

**YENİ AÇİL-HİDRAZON SCHİFF BAZLARI
İLE
BUNLARIN GEÇİŞ METAL KOMPLEKSLERİNİN
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN
İN VİTRO TESTLERLE BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Ayşegül VAROL

Eskişehir - 2017

**YENİ AÇIL-HİDRAZON SCHİFF BAZLARI İLE BUNLARIN GEÇİŞ METAL
KOMPLEKSLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN *İN VİTRO* TESTLERLE
BELİRLENMESİ**

Ayşegül VAROL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Mayıs, 2017

*Bu Tez Çalışması Anadolu Üniversitesi BAP Komisyonunca kabul edilen
1604F168 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.*

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ayşegül VAROL’ un “Yeni Açıl-Hidrazon Schiff Bazları İle Bunların Geçiş Metal Komplekslerinin Biyolojik Aktivitelerinin *in vitro* Testlerle Belirlenmesi” başlıklı tezi/...../..... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, İleri Teknolojiler Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	Ünvanı -Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL	
Üye	: Doç. Dr. Emel ERGENE	
Üye	: Doç. Dr. Mustafa Uyanoglu	

.....
Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Nedim DEĞİRMENÇİ

ÖZET

YENİ AÇIL-HİDRAZON SCHIFF BAZLARI İLE BUNLARIN GEÇİŞ METAL KOMPLEKSLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN *İN VİTRO* TESTLERLE BELİRLENMESİ

Ayşegül VAROL

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mayıs, 2017

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

İlk kez Alman kimyager Hugo Schiff tarafından sentezlenen schiff bazları; karbonil bileşiklerin ve primer aminlerin kondenzasyonu sonucunda meydana gelen bileşiklerdir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, schiff bazlarının geçiş metalleri ile oluşturdukları komplekslerin; bitki büyüme inhibitörü, insektisidal, anti-bakteriyel, anti-mikrobiyal, anti-viral, anti-tüberküloz, anti-depresan ve anti-konvülzan (epilepsi önleyici) gibi çeşitli biyolojik aktiviteler sergilediklerini ortaya koymuştur. Hidrazon türevleri ise schiff bazlarının biyolojik aktivitelerini arttıran moleküller olarak karşımıza çıkmaktadır. Sahip oldukları biyolojik aktiviteler sayesinde schiff bazlarının geçiş metalleri ile oluşturdukları kompleksler yeni anti kanser ajanlar geliştirmek adına büyük önem arz etmektedirler.

Tez çalışmasında; yeni sentezlenen schiff bazları ve schiff bazlarının geçiş metalleri ile oluşturdukları bileşiklerin meme kanseri ve sağlıklı hücre hatları üzerine etkileri alamar blue hücre canlılığı, LDH hücre membran bütünlüğü, Picogreen dsDNA miktar ölçüm testleri kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca; reaktif oksijen türlerinin birikimi ve kaspaz-3 aktiviteleri de ölçülmüştür. Cis-platin ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Farklı hücre hatları üzerinde gerçekleştirilen deneyler sonucunda; yeni sentezlenen schiff baz komplekslerinin, cis-platin ile kıyaslandığında, kanser hücreleri üzerinde daha etkili, sağlıklı hücre hattı üzerinde ise daha az toksik aktivite sergiledikleri gözlenmiştir. Geçiş metallerinin ise açıl-hidrazon türevlerini içeren schiff bazlarının anti-kanser aktivitelerini arttırdığı belirlenmiştir. Bu nedenle; geçiş metallerini içeren schiff baz komplekslerinin kanser tedavilerinde umut vaat eden birer antikanser ajan adayı olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Kanser, schiff bazları, açıl hidrazon, geçiş metalleri

ABSTRACT
**INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF THE NOVEL ACYL-
HYDRAZONE SCHIFF BASE and THEIR TRANSITION METAL COMPLEXES BY
USING *IN VITRO* TESTS**

Ayşegül VAROL

Department of Advanced Technologies

Anadolu University, Graduate School of Science, May, 2017

Supervisor: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

Schiff bases, had been synthesized for the first-time by the chemist Hugo Schiff, are the compounds that resulting from the condensation of carbonyl compounds and primary amines. Studies to date have shown that transition metal complexes of schiff bases exhibit various biological activities such as plant growth inhibitor, insecticidal, anti-bacterial, antimicrobial, antiviral, antituberculosis, antidepressant and anticonvulsant (anti-epileptic). The hydrazone derivatives are antagonistic molecules, which enhance the biological activity of schiff bases. Due to their biological activities, the complexes that are formed with transition metals and schiff bases are so important in order to development new anti-cancer agents.

In the thesis; cytotoxic activities of new synthesized schiff bases and complexes of schiff bases formed by transition metals on breast cancer and healthy cell lines were determined by using Alamar Blue cell viability, LDH cellular membrane integrity and PicoGreen dsDNA quantitation assays. Furthermore, the activities on reactive oxygen species accumulation and caspase-3 activities were also measured. Cis-platinum is used as a positive control. As a result of the achieved experiments on different cell lines, it was observed that new synthesized schiff base complexes displayed more influence on cancer cells and less toxicity on the healthy cell line, in a comparison with cis-platinum. It was also determined that the transition metals increase the anti-cancer activities of schiff bases containing acyl-hydrazone derivatives. Therefore; schiff base complexes containing transition metals are thought that some promising anti-cancer agent candidates in cancer therapies.

Keywords: Cancer, schiff bases, acyl hydrazine, transition metals

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresinde laboratuvarını bana açarak hücre kültürü tekniklerini bizzat kendisi öğreten, ihtiyaç duyduğum her zaman sabırla ve güler yüzlü bir şekilde desteğini esirgemeyen, içten, sevecen ve dürüstlüğüyle öğrencilerine yardımcı olan sevgili hocam Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL' a,

Tez çalışmamda kullandığım maddelerin sentezini, analizini yapan ve çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Kimya Bölümünde görevli öğretim üyesi Prof. Dr. Ramazan GÜP ve doktora öğrencisi Cansu GÖKÇE' ye

Tez çalışmam için 1604F168 numaralı proje kapsamında maddi destek sağlayan Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna,

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan, yol gösteren yön veren hocalarıma, araştırma görevlilerine ve bölüm çalışanlarına,

Hayatım boyunca beni destekleyen annem Döne VAROL'a,

Ayrıca bu süreç boyunca bildiklerini benimle paylaşan, her daim bana destek olan, başarılı olmam için emek sarf eden, çalışmalarımın verimli bir şekilde ilerlemesi için oldukça önemli akademik katkılar sağlayan, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde araştırma görevlisi olan abim Mehmet VAROL'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Babam Alaattin VAROL' a...

Ayşegül VAROL

Mayıs, 2017

...../...../.....

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Ayşegül VAROL

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser.....	1
1.2. Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü)	3
1.2.1. Hücre Dışı (Ekstrinsik) Apoptoz Yolağı	7
1.2.2. Mitokondriyal (İntrinsik) yolak	8
1.3. Kanser Tedavisinde Kullanılan Yöntemler	10
1.4. Kemoterapi.....	11
1.5. Schiff Bazları.....	14
1.5.1. Schiff bazlarının anti-mikrobiyal aktivitesi	15
1.5.2. Schiff bazlarının anti-fungal aktivitesi	16
1.5.3. Schiff bazlarının anti-viral aktivitesi	16
1.5.4. Schiff bazlarının insektisidal aktivitesi	17
1.5.5. Schiff bazlarının bitki büyüme düzenleyicisi olarak kullanımları	17

1.5.6. Schiff bazlarının anti- Alzheimer aktivitesi	18
1.5.7. Schiff bazlarının detoksifikasyon aktiviteleri	18
1.5.8. Schiff bazlarının antikanser ve sitotoksik aktiviteleri	19
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
2.1. Çalışmada Kullanılan Schiff Bazlar.....	22
2.1.1. 4-hidroksi-N'-[(1Z)-1-(2-hidroksifenil)etiliden] benzohidrazid (BK1) sentezi	22
2.1.2. (Z)-etil 2-(4-(1-(2-(4-(2-etoksi-2-oksoetoksi) benzoil) hidrazon) etil) fenoksi) asetat (BK2) sentezi	23
2.1.3. BK1 ve BK2 ligandlarından bakır komplekslerinin sentezi (BK1X ve BK2X)	24
2.2. Çalışmada Kullanılan Malzemelerin Hazırlanması	25
2.3. Çalışmada Kullanılan Hücreler ve Kültür Koşulları.....	25
2.3.1. İnsan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D) hücre kültürü	25
2.3.2. İnsan meme bezi epitelyum IV. aşama adenokarsinoma (HCC1428) hücre kültürü.....	26
2.3.3. İnsan göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücre kültürü	26
2.4. Alamar Blue Hücre Canlılığı Testi.....	27
2.5. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivite Ölçümü.....	29
2.6. Çift Zincirli DNA (dsDNA) Miktar Analizi	30
2.7. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Ölçümü	31
2.8. Kaspaz-3 Aktivite Ölçümü	33
3. BULGULAR.....	35
3.1. Alamar Hücre Canlılığı Belirleme Testi Sonuçları	35
3.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivite Ölçümü.....	41

3.3. PicoGreen Çift Zincirli DNA (dsDNA) Miktar Tayini.....	47
3.4. Hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) birikiminin ölçümü	53
3.5. Kaspaz-3 Aktivite Ölçümü	58
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	62
KAYNAKÇA	75
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1.	Kanser hücrelerinin sahip oldukları yetenekler	3
Şekil 1.2.	Apoptozun (programlanmış hücre ölümünün) aşamaları	5
Şekil 1.3.	Kaspaz enzimlerinin gruplandırılması.....	6
Şekil 1.4.	Bir kaspaz enziminin genel yapısı	7
Şekil 1.5.	Hücre içi ve hücre dışı apoptoz yolları.....	8
Şekil 1.6.	Sitotoksik ajanların etki alanları	12
Şekil 1.7.	Schiff bazı ve metal komplekslerinin genel sentezi.....	15
Şekil 2.1.	BK1 ve BK2 Schiff bazlarının sentez aşamaları	22
Şekil 2.2.	BK1 Schiff bazının kimyasal yapısı.....	23
Şekil 2.3.	BK2 Schiff bazının kimyasal yapısı.....	23
Şekil 2.4.	BK1X Schiff bazının kimyasal yapısı	24
Şekil 2.5.	BK2X Schiff bazının kimyasal yapısı.....	25
Şekil 2.6.	Alamar Blue, resazurin ve resorufin sodyum tuzlarının kimyasal yapısı.....	28
Şekil 2.7.	Laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitesine bağlı hücre membran hasarı belirleme testinin reaksiyon diyagramı.....	29
Şekil 2.8.	DCF-DA molekülünün hücre içindeki metabolizması ve ROS aktivitesi sonucu DCF oluşumu	32
Şekil 2.9.	Kaspaz-3 aktivasyonu sonucu p-nitroanilin oluşması.....	33
Şekil 3.1.	Cisplatinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme faz 4 adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin alamar blue yöntemiyle hücre canlılığının belirlenmesi	36
Şekil 3.2.	BK1 kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme faz 4 adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin alamar blue yöntemiyle hücre canlılığının belirlenmesi	37
Şekil 3.3.	BK1X kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme faz 4 adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin alamar blue yöntemiyle hücre canlılığının belirlenmesi	38

- Şekil 3.4.** BK2 kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme faz 4 adenokarsinoma (HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin alamar blue yöntemiyle hücre canlılığının belirlenmesi 39
- Şekil 3.5.** BK2X kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme faz 4 adenokarsinoma (HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin alamar blue yöntemiyle hücre canlılığının belirlenmesi 40
- Şekil 3.6.** Cisplatinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. Faz adenokarsinoma (HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin membran bütünlüğü üzerine aktivitesinin belirlenmesi 42
- Şekil 3.7.** BK1 kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. Faz adenokarsinoma (HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin membran bütünlüğü üzerine aktivitesinin belirlenmesi 43
- Şekil 3.8.** BK1X kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. Faz adenokarsinoma (HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin membran bütünlüğü üzerine aktivitesinin belirlenmesi 44
- Şekil 3.9.** BK2 kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. Faz adenokarsinoma (HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin membran bütünlüğü üzerine aktivitesinin belirlenmesi 45
- Şekil 3.10.** BK2X kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. Faz adenokarsinoma (HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin membran bütünlüğü üzerine aktivitesinin belirlenmesi 46
- Şekil 3.11.** Cisplatinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma (HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin canlılığı üzerine aktivitesinin çift zincirli DNA miktar tayini ile belirlenmesi 48
- Şekil 3.12.** BK1 kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. Faz adenokarsinoma (HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin canlılığı üzerine aktivitesinin çift zincirli DNA miktar tayini ile belirlenmesi 49

Şekil 3.13. BK1X kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. Faz adenokarsinoma (HCC1428), göbek bağı damar endotel(HUVEC) hücrelerinin canlılığı üzerine aktivitesinin çift zincirli DNA miktar tayini ile belirlenmesi.....	50
Şekil 3.14. BK2 kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel(HUVEC) hücrelerinin canlılığı üzerine aktivitesinin çift zincirli DNA miktar tayini ile belirlenmesi.....	51
Şekil 3.15. BK2X kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel(HUVEC) hücrelerinin canlılığı üzerine aktivitesinin çift zincirli DNA miktar tayini ile belirlenmesi.....	52
Şekil 3.16. BK1 kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel(HUVEC) hücrelerinde meydana gelen ROS birikimi üzerine aktiviteleri	54
Şekil 3.17. BK1X kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. Faz adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel(HUVEC) hücrelerinde meydana gelen ROS birikimi üzerine aktiviteleri	55
Şekil 3.18. BK2 kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel(HUVEC) hücrelerinde meydana gelen ROS birikimi üzerine aktiviteleri	56
Şekil 3.19. BK2X kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. Faz adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel(HUVEC) hücrelerinde meydana gelen ROS birikimi üzerine aktiviteleri	57
Şekil 3.20. BK1 kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma (HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin ölçümü	60
Şekil 3.21. BK1X kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin ölçümü	60

Şekil 3.22. BK2 kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin ölçümü	61
Şekil 3.23. BK2X kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin ölçümü	61
Şekil 4. 1. Hücre içerisinde serbest radikallerin oluşmasında gerçekleşen kimyasal tepkimeler	70

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

TNF	:Tümör nekroz faktörü
DED	:Ölüm domaini
HSP	:Heat shock protein
CAD	:Kaspaz tarafından aktive edilmiş deoksiribonükleaz
AIF	:Apoptoz başlatıcı faktör
miRNA	:Mikro ribonükleik asit
siRNA	:Küçük interferans ribonükleik asit
DNA	:Deoksiribonükleik asit
RNA	:Ribonükleik asit
T-47D	:İnsan meme bezi epitelyum duktal karsinoma hücresi
HCC1428	:İnsan meme bezi epitelyum IV. evre adenokarsinoma hücresi
HUVEC	:İnsan göbek bağı damar endotel hücresi
LDH	:Laktat Dehidrogenaz aktivitesi
dsDNA	:Çift zincirli deoksiribonükleik asit
PBS	:Fosfat tamponlu tuz solüsyonu
TE	:Tris-EDTA tampon
ROS	:Reaktif oksijen türevleri
DCFH-DA	:Dichlorodihidrofluorescein diacetate
DCFH	:2' 7'-Dichlorodihidrofluorescein

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

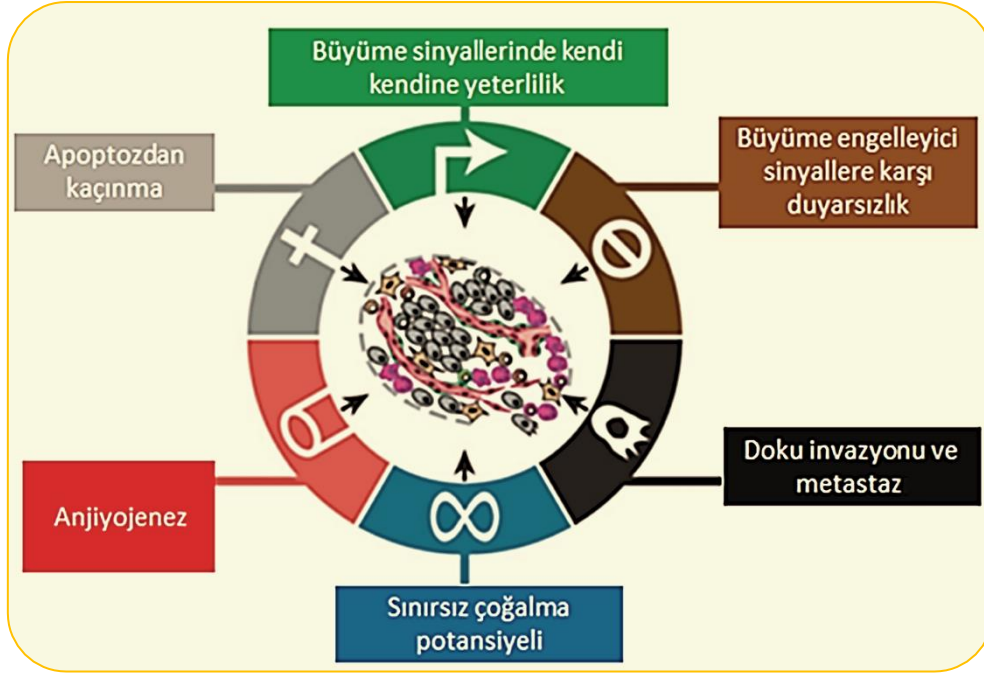
Kanser; insan sağlığını ölümcül bir şekilde tehdit eden ciddi bir hastalık olarak her geçen gün karşımıza daha fazla çıkmaktadır (Kucukoglu vd. 2016). Kardiyovasküler (kalp, damar ve kan dolaşımı ile ilgili) hastalıklardan sonra dünyada en önemli ikinci sağlık problemi olan kanser; günden güne artış gösteren ölüm oranıyla bilim dünyasında da büyük endişe uyandırmaktadır (Ferlay vd. 2015, Wani vd. 2016). Yapılan araştırmalar; 2012’de dünya çapında 14.1 milyon yeni kanser vakası ile karşılaşıldığını, 8.2 milyon insanın kanser nedeniyle yaşamını yitirdiğini ve 32.6 milyon insanın hala kanser tedavisi gördüğünü ortaya koymuştur (Chauthe vd. 2015). Dünya Sağlık Örgütü (WHO); yakın gelecekte, her yıl ölümle sonuçlanan kanser vakalarının; 8,2 milyondan, 13 milyona yükseleceğini tahmin etmektedir (Kazemi vd. 2016). Bu nedenle; kanser hastalıklarını belirlemek ve kanserle mücadele etmek için yeni teknik ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmaların sayısında artış gözlemlenmektedir (Alfarouk vd. 2015, Ranjan vd. 2017).

Günümüzde kanseri tedavi etmek amacıyla; kemoterapi, radyoterapi, çeşitli antikorların kullanılması, endokrin tedavi, metabolik inhibitörlerin kullanılması ve aşı uygulamaları olmak üzere birçok yöntem kullanılabilmektedir (Lukong 2017) Ancak; kanser, 200’den fazla farklı tipi bulunan ve tedavi yöntemlerine farklı cevaplar verebilen bir hastalık olarak değerlendirilmelidir (Parker vd. 2016). Bununla birlikte; tüm kanser olguları, hücre ölümünden yoksun ve kontrolsüz olarak çoğalma yeteneğindeki, anormal hücrelerin doku oluşturmuş formları olarak karakterize edilmektedir (Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde 2015). Sağlıklı hücrelerin, çeşitli genetik değişiklikler sonucu, anormal özelliklere sahip olan kanser hücrelerine dönüşmesi süreci karsinogenez olarak isimlendirilmektedir (Hanahan ve Weinberg 2011). Bu süreç sonunda, normal hücreler; kontrolsüz bir şekilde çoğalabilme yeteneği kazanarak, standart yaşam sürelerinin ötesinde hayatta kalma yetisi kazanırlar (Feitelson vd. 2015). Ayrıca, karsinogenezi takip eden evrelerde, metastaz olarak adlandırılan bir süreçle kanser hücreleri göç ederek dolaşım sistemine dahil olabilmekte ve vücudun farklı bölgelerinde yer alan doku ve organlara yayılabilmektedirler (Hanahan ve Weinberg 2000). Metastaz olgusunun; kanser hastalarının başlıca ölüm nedeni olduğu bilinmektedir (Ganesan ve Lingeshwaran 2017). Bu nedenle; kanser olgularının erken tanısı kadar, hastalığın hangi

aşamada olduğu, boyutu ve ilerleyişinin önceden tahmin edilmesi tedavinin başarıya ulaşabilmesi için büyük önem taşımaktadır (Ganesan ve Lingeshwaran 2017).

Karsinogenezin meydana gelmesinde ise apoptoz (programlanmış hücre ölümü) yollarında ya da hücrelerin bölünmesinden sorumlu olan proteinleri uyaran genlerde meydana gelen mutasyon veya hasarların sorumlu olduğu bilinmektedir (Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde 2015). Meydana gelen bu mutasyon ve hasarlar, hücre içi sinyal yollarının işleminde değişikliğe yol açmaktadır (Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde 2015). Hücre içi sinyal yollarının doğru işlememesi sonucunda ise kontrolsüz hücre çoğalması tetiklenebilmekte, hücre ölümü engellenmekte, genetik materyaldeki hata oranı artmakta ve bu hücreler bağışıklık sisteminden (immün sistem) kaçabilme yetisi kazanabilmektedir (Hanahan ve Weinberg 2011). Bu nedenle, ilaç keşfi ve tasarımı çalışmalarında, etken bileşiklerin hücre içi sinyal yolları üzerine aktivitelerinin incelenmesi ve aydınlatılması da gerekmektedir (Zamble ve Lippard 1995, Rampazzo vd. 2016). Karsinogenez ve kanser hücreleri incelendiğinde ise bu hücrelerin, normal hücrelerden farklı özelliklere sahip oldukları ve kanser tipinden bağımsız olarak altı temel özelliği sergiledikleri belirlenmiştir (Şekil 1.1) (Hanahan ve Weinberg 2011).

Farklı kanser vakaları üzerinde yapılan araştırmalarda; cinsiyete bağlı olarak, bayanlarda meme kanseri birinci sırada yer alırken, erkeklerde prostat kanserinin daha yaygın olduğu gözlemlenmiştir (Chauthe vd. 2015, Doğan vd. 2016). İstatistikler incelendiğinde, her yıl 400,000 bireyden daha fazlasının meme kanseri nedeniyle yaşamını yitirdiği ve yaklaşık olarak bir milyon yeni meme kanseri tanısı yapıldığı gözlemlenmektedir (Velaie vd. 2016). Meme kanserine neden olan etkenlerin çeşitlilik göstermesiyle birlikte; yaş, obezite, hormonal değişiklikler ve genetik faktörlerin hastalığın ortaya çıkmasında başlıca etkenler olduğu düşünülmektedir (Zingue vd. 2016).



Şekil 1.1. *Kanser hücrelerinin sahip oldukları yetenekler*
Kaynak: Hanahan ve Weinberg, 2011, s. 58

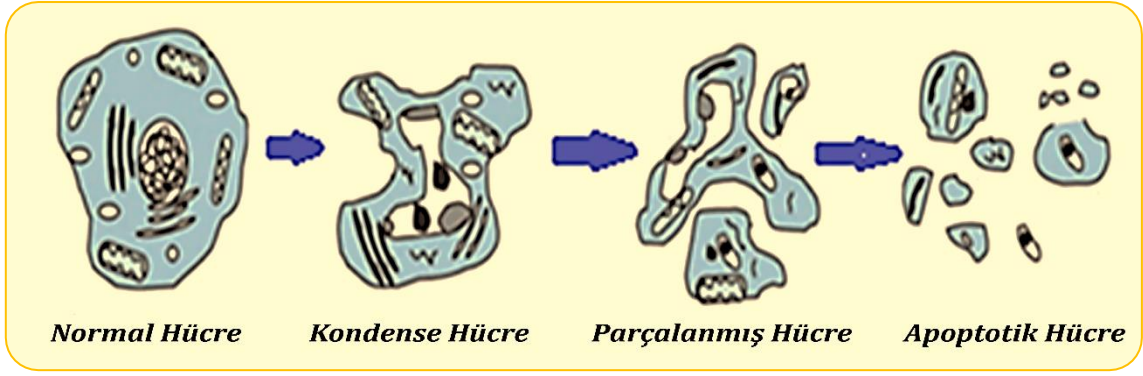
Meme kanseri olan hastaların hayatta kalma oranları; bulundukları ülkenin gelişmişlik düzeyine bağlı olarak %40 ile %90 arasında değişebilmektedir. Çünkü gelişmemiş ülkelerde tedaviye ulaşma imkanı sınırlı ve hastalardaki kanser oluşumlarının daha ileri evrelerde fark edilmesi söz konusudur (Coelho vd. 2017). Bununla birlikte; yapılan bilimsel araştırmaların ve meme kanserini tedavi etmek için kullanılan yöntemlerin de yetersiz kaldığı düşünülmektedir (Luong vd. 2016, Wani vd. 2016). Günümüzde, radyoterapi, farklı kemoterapi formları ve hormon terapileri gibi çeşitli yöntemlerinin meme kanserinin tedavisi için uygulandığı bilinmektedir (Luqmani 2005, Coelho vd. 2017). Meme kanseri tedavisinde kullanılan bu yöntemler ise kanser hücreleri ile apoptoz arasındaki ilişki göz önünde bulundurularak geliştirilmiş tedavi yöntemleridir (Wyllie 1993, Kerr vd. 1994).

1.2. Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü)

Sağlıklı organizmalarda, bir hücrenin görevi sona erip, o hücreye gerek duyulmuyorsa, çeşitli hücre içi mekanizmaların devreye girmesi sonucu hücre ölümüne sürüklenebilir (Güleş ve Eren 2008). Bu mekanizmalardan biri olan apoptoz (programlanmış hücre ölümü); ilk olarak patolog Andrew Wyllie tarafından keşfedilmiş ve bilim dünyasına tanıtılmıştır (Wyllie 1993). Apoptoz kelimesi; Yunanca ağaçtan dökülen yapraklar anlamına gelmekte ve hücrelerde meydana gelen fizyolojik bir olayı

tanımlamaktadır (Wyllie 1993, Mak 2003). Sağlıklı hücrelerde kontrollü bir şekilde meydana gelen apoptoz olgusunun sekteye uğraması ve hücre içi sinyal yollarının bozulması sonucunda, bazı hücrelerin apoptozdan kaçınması durumu; karsinogenezin meydana gelmesinde büyük önem taşımaktadır (Hanahan ve Weinberg 2011, Frączek vd. 2016). Bu nedenle; bilim adamları, kanser hücreleri ile apoptoz arasındaki ilişkinin önemini fark etmiş ve kemoterapi, radyoterapi ve hormon tedavileri gibi bir dizi tedavi yöntemlerini bu prensibe dayalı olarak geliştirmeyi hedeflemiştir (Wyllie 1993, Kerr vd. 1994). Genellikle bu tedavi yöntemlerinin temel amacı; kanserli dokudaki hücrelerin DNA'sını hedef alarak, fiziksel ve kimyasal DNA hasarı oluşturmak ve dolaylı yoldan apoptozu aktif hale getirmektir (LaCasse vd. 1998, Hunter vd. 2007).

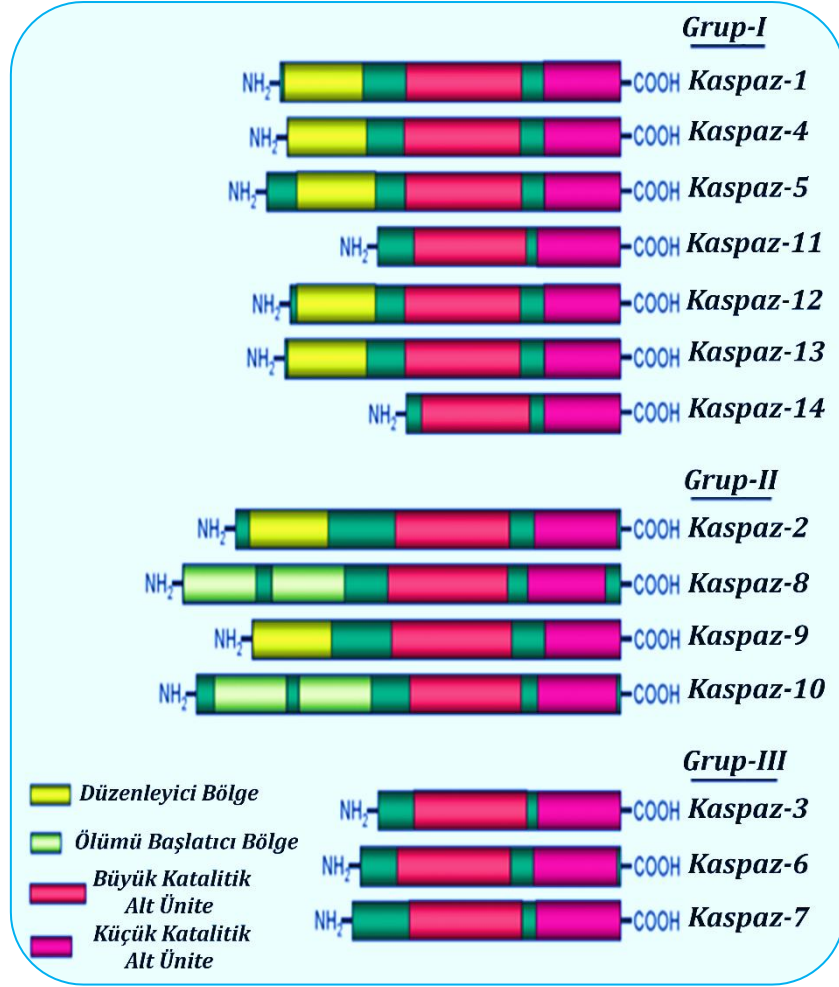
Hücrelerde meydana gelen apoptoz olgusu; çeşitli biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler sonucu takip edilebilmektedir (Redza-Dutordoir ve Averill-Bates 2016). Çeşitli proteinlerin yıkımı, proteinler arasında çapraz bağlantıların oluşması, DNA kırılmalarının gözlenmesi ya da fagositoz aktivitelerinin başlatılması gibi düzenlemeler sonucu hücrelerde apoptotik oluşumlar gözlenebilmektedir (Elmore 2007). Apoptozun morfolojik indikatörleri arasında; hücrelerin şişmesi, hücrelerin küçülmesi, kondense olmaya (yoğunlaşmaya) başlaması ve hücre iskeletinin dağılarak, çekirdeğin ortadan kaybolmaya başlaması gibi değişimler yer almaktadır (Güleş ve Eren 2008). Ayrıca; hücre sitoplazması ve organeller üzerindeki iç basıncın artması sonucu sıkıca paketlenmesi, hücre çekirdeğinde ise apoptotik cisimlerin meydana gelmesi şeklinde değişiklikler de gözlemlenebilmektedir (Öniz 2004). Hücre çekirdeğinde meydana gelen apoptotik cisimler; çekirdekte bulunan yapısal proteinlerin ve kromatinlerin parçalanması sonucu, çekirdek membranının iç yüzünde farklılaşmaların meydana gelmesiyle; at nalı şeklinde oluşumların gözlemlenmesi veya çekirdek etrafında tomurcuk benzeri yapıların oluşması şeklinde gözlemlenebilmektedir (Padanilam 2003, Güleş ve Eren 2008). Bununla birlikte; apoptozun başlaması sonucu küçülmeye başlayan hücreler, hücre-hücre ve hücre-yüzey bağlantılarını kaybetmeye başlarlar (Wyllie 1993). Daha sonrasında komşu hücreler veya makrofajlar tarafından sindirilen apoptoza uğramış hücreler ortamdan uzaklaştırılmakta ve organik materyalleri yeniden kullanım için çevre hücrelere sunulmaktadır (Şekil 1.2) (Redza-Dutordoir ve Averill-Bates 2016).



Şekil 1.2. Apoptozun (programlanmış hücre ölümünün) aşamaları

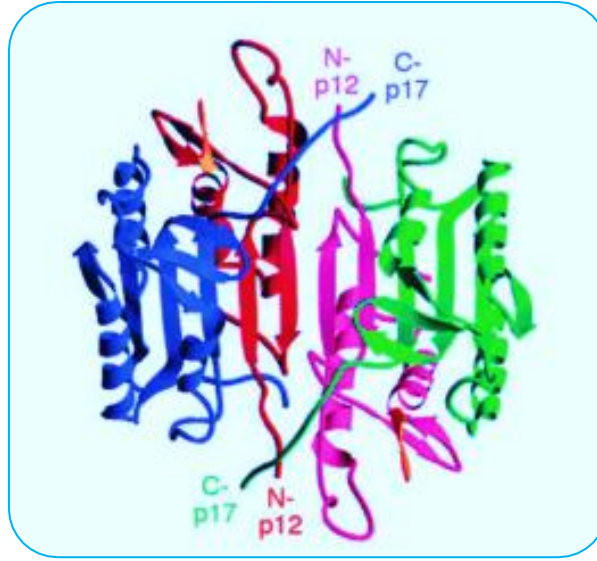
Kaynak: Padanilam, 2003, s. F609

Apoptoz; enerjiye bağlı olan hücre içi ve hücreler arası sinyal yollarını da içerisine alan, bir dizi moleküler olayın dahil olduğu, ileri ve oldukça karmaşık bir mekanizmalar bütünüdür (Elmore 2007). Bu karmaşık mekanizmalar içerisinde, kaspazlar (sistein bağımlı aspartik aside özel proteazlar) en önemli moleküller olarak karşımıza çıkmaktadır (Özdemir ve Mustafa 2009). Kaspazlar; aktif merkezlerinde sistein aminoasitlerini taşıdıkları ve hedefledikleri proteinleri aspartik asit birimlerinden kestikleri için kaspaz (Caspase; Cysteine Aspartate Specific ProteASEs) ismini almışlardır (Wang ve Niu 2015). Normal şartlarda, hücre sitoplazmasında aktif olmayan formda bulunan kaspazlar; proteolitik parçalanmanın ardından aktif hale geçerler ve apoptozun gerçekleşmesi için görev alırlar (Wu vd. 2014). Kaspazlar üzerine yapılan bilimsel araştırmalar sonucunda, 15 farklı kaspaz enzimi tanımlanmış ve bu kaspazlar; inflamatuvar kaspazlar (grup-1), başlatıcı kaspazlar (grup-2) ve işlemci kaspazlar (grup-3) olmak üzere 3 gruba ayırmıştır (Şekil 1.3) (Lavrik vd. 2005, Wu vd. 2014). İnflamatuvar kaspaz sınıfı; kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14 ve 15 olmak üzere 8 adet kaspaz enzimini içerisinde barındırırken, başlatıcı kaspazlar içerisinde; kaspaz 2, 8, 9 ve 10 olmak üzere 4 adet kaspaz bulunmaktadır. Kaspaz 3, 6 ve 7 ise işlemci kaspazlar sınıfına dahildirler (Chang ve Yang 2000, Lavrik vd. 2005).



Şekil 1.3. Kaspaz enzimlerinin gruplandırılması
Kaynak: Lavrik vd., 2005, s. 82

Kaspazların yapıları incelendiğinde; NH₂-terminal bölge, 20 kDa ağırlığında büyük alt ünite, 10 kDa ağırlığında küçük alt ünite ve katalitik alt üniteleri birbirine bağlama görevi üstlenen bağlayıcı bir bölge olmak üzere dört bölgeden oluştuğu gözlemlenmektedir (Şekil 1.4) (Chang ve Yang 2000, Lavrik vd. 2005). Aktif olmayan formda bulunan bazı öncül kaspazların yapılarında; bu alt üniteler arasında 10 amino asitlik kısa bir bağlayıcı bölge de bulunabilmektedir (Chang ve Yang 2000). Öncül kaspazlar; herhangi bir apoptotik sinyal ile aktive edildiklerinde bir dizi proteolitik işlem gerçekleşmekte ve öncül kaspazlar aktif forma dönüşmektedir. Aktivasyon gerçekleşirken, öncül kaspazın yapısında yer alan; N-terminal bölge ve birbirine bağlı iki alt ünite ayrılmaktadır. Alt üniteler dimerize olarak parçalanarak başka bir kaspaz ile heterotetramerik bir kompleks oluşturabilmektedir. Oluşan aktif kaspaz yapısı; diğer kaspazları aktifleştirerek apoptozun gerçekleşmesinde rol almakta ve apoptotik sinyal yolağının işlemlerini sağlamaktadır (Chang ve Yang 2000, Wu vd. 2014).

