İki Çekirdekli Bakır - Hidrazon Kompleksinin Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması

Merve Özcan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak 2023

The Investigation of Cytotoxic Effects of Dinuclear Copper - Hydrazone Complex

Merve Özcan

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

January 2023

İki Çekirdekli Bakır - Hidrazon Kompleksinin Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması

Merve Özcan

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. A. Pınar Öztopcu Vatan

Ocak 2023

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. A. Pınar Öztopcu Vatan danışmanlığında hazırlamış olduğum "İki Çekirdekli Bakır - Hidrazon Kompleksinin Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik, ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi, tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 19.01.2023

Merve Özcan

İmza

ÖZET

Bu tez çalışmasında iki çekirdekli Bakır - Hidrazon Kompleksinin 0,01; 0,1; 1; 10 ve 20 µM dozlarının sitotoksik etkileri insan akciğer kanseri (A549 ve H460) hücreleri, sağlıklı insan hücresi üzerindeki sitotoksik etkileri ise insan akciğer bronşiyal epitelyal hücresi (BEAS-2B) üzerinde konsantrasyona ve zamana bağlı olarak (MTT) testi kullanılarak araştırıldı. Ayrıca iki çekirdekli Bakır - Hidrazon Kompleksinin Vero hücresi kültüründe çoğaltılan *Poliovirüs Tip 1* üzerindeki antiviral etki sitopatik etki önleme testi; *Bacillus subtilis, Enterococcus hirae, Staphylococcus aureus, Escherichia coli ve Pseudomonas aeruginosa* bakterileri üzerindeki antibakteriyel etkisi Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Testi ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) testleri kullanılarak araştırıldı.

Bakır - Hidrazon Kompleksinin A549 hücresinde 24 ve 48 saatlik IC_{50} değerleri sırasıyla 4 ve 2 µM; H460 hücresi için ise sırasıyla 8 ve 5 µM olarak hesaplandı. BEAS-2B hücrelerinde ise IC_{50} değerleri 24 ve 48 saat için 11 ve 7 µM olarak hesaplandı. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılanan 0,01; 0,1; 1; 10 ve 20 µM karboplatin dozlarının ise hem 24 hem de 48 saatlik uygulamalarda her iki hücre dizisi üzerinde de çok düşük bir toksisiteye sahip olduğu belirlendi ve IC_{50} değeri hesaplanamadı.

Sonuç olarak insan akciğer kanseri hücre dizilerinde ilk kez denenen Bakır - Hidrazon Kompleksinin özellikle 1 µM dozundan itibaren doz artışına bağlı olarak hem A549 hem de H460 hücrelerinde hücre çoğalmasını baskıladığı belirlendi. Bu etkinin doza bağlı olarak arttığı fakat zamana bağlı olarak değişmediği gözlendi. Ayrıca denenen konsantrasyonlardaki iki çekirdekli Bakır - Hidrazon Kompleksinin *Poliovirüs Tip 1* üzerinde herhangi bir antiviral etkinliği belirlenemedi. Antibakteriyel etkinlik deneyleri sonucunda ise bileşiğin *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde antibakteriyel etkinliği olmadığı belirlendi. MİK ve MBK değerleri ise sırasıyla *Bacillus subtilis* için 31,25- 62,5; *Enterococcus hirae* için 62,5- 250 ve *Staphylococcus aureus* için 62,5- 500 µM olarak hesaplanmıştır.

Anahtar kelimeler: Bakır - Hidrazon Kompleksi, akciğer kanseri, sitotoksisite, antiviral, antibakteriyel.

SUMMARY

In this study, the cytotoxic effects of the binuclear Copper - Hydrazone Complex on human lung cancer cell lines (A549 and H460) and healthy human cells on human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B) were investigated by using (MTT) assay depending on concentration (0.01; 0.1; 1; 10 and 20 μM) and time depend manner. In addition, the antiviral effect of the binuclear Copper - Hydrazone Complex on *Poliovirus Type 1* grown in Vero cell culture, antibacterial effect on *Bacillus subtilis, Enterococcus hirae, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria was determined using Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBK) tests.

The IC_{50} values of the Copper - Hydrazone Complex in cell A549 at 24 and 48 hours were 4 and 2 μM, respectively; for the H460 cell, they were calculated as 8 and 5 μM, respectively. IC_{50} values in BEAS-2B cells were calculated as 11 and 7 μM for 24 and 48 hours. It was determined that 0.01; 0.1; 1; 10 and 20 μM carboplatin doses used as positive control in the study had very low toxicity on both cell lines in both 24 hour and 48 hour applications, and the IC_{50} value could not be calculated.

As a result, it was determined that the Copper - Hydrazone Complex, which was tested for the first time in human lung cancer cell lines, suppressed cell proliferation in both A549 and H460 cells, depending on the dose increase, especially from the 1 μM dose. It was observed that this effect increased depending on the dose, but did not change depending on the time. In addition, any antiviral activity of the binuclear Copper - Hydrazone Complex on *Poliovirus Type 1* at the concentrations mentioned could not be determined. As a result of antibacterial activity experiments, it was determined that the compound did not have antibacterial activity on *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa.* MIC and MBK values, respectively, were 31.25-62.5 for *Bacillus subtilis*; 62.5- 250 μM for *Enterococcus hirae* and 62.5- 500 μM for *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Copper - Hydrazone Complex, lung cancer, cytotoxicity, antiviral, antibacterial.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET vi
SUMMARY vii
TEŞEKKÜR viii
İÇİNDEKİLER ix
ŞEKİLLER DİZİNİ xi
ÇİZELGELER DİZİNİ xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI 3
2.1. Kanser 3
2.2. Akciğer Kanseri 5
2.2.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri 6
2.2.2. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri 7
2.2.2.1. Skuamöz hücreli karsinom 8
2.2.2.2. Adenokarsinom 8
2.2.2.3. Büyük hücreli karsinom 9
2.3. Bakır - Hidrazon Kompleksi 10
2.4. Karboplatin 10
3. MATERYAL VE YÖNTEM 13
3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları 13
3.1.1. Hücre Sayımı ve Hücre Ekimi 13
3.1.2. Bakır - Hidrazon Kompleksi ve karboplatin dozlarının hazırlanması 14
3.1.3. Bakır - Hidrazon Kompleksi ve karboplatinin akciğer kanseri ve sağlıklı hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi 16
3.2. Antiviral Aktivite Tayini 17
3.2.1. Hücre Sayımı ve Hücre Ekimi 19
3.2.2. Antiviral Sitotoksisite Analizi 19
3.2.3. Antiviral Test Aşaması 20
3.3. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Testi 22

İÇİNDEKİLER (devam)

3.4. Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu (MBK) ……23
4. BULGULAR VE TARTIŞMA ……..…24
4.1. Bakır - Hidrazon Komplesinin Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında Oluşturduğu Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi …….….24
4.2. Bakır - Hidrazon Komplesinin BEAS-2B Hücre Hattında Oluşturduğu Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi ……..…..…31
4.3. Karboplatinin Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında Oluşturduğu Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi ……....34
4.4. Bakır - Hidrazon Komplesinin Antiviral Etkinliğinin Araştırılması ……...37
4.5. Antiviral Test Sonuçları ……...39
4.6. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Testi ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) Testi Sonuçları …….……..41
5. SONUÇ VE ÖNERİLER …….……...…..45
KAYNAKLAR DİZİNİ ……49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

2.1. 2020 yılına ait dünya çapındaki her yaşta ve her iki cinsiyette görülen yeni vaka sayısı 3

2.2. Dünya çapındaki 2020 yılına ait her yaşta ve her iki cinsiyette görülen kansere bağlı ölüm sayısı 4

2.3. Türkiyede 2020 yılına ait her yaşta ve her iki cinsiyette görülen yeni vaka sayısı 4

2.4. Türkiyede 2020 yılına ait her yaşta ve her iki cinsiyette görülen kansere bağlı ölüm sayısı 4

2.5. Küçük hücreli akciğer karsinomu örneği 7

2.6. Skuamöz hücreli karsinom örneği 8

2.7. Akciğer adenokarsinomu histolojik alt tipleri (hematoksilen ve eozin boyası x40) (a) lepidik; (b) papiller; (c) asiner; (d) katı; (e) mikropapiller; (f) müsinöz 9

2.8. Büyük hücreli karsinom örneği 9

2.9. Platin bazlı atikanser ilaçların kimyasal yapıları (A: Sisplatin, B: Karboplatin C: Oksaliplatin) 11

2.10. Karboplatin ve DNA arasındaki eklentilerin oluşumu 12

3.1. Bakır - Hidrazon Kompleksinin halkasal yapısı 14

3.2. MTT'nin formazana dönüşümü 16

3.3. Zarfsız virüsün (A) ve zarflı virüsün (B) yapısı 18

3.4. Poliovirüsün yapısı 18

4.1. Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonlarının 24 saat süreyle A549 hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi 24

4.2. Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonlarının 48 saat süreyle A549 hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi 25

4.3. Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonlarının 24 saat süreyle H460 hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi 26

4.4. Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonlarının 48 saat süreyle H460 hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi 26

4.5. Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonlarının 24 saat süreyle BEAS-2B hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi 31

4.6. Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonlarının 48 saat süreyle BEAS-2B hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi 32

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.7. Karboplatin dozlarının 24 saat süreyle A549 hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi 34

4.8. Karboplatin dozlarının 48 saat süreyle A549 hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi 35

4.9. Karboplatin dozlarının 24 saat süreyle H460 hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi 35

4.10. Karboplatin dozlarının 48 saat süreyle H460 hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi 36

4.11. Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonlarının 24 saat süreyle Vero hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi 38

4.12. Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonlarının 48 saat süreyle Vero hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi 38

4.13. Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonlarının Vero hücre hattına ve Poliovirüse karşı inhibisyon etkisi 39

4.14. Gram pozitif (A) ve gram negatif (B) bakterilerin hücre duvar yapıları 41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

2.1. Akciğer kanseri risk faktörleri 6
3.1. Deneyde uygulanan Bakır - Hidrazon Kompleksi dozları 15
3.2. Deneylerde uygulanan karboplatin dozları 15
3.3. Sitotoksisite testinde uygulanan Bakır - Hidrazon Kompleksinin konsantrasyonları 20
3.4. Antiviral testte kullanılan 96 kuyucuklu kültür kabı planı 21
3.5. Antiviral testte uygulanan Bakır - Hidrazon Kompleksi konsantrasyonları 22
3.6. MİK testinde kullanılan 96 kuyucuklu kültür kabı planı 23
3.7. Bakır - Hidrazon Kompleksinin MİK ve MBK değerleri 42
3.8. Bileşik 1, 2 ve 3'ün MİK ve MBK değerleri 43

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	**Açıklamalar**
%	Yüzde
˚C	Celcius degree (Santigrat derece)
µL	mikrolitre (10^{-6} litre)
µm	mikrometre (10^{-6} metre)
µM	mikromolar (10^{-6} molar)
cm^2	santimetrekare
dk	dakika
L	litre
mg	miligram
mL	mililitre (10^{-3} litre)
mM	milimolar (10^{-3} molar)
nm	nanometre
rpm	rounds per minute (dakikadaki devir sayısı)

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
A549	İnsan akciğer karsinomu hücre dizisi
ABD	Amerika birleşik devletleri
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
ATCC	Amerikan kültür koleksiyonu
BT	Bilgisayarlı tomografi
CFU	Colony forming unit
DMEM	Dulbecco’s modified eagle’s medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DKID50	% 50 doku kültürü bulaşıcı dozu
FBS	Fetal dana serumu
H460	İnsan büyük hücreli akciğer karsinomu

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

HeLa	İnsan serviks karsinom hücre dizisi
HBSS	Hank’s Balance Salt Solution (Hank'ın dengelenmiş tuz solüsyonu)
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IC_{50}	Hücrelerin % 50’sini öldüren konsantrasyon/doz
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
MBK	Minimum bakterisidal konsantrasyon
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
M.Ö	Milattan önce
MTT	3-(4,5-Dimetiltriazol-2-il)-2,5 difeniltetrazoliumbromid
MTS	3-(4, 5-dimetiltiyazol-2-il)-5-(3karboksimetoksifenil)-2-(4-sülffenil)-2H-tetrazolyum
MCF7	İnsan meme karsinom hücre dizisi
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
PBS	Fosfat buffer saline (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi)
RNA	Ribonükleik asit
SPSS	Statistics program for social and science
TSA	Triptik soy agar
TSB	Triptik soy broth
TTF1	Tiroid transkripsiyon faktörü 1

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser; hücrelerin farklı faktörler ile genetik değişikliğe uğraması ve bunun sonucunda hücrelerin bölünme kontrollerini kaybetmeleri olarak tanımlanabilir. Tarihsel olarak araştırıldığında kanser hastalığının ortaya çıkışı ile ilgili kayıtlara çok eski dönemlerde rastlanmaktadır. Hastalık ile ilgili ilk kayıtlar yaklaşık M.Ö 3000'li yıllarda Mısır'daki papirüslerde bulunmuştur (Baykara, 2016). Tarihçesi oldukça eski olan bu hastalıkla ilgili yüzyıllardır farklı çalışmalar yapılmakta ve tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Özellikle DNA'nın yapısının 1953 yıllında Watson ve Crick tarafından belirlenmesi sayesinde hastalığın oluşması ve mekanizması hakkında pek çok bilgi edinilmesine rağmen, günümüzde hala pek çok kanser türünün tedavi edilmesinde başarılı sonuçlar elde edilememiştir.

Kansere bağlı ölümlerde akciğer kanseri ilk sırada yer almaktadır. Küçük hücreli ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere iki çeşidi bulunan akciğer kanserinde, Amerika'daki KHDAK vakaları için beş yıllık sağ kalım oranının yaklaşık % 20 olduğu belirtilmiştir (van der Hoorn vd., 2021). Bunun en önemli sebepleri hastalığın genellikle geç evrede teşhis edilmesi ve bu duruma bağlı olarak halen tedavisinde en etkili yöntem olan cerrahi müdahale için geç kalınmış olmasıdır.

Akciğer kanserinin tedavisinde kullanılan yöntemler hastalığın hangi evrede olduğuna ve kanserin tipine göre farklılık göstermektedir. Günümüzde kullanılan tedavi yöntemleri; cerrahi müdahale, radyasyon tedavisi, immüoterapi, hedefe yönelik tedaviler ve yüksek dozda uygulanan kemoterapötik ajanlar (sisplatin, etoposid ve paklitaksel gibi) olarak belirtilmektedir. Ancak kemoterapötik ajanların tekli veya kombine kullanımları bulantı, nörotoksisite, anemi, nefrotoksisite gibi ciddi yan etkiler oluşturduğu rapor edilmektedir. Ayrıca bu ajanların çoklu ilaç direnci geliştirmeleri, zayıf seçicilik göstermeleri ve sitotoksik olmaları nedeniyle tedavi başırısı sınırlıdır (Abdulbaqi vd., 2021). Bu nedenle birçok bilim insanının tedavisi üzerine yoğunlaştığı hastalıkta, kanserli hücrelerin çoğalmasını engelleyen farklı etken maddelerin arayışı halen sürmektedir.

Virüsler günümüzde hala tehlikeli hastalıklara yol açabilecek kapasiteye sahiptir. Özellikle son iki senedir yaşadığımız Covid Pandemisi tüm dünyada istenmeyen pek çok ölüme yol açarken, pek çok ülkenin de sağlık alt yapısında aksamalara, hatta durma noktasına gelmesine yol açmıştır. Zaman içerisinde farklı virütik hastalıklar için ilaç ya da aşılar geliştirilse bile dünyanın çeşitli yerlerinde, değişik virüslerin neden olabileceği hastalıklar ortaya çıkabilmektedir. Çocuk felci, Poliovirüsün neden olduğu ve genellikle 5 yaş altı çocuklarda görülen tehlikeli bir hastalıktır. Bugün aşısı bulunan ve pek çok ülkede artık görülmeyen bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Dünyada sadece Pakistan ve Afganistan'da bulunan bu hastalık, 2022 yılı içerisinde Afrika kıtasında tekrar görülmeye başlamıştır. Bu durumun Afrika kıtasındaki sağlık hizmetlerinin, sağlık personelinin ve ilaçların yetersiz oluşundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bazı Güney Afrika ülkelerinde çocuklara çocuk felci aşısı yapmak için kampanya başlatıldığı bildirilmiştir. Ayrıca ülkemizde çocuk felci hastalığı tamamen ortadan kaldırılmış olmasına rağmen, son dönemde var olan savaşlar nedeniyle ülkemize gelen sığınmacılar tarafından taşındığı ve hastalığın rapor edildiği bildirilmiştir. Poliovirüsün 3 farklı tipi olup tip 2 ve 3 günümüzde ortadan kalkmıştır (Gwinji vd., 2022).

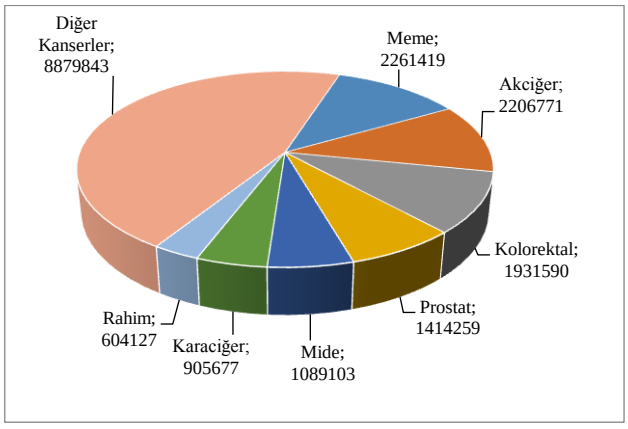
Çalışmada, yeni sentelenmiş olan Bakır - Hidrazon Kompleksinin ($C_{30}H_{26}Cl_6Cu_2N_4O_{14}$) iki farklı akciğer kanseri hücre dizisi (A549 ve H460) üzerindeki sitotoksik etkileri konsantrasyona ve zamana bağlı olarak araştırıldı. Ayrıca Bakır - Hidrazon kompleksinin antiviral etkinliği *Poliovirüs Tip 1* üzerinde Antiviral Sitotokisite Analizi ile araştırıldı. Ayrıca, Bakır - Hidrazon Kompleksinin iki gram negatif (*Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*), üç gram pozitif bakteri suşu (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus hirae* ve *Staphylococcus aureus*) üzerinde ki antibakterial etkisi, Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Testi ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) Testi ile araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

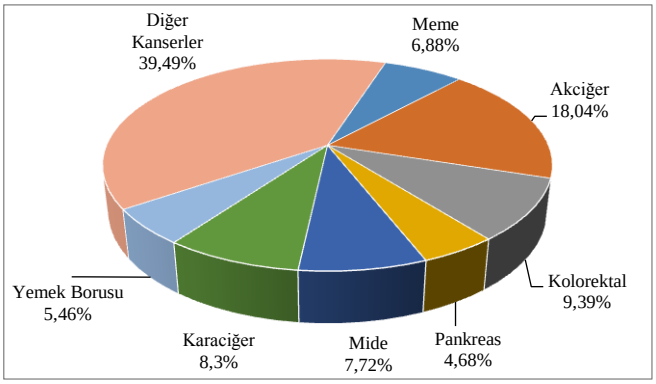
2.1. Kanser

Kanser, çeşitli etkenler nedeniyle genlerde oluşan değişiklikler sonucu hücrelerin kontrolsüz şekilde büyümesi, çoğalması ve çevresindeki diğer dokuları istila etmesi ile tanımlanan süreçleri içeren bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca kanser geliştiğinde geliştiği yere bağlı olarak tek bir hastalık değil birbiriyle ilişkili hastalıklar grubu olarak da tanımlanabilir (Arayıcı vd., 2021). Kansere neden olan pek çok bedensel, çevresel ve biyolojik etkenler bulunmaktadır.

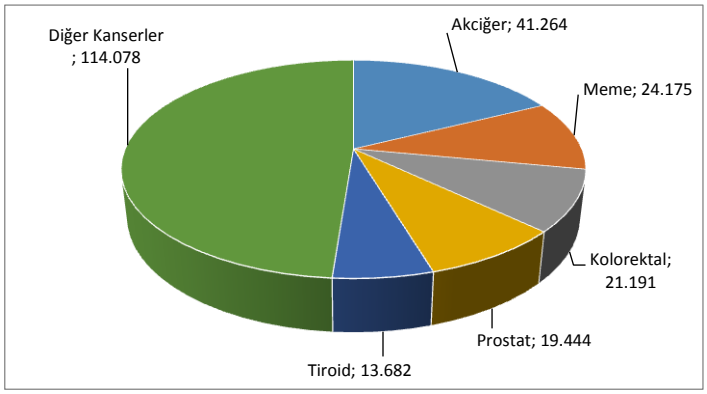
Dünyada kanser hastalığı hakkındaki istatistiksel verilere bakıldığında; her 5 kişiden biri kanser hastalığına yakalanmakta, her 8 erkekten biri ve her 11 kadından biri kanser sebebiyle ölmektedir. Dünyada her iki cinsiyeti de kapsayan ve en sık görülen kanser türleri; meme kanseri, akciğer kanseri, kolorektal kanser ve prostat kanseriyken, en fazla ölüm akciğer kanserinde meydana gelmektedir. (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2). Ülkemizde ise her iki cinsiyeti de kapsayan en yaygın görülen kanser türleri akciğer, meme, kolorektal ve prostat kanserleridir (Şekil 2.3) (Özdoğan, 2021). Ülkemizde kansere bağlı ölümler ise en fazla akciğer kanserinden kaynaklanmaktadır. (Şekil 2.4)



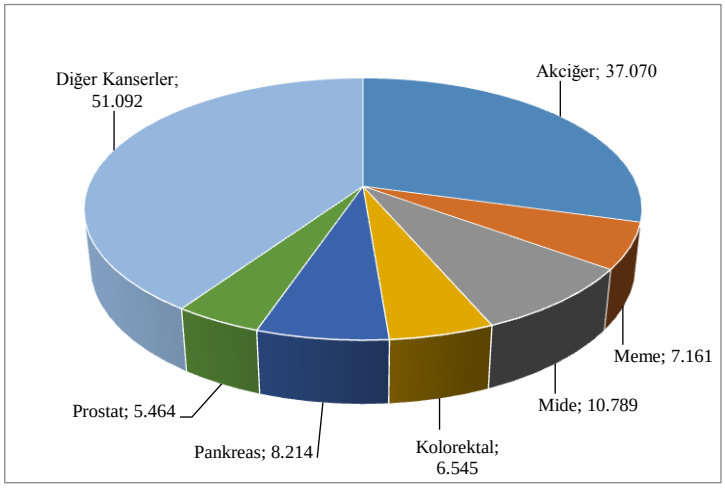
Şekil 2.1. 2020 Yılına Ait Dünya Çapındaki Her Yaşta ve Her İki Cinsiyette Görülen Yeni Vaka Sayısı (Özdoğan, 2021).



