



**POTANSİYEL DNA HEDEFLİ BİR ANTİKANSER İLAÇ ADAYI OLARAK
YENİ SENTEZLENEN ASİMETRİK DİİMİNE SCHİFF BAZININ
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN VE DNA ETKİLEŞİMLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Zehra Kübra YILMAZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2019

Zehra Kübra YILMAZ tarafından hazırlanan “POTANSİYEL DNA HEDEFLİ BİR ANTİKANSER İLAÇ ADAYI OLARAK YENİ SENTEZLENEN ASİMETRİK DİİMİNE SCHİFF BAZININ BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN VE DNA ETKİLEŞİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Belma ASLIM

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Başkan: Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Prof. Dr. Ümmühan ÖZDEMİR ÖZMEN

Kimya Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Tez Savunma Tarihi: 02/07/2019

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Zehra Kübra YILMAZ

02/07/2019

POTANSİYEL DNA HEDEFLİ BİR ANTİKANSER İLAÇ ADAYI OLARAK YENİ
SENTEZLENEN ASİMETRİK DİİMİNE SCHIFF BAZININ BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN VE DNA ETKİLEŞİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)

Zehra Kübra YILMAZ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Temmuz 2019

ÖZET

Çoğu kemoterapötik antikanser ilaç, DNA ile etkileşime girerek antitümör aktivite göstermektedir. Antikanser adayı yeni ilaçların keşfedilmesinde DNA hedefli ilaçlar önemli yer tutmaktadır. Bu tez çalışmada, yeni sentezlenen, karakterize edilen ve yapısal özellikleri tanımlanan 2-(4-(2-hidroksibenzilidenamino)benzilidenamino)benzoik asit olarak adlandırılan asimetrik diimin Schiff bazının DNA hedefli antikanser ilaç aday olabilme potansiyelini ortaya koymak amacı ile biyolojik aktivitesi çalışılmıştır. Öncelikli olarak, DNA bağlanma, DNA kesim aktivitesi çalışmaları ile DNA hedefli ilaç aday olabilme potansiyeli araştırılmıştır. Sonra ise, topoizomera α inhibisyon aktivitesi, HT-29 ve HeLa kanser hücre hatlarında antiproliferatif aktivite ve sitokinez-blok mikronükleus (CBMN) çalışmaları ile antikanser ilaç aday olabilme potansiyeli ortaya konulmuştur. Ayrıca, Schiff bazının biyolojik materyallerde güvenli kullanımı mutajenite çalışması (Ames testi) ile test edilmiştir. Schiff bazının interkalasyon yoluyla DNA'ya etkili bir şekilde bağlandığı, 2000-3500 μ M arasındaki konsantrasyonlarda singlet oksijen veya singlet oksijen benzeri türler gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluştuğu bir oksidatif DNA hasar yoluğ α üzerinden kesim aktivitesi gösterdiğ α , 500 ve 1000 μ M konsantrasyonlarında topoizomera α inhibisyon aktivitesi gösterdiğ α tespit edilmiştir. Ayrıca, en yüksek 500 ve 1000 μ M konsantrasyonlarında HT-29 ve HeLa hücrelerinde antiproliferatif aktivite gösterdiğ α ve 1000 μ M konsantrasyonunda da apoptozis ölüm yoluğ α üzerinden genotoksik bir hasar yarattığı belirlenmiştir. 200-2000 μ M arasındaki konsantrasyonlarda ise, mutajenik bir aktivite sergilemediğ α tespit edilmiştir. Sonuç olarak, Schiff bazının düşük konsantrasyonlarda DNA ile etkileştığ α , 2000 μ M ve daha yüksek konsantrasyonlar da DNA'yı keserek, topoizomera α 'yı inhibe ederek, kanser hücrelerinde de DNA hasarını indükleyerek hücre bölünmesini engellediğ α ve neticede apoptozis veya otofaji ölüm yoluğ α üzerinden etkili olduğı sonucuna varılmıştır. Bu özelliklerinden ötürü, Schiff bazının güvenli kullanılabilecek, DNA hedefli bir antikanser ilaç olmaya aday olabileceğ α söylenebilir.

Bilim Kodu : 20309
Anahtar Kelimeler : Schiff bazı, DNA etkileşim, Topoizomera α inhibisyonu, Antiproliferatif aktivite, Mikronükleus testi, Apoptozis, Mutajenite
Sayfa Adedi : 126
Danışman : Prof. Dr. Belma ASLIM

INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES AND DNA INTERACTIONS OF
NEWLY SYNTHESIZED ASYMMETRIC DIIMINE SCHIFF BASE AS A POTENTIAL
DNA-TARGETED ANTICANCER DRUG

(M. Sc. Thesis)

Zehra Kubra YILMAZ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2019

ABSTRACT

Most chemotherapeutic anticancer drugs show antitumor activity by interacting with DNA. DNA-targeted drugs hold an important place in the discovery of new anticancer drugs. In this thesis study, the biological activity of an asymmetric diimine Schiff Base designated as 2-(4-(2-hydroxybenzylideneamino)benzylideneamino) benzoic acid, which was newly synthesized, characterized, and whose structural properties were defined, was studied in an attempt to discover its potential for being a DNA-targeted anticancer drug candidate. Firstly, its potential to be a DNA-targeted drug was investigated by DNA binding and DNA cleavage activity studies. Then, its potential to be an anticancer drug was demonstrated by topoisomerase II α inhibition activity, antiproliferative activity in HT-29 and HeLa cancer cell lines, and cytokinesis-block micronucleus (CBMN) studies. In addition, safe use of Schiff base in biological materials was tested by mutagenicity study (Ames test). It was demonstrated that the Schiff base effectively bound to DNA via intercalation; showed cleavage activity through an oxidative DNA damage pathway whereby reactive oxygen species (ROS) such as singlet oxygen or singlet oxygen-like entity are formed at concentrations of 2000-3500 μ M; and showed topoisomerase II α inhibition activity at concentrations of 500 and 1000 μ M. Furthermore, it was determined that, it showed antiproliferative activity in HT-29 and HeLa cells at the highest 500 and 1000 μ M concentrations and it caused genotoxic damage via apoptosis death pathway at 1000 μ M concentration. At concentrations between 200 and 2000 μ M, on the other hand, it was found that it did not show a mutagenic activity. As a result, it was concluded that the Schiff base interacts with DNA at low concentrations, inhibits cell division by cleaving DNA, inhibits topoisomerase II α , and induces DNA damage in cancer cells, thereby acting via apoptosis or autophagy death pathway at concentrations of 2000 μ M or above. Because of these properties, it may be suggested that the Schiff base may be candidate for a safe DNA-targeted anticancer drug.

Science Code : 20309

Keywords : Schiff Base, DNA interaction, Topoisomerase II α inhibition, Antiproliferative activity, Micronucleus assay, Apoptosis, Mutagenicity

Page Number : 126

Supervisor : Prof. Dr. Belma ASLIM

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince ve tez çalışmamın her aşamasında engin bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, çalışmalarım için her türlü araştırma olanağını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, değerli danışman hocam Prof. Dr. Belma ASLİM'a en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada, bilgilerini benimle paylaşan ve desteğini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ'a ve Prof. Dr. Zekiye SULUDERE'ye, tez çalışmamda kullanılan 2-(4-(2-hidroksibenzilidenamino) benzilidenamino) benzoik asit olarak adlandırılan asimetric diimin Schiff bazını sentezleyen ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen hocam Araş. Gör. Dr. Özlem ÖZDEMİR'e, tez çalışmalarım boyunca her konuda her zaman sabır ve anlayışı ile yanımda olan, yardımını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili hocam Arş. Gör. Ümmügülsüm TÜKENMEZ'e ve Gazi Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda birlikte çalıştığım arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Hayatımın her anında olduğu gibi bu zorlu süreçte de sabır ve anlayışları ile yanımda olan, maddi ve manevi destekleriyle beni yalnız bırakmayan, emeklerini asla ödeyemeyeceğim babam Ali YILMAZ ve annem Zemzem YILMAZ'a, sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim kardeşlerim Yagnur YILMAZ ve Aysu YILMAZ'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Schiff Bazları.....	5
2.1.1. Diimin Schiff bazları	6
2.1.2. Aminoasit Schiff bazları	7
2.2. Kanser	7
2.3. Mevcut Kanser İlaçları ve Hedefleri	8
2.4. Metal Bazlı Antikanser İlaçlar ve Hedefleri	9
2.5. Topoizomeras İnhibitörü Olarak Geliştirilen Antikanser İlaçlar	10
2.5.1. Topoizomeras II inhibitörleri	13
2.6. DNA Hedefli Antikanser İlaçlar.....	14
2.6.1. DNA-ilaç etkileşimi.....	16
2.6.2. DNA-ilaç bağlanma şekilleri.....	17
2.6.3. DNA-ilaç etkileşiminin araştırılmasında kullanılan analiz yöntemleri	23
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Materyal	27

	Sayfa
3.1.1. Asimetrik diimin Schiff bazı	27
3.1.2. Çalışmada kullanılan hücre hatları	27
3.1.3. Çalışmada kullanılan <i>Salmonella typhimurium</i> test suşları	28
3.1.4. Mutajenite testinde kullanılan besi ortamları ve çözeltiler	29
3.2. Metot.....	32
3.2.1. Asimetrik diimin Schiff bazının hazırlanışı	32
3.2.2. DNA bağlanma çalışması.....	33
3.2.3. DNA kesim aktivitesi.....	34
3.2.4. Antikanser aktivite	35
3.2.5. Topoizomeraz II α inhibisyon çalışması	40
3.2.6. Mutajenite testi	41
3.2.7. İstatistiksel analizler	46
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	47
4.1. Asimetrik Diimin Schiff Bazının Yapısı	47
4.2. Asimetrik Diimin Schiff Bazının DNA Bağlanma Çalışması	48
4.3. Asimetrik Diimin Schiff Bazının DNA Kesim Aktivitesi	50
4.3.1. Asimetrik diimin Schiff bazının indirgeyici ajan olmaksızın DNA kesim aktivitesi	50
4.3.2. Asimetrik diimin Schiff bazının indirgeyici ajanlar varlığında DNA kesim aktivitesi	51
4.3. Asimetrik Diimin Schiff Bazının Antikanser Etkisi.....	57
4.4.1. Asimetrik diimin Schiff bazının kanser hücrelerinde (HT-29, HeLa) antiproliferatif etkisi	57
4.4.2. Asimetrik diimin Schiff bazının HT-29 ve HeLa kanser hücre hatlarında sitokinez-blok mikronükleus (CBMN) testi.....	60
4.4. Asimetrik Diimin Schiff Bazının Topoizomeraz II α İnhibisyon Aktivitesi	67
4.6. Mutajenite Testi.....	67
4.6.1. Genetik işaretlerin kontrolü.....	67

	Sayfa
4.6.2. Asimetrik diimin Schiff bazının mutajenik etkisi.....	69
5. TARTIŞMA	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	89
KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ	125

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Topoizomeras inhibitörü olarak geliştirilen antikanser ilaçlar	12
Çizelge 2.2. DNA hedefli antikanser ilaçlar	14
Çizelge 4.1. Schiff bazının (35 μ M), 5-120 μ M arasındaki konsantrasyonlarda CT-DNA ile etkileşimi ve spektral parametreleri.....	49
Çizelge 4.2. Schiff bazının farklı konsantrasyonlarının süpersarmal sirküler pBR322 plazmid DNA'sındaki kesim verileri.....	51
Çizelge 4.3. Schiff bazının farklı konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucunda HT-29 ve HeLa hücrelerinin proliferasyonu üzerine olan inhibitör etkisi	60
Çizelge 4.4. Schiff bazına maruz bırakılan HT-29 hücrelerinde MN oluşumu.....	61
Çizelge 4.5. Schiff bazına maruz bırakılan HeLa hücrelerinde MN oluşumu	62
Çizelge 4.6. Schiff bazının 200-2000 μ M konsantrasyon aralığında <i>S. typhimurium</i> TA98 ve <i>S. typhimurium</i> TA100 suşlarına göre mutajenitesi.....	71

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Diimin Schiff bazlarının genel yapısı	6
Şekil 2.2. Aminoasit Schiff bazlarının genel yapısı	7
Şekil 2.3. (a) Dış ajanların kovalent olarak nükleotitleri bağlayabildiği reaksiyon bölgeleri: metal bağlama bölgeleri (kırmızı); alkilasyon ve nitrozasyon reaksiyon bölgeleri (mavi), (b) cisplatinin aynı iplikteki iki guanine çapraz bağlanması sonucunda oluşan eklentinin kimyasal yapısı, d (GpG)	18
Şekil 2.4. Kovalent olmayan bağlanma tipleri	19
Şekil 2.5. İnterkalasyon yoluyla bağlanan ilaçlar: (a) Etidyum bromür, (b) Proflavin ve (c) Benzopiren, Oluğa bağlanan ilaçlar: (d) DAPI, (e) Netropsin ve (f) Distamisin	20
Şekil 3.1. 2-(4-(2-hidroksibenzilidenamino)benzilidenamino)benzoik asit	27
Şekil 3.2. Asimetrik diimin Schiff bazının sentez basamakları	33
Şekil 3.3. Tetrazolyum tuzlarının formazana indirgenmesi	36
Şekil 4.1. CT-DNA'nın artan konsantrasyonlarının (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 60, 90 ve 120 μ M) varlığında ve CT-DNA yokluğunda, Schiff bazının (35 μ M) UV absorbans spektrumları. Ek olarak, UV absorpsiyon eğrisinin [DNA]/(ea-ef) ile [DNA] verilerine göre çizimi	49
Şekil 4.2. Schiff bazının farklı konsantrasyonlarının, (A) HT-29 ve (B) HeLa kanser hücrelerine karşı 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasındaki % canlılık değerleri	59

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. HT-29 hücre hattının inverted mikroskop görüntüsü (10X)	28
Resim 3.2. HeLa hücre hattının inverted mikroskop görüntüsü (10X)	28
Resim 3.3. <i>S. typhimurium</i> TA98 (A) ve <i>S. typhimurium</i> TA100 (B) mutant suşlarının 100X'lik objektifteki ışık mikroskobu görüntüleri	29
Resim 3.4. Formazan kristallerinin 10X'lik objektifteki inverted mikroskop görüntüsü	37
Resim 3.5. HT-29 (A) ve HeLa (B) hücre hatlarında MTT yöntemi ile gerçekleştirilen antiproliferatif aktivite çalışmasının mikrolaka görüntüleri	38
Resim 4.1. Schiff bazının pBR322 plazmid DNA'sını kesim aktivitesi	51
Resim 4.2. H ₂ O ₂ varlığında, Schiff bazının pBR322 plazmid DNA'sını kesim aktivitesi	52
Resim 4.3. AA varlığında, Schiff bazının pBR322 plazmid DNA'sını kesim aktivitesi	53
Resim 4.4. EtOH varlığında, Schiff bazının pBR322 plazmid DNA'sını kesim aktivitesi	54
Resim 4.5. NaN ₃ varlığında, Schiff bazının pBR322 plazmid DNA'sını kesim aktivitesi	55
Resim 4.6. DAPI varlığında, Schiff bazının pBR322 plazmid DNA'sını kesim aktivitesi	56
Resim 4.7. MG varlığında, Schiff bazının pBR322 plazmid DNA'sını kesim aktivitesi	56
Resim 4.8. HT-29 hücre hattındaki hasarın morfolojik olarak değerlendirilmesi (A) Schiff bazı ile muamele edilmeyen hücrelerin morfolojisi, Schiff bazı ile muamele edilen; (B) apoptotik hücreler, (C) bir MN içeren çift çekirdekli (binükleat) hücreler, (D) vakuol içeren hücre sitoplazması örnekleri	63
Resim 4.9. HeLa hücre hattındaki hasarın morfolojik olarak değerlendirilmesi (A) Schiff bazı ile muamele edilmeyen hücrelerin morfolojisi, Schiff bazı ile muamele edilen; (B) apoptotik hücreler, (C) bir MN içeren çift çekirdekli (binükleat) hücreler, (D) vakuol içeren hücre sitoplazması örnekleri	64
Resim 4.10. HT-29 hücre hattındaki hasarın, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile değerlendirilmesi	65

Resim	Sayfa
Resim 4.11. HeLa hücre hattındaki hasarın, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile değerlendirilmesi.....	66
Resim 4.12. Schiff bazının insan topo II α (1 U) inhibisyon aktivitesi	67
Resim 4.13. <i>S. typhimurium</i> 'un (TA98) histidin gereksinimi kontrolü sonuçları	68
Resim 4.14. <i>S. typhimurium</i> 'un (TA98) <i>uvrB</i> mutasyonu kontrolü sonuçları.....	68
Resim 4.15. <i>S. typhimurium</i> 'un (TA98) <i>rfa</i> mutasyonu kontrolü sonucu	69

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
~	Yaklaşık olarak
%	Yüzde
$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Mikrogram/mikrolitre
$\mu\text{g}/\text{mL}$	Mikrogram/mililitre
mg/mL	Miligram/mililitre
g/mol	Gram/mol
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
cm	Santimetre
nm	Nanometre
g	Gram
ng	Nanogram
mL	Mililitre
μL	Mikrolitre
μm	Mikromol
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
V	Volt
pH	Asitlik bazlık birimi
M	Molar
ϵ	Molar absorpsiyon katsayısı
α	Alfa
MHz	Megahertz
U	Unit
$\text{\AA}$	Angstrom
kJ	Kilo joule

Kısaltmalar**Açıklamalar****A**

Adenin

AA

Askorbik Asit

AFM

Atomic Force Microscopy

ALL

Akut Lenfoblastik Lösemi

AML

Akut Miyeloblastik Lösemi

ATP

Adenozin Trifosfat

C

Sitozin

CBMN

Cytokinesis Block Micronucleus

CBPI

Cytokinesis Block Proliferation Index

CD

Sirküler Dikroizm

CE

Kapiller Elektroforez

CML

Kronik Miyelojenöz Lösemi

CO₂

Karbondioksit

CPT

Kamptotesin

CRC

Kolonrektal Kanser

CT-DNA

Calf Thymus–Deoksiribonükleik Asit

Cyt-B

Cytochalasin-B

DAPI

4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidroklorid

Dk

Dakika

DMEM

Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO

Dimetilsülfoksit

DNA

Deoksiribonükleik Asit

DSC

Differential Scanning Calorimetry

DTT

Ditiyotreitol

EB

Etidyum Bromür

EDTA

Etilendiamin Tetra Asetik Asit

EPR

Elektron Paramanyetik Rezonans

ESI

Elektorsprey İyonizasyonu

FBS

Fetal Bovine (Sığır) Serum

FDA

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FID

Fluorescent Intercalator Displacement

Kısaltmalar**Açıklamalar****FT-IR**

Fourier Transform Infrared

G

Guanin

HB

Histidin/Biyotin

HBA

Histidin/Biyotin/Ampisilin

HPLC

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

HPV

İnsan Papilloma Virüsü

ICD

Induced Circular Dichroism

IR

Infrared

ITC

Isothermal Titration Calorimetry

LC

Lineer Form

LD

Lineer Dikroizm

MDR

Multiple Drug Resistance

MG

Methyl Green

MGA

Minimal Glukoz Agar

MN

Mikronükleus

MO

Mutajenik Oran

MPA

3-Merkaptopropiyonik Asit

MvH

McGhee-von Hippel

NA

Nutrient Agar

NB

Nutrient Broth

NC

Çentikli Sirküler Form

NMR

Nükleer Manyetik Rezonans

OECD

Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü

PBS

Phosphate Buffered Saline

RI

Replication Index

RNA

Ribonükleik Asit

ROS

Reaktif Oksijen Türleri

rpm

Dakıkada Devir Sayısı

RR

Ribonükleotit Redüktaz

SC

Süpersarmal Form

SD

Standart Sapma

Kısaltmalar**SERS****SF****SPR****T****TAE****UV****UV-vis****Açıklamalar**

Surface Enhanced Raman Spectroscopy

Serum Fizyoloji

Surface Plasmon Resonance

Timin

Tris-Asetik Asit-EDTA

Ultraviyole

Ultraviyole-visible

1. GİRİŞ

Kanser, dünya çapındaki ölümlerin başlıca nedeni haline gelen, genellikle genetik ve epigenetik değişikliklerin çeşitliliği ile karakterize edilen ve DNA replikasyonunun inhibisyonu üzerinden kanser hücrelerinin çoğalmasını önleyerek tedavi edilen multigenik bir hastalık sınıfıdır (Helleday, Petermann, Lundin, Hodgson ve Sharma, 2008).

Günümüzde klinik olarak kullanılan antikanser ilaçların metastaz kontrol yeteneğinin olmaması veya seçici olmama gibi problemlerin hala devam etmesi (Chambers, Groom ve MacDonald, 2002) ve ayrıca, kanserli hücrelerin birden fazla ilaca karşı direnç geliştirmesi de fazlaca görülen bir problemdir (Gottesman, Fojo ve Bates, 2002; Yap, Chan, Chui ve Chen, 2010). Kanser hücrelerinde DNA'nın hedef alınması, antikanser ilaç tasarımı için birincil hücre içi hedef olarak tanımlanmaktadır ve kemoterapötik ajanların geliştirilmesi için en umut verici biyolojik reseptörlerden biri olmaya devam etmektedir (Tabassum ve diğerleri, 2014).

Ölümcül tümörlerin tedavisi için kullanılan cisplatin, cis-diaminodikloroplatin(II) ve diğer platin bazlı ilaçların klinik başarısı, tıbbi inorganik kimyada ilgi çekici bir hal almıştır. Bununla birlikte, cisplatin ve türevlerinin büyük başarısına rağmen, ciddi sistemik toksisite, içsel ilaç direnci (ilacın hedef dışı bağlanması nedeniyle) ve yüksek maliyet sorunları nedeniyle kullanımları kısıtlanmıştır (Rosenberg, Van Camp ve Krigas, 1965; Rosenberg, Renshaw, Vancamp, Hartwick ve Drobnik, 1967; Kelland, 2007). Bu tür DNA-hedefleyici ilaçlar, nükleobazlara kovalent olarak bağlanarak etki göstermekle birlikte oldukça düşük seçiciliğe de sahiptir (Tabassum ve diğerleri, 2014). Bu nedenle cisplatine alternatif olarak geliştirilecek ilaçların da aynı mekanizmaya sahip olacağı düşünülerek, daha etkili ilaçlar geliştirebilmek adına, elektrostatik bağlanma, oluğa bağlanma ve interkalasyon gibi kovalent olmayan farklı bağlanma stratejileriyle DNA'da hasar üretebilecek, yüksek seçiciliğe, düşük toksisite ve farmakokinetik profillere sahip yeni DNA hedefli ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç vardır (Pizarro ve Sadler, 2009). DNA ile antitümör bir bileşik arasındaki etkileşim, kanser hücrelerinde DNA hasarını indükleyerek hücre bölünmesini bloke eder ve son olarak hücre ölümü ile sonuçlanır (Tabassum ve diğerleri, 2014; Afrati ve diğerleri, 2010). Antitümör ajanların DNA'ya bağlanması veya DNA'yı spesifik bölgesinden kesmesi, tümörün yerleşim mekanizmasının anlaşılmasında ve dolayısıyla kanser tedavisinde çok büyük öneme sahiptir. Bu nedenle, genetik bilgiyi

düzenleyebilen ve/veya transkripsiyonun inhibisyonu yoluyla kanser hücrelerinin replikasyonuna ve büyümesine engel olabilen yeni bileşiklerin geliştirilmesi ve DNA bağlanma çalışmaları DNA'yı hedefleyen yeni ve etkin ilaçların tasarımı açısından önemlidir (Pyle ve Barton 1990, McIntosh ve diğerleri, 2001, Fu, Bradley ve Turro, 2003; Ejidike ve Ajibade, 2015; Abdi, Hadadzadeh, Weil ve Salimi, 2012).

Antikanser ilaçlar DNA'ya bağlanma biçimine göre iki ana kategoriye ayrılırlar (Baraldi ve diğerleri, 2004): antramisin, trabektedin, mitomisin C (Tomasz, 1995) ve bleomisin A2 (Baraldi ve diğerleri, 2004) gibi DNA'da ve fonksiyonlarında kalıcı hasara sebep olan kovalent bağlanan ilaçlar (Beria ve diğerleri, 2004) ve distamisin ve netropsin gibi fiziksel olarak DNA ile etkileşen ve etkilerini geçici olarak DNA fonksiyonlarını değiştirerek gösteren kovalent olmayan şekilde bağlanan ilaçlardır (Lown, 1994; Baraldi ve diğerleri, 2004). Kovalent olmayan etkileşimler; elektrostatik etkileşimler, interkalasyon ve oluklara bağlanma olmak üzere 3 şekilde sınıflandırılabilir (Lown, 1994). Antikanser ilaçların etkilerini gösterdiği bağlanma mekanizması (Bailly, 1998) interkalasyon (berberin, daunorubisin ve doksorubisin (Ridge, Bailly, Graves ve Waring, 1994; Baguley ve Falkenhaus, 1978)), büyük (Hamilton ve Arya, 2012) ve küçük oluk bağlayıcıları (distamisin (Pugliese ve Martinetto, 1978)) ve netropsin (Kopka, Yoon, Goodsell, Pjura ve Dickerson, 1985)), elektrostatik etkileşim (lexitropsin ve türevleri) gibi çeşitlilik göstermektedir. Dolayısıyla DNA'yı hedef alan ilaçların keşfi, antikanser ilaçların temelini oluşturmaya devam edecektir.

Schiff bazları, kolaylıkla sentezlenmesi, yüksek stabilitesi, biyo-uyumlulukları, farmakolojik özellikleri ve özellikle de serbest radikal süpürücü (Li ve Liu, 2011) ve antikanser aktivitesi (Holder ve diğerleri, 2013; Cheng ve diğerleri, 2010) nedeniyle çok sayıda araştırmacıyı cezbeden bir bileşik sınıfıdır (Tabassum ve diğerleri, 2014; Khosravi, Sahihi, Dashtbani, Rudbari ve Borhan, 2017; Ferlay ve diğerleri, 2015; Chow ve diğerleri, 2014; Chen ve diğerleri, 2013; Ghosh, Layek, Fleck, Saha ve Bandyopadhyay, 2015). Ayrıca, Schiff bazı kompleksleri, biyokimyasal, analitik ve antimikrobiyal reaktifler ve katalitik ajanlar olarak önem kazandıkları için, son birkaç yılda en çok çalışılan koordinasyon bileşiklerinden biri olmuştur (Sahin ve diğerleri, 2017; Golcu, Tumer, Demirelli ve Wheatley, 2005; Nair ve Joseyphus, 2008; Kuo, Huang ve Lin, 2008; Mohamed, 2006; Kursunlu, Guler, Sevgi ve Ozkalp, 2013; Kocyigit, Kursunlu ve Guler, 2010). Çoğu tümör hücresi, radyoterapiye ve/veya birçok kemoterapötik ilaca dirençli

olduğundan, yeni biyoredüktif moleküllerin sentezi, yenilikçi bir strateji olabilir. Bu nedenle, Schiff bazı türevlerinin antikanserojenik ve DNA etkileşim potansiyelinin araştırılması büyük önem kazanmıştır (Sahin ve diğerleri, 2017). Schiff bazlarının, tümör hücrelerine karşı antiproliferatif etki göstermesi ve DNA'ya bağlanma kabiliyetine sahip olması (Sahin ve diğerleri, 2017; Garuti, Roberti, Malagoli, Rossi ve Castelli, 2000; Xing ve Skibo, 2000; Skibo ve Xing, 2001) nükleik asit kimyasında yeni yapısal problemler olarak kullanımlarının yanı sıra umut vadeden terapötik ajanların geliştirilmesi nedeniyle de özellikle ilgi çekicidir (Tabassum ve diğerleri, 2014; Farrell, 2002; Li, Zhang, Chen, Niu ve Ji, 2012). Literatürde simetrik diimin Schiff bazlarının biyolojik potansiyelleri ile ilgili oldukça fazla çalışma bulunmasına rağmen, asimetrik diimin Schiff bazları ile ilgili yapılan çalışmalar hala yeterli düzeyde değildir (Güngör, 2008).

Birçok antikanser ajan, antitümör aktivitesini, DNA ile etkileşime girerek göstermektedir (Angelusiu, Barbuceanu, Draghici ve Almajan, 2010; Aslan, Özcan ve Karacan, 2011; Xu, Zhang, Zhang, Gao ve Zeng, 2011). Dolayısıyla DNA ile etkileşim çalışmaları, antikanser ilaçların etkileşim mekanizmalarının aydınlatılmasında, DNA hedefli ilaçların tasarımında ve mutajenez ile karsinogenez gibi biyolojik süreçlerin anlaşılması açısından oldukça önem arz etmektedir (Li ve Yang, 2009). Bu bilgiler doğrultusunda, Schiff bazının DNA bağlanma ve DNA kesim aktivitesi gösterdiği ortaya konulur ise, kanser tedavisinde terapötik amaçla kullanılabilme imkanı bulacağı açıktır. Ayrıca DNA'ya bağlanan ajanların antikanser aktivitelerinin, DNA topoizomeraaz enzimlerini inhibe etme özellikleriyle de yakından ilişkili olduğu bildirilmektedir (Potmesil ve Kohn, 1991; Ralph, Judd, Pommier ve Kolin, 1994; Tırnoğlu, 2016). Ek olarak, DNA hedefli bir ilaç tasarlarken, yeni sentezlenen bir bileşenin DNA için gerekli afiniteye sahip olup olmama kapasitesini, ilacın yapısının, bağlanmanın özgüllüğü/afinitesi ile nasıl ilişkili olduğunu ve istenen niteliklere sahip bir ilacın ne gibi yapısal mutasyonlara yol açabileceğini bilmek gerekmektedir (Shaikh ve Jayaram, 2004).

Schiff bazları, imin ($C=N$) grubunda elektrofilik karbon ve nükleofilik azot içerir ve enzim ve DNA gibi birkaç nükleofilik ve elektrofilik biyolojik türle etkileşime girme ihtimaline sahiptir. Reaktif imin grubu nedeniyle, Schiff bazlarının interkalasyon ve oluk bağlama ile doğrudan DNA ile etkileşime girebileceği öne sürülmüştür (Silva ve diğerleri, 2017). Schiff bazlarının yapısındaki aromatik kısım, istifleme etkileşimi yoluyla DNA'ya bağlanma kapasitesinin artırılmasında ve DNA çift sarmalının stabilize edilmesinde

anahtar rol oynar (Rambabu, Kumar, Tejaswi ve Vamsikrishna, 2016). Ayrıca, Schiff bazlarının yapısında bulunan polar gruplar ile DNA'nın çift sarmalının arasında hidrojen bağlarının oluşması, Schiff bazının DNA'ya bağlanmasını etkilemektedir (García-Friaza, Fernández-Botello, Pérez, Prieto ve Moreno, 2006). Amino asit temelli Schiff bazları da, DNA ile anlamlı bir şekilde etkileşime girebilmektedir. Çeşitli amin ve karboksil grubu gibi aktif bağlama bölgelerine sahiptirler ve bu aktif bölgeler, DNA'ya bağlanmada seçici etki gösterebilirler (Arunadevi, Paulpandiyan ve Raman, 2017).

Bu nedenle bu tez çalışmasında, ilk defa sentezlenen ve çeşitli spektroskopik metotlar (element analizi, FT-IR, ^1H / ^{13}C NMR, UV-vis ve kütle) ile yapısal özellikleri tanımlanan 2-(4-(2-hidroksibenzilidenamino)benzilidenamino)benzoik asit olarak adlandırılan asimetric diimin Schiff bazının aşağıda bahsedilen biyolojik özellikleri incelenmiştir:

- i. DNA hedefli ilaç adayı olabilme potansiyeli; DNA bağlanma ve DNA kesim aktivitesi çalışmaları ile incelenmiştir.
- ii. Antikanser ilaç adayı olabilme potansiyeli; antiproliferatif aktivite, sitokinez-blok mikronükleus (CBMN), topoizomerez II α inhibisyon aktivitesi çalışmaları ile ortaya konulmuştur.
- iii. Schiff bazının biyolojik materyallerde güvenli kullanımı; mutajenite çalışması ile test edilmiştir.

Yukarıda verilen çalışmalar ile 2-(4-(2-hidroksibenzilidenamino)benzilidenamino)benzoik asit olarak adlandırılan asimetric diimin Schiff bazından, kanser hücrelerinde apoptozis yolağı üzerinden antiproliferatif aktivite gösterme potansiyali olan, DNA hedefli yeni bir antikanser ilaç adayı bulunması amaçlanmıştır. Aynı zamanda 2-(4-(2-hidroksibenzilidenamino)benzilidenamino)benzoik asit olarak adlandırılan asimetric diimin Schiff bazının, DNA'ya bağlanma ve DNA kesim aktivitesi çalışmalarının ortaya konulması ile DNA etkileşim mekanizması açıklanmış olacaktır. Böylece, mekanizmanın ortaya konulması ile 2-(4-(2-hidroksibenzilidenamino)benzilidenamino)benzoik asit olarak adlandırılan asimetric diimin Schiff bazından, DNA hedefli farklı ilaçlar ve etken maddeler geliştirmek de mümkün olabilecektir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

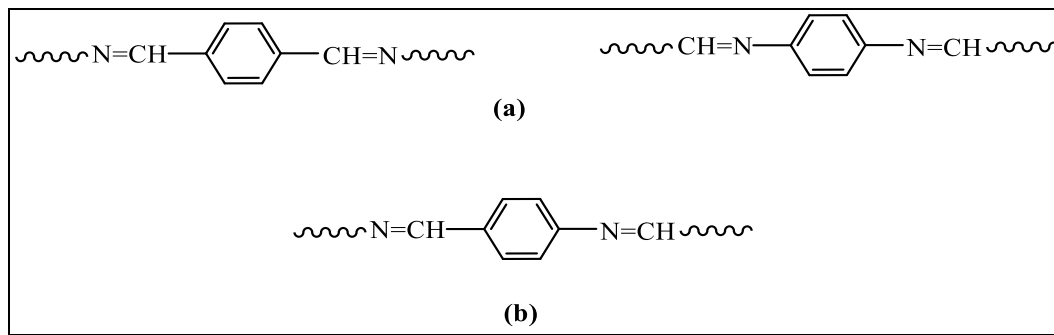
2.1. Schiff Bazları

Schiff bazları, karbonil bileşiklerinin (aldehit veya keton) birincil aminler ile kondensasyon tepkimesi sonucu elde edilen ve güçlü koordinasyon yeteneğine sahip organik bileşiklerdir. Schiff bazının yapısındaki (C=N) ikili bağına "azometin" veya "imin" bağı denir. Schiff bazları ilk kez 1864 yılında Alman kimyacı Hugo Schiff tarafından sentezlenmiştir (Güngör, 2008; Yang ve diğerleri, 2016; Sahin ve diğerleri, 2017).

Birçok araştırmacı tarafından Schiff bazlarının umut verici ilaç ajanları veya biyolojik problemler ve analitik araçlar olarak biyolojik veya terapötik uygulamalarda kullanıldığı bildirilmiştir. Ayrıca, Schiff bazlarının antibakteriyel (Venugopal ve Jayashree, 2008; Lashanizadegan ve Jamshidbeigi, 2011), antiinflamatuar (Sujith, Rao, Shetty ve Kalluraya, 2009; Alam, Choi ve Lee, 2012), antikanser (Villar, Encio, Migliaccio, Gil ve Martinez-Merino, 2004), antifungal (Lakshmi, 2003) ve antiviral (Karthikeyan ve diğerleri, 2006) ajanlar olarak biyoaktiviteleri ve bu bileşiğin bazı türevlerinin ise, DNA ve RNA sentezi üzerinde inhibe edici etkilerinin olduğu, bu etkiyi ise ribonükleotit redüktaz (RR) enzimini inhibe ederek gerçekleştirdikleri bildirilmiştir (Parlak ve diğerleri, 2019). Schiff bazları, azometin azot atomuyla metal iyonuna bağlanan ligandlar olup geniş çapta çalışılmıştır. Azometin türevlerinde, C=N bağı biyolojik aktivite için çok önemlidir (Prakash ve Adhikari, 2011). Son yapılan araştırmalar, Schiff bazı ligandlarının geçiş metali iyonlarıyla kompleksleşmesinden sonra biyolojik aktivitelerinin arttığını göstermiştir (Anaconda, Rodriguez ve Camus, 2014; Sundararajan, Jeyakumar, Anandakumaran ve Selvan, 2014; Tarushi ve diğerleri, 2011; Khosravi, Sahihi, Dashtbani, Rudbari ve Borhan, 2017). Bu nedenle, DNA ve proteinler gibi biyomakromoleküller ile etkileşimlerinin araştırılması, yeni ve daha etkili farmasötik moleküllerin entelektüel tasarımı ve üretimi için ilk adımdır. Birçok kanser hücresi, radyoterapiye ve/veya birkaç kemoterapötik ilaca dirençli olduğundan, yeni biyo-redüktif moleküllerin sentezi, yenilikçi bir strateji olabilir. Bu nedenle, Schiff bazı türevlerinin antikanserojenik ve DNA etkileşim potansiyelinin araştırılması büyük önem kazanmaktadır (Sahin ve diğerleri, 2017).

2.1.1. Diimin Schiff bazları

Schiff bazları, yapısındaki "imin" bağı sayısına bağlı olarak monoimin, diimin, triimin, vb. şeklinde adlandırılabilir (Özdemir, 2016; Özdemir, 2017). Aromatik diimin bileşikleri, imin bağlarını oluşturan azot ve karbon atomlarının birbirlerine olan konumlarına göre, simetrik (Şekil 2.1a) veya asimetrik (Şekil 2.1b) yapıda olabilir. Simetrik diimin bileşikleri 1 mol dialdehit ile 2 mol aminden veya 2 mol aldehit ile 1 mol diaminden kolaylıkla sentezlenebildiğinden, literatürde bu bileşiklere oldukça fazla rastlanmaktadır.

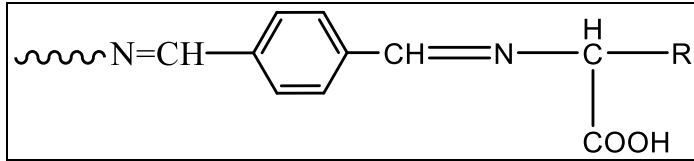


Şekil 2.1. Diimin Schiff bazlarının genel yapısı

Asimetrik diimin bileşikleri aynı aromatik halkada hem aldehit hem de amino grubu içeren bir çıkış bileşiği gerektirmektedir. Bu tip bileşikler, hem molekül içi hem de moleküller arası kondenzasyon tepkimeleri ile hemen bozulabileceğinden kararsızdır. Bu nedenle asimetrik diimin bileşikleri tek kademede elde edilemezler (Güngör, 2008). Asimetrik Schiff bazı ligandlarının geçiş metali komplekslerinin koordinasyon kimyası, doğal sistemlerde merkezi metal iyonları etrafındaki ligandların asimetrik oluşundan ötürü son yıllarda çok dikkat çekmiştir (Meghdadi ve diğerleri, 2012). Asimetrik Schiff bazı ligandları, simetrik olanlara göre, geçiş metali komplekslerinin özelliği, geometrisi ve bileşimi olarak birçok avantaja sahiptir (Khalaji, Rad, Grivani ve Das, 2010). Asimetrik Schiff bazları biyolojik olarak önemli türler için uygun model ve çeşitli organik dönüşümler için de katalizör olarak da kullanılabilir; ek olarak, manyetik ve optik özelliklerinden dolayı, optoelektronik uygulamalar ve biyosensörlerin tasarımı için umut vadetmektedir (Lashanizadegan ve Seraj, 2010; Sahin ve diğerleri, 2017). Son yıllarda, asimetrik Schiff bazlarının özellikleri ve sentezi üzerine yapılan araştırmalar ve biyolojik potansiyallerinin ortaya konulmasına yönelik çalışmalara ilgi artmış olmakla birlikte, asimetrik Schiff bazları ile ilgili yapılan çalışmalar hala yeterli düzeyde değildir.

2.1.2. Aminoasit Schiff bazları

Schiff bazları, aldehit veya ketonların birincil aminler ile kondenzasyon tepkimesi sonucu elde edilen bileşiklerdir. Eğer kullanılan amin bileşiği amino asit ise bu Schiff bazlarına "amino asit Schiff bazı" denilmektedir (Şekil 2.2) ve bu bileşikler yapı olarak B₆ vitamininin koenzimine benzemektedir (Özdemir, Gürkan, Sarı ve Tunç, 2015).



Şekil 2.2. Aminoasit Schiff bazlarının genel yapısı

Aminoasit Schiff bazları ve metal kompleksleri de antimikrobiyal, antioksidan, antihelmintik, antiviral, antikanser, vb. pek çok biyolojik aktiviteye sahiptir ve yapılarındaki imin (CH=N) grubunun bu özellikleri sağladığı düşünülmektedir (Özdemir ve diğerleri, 2015).

2.2. Kanser

Kanser, dünya çapındaki ölümlerin başlıca nedeni haline gelen, genellikle genetik ve epigenetik değişikliklerin çeşitliliği ile karakterize edilen ve DNA replikasyonunun inhibisyonu üzerinden kanser hücrelerinin çoğalmasının önlenmesi yolu ile tedavi edilen multigenik bir hastalık sınıfıdır (Helleday ve diğerleri, 2008). Örneğin, kolon kanseri veya bağırsak kanseri olarak da bilinen kolorektal kanser (CRC) dünya çapında üçüncü en yaygın kanserdir ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir (Fakih, 2015; Torre, Siegel, Ward ve Jemal, 2016). Bu kanser onkogenlerin aktivasyonu veya tümör supresör genlerin inaktivasyonu (Yeang, McCormick ve Levine, 2008) ve onkogenik yapıların aktivasyonuna yol açan ek epigenetik değişiklikler gibi genetik modifikasyonların birikmesi sonucunda gelişmektedir (Coant, García-Barros, Zhang, Obeid ve Hannun, 2018). Serviks kanseri olarak da bilinen rahim ağzı kanseri ise, dünyada kadınlarda görülen dördüncü en yaygın ölümcül kanserdir (Siegel, Naishadham ve Jemal, 2013; Prasad, Sabarwal, Yadav ve Singh, 2018). Bu kanserin yaklaşık % 99'u insan papilloma virüsünün (HPV) neden olduğu enfeksiyondan kaynaklanmaktadır (Walboomers ve diğerleri, 1999).

2.3. Mevcut Kanser İlaçları ve Hedefleri

Kemoterapi, kanser tedavisinde uygulanan en yaygın ve etkili yöntemdir. Günümüzde klinik olarak kullanılan antikanser ilaçların metastaz kontrol yeteneğinin olmaması, stabilitesinin yeterli olmaması veya seçici olmama gibi problemlerin hala devam etmesi (Chambers, 2002) ve ayrıca, kanserli hücrelerin birden fazla ilaca karşı direnç geliştirmesi de fazlaca görülen bir problem olup, kemoterapide başarıya ulaşmayı büyük ölçüde engellemektedir (Gottesman, 2002; Yap, 2010). Bu nedenle de mevcut ilaçların etkinliğini artırmak ya da yeni ilaçların tasarlanması yoluna gidilmektedir (Aksoy, 2010). Antikanser ilaçlar genellikle beş farklı mekanizma üzerinden etki göstermektedir. Bunlar şu şekilde sıralanabilir (Ölgen, Bıçak ve Nebioğlu, 2002).

1. Pürin ve pirimidin nükleotid prekürsörlerinin sentezini engelleyerek ya da DNA ve RNA sentezinde bunların yerlerini alarak
2. DNA fonksiyonlarını bozarak
3. Hücre yapısındaki nükleofilik gruplara kovalent bağlarla bağlanarak
4. Mikrotübüllerin polimerize ve depolimerize şekilleri arasındaki dengeyi bozarak
5. Hormon uyarısı ile sitoplazmik reseptörlere bağlanıp gelişme ve büyüme hızını yavaşlatarak

Günümüzde kullanılan antikanser ilaçlar aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir (Kaçar, 2016).

1. Alkilleyici ajanlar (Prokarbazin, Nitrozüre, Tiyotepa, Azot mustard): Bu ilaçlar, hücresel nükleofillere saldıran oldukça yüksek elektrofilik moleküller olup, DNA'ya alkil grupları ekleyerek kanser hücrelerinin ölümüne sebep olurlar.
2. Antimetabolitler (Pirimidin antagonistleri, Pürin antagonistleri, Metotreksat): Bu grup ilaçlar direkt olarak DNA ile etkileşime girmek yerine DNA'nın replikasyonunu inhibe ederek kanser hücrelerinin ölümüne yol açar.
3. Tübülinle veya alkaloidler ile etkileşen ajanlar (Vinblastin, Vinkristin): Bu ilaçlar, tübülün fonksiyonunu bozarak eşleşen kromozomların iç iplikçikleri tarafından hücre kutuplarına çekilmesine engel olmaktadır.
4. Antrasiklinler (Doksorubisin, Apirubisin, İdarubisin): Bu ilaçlar, DNA topoziomeraz enzimini inhibe ederek DNA replikasyonuna engel olmaktadır ve böylece kanser hücrelerinin ölümüne sebep olmaktadır.

5. Antitümör antibiyotikler (Bleomisin): Bu ilaçlar, topoizomera I enzimini inhibe ederek antitümör aktivite göstermektedirler.
6. Platin bazlı ilaçlar (Cisplatin, Karboplatin ve Oksaliplatin)
7. Taksanlar (Paklitaksel, Nab-paklitaksel)

2.4. Metal Bazlı Antikanser İlaçlar ve Hedefleri

Cisplatin ve türevleri, kanser tedavisi için en yaygın olarak kullanılan metal bazlı ilaçlardır. Cisplatin, DNA'nın N7 guaninine bağlanarak her bir DNA zincirinde veya çift sarmalı oluşturan zincirler arasında çapraz bağların oluşmasını sağlayarak DNA ve RNA sentezi bozar. Cisplatinin antitümör aktivitesinin keşfedilmesinden sonra, birçok araştırmacı potansiyel olarak kanser kemoterapisinde kullanılabilecek yeni metal bazlı antikanser ajanların tasarımına odaklanmıştır. Son kırk yılda, *in vitro* ve *in vivo* olarak çok sayıda metal kompleksi kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve değerlendirilmiştir. Bazıları ise klinik çalışmaların farklı aşamalarında. Bu kompleksler arasında platin (PtII ve PtIV), rutenyum (RuII ve RuIII), altın (AuI ve AuIII) ve titanyum (TiIV) kompleksleri en çok çalışılan metallerdir (Muhammad ve Guo, 2014).

