



**T.C.
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN MEME KANSER HÜCRELERİNDE
N-KOORDİNE Ru(II)-*p*-SİMEN BİLEŞİKLERİNİN
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DİLEK DURGUN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMASÖTİK BİYOKİMYA
ANA BİLİM DALI**

SİVAS-2022

**T.C.
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN MEME KANSER HÜCRELERİNDE
N-KOORDİNE Ru(II)-*p*-SİMEN BİLEŞİKLERİNİN
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DİLEK DURGUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FARMASÖTİK BİYOKİMYA
ANA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. SERAP ŞAHİN-BÖLÜKBAŞI
2. TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. NESLİHAN ŞAHİN**

SİVAS-2022

“İnsan Meme Kanseri Hücresinde N-koordine Ru(II)-p-simen Bileşiklerinin Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması” adlı **Yüksek Lisans** Tezi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Farmasötik Biyokimya** Ana Bilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Dr. Öğr. Üyesi Leyla AYDOĞAN _____

Üye Doç. Dr. Sema MISIR _____

Üye (Danışman) Doç. Dr. Serap ŞAHİN-BÖLÜKBAŞI _____

ONAY

Bu tez çalışması, Tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRÜ

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu’nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.



ÖZET

İNSAN MEME KANSER HÜCRELERİNDE *N*-KOORDİNE Ru(II)-*p*-SİMEN BİLEŞİKLERİNİN SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dilek DURGUN
Yüksek Lisans Tezi
Farmasötik Biyokimya Ana Bilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Serap ŞAHİN-BÖLÜKBAŞI
2. Danışman: Doç. Dr. Neslihan ŞAHİN
2022, 80 sayfa + xiv

Bu çalışmada, *N*-alkilbenzimidazol ligandları (**1a-c**) ve bu ligandların *N*-koordine Ru(II)-*p*-simen komplekslerinin (**2a-c**) MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktiviteleri araştırıldı. L-929 fibroblast hücreleri, sağlıklı kontrol hücreler olarak kullanıldı. Hem ligandların hem de Ru(II)-*p*-simen komplekslerinin sitotoksik aktiviteleri 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon süreleri için MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür) yöntemi kullanılarak araştırıldı. Ru(II)-*p*-simen komplekslerinin (**2a-c**), ligandlarına (**1a-c**) göre daha yüksek sitotoksik aktivite gösterdikleri bulundu. Sonuçlarımız, **2a** ve **2b** komplekslerinin, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ve L-929 sağlıklı hücrelerin canlılık oranlarında derişim ve zamana bağlı düşüşlere neden olduklarını gösterdi. **2c** kompleksinin, hem MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde hem de L-929 sağlıklı hücrelerde her üç inkübasyon süresi için IC₅₀ değerinin 500 µM dan daha büyük olduğu belirlendi. Veriler, **2a**'nın MCF-7 hücrelerinde en yüksek sitotoksik aktivite gösterirken kompleks **2b** nin ise MDA-MB-231 hücrelerinde daha yüksek sitotoksik etki gösterdiğine işaret etmektedir. Ayrıca, **2b** kompleksinin L-929 sağlıklı hücrelere karşı kompleks **2a**'dan daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği bulundu. Kompleks **2a**'nın MCF-7 hücrelerinde zaman bağlı seçicilik gösterdiği belirlendi.

Anahtar kelimeler: Benzimidazol; *p*-simen; MTT; Sitotoksik aktivite; MCF-7; MDA-MB-231; Rutenyum

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC EFFECTS OF *N*-COORDINATED Ru(II)-*p*-CYMENE COMPOUNDS ON HUMAN BREAST CANCER CELLS

Dilek DURGUN

Master Thesis

Department of Pharmaceutical Biochemistry

Supervisor: Associate Prof. Dr. Serap ŞAHİN-BÖLÜKBAŞI

Second Supervisor: Associate Prof. Dr. Neslihan ŞAHİN

2022, 80 pages + xiv

In this study, it has been investigated the cytotoxic activities of *N*-alkylbenzimidazole ligands (**1a-c**) and their *N*-coordinated Ru(II)-*p*-cymene complexes (**2a-c**) against MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. L-929 fibroblast cells, were used as healthy control cells. The cytotoxic activities of both ligands and Ru(II)-*p*-cymene complexes were investigated by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) analysis for 24 h, 48 h, and 72 h incubation times. It was found that the Ru(II)-*p*-cymene complexes (**2a-c**) showed better cytotoxic activity than their own ligands (**1a-c**). Our results indicated that complexes **2a** and **2b** caused concentration and time-dependent cell viability decreases on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells and L-929 healthy cells. It was determined that the IC₅₀ value of the **2c** complex was greater than 500 µM for all three incubation times both in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells and L-929 healthy cells. Data indicated that complex **2a** the most cytotoxic compound on MCF-7 whereas complex **2b** showed most cytotoxicity on MDA-MB-231 cells. In addition, it was found that the complex **2b** showed more cytotoxic effect on L-929 healthy cells than complex **2a**. It was determined that complex **2a** showed time dependent selectivity in MCF-7 cells.

Keywords: Benzimidazole; *p*-cymene; MTT; Cytotoxic activity; MCF-7; MDA-MB-231; Ruthenium

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
YÖNERGE	iii
KATKI BELİRTME/TEŞEKKÜR	iv
İTHAT	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kanser	2
2.2. Dünya Kanser Verileri (2020)	2
2.3. Türkiye Kanser Verileri (2020)	5
2.4. Dünya ve Türkiye’de Meme Kanseri Epidemiyolojisi	7
2.5. Meme Kanseri	8
2.6. Meme Kanseri Risk Faktörleri	9
2.6.1. Demografik Özellikler	9
2.6.1.1. Cinsiyet	9
2.6.1.2. Yaş	9
2.6.1.3. Kan Grubu	10
2.6.2. Üreme İle İlgili Faktörler	10
2.6.2.1. Menarş Yaşı	10
2.6.2.2. Menopoz Yaşı	10
2.6.2.3. Hamilelik	10
2.6.2.4. Kürtaj	11
2.6.3. Hormonal Faktörler	11
2.6.3.1. Doğum Kontrol Yöntemleri	11
2.6.3.2. Yumurtlama Uyarıcı İlaçlar	11
2.6.3.3. Menopoz Sonrası Hormon Tedavizi	11
2.6.4. Kalıtsal Faktörler	12
2.6.4.1. Genetik Faktörler	12
2.6.4.2. Ailede Meme Kanseri Öyküsü	12

2.6.5. Yaşam Tarzı Faktörleri	13
2.6.6. Diğer Faktörler	13
2.7. Meme Kanseri Belirtileri	13
2.8. Meme Kanseri Evreleri	13
2.9. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri	14
2.10. Azoller	14
2.11. Benimidazol İçeren Bileşiklerin Sitotoksik Aktiviteleri	15
2.12. Metal-Azol Kompleksleri	19
2.13. Rutenyum Komplekslerinin Sitotoksik Aktiviteleri	20
2.14. <i>p</i> -simen İçeren Komplekslerin Sitotoksik Aktiviteleri	25
2.15. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları ve Özellikleri	28
2.16. Sitotoksik Aktivite Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Çalışmanın Yapıldığı Yer, Çalışma Materyali ve Zamanı	32
3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar	32
3.3. Genel Sentez Yöntemi	33
3.4. Azol Ligandlarının Sentezi	33
3.4.1. <i>N</i> -(3-Metilbenzil)benzimidazol, 1a	33
3.4.2. <i>N</i> -(2-Klorbenzil)benzimidazol, 1b	33
3.4.3. <i>N</i> -(Etoksietil)benzimidazol 1c	34
3.5. <i>N</i> -koordine Ru(II)- <i>p</i> -simen Komplekslerinin Sentezi	34
3.5.1. Dikloro-(<i>N</i> -(3-metilbenzil)benzimidazol)-(<i>p</i> -simen)rutenyum(II), 2a	34
3.5.2. Dikloro-(<i>N</i> -(2-klorbenzil)benzimidazol)-(<i>p</i> -simen)rutenyum(II), 2b	35
3.5.3. Dikloro-(<i>N</i> -(etoksietil)benzimidazol)-(<i>p</i> -simen)rutenyum(II), (2c)	35
3.6. Sitotoksik Aktivite	35
3.6.1. Hücrelerin Çözülmesi	36
3.6.2. Hücrelerin Pasajlanması	36
3.6.3. Hücrelerin Sayımı	36
3.6.4. Bileşiklerin Hazırlanması	36
3.6.5. Hücrelerin Ekimi ve Dozlama	36
3.6.6. MTT Ölçümü	37
3.7. İstatistik Analiz	37
4. BULGULAR	38
4.1. Azol Ligandları (1a-c) ve bu Ligandların <i>N</i> -Koordine Ru(II)- <i>p</i> -simen Komplekslerinin (2a-c) Sentezi	38
4.2. Sitotoksik Aktivite	38
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ	64
7. KAYNAKLAR	66
8. ÖZGEÇMİŞ	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1.	Dünyada 2020 yılında (a) en fazla görülen (b) en çok ölüme neden olan, kanser türler [42]	3
Şekil 2.2.	Dünyada 2020 yılında kadınlarda (a) en fazla görülen (b) en çok ölüme neden olan, kanser türleri	4
Şekil 2.3.	Türkiye’de 2020 yılında (a) en fazla görülen (b) en çok ölüme neden olan, kanser türleri	5
Şekil 2.4.	Türkiye’de 2020 yılında kadınlarda (a) en fazla görülen (b) en çok ölüme neden olan, kanser türleri	6
Şekil 2.5.	Meme kanserimin farklı coğrafi bölgelerde görülme ve ölüm oranları	7
Şekil 2.6.	En yaygın azol yapıları	15
Şekil 2.7.	Benzimidazol yapısı	16
Şekil 2.8.	Benzimidazol içeren bazı ilaçlar	17
Şekil 2.9.	Sentezlenen ilk Ru(II) ve Ru(III) komplekslerinin yapıları	22
Şekil 2.10.	Ru komplekslerinin yapıları (NAMI-A, KP1039, KP1339)	22
Şekil 2.11.	Rutenyum kurşun komplekslerinin yapıları	24
Şekil 2.12.	<i>p</i> -simenin kimyasal yapısı	25
Şekil 2.13.	Rutenyum <i>p</i> -simen komplekslerinin yapıları	27
Şekil 2.14.	MCF-7 hücre hattı morfolojisi	28
Şekil 2.15.	MDA-MB-231 hücre hattı morfolojisi	29
Şekil 2.16.	L-929 hücre hattı morfolojisi	29
Şekil 2.17.	MTT prensibi	30
Şekil 2.17.	MTT, WST-1 ve XTT yapıları	31
Şekil 4.1.	<i>N</i> -(3-Metilbenzil)benzimidazol (1a) ve Dikloro-(<i>N</i> -(3-metilbenzil)benzimidazol)-(p-simen)rutenyum(II) (2a)’un MCF-7 meme kanser hücreleri üzerine sitotoksik aktiviteleri. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar $\pm$ SEM olarak verilmiştir. (Kontrole göre anlamlılık; $p < 0.0001$)	39

- Şekil 4.2.** *N*-(2-Klorbenzil)benzimidazol (**1b**) ve Dikloro-(*N*-(2-klorbenzil)benzimidazol)-(*p*-sime)rutenyum(II) (**2b**)’un, MCF-7 meme kanser hücreleri üzerine sitotoksik aktiviteleri. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar $\pm$ SEM olarak verilmiştir (Kontrolle göre anlamlılık; * $p < 0.05$, \$ $p < 0.0001$). 40
- Şekil 4.3.** *N*-(Etoksietil)benzimidazol (**1c**) ve Dikloro-(*N*-(etoksietil)benzimidazol)-(*p*-sime)rutenyum(II) (**2c**)’un MCF-7 meme kanser hücreleri üzerine sitotoksik aktiviteleri.. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar $\pm$ SEM olarak verilmiştir (Kontrolle göre anlamlılık; * $p < 0.05$, # $p < 0.005$, & $p < 0.0005$, \$ $p < 0.0001$). 41
- Şekil 4.4.** *N*-(3-Metilbenzil)benzimidazol (**1a**) ve Dikloro-(*N*-(3-metilbenzil)benzimidazol)-(*p*-sime)rutenyum(II) (**2a**)’un MDA-MB-231 meme kanser hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar $\pm$ SEM olarak verilmiştir. (Kontrolle göre anlamlılık; # $p < 0.005$, & $p < 0.0005$, \$ $p < 0.0001$) 43
- Şekil 4.5.** *N*-(2-Klorbenzil)benzimidazol (**1b**) ve Dikloro-(*N*-(2-klorbenzil)benzimidazol)-(*p*-sime)rutenyum(II) (**2b**)’un, MDA-MB-231 meme kanser hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar $\pm$ SEM olarak verilmiştir. (Kontrolle göre anlamlılık; # $p < 0.005$, & $p < 0.0005$, \$ $p < 0.0001$) 44
- Şekil 4.6.** *N*-(Etoksietil)benzimidazol (**1c**) ve Dikloro-(*N*-(etoksietil)benzimidazol)-(*p*-sime)rutenyum(II) (**2c**)’un MDA-MB-231 meme kanser hücreleri üzerine sitotoksik aktiviteleri. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar $\pm$ SEM olarak verilmiştir (Kontrolle göre anlamlılık; * $p < 0.05$, # $p < 0.005$, & $p < 0.0005$, \$ $p < 0.0001$) 45
- Şekil 4.7.** *N*-(3-Metilbenzil)benzimidazol (**1a**) ve Dikloro-(*N*-(3-metilbenzil)benzimidazol)-(*p*-sime)rutenyum(II) (**2a**)’un L-929 L-929 fare sağlıklı fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik aktiviteleri. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar $\pm$ SEM olarak verilmiştir (Kontrolle göre anlamlılık; * $p < 0.05$, \$ $p < 0.0001$) 47
- Şekil 4.8.** *N*-(2-Klorbenzil)benzimidazol (**1b**) ve Dikloro-(*N*-(2-klorbenzil)benzimidazol)-(*p*-sime)rutenyum(II) (**2b**)’un, L-929 fare sağlıklı

fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik aktiviteleri. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar $\pm$ SEM olarak verilmiştir (Kontrolle göre anlamlılık; $\$p<0.0001$). 48

- Şekil 4.9.** *N*-(Etoksietil)benzimidazol (1c) ve Dikloro-(*N*-(etoksietil)benzimidazol)-(*p*-sime)rutenyum(II) (2c)'un L-929 fare sağlıklı fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik aktiviteleri. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar $\pm$ SEM olarak verilmiştir (Kontrolle göre anlamlılık; * $p<0.05$, # $p<0.005$, & $p<0.0005$, $\$p<0.0001$). 49
- Şekil 5.1.** *cis*- β -[Ru(picenBz₂)(N₂-bidentate)](PF₆)₂ kompleksleri 52
- Şekil 5.2.** Ru(II)-*p*-sime 2-aril-imidazo-1,10-fenantrolin türevi kompleksleri 54
- Şekil 5.3.** Organofosfor ligandları içeren Ru(II)-*p*-sime kompleksleri 55
- Şekil 5.4.** [Ru(bpy)₂L]PF₆ komplekslerinin kimyasal yapıları 56
- Şekil 5.5.** Ru(II)-aren komplekslerinin sentezi 57
- Şekil 5.6.** Binükleer Ru(II)-*p*-sime kompleksinin sentezi 58
- Şekil 5.7.** Triazol ligandları içeren yeni Ru(II)-*p*-sime kompleksler 59
- Şekil 5.8.** Fosfin içeren η^6 -*p*-cymene ruthenium(II) kompleksleri 61
- Şekil 5.9.** Piridin/pirimidin içeren Ru(II)-HNC kompleksleri 62
- Şekil 5.10.** Ru(II) aren kompleksleri 63
- Şema 4.1.** Azol ligandları (1a-c) ve bu ligandların *N*-koordine Ru(II)-*p*-sime komplekslerinin (2a-c) sentezi 38

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1.1. Meme kanseri hücrelerinin reseptör içeriklerine göre sınıflandırılması	8
Tablo 4.1. Azol ligandları (1a-c) ve bu ligandların <i>N</i> -koordine Ru(II)- <i>p</i> -simen komplekslerinin (2a-c) MCF-7 insan meme kanser hücrelerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saat için IC ₅₀ değerleri	42
Tablo 4.2. Azol ligandları (1a-c) ve bu ligandların <i>N</i> -koordine Ru(II)- <i>p</i> -simen komplekslerinin (2a-c) MDA-MB-231 insan meme kanser hücrelerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saat için IC ₅₀ değerleri	46
Tablo 4.3. Azol ligandları (1a-c) ve bu ligandların <i>N</i> -koordine Ru(II)- <i>p</i> -simen komplekslerinin (2a-c) L-929 fare sağlıklı fibroblast hücrelerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saat için IC ₅₀ değerleri	50
Tablo 4.4. <i>N</i> -koordine Ru(II)- <i>p</i> -simen komplekslerin (2a-c) seçicilik indeksleri (SI)	51

KISALTMALAR/SİMGELER

Ru	Rutenyum
MTT	3-(4, 5-dimetilthiazol-2-yl)-2, 5-difeniltetrazolium bromid
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
IARC	Uluslararası kanser araştırma ajansı
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
ER	Östrojen reseptörü
PR	Progesteron reseptörü
HER2	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
HRT	Hormon replasman tedavi
MMP-2	Matris metalloproteinaz-2
Im	İmidazol
Imd	İmidazoln
BIm	Benzimidazol
IC₅₀	Hücrelerinin % 50'sinin ölümüne neden olan madde derişimi
5-FU	5- Florourasil
Pt	Platin
DMSO	Dimetilsülfoksit
HSA	İnsan serum albumin
PARP	Poli (ADP-riboz) polimeraz
CAM	Civciv embriyosu korioallantoik membran
THF	Tetrahidrofuran
PBS	Fosfat tampon tuzu
DCM	Diklorometan
Et₂O	Etanol
µL	Mikrolitre
CO₂	Karbondioksit
SI	Seçicilik İndeksi
µM	Mikromolar
EDTA	Etilendiamintetrasetik asit

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Yaşam tarzı, ortalama yaşın artması, çevresel faktörler gibi farklı etkenler sebebiyle kanser görülme sıklığı tüm dünyada artış göstermektedir. Kanser tanısı için yapılan taramalar da kanser görülme artışında dolaylı etken olarak göz önüne alınmaktadır. Meme kanseri dünyada kadınlarda en sık teşhis edilen kanser türüdür [<https://gco.iarc.fr>, Erişim tarihi; 10 Ocak 2022]. Tüm kanser çeşitlerinde olduğu gibi meme kanseri tedavisi içinde birçok farklı tedavi stratejisi geliştirilmektedir. Halihazırda kullanılan ilaçların ciddi yan etkileri nedeniyle yeni ve düşük toksisiteli ilaç adayları moleküllerin keşfi ve etki mekanizmalarının aydınlatılmasını içeren çalışmalar önemini korumaktadır. Metalleri içeren heterosiklik kompleksler metal-protein mimik bileşikler oldukları için biyoinorganik kimyada oldukça yoğun çalışılan molekül sınıflarıdır. Rutenyum kompleksleri, ilaç geliştirme için uygun çeşitli özelliklere sahip olması nedeniyle tıbbi kimyada önemli bir ilgi görmektedir.

Çalışmamızda; *N*-alkilbenzimidazol ligandları (**1a-c**) ve bu ligandların *N*-koordine Ru(II) kompleksleri (**2a-c**) inert atmosferde ve standart şilenk tekniği kullanılarak sentezlendi. Sentezlenen ligandların (**1a-c**) ve komplekslerin (**2a-c**) sitotoksik aktiviteleri, MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanser hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat inkubasyon sürelerinde MTT yöntemi ile araştırıldı. Bileşiklerin sağlıklı ve kanserli hücreler arasında olası seçici özelliklerinin araştırılması amacıyla L-929 fare sağlıklı fibroblast hücreleri kullanıldı. Çalışma bulgularının, meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek yeni aday bileşiklerin saptanmasının yanısıra, etkin ve düşük toksisiteye sahip yeni bileşiklerin sentezlenebilmesi amacıyla yol gösterici olması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

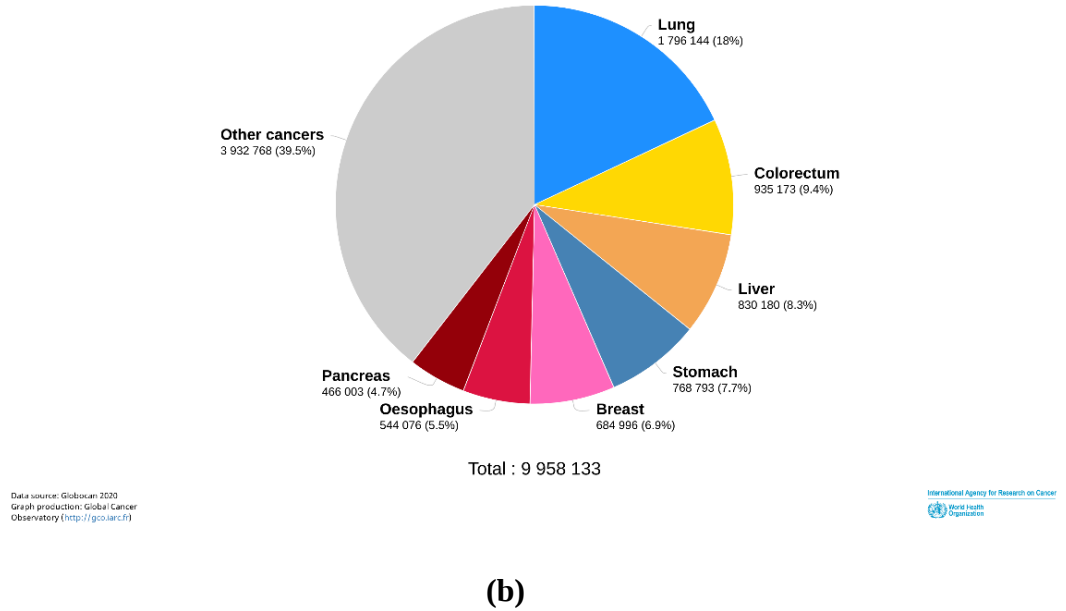
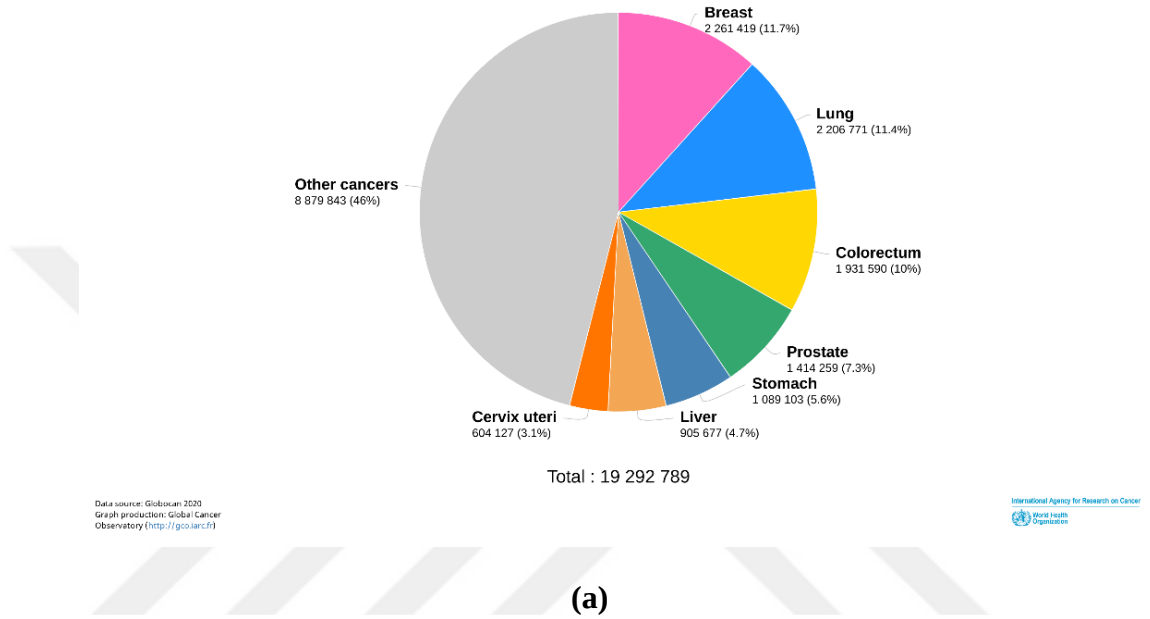
2.1 Kanser

Kanser, hücrelerin normal özelliklerini temelden değiştiren bir dizi moleküler olaydan kaynaklanmakta olup, normal hücre bölünmesini düzenleyen süreçlerin bozulduğu ve anormal hücrelerin oluşmasıyla karakterize bir hastalıktır. Kanser, kalp damar hastalıklarından sonra dünya da ikinci en önemli ölüm nedeni olarak yer almaktadır [<https://gco.iarc.fr>, Erişim tarihi; 10 Ocak 2022]. Birçok farklı tür kanser bulunmakta ve her bir kanser türünün, oluşum mekanizmaları ve faktörleri çok çeşitli olabilmektedir. Kanser oluşumu ve ilerlemesinde genetik ve çevresel faktörlerin yanı sıra, yaşam tarzı, beslenme şekli, sigara-alkol tüketimi, yaş, kilo vb. gibi birçok faktörün etkili olduğu bilinmektedir [1]. Kanser tedavisi için her geçen gün yeni yöntemler geliştirilmektedir. Kanser, yaşam kalitesini çok düşürdüğü, psikolojik, sosyal ve ekonomik olarak insanları ve ülkeleri zorladığı için daha etkin, düşük toksisiteli ve kolay ulaşılabilir tedavi yollarının keşfedilmesi amacıyla yapılan bilimsel çalışmalar güncelliğini korumaktadır.

2.2. Dünya Kanser Verileri (2020)

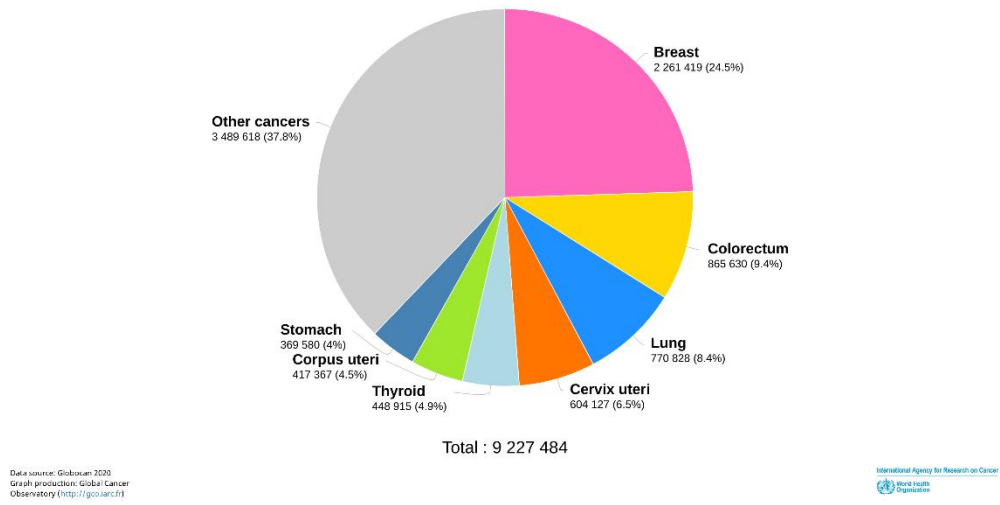
Dünya sağlık örgütü (DSÖ) tarafından 2020 yılı için, tüm dünyada 20 milyona yakın yeni kanser vakası ve 10 milyona yakın kanser nedeni ölüm bildirilmiştir. 2020 yılında tüm dünyadaki vaka sayıları göz önüne alındığında; 2.26 milyon vaka ile meme kanseri ilk sırada yer alırken, akciğer (2.21 milyon), kolon ve rectum (1.93 milyon), prostat (1.41 milyon), cilt (non-melonoma) (1.20 milyon) ve mide (1.09 milyon) kanserleri en çok teşhis edilen ilk altı kanser türü olarak bildirilmiştir. Tüm dünyada 2020 yılında en fazla ölüme yol açan kanser türlerinin göz önüne alındığında ise; 1.80 milyon vaka ile akciğer kanseri ilk sırada yer alırken, kolon ve rectum (935 bin), karaciğer (830 bin), mide (769 bin) ve meme (685 bin) kanserleri en fazla ölüme neden olan ilk dört kanser türü olarak bildirilmiştir [<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, Erişim tarihi; 10 Ocak 2022]. Uluslararası kanser araştırma ajansı (IARC) tarafından 2020 yılında, tüm dünyada en fazla vaka görülen kanser türlerinin sırasıyla; meme, akciğer kolorektum, prostat, mide, karaciğer ve serviks kanserleri (**Şekil 2.1a.**) ve en fazla ölüm gözlenen kanser türlerinin ise sırasıyla; akciğer, kolorektum, karaciğer, mide, meme, özofagus ve pancreas kanserleri

(Şekil 2.1b.) olduğu bildirilmiştir [<https://gco.iarc.fr>, Erişim tarihi; 10 Ocak 2022]. Kadınlar ve erkeklerde kanser türüne ve bölgeye bağlı olarak ölüm oranlarının sırasıyla; dört ve dokuz kata kadar değiştiği ve dünya genelinde, kanser görülme oranının erkeklerde kadınlara göre iki kat daha fazla olduğu bildirilmiştir [2].

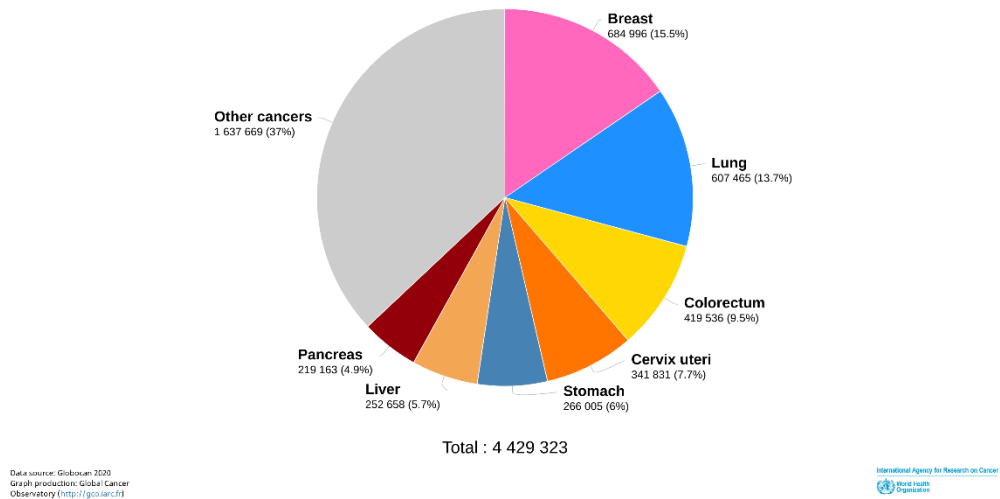


Şekil 2.1. Dünyada 2020 yılında **(a)** en fazla görülen **(b)** en çok ölüme neden olan, kanser türleri [<https://gco.iarc.fr>, Erişim tarihi; 10 Ocak 2022]

Uluslararası kanser araştırma ajansı (IARC) tarafından 2020 yılında, tüm dünyada kadınlar arasında 9 227 484 yeni kanser vakası gözlemlendiği ve en fazla vaka görülen kanser türlerinin sırasıyla; meme, kolorektum, akciğer, servik, tiroid, rahim ve mide kanserleri (**Şekil 2.2a.**) olduğu bildirilmiştir. Kadınlarda, 2020 yılında tüm dünyada kanser nedeniyle ölüm sayısının 4 429 323 olduğu ve en fazla ölüm gözlenen kanser türlerinin ise sırasıyla; meme, akciğer, kolorektum, servik, mide, karaciğer ve pankreas kanserleri (**Şekil 2.2b.**) olduğu bildirilmiştir [<https://gco.iarc.fr>, Erişim tarihi; 10 Ocak 2022].