Şekil 2.2**.** Dünya Çapındaki 2020 Yılına Ait Her Yaşta ve Her İki Cinsiyette Görülen Kansere Bağlı Ölüm Sayısı (Özdoğan, 2021).



Şekil 2.3. Türkiye'de 2020 Yılına Ait Her Yaşta ve Her İki Cinsiyette Görülen Yeni Vaka Sayısı (Özdoğan, 2021).



Şekil 2.4**.** Türkiye'de 2020 Yılına Ait Her Yaşta ve Her İki Cinsiyette Görülen Kansere Bağlı Ölüm Sayısı (Özdoğan, 2021).

Hastalığın erken teşhisi, akciğer kanserinde kaynaklanan ölümleri azaltmak için oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalara göre akciğer kanseri riski taşıyan kişilerin düşük doz sarmal bilgisayarlı tomografi (BT) ile taramalarının yapılması ölüm oranının % 20 oranında azalmasını sağlamıştır (The National Lung Screening Trial Research Team, 2011). Bununla birlikte, hastaların yarısından fazlası maalesef ileri evrelerde akciğer kanseri tanısı almaktadır (Guo vd., 2021).

2.2 Akciğer Kanseri

Kansere bağlı ölümlerde akciğer kanseri dünyada ikinci, Türkiye'de ise birinci sırada yer almaktadır. Küçük hücreli ve küçük hücreli dışı (KHDAK) olmak üzere iki çeşidi bulunan akciğer kanserinin, Amerika'daki KHDAK vakaları için beş yıllık sağ kalım oranının yaklaşık % 20 olduğu belirtilmiştir. Bunun en önemli sebepleri hastalığın genellikle geç evrede teşhis edilmesi ve tedavisinde kullanılan yöntemlerin tam olarak etkin olmamasıdır (van der Hoorn vd., 2021).

Son dönemler de akciğer kanseri vakalarındaki artışın aksine, akciğer kanseri hastalarının genel sağ kalım oranında değişim gözlemlenmemiştir. Bunun en önemli sebebi başarılı tedavi yöntemlerinin hala tam olarak geliştirilememiş olmasındandır. Akciğer kanserinin moleküler mekanizmalarını anlamada pek çok gelişme yaşanmasına ve tedavide yeni terapötik ajanların belirlenmesine ve kullanılmasına rağmen, 5 yıllık sağkalım oranının oldukça az olduğu tespit edilmiştir (Gomez-Larrauri vd., 2021). Elde edilen veriler, kişisel yanıt ve yan etki riskine karşı daha kesin belirteçlerin (radyo-duyarlılık için moleküler biyobelirteçler, radyomikler, immün konak belirteçleri gibi daha eksiksiz görüntüleme analizi) ve kişiselleştirilmiş terapötik yaklaşımların geliştirilmesine gerek duyulduğunu göstermektedir (Śliwińska-Mossoń vd., 2020).

Akciğer kanserinin kemoterapi ve hedefe yönelik tedaviler dahil olmak üzere uygun şekilde tedavi edilebilmesi için kanser hücresi tiplerinin doğru şekilde sınıflandırılması çok önemli bir süreçtir (Coudray vd., 2018). Akciğer kanseri vakalarının % 85 i uzun süre tütün kullanımından kaynaklanırken hastaların % 10-15'i ise hiç sigara kullanmamıştır.

Buna rağmen sigara içmeyenlerin kansere yakalanmasına radon gazı, asbest, hava kirliliği, sigara dumanına maruz kalma (pasif içicilik) gibi risk faktörleri neden olmaktadır (Çizelge 2.1) Genetik faktörler ise akciğer kanseri hastalığının ortaya çıkmasını % 8 oranında etkilemektedir (Zhu vd., 2017).

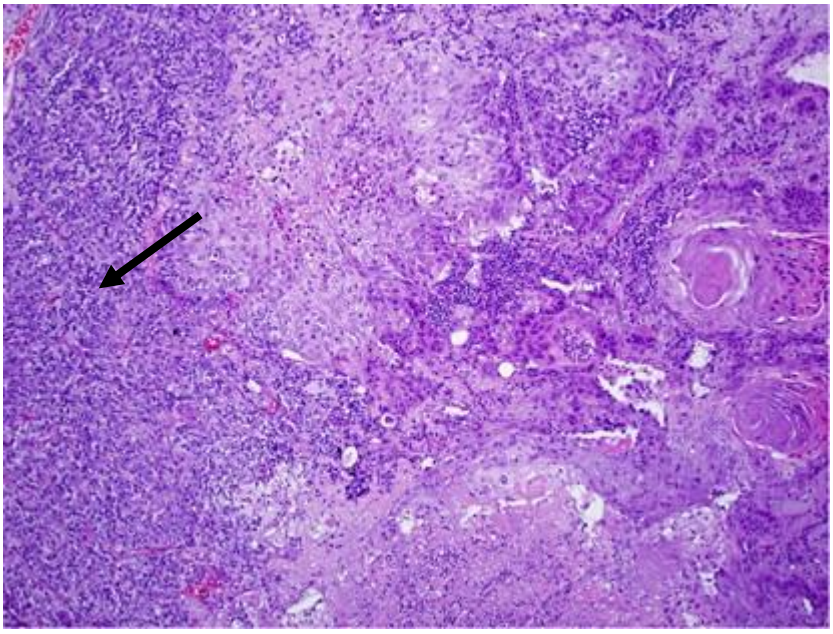
Çizelge 2.1. Akciğer Kanseri Risk Faktörleri (Schabath ve Cote, 2019).

Risk Faktörü	**Risk Büyüklüğü**
Tütün içmek	Hiç sigara içmeyenlere kıyasla 20 kat fazla risk
Pasif içicilik	Hiç sigara içmeyenlere kıyasla % 25 ila % 28 kat fazla risk
Diğer Tütün Kullanımı (nargile, puro, pipo)	1,9 ila 4,6 kat fala risk
Radon	% 14 ila % 29 fazla risk
Asbest	% 12 ila % 24 fazla risk
KOAH, amfizem veya kronik bronşit öyküsü	2 ila 3 kat fazla risk
Astım öyküsü	% 28 ila % 44 fazla risk
Pnömoni öyküsü	% 30 ila % 57 fazla risk
Tüberküloz öyküsü	% 48 ila % 76 fazla risk
HIV	2 kat fazla risk

Akciğer kanseri histolojik olarak incelendiğinde iki kategoriye ayrılmaktadır. Bunlar, akciğer kanseri vakalarının % 15'ini oluşturan küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve % 85'ini oluşturan küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) dir (Schabath ve Cote, 2019).

2.2.1 Küçük hücreli akciğer kanseri

Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) çoğunlukla sigara kullanan veya kullanmış kişilerde tanımlanan ve kötü bir seyri olan hastalıktır. Hastalar öksürük ve nefes alamama şikâyetleriyle hastaneye başvururlar ve genellikle bu aşamada kanser metastas yapmış durumdadır. KHAK özellikle akciğerin farklı bölgelerine, lenf düğümlerine, karaciğere, beyne, kemiğe veya adrenal bezlere metastas yaparak yayılmaktadır (Rudin vd., 2021). Küçük hücreli akciğer kanseri hücrelerinin hematoksilen eozin ile boyandıktan sonraki görüntüsü ok (←) ile Şekil 2.5.'da gösterilmektedir.



Şekil 2.5. Küçük hücreli akciğer karsinomu ok (←) ile gösterilmiştir (Travis, 2012).

KHAK hastalığına yakalanan kadınların sayısı son 50 yılda tüm dünyada artış göstermektedir. Bu artışın özellikle kadınlarda sigara kullanımının artmasının bir sonucu gözlendiği belirtilmektedir. ABD' de ise son 30 yılda sigara içme miktarının azalmasına bağlı olarak, yeni KHAK vakalarında da azalma gözlemlenmiştir (Rudin vd., 2021).

2.2.2 Küçük hücreli dışı akciğer kanseri

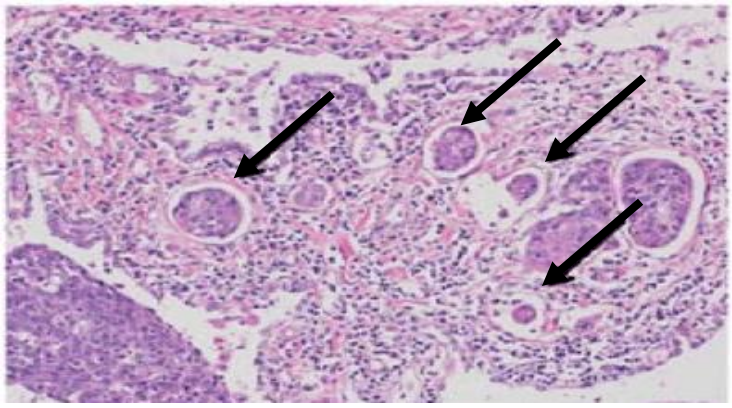
Akciğer kanserlerinin % 85'ini oluşturan Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri **(**KHDAK) hastaları için 5 yıllık sağ kalım oranı günümüzde % 15'ten azdır. KHDAK tanısı konulan hastalarda 2 yıl içinde % 80'e yakınında metastaz gerçekleştiği belirlenmiştir.

KHADAK tedavisinde öncelikli olarak cerrahi, kemoterapi, veya radyasyon gibi tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Daha sonrasında ise hedefe yönelik belirlenen yeni tedavi yöntemleri ile tedaviye devam edilmektedir. Bu yeni tedaviler, tasarlanmış sitotoksik kimerik antijen reseptörü-bağışıklık T hücreleri, KHADAK tümörlerini harekete geçiren onkogenlere karşı küçük molekül inhibitörleri, bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri ve onkolitik virüslerdir (Martin-Fernandez, 2022).

KHADAK kendi içerisinde üç farklı gruba ayrılmaktadır.

2.2.2.1.Skuamöz hücreli karsinom

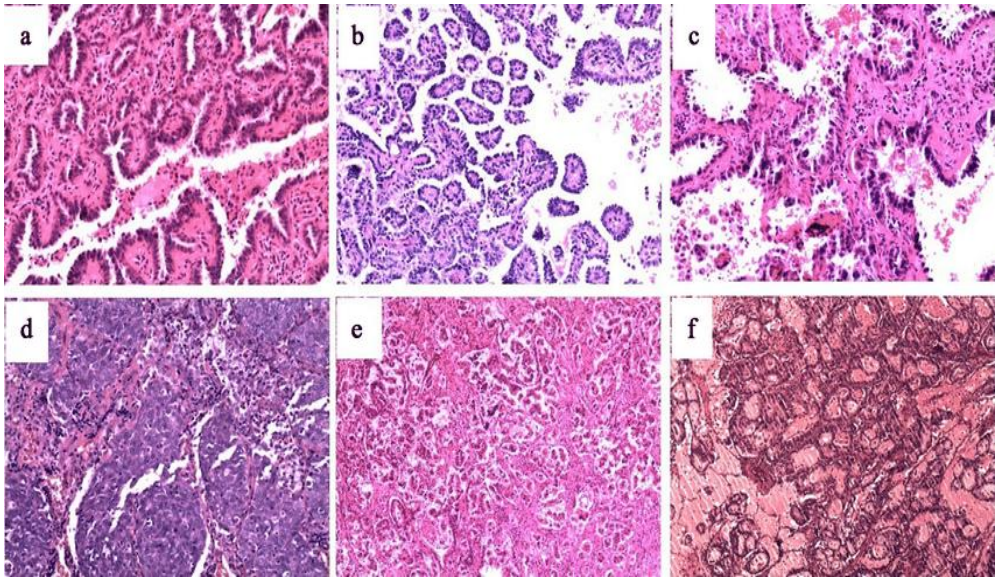
Erkeklerde en çok tanı alan akciğer kanseri çeşididir. Genellikle bronş epitelinde tespit edilir ve sigara kullanımı ile yakın ilişkili bir karsinom olarak tanımlanmaktadır (Aydın, 2021). Histolojik olarak skuamöz hücreli karsinom örneği ok (←) ile Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Skuamöz Hücreli Karsinom ok (←) ile gösterilmektedir (Masuda vd., 2017).

2.2.2.2.Adenokasinom

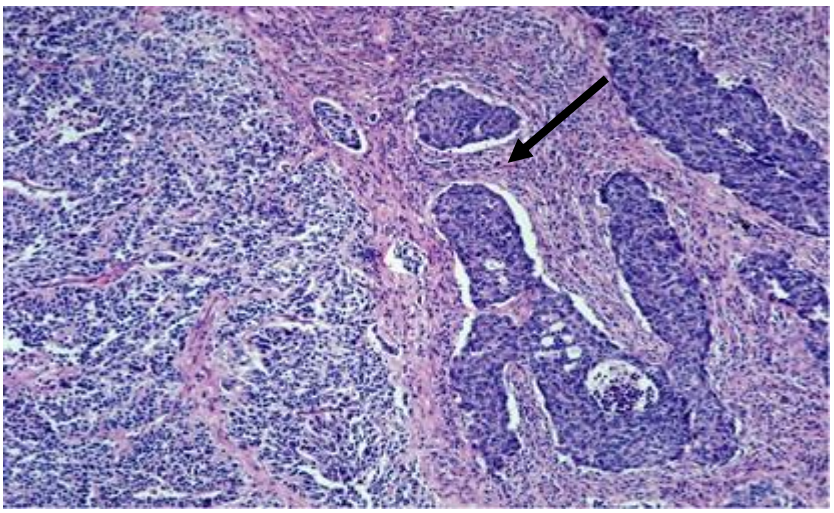
Akciğer kanseri tanılarının % 40'ını ve KHDAK' nin ise yaklaşık % 60'ını oluşturan adenokarsinom en yaygın akciğer kanseri türüdür (Aydın, 2021). Adenokarsinomu tanımlamada kullanılan morfolojik özellikler, tübül veya papilla oluşumu ile müsin salgılamasıdır (Myers, 2018). Şekil 2.7'de histolojik alt tiplemesi gösterilmektedir. Adenokarsinom ve Skuamöz Hücreli Karsinomu tanımlamada hematoksilen eozin boyamanın yeterli olmadığı durumlarda ise TTF1 ve p63/p40 primer antikorları kullanılarak immünhistokimyasal boyama gerçekleştirilmektedir (Öz, 2020).



Şekil 2.7. Akciğer adenokarsinomu histolojik alt tipleri (hematoksilen ve eozin boyası x40) (a) lepidik; (b) papiller; (c) asiner; (d) katı; (e) mikropapiller; (f) müsinöz (Lu vd., 2015).

2.2.2.3.Büyük hücreli karsinom

Diğer KHADK çeşitlerine göre daha agresif olduğu düşünülmektedir. Akciğer kanserlerinin küçük bir kısmını oluşturmaktadır (% 3). Sigara kullanımı ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Sholl, 2014). Büyük hücreli karsinom hücrelerinin hematoksilen eozin ile boyandıktan sonraki görüntüsü Şekil 2.8'de ok (←) ile gösterilmektedir.



Şekil 2.8. Büyük hücreli karsinom ok (←) ile gösterilmektedir (Travis, 2012).

2.3. Bakır - Hidrazon Kompleksi

Bakır elementi biyolojik sistemler için oldukça önemli bir elementtir. Özellikle enerji üretiminde ve oksidatif süreçte yer alan enzimler için uygun bir kofaktör olarak görev almaktadır (Duncan ve White, 2012). Tüm bu özelliklerinden dolayı bakır, kimyasal reaksiyonlar yardımıyla çeşitli liganlarla birleşerek yeni komplekslerin sentezlenmesinde yaygın olarak tercih edilmektedir. Örneğin peptidler (Arjmand vd., 2020), schiff bazları (Parsekar vd., 2022)., aminoasitler (Parveen vd., 2020). ve azoller bakır içeren sentez ürünlerine örnek olarak verilebilir (Hu vd., 2018).

Schiff bazları kolay bulunmaları ve metal bağlama yetenekleri sayesinde araştırmacılar tarafından sıklıkla bileşik oluşturmak için tercih edilmektedir (Bazhin vd., 2018). Schiff bazlarının özellikle bakır içeren komplekslerinin DNA ile iyi etkileşim göstererek özellikle kanserli hücrelerde çoğalmayı baskılayıcı etki gösterdiği farklı çalışmalarla belirlenmiştir (Neethu vd., 2021). Bu özellikleri nedeniyle Shiff bazları günümüzde ilaç yapımı ve malzeme bilimi gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

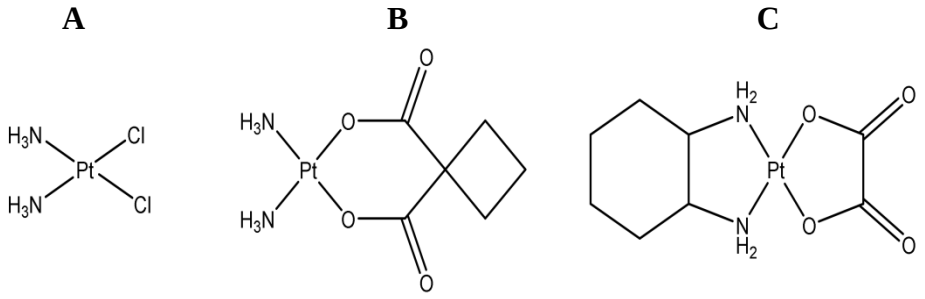
Schiff bazlarının sentezinde kullanılan hidrazonlar da metal iyonları ile birlikte kararlı metal kompleksleri oluştururlar. Bu metal kompleksleri farklı yapılara ve biyolojik uygulama alanlarına sahip olabilirler. Metallerle birleşen hidrazonların farmakolojik uygulamalarının yanı sıra antitümör (Burgos-Lopez vd., 2019), antimikrobiyal (Noshiranzadeh vd., 2017), antitüberküler (Nogueira vd., 2019) ve antioksidan (Ayyannan vd., 2020) özellikler gösterdikleri yapılan farklı çalışmalarla belirlenmiştir. Bununla birlikte hidrazonların, sentezlenmesinin kolay olması ve çeşitli alanlarda kullanılabilmesi nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır.

2.4. Karboplatin

Kanser tedavisinde kullanılan kemotöropotik ilaçların % 80'i sisplatin, karboplatin, ve oksaliplatin gibi yapısında platin içeren (Şekil 2.9.) ilaçlardan oluşmaktadır (Lang vd., 2021). Sisplatin, çoğunlukla akciğer, yumurtalık, testis ve mesane kanseri gibi çeşitli

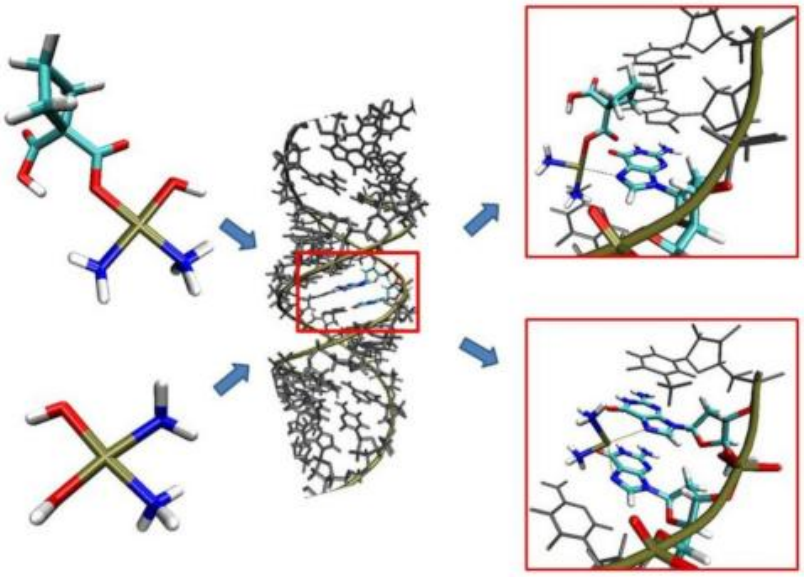
kanser türlerinin tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır. Vücuda damar yoluyla verildikten sonra nükleofilik biyomoleküllerle reaksiyona girerek çekirdek zarını geçerek DNA yapısını oluşturan adenin ve guanine kovalent olarak bağlandığı belirlenmiştir. Bu durumda DNA hasarına ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Zampieri vd., 2020). Sisplatin tedavide yaygın olarak kullanılmakla birlikte tedavi başladıktan sonra tümör hücrelerinde ilaç direnci oluşturması en istenmeyen yan etkilerinden birisidir. Ayrıca böbreklerde ciddi toksisiteye neden olduğu bilinmektedir.