Platin (Pt) bileşikler i şu anda klinikte yaygın olarak kullanılan DNA hasarına neden olan tek antikanser ilaç sınıfı olarak bilinmektedir (Kostova, 2006). Karboplatin ve oksaliplatin, çeşitli kanserlerin tedavisinde dünya çapında kullanılan, FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) onaylı platin bazlı antikanser ilaçlar olup, nedaplatin, lobaplatin ve heptaplatin ise, sırasıyla Japonya, Çin ve Kore'de ise klinik kullanımı onaylanmış ilaçlardır (McKeage ve diğerleri, 2000; Muhammad ve Guo, 2014). Bunlar DNA'nın nükleofilik bağlanma bölgeleri ile etkileşen ve dolayısıyla DNA sarmalları arasında ve içinde çapraz bağlar oluşturma s y o l u y l a DNA sentezini inhibe eden ve bu sayede sitostatik etki gösteren ilaçlardır (Muhammad ve Guo, 2014). Ayrıca, DNA ile etkileşime giren çeşitli rutenyum kompleksleri de sentezlenmiştir (Han Ang ve Dyson, 2006; Liu ve diğerleri, 2006). Sentezlenen Rutenyum (II)-aren kompleksinin yüksek antikanser aktivitesi sergilediği (Habtemariam ve diğerleri, 2006; Yan, Melchart, Habtemariam ve Sadler, 2005) ve DNA'ya interkalasyon yolu ile bağlanıp cisplatine kıyasla DNA'da farklı yapısal bozulmalara neden olduğu bildirilmiştir (Liu ve diğerleri, 2006). Klinik değerlendirme altındaki NAMI-A ve KP1019 ilaçları dahil olmak üzere diğ er rutenyum bazlı antikanser

ilaçlar ise, farklı etki mekanizmalarına sahip olup, özellikle gen ürünleri ile hücresel transdüksiyon gibi klasik olmayan hedefleri amaçlamaktadır (Dyson ve Sava, 2006).

Ancak şüana kadar geliştirilen antikanser ilaçlar, yüksek toksisite, ilaç direnci ve yan etkilerinin sebebiyle kullanımları kısıtlanmaktadır (Kelland, 2007; Rosenberg, Vancamp, Trosko ve Mansour, 1969; Jamieson ve Lippard, 1999; Arnesano ve Natile, 2009; Klein ve Hambley, 2009; Gust, Beck, Jaouen ve Schönerberger, 2009; Wu ve diğerleri, 2009; Jung ve Lippard, 2007). Bu dezavantajlar, araştırmacıları daha etkili, daha az toksik ve hedefe özgü antikanser ilaçların tasarlanması için, yenilikçi stratejiler geliştirmeye teşvik etmiştir (Tabassum ve diğerleri, 2014).

2.5. Topoizomeraz İnhibitörü Olarak Geliştirilen Antikanser İlaçlar

DNA topoizomeraz (topo) enzimleri antikanser ilaç keşfinde önemli bir hedef olarak kabul edilmiştir ve son zamanlarda antikanser ilaç olarak, hücre proliferasyonunda ciddi role sahip olan topoizomeraz I ve II inhibitörleri geliştirilmektedir (Çizelge 2.1) (Andoh, 2003; Nitiss, 2009; Wang, Morris-Natschke ve Lee, 1997; Haglof, Popa ve Hochster, 2006; Pommier, 2009; Salerno ve diğerleri, 2010). Antitümoral tedavi rejimlerinin yaklaşık % 50'si topoizomerazları inhibe eden en az bir ilacın kullanımına dayanır (Hande, 1998a; Hande, 1998b; Baviskar ve diğerleri, 2011).

Topoizomerazlar (I ve II), DNA'yı bir topolojik formdan diğer bir forma dönüştüren (DNA zincirlerinde düzenli kırıklar oluşturup tekrar birleştirerek konformasyonel değişiklikleri katalizleyen) ve transkripsiyon, replikasyon, rekombinasyon, transpozisyon ile kromozom segregasyonunda anahtar rol oynayan önemli nükleer enzimlerdir (Wang, 2002; Nitiss, 2009; Champoux, 2001; Goto ve Wang, 1982; Baviskar ve diğerleri, 2011). Süpersarmal DNA'da sırasıyla tek iplikçikli ve çift iplikçikli kırılmaya neden olan iki ana tip topoizomeraz I ve II enzimi vardır (Palchaudhuri ve Hergenrother, 2007). İnsan tip I enzimlerinden; Topo I, Topo III α ve Topo III β 'den sadece Topo I, antikanser ilaçların hedefi olarak doğrulanmıştır (kamptotesin bazlı türevler: irinotekan, topotekan ve belotekan) (Zunino ve Pratesi, 2004; Sriram, Yogeewari, Thirumurugan ve Ratan Bal, 2005). Ayrıca, literatürde, Hoechst 33258, bleomisin ve netropsin (G-C tanıma elementleri) gibi küçük oluk analoglarının da, güçlü DNA Topo I inhibisyonu nedeniyle geniş spektrumda antitümör aktivitesi olan güçlü antitümör ilaçlar olduğu belirtilmiştir

(Bailly, 2000; Kathiravan, Khilare, Chothe ve Nagras, 2013; Tabassum, Zaki, Afzal ve Arjmand, 2014). Tip II enzimlerden, Topo II α ve Topo II β farklı genler tarafından kodlanır ve ayrı ekspresyon seviyelerine sahiptir. Topo II α 'nın ekspresyonu, hızla bölünen hücrelerin proliferasyona bağlı bir şekilde düzenlenir ve dokularda belirgin seviyelere sahiptir (Heck ve Earnshaw, 1984; Hsiang, Wu ve Liu, 1988). İnterkalasyon yapan antrasiklinler (doksorubisin ve daunorubisin) ve etoposid, Topo II α 'nın aktivitesini azaltarak, antikanser aktivite gösteren klinik uygulamalarda kullanılan bileşiklerdir (Hande, 1998). Tersine, büyüme Topo II β 'nin ekspresyonunu etkilemez; Bu enzim tüm hücrelerde bulunur. Bu yüzden antikanser ilaçların hedefi olarak tercih edilmemektedir (Isaacs ve diğerleri, 1998; Yang, Li, Prescott, Burden ve Wang, 2000).

Topoizomeraz enzimlerini hedefleyen antikanser ilaçlar etki mekanizmaları bakımından sınıf I ve II olmak üzere iki genel gruba ayrılırlar; Topoizomeraz zehirleri olarak adlandırılan sınıf I ilaçlar, kovalent DNA-topoizomeraz kompleksini stabilize eder, böylece enzimi etkisiz hale getirirler (Larsen, Escargueil ve Skladanowski, 2003). Yani enzimi mutajenik ve öldürücü etkileri başlatan hücresel bir toksin formuna dönüştürerek etki gösterirler. İkinci kategorideki ilaçlar ise, Katalitik inhibitörler olup, topoizomerazın DNA'ya bağlanmasını önleyebilir, kovalent olmayan DNA-topoizomeraz komplekslerini stabilize edebilir veya ATP'nin enzime bağlanmasını önleyebilir (Larsen ve diğerleri, 2003). Yani enzimin katalitik işlevini engellerler. Bu inhibitörlerin en önemli olanları kumarin antibiyotikleri ve fostriesin analoglarıdır (Morrell ve diğerleri, 2017). Hücrenin içinde kararlı bir DNA-topo kompleks yapısı oluştuğunda, hasarlı DNA tanınır ve p53'e bağlı hücre ölümü başlatılır (Solary, Bertrand ve Pommier, 1994). Çeşitli interkalatörler ve oluk bağlayıcılar topoizomeraz I veya II hedefleyici ajanlar olarak kabul edilmektedir (Montaner ve diğerleri, 2005; Denny, 2004; Palchaudhuri ve Hergenrother, 2007).

Biyokimya, tıbbi kimya, farmakoloji ve onkoloji alanlarında bu enzim gruplarına duyulan ilgi dünyada önemli ölçüde artmıştır. Ancak günümüzde bu enzim gruplarını hedefleyen antikanser ilaçların verimli kullanılmasında önemli engeller ile karşılaşmaktadır. Bunlar, hedef dokuya ulaşılmadaki özgünlük gibi genel güçlüklerden başka tedavi sürecinde karşılaşılan toksisite, sekonder malignite ve genetik ya da kazanılmış çoklu ilaç direncinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, bu enzimler hem normal hücrelerde hem de kanserli hücrelerde aktif olduğu için kanser tedavisi sırasında normal hücreler de zarar görmektedir. Bu amaçla daha etkin ve sadece kanserli hücrelerin yok edilmesine özgü

araştırmalarda DNA hedeflenmiş ve daha etkin ve seçici alternatif antikanser ilaçlar geliştirilmiştir (Tabassum ve diğerkleri, 2014).

Çizelge 2.1. Topoizomeraz inhibitörü olarak geliştirilen antikanser ilaçlar

İlaçlar	Klinik Olarak Kullanımları	Etki Mekanizmaları
Dokсорubisin	Rabdomiyosarkoma, meme kanseri, erişkin akut lösemi, endometriyal kanser, mide kanseri, rahim ağız kanseri, non-Hodgkin's lenfoma (Sangeetha, Mathew, Sudhamani ve Naik, 2014)	Topoizomeraz II inhibitörü–DNA kompleksi (interkalasyon) (Sangeetha ve diğerkleri, 2014)
Daunorubisin	Genellikle AML (Ayyıldız, Dede, Söker, Kadiroğlu ve Yeşilbağdan, 2005)	Topoizomeraz II inhibitörü–DNA kompleksi (interkalasyon) (Sangeetha ve diğerkleri, 2014)
Etoposid	Testis kanseri; küçük hücreli akciğerk kanseri vb. (McClendon ve Osheroff, 2007)	Stabilize topoizomeraz II–DNA kompleksi (McClendon ve Osheroff, 2007)
Mitoksantron	Lösemiler (ALL ve CML); meme kanseri, yumurtalık kanseri, prostat kanseri vb. (Zunino ve Capranico, 1990; Baviskar ve diğerkleri, 2011)	Stabilize topoizomeraz II–DNA kompleksi (Zunino ve Capranico, 1990; Baviskar ve diğerkleri, 2011)
Teniposid	Küçük hücreli akciğerk kanseri, intrakranial malign tümör, lenfoma, lösemi ve diğerk neoplazmalar (Clark ve Slevin, 1987; Feun ve diğerkleri, 2007; Hartmann ve Lipp, 2006)	Stabilize topoizomeraz II–DNA kompleksi (Zunino ve Capranico, 1990; Baviskar ve diğerkleri, 2011)
Amsakrin	Akut miyelo ve lenfatik lösemi vb. (Zunino ve Capranico, 1990; Baviskar ve diğerkleri, 2011)	Stabilize topoizomeraz II–DNA kompleksi (interkalasyon) (Zunino ve Capranico, 1990; Baviskar ve diğerkleri, 2011)
Kamptotesin (CPT), CPT11 (irinotekan), topotekan ve 9-amino-CPT	Ovaryum, kolorektal ve küçük hücreli akciğerk kanseri vb. (Kurtan, Kurtoğlu ve Melikoğlu, 2014)	Stabilize topoizomeraz I–DNA kompleksi (Pommier, 2006; Thomas, Rahier ve Hecht, 2004; Baviskar ve diğerkleri, 2011)
Bleomisin	zefagus, serviks, baş boyun skuamöz hücreli karsinom, germ hücreli tümör, hodgkin ve non-hodgkin lenfoma vb. (Aslan ve kszođlu, 2017)	Stabilize topoizomeraz I–DNA kompleksi (Tabassum ve diğerkleri, 2014)

AML, akut miyeloblastik lösemi; ALL, akut lenfoblastik lösemi; CML, kronik miyelojenz lösemi

2.5.1. Topoizomeraz II inhibitörleri

Topoizomeraz II enzimi, çoğu antikanser ilaç (teniposid, etoposid ve doksorubisin vb.) için birincil moleküler hedeftir. DNA'da interkalasyon yapan ajanların çoğu Topoizomeraz II inhibitörleri olarak bilinmektedir. Bu inhibitörler, topoizomeraz II enziminin çift iplikli DNA kırıklarını yeniden birleştirme aktivitesini engel olarak DNA replikasyonunun inhibe olmasına neden olmaktadır (Öztürk, 2013). Topoizomeraz II inhibitörleri, topoizomeraz II enzimlerini yüksek miktarda içeren ve yüksek oranda DNA replikasyonu geçiren hücreler için çok daha öldürücü bir etki göstermektedir. Hızlı bölünen hücrelerde enzimin konsantrasyonu yükseldiği için bu inhibitörler daha fazla cevap verme eğilimi gösterirler (Nitiss, 2009; Öztürk, 2013).

Topoizomeraz II üzerinde etki eden ilaçlar veya ajanlar ikiye ayrılır: topoizomeraz II zehiri ve topoizomeraz II katalitik inhibitörüdür (Hande, 2008). Topoizomeraz II zehirleri, ilaç/ajan-G segmentinden bölünmüş DNA-topo II'nin kovalent üçlü kompleksinin oluşmasıyla, DNA ile topoizomeraz II'nin kesim kompleksini stabilize eder. Böylece religasyonu bloke eder, enzim serbest kalır ve apoptozu indükler (Baviskar ve diğerleri, 2011). Topoizomeraz II katalitik inhibitörleri, katalitik siklusun diğer adımlarından herhangi birinde, zehirlerden daha etkilidir. Topoizomeraz II'nin katalitik aktivitesini inhibe ederek apoptozu sebep olduğu düşünülmektedir (Nitiss, 2009; Öztürk, 2013). Günümüzde doksorubisin, etoposid, amsakrin, mitoksantron ve elliptisin gibi birçok topo II zehiri, kanser tedavisinde klinik olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, kanser kemoterapisindeki önemine rağmen, çoğu kanıt topoizomeraz II zehirlerinin, rekombinasyon-onarım yollarına karşı apoptozun indüksiyonu için, enzim seviyesi ile ilişkili DNA kırılmalarına bağlı olarak, spesifik lösemilere yol açan kromozom translokasyonlarını tetikleyebileceğini göstermektedir (McClendon ve Osherof, 2007; Winick ve diğerleri, 1993). Bu nedenle, son yıllarda, topo II zehirlerinin sitotoksik etkilerini azaltacak ve çoklu ilaç direncinin (MDR) üstesinden gelebilecek topo II katalitik inhibitörlerinin geliştirilmesi önem kazanmıştır (Larsen ve diğerleri, 2003; Huang ve diğerleri, 2010; Jiménez-Alonso ve diğerleri, 2008). Topoizomeraz II katalitik inhibitörleri halen klinik olarak kullanılmaktadır, örneğin, diğer ilaçların etkinliğini arttırmak için modülatör olarak suramin ve novobiosin, kardiyoprotektörler olarak (S)-(+)-1,2 bis(3,5-dioksopiperazinil)propan (ICRF 187), antineoplastik ajanlar olarak aklorubisin ve 4,4'-1,2-(etandiil) bis(1-izobutoksikarboniloksimetil-2,6-piperazinedione) (MST 16)'dir (Larsen ve

diğerleri, 2003). Ayrıca, etoposid, salvisin ve bis-indolilmetan gibi topoizomeraz II inhibitörlerinin, invazyon (Winick ve diğerleri, 1993), metastaz (Lang ve diğerleri, 2005; Mashimo ve diğerleri, 2000) ve anjiyogenez ile ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenleyebilme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Chang ve diğerleri, 2005; Baviskar ve diğerleri, 2011).

2.6. DNA Hedefli Antikanser İlaçlar

Son yıllarda DNA hedefli ilaçlar çok ilgi çeken bir çalışma alanı olmuştur. Bilim insanlarının çoğu ilaç salınımının kontrollü bir şekilde gerçekleşebilmesi için DNA'yı hedef almıştır. Ayrıca, DNA, replikasyon ve transkripsiyon üzerindeki merkezi rolü nedeniyle, antikanser ilaçların tasarımı için birincil hücre içi hedef olarak tanımlanmıştır (Yang ve diğerleri, 2016; Afrati ve diğerleri, 2010). Bir başka deyişle, DNA ile bu ajanların etkileşimi, DNA hasarını indükleyerek hücre bölünmesini engellemekte ve neticede hücre ölümüne yol açmaktadır. Örneğin, sitarabin, hücre döngüsünde S fazına özgü antineoplastik bir ilaç olup, DNA sentezine engelleyerek antikanser aktivite göstermektedir (Barral ve diğerleri, 2018). Methotrexat, merkaptopürin, flouaurasil ve tiyoguanin gibi antimetabolitler, nükleotid öncüllerinin sentezinin bozmakta ya da DNA'ya bağlanabilmektedirler. Alkilleyici ajanlar, DNA'nın guanin elektrofile bağlanarak veya çapraz bağlanarak DNA'nın replikasyonuna engel olurlar. Dolayısıyla bu yolla hücre bölünmesini inhibe ederler. Antrasiklinler ve epifillotoksinler, DNA replikasyonuna, paklitaksel, vinblastin ve vinkristin gibi ilaçlar ise, tübülün fonksiyonunu bozarak eşleşen kromozomların iğ iplikçikleri tarafından hücre kutuplarına çekilmesine engel olmaktadır. Ayrıca, günümüzde birçok DNA hedefli ilaç, DNA ve RNA polimeraz, topoizomeraz, nükleaz enzimlerinin inhibisyonu gibi ciddi hücresel süreçlere de müdahale ederek işlev görmektedir. Örneğin, epirubisin, hem DNA ve RNA sentezini hem de topoizomeraz II ile DNA bölünmesini tetikleyen ve sonuç olarak, bu mekanizma ile hücre ölümüne yol açan bir ilaçtır (Schulz, Blumenfeld, Hetts ve Grubbs, 2017). Daunorubisin, DNA'ya interkalasyon yolu ile bağlanan DNA sentezini inhibe eden bir ilaçtır. Ayrıca, topoizomeraz II enzimini etkileyerek DNA'nın transkripsiyonunu engellediği ve dolayısıyla hücre ölümüne sebep olduğu da bilinmektedir (Lai ve diğerleri, 2016; Kariper, 2017). Sonuç olarak, klinik açıdan yararlı antikanser ilaçların çoğu DNA'yı hedeflemektedir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. DNA hedefli antikanser ilaçlar

İlaçlar	Klinik Olarak Kullanımları	Etki Mekanizmaları
Siklofosfamid	Nöroblastoma, non-Hodgkin's lenfoma, retinoblastoma, meme kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri (Hurley, 2002)	DNA iplikleri arasındaki çapraz bağlar (Hurley, 2002)
Melphalan	Multipl miyeloma (Hurley, 2002)	DNA iplikleri arasındaki çapraz bağlar (Hurley, 2002)
Mitomisin C	Gastrointestinal sistem ve mide kanseri (Hurley, 2002)	DNA iplikleri arasındaki çapraz bağlar (Hurley, 2002)
Cisplatin	Testis kanseri, yumurtalık kanseri, baş ve boyun kanseri (Muhammad ve Guo, 2014)	DNA iplikleri arasındaki kovalent çapraz bağlar (Muhammad ve Guo, 2014)
Aktinomisin D	Koryokarsinoma, yumuşak doku sarkomu, Rabdomiyosarkom, Ewing's sarkomu, Wilm's tümörü (Sangeetha ve diğerleri, 2014)	DNA zincirinin uzamasını engelleyerek hem DNA hem de RNA sentezinin inhibisyonu (Sangeetha ve diğerleri, 2014)
Bleomisin	Testis kanseri; non-Hodgkin's lenfoma (Hurley, 2002)	Radyomimetik ilaç DNA'nın çift iplikliğinde kırıklara sebep olur (Hurley, 2002)

DNA için gerekli afiniteye sahip sekansa özgü ilaçların tasarımında ise, ilacın yapısının, bağlanmanın özgülüğü / afinitesi ile nasıl ilişkili olduğunu ve istenen niteliklere sahip bir ilacın ne gibi yapısal mutasyonlara yol açacağını bilmek gerekmektedir (Shaikh ve Jayaram, 2004).

DNA hedefli ilaçların geliştirilmesinde esas alınan özellikler;

- DNA'daki hedef diziye bağlanabilen ilaçlar geliştirilmelidir.
- Bir ilaç biyolojik hedefe bağlanabilmek için yeterince duyarlı olmalıdır. Ancak diğer biyomoleküller tarafından inaktive edileceğinden çok da duyarlı olmamalıdır.
- Hastalıkla ilişkili hedef DNA sekansı tespit edilir. Böylece ilacın bu hedef sekans ile etkileşimi insanın normal işlevlerine müdahale etmeyecek şekilde gerçekleşir (Van Rijt ve Sadler, 2009).
- DNA polianyon yapısında olduğu için, etkileşeceği ilaç molekülünün de katyonik yapıda olması çok önemlidir (Barone ve diğerleri, 2013). Çünkü pozitif yük ile omurga fosfat grupları arasındaki elektrostatik çekim, ilaç-DNA etkileşimini stabilize eder (Patterson, Coxon ve Streckowski, 1997).

2.6.1. DNA-ilaç etkileşimi

Genetik bilginin taşıyıcısı olan DNA, replikasyon ve transkripsiyon üzerindeki merkezi rolü nedeniyle ilaç etkileşimlerinin ana hedefidir (Yang ve diğerleri, 2016). DNA-ilaç etkileşimini anlayabilmek için, bu etkileşimin kinetiğinin, mekanizmasının ve enerjisinin bilinmesi gereklidir (Gibson, 2002). Bu nedenle, ilaçların nükleik asitlerle etkileşim mekanizmalarının anlaşılması ve bunların biyolojik etmenler ile ilişkisi, büyük bir ilgi konusu olmuştur. Ayrıca, bu etkileşimin anlaşılması, her tür genetik hastalığın araştırılmasında da temel bir hedef haline gelmiştir (Neidle ve Thurston, 2005).

İlaç-nükleik asit etkileşimleri, genellikle nükleik asit yapısında değişikliklere yol açmaktadır, bu da bazların kaybı, ilavesi veya yer değiştirmesi ile birlikte, konformasyonel değişimler ile sonuçlanabilir, böylece DNA sekansını modifiye edebilir ve genetik mesajın doğruluğunu etkileyebilir. Bu değişiklikler protein sentezinin inhibe olmasına veya yapısal modifikasyonlar sonucunda protein sentezinde artışa sebep olabilir veya enzimlerin özgünlüğünü değiştirebilir (Barone ve diğerleri, 2013). Ayrıca, DNA, sadece belirli bir bölgesine özel bir düzenleyici proteininin bağlanması ile gerekli sinyali aldığında transkripsiyon ve replikasyon süreçlerine başlar. Bu yüzden düzenleyici bu proteinin gücünü ve spesifitesini taklit edebilen küçük bir molekülün bağlanmasıyla DNA fonksiyonları yapay olarak düzenlenebilir, inhibe edilebilir ya da aktive edilebilir. Böylece bu sentetik küçük molekül, DNA fonksiyonlarının inhibisyonu ya da aktivasyonu ile bir hastalığın tedavisi ya da kontrolü için gerekli olduğunda bir ilaç olarak hareket edebilir. DNA aktivasyonu ile ilacın hedeflediği alana bağlı olarak, gerekli proteini daha fazla üretir ya da DNA replikasyonuna neden olur. DNA inhibisyonu ile da, protein sentezini ya da replikasyonu kısıtlar ve hücre ölümüne neden olabilir (Kostova, 2006).

Dolayısıyla, DNA-ilaç etkileşimlerinin çalışılması, sadece mekanizmanın anlaşılmasında değil aynı zamanda yeni DNA hedefli ilaçların tasarımı açısından da oldukça önemlidir (Hajian, Shams ve Mohagheghian, 2009).

Bir ilaç molekülünün DNA ile etkileşim yolları;

- Polimerazlar ve transkripsiyon faktörleri gibi DNA-bağlayıcı proteinlerin kontrolü sayesinde: Burada ilaç molekülü DNA ile direkt etkileşime girmez. Bunun yerine DNA

molekölüne bağlı olarak bulunan proteinlerle etkileşime girer ve bunun için fonksiyonunu değiştirir.

- DNA-RNA hibritlerinin oluşması: RNA molekülüne bağlanması ile DNA'nın tek bir ipliğine bağlanarak DNA-RNA hibritinin oluşmasını sağlayarak, transkripsiyon aktivitesine müdahale eder (Ausubel ve diğerleri, 1999; Rauf ve diğerleri, 2005).
- İlaç olarak adlandırılan küçük moleküller ile direkt etkileşim: Burada küçük aromatik ligand moleküller doğrudan DNA çift sarmalına bağlanır ve bu moleküller oluğa bağlananlar, interkalator gibi moleküllerdir (Van Rijt ve Sadler, 2009; Lerman, 1961).

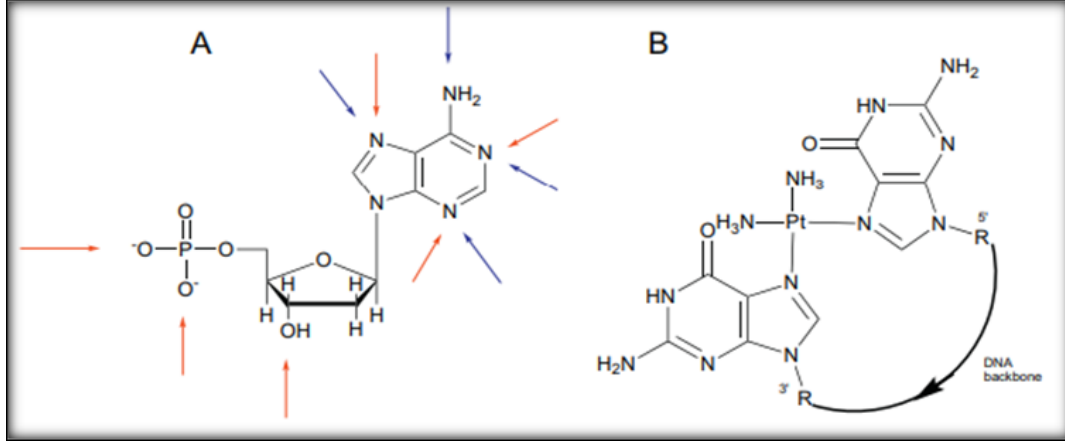
2.6.2. DNA-ilaç bağlanma şekilleri

DNA hedefli ilaçlar arasında en çok, kovalent veya kovalent olmayan bağlar gibi farklı bağlar oluşturarak bağlanan ve farklı pozisyonlarda DNA'ya bağlanan multifonksiyonel ilaç molekülleri tercih edilmektedir. Ayrıca, antikanser ilaçların çoğu, kovalent veya kovalent olmayan bağlanma yolu ile DNA'nın replikasyon mekanizmasına zarar vererek antitümör etki gösterir. DNA'ya bağlanabilen bileşikler hakkında fikir sahibi olabilmek için, bileşiklerin DNA'ya bağlanma şekillerinin bilinmesi gerekmektedir (Suh ve Chaires, 1995; Maheswari ve Palaniandavar, 2004). Çünkü bu bağlanma şekilleri, DNA ile ilaç moleküllerinin arasındaki etkileşimin, DNA'ya bağlanma afinitesinin, bağlanmadaki kooperativitenin moleküler temellerinin, ligand indüklü konformasyonel değişimlerin, aminoasit yan zincirlerinin nükleik asitlerle olan etkileşimlerinin ve diğer nükleik asit etkileşimlerinin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır (Barut, 2016; Barone ve diğerleri, 2013). DNA'ya bağlanan ilaçlar, DNA'ya bağlanma biçimine göre şu şekilde kategorize edilmektedir; kovalent bağlanma ajanları ve kovalent olmayan bağlanma ajanlarıdır (interkalatörler, oluk bağlayıcıları ve (Komeda ve diğerleri, 2006), fosfodiester omurga bağlayıcılarıdır). Klinik açıdan antikanser potansiyeli olan bileşikler, genellikle interkalatörler veya oluğa bağlanabilenlerdir (Barone ve diğerleri, 2013).

Kovalent bağlanma

Metal komplekslerinin nükleik asitler ile kovalent bağlanması, genelde kinetik olarak kontrollü olmasına rağmen, hız ve metalleşme alanı, başlangıç tersinir kovalent-olmayan bağlanma (ön-birleşme) yoluyla kolaylıkla modüle edilebilir. DNA polianyon yapısında olduğu için, bağlanacak olan metal kompleksinin de katyonik yapıda olması çok önemlidir.

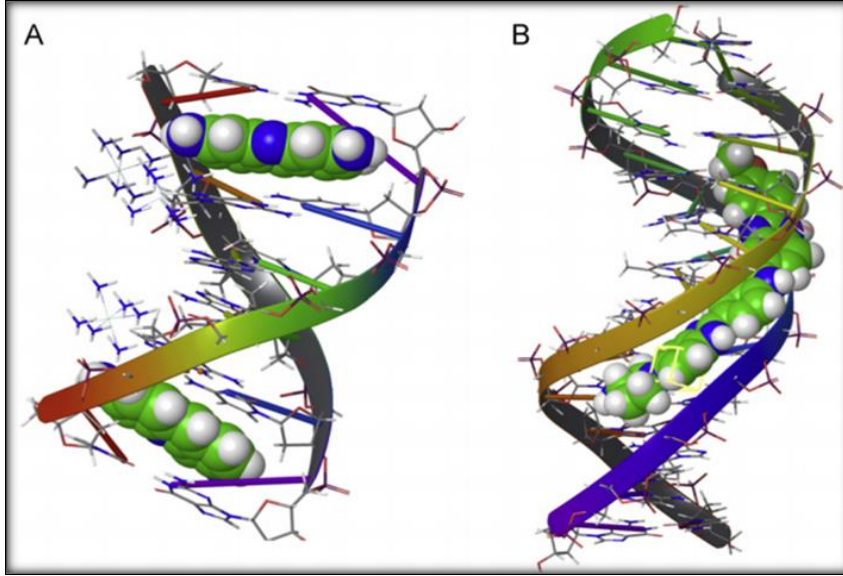
Kovalent bağlanma geri dönüşümsüzdür ve hücre replikasyonunu inhibe eder. Şekil 2.3a, ajanların nükleotidlerle etkileşeceği tepkime bölgelerini gösterirken, Şekil 2.3b, antitümör ajan olan cisplatinin sırasıyla, iki guaninin N7 bölgesine ve DNA zincirine bağlanmasını göstermektedir (Barone ve diğerleri, 2013).



Şekil 2.3. (a) Dış ajanların kovalent olarak nükleotitleri bağlayabildiği reaksiyon bölgeleri: metal bağlama bölgeleri (kırmızı); alkilasyon ve nitrozasyon reaksiyon bölgeleri (mavi), (b) cisplatinin aynı iplikteki iki guanine çapraz bağlanması sonucunda oluşan eklentinin kimyasal yapısı, d (GpG) (Barone ve diğerleri, 2013)

Kovalent olmayan bağlanma

Günümüzde antikanser, antiviral ilaç veya antibiyotik olarak kullanılan ilaçların çoğu, etkilerini nükleik asitler üzerinden tersinir bir etkileşim ile göstermektedir. Bu etkileşim, interkalasyon, oluğa bağlanma ve elektrostatik etkileşim olmak üzere 3 çeşittir. Özellikle, interkalasyon ve oluğa bağlanma kovalent olmayan etkileşimin ana çeşitleridir (Şekil 2.4 (Tang, Juang ve Harbison, 1990; Aymami, Nunn ve Neidle, 1999; Barone ve diğerleri, 2013)).

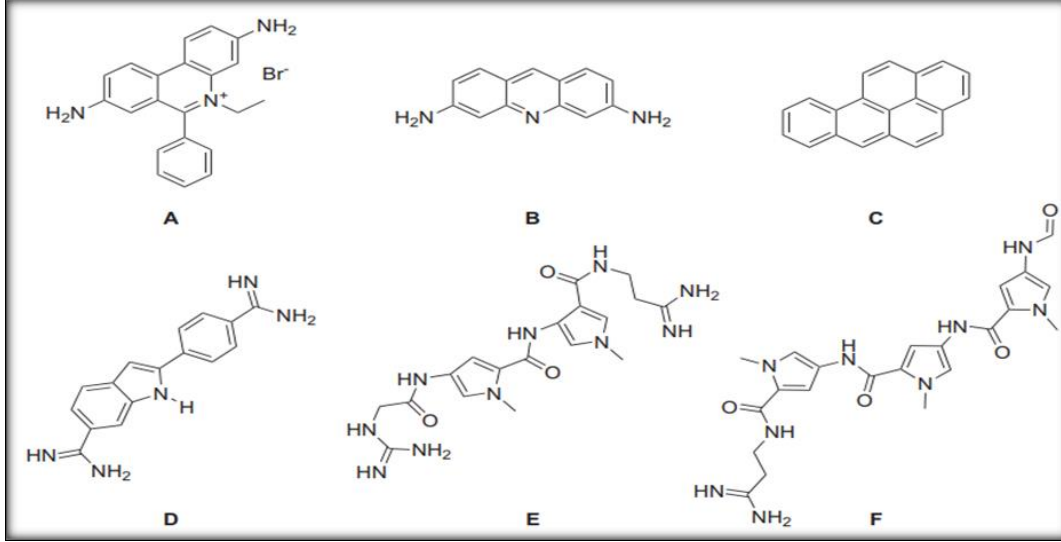


Şekil 2.4. Kovalent olmayan bağlanma tipleri: (a) Proflavinin çift sarmalın iki komşu baz çifti arasına interkalasyonu sonucunda meydana gelen bükülme (Tang ve diğerleri, 1990), (b) Tris-benzimidazol ilacının DNA'nın küçük oluğunu tanınması ve bağlanması (Aymami ve diğerleri, 1999)

İnterkalasyon yolu ile bağlanma

İnterkalasyon (Bkz. Şekil 2.4a) yolu ile bağlanan bileşikler; düzlemsel, aromatik ya da heteroaromatik yapıya sahiptirler. Bu bileşikler DNA'daki komşu baz çiftleri arasına girerek DNA'ya bağlanırlar ve bu baz çiftleriyle kümelenirler (Marky, Snyder, Remeta ve Breslauer, 1983; Lerman, 1961; Bhadra ve Kumar, 2011), böylece komşu baz çiftleri arasındaki düzlemsel heterosiklik grupların istiflenmesine yani π -istiflenmesi neden olurlar. Bu süreç, DNA omurgasının (DNA'nın uzunluğunda ve hidrodinamikliğinde) konformasyonunun bozulmasına ve dolayısıyla protein-DNA etkileşiminin inhibe olmasına yol açar (García ve diğerleri, 2008; Strekowski ve Wilson, 2007). Sonra ise sırasıyla topoizomeraazlar, polimerazlar, DNA onarım sistemleri ve transkripsiyon faktörleri gibi DNA ile ilişkili proteinlerin tanınmasını ve işlevini engelleyerek, transkripsiyon ve replikasyon sürecinin yavaşlatılmasına, hatta inhibe olmasına neden olabilirler (Thurston, 2006; Avendaño ve Menéndez, 2015; Barone ve diğerleri, 2013). Örneğin, *Streptomyces* suşlarından izole edilen polipeptit antibiyotiklerinden biri olan aktinomisin de, DNA zincirinin uzamasını engelleyerek hem DNA hem de RNA sentezine engel olmaktadır. Bu etkiler, tam olarak tersinirdir ve interkalatörün kaldırılmasıyla DNA çift iplikçığı işlem sonrası zarar görmez (Lerman, 1963). Örneğin etidyum bromür, proflavin (DNA üzerindeki fosfat gruplarını negatif olarak değiştirerek etkileşime girmektedir)(García ve

diğerleri, 2010) ve benzopiren (Metcalf ve Thomas, 2003) gibi kuvvetli kanserojenler tersinir etki göstermektedir (Şekil 2.5). İnterkalatörler çerçeve kayması mutajenleri olarak da işlev görürler (Snyder ve Hendry, 2005; Snyder, 2007).



Şekil 2.5. İnterkalasyon yoluyla bağlanan ilaçlar: (a) Etidyum bromür, (b) Proflavin ve (c) Benzopiren, Oluğa bağlanan ilaçlar: (d) DAPI, (e) Netropsin ve (f) Distamisin (Barone ve diğerleri, 2013)

İnterkalasyonda etkin olan kuvvetler yük transfer kuvvetleridir; fakat hidrojen bağları ve elektrostatik kuvvetler de kararlılıkta rol oynarlar (Neidle ve Abraham, 1984). Baz çiftleri ile interkalatör moleküller arasındaki van der Waals kuvvetleri, birbirleriyle kümelenmiş baz çiftleri arasındaki van der Waals kuvvetlerinden çok daha güçlüdür (Krug ve Reinhardt, 1975). İnterkalasyon bağlanma biçimi, DNA'daki hidrojen bağlarında kırıklara sebep olmaz, fakat heliks yapısını deforme eder.

Leonard Lerman'a göre (1961), interkalasyonun çalışma prensibi; polianyonik olan DNA sulu çözeltide bulunan katyonik interkalatörü elektrostatik olarak kendine doğru çeker. İnterkalatör iyon, DNA'nın dış yüzeyi ile zayıf bir elektrostatik bağ kurar ve bunu DNA'ya her zaman bağlı durumda olan bir sodyum veya magnezyum katyonu ile yer değiştirerek yapar. DNA'ya bağlanan bu ligand sonra bu hidrofilik konumdan baz çiftleri arasındaki hidrofobik ortamın içine kayabilir. Bu sırada DNA molekülünün çözeltideki moleküllerle çarpışmalardan absorpladığı enerji, baz çiftlerinin kısa süreli olarak açılmalarını sağlar, geçici bir aralanma sırasında interkalatör oluşan boşluğa girebilir (Lerman, 1961; Luzzati, 1961; Lerman, 1963; Sangeetha ve diğerleri, 2014). Yani pozitif yük ile omurga fosfat

grupları arasındaki elektrostatik çekim, ilaç-DNA etkileşimini stabilize eder (Patterson ve diğerleri, 1997). Reaksiyona giren sistemin fizikokimyasal davranış bilgisi, DNA ile etkileşime girebilen ilaçların biyolojik etkilerini açıklamaya yardımcı olabilir (Barone ve diğerleri, 2013).

Oluğa bağlanma

DNA oluklarında negatif elektrostatik çekim kuvvetinin yüksek miktarda olması, oluğa bağlanmanın başlangıcı olarak kabul edilir (Bkz. Şekil 2.4b) (Pullman, 1989). Oluğa bağlanma, ilacın çift, üç veya G-dört katlı sarmalların oluklarına yerleşmesi anlamına gelmektedir. Oluğa bağlananların interkalatörlerin aksine, DNA omurgasında daha az bozulmaya sebep oldukları bilinmektedir (Biver, Secco ve Venturini, 2005). İlaçların çoğu büyük ve küçük oluklara uyum sağlayarak bağlanmaktadır (Raman ve Selvan, 2012). Oluğa bağlanan moleküller özellikle A-T (adenin-timin)'ce zengin olan bölgeler ile etkileşime girmektedir. Bunun sebebi, A-T'ce zengin olan bölgelerin G-C (guanin-sitozin) bazlarını içeren bölgelere göre daha dar olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, A-T bazlarının bulunduğu bölgede daha fazla elektrostatik çekim potansiyeli ve daha az sterik engel bulunmaktadır (Shaikh ve Jayaram, 2004). DNA sarmalının bir tarafındaki iplikte omurgalar birbirine yakın konumda ise küçük oluk, birbirine uzak ise büyük oluk oluşmaktadır. Bu olukların boyutlarının birbirinden farklılık göstermesi, DNA ile etkileşen protein ve diğer moleküllere hedefli etkileşim seçimi konusunda büyük bir çeşitlilik sağlamaktadır (Silverman ve Holladay, 2014). Büyük oluk alanı omurga şeklinde olmadığı için, bu alandaki bazların DNA'ya bağlanan belli proteinlerle etkileşimi kolay olmaktadır. Karşılıklı taraflarda, oluklar moleküller etrafında bükülmekte ve belirli proteinlerin bağlanmasıyla DNA yapısında değişiklik meydana gelmektedir veya transkripsiyon ve translasyon düzenlenmektedir. Küçük oluğa bağlanan moleküller, genellikle heterosiklik veya aromatik hidrokarbon halka serilerinden oluşmaktadır. Distamisin veya netropsin bazlı çok sayıda hibrit molekül (Bkz. Şekil 2.5), seçiciliğin ve özgüllüğün geliştirilmesi ve istenmeyen yan etkileri azaltılması amacıyla sentezlenmiştir (Khan ve diğerleri, 2012). Amido gruplarına ve üç ile iki N-metilpirol halkasına sahip olan bu iki yapı, oldukça yeterli olan belirli eğrilikleri ile oluğa uyum gösterirler; ayrıca, bunlar bazların ve DNA omurgasındaki fosfat gruplarının atomları ile H-bağı yapabilen verici veya alıcı atomlara sahiptirler. Yani hidrofobik etkileşimlerinin ve hidrojen bağlarının sayesinde, DNA'nın küçük oluğunda bulunan A-T'ce zengin olan bölgeler ile etkileşime girmektedirler. Ancak

distamisin ve netropsin gibi moleküller DNA'nın küçük oluğu etrafına sarılarak bir hilal şekli oluşturmamaktadır ve DNA'nın esnemesini tanımda yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden pirol ve imidazol halka sistemlerini ihtiva eden poliamid moleküllerinin oligomerik "hairpin"li dizileri, spesifik bir sekansa özgü bir şekilde ve yüksek afinitesi ile birlikte DNA'nın küçük oluğuna bağlanma yeteneğine sahip olması koşuluyla sentezlenmiştir (Sangeetha ve diğerleri, 2014). Küçük oluk bağlayıcıları, yüksek özgüllüklerinden ve gen ekspresyonunu modüle etme eğilimlerinden ötürü halen geliştirilmeye devam etmektedir (Ruiz ve diğerleri, 2010).

Moleküler düzeyde, her oluğun çevresi birbirinden farklılık göstermektedir (Lown, 1994). Büyük olukların çoklu etkileşim alanları bulunup, moleküller ile nispeten daha güçlü bağlanma yeteneği gösterdikleri bilinmektedir (Kielkopf ve diğerleri, 1998; Pabo ve Sauer, 1984). 11,6 Å genişlik ve 8,5 Å derinliğindedir (Neidle, 2001). Öte yandan, küçük oluklar ise daha az sayıda bağlanma alanına sahiptir ve 8,2 Å derinliğinde olup daha küçüktürler ve küçük molekülleri bağlamak için gereken alana sahiptirler. Antibiyotik ve antikanser ilaçların çoğunun küçük moleküller olduğu göz önüne alındığında, küçük olukların aslında asıl bağlama bölgesi olduğu söylenebilir (Neidle, 2001, Gao, Mirau ve Patel, 1992).

Oluğa bağlanan moleküllerin etkileşim yolları;

- Oluğa bağlanan moleküller, genellikle rotasyonal özgürlüğe sahip olan heterosiklik ya da aromatik hidrokarbon halka serilerinden oluşmuştur. Bu moleküller küçük veya büyük oluk içerisine yerleşebilmek için bir su molekülünü ayrılmasına sebep olurlar.
- İlaç moleküllerinin ilk hedefi spesifik DNA dizilerini tanımdır.
- Bu hedef 16-18 baz çiftinden oluşan bir alandır.
- Bu moleküller kovalent olmayan bağlar ile DNA sarmalına bağlanmaktadır.
- Bu moleküller doğrudan etkileşim özelliğine sahip olup, nükleik asitlerin büyük (G-C) veya küçük (A-T) oluğuna bağlanarak baz çiftleri arasına girer (Raman ve Selvan, 2012).

Elektrostatik etkileşim yolu ile bağlanma

Negatif yüklü DNA fosfat omurgası ile katyonik türler arasındaki elektrostatik etkileşimler, küçük moleküllerin bağlanma afinitesini arttırmak için önemli olabilecek ideal spesifik olmayan etkileşimlerdir. Büyük ölçüde, bu klasik dışsal bağlanma

etkileşimleri, yani elektrostatik veya oluğa bağlanma, genellikle sarmalın dış tarafında meydana gelir. Elektrostatik etkileşim, DNA'nın ilaç-ilac dışsal etkileşimini sağlayan bir iskele olarak etkisini gösterir (García ve diğerleri, 2010). Bu tip bir etkileşim, spektral eğrilerin değişmeden kaldığı elektrostatik etkileşim ile ilgili kayda değer bir fark oluşturan UV emilim spektrumunda değişikliklere (kırmızıya kaymaya) sebep olur. Elektrostatik etkileşimin bağlanma sabitleri ($\Delta G = -12,6 \text{ kJ mol}^{-1}$), interkalasyona kıyasla düşüktür (Seifert, Connor, Kushon, Wang ve Armitage, 1999). Hem interkalasyon hem de elektrostatik etkileşim, reaksiyon için düzlemsel aromatik ligandlar gerektirir, dolayısıyla bu bağlama biçimleri benzer ligandlarda gözlemlenebilir.