(a)

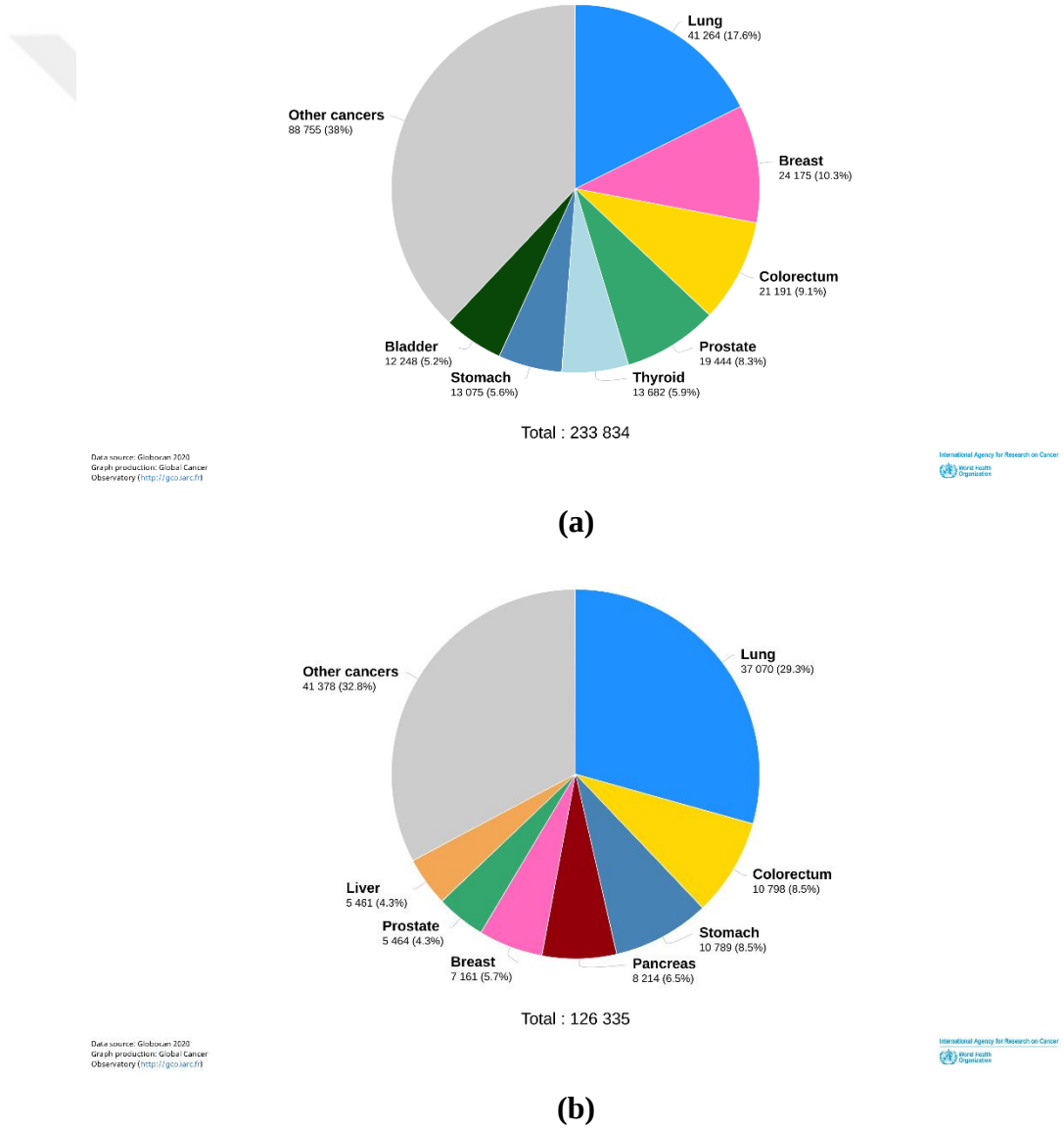


(b)

Şekil 2.2. Dünyada 2020 yılında kadınlarda (a) en fazla görülen (b) en çok ölüme neden olan, kanser türleri [<https://gco.iarc.fr>, Erişim tarihi; 10 Ocak 2022]

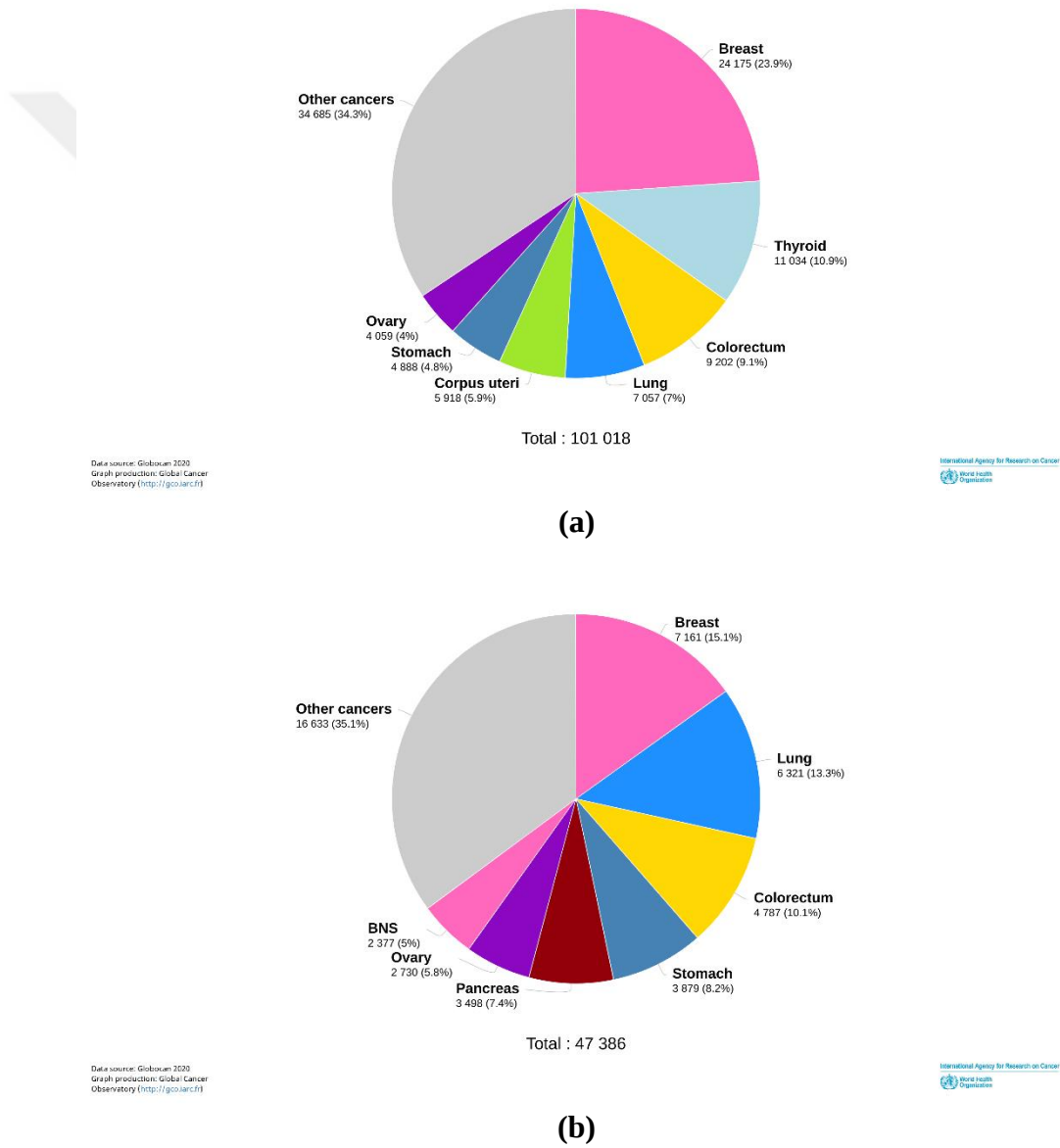
2.3. Türkiye Kanser Verileri (2020)

Uluslararası kanser araştırma ajansı (IARC) tarafından 2020 yılında, Türkiye’de en fazla vaka (toplam vaka sayısı 233834) görülen kanser türleri sırasıyla; akciğer, meme, kolorektum, prostat, tiroid, mide ve mesane kanserleri (**Şekil 2.3a.**), en fazla ölüm (toplam ölüm sayısı 126 335) gözlenen kanser türleri ise sırasıyla; akciğer, kolorektum, mide, pankreas, meme, prostat ve karaciğer kanserleri (**Şekil 2.3b.**) olarak bildirilmiştir [<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf> Erişim tarihi; 10 Ocak 2022].



Şekil 2.3. Türkiye’de 2020 yılında (a) en fazla görülen (b) en çok ölüme neden olan, kanser türleri [<https://gco.iarc.fr>, Erişim tarihi; 10 Ocak 2022]

Uluslararası kanser araştırma ajansı (IARC) tarafından 2020 yılında Türkiye’de kadınlarda görülen 101 018 yeni kanser vakasında en fazla vaka görülen kanser türleri; meme, tiroid, kolorektum, akciğer, endometrial, mide ve over kanserleri (**Şekil 2.4a.**), kanser nedeni görülen toplam 47 386 vakada en fazla ölüm gözlenen kanser türlerinin ise sırasıyla; meme, akciğer, kolorektum, mide, pankreas, over ve BNS kanserleri (**Şekil 2.4b.**) olduğu bildirilmiştir [<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf> Erişim tarihi; 10 Ocak 2022].

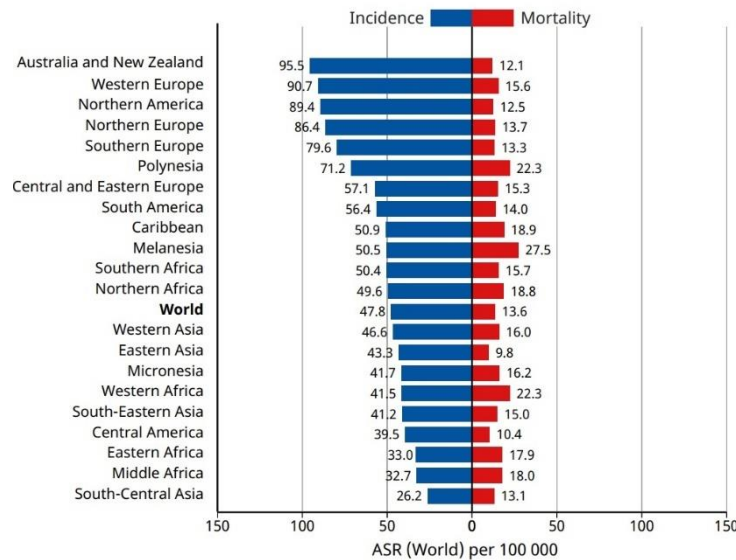


Şekil 2.4. Türkiye’de 2020 yılında kadınlarda **(a)** en fazla görülen **(b)** en çok ölüme neden olan, kanser türleri [<https://gco.iarc.fr>, Erişim tarihi; 10 Ocak 2022]

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verileri, dünyada olduğu gibi Türkiye’de de kanserin, kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci en önemli ölüm nedeni olduğuna ve Türkiye’de her beş ölümden birinin kanser nedenli geliştiğine işaret etmektedir [3-4]. Türkiye’nin batı bölgelerinde meme kanseri görülme sıklığının doğu bölgelerine oranla yaklaşık olarak iki kat fazla olduğu bildirilmiştir [5].

2.4. Dünya ve Türkiye’de Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Uluslararası kanser araştırma ajansı (IARC) 2020 yılı verilerine göre meme kanseri, dünyada yeni teşhis edilen tüm kanser vakaları arasında % 11.7 ve kadınlar arasında yeni teşhis edilen vakalar arasında da % 24.5 ile ilk sırada yer almaktadır. Meme kanseri, ölümlle sonuçlanan tüm kanser vakaları arasında % 6.9 ile beşinci sırada, kadınlar arasında ölümlle sonuçlanan tüm kanser türleri arasında ise % 15.5 ile ilk sırada yer almaktadır (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2.) Türkiye’de de yeni teşhis edilen tüm kanser vakaları arasında % 10.3 ile ikinci sırada ve kadınlar arasında yeni teşhis edilen vakalar arasında da % 23.9 ile ilk sırada yer almaktadır. Meme kanseri, ölümlle sonuçlanan tüm kanser vakaları arasında % 5.7 ile beşinci sırada, kadınlar arasında ölümlle sonuçlanan tüm kanser türleri arasında ise % 15.1 ile ilk sırada yer almaktadır (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4.) [<https://gco.iarc.fr>, Erişim tarihi; 10 Ocak 2022].



Şekil 2.5. Meme kanserinin farklı coğrafi bölgelerde görülme ve ölüm oranları [<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>, Erişim Tarihi; 10 Ocak 2022]

Meme kanserinin ülkelere ve bölgelere göre görülme sıklığı ve ölüm oranları değişkenlik göstermektedir. Avustralya ve Yeni Zelanda, Kuzey Amerika kıtası, Avrupa kıtasında hem meme kanserinin en yüksek oranlarda görüldüğü hem de meme kanseri kaynaklı en düşük ölüm oranlarının gözlendiği belirtilmiştir. Meme kanseri görülme oranlarının düşük olduğu Asya ve Afrika kıtalarında ise, en yüksek meme kanseri ölüm oranlarının gözlendiği bildirilmiştir (**Şekil 2.5.**) [<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>, Erişim Tarihi; 10 Ocak 2022]. Beyaz ırk kadınlarda meme kanseri görülme sıklığının siyah ırk kadınlara kıyaslandığında % 20 daha yüksek olmasına rağmen ölüm oranlarının siyah ırkta daha yüksek olduğu saptanmıştır. Çok gelişmiş ülkelerde meme kanserine bağlı ölümlerin az gelişmiş ülkelere göre daha az olduğu bildirilmiştir. Meme kanserinin görülme oranları ve ölüm oranlarının, etnik köken ve gelişmişlik düzeyine bağlı olarak değişkenlik göstermesinin yaş, yaşam tarzı, sosyoekonomik düzey, beslenme şekli gibi farklı parametrelerle bağlantılı olduğu düşünülmektedir [2, 6].

2.5. Meme Kanseri

Meme kanseri, memede bulunan hücrelerin kontrolsüz bölünmeleri ve bölünen bu hücrelerin vücudun farklı bölgelerine metastaz yapmaları olarak tanımlanmaktadır. Meme kanseri sınıflandırılması, etiyoloji, klinik tablo, moleküler özellikler ve tedaviye yanıt gibi çeşitli faktörler temel alınarak yapılmaktadır [7, 8]. Östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2), klinik sonuçları öngörmek ve terapötik yaklaşımları sağlamak amacıyla invazif meme kanserinde en yaygın kullanılan sınıflandırmadır (**Tablo 1**) [9].

Tablo 1. Meme kanseri hücrelerinin reseptör içeriklerine göre sınıflandırılması

Sınıflandırma	İmmünoprofil	Hücre Hatları
Luminal A	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER ⁻	MCF-7, T47D
Luminal B	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER ⁺	BT474, ZR-75
Bazal	ER ⁻ , PR ⁻ , HER ⁻	MDA-MB-468
Normal	ER ⁻ , PR ⁻ , HER ⁻	MDA-MB-231
HER2	ER ⁻ , PR ⁻ , HER ⁺	SKBR3, MDA-MB-453

Mememin yapısını süt kanalları ve lobüllerden oluşturmaktadır. Duktal kanser, süt kanallarında gelişen kanser tipi iken lobüller kanser ise lobüllerde gelişen kanser türüdür. Meme kanserinin patolojik sınıflandırılması; kanser primer bölgede kaldığında in situ, metastaz yapmış ise invazif meme kanseri olarak tanımlanmaktadır [10].

2.6. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanseri, çok faktörlü bir hastalık olup ortaya çıkmasında çeşitli etkenler rol almaktadır [11]. Hastalık tüm dünyada görülmesine rağmen, görülme sıklığı, ölüm ve hayatta kalma süreleri dünyanın farklı bölgelerinde önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenliğin nüfus yapısı, yaşam tarzı, genetik faktörler ve çevre gibi birçok farklı faktöre bağlı olabileceği belirtilmiştir [12]. Risk faktörlerindeki değişiklikler meme kanseri prevalansının her geçen gün artmasına neden olmaktadır [13]. Kişisel taramalar meme kanseri yükünü azaltabilmekle birlikte, tarama yöntemlerinin yan etkileri, aşırı tanı sayısı ve artan maliyetler kişisel taramaların dezavantajları olarak bildirilmektedir. Kadınların meme kanseri risk faktörlerine göre sınıflandırılmaları, risksiz yöntemlerin geliştirilmesinde ve hedefe yönelik meme kanseri tarama programlarının tasarlanmasında etkili olabilecektir [14].

2.6.1. Demografik Faktörler

2.6.1.1. Cinsiyet

Meme kanseri genellikle kadınlara özgü bir hastalıktır. Erkeklerde ise nadir görülmekte ve erkeklerde görülen toplam kanser vakalarının %1'inden daha azına neden olmaktadır [15]. Meme kanseri, hormonal dengesizliği olan, radyasyona maruz kalan ve ailesinde meme kanseri öyküsü olan yaşlı erkeklerde daha sık görülmekte olup erkeklerde bu hastalık için en yaygın risk faktörü *BRCA2* genindeki mutasyondur [15, 16].

2.6.1.2. Yaş

Cinsiyetten sonra yaş, meme kanseri için bilinen en önemli risk faktörüdür [17]. Meme kanseri insidansı yaşla birlikte önemli ölçüde artmakta, menopoza çağında zirveye ulaşmakta ve daha sonra giderek azalarak sabit kalmaktadır [18]. 50 yaş üstünde gözlenen meme kanseri-insidans oranı ile ilişkilendirilmiştir. Ancak

genç kadınlarda meme tümörlerinin, daha büyük boyutlarda, ileri evrelerde, pozitif lenf düğümlerinde ortaya çıktıkları ve daha düşük sağkalım oranları gözlenmiştir [1].

2.6.1.3. Kan Grubu

Yapılan çalışmalarda, A kan grubu ve Rh (+) olan kadınların meme kanserine yakalanma riskinin daha yüksek olduğu, AB kan grubu ve Rh (-) olan kadınların ise meme kanserine yakalanma riskinin daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu bir araştırma ile doğrulansa da, birçok araştırmacı kan grubu ile meme kanseri arasında bir ilişki bulamamıştır [1].

2.6.2. Üreme İle İlgili Faktörler

Ergenlik çağında başlayan ve aylık döngüler boyunca devam eden yumurtalık hormonları ile meme kanserinin ilişkili olduğu ve bu hormonların gebelik sayısından da etkilenecek menopozda azaldıkları bildirilmiştir [17].

2.6.2.1. Menarş Yaşı

Menarş yaşının küçük olmasının meme kanseri riskini artırdığı bir çok çalışma ile gösterilmiştir. Bununla birlikte, diğer bazı çalışmalarda, daha genç menarş yaşı ile meme kanseri riski artışı arasında ilişki gösterilememiştir [1].

2.6.2.2. Menopoz Yaşı

Menopozda ileri yaşın, meme kanseri insidansını arttırdığı birçok çalışma ile gösterilmiştir [1].

2.6.2.3. Hamilelik

İlk doğumun ileri yaşlarda yapılmasının meme kanseri riskini altı kattan daha fazla arttırdığı belirtilmiştir. Yapılan her doğumun PR + ve ER + kanser riskini % 10 a kadar azalttığı ancak ilk doğumun ileri yaşlarda yapılmasının meme kanseri gelişme riskini %27 arttırdığı bildirilmiştir. Erken anne olma yaşının, meme kanseri riskini yaklaşık % 23 azalttığı saptanmıştır. Hiç doğum yapmamış kadınların, üçten fazla çocuğu olan kadınlara göre daha yüksek meme kanseri riski taşıdıkları belirtilmiştir. Doğum yapmış kadınlarda doğum sayısındaki artışla meme kanseri riskinde azalış gözlenmesine rağmen başka bir çalışmada

beşten fazla tam gebelik geçirmiş kadınlarda artmış meme kanseri riski olduğu belirlenmiştir. Doğum yapmamış kadınlarda büyük tümörler, yüksek Ki67 düzeyleri, yüksek siklin D1 düzeyleri ve HER2-pozitif tümörle ilişkilendirilmiştir. Son doğumda ileri yaş, meme kanseri gelişme riskinin artmasıyla da ilişkilendirilmiş, ancak meme kanseri ile son doğum zamanı arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Erken doğum yapan kadınların meme kanseri riskinin iki kat kadar arttığı belirtilmiştir. Hamilelik sırasında gelişen bulantı ve kusma ile meme kanseri gelişme riski arasında ters bir ilişki olduğu gösterilmiştir [1].

2.6.2.4. Kürtaj

Daha yüksek kürtaj insidansının meme kanseri gelişme riskini arttırdığı bildirilmiştir. Ancak farklı epidemiyolojik çalışmadan elde edilen bulguların analizi sonucunda, kendi kendine veya doğal kürtajın meme kanseri gelişme riskini artırmadığını gösterilmiştir [1].

2.6.3. Hormonal Faktörler

2.6.3.1. Doğum Kontrol Yöntemleri

Oral doğum kontrol hapı kullanımı meme kanseri gelişme riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. McDonald ve ark., tarafından yapılan çalışmada 35-64 yaş aralığında halen veya daha önce doğum kontrol hapı kullanımının meme kanseri gelişimi riskinde artış ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir. Williams ve ark., mevcut kontraseptif kullanımı ile meme lobüler tümörleri arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Meme kanserine yakalanma riskinin artması, hormonal kontraseptif ilaçların kesilmesinden 5-10 yıl sonra azalmaktadır [1].

2.6.3.2. Yumurtlama Uyarıcı İlaçlar

Altı aydan uzun süre yumurtlamayı uyarıcı ilaçların kullanılmasının meme kanseri gelişme riskini artırdığı gösterilmiş ancak bu bulgu diğer çalışmalarda doğrulanmamıştır [1].

2.6.3.3. Menopoz Sonrası Hormon Tedavisi

Hormon replasman tedavisi (HRT) kullanımı ile meme kanseri gelişme riskinin arttığı ve bu riskin, HRT kullanımının kesilmesinden 5 yıl sonra azaldığı

gösterilmiştir [19]. Bir milyon kadını içeren çalışmanın sonuçları, mevcut HRT kullanımının artan ölüm oranı ve meme kanseri geliştirme riski ile ilişkili olduğunu ve östrojen-progesteron kombinasyon yöntemlerini kullananlarda bu riskin diğer HRT yöntemlerini kullananlara göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermiştir [20]. Bu sonuçlar, HRT tedavisine progesteron eklenmesinin meme kanseri gelişme riskini önemli ölçüde artırdığını gösteren çalışmalar ile uyumludur [21]. HRT'de progesteron seçiminin meme kanseri geliştirme riskine göre belirlenmesi gerektiği öngörülmüştür. Östrojen-progesteron veya östrojen-didrogesteron yöntemlerinde bu riskin diğer yöntemlere göre daha düşük olduğunu bildirilmiştir [22]. Postmenopozal kadınlarda ve *BRCA1* mutasyonu taşıyıcılarında HRT kullanımının meme kanseri gelişme riskini artırmadığını gösterilmiştir [20].

2.6.4. Kalıtsal Faktörler

2.6.4.1. Genetik Faktörler

Meme kanseri insidansında birçok genetik faktör rol oynasa da, kalıtsal meme kanseri vakalarının yaklaşık % 40'ı, baskın otozomal yöntemle kalıtılan *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır [23]. *BRCA1* mutasyonu taşıyıcılarının % 55-65'i ve *BRCA2* mutasyonu taşıyıcılarının % 45'inde 70 yaşına kadar meme kanseri geliştiği bildirilmiştir [24]. 80 yaşına kadar kümülatif meme kanseri riski *BRCA1* mutasyonu taşıyıcılarda % 72 iken *BRCA2* mutasyonu taşıyıcılarında % 69 olarak bulunmuştur [25]. Matris metalloproteinaz (MMP-2 c-735-T) polimorfizmleri, meme kanseri gelişme riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiş ve ayrıca, MMP-2c alelinin, daha genç yaşta meme kanseri gelişme riskini de 1.64 kat artırdığı bulunmuştur [26].

2.6.4.2. Ailede Meme Kanseri Öyküsü

Ailesinde meme kanseri öyküsü olan (50 yaşından küçük kadınlarda iki veya daha fazla vaka veya herhangi bir yaşta üç veya daha fazla vaka) ve *BRCA* mutasyonları açısından negatif olan kadınlarda meme kanseri gelişme olasılığının yaklaşık 11 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir [27]. Yakın akrabalarda erken başlangıçlı meme kanseri öyküsü, *BRCA1* ve *BRCA2* taşıyıcılarında meme kanseri oluşumu için risk faktörü olarak belirtilmiştir [28].

Ailede meme kanseri öyküsü olması bireyi, tamoksifen ile kemokorumaya veya manyetik rezonans görüntüleme ile yoğunlaştırılmış meme taraması yaptırmaya yönlendirilebilmektedir [27].

2.6.5. Yaşam Tarzı Faktörleri

Obezite ve aşırı kilo, alkol ve sigara tüketimi, kahve, beslenme şekli, fiziksel aktivite, D vitamini ve uyku süresi gibi kişisel birçok özellik de meme kanseri ile ilişkilendirilmiştir [1].

2.6.6. Diğer Faktörler

Hava kirliliği, gece çalışma, sosyoekonomik durum, radyasyon ve diyabet gibi diğer faktörler de meme kanseri gelişmesinde etkin rol oynamaktadır [1].

2.7. Meme Kanseri Belirtileri

Daha çok invaziv meme kanserinde görülen semptomlar; memede tahriş veya kaşıntı, meme renginde değişiklik, meme boyutunda veya şeklinde artış (kısa bir süre içinde), meme ucu derisinin soyulması veya dökülmesi, memede yumru veya kalınlaşma, meme derisinde kızarıklık veya çukurlaşma (portakal kabuğu gibi) olarak belirtilmiştir [29].

2.8. Meme Kanseri Evreleri

Meme kanseri; tümörün hacmi, nodların yerleşim yerleri/durumları ve metastatik potansiyellerine göre dört evrede gruplandırılmaktadır [30]. Erken evre teşhiste, teşhisten sonraki 5 yılda hayatta kalma süreleri % 70'dir.

Evre 0: Kanseri hücreleri yalnızca memede lokalizedir ve metastaz yapmamıştır.

Evre I: Kanseri hücreleri yalnızca meme dokusu içerisinde göç etme özelliği kazanmışlardır. Bu evre *Evre IA* ve *Evre IB* olmak üzere iki alt gruptan oluşmaktadır.

Evre II : Bu evre iki alt grup içermektedir. *Evre IIA*'da 2-5 cm büyüklüğündeki tümörler lenf nodlarında bulunmaktadır. *Evre IIB*'de 2-5 cm büyüklüğündeki tümörler üç aksiller lenf nodlarından birinde ve göğüs kemiğine yakın lenf nodlarında bulunurlar.

Evre III: Bu evre üç alt grup içermektedir. *Evre IIIA* da, 5 cm den daha büyük tümörler aksiller lenf nodları veya göğüs kemiğine yakın lenf nodlarında

bulunabilirler. *Evre IIIB* de, tümör meme derisi veya duvarında şişkinlik veya yaraya neden olmaktadır. Meme derisinde kabarıklık, yanma hissi ve kızarıklık oluşur. *Evre IIIC* de, on ya da daha fazla aksiller lenf nodlarında, lenf nodunun üstünde ve köprücük kemiğinin altında yayılım görülebilmektedir.

Evre IV: Kanseri hücreleri metastatik özellik kazanmış olup vücudun diğer bölgelerine yayılmıştır.

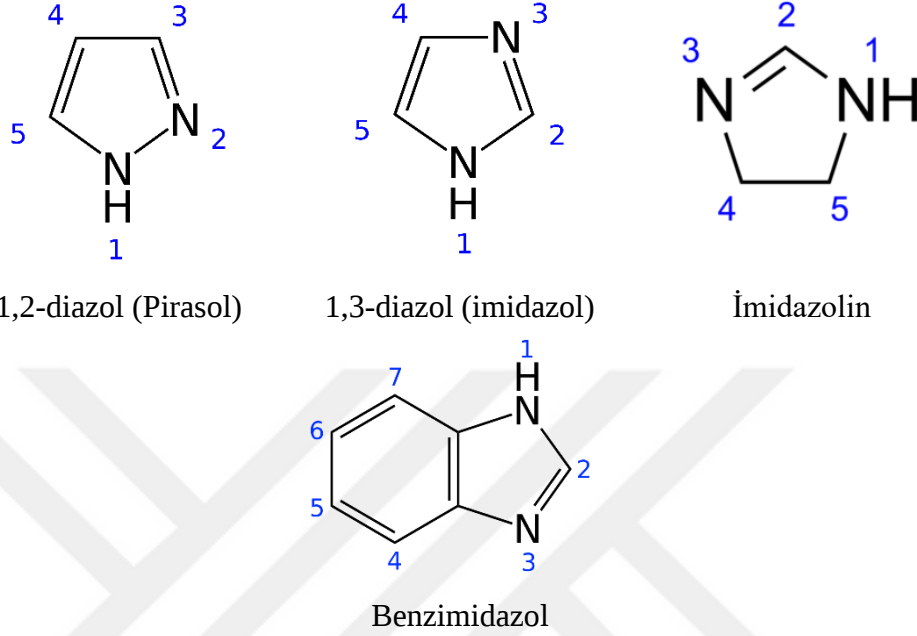
2.9. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri

Meme kanseri için tedavi yönteminin belirlenmesinde hastalığın evresi, hastanın durumu ve diğer faktörler göz önüne alınmaktadır. Meme kanseri tedavisinde; lokal (cerrahi tedavi, radyoterapi) ve sistemik tedavi (kemoterapi, endokrin tedavi) gibi farklı türde tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Cerrahi; kanserin evrenmesine ve türüne bağlı olarak, tümörün çıkarılması (lumpektomi), memenin tamamen çıkarılması (mastektomi) ve çevresindeki dokuların çıkarılması gibi farklı uygulama şekilleri bulunmaktadır. Radyasyon tedavisi; kanser hücrelerini öldürmek veya büyümelerini önlemek için yüksek enerjili X-ışını veya diğer radyasyon türlerinin kullanıldığı bir kanser tedavi yöntemidir. Kemoterapi; hücreleri öldürerek veya bölünmelerini durdurarak kanser hücrelerinin büyümesini durdurmak için ilaçların kullanıldığı bir kanser tedavi yöntemidir. Hormonal tedavi; hormonları etkilerini bloke eden ve kanser hücrelerinin büyümesini durduran bir tedavi şeklidir. Hedefe yönelik tedavi; normal hücrelere zarar vermeden belirli kanser hücrelerini tanımlamak ve onlara saldırmak için ilaçların veya diğer maddelerin kullanıldığı bir yöntemidir [31].

2.10. Azoller

Halkada karbon atomu ile birlikte azot, oksijen ve kükürt gibi farklı atomları da içeren bileşikler heterosiklik bileşikler olarak isimlendirilmektedir. Yaşam için gerekli olan heterosiklik bileşikler doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Heterosiklik bileşikler, tüm canlı hücrelerin metabolizmasında önemli rol oynamaktadırlar. Azot bazlı heterosiklik bileşikler, insanlık için önemli rol oynamaktadır. Azot atomu içeren beş üyeli halkalar azoller, iki azot içeren beş üyeli halkalar ise diazoller olarak bilinen heterosiklik bileşiklerdir. Bu bileşiklerin 1,2-diazoller ve 1,3-diazoller olmak üzere iki farklı izomeri

bulunmaktadır. Azoller ve türevleri, hem biyolojik aktiviteleri hemde endüstriyel kullanıma elverişli özellikleri nedeniyle yaygın kullanımı olan bileşik sınıfları arasında yer almaktadır [32].

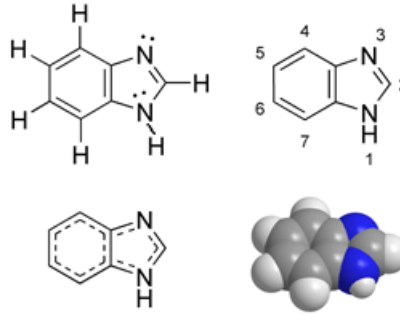


Şekil 2.6. En yaygın azol yapıları

En bilinen azol bileşikleri; imidazol, benzimidazol ve imidazolindir. 1,3-diazollerden olan imidazollerde (Im) 4 ve 5 numaralı karbonlar arasında çift bağ bulunurken imidazolinler (Imd) doymuş bileşiklerdir. Benzimidazol (BIm) yapısında ise imidazol halkasının 4. ve 5. konumlarında benzen halkası bulunmaktadır (Şekil 2.6.).

2.11. Benzimidol İçeren Bileşiklerin Sitotoksik Aktiviteleri

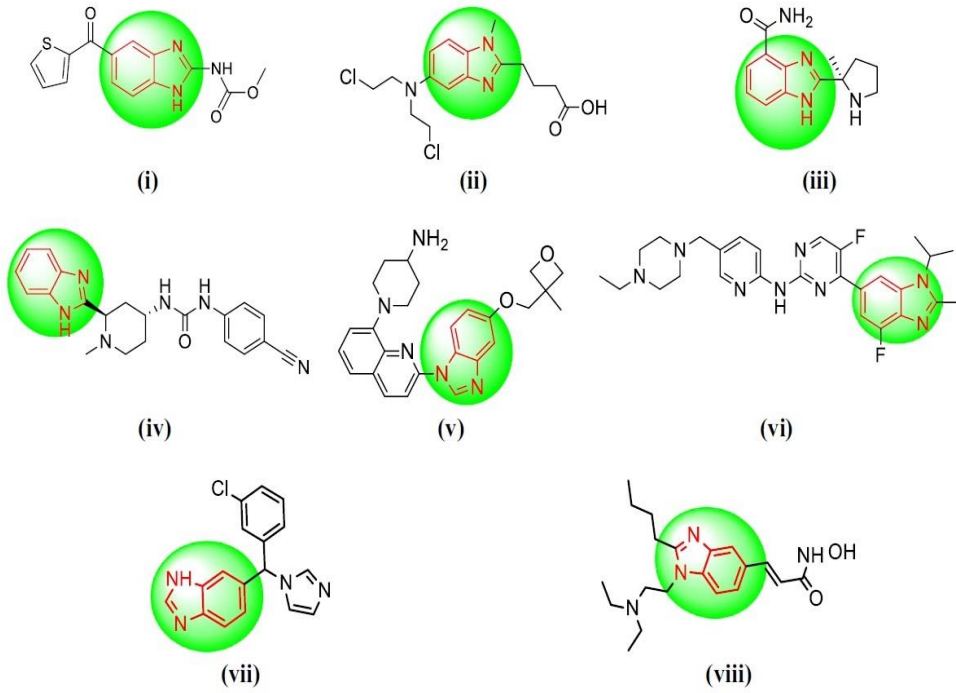
Azot bazlı heterosiklik bileşikleri arasında özellikle benzimidazol, sadece biyolojik olarak değil aynı zamanda endüstriyel olarak da büyük bir öneme sahiptir. Benzimidazoller, biyolojik olarak aktif olan ve tıbbi kimyada oldukça yüksek öneme sahip olan bir heterosiklik bileşik grubudur. Benzimidazol, benzen halkasına kaynaşmış bitişik konumda iki azot atomu içeren imidazol halkasına sahip bisiklik bir bileşiktir (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Benzimidazol yapısı.