Bu nedenle araştırmacılar sisplatinin yapısında değişiklikler olurturarak sisplatin analoğu olan karboplatini (1,1-siklobutildikarboksilat) geliştirmişlerdir (Şekil 2.9). Yapılan çalışmalar karboplatinin sisplatinden daha az sitotoksisiteye neden olduğunu göstermiştir. Fakat karboplatinin aktivitesinin sisplatine göre düşük olmasından dolayı tedavi esnasında daha yüksek karboplatin dozları uygulanmaktadır (Schoch vd., 2020; Szefler vd., 2021).



Şekil 2.9. Platin bazlı antikanser ilaçların kimyasal yapıları. (A: Sisplatin, B: Karboplatin, C: Oksaliplatin) (Szefler vd., 2021).

Karboplatin gibi platin kompleksleri, DNA moleküllerine çapraz bağlar ile bağlanarak DNA'nın yapısını bozmaktadır (Şekil 2.10). Böylelikle hücrenin işleyişini etkileyerek apoptoza veya nekroza gitmesine neden olmaktadır (Szefler vd., 2021).



Şekil 2.10. Karboplatin ve DNA arasındaki eklentilerin oluşumu (Szefler vd., 2021).

Bu tez çalışmasında Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü Anorganik Kimya Anabilim Dalı' nda sentezlenmiş olan bir Bakır - Hidrazon Kompleksinin ($C_{30}H_{26}Cl_{l6}Cu_2N_4O_{14}$) iki farklı insan akciğer kanseri (A549 ve H460) ve sağlıklı insan akciğer bronşiyal epitelyal hücre hattı (BEAS-2B) hücreleri üzerindeki sitotoksik etki farklı ise konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücre kültürü yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca kompleksin farklı dozlarının antiviral ve antibakteril etkileri de çalışılmıştır. *Poliovirüs Tip 1* üzerinde antiviral etkisi ve 5 farklı bakteri suşu kullanılarak (*Bacillus subtilis, Enterococcus hirae, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*) antibakteriyel aktiviteside araştırılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Deneylerde Amerikan Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) daha önce satın alınarak -196 ^{0}C'de sıvı azot içerisinde saklanan küçük hücreli dışı akciğer kanseri (A549, CCL185) ve büyük hücreli akciğer kanseri (H460, HTB-177) hücre hatları üzerinde Bakır - Hidrazon Kompleksinin sitotoksik aktivitesi araştırılmıştır. Ayrıca Bakır - Hidrazon Kompleksinin hücre çoğalmasını baskılayıcı etkisi sağlıklı insan akciğer bronşiyal epitelyal hücre hattı (BEAS-2B, CRL-9609) üzerinde de denenmiştir. Deneylerde pozitif kontrol olarak akciğer kanserinin tedavisinde sıklıkla kullanılan karboplatin (Carbodex) seçilmiştir.

Sıvı azot tankında saklanan hücreler çözündükten sonra biyogüvenlik kabini içerisinde % 10 Fetal Dana Serumu (FBS), % 1 penisilin-streptomisin solüsyonu ve Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içeren besi ortamında 25 cm^2'lik (T-25) kültür kaplarına ekilmiştir. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler 75 cm^2'lik (T-75) flasklara aktarılarak 37 ^{0}C' de, % 5 CO_2 ve % 95 nem içeren karbondioksitli inkübatörde (Thermo) çoğaltılmıştır. Hücrelerin yoğunluğu ve besi ortamının kirliliği günlük olarak takip edilerek bir gün arayla besi ortamları değiştirilmiştir.

Hücrelerin yoğunluğu T-75'lik flasklarda % 70-80'e ulaştıktan sonra deney gerçekleştirilmiştir. Öncellikle flaskta bulunan besi yeri uzaklaştırılarak dengelenmiş fosfat tamponlu çözeltisi (PBS) ile yıkama işlemi yapılmıştır. Daha sonra flaska % 0,25'lik Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek tabandaki hücreler kaldırılmış ve santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Tüpler 1200 rpm'de ve 5 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı kısım atılmıştır. Dipte kalan pelletin üzerine taze besiyeri eklenerek pellette bulunan hücreler besiyeri içerisine süspanse edilerek dağıtılmıştır.

3.1.1. Hücre Sayımı ve Hücre Ekimi

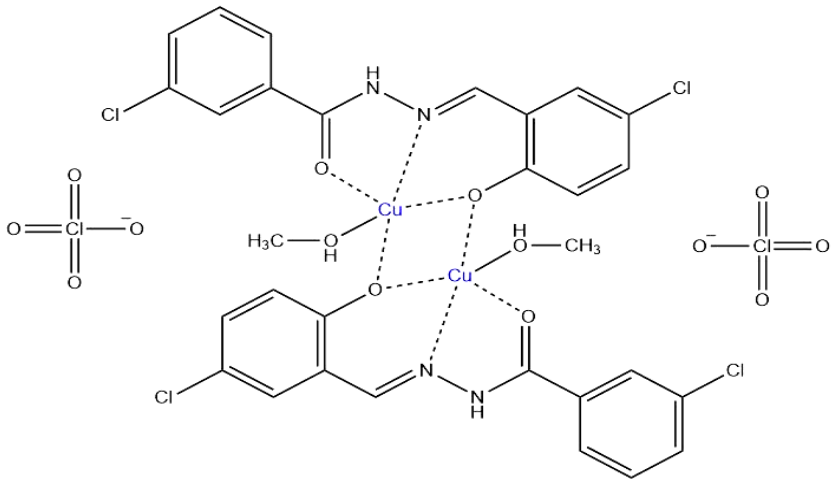
Hücre sayımını yapmak için hazırlanan 0,2 mL hücre süspansiyonuna; 0,3 mL Hank's Dengelenmiş Tuz Solüsyonu ve 0,5 mL Tripan mavisi eklenerek 5 dakika

beklenerek hücrelerin boya muamele edilmesi sağlanmıştır. Canlı hücreler boya ile boyanmazken, ölü hücrelerin hücre zar bütünlüğü bozulduğu için boya hücrenin içerisine nüfuz ederek hücreyi boyamaktadır. Boya ile muamele edilen hücre süspansiyonundan 10 µL alınarak, hücre sayım cihazında (Cedex XS, Innovatis) hücre sayımı yapılmıştır. Bu sayede 1 mL hacim içindeki hücre sayısı belirlenmiştir.

Sayma işlemi yapıldıktan sonra hücreler, her bir kuyucukta 100 µL besiyeri içinde 10.000 canlı hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. Daha sonra kültür kapları 37 ˚C'de, % 95 nem ve % 5 CO_2 içeren inkübatörde 24 saat bekletilmiştir.

3.1.2. Bakır - Hidrazon Kompleksi ve karboplatin dozlarının hazırlanması

Deneylerde Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü Anorganik Kimya Anabilim Dalı' nda sentez edilen Moleküler Formülü; $C_{30}H_{26}Cl_6Cu_2N_4O_{14}$, moleküler ağırlığı 1006,35 g/mol olan Bakır - Hidrazon Kompleksi kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Bakır - Hidrazon Kompleksinin Halkasal Yapısı

Bakır - Hidrazon Kompleksi % 96' lık etanol içerisinde 10 mM ana stok olacak şekilde çözülmüştür. Ana stok solüsyonu DMEM ile dilüe edilerek 0,01; 0,1; 1; 10 ve 20 µM olmak üzere 5 farklı konsantrasyon hazırlanmıştır (Çizelge 3.1). 24 saat inkübasyon süresi sonunda hazırlanan dozlar her bir kuyucuğa 100 µL olacak şekilde eklenmiştir.

Bakır - Hidrazon Kompleksi içermeyen negatif kontrol kuyucuklarına ise sadece 100 µL besiyeri eklenmiştir. Hücreler 24 ve 48 saat boyunca hazırlanan konsantrasyonlar ile muamele edilmiş olup her bir konsantrasyon 8 kuyuya uygulanmıştır.

Çizelge 3.1. Deneyde uygulanan Bakır - Hidrazon Kompleksi konsantrasyonları.

Kontrol grubu: Sadece besi ortamı
0,01 µM konsantrasyon grubu
0,1 µM konsantrasyon grubu
1 µM konsantrasyon grubu
10 µM konsantrasyon grubu
20 µM konsantrasyon grubu

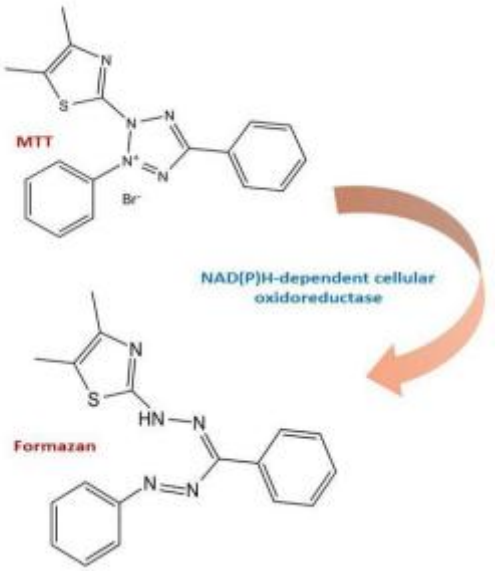
Deneylerde pozitif kontrol olarak karboplatin (Carbodex) kullanılmıştır. Flakon halde ticari olarak satın alınan karboplatinin üzerine saf su eklenerek 10 mM ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok çözeltisi DMEM ile dilüe edilerek 5 farklı konsantrasyonda karboplatin dozları hazırlanmıştır (Çizelge 3.2). 24 saat inkübasyon süresi sonunda hazırlanan dozlar her bir kuyucuğa 100 µL eklenmiştir. Karboplatin içermeyen negatif kontrol kuyucuklarına ise sadece 100 µL besiyeri eklenmiştir. Hücreler 24 ve 48 saat boyunca dozlar ile muamele edilmiş olup her bir doz 8 kuyuya uygulanmıştır.

Çizelge 3.2. Deneyde uygulanan karboplatin dozları.

Kontrol grubu: Sadece besi ortamı
0,01 µM karboplatin doz grubu
0,1 µM karboplatin doz grubu
1 µM karboplatin doz grubu
10 µM karboplatin doz grubu
20 µM karboplatin doz grubu

3.1.3. Bakır - Hidrazon Kompleksi ve karboplatinin akciğer kanseri ve sağlıklı hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Deneylerde kullanılan Bakır - Hidrazon Kompleksi ve karboplatinin hücre çoğalması üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla MTT testi kullanılmıştır. MTT testi, NAD(P)H'ye bağlı hücresel oksidoredüktaz enzimleri sayesinde MTT' nin formazan kristallerine indirgenmesini sağlamaktadır (Şekil 3.2). Sağlıklı hücreler bu işlemi gerçekleştirebilirken ölü veya inaktif olan hücreler bunu gerçekleştirememektedir. MTT indirgemenin sonucunda mor renkli formazan oluşmakta ve DMSO ile kolaylıkla çözünebilmektedir. Mor renk ile kuyudaki canlı hücre miktarı arasında doğru bir orantı vardır. Canlı hücrelerin fazla miktarda bulunduğu kuyular daha mor, ölü hücrelerin fazla bulunduğu kuyular ise daha açık renkli gözlenecektir. Formazan miktarındaki yoğunluk kolorimetrik olarak ölçülerek hücre canlılığı veya hücre ölümü miktarı sayısal olarak belirlenebilmektedir (Bektur Aykanat ve Kaçar, 2021).



Şekil 3.2. MTT nin Formazana Dönüşmü (Nasirli, 2020)

Bakır - Hidrazon Kompleksi ile 24 ve 48 saat süre ile muamele edilen hücrelerin bulunduğu kuyucuklara 20 µL MTT (5 mg/L) ilave edilmiştir. Daha sonra kültür kapları 3 saat boyunca 37 ^{0}C'de % 5 CO_2'li inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda kuyucukların

içeriği dökülerek her kuyucuğa 100 µL Dimetil Sülfoksit (DMSO) konulmuştur. 5 dakika karanlık ortamda bekletildikten sonra kültür kapları 570/620 nm dalga boyunda mikroplate okuyucuda (Tecan, Sunrise) spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. Kuyucuklarda bulunan hücrelerin canlılığını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır (Oztopcu-Vatan vd., 2015).

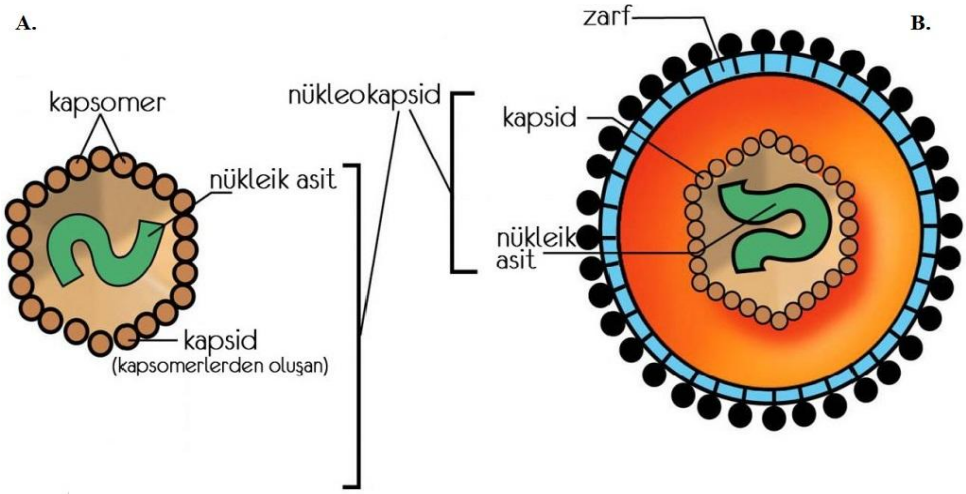
$$\text{Hücre Canlılığı (\%)}: \frac{\text{İlaç verilen her bir kuyucuktaki hücre absorbansı x100}}{\text{Kontrol hücrelerinin ortalama absorbansı}}$$

Akciğer kanseri hastalığının tedavisinde kullanılan karboplatinin sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla, hücreler 24 ve 48 saat süre boyunca karboplatin dozlarıyla muamele edilmiştir. Muamele süresi sonunda hücrelerin bulunduğu kuyucuklara 20 µL MTT (5mg/L) ilave edilerek 3 saat boyunca 37 °C'de % 5 CO_2'li inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda kuyucukların içeriği dökülerek her kuyucuğa 100 µL DMSO (Dimetil Sülfoksit) konulmuştur. 5 dakika karanlık ortamda bekletildikten sonra ELİSA mikroplate okuyucuda 570/620 nm dalga boyunda ölçümler yapılmıştır.

Deneyler sonucunda elde edilen veriler SPSS programında tek yönlü varyans analizi (One-Way Anova) ile incelenmiştir. Ardından Tukey'in çok yönlü karşılaştırma yöntemiyle veriler değerlendirilmiştir. Anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak belirlenmiştir. Ayrıca istatistiksel değerlendirmesi tamamlanan verilerin grafikleri Microsoft Excel (Office 2007) programı kullanılarak çizilmiştir ve anlamlılıklar yıldız (*) sembolü ile gösterilerilmştir.

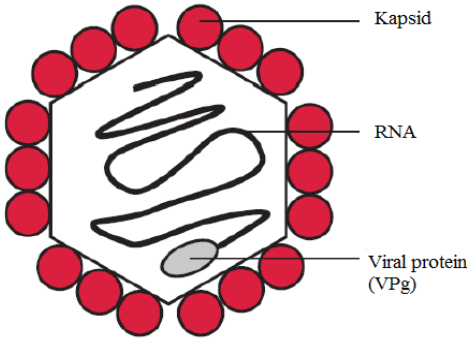
3.2. Antiviral Aktivite Tayini

Virüsler zorunlu olarak hücre içerisinde yaşayan ve arkea, bakteri, bitki, ve hayvanları enfekte edebilen yaşam formlarıdır (Seker vd., 2020). Taşıdıkları kalıtsal materyale göre DNA veya RNA virüsü olarak adlandırılmaktadırlar. Kalıtsal materyal kapsit adı verilen protein bir kılıfın içinde bulunmaktadır. Bazı virüsler kapsitin dışında bulunan ve lipid yapıda olan çift katlı bir membrana sahiptir. Bu virüsler (*SARS-CoV-2, Herpes simpleks*) zarflı virüsler olarak tanımlanmaktadır (Özçolpan, 2019). Zarflı ve zarfsız virüslerin yapısı Şekil 3.3' de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Zarfsız virüsün (A) ve zarflı virüsün (B) yapısı (Kaya, 2018).

Poliovirüsler, kalıtım materyali olarak RNA taşıyan zarfsız virüslerdir (Şekil 3.4). Ağırlıklı olarak küçük çocukları etkileyen poliovirüsün neden olduğu hastalık çocuk felci (Poliomyelit) olarak adlandırılmaktadır. Vücuda ağız yoluyla alınan bir virüs; öncellikle boğazda ya da bağırsakta çoğalmaya başlar. Daha sonra merkezi sinir sistemine ulaşarak motor nöronları etkiler. Yapılan araştırmalar sonucunda poliovirüs ile enfekte olan 200 kişiden sadece birinin kalıcı felce yakalandığı belirtilmiştir (Mutlu, 2018).



Şekil 3.4. Poliovirüsün yapısı (Aryal, 2022).

Bakır - Hidrazon Kompleksinin antiviral aktivitesinin belirlenmesi için kullanılacak olan sitotoksisite ve antiviral test çalışmalarında, daha önceden Amerikan Kültür

Koleksiyonundan satın alınan ve -196 ^{0}C saklanan maymun böbrek epitel hücresi (Vero, CCL-81) ile birlikte, daha önceden Friedrich Loeffler Enstitüsü'nden satın alınan *Poliovirüs Tip 1* (LSc 2ab) kullanılmıştır.

Vero hücreler önce sıcak su banyosunda çözdürülmüş ardından biyogüvenlik kabini içerisinde T-25 kültür kaplarına ekilmiştir. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler T-75 flasklara aktarılarak 37 ^{0}C' de, % 5 CO_2 içeren inkübatörde (Thermo) çoğaltılmıştır. Hücrelerin yoğunluğu ve besi ortamının kirliliği günlük olarak takip edilmiştir. Hücrelerin yoğunluğu % 70-80'e ulaştığında pasajlama işlemi yapılarak hücre süspansiyonu elde edilmiştir.

3.2.1. Hücre sayımı ve hücre ekimi

Elde edilen hücre süspansiyonuna Tripan mavisi eklenerek hücreler boya ile iyice karıştırılmıştır. Daha sonra hazırlanan hücre ve tripan mavisi karışımından 10 µL alınarak cihazda hücre sayımı (Cedex) gerçekleştirilmiştir. Antiviral test için 96 kuyucuklu kültür kabında bulunan her bir kuyucuğa 100 µL besi yeri içerisinde 20.000 hücre ekilmiştir. Daha sonra kültür kapları 37 ^{0}C'de, % 95 nem ve % 5 CO_2 içeren inkübatörde 24 saat bekletilmiştir.

3.2.2. Antiviral sitotokisite analizi

Virüsidal testin yapılabilmesi için öncelikle Bakır-Hidrazon kompleksinin dozlarının belirlenmesi gerekmektedir. Virüs üzerindeki doz ayarlamasının yapılması için öncelikle virüs içermeyen Vero hücresi üzerinde MTT yöntemiyle bileşiğin hücreye toksik olmayan ve hücreyi öldürmeyen dozu belirlenmiş, sonrasında Poliovirus içeren Vero hücresi üzerinde antiviral test aşamasına geçilmiştir.

Bakır - Hidrazon Kompleksinin ana stok solüsyonu DMEM ile dilüe edilerek 4 farklı konsantrasyon hazırlanmıştır (Çizelge 3.3). 24 saat inkübasyon süresi sonunda hazırlanan dozlar her bir kuyucuğa 100 µL olacak şekilde eklenmiştir. Bakır - Hidrazon Kompleksi içermeyen negatif kontrol kuyucuklarına ise 100 µL besiyeri eklenmiştir. Hücreler 24 ve 48 saat boyunca konsantrasyonlarla muamele edilmiş olup her bir konsantrasyon 8 kuyuya uygulanmıştır.

Bakır - Hidrazon Kompleksi ile 24 ve 48 saat muamele edilen hücrelerin bulunduğu kuyucuklara 20 µL MTT (5mg/L) ilave ediliştir. Daha sonra kültür kapları 3 saat boyunca 37 ^{0}C'de, % 5 CO_2'li ortam içeren inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda kuyucukların içeriği dökülerek her kuyucuğa 100 µL DMSO konulmuştur. 5 dakika karanlık ortamda bekletildikten sonra mikroplate okuyucuda 570/620 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçümler yapılmıştır.

Çizelge 3.3. Sitotoksisite testinde uygulanan Bakır - Hidrazon Kompleksinin konsantrasyonları.

Kontrol grubu: Sadece besi ortamı
0,01 µM konsantrasyon grubu
0,1 µM konsantrasyon grubu
1 µM konsantrasyon grubu
10 µM konsantrasyon grubu

3.2.3. Antiviral test aşaması

1. Antiviral testi gerçekleştirmek amacıyla 96 kuyucuklu kültür kabına her 100 µL besiyeri içerisinde 20.000 hücre olacak şekilde Vero hücresi ekimi yapılmıştır. Daha sonra hücreler 37 ^{0}C, % 5 CO_2 ve nemli ortamda 24 saat inkübe edilmiştir.
2. 24 saatin sonunda kültür kabında Bakır-Hidrazon Kompleksi + virüs ve virüs kontrol kuyularında bulunan hücreler % 2 FBS içeren DMEM ile 100 $DKID_{50}$/0,1 mL hazırlanan Poliovirüs süspansiyonu ile enfekte edilmiştir. Diğer kuyulara ise % 2 FBS içeren DMEM konularak 1 saat süre ile 37 ^{0}C, % 5 CO_2 ve nemli ortamda bekletilmiştir. Testte kullanılan 96 kuyucuklu kültür kabı planı Çizelge 3.4' de gösterilmiştir.
3. 1 saat sürenin sonunda Bakır-Hidrazon Kompleksi + Hücre ve Bakır-Hidrazon Kompleksi + Virüs kuyularının ilk sırası hariç her kuyuya 216 µL % 2 FBS içeren DMEM konulmuştur.

