



**T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KATYONİK GRUP İÇEREN SCHIFF BAZI LİGANDI VE CO (II)
METAL KOMPLEKSİNİN KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE
ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Melis KILIÇ

MUĞLA-2023

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KATYONİK GRUP İÇEREN SCHIFF BAZI LİGANDI VE CO (II)
METAL KOMPLEKSİNİN KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE
ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Melis KILIÇ

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Esin SAKALLI ÇETİN**

*Bu tez, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından, 22/145/01/3/4
kod numaralı proje ile desteklenmiştir.*

MUĞLA-2023

TEZ ONAYI

Melis KILIÇ tarafından hazırlanan “Katyonik Grup İçeren Schiff Bazı Ligandı ve Co (II) Metal Kompleksinin Kansere Hücreleri Üzerine Antikanser Etkilerinin Araştırılması” başlıklı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programında, Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı	Doç. Dr. Esin SAKALLI ÇETİN Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	(İmza)
Üye	Prof. Dr. Tuba EDGÜNLÜ Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	(İmza)
Üye	Prof. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU Süleyman Demirel Üniversitesi	(İmza)

Tez savunma tarihi: 14.07.2023

Bu tez Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programında, Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirmektedir.

Prof. Dr. Müesser ÖZCAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan metinleri sahiplerinden yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / MSKÜ Açık Erişim Sisteminde erişime açılabilir.

☐ Tezimle ilgili patent başvurusu yapılacağından veya patent alma süreci devam ettiğinden Enstitü Yönetim Kurulu kararı ile tezimin mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl erişime açılmasının ertelenmesini talep ediyorum.

☒ Tezimde yeni teknik, materyal ve metotlar kullanıldığından ve henüz makaleye dönüşmemiş olduğundan Enstitü Yönetim Kurul kararı ile mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay tezimin erişime açılmasının ertelenmesini talep ediyorum.

14.07.2023

(İmza)

Melis KILIÇ

ETİK BEYAN

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Katyonik Grup İçeren Schiff Bazı Ligandı ve Co (II) Metal Kompleksinin Kansere Hücreleri Üzerine Antikanser Etkilerinin Araştırılması” isimli çalışmada tezin planlanmasından yazımına kadar tüm süreçlerde etik ilkelere bağlı kaldığımı, tezime ilişkin bilgi ve belgeleri akademik ve bilimsel etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezimde kullandığım tüm görsel ve yazılı materyallerin kaynağını gösterdiğimi, yararlandığım eserlerin tümünün kaynaklar bölümünde yer aldığını, tezin Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

14.07.2023

(İmza)

Melis KILIÇ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tez çalışmalarım boyunca manevi desteği, hoşgörüsü ve göstermiş olduğu sabırdan dolayı bana her türlü imkanı sağlayan değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Esin SAKALLI ÇETİN'e,

Lisansüstü eğitimim boyunca bilimsel bilgilerini paylaşan ve yol gösteren, her zaman yardım ve desteklerini hissettiren Ana bilim dalımızın değerli hocaları Sayın Prof. Dr. Tuba EDGÜNLÜ'ye, Sayın Doç. Dr. Turan DEMİRCAN'a, Sayın Araş. Gör. Dr. İbrahim Uğur ÇALIŞ'a ve Sayın Araş. Gör. Dr. Aycan AŞIK'a,

Tez çalışmamda yer alan bileşiklerin sentezini yapan ve kullanım izni veren, çalışmalarım esnasında büyük destek gördüğüm Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Anorganik Kimya Ana Bilim Dalı Sayın Prof. Dr. Ramazan GÜP'e, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Sayın Öğr. Gör. Dr. Cansu TOPKAYA'ya ve katkılarından dolayı Fen Fakültesi Kimya Bölümü Kimya Ana Bilim Dalı Sayın Öğr. Gör. Tolga GÖKTÜRK'e,

Tez çalışmam süresince laboratuvar deneylerine yardımları ve katkılarından dolayı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Burak Ekrem ÇİTİL'e,

Tez çalışmalarına bilgi ve deneyimleriyle katkı sağlayan Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Ana Bilim Dalı Sayın Prof. Dr. Şevki ARSLAN'a,

Her zaman yanımda olan, birlikte çalışmaktan çok mutlu olduğum, beraber yürüdüğümüz bu yolda sevgi ve anlayışlarıyla bana destek olan değerli dostlarım Ayşegül DEMİRTAŞ BİLGİÇ'e, Ebru Nur AKSU'ya ve Çilem ÖZDEMİR'e,

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her anımda yanımda olan, bugünlere gelmem için büyük fedakarlık gösteren, sonsuz sevgileri ve emeklerinden dolayı sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından, 22/145/01/3/4 No'lu Yüksek Lisans Tez Projesi olarak desteklenmiştir. Tez çalışmasına mali desteklerinden dolayı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

KATYONİK GRUP İÇEREN SCHIFF BAZI LİGANDI VE CO (II) METAL KOMPLEKSİNİN KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

En önemli sağlık sorunlarının başında gelen kanser, tedavisi oldukça zor olan komplike bir hastalıktır. Gün geçtikçe artan kanser terapötik rejimlerine rağmen, her yıl milyonlarca kişi kanserden ölmektedir. Kanser tedavisinde yaygın olarak sisplatin gibi kemoterapötik ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaçlar, başlangıçta birçok kanser türüne klinik başarı göstermekte ancak ilerleyen aşamalarda ciddi yan etkilere ve ilaç direncine neden olmaktadır. Bu nedenle metal bazlı yeni ajanların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Metal bazlı terapötikler için yüksek antikanser aktivite ile düşük toksisite arasında denge kurabilecek temel eser elementlerin seçimine odaklanılmaktadır. Son yıllarda antikanser özelliklere sahip Schiff bazı geçiş metali komplekslerinin kanser tedavisinde reaktif ajan olarak kullanılmaları araştırılmaktadır. Bu tez çalışmasında, sentezi ve karakterizasyonu tamamlanmış 2,6-diasetilpiridin bis(4-açilhidrazon) ligandı (H_2L^9) ve bu ligandın yedi koordineli Co (II) kompleksinin farklı insan kanser hücre hatları üzerine antikanser etkileri araştırılmıştır. Bileşiklerin, kanser hücreleri (HT-29, Caco-2, MDA-MB-231, A549, HepG2, LNCaP) ve sağlıklı hücreler (CCD-18Co) üzerindeki sitotoksik etkisi, doza ve zamana bağlı olarak kolorimetrik MTT yöntemi ile değerlendirilmiş ve referans ilaç sisplatin ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler ile bileşiklerin %50 öldüren konsantrasyonları ve sitotoksik seçicilik indeksleri hesaplanmıştır. Bileşiklerin Caco-2 kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini aydınlatmak için Anneksin V-FITC/Propidyum İyodür boyaması ile apoptoz analizi, TMRE floresan boyası ile mitokondriyal membran potansiyelinin analizi ve floresan DCF probu ile reaktif oksijen türlerinin analizi flow sitometrisinde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, antikanser etkileri araştırılan kimyasal bileşiklerin Caco-2 hücreleri üzerine sitotoksik seçiciliğinin sisplatine kıyasla daha yüksek olduğunu, ayrıca hücre içi ROS üretimine ve MMP kaybına yol açarak erken apoptotik hücre yoğunluğunu arttırdığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Antikanser, Sisplatin, Schiff Bazı Ligandları, Metal Kompleksleri

INVESTIGATION OF THE ANTI-CANCER EFFECTS OF SCHIFF BASE LIGAND AND CO (II) METAL COMPLEX CONTAINING CATIONIC GROUP ON CANCER CELLS

ABSTRACT

Cancer, which is one of the most important health problems, is a complicated disease that is very difficult to treat. Despite the increasing number of cancer therapeutic regimens, millions of people die from cancer each year. Chemotherapeutic drugs such as cisplatin are widely used in cancer treatment. These drugs show clinical success in many cancer types at the beginning, but cause serious side effects and drug resistance in the later stages. Therefore, there is a need to develop new metal-based agents. For metal-based therapeutics, the focus is on the selection of essential trace elements that can balance high anticancer activity with low toxicity. In recent years, the use of Schiff base transition metal complexes with anticancer properties as reactive agents in cancer treatment has been investigated. In this thesis, the anticancer effects of 2,6-diacetylpyridine bis(4-acylhydrazone) ligand (H_2L^9) and the seven coordinated Co (II) complex of this ligand on different human cancer cell lines were investigated. The cytotoxic effect of the compounds on cancer cells (HT-29, Caco-2, MDA-MB-231, A549, HepG2, LNCaP) and healthy cells (CCD-18Co) was evaluated with the colorimetric MTT method depending on the dose and time and compared with the reference drug cisplatin. With the obtained data, 50% killing concentrations and cytotoxic selectivity indexes of the compounds were calculated. In order to elucidate the cytotoxic effects of the compounds on Caco-2 cancer cells, apoptosis analysis with Annexin V-FITC/Propidium Iodide staining, analysis of mitochondrial membrane potential with TMRE fluorescent dye, and analysis of reactive oxygen species with fluorescent DCF probe were performed in flow cytometry. The results showed that the cytotoxic selectivity of the chemical compounds, whose anticancer effects were investigated, on Caco-2 cells was higher than cisplatin, and also increased the density of early apoptotic cells by causing intracellular ROS production and MMP loss.

Keywords: Anticancer, Cisplatin, Schiff Base Ligands, Metal Complexes

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	ii
ETİK BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kanser	4
2.1.1. Kanser Oluşumu	5
2.1.2. Kansere Neden Olan Faktörler	6
2.1.3. Kanser Hücrelerinin Özellikleri	7
2.2. Kanser Tedavisi.....	14
2.2.1. Cerrahi Tedavi	14
2.2.2. Radyoterapi	14
2.2.3. Kemoterapi	15
2.2.4. Moleküler Hedefli Tedavi	17
2.2.5. Hormon Tedavisi	18
2.2.6. İmmünoterapi	19
2.2.7. Kök Hücre Tedavisi.....	20
2.2.8. Gen Tedavisi.....	21
2.3. Sisplatin.....	22
2.3.1. Sisplatinin Moleküler Etki Mekanizması	23
2.3.2. Sisplatinin Toksik Yan Etkileri	27
2.3.3. Sisplatin Direnci	28
2.3.4. Sisplatin ve Kombinasyon Tedavisi	34
2.4. Schiff Bazları	34
2.4.1. Schiff Bazlarının Sentezi.....	35
2.4.2. Schiff Bazları ve Koordinasyon Kimyası.....	36
2.4.3. Schiff Bazlarının Metal Kompleksleri	39
2.4.4. Metal Komplekslerinin Antikanser Aktivitesi	41
2.4.5. Kobalt Metalinin Biyolojik Önemi ve Antikanser İlaç Potansiyeli	42

3. YÖNTEM	46
3.1. Araştırma Modeli	46
3.2. Araştırma Evren ve Örneklemi/Araştırma Materyali.....	48
3.3. Veri Toplama Araçları	48
3.3.1. Araştırmada Kullanılan Cihazlar.....	48
3.3.2. Araştırmada Kullanılan Sarf Malzemeler.....	49
3.4. Veri Toplama Süreci	50
3.5. Deneysel Kurgu.....	50
3.5.1. Hücre Kültürü.....	50
3.5.2. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) Sitotoksikite Testi	52
3.5.3. Anneksin V-FITC/Propidyum İyodür (PI) Boyama Yöntemi ile Apoptoz Analizi	53
3.5.4. Mitokondriyal Membran Potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) Tayini.....	54
3.5.6. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Ölçümü	54
3.6. İstatistiksel Analiz.....	55
3.7. Etik Onay	55
3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları	55
4. BULGULAR.....	56
4.1 MTT Testi Bulguları	56
4.1.1. CCD-18Co Hücre Hattı Üzerindeki MTT Testi Bulguları.....	56
4.1.2. Caco-2 Hücre Hattı Üzerindeki MTT Testi Bulguları	57
4.1.3. HT-29 Hücre Hattı Üzerindeki MTT Testi Bulguları	58
4.1.4. MDA-MB-231 Hücre Hattı Üzerindeki MTT Testi Bulguları.....	59
4.1.5. LNCaP Hücre Hattı Üzerindeki MTT Testi Bulguları.....	60
4.1.6. A549 Hücre Hattı Üzerindeki MTT Testi Bulguları	61
4.1.7. HepG2 Hücre Hattı Üzerindeki MTT Testi Bulguları	62
4.2. Anneksin V-FITC/Propidyum İyodür (PI) Yöntemi ile Apoptoz Analizinin Bulguları.....	65
4.3. Mitokondriyal Membran Potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) Analizinin Bulguları	67
4.4. Reaktif Oksijen Türleri Analizinin Bulguları	69
5. TARTIŞMA.....	71
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	82
6.1. Sonuçlar	82
6.2. Öneriler	82
KAYNAKLAR	84
EKLER	114
Ek 1: ETİK KURUL ONAYI	114

Ek 2: KURUM İZİN ONAYI	115
Ek 3: ÖZ GEÇMİŞ.....	116



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

µM: Mikromolar

°C: Santigrat derece

Akt: Protein kinaz B

Apaf-1: Adaptör protein apoptotik proteaz aktive edici faktör 1

ATM: Ataksi telanjiektazi

ATP: Adenozin trifosfat

ATR: ATM ve RAD3 ile ilişkili protein

Bad: Bcl-2 ile ilişkili hücre ölümü agonisti

Bak: Bcl-2 homolog antagonisti

Bax: Bcl-2 ilişkili X proteini

Bcl-2: B-hücreli lenfoma 2

Bcl-xL: B-hücreli lenfoma ekstra büyük

Bid: BH3 etkileşimli domain ölüm agonisti

BRCA1/2: Meme kanseri duyarlılık geni 1/2

Cdk: Siklin bağımlı kinaz

Chk1/Chk2: Kontrol noktası kinaz 1/2

cm²: Santimetre kare

Co: Kobalt

CO₂: Karbondioksit

CTR1/2: Bakır taşıyıcı protein 1/2

Cu: Bakır

DCF: 2',7'-dikloro-floresein

dk: Dakika

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

ECM: Ekstrasellüler matris

EMT: Epitelyal-mezenkimal geçiş

ER: Endoplazmik retikulum

ERCC1: Eksizyon onarımı çapraz tamamlayıcı grup 1
FAS: Tümör nekroz faktör reseptörü süper ailesi üyesi 6
FBS: Fetal Bovin Serum
FDA: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi
FITC: Floresan izotiyosiyanat
GCO: Küresel Kanser Gözlemevi
GSH: Glutasyon
H₂DCFDA: 2',7'-diklorofloresein diasetat
H₂L⁹: 2,6-diasetil piridin bis(4-açilhidrazon) Schiff bazı ligandı
HBSS: Hank's Balanced Salt Solution
HER2: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HIF-1 α : Hipoksi ile indüklenbilir faktör-1 α
HR: Homolog rekombinasyon
HSC: Hematopoietik kök hücre
IARC: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
iPSC: İndüklenmiş pluripotent kök hücre
JNK: c-Jun N-terminal kinaz
MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinaz
Mcl-1: İndüklenmiş miyeloid lösemi hücre farklılaşma proteini
MET: Mezenkimal-epitelyal dönüşüm
mg: Miligram
mL: Mililitre
mM: Milimolar
MMP: Mitokondriyal membran potansiyeli
MMR: Yanlış eşleşme onarımı
MOMP: Mitokondriyal dış zar geçirgenliği
MSC: Mezenkimal kök hücre
MT: Metalloprotein
MTT: 3,4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
N: Nitrojen
NER: Nükleotid eksizyon onarımı
Ni: Nikel
Noxa: Forbol-12-miristat-13-asetat kaynaklı protein 1
O: Oksijen

OCT1/2: Organik katyon taşıyıcılar

PBS: Fosfat tamponlu salin

PDGFR: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü

PI: Propidyum iyodür

PI3K: Fosfatidilinositol 3-kinaz

PKC: Protein kinaz C

pRb: Retinoblastoma proteini

PS: Fosfotidilserin

Pt: Platin

Puma: p53 yukarı regüle edilmiş apoptoz modülatörü

Raf: Hızla hızlandırılmış fibrosarkom

RNA: Ribonükleik asit

ROS: Reaktif oksijen türleri

RPA: Replikasyon proteini A

RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute Medium

S: Kükürt

SRB: Sülförhodamin B

TEM: Transendotelyal göç

TGF β : Transforme edici faktör beta

TMRE: Tetra-metilrodamin etil ester

TNF- α : Tümör nekroz faktörü α

TSL: Translezyon sentezi

U: Ünite

UV: Ultraviyole

v/v: Hacimce yüzde

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

VEGFR: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü

XPA: Kseroderma pigmentosum tamamlayıcı grup A

XPB: Kseroderma pigmentosum tamamlayıcı grup B

XPC: Kseroderma pigmentosum tamamlayıcı grup C

XPD: Kseroderma pigmentosum tamamlayıcı grup D

XPF: Kseroderma pigmentosum tamamlayıcı grup F

XPB: Kseroderma pigmentosum tamamlayıcı grup G

Zn: Çinko

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Her iki cinsiyet ve her yaştan 2020 yılında Türkiye’de görülen kanser türlerinin insidansı (A) ve mortalite (B) oranları.	4
Şekil 2.2 Normal dokudan gelişen benign ve malign tümörler.	5
Şekil 2.3. Kanser hücrelerinin ayırt edici özellikleri.	7
Şekil 2.4. Sisplatinin kimyasal yapısı.	22
Şekil 2.5. Sisplatin analogları karboplatin ve oksaliplatin bileşiklerinin kimyasal yapıları.	23
Şekil 2.6. Hücreye giren sisplatin bileşiğinin aktivasyonu ve moleküler hedefleri.	24
Şekil 2.7. Sisplatinin DNA’daki pürin bazları ile etkileşimi.	25
Şekil 2.8. Schiff bazının genel yapısı.	35
Şekil 2.9. Schiff bazı sentezinin genel gösterimi.	35
Şekil 2.10. Açıl hidrazonun şematik yapısı.	38
Şekil 2.11. Schiff bazı metal kompleksinin sentezi.	39
Şekil 2.12. Sentezlenen bileşikler.	45
Şekil 3.1. Çalışmanın akış diyagramı.	50
Şekil 3.2. MTT sitotoksikite testinin akış şeması.	53
Şekil 4.1. CCD-18Co hücre hattında H_2L^9 , Co (II) kompleksi ve sisplatinin zamana bağlı IC_{50} değerleri (μM).	57
Şekil 4.2. Caco-2 hücre hattında H_2L^9 , Co (II) kompleksi ve sisplatinin zamana bağlı IC_{50} değerleri (μM).	58
Şekil 4.3. HT-29 hücre hattında H_2L^9 , Co (II) kompleksi ve sisplatinin zamana bağlı IC_{50} değerleri (μM).	59
Şekil 4.4. MDA-MB-231 hücre hattında H_2L^9 , Co (II) kompleksi ve sisplatinin zamana bağlı IC_{50} değerleri (μM).	60
Şekil 4.5. LNCaP hücre hattında H_2L^9 , Co (II) kompleksi ve sisplatinin zamana bağlı IC_{50} değerleri (μM).	61
Şekil 4.6. A549 hücre hattında H_2L^9 , Co (II) kompleksi ve sisplatinin zamana bağlı IC_{50} değerleri (μM).	62
Şekil 4.7. HepG2 hücre hattında H_2L^9 , Co (II) kompleksi ve sisplatinin zamana bağlı IC_{50} değerleri (μM).	63
Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlardaki H_2L^9 ligandının 48 saat inkübasyon sonrası Caco-2 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin flow sitometri analizi.	66
Şekil 4.9. H_2L^9 ligandının farklı konsantrasyonlarında apoptotik hücrelerin bar diyagramına göre yüzdeleri (%).	66
Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlardaki Co (II) kompleksinin 48 saat inkübasyon sonrası Caco-2 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin flow sitometri analizi.	67

Şekil 4.11. Co (II) metal kompleksinin farklı konsantrasyonlarında apoptotik hücrelerin bar diyagramına göre yüzdeleri (%).	67
Şekil 4.12. H₂L⁹ ligandının farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş Caco-2 hücrelerinin MMP seviyeleri kaybının yüzdesi.	68
Şekil 4.13. Co (II) metal kompleksinin farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş Caco-2 hücrelerinin MMP seviyeleri kaybının yüzdesi.	69
Şekil 4.14. H₂L⁹ ligandının farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş Caco-2 hücre hattında ROS seviyelerinin negatif kontrole oranı.	70
Şekil 4.15. Co (II) metal kompleksinin farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş Caco-2 hücre hattında ROS seviyelerinin negatif kontrole oranı.	70
Şekil 5.1. Schiff bazı H₂L⁹ ligandının yedi koordineli kobalt (II) metal kompleksinin kanser hücrelerindeki hücre içi ROS ve MMP aracılı apoptozun şematik gösterimi.	81



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Bazı kanser türlerinde sisplatin ve diğer kanser ilaçlarının kombinasyon tedavisine örnekler.....	34
Tablo 4.1. H₂L⁹ ligandının, Co (II) kompleksinin ve sisplatinin tüm hücre hatlarında 24, 48 ve 72 saat için MTT testi sonuçlarından elde edilen IC₅₀ dozları.....	64
Tablo 4.2. H₂L⁹ ligandının, Co (II) kompleksinin ve sisplatinin 48 saat için hesaplanan sitotoksik seçicilik indeksleri (SI) (μM)	65

1. GİRİŞ

Kanser, günümüzde ekonomik olarak gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde en yaygın görülen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır (Rocha vd., 2018). Çok hücreli organizmalarda hücresel fizyolojik süreçlerin bozulması sonucu ortaya çıkan kanser, heterojen bir hastalıktır ve organizmanın farklı bölgelerine agresif bir şekilde yayılabilen, kontrolsüz hücre bölünmesi ve büyümesi ile karakterize edilir (Motofei, 2022). Çeşitli karsinojen faktörlerin (somatik mutasyonlar, iyonlaştırıcı radyasyon, tütün dumanı, kimyasal ve enfeksiyöz ajanlar vb.) neden olduğu genetik ve epigenetik değişiklikler kanser gelişiminde önemli bir rol oynar (Aggarwal vd., 2009; Yahya ve Alqadhi, 2021). Tüm kanser türlerinin ayırt edici ortak özelliği yüksek genomik kararsızlık, kanser hastalarında tedavinin başarılı olmasını büyük ölçüde engellemektedir (Aggarwal vd., 2009; Rocha vd., 2018).

Kanser tedavisinde en çok tercih edilen ve en etkili olduğu bilinen yöntem kemoterapidir. Kemoterapi, kanserin türüne ve evresine bağlı olarak, hızlı çoğalan kanser hücrelerinin büyümesini ve bölünmesini engellemek için çeşitli sitotoksik bileşiklerin veya ilaçların kullanıldığı bir yöntemdir. Farklı etki mekanizmalarına sahip kemoterapötikler, deoksiribonükleik asitin (DNA) kimyasal yapısını bozarak, replikasyonu veya transkripsiyonu baskılayarak, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesi yoluyla DNA'da doğrudan veya dolaylı olarak hasar oluşturarak ve apoptotik mekanizmaları harekete geçirerek kanser hücrelerini yok etmeyi hedeflemektedir. Ancak kemoterapötik ajanlar, kanserli hücrelere spesifik olmadığı için normal hücrelere de zarar vererek ciddi yan etkilere neden olurlar. Bununla birlikte klinikte halihazırda kullanılan çoğu kemoterapötik ilaca karşı kazanılan ilaç direnci ve hastalığın nüksetmesi tedaviyi zorlaştırmaktadır (Anand vd., 2022; Behranvand vd., 2022; Li vd., 2022). Bu nedenle hem ilaç direncinin üstesinden gelmek hem de sağlıklı hücrelerde minimum yan etkilerle kanser hücrelerine karşı yüksek etkinliğe sahip olan yeni antikanser bileşiklerin keşfedilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Hernández-Romero vd., 2021).

Kanser kemoterapisinde yaygın olarak kullanılan platin bazlı inorganik ilaç sisplatinin $[cis-Pt(NH_3)_2Cl_2]$ keşfedilmesinden sonra, metal bazlı komplekslerin

antikanser ilaçlar olarak kullanılması araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Tıbbi inorganik kimya alanındaki gelişmeler, platin bazlı ilaçların toksisitesini ve direnç sorununu ortadan kaldırmak için yüksek özgüllüğe ve daha iyi biyolojik aktiviteye sahip, platin bazlı olmayan, yeni metal bazlı kemoterapötiklerin geliştirilmesine odaklanmıştır (Ahmad vd., 2014; Ronconi ve Sadler, 2007; Zhang ve Lippard, 2003).

Düşük moleküler ağırlıklı geçiş metalleri (bakır, kobalt, çinko, nikel, demir vb.) biyolojik sistemlerde kararlı olmaları ve normal hücrelere karşı düşük toksisite göstermeleri nedeniyle antikanser bileşiklerin geliştirilmesi amacıyla araştırılmaktadır (Pravin ve Raman, 2014; Tyagi vd., 2015). Son yıllarda, Schiff bazı ligandlarından türetilen geçiş metali komplekslerinin DNA ile etkileşimleri aracılığıyla sergiledikleri gelişmiş biyolojik aktiviteler koordinasyon kimyasında büyük ilgi konusu olmuştur (Chang vd., 2016; Maiti vd., 2020). Aktif bir imin grubu içeren Schiff bazları, basit sentezleri, iyi çözünürlükleri ve doğal biyolojik ligandlarla yapısal benzerliklerinden dolayı koordinasyon kimyasında yaygın olarak kullanılan önemli bir ligand sınıfıdır (Basha vd., 2019). Hidrazon Schiff bazı ligandları, çeşitli koordinasyon bölgelerine sahip olmaları ve kanser kemoterapisini de içeren potansiyel biyolojik ve farmasötik aktiviteleri nedeniyle ilgi çekici ligandlar arasına girmişlerdir (Sedaghat vd., 2023). Hidrazonlar, -NH-N=CH- grubu ile karakterize edilen organik bileşiklerdir. Bunlar arasında açıl hidrazonlar, C=O gibi ek bir verici bölgeye sahip olmalarından dolayı çeşitli biyolojik alanlarda potansiyel etkiler gösterir (Angelusiu vd., 2010). Hidrazon türevleri, farmasötik uygulamalar için metal komplekslerinin sentezinde potansiyel başlangıç maddeleri olarak kullanılmaktadır (Kanchanadevi, Fronczek ve Mahalingam, 2021). Özellikle 2,6-diasetilpiridin bis(açilhidrazonları) metal komplekslerinin sentezi için en uygun ligandlardır. Bu ligandların metallerle kompleks oluşturma yetenekleri, esnekliklerine ve yüksek koordinasyon kapasitelerine dayanır (Darmanović vd., 2019). Hidrazonların geçiş metalleri ile kompleks oluşturma, biyolojik aktivitenin birkaç kat artmasına yol açmaktadır ve bu bileşikler antikanser, antiviral, antimikrobiyal ve antioksidan ajan gibi çeşitli uygulama alanı bulmaktadır (Shakdofa vd., 2014). Daha önce yapılan bir çalışmada, hidrazon geçiş metali komplekslerinin [Ni (II), Co (II), Cu (II)] DNA bağlama yetenekleri ve DNA nükleaz aktiviteleri üzerine *in vitro* antikanser özellikler gösterdiği bildirilmiştir (Krishnamoorthy vd., 2017).

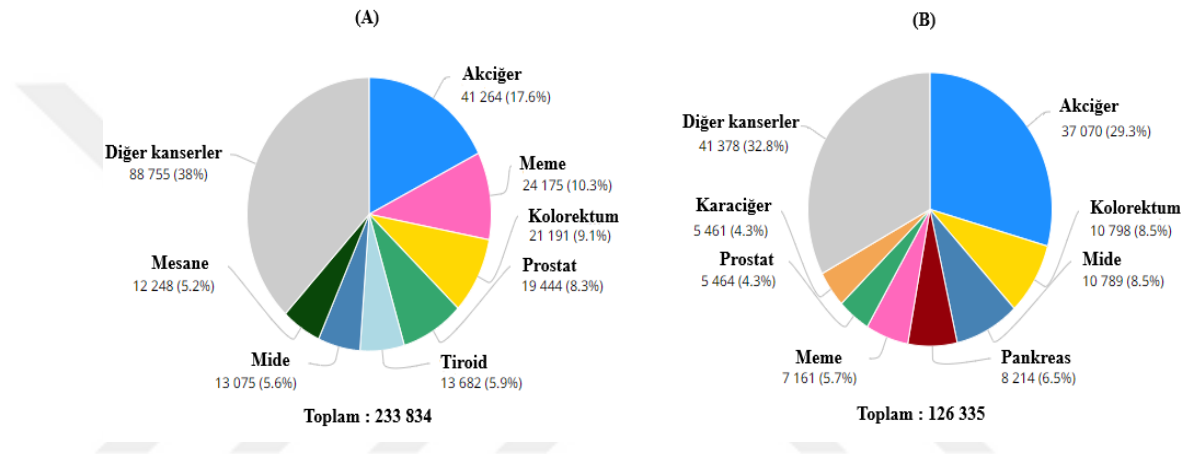
Literatürde daha önce, farklı Schiff bazı ligandları ile oluşturulan kobalt komplekslerinin, DNA ile etkileşime girmesi sonucu potansiyel antikanser ajanlar olarak rol oynadıkları bildirilmiştir (Abdel-Rahman vd., 2016b; Ali vd., 2020; Arunadevi vd., 2019; Manojkumar vd., 2019; Raja, Bhuvanesh ve Natarajan, 2012; Rambabu vd., 2020; Revathi vd., 2017). Bu nedenle, Schiff bazı kobalt komplekslerinin direnç geliştiren ve nükseden kanser türlerinin tedavisi için potansiyel ilaç adayları olarak daha fazla araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, mevcut bilgiler ve ihtiyaçlar doğrultusunda, farklı insan kanser hücreleri üzerine sağlıklı hücreye göre seçici olarak güçlü antikanser aktivite göstermesi hedeflenen 2,6-diasetilpiridin bis(4-açilhidrazon) (H_2L^9) Schiff bazı ligandı ve bu ligandın yedi koordineli Co(II) kompleksinin in vitro sitotoksik etkileri MTT testi ile araştırılmıştır. Ayrıca, bu bileşiklerin sitotoksik etkisi geleneksel kemoterapötik ilaç sisplatin ile karşılaştırılmıştır. Bileşiklerin, sisplatine göre sitotoksik seçiciliğinin kolon kanseri hücre hattı (Caco-2) üzerinde en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, bileşiklerin Caco-2 kanser hücrelerinde sitotoksik etkilerini aydınlatmak için Anneksin V-FITC/PI metodu ile hücre ölüm modu analiz edilmiş, ardından mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) kaybı ve reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesi araştırılmıştır. Daha önce H_2L^9 Schiff bazı ligandı ve bu ligandın yedi koordineli Co(II) kompleksinin farklı kanser hücreleri üzerine antikanser aktivitelerinin araştırılmamış olması çalışmamızı özgün kılmaktadır. Bu çalışma ile kanser tedavisinde mevcut kemoterapötik ilaçların metalle ilişkili toksisitesini azaltmak için insanlarda iyi tolere edildiği bilinen kobalt metalinin, Schiff bazı ligandı ile oluşturulan kompleksin potansiyel kemoterapötik ajan olarak olası kullanımı amaçlanmaktadır. Bu doğrultuda kanser tedavisi için literatüre yeni metal bazlı kemoterapötik ajanların kazandırılmasını hedeflemekteyiz ve bu alana yapacağımız katkının son derece önemli olduğu kanaatindeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, dünya çapında milyonlarca insanın ölümüne yol açan ciddi bir halk sağlığı sorunudur ve ölümle sonuçlanan hastalıklar arasında ikinci sırada yer almaktadır (Hassanpour ve Dehghani, 2017). Hem insidansı hem de mortalite oranı dünya çapında giderek artan kanser her yıl yaklaşık 19-20 milyon kişide teşhis edilmektedir (Chhikara ve Parang, 2023).



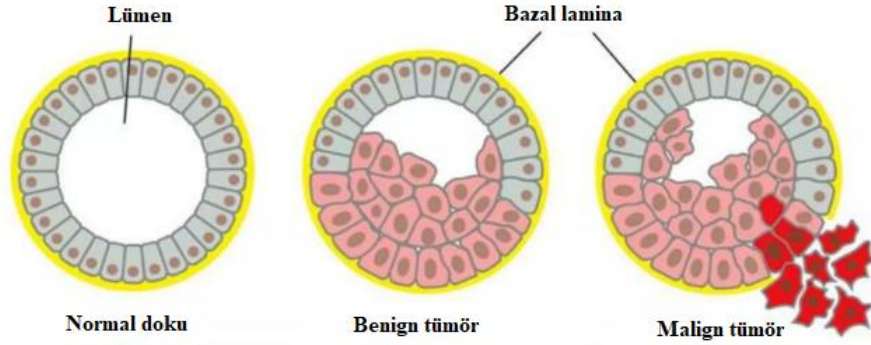
Kaynak: World Health Organization. GLOBOCAN Database, 2020.

Şekil 2.1. Her iki cinsiyet ve her yaştan 2020 yılında Türkiye’de görülen kanser türlerinin insidansı (A) ve mortalite (B) oranları.

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)’nın Küresel Kanser Gözlemevi (GCO) tarafından kaydedilen GLOBOCAN 2020 verileri, küresel düzeydeki kanser yükünün tahminen 19,3 milyon yeni kanser hastası olduğunu ve 10 milyon kişinin ise kanserden öldüğünü göstermektedir. Bu verilere göre dünya çapında en sık teşhis edilen kanser türleri arasında meme, akciğer, kolorektal, prostat, karaciğer ve mide kanserleri yer almaktadır (Sung vd., 2021). Türkiye’de ise akciğer, meme, kolorektal, prostat ve tiroit kanserleri 2020 yılında en sık görülen kanser türleri olmuştur (World Health Organization. GLOBOCAN Database, 2020).

Kanser, çok hücreli organizmalarda hücrelerin hayati fonksiyonlarından sorumlu düzenleyici mekanizmaların bozulması sonucunda gelişen anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ve yayılması (metastaz) ile karakterize edilmektedir (Cooper ve Hausman, 2015). Hücrel organizasyon kontrolünün kaybedilmesiyle sürekli çoğalan

hücreler vücutta tümör adı verilen kitleler oluşturur. Tümörler, benign (iyi huylu) veya malign (kötü huylu) olmak üzere iki şekilde kategorize edilmektedir (Baran, 2018).



Kaynak: Baran, 2018.

Şekil 2.2 Normal dokudan gelişen benign ve malign tümörler.

Benign tümörler, bulundukları dokudan ayrılmazlar ve çevre dokulara yayılmazlar. Malign tümörler ise vücudun diğer doku ve organlarına yayılma kabiliyetine sahiptir. Farklı hücre tiplerinden köken alan tümörler; karsinomlar, sarkomlar ve lösemi veya lenfomalar olarak sınıflandırılır (Baran, 2018). Normal hücrelerin çeşitli nedenlere bağlı olarak malign forma dönüşmesiyle kanserleşme ortaya çıkmaktadır (Cooper ve Hausman, 2015).

2.1.1. Kanser Oluşumu

Kanser oluşumu, hücre fonksiyonlarını etkileyen, genomun dinamik yapısını ve işlevini değiştiren birçok genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesiyle meydana gelen çok aşamalı bir süreçtir (Hanahan ve Weinberg, 2000). Hücre genomunun kanser oluşumunda rol oynadığına dair ilk temeller David von Hanseman ve Theodor Boveri tarafından atılmıştır. Yaptıkları araştırmalarla kanser hücrelerinde birtakım kromozomal anormalliklerin olduğunu gözlemleyerek, kanserlerin kalıtsal materyalde oluşan değişikliklerin bir sonucu olarak ortaya çıktığını ve bu değişikliklerin anormal hücre klonlarına yol açtığını bildirmişlerdir (Stratton, Campbell ve Futreal, 2009). Klonal büyüme, genetik çeşitlilik ve klonal seçim süreçleri kanser gelişiminde etkili faktörlerdir (Greaves ve Maley, 2012). Kanserlin klonal evrim hipotezine öncülük eden Peter Nowell, 1976 yılında çoğu kanserin tek bir progenitör hücreden köken aldığını ve tümörün ilerlemesine neden olan genetik değişikliğin en agresif klonların seçilimine izin verdiğini ileri sürmüştür (Nowell, 1976).

Genlerde birbiri ardına gelen mutasyonların birikmesi sonucu genin işleyişi değişerek kanser oluşumuna neden olur. Bu değişiklikler hücre büyümesini ve doku homeostazını kontrol eden hücre döngüsünü, apoptozu ve hücre farklılaşması ile ilişkili olan biyolojik yolları etkileyerek hücrenin klonal çoğalmasına, çevre dokuları istila etmesine (invazyon) ve metastaz yeteneği kazanmasına yol açar (Corn ve El-Deiry, 2002; Futreal vd., 2001). Kanser hücrelerinin bu ayırt edici özelliklere sahip olmasının en büyük nedeni; kromozomal yeniden düzenlemeler de dahil olmak üzere genomda meydana gelen rastgele mutasyonlar sonucunda oluşan genomik kararsızlıktır (Hanahan ve Weinberg, 2011). Genom boyunca rastgele oluşan mutasyonlar, kanser hücrelerine "mutatör fenotip" özelliği kazandırır. Bu özellik bir tümördeki malign hücrelerin heterojenliğine ve kemoterapiye karşı direnç kazanılmasına katkıda bulunur (Bielas vd., 2006).

Kanser gelişiminde rol oynayan en önemli genetik değişiklikler; onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonudur. Normal durumda proto-onkogenler hücre bölünmesini, büyümesini ve farklılaşmasını kontrol eden proteinleri kodlar. Proto-onkogenlerde meydana gelen kromozomal translokasyon, gen duplikasyonu, insersiyonu, delesyonu ve nokta mutasyonları bu genleri onkogenlere dönüştürür. Mutasyonlar sonucu aktifleşen onkogenlerin aşırı ekspresyonu, kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasını başlatarak kanserin ilerlemesine neden olur. Kanser gelişiminde rol oynayan diğer bir gen ailesi olan tümör baskılayıcı genlerin ürünleri normal şartlarda tümör gelişiminin ve agresif hücre çoğalmasının engellenmesinden sorumludur. Ancak bu genler mutasyona uğradıklarında, hücre çoğalması üzerindeki negatif regülasyonunu kaybederek tümör gelişimini teşvik ederler (Cooper ve Hausman, 2015; Imran vd., 2017).

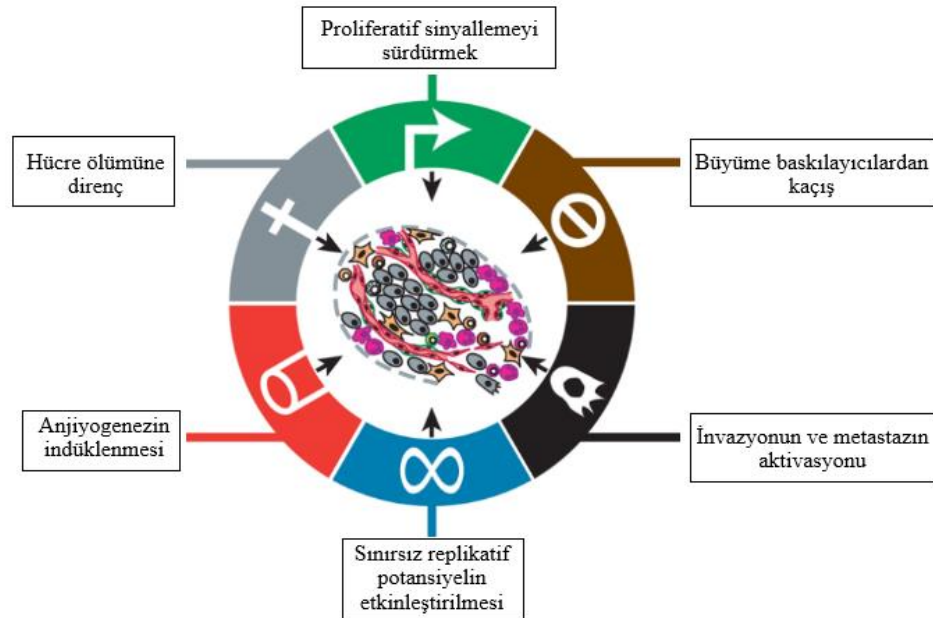
2.1.2. Kansere Neden Olan Faktörler

Kanser hücrelerinde mutasyonların oluşması çeşitli eksojen ve endojen kaynaklı faktörlere bağlıdır. İyonlaştırıcı radyasyon, ultraviyole (UV) ışınları ve birçok kimyasal karsinojenler gibi eksojen faktörler hücrelerde DNA hasarını ve mutasyonları indükleyici etkiler gösterirler. DNA hasarını indükleyen başka bir etmen ise endojen faktörlerdir. Replikasyon sırasında meydana gelen hatalar ya da metabolizma sırasında oluşan reaktif oksijen türleri endojen faktörlere örnek verilebilir. Normal hücreler DNA'da meydana gelen hasarı onarmak için DNA tamir mekanizmalarına sahiptir. Ancak kanser

hücrelerinde bu mekanizmalarda çeşitli nedenlerden dolayı hatalar meydana gelir ve kansere yol açan mutasyonların oluşması önlenemez (Bertram, 2000). Kansere neden olan bu faktörlere ek olarak enfeksiyöz ajanlar da karsinogenez faktörlerinden biridir. Başlıca kanserojen enfeksiyöz ajanlar; *Helicobacter pylori* bakterisi, insan papilloma virüsleri (HPV'ler), hepatit B ve C virüsleri, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ve Epstein-Barr virüsüdür (Parkin, 2006).

2.1.3. Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Hücre kültürü ortamında çoğaltılan normal hücreler hücre-hücre etkileşimine bağlı olarak belirli bir yoğunluğa ulaştıklarında büyümeyi ve çoğalmayı sürdürülemez. Bu, normal hücrelerin yoğunluğa bağlı kontakt inhibisyonundan etkilendiğini gösterir. Fakat kanser hücreleri yakınındaki hücrelerle temas kurmasına rağmen çoğalmaya devam ederek düzensiz hücre tabakaları oluştururlar (Cooper ve Hausman, 2015). Kanser hücreleri normal hücrelerden farklı olarak hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini sağlayan adhezyon moleküllerini daha az ifade ederler. Bu durum kanser hücrelerinin sürekli çoğalmasına ve büyümesine yol açarak aynı zamanda invazyon ve metastaz yeteneğinin gelişmesine de neden olur. Ayrıca kanser hücreleri, adherent özelliğinin az olmasından dolayı morfolojik olarak normal hücrelere göre daha yuvarlak yapıdadır (Baran, 2018).



Kaynak: Hanahan ve Weinberg, 2011'den Türkçeleştirilmiştir.

Şekil 2.3. Kanser hücrelerinin ayırt edici özellikleri.