2.6.3. DNA-ilac etkileşiminin araştırılmasında kullanılan analiz yöntemleri

Metal kompleks-DNA etkileşimlerini incelemek için bir dizi teknik kullanılmaktadır (Barone ve diğerleri, 2013). Bunlar; Kızılötesi (IR), Raman, Sirküler dikroizm, UV-vis, Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopileri, Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM), Elektroforez, Kütle spektrometrisi, Viskozite ölçümleri, Termal denatürasyon çalışmaları, Cyclic, Square dalga ve Diferansiyel eğilim voltametrisi, vb. Bu teknikler, ilaç-DNA etkileşiminin DNA yapısı üzerindeki etkilerini karakterize etmek için kullanılmaktadır (Sirajuddin, Ali ve Badshah, 2013). Bunlar arasından sadece X-ışını ve NMR, bu etkileşimi atomik seviye de incelemektedir (Wahl ve Sundaralingam, 1995; Cachau ve Podjarny, 2005; Andersen ve Sletten, 2000; Han ve Gao, 2000). Kütle spektrometrisi, matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI) ve elektrosprey iyonizasyon (ESI) yöntemlerinin getirilmesi ile büyük ve termal olarak kararsız biyomoleküllerin (Mano ve Goto, 2003), oligonükleotidler, proteinler ve metal komplekslerinin doğrudan analizini sağlamaktadır (Beck, Colgrave, Ralph ve Sheil, 2001). Bu teknik, kapiller elektroforez (CE) veya yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile birleştirilebilir. HPLC yöntemi ise, serbest metal iyonları ve koordinasyon bileşiklerini ayırt etmek ve saptamak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Martins ve diğerleri, 2006; Constantinou-Kokotou, Karikas ve Kokotos, 2001; Volckova, Dudones ve Bose, 2002). CE, yüksek elektrik alanının etkisi altında türlerin yüke, büyüklüğe ve sürtünme kuvvetine göre ayrılmasına dayanmaktadır (Sekhon, 2011; Righetti, Gelfi ve D'Acunto, 2002). Bu etkili ve hızlı teknik, afinite ve seçicilik hakkında fikir vermektedir (Araya, Huchet, McGroarty, Skellern ve Waigh, 2007; Hamdan, Skellern ve Waigh, 1998). Jel elektroforezi farklı protokoller için kullanılabilir; topoizomeras inhibisyon (Webb ve Ebeler, 2003) ve DNA

kesme çalışmaları (Ruiz ve diğerleri, 2010; Tan, Wang ve Zhu, 2009) interkalatif bağlanmayı (Keck ve Lippard, 1992; Zeman, Depew, Danishefsky ve Crothers, 1998) doğrulamaya yardımcı olan deneylerdir. Footprinting, nükleik asitlerin omurgasındaki spesifik sekanslara bağlanan ilaçlar tarafından enzimatik veya kimyasal nükleaz aktivitesinin inhibe edildiği kesim deneyleridir. Poliakrilamid CE yöntemi ile nükleik asit fragmentleri ayrılarak, bağlanma bölgelerinin uzunluğu ve pozisyonu hakkında fikir sahibi olunmaktadır (Hampshire, Rusling, Broughton-Head ve Fox, 2007). Sekansa özgü seçiciliği incelemek için, rekabet diyalizi (Ren ve Chaires, 1999), restriksiyon endonükleaz koruma seleksiyonu ve amplifikasyonu (REPSA) (Van Dyke, Van Dyke ve Sunavala-Dossabhoy, 2007; Stoltenburg, Reinemann ve Strehlitz, 2007), üsse ait zenginleştirme ile ilaçların sistematik evrimi (SELEX) (Khalid, Hannon, Rodger ve Rodger, 2006) ve floresan interkalatör yer değiştirmesi (FID) (Tse ve Boger, 2004; Asare-Okai ve Chow, 2011) yöntemleri kullanılmaktadır. Elektron paramanyetik rezonansı (EPR), DNA'ya bağlı bir paramanyetik merkezle donatılmış ilaçların heliks eksenine olan uyumunun yanı sıra DNA ipliğindeki konformasyonel değişiklikleri anlamak için kullanılır (Ng ve diğerleri, 2008). Raman spektroskopisi (Duguid, Bloomfield, Benevides ve Thomas, 1993) ve Yüzey-geliştirilmiş Raman spektroskopisi (SERS) (Xie ve diğerleri, 2008), nükleik asit bağlanma bölgelerini belirlemek ve ilacın uyarması sonucunda DNA oluşan konformasyonel değişimleri karakterize etmek için kullanılan tekniklerdir. Yüzey plazmon rezonansı (SPR) gerçek zamanlı olarak DNA-ilaç etkileşimi sırasında meydana gelen kırılma indeksindeki değişimleri ölçer (Ciolkowski, Fang ve Lund, 2000), denge ve etkileşim kinetiği hakkında fikir verir (Tanious, Nguyen, Wilson, Correia ve Detrich, 2008). Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) DNA-ilaç komplekslerinin doğrudan görüntülenmesine olanak verir (Alessandrini ve Paolo, 2005). Viskozite ve sedimentasyon hidrodinamik yöntemleri, bağlanma biçimini belirlemek için kullanılmaktadır. Ligandın baz çiftlerine interkalasyonu, DNA çift sarmalının kısmi olarak gevşemesine ve uzunluğunda artışa neden olur, dolayısıyla nispi viskozitede artış ve sedimentasyon katsayısında ise azalma olur. Bu değişiklikler oluğa bağlanma biçiminde gözlemlenmemektedir (Cohen ve Eisenberg, 1969). Polarize ışık spektroskopisi, DNA-ilaç komplekslerinin hızlı bir şekilde karakterizasyonunu mümkün kılar. Lineer dikroizm (LD) ilacın DNA uzun eksenine oryantasyonu ile doğrudan ilişkilidir. LD'nin varlığı ilacın DNA'ya bağlı olduğunu gösterir. Baz çiftlerine sıkı sıkıya istiflenmiş interkalatörler, baz çiftlerine benzer LD gösterirken, oluk bağlayıcıları karşıt LD gösterirler (Norden, Kubista ve Kurucsev, 1992). Sirküler dikroizm (CD), DNA-ilaç kompleksini yapısal olarak

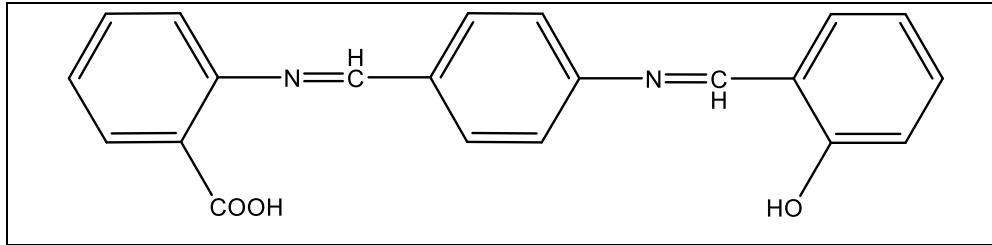
anlamayı sağlamaktadır. Kiral olmayan ilaçlar sinyal vermez, bu yüzden kiral olmayan bir ilacın absorpsiyon bölgesinde bir sirküler dikroizm sinyalini indüklemesi (ICD), o ilacın DNA'ya bağlandığının en büyük göstergesidir (Kypr, Kejnovská, Renčiuk ve Vorlíčková, 2009). UV-vis absorpsiyon ve floresans spektroskopisi, iyi duyarlılık, tekrarlanabilirlik, basitlik ve çok yönlülüklerinden dolayı en çok kullanılan yöntemler olup, bu yöntemler ile yeni bir sitotoksinin DNA ile etkileşip etkileşmediği ve nasıl etkileştiği hızlı ve basit bir şekilde belirlenebilmektedir (Palchaudhuri ve Hergenrother, 2007). İlaçların absorbans ve floresans spektrumları, nükleik asitlerle etkileşime girmeleri sonucunda da değişmektedir. Nükleik asitlerle etkileşime girdiğinde floresans artışı veya söndürme gözlemlenebilir (Busto ve diğerleri, 2011). Kalorimetrik teknikler, termodinamik bağlanma parametrelerini elde etmek için güçlü bir araçtır. DNA-ilaç kompleksinin termal denatürasyonu, diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC) (Giancola ve Therm, 2008) veya DNA erimesinin termodinamik özelliklerini sağlayan UV-vis (Mergny ve Lacroix, 2003) ölçümleri tarafından değerlendirilir. İnterkalatörler erime sıcaklığını artırmaktadırlar ve diğer bağlanma modlarına göre termal stabilizasyon neden olmamaktadırlar. İzotermal titrasyon kalorimetrisi (ITC) stokiyometri ve bağlanma afinitesi hakkında fikir verir (Chaires, 2008; Jelesarov ve Bosshard, 1999). Moleküler dinamikler, Monte Carlo simülasyonları ve kuantum kimyasal hesaplamalar gibi moleküler modelleme teknikleri (Gago, 2004) ve hesaplamalı yaklaşımlar; bağlanma modları, bağlanma enerjileri, spesifik sekanslar, bağlanma afiniteleri, stokiyometri ve DNA-ilaç etkileşiminin konformasyonel değişiklikleri hakkında bilgi sağlar.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Asimetrik diimin Schiff bazı

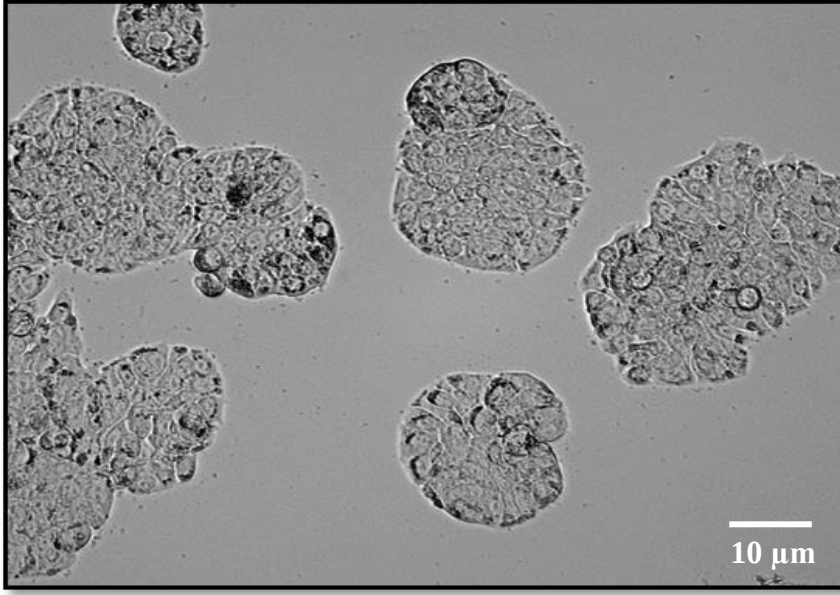
Bu çalışmada, yapısında asimetrik olarak iki adet imin grubu bulunan ve serbest karboksil (COOH) grubu içeren "amino asit Schiff bazı" benzeri yeni bir Schiff bazı (Şekil 3.1) kullanılmıştır. 2-(4-(2-hidroksibenzilidenamino)benzilidenamino)benzoik asit olarak adlandırılan asimetrik diimin Schiff bazı, Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Anorganik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Dr. Özlem ÖZDEMİR tarafından ilk kez sentezlenmiştir. Bileşik orijinal olup, iki aşamalı bir metotla elde edilmiştir. Birinci aşamada aldehit olarak 4-nitrobenzaldehit (Merck) ve amin bileşiği olarak antranilik asit (Aldrich) kullanılarak bir nitro-Schiff bazı elde edilmiştir. İkinci aşamada, bu nitro-Schiff bazının yapısındaki nitro grubu sodyum ditiyonit (Aldrich) ile amino grubuna indirgenmiş ve salisilaldehit (Aldrich) ile tepkimeye sokularak, asimetrik diimin Schiff bazı sentezlenmiştir.



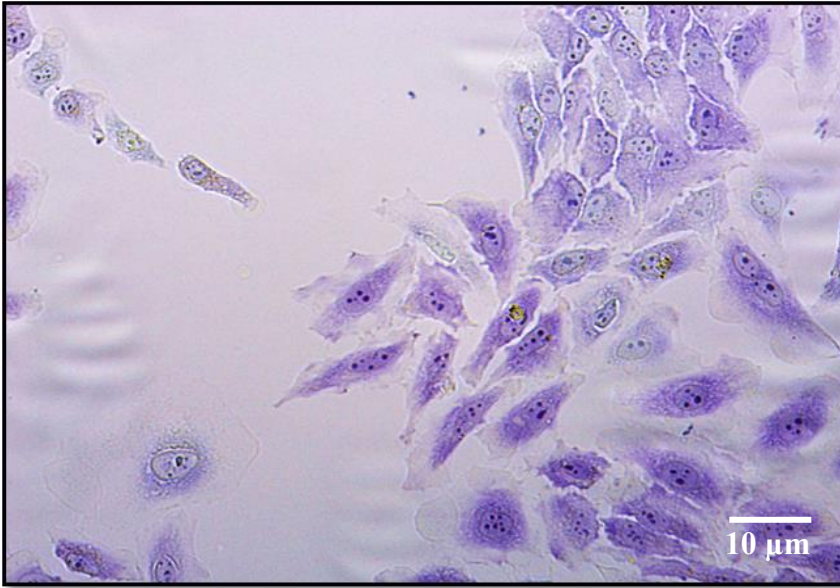
Şekil 3.1. 2-(4-(2-hidroksibenzilidenamino)benzilidenamino)benzoik asit

3.1.2. Çalışmada kullanılan hücre hatları

Çalışmada gastrointestinal sistem epitelyum hücrelerine bir model olarak kullanılan insan kolorektal adenokarsinoma kanser hücre hattı HT-29 (Resim 3.1) (ATCC® HTB-38TM) ve insan servikal kanser hücre hattı HeLa (Resim 3.2) (ATCC® CCL-2TM) kullanılmıştır. HT-29 hücreleri, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hakan AKBULUT'tan, HeLa hücreleri ise, Hamamatsu Üniversitesi Patoloji bölümünden (Japonya) temin edilmiştir. Hücreler ile yapılan tüm çalışmalar steril kabin (Telstar BIO II A) içerisinde gerçekleştirilmiştir.



Resim 3.1. HT-29 hücre hattının inverted mikroskop görüntüsü (10X)

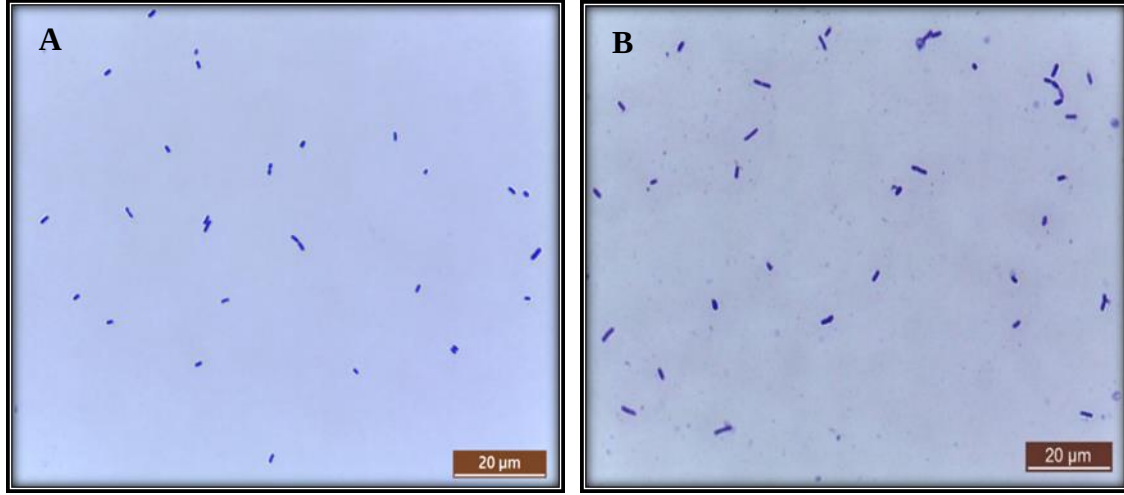


Resim 3.2. HeLa hücre hattının inverted mikroskop görüntüsü (10X)

3.1.3. Çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* test suşları

Deneyde, Maron ve Ames (1983) tarafından, *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla geliştirilmiş TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. Bu suşlar Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyeleri'nden olan Prof. Dr. Muhsin KONUK'dan temin edilmiştir. *S. typhimurium* TA98 suşları kodon kayması, *S.*

typhimurium TA100 suşu baz çifti dönüşümü tipindeki mutasyonların saptanmasında kullanılmıştır (Resim 3.3).



Resim 3.3. *S. typhimurium* TA98 (A) ve *S. typhimurium* TA100 (B) mutant suşlarının 100X'lik objektifteki ışık mikroskobu görüntüleri (Kristal viyole)

3.1.4. Mutajenite testinde kullanılan besi ortamları ve çözeltiler

Çalışmada kullanılan besi ortamları ve çözeltiler aşağıdaki belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Vogel-Bonner-E ortamı (50X VB tuzları)

	<u>1000 mL</u>
Magnezyum sülfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	10 g
Sitrikasit monohidrat	100 g
Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)	500 g
Sodyum amonyum fosfat ($\text{NaH}_2\text{N}_4\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	175 g
Distile su (45 °C)	670 mL

Yukarıda belirtilen maddeler sırası ile distile suya eklenmiştir. Toplam hacim 1000 mL'ye tamamlanıp, otoklavda 121 °C'de 20 dk sterilize edilmiştir. Oda sıcaklığında saklanmıştır.

(0,5 mM) Histidin/biyotin (HB) solüsyonu

	<u>250 mL</u>
D-Biyotin (F.W. 247,3)	30,9 mg
L-Histidin-HCl (F.W. 191,7)	24,0 mg
Distile su	250 mL

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülmüş ve sonra histidin ilave edilerek otoklavda 121 °C’de 20 dk sterilize edilmiştir. Çözelti +4 °C’de saklanmıştır.

(% 0,8/0,02 NaOH) Ampisilin solüsyonu

	<u>100 mL</u>
Ampisilin trihidrat	0,8 g
0,02 M NaOH	100 mL

Ampisilin trihidrat, 0,02 M NaOH içinde çözülmüş ve sterilizasyon için 0,22 µm por çaplı filtreden geçirilmiştir. Çözelti +4 °C’de saklanmıştır.

Top agar

	<u>1000 mL</u>
Agar	6 g
NaCl	5 g
Distile su	1000 mL

Yukarıda belirtilen maddeler sırası ile distile suya eklenmiştir. Manyetik karıştırıcıda ısıtılarak çözülmüş ve otoklavda 121 °C’de 20 dk sterilize edilmiştir. Biraz soğuduktan sonra 100 mL top agara 10 mL (0,5 mM) HB solüsyonu olacak şekilde ilave yapılarak karıştırılmıştır.

Histidin/biyotin plakları (HB agar)

	<u>1000 mL</u>
Agar	15 g
% 20 Glukoz	50 mL
% 0,5 Histidin	10 mL
% 0,13 Biyotin	6 mL
50X VB	20 mL
Distile su	914 mL

Agar ve distile su karıştırıldıktan sonra otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Solüsyon 45 °C'ye kadar soğutulup, içerisine % 20 glukoz, 50X VB tuzları ve histidin çözeltisi eklenmiş, solüsyon biraz daha soğuduktan sonra biyotin ilave edilerek karıştırılıp plaklara 30 mL olarak aktarılmıştır.

Histidin/biyotin/ampisilin plakları (HBA agar)

	<u>1000 mL</u>
Agar	15 g
Distile su	910 mL
50X VB	20 mL
% 20 Glukoz	50 mL
% 0,5 Histidin	10 mL
% 0,13 Biyotin	6 mL
(% 0,8/0,02 NaOH) Ampisilin	3,15 mL

Agar ve distile su karıştırıldıktan sonra otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Solüsyon 45 °C'ye kadar soğutulup, içerisine % 20 glukoz, 50X VB tuzları ve histidin çözeltisi eklenmiş, solüsyon biraz daha soğuduktan sonra biyotin ve ampisilin ilave edilerek karıştırılıp plaklara 30 mL olarak aktarılmıştır. Bu petrilere bakteriler 4 °C'de 2 ay süre ile saklanabilmektedir.

Minimal glukoz agar (MGA) plakları

	<u>1000 mL</u>
Agar	15 g
Distile su	930 mL
50X VB	20 mL
% 20 Glukoz	50 mL

Agar ve distile su karıştırıldıktan sonra otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Solüsyon 45 °C'ye kadar soğutulup, içerisine % 20 glukoz ve 50X VB tuzları eklenip, karıştırılarak plaklara 30 mL olarak aktarılmıştır.

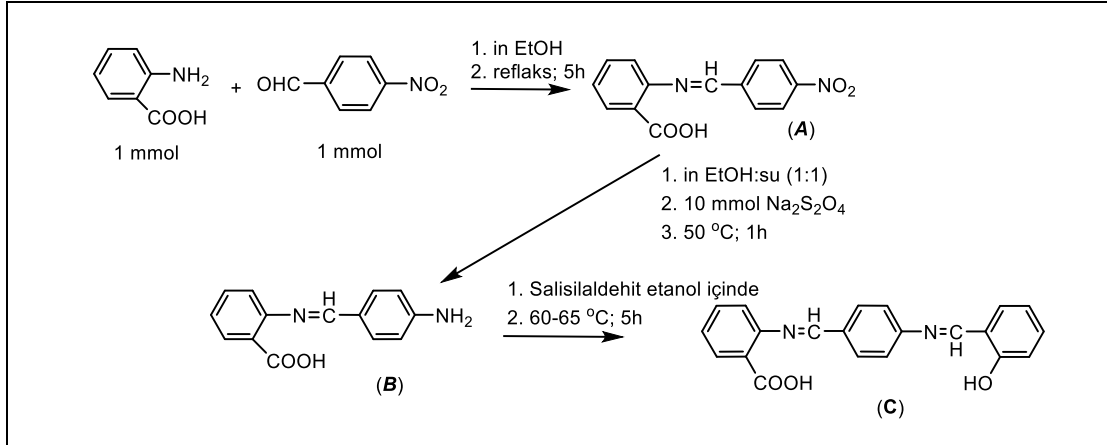
0,2 M Fosfat tamponu (pH 7,4)

	<u>500 mL</u>
0,2 M Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	13,82 g
0,2 M Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	14,2 g
Distile su	500 mL

Yukarıda belirtilen maddeler sırası ile distile suya eklenmiştir. Karışım pH 7,4'e ayarlandıktan sonra 121 °C'de 20 dk otoklavda sterilize edilmiştir. Oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.2. Metot**3.2.1. Asimetrik diimin Schiff bazının hazırlanışı**

1 mmol (0.270 g) nitro Schiff bazı (Şekil 3.2A) 50 °C'da etanol-su karışımında (40 mL:40 mL) çözülmüştür. 10 mmol (1.740 g) katı sodyum ditiyonit bu çözeltiye bir saat süre içerisinde azar azar eklenmiş ve karıştırılmıştır (Şekil 3.2B). İndirgenme işlemi tamamlandığında, 5 mL etanol içerisinde çözülmüş olan 1 mmol (0.122 mL) salisilaldehit yukarıdaki karışıma eklenmiştir (Şekil 3.2C). Karışım 60-65 °C sıcaklıkta 6 saat boyunca karıştırılmıştır. Bu çözelti oda sıcaklığında yaklaşık bir hafta boyunca bekletilmiştir. Sürenin bitiminde oluşan açık turuncu renkli katı etanolden kristallendirilmiştir.



Şekil 3.2. Asimetrik diimin Schiff bazının sentez basamakları

3.2.2. DNA bağlanma çalışması

DNA bağlanma çalışması olarak, Schiff bazı-DNA etkileşimlerinin araştırılmasında en yaygın ve etkili tekniklerden biri olan UV absorpsiyon çalışması yapılmıştır (Shahabadi, Kashanian ve Darabi, 2010; Sun ve diğerleri, 2011; Jaumot ve Gargallo, 2012; Wei, Wang ve Zhang, 2010; Bhadra ve Kumar, 2011). Bu çalışmayla Schiff bazı ile DNA arasındaki etkileşim biçiminin ve bağlanma afinitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır (Shahabadi, Kashanian, Khosravi ve Mahdavi, 2010).

Sigma-Aldrich'ten katı olarak alınan CT-DNA, 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH 7,2) tampon çözeltisi ile oda sıcaklığında çözülmüştür. En fazla 3 gün +4 °C'de saklanmıştır. CT-DNA molar derişimi, 260 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değeri ve molar absorpsiyon katsayısı ($\epsilon=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak bulunmuştur (Gultneh ve diğerleri, 1999). CT-DNA stok çözeltisinin RNA ya da protein kontaminasyonu içerip içermediği, A_{260}/A_{280} oranının 1,8–2,0 aralığında olup olmadığı Take3 plate (BioTek) ile kontrol edilmiştir (Marmur, 1961; Tekin, 2014). Schiff bazı, DMSO (Dimetilsülfoksit, Merck) içerisinde çözülerek $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ konsantrasyonunda bir stok çözelti hazırlanmış ve çalışmada kullanılacak 35 μM konsantrasyonu ise, bu stok çözeltisinden hazırlanmıştır.

Absorpsiyon titrasyon deneyi için, UV-absorpsiyon spektrumları, 35 μM Schiff bazı, 5-120 μM arasındaki konsantrasyonlarda, CT-DNA ilave edilip, son hacim 5 mM Tris-HCl /50 mM NaCl (pH 7,2) tamponu ile tamamlanarak, 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra, T60 UV-vis Spektrofotometrisinde (PG Instruments) 200 ile 500 nm dalga boyu aralığında ölçülmüştür (Li ve diğerleri, 2011). Elde edilen sonuçlardan

McGhee-von Hippel (MvH) Eş. 3.1 göre, her bir DNA konsantrasyonuna ([DNA]) karşı $[DNA]/(\epsilon a - \epsilon f)$ değerleri grafiğe geçirilmiştir. Grafikten elde edilen doğrunun eğimi $1/(\epsilon b - \epsilon f)$ 'yi, kesim noktası ise $1/K_b(\epsilon b - \epsilon f)$ olarak bulunmuş ve iki değer birbirine oranlanarak bağlanma sabitleri (K_b) hesaplanmıştır; $[DNA]/(\epsilon a - \epsilon f) = [DNA]/(\epsilon b - \epsilon f) + 1/K_b(\epsilon b - \epsilon f)$ (3.1)

([DNA]: DNA konsantrasyonu (M), ϵf : Serbest haldeki bileşiğin molar sönüm katsayısı, ϵb : Bileşiğin çözeltideki bağlı formunun molar sönüm katsayısı, ϵa : Ölçülen absorbans/[Kompleks (M)] ile hesaplanan molar sönüm katsayısı, K_b : Bağlanma sabiti) (Pyle ve diğerleri, 1989).

Absorbans şiddetindeki değişim ise Eş. 3.2 kullanılarak yüzde oranlarıyla verilmiştir; $\%H = [(A_i - A_s)/A_i] \times 100\%$ (3.2)

(% H: Absorbans şiddetindeki değişimin (hipokromizm veya hiperkromizimin) yüzde değeri, A_i : DNA eklenmeden önce bileşiğin serbest haldeki absorbans şiddeti, A_s : Maksimum konsantrasyonda DNA ilave edildikten sonraki bileşiğin absorbans şiddeti) (Pravin, Utthra, Kumaravel ve Raman, 2016; Shahabadi, Kashanian ve Darabi, 2009)

3.2.3. DNA kesim aktivitesi

Bu çalışmanın amacı, Schiff bazının DNA kesim aktivitesi gösterip göstermediğini ortaya koymaktır ve dolayısıyla kanser tedavisinde terapötik amaçla kullanılabilme imkanı bulup bulmayacağı da araştırılmıştır. Tüm kesim aktiviteleri için pBR322 plazmid DNA kullanılmıştır. Schiff bazı stok çözeltisinden ($5 \times 10^{-3} M$), çalışmada kullanılacak 1000-3500 μM arasındaki konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Bu deneyde 7 μL plazmid DNA (0,5 $\mu g/\mu L$), Schiff bazının stok solüsyonundan hazırlanan 1000-3500 μM arasındaki konsantrasyonlar ile sırasıyla karıştırılmıştır. Son olarak toplam hacim 30 μL olacak şekilde, reaksiyon karışımı 10 mM Tris-HCl/50 mM NaCl tamponu (pH 7,22) ile seyreltilmiştir. Bundan sonra, reaksiyon karışımları 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra örnekler, % 1'lik agaroz jel üzerine 4 μL yükleme boyası (% 0,25 bromfenol mavisi, % 0,25 ksilen siyanol, % 30 gliserol, 10 mmol EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit)) ile yüklenmiştir. Jel, TAE tamponunda 45 dk 70 V'da yürütülmüştür. EB (Etidyum bromür, 10 mg/mL) çözeltisi ile boyanmıştır. UV ışığı altında Jel Dokümantasyon Sistemi (BIO-RAD) ile görüntülenmiştir (Kulaksızoğlu, Gökçe ve Güp,

2012; Netalkar, Netalkar, Budagumpi ve Revankar, 2014). DNA kesim aktivitesi, kompleksin süpersarmal DNA (SC)'yı, çentikli sirküler form (NC) ve lineer forma (LC) dönüştürme yeteneğinin belirlenmesi ile ölçülmüştür. Bant yoğunlukları, Image Lab™ Software Version (Yazılım Sürümü) 5.2.1 programı kullanılarak belirlenmiştir (Bernadou, Pratviel, Bennis, Girardet ve Meunier, 1989; Babu, Reddy ve Krishna, 2007).

Schiff bazı tarafından uyarılan pBR322 DNA'sının kesim aktivitesini incelemek ve kesim mekanizmasını daha iyi anlayabilmek amacıyla, çeşitli aktivörler, radikal gidericiler ve oluk bağlayıcılar kullanılmıştır. Kesim reaksiyonu, aktivatör olarak; hidrojen peroksit (0,4 M, H₂O₂), askorbik asit (0,4 M, AA), radikal giderici olarak; etil alkol (0,4 M, EtOH), sodyum azid (0,4 M, NaN₃), oluk bağlayıcılar olarak ise; 4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidroklorid (8 µM, DAPI) ve metil yeşili (MG, 0,01 mg/mL solüsyonundan 2,5 µL) varlığında incelenmiştir. Örnekler 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra DNA kesim aktivitesi, yukarıda anlatıldığı şekilde belirlenmiştir (Arjmand ve Jamsheera, 2011; Li ve diğerleri, 2011; Arjmand, Parveen, Afzal, Toupet ve Hadda, 2012; Arjmand, Sharma, Muddassir ve Tabassum, 2011).

3.2.4. Antikanser aktivite

Schiff bazının HT-29 ve HeLa hücre hatları üzerine antiproliferatif etkisi

HT-29 (İnsan kolorektal adenokarsinoma hücre hattı) hücresinin geliştirilme koşulları

HT-29 hücresi, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, Grand Island, NY, USA) içerisine; % 1 L-Glutamin (Sigma), % 1 penisilin/streptomisin (Sigma), % 10 fetal sığır serumu (FBS; Gibco) ve % 40 MCDB-201 (Sigma) katılarak hazırlanmış besi ortamında, 37°C sıcaklıkta, % 5 CO₂ içeren inkübatörde (Panasonic) geliştirilmiştir. Çalışmada kullanılacak hücrelerin besi ortamı gün aşırı değiştirilmiş ve flasklarda tam yayılma (% 80-90) göstermiş hücreler Tripsin-EDTA (Gibco) çözeltisi ile kaldırılmış ve thoma lamı ile inverted mikroskopta (Leica DM IL LED) sayımı yapılmıştır. Sitotoksikite ve antiproliferatif aktivite çalışmalarında hücreler, 96 kuyulu mikropatlara aktarılmıştır. Mikropatlarda 1x10⁴ hücre/kuyu olacak şekilde yoğunluğa ulaşana kadar geliştirilmiş ve sonrası denemelere alınmıştır (Shivananjappa ve Joshi, 2011; Morita ve diğerleri, 2002).

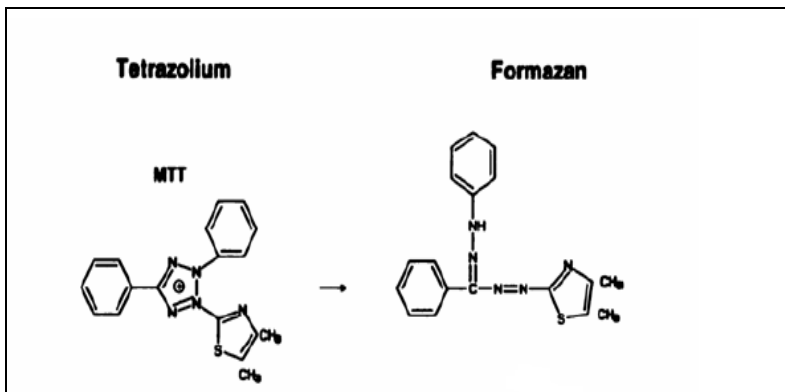
HeLa (İnsan serviks adenokarsinoma hücre hattı) hücresinin geliştirilme koşulları

HeLa hücresi, DMEM içerisine % 10 fetal sıgır serumu, % 1 penisilin/streptomisin ve % 1 L-Glutamin katılarak hazırlanmış besi ortamında, 37°C sıcaklık ve % 5 CO₂ içeren inkübatör de geliştirilmiştir. Besi yeri gün aşırı değiştirilmek suretiyle hücrelerin büyüme ve gelişmeleri takip edilmiş, flasklarda % 80-90 (maksimum) yoğunluğa ulaşmış hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılmış, deneme öncesi 96 kuyulu mikropklara alınmış ve 1x10⁴ hücre/kuyu yoğunluğuna ulaşana kadar geliştirilmiştir (Morita ve diğerleri, 2002).

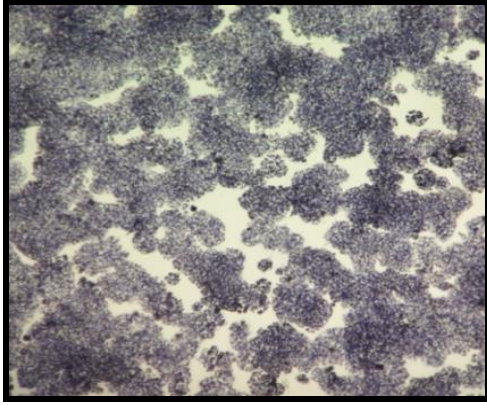
HT-29 ve HeLa hücreleri kriyo tüplerde -196 °C'de Sıvı azot tankında (International Cryogenics, Inc., IC 38RX) saklanmıştır.

Antiproliferatif aktivite testi

Kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik düzeyde antiproliferatif etkinin belirlenmesi amaçlanmıştır. HT-29 ve HeLa hücre canlılığı, MTT yöntemi ile belirlenmiştir. MTT testi, apoptozisin erken evresinde veya canlı hücrelerdeki mitokondriyal redüktaz enziminin, sarı renkli MTT (3-(4,5-dimetildiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolyum bromür) çözeltisinde bulunan tetrazolium halkasını, suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine (Şekil 3.3 ve Resim 3.4) dönüştürmesi ve oluşan renkli kristallerin DMSO ile çözülerek, çözeltinin 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Mosmann, 1983).



Şekil 3.3. Tetrazolyum tuzlarının formazana indirgenmesi (Kaçar, 2016)



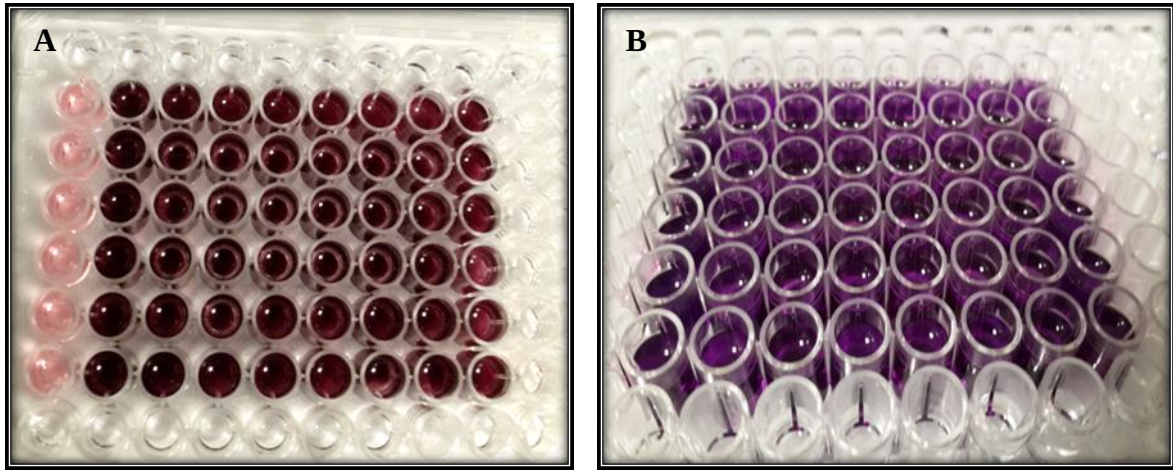
Resim 3.4. Formazan kristallerinin 10X’lik objektifteki inverted mikroskop görüntüsü

5×10^{-3} M konsantrasyonda hazırlanmış stok solüsyonundan, 50-1000 μM konsantrasyon aralığında Schiff bazı mikropklara ilave edilmiştir ve sırasıyla 24, 48 ile 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kuyucuklara MTT (5 mg/mL PBS tamponu içinde) solüsyonu 20 μL ilave edilmiş ve 37 °C’de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında her bir kuyucuktan MTT’li ortam uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa 200 μL DMSO konularak, 30 dk hücre içindeki formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Örneklerin, Elisa Reader mikropklaka okuyucusu (Epoch BioTek) ile 570 nm’de absorbanları okunmuştur (Zhang ve diğerleri, 2013; Tetteh, Dodoo, Appiah-Opong ve Tuffour, 2014; Hajrezaie ve diğerleri, 2014; Kril ve diğerleri, 2012). HT-29 ve HeLa hücre hatlarında gerçekleştirilen antiproliferatif aktivite çalışmalarında, mikropklalarda renk değişikliği gözlemlenmiştir. Kontrol gruplarında canlılık yüksek olduğu için daha koyu bir renk gözlemlenirken, deney gruplarında uygulanan Schiff bazının konsantrasyon artışına bağlı olarak renk yoğunluğu azalmıştır. Bu durum canlılığın azalması ile doğru orantılıdır (Resim 3.5). Canlı hücrelerde mitokondriyal redüktaz enzimi, MTT solüsyonunda bulunan tetrazolium halkasını, suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüştürür. Renk yoğunluğundaki azalma bu enzimin yeterli sayıda olmadığı, yani yeteri sayıda canlı hücre olmadığı anlamına gelmektedir. Sonuçlar değerlendirilirken, kontrol grubunun (Schiff bazı ile muamele edilmeyen) hücre canlılığı % 100 kabul edilerek, karşılaştırmalı olarak grafiklendirilmiştir. Deney her bir veri için 6 paralel olarak yapılmıştır ve ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. Deney ve kontrol gruplarının ortalama absorban (ABS) değerleri karşılaştırılarak, aşağıda verilen Eş. 3.3 ile % canlılık değeri hesaplanmıştır;

$$\% \text{ Canlılık} = [\text{ABSD} / \text{ABSK}] \times 100 \quad (3.3)$$

(ABSD: Deney grubunun ortalama absorbans değeri, ABSK: Kontrol grubunun ortalama absorbans değeri) (Krishnamoorthy, Sathyadevi, Cowley, Butorac ve Dharmaraj, 2011; Rao ve diğerleri, 2011; Li ve diğerleri, 2011).

IC₅₀, kontrol hücrelerine kıyasla, ilgili kimyasal ile muamele sonrası hücrelerin % 50'sini öldüren konsantrasyondur (Scheffler, You ve Ott, 2010; Rubner ve diğerleri, 2010). Bileşik konsantrasyonlarına bağlı % canlılık, Microsoft Excel de grafikleştirilmiş, grafikteki regresyon denkleminin bağlı olarak hücrelerin % 50'sinin ölümüne sebep olan konsantrasyon belirlenmiştir (Araújo ve diğerleri, 2013). İstatistiksel analizler ise, SPSS 22.0 programı ile yapılarak gruplar arasındaki farklılıklara bakılmıştır.



Resim 3.5. HT-29 (A) ve HeLa (B) hücre hatlarında MTT yöntemi ile gerçekleştirilen antiproliferatif aktivite çalışmasının mikropilaka görüntüleri

Sitokinez-blok mikronükleus (CBMN) testi

CBMN testi, interfaz hücrelerinin sitoplazması içinde mikronükleus oluşumunu uyaran bileşiklerin tespiti için kullanılan bir mutajenite test sistemidir. CBMN testi, morfolojik kriterler kullanarak, hücre bölünmesi inhibisyonu, kromozom kaybı, kromozom kırılması, apoptozis ve nekrosis gibi sitotoksite, antiproliferatif aktivite ve genotoksisite değerlendirmelerine olanak sağlamaktadır (Fenech, 2000).

Bu tez çalışmasında, Schiff bazının antiproliferatif etkisinin genotoksisiteye bağlı bir apoptozis ile ilişkili olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada 6 kuyulu mikropilaklarda 5×10^5 hücre/kuyu (2,0 mL/kuyu) olacak şekilde HT-29 ve HeLa hücreleri geliştirilmiştir. Schiff bazı stok çözeltisinden (5×10^{-3} M), çalışmada kullanılacak 1000 μ M

konsantrasyonu hazırlanmıştır. Bu konsantrasyondaki Schiff bazı ile muamele edilen hücreler, hücre bölünmesi ve kromozom hasarına bağlı mikronükleus oluşumunu belirlemek amacıyla % 5 CO₂, 37 °C'de 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyondan sonra, mitoz sonrasındaki hücre bölünmesini inhibe edebilmek için sitokalazin B (Sigma) (Cyt-B, 6 µg/mL) içeren taze DMEM uygulanmıştır ve 27 saat için inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında, hücreler iki kez PBS ile yıkanmıştır, tripsinizasyon (% 0,05 tripsin-EDTA'nın 300 µL'si ile 5 dk) ile kaldırılmıştır ve 10 dk boyunca 720 x g'de santrifüj edilmiştir. Pelletler daha sonra oda sıcaklığında hipotonik solüsyonda (3 mL % 0,56 KCl) yeniden süspanse edilmiştir ve 3 mL Carnoy reaktifi (metanol: glasiyal asetik asit - 5:1 v/v) ile fikse edilmiştir. Hücre süspanسیونları 10 dk 720 x g'da tekrar santrifüj edilmiştir ve 6 mL fiksatif içinde yeniden süspanse edilmiştir. Ardından tüpler 10 dk için santrifüj edilmiştir, süpernatant atılmıştır ve hücre süspanسیونları lamlara (konsantrasyon başına üç lam) damlatılarak yayılmıştır. Kuruduktan sonra, lamlar 20 dk % 10 Giemsa (Vms Chemical) ile boyanmıştır, distile su ile yıkanmış, havayla kurutulmuştur (Fenech, 2007). Hücreler, bir ışık mikroskobu (LEICA DM750, Leica Application Suite Version 4.3.0) kullanılarak, 100X büyütme ile incelenmiştir.

Schiff bazının 1000 uM konsantrasyonunun hem 24 hem 48 saat uygulamaları için, incelenen 500 binükleat hücrede toplam MN (mikronükleus) sayısı saptanarak, MN taşıyan binükleat hücrelerin oranı ve toplam MN sayısının incelenen binükleat hücre sayısına bölünmesiyle hücre başına düşen MN ortalaması ve % MN hesaplanmıştır (Fenech, 2000; Titenko-Holland ve diğerleri, 1997; Symonds, Konczak ve Fenech, 2013).

Toksisite ve antiproliferatif aktivite ölçütü olarak her kültürde 500 hücre sayılmış ve sitokinez-blok proliferasyon indeksi (CBPI) hesaplanmıştır. CBPI, hücre siklusunda gecikmenin bir ölçütü olarak kabul edilip, sitokalazin B'ye maruz kalma süresince her hücre için hücre siklusu sayısı hakkında bilgi verir. Aşağıdaki Eş. 3.4 ile hesaplanmıştır;

$$CBPI = [1N + (2 \times 2N) + (3 \times >2N)] / TC \quad (3.4)$$

(1N: Bir çekirdekli hücre sayısı, 2N: İki çekirdekli hücre sayısı, > 2N: İki'den daha fazla çekirdek bulunduran hücre sayısı, TC: İncelenen toplam hücre sayısı) (Fenech, 2000; Pepe ve diğerleri, 2013; Titenko-Holland ve diğerleri, 1997).

Bir bileşiğin DNA replikasyonu üzerindeki etkisini saptamak amacıyla replikasyon indeksi kullanılmıştır. Replikasyon indeksi (RI) aşağıdaki Eş. 3.5 kullanılarak hesaplanmıştır; RI=
$$[((2N)+(2 \times >2N))/(TC)U] / [((2N)+(2 \times >2N))/(TC)K] \times 100 \quad (3.5)$$

(U: Uygulama yapılan grubun hücre sayısı, K: Kontrol grubunun hücre sayısı) (Tarantini ve diğerleri, 2015). Her deney için kontrol grubu; herhangi bir uygulama yapılmamış, DMEM’de geliştirilmiş hücre kültürüdür.

Elektron mikroskobu ile morfolojik değerlendirme

Bu çalışmada, 6 kuyulu mikropiplaklarda, lamel üzerinde 5×10^5 hücre/kuyu (2,0 mL/kuyu) olacak şekilde HT-29 ve HeLa hücreleri geliştirilmiştir. Schiff bazı stok çözeltisinden ($5 \times 10^{-3}M$), çalışmada kullanılacak 1000 μM konsantrasyonu hazırlanmıştır. Bu konsantrasyondaki Schiff bazı ile muamele edilen hücreler, % 5 CO₂, 37 °C’de 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, hücreler % 2,5 Gluter aldehitte tespit edilmiştir. Sonra, sodyum fosfat tamponu (pH 7,2) ile yıkanmış ve % 70’lik alkole alınmıştır. Yükselen alkol serilerinden sonra ise, kritik noktada kurutulmuştur (Polaron, CPD 701 Critical Point Dryer). Kaplama cihazında (Polaron SC502) altınla kaplanmıştır ve taramalı elektron mikroskobunda, (SEM, Jeol JSM-6060) 10 kV’de incelenerek, dijital görüntüleri alınmıştır.

3.2.5. Topoizomeraz IIα inhibisyon çalışması

Bu çalışma ile Schiff bazının insan topoizomeraz IIα (topo IIα) aktivitesi üzerine olan etkisinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmanın temeli, bir inhibitör tarafından topo IIα’nın çift iplikli DNA kırıklarını yeniden birleştirmesi aktivitesini inhibe ederek, DNA replikasyonunun devam etmesine engel olmaktır. Hücrelerdeki tek ya da çift zincir kırıklı DNA parçalarının birikimi sonucunda ise programlı hücre ölümü meydana gelmektedir (Baguley ve Ferguson, 1998; Tırnoğlu, 2016; Öztürk, 2013).

Schiff bazı stok çözeltisinden ($5 \times 10^{-3}M$), çalışmada kullanılacak 500 ve 1000 μM konsantrasyonları hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonların, insan topo IIα inhibitör aktivitesi aşağıdaki gibi ölçülmüştür. 200 ng süpersarmal pBR322 plazmid DNA’sı (Thermo Scientific) ve 1 birim (unit) insan topo IIα (TopoGEN, ABD) içeren karışım, test tamponu

(1,5 M NaCl, 0,1 M MgCl₂, 5 mM ditiotritol, 1 mM ATP içeren 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0)) içinde bileşik ile ve bu bileşik olmadan 37 °C'de 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. 20 µL'lik son hacimdeki reaksiyon, 3 µL 7mM EDTA'nın eklenmesiyle durdurulmuştur. Reaksiyon ürünleri, TAE tamponu ile % 1'lik agaroz jelde 25 V'da, 4 saat boyunca yürütülerek analiz edilmiştir (Jun ve diğerleri, 2011; Xue ve diğerleri, 2012; Zeglis, Divilov ve Lewis, 2011) ve DNA bant yoğunlukları ölçüldükten sonra her bir konsantrasyonu için % inhibisyon değeri Eş. 3.6 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = [\text{ODsDNA} / \text{ODksDNA}] \times 100 \quad (3.6)$$

(ODsDNA = İnhibisyon sonucu gevşemiş hale dönüştürülmeyen süpersarmal DNA bant yoğunluğu, ODksDNA = Enzim olmayan kuyudaki süpersarmal DNA bant yoğunluğu) (Park ve diğerleri, 2004). Bileşik konsantrasyonlarına bağlı % inhibisyon ise, Microsoft Excel'de grafikleştirilmiş, grafikteki regresyon denklemine bağlı olarak IC₅₀ (%50 inhibisyona neden olan konsantrasyon) belirlenmiştir (He, Jin ve Tan, 2015).

3.2.6. Mutajenite testi

Bu test ile Schiff bazının *S. typhimurium* TA98 ve *S. typhimurium* TA100 suşları üzerindeki mutajenik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu testin temeli, yapay mutasyon oluşturulmuş olan *S. typhimurium*'un histidin aminoasidini sentezleme yeteneklerini kaybetmiş his⁻ olan oksotrofik suşların test bileşeni ile muamelesinden sonra tekrar bir mutasyon geçirerek his⁺ hale dönüşmesi esasına dayanır (Ames, 1973; Maron ve Ames, 1983). Bu çalışmada, test bakterilerinin stok kültürleri ile mikrozomal fraksiyonun hazırlanması, bakterilerin genetik özelliklerinin kontrol edilmesi ve Ames/*Salmonella*/mikrozom testi Maron ve Ames yöntemine uygun olarak plak inkorporasyon metodu ile yapılmıştır (Maron ve Ames, 1983). Her doz paralel 3 plak halinde denenmiş ve farklı zamanlarda iki bağımsız deney yapılmıştır. Solvent, pozitif ve spontan kontroller de deneye paralel olarak denenmiştir.