İlk benzimidazol türevi 1872'de Hobrecker tarafından sentezlenmiştir [33]. Benzimidazolün farmakolojik özellikleri üzerine ilk araştırma makalesi 1943 yılında Goodman ve Nancy Hart tarafından yayınlanmış ve 1944 yılında Woolley bazı benzimidazol türevlerinin antibakteriyel aktivitelerini bildirmiştir. Vitamin B-12'nin asit hidrolizinden sonra, 1949'da Norman GB ve Karl Folker 5,6-dimetil benzimidazolün bozunma ürünü olduğu bildirmişlerdir [34]. Benzimidazol türevlerinin, antiviral, antikanser, antihelmintik, anti-inflamatuar, analjezik, antihistaminik, antiparazitik, antikonvülsan, antiülser, antihipertansif, antifungal, proton pompa inhibitörü ve antikoagülan gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olması nedeniyle, benzimidazollerin kimyası ve farmakolojisi tıbbi kimyada büyük ilgi görmektedir [35].

Hemen hemen tüm benzimidazol türevleri, iki halka sistemi ile farklı fonksiyonel gruplar içermektedirler ve bu özellikleri, yapısında yer aldıkları ilaçların fiziko-kimyasal, metabolik ve farmakokinetik özelliklerinde önemli modifikasyonlara yol açmaktadır. Benzimidazol halkası, modern ilaç keşfinde önemli bir farmakofordur. Benzimidazol içeren bazı ilaçların; (i) nocodazol, (ii) bendamustin, (iii) veliparib, (iv) glasdegib, (v) crenolanib, (vi) abemaciclib, (vii) liarozol, (viii) pracinostat yapıları **Şekil 2.8.**'de gösterilmiştir [36]. Benzimidazol türevleri, çeşitli enzim ve protein reseptörlerine karşı gösterdikleri afinite nedeniyle, ilaç dozlanması için ayrıcalıklı "alt yapılar" olarak sınıflandırılmaktadırlar.



Şekil 2.8. Benzimidazol içeren bazı ilaçlar [36].

Mevcut antikanser ilaçların başlıca sınırlamaları direnç gelişimi ve normal hücrelere toksisite göstermeleridir [37]. Benzimidazol ve türevleri, kemoterapötik değerleri nedeniyle de oldukça dikkat çekmektedir. Refaat, ve ark., (2010) tarafından yapılan çalışmada, 5-kloro veya 5-underiveized karboksilik asit grubunu içeren ve güçlü antitümör aktivite gösteren bazı yeni 2-ikameli benzimidazol türevleri sentezlenmiştir [38]. Anti-helmitik, benzimidazol metil karbamat ilaçların, antikanser aktivite sergiledikleri ancak suda çözünürlüklerinin düşük olduğu ve metastaz yapmış kanserlere sistemik uygulama için zayıf uygunluğa sahip oldukları öngörülmektedir. Cheong ve ark., (2018) çözünürlüğü artırmak için bir oksetan veya bir amin grubu içeren yeni benzimidazoller geliştirmişler ve bunların, belirgin bir toksisite olmaksızın prostat ve akciğer tümörlerinin büyümesinin önemli ölçüde inhibe ettiklerini göstermişlerdir [39]. İndol ve benzimidazol halkaları, farklı kanser hücrelerine karşı etkili ajanlar olan mevcut ilaçlarda bulunan biyolojik olarak değerli moleküllerdir. Fenilindol türevlerinin meme kanserini engellediği gösterilmiş ve son araştırmalar, farklı 2-benzimidazol türevlerinin çeşitli kanser hücre hatlarına karşı güçlü antikanser etkileri olduğunu göstermektedir. Karadayi ve ark., (2020)

p-florobenzil veya küçük alkil grupları ve elektron çeken gruplar içeren yeni indol benzimidazollerin oldukça etkili antikanser aktiviteye sahip olduklarını bildirmiştir [40]. Modifiye edilmiş nükleozitler, biyoorganik ve tıbbi kimyada değerli uygulamalara sahiptirler. Birçok farklı nükleozid analogunun yanı sıra tıbbi kimya ve sentetik biyolojide önemli olan doğal-olmayan nükleozitler de sentezlenerek biyolojik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Günümüzde, purin ve pirimidin nükleozidlerinin analoglarını modifiye etmek ve biyolojik aktivitelerini değerlendirmek için yapılan çalışmalar devam etmektedir. Pürin bazının yapısal benzeri olan benzimidazol, DNA ve RNA ile etkileşerek geniş bir biyolojik aktivite yelpazesi sağlamaktadır. Shinde ve ark., (2020) iki konumunda farklı ikame ediciler içeren ve umut verici anti-kanser aktivite sergileyen yeni şeker-modifiye benzimidazol nükleozidleri sentezlemişlerdir [41]. Wanga ve ark., [42] bir dizi chrysin benzimidazol türevi sentezlemiş ve bileşiklerin antikanser aktivitelerini MCF-7 meme kanser hücrelerine karşı araştırmışlardır. MCF-7 meme kanser hücrelerine karşı doza bağlı olarak en yüksek anti-proliferatif etkiye sahip olan bileşiğin IC₅₀ değeri 25.72 ± 3.95 µM olarak bulunmuş olup aynı bileşiğin, tümörlü farelere uygulanması sonucunda tümör büyümesinin baskılandığı belirtilmiştir. Başka bir çalışmada ise, florlu veya hidroksillenmiş alkil grupları içeren benzimidazol türevleri sentezlenerek antikanser aktivitelerini araştırılmıştır. U87 glioblastoma hücre hattında, bağlı herhangi bir grup içermeyen benzimidazol çekirdeği ve anilin azotuna bağlı 2-floroetil zinciri içeren bileşiğin (IC₅₀= 45.2 ± 13.0 µM), standart antitumor ilaç olarak kullanılan doksorubisinle (IC₅₀=16.6 ± 2.5 µM) kıyaslanabilir bir sitotoksik aktivite sergilediği bulunmuştur [43]. Shaker ve ark. [44] tarafından, A549 akciğer, HCT-116 kolon ve MCF-7 meme kanser hücrelerinde, doksorubine yakın veya doksorubisinden daha yüksek aktivite sergileyen 1-ikameli benzimidazol türevi bileşikler sentezlenmiştir. Onnis ve ark., [45] bir dizi yeni benzimidazol bileşiği sentezleyerek bu yeni bileşiklerin antiproliferatif aktiviteleri incelemişlerdir. Özellikle hidrazon farmakoforlarını içeren benzimidazol-hidrazon bileşiklerinin önemli antiproliferatif aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Çevik ve ark., [46] tarafından, benzimidazol türevleri sentezlenerek antikanser aktiviteleri A549 akciğer ve MCF-7 meme

kanser hücrelerinde araştırılmıştır. Bileşiklerin, hücre hattına bağlı olarak, antikanser ilaç cisplatinle karşılaştırılabilir veya daha yüksek sitotoksik aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur. Yadav ve ark., [47] tarafından yapılan çalışmada bir seri benzimidazol türevi sentezlenmiş ve sitotoksik aktiviteleri MCF-7 meme kanser hücreleri üzerinde araştırılmıştır. MCF-7 hücrelerine karşı IC_{50} değeri 0.0013 μM olarak bulunan bileşiğin, kemoterapötik ilaçlar olan 5-FU ($IC_{50}= 0.0461 \mu M$) ve karboplatinden ($IC_{50}= 0.2694 \mu M$) daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Yeni benzimidazol sınıfı bileşiklerin sentezlenerek antikanser aktiviteleri HCT-116 kolon kanser hücrelerine karşı araştırıldığı başka bir çalışmada ise, IC_{50} değeri 0.00005 μM olarak bulunan bileşiğin, kemoterapötik ilaç olan 5-FU ($IC_{50}= 0.00615 \mu M$)'ya göre belirgin yüksek antitumor etkinliği olduğu saptanmıştır [48]. Mohammed ve ark., [49] tarafından sentezlenen bir seri yeni benzimidazol bileşiğinin antikanser potansiyelleri MCF-7 meme, A549 akciğer ve HeLa endometrium, kanser hücrelerinde araştırılarak aktiviteleri cisplatin ile karşılaştırılmıştır. Sentezlenen bileşikler arasında, çalışılan kanser hücreleri üzerine cisplatin ile karşılaştırılabilir aktivite sergileyen bileşiklerin olduğu belirtilmiştir. Yeni sentezlenen benzimidazol, -kalkon, -merkaptasetohidrazid ve -tiyosemikarbazid türevleri ile birlikte benzimidazol-2-izoksazol türevi bileşiklerin PC12 (sıçan adrenal medulla feokromositoma) ve HEPG2 (insan karaciğer) kanser hücrelerinde yüksek sitotoksik aktivite gösterdikleri bulunmuştur [50]. Bir dizi yeni nitrobenzimidazol sentezlenmiş ve test edilen tüm bileşiklerin insan hepatoselüler (HEPG2), insan meme (MCF7) ve insan kolon (HCT 116) kanser hücre hatlarına karşı düşük IC_{50} değerleri ile, (<10 mikrog/ml) yüksek antitümör aktivite sergiledikleri belirtilmiştir [51]. Bir dizi yeni sentezlenen bis(benzimidazol), bis(benzoksazol), benzotiazol ve bunların türevi bileşiklerin, A-549, BFTC-905, RD, MES-SA ve HeLa hücre hatlarına karşı yüksek *in vitro* antitümör aktivite gösterdikleri bulunmuştur [52].

2.12. Metal-Azol Kompleksleri

Günümüzde halen, metastaz özellikteki tümörlerin çoğu formunun tedavisinde kullanılabilecek güncel bir onkoterapi mevcut değildir. Bu nedenle, yeni aktif kemoterapötiklerin keşfine olan ihtiyaç güncelliğini korumaktadır [53,54].

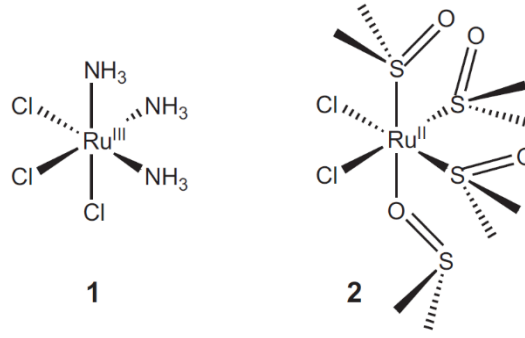
Metalloterapötik ajanlar, kanser hücresi bölünmesini engelleyerek, DNA hasar indüksiyonu ile kanser hücrelerinin apoptoza gitmelerini tetikleyerek ve DNA-tamir mekanizmalarını bozarak etki göstermektedirler [55-57]. Platin bileşiklerinin tesadüfi keşfi ve geliştirilmesinden sonra metal yapılar günümüzde, tıbbi kimya ve ilaç geliştirme alanlarında önemli rol oynamaktadırlar [58, 59]. İnsanlarda görülen farklı kanserlerin tedavisinde klinikte en etkin ve yaygın olarak kullanılan platin bazlı ilaçlardan birisi sisplatindir. Ancak sisplatinin önemli terapötik etkilerine eşlik eden ciddi yan etkileri nedeniyle ilaç direncinde artış gözlenmekte ve bu da ilacın etkinliği azalmaktadır [60]. Bu nedenlerle platine alternatif farklı geçiş metallerini içeren antitumor potansiyele sahip yeni bileşikler araştırılmaktadır. Bazı vitaminler ve ilaçların yapılarında yer alan heterosiklik bileşikler arasında özellikle *N*-donör ligandı içeren bileşiklerin, birçok farklı biyolojik süreçte önemli rollerinin olduğu bilinmektedir [61-63]. Birçok araştırmacı heterosiklik bileşiklerin çeşitli metallerle oluşturdukları bileşiklerin sitotoksik aktiviteleri üzerine araştırmalar yapmaktadırlar [63-66].

2.13. Rutenyum Komplekslerinin Sitotoksik Aktiviteleri

Rutenyum, sahip olduğu kimyasal ve biyolojik özellikleri nedeniyle farmakolojik uygulamalar için uygun çalışma koşulları sağlamaktadır. Rutenyum bileşiklerini, tıbbi uygulamalar için önemli alternatifler haline getiren özellikler; (i) sisplatine dirençli bazı hücre hatlarına karşı aktif olmaları, (ii) normal hücrelere kıyasla kanser hücreleri için daha yüksek seçiciliklerinden dolayı yan etkilerinin düşük olması, (iii) bu bileşiklerin hedefleri için daha yüksek seçiciliği, sağlıklı doku ile karşılaştırıldığında tümör hücreleri tarafından seçici alımı, (iv) çeşitli biyolojik moleküllere bağlanmada demiri taklit edebilme yeteneği, (v) redoks oksidasyon durumları, (vi) su toleransları ve nispeten düşük indirgene potansiyeli olarak sıralanmaktadır [67, 68]. Rutenyum kompleksleri ayrıca, sadece kare düzlemsel koordinasyon oluşturan platin komplekslerinin aksine oktahedral geometri oluşturma eğiliminde de olduklarından ligandların bağlanması için iki ek alan daha sağlamaktadırlar [69]. Bu ise, bağlanabilecek ligandların ve tasarlanacak olan bileşiklerin çeşitliliğini artırarak anti-kanser potansiyeli yüksek bileşiklerin sentezlenmesine olanak sağlamaktadır.

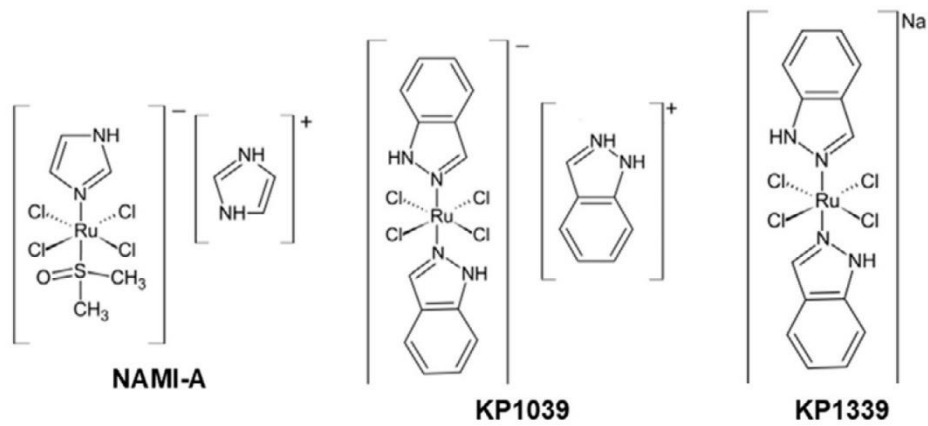
Rutenyum, farklı elektronegatifliğe sahip elementlerle güçlü bağ yapabilmesi nedeniyle, DNA'nın yanısıra farklı moleküllere de bağlanabilmektedir [69]. Rutenyum, çok çeşitli oksidasyon durumlarına sahip olmasına rağmen, anti-tümör özellikteki rutenyum kompleksleri, yüksek oksidasyon durumlarının nispeten kararsız olması nedeniyle öncelikle +2 ve +3 durumlarında bulunurlar. Hücrenin içinde, +2 ve +3 oksidasyon durumları, karşılıklı dönüşüm için gereken düşük enerji bariyeri nedeniyle kolaylıkla birbirine dönüşebilmektedir [69]. *In vivo* kanser ortamında (hipoksi, yüksek GSH, düşük pH), rutenyumun oksidasyon durumu, +3'ten biyoaktivite gösterdiği +2'ye düşer. Tümörden etkilenen hücreler, proliferasyonun bir sonucu olan yüksek metabolizmaları nedeniyle düşük oksijen içeriğine sahiptirler. Bu nedenle, rutenyumun oksidasyon durumunun +3'ten +2'ye düşmesi, ilacı kanserle enfekte olmuş hücrelere saldırması için aktive ederken, normal hücreler ise metalin +3 durumunda etkilenmeden kalmaktadırlar [70-72]. Rutenyum kompleksleri, yavaş ligand değişim kinetiği sergilemekte veya başka bir ifadeyle, biyolojik ortamlarda kararlıdır. Hızlı ligand ayrışma oranları, ilacın hedef hücrelere salınmadan önce deaktivasyonuna yol açarak, potansiyel olarak ilaç aktivitesini azaltmakta ve yan etkileri arttırmaktadır. Rutenyum komplekslerindeki değişim oranı, aktif ilacın kontrollü salınımına olanak sağlamaktadır [69, 73]. Rutenyum içeren metalloterapötiklerle ilgili çalışmalar da gün geçtikçe artmakta olup birçok yeni Ru-bileşiğinin antitümör aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir [74]. Rutenyum terapötikleri, klinik araştırmalarda başarılı bir şekilde kullanılmış ve farklı antitümör etki mekanizmaları rapor edilmiştir [74].

Kanser aktivitesi için değerlendirilen ilk rutenyum bileşikler kloro-amin Ru(II) ve Ru(III) kompleksleri olup bu kompleksler Clarke ve ark., [75] tarafından kloro-amin Pt(II) antikanser ilaçların yapısal analogları olarak sentezlenmişlerdir. Durig ve ark., *fac*-Ru(NH₃)₃Cl₃ (**1**) kompleksinin, *E. coli* hücrelerinin filamentli büyümesini aynı derişimdeki sispaltinle benzer indüklediğini gözlemlemişlerdir [76]. 1980'lerin ortalarında Mestroni ve ark., [77] tarafından sentezlenen *cis*-[RuCl₂(dmsö)₄] (dmsö = dimetilsülfoksit) (**2**) Ru(II) kompleksinin antitümör aktivite gösterdiği saptanmıştır. [Şekil 2.9.]



Şekil 2.9. Sentezlenen ilk Ru(II) ve Ru(III) komplekslerinin yapıları [78]

Platin içeren antikanser komplekslerin yüksek sitotoksik etkilerine alternatif olarak, daha düşük toksisiteli çok sayıda rutenyum bileşiği tasarlanmıştır [30]. Bunlar arasında, NAMI-A, KP1019 ve KP1339 rutenyum(II) komplekslerinin klinik faz I/II çalışmaları yapılmıştır (**Şekil 2.10.**) [79, 80]. NAMI-A, en çok çalışılan ve ilk anti-metastatik ilaç olarak klinik denemesi yapılan Ru kompleksidir [81]. NAMI-A, birçok hayvan tümör modelinin yer aldığı preklinik çalışmalarda sitotoksik etki göstermeksizin tümör metastazını inhibe etmiştir. Çeşitli solid tümörlü hastalarda monoterapi olarak NAMI-A ile faz I klinik çalışma başlatılmış ancak faz II klinik çalışmalarda gözlenen kısıtlı etkinliği nedeniyle faz II çalışması sonlandırılmıştır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalarda NAMI-A ile gempitabin kombinasyon halinde klinik faz I/II çalışmaları da yapılmıştır.

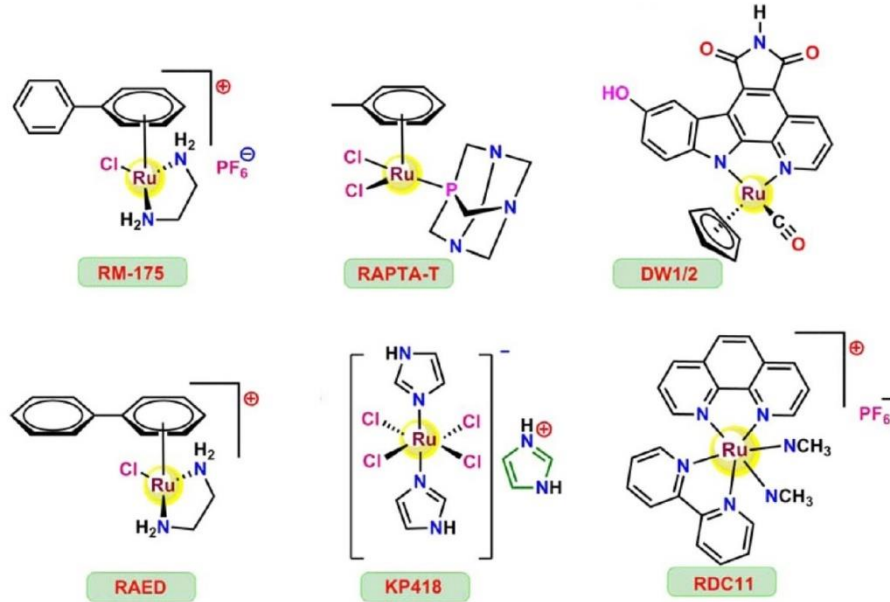


Şekil 2.10. Ru komplekslerinin yapıları (NAMI-A, KP1039, KP1339) [64]

Kombinasyonel uygulamanın tek başına gempitabin ile karşılaştırıldığında, tedavinin etkinliği azaltması nedeniyle klinik çalışmalar durdurulmuştur [82].

KP1019 ve KP1339 komplekslerinin, platin-dirençli kolon karsinomu hücre hatlarına karşı etkili olduğu ve ilerlemiş katı tümörlü hastalarda yapılan faz I çalışmasında ciddi yan etkiler göstermediği bildirilmiştir [82]. KP1019'un sudaki çözünürlüğünün düşük olması ileri çalışmalarını kısıtlamıştır ancak KP1019'un sodyum tuzu olan KP1339'un çözünürlüğü yüksek olup klinik çalışmaları devam etmektedir [83]. Üç adet 4,7-difenil-1,10-fenantrolin ligandı içeren Ru(II) kompleksinin, mikrotübüllere bağlanan ve işlevlerini bozan ilk metal kompleksi olduğu bildirilmiştir. Kompleksin, H358 akciğer ve MCF-7 meme kanser hücrelerinde IC₅₀ değerlerinin sırasıyla; 1.7 µM ve 1.5 µM olduğu ve güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Kompleksin, mikrotübülleri *in vitro* olarak paklitaksel'e benzer şekilde stabilize ettiği saptanmıştır [84]. Semikinonat ve 4,7-difenil-1,10-fenantrolin ligantlarını içeren Ru(II) kompleksinin HeLa, A2780 ve A2780cisR kanser hücre hatlarına karşı 0.45-0.67 µM aralığında değişen düşük IC₅₀ değerleri ile oldukça yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur. Kompleksin ayrıca, HeLa çok hücreli tümör sferoidlerine (MCTS) karşı cisplatin ve doksorubisinden yaklaşık 3 kat daha fazla toksik etki gösterdiği ve *in vivo* olarak farelerde tümör büyümesini azalttığı ve yaşam sürelerini uzattığı bildirilmiştir [85]. Fenantrolin ve fenantroimidazol yapılarını içeren Ru(II) kompleksinin, HepG2, A549, CNE-1 (nazofarenks) kanser hücre dizilerinde 3.0-4.0 µM IC₅₀ değerleri ile güçlü ve seçici bir sitotoksikite gösterdiği saptanmıştır. Kompleksin, apoptozisi mitokondri-bağlı olarak aktive ettiği düşünülmektedir. Kompleksin, zebra balığı zenograf modelinde tümör hücresi büyümesini engellediği rapor edilmiştir [86]. Fenantrolin ve izokinolin ligandları içeren Ru(II) kompleksi, S ve G2/M fazlarında durdurma, mitokondriyal membran potansiyelini azaltma, hücre içi ROS oluşumunu teşvik etme ve hücre apoptozisine yol açan DNA hasarını tetiklemeyi içeren karma etki mekanizması göstermiştir. Sonuç olarak, kompleksin NCI-H460, A549, HeLa ve MCF-7 kanser hücre hatlarında 1.8-7.0 µM IC₅₀ değerleri ile yüksek sitotoksikite gösterirken, hem normal bronşiyal HBE hücrelerine (IC₅₀ = 20 µM) hem de zebra balığı embriyolarına karşı <16 µM daha düşük toksisite sergilediği belirtilmiştir [87].

Diamin yapılarına sahip rutenyum bileşikler, ileriye dönük yeni metal bazlı antitümör terapötikleri olarak değerlendirilmektedir (Şekil 2.11.). RM-175, rutenyum organometalik kurşun bileşiği olup apoptozu, Bax, p53 ve klonojenitenin kaybıyla indülediği belirtilmiştir [88]. RAPTA-T, bir başka rutenyum içeren etkili RAPTA- türevi olup, meme kanseri hücrelerine karşı anti-invaziv ve antimetastatik etkiler gösterdiği bulunmuştur [89]. DW1/2, bir sinyal iletim yolunu hedefleyen ilk rutenyum antitümör ajanıdır. DW1/2 bir proteine bağlanmakta ve bu nedenle bir glikojen sentaz kinaz (GSK)-3 β inhibitörü olarak karakterize edilebilmekte ve aynı zamanda p53'ün güçlü bir aktivatörü olarak davranabilmektedir [90].



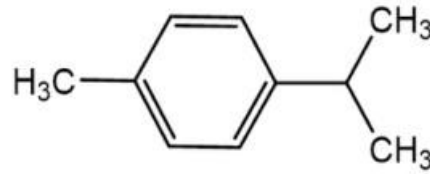
Şekil 2.11. Rutenyum kurşun komplekslerinin yapıları [74]

RAED44, 1,2-etilendiamin ligandı taşıyan rutenyum-aren bileşiğidir. DNA'ya bağlanma ve guanin ile ürün oluşturma yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Bu rutenyum terapötik kompleksinin, DNA etkileşimi ile neoplastik hücrelerde güçlü *in vitro* sitotoksikite sergilediği bildirilmiştir [91, 92]. KP418 yapısında, imidazol ve kurşun içeren kompleks olup murin P388 lösemi ve B16 melanom hücrelerine karşı terapötik aktivite gösterdiği belirtilmiştir [93]. Rutenyum ve kurşun içeren RDC11 kompleksinin, sisplatine duyarlı olanlar ve dirençli olanlar dahil olmak üzere çok sayıda tümör hücre dizisi için *in vitro* sitotoksik aktivite sergilediği bulunmuştur. RDC11 tedavisinin, sisplatine kıyasla kronik toksisiteyi

azalttığı ve farelerde çeşitli zenograf model kanserlerin büyümesini sisplatinden daha etkili bir şekilde engellediği gözlenmiştir [94]. Kurşun ve Ru ve içeren ONCO4417 kompleksi, RM175 kompleksinde bulunan heksaflorofosfat anyonu (PF₆⁻) yerine klor eklenmesiyle elde edilmiştir. *In vitro* sonuçlar, ONCO4417'nin birçok tümör hücresinde metaztazı önlemede önemli bir etkinlik sergilediği ve platine eşdeğer etkiye sahip olduğunu göstermiştir [95].

2.14. *p*-simen İçeren Komplekslerinin Sitotoksik Aktiviteleri

p-simen (p-izopropiltoluen), çeşitli aromatik bitki türlerinin uçucu yağlarında yaygın olarak bulunan monosiklik monoterpen hidrokarbondur (**Şekil 2.12.**).



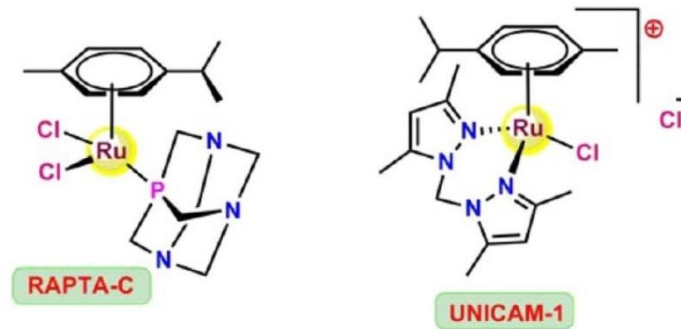
Şekil 2.12. *p*-simenin kimyasal yapısı

p-simenin, antimikrobiyal, antioksidan, anti-inflamatuar, antiparaziter, antidiyabetik, antiviral ve antitümör gibi birçok farklı farmakolojik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir [96-102]. Zhou ve ark., (2013) *p*-simenin mide SGC-7901, karaciğer BEL-7404 ve nazofaringeal CNE-1 kanser hücre hatları için IC₅₀ değerlerini sırasıyla; 20.7, 71.1 ve 42.6 µM olarak belirlemişlerdir [103]. Başka bir çalışmada *p*-simenin, MCF-7 ve MDA-MB-453 meme kanseri, SW-480 kolon ve IM9 mutiple miyeloma kanser hücreleri için sırasıyla; 13.8 ± 1.3 µM, 17.3 ± 0.6 µM, 13.8 ± 0.1 µM ve 12.1 ± 0.5 µM IC₅₀ değerlerine sahip oldukları saptanmıştır [104]. MDA-MB-435 meme ve HCT116 kolon kanser hücreleri için sırasıyla; 55 ± 015 ve 80 ± 5 µM IC₅₀ değerlerine sahip olan *p*-simenin kanser hücrelerinin proliferasyonunu belirgin bir şekilde inhibe ederek anti-invaziv etki gösterdiği bildirilmiştir [105, 106]. Li ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada *p*-simenin, HT1080 insan fibrosarkom hücre hatlarında ERK1/2 ve p38 MAPK sinyal yollarının inhibisyonu aracılığıyla 12-O-tetradekanoil-forbol-13-asetat (TPA)-indüklü MMP-9 ekspresyonunu önemli ölçüde baskıladığı gösterilmiştir. Çalışmada ayrıca *p*-simenin, HT-1080 hücrelerinin invaziv

aktivitesini bazal seviyede azalttığı (600 μ M'de %87 inhibisyon) bulunmuştur [107].

Yapısında *p*-simen içeren birçok bileşiğin antikanser aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir [108]. Bhattacharyya ve ark. (2017), rutenyum (II)-*p*-simen kompleksleri sentezleyerek, komplekslerin MCF-7 meme, LNCaP prostat, MIA PaCa-2 pankreas, HepG2 karaciğer ve HFF-1 sünnet derisi fibroblast olmak üzere altı farklı insan hücresi üzerinde antikanser aktivitesini araştırmışlardır. Rutenyum (II)-*p*-simen komplekslerinin, incelenen hücre hatlarına karşı 6.4 ± 0.8 ila 11.7 ± 1.2 μ M arasında değişen IC_{50} değerleri ile önemli antiproliferatif aktivite gösterdikleri bulunmuştur [109]. Rutenyum (II)-*p*-simen komplekslerinin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde antikanser etkilerini, hücre döngüsü durdurma, hücre apoptozu ve otofajinin indüklenmesi, DNA ve insan serum albümini (HSA) ile etkileşim, reaktif oksijen türlerinin modülasyonu, kanser hücre çoğalmasının baskılanması dahil olmak üzere birçok farklı kontrol noktasını hedefleyerek gösterdikleri bildirilmiştir [110]. Ayrıca, Meng ve ark. (2019), tarafından yapılan çalışmanın sonuçları, organo-metalik rutenyum-*p*-simenin, apoptotik sitokrom c seviyelerini artırarak ve kaspaz-3 ve kaspaz-9 proteinlerini aktive ederek insan rahim ağzı kanseri (HeLa) hücrelerinin apoptozunu indüklediğini ve böylece kanser hücrelerinin göçünü engellediğini göstermiştir. Bu etkiye, telomeraz aktivitesinin inhibisyonu ve mitokondri disfonksiyonunun aracılık ettiği belirtilmiştir [111]. Bhatti ve ark. (2019), tarafından yapılan başka bir çalışmada Ru (II)-*p*-simen komplekslerinin insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) A549 ve A427 hücre hatları üzerindeki antikanser etkileri araştırılmıştır. Ru(II)-*p*-simen kompleksinin 20 μ M derişimde, hücre çoğalmasını etkili bir şekilde inhibe ettiği ve G0/G1 hücre döngüsü fazında hücre yüzdesini, pozitif kontrol olarak kullanılan standart ilaç sisplatin (CP) ile karşılaştırıldığında, NSCLC A549 ve A427 hücrelerinde sırasıyla, % 15.72 ve % 16.42 arttırdığını göstermişlerdir. TUNEL analiz sonuçları da, Ru(II)-*p*-simen kompleksinin, NSCLC A549 ve A427 hücrelerinin metastaz yeteneklerini baskılayarak hücre apoptozunu önemli ölçüde indüklediğini ortaya koymuştur. Ru(II)-*p*-simen kompleksinin, apoptozis ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde anahtar rol oynayan, Poli (ADP-riboz)

polimeraz (PARP) aktivasyonunu ve p53, p21 ve p15 tümör baskılayıcı protein ifadelerinin yukarı regülasyonunu içeren kaspaz-3/-9 aktivasyonu yoluyla, NSCLC hücrelerinin apoptozunu indüklediği belirlenmiştir [112]. Bir başka çalışmada sentezlenen rutenyum-*p*-simen bileşiğinin, insan yumurtalık karsinomu A2780 ve crA2780 hücre hatları üzerinde önemli bir antitümör etkiye sahip olduğu ve antikanser etkinin, tümör hücre dizilerini apoptoza götüren S ve G2/M fazlarının inhibe edilmesi sonucunda DNA sentezinin azalmasıyla ilişki olduğu bulunmuştur [113]. Başka bir araştırma, Osmiyum(II)-*p*-simen kompleksi sentezlenerek, A2780 insan yumurtalık kanseri, HEK-293 tümörojenik olmayan ve insan endotelial ECRF24 hücreleri üzerindeki antikanser etkisi araştırılmıştır. Osmium(II)-*p*-simen kompleksinin, civciv embriyosu korioallantoik membran (CAM) modelinde vaskülarizasyonun bozulması ve apoptoz indüklenmesi aracılığıyla çalışılan hücre hatlarına karşı önemli sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir [114]. RAPTA-C, *p*-simen içeren bir Ru(II) kompleksi olup, kanser hücrelerinde kromatin içindeki histon proteinini tercihli olarak hedeflemektedir. RAPTA-C'nin sağlıklı hücreler için toksik görünmemekle birlikte hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda neoplastik hücrelere karşı antimetastatik, antianjiyogenik ve antitümör aktivite sergilediği belirtilmiştir [115].