4. Bakır-Hidrazon Kompleksi + Hücre ve Bakır-Hidrazon Kompleksi + Virüs kuyularının ilk sırasına ise 50 µM konsantrasyonda hazırlanan Bakır-Hidrazon Kompleksi' nden 300 µL konulmuştur. Daha sonra ilk kuyulardan 100 µL alınanrak bir alt sıradaki kuyulara eklenerek sulandırmalar yapılmıştır. Sulandırmaları tamamlanan kültür kapları 72 saat süre ile 37 ^{0}C, % 5 CO_2 ve nemli ortamda bekletilmiştir. Testte uygulanan Bakır - Hidrazon Kompleksi konsantrasyonları Çizelge 3.5' de gösterilmiştir.
5. İnkübasyon süresi sonunda kültür kabının içeriği boşaltılarak ve her kuyuya 100 µL % 2 FBS içeren DMEM konularak 30 dakika bekletilmiştir.
6. 30 dakika 37 ^{0}C, % 5 CO_2 ve nemli ortamda bekletildikten sonra, her bir kuyuya 20 µL (5 mg/L) MTT eklenmiş ve 37 ^{0}C, % 5 CO_2 ve nemli ortamda 3 saat bekletilmiştir.
7. 3 saatin sonunda kuyucukların içeriği dökülerek her kuyucuğa 100 µL DMSO konulmuştur. 5 dakika karanlık ortamda bekletildikten sonra ELISA mikropleyt okuyucuda (Tecan, Sunrise) 570/620 nm dalga boyunda ölçümler yapılmıştır.

Çizelge 3.4. Antiviral testte kullanılan 96 kuyucuklu kültür kabı planı.

	Kontrol	Bakır-Hidrazon Kompleksi + Hücre			Kontrol	Bakır-Hidrazon Kompleksi + Virüs			Kontrol	Virüs Kontrol	Hücre Kontrol	Kontrol
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Çizelge 3.5. Antiviral testte uygulanan Bakır - Hidrazon Kompleksi konsantrasyonları.

Kontrol grubu: Sadece besi ortamı
50 µM konsantrasyon grubu
15,82 µM konsantrasyon grubu
5,007 µM konsantrasyon grubu
1,585 µM konsantrasyon grubu
0,501 µM konsantrasyon grubu
0,159 µM konsantrasyon grubu
0,05 µM konsantrasyon grubu
0,016 µM konsantrasyon grubu

3.3. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Testi

Bakır-Hidrazon Kompleksi' nin bakteriler üzerindeki etkinliğini belirlemek amacıyla Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Testi gerçekleştirilmiştir. Deneylerde *Bacillus subtilis (ATCC 6633) Enterococcus hirae (ATCC 10541), Staphylococcus aureus (ATCC 6538), Escherichia coli (ATCC 8739) ve Pseudomonas aeruginosa (ATCC 15442)* bakteri suşları kullanılmıştır.

1. U tabanlı 96 kuyucuklu kültür kabının ilk sırasında bulun kuyucuklara 2 kat yoğunlukta (2X) hazırlanmış olan Triptik Soy Broth (TSB) besiyerinden 50 µL konulmuştur.
2. Kültür kabının ikinci sırasından itibaren on ikinci sıraya kadar (1X) yoğunlukta hazırlanan TSB besiyerinden her kuyuya 50 µL konulmuştur.
3. On ikinci sıraya ise 100 µL (1X) yoğunlukta TSB besiyeri konulmuştur.
4. Daha sonra 1mM konsantrasyonda hazırlanan Bakır-Hidrazon Kompleksi'den 50 µL alınarak 96 kuyucuklu kültür kabının ilk beş sırasına eklenmiştir. Altıncı sıraya Gentamisin (200 µg/ml) ve yedinci sıraya da seyreltici konulmuştur. Burada bulunan besiyeri ile iyice karıştırılarak 50 µL alınıp

ikinci sıradaki kuyulara konulmuştur. Bu işlem onuncu sıradaki kuyulara kadar uygulanıp onuncu kuyudan 50 µL dışarı atılmıştır.

5. Daha sonra her kuyuya 50 µL bakteri süspansiyonundan ($1x10^8$ CFU/mL) konulmuştur. On ikinci sıraya ise bakteri süspansiyonu konulmamış olup besiyeri kontrolü olarak kullanılmıştır. Kuyucuklara bakteri süspansiyonu eklendikten sonra pleyt 37 ^{0}C inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.6. MİK testinde kullanılan 96 kuyucuklu kültür kabı planı.

												Bakteri Kontrol	Besiyeri Kontrol
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Bakır-Hidrazon Kompleksi	**A**												
Bakır-Hidrazon Kompleksi	**B**												
Bakır-Hidrazon Kompleksi	**C**												
Bakır-Hidrazon Kompleksi	**D**												
Bakır-Hidrazon Kompleksi	**E**												
Gentamisin	**F**												
Seyreltici	**G**												

3.4. Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu (MBK)

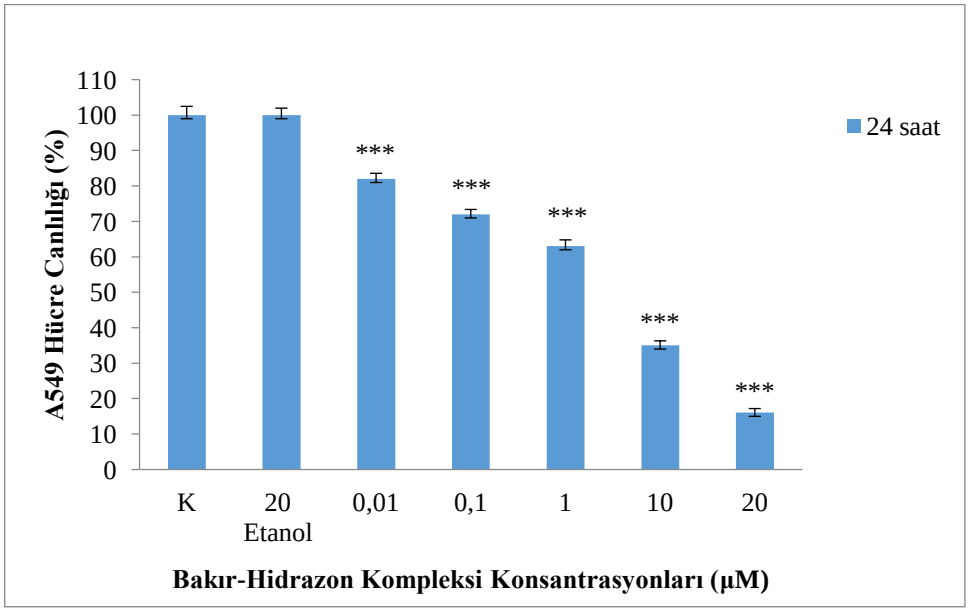
Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu Testi, MİC testi yapıldıktan sonra elde edilen sonuçlara göre gerçekleştirilir. MİC testi sonunda bakteri üremesinin olmadığı yani bulanıklık bulunmayan kuyucuklardan 50 µL alınarak Triptik Soy Agar (TSA) besiyerine ekim yapılır ve 30 ^{0}C inkübatörde yaklaşık 24 saat bekletilir. MBK testi sonunda, test edilen antibakteriyel maddenin bakteri canlılığını ≥ % 99,9 oranında inhibe ettiği konsantrasyon belirlenir. Belirlenen bu konsantrasyon MBK değeri olarak adlandırılır (Uzun Yaylaci, 2021).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bakır - Hidrazon Komplesinin Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında Oluşturduğu Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

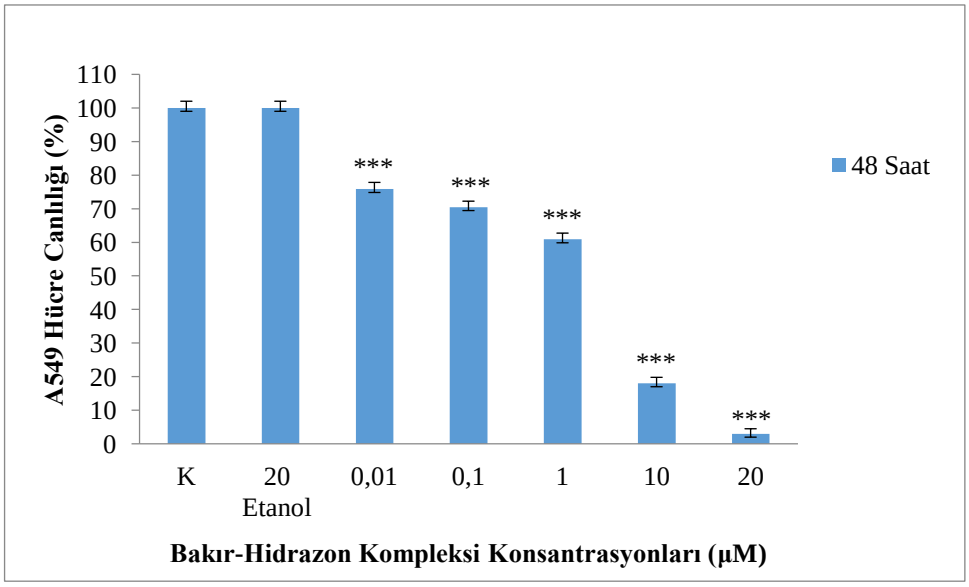
Çalışmamızda Bakır - Hidrazon Komplesinin 0,01; 0,1; 1; 10 ve 20 µM konsantrasyonlarının sitotoksik etkisi iki farklı zaman diliminde ve iki farklı akciğer kanseri hücre dizisi üzerinde (A549 ve H460) araştırılmıştır. Ayrıca çözücü kontrol (% 96'lık etanol) grubu da çalışmaya eklenmiştir. Bu amaçla Bakır - Hidrazon Komplesinin 20 µM konsantrasyonu içinde bulunan % 96'lık etanol miktarı içeren çözücü kontrol dozu, 24 ve 48 saat süre ile hücre dizilerine uygulanmıştır.

Yirmi dört saat sonunda Bakır - Hidrazon Komplesinin beş farklı konsantrasyonunun A549 hücre hattındaki canlılığı sırasıyla % 18, 28, 37, 65 ve 84 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir (***: $p<0,001$; Şekil 4.1). Yirmi dört saat için hücrelerin yarısını öldüren IC_{50} değeri ise 4 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.1. Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonlarının 24 saat süreyle A549 hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi. Kontrol grubundaki hücre canlılığı % 100 kabul edilmiştir. (K: Kontrol, ***: $p<0,001$).

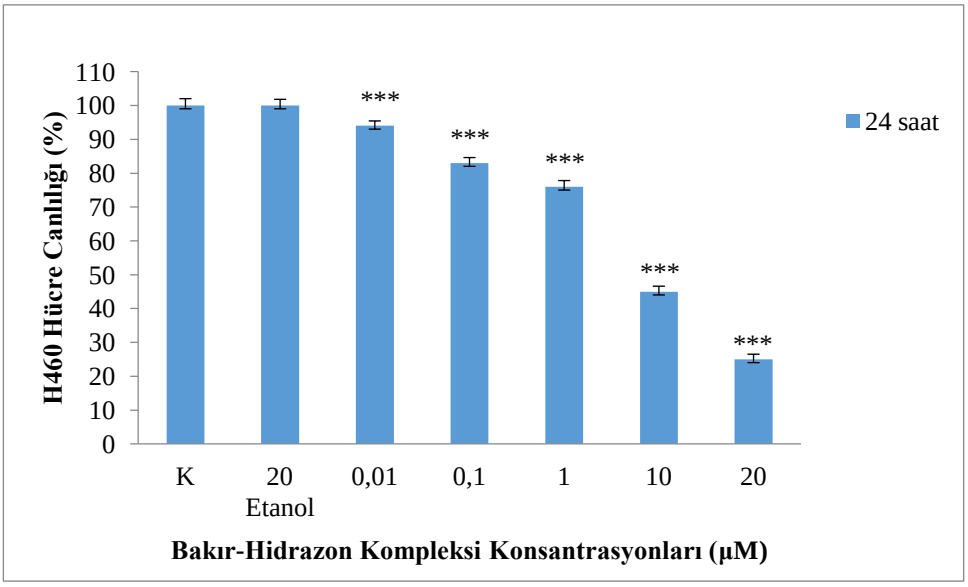
Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonları A549 hücre dizisine kırk sekiz saat boyunca uygulandıktan sonra, hücre canlılığını sırasıyla % 25, 30, 40, 82 ve 97 oranında baskıladığı tespit edilmiştir (***: $p<0,001$; Şekil 4.2). Kırk sekiz saat IC_{50} değeri ise için 2 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.2. Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonlarının 48 saat süreyle A549 hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi. Kontrol grubundaki hücre canlılığı % 100 kabul edilmiştir (K: Kontrol, ***: $p<0,001$).

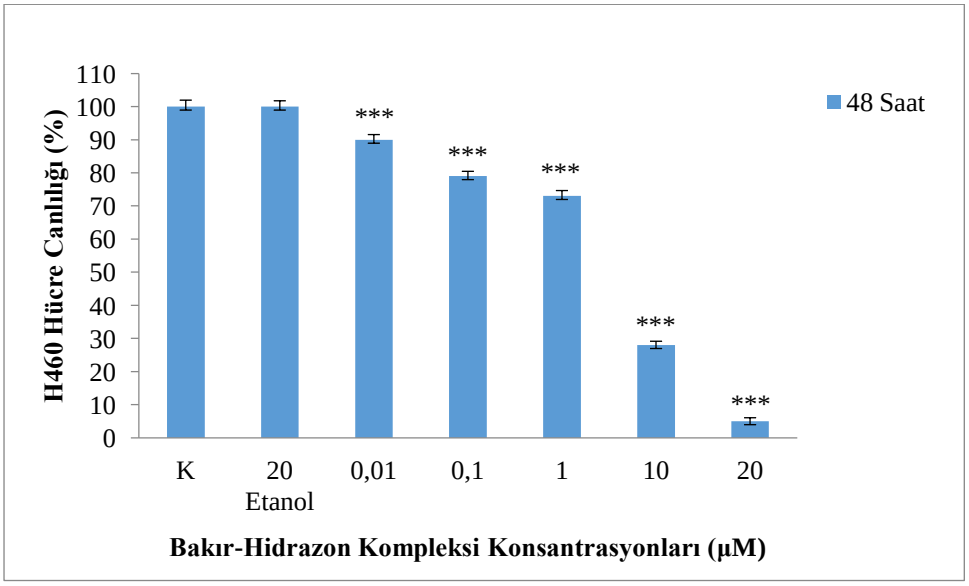
Bu çalışmada hem 24 hem de 48 saatlik 20 µM Bakır - Hidrazon Komplesinin çözücü kontrol denemelerinde kullanılan en yüksek konsantrasyon içinde bulunan alkol miktarının A549 hücre canlılığı üzerinde herhangi bir baskılayıcı etkisinin olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).

Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonları ile H460 hücre dizisi yirmi dört saat süreyle muamele edildiğinde ise hücre canlılığının sırasıyla % 6, 18, 24, 55 ve 75 oranında baskılandığı belirlenmiştir (***: $p<0,001$; Şekil 4.3). IC_{50} değeri ise yirmi dört saat için 8 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.3. Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonlarının 24 saat süreyle H460 hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi. Kontrol grubundaki hücre canlılığı % 100 kabul edilmiştir (K: Kontrol, ***: $p<0,001$).

H460 hücre hattı kırk sekiz saat boyunca Bakır - Hidrazon Komplesinin farklı konsantrasyonları ile muamele edildiğinde ise hücre canlılığının % 10, 21, 27, 72 ve 95 oranında baskılandığı belirlenmiştir (***: $p<0,001$; Şekil 4.4). Kırk sekiz saat için IC_{50} değeri ise 5 µM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonlarının 48 saat süreyle H460 hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi (K: Kontrol, ***: $p<0,001$).

Bu çalışmada hem 24 hem de 48 saatlik 20 µM Bakır - Hidrazon Komplesinin çözücü kontrol denemelerinde kullanılan en yüksek konsantrasyon içinde bulunan alkol miktarının H460 hücre canlılığı üzerinde herhangi bir baskılayıcı etkisinin olmadığıda belirlenmiştir ($p>0,05$).

Yeni sentezlenen metal komplekslerinin kanserli hücrelerin çoğalmasını baskılayıcı etkileri sıklıkla araştırılmaktadır. Bakır özellikle yeni sentezlenecek bileşiklerin yapısına katılmak için sıklıkla tercih edilen bir metaldir. Özellikle canlıların yapısında bakır elementinin bulunması ve enzimlerin çalışmasında kofaktör olarak önemli rol oynamasından dolayıda da tercih edilmektedir. Örneğin; Philip vd. yaptığı bir çalışmada pirazolon bazlı hidrazon türevi kullanılarak; bakır, kobalt, nikel ve çinko içeren çeşitli metal kompleksleri sentezlenmiştir. Bu bileşiklerin meme kanseri (MDA -MB-231), kronik myeloid lösemi (K-562), serviks adenokarsinom (HeLa), insan kolorektal adenokarsiom (HT-29) ve insan hepatoselüler karsinoma (Hep-G2) hücrelerinde 48 saatteki sitotoksik etkileri MTT yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin toksik etkisinin en fazla gözlendiği hücre HeLa hücre hattı olup bu hücredeki IC_{50} değeri diğer hücrelere kıyasla daha düşüktür. Bakır, kobalt, nikel ve çinko içeren bileşiklerin HeLa hücresindeki IC_{50} değeri sırasıyla 13 µM, 40 µM, 58,5 µM ve 46 µM olarak hesaplanmıştır. Bu verilere bakıldığında bakır içeren bileşiğin diğer bileşiklere kıyasla daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Philip vd., 2022).

Yapılan başka bir çalışmada -(lH-benzo[d]imidazol-2-il)-β-karbolin (Y-5) ligandı kullanılarak [PtL] (kompleks 1**)** , [CuL] (kompleks 2), $[Co(L)_2]$ (kompleks 3) ve $[Ni(L)_2]$ (kompleks 4) olmak üzere dört farklı bileşik sentezlenmiştir. Bu bileşiklerin A549, HeLa ve sağlıklı insan embriyonik akciğer fibroblast hücresi (Helf) üzerindeki sitotoksik etkileri 48 saat sonunda MTT testi kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmada sisplatin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Sisplatinin IC_{50} değerleri HeLa hücresinde 3, A549'da 7 ve Helf hücresinde 9 µM olarak belirlenmiştir. A549 hücresi için komplekslerin IC_{50} değerleri sırasıyla 152, 54, >200 ve >200 µM olarak hesaplanmıştır. A549 hücresinde en fazla sitotoksik etkiyi bakır içeren kompleks göstermiştir. HeLa hücresinde ise kompleks 1 ve 2'nin IC_{50} değerleri 77 ve 92 µM'dır. Denenen dört bileşikten kompleks 1 ve 2' nin diğer bileşiklere kıyasla daha fazla sitotoksisiteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Kompleks 1 ve

2’ nin sağlıklı hücre hattı olan Helf üzerindeki IC_{50} değerlerinin 200 µM’ dan büyük olduğu hesaplanmıştır. Deneylerde komplekslerin DNA’ya bağlanma yetenekleri de araştırılmıştır. Komplekslerin kimyasal yapılarına bakıldığında ise kompleks 1 ve 2’nin benzer yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. Bu yapıların DNA’ ya bağlanma üzerinde etkili olduğu ve bu sayede bileşiklerin antiprolatif etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada ise kullandığımız bakırlı bileşiğin A549 hücresinde kırk sekiz saatlik IC_{50} değeri 2 µM olarak hesaplanmış olup, daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun, bileşiklerin farklı yapılara ve farklı bağlanma şekillerine sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Jin vd., 2014).

Kumar’ın yaptığı bir çalışmada Schiff bazı ligandı kullanılarak Mn(II), Cu(II), Ni(II), Fe(III) ve Co(II) içeren bileşikler sentezlenmiştir. Bu bileşiklerin Dalton Lenfoma Ascites (DLA) hücresi kaynaklı katı tümöre karşı antikanser etkinliğini araştırmak amacıyla tripan mavisi boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu deneyde, bileşiklerin 10, 20, 50, 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonları DLA hücresine uygulanmıştır. Hücreye 200 µg/mL konsantasyonda uygulanan Mn(II), Cu(II), Ni(II), Fe III) ve Co(II) içeren bileşikler, hücrede sırasıyla % 52, 86, 59, 70 ve 71 oranında sitotoksisiteye neden olmuştur. En fazla sitotoksisiteyi bakır içeren bileşiğin gösterdiği ve IC_{50} değerinin 47 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler sonucunda, bakır içeren bileşik kullanılarak in vivo deney aşamasına geçilmiş ve bu bileşiğin katı tümörler için etkili bir antikanser ajan olabileceği rapor edilmiştir (Kumar, 2022).

Daravath vd. yapığı bir çalışmada, üç farklı Schiff bazı ligandı ve bu ligandlar kullanılarak 3 farklı bakırlı bileşik sentezlenmiştir. Bileşiklerin sitotoksisitesi A549 ve MCF-7 hücrelerinde 48 saat süre ile MTT test yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Bileşik 1, 2 ve 3’ün A549 hücrelerindeki IC_{50} değeri sırasıyla; 38, 42 ve 48 µM olarak hesaplanmıştır. MCF-7 hücrelerinde ise bileşiklerin IC_{50} değerleri 34, 39 ve 45 µM olarak belirlenmiştir. En fazla sitotoksik etkiyi Bileşik 1’in gösterdiği tespit edilmiştir. Bileşik 1’de bulunan halojen grubunun bileşiğin DNA bağlanma yeteneğini arttırdığı ve bu sayede hücrede toksisiteye neden olduğu düşünülmektedir (Daravath vd., 2022).

