



## ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.  
2011; 25 (1): 25 - 32  
http://www.fusabil.org

### Yeni Sentezlenen Bir Tiyosemikarbazon Türevinin Prostat Kanseri Hücre Kültürleri Üzerine Antikanserojenik Özelliklerinin Belirlenmesi: *In Vitro* Bir Çalışma

Ali BEYTUR<sup>1</sup>  
Suat TEKİN<sup>2</sup>  
Taha KELEŞTİMUR<sup>3</sup>  
Zuhal ERGİN<sup>4</sup>  
Süleyman SANDAL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>İnönü Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Üroloji Anabilim Dalı  
Malatya, TÜRKİYE

<sup>2</sup>İnönü Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Fizyoloji Anabilim Dalı  
Malatya, TÜRKİYE

<sup>3</sup>Yeditepe Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Fizyoloji Anabilim Dalı  
İstanbul, TÜRKİYE

<sup>4</sup>Fırat Üniversitesi,  
Fen Fakültesi,  
Kimya Bölümü  
Elazığ, TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 20.02.2011  
Kabul Tarihi : 28.03.2011

#### Yazışma Adresi Correspondence

Süleyman SANDAL  
İnönü Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı,  
Malatya-TÜRKİYE

ssandal@inonu.edu.tr

**Amaç:** Prostat kanseri, erkeklerde en yaygın olan kanser türlerinden biridir. Değişik tipteki çoğu kanser türleri için kesin çözüm olabilecek bir tedavi yöntemi tam olarak geliştirilemediği için, bu yöndeki çalışmalar artarak devam etmekte ve güncelliğini korumaktadır. Tiyosemikarbazon (TSC) ve Schiff bazlarının türevleri ve bunların metal kompleksleri antitümör aktiviteye sahiptirler ve antitümör ilaçlar olarak kullanılmaktadırlar. Bu bileşiklerde meydana getirilen yapısal değişikliklerle oluşturulan maddelerin farklı etkilere sahip olduğu kantitatif yapı-aktivite ilişkisi (QSAR) araştırmaları ile ortaya konulmuştur. Çalışmamızın amacı, laboratuvarlarımızda sentezlenebilen ve antikanserojenik etki gösterme potansiyeline sahip bu bileşiklerin muhtemel antikanserojenik etkilerinin belirlenmesi ve bu etkilerinin mekanizmalarının aydınlatılmasıdır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada androjen duyarlı (LNCaP) ve androjen duyarsız (PC3) olarak iki farklı prostat kanseri hücre kültürü kullanıldı. İlk aşamada, prostat kanseri hücreleri TSC türevi ve farklı metal komplekslerinin 1, 25 ve 50 µM'lık konsantrasyonlarıyla 24 saat süreyle inkübe edildiler ve 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) yöntemi ile bu maddelerin antitümör etkinlikleri belirlendi. Comet assay ile de DNA hasarı üzerinden etkilerinin varlığı tayin edildi.

**Bulgular:** TSC ve metal komplekslerinin hepsinin (Ni kompleksi hariç) LNCaP hücrelerinin canlılığı üzerine doz bağımlı olarak etkilerinin olduğu belirlendi. Ancak PC3 hücreleri üzerine (ligandın 25 ve 50 µM konsantrasyonları hariç) herhangi bir etki gözlenmedi.

**Sonuç:** Bu çalışmanın sonuçları, test edilen ajanların LNCaP hücreleri üzerine antitümör aktiviteye sahip olduğunu ve bu etkilerini androjen reseptörü varlığında DNA hasarına sebep olarak ortaya koyduğunu gösterdi.

**Anahtar Kelimeler:** LNCaP, PC3, tiyosemikarbazon, DNA hasarı, prostat kanseri.

#### Determination of Anti-Carcinogenic Properties of a Newly Synthesized Thiosemicarbazone Derivate on Prostate Cancer Cell Cultures: an *In Vitro* Study

**Objective:** Prostate cancer is the most common type of cancer in males. There is currently no therapy to cure various types of cancer, and hence studies aiming to develop cancer treatment are important and ongoing. Thiosemicarbazone (TSC) and Schiff base and their metal complexes have antitumor activity and are being used as antitumor drugs. It has been revealed with quantitative-structure-activity relationship (QSAR) studies that production of new substances by structural changes in these compounds has different effects. In this study, a new TSC and its Cu, Co and Ni metal complexes synthesized in our laboratory was investigated in terms of their mechanism of action and antitumor properties by using androgen-dependent (LNCaP) and independent (PC3) human prostate cancer cell lines.

**Materials and Methods:** At the first stage of the study, these cell lines were treated with varying concentrations of TSC and Schiff base and their metal complexes (1,25 and 50 µM) for 24 h. Antitumor activities of these substances were evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Mode of action of these antitumor substances was determined by comet assay (reveals DNA damage).

**Results:** TSC and its metal complexes (except Ni complex) dose-dependently reduced cell viability of LNCaP cells but they did not have any effect on viability of PC3 cells (except 25 and 50 µM). All of the substances dose-dependently increased DNA breakage in LNCaP cells, but not in PC3 cells.