Şekil 2.13. Rutenyum *p*-simen komplekslerinin yapıları [74]

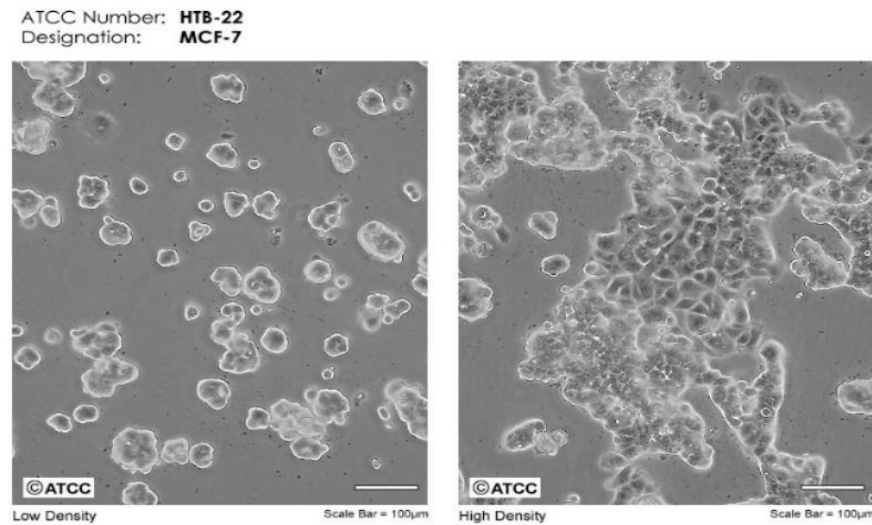
RAPTA-C'nin erlotinib ile kombinasyonel uygulamasının etkili antikanser aktivite gösterdiği bildirilmiştir [116]. RAPTA-C ile aynı *p*-simen ligandını içeren bir başka Ru(II) kompleksi sentezlenmiş ve A2780 ve kolon HT-29 kanser hücre hatlarına sırasıyla; 1.98 μM ve 3.17 μM IC_{50} değerlerine sahip olduğu ve

yüksek sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Kompleksin, tümör zenograf modelinde hem tümör büyümesini hem de metastazı inhibe ettiği ve sispilatinden daha iyi tolere edilebilir ve daha etkili olduğu belirtilmiştir [117].

RAPTA-C'nin Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC) fare meme tümöründe, hücre ölümünü p53-JNK ve mitokondriyal yollar aracılığıyla indüklediği belirlenmiştir [118]. Rutenyum, kurşun ve *p*-simen içeren bir başka bileşik, UNICAM-1, suda çözünen bir kompleks olup A17 üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde büyümeyi önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır [119].

2.15. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatlarının Özellikleri

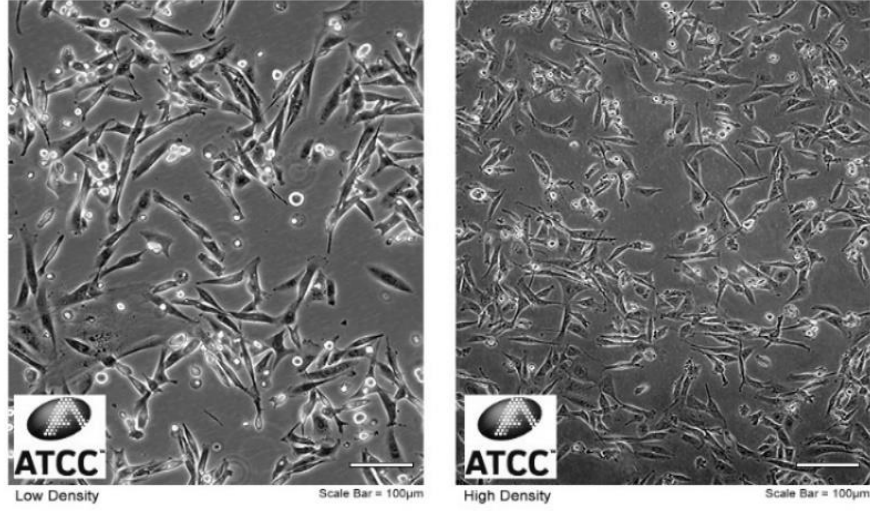
Kafkas kökenli bir kadından izole edilen, meme adenokarsinoma, MCF-7 meme kanser hücre hattı, HER2 bakımından negatif iken östrojen ve progesteron reseptörlerince pozitif olup östrojen uyarılması ile büyümektedir (Şekil 2.14.). MCF-7 hücreleri *in vitro* meme kanseri çalışmalarında, meme epitelini taklit eden karakteristikleri sebebiyle sıklıkla kullanılmaktadırlar.



Şekil 2.14. MCF-7 hücre hattı morfolojisi [120].

Kafkas kökenli bir kadının meme dokusundaki adenokarsinomadan elde edilen MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı, yüksek agresif potansiyele sahip olup östrojen, progesteron ve HER2 reseptörleri bakımından üçlü negatif özellik göstermektedir (Şekil 2.15.). Bu nedenle östrojen reseptörü aracılı kemoterapötik ilaçlardan etkilenmemektedir.

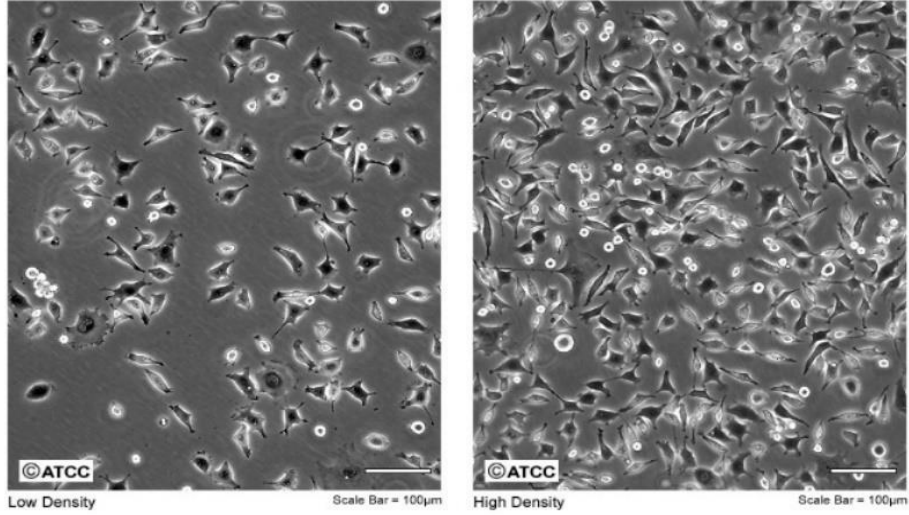
ATCC Number: **HTB-26™**
Designation: **MDA-MB-231**



Şekil 2.15. MDA-MB-231 Hücre hattı morfolojisi [120]

Fare (erkek) sağlıklı adipoz dokudan elde edilen L-929 hücre hattı, fibroblastik karakteristiğe sahiptir (Şekil 2.16.).

ATCC Number: **CCL-1**
Designation: **NCTC clone 929**

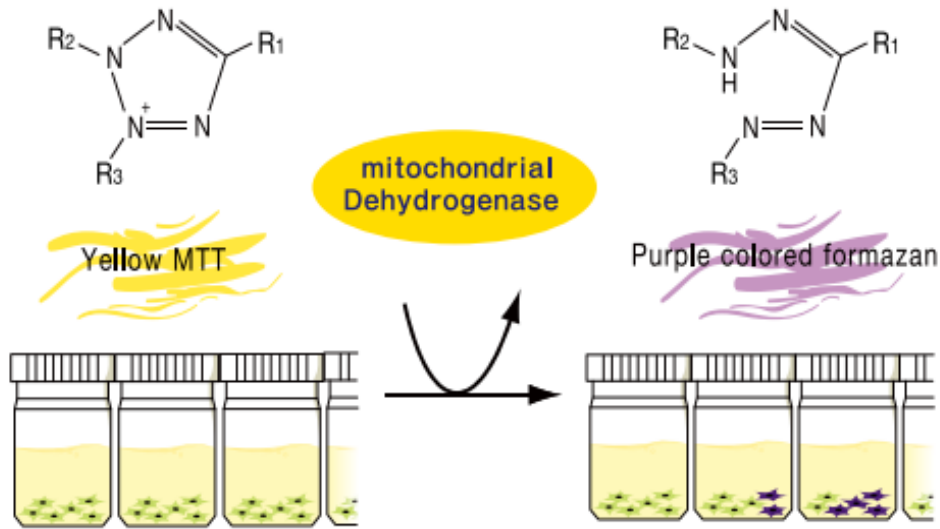


Şekil 2.16. L-929 Hücre hattı morfolojisi [120].

2.16. Sitotoksik Aktivite Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

İlaç adayı bileşiklerin olası sitotoksik potansiyellerinin incelenmesinde kullanılan yöntemlerin en önemlisi hücre toksisite analizleridir.

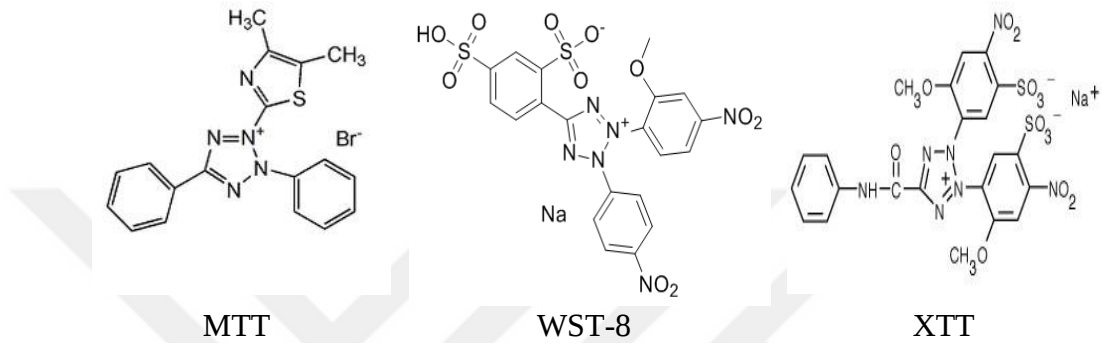
Toksisite testlerinde hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla tetrazolyum tuzları sıklıkla kullanılmaktadırlar. Tetrazolyum tuzları, heterosiklik yapıya sahip olan organik bileşiklerdir. Tetrazolyum tuzları, elektron alarak indirgenmekte ve formazon adı verilen kristal yapılara dönüşerek renk değiştirmektedirler. Tetrazolyum bileşiklerinin bu özellikleri, yalnızca canlı hücrelerde görülmekte olup cansız hücrelerde renk değişimi oluşmamaktadır [121]. En yaygın kullanılan tetrazolium tuzları; 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (**MTT**)'yi takiben 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (**MTS**), 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid (**XTT**) ve 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum (**WST**) olup kolorimetrik analiz metodlar olarak kullanılmaktadırlar [122].



Şekil 2.17. MTT prensibi

Tetrazolyum bileşikleri, hücre zarından geçme özellikleri ve çözünülebilme özelliklerine göre iki grupta incelenmektedirler. İlk grupta yer alan MTT bileşiği, pozitif yüklü olup ökaryotik hücre zarından kolaylıkla geçebilmekte ve hücre içerisinde elektron alıp indirgenerek suda çözünmeyen mor renkli bir formazon kristal oluşturmaktadır [123, 124]. Negatif yüklü XTT, WST ve MTS ise ikinci grupta yer alan tetrazolium tuzları olup ökaryotik hücre zarından geçememektedirler. Bu nedenle, XTT, WST ve MTS ile birlikte elektron alıcı

yapıların (fenazin metil sülfat veya fenazin etil sülfat) bulunması gerekmektedir [125, 126]. Elektron alıcı moleküller, ökaryotik hücre zarından geçerek sitoplazma veya plazma zarından aldıkları elektronları tetrazolium tuzlarına aktararak suda çözünür formazan kristalleri oluşturmaktadırlar [127]. Hücre toksisitesi analizlerinde en sık kullanılan tetrazolyum bileşiklerinin yapıları Şekil 2.18.'de verilmiştir.



Şekil 2.18. MTT, WST-1 ve XTT yapıları [127].

Tetrazolyum tuzları kullanılarak yapılan canlılık testleri; (1) hücreler ile bileşiklerin belirli sürelerde inkübe edilmesi, (2) bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılarak tetrazolium tuzunun eklenmesi ve tetrazolium tuzu ile inkübasyon, (3) oluşan renk değişimlerinin spektrofotometrik analiz yöntemleri ile analiz edilmesi basamakların içermektedir [122, 128, 129]. Analiz sonucunda saptanan absorbans miktarı, canlı hücre sayısı ile orantılı olarak değişmektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışmanın Yapıldığı Yer, Çalışma Materyali ve Zamanı

Ligandlar (**1a-c**) ve Ru(II)-*p*-simen komplekslerinin (**2a-c**) sentezi ve sitotoksik aktivite çalışmaları, 2018 yılında, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirildi. MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) ve MCF-7 (ATCC® HTB-22™) meme kanser hücreleri ATTC'den, L-929 fare sağlıklı fibroblast hücreleri ECACC'den ticari olarak temin edildi.

3.2. Kullanılan Sarf Malzeme ve Cihazlar

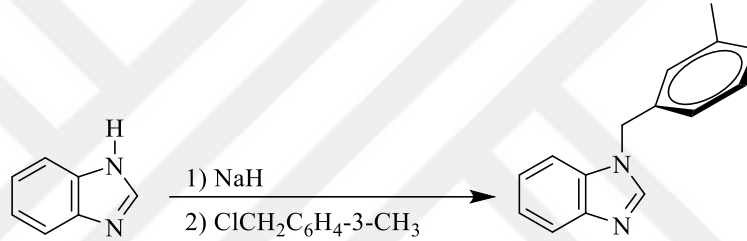
Malzeme	Marka
MDA-MB-231 hücre hattı	ATTC (HTB-26)
MCF-7 hücre hattı	ATTC (HTB-22)
L-929 hücre hattı	ECACC (NCTC)
DMEM	Sigma (D6429)
RPMI-1640	ATTC (30-2001)
Fetal bovin serum	ATTC (30-2020)
Penicilin-Streptomycin	ATTC (30-2300)
%0.25 Tripsin-EDTA (1X)	Sigma
MTT	Serva
Sodyum hidrür	Sigma
3-Metilbenzilklorür	Sigma
2-Klorbenzilklorür	Sigma
Etoksietilklorür	Sigma
[RuCl ₂ (<i>p</i> -simen)] ₂	Sigma
Benzimidazol	Sigma
Hekzan	Sigma
Dietileter	Sigma
Toluen	Sigma
Diklorometan (DCM)	Sigma
Tetrahidrofur	Sigma
Etanol	Sigma
Tripan Blue	Sigma
PBS	Sigma
Laminar Kabin	Bilser Biosafety
CO ₂ İnkübarör	ESCO
ELISA	Biotek, Epoch
Hücre görüntüleme cihazı	Juli FL
-80 °C	Nüve

3.3. Genel Sentez Yöntemi

Sentezlenen bileşiklerin bazıları havanın nemine ve oksijene karşı hassas olmaları nedeniyle tüm deneyler inert atmosferde gerçekleştirildi. Bundan dolayı tepkimede kullanılan cam malzemeler kullanılmadan önce vakum altında ısıtılarak içerisindeki nem ve oksijen uzaklaştırılıp daha sonra argon gazı ile dolduruldu. Çözücüler ve reaktifler, kullanılmadan önce literatürde verilen yöntemler esas alınarak kurutulup inert ortamda saflaştırıldı [130]. Benzimidazol türevi ligantlar ve Ru(II)-*p*-simen kompleksleri literatüre göre sentezlendi [131,132].

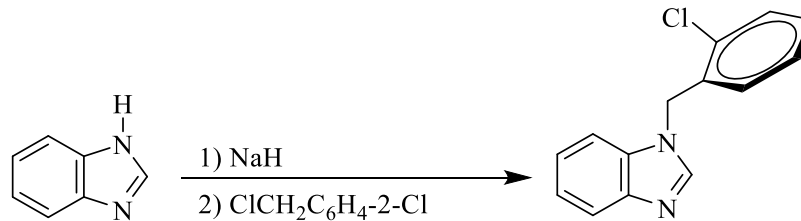
3.4. Azol Ligandlarının Sentezi

3.4.1. *N*-(3-Metilbenzil)benzimidazol, 1a



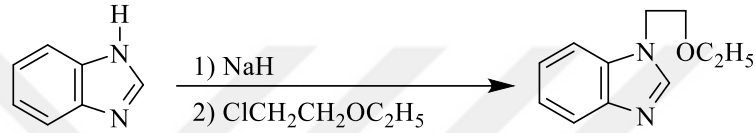
Hekzan ile yıkanıp kurutulmuş sodyum hidrür (1.2 g, 50 mmol) bir şilence konuldu. Üzerine THF (50 mL) eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika karıştırıldı. Karışım üzerine benzimidazol (5.90 g, 50 mmol) azar azar ilave edildi. Çözeltiye 3-metilbenzilklorür (7.73 g, 50 mmol) eklendi. Oluşan çözelti bir gece oda sıcaklığında, 3 saat su banyosunda karıştırıldı. Çözelti soğutuldu ve THF vakumda uzaklaştırıldı. Elde edilen katı üzerine diklormetan (40 mL) ilave edildi ve filtreden süzülde. Ham ürün DCM/Et₂O karışımında kristallendirildi. Verim: 7.2 g; % 65.

3.4.2. *N*-(2-Klorbenzil)benzimidazol, 1b



Hekzan ile yıkanıp kurutulan sodyum hidrür (1.2 g, 50 mmol) bir şilenke konuldu. Üzerine THF (50 mL) eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika karıştırıldı. Karışım üzerine benzimidazol (5.90 g, 50 mmol) azar azar ilave edildi. Çözeltiye 2-klorbenzilklorür (8.05 g, 50 mmol) eklendi. Oluşan çözelti bir gece oda sıcaklığında, 3 saat su banyosunda karıştırıldı. Çözelti soğutuldu ve THF vakumda uzaklaştırıldı. Elde edilen katı üzerine diklormetan (40 mL) ilave edildi ve filtreden süzüldü. Ham ürün DCM/Et₂O karışımında kristallendirildi. Verim: 6.06 g; % 50.

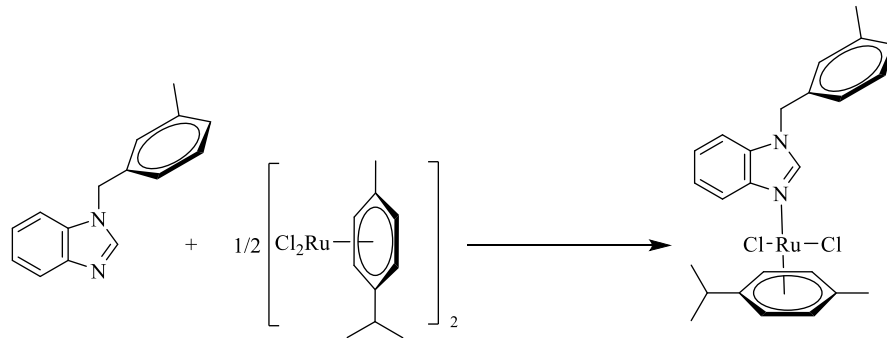
3.4.3. *N*-(Etoksietil)benzimidazol, 1c



Hekzan ile yıkanıp kurutulan sodyum hidrür (1.2 g, 50 mmol) bir şilenke konuldu. Üzerine THF (50 mL) eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika karıştırıldı. Karışım üzerine benzimidazol (5.90 g, 50 mmol) azar azar ilave edildi. Çözeltiye etoksietilklorür (5.4 g, 50 mmol) eklendi. Oluşan çözelti bir gece oda sıcaklığında, 3 saat su banyosunda karıştırıldı. Çözelti soğutuldu ve THF vakumda uzaklaştırıldı. Elde edilen katı üzerine diklormetan (40 mL) ilave edildi ve filtreden süzüldü. Ham ürün damıtıldı. Verim: 8.0 g; % 84.

3.5. *N*-Koordine Ru(II)-*p*-simen Komplekslerinin Sentezi

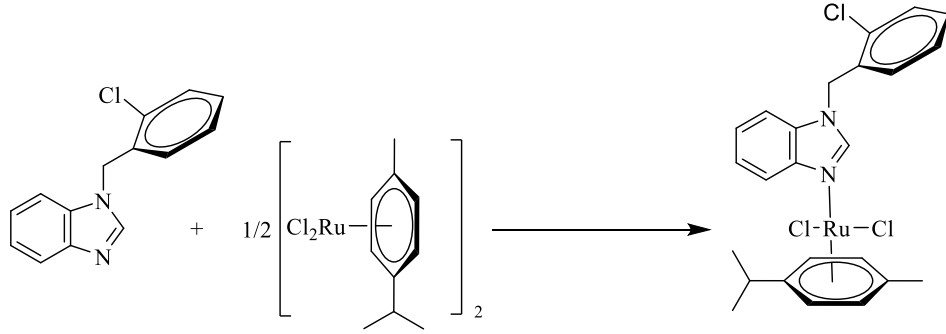
3.5.1. Dikloro-(*N*-(3-metilbenzil)benzimidazol)-(p-simen)rutenyum(II), 2a



N-(3-Metilbenzil)benzimidazol (0,22 g; 1,00 mmol) kuru toluende (10 mL) çözüldü ve çözeltiye [RuCl₂(*p*-simen)]₂ kompleksi (0,31 g; 0,5 mmol) ilave edildi. Toluene sıcaklığında 4 saat reflux kaynatıldı. Çözücünün tamamı vakumda

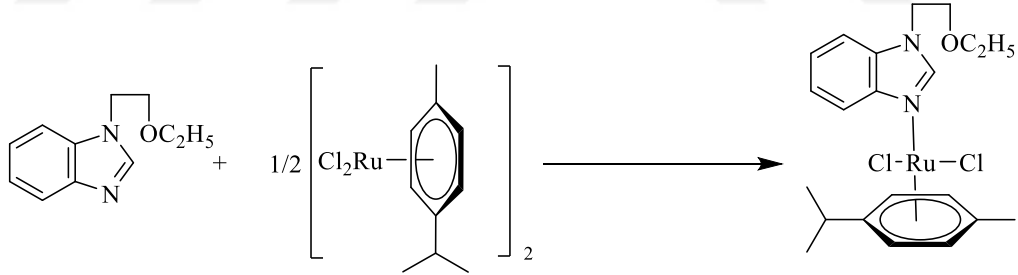
uzaklaştırılıp turuncu renkteki ham ürün eterle yıkandı ve vakumda kurutuldu. DCM/eter (1:4) ortamında kristallendirildi. Verim: 0,45 g; % 80.

3.5.2. Dikloro-(*N*-(2-klorbenzil)benzimidazol)-(*p*-simen)rutenyum(II), 2b



N-(2-Klorbenzil)benzimidazol (0,24 g; 1,00 mmol) kuru toluende (10 mL) çözüldü ve çözeltiye [RuCl₂(*p*-simen)]₂ kompleksi (0,31 g; 0,5 mmol) ilave edildi. Toluene sıcaklığında 4 saat reflux kaynatıldı. Çözücünün tamamı vakumda uzaklaştırılıp turuncu renkteki ham ürün eterle yıkandı ve vakumda kurutuldu. DCM/eter (1:4) ortamında kristallendirildi. Verim: 0,35 g; % 62.

3.5.3. Dikloro-(*N*-(etoksietil)benzimidazol)-(*p*-simen)rutenyum(II), 2c



N-(Etoksietil)benzimidazol (0,19 g; 1,00 mmol) kuru toluende (10 mL) çözüldü ve çözeltiye [RuCl₂(*p*-simen)]₂ kompleksi (0,31 g; 0,5 mmol) ilave edildi. Toluene sıcaklığında 4 saat reflux kaynatıldı. Çözücünün tamamı vakumda uzaklaştırılıp turuncu renkteki ham ürün eterle yıkandı ve vakumda kurutuldu. DCM/eter (1:4) ortamında kristallendirildi. Verim: 0,42 g; % 81.

3.6. Sitotoksik Aktivite

Azol ligandları (1a-c) ve bu ligandların *N*-koordine Ru(II)-*p*-simen komplekslerinin (2a-c) sitotoksik aktiviteleri MDA-MB-231 (ATCC® HTB-

26TM) ve MCF-7 (ATCC® HTB-22TM) meme kanser hücreleri ve L-929 fare sağlıklı fibroblast hücreleri ile araştırıldı.

3.6.1. Hücrelerin Çözülmesi

-80 °C'den çıkarılan hücreler (MDA-MB-231, MCF-7, ve L-929) 37 °C'lik su banyosunda hızlı bir şekilde çözülerek, %10 FBS ve % 1 penicilin-streptomycin içeren 8 mL besi yeri bulunan (MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanser hücresi üzerine DMEM, L-929 sağlıklı hücreler üzerine ise RPMI 1640) 25 mL'lik flasklara alındı. Flasklarda canlı hücre varlığı kontrol edildikten sonra inkübatöre kaldırıldı.

3.6.2. Hücrelerin Pasajlanması

Flasklardaki hücrelerin büyüme yüzdeleri % 80-90'a ulaştığında, besi yerleri aspire edildi. Flask içerisine tüm yüzeyini kaplayacak şekilde Tiripsin-EDTA eklendi ve hücrelerin flask yüzeyinden ayrılmaları sağlandı. Flasklar içerisine, hücre türlerine göre uygun besi yerlerinden 10'ar mL eklendi. Elde edilen hücre süspansiyonu farklı flasklara eklenerek toplam hacim hücre türlerine uygun besi yerleri ile 12-15 mL'ye tamamlandı ve flasklardaki canlı hücre varlığı ve yoğunlukları kontrol edilerek CO₂ inkübatöre kaldırıldı.

3.6.3. Hücrelerin Sayımı

3.6.2.'de elde edilen homojen hücre karışımından 10 µL ve 10 µL tripan blue karıştırıldı. Bu karışımından 10 µL alınarak gerçek zamanlı hücre görüntüleme cihazında en az 3 farklı bölgede hücre sayımı yapıldı. Üç sayımın ortalaması alınarak hücre sayım işlemi tamamlandı.

3.6.4. Bileşiklerin Hazırlanması

Bileşikler, hücrelere uygulanacakları gün dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü ve farklı derişimdeki (30-500 µM) çözeltileri hazırlandı.

3.6.5. Hücrelerin Ekimi ve Dozlama

3.6.3.'de açıklandığı şekilde sayılan hücreler, hücre türüne göre DMEM ve RPMI besi yerleri ile 100000 hücre/mL olacak şekilde seyreltilerek 96 kuyulu plakalara ekildi. Plakalar, % 95 nem, % 5 CO₂ ve 37 °C koşullarındaki inkübatörde 24 saat bekletilerek hücrelerin plakalara tutunarak büyümeleri (yaklaşık büyüme yüzdeleri % 80-90) sağlandı. 3.6.4.'de açıklandığı gibi

hazırlanan farklı derişimlerdeki bileşikler hücrelere uygulanarak 24, 48 ve 72 saat sonra MTT ölçümü yapıldı ve hücre canlılıkları belirlendi.

3.6.6. MTT Ölçümü

Dozlama yapıldıktan 24, 48 ve 72 saat sonra, her bir kuyuya 10 µl MTT eklenerek plakalar iki saat süresince % 95 nem, % 5 CO₂ ve 37 °C içeren inkübatörde inkübe edildi. İki saat sonunda herbir kuyudaki besi yeri aspire edildi ve herbir kuyuya 100'er µL DMSO eklendi. Plakalar, 15 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildikten sonra absorbans değerleri Elisa okuyucu ile 570 nm dalga boyunda okundu [133].. Her bir bileşğin 24, 48 ve 72 saat için IC₅₀ değerleri GraphPad Prism kullanılarak hesaplandı.

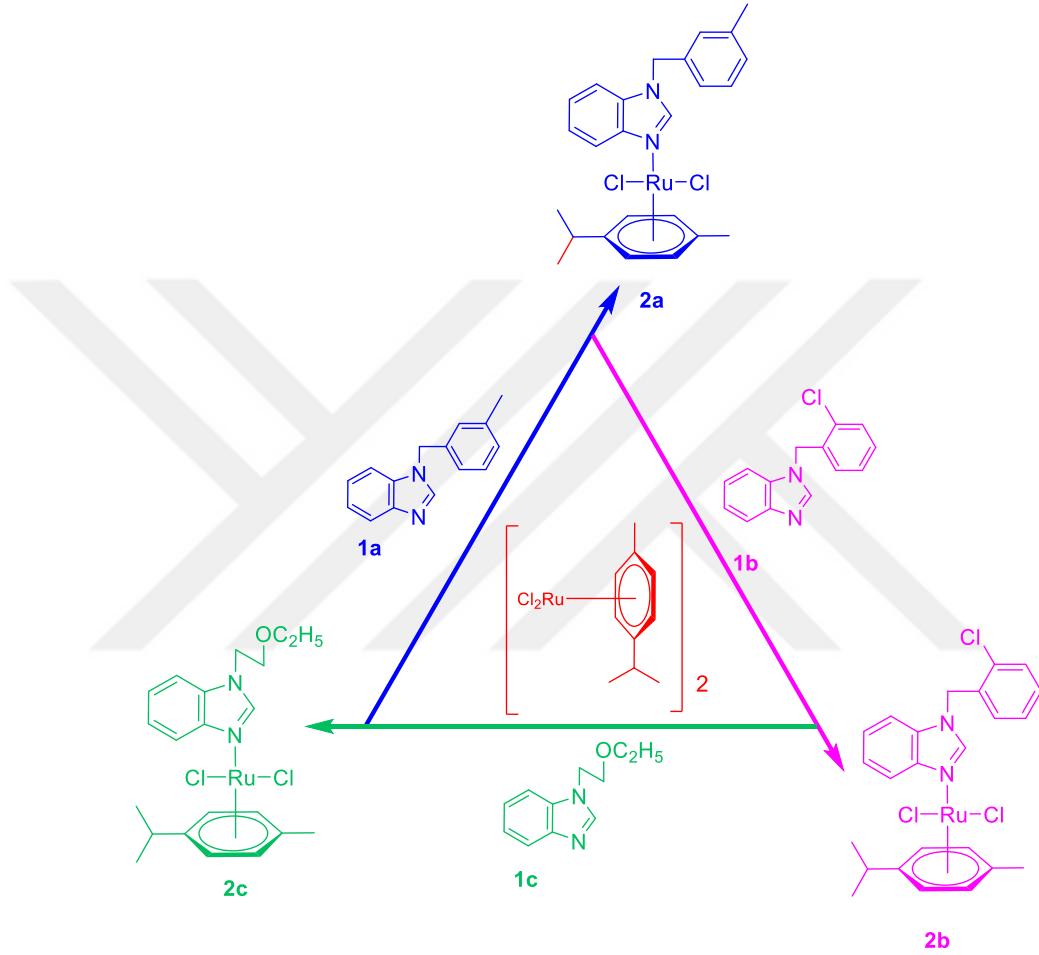
3.7. İstatistik Analiz

Antikanser aktivite deneylerindeki tüm ölçümler dokuz tekrarlı olarak yapıldı (n=9) ve sonuçlar standart sapmalarıyla ($\pm$ SEM) verildi. GraphPad Prism8 programı (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak IC₅₀ değerleri hesaplandı. Gruplar arasındaki farkın karşılaştırılması için One Way Anova ve Dunnett's çoklu karşılaştırma testi kullanıldı ve anlamlılık için *p< 0.05, #p< 0.005, &p< 0.0005, \$p< 0.0001 olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Azol Ligandları (1a-c) ve bu Ligandların N-Koordine Ru(II)-*p*-simen Komplekslerinin (2a-c) Sentezi

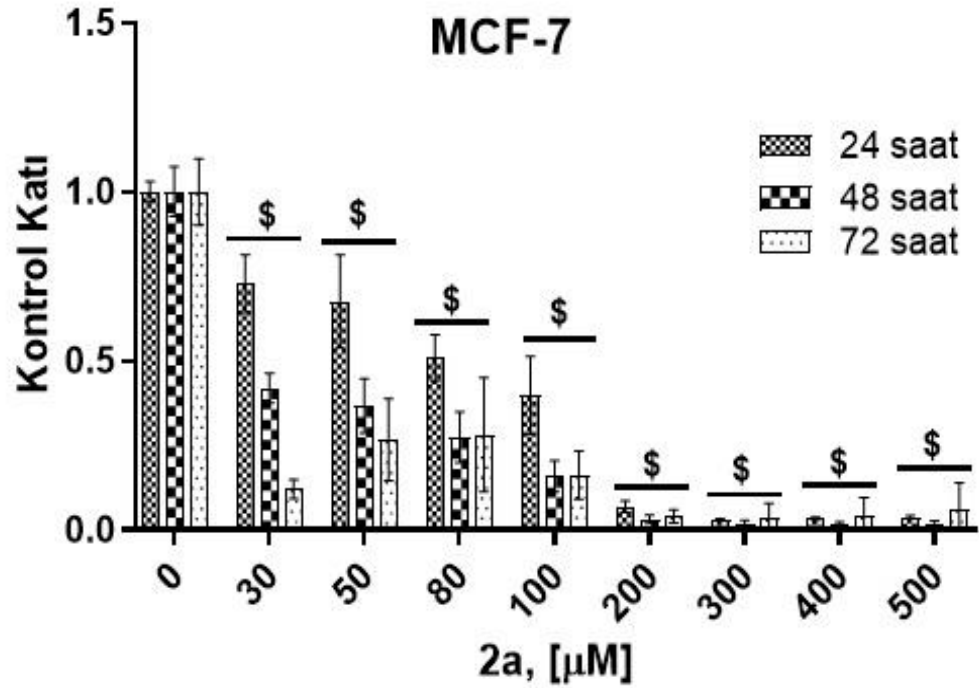
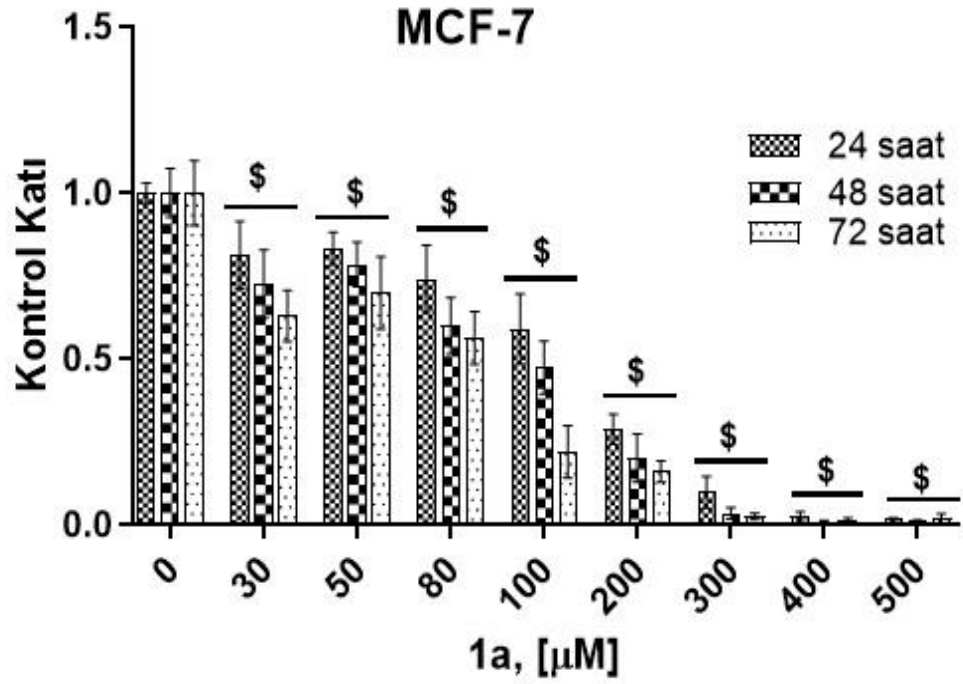
Azol ligandları (1a-c) ve bu ligandların N-koordine Ru(II)-*p*-simen kompleksleri (2a-c) literatüre göre sentezlendi [131, 132].