S. typhimurium TA98 ve *S. typhimurium* TA100 suşlarının hazırlanması

Stoklardaki bakteri plakları, HBA plaklarına paralel ekimleri yapıp 37 °C'lik etüvde (Raypa) 48 saat inkübe edilmiştir. Sonra iyi izole olmuş bir koloni seçilip, 2 mL nutrient

broth (NB, Oxoid no:2) içinde süspanse edilerek, 37 °C'de bir gece (12-16 saat) çalkalamalı inkübatörde (Infors AG) inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra öze ile bir öze dolusu sıvı kültür alınıp HBA üzerine çizgi ekim yapıp, plaklar 37 °C'lik etüvde 48 saat inkübe edilmiştir. Bu plaklar +4 °C'de 2 ay süre ile saklanmış ve pasajlar yapılmıştır (Tepekozcan, 2013; Akyıl, 2012). Bu plaklar master plak olarak geçmektedir.

Genetik kontrolleri yapılarak HBA'ya ekilmiş olan bakterilerden tek koloniler alınarak 2 mL NB içinde 37 °C'de 16 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, steril ependorf tüplerine 1 mL bakteri kültürü ve 90 µL DMSO eklenerek karıştırılmıştır ve bu tüpler sıvı azot içerisine daldırılıp çıkartılarak şok donmaları sağlanmıştır. Şok dondurulan kültürler stok olarak kullanılmak üzere -80 °C'ye kaldırılmıştır (Maron ve Ames, 1983; Diril, Sumer ve Izbirlik, 1990; Öksüzoğlu, 2005; Tepekozcan, 2013; Akyıl, 2012). Bu stok kültürler 1-2 yıl süre ile tazeliklerini korumaktadır (Tepekozcan, 2013; Akyıl, 2012).

S. typhimurium TA98 ve TA100 suşları için, master plaklarından iyi üremiş bir koloni öze ile alınarak 20 mL NB ve 63 µL ampisilin solüsyonu (% 0,8/0,02 NaOH) içerisinde süspanse edilmiştir. Ve 140 rpm'de 16 saat çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Taze kültür hazırlamak için, 16 saatlik inkübasyonun sonunda bu kültürlerden 500 µL alınarak, 20 mL NB ve 63 µL ampisilin solüsyonu içerisinde süspanse edilmiş ve 110 devir/dk'da 5 saat çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır (Maron ve Ames, 1983; Diril ve diğerleri, 1990; Öksüzoğlu, 2005; Tepekozcan, 2013; Akyıl, 2012).

S. typhimurium TA98 ve *S. typhimurium* TA100 suşlarının kontrol testlerinin yapılması

Testin güvenilirliği açısından test suşlarının orijinal mutasyonlara sahip olup olmadığını öğrenmek amacıyla, suşların genetik özellikleri aşağıdaki testler ile kontrol edilmiştir.

Histidin gereksinimi kontrolü

Bakterilerin MGA üzerine ekilmeleri sonucu his⁻ bakteriler his⁺'lardan ayırt edilmektedir. 37 °C'de, NB içinde bir gece üretilen bakteri kültüründen HB ve MGA plaklarına çizgi ekim yapılmıştır. 37 °C'lik etüvde 48-72 saat inkübasyondan sonra HB plaklarında üreme

gözlemlenirken, MGA plaklarında üreme gözlemlenmemiştir. Böylece kullanılacak bakteri kültürlerinin his- mutasyonunu taşıdığı anlaşılmıştır (Tepekozcan, 2013; Akyıl, 2012).

uvrB mutasyonu kontrolü

Bu mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile belirlenmiştir. Bu test için, 37 °C’de, NB içinde üretilen bakteri kültüründen bir öze dolusu alınıp 2 adet nutrient agar (NA) plağının tamamına paralel ekim yapılmıştır. Plaklardan biri UV altında 8 sn süre ile ışınlanmıştır ve 37 °C’lik etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. Kullanılan UV ışığı dozu, *uvrB* mutasyonu taşıyan bakteri suşlarını öldürecek doza sahiptir. Çünkü bakterilerin DNA kesme tamir etme mekanizması engellenmiştir. Bundan dolayı UV’ye maruz bırakılan plakta üreme olmazken, UV’ye maruz bırakılmayan plakta normal bir üreme gözlemlenmiştir. Bu da kullanılacak bakterilerin *uvrB* mutasyonunu taşıdığını göstermiştir (Tepekozcan, 2013; Akyıl, 2012).

Rfa mutasyonu kontrolü

Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuş ve hücre duvarının geçirgenliği arttırılmıştır. Bu mutasyonun varlığı kristal viyoleye duyarlılık testi ile belirlenmiştir. Bu test için, 37 °C’de, NB’de üretilen bakteri kültüründen 0,1 mL alınarak, 45 °C su banyosunda tutulan 2,5 mL top agar üzerine ilave edildikten sonra NA plaklarına dökülerek, plaklara 8 işareti yaptırılmıştır. 10 dk donması beklendikten sonra plağın ortasına steril bir filtre kağıdı diski yerleştirilip diskin ortasına % 1’lik kristal viyole çözeltisinden 10 µL damlatılmıştır ve plaklar 37 °C’lik etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra disk çevresinde üreme olmayan bir zon gözlemlenmiştir. Boya maddesi bakterilerin içine kolayca girip bakterilerin üremesini engellediği için zonun oluşması bakterilerin Rfa mutasyonunu taşıdıklarını göstermiştir (Tepekozcan, 2013; Akyıl, 2012).

R-faktör varlığı kontrolü

Test bakterilerinde bulunan, R-faktör taşıyan pKM101 plazmidlerinin kaybolup kaybolmadıkları ampisiline dirençliliklerinin ölçülmesi ile test edilmiştir. Bu amaçla, 37 °C’de, NB’de üretilen bakteri kültüründen alınarak, ampisilin solüsyonu içeren HBA

plaklarına çizgi ekim yapılmıştır. Sonra 37 °C'lik etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmış ve plazmid içeren mutant bakterilerin ampisilinli ortamda gelişikleri gözlemlenmiştir. Bu durum bakterilerin R-faktör plazmidini içerdiği anlamına gelmektedir (Tepekozcan, 2013; Akyıl, 2012).

Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü

Mutant test bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his⁻ durumundan his⁺ durumuna dönüşmesi belirli sınırlar içinde mümkün olmaktadır. Bu sınırlar *S. typhimurium* TA98 için 20-50 revertant/plak; *S. typhimurium* TA100 için 75-200 revertant/plaktır (Tepekozcan, 2013; Akyıl, 2012). Bu test için, 37 °C'de, NB'de üretilen bakteri kültüründen 0,1 mL alınarak, 45 °C'deki su banyosunda tutulan, 0,25 mL 0,5 M histidin-(-)biyotin (HB) solüsyonu içeren 2,5 mL top agar üzerine ilave edilmiştir ve test tüpü yavaşça çalkalanarak MGA plaklarına yayılmıştır. Sonra 37 °C'lik etüvde 48-72 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır (Tepekozcan, 2013; Akyıl, 2012).

Sıvı kültürün mL'sindeki bakteri sayısının belirlenmesi

Gecelik kültürün mL'sinde bulunan bakteri sayısını hesaplamak için, HBA plaklarında iyi üremiş bir koloni öze ile alınarak 20 mL NB içerisinde süspanse edilmiştir. Sonra kültür çalkalamalı inkübatörde 37 °C'de 110 rpm'de 12-16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra gecelik kültürden 100 µL alınmış ve 20 mL NB içeren falkona eklenmiştir. Böylece taze kültürleri hazırlanmış olup, 140 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda taze kültürün % 0,9 serum fizyolojik (SF) ile 10⁰-10⁻⁵ olacak şekilde bir dizi seyreltme yapılmıştır. Bu seyreltmelerden NA plaklarına her bir konsantrasyondan 3 petri olacak şekilde, 100 µL alınmış ve 45°C'deki su banyosunda tutulan 2,5 mL top agar içeren tüpe ilave edilmiştir. Daha sonra test tüpü yavaşça çalkalanarak NA plaklarına yayılmış ve 37 °C'lik etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları ile yapılan mutajenite testlerinde kullanılan bakteri kültürlerinin 1 mL'sinde 1-2 x 10⁹ mL/bakteri olması öngörülmektedir (Maron ve Ames, 1983; Diril ve diğerleri, 1990; Öksüzoğlu, 2005; Tepekozcan, 2013; Akyıl, 2012).

Schiff bazının çeşitli konsantrasyonlarının sitotoksik etkilerinin saptanması

Sitotoksik etkiyi saptamak amacıyla yapılan bu test Dean vd. (1985)'e göre yapılmıştır. Schiff bazı stok çözeltisinden ($5 \times 10^{-3} \text{M}$), çalışmada kullanılacak 200-2000 μM arasındaki konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Schiff bazının, *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları için, öldürücü dozunun saptanması amacıyla, 2 mL top agara 0,5 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH 7,4), 0,1 mL bakteri kültürü ve 0,1 mL 100-2000 μM konsantrasyon aralığında Schiff bazı ilave edilmiştir. Tüpteki karışım 3 ayrı NA plağına dökülerek plaklar 37 °C'lik etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. Sonra plaklardaki ortalama koloni sayısı hesaplanmış ve kontrol plakları ile kıyaslanarak toksik ve toksik olmayan dozlar belirlenmiştir (Tepekozcan, 2013; Akyıl, 2012).

Mutajenik etkinin Ames/*Salmonella*/mikrozom testi ile belirlenmesi

Bu işlem için, 0,25 mL histidin-(-)biyotin solüsyonu ilave edilmiş 45 °C'lik su banyosunda bulunan 2 mL'lik top agar içeren test tüplerine, 0,5 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH 7,4), 0,1 mL 5 saatlik taze bakteri kültürü ve 0,1 mL 200-2000 μM konsantrasyon aralığında Schiff bazı eklenmiştir. Tüpler yavaşça çalkalanarak MGA plaklarına dökülmüş ve plaklara 8 işareti yaptırılarak top agarın plak üzerine homojen bir şekilde yayılması sağlanmıştır. 15 dk donması beklendikten sonra plaklar 48-72 saat 37 °C'lik etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında plaklardaki koloniler sayılmıştır. Deney her doz için 3 ayrı plak olmak üzere hazırlanmış ve sonuçların değerlendirilebilmesi için deneye paralel olarak spontan kontrol, solvent kontrol (% 0,5 DMSO içeren distile su) ve pozitif (diagnostik) kontrol olarak 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ NaN_3 kullanılmıştır (Tepekozcan, 2013; Duff, Thangella, Creaven, Walsh ve Egan, 2012; Griffith ve diğerleri, 2011; Akyıl, 2012).

Ames/*Salmonella*/mikrozom test sisteminde, bir maddeye mutajen denilebilmesi için histidin protroflarının sayısının kendiliğinden geriye dönen (spontan) koloni sayısının en az iki katı olması ya da iki katından az olduğu durumlarda doza bağlı bir artış göstermesi gerekmektedir (Öksüzöğlu, 2005; Dean, Brooks, Hodson-Walker ve Hutson, 1985). Çalışma sonucunda elde edilen veriler bu mantığa göre yorumlanmıştır.

Bir maddenin mutajen olup olmadığı, aşağıdaki Eş. 3.1 ile hesaplanan mutajenite oranına göre belirlenmektedir; Mutajenik oran (MO) = Deney grubunda mutasyona uğramış

kolonilerin sayısı / negatif kontrolde mutasyona uğramış kolonilerin sayısı (3.1)
(Luo ve diğerleri, 2016).

3.2.7. İstatistiksel analizler

Tüm deneyler en az dört paralelle gerçekleştirilmiştir ve tüm sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak verilmiştir. Birçok grubu karşılaştırmak ve sonuçları değerlendirmek için, SPSS 22.0 Windows paket programında tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) kullanılarak % 95 güven aralığı ile veriler analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılığı değerlendirmek için, antiproliferatif aktivite çalışmasında HT-29 hücre hattında 24 ve 72 saat için, HeLa hücre hattında 24, 48, 72 saat için Dunnett C ve Games-Howell testleri ile HT-29 hücre hattında 48 saat için Tukey ve Bonferroni; Ames/*Salmonella*/mikrozom testinde ise, Tukey, Bonferroni post hoc testi ile çoklu karşılaştırma yapılmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Asimetrik Diimin Schiff Bazının Yapısı

Bu çalışmada yapısında asimetrik olarak iki adet imin grubu bulunan ve serbest karboksil (COOH) grubu taşıyan "amino asit Schiff bazı" benzeri yeni bir Schiff bazı kullanılmıştır. 2-(4-(2-hidroksibenzilidenamino)benzilidenamino)benzoik asit olarak adlandırılan asimetrik diimin Schiff bazının sentezi bu tez çalışması kapsamında yapılmamıştır. Bu bileşik ilk kez Dr. Özlem ÖZDEMİR (Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Anorganik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi) tarafından sentezlenmiştir ve bileşik ile ilgili aşağıda verilen analiz sonuçları Dr. Özlem ÖZDEMİR'e aittir.

Bileşik, element analizi (LECO CHNS-932), FT-IR (Thermo Scientific Nicolet iD5 ATR (KBr disk, 4000-400 cm^{-1})), $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR (Bruker Ultrashield 300 MHz), UV-vis (Analytika Jena UV-200) ve kütle spektrumları (Waters 2695 Alliance Micromass ZQ marka LC-MS) ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçları şu şekildedir.

Renk : Turuncu

Verim = % 42 (0,145 g)

E. N. (Barnstead Electrothermal BI 9200) = 120 °C.

Element analizi $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ (344,37 g/mol) Hesaplanan: C, % 73,24; H, % 4,68; N, % 8,13. Bulunan: % C, 73,26; H, 4,822; N, 6,66.

IR (KBr, cm^{-1}): 3570-3100 (geniş) (OH / COOH gerilme), 3062 (C-H benzen), 2932/2850 (C-H), 1660 (C=O), 1607 (C=N), 1580/1455 (C=C benzen), 1188 (C-O karboksil), 1148 (C-O fenol).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 6,50 (i, 1H, $J = 7,5$), 6,70 (ç, 1H, $J = 6,3$), 6,82 (ü, 1H, $J = 7,0$), 7,00 (ç, 1H, $J = 8,2$), 7,15 (i, 1H, $J = 7,7$), 7,30 (ç, 1H, $J = 7,7$), 7,41 (i, 1H, $J = 6,2$), 7,62 (ç, 1H, $J = 8,1$), 7,78 (i, 1H, $J = 7,2$), 8,95 (i, 1H, $J = 6,4$, CH=N), 9,60 (i, 1H, $J = 6,8$, CH=N), 10,75 (b, 1H, COOH), 13,00/13,20 (b, 1H, OH).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 114,8, 115,0, 116,9, 117,1, 117,6, 119,1, 119,9, 120,0, 128,5, 129,6, 132,7, 133,2, 135,4, 136,8 (Aromatik), 151,5 (C-OH), 161,1 (C=N), 162,2 (COOH).

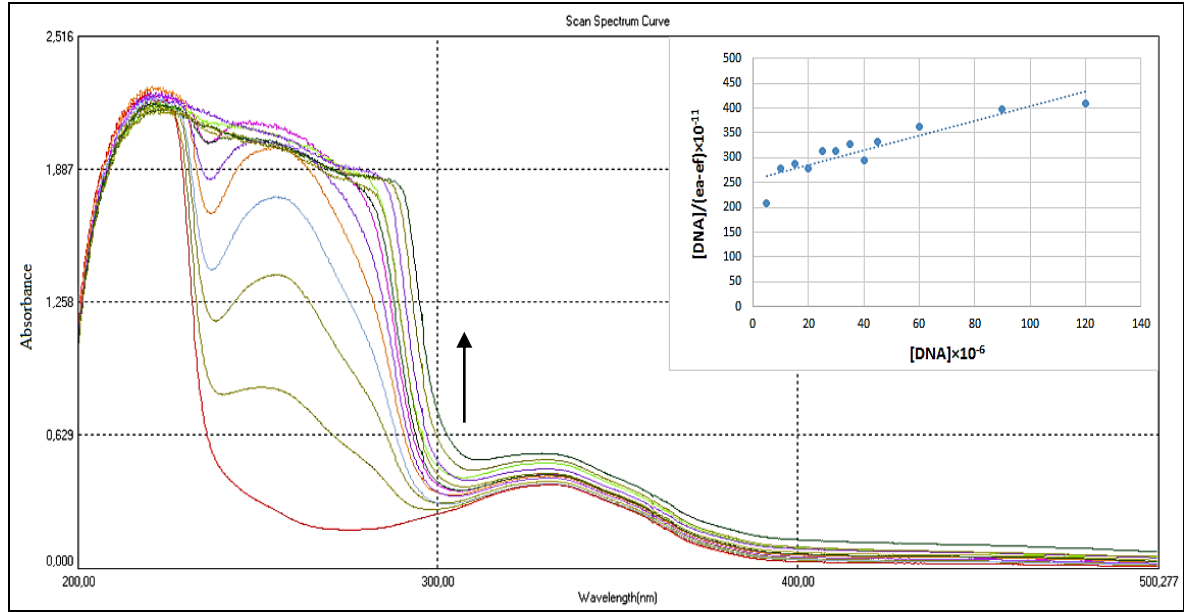
UV-vis (DMSO): λ max (nm) (log ϵ): 331 (4,10), 426 (omuz) (3,50).

LC-MS (ESI-negatif): m/z (% RI) : 344 ($[M]^+$, gözlenmedi), 323,5 (% 15), 279,5 (% 13), 212,5 (% 100), 147,3 (% 9). Bileşiğin kütle spektrumunda moleküler iyon piki gözlenmemiştir. Temel pik 212 m/z değerinde gözlenmiş olup, yapıdan $(C_7H_5NO_2)^{2-}$ radikalinin ayrılmasıyla oluşan, 2-((p-tolilimino)metil)fenol molekülüne aittir.

Bu tez çalışmasında, DNA hedefli ilaç adayı olabilecek asimetrik diimin Schiff bazının, element analizi, FT-IR, $^1H/^{13}C$ NMR, UV-vis ve kütle spektrumları ile karakterizasyonu yapılmış ve yapısal özellikleri tanımlanmış olup, biyolojik aktivitesi çalışılmıştır.

4.2. Asimetrik Diimin Schiff Bazının DNA Bağlanma Çalışması

UV absorpsiyon çalışması ile Schiff bazının etkileşim biçimi (örn, interkalasyon yolu ile bağlanma, oluğa bağlanma veya elektrostatik etkileşim yolu ile bağlanma) ve bağlanma afinitesi test edilmiştir. Bağlanma çalışmalarında dana timus DNA'sı (CT-DNA) kullanılmıştır. Çift sarmal yapıya sahip CT-DNA ile sentezlenen Schiff bazı arasındaki etkileşimler UV-vis spektrofotometresi kullanılarak incelenmiştir. CT-DNA'nın farklı konsantrasyonlarının (5-120 μM arası) varlığı ve CT-DNA yokluğunda, Schiff bazının (35 μM), UV absorbans spektrumları belirlenmiş ve UV absorpsiyon eğrisi Şekil 4.1'de gösterilmiştir ve yukarı yönde gösterilen oklar ise, DNA derişimindeki artışa bağlı olarak soğurmada meydana gelen artmayı ifade etmektedir. Schiff bazının, 5-120 μM arasındaki CT-DNA konsantrasyonu artışına bağlı olarak UV absorbansında artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Bu bileşiğin absorbans spektrumları, 295,80 nm'de DNA'nın baz çiftleri arasında yoğun bir $\pi \rightarrow \pi^*$ absorpsiyonu olduğunu göstermektedir. Bu da hiperkromik etki (% H= 58,24) olarak açıklanmaktadır. Ayrıca, hiperkromik etkinin yanı sıra, soğurma spektrumunda, Schiff bazının DNA ile etkileşim içinde olduğunu gösteren, kırmızıya kayma da (20,6 nm kadar) gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1). Bu spektral özellikler, Schiff bazının DNA ile etkileşim tipinin genellikle, DNA'nın baz çiftleri ve aromatik kromofor arasında bir istiflenme etkileşimi (interkalasyon) olduğunu göstermektedir. Schiff bazının 5-120 μM konsantrasyon aralığında CT-DNA'ya bağlanma sabiti (K_b); $1,5 \times 10^5 M^{-1}$ olarak verilmiştir (Bkz. Çizelge 4.1). Buna göre, Schiff bazının 5-120 μM konsantrasyon aralığında CT-DNA'ya bağlanma afinitesinin yüksek olduğu söylenebilir.



Şekil 4.1. CT-DNA'nın artan konsantrasyonlarının (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 60, 90 ve 120 μM) varlığında ve CT-DNA yokluğunda, Schiff bazının (35 μM) UV absorbans spektrumları. Ek olarak, UV absorpsiyon eğrisinin $[\text{DNA}]/(\text{ea}-\text{ef})$ ile $[\text{DNA}]$ verilerine göre çizimi

Çizelge 4.1. Schiff bazının (35 μM), 5-120 μM arasındaki konsantrasyonlarda CT-DNA ile etkileşimi ve spektral parametreleri

λ_{max} (nm)		$\Delta\lambda$ (nm) ^a	% H ^b	K_b (M ⁻¹) ^c
Serbest Hali	DNA'ya Bağlanmış Hali	20,6 (kırmızıya kayma)	58,24 (hiperkromizm)	$1,5 \times 10^5$
275,20	295,80			

a. Dalga boyundaki değişim (nm)

b. Absorbans şiddetindeki değişimin (hipokromizm veya hiperkromizmin) yüzde değeri

c. Bağlanma sabiti (M⁻¹)

Sonuç olarak, Schiff bazının DNA'ya interkalasyon yolu ile bağlandığı ve bağlanma eğiliminin de yüksek olduğu söylenebilir. Ayrıca, asimetrik diimin Schiff bazının yapısındaki iki adet imin grubunun interkalasyon yolu ile doğrudan DNA'ya bağlandığı; Schiff bazının yapısındaki serbest karboksil (COOH) ve hidroksil (OH) gruplarının ise, hidrojen bağı yaparak DNA ile olan etkileşimi artırdığı düşünülmektedir.

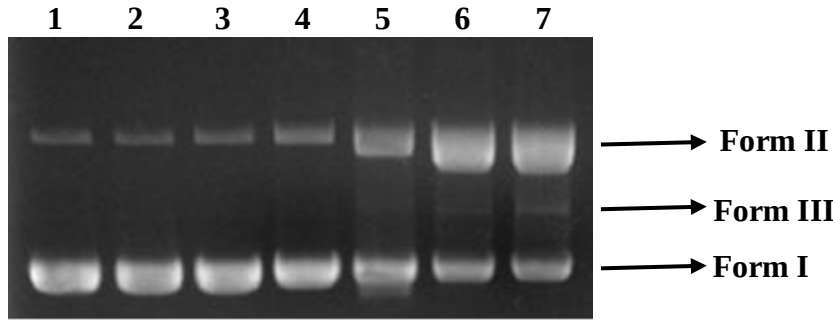
4.3. Asimetrik Diimin Schiff Bazının DNA Kesim Aktivitesi

DNA kesim aktivitesi, DNA hedefli antikanser ilaçların antitümör aktivite mekanizmalarının anlaşılması açısından büyük öneme sahiptir. Genellikle antikanser ajan olarak incelenen bileşiklerin biyolojik aktiviteleri, DNA'ya bağlanma, DNA'nın yapısına zarar verme ve fonksiyonunu bozma özellikleriyle araştırılıp ilişkilendirilmektedir. Bu çalışmanın başlıca amaçlarından biri de, incelenen Schiff bazının kesim aktivitesine göre antikanser bir bileşik olarak değerlendirilip değerlendirilemeyeceğini belirlemek ve kesim aktivitesi ile DNA'ya bağlanma kapasitesi ve antikanser aktivitesi arasındaki ilişki ortaya koymaktır.

4.3.1. Asimetrik diimin Schiff bazının indirgeyici ajan olmaksızın DNA kesim aktivitesi

Schiff bazının 1000-3500 μM konsantrasyon aralığında DNA ile etkileşimleri süpersarmal pBR322 plazmid DNA'sının kesim denemesiyle incelenmiş, kesim reaksiyonu jel elektroforez tekniği ile görüntülenmiş ve kesme reaksiyon sonuçları, Resim 4.1'de, % bant yoğunluğu sonuçları ise, Çizelge 4.2'de verilmiştir. Resimdeki Form I; pBR322 plazmid DNA'nın kesim olmamış süpersarmal formunu, Form II; tek bir iplikte olan kesim ile aşırı sargılı yapının gevşemiş formunu (Jelde en yavaş ilerleyen formdur), Form III ise; iki ipliğin kesimi ile oluşan lineer yapıyı göstermektedir.

Yapılan çalışma sonucunda, Schiff bazının artan konsantrasyonlarda plazmid DNA'yı kesim aktivitesinin arttığı, süpersarmal formdan (Form I), halkasal (Form II) ve lineer (Form III) formlara dönüştüğü gözlemlenmiştir. Schiff bazının 2000 μM ve üstündeki konsantrasyonlarda Form I'in azalmaya ve aynı orantıda Form II'nin ise kalınlaşmaya başladığı görülmüştür. 3000 ve 3500 μM konsantrasyonlarında ise, bu dönüşümün daha yoğun olduğu Form II'nin çok kalınlaştığı ve Form III'ün ise belirginleştiği tespit edilmiştir. Kesim sonuçları, % bant yoğunluğu oluşumuna göre değerlendirildiğinde, Schiff bazının 3000 μM konsantrasyonunda Form I % 43,1; Form II % 56,5; Form III % 0,5 olarak, 3500 μM konsantrasyonunda ise, Form I % 36,8; Form II % 61,9; Form III % 1,3 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre; Schiff bazının 2000 μM konsantrasyonunda tek zincir kopması yapmaya başladığı, 2500 μM konsantrasyonundan itibaren de çift zincir kopması yaparak kesim aktivitesi gösterdiği, 3000 ve 3500 μM konsantrasyonlarında ise, süpersarmalı tamamen keserek lineer hale çevirmeye başladığı söylenebilir.



Resim 4.1. Schiff bazının pBR322 plazmid DNA'sını kesim aktivitesi (1.kuyu; Negatif kontrol olarak, sadece pBR322 DNA, 2-7 arası kuyular; sırasıyla 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 ve 3500 μM Schiff bazı uygulanmış pBR322 DNA)

Çizelge 4.2. Schiff bazının pBR322 plazmid DNA'sını kesim aktivitesinin % bant yoğunluğu olarak verilen sonuçları

Kuyucuklar	Uygulamalar	(%) Bant Yoğunluğu		
		Form I	Form II	Form III
1	Kontrol ^a	96,6	3,4	-
2	Konsantrasyonlar ^b (μM)			
	1000	97,1	2,9	-
3	1500	97,4	2,6	-
4	2000	93,6	6,4	-
5	2500	76,9	23,1	-
6	3000	43,1	56,5	0,5
7	3500	36,8	61,9	1,3

a. Hiçbir şey uygulanmamış pBR322 plazmid DNA

b. pBR322 plazmid DNA'sına uygulanan Schiff bazı konsantrasyonları (μM)

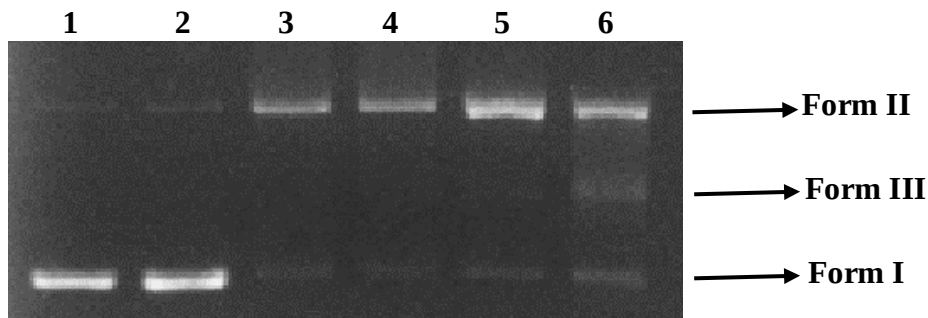
4.3.2. Asimetrik diümin Schiff bazının indirgeyici ajanlar varlığında DNA kesim aktivitesi

Bu çalışmada, Schiff bazının 2000-3500 μM konsantrasyon aralığında pBR322 plazmid DNA'sını kesiminin, hangi mekanizma üzerinden gerçekleştiğinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Çalışmada, DNA kesim aktivitesi, aktivatör olarak, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve askorbik asit (AA) varlığında; radikal giderici olarak, hidroksil radikal ($\cdot\text{OH}$) giderici olan etil alkol (EtOH) ve singlet oksijen ($^1\text{O}_2^*$) giderici olan sodyum azid (NaN_3) varlığında; oluk bağlayıcılar olarak ise, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ve metil yeşili (MG) varlığında incelenmiştir.

Aktivatörlerin varlığında DNA kesim aktivitesi

DNA'nın kesim süreci ve metal komplekslerinin nükleaz aktivitesi genellikle aktivatörler ile ilişkilidir. Aktivatörler ile nükleaz aktivitesi artırılabilceği gibi kısa sürede kesim yapmak da mümkün olabilir. Bu çalışmada, Schiff bazının kesim aktivitesini artırıcı aktivatör olarak, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve askorbik asit (AA) kullanılmıştır.

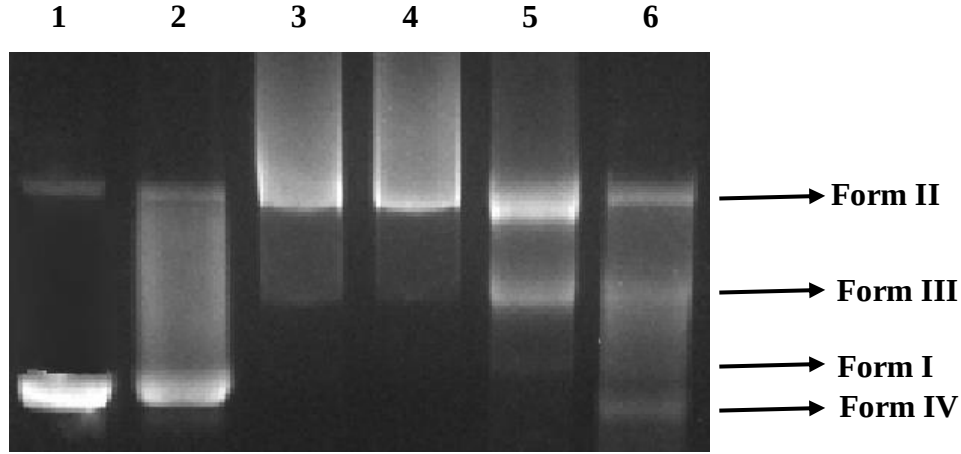
Yapılan çalışma sonucunda, H_2O_2 tek başına uygulandığında kesim aktivitesi göstermez iken, Schiff bazı ile uygulandığında Schiff bazının artan konsantrasyonları ile kesim aktivitesinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. Schiff bazının 2000 ve 2500 μM konsantrasyonlarında Form I kontrole göre tamamen azalırken, Form II kalınlaşmaya başlamıştır. 3000 ve 3500 μM konsantrasyonlarında ise, bu durum daha yoğun olarak gözlemlenmiştir. Ayrıca, bu konsantrasyonlarda Form III'de oluşmaya başlamıştır. Bu sonuçlara göre, Schiff bazının aktivatör olan H_2O_2 varlığında, 2000 ve 2500 μM konsantrasyonlarında tek zincir kopması, 3000 ve 3500 μM konsantrasyonlarında ise çift zincir kopması yaptığı belirlenmiştir. Ayrıca, 3000 ve 3500 μM konsantrasyonlarında belirlenen Form III, süpersarmal sirküler formun tamamen kesilerek lineer forma dönüşümünün de bir göstergesi olmuştur. Sonuçlar, Resim 4.2'de verilmiştir.



Resim 4.2. H_2O_2 varlığında, Schiff bazının pBR322 plazmid DNA'sını kesim aktivitesi (1.kuyu; Negatif kontrol olarak, sadece pBR322 DNA, 2. kuyu; Pozitif kontrol olarak, H_2O_2 (0,4 M) uygulanmış pBR322 DNA, 3-6 arası kuyular; H_2O_2 ve sırasıyla 2000, 2500, 3000 ve 3500 μM Schiff bazı uygulanmış pBR322 DNA)

AA varlığında, Schiff bazının artan konsantrasyonlarında plazmid DNA'yı kesim aktivitesinin, konsantrasyona bağlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir. Schiff bazının tüm konsantrasyonlarında Form I'in kaybolduğu, Form II'nin ise yoğun bir şekilde olduğu görülmüştür. Ayrıca, 3000 ve 3500 μM konsantrasyonlarında Form III'ün

oluşmasının yanı sıra Form IV olarak belirlenen yapılar da gözlemlenmiştir. Sonuçlar, Resim 4.3’de verilmiştir. Form IV’ün ise tamamen parçalanma sonucunda oluşan küçük DNA fragmentleri olduğu düşünülebilir.



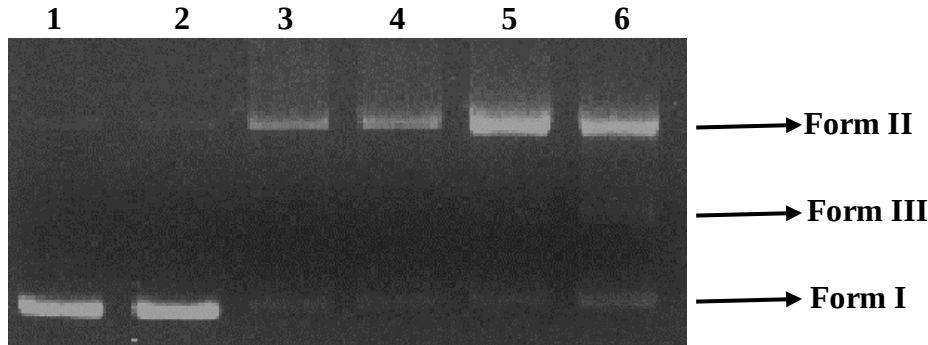
Resim 4.3. AA varlığında, Schiff bazının pBR322 plazmid DNA’sını kesim aktivitesi (1.kuyu; Negatif kontrol olarak, sadece pBR322 DNA, 2. kuyu; Pozitif kontrol olarak, AA (0,4 M) uygulanmış pBR322 DNA, 3-6 arası kuyular; AA ve sırasıyla 2000, 2500, 3000 ve 3500 μ M Schiff bazı uygulanmış pBR322 DNA)

DNA kesim aktivitesi her iki aktivatör varlığında değerlendirildiğinde, H_2O_2 ’e göre AA’nın Schiff bazının kesim aktivitesini kuvvetli bir şekilde artırdığı tespit edilmiştir Schiff bazının düşük konsantrasyonlarında ($<2000 \mu$ M) AA ile kesim aktivitesi gösterebileceği düşünülmektedir. Schiff bazının AA ile düşük konsantrasyonlarda kullanımıyla elde edebilecek yüksek kesim aktivitesi, DNA hedefli antikanser ilaçlarda, bileşenin yüksek konsantrasyonlarda oluşumuna bağlı oluşabilecek olumsuzluğu da ortadan kaldıracaktır. Ayrıca, AA’nın Schiff bazının yapısındaki serbest karboksil (COOH) ve hidroksil (OH) grupları arasındaki hidrojen bağ etkisini artırdığı ve buna bağlı olarak da, yüksek kesim aktivitesi sergilediği düşünülmektedir.

Radikal gidericiler varlığında DNA kesim aktivitesi

Bu çalışmada, DNA kırılmasından sorumlu olan reaktif oksijen türlerinden (ROS), etil alkol (EtOH) ve sodyum azid (NaN_3) radikal gidericileri kullanılarak, Schiff bazının DNA kesim aktivitesi araştırılmıştır.

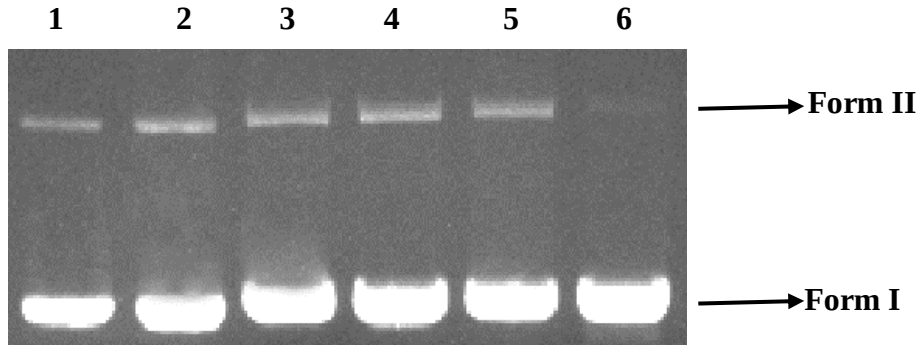
Yapılan çalışma sonucunda EtOH varlığında, Schiff bazının artan konsantrasyonlarda plazmid DNA'yı kesim aktivitesinde aynı oranda arttığı, süpersarmal formun (Form I) açılarak halkasal formu (Form II) oluşturduğu görülmüştür. 3500 μM konsantrasyonunda ise, Form II'nin tamamen kesilerek, lineer forma (Form III) dönüşmeye başladığı tespit edilmiştir. Sonuçlar, Resim 4.4'de verilmiştir. Hidroksil radikal giderici EtOH'un Schiff bazının oluşturduğu kesim aktivitesini inhibe etmemesi, Schiff bazının hidroksil radikalleri ile kesim aktivitesi göstermediğinin bir kanıtı olmuştur. Dolayısıyla hidroksil radikallerinin Schiff bazının oluşturduğu DNA kesiminden sorumlu olmadığı söylenebilir.



Resim 4.4. EtOH varlığında, Schiff bazının pBR322 plazmid DNA'sını kesim aktivitesi (1.kuyu; Negatif kontrol olarak, sadece pBR322 DNA, 2. kuyu; Pozitif kontrol olarak, EtOH (0,4 M) uygulanmış pBR322 DNA, 3-6 arası kuyular; EtOH ve sırasıyla 2000, 2500, 3000 ve 3500 μM Schiff bazı uygulanmış pBR322 DNA)

Yapılan çalışma sonucunda, NaN_3 varlığında, Schiff bazının artan konsantrasyonlarda, söndürücü etki göstererek, plazmid DNA'yı kesim aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. İlk kuyuya yüklenen sadece pBR322 plazmidinde (negatif kontrol) görülen yoğun süpersarmal form (Form I) ve az yoğun halkasal form (Form II) görüntüsünün 2000, 2500 ve 3000 μM konsantrasyonlarında değişiklik göstermemesi, Schiff bazının, NaN_3 varlığında kesim aktivitesini inhibe ettiğinin kanıtı olmuştur. Ayrıca, NaN_3 varlığında, 3500 μM konsantrasyonundaki Schiff bazının, pBR322 plazmid DNA'sında Form I yoğunluğunu artırması ve Form II yoğunluğunu azaltması, Schiff bazının,

süpersarmalın kesiminden ziyade yoğun süpersarmal oluşumunu teşvik ettiğini göstermiştir. Sonuçlar, Resim 4.5’de verilmiştir. Sonuç olarak, Schiff bazının artan konsantrasyonlarda (özellikle 3500 μ M konsantrasyonunda), singlet oksijen giderici, NaN_3 varlığında, DNA kesim aktivitesini inhibe ederek, süpersarmal plazmid DNA’yı daha yoğun bir süpersarmal forma çevirmesi, Schiff bazının kesim aktivitesinden singlet oksijen veya singlet oksijen benzeri reaktif oksijen türlerinin (ROS) sorumlu olabileceğini ve dolayısıyla bu kesim reaksiyonunun da oksidatif DNA hasar yoluyla üzerinden gerçekleşebileceğini, buna bağlı olarak da ölüm yolunun apoptozis olabileceğini göstermektedir.



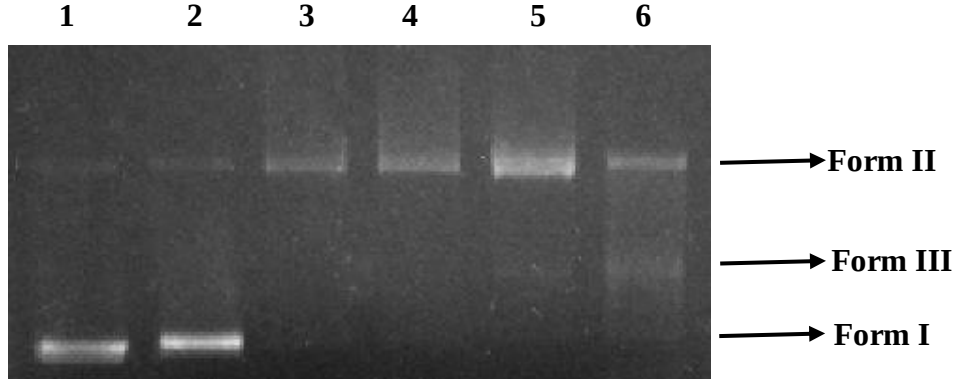
Resim 4.5. NaN_3 varlığında, Schiff bazının pBR322 plazmid DNA’sını kesim aktivitesi (1.kuyu; Negatif kontrol olarak, sadece pBR322 DNA, 2. kuyu; Pozitif kontrol olarak, NaN_3 (0,4 M) uygulanmış pBR322 DNA, 3-6 arası kuyular; NaN_3 ve sırasıyla 2000, 2500, 3000 ve 3500 μ M Schiff bazı uygulanmış pBR322 DNA)

Oluk bağlayıcılar varlığında DNA kesim aktivitesi

Schiff bazının DNA ile potansiyel etkileşim bölgesini belirlemek amacıyla, küçük oluğa bağlanma ajanı olan 4',6–diamidino–2–fenilindol (DAPI) ve büyük oluğa bağlanma ajanı olan metil yeşili (MG) varlığında, Schiff bazının süpersarmal pBR322 plazmid DNA kesim aktivitesi incelenmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda, DAPI varlığında, Schiff bazının artan konsantrasyonlarda plazmid DNA’yı kesim aktivitesi gösterdiği, süpersarmal formdan (Form I), halkasal forma (Form II) dönüşüm olduğu tespit edilmiştir. 2000, 2500 ve 3000 μ M konsantrasyonlarında Form II’de bir artış gözlenirken, 3500 μ M konsantrasyonunda Form I ve Form II’de bir azalma gözlemlenmiş ve ayrıca süpersarmal sirküler formun tamamen kesilerek lineer

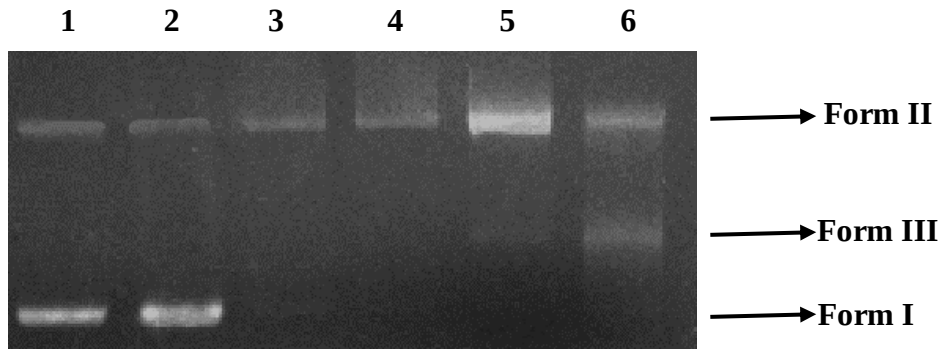
forma (Form III) dönüşümeye başladığı da görülmüştür. Sonuçlar, Resim 4.6'da verilmiştir.



Resim 4.6. DAPI varlığında, Schiff bazının pBR322 plazmid DNA'sını kesim aktivitesi (1.kuyu; Negatif kontrol olarak, sadece pBR322 DNA, 2. kuyu; Pozitif kontrol olarak, DAPI (8 μ M) uygulanmış pBR322 DNA, 3-6 arası kuyular; DAPI ve sırasıyla 2000, 2500, 3000 ve 3500 μ M Schiff bazı uygulanmış pBR322 DNA)

Yapılan çalışma sonucunda, MG varlığında, Schiff bazının artan konsantrasyonlarda plazmid DNA'yı kesim aktivitesi gösterdiği, süpersarmal formdan (Form I), halkasal forma (Form II) dönüşüm olduğu tespit edilmiştir. 2000, 2500 ve 3000 μ M konsantrasyonlarında Form II'de bir artış gözlenirken, 3500 μ M konsantrasyonunda Form I ve Form II'de bir azalma gözlemlenmiş ve ayrıca süpersarmal sirküler formun tamamen kesilerek lineer forma (Form III) dönüşümeye başladığı da görülmüştür. Sonuçlar, Resim 4.7'de verilmiştir.

Bu çalışmalar sonucunda, Schiff bazının hem DAPI hem de MG varlığında yapılan kesim aktivite çalışmalarında her iki ajanın da Schiff bazının kesim aktivitesini inhibe etmediği, dolayısıyla, Schiff bazının DNA'daki büyük ve küçük oluğa bağlanarak kesim aktivitesi göstermediği belirlenmiştir. Bu sonuca göre, Schiff bazının DNA'ya kovalent olmayan interkalasyon yoluyla bağlandığı söylenebilir. Kesim aktivitesinde çıkan bu sonuç DNA bağlanma çalışmasında çıkan sonucu da desteklemiştir (Bkz. Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1).



Resim 4.7. MG varlığında, Schiff bazının pBR322 plazmid DNA'sını kesim aktivitesi (1.kuyu; Negatif kontrol olarak, sadece pBR322 DNA, 2. kuyu; Pozitif kontrol olarak, MG (0,01 mg/mL solüsyonundan 2.5 μ L) uygulanmış pBR322 DNA, 3-6 arası kuyular; MG ve sırasıyla 2000, 2500, 3000 ve 3500 μ M Schiff bazı uygulanmış pBR322 DNA)

Sonuç olarak, Schiff bazının 2000-3500 μ M konsantrasyon aralığında DNA kesim aktivitesi gösterdiği, 3000 ve 3500 μ M konsantrasyonlarında ise bu aktivitenin daha etkin olduğu belirlenmiştir. Bu özelliğinden dolayı da etkili bir DNA kesim ajanı olarak nitelendirilebilir. Ayrıca, Schiff bazının, AA varlığında çok önemli bir aktivatör etki gösterdiği, singlet oksijen veya singlet oksijen benzeri türler gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluştuğu bir oksidatif DNA hasar yolağı üzerinden kesim aktivitesi sergilediği ve bu aktiviteyi DNA'ya kovalent olmayan interkalasyon yolu ile bağlanarak gösterdiği söylenebilir. Bu kesim sonuçları DNA bağlanma sonuçlarını da desteklemektedir.

