
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

# TETRAZOLATO LİGANDI VE PLATİN KOMPLEKSİNİN *IN SILIKO* YAKLAŞIM VE *IN VITRO* GENOTOKSİSİTE YÖNTEMLERİ İLE PREKLİNİK GÜVENLİLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

**Fatma OKUŞ**

**DOKTORA TEZİ**
**BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ARALIK 2024**

## ETİK BEYAN

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

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

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

Fatma OKUŞ
23/12/2024

# TETRAZOLATO LİGANDI VE PLATİN KOMPLEKSİNİN *IN SILIKO* YAKLAŞIM VE *IN VITRO* GENOTOKSİSİTE YÖNTEMLERİ İLE PREKLİNİK GÜVENLİLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Fatma OKUŞ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2024

## ÖZET

Kanser tedavisinde Pt(II) bazlı ilaçlar sıklıkla tercih edilmektedir. Ancak yan etkileri ve direnç mekanizmaları bu ilaçların kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle yeni ve toksisitesi düşük Pt(II) komplekslerinin sentezlenmesi önemlidir. Bu amaçla tez çalışmasının da dahil olduğu Tübitak ARDEB 1001 projesi kapsamında sentezlenip karakterizasyonu yapılmış olan tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksinin biyolojik etkileri *in vitro* genotoksisite yöntemleri ile (Kromozomal anormallik, sitokinez blok mikronükleus ve komet testleri) araştırılmış, pozitif kontrol olarak cisplatin kullanılmıştır. *In siliko* kullanılarak DNA etkileşimleri ve preklinik güvenlilik değerlendirmesi kapsamında toksikolojik profillemesi yapılmıştır. Genotoksisite testlerinde kullanılacak konsantrasyonlara *in siliko* toksikoloji araçları kullanılarak belirlenen $LD_{50}$ dozuna göre karar verilmiştir. Tetrazolato ligandının çalışılan konsantrasyonlarda (2,34; 4,68; 9,37; 18,75; 37,5 µg/mL) genotoksik ve sitotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Pt(II) kompleksinin ise yüksek konsantrasyonlarda (18,75; 37,5µg/mL) cisplatine benzer genotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Moleküler doking çalışmaları farklı dizilimlere sahip DNA yapıları (PDB kodları: 8F2Y, 8F2W, 8F20, 1BNA) ile gerçekleştirilmiştir. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksinin DNA afinitesi esnek kenetleme (doking) yönteminde sırasıyla -9,742 ve -7,967 kcal/mol (en yüksek) olarak belirlenmiştir. Preklinik güvenlilik kapsamında altı farklı *in siliko* araç kullanılmış ve tetrazolato ligandının genel olaral toksik olmadığı kanısına varılmıştır. Elde edilen sonuçlar tetrazolato ligandının hem *in vitro* hem de *in siliko* yaklaşımda düşük toksisite beklentisini karşıladığını işaret etmektedir. Pt(II) kompleksinin ise hem DNA afinitesi hem de *in vitro* genotoksisite verileri ileri çalışmalar için uygun bir kompleks olduğunu göstermiştir.

Bilim Kodu : 20316
Anahtar Kelimeler : Tetrazol, Schiff bazı, genotoksisite, *in siliko*, moleküler doking
Sayfa Adedi : 155
Danışman : Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU
İkinci Danışman : Prof. Dr. Gonca ÇAKMAK

# PRECLINICAL SAFETY ASSESSMENT OF TETRAZOLATO LIGAND AND PLATIN COMPLEX WITH *IN SILICO* APPROACH AND *IN VITRO* GENOTOXICITY METHODS

(Ph. D. Thesis)

Fatma OKUŞ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

December 2024

## ABSTRACT

Pt(II) based drugs are frequently preferred in cancer treatment. However, side effects and resistance mechanisms limit the use of these drugs. Therefore, it is important to synthesize new Pt(II) complexes with low toxicity. For this purpose, the biological effects of the tetrazolato ligand and the Pt(II) complex, which were synthesized and characterized as part of the Tübitak ARDEB 1001 project, including the thesis study, were investigated by *in vitro* genotoxicity methods (Chromosomal abnormality, cytokinesis block micronucleus and comet tests), using cisplatin as a positive control. *In silico* methods were used for toxicological profiling within the scope of DNA interactions and preclinical safety assessment. The concentrations to be used in genotoxicity tests were decided according to the $LD_{50}$ dose determined using *in silico* toxicology tools. Tetrazolato ligand was found to have no genotoxic and cytotoxic effect at the concentrations studied (2.34; 4.68; 9.37; 18.75; 37.5µg/mL). Pt(II) complex was found to have a genotoxic effect similar to cisplatin at high concentrations (18.75 and 37.5 µg/mL). Molecular docking studies were carried out with DNA structures with different sequences (PDB codes: 8F2Y, 8F2W, 8F20, 1BNA). The DNA affinity of the tetrazolato ligand and Pt(II) complex was determined as -9.742 and -7.967 kcal/mol (highest), respectively, in the flexible docking method. Six different *in silico* tools were used for preclinical safety and the tetrazolato ligand was found to be generally non-toxic. The results obtained indicate that the tetrazolato ligand fulfils the expectation of low toxicity both *in vitro* and *in silico* approach. As for the Pt(II) complex, both DNA affinity and *in vitro* genotoxicity data indicate that it is a suitable complex for further studies.

Science Code : 20316
Key Words : Tetrazole, Schiff base, genotoxicity, *in silico*, molecular docking
Page Number : 155
Supervisor : Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU
Co-Supervisor : Prof. Dr. Gonca ÇAKMAK

# TEŞEKKÜR

Araştırma yolculuğum boyunca verdiği sarsılmaz destek ve içgörülü eleştirileriyle, yeteneklerime ve akademik potansiyelime olan sarsılmaz inancıyla en düşük anlarımda bile devam etmem için beni cesaretlendiren, bilgi ve görüşleri ile konunun seçiminden araştırmanın yürütülmesi ve yazımına kadar beni yönlendiren saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na en derin şükranlarımı sunuyorum. Akademik mükemmelliğe olan derin bağlılığı ve ayrıntılara gösterdiği titiz dikkat ile bu tezi önemli ölçüde şekillendiren kıymetli hocam ve ikinci danışmanım Prof. Dr. Gonca ÇAKMAK'a da aynı şekilde minnettarım. Açtığı laboratuvarla benim ve daha pek çok öğrencinin hayatına dokunan, aynı zamanda tez komite üyesi olan değerli hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a şükranlarımı sunuyorum. Tez komite üyesi olan diğer hocam Prof. Dr. Serkan YILMAZ'a da yapıcı geri bildirimleri ve çalışmamın kalitesini artıran temel önerileri için teşekkür ederim. Aynı zamanda çalışmalarım sırasında kendi öğrencisiymişim gibi benimle ilgilenen ve her soruma titizlikle yanıt veren değerli hocam Prof. Dr. Nurşen SARI'ya da teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Bu tez, zorlu akademik arayış sırasında ailemden aldığım sarsılmaz desteğin ve sınırsız sevginin bir yansımasıdır. Merakımı besleyen ve eğitim çabalarımı en başından beri destekleyen değerli eşim Salih OKUŞ'a ve iki küçük meleğime, sabır ve destekleri için büyük bir minnet borcum var. Ayrıca, her ihtiyaç duyduğumda yanımda olan ve devam etmenin imkânsız göründüğünde beni cesaretlendiren sevgili küçüğüm Zeynep GÜNAYDIN'a minnettarım. Maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda hissettiğim ve varlıklarından güç aldığım kıymetli kardeşim Mehmet GÜNAYDIN, annem Rahime GÜNAYDIN ve babam Halil GÜNAYDIN'na da şükranlarımı sunuyorum. Üniversitedeki laboratuvar arkadaşlarıma da teşekkürü bir borç bilirim. Onların tartışmaları ve sarsılmaz desteği araştırma deneyimimi zenginleştirdi ve bu yolculuğu sadece mümkün kılmakla kalmadı, aynı zamanda keyifli hale getirdi.

Bu tez çalışması için YÖK 100/2000 Doktora Bursu Programı kapsamında "Moleküler Farmakoloji ve İlaç Araştırmaları" öncelikli alanında burs vererek beni destekleyen YÖK kurumuna teşekkür ederim. Aynı zamanda tez çalışması TÜBİTAK ARDEB 1001 (122Z762) kodlu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir. Bu maddi destekten ötürü de TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

**Sayfa**

ÖZET ..... iv

ABSTRACT ..... v

TEŞEKKÜR ..... vi

İÇİNDEKİLER ..... vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ ..... x

ŞEKİLLERİN LİSTESİ ..... xi

RESİMLERİN LİSTESİ ..... xiii

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... xiv

1. GİRİŞ ..... 1

2. GENEL BİLGİLER ..... 5

2.1. Kanser ..... 5

2.2. Cisplatin ..... 5

2.2.1. Cisplatinin antikanser etki mekanizması ..... 6

2.2.2. Cisplatinin neden olduğu yan etkiler ..... 7

2.2.3. Cisplatin direnci ..... 9

2.3. Kemoterapide Kullanılan Diğer Pt(II) Bazlı İlaçlar ..... 10

2.3.1. Karboplatin ..... 12

2.3.2. Oksaliplatin ..... 12

2.3.3. Yeni Pt(II) bazlı yapılar için yapı ile aktivite arasındaki ilişki ..... 13

2.4. Tetrazol ve Schiff Bazları'nın Farmakolojik Önemi ..... 14

2.4.1. Schiff bazı ..... 14

2.4.2. Tetrazol ..... 15

2.4.3. Schiff bazı içeren Pt(II) komplekslerinin genotoksik etkileri ..... 15

2.4.4. Tetrazol içeren Pt(II) komplekslerinin genotoksik etkileri ..... 16

**Sayfa**

2.5. Genotoksisite ve Kanser ..... 17

2.6. Genotoksisite Testleri ..... 21

2.6.1. Kromozomal anormallik (KA) testi ..... 22

2.6.2. Sitokinezi bloklanmış mikronükleus (CBMN) sitom testi ..... 23

2.6.3. Komet testi ..... 23

2.7. Toksikoloji Değerlendirmesinde Hayvan Deneylerine Alternatif Yöntemler ve Aralarında *in siliko* Araçların Yeri ..... 24

2.7.1. Moleküler doking ..... 27

2.7.2. *In siliko* toksikoloji ..... 27

2.7.3. *In siliko* toksikoloji yaklaşımında kullanılan araçlar ve $LD_{50}$ tahmini ..... 28

2.8. *In siliko* yaklaşımı ile preklinik güvenlilik değerlendirilmesi ..... 31

3. MATERYAL METOD ..... 33

3.1. Materyal ..... 33

3.1.1. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) Kompleksi ..... 33

3.2. Metod ..... 35

3.2.1. *In Siliko* yöntemler ile TetSalCl ligandının Rat Oral $LD_{50}$ dozunun belirlenmesi ..... 36

3.2.2. Genotoksisite testlerinde kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi ..... 36

3.2.3. Kromozomal anormallik testi ..... 36

3.2.4. Sitokinez blok mikronükleus sitom ..... 37

3.2.5. Komet testi ..... 40

3.2.6. Genotoksisite testleri verilerini değerlendirmek için kullanılan istatistiksel analizler ..... 43

3.3. Moleküler Doking ..... 43

3.4. Preklinik Güvenlilik Değerlendirilmesi ..... 45

4. BULGULAR ..... 47

4.1. *In Siliko* Yöntemler ile TetSalCl Ligandının Rat Oral $LD_{50}$ Dozunun Belirlenmesi ..... 47

**Sayfa**

4.1.1. *In siliko* $LD_{50}$ tahminleri ..... 47

4.2. Genotoksisite testlerinde kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi ..... 47

4.2.1. Cisplatinin pozitif kontrol konsantrasyonunun belirlenmesi ..... 47

4.2.2. TetSalCl ligandı için kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi ..... 48

4.3. Kromozomal anormallik testi sonuçları ..... 48

4.4. Sitokinez blok mikronükleus sitom testi sonuçları ..... 54

4.5. Komet testi sonuçları ..... 58

4.6. Moleküler Doking Sonuçları ..... 63

4.6.1. Tetrazolato ligandı ve 8F2Y kodlu DNA yapısı için gerçekleştirilen doking ve esnek doking çalışması ..... 64

4.6.2. Tetrazolato ligandı ve 8F2W kodlu DNA yapısı için gerçekleştirilen doking ve esnek doking çalışması ..... 64

4.6.3. Tetrazolato ligandı ve 8F20 kodlu DNA yapısı için gerçekleştirilen doking ve esnek doking çalışması ..... 65

4.6.4. Tetrazolato ligandı ve 1BNA kodlu DNA yapısı için gerçekleştirilen doking ve esnek doking çalışması ..... 66

4.6.5. Pt(II) kompleksi ve 8F2Y kodlu DNA yapısı için gerçekleştirilen doking ve esnek doking çalışması ..... 67

4.6.6. Pt(II) kompleksi ve 8F2W kodlu DNA yapısı için gerçekleştirilen doking ve esnek doking çalışması ..... 67

4.6.7. Pt(II) kompleksi ve 8F20 kodlu DNA yapısı için gerçekleştirilen doking ve esnek doking çalışması ..... 68

4.6.8. Pt(II) kompleksi ve 1BNA kodlu DNA yapısı için gerçekleştirilen doking ve esnek doking çalışması ..... 69

4.7. Preklinik Güvenlilik Değerlendirilmesinden Elde Edilen Sonuçlar ..... 71

5. TARTIŞMA ..... 75

6. SONUÇ VE ÖNERİLER ..... 117

KAYNAKLAR ..... 121

ÖZGEÇMİŞ ..... 153

# ÇİZELGELERİN LİSTESİ

**Çizelge** **Sayfa**

Çizelge 3.1. Bölünme indekslerinin belirlenmesi için kullanılan formüller ..... 40

Çizelge 3.2. Tripan mavisi canlılık testi verilerinin değerlendirilmesi için kullanılan formüler ..... 40

Çizelge 3.3. Genotoksisite testleri ile hazırlanan preparatlardan değerlendirilen hücre sayıları ..... 43

Çizelge 3.4. Doking için kullanılan DNA yapıları ..... 44

Çizelge 3.5 Preklinik güvenlilik değerlendirme için kullanılacak veriler ..... 46

Çizelge 4.1. (TetSalCl) Ligandı için programlardan elde edilen Rat oral $LD_{50}$ dozları. 47

Çizelge 4.2. Cisplatin mitotik indeks sayım sonuçları..... 47

Çizelge 4.3. TetSalCl Ligandı mitotik indeks sayım sonuçları ..... 48

Çizelge 4.4. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi muamelesi sonucu insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları 50

Çizelge 4.5. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi muamelesi sonucu insan periferal lenfositlerinde oluşan mikronükleus, nükleoplazmik köprü ve nükleer tomurcuk frekansları ile nükleer bölünme ve sitokinez blok proliferasyon indeksleri ..... 56

Çizelge 4.6. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde oluşan DNA hasarı ..... 60

Çizelge 4.7. Doking çalışmalarınan elde edilen doking (D) ve Esnek Doking (ED) skorları (kcal/mol)..... 70

Çizelge 4.8. Tetrazolato ligadı ve Pt(II) komplesinin farklı DNA yapıları ile olan etkileşimeri ve etkileştikleri bazlar ..... 71

# ŞEKİLLERİN LİSTESİ

**Şekil** **Sayfa**

Şekil 2.1. FDA tarafından onaylanmış platin bazlı ilaçlar ..... 11

Şekil 2.2. Pt(II) bazlı ilaçların tarihi kronolojisi ..... 11

Şekil 2.3. Genotoksinlere maruz kalmanın insan sağlığı üzerindeki başlıca etkileri..... 18

Şekil 2.4. İlaç keşfi süreci ve preklinik çalışmanın ana içeriğini özetleyen akış şeması 32

Şekil 3.1. Tetrazolato ligandı (A) ve Pt(II) kompleksinin (B) kimyasal yapıları ..... 34

Şekil 3.2. Cis diammino diklororo platin (II) kompleksinin (Cisplatin) kimyasal yapısı ..... 35

Şekil 3.3. Hidrojen peroksit'in yapısal formülü..... 35

Şekil 3.4. Kromozomal anormallik ve sitokinez blok mükronükleus testi preperasyon diyagramı ..... 39

Şekil 3.5. Komet testi preperasyon diyagramı ..... 42

Şekil 3.6. Moleküler doking uygulama diyagramı..... 45

Şekil 4.1. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi uygulamasının insan periferal lenfositlerindeki anormal hücre yüzdesi üzerine etkisi..... 51

Şekil 4.2. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi uygulamasının insan periferal lenfositlerindeki hücre başına düşen anormallik frekansı üzerine etkisi ..... 51

Şekil 4.3. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi uygulamasının insan periferal lenfositlerindeki mitotik indeks değerleri ..... 52

Şekil 4.4. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksinin insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü frekansları üzerine etkisi ..... 57

Şekil 4.5. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi muamelesi sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde tripan mavisi testine göre değişen canlılık değerleri ..... 59

Şekil 4.6. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi muamelesi sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde komet kuyruk yoğunluğu ..... 60

Şekil 4.7. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi muamelesi sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde komet kuyruk uzunluğu..... 61

**Şekil** **Sayfa**

Şekil 4.8. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi muamelesi sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde komet kuyruk momenti ..... 61

Şekil 4.9. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksinin insan lenfositleri üzerindeki genotoksik etkilerinin çözücü kontrole göre değişiminin genel görünümü... 63

Şekil 4.10. A: 8F2Y kodlu DNA yapısı ve Tetrazolato ligandının etkileşimi, B: Etkileşim sonucu oluşan bağların detaylı gösterimi, C: Esnek doking sonrası oluşan etkileşimler (mor: Hidrojen bağı, sarı: halojen bağı, kırmızı: tuz köprüsü)..... 64

Şekil 4.11. A: 8F2W kodlu DNA yapısı ve Tetrazolato ligandının etkileşimi, B: Etkileşim sonucu oluşan bağların detaylı gösterimi, C: Esnek doking sonrası oluşan etkileşimler (mor: Hidrojen bağı)..... 65

Şekil 4.12. A: 8F20 kodlu DNA yapısı ve Tetrazolato ligandının etkileşimi, B: Etkileşim sonucu oluşan bağların detaylı gösterimi, C: Esnek doking sonrası oluşan etkileşimler (mor: Hidrojen bağı, yeşil: $\pi \rightarrow \pi$ etkileşimi, sarı: Halojen bağı)..... 66

Şekil 4.13. A: 1BNA kodlu DNA yapısı ve Tetrazolato ligandının etkileşimi, B: Etkileşim sonucu oluşan bağların detaylı gösterimi, C: Esnek doking sonrası oluşan etkileşimler (mor: Hidrojen bağı, yeşil: $\pi \rightarrow \pi$ etkileşimi, sarı: halojen bağı)..... 66

Şekil 4.14. A: 8F2Y kodlu DNA yapısı ve Pt(II) kompleksinin etkileşimi, B: Esnek doking sonrası konformasyonel değişim, C: Esnek doking sonrası oluşan etkileşimler (mor: hidrojen bağı) ..... 67

Şekil 4.15. A: 8F2W kodlu DNA yapısı ve Pt(II) kompleksinin etkileşimi, B: Esnek doking sonrası konformasyonel değişim, C: Esnek doking sonrası oluşan etkileşimler (kırmızı: $\pi$ katyon bağı, mor: hidrojen bağı, kırmızı mor: tuz köprüsü) ..... 68

Şekil 4.16. A: 8F20 kodlu DNA yapısı ve Pt(II) kompleksinin etkileşimi, B: Esnek doking sonrası konformasyonel değişim, C: Pt(II) iyonu ve bazlar arası uzaklık ölçümü, D: Esnek doking sonrası oluşan etkileşimler (sarı:halojen bağı, yeşil: $\pi \rightarrow \pi$ etkileşimi, mor hidrojen bağı)..... 69

Şekil 4.17. A: 1BNA kodlu DNA yapısı ve Pt(II) kompleksinin etkileşimi, B: Esnek doking sonrası konformasyonel değişim, C: Pt(II) iyonu ve bazlar arası uzaklık ölçümü (2,81; 3,16; 2,70 Å), D: Esnek doking sonrası oluşan etkileşimler (sarı: halojen bağı, kırmızı: $\pi$ katyon etkileşimi, mor: hidrojen bağı, yeşil: $\pi \rightarrow \pi$ etkileşimi)..... 70

# RESİMLERİN LİSTESİ

**Resim** **Sayfa**

Resim 3.1. Komet görüntü analizi..... 41

Resim 4.1. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri ..... 53

Resim 4.2. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü içeren binükleat hücreler..... 58

Resim 4.3. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının komet testi ile görünümü ..... 62

# SİMGELER VE KISALTMALAR

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

| **Simgeler** | **Açıklamalar** |
|---|---|
| **%** | Yüzde |
| **µg/mL** | Mikrogram / Mililitre |
| **µL** | Mikrolitre |
| **µM** | Mikromolar |
| **$H_2O$** | Su |
| **$LD_{50}$** | Letal doz 50 |
| **mA** | Miliamper |
| **mg/kg** | Miligram / kilogram |
| **mL** | Mililitre |
| **mL/kg** | Mililitre / kilogram |
| **mM** | Milimolar |
| **N** | Azot |
| **O** | Oksijen |
| **ºC** | Santigrat derece |
| **Pt** | Platin |
| **rpm** | Devir sayısı |
| **V** | Volt |

| **Kısaltmalar** | **Açıklamalar** |
|---|---|
| **5HT3** | Serotonin reseptörü |
| **A431** | Epidermoid kanser hücresi |
| **ATP7A** | Bakır ihraç eden P-tipi ATPaz A |
| **ATP7B** | Bakır ihraç eden P-tipi ATPaz B |
| **BRCA1** | Meme kanseri tip 1 duyarlılık proteini |
| **BRCA2** | Meme kanseri tip 2 duyarlılık proteini |
| **CBMN** | Sitokinez blok mikronükleus testi |

| Kısaltmalar | Açıklamalar |
|---|---|
| **CBPİ** | Sitokinez blok proliferasyon indeksi |
| **CDK2** | Siklin bağımlı kinaz 2 |
| **CP** | Cisplatin |
| **CTR1** | Bakır taşıyıcı 1 |
| **CTR2** | Bakır taşıyıcı reseptör 2 |
| **CTZ** | Kemoreseptör tetikleme bölgesi |
| **DMSO** | Dimetiksülfoksit |
| **DNA** | Deoksiribonükleik asit |
| **ECVAM** | Avrupa Alternatif Yöntemleri Doğrulama Merkezi |
| **EPA** | Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Kurumu |
| **ERCC-1** | DNA eksizyon onarım proteini |
| **ERK** | Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz |
| **FDA** | Food and Drug Administration |
| **FT-IR** | Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi |
| **GLOBOCAN** | Küresel Kanser Gözlemevi |
| **GSH** | Glutatyon |
| **HCT116** | Kolon kanseri hücresi |
| **HeLA** | İnsan servikal kanser hücresi |
| **HMG** | Yüksek mobilite grubu |
| **HMG1** | Yüksek mobilite grubu 1 |
| **HPLC** | Yüksek performanslı sıvı kromatografisi |
| **ICH** | Uluslararası uyumlaştırma konseyi |
| **JNK** | c-jun n-terminal protein kinaz |
| **KA** | Kromozomal anormallik testi |
| **MAPK** | Mitojenle aktive olan protein kinaz |
| **MGMT** | Metillenmiş DNA-protein-sistein metiltransferaz |
| **Mİ** | Mitotik indeks |
| **MMR** | Yanlış eşleşme onarımı |
| **MN** | Mikronükleus testi |
| **MRP2** | Çoklu ilaç direnciyle ilişkili protein 2 |
| **NDİ** | Nükleer bölünme indeksi |
| **NER** | Nükleotid eksizyon onarımı |

| Kısaltmalar | Açıklamalar |
|---|---|
| **OCT2** | Organik katyon taşıyıcı |
| **OECD** | Ekonomik Kalkınma ve İş Birliği Örgütü |
| **RES** | Retiküloendotelyal sistem |
| **ROS** | Reaktif oksijen türleri |
| **TNF-a** | Tümör nekroz faktörü |
| **TNFR-1** | Tümör nekroz faktörü reseptör 1 |
| **WHO** | World Health Organization |

# 1. GİRİŞ

Dünyada en çok ölüme neden olan hastalıklar listesinde ikinci sırasında yer alan kanserin tedavisi için platin (Pt) bazlı ilaçlar önemli bir yer teşkil etmektedir [1, 2]. 1900'lerin başında ünlü Alman kimyager Paul Ehrlich, hastalıkları tedavi etmek için kimyasalların kullanılabileceği fikrini öne sürerek "Kemoterapi" terimini ilk kullanan kişi olmuştur. Ardından bir dizi kimyasalın hastalıklara karşı potansiyel aktivitelerini anlamak için hayvan modellerinin etkinliğini araştırmış ve ilk kez belgelemiştir [3, 4]. 1908'de frengi hastalığının tedavisi için tavşanları kullanan Ehrlich arsenik bileşiklerinin tedavide etkin olduğunu belirlemiştir. Bu gelişme kanser tedavisinde kullanılabilecek kimyasalların araştırılmasının da başlamasına neden olmuştur. Ardından anilin boyaları ve ilk eski alkilleyici ajanlar da dahil olmak üzere kanser tedavisine yönelik ilaçlarla da ilgilenmiştir [5]. 1946 yılında lenfoid tümörü olan farelerde nitrojen mustardın anlamlı regresyona neden olduğunun yayınlanmasından sonra, 1960'ların başında akut çocukluk lösemisinin tedavisinde kombine kemoterapinin etkinliğinin gösterilmesi kanser kemoterapisinin gelişmesinde önemli adımlar olmuştur. Bu gelişmeler klorambusil, siklofosfamid, Aktinomycin D, antrasiklinler, kromomisinler, mitomisin ve bleomisin dahil olmak üzere daha fazla antitümör kimyasal arayışına öncülük etmiştir [3, 4]. 1960'lara kadar kanser tedavisinde cerrahi uygulamalar ve radyoterapi egemen olmuş ancak radikal lokal tedavilerden sonra bile mikrometastazların varlığı nedeniyle iyileşme oranları yaklaşık %33'te sabitlenmiştir. Daha sonra, çeşitli ilerlemiş kanserleri olan hastalara kemoterapi uygulanmaya başlanmıştır. Başlangıçta meme kanseri hastalarında mikrometastaz sorunuyla başa çıkmak için cerrahi ve/veya radyasyon tedavileri ile ilaç uygulaması yapılmış ve adjuvan kemoterapi alanı doğmuştur. Üç yöntemin bir arada kullanıldığı tedavi, sağlıklı hücreye en az zararla en fazla antitümör etkiyi sağlayacak şekilde minimum toksisite çalışmaları sonuç verdikten sonra standart klinik uygulama haline gelmiştir [3]. 1969 yılında cisplatinin (cis-diamminedichloroplatinum) hayvan modellerinde kanserli dokuda anlamlı küçülmeyi sağlaması sonrası Pt(II) bazlı ilaçların kanser tedavisinde kullanımı başlamıştır [6, 7]. Cisplatin denemelerinde pek çok kanserli hastanın tümörlü dokudan kurtulmasını sağlamıştır. Ancak aynı hastalar bu kez de akut böbrek yetmezliğinden müzdarip olmuş ve cisplatinin yan etkileri bu şekilde ortaya çıkmıştır. Yan etkilerinin belirlenmesi bu kimyasala benzeyen ancak istenmeyen etkileri çok daha az olan yeni moleküllerin arayışını başlatmıştır [7-9].

Metallerin çoğu insan vücudu için doğal değildir. Elimine edilmeleri ve toksik davranışları için etkili bir mekanizma bulunmamaktadır. Bir element olan Platin de geçiş elementleri grubundandır ve DNA (Deoksi Ribonükleik Asit) ile etkileşimi nedeniyle kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Platinin uygun bir ligand ile şelatlanarak kullanılmasının serbest metal iyonu toksisitesinden kaynaklanabilecek tıbbi problemlerin üstesinden gelinmesinde etkili bir yol olacağı bilinmektedir. Aynı amaçla sentezlenmiş farklı platin bazlı ilaçlar FDA (US Food and Drug Administration, Amerika Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından kanser tedavisi için onaylanmıştır [5]. Bugüne kadar onay almış platin bazlı ilaçlarda anti kanser etkiyi Pt iyonunun gerçekleştirdiği bilinmektedir. Bu nedenle Pt iyonunu taşıyan ligandlar büyük öneme sahiptir. Bu bilgiler ışığında Pt(II) iyonunun etkinliğini korurken yan etkilerini azaltabilecek bir ligadın olabileceği düşünülen tetrazolato ligandının biyolojik etkinliğinin belirlenmesi bu tez çalışmasının da amacı olmuştur.

Tetrazolato ligandında farmakofor özellikleri nedeniyle ilaç moleküllerinde sıklıkla kullanılan tetrazol (IUPAC / Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği) adı: tetrazolato) [7, 10, 11] molekülünün Schiff bazı içeren yapısı kullanılmıştır. Schiff bazı yapısı vücutta metabolik faaliyetler sırasında sıklıkla oluşup bozulan azot ve karbon arasında çift bağ oluşumu ile tanımlanan bir yapıdır [7]. Schiff bazları yapısal özellikleri, metallerle kolay bağ kurmaları, üstün farmakolojik etkileri sayesinde koordinasyon kimyasında kullanılmaktadır [7, 12-14]. Yüksek etki ve düşük yan etki verileri nedeniyle Schiff bazı içeren yapılar yeni ilaç keşiflerinde güçlü bir kaynak olarak görülmektedir [7, 13-16]. Tetrazol ise düşük toksisite, yüksek etkinlik ve uzun biyoyararlanım gibi etkileriyle ilaç tasarımında kullanılması tavsiye edilen bir moleküldür [10, 17-19].

Pt bazlı ilaçların yan etkilerinden biri de genotoksisitedir. Genotoksisite bir kimyasalın genetik materyal üzerindeki istenmeyen etkisi olarak tanımlanmaktadır [20]. Bu etkinin ve mekanizmasının detaylı araştırılması ve anlaşılması için, kromozomlarda oluşan sayısal (poliploidi, endoreduplikasyon) ve yapısal (kromozom kırığı, kromatit kırığı, kardeş kromatidlerde birleşme vb.) anomalileri ayrıntılı olarak belirleyen kromozomal anormallik; klastojenik ve anöjenik etkilerin yanında kromozomal kararsızlığı da belirleyen sitokinez blok mikronükleus sitom ve DNA üzerinde oluşan hasarların belirlenmesini sağlayan komet testleri bir arada kullanılmaktadır [21-23]. Bu testlerin uygulamasında, sitotoksik etki hakkında bilgi veren kromozomal anormallik testinde mitotik indeks, sitokinez blok mikronükleus sitom yönteminde nükleer bölünme indeksi, proliferasyon indeksi verileri de

elde edilmektedir. Komet testinde ise tripan mavisi canlılık testi kullanılabilmektedir. Bu detaylı veriler genotoksik etki ile sitotoksik etki arasındaki ilişkinin belirlenmesi için de yol gösterici olmaktadır. Tez kapsamında gerçekleştirilen genotoksisite testlerinde muamele edilecek konsantrasyonların belirlenmesinde tetrazolato ligandının $LD_{50}$ dozu baz alınmıştır. Tetrazolato ligandı yeni sentezlenmiş bir yapı olduğundan $LD_{50}$ dozunun belirlenmesi için son yıllarda önemi gittikçe artan [24, 25] *in siliko* toksikoloji programlarından faydalanılmıştır.

İlaç araştırmalarında bilgisayar temelli yaklaşımların başlangıç yöntemleri olarak kullanılması regülasyon kuruluşlarınca, zaman, maliyet ve 3R kuralı kapsamında desteklenmektedir [26]. Bu anlamda molekül tasarımından sonra etkinliğin belirlenmesi için moleküler doking çalışmaları kullanılmaktadır [27-29]. Bu çalışmalardan elde edilen veriler tasarlanan moleküllerin olası etkinlikleri hakkında ön bilgiler sağlamaktadır. Tez kapsamında da *in siliko* yaklaşımlardan moleküler doking yöntemi kullanılarak tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksinin DNA ile etkileşimi araştırılmıştır.

Kimyasal toksisitesinin belirlenmesinde hayvan deneyleri kullanılmaktadır. Deneylerde hayvan kullanımı uzun zaman ve maliyet gerektirmektedir. Son yıllarda bu durumu değiştirmek için bilgisayar modelleri, hücre ve doku kültürleri ve alternatif organizmaların (prokaryotlar, funguslar, protistler, alt omurgalılar ve omurgasızlar) kullanılması hayvan deneylerine alternatif olarak gösterilmektedir [30, 31]. Bilgisayarlı yaklaşımlar da hayvan deneylerine alternatif yöntem olarak Avrupa ve Amerika'da özellikle kozmetik endüstrisinde hayvan deneylerinin yasaklanması sonrasında yaygınlaşmıştır [32-35]. Alternatif yöntemlerin sonuçlarını analiz etmek için modern analitik tekniklerin, veri toplama ve istatistiksel prosedürlerin kullanılmasının güvenilir sonuçlar sağlayabileceği bildirilmektedir. Bu entegre yaklaşımların, hayvanların bilimsel prosedürlere asgari düzeyde dahil edilmesiyle sonuçlanması beklenmektedir [31]. İlaç temelli moleküllerin preklinik çalışmalarında da *in siliko* programların devreye girmesi avantaj sağlamaktadır [36, 37]. Tez çalışması kapsamında da bu programların kullanılması, yayınlarla duyurulması ile benzer yaklaşımların ülkemizde kullanımının yaygınlaştırılmasını sağlayacaktır. Bunun yanı sıra elde edilen bilgilerin modelleme veritabanları ile paylaşılması *in siliko* programların geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

Bu bilgiler ışığında tez çalışmasında tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksinin:

1. *In siliko* yaklaşım ile genotoksisite yöntemlerinde kullanılacak konsantrasyonlara karar vermek için $LD_{50}$ dozunun belirlenmesi,
2. *In vitro* preklinik genotoksisite bulgularına, uluslararası kılavuzlarda (OECD) valide edilmiş deney hayvanı kullanılmayan ya da bilimsel geçerliliği olan yöntemlerle ulaşılması,
3. DNA ile etkileşiminin moleküler doking yöntemi ile sorgulanması
4. Preklinik güvenlilik verilerine kapsamlı *in siliko* toksikoloji yazılım araçları ile ulaşılıp bütün bulguların bir arada değerlendirilmesi,
5. Geniş çaplı *in vitro* toksisite verisine ilk kez erişilerek bunların *in siliko* veritabanları ve yazılım araçları için de kaynak oluşturması, katkıda bulunması

amaçlanmıştır.

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1. Kanser

Kanser hastalığı dünya çapında önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından kanser kontrolü ve araştırmaları hakkında bilgilendirme yapmak ve küresel kanser istatistikleri sunmak üzere kurulmuş olan GLOBOCAN (Global Cancer Observatory) platformunda: 2022 yılında yaklaşık 20 milyon insana kanser teşhisi konulduğu, 10 milyon civarında insanın kanserden hayatını kaybettiği bildirilirken, 5 yıllık yaygın vaka sayısının yaklaşık 54 milyona ulaşacağı öngörülmektedir [38-41]. Dünyada ölüm nedenlerini gösteren istatistiklerde kanser, türlerine göre değişmekle beraber birinci veya ikinci sırada yer almaktadır [40]. İstatistiklere göre dünyada her 5 kişiden 1'i kansere yakalanırken; 11 kadından 1'i ve 8 erkekten 1'i kanser nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Aynı platformda Türkiye'de 2022 yılında 240.013 kanser vakası görüldüğü ve 129.672 ölümün kanser nedenli gerçekleştiği, 5 yıllık yaygın vaka sayısının 679.335 olacağı bildirilmektedir [38, 39].

Geleneksel kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahale kanser tedavisinin altın yöntemleri olarak bildirilmektedir [42]. Kemoterapi birçok kanser türü için farklı evrelerde baskın tedavi yöntemi olmaya devam etmektedir [43]. Kemoterapi için geliştirilmiş en iyi ve ilk metal bazlı kemoterapötik ilaç cisplatindir [9]. Peyrone tarafından 1844'te sentezlenen [44, 45] cisplatinin antikanser özelliği 1969'da Rosenberg ve diğerleri, tarafından gösterilmiş [6], 1978 yılında da Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Kanser teşhisi alan hastaların yaklaşık %50'sinin tedavilerinin bir bölümünde cisplatin kullandığı bildirilmiştir [9, 46-48].

## 2.2. Cisplatin

İlk kez 1844'te sentezlenen cisplatinin, antibakteriyel ve antitümoral etkileri, tesadüfen onu keşfeden Rosenberg ve diğerleri, tarafından gösterilmiştir [6, 49]. Metal bazlı bileşiklerin toksik olduğu bilinmesine rağmen cisplatinin antikanser etkisinin keşfinin üzerine farelerde belli dozlarının telafi edilebildiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar cisplatinin kanser tedavisinde kullanılabileceğinin göstergesi olmuştur. 1978 yılında FDA tarafından onaylandıktan sonra özellikle metastatik testis, yumurtalık ve mesane kanserlerinin tedavisinde kullanılsa da [9]

akciğer, rahim gibi kanser türlerinin kemoterapisinde de ana bileşenlerden biri olmuştur [7, 50, 51].

### 2.2.1. Cisplatinin antikanser etki mekanizması

Cisplatinin antikanser etkisi hücre içerisinde farklı yaşamsal hedeflerle etkileşmesi ile oluşmaktadır. Bu hedeflerin başında genomik veya mitokondriyal DNA bulunmaktadır. İntravenöz uygulamadan sonra yüksek miktarda cisplatin plazma proteinlerine bağlanarak inaktive olmaktadır. Ayrıca hücre dışında klorür iyonu konsantrasyonunun yüksek olması (100 mM) nedeniyle, serbest cisplatin plazmada nispeten düşük reaktivite sergilemektedir. Ancak düşük konsantrasyonda (~4 mM) klorür iyonu içeren hücreye girdikten sonra, cisplatindeki klorür iyonları su molekülleri ($H_2O$) ile yer değiştirmektedir. Bu sayede, reaktif ve hücrede bulunan çeşitli makromoleküllerle etkileşmeye hazır teksulu (monoaqua) ve çiftsulu (diaqua) cisplatin kompleksleri oluşmaktadır [52]. Bu aktif formlar özellikle DNA'yı hedef almaktadır. Cisplatin üzerindeki Pt(II) iyonu, DNA üzerinde guanin ve adenin bazlarına $N^7$; pirimidinlere ise $O^6$ pozisyonundan bağlanmaktadır. Guaninde, alkali koşullar altında $N^7$ atomuna ve protonsuz $N^{1}$'de bağlanma mümkün olsa da adenin ve guaninin $N^7$ atomları DNA ile bağlanma için en uyumlu olanlar olarak bildirilmiştir. Oluşan Pt-$N^7$ guanin bağının termodinamik olarak kararlı olduğu gösterilmiştir [52, 53]. Monoaqua yapısı tek bir alana bağlanarak alkilleyici etki gösterirken, diaqua yapısında iki reaktif bölge olduğundan biri guanin $N^7$'ye bağlandıktan sonra, yakındaki bir guaninle ikinci bir reaksiyon meydana gelebilmektedir. Bu eklentiler DNA sarmalının yapısının değişmesine ve etkinliğini kaybetmesine neden olmaktadır [9, 45, 54, 55].

DNA yapısındaki değişime farklı hücresel yanıtlar oluşmaktadır. Bunlardan ilki eklentiler nedeniyle yapısı değişen DNA sarmalına DNA polimerazların bağlanamamasıdır. Bu durum da hücre döngüsünü ilerleten replikasyon ve transkripsiyon basamaklarını engellemektedir [52]. İkinci tepki DNA onarım mekanizmalarının aktifleşmesidir. Platin-DNA eklentileri esas olarak, nükleotid eksizyon onarımı (NER) ile onarılmaktadır. Bu onarım sisteminin substrat özgüllüğünün küçük olması ve sınırlı kapasitesi nedeniyle platin-DNA eklentileri nedeniyle oluşan DNA hasarının tamamen ortadan kaldırılması mümkün olmamaktadır. Bunun yanında, eklentiler bazı DNA polimerazları tarafından atlanabilmektedir. Replikatif bypass olarak adlandırılan bu translezyon DNA sentezi, hücrelerin hücre döngüsünün sentez fazında ilerlemesini sağlamaktadır [45, 52]. Lezyonlar nedeniyle aktif olan bir diğer tamir

mekanizması olan yanlış eşleşme onarımı (Mismatch Repair, MMR) sistemi, cisplatinin sitotoksik aktivitesi için önemli bir ön koşul olarak görülmektedir. Buna göre; baz çifti uyumsuzlukları MMR proteinleri tarafından tanınıp onarılmaktadır. Onarım daha önce sentezlenen DNA zincirinin kesilmesi ve hasarlı bölgelerin yeniden sentezlenmesi ile gerçekleşmektedir. Onarım girişimleri hücrenin normal döngüsüne devam etmesini sağlayacak oranda onarım yaparak apoptozun indüklenmesine ve hücre ölümünün gerçekleşmesine engel olmaktadır. Bu nedenle, hücrede MMR eksikliği cisplatin direnci ile de ilişkilendirilmektedir [52, 56]. Bir diğer hücresel yanıt HMG (Yüksek Mobilite Grubu Proteini) proteinleri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Birçok HMG kutu proteini transkripsiyon faktörleri olarak çalışmaktadır. Ancak bu proteinler kısmen platinlenmiş DNA'ya doğal substratlarından daha yüksek bir afinite sergilemektedirler. Örneğin HMG proteinlerinden HMGB1 (Yüksek Mobilite Grubu Proteini 1) grubu proteinler, platin-DNA eklentileri ile bağlar oluşturarak DNA onarım mekanizmalarına ait proteinlerin bu alanlara bağlanmasına engel olmaktadırlar. Transkripsiyon faktörlerinin platin-DNA eklentileri tarafından yakalanarak transkripsiyonun inhibe edildiği bu fenomene "transkripsiyon faktörü kaçırma" adı verilmiştir [52]. Cisplatinin neden olduğu hücresel yanıtta bir diğer etki, hidroksil radikaller ve süperoksit gibi reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturarak oksidatif stresi indüklemesidir. ROS'un lipid peroksidasyonundan, sülfhidril gruplarının tükenmesinden, farklı sinyal iletim yollarının değişmesinden, DNA hasarından ve sonuç olarak hücrelerin apoptozisinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Mitokondri oksidatif stresin en önemli hedeflerinden biridir ve ROS mitokondriyal solunum fonksiyonunu etkileyerek hücresel disfonksiyona neden olabilmektedir [9]. Son hücresel yanıt olarak cisplatinin neden olduğu DNA hasarı hücrenin apoptoz ve nekroz yolaklarını aktive ederek hücreyi ölüme götürmekte bu sayede kanser hücrelerini yok etmektedir [9, 45, 52, 57].

### 2.2.2. Cisplatinin neden olduğu yan etkiler

Cisplatin kanserli hücreleri yok ettiği kadar sağlıklı hücrelere de zarar vererek yan etkilere neden olmakta, bu durum cisplatin kullanımını kısıtlamaktadır. Oluşan yan etkilerin en yaygını nefrotoksisitedir, ayrıca ototoksisite, hepatotoksisite, nörotoksisite, gastrointestinal etkiler de (bulantı, kusma) cisplatin kaynaklı yan etkiler arasındadır [9, 49, 58]. Yan etkilerin oluşumu cisplatinin ayrılan grubu olan Cl iyonlarından ve istenmeyen cisplatin etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır [8, 58]. Bu yan etkilerin oluşması cisplatin kullanımını kısıtlamaktadır. En önemli yan etki böbreklerdeki proksimal tübülar epitel hücrelerinde

oluşmaktadır. Çünkü böbrekler platin komplekslerinin boşaltımından sorumludur bu nedenle de platin böbreklerde birikmektedir [58, 59]. Cisplatinin hücre içine pasif difüzyon ve bakır taşıyıcılı membran proteinleri ile taşındığı bilinmektedir [60]. Cisplatin kaynaklı hasarın ana bölgesi olan böbrekte proksimal tübülün s3 segmenti, membran taşıyıcıları, bakır taşıyıcı 1 (CTR1) ve organik katyon taşıyıcı (OCT2) nedeniyle yüksek ilaç konsantrasyonlarına maruz kalmaktadır [59, 61]. Bunun yanında cisplatin özellikle tiyol içeren enzimlerle etkileşerek inflamasyon ve apoptozu indüklemektedir [59]. Sitoplazma içinde artan cisplatin konsantrasyonu, ROS ve tümör nekroz faktörünün (TNF-a) artmasına yol açmaktadır. TNF-a, TNF reseptör-1'e (TNFR-1) bağlanarak kaspaz 8'i, o da kaspaz 3'ü aktive ederek proksimal tübül hücrelerinin apoptozuna neden olmaktadır. Bu hücrelerdeki TNFR-1 eksikliğinde böbrek hücrelerinde hasar oluşumu da azalmaktadır. Böbrek hasarının bir diğer mekanizması ise kaspaz proteinlerinin doğrudan tetiklenmesi ile gerçekleşmektedir. Bu mekanizma endoplazmik retikulumda oluşan cisplatin kaynaklı stres ile ilişkilendirilmiştir. Buna göre stres sonucu endoplazmik retikulumun sitozolik membranında lokalize olan kaspaz 12'nin aktivasyonu ile apoptoz indüklenmektedir. Bunun yanında çift sarmallı DNA'nın kırılması sonucu uyarılan p53 apoptoz için BAX aracılı mitokondriyal yolu devreye sokarak başlatıcı kaspazlar-8, 9 ve 2'yi ve ardından yürütücü kaspaz 3'ü aktive etmektedir [58, 62]. Bir diğer yan etki mekanizması ise cisplatinin siklin bağımlı kinaz 2 (CDK2), mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK), c-Jun N-terminal protein kinaz (JNK) ve p38 gibi proteinlerle etkileşerek apoptoz yolaklarını indüklemesi olarak bildirilmiştir [63, 64]. Apoptoza giden hücreler nedeniyle medullanın dış şeridindeki proksimal tübülün S3 segmentindeki fırça sınırı incelmekte ve lokal kayıp olmaktadır [58, 59].

Cisplatine bağlı bir diğer yaygın yan etki ise, iç kulak fonksiyonlarının olumsuz etkilenerek işitme ve denge kaybına yol açması yani ototoksisitedir. Bu hasarda da renal tübül hücrelerinde olduğu gibi, koklear hücrelerdeki CTR1 ve OCT2 taşıyıcıları nedeniyle hücrelerin yüksek konsantrasyonlarda cisplatine maruz kalmasının rol oynadığı düşünülmektedir [65, 66]. Cisplatin kaynaklı ototoksisitenin, duyusal saç hücresi ölümü, strial ara ve marjinal hücre duvarında hasar ve ardından endolenfatik potansiyel kaybı gibi çeşitli mekanizmalara bağlı olduğu da bildirilmiştir [61, 67, 68].

Nörotoksisite cisplatin ile tedavi olan hastalarda görülen bir diğer yan etkidir. Mekanizması tam anlaşılmamış olmamakla beraber yine hücre membranı taşıyıcıları aracılığı ile sağlıklı

hücrelerin yüksek konsantrasyonda cisplatine maruz kalmaları ve hücresel DNA, mitokondriyal DNA, oksidatif stres hasarları nedeniyle oluştuğu düşünülmektedir [61, 69].

Kusma ve bulantı cisplatin maruziyeti sonucu oluşan ve yaygın olarak görülen yan etkilerden bir diğeridir. Merkezi ve periferik mekanizmalarla yönetildiği belirlenmiştir. Merkezi mekanizma medulla oblungata'daki kemoreseptör tetikleme bölgesinin (CTZ) cisplatin tarafından uyarılması ile gelişmektedir. Periferik mekanizmada ise gastrointestinal enterokromaffin hücrelerinin doğrudan hasar görmesi ile serotonin (5HT3) salınımının, vagus siniri afferent lifleri tarafından CTZ aktivasyonu nedeniyle oluşmaktadır [61, 70].

### 2.2.3. Cisplatin direnci

Cisplatinin kullanımını kısıtlayan bir diğer durum ise hücrelerin cisplatin etkisine karşı direnç geliştirmesidir. Bazı tümörler cisplatine baştan dirençliyken bazı kanser türlerinde direnç tedavi sırasında gelişebilmekte bu durum tedavinin de yarım kalmasına neden olmaktadır. Direncin hücresel mekanizması incelendiğinde multifaktöriyel bir etkinin varlığı görülmüştür. Bunun yanında farklı direnç mekanizmalarının da gelişebildiği de bildirilmiştir [57, 71]. Cisplatin direncinin gelişmesine neden olan başlıca mekanizmalar aşağıdaki şekilde belirlenmiştir.

Azaltılmış birikim: Hücre içine cisplatinin girememesi ve hücre içine giren cisplatinin hücre dışına atılması şeklinde iki ayrı mekanizma ile oluşmaktadır. İlk mekanizmada cisplatinin hücre içine taşınmasında görevli membran proteinlerinin (CTR1, CTR2, OCT2) düşük ekspresyonu nedeniyle cisplatin hücreye yeterli miktarda girememektedir. İkinci mekanizmada ise hücre içine giren cisplatin bakır ihraç eden P-tipi ATPaz (ATP7A, ATP7B) ve ATP bağlayıcı kaset çoklu ilaç taşıyıcı (MRP2) proteinleri tarafından aktif forma dönüşemeden hücre dışına atılmaktadır. Bunların yanında çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinlerin (MRP'ler) ve ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları üyelerinin cisplatine karşı hücresel dirence aracılık edebileceğini öne süren çalışmalar da bulunmaktadır [57].

Artan inaktivasyon: Hücre içi elektrofil tutucu, glutatyon, (GSH), ağır metal detoksifikasyon enzimi, metallothionein gibi hücresel thioller tarafından cisplatin nedeniyle oluşan toksisitenin azaltılması şeklinde oluşmaktadır [72].

Artan eklenti toleransı, artan onarım: Platin DNA eklentilerinin onarımı çoğunlukla NER DNA tamir mekanizması ile gerçekleşmektedir. Bu tamir mekanizmasına ait DNA eksizyon onarım poteini, ERCC-1 cisplatin direncinde rol oynayan ve en çok çalışılmış olan protein olarak bildirilmiştir. Cisplatine dirençli kanser hücrelerinde bu proteinin ekspresyonunun yüksek olduğu belirlenmiştir [71, 73]. NER sisteminin yeterli çalışmadığı durumlarda eklentiler nedeniyle çift zincir kırıkları oluşmaktadır. Ölümcül DNA hasarı olarak görülen bu oluşumlar homolog rekombinasyon yolu ile onarılmaktadır. Bu yolda görev alan önemli proteinler meme kanseri tip 1 ve 2 duyarlılık proteinlerinin (BRCA1 ve 2) ekspresyon düzeyleri de cisplatin direnci ile ilişkilendirilmiştir [74]. Cisplatin-DNA eklentilerini tanıyan bir diğer tamir mekanizması da MMR'dir. Bu mekanizmanın fazla çalışması direnç oluşumu ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca, son çalışmalarda O6-metilguanin DNA metiltransferaz (MGMT) ekspresyon seviyeleri ile cisplatin direnci arasında kayda değer bir korelasyon olduğu ortaya koyulmuştur [73, 75]. Guaninin $O^6$-pozisyonundaki alkil eklentilerini onaran bu eşsiz DNA onarım enzimi, O6-alkilguanin alkilleyici ajanlara karşı hücresel direncin iyi bilinen bir düzenleyicisi olarak görülmektedir [71, 76].

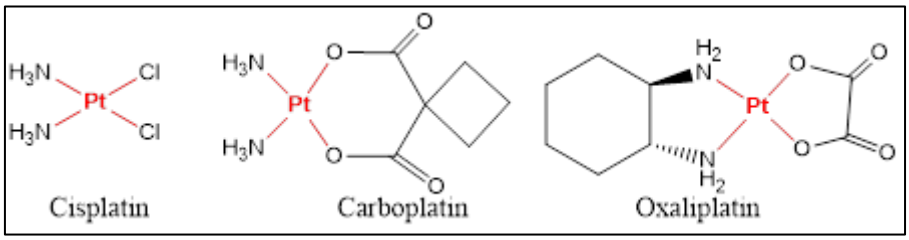
Apoptotik Yolların Başarısızlığı: Cisplatin maruziyeti sonrası hücrede DNA hasarı, mitokondriyel DNA hasarı, ROS miktarının artması şeklinde etkiler oluşmaktadır. Maruziyet sonrası kontrol edilemeyen bu mekanizmalar apoptoz ve nekroz yolaklarını aktive etmektedir. Bu aktivasyonda görevli proteinlerin aktifleşmesinde oluşan hasarlar hücrenin apoptoza gitmeden bölünmesini tamamlamasına neden olmaktadır. Bu durum cisplatin etkisi ile oluşması beklenen sitotoksisitenin önüne geçmektedir [52, 77, 78].

Yan etkiler ve direnç mekanizmaları nedeniyle kanser tedavileri yarım kalabilmektedir. Bu nedenle yan etki ve direnç mekanizmalarının aktivasyonuna neden olmayacak yeni Pt(II) bazlı aday moleküller sentezlenerek etkinlikleri araştırılmaktadır.

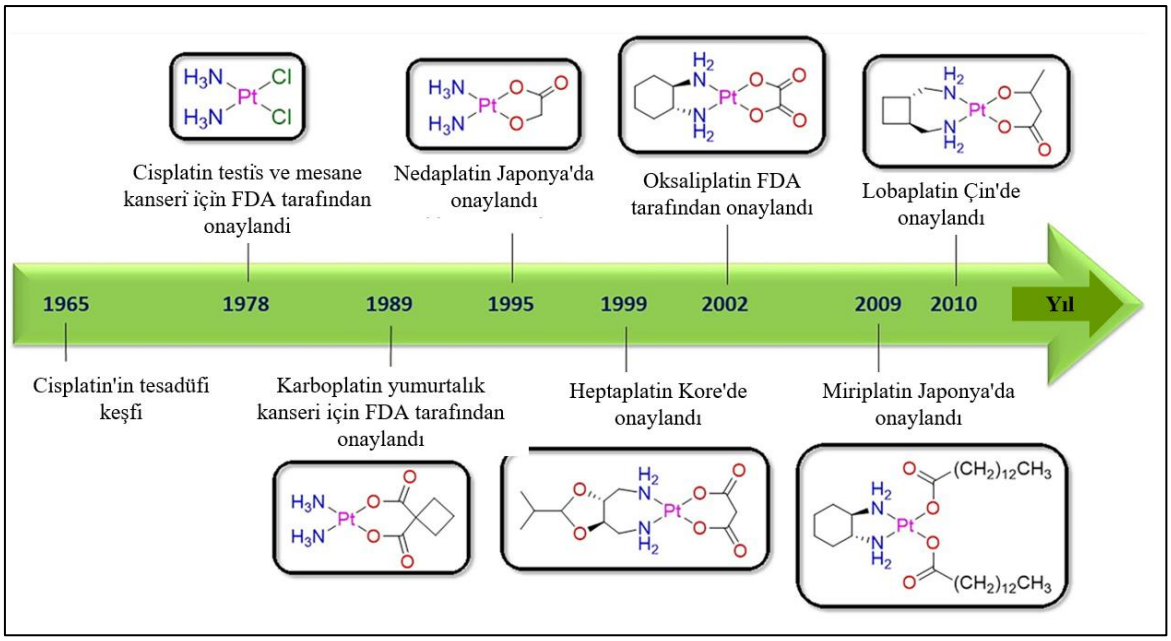
### 2.3. Kemoterapide Kullanılan Diğer Pt(II) Bazlı İlaçlar

Cisplatinin etki mekanizmaları, yan etkileri ve direnç mekanizmalarının ayrıntılı çalışılmış olması cisplatine benzer kimyasal yapıların keşfi için bilim dünyasına ışık tutmaktadır [79]. Pt(II) iyonunun yüksek antikanser etkisi bilindiğinden, düşük toksisiteli farklı platin bazlı moleküller geliştirilmiş ve FDA tarafından onaylanmıştır [80, 81] (Karboplatin, Oxaliplatin) (Şekil 2.1). FDA'nin onay vermediği heptaplatin, nedaplatin, miriplatin, lobaplatin gibi

Pt(II) bazlı ilaçlar Güney Kore, Japonya ve Çin'de bölgesel onaylı olarak kullanılmaktadır [5, 7, 82]. Küresel ve bölgesel onay almış olan ilaçların kabullerinin tarihi kronolojisi Şekil 2.2'de verilmiştir.




Şekil 2.1. FDA tarafından onaylanmış platin bazlı ilaçlar




Şekil 2.2. Pt(II) bazlı ilaçların tarihi kronolojisi [82]

Etkin tedavi olanağı sağlamasına rağmen, platin bazlı ilaçların klinik uygulamalarda kullanımlarını kısıtlayan toksisite ve ilaç direnci gibi mekanizmaların yanında, düşük biyoyararlanım, zayıf suda çözünürlük, kısa kan dolaşım süresi, seçicilik eksikliği, retiküloendotelyal sistem (RES) tarafından kolayca temizlenmesi, karaciğer metabolizması ve böbrek tarafından elimine edilmesi gibi özellikleri diğer önemli sınırlamalardır [42]. Tedavi gören hastalarda; hematolojik:lökopeni, trombositopeni [8], gastrointestinal: anoreksi, bulantı, kusma ve diyare [83], kulak hastalıkları:işitme yetersizliği [68], böbrek hastalıkları:böbrek yetmezliği, nefrotoksisite, hiperürisemi [58] gibi pek çok yan etkiler oluşmaktadır. Bunun yanında tedavi tamamlanmadan ilaçlara oluşan direnç de kullanımı

kısıtlayan bir diğer etkendir. Platinin tedavideki etkinliği kanıtlanmış olduğundan, hem yan etkileri ve direnç oluşumunu elimine etmek için hem de kullanımı nispeten daha kolay olacak (intravenöz yerine oral) alternatif yapıların sentezlenmesi amaçlanmıştır [84]. Bu amaçlarla, platini anyonik gruplarla şelatlama (Karboplatin, Oxaliplatin), amin değişiklikleri (Oxaliplatin) gibi farklı kimyasal yapı modifikasyonları ile yeni ilaçlar sentezlenmiştir (Martinho ve diğerleri 2019).

### 2.3.1. Karboplatin

Karboplatin (cis-diamin-1,1'-siklobutan dikarboksilat platin II) cisplatinin toksik etkilere neden olan, ayrılan grubu klorid yerine daha stabil bir grup eklenmesi hipoteziyle üretilmiştir; yapılan çalışmalardan elde edilen veriler hipotezi doğruladığını göstermiştir. 1989 yılında ovaryum kanseri için onay alan ikinci nesil Pt(II) bazlı ilaçtır [81]. Karboplatin, cisplatin ile benzer bir antikanser spektrumuna sahip olduğu, benzer DNA hasar kinetiği gösterdiği, özdeş Pt-DNA eklentilerine neden olduğu ancak cisplatine kıyasla uygulanmasının daha kolay ve daha düşük toksisite profiline sahip olduğu belirlenmiştir [78]. Cisplatin ve karboplatin arasındaki tek fark karboplatinin dikarboksilat içeren daha büyük bir liganda sahip olmasıdır bu durum ajanın metabolik olarak parçalanmasını ve toksik yan ürünlerin oluşmasını azaltmaktadır. Cisplatine benzer etki göstermesinin yanında nefrotoksisite, gastrointestinal ve nörolojik yan etkilerinin daha az olduğu bildirilmiştir. Miyelosupresyon ve trombositopeni ise karboplatin tedavisinde karşılaşılan yan etkiler olarak belirtilmiştir [51, 85].

### 2.3.2. Oksaliplatin

Bir diğer ilaç 2002’de FDA’dan onay alan Oxaliplatin (1R,2R-diaminocyclohexane oxalatoplatinum(II)) (Trans-R, R-1, 2-diaminosikloheksan oksalat platinum(II) olarak da bilinmektedir) olmuştur [80]. Bu ilaç ise cisplatine karşı gelişen dirençlerden biri olan DNA tamir mekanizmalarından MMR yolağının proteinlerinin Oxaliplatin yapısını tanımaması prensibi ile geliştirilmiştir [51, 86]. MMR aktivitesindeki eksiklik ile cisplatine oluşan direnç oksaliplatin ile aşılmıştır. Oksaliplatinin, MMR eksikliği olan ve cisplatin tedavisine dirençli kolorektal kanser hücrelerini yok edebildiği ve yüksek mobilite grubu (HMG) proteinlerinin, oksaliplatin-DNA eklentilerine cisplatin-DNA eklentilerine kıyasla çok daha düşük bağlanma afinitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Ouzon-Shubeita et al., 2019).