Proliferatif sinyallemei sürdürmek

Birçok moleküler değışikliğı sahip olan kanser hücreleri sağlıklı hücrelere göre farklı özellikler sergilemektedir. Bu özelliklerin başında kanser hücrelerinin mitojenik büyüme sinyallerini sürekli olarak sürdürebilmesi yer almaktadır. Normal koşullarda mitojenik büyüme sinyalleri hücrelere bazı büyüme faktörlerinin hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanmasıyla ve hücre içinde bir dizi sinyal kaskadının aktifleşmesiyle iletilmektedir. Bu sinyallerin eksikliğinde normal bir hücre çoğalmayı sürdüremez ve hücre döngüsünün dinlenme evresi olarak bilinen G0 evresine geçer (Hanahan ve Weinberg, 2000; Ho ve Dowdy, 2002). Çoğu kanser hücresi büyüme faktörlerini kendileri sentezleyerek sürekli çoğalmayı uyarır ve bu durum kanser hücrelerinin çoğalmak için diğer hücrelerden salınan büyüme faktörlerine ihtiyaç duymadığını gösterir. Diğer yandan kanser hücrelerinin büyüme faktörlerine bağımlı olmaksızın mitojenik büyüme sinyallerini sürdürebilmesi, bu hücrelerin büyüme faktörü reseptör proteinlerini yüksek seviyelerde eksprese etmesine, reseptörlerde meydana gelen yapısal değışikliklere veya reseptörlerle ilişkili sinyal yollarında rol alan proteinlerin aktivasyonuna yönelik değışikliklere bağılı olabilir. Ayrıca kanser hücreleri bağışıklık hücreleri dahil olmak üzere farklı tipteki hücrelerle bir arada bulunur. Bu hücreler arasındaki sinyalizasyon hem kanser hücrelerinin çoğalmasına hem de normal hücrelerin kanserleşmesine neden olabilir (Hanahan ve Weinberg, 2000).

Büyüme baskılayıcılardan kaçış

Kanser hücreleri, sürekli büyümeyi ve bölünmeyi sağlayan sinyalleri sürdürebilmenin yanı sıra büyümeyi baskılayan sinyallerden de kaçınırlar. Anti-proliferatif sinyaller, hücre döngüsünün erken G1 fazından geç G1 fazına geçişte yer alan restriksiyon kontrol noktasının düzenleyicisi retinoblastoma proteini (pRb) tarafından yönlendirilir. Tümör baskılayıcı protein olarak bilinen pRb, hücre döngüsünün ilerlemesine aracılık eden bazı genlerin transkripsiyonundan sorumlu E2F transkripsiyon faktörlerine bağlanarak hücre proliferasyonunun baskılanmasını sağlar. pRb'nin E2F'lerle etkileşimi, siklin ve sikline bağımlı kinazlar (Cdk) tarafından düzenlenir. Hücre büyüme faktörleri ile uyarıldığında siklin-Cdk kompleksleri, pRb'yi fosforilleyerek E2F'lere bağlanmasını engeller ve hücre döngüsünün restriksiyon noktasından geçişini katalize eder. Onkogen olarak hareket eden siklin-Cdk komplekslerinin aktivitesi ise INK4 inhibitör ailesinin üyelerinden biri olan p16 proteini tarafından engellenir. Kanser hücrelerinde fonksiyonel pRb'nin kaybı ya da p16'da meydana gelen mutasyonlar hücre

döngüsünün ilerlemesine izin vererek hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına yol açar (Hanahan ve Weinberg, 2011; Harbour vd., 1999; Ho ve Dowdy, 2002). Hücre büyümesini baskılayan bir diğer tümör baskılayıcı protein ise p53'tür. Normalde p53, genomda bir hasar oluştuğunda veya diğer hücresel stres koşullarında hücre döngüsünün ilerlemesini baskılayan genlerin transkripsiyonunu indükleyerek hücre döngüsünü durdurabilir. Eğer hasar onarılamazsa pro-apoptotik genlerin transkripsiyonunu indükleyerek hücreyi apoptoza teşvik eder. Hücrelerde p53 geninde meydana gelen mutasyonlar ve kromozomal delesyonlar işlevsel p53 kaybına neden olur. Bu durum da genomik hasar varlığında hücre döngüsü ilerlemeye devam ederek genetik kararsızlığın oluşmasına, hücrenin kontrolsüz çoğalmasına ve sağ kalımına yol açar. Birçok kanser türünde p53'ün yüksek oranda mutasyona uğradığı bilinmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2011; Tokino ve Nakamura, 2000).

Hücre ölümüne direnç

“Programlanmış hücre ölümü” olarak adlandırılan apoptoz, gelişim sürecinde dokuların şekil almasında ya da hücresel stres altında homeostatik dengenin korunması için zarar gören hücrelerin yok edilmesinde görev alan hücre ölümü mekanizmasıdır (Baran, 2018). Bu mekanizma hem dışsal hem de içsel yollarla tetiklenebilir. Ölüm reseptörü yolu olarak da bilinen dışsal apoptotik yol, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (tümör nekroz faktörü reseptör süper ailesi) ekstrasellüler ligandların bağlanması sonucunda ölüm yol açan sinyal kompleksinin (DISC) oluşmasıyla başlatılır. İçsel apoptotik yol ise mitokondriyal yol olarak bilinir ve hücre içinden gelen sinyallerle uyarılarak mitokondriyal dış zar geçirgenliğinin (MOMP) bozulmasıyla aktifleşir (Fernald ve Kurokawa, 2013; Kroemer, Galluzzi ve Brenner, 2007). Apoptoz, B-hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) ailesinin üyeleri ve bir sistein proteaz ailesi olan kaspazlar tarafından düzenlenir. Kaspazlar, sinyale yanıt olarak etkinleştirilen “başlatıcı kaspazlar” (kaspaz-2, 8, 9, 10) ve apoptotik işlemleri sonlandırıcı “efektör kaspazlar” (kaspaz-3, 6, 7) olmak üzere iki sınıf halinde apoptotik yolda rol oynarlar (Celepli vd., 2020). Dışsal apoptotik yolda hücre ölüm sinyali, başlatıcı kaspaz-8'in reseptör aracılı aktifleşmesiyle iletilir. Aktive edilmiş kaspaz-8 daha sonra efektör kaspazları proteolitik olarak aktive ederek apoptozu indükler (Lowe ve Lin, 2000). Diğer bir protein ailesi Bcl-2'nin üyeleri, apoptozu uyaran pro-apoptotik (Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, Bcl-Xs, Puma ve Noxa) ve apoptozu baskılayan anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1) proteinleri içerir. Bu proteinler özellikle içsel apoptotik yolda önemli roller oynamaktadır (Celepli vd., 2020).

Hücre içinde genotoksik ya da sitotoksik stres varlığında pro-apoptotik proteinler Bcl-2 ilişkili protein X (Bax) ve Bcl-2 antagonist katili 1 (Bak) mitokondriyal dış zarda birikerek gözenekler oluştururlar. Bu gözeneklerden sitoplazmaya sitokrom c molekülü salınır. Sitokrom c, sitoplazmada adaptör protein apoptotik proteaz aktive edici faktör 1'e (Apaf-1) bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eden apoptozom kompleksinin oluşmasını sağlar. Başlatıcı kaspaz-9, apoptozom kompleksi içinde aktive olduktan sonra efektör kaspazların aktivasyonunu gerçekleştirerek apoptozu indükler (Fernald ve Kurokawa, 2013). Ayrıca dışsal apoptotik yolda yer alan kaspaz-8, mitokondriyal membran geçirgenliğini destekleyen BH3-etkileşimli ölüm agonisti (Bid) proteinini proteolitik olarak aktive ederek dışsal apoptotik yolu mitokondriyal yola bağlayabilir (Kroemer, Galluzzi ve Brenner, 2007).

Daha önce de bahsedildiği gibi DNA hasarı oluştuğunda tümör baskılayıcı protein p53, Bcl-2 protein ailesinin pro-apoptotik üyeleri Noxa ve Puma proteinlerinin transkripsiyonel aktivasyonlarını sağlayarak apoptozu uyarır. Kanser hücreleri farklı stratejiler geliştirerek apoptotik sinyalleri baskılayabilirler (Fernald ve Kurokawa, 2013; Hanahan ve Weinberg, 2011). Örneğin, mutasyona uğrayan p53'ün fonksiyonel kaybı, malign forma dönüşebilecek hücrelerin ortadan kaldırılmasını engelleyen apoptozu devre dışı bırakır (Bertram, 2000). Bunun haricinde kanser hücreleri pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu, hücre yüzeyi ölüm reseptörlerinin ve ligandlarının ekspresyonunu azaltarak ya da anti-apoptotik proteinleri aşırı eksprese ederek ve apoptoz indükleyici bir sinyal iletmeyen tuzak reseptörlerini eksprese ederek apoptozdan kurtulabilirler. Ayrıca kanser hücreleri, insülin benzeri büyüme faktörü 1/2 (Igf1/2) gibi hücre sağ kalımı ile ilişkili faktörlerin ekspresyonunu indükleyerek veya fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (AKT) gibi hücre hayatta kalma sinyalinin hiperaktivasyonunu sağlayarak da apoptozu karşı direnç mekanizmaları oluşturabilirler (Fernald ve Kurokawa, 2013; Hanahan ve Weinberg, 2011; Lowe ve Lin, 2000).

Replikatif ölümsüzlüğü etkinleştirme

2000 yılında yapılan bir çalışma, kültürlenmiş normal insan hücrelerinin replikasyon yeteneğinin sınırlı olduğunu göstermiştir. Bu sınırlama, kromozom uçlarında bulunan ve onları koruyan tekrarlı telomer dizilerinin her replikasyon döngüsü sonrasında kısalmasından kaynaklanmaktadır. Çoğalan normal hücreler telomerlerin kısalması

sonucunda bölünmeyi durdurarak replikatif yaşlanma adı verilen bir sürece girer. Kanser hücreleri ise, normal somatik hücrelerin çoğunda sentezlenmeyen, telomeraz enzimini aşırı eksprese ederek replikasyon sonrası telomer uzunluğunu koruyabilir. Bu sayede sınırsız replikasyon yeteneği gösteren kanser hücreleri hem replikatif yaşlanmadan hem de hücre ölümünden kaçınarak ölümsüzlük kazanırlar (Bertram, 2000; Hanahan ve Weinberg, 2011; Hayflick, 2000).

İnvazyon, anjiyogenez ve metastazın aktivasyonu

Epitel kökenli kanser hücreleri, gen ekspresyon profillerini ve fenotipik özelliklerini değiştirerek invaziv ve metastatik yetenek kazanırlar. İnvazyon ve metastaz süreci birçok aşamadan oluşan farklı moleküler mekanizmaları içerir. Kansere bağlı ölümlerin birçoğu metastazdan kaynaklanmaktadır. Metastaz, kanser hücrelerinin ilk çoğalmaya başladığı birincil tümörden ayrılarak uzak dokulara veya organlara yayılması olarak tanımlanır (Leber ve Efferth, 2009; Wittekind ve Neid, 2005). Karsinom hücreler, birincil tümörlerden hücre polaritesinin kaybolduğu epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) adı verilen bir mekanizma ile ayrılırlar. EMT, epitel kökenli hücrelerin iç şeklindeki mezenkimal fenotipe dönüşerek hücrelerin migrasyon (göç) özelliği kazanmasıdır. Hücre-hücre bağlantılarının kaybı üzerine aktifleşen EMT süreci, hücre iskeletinin yeniden şekillenmesini, EMT'yi düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin (Snail, Slug, Twist ve Zeb1/2) ekspresyonunu, hücre yüzeyi proteinlerinin ekspresyonlarının değişmesini ve ekstrasellüler matriksi (ECM) degrade eden enzimlerin üretilmesini içerir. Hücre adezyon moleküllerinden özellikle epitelyal kadherin (E-kadherin) ekspresyonunun kaybı ile karakterize edilen EMT gelişiminde nöral kadherin (N-kadherin) ve matriks metaloproteinazların ekspresyonları artar (Dongre ve Weinberg, 2019; Wittekind ve Neid, 2005). Karsinoma hücreleri, ECM bileşenlerini matriks metaloproteinazlar aracılığıyla parçalayarak çevrelerindeki stromayı istila ederler ve böylece komşu dokulara invazyon gerçekleşir. Tümör çevresinde fibroblastlar, endotel hücreleri, mezenkimal kök hücreler ve bağışıklık hücreleri gibi farklı tipte stromal hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler ile karsinom hücreler arasındaki heterotipik etkileşimler tümörün gelişmesini destekler (Valastyan ve Weinberg, 2011).

Tümörler daha fazla büyümek için besin ve oksijen ihtiyacını karşılayabildikleri yeni kan damarlarının oluşmasını uyarır. Mevcut damarlardan yeni kan damarlarının oluşmasına “anjiyogenez” denir. Anjiyogenez, pro-anjiyojenik ve anti-anjiyojenik

faktörler arasındaki denge tarafından düzenlenir. Tümör hücreleri ve tümörle ilişkili stroma hücreleri; vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), tümör nekroz faktörü α (TNF- α), interleukin-8 ve anjiyogenin gibi anjiyogenezi uyaran pro-anjiyojenik faktörler üretirler. Bu faktörler arasından özellikle yeni damarların oluşumunda önemli rol oynayan VEGF, vasküler endotelial hücrelerin çoğalmasını sağlar. Endotelial hücreler çoğalmaları için uyarıldıktan sonra matriks metaloproteinazları salgılayarak bazal membranı parçalar ve tümör kütlelerine göç ederler. Burada yeni olgunlaşmamış damarlar oluştururlar. Yeni oluşan kan damarları, Anjiyotensin-1,2 ve reseptörleri Tie-2 tarafından stabilize edilir. Anjiyogenez genellikle hipoksi tarafından indüklenir. Hipoksik koşullar altında HIF-1 α 'nın aktivasyonu, VEGF ekspresyonunu uyarak anjiyojenik süreci tetiklemektedir (Farahani vd., 2014; Tonini, Rossi ve Claudio, 2003).

Büyüyen tümör hücreleri, metastatik yayılım için lenf veya kan damarlarının lümenine girerek dolaşım sistemine geçerler. Tümör hücrelerinin damar duvarlarının yapısını oluşturan perisit ve endotel hücre bariyerini aşarak damar içine girmesi “intravazasyon” olarak adlandırılır. Tümör mikroçevresindeki hücreler (makrofajlar, fibroblastlar, nötrofiller, trombositler), proteazlar veya bazı sinyal molekülleri (transforme edici faktör beta (TGF β)) gibi birçok faktör intravazasyona aracılık edebilir. Özellikle tümörle ilişkili makrofajlar (TAM) ve tümör hücreleri arasındaki epidermal büyüme faktörü/koloni uyarıcı faktör 1 (EGF/CSF1) etkileşiminin tümör hücrelerinin kan damarlarına girmesinde önemli bir faktör olduğu ortaya konulmuştur (Chiang, Cabrera ve Segall, 2016; Geiger ve Peeper, 2009; Valastyan ve Weinberg, 2011).

Dolaşımdaki tümör hücreleri, fiziksel hemodinamik kuvvetler, bağışıklık hücrelerinin saldırısı ve integrin aracılı ECM bağlantısının kaybı üzerine indüklenen anoikis hücre ölümü gibi birçok stres koşullarıyla karşılaşabilirler. Karsinom hücreleri, fiziksel stresten ve bağışıklık tepkisinden korunmak için trombin, katepsin B, matriks metaloproteinaz-2/-14, doku faktörü veya lökosit (L-) ve trombosit (P-) selektinler gibi moleküller salgılar. Bu moleküller, tümör hücrelerinin etrafında trombositlerin kalkan görevi görmesini ve böylece tümör hücrelerinin uzak doku bölgelerine tutuklanana kadar dolaşımda hayatta kalmalarını sağlar (Lambert, Pattabiraman ve Weinberg, 2017; Pachmayr, Treese ve Stein, 2017; Valastyan ve Weinberg, 2011). Bununla birlikte EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörleri Twist ve Snail'in, nörotrofik reseptör tirozin ile ilişkili kinaz B'nin (TrkB) aktivasyonları veya tümör hücrelerinin integrin reseptörlerinde

yaptığı değişiklikler, anoikis hücre ölümünün baskılanmasını sağlayarak tümör hücrelerinin dolaşımda sağ kalımını destekler (Geiger ve Peeper, 2009).

Dolaşımdaki tümör hücreleri, belirli organlara metastaz yapma eğilimi gösterirler. Doku tropizmi olarak adlandırılan bu durum, tümör hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen reseptörler ile hedef bölgelerde eksprese edilen aynı kökenli ligandların etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır. Örneğin; meme kanseri hücrelerinde kemokin reseptörü 4 (CXCR4) ekspresyonu, kanser hücrelerinin bu reseptörün CXC motifli kemokin ligandı 12'nin (CXCL12) bol bulunduğu organlara (akciğer, karaciğer, kemik iliği, beyin) metastaz yapmasını sağlar (Gupta ve Massagué, 2006; Pachmayr, Treese ve Stein, 2017).

Ekstravazasyon sonrası hedef dokuya ulaşan tümör hücrelerinin yeni çevreye uyum sağlamak için pre-metastatik niş oluşturdıkları bilinmektedir. Pre-metastatik niş, birincil tümörlerin metastatik bölgelerde hayatta kalması için gerekli olan mikro ortamın hazırlanmasını içerir. Birincil tümörler tarafından salgılanan moleküller, pre-metastatik bölgelere hareket eden kemik iliği kaynaklı hücreler ve hedef doku parankiminde bulunan stromal hücreler pre-metastatik niş oluşumunda önemli roller oynamaktadır (Liu ve Cao, 2016; Psaila ve Lyden, 2009). Birincil tümör tipine bağlı olarak farklı organlarda pre-metastatik niş oluşabilir. Ekstravaze tümör hücreleri mikrometastazlar oluşturduktan sonra yıllarca uyku halinde kalabilir veya çoğalarak makrometastazlar oluşturabilirler. Makrometastaz oluşumunda, ECM yeniden yapılandırılır ve EMT süreci tersine çevrilerek mezenkimal-epitelyal dönüşüm (MET) gerçekleşir (Geiger ve Peeper, 2009; Pachmayr, Treese ve Stein, 2017; Sökeland ve Schumacher, 2019).

Enerji metabolizmasının yeniden programlanması

Kanser hücrelerinde görülen anormal metabolizma da kanser gelişiminde ve metastazında önemli bir etkidir. Kanser hücreleri çoğalmak, hayatta kalmak ve çeşitli stres koşullarına uyum sağlamak için hücresel metabolizmayı yeniden düzenlerler. Sürekli büyüyüp çoğalan kanser hücreleri, normal hücrelere göre daha fazla enerjiye ihtiyaç duyar. Normal hücreler enerji üretmek için oksidatif fosforilasyon mekanizmasını kullanırken, kanser hücreleri aerobik glikoliz mekanizmasını tercih eder. “Warburg etkisi” olarak bilinen bu durum da oksijen varlığında bile artan glikoz tüketimi fazla miktarda laktat üretilmesine neden olur. Aerobik glikoliz yoluyla laktat üretimi daha hızlı

bir şekilde enerji sentezine yol açmaktadır. Bu nedenle, kanser hücreleri glikoz metabolizmasını değiştirerek hücre büyümesini ve çoğalmasını hızlandırabilir (Hanahan ve Weinberg, 2011; JH Park, Pyun ve HW Park, 2020; Liberti ve Locasale, 2016).

2.2. Kanser Tedavisi

Kanser, tümör içi heterojenliği gibi çeşitli patolojik özelliklere sahip olduğundan dolayı tedavisi zor olan bir hastalıktır. Kanser türüne, şiddetine ve ne kadar yayıldığına bağlı olarak çeşitli tedavi stratejileri uygulanmaktadır. Çoğunlukla kullanılan konvansiyonel tedavi yöntemleri; cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Bu tedavilere ek olarak kök hücre tedavisi, hormon tedavisi, moleküler hedefli tedavi, gen tedavisi ve immünoterapi gibi tedavi yaklaşımları da bulunmaktadır (Debela vd., 2021).

2.2.1. Cerrahi Tedavi

Cerrahi yöntem, kanserin erken evresinde tümör dokusunun vücuttan ameliyatla çıkarılması işlemidir (Debela vd., 2021; Mitra vd., 2015). Bu yöntem, lokal ve metastaz yapmamış kanserlerde birincil tedavi olarak tercih edilir (Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde, 2015). Tümör dokusu çıkarılırken diğer dokulara zarar vermemek için tümörlü dokunun bir kısmı cerrahi yöntemle çıkarılıp sonrasında kemoterapi ya da radyoterapi yöntemleri kullanılarak tümörün küçültülmesi sağlanabilir (Baykara, 2016).

2.2.2. Radyoterapi

Radyoterapi, iyonlaştırıcı radyasyonun kullanılmasıyla kanser hücrelerini yok etmeyi amaçlayan bir tedavi yöntemidir. Yüksek enerjili radyasyon, DNA'ya etki ederek hücrelerin bölünüp çoğalmasını engeller. Radyoterapi, lokalize tümörler için etkili bir tedavi yöntemidir ancak çevre dokudaki normal hücreler de zarar görebilir. Normal hücreler radyasyondan kaynaklanan hasarı kanser hücrelerine kıyasla daha hızlı onarabilir. Radyoterapinin asıl amacı, kanser hücrelerine uygulanan radyasyon dozunu artırarak normal hücrelerin radyasyondan etkilenmesini azaltmaktır. Bunun için stereotaktik radyoterapi (SBRT), yoğunluk aracılı radyoterapi (IMRT) ve görüntü kılavuzluğunda radyoterapi (IGRT) gibi önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Baş ve boyun karsinomları, serviks karsinomları, prostat karsinomları ve meme karsinomları gibi çeşitli kanser türlerinin tedavisinde radyoterapi yöntemi kullanılmaktadır (Baskar vd., 2012; Chen ve Kuo, 2017).

2.2.3. Kemoterapi

Kemoterapi, kanser hücrelerini öldürmek veya çoğalmalarını engellemek için kimyasal kemoterapötik ilaçların kullanılmasını içerir (Zhong vd., 2021). Kanser türüne ve hassasiyetine bağlı olarak farklı kemoterapötik ilaçlar uygulanabilir. Çoğu kemoterapi ilacının ortak hedefi DNA'ya zarar vermek veya hücre bölünmesini engelleyerek hücre ölümüne neden olmaktır. Kemoterapötik ilaçlar etki mekanizmalarına göre alkilleyici ajanlar, anti-metabolitler, topoizomeraz inhibitörleri, mitotik iğ inhibitörleri ve anti-tümör antibiyotikler gibi çeşitli gruplara ayrılırlar. Bu ilaçlar hücre bölünmesi ile ilgili süreçlere müdahale ederek terapötik etkilerini gösterirler (Bhosle ve Hall, 2006; Bukowski, Kciuk ve Kontek, 2020; Jones, 2016; Kashifa Fathima vd., 2022).

Alkilleyici ajanlar, DNA çapraz bağlanmasını, yanlış baz eşleşmesini veya DNA zincirlerinin kırılmasını sağlayarak hücre replikasyonunu ve çoğalmasını baskırlar. Nitrojen hardalları (*Chlorambusil*, *Melfalan*), etilen aminler (*Thiotepa*), platin bazlı ajanlar (*Sisplatin*, *Karboplatin*), alkil sülfonatlar (*Busulfan*), triazinler (*Temozolomid*) ve nitrozüreler (*Streptozosin*) alkilleyici ajanlara örnektir.

Anti-metabolitler, hücre için gerekli olan normal moleküllere benzerlik gösteren bileşiklerdir. Bu benzerlik sayesinde DNA veya ribonükleik asit (RNA) yapıtaşlarının yerini alarak DNA/RNA sentezini bozabilirler veya dihidrofolat redüktaz gibi bazı enzimleri baskılayabilirler. Böylelikle hücre döngüsünün sentez (S) fazında hücrenin çoğalmasını engelleyerek apoptoza yol açarlar. *Metotreksat* gibi antifolatlar, *5-fluorourasil (5-FU)* gibi pirimidin analogları ve *Kladribin* gibi pürin analogları anti-metabolitlere örnek verilebilir.

Topoizomeraz inhibitörleri, DNA'nın replikasyonunda, transkripsiyonunda ve onarımında rol oynayan topoizomeraz enzimlerinin normal aktivitelerini engelleyerek DNA'da kalıcı zincir kırılmalarına neden olur ve bu durum hücre ölümüyle sonuçlanır. *İrinotekan* ve *Topotekan* topoizomeraz I'yi inhibe ederken, *Teniposid* ve *Etoposid* topoizomeraz II'yi inhibe eder.

Mitotik iğ inhibitörleri, mikrotübüllerin oluşmasını engelleyerek mitotik fazdaki hücrelerin bölünmesini durdururlar. Taksanlar (*Paklitaksel*, *Dosetaksel*) ve vinka alkaloidleri (*Vinblastin*) mitotik iğ inhibitörleri grubunda yer almaktadır.

Anti-tümör antibiyotikler, kanser hücrelerinde DNA'ya bağlanarak replikasyonu ve transkripsiyonu baskılar. Böylece kanserli hücrelerin büyümelerini ve çoğalmalarını önlerler. Antrasiklinler (*Doksorubisin*, *Epirubisin*) ve *Bleomisin* anti-tümör antibiyotiklerine örnek verilebilir (Bhosle ve Hall, 2006; Bukowski, Kciuk ve Kontek, 2020; Kashifa Fathima vd., 2022; Nygren, 2001).

Kemoterapi, hasta ve tümör özelliklerine göre palyatif, adjuvan veya neoadjuvan terapilerde kullanılabilir. İlerlemiş metastatik hastalığı teşhis edilen kişilerde kemoterapi kanseri tamamen yok edemez. Bu nedenle palyatif amaçlı kemoterapi kullanılır. Palyatif kemoterapi, kanser türüne bağlı olarak gelişen semptomların hafifletilmesini ve yaşam kalitesini iyileştirerek genel sağ kalımı artırmayı amaçlar. Meme, kolorektal, prostat, akciğer ve baş ve boyun kanser türlerinin tedavisi için palyatif kemoterapi kullanılmaktadır. Adjuvan tedavi, cerrahi veya radyoterapi tedavileri ile belirlenemeyen gizli mikrometastazları ortadan kaldırmak için ilk tedaviye ek olarak kemoterapinin kullanılmasını içerir. Genellikle meme, kolorektal ve akciğer kanseri tedavisinde adjuvan kemoterapi uygulanmaktadır. Neoadjuvan tedavide ise kemoterapi, cerrahi veya radyoterapiden önce uygulanır. Bu şekilde kemoterapi ile birincil tedaviden önce tümör boyutu küçültülebilir ve görülmeyen mikrometastazlar yok edilebilir. Meme kanserinde ve osteosarkomların tedavisinde sıklıkla kullanılır (Bhosle ve Hall, 2006; Jones, 2016).

Kemoterapi genellikle metastatik özellikteki kanserlerin tedavisinde kullanılan bir yöntem olup tümör boyutunun azalması tedaviye verilen en iyi yanıttır. Ancak kemoterapide kullanılan sitotoksik ilaçlar, aktif olarak çoğalan hücrelere seçicilik sağladığından kanserli hücrelerin yanı sıra hızlı çoğalan normal hücreleri de etkileyerek ciddi yan etkilere neden olur. Bu durum, tedavinin etkinliğini sınırlandırmaktadır. Kemoterapi yöntemi, normal hücrelerde oluşabilecek toksisiteyi belli bir seviyeye kadar kabul ederken maksimum düzeyde kanser hücresini öldürmeyi amaçlar. Bu doğrultuda uygulanacak ilacın dozu, normal hücrelerde oluşacak hasar göz önünde bulundurularak belirlenmelidir (Corrie, 2007).

Kemoterapi yönteminin başarısını sınırlandıran diğer bir faktör ise kanser hücrelerinin kemoterapi sırasında sitotoksik ilaçlara karşı geliştirdiği çoklu ilaç direncidir. İlaç direncinin nedenleri arasında DNA onarım yeteneğinin artması, ilaç akışının artması, ilaç metabolizmasının artması, genetik faktörler ve büyüme faktörlerinin etkisi yer almaktadır. Bu mekanizmalar, kullanılan sitotoksik ilaçların etkisini azaltarak kanser tedavisini zorlaştırır (Bukowski, Kciuk ve Kontek, 2020; Dembic, 2020).

İlaç direncinin gelişimini en aza indirerek kanser hücreleri üzerindeki tedavinin etkinliğini artırmak ve normal dokulardaki toksisiteyi engellemek için farklı etki mekanizmalarına sahip kemoterapötik ilaçlar belirli kombinasyonlar halinde uygulanabilir. Kombinasyon kemoterapisi, tümör heterojenitesinin neden olduğu zorlukların üstesinden gelerek uzun süreli iyileştirici etkiler sağlayabilir. Bazı lösemilerin ve lenfomaların tedavisinde kombinasyon kemoterapisi sıklıkla kullanılmaktadır (Nygren, 2001; Pomeroy vd., 2022).

2.2.4. Moleküler Hedefli Tedavi

Kemoterapinin kanser hücrelerini sağlıklı hücrelerden ayırt edememesi ve önemli toksik etkilerinin olması kanser tedavisi için hedefe yönelik terapötik ajanların geliştirilmesinde etkili olmuştur. Hedefe yönelik tedavi, kanserin gelişiminde rol oynayan moleküler mekanizmaların anlaşılmasıyla ortaya çıkan güncel bir tedavi yaklaşımıdır. Moleküler hedefli tedavinin amacı, kanserin büyümesini ve ilerlemesini engellemek için kanserle ilişkili spesifik moleküler hedeflerin terapötik ajanlar tarafından baskılanmasını içerir. Monoklonal antikorlar, küçük moleküllü inhibitörler ve immün sistemi uyaran kanser aşılari moleküler hedefli tedavide kullanılan ajanlardır. Bu terapötik ajanlar anti-kanser etkilerini, kanser hücrelerinin büyümesini sağlayan sinyalleri baskılayarak, hücre döngüsünün ilerlemesini durdurarak, apoptozu indükleyerek, çoklu ilaç direncini tersine çevirerek, tümör mikro çevresini modüle ederek veya bağışıklık sistemini aktive ederek gösterir. Örneğin; insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) monoklonal antikor olan *Trastuzumab* (Herceptin®), HER2 proteinini hedefleyerek HER2-pozitif meme kanseri hücrelerinde bölünmeyi azaltır, reseptörün içselleştirilmesini sağlar ve hücre döngüsünün durdurulmasını teşvik eder. Küçük moleküllü multikinaz inhibitörü olan *Sorafenib* (Nexavar®), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR), trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) ve Raf (hızla hızlandırılmış fibrosarkom) gibi çeşitli reseptör tirozin kinazları inhibe ederek ilerlemiş renal hücreli

karsinom (RCC) ve hepatosellüler karsinom (HCC) tedavisinde anti-anjiyojenik etkiler gösterir. Meme, akciğer, kolorektal, lösemi, lenfoma ve over kanserleri gibi çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylı birçok moleküler hedefli ilaç klinik başarılar göstermiştir (Lee, Tan ve Oon, 2018; Min ve Lee, 2022; Zhong vd., 2021).

Klasik kemoterapi ilaçlarına kıyasla moleküler hedefli ilaçlar, kanser hücrelerini hedefleyerek normal hücreleri koruyabilirler ve bu nedenle daha düşük toksik etkiler gösterirler. Ancak kemoterapide olduğu gibi ilaç direncinin ortaya çıkması moleküler hedefli tedavinin önünde büyük bir engel oluşturur. İlaç direncinin üstesinden gelmek için moleküler hedefli tedavi ve kemoterapiye ek olarak radyoterapiyi de içeren kombinasyon tedaviler uygulanabilir. Örneğin, antikor ilaç konjugatları sitotoksik kemoterapötik ilaçların hedefe yönelik tasarlanan monoklonal antikorlar ile birleştirilmesiyle daha güçlü bir tedavi şekli oluşturmaktadır. Ayrıca yeni terapötik hedeflerin belirlenmesi dirençli kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleyebilecek yeni anti-kanser ilaçların geliştirilmesine olanak sağlayabilir (Ke ve Shen, 2017; Lee, Tan ve Oon, 2018; Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde, 2015; Zhong vd., 2021).

2.2.5. Hormon Tedavisi

Hormonlar, vücudun belli bir bölgesinden doğal olarak sentezlenen proteinlerdir ve hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanarak çeşitli sinyal yollarında rol oynarlar. Kanser hormonal tedavisindeki amaç, sentezlenen hormonun hücreye bağlanmasını engelleyerek kanser hücrelerinin büyümesini durdurmaktır. Bu nedenle hormonal kanser tedavisinde; hormonun sentezini baskılayan inhibitörler (aromataz inhibitörleri ve gonadotropin salgılayan hormon analogları), gerçek hormonun reseptöre bağlanmasını engelleyen hormon reseptör antagonistleri (anti-östrojenler ve anti-androjenler) veya kanserli hücreler üzerinde sitotoksik etkiyi artırmak için sentetik hormon takviyesi (progestin, sentetik östrojen) kullanılabilir. Hormon tedavisi, birincil tümörün boyutunu küçültmek için neoadjuvan olarak veya kanserin tekrar görülme riskini azaltmak için adjuvan olarak da uygulanabilir. Genellikle meme, prostat, over ve endometriyum kanserlerinin tedavisinde etkili bir yöntemdir (Abraham ve Staffurth, 2011; Baykara, 2016; Kashifa Fathima vd., 2022).

2.2.6. İmmünoterapi

İmmünoterapi tedavi yöntemi, kanser hücrelerine saldırmak için bağışıklık sistemi kullanılarak kansere karşı aktif ya da pasif bağışıklık oluşturmaktır. Kanser immünoterapisi, bağışıklık sisteminin aktivasyonunu sağlayan veya aktivitesini artıran çeşitli terapötik ajanların kullanılmasıyla anti-tümör bağışıklık yanıtlarını iyileştirmeyi ve tümöre özgü bir immün yanıtın üretilmesini amaçlar. İmmünoterapide kullanılan terapötik ajanlar şu şekildedir:

Sitokinler: Bağışıklık sistemi hücrelerinin aktivitesini uyararak kanser hücrelerinin çoğalmasını baskırlar. İmmünoterapide interferon (IFN), interlökin (IL) ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) gibi sitokinler kullanılmaktadır.

Monoklonal antikolar: Kanser hücrelerindeki spesifik antijenleri hedefleyerek çoğalmalarını engellemek amacıyla kullanılırlar. Örneğin, hücrel bağışıklık kontrol noktaları sitotoksik T lenfosit antijen-4 (CTLA-4) ve programlanmış hücre ölümü proteini-1'in (PD-1) monoklonal antikolar tarafından inhibisyonu T hücrelerinin aktif kalmasını sağlayarak tümör hücrelerinin ölümünü uyarabilir. Çıplak monoklonal antikolar, konjuge monoklonal antikolar, radyoaktif işaretli monoklonal antikolar ve bispesifik monoklonal antikolar kanser immünoterapisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tasarlanmış T hücreleri: Kimerik antijen reseptörü T-hücresi (CAR T-hücresi) ve T hücre reseptörü (TCR) tedavisi olarak bilinir. Kimerik antijen reseptörü T-hücresi tedavisi, hasta kanından izole edilen T hücrelerine tümör hücrelerinde bulunan bir antijene özgü kimerik antijen reseptörü eklenerek *in vitro* tasarlanmış T hücrelerinin tekrardan hastaya verilmesini içerir. Bu hücreler kanser hücreleri üzerindeki spesifik antijeni tanıyarak kanser hücrelerinin ölümünü uyarır. T hücre reseptörü tedavisi de tümör mutasyonlarından kaynaklanan antijenlere (neo-antijenler) özgü T hücrelerinin yeniden tasarlanmasını içerir. T hücre reseptörleri, majör histokompatibilite komplekslerinin (MHC'ler) sunduğu tümörle ilişkili antijenlere yanıt oluşturarak T hücrelerinin aktivasyonunu sağlar.

Kanser aşıları: Dendritik hücre aşıları, DNA veya RNA aşıları, tümör hücresi lizatından üretilen aşılar veya neo-antijen aşılarını içerir. Kanser aşılarının amacı, tümörle ilişkili antijenlerin ekspresyonuna dayanarak bağışıklık sistemini harekete geçirmektir (Baxevanis, Perez ve Papamichail, 2009; Oiseth ve Aziz, 2017; Riley vd., 2019).

2.2.7. Kök Hücre Tedavisi

Kök hücreler, kemik iliğinde veya periferik kanda bulunan kendi kendini yenileyebilen ve herhangi bir vücut hücresine dönüşebilen farklılaşmamış hücrelerdir. Farklı kaynaklardan izole edilen kök hücrelerin çoğalma, göç ve farklılaşma özellikleri de farklılık gösterir. Bu farklılık kanser tedavisinde kök hücrelerin hangi amaçla uygulanacağını belirler. Kök hücre tedavisinde yaygın olarak yetişkin kök hücreler (ASC) kullanılmaktadır. Kemik iliği kaynaklı ASC'lerden en sık kullanılanları mezenkimal kök hücreler (MSC) ve hematopoietik kök hücrelerdir (HSC). Ayrıca yetişkin somatik hücrelerden yeniden programlanan indüklenmiş pluripotent kök hücrelerde (iPSC) kanser tedavisi için kullanılmaktadır. Kanser tedavisinde çeşitli kök hücre tedavi uygulamaları bulunmaktadır:

- Yüksek doz kemoterapi veya radyoterapiden sonra HSC'lerin transplantasyonu hemotolojik iyileştirmeyi kolaylaştırır. Bu uygulama lösemi ve lenfomaların tedavisinde kullanılmaktadır.
- Kemoterapi, radyoterapi veya cerrahi tedavilerden dolayı hasar gören dokuların onarılmasında hasta dokularından üretilen iPSC'ler kullanılabilir.
- Malignitelerin tedavisinden sonra uygulanan MSC'lerin infüzyonu, farklılaşmamış HSC'lerin çoğalmasını korur, hasarlı dokuların iyileşmesini sağlar veya bağışıklık sisteminin güçlü yanıtlarını azaltabilir.
- Kök hücreler modifiye edilerek kanser tedavisi için terapötik taşıyıcılar olarak uygulanabilirler. Ön ilaçları sitotoksik ürünlere dönüştürücü enzimlerin ekspresyonunu gerçekleştiren kök hücrelerin tasarlanması, anti-tümör ilaçları içeren nanopartiküllerin veya bağışıklık sistemini

aktive etmek için onkolitik virüslerin kök hücreler aracılığıyla tümör bölgelerine iletilmeleri bu uygulamaya örnek olabilir.

- Kök hücreler, bağışıklık hücrelerinin üretilmesi amacıyla immünoterapiye dahil edilebilir.
- Normal kök hücreler, kanserin gelişiminde rol oynayan kanser kök hücrelerini (CSC) hedeflemek için kullanılabilir. Kök hücre temelli anti-kanser aşılarının geliştirilmesi CSC'lerin hedeflenmesi için kullanılan bir uygulamadır (Chu vd., 2020; Sagar vd., 2007).

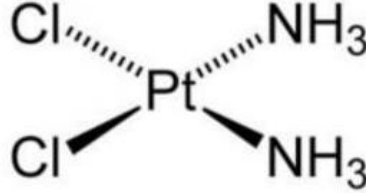
2.2.8. Gen Tedavisi

Gen tedavisi, hastalık gelişimine neden olan anormal genlerin fonksiyonlarının düzeltilmesi için normal genlerin spesifik hedef hücrelere transfer edilmesi yöntemidir. Kanser tedavisi için kanserli hücreye veya çevre dokudaki hücrelere gen transferi, kanserin büyümesini yavaşlatmaya ve hücre ölümünü indüklemeye aracılık eder. Kanser hücrelerini yok edebilen terapötik genlerin etkili bir şekilde tümör bölgesine iletilmesi için viral (adeno-ilişkili virüs, retrovirüs, herpes simpleks virüsü gibi) veya viral olmayan vektörler (katyonik polimerler, peptidler ve lipozomlar gibi) kullanılmaktadır (Cross ve Burmester, 2006; El-Aneed, 2004a, 2004b; Gonçalves ve Paiva, 2017).

Kanserli hücrelerin gelişiminde rol oynayan genetik düzeydeki değişiklikler gen tedavisinin hedefleri arasındadır. Kanser gen tedavisinde çoğunlukla pro-apoptotik genler ve anti-onkogenler kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra kemoterapi ve gen tedavisinin kombinasyonu ile oluşturulan intihar geni stratejisi de kanser tedavisinde kullanılabilir. İntihar geni stratejisi, intihar geni tarafından kodlanan enzim aracılığıyla toksik olmayan bir ön ilacın kanserli hücrelerde aktif sitotoksik ürünlere dönüştürülmesine dayanır. Kanser gen tedavisi uygulamalarından bir diğeri ise anti-tümör immün yanıtları oluşturan genlerin ekspresyonudur. Bu uygulama bağışıklık sisteminden kaçan kanser hücrelerine karşı bağışıklık tepkisinin artırılmasını amaçlar (Cross ve Burmester, 2006; Debela vd., 2021; El-Aneed, 2004a, 2004b; Gonçalves ve Paiva, 2017).

2.3 Sisplatin

Sisplatin (*cis*-diamindikloroplatin (II), CDDP), anti-kanser aktiviteye sahip platin bazlı metalik bir koordinasyon bileşiğidir (Dasari ve Bernard Tchounwou, 2014). Moleküler yapısı [*cis*-Pt(Cl₂(NH₃)₂), bir *cis* oryantasyonunda platin atomuna (Pt (II)) koordine edilmiş iki amid ve iki klorür ligandından oluşur (Chen ve Chang, 2019).

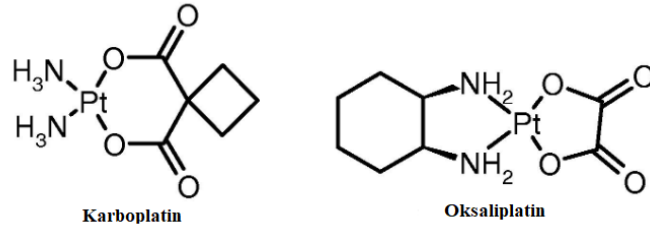


Şekil 2.4. Sisplatinin kimyasal yapısı.

Sisplatin, 1844 yılında Michele Peyrone tarafından ilk defa sentezlenmiş ve kimyasal yapısı 1893'te Alfred Werner tarafından açıklanmıştır (Barry ve Sadler, 2014; Peyrone, 1844). 1965 yılında Dr. Barnett Rosenberg tarafından yapılan bir çalışma ile *Escherichia coli*'de hücre bölünmesini inhibe eden sitotoksik özelliğe sahip olduğu keşfedilmiştir ve bu özelliği sisplatinin anti-kanser ilaç olarak kullanılabileceğine dikkat çekmiştir (Rosenberg, Van Camp ve Krigas, 1965). 1978'de FDA tarafından onaylanan sisplatin, kanser tedavisinde kullanılan ilk metal bazlı kemoterapötik ilaç olmuştur. Bu durum, kanser tedavisinde potansiyel anti-kanser ajanlar olarak metal içeren inorganik koordinasyon bileşiklerine olan ilgiyi artırmıştır (Frezza vd., 2010; Kelland, 2007).