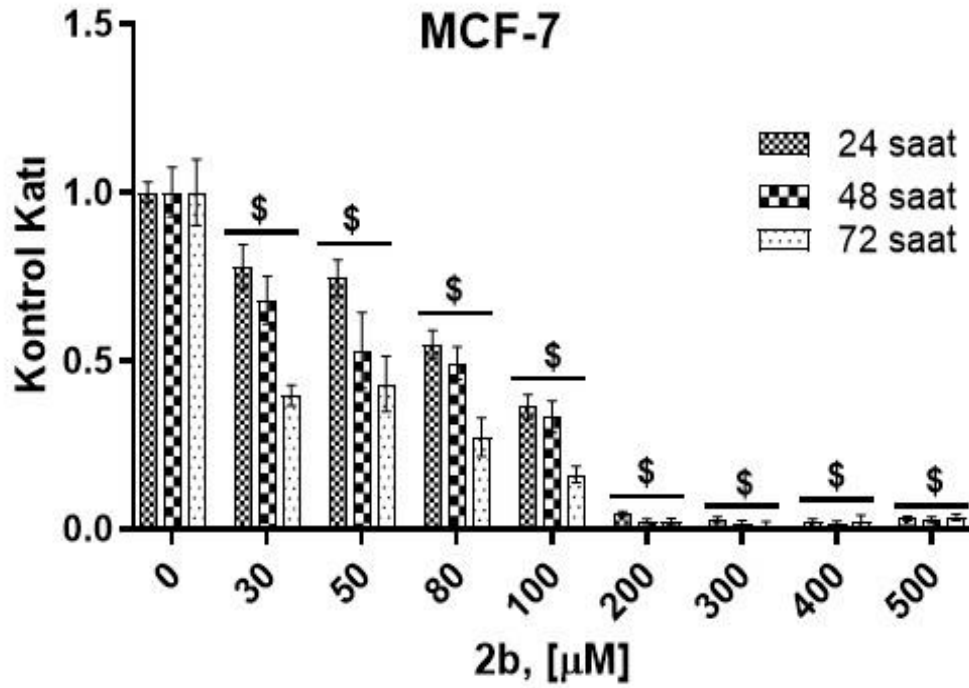
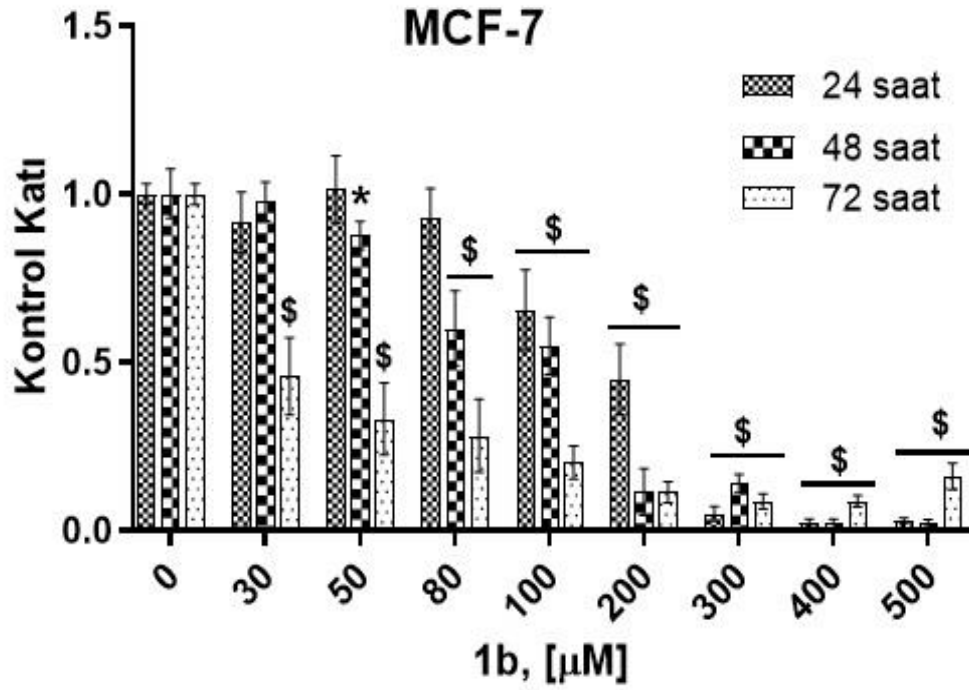
Şema 1. Azol ligandları (1a-c) ve bu ligandların N-koordine Ru(II)-*p*-simen komplekslerinin (2a-c) sentezi [131, 132].

4.2. Sitotoksik Aktivite

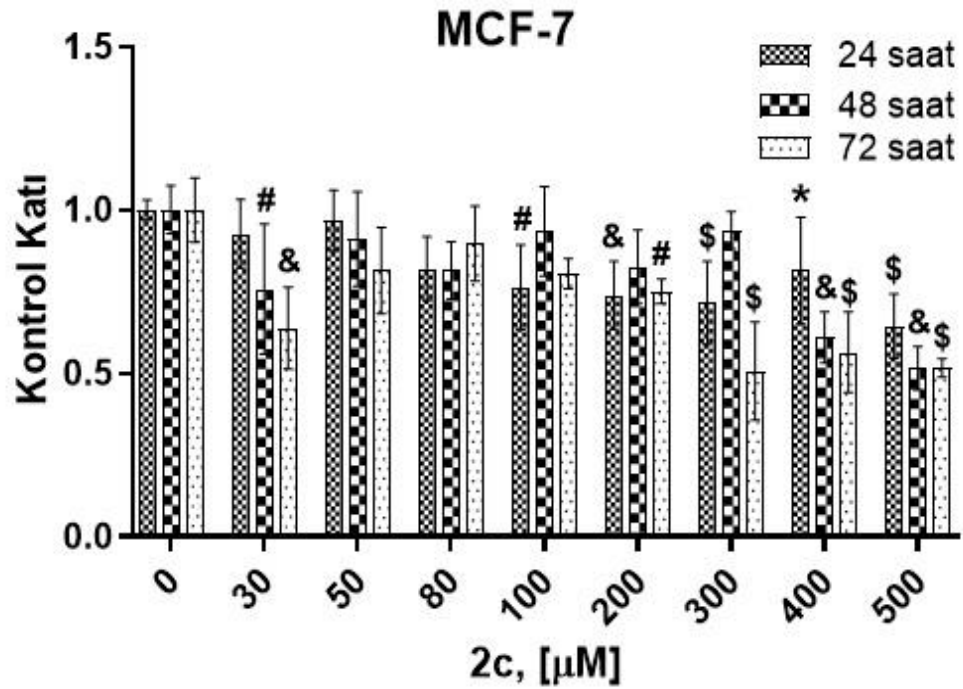
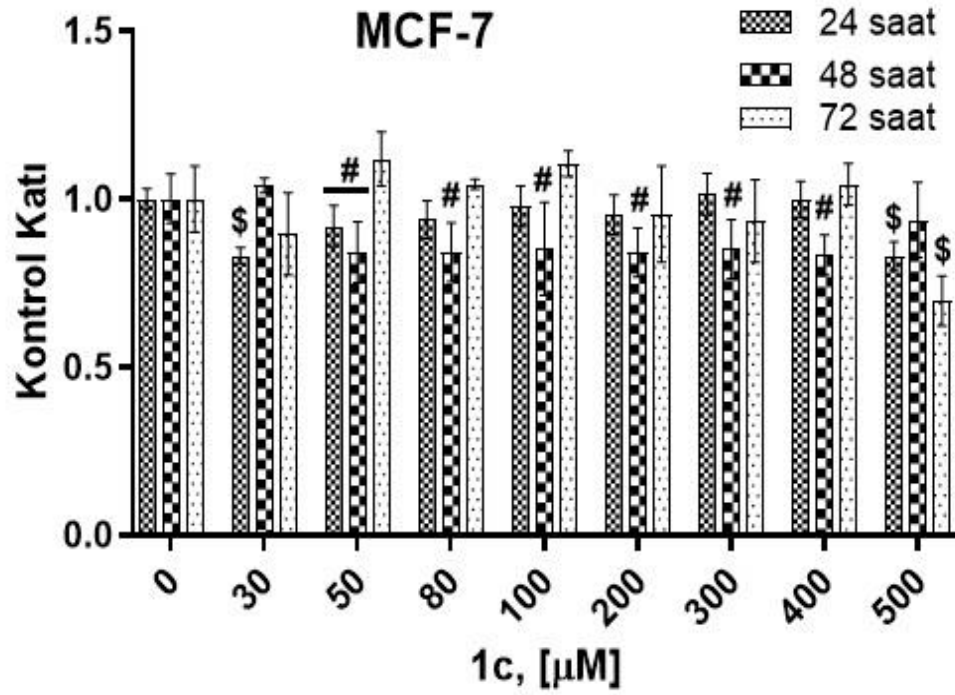
Azol ligandları (1a-c) ve bu ligandların N-koordine Ru(II)-*p*-simen komplekslerinin (2a-c), 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon süreleri için MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücreleri üzerine sitotoksik aktiviteleri MTT yöntemi ile belirlendi (Şekil 4.1-4.6). Tüm bileşikler L-929 fare sağlıklı fibroblast hücrelerine de uygulanarak, komplekslerin sağlıklı ve kanserli hücreler arasında seçici özellikleri de araştırıldı (Şekil 4.7-4.9).



Şekil 4.1. *N*-(3-Metilbenzil)benzimidazol (**1a**) ve dikloro-*N*-(3-metilbenzil) benzimidazol)-(p-simen)rutenyum(II) (**2a**)’un MCF-7 meme kanser hücreleri üzerine sitotoksik aktiviteleri. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar $\pm$ SEM olarak verilmiştir. (Kontrole göre anlamlılık; \$p< 0.0001)



Şekil 4.2. *N*-(2-Klorbenzil)benzimidazol (**1b**) ve dikloro-(*N*-(2-klorbenzil) benzimidazol)-(*p*-simen)rutenyum(II) (**2b**)’un, MCF-7 meme kanser hücreleri üzerine sitotoksik aktiviteleri. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış ($n=9$) ve sonuçlar $\pm$ SEM olarak verilmiştir (Kontrole göre anlamlılık; $*p < 0.05$, $\$p < 0.0001$).



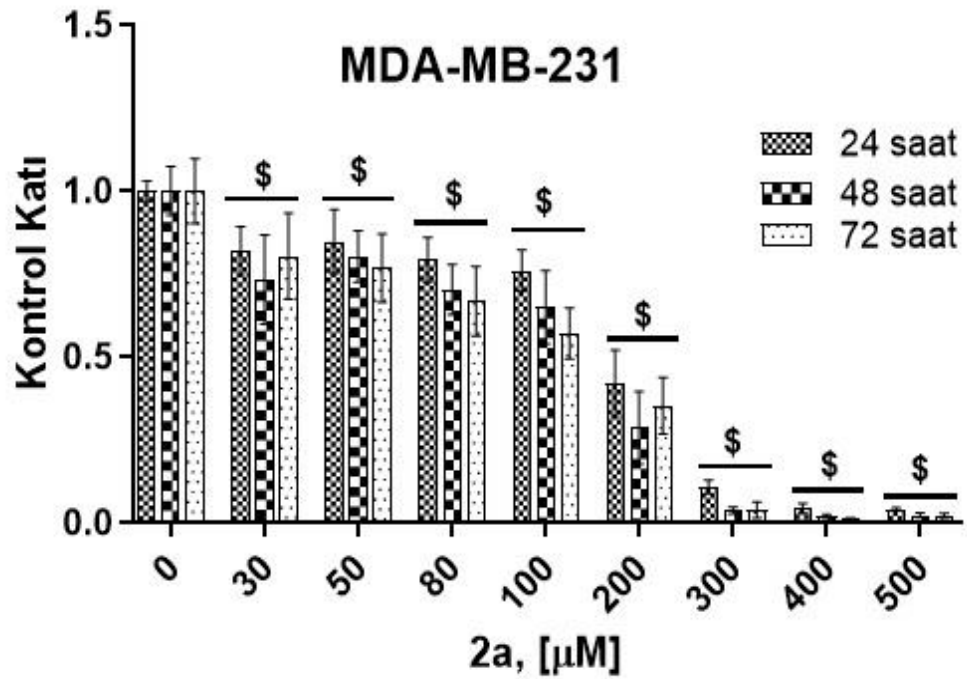
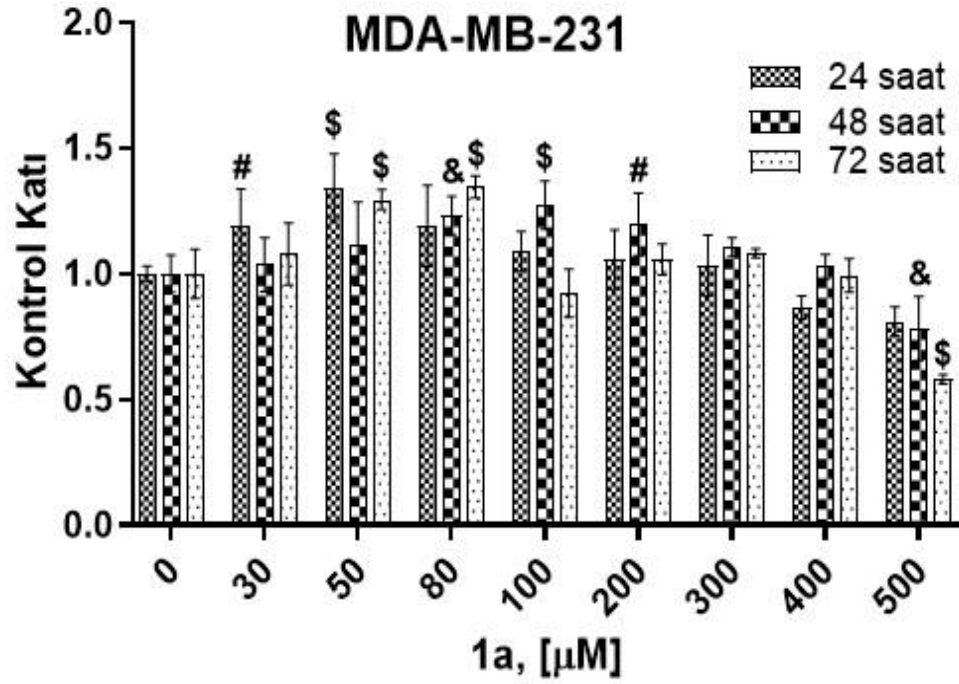
Şekil 4.3. *N*-(Etoksietil)benzimidazol (**1c**) ve dikloro-*N*-(etoksietil) benzimidazol)-(*p*-simen)rutenyum(II) (**2c**)’un MCF-7 meme kanser hücreleri üzerine sitotoksik aktiviteleri.. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış ($n=9$) ve sonuçlar $\pm$ SEM olarak verilmiştir (Kontrole göre anlamlılık; * $p<0.05$, # $p<0.005$, & $p<0.0005$, \$ $p<0.0001$).

Tablo 4.1. Azol ligandları (**1a-c**) ve bu ligandların *N*-koordine Ru(II)-*p*-simen komplekslerinin (**2a-c**) MCF-7 insan meme kanser hücrelerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saat için IC₅₀ değerleri

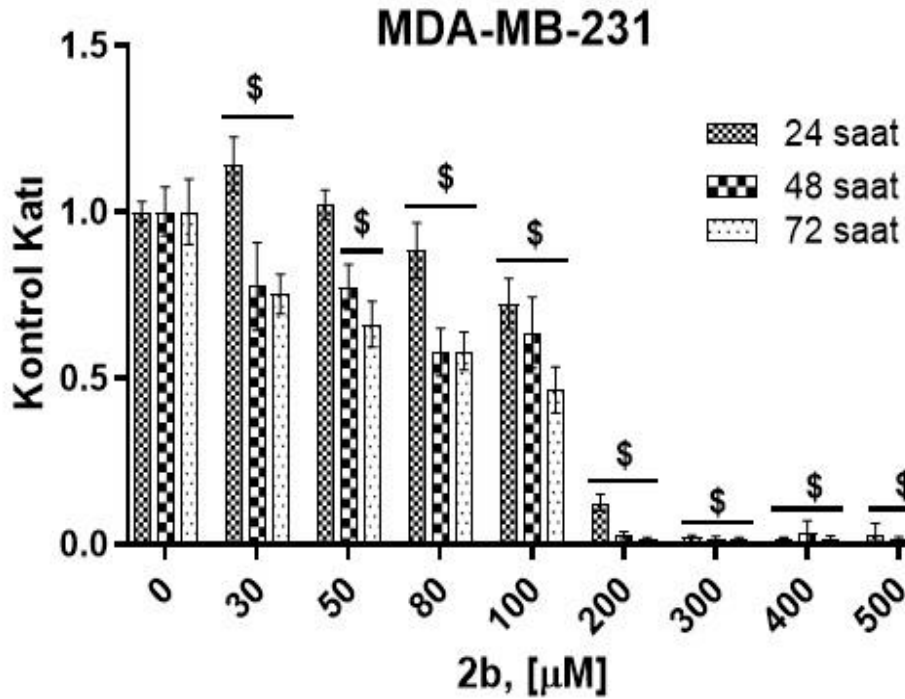
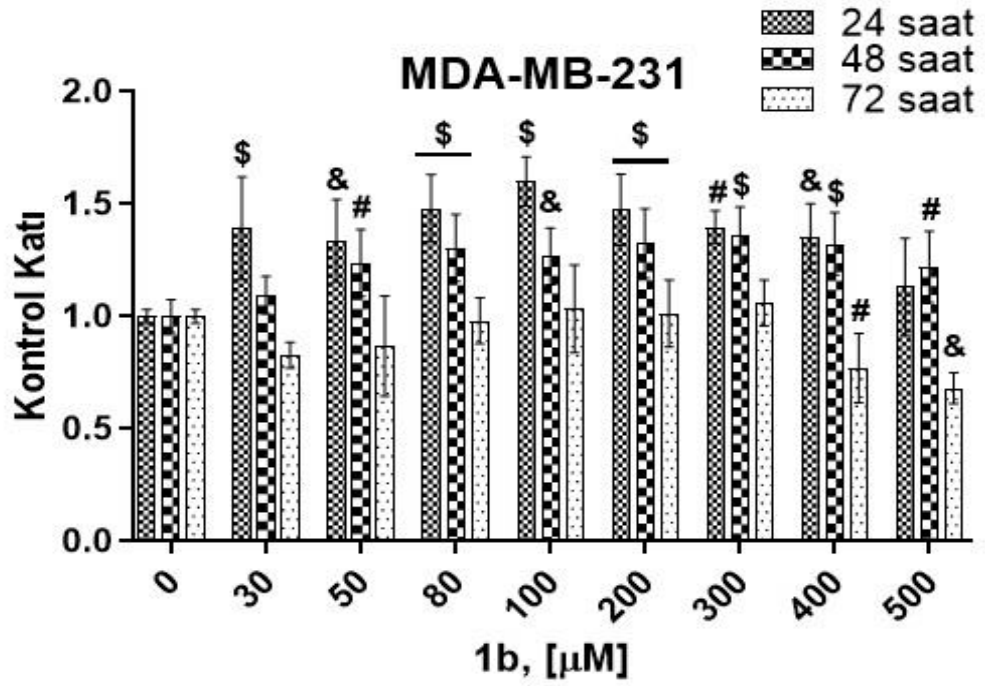
Bileşik	(IC ₅₀ , μ M) ^a		
	24 saat	48 saat	72 saat
1a	247.1 $\pm$ 0.097	154.9 $\pm$ 0.094	85.50 $\pm$ 0.152
1b	172.7 $\pm$ 0.030	94.53 $\pm$ 0.031	<30
1c	>500	>500	>500
2a	65.17 $\pm$ 0.083	<30	<30
2b	74.79 $\pm$ 0.122	63.47 $\pm$ 0.100	<30
2c	>500	>500	>500

Hücre canlılığında % 50 azalmaya neden olan derişim değeri olan ^aIC₅₀ değerleri, hücrelerin bileşiklerle 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon sürelerinin sonunda MTT deneyi ile belirlendi. Sonuçlar $\pm$ SEM olarak verilmiştir (n=9).

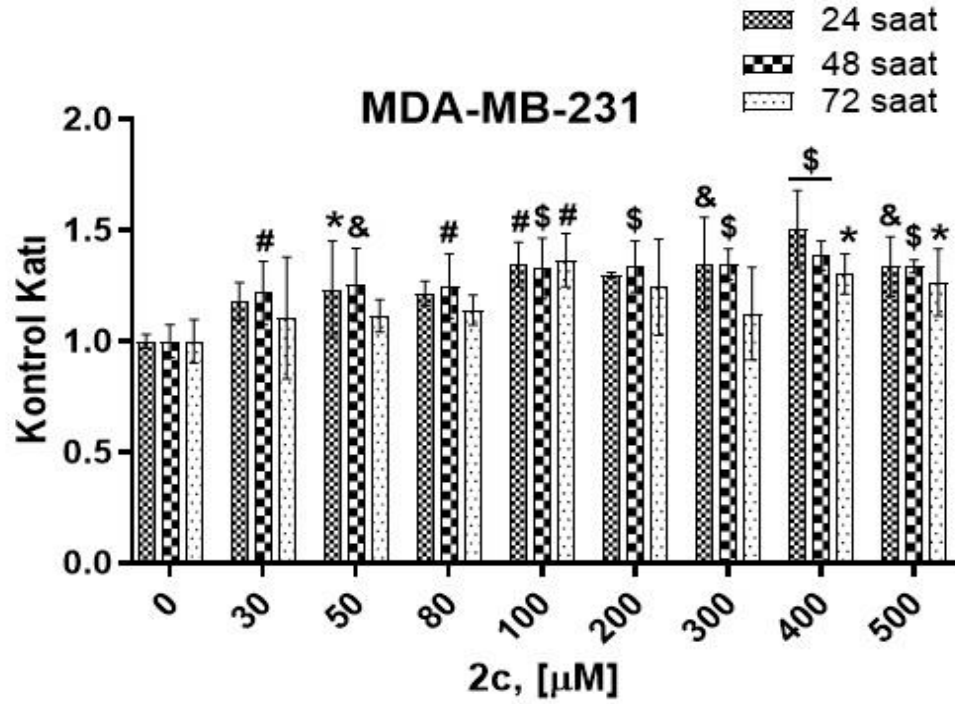
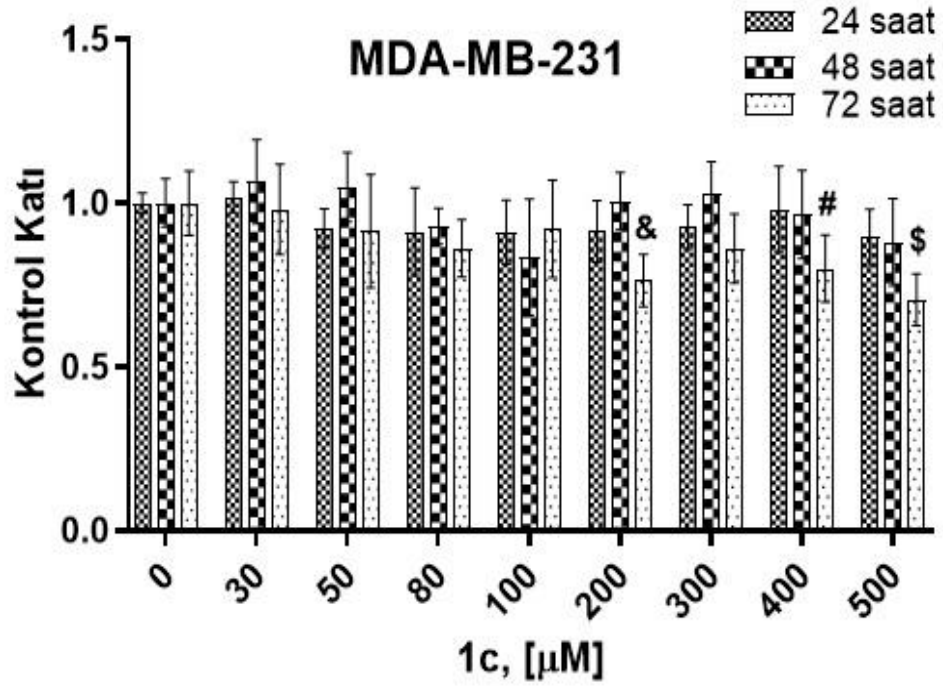
Şekil 4.1 - 4.3'de; x eksenini azol ligandları (**1a-c**) ve Ru(II)-*p*-simen komplekslerinin (**2a-c**) derişimlerini, y eksenini ise hücrelerin kontrole göre canlılık oranlarını göstermektedir. Şekil 4.1 - 4.3'de görüldüğü gibi ligandlar (**1a-c**) ve komplekslerin (**2a-c**) derişimindeki artışla paralel olarak sitotoksik aktivitede artış ve MCF-7 meme kanser hücrelerinin ölüm oranlarında artış gözlemlendi. Bu grafiklerden faydalanılarak azol ligandları (**1a-c**) ve Ru(II)-*p*-simen komplekslerinin (**2a-c**) MCF-7 meme kanser hücrelerinin % 50'sini öldürdükleri derişim değerleri (IC₅₀) belirlendi (Tablo 4.1.). Düşük IC₅₀ değerleri, yüksek sitotoksik aktiviteye işaret etmektedir. Ligandların (**1a-b**), komplekslere (**2a-b**) göre daha büyük IC₅₀ değerlerine sahip oldukları ve komplekslere göre daha düşük sitotoksik aktivite gösterdikleri belirlendi. **1a** ve **1b** ligandları ile **2a** ve **2b** komplekslerinin IC₅₀ değerlerinin zamana bağlı olarak azaldığı ve buna bağlı olarak sitotoksik aktivitelerinin arttığı gözlemlendi. **1c** ligandı ve **2c** kompleksinin IC₅₀ değerleri, tüm inkübasyon süreleri için 500 μ M dan büyük bulundu. Tüm sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde; **2a** kompleksinin 24 saat dışında en düşük IC₅₀ değerlerine ve en yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu saptandı. IC₅₀ değeri 500 μ M'dan küçük bileşiklerin MCF-7 meme kanser hücreleri üzerine antikanser aktivite sıralaması; **2a** > **2b** > **1b** > **1a** olarak bulundu.



Şekil 4.4. *N*-(3-Metilbenzil)benzimidazol (**1a**) ve dikloro-(*N*-(3-metilbenzil) benzimidazol)-(*p*-simen)rutenyum(II) (**2a**)’un MDA-MB-231 meme kanser hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar $\pm$ SEM olarak verilmiştir. (Kontrolle göre anlamlılık; #p<0.005, &p<0.0005, \$p< 0.0001).



Şekil 4.5. *N*-(2-Klorbenzil)benzimidazol (**1b**) ve dikloro-(*N*-(2-klorbenzil) benzimidazol)-(*p*-simen)rutenyum(II) (**2b**)’un, MDA-MB-231 meme kanser hücreleri üzerine sitotoksik aktiviteleri. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar $\pm$ SEM olarak verilmiştir (Kontrole göre anlamlılık; #p<0.005, &p<0.0005, \$p<0.0001).



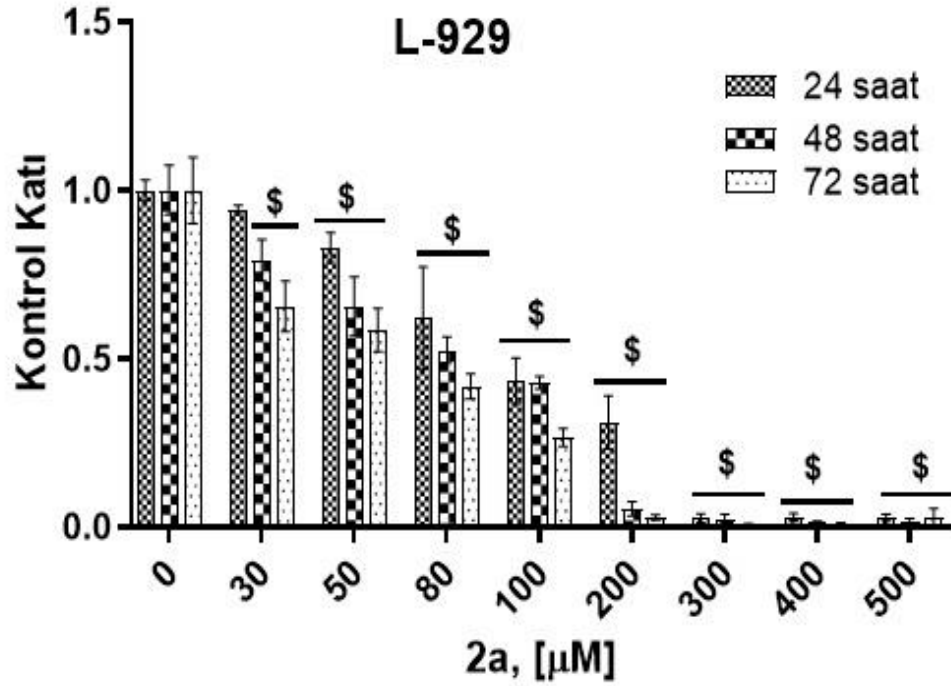
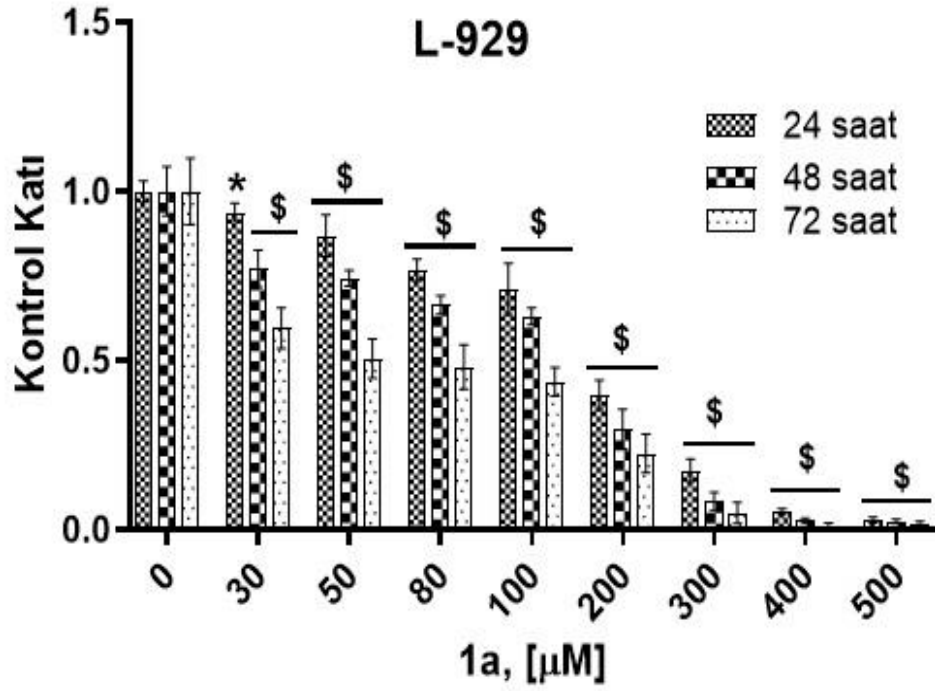
Şekil 4.6. *N*-(Etoksietil)benzimidazol (**1c**) ve dikloro-*N*-(etoksietil)benzimidazol)-(*p*-simen)rutenyum(II) (**2c**)’un MDA-MB-231 meme kanser hücreleri üzerine sitotoksik aktiviteleri. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar $\pm$ SEM olarak verilmiştir (Kontrole göre anlamlılık; * p <0.05, # p <0.005, & p <0.0005, \$ p <0.0001).