Oksaliplatinin, cisplatin ve karboplatinden farkı; hacimli bir diaminosikloheksan (DACH) kısmına ve bir oksalat 'ayrılan grubun'a sahip olmasıdır. Cisplatin ve karboplatinin etkisiz olduğu kolorektal ve gastrointestinal tümörlerde daha etkilidir (Zhou et al., 2020). Oksaliplatin, daha iyi güvenlik profili ve cisplatine dirençli kanser hücrelerine karşı etkinliği nedeniyle avantajlı bir kemoteropötik ajan olarak tanımlanmaktadır [77]. Bu ilacın ana yan etkileri ise nörotoksisite, hematolojik toksisite, gastrointestinal sistem toksisitesi ve tübüler nekroz olarak belirlenmiştir [54, 87].

### 2.3.3. Yeni Pt(II) bazlı yapılar için yapı ile aktivite arasındaki ilişki

FDA onaylı yukarıdaki üç ilacın kullanım amacı kanser hücrelerinin yok edilmesi olsa da, kanser türlerine göre etkinliklerinin çok farklı olduğu bulunmuştur. Bu farklılık ilaçların kimyasal yapılarından kaynaklanmaktadır. DNA ipliklerinde ip içi çapraz bağ oluşumunun kinetiğinin, büyük ölçüde taşıyıcı ligandın doğasına bağlı olduğu belirlenmiştir [84].

FDA ve farklı ülkeler tarafından bölgesel onay almış platin bazlı ilaçlar (cisplatin, karboplatin oxaliplatin, nedaplatin, miriplaitin, heptaplatin, lobaplatin) cis-[$PtL_2X_2$] genel formülüne sahiptir; burada $L_2$ ayrılmayan, $X_2$ ise ayrılan grup ligandlarını temsil etmektedir [42]. Bugüne kadar yapılmış çalışmalardan Pt iyonu taşıyıcısı olacak alternatif ligantların özellikleri;  Pt ile etkileşebilmesi, Pt iyonunu çekirdeğe kadar taşıyabilmesi; Pt iyonlarının alkilleyici etkisi bilindiğinden onları hücre içinde DNA'ya kadar ulaştırabilecek kadar kararlı olması ve ayrılan yapıların olmaması veya olması halinde toksik etkisinin olmaması şeklinde belirlenmiştir [54, 88]. Bunun yanında Pt bileşiklerinin antitümör aktivite gösterebilmesi için belirli yapısal kriterlere sahip olması gerektiği, yani yapı ile aktivite arasındaki ilişki hakkında bazı özellikler belirlenmiştir [54]. Bileşiğin birbirine göre cis olan iki ayrılan gruba sahip olması, ayrılan grupların iki cis-tek dişli veya bir çift dişli olması, molekül üzerinde yaklaşık 3,4 Å uzaklıkta olması gerekmektedir. Ayrılan gruplar, en kolay kaybedilen gruplar olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle ayrılan grupların kaybolma kolaylığının, bileşiğin toksisitesinin yanı sıra aktivitesini de etkileyeceği bildirilmiştir [89, 90]. Komplekslerin geometrisinin kare düzlemsel veya oktahedral olması gerektiği [48, 90] ve biyolojik hedefle hidrojen bağı için gerekli olan en az bir N-H grubuna sahip olmasının etkinlik için önemli olduğu da bildirilmiştir [90, 91].

## 2.4. Tetrazol ve Schiff Bazları'nın Farmakolojik Önemi

### 2.4.1. Schiff bazı

Schiff bazları, ilk olarak Alman bilim adamı Hugo Schiff tarafından 1864'te rapor edilmiştir. Genel formülü -$R_1$-C = N-$R_2$- olarak belirlenmiş olan kararlı bir imin bileşikleri sınıfıdır [92]. Yapısında karbon-azot çift bağı (>C=N-) bulunmaktadır [11, 14]. Schiff bazları yapısal çeşitlilikleri nedeniyle koordinasyon kimyası çalışmalarında sıklıkla kullanılıp özellikle metal kompleksleri içeren ilaç araştırmalarında tercih edilmektedir [14, 93-96].

Schiff bazı kompleksleri gerek doğal protein gerekse metalloenzim ve enzimlere olan metabolik yakınlıklarından dolayı biyomimetik model bileşikler olarak dikkate alınmaktadır [96, 97]. Üstün farmakolojik [98] etkilere sahip olmaları nedeniyle ayrıcalıklı ligantlar olarak değerlendirilmektedir [99, 100]. Yüksek etki ve düşük yan etki verileri nedeniyle Schiff bazı içeren yapılar yeni ilaç keşiflerinde güçlü bir kaynak olarak görülmektedir [11, 101, 102].

Canlı yapısında en çok bulunan elementlerden olan azot (N) ve karbonun (C) çift bağ ile bir araya gelmesi ile oluşan Schiff bazı metabolik olayların pek çok aşamasında vücutta doğal olarak sentezlenmektedir ve bu oluşumlar Schiff bazı reaksiyonları olarak sınıflandırılmaktadır. Bu özelliği Schiff bazının vücutta yan etki oluşturmadan farklı kullanım alanlarına sahip olmasına neden olmuştur. Örneğin; immün cevap sırasında görev alan hücrelerden olan özel antijen sunan hücrelerin yardımcı hücrelerle etkileşimlerinin incelendiği bir çalışmada bu hücrelerin hücre yüzey ligantları arasında geçici kovalent kimyasal olaylar olduğu, karbonil ve amin grupları arasında gerçekleşen bu olaylar sırasında Schiff bazı oluşturarak hücrelerin etkileşime geçtikleri bildirilmiştir. Bu kimyasal mekanizmanın keşfi, bağışıklık yanıtlarının manipülasyonu için yeni bir hedef sağlamaktadır. Schiff bazı oluşturucu moleküller karbonil gruplarının fizyolojik donörünün yerine geçebilmekte ve immun cevap oluşturacak hücrelere uyarıcı sinyal sağlayabilmektedir. Bu Schiff bazı mekanizması, oral olarak biyoyararlanabilen, sistemik olarak aktif immün güçlendirici ilaçların tasarımına ve rasyonel bir tıbbi kimya yaklaşımına izin vermektedir [103]. Bunun yanında DNA'nın nükleozomlar halinde organizasyonu sırasında da Schiff bazı yapısının oluştuğu gösterilmiştir. Nükleozom oluşumunda önemli bir yeri olan 5-hidroksi metil sitozin oksidasyonu ile 5 formil sitozin oluşmaktadır. 5 formil

sitozin epigenetik alanında yapılan çalışmalarda kullanılan önemli bir epigenetik işarettir. Fare embriyonik kök hücreleri ile yapılan çalışmalarda DNA'nın histon proteinleri ile yaptığı etkileşim sırasında 5 formil sitozin ve histon proteinleri arasında Schiff bazı oluştuğu gösterilmiştir [104].

### 2.4.2. Tetrazol

Heterosiklik halkalı bir bileşik olan tetrazol tıbbi kimyada büyük öneme sahiptir. Biyolojik olarak önemi karboksilik asit ve cis-amit gruplarının biyoizosterik bir analoğu olmasıdır. Metabolik stabilitesi ve diğer fizikokimyasal özellikler tetrazolleri yeni farmasötiklerin tasarımı ve üretimi için çekici hale getirmektedir [105]. Tetrazol halkası farmakolojik etkinliğe sahip olması nedeniyle antibakteriyel, antialerjik, antienflamatuar, anjiyotensin II antagonisti gibi ilaçların sentezinde sıkça kullanılmaktadır [106, 107]. 1950 yılından günümüze kadar biyoaktif özellik gösteren tetrazol türevleri üzerine birçok organik molekül sentezlenmiştir [108, 109]. 20. ve 21. yüzyılda da pek çok tetrazol içeren ve biyolojik olarak aktif olan moleküller sentezlenmiştir. Bunlardan birçoğu da tüm dünyada kullanım halindedir. Örneğin; Tetrazol halkası içeren Metrazol bileşiği, (kardiazol ya da 1,5-pentametilentetrazol) merkezi sinir sistemini uyarıcı özelliği nedeniyle demans tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca, şok tedavisi, kalp ve solunum uyarıcı olarak kullanıldığı bildirilmektedir. Bunun yanında Astım tedavisi ve büyüme hormonu LTD4 antagonisti olarak kullanılan Tomelukast bileşiği tetrazol halkası içermektedir. Angiotensin II tip 1 reseptör antagonisti, losartan ve analogları; loop diüretik azosemid; Histamine H2 ve H3 reseptör blokeri; tazano-plast, pemiroplast, pranlukast, tomelukast; cephalosporin antibiyotikleri, latamoxef; sentetik analjezik ilaç; seçici tip 3 fosfodiesteraz inhibitörü silostazol tetrazol içeren ilaç yapılarının diğer örnekleridir [106, 110].

### 2.4.3. Schiff bazı içeren Pt(II) komplekslerinin genotoksik etkileri

Schiff bazları metallerle kolay koordine olabildiklerinden çeşitli metal kompleksleri sentezlenerek ve biyolojik etkinlikleri araştırılmaktadır. Schiff bazlarının Pt(II) komplekslerinin incelendiği çalışmalarda biyolojik etkinlik, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi kullanılarak sitotoksik etkinin belirlenmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda genel etkinin Pt(II) iyonu ilave edildikten sonra ligandın sitotoksik etkisinin arttığı yönündedir. Örneğin; Shiju ve diğerleri, 2015 yılında insan

servikal kanser hücreleri (HeLa), kolon kanseri hücreleri (HCT116), Epidermoid kanser hücreleri (A431) ile yaptıkları çalışmada Schiff bazı ligantları ve onların Pt(II) komplekslerinin antikanser özelliklerini belirlemeyi amaçlamışlardır. 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 μM konsantrasyonları ile hücreler 48 saat muamele edilmiştir. Muamele edilmeyen hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Hücre bölünmesinin baskılanmasının incelenmesi için yapılan MTT testi hem ligandların hem de komplekslerin konsantrasyonla birlikte artan bölünmeyi inhibe edici etkisini göstermiş, ligandlara göre platinli komplekslerin daha etkili olduğu belirtilmiştir. Belirlenen $IC_{50}$ değerlerine göre ise HCT116 hücre hattında diğerlerine göre daha etkin oldukları vurgulanmıştır [111]. Gupta ve diğerleri, ise 2020 yılında yaptıkları çalışmada Schiff bazı ve Pt(II) komplekslerin MTT testi prosedürü ile antikanser özelliklerini araştırmışlardır. Akciğer adenokarsinom kanser hücreleri (A549) ile yapılan çalışmada Schiff bazı ligandı ve Pt(II) kompleskleri artan konsantrasyonlar ile 24 saat boyunca hücrelere muamele edilmiştir. Elde edilen sonuçlar konsantrasyonlar arttıkça hücre canlılığının azaldığını göstermiştir. Bu yapıların tümör hücresi büyümesini engellediğini ve daha ileri tetkiklerin yapılmasının uygun olduğu belirtilmiştir [112].

### 2.4.4. Tetrazol içeren Pt(II) komplekslerinin genotoksik etkileri

Tetrazoller düşük toksisite ve yüksek biyoyararlanım nedeniyle aday ilaç moleküllerinin geliştirilmesinde tercih edilmektedir, bunun yanında Pt(II) komplekslerinin de sentezlenerek biyolojik etkinliklerinin araştırıldığı çalışmalar yapılmaktadır. Tetrazol içeren Pt(II) komplekslerinin incelendiği çalışmalarda da biyolojik etkinliğin genellikle MTT testi kullanılarak sitotoksik etkinin belirlenmesi şeklinde gerçekleştirildiği görülmektedir. Çalışmalarda belirlenen genel etki Pt(II) iyonu ilave edildikten sonra tetrazollü ligandın sitotoksik etkisinin arttığı yönündedir. Uemura ve arkadaşlarının 2013'te yaptıkları tetrazol içeren Pt(II) kompleksinin çalışıldığı bir araştırmada tetrazolle bağlanmış iki Pt(II) merkezi içeren bir bileşik sentezlenmiş ve sitotoksik etkisi küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücre hattında gösterilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre bu bileşiğin cisplatine direncin üstesinden geldiği, sitotoksik etkilerinin olduğu ve kemoterapi dirençli kanserlerde etkili olduğu bildirilmiştir [113]. Imai ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları bir diğer çalışmada ise azolato köprülü iki çekirdekli platin kompleksi'nin DNA replikasyonunun yanında RNA transkripsiyonunu da inhibe ettiği, S/G2 kontrol noktasında hücreleri durdurduğu ve cisplatine dirençli kanser hücrelerine karşı da etkili olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında

cisplatinden daha az çapraz bağa neden olduğu, kromatin katlanmasını uyardığı ve kemoterapiye duyarsız olan kanserlerin tedavisi için klinik uygulamaların genişletileceği bildirilmiştir [114].

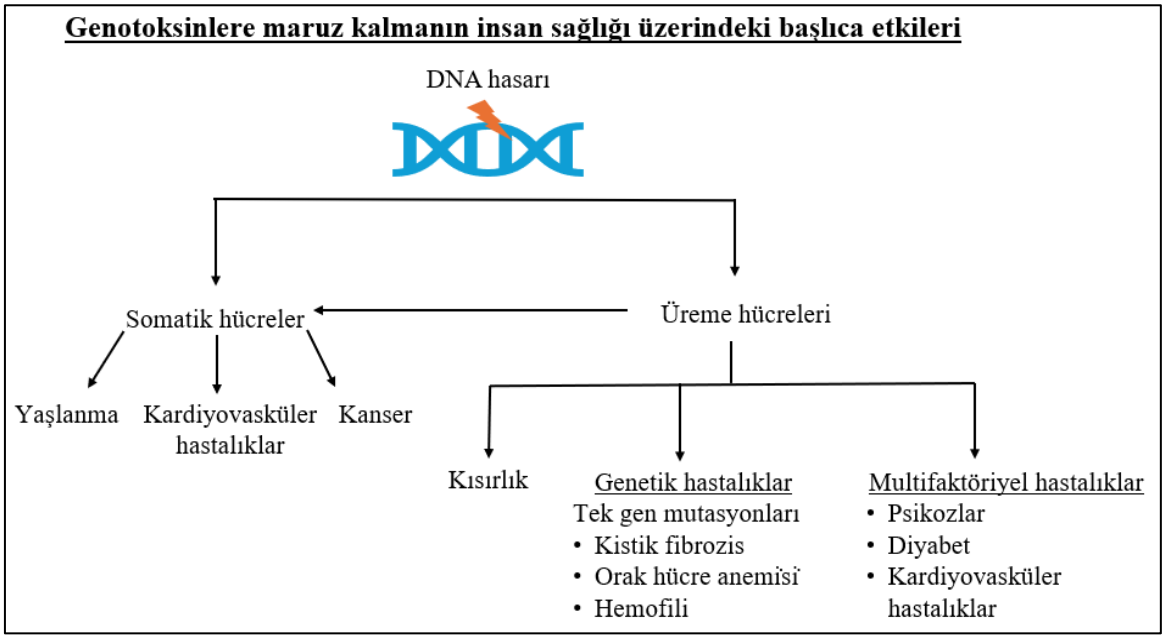
Yapılan literatür araştırması hem Schiff bazı hem de tetrazol yapısının Pt(II) ile kompleksleştiğinde sitotoksik etkisinin arttığını göstermektedir. Üstün farmakolojik etkileri ve düşük toksisite verileri ile tanınan bu yapıların bir arada kullanıldığı tetrazolato ligandının ve onun Pt(II) kompleksinin sağlıklı hücrelerde genotoksik etkisinin belirlendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

## 2.5. Genotoksisite ve Kanser

"Genotoksisite" terimi, bir ajanın mutasyonlara ve kromozomal anormalliklere neden olarak DNA'ya zarar verme kapasitesini tanımlamaktadır [20, 115]. Kimyasalların Sınıflandırılması ve Etiketlenmesine İlişkin Küresel Uyumlaştırılmış Sistem (GHS) tarafından, 'genotoksik' ve 'genotoksisite' genel terimlerinin "normal replikasyon süreçlerine müdahale ederek DNA hasarına neden olanlar da dahil olmak üzere DNA'nın yapısını, bilgi içeriğini veya ayrışmasını değiştiren veya replikasyonunu fizyolojik olmayan bir şekilde (geçici olarak) değiştiren maddeler veya süreçler" için geçerli olduğu bildirilmiştir [116, 117]. Genotoksisite özelliklerini içeren mutajenik ajanlar genotoksin olarak adlandırılmaktadır. Genetik toksikoloji ise potansiyel ajanlar veya maddeler nedeniyle hücrede DNA ve kromozomal hasarın incelenmesiyle ilgilenen bilim dalı olarak tanımlanmaktadır [20, 118]. Genotoksisite bazen mutajenite ile karıştırılmaktadır. Genel olarak ikisi arasındaki ayrım genotoksik maddelerin her zaman mutajenik özelliklere sahip olmadığı; ancak her mutajen maddenin genotoksisiteyi tetikleyebileceği gerçeği ile yapılmaktadır [118].

Kimyasal ve biyolojik maddelere maruz kalmak, epigenomda değişikliklere ve/veya genomik istikrarsızlığa neden olabilmekte ve bu da kanser dahil olmak üzere bir dizi rahatsızlığa yol açabilmektedir. Bu tür bir zarar somatik hücrede oluştuğunda, DNA hasarı somatik bir mutasyona neden olarak potansiyel olarak malign transformasyon yoluyla kanser gelişimine yol açabilmektedir. Tersine, bir germ hücresinde meydana geldiğinde, kalıtsal olarak değiştirilebilir bir özelliği (germ hattı mutasyonu) tetikleme potansiyeline sahip olmaktadır. Kanserojenler genellikle genotoksik özelliktedirler ve kansere neden olma

potansiyeline katkıda bulunmaktadırlar [115, 118]. Genotoksinlere maruz kalmanın insan sağlığı üzerindeki başlıca etkileri Şekil 2.3'te özetlenmiştir.




Şekil 2.3. Genotoksinlere maruz kalmanın insan sağlığı üzerindeki başlıca etkileri [118]

Genotoksik maddeler hücresel DNA ile doğrudan etkileşime girerek, uygun şekilde yönetilmediği takdirde mutasyonlara yol açabilecek strese neden olmaktadırlar. Bu maddeler DNA'yı potansiyel olarak zararlı ve çeşitli şekillerde değiştirebilmektedirler. Bu değişimlerden biri çift zincir kırılmalarıdır (DSB'ler) ve DNA sarmalında her iki iplikte eş zamanlı kırılmalar olarak tanımlanmışlardır. DSB'ler kromozomları bölen ciddi hasarlardır ve onarılmazlarsa ölümcül olabilmektedirler. Tek iplikli kırılmalar (SSB'ler) ise daha sık oluşan hasarlardır. Normal fizyolojik koşullar altında transkripsiyon ve replikasyon süreçleri sırasında kendiliğinden de meydana gelebilmektedirler. Bununla birlikte, bu kırılmalar hücrenin onarım kapasitesinden daha yüksek bir oranda meydana gelirse, tamir mekanizmaları tarafından onarılamayabilmektedirler, bu durum da zararlı etkilerin başlamasına neden olmaktadır [115]. Genotoksik maddeler DNA'nın yapısını direkt ve dolaylı mekanizmalarla değiştirmektedirler. 'DNA-reaktif' maddeler öncelikli olarak kovalent DNA eklentileri oluşturarak ve çapraz bağlanma yoluyla direkt DNA hasarına neden olmaktadırlar (yani, iplik içi DNA çapraz bağları, iplikler arası DNA çapraz bağları ve DNA-protein çapraz bağları). Buna karşılık, 'DNA-reaktif olmayan' genotoksik maddeler, örneğin reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesi, genomik stabilitenin, kromozom bütünlüğünün veya mitotik iğin işleyişinin korunmasında rol oynayan hücresel bileşenlere

müdahale edilmesi gibi dolaylı mekanizmalar yoluyla DNA hasarına yol açmaktadırlar [117].

Genotoksik karsinojenler mutasyonlara neden olarak kanseri başlatan kimyasallar olarak tanımlanmaktadırlar. Bunlar, çok düşük seviyelerde bile insanlar için kanser riski oluşturdukları varsayımına göre düzenlenmektedirler. Öte yandan, genotoksik olmayan karsinojenlerin izin verilen bir maruz kalma sınırı veya dozu olduğuna inanılmakta ve maruz kalma veya alım bu eşiğin altında kaldığı sürece toplumda kullanımlarına izin verilmektedir. Bu kanserojenler, hormonal etkiler, sitotoksisite, hücre çoğalması veya epigenetik değişiklikler gibi mutasyonlarla ilgisi olmayan yollarla kansere neden olmaktadırlar [115, 117]. Kanserojenler, DNA'yı tahrip ve kontrolsüz hücre bölünmesini teşvik ederek kansere neden olma potansiyeline sahip maddeler olarak tanımlanmaktadırlar. Kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre değişse de genel olarak şu mekanizmalarla kansere neden olmaktadırlar [115]:

Doğrudan DNA hasarı: Bazı kanserojenler hücrelerdeki DNA ile doğrudan etkileşime girerek DNA diziliminde mutasyonlara veya kimyasal değişikliklere neden olabilir. Bu değişiklikler, hücre büyümesini ve bölünmesini kontrol eden normal hücresel süreçleri bozarak kanserli hücrelerin oluşumuna yol açabilmektedir.

1) Dolaylı DNA hasarı: Dolaylı etkili kanserojenler doğaları gereği kansere neden olmasalar da, metabolize edildiklerinde DNA hasarına neden olabilen maddelerdir. Vücuttaki enzimler oksidasyon veya kanserojenin kimyasal modifikasyonu gibi süreçler yoluyla bu maddeleri DNA'ya zarar veren reaktif ara ürünlere dönüştürebilmektedir.
2) Genotoksisite: Genotoksisite gösteren karsinojenler hücrelerin genetik materyaline zarar veren maddelerdir. Bu hasar herhangi bir anomaliye neden olmayabileceği gibi, mutasyonlara, kromozomal yeniden düzenlemelere ve kanser gelişimini teşvik edebilecek diğer genetik anormalliklere yol açabilme potansiyeline sahiptir.
3) Epigenetik değişiklikler: Bazı karsinojenler hücrelerde epigenetik değişikliklere neden olabilmektedirler. Epigenetik modifikasyonlar DNA dizilimini değil gen ifade kalıplarını etkilemektedir. Değişen gen ifadesi anormal hücresel yanıtlara ve potansiyel olarak kanser gelişimine katkıda bulunabilmektedir.

4) İnflamasyon ve kronik irritasyon: Dokularda kronik enflamasyona veya tahrişe neden olan karsinojenlerdir. Uzun süreli enflamasyon hücre çoğalmasını uyarmakta ve kanser gelişimini uyarabilmektedir.
5) Hormonal etkiler: Vücuttaki hormonal dengenin bozulması sonucu, hücre büyümesinin düzenlenmesini etkileyerek hormonla ilişkili kanserlerin gelişimini teşvik etmektedirler.
6) Bağışıklık sisteminin baskılanması: Bağışıklık sisteminin anormal hücreleri tespit etme ve ortadan kaldırma yeteneğini baskılayarak kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesine izin vermektedirler.

Genotoksik etkinin belirlenmesi ilaç araştırmalarında da önemli bir yer tutmaktadır. Aday ilaç moleküllerinin etkinliklerinin değerlendirilmesi ve risklerinin kontrol edilmesi için uluslararası kuruluşlar, regülasyonları ile bilim insanlarına yol göstermektedir. Ülkemizin de yönergelerini takip ettiği Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency, EMA) Beşeri Tıbbi Ürünler Komitesi, beşeri ilaçlar için ruhsat başvurularına dair bilimsel kılavuzlar hazırlamaktadır. Klinik dışı çalışmalar kapsamındaki kılavuzlardan toksikolojik değerlendirme için "ICH S2 İnsan kullanımına yönelik farmasötikler için genotoksisite testi ve veri yorumlama-Bilimsel kılavuz" bulunmaktadır. ICH S2A ve S2B kılavuzlarını birleştirerek yenileyen kılavuz "küçük moleküllü" ilaç adaylarının genotoksisitesinin test edilmesi için geliştirilmiştir [119]. Bu amaçla beşeri ilaçların potansiyel genotoksisite risklerinin tahmini için standart genetik toksikoloji test bataryasını optimize etmeyi ve olası risk karakterizasyonunu iyileştirmeyi amaçlamaktadır. Genotoksik etki ile gen mutasyonları veya daha büyük ölçekli kromozomal hasarlar oluşabilmektedir ve bu etkileri gösterebilen tek bir test bulunmamaktadır. Bu nedenle genotoksik etkinin belirlenmesinde her ihtimalin değerlendirilmesine olanak sağlayan test sisteminin kullanılması önerilmektedir. Yönergede bahsi geçen test bataryasının; mutajenitenin belirlendiği bakteriyel ters gen mutasyon testi ve memeli hücrelerinde *in vitro* ve/veya *in vivo* olarak genotoksisitenin değerlendirildiği testlerden oluşması belirlenmiştir [120]. Genotoksik etkinin ilaç safsızlıklarında belirlenmesi de regülasyon kuruluşlarının düzenlemelerinde önemli yer tutmaktadır. Farmasötiklere yönelik yönergelerin oluşturulması için evrensel bir birlik olan Dünya Uyum Komitesi (Worldwide Committee for Harmonisation) insan kullanımına yönelik farmasötikler için özel ön koşulları belirlemektedir. Küresel bir kuruluş olan Uluslararası Uyumlaştırma Konseyi de (ICH), ilaçların kullanımını düzenleyen yönetmelikleri oluşturmakla görevlidir. M7 olarak bilinen ICH kılavuzları, farmasötiklerdeki DNA-reaktif (mutajenik) safsızlıkları değerlendirerek ve kontrol ederek kanser riskini azaltmayı

amaçlamaktadır. Bu kılavuz, ihmal edilebilir kanserojenik risk oluşturması beklenen mutajenik safsızlık seviyelerinin belirlenmesinde hem güvenlik hem de kalite risk yönetimine ilişkin hususları vurgulamaktadır. Nihai ilaç maddesi veya ürününde bulunan veya bulunması makul görülen mutajenik safsızlıkların insan kullanımının koşulları dikkate alınarak değerlendirilmesi ve kontrolüne yönelik tavsiyeleri özetlemektedir [121].

Kanser, önemli bir küresel sağlık sorunu olmaya devam eden karmaşık ve çok yönlü bir hastalıktır. Kanserojenlerin tanımlanması ve etki mekanizmalarının aydınlatılması onkoloji alanında büyük önem taşımaktadır. Kanserojenler çeşitli çevresel, besinsel ve mesleki ortamlarda bulunabilmekte ve insan sağlığı için sürekli bir tehdit oluşturmaktadır. Bu ajanların kanseri başlattığı ve teşvik ettiği çeşitli yolların anlaşılması, etkili önleyici tedbirlerin uygulanması ve hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi için çok önemlidir [115]. Kanserin genotoksisitesi, gen mutasyonu, yapısal sapma, rekombinasyonlar ve kromozomların sayısal değişiklikleri şeklinde ifade edilmektedir [118]. Bu olası etkilerin anlaşılması için uluslararası kuruluşlarca düzenlenmiş ve tasarlanmış genotoksisite testleri kullanılmaktadır.

## 2.6. Genotoksisite Testleri

Kromozomların kanser için önemi yirminci yüzyılın başında, anormal mitoz nedeniyle kromozomların kaybedilmesi veya kazanılmasının kansere yol açabileceği fikrini ortaya atan Theodore Boveri (1914) tarafından geliştirilmiştir [122]. Bu öncü görüş, yaklaşık 50 yıl sonra, 1960'ların başında, Philadelphia kromozomunda ilk spesifik kromozom anormalliğinin tanımlanmasıyla resmileştirilmiştir [123, 124]. 1968 yılında Caspersson tarafından kromozom bantlamasının keşfedilmesinden beri kanser biyolojisinde kullanılmaktadır [125]. 1980'lerde, çoğunlukla hematolojik kanserlerde meydana gelen bir dizi yeni kansere özgü kromozomal yeniden düzenleme (çoğu translokasyon) bulunmuştur. Bu gelişmeler kromozomlarda belirlenen yeniden düzenlenmelerden etkilenen birçok genin hücre büyümesi, gelişmesi veya hayatta kalmasındaki bazı kritik aşamalarda yer aldığını da ortaya koymuştur. Aynı zamanda kromozomal değişikliklerin oluşum mekanizmalarının ve kanser gelişimindeki rollerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır [126, 127].

Günümüzde valide edilmiş bazı genotoksisite testleri uluslararası regülasyon kuruluşlarınca ilaç molekülleri, kozmetikler, gıdalar gibi çeşitli tüketici ürünlerinin bileşenlerin yasal

düzenlemelerinde kullanılan testlerdir. Genotoksik potansiyellerin ve genetik materyal üzerine etkilerinin belirlenmesi için, Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD)'nün hazırladığı ve farklı mekanizmaları belirleyen genotoksisite testleri; 473. Kılavuz (*In Vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test) kromozomal anormallik (KA) [22] , 487. kılavuz (*In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test) mikronukleus (MN) [128] testleri bulunmaktadır. Bunların yanında DNA hasarını inceleyen ancak henüz OECD kılavuzu bulunmayan *in vitro* Komet testi (single cell gel electrophoresis) [129] bulunmaktadır.

### 2.6.1. Kromozomal anormallik (KA) testi

Kromozomal anormallik testi kimyasal maddelerin genotoksisite araştırmalarında kabul görmüş (OECD Test no: 473) bir yöntemdir [22]. Test kapsamında elde edilen verilerden biri DNA'da oluşan zincir kırıklarıdır. Oluşan tek zincir kırıkları çoğu zaman çift zincir kırığına dönüşebilmekte ve bu kırıklar tamir edilmediğinde ya da yanlış tamir edildiğinde genomik kararsızlığa ve kromozomal anormalliklere neden olmaktadır [130, 131]. Test edilen ajanın etkisine göre kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, halka kromozom, kardeş kromatidlerde birleşme, gibi yapısal [132, 133] ve DNA'nın kendini eşlemesinden sonra, iğ ipliği, kinetokor ve sentriol yapılarının etkilenmesi sonucu oluşan endoreduplikasyon ve poliploidi gibi sayısal anormallikler de bu test ile belirlenmektedir [131].

Pek çok çalışmada, periferal kan lenfositlerinde kromozomal anormallik frekansının genotoksik karsinojenlere maruz kalmanın erken biyolojik etkilerini belirlemede etkili ve uygun bir yöntem olduğu açıklanmıştır [134-138]. Kromozomlarda oluşan hasarların mekanizmalarının farklı dokularda benzer olduğu düşünüldüğünden, lenfositlerdeki hasar düzeyinin kanser riskini göstermesi beklenmektedir [131, 133, 139]. Kanser gelişiminin kanser hücrelerinde gözlenen hem sayısal hem de yapısal kromozomal anormalliklerle sonuçlanan genom kararsızlığı ile ilişkili olduğu da bilinmektedir [137, 140].

Kromozomal anormallik testi sırasında hazırlanan preperatlardan mitotik indeks (MI, mitoz geçiren hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı) oranları da belirlenmektedir. Bu veri uygulanan maddenin sitotoksisitesinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir biyobelirteçtir ve hücre proliferasyon oranının güvenilir bir göstergesi olarak kullanılmaktadır [141]. MI'deki değişikliklerin, kimyasalın DNA ile doğrudan etkileşimi,

hücre döngüsünü düzenleyen faktörlerin modifikasyonuna neden olarak hücre bölünmesini etkilemesi ve hücre enerji metabolizmasının etkilenmesi sonucunda meydana geldiği bildirilmiştir [141-144].

### 2.6.2. Sitokinezi bloklanmış mikronükleus (CBMN) sitom testi

*In vitro* mikronükleus testi, interfaz hücreleri kullanılarak hem yapısal (klastojenik) hem de sayısal (aneugenik) kromozom değişikliklerinin tespit edilmesini sağlamaktadır [145-147]. Lenfositlerde artan MN frekansının kanser riski ile doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir [146, 148]. Farklı yıllarda yapılan çalışmalarda kapsamlı analizlere dayanılarak, lenfositlerdeki MN'nin insanlarda artan kanser riskinin tespiti için güvenilir bir belirteç olduğu bildirilmiştir [146, 148, 149].

MN testinde hücre sitokinezi sitokalasin-B ile inhibe edilmektedir. Bu sayede bir kez bölündüğü anlaşılan iki çekirdekli hücrelerdeki (binükleat hücreler) hasarın belirlenmesi ile karakterizedir. MN skorlamasının binükleat hücrelerle sınırlandırılması, testte önemli bir değişken olabilecek spontan hasarların gözardı edilmesini sağlamaktadır [148, 150, 151].

CBMN testi de MN testinde sayılan mikronükleusların yanında nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü oluşum frekanslarının belirlenebilmesi ile geliştirilmiştir. CBMN testi de kromozomal instabilite ve mitotik bozulmaların belirlenmesinde etkin bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu testin preperatlarından yapılan sayımlarda nükleer bölünme indeksi (NDI) ve sitokinez blok proliferasyon indeksi (CBPI) gibi sitotoksisite hakkında bilgi veren veriler de elde edilmektedir [21, 151-153].

### 2.6.3. Komet testi

Komet testi, DNA hasarını (iplik kopmaları ve alkali koşullar altında sarmal kopmalarına dönüşen diğer lezyonları) ve DNA onarım aktivitesini saptamak için kullanılan hızlı, güvenilir, basit ve hassas bir testtir [23, 144, 154, 155]. Komet testi ilk olarak 1978 yılında, DNA kırılmalarının saptandığı bir yöntem olarak tanımlanmıştır [156]. 1984 yılında ise mikroelektroforez tekniğinin kullanılması ile yöntem geliştirilmiştir [157]. Birkaç yıl sonra elektroforez çözeltisinin pH'ının artırılmasıyla modifiye edilmiş ve günümüzde en yaygın olarak kullanılan alkali komet deneyi ortaya çıkmıştır [23]. Testte, agarda süspanse

edildikten sonra lizis işlemine tabi tutulmuş hücreler alkali koşullar altında elektroforeze tabi tutulur, nötralize edilir ve floresan bir DNA boyası ile boyanarak değerlendirilir. DNA hasarı artmış olan hücrelerde, kromozomal DNA'nın çekirdekten göçü artmakta ve 'kuyruklu yıldız' şeklini andıran görüntüyü oluşturmaktadır. Görüntü analiz yazılımı kullanılarak kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti gibi parametreler DNA hasarının bir ölçüsü olarak belirlenmektedir [129, 150]. Alkali komet testi ile DNA üzerindeki tek ve çift zincir kırıkları, hassas bölgeler, çapraz bağlanmalar ve oksidatif DNA hasarı belirlenebilmektedir [129, 158, 159]. Komet testi sırasında tripan mavisi canlılık testi kullanılarak, sitotoksik etki değerlendirmeside yapılmaktadır [147].

## 2.7. Toksikoloji Değerlendirmesinde Hayvan Deneylerine Alternatif Yöntemler ve Aralarında *in siliko* Araçların Yeri

İlaç toksisitesini değerlendirmek için hayvan çalışmaları tarihsel olarak en geleneksel yaklaşımdır. İlaç adaylarının preklinik ve klinik araştırmalarında da *in vitro* yöntemlerden sonra olmazsa olmaz ileri yöntemlerin onay yöntemleri olarak kullanımı vardır [120]. Ancak bu çalışmalar maliyet, zaman ve etik hususlar nedeniyle pek çok ürün için olduğu gibi ilaç adaylarının test edilmesinde de tartışılmaktadır. Kozmetikler için ise *in vivo* çalışmalar tamamen yasaklanmıştır [160]. Bununla birlikte, ABD Çevre Koruma Ajansı (US EPA), fare, sıçan, tavşan, kobay, köpek gibi türler de dahil olmak üzere yılda yaklaşık 20.000 ila 100.000 hayvan çalışması talebi yapıldığını ve Avrupa'daki güvenlik testlerinde yılda yaklaşık 600.000 hayvan kullanıldığını bildirmiştir [33].

Avrupa Birliği ülkelerinde hayvanlar üzerinde denenmiş kozmetiklerin satılması 2004'te yasaklanmıştır. Bu süreç 2013 yılında aynı yasağın devamına ilaveten hayvanlar üzerinde kozmetik ürünler için *in vivo* test yapılmasının tamamen yasaklanması ile sonuçlanmıştır [160]. Avrupa'da, deney hayvanı testlerine yönelik 3R kuralının ışığında alternatif yöntemlerin geliştirilmesi ve valide edilmesi için ECVAM (Europian Centre for the Validation of Alternative Methods, Avrupa Alternatif Yöntemleri Doğrulama Merkezi) kurulmuş [161] ve 2007-2011 yılları arasında 238 milyon avro fonlama yapılmıştır [162]. Avrupa Birliği ve 7 endüstri sektörü ortaklığında kurulan Hayvan Deneylerine Alternatif Yaklaşımlar için Avrupa Ortaklığı (The European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing -EPAA) alternatif yöntemleri geliştirmek için bir araya gelmiş olan Avrupa ortaklığıdır. Bu yıl 2005 yılından beri yayınladıkları programlarının yenisini, 4.

Hareket programlarını, 2021-2025 Hareket Programı olarak yayınlamışlar ve bu programda son 15 yılda 3R yaklaşımları alanında; genetik mühendisliği, toksikogenomik, biyokimyasal bilimler, biyoloji süreçlerinin mekaniğinin anlaşılması vb. konularda önemli ilerleme kaydedildiğini bildirmişlerdir. Planın devamında hayvanlar kullanılmadan veya daha az hayvan kullanılarak daha çok sayıda toksikolojik son noktaların elde edilebildiği; "çip üzerindeki organ", "pluripotent kök hücreler" gibi *in vitro* ve "*in-siliko* modeller" gibi bilgisayara dayalı teknolojilerin ve modellerin gelişmesine yol açtığının da altı çizilmiştir [163].

U. S. EPA (Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı), 2025 yılına kadar hayvanlar üzerinde yapılan deneyler için fonlamalarını %30 azaltacağını; [33] 2035'e kadar ise tüm memeli hayvan deneylerini ve fonlanmasının sonlandırılacağını bildirmiştir [164]. FDA ise 2017 yılının aralık ayında Toksikoloji Çalışma Grubu aracılığı ile öngörülebilir toksikolojide FDA'nın yol haritasını [165] yayınlayarak alternatif yöntemler alanındaki çalışmalarını başlatmıştır. 2018 yılında yayınladığı yıllık rapor ile öngörülebilir toksikoloji yaklaşımını ve halihazırda ICH, ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, Alternatif Yöntemlerin Doğrulanmasına İlişkin Kurumlar Arası Koordinasyon Komitesi), OECD, EU-TOXRISK Konsorsiyumu (An Integrated European 'Flagship' Program Driving Mechanism-based Toxicity Testing and Risk Assessment for the 21st Century, Mekanizma Temelli Toksisite Testi ve 21. Yüzyıl İçin Risk Değerlendirmesine Yönelik Entegre Bir Avrupa 'Amiral Gemisi' Programı) gibi kuruluşlarla bilgisayarlı yöntemler aracılığı ile tahmine dayalı toksikolojiyi ilerletmekle ilgili ortak projelerde yer aldığını bildirmiştir [166].

Otorite kuruluşlarının yaklaşımları ve 3R (Değiştirme, Azaltma ve İyileştirme, Replacement, Reduction and Refinement) kapsamında hayvan deneylerine alternatif yöntemler olarak geliştirilen yaklaşımlardan biri de *in siliko* araçlardır. Bu araçlar etkinlik belirlenmesi ve toksisite verisi elde etmek için kullanışlı yöntemler olarak tanımlanmaktadır [26].

İlaç araştırma ve geliştirme, yüksek maliyet ve uzun zaman gerektirdiği için [167] *in siliko* yaklaşımlar ilaç aday molekülü araştırmalarında önem kazanmışlardır. Çünkü bu yaklaşım maliyet ve zamandan tasarruf edilmesini sağlamaktadır [168, 169]. Ayrıca son yıllarda önem kazanan "Yeşil mutabakat" ve "Sürdürülebilirlik" regülasyonları kapsamında da *in siliko*

araçların geliştirilmesi, kullanımı ve yaygınlaşması desteklenmektedir [36, 170-173]. *In siliko* toksikoloji araçları ile aday ilaç moleküllerinin belirlenmesi ve elenmesi konusunda benzer bir yaklaşım daha önce Lipinski'nin Beş Kuralı uygulaması ile de yapılmakta idi. Lipinski kuralları insan vücudunda bulunan lipid çift katmanlarının absorpsiyon veya geçirgenlik seviyesini belirlemeye yardımcı olarak, bileşiğin oral biyoyararlanımı hakkında öngörü sağlamaktadır. İyi biyoyararlanım göstergesi olarak belirlenen Lipinski kuralları şunlardır: moleküler ağırlık (MW) ≤500 g/mol, lipofilisite katsayısı LogP≤5, hidrojen bağı vericisi ≤5, hidrojen bağı alıcısı ≤10, molar kırılma değerleri 4-130 arasında olmalıdır [174, 175]. Yıllar önce ilaç adaylarının belirlenmesinde kullanılan bu öngörüler günümüzde bilgisayarlı yöntemlerin gelişmesi ile aday moleküllerin elenmesi, *in siliko* toksikoloji kapsamında daha geniş perspektifte bilgi sağlayan bilgisayarlı modellerle yapılabilmektedir [176].

*In siliko* modeller, ilaçtan kozmetiğe, tarım ilaçlarına kadar pek çok etkenin yapı-aktivitesinin, fizikokimyasal özelliklerinin ve toksisitesinin tahmin edilmesinden adaylarının kimyasal yapılarının istenilen özelliklere göre optimize edilmesine kadar çok sayıda uygulamada kullanılmaktadır. Bunun bir sonucu olarak, yasal talepleri karşılamak ve düzenleyici kuruluşlar adına bilgi sağlamak amacıyla *in siliko* araçların potansiyelinin giderek daha fazla farkına varılmaktadır [26, 177].

*In siliko* toksikoloji araçlarının temel ilkesi, bir kimyasalın içsel özelliklerinin, potansiyel etkileşimlerinin ve nihai etkilerinin moleküler yapısı içinde kodlanmış olmasıdır. Benzer kimyasalların benzer etkilere yol açması beklenmektedir. Bu nedenle, benzer kimyasalların özelliklerini tahmin etmek için etkinliği daha önce belirlenmiş olan kimyasalların bilgileri kullanılmaktadır [26, 178]. *In siliko* toksikoloji yaklaşımı ile bilgisayar tabanlı değerlendirmeye olanak sağlayan yöntem için kimyasalın sadece 2D yapısal özelliklerinin bilinmesi yeterlidir. Program veri tabanından bulunan benzer yapısal ve fizikokimyasal özellikteki kimyasallardan yola çıkarak tahminler yapmaktadır. Yeterli kanıtla sonuca ulaşılamayan durumlar söz konusu olur ise bu da ayrıca belirtilmektedir. Tahmin sistemine dayalı olan ve günümüzde tüm dünyada düzenleyici kuruluşların (EC, EPA, FDA gibi) desteği ile kullanımı her gün artan bu yazılımlar, uzun zaman, emek, para deney hayvanı kullanımını azaltarak alternatif yöntemlere yeni bir boyut kazandırmıştır [24, 35, 178].

### 2.7.1. Moleküler doking

*In siliko* yaklaşımlardan biri olan, ligandlar ile makromoleküller (DNA, protein, enzim vb.) arasındaki enerjik etkileşim ve olası bağlanma mekanizmaları hakkında bilgi veren moleküler doking (yanaştırma, kenetleme) 1980'li yıllarda geliştirilmiştir [28, 179, 180]. Bu yöntem kovalent olmayan, hidrojen bağı, van der waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler, elektrostatik etkileşimler, π-π etkileşimi ve tuz bağı oluşumu gibi bağlanmaları belirlemekte ayrıca uzaklık ölçümü ile olası kovalent etkileşimleri tahmin edebilmektedir [29, 181]. Kimyasal yapıya dayalı ilaç araştırmaları için öngörü sağlayan yaklaşım, ilaç keşif çalışmalarına önemli avantajlar sunmaktadır [20, 27, 182, 183].

Aday ilaç molekül araştırmalarında seçilen hastalığın hedefine yönelik kimyasal grupların belirlenmesi önemlidir. Örneğin kanser tedavisinde kullanılan Pt(II) bazlı ilaçların hedefi DNA'dır. DNA üzerindeki nükleik asitler ve olası ligantların etkileşiminin pek çok hücresel mekanizmayı etkilediği bilinmektedir [183]. Bu nedenle DNA ligand komplekslerinin doking etkileşimlerini belirleyecek yeni algoritmalar da geliştirilmektedir [183]. Yöntem makromolekül stabilken ligandın esnek olduğu doking ve her ikisinin de esnek olduğu esnek doking şeklinde uygulanabilmektedir. Esnek doking uygulamasında her iki yapının da farklı konformasyonlarının değerlendirilmesi, elde edilen skorların gerçeğe daha yakın olmasını sağladığı bildirilmiştir [184-187].

### 2.7.2. *In siliko* toksikoloji

İnsanlar ve hayvanlar için güvenli ürünler geliştirmek için kimyasalların farklı organizmalar üzerindeki potansiyel etkilerinin belirlenmesi gerekmektedir. Kimyasalların etkisinin ortaya çıkması konsantrasyon-zaman profili (iç maruziyet) ve ayrıca doğal aktivitesi (toksisite) ile belirlenmektedir. Bazı kimyasallar için, belli maruziyet senaryoları altında, belli türler için veriler mevcuttur. Bu gerçek, öngörücü yöntemlerin kullanımının kaçınılmaz olduğunu ortaya koymaktadır [26, 188]. *In siliko* toksikoloji terimi genellikle bilgisayar tabanlı bir analiz yoluyla maddelerin toksik etkinliklerini belirleyecek bir deneyi, matematiksel olarak hesaplaması veya bilimsel analizi ve madde ile ilgili verilerin organizasyonunu ifade etmektedir. Daha açık bir ifadeyle, terim, toksisite tahminleri veya gerçek deneysel toksikoloji ile ilgili verileri üretmek için tasarlanmış tipik olarak hesaplama algoritmalarını (matematiksel, kimyasal ve biyolojik) kullanan çeşitli bilgisayar tabanlı veri analiz

araçlarının kullanımı anlamına gelmektedir. Kısacası, *in siliko* toksikoloji, bir maddenin toksikolojik aktivitesini tahmin etmek ve mevcut verileri analiz etmek, modellemek için bilgisayar teknolojilerinin uygulanmasıdır [32, 174].

Avrupa yönetmeliği şu anda hayvanların kullanımını kısıtlamıştır. Hayvan refahının korunmasına yönelik artan endişenin bir sonucu olarak, Kimyasalların Kaydı, Değerlendirilmesi, İzni ve Kısıtlanması (REACH) yönetmeliği gibi düzenlemeler oluşturmuştur. Bu düzenlemeler $LD_{50}$ dozu belirleme gibi hayvan deneylerine dayalı verilerin elde edilmesinde kullanılabilecek alternatif toksisite yöntemlerini desteklemektedir [189]. REACH düzenlemesi, özellikle yeni sentezlenmiş kimyasalların toksisite verilerinin elde edilmesinde, herhangi bir yeni deneysel değer sunmadan önce hâlihazırda hangi bilgilerin mevcut olduğunu ve alternatif veri kaynaklarının dikkatlice kontrol edilmesini şart koşmaktadır [190]. Bu sayede *in siliko* yaklaşımlar, *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerin tamamlayıcısı veya ikamesi olarak yaygın bir uygulamaya ulaşmıştır. *In siliko* yöntemlerin uygulanması, tahmin edilen etkilerin güvenilirliğinin dikkatli bir şekilde değerlendirilmesini gerektirmektedir. Bu nedenle *in siliko* toksikoloji yaklaşımları düzenleyici kuruluşlarca belirlenmiş amaca uygun şekilde ve bilimsel olarak geçerli yöntemlerle elde edildiği durumlarda test yerine kullanılabilmektedir [26, 191].

### 2.7.3. *In siliko* toksikoloji yaklaşımında kullanılan araçlar ve $LD_{50}$ tahmini

*In siliko* yaklaşımlar yapısal alarm (structural alert) ve yapı-aktivite ilişkisine (structure-activity relationship) dayanan farklı yöntemlerle geliştirilmektedir. Günümüzde kullanımda olan pek çok hem ücretsiz hem de ücretli *in siliko* araçlar bulunmaktadır. Bunlar arasında, OECD, EPA gibi regülasyon kuruluşlarının hazırladıkları ücretsiz (OECD QSAR, EPA T.E.S.T.), bazı laboratuvarların geliştirerek erişime açtıkları (GUSAR Way2Drug, ProTox, VegaHub) ve özel şirketlerin, araştırmacılar ve laboratuvarlarla iş birliği ile hazırladıkları ücreti karşılığında kullanılabilenler (Schrödinger, ADMET Predictor, Percepta, MultiCase vb.) araçlar bulunmaktadır. Her programın tahmin için kullandığı bir veri seti ve istatistiksel modelleme yöntemi bulunmaktadır. Örneğin ABD EPA kuruluşunun geliştirdiği T.E.S.T (US EPA Toxicity Estimation Software Tool) programı yapı aktivite ilişkisini kullanarak bir bileşiğin toksisitesini tahmin etmek üzere geliştirilmiştir [35]. ProTox 3.0, akut toksisite, organ toksisitesi, toksikolojik son noktalar, moleküler başlatıcı olaylar, metabolizma, advers etki yolakları ve toksisite hedefleri gibi toksisite son noktalarının tahmini için toplam 61

modele dayanan bir platformdur. Program 3R (Reduce, Replacement, Refinement) kuralı ışığında yeni geliştiren moleküllerin preklinik çalışmalarına katkı sağlamak için geliştirilmiştir [35, 192]. EPA Chemicals Dashboard (CompTox), bilgisayarlı toksikoloji ile kimyasalların kimyası, toksisitesi ve maruziyet bilgilerine kolay erişim sağlamak için geliştirilmiştir. CompTox veri ve modelleri, daha fazla teste tabi tutulması gereken kimyasalların belirlenmesini sağlamaktadır [193]. Bir diğer ücretsiz program da Gusar Way2Drug; Moskova Rusya Tıp Bilimleri Akademisi Biyomedikal Kimya Enstitüsü tarafından geliştirilmiştir. İlk olarak maddelerin aktivite spektrumları için öngörü yapan bir bilgisayar sistemi olarak OECD'nin prensiplerine göre geliştirilmiştir. Günümüzde ise antitarget etkileşim, ekotoksisite gibi farklı alanlarda öngörü yapabilen geniş bir platform haline gelmiştir. Way2Drug portalı, yaklaşık otuz yıldır biyoinformatik, kemoinformatik ve bilgisayar destekli ilaç keşfinde çalışan multidisipliner bir araştırmacı ekibi tarafından geliştirilmekte ve desteklenmektedir [194]. Kimyasalların akut oral toksisite açısından taranmasına olanak sağlayan CATMoS (The Collaborative Acute Toxicity Modeling Suite)'da bir diğer ücretsiz programdır. Ulusal Toksikoloji Programı (NTP) ve Alternatif Toksikolojik Yöntemlerin Değerlendirilmesi için Kurumlar Arası Merkezin (NICEATM) toksikolojik son noktaların tahmini için yeni modellerin geliştirilmesi amacıyla bilim insanlarına yaptığı çağrı ile toplanan rat oral toksisite verisi ile geliştirilmiştir [195, 196].

Ticari olarak özel kuruluşlarca geliştirilmiş programlar da bulunmaktadır. Bunlardan biri olan SimulationPlus aday ilaç molekülü geliştirilmesi, preklinik güvenlilik değerlendirmesi için gerekli ön tahminler, detaylı etkinin belirlenmesi için organlara özel programları da içeren geniş bir platformdur. Yeni geliştirilen moleküllerin toksikolojik özelliklerinin belirlenmesi için platformdaki ADMET predictor modülü kullanılmaktadır. Bu platformda hepatotoksisite testi, endokrin sistem toksisitesi, üreme toksisitesi, öngörülebilmektedir [197]. Bir diğer ücretli yazılım olan ve ACD/Labs tarafından geliştirilen Percepta Platformu ise, fizikokimyasal, ADME/Tox ve diğer moleküler özellik verilerini tahmin etmek ve yönetmek amacıyla uygulamalar portföyü olarak geliştirilmiştir [198].

Kimyasalların toksisite profillerinin belirlenmesi için kullanılacak konsantrasyon veya doz aralıklarının belirlenmesi ilk ve önemli adımlardan biridir. Bu nedenle ilk defa sentezlenmiş ve etkinliği araştırılmak istenen bir kimyasalın belirlenmesi gereken önemli özelliklerinden biri akut toksisitedir [199]. Akut toksisite "medyan öldürücü doz" ($LD_{50}$), yani 24 saat içinde hayvanların %50'sini öldüren doz olarak ifade edilmektedir [200]. Deney sırasında farklı

dozların uygulandığı hayvanlar ilk 24 saat ve 2 hafta boyunca her gün gözlenmektedir. Bu süre boyunca da görünüm ve davranıştaki değişiklikler kaydedilmektedir. Akut toksisitenin belirlenmesi için bu süreçte deney hayvanlarında gözlenen klinik işaretler ile $LD_{50}$ değeri, intravenöz, oral, gibi farklı uygulama yollarına göre belirlenmektedir [201].

Kimyasalların insan sağlığına olası etkilerinin belirlenmesi geleneksel olarak hayvan deneyleri ile gerçekleştirildiğinden bu alanda geçmişten beri fazla sayıda veri bulunmaktadır. Bu veriler hayvan deneylerinden feragat edilmesi için düzenleyici otoritelerin tehlike ve risk değerlendirilmesinde alternatif yollar aramaya teşviki *in siliko* modellerin teknolojik olarak gelişmesini hızlandırmıştır [202]. Regülasyon kuruluşlarınca $LD_{50}$ değerinin belirlenmesi kimyasalların toksikolojik sınıflandırmasının temeli olarak görülmektedir. Bu nedenle akut toksisitenin tahmini için *in siliko* araçların geliştirilmesi alanında özel çaba sarf edilmiştir [195, 203, 204].

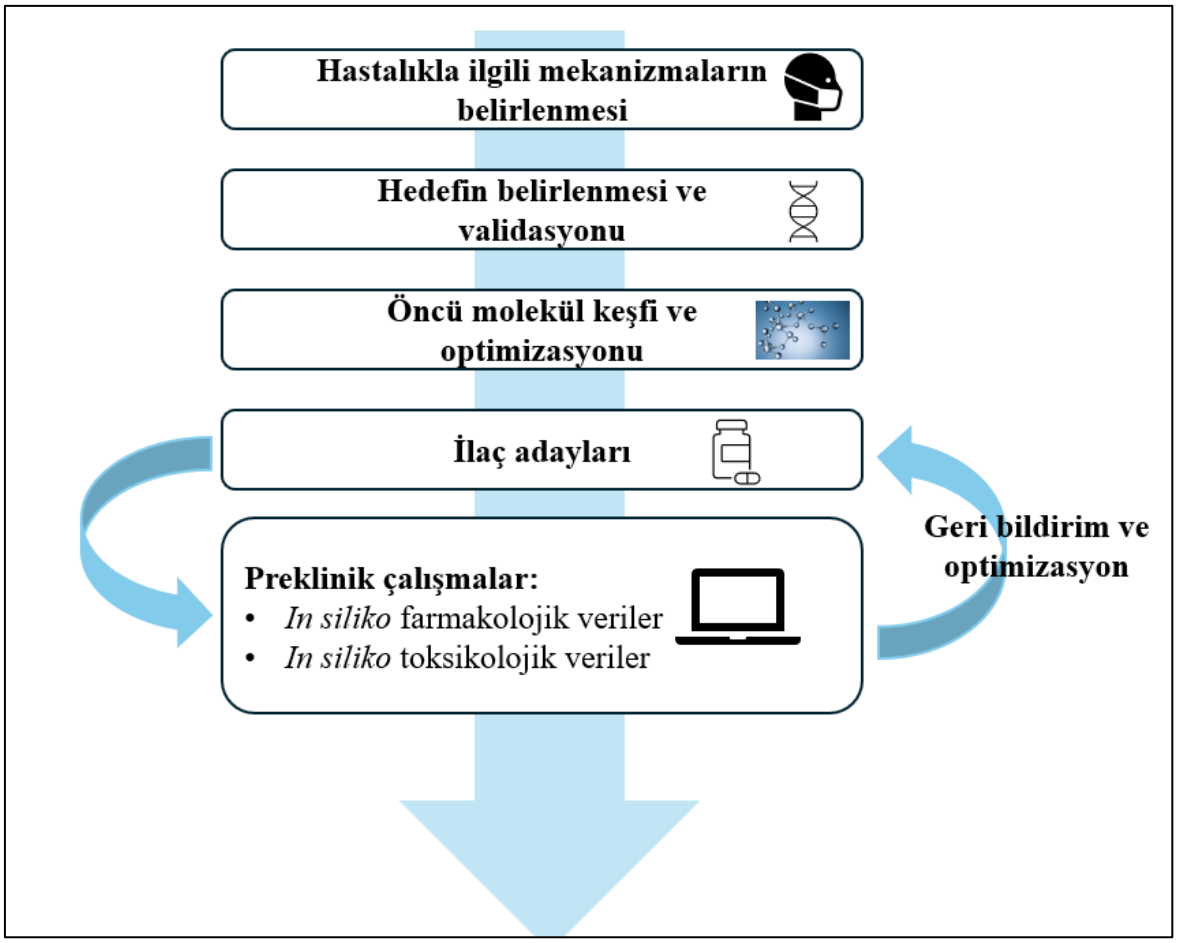
*In siliko* programlarda $LD_{50}$ dozunun belirlenmesi için hazırlanan veri tabanlarında özellikle ratların verileri tercih edilmiştir. Çünkü bu hayvanlar üzerinde günümüze dek pek çok deney yapılmış ve büyük miktarda deneysel veri birikmiştir. Ayrıca insan $LD_{50}$ dozuna en uyumlu $LD_{50}$ dozunun ratlarda belirlenebildiği bildirilmiştir. CLP ise oral ve inhalasyon yollarıyla akut toksisitenin belirlenmesinde ratları uygun tür olarak belirtmiştir [199, 203]. Güvenilir bir *in siliko* akut oral toksisite modeli beklentisi, insan sağlığı ile ilgili endişeleri gidermek için hızlı ve erken bilgilendirme, akut toksik olabilecek veya olmayabilecek bileşikleri tanımlama, bileşiklere daha ileri testler için öncelik verme ve *in vivo* çalışmalar gerekli olduğunda başlangıç dozlarını açıklama potansiyeli sunmaktadır. Laboratuvar hayvanlarının kullanımının tamamen ortadan kaldırılması henüz mümkün görünmese de, *in siliko* akut oral toksisite teknolojilerinin özellikle toksik olmayan bileşikler için hayvan çalışmalarına olan bağımlılığı azaltabileceği düşünülmektedir [202].

*In siliko* araçlar genellikle *in vivo* toksisite testleri için birebir ikame olarak işlev görmezler, ancak bir kimyasal, biyolojik bir sistemle etkileşime girdiğinde dahil olan süreçlerin tam bir mekanik anlayışının oluşturulmasına yardımcı olabilecek ilgili bilgilerin parçalarını sağlamaktadırlar. *In siliko* modellerden elde edilen tahminler, diğer yöntemlerle birlikte kullanıldığında daha faydalıdır, ancak bu, ilgili kimyasal ve biyolojik bilgilerin entegre edilebileceği esnek bir çerçeve gerektirmektedir [26].