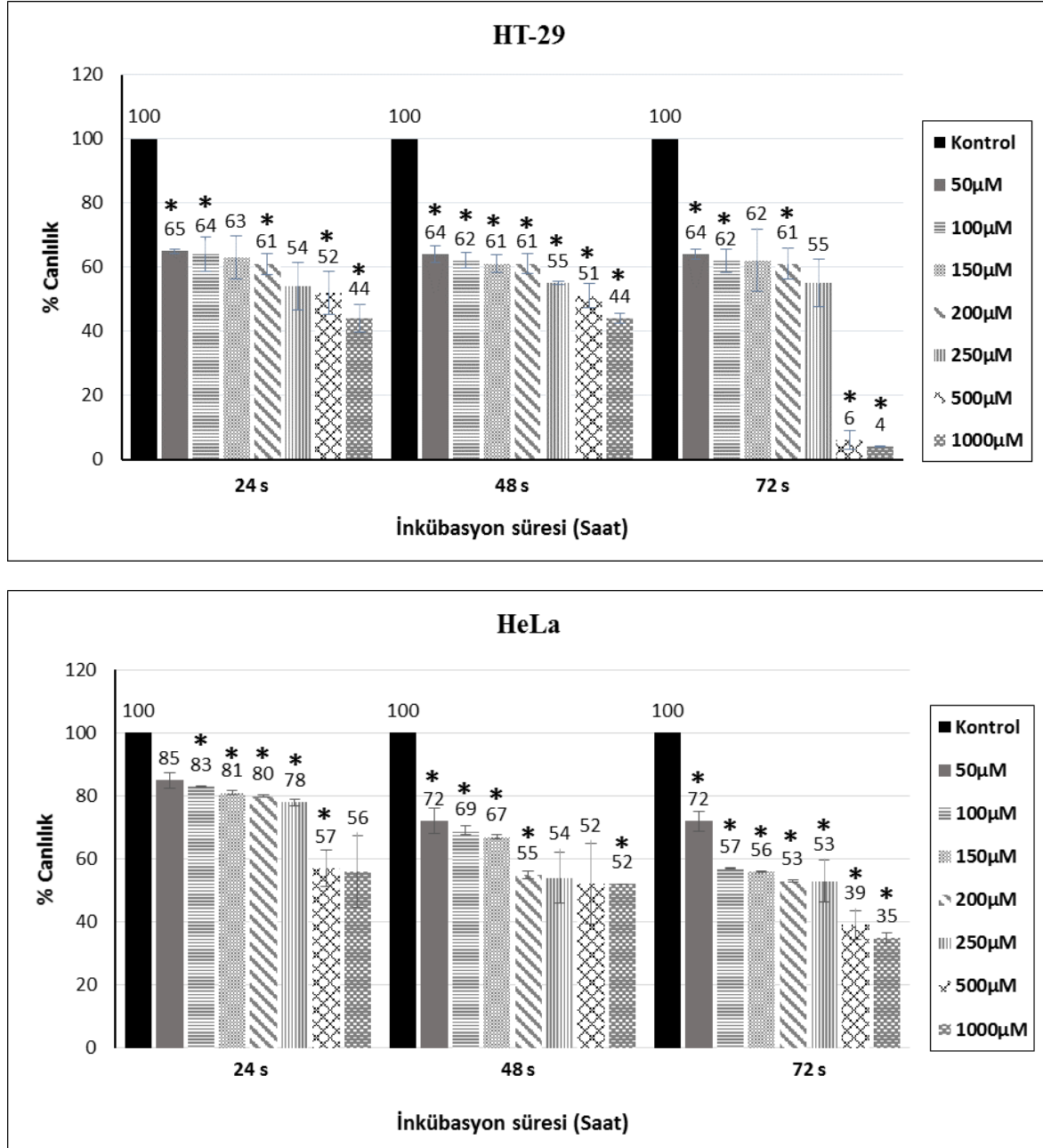
4.3. Asimetrik Diimin Schiff Bazının Antikanser Etkisi

Schiff bazının farklı konsantrasyonlarındaki antikanser etkisi insan kolorektal adenokarsinoma (HT-29) ve insan servikal (HeLa) kanser hücrelerinin canlılığı esas alınarak MTT testi ile belirlenmiştir. Ayrıca, kanser hücrelerinin üzerine antiproliferatif etkisi, MN oluşumu esas alınarak, sitokinez-blok mikronükleus (CBMN) testi ile değerlendirilmiş ve hücresel hasar ışık mikroskobu ile belirlenmiştir.

4.4.1. Asimetrik diimin Schiff bazının kanser hücrelerinde (HT-29, HeLa) antiproliferatif etkisi

Bu çalışmada, Schiff bazının farklı konsantrasyonları (50-1000 μ M arası) ve farklı uygulama sürelerinde (24, 48 ve 72 saat) HT-29 ve HeLa kanser hücrelerinde sergilediği antiproliferatif aktivite belirlenmiştir. HT-29 ve HeLa hücre hatlarına 24, 48 ve 72 saat

boyunca Schiff bazının uygulanmasının ardından elde edilen yüzde canlılık değerleri Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Schiff bazının artan konsantrasyonlarda, HT-29 ve HeLa hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Schiff bazının farklı uygulama sürelerinde düşük konsantrasyonlarda (50-250 μ M arası) canlılık üzerine etkisi birbirine yakın bulunurken, yüksek konsantrasyon ve uygulama sürelerinde özellikle de 72 saat uygulama süresinde ölümün çok daha fazla olduğu dikkati çekmiştir. En yüksek ölüm; Schiff bazının 72 saat inkübasyon sonunda HT-29 hücresi için 500 ve 1000 μ M konsantrasyon uygulamalarında (sırasıyla % 94 ve % 96 ölüm), HeLa hücresi için ise, 1000 μ M konsantrasyonda (% 65 ölüm) belirlenmiştir. Genel olarak değerlendirecek olursak Schiff bazının her iki kanser hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğu ve HeLa’ya kıyasla HT-29 hücresinde biraz daha etkin olduğu söylenebilir. Schiff bazının HT-29 hücresinde 72 saat 500 ve 1000 μ M konsantrasyon uygulamasındaki yüksek ölüm, sağlıklı hücrelerde de toksik etki yapabilme ihtimali nedeniyle uygun olmayacağı, bu inkübasyon süresinde Schiff bazının 250 μ M konsantrasyonunun daha uygun olabileceği düşünülmüştür. Her iki kanser hücresi için ise, 24 ve 48 saat inkübasyon süresinde, Schiff bazının 500 veya 1000 μ M konsantrasyonundaki uygulamalarının ideal olabileceği söylenebilir. Schiff bazının HT-29 ve HeLa hücre hatlarında, uygulanan tüm konsantrasyonlarda hücrelerin canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Sonuçlar, Şekil 4.2’de altı paralelli çalışmanın ortalaması alınarak, $\pm$ SD şeklinde verilmiştir (* $p < 0,05$).



Şekil 4.2. Schiff bazının farklı konsantrasyonlarının, (A) HT-29 ve (B) HeLa kanser hücrelerine karşı 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasındaki % canlılık değerleri

Schiff bazının 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasındaki antiproliferatif aktivitesinin gösterilmesinde önemli olan IC_{50} (kontrol hücrelerine kıyasla, ilgili kimyasal ile muamele sonrası hücrelerin % 50'sini öldüren konsantrasyon) değerleri Çizelge 4.3'de verilmiştir. HT-29 IC_{50} değerinin, tüm konsantrasyonlarda HeLa'ya göre düşük olması, Schiff bazının HT-29 kanser hücresine daha etkili olduğunu kanıtlamıştır. Bu sonuçlara göre, IC_{50} değerleri % canlılık grafiğindeki sonuçları desteklemiştir.

Çizelge 4.3. Schiff bazının farklı konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucunda HT-29 ve HeLa hücrelerinin proliferasyonu üzerine olan inhibitör etkisi

Hücre Hatları	IC ₅₀ (μM)			IC ₅₀ (μg/mL)		
	24 saat	48 saat	72 saat	24 saat	48 saat	72 saat
HT-29	662	648	252	40	39	15
HeLa	1040	869	389	62	52	23

Ayrıca, asimetrik diimin Schiff bazının yapısında bulunan iki adet imin, serbest karboksil (COOH) ve hidroksil (OH) gruplarının, bileşiğin antiproliferatif aktivite göstermesinden sorumlu olduğu da düşünülmektedir.

4.4.2. Asimetrik diimin Schiff bazının HT-29 ve HeLa kanser hücre hatlarında sitokinez-blok mikronükleus (CBMN) testi

Bu çalışmada, Schiff bazının kromozom veya genom hasarını indükleme yeteneği, mikroskobik olarak CBMN testi ile araştırılmış ve ölümün hangi yolla olduğunun ortaya konulması amaçlanmıştır.

Schiff bazının, HT-29 hücresinde 24 saatlik uygulama süresinde, kontrol hücrelerine göre, mikronükleus (MN) içeren çift çekirdekli hücrelerin (BNC) ortalama yüzdesinde (% MNBNC) 1,1 katlık bir artış gözlemlenirken, 48 saatlik uygulama süresinde bu artışın 1,5 kat olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). Bu durum, 48 saatlik uygulama süresinde kromozom veya genom hasarının daha yüksek olduğunu göstermiştir. HeLa hücresinde ise, 24 saatlik uygulama süresinde, kontrol hücrelerine göre, mikronükleus (MN) içeren çift çekirdekli hücrelerin (BNC) ortalama yüzdesinde (% MNBNC) 1,3 katlık bir artış gözlemlenirken, 48 saatlik uygulama süresinde bu artışın 1,1 kat olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). Bu durum, 24 saatlik uygulama süresinde kromozom veya genom hasarının daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlara göre, her iki kanser hücresi değerlendirildiğinde, Schiff bazının HT-29 kanser hücresinde daha etkin olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar antiproliferatif aktivite çalışması sonuçlarını da desteklemiştir (Bkz. Şekil 4.2 ve Çizelge 4.3).

Sitokinez-blok proliferasyon indeksi (CBPI) ve Replikasyon indeksi (RI) antiproliferatif aktiviteyi tahmin etmek için kullanılan ölçütlerdir. HT-29 hücre hattında 48 saatlik

uygulama süresi sonunda kontrolle kıyaslandığında, CBPI değerinin azaldığı tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.4). Dolayısıyla, Schiff bazının, 1000 μ M konsantrasyonun, 24 saatlik uygulama süresine kıyasla, 48 saatlik uygulama süresinde, HT-29 hücre hattında daha fazla antiproliferatif aktivite gösterdiği belirlenmiştir. HeLa hücre hattında ise, hem 24 saat hem de 48 saatlik uygulama süresinde, CBPI değerinde azalma gözlemlenmiş olup, 24 saatte bu azalmanın daha yüksek olması (Bkz. Çizelge 4.5), hücre döngüsündeki inhibisyonun ve antiproliferatif etkinin daha fazla olduğunu göstermektedir.

Schiff bazının, HT-29 hücre hattında 24 saatlik uygulama süresinde RI değerinde bir değişiklik tespit edilmemiştir. 48 saatlik uygulama süresinde ise, RI değerinde % 14'lük bir azalış saptanmıştır (Bkz. Çizelge 4.4). Dolayısıyla bu sonuca göre, 1000 μ M konsantrasyonundaki Schiff bazının 48 saatlik uygulama süresinde, HT-29 hücre hattında, genotoksositeye bağlı bir antiproliferatif aktivite gösterdiği belirlenmiştir. HeLa hücre hattında ise, 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinde sırasıyla % 15 ve % 14'lük bir azalış olduğu saptanmıştır (Bkz. Çizelge 4.5). Dolayısıyla Schiff bazının 1000 μ M konsantrasyonun da 24 saatlik uygulama süresinde, daha fazla genotoksositeye bağlı bir antiproliferatif aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bu sonuçlar, CBPI değeri sonuçları ile de uyumludur.

Çizelge 4.4. Schiff bazına maruz bırakılan HT-29 hücrelerinde MN oluşumu

Uygulamalar	İnkübasyon Süresi	% MNBNC ^c	CBPI	RI
Kontrol ^a	24 saat	8,9	1,91	100
Schiff bazı ^b		9,6	1,94	100
Kontrol ^a	48 saat	6,7	2,06	100
Schiff bazı ^b		9,7	1,92	86

a. Sadece DMEM

b. 1000 μ M konsantrasyonundaki Schiff bazı

c. Mikronükleus (MN) içeren çift çekirdekli hücrelerin (BNC) ortalama yüzdesi

Çizelge 4.5. Schiff bazına maruz bırakılan HeLa hücrelerinde MN oluşumu

Uygulamalar	İnkübasyon Süresi	% MNBNC ^c	CBPI	RI
Kontrol ^a	24 saat	9,9	2,408	100
Schiff bazı ^b		12,7	2,192	85
Kontrol ^a	48 saat	10,6	2,376	100
Schiff bazı ^b		11,4	2,180	86

a. Sadece DMEM

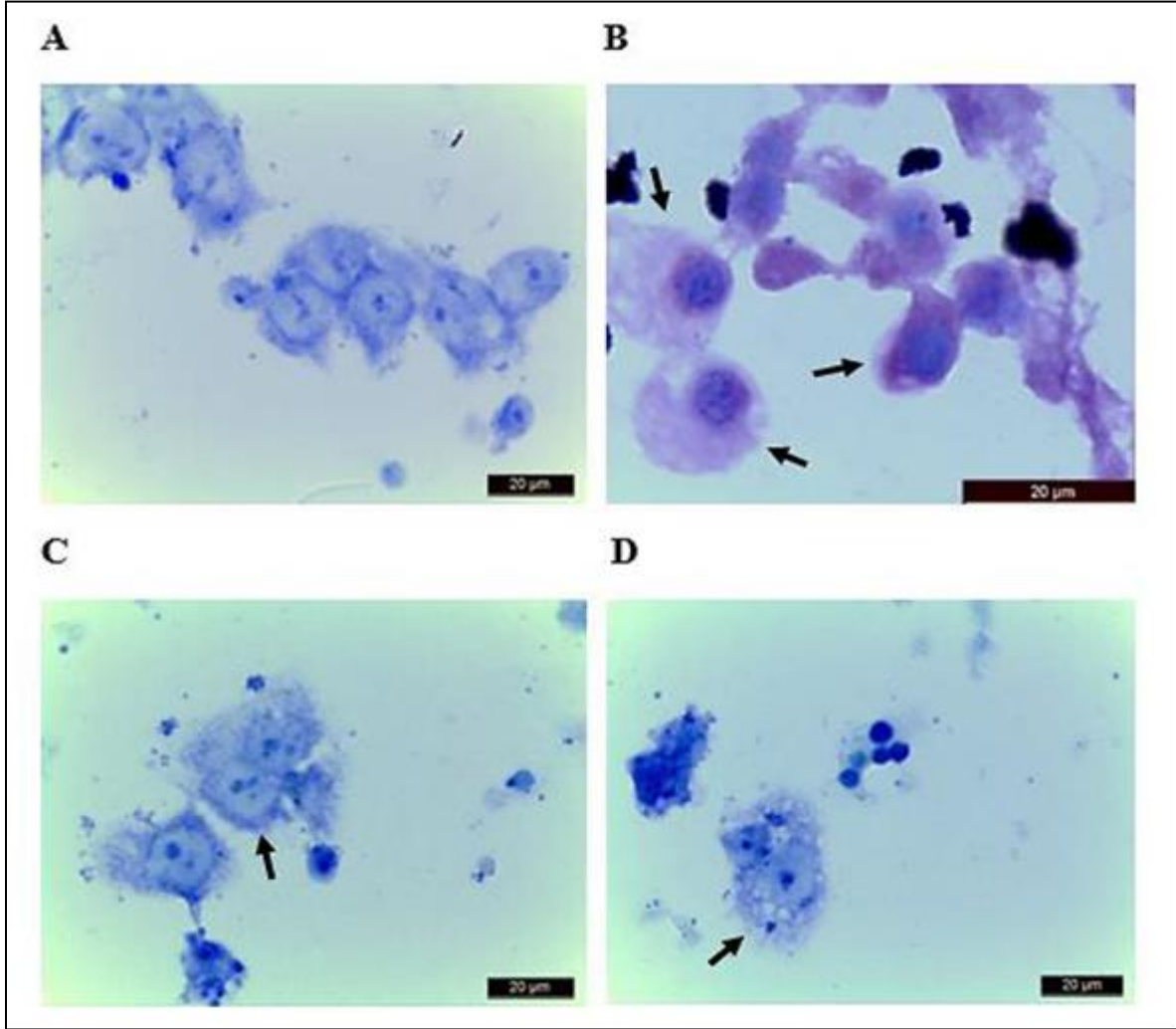
b. 1000 µM konsantrasyonundaki Schiff bazı

c. Mikronükleus (MN) içeren çift çekirdekli hücrelerin (BNC) ortalama yüzdesi

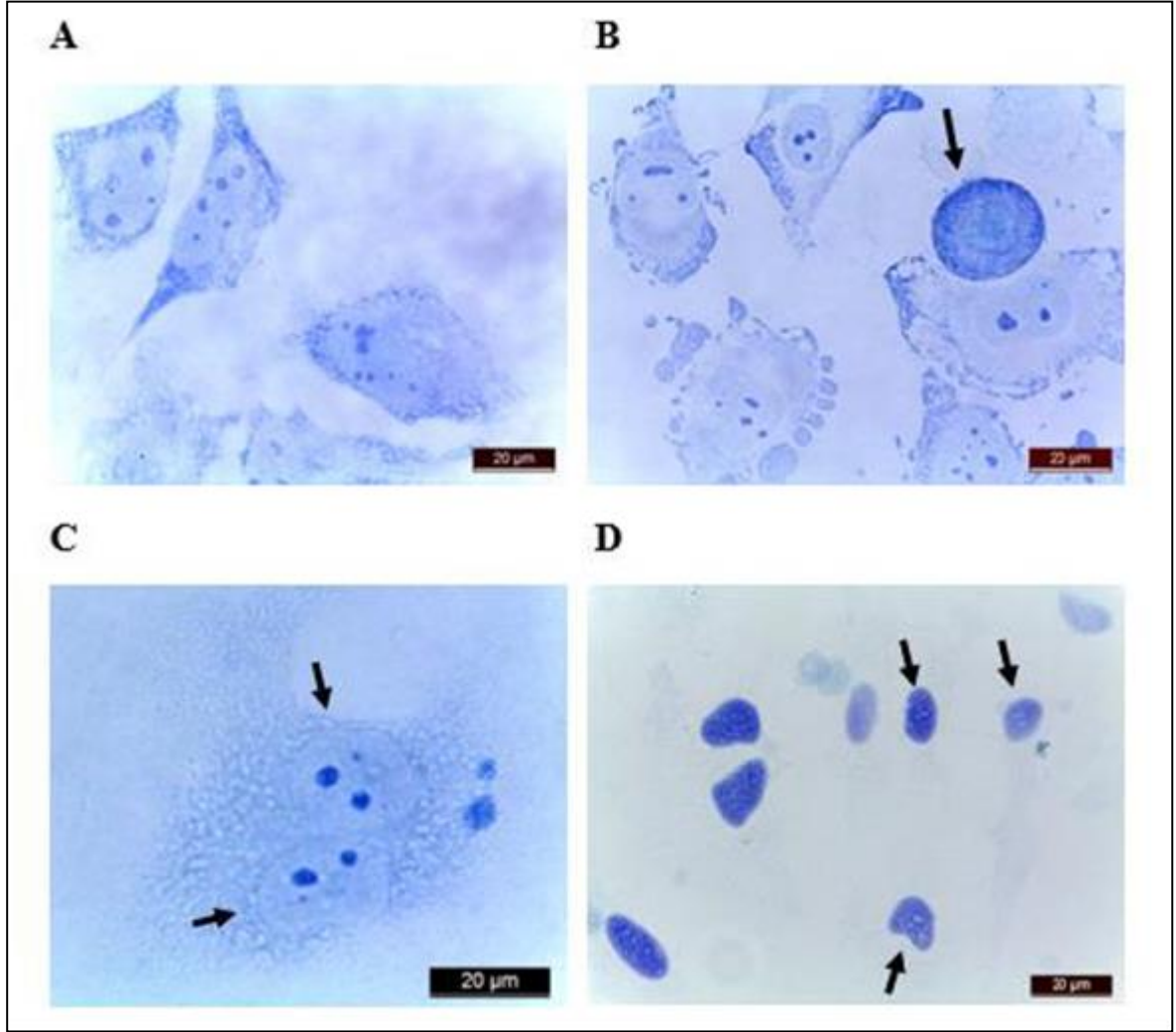
Hücrel hasarın morfolojik olarak değerlendirilmesi

Schiff bazının, HT-29 ve HeLa kanser hücrelerine olan antiproliferatif etkisinin apoptozise bağlı bir ölüm yolağı üzerinden olup olmadığını belirlemek için, CBMN testi kapsamında 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, deney gruplarına göre hazırlanan preparatlara Giemsa boyama yapılmıştır ve morfolojik olarak değerlendirilen hücrel hasar ışık mikroskopunda 100X'lik objektifte belirlenmiş olup, görüntüler Resim 4.8 ve Resim 4.9'da verilmiştir. Ayrıca, hücrel hasar, taramalı elektron mikroskopunda (SEM), 10 kV büyütmede incelenmiş ve görüntüler Resim 4.10 ve Resim 4.11'de verilmiştir.

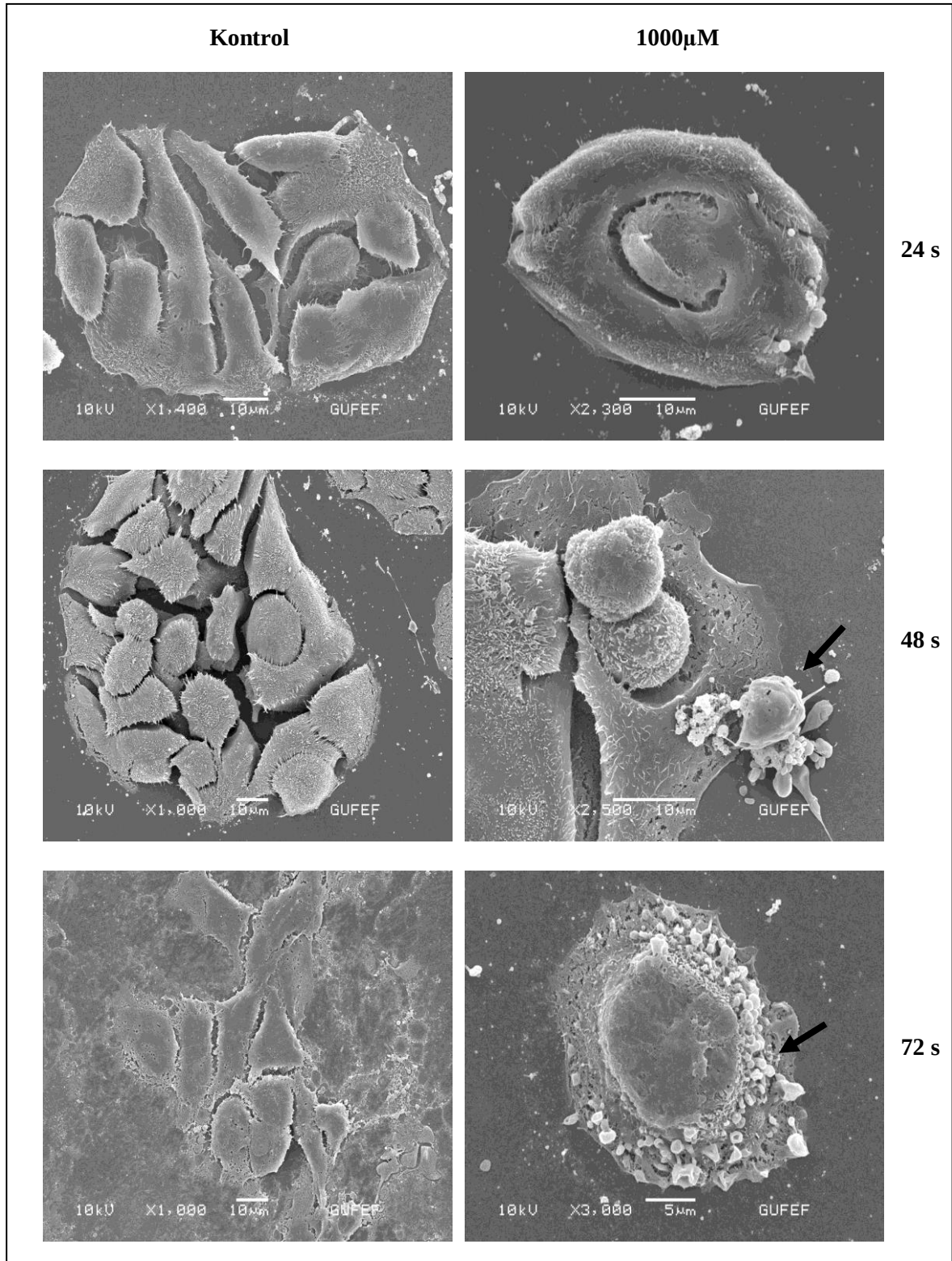
1000 µM konsantrasyonundaki Schiff bazına, farklı uygulama sürelerinde maruz bırakılan, HT-29 ve HeLa hücrelerinin çoğunda, apoptozisin karakteristik özelliği olan, yoğun nükleer fragmentler, çekirdek içerisinde kromatin kondensasyonu ile apoptatik cisimcikler gözlemlenmiştir. Her iki kanser hücresinde de, 48 saatlik uygulama süresinde, apoptozis için tipik olan, nükleer fragmentler, kromatin kondensasyonu ile apoptatik cisimcikler oldukça yoğun bir şekilde gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, bu durum genellikle ölümün apoptozis kaynaklı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, apoptatik hücrelere kıyasla daha az sayıda olan ve sitoplazmalarında vakuol bulunduran hücreler de dikkati çekmiştir. Bu hücrelerin gözlemlenmesi de, kısmi olarak ölümün otofaji denilen programlanmış hücre ölümü ile gerçekleştiğini göstermiştir.



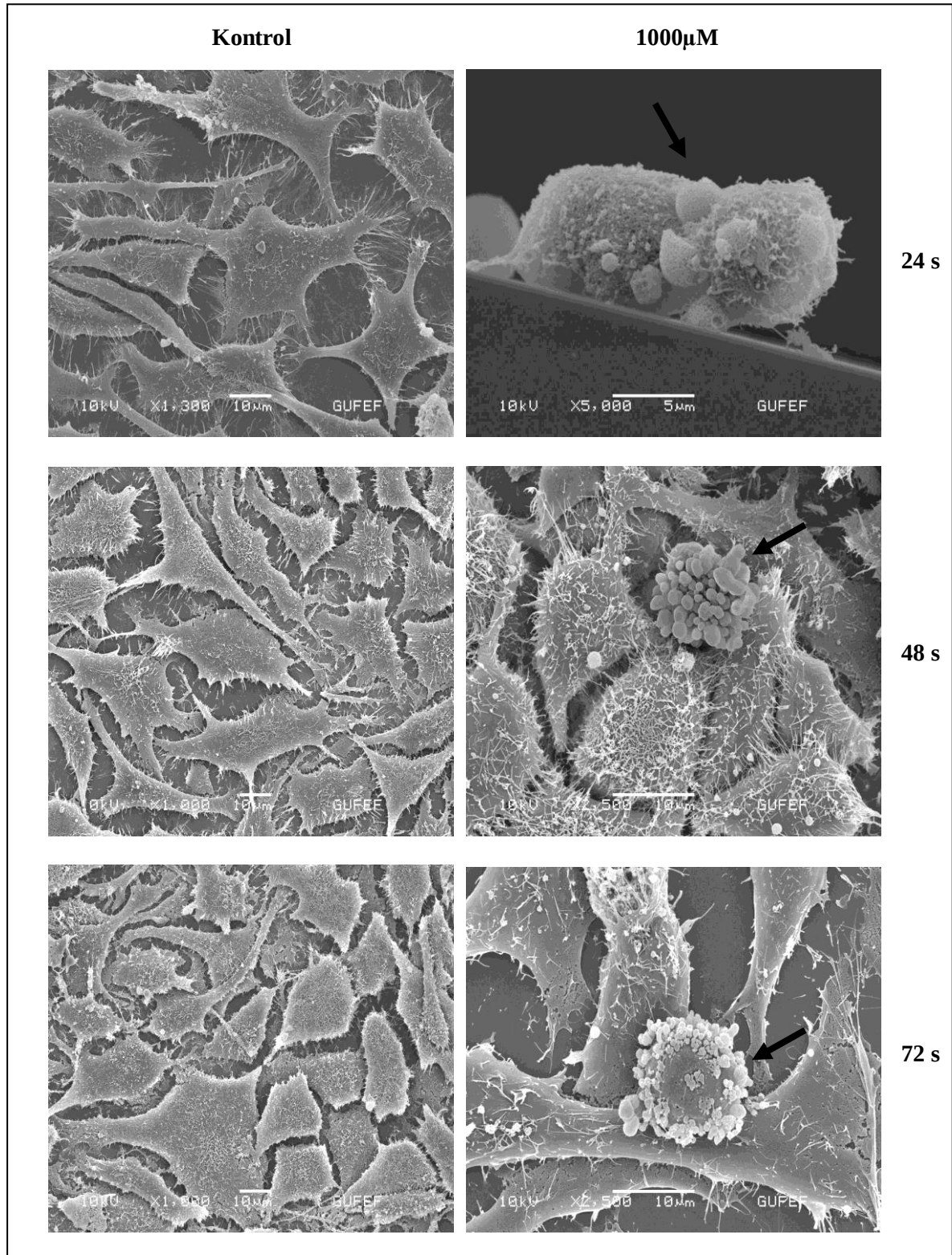
Resim 4.8. HT-29 hücre hattındaki hasarın morfolojik olarak değerlendirilmesi (A) Schiff bazı ile muamele edilmeyen hücrelerin morfolojisi, Schiff bazı ile muamele edilen; (B) apoptotik hücreler, (C) bir MN içeren çift çekirdekli (binükleat) hücreler, (D) vakuol içeren hücre sitoplazması örnekleri (Oklar ile gösterilmektedir, 100X büyütme)



Resim 4.9. HeLa hücre hattındaki hasarın morfolojik olarak değerlendirilmesi (A) Schiff bazı ile muamele edilmeyen hücrelerin morfolojisi, Schiff bazı ile muamele edilen; (B) apoptotik hücreler, (C) bir MN içeren çift çekirdekli (binükleat) hücreler, (D) vakuol içeren hücre sitoplazması örnekleri (Oklar ile gösterilmektedir, 100X büyütme)



Resim 4.10. HT-29 hücre hattındaki hasarın, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile değerlendirilmesi (Apoptotik hücreler, oklar ile gösterilmektedir, 10 kV büyütme)

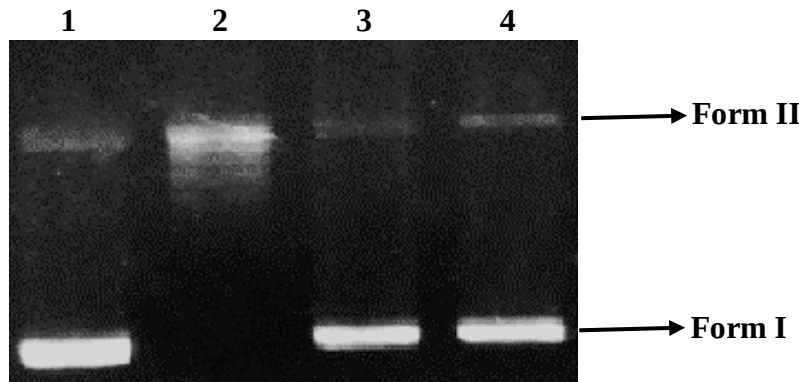


Resim 4.11. HeLa hücre hattındaki hasarın, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile değerlendirilmesi (Apoptotik hücreler oklar ile gösterilmektedir, 10 kV büyütme)

4.4. Asimetrik Diimin Schiff Bazının Topoizomeraz II α İnhibisyon Aktivitesi

Topoizomeraz enzimleri, replikasyon ve transkripsiyon işlemleri sırasında DNA segmentinin konformasyonunu ve topolojisini hızla kontrol eden ve değiştiren temel enzimlerdir. Kanserli hücrelerde topoizomeraz enzimlerinin yüksek ekspresyonu nedeniyle, bu enzimlerin inhibisyonu, kemoterapide umut verici bir ilaç hedefi olmaktadır. Bu çalışmada, Schiff bazının insan topoizomeraz II α (topo II α) aktivitesine olan etkisi, agaroz jel elektroforez tekniğiyle araştırılmıştır.

Schiff bazının 500 ve 1000 μ M konsantrasyonlarda, insan topo II α 'nin aktivitesini inhibe ettiği ve her iki dozda da tek zincir kopması yaptığı tespit edilmiştir (Resim 4.12). Ayrıca, insan topo II α aktivitesinin gösterilmesinde önemli olan IC₅₀ değeri (% 50 inhibisyona neden olan konsantrasyon), 77,5 μ M olarak bulunmuştur. Bu da Schiff bazının 77,5 μ M konsantrasyonunda insan topo II α aktivitesinin % 50'sini inhibe ettiği anlamına gelmektedir.



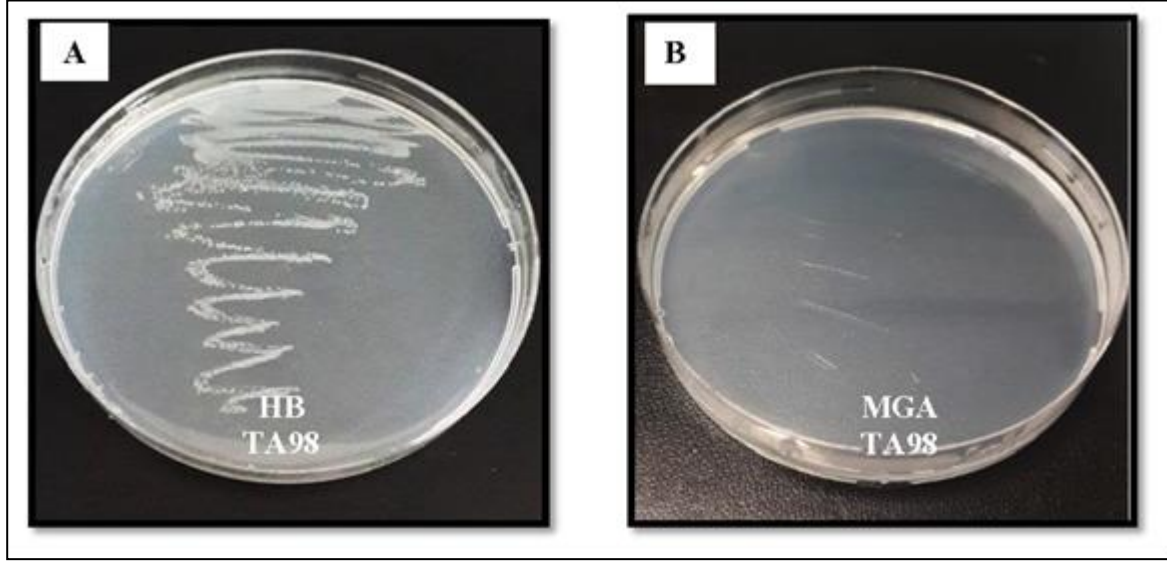
Resim 4.12. Schiff bazının insan topo II α (1 U) inhibisyon aktivitesi (1. kuyu; sadece pBR322 DNA, 2. kuyu; topo II α uygulanmış pBR322 DNA ve 3. kuyu; topo II α , 500 μ M Schiff bazı uygulanmış pBR322 DNA, 4. kuyu; topo II α , 1000 μ M Schiff bazı uygulanmış pBR322 DNA)

4.6. Mutajenite Testi

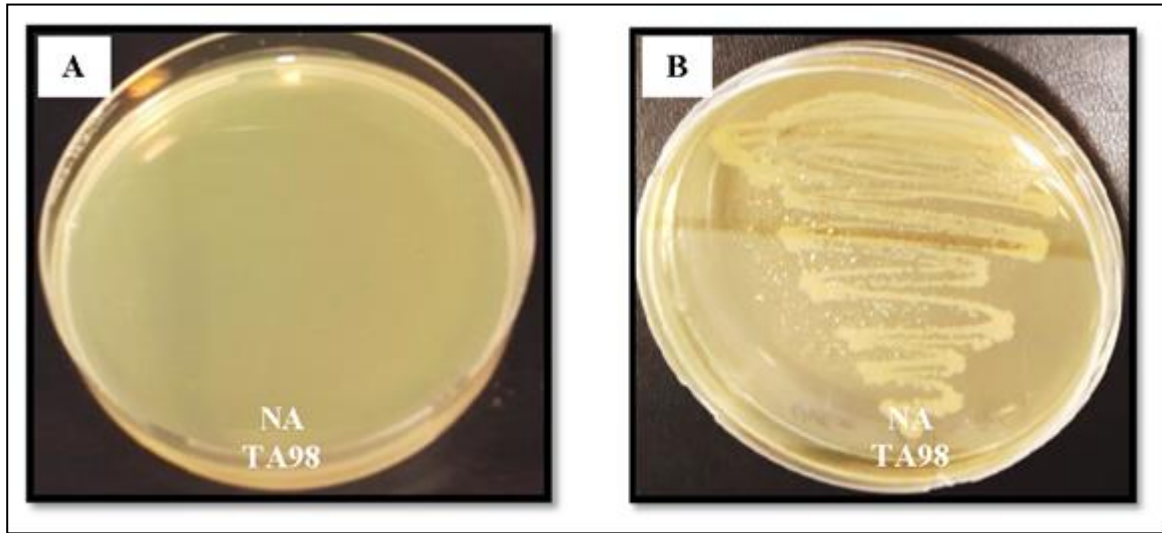
4.6.1. Genetik işaretlerin kontrolü

Çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının histidin gereksinimi, *uvrB* mutasyonu, *rfa* mutasyonu, R-faktör varlığı ve spontan olarak geriye dönen koloni sayısı bakımından genetik işaretlerinin kontrolü yapıldı. Resim 4.13'de, (A)

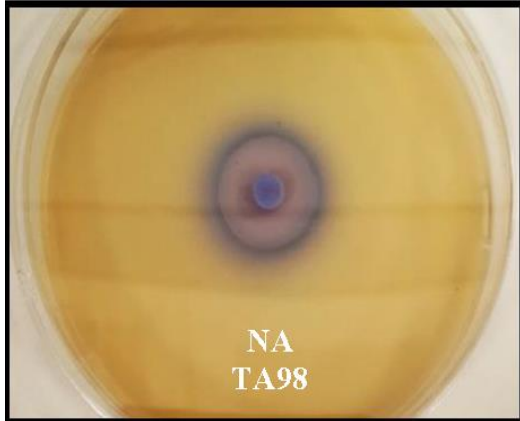
HB plağında üreme gözlemlenirken, (B) MGA plağında üreme gözlemlenmemiştir. Resim 4.14’de, (A) UV’ye maruz bırakılan NA plağında üreme gözlemlenmemişken, (B) UV’ye maruz bırakılmayan NA plağında üreme gözlemlenmiştir. Resim 4.15’de ise NA plağında disk çevresinde üreme olmayan bir zon gözlemlenmiştir.



Resim 4.13. *S. typhimurium*'un (TA98) histidin gereksinimi kontrolü sonuçları



Resim 4.14. *S. typhimurium*'un (TA98) *uvrB* mutasyonu kontrolü sonuçları



Resim 4.15. *S. typhimurium*'un (TA98) rfa mutasyonu kontrolü sonucu

4.6.2. Asimetrik diimin Schiff bazının mutajenik etkisi

Bu çalışmada, Schiff bazının mutajenik etkisinin olup olmadığı, Ames/*Salmonella*/mikrozom test sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu testte, *S. typhimurium* TA98 ve *S. typhimurium* TA100 mutant suşları kullanılmıştır.

Bu çalışmada, *S. typhimurium* TA98 ve *S. typhimurium* TA100 mutant suşlarının neden olduğu çerçeve kayması ve baz çifti değişimi tipindeki mutasyonlara göre, Schiff bazının farklı konsantrasyonlarda (200-2000 μ M konsantrasyon aralığında) mutajenik etkisi test edilerek, mutasyon yapma kapasitesi araştırılmıştır. Bu mutasyonların değerlendirilmesinde spontan kontrol dikkate alınmıştır. Deney her doz için 3 ayrı plak olarak uygulanmıştır. Yapılan çalışmada çözücü olarak, % 0,5 DMSO içeren distile su kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak çözücünün mutasyona sebep olmaması yani koloni sayısında pozitif kontrole kıyasla artış olmaması gerekmektedir. Yapılan çalışma sonucunda, pozitif kontrole kıyasla çözücünün mutasyona sebep olmadığı bulunmuştur. Pozitif kontrol olarak, 0,1 μ g/ μ L sodyum azid (NaN_3) kullanılmıştır. Sodyum azid bir mutajen olduğu için, mutant bakteri suşlarını his^- durumundan his^+ durumuna dönüştürerek mutant koloni sayısında artışa sebep olmaktadır. Sonuçlarımız pozitif kontrol olarak sodyum azid uygulanan *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının revertant koloni sayısında artış olduğunu göstermektedir. Buna göre sonuçlar değerlendirildiğinde, *S. typhimurium* TA98 suşu için revertant koloni sayısındaki bu artış, çerçeve kaymasına neden olan mutasyonların gerçekleştirildiğini gösterirken, *S. typhimurium* TA100 suşu için ise baz çifti değişimine neden olan mutasyonların gerçekleştirildiğini göstermiştir. Spontan

kontrol ise, mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his⁻ durumundan his⁺ durumuna dönüşmesidir.

Ames/*Salmonella*/mikrozom testinde bir maddeye mutajen denilebilmesi için histidin protroflarının sayısının kendiliğinden geriye dönen (spontan) koloni sayısının en az iki katı olması ya da iki katından az olduğu durumlarda doza bağlı bir artış göstermesi gerekmektedir. Yapılan testler sonucunda elde edilen bulgulara göre (Çizelge 4.6), Schiff bazının 200-2000 µM arasındaki konsantrasyonlarında, *S. typhimurium* TA98 ve *S. typhimurium* TA100 suşlarının koloni sayısının, kendiliğinden geriye dönen koloni sayısının en az iki katı kadar olmadığı ve doza bağlı olarak koloni sayısında da yine önemli bir artış olmadığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, Schiff bazının denenen tüm konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 ve *S. typhimurium* TA100 suşlarında mutajenik etkiye sahip olmadığını göstermektedir.

Ayrıca, bir maddenin mutajen olabilmesi mutajenik oranının (MO) 2 ve 2'nin üstünde olması ile mümkün olmaktadır. Schiff bazının konsantrasyon artışına bağlı olarak, *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının koloni sayısında ciddi bir azalış gözlemlenmekle birlikte, mutajenik oranının tüm konsantrasyonlarda 2'nin çok altında olması, bileşenin denenen tüm konsantrasyonlarda çerçeve kaymasına ve baz çifti değişimine neden olan mutasyonlara sebep olmadığını göstermektedir. Her iki suşu kıyaslandığında ise, Schiff bazının TA98 suşu için çerçeve kaymasına neden olan mutasyon riskini oldukça azalttığı da tespit edilmiştir. Sonuç olarak, Schiff bazının mutajen olmadığı ve buna bağlı olarak kullanımının ise güvenli olabileceği sonucu çıkarılabilir.

Yapılan istatistik analizinde, negatif kontrole göre, *S. typhimurium* TA98 ve *S. typhimurium* TA100 revertant koloni sayısı $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak belirlenmiş ve sonuçlarımızı desteklemiştir. Schiff bazının 200-2000 µM konsantrasyon aralığında mutajenitesini belirlemek üzere yapılan Ames/*Salmonella*/mikrozom testi sonuçları, dört paralelli çalışmanın ortalaması alınarak, standart sapması ile Çizelge 4.6'da verilmiştir. Sonuç olarak, bu madde mutajenik etki göstermemiştir ve ilaç bileşenleri için kullanımında güvenli bir aday olduğu kanıtlanmıştır.

Çizelge 4.6. Schiff bazının 200-2000 µM konsantrasyon aralığında *S. typhimurium* TA98 ve *S. typhimurium* TA100 suşlarına göre mutajenitesi

Schiff Bazı (µM)	TA98		TA100	
	Revertant Sayısı ± SD	MO ^a	Revertant Sayısı ± SD	MO ^a
200	210 ±23*	1,65	345 ±9	1,57
250	178 ±20*	1,40	334 ±2	1,52
500	159 ±13	1,25	326 ±2	1,48
1000	157 ±2	1,24	320 ±9*	1,46
1500	89 ±3*	0,70	314 ±4*	1,43
2000	89 ±10*	0,70	306±0*	1,39
Spontan Kontrol ^b	234 ± 1	-	191 ± 7	-
Negatif Kontrol ^c	127 ± 2	-	220 ± 10	-
Pozitif Kontrol ^d	1050 ± 100	-	1545 ± 18	-

*: Negatif kontrole göre revertant sayısı $p<0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı, ±: Sonuçlar dört paralelin aritmetik ortalaması alınarak ± SD olarak verilmiştir

a: Mutajenik oran

b: Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his⁻ durumundan his⁺ durumuna dönüşmesi

c: % 0,5 DMSO

d: 0,1 µg/µL Sodyum azid

Genel değerlendirme yapıcak olursak iki mutasyon testide birbirini doğrulamış ve desteklemiştir.

5. TARTIŞMA

Kanserin sanayileşmiş ülkelerde ikinci ölüm nedeni olduğu ve tahminen tüm ölümlerin dörtte birini oluşturduğu bilinmektedir. Bu nedenle, yeni DNA hedefli antikanser bileşiklerin geliştirilmesi oldukça önemlidir (Yang ve diğerleri, 2016). Cisplatin ile türevleri, antitümör etkilerini DNA'ya kovalent yolla bağlanarak gösteren (Pizarro ve Sadler, 2009) ve kanser tedavi rejimlerinin % 50'sinden fazlasında hala kullanılan ilaçlardır (Jakupec, Galanski, Arion, Hartinger ve Keppler, 2008; Dyson ve Sava, 2006). Ancak, bu ilaçların yüksek toksisite, içsel ilaç direnci gibi sorunlar nedeniyle kullanımlarında ciddi zorluklar yaşanmaktadır (Rosenberg ve diğerleri, 1965; Rosenberg ve diğerleri, 1967; Kelland, 2007). Bu nedenle, cisplatine alternatif olarak geliştirilecek ilaçların da aynı mekanizmaya sahip olacağı düşünülerek, daha etkili ilaçlar geliştirebilmek adına, elektrostatik bağlanma, oluğa bağlanma ve interkalasyon gibi kovalent olmayan farklı bağlanma stratejileriyle DNA'da hasar üretebilecek ajanların tasarlanması gerekmektedir (Pizarro ve Sadler, 2009).

Tez kapsamında, 2-(4-(2-hidroksibenzilidenamino)benzilidenamino)benzoik asit olarak adlandırılan asimetrik diimin Schiff bazının DNA hedefli antikanser ilaç adayı veya ilaç taşıyıcısı olabilme potansiyelini ortaya koymak amacı ile biyolojik aktivitesi çalışılmıştır. DNA hedefli ilaç adayı olabilme potansiyeli, DNA bağlanma ve DNA kesim aktivitesi çalışmaları ile antikanser ilaç adayı olabilme potansiyeli ise, antiproliferatif aktivite, sitokinez-blok mikronükleus (CBMN) ve topoizomerez II α inhibisyon aktivitesi çalışmaları ile ortaya konulmuştur. Ayrıca, Schiff bazının biyolojik materyallerde güvenli kullanımı mutajenite çalışması (Ames/*Salmonella*/mikrozom testi) ile test edilmiştir.