Tablo 4.2. Azol ligandları (**1a-c**) ve bu ligandların *N*-koordine Ru(II)-*p*-simen komplekslerinin (**2a-c**) MDA-MB-231 insan meme kanser hücrelerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saat için IC₅₀ değerleri

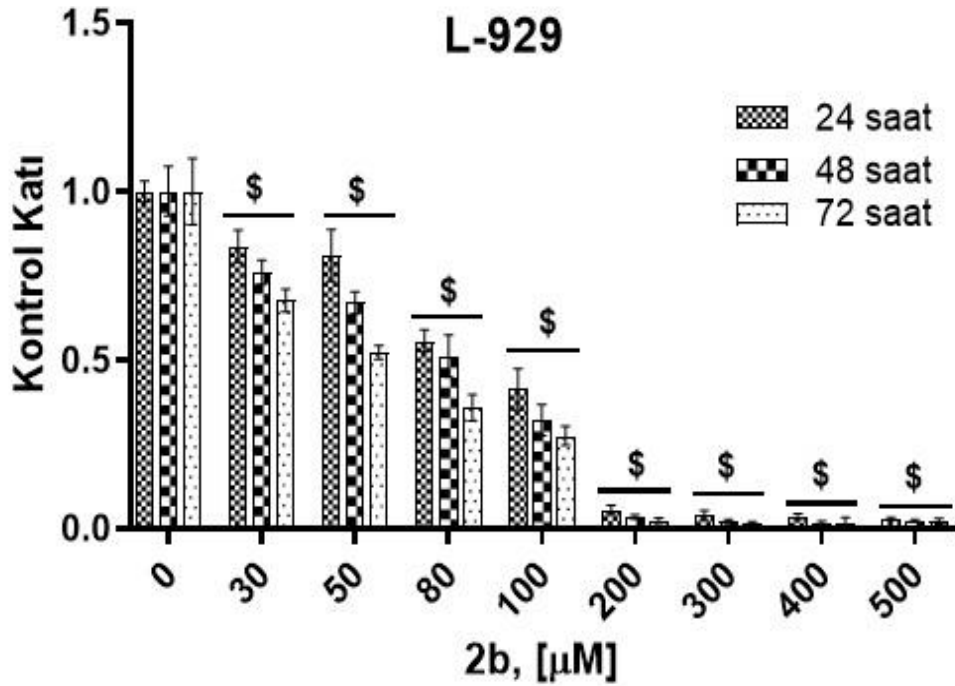
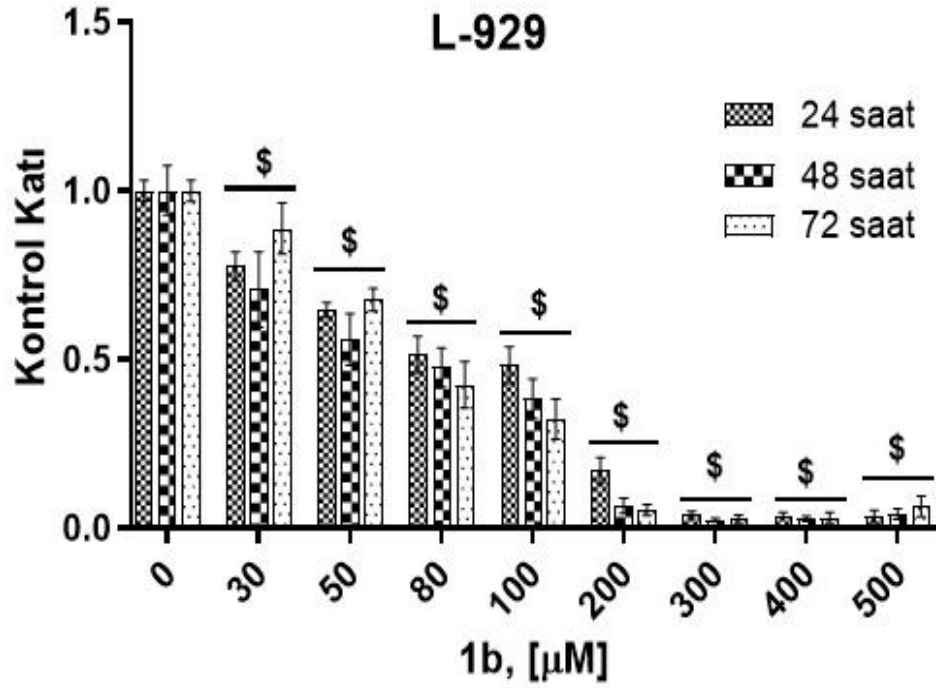
Bileşik	(IC ₅₀ , µM) ^a		
	24 saat	48 saat	72 saat
1a	>500	>500	>500
1b	>500	>500	>500
1c	>500	>500	>500
2a	197.9 ± 0.012	170.3 ± 0.020	171.1 ± 0.034
2b	125.3 ± 0.074	111.8 ± 0.122	95.19 ± 0.092
2c	>500	>500	>500

Hücre canlılığında % 50 azalmaya neden olan derişim değeri olan ^aIC₅₀ değerleri, hücrelerin bileşiklerle 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon sürelerinin sonunda MTT deneyi ile belirlendi. Sonuçlar ± SEM olarak verilmiştir (n=9).

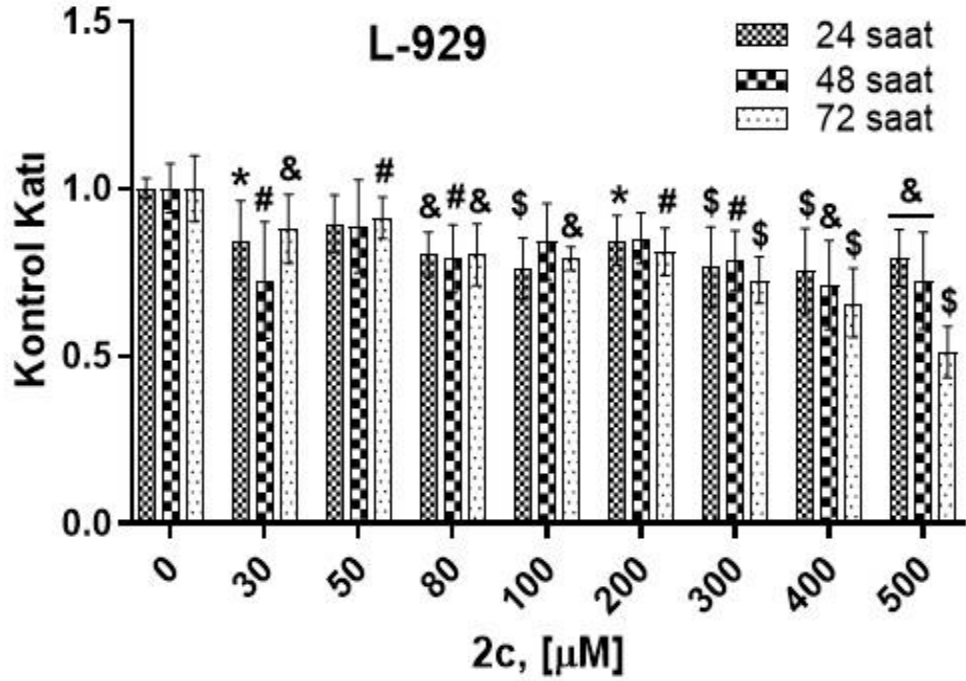
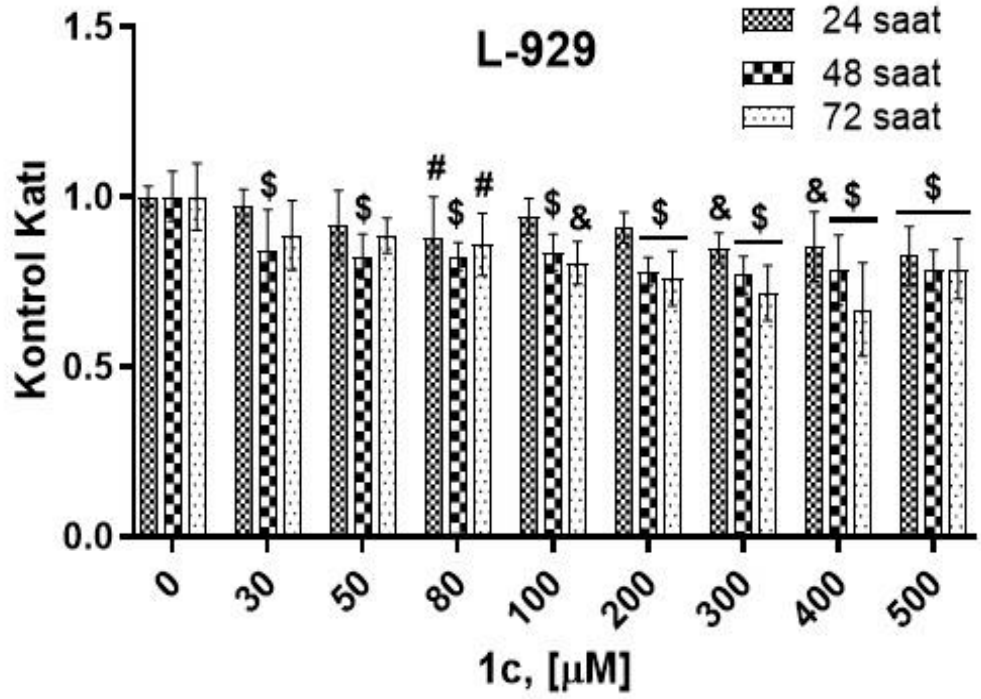
Şekil 4.4 – 4.6’da; x eksenini azol ligandları (**1a-c**) ve Ru(II)-*p*-simen komplekslerinin (**2a-c**) derişimlerini, y eksenini ise hücrelerin kontrole göre canlılık oranlarını göstermektedir. Şekil 4.4 – 4.6’da görüldüğü gibi ligand ve komplekslerin (**1c** ligandı ve **2c** kompleksi hariç) derişimlerdeki artışla paralel olarak sitotoksik aktivitede artış gözlemlendi. Yani, bileşiklerin derişimlerinin artmasıyla, MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin canlılık oranlarında düşüş gözlemlendi. Bu grafikler kullanılarak, ligandlar ve komplekslerin MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin % 50’sini öldürdükleri derişim değerleri (IC₅₀) hesaplandı (Tablo 4.2.). IC₅₀ değeriindeki azalma sitotoksik aktivitedeki artışa işaret etmektedir. Ligandların (**1a-c**) ve **2c** kompleksinin tüm inkübasyon sürelerinde 500 µM dan büyük IC₅₀ değerine sahip oldukları ve bu nedenle, MDA-MB-231 insan meme kanser hücreleri üzerine sitotoksik aktivite göstermedikleri belirlendi. **2a** ve **2b** komplekslerinin ligandlarına (**1a-b**) göre daha düşük IC₅₀ değerlerine sahip oldukları ve daha yüksek sitotoksik aktivite gösterdikleri saptandı. Tüm inkübasyon sürelerinde **2b** kompleksinin IC₅₀ değerleri **2a** kompleksi için elde edilen IC₅₀ değerlerinden daha küçük olduğundan, **2b** kompleksinin MDA-MB-231 meme kanser hücreleri üzerine daha yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bulundu. IC₅₀ değeri 500 µM’dan küçük olan bileşiklerin MDA-MB-231 meme kanser hücreleri üzerine sitotoksik aktivite sıralaması; **2b** > **2a** olarak bulundu.



Şekil 4.7. *N*-(3-Metilbenzil)benzimidazol (**1a**) ve dikloro-(*N*-(3-metilbenzil) benzimidazol)-(p-simen)rutenyum(II) (**2a**)’un L-929 fare sağlıklı fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik aktiviteleri. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar $\pm$ SEM olarak verilmiştir (Kontrole göre anlamlılık; *p<0.05, \$p<0.0001).



Şekil 4.8. *N*-(2-Klorbenzil)benzimidazol (**1b**) ve dikloro-*N*-(2-klorbenzil) benzimidazol)-(*p*-simen)rutenyum(II) (**2b**)’un, L-929 fare sağlıklı fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik aktiviteleri. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar $\pm$ SEM olarak verilmiştir (Kontrole göre anlamlılık; \$p<0.0001).



Şekil 4.9. *N*-(Etoksietil)benzimidazol (1c) ve dikloro-(*N*-(etoksietil)benzimidazol)-(*p*-simen)rutenyum(II) (2c)'un L-929 fare sağlıklı fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik aktiviteleri. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar $\pm$ SEM olarak verilmiştir (Kontrole göre anlamlılık; * p <0.05, # p <0.005, & p <0.0005, \$ p <0.0001).

Tablo 4.3. Azol ligandları (**1a-c**) ve bu ligandların N-koordine Ru(II)-*p*-simen komplekslerinin (**2a-c**) L-929 fare sağlıklı fibroblast hücrelerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saat için IC₅₀ Değerleri

Bileşik	(IC ₅₀ , µM) ^a		
	24 saat	48 saat	72 saat
1a	310.6 ± 0.056	290.5 ± 0.076	250.3 ± 0.091
1b	98.22 ± 0.057	65.68 ± 0.094	32.60 ± 0.070
1c	>500	>500	>500
2a	80.55 ± 0.100	72.41 ± 0.084	54.28 ± 0.127
2b	64.57 ± 0.078	54.06 ± 0.078	50.68 ± 0.102
2c	>500	>500	>500

Hücre canlılığında % 50 azalmaya neden olan derişim değeri olan ^aIC₅₀ değeri, hücrelerin bileşiklerle 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon sürelerinin sonunda MTT deneyi ile belirlendi. Sonuçlar ± SEM olarak verilmiştir (n=9).

Şekil 4.7. - 4.9.'da; azol ligandları (**1a-c**) ve Ru(II)-*p*-simen komplekslerinin (**2a-c**) derişimlerini, y eksenini ise hücrelerin kontrole göre canlılık oranlarını göstermektedir. **Şekil 4.7. - 4.9.**'da görüldüğü gibi ligand ve komplekslerin (**1c** ligandı ve **2c** kompleksi hariç) derişimlerdeki artışla paralel olarak sitotoksik aktivitede ve L-929 hücrelerinin ölüm oranlarında artış gözlemlendi. Bu grafikler yardımıyla ligandlar (**1a-c**) ve Ru(II)-*p*-simen komplekslerin (**2a-c**) L-929 hücrelerinin % 50'sini öldürdükleri derişim değeri (IC₅₀) belirlendi (**Tablo 4.3.**). Düşük IC₅₀ değeri yüksek sitotoksik aktiviteye işaret etmektedir. Komplekslerin (**2a-b**), L-929 hücrelerinde ligandlarına göre (**1a-b**) daha düşük IC₅₀ değerlerine sahip oldukları ve daha yüksek sitotoksik aktivite gösterdikleri belirlendi. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücre hattına benzer olarak; Tüm inkübasyon sürelerinde, **1c** ligandı ile **2c** kompleksinin IC₅₀ değeri 500 µM'dan büyük olarak gözlemlendiğinden **1c** ligandı ile ve **2c** kompleksinin L-929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivite göstermedikleri belirlendi. **2b**'nin tüm inkübasyon süreleri için elde edilen IC₅₀ değerlerinin diğer komplekslerin IC₅₀ değerlerinden daha küçük olduğu gözlemlendi. Bu nedenle, **2b** kompleksinin L-929 hücreleri üzerine en yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu belirlendi. Bileşiklerin L-929 fare sağlıklı fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik aktivite sıralaması; **2b** > **2a** > **1b** > **1a** olarak belirlendi.

Tablo 4.4. *N*-koordine Ru(II)-*p*-simen komplekslerinin (**2a-c**) seçicilik indeksleri (Sİ)

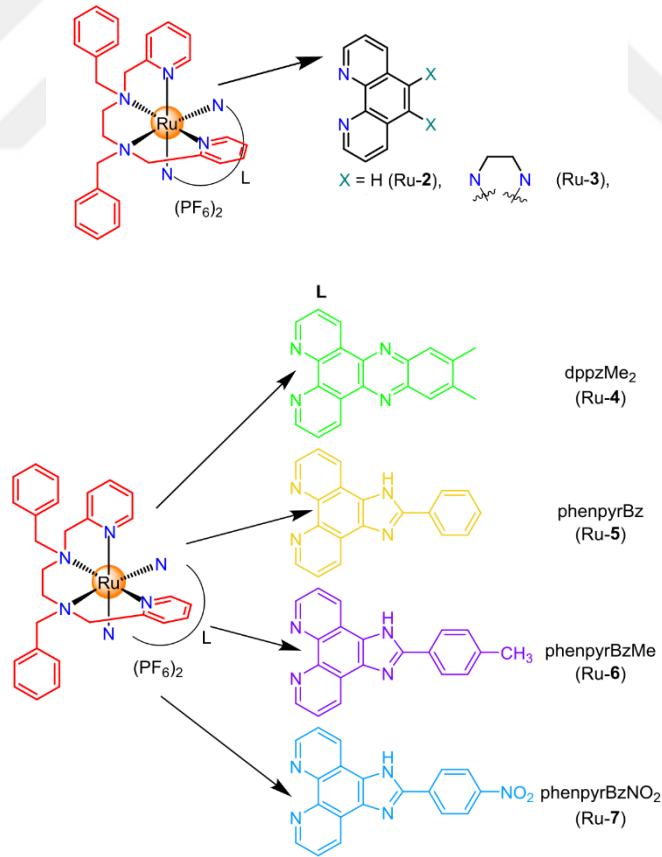
Hücre hattı	Zaman (Saat)	Kompleks (Sİ) ^a		
		2a	2b	2c
MCF-7	24	1.23	0.86	≥ 1
	48	>2.41	0.85	≥ 1
	72	>1.81	>1.69	≥ 1
MDA-MB-231	24	0.40	0.52	≥ 1
	48	0.42	0.48	≥ 1
	72	0.32	0.53	≥ 1

^aSeçicilik indeksi, aynı kompleksin aynı zaman noktaları için sağlıklı hücreler için gözlenen IC₅₀ değerlerinin kanserli hücreler için gözlenen IC₅₀ değerlerine bölünmesiyle hesaplandı.

MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanser hücreleri için en yüksek seçiciliğe sahip olan Ru(II)-*p*-simen kompleksi belirlemek için, her bir kompleksin iki ayrı meme kanser hücre hattı için seçicilik indeksi (Sİ) değerlerini hesaplandı (**Tablo 4.4.**). Elde ettiğimiz sonuçlara göre, MCF-7 insan meme kanser hücreleri için **2a**'nın 48 saat ve 72 saat inkübasyon sürelerinde yüksek Sİ değerlerine sahip olduğu bulundu. **2b** kompleksi göz önüne alındığında ise, yalnızca 72 saat inkübasyon sonrasında yüksek Sİ gösterdiği belirlendi. **2a** ve **2b**'nin MDA-MB-231 insan meme kanser hücreleri için 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinde Sİ değerleri 1'den küçük bulundu. **2c** kompleksinin MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanser hücre hatlarında tüm inkübasyon süreleri için Sİ değerleri ≥ 1 olarak bulundu. Verilere göre elde edilen bir diğer önemli sonuç; komplekslerin MDA-MB-231 meme kanseri üzerine gözlenen Sİ değerleri birbiri ile çok yakın değerler olup, MCF-7 meme kanser hücre hattı için Sİ değerlerinin ise zamana bağlı olarak değişim göstermesidir. Bu nedenle kompleksler, MCF-7 hücreleri üzerinde zamana bağlı seçicilik gösterirken, MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde zaman bağlı seçici özellik göstermemişlerdir.

5. TARTIŞMA

Rutenyum, *p*-simen ve bezimidazolün önemli biyolojik kapasiteleri nedeniyle bu üç yapıyı içeren komplekslere olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Bjelosevic ve arkadaşları tarafından yedi adet *cis-β*-[Ru(picenBz₂)(N₂-bidentate)](PF₆)₂ kompleksi sentezlenmiş ve komplekslerin yapıları NMR, HPLC, ESI-MS ve UV yöntemlerini kullanarak karakterize edilmiştir [134] (**Şekil 5.1.**). Sentezlenen komplekslerin *in vitro* sitotoksik aktiviteleri, kolon (HT-29), glioblastoma (U87 ve SJ-G2), meme (MCF-7), yumurtalık (A2780), akciğer (H460), cilt (A431), prostat (DU145), nöroblastom (BE2-C) ve pankreas (MIA) kanser hücreleri üzerinde 72 saat inkübasyon sonrasında belirlenmiştir. Ayrıca tüm kompleksler sağlıklı meme doku hücrelerine de (MCF10A) uygulanarak, komplekslerin sağlıklı ve kanser hücreleri arasında olası seçicilik özellikleri de araştırılmıştır. Komplekslerin sitotoksik aktiviteleri kemoterapötik ilaçlar olan cisplatin, oksaliplatin ve karboplatin ile karşılaştırılmıştır.

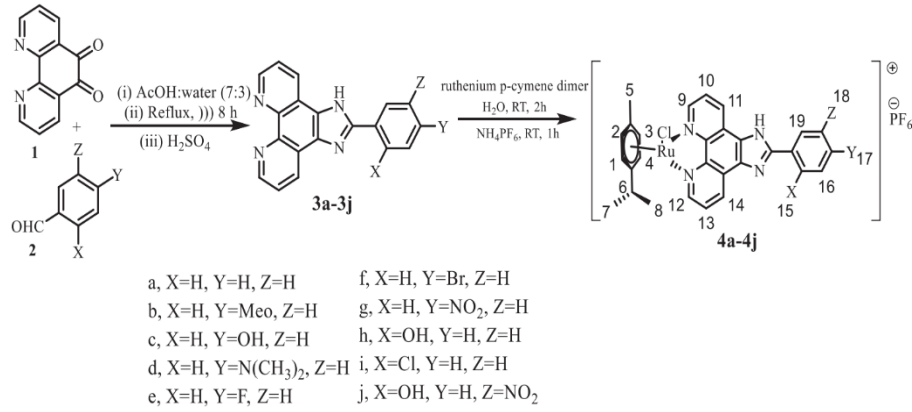


Şekil 5.1. *cis-β*-[Ru(picenBz₂)(N₂-bidentate)](PF₆)₂ kompleksleri [134]

Ru-6 kompleksinin en yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu ve oksaliptatin, sisplatin ve karboplatinden sırasıyla 5 kat, 2 kat ve 19 kat daha yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Ru-1, Ru-2 ve Ru- 3 komplekslerin MCF-7 meme kanseri için GI_{50} değerleri $>50 \mu M$, Ru-4 ($0.13 \pm 0.019 \mu M$), Ru-5 ($5.0 \pm 0.4 \mu M$ 4), Ru-6 ($0.76 \pm 0.18 \mu M$), Ru-7 ($0.96 \pm 0. \mu M$ 47) olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda **2a**, **2b** ve **2c** komplekslerinin MCF-7 hücrelerinde 72 saat inkübasyon süresi için IC_{50} değerleri sırasıyla; $<30 \mu M$, $<30 \mu M$ ve $>500 \mu M$ olup, Bjelosevic ve ark., (2022) tarafından sentezlenen bileşiklere göre düşük sitotoksik aktivite sergiledikleri gözlemlendi. **Ru-4**, **Ru-5**, **Ru-6** ve **Ru-7** için MCF-7 meme kanser hücrelerinde 72 saat inkübasyon süresi için seçicilik indeksleri sırasıyla; 25.28, 1.38, 0.55 ve 1.16 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan **2a**, **2b** ve **2c** komplekslerinin MCF-7 meme kanser hücrelerinde 72 saat inkübasyon süresi için hesaplanan seçicilik indeksleri sırasıyla; >1.81 , >1.69 ve ≥ 1 olup, **Ru-4** dışındaki komplekslerden daha yüksek seçici özelliğe sahip oldukları saptandı.

De ve ark., tarafından yapılan çalışmada bir dizi (**4a-4j**) rutenyum(II)-*p*-simen-2-aril-imidazo-1,10-fenantrolin türevleri sentezlenmiş ve yapıları elementel analiz, IR, LC-MS ve NMR teknikleri ile karakterize edilmiştir [135] (**Şekil 5.2.**). Sentezlenen Ru(II) komplekslerinin sitotoksik aktiviteleri, meme kanseri (MDA-MB-231) ve rahim ağzı kanseri (HeLa) hücreleri üzerinde, seçici özellikleri ise insan embriyonik sağlıklı böbrek hücresi (HEK-29) üzerinde 24 saat uygulama sonrasında araştırılmıştır. Komplekslerin sitotoksik aktiviteleri kemoterapötik ilaç olan sisplatin ile karşılaştırılmıştır. **4a-4j** komplekslerinin MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde 24 saat inkübasyon süresi için IC_{50} değerleri sırasıyla; $28.03 \pm 1.7 \mu M$, $34.33 \pm 2.1 \mu M$, $3.99 \pm 1.3 \mu M$, $17.59 \pm 1.1 \mu M$, $8.23 \pm 1.9 \mu M$, $2.47 \pm 2.2 \mu M$, $2.37 \pm 1.8 \mu M$, $52.74 \pm 1.5 \mu M$, $78.41 \pm 1.6 \mu M$ ve $32.08 \pm 1.3 \mu M$ olarak belirlenmiştir. En düşük IC_{50} değerine ($2.37 \pm 1.8 \mu M$) sahip olan olan **4g**'nin en yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu ve cisplatin'den 3.5 kat daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan **2a**, **2b** ve **2c** komplekslerinin MDA-MB-231 hücrelerinde 24 saat inkübasyon süresi için IC_{50} değerleri sırasıyla; $197.9 \pm 0.012 \mu M$, $125.3 \pm 0.074 \mu M$ ve $>500 \mu M$ olup, De ve ark., (2021) tarafından

sentezlenen bileşiklere göre düşük sitotoksik aktivite sergiledikleri belirlendi. **4a-4j** komplekslerinin MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde 24 saat inkübasyon süresi için seçicilik indeksleri sırasıyla; 7.25, 1.55, 22.27, 4.08, 10.38, 37.80, 75.19, 1.94, 1.22 ve 1.96 olarak belirlenmiştir.

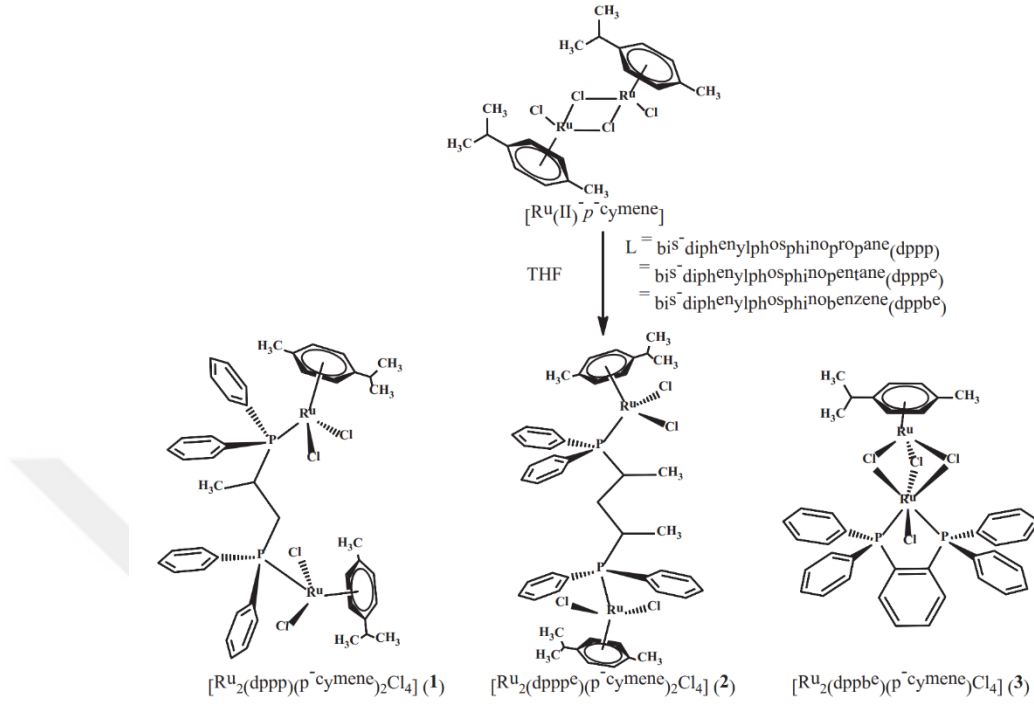


Şekil 5.2. Rutenyum(II)-*p*-simen 2-aril-imidazo-1,10-fenantrolin türevi kompleksleri [135]

Çalışmamızda kullanılan **2a**, **2b** ve **2c** komplekslerinin MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde 24 saat inkübasyon süresi için hesaplanan seçicilik indeksleri sırasıyla; 0.40, 0.52 ve ≥ 1 olup, De ve ark (2021) tarafından sentezlenen tüm komplekslerden daha düşük seçici özelliğe sahip oldukları saptandı. Çalışmamızla benzer olarak, Ru(II) kompleks aktivitelerinin, komplekste bulunan bağlı gruplara, grupların bağlanma yerlerine ve çalışılan hücre türüne göre değişiklik gösterdiği belirtilmiştir.

Klaimanee ve ark., tarafından organofosfor ligandları içeren üç adet yeni organometalik Ru(II)-*p*-simen kompleksi sentezlenerek yapıları X-ışını kırınımı, ¹H NMR, ES-MS, FTIR, elementel analiz ve yoğunluk fonksiyonel teorisi ile karakterize edilmiştir [136] (Şekil 5.3.). Ru(II) kompleksleri ve serbest ligandların sitotoksik aktiviteleri, MCF-7, HCC1937 ve MDA-MB-231 insan meme kanser hücrelerinde 48 saat inkübasyon sonrasında araştırılmıştır. Komplekslerin sitotoksik aktiviteleri kemoterapik ilaç olan sisplatin ile karşılaştırılmıştır. **1-3** komplekslerinin MCF-7 meme kanser hücrelerinde 48 saat inkübasyon süresi için IC₅₀ değerleri sırasıyla; $0.3520 \pm 0.02 \mu\text{M}$, $0.6563 \pm 0.04 \mu\text{M}$, $0.5272 \pm 0.01 \mu\text{M}$ ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde 48 saat

inkübasyon süresi için IC₅₀ değerleri sırasıyla; 0.8944 ± 0.03 µM, 1.6036 ± 0.06 µM ve 1.1856 ± 0.03 µM olarak belirlenmiştir.

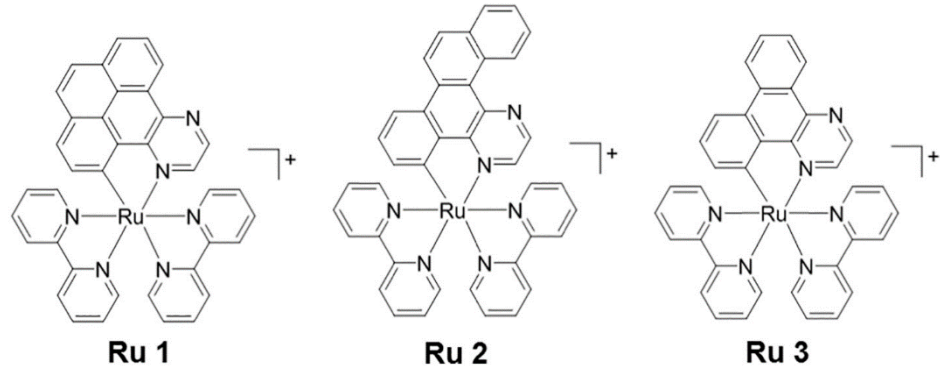


Şekil 5.3. Organofosfor ligandları içeren Ru(II)-*p*-simen kompleksleri [136]

Çalışmamızda kullanılan **2a**, **2b** ve **2c** komplekslerinin MCF-7 hücrelerinde 48 saat inkübasyon süresi için IC₅₀ değerleri sırasıyla; <30 µM, 63.47 ± 0.100 µM, >500 µM ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde 48 saat inkübasyon süresi için IC₅₀ değerleri sırasıyla; 170.3 ± 0.020 µM, 111.8 ± 0.122 µM, >500 µM olup, Klaimanee ve ark., (2021) tarafından sentezlenen bileşiklere göre düşük sitotoksik aktivite sergiledikleri belirlendi.