Han vd. yaptıkları bir çalışmada bakır, kobalt ve çinko içeren nanopartikül boyutunda Metal-organik çerçeveler (MOF) sentezlemişlerdir. Bu bileşiklerin yumurtalık

kanseri (SKOV3), glioblastoma (U87MG) ve glioblastoma (LN229) kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Hücreler Co-MOF, Zn-MOF ve Cu-MOF bileşikleri ile 24 saat boyunca muamele edildikten sonra alamar mavisi boyası kullanılarak sitotoksisiteleri belirlenmiştir. Bunun sonucunda bileşiklerin sağlıklı HDF hücresi üzerinde sitotoksik etki oluşturmadığı, Cu-MOF bileşiğinin SKOV3 hücresi üzerindeki sitotoksisitesinin diğer bileşiklere kıyasla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Cu-MOF bileşiğinin SKOV3 hücresi üzerinde 24 saatte oluşturduğu IC_{50} değeri 12,5 μM olarak hesaplanmıştır (Han vd., 2022). Bu çalışmada da denenen bakır, kobalt ve çinko içeren nanopartiküllerin içinde kanserli hücreler üzerinde en fazla toksik etkiye bakır içeren nanopartikülün sebep olduğu belirlenmiştir.

Yapılan farklı bir çalışmada ise aril hidrazon ligandı (1-etil-N′-furan-2-il)-metilen)-1,4-dihidro-7-metil-4-okso-1,8-naftiridin-3-karbohidrazid (NFMHMONC) kullanılarak bakır içeren $[Cu(II)(NFMHMONC)_2]Cl_2$ ve kobalt içeren $[Co(II)(NFMHMONC)_2H_2O]Cl_2$ bileşikleri sentezlenmiştir. Bu bileşikler HeLa ve meme kanseri (MCF-7) hücrelerine 24 saat süre ile uygulanmıştır. Bakır içeren bileşiğin ise 24 saatlik IC_{50} değeri 26,66 ve 42,25 μM' dır. Kobalt içeren bileşik ise en düşük sitotoksik etkiye sahip olup IC_{50} değeri 40.44 ve 49.09 μM' dır. Yapılan test sonucunda bakır içeren bileşiğin kobalt içeren bileşiğe kıyasla daha etkili olduğu görülmektedir (Chennam vd., 2022).

Bu amaçla çalışmamızda bakır kullanılarak sentezlenen Bakır - Hidrazon Komplesinin farklı konsantrasyonlarının sitotoksik etkileri insan akciğer kanseri (A549 ve H460) hücreleri üzerinde konsantrasyon ve zamana bağlı olarak 3-(4,5-Dimetiltriazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid (MTT) testi kullanılarak ilk kez araştırıldı. A549 hücre dizisinde yirmi dört saat için hücrelerin yarısını öldüren IC_{50} değeri ise 4 μM, kırk sekiz saat için ise 2 μM olarak hesaplandı. H460 hücre dizisinde yirmi dört saat için hücrelerin yarısını öldüren IC_{50} değeri ise 8 μM, kırk sekiz saat için ise 5 μM olarak hesaplandı. Bakır - Hidrazon Komplesinin her iki hücre hattı üzerinde de düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığını benzer şekilde baskıladığı tespit edildi. İki hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi karşılaştırıldığında bu etkinin benzer olmakla beraber, Bakır - Hidrazon Komplesinin A549 hücreleri üzerinde daha sitotoksik bir aktivite gösterdiği gözlenmiştir. İki hücre hattında Bakır - Hidrazon Komplesinin zamana bağlı toksik etkisine bakıldığında, 24 ve 48 saatlik uygulamalar arasında sitotoksik etki bakımından anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Kısaca doza bağlı ama zamana bağlı olmayan bir sitotoksik etki gözlenmiştir. Bunun en önemli sebebinin 24 saatlik uygulama esnasında Bakır - Hidrazon Komplesinin düşük dozlarının bile yüksek sitotoksik aktivite göstermesinden dolayı olduğu düşünülmektedir. Diğer bir değişle Bakır - Hidrazon Komplesinin düşük dozları zaten ilk 24 saat içinde hücrelerin büyük bir kısmının yaşamsal aktivitelerini durduracak sitotoksik aktiviteye sahip olmasından dolayı olduğu düşülmektedir.

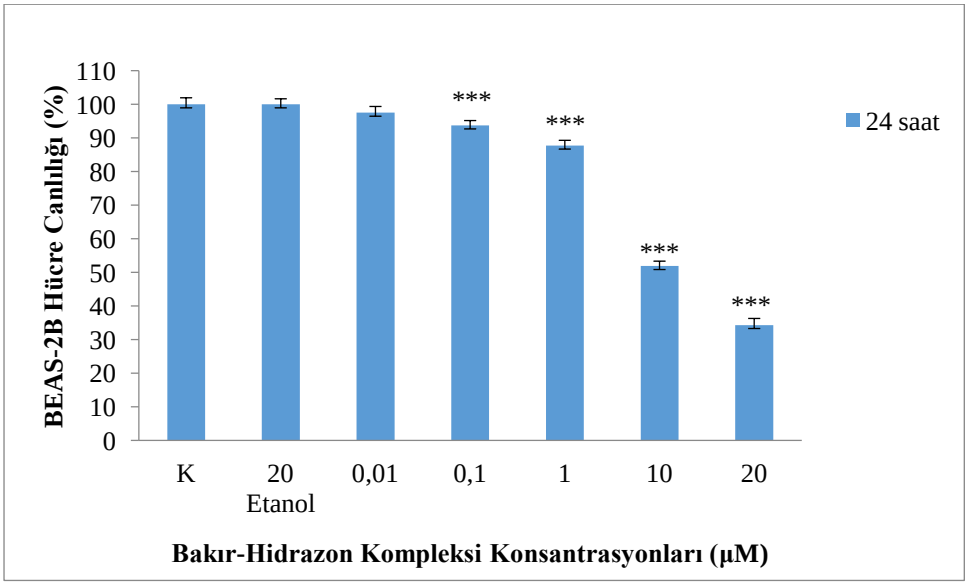
Yapılan bir çalışmada N-asilhidrazon ligandı kullanılarak sentezlenen yeni bir bakır (II) bileşiğinin $[Cu(HL)(H_2O)](NO_3)H_2$ yirmi dört saatlik sitotoksisitesi araştırılmıştır. Araştırmada insan osteosarkom (MG-63), insan kolorektal adenokarsiom (HT-29), küçük hücreli dışı akciğer (A549) kanser hücre dizilerinde ve sağlıklı fareden türetilen fibroblast (L929) hücrelerinde bileşiğin sitotoksik etkileri belirlemek için MTT testi kullanılmıştır. Bileşiğin hücre çoğalmasını baskılayan IC_{50} değerleri sırasıyla 2,0; 7,4; 3,1 ve 3,6 μM olarak belirlenmiştir. (Rodríguez vd., 2021). Çalışmada denenen bileşiğin, farklı üç kanserli hücre hattında da benzer sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmektedir. Çalışmamızda da benzer şekilde denenen Bakır - Hidrazon Komplesinin iki farklı akciğer karsinomuna ait hücre dizileri üzerinde birbirine yakın hücre çoğalmasını baskılayıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Zeng vd. yaptığı başka bir çalışmada ise; bakır ile birlikte 2-amino-6-metoksibenzotiyazol (ambt) ve 4-kloro-3-nitrobenzoik asit (cnba) ligandlarını kullanarak bileşik 1 ve (ambt) ile 4-klorobenzoik asit (clba) kullanarak bileşik 2 sentezlenmiştir. Bu bileşikler ile yapılan sitotoksisite çalışmalarında Bileşik 1 için 24 ve 48 saatlik IC_{50} değerleri sırasıyla; A549 hücre dizisinde 61,56 ve 25,73 μM, HeLa hücre dizisinde 37,27 ve 19,77 μM, HepG2 (insan hepatoselüler karsinoma) hücre dizisinde 48,35 ve 23.47 μM olarak belirlenmiştir. Bileşik 2 için ise 24 ve 48 saatlik IC_{50} değerleri sırasıyla; A549 hücrelerinde 36,96 ve 25,13 μM, HeLa hücrelerinde 21,85 ve 14,58 μM, HepG2 hücrelerinde ise 29,84 ve 14,97 μM olarak belirlenmiştir. Çalışmada her iki bileşiğin özellikle HeLa hücre dizisi üzerinde daha toksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca zamana bağlı olarakta toksik etkinin arttığı da gözlenmiştir. Ayrıca bileşiklerin DNA ile bağlanma yetenekleri test edildiğinde Bileşik 2'nin daha fazla bağlanma derecesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Buradan yola çıkarak Bileşik 2'nin kanser hücrelerinde Bileşik 1'e göre daha fazla sitotoksik etki göstermesinin nedeninin bu bağlanma yeteneği ile ilişkili

olabileceği düşünülmektedir (Zeng vd., 2021). Bileşik 1 için 24 ve 48 saatlik IC_{50} değerleri sırasıyla; A549 hücre dizisinde 61,56 ve 25,73 olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda ise denenen Bakır - Hidrazon Komplesinin A549 hücre dizisindeki IC_{50} değeri ise 4 µM, kırk sekiz saat için ise 2 µM olarak hesaplandı. Çalışmamızda denenen bakır kompleksinin, Zeng vd. denediği Bileşik 1'e göre daha yüksek sitotoksik aktiviteye sahiptir, fakat zamana bağlı olarak toksisitede bir artış gerçeklememiştir. Aynı hücre hattı olmasına rağmen görülen sitotoksik etkinin farklı olması ve zamana bağlı olarak toksik etkide görülen değişikliklerin bileşiklerin yapısal farklılıklarından ileri geldiği düşünülmektedir.

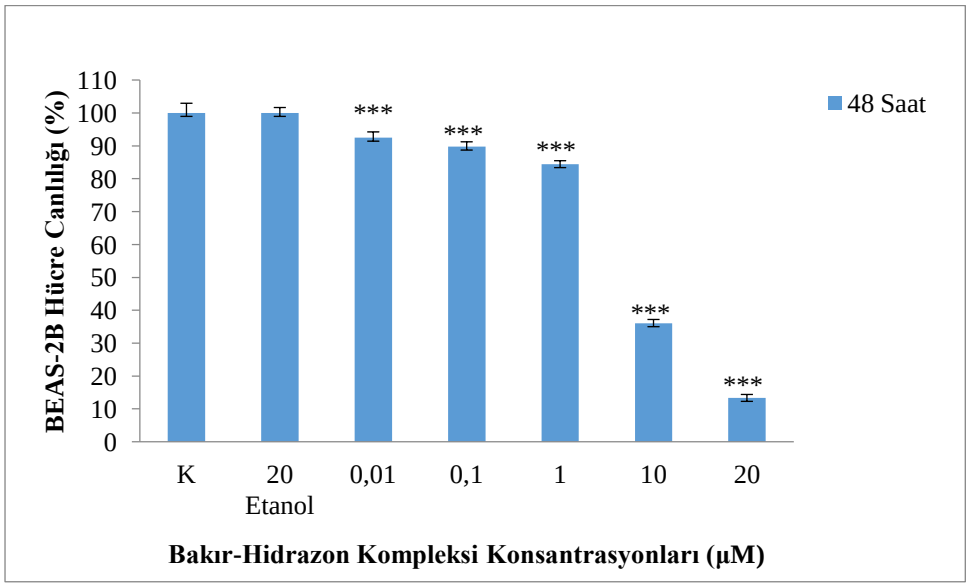
4.2. Bakır - Hidrazon Komplesinin BEAS-2B Hücre Hattında Oluşturduğu Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

Çalışmamızda Bakır - Hidrazon Komplesinin 0,01; 0,1; 1; 10 ve 20 µM konsantrasyonları 24 ve 48 saat boyunca BEAS-2B hücre hattına uygulanmıştır. Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonları BEAS-2B hücre dizisine yirmi dört saat boyunca uygulandıktan sonra 0,01 µM konsantrasyonda hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı gözlenirlen ($p > 0,05$), diğer konsantrasyonlarda sırasıyla 7, 13, 51 ve 34 oranında baskıladığı tespit edilmiştir (***: $p<0,001$; Şekil 4.5). IC_{50} değeri ise yirmi dört saat için 11 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.5. Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonlarının 24 saat süreyle BEAS-2B hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi (K: Kontrol, ***: p<0,001).

Kırk sekiz saat sonunda Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonlarının BEAS-2B hücre hattındaki canlılığı sırasıyla % 8, 11, 16, 64 ve 87 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir (***: p<0,001; Şekil 4.6). Kırk sekiz saat için IC_{50} değeri ise 7 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.6. Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonlarının 48 saat süreyle BEAS-2B hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi (K: Kontrol, ***: p<0,001).

Çalışmamızda Bakır - Hidrazon Komplesinin 5 farklı konsantrasyonu 24 ve 48 saat boyunca sağlıklı hücre hattı olarak kullanılan BEAS-2B hücre hattına uygulanmıştır. IC_{50} değerleri 24 saat için 11 µM, 48 saat için 7 µM olarak hesaplanmıştır. Bakır - Hidrazon Kompleksi ile muamele edilen BEAS-2B hücrelerinde oluşan toksisitenin, A549 ve H460 hücrelerine oranla daha az olduğu gözlenmiştir. Rodríguez vd., (2021) yaptığı çalışmada da N-asilhidrazon ligandı kullanılarak sentezlenen yeni bir bakır (II) bileşiğinin $[Cu(HL)(H_2O)](NO_3)H_2$ yirmi dört saatlik sitotoksisitesi araştırılmıştır. Araştırmada küçük hücreli dışı akciğer (A549) kanser hücre dizilerinde ve sağlıklı fareden türetilen fibroblast (L929) hücrelerinde bileşiğin sitotoksik etkileri belirlemek için MTT testi kullanılmıştır. Bileşiğin hücre çoğalmasını baskılayan IC_{50} değerleri sırasıyla A549 da 3,1 ve L929 hücrelerinde ise 3,6 µM olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada da bizim çalışmamıza benzer şekilde denen bileşiğin benzer şekilde sağlıklı hücre hattında da sitotoksik bir aktiviteye

sahip olduğu görülmektedir. Hatta bu çalışmada denen bileşiğin normal hücre hattında biraz daha fazla sitotoksik etkiye neden olduğu da görülmektedir.

Yapılan başka bir çalışmada ise bakır ile sentezlenen komplekslere glisin eklenilerek kapalı formülleri [Cu(nphen)(gly)(H_2O)] ve [Cu(dmphen)(gly)(NO_3)(H_2O)] olan ve kompleks 1 ve 2 olarak isimlendirilen iki kompleks sentezlenmiştir. Sentezlenen bu komplekslerin sitotoktoksik aktiviteleri Caco-2 (kolorektal kanser), A549 ve MCF-7 kanser hücrelerinde ve sağlıklı hücre dizisinde (BEAS-2B) XTT testi kullanılarak araştırılmıştır. Deneyler sonucunda kompleks 1 ve 2'nin Caco-2 hücre dizisi üzerinde en yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Caco-2 hücreleri üzerinde kompleks 1 ve 2 için 24 saatlik IC_{50} değerleri sırasıyla 1,07 ve 0,66 μM olarak hesaplanmıştır. MCF-7 hücrelerinde ise IC_{50} değeri sırasıyla 1,09 ve 1,01 μM, A549 hücrelerinde ise 2,59 ve 12,09 μM olarak bulunmuştur. BEAS-2B hücrelerinde ise IC_{50} değerleri 2,72 ve 2,33 μM olarak rapor edilmiştir. Bu çalışmada da denenen kompleksler bizim çalışmamıza benzer şekilde kanserli hücreler ile sağlıklı hücreler üzerinde yakın sitotoksik aktiviteler göstermiştir (İnci vd., 2017). Komplekslerin A549 hücreleri ile BEAS-2B hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi karşılaştırıldığında kompleks 1'in 24 saatlik toksisitesinin her iki hücre hattında zamana bağlı bir değişim göstermediği, buna rağmen 48 saatlik uygulamada ise Kompleks 2'nin 48 saatlik etkisinin özellikle BEAS-2B hücrelerinde arttığı rapor edilmiştir. Yani kompleks 2 normal hücre hattında 48 saatlik uygulamada daha fazla sitotoksik etkiye neden olmuştur. Yine komplekslerin kimyasal yapılarındaki değişikliğin sitotoksik etki üzerinde değişkenliğe sebep olabileceği rapor edilmiştir (İnci vd., 2017).

Yapılan başka bir çalışmada bakır ve kobalt içeren; [Co($iaa)_2$($H_2O)_2$]H_2O, [Co(1-allim)$_6$]($NO_3)_2$, [Cu($iaa)_2$(H_2O)], [Cu(1-allim)$_4$($NO_3)_2$] bileşikleri ve tek başına metal iyonları ($CuCl_2$ ve $CoCl_2$) A549 ve BEAS-2B hücrelerine 48 saat boyunca 7-250 μM konsantrasyon aralığında uygulanmıştır. MTT testi uygulanarak sonuçlar karşılaştırıldığında A459 hücrelerinin, BEAS-2B hücresine göre daha duyarlı olduğu, [Cu(1-allim)$_4$($NO_3)_2$] bileşiğinin diğer bileşiklere ve tek başına metal iyonlarına kıyasla daha yüksek toksisiteye sahip olduğu belirlenmiştir (Gałczyńska vd., 2019).

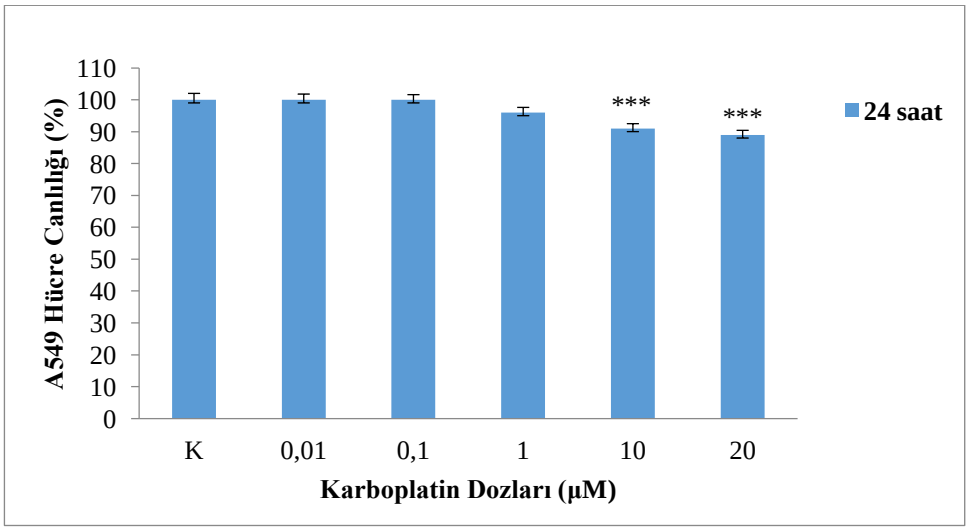
Maalesef şu an klinikte kanser tedavisinde kullanılanılan pek çok kemoterapötik ilacın normal hücreler üzerinde toksik etkileri bulunmaktadır. Özellikle kanser hastalığı

için yeni ilaç geliştirme çalışmalarında normal hücrelere zarar vermeyen ama kanserli hücrelerin çoğalmasını durduran kimyasal maddelerin arayışı halen devam etmektedir.

4.3. Karboplatinin Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında Oluşturduğu Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

Çalışmamızda akciğer kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan karboplatin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Karboplatinin, A549 ve H460 hücre hatlarında oluşturduğu sitotoksik etki, hücrelerin canlılığını mitokondriyal aktiviteye bağlı olarak ölçen MTT testi kullanılarak hesaplanmıştır. Akciğer kanseri hücreleri 24 ve 48 saat boyunca karboplatinin 0,01; 0,1; 1; 10 ve 20 µM dozları ile muamele edilmiştir.

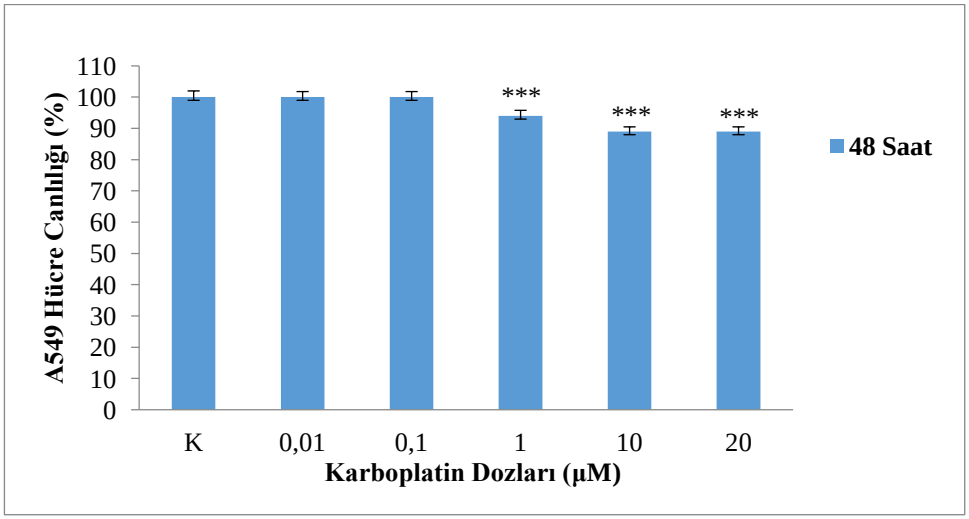
Yirmi dört saat boyunca karboplatinin 0,01, 0,1 ve 1 µM dozları ile muamele edilen A549 hücre hattında herhangi bir çoğalmayı baskılayıcı etki gözlenmezken ($p > 0,05$); 10 ve 20 µM dozlarında sırasıyla % 9 ve 11 oranında çoğalmayı baskılayıcı etki gözlenmiştir (***: $p<0,001$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Karboplatin dozlarının 24 saat süreyle A549 hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi (K: Kontrol, ***: $p<0,001$).