## 2.8. *In siliko* yaklaşımı ile preklinik güvenlilik değerlendirilmesi

Preklinik güvenlilik değerlendirmesi ilaç kullanımında güvenli miktar ve zamanlamayı belirlemek ve potansiyel yan etkileri değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Bu etkileri belirlemek için preklinik güvenlilik değerlendirmesi kapsamında klasik olarak ilaç aday molekülün yararlı ancak toksik olmayan miktarının ve uygulama yönteminin belirlenmesi için *in vitro* ve *in vivo* deneyler gerçekleştirilmektedir [24, 205]. Preklinik güvenlilik değerlendirmesi için uluslararası düzenleyici kuruluşlar tarafından hazırlanmış yönergeler bulunmaktadır (ICH guideline M3(R2) [206, 207]. Bir ilacın pazarlama onayı için preklinik güvenlilik değerlendirmesi genellikle farmakoloji, genel toksisite, toksikokinetik ve klinik olmayan farmakokinetik, üreme toksisitesi, genotoksisite çalışmalarını ve özel endişe nedeni olan veya uzun süreli kullanımı amaçlanan ilaçlar için kanserojen potansiyelin değerlendirilmesini içermektedir [206]. Kanser gibi hayatı tehdit eden hastalıklar için ilaç geliştirilirken ise optimizasyon ve hızlandırma için hem toksikolojik değerlendirme hem de klinik geliştirmede duruma göre farklı bir yaklaşım kullanılabilmektedir. Bu durumlarda preklinik güvenlilik değerlendirmesindeki çalışmalar kısaltılabilmekte, ertelenebilmekte, çıkarılabilmekte veya eklenebilmektedir. [208]. Anti kanser ilaçların geliştirilmesindeki yaklaşımlar için düzenleyici kuruluşlarca özel yönergeler hazırlanmıştır [209, 210].

Preklinik güvenlilik çalışmaları için değerlendirme yapılırken; genel toksisite çalışmaları için yüksek doz seçimi, farmakoloji, toksikokinetik ve farmakokinetik etkilerin belirlenmesi, akut toksisite, tekrarlı doz toksisite, insanda ilk dozun tahmin edilmesi, lokal tolerans, genotoksisite, kanserojenlik, üreme toksisitesi çalışmaları gerçekleştirilmektedir [206]. Antikanser ilaçların geliştirilmesi için ise farmakoloji, güvenlilik farmakolojisi, farmakokinetik, genel toksikoloji, üreme toksikolojisi, genotoksisite, kanserojenlik, immünotoksisite ve fotogüvenlilik testlerinin yapılması düzenleyici kuruluşlarca önerilmiştir [209, 210]. Uzun ve maliyetli bir süreç olan preklinik değerlendirme sürecinde bilgisayarlı modellerden elde edilen veriler erken tedbirler alınmasını böylece hem zamandan hem de maliyetten tasarruf etmeyi sağlamaktadır [169]. Bilgisayarlı yaklaşımlar için geliştirilen araçlarda kullanılan veri tabanlarının geliştirilmesi *in siliko* programların öngörülerinin doğruluğunu ve yeni veriler için de öngörü yapabilmesini sağlamaktadır [211, 212]. İlaç keşfi sürecini ve preklinik çalışmanın ana içeriğini özetleyen akış şeması Şekil 2.4'te verilmiştir.




Şekil 2.4. İlaç keşfi süreci ve preklinik çalışmanın ana içeriğini özetleyen akış şeması [213].

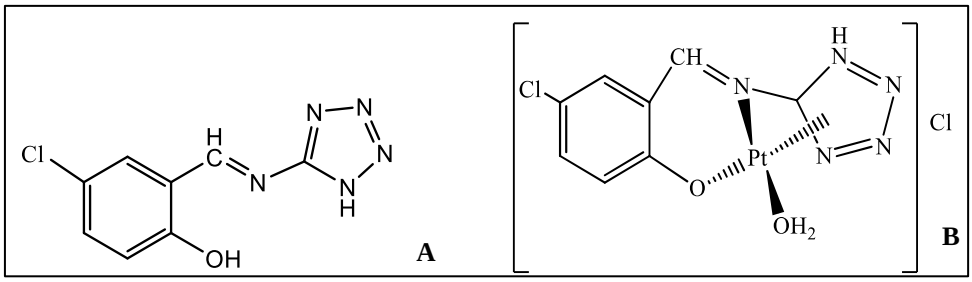
# 3. MATERYAL METOD

## 3.1. Materyal

Bu araştırmada tetrazolato ligandı ve onun Pt(II) kompleksinin genotoksik etkilerinin belirlenmesi ve *in siliko* yaklaşımla preklinik güvenlilik değerlendirmesinin yapılması amaçlanmıştır. Genotoksik etkilerin belirlenmesi için insan periferal lenfositleri ve izole lenfositler kullanılarak kromozomal anormallik, sitokinez blok mikronükleus sitom ve komet testleri uygulanmıştır. Periferik kan, sigara, alkol ve ilaç kullanmayan, herhangi bir hastalığı olmayan ve genotoksik ajanlara maruz kalma öyküsü bulunmayan 18-30 yaşlarında bir erkek ve iki kadın donörden temin edilmiştir. Tez kapsamında gerçekleştirilen *in vitro* yaklaşım deneyleri Gazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 02/11/2020-685 sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir. Genotoksisite testlerinde kullanılacak konsantrasyonların ve ligandların toksisite sınıfının belirlenmesi için T.E.S.T (US EPA Toxicity Estimation Software Tool), ProTox, EPA Chemical Dashboard, GusarWay2Drug, CATMoS programları aracılığı ile belirlenen $LD_{50}$ dozları kullanılmıştır. Preklinik güvenlilik değerlendirme çalışması için ise ACD Labs Percepta, VegaHub, Protox, EPA TEST ve SwissADME programlarının öngörüleri değerlendirilmiştir. Ayrıca 122Z762 kodlu TÜBİTAK ARDEB 1001 projesi kapsamında tetrazolato ligandı ve onun Pt(II) kompleksinin sentez, karakterizasyon, sağlıklı ve kanser hücre hatlarında sitotoksisite testleri gerçekleştirilmiştir.

### 3.1.1. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) Kompleksi

Bu tez çalışmasında kullanılan tetrazolato ligandı ve onun Pt(II) kompleksinin sentezi 122Z762 kodlu TÜBİTAK ARDEB 1001 projesi kapsamında Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü İnorganik Kimya Laboratuvarında Prof. Dr. Nurşen SARI ve Doç. Dr. Elvan HASANOĞLU ÖZKAN tarafından sentezlenerek karakterize edilmiştir. Tetrazolato ligandının ve o'nun Pt(II) kompleksinin öngörülen molekül formülleri Şekil 3.1.'de verilmiştir.




Şekil 3.1. Tetrazolato ligandı (A) ve Pt(II) kompleksinin (B) kimyasal yapıları

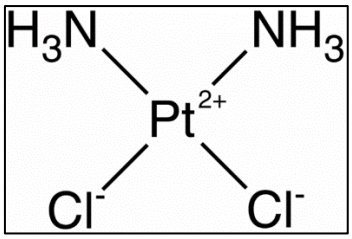
Cisplatinin kanser tedavisindeki etkili olmasının nedenleri; kare düzlemsel geometri ve Pt(II) iyonundaki ligantların cis yapısı olarak bildirilmektedir (Raudenska, 2019; Gebel 1997). Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksinde de kare düzlemsel geometrik yapı elde edilmiş, Pt(II) iyonu ile bağ yapan düşük toksisiteye sahip olan, tetrazol ve Schiff bazı yapıları ile desteklenmiştir. Bu bağlamda Pt(II)- tetrazol halkası içeren Schiff bazı ligandı ile birleştirilerek molekül oluşturulmuştur. Pek çok alanda ilaç geliştirmesinde kullanılan tetrazol ve Schiff bazı yapılarının bir arada olduğu ligant sentezlenmiş ve düşük toksisiteli olabileceği tahmin edilen bu yapı üzerine kanser tedavisindeki rolü nedeniyle Pt(II) iyonu ile koordine edilmiştir. Yapılan literatür taramasında çalışmamıza konu olan tetrazolato ligandına benzer (tetrazol içeren Schiff bazı ligandı) benzer ve onun Pt(II) kompleksi sentezlenmiş haline rastlanmamıştır. Ancak Schiff bazı-Pt(II) kompleksleri ve tetrazol-Pt(II) kompleksleri bulunmaktadır.

Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan cisplatin ve hidrojen peroksit ile ilgili açıklamalar ve formülleri şöyledir:

<u>Cisplatin</u>

Molekül ağırlığı: 300,05 g/mol
Molekül formülü: $Cl_2H_6N_2Pt$
Ürün kodu: 201600206
Etki: Metastatik testis tümörleri, metastatik yumurtalık tümörleri ve ilerlemiş mesane kanserinin tedavisi için

Yapısal Formülü: Şekil 3.2.'de verilmiştir.

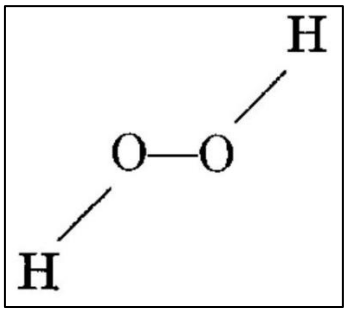



Şekil 3.2. Cis diammino diklororo platin (II) kompleksinin (Cisplatin) kimyasal yapısı [214]

Hidrojen peroksit ($H_2O_2$)

Molekül ağırlığı: 34,01 g/mol
Molekül formülü: $H_2O_2$
CAS No: 7722-84-1
Saflık: %35
Etki: Organik ve/veya inorganik bileşikleri oksitleme yeteneği, DNA hasarı

Yapısal Formülü: Şekil 3.3.'de verilmiştir.




Şekil 3.3. Hidrojen peroksit'in yapısal formülü [215]

## 3.2. Metod

Genotoksisite deneylerinde kullanılacak $LD_{50}$ dozları *in siliko* yaklaşım ile belirlenmiştir. Ardından kültüre edilmiş insan periferal lenfositlerinde kromozomal anormallik (KA) ve sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) testleri uygulanmış olup izole insan lenfositleri ile de komet testi gerçekleştirilmiştir. Deneyler tamamlandıktan sonra farklı DNA dizilimlerine sahip DNA yapıları ile tetrazolato ligandının etkileşimi moleküler doking

yöntemi ile (Schrödinger Maestro) araştırılmış ve *in siliko* toksikoloji programları (ACD Labs Percepta, TEST, Vegahub, Protox, EPA ve SwissADME) kullanılarak preklinik güvenlilik değerlendirmesi yapılmıştır.

### 3.2.1. *In Siliko* yöntemler ile TetSalCl ligandının Rat Oral $LD_{50}$ dozunun belirlenmesi

İlk defa sentezlenmiş bir molekül olan (TetSalCl) ligandının genotoksik verilerinin elde edilmesi için gerçekleştirilmesi planlanan genotoksisite testlerinde uygulanacak konsantrasyon aralığı için $LD_{50}$ dozundan yararlanılacağından *in siliko* yaklaşım ile ligandın $LD_{50}$ dozu belirlenmiştir. Bunun için T.E.S.T (US EPA Toxicity Estimation Software Tool), Protox, EPA Chemical Dashboard, GUSARWAY2DRUG, CATMoS programları kullanılmış ve TetSalCl ligandının kimyasal yapısından (Şekil 3.1A) faydalanılmıştır. Programların panellerine 2D yapı çizilerek rat oral $LD_{50}$ dozu için öngörüleri alınmıştır.

### 3.2.2. Genotoksisite testlerinde kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi

*In siliko* yaklaşım ile elde edilen $LD_{50}$ dozu insan dozuna çevrilerek ön deneme deneyi için kullanılacak konsantrasyonlar: 1,17; 2,34; 4,68; 9,37; 18,75; 37,50; 75,00; 150,00 µg/mL olarak belirlenmiştir. Deneylerde kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi için insan periferal lenfosit hücrelerinde kromozomal anormallik testi uygulanmıştır. Test OECD'nin *in vitro* memeli hücrelerinde kromozomal anormallik testi yönergelerine [22] (OECD TK 473) göre bazı değişikliklerle [216] gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4). Bu deneyden elde edilen preparatlardan mitotik indeks sayımı yapılmış ve ligandın mitotik indeksi etkilemediği konsantrasyonlar olan 37,50; 18,75; 9,37; 4,68; 2,34 µg/mL seçilmiştir. Aynı konsantrasyonlarda Pt(II) kompleksinin de genotoksik etkisi araştırılmıştır.

### 3.2.3. Kromozomal anormallik testi

İnsan periferal lenfosit hücrelerinde kromozomal anormallik (KA) testi OECD'nin 473 numaralı kılavuzunda yayınlanan [22] metoda göre bazı değişikliklerle [217] gerçekleştirilmiştir. Deney için 1/10 oranında heparinize edilmiş periferik kan (0,2 mL) steril şartlarda, 2,5 mL'lik kromozom ortamına (Lymphoplus medium) eklenmiş ve tüpler 37ºC'lik etüvde toplam 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kültür süresinin başlangıcından 24 saat sonra ön deneme deneyi verilerine göre belirlenen konsantrasyonlarda (2,34; 4,68;

9,37; 18,75; 37,50 µg/mL) tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi ile muamele edilmiştir. Deneylerde ayrıca negatif (distile su), çözücü (DMSO, final konsantrasyon %0,5) ve bir de pozitif kontrol (0,25 µg/mL cisplatin) grupları bulundurulmuştur.

Deney başlangıcından 48 saat sonra ise önceden ayrıca hazırlanmış ve kültürü başlatılmış olan tüplere KA testinin 24 saatlik muamelesi için aynı konsantrasyonlar ve kontrol gruplarının muamelesi yapılmıştır. Deney başlangıcının 70. saatinde 0,06 µg/mL kolşisin ekimi yapılmış ve 72. saatte deney sonlandırılmıştır. Tüpler etüvden alınarak 1100 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından süpernatantı atılan tüplere 5'er mL 0,075M KCl vorteks kullanılarak ilave edilmiş ve 37 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüplere 2,5 mL 3:1 oranında hazırlanarak -20 Cº'de soğutulmuş metanol ve asetik asit karışımından oluşan fiksatif ilave edilmiştir. Ardından tekrar santrifüj edilen tüplerden süpernatant atılmış ve fiksasyon işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Üçüncü fiksatiften sonra santrifüj edilen tüplerden uygun miktarda süpernatant atılarak dipte kalan kısım pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.

### 3.2.4. Sitokinez blok mikronükleus sitom

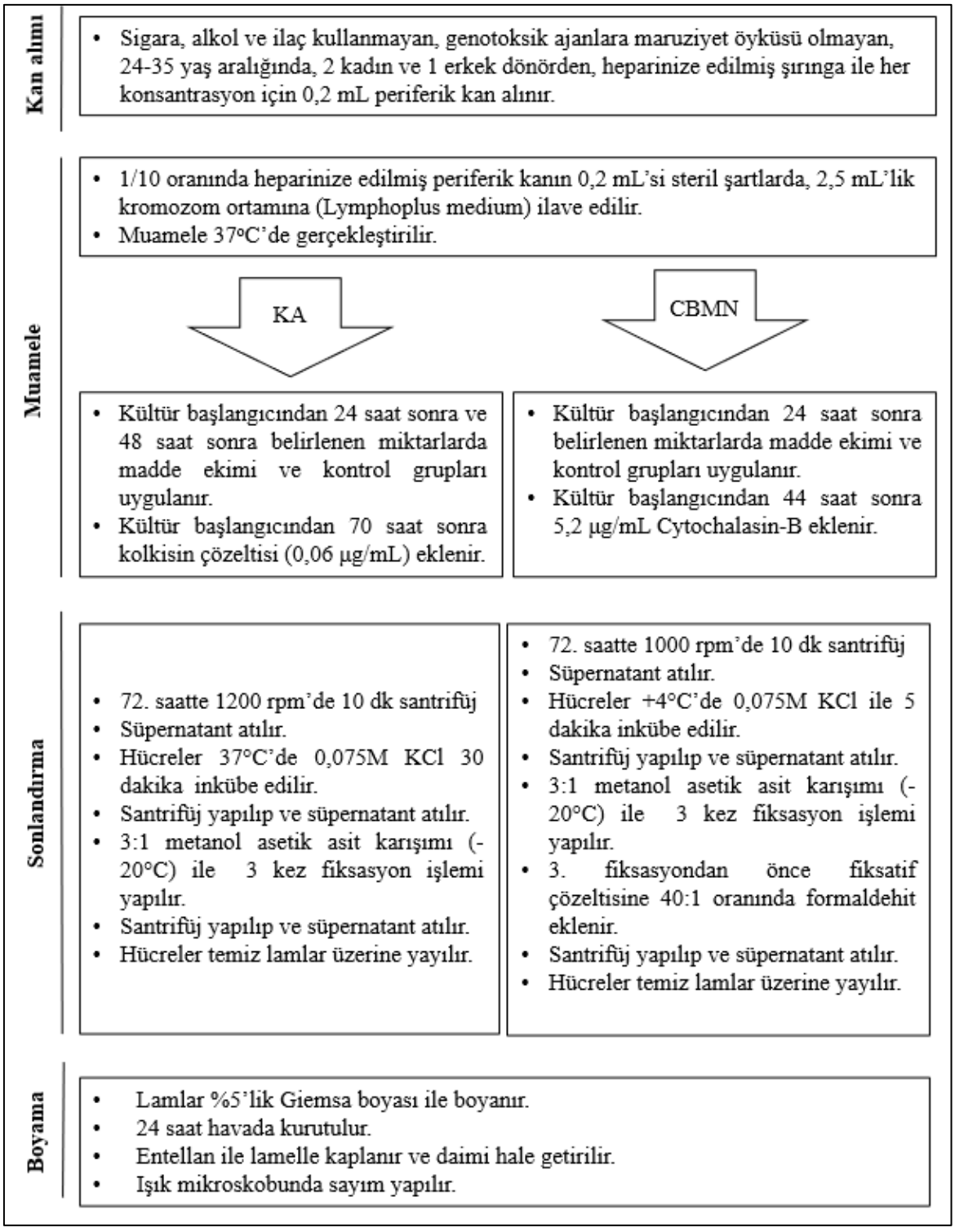
*In vitro* memeli mikronükleus testi [128] periferal lenfosit hücrelerinde sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) yöntemi olarak bazı değişikliklerle [145, 153, 217] uygulanmıştır. Deney için 1/10 oranında heparinize edilmiş periferik kan (0,2 mL) steril şartlarda, 2,5 mL'lik kromozom ortamına (Lymphoplus medium) eklenmiş ve tüpler 37ºC'lik etüvde toplam 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Test başlangıcından 24 saat sonra daha önce belirlenen konsantrasyonlarda (2,34; 4,68; 9,37; 18,75; 37,50 µg/mL) tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi ile muamele edilmiştir. Deneylerde ayrıca negatif (distile su), çözücü (DMSO, final konsantrasyon %0,5) ve bir de pozitif kontrol (0,25 µg/mL cisplatin) grupları bulundurulmuştur. Deneyin 44. saatinde de sitokalasin B ekimi (5,2 µg/mL) gerçekleştirilmiş ve deney 72. saatte sonlandırılmıştır. Etüvden alınan tüpler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından süpernatantı atılan tüplere hipotonik çözeltisi (0,075M KCl) vorteks kullanılarak ilave edilmiş ve +4ºC'de 5 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda santrifüj edilen tüplerden süpernatant atılmış ve 3:1 oranında hazırlanarak -20ºC'de soğutulmuş metanol ve asetik asit karışımından oluşan fiksatif ilave edilmiş ve bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Son fiksasyon işleminde fiksatif çözeltisine 40:1 oranında formaldehit ilave edilmiştir. Uygun miktarda süpernatant atılarak pipetaj yapılmıştır.

Hem KA testi hem de MN testi için hücreler önceden distile su ile yıkanıp, kurutulup, soğutulmuş lamlar üzerine yayılmıştır. Preparatlar 24 saat kuruduktan sonra %5'lik Giemsa (pH 6,8) boyası ile boyanarak tekrar 24 saat kurutulmuş ve entellan ile daimî hale getirilmiştir. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobunda sayılmıştır. KA ve CBMN testleri için gerçekleştirilen tüm işlemler Şekil 3.4'de verilen akış diyagramında özetlenmiştir.

Preparatların incelenmesi ve değerlendirilmesi

Kromozomal anormallik testi için hazırlanan preperatlardan kromozomal anormallikler ve Mitotoik İndeks (Mİ) belirlenmiştir. Kromozomal anormalliklerin (toplam hücre sayısı içindeki anormal hücrelerin yüzdesi (% anormal hücre) ve hücre başına düşen kromozom anormalliği (KA/hücre)) belirlenmesi için her bir konsantrasyona ait preparatlardan kromozomları iyi dağılmış olan toplam 100 metafaz (3 donör için toplam 300 metafaz) incelenmiştir. Mİ'i saptamak için her muamele grubundan 3.000 hücre sayılarak bunlar içindeki metafazlar tespit edilmektedir. Mİ, bölünen hücre sayısının toplam hücre sayısına oranının yüzde cinsinden hesaplanması ile bulunmaktadır (Çizelge 3.1).

CBMN-Cyt test prosedürüne göre hazırlanmış preparatlardan mikronükleus (MN), nükleer tomurcuk (NT) ve nükleoplazmik köprü (NPK) frekanslarının yanında nükleer bölünme (NBİ) ve sitokinez blok proliferasyon (CBPİ) indeksleri belirlenmiştir. MN, NT ve NPK frekansları binükleat (çift çekirdekli; çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak sitoplazmik bölünmesi Sitokalasin-B ile engellenmiş) hücrelerin değerlendirilmesiyle belirlenmektedir. Bu sayede madde muamelesinden sonra 1 kez mitoz bölünme geçirmiş hücreler tespit edilmektedir. Çalışma 3 ayrı donörden alınan kan örnekleri ile gerçekleştirildiğinden CBMN-Cyt frekanslarının belirlenmesi, her konsantrasyon için 3000 binükleat hücrenin değerlendirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. NBİ ve CBPİ için 1, 2, 3 ve 4 çekirdekli hücreler değerlendirilmiştir. Her konsantrasyon için 500 hücre (3 donör için 1500 hücre) sayılmıştır. Ardından Çizelge 3.1'de belirtilen formüller uygulanmıştır.




Şekil 3.4. Kromozomal anormallik ve sitokinez blok mükronükleus testi preperasyon diyagramı

Çizelge 3.1. Bölünme indekslerinin belirlenmesi için kullanılan formüller

| | | |
|---|---|---|
| Mİ | KA | [Metafaz sayısı x100]/n |
| NBİ | CBMN | [1x(1N) + 2x(2N) + 3x(3N+4N)] / n |
| CBPİ | CBMN | [1x(1N) + 2x(2N) + 3x(3N) + 4(4N)] / n |

1N: 1 çekirdekli hücre, mononükleat; 2N: 2 çekirdekli hücre, binükleat;3N: 3 çekirdekli hücre, trinükleat;4N: 4 çekirdekli hücre, tetranükleat

### 3.2.5. Komet testi

Donörlerden alınan kan buz üzerinde PBS ile süspanse edilmiş ve biocoll ile lenfosit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu lenfositler 1 saat süre ile belirlenmiş konsantrasyonlarla (2,34; 4,68; 9,37; 18,75; 37,5) tetrazolato ligandı ve onun Pt(II) kompleksi ile aynı zamanda kontrol grupları (negatif kontrol:distile su; çözücü kontrol: DMSO (final konsantrasyon %0,5); pozitif kontrol:100 µM $H_2O_2$ ile muamele edilmiştir. Süre sonunda santrüfüj ile hücreler maddeden ayrılmış, PBS ile süspanse edilmiş ve canlılık testine geçilmiştir. Buna göre 10 µL %4'lük Tripan mavisi boyası ve 10 µL hücre karıştırılarak boyanmış ve thoma lamına yayılarak ışık miroskobunda sayılarak kaydedilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 3.2'de verilen formülle değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.2. Tripan mavisi canlılık testi verilerinin değerlendirilmesi için kullanılan formüler

| | |
|---|---|
| Canlı Hücre sayısı | Canlı hücre sayısı / Toplam hücre sayısı x $10^4$ x DF |

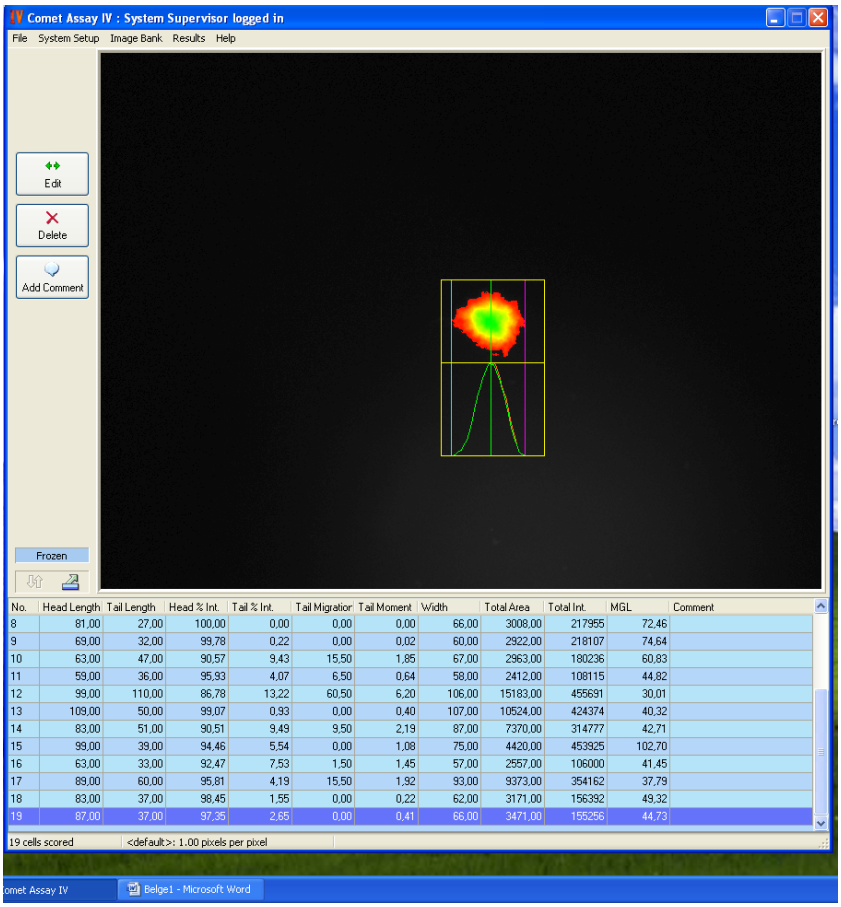
DF : Dilüsyon Faktörü

Komet testi Singh ve arkadaşlarının [23] metodunda bazı modifikasyonlarla [129, 155, 216] gerçekleştirilmiştir. Canlılık testinden sonra komet testi için lenfositler düşük erime ısılı agar ile karıştırılmış ve önceden daha yüksek erime ısılı agar ile kaplanmış lamlara yayılmıştır. Lamelle kapatılan lamlar +4ºC'de bekletilmiş ardından lameller kaldırılarak en az 1 saat lysing işlemine tabi tutulmuştur. Süre sonunda elektroforez tankına dizilen preparatlar elektroforez tamponunda bekletilmiş ve 25 V, 300 mA'de 20 dakika elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonunda 0,4 M Tris (pH=7,5) tamponunda nötralize edilen lamlar EtBr ile boyanmıştır. Tüm işlemler akış diyagramında belirtilmiştir (Şekil 3.5).

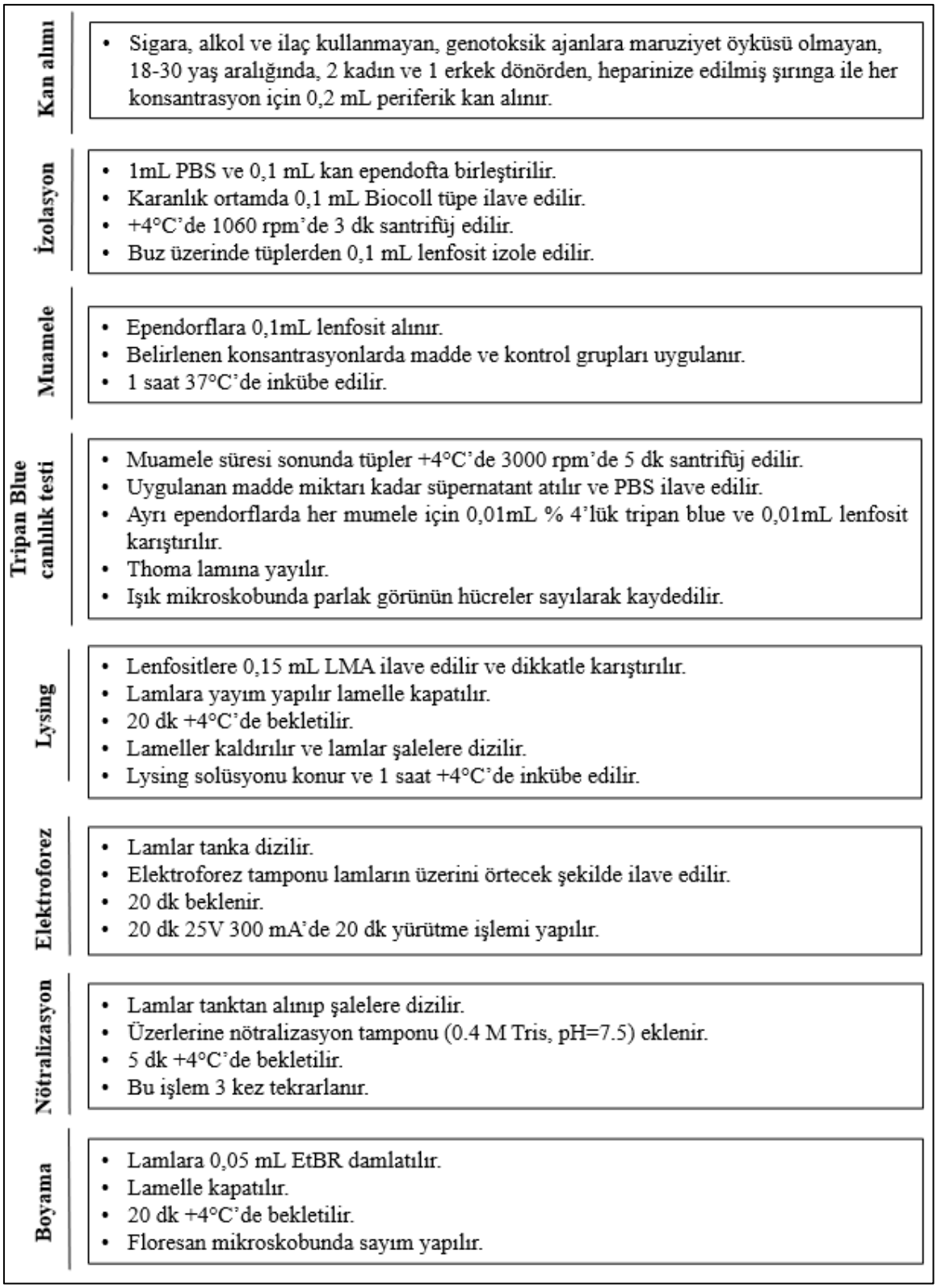
Komet sayımı ve görüntü analizi

Hazırlanan preparatlardan her konsantrasyon için 100'er hücre (3 donör için 300 hücre) (Çizelge 3.3) floresan mikroskopta "Comet Assay IV", Perceptive Instruments Ltd., UK

analiz programı kullanılarak incelenmiştir (Resim 3.1). Hücrelerde gözlemlenen hasar dereceleri % kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametreleri kullanılarak değerlendirilmiştir.




Resim 3.1. Komet görüntü analizi




Şekil 3.5. Komet testi preperasyon diyagramı

Çizelge 3.3. Genotoksisite testleri ile hazırlanan preparatlardan değerlendirilen hücre sayıları

| Test | Veriler | Sayılan hücre* | Preparat sayısı | Toplam |
|---|---|---|---|---|
| KA | % Anormal hücre | 300 | 78 | 23.400 |
| | KA/Hücre | | | |
| | Mİ | 3000 | 78 | 234.000 |
| CBMN-Cyt | MN | 3000 | 39 | 117.000 |
| | NT | | | |
| | NPK | | | |
| | NBİ | 1500 | 39 | 58.500 |
| | CBPİ | | | |
| Komet | Kuyruk uzunluğu | 300 | 39 | 11.700 |
| | Kuyruk yoğunluğu | | | |
| | Kuyruk momenti | | | |

*3 donör için

### 3.2.6. Genotoksisite testleri verilerini değerlendirmek için kullanılan istatistiksel analizler

KA, MN-Cyt preperatlarında sayımlar tamamlandıktan sonra KA için; anormal hücre, hücre başına düşen anormallik ve mitotik indeks, MN-Cyt için; mikronükleus, nükleoplazmik köprü ve nükleer tomurcuk verilerini değerlendirmek amacıyla z testi uygulanmıştır. Komet testi verileri elde edildikten sonra da kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametrelerinin değerlendirilmesi için ise IBM SPSS Statistics 2023 programı ile T testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılıklar belirlendikten sonra konsantrasyon etki ilişkisinin olup olmadığı regresyon analizi (IBM SPSS Statistics 2023) ile değerlendirilmiştir.

## 3.3. Moleküler Doking

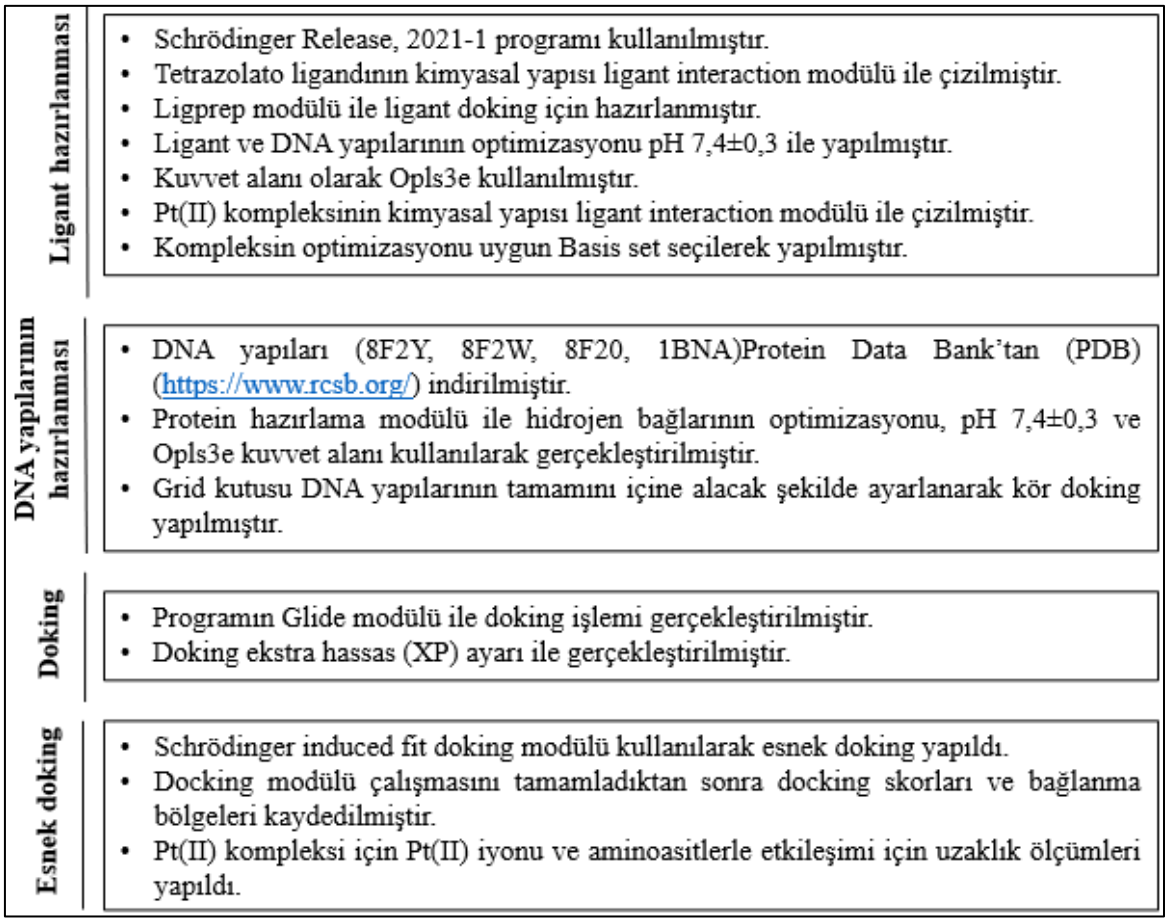
Docking için Schrödinger Maestro (Schrödinger Release, 2021-1) programı kullanılmıştır. Program içinde LigPrep modülü ile tetrazolato ligandının iki boyutlu kimyasal yapısı programa aktarılmıştır. Ligandın hazırlaması için epik modül ve Opls3e kuvvet alanı kullanılmıştır. Kanser hücrelerinde pH değeri normal hücrelerden farklılık göstermektedir. Çünkü metabolik faaliyetleri çok hızlı olan bu hücreler normal hücrelerden çok daha fazla proton ($H^+$) iyonu üretmektedir [218, 219]. Bu nedenle ligand doking için hazırlanırken pH 7,4±0,3 olarak ayarlanmıştır. Pt(II) kompleksinin doking çalışmasında kompleksin 2D yapısı Schrödinger programının ligant interaction modülü ile çizilmiştir. Ardından uygun basis set ile kompleksin optimizasyonu yapılmıştır. Doking için Protein Data Bank'ta (PDB)

(https://www.rcsb.org/) 8F2Y, 8F2W, 8F20, 1BNA kodlarıyla tanımlanmış olan yapılar kullanılmıştır (Çizelge 3.4). Protein Preparation Wizard modülü aracılığı ile PDB kodları kullanılarak yapılar programa aktarılmıştır. DNA yapıları ligand ile aynı koşullarda doking için hazırlanmıştır.

Çizelge 3.4. Doking için kullanılan DNA yapıları

| PDB | Baz dizilimi | Çözünürlük (Å) | Organizma | Kaynak |
|---|---|---|---|---|
| 8F2Y | 5'-CGCGATATCGCG-3' | 1,78 | İnsan | [220] |
| 8F2W | 5'-CGCGAATTCGCG-3' | 1,30 | İnsan | [220] |
| 8F20 | 5'-CGCAAAAAAGCG-3' | 2,23 | İnsan | [220] |
| 1BNA | 5'CGCGAATTCGCG-3' | 1,90 | N/A | [221] |

DNA yapılarının optimizasyonu tamamlandıktan sonra grid hazırlanmıştır. Docking Glide programının ligant doking modülü kullanılarak ekstra hassas XP ayarında yapılmıştır. Esnek doking çalışmasında ise aynı koşullarda Schrödinger induced fit doking modülü kullanılmıştır. Doking tamamladıktan sonra docking skorları ve bağlanma bölgeleri kaydedilmiştir. Program kovalent olmayan bağlarla oluşan etkiyi belirlediği için kovalent olmayan bağlarla etkileştiği düşünülen Pt(II) iyonu ve DNA yapıları arasında mesafe ölçümü yapılarak etkileşim değerlendirilmiştir. Pt(II) iyonuna 3-3,5 Å ve altı yakınlıkta olan atomlar belirlenmiştir. Bu yakınlıkta iyonun kovalent bağ oluşturabilecek kadar yapı ile yakınlaştığı anlaşılmıştır [222]. Tüm işlemler akış diyagramında belirtilmiştir (Şekil 3.6).




Şekil 3.6. Moleküler doking uygulama diyagramı

### 3.4. Preklinik Güvenlilik Değerlendirilmesi

Preklinik güvenlilik değerlendirme ACD Labs Percepta, EPA TEST, VegaHub, Protox, Simulation Plus ve SwissADME programları ile gerçekleştirilmiştir. Bu programların panellerine tetrazolato ligandının kimyasal yapısı (Şekil 3.1A) çizilerek veriler elde edilmiştir. Preklinik güvenlilik değerlendirme kapsamında tetrazolato ligandının farmakokinetik, organ toksisitesi, akut toksisite verileri, toksikolojik son noktalar (karsinojenesite, mutajenisite, sitotoksisite, immünotoksisite) ve toksikolojik yolakları ile ilgili veriler (Çizelge 3.5) elde edilmiştir.

Çizelge 3.5 Preklinik güvenlilik değerlendirme için kullanılacak veriler

| Elde edilecek veriler |
|---|
| Mutajenesite |
| Genotoksisite ve Karsinojenesite |
| hERG inhibisyonu |
| Kan beyin bariyeri geçirgenliği |
| Östrojen reseptörü etkisi |
| Androjen reseptör etkisi |
| p-glycoprotein inhibisyonu |
| p-glycoprotein subsratı |
| Aktif taşıma |
| P450 inhibisyonu |
| P450 subsratı |
| CYP enzimleri etkileşimi |
| Tiroid reseptör etkileşimi |
| Organ toksisitesi |

# 4. BULGULAR

## 4.1. *In Siliko* Yöntemler ile TetSalCl Ligandının Rat Oral $LD_{50}$ Dozunun Belirlenmesi

### 4.1.1. *In siliko* $LD_{50}$ tahminleri

TEST, Protox, EPA Chemical Dashboard, GusarWay2Drug ve Catmos programlarına TetSalCl ligandının kimyasal yapısı çizilmiş ve Rat oral $LD_{50}$ değerleri belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Elde edilen bu değerlerin ortalaması alındığında tetrazolato ligandı için Rat oral $LD_{50}$ dozu 940,3818 mg/kg olarak saptanmış ve insan dozuna ekstrapole edilerek [223] 151,6745 mg/kg değeri belirlenmiştir. *In siliko* araçlar metal içeren kimyasal yapılarla ilgili öngörüde bulunamadığından $LD_{50}$ dozu sadece tetrazolato ligandı için belirlenmiş ve ön çalışmalar sonraki deneysel sitotoksisite çalışmaları için karşılaştırma aynı zamanda yol gösterici olarak kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. (TetSalCl) Ligandı için programlardan elde edilen Rat oral $LD_{50}$ dozları

| PROGRAM | $LD_{50}$ rat oral dozu |
|---|---|
| T.E.S.T. | 1132,96 mg/kg |
| ProTox | 540,00 mg/kg |
| EPA Chemıcal Dashboard | 1127,94 mg/kg |
| GusarWay2Drug | 1406,00 mg/kg |
| CATMoS | 495,00 mg/kg |

## 4.2. Genotoksisite testlerinde kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi

### 4.2.1. Cisplatinin pozitif kontrol konsantrasyonunun belirlenmesi

Mitotik indeks sayımından elde edilen veriler Çizelge 4.2'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda 0,25 µg/mL konsantrasyonunun pozitif kontrol olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.2. Cisplatin mitotik indeks sayım sonuçları

| Konsantrasyon µg/mL | Mitotik indeks (MI) |
|---|---|
| Kontrol (50 µl ds) | 95 |
| 1,00 | Toksik |
| 0,80 | Toksik |
| 0,50 | 39 |
| 0,25 | 55 |

### 4.2.2. TetSalCl ligandı için kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi

*In siliko* araçlarla elde edilen Rat oral $LD_{50}$ dozu insan dozuna çevrildiğinde elde edilen 151,6745 mg/kg dozu kullanılarak konsantrasyon belirleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bunun için insan periferik lenfositleri en yüksek konsantrasyon 150,00 olmak üzere 75,00; 37,50; 18,75; 9,37; 4,68; 2,34; 1,17 µg/mL konsantrasyonlarında tetrazolato ligandı ile muamele edilmiştir. Deneyden elde edilen preparatlardan yapılan mitotik indeks sayım sonuçları Çizelge 4.3'te verilmiştir. Sayım sonuçlarının *in siliko* verilerle uyumlu olduğu belirlenmiştir. Buna göre $LD_{50}$ dozu baz alınarak belirlemiş olan en yüksek konsantrasyon (150 µg/mL) beklendiği gibi toksik etki göstermiştir. 75 ve 4,68 µg/mL konsantrasyonlarında ise etkinin nispeten stabil kaldığı; 2,34; 1,17 µg/mL konsantrasyonlarda ise etkisiz kaldığı belirlenmiştir.

Pt(II) bazlı ilaçların toksik etkisinin ayrılan gruplar nedeniyle olduğu bilindiğinden genotoksisite değerlendirmesi için tetrazolato ligandının sitotoksik etkisinin düşük olduğu konsantrasyonlar seçilmiştir. Buna göre genotoksisite deneylerinde 2,34; 4,68; 9,37; 18,75; 37,50 konsantrasyonları çalışılmıştır.

Çizelge 4.3. TetSalCl Ligandı mitotik indeks sayım sonuçları

| Konsantrasyon (µg/mL) | Mitotik İndeks |
|---|---|
| K | 97 |
| ÇK | 84 |
| PK | 55 |
| 1,17 | 82 |
| 2,34 | 80 |
| 4,68 | 77 |
| 9,37 | 71 |
| 18,75 | 68 |
| 37.50 | 63 |
| 75,00 | 59 |
| 150,00 | 49 |

## 4.3. Kromozomal anormallik testi sonuçları

Kromozomal anormallik (KA) testi preparatlarından tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksinin farklı konsantrasyonlarının mikroskobik değerlendirme sonucu kromozomlarda oluşturduğu hasarlar (anormal hücrelerin çeşitleri ve yüzdesine ait bulgular) ve sitotoksisite göstergesi olarak mitotik indeks bulgularının elde edilmesi hedeflenmiştir. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksin insan periferal lenfositlerine muamelesi sonucu 24

ve 48 saatlik uygulamalarda kromatit ve kromozom kırığı, kardeş kromatitlerde birleşme, fragment, halka, disentrik kromozom ve kromatit değişimi olmak üzere 7 farklı yapısal ve endoreduplikasyon ile poliploidi olmak üzere 2 farklı sayısal anormallik gözlenmiştir (Resim 4.1). Artan konsantrasyonla beraber yapısal anormallik olarak kırıklardan sonra (ktk:33,7; kzk: 20,44) en çok görülen anormallik kardeş kromatidlerde birleşme (17,15) olarak kaydedilmiştir. Bunun yanında endoreduplikasyon (0,49) ve poliploidi (13,02) gibi sayısal anormallikler kromozom anormallik yüzdesi hesabında diğer anormalliklere göre yüksek oranda oluşmuştur (Çizelge 4.4; Şekil 4.1; Şekil 4.2; Şekil 4.3).

Tetrazolato ligandı 24 saatlik uygulamada kromozomal anormalliklere neden olmamıştır 48 saatlik uygulamada ise en yüksek konsantrasyonlarda (18,75; 37,5 µg/mL) hem anormal hücre hem de hücre başına anormallik değerlerinde çözücü kontrole göre anlamlı artışa neden olmuştur. Pt(II) kompleksi ise 24 saatlik uygulamada 9,37 µg/mL'den, 48 saatlik uygulamada ise 4,68 µg/mL'den itibaren hem anormal hücre hem de hücre başına anormallik frekanslarında anlamlı artışa neden olmuşur. Yapılan regresyon analizinde hem 24 saatlik uygulama için anormal hücre ($r = 0,944$) ve hücre başına düşen anormalliklerin ($r = 0,947$) hem de 48 saatlik uygulamada anormal hücre ($r = 0,939$) ve hücre başına düşen anormalliklerin ($r = 0,933$) konsantrasyona bağlı olarak artış gösterdiği belirlenmiştir.

[Pt(Tet-SalCl)] kompleksinin hem 24 hem de 48 saatlik uygulamalarında çözücü kontrole göre mitotik indeks anlamlı düşüş göstermiştir. 24 saatlik uygulamada en yüksek konsantrasyonda (37,5), 48 saatlik uygulamada ise en yüksek iki konsantrasyonda (18,75; 37,5) mitotik indekste çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. (Tet-SalCl) ligandında ise mitotik indeks değişimi istatistiki olarak anlamlılık göstermemiştir. Pt(II) kompleksinin Mİ verileri için yapılan regresyon analizinde hem 24 saatlik uygulamada ($r = -9,98$) hem de 48 saatlik uygulamada ($r = -9,13$) konsantrasyona bağlı olarak mitotik indeksin düştüğü belirlenmiştir.

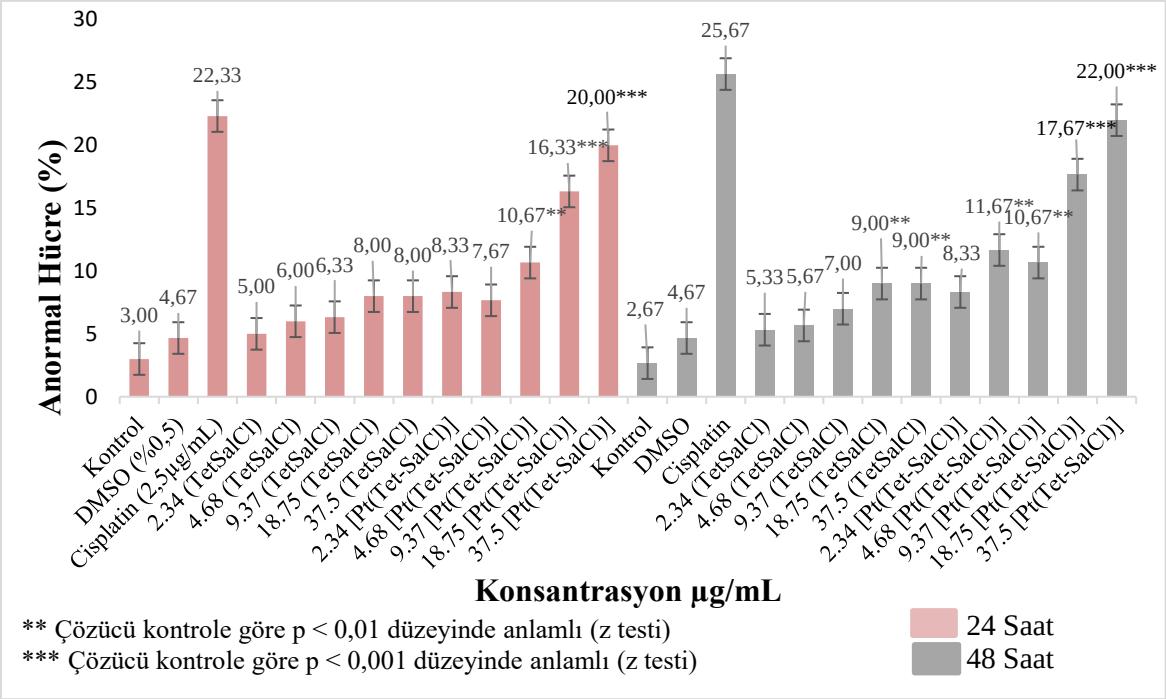
Çizelge 4.4. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi muamelesi sonucu insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları

| Test Maddesi | Uygulama | | Anormallikler | | | | | | | | | Anormal Hücre ± SH (%) | KA/ Hücre ± SH | Mİ± SH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Süre (Saat) | Konsantrasyon (µg/mL) | ktk | kzk | kkb | f | h | ds | ktd | e | p | | | |
| K | 24 | 0 | 5 | 2 | 2 | - | - | - | - | - | - | 3±0,99 | 0,030±0,099 | 8,13 ± 0,50 |
| ÇK(DMSO) | 24 | %0,5 | 7 | 3 | 2 | 4 | - | - | - | - | 1 | 4,67±1,22 | 0,005±0,004 | 7,53 ± 0,48 |
| PK(CP) | 24 | 0,25µg/mL | 23 | 16 | 7 | 4 | 1 | 4 | 15 | - | 1 | 22,33±2,40 | 0,220±0,025 | 4,03±0,36 |
| (Tet-SalCl) | 24 | 2,34 | 6 | 6 | 6 | - | - | - | - | - | 5 | 5±1,26 | 0,050±0,013 | 7,43 ± 0,49 |
| | | 4,68 | 7 | 6 | 1 | 2 | - | - | - | - | 1 | 6±1,37 | 0,060±0,014 | 7,23 ±0,47 |
| | | 9,37 | 6 | 5 | 3 | 1 | - | 1 | - | - | 5 | 6,33±1,41 | 0,060±0,014 | 7,47 ± 0,48 |
| | | 18,75 | 9 | 6 | 3 | 4 | - | - | - | - | 2 | 8±1,57 | 0,080±0,014 | 7,03 ± 0,47 |
| | | 37,50 | 10 | 7 | 5 | 3 | - | - | - | - | 5 | 8±1,57 | 0,100±0,017 | 6,63 ± 0,45 |
| [Pt(Tet-SalCl)] | | 2,34 | 9 | 3 | 4 | 4 | - | - | - | - | 5 | 8,33±1,6 | 0,080±0,014 | 6,20±0,44** |
| | | 4,68 | 7 | 7 | 4 | 2 | - | 2 | - | - | 2 | 7,67±1,54 | 0,080±0,014 | 5,43±0,41** |
| | | 9,37 | 16 | 7 | 4 | 1 | - | - | 1 | - | 4 | 10,67±1,78** | 0,110±0,017** | 4,97±0,40** |
| | | 18,75 | 14 | 14 | 6 | 6 | - | - | 2 | - | 7 | 16,33±2,13*** | 0,160±0,020*** | 4,30±0,37** |
| | | 37,50 | 19 | 12 | 9 | 6 | - | - | 3 | - | 9 | 20±2,31*** | 0,200±0,022*** | 3,67±0,34*** |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| K | 48 | 0 | 3 | 1 | 2 | | - | - | - | - | | 2,67±0,93 | 0,027±0,010 | 8,30 ± 0,51 |
| ÇK (DMSO) | 48 | %0,5 | 6 | 2 | 3 | 1 | - | 2 | - | - | 1 | 4,67±1,22 | 0,047±0,028 | 7,80 ± 0,49 |
| PK (CP) | 48 | 0,25µg/mL | 23 | 16 | 11 | 7 | 1 | 3 | 15 | - | 2 | 25,67±2,52 | 0,250±0,026 | 3,63±0,49 |
| (Tet-SalCl) | 48 | 2,34 | 6 | 2 | 2 | 2 | - | - | - | - | 3 | 5,33±1,30 | 0,050±0,014 | 7,70 ± 0,49 |
| | | 4,68 | 6 | 2 | 6 | 2 | - | - | - | - | 1 | 5,67±1,34 | 0,050±0,014 | 7,37 ± 0,48 |
| | | 9,37 | 5 | 1 | 8 | 1 | - | - | - | - | 6 | 7±1,47 | 0,070±0,014 | 7,00 ± 0,47 |
| | | 18,75 | 8 | 3 | 10 | | - | - | - | 1 | 5 | 9±1,65** | 0,090±0,017** | 7,03 ± 0,47 |
| | | 37,50 | 8 | 4 | 7 | 1 | - | - | - | - | 8 | 9±1,65** | 0,090±0,017** | 6,50 ± 0,45 |
| [Pt(Tet-SalCl)] | | 2,34 | 4 | 2 | 10 | 2 | - | - | 1 | 1 | 5 | 8,33±1,6 | 0,083±0,014 | 6,07±0,44* |
| | | 4,68 | 9 | 7 | 9 | 2 | - | 1 | 2 | 1 | 5 | 11,67±1,85** | 0,120±0,020** | 5,57±0,42* |
| | | 9,37 | 13 | 8 | 4 | 2 | - | - | 1 | - | 4 | 10,67±1,78** | 0,110±0,017** | 5,10±0,40** |
| | | 18,75 | 21 | 10 | 8 | 2 | - | 1 | 2 | 1 | 7 | 17,67±2,20*** | 0,180±0,022*** | 4,53±0,38*** |
| | | 37,50 | 27 | 14 | 5 | 5 | - | 1 | 2 | - | 16 | 22±2,39*** | 0,220±0,024*** | 3,83±0,35*** |
| Kromozomal Anormallik Yüzdesi (%) | | | 33,7 | 20,44 | 17,15 | 7,79 | 0,24 | 1,83 | 5,35 | 0,49 | 13,02 | | | |
| K: Kontrol, ÇK: Çözücü Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, DS: distile su, DMSO: dimetilsülfoksit, CP: cisplatin | | | | | | | | | | | | | | |

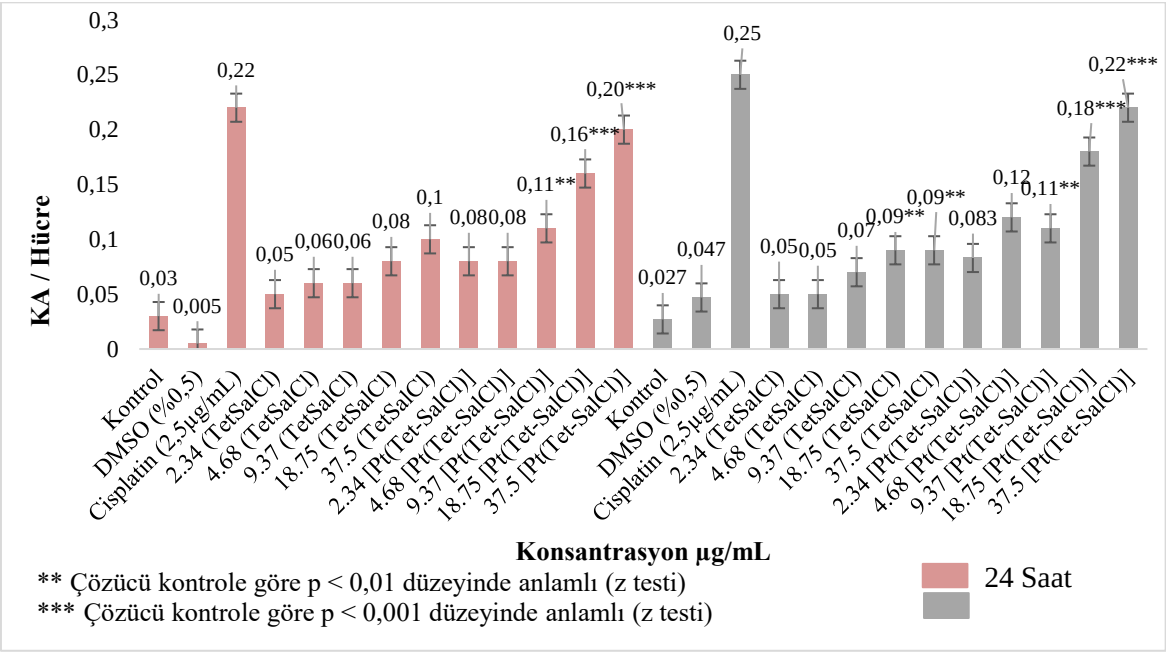
* Çözücü kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

** Çözücü kontrole göre $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)

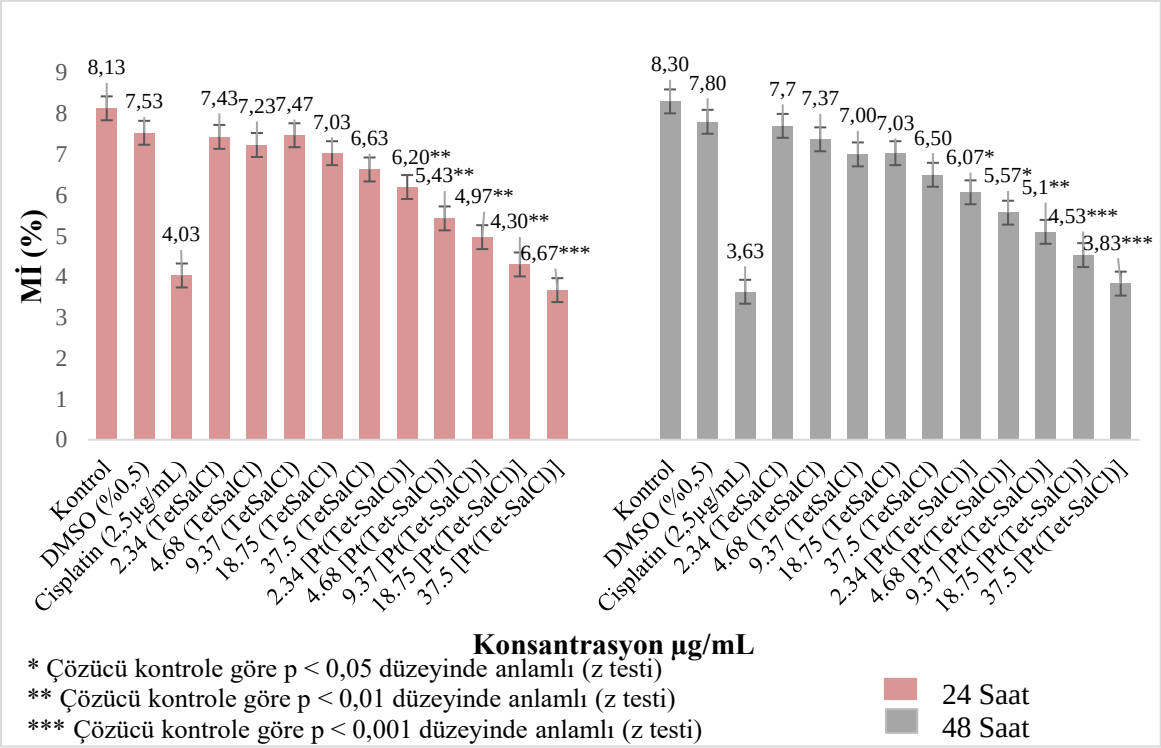
*** Çözücü kontrole göre $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



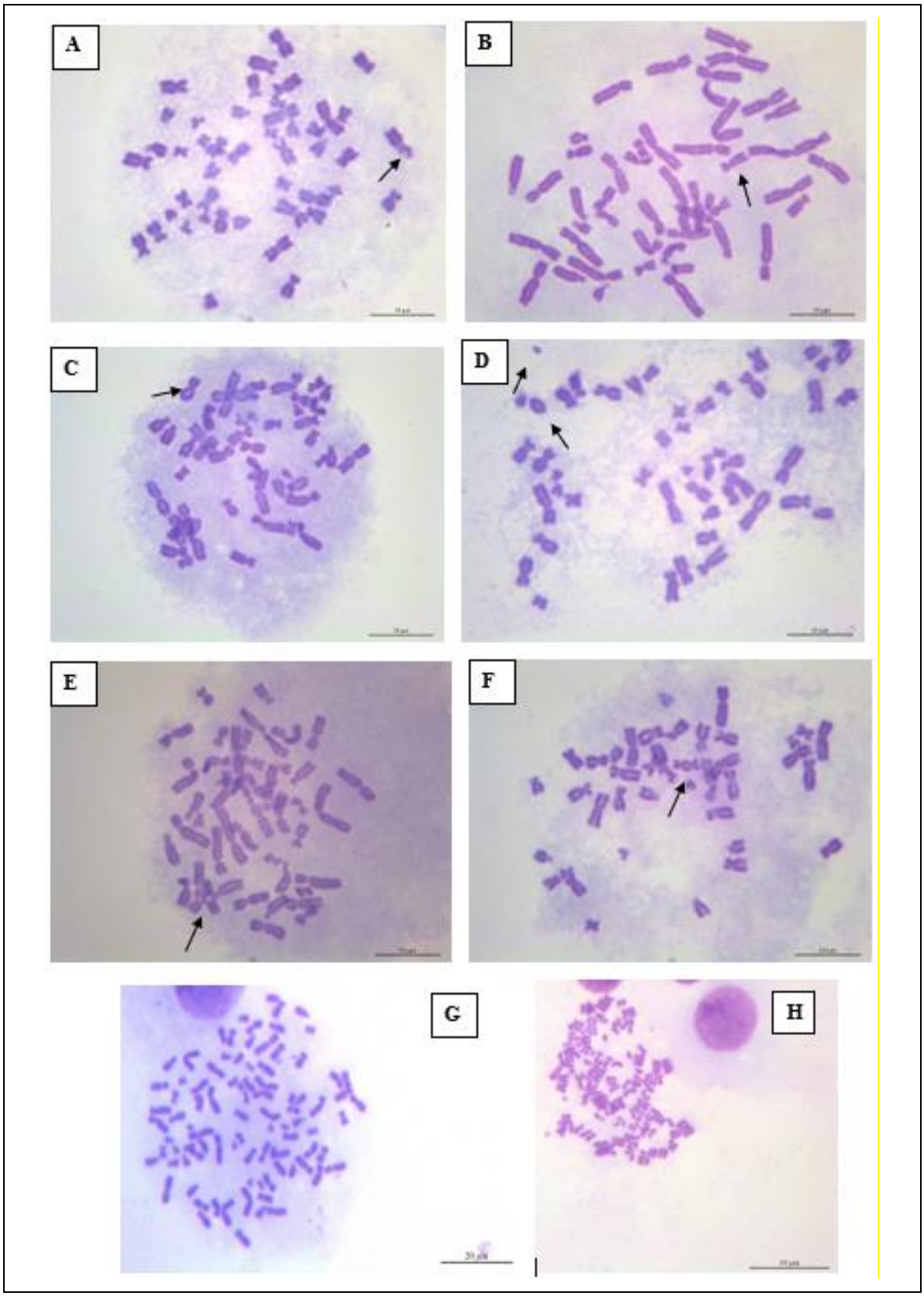

Şekil 4.1. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi uygulamasının insan periferal lenfositlerindeki anormal hücre yüzdesi üzerine etkisi




Şekil 4.2. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi uygulamasının insan periferal lenfositlerindeki hücre başına düşen anormallik frekansı üzerine etkisi




Şekil 4.3. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi uygulamasının insan periferal lenfositlerindeki mitotik indeks değerleri




Resim 4.1. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri A) kromatid kırığı B) kromozom kırığı C) kardeş kromatidlerde birleşme D) fragment ve halka kromozom E) kromatit değişimi F) disentrik kromozom G) poliploidi H) endoreduplikasyon

Hem kromozomal anormallik oranları hem de mitotik indeks değerleri birlikte değerlendirildiğinde, Tet-SalCl ligandın sitotoksik ve genotoksik potansiyelinin olmadığı ancak yüksek konsantrasyon ve uzun muamele süresinin genotoksik potansiyeli artırabileceği gözlenmektedir. Pt(Tet-SalCl)] kompleksi ise her iki uygulama süresinde de yüksek konsantrasyonlarda genotoksik potansiyel sergilemiş ve tüm konsantrasyonlarda mitotik indeksi düşürerek sitotoksik etki göstermiştir. Özellikle en yüksek iki konsantrasyonda (24 ve 48 saatlik uygulamalarda) hemen hemen cisplatin kadar mitotik indeksi düşürmüştür. KA oranı bakımından ise sadece en yüksek konsantrasyonda cisplatine yakın bir artışa sebep olmuştur.