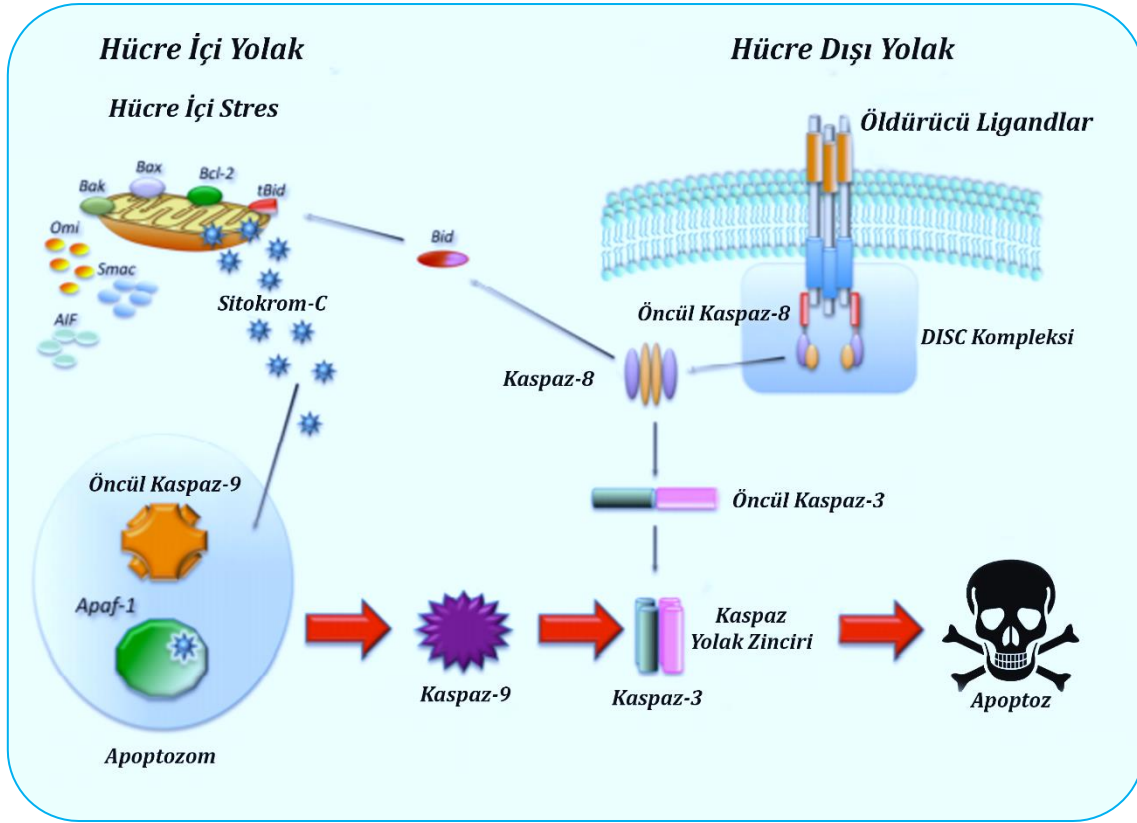


Şekil 1.4. Bir kaspaz enziminin genel yapısı
Kaynak: Chang ve Yang, 2000, s. 824

Apoptozun gerçekleşmesi için işleyen hücre yolları incelendiğinde; mitokondri/sitokrom-c aracılı iç yolak (intrinsik) ve dış sinyaller aracılı (ekstrinsik) yolak olmak üzere iki temel yolağın olduğu belirlenmiştir (Şekil 1.5) (Wajant 2002, Holoch ve Griffith 2009, Favaloro vd. 2012, Frączek vd. 2016). Ayrıca; bazı kaynaklarda, bu yolaklardan bağımsız olarak, endoplazmik retikulum aracılı apoptotik yolak ve doğal öldürücü (natural killer) hücreler tarafından salgılanan perforin/granzim proteinlerine bağlı apoptotik yollar da ayrı başlıklar altında incelenebilmektedir (Elmore 2007, Favaloro vd. 2012, Muñoz-Pinedo 2012).

1.2.1. Hücre Dışı (Ekstrinsik) Apoptoz Yolağı

Apoptozun ekstrinsik yolak aracılığıyla başlatılmasında, tümör nekroz faktörü (TNF) gen ailesinin reseptörleri (ölüm reseptörleri) görev almaktadır. TNF reseptör ailelerinin üyeleri; yapılarında sistein amino asidi bakımından zengin ekstraselüler (hücre dışı) alt üniteye ve yaklaşık 80 amino asidi bünyesinde barındıran sitoplazmik alt üniteye sahiptirler (Ashkenazi ve Dixit 1998).



Şekil 1.5. Hücre içi ve hücre dışı apoptoz yolları
Kaynak: Favaloro vd., 2012, s. 332

En iyi bilinen ölüm reseptörleri arasında FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/RD3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5 gibi hücre yüzeyinde yer alan moleküller bulunmaktadır (Chicheportiche vd. 1997, Ashkenazi ve Dixit 1998). FasL/FasR ve TNF- α /TNFR1 gibi ölüm reseptörleri; hücre dışından gelen sinyallerle uyarıldıktan sonra, birbirleriyle etkileşime geçerek, homolog trimerik (üçlü) bir yapıyı oluştururlar. Sinyal aracılığıyla oluşan bu trimerik yapı; ölüm bölgesi olarak da adlandırılan DED (death domain), TRADD (ölüm bölgesi ile ilişkili TNFR-1) ve FADD (ölüm bölgesi ile ilişkili Fas) ile etkileşime girerler (Wajant 2002, Hsu vd. 2011). Bu etkileşimin bir sonucu olarak; ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşur ve DISC sayesinde öncül kaspaz-8 ya da öncül kaspaz-10 enzimleri aktive olurlar (Kischkel vd. 1995). DISC aktivitesiyle aktive olan kaspaz-8 ise başta kaspaz-3 enzimi olmak üzere diğer kaspazları uyararak apoptoz yolağının ilerlemesini sağlamaktadır (Elmore 2007).

1.2.2. Mitokondriyal (İntrinsik) yolak

Hücre içerisinde oluşan sinyaller tarafından tetiklenen intrinsik apoptoz yolağı; pozitif ve negatif faktörler olmak üzere farklı etkenler aracılığıyla başlatılabilmektedir.

Apoptozun baskılanmasında görev alan hormon, sitokin ve bazı büyüme faktörlerini içeren; negatif faktörlerin eksikliği söz konusu olduğunda apoptoz tetiklenebilmektedir. Apoptozu direk olarak tetikleyen pozitif faktörler ise radyasyon, serbest radikallerin artması, viral enfeksiyonlar, toksinler vb. faktörlerden meydana gelmektedir (Elmore 2007). Pozitif faktörlerde meydana gelen artış ve negatif faktörlerin ortamda bulunmaması intrinsik yolda önemli roller üstlenen mitokondri organelinde bir dizi değişikliklere yol açabilmektedir. Bu değişiklikler arasında; mitokondri zar potansiyelinin kaybolması, mitokondri zarında yer alan geçiş kanallarının kontrolsüz olarak açılması ve öncül apoptoz proteinlerinin hücre sitoplazmasına salınması yer almaktadır (Saelens vd. 2004). İntrinsik apoptoz yolağında yer alan öncül apoptoz proteinlerinin ilk grubunu; sitokrom-c, Smac/DIABLO ve HtrA2/Omi gibi serin proteazlar oluşturmaktadır (Garrido vd. 2006). Sitokrom-c molekülü; apoptozun başlatılmasında en önemli rolü üstlenmekte ve mitokondriden sitoplazmaya salınarak, öncül kaspaz-9'u ve Apaf-1'i aktive ederek "apoptozom" adı verilen kompleksin oluşmasını sağlamaktadır (Hill vd. 2004, Garrido vd. 2006). Ayrıca, apoptozom kompleksinin oluşmasında HSP (heat shock protein) olarak adlandırılan proteinlerin sıkı kontrolü altında gerçekleşmektedir (Garrido vd. 2006). Öncül kaspaz-9 proteinin aktivasyonu ise bir seri kaspaz aktivasyonunu tetiklemekte ve son olarak kaspaz-3'ün aktive olmasıyla apoptoz meydana gelmektedir (Taneja vd. 2001).

Sitokrom-c dışındaki öncül apoptoz proteinleri arasında; endonükleaz G, CAD (kaspaz tarafından aktive edilmiş deoksiribonükleaz) ve AIF (apoptoz başlatıcı faktör) gibi moleküller de yer almaktadır (Elmore 2007). AIF molekülü de sitokrom-c gibi mitokondri içinden salınmaktadır. Ancak; AIF ve endonükleaz G molekülleri, kaspazlardan bağımsız olarak apoptoz olgusunda görev almaktadırlar (Li vd. 2001, Elmore 2007). Mitokondriden sitoplazmaya salınan AIF molekülü; çekirdeğe ulaşarak deoksiribonükleaz enzimini aktive etmekte ve DNA'nın 50 kb'lık parçalara ayrılmasında görev almaktadır. Ayrıca; periferik nükleer kromatinlerin yoğunlaşmasına sebep olmakta ve bu olay "birinci evre" olarak adlandırılmaktadır (Susin vd. 2000, Joza vd. 2001). Birinci evreyi takip eden ikinci evrede ise endonükleaz G ve CAD molekülleri mitokondriden salınmakta ve AIF molekülüne benzer aktivite göstererek kromatin yoğunlaşmasında artışa neden olmaktadır (Susin vd. 2000).

İntrinsik apoptoz yolağının düzenlenmesinde; tümör baskılayıcı genler tarafından düzenlenen Bcl-2 ailesine üye olan proteinlerin görev aldığı bilinmektedir (Cory ve Adams 2002). Bcl-2 ailesine üye olan proteinler genellikle mitokondriyal membran potansiyeli ve geçirgenliği üzerine etki göstererek mitokondriden sitokrom-c molekülünün salınmasında görev almaktadırlar (Wu vd. 2014). Öncül apoptoz ve anti-apoptoz proteinlerinden oluşan Bcl-2 protein ailesinin yaklaşık olarak 25 farklı üyesi bulunmaktadır. Bu üyelerden; Bcl-10, Bak, Bax, Bid, Bad ve Bik molekülleri öncül apoptoz proteinleriyken; Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w ve BAG gibi proteinler anti-apoptoz özellikli üyelere örnek verilebilir (Cory ve Adams 2002).

1.3. Kanser Tedavisinde Kullanılan Yöntemler

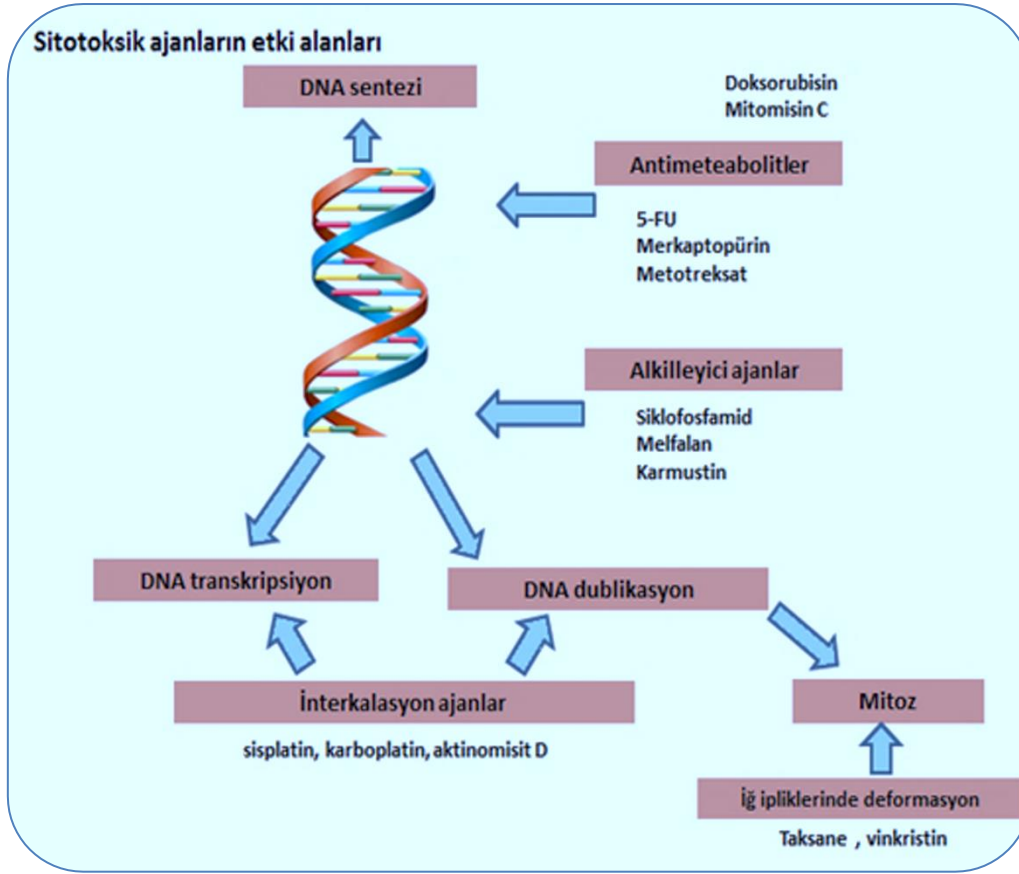
Günümüzde kanserle mücadele etmek için cerrahi müdahale, radyoterapi, kemoterapi, endokrin terapi ile çeşitli antikorların, metabolik inhibitörlerin ve aşılardan oluşan terapiler gibi birçok farklı yöntem izlenebilmektedir (Luqmani 2005). Kanser vakalarında en yaygın başvuru olan tedavi yöntemi genellikle cerrahi müdahale olarak karşımıza çıkmaktadır; ancak bu yöntemin başarılı olabilmesi için erken tanı büyük önem taşımaktadır (Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde 2015). Kanser dokusunu oluşturan hücrelerin bölünmesini ve hastalığın ilerlemesini engellemek amacıyla; kemoterapi yöntemi tercih edilmekte ve bu yolla meme kanseri hastalarının %60-70'i tedavi edilmektedir (Luqmani 2005, Velaei vd. 2016). Alternatif olarak uygulanan radyoterapi yönteminde ise uygun dozlarda X ışınları hastaya uygulanmakta ve hedef hücrelerinin öldürülmesi amaçlanmaktadır (Grisold vd. 2016). Meme kanseri gibi vakalarda uygulanan en özelleşmiş yöntem olarak karşımıza endokrin terapi yöntemi çıkmaktadır (Luqmani 2005, Parker vd. 2016). Aromataz inhibitörleri kullanılarak östrojen hormonlarının sentezini bloke eden tedaviler hormon tedavi yöntemlerinden en iyi bilinenleri arasındadır (Lukong 2017). Kanser tipinden ziyade moleküler hedeflere odaklanan tedavi yöntemlerinden biri olarak karşımıza çıkan antikorların kullanıldığı terapi yöntemlerine en iyi örnek ise erbB2/HER2/neu reseptörlerini hedef alan herseptin isimli antikorların kullanıldığı terapi yöntemidir (Wen vd. 2006). Metabolik inhibitörler aracılığıyla gerçekleştirilen kanser terapileri de moleküler hedeflere odaklanmakta; hücre sinyal yolları ya da spesifik proteinler üzerine etki göstererek, hücre döngüsünü düzenlemektedirler (Abbas vd. 2015). Kanser tedavisinde aşılardan kullanılması; bilimsel çevrelerce ideal bir çözüm olarak düşünülse

de, tümör spesifik proteinlerin eksikliğinden dolayı, bu yaklaşım çeşitli engellere takılmaktadır (Luqmani 2005). Bu terapi yöntemlerinin yanı sıra, kanser oluşumunda etkili olan genlerin ifadesinde değişikliği tetikleme yeteneğindeki; miRNA (mikro RNA) ve siRNA (küçük interferans RNA) moleküllerinin kullanımı gibi farklı yaklaşımlar da bulunmaktadır (Parker vd. 2016). Metastatik özellik göstermeyen lokal kanser olgularında, hiç kuşkusuz ki radyoterapi ve cerrahi müdahalelere öncelik tanınmaktadır; fakat kanserin ileri safhaları için bu gibi müdahaleler yetersiz kalmaktadır (Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde 2015). Özellikle metastatik olgularda, ikincil tümör alanlarının tespiti zor olduğundan dolayı, kemoterapi gibi yöntemlerin kullanılması kaçınılmaz olmaktadır (Wagner vd. 2006).

1.4. Kemoterapi

Kemoterapi; kanser hücreleri üzerinde çeşitli toksik etkilere sahip olan, ilaç etken bileşiklerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilen, kimyasal bir tedavi yöntemi olarak tanımlanmaktadır (Luqmani 2005). Sistematik bir yaklaşım olan kemoterapi yöntemi; kanser olgularına karşı kullanılan en önemli tedavi yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır (Luong vd. 2016, of Aguiar vd. 2016). İlk kemoterapi uygulaması; I. Dünya savaşı sırasında kimyasal silah olarak keşfedilen hardal gazının, kemik iliği üzerindeki depresif etkileri göz önünde bulundurularak, lenfoma hastalarının tedavi edilmesi amacıyla kullanılması sayesinde gerçekleştirilmiştir (Chabner ve Roberts 2005). Kemoterapik ajanlar üzerine yapılan araştırmaların artış göstermesiyle birlikte; bisulfan, klorambusil, merkaptopürin, tiyoguanin, doksorubisin, 5-fluorourasil gibi çok sayıda molekül keşfedilmiş ve klinik uygulamaya konulmuştur (Kumar vd. 2015).

Kemoterapi uygulamalarında kullanılan ajanlar genellikle kanser hücrelerine ulaştıktan sonra tümör hücrelerinin büyümesinde ve çoğalmasında sorumlu olan mekanizmalar üzerinde etkili olurlar (Luqmani 2005). Kullanılan bu ajanların etkili oldukları hücre içi mekanizmalar göz önünde bulundurulduğunda; anti-metabolitler, genotoksik ajanlar ve mitotik ajanlar olmak üzere üç grupta sınıflandırılmaktadırlar (Şekil 1.6) (Clarke vd. 1991, Luqmani 2005, Weaver ve Cleveland 2005, Fine vd. 2010).



Şekil 1.6. Sitotoksik ajanların etki alanları
Kaynak: Luqmani, 2005, s. 36

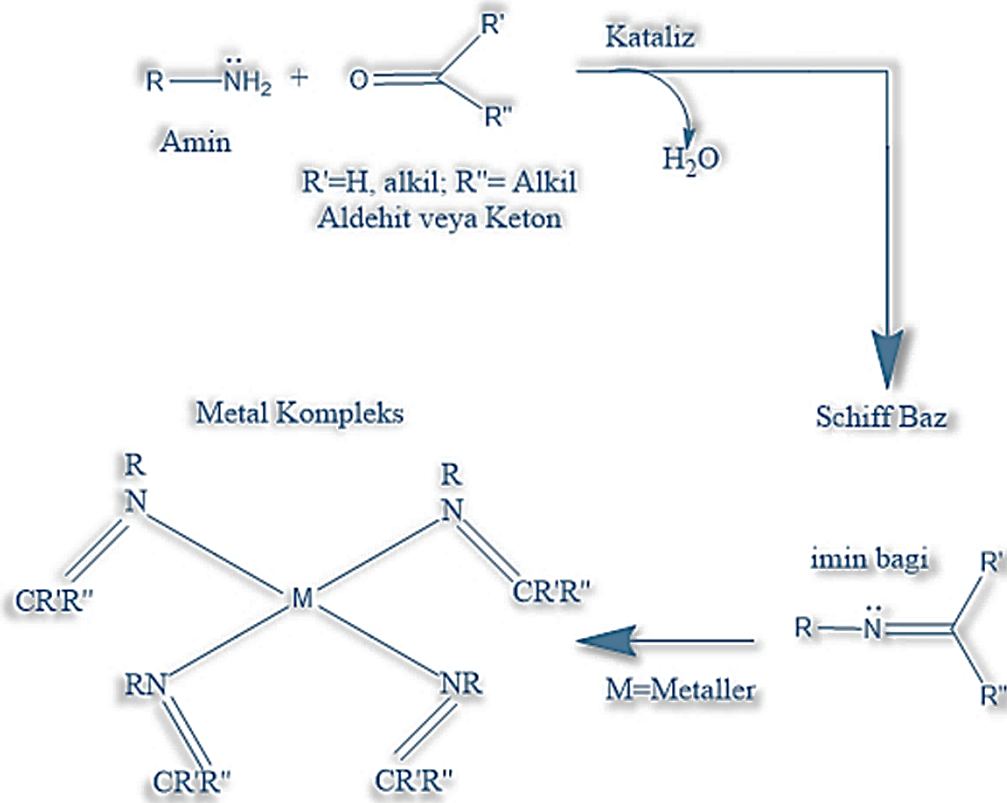
Anti-metabolit olarak adlandırılan bileşikler genellikle DNA (deoksiribonükleik asit) ve RNA (ribonükleik asit) sentezinden sorumlu olan mekanizmaları hedef almaktadırlar (Serdjebi vd. 2015). Bu bileşikler; nükleotidlerin sentezinden sorumlu olan proteinleri baskılayarak ya da aktive ederek nükleotid metabolizması üzerinde etkili olabilirler (Rampazzo vd. 2016). Yapılan araştırmalara göre, bazı anti-metabolitlerin; ribonükleotid redüktazları, pürin nükleosit fosforilazları, dehidrofolat redüktazları engelleyerek, kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalması üzerinde etki gösterdikleri belirlenmiştir (Aye vd. 2015, Serdjebi vd. 2015). Anti-metabolit özellikteki kemoterapi ajanları arasında en iyi bilinen örnek olarak karşımıza 5-floraurasil molekülü çıkmakta ve çeşitli nükleotidlerin sentez aşamalarını engelleyerek kanser hücrelerinin büyümesini engellemektedir (Sahai 2005, Wilson vd. 2014). Genotoksik ajanlar ise doğrudan DNA'ya bağlanarak kanser hücrelerini apoptoza sürüklemekte ve kendi aralarında; alkilleyici ilaçlar, interkalasyon (araya giren) ajanları ve enzim inhibitörleri olarak üç gruba ayrılmaktadırlar (Luqmani 2005). Enzim inhibitörleri; topoizomerazlar (DNA topolojisini düzenleyen enzimler) gibi çeşitli enzimlerin

baskılanması sonucu, DNA replikasyonu ve transkripsiyon üzerinde etkili olurken, sisplatin gibi ajanlar DNA'yı oluşturan bazlara kovalent bağlanarak, genotoksik aktivite göstermektedirler (Zamble ve Lippard 1995, Lee vd. 2016). Kemoterapide kullanılan mitotik ajanlar; genellikle tübülün monomerlerinin polimerizasyonunu engelleyerek hücre bölünmesi üzerine aktivite göstermektedirler (Luqmani 2005). Bitkilerden elde edilen; paklitaksel, vinka alkaloidleri gibi ilaçlar klinik olarak uygulanan mitotik inhibitörlere örnek gösterilebilirler (Voloshin vd. 2016).

Kemoterapide kullanılan bileşikler incelendiğinde karşımıza sıklıkla metal içerikli bileşikler çıkmakta ve bu bileşikler; sadece kemoterapide değil zirai ve endüstriyel uygulamalarda da büyük önem arz etmektedirler (Kumar vd. 2009). Çünkü metallerin; kimyasal yeteneklerine bağlı olarak, hücresel olaylarda ve biyokimyasal mekanizmalarda görev aldıkları bilinmektedir (Florea ve Büsselberg 2011). Bu nedenle, farmasötik kimya ve kansere karşı ilaç tasarımı projelerinde sıklıkla metal temelli bileşiklerin konu alındığı ve bilim adamlarının dikkatinin bu noktaya yoğunlaştığı gözlemlenmektedir (Bruijninx ve Sadler 2008). Metal içerikli kemoterapi ajanları arasında en bilineni ise, farmasötik kimya alanında yeni bir devir açan, sisplatin kompleksidir (Ott ve Gust 2007). 1960 yılında Rosenberg tarafından sisplatinin anti kanser özelliklerinin mucizevi keşfi, kimyasal kanser tedavisi alanında yeni bir dönem açmıştır (Florea ve Büsselberg 2011, Yu vd. 2016). Takip eden dönemde ise karboplatin, oksaliplatin, nedaplatin ve lobaplatin gibi platin temelli bileşikler keşfedilmiş ve bazıları klinik uygulamaya konulmuştur (Ott ve Gust 2007). Yapılan klinik uygulamalarda; sarkoma ve kemik iliği kanseri gibi farklı tipteki kanser olguları için kullanılabilen; sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin gibi ilaçların tedavide başarılı olduğu belirlenmiştir (Florea ve Büsselberg 2011). Ancak; tedavi sonrasında, kanser hücrelerinde etken bileşiğe karşı dirençlilik, istenmeyen yan etkilerin oluşması ya da sistemik toksisite olmak üzere çeşitli problemlerin oluşabildiği de gözlemlenmiştir (Florea ve Büsselberg 2011, Li vd. 2014). Bu nedenle, platin türevli ilaçların kemoterapide kullanımı sınırlı kalmaktadır (Wang ve Niu 2015). Araştırmacılar ise bu gibi engellerin üstesinden gelmek için daha az toksik özellik gösteren, kendine has özellikleri olan ve yan etki oluşturma oranı düşük olan kemoterapi ajanlarının keşfi üzerine yoğunlaşmıştır (Ott ve Gust 2007, Li vd. 2014). Schiff bazlarının kemoterapide kullanılması da, araştırmacıların bu çabalarının bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır (Rudbari vd. 2016).

1.5. Schiff Bazları

Alman kimyager Hugo Schiff tarafından, 1864 yılında, ilk defa sentezlenen schiff bazları; karbonil bileşikler ve primer aminlerin kondenzasyonu (İki veya daha fazla molekülün su gibi küçük bir molekülü atarak birleştiği tepkimeler) ile sentezlenen önemli bir kimyasal molekül sınıfıdır (Şekil 1.7)(Hameed vd. 2016). Schiff bazları yapılarında; nitrojen, sülfür ve oksijen içeren heterosiklik halkalardan oluşabilen ve biyolojik sistemlerdeki basit moleküllere benzerlik göstermelerinden dolayı bilimsel çevrelerin dikkatini üzerlerine çeken moleküller olarak karşımıza çıkmaktadırlar (Joshi ve Kumar 2014, Poonia vd. 2016, Ansari vd. 2017). Ayrıca, schiff bazları küçük molekül yapısına sahip olmaları nedeniyle, koordinasyon kimyasının çalışma konuları arasında yer almakta ve bu moleküllerden farklı geçiş metal komplekslerinin sentezlenmesi söz konusu olabilmektedir (Chang vd. 2016). Hidrazon türevi moleküller içerebilen schiff bazlarının sentezi de bu şekilde mümkün olmakta ve bu bileşikler kanser tedavisi araştırmalarında umut vaat edici moleküller olarak değerlendirilmektedirler (El-Faham vd. 2016). Bununla birlikte; farklı özelliklerde heterosiklik halkalar içerebilen schiff bazlarının; bitki büyüme inhibitörü (Şimûnek ve Macháček 2010), insektisidal (Shams vd. 2011), anti-bakteriyel (Cheng vd. 2010), anti-mikrobiyal (Rudrapal vd. 2012), anti-viral (Vicini vd. 2003), anti-tüberküloz (Kascheres 2003), anti-depresan (Raman vd. 2009), anti-konvülzan (epilepsi önleyici) (Verma vd. 2004) ve antikanser aktivite gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip oldukları da yapılan araştırmalarla ortaya konulmuştur (Kucukoglu vd. 2016).



Şekil 1.7. Schiff bazı ve metal komplekslerinin genel sentezi
Kaynak: Hameed vd., 2017, s. 65

1.5.1. Schiff bazlarının antimikrobiyal aktivitesi

20. yüzyıl bakteriyel enfeksiyon kaynaklı hastalıklar nedeniyle oluşan ölüm riskinin ciddi oranda azaldığı ve patolojik etmenlerin kontrol edilebilirliğinin arttığı bir dönem olarak karakterize edilmektedir (Vicini vd. 2003). Bununla birlikte; mikroorganizmalar insan sağlığını olumsuz yönde etkilemeye devam etmekte ve antibiyotiklere karşı direnç oluşturma yeteneklerinden dolayı yeni antimikrobiyal ajanların keşfine artan bir şekilde ihtiyaç duyulmaktadır (Paulpandiyar ve Raman 2016). Bu kapsamda yapılan çalışmalar; schiff bazlarının metal komplekslerle olan bileşiklerinin çok sayıda bakteri üzerinde etkili olduğunu ve geniş spektrumlu antimikrobiyal etki gösterdiklerini ortaya çıkarmıştır (Ansari vd. 2017). Örnek olarak; Manjunath ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada bakır, nikel ve kobalt gibi farklı geçiş metalleriyle elde edilen schiff baz komplekslerin etkili birer antimikrobiyal ajan oldukları ve *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella typhi* gibi insanlarda çeşitli hastalıklara neden olabilen bakteriler üzerine aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Manjunath vd. 2017).

1.5.2. Schiff bazlarının anti-fungal aktivitesi

Geniş biyolojik aktiviteye sahip olan schiff bazlarının antimikrobiyal aktivitelerinin yanı sıra, antifungal aktivite de gösterebildikleri bilinmekte ve kuvvetli birer anti-fungal ajan olabildikleri değerlendirilmektedir (Bharti vd. 2010). Manjunat ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada da; sentezlenen schiff bazlarının antimikrobiyal aktivitelerinin yanında, anti-fungal aktiviteleri de; *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* ve *Cladosporium* gibi mantarlar üzerine incelenmiş ve yüksek anti-fungal aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir (Manjunath vd. 2017). Ayrıca, flavanone ve naringen sınıfı bileşiklerin reaksiyonlarından elde edilen moleküllerin schiff bazlarının metal kompleksleri ile oluşturduğu bileşiklerin; *Geotrichum candidum*, *Alternaria alternate*, *Mucor hiemalis* gibi çeşitli mantarlar üzerinde etkili oldukları da keşfedilmiştir (Brodowska vd. 2016). Yine önemli birer schiff baz türevi olan açıl hidrazon içerikli schiff bazı komplekslerinin de; *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata* ve *Candida tropicalis* gibi farklı mantar türleri üzerinde etkili oldukları keşfedilmiştir (Ortiz vd. 2016).

1.5.3. Schiff bazlarının anti-viral aktivitesi

Virüsler; dünya genelinde gerek insan sağlığı, gerekse bitkisel organizmaların yaşamı üzerine olumsuz etkiler gösterebilmekte, hatta yaşamlarını kaybetmelerine neden olabilmektedir (Alexander vd. 2014, Dube vd. 2016). Virüslerin olumsuz etkileri, özellikle bağışıklık sistemi zayıfladığı anda ortaya çıkmaktadır ki; insan sağlığı üzerine etkili olan ve sıklıkla rastlanan, basit bir virüs olarak *Herpes simpleks* (HSV; uçuk virüsü) virüsü bu olguya örnek verilebilir (Lin & Scott, 2012). Bitkiler üzerine etkili olan *Tobacco mosaic virus* (TMV) isimli virüs de tarımsal uygulamalarda sıklıkla karşılaşılan ve ciddi maddi hasarlara neden olan bir organizma olarak karşımıza çıkmaktadır (Scholthof vd. 2000). Bu kapsamda, Abdel-rahman ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada; krom, demir, kobalt ve nikel geçiş metallerini içeren schiff bazlarının *Herpes simpleks* ve *Tobacco mosaic virus* virüsleri üzerine ciddi anlamda anti-viral aktivite sergiledikleri belirlenmiştir (Abdel-Rahman vd. 2016). Bununla birlikte, schiff bazlarının antiviral aktiviteleri üzerine çok sayıda çalışma bulunmakta ve birçok schiff bazı kompleksinin anti-viral ajan olarak umut vaat ettiği düşünülmektedir (Jarrahpour vd. 2007, Kumar vd. 2009, da Silva vd. 2011, Zhang vd. 2016a).

1.5.4. Schiff bazlarının insektisidal aktivitesi

Tarımsal uygulamalarda viral enfeksiyonlar kadar böcek istilaları da büyük önem arz etmekte ve ciddi maddi kayıplara neden olabilmektedir (Lander vd. 2014, Duan vd. 2015). Bu nedenle, kimya araştırmalarının önemli bir kısmını da böceklere karşı geliştirilen insektisidal ajanlar oluşturmaktadır (Jeanguenat 2013). Bu kapsamda, schiff bazlarının insektisidal aktiviteleri üzerine de çok sayıda çalışma yapıldığı göze çarpmaktadır (Karmakar vd. 2015, Kenawy vd. 2015, Muthal vd. 2016, Liu vd. 2017). Yapılan araştırmalar sonucunda; vitamin B1, penisilin, koenzim ve karboksilaz moleküllerinin yapısında bulunan tiyazol halkasını bünyesinde barındıran schiff bazlarının ve türevlerinin etkin birer insektisidal ajan oldukları belirlenmiştir (Kumar vd. 2009, Joshi ve Kumar 2014). Ayrıca, pamuk bitkisinin çeşitli herbivorlara ve patojen organizmalara karşı korunmak amacıyla salgılamış olduğu gossypol adı verilen sekonder metabolitler ile schiff bazlarından kompleks oluşturulabildiği ve elde edilen bileşiklerin etkili birer insektisidal olduğu da belirlenmiştir (Krempl vd. 2016). Böylece, doğal bileşiklerin schiff baz yapısına dahil edilmesiyle; hem bitkiler üzerine oluşabilecek zararların önüne geçilmesi amaçlanmış, hem de bitkilerin yaşam ortamını istila eden böcekler hedef alınarak yok edilmeleri sağlanmıştır (Krempl vd. 2016)

1.5.5. Schiff bazlarının bitki büyüme düzenleyicisi olarak kullanımları

Tarım alanlarının ve bitkisel organizmaların korunması kadar bu organizmaların büyümesi üzerinde etkiye sahip olan maddelerin keşfedilmesi de büyük önem arz etmekte; ancak çok az sayıda molekül bitki büyümesi, fertilizasyon üzerine aktivite gösterebilmektedir (Wu vd. 1984, Pang vd. 2001, Zeng vd. 2003). Lantanit sınıfı metal iyonlarının; bitkilerin büyümesinde önemli görevler üstlenen oksin hormonu ile sinerjik etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Tyler 2004). Bununla birlikte, schiff bazları da metallerle kolay koordinasyona girebilmekte ve kompleksler oluşturabilmektedir (Kostova ve Saso 2013). Bu kapsamda, Naik ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada; lantanit (III) metalleriyle schiff baz kompleksleri elde edilmiş ve bitki büyümesi üzerinde olumlu etkiler oluşturdukları belirlenmiştir (Naik vd. 2012). Ayrıca, schiff bazlarının tiyodiazol türevleriyle oluşturdukları komplekslerin de oksin ve sitokin hormonlarına karşı etkili oldukları ve bitki büyüme düzenleyicisi olarak görev üstlenebildikleri de bilinmektedir (Kumar vd. 2009).

1.5.6. Schiff bazlarının anti- Alzheimer aktivitesi

Alzheimer hastalığı; merkezi sinir sisteminde meydana gelen nörodejenerasyonlar (sinir sistemi dokularında meydana gelen hasarlar) sonucu oluşan ve dünyada milyonlarca insanda rastlanan bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır (Pohanka 2011). Şaşırtıcı bir şekilde gelişmiş ülkelerde daha fazla rastlanan bir olgu olan Alzheimer hastalığı; hafıza kaybı, düşünürken ya da konuşurken güçlük çekme ve diğer bilişsel bozukluklar ile karakterize edilebilmektedir (Hameed vd. 2016). Günümüzde kullanılan Alzheimer tedavileri kesin çözüm olmamakla birlikte, sadece hastalığın erken safhalarında etkili olabilmektedirler (Pohanka 2011, Schwarz vd. 2014). Tedavide kullanılan temel yaklaşımlardan biri; hastalığın oluşumunda önemli roller üstlenen β -sekretaz enziminin hedef alınarak, baskılanmasıdır (Wolfe 2001). Schiff bazlarının β -sekretaz enzimi üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalarda ise bu moleküllerin önemli birer β -sekretaz inhibitörü (baskılayıcısı) olduğu ve anti-Alzheimer aktiviteye sahip olabilecekleri gözlemlenmiş hatta bazı Schiff bazları bu özellikleri nedeniyle patent koruması altına alınmıştır (Gabellieri vd. 2014). Anti-Alzheimer özelliğe sahip olan bu bileşiklere; BACE1 ve BACE2 isimli β -sekretaz sınıfı enzimlerin aktivitesini baskılama özelliğine sahip olan, 3,5-difluoropiridin-2-karboksilik ve 5-(3-aminofenil)-5-metilmorfolin-3,1 hidroklorür molekülleri örnek olarak verilebilmektedir (Andreini vd. 2012, Hameed vd. 2016).