Sisplatin, testis, over, mesane, akciğer ve meme kanseri gibi diğer birçok katı tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Ancak tümör büyümesine karşı başarılı terapötik etkiler göstermesine rağmen ilaç direnci ve toksik yan etkileri nedeniyle klinik kullanımı kısıtlanmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar, klinik olarak etkili, daha az toksisitesi olan yeni sisplatin analogları geliştirmiş ve bunlardan sadece karboplatin ve oksaliplatin bileşiklerinin klinik kullanımı onaylanmıştır. İkinci nesil platin kemoterapi ilacı karboplatin, sisplatine göre daha az toksisite göstererek agresif tümörlerin tedavisinde yüksek doz kemoterapi için uygundur. Hem sisplatin hem de karboplatin DNA'da benzer etki mekanizması gösterir ve benzer tümörlerin tedavisinde etkilidirler. Ancak karboplatin, testiküler germ hücreli kanserlerin ve mesane kanserlerinin tedavisinde etkili değildir. Ayrıca birbirleriyle çapraz direnç gösterirler. Üçüncü nesil platin kemoterapi ilacı oksaliplatin ise çapraz direnç oluşturmada hücrede farklı etkilere neden olur ve özellikle kolorektal kanserlerin tedavisinde oldukça etkilidir (Bergamo,

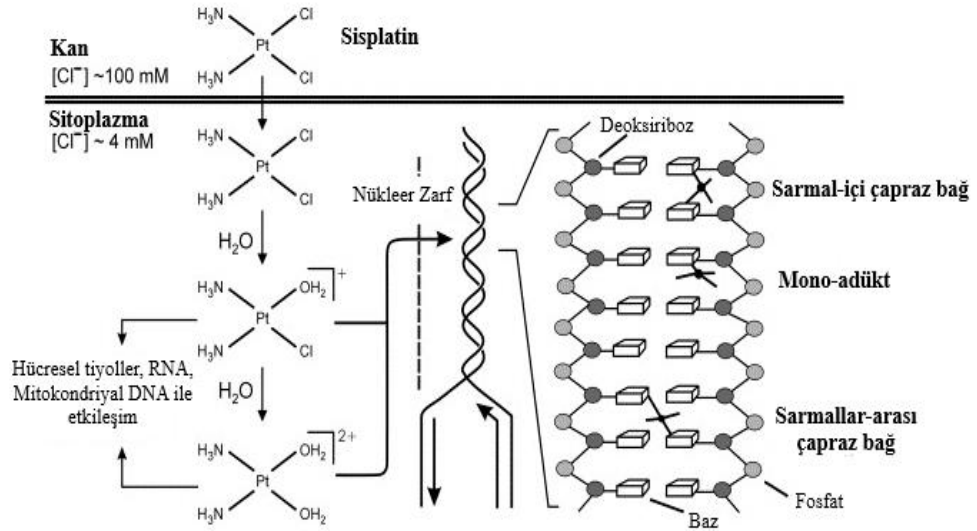
Dyson ve Sava, 2018; Chen ve Chang, 2019; Ghosh, 2019; Rabik ve Dolan, 2007; Zhang vd., 2022).



Şekil 2.5. Sisplatin analogları karboplatin ve oksaliplatin bileşiklerinin kimyasal yapıları.

2.3.1. Sisplatinin Moleküler Etki Mekanizması

Sisplatin, steril salin solüsyonu şeklinde intravenöz olarak uygulanır. Kandaki klorür konsantrasyonu yüksek olduğundan (~100 mM) dolaşımında bozunmadan hareket eder ve tüm vücuda kan dolaşımı yoluyla dağılır. Dolaşımdaki sisplatinin büyük bir kısmına kan plazma proteinleri bağlanabilir ve bu durum büyük miktarda sisplatinin deaktivasyonuna neden olur (Ghosh, 2019). Kalan sisplatinin hücreler tarafından alınımına pasif difüzyon veya bakır taşıyıcılar (CTR1 ve CTR2) ile organik katyon taşıyıcılar (OCT1 ve OCT2) aracılık eder. Nötr sisplatin hücrelere esas olarak plazma zarından pasif difüzyonla taşınır. Ancak bu mekanizmaya ek olarak, transmembran taşıyıcı proteinler aracılığıyla kolaylaştırılmış difüzyon yolunu kullanarak da hücrelere girebilir. Özellikle sisplatinin hücreye taşınması, CTR1 tarafından gerçekleşir. Bu transmembran protein, metiyonin ve histidin kalıntılarından zengin bir hücre dışı domain içerir ve hem bakır hem de sisplatinin hücreye taşınması için gereklidir (Makovec, 2019). Ayrıca sisplatin, CTR1'in bozulmasına neden olarak kanser hücrelerinde sisplatin alımının azalmasına yol açar. Hücrelerde yüksek CTR1 ekspresyonu sisplatine karşı hassasiyeti artırır (Holzer, Manorek ve Howell, 2006).

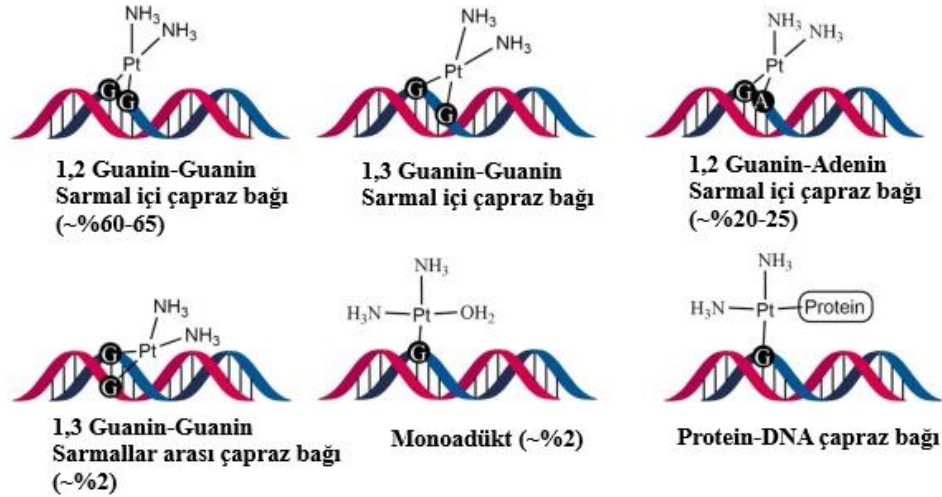


Kaynak: Kartalou ve Essigmann, 2001'den Türkçeleştirilmiştir.

şekil 2.6. Hücreye giren sisplatin bileşiğinin aktivasyonu ve moleküler hedefleri.

Sisplatin hücreye girdiğinde sitoplazmadaki düşük klorür konsantrasyonu (~4 mM), platin kompleksinin klorür ligandları ile su moleküllerinin yer değiştirmesine neden olur ve böylelikle sisplatinin aktivasyonu sağlanır. Sisplatinin daha reaktif hale gelmesi, monohidratlı $[cis-(NH)PtCl(OH_2)]^+$ veya dihidratlı $[cis-(NH)Pt(OH_2)_2]^{2+}$ sisplatin formlarının oluşmasıyla gerçekleşir. Oluşan hidrolize ürünler oldukça güçlü elektrofilik özellik göstererek proteinlerin sülfhidril grupları veya nükleik asitlerin nitrojen donör atomları gibi nükleofilik bölgelerle reaksiyona girebilir (Dasari ve Bernard Tchounwou, 2014; Kartalou ve Essigmann, 2001; Rocha vd., 2018).

Sisplatinin anti-kanser aktivitesinin temel hedefi genomik DNA'dır. Hücrenin çekirdeğine giren reaktif sisplatin özellikle DNA'daki pürin bazlarının (guanin ve adenin) imidazol halkasındaki N7 nükleofilik bölgeleri ile reaksiyona girerek DNA'ya kovalent olarak bağlanabilir. Reaktif platin bileşiğinin DNA ile reaksiyonu sonucu yapısal olarak farklı tipte adüktlerin oluşumuna yol açmaktadır. İlk olarak sisplatinin bir su molekülünü kaybetmesiyle monoadükt formlar oluşmakta ancak bunların çoğu daha sonra sarmal-ıçi veya sarmallar-arası çapraz bağlar oluşturmak için tekrar reaksiyona girmektedir (Alderden, Hall ve Hambley, 2006; Fuertes, Alonso ve Pérez, 2003).



Kaynak: Ghosh, 2019'dan Türkçeleştirilmiştir.

Şekil 2.7. Sisplatinin DNA'daki pürin bazları ile etkileşimi.

Pürin bazlarının sisplatin tarafından üretilen çapraz bağları; %60-65'i 1,2-d(GpG) sarmal içi çapraz bağlar, %20-25'i 1,2-d(ApG) sarmal içi çapraz bağlar, %2'si 1,3-(GpXpG) sarmallar arası çapraz bağları içerirken %2'si monoaddükt oluşumunu içermektedir. Ayrıca DNA-protein çapraz bağları da sisplatin tarafından indüklenebilir. Daha sık üretilen 1,2-sarmal içi çapraz bağlar, en dikkat çekici DNA değişiklikleridir ve diğer çapraz bağlara göre sisplatin sitotoksitesi üzerinde daha etkilidir (Fuertes, Alonso ve Pérez, 2003; Ghosh, 2019). Aynı zamanda 1,2-sarmal içi çapraz bağlar, bazı yüksek mobilite grubu (HMG) proteinleri tarafından spesifik olarak tanınarak onarımları baskılanabilir (Ghosh, 2019; Rocha vd., 2018; Wang vd., 2021).

Çapraz bağların oluşumu, DNA'da bükülmelere yol açarak kanser hücrelerinde DNA hasarını indüklemektedir. Hasar varlığında, DNA replikasyonu ve transkripsiyonu engellenerek hücre döngüsü durdurulur. Sisplatinin neden olduğu DNA'nın değiştirilmiş yapısı, DNA hasarı onarım proteinleri tarafından tanınmadığında veya düzeltilemediğinde apoptotik sinyal yollarının aktivasyonu ile programlanmış hücre ölümü uyarılır. Bununla birlikte hücre içi sisplatinin çok az bir kısmı (~%1) nükleer DNA'ya bağlanarak apoptozu uyarabilir (Ghosh, 2019; Rocha vd., 2018; Wang vd., 2021).

Sisplatinin birincil mekanizması DNA'da hasar oluşturarak kanser hücrelerinde apoptoz yoluyla hücre ölümüne neden olmaktır. Oluşan DNA hasarına karşı hücrel yanıtın ortaya çıkarılmasında tümör baskılayıcı protein p53'ün aktivasyonu önemli bir

rol oynar. Hücrede DNA hasarı ile aktive olan mutasyona uğramış ataksi telanjiektazi (ATM) proteini veya ATM ve RAD3 ile ilişkili protein (ATR), p53'ün fosforilasyonu ve stabilizasyonunu sağlayarak aktivasyonuna yol açar. Aktive edilen p53, hücre döngüsü ilerlemesinde, DNA onarımında ve apoptozda yer alan genlerin ekspresyonunu düzenleyebilir (Basu ve Krishnamurthy, 2010). Sisplatinin neden olduğu hasarlı DNA'nın onarılması için hücre döngüsü kontrol noktaları (Chk1 ve Chk2) aktifleşerek hücre döngüsü durdurulur (Pabla vd., 2008). Sisplatin kaynaklı DNA hasarının onarılmasında nükleotid eksizyon onarımı (NER) ve yanlış eşleşme onarımı (MMR) en önemli mekanizmalardır. Hasar onarılamazsa p53, anti-apoptotik proteinlerin işlevlerini baskılayarak (Bcl-xL; B hücreli lenfoma ekstra büyük, FLIP; flice benzeri inhibitör protein) ve hem ölüm reseptörü (FAS) hem de mitokondriyal apoptotik yollarda rol oynayan pro-apoptotik genleri (Bax ve Apaf-1 gibi) aktive ederek apoptozu indükleyebilir (Basu ve Krishnamurthy, 2010; Vousden ve Lu, 2002; Wang vd., 2021). Ayrıca sisplatin kaynaklı genotoksik strese sadece p53 aracılı tepkiler değil, aynı zamanda çeşitli protein kinazların (c-Abl; siklobutan dikarboksilat, PKC; protein kinaz C, MAPK'ler; mitojenle aktive olan protein kinazlar gibi) aktivasyonu da eşlik etmektedir (Basu ve Krishnamurthy, 2010).

Sisplatin, DNA hasarına ek olarak hücre ölümüne neden olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesini de tetikler. Sisplatin ile indüklenen ROS oluşumu, sisplatinin konsantrasyonuna ve maruz kalma süresine bağlıdır (Brozovic, Ambriović-Ristov ve Osmak, 2010). Normal şartlarda hücre içi redoks homeostazı, tiyol (sülhidril-SH) grubu içeren antioksidan moleküller (GSH-indirgenmiş glutatyon vb.) tarafından kontrol edilir. Ancak bir tiyol grubu moleküler oksijen ile etkileşime girerek serbest radikallerin oluşumuna yol açar ve bu durum ROS üretimi ile sonuçlanır (Florea ve Büsselberg, 2011). Aşırı ROS üretimi, mitokondriyal ve hücrel oksidatif strese neden olur. Oksidatif stres, sisplatin sitotoksitesinde yer alan mekanizmalardan biridir. Reaktif oksijen türleri, oksidatif stres koşullarında hücrel proteinlere, lipidlere ve DNA'ya zarar verir. Oksidatif stres, mitokondriyal lipid peroksidasyonu ile mitokondriyal membran geçirgenliğini değiştirerek hücrel işlev bozukluğuna neden olur. Ayrıca sisplatin mitokondriyal DNA'ya da bağlanarak ROS birikimini indükler ve oksidatif stresin artmasına yol açar. Sonuçta, sisplatin tarafından üretilen ROS, oksidatif DNA hasarını indükleyerek hücre ölümüne neden olur (Brozovic, Ambriović-Ristov ve Osmak, 2010; Sancho-Martínez vd., 2012).

Hücre ölümü, sisplatin konsantrasyonuna ve hücrel hasara bağlı olarak hem apoptotik hem de nekrotik olabilir. Sisplatin konsantrasyonu düşük olduğunda apoptoz indüklenirken, daha yüksek sisplatin konsantrasyonunda enflamasyona neden olan nekroz ölüm şekli indüklenir. Yüksek dozlarda sisplatin, hücrel enerji kaynağı adenozin trifosfat (ATP) molekülüne ve apoptotik süreçte rol oynayan proteinlere zarar vererek nekrotik hücre ölümüne yol açabilir (Gonzalez vd., 2001; Sancho-Martínez vd., 2012). Ayrıca ROS, bozulmuş sitozolik içeriklerin (organeller veya proteinler gibi) lipozomlarda degradasyonunu içeren kendi kendine katabolik bir süreç olan otofaji aracılı hücre ölümüne de neden olabilir (Dasari ve Bernard Tchounwou, 2014).

Sisplatin ayrıca endoplazmik retikulum (ER) işleyişini bozarak hücre içi kalsiyum homeostazının değişmesine ve ER’de yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikmesine neden olur, bu durum ER stresini oluşturur. Sisplatin aracılı ER stres, DNA hasarından bağımsız olarak apoptotik hücre ölümünü indükleyebilir (Mandic vd., 2003). Yapılan bir çalışmada sisplatine maruz kalan insan serviks kanseri hücrelerinde ER’den serbestleşen kalsiyum seviyelerinin arttığını ve bu durumun sisplatin kaynaklı apoptozu düzenlediği gösterilmiştir (Shen vd., 2016).

2.3.2. Sisplatinin Toksik Yan Etkileri

Sisplatin, gastrointestinal toksisite, hepatotoksisite, nefrotoksisite, ototoksisite ve nörotoksisite gibi çeşitli toksik yan etkilerle ilişkilendirilmiş güçlü bir kemoterapötik ilaçtır (Tchounwou vd., 2021). Bu yan etkiler, sisplatin tedavisinin dozuna veya sistemik ve bireysel koşullara bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Astolfi vd., 2013).

Gastrointestinal Toksisite: Yan etkiler arasında en sık görülenidir. Hastaların çoğunda mide bulantısı ve kusma gibi gastrointestinal semptomlar görülür. Bu semptomlar, antiemetik ilaçların uygulanmasıyla azalabilir (Astolfi vd., 2013).

Hepatotoksisite: Sisplatinin yüksek doz uygulaması hepatotoksisiteye neden olur. Sisplatin tedavisi ile antioksidan savunma mekanizmasında rol oynayan indirgenmiş glutatyon (GSH) seviyelerinin azalmasından kaynaklanan oksidatif stres hepatotoksisitenin temel nedenidir. Dolaşımdaki transaminazların artması ve serum/bilirubinde hepatik enzim seviyelerinin yükselmesi karaciğer hasarının klinik

belirtileridir. Sisplatin ile indüklenen hepatotoksisitenin etkileri selenyum ve E vitamini uygulanarak azaltılabilir (Dasari ve Bernard Tchounwou, 2014).

Nefrotoksisite: Sisplatinin renal atılımı, diğer organlara göre böbreklerde daha yüksek sisplatin birikimine neden olur. Bu sisplatin birikimi, terminal proksimal tübülü ve distal tübülü etkileyerek nefrotoksisiteye yol açar. Sisplatin nefrotoksisitesi, sisplatinin hücre içine alımını sağlayan transmembran taşıyıcıların böbrek hücrelerinde yüksek ifade edilmesinden kaynaklanabilir. Sisplatin ile tedavi edilen hastaların intravenöz hidrasyonu, nefrotoksik etkileri azaltabilir. Yeni nesil sisplatin analogları karboplatin ve oksaliplatin tedavisinde nefrotoksisite daha nadir görülür (Astolfi vd., 2013; Rabik ve Dolan, 2007; Tchounwou vd., 2021).

Ototoksisite: Sisplatin kaynaklı ototoksisite, yüksek doz sisplatin uygulanan hastaların büyük bir kısmında görülür. Klinik belirtisi işitme kaybını içermektedir. Sisplatin tedavisi kokleada (iç kulak) antioksidan enzim aktivitesini baskılayarak ROS üretimine ve lipid peroksidasyonunun artmasına yol açar. Bu durum, koklea hücrelerinde kalsiyum akışına neden olarak apoptozu indükleyebilir. Sisplatin ototoksisitesinin tedavisi için antioksidanların ve anti-inflamatuvar ajanların lokalize veya sistemik uygulanması gibi çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır (Rybak vd., 2007; Sheth vd., 2017).

Nörotoksisite: Nöron sistemi içinde sisplatinin birikmesini içeren nörotoksisite, sisplatin dozunu sınırlayan en ciddi toksisitedir. Sisplatin tedavisinde en çok nöron sisteminin periferik duyu sinirleri etkilenir. Araştırmacılar, dorsal kök ganglion nöronlarında yüksek platin-DNA eklentilerinin birikimini tespit etmişlerdir. Sisplatin nörotoksisitesi, periferik nöropati, motor fonksiyonlarında bozukluklar ve ensefalopati şeklinde görülebilir. Bu toksikolojik etkileri önlemek için nörotropik faktörler, kükürt tiyoller, antioksidanlar ve fosforik asit antibiyotikleri gibi çeşitli ajanlar kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar, karboplatin tedavisinde nörotoksisitenin daha az yaygın olduğunu göstermektedir (Aldossary, 2019).

2.3.3. Sisplatin Direnci

Çeşitli kanser türlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan sisplatinin kemoterapötik etkinliğini kısıtlayan en önemli dezavantajı ilaç direncidir. Kanser hücreleri anti-kanser ilaçların tedavisine yanıt vermediğinde ilaç direnci ortaya

çıkılmaktadır. Sisplatin tedavisinin başlangıcında kanser hücreleri sisplatine yanıt verir fakat zamanla tümörün nüks ettiği ve kemoterapiye dirençli hale geldiği görülür. Bu durum, başarılı sisplatin tedavisinin iyileştirici etkilerinin azalmasına neden olur (Aldossary, 2019; Amable, 2016; Florea ve Büsselberg, 2011). Sisplatin direnci, kanser türlerine göre farklılık gösterebilir. Germ hücreli kanserler, baş ve boyun kanseri ya da küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) gibi kanser türleri sisplatine duyarlıyken kolorektal kanser ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) gibi kanser türleri sisplatine karşı dirençlidir (Fuertes, Alonso ve Pérez, 2003).

İlaç direnci, kazanılmış ve içsel direnç olmak üzere iki şekildedir. Kazanılmış direnç, başlangıçta etkili olan ilaç zamanla etkisiz hale geldiğinde ortaya çıkarken, içsel direnç ilaçla tedavinin başlangıcından itibaren ilacın etkisiz olduğu dirençtir (Florea ve Büsselberg, 2011). İlaç tedavisine duyarlı olan kanser türleri genellikle tedavi sırasında kazanılmış direnç geliştirirler (Fuertes, Alonso ve Pérez, 2003). Sisplatin direncine yol açan mekanizmalar genel olarak; ilacın değişen hücresel birikimini, artan DNA onarımını, apoptozda rol oynayan proteinlerin ekspresyonlarındaki değişiklikleri ve artan sitozolik ilaç inaktivasyonunu içermektedir (Amable, 2016; Köberle vd., 2010).

Sisplatinin değişen hücresel birikimi: Hücre içine ilaç alımının azalması ve hücreye giren ilacın artan şekilde uzaklaştırılmasının bir sonucu olarak hücre içi ilaç konsantrasyonunda azalma meydana gelir (Fuertes, Alonso ve Pérez, 2003). Yapılan çalışmalar, azalan doku Pt konsantrasyonlarının sisplatin direnci ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Chen ve Chang, 2019). Sisplatin birikiminin kanser hücrelerinde azalması, kazanılmış direncin önemli bir mekanizmasıdır (Florea ve Büsselberg, 2011). Sisplatinin hücreye alımında rol oynayan transmembran taşıyıcıların azalan ekspresyonu ve sisplatinin hücre dışına çıkarılmasında rol oynayan bakır taşıyıcı P-tipi ATPazların (ATP7A ve ATP7B) artan ekspresyonu kanser hücrelerinde sisplatin birikiminin azalmasına yol açarak sisplatin direncine katkıda bulunur (Amable, 2016; Rabik ve Dolan, 2007). Ayrıca ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarının protein ailesine ait olan çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinlerde hücresel sisplatin direncine aracılık eder. Çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinler, ATP'ye bağlı olarak sisplatini indirgenmiş GSH konjugasyonu yoluyla hücre dışına taşıyarak sisplatine direnç sağlar. Genellikle azalan sisplatin birikiminin, ilacın hücre dışına taşınmasından ziyade hücre içine alımının azalmasına bağlı olduğu kabul edilir (Amable, 2016; Fuertes, Alonso ve Pérez, 2003).

Sisplatinin sitozolik inaktivasyonu: Sitoplazmaya giren sisplatinin aktifleşen hidrolize formları, GSH ve metalleriyoninler (MT'ler) gibi tiyol içeren makromoleküllerle etkileşime girer. Bu moleküllerin hücre içi yüksek konsantrasyonları sisplatin direncine neden olabilir (Rabik ve Dolan, 2007). Sitozolik sisplatinin inaktivasyonunun birincil mekanizması, platin-GSH konjugatlarının oluşmasıdır. Hücre içi glutatyon, indirgenmiş sülfhidril grupları formunda tutularak redoks ortamını koruyan bir antioksidan olarak rol oynar. Glutatyon S-transferaz (GST) enzimleri aracılığıyla veya kendiliğinden oluşan platin-GSH konjugatları, sisplatinin çözünürlüğünü artırarak ATP'ye bağımlı glutatyon S-konjugat pompası tarafından hücre dışına uzaklaştırılır. Böylelikle inaktive edilen sisplatinin DNA ile reaksiyona girme yeteneği azalır. Bununla birlikte sisplatine dirençli hücrelerde hücre içi GSH seviyelerinin azalması sisplatinin sitotoksik etkisini artırır (Amable, 2016; Fuertes, Alonso ve Pérez, 2003; Kartalou ve Essigmann, 2001). Yapılan bir çalışma, sisplatine dirençli insan mesane kanseri hücre hatlarında, hücre içi GSH konsantrasyonunu azaltan ajanları kullanarak hem sisplatin duyarlılığının hem de sitotoksitesinin arttığını göstermiştir (Byun vd., 2005). Sitozolik sisplatin inaktivasyonunun diğer bir mekanizması, MT proteinlerine bağlanmasını içerir. MT proteinleri, ağır metallerin (bakır, çinko, kadmiyum gibi) homeostazında ve detoksifikasyonunda rol oynayan sistein açısından zengin proteinlerdir. Sisplatine bağlanan MT'lerin aşırı ekspresyonu, bazı kanser hücrelerinde sisplatin direncine katkıda bulunabilir. Prostat, akciğer, over ve serviks kanseri hücre hatlarında yapılan çalışmalar artan MT ekspresyonunun sisplatin direnci ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (Amable, 2016; Köberle vd., 2010).

Sisplatin kaynaklı DNA hasarının artan onarımı: Sisplatin tarafından oluşturulan DNA hasarı genel olarak NER mekanizması yoluyla onarılır. Hasarı ortadan kaldırmak için birbiriyle uyumlu birden çok proteinin rol oynadığı NER mekanizması, DNA'dan hasarlı nükleotitlerin kesilip çıkarılmasını ve daha sonra genom bütünlüğünün korunması için DNA sentezinin yapılmasını içerir. Bu onarım mekanizması, sisplatin kaynaklı üç tip sarmal içi çapraz bağları (1,2-d(ApG), 1,2-d(GpG) ve 1,3-d(GpNpG)) tanır, ancak 1,3-sarmal içi çapraz bağların onarılmasında daha etkilidir. Çift sarmaldaki hasar ilk olarak kseroderma pigmentosum tamamlayıcı grup C/insan RAD23 homolog B (XPC/HR23B) protein kompleksi tarafından tanınır ve ATP bağımlı DNA helikaz alt birimlerini (XPB; kseroderma pigmentosum tamamlayıcı grup D ve XPD; kseroderma pigmentosum tamamlayıcı grup B) içeren transkripsiyon faktörü II H'nin (TFIIH) işe

alınması sağlanır. Bu kompleks hasarlı nükleotit ile karşılaşana kadar DNA çift sarmalını çözer. Ardından replikasyon proteini A (RPA), kseroderma pigmentosum tamamlayıcı grup A (XPA) ve kseroderma pigmentosum tamamlayıcı grup G'den (XPG) oluşan endonükleolitik bölünme öncesi kompleks bir araya getirilir ve XPG ve kseroderma pigmentosum tamamlayıcı grup F/eksizyon onarımı çapraz tamamlayıcı grup 1 (XPF/ERCC1) endonükleazları DNA'yı her iki taraftan keserek hasarlı nükleotiti uzaklaştırır. Son olarak RPA, replikasyon faktörü C (RFC), proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA) ve replikatif DNA polimerazlarını içeren DNA onarım sentezi kompleksi oluşan boşluğun doldurulması için hareket eder ve DNA ligaz I tarafından DNA ligasyonu gerçekleştirilerek onarım tamamlanır (Amable, 2016; Gillet ve Schärer, 2006; Menck ve Munford, 2014; Zamble vd., 1996). Çalışmalar, NER mekanizmasında yer alan birçok genin aşırı ekspresyonunu sisplatin direnci ile ilişkilendirmektedir. Örneğin, platin tedavisine dirençli over kanseri hastalarının tümör dokularında ERCC1, XPA ve XPB genlerinin ekspresyon seviyelerinin yüksek olduğu gösterilmiştir (Dabholkar vd., 1994, 2000). Diğer bir NER geni olan XPF'nin over ve kolon kanseri hücrelerinde artan ekspresyonu sisplatin direnci ile pozitif korelasyon göstermiştir (Stevens vd., 2008). Bununla birlikte genellikle sisplatine duyarlı testis kanserlerinde XPA, ERCC1 ve XPF ekspresyonlarının düşük seviyelerde olduğu bildirilmektedir (Welsh vd., 2004). Sisplatin direnci ile ilişkili olan diğer bir onarım mekanizması ise MMR yoludur. Yanlış eşleşme onarımı, DNA replikasyonu sırasında oluşan yanlış baz eşleşmesi ya da inversiyonlar ve delesyonlar gibi hataların düzeltilmesinden sorumlu DNA onarım mekanizmasıdır. Bu mekanizma da NER yolağına benzer şekilde; yanlış eşleşmenin tanınması, kesilip çıkarılması, kesilen DNA dizisinin yeniden sentezini ve ligasyonunu içerir. Önemli proteinleri arasında hMLH1 (MutL homolog 1), hMSH2 (MutS homolog 2), hMSH6 (MutS homolog 6) ve hPMS2 (insan yanlış eşleşme onarım proteini 2) yer alır. Replikatif hataların düzeltilmesinin yanı sıra MMR, sisplatin gibi alkilleyici maddelerin neden olduğu DNA hasarını da tanır ancak bu hasarları onaramaz. Bu durum, MMR tarafından tanınan sisplatin-DNA eklentisinin çıkarılamayıp yeni sentezlenen DNA sarmalındaki bazın değiştirilmesinden kaynaklanır. Hasar tamamen onarılamadığından MMR mekanizması sürekli aktive olarak nafile bir döngüye yol açar ve sonuçta hücre döngüsünün durması ve apoptotik sinyalin oluşması tetiklenir. Yanlış eşleşme onarım mekanizmasını düzenleyen genlerde meydana gelen kusurlar, apoptotik yanıtın baskılanmasına ve dolayısıyla sisplatin direncinin ortaya çıkmasına neden olabilir (Kunkel ve Erie, 2005; Martin, Lord ve Ashworth, 2010; Sergeant vd., 2002). Tümör

hücrelerinde MMR'nin fonksiyonel eksikliği sisplatine karşı 2-3 kat daha fazla direnç oluşturmaktadır (Stojic, Brun ve Jiricny, 2004). Örneğin, hMLH1 fonksiyonu eksik olan insan kolon kanseri hücreleri (HCT116) bu proteini ifade eden hücreler ile karşılaştırıldığında sisplatine karşı 2,1 kat daha direnç göstermektedir. Benzer şekilde insan endometriyum kanser hücrelerinde (HEC59) hMSH2 eksikliği sisplatine karşı 1,8 kat daha fazla direnç geliştirmektedir (Fink vd., 1996). Ayrıca hMLH1 ekspresyonu içermeyen sisplatine dirençli over kanseri hücre hattında (A2780), hMLH1 ekspresyonunun tekrar kazandırılması sisplatine olan duyarlılığı arttırmıştır (Durant vd., 1999). Sisplatin tarafından DNA'da oluşturulan sarmal içi çapraz bağlar varlığında durdurulan DNA replikasyonu, translezyon sentezi (TLS) adı verilen bir DNA hasarı tolerans mekanizması tarafından gerçekleştirilir (Rocha vd., 2018; Shachar vd., 2009). Onarım mekanizmalarının yetersiz olduğu hücreler tarafından kullanılan TLS, hasarlı DNA'nın replikasyonu için özel DNA polimerazları kullanır; POLH, POLI, POLK, REV1, REV3 ve REV7. Bu özelleşmiş DNA polimerazlar, hasarlı DNA bölgelerinin baypas edilmesi yoluyla DNA sentezini gerçekleştirebilir. Örneğin, cisplatin-GpG eklentileri POLH ve REV3 tarafından baypas edilebilmektedir (Shachar vd., 2009). *In vitro* yapılan çalışmalar, translezyon sentezinde rol alan bazı DNA polimerazların sarmal içi çapraz bağları baypas ederek sisplatin direncinin oluşmasına katkıda bulunduğunu göstermiştir. İnsan fibroblast hücrelerinde REV3 ekspresyonunun azaltılması hücreleri sisplatine karşı daha duyarlı hale getirmiş ve sisplatin-DNA eklentileri oluşuktan sonra artan REV3 ekspresyonunun hayatta kalan hücrelerde ilaca karşı direncin ortaya çıkmasında rol oynadığı gösterilmiştir (Wu vd., 2004). Başka bir çalışma, MMR eksikliği olan insan kolon karsinomu hücrelerinde REV3 polimerazın hem sisplatin kaynaklı mutajeniteyi hem de sisplatin direncini desteklediğini göstermiştir (Lin vd., 2006). Bununla birlikte sisplatin ile indüklenen sarmallar arası çapraz bağlar, homolog rekombinasyon (HR) sistemi tarafından onarılan çift sarmal kırılmalarına yol açabilir (Frankenberg-Schwager vd., 2005). Çift sarmal kırılmaları, ATM ve ATR gibi DNA hasarı sinyal faktörlerinin aktivasyonunu tetikleyerek hücre döngüsünün durdurulmasını ve homolog rekombinasyon için gerekli DNA onarım proteinlerinin işe alınmasını sağlar (Smith vd., 2010). Homolog rekombinasyon mekanizması, çift sarmal kırılmalarını düzeltmek için homolog bir kardeş kromatide ihtiyaç duyduğundan genellikle hücre döngüsünün S ve G2 fazlarında yer alan DNA onarım sistemidir (Hartlerode ve Scully, 2009; Venkitaraman, 2002). Özellikle ailesel meme ve over kanserlerinde sıklıkla mutasyona uğrayan tümör baskılayıcı genler meme kanseri duyarlılık geni 1 (BRCA1) ve

meme kanseri duyarlılık geni 2 (BRCA2) tarafından kodlanan proteinler, HR aracılı DNA onarımında rol oynayan önemli proteinlerdir (O'Donovan ve Livingston, 2010; Venkitaraman, 2002). Ayrıca, NER mekanizmasının bileşenleri, XPF ve ERCC1 proteinleri de homolog rekombinasyonda yer almaktadır (Miyagawa, 2008). Homolog rekombinasyon mekanizması eksik olan kanser hücrelerinin sisplatin tedavisine daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Örneğin, over kanserlerinin sisplatine duyarlılığı HR proteinlerinin azalan ekspresyonu veya BRCA1/2'deki mutasyonlar ile ilişkilidir (Sakai vd., 2008; Swisher vd., 2008; Taniguchi vd., 2003). Ancak başlangıçta sisplatin tedavisine duyarlı olan kanser hücrelerinde mutasyona uğramış BRCA1 ve BRCA2 işlevini tekrar kazandıran ikincil mutasyonlar sisplatin direncine aracılık edebilir (Edwards vd., 2008; Sakai vd., 2008). Daha önceki yıllarda yapılan bir çalışma, sisplatine dirençli meme kanseri hücre hatlarında BRCA1 ekspresyonunun arttığını göstermektedir (Husain vd., 1998).

Sisplatin direncinde apoptotik değişiklikler: Pro-apoptotik faktörlerin azalan ekspresyonu veya kaybı ve anti-apoptotik faktörlerin artan ekspresyonu sisplatin direncinin ortaya çıkmasında etkilidir (Siddik, 2003). p53'ün kanser hücrelerinde sisplatine yanıt olarak indüklenen apoptotik yolda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Basu ve Krishnamurthy, 2010). Mutasyona uğramış p53 içeren insan kanser hücre hatlarının vahşi tip p53 içeren hücre hatlarına kıyasla sisplatine daha dirençli olduğu tespit edilmiştir (Branch vd., 2000). Glioma hücre hatlarında p53'ün inaktivasyonu da sisplatin direncine yol açmıştır (Xu, Mymryk ve Cairncross, 2005). Sisplatin kaynaklı apoptotik yollarda yer alan Bcl-2 ailesi proteinlerinin ekspresyonel değişiklikleri de sisplatin direnci ile ilişkilendirilmektedir. Örneğin, sisplatine dirençli over kanseri hücrelerinde anti-apoptotik protein Bcl-xL'nin ekspresyonunda artış gözlenmektedir (Gebauer vd., 2000). Başka bir çalışma, meme kanseri hücrelerinde pro-apoptotik protein Bax'ın aşırı ekspresyonunun sisplatine olan duyarlılığı artırdığını göstermektedir (Sakakura vd., 1997). Ayrıca apoptozu inhibe eden Bcl-2 veya Bcl-xL'nin hücrelere transfeksiyonu sisplatine direnç sağlarken, Bcl-xL ekspresyonunun azalması hücreleri sisplatin gibi apoptotik uyarılara duyarlı hale getirir (Gao ve Dou, 2000; Miyake vd., 1999; Taylor vd., 1999). Sisplatinin hücre tepkisine aracılık ettiği bilinen MAPK ailesi üyelerinin (ERK1/2; hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2, SAPK/JNK; stresle aktive olan kinaz/c-Jun N-terminal kinaz ve p38) aktivasyonu da apoptozun düzenlenmesinde yer almaktadır (Basu ve Krishnamurthy, 2010). Sisplatin dirençli over kanseri hücrelerinde

yapılan bir çalışmada, JNK ve p38 MAPK'nin uyarılması Fas ligandının (FasL) ekspresyonunu artırarak apoptozu tetiklediği ve hücreleri sisplatine duyarlı hale getirdiği gözlenmektedir (Mansouri vd., 2003).

2.3.4. Sisplatin ve Kombinasyon Tedavisi

Sisplatinin hücresel alımı ve akışındaki değişiklikler, hücre içi detoksifikasyonun artması, DNA onarımının artması ve apoptotik sinyallemedeki kusurlar nedeniyle sisplatin tedavisinden nüksetmiş birçok kanser hastasında gözlenen ilaç direncinin ve toksisitesinin üstesinden gelmek için birçok kanser türünün tedavisinde sisplatin diğer anti-kanser ilaçlarla kombinasyon halinde kullanılabilir (Tablo 2.1.) (Dasari ve Bernard Tchounwou, 2014; Tsvetkova ve Ivanova, 2022).

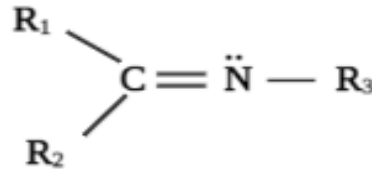
Tablo 2.1. Bazı kanser türlerinde sisplatin ve diğer kanser ilaçlarının kombinasyon tedavisine örnekler

Kombinasyon	Kanser türü	Kaynak
Sisplatin/Paklitaksel	Over kanseri	(Armstrong vd., 2006)
Sisplatin/Doksorubisin	Endometriyal karsinoma	(Randall vd., 2006)
Sisplatin/Gemcitabin	Safra kanseri	(Valle vd., 2010)
Sisplatin/Nesitumumab/Gemcitabin	Skumöz küçük hücreli dışı akciğer kanseri	(Watanabe vd., 2019)
Sisplatin/Anvirzel	Meme, Kolon, Akciğer, Prostat, Melanom ve Pankreas kanseri	(Apostolou vd., 2013)

2.4. Schiff Bazları

Schiff bazları, ilk kez 1864'te Alman kimyager Hugo Schiff tarafından keşfedilen karbonil bileşikler (aldehit veya keton) ile primer aminler arasındaki kondenzasyon reaksiyonlarının ürünleridir (Schiff, 1864). İminler veya azometinler olarak da bilinen Schiff bazları yapısal olarak, karbonil grubunun (C=O) bir imin (>C=N-) veya azometin grubuyla (-CH=N-) değiştirildiği keton veya aldehit benzeri bileşiklerdir (Abu-Dief ve Mohamed, 2015). Primer aminin aldehit ile reaksiyonu aldimin veya azometin, keton ile

reaksiyonu ketimin veya imin olarak adlandırılır (Berber, 2020). Bu bileşiklerin genel formülü $R_1R_2C=NR_3$ şeklindedir (Şekil 2.8.).



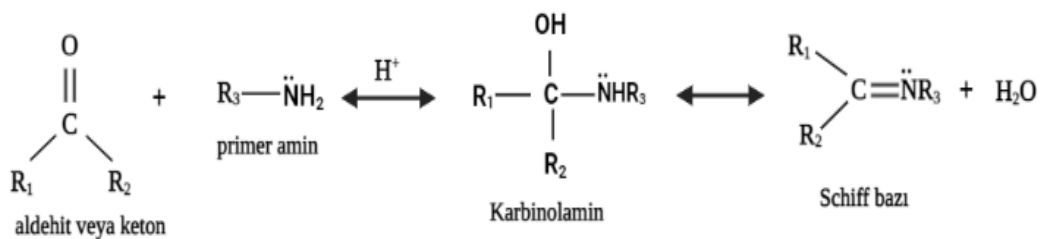
R_1, R_2 =alkil veya aril, $R_3 \neq H$.

Şekil 2.8. Schiff bazının genel yapısı.

Fonksiyonel grup olarak karbon-azot çift bağı ($C=N$) içeren Schiff bazların genel formülünde gösterilen R_1, R_2 ve R_3 yan grupları alkil, aril, sikloalkil veya heteroaril olabilir (Qin vd., 2013). Aril içeren Schiff bazları, alkil içerenlere göre daha kararlıdır ve daha kolay sentezlenir (Cozzi, 2004).

2.4.1. Schiff Bazlarının Sentezi

Schiff bazların sentezi için farklı yöntemler bulunmaktadır. Genellikle kolay sentezlenen Schiff bazlarının klasik sentez yöntemi, azeotropik damıtma koşullarında primer amin ile bir karbonil bileşiğinin kondenzasyon tepkimesine dayanır (Da Silva vd., 2011). Farklı tepkime şartlarında sentezlenebilen Schiff bazları, yaygın olarak organik çözücülerin kullanılmasıyla uygun asidik şartlardaki ısıtma işlemleriyle elde edilir (Cozzi, 2004).



Şekil 2.9. Schiff bazı sentezinin genel gösterimi.

İki adımda gerçekleşen Schiff bazların sentezi, ilk olarak primer aminin nitrojen atomunun elektrofilik karbonil bileşiklerin karbonuna nükleofilik saldırısıyla kararsız karbinolamin ara bileşiği oluşumunu, ikinci adım ise karbinolaminin asit veya baz kataliziyle dehidrasyonu sonucu Schiff bazı oluşumunu içerir. Schiff bazı oluşumu iki yönlü bir reaksiyondur ve reaksiyon hızını karbinolaminin dehidrasyonu belirler (More

vd., 2019). Karbinolamin bir alkol olduğundan asit kataliziyle dehidrasyona uğrar. Bu durum reaksiyonun çözeltinin pH'ından etkilendiğini göstermektedir. Asit konsantrasyonu çok yüksek olursa amin protonlanır ve nükleofilik tepkimeyi başlatamaz. Bu nedenle Schiff bazı sentezi reaksiyon hızının en iyi olduğu hafif asidik pH'ta gerçekleştirilir (Xavier ve Srividhya, 2014). Reaksiyon hızını artırmak için $ZnCl_2$, $TiCl_4$, $MgSO_4$, $CuSO_4$ ve H_2SO_4 gibi Lewis asitleri katalizör olarak kullanılabilir (Chakraborti, Bhagat ve Rudrawar, 2004; Dalpozzo vd., 2006; Liu vd., 1999). Schiff bazları hidrolize karşı dayanıklı olmadıkları için genellikle susuz ortamda hazırlanmalıdır (Xavier ve Srividhya, 2014). Reaksiyon tersine çevrilebilir olduğundan açığa çıkan su molekülü; Dean-Stark aparatı, moleküler elekler veya magnezyum sülfat gibi dehidrasyon ajanları ya da tetrametil ortosilikat ve trimetil ortoformat gibi çözücüler kullanılarak uzaklaştırılabilir (Cozzi, 2004; Look vd., 1995; Love ve Ren, 1993; Westheimer ve Taguchi, 1971).