**Conclusion:** Our results indicate that the tested agents have antitumor activity on LNCaP cell lines and these cytotoxic effects appear to be androgen receptor dependent DNA damage.

**Key Words:** LNCaP, PC3, thiosemicarbazone, DNA damage, prostate cancer.

#### Giriş

Prostat kanseri, ülkemizde yüz binde 24,33'lük oranla akciğer kanserinden sonra ikinci en sık görülme oranına sahip kanser türüdür (1). Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da da insidansı oldukça yüksektir (2). Tiyosemikarbazon (TSC) ve Schiff Bazı (SB) türevleri, antiviral, antineoplastik vb etkileri nedeniyle yoğun bir kullanım alanına sahiptirler (3). Bu bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin, molekülün iki azot atomu ve bir

kükürt atomu ile esansiyel ağır metal iyonları arasında oluşan üç dişli şelat oluşturma yeteneğinden kaynaklanabileceği belirtilmektedir (4). Bazı araştırmacılar ligandlara göre şelatların daha aktif olduğunu ve aromatik aldehitlerle birleşerek yeni bileşikler oluşturmuş (sübstitüye olmuş) TSC'ler ve metal komplekslerinin güçlü bir farmakolojik etkiye sahip olduklarını rapor etmişlerdir (5). TSC'lerle ilgili yapılan mevcut araştırmalarda ligand olarak özellikle 2-asetil pridin, geçiş metali olarak çoğu enzim kofaktörleri olan Cu, Co, Ni, Zn gibi metallerle birlikte canlı organizmalar için çok toksik olmalarına rağmen, Cd ve Hg bileşiklerinin de antitümör özellikleri araştırılmıştır (6, 7). TSC'ler ve SB türevleri DNA ve RNA sentezini inhibe etmektedirler. Onların bu etkisi ribonükleotitleri deoksiribonükleotitlere indirgeyen ribonükleotit redüktazın (RR) bilinen en güçlü inhibitörü olmalarından kaynaklanmaktadır (2). RR, hücre bölünmesi ve tümör gelişimi için oldukça önemli bir enzimdir (8, 9). RR inhibitörü olan TSC'ler DNA sentezi ve tamirini inhibe ederek antineoplastik etkiler gösterirler (10). Yapılan prelinik melanoma modellerinde (11) ve prostat kanserli hastalara tek ajanın uygulandığı Faz I çalışmalarında (12) 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde TSC'nin (Triapine®) antitümör aktivite gösterdiği saptanmıştır. Farklı TSC analoglarının etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, TSC analoglarının DU 145 prostat kanseri hücrelerinin invazyonunu (en güçlü olarak 3-bromophenyl-20 -fluorophenyl TSC 1) önemli biçimde inhibe ettikleri ortaya konulmuştur (13). Adsule ve ark. da PC-3 ve LNCaP prostat kanseri hücreleri üzerinde yaptıkları denemelerde yeni TSC ve SB-Cu komplekslerinin doz bağımlı olarak antiproliferatif ve pro-apoptotik aktiviteye sahip olduklarını ve bu etkilerini de kanser hücrelerinde proteozom aktivitesini inhibe ederek ortaya koyduklarını rapor etmişlerdir (14). TSC'lerin antitümör aktiviteye sahip olması ve bu aktivitelerini de genellikle DNA üzerine etki ederek gösterdikleri ileri sürülmüştür (2, 10). Bu çalışma, laboratuvarımızda sentezlenen ve antitümör aktiviteye sahip olma potansiyelinde olan yeni TSC ve metal komplekslerinin *in vitro* olarak antitümör özelliklerinin belirlenmesi ve sergileyecekleri olası etkilerinin DNA hasarı ile ilişkisini ortaya çıkarmak amacıyla planlandı.

## Gereç ve Yöntem

### Kimyasallar ve ajanlar

Test edilecek ligand (L) [(E)-4-((5-amino-3-(2-hydroxybenzylideneamino)-1H-pyrazol-4-yl) diazenil) benzoic acid] ve farklı metal kompleksleri (L-Co, L-Cu, L-Ni), Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde sentezlendi ve karakterize edildi (15-26). Newborn Fetal calf serum (FCS) ve penisilin-streptomisin Biological Industries'den (Israel), NaCl, NaOH, dimetil sülfoksit (DMSO) ve HCl Merck'ten (Dormstadt, Germany) satın alındı. Kullanılan diğer kimyasallar, medyumlar ve ajanlar Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, USA) sağlandı. Deneylerin tüm safhalarında bi-distile su kullanıldı. Test edilen ligandlar DMSO' da çözüldüler ve DMSO' nun final konsantrasyonu uygulamaların hiçbirinde %0.5'den daha büyük bir konsantrasyonda değildi.