1.5.7. Schiff bazlarının detoksifikasyon aktiviteleri

Schiff bazları; kimyasal silah kaynaklı çeşitli toksik maddelerin etkilerini azaltmak amacıyla kullanılabilmektedirler. Bu kapsamda, aşırı derecede tehlikeli olan sarin gazına karşı, bazı Schiff bazların detoksifikasyon aktivitesi gösterdikleri bilinmektedir (Owens vd. 2013). Eşsiz özelliklere sahip olan Schiff bazları; yapılarında elektrofilik (elektronca fakir olan) karbon ve nükleofilik (elektronca zengin olan) nitrojen içerdiklerinden dolayı, zehirli kimyasallarla oldukça kolay bir şekilde etkileşime girebilmektedirler (Owens vd. 2013, Hameed vd. 2016). Schiff bazlarının; amin, alkol, siyanür, tiyalot gibi zehirli maddelerin ve halojen özelliklere sahip olan toksik maddeleri etkisiz hale getirmede başarılı oldukları bilinmektedir (Hameed vd. 2016). Schiff bazlarının detoksifikasyon aktivitelerinden dolayı, insan sağlığına zararlı olan; plastik, seramik ve

polimer gibi zehirli maddeler içerebilen malzemelerin zararlarından korunmak amacıyla yararlanılabilecek kompleksler oldukları düşünülmektedir (Hameed vd. 2016).

1.5.8. Schiff bazlarının antikanser ve sitotoksik aktiviteleri

Geniş biyolojik aktivitelere sahip olan schiff bazlarının metal kompleksleri; antikanser ilaç etken bileşik adayları olarak da birçok çalışmaya konu olmaktadır (Brodowska vd. 2016). Yapılan çalışmalar; schiff bazlarının, hücre içinde bulunan farklı metabolitleri hedef alarak, kanser hücreleri üzerinde etkili olduklarını göstermiştir (Hameed vd. 2016). Hücresel fonksiyonların devamlılığı için gerekli genetik bilgiyi içeren DNA ise antikanser ajanların öncelikli hedef moleküllerden birisi olarak karşımıza çıkmaktadır (Abdel-Rahman vd. 2016). Kanser tedavilerinde kullanılan birçok bileşik; DNA'ya bağlanarak, DNA replikasyonu üzerine baskılayıcı aktivite göstermekte ve kanser hücrelerinin büyümesini engellemektedir (Koiri vd. 2008). Nükleik asitlerle kolaylıkla etkileşime girebilme yeteneğine sahip olan küçük molekül yapıları ligandlar veya metal kompleksleri de; yeni antikanser ajanların geliştirilmesi için sıklıkla tercih edilmektedir (Arjmand ve Muddassir 2011, Shokohi-pour vd. 2016). Yapılarında oksijen ve azot içeren schiff bazlarının farklı metal kompleksleriyle oluşturdukları bileşiklerin de; DNA ile oldukça sıkı etkileşimlere girdikleri düşünülmektedir (Gomathi vd. 2014). Yousuf ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, schiff bazlarının; kobalt, çinko ve bakır gibi geçiş metalleri ile oluşturdukları komplekslerin, DNA ile etkileşimleri göz önünde bulundurularak, antikanser aktiviteleri araştırılmıştır (Yousuf ve Arjmand 2016). Farklı geçiş metallerini içeren schiff baz komplekslerinin; DNA'nın morfolojik yapısında değişikliklere yol açtığı ve lösemi (HL60), rahim kanseri (HeLa), meme kanseri (MCF-7) gibi hücre hatları üzerinde oksidatif hasara neden olarak, sitotoksik aktivite sergiledikleri gözlenmiştir (Yousuf ve Arjmand 2016). Ayrıca, schiff bazları ile kompleks oluşturan geçiş metallerinin; histidin ve sistein gibi çeşitli amino asitlere karşı yüksek afinite (moleküllerin birbiriyle bağ yapabilme yetenekleri) sergiledikleri de bilinmektedir (Hartwig 2001, Hameed vd. 2016). Histidin ve sistein amino asitleri; çinko parmak bölgeleri gibi transkripsiyonu uyaran önemli proteinlerin yapısında yer almaktadırlar (Hartwig 2001). Harney ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada ise sentezlenen schiff bazlarının; transkripsiyonun başlamasında etkin rol üstlenen çinko parmak bölgeleriyle etkileşimleri sonucu, meme kanseri başta olmak üzere farklı kanser olguları üzerinde oldukça etkili antikanser aktiviteye sahip oldukları

belirlenmiştir (Harney vd. 2009, Hameed vd. 2016). Kanser terapilerinde önemli görülen bir diğer hedef ise hücrelerin bölünmesinde önemli roller üstlenen mikrotübüllerdir (Louzao vd. 2011). Benzofenon moleküllerini içeren schiff baz komplekslerinin; tübülün polimerizasyonunu engelleyerek kanser hücrelerinin çoğalması üzerinde etkili olabildikleri bilinmektedir (Leblond vd. 2011). Ayrıca yapılan çalışmalar, geçiş metallerini içeren schiff bazlarının farklı enzimleri doğrudan veya dolaylı olarak etkilemesi sonucu anti kanser aktiviteye sahip olduklarını gözler önüne sermiştir (Yan vd. 2015a, Lee vd. 2016). Bu enzimler arasında, apoptozun gerçekleşmesinde hayati öneme sahip olan ve sistein proteaz enzim ailesinde yer alan, kaspazlar da bulunmaktadır (Ekert vd. 1999). Özellikle schiff bazlarının bakır metali ile oluşturdukları komplekslerin; farklı enzimlerin aktivitelerini baskılayarak, apoptoza yol açtığı ve diğer antikanser ajanlara göre daha etkili oldukları bilinmektedir (Konarikova vd. 2013, Hajrezaie vd. 2014). Bununla birlikte, bakır metali içeren birçok schiff baz kompleksi; sağlıklı hücreler için daha az toksik olmasına rağmen, meme kanseri, akciğer kanseri ve kolon kanseri gibi kanserli hücreler üzerinde daha etkili toksisiteye neden olmaktadır (Marzano vd. 2009).

Schiff bazlarının açıl hidrozonlarla yapmış oldukları komplekslerin de etkili antikanser ajan olabildikleri bilinmektedir (Li vd. 2015). Eşsiz moleküler yapıya sahip olan hidrazon türevleri; anti-tüberküloz, antikanser, sitotoksik ve anti-mikrobiyal gibi çeşitli biyolojik aktiviteler sergilemektedirler (Ferreira vd. 2016, Hameed vd. 2016, Joshi vd. 2016). Çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olan bu hidrazon türevleri; diğer moleküllerle kolay koordinasyona girmeleri ve heterosiklik halka oluşturmaları gibi yeteneklerinden dolayı, bilim adamlarının dikkatlerini üzerine çekmeyi başarmışlardır (Aboul-Fadl vd. 2012, Hong vd. 2014, Hameed vd. 2016). Son zamanlarda yapılan çalışmalar da, schiff bazlarının geçiş metal komplekslerinin, açıl hidrazon türevleriyle koordinasyonu sonucu oluşturdukları bileşiklerin; DNA replikasyonunda, gen ifadesinde ve protein aktivasyonunda etkiye sahip olduklarını göstermiştir (Li vd. 2015). Ayrıca, açıl hidrazon türevlerinin; kanser hücreleri üzerinde reaktif oksijen türlerinin birikimine neden oldukları ve meme kanseri hücrelerini apoptoza sürükledikleri gözlenmiştir (Singh vd. 2017b). Schiff bazları ve türevleriyle gerçekleştirilen birçok çalışma sonucuyla, sergiledikleri antikanser ve sitotoksik aktivitelerine bağlı olarak, kanserle mücadelede umut vaat ettikleri belirlenmiş ve bu nedenle bilim adamlarının

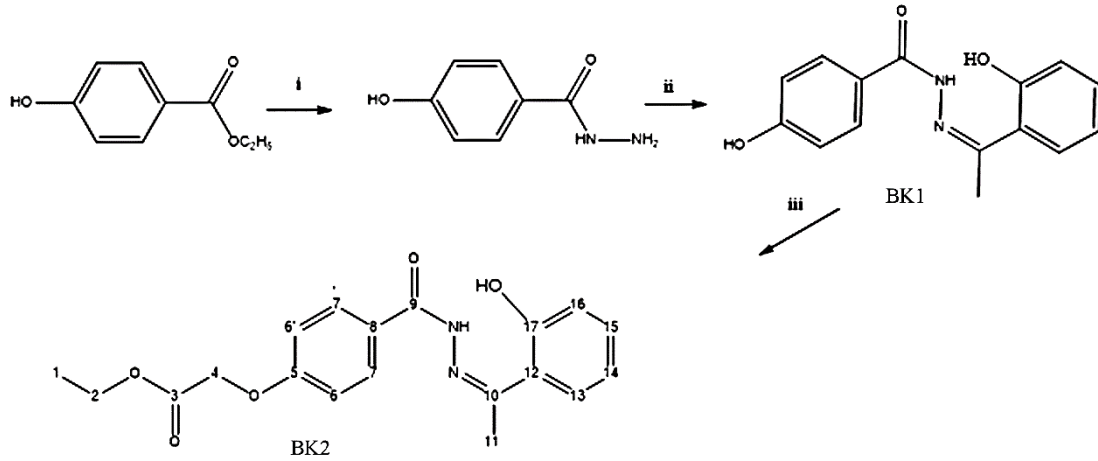
enerji ve dikkatleri daha etkili schiff bazlarının keşfi üzerine yoğunlaşmıştır (Shokohipour vd. 2016).

Bu nedenle, gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında yeni sentezlenen schiff baz komplekslerinin sağlıklı ve kanserli hücre hatları üzerine sitotoksik aktiviteleri; Alamar Blue hücre canlılığı, LDH hücre membran hasarı ve PicoGreen dsDNA miktar tayini testleriyle gerçekleştirilmiştir. Test bileşiklerinin sitotoksik aktiviteleri belirlendikten sonra, hücre içi reaktif oksijen (ROS) birikimi ve kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine aktiviteleri araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Schiff Bazları

Schiff bazlarının metal kompleksleri ile oluşturdukları bileşikler; Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Kimya Bölümünde görevli öğretim üyesi Prof. Dr. Ramazan GÜP ve doktora öğrencisi Cansu GÖKÇE tarafından sentezlenerek, saflaştırılmış ve karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Sentez, saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarıyla ilgili yöntem ve değerlendirmeler Gup ve ark. tarafından 2015'te yayınlanan çalışmada detaylı olarak anlatılmıştır (Gup vd. 2015). Çalışma kapsamında kullanılan ligantların sentez aşamaları Şekil 2.1'de görülebilir.



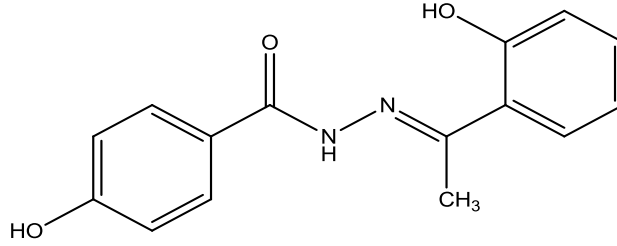
Şekil 2.1. BK1 ve BK2 Schiff bazlarının sentez aşamaları

2.1.1. 4-hidroksi-N'-[(1Z)-1-(2-hidroksifenil)etiliden]benzohidrazid (BK1) sentezi

0,01 mol 2-hidroksi-asetofenonun (0,136 g) 10 mL alkoldeki çözeltisi, 0,01 mol (1,52 g) 4-hidroksibenzohidrazinin ve iki damla asetik asit içeren etil alkol karışımına (10 mL) damla damla ilave edilerek geri soğutucu altında yaklaşık 5 saat karıştırıldı. Bir gece bekletildikten sonra oluşan sarı kristaller süzülerek toplandı ve dietileter ile yıkandı. Oluşan kristaller süzülerek, vakum altında kurutuldu (Şekil 2.2).

Verim: % 83; E.N.: 249-250 °C; UV (DMF, nm) 286, 324; IR (ATR, cm⁻¹) 3292 (OH), 1639 (C=O)_{amide}, 1602 (C=N), 1369 (C-N), 1251 (C-O); ¹H-NMR (DMSO-_d₆) δ 2.49 (s, 3H, CH₃), 6.94 (d, 2H, Ar-H^e), 7.89 (d, 2H, Ar-H^d), 7.84 (s, 1H, H^a), 6.91 (d, 1H, H^c), 6.35 (q, 1H, H^b), 10.26 (s, 1H, OH), 11.14 (s, 1H, NH), 13.53 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (DMSO-_d₆, ppm) 164.7 (C=O), 161.7 (C=N), 159.4 (C-O), 157.7 (C-O), 131.7, 130.9, 129.0, 124.0,

120.2, 119.2, 117.9, 115.7 (Ar-C), 14.6 (CH₃). Elementel Analiz (% Hesaplanan/bulunan) C₁₉H₂₀N₂O₅ C: 66.66/66.84, H: 5.22/5.08, N: 10.36/10.18.

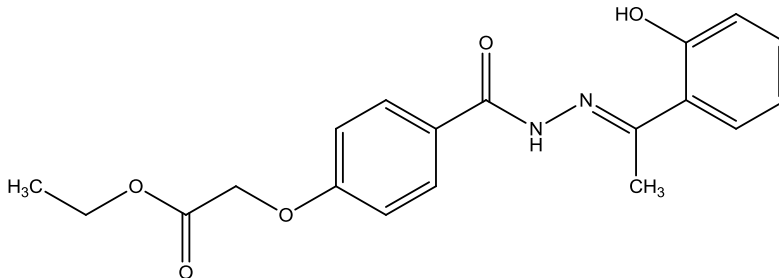


Şekil 2.2. BK1 Schiff bazının kimyasal yapısı

2.1.2. (Z)-etil 2-(4-(1-(2-(4-(2-etoksi-2-oksoetoksi) benzoil) hidrazon) etil) fenoksi) asetat (BK2) sentezi

0,01 mol etil bromoasetat, 0,01 mol BK1 açıl hidrazon schiff bazı ve 0,01 mol kuru K₂CO₃ içeren 25 mL aseton karışımına damla damla ilave edilerek geri soğutucu altında 40 saat karıştırıldı. Karışım soğutulduktan sonra soğuk su ilave edilerek ürün çöktürüldü ve süzüldü. Su ile yıkandıktan sonra aseton-su karışımında kristallenmeye bırakıldı (Şekil 2.3).

Verim: % 50; E.N.: 178 °C; UV (DMF, nm) 284, 326; IR (ATR, cm⁻¹) 3218 (OH), 2904-2979 (CH_{alifatik}) 1757 (C=O)_{ester}, 1636 (C=O)_{amide}, 1603 (C=N), 1384 (C-N), 1253 ve 1080 (C-O-C); ¹H NMR (CDCl₃, ppm) δ 1.29-1.34 (t, 3H, CH₃), 2.47 (s, 3H, N=C-CH₃), 4.23-4.30 (q, 4H, OCH₂CH₃), 4.73 (2H, Ar-OCH₂), 6.85 (d, 2H, ArH), 7.26 (d, 2H, ArH), 7.52 (d, 2H, ArH), 7.94 (d, 2H, ArH), 10.89 (s, 1H, NH); 13.32 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃, ppm) 168.2 (C=O_{ester}), 164.1 (C=O_{amide}), 160.5 (C=N), 159.2 (C-O), 157.5 (C-O), 131.1, 130.1, 127.9, 126.2, 119.4, 118.4, 117.6, 114.1 (Ar-C), 64.9 (OCH₂), 61.2 (OCH₂CH₃), 14.1 (CH₃-C=N), (CH₃), 13.9 (CH₂CH₃). Elementel Analiz (% Hesaplanan/bulunan) C₁₉H₂₀N₂O₅ C: 64.04/64.22, H: 5.66/5.54, N: 7.86/8.19.

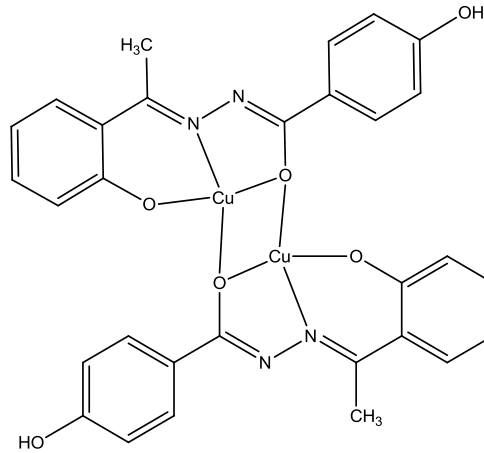


Şekil 2.3. BK2 Schiff bazının kimyasal yapısı

2.1.3. BK1 ve BK2 ligandlarından bakır komplekslerinin sentezi (BK1X ve BK2X)

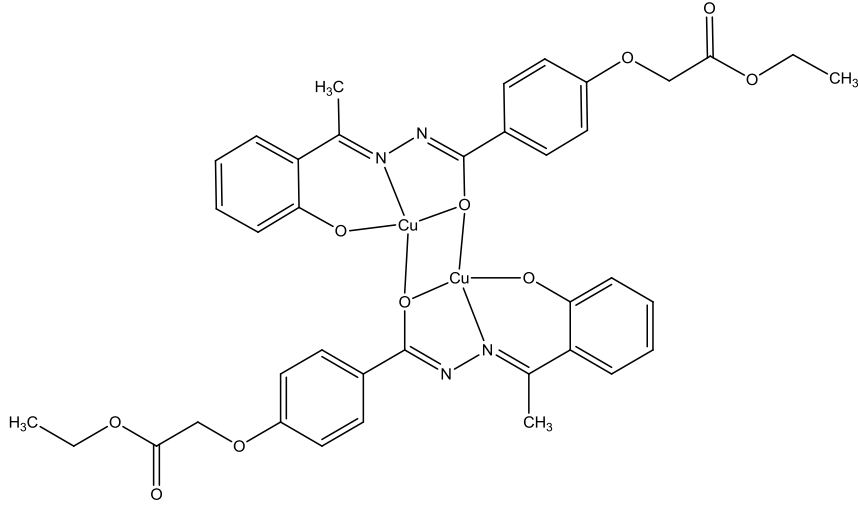
1 mmol ligand (BK1 için 0,270 gr ya da BK2 için 0,356 gr) 15 mL etanolde çözülerek üzerine 1 mmol (0,20 gr) $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ' ın 10 mL etil alkoldeki çözeltisi damla damla ilave edilerek geri soğutucu altında 3 saat kaynatıldı. Çözücü vakum altında uçurulduktan sonra toplandı ve soğuk su ile yıkandı. DMF/eter karışımında kristallendirildi.

$[\text{Cu}_2(\text{BK1})_2]$: Koyu Yeşil Kompleks (BK1X); Verim: % 80; E.N.: $>350^\circ\text{C}$. $\mu_{\text{eff}} = 1.39$ B.M.; UV (DMF, nm) 314, 330, 384; FT-IR (ATR, cm^{-1}) 3331 b (O-H), 1597 m (C=N-N=C), 1359 (C-N), 1248 s ve 1162 m (C-O-C). Elementel Analiz (%Hesaplanan/bulunan) $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{Cu}_2\text{N}_4\text{O}_6$ C: 54.30/53.83, H: 3.65/3.78, N: 8.44/8.33, Cu: 19.15/19.02. (Şekil 2.4)



Şekil 2.4. BK1X Schiff bazının kimyasal yapısı

$[\text{Cu}_2(\text{BK2})_2]$: Yeşil Kompleks (BK2X); verim: % 78; E.N.: 325°C . $\mu_{\text{eff}} = 1.34$ B.M.; UV (DMF, nm) 313, 330 and 386; FT-IR (ATR, cm^{-1}) 1762 (C=O)_{ester}, 1597 (C=N-N=C), 1256 ve 1165 (C-O-C). Elementel Analiz (%Hesaplanan/bulunan) $\text{C}_{38}\text{H}_{36}\text{Cu}_2\text{N}_4\text{O}_{10}$ C: 54.61/54.39, H: 4.34/4.41, N: 6.70/6.66, Cu: 15.21/15.06. (Şekil 2.5)



Şekil 2.5. BK2X Schiff bazının kimyasal yapısı

2.2. Çalışmada Kullanılan Malzemelerin Hazırlanması

Schiff baz komplekslerinin memeli hücre hatları üzerindeki biyolojik aktivitelerini araştırmak amacıyla gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında steril koşulların sağlanması doğru sonuçların elde edilmesi açısından büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle, çalışmada kullanılan bazı cam ve plastik malzemelerin yanı sıra bazı sıvı malzemelerin alüminyum folyolara sarılı olarak otoklavda 121°C ve 1,5 atm/Hg basınçta 20 dakika, diğer cam ve metal malzemelerin ise alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180°C'de 2 saat süre ile sterilizasyonu sağlanmıştır. Ayrıca; çalışmada kullanılan ısıya bozulabilen sıvı kimyasallar 0,2µm aralıklı selüloz nitrat filtreden geçirmek suretiyle sterilize edilmiştir.

2.3. Çalışmada Kullanılan Hücreler ve Kültür Koşulları

2.3.1. İnsan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D) hücre kültürü

T-47D hücreleri (ATCC® HTB-133™); ilk kez 1979 yılında, göğüs kanseri olgusuna rastlanan 54 yaşındaki bir kadından, meme duvarının delinmesi yoluyla, boşluktan alınan sıvıdan (plevral efüzyon sıvısı) izole edilen, epitel hücre morfolojisine sahip bir hücre hattıdır (Keydar vd. 1979). T-47D hücre hattı östrojen, progesteron, glukokortikoid ve androjen için steroid hormon reseptörlerine sahiptir (Ono vd. 1987). Yüksek lisans tez çalışması kapsamında kullanılan T-47D hücreleri; Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Tarafından desteklenen 1502F068 numaralı proje kapsamında ATCC firmasından (American Type Culture Collection, Middlesex, UK) satın alınarak kültüre edilmiş ve stoklanmıştır. Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Hücre Kültürü Laboratuvarında sıvı azot tankları içinde muhafaza edilen hücrelerdir. T-47D hücreleri; %10 Fetal Bovine Serum (FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), %1 penisilin-streptomisin solüsyonu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) ve 1.5 gr/L sodyum bikarbonat ile 200 ünite/L bovine insülin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) içeren RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) medyum ortamında ve 75 cm² flasklar içerisinde, 37 °C'de, %5 CO₂ içeren bir ortamda kültüre edilmiştir.

2.3.2. İnsan meme bezi epitelyum IV. evre adenokarsinoma (HCC1428) hücre kültürü

HCC1428 hücreleri (ATCC® CRL-2327™); ilk kez 1995 yılında, göğüs kanseri olgusuna rastlanan ve ailesinde de kanser olgusuna rastlanmış olan (anneannesinde) 49 yaşındaki Kafkas ırkına mensup bir kadından izole edilmiştir (Gazdar vd. 1998). HCC1428 hücreleri cisplatine karşı dirençli, metastatik özellikte ve IV. evre (aşama) kanser hücreleri olarak tanımlanmaktadır (Ahmadian vd. 1997, Gazdar vd. 1998, Sakai vd. 2008). Yüksek lisans tez çalışması kapsamında kullanılan HCC1428 hücreleri; Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Tarafından desteklenen 1502F068 numaralı proje kapsamında ATCC firmasından satın alınarak kültüre edilmiş ve stoklanmıştır. Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarında sıvı azot tankları içinde muhafaza edilen hücrelerdir. HCC1428 hücreleri; %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve 1 gr/L sodyum bikarbonat içeren RPMI-1640 medyum ortamında ve 75 cm² flasklar içerisinde, 37°C'de, %5 CO₂ içeren bir ortamda kültüre edilmiştir.

2.3.3. İnsan göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücre kültürü

HUVEC hücreleri (ATCC® CRL-1730™); ilk kez 1984 yılında, Jaffe ve arkadaşlarının 1973 yılında kullandığı primer endotel hücre izolasyon metodu modifiye edilerek, insan göbek bağı damarından izole edilerek stoklanmış olan primer özellikli ve sağlıklı damar endotel hücreleridir (Jaffe vd. 1973, HoSHI ve McKeehan 1984). HUVEC hücrelerinin, damar dokusundan izole edilmeleri nedeniyle *in vitro* koşullarda da kılcal damar benzeri veya tüp benzeri yapılar oluşturabildikleri bilinmektedir (Lewis 1921, Maruyama 1963). Yüksek lisans tezi kapsamında Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Hücre Kültürü

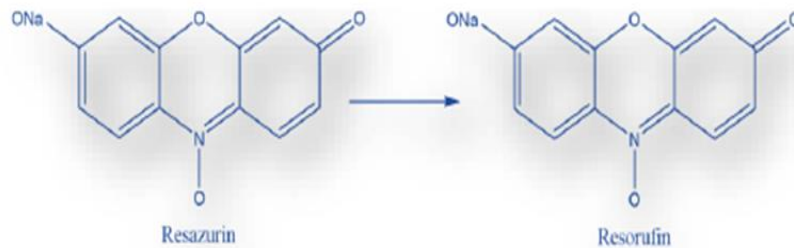
Laboratuvarı hücre stoklarımızda bulunan HUVEC hücreleri; daha önceden ATCC (American Type Culture Collection) firmasından satın alınarak kültüre edilmiş ve stoklanmıştır. Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarında sıvı azot tankları içinde saklanmış olan 4-5 pasaj numarasına sahip hücrelerdir. Hücreler için uygun koşulların sağlanması adına %20 FBS, %1 penisilin-streptomisin solüsyonu, 1.5 gr/L sodyum bikarbonat ve 30 mg/L olacak şekilde, sığır (bovine) hipofiz bezinden izole edilmiş, endotel hücresi büyüme takviyesi (ECGS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) içeren Ham's F12 (Ham's Nutrient Mixture F12; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) medyum ortamında ve 75 cm² flasklar içerisinde, 37°C'de, %5 CO₂ içeren bir ortamda kültüre edilmiştir.

2.4. Alamar Blue Hücre Canlılığı Testi

Alamar blue boyası (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA); biyolojik ve çevresel sistemlerdeki sitotoksikite ve hücre canlılığını belirlemek gibi çeşitli çalışmalarda yaklaşık 50 yıldan beri kullanılan bir yöntemdir (Rampersad 2012). Alamar blue hücre canlılığı belirteci; normalde yükseltgen formda (resazurin sodyum tuzu) bulunan mavi renkli ve floresan özellik göstermeyen bir boya iken, hücrelerin mitokondriyal metabolik aktivitelerinden köken alan dehidrojenazlar ve sitokromlar tarafından indirgenerek kırmızı renkli (resofurin sodyum tuzu) ve floresan özellik gösteren indirgenmiş forma dönüşmektedir (Hamid vd. 2004). Suda çözünebilen bir boya olan alamar blue; bu renk değişimi sayesinde hem kolorimetrik olarak hem de florometrik olarak hücre proliferasyonunun ölçülmesinde kullanılabilen bir belirteç olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 2.6.)(Lancaster ve Fields 1996, Al-Nasiry vd. 2007). Suda çözülebilen bir boya olan alamar blue; *in vitro* çalışmalarda hücre canlılığını belirlemenin yanı sıra apoptoz, hücre döngüsü fonksiyonu ve kontrolü gibi çeşitli amaçlar içinde kullanılmaktadır (Al-Nasiry vd. 2007, Rampersad 2012). Yapılan araştırmalar, alamar blue yönteminin hücre lizisi ya da ekstraksiyon işlemi olmaksızın tekrar edilebilir, oldukça ekonomik ve en önemlisi de hücreler üzerinde herhangi toksik etkiye sebep olmamasından dolayı üstün özelliklere sahip olduğunu belirtmiştir (O'brien vd. 2000). Alamar blue yöntemi uygulanırken hücreler üzerine doğrudan 10 µl/kuyucuk olacak şekilde alamar blue boyası hücreler üzerine eklenebilir ve böylece medyum değişikliğine gerek kalmadan hücre medyumunu tassarufu sağlanabilir (Hamid vd. 2004). Çalışmalar sırasında, alamar blue boyasının doğrudan eklenmesinin medyum içine

karışarak homojen bir solüsyon oluşturmada problemler olabileceği gözlenmiş, bu nedenle de hücrelere eşit seviyede nüfuz etmediği ve boyanın hücrelere verilmesinden sonra daha uzun süre inkübasyona ihtiyaç duyulduğu (~4 saat) gözlemlenmiştir. Bunun sonucu olarak, tez çalışması kapsamında elde edilen verilerin daha doğru ve standart sapması düşük sonuçlar olması amacıyla taze ve homojen bir medyum hazırlanarak hücrelere 100 µl/kuyucuk kadar alamar blue boyası verilmiştir. Ayrıca oldukça basit ve hızlı olan alamar blue yönteminin; kolorimetrik ölçümlerinin yanı sıra hem florimetrik hem de UV spektrofotometrede ölçülebilir olması da ayrı bir avantaj sağlamaktadır (O'brien vd. 2000, Hamid vd. 2004).

Yüksek lisans tezi kapsamında; T-47D hücreleri 15×10^3 hücre/kuyucuk, HCC1428 hücreleri 15×10^3 hücre/kuyucuk ve HUVEC hücreleri 10×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilerek 24 saat süreyle, 37°C ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona (belli bir sıcaklıkta belli bir süre beklemek) bırakılmıştır. Süre sonunda, hücreler schiff bazlarının metal kompleksleriyle oluşturdukları bileşiklerin 0.625,1.25,2.5,5,10 µM konsantrasyonlarına 24 veya 48 saat süreyle maruz bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, 10 µl/kuyucuk olacak şekilde Alamar Blue boyası hücrelere verilmiş ve hücreler 4 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda, canlı hücrelerin metabolizması sonucunda indirgenerek floresan özellik kazanan Alamar Blue miktarı 570 nm dalga boyunda florometrik plaka okuyucuda (SpectraMax® M Series Multi-Mode Microplate Reader; Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, CA) okutularak belirlenmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS programında tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Aralık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

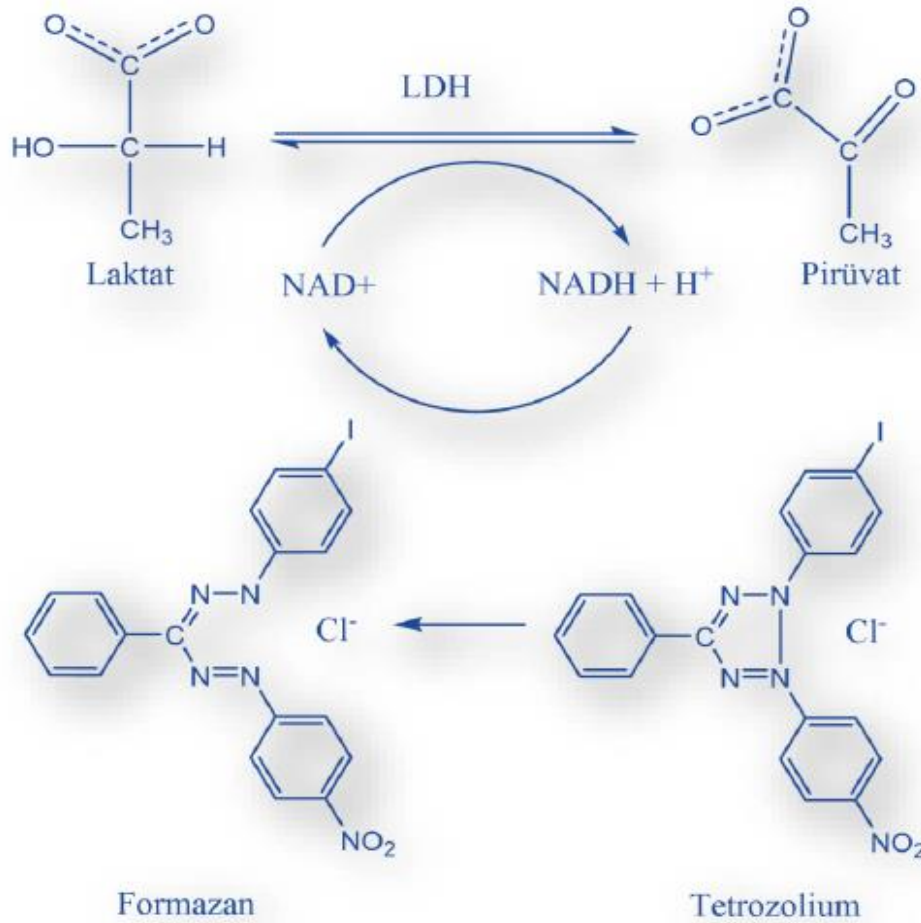


Şekil 2.6. Alamar Blue, resazurin ve resorufin sodyum tuzlarının kimyasal yapısı

Kaynak: Byth, 2001, s.341

2.5. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivite Ölçümü

Laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesi ölçüm testleri; çeşitli sebeplerle hücre membranında hasar meydana gelen ve bu hasar sonucunda sitoplazması bulunduğu ortama sızan hücrelerin belirlenmesi prensibine dayanmaktadır; çünkü LDH enzimi hücre sitoplazmasında bulunmakta ve hücre sitoplazmasından sızan bu enzim aktivitesine sızdığı ortamda da devam edebilmektedir (Fotakis ve Timbrell 2006). Hasar gören hücreler tarafından bulundukları ortama bırakılan LDH enzimlerinin aktivitesini belirlemek için; bu ortama laktat molekülü ve tetrazolium tuzları ilave edilir. Böylece LDH enzim aktivitesiyle laktat molekülleri pirüvat moleküllerine dönüştürülürken, NAD^+ molekülleri $\text{NADH} + \text{H}^+$ moleküllerine dönüşür, bu moleküllerin tersinmesi sırasında ise ortama bırakılan tetrazolium tuzları 490-500 nm dalga boyundaki ışığı absorbe edebilen formazan tuzlarına dönüşmektedir (Şekil 2.7) (Fotakis ve Timbrell 2006).



Şekil 2.7. Laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitesine bağlı hücre membran hasarı belirleme testinin reaksiyon diyagramı

Kaynak: Fotakis ve Timbrell, 2006, s.482

Yüksek lisans tezi kapsamında; T-47D hücreleri 15×10^3 hücre/kuyucuk, HCC1428 hücreleri 15×10^3 hücre/kuyucuk ve HUVEC hücreleri 10×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilerek 24 saat süreyle, 37°C ve %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda, hücreler schiff bazlarının metal kompleksleriyle oluşturdukları bileşiklerin 0.625,1.25,2.5,5,10 μM konsantrasyonlarına 24 veya 48 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Süre sonunda, her test kuyucuğundan 100 μl medyum alınarak yeni bir 96 kuyucuklu plakaya aktarılmıştır. Aktarılan medyumlar üzerine laktat molekülü ve tetrazolium tuzu içeren solüsyon eklenerek 30 dk inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda indirgenen formazan tuzlarının miktarı 490 nm de ELİZA'da ölçülmüştür. İstatistiksel analizler için SPSS programında tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Aralık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

2.6. Çift Zincirli DNA (dsDNA) Miktar Analizi

Hücre canlılığını belirleme yöntemlerinden biri de; çeşitli sebeplerle yaşamı sona ermiş olan hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması sonrasında, geride kalan canlı hücrelerin çift zincirli DNA (dsDNA) miktarının belirlenmesidir (Ng vd. 2005). PicoGreen reaktifi ise dsDNA miktarının ölçülmesi amacıyla kullanılan ve çift zincirli DNA'ya bağlandığında yeşil renkte floresan ışıma yapabilen, çok hassas bir boya olarak karşımıza çıkmaktadır ki 25 pg/ml yoğunluğa sahip dsDNA miktarını belirleyecek düzeyde bir hassasiyete sahiptir (Rampersad 2012).