Aldehitler ile oluşan Schiff baz reaksiyonları ketonlara göre daha kolay gerçekleşmektedir (Xavier ve Srividhya, 2014). Katalizörlerin kullanılması ve reaksiyon karışımından suyun uzaklaştırılması reaksiyon verimini %80-95'e kadar yükseltebilir. Aminlerle reaksiyona giren alifatik ketonlar aldehitlere göre daha yavaş imin oluşturmaktadır ve bu durum reaksiyon süresinin uzamasına neden olur. Aromatik ketonlar ise imin oluşumunda alifatik ketonlara kıyasla daha az reaktiftir ve sert reaksiyon koşulları gerektirir (Qin vd., 2013).

Son zamanlarda imin sentezinde çözücü içermeyen yöntemler de önerilmektedir. Bu yöntemler genellikle daha ucuz, kolay ve çevre kirliliği açısından daha az sorunlu olduğu için önemli avantajlar sağlar (Naeimi, Salimi ve Rabiei, 2006; Van Den Ancker, Cave ve Raston, 2006). Bunlardan biri mikrodalga ısıma yöntemidir. Mikrodalga ısıma yöntemi, reaksiyon hızını artırarak kısa sürede yüksek verim elde edilmesini sağladığı için yaygın olarak kullanılmaktadır (Gopalakrishnan vd., 2007; Grewal vd., 2013).

2.4.2. Schiff Bazları ve Koordinasyon Kimyası

Schiff bazları, yapısal özelliklerinden dolayı koordinasyon kimyasında ligand olarak rol oynar. İlk kez 1933 yılında Pfeiffer tarafından ligand olarak kullanılan Schiff bazları önemli bir organik ligand sınıfıdır (Pfeiffer vd., 1933; Sumrra vd., 2014). Schiff bazı ligandlar (HL), azometin nitrojeni ile metal iyonlarını iyi koordine edebilir ve

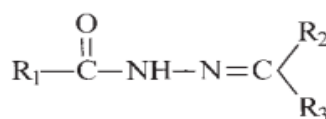
oldukça önemli metal kompleksleri oluşturabilirler (Ghanghas vd., 2021). Azometin nitrojeni üzerinde eşleşmemiş elektronlar bulundurduğu için Schiff bazları elektron verici özelliğe sahiptir ve karakteristik olarak bazıktır. Bu ligandlar, koordinasyon bileşiklerinin oluşumu sırasında metal iyonlarına bir veya daha çok elektron verirler. Geçiş metalleri ile kararlı kompleksler oluşturmak için Schiff bazları ayrıca azometin grubuna yakın bulunan ve yer değiştirebilir hidrojen atomu içeren ikinci bir nükleofilik grup içermelidir. Bu grup hidroksil (-OH), amin (-NH₂) veya tiyol (-SH) grupları olabilir (Subasi, 2023). Azometin grubunun yanında başka bir nükleofilik grup bulunması Schiff bazı ligandlarının koordinasyon yeteneklerini artırır ve kararlı metal komplekslerinin oluşmasını sağlar (Tsantis vd., 2020).

Geçiş metali koordinasyon kimyasında şelatlayıcı ligandlar olarak yer alan Schiff bazlarının çeşitli donör (verici) atomları (O; oksijen, N; nitrojen ve S; kükürt) metal komplekslerinin oluşumunda önemlidir (Ghanghas vd., 2021; Gupta ve Sutar, 2008). Bu donör ligandların ve metal iyonların etkileşimi farklı geometrilerde kompleksler verir ve literatürdeki mevcut bilgiler, bu komplekslerin biyolojik olarak aktif bileşikler olduğunu ortaya koymaktadır. Koordinasyon bileşiklerinin sentezinde ligand olarak kullanılan Schiff bazları kimyacılar tarafından günümüzde de hazırlanmakta olup, aktif ve iyi tasarlanan Schiff bazı ligandları “ayrıcalıklı ligandlar” olarak kabul edilmektedir. Bu ligandlar, çeşitli metalleri oksidasyon durumunda stabilize ederek metal komplekslerinin katalitik dönüşümlerdeki performanslarını kontrol eder (Cozzi, 2004).

Esnek ve farklı yapılara sahip olan Schiff bazları iki dişli, üç dişli, dört dişli veya altı dişli ligandlar olarak görev yaparlar. Bu durum ortak çözücülerdeki kolay sentezleri, güçlü çözünürlükleri, yapısal çeşitlilikleri, manyetik, spektral, redoks ve katalitik özelliklerinden kaynaklanabilir (El-Gammal, Bekheit ve Tahoona, 2015).

En çok çalışılan Schiff bazı ligandlarından biri, Salen tipi ligandlardır. Bu ligandlar, salisilaldehit bileşiklerinin diamin türevleri ile kondenzasyonu sonucu oluşur. Salen tipi ligandlar, merkezi metal katyonunu N, N, O, O donör atomları ile koordine edebilen dört dişli ligandlar sınıfıdır. İki değerlikli geçiş metalleri (örneğin, Cu (II) ve Ni (II) vb.) salen tipi ligandlarla dört koordinasyonlu kompleksler oluşturur. Bunun yanı sıra üç değerlikli geçiş metalleri (örneğin, Co (III), Fe (III) vb.) salen tipi ligandlarla altı koordineli kompleksler de oluşturabilmektedir (Karmakar ve Chattopadhyay, 2019).

Hidrazon fonksiyonel grupları içeren Schiff bazı ligandları da, hem metal iyonlarına karşı farklı koordinasyon modları sergileme hem de çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahip olmalarından dolayı koordinasyon kimyasında yer alan önemli ligandlardır (Bulhac vd., 2017). Hidrazonlar, aldehitlerin veya ketonların hidrazitlerle (-NH₂-NH₂ fonksiyonel grup içeren bileşikler) reaksiyonunda, oksijenin hidrazonun NNH₂ fonksiyonel grubu ile yer değiştirmesiyle oluşan Schiff bazlarıdır. Geçiş metallerini şelatlama özellikleri açısından çok dişli ligandlar olarak davranırlar (Pouralimardan vd., 2007; Szklarzewicz vd., 2020). Bu bileşikler hidrazona bağlı aromatik halkadaki yan gruplar aracılığıyla metal merkezine iki dişli, üç dişli veya dört dişli şekilde koordine olabilirler (Szklarzewicz vd., 2020). Hidrazon ligandları içeren bakır, kobalt ve nikel Schiff bazı komplekslerine fizyolojik ve biyolojik aktivitelerinden dolayı büyük ilgi duyulmaktadır (Cao vd., 2018; Li vd., 2016; Mondal vd., 2016). Özellikle açıl hidrazonların siklik ürünleri anti-bakteriyel, anti-inflamatuar ve anti-tümör gibi geniş uygulamalara sahip heterosiklik bileşikler olduğu bilinmektedir (Chang vd., 2015; Singh vd., 2016). Açıl hidrazonlar, metanol veya etanol çözücülerde asit hidrazidin çeşitli karbonil bileşikleriyle reaksiyonundan sentezlenirler (Singh vd., 2016).



Kaynak: Andjelković, Šumar ve Ivanović-Burmazović, 2001.

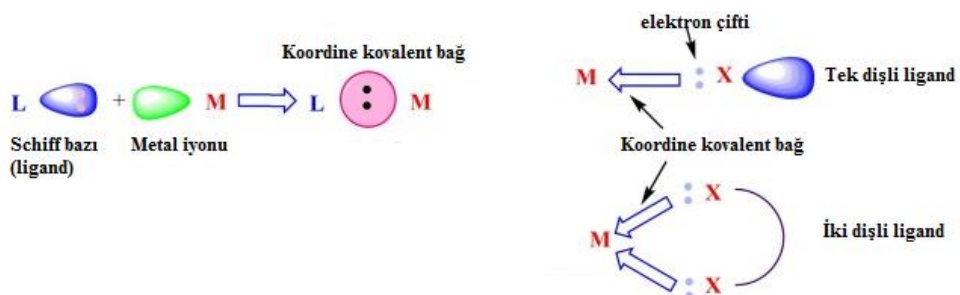
Şekil 2.10. Açıl hidrazonun şematik yapısı.

Sentezlenen hidrazonların yapılarındaki heterosiklik halkanın varlığı farmakolojik özelliklerini genişletmede önemli bir rol oynar (Xu vd., 2017). Ek olarak, biyolojik aktivite, kondenzasyon reaksiyonu sırasında farmakolojik olarak aktif karbonil bileşiklerinin bir hidrazite bağlanmasından etkilenebilir. Bu şekilde sentezlenen açıl hidrazon türevleri, herhangi bir biyoelementin bağlanması için şelatlama maddesi olarak kullanılır. Uygun bir metal ve fonksiyonel karbonil bileşiğinin seçilmesi, başlangıç hidrazit maddesine göre daha yüksek biyolojik aktivite ile sonuçlanabilir (Andjelković, Šumar ve Ivanović-Burmazović, 2001). Açıl hidrazon ligandların biyoaktivitesi, çoklu koordinasyon bölgelerinin varlığına ve organizmaların metabolizmaları için gerekli esansiyel metal iyonları (demir, çinko, bakır gibi) ile kararlı şelatlar oluşturmalarına bağlıdır (P Singh, DP Singh ve VP Singh, 2014).

Son zamanlarda çalışmalar, açıl hidrazon analoglarının merkezi metal atomunun lipofilikliğini artırdığını ve böylece hidrazon komplekslerinin hücre zarı geçirgenliğine yardımcı olan ligandlar olarak rol oynadığını göstermektedir (Aly ve Fathalla, 2020; Yao vd., 2019).

2.4.3. Schiff Bazlarının Metal Kompleksleri

Schiff bazlarının metal kompleksleri ana grup ve geçiş metali koordinasyon kimyasında önemli stereokimyasal modellerdir (Das vd., 2014). Schiff bazlarının metal kompleksleri üç yöntemle sentezlenir. Bu yöntemler; Schiff bazı sentezlendikten sonra uygun bir çözücü içinde metal iyonuyla etkileşimini (Akhter vd., 2017), aldehit, amin ve metal bileşiğinin tek aşamalı bir reaksiyonda etkileşime girmesini (Fernández-G vd., 2001) ve aldehit veya amin metal kompleksini diğeriyle (aldehit veya aminle) reaksiyona sokarak Schiff bazını metal şelat formunda hazırlanmasını (Kim vd., 2004) içerir. Metal komplekslerinin özellikleri kullanılan Schiff bazı ligandların tipine, koordinasyon bölgelerine ve metal iyonlarına göre değişiklik gösterir (Tverdova vd., 2012). Metal iyonunun büyüklüğü, yükü, iyonlaşma potansiyeli ve Schiff bazı ligandlarının nitrojenine bağlı yan gruplar metal komplekslerinin kararlılığında etkili unsurlardır (Subasi, 2023). Geçiş metalleri, özellikle Cu (II), Co (II), Ni (II) ve Zn (II), doğadaki kararlılıkları ve düşük toksisiteleri nedeniyle genellikle Schiff bazı ligandı ile metal komplekslerinin sentezlenmesinde kullanılmaktadır (Pravin ve Raman, 2014).



Kaynak: Ghanghas vd., 2021'den Türkçeleştirilmiştir.

(M: metal iyonu, X: O, N, S).

Şekil 2.11. Schiff bazı metal kompleksinin sentezi.

Schiff bazları ve metal kompleksleri yapısında bulunan donör atomların türüne ve sayısına göre sınıflandırılırlar. Donör atomlar (O, N, S); NN, ON- iki dişli ligandlar, NNN, ONO, NNS, ONS- üç dişli ligandlar ve ONNO, NNNN, NSNO- dört dişli ligandlar ve NNOOSS- altı dişli ligandlar şeklinde bulunabilir (Morgan, El-Sonbati ve Eissa, 2017; Raczuk vd., 2022). Schiff bazı oluşumunda kullanılan karbonil bileşiği ve amin türü

donör atomların tipini etkileyebilir (Dalia vd., 2018). Schiff bazlarının metal kompleksleri farklı şekillerde bulunabilir: Merkezi metal iyonuna bağlı özdeş ligandlar içeren kompleksler homoleptik, farklı ligandlar içeren heteroleptik kompleksler olarak adlandırılır (Dar vd., 2019; Yusof vd., 2020). Schiff bazı metal kompleksi tek bir merkezi metal içeriyorsa monometalik (mononükleer), iki veya daha fazla metal iyonu içeriyorsa polimetalik (polinükleer) olarak adlandırılır (Abdel-Rahman vd., 2016a; Dey vd., 2014; Puzari, Borah ve Das, 2022). Yapılarındaki Schiff bazları simetrik veya asimetrik şekilde bulunabilir. Asimetrik Schiff bazı, farklı koordinasyon modlarını içeren bir, iki veya daha fazla metal merkezine bağlanabilme özelliğine sahiptir (Pouralimardan vd., 2007).

Schiff bazları ve metal kompleksleri çeşitli yapısal özelliklerinden dolayı geniş bir uygulama alanına sahiptirler. Bu kompleksler, iyi bir fotokromik ve termokromik özelliklere sahip olduğundan modern teknolojide optik bilgisayarlar, görüntüleme sistemleri, foto stabilizatörler, güneş filtreleri ve doğrusal olmayan optik davranışları nedeniyle elektronik ve fotonik cihazlarda kullanılmaktadır (Yeap vd., 2003). Ayrıca Schiff bazları ve metal kompleksleri endüstriyel sanayide boyalar, pigmentler ve polimer stabilizatörleri olarak kullanılırlar (Abuamer vd., 2014; Lasri vd., 2018; Sabaa, Mohamed ve Oraby, 2009). Bunların yanında çeşitli kimyasal reaksiyonlarda iyi bir katalizör olarak rol oynadıkları bilinmektedir (Kargar vd., 2021, 2022). Schiff bazlarının farklı metaller için korozyon inhibitörü olarak işlev gördüğü de bildirilmiştir (Abd El-Lateef, Abu-Dief ve El-Gendy, 2015).

Özellikle biyokimyasal, klinik ve farmakolojik olarak çeşitli özelliklere sahip olan Schiff bazı metal kompleksleri son yıllarda tıp alanında büyük gelişmeler göstermektedir (Ghanghas vd., 2021). Tıbbi inorganik kimya alanındaki gelişmeler, metal bazlı ilaçların hazırlanmasını ve çeşitli hastalıkların teşhisi veya tedavisi için metal içeren terapötik ajanların geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (Akhter vd., 2017). Bazı ilaçların, metal kompleksleri olarak uygulanması serbest organik bileşiklerden daha fazla aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Golcu vd., 2005). Yapılarındaki azometin grubunun varlığı, Schiff bazı metal komplekslerinin biyolojik aktivitelerinde önemli rol oynar. Azometin grubundaki nitrojenin eşleşmemiş elektron çiftleri, hücrelerdeki çeşitli biyomoleküllerin aktif merkezleri ile hidrojen bağı oluşturarak normal hücre süreçlerine müdahale eder (Uddin, Ahmed ve Alam, 2020). Schiff bazı içeren metal komplekslerin biyolojik aktivitesi, Schiff bazı ligandlarından daha yüksektir (Karmakar ve Chattopadhyay, 2019;

Soroceanu ve Bargan, 2022). Bu komplekslerin bilinen en önemli biyolojik uygulamaları şunlardır: antibakteriyel (Gaballa vd., 2007; Mohamed, Omar ve Hindy, 2005), anti-inflamatuar (Pontiki, Hadjipavlou-Litina ve Chaviara, 2008), antiviral (Karaküçük-İyidoğan vd., 2011), antifungal (Neelakantan vd., 2008; Raman, Johnson Raja ve Sakthivel, 2009), antitümör (Hajrezaie vd., 2014; Xiao vd., 2022) ve antioksidan (Wang vd., 2007). Bunlara ek olarak, antimalaryal, antitüberküloz, antikonvülsan, analjezik ve antipiretik gibi birçok sayıda biyolojik uygulama alanına sahiptirler (Uddin, Ahmed ve Alam, 2020).

2.4.4. Metal Komplekslerinin Antikanser Aktivitesi

Platin bazlı antikanser ilaçlarının gelişmesi, inorganik metal komplekslerine olan ilgiyi artırmış ve yeni nesil antikanser ilaçlarının geliştirilmesi için zemin oluşturmıştır. Mevcut kemoterapötiklerin ciddi yan etkileri nedeniyle de günümüzde antikanser aktivitelere sahip yeni bileşiklerin araştırılması devam etmektedir. Daha önce de bahsedildiği gibi platin bazlı kemoterapötik ilaçların kanser hücrelerindeki birincil hedefi DNA molekülüdür (Sun vd., 2021). Bu nedenle geçiş metal kompleksleri ve DNA arasındaki etkileşim, kanser tedavisi için yeni terapötik ajanların tasarımında önemlidir (Abdel-Rahman vd., 2014). Geçiş metal kompleksleri genellikle kovalent veya kovalent olmayan etkileşimlerle DNA'ya bağlanabilir. Kovalent bağlanma modu, DNA'nın azotlu bazının veya fosfat grubunun merkezi metal iyonuna bağlanmasını içerir (Indumathy vd., 2008). Sisplatinin DNA'ya kovalent bağlanarak replikasyonu baskıladığı iyi bilinmektedir (Barone vd., 2013). Kovalent olmayan bağlanma modları ise molekülün DNA'nın baz çiftleri arasına girdiği interkalasyonu, DNA'nın büyük veya küçük oluğuna yerleştiği oluk bağlanmayı ve DNA'nın dış yüzeyi boyunca etkileşime girdiği elektrostatik bağlanmayı içerir (Indumathy vd., 2008). Bu bağlanmalar arasında en önemlisi interkalasyondur, çünkü her zaman hücrel bozulmaya yol açar (Dalia vd., 2018).

Metal komplekslerinin DNA ile etkileşimleri, ligand donörünün atom tipi, ligandın koordinasyon geometrisi, hidrofobikliği, spin durumu, redoks potansiyeli ve kompleksler üzerindeki hidrojen bağlama özelliği gibi çeşitli faktörler tarafından yönetilir (Indumathy vd., 2008). Nükleik asitlerin baz ve fosfat omurgası metal iyonunun tipine göre farklı afinite gösterir. Daha önce yapılan bir çalışma DNA'nın fosfat omurgasına göre metal afinitesinin $Mg^{+2} > Co^{+2} > Ni^{+2} > Mn^{+2} > Zn^{+2} > Cd^{+2} > Cu^{+2}$ şeklinde olduğunu

bildirmiştir (Barone vd., 2013). Literatürde Co (II), Ni (II), Zn (II) ve Cu (II) Schiff bazı komplekslerinin DNA ile etkileşimlerini içeren birçok çalışma mevcuttur ve günümüzde de aktif olarak çalışılmaya devam etmektedir (Gökçe, Dilek ve Gup, 2015; Khan vd., 2011). Ayrıca yapılan araştırmalar Schiff bazı geçiş metali komplekslerinin nükleaz aktivitesi gösterdiğini belirtmektedir (Raman, Dhavethu Raja ve Sakthivel, 2007). Yapay metalonükleazlar olarak bilinen geçiş metali kompleksleri nükleik asitlerin oksidatif veya hidrolitik bölünmesine aracılık edebilirler (Cowan, 2001).

Potansiyel antikanser ajanlar olarak Schiff bazı ligandları ve metal komplekslerinin antitümör aktivitelerinin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte karsinom hücrelerinde DNA ile etkileşime girerek heliks yapısının bozulmasını ve mitokondriyal disfonksiyonu indükleyerek hücre ölümünü destekledikleri bilinmektedir (Alfonso-Herrera vd., 2022). Son birkaç yılda Schiff bazı metal komplekslerinin antikanser aktiviteleri önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir. Xiao ve ark. (2017), sentezledikleri iki farklı Schiff bazı ligandına sahip Co (II) komplekslerinin insan cilt kanseri hücrelerinin (A-431, HT-144, SK-MEL-40) büyümesini engellediğini göstermiştir (Xiao vd., 2022). Zhang ve ark. (2012), sentezledikleri geçiş metali koordinasyon komplekslerinin (Cu^{+2} , Zn^{+2} ve Cd^{+2}) insan meme kanseri hücrelerinde (MDA-MB-231) hücresel proliferasyonu engelleyerek apoptozu indüklediğini göstermiştir (Zhang vd., 2012). Hajrezaie ve ark. (2014), Schiff bazı bakır (II) kompleksinin insan kolon kanseri hücrelerinde (HT-29) güçlü antiproliferatif etkiler gösterdiğini, G1 fazındaki hücrelerin apoptoza uğradığını ve ROS üretiminde artışa yol açtığını göstermiştir (Hajrezaie vd., 2014). Abdel-Rahman ve ark. (2016), tarafından yapılan bir çalışmada, potansiyel farmasötik aktivitelerini vurguladıkları Fe (III) ve Cu (II) metalleriyle oluşturulan koordinasyon bileşiklerinin çeşitli kanser hücre hatlarında sitotoksik olarak etkili olduğu gösterilmiştir (Abdel-Rahman vd., 2016a). Bazı Schiff bazı ve metal komplekslerinin lösemi hücrelerinde ilaç direncini tersine çevirdiği ve hücre büyümesini yavaşlattığı bildirilmiştir (Majumder vd., 2006).

2.4.5. Kobalt Metalinin Biyolojik Önemi ve Antikanser İlaç Potansiyeli

Kobalt, periyodik tabloda demir ve nikel arasında yer alan birinci sıra geçiş metalidir. Çeşitli oksidasyon formlarında oluşabilir, en çok Co^{+2} ve Co^{+3} oksidasyon formları bilinmektedir (Kobayashi ve Shimizu, 1999). Çeşitli metabolik işlevlerde rol oynayan kobalt diğer birinci sıra geçiş metallerine göre insan vücudunda ve doğada daha

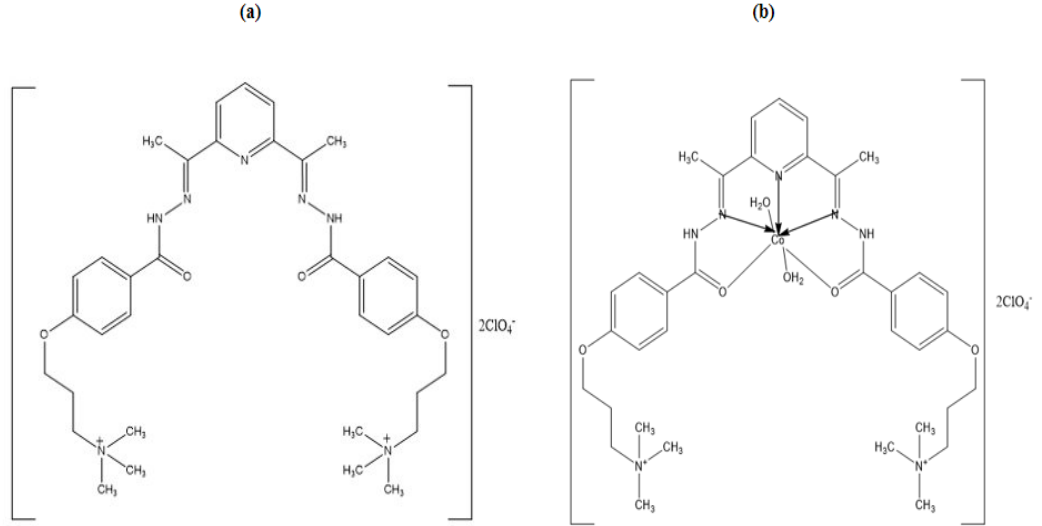
az bulunmaktadır (Okamoto ve Eltis, 2011). Yaşam için gerekli eser metallere biri olan kobalt canlı organizmalarda inorganik ve organik formlarda bulunabilir. Organik formdaki kobalt, DNA sentezini dolaylı olarak düzenleyen B12 vitaminin (kobalamin) önemli bir bileşenidir ve hücresel mitozda koenzim olarak rol oynar. Ayrıca sinir hücrelerinde miyelin kılıfı oluşturmak için bazı aminoasitlerin ve proteinlerin oluşumunda ve organizmanın düzgün çalışması için gerekli nörotransmitterlerin oluşumunda da yer almaktadır (Abdel-Rahman vd., 2014). İyon halindeki inorganik formu ise insan vücudu için toksiktir ve uzun süre depolanması durumunda hücre hasarına neden olabilmektedir. Toksik özelliği, redoks aktivitesiyle ROS oluşumuna yol açması ve metalloenzimlerdeki demirin yerine geçerek süstitüsyonel inert kompleksler oluşturmaktan kaynaklanır (Czarnek, Terpilowska ve Siwicki, 2015; Renfrew vd., 2018). Bununla birlikte hücreler toksik ağır metallerin aksine fazla kobaltı uzaklaştırmak için mekanizmalar geliştirmiştir. Bu nedenle kobalt, insanlar için gerekli olmayan platin gibi metallere daha düşük toksisiteye neden olur (Munteanu ve Suntharalingam, 2015).

Kobaltın, sisplatin gibi metal bazlı kemoterapötik ajanlara kıyasla daha az toksik olması ve *in vivo* uyumluluğu araştırmacıları bu metalin koordinasyon bileşiklerini farmasötik alanda araştırmaya yönlendirmiştir (King vd., 2019; Munteanu ve Suntharalingam, 2015). Kobalt komplekslerin biyolojik aktivitesi ilk olarak 1952’de Dwyer ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Araştırmacılar çalışmalarında Co (III) Schiff bazı kompleksinin farelerde bakteriyosidal aktivite gösterdiğini ve düşük toksisiteye neden olduğunu bulmuştur (Dwyer vd., 1952). Yapılan bu çalışma ile kobalt içeren komplekslerin biyolojik olarak aktif bileşikler olabileceği gösterilmiştir. Bundan dolayı kobalt kompleksleri, ilaç dağıtımı için yapı iskeleleri (O’Neill vd., 2017), potansiyel antikanser ajanlar (Xiao vd., 2017), enzim inhibitörleri (Holbrook vd., 2015) ve antiviral ilaçlar gibi tıbbi uygulamaları araştırılmıştır. Kobalt kompleksleri çok yönlülüğüne rağmen diğer geçiş metali komplekslerle karşılaştırıldığında inorganik ilaçlar olarak detaylı bir şekilde incelenmemiştir (Heffern vd., 2013). Şimdiye kadar klinik denemelere ulaşan tek kobalt bazlı terapötik ajan, ilaca dirençli *herpes simplex virüs 1*’e karşı etkili Co (III) Schiff bazı kompleksi olan Doxovir’dir (Schwartz, Lium ve Silverstein, 2001). Biyoaktif kobalt kompleksleri, terapötik özellikler ortaya çıkarmak için farklı etkiler gösterir. Bunlar; ligand değişimi yoluyla doğrudan biyomoleküller üzerinde etki eden kobalt kompleksleri, biyoaktif ligandların aktivitesini değiştiren kobalt

kompleksleri ve hücre içi redoks ile aktive olan kobalt kompleksleri şeklinde sıralanabilir (Heffern vd., 2013).

Literatürde kobalt komplekslerinin, farklı terapötik etkileri ile antikanser potansiyele sahip oldukları gösterilmiştir. Co (II) ve Co (III) komplekslerinin G/C açısından zengin sekansta DNA'nın küçük oluşuna bağlanabildiği ve yapay nükleazlar gibi davranarak DNA'yı hidrolitik veya oksidatif yolla parçalayabildiği ve sonuçta ROS oluşumunu veya topoizomerazı inhibe ederek apoptozu tetikledikleri bildirilmiştir (Beebe vd., 2020; Massoud vd., 2014). Indumathy ve arkadaşları (2008), kobalt komplekslerin DNA'ya interkalasyon yoluyla bağlanabildiğini ve DNA'yı oksidatif yolla parçalamasından dolayı terapötik uygulamalarda yer bulabileceğini göstermiştir (Indumathy vd., 2008). Ayrıca kobaltın DNA onarımını engelleyerek oksidatif DNA hasarına yol açtığı da gösterilmiştir (Hengstler, 2003). Kobalt komplekslerinin, DNA ile olan etkileşimleri ve mevcut kemoterapötik ajanlardan daha az toksisite göstermeleri kanser tedavisinde reaktif ajan olarak kullanılması umut vaad etmektedir.

Bu tez çalışmasında, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Anorganik Kimya Araştırma Laboratuvarı tarafından sentezi ve karakterizasyonu tamamlanan yapısında katyonik gruplar içeren 2,6-diasetil piridin bis(4-açilhidrazon) Schiff bazı ligandı (H_2L^9) ve bu ligandın yedi koordineli Co (II) geçiş metali kompleksinin antikanser etkileri araştırılmıştır. Metal kompleksinin merkezi Co (II) iyonu, beş dişli hidrazon ligandının N_5O_2 (O, N, N', N, O) azometin nitrojen atomu ve hidroksil grubunun oksijen atomu ile yedi koordinasyonludur ve beşgen-bipiramidal koordinasyon geometrisine sahiptir. 2,6-diasetil piridin bis(4-açilhidrazon) Schiff bazı ligandının Co (II) geçiş metali kompleksinin DNA'ya interkalasyon yoluyla bağlandığı ve güçlü nükleaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Gökçe, Dilek ve Gup, 2015).



(a) Yapısında katyonik gruplar içeren 2,6-diasetil piridin bis(4-açılhidrazon) Schiff bazı ligandı (H_2L^9) ve (b) bu ligandın yedi koordineli Co (II) geçiş metali kompleksinin şematik yapısı.

Şekil 2.12. Sentezlenen bileşikler.

3. YÖNTEM

3.1. Araştırma Modeli

Bu çalışmada, katyonik gruplar içeren 2,6-diasetil piridin bis(4-açilhidrazon) Schiff bazı ligandı (H_2L^9) ve bu ligandın yedi koordineli Co (II) geçiş metali kompleksinin antikanser etkilerini araştırmak amacıyla hücre kültürü, MTT sitotoksosite testi, Anneksin V-FITC/Propidyum İyodür (PI), MMP tayini ve ROS ölçümü yapıldı.

Hücre kültürü, hücrelerin laboratuvar ortamında (*in vitro*) uygun koşullarda büyütülmesini sağlamak için kullanılan bir yöntemdir (Langdon, 2004). Bu çalışmada farklı kanser hücre hatları (HT-29, Caco-2, MDA-MB-231, A549, HepG2, LNCaP) ve sağlıklı hücre hattı (CCD-18Co) üzerine antikanser etkileri araştırılan kimyasal bileşiklerin hücrelere uygulanabilmesi için hücre kültürü ortamında hücrelerin büyütülmesi sağlandı.

Schiff bazı H_2L^9 ligandı, Co (II) kompleksi ve sisplatinin HT-29, Caco-2, MDA-MB-231, A549, HepG2, LNCaP ve CCD-18Co hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek için 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) yöntemi kullanıldı. Bileşiklerin sitotoksisiteyi, pozitif kontrol olarak kullanılan antikanser ilaç sisplatine karşı değerlendirildi. Mosmann (1983), tarafından geliştirilen MTT yöntemi, *in vitro* koşullarda sitotoksisiteyi ölçmek için canlı hücrelerin metabolik aktivitesine dayanan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir (Mosmann, 1983). Sarı renkli tetrazolyum tuzu olan MTT, canlı hücrelerin mitokondrisinde bulunan süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından suda çözünemeyen mavi-mor renkli formazan kristallerine indirgenir. Bu enzim, canlı hücrelerde aktif olduğu için formazan kristallerinin oluşumu canlı hücre sayısı ile doğrudan ilişkilidir (Denizot ve Lang, 1986; Horáková vd., 2001). Formazan kristalleri, dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözünür hale getirilir ve oluşan renk şiddeti belirli dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülerek (Wachsmann ve Lamprecht, 2012) canlı hücrelerin sayısı belirlenir.

Kimyasal bileşiklerin, Caco-2 hücre hattında hücre ölüm şeklini belirlemek için Anneksin V-FITC/PI boyama yöntemi kullanıldı. Bu yöntem, hücrelerin membran bütünlüğü ve geçirgenliğine dayanarak apoptotik hücrelerin saptanmasında yaygın olarak

kullanılan tekniklerden biridir. Apoptozun erken aşamasında, hücrelerin membran asimetrisi kaybolur ve normalde iç yüzeyde bulunan fosfatidilserin (PS) molekülü, hücrenin dış yüzeyine doğru yerleşir. Yeşil floresan etiketli (FITC, floresan izotiyosiyanat) Anneksin-V, PS'ye bağlanarak apoptotik hücrelerin görünür hale gelmesini sağlar. Ancak, Anneksin V-FITC, membran bütünlüğü kaybolan nekrotik hücreleri de boyadığından PI ile birlikte kullanılır. Kırmızı renkli floresan prob PI, membran bütünlüğü tamamen bozulan hücrelerin boyanmasını sağlar. Yalnızca, nekrotik hücrelerin ve apoptozun son aşamasındaki hücrelerin membranı PI geçirgen olduğu için, PI boyaması kullanılarak apoptotik ve nekrotik hücrelerin birbirinden ayırt edilmesi sağlanır (Crowley vd., 2016; Rieger vd., 2011).

Kimyasal bileşiklerin, Caco-2 hücre hattında mitokondriyal membran potansiyelindeki (MMP) değişikliklere ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna etkisini incelemek için MMP tayini ve ROS ölçümü yapıldı. MMP'deki kantitatif değişiklikler, mitokondriyal fonksiyona bağlı olarak incelenmektedir. Mitokondri, hücresel enerjinin oksidatif fosforilasyon aracılığıyla üretilmesinde yer alır (Sakamuru, Attene-Ramos ve Xia, 2016) ve ayrıca ROS üretiminin gerçekleştiği ana bölgedir. Mitokondride oksidatif stresin artması sonucu mitokondriyal membran potansiyeli bozulur ve hücresel ROS üretiminde artış meydana gelir. Apoptozun erken aşamasında görülen MMP kaybı, mitokondriden sitokrom c salınmasını tetikleyerek apoptozun uyarılmasına yol açar. Bu nedenle mitokondrideki morfolojik ve moleküler değişiklikler apoptozun önemli bir aşamasıdır (Rehfeldt, Laufer ve Goettert, 2021). Bununla birlikte artan ROS seviyesi, tüm hücresel biyomoleküllere (lipitler, proteinler, nükleik asitler vb.) zarar verir (Marrocco, Altieri ve Peluso, 2017) ve geri dönüşü olmayan oksidatif hasara neden olarak hücre ölümüne yol açar. Yüksek ROS seviyeleri kanser hücrelerinin ortak bir biyokimyasal özelliğidir. Normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerinde yüksek endojen ROS seviyesi terapötik seçicilik için önemlidir. Farmakolojik olarak aktif bileşikler, kanser hücrelerinde ROS seviyelerini artırarak hücre ölümünü tetikler (Zhu vd., 2014). Bu nedenle, H₂L⁹ ligandı ve Co (II) kompleksi uygulanan Caco-2 kanser hücrelerinde, hücre ölümünün MMP seviyesi kaybından ve ROS üretimindeki artıştan kaynaklı olup olmadığı araştırıldı.

3.2. Araştırma Evren ve Örneklemi/Araştırma Materyali

Tez çalışmasında ticari olarak Avrupa Hücre Kültürleri Koleksiyonundan (ECACC, UK) satın alınan yedi adet insan hücre hattı kullanılmıştır. Kullanılan hücre hatları şu şekildedir:

- Kolon kanseri hücre hatları HT-29 (ECACC 91072201) ve Caco-2 (ECACC 86010202)
- Meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 (ECACC 92020424)
- Prostat kanseri hücre hattı LNCaP (ECACC 89110211)
- Akciğer kanseri hücre hattı A549 (ECACC 86012804)
- Sağlıklı kolon fibroblast hücre hattı CCD-18Co (ECACC 90070503)
- Karaciğer kanseri hücre hattı HepG2 (ECACC 85011430)

Tez çalışmasında antikanser etkileri araştırılan 2,6-diasetilpiridin bis(4-açilhidrazon) Schiff bazı ligandı (H_2L^9) ve bu ligandın yedi koordineli Co (II) kompleksi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Anorganik Kimya Araştırma Laboratuvarı tarafından sentezlenmiştir ve karakterizasyonu yapılmıştır (Gökçe, Dilek ve Gup, 2015).

3.3. Veri Toplama Araçları

Kimyasal bileşiklerin hücreler üzerindeki sitotoksik aktivitesini ölçmek üzere kullanılan MTT sitotoksikite testinin analizi için hazırlanan plakalar, Mikroplaka Okuyucu'da (Molecular Devices, SpectraMax® i3) oluşan renk şiddetine bağlı olarak 540 nm dalga boyunda okutuldu ve absorbans değerleri SoftMax® Pro Yazılımı kullanılarak elde edildi.

Anneksin V-FITC/PI boyaması, MMP tayini ve ROS ölçümünün verileri BD FACSCanto™ II flow sitometri (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) cihazı kullanılarak elde edildi. Flow sitometrisi, solüsyondaki tek hücrelerin sürekli bir akışla lazer ışını kullanılarak floresan ışık sinyallerinin üretilmesi aracılığıyla hücre miktarının ölçülmesine dayanır (McKinnon, 2018).

3.3.1. Araştırmada Kullanılan Cihazlar

- +4 Buzdolabı (Bosch)
- CO₂ İnkübatörü (Thermo Scientific)

- Steril Kabin (Thermo Scientific)
- Hassas Terazı (Shimadzu, TX423L)
- İnverted Mikroskop (Leica DMI3000 B)
- Vortex (Dragon)
- Santrifüj (Nüve, NF 400)
- -20 Derin Dondurucu (AEG)
- Mikroplaka Okuyucu (Molecular Devices, SpectraMax® i3)
- Flow Sitometri (BD FACSCanto™ II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)

3.3.2. Araştırmada Kullanılan Sarf Malzemeler

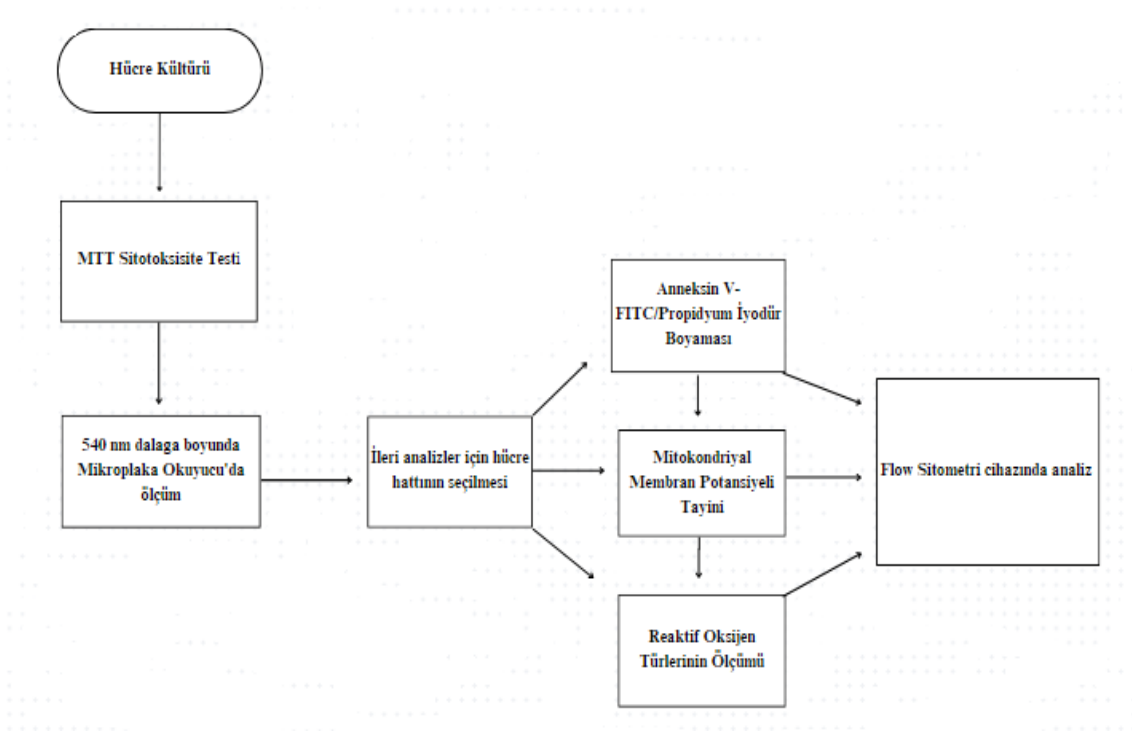
- Sisplatin (Cipintu 10 mg/10 mL)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma D6429)
- Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640) (Sigma R8758)
- Penisilin/Streptomisin (100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin) (Sigma P4333)
- L-Glutamin (Euroclone ECB3004D)
- Fetal Bovin Serum (FBS) (Sigma F7524)
- %0.25 Trypsin-EDTA Solüsyonu (Sigma T4049)
- Fosfat Tamponlu Salin (PBS) (EuroClone ECB4004L)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (MERCK K38436331)
- Tripın Mavisi Solüsyonu (Sigma T8154)
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT tuzu) (Sigma M5655)
- FITC Anneksin V Apoptoz Belirleme Kiti (BD Pharmingen™, 556547)
- ROS Assay Kit (ABP Biosciences, USA, A057)
- Mitokondriyal Membran Potansiyeli Kiti (BD Pharmingen™ MitoStatus TMRE, 564696)
- 6 Kuyucuklu Plaka (Thermo Scientific 130184)
- 96 Kuyucuklu Plaka (Thermo Scientific AB1400W)
- 25 cm²'lik Flask (Thermo Scientific 130189)
- 75 cm²'lik Flask (Biologix 07-8075)
- 1-10 µl'lik pipet uçları (Biologix 20-0010)
- 20-200 µl'lik pipet uçları (Biofil®)
- 100-1000 µl'lik pipet uçları (Biologix 20-1000)
- Pastör Pipetler (Tarsons 940091)

- Serolojik Pipetler (Sorfa Life Science 314100)
- Şarjlı Pipet Pompası (Thermo S1)
- Santrifüj Tüpleri (BIOFIL®)
- Çok Kanallı Otomatik Pipet (Thermo Transferpette® S-8)

3.4. Veri Toplama Süreci

Bu çalışmada tüm veriler *in vitro* laboratuvar ortamından elde edildi.

3.5. Deneysel Kurgu



Şekil. 3.1. Çalışmanın akış diyagramı.

3.5.1. Hücre Kültürü

HT-29, Caco-2, A549, HepG2 ve CCD18Co hücreleri %10 (v/v) ısı ile inaktive edilmiş Fetal Bovin Serum (FBS), %1 Penisilin (100 U/mL)/Streptomisin (100 µg/ml), %1 L-glutamin (292.3 mg/ml) ile zenginleştirilmiş yüksek glukoz içeren DMEM besiyeri içinde, MDA-MB-231 ve LNCaP hücreleri %10 (v/v) ısı ile inaktive edilmiş FBS, %1 Penisilin (100 U/mL)/Streptomisin (100 µg/mL), %1 L-glutamin (292.3 mg/mL) ile zenginleştirilmiş RPMI-1640 besiyeri içinde steril 25 cm²'lik kültür flasklarında 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde kültüre edilerek çoğaltıldı. Kültür flaskı her gün inverted mikroskop altında kontrol edildi ve çoğalan hücreler 25 cm²'lik kültür flaskın yüzeyini tamamen kapladıklarında (konfluent) pasajlama işlemi

yapıldı. Pasajlama için ilk olarak, flask içerisindeki hücrelerin üzerindeki besiyeri pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve hücreleri serumdan arındırmak için flaska 2 mL 1X PBS eklenerek hücrelerin hafifçe yıkanması sağlandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra PBS pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Flask yüzeyine yapışan (adherent) hücreleri yüzeyden ayırmak için tripsinizasyon işlemi uygulandı. Bu işlem için hücrelere 0,5 mL 1X (%0.25'lik) Trypsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek 37°C'de, %5 CO₂'li inkübatörde yaklaşık 3 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, mikroskop altında kültür flaskının yüzeyinden ayrıldığı kontrol edilen hücrelere 5 mL taze besiyeri ortamı eklenerek tripsin etkisiz hale getirildi. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu 15 mL'lik steril falkon tüpe aktarıldı ve 1500 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve hücre pelleti 1 mL uygun taze besiyeri ile homojen olacak şekilde çözdürüldükten sonra üzerlerine 9 mL besiyeri eklendi. 10 mL'lik hücre süspansiyonları 75 cm²'lik kültür flasklarına aktarıldı ve 37°C'de, %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde hücrelerin istenilen sayıya ulaşmaya kadar çoğalmaları sağlandı.