### Hücre kültürleri

Androjen reseptör pozitif (LNCaP) ve androjen reseptör negatif (PC3) insan prostat kanseri hücre serileri Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üro-onkolojik Araştırmalar Laboratuvarı'ndan ücretsiz olarak temin edildi. Tüm hücreler 25 mm<sup>2</sup> kültür flasklarında, içerisine %10 FCS, 100U/ml penisilin ve 0.1mg/ml streptomisin ilave edilerek hazırlanan RPMI-1640 medyumuna ile beslendiler. %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde, 37°C'de ve nemli ortamda tutulan hücrelerin medyumları haftada iki defa değiştirildi. Hücreler konfluent olduğunda tripsin-EDTA kullanılarak flasklardan söküldü ve 96 kuyucuklu plakelere aktarılarak MTT ve Comet Assay analizlerinde kullanıldılar.

### Test ajanları ile muamele

Test edilecek ajanların (L, L-Co, L-Cu, L-Ni ) 1, 25 ve 50 µM'lık konsantrasyonları ile aynı miktarlarda çözücü (DMSO) hücrelerin içinde bulunduğu kuyucuklara ilave edildi ve CO<sub>2</sub> inkübatöründe (Nuair Co, Plymouth, MN, ABD) 24 saat süreyle 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonlar sonrasında hücrelerin canlılık oranı bir hemositometrede %0.4 trypan blue kullanılarak belirlendi. Canlılık oranının %90'ın altında olduğu durumlarda deneylere başlanmadı.

### MTT Assay

Sitotoksik etkiler, sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biri olan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid] assay yöntemi ile belirlendi (27). Bu yöntem, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntemde, MTT canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilmekte ve spektrofotometrik olarak belirlenen değer yasayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir (27, 28). Steril PBS içerisinde hazırlanan stok MTT solüsyonundan, 0,5 mg/mL MTT çalışma solüsyonu hazırlandı ve 96 kuyucuklu plaklara ilave edildi. İnkübatörde 3 saat bekletildikten sonra plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında (Bio-Rad, ABD) 540 nm dalga boyunda okutuldu (29). Kontrol kuyucukları okutulurken elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu değer %100 canlı hücre olarak kabul edildi. Çözücü ve ajan uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlandı ve yüzde canlılık olarak kabul edildi. MTT denemeleri farklı günlerde en az 10 kez tekrarlandı ve test maddelerinin prostat kanseri hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin olup olmadığı tespit edilmeye çalışıldı.

### Comet Assay

Tek hücre jel elektroforezi olarak da bilinen Comet Assay, memelilerin DNA hasarını (genotoksosite)

belirlemek için yaygın olarak kullanılır (30). Nötral comet assay tekniği Devlin ve ark. (31) tarafından tarif edilen metotta küçük değişiklikler yapılarak uygulandı. Kısaca şöyleydi: İlk olarak rodajlı lamlar mikrodalga fırında PBS içerisinde çözdürülen %0.65'lik high melting agarose (HMA) ile kaplandı ve karanlıkta 1 gün süreyle kurumaya bırakıldı. Kültüre edilen prostat kanser hücre tipleri, test edilecek bileşiklerin farklı konsantrasyonları (1, 25 ve 50  $\mu\text{M}$ ) ile 24 saat inkübe edildiler. İnkübasyondan sonra hücreler 42°C sıcaklıktaki low melting agarose ile karıştırılarak HMA ile kaplanmış lam üzerine yayıldı ve lamaların üzeri hızlı bir şekilde lamelle kapatılarak agar katılaşmaya kadar 10-15 dakika süreyle karanlıkta +4°C'de tutuldular. Daha sonra lamalar stok lizis solüsyonundan (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH: 10) taze olarak hazırlanmış soğuk lizis solüsyonu (stok lizis solüsyonuna, %1 Triton X-100 ve %10 DMSO ilave edilerek hazırlandı) içerisine yerleştirildi ve yine karanlıkta +4°C'de 1 saat süreyle bekletildi.

#### Elektroforez

Lizis işleminden sonra lamalar içerisi soğuk nötral elektroforez tamponu ile dolu yatay bir elektroforez tankına (Bio-Rad, ABD) aynı yönlü olarak yerleştirildi. Lamalar tanka yerleştirilmeden önce tankın voltu 25 V (0.83 V/cm), amperi de 300 mA'e sabitlendi ve 20 dakika süreyle işleme devam edildi. Elektroforez sonrasında lamalar nötralizasyon tamponu (0.4 M Tris, pH 7.5) ile 3 kez 5 dk, +4°C'de nötralize edildiler. Daha sonra lamalar,

50  $\mu\text{l}$  ethidium bromide ile boyandı ve üzerine lamel kapatılarak karanlıkta +4°C'de 20-30 dk. kadar bekletildi.

#### Skorlama

Skorlama işlemi, bir floresans mikroskop (Zeiss Axiovert, Almanya) ve Comet IV software programı kullanılarak yapıldı. Her lamdan rastgele en az 25 hücre sayılarak, grupların tail intensity (TI), tail length (TL) ve tail moment (TM) parametreleri belirlendi. TI, TL ve TM parametrelerinde meydana gelen artışlar DNA hasarının varlığını ve oranını belirlememize yardımcı oldu. Analizler farklı günlerde en az beşer kez tekrarlandı.