### 4.4. Sitokinez blok mikronükleus sitom testi sonuçları

Sitokinez blok mikronükleus sitom (MNCyt) testi preparatlarından tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksinin farklı konsantrasyonlarının mikroskobik değerlendirme sonucu oluşturduğu hasarlar (Mikronükleus, nükleer köprü ve tomurcuk) ve sitotoksisite göstergesi olarak nükleer bölünme indeksi (NBİ) ve Sitokinez Blok Proliferasyon İndeksi (CBPİ) bulgularının elde edilmesi hedeflenmiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 4.12'de gösterilmiştir. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi ile muamele edilen insan lenfositlerinde bir ve iki mikronükleuslu binükleatlarla, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü içeren binükleatlara da rastlanmıştır (Resim 4.2).

Tetrazolato ligandı muamelesi sonucu mikronükleus, nükleoplazmik köprü ve nükleer tomurcuk içeren binükleat hücrelerin frekansında çözücü kontrole göre anlamlı bir değişimin olmadığı belirlenmiştir. Pt(II) kompleksi muamelesi sonucunda ise tüm frekanslarda (mikronükleus, nükleoplazmik köprü ve nükleer tomurcuk içeren binükleat hücreler) anlamlı artışların olduğu belirlenmiştir. Bu artışlar MN frekansında en yüksek iki konsantrasyonda (18,75 ve 37,5 µg/mL), nükleoplazmik köprü oluşumunda en düşük ve en yüksek konsantrasyonda (2,34 ve 37,5 µg/mL) ve nükleer tomurcuk frekansında ise en yüksek üç konsantrasyonda (9,37;18,75 ve 37,5 µg/mL) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.5; Şekil 4.4). Diğer yandan tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksinin nükleer bölünme indeksi (NBİ) ve Sitokinez Blok Proliferasyon İndeksi (CBPİ) üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Pt(II) kompleksi uygulaması sonucu oluşan mikronükleus (r=0,628), nükleoplazmik köprü (r=0,473) ve nükleer tomurcuk

(r=0,53) içeren binükleat hücrelerin frekansındaki artışların konsantrasyonla ilişkisinin zayıf olduğu belirlenmiştir.

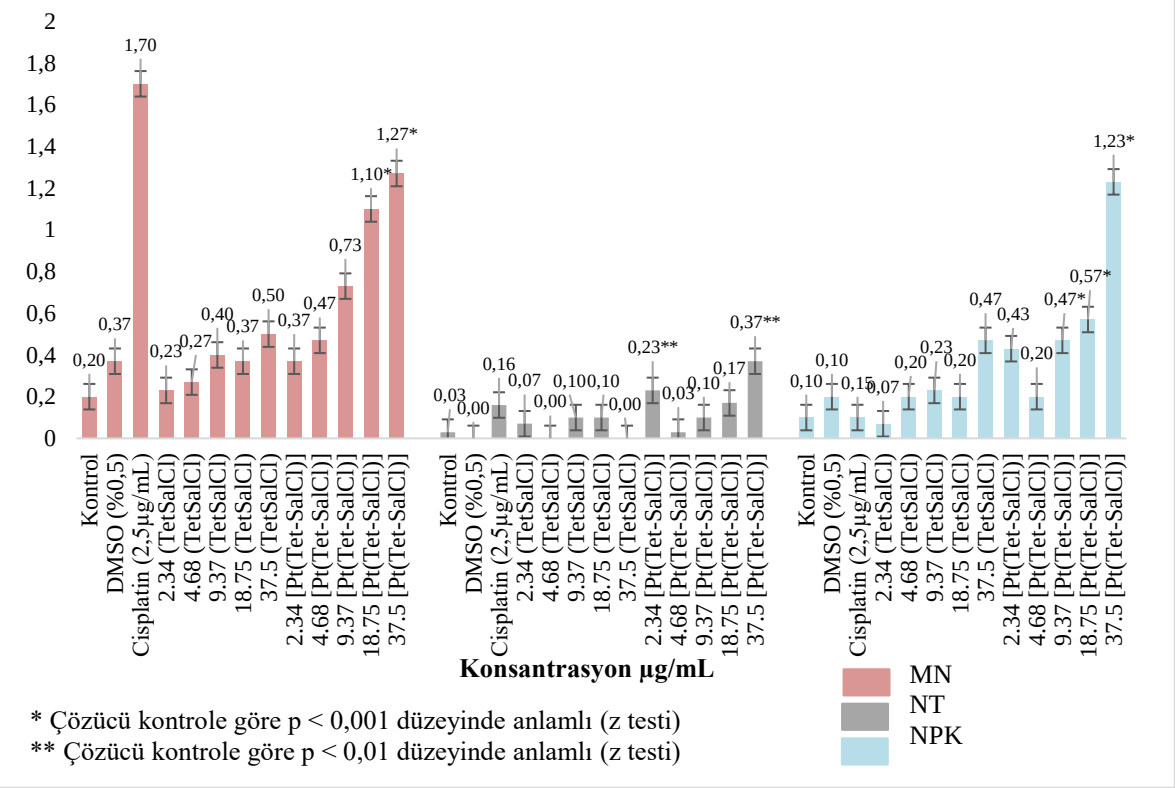
Çizelge 4.5. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi muamelesi sonucu insan periferal lenfositlerinde oluşan mikronükleus, nükleoplazmik köprü ve nükleer tomurcuk frekansları ile nükleer bölünme ve sitokinez blok proliferasyon indeksleri

| Test maddesi | Uygulama | | Sayılan binükleat hücre sayısı | BN hücreler içinde mikronükleus frekansları | | | MN ± SH (%) | Nükleoplazmik Köprü ± SH (%) | Nükleer Tomurcuk (NBUD)± SH (%) | Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) ± SH | Sitokinez Blok Proliferasyon İndeksi (CBPi) ± SH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Süre (Saat) | Konsantrasyon (µg/mL) | | (1) | (2) | T | | | | | |
| Kontrol | 48 | 0 | 3000 | 6 | | 6 | 0,20±0,08 | 0,03±0,03 | 0,1±0,06 | 2,09±0,37 | 1,93±0,36 |
| ÇK | 48 | %0,5(DMSO) | 3000 | 11 | | 11 | 0,37±0,11 | 0,00±0,00 | 0,2±0,08 | 1,87±0,35 | 1,74±0,34 |
| PK | 48 | 2,5µg/mL (CP) | 3000 | 39 | 6 | 51 | 1,70±0,24 | 0,16±0,07 | 0,10±0,05 | 1,26±0,29 | 1,25±0,29 |
| (Tet-SalCl) | 48 | 2,34 | 3000 | 7 | | 7 | 0,23±0,09 | 0,07±0,05 | 0,07±0,0 | 1,88±0,35 | 1,77±0,34 |
| | 48 | 4,68 | 3000 | 8 | | 8 | 0,27±0,09 | 0,00±0,00 | 0,2±0,08 | 1,6±0,32 | 1,66±0,33 |
| | 48 | 9,37 | 3000 | 12 | | 12 | 0,40±0,11 | 0,10±0,06 | 0,23±0,09 | 1,72±0,34 | 1,65±0,33 |
| | 48 | 18,75 | 3000 | 11 | | 11 | 0,37±0,11 | 0,10±0,06 | 0,2±0,08 | 1,6±0,32 | 1,55±0,32 |
| | 48 | 37,50 | 3000 | 13 | 1 | 15 | 0,50±0,13 | 0,00±0,00 | 0,47±0,13 | 1,59±0,32 | 1,53±0,32 |
| [Pt(Tet-SalCl)] | 48 | 2,34 | 3000 | 9 | 1 | 11 | 0,37±0,11 | 0,23±0,09** | 0,43±0,12 | 1,65±0,33 | 1,6±0,33 |
| | 48 | 4,68 | 3000 | 10 | 2 | 14 | 0,47±0,13 | 0,03±0,03 | 0,2±0,08 | 1,63±0,33 | 1,59±0,33 |
| | 48 | 9,37 | 3000 | 22 | | 22 | 0,73±0,16 | 0,10±0,06 | 0,47±0,13* | 1,62±0,33 | 1,56±0,32 |
| | 48 | 18,75 | 3000 | 27 | 3 | 33 | 1,10±0,19* | 0,17±0,08 | 0,57±0,14* | 1,50±0,31 | 1,47±0,31 |
| | 48 | 37,50 | 3000 | 36 | 1 | 38 | 1,27±0,21* | 0,37±0,11** | 1,23±0,20* | 1,51±0,31 | 1,48±0,31 |

K: Kontrol, ÇK: Çözücü Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, DS: distile su, DMSO: dimetilsülfoksit, CP: cisplatin

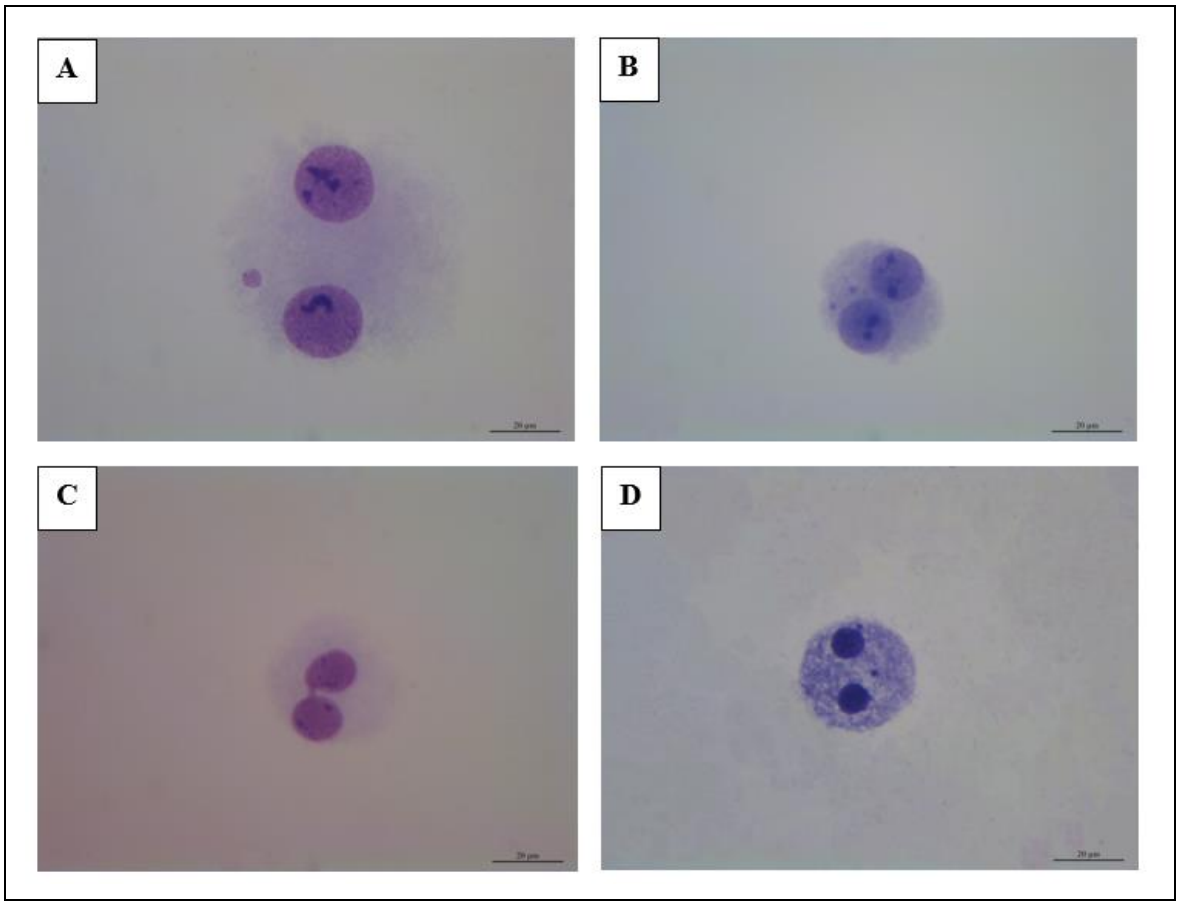
* Çözücü kontrole göre $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)

** Çözücü kontrole göre $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)




Şekil 4.4. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksinin insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü frekansları üzerine etkisi

58



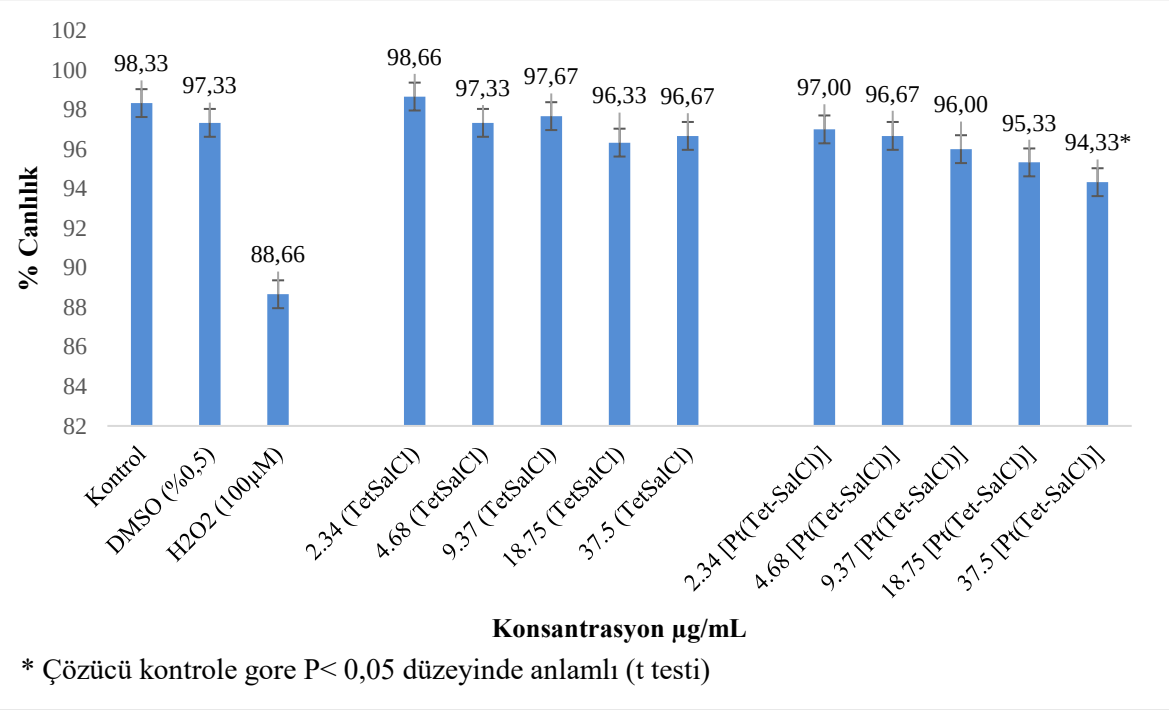

Resim 4.2. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü içeren binükleat hücreler A) bir mikronükleuslu binükleat hücre B) iki mikronükleuslu binükleat hücre C) bir nükleoplazmik köprü içeren binükleat hücre D) bir tomurcuk ve bir mikronükleus içeren binükleat hücre

### 4.5. Komet testi sonuçları

Komet testi sırasında yapılan tripan mavisi canlılık testinden sitotoksisite göstergesi olarak % canlılık verilerinin ve sonrasında hazırlanan preparatlardan tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksinin farklı konsantrasyonlarının mikroskobik değerlendirme sonucu neden olduğu DNA hasarları (kuyruk toğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti) bulgularının elde edilmesi hedeflenmiştir.

Tripan mavisi canlılık testi sonuçlarından kontrol grubunda 98,33 olan canlılık değerinin tetrazolato ligandının yüksek konsantrasyonlarında (18,75; 37,5 µg/mL) ve Pt(II) kompleksinin tüm konsantrasyonlarında azaldığı belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu bu azalışların sadece Pt(II) kompleksinin 37,5 µg/mL

konsantrasonunda anlamlı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6; Şekil 4.5). Yapılan regresyon analizinde bu azalmanın konsantrasyonla ilişkisinin yüksek (r=0,99) olduğu belirlenmiştir.




Şekil 4.5. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi muamelesi sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde tripan mavisi testine göre değişen canlılık değerleri

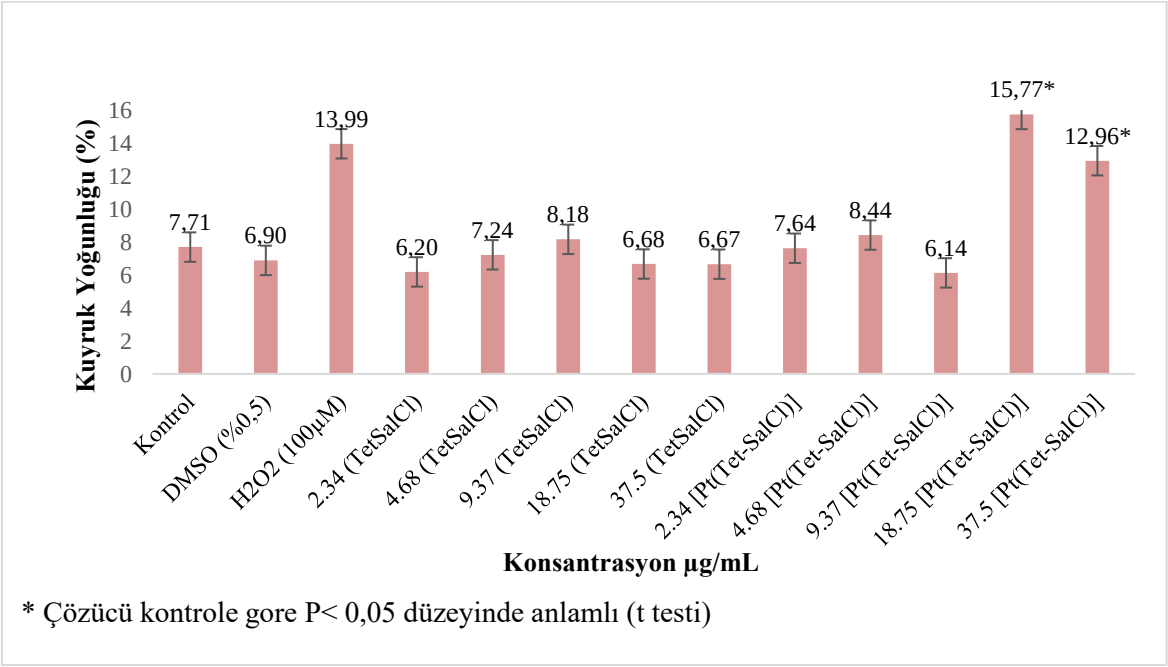
Tetrazolato ligandı ve Pt (II) kompleksinin DNA üzerineki etkisinin belirlenmesi için kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olmak üzere 3 ayrı parametreden faydalanılmıştır. Tetrazolato ligandının izole lenfositlere 1 saat muamelesi sonucu DNA hasarında anlamlı artışa neden olmadığı belirlenmiştir. Pt(II) kompleksinin ise en yüksek konsantrasyonlarda (18,75 ve 37,50 µg/mL) tüm parametrelerde DNA hasarında çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamı artışa neden olduğu belirlenmiştir. Regresyon hesaplamaları DNA hasarının konsantrasyonla beraber arttığını göstermiştir (kuyruk yoğunluğu için r=0,64; kuyruk uzunluğu için r=0,79 ve kuyruk momenti için r=0,85) (Çizelge 4.6; Şekil 4.6; Şekil 4.7; Şekil 4.8). Komet testi sonrasında preperatlar sayılırken gözlenen DNA hasarlarına örnekler Resim 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.6. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde oluşan DNA hasarı



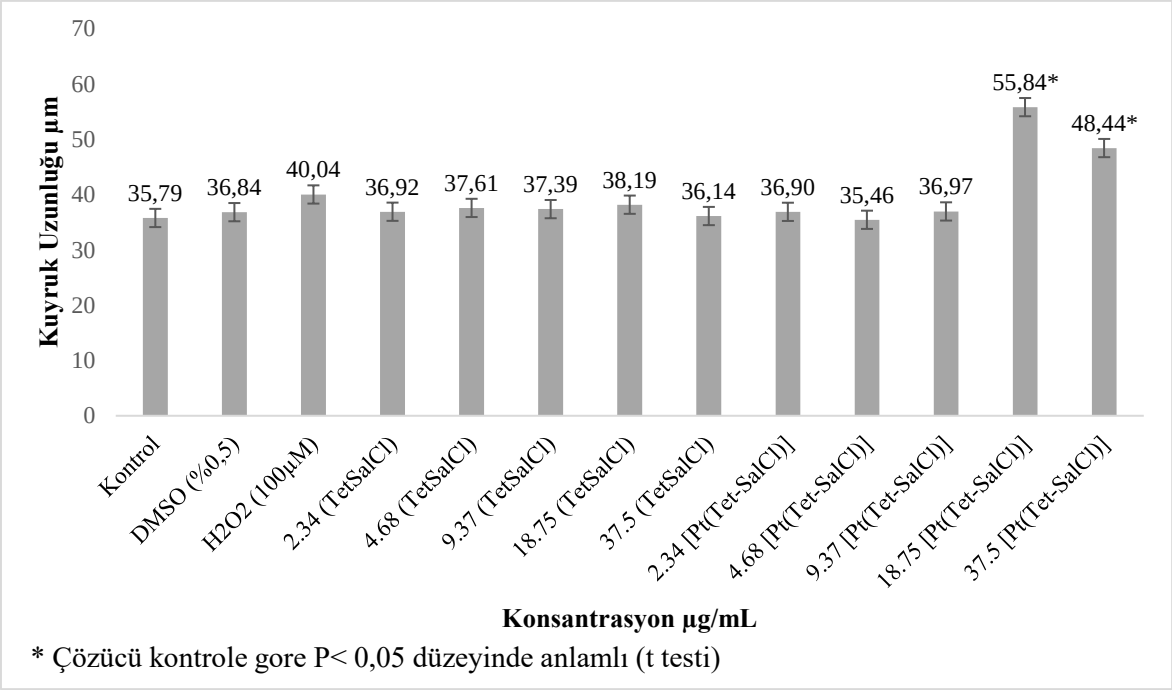
| Test Maddesi | Süre (Saat) | Konsantrasyon (µg/mL ) | Kuyruk yoğunluğu % | Kuyruk uzunluğu µm | Kuyruk momenti | Canlılık (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| K | 1 | DS | 7,71±0,81 | 35,79±0,71 | 1,76±0,27 | 98,33±0,33 |
| ÇK | 1 | DMSO | 6,90±0,89 | 36,84±0,76 | 1,77±0,36 | 97,33±0,33 |
| PK | 1 | $H_2O_2$ | 13,99±1,29 | 40,04±0,85 | 3,65±0,48 | 88,66±2,03 |
| | | | | | | |
| (Tet-SalCl) | 1 | 2,34 | 6,20±628 | 36,92±0,65 | 1,23±0,17 | 98,66±0,33 |
| | 1 | 4,68 | 7,24±0,87 | 37,61±0,77 | 1,80±0,34 | 97,33±0,33 |
| | 1 | 9,37 | 8,18±0,87 | 37,39±0,79 | 1,89±0,27 | 97,67±0,33 |
| | 1 | 18,75 | 6,68±0,80 | 38,19±0,81 | 1,71±0,37 | 96,33±0,33 |
| | 1 | 37,50 | 6,67±0,81 | 36,14±0,77 | 1,50±0,24 | 96,67±0,67 |
| | | | | | | |
| [Pt(Tet-SalCl)] | 1 | 2,34 | 7,64±0,85 | 36,90±0,70 | 1,69±0,26 | 97,00±0,58 |
| | 1 | 4,68 | 8,44±1,11 | 35,46±0,84 | 2,00±0,37 | 96,67±0,33 |
| | 1 | 9,37 | 6,14±0,77 | 36,97±0,75 | 1,35±0,27 | 96,00±0,58 |
| | 1 | 18,75 | 15,77±1,60* | 55,84±1,44* | 5,75±0,79* | 95,33±0,33 |
| | 1 | 37,50 | 12,96±1,46* | 48,44±1,64* | 5,54±0,90* | 94,33±0,33* |
| * Çözücü kontrole gore P< 0,05 düzeyinde anlamlı (t testi) | | | | | | |

K: Kontrol, ÇK: Çözücü Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, DS: distile su, DMSO: dimetilsülfoksit, CP: cisplatin



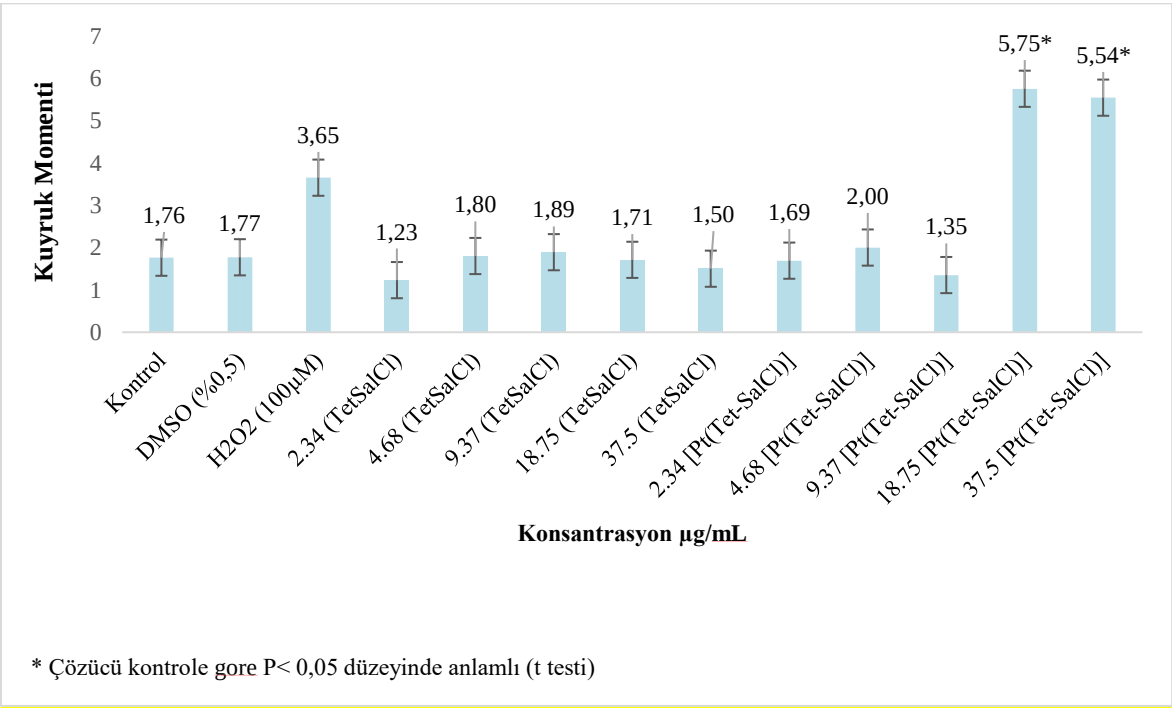

* Çözücü kontrole gore P< 0,05 düzeyinde anlamlı (t testi)

Şekil 4.6. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi muamelesi sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde komet kuyruk yoğunluğu



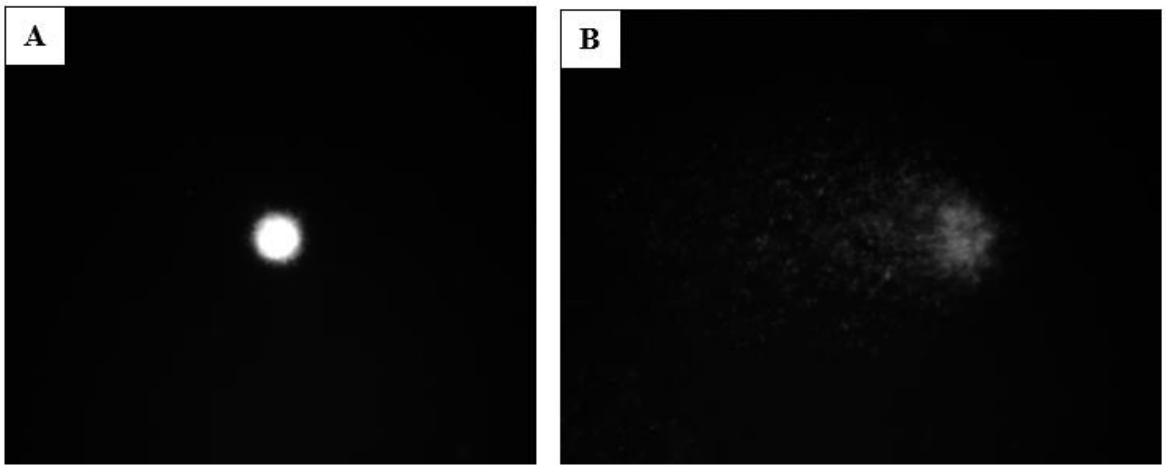

* Çözücü kontrole gore P< 0,05 düzeyinde anlamlı (t testi)

Şekil 4.7. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi muamelesi sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde komet kuyruk uzunluğu




* Çözücü kontrole gore P< 0,05 düzeyinde anlamlı (t testi)

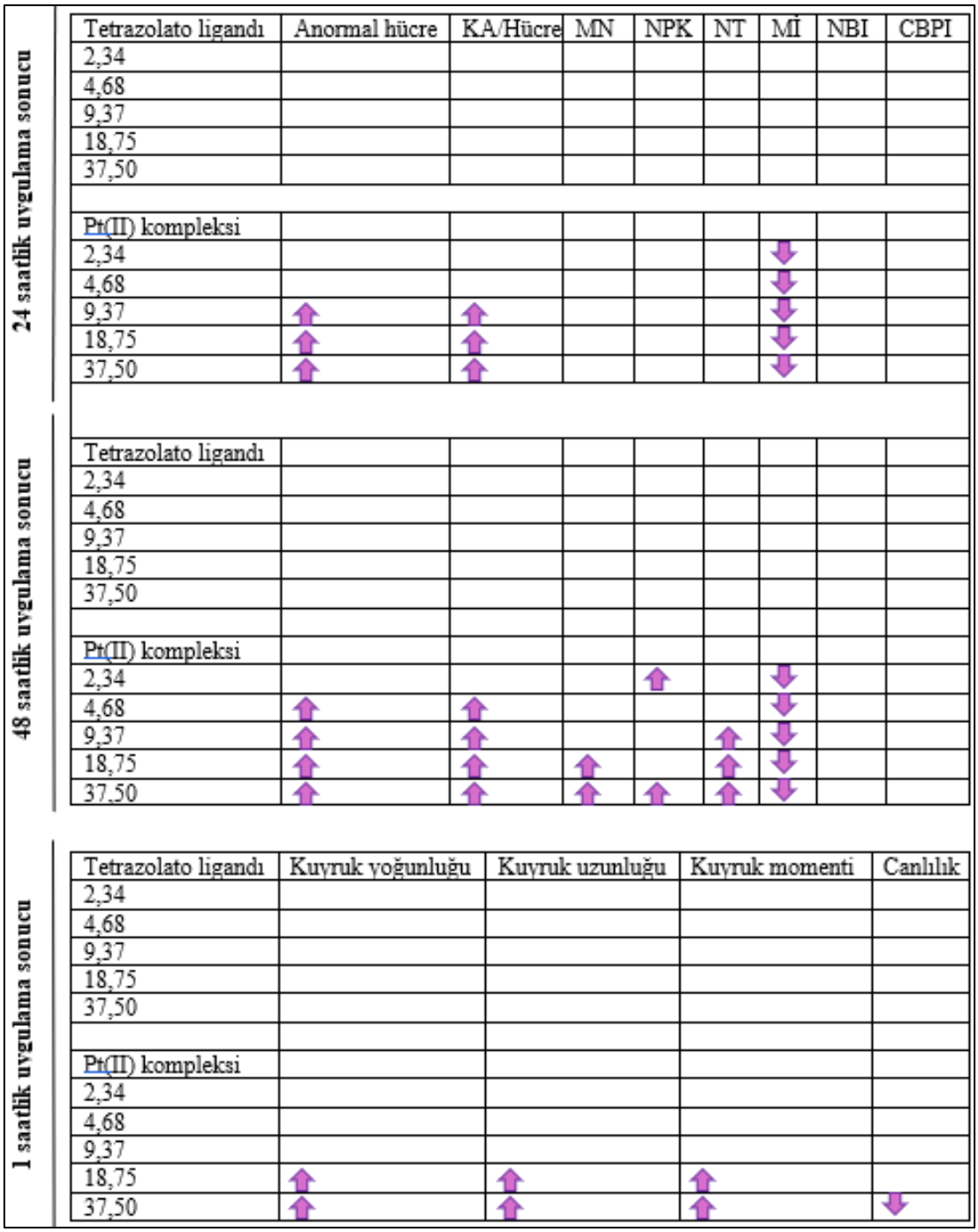
Şekil 4.8. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi muamelesi sonucunda izole insan periferal lenfositlerinde komet kuyruk momenti




62

Resim 4.3. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının komet testi ile görünümü A) Hasarsız DNA B) Çok hasarlı DNA

Tez çalışmasından elde edilen tüm genotoksisite verileri Şekil 4.9'da özetlenerek verilmiştir.




Şekil 4.9. Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksinin insan lenfositleri üzerindeki genotoksik etkilerinin çözücü kontrole göre değişiminin genel görünümü

### 4.6. Moleküler Doking Sonuçları

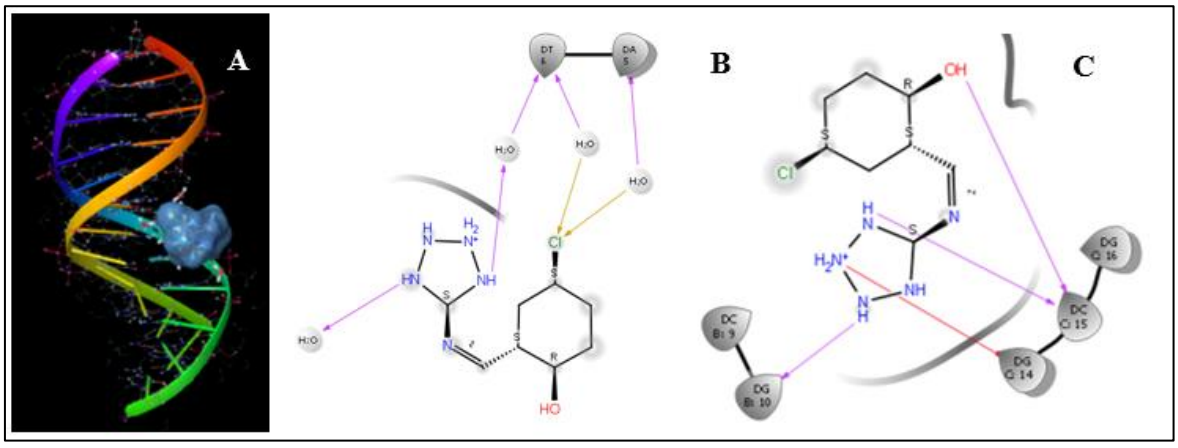
Moleküler doking çalışması ile farklı baz dizilimine sahip DNA yapıları ile Tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksinin etkileşiminin olup olmadığının ve varsa bu etkileşimin nasıl olduğunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Doking için ligand optimizasyonunda 16 farklı

konformasyonel değişim olmuştur. Bunlardan en yüksek doking skoruna sahip olanlar değerlendirilmiştir.



### 4.6.1. Tetrazolato ligandı ve 8F2Y kodlu DNA yapısı için gerçekleştirilen doking ve esnek doking çalışması

Doking çalışmasında DNA yapısındaki timin ve tetrazolato ligandının yakınlaştığı ve DNA yapısı etrafında bulunan $H_2O$ molekülleri ile hidrojen bağı oluşturduğu belirlenmiştir. Tetrazolato ligandının yapısında aromatik halkada bulunan klor iyonu da $H_2O$ molekülleri ile halojen bağı oluşturmuştur. Bu alandaki adenin ve timinle yakınlaştığı belirlenmiştir. Veriler kaydedildikten sonra gerçekleştirilen esnek doking çalışması DNA ile tetrazolato ligandı etkileşiminin DNA yapısının uç kısmında -ki burada sitozin (cytosine, S, C) ve guanin bazları bulunmaktadır- gerçekleştiğini göstermiştir. Tetrazolato ligandındaki tetrazol halkası hem guanin hem de sitozin ile tuz köprüsü ve hidrojen bağı oluşturark etkileşmiştir. Aromatik halka ise sitozin ile h bağı yoluyla etkileşmiştir. Genel olarak ise tetrazolato ligandının tüm bu etkileşimleri DNA'nın büyük oluğuna yerleşerek gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Şekil 4.10).

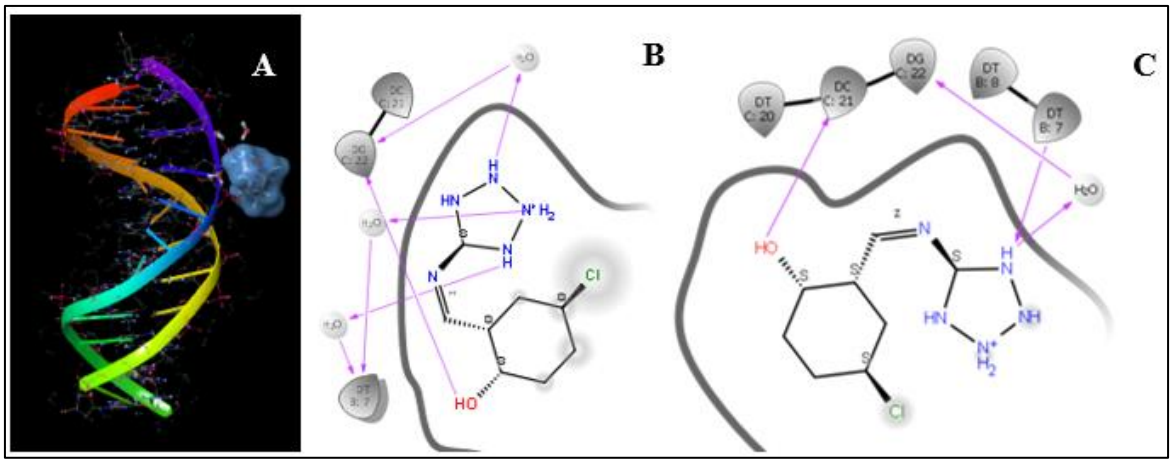



Şekil 4.10. A: 8F2Y kodlu DNA yapısı ve Tetrazolato ligandının etkileşimi, B: Etkileşim sonucu oluşan bağların detaylı gösterimi, C: Esnek doking sonrası oluşan etkileşimler (mor: Hidrojen bağı, sarı: halojen bağı, kırmızı: tuz köprüsü).

### 4.6.2. Tetrazolato ligandı ve 8F2W kodlu DNA yapısı için gerçekleştirilen doking ve esnek doking çalışması

Doking çalışmasında 8F2w DNA yapısı etrafındaki $H_2O$ molekülleri tetrazol halkası arasında hidrojen bağı oluştuğu, bu $H_2O$ moleküllerinin de timin ve guanin bazları ile

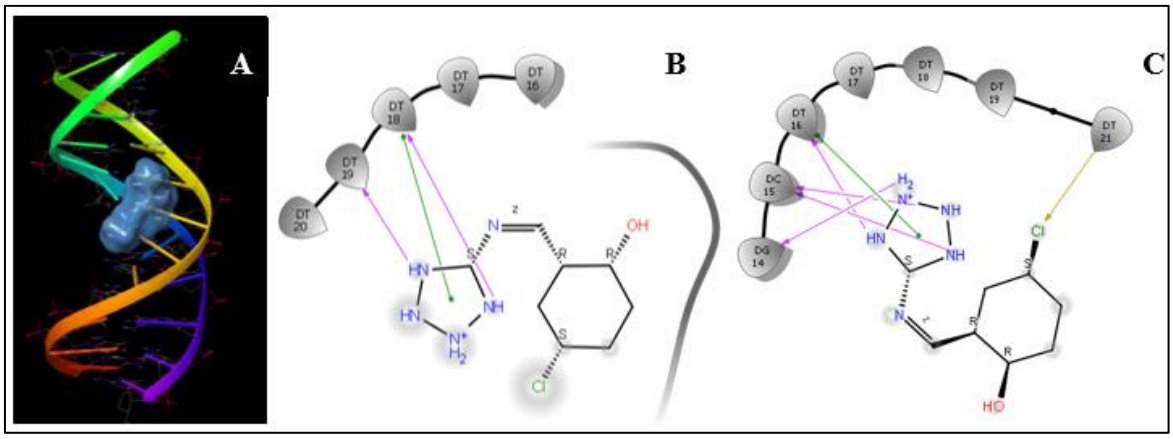
etkileştiği belirlenmiştir. Aromatik halka ise guanin ile hidrojen bağı oluşturmuştur. Esnek doking çalışması sonucunda ise tetrazol ve timin bazı arasında etkileşim olduğu aynı zamanda $H_2O$ molekülleri ile de etkieşimlerin oluştuğu belirlenmiştir. Aromatik halka ise sitozin ile hidrojen bağı oluşturmuştur. Genel olarak ise tetrazolato ligandı DNA yapısı ile interkalasyon yoluyla etkileşmiştir (Şekil 4.11).




Şekil 4.11. A: 8F2W kodlu DNA yapısı ve Tetrazolato ligandının etkileşimi, B: Etkileşim sonucu oluşan bağların detaylı gösterimi, C: Esnek doking sonrası oluşan etkileşimler (mor: Hidrojen bağı).

### 4.6.3. Tetrazolato ligandı ve 8F20 kodlu DNA yapısı için gerçekleştirilen doking ve esnek doking çalışması

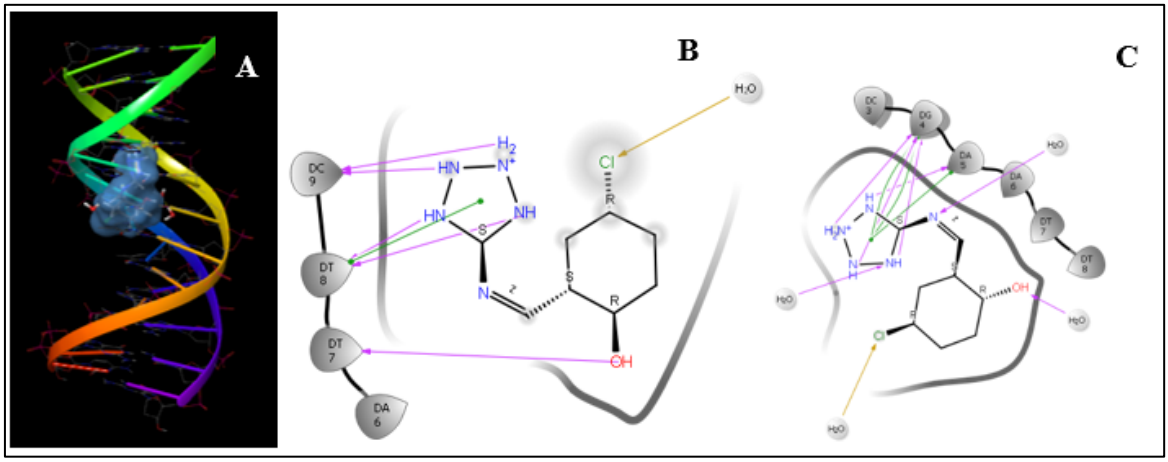
Doking çalışmasında tetrazolato ligandının tetrazol halkasının timinlerle hidrojen bağı ve π →π etkileşimi oluşturduğu belirlenmiştir. Esnek doking sonrasında ise tetrazol halkası timin, guanin ve sitozin bazları ile π →π etkileşimi ve hidrojen bağı oluşturmuştur. Genel etkileşim de ise tetrazolato ligandının DNA yapısının büyük oluğuna girdiği belirlenmiştir (Şekil 4.12).




Şekil 4.12. A: 8F20 kodlu DNA yapısı ve Tetrazolato ligandının etkileşimi, B: Etkileşim sonucu oluşan bağların detaylı gösterimi, C: Esnek doking sonrası oluşan etkileşimler (mor: Hidrojen bağı, yeşil: π →π etkileşimi, sarı: Halojen bağı).

### 4.6.4. Tetrazolato ligandı ve 1BNA kodlu DNA yapısı için gerçekleştirilen doking ve esnek doking çalışması

Doking çalışmasında tetrazol halkası sitozin ve timin ile h bağı ve π →π etkileşimi yoluyla etkileşmiştir. Aromatik halka ise timin bazı ile h bağı oluşturmuş ve DNA yapısı etrafındaki su molekülleri ile halojen bağı oluşturmuştur. Esnek doking çalışması sonrasında tetrazol halkasının etkileşimleri adenin ve guanin bazlarıyla olmuştur. Bu etkileşimler π →π etkileşimi ve hidrojen bağı oluşması ile gerçekleşmiştir. Aromatik halka da DNA yapısının etrafındaki $H_2O$ molekülleri ile halojen bağı ve hidrojen bağı aracılığı ile etkileşmiştir. Genel olarak tetrazolato ligandı DNA yapısının büyük oluğuna girerek etkileşmiştir (Şekil 4.13).

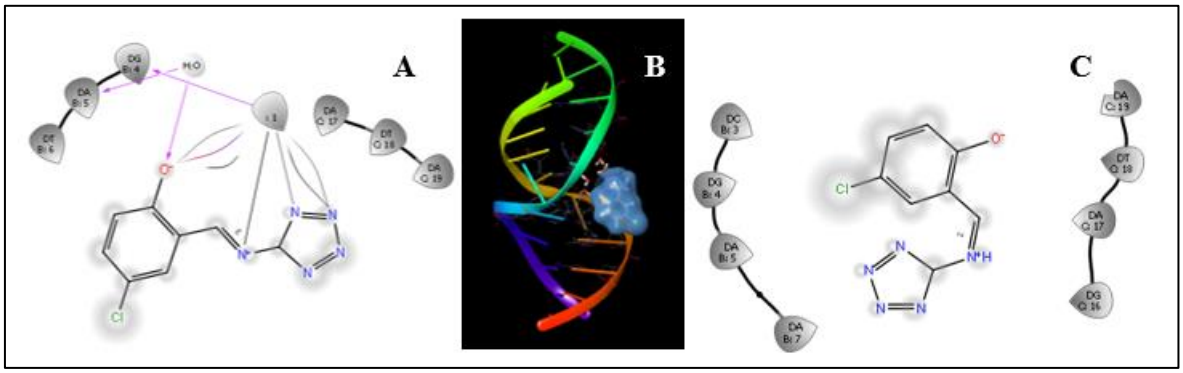



Şekil 4.13. A: 1BNA kodlu DNA yapısı ve Tetrazolato ligandının etkileşimi, B: Etkileşim sonucu oluşan bağların detaylı gösterimi, C: Esnek doking sonrası oluşan etkileşimler (mor: Hidrojen bağı, yeşil: π →π etkileşimi, sarı: halojen bağı)

Tüm DNA yapıları ile gerçekleştirilen doking çalışmalarına ait doking skorları değerlendirildiğinde tüm DNA yapıları ile tetrazolato ligandının kuvvetli etkileşim gösterdiği görülmüştür. En güçlü etkileşimin ise 1BNA kodlu yapı ile gerçekleştiği belirlenmiştir. Esnek doking çalışmasından sonra ise beklendiği gibi doking skorları yükselmiştir (Çizelge 4.14).

### 4.6.5. Pt(II) kompleksi ve 8F2Y kodlu DNA yapısı için gerçekleştirilen doking ve esnek doking çalışması

Doking sonuçlarına göre Pt(II) komplesi Pt(II) iyonu aracılığı ile guanin ile etkileşmiştir. Komplekse ait aromatik halka ise DNA yapısı etrafındaki $H_2O$ molekülleri ile etkileşmiştir. Bunların yanında hidrofobik etkileşimlerle kompleksin DNA yapısının büyük oluğuna yerleştiği gözlenmiştir. Esnek doking sonrasında kompleksin konumu değişmemiştir. Pt(II) iyonu ve DNA yakınlaştığı bazlar arasında yapılan uzaklık ölçümlerinde ise iyonun bazlar yerine $H_2O$ molekülleri ile yakınlaştığı belirlenmiştir (Şekil 4.14).

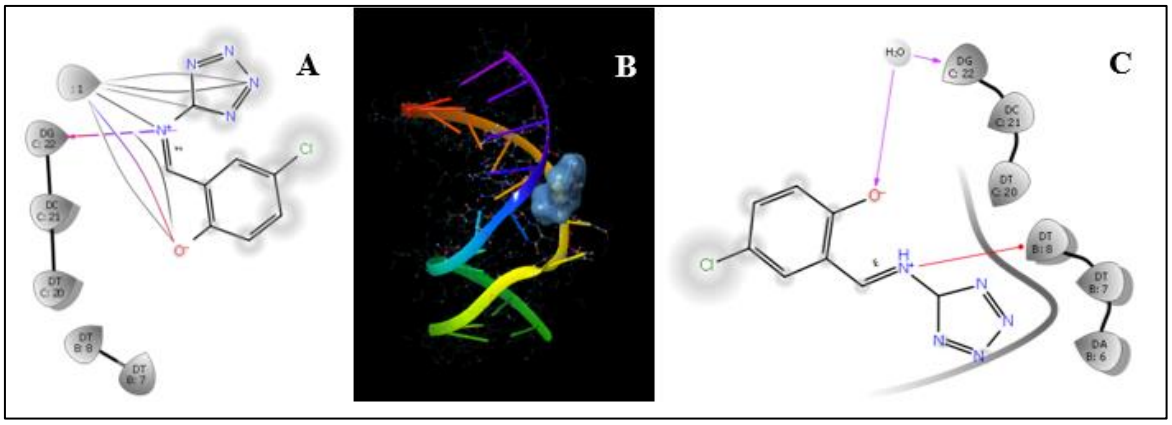



Şekil 4.14. A: 8F2Y kodlu DNA yapısı ve Pt(II) kompleksinin etkileşimi, B: Esnek doking sonrası konformasyonel değişim, C: Esnek doking sonrası oluşan etkileşimler (mor: hidrojen bağı)

### 4.6.6. Pt(II) kompleksi ve 8F2W kodlu DNA yapısı için gerçekleştirilen doking ve esnek doking çalışması

Doking sonuçlarına göre Pt(II) kompleksindeki Schiff bazı DNA yapısı üzerindeki guanin bazı ile tuz köprüsü oluşturmuştur. Genel olarak ise Pt(II) kompleksinin interkalasyon yoluyla DNA yapısıyla etkileştiği gözlenmiştir. Esnek doking çalışması yapıldıktan sonra Schiff bazının etkileşimi guanin yerine timin bazı ile gerçekleşmiştir. Bu etkileşimde doking çalışmasında olduğu gibi tuz köprüsü yoluyla olmuştur. Esnek doking sonrası aromatik

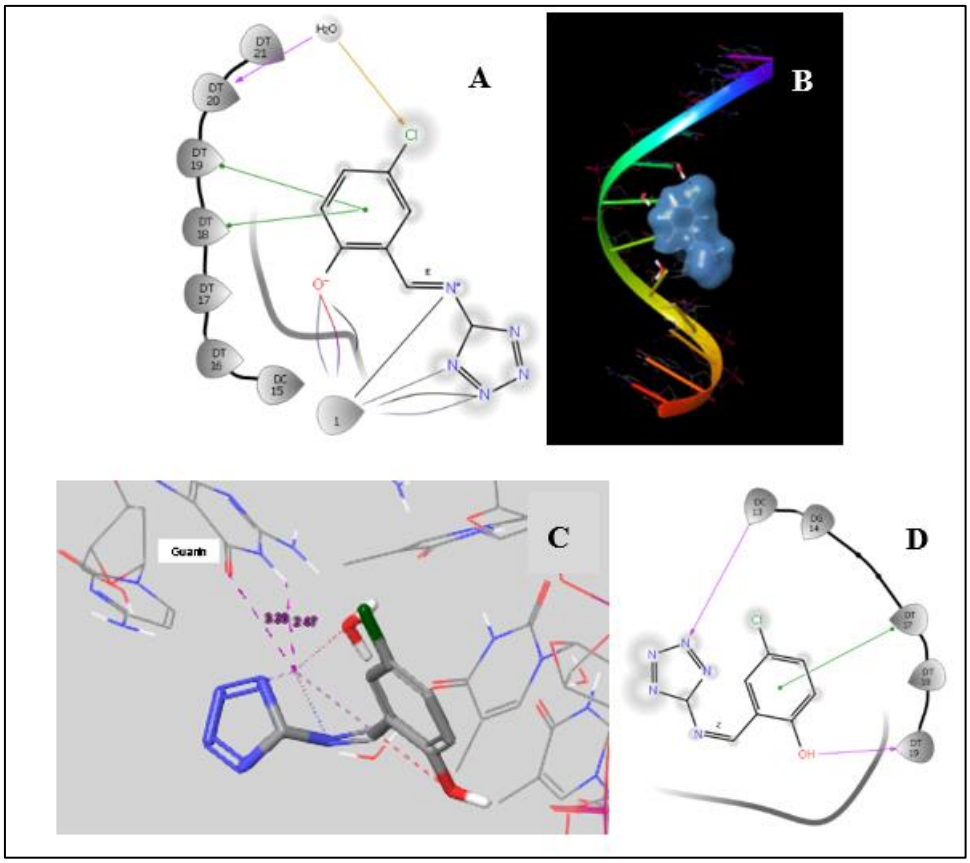
halkanın etkileşimi de değişmiştir. Aromatik halka hidrojen bağı oluşturarak DNA yapısı üzerinde bulunan $H_2O$ molekülleri ile etkileşmiştir. Etkileşimler belirlendikten sonra kompleks üzerindeki Pt(II) iyonu ve DNA yapısı arasında uzaklık ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümler Pt(II) kompleksinin DNA yapısındaki bazlar yerine $H_2O$ molekülleri ile etkileştiğini ortaya koymuştur (Şekil 4.15).