Hücre sayımı

Hücre sayımı için %0.25'lik tripsin-EDTA solüsyonu ile yüzeyden ayrılan hücrelerin santrifüjü yapıldıktan sonra hücre pelleti üzerine uygun hacimde besiyeri eklenmesi sonucu oluşan hücre süspansiyonundan 18 µL alınarak 1.5 mL'lik ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine eşit miktarda %0.5 tripan mavisi eklenerek homojen bir şekilde karışması için hafifçe pipetleme işlemi yapıldı. Bu karışımdan 12 µL alınarak Thoma lamına konuldu ve mikroskop altında hücre sayımı yapıldı. Sayılan hücre sayısı, Formül 3.1'de gösterildiği gibi, sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 mL'deki hücre sayısı bulundu.

$$\text{(Formül 3.1.) } \text{Hücre/mL} = \text{Hücre Sayısı} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 10^4$$

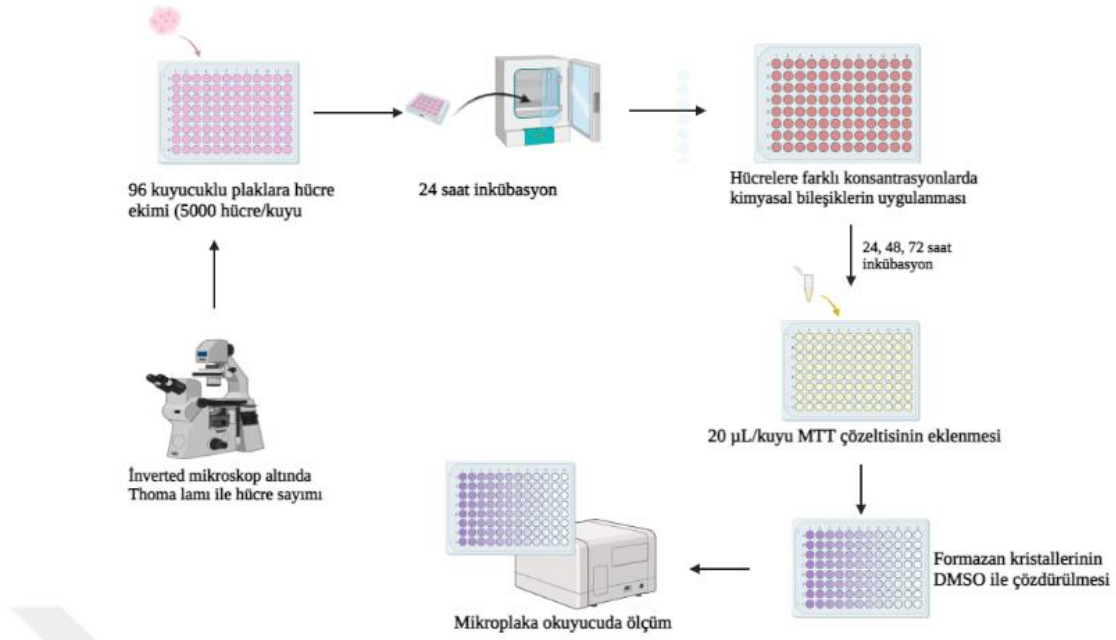
Kullanılan kimyasal bileşiklerin hazırlanması

Schiff bazı H₂L⁹ ligandı ve Co (II) kompleksinden oluşan ana stok çözeltileri (10 mM) dimetilformamid (son konsantrasyonu %0.5'i geçmeyecek şekilde) içinde hazırlandı (Gökçe vd., 2015) ve stok çözeltiler -20°C'de saklandı. Pozitif kontrol olarak kullanılan antikanser bileşik sisplatin 100 mg/100 mL stok konsantrasyonu olacak şekilde alikotlar halinde -20°C'de saklandı. Bileşiklerin, hücrelere sitotoksik etkisini ve ileri analizlerde kullanılacak dozlarını belirlemek için uygun besiyerleri ile seyreltme işlemi yapıldı.

3.5.2. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) Sitotoksosite Testi

Tüm hücreler thoma lamında sayıldıktan sonra MTT testi için, 96 kuyucuklu plakalara 100 μ L besiyeri içinde 5×10^3 hücre/kuyucuk 3 tekrarlı olacak şekilde ekildi ve 24 saat 37 $^{\circ}$ C’de %5 CO₂’li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda hücrelere 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.125 μ M konsantrasyonlarda H₂L⁹ ligandı ve Co (II) kompleksi kuyucuklardaki son hacim 200 μ L olacak şekilde uygulandı. Pozitif kontrol olarak kullanılan sisplatin ise 100-1.5 μ M konsantrasyonlar arasında yedi seri dilüsyon şeklinde plakalara ekilen hücrelere uygulandı. Negatif kontrol grubu için 96 kuyucuklu plakaların son kuyucuklarındaki hücrelere 100 μ L uygun besiyeri eklendi. Hücrelere H₂L⁹ ligandı, Co (II) kompleksi ve sisplatin uygulamasını takiben plakalar 24, 48, 72 saat süreyle 37 $^{\circ}$ C’de %5 CO₂’li inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

Stok MTT çözeltisi (5 mg/mL), steril fosfat tamponu (PBS) içerisinde hazırlandı. İnkübasyon süreleri sonrasında plakalardaki her bir kuyucuğa 20 μ L MTT çözeltisi ilave edildi ve hücreler etüvde 3 saat inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklardaki tüm besiyerleri boşaltıldıktan sonra formazan kristallerini çözündürmek amacıyla her bir kuyucuğa 100 μ L DMSO eklendi ve oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 20 dk bekletildi. Hücrelerde oluşan renk şiddeti Mikroplaka Okuyucu’da (SpectraMax i3) 540 nm dalga boyunda ölçüldü. Ölçüm sonrası okunan absorbans değerleri kullanılarak hücrelerin negatif kontrol grubu %100 canlı kabul edildi ve etken madde uygulanan hücrelerden elde edilen absorbans değerlerine oranlanarak %50 öldüren konsantrasyonları (IC₅₀) hesaplandı. Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil. 3.2. MTT sitotoksosite testinin akış şeması.

3.5.3. Anneksin V-FITC/Propidyum İyodür (PI) Boyama Yöntemi ile Apoptoz Analizi

Schiff bazı H_2L^9 ligandı ve Co (II) kompleksinin Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksitesinden apoptozun sorumlu olup olmadığını araştırmak için apoptoz geçiren hücre popülasyonunu saptamak için, FITC Anneksin V BD Pharmingen™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) apoptoz belirleme kiti kullanıldı. İlk olarak, Caco-2 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara 1.5 mL DMEM besiyerinde 25×10^4 hücre/kuyucuk 3 tekrarlı olacak şekilde ekildi ve 24 saat boyunca $37^\circ C$ 'de %5 CO_2 'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda hücelere, MTT sitotoksosite testi sonucu hesaplanan IC_{50} dozlarında (0, 25, 50, 100 μM) H_2L^9 ligandı ve Co (II) kompleksi son hacim 3 mL olacak şekilde uygulandı ve CO_2 'li inkübatörde 48 saat inkübasyona bırakıldı (negatif kontrol grubuna sadece besiyeri eklenmiştir). İnkübasyon sonrası, kuyucuklardaki hücreler tripsinizasyon ile plakanın yüzeyinden kaldırılarak ayrı falkon tüplere toplandı ve 2000 rpm'de 3 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant kısım atıldı ve hücreler 2 defa soğuk 1X PBS (1 mL) ile 2000 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra PBS uzaklaştırıldı ve hücre pelletleri üzerine 100 μL 1X Annexin V bağlama tamponu eklenerek hücreler yeniden süspanse edildi. Bunun üzerine her bir tüpe 5 μL Anneksin V-FITC eklendi ve tüpler oda sıcaklığında ($25^\circ C$) 15 dk karanlıkta bekletildi. İnkübasyondan sonra tüplere 400 μL 1X bağlama tamponu eklendi ve hücreler flow sitometrisinde incelenmeden hemen önce 5 μL PI ile boyandı. Ardından apoptotik,

nekrotik ve canlı hücre oranları BD FACSCanto™ II flow sitometri cihazında (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) analiz edildi.

3.5.4. Mitokondriyal Membran Potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) Tayini

Hücre apoptozunun erken aşamasında MMP'deki kantitatif değişiklikler, BD Pharmingen™ MitoStatus TMRE (Tetra-metilrodamin etil ester) mitokondriyal membran potansiyeli kiti (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) kullanılarak belirlendi. H_2L^9 ligandı ve Co (II) kompleksinin Caco-2 hücre hattı üzerine MMP analizi için hücreler ilk olarak 6 kuyucuklu plakalara 1.5 mL DMEM besiyerinde 25×10^4 hücre/kuyucuk 3 tekrarlı olacak şekilde ekildi ve 24 saat boyunca $37^\circ C$ 'de %5 CO_2 'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra hücreler MTT sitotoksosite testi ile belirlenen IC_{50} dozlarında (0, 25, 50, 100 μM) H_2L^9 ligandı ve Co (II) kompleksi ile muamele edildi ve $37^\circ C$ 'de %5 CO_2 'li inkübatörde 48 saat inkübasyona bırakıldı (negatif kontrol grubuna sadece besiyeri eklenmiştir). Süre sonunda hücreler tripsinizasyon ile ayrı ayrı falkon tüplere toplandı ve 2000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra hücre pelleti üzerinde 1 mL besiyeri kalacak şekilde süpernatantın bir kısmı atıldı ve üzerine 1 μL floresan boya TMRE (400 nM) eklenerek 30 dk süreyle $37^\circ C$, %5 CO_2 'li inkübatörde inkübe edildi. Ardından 2000 rpm'de 3 dk tekrar santrifüj yapıldı ve daha sonra hücreler 2 defa 1X PBS (1 mL) ile 2000 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek yıkandı. En son santrifüj tamamlandıktan sonra hücre pelletleri üzerine 1'er mL PBS eklenerek hücreler yeniden süspanse edildi. TMRE, kırmızı renkli floresan bir boyadır. Hücreler TMRE ile boyandıktan sonra MMP'deki değişiklikler TMRE'nin floresan ışıma yoğunluğuna göre BD FACSCanto™ II flow sitometri cihazında (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) analiz edildi.

3.5.6. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Ölçümü

Schiff bazı H_2L^9 ligandının ve Co (II) kompleksinin Caco-2 hücrelerinde hücre içi ROS oluşumuna etkisini değerlendirmek ve tespit etmek için ROS test kiti (ABP Biosciences, USA) kullanıldı. ROS test kiti, hücre içi ROS'u tespit etmek için 2',7'-diklorofloresein diasetat (H_2DCFDA) probunu içerir. Bu prob, floresan özellikte değildir ve hücre içine girdikten sonra asetat grupları hücresel esteraazlar tarafından H_2DCF oluşturmak üzere uzaklaştırılır. Reaktif oksijen türleri tarafından H_2DCF 'nin oksidasyonu, floresan özellikteki 2',7'-dikloro-floresein (DCF) verir. ROS ölçümü için Caco-2 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara 1.5 mL besiyerinde 25×10^4 hücre/kuyucuk 3

tekrarlı olacak şekilde ekildi ve 24 saat 37 °C’de %5 CO₂’li inkübatörde inkübe edildi. Daha sonra hücreler ROS üretimini indüklemek için 48 saat boyunca IC₅₀ dozlarında (0, 25, 50, 100 µM) H₂L⁹ ligandı ve Co (II) kompleksi ile muamele edildi. Süre sonunda hücreler tripsinizasyon ile ayrı ayrı falkon tüplere toplandı ve 2000 rpm’de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüplere 1X H₂DCFDA boyama solüsyonundan (10 µM) 100 µL eklenerek hücreler yeniden süspanse hale getirildi. Yavaş bir şekilde pipetleme işlemi yapıldıktan sonra hücreler 37 °C’de 30 dk inkübe edildi. Süre sonunda 2000 rpm’de 3 dk santrifüj yapıldı ve daha sonra hücreler önceden ısıtılmış tamponla (HBSS) üç kez yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra hücrelere önceden ısıtılmış 1 mL besiyeri eklendi ve hücreler esterazların asetat gruplarını hidrolize etmesi ve boyayı oksidasyona duyarlı hale getirmesi için 37 °C’de 20 dk kadar inkübasyona bırakıldı. Canlı hücrelerdeki toplam ROS seviyeleri, 488 nm’de BD FACSCanto™ II flow sitometri cihazında (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) analiz edildi.

3.6. İstatistiksel Analiz

Hücreleri öldüren %50 konsantrasyon değerlerinden (IC₅₀) elde edilen veriler ortalama±standart sapma olarak gösterilmiştir. Gruplar arasındaki farklılık tek yönlü ANOVA ile analiz edildi. Çoklu karşılaştırmalar, Tukey HSD testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak önemli farklılıklar p<0.05 ile doğrulanmıştır. Tüm analizler IBM SPSS Statistics 21.0 paket programı ile gerçekleştirilmiştir.

3.7. Etik Onay

Bu tez çalışmasında etik onay gerekmemektedir.

3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmamızı sınırlandırıcı bir etki bulunmamaktadır

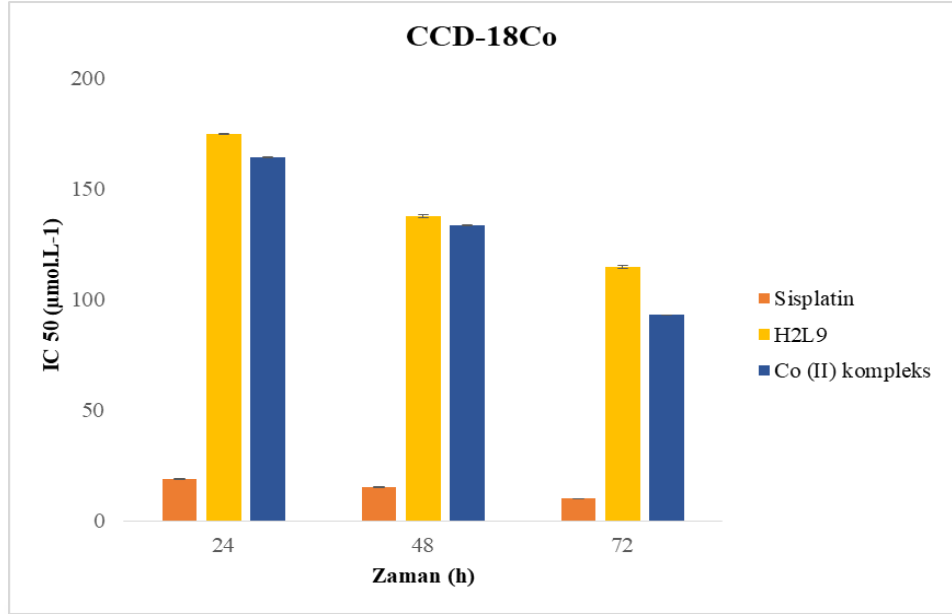
4. BULGULAR

4.1 MTT Testi Bulguları

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Anorganik Kimya Araştırma Laboratuvarı tarafından sentezlenen ve karakterizasyonu yapılan, 2,6-diasetilpiridin bis(4-açilhidrazon) Schiff bazı ligandı (H_2L^9) ve bu ligandın yedi koordineli kobalt (II) içeren geçiş metali kompleksinin 3.125-200 μM arasında değişen konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat muamele edilen HT-29 ve Caco-2 insan kolon kanseri hücreleri, MDA-MB-231 insan meme kanseri hücresi, LNCaP insan prostat kanseri hücresi, A549 insan akciğer kanseri hücresi, HepG2 insan karaciğer kanseri hücresi ve CCD18-Co insan sağlıklı kolon fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlendi ve elde edilen sonuçlar aynı koşullar altında pozitif kontrol olarak kullanılan antikanser ilaç sisplatin (1.5-100 μM) ile karşılaştırıldı. Tüm hücre hatlarında test edilen bileşiklerin, sitotoksik dozlarını belirlemek için MTT testi ile elde edilen verilerden IC_{50} (hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibisyon konsantrasyonları) değerleri hesaplandı (Tablo 4.1).

4.1.1. CCD-18Co Hücre Hattı Üzerindeki MTT Testi Bulguları

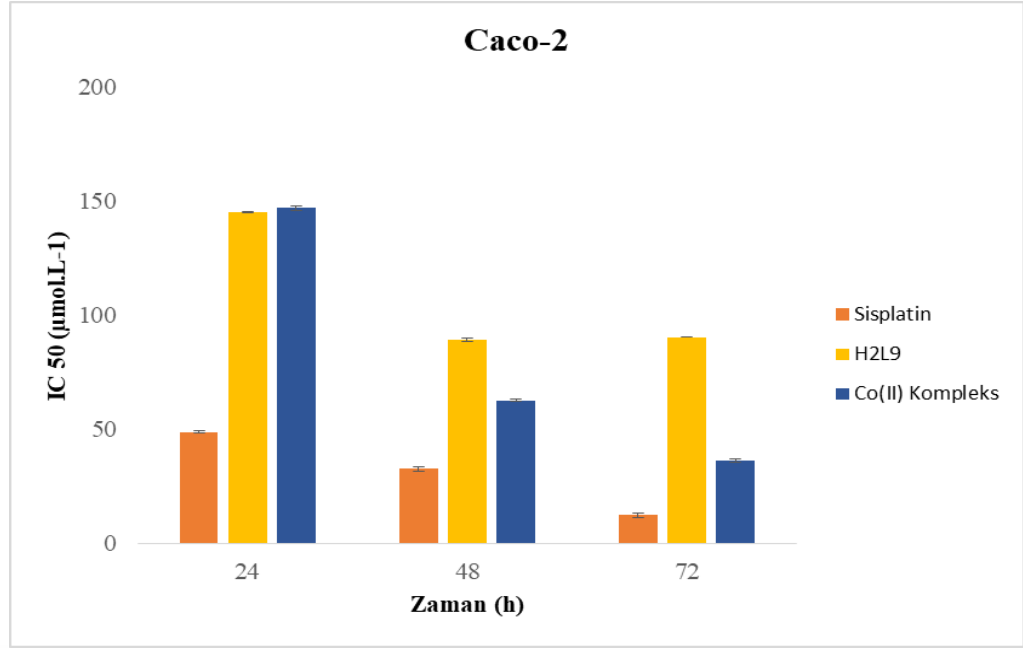
CCD-18Co hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan H_2L^9 ligandının, Co (II) kompleksinin ve sisplatinin sitotoksik IC_{50} dozları Tablo 4.1 ve Şekil 4.1’de gösterilmiştir. H_2L^9 ligandının CCD-18Co hücre hattındaki IC_{50} değerleri sırasıyla 175.08 $\pm$ 0.21; 137.74 $\pm$ 0.56; 114.74 $\pm$ 0.53 μM olarak hesaplandı. Co (II) kompleksinin CCD-18Co hücre hattındaki IC_{50} değerleri sırasıyla 164.42 $\pm$ 0.79; 133.7 $\pm$ 0.58; 93.03 $\pm$ 0.85 μM olarak hesaplandı. Son olarak sisplatinin CCD-18Co hücre hattındaki IC_{50} değerleri sırasıyla 18.69 $\pm$ 0.16; 15.19 $\pm$ 0.07; 10.02 $\pm$ 0.07 μM olarak hesaplandı. Bileşiklerin CCD-18Co hücre hattında IC_{50} değerlerinin zamana ve doza bağlı olarak azaldığı gözlemlendi.



Şekil 4.1. CCD-18Co hücre hattında H₂L⁹, Co (II) kompleksi ve sisplatinin zamana bağlı IC₅₀ değerleri (µM).

4.1.2. Caco-2 Hücre Hattı Üzerindeki MTT Testi Bulguları

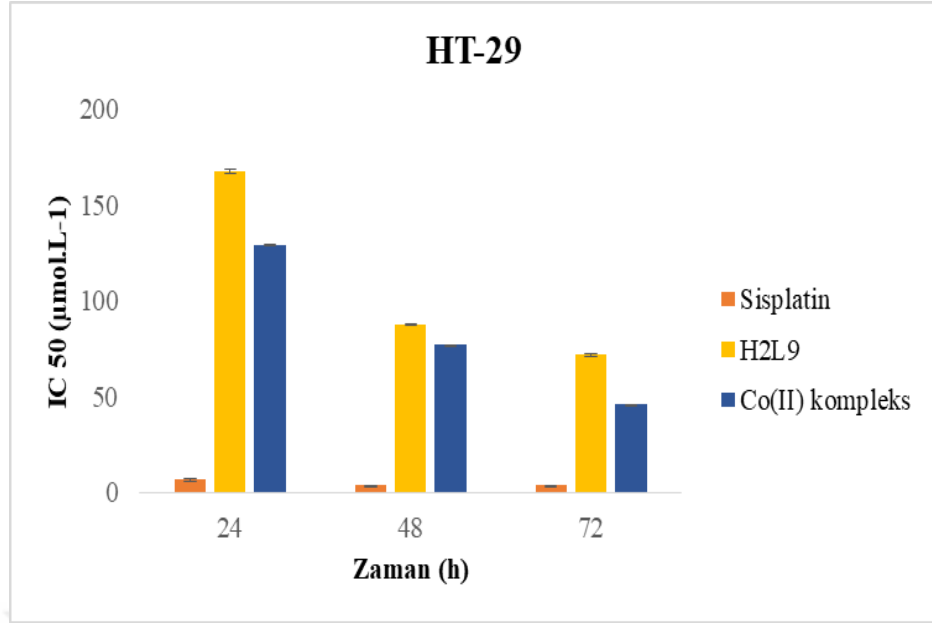
Caco-2 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan H₂L⁹ ligandının, Co (II) kompleksinin ve sisplatinin sitotoksik IC₅₀ dozları Tablo 4.1 ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir. H₂L⁹ ligandının Caco-2 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri sırasıyla 145.31±0.33; 90.45±0.73; 89.24±0.12 µM olarak; Co (II) kompleksinin, Caco-2 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri sırasıyla 147.03±0.85; 62.74±0.54; 36.25±0.69 µM olarak hesaplandı. Sisplatinin, Caco-2 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri sırasıyla 48.92±0.34; 32.69±0.87; 12.5±0.89 µM olarak hesaplandı. Tüm bileşiklerin Caco-2 hücre hattında IC₅₀ değerlerinin zamana ve doza bağlı olarak azaldığı gözlemlendi.



Şekil 4.2. Caco-2 hücre hattında H₂L⁹, Co (II) kompleksi ve sisplatinin zamana bağlı IC₅₀ değerleri (µM).

4.1.3. HT-29 Hücre Hattı Üzerindeki MTT Testi Bulguları

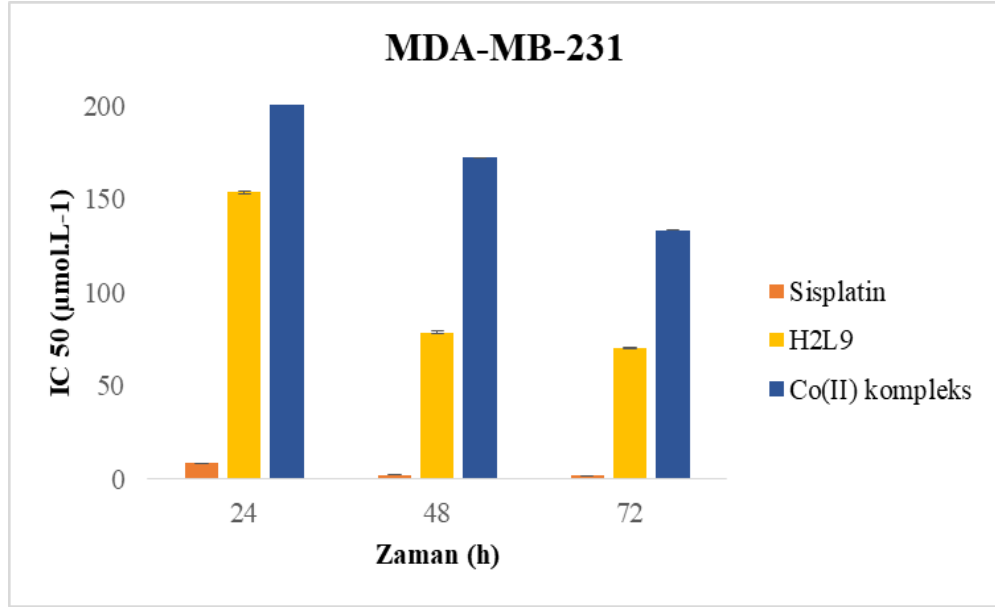
HT-29 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan H₂L⁹ ligandının, Co (II) kompleksinin ve sisplatinin sitotoksik IC₅₀ dozları Tablo 4.1 ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir. H₂L⁹ ligandının, HT-29 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri sırasıyla 167.62±0.76; 87.89±0.31; 71.83±0.85 µM olarak hesaplandı. Co (II) kompleksinin, HT-29 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri sırasıyla 129.26±0.27; 77.14±0.69; 45.88±0.63 µM olarak hesaplandı. Sisplatinin, HT-29 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri sırasıyla 7.02±0.22; 3.68±0.03; 3.64±0.03 µM olarak hesaplandı. Tüm bileşiklerin HT-29 hücre hattında IC₅₀ değerlerinin zamana ve doza bağlı olarak azaldığı gözlemlendi.



Şekil 4.3. HT-29 hücre hattında H₂L⁹, Co (II) kompleksi ve sisplatinin zamana bağlı IC₅₀ değerleri (µM).

4.1.4. MDA-MB-231 Hücre Hattı Üzerindeki MTT Testi Bulguları

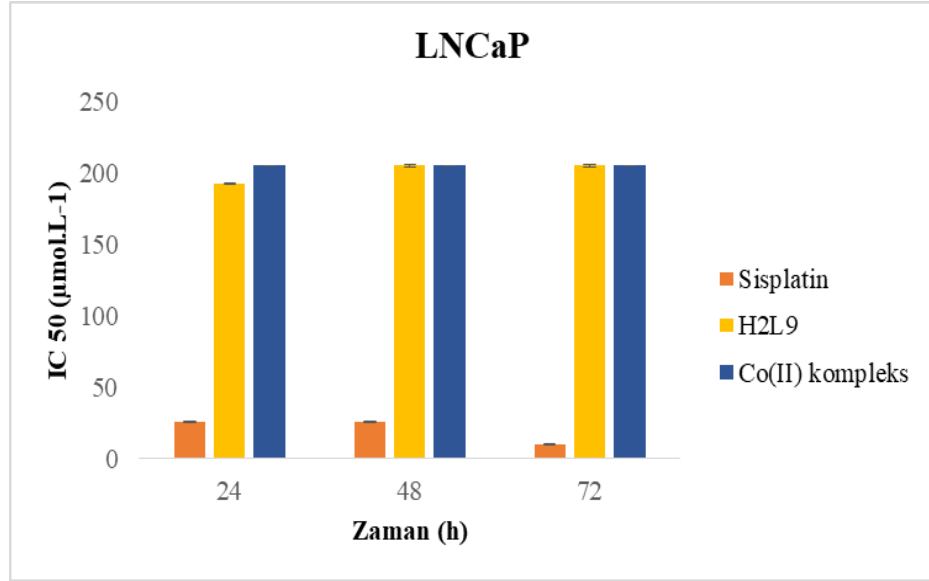
MDA-MB-231 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan H₂L⁹ ligandının, Co (II) kompleksinin ve sisplatinin sitotoksik IC₅₀ dozları Tablo 4.1 ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir. H₂L⁹ ligandının, MDA-MB-231 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri sırasıyla 153.7±0.46; 78.67±0.64; 70.28±0.4 µM olarak hesaplandı. Co (II) kompleksinin, MDA-MB-231 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri sırasıyla >200; 172.22±0.44; 133.52±0.65 µM olarak hesaplandı. Sisplatinin, MDA-MB-231 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri sırasıyla 8.43±0.01; 2.19±0.02; 1.78±0.01 µM olarak hesaplandı. Tüm bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hattında IC₅₀ değerlerinin zamana ve doza bağlı olarak azaldığı gözlemlendi.



Şekil 4.4. MDA-MB-231 hücre hattında H₂L⁹, Co (II) kompleksi ve sisplatinin zamana bağlı IC₅₀ değerleri (µM).

4.1.5. LNCaP Hücre Hattı Üzerindeki MTT Testi Bulguları

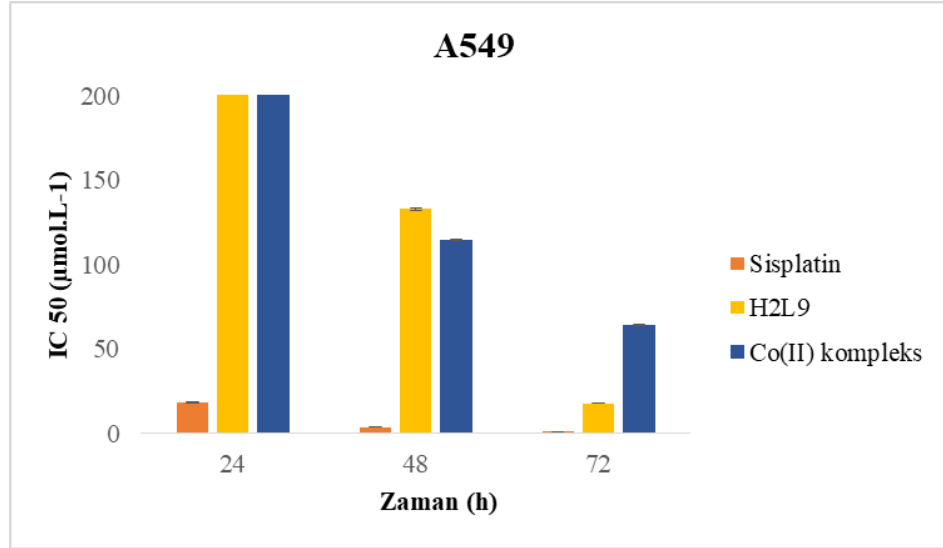
LNCaP hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan H₂L⁹ ligandının, Co (II) kompleksinin ve sisplatinin sitotoksik IC₅₀ dozları Tablo 4.1 ve Şekil 4.5'te gösterilmiştir. H₂L⁹ ligandının ve Co (II) kompleksinin, LNCaP hücre hattındaki IC₅₀ değerlerinin uygulanan doz aralığından (>200 µM) daha yüksek olduğu tespit edildi. Sisplatinin, LNCaP hücre hattındaki IC₅₀ değerleri sırasıyla 26.05±0.58; 25.95±0.48; 10.33±0.28 µM olarak hesaplandı. H₂L⁹ ligandının ve Co (II) kompleksinin LNCaP hücre hattı üzerine sitotoksik etkilerinin 3.125-200 µM doz aralığından daha yüksek olduğu belirlendi. Sisplatinin, LNCaP hücre hattındaki IC₅₀ değerleri zamana ve doza bağlı olarak azaldığı tespit edildi.



Şekil 4.5. LNCaP hücre hattında H₂L⁹, Co (II) kompleksi ve sisplatinin zamana bağlı IC₅₀ değerleri (µM).

4.1.6. A549 Hücre Hattı Üzerindeki MTT Testi Bulguları

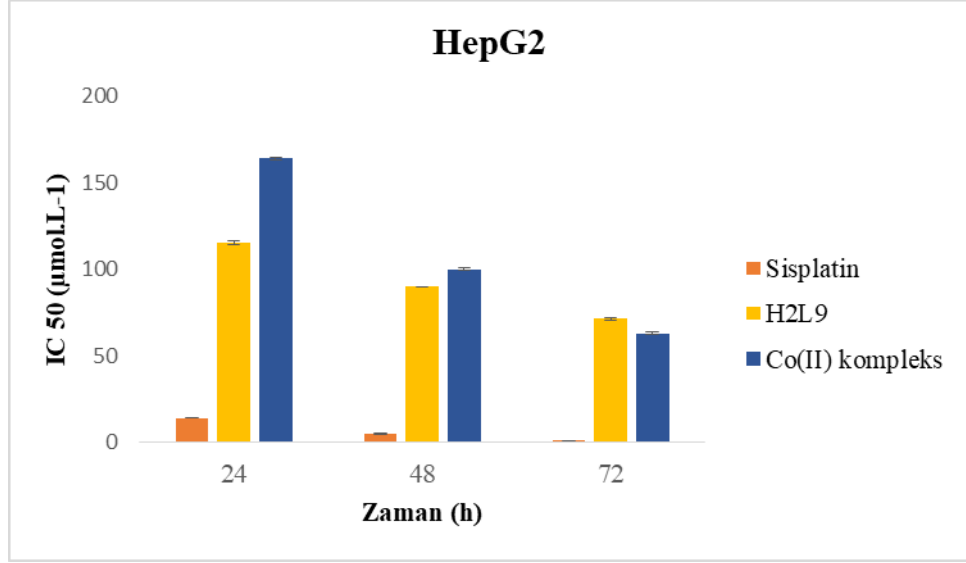
A549 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan H₂L⁹ ligandının, Co (II) kompleksinin ve sisplatinin sitotoksik IC₅₀ dozları Tablo 4.1 ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir. H₂L⁹ ligandının, A549 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri sırasıyla >200; 133.1±0.75; 17.89±0.14 µM olarak hesaplandı. Co (II) kompleksinin, A549 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri sırasıyla >200; 114.7±0.58; 64.11±0.36 µM olarak hesaplandı. Sisplatinin, A549 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri sırasıyla 18.44±0.14; 3.65±0.03; 1.36±0.01 µM olarak hesaplandı. Tüm bileşiklerin A549 hücre hattındaki IC₅₀ değerlerinin zamana ve doza bağlı olarak azaldığı gözlemlendi.



Şekil 4.6. A549 hücre hattında H₂L⁹, Co (II) kompleksi ve sisplatinin zamana bağlı IC₅₀ değerleri (µM).

4.1.7. HepG2 Hücre Hattı Üzerindeki MTT Testi Bulguları

HepG2 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan H₂L⁹ ligandının, Co (II) kompleksinin ve sisplatinin sitotoksik IC₅₀ dozları Tablo 4.1 ve Şekil 4.7’de gösterilmiştir. H₂L⁹ ligandının, HepG2 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri sırasıyla 115.55±0.87; 89.96±0.02; 71.73±0.73 µM olarak hesaplandı. Co (II) kompleksinin HepG2 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri sırasıyla 164.06±0.79; 100.13±0.57; 62.97±0.8 µM olarak hesaplandı. Sisplatinin, HepG2 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri sırasıyla 14.30±0.13; 5.07±0.03; 1.35±0.02 µM olarak hesaplandı. Tüm bileşiklerin HepG2 hücre hattındaki IC₅₀ değerlerinin zamana bağlı olarak azaldığı gözlemlendi.



Şekil 4.7. HepG2 hücre hattında H₂L⁹, Co (II) kompleksi ve sislpatinin zamana bağlı IC₅₀ değerleri (µM)

Tablo 4.1. H₂L⁹ ligandının, Co (II) kompleksinin ve sisplatinin tüm hücre hatlarında 24, 48 ve 72 saat için MTT testi sonuçlarından elde edilen IC₅₀ dozları.

		Hücre Hatları (IC ₅₀ (μM))						
		CCD-18Co	Caco-2	HT-29	MDA-MB-231	LNCaP	A549	HepG2
H ₂ L ⁹	24 h	175.08±0.21	145.31±0.33	167.62±0.76	153.7±0.46	>200	>200	115.55±0.87
	48 h	137.74±0.56	90.45±0.73	87.89±0.31	78.67±0.64	>200	133.1±0.75	89.96±0.02
	72 h	114.74±0.53	89.24±0.12	71.83±0.85	70.28±0.4	>200	17.89±0.14	71.73±0.73
Co(II) Kompleksi	24 h	164.42±0.79	147.03±0.85	129.26±0.27	>200	>200	>200	164.06±0.79
	48 h	133.7±0.58	62.74±0.54	77.14±0.69	172.22±0.44	>200	114.7±0.58	100.13±0.57
	72 h	93.03±0.85	36.25±0.69	45.88±0.63	133.52±0.65	>200	64.11±0.36	62.97±0.8
Sisplatin	24 h	18.69±0.16	48.92±0.34	7.02±0.22	8.43±0.01	26.05±0.58	18.44±0.14	14.30±0.13
	48 h	15.19±0.07	32.69±0.87	3.68±0.03	2.19±0.02	25.95±0.48	3.65±0.03	5.07 ± 0.03
	72 h	10.02±0.07	12.5±0.89	3.64±0.03	1.78±0.01	10.33±0.28	1.36±0.01	1.35 ± 0.02

Bileşiklerin farklı kanser hücrelerine (Caco-2, HT-29, MDA-MB-231, A549, HepG2) karşı seçici etkisini değerlendirmek için sağlıklı hücrelerin (CCD-18Co) IC₅₀ değerleri kanser hücrelerinin IC₅₀ değerlerine oranlanarak sitotoksik seçicilik indeksleri (SI) hesaplandı (Tablo 4.2) H₂L⁹ ligandının, Co (II) kompleksinin ve sisplatinin kanser hücrelerine karşı 48 saat inkübasyon için hesaplanan SI değerleri sırasıyla SI_(CCD-18Co/Caco-2)=1.54, 2.13 ve 0.46 μM; SI_(CCD-18Co/HT-29)=1.56, 1.73 ve 4.12 μM; SI_(CCD-18Co/MDA-MB-231)=1.75, 0.77 ve 6.93 μM; SI_(CCD-18Co/A549)=1.03, 1.16 ve 4.16 μM; SI_(CCD-18Co/HepG2)=1.53, 1.33 ve 2.99 μM olarak bulundu.

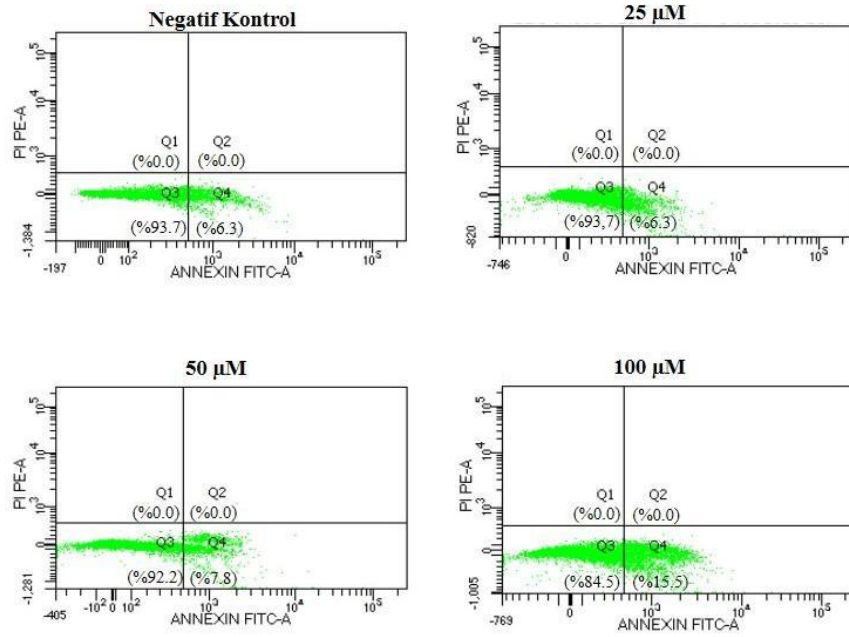
Tablo 4.2. H₂L⁹ ligandının, Co (II) kompleksinin ve sisplatinin 48 saat için hesaplanan sitotoksik seçicilik indeksleri (SI) (μM)

Bileşikler	CCD-18Co/ Caco-2	CCD-18Co/ HT-29	CCD-18Co/ MDA-MB-231	CCD-18Co/ A549	CCD-18Co/ HepG2
H ₂ L ⁹	1.54	1.56	1.75	1.03	1.53
Co (II) kompleksi	2.13	1.73	0.77	1.16	1.33
Sisplatin	0.46	4.12	6.93	4.16	2.99

SI; sitotoksik seçicilik indeksi (normal hücrelerde SI= IC₅₀/ kanser hücrelerinde IC₅₀ olarak ifade edilir.

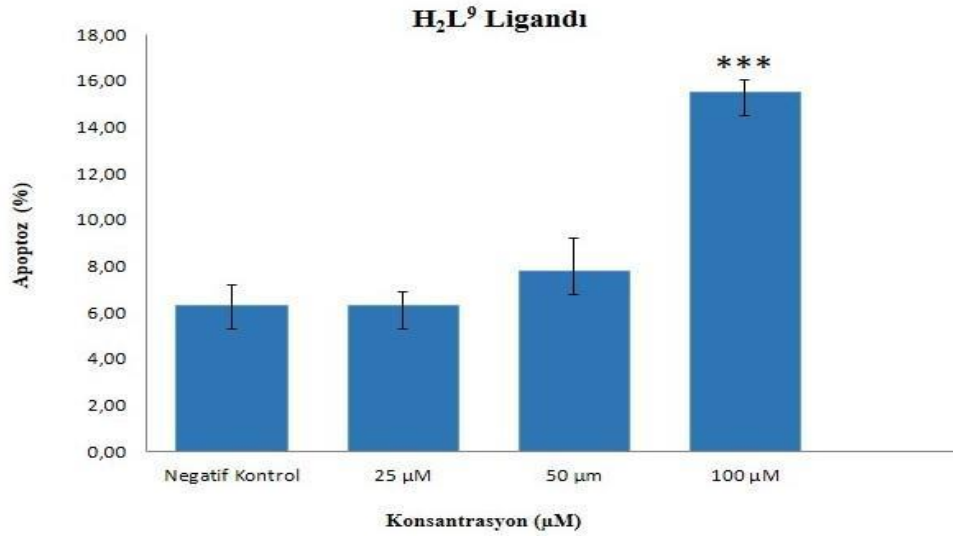
4.2. Anneksin V-FITC/Propidyum İyodür (PI) Yöntemi ile Apoptoz Analizinin Bulguları

Caco-2 hücreleri, IC₅₀ dozlarında (0, 25, 50, 100 μM) H₂L⁹ ligandı ve Co (II) kompleksi ile 48 saat muamele edildikten sonra apoptotik etkileri Anneksin-V/PI boyaması yapılarak flow sitometri cihazında analiz edildi. Elde edilen bulgular, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de verilmiştir. Anneksin V-FITC/PI boyamasının flow sitometri analiz sonuçları, apoptotik Caco-2 hücrelerinin erken apoptozda (kadran Q2) olduğunu gösterdi. Kontrol hücrelerinde %6.30 oranında erken apoptoz (kadran Q4) tespit edildi. H₂L⁹ ligandının 25, 50, 100 μM dozları ile muamele edilen Caco-2 hücrelerinde sırasıyla %6.30, %7.80 ve %15.50 oranında erken apoptoz; Co (II) kompleksi ile muamele edilen Caco-2 hücrelerinde sırasıyla %14.80, %18.20 ve %20.00 oranında erken apoptoz gözlemlendi. Her iki bileşik için de nekroz (Q1) ve geç apoptoz (Q2) gözlemlenmedi (Şekil 4.10.). Apoptoz analizi için n=3 tekrarlı olmak üzere, tek yönlü ANOVA Tukey HSD testi yapıldı. Hücrelere uygulanan H₂L⁹ ligandının 100 μM dozunda diğer gruplara kıyasla apoptoz yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edildi (p<0.001). Co (II) metal kompleksi uygulanan hücrelerde ise negatif kontrole kıyasla tüm dozlarda apoptoz yüzdesinin anlamlı olarak arttığı tespit edildi (p<0.001).