#### İstatistiksel Analizler

Verilerin analizinde SPSS 15.0 for Windows programı kullanıldı. MTT Assay'den elde edilen hücre canlılığı yüzde değerleri Students' t testi kullanılarak, Comet Assay'den elde edilen sonuçlar da one-way ANOVA post hoc Tukey HSD testi kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar ortalaması±SEM olarak belirtildi ve  $p<0.05$  olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

#### Bulgular

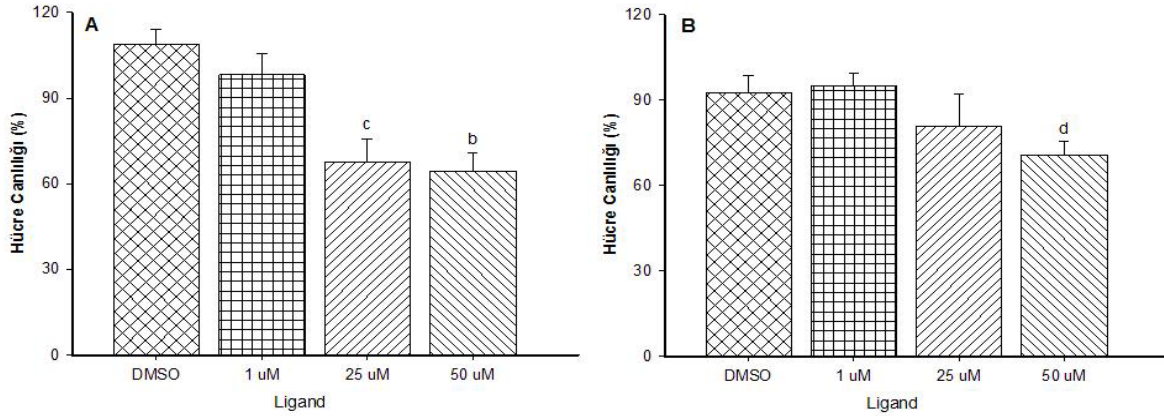
**Hücre canlılığı:** LNCaP ve PC3 hücreleri 24 saat süreyle L, L-Cu, L-Co ve L-Ni'nin farklı konsantrasyonları ile (1, 25 ve 50  $\mu\text{M}$ ) inkübe edildikten sonra hücrelerin canlılık oranlarında meydana gelen % değişimler MTT assay ile belirlenip tüm sonuçlar Tablo 1' de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** LNCaP ve PC3 insan prostat kanser hücre kültürlerine test ajanlarının uygulanmasından 24 saat sonra hücre canlılık oranlarında meydana gelen % değişiklikler (Students' t testi; <sup>a</sup> $p<0.001$ , <sup>b</sup> $p<0.005$ , <sup>c</sup> $p<0.01$  ve <sup>d</sup> $p<0.05$ ).

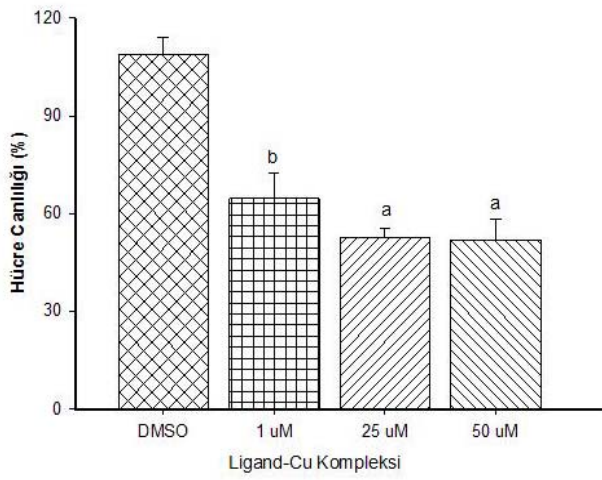
	LNCaP			PC3		
	1 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$
Çözücü Kontrol	108.72±5.48	108.72±5.48	108.72±5.48	92.56±5.89	92.56±5.89	92.56±5.89
Ligand	98.23±7.53	67.47±8.14 <sup>c</sup>	64.42±6.49 <sup>b</sup>	95.20±4.32	80.71±11.49	70.73±4.77 <sup>d</sup>
Ligand-Cu	64.58±7.99 <sup>b</sup>	52.82±2.80 <sup>a</sup>	51.86±6.25 <sup>a</sup>	84.63±3.79	74.50±10.93	71.70±9.36
Ligand-Co	67.89±3.58 <sup>b</sup>	54.45±8.05 <sup>b</sup>	56.57±6.42 <sup>b</sup>	91.46±6.67	77.67±8.32	76.28±8.49
Ligand-Ni	68.27±5.17 <sup>b</sup>	69.24±6.06 <sup>b</sup>	71.95±6.78 <sup>c</sup>	81.59±2.48	82.01±6.36	76.37±8.09

LNCaP hücrelerine uygulanan ligandın 25 ve 50  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları hücre canlılığında anlamlı azalmaya sebep olurken ( $p<0.01$  ve  $p<0.005$ , sırasıyla; Şekil 1A), PC3 hücreleri üzerine sitotoksik etki sadece ligandın en yüksek konsantrasyonda gözlemlendi ( $p<0.05$ , Şekil 1B).