Şekil 4.15. A: 8F2W kodlu DNA yapısı ve Pt(II) kompleksinin etkileşimi, B: Esnek doking sonrası konformasyonel değişim, C: Esnek doking sonrası oluşan etkileşimler (kırmızı: π katyon bağı, mor: hidrojen bağı, kırmızı mor: tuz köprüsü)

### 4.6.7. Pt(II) kompleksi ve 8F20 kodlu DNA yapısı için gerçekleştirilen doking ve esnek doking çalışması

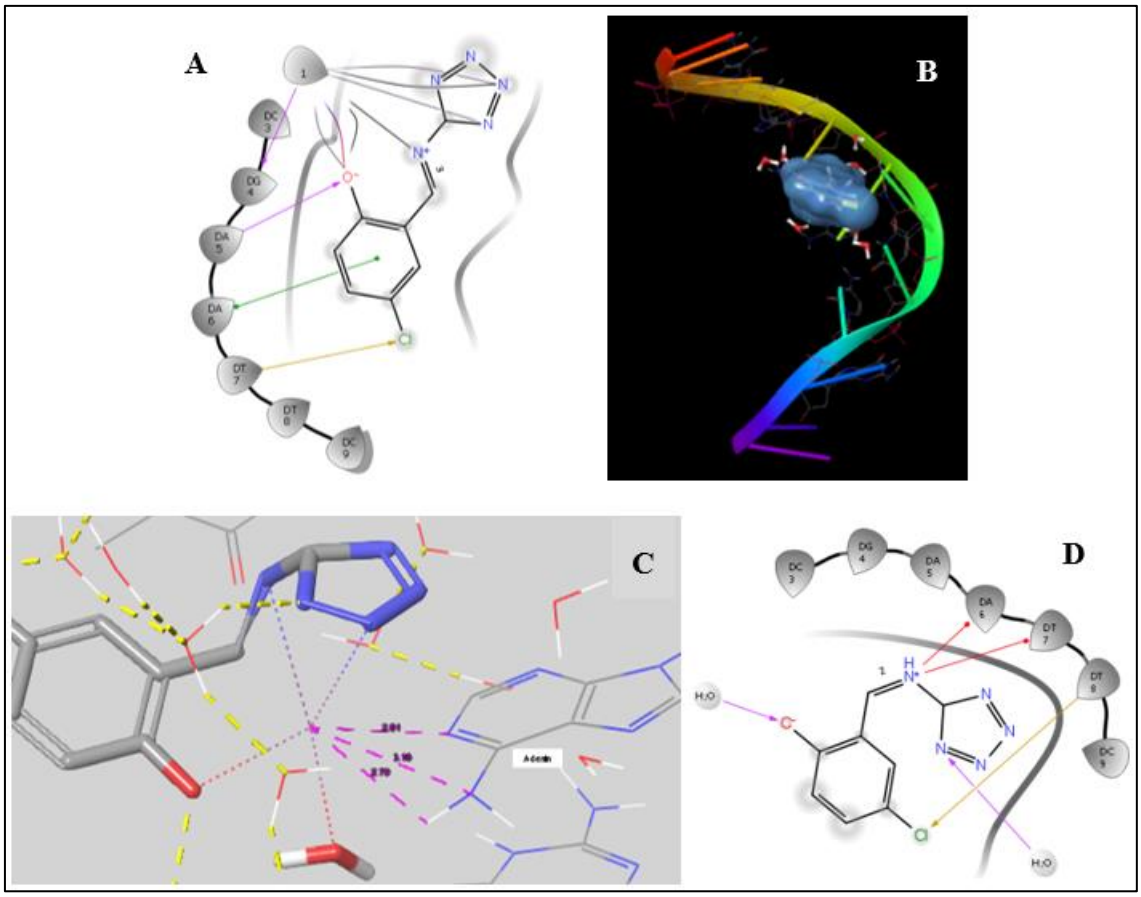
Doking çalışması Pt(II) kompleksinin aromatik halkasının Timin bazı ile π →π etkileşimi oluşturduğunu göstermiştir. Aynı zamanda klor iyonu aracılığı ile DNA yapısı etrafındaki $H_2O$ molekülleri ile halojen bağı yoluyla etkileşmektedir. Esnek doking çalışması sonrasında aromatik halkanın etkileşimlerinin değiştiği belirlenmiştir. Aromatik halka yine timin bazı ile π →π etkileşim ve hidrojen bağı ile etkileşmiştir. Tetrazol halkası ise sitozin ile hidrojen bağı oluşturmuştur. Etkileşimler belirlendikten sonra Pt(II) iyonu ve bazlar arasında ölçümler yapılmış ve iyonun guanin bazı ile yakınlaştığı (3,28; 2,47 Å) belirlenmiştir. Bu yakınlık iki yapı arasında kovalent etkileşimlerin olabileceği şeklinde yorumlanmaktadır. Pt(II) kompleksinin DNA yapısı ile genel etkileşiminin ise büyük oluğa yerleşerek gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 4.16).




Şekil 4.16. A: 8F20 kodlu DNA yapısı ve Pt(II) kompleksinin etkileşimi, B: Esnek doking sonrası konformasyonel değişim, C: Pt(II) iyonu ve bazlar arası uzaklık ölçümü, D: Esnek doking sonrası oluşan etkileşimler (sarı:halojen bağı, yeşil: π →π etkileşimi, mor hidrojen bağı).

### 4.6.8. Pt(II) kompleksi ve 1BNA kodlu DNA yapısı için gerçekleştirilen doking ve esnek doking çalışması

Doking çalışması Pt(II) kompleksine ait aromatik halkanın adenin ve timin bazları ile π →π etkileşimi, hidrojen ve halojen bağları oluşturduğu belirlenmiştir. Bunun yanında Pt(II) iyonu DNA yapısına ait guanin bazı ile hidrojen bağı ile etkileşmiştir. Esnek doking çalışması sonrasında Pt(II) komplesinde bulunan Schiff bazının adenin ve timin bazları ile π katyon bağı oluşturduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda kompleksin aromatik halkası timin bazı ile halojen bağı kurarak etkileşmiştir. Bunun yanında hem aromatik halka hem de tetrazol halkası DNA yapısı etrafındaki H2O molekülleri ile etkileşmiştir. Olası kovalent etkileşimlerin belirlenmesi için gerçekleştirilen Pt(II) iyonu ve bazlar arası uzaklık ölçümlerinde Pt(II) iyonunun adenin bazı ile yakınlaştığı (2,81; 3,16; 2,70 Å) belirlenmiştir (Şekil 4.17).




Şekil 4.17. A: 1BNA kodlu DNA yapısı ve Pt(II) kompleksinin etkileşimi, B: Esnek doking sonrası konformasyonel değişim, C: Pt(II) iyonu ve bazlar arası uzaklık ölçümü (2,81; 3,16; 2,70 Å), D: Esnek doking sonrası oluşan etkileşimler (sarı: halojen bağı, kırmızı: π katyon etkileşimi, mor: hidrojen bağı, yeşil: π →π etkileşimi)

Tüm DNA yapıları ve Pt(II) kompleksi ile gerçekleştirilen doking çalışmalarına ait doking skorları değerlendirildiğinde tüm DNA yapıları ile kompleksin kuvvetli etkileşim gösterdiği görülmüştür. En güçlü etkileşim ise 1BNA kodlu yapı ile gerçekleşmiştir (-7,967). Hem doking hem de esnek doking çalışmaları değerlendirildiğinde 8F2Y kodlu DNA yapısı için esnek doking sonucu etkileşim skoru az da olsa düşüş göstermiştir. Ancak diğer DNA yapıları için esnek doking skorları beklenildiği gibi yükselmiştir [224] (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Doking çalışmalarınan elde edilen doking (D) ve Esnek Doking (ED) skorları (kcal/mol)

| DNA yapısı | Tetrazolato ligandı | | Pt(II) kompleksi | |
|---|---|---|---|---|
| | D | ED | D | ED |
| 8F2Y | -6.502 | -8.077 | -6.104 | -5,941 |
| 8F2W | -7.165 | -7.273 | -5.796 | -6.158 |
| 8F20 | -5.225 | -7.304 | -5.805 | -6,306 |
| 1BNA | -8.186 | -9.742 | -4.073 | -7.967 |

Tez kapsamında hem tetrazolato ligandının hem de Pt(II) komplesinin farklı baz dizilimlerine sahip DNA yapıları ile etkileşimleri araştırılmıştır. Çalışma sonunda tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksinin, tüm DNA yapıları ile, etkileştiği bazlar ve oluşan etkileşimler Çizelge 4.8'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.8. Tetrazolato ligadı ve Pt(II) komplesinin farklı DNA yapıları ile olan etkileşimeri ve etkileştikleri bazlar

| DNA | Kovalent olmayan etkileşimlerin olduğu bazlar | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tetrazolato Ligandı | | | | Pt(II) kompleksi | | | |
| | Doking | | Esnek Doking | | Doking | | Esnek Doking | |
| 8F2Y | Tet., Aro. | A,T | Tet., Aro. | G,S | Aro.,Pt(II) | A,G | - | - |
| 8F2W | Tet., Aro. | T,G | Tet., Aro. | S,G,T | Sch. | G,T | Sch., Aro. | T,G |
| 8F20 | Tet. | T | Tet., Aro. | T,G,S | Aro. | T | Tet., Aro. | S,T |
| 1BNA | Tet., Aro. | S,T | Tet., Aro.,Sch | G,A | Aro.,Pt(II) | G,A | Tet., Aro.,Sch. | A,T |

Tet: tetrazol, Aro: Altı karbonlu aromatik halka, Sch: Schiff bazı. A: Adenin, G: Guanin, T: Timin, S: Sitozin

## 4.7. Preklinik Güvenlilik Değerlendirilmesinden Elde Edilen Sonuçlar

Preklinik güvenlilik *in siliko* yaklaşımla değerlendirilmiştir. Bu programlar metal içeren kompleksler için tahmin vermediğinden değerlendirme tetrazolato ligandı (TetSalH) için yapılmıştır. Değerlendirmede ICH güvenlilik yönergelerince elde edilmesi düzenlenmiş (ICH 2024): karsinojenlik, genotoksisite, toksikokinetik ve farmakokinetik, genel toksisite, immunotoksikoloji verileri kullanılmıştır. Veriler ACD Labs Percepta, TEST, Vegahub, Protox, Simulatiom Plus ve SwissADME programları ile elde edilmiştir. *In siliko* yaklaşımla elde edilen bulgular Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9 *In siliko* araçlar ile değerlendirilen preklinik güvenlilik verileri

| Program / Parametre | Percepta | TEST | VegaHub | Protox | Simulation Plus | SwissADME |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Mutajenesite | - | - | - | + | - | N/A |
| Genotoksisite ve Karsinojenesite | - | N/A | + | N/A | + | N/A |
| hERG inhibisyonu | + | N/A | N/A | N/A | - | N/A |
| Kan beyin bariyeri geçirgenliği | + | N/A | N/A | + | + | - |
| Östrojen reseptörü etkisi | - | N/A | - | - | - | N/A |
| Androjen reseptör etkisi | - | N/A | - | - | - | N/A |
| p-glycoprotein inhibisyonu | - | N/A | - | N/A | - | N/A |
| p-glycoprotein subsratı | - | N/A | - | N/A | - | - |
| Aktif taşıma | - | N/A | N/A | N/A | N/A | - |
| P450 inhibisyonu | - | N/A | - | N/A | - | N/A |
| P450 subsratı | - | N/A | - | N/A | - | N/A |
| CYP enzimleri etkileşimi | | | | | | |
| CY1A2 | - | N/A | N/A | - | + | - |
| CYP2C19 | - | N/A | N/A | - | - | - |
| CYP2C9 | - | N/A | N/A | - | - | - |
| CYP2D6 | - | N/A | N/A | - | - | - |
| CYP3A4 | - | N/A | N/A | - | - | - |
| CYP2E1 | - | N/A | N/A | - | - | - |
| Tiroid reseptör etkileşimi | - | N/A | N/A | - | N/A | N/A |
| Organ toksisitesi | | | | | | |
| Karaciğer | + | N/A | - | + | - | N/A |
| Nörotoksisite | N/A | N/A | N/A | + | N/A | N/A |
| Böbrek | + | N/A | N/A | + | N/A | N/A |
| Akciğer | + | N/A | N/A | - | - | N/A |
| Kardiyotoksisite | - | N/A | N/A | - | - | N/A |
| Gastrointestinal | + | N/A | N/A | N/A | | N/A |
| Kan | + | N/A | N/A | N/A | | N/A |

N/A: program bu konuda tahmin vermiyor.

Preklinik güvenlilik değerlendirmesi için regülasyon kuruluşları ve bağımsız laboratuvarlara ait ücretli ve ücretsiz altı araç kullanılmıştır. Her aracın öngörü verdiği ve vermediği son noktalar bulunmaktadır. Kapsamlı bir değerlendirme olması için farklı yaklaşımlarla geliştirilmiş olan bu araçlar aracılığı ile detaylı değerlendirme yapılmıştır (Çizelge 4.9). Yapılan detaylı *in siliko* araştırmada Percepta, TEST, VegaHub ve Simulation Plus programları tetrazolato ligandının mutajeniteye neden olmadığını öngörmüştür. ProTox ise pozitif olacağı sonucunu vermiştir. SwissADME mutajenesite son noktası hakkında öngörü vermemektedir. *In siliko* toksikoloji proramlarının tetrazolato ligandı hakkında genel önörüsü mutajenik olmadığı yönündedir. Genotoksisite ve karsinojenesite için ise Percepta programı tetrazolato ligandının güvenli olduğu sonucunu verirken, VegaHub ve Simulation Plus pozitif sonuç vermiştir. Preklinik güvenlilik kapsamında değerlendirilen bir diğer parametre de hERG inhibisyonudur. Percepta programı güvenilir olmasa de ligandın inhibisyona neden olduğu sonucunu vermiştir. Simulation Plus ise negatif sonuç vermiştir. TEST, VegaHub, ProTox ve SwissADME bu konuda öngörü yapmamaktadır. Tetrazolato ligandının kan beyin bariyeri geçirgenliği ile ilgili yapılan *in siliko* tahmine göre Percepta, Protox, Simulation Plus düşük penetrasyon sonucunu verirken SwissADME penetrasyon olmadığı öngörüsünü vermiştir. TEST ve VegaHub (veri tabanında ligandımıza benzer yapıda molekül olmadığından) programları ise bu son nokta ile ilgili öngörü vermemiştir. Ligandın östrojen ve androjen reseptörlere olan ilgisini tüm programlar negatif olarak öngörmüştür. TEST ve SwissADME ise bu konuda öngörü yapmamaktadır. Androjen reseptör etkisi için de tüm programlar (TEST ve SwissADME bu konuda öngörü vermemektedir) negatif sonuç vermiştir. *In siliko* değerlendirme tetrazolato ligandının P-gb proteininin ne subsratı olduğunu ne de onu inhibe ettiğini göstermektedir. TEST ve ProTox ise bu konuda öngörü vermemektedir. Aktif taşıma ile ilgili *in siliko* öngörüler tetrazolato ligandının aktif yolla taşınmadığı yönündedir. Tetrazolato ligandının CYP enzimleri ile etkileşimi ise *in siliko* araçlarca negatif olarak belirlenmiştir. TEST ve VegaHub bu etkileşim için öngörü vermemiştir. Simulation plus ise CYP1A2 inhibitörü olduğu ancak subsratı olmadığı; CYP2C9'u inhibe ettiği ancak subsratı olmadığı, CYP2D6, CYP3A4 ve CYP2E1'in ne inhibitörü ne subsratı olmadığı şeklinde detaylı veri sunmuştur. Genel olarak tetrazolato ligandını CYP enzimlerinin ne inhibitörü ne de subsratıdır. *In siliko* araçların CYP emzimleri etkileşimi ile ilgili genel öngörüsü tetrazolato ligandının bu enzimlerle etkileşmediği yönündedir. Bir diğer preklinik güvenlilik parametresi olan tiroid reseptör etkileşimi için Percepta ve ProTox araçları tetrazolato ligandının reseptör ile etkileşmediğini öngörmüştür. Diğer araçlar ise bu konuda öngörü vermemiştir. *In siliko* toksikoloji

değerlendirmesine göre Percepta ve ProTox tetrazolato ligandının hepatotoksin olduğu, VegaHub ve Simulation Plus ise hepatoksin olmadığı öngörüsünü vermiştir. TEST ve SwissADME ise bu konuda öngörü verememiştir. Nörotoksisite ile ilgili sadece Simulation Plus programı tetrazolato ligandının nörotoksik olduğu öngörüsünü yapmıştır. Diğer programlar ise bu konuda öngörü vermemektedir. Percepta ve ProTox programları tetrazolato ligandının nefrotoksik olduğunu öngörmektedir. Diğer programlar bu konuda öngörü vermemektedir. *In siliko* araçlar tetrazolato ligandının akciğer toksisitesine neden olup olmadığı konusunda farklı öngörüler sunmuştur. Buna göre Percepta pozitif, ProTox ve Simulation Plus negatif öngörü vermiştir. TEST ve Vegahub ise bu konuda öngörü vermemiştir. Kardiyotoksisite hakkında ise *in siliko* öngörüler Percepta, ProTox ve Simulation Plus tarafından verilmiştir. Buna göre tetrazolato ligandı kardiyotoksisiteye neden olmamaktadır. Diğer programlar ise kardiyotoksisite verisi vermemektedir. Gastrointestinal sistem toksisitesi ile ilgili olarak *in siliko* araçlardan sadece Percepta veri vermektedir ve ligandın sistem için toksik olduğunu öngörmüştür.

# 5. TARTIŞMA

Çalışmamız TÜBİTAK ARDEP 122Z762 kodlu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir. Proje kapsamında gerçekleştirilen düşük toksisiteli ligand tasarımı ve onun Pt(II) kompleksi sentezlenmiştir. Tez kapsamında da bu ligand (Tetrazolato) ve onun Pt(II) kompleksinin genotoksik özelliklerinin *in vitro* yöntemlerle belirlenmesi ve *in siliko* araçlarla DNA etkileşimi ve preklinik güvenlilik değerlendirmesi amacına yönelik araştırmalar gerçekleştirilmiştir.

Dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedeni olan kanser için geliştirilen tedavi yöntemlerinden biri de Pt(II) bazlı ilaçlardır. Kemoterapötik ilaçlar içinde platin bazlı ilaçlar, kullanımda olan tüm kanser önleyici ilaçların neredeyse %50'sinden fazlasını oluşturmaktadır [42]. Ancak Pt(II) bazlı ilaçlar direnç oluşumu ve yan etkiler nedeniyle daha az etkili hale gelmektedir [57]. Aktif kullanımdaki moleküllerdeki bu durum nedeniyle farklı yeni yapılara sahip Pt(II) bazlı anti-kanser ilaç adayı klinik değerlendirme altındadır [225, 226]. Ancak 2004 yılında kabul alan oksaliplatinden bu yana faz çalışmalarını geçebilen yeni bir ilaç olmamıştır [80]. Kanser tedavisinde büyük öneme sahip bu yapıların etkinliğinin araştırılması ve düşük toksisiteli yeni yapıların belirlenmesi, küresel sağlık sistemine büyük bir yük getiren kanser için alternatif tedavi yöntemlerinin ve ilaç moleküllerinin geliştirilmesi önemlidir. Bu nedenle tez çalışmasının da dahil olduğu proje kapsamında tetrazolato ligandı ve onun Pt(II) kompleksi sentezlenmiştir.

Kanser tedavisinde kullanılması amacıyla geliştirilen kimyasallarda tetrazol yapısının sıklıkla kullanıldığı belirtilmektedir [227]. Tetrazol özellikle karboksilik asidin biyoizosterik analoğu olarak ilaç moleküllerinin eşleniklerinin sentezlenmesinde kullanılmıştır. Bu nedenle de birçok ilacın yapısında bulunmaktadır. Karboksilik asidin yerine kullanıldıktan sonra tetrazollü ilaçların biyoyararlanımının arttığı ve toksisitelerinin azaldığı da tespit edilmiştir. Bu nedenle de farmakolojik araştırmalarda kullanımı tavsiye edilen bir molekül haline gelmiştir [228, 229]. Tetrazoller düşük baziklik, yüksek asitlik, çok sayıda azot atomu içermesi, yüksek stabilite ve yüksek oluşum entalpisi gibi birçok olumlu özelliğe sahiptir. İlaç tasarımında lipofilik aralayıcılar olarak, yararlı antitümör, antikanser ajanlar, peptit inhibitörleri ve N içeren bileşikler yapmak için başlangıç malzemeleri olarak kullanılmaktadırlar [230]. Vücut metabolizmasında da oldukça kararlıdırlar ve hedef dokularda reseptörlerin onları tanıdığı bölgelerin üzerine yığılarak çalışmaktadırlar [230,

231]. Tetrazol türevli bir ilaç olan letrozol, tamoksifene dirençli meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır [229]. Tetrazol türevli bir diğer ilaç olan Encequidar (HM30181) ise p-glikoprotein (P-gp) inhibitörü olarak kullanılmakta ve bir başka inhibitör olan tariquitar bileşiğinden 20-50 kat daha etkili olduğu bildirilmektedir. Bunun yanında Encequidar'ın yumurtalık, yemek borusu, meme gibi kanser türlerinin tedavisinde kullanılan paklitakselin oral biyoyararlanımını 12 kattan fazla artırabildiği sıçanlarda gösterilmiş olup P-gp substratlarının oral absorpsiyonunu arttırmak için geliştirilmektedir [227]. Tüm bu gelişmeler azol grubu kimyasallardan olan tetrazollerin yeni antikanser ajanların sentezlenmesinde önemli farmakoforlar olarak görülmesine neden olmuştur. Tetrazol içeren Pt(II) komplekslerinin carboplatin ve cisplatin gibi ilaçlara göre etkili olabildiği bildirilmektedir [232]. Bu nedenle de çalışmamıza konu olan toksisite profili düşük Pt(II) iyonu taşıyıcı ligant (tetrazolato) sentezi için de tetrazol yapısı kullanılmıştır.

Araştırmamıza konu olan tetrazolato ligandının toksisite profilinin düşük olmasına katkısı olduğu düşünülen bir diğer özellik de molekülde doğal enzim ve proteinlere benzer yapıları nedeniyle biyomimetik model olarak kullanılmakta olan, azometinler olarak da bilinen Schiff bazı içermesidir [233]. Schiff bazlarının bazı metal iyonlarına karşı seçici ve spesifik reaksiyon vermeleri, kararlı ve kolay sentezlenebiliyor olmaları [234] Pt(II) bazlı ilaçlar için de umut verici olabileceklerini göstermektedir. İlk olarak 1933 yılında Pfeiffer tarafından metaller için ligant olarak kullanılmıştır [235]. Schiff bazı, yapılarındaki azot atomu sayesinde farklı biomoleküllerin aktif bölgelerine bağlanabilmektedir (Divya ve diğerleri, 2017). Farklı Schiff bazlarının tümör ağırlığını düşürdüğü, farelerde Ehrlich asit tümör hücrelerinin gelişimini yavaşlattığı ve azalmış hematolojik faaliyetleri; kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri, hemoglobin gibi, düzenlediği ve hematopoietik sistemi koruduğu bildirilmiştir [236, 237]. Erişilebilirlikleri ve yapısal çeşitlilikleri nedeniyle geçiş metali koordinasyon kimyasında en önemli modeller arasında yer almaktadırlar. Birçok farklı metali koordine edebildikleri ve çeşitli oksidasyon durumlarında stabilize edebildikleri için önem kazanmışlardır. Bunun yanında, heterosiklik bileşiklerle metal komplekslerinin de çok fonksiyonlu grupların varlığı nedeniyle potansiyel ilaçlar olarak uygulamaları bulunmaktadır [96, 97].

Tez çalışmasında kullanılan tetrazolato ligandı düşük toksisiteli oldukları bildirilen tetrazol halkası [238] ve Schiff bazı yapılarını [11] içermektedir. Schiff bazı sayesinde Pt iyonu ile etkileşerek kompleksleşmesi sağlanmıştır. Tetrazolün ise toksisite profilini düşürmesi ve

biyoyararlanımı arttırması [19] beklenmektedir. Pt(II) iyonunun komplekste yer alması sitotoksik etkisi nedeniyle DNA ile bağ oluşturmasını sağlamaktadır. Yapılan araştırmalarda DNA ile bağın Pt(II) bazlı ilaçlarda Pt(II) iyonu sayesinde oluşan kare düzlemsel yapı nedeniyle olduğu belirlenmiştir [239]. Tez kapsamında incelenen Pt(II) kompleksinde de bu kare düzlemsel yapı tetrazol ve Schiff bazı sayesinde korunmuştur. Tez çalışmasının da dahil olduğu TÜBİTAK ARDEB 1001 projesi kapsamında tetrazolato ligandı ve onun Pt(II) kompleksinin sentez ve karakterizasyon deneylerinde başarıyla sentezlendiği ve kimyasal yapı temsili belirlenmiştir. Sentez tamamlandıktan sonra tez çalışması kapsamında genotoksisite testleri ile biyolojik aktiviteleri piyasadaki en eski Pt(II) bazlı kanser ilacı olan cisplatine karşı araştırılmıştır. Elde edilen bulgular Pt(II) kompleksi ile cisplatinin benzer ve farklı etkilerinin olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, tetrazolato ligandının etkileri ve Pt(II) kompleksinin etkileri açısından ayrı ayrı diğer çalışmalarla karşılaştırmalar yoluyla tartışılacaktır.

Genotoksisite, herhangi bir etkenin genetik materyal üzerinde değişikliklere neden olması sonucu oluşmaktadır. [20]. Dünyadaki hemen hemen her gelişmiş ülkede, tüm yeni kimyasallar ve diğer birçok materyal için genotoksisite testlerinin yapılması düzenleyici bir gereklilik haline gelmiştir [132, 169]. Kanser tedavisinde kullanılan Pt(II) bazlı ilaçların yan etkilerinden birinin de genotoksisite olduğu bildirilmekte, bu genotoksik etki ikincil tümör oluşumları ile de ilişkilendirilmektedir [84]. Bu nedenle bu alanda yapılan araştırmalarda aday ilaç molekülü olması beklenen yapıların genotoksik potansiyellerinin belirlenmesi önemlidir. Genotoksik etkinin belirlenmesinde, kullanımı otoritelerce de uygun bulunan insan periferal lenfositleri araştırmamızda tercih edilmiştir [22, 128]. Bu hücreler hücre döngüsünün G0 fazındadır. Mitoz geçirmemiş olması onlarda genotoksik birikimin olmamasına neden oluştur. Uygun hücre bölünme tetikleyicilerle bölünmeye teşvik edilen hücrelere, madde muamelesi gerçekleştirilir bu sayede maddenin genotoksik etkisinin belirlenmesini sağlamaktadır. Ayrıca sabit karyotipe (2n=46) sahip olmaları, kolay kültüre edilebilmeleri bu hücrelerin *in vitro* çalışmalarda tercih edilmesine neden olmuştur [146, 240, 241].

Çalışmamızda tetrazolato ligandı ve onun Pt(II) kompleksinin genetik materyal üzerinde değişikliklere neden olup olmadıkları kromozomal anormallik, sitokinez blok mikronükleus sitom ve komet testleri ile belirlenmiştir. Bu yöntemler arasında KA ve MN testleri farmasötiklerin preklinik değerlendirilmesinde kullanılmaktadır [119, 242]. KA testi ile

kromozomlarda oluşan yapısal ve sayısal anormallikler belirlenirken MN testi ile de anojenik ve klastojenik etkiler belirlenmektedir. Genotoksisite profilinin değerlendirilmesinde bu deneylerin birlikte kullanılması tavsiye edilmektedir [119, 120]. Kromozomlarda ve DNA üzerinde oluşan hasarı inceleyen bu testler aynı zamanda mitotik indeks, nükleer bölünme indeksi ve tripan mavisi canlılık testi ile sitotoksisite verisi elde etmemizi de sağlamaktadır. Tüm bu testlerin bir arada kullanılması ile elde edilen verinin bir kimyasalın genotoksik potansiyelinin belirlenmesi için önemli olduğu bilinmektedir.

Çalışmamıza konu olan tetrazolato ligandı ve Pt(II) kompleksi yeni sentezlenerek fizikokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiş moleküllerdir. Ligandın ve onun Pt(II) kompleksinin toksisite düzeyini, antikanser etkinliği cisplatin ile karşılaştırmalı olarak anlamak için sitotoksisite ve genotoksisite verileri TÜBİTAK ARDEP 1001 projesi (122Z764) ile belirlenmiştir. Proje kapsamında yürütülen tez çalışmamız ile gerçekleştirilen genotoksisite testlerinde kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi için *in siliko* toksikoloji $LD_{50}$ tahmin araçları kullanılmıştır (TÜBİTAK ARDEP 1001 122Z764 kodlu proje). $LD_{50}$ dozu deney hayvanlarında akut toksisite testi ile belirlenmektedir. Bir etkenin toksisite sınıfını bulmak, toksisitesi hakkında bilgi sahibi olmak için $LD_{50}$ değerleri kullanılmaktadır. Bu değerlerin elde edilmesi regülasyon kuruluşlarınca da gerekli görülmektedir [203] . Ancak, bütün dünyada hayvan refahının korunmasına yönelik artan etik kaygıların sonucu olarak hali hazırda etkenle ilgili yapılmış deney hayvanı sonuçları varsa bu bilgiler yeni bir regülasyon için kullanılabilmektedir. En önemlisi de düzenleyici otoritelerin risk değerlendirilmesi için alternatif yollar aramaya teşviki sonucu geçmişte yapılmış deneylerden elde edilen fazla sayıda verinin kullanımı ile *in siliko* modeller geliştirilebilmektedir [202]. Oral ve inhalasyon yollarıyla akut toksisitenin belirlenmesinde ratlar uygun tür olarak kullanılmaktadır çünkü rat $LD_{50}$ dozu insanlara uyarlanabilmektedir. Geçmişte ratlar üzerinde çok fazla akut toksisite testlerinin yapılmış olması bu konuda veri birikmesine neden olmuştur. Bu verilerin derlenmesi ile oluşturulan veritabanları sayesinde de *in siliko* rat $LD_{50}$ dozunun belirlenmesi için farklı araçlar geliştirilmiştir [199, 203].

Genotoksisite çalışmamızda gereken konsantrasyon aralığına karar vermek için tetrazolato ligandının 2D kimyasal yapısı (Şekil 3.1 A) kullanılarak Rat oral $LD_{50}$ tahmini yapabilen 5 farklı programla (TEST, Protox, EPA Chemical Dashboard, GusarWay2Drug ve Catmos) veriler elde edilmiştir. Araçların yaptığı $LD_{50}$ tahminleri arasında farklılıklar olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.1). Bu farklılıkların araçlar hazırlanırken oluşturulan

veritabanlarından kaynaklandığı bilinmektedir. Programlar paneller aracılığı ile tanıtılan 2D kimyasal yapıyı kendi veritabanları ile karşılaştırarak sonuç vermektedir. Kullanılan araçların veritabanları birbirinden farklı olduğundan $LD_{50}$ dozu tahminleri de farklılık göstermiştir. Bu nedenle tetrazolato ligandına ait $LD_{50}$ dozu belirlenmesi için farklı programlardan elde edilen sonuçların ortalaması kullanılmıştır. Elde edilen ortalama değer ligandın toksisite sınıfının "hafif toksik" olduğunu göstermiştir. Tetrazolato ligandı için belirlenen $LD_{50}$ dozu insan dozuna ekstrapole edildikten sonra seçilen konsantrasyon aralığında mitotik indeks değerlendirilmesi yapılmıştır. Değerlendirme sonuçlarında tetrazolato ligandının toksik olmadığı konsantrasyonların kullanılmasına karar verilmiştir. Çünkü, cisplatin toksisitesinin; cisplatinin hücre içine girmesinden sonra ayrılan grupların toksik etki göstermesi nedeniyle olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir [1, 2, 9]. Çalışmamıza konu olan tetrazolato ligandının tetrazol içeren Schiff bazı yapısında olması ile olası toksik etkisinin azalması veya ayrılan grup olması halinde de toksik etki olmadan elimine edilmesini amaçlamaktadır.

Cisplatin kullanımı ile oluşan toksik etkilerin ortadan kaldırılması ve cisplatinin antikanser etkisinin devam ettirilmesi amacıyla yeni moleküller (Karboplatin, Oxaliplatin gibi) geliştirilmiştir. Bu yeni yapılarda cisplatinin DNA ile etkileşiminden sonra ayrılan grubu olan $Cl^-$ iyonu (klorit) [243, 244] yerine toksisitesi düşük ligantlar tercih edilmiştir. Örneğin; cisplatinden sonra en çok kullanılan platin bazlı ilaç olan karboplatinin yapısında dikorboksilat grubu kullanılmıştır [244, 245]. Ayrılan klorid grupları yerine dikarboksilat grubunun kullanılması ile toksisite azalmıştır [8]. Benzer düşünceyle sentezlenen 3. nesil platin bazlı ilaç oxaliplatin ise 1,2 diaminosiklohekzan taşıyıcı ligandı ile oluşturulmuştur. Oxaliplatin DNA ile etkileşmeden ribozom biyogenez stresi ile hücre ölümüne neden olmaktadır. Cisplatine direnç kazanmış kanser türlerindeki etkinliğinin bu özelliğinden kaynaklandığı bildirilmiştir [51, 246, 247]. Bu çalışmalardan platinin taşıyıcısı konumunda olan ligandın toksik özelliklerinin düşürülmesi ile yan etkilerin azaltıldığı anlaşılmaktadır. Bu nedenle araştırmamızda antikanser etki göstermesi beklenen tetrazolato ligandının Pt(II) kompleksinin klorid içermemesi, toksisitesi düşük ligand içermesi ile yeni bir molekül önerisi olacağı düşünülmektedir. Yapılan ön sitotoksisite çalışmaları ve liganda yönelik *in siliko* yaklaşımla elde edilen $LD_{50}$ düzeyleri kullanılarak genotoksik etkilerinin belirlenmesi için tetrazolato ligandının sitotoksik etki göstermediği konsantrasyonlar (37,50; 18,75; 9,37; 4,68; 2,34 μg/mL) belirlenmiş ve hem ligand hem de Pt(II) kompleksi için deneyler bu

konsantrasyonlarda gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak ilk Pt(II) bazlı ilaç olan cisplatin kullanılmıştır.

Tez çalışmasında elde edilmesi planlanan genotoksik etkiye dair ilk test kromozomal anormallik testidir. Bu test kromozomlarda oluşan yapısal ve sayısal değişikliklerin belirlenmesini sağlamaktadır. Periferik kan lenfositlerindeki kromozomal anormallikler, bilinen veya potansiyel mutajenlere ve kanserojenlere maruz kalan sağlıklı bireylerin gözetimi için on yıllardır kullanılmaktadır. Ek olarak, kromozom değişiklikleri neoplastik hücrelerin tipik özellikleridir ve belirli kanserler için spesifik kromozom anormallikleri yaygın olarak bulunmaktadır [146, 148, 241, 248]. Kromozom aberasyonları mutajenlerin genom üzerindeki etkisini yansıtan biyolojik son noktalardır [249]. Genetik değişimler maruz kalınan dış etkenlerle (iyonize radyasyon, nanopartiküller, pertisitler gibi kimyasal gruplar) ve hücre metabolizması sırasında kendiliğinden (ROS, topoizomeraz mekanizmaları, replikasyon hataları gibi) oluşabilmektedir [131]. Bu değişimlerle oluşan genomik kararsızlık kanser başlangıcına da neden olabilen kromozomal anormalliklere yol açmaktadır [249]. Yapısal kromozom aberasyonları hücre için öldürücü (disentrik, halka vb.) veya öldürücü olmayanlar (kırıklar ve küçük delesyonlar) olarak sınıflandırılabilmektedir [132]. Bu aberasyonlar, normal dizi bütünlüğünün bozulduğu kromozomal segmentlerin yer değiştirmesi, kaybı veya kazanımı yoluyla yeniden düzenlemeleri içermektedir ve yalnızca birkaç nükleotidi veya çok daha büyük segmentleri kapsayabilmektedir. Translokasyonlar, delesyonlar, insersiyonlar, inversiyonlar, kırılmalar, kardeş kromatit değişimi, kardeş kromatitlerde birleşme ve telomer uzunluğundaki değişiklikler bu aberasyonlardandır. Yapısal kromozomal aberasyonlar simetrik (veya kararlı) veya asimetrik (veya kararsız) olarak da ikiye ayrılabilmektedir. Asimetrik kromozomal aberasyonlar mitozda eşit olmayan ayrışmaya yol açan disentrik kromozomları, fragment ve halka kromozomları içermekte ve bu nedenle kararsız olarak sınıflandırılmaktadır [249]. Bir diğer sınıflandırmada kromozomal aberasyonlar DNA'da oluşan hasarın özelliğine göre kromatit veya kromozom tipi olarak ayrılmaktadır. Kromatid tipi aberasyonlar bir kromozomun sadece bir kromatidindeki değişiklikleri yansıtmaktadır ve etilen oksit, UV ışığı gibi ajanlar tarafından S fazında indüklenmektdir. Kromatid tipi aberasyonlar baz modifikasyonlarından homolog rekombinasyon ve enzimatik olarak çift iplikçik kırılmalarına dönüşebilen tek iplikçik kırılmalarından ya da eksik veya başarısız DNA onarımı ile oluşmaktadır [130, 249]. Kromozom tipi aberasyonlar ise kromozomun her iki kromatidini de içeren aberasyonlardır. Bunlar periferik kan lenfositlerinde G0 fazında

çift sarmal kırıkları üreten ajanlar tarafından oluşturulmaktadır. Bu ajanlar arasında iyonlaştırıcı radyasyonlar ve iyonlaştırıcı radyasyonlara benzer bir etkiye sahip olan alkilleyici ajanlar gibi kimyasal klastojenler bulunmaktadır. Hücre döngüsünün G0-G1 fazındaki lenfositlerde, kromozom tipi aberasyonlar temel olarak çift iplikçik kırılmalarının nonhomolog DNA uç birleştirme veya konservatif olmayan homolog rekombinasyon onarımı ile onarılmasından kaynaklanmaktadır. Kırılmalar, onarılmamış veya tam olarak onarılmamış çift iplikçik kırılmalarının sonucu oluşmaktadır. Hasarlı hücrelerin DNA sentezi sonrasında kromozomlar çoğaldığında, daha önce oluşmuş aberasyonlar iki katına çıkarak, metafazda disentrik, halka kromozom gibi kromozom tipi anomalilerin görülmesine neden olmaktadır [131, 249].

Kromozomal anormalliklerle ilişkilendirilen genetik yapılardan biri de ökaryotik kromozomların uç kısımlarında yer alan TTAGGG tekrarlarıdir Nükleoprotein yapısında olan bu tekrarlı kısımlar telomer olarak adlandırılmaktadır. Telomerler hücre ömrünün uzunluğunun düzenlenmesinden, kromozomların ekzonükleolitik bozulması ile oluşabilecek DNA hasarı ve kromozomal kararsızlığın oluşmasından korumaktadır. Telomerler her hücre bölünmesinde kısalmaktadır. Kısalan telomer uçları kromozom tipi anormalliklerin artmasına neden olmaktadır. Bu artış ile oluşan genomik kararsızlık kanser oluşumu ile de ilişkilendirilmektedir [250, 251]. Zamanla kısalarak zayıflayan bu bölgeler homolog olmayan uç birleştirme tamir mekanizması ile onarılma sırasında homolog olmayan kromozomlara eklenebilmektedir. Bu nedenle de kromozom uçlarında birleşme, halka ve fragment gibi yapısal anormallikler olşabilmektedir [249, 251].

Kromozomal anormallikler kromozom sayılarındaki değişimler ile de oluşmaktadır. Bu anormallikler sayısal anormallikler olarak adlandırılmaktadır ve normal olmayan kromozom ayrılmaları sonucu oluşmaktadır. Kromozom sayısındaki bu sapmalar poliploidi ve endoreduplikasyon gibi anormalliklere neden olmaktadır. Sayısal anormalliklerin hücre bölünmesi sırasında indüklendiği bilinmektedir. Sentromer gibi esansiyel DNA içeren yapılarda; tübülin, sentriyoller gibi iğ aparatlarında; siklinler, siklin bağımlı kinazlar ve p53 gibi hücre döngüsü kontrol proteinlerinde inaktivasyon olması sonucu bu anormalliklerin oluştuğu bildirilmektedir [131, 252-254].

Tez çalışmasında hem tetrazolato ligandının hem de Pt(II) kompleksinin genetik materyal üzerine *in vitro* etkisi kromozomal anormallik testi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar

ligandın 48 saatlik uygulamada sadece yüksek konsantrasyonlarda (18,75; 37,5 µg/mL) anormalliğe neden olduğunu göstermiştir. Aynı preperatlardan elde edilen mitotik indeks verilerine göre ise tetrazolato ligandı ne 24 ne de 48 saatlik uygulamada mitotik indeks oranlarında anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Yapılan literatür taramasında tetrazolato ligandı gibi tetrazol içeren bir Schiff bazının genotoksik potansiyelinin ne kromozomal anormallik ne sitom ne de komet testi ile belirlendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle genotoksik etkinin karşılaştırılması için Schiff bazlarının genotoksik etkisi ve tetrazol içeren yapıların genotoksik etkisi olarak ayrı ayrı araştırılıp değerlendirilmiştir. Bu araştırmaya göre literatürde Schiff bazlarının genellikle bir metal iyonu ile kompleksleştirildikten sonra genotoksik etkilerinin araştırıldığı görülmektedir [255-257]. Ancak Schiff bazlarının ve tetrazol içeren yapıların tek başına kromozomal anormallik oluşturma potansiyelinin incelendiği birer çalışma bulunmuştur. Demir ve diğerleri, 2020 yılında Schiff bazı içeren ligant (1-[(4-Nitronaphthyl-1-ylimino)methyl]naphthalen2-ol HL) sentezlemiş ve insan periferal lenfositlerinde kromozomal anormalliklere neden olup olmadığını $1{,}2\times10^{-3}$; $2{,}4\times10^{-3}$; $4{,}8\times10^{-3}$ M konsantrasyonlarında belirlemişlerdir. Araştırma sonuçları Schiff bazının uygulanan konsantrasyonlarda 24 ve 48 saatlik muamelelerde kromozomal anormalliklere neden olmadığını göstermiştir. Schiff bazının kromozomal anormallik oluşturma frekansı konsantrasyona bağlı olarak artsa da istatistiksel olarak anlamlılık belirlenmemiştir. Ayrıca araştırmada gerçekleştirilen mitotik indeks sayımlarında da Schiff bazının hücre canlılığında azalmaya neden olmadığı belirlenmiştir [258]. Tetrazol içeren, 4-glycosyltetrazole yapısının genotoksik etkisinin kromozomal anormallik testi ile insan periferal lenfositlerinde belirlendiği bir araştırmada ise 24 saat muamele sonunda tetrazollü bileşiğin genotoksik hasara neden olmadığı gibi sitotoksik etkisinin de olmadığı belirlenmiştir [259].

Tez kapsamında gerçekleştirilen genotoksik etki belirleme çalışmalarında ikinci test olarak sitokinezi bloklanmış mikronükleus sitom testi kullanılmıştır. *In vitro* micronükleus testi, genotoksisite testleri içinde en çok tercih edilen testlerden biridir. Kimyasallar ile muameleden sonra hem anöjen hem de klastojen etkiyi tespit edilebilmektedir [128, 260]. Epidemiyolojik çalışmalarda insan periferal lenfositlerinde MN frekansındaki artış ile kanser insidansı arasında önemli bir korelasyon olduğu belirlenmiştir [146, 261-264]. Mikronükleus, mitoz geçiren bir hücrede çekirdek bölünmesinden sonra çekirdek dışında kalmış olan sentromersiz kırıklardan veya tam kromozomlar nedeniyle oluşmaktadır. Bu yapılar çekirdek zarı ile çevrilir ve çekirdek ile aynı boyanma özellikleri göstermektedir.

Oluşum mekanizmaları olarak; onarılmamış DNA hasarı ve iğ ipliği, kinetekor gibi mitoz bölünmede görev alan proteinlerin hatalı çalışması, oksidatif stres, hücre döngüsü kontrol noktaları hataları, DNA tamir genlerindeki mutasyonlar tanımlanmıştır [21, 148, 265]. Sitokinez-blok mikronukleus sitom testi standart sitokinezi bloklanmış mikronükleus testi temel alınarak geliştirilmiştir [152]. Standart mikronükleus testi kromozom kırılması, kromozom kaybı, ayrılmama, nekroz, apoptoz ve sitostazın ölçülmesi için kapsamlı bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Ancak test geliştirilerek telomer uç füzyonları veya DNA yanlış onarımından kaynaklanan disentrik kromozomların bir biyobelirteci olan nükleer köprüleri ve gen amplifikasyonunu, değişen gen dozaj olaylarını tespit etmek için bir biyobelirteç olan nükleer tomurcuklarını değerlendirmek için kullanılmaya başlanmıştır. Testin bu geliştirilmiş haline sitom adı verilmiştir. "Sitom" kavramı, incelenen sistemdeki her hücrenin canlılık durumu (NBI: nükleer blünme indeksi, CBPI: sitokinez blok proliferasyon indeksi), mitotik durumu (tek çekirdekli, iki çekirdekli, çok çekirdekli) ve kromozomal kararsızlık veya hasar durumu (MNi, NPBs, NBUDs varlığı) açısından sitolojik olarak değerlendirildiği anlamında kullanılmaktadır [21, 152]. Mikronükleus, nükleoplazmik köprü ve nükleer tomurcuk yapılarını belirleyebiliyor olması nedeniyle sitokinez-blok mikronukleus sitom testi, DNA tamirindeki hasarlar ve telomer uç lezyonları hakkında da bilgi vermektedir [21, 151, 152, 266].

Tez kapsamında gerçekleştirilen sitokinez blok mikronükleus sitom testi sonuçları tetrazolato ligandının mikronükleus, nükleoplazmik köprü ve nükleer tomurcuk içeren binükleat hücrelerin frekansında değişikliklere ya da sitositaz (CBPİ) ve sitotoksik (NBİ) etkilere neden olmadığını göstermektedir. Literatürde tetrazolato ligandının kimyasal yapısına benzer şekilde tetrazol içeren Schiff bazı yapısı olmadığından, Schiff bazı içeren yapıların ve tetrazol içeren yapıların MN frekansı üzerine etkileri literatürde ayrı ayrı araştırılmıştır. Schiff bazlarının genotoksik etkisinin MN testi ile araştırıldığı çalışmalarda tez kapsamında elde edilen verileri doğrulayan sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Bu çalışmaların ilki 2014 yılında Şakiyan ve diğerleri, tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada glutamin ve asparajin aminoasitleri ile bağlı Schiff bazlarının genotoksik etkisi insan periferal lenfositlerinde mikronükleus testi ile araştırılmıştır. 40 μM konsantrasyonla muamele sonunda Schiff bazlarının MN frekanslarında anlamlı artışa neden olmadığı belirlenmiştir. Çalışmada aynı zamanda Schiff bazlarının Aflatoxin $B_1$ mikotoksininin mutajenik aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir [267]. 2016'da gerçekleştirilen bir diğer çalışmada yine aminoasit (Serin, treyonin ve tirozin) içeren Schiff bazları kullanılmıştır. Bu

Schiff bazlarının genotoksik etkileri MN testi ile araştırılmış ve tek konsantrasyonda (40 mM) insan periferal lenfositlerine uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlarda bu konsantrasyonda Schiff bazlarının MN frekansında anlamlı artışa neden olmadığını belirlemişlerdir. Çalışmada aynı zamanda Schiff bazlarının Aflatoxin $B_1$'in neden olduğu genetik hasarı düzeltip düzeltmediği sorgulanmış ve konsantrasyona bağlı şekilde antigenotoksik etki gösterdikleri belirlenmiştir [268] . 2019 yılında ise indol içeren polimerik Schiff bazı sentezlenerek genotoksik etkisi MN testi ile değerlendirilmiştir. Araştırmada 5, 10, 20 and 40 mg/mL konsantrasyonlarında Schiff bazlarının MN frekanslarında artışa neden olup olmadığının yanında genotoksik ajan olarak bilinen $NaN_3$ tarafından ouşturulan genotoksik hasarı düzeltip düzeltmediği sorgulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Schiff bazlarının tek başlarına MN frekansında anlamlı değişikliğe neden olmadığını ve genotoksik hasar üzerinde antimutajenik bir etki de göstermediğini ortaya koymuştur [269]. Yine 2019 yılında yapılan başka bir çalışmada azomethin içeren Schiff bazlarının genotoksik etkisinin olup olmadığı MN testi ile araştırılmıştır. İnsan periferal lenfositleri 10 μM konsantrayonunda Schiff bazlarına maruz bırakılmıştır. 48 saat muamelenin ardından Schiff bazlarının MN frekansında artışa neden olmadığı belirlenmiştir. Aflatoxin $B_1$'in pozitif kontrol olarak kullanıldığı çalışmada aynı zamanda bu genotoksik ajanın neden olduğu hasarın Schiff bazları tarafından düzeltilip düzeltilemediği sorgulanmış ve 5, 10 ve 20 μM konsantrasyonlarında antigenotoksik etki gösterdikleri belirlemişlerdir [270]. 2020'de yapılan bir araştırmada da sentezlenen Schiff bazının genotoksik etkisi insan periferal lenfositlerinde $1.2\times10^{-3}$M - $4.8\times10^{-4}$M konsantrasonlarında, 24 ve 48 saat muamele ile MN testiyle araştırılmış ve pozitif kontrol olarak mitomisin C kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Schiff bazı ligandlarının MN frekanslarında anlamlı değişikliğe neden olmadığını göstermiştir [258]. Tetrazol içeren yapıların ise MN testi ile genotoksik etkisinin belirlendiği tek bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar tez çalışmasından elde edilen verilerle örtüşmemektedir. Epidemiyolojik olarak gerçekleştirilmiş olan çalışmaya anjiyotensin II reseptör blokerleri olan ve bifenil-tetrazol sınıfına ait Kandesartan, Olmesartan ve Valsartan hipertansiton ilaçlarını kullanan 55 hipertansif hasta katılmıştır. Tetrazol içeren bu ilaçları kullanan hastalarda genotoksik hasar oluşup oluşmadığı MN testi ile sorgulanmıştır. Çalışma sonuçları üç ilacın da hastalarda MN frekansını anlamlı ölçüde arttırdığını göstermiştir. Buna ek olarak, çalışmada sağlıklı donörlerden alınan periferik lenfositlere *in vitro* olarak bu ilaçlarla muamele edilmiştir. *In vitro* çalışmada iki MN'li lenfositlerin önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Bu artışın bahsedilen ilaçlara *in vitro* maruz kalındığında ciddi hasar potansiyelini doğruladığı vurgulanmıştır. Aynı çalışmada bildirilen

NBİ verilerine göre ise tetrazol içeren bu ilaçları kullanan hastalarda hücresel sitotoksisitenin oluştuğu belirlenmiştir [271].

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen bir diğer genotoksisite testi de de komet testidir. Bu test DNA hasarını, iplik kopmalarını ve alkali koşullar altında sarmal kopmalarına dönüşen diğer lezyonları belirleyen basit, hassas, hızlı, ekonomik ve güvenilir bir yöntem olarak bilinmektedir [154, 272]. Tez çalışmasında kullanılan alkali komet testi DNA'daki tek ve çift zincir kırıklarını, DNA'nın kendisi ve proteinlerle oluşturduğu çapraz bağlar, alkali labil bölgeler ve eksik eksizyon tamir bölgelerinden kaynaklanan tek zincir kırıklarına duyarlı bir yöntemdir [129]. Test sonucunda elde edilen kuyruk yoğunluğu komet kuyruğunda bulunan DNA yüzdesinin ifadesidir bu nedenle artan DNA hasarının önemli bir göstergesidir. Bir diğer parametre olan kuyruk uzunluğu ise kuyruk momenti parametresi ile kullanılmaktadır. Moment değeri kuyrukta bulunan DNA yüzdesi ve oluşan kuyruğun uzunluğunu kullanarak kuyruktaki DNA ve göç miktarının ifadesidir. Program aracılığı ile yapılan moment hesabı ile en minik DNA parçaları ve kırık sayıları değerlendirilmekte ve artan moment değeri DNA hasarının da arttığına işaret etmektedir [158, 273]. Bu nedenlerle çalışmamızda gerçekleştirilen komet testinde kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametreleri birlikte kullanılmıştır.

Tez kapsamında gerçekleştirilen komet testi sonuçlarına göre tetrazolato ligandının izole lenfositlerde 1 saat muameleden sonra DNA hasarını en yüksek konsantrasyonlarda (18,75 ve 37,50 µg/mL) tüm parametrelerde (kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti) çözücü kontrole göre anlamlı arttırdığı ve bu artışın konsantrasyona bağlı olduğu belirlenmiştir. Komet testi sırasında gerçekleştirilen ve sitotoksisite verisi veren Tripan mavisi testi sonuçlarına göre ise tetrazolato ligandının çözücü kontrol grubunda %97,33 olan canlılık değerini 18,75 ve 37,5 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla %96,33 ve %96,67 olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan cisplatin ise canlılığı %88,66 azaltmıştır. Bu anlamda tetrazolato ligandı hücre canlılığı azalmasında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe neden olmamıştır.

Literatür taramasında Schiff bazı ve tetrazol yapılarını ayrı ayrı bulunduran ve genotoksik etkileri insan periferal lenfositlerinde komet testi ile belirlenmiş olan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak farklı hücrelerde yapılmış üç çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan ilkinde yapısında iki tane Schiff bazı bulunan bileşiğin DNA üzerindeki etkisi

insan meme kanser hücre hattı (MCF-7) kullanılarak komet testi ile araştırılmıştır. 5, 10, 25, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarının kullanıldığı çalışmada pozitif kontrol olarak cisplatin kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar sentezlenen iki yapılı Schiff bazının 50 μM konsantrasyonunda cisplatine benzer genotoksik etkiye ulaştığı ve bu etkinin konsantrasyonla beraber attığı belirlenmiştir [274]. 2023 yılında gerçekleştirilen başka bir araştırmada ise 3 ayrı Schiff bazının genotoksik etkisi insan servikal ve kolorektal kanser (HeLa ve Caco-2) ve normal domuz böbreği (LLC-PK1) hücre hatlarında komet testi ile belirlenmiştir. Çalışma için 3 konsantrasyon (1,10, ve 50μM) kullanılmış ve Schiff bazının DNA hasarı oluşturma frekansları cisplatin ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda artan konsantrasyonla beraber DNA hasarının tüm hücre hatlarında arttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı değişikliğin olmadığı bildirilmiştir [275]. Tetrazol içeren Pirazolo[4,3-e]tetrazolo[1,5-b][1,2,4]triazin sülfonamidler yapısının genotoksik etkisi ise insan ovaryum, kolon ve prostat kanser hücreleri (HeLa, HCT116 ve PC-3) ve sağlıklı periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) 24 saat muamele sonrası alkali ve nötral komet testleri ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar tetrazol içeren yapıların hem kanser hem de sağlıklı hücrelerde genotoksik etkili olduğunu göstermiştir [276]. Literatürden elde edilen veriler ile tez çalışmasından elde edilen veriler uyuşmaktadır.

Genotoksisite hakkında Schiff bazı içeren ve tetrazol içeren yapıların ayrı ayrı genotoksik özelliklerinin belirlendiği çalışmalar değerlendirildiğinde KA ve MN testlerinin tez çalışmasında olduğu gibi insan periferal lenfositlerinde gerçekleştirildiği, komet testinde ise farklı hücrelerin kullanıldığı görülmektedir. Literatür verileri genel olarak Schiff bazı içeren yapıların genotoksik etki göstermediğini ancak tetrazol içeren yapıların genotoksik özellikte olduğunu göstermektedir. Bu çalışmalardan Schiff bazı yapısını konu alan çalışmalar tez kapsamında elde edilen sonuçlarla uyumlu iken tetrazol yapısını konu alan çalışmaların sonuçlarının uyumlu olmadığı görülmektedir. Çalışma sayısının azlığı, kimyasal yapıların farklılığı, kullanılan dozların ve hücre tiplerinin değişkenliği literatüre dayalı sağlıklı bir sonuç değerlendirmesinin önüne geçmektedir. Yapılan literatür taramasında tetrazol içeren bir Schiff bazına da rastlanmamış olması tez çalışması sonucu elde edilen tetrazolato ligandına ait genotoksisite verilerinin literatürde bir boşluğu dolduracağına işaret etmektedir.

Tez çalışmasında gerçekleştirilen genotoksisite testlerinde sitotoksisite verisi sunan sonuçlar da elde edilmiştir. Tetrazolato ligandının sitotoksik etkisi $LD_{50}$ tahmini ve hücre hatlarında

WST1 testi (TÜBİTAK ARDEB 1001, 122Z762) ile belirlenmesine ek olarak KA testinde MI, MN testinde NBI ve CBPI, komet testinde ise tripan mavisi canlılık testi ile de sitotoksisite verilerine ışık tutmaktadır. Sitotoksite mekanizmaları nükleik asit ve proteinlerin sentezlerinin inhibisyonu, hücresel enerji üretim yolaklarının etkilenmesi, hücredeki zar bütünlüğünün (plazma mebranı ve zarlı organellerin membranları) zayıflaması olarak bildirilmiştir [277].

Bu verilerden KA preparatlarından elde edilen Mİ verisi hücre proliferasyonunu ölçmektedir ve madde uygulamasından sonra hücre bölünmesindeki artış ve azalışlar tespit edilebilmektedir. Mİ hücre döngüsünün tüm alt bileşenleri ve kontrol noktaları hakkında dolaylı olarak bilgi verebilen evrensel bir parametre olarak tanımlanmaktadır Bu nedenle de Mİ uygulanan maddenin sitotoksik etkisi hakkında bilgi vermektedir [277, 278]. Mİ değerlerinde görülen azalma farklı mekanizmalarla açıklanmıştır. Bu mekanizmalardan biri hücrenin enerji düzeyinin azalmasıdır. Bu azalma hücrenin enerji üretimindeki bir sorundan veya ATP seviyesinin azalmasından kaynaklanabilmektedir [279], Mİ'in düşmesine neden olan bir diğer mekanizma ise DNA sentezinin inhibisyonu veya hücre döngüsü evrelerindeki (G1, S veya G2) gecikme veya durma ile ilişkilendirilmiştir [277]. MN testinden elde edilen NBİ ve CBPİ verileri de hücre çoğalmasının sayısal değeri hakkında bilgi veren parametrelerdir. Mİ'dan farklı olan bu parametreler bölünmüş veya interfaz evresindeki hücrelerin çekirdek sayısı ile hesaplanmaktadır. Bu nedenle de doğrudan DNA replikasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. NBİ ve CBPİ bölünme oranı hakkında önemli veri sunsa da nekroz veya apoptoz yoluyla hücre ölümündeki bir artış, hayatta kalan hücrelerde her zaman NBİ'nin azalmasına neden olmamaktadır [277]. Sitotoksisite hakkında veri veren bir diğer yaklaşım ise tripan mavisi canlılık testidir. Bu test hücre süspansiyonlarındaki canlı ve cansız hücre sayısını belirlemeyi sağlayan bir testtir. Hücrelere uygulanan boya nedeniyle canlı hücreler ve cansız olanlar arasında gözlemlenebilen bir fark oluşturulması prensibiyle geliştirilmiştir. Canlı hücre sayısı ve cansız hücre sayısı hakkında bilgi vermesi ile sitotoksik etkinin değerlendirilmesi için basit ve etkili bir yöntem olarak tanımlanmıştır [280].

KA testinde Mİ, MN testinde NBİ ve CBPİ, komet testinde ise tripan mavisi canlılık testi verilerine göre tetrazolato ligandı ne hücre kültürü deneylerinde (KA ve MN) ne de izole lenfositlerle gerçekleştirilen deneyde (Tripan mavisi canlılık testi) sitotoksik etki göstermemiştir. Bu sonuçlar $LD_{50}$ tahminleri ve WST1 sonuçlarımızla da örtüşmektedir (TÜBİTAK ARDEB 1001, 122Z762).