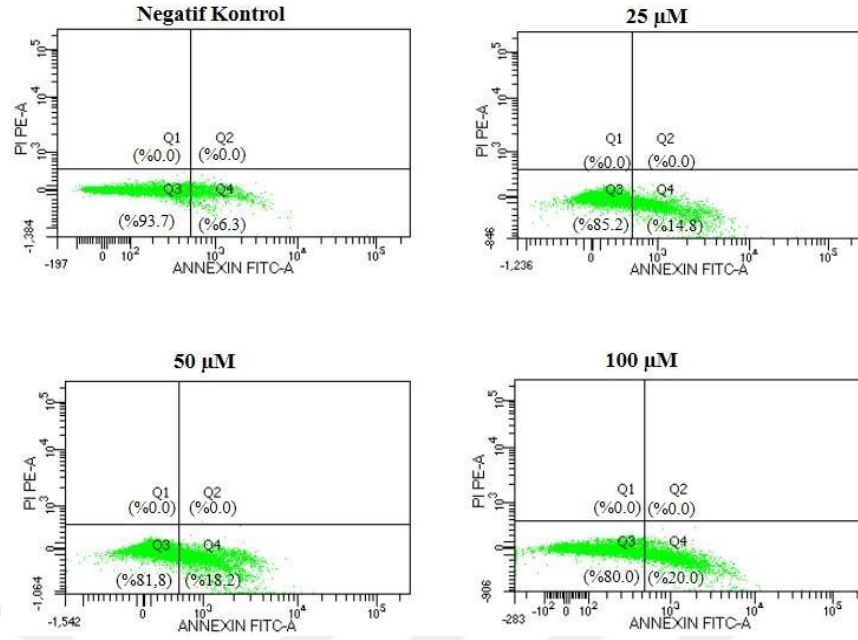
Q3-sol alt kadrant= canlı hücreler; Q1-sol üst kadrant= nekroz geçiren hücreler; Q4-sağ alt kadrant= erken apoptotik hücreler; Q2-sağ üst kadrant= geç apoptotik hücreler.

Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlardaki H₂L⁹ ligandının 48 saat inkübasyon sonrası Caco-2 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin flow sitometri analizi.



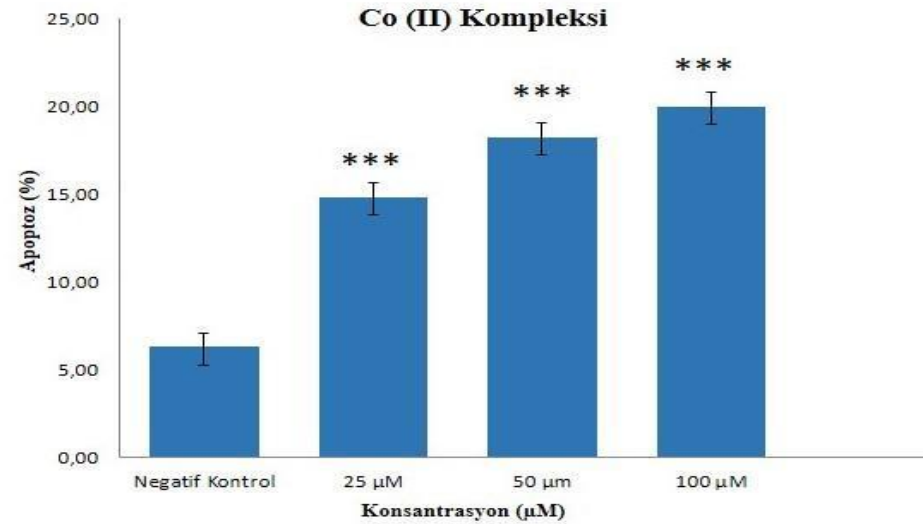
Sonuçlar ortalama±standart hata (n=3) olarak verildi. Tek yönlü ANOVA Tukey HSD testi yapıldı. Veriler, negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldı (**p<0.001).

Şekil 4.9. H₂L⁹ ligandının farklı konsantrasyonlarında apoptotik hücrelerin bar diyagramına göre yüzdeleri (%).



Q3-sol alt kadrant= canlı hücreler; Q1-sol üst kadrant= nekroz geçiren hücreler; Q4-sağ alt kadrant= erken apoptotik hücreler; Q2-sağ üst kadrant= geç apoptotik hücreler.

Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlardaki Co (II) kompleksinin 48 saat inkübasyon sonrası Caco-2 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin flow sitometri analizi.



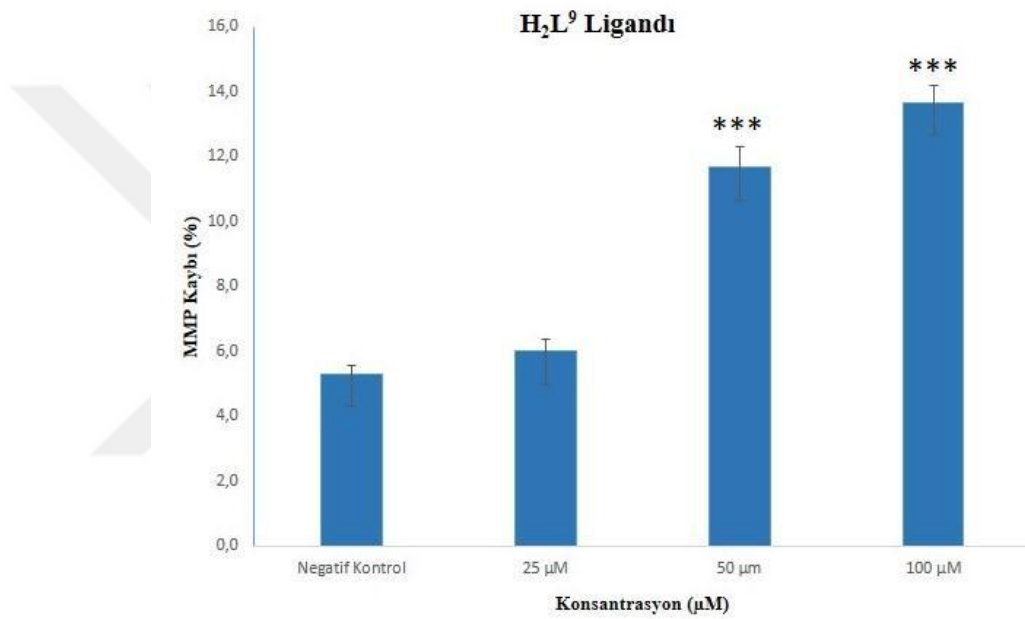
Sonuçlar ortalama±standart hata (n=3) olarak verildi. Tek yönlü ANOVA Tukey HSD testi yapıldı. Veriler, negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldı (***)p<0.001).

Şekil 4.11. Co (II) metal kompleksinin farklı konsantrasyonlarında apoptotik hücrelerin bar diyagramına göre yüzdeleri (%).

4.3. Mitokondriyal Membran Potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) Analizinin Bulguları

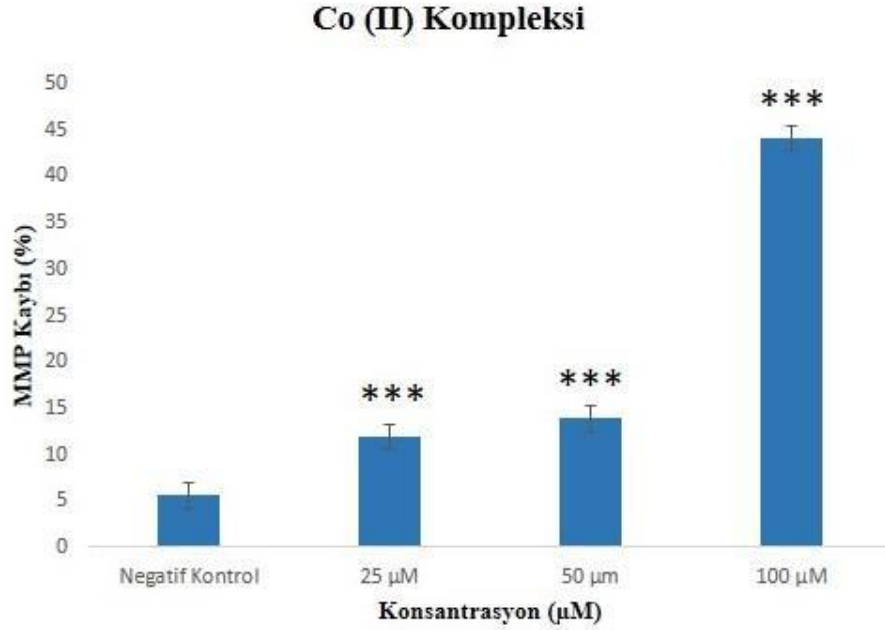
Caco-2 hücreleri, IC₅₀ dozlarında (0, 25, 50, 100 µM) H₂L⁹ ligandı ve Co (II) kompleksi ile 48 saat muamele edildikten sonra hücrelerdeki mitokondriyal membran

potansiyelindeki kantitatif değişiklikler floresan boya TMRE kullanılarak flow sitometri ile analiz edildi. Etken madde uygulanmayan kontrol grubunda (0 μ M) MMP seviyelerinin kaybı %5.56, H_2L^9 ligandının 25, 50, 100 μ M dozları ile muamele edilen hücrelerde sırasıyla %5.93, %11.50 ve %13.10 (Şekil 4.12.), Co (II) kompleksi ile muamele edilen hücrelerde %11.86, %13.86 ve %44.2 (Şekil 4.13.) olarak bulundu. Negatif kontrol grubuna kıyasla, hücrelere uygulanan H_2L^9 ligandının 50 ve 100 μ M dozlarında, MMP kaybı yüzdesinin istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttığı tespit edildi ($p<0.001$). Kobalt (II) kompleksinin 25, 50, 100 μ M dozlarında negatif kontrol grubuna kıyasla MMP kaybı yüzdesinin anlamlı olarak arttığı tespit edildi ($p<0.001$).



Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata (n=3) olarak verildi. Tek yönlü ANOVA Tukey HSD testi yapıldı. Veriler, negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldı (***) $p<0.001$).

Şekil 4.12. H_2L^9 ligandının farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş Caco-2 hücrelerinin MMP seviyeleri kaybının yüzdesi.

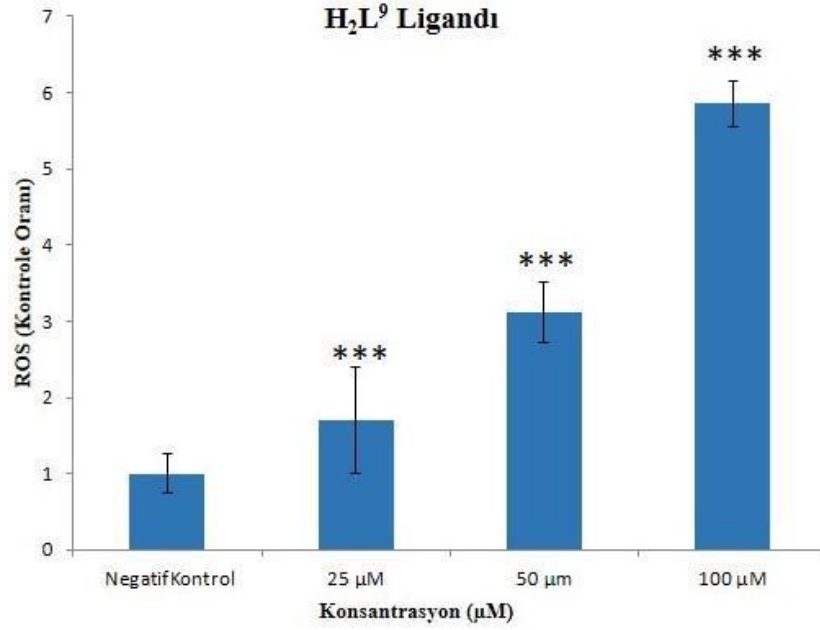


Sonuçlar ortalama±standart hata (n=3) olarak verildi. Tek yönlü ANOVA Tukey HSD testi yapıldı. Veriler, negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldı (***p<0.001).

Şekil 4.13. Co (II) metal kompleksinin farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş Caco-2 hücrelerinin MMP seviyeleri kaybının yüzdesi.

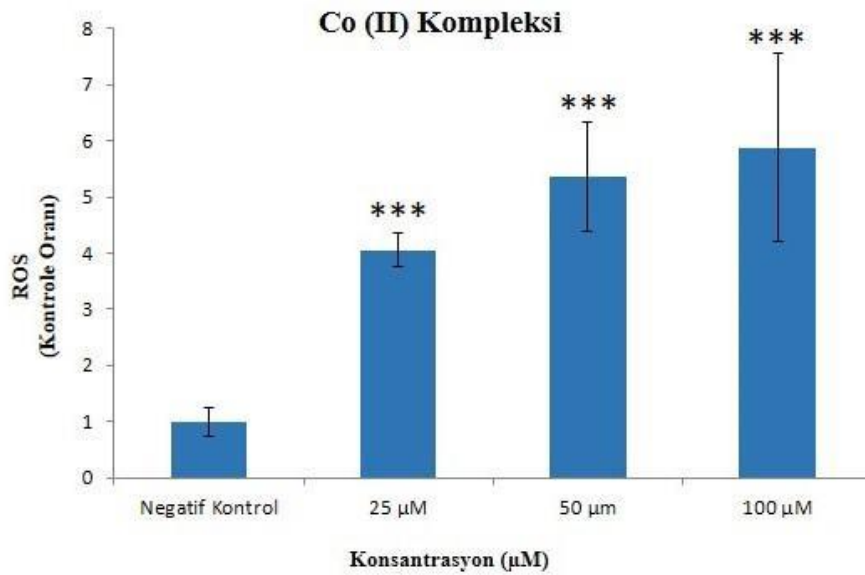
4.4. Reaktif Oksijen Türleri Analizinin Bulguları

Caco-2 hücreleri, IC₅₀ dozlarında (0, 25, 50, 100 µM) H₂L⁹ ligandı ve Co (II) kompleksi ile 48 saat muamele edildikten sonra ROS ölçümü floresan DCF probu kullanılarak flow sitometri cihazında analiz edildi. Elde edilen ROS değerleri, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te gösterilmiştir. Etken madde uygulanmayan kontrol grubunda (0 µM) ortalama ROS değeri %3.60 olarak bulundu. H₂L⁹ ligandının 25, 50, 100 µM dozları ile muamele edilen Caco-2 hücrelerinde ortalama ROS değerleri sırasıyla %6.13, %11.23 ve %21.10 olarak tespit edilirken; Co (II) kompleksinin ROS değerleri sırasıyla %21.10, %27.90 ve %30.60 olarak tespit edildi. Bileşiklerin uygulanan tüm dozlarında ortalama ROS değerleri, negatif kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı tespit edildi ve ayrıca tüm dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu bulundu (p<0.001).



Sonuçlar ortalama±standart hata (n=3) olarak verildi. Tek yönlü ANOVA Tukey HSD testi yapıldı. Veriler, negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldı (**p<0.001).

Şekil 4.14. H₂L⁹ ligandının farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş Caco-2 hücre hattında ROS seviyelerinin negatif kontrole oranı.



Sonuçlar ortalama±standart hata (n=3) olarak verildi. Tek yönlü ANOVA Tukey HSD testi yapıldı. Veriler, negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldı (**p<0.001).

Şekil 4.15. Co (II) metal kompleksinin farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş Caco-2 hücre hattında ROS seviyelerinin negatif kontrole oranı.

5. TARTIŞMA

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve yayılması ile karakterize edilen oldukça karmaşık ve ölümcül bir hastalıktır (Garcia-Oliveira vd., 2021). Tüm dünyada insidansı ve mortalitesi hızla artan kanser, günümüzde insan sağlığı için tehdit oluşturmaya devam etmektedir (Bray vd., 2018; Siegel vd., 2022). Kanser tedavisi için farklı stratejik yaklaşımlar bulunmakla birlikte kanser hastalarının tedavisinde başlıca kemoterapi yöntemi kullanılmaktadır (Liu, 2009; Shumi vd., 2022). Kemoterapi, klinikte kemoterapötik ilaçların kullanılmasıyla hastaların sağkalımını artırmayı ve yaşam kalitesini iyileştirmeyi hedeflemektedir (Liu, 2009). Ancak sispaltin gibi yaygın olarak kullanılan metal bazlı kemoterapötik ilaçların yüksek toksik yan etkileri, ilaç direncinin gelişmesi ve hastalığın tedavi sonrasında metastaz geliştirmesi nedeniyle klinik kullanımları sınırlıdır (Bruijninx ve Sadler, 2008). Bu nedenle düşük toksisiteye ve iyileştirilmiş terapötik özelliklere sahip olan yeni metal bazlı ilaçların keşfedilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Li, Yang ve Wu, 2010; Saygıdeğer Demir vd., 2022).

Özel bir ligand sistemi olan Schiff bazları, geçiş metali iyonlarını koordine ederek kararlı metal kompleksleri oluşturmaları nedeniyle son zamanlarda potansiyel antikanser ajanlar olarak büyük ilgi çekmektedirler (Alorini vd., 2022; Matela, 2020). Metallerin koordinasyon bileşiklerinin özellikleri, ligandların yapısına ve metal iyonuna bağlı donör atomları tarafından belirlenmektedir. Ligandlar, metal komplekslerin lipofilikliğini sağlayarak hedef bölgelere taşınmasında görev alırlar (Yusof vd., 2020). Farmakolojik olarak aktif Schiff bazı ligandlarının antikanser aktiviteleri metallerle koordinasyonu ile artırılmaktadır (Ali vd., 2020). Canlı organizmaların biyolojik hücre içi ortamında temel eser elementlerinden biri olan kobaltın düşük moleküler ağırlıklı olması ve Schiff bazları ile esnek koordinasyon modlarına sahip olması nedeniyle Schiff bazı kobalt kompleksleri, kanser tedavisinde potansiyel antikanser ilaç adayları olarak araştırılmaktadır (Ali vd., 2020; Banerjee vd., 2013; Tyagi vd., 2015).

Kanser tedavisi için birincil hücre içi hedef DNA molekülüdür. Bu nedenle kemoterapötik ajanlar olarak geliştirilecek yeni metal komplekslerinin kanser hücrelerinde DNA ile etkileşimlerinin incelenmesi antikanser aktiviteleri için önemlidir (Abdel-Rahman vd., 2017). Şimdiye kadar farklı Schiff bazı ligandları içeren kobalt

komplekslerinin DNA ile etkileşimleri araştırılmış olup bu komplekslerin DNA'yı etkili bir şekilde bağladığı ve DNA'yı endonükleolitik olarak parçaladıkları bildirilmiştir (Arunadevi vd., 2019; Banerjee vd., 2013; Jiao vd., 2005; Maiti vd., 2020; Rambabu vd., 2020; Shahabadi, Kashanian ve Darabi, 2010). Ayrıca kobalt komplekslerinin reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu yoluyla DNA hasarını indükleyerek antikanser aktivite sergiledikleri gösterilmiştir (Zhang ve Sadler, 2017). Ghosh ve ark. (2013), redoks aktif kobalt komplekslerinin ROS aracılı nükleaz aktivitelerinin arttığını ve bu nedenle oksidatif DNA parçalama aktivitesinde önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir (Ghosh vd., 2013). Daravath ve ark. (2018), sentezledikleri benzotiyazol Schiff bazı ligandı Co (II) kompleksinin, DNA'ya interkalatif mod yoluyla bağlandığı ve ROS'un aracılık ettiği oksidatif DNA parçalanmasına yol açtığını ortaya koymuştur (Daravath vd., 2018).

Biyoaktif Schiff bazı kobalt komplekslerinin, DNA ile etkileşimi, ROS üretimi ve hücre döngüsünü G2-M fazında durdurması yoluyla apoptozu indükleyebileceği gösterilmiştir (Ambika vd., 2019; Dasgupta vd., 2022). Apoptozun indüklenmesi, kanser türüne özgü olmadığı için yeni keşfedilen antikanser bileşiklerin apoptotik etkileri kanser tedavisinde terapötik bir strateji oluşturmaktadır (Pfeffer ve Singh, 2018). Kanser hücrelerini hedef alan yeni antikanser bileşiklerin geliştirilmesi için *in vitro* koşullarda sitotoksik etkilerinin ve apoptotik etkilerinin insan kanser hücre hatları üzerine araştırılması gerekmektedir (Das vd., 2014).

Tez çalışması kapsamında, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Anorganik Kimya Araştırma Laboratuvarı tarafından sentezlenen ve karakterizasyonu tamamlanan, yapısında katyonik gruplar içeren 2,6-diasetil piridin bis(4-açilhidrazon) Schiff bazı ligandının (H_2L^9) ve bu ligandın yedi koordineli kobalt (II) kompleksinin antikanser etkileri araştırılmıştır. Gökçe ve ark. (2015), sentezledikleri Co (II) (2) kompleksinin interkalasyon yoluyla DNA'ya bağlanabildiğini ve oksidatif yolla DNA'yı parçalayabildiğini bildirmiştir (Gökçe, Dilek ve Gup, 2015). Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda öncelikle H_2L^9 ligandının ve yedi koordineli Co (II) kompleksinin doza (200- 3.125 μM) ve zamana (24, 48 ve 72 saat) bağlı olarak sağlıklı (CCD-18Co) ve farklı kanser hücre hatları (HT-29, Caco-2, MDA-MB-231, LNCaP, A549 ve HepG2) üzerine sitotoksik etkileri *in vitro* koşullarda yaygın olarak kullanılan MTT testi ile araştırılmıştır. Pozitif kontrol olarak, geleneksel kemoterapötik ilaç cisplatin (100-1.5 μM) kullanılmıştır. Elde edilen MTT verilerine göre her kimyasal bileşik için

hücrelerin %50 büyümesini engelleyen konsantrasyonları (IC_{50}) 24, 48 ve 72 saat inkübasyon için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Sitotoksik etkinin göstergesi olarak düşük IC_{50} değeri yüksek sitotoksisiteyi, yüksek IC_{50} değeri düşük sitotoksisiteyi göstermektedir (Ulukaya vd., 2008). Buna göre H_2L^9 ligandının, Co (II) kompleksinin ve sisplatinin 24, 48 ve 72 saat için Caco-2, HT-29, MDA-MB-231, A549 ve HepG2 hücre hatları üzerindeki IC_{50} değerlerinin zamana bağlı olarak düştüğü, dolayısıyla sitotoksisitenin arttığı tespit edilmiştir. H_2L^9 ligandının ve Co (II) kompleksinin tüm kanser hücre hatlarındaki IC_{50} değerleri, sisplatinin IC_{50} değerleri ile karşılaştırıldığında daha düşük sitotoksisite gösterdikleri gözlenmiştir. H_2L^9 ligandının, 24 saat inkübasyon sonrası HepG2 kanser hücre hattına ($IC_{50}=115.55\pm0.87 \mu M$), 48 saat inkübasyon sonrası MDA-MB-231 kanser hücre hattına ($IC_{50}=78.67\pm0.64 \mu M$) ve 72 saat inkübasyon sonrası A549 kanser hücre hattına ($IC_{50}=17.89\pm0.14 \mu M$) karşı en yüksek sitotoksik etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir. Co (II) kompleksi, 24 saat inkübasyon sonrası HT-29 kanser hücre hattına ($IC_{50}=129.26\pm0.27 \mu M$) en yüksek sitotoksik etkiyi gösterirken, 48 ve 72 saat için Caco-2 kanser hücre hattında (sırasıyla $IC_{50}=62.74\pm0.54 \mu M$; $IC_{50}=36.25\pm0.69 \mu M$) en yüksek sitotoksik etkiyi göstermiştir. LNCaP kanser hücre hattında H_2L^9 ligandının ve Co (II) kompleksinin tüm inkübasyon süreleri için IC_{50} değerleri $200 \mu M$ 'dan daha yüksek hesaplandığı için LNCaP kanser hücrelerinin etken maddelere karşı dirençli olduğu söylenebilir.

Bileşiklerin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin yanı sıra sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini gözlemlemek için CCD-18Co sağlıklı insan kolon fibroblast hücre hattı ile çalışılmıştır. Bileşiklerin ve sisplatinin CCD-18Co sağlıklı hücre hattı üzerindeki 24, 48 ve 72 saat için hesaplanan IC_{50} değerleri karşılaştırıldığında, sisplatinin H_2L^9 ligandı ve Co (II) kompleksine göre sağlıklı hücelere daha toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuç, sentezlenen bileşiklerin sisplatine kıyasla CCD-18Co sağlıklı hücre hattına daha az zarar verdiğini göstermektedir. Ek olarak, elde edilen IC_{50} değerlerine göre H_2L^9 ligandının CCD-18Co sağlıklı hücreler üzerine Co (II) kompleksine kıyasla daha düşük sitotoksik etki gösterdiği ve daha az zararlı olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeni, Co (II) kompleksinin moleküler ağırlığının H_2L^9 ligandından daha yüksek olmasından kaynaklı olabilir.

Potansiyel kemoterapötik bir ajandan beklentimiz, kanser hücrelerine yüksek sitotoksik etki gösterirken sağlıklı hücelere düşük toksisite göstermesidir. Bundan dolayı H_2L^9 ligandı, Co (II) kompleksi ve sisplatinin 48 saat inkübasyonları sonrasında kanser

hücrelerine karşı seçici etkilerini değerlendirmek için sitotoksik seçicilik indeksleri (SI) hesaplanmıştır. Sitotoksik seçicilik indeksi, sağlıklı hücrelerin (CCD-18Co) IC_{50} değerinin kanser hücrelerinin (Caco-2, HT-29, MDA-MB-231, A549 ve HepG2) IC_{50} değerine oranı şeklinde hesaplanmaktadır. Seçicilik indeksinin yüksek olması aktif bileşiklerin sağlıklı hücrelere kıyasla kanser hücrelerine karşı seçici olarak daha sitotoksik olduğunu göstermektedir (Wu vd., 2019). Seçicilik indeksi >2 ise bileşiğin kemoterapötik olarak değerli olduğu anlamına gelmektedir. Bileşiklerin SI değerleri karşılaştırıldığında HT-29, MDA-MB-231, A549 ve HepG2 hücrelerinde sisplatinin en yüksek sitotoksik seçiciliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık, Caco-2 hücrelerinde H_2L^9 ligandının ve Co (II) kompleksinin SI değerleri sisplatinden sırasıyla 3.3 ve 4.6 kat daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Özellikle Co (II) kompleksinin Caco-2 hücrelerinde SI değeri [$SI_{(CCD-18Co/Caco-2)} = 2.13 \mu M$] 2'den yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç, Co (II) kompleksinin Caco-2 hücrelerinde güçlü antikanser aktiviteye sahip olduğunu ve bunun yanı sıra CCD-18Co sağlıklı kolon hücrelerine daha az zararlı olduğunu göstermektedir. Buna göre, Co (II) kompleksinin Caco-2 hücrelerinde serbest H_2L^9 ligandından ve sisplatinden kemoterapötik olarak daha etkili olduğu söylenebilir. Co (II) kompleksinin Caco-2 hücreleri üzerine yüksek sitotoksik etkisi, H_2L^9 ligandı ile koordinasyon özelliğine bağlı olabilir.

Literatürde farklı Schiff bazı ligandları kullanılarak sentezlenen Co (II) metal komplekslerinin, çeşitli kanser hücre hatları üzerine sitotoksik etkilerini araştıran benzer çalışmalar mevcuttur. Alkış ve ark. (2021), sentezledikleri pirimidin bazlı Schiff bazı ligandı (L) ve bu ligandın Co (II) metal kompleksinin, Caco-2 insan kolon kanseri ve I-929 normal fare fibroblast hücre hatları üzerine *in vitro* sitotoksik etkilerini MTT testi ile incelemişlerdir. Sentezlenen bileşiklerin 24 saat inkübasyonu sonrasında Co (II) metal kompleksinin ($IC_{50} = 609.6 \mu M$) serbest liganda ($IC_{50} = 803.65 \mu M$) kıyasla Caco-2 kanser hücrelerinde daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği ve sağlıklı I-929 fibroblast hücrelerinde ise çok daha düşük sitotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Alkış vd., 2021). Çalışmamızda ise Caco-2 kanser hücreleri üzerine H_2L^9 ligandının ve Co (II) metal kompleksinin 24 saat inkübasyon sonrası eşit oranda sitotoksik etki gösterdiği ve benzer şekilde bileşiklerin CCD-18Co sağlıklı kolon hücrelerine karşı daha düşük sitotoksik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte Alkış ve ark., tarafından yapılan araştırmaya kıyasla çalışmamızda antikanser etkileri incelenen bileşiklerin IC_{50}

değerlerinin ($H_2L^9=145.31 \mu M$; $Co(II)=147.03 \mu M$) çok daha düşük olduğu, dolayısıyla daha yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmektedir.

Martinez-Bulit ve ark. (2015), sentezledikleri Schiff bazı ligandı [2,6-bis(arilimino)piridin] (L) ve bu ligandın yedi koordineli $Co(II)$ kompleksinin, *in vitro* sitotoksik aktivitelerini insan serviks kanseri (HeLa), insan kolon kanseri (HCT-15), insan meme kanseri (MCF-7) ve insan prostat kanseri (PC-3) hücre hatlarında Sülförhodamin B (SRB) testi ile incelemişler ve pozitif kontrol olarak kullanılan sisplatinin sitotoksik etkilerine karşı değerlendirmişlerdir. Bileşiklerin 48 saat inkübasyonu sonrasında IC_{50} değerlerine göre $Co(II)$ kompleksinin aynı koşullar altındaki serbest liganda kıyasla PC-3 ($IC_{50}=99.9 \mu M - 130.2 \mu M$) ve HCT-15 ($IC_{50}=45.6 \mu M - 65.1 \mu M$) kanser hücre hatları üzerinde daha yüksek sitotoksikite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte ligandın ve metal kompleksinin kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik etkilerinin sisplatine kıyasla daha düşük olduğunu göstermişlerdir (Martinez-Bulit vd., 2015). Benzer şekilde çalışmamızda, H_2L^9 ligandının ve $Co(II)$ kompleksinin kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik etkilerinin sisplatine kıyasla daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, $Co(II)$ kompleksi, serbest H_2L^9 ligandına göre en iyi sitotoksik etkilerini insan kolon kanseri hücre hatlarına (Caco-2 ve HT-29) karşı göstermiştir.

Raja ve ark. (2012), sentezledikleri hidrazon Schiff bazı ligandı [2-okso-1,2-dihidrokinolin-3-karbaldehit (izonikotinik) hidrazon] (H_2L) ve bu ligandın $Co(II)$ kompleksinin interkalasyon yoluyla DNA'ya bağlandığını tespit ettikten sonra bileşiklerin, insan karaciğer karsinoma hücre hattı (HepG2), insan gırtlak kanseri hücre hattı (HEp-2), insan servikal kanseri hücre hattı (HeLa), insan deri kanseri hücre hattı (A431) ve normal fare embriyonik fibroblast hücre hattı (NIH 3T3) üzerine *in vitro* sitotoksikite çalışmalarını MTT testi ile araştırmışlardır. Bileşiklerin sitotoksik etkileri, sisplatin ile karşılaştırarak değerlendirmişlerdir. Sentezledikleri $Co(II)$ kompleksinin 48 saat inkübasyonu sonrasında HeLa, HEp-2 ve HepG2 kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin neredeyse sisplatinin etkisine eşit olduğunu tespit etmişlerdir. $Co(II)$ kompleksinin HepG2 kanser hücre hattına karşı sitotoksik aktivitesinin ($IC_{50}=3.35\pm0.18 \mu M$) sisplatine göre ($IC_{50}=11.9\pm0.7 \mu M$) daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca $Co(II)$ kompleksinin ($IC_{50}>350 \mu M$) normal hücre hattı NIH 3T3'e karşı sisplatine ($IC_{50}=198\pm11 \mu M$) kıyasla daha az toksik olduğunu tespit etmişlerdir (Raja, Bhuvanesh

ve Natarajan, 2012). Benzer şekilde çalışmamızda, H_2L^9 ligandı içeren Co (II) kompleksinin CCD-18Co sağlıklı hücre hattı üzerine sisplatine kıyasla daha az toksik olduğu ve bileşiklerin sağlıklı hücreye kıyasla kanser hücrelerinde daha yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir.

Revathi ve ark. (2016), yeni bir Schiff bazı ligandı [2-(4,6-dimetilpirimidin-2-ylimino)metil]-4-nitrofenol] (HL) ve bu ligandın Co (II) metal kompleksini sentezlemişler ve kompleksin DNA'ya oluk bağlama modu ile bağlandığını göstermişlerdir. Bunun üzerine sentezledikleri bileşiklerin sitotoksik etkilerini insan meme kanseri hücre hattı (MCF-7), insan servikal kanseri hücre hattı (HeLa), insan gırtlak kanseri hücre hattı (HEp2) ve normal insan dermal fibroblast hücre hattı (NHDF) üzerine MTT testi ile araştırmışlardır. Bileşiklerin hücreler üzerindeki 72 saat inkübasyonu sonrasında IC_{50} değerleri karşılaştırıldığında tüm kanser hücre hatlarında Co (II) kompleksinin, serbest Schiff bazı ligandına göre daha güçlü sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte, Co (II) kompleksinin NHDF normal hücrelerine karşı liganda kıyasla daha az toksik olduğunu tespit etmişlerdir (Revathi vd., 2017). Revathi ve ark., tarafından yapılan çalışmadan farklı olarak, çalışmamızda incelenen bileşiklerin IC_{50} değerleri karşılaştırıldığında 72 saat inkübasyon sonrasında en yüksek sitotoksik etkiyi H_2L^9 ligandının (A549, $IC_{50}= 17.89\pm0.14 \mu M$) gösterdiği görülmektedir. Ancak sitotoksik seçicilik indeksine göre Co (II) kompleksinin, kemoterapötik bir bileşikten beklenildiği gibi, sağlıklı hücrelere kıyasla Caco-2 kanser hücrelerine daha fazla sitotoksik olmasından dolayı serbest liganda oranla daha iyi antikanser aktiviteye sahip olduğu söylenebilir.

Patil ve ark. (2022), sentezledikleri hidrazon Schiff bazı ligandı [(E)-N'-(2,5-dimetoksibenziliden)-2-hidroksibenzohidrazit] (HY) ve bu ligandın Co (II) metal kompleksinin *in vitro* antikanser aktivitelerini insan meme kanseri (MCF-7) ve insan servikal kanseri (HeLa) hücre hatlarına karşı MTT testi ile araştırmışlardır ve sisplatine karşı değerlendirmişlerdir. Her iki hücre hattı için Co (II) kompleksinin serbest liganda kıyasla daha yüksek antikanser aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca kompleksin hücreler üzerindeki antikanser aktivitesinin sisplatine çok yakın olduğunu bildirilmişlerdir (Patil vd., 2022).

Devi ve ark. (2021), sentezledikleri hidrazon ligandları (HL¹-HL⁴) ve bu ligandların Co (II) komplekslerinin (5), (9), (13), (17) sitotoksik etkisini, insan akciğer kanser hücre hattı (A549), prostat kanser hücre hattı (DU145) ve kolorektal kanser hücre hattı (SW620) üzerine MTT testi ile araştırmışlar ve standart antikanser ilaç paklitaksel etkilerine karşı değerlendirmişlerdir. Sentezlenen tüm kobalt komplekslerinin antikanser aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, kompleks (17)'nin üç kanser hücre hattına karşı (<30 µM) en iyi aktivite gösterdiğini tespit etmişler, bunun yanı sıra kompleks (5) ve (9)'un aktivitesinin A549 hücre hattına karşı (<30 µM) daha iyi olduğunu bulmuşlardır. Kompleks (13)'ün ise orta derece aktivite gösterdiği bulunmuştur. Tüm komplekslerin sentezlenen ligandlara kıyasla daha yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir ve ligandların, antikanser aktivitesi için metal kompleksinin gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmamıza benzer şekilde sentezlenen bileşiklerin IC₅₀ değerleri standart ilaç paklitaksel'e kıyasla daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir (Devi vd., 2022).

Yapılan in vitro sitotoksisite çalışmaları, Co (II) metal komplekslerinin serbest Schiff bazı ligandlarına kıyasla farklı kanser hücre hatları üzerine daha yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum, komplekslerdeki merkezi kobalt metalinin koordinasyon gücünün antikanser aktivite üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir. Araştırmacılar bunun nedenini, merkezi metal atomunun ligandlarla şelasyonu ile lipofilik doğasını arttırdığı ve hücre zarının lipid tabakası boyunca komplekslerin geçirgenliğini destekleyen metal iyon yükünün azalmasından kaynaklı olabileceğini bildirmişlerdir (Joseyphus ve Nair, 2010; Vamsikrishna vd., 2020). Tez çalışmasında hem H₂L⁹ ligandı hem de Co (II) kompleksinin farklı kanser hücreleri üzerine sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte SI değerlerine göre, yapılan çalışmalarla uyumlu olarak, Caco-2 kanser hücrelerinde Co (II) kompleksinin serbest H₂L⁹ ligandından ve cisplatinden çok daha yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Bu nedenle ileri antikanser aktivite çalışmalarına Caco-2 hücreleri ile devam edilmiştir.

Schiff bazı H₂L⁹ ligandı ve Co (II) metal kompleksinin Caco-2 kanser hücre hattı üzerine olan sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla Anneksin V-FITC/PI boyaması, MMP analizi ve ROS ölçümü yapılmıştır.

Anneksin V, apoptoz sırasında hücre zarının dış yüzeyine yerleşen negatif yüklü fosfotidilserin molekülüne bağlanarak apoptotik hücreleri erken aşamada tespit etmek için kullanılan yaygın bir yöntemdir. Apoptotik hücreleri saptamak için Anneksin-V, floresan bir ışığa veren FITC maddesi ile etiketlenir ve hücre boyamasının analizi flow sitometrisi ile gerçekleştirilir. Anneksin V-FITC konjugatı, nekroz geçiren hücrelere de bağlanabildiğinden apoptotik ve nekrotik hücreleri ayırt etmek için propidyum iyodür (PI) boyaması da yapılır. Propidyum iyodür, yalnızca ölü hücreleri boyayabilir. Bu nedenle Anneksin V-FITC boyaması ile erken apoptotik hücreler tespit edilirken, PI boyaması ile geç apoptotik ve nekrotik hücreler tespit edilmektedir (Brumatti, Sheridan ve Martin, 2008). Bu tez çalışmasında, Caco-2 hücrelerinin IC_{50} dozlarında (25, 50 ve 100 μM) H_2L^9 ligandı ve Co (II) kompleksi ile 48 saat muamele edildikten sonra sitotoksik hücre ölüm modu, Anneksin V-FITC/PI boyama yöntemi ile flow sitometride araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, Caco-2 hücrelerinin Anneksin V-FITC pozitif/PI negatif boyanması üzerine test edilen bileşiklerin sitotoksik etkilerinin erken apoptozdan kaynaklandığı tespit edilmiştir. Flow sitometri analizi sonuçları, Caco-2 hücreleri üzerine uygulanan tüm bileşiklerin doza bağımlı bir şekilde apoptozu indüklediğini göstermektedir. Test edilen bileşiklerin apoptoz yüzdeleri karşılaştırıldığında, en yüksek apoptotik etkinin 100 μM konsantrasyonda Co (II) kompleksi ile muamele edilen Caco-2 hücrelerinde (%20.00) olduğu tespit edilmiştir. Negatif kontrol grubuna göre (%6.30), Co (II) kompleksinin 25, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarında apoptoz yüzdesinin anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte H_2L^9 ligandının Caco-2 hücrelerinde negatif kontrol grubuna (%6.30) kıyasla en yüksek konsantrasyonda (%15.50) apoptoz yüzdesinin anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Her iki bileşiğinde Caco-2 hücrelerinde apoptozu indüklediği, bunun yanı sıra Co (II) kompleksinin apoptotik etkisinin serbest liganda kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Mahdy ve ark. (2022), insan meme kanseri hücre hattı (MCF-7) üzerinde sentezledikleri imidazol bazlı Schiff bazı ligandı Co (II) metal kompleksinin (CoL3) hücre ölüm modunu 48 saatlik inkübasyon sonrasında Anneksin V-FITC/PI yöntemi ile flow sitometrisinde araştırmışlardır. CoL3 kompleksinin ($IC_{50}=0,90\pm0,05 \mu g/mL$) MCF-7 hücrelerinde apoptotik hücre popülasyonunu arttırdığı bildirilmiştir. Erken apoptoz oranları, kontrol grubuna kıyasla % 0.66'dan CoL3 kompleksi ile tedavi edilen grupta % 4.33'e yükseldiği, geç apoptoz oranının ise % 0.14'ten % 23.18'e yükseldiği

gösterilmiştir (Mahdy vd., 2022). Bu çalışma MCF-7 hücrelerinin daha çok geç apoptotik evrede olduğunu gösterirken, çalışmamızda farklı olarak Caco-2 hücrelerinin erken apoptotik evrede olduğu belirlenmiştir.