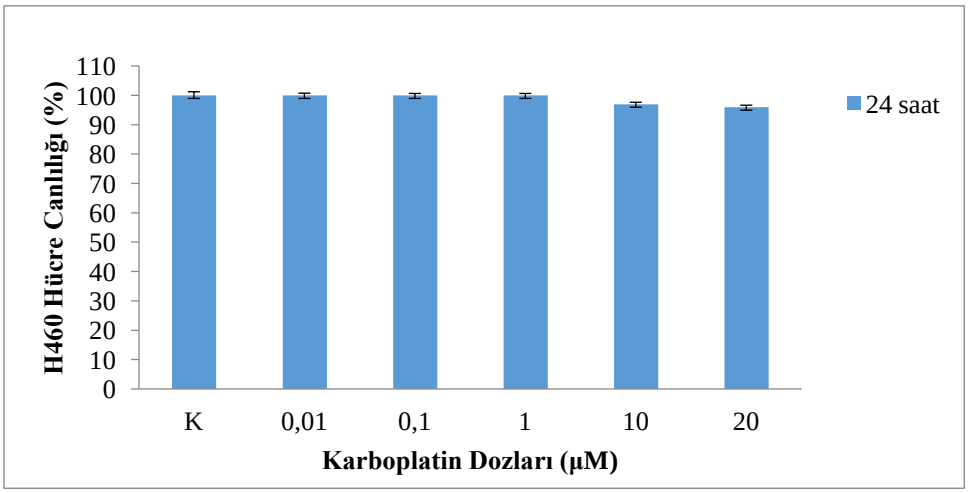
Kırk sekiz saat boyunca karboplatinin 0,01 ve 0,1 µM dozları ile muamele edilen A549 hücre hattında herhangi bir çoğamayı baskılayıcı bir etki gözlenmezken ($p>0,05$); diğer dozlarda sırasıyla % 6, 11 ve 11 oranında çoğalmayı baskılayıcı etki gözlenmiştir.

(***: p<0,001) (Şekil 4.7). A549 hücrelerinde yirmi dört ve kırk sekiz saat için IC_{50} değeri hesaplanamamıştır.



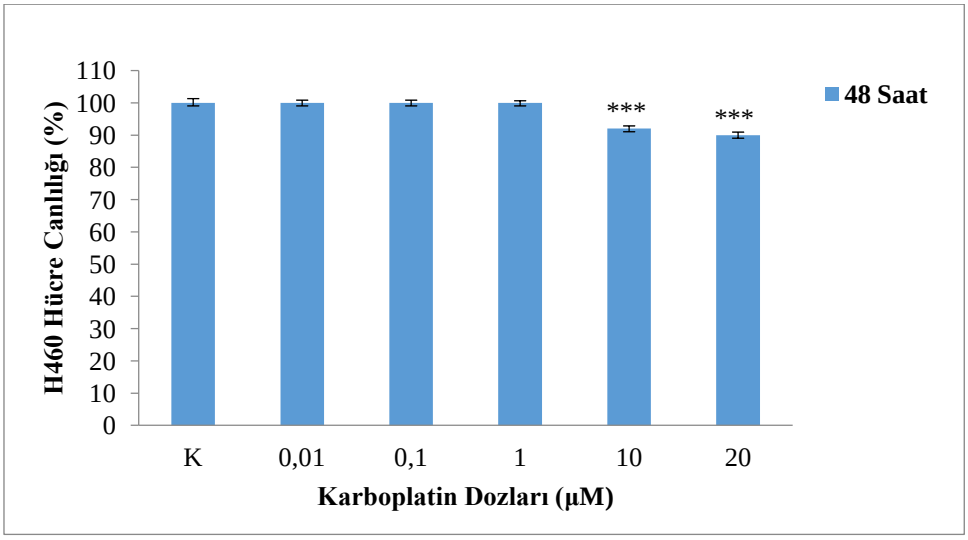
Şekil 4.8. Karboplatin dozlarının 48 saat süreyle A549 hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi (K: Kontrol, ***:p<0,001).

H460 hücreleri ile yirmi dört saat karboplatinin 0,01; 0,1 ve 1 µM dozları ile muamele edildiğinde çoğalmayı baskılayıcı bir etki gözlenmemiş olup, 10 ve 20 µM dozlarda ise çoğalmayı kontrole göre % 3 ve 4 oranında azalttığı belirlenmiştir (p>0,05) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Karboplatin dozlarının 24 saat süreyle H460 hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi (K: Kontrol).

H460 hücreleri kırk sekiz saat süreyle karboplatinin 0,01; 0,1 ve 1 µM dozları ile muamele edildiğinde hücre canlılığında herhangi bir azalma gözlenmemişken ($p > 0,05$), 10 ve 20 µM dozlarda ise çoğalmayı kontrole göre % 8 ve 10 oranında azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4.10). H460 hücrelerinde yirmi dört ve kırk sekiz saat için IC_{50} değeri hesaplanamıştır.



Şekil 4.10. Karboplatin dozlarının 48 saat süreyle H460 hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi (K: Kontrol, ***:$p < 0,001$).

Çalışmamızda, denenen karboplatin dozlarının küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve büyük hücreli akciğer kanseri hücreleri üzerinde doza ve zaman bağlı olarak herhangi bir toksisite göstermediği belirlenmiştir. Buna rağmen çalışmamızda denen Bakır - Hidrazon Komplesinin her iki zaman diliminde de karboplatine göre oldukça toksik olduğu belirlenmiştir.

Subhajit vd. yaptığı bir çalışmada Pt(II) içeren 6 adet bileşik sentezlemiş ve bu bileşiklerin A549, MCF-7 ve MDA-MB-231 (meme kanseri) hücreleri üzerindeki antikanser aktivitesi MTT yöntemi kullanılarak araştırmıştır. Bu çalışmada sisplatin ve oxaliplatinin yanı sıra karboplatin de pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Deney sonuçlarına göre 72 saat için, karboplatinin A549 hücrelerinde oluşturduğu sitotoksik etkinin IC_{50} değeri 48 µM, sisplatinin 18 µM ve oxaliplatinin 26 µM olarak hesaplanmıştır (Mukherjee vd., 2017). Bizim çalışmamızda A549 hücrelerine uygulanan en uzun maruz

kalma süresi 48 saat olarak planlamıştı ve bu sürede hücrelerde karboplatinin toksik etkisi görülmemişti. Bu çalışmada ise uygulama süresi 72 saat olarak planlamıştır. Hücrelerin karboplatine bir gün daha fazla maruz kalmaları sitotoksik etkinin ortaya çıkmasında etkili olduğu düşünülebilir

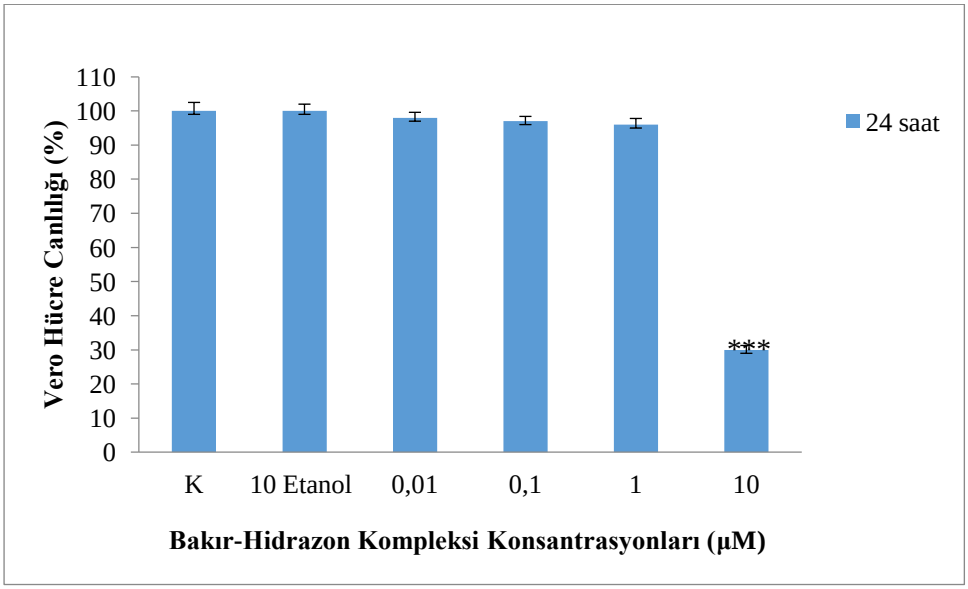
Yapılan başka bir çalışmada da Panobinostat bileşiğinin toksisitesi yine pozitif kontrol olarak karboplatin kullanılarak MTS yöntemiyle araştırılmıştır. Karboplatin tek başına A549 ve H460 hücrelerine 72 saat boyunca uygulandığında, IC_{50} değerleri sırasıyla 280 μM ve 132 μM olarak hesaplanmıştır (Wang vd., 2018). Mukherjee vd. yaptığı bir çalışmada karboplatinin A549 hücrelerinde oluşturduğu 72 saatlik sitotoksik etkinin IC_{50} değeri 48 μM olarak bulunurken (Mukherjee vd., 2017), Wang vd yaptığı deneyde A549 hücrelerine 72 saat boyunca karboplatin uygulandığında, IC_{50} değeri 280 μM olarak bulunmuştur. Bu iki çalışmada da aynı hücre ve aynı maddenin denenmesine rağmen, farklı IC_{50} değerlerinin bulunmasının sebebi yöntemsel farklılıklar ya da kültür koşullarındaki değişikliklerden kaynaklanabileceğini göstermektedir.

4.4. Bakır - Hidrazon Komplesinin Antiviral Etkinliğinin Araştırılması

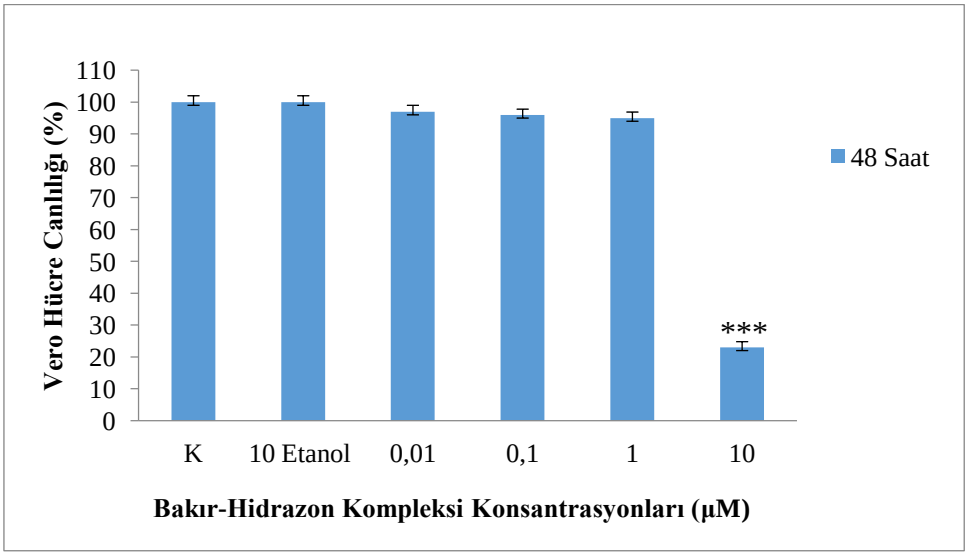
Virüsler oldukça küçük canlılardır. Bu nedenle varlığı ışık mikroskobunda gözlemlenemez. Görüntülenebilmeleri için elektron mikroskobuna ihtiyaç vardır. Araştırmacılar virüslerin varlığını gösterebilmek için elektron mikroskobu dışında farklı yöntemler geliştirmişlerdir. Bu yöntemlerden birisi de hücre kültüründe virüslerin çoğaltılmasıdır. Virüsler, ortamda bulunan canlı hücreleri kullanarak çoğalabilmektedir. Hücre kültüründe bulunan hücrelerin virüsle enfekte edilmesi ve hücrelerde çoğalması virüslerin varlığının tespit edilmesinde kullanılır (Akçalı, 2010). Antiviral aktivite tayin yöntemi bu şekilde yapılmaktadır.

Çalışmada Bakır - Hidrazon Komplesinin farklı dozlarının Poliovirüs üzerindeki antiviral etkinliğinin tespiti için Vero hücre hattı kullanılmıştır. Bu amaçla sentezlenen kompleksin Vero hücresi üzerindeki toksik olan ve toksik olmayan dozlarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla MTT yöntemi kullanılarak sitotoksisite testi yapılmıştır. Bakır - Hidrazon Komplesinin 0,01; 0,1; 1; 10 μM konsantrasyonları ve 10 μM Etanol çözücü kontrolü ile Vero hücre hattı 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Bakır - Hidrazon Komplesi ile muamele edilen Vero hücrelerinde 24 saat sonunda 0,01; 0,1; 1 konsantrasyonlarının hücre

canlılığı üzerinde herhangi bir baskılayı etkisi olmazken (p>0,05; Şekil 4.11), 10 µM konsantrasyonunun % 70 oranında hücre canlılığını inhibe ettiği belirlenmiştir (***; p<0001; Şekil 4.11), 48 saat sonunda ise yine 0,01; 0,1; 1 dozlarının hücre canlılığı üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmazken (p>0,05; Şekil 4.12), 10 µM konsantrasyonunun % 77 oranında canlılığı inhibe ettiği tespit edilmiştir (***; p<0001; Şekil 4.12).



Şekil 4.11. Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonlarının 24 saat süreyle Vero hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi (K: Kontrol, ***: p<0,001).

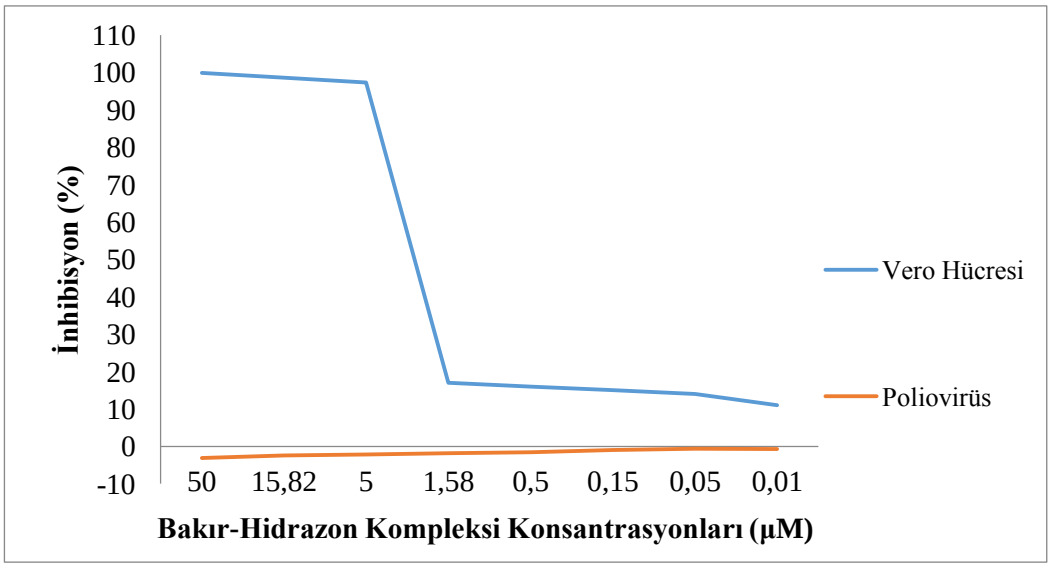


Şekil 4.12. Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonlarının 48 saat süreyle Vero hücre hattına uygulanması sonucu mitokondriyal aktiviteye etkisi (K: Kontrol, ***: p<0,001).

4.5. Antiviral Test Sonuçları

Bakır - Hidrazon Komplesinin Vero hücre hattı üzerinde 10 µM konsantrasyondan itibaren toksik olduğu belirlendikten sonra, 50; 15,2; 5; 1,58; 0,5; 0,05 ve 0,01 µM konsantrasyondaki antiviral etkinliği ilk kez araştırılmıştır.

1,58 µM ve daha düşük denenen konsantrasyonlardan itibaren Vero hücre canlılığında bir inhibisyon gözlenmemiş olup aynı konsantrasyolarda Poliovirüs canlılığında herhangi bir inhibisyon olmadığı belirlenmiştir. Elde edilen veriler sonucunda, sentezlenen bileşiğin antiviral etkinliğinin olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Bakır - Hidrazon Komplesi konsantrasyonlarının Vero hücre hattına ve Poliovirüse karşı inhibisyon etkisi.

Bakırlı bileşikler gibi çeşitli metal komplekslerinin antimikrobiyal etkinlikleri yıllardır bilindiğinden, bu bileşiklerin antiviral etkinlikleri de sıklıkla araştırılmaktadır. Özellikle virüslerde zarf yapısının bulunup bulunmaması, çalışılan bileşiğin etkinliğinin belirlenmesinde önemli bir yere sahiptir.

Yapılan bir çalışmada zarflı bir virüs olan İnfluenza A virüsü (A/PR8/H1N1) ve zarfsız bir virüs olan Bakteriyofaj Qβ virüsü üzerinde; solüsyon halindeki iyonik bakır ve gümüş ile beraber cam bir yüzeyde bulunan katı formdaki bakır ve gümüş bileşiklerinin etkileri araştırılmıştır. Deneyler sonucunda katı formdaki bakır oksidin (Cu_2O) İnfluenza A ve Bakteriyofaj Qβ üzerinde antiviral etkisi bulunurken, katı formdaki (diğer) bakır oksidin (CuO) daha az antiviral etkisi olduğu tespit edilmiştir. Bunun, bileşiklerin oksidasyon durumlarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Minoshima vd., 2016).

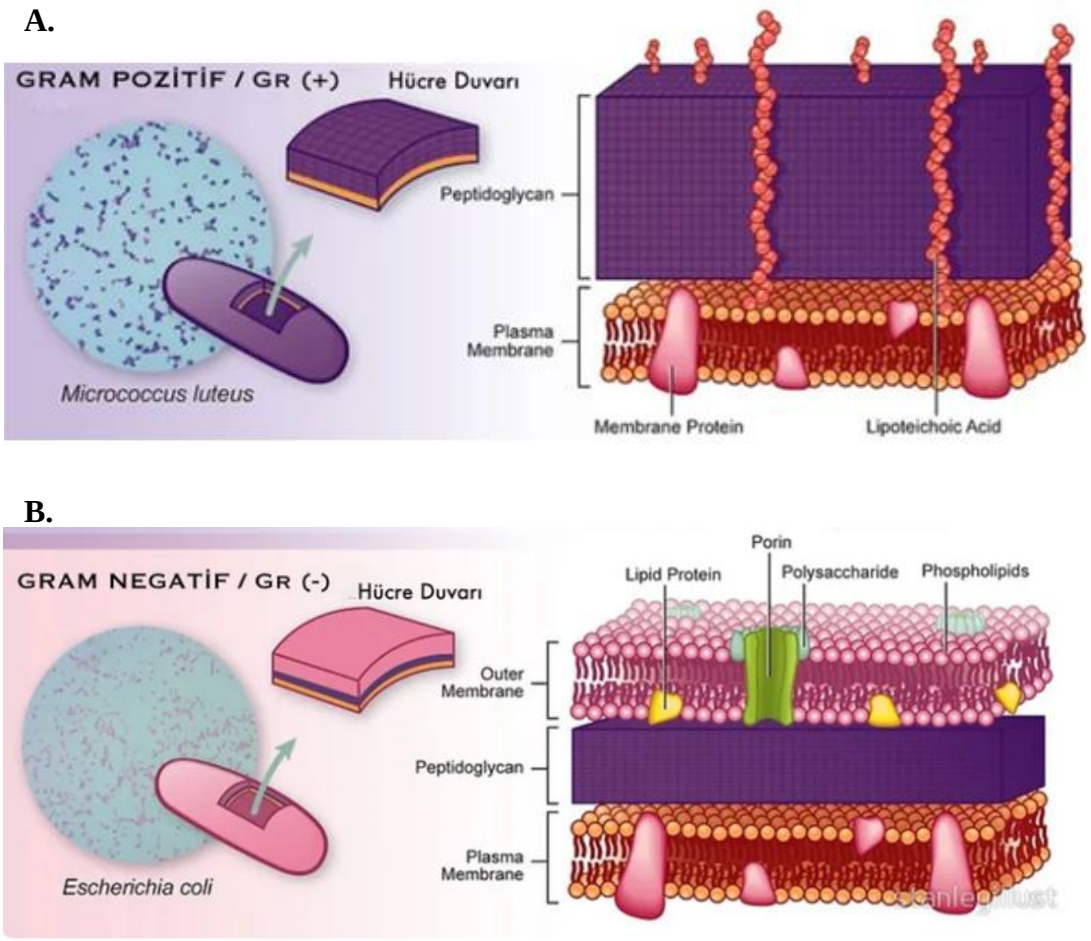
Aynı çalışmada suda çözünebilen gümüş nitrattan ($AgNO_3$) ve gümüş(I) oksit (Ag_2O) bileşiklerinin *İnfluenza A* virüsü üzerinde antiviral etkisi bulunurken, suda çözünmeyen gümüş sülfit (Ag_2S) bileşiğinin bir etkisinin olmadığı hesaplanmıştır. Bunun nedeni olarak da gümüş içeren metal komplekslerinin su içerisinde çözünme miktarlarındaki farklılıklar olduğu düşünülmektedir. Aynı metal kompleksleri *Bakteriyofaj Qβ* üzerinde denendiğinde ise daha düşük bir antiviral etki gözlenmiş olup, suda çözünen gümüşlü bileşiklerin zarfsız virüsler üzerinde antiviral etkinliğinin olmadığı tespit edilmiştir. Ag_2S bileşiğinin ise her iki virüste de antiviral etkinliğinin olmadığı belirlenmiştir (Minoshima vd., 2016). Bizim çalışmamızda kullanılan Bakır – Hidrazon Kompleksinin suda çözünmüş olmasından dolayı etkiğinin azalmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Yapılan başka bir çalışmada ise Rutenyum ile birlikte Cl, Br, I ve NCS içeren dokuz farklı bileşik sentezlenmiştir. Bu bileşiklerin *Herpes simpleks* ve *Poliovirüs Tip 1* üzerindeki antiviral etkinliği araştırılmıştır. Deneyler sonucunda bileşiklerden sekiz tanesi *Herpes simpleks* ve *Poliovirüs Tip 1* üzerinde etkisiz bulunurken bir tanesi *Poliovirüs Tip 1* üzerinde antiviral etkili bulunmuştur (Allardyce vd., 2003). Bizim çalışmamıza benzer şekilde bakır dışındaki farklı metal iyonları içeren bileşiklerin *Poliovirüs Tip 1* üzerinde antiviral etkinliklerinin olmadığı belirlenmiştir.