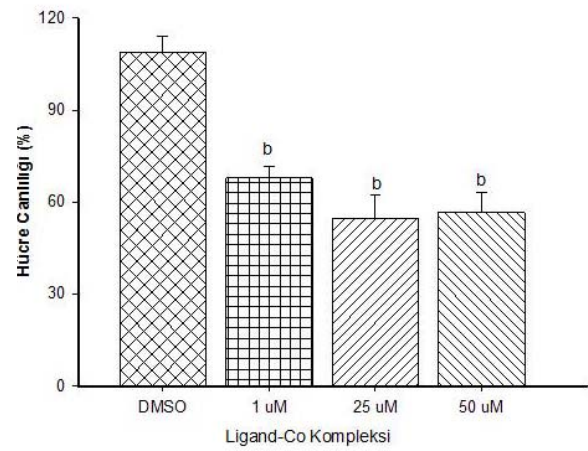
L-Cu'nun test edilen tüm konsantrasyonları LNCaP hücrelerinin canlılığında anlamlı azalmalara sebep oldu (1  $\mu\text{M}$  için  $p<0.005$ ; 25 ve 50  $\mu\text{M}$  için  $p<0.001$ ; Şekil 2) ancak PC3 hücreleri üzerine herhangi bir sitotoksik etki oluşturmadı.



**Şekil 1.** LNCaP (A) ve PC3 (B) hücre kültürlerine ligand uygulanmasından 24 saat sonra hücre canlılık oranlarında meydana gelen % değişiklikler (Students' t testi; <sup>b</sup>p<0.005, <sup>c</sup>p<0.01 ve <sup>a</sup>p<0.05).



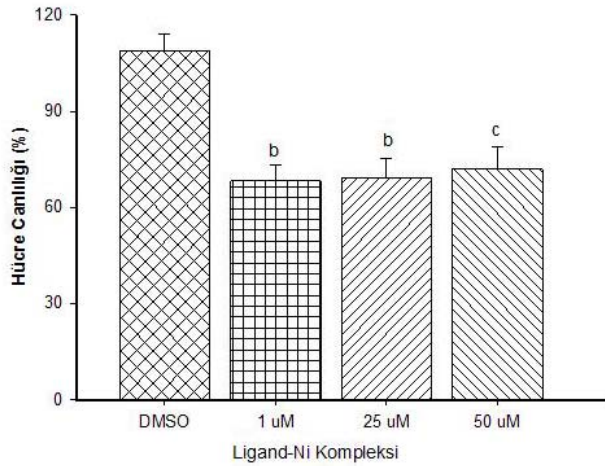
**Şekil 2.** LNCaP hücre kültürlerine ligand-Cu kompleksinin uygulanmasından 24 saat sonra hücre canlılık oranlarında meydana gelen % değişiklikler (Students' t testi; <sup>a</sup>p<0.001, <sup>b</sup>p<0.005).



**Şekil 3.** LNCaP hücre kültürlerine ligand-Co kompleksinin uygulanmasından 24 saat sonra hücre canlılık oranlarında meydana gelen % değişiklikler (Students' t testi; <sup>b</sup>p<0.005).

L-Co'nun 1, 25 ve 50 µM'lık konsantrasyonlarının hiçbir PC3 hücrelerinin canlılık oranlarında anlamlı bir azalma meydana getirmezken, LNCaP hücrelerinin canlılık oranları uygulanan tüm konsantrasyonlarda anlamlı şekilde azaldı (p<0.005; Şekil 3).

LNCaP hücreleri üzerine uygulanan L-Ni konsantrasyonlarının tamamı anlamlı biçimde sitotoksik etki sergilerken (1 ve 25 µM için p<0.005; 50 µM için p<0.01; Şekil 4), test edilen bileşiklerin hiçbir konsantrasyonu PC3 hücrelerinin canlılığının anlamlı biçimde azalmasına neden olmadı.



**Şekil 4.** LNCaP hücre kültürlerine ligand-Ni kompleksinin uygulanmasından 24 saat sonra hücre canlılık oranlarında meydana gelen % değişiklikler (Students' t testi; <sup>b</sup>p<0.005, <sup>c</sup>p<0.01).

**Tablo 2.** PC3 insan prostat kanser hücre kültürlerine test ajanlarının uygulanmasından 24 saat sonra TI, TL ve TM değerlerinde meydana gelen değişiklikler (one-way ANOVA, post hoc Tukey HSD testi).