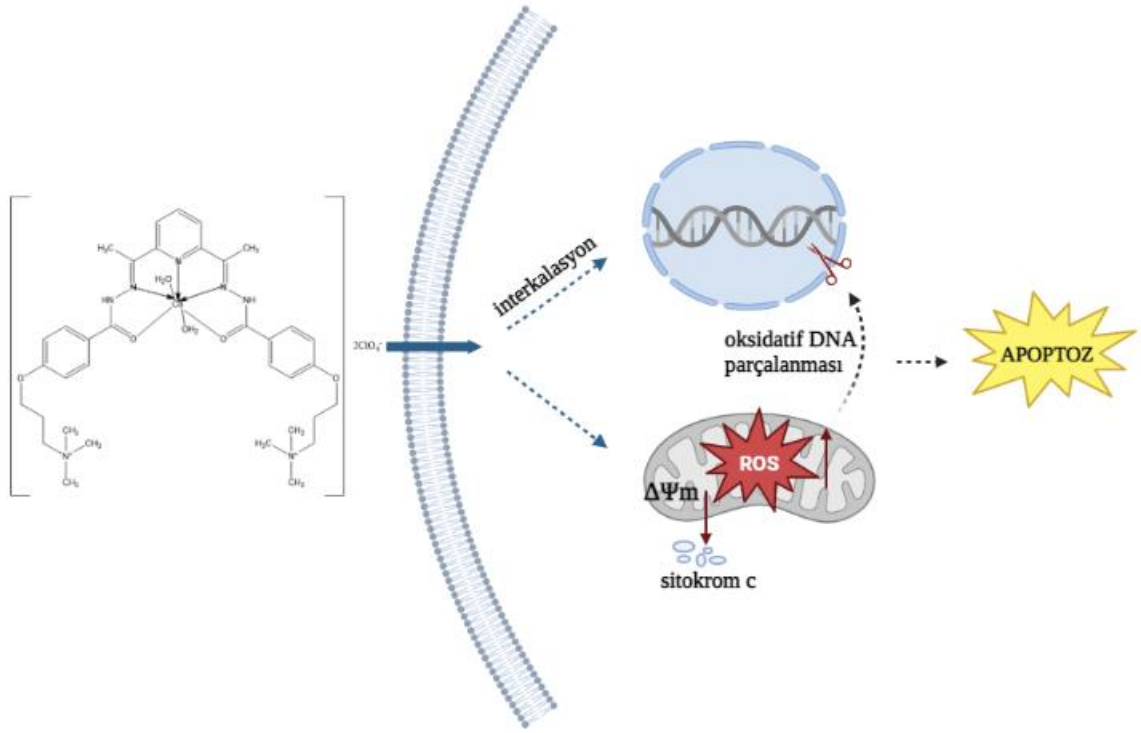
Qi ve ark. (2019), sentezledikleri yeni Schiff bazı ligandı Co (II) metal kompleksinin, insan mide kanseri hücre hattı (MGC-803) üzerine 24 saat inkübasyonu sonrasında apoptotik etkisini Anneksin V-FITC/PI boyama yöntemi ile flow sitometrisinde analiz etmişlerdir. Flow sitometri sonuçları ile Co (II) kompleksinin MGC-803 hücrelerinde apoptozu indükleyemediği gösterilmiştir (Qi vd., 2019). Bu çalışmadan farklı olarak, çalışmamızın sonuçları H_2L^9 ligandı içeren Co (II) kompleksinin Caco-2 hücrelerinde apoptozu indüklediği gözlenmiştir.

Caco-2 kanser hücrelerinde hücre ölümünü yöneten apoptotik mekanizmayı daha fazla doğrulamak için MMP ve ROS ölçümü flow sitometrisinde analiz edilmiştir. Mitokondriyal membran potansiyeli, hücre ölümünün bir belirteci olarak kullanılır ve mitokondriyal fonksiyon için önemlidir (Morcelli vd., 2016). Aşırı ROS, mitokondriyal membran geçirgenliğinin artmasına neden olur ve solunum zincirine zarar vererek ROS üretiminin artmasına yol açar. Erken apoptozun karakteristik bir belirteci olan mitokondriyal membran potansiyelinin kaybı, mitokondriden sitokrom c salınımını tetikleyerek apoptoza neden olan olayları başlatabilir (Yılmaz vd., 2018). Çalışmamızda, IC_{50} dozlarında (25, 50, 100 μM) H_2L^9 ligandı ve Co (II) kompleksi ile 48 saat muamele edilen Caco-2 hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyelindeki değişiklikler, floresan probu TMRE kullanılarak değerlendirilmiştir. Flow sitometri analizi, her iki bileşiminde Caco-2 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeli kaybının doza bağlı bir şekilde arttırdığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, Co (II) kompleksinin 100 μM konsantrasyonu ile muamele edilen hücrelerde MMP kaybının en yüksek seviyede olduğu gözlenmiştir. Negatif kontrole kıyasla Co (II) kompleksinin, hücrelerdeki MMP seviyeleri kaybını %5.56'dan, %11.86'ya (25 μM), %13.86'ya (50 μM) ve %44.2'ye (100 μM) arttırdığı tespit edilmiştir. Bu artış, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ek olarak, H_2L^9 ligandının 50 μM (%11.50) ve 100 μM (%13.10) dozlarında negatif kontrole kıyasla MMP seviyeleri kaybında anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, Anneksin V-FITC/PI boyama yöntemi ile Caco-2 hücrelerinde tespit edilen erken apoptoz sonuçları ile uyumludur. Her iki etken maddenin de, mitokondriyal membran potansiyel kaybını artırarak erken apoptozu indüklediği gözlenmiştir.

Morcelli ve ark. (2016), iki farklı grup içeren Schiff bazı ligandlarının Co (II) komplekslerini **(2)** ve **(3)** sentezleyerek, bu bileşiklerin histiositik lenfoma hücre hattında (U937) hücre ölümüne neden olan mekanizmayı Anneksin V-FITC/PI ve MMP analizi ile araştırmışlardır. Komplekslerin hücreler üzerindeki 80µM dozunda 24 saat muamelesinden sonra, kompleks **(3)**'ün %95 oranında apoptozu indüklediği, kompleks **(2)**'nin ise %11 oranında apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Bununla birlikte çalışmamızdan farklı olarak hücrelerin geç apoptotik aşamada olduğu gösterilmiştir. Ayrıca araştırmacılar, kompleks **(3)**'ün U937 hücrelerinin %98'inde MMP kaybını desteklediği, kompleks **(2)**'nin ise hücrelerin yalnızca %9'unda MMP kaybına neden olduğunu göstermiştir. Komplekslerin, U937 hücre hattına karşı toksisitesinin, doğrudan mitokondriyal membran potansiyelinin kaybı ile ilişkili olan intrinsik apoptoz yoluyla aracılık ettiği bildirilmiştir (Morcelli vd., 2016). Benzer şekilde çalışmamızda da, Co (II) kompleksinin Caco-2 hücrelerinde MMP kaybına neden olarak erken apoptoz yoluyla sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Hücre içi aşırı ROS üretimi, apoptotik hücre ölümüne yol açan oksidatif DNA hasarının temel nedenini oluşturmaktadır. Antikanser aktivitesine sahip bileşiklerin, ROS üretimini artırarak ve mitokondriyal fonksiyon kaybını tetikleyerek kanser hücrelerinin apoptoz aracılı ölümünü destekleyebileceği öne sürülmektedir (Qin vd., 2016). Redoks aktif kobalt komplekslerinin kanser hücrelerinde ROS oluşumunu arttırdığı ve oksidatif stres kaynaklı apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Mondal vd., 2016). Bu çalışmada, Caco-2 hücrelerinde H₂L⁹ ligandı ve Co (II) kompleksinin hücre içi ROS üretimine aracılık edip etmediği flow sitometrisinde floresan DCF probu kullanılarak analiz edilmiştir. Caco-2 hücrelerinin IC₅₀ dozlarında (25, 50, 100 µM) 48 saat süreyle H₂L⁹ ligandı ve Co (II) kompleksi ile muamele edilmesinden sonra hücre içi ROS seviyesinin doza bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Hem H₂L⁹ ligandı hem de Co (II) kompleksi, hücre içi ROS seviyesini negatif kontrol grubuna kıyasla tüm dozlar arasında anlamlı şekilde arttırmıştır. H₂L⁹ ligandının 25, 50, 100 µM dozları ile muamele edilen Caco-2 hücrelerinde negatif kontrole kıyasla hücre içi ROS üretiminin sırasıyla 1.7, 3.1 ve 5.8 kat arttığı; Co (II) kompleksinin 4.0, 5.3 ve 5.8 kat arttığı tespit edilmiştir. Bileşiklerin ROS değerleri karşılaştırıldığında, Co (II) kompleksinin serbest liganda kıyasla Caco-2 hücrelerinde hücre içi ROS üretimini daha çok arttırdığı gözlenmiştir. Devi ve ark., tarafından yapılan çalışmada, hidrazon Schiff bazı ligandı içeren Co (II) kompleksinin **(9)** 20 µM konsantrasyonda A549 kanser hücrelerine 24 saat uygulanmasından sonra, hücre

içi ROS üretimini ve mitokondriyal membran potansiyel kaybını önemli ölçüde arttırdığını ve bu sonuçların, kanser hücrelerini intrinsik apoptoz yoluyla öldürdüğünü bildirilmiştir (Devi vd., 2022). Çalışmamızda benzer şekilde, Co (II) kompleksinin Caco-2 kanser hücrelerinde doza bağlı olarak MMP kaybını ve hücre içi ROS üretimini arttırdığı, buna bağlı olarak kanser hücrelerini erken apoptoz yoluyla öldürdüğü sonucuna varılmıştır.



Şekil 5.1. Schiff bazı H₂L⁹ ligandının yedi koordineli kobalt (II) metal kompleksinin kanser hücrelerindeki hücre içi ROS ve MMP aracılı apoptozun şematik gösterimi.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Bu çalışmada 2,6-diasetilpiridin bis(4-açilhidrazon) Schiff bazı ligandı (H_2L^9) ve bu ligandın yedi koordineli Co (II) metal kompleksinin farklı kanser hücreleri üzerine antikanser etkileri araştırıldı. Araştırmanın sonuçları, her iki bileşiğinde beş farklı (Caco-2, HT-29, MDA-MB-231, A549 ve HepG2) kanser hücre hattı üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu gösterdi. Kemoterapötik bir ilaçtan beklendiği gibi bileşiklerin sağlıklı hücrelere oranla kanser hücrelerine karşı daha fazla sitotoksik olduğu tespit edildi. *In vitro* sitotoksikite çalışmamızın önemli sonuçlarından biri de, bileşiklerin kemoterapötik ilaç sisplatine kıyasla sağlıklı hücrelere daha az toksik olmalarıdır. Bileşiklere karşı en dirençli kanser hücre hattının LNCaP, en duyarlı kanser hücre hattının ise Caco-2 olduğu tespit edildi. Özellikle Co (II) kompleksi, Caco-2 kanser hücrelerine karşı serbest H_2L^9 ligandına ve sisplatine kıyasla daha yüksek seçicilik gösterdi. H_2L^9 ligandının ve Co (II) kompleksinin, Caco-2 hücrelerinde sitotoksik etkisinin erken apoptozdan kaynaklandığı tespit edildi. Bununla birlikte flow sitometri sonuçları, bileşiklerin doza bağlı bir şekilde, hücre içi ROS üretimini ve MMP seviyeleri kaybını artırarak erken apoptozu indüklediğini gösterdi. Bu sonuç ile yapılan diğer çalışmalara benzer şekilde, H_2L^9 ligandının ve Co (II) kompleksinin Caco-2 kanser hücrelerini intrinsik apoptoz aracılığıyla öldürdüğü düşünülebilir. Sonuç olarak verilerimiz, Schiff bazı ligandı ve Co (II) kompleksinin sisplatine kıyasla orta derecede antikanser aktivite gösterdiğini, bunun yanı sıra Co (II) kompleksinin serbest liganda oranla daha iyi antikanser aktiviteye sahip olduğunu gösterdi. Böylece, H_2L^9 ligandından türetilen Co (II) kompleksinin kanser tedavisi için potansiyel ajan olabileceği öngörülmekte ve ileriye dönük antikanser çalışmaları için temel oluşturabilecek niteliktedir.

6.2. Öneriler

Farklı kanser türlerinin tedavisi için potansiyel antikanser bileşiklerin araştırılması halen devam ettiği için çalışmamızın sonuçları literatüre yeni bileşiklerin kazandırılması ve bu alanda yapılacak diğer çalışmalara katkı sağlaması açısından önemlidir. İleri analizler yapılarak Co (II) kompleksinin kanser hücrelerinde neden olduğu apoptoz mekanizması, kaspaz aktivasyonu gibi apoptotik belirteçler ile daha fazla aydınlatılmalıdır. Ayrıca, bir sonraki aşamada çalışmanın antikanser etkilerinin *in vivo*

deneysel tümör modellerinde doğrulanması önerilmektedir. Bu sayede kanser tedavisinde klinikte kullanılmaları test edilebilir.



KAYNAKLAR

- Abd El-Lateef HM, Abu-Dief AM ve El-Gendy BEDM (2015). Investigation of adsorption and inhibition effects of some novel anil compounds towards mild steel in H₂SO₄ solution: Electrochemical and theoretical quantum studies. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 758, 135-147. DOI: 10.1016/j.jelechem.2015.10.025
- Abdel-Rahman LH, Abu-Dief AM, Aboelez MO ve Abdel-Mawgoud AAH (2017). DNA interaction, antimicrobial, anticancer activities and molecular docking study of some new VO (II), Cr (III), Mn (II) and Ni (II) mononuclear chelates encompassing quaridentate imine ligand. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 170, 271-285. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.04.003
- Abdel-Rahman LH, Abu-Dief AM, Adam MSS ve Hamdan SK (2016a). Some new nano-sized mononuclear Cu (II) Schiff base complexes: design, characterization, molecular modeling and catalytic potentials in benzyl alcohol oxidation. *Catalysis Letters*, 146, 1373-1396. DOI: 10.1007/s10562-016-1755-0
- Abdel-Rahman LH, Abu-Dief AM, El-Khatib RM ve Abdel-Fatah SM (2016b). Sonochemical synthesis, DNA binding, antimicrobial evaluation and in vitro anticancer activity of three new nano-sized Cu (II), Co (II) and Ni (II) chelates based on tri-dentate NOO imine ligands as precursors for metal oxides. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 162, 298-308. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.06.052
- Abdel-Rahman LH, El-Khatib RM, Nassr LA, Abu-Dief AM, Ismael M ve Seleem AA (2014). Metal based pharmacologically active agents: Synthesis, structural characterization, molecular modeling, CT-DNA binding studies and in vitro antimicrobial screening of iron (II) bromosalicylidene amino acid chelates. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 117, 366-378. DOI: 10.1016/j.saa.2013.07.056
- Abraham J, Staffurth J (2011). Hormonal therapy for cancer. *Medicine*, 39(12), 723-727. DOI: 10.1016/j.mpmed.2011.09.006
- Abuamer KM, Maihub AA, El-Ajaily MM, Etorki AM, Abou-Krishna MM ve Almagani MA (2014). The role of aromatic Schiff bases in the dyes techniques. *International Journal of Organic Chemistry*, 04(01), 7-15. DOI: 10.4236/ijoc.2014.41002
- Abu-Dief AM, Mohamed IM (2015). A review on versatile applications of transition metal complexes incorporating Schiff bases. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(2), 119-133. DOI: 10.1016/j.bjbas.2015.05.004
- Aggarwal BB, Danda D, Gupta S ve Gehlot P (2009). Models for prevention and treatment of cancer: problems vs promises. *Biochemical Pharmacology*, 78(9), 1083-1094. DOI: 10.1016/j.bcp.2009.05.027

- Ahmad M, Afzal M, Tabassum S, Kalińska B, Mrozinski J ve Bharadwaj PK (2014). Synthesis and structure elucidation of a cobalt (II) complex as topoisomerase I inhibitor: In vitro DNA binding, nuclease and RBC hemolysis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 74, 683-693. DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.10.025
- Akhter S, Zaman HU, Mir S, Dar AM ve Shrivastava S (2017). Synthesis of Schiff base metal complexes: A concise review. *European Chemical Bulletin*, 6(10), 475-83. DOI: 10.17628/ecb.2017.6.475-483
- Alderden RA, Hall MD ve Hambley TW (2006). The discovery and development of cisplatin. *Journal of Chemical Education*, 83(5), 728. DOI: 10.1021/ed083p728
- Aldossary SA (2019). Review on pharmacology of cisplatin: clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(1), 7-15. DOI: 10.13005/bpj/1608
- Alfonso-Herrera LA, Rosete-Luna S, Hernández-Romero D, Rivera-Villanueva JM, Olivares-Romero JL, Cruz-Navarro JA (2022). Transition metal complexes with tridentate Schiff bases (O N O and O N N) derived from salicylaldehyde: An analysis of their potential anticancer activity. *ChemMedChem*, 17(20), e202200367. DOI: 10.1002/cmdc.202200367
- Ali I, Mahmood LM, Mehdar YT, Aboul-Enein HY ve Said MA (2020). Synthesis, characterization, simulation, DNA binding and anticancer activities of Co (II), Cu (II), Ni (II) and Zn (II) complexes of a Schiff base containing o-hydroxyl group nitrogen ligand. *Inorganic Chemistry Communications*, 118, 108004. DOI: 10.1016/j.inoche.2020.108004
- Alkış ME, Keleştemür Ü, Alan Y, Turan N ve Buldurun K (2021). Cobalt and ruthenium complexes with pyrimidine based schiff base: Synthesis, characterization, anticancer activities and electrochemotherapy efficiency. *Journal of Molecular Structure*, 1226, 129402. DOI: 10.1016/j.molstruc.2020.129402
- Alorini TA, Al-Hakimi AN, Saeed SES, Alhamzi EHL ve Albadri AE (2022). Synthesis, characterization, and anticancer activity of some metal complexes with a new Schiff base ligand. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(2), 103559. DOI: 10.1016/j.arabjc.2021.103559
- Aly SA, Fathalla SK (2020). Preparation, characterization of some transition metal complexes of hydrazone derivatives and their antibacterial and antioxidant activities. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(2), 3735-3750. DOI: 10.1016/j.arabjc.2019.12.003
- Amable L (2016). Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacological Research*, 106, 27-36. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.01.001

- Ambika S, Manojkumar Y, Arunachalam S, Gowdhami B, Meenakshi Sundaram KK, Solomon RV (2019). Biomolecular interaction, anti-cancer and anti-angiogenic properties of cobalt (III) Schiff base complexes. *Scientific Reports*, 9(1), 2721. DOI: 10.1038/s41598-019-39179-1
- Anand U, Dey A, Chandel AKS, Sanyal R, Mishra A, Pandey DK (2022). Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes & Diseases*. DOI: 10.1016/j.gendis.2022.02.007
- Andjelković K, Šumar M ve Ivanović-Burmazović I (2001). Thermal analysis in structural characterization of hydrazone ligands and their complexes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 66(3), 759-778. DOI: 10.1023/a:1013140021386
- Angelusiu MV, Barbuceanu SF, Draghici C ve Almajan GL (2010). New Cu (II), Co (II), Ni (II) complexes with aroyl-hydrazone based ligand. Synthesis, spectroscopic characterization and in vitro antibacterial evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(5), 2055-2062. DOI: 10.1016/j.ejmech.2010.01.033
- Apostolou P, Toloudi M, Chatziioannou M, Ioannou E, Knocke DR, Nester J (2013). Anvirzel™ in combination with cisplatin in breast, colon, lung, prostate, melanoma and pancreatic cancer cell lines. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 14(1), 1-6. DOI: 10.1186/2050-6511-14-18
- Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, Huang HQ, Baergen R, Lele S (2006). Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*, 354(1), 34-43. DOI: 10.1056/NEJMoa052985
- Arunadevi A, Porkodi J, Ramgeetha L ve Raman N (2019). Biological evaluation, molecular docking and DNA interaction studies of coordination compounds gleaned from a pyrazolone incorporated ligand. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 38(9), 656-679. DOI: 10.1080/15257770.2019.1597975
- Astolfi L, Ghiselli S, Guaran V, Chicca M, Simoni EDI, Olivetto E (2013). Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: A retrospective evaluation. *Oncology Reports*, 29(4), 1285-1292. DOI: 10.3892/or.2013.2279
- Banerjee A, Guha A, Adhikary J, Khan A, Manna K, Dey S (2013). Dinuclear cobalt (II) complexes of Schiff-base compartmental ligands: Syntheses, crystal structure and bio-relevant catalytic activities. *Polyhedron*, 60, 102-109. DOI: 10.1016/j.poly.2013.05.014
- Baran Y (2018). *Kanser Moleküler Biyolojisi*. Ankara: Kısayol Yayıncılık.
- Barone G, Terenzi A, Lauria A, Almerico AM, Leal JM, Busto N (2013). DNA-binding of nickel (II), copper (II) and zinc (II) complexes: Structure–affinity relationships. *Coordination Chemistry Reviews*, 257(19-20), 2848-2862. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.02.023

- Barry NP, Sadler PJ (2014). 100 years of metal coordination chemistry: from Alfred Werner to anticancer metallodrugs. *Pure and Applied Chemistry*, 86(12), 1897-1910. DOI: 10.1515/pac-2014-0504
- Basha MT, Alghanmi RM, Shehata MR ve Abdel-Rahman LH (2019). Synthesis, structural characterization, DFT calculations, biological investigation, molecular docking and DNA binding of Co (II), Ni (II) and Cu (II) nanosized Schiff base complexes bearing pyrimidine moiety. *Journal of Molecular Structure*, 1183, 298-312. DOI: 10.1016/j.molstruc.2019.02.001
- Baskar R, Lee KA, Yeo R ve Yeoh KW (2012). Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9(3), 193. DOI: 10.7150/ijms.3635
- Basu A, Krishnamurthy S (2010). Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *Journal of Nucleic Acids*, 2010. DOI: 10.4061/2010/201367
- Baykara O (2016). Current modalities in treatment of cancer. *Balikesir Health Sciences Journal*, 5(3), 154-165. DOI: 10.5505/bsbd.2016.93823
- Baxevanis CN, Perez SA ve Papamichail M (2009). Cancer immunotherapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 46(4), 167-189. DOI: 10.1080/10408360902937809
- Beebe SJ, Celestine MJ, Bullock JL, Sandhaus S, Arca JF, Cropek DM (2020). Synthesis, characterization, DNA binding, topoisomerase inhibition, and apoptosis induction studies of a novel cobalt (III) complex with a thiosemicarbazone ligand. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 203. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110907
- Behranvand N, Nasri F, Zolfaghari Emameh R, Khani P, Hosseini A, Garssen J (2022). Chemotherapy: A double-edged sword in cancer treatment. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 71(3), 507-526. DOI: 10.1007/s00262-021-03013-3
- Berber N (2020). Preparation and characterization of some Schiff base compounds. *Adiyaman University Journal of Science*, 10(1), 179-188. DOI: 10.37094/adyujsci.633080
- Bergamo A, Dyson PJ ve Sava G (2018). The mechanism of tumour cell death by metal-based anticancer drugs is not only a matter of DNA interactions. *Coordination Chemistry Reviews*, 360, 17-33. DOI: 10.1016/j.ccr.2018.01.009
- Bertram JS (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 21(6), 167-223. DOI: 10.1016/S0098-2997(00)00007-8
- Bhosle J, Hall G (2006). Principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery (Oxford)*, 24(2), 66-69. DOI: 10.1383/surg.2006.24.2.66

- Bielas JH, Loeb KR, Rubin BP, True LD ve Loeb LA (2006). Human cancers express a mutator phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(48), 18238-18242. DOI: 10.1073/pnas.0607057103
- Branch P, Masson M, Aquilina G, Bignami M ve Karran P (2000). Spontaneous development of drug resistance: mismatch repair and p53 defects in resistance to cisplatin in human tumor cells. *Oncogene*, 19(28), 3138-3145. DOI: 10.1038/sj.onc.1203668
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA ve Jemal A (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492
- Brozovic A, Ambriović-Ristov A ve Osmak M (2010). The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Critical Reviews in Toxicology*, 40(4), 347-359. DOI: 10.3109/10408441003601836
- Bruijninx PC, Sadler PJ (2008). New trends for metal complexes with anticancer activity. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(2), 197-206. DOI: 10.1016/j.cbpa.2007.11.013
- Brumatti G, Sheridan C ve Martin SJ (2008). Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods*, 44(3), 235-240. DOI: 10.1016/j.ymeth.2007.11.010
- Bukowski K, Kciuk M ve Kontek R (2020). Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3233. DOI: 10.3390/ijms21093233
- Bulhac I, Danilescu O, Rija A, Shova S, Kravtsov VC ve Bourosh PN (2017). Cobalt (II) complexes with pentadentate Schiff bases 2, 6-diacetylpyridine hydrazones: Syntheses and structures. *Russian Journal of Coordination Chemistry*, 43, 21-36. DOI: 10.1134/S1070328417010018
- Byun SS, Kim SW, Choi H, Lee C ve Lee E (2005). Augmentation of cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant human bladder cancer cells by modulating glutathione concentrations and glutathione-related enzyme activities. *BJU international*, 95(7), 1086-1090. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2005.05472.x
- Cao W, Liu Y, Zhang T ve Jia J (2018). Synthesis, characterization, theoretical and antimicrobial studies of tridentate hydrazone metal complexes of Zn (II), Cd (II), Cu (II) and Co (III). *Polyhedron*, 147, 62-68. DOI: 10.1016/j.poly.2018.03.012
- Celepli S, Bigat İ, Celepli P ve Karagin PH (2020). Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*, 24, 103-111. Erişim Adresi: <https://guncel.tgv.org.tr/journal/82/pdf/100641.pdf>

- Chakraborti AK, Bhagat S ve Rudrawar S (2004). Magnesium perchlorate as an efficient catalyst for the synthesis of imines and phenylhydrazones. *Tetrahedron Letters*, 45(41), 7641-7644. DOI: 10.1016/j.tetlet.2004.08.097
- Chang HQ, Jia L, Xu J, Xu ZQ, Chen RH, Wu WN (2015). Syntheses, characterizations, antitumor activities and cell apoptosis induction of Cu (II), Zn (II) and Cd (II) complexes with hydrazone Schiff base derived from isonicotinohydrazide. *Inorganic Chemistry Communications*, 57, 8-10. DOI: 10.1016/j.inoche.2015.04.010
- Chang HQ, Jia L, Xu J, Zhu TF, Xu ZQ, Chen RH (2016). Syntheses, crystal structures, anticancer activities of three reduce Schiff base ligand based transition metal complexes. *Journal of Molecular Structure*, 1106, 366-372. DOI: 10.1016/j.molstruc.2015.11.001
- Chen HHW, Kuo MT (2017). Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges. *Oncotarget*, 8(37), 62742-62758. DOI: 10.18632/oncotarget.18409
- Chen SH, Chang JY (2019). New insights into mechanisms of cisplatin resistance: from tumor cell to microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4136. DOI: 10.3390/ijms20174136
- Chhikara BS, Parang K (2023). Global Cancer Statistics 2022: The trends projection analysis. *Chemical Biology Letters*, 10(1), 451-451. Erişim Adresi: <https://pubs.thesciencein.org/journal/index.php/cbl/article/view/451>
- Chiang SP, Cabrera RM ve Segall JE (2016). Tumor cell intravasation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 311(1), C1-C14. DOI: 10.1152/ajpcell.00238.2015.
- Chu DT, Nguyen TT, Tien NLB, Tran DK, Jeong JH, Anh PG (2020). Recent progress of stem cell therapy in cancer treatment: molecular mechanisms and potential applications. *Cells*, 9(3), 563. DOI: 10.3390/cells9030563
- Cooper GM, Hausmann RE (2016). Hücre Moleküler Yaklaşım. N. Atabey, E. Kalay, M. Sakızlı (Editör). Yedinci baskı. İzmir. İzmir Tıp Kitabevi, s. 1-832.
- Corn PG, El-Deiry WS (2002). Derangement of growth and differentiation control in oncogenesis. *Bioessays*, 24(1), 83-90. DOI: 10.1002/bies.10036
- Corrie PG (2008). Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine*, 36(1), 24-28. DOI: 10.1016/j.mpmed.2007.10.012
- Cowan JA (2001). Chemical nucleases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(6), 634-642. DOI: 10.1016/S1367-5931(01)00259-9

- Cozzi PG (2004). Metal–Salen Schiff base complexes in catalysis: practical aspects. *Chemical Society Reviews*, 33(7), 410–421. DOI: 10.1039/b307853c
- Cross D, Burmester JK (2006). Gene therapy for cancer treatment: past, present and future. *Clinical Medicine & Research*, 4(3), 218–227. DOI: 10.3121/cmr.4.3.218
- Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP ve Waterhouse NJ (2016). Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocol*, 2016(11), 953–957. DOI: 10.1101/pdb.prot087288
- Czarnek K, Terpiłowska S ve Siwicki AK (2015). Selected aspects of the action of cobalt ions in the human body. *Central European Journal of Immunology*, 40(2), 236–242. DOI: 10.5114/ceji.2015.52837
- Da Silva CM, da Silva DL, Modolo LV, Alves RB, de Resende MA, Martins CV (2011). Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. *Journal of Advanced Research*, 2(1), 1–8. DOI: 10.1016/j.jare.2010.05.004
- Dabholkar M, Thornton K, Vionnet J, Bostick-Bruton F, Yu JJ ve Reed E (2000). Increased mRNA levels of xeroderma pigmentosum complementation group B (XPB) and Cockayne's syndrome complementation group B (CSB) without increased mRNA levels of multidrug-resistance gene (MDR1) or metallothionein-II (MT-II) in platinum-resistant human ovarian cancer tissues. *Biochemical Pharmacology*, 60(11), 1611–1619. DOI: 10.1016/S0006-2952(00)00448-2
- Dabholkar M, Vionnet J, Bostick-Bruton F, Yu JJ ve Reed E (1994). Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 94(2), 703–708. DOI: 10.1172/JCI117388
- Dalia SA, Afsan F, Hossain MS, Khan MN, Zakaria C, Zahan ME (2018). A short review on chemistry of schiff base metal complexes and their catalytic application. *International Journal of Chemical Studies*, 6(3), 2859–2867. Erişim Adresi: <https://www.chemijournal.com/archives/2018/vol6issue3/PartAP/6-1-394-798.pdf>
- Dalpozzo R, De Nino A, Nardi M, Russo B ve Procopio A (2006). Erbium (III) triflate: A valuable catalyst for the synthesis of aldimines, ketimines, and enaminones. *Synthesis*, 2006(07), 1127–1132. DOI: 10.1055/s-2006-926378
- Dar OA, Lone SA, Malik MA, Wani MY, Talukdar MIA, Al-Bogami AS (2019). Heteroleptic transition metal complexes of Schiff-base-derived ligands exert their antifungal activity by disrupting membrane integrity. *Applied Organometallic Chemistry*, 33(11), e5128. DOI: 10.1002/aoc.5128

- Daravath S, Vamsikrishna N, Ganji N ve Venkateswarlu K (2018). Synthesis, characterization, DNA binding ability, nuclease efficacy and biological evaluation studies of Co (II), Ni (II) and Cu (II) complexes with benzothiazole Schiff base. *Chemical Data Collections*, 17, 159-168. DOI: 10.1016/j.cdc.2018.08.009
- Darmanović D, Shcherbakov IN, Duboc C, Spasojević V, Hanžel D, Anđelković K (2019). Combined experimental and theoretical investigation of the origin of magnetic anisotropy in pentagonal bipyramidal isothiocyanato Co (II), Ni (II), and Fe (III) complexes with quaternary-ammonium-functionalized 2, 6-diacetylpyridine bisacylhydrazone. *The Journal of Physical Chemistry C*, 123(51), 31142-31155. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b08066
- Das K, Datta A, Liu PH, Huang JH, Hsu CL, Chang WT (2014). Structural characterization of cobalt (II) complexes of an N, O donor Schiff base and their activity on carcinoma cells. *Polyhedron*, 71, 85-90. DOI: 10.1016/j.poly.2013.12.035
- Dasari S, Bernard Tchounwou P (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364-378. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025
- Dasgupta S, Kar K, Barua A, Ghosh D, Kabi B, Dewan K (2022). A significantly non-toxic novel Cobalt (III) Schiff base complex induces apoptosis via G2-M cell cycle arrest in human breast cancer cell line MCF-7. *Life Sciences*, 308, 120963. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120963
- Debela DT, Muzazu SG, Heraro KD, Ndalama MT, Mesele BW, Haile DC (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Medicine*, 9, 20503121211034366. DOI: 10.1177/20503121211034366
- Dembic Z (2020). Antitumor drugs and their targets. *Molecules*, 25(23), 5776. DOI: 10.3390/molecules25235776
- Denizot F, Lang R (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271-277. DOI: 10.1016/0022-1759(86)90368-6
- Devi J, Kumar S, Kumar D, Jindal DK ve Poornachandra Y (2022). Synthesis, characterization, in vitro antimicrobial and cytotoxic evaluation of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes derived from bidentate hydrazones. *Research on Chemical Intermediates*, 48(1), 423-455. DOI: 10.1007/s11164-021-04602-8
- Dey D, Kaur G, Ranjani A, Gayathri L, Chakraborty P, Adhikary J (2014). A trinuclear zinc-schiff base complex: biocatalytic activity and cytotoxicity. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2014(21), 3350-3358. DOI: 10.1002/ejic.201402158

- Dongre A, Weinberg RA (2019). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(2), 69-84. DOI: 10.1038/s41580-018-0080-4
- Durant ST, Morris MM, Illand M, McKay HJ, McCormick C, Hirst GL (1999). Dependence on RAD52 and RAD1 for anticancer drug resistance mediated by inactivation of mismatch repair genes. *Current Biology*, 9(1), 51-54. DOI: 10.1016/S0960-9822(99)80047-5
- Dwyer FP, Gyarfás EC, Rogers WP ve Koch JH (1952). Biological activity of complex ions. *Nature*, 170(4318), 190-191. DOI: 10.1038/170190a0
- Edwards SL, Brough R, Lord CJ, Natrajan R, Vatcheva R, Levine DA (2008). Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature*, 451(7182), 1111-1115. DOI: 10.1038/nature06548
- El-Aneed A (2004a). An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release*, 94(1), 1-14. DOI: 10.1016/j.jconrel.2003.09.013
- El-Aneed A (2004b). Current strategies in cancer gene therapy. *European Journal of Pharmacology*, 498(1-3), 1-8. DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.06.054
- El-Gammal OA, Bekheit MM ve Tahooun M (2015). Synthesis, characterization and biological activity of 2-acetylpyridine- α -naphthoxyacetylhydrazone its metal complexes. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 135, 597-607. DOI: 10.1016/j.saa.2014.05.071
- Farahani E, Patra HK, Jangamreddy JR, Rashedi I, Kawalec M, Rao Pariti RK (2014). Cell adhesion molecules and their relation to (cancer) cell stemness. *Carcinogenesis*, 35(4), 747-759. DOI: 10.1093/carcin/bgu045
- Fernald K, Kurokawa M (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends in Cell Biology*, 23(12), 620-633. DOI: 10.1016/j.tcb.2013.07.006
- Fernández-G JM, del Rio-Portilla F, Quiroz-García B, Toscano RA ve Salcedo R (2001). The structures of some ortho-hydroxy Schiff base ligands. *Journal of Molecular Structure*, 561(1-3), 197-207. DOI: 10.1016/S0022-2860(00)00915-7
- Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehmé A (1996). The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Research*, 56(21), 4881-4886. Erişim Adresi: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/56/21/4881/502695>
- Florea AM, Büsselberg D (2011). Cisplatin as an anti-tumor drug: Cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*, 3(1), 1351-1371. DOI: 10.3390/cancers3011351

- Frankenberg-Schwager M, Kirchermeier D, Greif G, Baer K, Becker M ve Frankenberg D (2005). Cisplatin-mediated DNA double-strand breaks in replicating but not in quiescent cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology*, 212(2-3), 175-184. DOI: 10.1016/j.tox.2005.04.015
- Frezza M, Hindo S, Chen D, Davenport A, Schmitt S, Tomco D (2010). Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 16(16), 1813-1825. DOI: 10.2174/138161210791209009
- Fuertes MA, Alonso C ve Pérez JM (2003). Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: Enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chemical Reviews*, 103(3), 645-662. DOI: 10.1021/cr020010d
- Futreal PA, Kasprzyk A, Birney E, Mullikin JC, Wooster R ve Stratton MR (2001). Cancer and genomics. *Nature*, 409(6822), 850-852. DOI: 10.1038/35057046
- Gaballa AS, Asker MS, Barakat AS ve Teleb SM (2007). Synthesis, characterization and biological activity of some platinum (II) complexes with Schiff bases derived from salicylaldehyde, 2-furaldehyde and phenylenediamine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 67(1), 114-121. DOI: 10.1016/j.saa.2006.06.031
- Gao G, Dou QP (2000). G1 phase-dependent expression of Bcl-2 mRNA and protein correlates with chemoresistance of human cancer cells. *Molecular Pharmacology*, 58(5), 1001-1010. DOI: 10.1124/mol.58.5.1001
- Garcia-Oliveira P, Otero P, Pereira AG, Chamorro F, Carpena M, Echave J (2021). Status and challenges of plant-anticancer compounds in cancer treatment. *Pharmaceuticals*, 14(2), 1-28. DOI: 10.3390/ph14020157
- Gebauer GERD, Mirakhur BELOO, Nguyen QUANG, Shore SK, Simpkins H ve Dhanasekaran N (2000). Cisplatin-resistance involves the defective processing of MEKK1 in human ovarian adenocarcinoma 2008/C13 cells. *International Journal of Oncology*, 16(2), 321-326. DOI: 10.3892/ijo.16.2.321
- Geiger TR, Peeper DS (2009). Metastasis mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1796(2), 293-308. DOI: 10.1016/j.bbcan.2009.07.006
- Ghanghas P, Choudhary A, Kumar D ve Poonia K (2021). Coordination metal complexes with Schiff bases: Useful pharmacophores with comprehensive biological applications. *Inorganic Chemistry Communications*, 130, 108710. DOI: 10.1016/j.inoche.2021.108710

- Ghosh K, Mohan V, Kumar P ve Singh UP (2013). DNA binding, nuclease and superoxide scavenging activity studies on mononuclear cobalt complexes derived from tridentate ligands. *Polyhedron*, 49(1), 167-176. DOI: 10.1016/j.poly.2012.09.025
- Ghosh S (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic chemistry*, 88, 102925. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.102925
- Gillet LC, Schärer OD (2006). Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chemical Reviews*, 106(2), 253-276. DOI: 10.1021/cr040483f
- Golcu A, Tumer M, Demirelli H ve Wheatley RA (2005). Cd (II) and Cu (II) complexes of polydentate Schiff base ligands: synthesis, characterization, properties and biological activity. *Inorganica Chimica Acta*, 358(6), 1785-1797. DOI: 10.1016/j.ica.2004.11.026
- Gonçalves GAR, Paiva RDM (2017). Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein (Sao Paulo)* 15: 369–375. DOI: 10.1590/S1679-45082017RB4024
- Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C ve Perez JM (2001). Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis?. *Molecular Pharmacology*, 59(4), 657-663. DOI: 10.1124/mol.59.4.657
- Gopalakrishnan M, Sureshkumar P, Kanagarajan V ve Thanusu J (2007). New environmentally-friendly solvent-free synthesis of imines using calcium oxide under microwave irradiation. *Research on Chemical Intermediates*, 33, 541-548. DOI: 10.1163/156856707782565822
- Gökçe C, Dilek N ve Gup R (2015). Seven coordinated cobalt (II) complexes with 2, 6-diacetylpyridine bis (4-acylhydrazone) ligands: Synthesis, characterization, DNA-binding and nuclease activity. *Inorganica Chimica Acta*, 432, 213-220. DOI: 10.1016/j.ica.2015.03.040
- Greaves M, Maley CC (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), 306-313. DOI: 10.1038/nature10762
- Grewal AS, Kumar K, Redhu S ve Bhardwaj S (2013). Microwave assisted synthesis: a green chemistry approach. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 3(5), 278-285. Erişim Adresi: https://www.researchgate.net/profile/Ajmer-Grewal/publication/261872979_Microwave_assisted_synthesis_a_green_chemistry_approach/links/542501bd0cf26120b7ac4d55/Microwave-assisted-synthesis-a-green-chemistry-approach.pdf
- Gupta GP, Massagué J (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127(4), 679-695. DOI: 10.1016/j.cell.2006.11.001

- Gupta KC, Sutar AK (2008). Catalytic activities of Schiff base transition metal complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 252(12-14), 1420-1450. DOI: 10.1016/j.ccr.2007.09.005
- Hajrezaie M, Paydar M, Zorofchian Moghadamtousi S, Hassandarvish P, Gwaram NS, Zahedifard M (2014). A Schiff Base-derived copper (II) complex is a potent inducer of apoptosis in colon cancer cells by activating the intrinsic pathway. *The Scientific World Journal*, 2014. DOI: 10.1155/2014/540463
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9
- Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 98(6)144(5), 646-674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA ve Dean DC (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*, 98(6), 859-869. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81519-6
- Hartlerode AJ, Scully R (2009). Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochemical Journal*, 423(2), 157-168. DOI: 10.1042/BJ20090942
- Hassanpour SH, Dehghani M (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4), 127-129. DOI: 10.1016/j.jcrpr.2017.07.001
- Hayflick L (2000). The illusion of cell immortality. *British Journal of Cancer*, 83(7), 841-846. DOI: 10.1054/bjoc.2000.1296
- Heffern MC, Yamamoto N, Holbrook RJ, Eckermann AL ve Meade TJ (2013). Cobalt derivatives as promising therapeutic agents. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17(2), 189-196. DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.11.019
- Hengstler JG (2003). Re: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis*, 24(11), 1855-1857. DOI: 10.1093/carcin/bgg166
- Hernández-Romero D, Rosete-Luna S, López-Monteon A, Chávez-Piña A, Pérez-Hernández N, Marroquín-Flores J (2021). First-row transition metal compounds containing benzimidazole ligands: An overview of their anticancer and antitumor activity. *Coordination Chemistry Reviews*, 439, 213930. DOI: 10.1016/j.ccr.2021.213930
- Ho A, Dowdy SF (2002). Regulation of G1 cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12(1), 47-52. DOI: 10.1016/S0959-437X(01)00263-5

- Holbrook RJ, Weinberg DJ, Peterson MD, Weiss EA ve Meade TJ (2015). Light-activated protein inhibition through photoinduced electron transfer of a ruthenium (II)-cobalt (III) bimetallic complex. *Journal of the American Chemical Society*, 137(9), 3379-3385. DOI: 10.1021/jacs.5b00342
- Holzer AK, Manorek GH ve Howell SB (2006). Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Molecular Pharmacology*, 70(4), 1390-1394. DOI: 10.1124/mol.106.022624
- Horáková K, Šovčíková A, Seemannová Z, Syrová D, Bušányová K, Drobná Z (2001). Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(6), 650-664. DOI: 10.1016/S0891-5849(00)00508-6
- Husain A, He G, Venkatraman ES ve Spriggs DR (1998). BRCA1 up-regulation is associated with repair-mediated resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Research*, 58(6), 1120-1123. Erişim Adresi: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/58/6/1120/504917>
- Imran A, Qamar HY, Qurban ALI, Naeem H, Mariam RIAZ, Saima AMIN (2017). Role of molecular biology in cancer treatment: a review article. *Iranian Journal of Public Health*, 46(11), 1475. Erişim Adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5696686>
- Indumathy R, Kanthimathi M, Weyhermuller T ve Nair BU (2008). Cobalt complexes of terpyridine ligands: crystal structure and nuclease activity. *Polyhedron*, 27(17), 3443-3450. DOI: 10.1016/j.poly.2008.08.003
- Jiao K, Wang QX, Sun W ve Jian FF (2005). Synthesis, characterization and DNA-binding properties of a new cobalt (II) complex: Co (bbt) 2Cl2. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(6), 1369-1375. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2005.03.017
- Jones R (2016). Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine*, 44(1), 25-29. DOI: 10.1016/j.mpmed.2015.10.007
- Joseyphus RS, Nair MS (2010). Synthesis, characterization and biological studies of some Co (II), Ni (II) and Cu (II) complexes derived from indole-3-carboxaldehyde and glycylglycine as Schiff base ligand. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(4), 195-204. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.05.001>
- Kanchanadevi S, Fronczek FR ve Mahalingam V (2021). Ruthenium (III) hydrazone complexes with triphenylphosphine/triphenylarsine co-ligands: Synthesis, DNA/BSA binding, antioxidative and cytotoxic activity. *Inorganica Chimica Acta*, 526, 120532. DOI: 10.1016/j.ica.2021.120532