Yüksek lisans tezi kapsamında; T-47D hücreleri 15×10^3 hücre/kuyucuk, HCC1428 hücreleri 15×10^3 hücre/kuyucuk ve HUVEC hücreleri 10×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilerek 24 saat süreyle, 37°C ve %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda, hücreler schiff bazlarının metal kompleksleriyle oluşturdukları bileşiklerin 0.625,1.25,2.5,5,10 μM konsantrasyonlarına 24 veya 48 saat süreyle maruz bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, test bileşiklerini içeren medyum hücrelerden uzaklaştırılmış ve hücreler 3 kez PBS (Fosfat tamponlu tuz solüsyonu; Life Technologies, Carlsbad, CA) ile yıkanmıştır. Plaka zeminine yapışık halde kalan canlı hücrelerin dsDNA miktarını ölçmek için her kuyucuğa 5 μl liziz solüsyonu (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) ve kit içerisinde bulunan 0,5 μl PicoGreen reaktifi (200x), 2,5 μl TE (Tris-EDTA tampon; 20x) ile hazırlanmış olan 42 μl PicoGreen solüsyonu eklenmiştir. Daha sonra plakalar 30 dakika buz üzerinde inkübe

edilmiş ve plakalar florimetrik plaka okuyucuda 520 nm dalga boyunda okutulmuş dsDNA miktarları belirlenmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS programında tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Aralık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

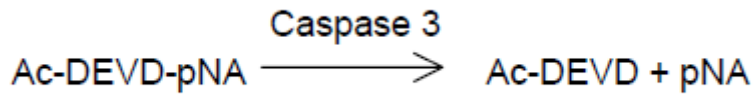
2.7. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Ölçümü

Reaktif oksijen türevleri (ROS); kısa ömürlü oldukça küçük moleküllerdir (Miller vd. 2007). Hücre içerisinde bulunan reaktif oksijen türevleri; hücre göçü, hücre farklılaşması ve çoğalması ya da hücre ölümü gibi biyolojik olayların gerçekleşmesinde önemli roller üstlenmektedirler (Covarrubias vd. 2008). Hücre içerisinde aşırı derecede ROS var olması ise oksidatif hasara yol açmaktadır (Halliwell 2011). Bu nedenle, hücre içerisinde meydana gelen reaktif oksijen türevleri çeşitli savunma mekanizmalarıyla dengede tutulmaktadır (Miller vd. 2007, Halliwell 2011). Bu dengenin bozulması sonucunda hücrelerde aşırı derecede reaktif oksijen türevlerinin oluşması ise protein, lipid ve nükleik asitler üzerinde hasara yol açarak, hücreleri ölüme sürüklemekte ya da çeşitli hastalıkların oluşmasına yol açmaktadır (Miller vd. 2007).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) ölçüm test tekniği ise hücre içerisinde oluşan veya belirli miktarlarda bulunabilen hidroksit, peroksit ve diğer ROS türevlerinin miktarını florimetrik olarak ölçmeye dayanan bir yöntemdir. Bu test tekniğinde hücre içine girme özelliğine sahip olan ve floresan ışımaya potansiyeline sahip 2' 7' Dichlorodihidrofluorescein diacetate (DCFH-DA) kullanılmaktadır. Hücre içine difüzyon ile geçiş yapan DCFH-DA, hücre içi esterazlar tarafından floresans özelliği olmayan 2' 7'-Dichlorodihidrofluorescein (DCFH)'e deasetilize olmaktadır. DCFH kompleksi ise hidrojen peroksidazlar veya lipid peroksidazlar tarafından okside edilerek, floresan özellik kazanan DCF kompleksini oluşturmaktadır. Oluşan DCF florimetrik olarak ölçülmekte ve dolaylı bir şekilde hücre içinde oluşmuş olan ROS miktarı belirlenmektedir (Şekil 2.8.) (Yang vd. 1998).

2.8. Kaspaz-3 Aktivite Ölçümü

Kaspazlar programlanmış hücre ölümünün gerçekleşmesinde önemli roller üstlenen enzimlerdir (Porter ve Jänicke 1999). Sistein protez ailesine ait olan kaspazlar; kimi zaman çeşitli dış uyarıcılar aracılığıyla tetiklenen apoptozun gerçekleşmesinde sentetik veya doğal inhibitörler olarak görev alırken, kimi zamanda çeşitli proteolitik yıkımlar sonucu apoptozun meydana gelmesinde öncülük etmektedirler (Chang ve Yang 2000). Bu zamana kadar yaklaşık 14 farklı kaspaz enzimi tanımlanmakla birlikte; kaspazlar kendi aralarında inflamatuvar, başlatıcı ve işlemci olmak üzere üç gruba ayrılmaktadırlar (Lavrik vd. 2005). İşlemci kaspazlar arasında değerlendirilen kaspaz-3 ise DNA fragmentasyonuna, apoptotik hücrelerin oluşmasına ve kromatin yoğunlaşmasına sebep olan en önemli enzimler arasında yer almaktadır (Porter ve Jänicke 1999). Kaspaz-3 enzimi; apoptoz aracılığıyla gerçekleşen birçok morfolojik değişikliklerden sorumlu olmasının yanı sıra farklı hücre tiplerinde veya dokularda çeşitli uyarılar aracılığıyla aktif hale geldiğinden programlanmış hücre ölümünün gerçekleştiğini gösteren bir belirteç olarak kabul edilmektedir (Porter ve Jänicke 1999, Güleş ve Eren 2008). Kaspaz kolorimetrik assay kit ise apoptozun belirlenmesinde kullanılan oldukça kolay yöntemlerden birisidir (Jerome vd. 2003). Ortamda bulunan kaspaz-3'ün; acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilidin substratını (Ac-DEVD-pNA) hidroliz etmesi sonucu p-nitroanilin (pNA) salınmasıyla apoptozun kolorimetrik ölçümü prensibine dayanmaktadır (Şekil 2.9). Substrattan salınan pNA'nın 405 nm'de yüksek absorbans göstermesi sonucuyla da kaspaz-3 aktivasyonunun ölçümü gerçekleşmektedir.



Şekil 2.9. Kaspaz-3 aktivasyonu sonucu p-nitroanilin oluşması

Kaynak: Cohen ve ark., 1997, s.6

Yüksek lisans tez projesi kapsamında schiff bazlarının farklı konsantrasyonlarının apoptoz üzerindeki etkilerini belirlemek adına; T-47D, HCC1428 ve HUVEC hücreleri üç milyon olacak şekilde 25 cm²'lik flasklara ekilerek 24 saat süreyle, , 37°C ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda, hücrelerin test bileşiklerinin 0.625,1.25,2.5 µM konsantrasyonlarına 24 saat maruz kalması sağlanmıştır. Test bileşiklerine maruz kalan hücreler sonrasında tripsin ile kaldırılarak, kaldırma işlemi sırasında PBS, PBS-EDTA (etilendiamin tetraasetik asit içeren fosfat tamponlu tuz solüsyonu) vs hepsi aynı santrifüj tüpü içerisine konularak 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonrasında çöken hücreler 200 µl PBS içerisinde çözülerek 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılıp, 1600 g'de 1 dakika santrifüj işlemi uygulanarak PBS uzaklaştırılmıştır. Hücreler 100 µl 1x lisiz buffer içerisinde süspanse edilerek, 15-20 dakika buz üzerinde inkübasyona maruz kalmış ve beklenen süre sonunda hücre lizati 15 dakika 4 °C'de 1600 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant ise 450 nm absorbandsda kolorimetrik olarak ölçülmüştür.

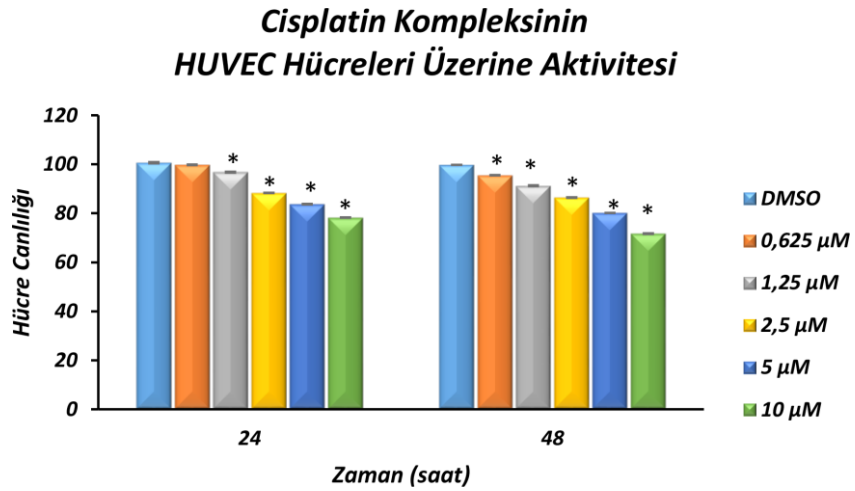
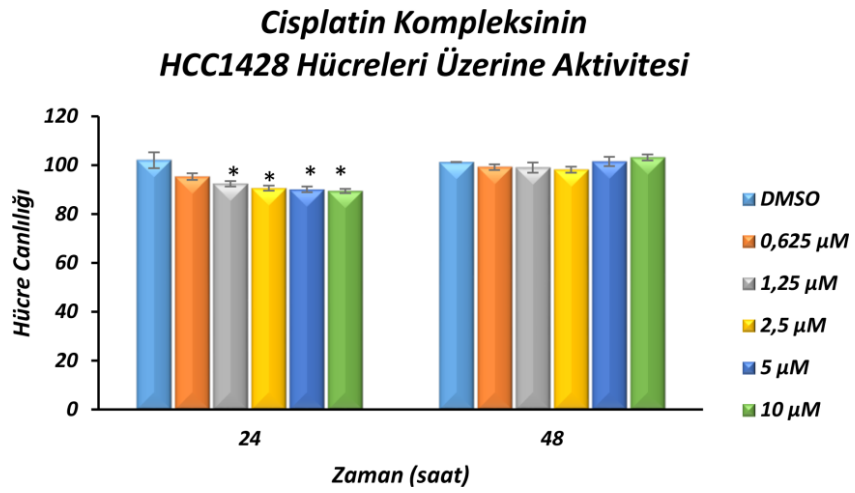
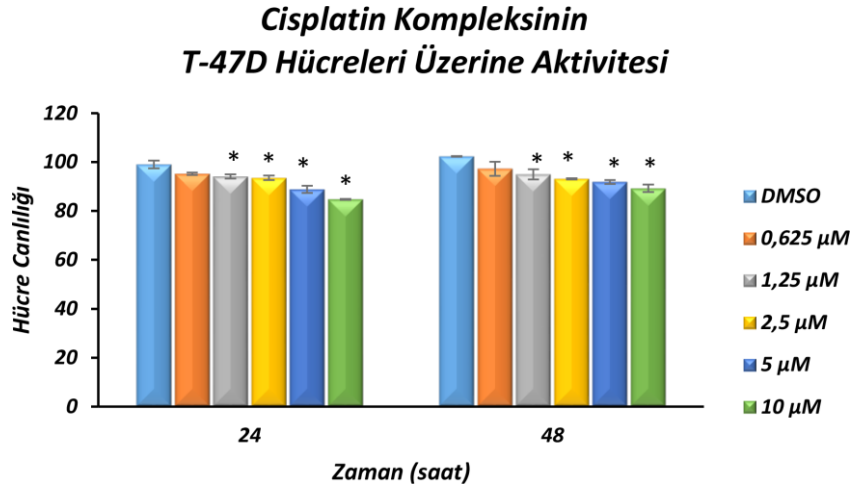
3. BULGULAR

3.2. Alamar Hücre Canlılığı Belirleme Testi Sonuçları

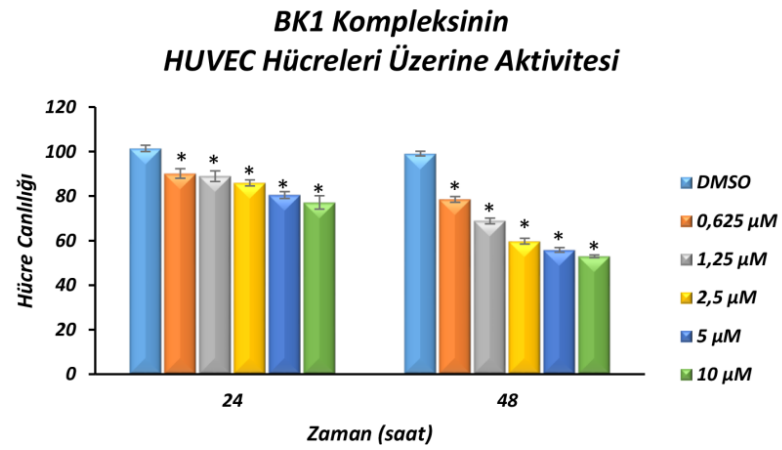
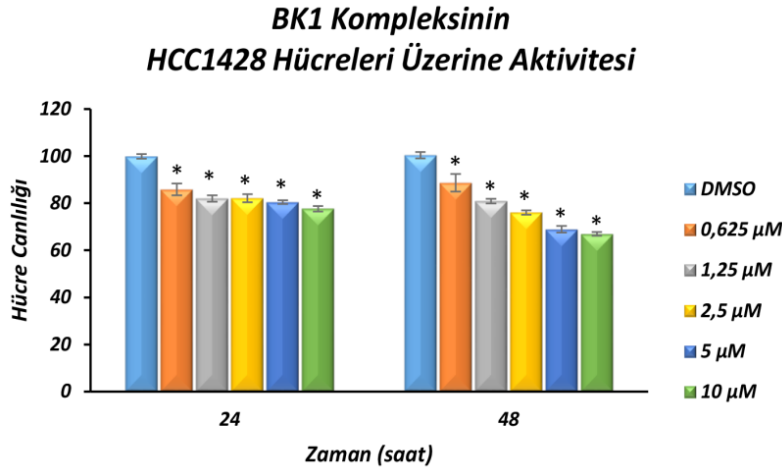
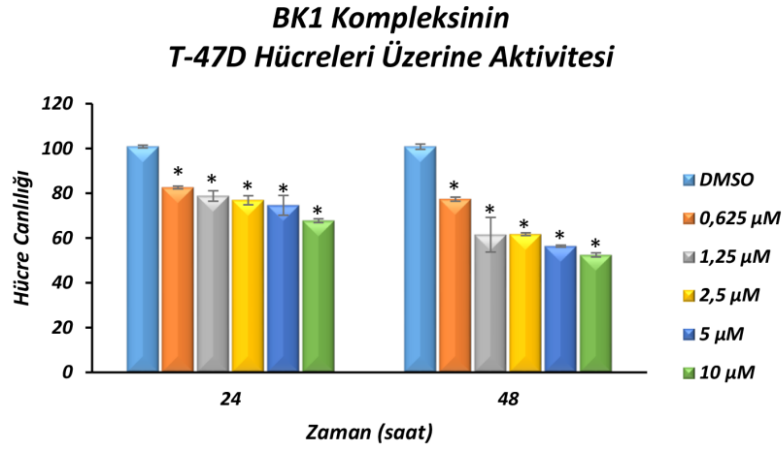
Sentezlenen BK1, BK1X, BK2 ve BK2X schiff bazlarının geçiş metal kompleksleri; (T-47D) insan meme epitelyum duktal karsinoma, (HCC1428) insan meme epitelyum 4. aşama denokarsinoma, (HUVEC) insan göbek bağı damar endotel hücreleri kullanılarak alamar blue yöntemi ile hücrelerin canlılığı belirlenmiştir. Schiff bazlarının farklı metal komplekslerinin yanı sıra pozitif kontrol olarak sisplatin kullanılmıştır.

BK1, BK1X, BK2 ve BK2X kompleksinin 0.625,1.25,2.5,5,10 μ M konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerine olan aktiviteleri incelendiğinde; küçük yapıli bileşiklerin, farklı dokulardan izole edilen kanser hücreleri üzerine toksik aktivitesinin sağlıklı endotel hücreleri üzerine olan toksik aktivitesinden daha fazla olduğu belirlenmiştir. T-47D insan meme epitelyum duktal karsinoma hücreleri diğeri hücre hatlarına göre daha fazla etkilenecek, canlılıklarında artan konsantrasyonlarına ve zamana bağımlı olarak bir azalma gözlenmiştir. Farklı test maddeleri kendi aralarında karşılaştırıldığında; BK1X kompleksi BK1 kompleksine göre, BK2X kompleksi ise BK2 kompleksine göre kanser hücreleri üzerinde daha etkili toksik aktiviteye sahiptir. Özellikle de BK2X kompleksi; diğeri schiff bazlarının metal komplekslerinden daha etkili sitotoksik aktivite sergilemektedir. BK2 ve BK1 schiff baz komplekslerinin ise hücre hatlarının canlılığı üzerine etkileri birbirine oldukça yakın olmakla birlikte BK1 kompleksinin daha az aktivite sergilediğı sonucuna ulaşılmıştır.

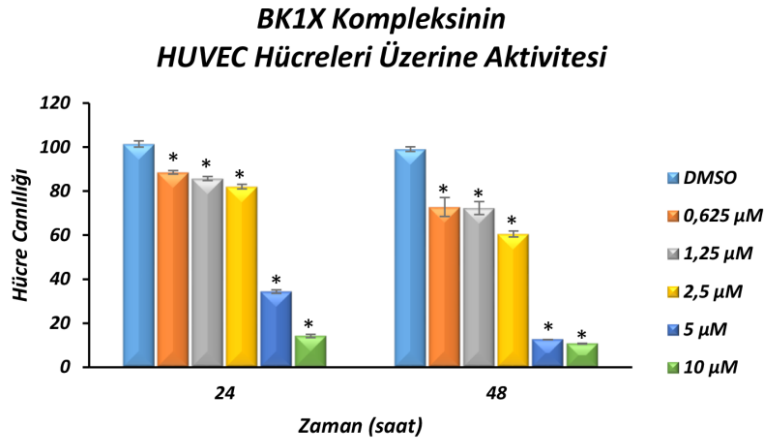
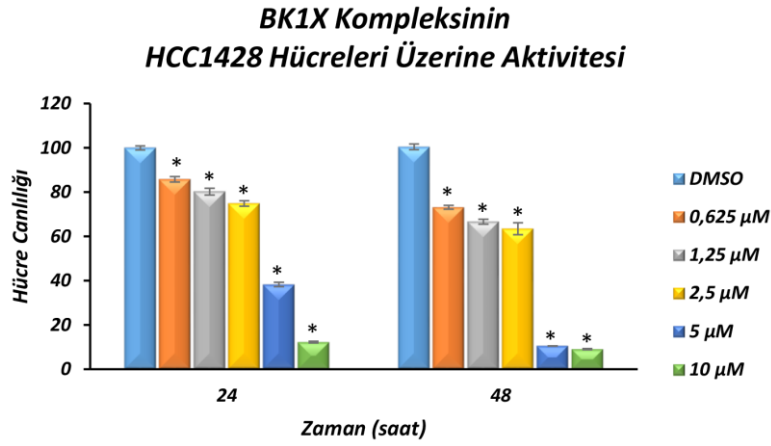
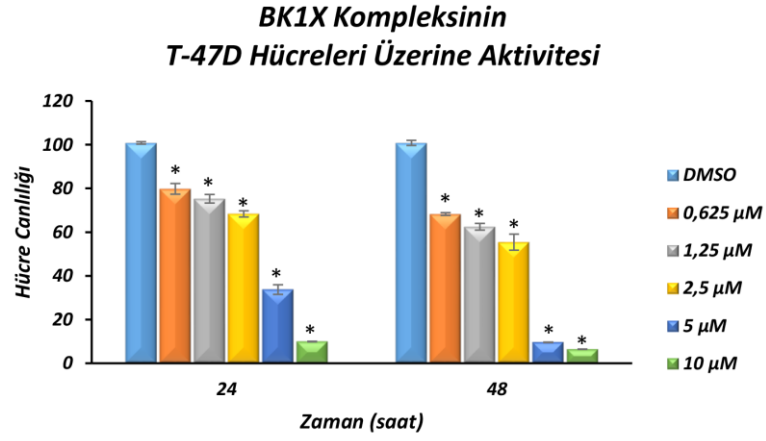
Test bileşiklerinin toksik aktivitesi; pozitif kontrol olarak kullanılan cisplatinle kıyaslandığında kanser hücrelerinin canlılığı üzerinde oldukça etkili olmaktadır. Test bileşiklerinin sağlıklı hücre hattı üzerine olan etkileri ise BK1 ve BK2 maddelerinde pozitif kontrolün değerlerine daha yakın olmaktadır (Şekil 3.1-3.2-3.3-3.4- 3.5).



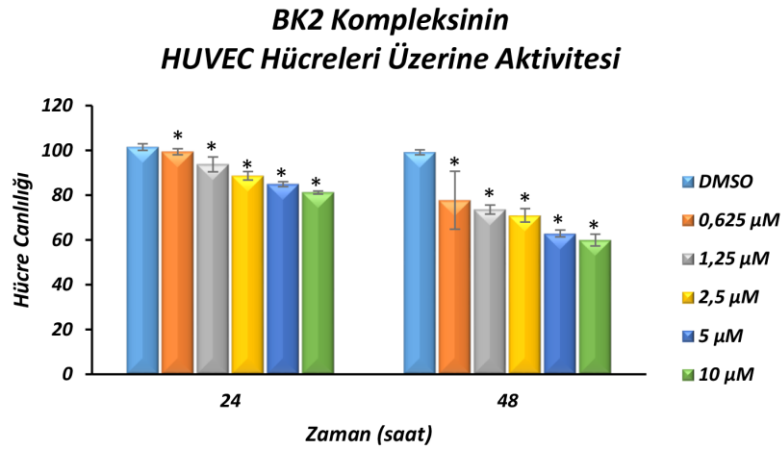
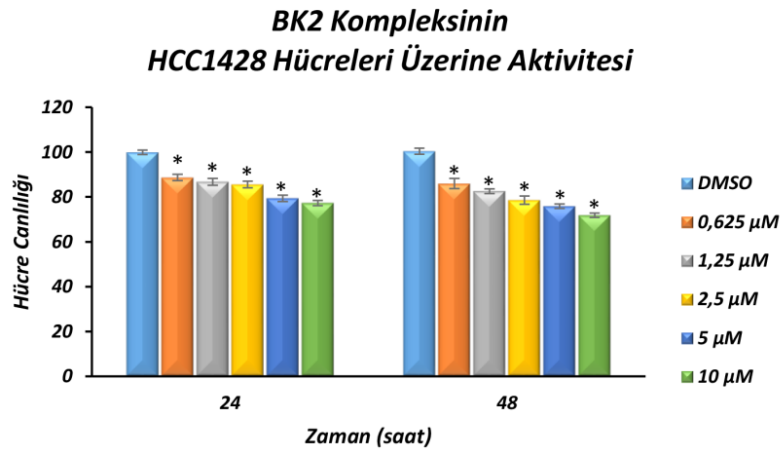
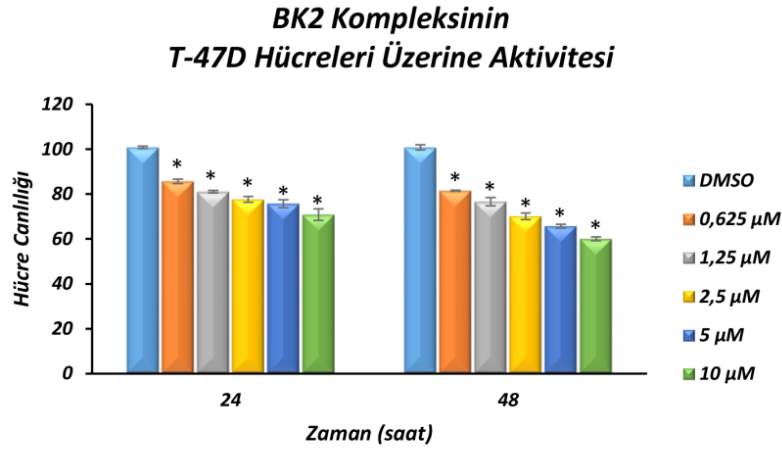
Şekil 3.1. Cisplatinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme faz 4 adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin alamar blue yöntemiyle hücre canlılığının belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.



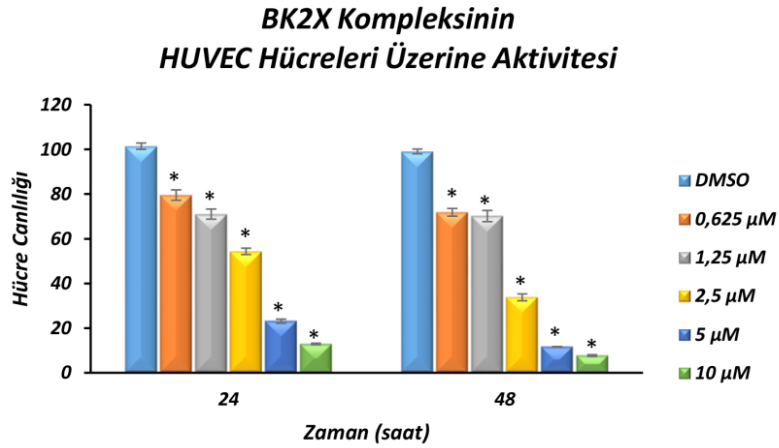
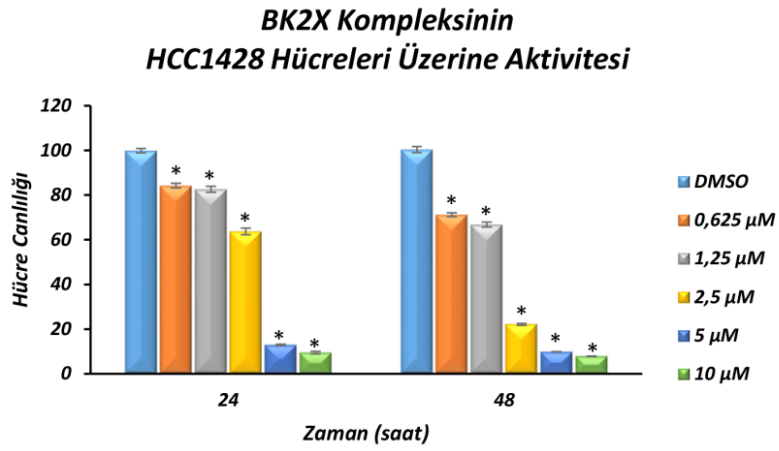
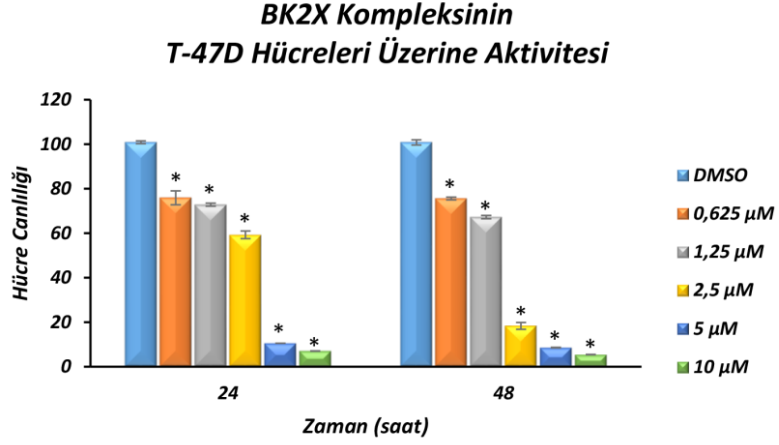
Şekil 3.2. BK1 kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme faz 4 adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin alamar blue yöntemiyle hücre canlılığının belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p<0,05$.



Şekil 3.3. BK1X kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme faz 4 adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin alamar blue yöntemiyle hücre canlılığının belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.



Şekil 3.4. BK2 kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme faz 4 adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin alamar blue yöntemiyle hücre canlılığının belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.

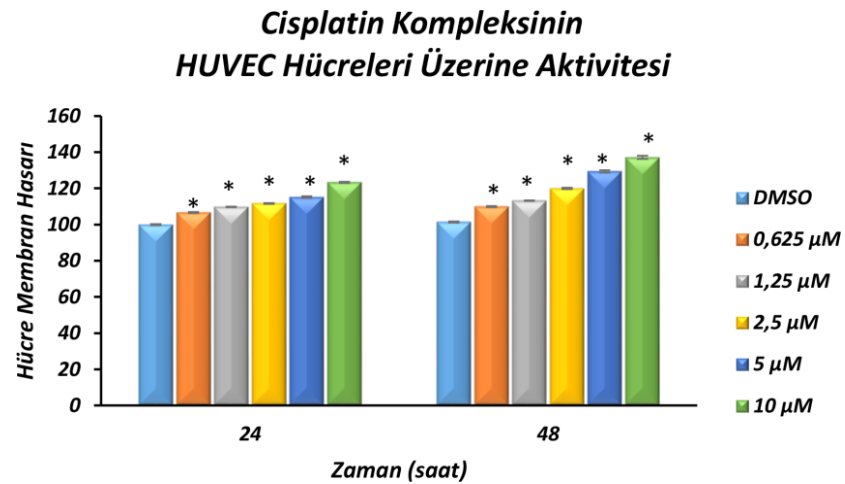
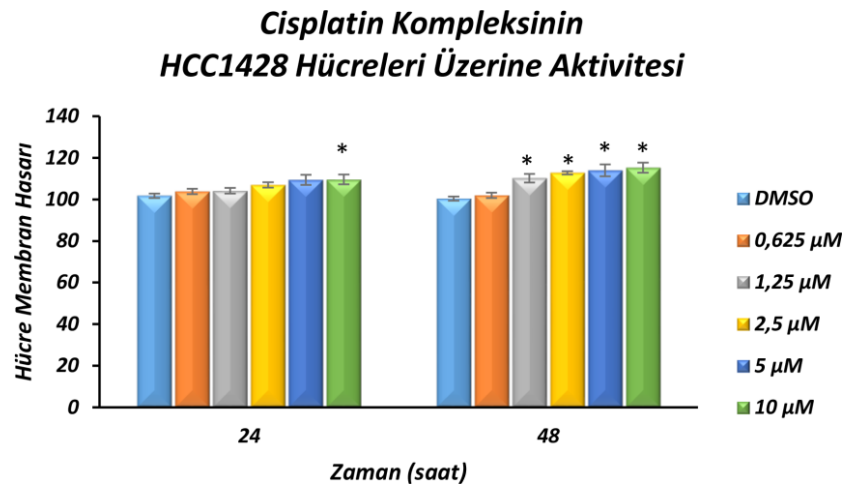
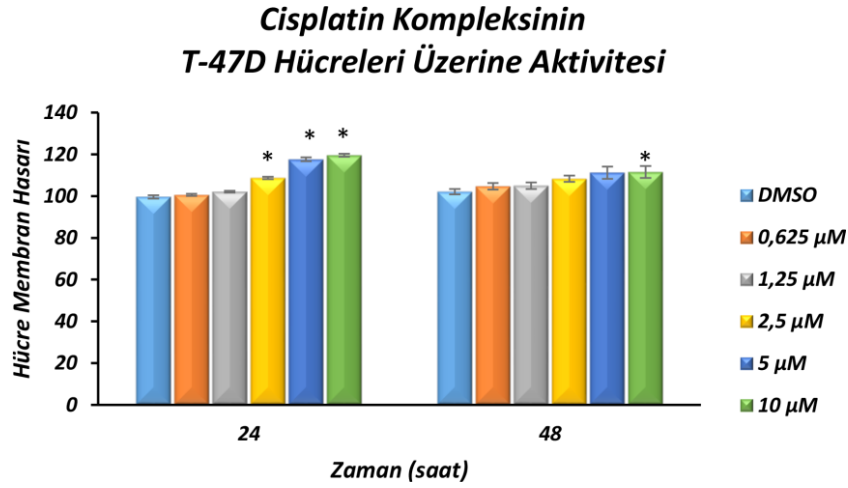


Şekil 3.5. BK2X kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme faz 4 adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin alamar blue yöntemiyle hücre canlılığının belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.

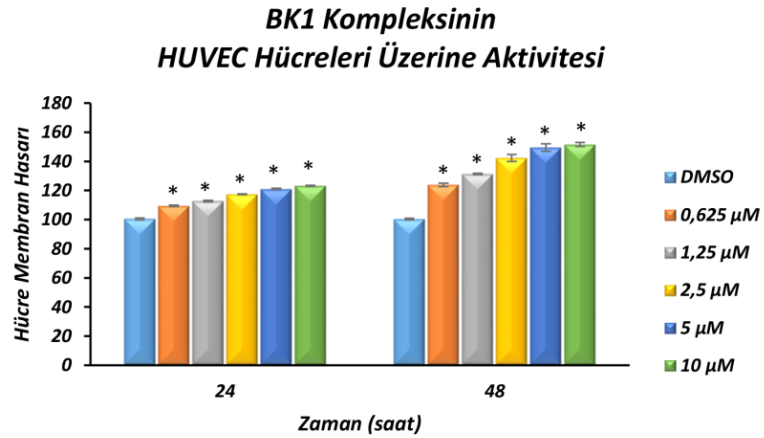
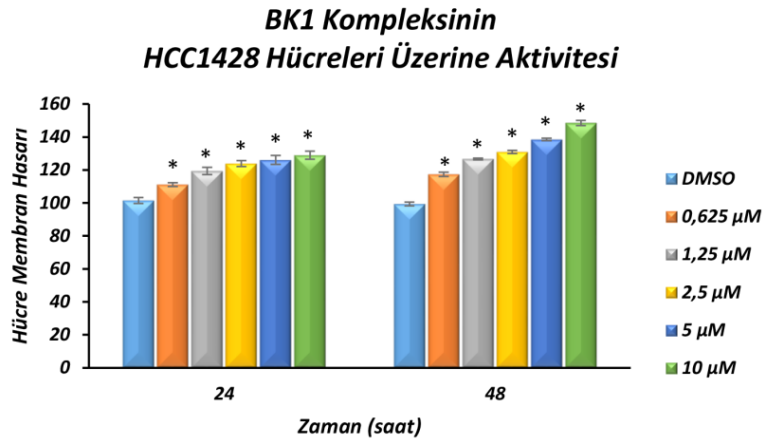
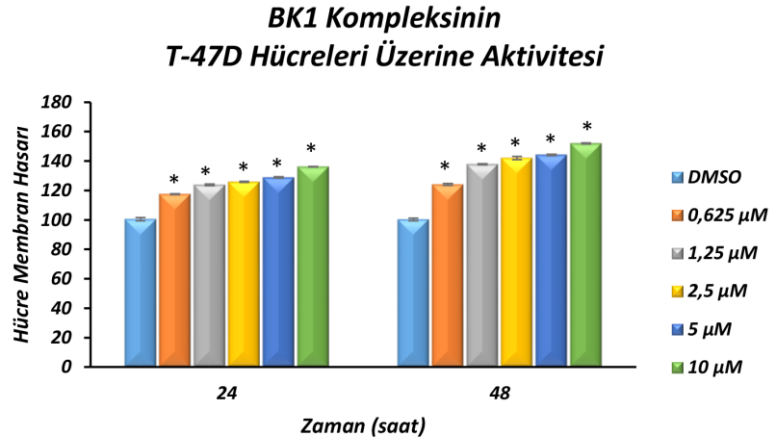
3.3. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivite Ölçümü

LDH aktivite ölçüm testlerinde, alamar blue yönteminden farklı olarak, hücre canlılığını belirlemek yerine, hücre membranında hasar oluşan ve sitoplazması bulunduğu ortama sızan hücrelerin miktarının belirlenmesi amaçlanmaktadır. Yüksek lisans tezi kapsamında pozitif kontrol ile birlikte sentezlenen schiff bazlarının metal komplekslerinin; HCC1428, T-47D ve HUVEC hücreleri üzerinde oluşturdukları hücre membran hasarı LDH kiti kullanılarak belirlenmiştir.