Sitotoksisite açısından gerçekleştirilen literatür taramasında da genotoksisite verilerinde olduğu gibi tetrazolato ligandına benzer bir yapıya rastlanmamış bu nedenle Schiff bazı ve tetrazol içeren yapılar ayrı ayrı incelenmiştir. Buna göre; kinolinon'dan türevlenen Schiff bazı ligandlarının sitotoksik etkisi, karaciğer karsinom hücreleri (HepG2) kullanılarak, 0–1000 mM konsantrasyonlarında, 96 saat muamele ile araştırılmıştır. Sonuçlar Schiff bazlarının $IC_{50}$ değerlerinin 100 μM'ın üzerinde olduğunu bu nedenle sitotoksik olmadıklarını göstermiştir [281]. 5-kloro İzatin Schiff bazı türevlerinin sitotoksik etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise insan meme, servikal ve hepatoselüler kanser hücre hatları (MCF7, HeLa ve HepG2) ile sağlıklı periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) MTT testi ile sitotoksik etki araştırılmıştır. 24 saat muamele sonunda Schiff bazlarının $IC_{50}$ değerleri sırasıyla 4.57- 4.28; 7.78- 6.43; 4.63- 4.58; 19.61- 16.58 μM olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar 5-kloro İzatin Schiff bazlarının hem kanser hem de sağlıklı hücrelerde sitotoksik olduğunu göstermektedir. Ancak sağlıklı hücreler için belirlenen $IC_{50}$ değerinin kanserli hücrelere göre daha yüksek olması, kanser ilaçlarında önemli bir özellik olan, sağlıklı hücre seçiciliğini işaret etmektedir [282]. Schiff bazlarının sitotoksik etkisinin insan akut T-lenfoblastik lösemi hücre hatları (CEM/ADR5000 ve CCRFCEM) ve sağlıklı periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) MTT testi ile araştırıldığı bir başka çalışmada hücreler $10^{-8}$ M ve $-10^{-4}$ M konsantrasyonlarında 48 ve 72 saat Schiff bazları ile muamele edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Schiff bazlarının ne kanser ne de sağlıklı hücrelerde sitotoksik etkilerinin olmadığını göstermiştir [283]. S-alkil ve S-aril ditiyokarbazat Schiff bazlarının sitotoksik etkisi ise insan meme, kolon ve karaciğer kanser (MCF7, HCT116 ve HepG2) ve normal akciğer fibroblastı (WI38) hücre hatlarında MTT testi ile belirlenmiştir. Hücreler farklı konsantrasyonlarda Schiff bazları ile 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Deney sonuçları maruziyet süresi arttıkça sitotoksik etkinin arttığını göstermiştir. 24 saatllik uygulamada kanser hücrelerinde $IC_{50}$ değeri hesaplanamamıştır. Sağlıklı hücrede ise 24 saatlik uygulamada Schiff bazının $IC_{50}$ değerinin 74,65μM olduğu belirlenmiştir. 48 saatlik uygulamada bu değer 68,22 μM'a düşmüştür. Bu sonuçlar Schiff bazının sağlıklı hücrelerde daha sitotoksik olduğunu göstermiştir. 48 saatlik uygulamada Schiff bazının sitotoksik etkisi HePG2 > WI38 > HCT116 > MCF7 olarak belirlenmiştir [284]. Yapısında iki tane Schiff bazı bulunan bir bileşiğin antikanser etkisi insan meme, prostat, kolon, servikal, kolorektal, endometriyal (MCF-7, PC3, HT-29, HeLa, Du-145, DLD-1, ECC-1) ve sağlıklı prostat (PNT1A) hücre hatlarında incelenmiştir. Belirlenen $IC_{50}$ değerleri iki Schiff bazı içeren yapının tüm hücre hatlarında sitotoksik olduğunu göstermiştir [274]. 3-asetilkumarin benzoilhidrazon Schiff bazının sitotoksik etkileri ise insan meme ve

servikal karsinom (MCF7, HeLa) ile normal akciğer fibroblastı (WI38) hücre hatlarında 24 ve 48 saat uygulamada belirlenmiştir. $IC_{50}$ değerleri Schiff bazının her iki hücre hattında sitotoksik etkili olduğunu ancak MCF7 hücrelerinde bu etkinin daha kuvvetli olduğunu ortaya koymaktadır. Schiff bazı ile muamele süresinin arttılmasının ise sitotoksik etkide önemli bir değişikliğe neden olmadığı sonucuna varılmıştır [285]. Birbirinden farklı altı kinoksalin türevli Schiff bazının sitotoksik etkileri MCF-7 hücre hattında 2, 4, 8, 12, 16, and 20 µg/mL konsantrasyonlarında 24 saat muamele ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar tüm Schiff bazlarının sitotoksik etkili olduğunu göstermiştir. Hesaplanan $IC_{50}$ değerleri ise 35,52 ile 18,02 µM arasında değişmektedir [286].

Tetrazol içeren yapıların sitotoksik etkilerinin araştırıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. 2022 yılında gerçekleştirilen bir araştırmada tetrazol içeren Pirazolo[4,3-e]tetrazolo[1,5-b][1,2,4]triazin sülfonamidler yapısının sitotoksik olup olmadığı insan servikal, kolon ve prostat kanser (HeLa, HCT116 ve PC-3) ve sağlıklı PBMC hücrelerinde araştırılmıştır. Çok düşük $IC_{50}$ değerlerinin hesaplandığı çalışmada tetrazol içeren yapının sağlıklı hücrelere daha toksik olduğu da belirlenmiştir [276]. Steroidal tetrazollerin sitotoksik etkisinin insan servikal kanser, miyeloid lösemi ve meme kanseri (HeLa, KCL-22, MDA-MBA-231) ve sağlıklı PBMC hücrelerde 48 saat muamele ile MTT testi uygulanarak belirlendiği çalışmadan elde edilen sonuçlarda tetrazol içeren yapıların hem kanser hem de sağlıklı hücrelerde sitotoksik olduğunu göstermiştir. Hesaplanan $IC_{50}$ değerleri yapıların sağlıklı hücre seçiciliğine sahip olduğunu işaret etmektedir [287]. Fare miyeloma hücre hattında (B9) yeni sentezlenmiş aminotetrazol türevinin (1 - 100 µM) 24 saat muamele sonunda MTT testi ile sitotoksik etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada konsantrasyon artışı ile sitotoksik etkinin arttığı, 50 µM'lık uygulamadan sonra hücre canlılığının %50'den daha az olduğu belirtilmiştir [288]. Tetrazol ile kaynaşmış imidazopiridin türevlerinin sitotoksik etkisinin araştırıldığı çalışmada ise sitotoksik etki akciğer, meme kanser hücre hatlarında (A549, MCF7 ve MDA-MB-231) MTT testi kullanılarak belirlenmiştir. Hücreler 1 – 10 µM konsantrasyonlarında tetrazol türevleri ile 24 saat muamele edilmiştir. Sonuçlar tüm tetrazol türevlerinin hem akciğer hem de meme kanseri hücre hatlarında sitotoksik olduğunu göstermiştir [289].

Tez kapsamında elde edilen veriler tetrazolato ligandının sitotoksik etkisinin olmadığını göstermiştir. Ancak Schiff bazı ve tetrazol içeren yapıların sitotoksik etkilerinin ayrı ayrı araştırıldığı çalışmalarda genel kanı hem Schiff bazı içeren yapıların hem de tetrazol içeren

yapıların sitotoksik etkili olduğunu yönündedir. Farklı konsantrasyon, hücre ve sitotoksisite testi uygulanmış olan bu araştırmalardan elde edilen genel kanı tez çalışmasının sonuçları ile uyumlu değildir. Ancak uyum göstermeyen bu çalışmalarda kullanılan bileşiklerin kimyasal yapıları da tez konusu olan tetrazolato ligandından farklıdır. Ayrı ayrı iken sitotoksik etkili olduğu belirlenen bu yapıların bir araya getirilerek sitotoksik verilerinin sunulmuş olması tez çalışmasından elde edilen verilerin literatürde önemli bir yer alacağını işaret etmektedir. Literatürde bu iki yapının ayrı ayrı sitotoksik etkili olduğu vurgulanırken tez kapsamında elde edilen sitotoksisite verileri tetrazolato ligandının sitotoksik etkili olmadığı yönündedir. Tez çalışmasının da dahil olduğu TÜBİTAK ARDEB 1001 (122Z762) projesinde tetrazolato ligandının sitotoksik etkisi hücrenin metabolik aktivitesini ölçme temeline dayanan WST-1 testi [290] ile hem insan sağlıklı (HUVEC) hem de kanser hücre hatlarında (A549 ve HeLa) belirlenmiştir. Hücreler tetrazolato ligandı ile logaritmik artan (300, 100, 30, 10 ve 3 µM) konsantrasyonlarda uygulanmış ve 48 saat muamele edilmiştir. Elde edilen sonuçlar tetrazolato ligandının sadece en yüksek konsantrasyon olan 300 µM'de sitotoksik etkili olduğunu göstermiştir bu nedenle de tetrazolato ligandı için $IC_{50}$ değeri hesaplanamamıştır. Bu veriler de tetrazolato ligandının ne sağlıklı ne de kanserli hücrelerde sitotoksik etkisinin olmadığını göstermiştir. Bu sonuçlar teze konu olan ve TÜBİTAK ARDEB 1001 (122Z762) projesi kapsamında amaçlanan düşük toksisiteli ligand tasarımının başarılı olduğunu işaret etmektedir.

Tez kapsamında genotoksik özellikleri belirlenen tetrazolato ligandının Pt(II) kompleksi tüm genotoksisite verilerinde (KA, MN ve komet) artan konsantrasyonlarında pozitif kontrol olan cisplatine yakın genotoksik ve sitotoksik etki göstermiştir. Kromozomal anormallik testinde 24 saatlik muamelede 9,37 µg/mL'den sonra artan konsantrasyonla; 48 saatlik uygulamalarında 4,68 µg/mL'den sonra artan konsantrasyonlarda anormallikler açısından Pt(II) kompleksi anlamlı artışa neden olmuştur. Bu sonuç zamanla Pt(II) kompleksinin genotoksisitesinin arttığına işaret etmektedir. Sitom testi sonuçları ise Pt(II) kompleksinin mikronükleus, nükleoplazmik köprü ve nükleer tomurcuk içeren binükleat hücrelerin frekanslarında anlamlı artışlara neden olduğunu göstermiştir. Bu artışlar MN frekansında en yüksek iki konsantrasyonda (18,75 ve 37,5 µg/mL), nükleoplazmik köprü oluşumunda en düşük ve en yüksek konsantrasyonda (2,34 ve 37,5 µg/mL) ve nükleer tomurcuk frekansında ise en yüksek 3 konsantrasyonda (9,37;18,75 ve 37,5 µg/mL) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Artışların konsantrasyonla ilişkisinin zayıf olduğu belirlenmiştir. Komet testinde de Pt(II) kompleksinin izole lenfositlere 1 saat muamelesi sonucu yüksek

konsantrasyonlarda (18,75 ve 37,50 µg/mL) DNA hasarını arttırdığı ve bu artışın konsantrasyonla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Literatür taramasında tetrazolato ligandı gibi tetrazol içeren bir Schiff bazının bulunmadığı daha önce belirlenmişti, bu nedenle tez çalışmasına konu olan Pt(II) kompleksine benzer bir yapının genotoksik etkilerinin belirlendiği bir çalışma da bulunmamaktadır. Bunun için Schiff bazı içeren Pt(II) kompleksleri ve tetrazol içeren Pt(II) komplekslerinin genotoksik etkilerinin belirlendiği çalışmaların olup olmadığı araştırılmıştır ancak herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu alanda gerçekleştirilen araştırmaların Pt(II) komplekslerinin sitotoksik etkisinin belirlenmesi üzerine olduğu görülmüştür.

Genotoksisite testlerinden elde edilen sitotoksisite verilerine göre Pt(II) kompleksi hem 24 hem de 48 saatlik uygulamalarında mitotik indeksi düşürmüştür. Bu etki 24 saatlik uygulamada en yüksek (37,5), 48 saatlik uygulamada ise en yüksek iki konsantrasyonda (18,75; 37,5) gerçekleşmiştir. Bu sonuç sitotoksik etkinin zamanla arttığını düşündürmektedir. MN-Cyt testinden elde edilen verilerde ise Pt(II) kompleksinin nükleer bölünme indeksi (NBİ) ve Sitokinez Blok Proliferasyon İndeksi (CBPİ) üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Komet testi sırasında gerçekleştirilen tripan mavisi canlılık testi sonuçlarında çözücü kontrol grubunda canlılık %98,33 olarak belirlenmiştir. Pt(II) kompleksi bu canlılık oranını muamele edilen konsantrasyon arttıkça düşürmüştür. İstatistiksel olarak bu azalma sadece 37,5 µg/mL konsantrasonunda anlamlı bulunmuştur. Tüm bu sonuçlar en yüksek konsantrasyonda Pt(II) kompleksinin cisplatine benzer şekilde sitotoksik etkili olduğunu göstermiştir.

Tez çalışmasının dahil olduğu TÜBİTAK ARDEB 1001 projesi (122Z762) kapsamında tetrazolato ligandının Pt(II) kompleksinin sitotoksik etkileri de WST-1 testi [290] ile iki farklı kanser hücresi (A549 ve HeLa) ve bir normal hücre hattında (HUVEC) belirlenmiştir. Hücrelere tetrazolato ligandının Pt(II) kompleksi ve Cisplatin logaritmik artan (300, 100, 30, 10 ve 3 µM) konsantrasyonlarda uygulanmış ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında her bir bileşik için % hücre canlılığı parametresi hesaplanmıştır. Muamele sonrası hücre ölümüne sebep olanlar için ise $IC_{50}$ değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar tetrazolato ligandının Pt(II) komplesinin 30, 100 ve 300 µM konsantrasyonlarında sitotoksik olduğunu göstermiştir. $IC_{50}$ değerleri A549 hücrelerinde 85.68 µM, HeLa hücrelerinde 66.35 µM ve kanser olmayan hücre hattı olan HUVEC hücrelerinde 48.39 µM olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar tetrazolato ligandının Pt(II) kompleksinin her iki kanser hücresinde sitotoksik

olduğunu göstermektedir. Bunun yanında HeLa hücreleri üzerinde daha sitotoksik olduğu anlaşılmaktadır. Aynı zamanda elde edilen bulgular sağlıklı hücre hattında kanser hücrelerine göre daha sitotoksik etkili olduğunu ortaya koymaktadır (TÜBİTAK ARDEB 1001 projesi 122Z762).

Sitotoksisite konusunda Schiff bazı içeren Pt(II) komplekslerinin ve tetrazol içeren Pt(II) komplekslerin etkilerinin belirlendiği çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların bazılarında Pt(II) komplekslerinin sitotoksik etkisi cisplatin, karboplatin gibi Pt(II) bazlı ilaçlarla karşılaştırılmıştır [286, 291-295]. Çalışmalarda özellikle vurgulanan kısım ise, tez çalışmasından elde edilen bulgulara benzer şekilde, ligandlara göre Pt komplekslerinin daha sitotoksik olduğu yönündedir.

Schiff bazı ile Pt(II) komplekslerinin antikanser etkisinin belirlendiği çalışmalardan ilkinde 2014 yılında Peng ve diğerleri, salisilaldehitten türevlenen Schiff bazı ve onun Pt(II) kompleksini sentezlemişlerdir. Akciğer, meme, karaciğer, mesane, kemik ve mide kanser hücreleri (A549, MDA-MB-231, HepG2, T24, MG-63, MGC-803) ve normal akciğer fibroblast (WI-38) ve insan göbek kordonu endotel (HUVEC) hücre hatlarında MTT testini kullanarak hem ligandın hem de kompleksin sitotoksik etkisini incelemişlerdir. 72 saat 20 µM konsantrasyonla hem liganda hem Pt(II) kompleksine maruz bırakılan hücrelerde, liganda göre Pt(II)'li kompleksin yüksek sitotoksisiteye neden olduğu belirlenmiştir. Tüm hücre hatlarında tümor hücrelerinin %50'den fazlasının öldüğü gözlenmiştir. Bunun yanında akciğer ve karaciğer kanser hücre hatlarında sırasıyla %89,8 ve %82,5 oranlarında sitotoksik etki gözlenmiştir. Çalışmanın devamında kompleksin cisplatine göre A549, MDA-MB-231, HepG2 ve MG-63 hücre hatlarında daha düşük $IC_{50}$ değerine sahip olduğu da belirtilmiştir. Özellikle A549 hücre hattında cisplatine göre 12 kat daha düşük $IC_{50}$ değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer hücre hatlarında cisplatine göre daha yüksek $IC_{50}$ değerleri belirlenmiş ve geniş spektrumlu bir antitümor etki ortaya konulduğu belirtilmiştir. Çalışmada sağlıklı hücre hattı olan akciğer fibroblast hücre hattında da Pt(II) kompleksinin yüksek sitotoksisiteye neden olduğu dolayısıyla Pt(II) kompleksinin kanser hücreleri ve normal hücreler arasında çok az seçicilik sergilediği belirtilmiştir [291]. Shiju ve diğerleri, ise 2015 yılında yaptıkları çalışmada benzaldehit türevlerinden hazırlanan Schiff bazı içeren ligant ve onun Pt(II) komplekslerini sentezleyerek insan rahim ağzı kanseri, kolon kanseri ve epidermoid karsinoma (HeLa, HCT116, A431) hücre hatlarında anti-kanser etkilerini araştırmışlardır. MTT testi kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada 6,25, 12,5, 25, 50 ve 100

μM konsantrasyonları kullanılarak 48 saat muamele edilmiştir. Kontrol grubu olarak muamele edilmemiş hücreler kullanılmıştır. Hem ligand hem de kompleksler HeLa, HCT116 ve A431 hücre hatlarında konsantrasyona bağlı olarak artan sitotoksisite etkisi göstermişlerdir. Ancak Schiff bazı ligandlarının kanser hücre hatlarına etkisi yüksek $IC_{50}$ değerleri (10μM'dan yüksek) nedeni ile oldukça düşük kalmıştır. Pt(II) komplekslerinin ise serbest liganda göre daha yüksek etki gösterdiği belirlenmiştir [111].

Deng ve diğerleri de 2019 yılında, modifiye edilmiş bir aroilhidrazon Schiff bazı ligandı ile bunun beş Pt(II) kompleksini sentezleyerek *in vitro* antitümör aktivitesi üzerinde çalışmışlardır. Etkinin belirlenmesi için akciğer adenokarsinomu (A549) ve aynı hücre hattının cisplatine direçli hali olan (A549cisR) hücre hatları kullanılarak MTT testi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Pt ile kompleksleştikten sonra Schiff bazı ligandının sitotoksisitesinin arttığını göstermiştir. Cisplatinin pozitif kontrol olarak kullanıldığı deneyde hesaplanan Pt(II) komplekslerine ait $IC_{50}$ değerlerinin, cisplatinden bile daha düşük olduğu kaydedilmiştir [292]. Al-Aghbari ve diğerleri desentezledikleri Schiff bazı ve Pt(II) kompleslerinin anti-kanser etkilerini insan rahim ağzı ve prostat kanseri (HeLa ve PC-3) hücre hatlarında, MTT testi kullanarak belirlemişlerdir. Test edilen ligandın ve onun Pt kompleksinin *in vitro* antikanser aktivitesinin sonuçları, pozitif bir kontrol olarak cisplatin ile karşılaştırılmıştır. Pt(II) kompleksin liganda göre her iki hücre hattında da daha yüksek bir sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [293]. 2020 yılında gerçekleştirilen bir araştırmada ise Schiff bazı ligandları ve onların Pt komplekslerinin antikanser özellikleri insan akciğer adenokarsinom (A549) hücrelerinde MTT testi ile araştırmışlardır. Schiff bazı ligandı ve platin kompleskleri ile artan konsantrasyonlarda 24 saat boyunca hücreler muamele edilmiştir. Elde edilen sonuçlar konsantrasyonlar arttıkça hücre canlılığının azaldığını ve bu yapıların tümör hücresi büyümesini engellediğini göstermiştir. Sonuçlara göre S ve G2/M fazlarındaki hücre sayısı azalmıştır. Bu durum maddenin etkisi ile G1 fazının engellenmiş olması ile ilişkilendirilmiştir. Maddenin DNA'da neden olduğu hasarın hücrelerin diğer fazlara geçişini engellediği belirtilmiştir [112]. Yine 2020 yılında Mbugua ve diğerleri, pirol bazlı Schiff bazı ve onların Pt(II) komplekslerini sentezlemişlerdir. Bileşiklerin sitotoksisitesinin belirlenmesi için insan kolorektal adenokarsinom, servikal, karaciğer, meme, prostat kanser (Caco-2, HeLa, Hep-G2, MCF-7, PC-3) ve kanserli olmayan meme epitel (MCF-12A) hücre hatları kullanılarak MTT testi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre cis-konformasyonlu Pt kompleksinin, kanser hücrelerine karşı gelişmiş ve seçici sitotoksisite gösterdiği bildirilmiştir. Schiff bazı Pt(II)

kompleksinin ayrıca güçlü DNA interkalasyon aktivitesi gösterdiği ve kanser tedavisi için uygun bir aday olabileceği, bunun belirlenebilmesi için daha fazla *in vivo* testlerin gerektiği bildirilmiştir [296].

S-alkil ve S-aril ditiyokarbazat Schiff bazları kullanılarak sentezlenen Pt(II) kompleksinin sitotoksik etkisi de insan meme, kolon ve karaciğer kanseri (MCF7, HCT116 ve HepG2) ile normal akciğer fibroblastı (WI38) hücre hatlarında MTT testi ile belirlenmiştir. Hücreler farklı konsantrasyonlarda Pt(II) kompeksi ile 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Deney sonunda hesaplanan $IC_{50}$ değerleri Pt(II) kopmpleksinin tüm hücre hatlarında sitotoksik etkili olduğunu göstermiştir. Sitotoksik etkinin 48 saatlik uygulamada daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Hücrelere göre sitotoksik etki sıralaması hem 24 hem de 48 saat için WI38 > MCF7 > HePG2 > HCT116 şeklinde gerçekleşmiştir. Sağlıklı hücre hattında $IC_{50}$ değerinin kanser hücrelerine göre daha yüksek olması bu Schiff bazı Pt(II) kompleksinin sağlıklı hücre seçiciliğinin olabileceğine işaret etmektedir [284]. Dhaduk ve diğerleri, ise 2022 yılında triptatrin Schiff Bazı yapısında ligandlar ve onların Pt(II) komplekslerini sentezlemişler ve MTT testi ile antikanser etkiyi belirlemişlerdir. Kemik kanseri hücre hattı (MG-63) kullanılarak yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar tüm Pt(II) komplekslerinin ligantlara göre konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Hesaplanan $IC_{50}$ değerleri ile Pt(II) komplekslerinin cisplatinle karşılaştırılabilir etkide olduğu belirtilmiştir [294]. Bir başka çalışma Schiff bazı içeren Pt(II) komplekslerinin sitotoksik etkileri üzerine 2022 yılında MTT testi ile Meme kanseri hücre hattı (MCF-7) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Komplekslerin $IC_{50}$ değerleri karboplatin ile karşılaştırılmış ve tüm yapıların karboplatin kadar sitotoksik etkiye sahip olmadığı ancak konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı belirlenmiştir [295]. Asilpirazolon bazlı Schiff bazı ligandlarının Pt(II) komplekslerinin antikanser etkisi insan meme kanseri hücrelerinde (SKBR3 ve MDA-MB-231) belirlenmiştir. Hücreler 0–100 μM konsantrasyonlarında 48 saat Pt(II) kompleksleri ile muamele edilmiş, sonuçlar cisplatin ve karboplatin ilaçları ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Schiff bazlarının Pt(II) komplekslerinin sitotoksik etkisinin cisplatinden düşük, karboplatinden ise yüksek olduğunu göstermiştir [297]. 2024 yılında ise imin/amin donörlü iki yeni Schiff bazı ve onların Pt(II) kompleksleri sentezlenerek sitotoksik etkileri insan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre hattında belirlenmiştir. Hücreler 24, 48 ve 72 saat Schiff bazı içeren Pt(II) kompleksleri ile 3,37; 6,75; 12,75; 25; 50 ve 100 μM konsantrasyonlarında muamele edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ayrı ayrı sentezlenen iki Schiff bazı içeren Pt(II) komplekslerinin sitotoksik etkili olduklarını

ancak bu etkinliğin birbirlerinden farklı olduğunu ortaya koymuştur. Komplekslerden biri %50 hücre canlılığı inhibisyonunu tüm zaman aralıklarında yaklaşık 5 μM konsantrasyonda gösterirken, aynı koşullar altında diğer kompleks 10 μM konsantrasyonda benzer etkiye ulaşmıştır. 48 ve 72 saatlik muamelelerde 10 μM konsantrasyonda her iki kompleksinde hücre canlılığına etkisinde zamana bağlı önemli bir değişiklik belirlenmemiştir [298]. 3-asetilkumarin benzoilhidrazon (HL) Schiff bazından türetilen Pt(II) kompleksinin sitotoksik etkileri ise insan meme ve servikal kanser (MCF7, HeLa) ile normal akciğer fibroblastı (WI38) hücre hatlarında 24 ve 48 saat uygulamada cisplatin ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar Pt(II) kompleksinin ligandından daha sitotoksik olduğunu göstermiştir. Pt(II) kompleksinin MCF7 hücrelerinde daha sitotoksik etkili olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında Schiff bazı içeren Pt(II) kompleksi her iki hücre hattında da cisplatine benzer sitotoksik etki göstermiştir. Sitotoksik etkinin zamana bağlı değişiminde önemli bir farklılık oluşmamıştır [285].

Hassan ve diğerleri, ise o-Etoksi benzaldehit ve tiyofen-2-karbaldehit dahil olmak üzere aldehidik moleküller ile Metforminden türetilen iki yeni bidentat Schiff baz ligandı ve onun Pt(II) kompleksinin sitotoksik etkisini MCF-7 hücrelerinde 0–50 μg/ml konsantrasyonlarında 24 saat muamele ile belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak meme kanseri tedavisinde etkisi ile bilinen Doxorubicin kullanılmıştır. Hücre canlılığının kompleksin inkübasyonundan sonra azaldığı ancak Doxorubicin kadar etkili olamadığı belirlenmiştir [299]. 2024 yılında gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ligand olarak kinoksalin bazlı Schiff bazları kullanan 6 ayrı Pt(II) komplekslerinin sitotoksik etkileri MCF-7 hücre hattında 2, 4, 8, 12, 16, and 20 μg/mL konsantrasyonları ile 24 saat muamele sonunda değerlendirilmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak cisplatin kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlarda Pt(II) komplekslerinin $IC_{50}$ değerlerinin 10,56 ile 7,64 μM arasında değiştiği ve cisplatine (10,46μM) yakın etki gösterdikleri belirlenmiştir [286].

Bu çalışmalarda sitotoksik etkinin belirlendiği testler tez kapsamında sitotoksisite verisi veren yöntemlerden farklı olmakla beraber varılan sonucun benzer olduğu görülmektedir. Beklendiği gibi hem literatürdeki çalışmalarda hem de tez çalışmasında Pt(II) komplekslerinin ligantlardan daha sitotoksik olduğu anlaşılmaktadır.

Biyolojik aktiviteleri, iyi stabiliteleri, lipofiliteleri ve elektrominesans özellikleri nedeniyle Pt içeren Schiff bazı kompleksleri potansiyel antitümör ajanlar olarak görülmektedirler. Bu

komplekslerin, klasik platin ilaçlarına benzemeyen çeşitli antitümör mekanizmalar aracılığıyla hareket ederek metal kemoterapisinin neden olduğu ciddi yan etkileri iyileştirmek için uygun bir çözüm sundukları bildirilmektedir [95]. Örneğin G-dörtlü DNA (G-quadruplex DNA), insan hücrelerinde bulunan olağandışı dört iplikli bir DNA'dır [300, 301]. G-dörtlü DNA yapısının, kromozom stabilitesinin korunması ve gen ekspresyonundaki değişiklikler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [302]. G-dörtlü DNA'nın özel kare-düzlemsel geometrisinin, Pt(II) Schiff bazı komplekslerinin bu alanlarda birikerek veya G-dörtlü yapının nükleotidlerinin arasına girerek bu yapıyı hedeflemesine izin verdiği bildirilmiştir [95, 301, 303]. İlaç sektöründe tümörlerin tedavisi için farklı mekanizmalara ve düşük yan etkilere sahip yeni farmakolojik ajanların bulunması önemlidir. Bu nedenle, kemoterapötik ilaçların kanser hücrelerine sitotoksisitesini seçici olarak artırabilen yeni duyarlılaştırıcı ajanların yaratılması gerekmektedir [95]. Aromatik düzlemsel ligandlar içeren metal kompleksleri de DNA'daki baz çiftleri ile bir araya gelerek dupleksin uzamasına ve çözülmesine izin vermektedir. İnterkale olmuş DNA ve metal kompleksi bölünen hücrelerde toksik olduğundan sadece kanser hücrelerini yok etmektedir. Ayrıca, hidrojen bağı, van der Waal's etkileşimleri ve hidrofobiklik gibi Schiff bazı moleküllerinin doğal özellikleri, metal komplekslerinin bağlanma kapasitesinin arttırılmasına büyük ölçüde katkıda bulunmaktadır [304]. Bunun yanında reaktif oksijen türleri (ROS) nedeniyle endoplazmik retikulum stresi ve mitokondrinin çalışmasının bozulması platin içeren Schiff bazı komplekslerinin antitümör mekanizmasını sağlayan önemli apoptoz yolakları olarak bildirilmiştir [95]. Tetrazolato ligandına benzer şekilde salisilaldehit türevlerinden hazırlanan Schiff bazlarının ortalama tümör ağırlığını düşürdüğü veya yavaşlattığı [305], kırmızı-beyaz kan hücreleri, hemoglobin gibi proteinleri düzenleyerek hematopoietik sistemi koruduğu bildirilmiştir [98].

Tetrazol içeren Pt(II) komplekslerinin incelendiği araştırmalar da tez çalışmasında elde edilen veriler doğrultusunda değerlendirilmiştir. 2013 yılında Serebryanskaya ve diğerleri, gerçekleştirdikleri çalışmada N-sübstitüe 5-aminotetrazollerin ve bunların Pt(II) komplekslerinin $10^{-2}$-$10^{-6}$ M konsantrasyonlarında antiproliferasyon etkisi, HeLa (insan rahim ağzı kanseri hücreleri) hücre hattında tripan mavisi; sitotoksik etkileri ise, insan servikal karsinom, rabdomiyosarkom (HeLa ve RD) hücre hatlarında MTT ve İnsan servikal karsinom, osteosarkom, küçük hücreli dışı akciğer adenokarsinom ve cisplatine dirençli yumurtalık kanseri (HeLa, U2OS, H1299 ve A2780/A2780cisR) hücre hatlarında MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

assay) testleri ile belirlenmiştir. Çalışmada komplekslerin cis ve trans yapıları karşılaştırılmış ve pozitif kontrol olarak cisplatin ve karboplatin kullanılmıştır. Tripan mavisi testinde Pt(II) komplekslerinin pozitif kontroller kadar olmasa da sitotoksik oldukları belirlenmiştir. MTT ve MTS testlerinde de Pt(II) komplekslerinin kanser ve cisplatine dirençli kanser hücre hatlarında sitotoksik oldukları belirlenmiştir. Tüm testler cis yapısındaki Pt(II) komplekslerinin trans yapıdakilere göre daha sitotoksik olduğunu göstermiştir. *In vitro* sitotoksik değerlendirmede belirlenen antiproliferatif etki ve sitotoksisitelerinin, Pt(II) komplekslerinin geometrilerine ve taşıyıcı ligandların hidrofobikliğine göre farklılık gösterdiğinin altı çizilmiştir [306]. Literatürde farklı araştırmalarda tetrazolato köprülü dinükleer Pt(II) komplekslerinin DNA ile cisplatinden farklı bir mekanizma ile etkileştikleri ve daha yüksek sitotoksik etkiye sahip oldukları bildirilmiştir. Bu nedenle farklı yıllarda tetrazolato köprülü Pt(II) komplekslerinin sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Komeda ve diğerleri, 2011 yılında küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattında (NSCLC) 24 saat muamele sonrası sitoksik etkileri MTT testi ile belirlenmiştir. 2 ayrı kompleksin çalışıldığı çalışmada $IC_{50}$ değerleri 23, 5 ve 9,2 μM olarak belirlenmiştir. Çalışmada cisplatinin $IC_{50}$ değeri ise 23,1 μM olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar tetrazolato köprülü dinükleer Pt(II) komplekslerinin NSCLC hücrelerinde cisplatin kadar etkili olduklarını açıkça ortaya koymuştur [307]. Yine Komeda ve ekibi tarafından 2013 yılında dört ayrı tetrazolato köprülü platin kompleksinin küçük hücreli akciğer kanseri hücre hatlarında (PC-9 ve PC-14) 48 saat ve aynı hücrelerin cisplatine dirençli formlarında 48 saat muamelesi ile sitotoksisite potansiyelleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar her iki kompleksin de sitotoksik etkili olduğunu göstermiştir. Bunun yanında cisplatine direçli hücre hatlarında da direncin üstesinden geldiği belirlenmiştir. Cisplatinle yapılan karşılaştırmada dört kompleksten üç tanesinin cisplatin kadar sitotoksik olduğu da bildirilmiştir [308]. Bu iki çalışmadan elde edilen veriler tetrazolato köprülü binüklear Pt(II) komplekslerinin cisplatin kadar sitotoksik ve cisplatin dirençli hücreler için de etkili olduğunu göstermiştir. Çalışmalara konu olan tetrazol içeren Pt(II) komplekslerinin etki mekanizmaları, nasıl direncin üstesinden geldikleri ve etki mekanizmalarının cisplatinden farkı takip eden çalışmalarda detaylı araştırılmıştır [113]. Cisplatinin gösterdiğinden daha az çapraz bağa neden olan bu tetrazol içeren Pt(II) komplekslerinin kromatin katlanmasını uyardığı ve dolayısıyla kemoterapiye tepki vermeyen kanserlerin tedavisi için klinik uygulamaların yapılabileceği bildirilmiştir [114]. 2021 yılında gerçekleştirilen bir çalışma ise daha önce bahsi geçen çalışmalardan elde edilen verilerin tam aksini göstermektedir. Buna göre, tetrazol içeren Pt(II) komplekslerinin antiproliferatif etkisi Tripan mavisi canlılık

testi ile araştırılmıştır. Sentezlenen tetrazol içeren Pt(II) kompleksleri farklı konsantrasyonlarda insan servikal kanser hücre hattina (HeLA) 48 saat mumele edilmiştir. Süre sonunda hemositometre ile sayım gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar bu bileşiklerin kanser hücre hattında sitotoksisiteye neden olmadığını göstermiştir. Bu sonuç tetrazol bileşiklerinin sentezlenmesini konu alan bu çalışmada, suda kolay çözünen bu yapıların lipofilitesinin düşük olması nedeniyle hücre içine girememesi olarak yorumlanmıştır [309]. 2022 yılında yapılan bir diğer çalışmada tetrazol içeren Pt(II) kompleksinin sitotoksik etkisi belirlenmiştir. Çalışma için insan alveoler bazal epitelyum adenokarsinom, yumurtalık teratokarsinom, hepatokarsinom, servikal karsinom (A549, PA-1, Huh7, HeLa) hücreleri ve sağlıklı hücre hattı olarak insan embriyonik böbrek hücre hattı (HEK293) kullanılmıştır. MTT testi ile $LC_{50}$ değerleri sırasıyla; 41,3; 10,6; 19,9; 3,7; 15,8 μmol $l^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Elde edlen sonuçlar sitotoksisite değerlerinin hücre hatlarına göre farklılık gösterdiğini artaya koymuştur. Tetrazol içeren bileşik en yüksek etkiyi HeLa hücre hattında göstermiştir. Sağlıklı hücre hattında belirlenen $IC_{50}$ değeri (15,8 μmol $l^{-1}$) bu maddenin sağlıklı hücrelere seçiciliğinin olmadığını da ortaya koymuştur [310].

Tetrazol içeren binükleer (iki adet Pt iyonu içeren) Pt(II) kompleksinin *in vitro* sitotoksik etkisi fare kolon kanser hücreleri (Colon-26) ile 24 saat muamele sonrası WST testi ile belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak oksaliplatin kullanılmıştır. Oksaliplatin'in 11 μM olarak ölçülen $IC_{50}$ değerinin yanında tetrazol içeren dinükleer Pt(II) komplekslerinin $IC_{50}$ değerleri 0,5; 0,7; 1,1; 2,2 μM olarak belirlenmiştir. Yani bu bileşikler oksaliplatin'e göre çok daha yüksek sitotoksik etkiye sahiptir. Bu durumun nedeninin maddenin binükleer yapıda olması olabileceği bildirilmiştir [311]. 2023 yılında yapılan bir çalışmada tetrazol içeren ligandların Pt(II) komple sentezlenerek antikanser etkileri meme hücresi hattında (MCF-7) cisplatin ile karşılaştırılmıştır. Cisplatinin $IC_{50}$ değerinin 4,46 μM olarak bulunduğu çalışmada tetrazol içeren yapıların $IC_{50}$ değerleri 52,14 ve 12,18 μM olarak belirleniştir. Bu sonuçlar her iki bileşiğin cisplatin kadar olmasa da konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etkili olduğu şeklinde yorumlanmıştır [312]. 2024 yılında tetrazol içeren Pt(II) kompleksinin sitotoksik etkisi insan kolon ve karaciğer kanser (CaCo2 ve HepG2) hücre hatlarında cisplatin ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, tetrazol içeren Pt(II) kompleksinin CaCo hücre hattında HepG2 hücrelerinden daha toksik olduğunu göstermiştir. Ancak Pt(II) kompleksi her iki hücrede de cisplatin kadar sitotoksik etki gösterememiştir [313].

Tez kapsamında elde edilen sitotoksisite verileri Pt(II) kompleksinin yüksek konsantrasonlarda hücre canlılığını azalttığını işaret etmektedir. Literatürde benzer yapı bulunmadığından Schiff bazı içeren Pt(II) kompleksleri ve tetrazol içeren Pt(II) komplekslerinin sitotoksik etkilerinin belirlendiği araştırmalar değerlendirilmiştir. Hem Schiff bazı içeren Pt(II) hem de tetrazol içeren Pt(II) komplekslerinin farklı hücre hatlarında sitotoksik etkili olduğu bununmuştur. Kimyasal yapılar ve sitotoksik etkinin değerlendirildiği çalışmalar farklı olsa da literatürden edinilen bu bilgiler tez kapsamında elde edilen verilerle uyumlu görünmektedir. Tetrazol içeren bir Schiff bazının Pt(II) kompleksinin sitotoksik etkisinin belirlendiği bir çalışmaya rastlanmamış olması da tez çalışmasından elde edilen verinin literatüre önemli bir katkı sağlayacağını göstermektedir.

Tez çalışmasında kullanılan Schiff bazı ve tetrazol yapıları üstün farmakolojik etkileri [227] ve düşük toksisite verileri [106, 314] ile bilinmektedir. Yapılan literatür araştırması Schiff bazı ve tetrazol yapılarının Pt(II) ile kompleksleştiklerinde DNA ile etkileşim ve antikanser özelliklerinin arttığını işaret etmektedir. Tez çalışmasında da tetrazolato ligandının Pt(II) kompleksinin sitotoksik etkili olması beklenmektedir. Pt(II) bazlı ilaçların sitotoksisitesi onların DNA üzerinde eklentiler oluşturması nedeniyle gerçekleşmektedir. Bu etki bilindiğinden tetrazolato ligandı ve onun Pt(II) kompleksinin de DNA ile etkileşip etkileşmediği moleküler doking yöntemi ile sorgulanmıştır. Çalışmada hem tetrazolato ligandının hem de Pt(II) kompleksinin farklı baz dizilimlerine sahip DNA yapıları ile etkileşimi araştırılmıştır.

İlaç araştırılmalarında pek çok öncü molekül preklinik güvenlilik değerlendirilmesi aşamasında, çözünürlük, toksisite, etkinliğin azalması nedenleri ile elenebilmekte bu durum zaman ve maddi kayba neden olmaktadır. Bilgisayarlı modellemelerle aday moleküllerin elenmesine neden olabilecek olası ihtimaller deney öncesi öngörülebilmektedir. Bu öngörüler aday moleküllerin sentez aşamasından önce değerlendirilmesini sağlamaktadır, bu kolaylık da fazladan yapılacak deneylerin önüne geçmektedir [169, 315]. Bunun yanında klasik deneysel yöntemler, kimyasal reaksiyonlar çok hızlı gerçekleştiğinden mekanizmalarının anlaşılmasına olanak sağlamamaktadır. Bilgisayar similasyonları ise etkileşimlerin mekanizmasının kimyasal yapısının anlaşılmasını sağlamaktadır. Bu nedenle bilgisayar simülasyonlarının gelişimi, karmaşık biyolojik etkileşimleri bile açıklamayı mümkün kılmaktadır [180, 316, 317]. Bilgisayarlı yaklaşımların yapay zekaya dayalı makine öğrenimi yöntemleriyle daha da gelişmeleri beklenmektedir [318].

Yapısal moleküler biyoloji ve yapı tabanlı ilaç keşfine önemli avantaj sunan moleküler doking, son otuz yılda önemli gelişme kaydetmiştir [27, 182, 183, 319]. Bilgisayara dayalı ilaç tasarım çalışmalarında geliştirilen yaklaşımlar, bu alandaki zaman ve maliyet gibi engelleri gidermede büyük önem taşımaktadır. Moleküler doking de bu araçlardan biridir [167, 168]. İlaç araştırmalarında öncü moleküllerin değerlendirilmesinde hedef makromoleküllerle ligandların etkileşimi moleküler doking yöntemi ile araştırılarak moleküller arasında eleme yapılabilmektedir. Bu eleme sentez sırasında kullanılacak kimyasalların, işlemlerin, zaman ve maliyetin azaltılmasında oldukça önemlidir Örneğin; nükleik asit- ligant etkileşimleri birçok hücresel süreçte önemli rollere sahip olduğundan [183] DNA'ya ait büyük oluğu veya küçük oluğu hedefleyen yapıların etkileşim mekanizmalarının araştırılması önemlidir [220]. Pt(II) iyonu bulunduran ilaçların DNA ile etkileşiyor olmaları, benzer yapıların DNA etkileşimlerinin belirlenmesini önemli kılmaktadır.

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen moleküler doking çalışmasında tetrazolato ligandının ve onun Pt(II) kompleksinin DNA etkileşimleri farklı baz dizilimlerine sahip dört farklı DNA yapılarında detaylı araştırılmıştır. Çalışma kapsamında ilk olarak makromolekül ve sentezlenen yapıların genel etkileşimi hakkında bilgi veren doking skorları hem ligandın hem de Pt(II) kompleksinin DNA ile kuvvetli etkileşime sahip olduğunu göstermiştir. Bu etkileşimler kovalent ve kovalent olmayan bağlar ve de hidrofobik etkileşimler aracılığı ile gerçekleşmiştir. Pt(II) kompleksi ile yapılan doking çalışmasında olası kovalent etkileşimlerin belirlenmesi için komplekse ait moleküllerle DNA yapıları arasında uzaklık ölçümü yapılmış ve tüm DNA yapıları ile ligandın elektron verici atomları arasında kovalent etkileşimin oluşmasını sağlayacak yakınlığın olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci kısmında esnek doking adı verilen ve hem DNA yapılarının hem de sentezlenmiş yapıların esnek olduğu çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada da yüksek doking skorları ile hem tetrazolato ligandı hem de Pt(II) kompleksinin yüksek affinitesi belirlenmiştir. Pt(II) iyonunun etkileşimlerini belirlemek için ayrıca DNA yapıları iyon arasındaki mesafe ölçülmüştür. Bu ölçümler Pt(II) iyonunun adenin ve guanin bazları ile yakınlaştığını göstermektedir. Bu sonuç Pt(II) iyonu ve bazlar arasında kovalent etkileşimin oluşabileceğini işaret etmektedir. Pt(II) bazlı ilaçların da guanin ve adenin bazları aracılığıyla DNA ile etkileştikleri bilinmektedir. [320]. En eski Pt(II) bazlı ilaç olan cisplatinin DNA bazları ile etkileşimi guanin>adenin>sitozin şeklinde belirlenmiş ve en kararlı etkileşimin guanin bazı ile oluştuğu belirlenmiştir [321]. Tez kapsamında moleküler

doking yönteminden elde edilen veriler tetrazolato ligandının Pt(II) kompleksinin de benzer bir etkileşim içinde olduğuna işaret etmektedir.

Yapılan literatür araştırmalarında tetrazol içeren Schiff bazı yapısının olmadığı bilindiğinden Schiff bazı içeren ve tetrazol içeren yapıların DNA ile etkileşimlerinin moleküler doking yöntemi ile araştırıldığı çalışmalar değerlendirilmiştir. Bu yapıların doking çalışmalarının 1BNA kodlu DNA'da gerçekleştirildiği, diğer DNA yapılarının kullanıldığı bir çalışmanın olmadığı belirlenmiştir. Tez kapsamında gerçekleştirilen doking çalışmalarında ligandaki Schiff bazının DNA yapıları ile etkileşmediği ancak esnek doking çalışmalarında sadece 1BNA kodlu yapıda adenin ve timinle etkileştiği belirlenmiştir. Pt(II) kompleksindeki Schiff bazı ise doking çalışmasında 8F2W kodlu DNA üzerindeki guanin ile etkileştiği, esnek doking çalışmalarında ise 8F2W yapısındaki timin ve 1BNA üzerindeki adenin ve timin bazları ile etkileştiği gözlenmiştir. Bu etkileşimler kovalent olmayan π katyon, tuz köprüsü ve hidrofobik etkileşimlerle olmuştur. 2017 yılında gerçekleştirilen bir araştırmada tez kapsamında bulunan verilere uygun olarak yeni sentezlenmiş bir Schiff bazının DNA'nın büyük oluğuna girerek etkileştiği bildirilmiştir [322]. 2018 yılında yeni sentezlenmiş Schiff bazının DNA ile etkileşimi 1BNA yapısı ile araştırılmış ve ligandın yüksek doking skoru ile sarmalın küçük oluğuna yerleştiği belirlenmiştir [323]. Dimetilaminobenzaldehit bazlı biyoaktif schiff bazlarının 1BNA yapısı ile etkileşimi araştırılmış ve Schiff bazlarının sitozin adenin timin ve guanin ile etkileştiği bildirilmiştir. Etkileşimler tez kapsamında elde edilen verilerde olduğu gibi yüksek doking skorları ile gerçekleşmiştir [324]. Tez çalışmasından elde edilen bu bulgulara benzer veriler 2019 yılında Deng ve diğerleri, tarafından gerçekleştirilen çalışmada da elde edilmiştir. Bu çalışmada B-DNA yapısı ile Schiff bazı içeren Pt(II) komplekslerinin etkileşimi doking yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçları kompleksin DNA yapısındaki adenin ve timince zengin küçük oluğuna yerleştiğini göstermektedir [292]. Tez kapsamında da Pt(II) kompleksinin adenin, guanin ve timinle etkileştiği ancak genel olarak DNA yapılarının büyük oluğuna uyum sağladığı belirlenmiştir. 2,6-diaminopiridin'den türetilen Schiff bazı ligandının 1BNA ile etkileşiminin incelendiği çalışmada Schiff bazlarının yüksek doking skorları ile DNA affinitesi gösterdiği belirlenmiştir [325]. 2020 yılında gerçekleştirilen bir diğer çalışmada piridin Schiff bazı ligandının 1BNA yapısı ile etkileşimi araştırılmış ve ligandın DNA üzerindeki proteinlerle etkileştiği bildirilmiştir. Bu çalışmada bulunan etkileşim skorunun tez kapsamında gerçekleştirilen doking çalışmalarından elde edilen skorlardan çok daha düşük olduğu görülmüştür [326]. Schiff bazı içeren Pt(II) kompleksinin

DNA ile etkileşiminin araştırıldığı bir diğer çalışmada da kompleksin guanin, adenin ve sitozin bazları ile etkileştiğini ve bu etkileşimin interkalasyon yoluyla olduğunu belirlenmiştir [327]. Bu tez çalışmasında da benzer etkileşim 8F2W DNA yapısı ve Pt(II) kompleksi arasında gerçekleşmiştir. 2023 yılında Schiff bazı içeren Pt(II) komplekslerinin DNA ile etkileşimi araştırılmış ve komplekslerin DNA'nın küçük oluğuna girerek etkileşim gösterdikleri belirlenmiştir [297]. 2024 yılında gerçekleştirilen bir araştırmada ise Schiff bazı içeren Pt(II) kompleksinin DNA yapısı ile etkileşimi doking yöntemi ile araştırılmış ve kompleksin adenin ve timin bakımından zengin olan küçük oluğuna uyum sağladığı belirlenmiştir. Etkileşimin hidrofobik ve van der Waals kuvvetleri ile gerçekleştiği bildirilmiştir [286]. Bu sonuçlar tez kapsamında elde edilen verilerle uyumludur çünkü Pt(II) kompleksinin doking çalışmalarında adenin guanin ve timin bazları ile etkileştiği belirlenmiştir.

Tetrazolato ligandının yapısındaki tetrazol halkası, tüm doking çalışmalarında DNA ile en çok etkileşen yapı olmuştur. Pt(II) kompleksinde ise tetrazolün liganttaki kadar etkileşim göstermediği belirlenmiştir. Bu sonucun Pt(II) iyonunun liganda koordine olmasından dolayı değişen yük dağılımından kaynaklandığı düşünülmektedir. Tetrazol içeren Pt(II) komplekslerinin DNA ile etkileşiminin doking yöntemi ile araştırıldığı çalışmalarda tez kapsamında elde edilen bulgulara benzer sonuçların olduğu görülmektedir. Örneğin 2018 yılında gerçekleştirilen çalışmada tetrazol içeren Pt(II) kompleksinin çalışmamızda da kullanılan 1BNA yapısı ile etkileşimi sorgulanmıştır. Sadece doking yöntemi ile gerçekleştirilen çalışmada kompleksin DNA'nin küçük oluğuna yerleştiğini ve 1BNA yapısı üzerindeki GAAT fragmenti ile etkileştiği belirlenmiştir. [328]. Tez çalışmasında ise Pt(II) kompleksi ve 1BNA yapısı arasındaki etkileşimin doking sırasında Pt(II) iyonunun guanin bazı ile etkileşmesi, bunun yanında aromatik halkanın adenin ve timin bazları ile etkileşmesi sonucu gerçekleştiği belirlenmiştir. Tetrazol ise DNA yapısı ile etkileşmemiştir. Baz etkileşimleri kısmen de olsa Protas ve arkadaşlarının (2018) bulguları ile uyumlu görünmektedir. Ancak Protas ve arkadaşlarının bulgularının aksine Pt(II) kompleksinin büyük oluğa yerleştiği belirlenmiştir.

Platinin antikanser etkisi DNA üzerinde oluşturduğu eklentiler sonucu oluşmaktadır. Bu nedenle toksisite profili düşük olması beklenen ligandın Pt(II) iyonu ile etkileşebilmiş olması önemlidir. Kanser tedavisinde kullanılan ilk Pt(II) bazlı ilaç olan cisplatin DNA üzerindeki nükleobazların nitrojen atomlarına bağlanmakta özellikle guaninin bazı ile

etkileşmektedir. Bu durum aynı anda tek DNA ipliğinde veya karşılıklı ipliklerde bağlanma oluşmasına neden olmaktadır. Bu eklentiler nedeniyle kıvrılan DNA replike olamamakta ve hücre ölümü gerçekleşmektedir [45, 239]. Tez çalışmasında da Pt(II) kompleksinin guanin ile hidrojen bağı yoluyla etkileştiği belirlenmiştir. Bunun yanında yapılan ölçümler kompleksin adenin ve timin bazları ile de etkileştiğini göstermiştir. Doking simülasyonu kabaca makromolekül ve sentezlenmiş bileşiklerin olası kimyasal etkileşimlerini belirlemektedir. Bu nedenle tez çalışmasında baz dizilimleri farklı DNA yapıları tercih edilmiştir. Literatür araştırmasında ise tez çalışmasına benzer doking çalışmalarının sadece 1BNA yapısı ile gerçekleştirildiği görülmektedir. Tetrazolato ligandına benzer bir yapının DNA ile etkileşiminin araştırıldığı bir doking çalışmasına rastlanmamıştır. Bu nedenle Schiff bazı ve tetrazol içeren yapıların DNA etkileşimleri araştırılmıştır. Bu çalışmalarda tez kapsamında elde edilen veriler kısmen doğrulansa da kimyasal yapılar tamamen farklı olduğundan anlamlı bir değerlendirme yapmak mümkün olmamaktadır. Genel olarak tez kapsamında elde edilen veriler hem ligandın hem de Pt(II) kompleksinin DNA yapılarına yüksek affinite gösterdiği yönündedir. Bu sonuç Pt(II) bazlı ilaçların temel etki mekanizması olan DNA üzerinde eklenti oluşturarak sitotoksisite oluşturma mekanizmasına benzer bir etkinin tez konusu olan Pt(II) kompleksi için de geçerli olduğunu varsaymamızı sağlamaktadır. Pt(II) bazlı ilaçların kullanımını kısıtlayan nedenlerden biri yan etkilerdir. Yapılan araştırmalarda DNA ile etkileşimlerinden sonra ayrılan grupların bu yan etkilere neden olduğunu göstermektedir. Tetrazolato ligandının Pt(II) kompleksinin DNA ile etkileşiminde ise ayrılan grup olmayacağı öngörülmektedir. Tez çalışmasında birbirini destekleyen ve kaynaklarla uyumlu olan verilerin elde edilmiş olmasının ileri seviye preklinik güvenlilik çalışmalarına ışık tutabileceği öngörülmektedir. Bu nedenle tetrazolato ligandının preklinik güvenlilik değerlendirmesi *in siliko* toksikoloji araçları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Preklinik güvenlilik değerlendirmesi, ilaç adaylarının amaçlanan kullanımıyla ilgili olarak neden olduğu potansiyel olumsuz etkileri değerlendirmeyi amaçlamaktadır [329]. Bir hastalığın oluşma mekanizmasında, hastalığın gelişimini engelleyecek veya yavaşlatacak bir makromolekülü hedef alan ve etkinliği belirlenen aday moleküllerin tespitinden sonra prelinik güvenlilik değerlendirmesi yapılmaktadır. Bu süreçte aday molekülle ilgili tehlikeler tanımlanmalı ve amaçlanan maruziyetteki potansiyel riskler ilacın potansiyel faydasıyla karşılaştırılarak değerlendirilmelidir. İlaç aday molekülünün preklinik

güvenliliğinin kapsamlı olarak değerlendirilmesini sağlamak için, birçok hususun ele alınması gerekmektedir [329].

Preklinik güvenlilik değerlendirmesinin nasıl yapılması gerektiği düzenleyici kuruluşlarca belirlenmektedir [242, 330]. ICH kanserojenlik, genotoksisite ve reprotoksisite gibi potansiyel riskleri ortaya çıkarmak için kapsamlı güvenlik kılavuzları seti hazırlamıştır [242]. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Ajansı, bir ilacın insanlar üzerinde test edilmeden önce, araştırmacıların toksisite olarak da adlandırılan, ciddi zarar verme potansiyeline sahip olup olmadığını sorgulamalarını istemektedir. Bu sorgulama *in vitro* ve *in vivo* olarak iki tür klinik öncesi araştırma türünü kapsamaktadır. Klinik öncesi araştırmaların aday molekülün dozaj ve toksisite seviyeleri hakkında ayrıntılı bilgi sağlaması gerekmektedir. Bu testlerden elde edilen veriler ilacın insanlarda test edilip edilmeyeceğine karar verilmesini sağlamaktadır [330]. Klinik öncesi ilaç geliştirme sürecinde, *in vitro* ve *in vivo* laboratuvar hayvan testleri yoluyla ilacın toksik ve farmakolojik etkileri değerlendirilmektedir. Bu değerlendirmede genotoksisite taramasının yanı sıra ilaç emilimi ve metabolizması, ilacın metabolitlerinin toksisitesi ile ilacın ve metabolitlerinin vücuttan atılma hızı üzerine araştırmalar yapılması gerekmektedir. Klinik öncesi aşamada, FDA asgari olarak genellikle şu çalışmaları istemektedir: ilacın farmakolojik profilini geliştirilmesi; en az iki hayvan türünde akut toksisitesinin belirlenmesi ve aday molekülün klinik çalışmalarda önerilen kullanım süresine bağlı olarak 2 hafta ila 3 ay arasında değişen kısa dönem toksisite çalışmalarının yapılması [331]. Klinik çalışmaların desteklenmesi ve ardından yeni bir ilacın pazarlanması için beklenen klinik öncesi çalışma türleri hem ilacın kullanım amacına hem de üzerinde çalışılan ve tedavi edilen hasta popülasyonuna bağlıdır. İlerlemiş, hayatı tehdit eden hastalıklarda potansiyel faydaların olması halinde toksisite riskleri kabul edilebilirdir ve klinik öncesi testler minimum düzeyde olabilmektedir. Seçilen popülasyonun bilinen bir hastalığı olmadığı durumlarda ise kabul edilebilir riskler çok daha azdır ve klinik öncesi değerlendirme daha kapsamlı olmalıdır [332].

Kanser ilaçlarında temel hedef kanserli hücrelerin yok edilmesi olduğu için yasal düzenleyici kuruluşlar antikanser ilaçların geliştirilmesi için ayrı yönetmelikler hazırlamışlardır. Her iki kuruluş da (FDA ve EMA) ilaçların preklinik değerlendirmesi için aday molekülün anti-tümör aktivitesinin yanı sıra etki mekanizmalarının ve zamanla değişen etkinliğinin ön karakterizasyonun yapılmasını istemektedir [333, 334]. EMA'nın hazırladığı antikanser ilaçlar için klinik çalışmalar öncesi değerlendirme kılavuzunda ilacın

farmakolojisi, güvenlik farmakolojisi, farmakokinetiği, genel toksisitesi, üreme toksikolojisi, fotogüvenlik testinin preklinik değerlendirmeyi desteklemek amacıyla yapılması istenmektedir. Genotoksisite ve karsinojenesite çalışmaları ilerlemiş kanserli hastaları tedavi etmeyi amaçlayan terapötikler için klinik araştırmaların desteklenmesinde gerekli görülmezken pazarlamayı desteklemek için bu veriler istenmektedir [333]. FDA ise antikanser ilaçların preklinik güvenlilik değerlendirmesinde hayati organ fonksiyonları (kardiyovasküler, solunum ve merkezi sinir sistemleri dahil) üzerindeki etkisinin değerlendirilmesini gerekli görmektedir [334]. Antikanser bir ilacın hastaların sağkalım süresini uzattığı gösterildiğinde, genellikle ek genel toksikoloji çalışmaları gerekmemektedir. Ek çalışmaların önemli görülmesi halinde, bu tür çalışmaların antikanser ilacın onaylanmasından sonra sunulabileceği de bildirilmiştir [335].

Preklinik güvenlilik değerlendirme ilaç keşfi ve ilaç geliştirmenin ayrılmaz bir parçasıdır. İlaç geliştirme sırasında hala pekçok molekül bu değerlendirme sürecinde elenmektedir. Bu nedenle, önemli güvenlilik son noktalarının taranması da dahil olmak üzere ilaç keşfinde ilaç adaylarının akıllıca seçilmesine ihtiyaç vardır. Son yıllarda, *in siliko* değerlendirmenin yanı sıra keşfin çok erken aşamalarında bazı son noktaların yüksek verimli taranmasına olanak tanıyan *in siliko* yaklaşımlarda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Tüm bu ilerlemelere rağmen, ilaç adaylarının *in vivo* değerlendirilmesi, güvenlilik testlerinin hala önemli bir parçasıdır [329, 336]. *In siliko* yaklaşımdan elde edilen veriler olası *in vivo* testler için de ön değerlendirme yapılmasını sağlamaktadır. Tez çalışması kapsamında düşük toksisite amacıyla sentezlenmiş olan tetrazolato ligandının toksisite profili preklinik güvenlilik değerlendirmesi perspektifinden, ücretli ve ücretsiz erişim sağlayan altı farklı *in siliko* araç kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aynı ligandla ilgili *in vitro* testlere başlamak üzere toksik sınıfını anlamaya ve doz aralığının belirlenmesine yönelik de $LD_{50}$ tahminleri benzer şekilde belirlenmiştir.

Farmasötik ve biyoteknoloji ürünlerinin, insanlarda klinik deneylerin başlatılmasından önce potansiyel yeni bir ilacın güvenliğine ilişkin bilgi sağlamak için bir dizi klinik olmayan genel toksikoloji çalışmasından geçmesi gerekmektedir. Klinik dışı güvenlik değerlendirmeleri, yeni bir molekülün onaylı bir ilaç haline gelebilmesi için gereklidir. Genel toksikoloji çalışmalarının sırası veya düzeni tipik olarak, maksimum tolere edilen dozu (MTD) belirlemek için artan doz çalışmalarını içerebilen akut tek doz çalışmalarıyla başlamaktadır. Klinik endikasyon ve beklenen tedavi süresinin bu çalışmaların gerekli olduğunu göstermesi

halinde, kemirgenler için altı aya ve kemirgen olmayanlar için dokuz aya kadar giderek daha uzun süreli maruziyete ilişkin ek çalışmalar yürütülmektedir [337]. Tez kapsamında gerçekleştirilecek *in vitro* çalışmalar için de rat oral akut $LD_{50}$ doz tahminleri, ücretsiz erişim sağlanan TEST, Protox, EPA Chemical Dashboard, GusarWay2Drug ve Catmos (sonuçlarını kullandığımız ücretsiz 5 *in siliko* testi) programları kullanılmış ortalamaları alındığında 940 mg/kg olarak tetrazolato ligandının rat oral $LD_{50}$ dozu belirlenmiştir. Bu $LD_{50}$ dozuna göre tetrazolato ligandı hafif toksik sınıfında yer almaktadır. Sonradan tez çalışmasının dahil olduğu TÜBİTAK ARDEB 1001 (122Z762) projesi kapsamında erişim sağlanan ücretli program Percepta'nin $LD_{50}$ modülü tetrazolato ligandının rat oral $LD_{50}$ dozunu 900 mg/kg olarak hesaplamıştır. Bu değer genotoksisite testlerinde kullanılmak üzere belirlenmiş (5 ayrı programdan elde edilen değerlerin ortaaması: 940 mg/kg) $LD_{50}$ dozu ile uyumludur. Genotoksisite testleri için $LD_{50}$ dozu belirlendikten sonra erişim sağlanan bir diğer program olan Simulation Plus ise tetrazolato ligandının $LD_{50}$ dozunu 1869 mg/kg olarak belirlemiştir. Bu farklı sonucun programın veritabanından kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Ücretsiz veritabanlarından ve gönüllü katkıda bulunanlar tarafından geliştirilen, ücretsiz erişim sağlanabilen bir program olan Vegahub, hedef kimyasal için elde edilen sonuçları benzer bileşikler için elde edilen sonuçlarla ilişkilendirebilmektedir [338]. Bu program da Rat oral $LD_{50}$ dozu tahmini için kullanılmıştır ancak tetrazolato ligandının $LD_{50}$ dozu için bir tahminde bulunamamıştır. Değerlendirmenin yapılamamasının nedeni olarak program veritabanında tetrazolato ligandına benzer bir molekülün olmadığını da sunduğu raporda belirtmiştir. Bu sonuç tez çalışmasından elde edilen verilerin bu tip ücretsiz programlara da kaynak oluşturabileceğine işaret etmektedir.