	PC3 (1 µl)			PC3 (50 µl)		
	TI	TL	TM	TI	TL	TM
Çözücü Kontrol	13.36±0.46	0.95±0.24	0.12±0.04	13.36±0.46	0.95±0.24	0.12±0.04
Ligand	18.02±1.98	3.11±1.89	0.41±0.26	12.41±0.40	0.58±0.14	0.06±0.01
Ligand-Cu	15.38±0.67	0.93±0.03	0.10±0.01	15.03±0.96	2.50±0.50	0.27±0.05
Ligand-Co	15.43±0.61	0.98±0.27	0.11±0.03	13.37±0.35	1.67±0.25	0.16±0.04
Ligand-Ni	15.15±0.31	0.97±0.20	0.11±0.03	15.38±0.18	1.69±0.54	0.19±0.07

**Tablo 3.** LNCaP insan prostat kanser hücre kültürlerine test ajanlarının uygulanmasından 24 saat sonra TI, TL ve TM değerlerinde meydana gelen değişiklikler (one-way ANOVA, post hoc Tukey HSD testi; <sup>a</sup>p<0.001, <sup>b</sup>p<0.05 ve <sup>c</sup>p<0.005).

	1 µl			50 µl		
	TI	TL	TM	TI	TL	TM
Çözücü Kontrol	11.36±0.33	0.68±0.21	0.10±0.05	11.36±0.33	0.68±0.21	0.10±0.05
Ligand	27.38±1.97 <sup>a</sup>	23.93±2.9 <sup>a</sup>	6.00±0.86 <sup>a</sup>	18.58±1.58 <sup>a</sup>	14.49±2.57 <sup>b</sup>	3.20±0.68 <sup>b</sup>
Ligand-Cu	14.49±0.10	5.78±1.68	1.36±0.51	22.06±1.53 <sup>a</sup>	18.74±2.61 <sup>a</sup>	4.07±0.71 <sup>a</sup>
Ligand-Co	11.84±0.30	0.49±0.11	0.04±0.01	21.77±1.32 <sup>a</sup>	18.15±2.21 <sup>a</sup>	3.70±0.53 <sup>a</sup>
Ligand-Ni	12.41±0.72	1.89±0.81	0.32±0.19	34.60±1.56 <sup>a</sup>	38.73±2.83 <sup>a</sup>	9.05±0.86 <sup>a</sup>

## Tartışma

Son yıllarda çeşitli tiyazol analoglarının antitümör aktiviteleri bu bileşiklerin tiyosemikarbazon ve tiyüre türevleri için de denenmiş ve TSC parçasına sübtitüye olmuş alifatik gruplara sahip türevlerin aynı yerde

DNA hasarı Comet Assay yöntemi kullanılarak belirlendi. LNCaP ve PC3 hücreleri sentezlenen ligand ve liganda bağlı Cu, Co ve Ni gibi metal komplekslerinin 1 ve 50 µM'lık iki farklı konsantrasyonuyla 24 saat süreyle inkübe edildiler. Elde edilen TI, TL ve TM parametreleri Tablo 2 (PC3) ve Tablo 3'te (LNCaP) sunulmuştur. Test edilen maddelerin düşük veya yüksek konsantrasyonlarının hiç biri PC3 hücrelerinin DNA'sında anlamlı herhangi bir hasara sebep olmadı.

Ligandın uygulanan düşük ve yüksek konsantrasyonlarının her ikisi de TI (p<0.001), TL (p<0.001; p<0.005, sırasıyla) ve TM (p<0.001; p<0.005, sırasıyla) parametrelerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdı. 24 saat süreyle 1 µM L-Cu uygulaması parametrelerin herhangi birinde artış meydana getirmezken, 50µM'lık konsantrasyon her üç parametreyi de (TI, TL ve TM) artırarak doz bağımlı bir şekilde DNA hasarına sebep oldu (p<0.001; Tablo 3). L-Co ve L-Ni uygulaması da L-Cu uygulaması ile benzer şekilde DNA hasarını doz bağımlı olarak artırdı (her iki kompleks için p<0.001; Tablo 3).

aromatik gruplara sahip türevlere göre daha fazla aktivite gösterebileceği belirtilmektedir (32). TSC'lerin yüksek afiniteye sahip metal-iyon şelatlarının biyolojik aktiviteleri, konjuge olmayan ve metal bağlı formları arasında