DNA, önemli bir hücresel reseptör olduğundan, birçok antikanser ajan, antitümör aktivitesini, DNA ile etkileşime girerek göstermektedir (Angelusiu ve diğerleri, 2010; Aslan ve diğerleri, 2011; Xu ve diğerleri, 2011). Bu ajanların antitümör mekanizması hala bilinmese de, birçok araştırmacı, birçok antikanser ajanın DNA'yı kestğini veya bağlanabildiğini göstermiştir. Örneğin, Organotin (IV) bileşiklerinin de, DNA ile etkileşime girerek antikanser aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Yang ve diğerleri, 2016). Ayrıca, literatürlerde Schiff bazı kompleksi içeren Cu (II) bileşiklerinin antitümör bir ajan olarak değerlendirilebilmesi için, DNA'ya bağlanması ve DNA'yı kesmesi gerektiği de bildirilmiştir (Santini ve diğerleri, 2013; Kate, Kumbhar, Khan, Joshi ve Puranik, 2013;

Cater ve diğerleri, 2013). Tabassum ve diğerleri (2014) ise, birçok bileşiğin, antikanser aktivitesini, DNA'ya bağlanarak gösterdiğini ve bu yolla DNA replikasyonunun değiştiğini ve tümör hücrelerinin büyümesinin inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, bu ilaçların etkililiğinin bağlanmanın moduna ve afinitesine bağlı olarak değiştiğini de vurgulamışlardır. Dolayısıyla DNA ile etkileşim çalışmaları, gen transkripsiyonu, mutajenez ve karsinogenez gibi biyolojik süreçlerin anlaşılmasında, DNA hedefli ilaçların tasarımı ve antikanser ilaçlarının mekanizmalarının aydınlatılması açısından oldukça önem arz etmektedir (Li ve Yang, 2009).

Bileşik-DNA etkileşimlerinin araştırılmasında en yaygın ve en etkili tekniklerden biri olan UV absorpsiyon çalışması yapılmıştır (Shahabadi ve diğerleri, 2010; Sun ve diğerleri, 2011; Jaumot ve Gargallo, 2012; Wei ve diğerleri, 2010; Bhadra ve Kumar, 2011). Bu çalışmasıyla, Schiff bazı ile DNA arasındaki etkileşim biçiminin ve bağlanma afinitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Schiff bazının, 5-120 μM arasındaki CT-DNA konsantrasyon artışına bağlı olarak, UV spektrumunda belli $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişi içinde hiperkromizm (% H= 58,24) ile kırmızı kayma gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1). Bu spektral özellikler, Schiff bazının DNA ile etkileşim tipinin genellikle, DNA'nın baz çiftleri ve aromatik kromofor arasında bir istiflenme etkileşimi (interkalasyon) olduğunu göstermektedir.

Literatürde hiperkromizm, DNA'nın denatürasyonu üzerine absorbansındaki artış olarak açıklanmaktadır (Shahabadi, Kashanian ve Fatahi, 2011; Li Yang, Wang ve Guo, 1996; Shi ve diğerleri, 2006). Ayrıca birçok literatüre göre, çift sarmal DNA'nın, denatüre edici ajanlar ile muamelesi sonucunda, yapıyı bir arada tutan etkileşim kuvvetinin bozulduğu ve çift sarmal yapının rastgele sarmal yapıya dönüşerek, iki tek zincire ayrıştığı bildirilmiştir. Bu durum ise, baz-baz etkileşiminin azalması, komplementer bazlar ve serbest formdaki bazlar arasında hidrojen bağlarının oluşmaması sebebiyle, DNA çözeltisinin artmasına bağlı olarak UV absorbansında artış (hiperkromizm) olarak değerlendirilmiştir (Arjmand ve Jamsheera, 2011; Kumar ve diğerleri, 2009; Satyanarayana, Dabrowiak ve Chaires, 1993). Ek olarak literatürlere göre, hiperkromizm ile kırmızı kayma spektral özelliklerinin birlikte gözlemlenmesi, genellikle bileşiğin DNA'ya interkalasyon yolu ile bağlanarak, DNA ile etkileştiğini ve DNA çift heliks yapısına bu yolla zarar verdiğini göstermektedir (Shahabadi ve diğerleri, 2011; Sirajuddin ve diğerleri, 2013; Mandal ve diğerleri, 2016). Bir molekülün DNA'ya interkalasyon yolu ile bağlandığında, π^* yörüngesinin, baz

çiftlerinin π yörüngesi ile eşleştiği ve $\pi \rightarrow \pi^*$ geçiş enerjisi seviyesinin azalmasına bağlı olarak kırmızı kaymaya yol açtığı da bildirilmektedir (Jayaseelan, Prasad, Vedanayaki ve Rajavel, 2016). Suda çözünür rutenyum (II) terpiridin komplekslerinin (Lazić, Arsenijević, Puchta, Bugarčić ve Rilak, 2016) ve 1,3-diamin Ru (II) terpirid kompleksi bazlı bir kafurun (Milutinović, Bugarčić ve Wilhelm, 2018) hiperkromizme ve kırmızıya kaymaya neden olduğunu buna bağlı olarak da komplekslerin interkalasyon yolu ile DNA'ya bağlandığı bildirilmiştir. Bu tez çalışması sonucu değerlendirildiğinde ise, UV spektrumunda belli $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişi içinde hiperkromizm ile kırmızı kayma spektral özellikleri birarada gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak da, literatürlere göre, Schiff bazının DNA'ya interkalasyon yolu ile bağlanarak, DNA ile etkileştiği ve bu yolla DNA çift sarmalına zarar verdiği söylenebilir.

K_b , bağlanma sabiti, komplekslerin DNA ile etkileşim afiniteleri hakkında fikir vermektedir (Tabatabaee ve diğerleri, 2013). Bu tez çalışmasında, Schiff bazının 5-120 μM konsantrasyon aralığında, CT-DNA varlığındaki K_b değeri, $1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.1). Literatürlere göre ise, $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ ($1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (Waring, 1965); $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ($0,55 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (Li, Yang, Wang ve Qin, 2008); $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{bpy})](\text{PF}_6)_2$ ($0,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (Maheswari, Rajendiran, Palaniandavar, Thomas ve Kulkarni, 2006); $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{L}]^{4+}$ ($2,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (Sun ve diğerleri, 2008) (elektrostatik bağlanma biçimi); $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{pph}_3)_2\text{Cl}]^+$ ($4,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (Sharma, Singh, Chandra ve Pandey, 2005); $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{Asph}_3)\text{Cl}]^+$ ($4,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (Sharma ve diğerleri, 2005); asimetrik ligandlı trikatyonik Co (III) kompleksleri, $[\text{Co}(\text{phen})_2(\text{pdta})]^{3+}$ ($2,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (Wang ve diğerleri, 2004); $[\text{Co}(\text{bpy})_2(\text{CNOIP})]^{3+}$ ($5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (Zhang ve diğerleri, 2001) gibi bazı interkalatör komplekslerin ve N, O donör Schiff bazı ligandlarıyla iki mononükleer Cu (II) komplekslerinin ($5,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ve $17,91 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (Jana ve diğerleri, 2016; Ghorai ve diğerleri, 2018) K_b değerleri yukarıda verilmiştir. Bu literatür bilgileri doğrultusunda, Schiff bazının K_b değeri, yukarıda verilen komplekslerin K_b değerleri ile karşılaştırıldığında oldukça yüksektir. Dolayısıyla, Schiff bazının DNA'ya güçlü bağlanma eğilimi gösterdiği söylenebilir.

Ayrıca, Schiff bazları, imin ($\text{C}=\text{N}$) grubunda elektrofilik karbon ve nükleofilik azot içerir ve enzim ve DNA gibi birkaç nükleofilik ve elektrofilik biyolojik türle etkileşime girme ihtimaline sahiptir. Reaktif imin grubu nedeniyle, Schiff bazlarının interkalasyon yoluyla doğrudan DNA ile etkileşime girebileceği öne sürülmüştür (Silva ve diğerleri, 2017).

Schiff bazlarının yapısındaki aromatik kısım, istifleme etkileşimi yoluyla DNA'ya bağlanma kapasitesinin artırılmasında ve DNA çift sarmalının stabilize edilmesinde anahtar rol oynar (Rambabu ve diğerleri, 2016). Ayrıca, Schiff bazlarının yapısında bulunan polar gruplar ile DNA'nın çift sarmalının arasında hidrojen bağlarının oluşması, Schiff bazının DNA'ya bağlanmasını etkilemektedir (García-Friaza ve diğerleri, 2006). Buna bağlı olarak da, tez kapsamında çalışılan asimetrik diimin Schiff bazının yapısındaki iki adet imin grubunun interkalasyon yolu ile doğrudan DNA'ya bağlandığı ve Schiff bazının yapısındaki serbest karboksil (COOH) ve hidroksil (OH) gruplarının ise, hidrojen bağı yaparak, DNA ile olan etkileşimi artırdığı düşünülmektedir.

Ek olarak, literatürlere göre, antikanser ilaçların çoğu, kovalent veya kovalent olmayan bağlanma yolu ile DNA'nın replikasyon mekanizmasına zarar vererek, antikanser etki göstermektedir (Suh ve Chaires, 1995; Maheswari ve Palaniandavar, 2004; Miao ve diğerleri, 2009). Özellikle de, klinik açıdan yararlı olan çoğu antikanser ilaç, DNA'ya interkalasyon yolu ile bağlanmaktadır (Barone ve diğerleri, 2013). Bu literatür bilgileri doğrultusunda, tez kapsamında çalışılan Schiff bazının, kovalent olmayan bağlanma biçimi olan, interkalasyon yolu ile DNA'ya bağlandığı tespit edilmiş olup, buna bağlı olarak da, DNA hedefli bir antikanser ilaç adayı olabileceği söylenebilir.

Metal komplekslerinin DNA'ya bağlanması, DNA kesimine dayanan kemoterapötik adayların tanınmasında önemli bir rol oynar (Tabassum ve diğerleri, 2014). Metal komplekslerinin antikanser aktivitelerinin, DNA'ya bağlanma, yapısına zarar verme ve işlevini bozma yeteneklerine bağlı olduğuna inanılmaktadır (Liang ve diğerleri, 2004). DNA fonksiyonunun bozulması replikasyon ve transkripsiyonun inhibisyonuna neden olur. Eğer DNA lezyonları onarılmaz ise hücre ölümü ile sonuçlanır (Liang ve diğerleri, 2004; Tabassum, Afzal ve Arjmand, 2012). Dolayısıyla metal iyonları ile aktive edilen DNA kesim çalışmaları oldukça ilgi çekicidir (Sigman, 1986; Armitage, 1998; Sitlani, Long, Pyle ve Barton, 1992). Bu bilgiler doğrultusunda, incelenecek bileşiğin DNA kesim aktivitesi gösterdiği ortaya konulur ise, kanser tedavisinde terapötik amaçla kullanılabilme imkanı bulacağı açıktır.

Bu tez çalışmasında ise, Schiff bazının DNA ile etkileşimi, agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak, süpersarmal pBR322 plazmid DNA'sının kesim denemesi çalışmaları ile incelenmiştir. Jel elektroforezinde, Form I; pBR322 plazmid DNA da kesim olmamış

süpersarmal formu, Form II; tek bir iplikte olan kesim ile aşırı sargılı yapının gevşemiş formunu (Jelde en yavaş ilerleyen formdur), Form III ise; iki ipliğin kesimi ile oluşan lineer yapıyı göstermektedir (Arjmand ve diğerleri, 2012; Melvin ve diğerleri, 2000; Arjmand ve diğerleri, 2011; Li ve diğerleri, 2011). Bu bilgiler doğrultusunda, yapılan tez çalışması sonucunda, Schiff bazının artan konsantrasyonlarda plazmid DNA'yı yüksek kesim aktivitesi gösterdiği, süpersarmal formdan (Form I), halkasal (Form II) ve lineer (Form III) formlara dönüşümünün 2000 μM ve sonrasındaki konsantrasyonlarda olduğu ve bu bileşiğin 2000 μM konsantrasyonunda tek zincir kopması yapmaya başladığı, 2500 μM konsantrasyonundan itibaren de çift zincir kopması yaparak kesim aktivitesi gösterdiği, 3000 ve 3500 μM konsantrasyonlarında ise, süpersarmalı tamamen keserek lineer hale çevirmeye başladığı tespit edilmiştir (Bkz. Resim 4.1 ve Çizelge 4.2). Yapılan literatür taramasına göre, pek çok bakır kompleksinin sadece tek zincir kesimi yaptığı bilinirken (Dong ve diğerleri, 2010), tez kapsamında çalışılan Schiff bazının tek zincir kesiminin yanında çift zincir kesimi de yaptığı görülmektedir (Bkz. Resim 4.1). Alizadeh ve diğerleri (2015), L-enantiyomerik floro-süstitüe edilmiş benzotiyazol Schiff bazı-valinin [Cu] kompleksinin yüksek DNA kesim aktivitesi gösterdiğini ve DNA'da çift zincir kopmalarına sebep olduğunu bildirmiş olup, bu özelliğinden dolayı bu kompleksin özellikle kanser kemoterapötiklerinde terapötik uygulamalar için kullanılabileceğini vurgulamışlardır. Bu bilgiler doğrultusunda, Schiff bazının yüksek kesim aktivitesi sergilemesi ve çift iplik kesimi yapması nedeniyle, bu bileşiğin etkili bir DNA kesim ajanı ve ayrıca yeni bir DNA hedefli antikanser ilaç adayı olabileceği söylenebilir.

Deng ve diğerleri (2018), Ni (II) komplekslerinin pBR322 DNA ile etkileşimlerinin, süpersarmal formu gevşettiğini, dolayısıyla plazmid DNA kesme kabiliyetinin, Ni (II) komplekslerinin DNA bağlanma kabiliyeti ile yakından ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, suda çözünür bakır (II) -dipeptid kompleksleri (Fu ve diğerleri, 2014), steroidal olmayan anti-enflamatuar ilaç sulindac'ın tri- ve diorganotin (IV) türevlerinin (Kumari ve Nath, 2017) ve L-enantiyomerik floro-süstitüe edilmiş benzotiyazol Schiff bazı-valinin [Cu] kompleksinin (Alizadeh ve diğerleri, 2015), DNA kesim aktivitelerinin, DNA bağlanma afinitesi ile ilgili olduğu belirtilmiştir. Benzer şekilde elde ettiğimiz sonuçlarımıza göre, Schiff bazının yüksek DNA kesim aktivitesinin, yüksek DNA bağlanma yeteneği ile doğrudan ilişkili olduğu söylenebilir.

Rajendiran ve diğeri (2007), bakır (II) komplekslerinin karışık diimine ligandlarının, DNA'ya kovalent olmayan bir bağ olan interkalasyon yolu ile bağlandığını, DNA'yı etkili bir şekilde kestiğini ve insan servikal epidermoid karsinom hücre hattında (ME180) antikanser aktivite gösterdiğini ve bu aktivitenin de DNA ile kovalent yolla etkileşen cisplatinden daha etkin olduğunu bildirmişlerdir. Annaraj, Balakrishnan ve Neelakantan (2016), süpersarmal plazmid DNA'ya bağlanan fenilalanin türevi ile diimin ko-ligandları içeren ligand bakır (II) kompleksleri tarafından indüklenen sarmal gevşeme miktarının, bu kompleksler ve DNA arasındaki interkalasyon etkileşim biçimine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca, başka bir literatürde ise, özellikle interkalasyon yapan ajanların DNA'ya bağlanma afinitesinin daha yüksek olduğu ve DNA'yı daha etkili bir şekilde kestiği de bildirilmiştir (Arjmand ve diğeri, 2011). Sonuç olarak, literatür bilgilerinde desteklediği gibi, Schiff bazının DNA'ya interkalasyon yolu ile güçlü bir afiniteyle bağlandığı belirlenmiş olup, bu bağlanma aktivitesinin de, DNA kesim aktivitesiyle yakından ilişkili olduğu sonucu çıkarılmıştır.

Tez kapsamında, Schiff bazının DNA kesim mekanizmasını tespit etmek amacıyla, aktivatör olarak, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve askorbik asit (AA); radikal giderici olarak, hidroksil radikal ($\cdot OH$) giderici olan etil alkol (EtOH) ve singlet oksijen ($^1O_2\cdot$) giderici olan sodyum azid (NaN_3); oluk bağlayıcılar olarak ise, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ve metil yeşili (MG) kullanılarak, kesim denemesi çalışmaları yapılmıştır.

DNA kesim aktivitesi, H_2O_2 ve AA aktivatörleri varlığında değerlendirildiğinde, H_2O_2 'e göre AA'nın, Schiff bazının 2000-3500 μM konsantrasyon aralığında, DNA kesim aktivitesini kuvvetli bir şekilde artırdığı tespit edilmiştir (Bkz. Resim 4.2 ve Resim 4.3). Ayrıca, AA'nın, Schiff bazının düşük konsantrasyonlarında da ($<2000 \mu M$), DNA kesim aktivitesi gösterebileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla, Schiff bazının AA ile düşük konsantrasyonlarda kullanımıyla elde edilebilecek yüksek kesim aktivitesi, DNA hedefli antikanser ilaçlarda, bileşenin yüksek konsantrasyonlarda oluşumuna bağlı oluşabilecek olumsuzluğu da ortadan kaldıracaktır. Böylece biyolojik organizmalara da herhangi bir zararı olmayacaktır. Bu da DNA hedefli antikanser ilaçlarının geliştirilmesinde, AA ile etkinliği artırılmış Schiff bazının güvenli kullanımını mümkün kılacaktır. Ek olarak, AA'nın Schiff bazının yapısındaki serbest karboksil ($COOH$) ve hidroksil (OH) grupları arasındaki hidrojen bağ etkisini artırdığı ve buna bağlı olarak da, yüksek kesim aktivitesi sergilediği düşünülmektedir.

Hidroksil radikal giderici olan EtOH varlığında yapılan kesim çalışması sonucunda, Schiff bazının DNA kesim aktivitesini artırıyor olması, özellikle de 3000 ve 3500 μM konsantrasyonlarında çift zincir kopması yaparak, DNA kesim aktivitesi göstermesi, bu DNA hasarından difüze hidroksil ($\cdot\text{OH}$) radikallerinin sorumlu olmadığını göstermiştir (Bkz. Resim 4.4). Yapılan literatür taramasında ise, Li ve diğerleri (2011), 1,4-tpbd (N,N,N',N'-tetrakis(2-yridylmethyl)benzene-1,4-diamine) ligand ve bakır (II) komplekslerinin EtOH varlığında DNA kesim aktivitesini artırdığını ve dolayısıyla bu kesimden hidroksil radikallerinin sorumlu olmadığını bildirmişlerdir. Dolayısıyla literatür bilgisi de, sonucumuzu desteklemiştir.

Singlet oksijen giderici olan NaN_3 varlığında, yapılan çalışma sonucunda, Schiff bazının DNA kesim aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Bkz. Resim 4.5). Bu durumun DNA ipliğindeki kesim sonucunda, singlet oksijen elektronlarının oluştuğu ve buna bağlı olarak DNA kesim aktivitesinde güçlü bir inhibisyona neden olduğu düşünülmektedir. Yapılan literatür taramasında ise, NaN_3 'in inhibe edici aktivitesinin, geçiş metalleri için azid anyonunun afinitesine bağlı olabileceği belirtilmiştir (Burrows ve Muller, 1998). Li ve diğerleri (2011), 1,4-tpbd (N,N,N',N'-tetrakis(2-yridylmethyl)benzene-1,4-diamine) ligand ve bakır (II) komplekslerinin, NaN_3 varlığında nükleaz aktivitesini önemli derecede azalttığını, bu DNA hasarının singlet oksijen ($^1\text{O}_2^*$) veya singlet oksijen benzeri reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından meydana geldiğini ve singlet oksijen türlerinin oksidatif kesim yolağı ile yakından ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, bir başka literatürde de benzer sonuçlar elde edilmiş olup, ROS türlerinin, DNA ipliğinde kopmalar yaparak, DNA'ya hasar verdiği ve bu yolla da programlı hücre ölümüne (apoptozis) sebep olduğu bildirilmiştir (Li ve diğerleri, 2011). Bu literatür bilgileri doğrultusunda, bu tez çalışması sonuçları değerlendirildiğinde, NaN_3 varlığında, Schiff bazının yüksek konsantrasyonlarda (2000-3500 μM) DNA kesim aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiş olup, buna bağlı olarak da Schiff bazının bu konsantrasyonlarda singlet oksijen veya singlet oksijen benzeri türler gibi reaktif oksijen türlerinin oluştuğu bir oksidatif DNA kesim yolağı ile DNA'ya hasar verdiği ve bu yolla apoptozise neden olabileceği söylenebilir.

Ayrıca, Schiff bazının DNA ile etkileşimi DAPI ve MG varlığında araştırılmıştır ve bu bileşiğin DAPI ve MG varlığında DNA kesim aktivitesinde herhangi bir inhibisyon gözlemlenmemiştir (Bkz. Resim 4.6 ve Resim 4.7). Literatür tarama sonuçlarına göre, Panja, Matsuo, Nagao ve Hirota (2011), azobenzene bağlantılı 1·Zn cis kompleksinin,

DAPI varlığında DNA kesim aktivitesinde inhibisyona neden olduğunu ve dolayısıyla DNA'nın küçük oluşuna bağlandığını bildirmişlerdir. Alizadeh ve diğerleri (2015) ise, Zn(II), L-/D-fluorobenzothiazole Schiff bazı-valin kompleksinin, DAPI ve MG varlığında DNA kesim aktivitesinde inhibisyona neden olduğunu, dolayısıyla hem DNA'nın küçük oluşuna hem de büyük oluşuna bağlandığını belirtmişlerdir. Tez çalışmasının sonuçları değerlendirildiğinde, Schiff bazının, DAPI ve MG varlığında DNA kesim aktivitesinde herhangi bir inhibisyon göstermemesi, literatür bilgilerine göre, bu bileşiğin DNA'nın hem büyük oluşuna hem de küçük oluşuna bağlanmadan, DNA'ya interkalasyon yolu ile bağlanabileceğini açıklamıştır. Ayrıca, bu sonuçlar, DNA bağlanma sonuçları ile de paralellik göstermiş ve birbirini desteklemiştir.

DNA hedefli antikanser ilaçlar, kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmedeki etkililiğinin keşfedilmesinden bu yana büyük ilgi görmektedir (Rosu ve diğerleri, 2012; Sinha ve diğerleri, 2008; Shukla ve diğerleri, 2009; Vicini ve diğerleri, 2003). Bu tez çalışmasına göre, uygulama süresi ve konsantrasyon arttıkça antiproliferatif etkinin arttığı ve en yüksek ölümün Schiff bazının 72 saat inkübasyonu sonunda HT-29 hücresi için 500 ve 1000 μ M konsantrasyon uygulamalarında (sırasıyla % 94 ve % 96 ölüm), HeLa hücresi için ise 1000 μ M konsantrasyonda (% 65 ölüm) belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.2). Schiff bazının HT-29 hücresinde 72 saat 500 ve 1000 μ M konsantrasyon uygulamasındaki yüksek ölüm, sağlıklı hücrelerde de toksik etki yapabilme ihtimali nedeniyle uygun olmayacağı, bu inkübasyon süresinde Schiff bazının 250 μ M konsantrasyonunun daha uygun olabileceği düşünülmüştür. Her iki kanser hücresi için ise, 24 ve 48 saat inkübasyon süresinde, Schiff bazının 500 veya 1000 μ M konsantrasyonundaki uygulamalarının ideal olabileceği söylenebilir. Ayrıca, antiproliferatif aktivitenin değerlendirilmesinde önemli olan IC₅₀ (kontrol hücrelerine kıyasla, ilgili kimyasal ile muamele sonrası hücrelerin % 50'sini öldüren konsantrasyon) değeri de en yüksek 72 saat inkübasyonun sonunda HT-29 hücresi için 252 μ M, HeLa hücresi için ise 389 μ M olarak belirlenmiş ve bu sonuçlarda % canlılık sonuçları ile uyumluluk göstermiştir (Bkz. Çizelge 4.3). Sonuç olarak, Schiff bazının HT-29 hücresinde daha yüksek antiproliferatif aktivite gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,05$).

Yapılan literatür taramalarında ise, Araújo ve diğerleri (2013) ile Fouche ve diğerleri (2008), bitki ekstraktlarının antiproliferatif aktivitesini, hücre canlılığındaki % azalmaya (% ölüme) göre 4 grup olarak kategorize etmişlerdir: inaktif (% 1-20), az aktif (% 20-50),

orta derecede aktif (% 50-70) ve çok aktif (% 70-100). Bu literatürlere göre, bu tez çalışmasının sonuçları değerlendirildiğinde, Schiff bazının 72 saat inkübasyonu sonunda, HT-29 hücresi için, 500 ve 1000 μM konsantrasyon uygulamalarında çok aktif bir antiproliferatif aktivite gösterdiği tespit edilirken, HeLa hücresi için ise, 500 ve 1000 μM konsantrasyon uygulamalarında orta derecede aktif bir antiproliferatif aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, Schiff bazı HT-29 hücresinde daha yüksek antiproliferatif aktivite göstermiştir.

Kaur, Singh ve Narasimhan (2019), naftol diazenil scaffold bazlı Schiff bazlarından NS-6, NS-11 ve NS-15 türevlerinin, HT-29 hücre hattı için IC_{50} değerlerinin $<50\mu\text{g/mL}$ olduğunu ve buna bağlı olarak bu bileşiklerin önemli antiproliferatif aktivite sergilediğini ve ayrıca NS-2 ve NS-8 türevleri için ise IC_{50} değerleri sırasıyla 19.26 $\mu\text{g/mL}$ ve 17.8 $\mu\text{g/mL}$ olduğunu ve buna bağlı olarak bu türevlerin diğerlerine göre daha iyi antiproliferatif aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Buna göre bu tez çalışmasının sonuçları değerlendirildiğinde, HT-29 hücresi için tüm uygulama sürelerinde IC_{50} değerlerinin $<50\mu\text{g/mL}$ olması, Schiff bazının HT-29 hücresinde önemli bir antiproliferatif aktivite sergilediğini göstermektedir. En iyi antiproliferatif aktivitesi ise, 72 saatlik uygulama süresinde 15 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir. HeLa hücresinin 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinde ise önemli bir antiproliferatif aktivite gözlemlenmemişken, 72 saatlik uygulama süresinde IC_{50} değeri, 23 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, Schiff bazının, naftol diazenil scaffold bazlı Schiff bazlarının tüm türevlerine kıyasla 72 saatlik uygulama sonunda HT-29 hücresinde çok daha iyi bir antiproliferatif aktivite gösterdiği söylenebilir.

Ayrıca, bu sonuçlar Schiff bazının antikanser aktivitesinin, hem DNA bağlanması hem de DNA kesim aktivitesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Literatürlere göre ise, Maheswari ve diğerleri (2006), Cu (II) Schiff bazı kompleksinin HL 60 (lösemi) kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etki göstermesinin, DNA'ya bağlanma ve DNA'yı kesme yetenekleri ile de ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Fu ve diğerleri (2014), $[\text{Cu}(\text{glygly})(\text{PyTA})]\text{ClO}_4 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (1) ve $[\text{Cu}(\text{glygly})(\text{PzTA})]\text{ClO}_4 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (2) bakır(II)-dipeptit komplekslerinin, HepG2, HeLa, A549 ve U87 hücre hatlarında antiproliferatif etki gösterdiğini ve bu sonucunda DNA kesim aktivitesi sonuçları ile uyumlu olduğunu belirtmişlerdir.

Ek olarak, Schiff bazları, DNA ile anlamlı bir şekilde etkileşime girebilmektedir. Çeşitli amin ve karboksil grubu gibi aktif bağlama bölgelerine sahiptirler ve bu aktif bölgeler, DNA'ya bağlanmada seçici etki gösterebilirler (Arunadevi ve diğerleri, 2017). Dolayısıyla, tez kapsamında çalışılan asimetrik diimin Schiff bazının yapısında bulunan iki adet imin, serbest karboksil (COOH) ve hidroksil (OH) gruplarının, bileşiğin antikanser aktivite göstermesinden sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

Kanser hücrelerinde DNA hasarı sonucu apoptozisin indüksiyonu, tümör büyümesini önlemek için etkili bir stratejidir (Pistritto, Trisciuglio, Ceci, Garufi ve D'Orazi, 2016). Antikanser çalışmalarında, hücre ölümünün çok olmasından ziyade mevcut ölümün apoptozis yolağı üzerinden gerçekleşmesi çok önemlidir. Bu tez çalışmasında, Schiff bazının antiproliferatif etkisinin genotoksositeye bağlı bir apoptozis ile ilişkili olup olmadığı CBMN testi ile belirlenmiştir ve bu test kapsamındaki hücresel hasar ise morfolojik olarak değerlendirilmiştir.

Schiff bazının, HT-29 hücresinde 24 saatlik uygulama süresinde, kontrol hücrelerine göre, mikronükleus (MN) içeren çift çekirdekli hücrelerin (BNC) ortalama yüzdesinde (% MNBNC) 1,1 katlık bir artış gözlemlenirken, 48 saatlik uygulama süresinde bu artışın 1,5 kat olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.4). Bu durum, 48 saatlik uygulama süresinde kromozom veya genom hasarının daha yüksek olduğunu göstermiştir. HeLa hücresinde ise, 24 saatlik uygulama süresinde, kontrol hücrelerine göre, mikronükleus (MN) içeren çift çekirdekli hücrelerin (BNC) ortalama yüzdesinde (% MNBNC) 1,3 katlık bir artış gözlemlenirken, 48 saatlik uygulama süresinde bu artışın 1,1 kat olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.5). Bu durum, 24 saatlik uygulama süresinde kromozom veya genom hasarının daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlara göre, her iki kanser hücresi değerlendirildiğinde, Schiff bazının HT-29 kanser hücresinde daha etkin olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar antiproliferatif aktivite çalışması sonuçlarını da desteklemiştir (Bkz. Şekil 4.2 ve Çizelge 4.3).

Literatürlere göre, Tarantini ve diğerleri (2015), 24 saatlik bir muameleden sonra, 16 µg/mL'de SiO₂-15 nm nanopartikülüne maruz kalan Caco-2 hücrelerinin MN frekansında 1,5 katlık bir artış olduğunu, 32 ve 64 µg/mL ile tedavi edilen hücrelerde ise, 3 katlık bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Tez çalışmasının sonuçları değerlendirildiğinde ise, HT-29 hücre hattında, 1000 µM konsantrasyonundaki Schiff bazı ile uygulama süresi arttıkça

MN frekansında yaklaşık 1,5 katlık bir artış gözlemlenmiştir. Yukarıdaki artışla kıyaslandığında düşük oranda kromozom veya genom hasarına neden olduğu söylenebilir. Perez, Rheingold ve Melendez (2015), Fc-CH₂CO₂-Ph-4-Py bileşiğinin 10, 1, 0,1 µM konsantrasyonların da MCF-7 hücre hattında Fc-CO₂-estradiol, Fc-(CO₂-Ph-4-Py)CO₂H, Fc-(CO₂-Ph-4-Py)₂ bileşiklerine kıyasla düşük sitotoksik aktivite gösterdiğini ve önemli bir genotoksik aktivite sergilemediğini de bildirmişlerdir. Bu çalışma sonuçları ile kıyaslandığında, Schiff bazının HT-29 ve HeLa hücre hatlarında inkübasyon süresindeki artışa bağlı olarak yüksek antiproliferatif aktivite ve düşük miktarda genotoksik etki gösterdiği söylenebilir.

Sitokinez-Blok Proliferasyon indeksi (CBPI), hücrelere uygulanan ajanların, sitostatik veya sitotoksik aktivitesini ve hücre proliferasyonu üzerine etkisini belirlemek için kullanılan bir ölçüttür (Anderson ve diğerleri, 1988; Nigro, Palermo, Mudry ve Carballo, 2003; Seligmann ve diğerleri, 2003). CBPI'daki bir azalma hücrenin proliferasyon kapasitesindeki bir kaybı ve hücre döngüsündeki bir inhibisyonu göstermektedir (Fenech, 2000). Bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasının sonuçları değerlendirildiğinde, HT-29 hücre hattında 48 saatlik uygulama süresi sonunda kontrole kıyaslandığında, CBPI değerinin azaldığı tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.4). Dolayısıyla, Schiff bazının, 1000 µM konsantrasyonun, 24 saatlik uygulama süresine kıyasla, 48 saatlik uygulama süresinde, HT-29 hücre hattında daha fazla antiproliferatif aktivite gösterdiği belirlenmiştir. HeLa hücre hattında ise, hem 24 saat hem de 48 saatlik uygulama süresinde, CBPI değerinde azalma gözlemlenmiş olup, 24 saatte bu azalmanın daha yüksek olması (Bkz. Çizelge 4.5), hücre döngüsündeki inhibisyonun ve antiproliferatif etkinin daha fazla olduğunu göstermektedir.

Replikasyon indeksi (RI) ise, hücrelere uygulanan ajanın, DNA replikasyonu üzerindeki etkisi belirlemek için kullanılan bir ölçüttür (Fenech, 2000). Tez çalışması sonuçları değerlendirildiğinde, Schiff bazının, HT-29 hücre hattında 24 saatlik uygulama süresinde RI değerinde bir değişiklik tespit edilmemiştir. 48 saatlik uygulama süresinde ise, RI değerinde % 14'lük bir azalış saptanmıştır (Bkz. Çizelge 4.4). Dolayısıyla bu sonuca göre, 1000 µM konsantrasyonundaki Schiff bazının 48 saatlik uygulama süresinde, HT-29 hücre hattında, genotoksositeye bağlı bir antiproliferatif aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, Schiff bazının HT-29 hücre hattında, ideal genotoksositeye bağlı antiproliferatif aktivitesinin 1000 µM konsantrasyonunun da 48 saatlik uygulama süresinde olabileceği

söylenebilir. HeLa hücre hattında ise, 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinde sırasıyla % 15 ve % 14'lük bir azalış olduğu saptanmıştır (Bkz. Çizelge 4.5). Dolayısıyla Schiff bazının 1000 μ M konsantrasyonun da 24 saatlik uygulama süresinde, daha fazla genotoksositeye bağlı bir antiproliferatif aktivite gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, Schiff bazının, HeLa hücre hattında, ideal genotoksositeye bağlı antiproliferatif aktivitesinin 1000 μ M konsantrasyonunun üstünde daha düşük uygulama sürelerinde olabileceği de söylenebilir. Bu sonuçlar, CBPI değeri sonuçları ile uyumluluk göstermiş olup, antiproliferatif aktivite çalışması sonuçlarını da desteklemiştir. Ayrıca, her iki hücre hattında da farklı uygulama sürelerinde görülen RI'daki bu azalma, OECD (Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü) kılavuzunda önerildiği gibi % 55'in üzerinde bulunmuştur. Bu sonuçlar, aşağıdaki literatür çalışması sonuçlarıyla da benzerlik göstermektedir. Tarantini ve diğerleri (2015), SiO₂-15 nm nanopartikülünün 16, 32 ve 64 μ g/mL dozlarında, Caco-2 hücrelerinde, RI değerlerinde bir azalmanın olduğunu, ancak bu değerlerin OECD (Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü) kılavuzunda önerildiği gibi % 55'in üzerinde kaldığını bildirmişlerdir (OECD, 2008).

Schiff bazının 1000 μ M konsantrasyonunda HT-29 ve HeLa hücrelerinin çoğunda apoptozise özgü morfolojik değişiklikler, yani nükleer kondensasyon ve apoptotik cisimcikler oluşturduğu tespit edilmiştir. Özellikle 48 saatlik uygulama süresinde, her iki kanser hücresinde, apoptozis için tipik olan, nükleer fragmentler, kromatin kondensasyonu ile apoptotik cisimcikler oldukça yoğun bir şekilde gözlemlenmiş olup, ayrıca apoptotik hücrelere kıyasla daha az sayıda olan ve sitoplazmalarında vakuol bulunduran hücreler de dikkati çekmiştir (Bkz. Resim 4.8 ve Resim 4.9). Ayrıca, hücresel hasar, her iki hücre hattı için de, taramalı elektron mikroskopunda (SEM) incelenmiştir ve apoptotik hücreler Bkz. Resim 4.10 ve Resim 4.11'de gösterilmiştir.

Literatürlere göre ise, apoptozis, morfolojik olarak benzer şekilde değerlendirilmiştir (Babich, Zuckerbraun, Ricklis ve Blau, 1998; Larsson, Wickström, Hassan, Öberg ve Granberg, 2010; Rao ve diğerleri, 2011; Barros ve diğerleri, 2011; Ding, Zhu, Li ve Gao, 2012; Vidhya ve Devaraj, 2011; Hernández ve diğerleri, 2016; Liu ve diğerleri, 2011; Venkatesan ve diğerleri, 2012; Wang ve diğerleri, 2011; Xu ve diğerleri, 2010). Ayrıca, literatüre göre, hücre sitoplazmasında vakuol görülmesi, genellikle otofajinin bir sonucu olarak kabul edilmektedir (Krick ve diğerleri, 2009). Otofajide, apoptozis gibi programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır (Danial ve Korsmeyer, 2004; Lum,

De Berardinis ve Thompson, 2005). Symonds ve diğerleri (2013) de, *Illawarra plum* ile muamele edilen HT-29 hücrelerinde benzer şekilde hücre sitoplazmasında vakuol oluşumunu gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak, Schiff bazının 1000 μ M konsantrasyonun da HT-29 ve HeLa hücrelerinde neden olduğu ölümlerin, nükleer kondensasyon, apoptotik cisimcikler gibi morfolojik değişikliklerden ötürü, apoptozis ve vakuol oluşumu nedeniyle de, otofaji denilen programlanmış hücre ölümleri sonucunda gerçekleştiği söylenebilir.

Topoizomeraz enzimleri, replikasyon ve transkripsiyon işlemleri sırasında DNA segmentinin konformasyonunu ve topolojisini hızla kontrol eden ve değiştiren temel enzimlerdir (Gaur ve Usman, 2019). Ancak bu enzimler, kanser hücrelerinde kontrolsüz bir şekilde işlev görmektedir. Bu nedenle, bu enzimlerin inhibisyonu, kemoterapide umut verici bir ilaç hedefi haline gelmiştir (Nitiss, 2009; Pommier, Leo, Zhang ve Marchand, 2010). Özellikle de insan topo II α enzimi, birçok kanser hücresinde yüksek oranda eksprese edilmektedir, bu da bu enzimleri antikanser ilaçlar için cazip bir hedef yapmaktadır (Jarvinen ve Liu, 2006; Sandhaus ve diğerleri, 2016). Çünkü topo II inhibe edici antikanser ilaçlara duyarlılığın, kanser hücrelerindeki topo II α ekspresyon seviyesine bağlı olduğu kanıtlanmıştır. Yani, düşük bir topo II α proteini konsantrasyonuna sahip olan hücreler, yüksek topo II α konsantrasyonuna sahip olan hücelere kıyasla, topo II inhibe edici antikanser ilaçlara karşı daha az hassastır (Ju ve diğerleri, 2006; Kellner, Sehested, Jensen, Gieseler ve Rudolph, 2002; Jarvinen ve Liu, 2006).

Topoizomeraz enzimlerinin inhibisyonu, DNA'nın pozitif süpersarmalının replikasyon ve transkripsiyonunun hızlı bir şekilde durmasına ve anormal negatif süpersarmal DNA yapılarının oluşmasına neden olur (Pommier, 2006; Pommier ve diğerleri, 2010). DNA'daki bu topolojik değişiklikler ise, gen transkripsiyonunun baskılanmasına veya aktivasyonuna sebep olabilir. Dolayısıyla bu enzimlerin inhibisyonu, özellikle de topo II α inhibisyonu, DNA yapısında değişikliğe ve kalıcı DNA hasarına neden olabilir ve buna bağlı olarak da apoptozis yolağı üzerinden hücre ölümüne ve/veya hücre döngüsünün durmasına yol açabilir (Nitiss, 2009; Pommier, 2006; Tabassum ve diğerleri, 2014). Etki mekanizması açıklanacak olursa, topoizomerazların normal işlevi sırasında, enzimlerin kovalent olarak DNA'ya bağlandığı geçici Topo-DNA kompleksleri oluşur. Topo I ve II'yi inhibe eden ilaçlar, nihayetinde replikasyon sırasında öldürücü DNA hasarı ile sonuçlanan Topo-DNA komplekslerini stabilize ederek etki gösterir (Drlica ve Franco, 1988; Pommier, 2009; Classen, Olland ve Berger, 2003). Bir başka deyişle, stabil DNA-topo

kompleksi oluştuğunda, hasarlı DNA tanınarak, p53'e bağlı hücre ölümü başlatılır (Solary ve diğerleri, 1994). Sonuç olarak, antikanser tedavi rejimlerinin yaklaşık % 50'si topoizomerazları inhibe eden en az bir DNA hedefli antikanser ilacın (doksorubisin, daunorubisin, epirubisin, amsakrin, bleomisin gibi) kullanımına dayanmaktadır (Hande, 1998a; Hande, 1998b; Baviskar ve diğerleri, 2011). Ayrıca, son zamanlarda DNA hedefli antikanser ilaç olarak, hücre proliferasyonunda ciddi role sahip olan topoizomeraz I ve II inhibitörleri de geliştirilmektedir (Andoh, 2003; Nitiss, 2009; Wang ve diğerleri, 1997; Haglof ve diğerleri, 2006; Pommier, 2009; Salerno ve diğerleri, 2010).

Bu tez çalışmasında ise, Schiff bazının insan topoizomeraz II α (topo II α) enzimine olan aktivitesi araştırılmıştır. Schiff bazının 500 ve 1000 μ M konsantrasyonların da, insan topo II α 'nın aktivitesini inhibe ettiği ve her iki dozda da tek zincir kopması yaptığı tespit edilmiştir (Bkz. Resim 4.12). Topoizomeraz enzim aktivitesinin değerlendirilmesinde önemli olan IC₅₀ değeri (% 50 inhibisyona neden olan konsantrasyon) ise 77,5 μ M olarak belirlenmiş olup, Schiff bazının bir topoizomeraz inhibitörü olabileceği düşünülmektedir. Topo II inhibitörü olarak geliştirilen antikanser bir ilaç olan kamptotesinin IC₅₀ değeri >100 μ M'tür (Berridge, Tan, McCoy ve Wang, 1996). Dolayısıyla Schiff bazının bu ilaca göre topo II'yi inhibe etmede daha etkin olduğu söylenebilir.

Yapılan literatür taramalarına göre, Arjmand ve diğerleri (2011), N,N-bis-[1(R/S)-1-benzil-2- etoksietan] bakır(II) klorid bileşiğinin artan konsantrasyonlara (24 ve 32 μ M) bağlı olarak insan topo II α 'nın aktivitesini inhibe ettiğini ve bu konsantrasyonların bildirilen topo II zehirli ilaçlara (>300 M) kıyasla oldukça düşük olduğunu belirtmişlerdir. Bu bilgiler doğrultusunda, Schiff bazının da insan topo II α 'nın aktivitesini inhibe ettiği 500 ve 1000 μ M konsantrasyonlarının da bildirilen bu skalaya (>300 M) kıyasla oldukça düşük olduğu görülmektedir. Son zamanlarda DNA'ya bağlanan ilaçların antikanser aktivitelerinin, DNA topoizomeraz enzimlerini inhibe etme özellikleriyle yakından ilişkili olduğu bildirilmektedir (Potmesil ve Kohn, 1991; Ralph ve diğerleri, 1994; Tırinoğlu, 2016). Bir başka çalışmada da, benzoilpiridin tiyosemikarbazonlarının yanısıra asetilpiridin-tiyosemikarbazonlar ve asetilpirazin-tiyosemikarbazonlar içeren α -(N)-heterosiklik tiyosemikarbazonlarının Cu (II) komplekslerinin birkaç serisinin de, insan topo II α 'nın inhibisyonu yolu ile yüksek antikanser aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Wilson, Jiang, McGill, Lisic ve Deweese, 2016; Conner ve diğerleri, 2016). Bu bilgiler doğrultusunda, tez çalışması sonuçları değerlendirildiğinde, Schiff bazının 500 ve 1000

μM konsantrasyonların da insan topo II α 'nın aktivitesini inhibe ederek, HT-29 ve HeLa kanser hücrelerinde yüksek antiproliferatif aktive gösterdiği ve buna bağlı ölümlerinde apoptozis yolağı üzerinden olduğu söylenebilir. Ek olarak, tez çalışması kapsamında yapılan CBMN testindeki morfolojik değerlendirme sonuçları da apoptozisi işaret etmektedir.

Ayrıca, DNA'ya interkalasyon yolu ile bağlanan ajanların (örneğin, doksorubisin, daunorubisin ve mitoksantron) topoizomeraz II'yi hedeflediği ve sitotoksik aktivitelerini, apoptozis yoluyla hücre ölümüyle sonuçlanan bir DNA-topoizomeraz II kompleksi oluşturulmasının aracılık ettiği bildirilmiştir (Barra ve diğerleri, 2016). Bir başka çalışma ile de DNA'ya interkalasyon yolu ile bağlanan bazı Ru (II) polipiridi komplekslerinin de topo II üzerinde inhibisyon aktivitesi sergilediği bildirilmiştir (Wang ve diğerleri, 2014). Bu bilgiler doğrultusunda, Schiff bazının DNA'ya interkalasyon yolu ile bağlanma özelliğinin, insan topo II α 'nın aktivitesini inhibe etme özelliği ile ilişkili olabileceği söylenebilir.

Mutajenler, genellikle DNA, RNA ve proteinlerdeki nükleofilik gruplara kolaylıkla saldıran ajanlar olup (Murray ve Mayes 1993), DNA'nın yapısında kalıcı hasarlar oluşturarak, kanser ve diğer dejeneratif hastalıkların etiyopatolojisinde rol oynayan mutasyonlara sebep olmaktadır (Venitt ve Parry, 1984). Bu nedenle yeni sentezlenen birçok kimyasal bileşiğin seri bir şekilde test edilerek mutajenik/kanserojenik etkilerinin saptanması gerekmektedir. Ames/*Salmonella*/mikrozom testi, kimyasal bileşiklerin mutajenik potansiyelini değerlendirmek için kullanılan bir testtir (Hong, Cho, Jang ve Lyu, 2011). Bu testin temeli, yapay mutasyon oluşturulmuş olan *Salmonella typhimurium*'un histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş his⁻ olan oksotrofik suşların test bileşeni ile muamelesinden sonra tekrar bir mutasyon geçirerek his⁺ hale dönüşmesi esasına dayanır (Ames, 1973; Maron ve Ames, 1983). Bu tez çalışmasında *S. typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşlarının neden olduğu çerçeve kayması ve baz çifti değişimi tipindeki mutasyonlara göre, Schiff bazının farklı konsantrasyonlarda mutajenik etkisi araştırılmıştır. Ames/*Salmonella*/mikrozom testinde bir maddeye mutajen denilebilmesi için histidin protroflarının sayısının kendiliğinden geriye dönen (spontan) koloni sayısının en az iki katı olması ya da iki katından az olduğu durumlarda doza bağlı bir artış göstermesi gerekmektedir (Maron ve Ames, 1983). Bu bilgiler doğrultusunda, yapılan çalışma sonucunda elde edilen bulgulara göre (Bkz. Çizelge 4.6), Schiff bazının 200-2000 μM

arasındaki konsantrasyonlarında, *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının koloni sayısının, kendiliğinden geriye dönen koloni sayısının en az iki katı kadar olmadığı ve doza bağlı olarak koloni sayısında da yine önemli bir artış olmadığı gözlemlenmiştir. Dolayısıyla Schiff bazının TA98 ve TA100 için çerçeve kayması ve baz çifti değişimi neden olan mutasyonlara sebep olmadığı tespit edilmiştir. Her iki suş kıyaslandığında ise, Schiff bazının TA98 suşu için çerçeve kaymasına neden olan mutasyon riskini oldukça azalttığı belirlenmiştir. Yina Huang (2010), poli(ϵ -kaprolakton)-poli(etilenglikol)-poli(ϵ -kaprolakton) (PCEC) nanomateriyallerinin Ames testinde *S. typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA102 ve TA1535 suşlarının varlığında mutajenik bir etki göstermediğini ve dolayısıyla ilaç bileşenleri için kullanımında güvenli bir aday olabileceğini belirtmiştir. Ayrıca, birçok literatür tarafından, bir maddenin mutajen olabilmesi için mutajen oranının (MO) 2 ve 2'nin üstünde olması gerektiği bildirilmektedir (Pavan ve diğerleri, 2013; Luo ve diğerleri, 2016; Pascali, Angelica, Lugoli, De Donno ve Fanizzi, 2011; Pan ve diğerleri, 2010; Maron ve Ames, 1983). Bu bilgiler doğrultusunda, tez çalışması sonuçları değerlendirildiğinde, MO tüm konsantrasyonlarda 2'nin altında bulunmuştur. Sonuç olarak, Schiff bazının mutajen olmadığı ve buna bağlı olarak kullanımının ise güvenli olabileceği sonucu çıkarılabilir. Ek olarak, çoğu interkalasyon yapan ajanın (akridin oranj, proflavin, akriflavin vb.) çerçeve kayması mutasyonu yaptığı bilinmektedir (Bütüner ve Kantarcı, 2006). Bilinenin aksine, Schiff bazının da interkalasyon yapan bir ajan olduğu ve çerçeve kayması ile baz çifti değişimi neden olan mutasyonlara sebep olmadığı söylenebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde aşağıdaki çıkarımlar elde edilmiştir.

