-1648.

**Ruiz R., Garcia B., Garcia-Tojal J., Busto N., Ibeas S., Leal J.M., Martins C., Gaspar J., Borrás J., Gil-García R., Gonzalez-Alvarez M., 2010.** Biological assays and noncovalent interactions of pyridine-2-carbaldehyde thiosemicarbazonecopper(II) drugs with [poly(dAT)]<sub>2</sub>, [poly(dG-dC)]<sub>2</sub>, and calf thymus DNA, *J. Biol. Inorg. Chem.* 15: 515-532.

**Ruiz-Azuara L., Bravo-Gómez M.E., 2010.** Copper compounds in cancer chemotherapy. *Curr. Med. Chem.*, 17(31): 3606-15.

**Santini C., Pellei M, Gandin V., Porchia M., Tisato F., Marzano C., 2014.** Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem. Rev.*, 114(1): 815-62.

**Santini C., Pellei M, Papini G, Morresi B, Galassi R, Ricci S, Tisato F, Porchia M, Rigobello MP, Gandin V, Marzano C., 2011.** In vitro antitumour activity of water soluble Cu(I), Ag(I) and Au(I) complexes supported by hydrophilic alkyl phosphine ligands. *J. Inorg. Biochem.*, 105(2): 232-40.

**Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens M.J., Seniff D., Boyd M.R., 1988.** Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.*, 48: 4827-4833.

**Selvakumar B, Rajendiran V, Uma Maheswari P, Stoeckli-Evans H, Palaniandavar M., 2006.** Structures, spectra, and DNA-binding properties of mixed ligand copper(II) complexes of iminodiacetic acid: the novel role of diimine co-ligands on DNA conformation and hydrolytic and oxidative double strand DNA cleavage. *J. Inorg. Biochem.*, 100(3): 316-30.

**Shear MJ, Hartwell JL, Peters VB, et al., 1947.** Some aspects of a joint institutional research program on chemotherapy of cancer; current laboratory and clinical experiments with bacterial polysaccharide and with synthetic organic compounds: Approaches to tumor chemotherapy, Ed.: Moulton FR, Washington (DC), American Association for the Advancement of Science, pp: 236–84.

**Sigman D.S., Graham D.R., D'Aurora V., Stern A.M., 1979.** Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline. cuprous complex. Inhibition of Escherichia coli DNA polymerase I. *J. Biol. Chem.*, 254(24): 12269-72.

**Starosta R., Stokowa K., Florek M., Król J., Chwilkowska A., Kulbacka J., Saczko J., Skala J., Jezowska-Bojczuk M., 2011.** Biological activity and structure dependent properties of cuprous iodide complexes with phenanthrolines and water-soluble tris (aminomethyl) phosphanes. *J. Inorg. Biochem.*, 105(8): 1102-8.

**Strause LG, Hegenauer J, Saltman P, Cone R, Resnick D., 1986.** Effects of long-term dietary manganese and copper deficiency on rat skeleton. *J. Nutr.*, 116(1): 135-41.

**Tan J, Wang B, Zhu L., 2009.** DNA binding and oxidative DNA damage induced by a quercetin copper(II) complex: potential mechanism of its antitumor properties. *J. Biol. Inorg. Chem.* 14(5): 727-39.

**Tawa R., Takami M., Imakura Y., Lee K.H., Sakurai H., 1997.** Breaks in double-strand DNA by Cu(II) complexes of etoposide (VP-16) and its derivatives, as evaluated by S1 nuclease treatment, *Biol. Pharm. Bull.*, 20: 1002–1005.

**Tisato F., Marzano C., Porchia M., Pellei M., Santini C., 2010.** Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies, *Med. Res. Rev.*, 30(4):708-49

**Townsend D.M., Tew K.D., 2003.** The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene.*, 22(47): 7369–75.

**Tudek B., Winczura A., Janik J., Siomek A., Foksinski M., Olinski R., 2010.** Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging, *Am. J. Transl. Res.*, 2: 254–284.



- Turnlund J.R., Keyes W.R., Anderson H.L., Acord L.L., 1989.** Copper absorption and retention in young men at three levels of dietary copper by use of the stable isotope copper-65. *Am. J. Clin. Nutr.*, 49(5): 870–878.
- Turski M.L., Thiele D.J., 2009.** New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling, and disease. *J. Biol. Chem.*, 284(2): 717–21.
- Uauy R., Olivares M., Gonzalez M., 1998.** Essentiality of copper in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 67(5 Suppl): 952S-959S.
- Uriu-Adams JY, Keen CL., 2005.** Copper, oxidative stress, and human health. *Mol. Aspects Med.* 26(4-5):268-98.
- Van Rijt, S.H.; Sadler, P.J., 2009.** Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discov. Today*, 14: 1089-1097.
- Veal J.M., Merchant K., Rill R.L., 1991.** The influence of reducing agent and 1,10-phenanthroline concentration on DNA cleavage by phenanthroline + copper. *Nucleic Acids Res.*, 19(12): 3383-8.
- Veal J.M., Rill R.L., 1988.** Sequence specificity of DNA cleavage by bis(1,10-phenanthroline) copper(I). *Biochemistry.*, 27(6): 1822-7.
- Veal JM1, Rill RL., 1989.** Sequence specificity of DNA cleavage by bis(1,10-phenanthroline) copper(I): effects of single base pair transitions on the cleavage of preferred pyrimidine-purine-pyrimidine triplets. *Biochemistry.*, 28(8): 3243-50.
- Vonk, W.I.M. and Klomp, L.W.J., 2008.** Role of transition metals in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Soc. Trans.*, 36: 1322–1328.
- Wallace D.C., 1999.** Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 283: 1482–1488.
- Wang T., Guo Z., 2006.** Copper in medicine: Homeostasis, chelation therapy and antitumor drug design. *Curr. Med. Chem.*, 13(5): 525–37.
- Xiao Y, Chen D, Zhang X, Cui Q, Fan Y, Bi C, Dou QP., 2010.** Molecular study on copper-mediated tumor proteasome inhibition and cell death. *Int. J. Oncol.*, 37(1): 81-7.
- Yamamoto K, Kawanishi S., 1989.** Hydroxyl free radical is not the main active species in site-specific DNA damage induced by copper (II) ion and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, 264(26): 15435-40.
- Yoshida T., 1949.** The Yoshida sarcoma, an ascites tumour. *Gann.*, 40: 1–20.
- Zeich D., Franco R., Pappa A., Panayiotidis M.I., 2011.** Reactive Oxygen Species (ROS) – induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis, *Mut. Res.*, 711: 167–173.
- Zhang Z, Bi C, Schmitt SM, Fan Y, Dong L, Zuo J, Dou QP., 2012.** 1,10-Phenanthroline promotes copper complexes into tumor cells and induces apoptosis by inhibiting the proteasome activity. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 17(8): 1257-67.

**Zubrod C.G., Schepartz S., Leiter J., Endicott J.M., Carrese L.M., Baker C.G., 1966.** The chemotherapy program of the National Cancer Institute: History, analysis, and plans. *Cancer Chemother. Rep.*, 50: 349–540.



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Muhammed Fawaz ABDULLAH

Doğum Yeri ve Tarihi : Gana / 1985

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Kumasi T.I. Ahmadiyya S.H.S. / 2001-2005

Lisans : Kwame Nkrumah Fen ve Teknoloji Üniversitesi /  
2007-2011 / Biyolojik Bilimleri

Yüksek Lisans : U.Ü. F.B.E. Biyoloji / 2014-2017.

İletişim : Amufaz25@gmail.com