Xie ve ark., tarafından $[Ru(bpy)_2L]PF_6$ formülüne sahip üç adet siklometalli Ru(II) kompleksi sentezlenerek, yapıları ESI-MS, ¹H-NMR ve elementel analiz ile karakterize edilmiştir [137] (**Şekil 5.4.**). Komplekslerin sitotoksik aktiviteleri (MDA-MB-231) meme, (SW620) kolon, (SW620AD300) ilaç-dirençli kolon, (MCF-7) meme kanser hücreleri üzerinde ve seçici özellikleri ise; (LO₂) sağlıklı karaciğer, (MCF-10A) sağlıklı meme ve (HUVEC) insan umbilikal ven endotel hücreleri üzerinde 48 saat inkübasyon sonrasında araştırılmıştır. Komplekslerin sitotoksik aktiviteleri kemoterapötik ilaç olan sisplatin ile karşılaştırılmıştır. Komplekslerin (**Ru1-3**) MCF-7 meme kanser hücrelerinde 48 saat inkübasyon

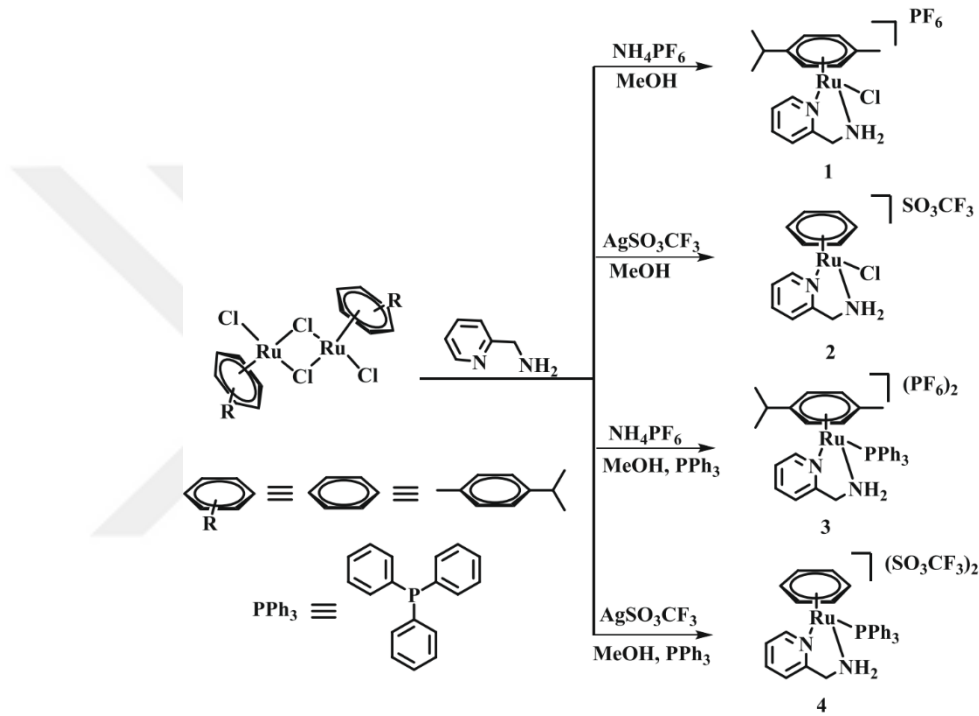
süresi için IC_{50} değerleri sırasıyla; $20.81 \pm 2.1 \mu M$, $>35 \mu M$, $11.2 \pm 1.8 \mu M$ ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde 48 saat inkübasyon süresi için IC_{50} değerleri sırasıyla; $6.30 \pm 0.9 \mu M$, $11.06 \pm 0.8 \mu M$ ve $3.39 \pm 2.4 \mu M$ olarak belirlenmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri için en düşük IC_{50} değerlerine (sırasıyla; $11.2 \pm 1.8 \mu M$ ve $3.39 \pm 2.4 \mu M$) sahip olan olan **Ru3** kompleksinin en yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu ve cisplatine göre, MCF-7 hücrelerine 1.78 kat, MDA-MB-231 hücrelerine ise 8.67 kat daha yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan **2a**, **2b** ve **2c** komplekslerinin MCF-7 hücrelerinde 48 saat inkübasyon süresi için IC_{50} değerleri sırasıyla; $<30 \mu M$, $63.47 \pm 0.100 \mu M$, $>500 \mu M$ ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde 48 saat inkübasyon süresi için IC_{50} değerleri sırasıyla; $170.3 \pm 0.020 \mu M$, $111.8 \pm 0.122 \mu M$, $>500 \mu M$ olup, Xie ve ark., (2021) tarafından sentezlenen bileşiklere göre düşük sitotoksik aktivite sergiledikleri saptandı.



Şekil 5.4. $[Ru(bpy)_2L]PF_6$ komplekslerinin kimyasal yapıları [137]

Ru1, **Ru2** ve **Ru3** komplekleri için MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde 48 saat inkübasyon süresi için seçicilik indeksleri çalışılan üç sağlıklı hücre (LO₂, MCF-10A ve HUVEC) içinde <1 olarak bulunmuştur. Yalnızca **Ru3** kompleksinin MCF-10A için seçicilik indeksi 1.15 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan **2a**, **2b** ve **2c** komplekslerinin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde 48 saat inkübasyon süresi için hesaplanan seçicilik indeksleri sırasıyla; >2.41 , 0.85 ve ≥ 1 ; 0.42 , 0.48 ve ≥ 1 olup, **Ru1**, **Ru2** ve **Ru3** komplekslerine göre daha yüksek seçici özelliğe sahip oldukları saptandı.

Pragti ve ark., tarafından yapılan çalışmada dört adet (**1-4**) rutenyum(II)-aren kompleksi sentezlenmiş ve yapıları ESI-MS, FTIR, $^1\text{H-NMR}$, X-ışınları kristalografisi teknikleri ile karakterize edilmiştir [138] (**Şekil 5.5.**). Sentezlenen rutenyum(II)-aren komplekslerinin sitotoksik aktiviteleri, meme kanseri (MCF-7) ve rahim ağzı kanseri (HeLa) hücreleri üzerinde, seçici özellikleri ise insan embriyonik sağlıklı böbrek hücresi (HEK-29) üzerinde 24 saat inkübasyon sonrasında araştırılmıştır.

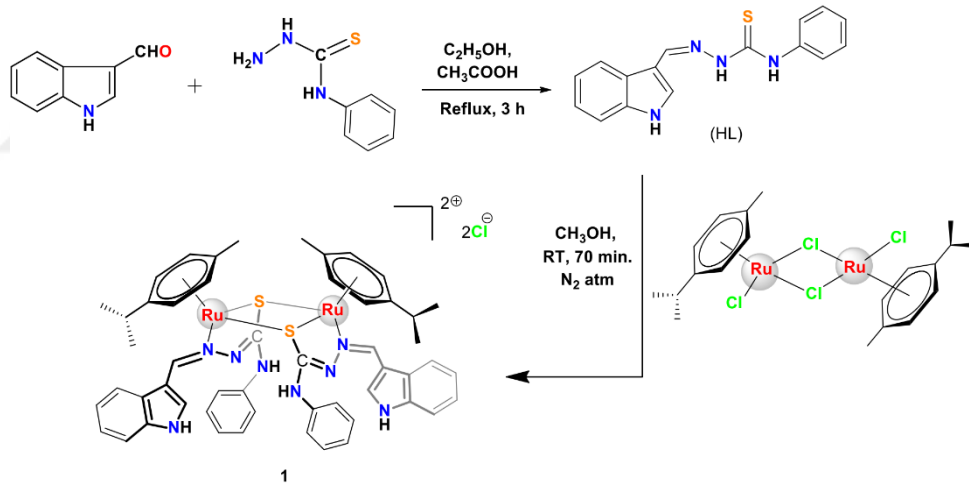


Şekil 5.5. Rutenyum(II)-aren komplekslerinin sentezi [138]

1-4 komplekslerinin MCF-7 meme kanser hücrelerinde 24 saat inkübasyon süresi için IC_{50} değerleri sırasıyla; $21.30 \pm 2.23 \mu\text{M}$, $25.12 \pm 3.65 \mu\text{M}$, $3.41 \pm 2.87 \mu\text{M}$, $9.61 \pm 3.46 \mu\text{M}$ olarak belirlenmiştir. En düşük IC_{50} değerine ($3.41 \pm 2.87 \mu\text{M}$) sahip olan **3** numaralı kompleksin en yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan **2a**, **2b** ve **2c** komplekslerinin MCF-7 hücrelerinde 24 saat inkübasyon süresi için IC_{50} değerleri sırasıyla; $65.17 \pm 0.083 \mu\text{M}$, $74.79 \pm 0.122 \mu\text{M}$ ve $>500 \mu\text{M}$ olup, Pragti ve ark., (2021) tarafından sentezlenen bileşiklere göre düşük sitotoksik aktivite sergiledikleri belirlendi. **1-4** komplekslerinin MCF-7 meme kanser hücrelerinde 24 saat inkübasyon süresi için seçicilik indeksleri sırasıyla; 1.82, 1.85, 9.98 ve 3.61

olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan **2a**, **2b** ve **2c** komplekslerinin MCF-7 meme kanser hücrelerinde 24 saat inkübasyon süresi için hesaplanan seçicilik indeksleri sırasıyla; 1.23, 0.86 ve ≥ 1 olup, Pragli ve ark (2021) tarafından sentezlenen tüm komplekslerden daha düşük seçici özelliğe sahip oldukları saptandı.

Haribabu ve ark., suda çözünür binükleer organometalik Ru(II)-*p*-simen kompleksini [Ru(η^6 -*p*-simen)(η^2 -L)]₂ (**1**), indol tiyosemikarbazon ligandından tek aşamalı reaksiyonla sentezleyerek yapısını UV, IR, ¹H NMR ve X-ışınları kristalografisi gibi çeşitli spektroskopik yöntemlerle karakterize etmişlerdir [139] (Şekil 5.6.). Kompleksin (**1**) ve ligandının (**HL**) sitotoksik aktiviteleri, akciğer (A549), rahim ağzı (HeLa), karaciğer (HepG-2), mesane (T24) ve endotel (EA.hy926) kanser hücreleri üzerinde, seçicilik özelliği ise sağlıklı böbrek epitel (Vero) hücreleri üzerinde 24 saat inkübasyon sonrasında araştırılmış ve sitotoksik aktiviteleri sisplatin ile karşılaştırılmıştır.

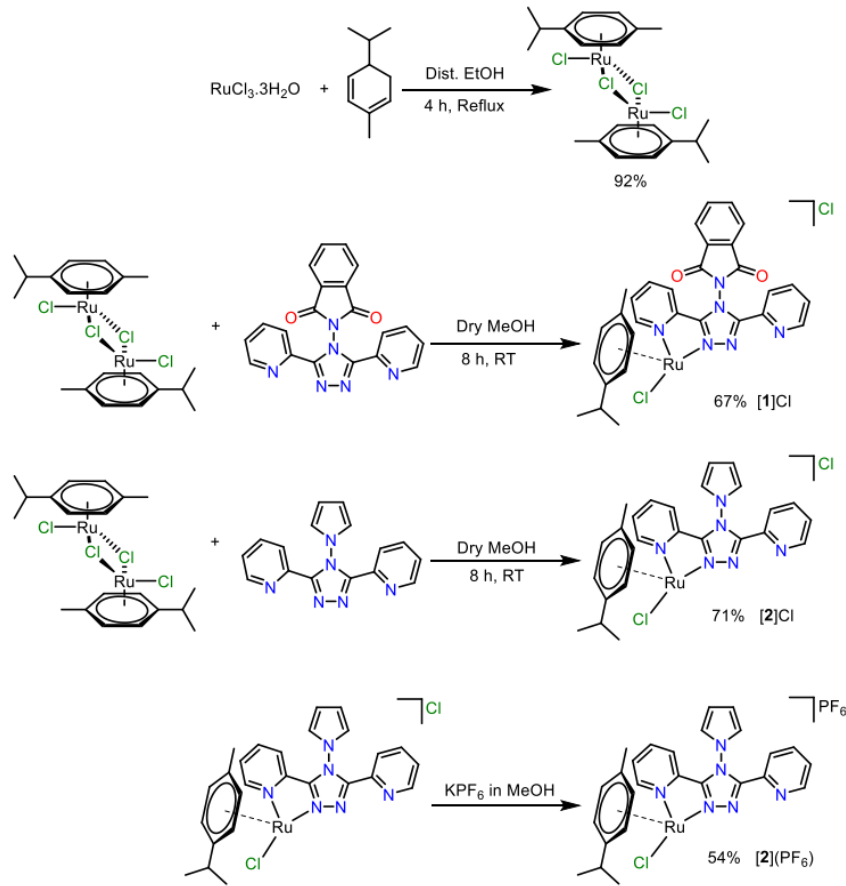


Şekil 5.6. Binükleer Ru(II)-*p*-simen kompleksinin sentezi [139]

Kompleks (**1**) ve ligandın (**HL**), MCF-7 meme kanser hücrelerinde 24 saat inkübasyon süresi için IC₅₀ değeri sırasıyla; 28.3 μ M ve >50 μ M olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan **2a**, **2b** ve **2c** komplekslerinin MCF-7 hücrelerinde 24 saat inkübasyon süresi için IC₅₀ değerleri sırasıyla; 65.17 $\pm$ 0.083 μ M, 74.79 $\pm$ 0.122 μ M ve >500 μ M olup, Haribabu ve ark., (2021) tarafından sentezlenen bileşiklere göre düşük sitotoksik aktivite sergiledikleri belirlendi. Kompleks (**1**) ve ligandın (**HL**), MCF-7 hücreleri için sisplatin (23.7 μ M) daha yüksek IC₅₀ değerlerine sahip olduğu ve bu nedenle sisplatin

göre daha düşük sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Kompleks (1) ve ligandın (HL), MCF-7 meme kanser hücrelerinde 24 saat inkübasyon süresi için seçicilik indeksleri sırasıyla; >2 ve >3.53 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan 2a, 2b ve 2c komplekslerinin MCF-7 meme kanser hücrelerinde 24 saat inkübasyon süresi için hesaplanan seçicilik indeksleri sırasıyla; 1.23, 0.86 ve ≥ 1 olup, Haribabu ve ark (2021) tarafından sentezlenen tüm komplekslerden daha düşük seçici özelliğe sahip oldukları saptandı.

Muley ve ark., triazol ligandları içeren yeni üç adet yarım sandviç rutenyum(II) *p*-simen kompleksi ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-simen})(\text{L}^1)\text{Cl}]\text{Cl}$: [1]Cl, L^1 :(2-(3,5-di(piridin-2-il)-4H)-1,2,4-triazol-4-il)izoindolin-1,3-dion), $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-simen})(\text{L}^2)\text{Cl}]\text{Cl}$: [2]Cl ve $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-simen})(\text{L}^2)\text{Cl}](\text{PF}_6)$: [2](PF₆), L^2 :(2,2-(4-(1H-pirol-1-il)-4H-1,2,4-triazol-3,5-diyl) dipiridin)), sentezleyerek yapılarını ¹³C NMR, ¹H NMR, FT-IR, ESI-MS ve X-ışını kristalografisi gibi farklı yöntemlerle karakterize etmişlerdir [140] (Şekil 5.7.)

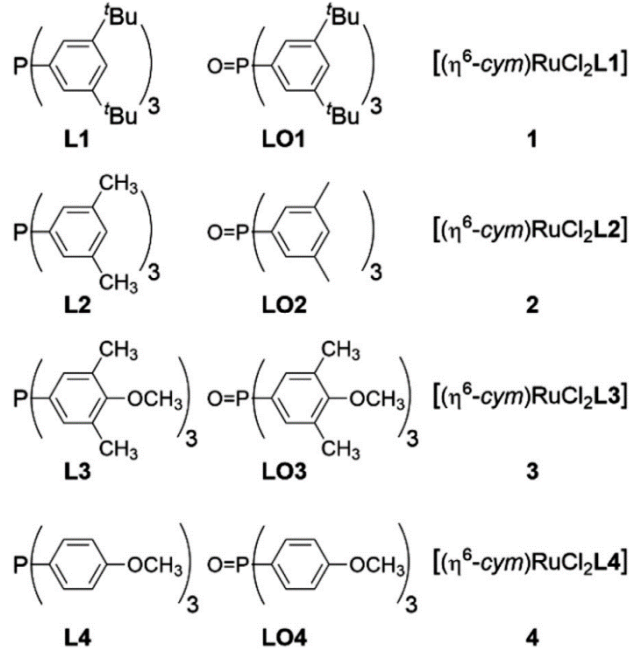


Şekil 5.7. Triazol ligandları içeren yeni Ru(II)-*p*-simen kompleksler [140]

Komplekslerin ([1]Cl, [2]Cl, [2](PF6)) sitotoksik aktiviteleri, akciğer (A549), meme (MDA-MB-231) kanser hücreleri üzerinde 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında araştırılmıştır. Komplekslerin 24 saat uygulama sonrasında MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde önemli hücre ölümüne neden olmadığı belirlenmiştir. Komplekslerin ([1]Cl, [2]Cl, [2](PF6)), 48 saat inkübasyon sonrasında, MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde IC₅₀ değerleri sırasıyla; $15.99 \pm 0.7044 \mu\text{M}$, $9.415 \pm 0.406 \mu\text{M}$ ve $56.885 \pm 1.064 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan **2a**, **2b** ve **2c** komplekslerinin MDA-MB-231 hücrelerinde 48 saat inkübasyon süresi için IC₅₀ değerleri sırasıyla; $170.3 \pm 0.020 \mu\text{M}$, $111.8 \pm 0.122 \mu\text{M}$, $>500 \mu\text{M}$ olup, Muley ve ark., (2021) tarafından sentezlenen bileşiklere göre düşük sitotoksik aktivite sergiledikleri saptandı. Komplekslerin ([1]Cl, [2]Cl, [2](PF6)), 72 saat inkübasyon sonrasında, MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde IC₅₀ değerleri sırasıyla; $1.13 \pm 0.046 \mu\text{M}$, $0.36 \pm 0.016 \mu\text{M}$ ve $11.32 \pm 0.49 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan **2a**, **2b** ve **2c** komplekslerinin MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saat inkübasyon süresi için IC₅₀ değerleri sırasıyla; $171.1 \pm 0.034 \mu\text{M}$, $95.19 \pm 0.092 \mu\text{M}$, $>500 \mu\text{M}$ olup, Muley ve ark., (2021) tarafından sentezlenen bileşiklere göre düşük sitotoksik aktivite sergiledikleri saptandı. Çalışmamızla benzer olarak, uygulama zamanındaki artışla birlikte hücre ölüm oranlarında artış ve IC₅₀ değerlerinde azalış gözlenmiştir.

Guimarães ve ark., (2021) alkil ve metoksi bağlı fosfin içeren dört adet nötral Ru-aren fosfin kompleksi sentezleyerek yapılarını X-ray kristalografi, NMR ve DFT gibi farklı yöntemlerle karakterize etmişlerdir [141] (Şekil 5.8.). Kompleksler (**1**, **2** ve **4**) ve ligandlar (**L1**, **L2** ve **L4**) ile fosfin oksitlerin (**LO1**, **LO2** ve **LO4**) sitotoksik aktiviteleri, akciğer (A549), meme (MDA-MB-231) kanser hücreleri üzerinde, seçicilik özelliği ise sağlıklı akciğer (MRC-5) hücreleri üzerinde 48 saat uygulama sonrasında araştırılmış ve sitotoksik aktiviteleri sisplatin ile karşılaştırılmıştır. Komplekslerin (**1**, **2** ve **4**) ve fosfin oksitlerin (**LO1**, **LO2** ve **LO4**), 48 saat inkübasyon sonrasında, MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde IC₅₀ değerleri sırasıyla; $28.0 \pm 2.3 \mu\text{M}$, $3.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ve $15.5 \pm 0.9 \mu\text{M}$; $74.2 \pm 1.4 \mu\text{M}$, $51.1 \pm 1.8 \mu\text{M}$ ve $150.5 \pm 4.5 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan **2a**, **2b** ve **2c** komplekslerinin MDA-

MB-231 hücrelerinde 48 saat inkübasyon süresi için IC₅₀ değerleri sırasıyla; 170.3 ± 0.020 µM, 111.8 ± 0.122 µM, >500 µM olup, Guimarães ve ark., (2021) tarafından sentezlenen Ru(II) aren kompleksleri ve bunların fosfin komplekslerine göre düşük sitotoksik aktivite sergiledikleri saptandı.

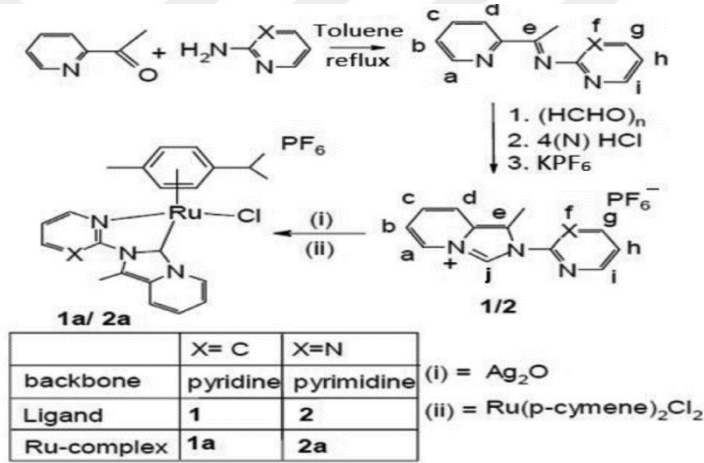


Şekil 5.8. Fosfin içeren η⁶-p-cymene ruthenium(II) kompleksleri [141]

Ligandların (**L1**, **L2** ve **L4**), MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde 48 saat inkübasyon sonrasında IC₅₀ değerleri sırasıyla; 85.5 ± 12.5 µM, 118.4 ± 10.6 µM ve 177.9 ± 24.5 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan **1a**, **1b** ve **1c** ligandlarının MDA-MB-231 hücrelerinde 48 saat inkübasyon süresi için IC₅₀ değerleri; >500 µM olup, Guimarães ve ark., (2021) tarafından sentezlenen ligandlara göre düşük sitotoksik aktivite sergiledikleri saptandı. Çalışmamızla benzer olarak, liganda metal (Ru(II)) bağlanmasıyla sitotoksik aktivitede artış belirlemişlerdir. Guimarães ve ark., (2021) tarafından sentezlenen ligandlar, Ru(II) kompleksleri ve fosfin oksitlerinin tamamının MDA-MB-231 hücreleri üzerine sisplatinden (IC₅₀=2.4 ± 0.2 µM) daha düşük sitotoksik ektivite gösterdiği, yalnızca **2** numaralı kompleksin, 3.1 ± 0.1 µM IC₅₀ değeri ile sisplatine en yakın sistosoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. **1**, **2** ve **4** komplekslerinin MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde 48 saat inkübasyon süresi için seçicilik indeksleri sırasıyla; >3.57, 0.58 ve 0.61 olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda kullanılan **2a**, **2b** ve **2c** komplekslerinin MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde 48 saat uygulama zamanı için hesaplanan seçicilik indeksleri sırasıyla; 0.42, 0.48 ve ≥ 1 olup, Guimarães ve ark (2021) tarafından sentezlenen **kompleks 1**'den daha düşük, **kompleks 2** ve **kompleks 4** ile benzer seçici özelliğe sahip oldukları saptandı.

Rana ve ark., (2021) piridin/pirimidin içeren Ru(II)-HNC komplekslerini (**1a**, **2a**), sentezleyerek yapılarını aydınlatmışlardır [142] (**Şekil 5.9.**). Komplekslerin (**1a**, **2a**) sitotoksik aktiviteleri, akciğer (A549), kolon (HCT116) ve meme (MCF-7) kanser hücreleri üzerinde, seçicilik özellikleri ise sağlıklı fare embriyonik fibroblast hücreleri (3T3) üzerinde 48 saat inkübasyon sonrasında araştırılmıştır.

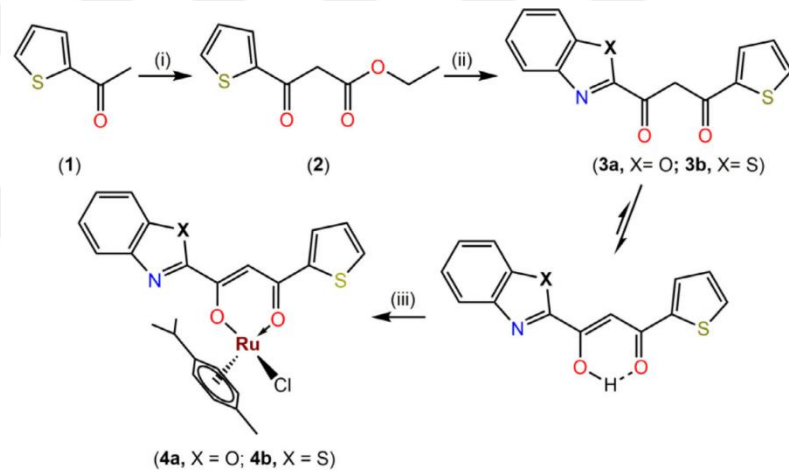


Şekil 5.9. Piridin/pirimidin içeren Ru(II)-HNC komplekslerini [142]

Komplekslerin (**1a**, **2a**) MCF-7 meme kanser hücrelerinde 48 saat inkübasyon süresi için IC₅₀ değerine sahip olan **2a** kompleksinin MCF-7 hücrelerinde daha yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu ve cisplatine göre, MCF-7 hücrelerine 4.24 kat daha yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan **2a**, **2b** ve **2c** komplekslerinin MCF-7 hücrelerinde 48 saat inkübasyon süresi için IC₅₀ değerleri sırasıyla; <30 μ M, $63.47 \pm 0.100 \mu$ M, >500 μ M olup, Rana ve ark., (2021) tarafından sentezlenen bileşiklere göre düşük sitotoksik aktivite sergiledikleri saptandı. **1a** ve **2a** kompleksleri için MCF-7 meme kanser hücrelerinde 48 saat inkübasyon süresi için seçicilik indeksleri sırasıyla; 3.01 ve 2.83 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan **2a**, **2b** ve **2c** komplekslerinin

MCF-7 meme kanser hücrelerinde 48 saat inkübasyon süresi için hesaplanan seçicilik indeksleri sırasıyla; >2.41 , 0.85 ve ≥ 1 olup, **2a** kompleksimiz Rana ve ark., (2001) tarafından sentezlenen **1a** ve **2a** kompleksleri ile benzer seçici özellik gösterirken, **2b** ve **2c** komplekslerimizin daha düşük seçici özellik gösterdiği belirlendi.

Ismail ve ark., (2021) tarafından genel formülü $[\eta^6-(p\text{-simen})\text{Ru}(\text{L})\text{Cl}]$ ($\text{L}=1\text{-(Benzazol-2-yl)-3-(tiofen-2-il) propan-1,3-dio}$) olan iki adet yeni hibrit yarı sandviç yapıda Ru(II) aren kompleksi (**4a,b**) sentezleyerek UV, ^1H NMR, ^{13}C NMR gibi yöntemlerle karakterize edilmiştir [143] (Şekil 5.10.). Komplekslerin (**4a, b**) sitotoksik aktiviteleri, akciğer (A549) ve meme (MCF-7) kanser hücreleri üzerinde, 24 saat inkübasyon sonrasında araştırılmış ve sitotoksik aktiviteleri sisplatin ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 5.10. Ru(II) aren kompleksleri [143]

Komplekslerin (**4a, 4b**), MCF-7 meme kanser hücrelerinde 24 saat inkübasyon süresi için IC_{50} değeri sırasıyla; $8.12 \mu\text{M}$ ve $3.93 \mu\text{M}$ olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan **2a, 2b** ve **2c** komplekslerinin MCF-7 hücrelerinde 24 saat inkübasyon süresi için IC_{50} değerleri sırasıyla; $65.17 \pm 0.083 \mu\text{M}$, $74.79 \pm 0.122 \mu\text{M}$ ve $>500 \mu\text{M}$ olup, Ismail ve ark., (2021) tarafından sentezlenen bileşiklere göre düşük sitotoksik aktivite sergiledikleri belirlendi. MCF-7 hücrelerinde komplekslerin (**4a, 4b**) IC_{50} değerlerinin, sisplatinden ($11.92 \mu\text{M}$) daha düşük değerlere sahip oldukları gözlenmiş olup, sisplatine göre **4a**'nın 1.46 kat, **4b**'nin ise 2.95 kat daha yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

6. SONUÇ

Bir antikanser ilaç adayı molekülde olması gereken en önemli özellik, kanserli hücrelere toksik etki gösterirken sağlıklı hücrelere toksik etki göstermemesidir. Kullanılan antikanser ilaçları tümör hücrelerine daha yüksek toksisite göstermekle birlikte sağlıklı hücrelere de toksik etki göstermektedir. Antikanser ilaçların yan etkileri ve toksisitesi nedeniyle kanser hastalarında kemoterapinin sonlandırılma oranları artmaktadır. Etkinliği yüksek ve yan etkileri düşük yeni antikanser ilaçların keşfinin acil ihtiyaç ve aynı zamanda kritik bir zorunluluk olduğu bilinmektedir.

Azol ligandları (**1a-c**) ve bu ligandların *N*-koordine Ru(II)-*p*-simeen kompleksleri (**2a-c**) sentezlendi. Ligand ve komplekslerin sitotoksik etkileri, MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanser hücrelerinde 24 saat, 48 saat ve 72 saat uygulama sürelerinden sonra MTT kolorimetrik yöntemi ile araştırıldı. Ayrıca tüm bileşikler L-929 fare sağlıklı fibroblast hücrelerine de uygulanarak, sağlıklı ve kanserli hücreler arasında seçici özellikleri de araştırıldı.

Ligand ve komplekslerin derişimlerdeki artışla paralel olarak sitotoksik etkiye artış, hücrelerinin canlılık oranlarında azalış gözleendi. Komplekslerin, ligandlarına göre daha düşük IC₅₀ değerlerine sahip oldukları ve bu nedenle daha yüksek sitotoksik etkiye sahip oldukları saptandı. **2a** ve **2b** kompleksleri için, MCF-7 hücrelerinde seçicilik indekslerinde zamana bağılı olarak artış gözlenirken, MDA-MB-231 hücrelerinde zamana bağılı olarak anlamlı bir değışim gözlenmedi.

Yapı sitotoksik aktivite arasındaki ilişki incelendiğinde; **2a-c** komplekslerini birbirinden farketkiren yapı, Ru(II)-*p*-simeen kompleksinde bulunan bağılı gruplardır. Bağılı gruplar; **2a-c** komplekslerinde sırasıyla; **3-metilbenzil**, **2-klorbenzil** ve **etoksietil**'dir. Komplekslerin MCF-7 insan meme kanser hücreleri üzerine sitotoksik aktiviteleri **2a>2b>2c** iken, MDA-MB-231 insan meme kanser hücreleri için ise **2b>2a>2c** olarak bulundu. **2a** kompleksinde bulunan **3-metilbenzil** ve **2b** kompleksinde bulunan **2-klorbenzil** gruplarının bileşlerin insan meme kanser hücre hatları üzerindeki yüksek sitotoksik aktivitesinde önemli rol aldığı belirlendi. **2c** kompleksinde bulunan **etoksietil** grubunun ise sitotoksik aktivitede etkili olmadığı saptandı.

Bu sonuçlar, komplekslerin yapısında bağı bulunan farklı grupların, kompleksin hem sitotoksik aktivitesinde hem de seçiciliğinde çok önemli rolü olduğunu göstermektedir. Sitotoksik aktivitenin kanser hücre hattına da bağı olarak değıştiğı belirlendi. MCF-7 hücreleri üzerinde **2a** kompleksinin, MDA-MB-231 hücreleri üzerinde ise **2b** kompleksinin daha etkin sitotoksik aktiviteye sahip oldukları gözlemlendi. Çalışma bulguları, farklı meme kanseri türlerinin tedavisinde kullanılabilecek aday yeni bileşiklerin sentezinde ve literatüre kazandırılmasında yol gösterici olacaktır.



KAYNAKLAR

- [1] Momenimovahed Z, Salehiniya H (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer - Targets and Therapy*, 11:151–164
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018). Global cancer statistics. GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492
- [3] TÜİK. Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2015.
- [4] Özmen M, Cantürk Z, Çelik V, Güler N, Kapkaç M, Koyunu A, Müslümanoğlu M, Utkan Z (2012). Meme Hastalıkları Kitabı Büneş Tıp Kitabevleri. Kısım I: Bölüm 1: Memenin Anatomisi, Fizyolojisi ve Konjenital Anomalileri, 3
- [5] Espié M, Lalloum M, Coussy F (2013). Epidemiology and risk factors of breast cancer. *Soins*, 58(776):22-24. doi.org/10.1016/j.soin.2013.04.003
- [6] Stewart WB, Wild CP (2014). World cancer report. WHO Press, Switzerland. https://www.who.int/cancer/publications/WRC_2014/en/
- [7] Rosen PP, Maia DM (1998). Rosen's breast pathology. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 122(5):480.
- [8] Azzopardi JG, Chepick OF, Hartmann WH, Jafarey NA, Llombart-Bosch A, Ozzello L, Rilke F, Sasano N, Sobin LH, Sommers SC, Stalsberg H, Sugar J, Williams AO (1982). The World Health Organization histological typing of breast tumors—second edition. *American Journal of Clinical Pathology*, 78(6):806-16.
- [9] Perou CM, Sørle T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge Ø, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406:747-752. <http://dx.doi.org/10.1038/35021093>
- [10] Anderson WAD, Damjanov I, Linder J (1996). Anderson's pathology. St Louis: Mosby. Vol. 2.
- [11] Zendejdel M, Niakan B, Keshtkar A, Rafiei E, Salamat F (2018). Subtypes of Benign Breast Disease as a Risk Factor for Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis Protocol. *Iran J Med Sci*, 43(1):1–8.
- [12] Hortobagyi GN, de la Garza Salazar J, Pritchard K, Amadori D, Renate Haidinger R, Hudis CA, Khaled H, Liu MC, Martin M, Namer M, O'Shaughnessy JA, Shen ZZ, Albain KS, ABREAST (2005).