- Karaküçük-İyidoğan A, Taşdemir D, Oruç-Emre EE ve Balzarini J (2011). Novel platinum (II) and palladium (II) complexes of thiosemicarbazones derived from 5-substitutedthiophene-2-carboxaldehydes and their antiviral and cytotoxic activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(11), 5616-5624. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.09.031
- Kargar H, Fallah-Mehrjardi M, Behjatmanesh-Ardakani R, Bahadori M, Moghadam M, Ashfaq M (2022). Pd (II) and Ni (II) complexes containing ONNO tetradentate Schiff base ligand: Synthesis, crystal structure, spectral characterization, theoretical studies, and use of PdL as an efficient homogeneous catalyst for Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction. *Polyhedron*, 213, 115622. DOI: 10.1016/j.poly.2021.115622
- Kargar H, Fallah-Mehrjardi M, Behjatmanesh-Ardakani R, Munawar KS, Ashfaq M ve Tahir MN (2021). Synthesis, spectral characterization, SC-XRD, HSA, DFT and catalytic activity of novel dioxovanadium (V) complex with aminobenzohydrazone Schiff base ligand: An experimental and theoretical approach. *Inorganica Chimica Acta*, 526, 120535. DOI: 10.1016/j.poly.2021.115428
- Karmakar M, Chattopadhyay S (2019). A comprehensive overview of the orientation of tetradentate N2O2 donor Schiff base ligands in octahedral complexes of trivalent 3d metals. *Journal of Molecular Structure*, 1186, 155-186. DOI: 10.1016/j.molstruc.2019.02.091
- Kartalou M, Essigmann JM (2001). Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 478(1-2), 23-43. DOI: 10.1016/S0027-5107(01)00141-5
- Kashifa Fathima J, Lavanya V, Jamal S ve Ahmed N (2022). The Effectiveness of Various Chemotherapeutic Agents in Cancer Treatment. *Current Pharmacology Reports*, 8(4), 236-252. DOI: 10.1007/s40495-022-00289-6
- Ke X, Shen L (2017). Molecular targeted therapy of cancer: The progress and future prospect. *Frontiers in Laboratory Medicine*, 1(2), 69-75. DOI: 10.1016/j.flm.2017.06.001
- Kelland L (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), 573-584. DOI: 10.1038/nrc2167
- Khan NUH, Pandya N, Prathap KJ, Kureshy RI, Abdi SHR, Mishra S (2011). Chiral discrimination asserted by enantiomers of Ni (II), Cu (II) and Zn (II) Schiff base complexes in DNA binding, antioxidant and antibacterial activities. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 81(1), 199-208. DOI: 10.1016/j.saa.2011.06.002
- Kim E, Chufán EE, Kamaraj K ve Karlin KD (2004). Synthetic models for heme– copper oxidases. *Chemical Reviews*, 104(2), 1077-1134. DOI: 10.1021/cr0206162

- King AP, Gellineau HA, MacMillan SN ve Wilson JJ (2019). Physical properties, ligand substitution reactions, and biological activity of Co (iii)-Schiff base complexes. *Dalton Transactions*, 48(18), 5987-6002. DOI: 10.1039/C8DT04606A
- Kobayashi M, Shimizu S (1999). Cobalt proteins. *European Journal of Biochemistry*, 261(1), 1-9. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00186.x
- Köberle B, Tomicic MT, Usanova S ve Kaina B (2010). Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1806(2), 172-182. DOI: 10.1016/j.bbcan.2010.07.004
- Krishnamoorthy E, Hassan S, Hanna LE, Padmalayam I, Rajaram R ve Viswanathan V (2017). Homology modeling of Homo sapiens lipoic acid synthase: substrate docking and insights on its binding mode. *Journal of Theoretical Biology*, 420, 259-266. DOI: 10.1016/j.jtbi.2016.09.005
- Kroemer G, Galluzzi L ve Brenner C (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, 87(1), 99-163. DOI: 10.1152/physrev.00013.2006
- Kunkel TA, Erie DA (2005). DNA mismatch repair. *Annual Review Biochemistry*, 74, 681-710. DOI: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133243
- Lambert AW, Pattabiraman DR ve Weinberg RA (2017). Emerging biological principles of metastasis. *Cell*, 168(4), 670-691. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.037
- Langdon SP (2004). Basic principles of cancer cell culture. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, 3-15. DOI: 10.1385/1-59259-406-9:3
- Lasri J, Elsherbiny AS, Eltayeb NE, Haukka M ve El-Hefnawy ME (2018). Synthesis and characterization of ferrocene-based Schiff base and ferrocenecarboxaldehyde oxime and their adsorptive removal of methyl blue from aqueous solution. *Journal of Organometallic Chemistry*, 866, 21-26. DOI: 10.1016/j.jorganchem.2018.04.004
- Leber MF, Efferth T (2009). Molecular principles of cancer invasion and metastasis. *International Journal of Oncology*, 34(4), 881-895. DOI: 10.3892/ijo_00000214
- Lee YT, Tan YJ ve Oon CE (2018). Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *European Journal of Pharmacology*, 834, 188-196. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.07.034
- Li B, Shao H, Gao L, Li H, Sheng H ve Zhu L (2022). Nano-drug co-delivery system of natural active ingredients and chemotherapy drugs for cancer treatment: A review. *Drug Delivery*, 29(1), 2130-2161. DOI: 10.1080/10717544.2022.2094498

- Li L, Zhang YZ, Liu E, Yang C, Golen JA, Rheingold AL (2016). Synthesis and structural characterization of zinc (II) and cobalt (II) complexes based on multidentate hydrazone ligands. *Journal of Molecular Structure*, 1110, 180-184. DOI: 10.1016/j.molstruc.2016.01.051
- Li Y, Yang ZY ve Wu JC (2010). Synthesis, crystal structures, biological activities and fluorescence studies of transition metal complexes with 3-carbaldehyde chromone thiosemicarbazone. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 5692-5701. DOI: 10.1016/j.ejmech.2010.09.025
- Liberti MV, Locasale JW (2016). The Warburg effect: how does it benefit cancer cells?. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211-218. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.12.001
- Lin X, Trang J, Okuda T ve Howell SB (2006). DNA polymerase ζ accounts for the reduced cytotoxicity and enhanced mutagenicity of cisplatin in human colon carcinoma cells that have lost DNA mismatch repair. *Clinical Cancer Research*, 12(2), 563-568. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1380
- Liu FS (2009). Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy—a quick review. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 48(3), 239-244. DOI: 10.1016/S1028-4559(09)60296-5
- Liu G, Cogan DA, Owens TD, Tang TP ve Ellman JA (1999). Synthesis of enantiomerically pure N-tert-butanefulfinyl imines (tert-butanefulfinimines) by the direct condensation of tert-butanefulfinamide with aldehydes and ketones. *The Journal of Organic Chemistry*, 64(4), 1278-1284. DOI: 10.1021/jo982059i
- Liu Y, Cao X (2016). Characteristics and significance of the pre-metastatic niche. *Cancer Cell*, 30(5), 668-681. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.09.011
- Look GC, Murphy MM, Campbell DA ve Gallop MA (1995). Trimethylorthoformate: a mild and effective dehydrating reagent for solution and solid phase imine formation. *Tetrahedron Letters*, 36(17), 2937-2940. DOI: 10.1016/0040-4039(95)00442-F
- Love BE, Ren J (1993). Synthesis of sterically hindered imines. *The Journal of Organic Chemistry*, 58(20), 5556-5557. DOI: 10.1021/jo00072a051
- Lowe SW, Lin AW (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3), 485-495. DOI: 10.1093/carcin/21.3.485
- Mahdy AR, Ali OAA, Serag WM, Fayad E, Elshaarawy RF ve Gad EM (2022). Synthesis, characterization, and biological activity of Co (II) and Zn (II) complexes of imidazoles-based azo-functionalized Schiff bases. *Journal of Molecular Structure*, 1259, 132726. DOI: 10.1016/j.molstruc.2022.132726

- Maiti SK, Kalita M, Singh A, Deka J ve Barman P (2020). Investigation of DNA binding and bioactivities of thioether containing Schiff base Copper (II), Cobalt (II) and Palladium (II) complexes: Synthesis, characterization, spectrochemical study, viscosity measurement. *Polyhedron*, 184, 114559. DOI: 10.1016/j.poly.2020.114559
- Majumder S, Dutta P, Mukherjee P, Datta ER, Efferth T, Bhattacharya S (2006). Reversal of drug resistance in P-glycoprotein-expressing T-cell acute lymphoblastic CEM leukemia cells by copper N-(2-hydroxy acetophenone) glycinate and oxalyl bis (N-phenyl) hydroxamic acid. *Cancer Letters*, 244(1), 16-23. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.11.030
- Makovec T (2019). Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiology and Oncology*, 53(2), 148-158. DOI: 10.2478/raon-2019-0018
- Mandic A, Hansson J, Linder S ve Shoshan MC (2003). Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 9100-9106. DOI: 10.1074/jbc.M210284200
- Manojkumar Y, Ambika S, Arulkumar R, Gowdhani B, Balaji P, Vignesh G (2019). Synthesis, DNA and BSA binding, in vitro anti-proliferative and in vivo anti-angiogenic properties of some cobalt (III) Schiff base complexes. *New Journal of Chemistry*, 43(28), 11391-11407. DOI: 10.1039/C9NJ01269A
- Mansouri A, Ridgway LD, Korapati AL, Zhang Q, Tian L, Wang Y (2003). Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(21), 19245-19256. DOI: 10.1074/jbc.M208134200
- Marrocco I, Altieri F ve Peluso I (2017). Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. DOI: 10.1155/2017/6501046
- Martin SA, Lord CJ ve Ashworth A (2010). Therapeutic targeting of the DNA mismatch repair pathway. *Clinical Cancer Research*, 16(21), 5107-5113. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0821
- Martinez-Bulit P, Garza-Ortíz A, Mijangos E, Barrón-Sosa L, Sánchez-Bartéz F, Gracia-Mora I (2015). 2, 6-Bis (2, 6-diethylphenyliminomethyl) pyridine coordination compounds with cobalt (II), nickel (II), copper (II), and zinc (II): synthesis, spectroscopic characterization, X-ray study and in vitro cytotoxicity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 142, 1-7. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2014.09.007
- Massoud SS, Perkins RS, Louka FR, Xu W, Le Roux A, Dutercq Q (2014). Efficient hydrolytic cleavage of plasmid DNA by chloro-cobalt (II) complexes based on sterically hindered pyridyl tripod tetraamine ligands: Synthesis, crystal structure and DNA cleavage. *Dalton Transactions*, 43(26), 10086-10103. DOI: 10.1039/C4DT00615A

- Matela G (2020). Schiff bases and complexes: a review on anti-cancer activity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 20(16), 1908-1917. DOI: 10.2174/1871520620666200507091207
- McKinnon KM (2018). Flow cytometry: an overview. *Current Protocols in Immunology*, 120(1), 5-1. DOI: 10.1002/cpim.40
- Menck CF, Munford V (2014). DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging?. *Genetics and Molecular Biology*, 37, 220-233. DOI: 10.1590/S1415-47572014000200008
- Min HY, Lee HY (2022). Molecular targeted therapy for anticancer treatment. *Experimental & Molecular Medicine*, 54(10), 1670-1694. DOI: 10.1038/s12276-022-00864-3
- Mitra AK, Agrahari V, Mandal A, Cholkar K, Natarajan C, Shah S (2015). Novel delivery approaches for cancer therapeutics. *Journal of Controlled Release*, 219, 248-268. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.09.067
- Miyagawa K (2008). Clinical relevance of the homologous recombination machinery in cancer therapy. *Cancer Science*, 99(2), 187-194. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2007.00644.x
- Miyake H, Hara I, Yamanaka K, Arakawa S ve Kamidono S (1999). Synergistic enhancement of resistance to cisplatin in human bladder cancer cells by overexpression of mutant-type p53 and Bcl-2. *The Journal of Urology*, 162(6), 2176-2181. DOI: 10.1016/S0022-5347(05)68155-4
- Mohamed GG, Omar MM ve Hindy AM (2005). Synthesis, characterization and biological activity of some transition metals with Schiff base derived from 2-thiophene carboxaldehyde and aminobenzoic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 62(4-5), 1140-1150. DOI: 10.1016/j.saa.2005.03.031
- Mondal S, Pakhira B, Blake AJ, Drew MG ve Chattopadhyay SK (2016). Co (III) and Ni (II) complexes of an anthracene appended aroyl hydrazone: Synthesis, crystal structures, DNA binding and catecholase activity. *Polyhedron*, 117, 327-337. DOI: 10.1016/j.poly.2016.05.052
- Morcelli SR, Bull ÉS, Terra WS, Moreira RO, Borges FV, Kanashiro MM (2016). Synthesis, characterization and antitumoral activity of new cobalt (II) complexes: Effect of the ligand isomerism on the biological activity of the complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 161, 73-82. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2016.05.003
- More MS, Joshi PG, Mishra YK ve Khanna PK (2019). Metal complexes driven from Schiff bases and semicarbazones for biomedical and allied applications: a review. *Materials Today Chemistry*, 14, 100195. DOI: 10.1016/j.mtchem.2019.100195

- Morgan SM, El-Sonbati AZ ve Eissa HR (2017). Geometrical structures, thermal properties and spectroscopic studies of Schiff base complexes: Correlation between ionic radius of metal complexes and DNA binding. *Journal of Molecular Liquids*, 240, 752-776. DOI: 10.1016/j.molliq.2017.05.114
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Motofei IG (2022). Biology of cancer; from cellular and molecular mechanisms to developmental processes and adaptation. *Seminars in Cancer Biology*, 86, 600-615. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.10.003
- Munteanu CR, Suntharalingam K (2015). Advances in cobalt complexes as anticancer agents. *Dalton Transactions*, 44(31), 13796-13808. DOI: 10.1039/C5DT02101D
- Naeimi H, Salimi F ve Rabiei K (2006). Mild and convenient one pot synthesis of Schiff bases in the presence of P2O5/Al2O3 as new catalyst under solvent-free conditions. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 260(1-2), 100-104. DOI: 10.1016/j.molcata.2006.06.055
- Neelakantan MA, Rusalraj F, Dharmaraja J, Johnsonraja S, Jeyakumar T ve Pillai MS (2008). Spectral characterization, cyclic voltammetry, morphology, biological activities and DNA cleaving studies of amino acid Schiff base metal (II) complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71(4), 1599-1609. DOI: 10.1016/j.saa.2008.06.008
- Nowell PC (1976). The clonal evolution of tumor cell populations: Acquired genetic lability permits stepwise selection of variant sublines and underlies tumor progression. *Science*, 194(4260), 23-28. DOI: 10.1126/science.959840
- Nygren P (2001). What is cancer chemotherapy?. *Acta Oncologica*, 40(2-3), 166-174. DOI: 10.1080/02841860151116204
- O'Donovan PJ, Livingston DM (2010). BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis*, 31(6), 961-967. DOI: 10.1093/carcin/bgq069
- Oiseth SJ, Aziz MS (2017). Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *J Cancer Metastasis Treat*, 3(10), 250-261. DOI: 10.20517/2394-4722.2017.41
- Okamoto S, Eltis LD (2011). The biological occurrence and trafficking of cobalt. *Metallomics*, 3(10), 963-970. DOI: 10.1039/c1mt00056j

- O'Neill ES, Kaur A, Bishop DP, Shishmarev D, Kuchel PW, Grieve SM (2017). Hypoxia-responsive cobalt complexes in tumor spheroids: laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry and magnetic resonance imaging studies. *Inorganic Chemistry*, 56(16), 9860-9868. DOI: 10.1021/acs.inorgchem.7b01368
- Pabla N, Huang S, Mi QS, Daniel R ve Dong Z (2008). ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(10), 6572-6583. DOI: 10.1074/jbc.M707568200
- Pachmayr E, Treese C ve Stein U (2017). Underlying mechanisms for distant metastasis-molecular biology. *Visceral Medicine*, 33(1), 11-20. DOI: 10.1159/000454696
- Park JH, Pyun WY ve Park HW (2020). Cancer metabolism: phenotype, signaling and therapeutic targets. *Cells*, 9(10), 2308. DOI: 10.3390/cells9102308
- Parkin DM (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International Journal of Cancer*, 118(12), 3030-3044. DOI: 10.1002/ijc.21731
- Patil PR, Javarappa R, Kumar AC ve Naik N (2022). Synthesis of Co (II), Ni (II) and Zn (II) Metal Complexes Derived from a Hydrazone Schiff Base: Electrochemical Behavior and Comprehensive Biological Studies. *ChemistrySelect*, 7(35), e202200752. DOI: 10.1002/slct.202200752
- Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A (2015). Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93, 52-79. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.03.018
- Peyrone M (1844). Ueber die einwirkung des ammoniaks auf platinchlorür. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 51(1), 1-29. DOI: 10.1002/jlac.18440510102
- Pfeffer CM, Singh AT (2018). Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 448. DOI: 10.3390/ijms19020448
- Pfeiffer P, Breith E, Lübke E ve Tsumaki T (1933). Tricyclische orthokondensierte nebenvaleenzringe. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 503(1), 84-130. DOI: 10.1002/jlac.19335030106
- Pomeroy AE, Schmidt EV, Sorger PK ve Palmer AC (2022). Drug independence and the curability of cancer by combination chemotherapy. *Trends in Cancer*, 8(11), 915-929. DOI: 10.1016/j.trecan.2022.06.009

- Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D ve Chaviara AT (2008). Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant activities of copper (II) Schiff mono-base and copper (II) Schiff base coordination compounds of dien with heterocyclic aldehydes and 2-amino-5-methyl-thiazole. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23(6), 1011-1017. DOI: 10.1080/14756360701841251
- Pouralimardan O, Chamayou AC, Janiak C ve Hosseini-Monfared H (2007). Hydrazone Schiff base-manganese (II) complexes: Synthesis, crystal structure and catalytic reactivity. *Inorganica Chimica Acta*, 360(5), 1599-1608. DOI: 10.1016/j.ica.2006.08.056
- Pravin N, Raman N (2014). Investigation of in vitro anticancer and DNA strap interactions in live cells using carboplatin type Cu (II) and Zn (II) metalloinsertors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 85, 675-687. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.08.036
- Psaila B, Lyden D (2009). The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nature Reviews Cancer*, 9(4), 285-293. DOI: 10.1038/nrc2621
- Puzari A, Borah D ve Das P (2022). Binuclear Pd (II) complexes with multidentate Schiff base ligands: synthesis, catalysis, and antibacterial properties. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 153(5-6), 435-442. DOI: 10.1007/s00706-022-02929-5
- Qi XH, Wu ZM, Wang SB, Wang BX, Wang LL, Li H (2019). Three novel Schiff base transition metal (II) complexes induce gastric cancer cell death through ROS-mediated apoptotic pathway. *Journal of Coordination Chemistry*, 72(14), 2310-2325. DOI: 10.1080/00958972.2019.1647535
- Qin JL, Qin QP, Wei ZZ, Yu YC, Meng T, Wu CX (2016). Stabilization of c-myc G-Quadruplex DNA, inhibition of telomerase activity, disruption of mitochondrial functions and tumor cell apoptosis by platinum (II) complex with 9-amino-oxoisoaporphine. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 124, 417-427. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.08.054
- Qin W, Long S, Panunzio M ve Biondi S (2013). Schiff bases: A short survey on an evergreen chemistry tool. *Molecules*, 18(10), 12264-12289. DOI: 10.3390/molecules181012264
- Rabik CA, Dolan ME (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews*, 33(1), 9-23. DOI: 10.1016/j.ctrv.2006.09.006
- Raczuk E, Dmochowska B, Samaszko-Fiertek J ve Madaj J (2022). Different Schiff bases—structure, importance and classification. *Molecules*, 27(3), 787. DOI: 10.3390/molecules27030787

- Raja DS, Bhuvanesh NS ve Natarajan K (2012). A novel water soluble ligand bridged cobalt (II) coordination polymer of 2-oxo-1, 2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde (isonicotinic) hydrazone: evaluation of the DNA binding, protein interaction, radical scavenging and anticancer activity. *Dalton Transactions*, 41(15), 4365-4377. DOI: 10.1039/c2dt12274j
- Raman N, Dhaweethu Raja J ve Sakthivel A (2007). Synthesis, spectral characterization of Schiff base transition metal complexes: DNA cleavage and antimicrobial activity studies. *Journal of Chemical sciences*, 119, 303-310. DOI: 10.1007/s12039-007-0041-5
- Raman N, Johnson Raja S ve Sakthivel A (2009). Transition metal complexes with Schiff-base ligands: 4-aminoantipyrine based derivatives—a review. *Journal of Coordination Chemistry*, 62(5), 691-709. DOI: 10.1080/00958970802326179
- Rambabu A, Pradeep Kumar M, Ganji N, Daravath S ve Shivaraj (2020). DNA binding and cleavage, cytotoxicity and antimicrobial studies of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes of 1-((E)-(4-(trifluoromethoxy)phenylimino)methyl)naphthalen-2-ol Schiff base. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38(1), 307-316. DOI: 10.1080/07391102.2019.1571945
- Randall ME, Filiaci VL, Muss H, Spirtos NM, Mannel RS, Fowler J (2006). Randomized phase III trial of whole-abdominal irradiation versus doxorubicin and cisplatin chemotherapy in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology*, 24(1), 36-44. DOI: 10.1200/JCO.2004.00.7617
- Rehfeldt SCH, Laufer S ve Goettert MI (2021). A highly selective in vitro JNK3 Inhibitor, FMU200, restores mitochondrial membrane potential and reduces oxidative stress and apoptosis in SH-SY5Y cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3701. DOI: 10.3390/ijms22073701
- Renfrew AK, O'Neill ES, Hambley TW ve New EJ (2018). Harnessing the properties of cobalt coordination complexes for biological application. *Coordination Chemistry Reviews*, 375, 221-233. DOI: 10.1016/j.ccr.2017.11.027
- Revathi N, Sankarganesh M, Rajesh J ve Raja JD (2017). Biologically active Cu (II), Co (II), Ni (II) and Zn (II) complexes of pyrimidine derivative Schiff base: DNA binding, antioxidant, antibacterial and in vitro anticancer studies. *Journal of Fluorescence*, 27, 1801-1814. DOI: 10.1007/s10895-017-2118-y
- Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD ve Barreda DR (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of Visualized Experiments*, (50), e2597. DOI: 10.3791/2597
- Riley RS, June CH, Langer R ve Mitchell MJ (2019). Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(3), 175-196. DOI: 10.1038/s41573-018-0006-z

- Rocha CRR, Silva MM, Quinet A, Cabral-Neto JB ve Menck CFM (2018). DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics*, 73, e478s. DOI: 10.6061/clinics/2018/e478s
- Ronconi L, Sadler PJ (2007). Using coordination chemistry to design new medicines. *Coordination Chemistry Reviews*, 251(13-14), 1633-1648. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.11.017
- Rosenberg B, Van Camp L ve Krigas T (1965). Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 205(4972), 698-699. DOI: 10.1038/205698a0
- Rybak LP, Whitworth CA, Mukherjea D ve Ramkumar V (2007). Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hearing Research*, 226(1-2), 157-167. DOI: 10.1016/j.heares.2006.09.015
- Sabaa MW, Mohamed RR ve Oraby EH (2009). Vanillin–Schiff's bases as organic thermal stabilizers and co-stabilizers for rigid poly (vinyl chloride). *European Polymer Journal*, 45(11), 3072-3080. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2009.08.018
- Sagar J, Chaib B, Sales K, Winslet M ve Seifalian A (2007). Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review. *Cancer Cell International*, 7(1), 1-11. DOI: 10.1186/1475-2867-7-9
- Sakai W, Swisher EM, Karlan BY, Agarwal MK, Higgins J, Friedman C (2008). Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature*, 451(7182), 1116-1120. DOI: 10.1038/nature06633
- Sakakura C, Sweeney EA, Shirahama T, Igarashi Y, Hakomori SI, Tsujimoto H (1997). Overexpression of bax sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and etoposide. *Surgery Today*, 27, 676-679. DOI: 10.1007/BF02388231
- Sakamuru S, Attene-Ramos MS ve Xia M (2016). Mitochondrial membrane potential assay. *High-throughput Screening Assays in Toxicology*, 17-22. DOI: 10.1007/978-1-4939-6346-1_2
- Sancho-Martínez SM, Prieto-García L, Prieto M, Lopez-Novoa JM ve López-Hernández FJ (2012). Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: an integrated view. *Pharmacology & Therapeutics*, 136(1), 35-55. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.07.003
- Saygıdeğer Demir B, İnce S, Yılmaz MK, Sezan A, Derinöz E, Taskin-Tok T (2022). DNA Binding and Anticancer Properties of New Pd (II)-Phosphorus Schiff Base Metal Complexes. *Pharmaceutics*, 14(11), 2409. DOI: 10.3390/pharmaceutics14112409

- Schiff H (1864). Mittheilungen aus dem Universitätslaboratorium in Pisa: Untersuchungen ü das Chinolin. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 131(1), 112-117. DOI: 10.1002/jlac.18641310113
- Schwartz JA, Lium EK ve Silverstein SJ (2001). Herpes simplex virus type 1 entry is inhibited by the cobalt chelate complex CTC-96. *Journal of Virology*, 75(9), 4117-4128. DOI: 10.1128/jvi.75.9.4117-4128.2001
- Sedaghat T, Aminian M, Abaee S, Hoveizi E, Tarassoli A, Beheshti A (2023). New organotin (IV) complexes with a bis-acyl-hydrazone ligand: Synthesis, crystal structure and immobilization on magnetic mesoporous silica nanoparticles as a strategy in cancer therapy. *Journal of Molecular Structure*, 1275, 134622. DOI: 10.1016/j.molstruc.2022.134622
- Sergent C, Franco N, Chapusot C, Lizard-Nacol S, Isambert N, Correia M (2002). Human colon cancer cells surviving high doses of cisplatin or oxaliplatin in vitro are not defective in DNA mismatch repair proteins. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 49, 445-452. DOI: 10.1007/s00280-002-0450-6
- Shachar S, Ziv O, Avkin S, Adar S, Wittschieben J, Reißner T (2009). Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. *The EMBO Journal*, 28(4), 383-393. DOI: 10.1038/emboj.2008.281
- Shahabadi N, Kashanian S ve Darabi F (2010). DNA binding and DNA cleavage studies of a water soluble cobalt (II) complex containing dinitrogen Schiff base ligand: The effect of metal on the mode of binding. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(9), 4239-4245. DOI: 10.1016/j.ejmech.2010.06.020
- Shakdofa MM, Shtaiwi MH, Morsy N ve Abdel-Rassel T (2014). Metal complexes of hydrazones and their biological, analytical and catalytic applications: A review. *Main Group Chemistry*, 13(3), 187-218. DOI: 10.3233/MGC-140133
- Shen L, Wen N, Xia M, Zhang YU, Liu W, Xu YE (2016). Calcium efflux from the endoplasmic reticulum regulates cisplatin-induced apoptosis in human cervical cancer HeLa cells. *Oncology Letters*, 11(4), 2411-2419. DOI: 10.3892/ol.2016.4278
- Sheth S, Mukherjea D, Rybak LP ve Ramkumar V (2017). Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and otoprotection. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 338. DOI: 10.3389/fncel.2017.00338
- Shumi G, Desalegn T, Demissie TB, Ramachandran VP ve Eswaramoorthy R (2022). Metal complexes in target-specific anticancer therapy: Recent trends and challenges. *Journal of Chemistry*, 2022, 1-19. DOI: 10.1155/2022/9261683

- Siddik ZH (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47), 7265-7279. DOI: 10.1038/sj.onc.1206933
- Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE ve Jemal A (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 7-33. DOI: 10.3322/caac.21708
- Singh N, Ranjana R, Kumari M ve Kumar B (2016). A review on biological activities of hydrazone derivatives. *International Journal Pharmaceutical Clinical Research*, 8(3), 162-6. Erişim Adresi: <http://impactfactor.org/PDF/IJPCR/8/IJPCR,Vol8,Issue3,Article2.pdf>
- Singh P, Singh DP ve Singh VP (2014). Synthesis, spectral and single crystal X-ray diffraction studies on Mn (II), Ni (II), Cu (II) and Zn (II) complexes with 2-hydroxy-benzoic acid (phenyl-pyridin-2-yl-methylene)-hydrazide. *Polyhedron*, 81, 56-65. DOI: 10.1016/j.poly.2014.05.066
- Smith J, Tho LM, Xu N ve Gillespie DA (2010). The ATM–Chk2 and ATR–Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advances in Cancer Research*, 108, 73-112. DOI: 10.1016/S0065-230X(10)08002-4
- Soroceanu A, Bargan A (2022). Advanced and biomedical applications of Schiff-base ligands and their metal complexes: A review. *Crystals*, 12(10), 1436. DOI: 10.3390/cryst12101436
- Sökeland G, Schumacher U (2019). The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade. *Molecular Cancer*, 18(1). DOI: 10.1186/s12943-018-0937-3
- Stevens EV, Nishizuka S, Antony S, Reimers M, Varma S, Young L (2008). Predicting cisplatin and trabectedin drug sensitivity in ovarian and colon cancers. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(1), 10-18. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0192
- Stojic L, Brun R ve Jiricny J (2004). Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair*, 3(8-9), 1091-1101. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.06.006
- Stratton MR, Campbell PJ ve Futreal PA (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719-724. DOI: 10.1038/nature07943
- Subasi NT (2022). Overview of Schiff bases. *Schiff Base in Organic, Inorganic and Physical Chemistry*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.108178
- Sumrra SH, Ibrahim M, Ambreen S, Imran M, Danish M ve Rehmani FS (2014). Synthesis, spectral characterization, and biological evaluation of transition metal complexes of bidentate N, O donor Schiff bases. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2014. DOI: 10.1155/2014/812924

- Sun Y, Lu Y, Bian M, Yang Z, Ma X ve Liu W (2021). Pt (II) and Au (III) complexes containing Schiff-base ligands: A promising source for antitumor treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 211, 113098. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.113098
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660
- Swisher EM, Sakai W, Karlan BY, Wurz K, Urban N ve Taniguchi T (2008). Secondary BRCA1 mutations in BRCA1-mutated ovarian carcinomas with platinum resistance. *Cancer Research*, 68(8), 2581-2586. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0088
- Szklarzewicz J, Jurowska A, Matoga D, Kruczała K, Kazek G, Mordyl B (2020). Synthesis, coordination properties and biological activity of vanadium complexes with hydrazone Schiff base ligands. *Polyhedron*, 185, 114589. DOI: 10.1016/j.poly.2020.114589
- Taniguchi T, Tischkowitz M, Ameziane N, Hodgson SV, Mathew CG, Joenje H (2003). Disruption of the Fanconi anemia–BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nature Medicine*, 9(5), 568-574. DOI: 10.1038/nm852
- Taylor JK, Zhang QQ, Monia BP, Marcusson EG ve Dean NM (1999). Inhibition of Bcl-xL expression sensitizes normal human keratinocytes and epithelial cells to apoptotic stimuli. *Oncogene*, 18(31), 4495-4504. DOI: 10.1038/sj.onc.1202836
- Tchounwou PB, Dasari S, Noubissi FK, Ray P ve Kumar S (2021). Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy. *Journal of Experimental Pharmacology*, 303-328. DOI: 10.2147/JEP.S267383
- Tokino T, Nakamura Y (2000). The role of p53-target genes in human cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 33(1), 1-6. DOI: 10.1016/S1040-8428(99)00051-7
- Tonini T, Rossi F ve Claudio PP (2003). Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene*, 22(42), 6549-6556. DOI: 10.1038/sj.onc.1206816
- Tsantis ST, Tzimopoulos DI, Holynska M ve Perlepes SP (2020). Oligonuclear actinoid complexes with Schiff bases as ligands—older achievements and recent progress. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 555. DOI: 10.3390/ijms21020555
- Tsvetkova D, Ivanova S (2022). Application of approved cisplatin derivatives in combination therapy against different cancer diseases. *Molecules*, 27(8), 2466. DOI: 10.3390/molecules27082466

- Tverdova NV, Pelevina ED, Giricheva NI, Girichev GV, Kuzmina NP ve Kotova OV (2012). Molecular structures of 3d metal complexes with various Schiff bases studied by gas-phase electron diffraction and quantum-chemical calculations. *Journal of Molecular Structure*, 1012, 151-161. DOI: 10.1016/j.molstruc.2011.06.037
- Tyagi P, Chandra S, Saraswat BS ve Yadav D (2015). Design, spectral characterization, thermal, DFT studies and anticancer cell line activities of Co (II), Ni (II) and Cu (II) complexes of Schiff bases derived from 4-amino-5-(pyridin-4-yl)-4H-1, 2, 4-triazole-3-thiol. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 145, 155-164. DOI: 10.1016/j.saa.2015.03.034
- Uddin MN, Ahmed SS ve Alam SR (2020). Biomedical applications of Schiff base metal complexes. *Journal of Coordination Chemistry*, 73(23), 3109-3149. DOI: 10.1080/00958972.2020.1854745
- Ulukaya E, Ozdikicioglu F, Oral AY ve Demirci M (2008). The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology in Vitro*, 22(1), 232-239. DOI: 10.1016/j.tiv.2007.08.006
- Valastyan S, Weinberg RA (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2), 275-292. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.024
- Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthoney A, Maraveyas A (2010). Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *New England Journal of Medicine*, 362(14), 1273-1281. DOI: 10.1056/nejmoa0908721
- Vamsikrishna N, Daravath S, Ganji N ve Pasha N (2020). Synthesis, structural characterization, DNA interaction, antibacterial and cytotoxicity studies of bivalent transition metal complexes of 6-aminobenzothiazole Schiff base. *Inorganic Chemistry Communications*, 113, 107767. DOI: 10.1016/j.inoche.2020.107767
- Van Den Ancker TR, Cave GW ve Raston CL (2006). Benign approaches for the synthesis of bis-imine Schiff bases. *Green Chemistry*, 8(1), 50-53. DOI: 10.1039/b513289d
- Venkitaraman AR (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 108(2), 171-182. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00615-3
- Vousden KH, Lu X (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), 594-604. DOI: 10.1038/nrc864
- Wachsmann P, Lamprecht A (2012). Polymeric nanoparticles for the selective therapy of inflammatory bowel disease. *Methods in Enzymology*, 508, 377-397. DOI: 10.1016/B978-0-12-391860-4.00019-7

- Wang L, Zhao X, Fu J, Xu W ve Yuan J (2021). The role of tumour metabolism in cisplatin resistance. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 691795. DOI: 10.3389/fmolb.2021.691795
- Wang RM, Mao JJ, Song JF, Huo CX ve He YF (2007). Antioxidant activity of bovine serum albumin binding amino acid Schiff-bases metal complexes. *Chinese Chemical Letters*, 18(11), 1416-1418. DOI: 10.1016/j.cclet.2007.09.015
- Watanabe S, Yoshioka H, Sakai H, Hotta K, Takenoyama M, Yamada K (2019). Necitumumab plus gemcitabine and cisplatin versus gemcitabine and cisplatin alone as first-line treatment for stage IV squamous non-small cell lung cancer: A phase 1b and randomized, open-label, multicenter, phase 2 trial in Japan. *Lung Cancer*, 129, 55-62. DOI: 10.1016/j.lungcan.2019.01.005
- Welsh C, Day R, McGurk C, Masters JR, Wood RD ve Köberle B (2004). Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *International Journal of Cancer*, 110(3), 352-361. DOI: 10.1002/ijc.20134
- Westheimer FH, Taguchi K (1971). Catalysis by molecular sieves in the preparation of ketimines and enamines. *The Journal of Organic Chemistry*, 36(11), 1570-1572. DOI: 10.1021/jo00810a033
- Wittekind C, Neid M (2005). Cancer invasion and metastasis. *Oncology*, 69(1), 14-16. DOI: 10.1159/000086626
- World Health Organization (WHO), GLOBOCAN Database (2020). Erişim adresi: <https://gco.iarc.fr/today/> Son Erişim Tarihi: 28.03.2023
- Wu F, Lin X, Okuda T ve Howell SB (2004). DNA polymerase ζ regulates cisplatin cytotoxicity, mutagenicity, and the rate of development of cisplatin resistance. *Cancer Research*, 64(21), 8029-8035. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3942
- Wu YG, Wang DB, Hu JJ, Song XQ, Xie CZ, Ma ZY (2019). An iron (III) complex selectively mediated cancer cell death: crystal structure, DNA targeting and in vitro antitumor activities. *Inorganic Chemistry Frontiers*, 6(4), 1040-1049. DOI: 10.1039/c9qi00030e
- Xavier A, Srividhya N (2014). Synthesis and study of Schiff base ligands. *IOSR Journal of Applied Chemistry*, 7(11), 06-15. DOI: 10.9790/5736-071110615
- Xiao C, Yang L, Jin L, Lin W, Zhang F, Huang S (2022). Prognostic and immunological role of cuproptosis-related protein FDX1 in pan-cancer. *Frontiers in Genetics*, 13, 962028. DOI: 10.3389/fgene.2022.962028

- Xu GW, Mymryk JS ve Cairncross JG (2005). Inactivation of p53 sensitizes astrocytic glioma cells to BCNU and temozolomide, but not cisplatin. *Journal of Neuro-oncology*, 74, 141-149. DOI: 10.1007/s11060-004-6601-3
- Xu J, Zhou T, Xu ZQ, Gu XN, Wu WN, Chen H (2017). Synthesis, crystal structures and antitumor activities of copper (II) complexes with a 2-acetylpyrazine isonicotinoyl hydrazone ligand. *Journal of Molecular Structure*, 1128, 448-454. DOI: 10.1016/j.molstruc.2016.09.016
- Yahya EB, Alqadhi AM (2021). Recent trends in cancer therapy: A review on the current state of gene delivery. *Life Sciences*, 269, 119087. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119087
- Yao Q, Qi J, Zheng Y, Qian K, Wei L, Maimaitiyiming M (2019). Synthesis, anticancer activity and mechanism of iron chelator derived from 2, 6-diacetylpyridine bis (acylhydrazones). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 193, 1-8. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2019.01.003
- Yeap GY, Ha ST, Ishizawa N, Suda K, Boey PL ve Mahmood WAK (2003). Synthesis, crystal structure and spectroscopic study of para substituted 2-hydroxy-3-methoxybenzalideneanilines. *Journal of Molecular Structure*, 658(1-2), 87-99. DOI: 10.1016/S0022-2860(03)00453-8
- Yilmaz VT, Icel C, Turgut OR, Aygun M, Erkisa M, Turkdemir MH (2018). Synthesis, structures and anticancer potentials of platinum (II) saccharinate complexes of tertiary phosphines with phenyl and cyclohexyl groups targeting mitochondria and DNA. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 155, 609-622. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.06.035
- Yusof ENM, Latif MA, Tahir MI, Sakoff JA, Veerakumarasivam A, Page AJ (2020). Homoleptic tin (IV) compounds containing tridentate ONS dithiocarbazate Schiff bases: Synthesis, X-ray crystallography, DFT and cytotoxicity studies. *Journal of Molecular Structure*, 1205, 127635. DOI: 10.1016/j.molstruc.2019.127635
- Zamble DB, Mu D, Reardon JT, Sancar A ve Lippard SJ (1996). Repair of cisplatin– DNA adducts by the mammalian excision nuclease. *Biochemistry*, 35(31), 10004-10013. DOI: 10.1021/bi960453+
- Zhang CX, Lippard SJ (2003). New metal complexes as potential therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(4), 481-489. DOI: 10.1016/S1367-5931(03)00081-4
- Zhang C, Xu C, Gao X ve Yao Q (2022). Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. *Theranostics*, 12(5), 2115-2132. DOI: 10.7150/thno.69424
- Zhang N, Fan YH, Zhang Z, Zuo J, Zhang PF, Wang Q (2012). Syntheses, crystal structures and anticancer activities of three novel transition metal complexes with Schiff base derived from 2-acetylpyridine and l-tryptophan. *Inorganic Chemistry Communications*, 22, 68-72. DOI: 10.1016/j.inoche.2012.05.022

Zhang P, Sadler PJ (2017). Redox-Active Metal Complexes for Anticancer Therapy. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2017(12), 1541-1548. DOI: 10.1002/ejic.201600908

Zhong L, Li Y, Xiong L, Wang W, Wu M, Yuan T (2021). Small molecules in targeted cancer therapy: Advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 201. DOI: 10.1038/s41392-021-00572-w

Zhu C, Hu W, Wu H ve Hu X (2014). No evident dose-response relationship between cellular ROS level and its cytotoxicity—a paradoxical issue in ROS-based cancer therapy. *Scientific Reports*, 4(1), 5029. DOI: 10.1038/srep05029



EKLER

Ek 1: ETİK KURUL ONAYI

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ'NE

Danışmanı olduğum 2044200003 nolu Melis KILIÇ'ın "Katyonik Grup İçeren Schiff Bazı Ligandı ve Co (II) Metal Kompleksinin Kanser Hücreleri Üzerine Antikanser Etkilerinin Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans Tezi için etik kurul kararı gerekmemektedir.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

06/01/2022
Doç. Dr. Esin SAKALLI ÇETİN
Tıbbi Biyoloji AD.

Ek 2: KURUM İZİN ONAYI

21.06.2022

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRLÜĞÜNE

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Melis KILIÇ'ın "Katyonik Grup İçeren Schiff Bazı Ligandı ve Co (II) Metal Kompleksinin Kanseri Hücreleri Üzerine Antikanser Etkilerinin Araştırılması" isimli planlanan tez çalışmasının laboratuvar aşamalarının Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalına ait laboratuvarlarda yürütülmesinde bir sakınca olmadığını bilginize sunar ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr. Tuba EDGÜNLÜ
Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı

Ek 3: ÖZ GEÇMİŞ

Adı Soyadı	: Melis KILIÇ
Yabancı Dili	: İngilizce (B1)
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)	: Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Mezunlu, 2019.
Lise	: Semih Tınay Anadolu Lisesi (İzmir)
Lisans	: Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik (2014-2019)
Yüksek Lisans	: Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıbbi Biyoloji (2020-)
Çalıştığı Kurum / Kurumlar ve Yıl :	
Sözlü Bildiri	: Kılıç, M., Aksu, E. N., & Çetin, E. S. Katyonik Grup İçeren Schiff Bazı Ligandı Ve Co (II) Metal Kompleksinin Kansere Hücreleri Üzerinde Antikanser Etkilerinin Araştırılması. Mskü, 1. Sağlık Bilimleri Öğrenci Sempozyumu, 70. (24 Mayıs 2022)
Bursiyer	: MSKÜ BAP Araştırma Projesi, “Pelvik Organ Prolapsus (POP) Cerrahi Komplikasyonlarında Mitojen Aktive Edici Protein Kinase (MAPK) Yolağı Genlerinin Rolünün Araştırılması MSKÜ BAP Araştırma Projesi, “Yeni 1,2,3 Triazol Türevi Bileşiklerinin Kansere Hücreleri Üzerine Antikanser Etkilerinin Araştırılması”