Tez çalışması kapsamında tetrazolato ligandı için gerçekleştirilen preklinik güvenlilik değerlendirmesi için ACD Labs Percepta, EPA TEST, VegaHub, Protox, Simulation Plus ve SwissADME programları kullanılmıştır. Değerlendirme kapsamında yasal otoritelerin ilaç araştırmalarında belirlenmesini önerdiği [206, 210, 330, 334] mutajenesite, genotoksisite, hERG inhibisyonu, kan beyin bariyeri geçirgenliği, östrojen ve androjen reseptör etkileşimi, p-glycoprotein etkileşimi, P450, CYP enzimleri ile ilişkisi, tiroid reseptör etkileşimi ve organ toksisitesi ile ilgili öngörüler değerlendrilmiştir.

Preklinik güvenlilik değerlendirmesinde mutajenisite, genotoksisite, karsinojenesite verileri hem toksisite hem de ticari açıdan belirlenmesi gereken son noktalardır. Genetik toksikoloji testleri yeni farmasötiklerin güvenlilik değerlendirmesi için gereklidir ICH M3(R2) ve ICH

S2(R1) rehber dokümanı uygun *in vitro* ve *in vivo* testlerin ana hatlarını çizmektedir. Terapötik endikasyona bağlı olarak, herhangi bir testte pozitif bir sonuç ilaç geliştirme programını durdurabilmektedir ve klinik çalışma katılımcılarının güvenliğini sağlamak için ek testler gerekebilmektedir [242, 339]. Yapılan detaylı *in siliko* araştırmada Percepta, TEST, VegaHub ve Simulation Plus programları tetrazolato ligandının mutajeniteye neden olmadığını öngörmüştür. ProTox ise pozitif olacağı sonucunu vermiştir. SwissADME mutajenesite son noktası hakkında öngörü vermemektedir. *In siliko* toksikoloji proramlarının tetrazolato ligandı hakkında genel önörüsü mutajenik olmadığı yönündedir. Genotoksisite ve karsinojenesite için ise Percepta programı tetrazolato ligandının güvenli olduğu sonucunu verirken, VegaHub ve Simulation Plus pozitif sonuç vermiştir ancak pozitif sonuçların doğruluk oranlarının da düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durum VegaHub ve Simulation Plus programlarının veritabanlarında tetrazolato ligandına benzer bir yapının olmadığı anlamına gelmektedir. TEST, ProTox ve SwissADME ise bu konuda öngörü vermemektedir. *In siliko* toksikoloji programlarının genel kanısı tetrazolato ligandının genotoksik olmadığı yönündedir. Tez kapsamında gerçekleştirilen ve birbirini destekleyen testlerin sonuçlarında uygulanan konsantrasyonlarda da tetrazolato ligandının genotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. *In siliko* programlardan elde edilen verilerin doğruluk oranlarının düşük olması, veritabanlarında tetrazolato ligandına benzer bir yapının olmadığını gösterdiğinden tez kapsamında elde edilen verilerin, bu veritabanlarına katkı sağlama açısından önemini ortaya koymaktadır.

Klinik öncesi kardiyak güvenlik testleri, potansiyel bir kardiyotoksik tehlikenin erken belirlenmesini sağlamaktadır. Buna ek olarak, spesifik risklerin karakterize edilmesine ve kardiyotoksisite mekanizmaları hakkında veri üretilmesine yardımcı olan klinik öncesi deneyler, spesifik müdahalelerle kardiyovasküler riskin azaltılmasının değerlendirilmesi için de önemli görülmektedir [340]. Kabul görmüş bir preklinik test örneği, kanser ilacı geliştirmede rutin olarak gerçekleştirilen özel bir *in vitro* çalışma olan insan eter- à- go- go-ilişkili gen (hERG) proaritmi testidir. hERG temel olarak kardiyak miyositler, endokrin hücreler ve lenfositlerde eksprese edilmektedir [340, 341]. hERG'deki genetik bir mutasyon ölümcül bir kardiyak aritmiye neden olmaktadır. Bu nedenle ilaç araştırmalarında maddelerin hERG inhibisyonları araştırılmaktadır [341]. Ayrıca hERG, mide kanseri, kolorektal kanser, endometriyal kanser ve glioblastoma gibi çok çeşitli insan kanser türünde aşırı eksprese edilmektedir. Tümör hücresi biyolojisi ile ilgili üç ana fonksiyon hERG aktivitesine atfedilmektedir: tümör hücresi proliferasyonu, tümör hücresi invazivliği ve

tümör neoanjiyogenezi [342]. Mevcut düzenleyici kurallar, sistemik olarak tüm bileşiklerin insanda ilk maruziyetten önce hERG kanalına karşı test edilmesini gerektirmektedir [343]. Bu nedenle antikanser ilaç araştırmalarında da hERG inhibisyonu değerlendirilmektedir [344]. Percepta programı güvenilir düzeyde olmasa da ligandın inhibisyona neden olduğu sonucunu vermiştir. Simulation Plus ise negatif yani inhibe edici etkisi olmadığı sonucunu doğruluk oranı düşük biçimde vermiştir. TEST, VegaHub, ProTox ve SwissADME bu konuda öngörü yapmamaktadır. hERG inhibisyonu ilaç araştırmalarında önemli bir son nokta olması ve *in siliko* araçların tetrazolato ligandı için düşük doğrulukta sonuç vermesi tetrazolato ligandının bu konuda tekrar değerlendirilmesinin uygun olduğuna işarete etmektedir.

Kan-beyin bariyeri (BBB), merkezi sinir sistemindeki (MSS) kan damarlarını hücre dışı sıvıdan ayıran seçici bir sınırdır. BBB'nin önemli işlevlerinden biri MSS'yi ksenobiyotiklerden korumaktır. Bu nedenle, merkezi sinir sistemini hedef alan ilaçların BBB'yi geçmesi gerekir. Buna karşılık, vücudun diğer bölümlerini hedef alan ilaçlar, olası psikotropik yan etkilerden kaçınmak için BBB'yi geçmemelidir [345]. BBB'yi geçmeyen ilaçların nörotoksisiteye neden olma potansiyeli düşük olduğundan, aday ilaç molekülleri için BBB'yi geçme taraması yapılması önerilmektedir [329]. Tetrazolato ligandının BBB geçirgenliği ile ilgili yapılan *in siliko* tahmine göre Percepta, Protox, Simulation Plus düşük penetrayon sonucunu, doğruluk oranı düşük olarak verirken SwissADME penetrasyon olmadığı öngörüsünü vermiştir. TEST ve VegaHub (veri tabanında ligandımıza benzer yapıda molekül olmadığından) programları ise bu son nokta ile ilgili öngörü vermemiştir. BBB geçirgenliğinin ilaç araştırmalarında önemli bir son nokta olması ve *in siliko* araçların tetrazolato ligandı için çoğunlukla pozitif sonuç vermesi tetrazolato ligandının bu konuda tekrar değerlendirilmesinin ileri çalışmalar için planlanabileceğini düşündürmektedir.

Östrojen reseptörü aktivasyonunun hücre büyümesini teşvik ederek, kanser hücrelerinin kemoterapötik ajanlara yanıtını etkilediği bilinmektedir [346]. Klinik öncesi kanıtlar, ürotelyal karsinogenez ve kanser progresyonunun indüklenmesinde androjen reseptör sinyalinin de kritik bir rol oynadığını göstermiştir [347]. Mesane kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada androjen reseptör aktivasyonunun cisplatin direncinin gelişimi ile ilgili olduğu belirlenmiştir [347]. Ligandın östrojen reseptörlere olan ilgisini tüm programlar negatif olarak öngörmüştür. TEST ve SwissADME ise bu konuda öngörü yapmamaktadır. Androjen reseptör etkisi için de tüm programlar (TEST ve SwissADME bu konuda öngörü

vermemektedir) negatif sonuç vermiştir. Ligandın androjen reseptöre ilgisinin olmaması, direnç gelişiminin engellenmesi için bu sonucun önemli olduğunu düşündürmektedir.

P-glikoprotein (P-gp), çok çeşitli, yapısal olarak farklı ve işlevsel olarak ilişkisiz hidrofobik bileşikleri hücre dışına atabilen ATP güdümlü bir transmembran taşıyıcıdır [348]. İlk olarak Juliano ve Ling (1976) tarafından ilaca dirençli Çin hamster yumurtalık hücrelerinde bulunan, yüzey fosfoglikoproteini olarak tanımlanmıştır. Tümör hücrelerindeki ekspresyonuna ek olarak, karaciğerde hepatositlerin kanaliküler yüzeyinde, böbreklerde proksimal tübüllerin epitel hücrelerinin apikal yüzeyinde, bağırsakta kolumnar epitel hücrelerinde, plasentada epitel hücrelerinde ve beyinde kapiller endotel hücrelerinin luminal yüzeyinde lokalize olmuştur [349]. P-gp proteininin anatomik lokalizasyonu, taşıyıcının toksik ksenobiyotikleri safra, idrar ve bağırsak lümenine atarak ve beyinde birikmelerini önleyerek vücudu koruyabileceğini düşündürmektedir. Lokalizasyonu nedeniyle, P-gp insanlarda ve hayvanlarda ilaçların emilimi, dağılımı, metabolizması ve atılımı süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu durum mdr1a ve mdr1a/1b nakavt fareler kullanılarak *in vivo* olarak gösterilmiştir. İki murin P-gp'den (MDR1A veya MDR1B) birinin eksikliği, ilaç emilimi ve atılımında önemli değişikliklere neden olmaktadır [350]. Ayrıca P-gp'nin kanser ilaçlarına direnç mekanizmalarından da sorumlu olduğu bildirilmektedir. P-gp ekspresyonu kemoterapötik ilaçlara (özellikle P-gp substratları olduğu bilinenler) maruz kaldıktan sonra artmakta ve tedaviyi engellemektedir. Sonuç olarak, P-gp ilaç direncinin potansiyel bir biyobelirteci olarak görülmektedir [351]. *In siliko* değerlendirmede tetrazolato ligandının P-gp proteini için ne subsratı olduğunu ne de inhibe ettiğini göstermektedir (Percepta, VegaHub, Simulation Plus, SwissADME). TEST ve ProTox ise bu konuda öngörü vermemiştir. Kanserde direnç gelişiminde P-gp subsratı olan moleküllerin dezavantajlı olduğu bildirildiğinden tetrazolato ligandının bu konuda güvenli olduğunun *in siliko* tahminlerce öngörülmüş olması önemlidir.

Hücre zarında bulunan taşıyıcı proteinler ile ilaç moleküllerinin etkileşimi ilaç aratırmalarında hem etkinlik hem de toksisite değerlendirmesi için kıymetlidir. İlaç taşıyıcıları, ATP-bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları ve çözünen madde taşıyıcıları olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. ABC taşıyıcıları, ATPaz bağımlı birincil aktif taşıma yoluyla çıkış pompaları olarak, çözünen madde taşıyıcıları ise çoğunlukla kolaylaştırılmış difüzyon veya ikincil aktif taşıma yoluyla ilaç alım taşıyıcıları olarak hareket etmektedirler. Klinik açıdan ise yedi taşıyıcı önemsenmektedir. Bunlar: çoklu ilaç direnci 1 proteini (MDR1/ABCB1 geni

tarafından kodlanan) olarak da adlandırılan P-gp, meme kanseri direnç proteini (BCRP/ABCG2), organik anyon taşıyıcı polipeptit (OATP1B1 ve 1B3/SLCO1B1 ve 1B3), organik anyon taşıyıcı (OAT1 ve 3/SLC22A6 ve A8) ve organik katyon taşıyıcıdır (OCT2/SLC22A2). *In vitro* metabolik sonuçlar, metabolizma hücrelerin içinde gerçekleştiği için, hücre içi konsantrasyona bağlıdır. Bu hücre içi konsantrasyon sadece pasif değil aynı zamanda membranlar boyunca aktif taşıma ile de modüle edilebilmektedir [352]. Tetrazolato ligandının P-gp ile etkileşmediği önceki *in siliko* değerlendirmede belirlenmişti. Bunun yanında aktif taşıma ile ilgili öngörüler tetrazolato ligandının aktif yolla taşınmadığı yönündedir. Ancak TEST, VegaHub, ProTox bu konuda öngörü vermemiştir. Simulation Plus tetrazolato ligandının OABT1'in subsratı olduğunu ancak inhibitörü olmadığını; OABTB3'ün subsratı olduğunu ancak inhibitörü olmadığını; OAT1 ve OAT3'ün hem subsratı hem de inhibitörü olduğu; OCT2'nin ise ne subsratı ne de inhibitörü olmadığını öngörmektedir. Bu sonuç Simulation Plus öngörüsüne göre ligandın aktif taşımada rol alan proteinlerle etkileştiğini göstermektedir.

Sitokrom P450'ler (CYP'ler) hidrokarbonların hidroksilasyonu, heteroatomların oksidasyonu ve dealkilasyonu, olefin epoksidasyonu, dehidrojenasyon ve desatürasyon gibi oksidatif kimyasal dönüşümleri katalize etmektedirler. Sitokrom P450'ler, onaylanmış ilaçların ~ %75'inin sistemik klirensinden sorumludurlar ve en yüksek konsantrasyonları karaciğerde bulunmaktadır. İnsanlarda, CYP üst ailesi 18 aile ve 42 alt ailede düzenlenmiş 57 genden oluşmaktadır. İnsan ilaç metabolizmasında yer alan başlıca CYP'ler CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4 ve CYP2E1'dir [353, 354]. CYP indükleyicileri için terapötik sınıflar analjezikler, anti-enfektifler, psikotropikler, anti-konvülzanlar, kanser kemoterapötikleri, gastrointestinal ajanlar ve kardiyovasküler ajanları içermektedir. Klinik öncesi çalışmalarda, özellikle kemirgenlerle yapılan çalışmalarda, CYP indükleyicisi olan ilaçların endojen metabolizmayı değiştirebileceği ve bu durumun da subakut çalışmalarda değişen homeostazdan sorumlu olabileceği ve uzun süreli çalışmalarda karaciğer tümörlerine kadar değişen olumsuz etkilere neden olabileceği bildirilmiştir. CYP baskılayıcıları ise ilaç metabolize edici enzim indüksiyonunun yaygınlığını ve terapötik ajanlar tarafından inhibisyonunu göstermektedir. Genel olarak amaç, güçlü bir CYP inhibitörü veya indükleyicisi olmayan ve metabolizması diğer ilaçlar tarafından inhibe edilmeyen yeni bir ilaç adayı geliştirerek potansiyel ilaç-ilaç etkileşimlerinden kaçınmaktır. Bu nedenle, ilaç geliştirme sürecinin başlarında ilaç adaylarının potansiyel substratlar, indükleyiciler veya sitokrom P450 inhibitörleri olarak tanımlanması önerilmektedir [353].

*In siliko* araçların P450 inhibisyonu ve subsratlığını genel olarak değerlendiren ve CYP enzimlerini tek tek değerlendiren modülleri bulunmaktadır. Bu durum veri tabanları ile ilişkilidir. P450 inhibisyonu ve subsratlığını açısından Perceta VegaHub ve Simulation Plus programları negatif sonuç vermiştir. TEST ProTox ve SwissADME bu genel değerlendirmede sonuç vermemiştir. Tetrazolato ligandının CYP enzimleri ile tek tek etkileşimi ise *in siliko* araçlarca negatif olarak belirlenmiştir. TEST ve VegaHub bu etkileşimler için öngörü vermemiştir. Simulation plus ise CYP1A2 inhibitörü olduğu ancak subsratı olmadığı; CYP2C9'u inhibe ettiği ancak subsratı olmadığı, CYP2D6, CYP3A4 ve CYP2E1'in ne inhibitörü ne subsratı olmadığı şeklinde detaylı veri sunmuştur. Genel olarak tetrazolato ligandını CYP enzimlerinin ne inhibitörü ne de subsratıdır. *In siliko* araçların CYP emzimleri etkileşimi ile ilgili genel öngörüsü tetrazolato ligandının bu enzimlerle etkileşmediği yönündedir.

Endokrin bozucular, hormonal düzenlemeyi ve normal endokrin sistemi bozma potansiyeli olan, sonuç olarak da hayvanlarda ve insanlarda sağlığı ve üremeyi etkileyen dış kaynaklı bileşiklerdir [355]. Tiroid Reseptörα ve Tiroid Reseptörβ genleri tarafından kodlanan tiroid hormon reseptörleri, nükleer reseptör süper ailesine ait ligand bağımlı transkripsiyon faktörleridir [356]. İnsan kanserlerinde bulunan tiroid reseptör genlerinin hipermetilasyonu veya silinmesi nedeniyle tiroid reseptörlerin ekspresyonunun azalması, tiroid reseptörlerin tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir. Tiroid reseptörlerin somatik mutasyonlarının insan kanserleri ile yakın ilişkisi, tiroid reseptörlerinin normal işlevlerinin kaybının kontrolsüz büyümeye ve hücre farklılaşmasının kaybına yol açabileceği fikrini daha da desteklemektedir [357, 358]. Aberrant tiroid reseptör etkisinin yanı sıra reseptör susturma, insan kanserinde yaygın olaylardır ve tiroid reseptörler ayrıca deneysel hayvan modellerinde tümör ilerlemesinde önemli bir role sahiptir. Bu da bu reseptörlerin kanserde yeni bir terapötik hedef oluşturduğunu düşündürmektedir [356, 358]. Percepta ve ProTox araçları tetrazolato ligandının Tiroid Reseptör ile etkileşmediğini bildirmektedir. Diğer araçlar bu konuda öngörü vermemiştir. Bu durum tetrazolato ligandının tiroid reseptör ile etkileşerek kanserojenesiteye neden olmayacağına işaret etmektedir.

Organ toksisitesi kapsamında karaciğer, böbrek, akciğer, gastrointestinal ve kan toksisitesi yanında, nörötoksisite, kardiyotoksisite için değerlendirme yapılmıştır. Karaciğer, vücudun bakımı, performansı ve homeostazının düzenlenmesinde bir dizi hayati işlev görür. Hastalıklarla mücadele, besin temini, enerji sağlama ve üreme için neredeyse tüm

biyokimyasal yollarla ilgilidir. Karaciğerin başlıca işlevleri karbonhidrat, protein ve yağ metabolizması, detoksifikasyon, safra salgılanması ve vitamin depolanmasıdır. Bu nedenle, sağlıklı bir karaciğerin korunması genel sağlık için çok önemli bir faktördür [359]. Hepatotoksisite, kimyasal kaynaklı karaciğer hasarı anlamına gelmektedir. Bazı tıbbi ajanlar aşırı dozda alındığında ve hatta bazen terapötik aralıklarda verildiğinde bile karaciğere zarar verebilmektedir. Karaciğer hasarına neden olan kimyasallar hepatotoksin olarak adlandırılır. 900'den fazla ilacın karaciğer hasarına neden olduğu tespit edilmiştir ve bir ilacın piyasadan çekilmesinin en yaygın nedenidir. Kimyasallar genellikle karaciğerde anormal karaciğer enzim testlerinde belirlenebilen subklinik hasara neden olmaktadır. İlaç kaynaklı karaciğer hasarının tüm hastane başvurularının %5'inden ve tüm akut karaciğer yetmezliklerinin %50'sinden sorumlu olduğu bildirilmiştir. İdiyosenkratik ilaç reaksiyonları vakalarının yüzde 75'inden fazlası karaciğer nakli veya ölümle sonuçlanmaktadır [360]. Kemoterapötik ilaçların da hepatotoksiteye neden olduğu bildirilmektedir [361]. *In siliko* toksikoloji değerlendirmesine göre Percepta ve ProTox tetrazolato ligandının hepatotoksin olduğu, VegaHub ve Simulation Plus ise hepatoksin olmadığı öngörüsünü vermiştir. Bu öngörülerin doğruluk oranlarının ise düşük olduğu belirlenmiştir. TEST ve SwissADME ise bu konuda öngörü verememiştir. İki ayrı programın bu konuda pozitif sonuç vermesi bir sonraki deneysel adımın karaciğer toksisitesi ile ilgili testlerin yapılması şeklinde planlanmasına işaret etmektedir.

Nörotoksikoloji, kimyasal, biyolojik veya fiziksel ajanlara maruz kalmanın ardından gelişmekte olan olgun sinir sisteminin yapısı veya işlevi üzerindeki olumsuz etkilerin incelenmesidir [362]. Nörotoksisite, preklinik veya klinik geliştirme sırasında advers ilaç reaksiyonlarının ve ilacın kullanımdan kaldırılmasının başlıca nedenlerinden biridir. Terapötik alandan bağımsız olarak tüm ilaç geri çekilmelerinin (1960-1999 yılları arasında) yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. Bu durum, ilaç geliştirmenin erken aşamalarında tehlike tanımlama ve risk değerlendirmesinin iyileştirilmesinin önemini vurgulamaktadır [363]. Nörotoksisite ile ilgili sadece Simulation Plus programı tetrazolato ligandının nörotoksik olduğu öngörüsünü yapmıştır. Diğer programlar ise bu konuda öngörü vermemektedir. Bu sonuç nörotoksisite ile ilgili veri tabanlarının geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir. Tetrazolato ligandı için ise nörotoksisite verisi elde edilecek çalışmaların yapılması gerektiğini işaret etmektedir.

Böbrekler, ksenobiyotiklerin metabolizması ve eliminasyonunda görev almaktadırlar. Bu nedenle de ilaç maruziyetlerinden sıklıkla etkilenmektedirler. Maruz kalınan ksenobiyotiklerin eliminasyonu ve glomerüler süzüntüyü yoğunlaştırma sırasında böbrekler ilaca bağlı toksisiteye karşı savunmasız hale gelmektedir [364, 365]. Böbrek güvenliğini artırmak aktif bir araştırma alanıdır. İlaç geliştirmenin erken aşamalarında nefrotoksik bileşikleri güvenilir bir şekilde tanımlamak, ilaç hakkında karar verme sürecini desteklemek ve mekanizmaları yeterince karakterize etmek için stratejilere ve model sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır [366]. İlaç geliştirmenin ilerleyen aşamalarında, klinik olmayan ve klinik ortamlarda türler arasında böbrek toksisitesini izlemek için hassas translasyonel biyobelirteçlerin değeri anlaşılmaktadır [365, 367]. Percepta ve ProTox programları tetrazolato ligandının nerotoksik olduğunu öngörmektedir. Diğer programlar bu konuda öngörü vermemektedir. Bu sonuçlar böbrek toksisitesi biyobelirteçlerine dair veri tabanlarının geliştirilmesine ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Tetrazolato ligandı için ise nefrotoksisite verisi elde edilecek ek çalışmaların yapılması gerektiği anlaşılmaktadır.

Pulmoner toksisite hedef organ olarak akciğere yönelik toksisiteyi ifade etmektedir. Akciğer yüksek oranda perfüze olduğundan ve oksijenle doldurulmak üzere toplam kalp debisini aldığından, vasküler sistem yoluyla, yani emilim yolundan bağımsız olarak sistemik dolaşıma giren ksenobiyotikler tarafından da zarar görebilmektedir [368]. Farmasötikler bağlamında, ilaca bağlı akciğer hastalıklarının, advers ilaç reaksiyonlarının önemli bir alt kümesi olduğu ve en yaygın formunun, esas olarak oral ve parenteral uygulamadan kaynaklanan ilaca bağlı akciğer hastalığı olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, ilaç keşfi ve inhale tedavilerin geliştirilmesinde, akciğerlere yönelik toksisite aşılması gereken zorlu bir engel olarak tanımlanmaktadır [369]. *In siliko* araçlar tetrazolato ligandının akciğer toksisitesine neden olup olmadığı konusunda farklı öngörüler sunmuştur. Buna göre Percepta pozitif, ProTox ve Simulation Plus negatif öngörü vermiştir. TEST ve Vegahub ise bu konuda öngörü vermemiştir. Bu öngörüler genel olarak akciğer toksisitesi açısından ligandın güvenli olduğuna işaret etmektedir.

Kalp, insanlarda farmasötik bileşiklerin toksisitesinin sık görüldüğü bir bölgedir ve yeni bir ilaç geliştirirken, ilacın kardiyak yapı ve fonksiyon üzerindeki olası olumsuz etkilerinin kapsamlı bir klinik öncesi değerlendirmesinin yapılması kritik önem taşımaktadır [370]. İlaç araştırmalarında kalbe olan etkinin belirlenmesi iki önemli nedenle ilişkilendirilmektedir. Birincisi dünyada en çok ölüme kardiyovasküler hastalıklar neden olmaktadır [371]. İkincisi

ise bir ilacın piyasadan çekilmesinin ve pazarlama ruhsat onayının gecikmesinin en yaygın nedeni olarak olumsuz kardiyak yan etkilerin bildirilmesidir [372, 373]. Bu nedenler ilaç araştırmalarında ek maliyete ve zaman kaybına neden olmaktadır. Bu yüzden preklinik güvenlilik değerlendirmelerinde kardiyotoksisite çalışmaları büyük önem taşımakta ve bu alanda öngörü yapılacak yeni veri ve modeller araştırılmaktadır [374-376]. Çalışmamızda gerçekleştirilen *In siliko* öngörülerden Percepta, ProTox ve Simulation Plus tetrazolato ligandının kardiyotoksisiteye neden olmadığı öngörüsünü vermiştir. Diğer programlar bu alanda veri vermemiştir. Bu durum düşük toksisiteli ligand oluşturma amacıyla uyum sağlamaktadır.

Gastrointestinal sistem, diyet ürünleri için normal giriş ve emilim yolu olarak hizmet ettiğinden toksik maddelere doğrudan maruz kalmaktadır [377]. İlaca bağlı gastrointestinal toksisiteler klinik çalışmalarda sık görülen advers etkiler arasındadır. İlaca bağlı gastrointestinal toksisitelerin yüksek prevalansı, kısmen erken tespite izin verecek veya daha güvenli moleküllerin optimizasyonuna rehberlik edecek sağlam deneysel araçların eksikliği nedeniyle yeni ilaçlar arasında devam etmektedir [378]. İlaçlarla ilişkili gastrointestinal etkiler genellikle işlevsel nitelikte olmakla beraber çeşitlidir. Gastrointestinal sistemde oluşan en yaygın yan etkiler bulantı ve kusma, ishal, kabızlık ve gastrik ülserasyon olarak tanımlanmıştır. Bu yan etkiler hayati tehlike nedeni olmasalar da hastanın tedaviye uyumunu ve yaşam kalitesini büyük ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle, prkelinik çalışmalarda olası etkilerin belirlenmesi istenebilmektedir [379]. *In siliko* araçlardan sadece Percepta gastrointestinal sistem toksisitesi ile ilgili veri vermektedir ve ligandın sistem için toksik olduğunu öngörmüştür. Bu sonuç hem veri eksikliğini hem de ek çalışmalar ile tetrazolato ligandının gastrointestinal sistem toksisitesi açısından değerlendirilmesi gerektiğini işaret etmektedir.

Bu verilerin yanında sadece Percepta programından tetrazolato ligandı ile ilgili farklı veriler de elde edilmiştir. Program içindeki safsızlık modülü tetrazolato ligandını karsinojenesite, mutajenesite ve üreme toksisitesi bakımında ICH sınıflandırmasına göre 5. grupta (toksik olmayan) sınıflandırmıştır. Ayrıca göz ve deri için orta hassasiyette irritasyona neden olduğu; %93,7 oranında oral biyoyaralanıma sahip olduğu; pasif emilimle hücreye alınabileceğini öngörmüştür.

Tez çalışmasından elde edilen bu ilk veriler öncü preklinik değerlendirmesinde yüksek ihtimalli tokisitenin belirlenmesi, olası *in vitro* deneylerle desteklenmesi ve deneylerin planlanması için kıymetlidir.

Kanser tedavisi için ilaç geliştirme çalışmaları diğer ilaçlardan farklı olarak ampirik olarak gerçekleşmiştir. Bu maddelerin çoğu sitotoksik etki göstermekte ve bu etki maksimum tolere edilebilen dozda gerçekleşmektedir. Sitotoksik etki nedeniyle kanser ilaçlarının preklinik değerlendirmelerinde toksisite ve maksimum tolere edilen dozun belirlenmesi gerekse de özellikle kemirgen olmayan türlerde kronik toksisite çalışmalarının (birçok sitotoksik ajanın bu ortamda kullanılmayacağı düşünüldüğünde) gerekçelendirilmesi daha zor görülmektedir. Bu nedenle antikanser ilaçların geliştirilmesinde tolere edilen maksimum dozdan ziyade etkili dozun belirlenmesinin klinik çalışmalar için öncelikli parametre olarak kabul edilmesi gerektiği görüşü bulunmaktadır [380]. Günümüzde de antikanser ilaç araştırmaları için yapılması gereken preklinik güvenlilik çalışmalarını düzenleyen yönetmelikler geliştirilmiştir [210]. Tez çalışmasının bu aşamasında *in siliko* araçlardan elde edilen veriler tetrazolato ligandının bu açılardan toksik olmadığına işaret etmektedir.

*In siliko* preklinik güvenlilik değerlendirmesi organ toksisitesi dışında tetrazolato ligandının güvenli olduğuna işaret etmektedir. Ancak bu öngörülerde kesinlik değeri de büyük öneme sahiptir [381]. *In siliko* araçlar tahminlerini sahip oldukları veritabanları aracılığı ile yapmaktadırlar. Bu nedenle veritabanının özellikleri tahminin kalitesini de etkilemektedir. Düşük doğruluk oranları hakkında öngörü yapılmak istenen kimyasal yapının benzerinin veritabanında olmaması ile ilişkilendirilmektedir [176]. Tetrazolato ligandı için yapılan öngörülerde de kesinlik değerlerinin düşük olduğu görülmüştür. Bu sonuç tez kapsamında elde edilerek literatüre kazandırılan tetrazolato ligandının *in vitro* verilerinin *in siliko* araçlar için de önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, varolan sonuçlar ligandın toksisitesini düşük öngörmesi, *in vitro* çalışmalarımızla örtüşmektedir.

# 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Pt(II) bazlı ilaçlar kanser tedavilerinde sıklıkla kullanılmalarına rağmen yan etkiler ve direnç gelişimi kullanımlarını kısıtlamaktadır. FDA'dan onay alan son ilacın üzerinden 20 yıl geçmiştir ve bu süreçte faz çalışmalarını geçebilen başka bir yapıya rastlanmamıştır. Bunun yanında FDA'dan onay almamış ama farklı ülkelerin kendi regülasyon kuruluşlarınca kullanımlarına izin verilmiş ilaçlar bulunmaktadır. Bu gelişmeler ve kanser tedavisinde Pt(II) bazlı ilaçların tedavideki yeri araştırmacıların yeni aday moleküller geliştirmelerine neden olmaktadır. Yan etkiler genellikle ilaçların ayrılan gruplarından yani ligandlardan kaynaklandığından düşük toksisiteli bir ligandın Pt(II) iyonunu taşımak üzere tasarlanması önemlidir.

Cisplatinin yan etkilerinin ayrılan Cl iyonlarından kaynaklandığı anlaşıldıktan sonra, Cl iyonlarının yerine daha kararlı ve halkasal yapıda kimyasal grupların konulması ile toksisitesinin azaltılması mümkün olmuştur. Bu yaklaşım ile elde edilen sonuçlar yeni ligandların tasarımına ve sentezine de ışık tutmuştur. Bu alanda kimyasal özellikleri belirlenmiş ve farmakolojik araştırmalarda tercih edilen yapıların değerlendirilmesi kabul edilebilir bir yaklaşımdır. Bu anlamda sentezlenen etkinliği belirlenen pek çok moleküle ait çalışmanın bulunduğu bilimsel literatürden anlaşılmaktadır. Tez çalışmasına konu olan tetrazolato ligandı da farmasötik etkileri ile ilaç geliştirme çalışmalarında kullanımları tavsiye edilen iki düşük toksisiteli yapının biraraya getirilmesiyle tasarlanmıştır. İzleyen ön toksisite testleri de cisplatin ile karşılaştırmalı olarak yapıyı ileri çalışmalar için destekler bulunmuştur. Bu amaçla, kompleksin genotoksisite ve eşlik eden sitotoksisite verilerine geçmeden sentezlenen ligandın *in siliko* yaklaşımla toksik sınıfı ve ileri deneyler için doz tahminleri ile kanser ve sağlıklı hücre hatlarındaki sitotoksisite verileri alınmıştır. Tez çalışmasında da elde edilen konsantrasyon tahminleri ile insan sağlıklı primer hücrelerinde tetrazolato ligandı ve Pt (II) kompleksinin genotoksisitesi farklı mekanizmaları olan genotoksisite yöntemleri ve bu yöntemlerin sitotoksisite parametreleri ile değerlendirildiğinde Pt(II) kompleksinin cisplatine göre düşük, liganda göre yüksek genotoksisitesi bulunmuştur. Pt(II) kompleksinin sitotoksisitesi de anti-kanser aday moleküllerinde beklendiği gibi bir antikanser ilaç olan cisplatinle karşılaştırıldığında onun kadar etkili olmasa da sitotoksik bulunmuştur.

Pt(II) bazlı ilaçların genel sitotoksisite mekanizmasının DNA üzerinde oluşturdukları eklentiler olduğu bilindiğinden moleküler doking yöntemi DNA etkileşimi belirleme çalışması da tez kapsamında yapılmıştır. Doking ile gerçekleştirilen çalışmalar da farklı baz dizilimlerine sahip DNA yapıları kullanılarak hem tetrazolato ligandının hem de Pt(II) kompleksinin DNA ile etkileşimi araştırılmış hem ligand hem de kompleksin yüksek DNA affinitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Bulgular, preklinik çalışmalarının yapılmasını destekler düzeydedir. Her ne kadar sağlıklı hücre sitotoksisite seçiciliği Pt(II) kompleksi ile sağlanmamış olsa da tetrazolato ligandının düşük toksisitesinin yan etkileri maskelemek noktasında umut verici olabileceği düşünülebilir.

İlaç adaylarının preklinik güvenlilik değerlendirilmesinde kullanımı giderek yaygınlaşan ve desteklenen *in siliko* araçlar ile tetrazolato ligandının detaylı toksikolojik verilerinin de tez kapsamında elde edilmesi değerlidir. Bu sonuçlar aday moleküller ile ilgili bir sonraki adımı tasarlamada önemli *in siliko* ve *in vitro* veriler sunarak alternatif yöntemlerin kullanımını, bilimsel literatürün zenginleştirilmesini ve *in siliko* çok sayıdaki araç için de güçlendirici olmuştur. Tetrazolato ligandı için *in siliko* araçların tahminlerinin düşük doğrulukta olduğu da göz önünde bulundurulduğunda bulgular çok değerli kaynak oluşturacaktır. *In siliko* araçlar veri tabanlarının kalitesi doğrultusunda gerçeğe yakın veri üretebilmektedir bu durum tez kapsamında elde edilen verilerin önemini arttırmaktadır.

Bir aday ilaç molekülünün ilaca dönüşmesi 10 yıllar sürebilen preklinik ve klinik dönemleri kapsayan etkinlik, güvenlik araştırmalarını *in vitro*dan *in vivo*ya ve faz çalışmalarına kadar içeren girift ve uzun bir yoldur. Bu sürecin başında preklinik veriler için *in siliko* yaklaşımları kullanmak, *in vitro* yöntemlerle devam etmek günümüzde kabul gören alternatif metodlardan faydalanmak anlamında çok önemli olduğu gibi olası *in vivo* çalışmalara geçmeden önce de doğru kararlar alabilmeyi sağlamaktadır. Şu ana kadar elde edilen veriler ligand ve kompleks moleküllerin umut verici olduğunu, cisplatin sonrası önerilen diğer moleküllerle çok detaylı karşılaştırmaların yapılmasının gerekliliğini, molekül yapısında olası modifikasyonların gerekli olup olmadığının irdelenmesinin önemini göstermektedir. Bulgular, literatüre de kazandırılarak pek çok araştırmacı ve toksisite yaklaşımı için katkı verecektir.

Tetrazolato ligandı için *in siliko* veriler düşük toksisite amacını doğrulamaktadır. Bu anlamda tetrazolato ligandının yeni yapılarda da kullanımı mümkün olabilecektir. Uzun ve zahmetli bir yol olan ilaç geliştirme çalışmaları için önerdiğimiz moleküller üzerinde yapılan çalışmalar ilk adım olarak değerlendirilebilir. Çalışma kapsamında elde edilen veriler hem çalışmanın ilerletilmesine hem yeni moleküllerin tasarımına ışık tutacaktır.

# KAYNAKLAR


1. Martinho, N., Santos, T. C. B., Florindo, H. F. and Silva, L. C. (2019). Cisplatin-membrane interactions and their influence on platinum complexes activity and toxicity. *Frontiers in Physiology*, 9, 1898.

2. Murray, D., Mirzayans, R. (2020). Cellular responses to platinum-based anticancer drugs and UVC: Role of p53 and implications for cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5766.

3. DeVita, V. T., Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research*, 68(21), 8643-8653.

4. İnternet: Amjad, M. T., Chidharla, A., Kasi, A. (2021). Cancer chemotherapy. *StatPearls*. Web: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564367/, Son Erişim Tarihi: 26/03/2024.

5. Amjad, M. T., Chidharla, A., Kasi, A. (2022). *Cancer Chemotherapy*: *In StatPearls*. New York: StatPearls Publishing, 87-92.

6. Rosenberg, B., Vancamp, L., Trosko, J. E. and Mansour, V. H. (1969). Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*, 222(5191), 385-386.

7. Chaudhary, N. K., Guragain, B., Chaudhary, S. K. and Mishra, P. (2021). Schiff base metal complex as a potential therapeutic drug in medical science: A critical review. *Bibechana*, 18(1), 214-230.

8. Oun, R., Moussa, Y. E., Wheate, N. J. (2018). The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Transactions*, 47(19), 6645-6653.

9. Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem*, 88, 46-82.

10. Popova, E. A., Trifonov, R. E., Ostrovskii, V. A. (2019). Tetrazoles for biomedicine. *Russian Chemical Reviews*, 88(6), 644.

11. Kumar, J., Rai, A., Raj, V. (2017). A comprehensive review on the pharmacological activity of schiff base containing derivatives. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 1(3), 88-102.

12. Faraj, E. M., Jumaa, F. H. (2021). Preparation, diagnostics and biological evaluation of new Schiff base and tetrazole derivatives. *Materials Today: Proceedings*, 48(8), 3549-3557.

13. Nath, B. D., Islam, M. M., Karim, M. R., Rahman, S., Shaikh, M. A. A., Georghiou, P. E. and Menelaou, M. (2022). Recent progress in metal-incorporated acyclic schiff-base derivatives: biological aspects. *ChemistrySelect*, 7(14), e202104290.

14. Mushtaq, I., Ahmad, M., Saleem, M. and Ahmed, A. (2024). Pharmaceutical significance of Schiff bases: An overview. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(1), 16.

15. Shekhar, S., Khan, A. M., Sharma, S., Sharma, B. and Sarkar, A. (2022). Schiff base metallodrugs in antimicrobial and anticancer chemotherapy applications: a comprehensive review. *Emergent Materials*, 5, 279–293.

16. Saritha, T. J., Metilda, P. (2021). Synthesis, Spectroscopic characterization and biological applications of some novel Schiff base transition metal (II) complexes derived from Curcumin moiety. *Journal of Saudi Chemical Society*, 5, 101245.

17. Serebryanskaya, T. V., Yung, T., Bogdanov, A. A., Shchebet, A., Johnsen, S. A., Lyakhov, A. S., Ivashkevich, L. S., Ibrahimava, Z. A., Garbuzenco, T. S. and Kolesnikova, T. S. (2013). Synthesis, characterization, and biological evaluation of new tetrazole-based platinum (II) and palladium (II) chlorido complexes—Potent cisplatin analogues and their trans isomers. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 120, 44-53.

18. Zhang, J., Wang, S., Ba, Y. and Xu, Z. (2019). Tetrazole hybrids with potential anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178, 341-351.

19. Yuan, Y., Li, M., Apostolopoulos, V., Matsoukas, J., Wolf, W. M., Blaskovich, M. A., Bojarska, J. and Ziora, Z. M. (2024). Tetrazoles: A multi-potent motif in drug design. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 116870.

20. Topaktaş, M., İstifli, E. (2022). Kısa süreli genotoksisite testleri ve genotoksisitede bilgisayar destekli in siliko moleküler kenetleme ve moleküler dinamik yaklaşımlar. F. Ünal ve D. Yüzbaşıoğlu (Eds.), *Genetik Toksikoloji*. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık, 1-29.

21. Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104.

22. İnternet: OECD. (2016). *Test no: 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test*. Web: https://www.oecd.org/en/publications/test-no-473-in-vitro-mammalian-chromosome-aberration-test_9789264071261-en.html, Son Erişim Tarihi: 26/04/2024.

23. Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191.

24. Marques, L., Costa, B., Pereira, M., Silva, A., Santos, J., Saldanha, L., Silva, I., Magalhães, P., Schmidt, S. and Vale, N. (2024). Advancing precision medicine: A review of innovative In Silico approaches for drug development, clinical pharmacology and personalized healthcare. *Pharmaceutics*, 16(3), 332.

25. Jeyasingh, J. R., Glory, J. I. (2024). The emergence of in-silico models in drug target interaction system: a comprehensive review. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 21(1), 11.

26. Madden, J. C., Enoch, S. J., Paini, A. and Cronin, M. T. (2020). A review of in silico tools as alternatives to animal testing: principles, resources and applications. *Alternatives to Laboratory Animals*, 48(4), 146-172.

27. Stanzione, F., Giangreco, I., Cole, J. C. (2021). Use of molecular docking computational tools in drug discovery. *Progress in Medicinal Chemistry*, 60, 273-343.

28. Sharif Ezzaz, A. (2024). *A review on principles of molecular docking and its application in drug discovery*. Master Thesis, Brac University, 45-52.

29. Sahu, Nayak, A. K., Hailemeskel, B. and Eyupoglu, O. E. (2024). Exploring recent updates on molecular docking: Types, method, application, limitation & future prospects. *International Journal of Pharmaceutical Research and Allied Sciences*, 13(2-2024), 24-40.

30. Doke, S. K., Dhawale, S. C. (2015). Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3), 223-229.

31. Balls, M., (2024). *A History of the Development of Alternatives to Animals in Research and Testing*. London, England: Sage Publications, 85-92.

32. Didziapetris, R., Reynolds, D. P., Japertas, P., Zmuidinavicius, D. and Petrauskas, A. (2006). In silico technology for identification of potentially toxic compounds in drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, 2(2), 95-103.

33. Djukić-Ćosić, D., Baralić, K., Jorgovanović, D., Živančević, K., Javorac, D., Stojilković, N., Radović, B., Marić, D., Ćurčić, M. and Djordjević, A. B. (2021). In silico toxicology methods in drug safety assessment. *Archives of Pharmacy*, 71(Notebook 4), 257-278.

34. Raies, A. B., Bajic, V. B. (2016). In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 6(2), 147-172.

35. Parthasarathi, R., Dhawan, A. (2018). In silico approaches for predictive toxicology. In *In Vitro Toxicology*. New York: Elsevier, 91-109.

36. Chatterjee, A. (2024). Computational methods and tools for sustainable and green approaches in drug discovery. In *Green Approaches in Medicinal Chemistry for Sustainable Drug Design*. New York: Elsevier, 603-616.

37. Poongavanam, V., Ramaswamy, V. (2024). *Computational Drug Discovery: Methods and Applications*. New York: John Wiley & Sons, 46-87.

38. İnternet: GLOBOCAN. (2022). *Statistics at a glance, 2022*. Web: https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/900-world-fact-sheet.pdf, Son Erişim Tarihi: 26/07/2024.

39. İnternet: WHO. (2021). *Latest Global Cancer Data: Cancer Burden Rises to 19.3 Million New Cases and 10.0 Million Cancer Deaths in 2020* Web: https://www.iarc.who.int/featured-news/latest-global-cancer-data-cancer-burden-rises-to-19-3-million-new-cases-and-10-0-million-cancer-deaths-in-2020/, Son Erişim Tarihi: 18/07/2024.

40. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 71(3), 209-249.

41. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 68(6), 394-424.

42. Zhang, Q., Kuang, G., Zhang, L. and Zhu, Y. (2023). Nanocarriers for platinum drug delivery. *Biomedical Technology*, 2, 77-89.

43. El-Hussein, A., Manoto, S. L., Ombinda-Lemboumba, S., Alrowaili, Z. A. and Mthunzi-Kufa, P. (2021). A review of chemotherapy and photodynamic therapy for lung cancer treatment. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 21(2), 149-161.

44. Peyrone, M. (1844). Ueber die einwirkung des ammoniaks auf platinchlorür. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 51(1), 1-29.

45. Tchounwou, P. B., Dasari, S., Noubissi, F. K., Ray, P. and Kumar, S. (2021). Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy. *Journal of Experimental Pharmacology*, 13, 303.

46. S Matos, C., LMB de Carvalho, A., P Lopes, R. and PM Marques, M. (2012). New strategies against prostate cancer–Pt (II)-based chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry*, 19(27), 4678-4687.

47. Imran, M., Ayub, W., Butler, I. S. (2018). Photoactivated platinum-based anticancer drugs. *Coordination Chemistry Reviews*, 376, 405-429.

48. Štarha, P., Křikavová, R. (2024). Platinum (IV) and platinum (II) anticancer complexes with biologically active releasable ligands. *Coordination Chemistry Reviews*, 501, 215578.

49. Rosenberg, B. (1980). Cisplatin: Its history and possible mechanisms of action. In W.P. Archie, T.C. Stanley, and K.C. Stephen (Eds.), *Cisplatin Current Status and New Developments*. New York: Academic Press, 9-20.

50. Rottenberg, S., Disler, C., Perego, P. (2021). The rediscovery of platinum-based cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 21(1), 37-50.

51. Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), 573-584.

52. Bosman, I., Kalayda, G. V. (2016). Platinum Complexes. In M. Schwab (Ed.), *Encyclopedia of Cancer*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1-6.

53. Zhang, C., Xu, C., Gao, X. and Yao, Q. (2022). Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. *Theranostics*, 12(5), 2115.

54. Kolli, R. (2013). *Effect of leaving ligands of platinum (II) diamine complexes on DNA and protein residues*. Master Thesis, Western Kentucky University Masters Theses & Specialist Projects, 1268.

55. Dasari, S., Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364-378.

56. Buß, I., Jaehde, U. (2009). Platinum Complexes. In M. Schwab (Ed.), *Encyclopedia of Cancer*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2358-2363.

57. Shruthi, S., Bhasker Shenoy, K. (2024). Cisplatin resistance in cancer therapy: causes and overcoming strategies. *Chemistry Select*, 9(25), e202401449.

58. Tang, C., Livingston, M. J., Safirstein, R. and Dong, Z. (2023). Cisplatin nephrotoxicity: new insights and therapeutic implications. *Nature Reviews Nephrology*, 19(1), 53-72.

59. Marzano, C., Bettio, F., Baccichetti, F., Trevisan, A., Giovagnini, L. and Fregona, D. (2004). Antitumor activity of a new platinum (II) complex with low nephrotoxicity and genotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 148(1-2), 37-48.

60. Sinani, D., Adle, D. J., Kim, H. and Lee, J. (2007). Distinct mechanisms for Ctr1-mediated copper and cisplatin transport. *Journal of Biological Chemistry*, 282(37), 26775-26785.

61. Santabarbara, G., Maione, P., Rossi, A. and Gridelli, C. (2016). Pharmacotherapeutic options for treating adverse effects of Cisplatin chemotherapy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 17(4), 561-570.

62. Price, P. M., Safirstein, R. L., Megyesi, J. (2004). Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 286(2), F378-F384.

63. Arany, I., Megyesi, J. K., Kaneto, H., Price, P. M. and Safirstein, R. L. (2004). Cisplatin-induced cell death is EGFR/src/ERK signaling dependent in mouse proximal tubule cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 287(3), F543-F549.

64. Francescato, H. D., Costa, R. S., Júnior, F. B. and Coimbra, T. M. (2007). Effect of JNK inhibition on cisplatin-induced renal damage. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 22(8), 2138-2148.

65. Laurell, G., Ekborn, A., Viberg, A. and Canlon, B. (2007). Effects of a single high dose of cisplatin on the melanocytes of the stria vascularis in the guinea pig. *Audiology and Neurotology*, 12(3), 170-178.

66. Hellberg, V., Gahm, C., Liu, W., Ehrsson, H., Rask-Andersen, H. and Laurell, G. (2015). Immunohistochemical localization of OCT2 in the cochlea of various species. *The Laryngoscope*, 125(9), E320-E325.

67. More, S. S., Akil, O., Ianculescu, A. G., Geier, E. G., Lustig, L. R. and Giacomini, K. M. (2010). Role of the copper transporter, CTR1, in platinum-induced ototoxicity. *Journal of Neuroscience*, 30(28), 9500-9509.

68. Chattaraj, A., Syed, M. P., Low, C. A. and Owonikoko, T. K. (2023). Cisplatin-Induced Ototoxicity: A Concise Review of the Burden, Prevention, and Interception Strategies. *JCO Oncology Practice*, OP. 22.00710.

69. Mert, H., Kerem, Ö., Mıs, L., Yıldırım, S. and Mert, N. (2024). Effects of protocatechuic acid against cisplatin-induced neurotoxicity in rat brains: an experimental study. *International Journal of Neuroscience*, 134(7), 725-734.

70. Ning, C., Yan, Y., Wang, Y., Li, R., Liu, W., Qiu, L., Sun, L. and Yang, Y. (2024). Research trends on chemotherapy induced nausea and vomiting: a bibliometric analysis. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1369442.

71. Chen, S.-H., Chang, J.-Y. (2019). New insights into mechanisms of cisplatin resistance: from tumor cell to microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4136.

72. Surowiak, P., Materna, V., Kaplenko, I., Spaczyński, M., Dietel, M., Lage, H. and Zabel, M. (2005). Augmented expression of metallothionein and glutathione S-transferase pi as unfavourable prognostic factors in cisplatin-treated ovarian cancer patients. *Virchows Archiv*, 447, 626-633.

73. Rocha, C. R. R., Silva, M. M., Quinet, A., Cabral-Neto, J. B. and Menck, C. F. M. (2018). DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics*, 73(suppl 1), e478s.

74. Bouwman, P., Jonkers, J. (2012). The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nature Reviews Cancer*, 12(9), 587-598.

75. Chen, S. H., Kuo, C. C., Li, C. F., Cheung, C. H. A., Tsou, T. C., Chiang, H. C., Yang, Y. N., Chang, S. L., Lin, L. C. and Pan, H. Y. (2015). O6-methylguanine DNA methyltransferase repairs platinum-DNA adducts following cisplatin treatment and predicts prognoses of nasopharyngeal carcinoma. *International Journal of Cancer*, 137(6), 1291-1305.

76. Tannock, I. F., Lee, C. M., Tunggal, J. K., Cowan, D. S. and Egorin, M. J. (2002). Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 8(3), 878-884.

77. Ouzon-Shubeita, H., Baker, M., Koag, M.-C. and Lee, S. (2019). Structural basis for the bypass of the major oxaliplatin–DNA adducts by human DNA polymerase η. *Biochemical Journal*, 476(4), 747-758.

78. Zhou, J., Kang, Y., Chen, L., Wang, H., Liu, J., Zeng, S. and Yu, L. (2020). The drug-resistance mechanisms of five platinum-based antitumor agents. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 343.

79. Martinho, N., Santos, T. C., Florindo, H. F. and Silva, L. C. (2019). Cisplatin-membrane interactions and their influence on platinum complexes activity and toxicity. *Frontiers in Physiology*, 9, 1898.

80. İnternet: FDA. (2004). *Drug Approval Package*. Web: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2004/021492_s002_EloxatinTOC.cfm, Son Erişim Tarihi: 26/08/2024.

81. İnternet: FDA. (1989). *Drug Approval Package*. Web: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=019880, Son Erişim Tarihi: 26/08/2024.

82. Peng, K., Liang, B.-B., Liu, W. and Mao, Z.-W. (2021). What blocks more anticancer platinum complexes from experiment to clinic: Major problems and potential strategies from drug design perspectives. *Coordination Chemistry Reviews*, 449, 214210.

83. Shahid, F., Farooqui, Z., Khan, F. (2018). Cisplatin-induced gastrointestinal toxicity: An update on possible mechanisms and on available gastroprotective strategies. *European Journal of Pharmacology*, 827, 49-57.

84. Famurewa, A. C., Mukherjee, A. G., Wanjari, U. R., Sukumar, A., Murali, R., Renu, K., Vellingiri, B., Dey, A. and Gopalakrishnan, A. V. (2022). Repurposing FDA-approved drugs against the toxicity of platinum-based anticancer drugs. *Life Sciences*, 120789.

85. Liu, G., Gao, J., Ai, H. and Chen, X. (2013). Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles. *Small*, 9(9-10), 1533-1545.

86. Liao, L., Tang, J., Hong, Z., Jiang, W., Li, Y., Kong, L., Han, K., Hou, Z., Zhang, C. and Zhou, C. (2024). The effects of oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy in high-risk stage II colon cancer with mismatch repair-deficient: a retrospective study. *BMC Cancer*, 24(1), 164.

87. O'Dowd, P. D., Sutcliffe, D. F., Griffith, D. M. (2023). Oxaliplatin and its derivatives–An overview. *Coordination Chemistry Reviews*, 497, 215439.

88. Wang, F.-Y., Huang, K.-B., Feng, H.-W., Chen, Z.-F., Liu, Y.-N. and Liang, H. (2018). New Platinum (II) agent induces bimodal death of apoptosis and autophagy against A549 cancer cell. *Free Radical Biology and Medicine*, 129, 418-429.

89. Montana, A. M., Batalla, C. (2009). The rational design of anticancer platinum complexes: the importance of the structure-activity relationship. *Current Medicinal Chemistry*, 16(18), 2235-2260.

90. Rosenberg, B. (1999). Platinum complexes for the treatment of cancer: why the search goes on. In *Cisplatin.* New York: CNC Press, 1-27.

91. Reedijk, J. (1987). The mechanism of action of platinum antitumor drugs. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), 181-192.

92. Lumme, P., Elo, H., Jänne, J. (1984). Antitumor activity and metal complexes of the first transition series. Trans-bis (salicylaldoximato) copper (II) and related copper (II) complexes, a novel group of potential antitumor agents. *Inorganica Chimica Acta*, 92(4), 241-251.

93. Divya, K., Pinto, G. M., Pinto, F. A. (2017). Application of metal complexes of Schiff bases as an antimicrobial drug: a review of recent works. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 9(3), 27-30.

94. Faraj, E. M., Jumaa, F. H. (2021). Preparation, diagnostics and biological evaluation of new Schiff base and tetrazole derivatives. *Materials Today: Proceedings*, 8, 35-38.

95. Sun, Y., Lu, Y., Bian, M., Yang, Z., Ma, X. and Liu, W. (2021). Pt (II) and Au (III) complexes containing Schiff-base ligands: A promising source for antitumor treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 211, 113098.

96. Abd-Elzaher, M. M., Labib, A. A., Mousa, H. A., Moustafa, S. A., Ali, M. M. and El-Rashedy, A. A. (2016). Synthesis, anticancer activity and molecular docking study of Schiff base complexes containing thiazole moiety. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(1), 85-96.

97. Divya, K., Pinto, G. M., Pinto, A. F. (2017). Application of metal complexes of Schiff bases as an antimicrobial drug: a review of recent works. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 9(3), 27-30.

98. Shekhar, S., Khan, A. M., Sharma, S., Sharma, B. and Sarkar, A. (2021). Schiff base metallodrugs in antimicrobial and anticancer chemotherapy applications: a comprehensive review. *Emergent Materials*, 1-15.

99. Saritha, T. J., Metilda, P. (2021). Synthesis, Spectroscopic characterization and biological applications of some novel Schiff base transition metal (II) complexes derived from Curcumin moiety. *Journal of Saudi Chemical Society*, 101245.

100. Ebosie, N. P., Ogwuegbu, M. O. C., Onyedika, G. O. and Onwumere, F. C. (2021). Biological and analytical applications of Schiff base metal complexes derived from salicylidene-4-aminoantipyrine and its derivatives: a review. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 1-31.

101. Kajal, A., Bala, S., Kamboj, S., Sharma, N. and Saini, V. (2013). Schiff bases: a versatile pharmacophore. *Journal of Catalysts*, 2013, 46-52.

102. Fabbrizzi, L. (2020). Beauty in Chemistry: Making Artistic Molecules with Schiff Bases. *The Journal of Organic Chemistry*, 85(19), 12212-12226.

103. Chen, H., Hall, S., Zheng, B. and Rhodes, J. (1997). Potentiation of the immune system by Schiff base-forming drugs: mechanism of action and therapeutic potential. *Biodrugs*, 7, 217-231.

104. Ji, S., Shao, H., Han, Q., Seiler, C. L. and Tretyakova, N. Y. (2017). Reversible DNA–protein cross-linking at epigenetic DNA Marks. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(45), 14130-14134.

105. Leyva-Ramos, S., Cardoso-Ortiz, J. (2021). Recent developments in the synthesis of tetrazoles and their pharmacological relevance. *Current Organic Chemistry*, 25(3), 388-403.

106. Popova, E. A., Trifonov, R. E., Ostrovskii, V. A. (2019). Tetrazoles for biomedicine. *Russian Chemical Reviews*, 88(6), 644.

107. Malik, M. A., Wani, M. Y., Al-Thabaiti, S. A. and Shiekh, R. A. (2014). Tetrazoles as carboxylic acid isosteres: chemistry and biology. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 78, 15-37.

108. Mihina, J. S., Herbst, R. M. (1950). The reaction of nitriles with hydrazoic acid: Synthesis of monosubstituted tetrazoles. *The Journal of Organic Chemistry*, 15(5), 1082-1092.

109. Nasrollahzadeh, M., Sajjadi, M., Ghafuri, H., Bidgoli, N. S. S. i., Pombeiro, A. J. L. and Hazra, S. (2021). Platinum and palladium complexes with tetrazole ligands: Synthesis, structure and applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 446, 214132.

110. Tawi, A. M. A. A.-Z., jassim Mohammad, H. A., Sahib, A. A. A. A. and Mahdi, Z. M. A. (2024). Tetrazole Anticancer and Antibodies. *Innovative: International Multidisciplinary Journal of Applied Technology (2995-486X)*, 2(7), 91-96.

111. Shiju, C., Arish, D., Bhuvanesh, N. and Kumaresan, S. (2015). Synthesis, characterization, and biological evaluation of Schiff base–platinum (II) complexes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 145, 213-222.

112. Gupta, B., Kumari, A., Belwal, S., Singh, R. V. and Fahmi, N. (2020). Synthesis, characterization of platinum (II) complexes of Schiff base ligands and evaluation of cytotoxic activity of platinum nanoparticles. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 50(10), 914-925.

113. Uemura, M., Yoshikawa, Y., Yoshikawa, K., Sato, T., Mino, Y., Chikuma, M. and Komeda, S. (2013). Second-and higher-order structural changes of DNA induced by antitumor-active tetrazolato-bridged dinuclear platinum (II) complexes with different types of 5-substituent. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 127, 169-174.

114. Imai, R., Komeda, S., Shimura, M., Tamura, S., Matsuyama, S., Nishimura, K., Rogge, R., Matsunaga, A., Hiratani, I. and Takata, H. (2016). Chromatin folding and DNA replication inhibition mediated by a highly antitumor-active tetrazolato-bridged dinuclear platinum (II) complex. *Scientific Reports*, 6(1), 1-14.

115. Bhandare, S. D. (2024). Deciphering the mechanisms of carcinogens: Unravelling the pathways of cancer initiation and progression: An insight into DNA damage, genotoxicity, and epigenetic changes. *Journal of Toxicological Studies*, 2(1), 1202-1202.