1. Literatürlere göre, antikanser ilaçların çoğu, kovalent veya kovalent olmayan bağlanma yolu ile DNA'nın replikasyon mekanizmasına zarar vererek, antikanser etki göstermektedir. Özellikle de, klinik açıdan yararlı olan çoğu antikanser ilaç, DNA'ya kovalent olmayan bağlanma biçimi olan interkalasyon yolu ile bağlanmaktadır. Sonuçlarımıza göre ise, Schiff bazının, kovalent olmayan bağlanma biçimi olan, interkalasyon yolu ile DNA'ya bağlandığı belirlenmiş olup, buna bağlı olarak da, DNA hedefli bir antikanser ilaç adayı olabileceği söylenebilir.
2. DNA bağlanma çalışması sonuçlarına göre, Schiff bazının DNA'ya interkalasyon yolu ile bağlandığı tespit edilmiştir. Ayrıca, bu bağlanma biçimi oluk bağlayıcılar (DAPI ve MG) varlığında, DNA kesim aktivitesi çalışması sonuçlarıyla doğrulanmıştır. DNA hedefli ilaçlar, nükleobazlara kovalent olarak bağlanarak etki göstermekle birlikte, oldukça yüksek toksisite ve düşük seçiciliğe de sahiptirler. Bu nedenle, yeni geliştirilecek olan DNA hedefli ilaçların kovalent olmayan yolla DNA'ya bağlanmasının, düşük toksisite ve yüksek seçiciliğe neden olabileceği düşünülmektedir. Sonuçlarımıza göre ise, Schiff bazının DNA'ya kovalent olmayan yolla (interkalasyon) bağlandığı belirlenmiştir. Bu şekilde bağlanma göstermesinden dolayı Schiff bazının, düşük toksisite ve yüksek seçiciliğe neden olabileceği düşünüülerek, güvenli bir antikanser ilaç olarak kullanımı önerilebilir.
3. Schiff bazının 2000-3500 μM konsantrasyon aralığında kesim aktivitesi belirlenmiş olup, 3000 ve 3500 μM konsantrasyonlarında bu aktivitenin daha etkin olduğu gözlemlenmiştir. Literatürlere göre, yüksek kesim aktivitesinin, yüksek DNA bağlanma aktivitesi ile yakından ilişkili olduğu belirtilmekle birlikte, bu durumda bileşenlerin antikanser aktivitesini artırdığı bildirilmiştir. Sonuçlarımız ise, bu literatür bilgilerini doğrulamıştır. Yüksek oranda DNA bağlanma aktivitesi gösteren Schiff bazının, yüksek kesim aktivitesi gösterdiği ve buna bağlı olarak da antikanser aktivitesini arttırdığı söylenebilir.
4. Schiff bazının hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) ile kesim aktivitesi göstermediği, singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) veya singlet oksijen benzeri türler gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluştuğu bir oksidatif DNA hasar yolağı üzerinden kesim aktivitesi gösterdiği

belirlenmiştir. Bu kesim mekanizması bize Schiff bazının apoptozis yoluyla antikanser etki gösterebileceğinin kanıtı olabilir.

5. Aktivatör olan H_2O_2 ve AA varlığında yapılan DNA kesim aktivitesi çalışması sonuçlarına göre, AA'nın H_2O_2 'e kıyasla Schiff bazının DNA kesim aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir. Buna göre, biyolojik bir bileşen olan AA'nın Schiff bazının özellikle kesim aktivitesine bağlı DNA hedefli bir antikanser ilaç olarak geliştirilmesinde aktivatör olarak kullanılması, Schiff bazının etkinliğini artıracak olup, biyolojik organizmalara da herhangi bir zararı olmayacaktır. Bu da DNA hedefli antikanser ilaçlarının geliştirilmesinde, AA ile etkinliği artırılmış Schiff bazının güvenli kullanımını mümkün kılacaktır.
6. Literatüre göre, çoğu interkalasyon yapan ajanın çerçeve kayması mutasyonu yaptığı bilinmektedir. Ancak, Schiff bazının baz çifti değişimine ve özellikle de çerçeve kaymasına neden olan mutasyonlara yol açmaması sebebiyle, ilaç adayı olarak güvenli kullanımı bu yönüyle önerilebilir.
7. Schiff bazının HT-29 ve HeLa kanser hücrelerinde antiproliferatif aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Artan uygulama sürelerine göre bu etkinin de arttığı tespit edilmiştir. CBMN sonuçlar değerlendirildiğinde ise, 1000 μM konsantrasyonun da her iki hücre hattında da DNA hasarına bağlı antiproliferatif aktivite belirlenmiştir. Bu aktivite HeLa hücresine kıyasla HT-29'un 48 saatinde daha etkin bulunmuştur. Schiff bazının kanser hücrelerinde 48 saat inkübasyon aralığında antiproliferatif aktivitesinin ~ % 50 aralığın da olmasına karşılık, ölümün hem apoptozis hem de otofaji ölüm yolağı üzerinden gerçekleştiği belirlenmiştir. Buna göre, hücre ölümünün (antiproliferatif etkinin) çok olmasından ziyade mevcut ölümün apoptozis ve otofaji yolağı üzerinden gerçekleşmesi, Schiff bazının potansiyel bir antikanser ilaç adayı olarak değerlendirebileceği sonucunu akla getirmektedir.
8. Topoizomerez enzimleri, birçok antikanser ilaç için etkili bir kemoterapötik hedef haline gelmiştir. Birçok literatür, DNA'ya bağlanan ilaçların antikanser aktivitelerinin, DNA topoizomerez enzimlerini inhibe etme özellikleriyle yakından ilişkili olduğunu ve apoptozis ölüm yolağına götürmede etkin olabileceğini vurgulamıştır. Bizim sonuçlarımızda Schiff bazının 500 ve 1000 μM konsantrasyonlarında insan topoizomerez II α (topo II α) enzim aktivitesini inhibe ettiği ve ayrıca Schiff bazının (IC₅₀, 77,5 μM) klinik olarak kullanılan antikanser bir ilaç olan kamptotesinden (IC₅₀ >100 μM) daha etkin bir inhibitör aktivite gösterdiği de belirlenmiştir. Bu sonuç hem literatür bilgisi hem de CBMN test sonuçlarımızla uyumlu olup, insan topo II α

aktivitesinin inhibisyonuna bağı olarak, kanser hücrelerindeki ölümlerin apoptozis yolağı üzerinden gerçekleştiğinin bir diğr göstergesi olmuştur. Aynı zamanda literatürler, DNA'ya interkalasyon yolu ile bağlanan ajanların topo II enzim aktivitesini inhibe ettiğini vurgulamıştır. Schiff bazının da DNA'ya interkalasyon yolu ile bağlanma özelliğinin, insan topo II α 'nın aktivitesini inhibe etme özelliğı ile ilişkili olabileceğı söylenebilir. Bu sonucumuz da diğr sonuçları desteklemiştir.

9. Schiff bazının mutajenik potansiyeli, Ames/*Salmonella*/mikrozom testi ile araştırılmıştır. Schiff bazının DNA'da baz çifti değışimine ve özellikle de çerçeve kaymasına neden olan mutasyonlara sebep olmadığı belirlenmiştir. Literatüre göre, çoğı interkalasyon yapan ajanın çerçeve kayması mutasyonu yaptığı bilinmektedir. Ancak, Schiff bazının baz çifti değışimine ve özellikle de çerçeve kaymasına neden olan mutasyonlara yol açmaması sebebiyle, bir mutajen olmadığı ve buna bağı olarak ilaç adayı olarak kullanımının ise, güvenli olabileceğı sonucu çıkarılabilir.

Bu tez çalışması sonuçları değılendirildiğinde aşağıdaki öneriler elde edilmiştir.

1. Schiff bazının DNA ile etkileşimini daha ileri seviyede ortaya koymak amacı ile farklı bağlanma çalışmalarının yapılması önerilmektedir.
2. Schiff bazının ilaç adayı olabilmesi için ileri düzey toksisite testlerinin yapılması ve eğer toksik etkisi çıkar ise, bu etkinin en aza indirgeneceğı modellemelerin geliştirilmesi öngörülmektedir.
3. Kanser üzerindeki etki mekanizmasının, farklı gen ve proteinlerle ileri düzey moleküler çalışmalarla gösterilmesi önerilmektedir. Schiff bazının apoptozis ve otofaji ölüm yolları moleküler düzeyde yapılacak çalışmalarla ortaya konulmalıdır.
4. Schiff bazı farklı hastalık modellerinde de DNA'yı hedef alarak etkin olabilir. Bu yönüyle diğr hastalıklarda da araştırılması önerilebilir.

Tüm çalışmalar Schiff bazının DNA hedefli antikanser ilaç adayı olabileceğini göstermiş olup, daha ileri çalışmalarla desteklenmesi durumunda, Schiff bazının patentinin alınması ve başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklara karşı DNA'yı hedef alabilecek ilaç geliştirilmesi mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abdi, K., Hadadzadeh, H., Weil, M. and Salimi, M. (2012). Mononuclear copper (II) complex with terpyridine and an extended phenanthroline base, [Cu (tpy)(dppz)]²⁺: Synthesis, crystal structure, DNA binding and cytotoxicity activity. *Polyhedron*, 31(1), 638-648.
- Afrati, T., Pantazaki, A. A., Dendrinou-Samara, C., Raptopoulou, C., Terzis, A. and Kessissoglou, D. P. (2010). Copper inverse-9-metallacrown-3 compounds interacting with DNA. *Dalton Transactions*, 39(3), 765-775.
- Aksoy, Y. (2010). Kanserde İlaç Direncinin Üstesinden Gelmenin Yolları: Yeni İlaçların Tasarımı. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 30(6), 2011-2016.
- Akyıl, D. (2012). *Bazı pestisitlerin mutajenite ve genotoksitelerinin belirlenmesi*, Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon, 43-68.
- Alam, M. S., Choi, J. H. and Lee, D. U. (2012). Synthesis of novel Schiff base analogues of 4-amino-1, 5-dimethyl-2-phenylpyrazol-3-one and their evaluation for antioxidant and anti-inflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(13), 4103-4108.
- Alessandrini, A., Facci, P. (2005). AFM: a versatile tool in biophysics. *Measurement Science and Technology*, 16(6), 65.
- Alizadeh, R., Yousuf, I., Afzal, M., Srivastav, S., Srikrishna, S. and Arjmand, F. (2015). Enantiomeric fluoro-substituted benzothiazole Schiff base-valine Cu (II)/Zn (II) complexes as chemotherapeutic agents: DNA binding profile, cleavage activity, MTT assay and cell imaging studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 143, 61-73.
- Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E. and Lee, F. D. (1973). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(8), 2281-2285.
- Anacona, J. R., Rodriguez, J. L. and Camus, J. (2014). Synthesis, characterization and antibacterial activity of a Schiff base derived from cephalixin and sulphathiazole and its transition metal complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 129, 96-102.
- Andersen, B., Sletten, E. (2000). NMR studies on metal complexes of DNA oligomers. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 79(1-4), 353-358.
- Anderson, D., Jenkinson, P. C., Dewdney, R. S., Francis, A. J., Godbert, P. and Butterworth, K. R. (1988). Chromosome aberrations, mitogen-induced blastogenesis and proliferative rate index in peripheral lymphocytes from 106 control individuals of the UK population. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 204(3), 407-420.

- Andoh, T. (Ed.). (2003). *DNA Topoisomerases in Cancer Therapy: Present and Future*, New York: Springer Science & Business Media, 55-81.
- Angelusiu, M. V., Barbuceanu, S. F., Draghici, C. and Almajan, G. L. (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.
- Annaraj, B., Balakrishnan, C. and Neelakantan, M. A. (2016). Synthesis, structure information, DNA/BSA binding affinity and in vitro cytotoxic studies of mixed ligand copper (II) complexes containing a phenylalanine derivative and diimine co-ligands. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 160, 278-291.
- Araújo, L. C. C., Aguiar, J. S., Napoleão, T. H., Mota, F. V. B., Barros, A. L. S., Moura, M. C. and Paiva, P. M. G. (2013). Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. *PLoS One*, 8(12), e81973.
- Araya, F., Huchet, G., McGroarty, I., Skellern, G. G. and Waigh, R. D. (2007). Capillary electrophoresis for studying drug–DNA interactions. *Methods*, 42(2), 141-149.
- Arjmand, F., Jamsheera, A. (2011). DNA binding studies of new valine derived chiral complexes of tin (IV) and zirconium (IV). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78(1), 45-51.
- Arjmand, F., Parveen, S., Afzal, M., Toupet, L. and Hadda, T. B. (2012). Molecular drug design, synthesis and crystal structure determination of CuII–SnIV heterobimetallic core: DNA binding and cleavage studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 141-150.
- Arjmand, F., Sharma, G. C., Muddassir, M. and Tabassum, S. (2011). Synthesis and enantiopreferential DNA-binding profile of late 3d transition metal R-and S-enantiomeric complexes derived from N, N-bis-(1-benzyl-2-ethoxyethane): Validation of R-enantiomer of copper (II) complex as a human topoisomerase II inhibitor. *Chirality*, 23(7), 557-567.
- Armitage, B. (1998). Photocleavage of nucleic acids. *Chemical Reviews*, 98(3), 1171-1200.
- Arnesano, F., Natile, G. (2009). Mechanistic insight into the cellular uptake and processing of cisplatin 30 years after its approval by FDA. *Coordination Chemistry Reviews*, 253(15-16), 2070-2081.
- Arunadevi, A., Paulpandiyar, R. and Raman, N. (2017). DNA interaction, molecular docking and biological profile of tetradentate histidine based metallointercalators. *Journal of Molecular Liquids*, 241, 801-810.
- Asare-Okai, P. N., Chow, C. S. (2011). A modified fluorescent intercalator displacement assay for RNA ligand discovery. *Analytical Biochemistry*, 408(2), 269-276.

- Aslan, F., Öksüzoğlu, Ö. B. (2017). Bleomycin induced organized pnömonia in synchronus bilateral seminoma. *Acta Oncologica Turcica*, 50(1), 92-93.
- Aslan, H. G., Özcan, S. and Karacan, N. (2011). Synthesis, characterization and antimicrobial activity of salicylaldehyde benzenesulfonylhydrazone (Hsalbsmh) and its Nickel (II), Palladium (II), Platinum (II), Copper (II), Cobalt (II) complexes. *Inorganic Chemistry Communications*, 14(9), 1550-1553.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1999). *Short protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons. Inc., 4.
- Avendaño, C., Menendez, J. C. (2015). *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs* (Second edition). Spain: Elsevier, 1-21.
- Aymami, J., Nunn, C. M. and Neidle, S. (1999). DNA minor groove recognition of a non-self-complementary AT-rich sequence by a tris-benzimidazole ligand. *Nucleic Acids Research*, 27(13), 2691-2698.
- Ayyıldız, O., Dede, Ş. İ. T., Söker, M., Kadiroğlu, A. K. and Yeşilbağdan, A. H. (2005). Daunorubicin induced blue-gray hyperpigmentation: a case report. *International Journal of Hematology and Oncology*, 28(4), 149-152.
- Babich, H., Zuckerbraun, H. L., Ricklis, A. S. and Blau, L. (1998). *In vitro* toxicity of sodium nitroprusside to human endothelial ECV304 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 5(2), 135-144.
- Babu, M. S., Reddy, K. H. and Krishna, P. G. (2007). Synthesis, characterization, DNA interaction and cleavage activity of new mixed ligand copper (II) complexes with heterocyclic bases. *Polyhedron*, 26(3), 572-580.
- Baguley, B. C., Falkenhaus, E. M. (1978). The interaction of ethidium with synthetic double-stranded polynucleotides at low ionic strength. *Nucleic Acids Research*, 5(1), 161-171.
- Baguley, B. C., Le Bret, M. (1984). Quenching of DNA-ethidium fluorescence by amsacrine and other antitumor agents: a possible electron-transfer effect. *Biochemistry*, 23(5), 937-943.
- Bailly, C. (1998). Sequence-specific recognition and modification of double-helical DNA by minor-groove binding conjugates structurally related to netropsin and distamycin. *In Advances in DNA Sequence-Specific Agents*, 3, 97-156.
- Bailly, C. (2000). Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Current Medicinal Chemistry*, 7(1), 39-58.
- Baraldi, P. G., Bovero, A., Fruttarolo, F., Preti, D., Tabrizi, M. A., Pavani, M. G. and Romagnoli, R. (2004). DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents. *Medicinal Research Reviews*, 24(4), 475-528.

- Barone, G., Terenzi, A., Lauria, A., Almerico, A. M., Leal, J. M., Busto, N. and Garcia, B. (2013). DNA-binding of nickel (II), copper (II) and zinc (II) complexes: Structure–affinity relationships. *Coordination Chemistry Reviews*, 257(19-20), 2848-2862.
- Barra, C. V., Rocha, F. V., Morel, L., Gautier, A., Garrido, S. S., Mauro, A. E. and Netto, A. V. (2016). DNA binding, topoisomerase inhibition and cytotoxicity of palladium (II) complexes with 1, 10-phenanthroline and thioureas. *Inorganica Chimica Acta*, 446, 54-60.
- Barral, C., Castellano, R., Tassistro, V., Goubard, A., Perrin, J. and Courbiere, B. (2018). Transmission of oocyte DNA damage to preimplantation embryos after in vivo mouse exposure to daunorubicin and cytarabine. In *34th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology*.
- Barros, F. W., Bandeira, P. N., Lima, D. J., Meira, A. S., de Farias, S. S., Albuquerque, M. R. J., Santos, J. R. M., Lemos, S. H., Morais, G. L. T., Costa-Lotufo, O. M. and do Ó Pessoa, C. (2011). Amyrin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(3), 1268-1276.
- Barut, B. (2016). *Suda çözünür ti (IV) ftalosiyanin bileşiklerinin DNA bağlanma, DNA kesim, antioksidan, antimikrobiyal aktivitelerinin ve topoizomerez I inhibisyonunun incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Baviskar, A. T., Madaan, C., Preet, R., Mohapatra, P., Jain, V., Agarwal, A., Guchhait, S. K., Kundu, C. N., Banerjee, U. C. and Bharatam, P. V. (2011). N-fused imidazoles as novel anticancer agents that inhibit catalytic activity of topoisomerase II α and induce apoptosis in G1/S phase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(14), 5013-5030.
- Beck, J. L., Colgrave, M. L., Ralph, S. F. and Sheil, M. M. (2001). Electrospray ionization mass spectrometry of oligonucleotide complexes with drugs, metals, and proteins. *Mass Spectrometry Reviews*, 20(2), 61-87.
- Beria, I., Baraldi, P. G., Cozzi, P., Caldarelli, M., Geroni, C., Marchini, S., Mongelli, N. and Romagnoli, R. (2004). Cytotoxic α -halogenoacrylic derivatives of distamycin A and congeners. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(10), 2611-2623.
- Bernadou, J., Pratviel, G., Bennis, F., Girardet, M. and Meunier, B. (1989). Potassium monopersulfate and a water-soluble manganese porphyrin complex, [Mn (TMPyP)](OAc) 5, as an efficient reagent for the oxidative cleavage of DNA. *Biochemistry*, 28(18), 7268-7275.
- Berridge, M. V., Tan, A. S., McCoy, K. D. and Wang, R. U. I. (1996). The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*, 4(1), 14-19.
- Bhadra, K., Kumar, G. S. (2011). Interaction of berberine, palmatine, coralyne, and sanguinarine to quadruplex DNA: a comparative spectroscopic and calorimetric study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).General Subjects*, 1810(4), 485-496.

- Biver, T., Secco, F. and Venturini, M. (2005). Relaxation kinetics of the interaction between RNA and metal-intercalators: The Poly (A)· Poly (U)/platinum-proflavine system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 437(2), 215-223.
- Burrows, C. J., Muller, J. G. (1998). Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission. *Chemical Reviews*, 98(3), 1109-1152.
- Busto, N., García, B., Leal, J. M., Gaspar, J. F., Martins, C., Boggioni, A. and Secco, F. (2011). ACMA (9-amino-6-chloro-2-methoxy acridine) forms three complexes in the presence of DNA. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(43), 19534-19545.
- Bütüner, D. B., Kantarcı, G. (2006). Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 35(2), 149-170.
- Cachau, R. E., Podjarny, A. D. (2005). High-resolution crystallography and drug design. *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal*, 18(3), 196-202.
- Cater, M. A., Pearson, H. B., Wolyniec, K., Klaver, P., Bilandzic, M., Paterson, B. M. and Haupt, Y. (2013). Increasing intracellular bioavailable copper selectively targets prostate cancer cells. *ACS Chemical Biology*, 8(7), 1621-1631.
- Chaires, J. B. (2008). Calorimetry and thermodynamics in drug design. *Annual Review of Biophysics*, 37, 135-151.
- Chambers, A. F., Groom, A. C. and MacDonald, I. C. (2002). Metastasis: dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), 563.
- Champoux, J. J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), 369-413.
- Chang, X., Tou, J. C., Hong, C., Kim, H. A., Riby, J. E., Firestone, G. L. and Bjeldanes, L. F. (2005). 3, 3'-Diindolylmethane inhibits angiogenesis and the growth of transplantable human breast carcinoma in athymic mice. *Carcinogenesis*, 26(4), 771-778.
- Chen, W., Ou, W., Wang, L., Hao, Y., Cheng, J., Li, J. and Liu, Y. N. (2013). Synthesis and biological evaluation of hydroxyl-substituted Schiff-bases containing ferrocenyl moieties. *Dalton Transactions*, 42(44), 15678-15686.
- Cheng, L. X., Tang, J. J., Luo, H., Jin, X. L., Dai, F., Yang, J., Qian, Y. P., Li, X. Z. and Zhou, B. (2010). Antioxidant and antiproliferative activities of hydroxyl-substituted Schiff bases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(8), 2417-2420.
- Chow, M. J., Licon, C., Yuan Qiang Wong, D., Pastorin, G., Gaidon, C. and Ang, W. H. (2014). Discovery and investigation of anticancer ruthenium–arene schiff-base complexes via water-promoted combinatorial three-component assembly. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(14), 6043-6059.

- Ciolkowski, M. L., Fang, M. M. and Lund, M. E. (2000). A surface plasmon resonance method for detecting multiple modes of DNA–ligand interactions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 22(6), 1037-1045.
- Clark, P. I., Slevin, M. L. (1987). The clinical pharmacology of etoposide and teniposide. *Clinical Pharmacokinetics*, 12(4), 223-252.
- Classen, S., Olland, S. and Berger, J. M. (2003). Structure of the topoisomerase II ATPase region and its mechanism of inhibition by the chemotherapeutic agent ICRF-187. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(19), 10629-10634.
- Coant, N., García-Barros, M., Zhang, Q., Obeid, L. M. and Hannun, Y. A. (2018). AKT as a key target for growth promoting functions of neutral ceramidase in colon cancer cells. *Oncogene*, 37(28), 3852.
- Cohen, G., Eisenberg, H. (1969). Viscosity and sedimentation study of sonicated DNA–proflavine complexes. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 8(1), 45-55.
- Conner, J. D., Medawala, W., Stephens, M. T., Morris, W. H., Deweese, J. E., Kent, P. L. and Lisic, E. C. (2016). Cu (II) benzoylpyridine thiosemicarbazone complexes: inhibition of human topoisomerase II α and activity against breast cancer cells. *Open Journal of Inorganic Chemistry*, 6(02), 146.
- Constantinou-Kokotou, V., Karikas, G. and Kokotos, G. (2001). Study of aminoglycoside–nucleic acid interactions by an HPLC method. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11(8), 1015-1018.
- Danial, N. N., Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.
- Dean, B. J., Brooks, T. M., Hodson-Walker, G. and Hutson, D. H. (1985). Genetic toxicology testing of 41 industrial chemicals. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 153(1-2), 57-77.
- Deng, J., Su, G., Chen, P., Du, Y., Gou, Y. and Liu, Y. (2018). Evaluation of DNA binding and DNA cleavage of nickel (II) complexes with tridentate α -N-heterocyclic thiosemicarbazones ligands. *Inorganica Chimica Acta*, 471, 194-202.
- Denny, W. A. (2004). Emerging DNA topoisomerase inhibitors as anticancer drugs. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 9(1), 105-133.
- Ding, X., Zhu, F. S., Li, M. and Gao, S. G. (2012). Induction of apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells by solamargine from *Solanum nigrum* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), 599-604.
- Diril, N., Sumer, S. and Izbirlik, A. (1990). A survey on the mutagenic effects of some organophosphorus insecticides in the *Salmonella*/microsome test system. *Doğa Mühendislik ve Çevre Bilimleri*, 14(2), 272-279.

- Dong, X., Wang, X., Lin, M., Sun, H., Yang, X. and Guo, Z. (2010). Promotive effect of the platinum moiety on the DNA cleavage activity of copper-based artificial nucleases. *Inorganic Chemistry*, 49(5), 2541-2549.
- Drlica, K., Franco, R. J. (1988). Inhibitors of DNA topoisomerases. *Biochemistry*, 27(7), 2253-2259.
- Duff, B., Thangella, V. R., Creaven, B. S., Walsh, M. and Egan, D. A. (2012). Anti-cancer activity and mutagenic potential of novel copper (II) quinolinone Schiff base complexes in hepatocarcinoma cells. *European Journal of Pharmacology*, 689(1-3), 45-55.
- Duguid, J., Bloomfield, V. A., Benevides, J. and Thomas Jr, G. J. (1993). Raman spectroscopy of DNA-metal complexes. I. Interactions and conformational effects of the divalent cations: Mg, Ca, Sr, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Pd, and Cd. *Biophysical Journal*, 65(5), 1916-1928.
- Dyson, P. J., Sava, G. (2006). Metal-based antitumour drugs in the post genomic era. *Dalton Transactions*, (16), 1929-1933.
- Ejidike, I. P., Ajibade, P. A. (2015). Transition metal complexes of symmetrical and asymmetrical Schiff bases as antibacterial, antifungal, antioxidant, and anticancer agents: progress and prospects. *Reviews in Inorganic Chemistry*, 35(4), 191-224.
- Fakih, M. G. (2015). Metastatic colorectal cancer: current state and future directions. *Journal of Clinical Oncology*, 33(16), 1809-1824.
- Farrell, N. (2002). Biomedical uses and applications of inorganic chemistry. An overview. *Coordination Chemistry Reviews*, 232(1-2), 1-4.
- Fenech, M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 81-95.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D. and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), 359-386.
- Feun, L. G., Marini, A., Landy, H., Markoe, A., Heros, D., Robles, C., Herrera, C. and Savaraj, N. (2007). Clinical trial of CPT-11 and VM-26/VP-16 for patients with recurrent malignant brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology*, 82(2), 177-181.
- Fouché, G., Cragg, G. M., Pillay, P., Kolesnikova, N., Maharaj, V. J. and Senabe, J. (2008). In vitro anticancer screening of South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(3), 455-461.

- Fu, P. K. L., Bradley, P. M. and Turro, C. (2003). Stabilization of duplex DNA structure and suppression of transcription in vitro by bis (quinone diimine) complexes of rhodium (III) and ruthenium (II). *Inorganic Chemistry*, 42(3), 878-884.
- Fu, X. B., Liu, D. D., Lin, Y., Hu, W., Mao, Z. W. and Le, X. Y. (2014). Water-soluble DNA minor groove binders as potential chemotherapeutic agents: synthesis, characterization, DNA binding and cleavage, antioxidation, cytotoxicity and HSA interactions. *Dalton Transactions*, 43(23), 8721-8737.
- Gago, F. (2004). Modelling and simulation: a computational perspective in anticancer drug discovery. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 4(5), 401-403.
- Gao, X., Mirau, P. and Patel, D. J. (1992). Structure refinement of the chromomycin dimer-DNA oligomer complex in solution. *Journal of Molecular Biology*, 223(1), 259-279.
- García, B., Ibeas, S., Ruiz, R., Leal, J. M., Biver, T., Boggioni, A., Secco, F. and Venturini, M. (2008). Solvent effects on the thermodynamics and kinetics of Coralyne self-aggregation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(1), 188-196.
- García, B., Leal, J. M., Ruiz, R., Biver, T., Secco, F. and Venturini, M. (2010). Change of the binding mode of the DNA/proflavine system induced by ethanol. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(25), 8555-8564.
- García-Friaza, G., Fernández-Botello, A., Pérez, J. M., Prieto, M. J. and Moreno, V. (2006). Synthesis and characterization of palladium (II) and platinum (II) complexes with Schiff bases derivatives of 2-pyridincarboxyaldehyde. Study of their interaction with DNA. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(8), 1368-1377.
- Garuti, L., Roberti, M., Malagoli, M., Rossi, T. and Castelli, M. (2000). Synthesis and antiproliferative activity of some benzimidazole-4, 7-dione derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10(19), 2193-2195.
- Gaur, R., Usman, M. (2019). A combined experimental and theoretical investigation of ruthenium (II)-hydrazone complex with DNA: Spectroscopic, nuclease activity, topoisomerase inhibition and molecular docking. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 209, 100-108.
- Ghorai, P., Saha, R., Bhuiya, S., Das, S., Brandão, P., Ghosh, D. and Saha, A. (2018). Syntheses of Zn (II) and Cu (II) Schiff base complexes using N, O donor Schiff base ligand: Crystal structure, DNA binding, DNA cleavage, docking and DFT study. *Polyhedron*, 141, 153-163.
- Ghosh, M., Layek, M., Fleck, M., Saha, R. and Bandyopadhyay, D. (2015). Synthesis, crystal structure and antibacterial activities of mixed ligand copper (II) and cobalt (II) complexes of a NNS Schiff base. *Polyhedron*, 85, 312-319.
- Giancola, C. (2008). A convenient tool for studying the stability of proteins and nucleic acids. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 91(1), 79-85.

- Gibson, D. (2002). Drug–DNA interactions and novel drug design. *The Pharmacogenomics Journal*, 2, 275–276.
- Golcu, A., Tumer, M., Demirelli, H. and Wheatley, R. A. (2005). Cd(II) and Cu(II) complexes of polydentate Schiff base ligands: synthesis, characterization, properties and biological activity. *Inorganica Chimica Acta*, 358, 1785–1797.
- Goto, T., Wang, J. C. (1982). Yeast DNA topoisomerase II. An ATP-dependent type II topoisomerase that catalyzes the catenation, decatenation, unknotting, and relaxation of double-stranded DNA rings. *Journal of Biological Chemistry*, 257(10), 5866–5872.
- Gottesman, M. M., Fojo, T. and Bates, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP–dependent transporters. *Nature Reviews Cancer*, 2(1), 48.
- Griffith, D. M., Duff, B., Suponitsky, K. Y., Kavanagh, K., Morgan, M. P., Egan, D. and Marmion, C. J. (2011). Novel trans-platinum complexes of the histone deacetylase inhibitor valproic acid; synthesis, in vitro cytotoxicity and mutagenicity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(6), 793–799.
- Gultneh, Y., Khan, A. R., Blaise, D., Chaudhry, S., Ahvazi, B., Marvey, B. B. and Butcher, R. J. (1999). Syntheses and structures of and catalysis of hydrolysis by Zn (II) complexes of chelating pyridyl donor ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 75(1), 7–18.
- Gust, R., Beck, W., Jaouen, G. and Schönenberger, H. (2009). Optimization of cisplatin for the treatment of hormone dependent tumoral diseases: Part 1: Use of steroidal ligands. *Coordination Chemistry Reviews*, 253(21–22), 2742–2759.
- Güngör, Ö. (2008). *Yeni asimetric diimin bileşiklerinin sentezi, metal komplekslerinin hazırlanması ve tautomerik özelliklerinin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Habtemariam, A., Melchart, M., Fernández, R., Parsons, S., Oswald, I. D., Parkin, A., Fabbiani, F. P. A., Davidson, J. E., Dawson, A., Aird, R. E., Jodrell, D. I. and Sadler, P. J. (2006). Structure– activity relationships for cytotoxic ruthenium (II) arene complexes containing N, N-, N, O-, and O, O-chelating ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(23), 6858–6868.
- Haglof, K. J., Popa, E. and Hochster, H. S. (2006). Recent developments in the clinical activity of topoisomerase-1 inhibitors. *Update on Cancer Therapeutics*, 1(2), 117–145.
- Hajian, R., Shams, N. and Mohagheghian, M. (2009). Study on the interaction between doxorubicin and deoxyribonucleic acid with the use of methylene blue as a probe. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(8), 1399–1405.

- Hajrezaie, M., Paydar, M., Zorofchian Moghadamtousi, S., Hassandarvish, P., Gwaram, N. S., Zahedifard, M. and Abdul Majid, N. (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*, 1-12.
- Hamdan, I. I., Skellern, G. G. and Waigh, R. D. (1998). Use of capillary electrophoresis in the study of ligand-DNA interactions. *Nucleic Acids Research*, 26(12), 3053-3058.
- Hamilton, P. L., Arya, D. P. (2012). Natural product DNA major groove binders. *Natural Product Reports*, 29(2), 134-143.
- Hampshire, A. J., Rusling, D. A., Broughton-Head, V. J. and Fox, K. R. (2007). Footprinting: a method for determining the sequence selectivity, affinity and kinetics of DNA-binding ligands. *Methods*, 42(2), 128-140.
- Han Ang, W., Dyson, P. J. (2006). Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: Towards targeted chemotherapy. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2006(20), 4003-4018.
- Han, X., Gao, X. (2000). Sequence specific recognition of ligand-DNA complexes studied by NMR. *Current Medicinal Chemistry*, 8(5), 551-581.
- Hande, K. R. (1998). Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1400(1-3), 173-184.
- Hande, K. R. (1998). Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European Journal of Cancer*, 34(10), 1514-1521.
- Hande, K. R. (2008). Topoisomerase II inhibitors. *Update on Cancer Therapeutics*, 3(1), 13-26.
- Hartmann, J. T., Lipp, H. P. (2006). Camptothecin and podophyllotoxin derivatives. *Drug Safety*, 29(3), 209-230.
- He, X., Jin, L. and Tan, L. (2015). DNA-binding, topoisomerases I and II inhibition and in vitro cytotoxicity of ruthenium (II) polypyridyl complexes: $[\text{Ru}(\text{dppz})_2\text{L}]^{2+}$ ($\text{L} = \text{dppz}-11\text{-CO}_2\text{Me}$ and dppz). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 135, 101-109.
- Heck, M. M., Earnshaw, W. C. (1986). Topoisomerase II: A specific marker for cell proliferation. *The Journal of Cell Biology*, 103(6), 2569-2581.
- Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B. and Sharma, R. A. (2008). DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 8(3), 193.

- Hernández, A. M., Rodríguez, N., González, J. E., Reyes, E., Rondón, T., Griñán, T., Macías, A., Alfonso, S., Vázquez, M. A. and Pérez, R. (2011). Anti-NeuGcGM3 antibodies, actively elicited by idiotypic vaccination in nonsmall cell lung cancer patients, induce tumor cell death by an oncosis-like mechanism. *The Journal of Immunology*, 186(6), 3735-3744.
- Holder, A. A., Taylor, P., Magnusen, A. R., Moffett, E. T., Meyer, K., Hong, Y., Ramsdale, S. E., Gordon, M., Stubbs, J., Seymour, L. A., Acharya, D., Weber, R. T., Smith, P. F., Dismukes, G. C., Ji, P., Menocal, L., Bai, F., Williams, J. L., Cropek, D. M. and Jarrett, W. L. (2013). Preliminary anti-cancer photodynamic therapeutic in vitro studies with mixed-metal binuclear ruthenium (II)–vanadium (IV) complexes. *Dalton Transactions*, 42(33), 11881-11899.
- Hong, C. E., Cho, M. C., Jang, H. A. and Lyu, S. Y. (2011). Mutagenicity and anti-mutagenicity of *Acanthopanax divaricatus* var. *albeofructus*. *The Journal of Toxicological Sciences*, 36(5), 661-668.
- Hsiang, Y. H., Wu, H. Y. and Liu, L. F. (1988). Proliferation-dependent regulation of DNA topoisomerase II in cultured human cells. *Cancer Research*, 48(11), 3230-3235.
- Huang, H., Chen, Q., Ku, X., Meng, L., Lin, L., Wang, X., Zhu, C., Wang, Y., Chen, Z., Li, M., Jiang, H., Chen, K., Ding, J. and Liu, H. (2010). A series of α -heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones inhibit topoisomerase II α catalytic activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(8), 3048-3064.
- Huang, Y., Gao, H., Gou, M., Ye, H., Liu, Y., Gao, Y., Peng, F., Qian, Z., Cen, X. and Zhao, Y. (2010). Acute toxicity and genotoxicity studies on poly (ϵ -caprolactone)-poly (ethylene glycol)-poly (ϵ -caprolactone) nanomaterials. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 696(2), 101-106.
- Hurley, L. H. (2002). DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2(3), 188.
- Isaacs, R. J., Davies, S. L., Sandri, M. I., Redwood, C., Wells, N. J. and Hickson, I. D. (1998). Physiological regulation of eukaryotic topoisomerase II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1400(1-3), 121-137.
- Jakupec, M. A., Galanski, M., Arion, V. B., Hartinger, C. G. and Keppler, B. K. (2008). Antitumour metal compounds: more than theme and variations. *Dalton Transactions*, (2), 183-194.
- Jamieson, E. R., Lippard, S. J. (1999). Structure, recognition, and processing of cisplatin–DNA adducts. *Chemical Reviews*, 99(9), 2467-2498.
- Jana, S., Santra, R. C., Frontera, A., Drew, M. G., Ortega-Castro, J., Fernández, D., Das, S. and Chattopadhyay, S. (2016). Copper (II) pseudohalide complexes with isomeric N₂O donor Schiff base ligands: Synthesis, characterization and molecular dynamics simulations of interactions with DNA. *Chemistry Select*, 1(3), 448-455.

- Jarvinen, T. A., Liu, E. T. (2006). Simultaneous amplification of HER-2 (ERBB2) and Topoisomerase II α (TOP2A) genes-molecular basis for combination chemotherapy in cancer. *Current Cancer Drug Targets*, 6(7), 579-602.
- Jaumot, J., Gargallo, R. (2012). Experimental methods for studying the interactions between G-quadruplex structures and ligands. *Current Pharmaceutical Design*, 18(14), 1900-1916.
- Jayaseelan, P., Prasad, S., Vedanayaki, S. and Rajavel, R. (2016). Synthesis, characterization, anti-microbial, DNA binding and cleavage studies of Schiff base metal complexes. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, 668-677.
- Jelesarov, I., Bosshard, H. R. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal of Molecular Recognition*, 12(1), 3-18.
- Jiménez-Alonso, S., Orellana, H. C., Estevez-Braun, A., Ravelo, A. G., Perez-Sacau, E. and Machin, F. (2008). Design and synthesis of a novel series of pyranonaphthoquinones as topoisomerase II catalytic inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(21), 6761-6772.
- Ju, B. G., Lunyak, V. V., Perissi, V., Garcia-Bassets, I., Rose, D. W., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (2006). A topoisomerase II β -mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science*, 312(5781), 1798-1802.
- Jun, K. Y., Lee, E. Y., Jung, M. J., Lee, O. H., Lee, E. S., Choo, H. Y. P., Na, Y. and Kwon, Y. (2011). Synthesis, biological evaluation, and molecular docking study of 3-(3'-heteroatom substituted-2'-hydroxy-1'-propyloxy) xanthone analogues as novel topoisomerase II α catalytic inhibitor. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(6), 1964-1971.
- Jung, Y., Lippard, S. J. (2007). Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chemical Reviews*, 107(5), 1387-1407.
- Kaçar, Ö. (2016). *Çeşitli kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkili paladyum türevlerinin moleküler etki mekanizmalarının aydınlatılması*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kariper, I. A. (2017). The Release of Doxorubicin's Active Ingredient from the Hydrogels with Poly (HEMA/Acrylamide/Itaconic acid) and Their Biological Function. *Indian journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(3), 401-406.
- Karthikeyan, M. S., Prasad, D. J., Poojary, B., Bhat, K. S., Holla, B. S. and Kumari, N. S. (2006). Synthesis and biological activity of Schiff and Mannich bases bearing 2, 4-dichloro-5-fluorophenyl moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(22), 7482-7489.

- Kate, A. N., Kumbhar, A. A., Khan, A. A., Joshi, P. V. and Puranik, V. G. (2013). Monitoring cellular uptake and cytotoxicity of copper (II) complex using a fluorescent anthracene thiosemicarbazone ligand. *Bioconjugate Chemistry*, 25(1), 102-114.
- Kathiravan, M. K., Khilare, M. M., Chothe, A. S. and Nagras, M. A. (2013). Design and development of topoisomerase inhibitors using molecular modelling studies. *Journal of Chemical Biology*, 6(1), 25-36.
- Kaur, H., Singh, J. and Narasimhan, B. (2019). Synthesis and evaluation of novel naphthol diazenyl scaffold based Schiff bases as potential antimicrobial and cytotoxic agents against human colorectal carcinoma cell line (HT-29). *BMC Chemistry*, 13(1), 49.
- Keck, M. V., Lippard, S. J. (1992). Unwinding of supercoiled DNA by platinum-ethidium and related complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 114(9), 3386-3390.
- Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), 573.
- Kellner, U., Sehested, M., Jensen, P. B., Gieseler, F. and Rudolph, P. (2002). Culprit and victim—DNA topoisomerase II. *The Lancet Oncology*, 3(4), 235-243.
- Khalaji, A. D., Rad, S. M., Grivani, G. and Das, D. (2010). Nickel (II) and copper (II) complexes with an asymmetric bidentate Schiff-base ligand derived from furfurylamine: Synthesis, spectral, XRD, and thermal studies. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 103(2), 747-751.
- Khalid, S., Hannon, M. J., Rodger, A. and Rodger, P. M. (2006). Simulations of DNA coiling around a synthetic supramolecular cylinder that binds in the DNA major groove. *Chemistry—A European Journal*, 12(13), 3493-3506.
- Khan, G. S., Shah, A., Zia-ur, R. and Barker, D. (2012). Chemistry of DNA minor groove binding agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 115, 105-118.
- Khosravi, I., Sahihi, M., Dashtbani, M., Rudbari, H. A. and Borhan, G. (2017). Deoxyribonucleic Acid and Bovine Serum Albumin Interaction with the Asymmetric Schiff Base Ligand and Its Molybdenum (VI) Complex: Multi Spectroscopic and Molecular Docking Studies. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, 56(9), 655-669.
- Kielkopf, C. L., White, S., Szewczyk, J. W., Turner, J. M., Baird, E. E., Dervan, P. B. and Rees, D. C. (1998). A structural basis for recognition of A·T and T·A base pairs in the minor groove of B-DNA. *Science*, 282(5386), 111-115.
- Klein, A. V., Hambley, T. W. (2009). Platinum drug distribution in cancer cells and tumors. *Chemical Reviews*, 109(10), 4911-4920.

- Kocyigit, O., Kursunlu, A. N. and Guler, E. (2010). Complexation properties and synthesis of a novel Schiff base with triphenylene nucleus. *Journal of Hazardous Materials*, 183(1-3), 334-340.
- Komeda, S., Moulaei, T., Woods, K. K., Chikuma, M., Farrell, N. P. and Williams, L. D. (2006). A third mode of DNA binding: phosphate clamps by a polynuclear platinum complex. *Journal of the American Chemical Society*, 128(50), 16092-16103.
- Kopka, M. L., Yoon, C., Goodsell, D., Pjura, P. and Dickerson, R. E. (1985). The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(5), 1376-1380.
- Kostova, I. (2006). Platinum complexes as anticancer agents. *Recent Patents on Anticancer Drug Discovery*, 1(1), 1-22.
- Krick, R., Mühe, Y., Prick, T., Bredschneider, M., Bremer, S., Wenzel, D., Eskelinen, E. L. and Thumm, M. (2009). Piecemeal microautophagy of the nucleus: genetic and morphological traits. *Autophagy*, 5(2), 270-272.
- Kril, A., Topashka-Ancheva, M., Iliev, I., Gerasimova, T., Kraicheva, I., Tsacheva, I. and Troev, K. (2012). *In vitro* antitumour activity, genotoxicity, and antiproliferative effects of aminophosphonic acid diesters and their synthetic precursors. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 67(9-10), 473-480.
- Krishnamoorthy, P., Sathyadevi, P., Cowley, A. H., Butorac, R. R. and Dharmaraj, N. (2011). Evaluation of DNA binding, DNA cleavage, protein binding and *in vitro* cytotoxic activities of bivalent transition metal hydrazone complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(8), 3376-3387.
- Krugh, T. R., Reinhardt, C. G. (1975). Evidence for sequence preferences in the intercalative binding of ethidium bromide to dinucleoside monophosphates. *Journal of Molecular Biology*, 97(2), 133-162.
- Kulaksızoğlu, S., Gökçe, C. and Güp, R. (2012). Synthesis and characterization of bis (azine) ligands and metal complexes: DNA-interaction and extraction properties for metals and dichromate anions. *Turkish Journal of Chemistry*, 36(5), 717-733.
- Kumar, R. S., Arunachalam, S., Periasamy, V. S., Preethy, C. P., Riyasdeen, A. and Akbarsha, M. A. (2009). Surfactant–cobalt (III) complexes: synthesis, critical micelle concentration (CMC) determination, DNA binding, antimicrobial and cytotoxicity studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(1), 117-127.
- Kumari, R., Nath, M. (2017). Tri-and diorganotin (IV) derivatives of non-steroidal anti-inflammatory drug sulindac: Characterization, electronic structures (DFT), DNA binding and plasmid cleavage studies. *Applied Organometallic Chemistry*, 31(8), 3661.
- Kuo, K., Huang, C. and Lin, Y. (2008). Synthesis and photophysical properties of multinuclear zinc-salophen complexes: enhancement of fluorescence by fluorene termini. *Dalton Transactions*, 29, 3889–3898.