Bakır - Hidrazon Kompleksi kullanarak yaptığımız antiviral testte ise zarf yapısı içermeyen *Poliovirüs Tip 1* üzerinde herhangi bir azalışın olmadığı belirlenmiştir. Bunun; bileşiğin yapısı, bileşikte bulunan elementler ve bunların bağlanış biçimlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.6.Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Testi ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) Testi Sonuçları

Bakteriler hücre duvar yapılarına göre gram pozitif ve gram negatif olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar (Şekil 4.14). Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı sitoplazmik zar ve hücrenin dış kısmında bulunan kalın peptidoglikan tabakadan oluşmaktadır. Gram negatif bakteriler ise sitoplazmik zar, ince bir peptidoglikan tabaka ve dış zardan oluşan bir hücre duvarı yapısına sahiptirler. Gram negatif bakterilerin dış zarında bulunan lipopolisakkaritlerden oluşan tabaka, hidrofobik maddelerin hücre içine girmesini engellerken, bakterinin dış etkenlere karşı daha dayanıklı olmasını sağlamaktadır. Gram negatif bakteriler bu sayede, gram pozitif bakterilere göre daha patojen özellik gösterirler ve ilaçla tedavi edilmeleri de oldukça zor olur (Elif ve Everest, 2013).



Şekil 4.14. Gram pozitif (A) ve gram negatif (B) bakterilerin hücre duvar yapıları (Türkoğlu ve Aslan, 2018).

Çalışmamızda Bakır - Hidrazon Kompleksinin konsantrasyonları (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 ve 7,81 μM) iki tane gram negatif (*Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*), 3 tane de gram pozitif bakteri (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus hirae* ve *Staphylococcus aureus*) üzerinde denenmiştir. Yapılan MİK ve MBK testi sonuçlarına bakıldığında (Çizelge 3.7) Bakır - Hidrazon Kompleksinin gram negatif olan *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerine karşı antibakteriyel etki göstermediği belirlenmiştir. MİK testinin sonucunda gram pozitif olan *Bacillus subtilis*, *Enterococcus hirae* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerinde ise sırasıyla 31,25; 62,5 ve 62,5 μM konsantrasyonlarında antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir. En güçlü MİK değerini *Bacillus subtilis* bakterisi üzerinde göstermiştir. Diğer iki bakterideki MİK değeri ise benzer şekilde olduğu belirlenmiştir. MBK testi sonucunda ise en güçlü MBK değerine sahip olan organizmanın *Bacillus subtilis* bakterisi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Bakır - Hidrazon Kompleksinin *Enterococcus hirae ve Staphylococcus aureus* bakterilerinin çoğalmasını benzer oranda baskıladığı gözlenmiştir. Çalışmada Gentamisin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Çizege 3.7. Bakır - Hidrazon Kompleksinin MİK ve MBK değerleri

	Bakır – Hidrazon Kompleksi		**Gentamisin**	
	MİK (μM)	MBK (μM)	MİK (μg/mL)	MBK (μg/mL)
Bacillus subtilis	31,25	62,5	1,56	3,125
Enterococcus hirae	62,5	250	50	>50
Staphylococcus aureus	62,5	500	6,25	6,25
Escherichia coli	>500	>500	12,5	12,5
Pseudomonas aeruginosa	>500	>500	6,25	6,25

Bakır ve bakır alaşımlarının antimikrobiyal aktivitesi uzun bir süredir bilinmektedir. Özellikle hastane enfeksiyonlarının yayılmasını azaltmak amacıyla bakır, tuvalet sifonu düğmeleri, elektrik açma kapama düğmeleri, koridor tırabzanları, kapı kolları ve kulpları, banyo armatürleri, yatak korkulukları vb. gibi dokunulan yüzeylerde kullanılmıştır. Bakırın tıpta antimikrobiyal ajan olarak kullanımı 19. yüzyıldan itibaren oldukça yaygınlaşmıştır (Boinovich vd., 2019). Yıllardır yapılan çalışmalarla bakırın antibakteriyel etkinlik mekanizmaları aydınlatılmıştır. Bakır, özellikle bakterilerin membran yapısını bozarak antibakteriyel etkinlik gösterdiği rapor edilmiştir. Özellikle

gram pozitif bakterilerin, gram negatif bakterilere kıyasla bakıra karşı daha duyarlı olduğu belirlenmiştir (Salah vd., 2021).

Yapılan bir çalışmada [Cu(Gly-L-Val)(HPBM)(H_2O)]ClO_4 H_2O (Bileşik 1), Cu(Gly-L-Val)(TBZ)(H_2O)]ClO_4 (Bileşik 2) ve [Cu(Gly-L-Val)(PBO)(H_2O)]ClO_4 (Bileşik 3) olmak üzere üç yeni bakırlı bileşik sentezlenmiştir. Bu bileşikler *B. subtilis, S.aureus, E.coli ve P. aeruginosa* bakterilerine uygulandıktan sonra MİK ve MBK değerleri hesaplanmış olup aşağıdaki Çizelge 3.8'de belirtilmiştir (Qi vd., 2018).

Çizelge 3.8. Bileşik 1,2 ve 3'ün MİK ve MBK değerleri.

	Bileşik 1 MİK – MBK (µg/mL)	**Bileşik 2 MİK – MBK (µg/mL)**	**Bileşik 3 MİK – MBK (µg/mL)**
B. subtilis	13 – 16	100 - 128	150 - 160
S.aureus	18 - 20	150 - 320	320 - 320
E.coli	26 - 32	200 - 256	320 - 512
P. aeruginosa	64 - 512	320 - >512	400 - >512

Hesaplamalar sonucunda bakır bileşiklerinin en yüksek antibakteriyel etkinliği *B. subtilis'de* gösterdiği ardından sırasıyla *S. aureus, E. coli* ve en az *P. aeruginosa'*da antibakteriyel etkinlik gösterdiği belirlenmiştir (Qi vd., 2018). Bu çalışmadan elde edilen sonuçların bizim deney sonuçlarımız ile oldukça uyumlu olduğu görülmüştür. Çalışmamızda Bakır - Hidrazon Komplesinin en yüksek antibakteriyel etkinliği *B. subtilis* (31,25- 62,5 µM) ve *S.aureus* (62,5- 500 µM) da gösterdiği, en az etkinliği ise *E.coli ve P. aeruginosa'da* (500- 500 µM) gösterdiği hesaplanmıştır. Çalışmanın verileri ile kendi verilerimiz karşılaştırıldığında kullanılan bakırlı bileşikler ile bizim kullandığımız Bakır - Hidrazon Komplesinin benzer şekilde antibakteriyel etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada ise sentezlenen bakırlı bileşiğin gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerindeki etkinliği araştırılmıştır. Bileşiğin MİK ve MBK değerleri sırasıyla *S. aureus* için 94 µg/mL, 94µg/mL; *E. coli* için 450 µg/mL, 450 µg/mL olarak

hesaplanmıştır (Derikvand vd., 2010). Bu çalışmada, sentezlenen bakırlı bileşiğin MİK ve MBK değerlerinin gram pozitif olan *S. aureus* bakterisinde daha düşük olduğu, gram negatif olan *E. coli* bakterisinde ise daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçların bizim deney sonuçlarımızla oldukça benzer olduğu tespit edilmiştir.

Bakır ve çinko içeren iki farklı bileşik ile yapılan bir çalışmada, bu bileşiklerin *S. aureus, E. coli* ve *P. aeruginosa* bakterileri üzendeki antibakteriyel etkileri araştırılmıştır. Deneyler sonucunda bakır içeren bileşiğin MİK değerleri sırasıyla 3,91 μg/mL; 125 μg/mL ve 0,98 μg/mL olarak bulunmuştur. Çinko içeren bileşiğin MİK değerleri ise 15,63 μg/mL; 125 μg/mL ve 1,95 μg/mL olarak hesaplanmıştır. Deneyler sonucunda bakır içeren bileşiğin çinko içeren bileşiğe kıyasla daha fazla antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Bu deneylerde, bileşiklerin yapısı nedeniyle *P. aeruginosa* bakterisinin zarından geçebilme özelliğinde olduğu ve bu sayede *P. aeruginosa* üzerindeki antibakteriyel etkinliğinin diğer bakterilerden fazla olduğu düşünülmektedir (Damena vd., 2022).

Bizim çalışmamızda ise etkinliğini araştırdığımız metal kompleksinin gram negatif olan *E. coli* ve *P. aeruginosa* üzerinde çoğalmayı baskılayıcı bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Bu sebeple bileşiğin hücre zarından geçebilme özelliğinde olmadığı, gram pozitif bakterilerde bulunan peptidoglikan tabaka üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir.

Şimdiye kadar sitotoksik, antiviral ve antibakterial özellikleri araştırılan bakır bileşiklerinin farklı etkinliklerinin gözelendiği yapılan literatür çalışmasında da anlaşılmaktadır. Bu çalışma sonuçlarındaki farklılıkların en temel sebebi farklı ligandlarla sentezlenmeleri, sentez aşamasında çeşitli yan grupların eklenmesi olabilir. Ayrıca farklı hücrelerin hücre kültür ortamı koşullarının farklı olması, sitotoksik çalışmalarda kullanılan farklı metodolojiler, farklı doz açılımları da sonuçları etkileyen önemli sebeplerdendir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kansere bağlı ölümler ile ilgili yapılan istatistiksel çalışmalara bakıldığında birinci sırada akciğer kanserinin yer aldığı görülmektedir. Küçük hücreli ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere iki çeşidi bulunan akciğer kanserinde, Amerika'daki KHDAK vakaları için beş yıllık sağ kalım oranının yaklaşık % 20 olduğu belirtilmiştir (van der Hoorn vd., 2021). Bunun en önemli sebepleri hastalığın genellikle geç evrede teşhis edilmesi ve bu duruma bağlı olarak halen tedavisinde en etkili yöntem olan cerrahi müdahale için geç kalınmış olmasıdır.

Akciğer kanserinin tedavisinde kullanılan yöntemler hastalığın hangi evrede olduğuna ve kanserin tipine göre farklılık göstermekle birlikte kemoterapi hastalığın tedavisinde yaygın olarak tercih edilmektedir. Fakat kemoterapi de kullanılan ilaçların yan etkilerinin fazla olması, zamanla kanserli hücrelerin bu ajanlara karşı çoklu ilaç direnci geliştirmeleri, zayıf seçicilik göstermeleri nedeniyle tedavi başırısı hala oldukça sınırlıdır (Abdulbaqi vd., 2021). Bu nedenle akciğer kanserinin tedavisinde kanserli hücrelerin çoğalmasını engelleyen, aynı zamanda da yan etkilerinin az olacağı farklı ilaç etken maddelerin arayışı halen sürmektedir.

Bakır içeren çeşitli metal komplekslerinin farklı kanserli hücre hatlarındaki sitotoksisitesini araştıran çalışmalara bakıldığında, bakırlı komplekslerin genellikle hücreler üzerinde güçlü bir sitotoksik aktivite gösterdiği gözlenmektedir. Bazı çalışmalarda ise bu hücre çoğalmasını baskılayıcı etkinin zamana bağlı olarakta arttığıda belirlenmiştir.

Çalışmamızda yeni sentezlenen Bakır - Hidrazon Kompleksinin 5 farklı dozunun küçük hücreli dışı akciğer kanseri (A549) ve büyük hücreli akciğer kanseri (H460) hücrelerinde oluşturduğu sitotoksik etki hem doza hem de zamana bağlı olarak ilk kez araştırılmıştır. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre dizisinde 24 saat için IC_{50} değeri 4 μM, 48 saat için ise 2 μM olarak hesaplanmıştır. Büyük hücreli akciğer kanseri hücre dizisinde 24 saat için IC_{50} değeri 8 μM, 48 saat için ise 5 μM olarak hesaplanmıştır.

Çalışmadan elde edilen veriler değerlendirildiğinde A549 hücre dizisinde Bakır - Hidrazon Kompleksinin 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisinin daha fazla olduğu görülmekle beraber, H460 hücre dizisinde de A549 hücre dizisinde gözlenen sitotoksisiteye oldukça yakın oranda hücre çoğalmasını baskılayıcı bir etki gösterdiği gözlenmiştir. Her iki hücre dizisinde de Bakır - Hidrazon Kompleksinin konsantrasyon artışına bağlı olarak sitotoksik etkinin arttığı, fakat zamana bağlı olarak bu etkide bir artış olmadığı belirlenmiştir.

Ayrıca, çalışmamızda halen akciğer kanseri tedavisinde kullanılmakta olan karboplatinin 0,01; 0,1; 1; 10 ve 20 μM dozları da her iki akciğer kanseri hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle uygulanmıştır. Sonuç olarak Bakır - Hidrazon Kompleksinin sitotoksik aktivitesi, karboplatinin sitotoksik aktivitesi ile karşılaştırıldığında Bakır - Hidrazon Kompleksinin karboplatine oranla daha yüksek sitotoksisiteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle akciğer kanseri tedavisinde kullanılan farklı anti-kanser ilaçlarla Bakır - Hidrazon Kompleksinin etkileşimi çalışılmaya değer bir konu olma özelliği taşımaktadır.

Çalışmamızın sonuçları özellikle yeni sentezlenen Bakır - Hidrazon Kompleksinin akciğer kanseri hücrelerin çoğalmasını düşük dozlarda durdurduğunu ilk defa göstermesi açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle farklı çalışmalarla, farklı kanserli hücrelerde de bu kompleksin hücre çoğalması üzerindeki baskılayıcı etkisi doza ve zamana bağlı olarak araştırılabilir. Böylece elde edilen veriler sayesinde kompleksin hangi kanser hücrelerinde daha sitotoksik bir etkiye sahip olduğu çalışmamızdan elde edilen verilerle karşılaştırılarak ortaya konulabilir.

Ayrıca farklı bir çalışmada akciğer kanseri hücrelerinde gelişen bu sitotoksik aktivitenin hangi mekanizmalarla tetiklendiği, hangi ölüm mekanizmaları ile gerçekleştiğide araştırılabilir.

İleride yapılacak çalışmalarda farklı kanser hücre dizilerinde, çeşitli kemotöropotik ilaçlar ile birlikte Bakır - Hidrazon Kompleksinin kombine verilerek antogonistik/sinerjistik etkilerinin araştırılmasıda farklı bir çalışma konusunu oluşturmaktadır.

Bakırın antikanser özelliğinin yanı sıra antibakteriyel özellikte olduğu yıllardır bilinmektedir. Bakırın antimikrobiyal amaçla MÖ. 2000' li yıllarda Mısır'da içme suyunu temizlemek amacıyla kullanıldığı, çeşitli uygarlıklarda da kulak enfeksiyonları, yanık ve bağırsak solucanlarına karşı tedavide ve hijyen amacıyla kullanıldığı tespit edilmiştir (Grass vd., 2011).

Yaptığımız çalışmada, Bakır - Hidrazon Kompleksinin *B. subtilis, S.aureus, E.coli, E. hirae ve P. aeruginosa* bakterilerine karşı antibakteriyel etkinliği MİK ve MBK yöntemleri kullanılarak ilk kez araştırılmıştır. Deneyler sonucunda bakterilerin MİK ve MBK değerleri sırasıyla: *B. subtilis* 31,25-62,5 μM; *S.aureus* 62,5-500 μM ve *E. hirae* 62,5-250 μM olarak hesaplanmıştır. *E.coli* ve *P. aeruginosa* bakterilerinde ise antibakteriyel etkinlik tespit edilememiştir. *E.coli* ve *P. aeruginosa* bakterilerinin gram negatif olmaları nedeniyle Bakır - Hidrazon Kompleksine karşı daha dayanıklı hale getirmiş olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, Bakır - Hidrazon Kompleksinin *B. subtilis, S.aureus, E.coli, E. hirae ve P. aeruginosa* bakterileri üzerindeki antibakteriyel etkinliği ilk kez araştırılmıştır. Yapılacak yeni araştırmalarda, Bakır - Hidrazon Kompleksinin farklı bakteri suşları ve bu bakteriler üzerindeki etki mekanizmaları araştırılabilir ve çalışmamızdan elde edilen veriler ile karşılaştırılması yapılabilir.

Poliovirüs, çocuk felci hastalığına neden olan zarfsız bir RNA virüsüdür. Ağız ve dışkı yoluyla bulaşabilmekte ve sindirim kanalında çoğalmaktadır (Krzysztoszek vd., 2022). Poliovirüsün Tip 1, 2 ve 3 olmak üzere üç farklı suşu bulunmaktadır (Al-Qassimi vd., 2022).

Yapılan çalışmalarda bakırın; zarflı- zarfsız, DNA ve RNA virüslerine karşı antiviral etkinliği olduğu kanıtlanmıştır. Bakırın; virüslerin genetik materyalinde, zarf yapı ve şekillerinde bozunmalara neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca zarflı virüslerin, zarfsız virüslere kıyasla daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Govind vd., 2021). Yapılan deneyler sonucunda, bakırın zarflı virüs olan *İnfluenza A* ve *Herpes simpleks* üzerinde ve bakır içeren yüzeylerin *İnfluenza A* virüsü üzerinde antiviral etkinliğe sahip olduğu rapor edilmiştir (Banti vd., 2020).

Çalışmamızda Bakır - Hidrazon Kompleksinin 50; 15,2; 5; 1,58; 0,5; 0,05 ve 0,01 μM konsantrasyonları kullanılarak *Poliovirüs Tip 1* üzerinde antiviral testi gerçekleştirilmiştir. Test sonucunda bileşiğin *Poliovirüs Tip 1* üzerinde herhangi bir antiviral etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bunun, *Poliovirüs Tip 1*'in zarf bulundurmaması ve bu sayede dirençli bir virüs olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bileşiğin zarflı ve zarfsız farklı virüsler üzerinde de denenmesi sayesinde etkinlik tayini farklı çalışma konusu olabilme özelliği taşımaktadır.

Bu çalışmada 5 farklı bakteri üzerinde Bakır - Hidrazon Kompleksinin farklı dozları denemiştir. Özellikle kompleksin gram negatif bakterilerin çoğalması üzerinde herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermezken, gram pozitif olan türlerin çoğalması üzerinde antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Farklı bakteri türleri üzerinde de kompleksin etkinlikleri araştırılabilir ve elde ettiğimiz sonuçlarla karşılaştırılabilir. Ayrıca farklı çalışmalarla da anti fungal etkinliğine de bakılabilir.

Sonuçlarımızın özellikle Bakır - Hidrazon Kompleksinin akciğer kanseri tedavisinde kullanılabilir bir ilaç olarak geliştirilmesinde yapılacak olan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara öncülük edeceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abdulbaqi, I. M., Assi, R. A., Yaghmur, A., Darwis, Y., Mohtar, N., Parumasivam, T., Saqallah, F. G., ve Wahab, H. A. (2021). *Pulmonary Delivery of Anticancer Drugs via Lipid-Based Nanocarriers for the Treatment of Lung Cancer: An Update.* Pharmaceuticals, *14*(8), 725. https://doi.org/10.3390/ph14080725

Akçalı, A. (2010). *Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi*. Türk Onkoloji Dergisi, *25*(3), 19-123.

Allardyce, C. S., Dyson, P. J., Ellis, D. J., Salter, P. A., ve Scopelliti, R. (2003). S*ynthesis and characterisation of some water soluble ruthenium(II)–arene complexes and an investigation of their antibiotic and antiviral properties.* Journal of Organometallic Chemistry, *668*(1), 35-42. https://doi.org/10.1016/S0022-328X(02)01926-5

Al-Qassimi, M. A., Al Amad, M., Anam, L., Almoayed, K., Al-Dar, A., ve Ezzadeen, F. (2022). *Circulating vaccine derived polio virus type 1 outbreak, Saadah governorate, Yemen, 2020.* BMC Infectious Diseases, *22*, 414. https://doi.org/10.1186/s12879-022-07397-0

Arayıcı, M. E., Başbınar, Y., ve Ellidokuz, H. (2021). *İnsan Kanserlerinin Etiyolojisinde Gen-Çevre Etkileşiminin Rolü.* ERÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi, *8*(2), Art. 2. https://dergipark.org.tr/en/pub/erusaglik/issue/68082/990885

Arjmand, F., Sharma, S., Parveen, S., Toupet, L., Yu, Z., ve Cowan, J. A. (2020). *Copper(II) L/D-valine-(1,10-phen) complexes target human telomeric G-quadruplex motifs and promote site-specific DNA cleavage and cellular cytotoxicity.* Dalton Transactions, *49*(28), 9888-9899. https://doi.org/10.1039/D0DT01527J

Aryal, S. (2022). *Polio Virus- An Overview*. Erişim: https://microbenotes.com/polio-virus/ Erişim tarihi: 02.01.2023

Aydın, S. (2021). Akciğer Kanseri ve Sağkalımı Etkileyen Faktörler. İçinde *INSAC Academic Developments on Health Sciences* (Ekim 2021, ss. 251-267). Duvar Yayınları.