- Investigators. The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. *Clin Breast Cancer*,6(5):391-401.
- [13] Parkin DM, Fernández LM (2006). Use of statistics to assess the global burden of breast cancer. *Breast J.* 12(s1):70-80.
- [14] Mavaddat N, Pharoah PD, Michailidou K (2015). Prediction of breast cancer risk based on profiling with common genetic variants. *JNCI: J Natl Cancer Inst*,107(5):djv 036
- [15] Giordano SH, Buzdar AU, Hortobagyi GN (2002). Breast Cancer in Men.*Ann Intern Med*,137(8):678–687.
- [16] Abdelwahab Yousef AJ (2017). Male Breast Cancer: Epidemiology and Risk Factors. *Semin Oncol*, 44(4):267–272.
- [17] Thakur P, Seam RK, Gupta MK, Gupta M, Sharma M, Fotedar V (2017). Breast cancer risk factor evaluation in a Western Himalayan state: A case–control study and comparison with the Western World. *South Asian J Cancer*, 6(3):106-109.
- [18] Kim Y, Yoo K-Y, Goodman MT (2015). Differences in Incidence, Mortality and Survival of Breast Cancer by Regions and Countries in Asia and Contributing Factors. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(7):2857-2870.
- [19] Beral V, Bull D, Doll R, Key T, Peto R, Reeves G (1997). Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52, 705 women with breast cancer and 108, 411 women without breast cancer. *Lancet*, 350(9084):1047-1059.
- [20] Beral V (2003). Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, 362(9382):419–427.
- [21] Ross RK, Paganini-Hill A, Wan PC, Pike MC (2000). Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *J Natl Cancer Inst*, 92(4):328–332.
- [22] Fournier A, Berrino F, Clavel-Chapelon F (2007). Unequal risks for breast cancer associated with different hormone replacement therapies: results from the E3N cohort study. *Breast Cancer Res Treat*, 107(1):103-111.
- [23] Cobain EF, Milliron KJ, Merajver SD (2016). Updates on breast cancer genetics: Clinical implications of detecting syndromes of inherited increased susceptibility to breast cancer. *Semin Oncol*, 43(5):528–535.
- [24] Godet I, Gilkes DM (2017). BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. *Integr Cancer Sci Ther*, 4(1):1-17.
- [25] Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, et al (2017). Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*, 317(23):2402-2416.

- [26] Yari K, Rahimi Z, Moradi MT, Rahimi Z (2014). The MMP-2 -735 C Allele is a Risk Factor for Susceptibility to Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(15):6199-6203.
- [27] Metcalfe KA, Finch A, Poll A, Horsman D, Kim-Sing C, Scott J, Royer R, Sun P, Narod SA (2009). Breast cancer risks in women with a family history of breast or ovarian cancer who have tested negative for a BRCA1 or BRCA2 mutation. *Br J Cancer*, 100(2):421-425.
- [28] Narod SA, Tung N, Lubinski J, Huzarski T, Robson M, Lynch HT, Neuhausen SL, Ghadirian P, Kim-Sing C, Sun P, Foulkes WD (2014). Hereditary Breast Cancer Clinical Study Group. A prior diagnosis of breast cancer is a risk factor for breast cancer in BRCA1 and BRCA2 carriers. *Curr Oncol*, 21(2):64-68.
- [29] Union for international cancer control. Cancer explained. Geneva, Switzerland: UICC press; 2013
- [30] Edge SB, Compton CC (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*, 17(6):1471-1474.
- [31] Costanza ME (2001). Epidemiology and risk factors for breast cancer. *Update*, 9(2):4-8.
- [32] Liu J, Chen J, Zhao J, Zhao Y, Li L, Zhang H (2003). A modified procedure for the synthesis of 1-arylimidazoles. *Synthesis*, 17:2661-2666. DOI: 10.1055/s-2003-42444
- [33] Anand K, Wakode S (2017). Development of drugs based on Benzimidazole Heterocycle: recent advancement and insights, *IJCS*, 5(2):350-362.
- [34] Singh Negi D, Kumar G, Singh M, Singh N (2017).. Antibacterial activity of benzimidazole derivatives: a mini review. *Res. Rev. J. Chem*, 6(3):18-28.
- [35] Gurvinder S, Maninderjit K, Mohan C (2013). Benzimidazoles: the latest information on biological activities. *IRPP*, 4(1):82-90
- [36] Tahlan S, Kumar S, Kakkar S, Narasimhan B (2019). Benzimidazole scaffolds as promising antiproliferative agents: a review. *BMC Chemistry*, 13(1):66.
- [37] Tahlan S, Narasimhan B, Lim SM, Ramasamy K, Mani V, Shah SAA (2019). 2-Mercaptobenzimidazole Schiff bases: design, synthesis, antimicrobial studies and anticancer activity on HCT-116 cell line. *Mini Rev Med Chem*, 19(13):1080-1092.
- [38] Mohareb RM, Kanel MM, Milad YR (2020). Uses of β -Diketones for the Synthesis of Novel Heterocyclic Compounds and Their Antitumor Evaluations. *Bull Chem Soc Ethiop*, 34:385-405.

- [39] Cheong JE, Zaffagni M, Chung I, Xu Y, Wang Y, Jernigan FE, Zetter BR, Sun L (2018). Synthesis and anticancer activity of novel water soluble benzimidazole carbamates. *Eur. J. Med. Chem*,144:372-385.
- [40] Karadayi FZ, Yaman M, Kislal MM, Keskus AG, Konu O, Ates-Alagoz Z (2020). Design, synthesis and anticancer/antiestrogenic activities of novel indole-benzimidazoles. *Bioorg. Chem*,100:103929.
- [41] Shinde VS, Lawande PP, Sontakke VA, Khan A (2020). Synthesis of benzimidazole nucleosides and their anticancer activity. *Carbohydr. Res*, 498:108178.
- [42] Z. Wang, X. Deng, S. Xiong, R. Xiong, J. Liu, L. Zou, X. Lei, X. Cao, Z. Xie, Y. Chen, Y. Liu, X. Zheng, G (2018). Tang, Design, synthesis and biological evaluation of chrysin benzimidazole derivatives as potential anticancer agents, *Nat. Prod. Res*, 32(24):2900–2909.
- [43] Morais GR, Palma E, Marques F, Gano L, Oliveira MC, Abrunhosa A, MirandaHV, Outeiro TF, Santos I, Paulo A (2017). Synthesis and biological evaluation of novel 2-aryl benzimidazoles as chemotherapeutic agents. *J. Heterocyclic Chem*, 54(1):255–267.
- [44] Shaker YM, Omar MA, Mahmoud K, Elhallouty SM, El-Senousy WM, Ali MM, Mahmoud AE, Abdel-Halim AH, Soliman SM, El Diwani HI (2015). Synthesis, in vitro and in vivo antitumor and antiviral activity of novel 1-substituted benzimidazole derivatives. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem*, 30(5):826-845.
- [45] Onnis V, Demurtas M, Deplano A, Balboni G, Baldisserotto A, Manfredini S, Pacifico S, Liekens S, Balzarini J (2016). Design, synthesis and evaluation of antiproliferative activity of new benzimidazolehydrazones. *J. Balzarini Mol.* 21(5):579-588.
- [46] Çevik UA, Sağlık BN, Korkut B, Ozay Y, Yılmaz S.(2018). Antiproliferative cytotoxic, and apoptotic effects of new benzimidazole derivatives bearing hydrazone moiety. *J. Heterocyclic Chem.* 55(1):138-148.
- [47] Yadav S, Lim SM, Ramasamy K, Vasudevan M, Shah SAA, Mathur A, Narasimhan B (2018). Synthesis and evaluation of antimicrobial, antitubercular and anticancer activities of 2-(1-benzoyl-1H-benzo[d]imidazol-2-ylthio)-N-substitutedacetamides. *Chem Cent J* 12:66.
- [48] Yadav S, Narasimhan B, Lim SM, Ramasamy K, Vasudevan M, Shah SAA, Mathur A (2018). Synthesis and evaluation of antimicrobial, antitubercular and anticancer activities of benzimidazole derivatives. *Egypt J Basic Appl Sci*, 5:100-109

- [49] Mohamed LW, Taher AT, Rady GS, Ali MM, Mahmoud AE (2018) Synthesis and biological evaluation of certain new benzimidazole derivatives as cytotoxic agents new cytotoxic benzimidazoles. *Der Pharma Chemica* 10(5):112-120
- [50] Zienab M, Nofal Elsyed A, Soliman SS, Abd El-Karim, Magdy I, Elzahar Aladdin M, Srouf SS, Timothy JM (2011). Novel Benzimidazole Derivatives as Expected Anticancer Agents. *Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research*, 68(4): 519-534
- [51] Refaat HM (2010). Synthesis and anticancer activity of some novel 2-substituted benzimidazole derivatives. *Eur J Med Chem*, 45(7):2949-56.
- [52] Huang ST, Hsieh JJ, Chen C (2006). Synthesis and anticancer evaluation of bis(benzimidazoles), bis(benzoxazoles), and benzothiazoles. *Bioorg Med Chem*, 14(17): 6106-6119
- [53] Tomasetti C, Li L, Vogelstein B (2017). Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science*, 355:1330-1334.
- [54] Livingston DM, Silver DP (2008). Cancer: crossing over to drug resistance. *Nature*, 451;1066-1067.
- [55] McQuitty RJ (2014). Metal-based drugs. *Sci. Prog*, 97:1-19.
- [56] Hurley LH (2002). DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2:188-200.
- [57] Hartinger CG, Dyson PJ (2009). Bioorganometallic chemistry—from teaching paradigms to medicinal applications. *Chem. Soc. Rev*, 38:391-401.
- [58] Galanski M (2006). Recent developments in the field of anticancer platinum complexes. *Recent Pat. Anti-Cancer Drug Discovery*, 1: 285-295.
- [59] Shaili E (2014). Platinum anticancer drugs and photochemotherapeutic agents: recent advances and future developments. *Sci. Prog*, 97:20-40.
- [60] Ohmichi M, Hayakawa J, Tasaka K, Kurachi H, Murata Y (2005). Mechanisms of platinum drug resistance. *Trends Pharmacol. Sci*, 26:113-116.
- [61] Nagar R (1990). Syntheses, characterization, and microbial activity of some transition metal complexes involving potentially active O and N donor heterocyclic ligands. *J. Inorg. Biochem*, 40(4):349-356. doi.org/10.1016/0162-0134(90)80069-A.
- [62] Cavagliolo G, Benedetto L, Boccaleri E, Colangelo D, Viano I, Osella D (2000). Pt(II) complexes with different N-donor aromatic ligands for specific inhibition of telomerase. *Inorg Chim Acta*, 305(1):61-68. doi.org/10.1016/S0020-1693(00)00114-6.

- [63] Sorenson JRJ (1982) Metal Ions in Biological Systems. (Sigel H Ed) M Dekker, New York, 14: 77.
- [64] Paprocka R, Wiese-Szadkowska M, Janciauskiene S, Kosmalski T, Kulik M, b, Helmin-Basa A (2022). Latest developments in metal complexes as anticancer agents. *Coordination Chemistry Reviews*, 452:214307
- [65] Peana MF, Medici S, Zoroddu MA, Rai M, Ingle AP (Eds.) (2018). Biomedical applications of metals. *S. Medici, Springer, Cham*, 221: 49-72. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-74814-6>.
- [66] Kar B, Roy N, Pete S, Moharana P, Paira P (2020). Ruthenium and iridium based mononuclear and multinuclear complexes: A Breakthrough of Next-Generation anticancer metallopharmaceuticals. *Inorganica Chimica Acta*, 512:119858
- [67] Allardyce CS, Dyson PJ (2001). Ruthenium in medicine: Current clinical uses and future prospects. *Platinum Met. Rev*, 45:62-69.
- [68] Hartinger CG, Seifried SZ, Jakupec MA, Kynast B, Zorbas H, Keppler BK (2006). From bench to bedside—preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A) *J. Inorg. Biochem*, 100:891-904.
- [69] Ruthenium compounds as anticancer agents, Education in chemistry by Royal society of chemistry (2012).
- [70] Hartinger CG, Groessl M, Meier SM, CasiniA, Dyson PJ (2013). Application of mass spectrometric techniques to delineate the modes-of-action of anticancer metallodrugs *Chem. Soc. Rev*, 42(14):6186-6199.
- [71] Antonarakis ES, Emadi A (2010). Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? *Cancer Chemother. Pharmacol*, 66(1):1-9.
- [72] Minchinton A, Tannock IF (2006). Drug penetration in solid tumours *Nat. Rev. Cancer*, 6:583-592.
- [73] Reedijk R (2008). Metal-Ligand Exchange Kinetics in Platinum and Ruthenium Complexes. *Platinum Met. Rev*, 52(1):2-11.
- [74] Thota S, Rodrigues DA, Crans DC, Barreiro EJ (2018). Ru(II) Compounds: Next-Generation Anticancer Metallotherapeutics? *J. Med. Chem*, 61:5805-5821
- [75] Clarke MJ (1980). Inorganic Chemistry in Biology and Medicine. *American Chemical Society*, Chapter 10:157-180.

- [76] Rademaker-Lakhai JM, Van Den Bongard D, Pluim D, Beijnen JH, Schellens JHM (2004). A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent. *Clin. Cancer Res*, 10:3717-3727.
- [77] Sava G, Giraldi T, Mestroni G, Zassinovich G (1983). Antitumor effects of rhodium(I), iridium(I) and ruthenium(II) complexes in comparison with cis-dichlorodiammino platinum(II) in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Chem. Biol. Interact.* 45:1-6.
- [78] Simovic' AR, Masnikosa R, Bratsos I, Alessio E (2019). Chemistry and reactivity of ruthenium(II) complexes: DNA/protein binding mode and anticancer activity are related to the complex structure. *Coordination Chemistry Reviews* 398:113011
- [79] Li X, Gorle AK, Sundaraneedi MK, Keene FR, Collins JG (2018). Kinetically-inert polypyridylruthenium(II) complexes as therapeutic agents. *Coord. Chem. Rev.* 375:134-147.
- [80] Riccardi C, Musumeci D, Trifuoggi M, Irace C, Paduano L, Montesarchio D (2019). Anticancer ruthenium(III) complexes and Ru(III)-containing nanoformulations: an update on the mechanism of action and biological activity. *Pharmaceuticals-Base*, 12:146.
- [81] Sava G, Clerici K, Capozzi I, Cocchietto M, Gagliardi R, Alessio E, Mestroni G, Perbellini A (1999). Reduction of lung metastasis by ImH[trans-RuCl₄(DMSO)Im]: mechanism of the selective action investigated on mouse tumours. *Anti-Cancer Drugs*, 10:129-138.
- [82] Alessio E, Messori L (2019). NAMI-A and KP1019/1339, two iconic ruthenium anticancer drug candidates face-to-face: A case story in medicinal inorganic chemistry. *Molecules*, 24(10):1995. <https://doi.org/10.3390/molecules24101995>.
- [83] Zeng L, Gupta P, Chen Y, Wang E, Ji L, Chao H, Chen ZS (2017). The development of anticancer ruthenium(II) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials. *Chem. Soc. Rev*, 46:5771-5804.
- [84] Alatrash N, Issa FH, Bawazir NS, West SJ, Van Manen-Brush K, C.P. Shelor CP, Dayoup AS, Myers KA, Janetopoulos C, Lewis EA, MacDonnell FM (2020). Disruption of microtubule function in cultured human cells by a cytotoxic ruthenium(ii) polypyridyl complex, *Chem. Sci.* 11264–275,
- [85] Notaro A, Frei A, Rubbiani R, Jakubaszek M, Basu U, Koch S, Mari C, Dotou M, Blacque O, Gouyon J, Bedioui F, Rotthowe N, Winter RF, Goud B, Ferrari S, Tharaud M, R̂ezáč'ováM, Humajov̂, Tomšík P, Gasser G (2020). Ruthenium(II) complex containing a redox-active semiquinonate ligand as a potential chemotherapeutic agent: from

- synthesis to in vivo studies. *J. Med. Chem.* 63(10):5568-5584,
- [86] Li Y, Wu Q, Yu G, L, Li LI, Zhao X, Huang X, Mei W (2019). Polypyridyl Ruthenium(II) complex-induced mitochondrial membrane potential dissipation activates DNA damage-mediated apoptosis to inhibit liver cancer. *Eur. J. Med. Chem.*, 164:282-291.
- [87] Chen JC, Wang J, Deng YY, Li BJ, Li CP, Lin YX, Yang D, Zhang H, Chen L, Wang T (2020). Novel cyclometalated Ru(II) complexes containing isoquinoline ligands: Synthesis, characterization, cellular uptake and in vitro cytotoxicity, *J. Med. Chem.*, 203:112562.
- [88] Hayward RL, Schornagel QC, Tente R, Macpherson JS, Aird RE, Guichard S, Habtemariam A, Sadler P, Jodrell DI (2005). Investigation of the role of Bax, p21/Waf1 and p53 as determinants of cellular responses in HCT116 colorectal cancer cells exposed to the novel cytotoxic ruthenium(II) organometallic agent, RM175. *Cancer Chemother. Pharmacol*, 55:577-583
- [89] Lee RFS, Escrig S, Maclachlan C, Knott GW, Meibom A, Sava G, Dyson PJ (2017). The differential distribution of RAPTA-T in non-invasive and invasive breast cancer cells correlates with its anti-invasive and anti-metastatic effects. *Int. J. Mol. Sci.*, 18:1869.
- [90] Debreczeni JÉ Bullock AN, Atilla GE, Williams DS, Bregman H, Knapp S, Meggers E (2006). Ruthenium half-sandwich complexes bound to protein kinase pim-1. *Angew. Chem., Int. Ed.* 45:1580-1585.
- [91] Morris RE, Aird RE, del Socorro Murdoch P, Chen H, Cummings J, Hughes ND, Parsons S, Parkin A, Boyd G, Jodrell DI, Sadler PJ (2001). Inhibition of cancer cell growth by ruthenium(II) arene complexes. *J. Med. Chem.*, 44:3616-3621.
- [92] Adhireksan Z, Davey GE, Campomanes P, Groessl M, Clavel CM, Yu H, Nazarov AA, Yeo CH, Ang WH, Droge P, Rothlisberger U, Dyson PJ, Davey CA (2014). Ligand substitutions between ruthenium-cymene compounds can control protein versus DNA targeting and anticancer activity. *Nat. Commun*, 5:3462.
- [93] Trondl R, Heffeter P, Kowol CR, Jakupec MA, Berger W, Keppler BK (2014). NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application. *Chem. Sci*, 5:2925- 2932.
- [94] Meng X, Leyva ML, Jenny M, Gross I, Benosman S, Fricker B, Harlepp S, Heßraud P, Boos A, Wlosik P, Bischoff P, Sirlin C, Pfeffer M, Loeffler JP, Gaidon C (2009). A ruthenium- containing organometallic compound reduces tumor growth through induction of

- the endoplasmic reticulum stress gene CHOP. *Cancer Res*, 69:5458-5466.
- [95] Antonarakis ES, Emadi A (2010). Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? *Cancer Chemother. Pharmacol*, 66:1-9.
- [96] Tian F, Woo SY, Lee SY, Chun HS (2018). p-Cymene and its derivatives exhibit antiaflatoxigenic activities against *Aspergillus flavus* through multiple modes of action. *Appl. Biol. Chem*, 61:489-497.
- [97] Makgwane PR, Ray SS (2016). Interface structural effect of ruthenium-cerium oxide nanocomposite on its catalytic activity for selective oxidation of bioterpenes-derived p-cymene. *J. Mol. Catal. Chem*, 418:19-29.
- [98] Santana MF, Guimaraes AG, Chaves DO, Silva JC, Bonjardin L, de Lucca Júnior W de, Ferro JN. de S, Barreto E. de O, Santos FE, do S, Soares, MBP (2015). The anti-hyperalgesic and anti-inflammatory profiles of p-cymene: Evidence for the involvement of opioid system and cytokines. *Pharm. Biol.* 53:1583-1590.
- [99] Shang X, Wang Y, Zhou X, Guo X, Dong S, Wang D, Zhang J, Pan H, Zhang Y, Miao X (2016). Acaricidal activity of oregano oil and its major component, carvacrol, thymol and p-cymene against *Psoroptes cuniculi* in vitro and in vivo. *Vet. Parasitol*, 226:93-96.
- [100] Abbasi S, Gharaghani S, Benvidi A, Rezaeinasab M (2018). New insights into the efficiency of thymol synergistic effect with p-cymene in inhibiting advanced glycation end products: a multi-way analysis based on spectroscopic and electrochemical methods in combination with molecular docking study. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal*, 150:436-451.
- [101] Sharifi-Rad J, Salehi B, Schnitzler P, Ayatollahi SA, Kobarfard F, Fathi M, Eisazadeh M, Sharifi-Rad M (2017). Susceptibility of herpes simplex virus type 1 to monoterpenes thymol, carvacrol, p-cymene and essential oils of *Sinapis arvensis* L., *Lallemantia royleana* Benth. and *Pulicaria vulgaris* Gaertn. *Cell. Mol. Biol*, 63:42-47.
- [102] Kaludjerović GN, Krajnović T, Momčilović M, Stosić-Grujić S, Mijatović S, Maksimović-Ivanić D, Hey-Hawkins E (2015). Ruthenium (II) p-cymene complex bearing 2, 2'-dipyridylamine targets caspase 3 deficient MCF-7 breast cancer cells without disruption of antitumor immune response. *J. Inorg. Biochem*, 153:315-321
- [103] Zhou Q, Li P, Lu R, Qian Q, Lei X, Xiao Q, Huang S, Liu L, Huang C, Su W (2013). Synthesis, X-ray diffraction study, and cytotoxicity of a -cationic p -cymene ruthenium chloro complex containing a chelating semicarbazone ligand. *Z. Anorg. Allg. Chem*, 639:943-946.

- [104] Krstić M, Sovilj SP, Grgurić Sipka Š, Evans IR, Borozan S, Santibanez JF (2011). Synthesis, structural and spectroscopic characterization, in vitro cytotoxicity and in vivo activity as free radical scavengers of chlorido(p-cymene) complexes of ruthenium(II) containing N-alkylphenothiazines. *Eur. J. Med. Chem*, 46:4168-4177.
- [105] Huxham LA, Cheu ELS, Patrick BO, James BR (2003). The synthesis, structural characterization, and in vitro anti-cancer activity of chloro(p-cymene) complexes of ruthenium(II) containing a disulfoxide ligand. *Inorg. Chim. Acta*, 352:238-246.
- [106] Aman F, Hanif M, Siddiqui WA, Ashraf A, Filak LK, Reynisson J, Sohnle T, Jamieson SM, Hartinger CG (2014). Anticancer ruthenium (η^6 -p-cymene) complexes of nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives. *Organometallics*, 33:5546-5553.
- [107] Li J, Liu C, Sato T (2016). Novel antitumor invasive actions of p-cymene by decreasing MMP-9/TIMP-1 expression ratio in human fibrosarcoma HT-1080 cells. *Biol. Pharm. Bull*, 39:1247-1253.
- [108] Balahbib A, El Omari N, EL. Hachlafi N, Lakhdr F, El Menyiy N, Salhi N, Mrabti HN, Bakrim S, Zengin G, Bouyahya A (2021). Health beneficial and pharmacological properties of p-cymene . *Food and Chemical Toxicology* 153:112259
- [109] Bhattacharyya S, Purkait K, Mukherjee A (2017). Ruthenium(ii) p-cymene complexes of a benzimidazole-based ligand capable of VEGFR2 inhibition: hydrolysis, reactivity and cytotoxicity studies. *Dalton Trans*, 46:8539-8554.
- [110] Lenis-Rojas OA, Robalo MP, Tomaz AI, Carvalho A, Fernandes AR, Marques F, Folgueira M, Yanez J, Vazquez-García D, Lopez-Torres M, Fernandez A, Fernandez JJ (2018). Ru II (p -cymene) compounds as effective and selective anticancer candidates with No toxicity in vivo. *Inorg. Chem*. 57:13150–13166.
- [111] Meng T, Qin QP, Chen ZL, Zou HH, Wang K, Liang FP (2019). Discovery of high in vitro and in vivo antitumor activities of organometallic ruthenium (II)–arene complexes with 5, 7-dihalogenated-2-methyl-8-quinolinol. *Dalton Tran.*, 48:5352-5360
- [112] Bhatti MZ, Ali A, Duong HQ, Chen J, Rahman FU (2019). Anticancer activity and mechanism of bis-pyrimidine based dimetallic Ru(II)(η^6 - p-cymene) complex in human non-small cell lung cancer via p53-dependent pathway. *J. Inorg. Biochem*, 194:52-64.

- [113] Adhireksan Z, Davey GE, Campomanes P, Groessl M, Clavel CM, Yu H, Nazarov AA, Yeo CHF, Ang WH, Droge P, Rothlisberger U, Dyson PJ, Davey CA (2014). Ligand substitutions between ruthenium–cymene compounds can control protein versus DNA targeting and anticancer activity. *Nat. Commun*, 5:3462.
- [114] Nowak-Sliwinska P, Clavel CM, Paunescu E, te Winkel MT, Griffioen AW, Dyson PJ (2015). Antiangiogenic and anticancer properties of Bifunctional ruthenium(II)– p -cymene complexes: influence of pendant perfluorous chains. *Mol. Pharm*, 12:3089-3096.
- [115] Rausch M, Dyson PJ, Nowak-Sliwinska P (2019) Recent considerations in the application of RAPTA-C for cancer treatment and perspectives for its combination with immunotherapies. *Adv. Ther.-Germany*, 2(9):1900042.
- [116] Berndsen RH, Weiss A, Abdul UK, Wong TJ, Meraldi P, Griffioen AW, Dyson PJ, Nowak-Sliwinska P (2017). Combination of ruthenium(II)-arene complex [Ru(η⁶-p-cymene)Cl₂(pta)] (RAPTA-C) and the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib results in efficient angiostatic and antitumor activity. *Sci. Rep*, 7:43005.
- [117] Chen C, Xu C, Li T, Lu S, Luo F, Wang H (2020). Novel NHC-coordinated ruthenium (II) arene complexes achieve synergistic efficacy as safe and effective anticancer therapeutics. *Eur. J. Med. Chem*. 203:112605.
- [118] Chatterjee S, Kundu S, Bhattacharyya A, Hartinger CG, Dyson PJ (2008). The ruthenium(II)-arene compound RAPTA-C induces apoptosis in EAC cells through mitochondrial and p53-JNK pathways. *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem*, 13:1149-1155.
- [119] Montani M, Pazmay GVB, Hysi A, Lupidi G, Pettinari R, Gambini V, Tilio M, Marchetti F, Pettinari C, Ferraro S, Iezzi M, Marchini C, Amici A (2016). The water soluble ruthenium(II) organometallic compound [Ru(p-cymene)(bis(3,5-dimethylpyrazol-1-yl)methane)Cl]Cl suppresses triple negative breast cancer growth by inhibiting tumor infiltration of regulatory T cells. *Pharmacol. Res*, 107:282-290.
- [120] <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products>
- [121] Altman FP. Tetrazolium salts and formazans. *Prog Histochem Cytochem*. 1976;9(3):1-56. DOI: 10.1016/s0079-6336(76)80015-0
- [122] Mossman BT (1983).. In vitro approaches for determining mechanisms of toxicity and carcinogenicity by asbestos in the gastrointestinal and respiratory tracts. *Environ Health Perspect*, 53:155-161. doi: 10.1289/ehp.8353155

- [123] Almutary A, Sanderson BJ (2016). The MTT and Crystal Violet Assays: Potential Confounders in Nanoparticle Toxicity Testing. *Int J Toxicol*, 35(4):454-462. doi: 10.1177/1091581816648906.
- [124] Chiba K, Kawakami K, Tohyama K (1998). Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol In Vitro*, 12(3):251-258. DOI: 10.1016/s0887-2333(97)00107-0
- [125] Dzitko K, Dudzińska D, Grzybowski M, Długońska H (2010). The utility of MTT and XTT colorimetric tests in the studies conducted in vitro with *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Wiad Parazytol*, 56(2):145-152.
- [126] Stevens MG, Olsen SC (1993). Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *J Immunol Methods*, 157(1-2):225-231. DOI: 10.1016/0022-1759(93)90091-k
- [127] Shokrzadeh M, Modanloo M (2017). An overview of the most common methods for assessing cell viability. *J Research in Medical and Dental Sci*, 5(2):33-41. doi: 10.5455/jrmds.2017526.
- [128] Funk D, Schrenk HH, Frei E. Serum albumin leads to false-positive results in the XTT and the MTT assay. *Biotechniques*. 2007;43(2):178-182. DOI: 10.2144/000112528
- [129] Riss TL, et all. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; Cell Viability Assays. 2004-2013 May 1 [updated 2016 Jul 1].
- [130] Perrin DD, Armarego WFF, Perrin DR (1980). Purification of laboratory Chemicals, Pergamon Press Ltd., Sec., Ed.
- [131] Özdemir İ, Şahin N, Çetinkaya B (2007). Transfer hydrogenation of ketones catalyzed by 1-alkylbenzimidazole ruthenium(II) complexes. *Monatshefte Fur Chemie*, 138(3):205-209.
- [132] Şahin N (2005) . N-Koordine Metal Komplekslerinin Sentezi ve Özellikleri. İnönü Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Malatya.
- [133] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR(1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*, 82(13):1107-1112. DOI: 10.1093/jnci/82.13.1107
- [134] Bjelosevic A, Sakoff J, Gilbert J, Zhang Y, McGhie B, Gordon C, Aldrich-Wright JR (2022). Synthesis, characterisation and biological activity of the ruthenium(II) complexes of the N₄-tetradentate (N₄-TL), 1,6-di(2'-pyridyl)-2,5-dibenzyl-2,5-diazaheptane (picenBz2). *Inorg Biochem*, 2022. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2021.111629
- [135] De S, Selva Kumar R, Gauthaman A, Ashok Kumar SK, Paira P, Moorthy A, Banerjee, S (2021). Luminescent ruthenium(II)-para-

cymene complexes of aryl substituted imidazo-1,10-phenanthroline as anticancer agents and the effect of remote substituents on cytotoxic activities *Inorganica Chimica Acta*, 515:120066.

- [136] Klaimanee E, Nhukeaw T, Saithonga S, Ratanaphan A, Phongpaichit S, Tantirungrotechai Y, Leesaku N (2021). Half-sandwich ruthenium (II)-p-cymene complexes based on organophosphorus ligands: Structure determination, computational investigation, in vitro antiproliferative effect in breast cancer cells and antimicrobial activity. *Polyhedron*. 204:115244.
- [137] Xie L, Wang L, Guan R, Ji L, Chao H (2021). Anti-metastasis and anti-proliferation effect of mitochondria-accumulating ruthenium(II) complexes via redox homeostasis disturbance and energy depletion *Journal of Inorganic Biochemistry*, 217:111380.
- [138] Pragti, Kundu BK, Sonka C, Ganguly R, Mukhopadhyay S (2021). Modulation of catalytic and biomolecular binding properties of ruthenium (II)-arene complexes with the variation of coligands for selective toxicity against cancerous cells *Polyhedron*, 207:115379.
- [139] Haribabu J, Balakrishnan N, Swaminathan S, Peter J, Gayathri D, Echeverria C, Bhuvanesh N, Karvembu R (2021). Synthesis, cytotoxicity and docking studies (with SARS-CoV-2) of water-soluble binuclear Ru-p-cymene complex holding indole thiosemicarbazone ligand. *Inorganic Chemistry Communications*, 134:109029.
- [140] Muley A, Karumban KS, Gupta P, Kumbhakar S, Giri B, Raut R, Misra A, Maji S (2021). Synthesis, structure, spectral, redox properties and anti-cancer activity of Ruthenium(II) Arene complexes with substituted Triazole Ligands. *Journal of Organometallic Chemistry*, 954-955:122074.
- [141] Guimarães IDL, Marszaukowski F, Ribeiro R, de Lazaro SR, de Oliveira KM, Batista AA, CastellerP, Wrobel E, Garcia JR, BoeréRT, Wohnrath K (2020). Synthesis and characterization of η^6 -p-cymene ruthenium(II) complexes containing alkyl- and methoxy-substituted triarylphosphines. *Journal of Organometallic Chemistry*, 931:121599.
- [142] Rana BK, Roymahapatra G, Das HK, Giri S, Cardoso MH, Franco OL, Kiran NK, Santra MK, Bag PP, Bertolasi V, Dinda J (2021). Pyridine and pyrimidine functionalized half-sandwich Ru(II)-N heterocyclic carbene complexes: Synthesis, structures, spectra, electrochemistry and

- biological studies. *Journal of Molecular Structure*, 1231:129822.
- [143] Ismail LA, Alfaifi MY, Elbehairi SEI, Elshaarawy RFM, Gad EM, El-Sayed WN (2021). Hybrid organoruthenium(II) complexes with thiophene- β -diketo-benzazole ligands: Synthesis, optical properties, CT-DNA interactions and anticancer activity. *Journal of Organometallic Chemistry*, 949:121960.