116. İnternet: UN Library (2021). *Globally Harmonized System of Classifcation and Labelling of Chemicals (GHS)—Ninth revised edition*. New York and Geneva. Web: https://www.un-ilibrary.org/content/periodicals/24121576, Son Erişim Tarihi: 26/08/2024.

117. Menz, J., Götz, M. E., Gündel, U., Gürtler, R., Herrmann, K., Hessel-Pras, S., Kneuer, C., Kolrep, F., Nitzsche, D. and Pabel, U. (2023). Genotoxicity assessment: opportunities, challenges and perspectives for quantitative evaluations of dose–response data. *Archives of Toxicology*, 97(9), 2303-2328.

118. Choudhuri, S., Kaur, T., Jain, S., Sharma, C. and Asthana, S. (2021). A review on genotoxicity in connection to infertility and cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 345, 109531.

119. İnternet: ICH. (2011). *Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use*. Web: https://database.ich.org/sites/default/files/S2_R1_Guideline.pdf, Son Erişim Tarihi: 18/06/2024.

120. İnternet: EMA. (2012). *ICH guideline S2 (R1) on genotoxicity testing and datainterpretation for pharmaceuticals intended for humanuse*. Web: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-s2-r1-genotoxicity-testing-and-data-interpretation-pharmaceuticals-intended-human-use-step-5_en.pdf, Son Erişim Tarihi: 18/06/2024.

121. İnternet: EMA, E. M. A. (2023). *ICH M7 Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk - Scientific guideline*. Web: https://www.ema.europa.eu/en/ich-m7-assessment-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit-potential-carcinogenic-risk-scientific-guideline, Son Erişim Tarihi: 18/06/2024.

122. Boveri, T. (1914). *Zur frage der entstehung maligner tumoren*. New York: Fischer, 88-92.

123. Nowell, P. C., Hungerford, D. A. (1961). Chromosome studies in human leukemia. II. Chronic granulocytic leukemia. *Journal of the National Cancer Institute*, 27(5), 1013-1035.

124. Nowell, P. C. (2007). Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(8), 2033-2035.

125. Caspersson, T. (1968). Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Experimental Cell Research*, 49(1), 219-22.

126. Rowley, J. D. (1973). A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 243(5405), 290-293.

127. Obe, G. (2007). *Chromosomal alterations: methods, results and importance in human health*. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 88-93.

128. İnternet: OECD. (2016). *Test No. 487: In vitro mammalian cell micronucleus test*. Web: https://www.oecd.org/en/publications/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264264861-en.html, Son Erişim Tarihi: 26/08/2024.

129. Ünal, F., Saygılı, Y., Akbaş, E. (2022). Kuyruklu yıldız/komet testi. F. Ünal ve D. Yüzbaşıoğlu (Eds.), *Genetik Toksikoloji*. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım, 313-340.

130. Jain, A. K., Singh, D., Dubey, K., Maurya, R. and Pandey, A. K. (2018). Chromosomal aberrations. In *Mutagenicity: Assays and Applications*. New York: Elsevier, 69-92.

131. İla, H., B., Husunet, M., T. (2022). Kromozom anormallikleri testi. F. Ünal ve D. Yüzbaşıoğlu (Eds.), *Genetik Toksikoloji*. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım, 153-179.

132. Tsuboi, K., Sakae, T., Gerelchuluun, A. (2020). *Proton beam radiotherapy: physics and biology*. New York: Springer, 46-93.

133. Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I.-L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S. and Lazutka, J. (2006). Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600(1-2), 37-45.

134. Cartus, A., Schrenk, D. (2017). Current methods in risk assessment of genotoxic chemicals. *Food and Chemical Toxicology*, 106, 574-582.

135. Guo, X., Ni, J., Dai, X., Zhou, T., Yang, G., Xue, J. and Wang, X. (2018). Biphasic regulation of spindle assembly checkpoint by low and high concentrations of resveratrol leads to the opposite effect on chromosomal instability. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 825, 19-30.

136. Salmaninejad, A., Ilkhani, K., Marzban, H., Navashenaq, J. G., Rahimirad, S., Radnia, F., Yousefi, M., Bahmanpour, Z., Azhdari, S. and Sahebkar, A. (2021). Genomic instability in cancer: Molecular mechanisms and therapeutic potentials. *Current pharmaceutical design*, 27(28), 3161-3169.

137. Raj, S. G., Rajitha, V. (2024). Assessment of genotoxic instability markers in peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients: a case control study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 42(3), 1559-1563.

138. Erikel, E., Yuzbasioglu, D., Unal, F. (2023). A study on Amygdalin's genotoxicological safety and modulatory activity in human peripheral lymphocytes in vitro. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 64(5), 291-308.

139. Roussel, C., Witt, K. L., Shaw, P. B. and Connor, T. H. (2019). Meta-analysis of chromosomal aberrations as a biomarker of exposure in healthcare workers occupationally exposed to antineoplastic drugs. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 781, 207-217.

140. Abbas, T., Keaton, M. A., Dutta, A. (2013). Genomic instability in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3), a012914.

141. Chacón, C. F., González, E. C. L., Poletta, G. L. (2021). Biomarkers of geno-and cytotoxicity in the native broad-snouted caiman (Caiman latirostris): Chromosomal aberrations and mitotic index. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 867, 503353.

142. Rojas, E., Herrera, L. A., Sordo, M., Gonsebatt, M. E., Montero, R., Rodriguez, R. and Ostrosky-Wegman, P. (1993). Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anti-Cancer Drugs*, 4(6), 637-640.

143. Ferreira-Lucena, L. R., Xavier, A. I. S. F., Netto, A. M., Magnata, S., Siqueira Lima, G. and Amaral, A. (2024). Extending culture time to improve Mitotic Index for cytogenetic dosimetry. *International Journal of Radiation Biology*, 3, 1-12.

144. Yuzbasioglu, D., Mamur, S., Avuloglu-Yilmaz, E., Erikel, E., Celebi-Keskin, A. and Unal, F. (2021). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects of exopolysaccharide pullulan in human lymphocytes in vitro. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 870, 503391.

145. Yüzbaşıoğlu, D., Avuloglu Yilmaz, E. (2022). Mikronükleus testi. F. Ünal ve D. Yüzbaşıoğlu (Eds.), *Genetik Toksikoloji*. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım, 219-249.

146. Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C. and Fenech, M. (2011). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*, 26(1), 93-100.

147. Cakmak, G. D., Schins, R. P., Shi, T., Fenoglio, I., Fubini, B. and Borm, P. J. (2004). In vitro genotoxicity assessment of commercial quartz flours in comparison to standard DQ12 quartz. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 207(2), 105-113.

148. Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S. and Barale, R. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28(3), 625-631.

149. Wultsch, G., Nersesyan, A., Kundi, M., Fenech, M., Eibensteiner, F., Mišík, M., Krupitza, G., Ferk, F. and Knasmüller, S. (2024). Use of micronucleus cytome assays with buccal cells for the detection of genotoxic effects: a systematic review and meta-analysis of occupational exposures to metals. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 108510.

150. Phillips, D. H., Arlt, V. M. (2009). Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology: Volume 1: Molecular Toxicology*, 87-110.

151. Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A., Surralles, J., Crott, J., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D., Tucker, J. D. and Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125-132.

152. Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600(1-2), 58-66.

153. Demircigil, G. C., Coskun, E., Vidinli, N., Erbay, Y., Yilmaz, M., Cimrin, A., Schins, R. P., Borm, P. J. and Burgaz, S. (2010). Increased micronucleus frequencies in surrogate and target cells from workers exposed to crystalline silica-containing dust. *Mutagenesis*, 25(2), 163-169.

154. Møller, P., Azqueta, A., Boutet-Robinet, E., Koppen, G., Bonassi, S., Milić, M., Gajski, G., Costa, S., Teixeira, J. P. and Pereira, C. C. (2020). Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. *Nature Protocols*, 15(12), 3817-3826.

155. Erikel, E., Yuzbasioglu, D., Unal, F. (2020). Genotoxic and antigenotoxic potential of amygdalin on isolated human lymphocytes by the comet assay. *Journal of Food Biochemistry*, 44(10), e13436.

156. Rydberg, B., Johanson, K. J. (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In *DNA repair mechanisms*. New York: Elsevier, 465-468.

157. Ostling, O., Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 123(1), 291-298.

158. Collins, A. R. (2002). The comet assay: principles, applications, and limitations. *In Situ Detection of DNA Damage: Methods and Protocols*. New York: Elsevier, 163-177.

159. Azqueta, A., Muruzabal, D., Boutet-Robinet, E., Milic, M., Dusinska, M., Brunborg, G., Møller, P. and Collins, A. R. (2019). Technical recommendations to perform the alkaline standard and enzyme-modified comet assay in human biomonitoring studies. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 843, 24-32.

160. İnternet: EC, E. C. (2013). *Ban on Animal Testing*. Web: https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/animal-testing_en, Son Erişim Tarihi: 16/06/2024.

161. İnternet: EC, E. C. (2024). *Hayvan testine alternatifler için AB Referans Laboratuvarı*. Web: https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam, Son Erişim Tarihi: 16/06/2024.

162. İnternet: EC, E. C. (2024). *Questions and Answers: Animal testing and cosmetics"*. . Web: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/MEMO_13_188, Son Erişim Tarihi: 16/06/2024.

163. İnternet: EPAA. (2020). *Draft EPAA Action Programme 2021-2025*. Web: file:///C:/Users/Fatma/Downloads/Action%20Programme%202021%202025%20adopted%2023%20Sept%202020.pdf, Son Erişim Tarihi: 16/06/2024.

164. Müller, N. D. (2024). Phase-out planning for animal experimentation: A definition, an argument, and seven action points. *ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation*, 41(2), 260-272.

165. İnternet: FDA. (2024). *FDA's Predictive Toxicology Roadmap*. Web: https://www.fda.gov/science-research/about-science-research-fda/fdas-predictive-toxicology-roadmap, Son Erişim Tarihi: 16/06/2024.

166. İnternet: FDA. (2024). *FDA's Predictive Toxicology Roadmap 2018 Annual Report Prepared by the Food and Drug Administration's Toxicology Working Group*. Web: https://www.fda.gov/media/128045/download, Son Erişim Tarihi: 16/06/2024.

167. Berdigaliyev, N., Aljofan, M. (2020). An overview of drug discovery and development. *Future Medicinal Chemistry*, 12(10), 939-947.

168. Shaker, B., Ahmad, S., Lee, J., Jung, C. and Na, D. (2021). In silico methods and tools for drug discovery. *Computers in Biology and Medicine*, 137, 104851.

169. Çakmak Pehlivanlı, A., Çakmak, G. (2022). Genotoksik etkiyi belirlemeye yönelik *in silico* yaklaşımlar. F. Ünal ve D. Yüzbaşıoğlu (Eds.), *Genetik Toksikoloji*. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık, 475-494.

170. Johnson, T. O., Akinsanmi, A. O., Ejembi, S. A., Adeyemi, O. E., Oche, J.-R., Johnson, G. I. and Adegboyega, A. E. (2023). Modern drug discovery for inflammatory bowel disease: The role of computational methods. *World Journal of Gastroenterology*, 29(2), 310.

171. Joseph, F., Martins, E., Harriet, K., Ermias, T. and Xiang, W. (2015). Green chemistry strategies for drug discovery. In E. Peterson and J. Manley (Eds.), *The business case for green chemistry in drug discovery*. New York: Royal Society of Chemistry, 291-296.

172. Sinha, S., Vohora, D. (2018). Drug discovery and development: An overview. *Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Research*, 3, 19-32.

173. Çetin, R., Okuş, F., Çakmak, G. (2023). Yasal düzenleyici otoritelerin sürdürülebilirlik yaklaşımları. *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 4(2), 63-79.

174. Supandi, Y., Merdekawati, F. (2018). In silico study of pyrazolylaminoquinazoline toxicity by lazar, protox, and admet predictor. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(9), 119-129.

175. Lipinski, C. A. (2004). Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug discovery today: Technologies*, 1(4), 337-341.

176. Agamah, F. E., Mazandu, G. K., Hassan, R., Bope, C. D., Thomford, N. E., Ghansah, A. and Chimusa, E. R. (2020). Computational/in silico methods in drug target and lead prediction. *Briefings in Bioinformatics*, 21(5), 1663-1675.

177. Wu, L., Jin, W., Yu, H. and Liu, B. (2024). Modulating autophagy to treat diseases: A revisited review on in silico methods. *Journal of Advanced Research*, 58, 175-191.

178. Ekins, S., Lane, T. R., Urbina, F. and Puhl, A. C. (2024). In silico ADME/tox comes of age: twenty years later. *Xenobiotica*, 54(7), 352-358.

179. Lin, R., Zhang, J., Xu, R., Yuan, C., Guo, L., Liu, P., Fang, Y. and Cui, B. (2023). Developments in molecular docking technologies for application of polysaccharide-based materials: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 3, 1-13.

180. Tao, X., Huang, Y. K., Wang, C., Chen, F., Yang, L. L., Ling, L., Che, Z. M. and Chen, X. G. (2020). Recent developments in molecular docking technology applied in food science: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(1), 33-45.

181. Sahu, Rathor, L. S., Dwivedi, S. D., Shah, K., Chauhan, N. S., Singh, M. R. and Singh, D. (2024). A review on molecular docking as an interpretative tool for molecular targets in disease management. *Assay and Drug Development Technologies*, 22(1), 40-50.

182. Du, L., Geng, C., Zeng, Q., Huang, T., Tang, J., Chu, Y. and Zhao, K. (2023). Dockey: a modern integrated tool for large-scale molecular docking and virtual screening. *Briefings in Bioinformatics*, 24(2), 047.

183. Feng, Y., Yan, Y., He, J., Tao, H., Wu, Q. and Huang, S.-Y. (2022). Docking and scoring for nucleic acid–ligand interactions: Principles and current status. *Drug Discovery Today*, 27(3), 838-847.

184. Potlitz, F., Link, A., Schulig, L. (2023). Advances in the discovery of new chemotypes through ultra-large library docking. *Expert Opin Drug Discov* 18(3), 303-313.

185. Sotriffer, C. A. (2011). Accounting for induced-fit effects in docking: what is possible and what is not?. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(2), 179-91.

186. Okus, F., Yuzbasioglu, D., Unal, F. (2024). Molecular docking study of frequently used food additives for selected targets depending on the chromosomal abnormalities they cause. *Toxicology*, 502, 153716.

187. Fan, J. Y., Fu, A. L., Zhang, L. (2019). Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, 7(2), 83-89.

188. Kleinstreuer, N. C., Tetko, I. V., Tong, W. (2021). *Introduction to special issue: computational toxicology*. New York: ACS Publications, 171-175.

189. İnternet: EC. (2008). *No 440/2008 of 30 May 2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH).* Web: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2008/440/oj/eng, Son Erişim Tarihi: 28/06/2024.

190. EC. (2006). Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. *Official Journal of the European Union*, 396, 1-849.

191. Yordanova, D., Schultz, T. W., Kuseva, C., Ivanova, H., Pavlov, T., Chankov, G., Karakolev, Y., Gissi, A., Sobanski, T. and Mekenyan, O. G. (2019). Alert performance: A new functionality in the OECD QSAR Toolbox. *Computational Toxicology*, 10, 26-37.

192. Drwal, M. N., Banerjee, P., Dunkel, M., Wettig, M. R. and Preissner, R. (2014). ProTox: a web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W53-W58.

193. İnternet: EPA. (2023). *CompTox Chemicals Dashboard Resource Hub*. Web: https://www.epa.gov/comptox-tools/comptox-chemicals-dashboard-resource-hub, Son Erişim Tarihi: 28/06/2024.

194. Druzhilovskiy, D. S., Rudik, A. V., Filimonov, D. A., Gloriozova, T. A., Lagunin, A. A., Dmitriev, A. V., Pogodin, P. V., Dubovskaya, V. I., Ivanov, S. M. and Tarasova, O. A. (2017). Computational platform Way2Drug: from the prediction of biological activity to drug repurposing. *Russian Chemical Bulletin*, 66(10), 1832-1841.

195. Kleinstreuer, N. C., Karmaus, A. L., Mansouri, K., Allen, D. G., Fitzpatrick, J. M. and Patlewicz, G. (2018). Predictive models for acute oral systemic toxicity: a workshop to bridge the gap from research to regulation. *Computational Toxicology*, 8, 21-24.

196. İnternet: ICCVAM. (2020). Biennial Progress Report 2018-2019 Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. Web: https://casetext.com/federal-register/interagency-coordinating-committee-on-the-validation-of-alternative-methods-biennial-progress-report-2018-2019-availability-of-report, Son Erişim Tarihi: 18/04/2024.

197. İnternet: SimulationPlus. (2024). *SimulationPlus*. Web: https://www.simulations-plus.com/resource-center/?resource-category=blog, Son Erişim Tarihi: 18/04/2024.

198. İnternet: ACD/Labs. (2024). *Percepta*. Web: https://www.acdlabs.com/products/percepta-platform/, Son Erişim Tarihi: 18/04/2024.

199. EC. (2008). No. 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. *Official Journal of the European Union. 2008b L*, 8, 353.

200. Trevan, J. W. (1927). The error of determination of toxicity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 101(712), 483-514.

201. Walum, E. (1998). Acute oral toxicity. *Environmental Health Perspectives*, 106(suppl 2), 497-503.

202. Graham, J. C., Rodas, M., Hillegass, J. and Schulze, G. (2021). The performance, reliability and potential application of in silico models for predicting the acute oral toxicity of pharmaceutical compounds. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 119, 104816.

203. Gonella Diaza, R., Manganelli, S., Esposito, A., Roncaglioni, A., Manganaro, A. and Benfenati, E. (2015). Comparison of in silico tools for evaluating rat oral acute toxicity. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 26(1), 1-27.

204. Noga, M., Michalska, A., Jurowski, K. (2024). The prediction of acute toxicity (LD50) for organophosphorus-based chemical warfare agents (V-series) using toxicology in silico methods. *Archives of Toxicology*, 98(1), 267-275.

205. Holt, J. D., Nuttall, J. P. (2013). Preclinical safety evaluation. *Microbicides for Prevention of HIV Infection*, 55-78.

206. İnternet: EMA. (2013). *ICH M3 (R2) Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals - Scientific guideline*. Web: https://www.ema.europa.eu/en/ich-m3-r2-non-clinical-safety-studies-conduct-human-clinical-trials-pharmaceuticals-scientific-guideline, Son Erişim Tarihi: 18/04/2024.

207. İnternet: FDA. (2015). Web: https://www.fda.gov/drugs/investigational-new-drug-ind-application/drug-development-and-review-definitions#:~:text=At%20the%20preclinical%20stage%2C%20the,months%2C%20depending%20on%20the%20proposed, Son Erişim Tarihi: 18/04/2024.

208. Holt, J. D. S., Nuttall, J. P. (2014). Preclinical safety evaluation. In J. Nuttall (Ed.), *Microbicides for Prevention of HIV Infection*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 55-78.

209. Guideline, I. H. T. (2009). *Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals S9*. International Conference on Harmonization, Brüksel, 185-202.

210. İnternet: EMA. (2013). *ICH S9 Non-clinical evaluation for anticancer pharmaceuticals - Scientific guideline*. Web: https://www.ema.europa.eu/en/ich-s9-non-clinical-evaluation-anticancer-pharmaceuticals-scientific-guideline, Son Erişim Tarihi: 18/04/2024.

211. Steger-Hartmann, T., Kreuchwig, A., Wang, K., Birzele, F., Draganov, D., Gaudio, S. and Rothfuss, A. (2023). Perspectives of data science in preclinical safety assessment. *Drug Discovery Today*, 8, 103642.

212. Corti, C., Bielo, L. B., Schianca, A. C., Salimbeni, B. T., Criscitiello, C. and Curigliano, G. (2023). Future potential targets of antibody-drug conjugates in breast cancer. *The Breast*, 3, 26-43.

213. Wu, F., Zhou, Y., Li, L., Shen, X., Chen, G., Wang, X., Liang, X., Tan, M. and Huang, Z. (2020). Computational approaches in preclinical studies on drug discovery and development. *Frontiers in Chemistry*, 8, 726.

214. İnternet: Biotechnology, N. C. f. (2024). *PubChem Compound Summary for CID 5460033, Cisplatin.* . Web: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5460033, Son Erişim Tarihi: 18/04/2024.

215. Busing, W. R., Levy, H. A. (1965). Crystal and molecular structure of hydrogen peroxide: a neutron-diffraction study. *The Journal of chemical physics*, 42(9), 3054-3059.

216. Yuzbasioglu, D., Mamur, S., Avuloglu-Yilmaz, E., Erikel, E., Celebi-Keskin, A. and Unal, F. (2021). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects of exopolysaccharide pullulan in human lymphocytes in vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 870, 503391.

217. Yuzbasioglu, D., Mahmoud, J. H., Mamur, S. and Unal, F. (2022). Cytogenetic effects of antidiabetic drug metformin. *Drug and Chemical Toxicology*, 45(2), 955-962.

218. Swietach, P., Vaughan-Jones, R. D., Harris, A. L. and Hulikova, A. (2014). The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society B - Journals Science*, 369(1638), 20130099.

219. Piasentin, N., Milotti, E., Chignola, R. (2020). The control of acidity in tumor cells: a biophysical model. *Scientific Reports*, 10(1), 13613.

220. Ogbonna, E. N., Paul, A., Farahat, A. A., Terrell, J. R., Mineva, E., Ogbonna, V., Boykin, D. W. and Wilson, W. D. (2023). X-ray Structure Characterization of the Selective Recognition of AT Base Pair Sequences. *ACS Bio & Med Chem Au Journal*, 3(4), 335-348.

221. Drew, H. R., Wing, R. M., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura, K. and Dickerson, R. E. (1981). Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(4), 2179-2183.

222. Frey, P. A. (2004). Low Barrier Hydrogen Bonds. In W.J. Lennarz and M.D. Lane (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry*. New York: Elsevier, 594-598.

223. Nair, A. B., Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7(2), 27.

224. Okuş, F., Yüzbaşıoğlu, D., Çakmak, G., Sarı, N. and Ünal, F. (2024). Molecular docking study of tetrazolato ligand and pt (II) complex. *KSU Journal of Agriculture and Nature*, 27(3), 528-540.

225. Shewach, D. S., Kuchta, R. D. (2009). Introduction to cancer chemotherapeutics. *Chemical Reviews*, 109(7), 2859-2861.

226. Gao, F., Zhang, X., Wang, T. and Xiao, J. (2019). Quinolone hybrids and their anti-cancer activities: An overview. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 165, 59-79.

227. Zou, Y., Liu, L., Liu, J. and Liu, G. (2020). Bioisosteres in drug discovery: focus on tetrazole. *Future Medicinal Chemistry*, 12(2), 91–93.

228. Nguyen, A., Dallerba, E., Lowe, A. B. (2022). Tetrazole as a Carboxylic Acid Isostere and the Synthesis of All Amine-Based Polyampholytes. *Macromolecular Rapid Communications*, 2200096.

229. Constantinescu, T., Lungu, C. N. (2021). Anticancer activity of natural and synthetic chalcones. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11306.

230. Jawad, A. A., Jber, N. R., Rasool, B. S. and Abbas, A. K. (2023). Tetrazole derivatives and role of tetrazole in medicinal chemistry: an article review. *Al-Nahrain Journal of Science*, 26(1), 1-7.

231. Verma, A., Kaur, B., Venugopal, S., Wadhwa, P., Sahu, S., Kaur, P., Kumar, D. and Sharma, A. (2022). Tetrazole: A privileged scaffold for the discovery of anticancer agents. *Chemical Biology & Drug Design*, 100(3), 419-442.

232. Bhaumik, P. K., Ghosh, K., Chattopadhyay, S. (2021). Synthetic strategies, crystal structures and biological activities of metal complexes with the members of azole family: A review. *Polyhedron*, 200, 115093.

233. Alfonso-Herrera, L. A., Rosete-Luna, S., Hernández-Romero, D., Rivera-Villanueva, J. M., Olivares-Romero, J. L., Cruz-Navarro, J. A., Soto-Contreras, A., Arenaza-Corona, A., Morales-Morales, D. and Colorado-Peralta, R. (2022). Transition metal complexes with tridentate schiff bases (O N O and O N N) derived from salicylaldehyde: an analysis of their potential anticancer activity. *ChemMedChem*, 17(20), e202200367.

234. Boulechfar, C., Ferkous, H., Delimi, A., Djedouani, A., Kahlouche, A., Boublia, A., Darwish, A. S., Lemaoui, T., Verma, R. and Benguerba, Y. (2023). Schiff bases and their metal complexes: A review on the history, synthesis, and applications. *Inorganic Chemistry Communications*, 110451.

235. Pfeiffer, P., Breith, E., Lübbe, E. and Tsumaki, T. (1933). Tricyclische orthokondensierte nebenvalenzringe. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 503(1), 84-130.

236. Devi, P. (2016). Schiff bases–interesting range of applications in various fields of science. *International Journal for Research Publication and Seminar*, 3, 106-108.

237. Brodowska, K., Lodyga-Chruscinska, E. (2015). Schiff bases—interesting range of applications in various fields of science. *ChemInform*, 46(11), 78-85.

238. Vishwakarma, R., Gadipelly, C., Mannepalli, L. K. (2022). Advances in tetrazole synthesis – an overview. *ChemistrySelect*, 7(29), 93-103.

239. Rahiminezhad, A., Moghadam, M. E., Divsalar, A. and Mesbah, A. W. (2022). How can the cisplatin analogs with different amine act on DNA during cancer treatment theoretically? *Journal of Molecular Modeling*, 28(1), 1-12.

240. O'Donovan, M., Freemantle, M., Hull, G., Bell, D., Arlett, C. and Cole, J. (1995). Extended-term cultures of human T-lymphocytes: a practical alternative to primary human lymphocytes for use in genotoxicity testing. *Mutagenesis*, 10(3), 189-201.

241. Hagmar, L., Bonassi, S., Strömberg, U., Brøgger, A., Knudsen, L. E., Norppa, H., Reuterwall, C. and Health, E. S. G. o. C. B. a. (1998). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Research*, 58(18), 4117-4121.

242. İnternet: ICH. (2024). *Safety Guidelines*. Web: https://www.ich.org/page/safety-guidelines, Son Erişim Tarihi: 30/03/2024.

243. Vijgh, W. J. (1991). Clinical pharmacokinetics of carboplatin. *Clinical Pharmacokinetics*, 21(4), 242-261.

244. Ward, A., Benfield, P. (1989). Carboplatin: a preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the treatment of cancer. *Drugs*, 37, 162-190.

245. Calvert, H. (2019). The clinical development of carboplatin–A personal perspective. *Inorganica Chimica Acta*, 498, 118987.

246. Cai, L., Yu, C., Ba, L., Liu, Q., Qian, Y., Yang, B. and Gao, C. (2018). Anticancer platinum-based complexes with non-classical structures. *Applied Organometallic Chemistry*, 32(4), e4228.

247. Khoury, A., Deo, K., Aldrich-Wright, J. R. (2020). Recent advances in platinum-based chemotherapeutics that exhibit inhibitory and targeted mechanisms of action. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 207, 111070.

248. Boffetta, P., Van Der Hel, O., Norppa, H., Fabianova, E., Fucic, A., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Puskailerova, D. and Znaor, A. (2007). Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from Central Europe. *American Journal of Epidemiology*, 165(1), 36-43.

249. Hemminki, K., Niazi, Y., Vodickova, L., Vodicka, P. and Försti, A. (2024). Genetic and environmental associations of nonspecific chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, 3, 06-22.

250. Tsatsakis, A., Oikonomopoulou, T., Nikolouzakis, T. K., Vakonaki, E., Tzatzarakis, M., Flamourakis, M., Renieri, E., Fragkiadaki, P., Iliaki, E. and Bachlitzanaki, M. (2023). Role of telomere length in human carcinogenesis. *International Journal of Oncology*, 63(1), 1-24.

251. Bolzán, A. D. (2020). Using telomeric chromosomal aberrations to evaluate clastogen-induced genomic instability in mammalian cells. *Chromosome Research*, 28(3), 259-276.

252. Proudlock, R. (2016). A practical guide to genetic toxicology testing. In *Genetic Toxicology Testing*. New York: Elsevier, 1-3.

253. Itoh, S., Hattori, C., Nagata, M. and Sanbuissho, A. (2012). Structural and numerical chromosome aberration inducers in liver micronucleus test in rats with partial hepatectomy. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 747(1), 98-103.

254. Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., De Boeck, M. and Decordier, I. (2002). Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1-2), 137-148.

255. Saleh, N. i., Khabour, O. F., Esmadi, F. T. and Al-Kofahi, E. (2011). In vivo cytogenetic studies on rat's bone-marrow cells of structurally related Schiff base complexes. *Drug and Chemical Toxicology*, 34(1), 92-99.

256. Eminovic, I., Kahrovic, E., Mesic, A., Turkusic, E., Kargic, D., Zahirovic, A. and Dolicanin, Z. (2016). Cytogenotoxic effects of two potential anticancer Ruthenium (III) Schiff Bases complexes. *Journal of Health Sciences*, 6(2), 112-120.

257. Khabour, O. F., Saleh, N. i., Alzoubi, K. H., Hisaindee, S., Al-Fyad, D., Al-Kaabi, L., Dodeen, A. and Esmadi, F. T. (2013). Genotoxicity of structurally related copper and zinc containing Schiff base complexes. *Drug and Chemical Toxicology*, 36(4), 435-442.

258. Demir, I., Diler, S., Uçan, S. (2020). Synthesis, characterzation, and genetoxic effect of some novel schiff base–metal complexes. *Russian Journal of General Chemistry*, 90, 1051-1054.

259. Figueiredo, J., Ismael, M., Pinheiro, J., Silva, A., Justino, J., Silva, F. V., Goulart, M., Mira, D., Araújo, M. and Campoy, R. (2012). Facile synthesis of oxo-/thioxopyrimidines and tetrazoles C–C linked to sugars as novel non-toxic antioxidant acetylcholinesterase inhibitors. *Carbohydrate Research*, 347(1), 47-54.

260. Fenech, M., Morley, A. A. (1985). The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 148(1-2), 99-105.

261. Cardinale, F., Bruzzi, P., Bolognesi, C. (2012). Role of micronucleus test in predicting breast cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 106(4), 780-790.

262. Asanov, M., Bonassi, S., Proietti, S., Minina, V. I., Tomino, C. and El-Zein, R. (2021). Genomic instability in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: A systematic review and meta-analysis of studies using the micronucleus assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 787, 108344.

263. Nichols, L., Lawrence, R., Haboubi, H., Al-Sarireh, B., Doak, S. and Jenkins, G. (2023). Measuring blood cell DNA damage using the PIG-A mutation and CBMN assay in pancreatic cancer patients: a pilot study. *Mutagenesis*, 38(2), 93-99.

264. Ganguly, B. B. (1993). Cell division, chromosomal damage and micronucleus formation in peripheral lymphocytes of healthy donors: related to donor's age. *Mutation Research/DNAging*, 295(3), 135-148.

265. Ellwanger, J. H., Kulmann-Leal, B., Ziliotto, M. and Chies, J. A. B. (2023). HIV infection, chromosome instability, and micronucleus formation. *Viruses*, 15(1), 155.

266. Struys, I., Verscheure, E., Lenaerts, L., Amant, F., Godderis, L. and Ghosh, M. (2023). Characterization of the genotoxic profile of antineoplastic drugs using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 97, 104036.

267. Şakiyan, İ., Anar, M., Öğütcü, H., Agar, G. and Sarı, N. (2014). Schiff bases attached L-glutamine and L-asparagine: First investigation on antimutagenic and antimicrobial analyses. *Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 42(3), 199-204.

268. Anar, M., Özkan, E. H., Öğütçü, H., Ağar, G., Şakıyan, I. and Sarı, N. (2016). Useful agents against aflatoxin B1–antibacterial azomethine and Mn (III) complexes involving L-Threonine, L-Serine, and L-Tyrosine. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(3), 853-858.

269. Nartop, D., Özkan, E. H., Gündem, M., Çeker, S., Ağar, G., Öğütcü, H. and Sarı, N. (2019). Synthesis, antimicrobial and antimutagenic effects of novel polymeric-Schiff bases including indol. *Journal of Molecular Structure*, 1195, 877-882.

270. Ceker, S., Ogutcu, H., Meral, S., Agar, A. A. and Agar, G. (2019). Synthesis, anti-microbial and anti-mutagenic activities of some Schiff bases derivatives containing thiophene group. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(6), 15-26.

271. Huerta, I., Barasoain, M., Télez, M., Longa, M., Muga, J., Barrenetxea, G., Ortiz-Lastra, E., González, J., Criado, B. and Arrieta, I. (2014). Genotoxic evaluation of five Angiotesin II receptor blockers: In vivo and in vitro micronucleus assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 767, 1-7.

272. Muruzabal, D., Sanz-Serrano, J., Sauvaigo, S., Treillard, B., Olsen, A.-K., López de Cerain, A., Vettorazzi, A. and Azqueta, A. (2021). Validation of the in vitro comet assay for DNA cross-links and altered bases detection. *Archives of Toxicology*, 95(8), 2825-2838.

273. Collins, A., Møller, P., Gajski, G., Vodenková, S., Abdulwahed, A., Anderson, D., Bankoglu, E. E., Bonassi, S., Boutet-Robinet, E. and Brunborg, G. (2023). Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. *Nature Protocols*, 18(3), 929-989.

274. Tülüce, Y., Hussein, A. I., Koyuncu, İ., Kilic, A. and Durgun, M. (2022). The effect of a bis-structured Schiff base on apoptosis, cytotoxicity, and DNA damage of breast cancer cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 36(10), e23148.

275. Sykuła, A., Nowak, A., Garribba, E., Dzeikala, A., Rowińska-Żyrek, M., Czerwińska, J., Maniukiewicz, W. and Łodyga-Chruścińska, E. (2023). Spectroscopic characterization and biological activity of Hesperetin Schiff bases and their Cu (II) complexes. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 761.

276. Bukowski, K., Marciniak, B., Kciuk, M., Mojzych, M. and Kontek, R. (2022). Pyrazolo [4, 3-e] tetrazolo [1, 5-b][1, 2, 4] triazine sulfonamides as novel potential anticancer agents: Cytotoxic and genotoxic activities in vitro. *Molecules*, 27(12), 3761.

277. Istifli, E. S., Hüsunet, M. T., Ila, H. B. (2019). Cell division, cytotoxicity, and the assays used in the detection of cytotoxicity. *Cytotoxicity-definition, identification, and cytotoxic compounds*, 1, 12-25.

278. Graña, E. (2018). Mitotic index. *Advances in Plant Ecophysiology Techniques*, 231-240.

279. Park, Y. Y., Ahn, J.-H., Cho, M.-G. and Lee, J.-H. (2018). ATP depletion during mitotic arrest induces mitotic slippage and APC/CCdh1-dependent cyclin B1 degradation. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(4), 1-14.

280. El-Dabae, W. H. (2024). Efficiency of MTT and trypan blue assays for detection of viability and recovery of different frozen cell lines. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*, 55(6), 1649-1657.

281. Duff, B., Thangella, V. R., Creaven, B. S., Walsh, M. and Egan, D. A. (2012). Anti-cancer activity and mutagenic potential of novel copper (II) quinolinone Schiff base complexes in hepatocarcinoma cells. *European Journal of Pharmacology*, 689(1-3), 45-55.

282. Shakir, M., Hanif, S., Sherwani, M. A., Mohammad, O., Azam, M. and Al-Resayes, S. I. (2016). Pharmacophore hybrid approach of new modulated bis-diimine CuII/ZnII complexes based on 5-chloro Isatin Schiff base derivatives: Synthesis, spectral studies and comparative biological assessment. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 157, 39-56.

283. Banerjee, A., Banerjee, K., Sinha, A., Das, S., Majumder, S., Majumdar, S. and Choudhuri, S. K. (2017). A zinc Schiff base complex inhibits cancer progression both in vivo and in vitro by inducing apoptosis. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 56, 383-392.

284. Elsayed, S. A., Badr, H. E., di Biase, A. and El-Hendawy, A. M. (2021). Synthesis, characterization of ruthenium (II), nickel (II), palladium (II), and platinum (II) triphenylphosphine-based complexes bearing an ONS-donor chelating agent: Interaction with biomolecules, antioxidant, in vitro cytotoxic, apoptotic activity and cell cycle analysis. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 223, 111549.

285. Elsayed, S. A., Elnabky, I. M., Aboelnga, M. M. and El-Hendawy, A. M. (2024). Palladium (ii), platinum (ii), and silver (i) complexes with 3-acetylcoumarin benzoylhydrazone Schiff base: Synthesis, characterization, biomolecular interactions, cytotoxic activity, and computational studies. *RSC Advances*, 14(27), 19512-19527.

286. Dhaduk, M. P., Dabhi, R. A., Bhatt, V. D., Bhatt, B. S. and Patel, M. N. (2024). Synthesis, characterization, biomolecular interaction, cytotoxicity, and computational studies of quinoxaline-based platinum (II) complexes. *Results in Chemistry*, 7, 101265.

287. Shamsuzzaman, A., Ali, A., Mashrai, A., Khanam, H., Sherwani, M. A., & Owais, M. (2014). Design, synthesis and biological evaluation of steroidal tetrazoles as antiproliferative and antioxidant agents. *European Chemical Bulletin*, 3(11), 1075-1080

288. Pallandre, J.-R., Borg, C., Rognan, D., Boibessot, T., Luzet, V., Yesylevskyy, S., Ramseyer, C. and Pudlo, M. (2015). Novel aminotetrazole derivatives as selective STAT3 non-peptide inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 103, 163-174.

289. Reddy, B., Taneja, A. K., Tej, M. B., Navya Sri, K., Tej, M. B., Vijayavardhini, S., Srilaxmi, D., Tiruveedhula, S., Penumutchu, S. R. and Rao, M. V. B. (2024). Design, synthesis and biological studies of tetrazole fused imidazopyridines. *Carbon Letters*, 34(1), 41-49.

290. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63.

291. Peng, Y., Zhong, H., Chen, Z.-F., Liu, Y.-C., Zhang, G.-H., Qin, Q.-P. and Liang, H. (2014). A planar schiff base platinum (II) complex: Crystal structure, cytotoxicity and interaction with DNA. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 62(3), 221-228.

292. Deng, J., Yu, P., Zhang, Z., Zhang, J., Zhewen, S., Cai, M., Yuan, H., Liang, H. and Yang, F. (2019). Novel Pt (ii) complexes with modified aroyl-hydrazone Schiff-base ligands: synthesis, cytotoxicity and action mechanism. *Metallomics*, 11(11), 1847-1863.

293. Al-Aghbari, S. A., Al-Shuja'a, O. M., Al-Badani, R. and Japir, A. A.-W. M. (2019). Synthesis, characterization and anticancer activity studies of new Schiff base Pt (II) complex. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*, 7(08), 1.

294. Dhaduk, M. P., Dabhi, R. A., Bhatt, B. S., Bhatt, V. D., & Patel, M. N. (2022). *Computational and biological studies of platinum(II) complex of tryptanthrin Schiff base.* Advance online publication: Research Square, 26-12.

295. Bazsefidpar, P., Zolghadri, S., Nikpoor, A. R., Eftekhar, E. and Jahromi, M. Z. (2022). Anti-proliferative impact of three Schiff base platinum (II) complexes against human breast cancer cell line. *Journal of Research in Pharmacy*, 26(6).

296. Mbugua, S. N., Sibuyi, N. R., Njenga, L. W., Odhiambo, R. A., Wandiga, S. O., Meyer, M., Lalancette, R. A. and Onani, M. O. (2020). New Palladium (II) and Platinum (II) complexes based on pyrrole schiff bases: synthesis, characterization, X-ray structure, and anticancer activity. *ACS Omega*, 5(25), 14942-14954.

297. Eslami Moghadam, M., Hasanzadeh Esfahani, M., Behzad, M., Zolghadri, S., Ramezani, N. and Azadi, Y. (2023). New platinum (II) complexes based on Schiff bases: Synthesis, specification, X-ray structure, ADMET, DFT, molecular docking, and anticancer activity against breast cancer. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 28(5), 519-529.

298. İrişli, S., Günnaz, S., Özcan, Ö., Arı, A., Maral, M., Erdem, A., Özel, D. and Yurt, F. (2024). Platinum (II) schiff base complexes and their effects on the inhibition of amyloid β1–42 aggregation. *Applied Organometallic Chemistry*, 38(8), e7540.

299. Hassan, S. S., Mohamed, E. F., Saleh, A. M., Shoukry, M. M. and Khalf-Alla, P. A. (2024). Design, structural characterization, DFT, molecular docking, and chemotherapeutic activity of novel platinum (II) and palladium (II) complexes derived from Metformin-based Schiff base. *Journal of Molecular Structure*, 138830.

300. Wu, P., Ma, D. L., Leung, C. H., Yan, S. C., Zhu, N., Abagyan, R. and Che, C. M. (2009). Stabilization of G-quadruplex DNA with platinum (II) schiff base complexes: luminescent probe and down-regulation of c-myc oncogene expression. *Chemistry–A European Journal*, 15(47), 13008-13021.

301. Froux, A., D'Anna, L., Rainot, A., Neybecker, C., Spinello, A., Bonsignore, R., Rouget, R., Harle, G., Terenzi, A. and Monari, A. (2024). Metal Center and aromatic moiety in schiff base complexes: impact on g-quadruplex stabilization and oncogene downregulation. *Inorganic Chemistry Frontiers*, 3, 25-32.

302. Biffi, G., Tannahill, D., McCafferty, J. and Balasubramanian, S. (2013). Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. *Nature Chemistry*, 5(3), 182-186.

303. Deng, J., Wang, J., Khan, M., Yu, P., Yang, F. and Liang, H. (2018). Structure and biological properties of five Pt (II) complexes as potential anticancer agents. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 185, 10-16.

304. Abu-Dief, A. M., El-khatib, R. M., Aljohani, F. S., Alzahrani, S. O., Mahran, A., Khalifa, M. E. and El-Metwaly, N. M. (2021). Synthesis and intensive characterization for novel Zn (II), Pd (II), Cr (III) and VO (II)-Schiff base complexes; DNA-interaction, DFT, drug-likeness and molecular docking studies. *Journal of Molecular Structure*, 130693.

305. Jesmin, M., Ali, M. M., Khanam, J. A. (2010). Antitumour activities of some schiff bases derived from benzoin, salicylaldehyde, amino phenol and 2, 4 dinitrophenyl hydrazine. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34(1), 48-85.

306. Serebryanskaya, T. V., Yung, T., Bogdanov, A. A., Shchebet, A., Johnsen, S. A., Lyakhov, A. S., Ivashkevich, L. S., Ibrahimava, Z. A., Garbuzenco, T. S. and Kolesnikova, T. S. (2013). Synthesis, characterization, and biological evaluation of new tetrazole-based platinum (II) and palladium (II) chlorido complexes—Potent cisplatin analogues and their trans isomers. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 120, 44-53.

307. Komeda, S., Lin, Y. L., Chikuma, M. (2011). A tetrazolato-bridged dinuclear platinum (II) complex exhibits markedly high *in vivo* antitumor activity against pancreatic cancer. *ChemMedChem*, 6(6), 987-990.

308. Komeda, S., Takayama, H., Suzuki, T., Odani, A., Yamori, T. and Chikuma, M. (2013). Synthesis of antitumor azolato-bridged dinuclear platinum (II) complexes with in vivo antitumor efficacy and unique in vitro cytotoxicity profiles. *Metallomics*, 5(5), 461-468.

309. Serebryanskaya, T. V., Lyakhov, A. S., Ivashkevich, L. S., Grigoriev, Y. V., Kritchenkov, A. S., Khrustalev, V. N., Tskhovrebov, A. G. and Ivashkevich, O. A. (2021). Novel tetrazole PtII and PdII complexes with enhanced water solubility: Synthesis, structural characterization and evaluation of antiproliferative activity. *Zeitschrift für Kristallographie-Crystalline Materials*, 236(1-2), 23-32.

310. Mikolaichuk, O. V., Popova, E. A., Protas, A. V., Shemchuk, O. S., Vasina, L. V., Pavlyukova, Y. N., Potanin, A. A., Molchanov, O. E., Maistrenko, D. N. and Semenov, K. N. (2022). Study of biocompatibility, cytotoxic activity in vitro of a tetrazole-containing derivative of 2-amino-4, 6-di (aziridin-1-yl)-1, 3, 5-triazine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 629, 176-182.

311. Uemura, M., Hiramoto, K., Yoneyama, H., Harusawa, S. and Komeda, S. (2022). Introduction of fluorine into antitumor-active dinuclear platinum (II) complexes leads to modulation of in vivo antitumor activity in mice. *Inorganic Chemistry*, 61(31), 12155-12164.

312. Alasadi, Y. K., Jumaa, F. H., Mukhlif, M. G. and Shawkat, S. M. (2023). Preparation, characterization, anti-cancer and antibacterial evaluation of new schiff base and tetrazole derivatives. *Tikrit Journal of Pure Science*, 28(2), 12-19.

313. Hameed, A. A., Al-Janabi, A. S., Saleh, A. M., Shaaban, S. and Alheety, M. (2024). Spectroscopic, biological activity, molecular docking and hydrogen storage studies of tetrazole-thione complexes. *Journal of Molecular Structure*, 1312, 138672.

314. Ritter, E., Przybylski, P., Brzezinski, B. and Bartl, F. (2009). Schiff bases in biological systems. *Current Organic Chemistry*, 3, 45-52.

315. Tripathi, A., Misra, K. (2017). Molecular docking: A structure-based drug designing approach. *JSM Construction Chemicals*, 5(2), 1042-1047.

316. Nie, X., Zhao, L., Deng, S., Su, W. and Zhang, Y. (2018). A review of molecular simulation applied in vapor-liquid equilibria (VLE) estimation of thermodynamic cycles. *Journal of Molecular Liquids*, 264, 652-674.

317. İnternet: Nobel Prize, *Nobel Prize Outreach AB 2023.* Web: https://nobelprize.org, Son Erişim Tarihi: 18/06/2024.

318. Demir, H., Daglar, H., Gulbalkan, H. C., Aksu, G. O. and Keskin, S. (2023). Recent advances in computational modeling of MOFs: From molecular simulations to machine learning. *Coordination Chemistry Reviews*, 84, 215112.

319. Yu, Y., Xu, S., He, R. and Liang, G. (2023). Application of molecular simulation methods in food science: status and prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(6), 2684-2703.

320. Hah, S. S., Stivers, K. M., de Vere White, R. W. and Henderson, P. T. (2006). Kinetics of carboplatin− DNA binding in genomic DNA and bladder cancer cells as determined by accelerator mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 19(5), 622-626.

321. Alotaibi, S. H., Momen, A. A. (2019). Anticancer drugs' deoxyribonucleic acid (DNA) interactions. In *Biophysical Chemistry-Advance Applications*. New York: IntechOpen, 85-93.

322. Guhathakurta, B., Basu, P., Purohit, C. S., Bandyopadhyay, N., Kumar, G. S., Chowdhury, S. and Naskar, J. P. (2017). Synthesis, characterization, structure, DNA binding aspects and molecular docking study of a novel Schiff base ligand and its bis (μ-chloro) bridged Cu (II) dimer. *Polyhedron*, 126, 195-204.

323. Bheemarasetti, M., Palakuri, K., Raj, S., Saudagar, P., Gandamalla, D., Yellu, N. R. and Kotha, L. R. (2018). Novel Schiff base metal complexes: synthesis, characterization, DNA binding, DNA cleavage and molecular docking studies. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 15, 1377-1389.

324. Almarhoon, Z. M., Al-Onazi, W. A., Alothman, A. A., Al-Mohaimeed, A. M. and Al-Farraj, E. S. (2019). Synthesis, DNA binding, and molecular docking studies of dimethylaminobenzaldehyde-based bioactive schiff bases. *Journal of chemistry*, 2019(1), 8152721.

325. Kurt, B., Temel, H., Atlan, M. and Kaya, S. (2020). Synthesis, characterization, DNA interaction and docking studies of novel Schiff base ligand derived from 2, 6-diaminopyridine and its complexes. *Journal of Molecular Structure*, 1209, 127928.

326. AlZamil, N. O. (2020). Synthesis, DFT calculation, DNA-binding, antimicrobial, cytotoxic and molecular docking studies on new complexes VO (II), Fe (III), Co (II), Ni (II) and Cu (II) of pyridine Schiff base ligand. *Materials Research Express*, 7(6), 065401.

327. Nemati, L., Keypour, H., Shahabadi, N., Hadidi, S. and Gable, R. W. (2021). Synthesis, characterization and DNA interaction of a novel Pt (II) macroacyclic Schiff base complex containing the piperazine moiety and its cytotoxicity and molecular docking. *Journal of Molecular Liquids*, 337, 116292.

328. Protas, A. V., Popova, E. A., Mikolaichuk, O. V., Porozov, Y. B., Mehtiev, A. R., Ott, I., Alekseev, G. V., Kasyanenko, N. A. and Trifonov, R. E. (2018). Synthesis, DNA and BSA binding of Pd (II) and Pt (II) complexes featuring tetrazolylacetic acids and their esters. *Inorganica Chimica Acta*, 473, 133-144.

329. Stark, C., Steger-Hartmann, T. (2015). Nonclinical safety and toxicology. In U. Nielsch, U. Fuhrmann, and S. Jaroch (Eds.), *New Approaches to Drug Discovery*: New York: Springer, 261-283.

330. İnternet: FDA. (2024). *The Drug Development Process / Step 2: Preclinical Research*. Web: https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-2-preclinical-research, Son Erişim Tarihi: 12/06/2024.

331. İnternet: FDA. (2024). *Drug Development and Review Definitions*. Web: https://www.fda.gov/drugs/investigational-new-drug-ind-application/drug-development-and-review-definitions#:~:text=At%20the%20preclinical%20stage%2C%20the,months%2C%20depending%20on%20the%20proposed, Son Erişim Tarihi: 12/06/2024.

332. DeGeorge, J. J., Ahn, C.-H., Andrews, P. A., Brower, M. E., Giorgio, D. W., Goheer, M. A., Lee-Ham, D. Y., McGuinn, W. D., Schmidt, W., Sun, C. J. and Tripathi, S. C. (1997). Regulatory considerations for preclinical development of anticancer drugs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 41(3), 173-185.

333. İnternet: EMA. (2009). *Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals*. Web: https://database.ich.org/sites/default/files/S9_Guideline.pdf, Son Erişim Tarihi: 12/06/2024.

334. İnternet: FDA. (2010). *Guidance for Industry S9 Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals* Web: https://www.fda.gov/media/73161/download, Son Erişim Tarihi: 12/06/2024.

335. İnternet: ICH. (2018). *ICH S9 Guideline: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals, Questions and Answers*. Web: https://database.ich.org/sites/default/files/S9_Q%26As_Q%26As.pdf, Son Erişim Tarihi: 12/06/2024.

336. Settivari, R. S., Martini, A., Wijeyesakere, S., Toltin, A. and LeBaron, M. J. (2024). Application of evolving new approach methodologies for chemical safety assessment. In *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*. New York: Elsevier, 977-1015.

337. Denny, K. H., Stewart, C. W. (2024). Acute, subacute, subchronic, and chronic general toxicity testing for preclinical drug development. In *A comprehensive guide to toxicology in nonclinical drug development*. New York: Elsevier, 149-171.

338. Roncaglioni, A., Lombardo, A., Benfenati, E. (2022). The VEGAHUB platform: The philosophy and the tools. *Alternatives to Laboratory Animals*, 50(2), 121-135.

339. Sawant, S. G., Fielden, M. R., Black, K. A. (2014). Evaluation of genotoxicity testing of FDA approved large molecule therapeutics. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 70(1), 87-97.

340. Oren, O., Neilan, T. G., Fradley, M. G. and Bhatt, D. L. (2021). Cardiovascular safety assessment in cancer drug development. *Journal of the American Heart Association*, 10(24), e024033.

341. Kalyaanamoorthy, S., Barakat, K. H. (2018). Development of safe drugs: the hERG challenge. *Medicinal Research Reviews*, 38(2), 525-555.

342. Zhang, R., Tian, P., Chi, Q., Wang, J., Wang, Y., Sun, L., Liu, Y., Tian, S. and Zhang, Q. (2012). Human ether-a-go-go-related gene expression is essential for cisplatin to induce apoptosis in human gastric cancer. *Oncology Reports*, 27(2), 433-440.

343. Vargas, H. M., Bass, A. S., Breidenbach, A., Feldman, H. S., Gintant, G. A., Harmer, A. R., Heath, B., Hoffmann, P., Lagrutta, A. and Leishman, D. (2008). Scientific review and recommendations on preclinical cardiovascular safety evaluation of biologics. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 58(2), 72-76.

344. Patil, V. M., Gaurav, A., Garg, P. and Masand, N. (2021). Non-cancer to anti-cancer: investigation of human ether-a-go-go-related gene potassium channel inhibitors as potential therapeutics. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 33(1), 1-16.

345. Hsiao, Y., Su, B.-H., Tseng, Y. J. (2021). Current development of integrated web servers for preclinical safety and pharmacokinetics assessments in drug development. *Briefings in Bioinformatics*, 22(3), bbaa160.

346. Matsumura, S., Ohta, T., Yamanouchi, K., Liu, Z., Sudo, T., Kojimahara, T., Seino, M., Narumi, M., Tsutsumi, S. and Takahashi, T. (2017). Activation of estrogen receptor α by estradiol and cisplatin induces platinum-resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*, 18(9), 730-739.

347. Kashiwagi, E., Ide, H., Inoue, S., Kawahara, T., Zheng, Y., Reis, L. O., Baras, A. S. and Miyamoto, H. (2016). Androgen receptor activity modulates responses to cisplatin treatment in bladder cancer. *Oncotarget*, 7(31), 49169.

348. Li, Y., Yuan, H., Yang, K., Xu, W., Tang, W. and Li, X. (2010). The structure and functions of P-glycoprotein. *Current Medicinal Chemistry*, 17(8), 786-800.

349. Juliano, R. L., Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 455(1), 152-162.

350. Lin, J. H., Yamazaki, M. (2003). Role of P-Glycoprotein in pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(1), 59-98.

351. Clarke, R., Leonessa, F., Trock, B. (2005). Multidrug resistance/P-glycoprotein and breast cancer: review and meta-analysis. *Seminars in Oncology*, 3, 9-15.

352. Clerbaux, L.-A., Paini, A., Lumen, A., Osman-Ponchet, H., Worth, A. P. and Fardel, O. (2019). Membrane transporter data to support kinetically-informed chemical risk assessment using non-animal methods: Scientific and regulatory perspectives. *Environment International*, 126, 659-671.

353. Amacher, D. E. (2010). The effects of cytochrome P450 induction by xenobiotics on endobiotic metabolism in pre-clinical safety studies. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 20(4), 159-166.

354. Andrade, E., Bento, A., Cavalli, J., Oliveira, S., Schwanke, R., Siqueira, J., Freitas, C., Marcon, R. and Calixto, J. (2016). Non-clinical studies in the process of new drug development-Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49(12), e5646.

355. Casals-Casas, C., Desvergne, B. (2011). Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annual Review of Physiology*, 73, 135-162.

356. Aranda, A., Martínez-Iglesias, O., Ruiz-Llorente, L., García-Carpizo, V. and Zambrano, A. (2009). Thyroid receptor: roles in cancer. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(7), 318-324.

357. Kim, W. G., Cheng, S.-y. (2013). Thyroid hormone receptors and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(7), 3928-3936.

358. Gigliotti, B. J., Jasim, S. (2024). Differentiated thyroid cancer: a focus on post-operative thyroid hormone replacement and thyrotropin suppression therapy. *Endocrine*, 83(2), 251-258.

359. Anwanwan, D., Singh, S. K., Singh, S., Saikam, V. and Singh, R. (2020). Challenges in liver cancer and possible treatment approaches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1873(1), 188314.

360. Pandit, A., Sachdeva, T., Bafna, P. (2012). Drug-induced hepatotoxicity: a review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*(Issue), 233-243.

361. Vincenzi, B., Armento, G., Spalato Ceruso, M., Catania, G., Leakos, M., Santini, D., Minotti, G. and Tonini, G. (2016). Drug-induced hepatotoxicity in cancer patients-implication for treatment. *Expert Opinion on Drug Safety*, 15(9), 1219-1238.

362. Crofton, K. M., Bassan, A., Behl, M., Chushak, Y. G., Fritsche, E., Gearhart, J. M., Marty, M. S., Mumtaz, M., Pavan, M. and Ruiz, P. (2022). Current status and future directions for a neurotoxicity hazard assessment framework that integrates in silico approaches. *Computational Toxicology*, 22, 100223.

363. Staflin, K., Misner, D., Dambach, D. (2016). Utilization of in vitro neurotoxicity models in pre-clinical toxicity assessment. *Stem Cells in Toxicology and Medicine*, 155-178.

364. Yadav, R., Kumar, D., Singh, J. and Jangra, A. (2024). Environmental toxicants and nephrotoxicity: implications on mechanisms and therapeutic strategies. *Toxicology*, 153784.

365. Dobrek, L. (2023). A synopsis of current theories on drug-induced nephrotoxicity. *Life*, 13(2), 325.

366. Connor, S., Li, T., Qu, Y., Roberts, R. A. and Tong, W. (2024). Generation of a drug-induced renal injury list to facilitate the development of new approach methodologies for nephrotoxicity. *Drug Discovery Today*, 103938.

367. Troth, S. P., Simutis, F., Friedman, G. S., Todd, S. and Sistare, F. D. (2019). *Kidney safety assessment: current practices in drug development*. Seminars in nephrology, 120-131.

368. Herling, A., Perluk, T. M., Freund, O., Maharshak, N. and Cohen, N. A. (2024). Pulmonary manifestations of IBD: case report and review of the literature. *Journal of Clinical Medicine*, 13(18), 5401.

369. Bassan, A., Alves, V. M., Amberg, A., Anger, L. T., Beilke, L., Bender, A., Bernal, A., Cronin, M. T., Hsieh, J.-H. and Johnson, C. (2021). In silico approaches in organ toxicity hazard assessment: Current status and future needs for predicting heart, kidney and lung toxicities. *Computational Toxicology*, 20, 100188.

370. Hanton, G. (2007). Preclinical cardiac safety assessment of drugs. In *Drugs in R & D*, 8, New York: Springer, 213-228.

371. İnternet: WHO. (2024). *Cardiovascular diseases*. Web: https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1, Son Erişim Tarihi: 26/04/2024.

372. Kettenhofen, R., Bohlen, H. (2008). Preclinical assessment of cardiac toxicity. *Drug Discovery Today*, 13(15-16), 702-707.

373. Mourya, A. S., Pandey, R. K. (2024). A study on factors attributed to failure of pharmaceutical products. *Applied Science and Biotechnology Journal for Advanced Research*, 3(2), 12-21.

374. Berridge, B., Pierson, J., Pettit, S. and Stockbridge, N. (2024). Challenging the status quo: a framework for mechanistic and human-relevant cardiovascular safety screening. *Frontiers in Toxicology*, 6, 1352783.

375. Kulesh, V., Vasyutin, I., Volkova, A., Peskov, K., Kimko, H., Sokolov, V. and Alluri, R. (2024). A tutorial for model-based evaluation and translation of cardiovascular safety in preclinical trials. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, 13(1), 5-22.

376. Ahmed, B., Abdelaziz, D., Abdelmajid, B. (2024). *Advancements in cardiotoxicity detection and assessment through artificial intelligence: a comprehensive review*. 2024 4th International Conference on Innovative Research in Applied Science, Engineering and Technology (IRASET), Fez, 1-8.

377. Banerjee, A. (2014). Gastrointestinal toxicity biomarkers. In *Biomarkers in Toxicology*. New York: Elsevier, 269-277.

378. Peters, M. F., Choy, A. L., Pin, C., Leishman, D. J., Moisan, A., Ewart, L., Guzzie-Peck, P. J., Sura, R., Keller, D. A. and Scott, C. W. (2020). Developing in vitro assays to transform gastrointestinal safety assessment: potential for microphysiological systems. *Lab on a Chip*, 20(7), 1177-1190.

379. Al-Saffar, A., da Costa, A. N., Delaunois, A., Leishman, D. J., Marks, L., Rosseels, M.-L. and Valentin, J.-P. (2015). Gastrointestinal safety pharmacology in drug discovery and development. *Principles of Safety Pharmacology*, 291-321.

380. Newell, D., Burtles, S., Fox, B., Jodrell, D. and Connors, T. (1999). Evaluation of rodent-only toxicology for early clinical trials with novel cancer therapeutics. *British Journal of Cancer*, 81(5), 760-768.

381. Kazmi, S. R., Jun, R., Yu, M.-S., Jung, C. and Na, D. (2019). In silico approaches and tools for the prediction of drug metabolism and fate: A review. *Computers in Biology and Medicine*, 106, 54-64.



*Gazili olmak ayrıcalıktır…*