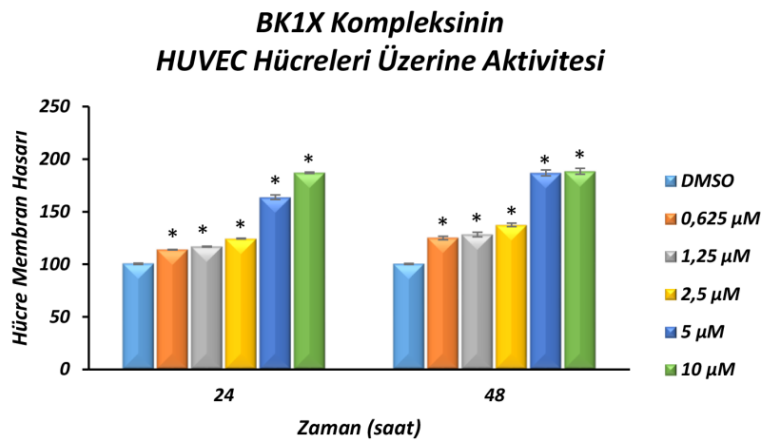
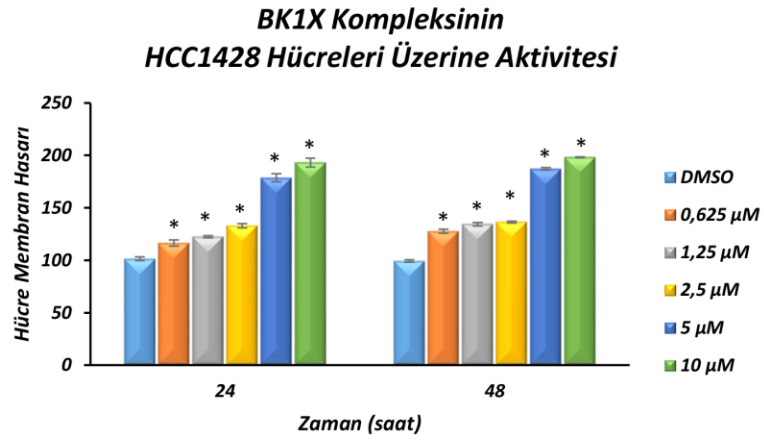
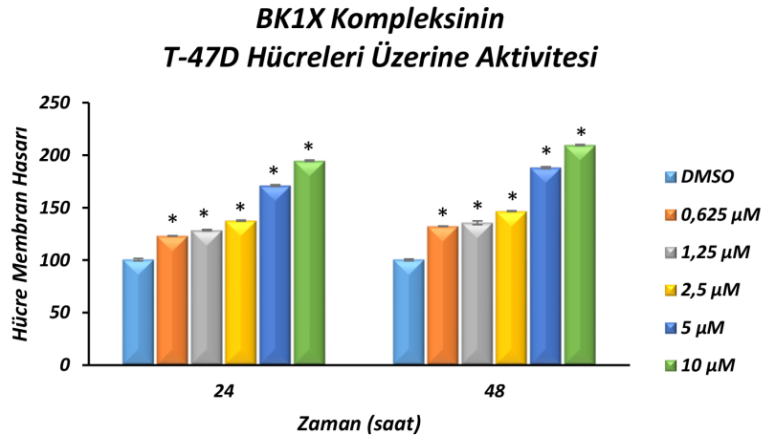
LDH aktivite ölçüm testlerinin sonuçları incelendiğinde; BK2X kompleksinin hücrelerin membran bütünlüğünü diğer schiff bazlarının metal komplekslerine göre daha fazla bozduğu, BK1 kompleksinin ise diğer bileşiklere göre daha az toksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Test maddelerinin toksik aktivitesi kendi aralarında değerlendirildiğinde; birbirlerinin türevi olan BK1X kompleksinin BK1 kompleksine, BK2X kompleksinin ise BK2 kompleksine göre daha fazla LDH aktivitesi sergilediği gözlenmiştir. Ayrıca; sağlıklı hücre hattı üzerinde daha az toksik aktivite gözlenmesinin yanı sıra HCC1428 hücre hattının schiff bazlarının metal komplekslerinden T-47D hücre hattına göre daha az etkilendiği sonucuna ulaşılmıştır. Her bir bileşik pozitif kontrole kıyasla kanser hücre hatlarında daha fazla LDH aktivitesine sebep olurken, sağlıklı hücre hattı üzerinde ise BK1 ve BK2 test maddelerinin pozitif kontrole daha yakın toksik etki sergilediği gözlenmiştir. (Şekil 3.6-3.7-3.8-3.9-3.10).



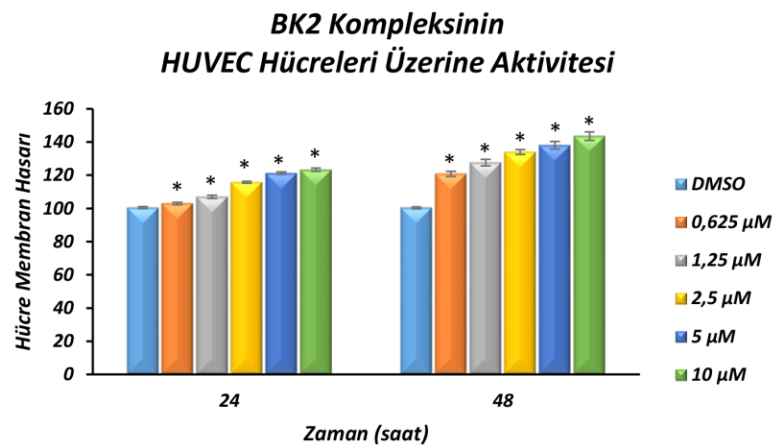
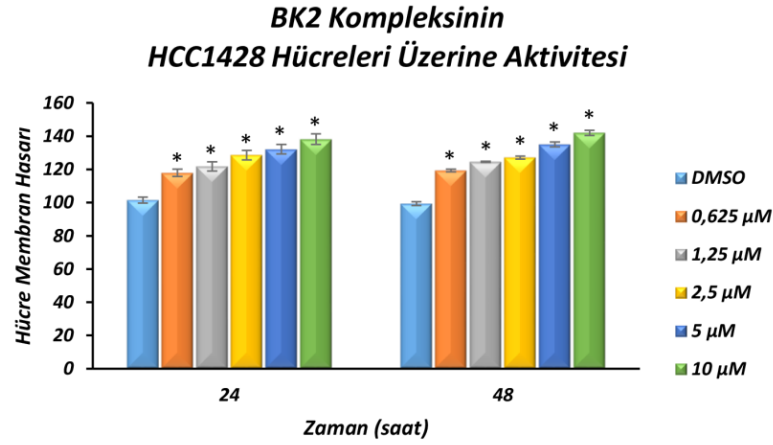
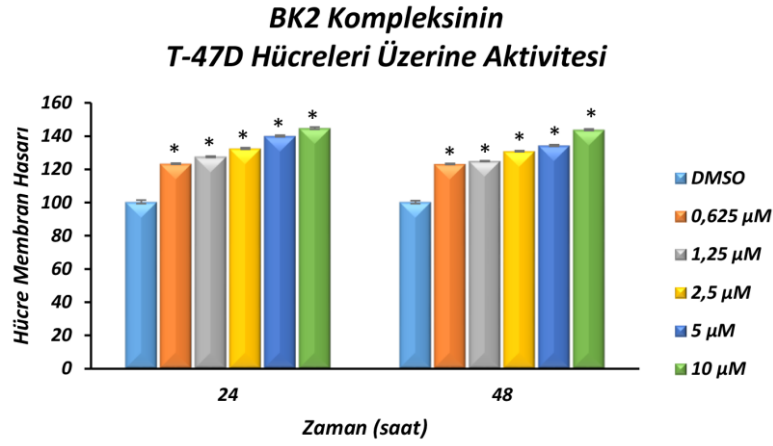
Şekil 3.6. Cisplatinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma (HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin membran bütünlüğü üzerine aktivitesinin belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.



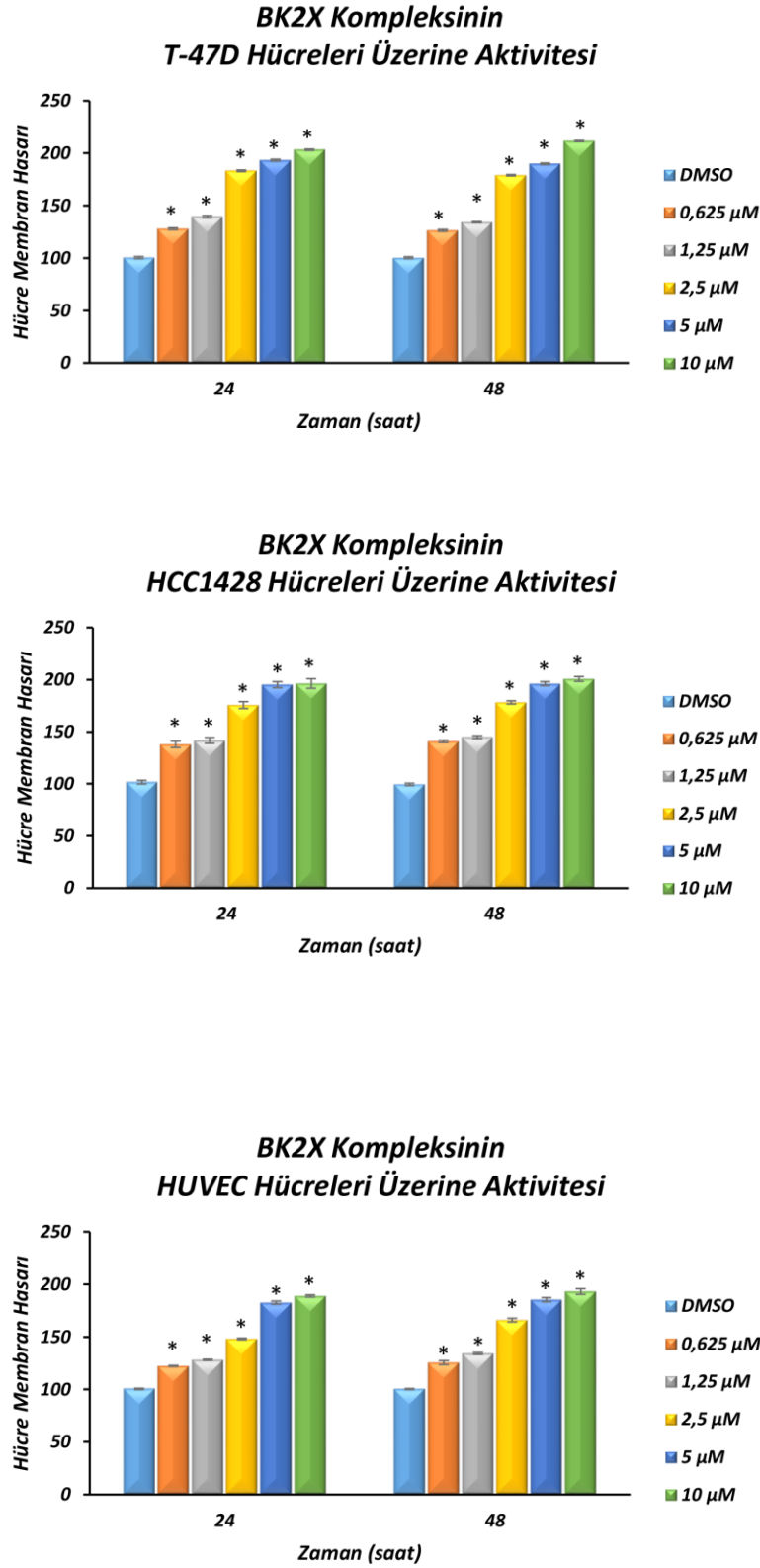
Şekil 3.7. BK1 kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma (HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin membran bütünlüğü üzerine aktivitesinin belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.



Şekil 3.8. BK1X kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma (HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin membran bütünlüğü üzerine aktivitesinin belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.



Şekil 3.9. BK2 kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma (HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin membran bütünlüğü üzerine aktivitesinin belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.

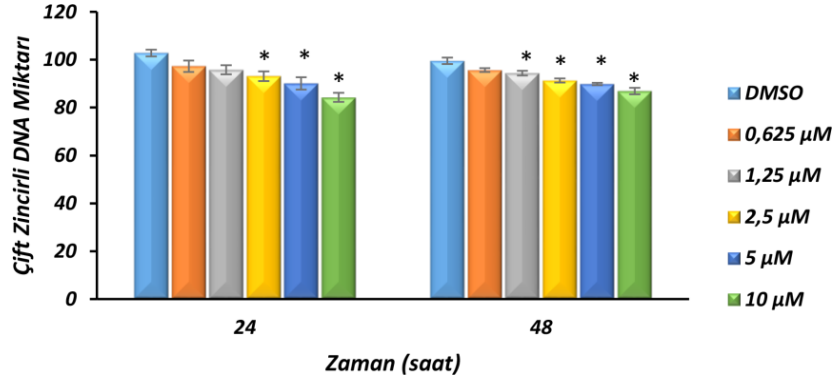


Şekil 3.10. BK2X kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma (HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinin membran bütünlüğü üzerine aktivitesinin belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.

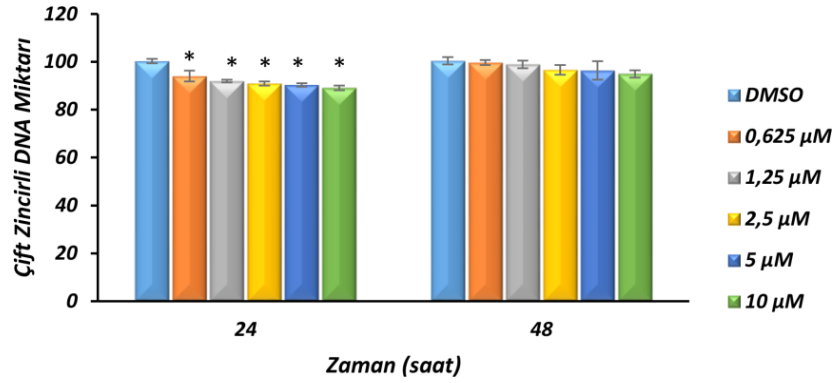
3.4. PicoGreen Çift Zincirli DNA (dsDNA) Miktar Tayini

Yeni sentezlenen schiff bazlarının metal komplekslerinin; T47D, HCC1428 ve HUVEC hücrelerinin canlılığı üzerine aktiviteleri, Picogreen reaktifi kullanılarak çift zincirli DNA (dsDNA) miktar tayini yöntemiyle de belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, diğer test yöntemleri sonunda elde edilen verilere yakın olmakla birlikte; test maddelerinin pozitif kontrole kıyasla kanser hücreleri üzerinde daha fazla etkili olduğu DNA(dsDNA) miktar tayin yöntemiyle de gözlenmiştir. Buna ek olarak schiff bazlarının metal kompleksleri kendi aralarında kıyaslandığında; artan konsantrasyonlara ve zamana bağlı bir şekilde BK2X kompleksinin kanser hücreleri üzerinde en etkili, BK1 kompleksinin ise en az etkili olduğu gözlenmiştir. (Şekil 3.11-3.12-3.13-3.14-3.15).

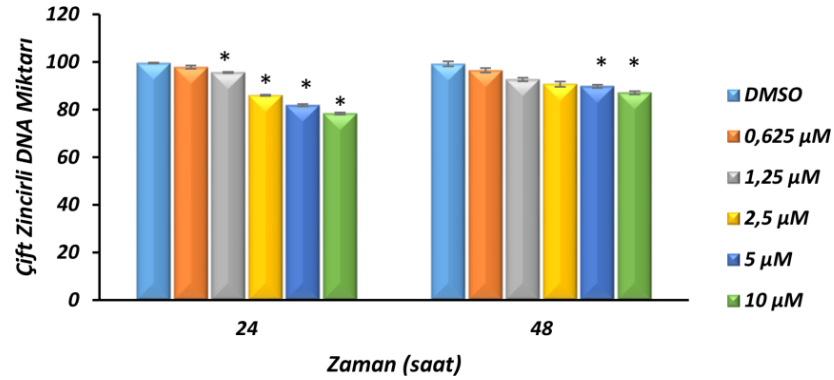
**Cisplatin Kompleksinin
T-47D Hücreleri Üzerine Aktivitesi**



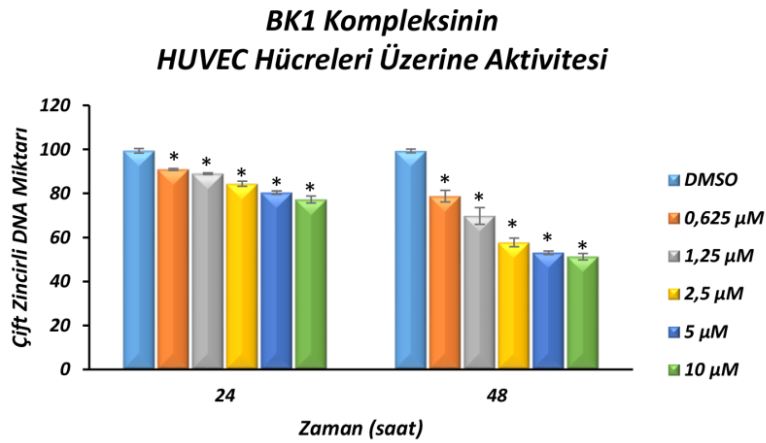
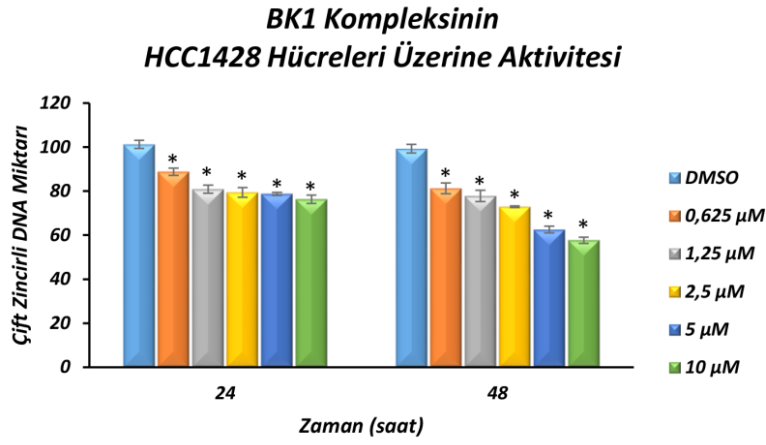
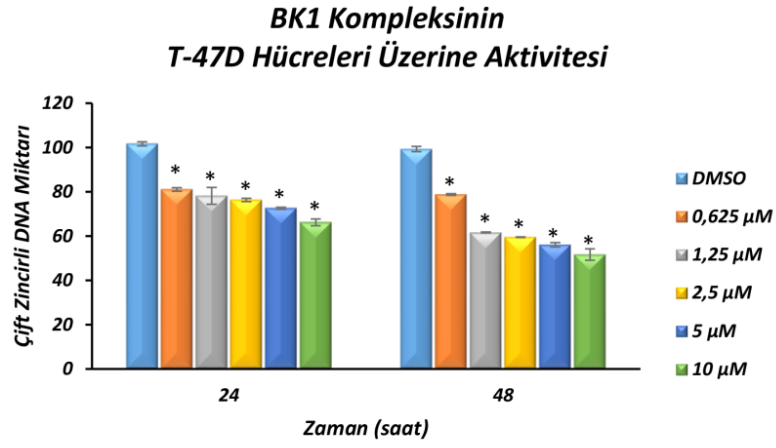
**Cisplatin Kompleksinin
HCC1428 Hücreleri Üzerine Aktivitesi**



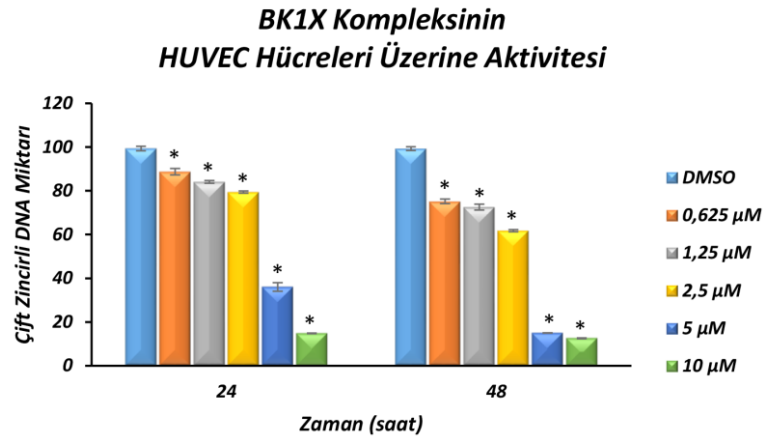
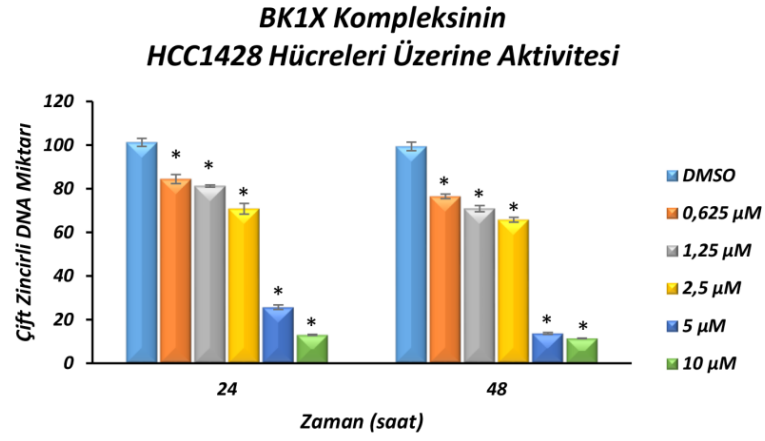
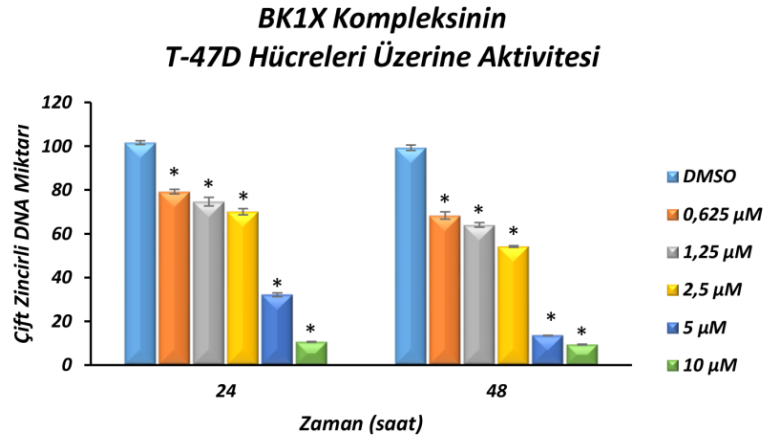
**Cisplatin Kompleksinin
HUVEC Hücreleri Üzerine Aktivitesi**



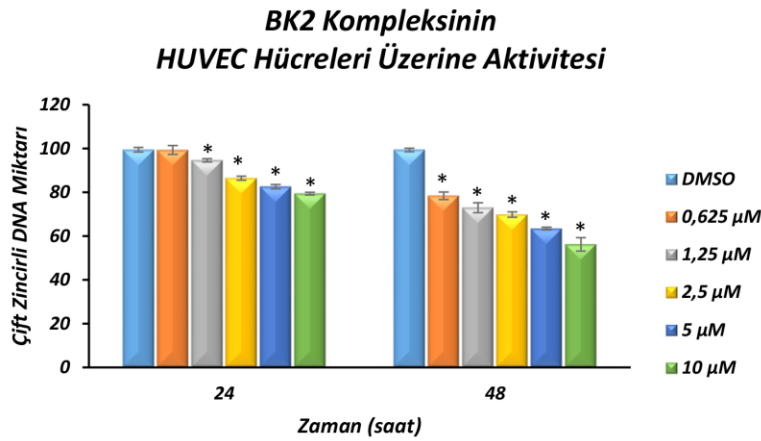
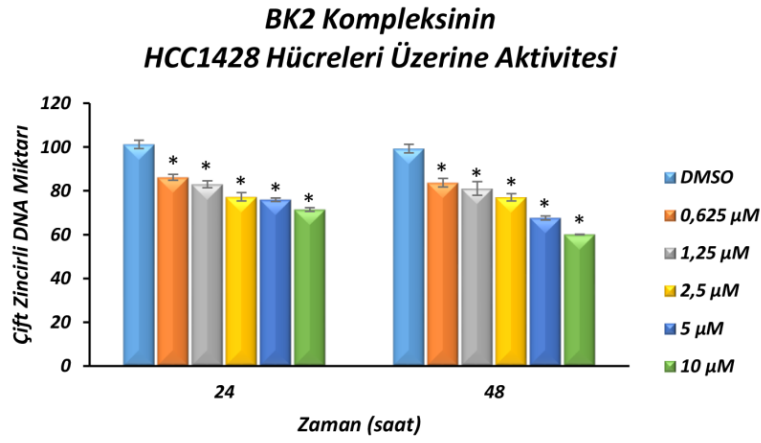
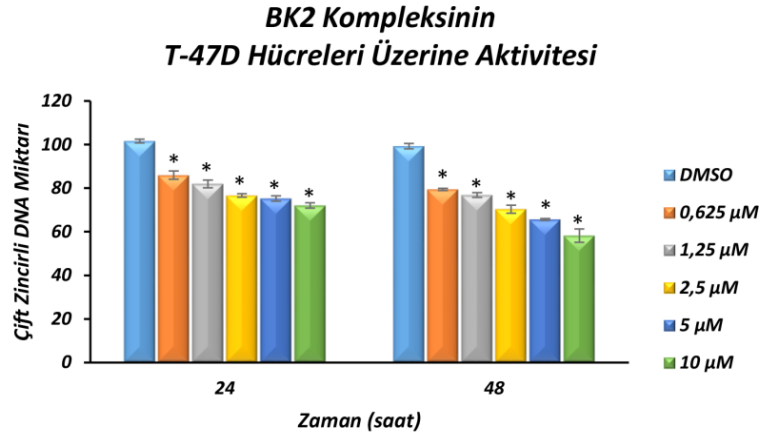
Şekil 3.11. Cisplatinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel(HUVEC) hücrelerinin canlılığı üzerine aktivitesinin çift zincirli DNA miktar tayini ile belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.



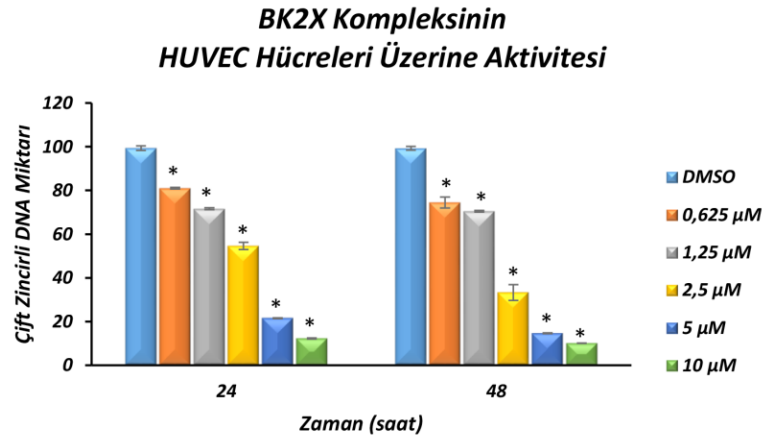
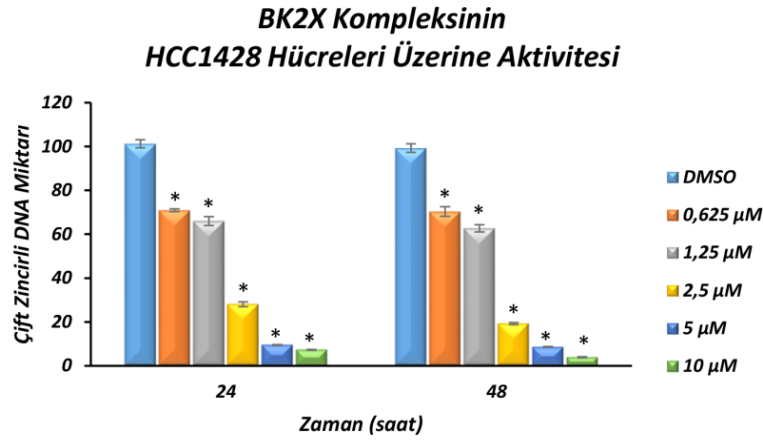
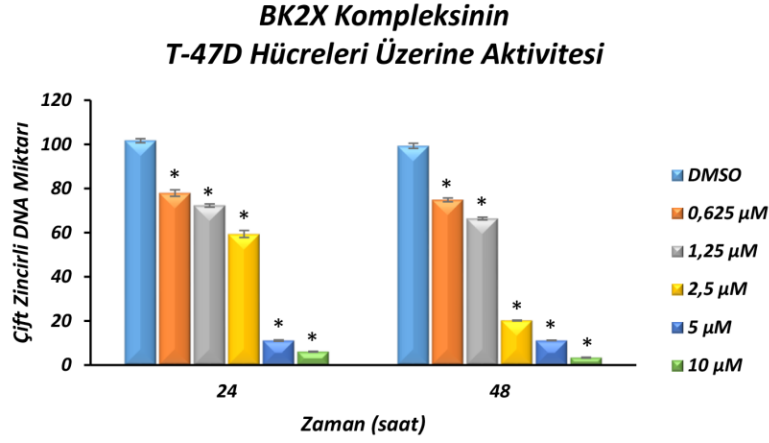
Şekil 3.12. BK1 kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel(HUVEC) hücrelerinin canlılığı üzerine aktivitesinin çift zincirli DNA miktarı tayini ile belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.



Şekil 3.13. BK1X kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel(HUVEC) hücrelerinin canlılığı üzerine aktivitesinin çift zincirli DNA miktar tayini ile belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p<0,05$.



Şekil 3.14. BK2 kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel(HUVEC) hücrelerinin canlılığı üzerine aktivitesinin çift zincirli DNA miktarı tayini ile belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.

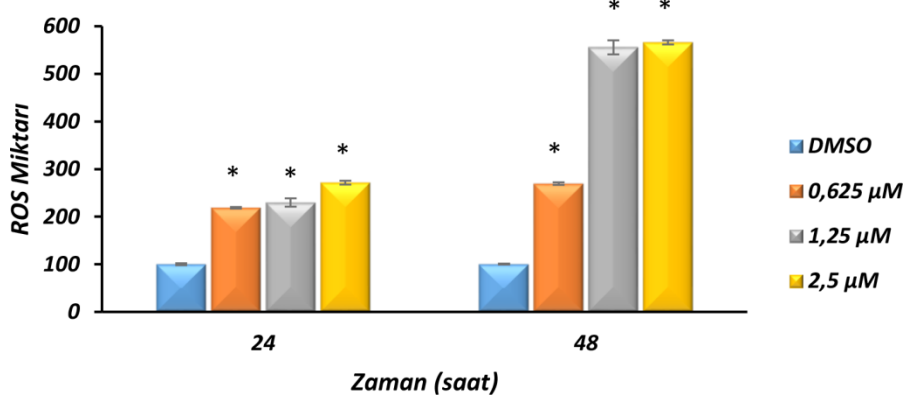


Şekil 3.15. BK2X kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma(HCC1428), göbük bağı damar endotel(HUVEC) hücrelerinin canlılığı üzerine aktivitesinin çift zincirli DNA miktarı tayini ile belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.

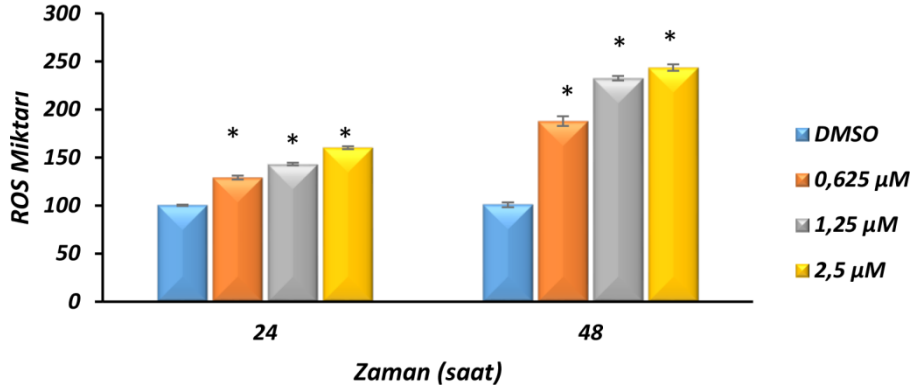
3.5. Hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) birikiminin ölçümü

Hücrelerde yeterli miktarda var olan reaktif oksijen türevleri; hücre içi sinyal iletiminde, hücrelerde gerçekleşen yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarının düzenli bir şekilde ilerlemesinde görev almaktadır. Reaktif oksijen türevlerinin düzensiz bir şekilde oluşması ise bu bileşiklerin nükleik asitlerle, proteinlerle ve lipitlerle etkileşime girerek oksidatif hasarın oluşmasına neden olmaktadır. Oksidatif hasar da hücrelerde apoptik yolların veya nekrotik yolların aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu nedenle; hücre içerisinde meydana gelen reaktif oksijen türevlerinin miktarının bilinmesi önem arz etmektedir. Yüksek lisans tezi kapsamında, yeni sentezlenen schiff bazlarının metal komplekslerinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), (HCC1428) insan meme bezi epitelyum IV. aşama adenokarsinoma ve insan göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücreleri üzerinde oluşturdukları reaktif oksijen türlerinin miktarı üzerine etkileri DCFH-DA (2' 7'-Diklorohidrofloresin diasetat) molekülü kullanılarak belirlenmiştir. Yüksek lisans tezi kapsamında yapılan çalışmada; test bileşiklerinin toksik olmayan konsantrasyonlarına 24 ve 48 saat süreyle maruz kalan hücrelerde zamana bağlı olarak reaktif oksijen türevlerinde artış gözlenmiştir. Yeni sentezlenen schiff bazlarının metal komplekslerine maruz kalan insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T47D) hücre hattının, insan meme bezi epitelyum IV. aşama adenokarsinoma (HCC1428) hücre hattına göre daha çok reaktif oksijen türevlerinin oluşması söz konusudur. Birbirlerinin türevi olan schiff bazlarının kompleksleri kendi aralarında kıyaslandığında; BK2X kompleksi, BK2 kompleksine göre ve BK1X kompleksi ise BK1 kompleksine göre daha fazla reaktif oksijen türevlerinin oluşmasına neden olmuştur. Ayrıca; BK2X kompleksinin diğer schiff bazlarının metal komplekslerine kıyasla daha fazla reaktif oksijen türevlerinin oluşmasına yol açtığı ve BK2 kompleksinin ise hücre hatları üzerinde en az reaktif oksijen türevlerinin oluşmasına yol açtığı belirlenmiştir. Elde edilen verilerde; 48 saatlik zaman dilimi sonrasında BK2X kompleksinin toksik olmayan dozlarının hücre hatları üzerine olan etkileri incelendiğinde, 2,5 µM'luk dozda reaktif oksijen türevlerinin miktarında düşüş gözlenmektedir. Bunun nedeni ise zamana ve doza bağımlı olarak hücre ölümü gözlenmektedir ki bu da reaktif oksijen türevlerinin ölçülürken sonuçları etkilemektedir. Buna ek olarak test maddelerinin toksik olmayan konsantrasyonlarının sağlıklı hücre hattı üzerine olan etkileri incelendiğinde daha az reaktif oksijen miktarı oluşturmaktadır (Şekil 3.17-3.18-3.19-3.20).

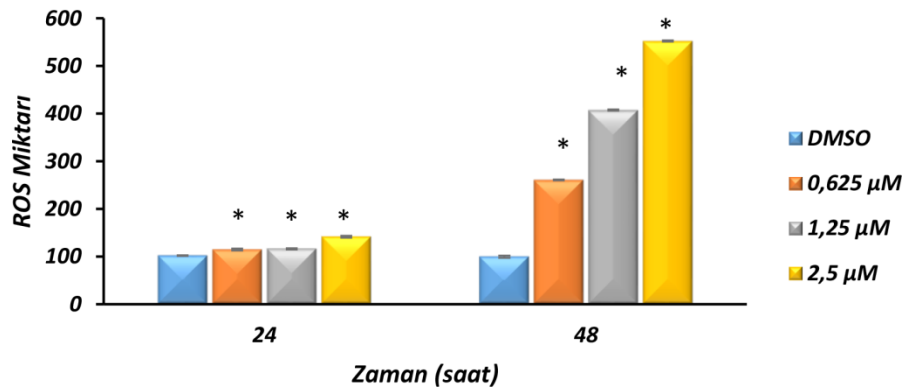
**BK1 Kompleksinin
T-47D Hücreleri Üzerine Aktivitesi**



**BK1 Kompleksinin
HCC1428 Hücreleri Üzerine Aktivitesi**

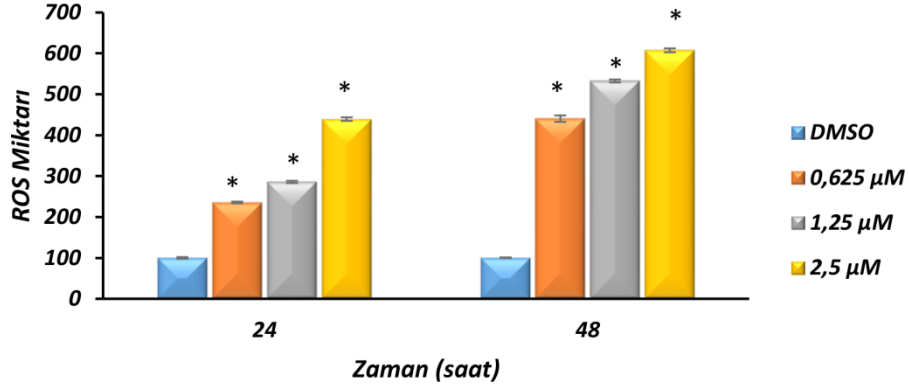


**BK1 Kompleksinin
HUVEC Hücreleri Üzerine Aktivitesi**

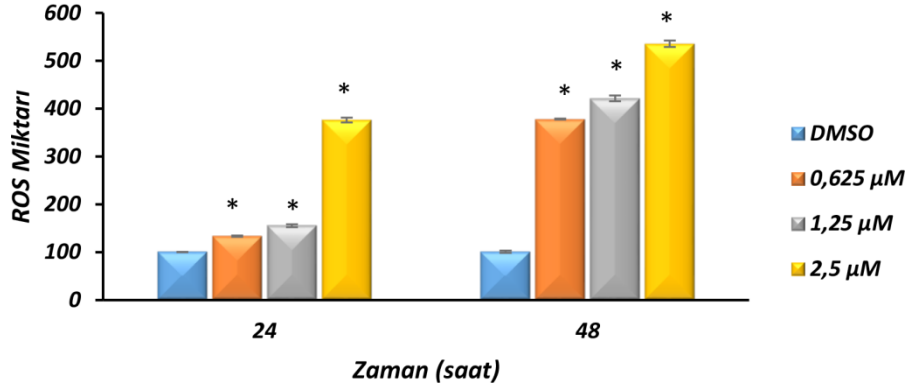


Şekil 3.16. BK1 kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel(HUVEC) hücrelerinde meydana gelen ROS birikimi üzerine aktivitelerinin belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p<0,05$.