- Kursunlu, A. N., Guler, E., Sevgi, F. and Ozkalp, B. (2013). Synthesis, spectroscopic characterization and antimicrobial studies of Co (II), Ni (II), Cu (II) and Zn (II) complexes with Schiff bases derived from 5-bromo-salicylaldehyde. *Journal of Molecular Structure*, 1048, 476-481.
- Kurtan, M., Kurtoğlu, S. and Melikoğlu, G. (2014). Kamptotesin. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 18(2), 85-100.
- Kypr, J., Kejnovská, I., Renčiuk, D. and Vorlíčková, M. (2009). Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Research*, 37(6), 1713-1725.
- Lai, B. M., Bhatnagar, B., Shacham, S., Kauffman, M., Dorrance, A. M., Blum, W., Sampath, D., Landesman, Y. and Garzon, R. (2016). XPO1 Inhibition Using Selinexor Synergizes With Chemotherapy in Acute Myeloid Leukemia (AML) by Targeting DNA Repair and Restoring Topoisomerase II α to the Nucleus. *Clinical Cancer Research*, 22(24), 6142-6152.
- Lakshmi, V. S. (2003). Biological activity of Mannich bases. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65(3), 213.
- Lang, J. Y., Chen, H., Zhou, J., Zhang, Y. X., Zhang, X. W., Li, M. H., Lin, L. P., Zhang, J. S., Waalkes, M. P. and Ding, J. (2005). Antimetastatic effect of salvicine on human breast cancer MDA-MB-435 orthotopic xenograft is closely related to Rho-dependent pathway. *Clinical Cancer Research*, 11(9), 3455-3464.
- Larsen, A. K., Escargueil, A. E. and Skladanowski, A. (2003). Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 99(2), 167-181.
- Larsson, D. E., Wickström, M., Hassan, S., Öberg, K. and Granberg, D. A. N. (2010). The cytotoxic agents NSC-95397, brefeldin A, bortezomib and sanguinarine induce apoptosis in neuroendocrine tumors in vitro. *Anticancer Research*, 30(1), 149-156.
- Lashanizadegan, M., Seraj, S. (2010). Synthesis and characterization of non-symmetric tetradentate complexes of Zn (II), Co (II), and Cu (II). *Turkish Journal of Chemistry*, 34(2), 263-268.
- Lazić, D., Arsenijević, A., Puchta, R., Bugarčić, Ž. D. and Rilak, A. (2016). DNA binding properties, histidine interaction and cytotoxicity studies of water soluble ruthenium (II) terpyridine complexes. *Dalton Transactions*, 45(11), 4633-4646.
- Lerman, L. S. (1961). Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *Journal of Molecular Biology*, 3(1), 18-IN14.
- Lerman, L. S. (1963). The structure of the DNA-acridine complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 49(1), 94.
- Li, D. D., Tian, J. L., Gu, W., Liu, X., Zeng, H. H. and Yan, S. P. (2011). DNA binding, oxidative DNA cleavage, cytotoxicity, and apoptosis-inducing activity of copper (II) complexes with 1, 4-tpbd (N, N, N', N'-tetrakis (2-ylidylmethyl) benzene-1, 4-diamine) ligand. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(6), 894-901.

- Li, M. X., Zhang, L. Z., Chen, C. L., Niu, J. Y. and Ji, B. S. (2012). Synthesis, crystal structures, and biological evaluation of Cu (II) and Zn (II) complexes of 2-benzoylpyridine Schiff bases derived from S-methyl-and S-phenyldithiocarbazates. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 106(1), 117-125.
- Li, Q., Yang, P., Wang, H. and Guo, M. (1996). Diorganotin (IV) antitumor agent. $(C_2H_5)_2SnCl_2$ (phen)/nucleotides aqueous and solid-state coordination chemistry and its DNA binding studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 64(3), 181-195.
- Li, T. R., Yang, Z. Y., Wang, B. D. and Qin, D. D. (2008). Synthesis, characterization, antioxidant activity and DNA-binding studies of two rare earth (III) complexes with naringenin-2-hydroxy benzoyl hydrazone ligand. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43(8), 1688-1695.
- Li, Y. F., Liu, Z. Q. (2011). Ferrocenyl Schiff base as novel antioxidant to protect DNA against the oxidation damage. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44(1-2), 158-163.
- Li, Y., Yang, Z. Y. (2009). DNA binding affinity and antioxidative activity of copper (II) and zinc (II) complexes with a novel hesperetin Schiff base ligand. *Inorganica Chimica Acta*, 362(13), 4823-4831.
- Liang, F., Wang, P., Zhou, X., Li, T., Li, Z., Lin, H. and Wu, C. (2004). Nickle (II) and cobalt (II) complexes of hydroxyl-substituted triazamacrocyclic ligand as potential antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14(8), 1901-1904.
- Liu, H. K., Berners-Price, S. J., Wang, F., Parkinson, J. A., Xu, J., Bella, J. and Sadler, P. J. (2006). Diversity in guanine-selective DNA binding modes for an organometallic ruthenium arene complex. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(48), 8153-8156.
- Liu, Y., Ma, X. Q., Jin, P., Li, H. T., Zhang, R. R., Ren, X. L., Wang, H. B., Tang, D. and Tian, W. R. (2011). Apoptosis induced by hematoporphyrin monomethyl ether combined with He-Ne laser irradiation in vitro on canine breast cancer cells. *The Veterinary Journal*, 188(3), 325-330.
- Lown, J. W. (1994). DNA recognition by lexitropsins, minor groove binding agents. *Journal of Molecular Recognition*, 7(2), 79-88.
- Lum, J. J., DeBerardinis, R. J. and Thompson, C. B. (2005). Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(6), 439-448.
- Luo, X., Zhu, W., Cui, J., Chen, J., Peng, L., Xiong, J. and Wang, D. (2016). Mutagenicity test of magnetic nanocomposite for interface fixation. *Nanomaterials and Nanotechnology*, 6, 1-3.
- Luzzati, V., Masson, F. and Lerman, L. S. (1961). Interaction of DNA and proflavine: a small-angle x-ray scattering study. *Journal of Molecular Biology*, 3(5), 634-639.

- Maheswari, P. U., Palaniandavar, M. (2004). DNA binding and cleavage properties of certain tetrammine ruthenium (II) complexes of modified 1, 10-phenanthrolines—effect of hydrogen-bonding on DNA-binding affinity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98(2), 219-230.
- Maheswari, P. U., Rajendiran, V., Palaniandavar, M., Thomas, R. and Kulkarni, G. U. (2006). Mixed ligand ruthenium (II) complexes of 5, 6-dimethyl-1, 10-phenanthroline: the role of ligand hydrophobicity on DNA binding of the complexes. *Inorganica Chimica Acta*, 359(14), 4601-4612.
- Maheswari, P. U., Roy, S., den Dulk, H., Barends, S., van Wezel, G., Kozlevcar, B., Gamez, P. and Reedijk, J. (2006). The square-planar cytotoxic $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{pyrimol})\text{Cl}]$ complex acts as an efficient DNA cleaver without reductant. *Journal of the American Chemical Society*, 128(3), 710-711.
- Mandal, S., Sadhukhan, R., Ghosh, U., Mandal, S., Saha, M., Butcher, R. J. and Saha, N. C. (2016). Synthesis and characterization of two Cu (II) complexes with a new pyrazole-based Schiff base ligand: crystallography, DNA interaction and antimicrobial activity of Ni (II) and Cu (II) complexes. *Journal of Coordination Chemistry*, 69(10), 1618-1634.
- Mano, N., Goto, J. (2003). Biomedical and biological mass spectrometry. *Analytical Sciences*, 19(1), 3-14.
- Marky, L. A., Snyder, J. G., Remeta, D. P. and Breslauer, K. J. (1983). Thermodynamics of drug-DNA interactions. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1(2), 487-507.
- Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology*, 3(2), 208-218.
- Maron, D. M., Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113(3-4), 173-215.
- Martins, C., Oliveira, N. G., Pingarilho, M., Gamboa da Costa, G., Martins, V., Marques, M. M., Beland, F. A., Churchwell, M. I., Doerge, D. R., Rueff, J. and Gaspar, J. F. (2006). Cytogenetic damage induced by acrylamide and glycidamide in mammalian cells: correlation with specific glycidamide-DNA adducts. *Toxicological Sciences*, 95(2), 383-390.
- Mashimo, T., Bandyopadhyay, S., Goodarzi, G., Watabe, M., Pai, S. K., Gross, S. C. and Watabe, K. (2000). Activation of the tumor metastasis suppressor gene, KAI1, by etoposide is mediated by p53 and c-Jun genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 274(2), 370-376.
- McClendon, A. K., Osheroff, N. (2007). DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 623(1-2), 83-97.

- McIntosh, C. M., Esposito, E. A., Boal, A. K., Simard, J. M., Martin, C. T. and Rotello, V. M. (2001). Inhibition of DNA transcription using cationic mixed monolayer protected gold clusters. *Journal of the American Chemical Society*, 123(31), 7626-7629.
- McKeage, M. J., Berners-Price, S. J., Galettis, P., Bowen, R. J., Brouwer, W., Ding, L., Zhuang, L. and Baguley, B. C. (2000). Role of lipophilicity in determining cellular uptake and antitumour activity of gold phosphine complexes. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 46(5), 343-350.
- Meghdadi, S., Mereiter, K., Langer, V., Amiri, A., Erami, R. S., Alshima'a, A. M. and Amirnasr, M. (2012). Synthesis, X-ray crystal structure, and electrochemistry of copper (II) complexes of a new tridentate unsymmetrical Schiff base ligand and its hydrolytically rearranged isomer. *Inorganica Chimica Acta*, 385, 31-38.
- Melvin, M. S., Tomlinson, J. T., Saluta, G. R., Kucera, G. L., Lindquist, N. and Manderville, R. A. (2000). Double-strand DNA cleavage by copper prodigiosin. *Journal of the American Chemical Society*, 122(26), 6333-6334.
- Mergny, J. L., Lacroix, L. (2003). Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides*, 13(6), 515-537.
- Metcalf, C., Thomas, J. A. (2003). Kinetically inert transition metal complexes that reversibly bind to DNA. *Chemical Society Reviews*, 32(4), 215-224.
- Milutinović, M. M., Bugarčić, Ž. D. and Wilhelm, R. (2018). A camphor based 1, 3-diamine Ru (ii) terpyridine complex: synthesis, characterization, kinetic investigation and DNA binding. *New Journal of Chemistry*, 42(10), 7607-7611.
- Mohamed, G. G. (2006). Synthesis, characterization and biological activity of bis (phenylimine) Schiff base ligands and their metal complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 64(1), 188-195.
- Montaner, B., Castillo-Avila, W., Martinell, M., Öllinger, R., Aymami, J., Giralt, E. and Pérez-Tomás, R. (2005). DNA interaction and dual topoisomerase I and II inhibition properties of the anti-tumor drug prodigiosin. *Toxicological Sciences*, 85(2), 870-879.
- Morita, H., He, F., Fuse, T., Ouwehand, A. C., Hashimoto, H., Hosoda, M., Mizumachi, K. and Kurisaki, J. I. (2002). Adhesion of lactic acid bacteria to Caco-2 cells and their effect on cytokine secretion. *Microbiology and Immunology*, 46(4), 293-297.
- Morrell, A., Placzek, M., Parmley, S., Antony, S., Dexheimer, T. S., Pommier, Y. and Cushman, M. (2007). Nitrated indenoisoquinolines as topoisomerase I inhibitors: a systematic study and optimization. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(18), 4419-4430.
- 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.

- Muhammad, N., Guo, Z. (2014). Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. *Current Opinion in Chemical Biology*, 19, 144-153.
- Murray, R. K. Mayes, P. A. *Harper'in Biyokimyası*. (Çev. G. Menteş ve Biltan Ersöz). İstanbul: Barış Kitabevi. (Eserin orijinali 1993'de yayımlandı), 811-917.
- Nair, M. S., Joseyphus, R. S. (2008). Synthesis and characterization of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes of tridentate Schiff base derived from vanillin and DL- α -aminobutyric acid. *Spectrochimica Acta A*, 70, 749-753.
- Neidle, S. (2001). DNA minor-groove recognition by small molecules. *Natural Product Reports*, 18(3), 291-309.
- Neidle, S., Abraham, Z. (1984). Structural and sequence-dependent aspects of drug intercalation into nucleic acid. *Critical Reviews in Biochemistry*, 17(1), 73-121.
- Neidle, S., Thurston, D. E. (2005). Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies. *Nature Reviews Cancer*, 5(4), 285.
- Netalkar, P. P., Netalkar, S. P., Budagumpi, S. and Revankar, V. K. (2014). Synthesis, crystal structures and characterization of late first row transition metal complexes derived from benzothiazole core: Anti-tuberculosis activity and special emphasis on DNA binding and cleavage property. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 79, 47-56.
- Ng, C. H., Kong, K. C., Von, S. T., Balraj, P., Jensen, P., Thirthagiri, E., Hamada, H. and Chikira, M. (2008). Synthesis, characterization, DNA-binding study and anticancer properties of ternary metal (II) complexes of edda and an intercalating ligand. *Dalton Transactions*, (4), 447-454.
- Nigro, M. L., Palermo, A. M., Mudry, M. D. and Carballo, M. A. (2003). Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives. *Toxicology In Vitro*, 17(1), 35-40.
- Nitiss, J. L. (2009). DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature Reviews Cancer*, 9(5), 327.
- Nitiss, J. L. (2009). Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 9(5), 338.
- Norden, B., Kubista, M. and Kurucsev, T. (1992). Linear dichroism spectroscopy of nucleic acids. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 25(1), 51-170.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), 2008. *Guideline for the Testing of Chemicals: (Draft-Test guideline 487)*, 1-8.
- Öksüzöğlü, E. (2005). Effect of α -Keto Acids Against H_2O_2 -and NaN_3 -Induced Mutagenesis in Different Strains of *Salmonella typhimurium*. *Turkish Journal of Biology*, 29(3), 161-166.

- Ölgen, S., Bıçak, I. and Nebioğlu, D. (2002). Angiogenesis ve kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 31(3), 193-214.
- Özdemir, Ö. (2016). Novel symmetric diimine-Schiff bases and asymmetric triimine-Schiff bases as chemosensors for the detection of various metal ions. *Journal of Molecular Structure*, 1125, 260-271.
- Özdemir, Ö. (2017). Intramolecular Proton Transfer Equilibrium in Salicylidene-and Naphthalene-based Tetraimine Schiff Bases. *Gazi University Journal of Science*, 30(1), 191-214.
- Özdemir, Ö., Gürkan, P., Sarı, M. and Tunç, T. (2015). Synthesis of monosodium salts of N-(5-nitro-salicylidene)-D-amino acid Schiff bases and their iron (III) complexes: spectral and physical characterizations, antioxidant activities. *Journal of Coordination Chemistry*, 68(14), 2565-2585.
- Öztürk, Ö. (2013). *DNA topoizomeraz II enzim inhibitörü yeni heterosiklik bileşiklerin in silico tasarım çalışmaları*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Pabo, C. O., Sauer, R. T. (1984). Protein-DNA recognition. *Annual Review of Biochemistry*, 53(1), 293-321.
- Palchaudhuri, R., Hergenrother, P. J. (2007). DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(6), 497-503.
- Pan, X., Redding, J. E., Wiley, P. A., Wen, L., McConnell, J. S. and Zhang, B. (2010). Mutagenicity evaluation of metal oxide nanoparticles by the bacterial reverse mutation assay. *Chemosphere*, 79(1), 113-116.
- Panja, A., Matsuo, T., Nagao, S. and Hirota, S. (2011). DNA cleavage by the photocontrolled cooperation of ZnII centers in an azobenzene-linked dizinc complex. *Inorganic Chemistry*, 50(22), 11437-11445.
- Park, H. J., Kim, Y. S., Kim, J. S., Lee, E. J., Yi, Y. J., Hwang, H. J., Suh, M. E., Ryu, C. K. and Lee, S. K. (2004). 6-Arylamino-7-chloro-quinazoline-5, 8-diones as novel cytotoxic and DNA topoisomerase inhibitory agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14(13), 3385-3388.
- Parlak, A. E., Cakmak, H., Sandal, S., Yılmaz, B., Sekerci, M., Karagöz Genc, Z., Tuzcu, M. and Karatepe, M. (2019). Evaluation of antioxidant and antiproliferative activities of 1, 2-bis (p-amino-phenoxy) ethane derivative Schiff bases and metal complexes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 33(2), e22247.
- Pascali, D., Angelica, S., Lugoli, F., De Donno, A. and Fanizzi, F. P. (2011). Mutagenic tests confirm that new acetylacetonate Pt (II) complexes induce apoptosis in cancer cells interacting with nongenomic biological targets. *Metal-Based Drugs*, 1-10.

- Patterson, S. E., Coxon, J. M. and Strekowski, L. (1997). Intercalation of ethidium and analogues with nucleic acids: a molecular orbital study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 5(2), 277-281.
- Pavan, F. R., Poelhsitz, G. V., da Cunha, L. V., Barbosa, M. I., Leite, S. R., Batista, A. A., Cho, H. S., Franzblau, G. S., Camargo, S. M., Resende, A. F., Leite, F. Q. C. and Varanda, E. A. (2013). *In vitro* and *in vivo* activities of ruthenium (II) phosphine/diimine/picolinate complexes (SCAR) against *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, 8(5), e64242.
- Pepe, G., Grossi, M. R., Berni, A., Filippi, S., Shanmugakani, R. K., Papeschi, C., Mosesso, P., Natarajan, A. T. and Palitti, F. (2013). Effect of blueberries (BB) on micronuclei induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) in mammalian cells, assessed *in vitro* and *in vivo* assays. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 758(1-2), 6-11.
- Perez, W. I., Rheingold, A. L. and Melendez, E. (2015). Crystal structure of bis [4-(1H-pyrrol-1-yl) phenyl] ferrocene-1, 1'-dicarboxylate: a potential chemotherapeutic drug. *Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications*, 71(5), 536-539.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A. and D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 8(4), 603.
- Pizarro, A. M., Sadler, P. J. (2009). Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie*, 91(10), 1198-1211.
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 6(10), 789.
- Pommier, Y. (2009). DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chemical Reviews*, 109(7), 2894-2902.
- Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H. and Marchand, C. (2010). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & Biology*, 17(5), 421-433.
- Potmesil, M., Kohn, K. W. (Eds). (1991). *DNA topoisomerase in cancer*. New York: Oxford University Press, 121-132.
- Prakash, A., Adhikari, D. (2011). Application of Schiff bases and their metal complexes-A Review. *International Journal of ChemTech Research*, 3(4), 1891-1896.
- Prasad, N., Sabarwal, A., Yadav, U. C. and Singh, R. P. (2018). Lupeol induces S-phase arrest and mitochondria-mediated apoptosis in cervical cancer cells. *Journal of Biosciences*, 1-13.

- Pravin, N., Utthra, P. P., Kumaravel, G. and Raman, N. (2016). Effective DNA binding and cleaving tendencies of malonic acid coupled transition metal complexes. *Journal of Molecular Structure*, 1123, 162-170.
- Pugliese, A., Martinetto, P. (1978). Biological effects of distamycin A. *Giornale di Batteriologia, Virologia ed Immunologia*, 71(7-12), 198-205.
- Pullman, B. (1989). *Molecular mechanisms of specificity in DNA-antitumour drug interactions*. Cambridge: Academic Press, 18, 1-113.
- Pyle, A. M., Barton, J. K. (1990). Probing nucleic acids with transition metal complexes. *Progress in Inorganic Chemistry: Bioinorganic Chemistry*, 38, 413-475.
- Pyle, A. M., Rehmann, J. P., Meshoyrer, R., Kumar, C. V., Turro, N. J. and Barton, J. K. (1989). Mixed-ligand complexes of ruthenium (II): factors governing binding to DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 111(8), 3051-3058.
- Rajendiran, V., Karthik, R., Palaniandavar, M., Stoeckli-Evans, H., Periasamy, V. S., Akbarsha, M. A., Srinag, B. S. and Krishnamurthy, H. (2007). Mixed-ligand copper (II)-phenolate complexes: effect of coligand on enhanced DNA and protein binding, DNA cleavage, and anticancer activity. *Inorganic Chemistry*, 46(20), 8208-8221.
- Ralph, R. K., Judd, W., Pommier, Y. and Kolin, K.W. (1994). Topics in Molecular and Structural Biology: Molecular Aspects of Anticancer Drug-DNA Interactions. In S. Neidle and M. J. Waring (Eds), *DNA Topoisomerases*. Macmillan, London, Springer Nature, pp. 175-202.
- Raman, N., Selvan, A. (2012). Investigation of DNA binding mechanism, photoinduced cleavage activity, electrochemical properties and biological functions of mixed ligand copper (II) complexes with benzimidazole derivatives: synthesis and spectral characterization. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27(3), 380-389.
- Rambabu, A., Kumar, M. P., Tejaswi, S. and Vamsikrishna, N. (2016). DNA interaction, antimicrobial studies of newly synthesized copper (II) complexes with 2-amino-6-(trifluoromethoxy) benzothiazole Schiff base ligands. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 165, 147-156.
- Rao, J., Xu, D. R., Zheng, F. M., Long, Z. J., Huang, S. S., Wu, X., Zhou, W. H., Huang, R. W. and Liu, Q. (2011). Curcumin reduces expression of Bcl-2, leading to apoptosis in daunorubicin-insensitive CD34+ acute myeloid leukemia cell lines and primary sorted CD34+ acute myeloid leukemia cells. *Journal of Translational Medicine*, 9(1), 71.
- Rauf, S., Gooding, J. J., Akhtar, K., Ghauri, M. A., Rahman, M., Anwar, M. A. and Khalid, A. M. (2005). Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37(2), 205-217.
- Ren, J., Chaires, J. B. (1999). Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands. *Biochemistry*, 38(49), 16067-16075.

- Ridge, G. S., Bailly, C., Graves, D. E. and Waring, M. J. (1994). Daunomycin modifies the sequence-selective recognition of DNA by actinomycin. *Nucleic Acids Research*, 22(24), 5241-5246.
- Righetti, P. G., Gelfi, C. and D'Acunto, M. R. (2002). Recent progress in DNA analysis by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 23(10), 1361-1374.
- Rosenberg, B., Renshaw, E., Vancamp, L., Hartwick, J. and Drobnik, J. (1967). Platinum-induced filamentous growth in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 93(2), 716-721.
- Rosenberg, B., Van Camp, L. and Krigas, T. (1965). Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 205(4972), 698-699.
- Rosenberg, B., Vancamp, L., Trosko, J. E. and Mansour, V. H. (1969). Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*, 222(5191), 385.
- Rosu, T., Pahontu, E., Ilies, D. C., Georgescu, R., Mocanu, M., Leabu, M., Shova, S. and Gulea, A. (2012). Synthesis and characterization of some new complexes of Cu (II), Ni (II) and V (IV) with Schiff base derived from indole-3-carboxaldehyde. Biological activity on prokaryotes and eukaryotes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 380-389.
- Rubner, G., Bensdorf, K., Wellner, A., Bergemann, S., Ott, I. and Gust, R. (2010). [Cyclopentadienyl] metallocarbonyl complexes of acetylsalicylic acid as neo-anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(11), 5157-5163.
- Ruiz, R., García, B., García-Tojal, J., Busto, N., Ibeas, S., Leal, J. M., Martins, C., Gaspar, J., Borrás, J., Gil-García, R. and González-Álvarez, M. (2010). Biological assays and noncovalent interactions of pyridine-2-carbaldehyde thiosemicarbazonecopper (II) drugs with [poly (dA–dT)] 2, [poly (dG–dC)] 2, and calf thymus DNA. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 15(4), 515-532.
- Sahin, M., Korkmaz, H., Kocak, N., Sahin, O., Karakurt, S. and Yilmaz, M. (2017). Synthesis of asymmetrical tridentate Schiff bases and metal complexes and investigation of anticarcinogen effects on human colon and cervical cancers. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 54(5), 288-300.
- Salerno, S., Da Settimo, F., Taliani, S., Simorini, F., La Motta, C., Fornaciari, G. and Marini, A. (2010). Recent advances in the development of dual topoisomerase I and II inhibitors as anticancer drugs. *Current Medicinal Chemistry*, 17(35), 4270-4290.
- Sandhaus, S., Taylor, R., Edwards, T., Huddleston, A., Wooten, Y., Venkatraman, R., Weber, R. T., González-Sarrías A., Martin, P. M., Cagle, P., Tse-Dinh, Y. C., Beebe, S. J., Seeram, N. and Holder, A. A. (2016). A novel copper (II) complex identified as a potent drug against colorectal and breast cancer cells and as a poison inhibitor for human topoisomerase II α . *Inorganic Chemistry Communications*, 64, 45-49.

- Sangeetha, G. K. R., Mathew, B. B., Sudhamani, C. N. and Naik, H. S. B. (2014). Mechanism of DNA binding and cleavage. *Biomedicine*, 2(1), 1-9.
- Santini, C., Pellei, M., Gandin, V., Porchia, M., Tisato, F. and Marzano, C. (2013). Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chemical Reviews*, 114(1), 815-862.
- Satyanarayana, S., Dabrowiak, J. C. and Chaires, J. B. (1993). Tris (phenanthroline) ruthenium (II) enantiomer interactions with DNA: mode and specificity of binding. *Biochemistry*, 32(10), 2573-2584.
- Scheffler, H., You, Y. and Ott, I. (2010). Comparative studies on the cytotoxicity, cellular and nuclear uptake of a series of chloro gold (I) phosphine complexes. *Polyhedron*, 29(1), 66-69.
- Schulz, M. D., Blumenfeld, C., Hetts, S. and Grubbs, R. H. (2017, April). *Materials for drug capture: filtering off-target chemotherapy agents from the bloodstream*. Paper presented at the 253rd American Chemical Society National Meeting & Exposition, San Francisco, CA.
- Seifert, J. L., Connor, R. E., Kushon, S. A., Wang, M. and Armitage, B. A. (1999). Spontaneous assembly of helical cyanine dye aggregates on DNA nanotemplates. *Journal of the American Chemical Society*, 121(13), 2987-2995.
- Sekhon, B. S. (2011). An overview of capillary electrophoresis: pharmaceutical, biopharmaceutical and biotechnology applications. *Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 2(2), 2.
- Seligmann, I. C., Lima, P. D., Cardoso, P. C., Khayat, A. S., Bahia, M. O., Buchi, D. F., Cabral, I. R. and Burbano, R. R. (2003). The anticancer homeopathic composite "Canova Method" is not genotoxic for human lymphocytes *in vitro*. *Genetics and Molecular Research*, 2(2), 223-8.
- Shahabadi, N., Kashanian, S. and Darabi, F. (2009). In vitro study of DNA interaction with a water-soluble dinitrogen Schiff base. *DNA and Cell Biology*, 28(11), 589-596.
- Shahabadi, N., Kashanian, S. and 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.
- Shahabadi, N., Kashanian, S. and Fatahi, A. (2011). Identification of Binding Mode of a Platinum (II) Complex, PtCl₂ (DIP), and Calf Thymus DNA. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 1-5.
- Shahabadi, N., Kashanian, S., Khosravi, M. and Mahdavi, M. (2010). Multispectroscopic DNA interaction studies of a water-soluble nickel (II) complex containing different dinitrogen aromatic ligands. *Transition Metal Chemistry*, 35(6), 699-705.

- Shaikh, S. A., Jayaram, B. (2004). DNA drug interaction. *Supercomputing Facility for Bioinformatics and Computational Biology*, 1-8.
- Sharma, S., Singh, S. K., Chandra, M. and Pandey, D. S. (2005). DNA-binding behavior of ruthenium (II) complexes containing both group 15 donors and 2, 2': 6', 2 ''-terpyridine. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(2), 458-466.
- Shi, S., Liu, J., Li, J., Zheng, K. C., Huang, X. M., Tan, C. P., Chen, L. M. and Ji, L. N. (2006). Synthesis, characterization and DNA-binding of novel chiral complexes Δ - and Λ -[Ru (bpy) $2L$] $2^+(L = o\text{-mopip}$ and $p\text{-mopip}$). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(3), 385-395.
- Shivananjappa, M. M., Joshi, M. K. (2011). Influence of aqueous extract of Arjuna (*Terminalia arjuna*) on growth and antioxidant defense system of human hepatoma cell line (HepG2). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(9), 1711-1721.
- Shukla, G., Tiwari, A. K., Sinha, D., Srivastava, R., Chandra, H. and Mishra, A. K. (2009). Synthesis and assessment of ^{99m}Tc chelate-conjugated alendronate for development of specific radiopharmaceuticals. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 24(2), 209-214.
- Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63(1), 11-30.
- Sigman, D. S. (1986). Nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper ion. *Accounts of Chemical Research*, 19(6): 180-186.
- Silva, C. M., Silva, M. M., Reis, F. S., Ruiz, A. L. T., de Carvalho, J. E., Santos, J. C., Figueiredo, I. M., Alves, R. B., Modolo, L. V. and de Fátima, Â. (2017). Studies on free radical scavenging, cancer cell antiproliferation, and calf thymus DNA interaction of Schiff bases. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 172, 129-138.
- Silverman, R. B., Holladay, M. W. (2014). *The organic chemistry of drug design and drug action* (Third edition). San Diego: Academic Press, 275-333.
- Sinha, D., Tiwari, A. K., Singh, S., Shukla, G., Mishra, P., Chandra, H. and Mishra, A. K. (2008). Synthesis, characterization and biological activity of Schiff base analogues of indole-3-carboxaldehyde. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43(1), 160-165.
- Sirajuddin, M., Ali, S. and Badshah, A. (2013). Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124, 1-19.
- Sitlani, A., Long, E. C., Pyle, A. M. and Barton, J. K. (1992). DNA photocleavage by phenanthrenequinone diimine complexes of rhodium (III): shape-selective recognition and reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 114(7), 2303-2312.

- Skibo, E. B., Xing, C. and Dorr, R. T. (2001). Aziridiny quinone antitumor agents based on indoles and cyclopent [b] indoles: structure– activity relationships for cytotoxicity and antitumor activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(22), 3545-3562.
- Snyder, R. D. (2007). Assessment of atypical DNA intercalating agents in biological and in silico systems. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 623(1-2), 72-82.
- Snyder, R. D., Hendry, L. B. (2005). Toward a greater appreciation of noncovalent chemical/DNA interactions: application of biological and computational approaches. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45(2-3), 100-105.
- Solary, E., Bertrand, R. and Pommier, Y. (1994). Apoptosis induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors in human leukemic HL-60 cells. *Leukemia & Lymphoma*, 15(1-2), 21-32.
- Sriram, D., Yogeewari, P., Thirumurugan, R. and Ratan Bal, T. (2005). Camptothecin and its analogues: a review on their chemotherapeutic potential. *Natural Product Research*, 19(4), 393-412.
- Stoltenburg, R., Reinemann, C. and Strehlitz, B. (2007). SELEX—a (r) evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering*, 24(4), 381-403.
- Strekowski, L., Wilson, B. (2007). Noncovalent interactions with DNA: an overview. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 623(1-2), 3-13.
- Suh, D., Chaires, J. B. (1995). Criteria for the Mode of Binding of DNA Binding Agents. *Biorganic and Medicinal Chemistry*, 3, (6), 723-728.
- Sujith, K. V., Rao, J. N., Shetty, P. and Kalluraya, B. (2009). Regioselective reaction: synthesis and pharmacological study of Mannich bases containing ibuprofen moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(9), 3697-3702.
- Sun, H., Xiang, J., Liu, Y., Li, L., Li, Q., Xu, G. and Tang, Y. (2011). A stabilizing and denaturing dual-effect for natural polyamines interacting with G-quadruplexes depending on concentration. *Biochimie*, 93(8), 1351-1356.
- Sun, J., Wu, S., An, Y., Liu, J., Gao, F., Ji, L. N. and Mao, Z. W. (2008). Synthesis, crystal structure and DNA-binding properties of ruthenium(II) polypyridyl complexes with dicationic 2,20 -dipyridyl derivatives as ligands. *Polyhedron*, 27, 2845-2850.
- Sundararajan, M. L., Jeyakumar, T., Anandakumaran, J. and Selvan, B. K. (2014). Synthesis of metal complexes involving Schiff base ligand with methylenedioxy moiety: Spectral, thermal, XRD and antimicrobial studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 131, 82-93.

- Symonds, E. L., Konczak, I. and Fenech, M. (2013). The Australian fruit Illawarra plum (*Podocarpus elatus* Endl., Podocarpaceae) inhibits telomerase, increases histone deacetylase activity and decreases proliferation of colon cancer cells. *British Journal of Nutrition*, 109(12), 2117-2125.
- Tabassum, S., Afzal, M. and Arjmand, F. (2012). New heterobimetallic CuII–Sn2IV complex as potential topoisomerase I inhibitor: In vitro DNA binding, cleavage and cytotoxicity against human cancer cell lines. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 115, 63-72.
- Tabassum, S., Zaki, M., Afzal, M. and Arjmand, F. (2014). Synthesis and characterization of Cu (II)-based anticancer chemotherapeutic agent targeting topoisomerase I α : In vitro DNA binding, pBR322 cleavage, molecular docking studies and cytotoxicity against human cancer cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 74, 509-523.
- Tabassum, S., Zaki, M., Ahmad, M., Afzal, M., Srivastav, S., Srikrishna, S. and Arjmand, F. (2014). Synthesis and crystal structure determination of copper (II)-complex: *in vitro* DNA and HSA binding, pBR322 plasmid cleavage, cell imaging and cytotoxic studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 83, 141-154.
- Tabatabaee, M., Bordbar, M., Ghassemzadeh, M., Tahriri, M., Tahrir, M., Lighvan, Z. M. and Neumüller, B. (2013). Two new neutral copper (II) complexes with dipicolinic acid and 3-amino-1H-1, 2, 4-triazole formed under different reaction conditions: Synthesis, characterization, molecular structures and DNA-binding studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70, 364-371.
- Tan, J., Wang, B. and Zhu, L. (2009). DNA binding and oxidative DNA damage induced by a quercetin copper (II) complex: potential mechanism of its antitumor properties. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 14(5), 727-739.
- Tang, P., Juang, C. L. and Harbison, G. S. (1990). Intercalation complex of proflavine with DNA: structure and dynamics by solid-state NMR. *Science*, 249(4964), 70-72.
- Tanious, F. A., Nguyen, B., Wilson, W. D., Correia, D. J. J. and Detrich, H. W. (2008). *Methods in Cell Biology*, San Diego: Academic Press, 53.
- Tarantini, A., Lanceleur, R., Mourot, A., Lavault, M. T., Casterou, G., Jarry, G., Hogeveen, K. and Fessard, V. (2015). Toxicity, genotoxicity and proinflammatory effects of amorphous nanosilica in the human intestinal Caco-2 cell line. *Toxicology In Vitro*, 29(2), 398-407.
- Tarushi, A., Polatoglou, E., Kljun, J., Turel, I., Psomas, G. and Kessissoglou, D. P. (2011). Interaction of Zn (II) with quinolone drugs: structure and biological evaluation. *Dalton Transactions*, 40(37), 9461-9473.
- Tekin, T. (2014). *Hidrazon oksim içeren farklı metal komplekslerin sentezlenmesi, karakterizasyonu ve DNA etkileşimlerinin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.

- Tepekozcan, A. (2013). *İndium Tin Oksit ve Bizmut (III) Oksit Nanomateryallerinin Mutajenik Özelliklerinin Ames Test İle Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon, 27-45.
- Tetteh, S., Dodoo, K. D., Appiah-Opong, R. and Tuffour, I. (2014). Spectroscopic Characterization, *In Vitro* Cytotoxicity and Antioxidant Activity of Mixed Ligand Palladium(II) Chloride Complexes Bearing Nucleobases. *Journal of Inorganic Chemistry*, 1-7.
- Thomas, C. J., Rahier, N. J. and Hecht, S. M. (2004). Camptothecin: current perspectives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(7), 1585-1604.
- Thurston, D. E. (2006). *Chemistry and pharmacology of anticancer drugs* (1st edition). London: CRC press, 100-298.
- Tırinoğlu, Ç. (2016). Bortezomib'in Etoposid ve Kamptotesin İle Birlikte Ökaryotik DNA Topoizomeraz Enzimleri Üzerine *In Vitro* İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aksaray.
- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A. M. and Smith, M. T. (1997). Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 388(1), 85-95.
- Tomasz, M. (1995). Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chemistry & Biology*, 2(9), 575-579.
- Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M. and Jemal, A. (2016). Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 25(1), 16-27.
- Tse, W. C., Boger, D. L. (2004). A fluorescent intercalator displacement assay for establishing DNA binding selectivity and affinity. *Accounts of Chemical Research*, 37(1), 61-69.
- Van Dyke, M. W., Van Dyke, N. and Sunavala-Dossabhoy, G. (2007). REPSA: General combinatorial approach for identifying preferred ligand–DNA binding sequences. *Methods*, 42(2), 118-127.
- Van Rijt, S. H., Sadler, P. J. (2009). Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discovery Today*, 14(23-24), 1089-1097.
- Venitt, S., Parry, J. M. (Eds.). (1984). *Mutagenicity testing: a practical approach*, Washington: IRL Press, 102-120.

- Venkatesan, P., Bhutia, S. K., Singh, A. K., Das, S. K., Dash, R., Chaudhury, K., Sarkar, D., Fisher, B. P. and Mandal, M. (2012). AEE788 potentiates celecoxib-induced growth inhibition and apoptosis in human colon cancer cells. *Life Sciences*, 91(15-16), 789-799.
- Venugopala, K. N., Jayashree, B. S. (2008). Microwave-induced synthesis of Schiff bases of aminothiazolyl bromocoumarins as antibacterials. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70(1), 88.
- Vicini, P., Geronikaki, A., Incerti, M., Busonera, B., Poni, G., Cabras, C. A. and La Colla, P. (2003). Synthesis and biological evaluation of benzo [d] isothiazole, benzothiazole and thiazole Schiff bases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11(22), 4785-4789.
- Vidhya, N., Devaraj, S. N. (2011). Induction of apoptosis by eugenol in human breast cancer cells. *Indian Journal of Experimental Biology*, 49, 871-878.
- Villar, R., Encio, I., Migliaccio, M., Gil, M. J. and Martinez-Merino, V. (2004). Synthesis and cytotoxic activity of lipophilic sulphonamide derivatives of the benzo [b] thiophene 1, 1-dioxide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(5), 963-968.
- Volckova, E., Dudones, L. P. and Bose, R. N. (2002). HPLC determination of binding of cisplatin to DNA in the presence of biological thiols: implications of dominant platinum-thiol binding to its anticancer action. *Pharmaceutical Research*, 19(2), 124-131.
- Wahl, M. C., Sundaralingam, M. (1995). New crystal structures of nucleic acids and their complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, 5(3), 282-295.
- Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J. F., Peto, J., Meijer, C. J. L. M. and Muñoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology*, 189(1), 12-19.
- Wang, H. K., Morris-Natschke, S. L. and Lee, K. H. (1997). Recent advances in the discovery and development of topoisomerase inhibitors as antitumor agents. *Medicinal Research Reviews*, 17(4), 367-425.
- Wang, J. C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 3(6), 430.
- Wang, X. L., Chao, H., Li, H., Hong, X. L., Liu, Y. J., Tan, L. F. and Ji, L. N. (2004). DNA interactions of cobalt (III) mixed-polypyridyl complexes containing asymmetric ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98(6), 1143-1150.
- Wang, Y. C., Qian, C., Peng, Z. L., Hou, X. J., Wang, L. L., Chao, H. and Ji, L. N. (2014). Dual topoisomerase I and II poisoning by chiral Ru (II) complexes containing 2-thiophenylimidazo [4, 5-f][1, 10] phenanthroline derivatives. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 130, 15-27.

- Wang, Z., Yang, X., Yang, S., Ren, G., Ferreri, M., Su, Y., Chen, L. and Han, B. (2011). Sodium fluoride suppress proliferation and induce apoptosis through decreased insulin-like growth factor-I expression and oxidative stress in primary cultured mouse osteoblasts. *Archives of Toxicology*, 85(11), 1407-1417.
- Waring, M. J. (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), 269-282.
- Webb, M. R., Ebeler, S. E. (2003). A gel electrophoresis assay for the simultaneous determination of topoisomerase I inhibition and DNA intercalation. *Analytical Biochemistry*, 321(1), 22-30.
- Wei, C., Wang, J. and Zhang, M. (2010). Spectroscopic study on the binding of porphyrins to (G4T4G4) 4 parallel G-quadruplex. *Biophysical Chemistry*, 148(1-3), 51-55.
- Wilson, J. T., Jiang, X., McGill, B. C., Lisic, E. C. and Deweese, J. E. (2016). Examination of the Impact of Copper (II) α -(N)-Heterocyclic Thiosemicarbazone Complexes on DNA Topoisomerase II α . *Chemical Research in Toxicology*, 29(4), 649-658.
- Winick, N. J., McKenna, R. W., Shuster, J. J., Schneider, N. R., Borowitz, M. J., Bowman, W. P., Kamen, B. A. and Buchanan, G. R. (1993). Secondary acute myeloid leukemia in children with acute lymphoblastic leukemia treated with etoposide. *Journal of Clinical Oncology*, 11(2), 209-217.
- Wu, Z., Liu, Q., Liang, X., Yang, X., Wang, N., Wang, X., Sun, H., Lu, Y. and Guo, Z. (2009). Reactivity of platinum-based antitumor drugs towards a Met-and His-rich 20mer peptide corresponding to the N-terminal domain of human copper transporter 1. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 14(8), 1313.
- Xie, W., Ye, Y., Shen, A., Zhou, L., Lou, Z., Wang, X. and Hu, J. (2008). Evaluation of DNA-targeted anti-cancer drugs by Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 47(2), 119-123.
- Xing, C., Skibo, E. B. (2000). Sigmatropic reactions of the aziridinyll semiquinone species. Why aziridinyll benzoquinones are metabolically more stable than aziridinyll indoloquinones. *Biochemistry*, 39(35), 10770-10780.
- Xu, A. H., Hu, Z. M., Qu, J. B., Liu, S. M., Syed, A. K. A., Yuan, H. Q. and Lou, H. X. (2010). Cyclic bisbibenzyls induce growth arrest and apoptosis of human prostate cancer PC3 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(5), 609.
- Xu, Z. H., Zhang, X. W., Zhang, W. Q., Gao, Y. H. and Zeng, Z. Z. (2011). Synthesis, characterization, DNA interaction and antibacterial activities of two tetranuclear cobalt (II) and nickel (II) complexes with salicylaldehyde 2-phenylquinoline-4-carboxylhydrazone. *Inorganic Chemistry Communications*, 14(10), 1569-1573.
- Xue, X., Qu, X. J., Gao, Z. H., Sun, C. C., Liu, H. P., Zhao, C. R., Cheng, Y. N. and Lou, H. X. (2012). Riccardin D, a novel macrocyclic bisbibenzyl, induces apoptosis of human leukemia cells by targeting DNA topoisomerase II. *Investigational New Drugs*, 30(1), 212-222.

- Yan, Y. K., Melchart, M., Habtemariam, A. and Sadler, P. J. (2005). Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes. *Chemical Communications*, (38), 4764-4776.
- Yang, X., Li, W., Prescott, E. D., Burden, S. J. and Wang, J. C. (2000). DNA topoisomerase II β and neural development. *Science*, 287(5450), 131-134.
- Yang, Y., Hong, M., Xu, L., Cui, J., Chang, G., Li, D. and Li, C. Z. (2016). Organotin (IV) complexes derived from Schiff base N'-[(1E)-(2-hydroxy-3-methoxyphenyl)methylidene] pyridine-3-carbohydrazone: Synthesis, in vitro cytotoxicities and DNA/BSA interaction. *Journal of Organometallic Chemistry*, 804, 48-58.
- Yap, K. Y. L., Chan, A., Chui, W. K. and Chen, Y. Z. (2010). Cancer informatics for the clinician: an interaction database for chemotherapy regimens and antiepileptic drugs. *Seizure*, 19(1), 59-67.
- Yeang, C. H., McCormick, F. and Levine, A. (2008). Combinatorial patterns of somatic gene mutations in cancer. *The FASEB Journal*, 22(8), 2605-2622.
- Zeglis, B. M., Divilov, V. and Lewis, J. S. (2011). Role of metalation in the topoisomerase II α inhibition and antiproliferation activity of a series of α -heterocyclic-N4-substituted thiosemicarbazones and their Cu (II) complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(7), 2391-2398.
- Zeman, S. M., Depew, K. M., Danishefsky, S. J. and Crothers, D. M. (1998). Simultaneous determination of helical unwinding angles and intrinsic association constants in ligand-DNA complexes: The interaction between DNA and calichearubicin B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4327-4332.
- Zhang, Q. L., Liu, J. G., Liu, J., Xue, G. Q., Li, H., Liu, J. Z., Zhou, H., Qu, L. H. and Ji, L. N. (2001). DNA-binding and photocleavage studies of cobalt (III) mixed-polypyridyl complexes containing 2-(2-chloro-5-nitrophenyl) imidazo [4, 5-f][1, 10] phenanthroline. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 85(4), 291-296.
- Zhang, Y., Wang, X., Fang, W., Cai, X., Chu, F., Liao, X. and Lu, J. (2013). Synthesis and in vitro antitumor activity of two mixed-ligand oxovanadium (IV) complexes of Schiff base and phenanthroline. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 1-14.
- Zunino, F., Capranico, G. (1990). DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines. *Anticancer Drug Design*, 5(4), 307-317.
- Zunino, F., Pratesi, G. (2004). Camptothecins in clinical development. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 13(3), 269-284.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : YILMAZ, Zehra Kübra
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 16.06.1992, Kırıkkale
 Medeni hali : Bekâr
 e-mail : kubrayilmaz395@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birim	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji	2014
Lise	Anıttepe Lisesi	2010

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
-	-	-

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Kaya, B., Yılmaz, Z. K., Şahin, O., Aslim, B., Tükenmez, Ü. and Ülküseven, B. (2019). Structural analysis and biological functionalities of iron (III)–and manganese (III)–thiosemicarbazone complexes: in vitro anti-proliferative activity on human cancer cells, DNA binding and cleavage studies. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 24(3), 365-376.
2. Yılmaz, Z. K., Aslim, B., Ozdemir, O. (2017, October 19-21). *New synthesis of asymmetric diimine Schiff base for the development of DNA targeted anticancer drug*, 5th International BAU-Drug Design, İstanbul.
3. Yılmaz, Z. K., Aslim, B., Ozdemir, O. (2018, April 26-27). *Asymmetric diimine Schiff base as potential chemotherapeutic drug: antiproliferative activity and micronucleus formation in human cancer cell lines*, International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, Ankara.

4. Yilmaz, Z. K., Aslim, B., Ozdemir, O. (2018, April 26-27). *Effect of the Schiff base artificial nucleases on the DNA cleavage activity in presence of activators and reactive oxygen species (ROS) for molecular target DNA*, International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, Ankara.

Dereceler

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi İkinciliği (2010-2014).

Hobiler

Yüzme, seyahat, kitap okumak, müzik dinlemek.



GAZİ GELECEKTİR..