oldukça farklılık göstermektedir (33-35). TSC ve SB'larda oluşturulan kimyasal değişikliklerle ortaya çıkan farklı maddenin, sentez edildiği ana maddeye göre daha farklı özellikler sergilediği yapı-aktivite çalışmalarıyla gösterilmiştir (36-38). Luque de Castro ve ark. (39) tarafından sentez edilen *1,2-Naphthoquinone-2-thiosemicarbazone*'un etkili bir antitümör ilaç olarak kullanılması düşünülürken, bu maddeden türetilen *4-hydroxy-3-methyl-1,2-naphthoquinone-1-thiosemicarbazone*'un MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine *in vitro* antitümör aktivite sergilediği belirlenmiştir (40). Bu liganda Cu bağlanmasıyla meydana getirilen metal kompleksinin ise, ana bileşenden çok daha güçlü bir antitümör aktivite sergilediği gözlenmiştir (40, 41). TSC-Cu komplekslerinin tümör hücrelerine karşı *in vitro* sitotoksik etkileri ile doğrudan ilişkili olduğu belirtilmektedir (42). Çalışmamızda ligandın farklı dozlarının uygulanması, canlılık oranlarında her iki tip hücre grubu üzerine doz bağımlı olarak etki gösterdi ancak LNCaP hücreleri üzerine olan etki daha güçlü olarak ortaya çıktı. Bakır, kobalt ve nikel komplekslerinin uygulanması PC3 hücreleri üzerinde anlamlı bir azalmaya yol açmamasına rağmen LNCaP hücreleri üzerine doz bağımlı etkiler meydana getirdiler (nikelin etkisi hariç). Özellikle ligandın bakır ve kobalt komplekslerinin etkileri en düşük dozda bile oldukça güçlü (%35.42 ve 32.11, sırasıyla) olarak ortaya çıktı. Nikel kompleksinin etkisi de benzer şekildeydi ancak etki doz bağımlı değildi. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar, denemesini yapmış olduğumuz ve yeni sentezlenmiş olan TSC türevinin anti-kanserojenik bir özelliğe sahip olabileceğini ve bu bileşiğin yapısında meydana getirilecek değişikliklerle sentezi yapılan metal komplekslerinin daha farklı ve belki de daha güçlü etkiler ortaya koyabileceğini göstermektedir. Yapılan çalışmalar, sentezlenen bu yeni bileşiklerin yapısal farklılığına bağlı olarak farklı derecelerde antitümör özelliklerinin olduğunu ortaya koysa da, bu maddelerin etki mekanizmalarını açıklamaya yönelik çalışmaların sayısı yeterli düzeyde değildir. İleri sürülen muhtemel hipotezlerden bir tanesi, metalin protein ya da enzimlere bağlanma ilgisindeki değişikliğin, DNA ile etkileşim sürecini değiştirdiği ve böylece hücre proliferasyonunun ve DNA replikasyonunun etkilenmesine sebep olduğudur (40). TSC'ler, ribonükleosit redüktazın bilinen en güçlü inhibitörlerindedir (3, 43, 44) ve SB'ları antitümör

aktivitelerini, ribonükleotitleri deoksiribonükleotitlere indirgeyen ribonükleotit redüktazı inhibe ederek gösterirler (4, 45). Ribonükleotitleri deoksiribonükleotitlere indirgeyerek dönüşümünü sağlayan bu enzim, hücre bölünmesi ve tümör gelişimi için oldukça önemlidir ve DNA biosentezinde hız kontrolünü sağlayan basamak olarak görülmektedir (8, 9). Ferrari ve ark. (6) TSC'li bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin DNA ile olan van der Waals ve hidrojen bağı gibi zayıf etkileşimlerden kaynaklandığı hipotezini ileri sürmüşlerdir. Çalışmadaki DNA hasarını belirlemeye yönelik analizlerin sonuçlarına göre, denemesini yapmış olduğumuz TSC türevi ve metal komplekslerinin etkileri hücrelere göre farklıydı. LNCaP hücreleri üzerinde yaptığımız denemelerde düşük konsantrasyonda da etkili olan ligand hariç diğer tüm ajanların etkileri doz bağımlı olarak sadece yüksek konsantrasyonda (50 µM) ortaya çıktı. Aynı maddelerin düşük ve yüksek konsantrasyonlarının PC3 hücrelerine uygulanması hücrelerde DNA hasarı meydana getirmedi. LNCaP hücrelerinin androjen reseptör pozitif, PC3 hücrelerinin ise negatif olduğu bilinmektedir (46). Çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar, kendi laboratuvarlarımızda sentezlenmiş olan bu yeni tiyosemikarbazon türevi ve metal komplekslerinin antitümör aktiviteye sahip olduğunu ve bu etkilerini prostat kanseri hücrelerinin DNA'sında hasar oluşturarak ortaya koyduğunu göstermektedir. Sitotoksik etkinin sadece LNCaP hücrelerinde ortaya çıkmış olması, etkinin androjen reseptör aracılı bir mekanizma ile olduğunu akla getirmektedir. Bu maddelerin *in vivo* denemelerde nasıl sonuçlar vereceği, sağlıklı dokular üzerine etkilerinin neler olacağını araştırılması oldukça önemlidir. Bu kapsamda etki mekanizmalarına yönelik farklı deney protokollerinin hazırlanması ve araştırmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

#### Teşekkür

Bu proje İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAPB Proje No: 2010/49) tarafından desteklenmiştir. Prostat kanseri hücrelerini temin etmemizde yardımlarını esirgemeyen Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Levent Türkeri'ye teşekkür ederiz.