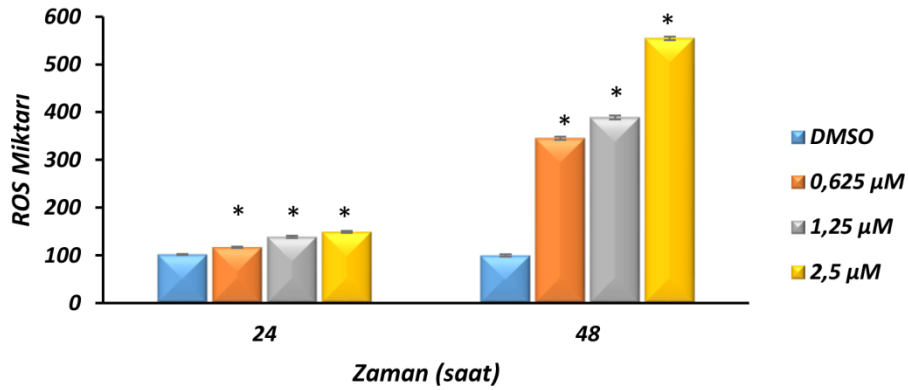
**BK1X Kompleksinin
T-47D Hücreleri Üzerine Aktivitesi**



**BK1X Kompleksinin
HCC1428 Hücreleri Üzerine Aktivitesi**

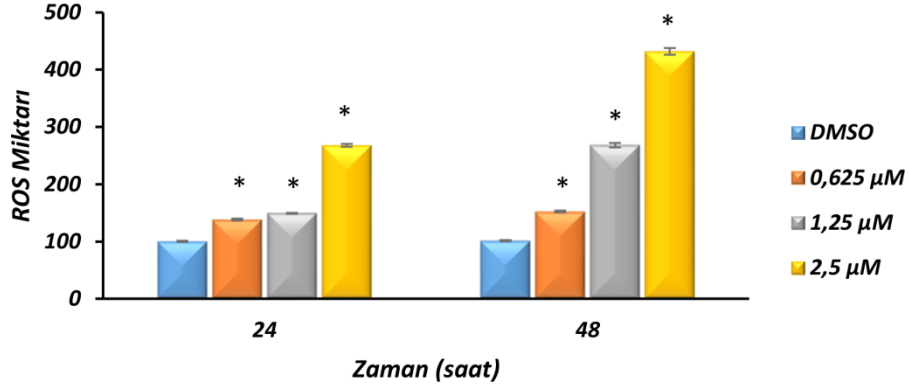


**BK1X Kompleksinin
HUVEC Hücreleri Üzerine Aktivitesi**

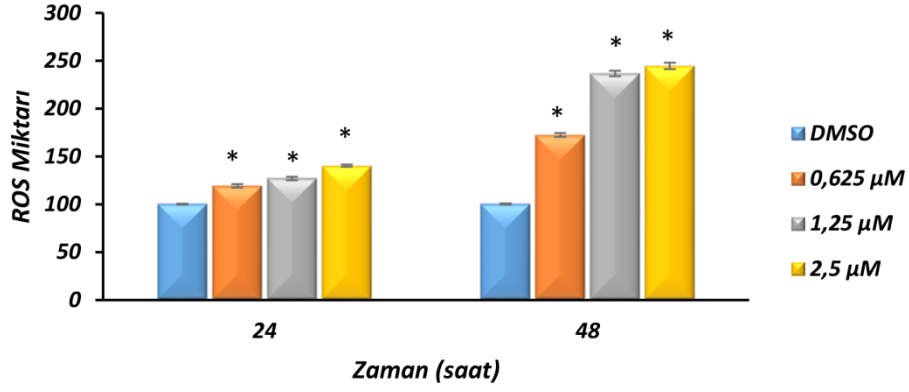


Şekil 3.17. BK1X kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel(HUVEC) hücrelerinde meydana gelen ROS birikimi üzerine aktivitelerinin belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p<0,05$.

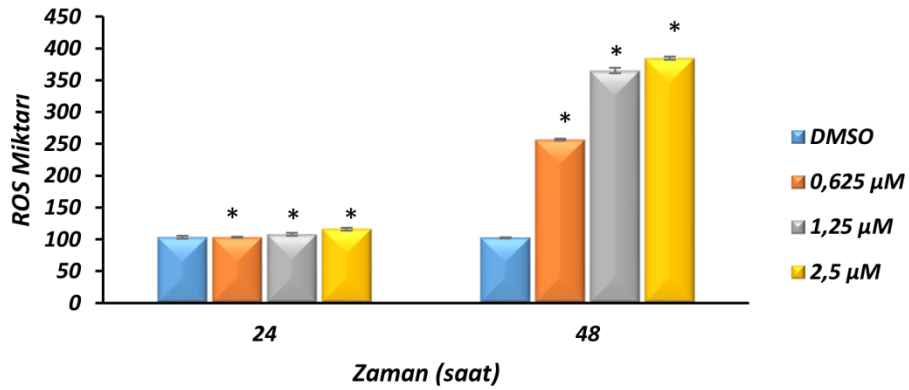
**BK2 Kompleksinin
T-47D Hücreleri Üzerine Aktivitesi**



**BK2 Kompleksinin
HCC1428 Hücreleri Üzerine Aktivitesi**

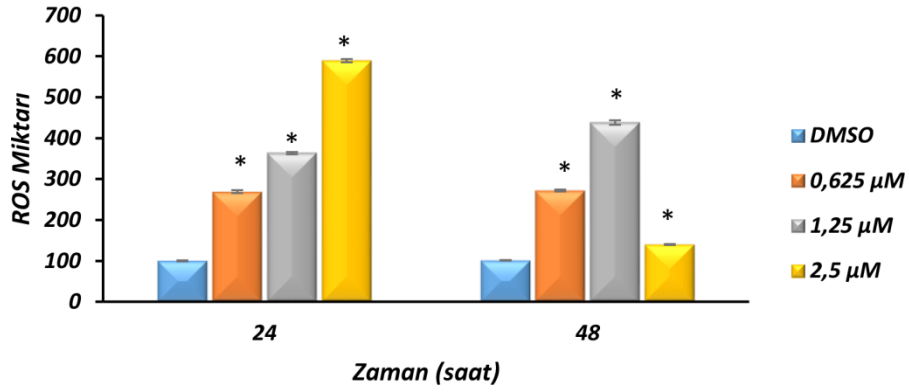


**BK2 Kompleksinin
HUVEC Hücreleri Üzerine Aktivitesi**

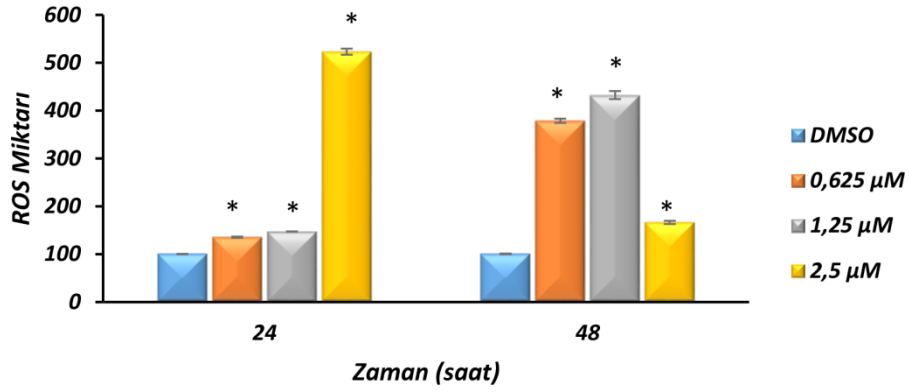


Şekil 3.18. BK2 kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel(HUVEC) hücrelerinde meydana gelen ROS birikimi üzerine aktivitelerinin belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p<0,05$.

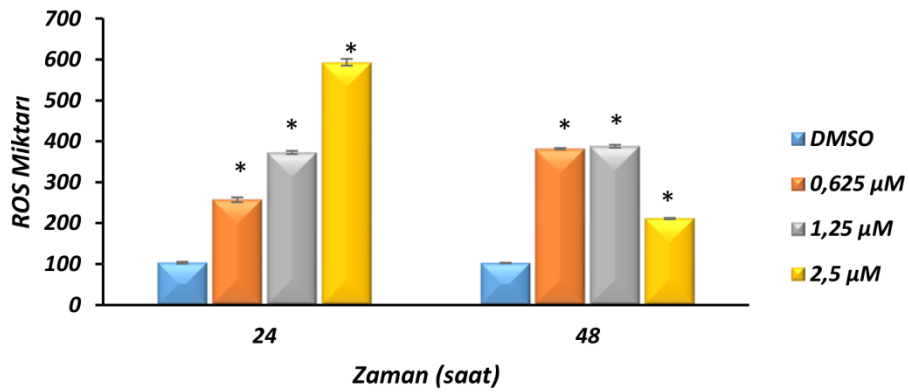
**BK2X Kompleksinin
T-47D Hücreleri Üzerine Aktivitesi**



**BK2X Kompleksinin
HCC1428 Hücreleri Üzerine Aktivitesi**



**BK2X Kompleksinin
HUVEC Hücreleri Üzerine Aktivitesi**



Şekil 3.19. BK2X kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel(HUVEC) hücrelerinde meydana gelen ROS birikimi üzerine aktivitelerinin belirlenmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p<0,05$.

3.6. Kaspaz-3 Aktivite Ölçümü

Programlanmış hücre ölümü; hücrelerin kendi kendinin yıkımını gerçekleştirdiği fizyolojik bir olaydır ve çok hücreli organizmalarda hücre içi dengenin sağlanması, çeşitli hastalıkların (kanser vb.) oluşmasının engellenmesi, nörodejeneratif bozuklukların (alzheimer hastalığı vb.) ortadan kaldırılması adına önem arz etmektedir. Çeşitli iç ve dış etkenler aracılığıyla uyarılan apoptoz, hücrelerde bir dizi biyokimyasal ve morfolojik değişikliklere yol açmaktadır. Apoptozun gerçekleştiği hücrelerde; DNA fragmentasyonları, bazı enzimlerin aktivasyonu ve sinyal yollarının uyarılması gibi biyokimyasal değişiklikler söz konusu olurken, bir yandan da kromatin yoğunlaşması, hücrelerin sitoplazmik içeriğini kaybederek büzülmesi veya apoptotik parçaların oluşması gibi morfolojik değişiklikler söz konusudur. Bu değişiklikler göz önünde bulundurularak günümüze kadar apoptozu belirlemek adına çeşitli yöntemler geliştirilmiş ve bu yöntemler birçok çalışmaya konu olmuştur. Kaspaz-3 aktivite ölçüm test tekniği de bu yöntemlerden birisi olmakla birlikte en çok tercih edilen güvenilir yöntemler arasında değerlendirilmektedir. Bu nedenle de yüksek lisans tezi kapsamında schiff bazlarının toksik olmayan konsantrasyonlarının, insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), (HCC1428) insan meme bezi epitelyum IV. aşama adenokarsinoma ve insan göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücreleri üzerine olan apoptotik etkileri, kaspaz-3 aktivite ölçüm test tekniği kullanılarak belirlenmiştir.

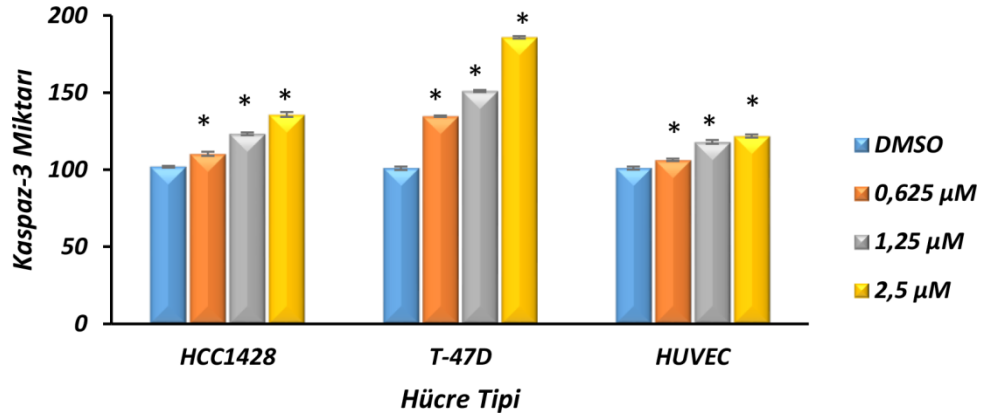
Elde edilen veriler; yeni sentezlenen BK1, BK1X, BK2 ve BK2X schiff baz komplekslerinin toksik olmayan konsantrasyonlarının kanser hücre hatları üzerinde sağlıklı hücre hattına göre daha fazla apoptotik aktivite sergilediğini göstermiştir. Test maddelerinin sispaltine karşı dirençlilik gösteren HCC1428 hücre hattında, T-47D hücre hattına göre daha az kaspaz-3 aktivitesi sergilediği gözlenmiştir. Birbirlerinin türevi olan BK1 ve BK1X kompleksleri kendi aralarında kıyaslandığında ise; BK1X kompleksinin kanser hücre hatları üzerinde daha fazla apoptotik etki sergilemesine rağmen sağlıklı hücre hattı üzerinde BK1 kompleksiyle benzer aktivite sergilediği sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca BK1X kompleksinin 1,25-2,5 μ M konsantrasyonları; BK1 kompleksine göre hem kanser hücre hatları üzerinde daha fazla toksik aktivite sergilemesi hem de sağlıklı hücre hattı üzerinde BK1 kompleksi ile benzer etki göstermesinden dolayı önem arz etmektedir.

BK2 ve BK2X komplekslerinin kaspaz-3 aktivite ölçüm test sonuçları incelendiğinde ise BK2X kompleksinin kanser hücreleri üzerinde daha fazla apoptotik

etkiye neden olduğu gözlenmiştir. BK2 kompleksinin toksik olmayan konsantrasyonları kendi aralarında kıyaslandığında; 2,5 µM konsantrasyonunun kanser hücre hatları üzerinde daha fazla kaspaz-3 aktivitesi sergilediğini ve diğer konsantrasyonların da birbirine yakın değerler olduğu gözlenmiştir. BK2 kompleksinin HUVEC hücre hattı üzerinde kaspaz aktivitesi incelendiğinde, elde edilen veriler farklı konsantrasyonların birbirine yakın değerlere sahip olduğunu göstermektedir.

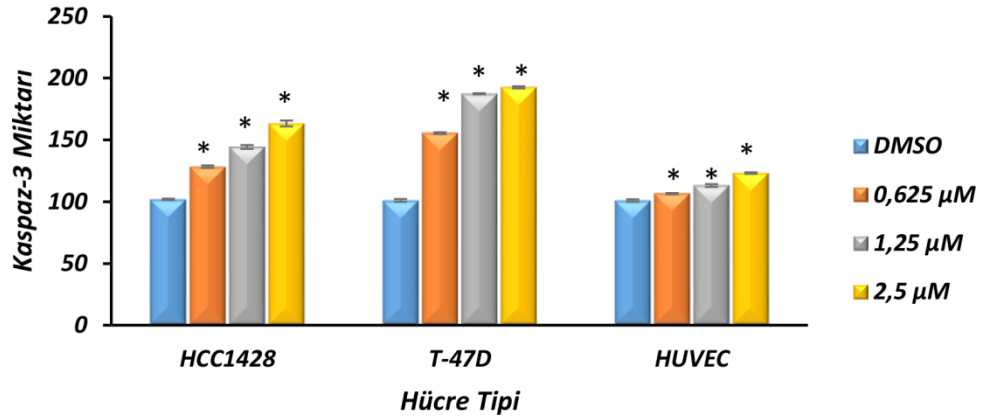
Yüksek lisans tez projesi kapsamında sentezlenen test maddeleri kendi aralarında değerlendirildiğinde farklı hücre hatları üzerinde en etkili kaspaz-3 aktivitesinin BK2X kompleksine ait olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Kaspaz-3 aktivitesinin en az olduğu değer ise BK2 bileşiğinde elde edilmiştir (Şekil 3.21-3.22-3.23).

BK1 Kompleksinin Apoptoz Üzerine Aktivitesi



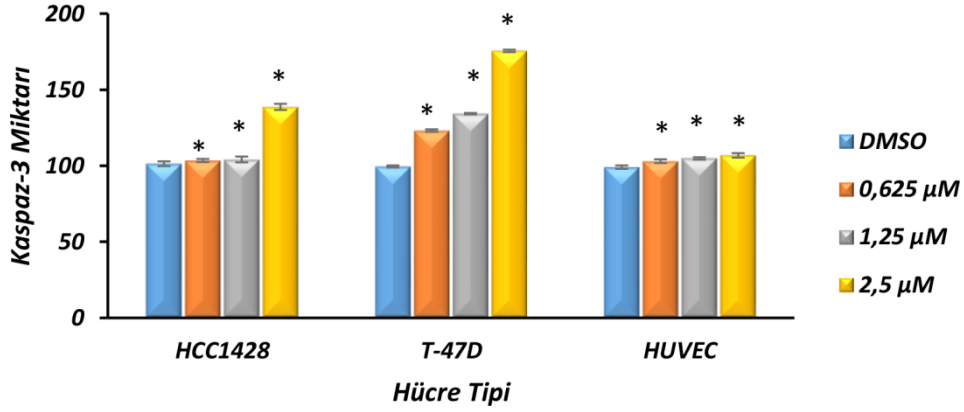
Şekil 3.20. BK1 kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma (HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin ölçümü. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.

BK1X Kompleksinin Apoptoz Üzerine Aktivitesi



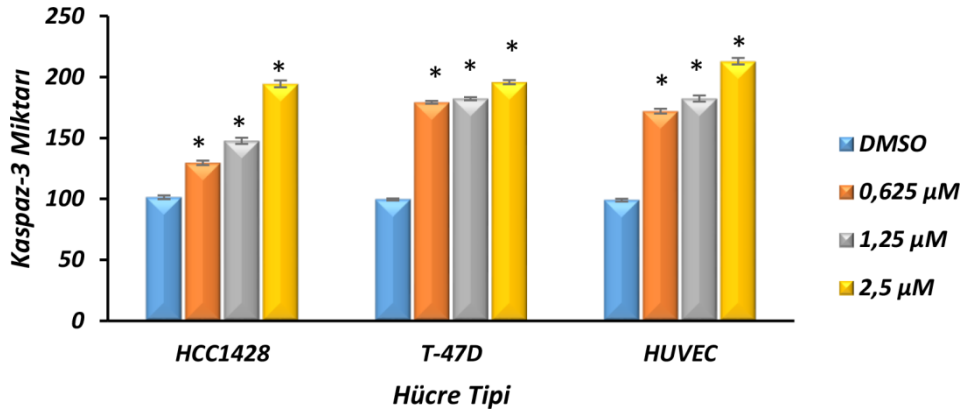
Şekil 3.21. BK1X kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma (HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin ölçümü. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.

BK2 Kompleksinin Apoptoz Üzerine Aktivitesi



Şekil 3.22. BK2 kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin ölçümü. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p<0,05$.

BK2X Kompleksinin Apoptoz Üzerine Aktivitesi



Şekil 3.23. BK2X kompleksinin insan meme bezi epitelyum duktal karsinoma (T-47D), meme 4. faz adenokarsinoma(HCC1428), göbek bağı damar endotel (HUVEC) hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin ölçümü. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p<0,05$.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser; uzun süreden beri çeşitli çalışmalara konu olmakla birlikte kesin çözüm bulunamayan ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra milyonlarca insanın ölümüne sebep olan sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır (Hanahan ve Weinberg 2011, Ferlay vd. 2015). Yaklaşık olarak 200'ün üzerinde farklı kanser vakası olduğu bilinmekle birlikte meme kanseri bayanlar arasında en yaygın rastlanan kanser hastalıkları arasında yer almaktadır (Chauthe vd. 2015, Parker vd. 2016). Elde edilen bilgilere göre meme kanserinin, bayanlarda gözlenen diğer kanser vakaları ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak % 23'ünü oluşturduğu ve bu rakamın da %16'sının ölümle sonuçlandığı bilinmektedir (Deodware vd. 2016). Meme kanseri gibi çeşitli kanser vakalarıyla mücadele etmek ve kanser hastalıklarından kaynaklanan ölüm oranlarını azaltmak adına radyoterapi, hormon tedavileri, cerrahi müdahaleler ve kemoterapi gibi çeşitli tedavi yöntemlerine başvurulmaktadır (Luqmani 2005, Maruthanila vd. 2016, Lukong 2017). Tercih edilen tedavi yöntemleri arasında, özellikle de kanserin erken aşamalarında, kemoterapi en yaygın kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır (Luo vd. 2016). İlaç tedavisi olarak tanımlanan kemoterapide; hasta tedavilerinde bir veya birden fazla ilacın kombinasyonuna başvurularak tedavinin gerçekleşmesi prensibi yatmaktadır (Luqmani 2005). Günümüzde de kanserle mücadele etmek adına; kemoterapi tedavilerinde çeşitli anti kanser ajanlar kullanılmaktadır fakat kanser hastalığının kesin çözümü söz konusu değildir (Bruijninx ve Sadler 2008, Freire vd. 2015, Singh vd. 2017a). Başvurulan tedavi yöntemlerinin hastalar üzerinde yetersiz kalmasının yanı sıra çeşitli yan etkilerin gözlemlenmesi de tedaviyi olumsuz yönde etkileyen ciddi bir problemdir (Chabner ve Roberts 2005). Meme kanseri gibi çeşitli kanser vakalarında kemoterapi tedavileri sonrasında gözlenen saç dökülmesi, mide bulantısı, gastrointestinal bozukluklar, kemik yapılarında meydana gelen hasarlar, ilaç dirençliliği gibi çeşitli yan etkiler söz konusu olmaktadır (Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde 2015, of Aguiar vd. 2016). Kemoterapide meydana gelen dirençlilik ise var olan bu yan etkilerden en önemlisidir ve kanser hastalarının tedavi sürecini sekteye uğratmaktadır (Frączek vd. 2016). İstenmeyen yan etkileri ortadan kaldırılmak ve hasta tedavilerinde olumlu sonuçlar elde etmek adına anti kanser ajanlar üzerine yapılan çalışmalar bilim dünyasının ana hedefleri arasındadır (Shapira vd. 2011, Alfarouk vd. 2015). Yeni anti kanser ajanların geliştirilmesi adına farklı yaklaşımlar söz konusu olsa

da yapılan bilimsel araştırmaların çoğunda metal türevli ajanlar ilgi odağı olmaktadır (Bruijninx ve Sadler 2008). Metallerin; ilaç etken maddeleri olarak yoğun bir şekilde ilgi görmelerinin ana sebebi ise hücre için gerekli olan biyokimyasal olayların kusursuz bir şekilde gerçekleşmesine olanak sağlamalarıdır (Frezza vd. 2010). Bu nedenle; kemoterapötik ajan olarak farklı metal kompleksler üzerine yapılan araştırmalar, özellikle de cisplatinin anti kanser aktivitesinin keşfedilmesinden bugüne kadar, modern biyokimyanın çalışma konusu haline gelmiştir (Ott ve Gust 2007, Wimberger vd. 2011). 1960 yılında Rosenberk ve arkadaşlarının cisplatin kompleksini keşfetmesi, kemoterapide önemli gelişmelere öncülük etmiş ve uzun süre boyunca yapılan bilimsel araştırmaların birçoğu yeni platin türevli anti kanser ajanlar üzerine olmuştur (Rosenberg ve Vancamp 1969)(Florea ve Büsselberg 2011, Wani vd. 2016). Cisplatin kompleksinin keşfedilmesinden sonra karboplatin, oksaliplatin, nedaplatin ve loplatin gibi çeşitli platin türevli ilaçlar keşfedilip, kanser hastaları üzerine uygulamaya konulmuştur (Bruijninx ve Sadler 2008). Tedavi süreci boyunca belli periyotlarla kullanılan bu ilaçlar çeşitli molekülleri (DNA, RNA, protein) yada hücre içerisinde gerçekleşen biyolojik olayları (replikasyon, transkripsiyon, apoptotik yollar gibi..) hedef alarak, doğrudan veya dolaylı yoldan kanser hücreleri üzerinde etki göstermektedir (Luqmani 2005, Paul vd. 2015, Banerjee vd. 2016, Lee vd. 2016). Cisplatin de genotoksik ajanlar içerisinde dahil olmakla birlikte kanser hücrelerinin genetik materyali üzerinde etkili olmaktadır (Florea ve Büsselberg 2011). Cisplatin, DNA'da bulunan guanin bazlarına monofonksiyonal ya da interstand (iç dayanak) çapraz bağlanarak kanser hücrelerinin genetik materyali üzerinde değişikliklere yol açmaktadır (Zamble ve Lippard 1995). Farklı kanser hücre hatları ise cisplatinin aktivitesini azaltmak adına DNA tamir mekanizmaları başta olmak üzere çeşitli mekanizmaları devreye sokarak canlılığını devam ettirmekte ve tedaviye dirençlilik göstermektedir (Zamble ve Lippard 1995, Frączek vd. 2016). Yapılan çalışmalar; farklı kanser hücre hatlarının anti kanser ajanların aktivitesine, DNA tamir mekanizmalarıyla, epigenetik mekanizmalarla veya apoptoza karşı dirençlilik göstererek, kimi zamanda ilaç inaktivasyonuna neden olarak karşı koyduklarını belirtmiştir (Housman vd. 2014). Kemoterapi tedavilerinde dirençliliği meydana getiren mekanizmaların gerçekleşmesinde veya tedavinin etkili bir şekilde ilerlemesinde hücrelerde bulunan genetik materyal ise önemli roller üstlenmektedir (Zamble ve Lippard 1995, Florea ve Büsselberg 2011). Bu nedenle; DNA her daim yeni anti kanser ajanların geliştirilmesinde

hedef nokta olmaktadır (Palermo vd. 2015). Elde edilen bilgiler doğrultusunda, yapılan çalışmalar da platin kompleksi içermeyen, DNA ile kolaylıkla etkileşime geçebilen oldukça küçük moleküller olarak kabul edilen yeni metal türevli ilaç etken maddeleri üzerine olmaktadır (Ott ve Gust 2007, Poonia vd. 2016).

Schiff bazları da DNA ile oldukça kolay bir şekilde koordinasyona girebilen küçük moleküller olarak bilinmektedirler (Poonia vd. 2016). Eşsiz özelliklere sahip olan schiff bazları aldehit ve primer aminlerin kondenzasyon reaksiyonu sonucunda oluşan bileşiklerdir (Güngör ve Gürkan 2010). İlk olarak 1864 yılında Hugo Schiff tarafından sentezlenen schiff bazları; $RN=CR'R''$ kimyasal yapısına sahiptirler ve yan gruplarında (R, R', R'') aril, heteroaril, sikloalkil ve alkil olmak üzere çeşitli kimyasal yapıları barındırabilirler (Hameed vd. 2016). Ayrıca schiff bazları, sahip oldukları kimyasal yapıları sayesinde doğal biyolojik sistemlerde bulunan yapılarla benzerlik gösterdiklerinden dolayı inorganik kimyanın ve modern koordinasyon kimyasının gelişmesinde önemli roller üstlenmişlerdir (Yan vd. 2015b, Mahmoud vd. 2016). Schiff bazlarının yapılarında bulunan azot ve oksijen, canlılarda bulunan genetik materyal ile yakın benzerlik gösterdiğinden dolayı biyolojik süreçlerde gerçekleşen olayların modifikasyonuna (değişikliklerinde) neden olmaktadır (Gomathi vd. 2014, Abdel-Rahman vd. 2016). Bunun yanı sıra farklı geçiş metalleri ile kolaylıkla etkileşime girerek, iki metal iyonu arasında köprü görevi görmektedirler (Mahmoud vd. 2016, Das vd. 2017). Son zamanlarda koordinasyon kimyasının ilgisi de çok fonksiyonlu ve farklı moleküller arasında köprü görevi gören ligantlar üzerine olmaktadır ve schiff bazları da ilgi gören önemli ligantlardan birisidir (Ziessel 2001). Özellikle schiff bazlarının farklı geçiş metalleri arasında köprü görevi görerek oluşturdukları kompleksler sahip oldukları biyolojik aktivitelerden dolayı oldukça önem arz etmektedir (Ziessel 2001, Das vd. 2017). Schiff bazlarının geçiş metalleri ile oluşturdukları kompleksler; bitki büyüme inhibitörü (Šimůnek ve Macháček 2010), insektisidal (Koori 2014), anti-bakteriyel (Njogu vd. 2017), anti-mikrobiyal (Kiran vd. 2015), anti-viral (Kumar vd. 2010), anti-tüberküloz (Chohan vd. 2004), anti-depresan (Raman vd. 2009), anti-konvülzan (epilepsi önleyici) (Hameed vd. 2016), anti-alzheimer (Rohn 2010) ve anti-kanser (Chacko ve Samanta 2017) aktiviteleri sergilemektedirler (Kumar vd. 2009, Hameed vd. 2016). Sadece geçiş metalleriyle değil aynı zamanda hidrozan türevleriyle oluşturulan schiff baz komplekslerinin de geniş biyolojik aktivite sergiledikleri bilinmektedir (Aboul-

Fadl vd. 2012). Çünkü hidrozan türevleri de schiff bazları gibi diğer moleküllerle kolaylıkla etkileşime girebilen ve antikanser aktivite gibi çeşitli biyolojik aktiviteler sergileyen çok yönlü bileşiklerdir (Verma vd. 2014). Bu nedenle hidrozan türevleri; yeni ilaç etken maddelerinin geliştirilmesinde son zamanlarda dikkat çeken moleküller olarak karşımıza çıkmaktadırlar (Onnis vd. 2009). Yapılan çalışmalarda; hidrazon türevlerinin, meme kanseri gibi çeşitli kanser hücre hatlarında apoptozu tetikleyerek anti-kanser aktivite sergilediklerini göstermiştir (Vogel vd. 2008). Ayrıca hücre içerisinde bulunan kinazların inaktivasyonuna (engellenmesine) yol açarak kanser hücre hatlarının kontrolsüz çoğalmalarını yavaşlattıkları da bilinmektedir (Xu vd. 2008). Schiff bazlarının geçiş metal komplekslerinin, hidrazon türevleri ile oluşturdukları moleküllerin ise anti kanser aktiviteleri umut vaad etmelerine rağmen, bu kompleksler üzerine literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır (Verma vd. 2014).

Sentezlenen farklı schiff baz komplekslerinin, tez projesi kapsamında, (T-47D) insan meme epitelyum duktal karsinoma, (HCC1428) insan meme epitelyum 4. aşama adenokarsinoma, (HUVEC) insan göbek bağı damar endotel hücreleri üzerine olan anti kanser aktiviteleri Alamar blue hücre canlılığı, LDH hücre membran hasarı ve PicoGreen dsDNA miktar tayini testleri kullanılarak incelenmiş ve testler sonucu elde edilen veriler birbirleriyle karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir (Bölüm 3.1, Bölüm 3.2, Bölüm 3.3).

BK1, BK1X, BK2, BK2X olmak üzere dört farklı schiff baz komplekslerinin alamar blue yöntemiyle sitotoksik aktivitesinin belirlenmesi sonucunda elde edilen veriler, schiff baz komplekslerinin kanser hücre hatları üzerinde cis-platine göre daha etkili anti kanser aktivite sergilediklerini göstermiştir (Bölüm 3.1). Cis-platin kompleksinin hasta tedavilerinde uygulanma dozu farklı kanser vakalarına göre ve kanserin evrelerine göre değişiklik göstermektedir (Laurell ve Jungnelius 1990). Meme kanseri hastalarında erken safhada olan hastalar için 30 mg/m² dozu tercih edilirken daha ileri safhalarda cisplatinin daha yüksek dozları tercih edilmektedir (Sledge Jr vd. 1988, Laurell ve Jungnelius 1990). Cis-platin kompleksinin 100 mg/m² dozdan fazlasının hastalar üzerinde ciddi yan etkiler oluşturması nedeniyle de daha düşük dozlarda ve etkili anti kanser ajanların geliştirmesi kaçınılmazdır. Deneysel çalışmalar sırasında kullanılan schiff baz kompleksleri ise özellikle de ileri safhalarda meme kanseri tedavilerinde kullanılan cis-platin kompleksinin hasta tedavilerinde uygulanan dozları ile karşılaştırıldıklarında, kanser hücre hatlarında daha düşük dozlarda etki gösterdiği

sonucuna ulaşılmıştır. BK1, BK1X, BK2 ve BK2X schiff baz komplekslerinin hücre canlılığı üzerine olan etkileri kendi aralarında karşılaştırıldığında ise BK1X ve BK2X schiff baz komplekslerinin daha etkili toksik aktivite sergilediğı gözlenmiştir (Bölüm 3.1). BK1X ve BK2X komplekslerinde olduğı gibi bakır metali içeren anti kanser ajanların geliştirilmesi bilimsel çalışmalarda oldukça yoğun ilgi görmektedir (Harris ve Gitlin 1996, Frezza vd. 2010, Ruiz-Azuara ve Bravo-Gomez 2010). Bugüne kadar da bakır metali ile sentezlenen birçok kompleksin oldukça etkili anti kanser aktivite sergiledikleri yapılan çalışmalarla da kanıtlanmıştır (Duncan ve White 2012). Bakır metali DNA sentezi, hücre büyümesi ve gelişmesi ve hatta enerji metabolizmalarının gerçekleştirilmesi için gerekli olan redoks tepkimelerde yer aldığından canlı organizmalarda hayati roller üstlenmektedir (Frezza vd. 2010, Acilan vd. 2016). Hücrelerde gerçekleşen birçok biyokimyasal olaylardan sorumlu olan bakır metali, hücre içerisinde doğal yollarla üretilen endojen bir metaldir (Vyas vd. 2013, Acilan vd. 2016). Bu nedenle de bakır ve bakır metali içeren komplekslerin sağlıklı hücreler üzerine daha az toksik etki gösterdiği bilinen bir gerçektir (Acilan vd. 2016). Test edilen schiff baz kompleksleri arasında bakır metali içeren BK1X ve BK2X komplekslerinin de sağlıklı hücre hattı üzerinde; kanser hücre hatlarıyla kıyaslandığında, daha az toksik etkiye neden olduğu gözlenmiştir (Bölüm 3.1). Ayrıca bakır metali, kanser hücrelerinin anjiyogenez gerçekleştirmesinde ko-faktör olarak görev üstlenmektedir (Frezza vd. 2010). Dolayısıyla kanser hücreleri sağlıklı hücrelere kıyasla farklı özellikler sergileyerek, daha fazla bakır metali içermektedir ve hücre içerisine bakır metali alımını daha da fazla arttırmaktadır (Hanahan ve Weinberg 2000, Gupte ve Mumper 2009, Acilan vd. 2016). Kanser hücreleri içerisine giren bakır metalinin hücre membranının seçici geçirgenliğinden dolayı da hücrelerde biriktiğı bilinmektedir (Vyas vd. 2013) Bakır metali içeren kompleksler de kanser hücreleri üzerinde cisplatine (DNA'ya kovalent bağlanan anti-kanser ajan) kıyasla farklı metabolik aktiviteler sergileyerek hücreler üzerinde toksik etkiye yol açmaktadır (Vyas vd. 2013). Hücre içerisine giren bakır metali DNA ile kolaylıkla etkileşime geçebilmesinin yanı sıra çeşitli redoks tepkimelerin gerçekleşmesine de olanak sağlayarak kanser hücrelerinin büyümesine ve çoğalmasına engel olmaktadır (Tardito ve Marchio 2009). Bu nedenle son zamanlarda yapılan çalışmalarda platin türevli kompleksler yerine bakır metali içeren kompleksler daha çok ön plana çıkmaktadır (Ruiz-Azuara ve Bravo-Gomez 2010). Cis-platin kompleksinin DNA üzerinde etki göstererek anti kanser aktivite sergilediğı fakat kanser hücrelerinin DNA

tamir mekanizmalarını yada mutasyonları devreye sokarak cisplatine karşı dirençlilik gösterdiği bilinmektedir (Zamble ve Lippard 1995). Söz konusu olan kemoterapide dirençliliğin üstesinden gelmek içinde bakır metali içeren kompleksler gibi kanser hücreleri üzerinde farklı mekanizmalar aracılığıyla etki gösteren anti kanser ajanların geliştirilmesi önem arz etmektedir. Cis-platine karşı dirençlilik gösteren HCC1428 hücre hattı üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda test edilen schiff baz komplekslerinin cis-platine göre daha etkili olduğunu saptanmıştır.