Ayyannan, G., Mohanraj, M., Gopiraman, M., Uthayamalar, R., Raja, G., Bhuvanesh, N., Nandhakumar, R., ve Jayabalakrishnan, C. (2020). *New Palladium(II) complexes with ONO chelated hydrazone ligand: Synthesis, characterization, DNA/BSA interaction, antioxidant and cytotoxicity.* Inorganica Chimica Acta, *512*, 119868. https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119868

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Banti, C. N., Kourkoumelis, N., Hatzidimitriou, A. G., Antoniadou, I., Dimou, A., Rallis, M., Hoffmann, A., Schmidtke, M., McGuire, K., Busath, D., Kolocouris, A., ve Hadjikakou, S. K. (2020). *Amantadine copper(II) chloride conjugate with possible implementation in influenza virus inhibition.* Polyhedron, 185, 114590. https://doi.org/10.1016/j.poly.2020.114590

Baykara, O. (2016). *Current Modalities in Treatment of Cancer.* Balıkesır Health Sciences Journal, 5(3), 154-165. https://doi.org/10.5505/bsbd.2016.93823

Bazhin, D., Kudyakova, Y., Slepukhin, P., Yanina, B., Malysheva, N., Kozitsina, A., Ivanova, A., Bogomyakov, A., ve Saloutin, V. (2018). *Dinuclear copper(ii) complex with novel N,N',N'',O-tetradentate Schiff base ligand containing trifluoromethylpyrazole and hydrazone moieties.* Mendeleev Communications, 28, 202-204. https://doi.org/10.1016/j.mencom.2018.03.032

Bektur Aykanat, N. E., ve Kaçar, S. (2021). *T-47D Meme Kanseri Hücreleri Üzerinde Kurkuminin Doz Bağımlı Etkisinin İncelenmesi.* Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 47(2), 241-245. https://doi.org/10.32708/uutfd.963295

Boinovich, L. B., Kaminsky, V. V., Domantovsky, A. G., Emelyanenko, K. A., Aleshkin, A. V., Zulkarneev, E. R., Kiseleva, I. A., ve Emelyanenko, A. M. (2019). *Bactericidal Activity of Superhydrophobic and Superhydrophilic Copper in Bacterial Dispersions.* Langmuir, 35(7), 2832-2841. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03817

Burgos-Lopez, Y., Del Plá, J., Balsa, L. M., León, I. E., Echeverría, G. A., Piro, O. E., García-Tojal, J., Pis-Diez, R., González-Baró, A. C., ve Parajón-Costa, B. S. (2019). *Synthesis, crystal structure and cytotoxicity assays of a copper(II) nitrate complex with a tridentate ONO acylhydrazone ligand. Spectroscopic and theoretical studies of the complex and its ligand.* Inorganica Chimica Acta, 487, 31-40. https://doi.org/10.1016/j.ica.2018.11.039

Chennam, K. P., Ravi, M., Boinala, A., Sudeepa, K., Ravinder, P., ve Sarala Devi, Ch. (2022). *Spectroanalytical, computational, DNA/BSA binding and in vitro cytotoxic activity studies of new transition metal complexes of novel aryl hydrazone.* Journal of Molecular Structure, 1252, 132126. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.132126

Coudray, N., Ocampo, P. S., Sakellaropoulos, T., Narula, N., Snuderl, M., Fenyö, D., Moreira, A. L., Razavian, N., ve Tsirigos, A. (2018). *Classification and mutation prediction from non–small cell lung cancer histopathology images using deep learning.* Nature Medicine, 24(10), Art. 10. https://doi.org/10.1038/s41591-018-0177-5

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Damena, T., Alem, M. B., Zeleke, D., Desalegn, T., Eswaramoorthy, R., ve Demissie, T. B. (2022). *Novel Zinc(II) and Copper(II) Complexes of 2-((2-Hydroxyethyl)amino)quinoline-3-carbaldehyde for Antibacterial and Antioxidant Activities: A Combined Experimental, DFT, and Docking Studies.* ACS Omega, 7(30), 26336-26352. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c02205

Daravath, S., Rambabu, A., Ganji, N., Ramesh, G., Anantha Lakshmi, P. V., ve Shivaraj. (2022). *Spectroscopic, quantum chemical calculations, antioxidant, anticancer, antimicrobial, DNA binding and photo physical properties of bioactive Cu(II) complexes obtained from trifluoromethoxy aniline Schiff bases.* Journal of Molecular Structure, 1249, 131601. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131601

Derikvand, Z., Talei, G. R., Aghabozorg, H., Olmstead, M. M., Azadbakht, A., Nemati, A., ve Gharamaleki, J. A. (2010). S*ynthesis, Crystal Structure, Spectroscopic, Electrochemical and Antimicrobial Properties of Cu(II) Complex with the Mixed Ligands of 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthroline and 4-Hydroxypyridine-2,6-dicarboxylic Acid.* Chinese Journal of Chemistry, 28(11), 2167-2173. https://doi.org/10.1002/cjoc.201090358

Duncan, C. ve White, A. R. (2012). *Copper complexes as therapeutic agents.* Metallomics, 4(2), 127-138. https://doi.org/10.1039/C2MT00174H

Elif, A.,ve Everest, A. (2013). *Antimikrobiyal Ajan Olarak Bitki Bileşenleri*. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 6(2), 27-32.

Gałczyńska, K., Ciepluch, K., Madej, Ł., Kurdziel, K., Maciejewska, B., Drulis-Kawa, Z., Węgierek-Ciuk, A., Lankoff, A., ve Arabski, M. (2019). *Selective cytotoxicity and antifungal properties of copper(II) and cobalt(II) complexes with imidazole-4-acetate anion or 1-allylimidazole.* Scientific Reports, 9, 9777. https://doi.org/10.1038/s41598-019-46224-6

Gomez-Larrauri, A., Ouro, A., Trueba, M., ve Gomez-Muñoz, A. (2021). *Regulation of cell growth, survival and migration by ceramide 1-phosphate—Implications in lung cancer progression and inflammation.* Cellular Signalling, 83, 109980. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.109980

Govind, V., Bharadwaj, S., Sai Ganesh, M. R., Vishnu, J., Shankar, K. V., Shankar, B., ve Rajesh, R. (2021). *Antiviral properties of copper and its alloys to inactivate covid-19 virus: A review.* Biometals, 34(6), 1217-1235. https://doi.org/10.1007/s10534-021-00339-4

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Grass, G., Rensing, C., ve Solioz, M. (2011). *Metallic Copper as an Antimicrobial Surface.* Applied and Environmental Microbiology, 77(5), 1541-1547. https://doi.org/10.1128/AEM.02766-10

Guo, M., Liu, Z., Si, J., Zhang, J., Zhao, J., Guo, Z., Xie, Y., Zhang, H., ve Gan, L. (2021). *Cediranib Induces Apoptosis, G1 Phase Cell Cycle Arrest, and Autophagy in Non-Small-Cell Lung Cancer Cell A549 In Vitro.* BioMed Research International, 2021, 1-11. https://doi.org/10.1155/2021/5582648

Gwinji, P. T., Musuka, G., Murewanhema, G., Moyo, P., Moyo, E., ve Dzinamarira, T. (2022). *The re-emergence of wild poliovirus type 1 in Africa and the role of environmental surveillance in interrupting poliovirus transmission.* IJID Regions, 5, 180-182. https://doi.org/10.1016/j.ijregi.2022.11.001

Han, I., Choi, S. A., ve Lee, D. N. (2022). *Therapeutic Application of Metal–Organic Frameworks Composed of Copper, Cobalt, and Zinc: Their Anticancer Activity and Mechanism.* Pharmaceutics, 14(2), 378. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020378

Hu, J., Liao, C., Mao, R., Zhang, J., Zhao, J., ve Gu, Z. (2018). *DNA interactions and in vitro anticancer evaluations of pyridine-benzimidazole-based Cu complexes.* MedChemComm, 9(2), 337-343. https://doi.org/10.1039/C7MD00462A

İnci, D., Aydın, R., Vatan, Ö., Sevgi, T., Yılmaz, D., Zorlu, Y., Yerli, Y., Çoşut, B., Demirkan, E., ve Çinkılıç, N. (2017). S*ynthesis and crystal structures of novel copper(II) complexes with glycine and substituted phenanthrolines: Reactivity towards DNA/BSA and in vitro cytotoxic and antimicrobial evaluation.* JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 22(1), 61-85. https://doi.org/10.1007/s00775-016-1408-1

Jin, Q.-M., Lu, Y., Jin, J.-L., Guo, H., Lin, G.-W., Wang, Y., ve Lu, T. (2014). *Synthesis, characterization, DNA binding ability and cytotoxicity of the novel platinum(II), copper(II), cobalt(II) and nickel(II) complexes with 3-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-β-carboline.* Inorganica Chimica Acta, 421, 91-99. https://doi.org/10.1016/j.ica.2014.05.036

Kaya, A. (2018). *Virüs Nedir? Virüslerin Genel Özellikleri, Yapısı ve Sınıflandırılması*. Erişim: https://www.tech-worm.com/virus-nedir-viruslerin-genel-ozellikleri-yapisi-siniflandirilmasi/, Erişim Tarihi: 02.01.2023

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Krzysztoszek, A., Gad, B., Diedrich, S., Böttcher, S., ve Wieczorek, M. (2022). *Investigation of airport sewage to detect importation of poliovirus, Poland, 2017 to 2020.* Eurosurveillance, 27(24), 2100674. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.24.2100674

Lang, T., Li, N., Zhang, J., Li, Y., Rong, R., ve Fu, Y. (2021). *Prodrug-based nano-delivery strategy to improve the antitumor ability of carboplatin in vivo and in vitro.* Drug Delivery, 28(1), 1272-1280. https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1938754

Lu, F., Li, S., Dong, B., Zhang, S., Lv, C., ve Yang, Y. (2015). *Identification of lung adenocarcinoma mutation status based on histologic subtype: Retrospective analysis of 269 patients: Lung cancer subtypes and mutation.* Thoracic Cancer, 7. https://doi.org/10.1111/1759-7714.12265

Martin-Fernandez, M. L. (2022). *Fluorescence Imaging of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer*. Cancers, 14(3), 686. https://doi.org/10.3390/cancers14030686

Masuda, R., Kijima, H., Nito, M., Wada, A., Matsuzaki, T., Ikoma, Y., Nakazato, K., Masuda, D., Tanaka, M., Kobayashi, H., Inokuchi, S., ve Iwazaki, M. (2017). *Lymphatic invasion is a significant indicator of poor patient prognosis in lung squamous cell carcinoma.* Molecular Medicine Reports, 15. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6256

Minoshima, M., Lu, Y., Kimura, T., Nakano, R., Ishiguro, H., Kubota, Y., Hashimoto, K., ve Sunada, K. (2016). *Comparison of the antiviral effect of solid-state copper and silver compounds.* Journal of Hazardous Materials, 312, 1-7. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.023

Mukherjee, S., Mitra, I., Reddy B., V. P., Fouzder, C., Mukherjee, S., Ghosh, S., Chatterji, U., ve Moi, S. Ch. (2017). *Effect of Pt(II) complexes on cancer and normal cells compared to clinically used anticancer drugs: Cell cycle analysis, apoptosis and DNA/BSA binding study.* Journal of Molecular Liquids, *247*, 126-140. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.09.104

Mutlu, A. (2018). *Salgın Haberleri 2018 Aşı Türevi Poliovirüs Salgınları.* ESTÜDAM Halk Sağlığı Dergisi, 3(3), Art. 3. https://dergipark.org.tr/tr/pub/estudamhsd/issue/40372/482804

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Myers, J. L. (2018). Akciğer—ClinicalKey. İçinde *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology* (ss. 372-443). https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B978032326339900010X?scrollTo=%23hl0002625

Nasirli, F. (2020). *Propolis Alt Fraksiyonlarının Antibiyofilm Ve Antikanser Etkilerinin Aydınlatılması* [Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Entitüsü]. YÖK Ulusal Tez Merkezi. https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=ZRePzQgK6bBxWdmdHWNZxw&no=lkCLOD_fRwIpeUg4Vr2bKg

Neethu, K. S., Sivaselvam, S., Theetharappan, M., Ranjitha, J., Bhuvanesh, N. S. P., Ponpandian, N., Neelakantan, M. A., ve Kaveri, M. V. (2021). *In vitro evaluations of biomolecular interactions, antioxidant and anticancer activities of Nickel(II) and Copper(II) complexes with 1:2 coordination of anthracenyl hydrazone ligands.* Inorganica Chimica Acta, 524, 120419. https://doi.org/10.1016/j.ica.2021.120419

Nogueira, T. C. M., dos Santos Cruz, L., Lourenço, M. C., ve de Souza, M. V. N. (2019). *Design, Synthesis and Anti-tuberculosis Activity of Hydrazones and N-acylhydrazones Containing Vitamin B6 and Different Heteroaromatic Nucleus.* Letters in Drug Design ve Discovery, 16(7), 792-798. https://doi.org/10.2174/1570180815666180627122055

Noshiranzadeh, N., Heidari, A., Haghi, F., Bikas, R., ve Lis, T. (2017). C*hiral lactic hydrazone derivatives as potential bioactive antibacterial agents: Synthesis, spectroscopic, structural and molecular docking studies.* Journal of Molecular Structure, 1128, 391-399. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.09.006

Oztopcu-Vatan, P., Sayitoglu, M., Gunindi, M., ve Inan, E. (2015). *Cytotoxic and apoptotic effects of menadione on rat hepatocellular carcinoma cells.* Cytotechnology, 67(6), 1003-1009. https://doi.org/10.1007/s10616-014-9739-7

Öz, B. (2020). *Patoloji: Morfolojiden Moleküler Analize Geçişde Doku Ekonomisi.* Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi, 6(3), 12-17. https://doi.org/10.5152/gghs.2018.035

Özçolpan, G. (2019). *Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonu Etkeni Olan Enterovirüslerin Saptanmasında Hücre Kültürü Yöntemi Ve Rt-Pcr Yöntemlerinin Karşılaştırılması* [Yüksek Lisans Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü]. YÖK Ulusal Tez Merkezi. https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=XzEARzAxT_B9i4dWYY4zmg&no=Df7wnyWqFr8EUt3vimJttQ

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Özdoğan, M. (2021). *Türkiye Kanser İstatistikleri 2020*. Erişim: https://www.drozdogan.com/turkiye-kanser-istatistikleri-2020/, Erişim Tarihi: 02.01.2023

Özdoğan, M. (2021). *Dünya Kanser İstatistikleri 2020 – Her 5 kişiden biri kanserle karşılaşıyor*. Erişim: https://www.drozdogan.com/dunya-kanser-istatistikleri-2020-her-5-kisiden-biri-kanserle-karsilasiyor/, Erişim Tarihi: 02.01.2023

Parsekar, S. U., Paliwal, K., Haldar, P., Antharjanam, P. K. S., ve Kumar, M. (2022). *Synthesis, Characterization, Crystal Structure, DNA and HSA Interactions, and Anticancer Activity of a Mononuclear Cu(II) Complex with a Schiff Base Ligand Containing a Thiadiazoline Moiety*. ACS Omega, 7(3), 2881-2896. https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05750

Parveen, S., Cowan, J. A., Yu, Z., ve Arjmand, F. (2020). *Enantiomeric copper based anticancer agents promoting sequence-selective cleavage of G-quadruplex telomeric DNA and non-random cleavage of plasmid DNA.* Metallomics, 12(6), 988-999. https://doi.org/10.1039/d0mt00084a

Philip, S., Jayasree, E. G., ve Mohanan, K. (2022). *Antiproliferative studies of transition metal chelates of a pyrazolone based hydrazone derivative*. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 0(0), 1-15. https://doi.org/10.1080/07391102.2021.2024257

Qi, Y.-Y., Liu, Y.-X., Gan, Q., Xiong, Y.-H., Mao, Z.-W., ve Le, X.-Y. (2018). *Three new mixed-ligand copper(II) complexes containing glycyl-l-valine and N,N-aromatic heterocyclic compounds: Synthesis, characterization, DNA interaction, cytotoxicity and antimicrobial activity*. Applied Organometallic Chemistry, 32(3), e4126. https://doi.org/10.1002/aoc.4126

Rodríguez, M. R., Balsa, L. M., Piro, O. E., Etcheverría, G. A., García-Tojal, J., Pis-Diez, R., León, I. E., Parajón-Costa, B. P., ve González-Baró, A. C. (2021). *Synthesis, Crystal Structure, Spectroscopic Characterization, DFT Calculations and Cytotoxicity Assays of a New Cu(II) Complex with an Acylhydrazone Ligand Derived from Thiophene.* Inorganics, 9(2), Art. 2. https://doi.org/10.3390/inorganics9020009

Rudin, C. M., Brambilla, E., Faivre-Finn, C., ve Sage, J. (2021). S*mall-cell lung cancer*. Nature Reviews Disease Primers, 7(1), 3. https://doi.org/10.1038/s41572-020-00235-0

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Salah, I., P. Parkin, I., ve Allan, E. (2021). *Copper as an antimicrobial agent: Recent advances.* RSC Advances, 11(30), 18179-18186. https://doi.org/10.1039/D1RA02149D

Schabath, M. B., ve Cote, M. L. (2019). *Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer.* Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 28(10), 1563-1579. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-0221

Seker, M., Özer, A., ve Korkut, C. (2020). *Virüsler, Viral Pandemileri Etkileyen Faktörler ve Sonuçları (Ed.), Küresel Salgının Anatomisi: İnsan ve Toplumun Geleceği,* 1. Baskı. (s.55-76) https://doi.org/10.53478/TUBA.2020.023

Sholl, L. M. (2014). *Large-cell carcinoma of the lung: A diagnostic category redefined by immunohistochemistry and genomics.* Current Opinion in Pulmonary Medicine, 20(4), 324. https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000068

Śliwińska-Mossoń, M., Wadowska, K., Trembecki, Ł., ve Bil-Lula, I. (2020). *Markers Useful in Monitoring Radiation-Induced Lung Injury in Lung Cancer Patients: A Review.* Journal of Personalized Medicine, 10(3), 72. https://doi.org/10.3390/jpm10030072

Subin Kumar, K. (2022). *Design, one-pot synthesis, cytotoxic, in vivo anticancer, antioxidant and antimicrobial evaluation of a novel mixed schiff base ligand and its metal complexes.* Results in Chemistry, 4, 100463. https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100463

Szefler, B., Czeleń, P., ve Krawczyk, P. (2021). *The Affinity of Carboplatin to B-Vitamins and Nucleobases.* International Journal of Molecular Sciences, 22(7), Art. 7. https://doi.org/10.3390/ijms22073634

The National Lung Screening Trial Research Team. (2011). *Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening.* New England Journal of Medicine, 365(5), 395-409. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1102873

Travis, W. D. (2012). *Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas.* Modern Pathology, 25(1), Art. 1. https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.150

Türkoğlu, P., ve Aslan, H. (2018). *Quorum Algılama (Quorum Sensing): Hücreler, Birbiriyle Nasıl Konuşur?*. Erişim: https://evrimagaci.org/quorum-algilama-quorum-sensing-hucreler-birbiriyle-nasil-konusur-7377, Erişim Tarihi: 02.01.2023

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Uzun Yaylaci, E. (2021). *Antibacterial Effects of Boric Acid Against Aquatic Pathogens.* Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences, 6(2),240-244 https://doi.org/10.35229/jaes.881144

van der Hoorn, I. A. E., Flórez-Grau, G., van den Heuvel, M. M., de Vries, I. J. M., ve Piet, B. (2021). *Recent Advances and Future Perspective of DC-Based Therapy in NSCLC.* Frontiers in Immunology, 12. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2021.704776

Wang, L., Syn, N. L.-X., Subhash, V. V., Any, Y., Thuya, W. L., Cheow, E. S. H., Kong, L., Yu, F., Peethala, P. C., Wong, A. L.-A., Laljibhai, H. J., Chinnathambi, A., Ong, P. S., Ho, P. C.-L., Sethi, G., Yong, W. P., ve Goh, B. C. (2018). *Pan-HDAC inhibition by panobinostat mediates chemosensitization to carboplatin in non-small cell lung cancer via attenuation of EGFR signaling.* Cancer Letters, 417, 152-160. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.12.030

Zampieri, L. X., Grasso, D., Bouzin, C., Brusa, D., Rossignol, R., ve Sonveaux, P. (2020). *Mitochondria Participate in Chemoresistance to Cisplatin in Human Ovarian Cancer Cells.* Molecular Cancer Research, 18(9), 1379-1391. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-1145

Zeng, Z., Cai, J., Li, F., Weng, Y., Huang, Q., Yang, H., Huang, Q., ve Wei, Y. (2021). *Synthesis, crystal structures, DNA interactions, and antitumor activity of two new dinuclear copper(ii) complexes with thiazole ligand.* RSC Advances, 11(63), 40040-40050. https://doi.org/10.1039/D1RA05798G

Zhu, Q.-G., Zhang, S.-M., Ding, X.-X., He, B., ve Zhang, H.-Q. (2017). *Driver genes in non-small cell lung cancer: Characteristics, detection methods, and targeted therapies*. Oncotarget, 8(34), 57680-57692. https://doi.org/10.18632/oncotarget.17016