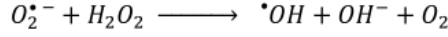
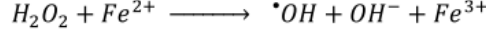
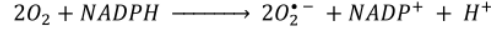
Schiff bazlarının metal komplekslerinin hücre membran bütünlüğü üzerine aktiviteleri laktat dehidrogenaz (LDH) aktivite ölçüm testi kullanılarak da belirlenmiştir (Bölüm 3.3). Schiff bazlarının anti kanser aktivitelerini belirlemek adına yapılan laktat dehidrogenaz aktivite ölçüm testinde; alamar blue yönteminde elde edilen veriler ile paralel sonuçlar gözlenmiştir (Bölüm 3.3). Test edilen schiff bazlarının BK1 kompleksinin en az, BK2X kompleksinin ise en fazla laktat dehidrogenaz aktivitesi sergilediği sonucuna ulaşılmıştır (Bölüm 3.3). Birbirlerinin türevi olan schiff baz kompleksleri kendi aralarında değerlendirildiğinde; BK1X kompleksinin BK1 kompleksine ve BK2X kompleksinin de BK2 kompleksine göre kanser hücre hatları üzerinde daha fazla hücre membran hasarına yol açtığı sonucuna ulaşılmıştır (Bölüm 3.3). Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada da geçiş metallerinin farklı ligantlarla oluşturdukları komplekslerin, ligantların tek başına sahip oldukları biyolojik aktivitelerini arttırarak daha etkili anti kanser aktivite özelliği kazanmalarına neden olduğu bildirilmiştir (Nanjundan vd. 2017). Deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen veriler bugüne kadar yapılan çalışmaları destekler niteliktedir. Farklı hücre hatları üzerinde anti kanser aktiviteleri test edilen BK1X ve BK2X komplekslerinin hem merkezlerinde pozitif yüklü geçiş metallerini içermeleri hem de schiff bazlarını yapılarında barındırmalarından dolayı oldukça etkili toksik aktivite sergiledikleri söylenebilir. Bunun nedeni ise pozitif yüklü geçiş metalleri hücre içerisinde var olan DNA, protein ve enzim gibi negatif yüklü metabolitlerle daha kolay bir şekilde etkileşime geçerek kanser hücreleri üzerinde etki göstermektedir (Arafath vd. 2017). Pozitif yüklü olan bakır metalinin de kimyasal özelliği sayesinde DNA ile kolaylıkla etkileşime geçtiği çeşitli çalışmalara konu olmuştur (Das vd. 2017). Schiff bazları da bakır metali gibi geçiş metallerini merkezlerine alarak oluşturdukları komplekslerle, geçiş metallerinin

biyolojik aktivitelerinin daha da fazla artmasına neden olmaktadır (Dhahagani vd. 2014, Li vd. 2015).

Kemoterapide kullanılmak adına geliştirilen ilaçların kimyasal özellikleri önemli olduğu kadar doza ve zamana bağlı olarak toksik etkilerinin farklı toksikolojik yöntemlerden faydalanarak karşılaştırılması da doğru sonuçlar elde edilmesi adına bir o kadar önem arz etmektedir (Mueller vd. 2004, Fotakis ve Timbrell 2006). Bunun ana nedeni ise; insan bünyesinde var olan metal dengesinin bozulduğu takdirde çeşitli patolojik sorunlara yol açmasıdır (Ruiz-Azuara ve Bravo-Gomez 2010). Metaller kendi aralarında toksik ya da toksik olmayan şekilde farklı gruplara ayrılmasalar da özellikle bakır metali gibi iz metallerin yüksek dozda vücut içerisine alındığında nörolojik bozuklara yol açtığı bilinmektedir (Frezza vd. 2010, Ruiz-Azuara ve Bravo-Gomez 2010, Duncan ve White 2012). Tez kapsamında sentezlenen ligantlar ve geçiş metalleri ile oluşturdukları komplekslerin hücre hatları üzerinde gösterdikleri biyolojik aktiviteleri bir kez daha picogreen reaktifi kullanılarak araştırılmıştır (Bölüm 3.3). Bu test sonucunda elde edilen veriler de, diğer test yöntemleri sonucunda elde edilen verilere paralellik göstermektedir.

İlaç tedavileri için geliştirilen yeni anti kanser ajanların hedef noktalarının DNA olmasının yanı sıra alternatif yaklaşımlar da söz konusudur (Ruiz-Azuara ve Bravo-Gomez 2010). Kanser hücrelerinin büyümesi ve çoğalması üzerinde etkili olan reaktif oksijen türevlerini hedef alan anti kanser ajanlar geliştirmek de bu yaklaşımlardan birisidir (Fricker 2007). Reaktif oksijen türevleri (ROS) normalde de hücre tarafından yeterli miktarda oluşturulan ve son elektron orbitalinde eşlenmemiş elektron çiftine sahip olan molekül, iyon ve radikallerdir (Storz 2005, Liou ve Storz 2010). Reaktif oksijen türevleri kendi aralarında serbest radikaller (süperoksit, hidroksi radikal, nitrik oksit, peroksil radikal gibi..) ve reaktif olmayan radikaller (hidrojen peroksit, organik hidroksi peroksit, hidrokloride gibi..) olacak şekilde iki gruba ayrılmaktadırlar (Liou ve Storz 2010, Redza-Dutordoir ve Averill-Bates 2016). Oldukça küçük yapıya sahip olan oksijen türevleri; hücre sinyal iletimi gibi hücre içi dengenin sağlanması açısından önemli olan birçok biyokimyasal süreçte yer almaktadır (Dickinson vd. 2010). Reaktif oksijen türevleri, hücreler için faydalı birçok görevi üstlense de hücre içerisinde aşırı miktarda oluşması da çeşitli problemlere yol açmaktadır (Valko vd. 2007). Onkogenlerin aktivasyonu, metabolizmanın hızlanması, mitokondriyal fonksiyonlarda değişikliklere

neden olmak ya da p53 gibi çeşitli tümör baskılayıcı genlerin ifadesinde modifikasyonlara yol açmak gibi hücreler için çeşitli problemlere yol açan aktivitelerin meydana gelmesinde reaktif oksijen türevlerinin rol aldıkları bilinmektedir (Trachootham vd. 2009). Bu nedenle hücre içerisindeki reaktif oksijen türevlerinin miktarı enzimatik ve enzimatik olmayan anti oksidan savunma mekanizmalarıyla dengede tutulmaktadır (Valko vd. 2007, Chu vd. 2016). Enzimatik antioksidan savunma mekanizmaları; süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi çeşitli enzimler ile hücre içi reaktif oksijenlerinin uzaklaştırılmasından sorumlu olan mekanizmalardır (Valko vd. 2007). Enzimatik olmayan mekanizmalar ise askorbik asit (vitamin C), α -Tokoferol (vitamin E), glutatyon (GSH), karotenoid ve flavonoid gibi çeşitli antioksidantları içerisinde barındıran savunma mekanizmalarıdır (Valko vd. 2007). Söz konusu olan anti oksidan savunma mekanizmaları yetersiz kaldığında ise reaktif oksijen türevlerinin miktarında artış gözlenmektedir (Kovacic 2006). Hücre içerisinde olması gerektiğinden fazla miktarda reaktif oksijen türevleri oluştuğunda ise, bu küçük moleküller; protein, lipit ve DNA gibi biyolojik materyaller üzerinde etki göstererek oksidatif hasarın oluşmasına neden olmaktadır (Tardito ve Marchio 2009, Daiber vd. 2017). Memeli hücrelerinde en fazla zarara neden olan reaktif oksijen türevi ise hidroksi (OH) radikallerdir ve kararsız yapıya sahip olduklarından dolayı hücre içerisindeki birçok materyalle kolaylıkla etkileşime geçerek oksidatif hasara yol açmaktadırlar (Forcados vd. 2017). Başlıca mitokondri organelinde enerji transferi sırasında oluşan hidroksi radikallerin fenton olarak adlandırılan reaksiyonlar ile de oluştuğu bilinmektedir (Valko vd. 2007, Tardito ve Marchio 2009). Hücre içerisinde reaktif oksijen türevlerinin oluşması başlangıç olarak ortamda bulunan oksijen ve NADPH moleküllerinin NADPH oksidaz varlığında süperoksit anyon radikallerine dönüşmesiyle başlamaktadır (Şekil 4.1) (Nimse ve Pal 2015). Oluşan süperoksit anyonları ise süperoksit dismutaz enzim aracılığı ile hidrojen peroksitlere dönüştürülmektedir (Şekil 4.1) (Nimse ve Pal 2015). Serbest radikallerin oluşmasında bir diğer tepkime ise fenton olarak adlandırılan, geçiş metallerinin ortamda bulunan hidrojen peroksitlerle, hipoksi (oksijenin yetersiz olduğu durumlar) koşullar altında tepkimesi sonucu oluşan reaksiyonlardır (Şekil 4.1) (Nimse ve Pal 2015). Fenton reaksiyonlarının gerçekleşmesinde, çeşitli geçiş metalleri görev üstlense de özellikle hücre içerisinde doğal olarak bulunan demir ve bakır metalleri rol oynamaktadır (Tardito ve Marchio 2009).



Şekil 4.1 Hücre içerisinde serbest radikallerin oluşmasında gerçekleşen kimyasal tepkimeler

Kaynak: Nimse, 2015, s. 4

Hücre içerisinde oluşan serbest radikallere karşı en hassas biyolojik materyaller ise lipidlerdir (Siems vd. 1995). Bilindiği üzere doymamış yağ asitleri hücre membranını oluşturan ana unsurlardır (Van Meer vd. 2008). Doymamış yağ asitlerinin, lipid peroksidasyonu olarak adlandırılan, serbest radikallerle oksidatif hasara uğraması sonucunda ise hücre memberanının yapısı değişmektedir ve hücre fonksiyonları gerektiği gibi yerine getirilememektedir (Nimse ve Pal 2015). Bunun yanı sıra lipid peroksidasyonu sonucunda malondialdehit ve 4-hidroksi-2-nonenal olmak üzere iki önemli ürün oluşmaktadır ki bu da hücrelerde karsinogenik ve mutajenik etkilere yol açmaktadır (Tardito ve Marchio 2009). Lipid peroksidasyonu aynı zamanda biyolojik materyallerin yapısını oluşturan aldehytlerin kırılmasında rol almaktadır ve bu da doku hasarlarına, çeşitli hastalıklara neden olmaktadır (Esterbauer vd. 1991). Lipitlerin yanı sıra hidroksi radikallerin; DNA'nın yapısını oluşturan bazlarla, şekerlerle etkileşime geçerek ve ya DNA'nın çift zincirli yapısında kırıklıklara yol açarak da oksidatif hasar oluşturduğu kanıtlanmıştır (Breen ve Murphy 1995). DNA üzerinde oluşan oksidatif hasar ise çeşitli hastalıkların oluşmasıyla yakın ilişkili olmakla birlikte DNA-protein ilişkisi üzerinde de etki göstererek proteinlerin ifadesinde değişikliklere yol açmaktadır (Dizdaroglu 1992). Ayrıca proteinler demir, bakır gibi metallerin oluşturdukları serbest oksijen türevleri tarafından oksidatif hasara uğramaktadır (Nimse ve Pal 2015). Özellikle proteinlerin yapısını oluşturan lizin, histidin ve arjinin gibi çeşitli amino asitler serbest radikallerle kolaylıkla etkileşime geçebilmektedir (Simpson vd. 1992, Giese vd. 2000). Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerin, genetik materyalin ve lipidlerin üzerinde gösterdikleri etkiler ise hücre sinyal iletiminde değişikliklere yol açarak; kanser hücrelerinin büyümesinde, gelişmesinde ve anjiyogenez (kanser hücrelerinin damar

oluşumu), hücre ölümü gibi önemli olaylar üzerinde etki göstermektedir (Liou ve Storz 2010). Sağlıklı hücrelere göre farklı özellikler sergileyen kanser hücrelerinde reaktif oksijen türevlerinin oluşumu daha fazla olmaktadır ve antioksidan savunma mekanizmaları daha zayıftır (Behrend vd. 2003, Storz 2005). Oluşan reaktif oksijen türevleri farklı kanser hücrelerinde farklı mekanizmalar üzerinde etki göstermektedir fakat genel olarak tüm kanser formlarında serbest radikallerin miktarındaki artışı kanser hücrelerinin çoğalmasında artışa neden olmaktadır (Liou ve Storz 2010). Ayrıca ROS miktarındaki artışın; hücrelerin komşu hücrelerle sıkı bağlantılar kurmasında yardımcı olan integrinlerin yapısında değişikliklere yol açarak hücre-hücre adezyonunu zayıflattığı ve bunun sonucunda da kanser hücrelerinin migrasyonuna (hücre göçü) neden olduğu bilinmektedir (Brown ve Bicknell 2001, Liou ve Storz 2010). Reaktif oksijen türevleri; kanser hücrelerinin yararına aktivite göstermelerinin yanı sıra mitokondriyal membran içeriğinde değişikliklere neden olarak hücreleri apoptoza da sürüklemektedirler (Forcados vd. 2017). Mitokondriyal membranların içeriğinde meydana gelen değişiklik, membran potansiyelinin kaybolmasına yol açarak sitokrom-c salınmasıyla sonuçlanır, sitokrom-c salınması da apaf-1 ve prokaspaz-3'ü aktive ederek hücreleri apoptoza sürüklemektedir (Hill vd. 2004, Yadav vd. 2015). Apoptoz mitokondriyal membran potansiyeli ile ilişkili olduğu kadar çeşitli sinyal yollarıyla da ilişkilidir ve reaktif oksijen türevlerinin sinyal yollarında meydana getirdikleri değişiklikler de apoptozun tetiklenmesine neden olmaktadır (Chung vd. 2003). Bu nedenle; bugüne kadar reaktif oksijen türevlerini hedef alan farklı anti kanser ajanlar geliştirilmiştir ve bu anti kanser ajanların hedeflerinde; hücre içi oksijen türevlerinin miktarında artışa yol açarak, kanser hücrelerini programlanmış hücre ölümüne sürüklemek yatmaktadır (Trachootham vd. 2009). Reaktif oksijen türevlerini hedef alarak, meme kanseri hücrelerinin apoptoza sürüklenmesine yol açan anti kanser ajanlar arasında aminoflavin, triphala ve pankratistatin gibi ilaçlar en bilinen örnekler arasında yer almaktadır (Liou ve Storz 2010). Schiff bazlarının geçiş metalleri ile oluşturdukları komplekslerinde reaktif oksijen türevleri üzerinde etki göstererek kanser hücrelerinin ölümüne neden oldukları yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Paul vd. 2015). Zhang ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada dört farklı schiff bazının bakır metalleri ile oluşturdukları bileşiklerin çeşitli kanser hücre hatları üzerinde anti oksidan aktivite sergileyerek, kanser hücreleri üzerinde etki gösterdikleri belirtilmiştir (Zhang vd. 2016b). Ayrıca Banerje ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmalarda da

yeni sentezlenen schiff bazlarının bakır şelatlarının karaciğer kanseri üzerine olan etkilerini araştırmış ve test edilen maddelerin, reaktif oksijen türevleri üzerinden, hücreleri apoptotik ölüme sürükledikleri sonucuna ulaşılmıştır (Banerjee vd. 2016). Yapılan çalışmalar göz önünde bulundurularak, yüksek lisans tez çalışması kapsamında sentezlenen schiff baz ligantları ve bu ligantların geçiş metalleri ile oluşturdukları komplekslerin kanser hücreleri üzerinde meydana getirdikleri reaktif oksijen türevlerinin miktarı belirlenmiştir (Bölüm 3.4). Elde edilen veriler doğrultusunda; yeni sentezlenen schiff baz komplekslerinin; doza bağımlı olarak, hücre hatları üzerinde reaktif oksijen türevlerinin miktarında artışa yol açtığı gözlenmiştir (Bölüm 3.4). Reaktif oksijen türevlerinin miktarının ölçülmesinde en az ROS oluşumuna neden olan BK2 kompleksiyken, en fazla ROS oluşmasına yol açan kompleks ise BK2X kompleksidir (Bölüm 3.4). Ayrıca; schiff bazlarının açıl hidrazon türevleri ile oluşturdukları ligantların (BK1 ve BK2 kompleksleri), geçiş metalleri ile oluşturdukları kompleksler olan BK1X ve BK2X komplekslerine kıyasla kanser hücre hatları üzerinde daha az reaktif oksijen türevlerinin oluşmasına neden olduğu gözlenmiştir (Bölüm 3.4). Bunun nedeni ise; geçiş metallerinin sentezlenen ligantların biyolojik aktivitelerini arttırdığı ve daha etkili anti kanser aktivite sergilemelerine neden olmasıdır. Bunun yanı sıra oldukça etkili anti kanser aktiviteye sahip olan BK1X ve BK2X komplekslerinin yapılarında bakır metalini barındırmaları da kanser hücre hatlarında daha fazla reaktif oksijen türevlerinin oluşmasına neden olmaktadır. Çünkü bakır metali gibi geçiş metalleri; reaktif oksijen türevlerinin oluşmasına yol açan fenton reaksiyonlarının gerçekleşmesinde rol almaktadır ve hücre içerisine fazla miktarda bakır metalinin girmesi daha fazla fenton reaksiyonlarının gerçekleşmesine olanak sağlayarak, reaktif oksijen türevlerinin miktarında artışa yol açmaktadır (Tardito ve Marchio 2009). Ayrıca bakır metali sahip olduğu pozitif yük sayesinde diğer metallerle kıyaslandığında daha fazla redoks tepkimelerinin gerçekleşmesine olanak sağlamaktadır (Duncan ve White 2012). Hücre içerisinde gerçekleşen redoks tepkimelerinde ise bir denge söz konusudur fakat bu dengenin sağlanması konusunda kanser hücreleri sağlıklı hücrelere kıyasla daha kırılgan bir özelliğe sahiptir (Tardito ve Marchio 2009). Elde edilen verilerde de bakır metali içeren schiff baz komplekslerinin sağlıklı hücrelere kıyasla kanser hücre hatları üzerinde daha etkili bir şekilde reaktif oksijen türevlerini oluşturduğu gözlenmiştir (Bölüm 3.4). Literatüre bakıldığında ise daha önce yapılan çalışmalarda reaktif oksijen türevlerini hedef alan çok sayıda bakır metali içeren schiff baz komplekslerinin sentezlendiği fakat

açıl hidrazon türevleri içeren schiff baz kompleksleri üzerine yapılan çalışmaların çok az sayıda olduğu gözlenmektedir (Duncan ve White 2012).

Schiff bazlarının kanser hücre hatları üzerinde reaktif oksijen türevlerinin miktarında artışa neden olduğu belirlendikten sonra kaspaz-3 aktivite ölçüm testi ile apoptotik etkileri belirlenmiştir (Bölüm 3.5). Aşırı miktarda reaktif oksijen türevlerinin oluşması çeşitli etkenler üzerinde aktivite sergileyerek hücreler üzerinde apoptotik uyarılara yol açabilir (Redza-Dutordoir ve Averill-Bates 2016). Çeşitli iç ve dış etkenler aracılığıyla gerçekleşen apoptoz ise hücrelerin farklı karakteristik özellikler sergilemesine neden olur (Güleş ve Eren 2008). Bu özellikler göz önünde bulundurularak da bugüne kadar hücrelerde meydana gelen apoptozu belirlemek adına çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Güleş ve Eren 2008). Bu yöntemlerden birisi olan kaspaz-3 yöntemi de en güvenilir yöntemlerden birisidir (Porter ve Jänicke 1999). Hücre içerisinde önemli olayların gerçekleşmesinde rol alan kaspaz-3 enzimi hem intrinsik hem ekstrinsik yolak aracılığıyla apoptozun gerçekleşmesinde görev üstlenmektedir ve aynı zamanda apoptozun meydana geldiğini gösteren bir belirteç rolü oynamaktadır (Porter ve Jänicke 1999, Banerjee vd. 2016). Kaspaz-3 aktivite ölçüm testinde elde edilen veriler; test edilen diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında en fazla apoptotik etkinin BK2X kompleksinde en az etkinin ise BK2 kompleksinde olduğu gözlenmiştir (Bölüm 3.5). Bunun nedeni ise BK2X kompleksinin diğer bileşiklere kıyasla daha fazla reaktif oksijen türevlerinin oluşmasına neden olmasıdır ve bu da hücrelerin apoptoza sürüklenmesi üzerinde etki göstermektedir. Ayrıca schiff bazlarının geçiş metallerinin, sadece reaktif oksijen türevleri üzerinden değil aynı zamanda DNA ile oldukça kolay etkileşime geçtiklerinden dolayı hücreleri apoptoza sürüklediği daha önce yapılan çalışmalarla da kanıtlanmıştır (Yu vd. 2016). Silveira ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmalarda sentezlenen schiff bazlarının DNA ile etkileşime geçerek, hücreler üzerinde apoptoza neden olduğu belirtilmiştir (da Silveira vd. 2008). Bir diğer çalışma ise; Konarikavo ve arkadaşlarının schiff bazlarının bakır metali ile oluşturdukları kompleksler üzerinedir ve yapılan çalışmada sentezlenen schiff baz komplekslerinin hem DNA üzerinde etki göstererek, hem de reaktif oksijen türevlerinin oluşmasına yol açarak hücreler üzerinde apoptotik etkiye neden olduğu bildirilmiştir (Konarikova vd. 2013). Elde edilen verilerde test bileşikleri; T47-D hücre hattı üzerinde daha fazla apoptotik etki sergilemesinin yanı sıra hem T47-D hücre hattı üzerinde, hem de ileri

safhada meme kanseri olan HCC1428 hücre hattı üzerinde apoptotik etkiye yol açtığı gözlenmiştir. Ayrıca test edilen maddelerin kanser hücre hatları üzerinde gösterdikleri apoptotik etkisinin sağlıklı hücre hatlarına göre daha fazla olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Sonuç olarak; meme kanseri üzerinde anti kanser aktiviteleri test edilen ligantların kanser hücre hatları üzerinde oldukça etkili oldukları gözlenmiştir ve bu ligantların geçiş metalleri ile oluşturdukları komplekslerle kıyaslandığında ise geçiş metallerinin anti kanser aktivitelerini arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır. Bakır metalini içeren BK1X ve BK2X komplekslerinin kanser hücre hatları üzerinde ligantlara kıyasla hem daha fazla reaktif oksijen türevlerinin oluşmasına yol açmakta hem de toksik olmayan dozları daha fazla apoptotik etkiye neden olmaktadır. Bu nedenle sentezlenen schiff bazları ve açıl hidrazon türevlerinin farklı geçiş metalleri ile oluşturdukları kompleksler kemoterapi tedavilerinde kullanılması açısından daha fazla umut vaat etmektedir. Ayrıca normal hücrelerin kanserli hücrelere dönüşmesinde tek bir sebep olmadığı gibi kemoterapi tedavilerinde tek bir metaboliti ve ya tek bir mekanizmayı hedef alan anti kanser ajanlar geliştirmek yerine birçok mekanizma üzerinde etki göstererek kanser hücreleri üzerinde aktivite sergileyen anti kanser ajanlar geliştirmek gereklidir. Bu konuda da eşsiz özelliklere sahip olan schiff bazlarının, geçiş metalleri ve açıl hidrazon türevleriyle oluşturdukları kompleksler önem arz etmelerinin yanı sıra bu bileşiklerin etki ettikleri mekanizmalar üzerine daha fazla araştırma yapılması faydalı olacaktır.

KAYNAKÇA

- Abbas, H.-A.S., Al-Marhabi, A.R., Eissa, S.I., Ammar, Y.A. (2015). Molecular modeling studies and synthesis of novel quinoxaline derivatives with potential anticancer activity as inhibitors of c-met kinase. *Bioorganic & medicinal chemistry* 23, 6560-6572.
- Abdel-Rahman, L.H., Abu-Dief, A.M., Newair, E.F., Hamdan, S.K. (2016). Some new nano-sized cr (iii), fe (ii), co (ii), and ni (ii) complexes incorporating 2-((e)-(pyridine-2-ylimino) methyl) naphthalen-1-ol ligand: Structural characterization, electrochemical, antioxidant, antimicrobial, antiviral assessment and DNA interaction. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 160, 18-31.
- Aboul-Fadl, T., Radwan, A.A., Attia, M.I., Al-Dhfyan, A., Abdel-Aziz, H.A. (2012). Schiff bases of indoline-2, 3-dione (isatin) with potential antiproliferative activity. *Chemistry Central Journal* 6, 49.
- Acilan, C., Cevatemre, B., Adiguzel, Z., Karakas, D., Ulukaya, E., Ribeiro, N., Correia, I., Pessoa, J.C. (2016). Validation data supporting the characterization of novel copper complexes as anticancer agents. *Data in Brief* 9, 1160-1174.
- Ahmadian, M., Wistuba, I.I., Fong, K.M., Behrens, C., Kodagoda, D.R., Saboorian, M.H., Shay, J., Tomlinson, G.E., Blum, J., Minna, J.D. (1997). Analysis of the fhit gene and fra3b region in sporadic breast cancer, preneoplastic lesions, and familial breast cancer probands. *Cancer research* 57, 3664-3668.
- Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten, C., Pijnenborg, R. (2007). The use of alamar blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human reproduction* 22, 1304-1309.
- Alexander, H., Mauck, K., Whitfield, A., Garrett, K., Malmstrom, C. (2014). Plant-virus interactions and the agro-ecological interface. *European journal of plant pathology* 138, 529-547.
- Alfarouk, K.O., Stock, C.-M., Taylor, S., Walsh, M., Muddathir, A.K., Verduzco, D., Bashir, A.H., Mohammed, O.Y., Elhassan, G.O., Harguindey, S. (2015). Resistance to cancer chemotherapy: Failure in drug response from adme to p-gp. *Cancer cell international* 15, 71.

- Andreini, M., Banner, D., Guba, W., Hilpert, H., Mauser, H., Mayweg, A.V., Narquizian, R., Power, E., Rogers-Evans, M., Travagli, M. (2012). 3-amino-5-phenyl-5, 6-dihydro-2h-[1, 4] oxazines. Google Patents
- Ansari, I.A., Sama, F., Raizada, M., Shahid, M., Rajpoot, R.K., Siddiqi, Z.A. (2017). Synthesis and spectral characterization of 2-((2-hydroxybenzylidene) amino)-2-methylpropane-1, 3-diol derived complexes: Molecular docking and antimicrobial studies. *Journal of Molecular Structure* 1127, 479-488.
- Arafath, M.A., Adam, F., Razali, M.R., Hassan, L.E.A., Ahamed, M.B.K., Majid, A.M.S. (2017). Synthesis, characterization and anticancer studies of ni (ii), pd (ii) and pt (ii) complexes with schiff base derived from n-methylhydrazinecarbothioamide and 2-hydroxy-5-methoxy-3-nitrobenzaldehyde. *Journal of Molecular Structure* 1130, 791-798.
- 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, 250-259.
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M. (1998). Death receptors: Signaling and modulation. *Science* 281, 1305.
- Aye, Y., Li, M., Long, M., Weiss, R. (2015). Ribonucleotide reductase and cancer: Biological mechanisms and targeted therapies. *Oncogene* 34, 2011-2021.
- Banerjee, K., Basu, S., Das, S., Sinha, A., Biswas, M.K., Choudhuri, S.K. (2016). Induction of intrinsic and extrinsic apoptosis through oxidative stress in drug-resistant cancer by a newly synthesized schiff base copper chelate. *Free radical research* 50, 426-446.
- Behrend, L., Henderson, G., Zwacka, R. (2003). Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochemical Society Transactions* 31, 1441-1444.
- Bharti, S.K., Nath, G., Tilak, R., Singh, S. (2010). Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel schiff bases containing 2, 4-disubstituted thiazole ring. *European journal of medicinal chemistry* 45, 651-660.
- Breen, A.P., Murphy, J.A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free radical Biology and medicine* 18, 1033-1077.
- Brodowska, K., Correia, I., Garribba, E., Marques, F., Klewicka, E., Łodyga-Chruscińska, E., Pessoa, J.C., Dzeikala, A., Chrusciński, L. (2016). Coordination ability and

- biological activity of a naringenin thiosemicarbazone. *Journal of inorganic biochemistry* 165, 36-48.
- Brown, N.S., Bicknell, R. (2001). Hypoxia and oxidative stress in breast cancer oxidative stress-its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast cancer research* 3, 323.
- Bruijninx, P.C., Sadler, P.J. (2008). New trends for metal complexes with anticancer activity. *Current opinion in chemical biology* 12, 197-206.
- Chabner, B.A., Roberts, T.G. (2005). Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer* 5, 65-72.
- Chacko, S., Samanta, S. (2017). A novel approach towards design, synthesis and evaluation of some schiff base analogues of 2-aminopyridine and 2-aminobenzothiazole against hepatocellular carcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 89, 162-176.
- Chang, H.-Q., Jia, L., Xu, J., Zhu, T.-F., Xu, Z.-Q., Chen, R.-H., Ma, T.-L., Wang, Y., Wu, W.-N. (2016). Syntheses, crystal structures, anticancer activities of three reduce schiff base ligand based transition metal complexes. *Journal of Molecular Structure* 1106, 366-372.
- Chang, H.Y., Yang, X. (2000). Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases. *Microbiology and molecular biology reviews* 64, 821-846.
- Chauthe, S.K., Mahajan, S., Rachamalla, M., Tikoo, K., Singh, I.P. (2015). Synthesis and evaluation of linear furanocoumarins as potential anti-breast and anti-prostate cancer agents. *Medicinal Chemistry Research* 24, 2476-2484.
- Cheng, K., Zheng, Q.-Z., Hou, J., Zhou, Y., Liu, C.-H., Zhao, J., Zhu, H.-L. (2010). Synthesis, molecular modeling and biological evaluation of psb as targeted antibiotics. *Bioorganic & medicinal chemistry* 18, 2447-2455.
- Chicheportiche, Y., Bourdon, P.R., Xu, H., Hsu, Y.-M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I., Browning, J.L. (1997). Tweak, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 272, 32401-32410.
- Chohan, Z.H., Pervez, H., Rauf, A., Khan, K.M., Maharvi, G.M., Supuran, C.T. (2004). Antibacterial and antifungal mono-and di-substituted symmetrical and unsymmetrical triazine-derived schiff-bases and their transition metal complexes. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 19, 161-168.

- Chu, T.-s., Lü, R., Liu, B.-t. (2016). Reversibly monitoring oxidation and reduction events in living biological systems: Recent development of redox-responsive reversible nir biosensors and their applications in in vitro/in vivo fluorescence imaging. *Biosensors and Bioelectronics* 86, 643-655.
- Chung, Y.M., Bae, Y.S., Lee, S.Y. (2003). Molecular ordering of ros production, mitochondrial changes, and caspase activation during sodium salicylate-induced apoptosis. *Free radical Biology and medicine* 34, 434-442.
- Clarke, S.J., Jackman, A.L., Harrap, K.R. (1991). Antimetabolites in cancer chemotherapy In *Purine and pyrimidine metabolism in man vii*, pp. 7-13: Springer
- Coelho, R., Da Silva, F., Do Carmo, I., Bonaccorsi, B., Hahn, S., Faroni, L. (2017). Is there a role for salvage radiotherapy in locally advanced breast cancer refractory to neoadjuvant chemotherapy? *The Breast* 31, 192-196.
- Cory, S., Adams, J.M. (2002). The bcl2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* 2, 647-656.
- Covarrubias, L., Hernández-García, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E., Castro-Obregón, S. (2008). Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? *Developmental biology* 320, 1-11.
- Da Silva, C.M., da Silva, D.L., Modolo, L.V., Alves, R.B., de Resende, M.A., Martins, C.V., de Fátima, Â. (2011). Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. *Journal of Advanced research* 2, 1-8.
- Da Silveira, V.C., Luz, J.S., Oliveira, C.C., Graziani, I., Ciriolo, M.R., da Costa Ferreira, A.M. (2008). Double-strand DNA cleavage induced by oxindole-schiff base copper (ii) complexes with potential antitumor activity. *Journal of inorganic biochemistry* 102, 1090-1103.
- Daiber, A., Oelze, M., Steven, S., Kröller-Schön, S., Münzel, T. (2017). Taking up the cudgels for the traditional reactive oxygen and nitrogen species detection assays and their use in the cardiovascular system. *Redox Biology*
- Das, K., Datta, A., Beyene, B.B., Massera, C., Garribba, E., Sinha, C., Akitsu, T., Tanka, S. (2017). A zig-zag end-to-end azido bridged mn iii 1-d coordination polymer: Spectral elucidation, magnetism, redox study and biological activity. *Polyhedron* 127, 315-322.

- Deodware, S., Sathe, D., Choudhari, P., Lokhande, T., Gaikwad, S. (2016). Development and molecular modeling of co (ii), ni (ii) and cu (ii) complexes as high acting anti breast cancer agents. *Arabian Journal of Chemistry*
- Dhahagani, K., Kumar, S.M., Chakkaravarthi, G., Anitha, K., Rajesh, J., Ramu, A., Rajagopal, G. (2014). Synthesis and spectral characterization of schiff base complexes of cu (ii), co (ii), zn (ii) and vo (iv) containing 4-(4-aminophenyl) morpholine derivatives: Antimicrobial evaluation and anticancer studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 117, 87-94.
- Dickinson, B.C., Srikun, D., Chang, C.J. (2010). Mitochondrial-targeted fluorescent probes for reactive oxygen species. *Current opinion in chemical biology* 14, 50-56.
- Dizdaroglu, M. (1992). Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutation Research/DNAging* 275, 331-342.
- Doğan, A., Demirci, S., Türkmen, N.B., Çağlayan, A.B., Aydın, S., Telci, D., Kılıç, E., Şahin, K., Orhan, C., Tuzcu, M. (2016). Schiff base-poloxamer p85 combination prevents prostate cancer progression in c57/bl6 mice. *The Prostate* 76, 1454-1463.
- Duan, J.J., Bauer, L.S., Abell, K.J., Ulyshen, M.D., Van Driesche, R.G. (2015). Population dynamics of an invasive forest insect and associated natural enemies in the aftermath of invasion: Implications for biological control. *Journal of Applied Ecology* 52, 1246-1254.
- Dube, B.N.R., Marshall, T.P., Ryan, R.P. (2016). Predictors of human immunodeficiency virus (hiv) infection in primary care: A systematic review protocol. *Systematic Reviews* 5, 158.
- Duncan, C., White, A.R. (2012). Copper complexes as therapeutic agents. *Metallomics* 4, 127-138.
- Ekert, P., Silke, J., Vaux, D. (1999). Caspase inhibitors. *Cell death and differentiation* 6, 1081-1086.
- El-Faham, A., Soliman, S.M., Ghabbour, H.A., Elnakady, Y.A., Mohaya, T.A., Siddiqui, M.R., Albericio, F. (2016). Ultrasonic promoted synthesis of novel s-triazine-schiff base derivatives; molecular structure, spectroscopic studies and their preliminary anti-proliferative activities. *Journal of Molecular Structure* 1125, 121-135.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35, 495-516.

- Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical Biology and medicine* 11, 81-128.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., De Laurenzi, V. (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)* 4, 330-349.
- Feitelson, M.A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R.J., Blain, S.W., Holcombe, R.F., Mahajna, J., Marino, M., Martinez-Chantar, M.L., Nawroth, R., Sanchez-Garcia, I. (Year) Published. *Seminars in cancer biology* 2015, 35: S25-S54. Elsevier.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in globocan 2012. *International journal of cancer* 136, E359-E386.
- Ferreira, I.P., Piló, E.D., Recio-Despaigne, A.A., Da Silva, J.G., Ramos, J.P., Marques, L.B., Prazeres, P.H., Takahashi, J.A., Souza-Fagundes, E.M., Rocha, W. (2016). Bismuth (iii) complexes with 2-acetylpyridine-and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones: Antimicrobial and cytotoxic activities and effects on the clonogenic survival of human solid tumor cells. *Bioorganic & medicinal chemistry* 24, 2988-2998.
- Fine, J.H., Chen, P., Mesci, A., Allan, D.S., Gasser, S., Raulet, D.H., Carlyle, J.R. (2010). Chemotherapy-induced genotoxic stress promotes sensitivity to natural killer cell cytotoxicity by enabling missing-self recognition. *Cancer research* 70, 7102-7113.
- Florea, A.-M., Büsselberg, D. (2011). Cisplatin as an anti-tumor drug: Cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers* 3, 1351-1371.
- Forcados, G.E., James, D.B., Sallau, A.B., Muhammad, A., Mabeta, P. (2017). Oxidative stress and carcinogenesis: Potential of phytochemicals in breast cancer therapy. *Nutrition and Cancer*, 1-10.
- Fotakis, G., Timbrell, J.A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of ldh, neutral red, mtt and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters* 160, 171-177.
- Frączek, N., Bronisz, I., Pietryka, M., Kępińska, D., Strzała, P., Mielnicka, K., Korga, A., Dudka, J. (2016). An outline of main factors of drug resistance influencing cancer therapy. *Journal of Chemotherapy* 28, 457-464.

- Freire, Á.M., Braga, H.A., Braga, A.A., Neto, M.L.R. (2015). Hope and pediatric cancer. *International archives of medicine* 8
- Frezza, M., Hindo, S., Chen, D., Davenport, A., Schmitt, S., Tomco, D., Ping Dou, Q. (2010). Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Current pharmaceutical design* 16, 1813-1825.
- Fricker, S.P. (2007). Metal based drugs: From serendipity to design. *Dalton Transactions*, 4903-4917.
- Gabellieri, E., Guba, W., Hilpert, H., Mauser, H., Mayweg, A.V., Rogers-Evans, M., Rombach, D., Thomas, A., Woltering, T., Wostl, W. (2014). 1, 4-oxazepines as bace1 and/or bace2 inhibitors. Google Patents
- Ganesan, S., Lingeshwaran, S. (2017). A biophysical model of tumor invasion. *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation* 46, 135-152.
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P., Didelot, C., Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death & Differentiation* 13, 1423-1433.
- Gazdar, A.F., Kurvari, V., Virmani, A., Gollahon, L., Sakaguchi, M., Westerfield, M., Kodagoda, D., Stasny, V., Cunningham, H.T., Wistuba, I.I. (1998). Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *International journal of cancer* 78, 766-774.
- Gieseg, S., Duggan, S., Gebicki, J.M. (2000). Peroxidation of proteins before lipids in u937 cells exposed to peroxy radicals. *Biochemical Journal* 350, 215-218.
- Gomathi, R., Ramu, A., Murugan, A. (2014). Evaluation of DNA binding, cleavage, and cytotoxic activity of cu (ii), co (ii), and ni (ii) schiff base complexes of 1-phenylindoline-2, 3-dione with isonicotinohydrazide. *Bioinorganic chemistry and applications* 2014
- Grisold, W., Grisold, A., Löscher, W. (2016). Neuromuscular complications in cancer. *Journal of the Neurological Sciences* 367, 184-202.
- Gup, R., Gökçe, C., Aktürk, S. (2015). Copper (ii) complexes with 4-hydroxyacetophenone-derived acylhydrazones: Synthesis, characterization, DNA binding and cleavage properties. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 134, 484-492.
- Gupte, A., Mumper, R.J. (2009). Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer treatment reviews* 35, 32-46.

- Güleş, Ö., Eren, Ü. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *YY Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi* 2, 73-78.
- Güngör, Ö., Gürkan, P. (2010). Synthesis and spectroscopic properties of novel asymmetric schiff bases. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 77, 304-311.
- Hajrezaie, M., Hassandarvish, P., Moghadamtousi, S.Z., Gwaram, N.S., Golbabapour, S., NajiHussien, A., Almagami, A.A., Zahedifard, M., Rouhollahi, E., Karimian, H. (2014). Chemopreventive evaluation of a schiff base derived copper (ii) complex against azoxymethane-induced colorectal cancer in rats. *PloS one* 9, e91246.
- Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants–quo vadis? *Trends in pharmacological sciences* 32, 125-130.
- Hameed, A., al-Rashida, M., Uroos, M., Ali, S.A., Khan, K.M. (2016). Schiff bases in medicinal chemistry: A patent review (2010-2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 1-17.
- Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., Bullock, P. (2004). Comparison of alamar blue and mtt assays for high through-put screening. *Toxicology in vitro* 18, 703-710.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *cell* 144, 646-674.
- Harney, A.S., Lee, J., Manus, L.M., Wang, P., Ballweg, D.M., LaBonne, C., Meade, T.J. (2009). Targeted inhibition of snail family zinc finger transcription factors by oligonucleotide-co (iii) schiff base conjugate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 13667-13672.
- Harris, Z.L., Gitlin, J.D. (1996). Genetic and molecular basis for copper toxicity. *The American journal of clinical nutrition* 63, 836S-841S.
- Hartwig, A. (2001). Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: Differential effects on structure and function. *Antioxidants and Redox Signaling* 3, 625-634.
- Hill, M.M., Adrain, C., Duriez, P.J., Creagh, E.M., Martin, S.J. (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native apaf-1 apoptosomes. *The EMBO journal* 23, 2134-2145.

- Holoch, P.A., Griffith, T.S. (2009). Tnf-related apoptosis-inducing ligand (trail): A new path to anti-cancer therapies. *European journal of pharmacology* 625, 63-72.
- Hong, M., Geng, H., Niu, M., Wang, F., Li, D., Liu, J., Yin, H. (2014). Organotin (iv) complexes derived from schiff base n'-[(1e)-(2-hydroxy-3-methoxyphenyl)methylidene] pyridine-4-carbohydrazone: Synthesis, in vitro cytotoxicities and DNA/bsa interaction. *European journal of medicinal chemistry* 86, 550-561.
- HoSHI, H., McKeehan, W.L. (1984). Brain-and liver cell-derived factors are required for growth of human endothelial cells in serum-free culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81, 6413-6417.
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: An overview. *Cancers* 6, 1769-1792.
- Hsu, D.C., Roth, H.S., West, D.C., Botham, R.C., Novotny, C.J., Schmid, S.C., Hergenrother, P.J. (2011). Parallel synthesis and biological evaluation of 837 analogues of procaspase-activating compound 1 (pac-1). *ACS combinatorial science* 14, 44-50.
- Hunter, A.M., LaCasse, E.C., Korneluk, R.G. (2007). The inhibitors of apoptosis (iaps) as cancer targets. *Apoptosis* 12, 1543-1568.
- Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G., Minick, C.R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *Journal of Clinical Investigation* 52, 2745.
- Jarrahpour, A., Khalili, D., De Clercq, E., Salmi, C., Brunel, J.M. (2007). Synthesis, antibacterial, antifungal and antiviral activity evaluation of some new bis-schiff bases of isatin and their derivatives. *Molecules* 12, 1720-1730.
- Jeanguenat, A. (2013). The story of a new insecticidal chemistry class: The diamides. *Pest management science* 69, 7-14.
- Jerome, K.R., Sloan, D., Aubert, M. (2003). Measurement of ctl-induced cytotoxicity: The caspase 3 assay. *Apoptosis* 8, 563-571.
- Joshi, P., Kumar, D. (2014). Metal complexes of biological active 2-aminothiazole derived ligands. *Russian Journal of Coordination Chemistry* 40, 445-459.
- Joshi, S.D., Kumar, D., Dixit, S.R., Tigadi, N., More, U.A., Lherbet, C., Aminabhavi, T.M., Yang, K.S. (2016). Synthesis, characterization and antitubercular activities of novel pyrrolyl hydrazones and their cu-complexes. *European journal of medicinal chemistry* 121, 21-39.

- Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.-Y.M., Ravagnan, L. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549-554.
- Karmakar, I., Mandal, S., Mitra, A. (2015). Evaluation of antimicrobial and insect repellent properties of two novel zinc (ii), and nickel (ii) complexes containing a tetradentate schiff base. *Journal of Integrated Science and Technology* 3, 60-67.
- Kascheres, C.M. (2003). The chemistry of enaminones, diazocarbonyls and small rings: Our contribution. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 14, 945-969.
- Kazemi, Z., Rudbari, H.A., Sahihi, M., Mirkhani, V., Moghadam, M., Tangestaninejad, S., Mohammadpoor-Baltork, I., Azimi, G., Gharaghani, S., Kajani, A.A. (2016). Synthesis, characterization and separation of chiral and achiral diastereomers of schiff base pd (ii) complex: A comparative study of their DNA-and hsa-binding. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 163, 246-260.
- Kenawy, E., Abdel-Hay, F., Mohy Eldin, M., Tamer, T., Ibrahim, E. (2015). Novel aminated chitosan-aromatic aldehydes schiff bases: Synthesis, characterization and bio-evaluation. *Int. J. of Adv. Res* 3, 563-572.
- Kerr, J.F., Winterford, C.M., Harmon, B.V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73, 2013-2026.
- Keydar, I., Chen, L., Karby, S., Weiss, F., Delarea, J., Radu, M., Chaitcik, S., Brenner, r.H. (1979). Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *European Journal of Cancer (1965)* 15, 659-670.
- Kiran, T., Prasanth, V.G., Balamurali, M., Vasavi, C., Munusami, P., Sathiyarayanan, K.I., Pathak, M. (2015). Synthesis, spectroscopic characterization and in vitro studies of new heteroleptic copper (ii) complexes derived from 2-hydroxy naphthaldehyde schiff's bases and n, n donor ligands: Antimicrobial, DNA binding and cytotoxic investigations. *Inorganica Chimica Acta* 433, 26-34.
- Kischkel, F., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P., Peter, M. (1995). Cytotoxicity-dependent apo-1 (fas/cd95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (disc) with the receptor. *The EMBO journal* 14, 5579.
- Koiri, R.K., Trigun, S.K., Dubey, S.K., Singh, S., Mishra, L. (2008). Metal cu (ii) and zn (ii) bipyridyls as inhibitors of lactate dehydrogenase. *Biometals* 21, 117-126.

- Konarikova, K., Andrezalova, L., Raptá, P., Slovakova, M., Durackova, Z., Laubertova, L., Gbelcova, H., Danisovic, L., Bohmer, D., Ruml, T. (2013). Effect of the schiff base complex diaqua-(n-salicylidene-l-glutamato) copper (ii) monohydrate on human tumor cells. *European journal of pharmacology* 721, 178-184.
- Koori, H. (2014). Near infrared fluorescent imaging agent. Google Patents
- Kostova, I., Saso, L. (2013). Advances in research of schiff-base metal complexes as potent antioxidants. *Current medicinal chemistry* 20, 4609-4632.
- Kovacic, P. (2006). Novel electrochemical approach to enhanced toxicity of 4-oxo-2-nonenal vs. 4-hydroxy-2-nonenal (role of imine): Oxidative stress and therapeutic modalities. *Medical hypotheses* 67, 151-156.
- Krempl, C., Heidel-Fischer, H.M., Jiménez-Alemán, G.H., Reichelt, M., Menezes, R.C., Boland, W., Vogel, H., Heckel, D.G., Joußen, N. (2016). Gossypol toxicity and detoxification in *helicoverpa armigera* and *heliopsis virescens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 78, 69-77.
- Kucukoglu, K., Tugrak, M., Demirtas, A., Sakagami, H., Gul, H. (2016). Synthesis and cytotoxic activity of (4-substituted-benzylidene)-(3-phenyl-1, 2, 4-oxadiazol-5-yl) methylamines. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 50, 234-238.
- Kumar, A., Kumar, N., Roy, P., Sondhi, S., Sharma, A. (2015). Microwave-assisted synthesis of benzenesulfonohydrazide and benzenesulfonamide cyclic imide hybrid molecules and their evaluation for anticancer activity. *Medicinal Chemistry Research* 24, 3760-3771.
- Kumar, K.S., Ganguly, S., Veerasamy, R., De Clercq, E. (2010). Synthesis, antiviral activity and cytotoxicity evaluation of schiff bases of some 2-phenyl quinazoline-4 (3) h-ones. *European journal of medicinal chemistry* 45, 5474-5479.
- Kumar, S., Dhar, D.N., Saxena, P. (2009). Applications of metal complexes of schiff bases-a review. *Journal of scientific and industrial research* 68, 181-187.
- LaCasse, E.C., Baird, S., Korneluk, R.G., MacKenzie, A.E. (1998). The inhibitors of apoptosis (iaps) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 17, 3247-3260.
- Lancaster, M.V., Fields, R.D. (1996). Antibiotic and cytotoxic drug susceptibility assays using resazurin and poisoning agents. Google Patents
- Lander, T.A., Klein, E.K., Oddou-Muratorio, S., Candau, J.-N., Gidoin, C., Chalon, A., Roig, A., Fallour, D., Auger-Rozenberg, M.-A., Boivin, T. (2014). Reconstruction of a

- windborne insect invasion using a particle dispersal model, historical wind data, and bayesian analysis of genetic data. *Ecology and evolution* 4, 4609.
- Laurell, G., Jungnelius, U. (1990). High-dose cisplatin treatment: Hearing loss and plasma concentrations. *The Laryngoscope* 100, 724-734.
- Lavrik, I.N., Golks, A., Krammer, P.H. (2005). Caspases: Pharmacological manipulation of cell death. *The Journal of clinical investigation* 115, 2665-2672.
- Leblond, B., Taverne, T., Beausoleil, E., Chauvignac, C., Casagrande, A.-S., Desire, L. (2011). Substituted isoquinolines and their use as tubulin polymerization inhibitors. Google Patents
- Lee, S.K., Tan, K.W., Ng, S.W. (2016). Topoisomerase i inhibition and DNA cleavage by zinc, copper, and nickel derivatives of 2-[2-bromoethyliminomethyl]-4-[ethoxymethyl] phenol complexes exhibiting anti-proliferation and anti-metastasis activity. *Journal of inorganic biochemistry* 159, 14-21.
- Lewis, W. (1921). Smooth muscle and endothelium in tissue culture. *Anat. Rec* 21, 72.
- Li, L.Y., Luo, X., Wang, X. (2001). Endonuclease g is an apoptotic dnase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
- Li, M., Gou, Y., Yang, F., Liang, H. (2014). DNA binding, cytotoxicity and apoptosis induction activity of a mixed-ligand copper (ii) complex with taurine schiff base and imidazole. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 128, 686-693.
- Li, Y., Zhao, J., He, C.-C., Zhang, L., Sun, S.-R., Xu, G.-C. (2015). Synthesis, crystal structure and biological activity of two mn complexes with 4-acyl pyrazolone derivatives. *Journal of inorganic biochemistry* 150, 28-37.
- Liou, G.-Y., Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free radical research* 44, 479-496.
- Liu, X.-H., Zhao, W., Shen, Z.-H., Xing, J.-H., Xu, T.-M., Peng, W.-L. (2017). Synthesis, nematocidal activity and sar study of novel difluoromethylpyrazole carboxamide derivatives containing flexible alkyl chain moieties. *European journal of medicinal chemistry* 125, 881-889.
- Louzao, M.C., Ares, I.R., Cagide, E., Espiña, B., Vilariño, N., Alfonso, A., Vieytes, M.R., Botana, L.M. (2011). Palytoxins and cytoskeleton: An overview. *Toxicon* 57, 460-469.

- Lukong, K.E. (2017). Understanding breast cancer–the long and winding road. *BBA clinical*
- Luo, R., Fang, D., Chu, P., Wu, H., Zhang, Z., Tang, Z. (2016). Multiple molecular targets in breast cancer therapy by betulinic acid. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 84, 1321-1330.
- Luong, D., Kesharwani, P., Killinger, B.A., Moszczynska, A., Sarkar, F.H., Padhye, S., Rishi, A.K., Iyer, A.K. (2016). Solubility enhancement and targeted delivery of a potent anticancer flavonoid analogue to cancer cells using ligand decorated dendrimer nano-architectures. *Journal of Colloid and Interface Science* 484, 33-43.
- Luqmani, Y. (2005). Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Medical Principles and Practice* 14, 35-48.
- Mahmoud, W.H., Deghadi, R.G., Mohamed, G.G. (2016). Spectroscopic and thermal characterization of biologically and anticancer active novel schiff base metal complexes. *Research on Chemical Intermediates* 42, 7869-7907.
- Mak, T. (2003). The e. Donnall thomas lecture apoptosis:“tis death that makes life live”. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 9, 483-488.
- Manjunath, M., Kulkarni, A.D., Bagihalli, G.B., Malladi, S., Patil, S.A. (2017). Bio-important antipyrine derived schiff bases and their transition metal complexes: Synthesis, spectroscopic characterization, antimicrobial, anthelmintic and DNA cleavage investigation. *Journal of Molecular Structure* 1127, 314-321.
- Maruthanila, V., Elancheran, R., Kunnumakkara, A., Kabilan, S., Kotoky, J. (2016). Recent development of targeted approaches for the treatment of breast cancer. *Breast Cancer*, 1-29.
- Maruyama, Y. (1963). The human endothelial cell in tissue culture. *Cell and Tissue Research* 60, 69-79.
- Marzano, C., Pellei, M., Tisato, F., Santini, C. (2009). Copper complexes as anticancer agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 9, 185-211.
- Miller, E.W., Bian, S.X., Chang, C.J. (2007). A fluorescent sensor for imaging reversible redox cycles in living cells. *Journal of the American Chemical Society* 129, 3458-3459.
- Mueller, H., Kassack, M.U., Wiese, M. (2004). Comparison of the usefulness of the mtt, atp, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *Journal of Biomolecular Screening* 9, 506-515.

- Muñoz-Pinedo, C. (2012). Signaling pathways that regulate life and cell death: Evolution of apoptosis in the context of self-defense In *Self and nonself*, pp. 124-143: Springer
- Muthal, B., Raut, B., Tekale, A. (2016). Synthesis and characterization of transition metal ion (coii, niii, cuii& znii) complexes of schiff bases derived from aminothiazole and their biological activity. *IJCS* 4, 78-82.
- Naik, G.N., Bakale, R.P., Pathan, A.H., Ligade, S.G., Desai, S.A., Gudasi, K.B. (2012). 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid derived schiff base and its lanthanide (iii) complexes: Synthesis, characterization, spectroscopic studies, and plant growth activity. *Journal of Chemistry* 2013
- Nanjundan, N., Narayanasamy, R., Butcher, R.J., Jasinski, J.P., Velmurugan, K., Nandhakumar, R., Balakumaran, M.D., Kalaichelvan, P.T., Gnanasoundari, V.G. (2017). Synthesis, crystal structure, biomolecular interactions and anticancer properties of ni (ii), cu (ii) and zn (ii) complexes bearing s-allyldithiocarbazate. *Inorganica Chimica Acta* 455, 283-297.
- Ng, K.W., Leong, D.T., Hutmacher, D.W. (2005). The challenge to measure cell proliferation in two and three dimensions. *Tissue Engineering* 11, 182-191.
- Nimse, S.B., Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances* 5, 27986-28006.
- Njogu, E.M., Omondi, B., Nyamori, V.O. (2017). Silver (i)-pyridinyl schiff base complexes: Synthesis, characterisation and antimicrobial studies. *Journal of Molecular Structure* 1135, 118-128.
- O'brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. (2000). Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* 267, 5421-5426.
- of Aguiar, A.C.V., of Moura, R.O., Mendonça, J.F.B., de Oliveira Rocha, H.A., Câmara, R.B.G., Schiavon, M.d.S.C. (2016). Evaluation of the antiproliferative activity of 2-amino thiophene derivatives against human cancer cells lines. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 84, 403-414.
- Onnis, V., Cocco, M.T., Fadda, R., Congiu, C. (2009). Synthesis and evaluation of anticancer activity of 2-arylamino-6-trifluoromethyl-3-(hydrazonocarbonyl) pyridines. *Bioorganic & medicinal chemistry* 17, 6158-6165.

- Ono, M., Kawakami, M., Ushikubo, H. (1987). Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line t47d. *Journal of Virology* 61, 2059-2062.
- Ortiz, S., Nelson, R., Kesternich, V., Perez-Fehrmann, M., Christen, P., Marcourt, L. (2016). Synthesis and antifungal activity of diaryl hydrazones from 2, 4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of the Chilean Chemical Society* 61, 3081-3084.
- Ott, I., Gust, R. (2007). Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs. *Archiv der Pharmazie* 340, 117-126.
- Owens, J.R., Salter, W.B., Simpson, K.M. (2013). Select schiff base compounds for chemical agent detoxification. Google Patents
- Öniz, H. (2004). Apoptoz: Ölmeye yatmak. *SSK Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi* 14
- Özdemir, A., Mustafa, A. (2009). Rho kinaz ve apoptoz. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2
- Padanilam, B.J. (2003). Cell death induced by acute renal injury: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 284, F608-F627.
- Palermo, G., Magistrato, A., Riedel, T., Von Erlach, T., Davey, C.A., Dyson, P.J., Rothlisberger, U. (2015). Fighting cancer with transition metal complexes: From naked DNA to protein and chromatin targeting strategies. *ChemMedChem*
- Pang, X., Li, D., Peng, A. (2001). Application of rare-earth elements in the agriculture of china and its environmental behavior in soil. *Journal of Soils and Sediments* 1, 124.
- Parker, J.P., Ude, Z., Marmion, C.J. (2016). Exploiting developments in nanotechnology for the preferential delivery of platinum-based anti-cancer agents to tumours: Targeting some of the hallmarks of cancer. *Metallomics* 8, 43-60.
- Paul, A., Anbu, S., Sharma, G., Kuznetsov, M.L., Koch, B., da Silva, M.F.C.G., Pombeiro, A.J. (2015). Synthesis, DNA binding, cellular DNA lesion and cytotoxicity of a series of new benzimidazole-based schiff base copper (ii) complexes. *Dalton Transactions* 44, 19983-19996.
- Paulpandiyam, R., Raman, N. (2016). DNA binding propensity and nuclease efficacy of biosensitive schiff base complexes containing pyrazolone moiety: Synthesis and characterization. *Journal of Molecular Structure* 1125, 374-382.

- Pérez-Herrero, E., Fernández-Medarde, A. (2015). Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 93, 52-79.
- Pohanka, M. (2011). Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders: Implication and counteracting of melatonin. *Journal of Applied Biomedicine* 9, 185-196.
- Poonia, K., Siddiqui, S., Arshad, M., Kumar, D. (2016). In vitro anticancer activities of schiff base and its lanthanum complex. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 155, 146-154.
- Porter, A.G., Jänicke, R.U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and differentiation* 6, 99-104.
- Raman, N., Johnson Raja, S., Sakthivel, A. (2009). Transition metal complexes with schiff-base ligands: 4-aminoantipyrine based derivatives—a review. *Journal of Coordination Chemistry* 62, 691-709.
- Rampazzo, C., Tozzi, M.G., Dumontet, C., Jordheim, L.P. (2016). The druggability of intracellular nucleotide-degrading enzymes. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 77, 883-893.
- Rampersad, S.N. (2012). Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors* 12, 12347-12360.
- Ranjan, R., Esimbekova, E.N., Kratasyuk, V.A. (2017). Rapid biosensing tools for cancer biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics* 87, 918-930.
- Redza-Dutordoir, M., Averill-Bates, D.A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1863, 2977-2992.
- Rohn, T.T. (2010). The role of caspases in alzheimer's disease; potential novel therapeutic opportunities. *Apoptosis* 15, 1403-1409.
- Rosenberg, B., Vancamp, L. (1969). Platinum compounds: A new class of potent antitumour agents. *Nature* 222, 385-386
- Rudbari, H.A., Iravani, M.R., Moazam, V., Askari, B., Khorshidifard, M., Habibi, N., Bruno, G. (2016). Synthesis, characterization, x-ray crystal structures and antibacterial activities of schiff base ligands derived from allylamine and their vanadium (iv),

- cobalt (iii), nickel (ii), copper (ii), zinc (ii) and palladium (ii) complexes. *Journal of Molecular Structure* 1125, 113-120.
- Rudrapal, M., De, B., Devanna, N. (2012). Synthesis and antimicrobial activity of some novel schiff's bases of 4-methyl-2-thiazolamine. *Anti-Infective Agents* 10, 72-74.
- Ruiz-Azuara, L., E Bravo-Gomez, M. (2010). Copper compounds in cancer chemotherapy. *Current medicinal chemistry* 17, 3606-3615.
- Saelens, X., Festjens, N., Walle, L.V., Van Gurp, M., van Loo, G., Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861-2874.
- Sahai, E. (2005). Mechanisms of cancer cell invasion. *Current opinion in genetics & development* 15, 87-96.
- Sakai, W., Swisher, E.M., Karlan, B.Y., Agarwal, M.K., Higgins, J., Friedman, C., Villegas, E., Jacquemont, C., Farrugia, D.J., Couch, F.J. (2008). Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in brca2-mutated cancers. *Nature* 451, 1116-1120.
- Scholthof, K.-B.G., Shaw, J.G., Zaitlin, M. (2000). Tobacco mosaic virus: One hundred years of contributions to virology.
- Schwarz, S., Csuk, R., Rauter, A. (2014). Microwave-assisted synthesis of novel purine nucleosides as selective cholinesterase inhibitors. *Organic & biomolecular chemistry* 12, 2446-2456.
- Serdjebi, C., Milano, G., Ciccolini, J. (2015). Role of cytidine deaminase in toxicity and efficacy of nucleosidic analogs. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 11, 665-672.
- Shams, H.Z., Mohareb, R.M., Helal, M.H., Mahmoud, A.E.-S. (2011). Design and synthesis of novel antimicrobial acyclic and heterocyclic dyes and their precursors for dyeing and/or textile finishing based on 2-n-acylamino-4, 5, 6, 7-tetrahydro-benzo [b] thiophene systems. *Molecules* 16, 6271-6305.
- Shapira, A., Livney, Y.D., Broxterman, H.J., Assaraf, Y.G. (2011). Nanomedicine for targeted cancer therapy: Towards the overcoming of drug resistance. *Drug resistance updates* 14, 150-163.
- Shokohi-pour, Z., Chiniforoshan, H., Momtazi-borojeni, A.A., Notash, B. (2016). A novel schiff base derived from the gabapentin drug and copper (ii) complex: Synthesis,

- characterization, interaction with DNA/protein and cytotoxic activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 162, 34-44.
- Siems, W.G., Grune, T., Esterbauer, H. (1995). 4-hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine. *Life sciences* 57, 785-789.
- Simpson, J.A., Narita, S., Gieseg, S., Gebicki, S., Gebicki, J.M., Dean, R.T. (1992). Long-lived reactive species on free-radical-damaged proteins. *Biochemical Journal* 282, 621-624.
- Šimůnek, P., Macháček, V. (2010). The structure and tautomerism of azo coupled β -enaminones. *Dyes and Pigments* 86, 197-205.
- Singh, R.K., Singh, A.K., Siddiqui, S., Arshad, M., Jafri, A. (2017a). Synthesis, molecular structure, spectral analysis and cytotoxic activity of two new aroylhydrazones. *Journal of Molecular Structure*
- Singh, R.K., Singh, A.K., Siddiqui, S., Arshad, M., Jafri, A. (2017b). Synthesis, molecular structure, spectral analysis and cytotoxic activity of two new aroylhydrazones. *Journal of Molecular Structure* 1135, 82-97.
- Sledge Jr, G.W., Loehrer Sr, P.J., Roth, B.J., Einhorn, L.H. (1988). Cisplatin as first-line therapy for metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 6, 1811-1814.
- Storz, P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci* 10, 1881-1896.
- Susin, S.A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Prévost, M.-C. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *The Journal of experimental medicine* 192, 571-580.
- Taneja, N., Tjalkens, R., Philbert, M., Rehemtulla, A. (2001). Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system. *Oncogene* 20, 167.
- Tardito, S., Marchio, L. (2009). Copper compounds in anticancer strategies. *Current medicinal chemistry* 16, 1325-1348.
- Trachootham, D., Alexandre, J., Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ros-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? *Nature reviews Drug discovery* 8, 579-591.
- Tyler, G. (2004). Rare earth elements in soil and plant systems-a review. *Plant and soil* 267, 191-206.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 44-84.
- Van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 112-124.
- Velaei, K., Samadi, N., Barazvan, B., Soleimani Rad, J. (2016). Tumor microenvironment-mediated chemoresistance in breast cancer. *The Breast* 30, 92-100.
- Verma, G., Marella, A., Shaquiquzzaman, M., Akhtar, M., Ali, M.R., Alam, M.M. (2014). A review exploring biological activities of hydrazones. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences* 6, 69.
- Verma, M., Pandeya, S.N., Singh, K.N., Stables, J.P. (2004). Anticonvulsant activity of schiff bases of isatin derivatives. *ACTA PHARMACEUTICA-ZAGREB*- 54, 49-56.
- Vicini, P., Geronikaki, A., Incerti, M., Busonera, B., Poni, G., Cabras, C.A., La Colla, P. (2003). Synthesis and biological evaluation of benzo [d] isothiazole, benzothiazole and thiazole schiff bases. *Bioorganic & medicinal chemistry* 11, 4785-4789.
- Vogel, S., Kaufmann, D., Pojarová, M., Müller, C., Pfaller, T., Kühne, S., Bednarski, P.J., von Angerer, E. (2008). Aroyl hydrazones of 2-phenylindole-3-carbaldehydes as novel antimitotic agents. *Bioorganic & medicinal chemistry* 16, 6436-6447.
- Voloshin, T., Munster, M., Blatt, R., Shteingauz, A., Roberts, P.C., Schmelz, E.M., Giladi, M., Schneiderman, R.S., Zeevi, E., Porat, Y. (2016). Alternating electric fields (ttfields) in combination with paclitaxel are therapeutically effective against ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *International journal of cancer* 139, 2850-2858.
- Vyas, K.M., Pandya, J.H., Gupta, V.K., Jadeja, R. (2013). Studies on DNA binding behavior of biologically active cu (ii) complexes of schiff bases containing acyl pyrazolones and 2-ethanolamine. *Journal of Coordination Chemistry* 66, 1094-1106.
- Wagner, A.D., Grothe, W., Haerting, J., Kleber, G., Grothey, A., Fleig, W.E. (2006). Chemotherapy in advanced gastric cancer: A systematic review and meta-analysis based on aggregate data. *Journal of Clinical Oncology* 24, 2903-2909.
- Wajant, H. (2002). The fas signaling pathway: More than a paradigm. *Science* 296, 1635-1636.
- Wang, J., Niu, R. (2015). Fluoride and effects on caspases In *Fluorine*, pp. 327-336

- Wani, W.A., Baig, U., Shreaz, S., Shiekh, R.A., Iqbal, P.F., Jameel, E., Ahmad, A., Mohd-Setapar, S.H., Mushtaque, M., Hun, L.T. (2016). Recent advances in iron complexes as potential anticancer agents. *New Journal of Chemistry* 40, 1063-1090.
- Weaver, B.A., Cleveland, D.W. (2005). Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer cell* 8, 7-12.
- Wen, X., Yang, G., Mao, W., Thornton, A., Liu, J., Bast, R., Le, X. (2006). Her2 signaling modulates the equilibrium between pro-and antiangiogenic factors via distinct pathways: Implications for her2-targeted antibody therapy. *Oncogene* 25, 6986-6996.
- Wilson, P.M., Danenberg, P.V., Johnston, P.G., Lenz, H.-J., Ladner, R.D. (2014). Standing the test of time: Targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology* 11, 282-298.
- Wimberger, P., Roth, C., Pantel, K., Kasimir-Bauer, S., Kimmig, R., Schwarzenbach, H. (2011). Impact of platinum-based chemotherapy on circulating nucleic acid levels, protease activities in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of ovarian cancer patients. *International journal of cancer* 128, 2572-2580.
- Wolfe, M.S. (2001). Secretase targets for alzheimer's disease: Identification and therapeutic potential. *Journal of medicinal chemistry* 44, 2039-2060.
- Wu, H., Che, X., Zheng, Q., Wu, A., Pan, K., Shao, A., Wu, Q., Zhang, J., Hong, Y. (2014). Caspases: A molecular switch node in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Int J Biol Sci* 10, 1072-1083.
- Wu, Z., Tang, X., Jia, Z. (1984). Studies of rare earth elements on role of enhancing production in agriculture. I. Effect of rare earth elements on some physiological process in crop. *J. Chin. Rare Earth Soc* 2, 75-79.
- Wyllie, A. (1993). Apoptosis (the 1992 frank rose memorial lecture). *British Journal of Cancer* 67, 205.
- Xu, G., Abad, M.C., Connolly, P.J., Neeper, M.P., Struble, G.T., Springer, B.A., Emanuel, S.L., Pandey, N., Gruninger, R.H., Adams, M. (2008). 4-amino-6-arylamino-pyrimidine-5-carbaldehyde hydrazones as potent erbb-2/egfr dual kinase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 18, 4615-4619.
- Yadav, N., Kumar, S., Marlowe, T., Chaudhary, A., Kumar, R., Wang, J., O'malley, J., Boland, P., Jayanthi, S., Kumar, T. (2015). Oxidative phosphorylation-dependent

- regulation of cancer cell apoptosis in response to anticancer agents. *Cell death & disease* 6, e1969.
- Yan, M., Pang, L., Ma, T.-t., Zhao, C.-l., Zhang, N., Yu, B.-x., Xia, Y. (2015a). A novel schiff base zinc coordination compound inhibits proliferation and induces apoptosis of human osteosarcoma cells. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]* 35, 700-706.
- Yan, X., Xu, J., Wu, X., Zhang, Z., Zhang, X., Fan, Y., Bi, C. (2015b). Proteasome inhibition and cytostatic effects on human cancer cells by pyrazolone-enamines: A combined crystallographic, structural and computational study. *New Journal of Chemistry* 39, 2168-2180.
- Yang, H.W., Hwang, K.J., Kwon, H.C., Kim, H.S., Choi, K.W., Oh, K.S. (1998). Detection of reactive oxygen species (ros) and apoptosis in human fragmented embryos. *Human reproduction* 13, 998-1002.
- Yousuf, I., Arjmand, F. (2016). In vitro DNA binding profile of enantiomeric dinuclear cu (ii)/ni (ii) complexes derived from l-/d-histidine-terephthaldehyde reduced schiff base as potential chemotherapeutic agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 164, 83-95.
- Yu, H., Yang, Y., Li, Q., Ma, T., Xu, J., Zhu, T., Xie, J., Zhu, W., Cao, Z., Dong, K. (2016). Ternary dinuclear copper (ii) complexes of a reduced schiff base ligand with diimine coligands: DNA binding, cytotoxic cell apoptosis, and apoptotic mechanism. *Chemical biology & drug design* 87, 398-408.
- Zamble, D.B., Lippard, S.J. (1995). Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends in biochemical sciences* 20, 435-439.
- Zeng, F., Tian, H.E., Wang, Z., An, Y., Gao, F., Zhang, L., Li, F., Shan, L. (2003). Effect of rare earth element europium on amaranthin synthesis in amarathus caudatus seedlings. *Biological trace element research* 93, 271-282.
- Zhang, B., Li, L., Liu, Y., Wang, Q. (2016a). Antiviral mechanism study of gossypol and its schiff base derivatives based on reactive oxygen species (ros). *RSC Advances* 6, 87637-87648.
- Zhang, Z., Gou, Y., Wang, J., Yang, K., Qi, J., Zhou, Z., Liang, S., Liang, H., Yang, F. (2016b). Four copper (ii) compounds synthesized by anion regulation: Structure, anticancer function and anticancer mechanism. *European journal of medicinal chemistry* 121, 399-409.

- Ziessel, R. (2001). Schiff-based bipyridine ligands. Unusual coordination features and mesomorphic behaviour. *Coordination Chemistry Reviews* 216, 195-223.
- Zingue, S., Cisilotto, J., Tueche, A.B., Bishayee, A., Mefegue, F.A., Sandjo, L.P., Nde, C.B.M., Winter, E., Michel, T., Ndinteh, D.T. (2016). *Crateva adansonii* dc, an african ethnomedicinal plant, exerts cytotoxicity in vitro and prevents experimental mammary tumorigenesis in vivo. *Journal of ethnopharmacology* 190, 183-199.