#### Kaynaklar

1. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı. "2005 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri" www.saglik.gov.tr/TR/dosya/1-44481/h/kanser-istatistikleri.xls 18.02.2011.
2. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. CA Cancer J Clin 2000; 50: 7-33.
3. Liberta AE, West DX. Antifungal and Antitumour Activity of Heterocyclic Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes. Biometals 1992; 5: 121-126, (1992).
4. Demertzi DK, Domopoulou A, Demertzis MA, et al. Palladium (II) Complexes of 2-Acetylpyridine N(4)-Methyl, N(4)-Ethyl and N(4)-Phenyl - Thiosemicarbazones. Crystal Structure of Chloro (2-Acetylpyridine N(4)-Methylthiosemicarbazonato) Palladium (II). Synthesis, Spectral Studies, In Vitro and In Vivo Antitumour Activity. J of Inorg. Biochem 1997; 68: 147-155.
5. Offing OE, Martelli S. Antibacterial Activity of Metal Complexes of Benzil and Benzoin Thiosemicarbazones. IL Farmaco 1994; 49: 513-518.
6. Barton JK, Lippard SJ. Nucleic Acid Metal Ion Interactions, Sparo, T.G., Ed., Wiley Interscience, New York, 1980: pp:31-113.
7. Ferrari BM, Capacchi S, Pelosi G, et al. Synthesis, Structural Characterization and Biological Activity of Helicin

- Thiosemicarbazone Monohydrate and a Copper (II) Complex of Salicylaldehyde Thiosemicarbazone. *Inorganica Chimica Acta* 1999; 286: 134-141.
8. Alvero AB, Chen W, Sartorelli AC, et al. Triapine (3-amino-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone) Induces Apoptosis in Ovarian Cancer Cells. *J Soc Gynecol Investig* 2006; 13:145-152.
  9. Yu Y, Wong J, Lovejoy DB, et al. Chelators at the cancer coalface: desferrioxamine to Triapine and beyond. *Clin Cancer Res*; 2006; 12: 6876-6883.
  10. Cory JG, Cory AH, Rappa G, et al. Inhibitors of ribonucleotide reductase. Comparative effects of amino- and hydroxy-substituted pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones. *Biochem Pharmacol*; 1994; 48: 335-344.
  11. Finch RA, Liu M, Grill SP, Rose WC, Loomis et al. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): a potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity. *Biochem Pharmacol*; 2000; 59: 983-991.
  12. Feun L, Modiano M, Lee K, et al. Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. *Cancer Chemother Pharmacol*; 2002; 50: 223-229.
  13. Kishore Kumar GD, Chavarria GE, Charlton-Sevcik AK, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of potent thiosemicarbazone based cathepsin L inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*; 2010;20: 1415-9.
  14. Adsule S, Barve V, Chen D, et al. Novel Schiff base copper complexes of quinoline-2 carboxaldehyde as proteasome inhibitors in human prostate cancer cells. *J Med Chem*; 2006; 49: 7242-7246.
  15. Sonmez M, Levent A, Sekerci M. Synthesis and characterization of Cu(II), Co(II), Ni(II), and Zn(II) complexes of a Schiff base derived from 1-amino-5-benzoyl-4-phenyl-1H-pyrimidine-2-one and 3-hydroxysalicylaldehyde. *Synt. and React. Inorg and Metal-Org. Chem* 2003; 33: 1747-1761.
  16. Balaban A, Sekerci M, Erk B. Synthesis, physico-chemical characterization, and stability constants of metal complexes of pyridine-2-carbaldehyde thiosemicarbazone. *Synt. and React. Inorg and Metal-Org. Chem* 2003; 33: 1775-1786.
  17. Sonmez M, Sekerci M. Synthesis and characterization of Cu(II), Co(II), Ni(II) and Zn(II) Schiff base complexes from 1-amino-5-benzoyl-4-phenyl-1H-pyrimidine-2-one with salicylaldehyde. *Polish J. Chem* 2002; 76: 907-914.
  18. Temel H, Taskin T, Sekerci M. Spectral and antifungal studies of transition metal complexes of N,N'-ethylenebis(salicylideneimine). *Russian J Inorg Chem* 2004; 49: 347-351.
  19. Sonmez M, Sekerci M. A new heterocyclic Schiff base and its metal complexes. *Synt and React Inorg and Metal-Org Chem.* 2004; 34: 489-502.
  20. Sonmez M, Sekerci M. Synthesis, characterization, and thermal investigation of copper(II), nickel(II), cobalt(II), and zinc(II) complexes with 5-benzoyl-1-(phenylmethylenamino)-4-phenyl-1H-pyrimidine-2-thione. *Synt and React Inorg and Metal-Org Chem.* 2003; 33: 1689-1700.
  21. Temel H, Cakir U, Ugras HI, Sekerci M. The synthesis, characterization and conductance studies of new Cu(II), Ni(II) and Zn(II) complexes with the Schiff base derived from 1,2-bis-(o-aminophenoxy)ethane and salicylaldehyde. *J Coordination Chemistry* 2003; 56: 943-951.
  22. Temel H, Ilhan S, Sekerci M. Synthesis and characterization of a new bidentate Schiff base and its transition metal complex. *Synt and React Inorg and Metal-Org Chem* 2002; 32: 1625-1634.
  23. Temel H, Ilhan S, Sekerci M, Ziyadanogullari R. The synthesis and spectral characterization of new Cu(II), Ni(II), Co(III), and Zn(II) complexes with Schiff base. *Spectroscopy Letters* 2002; 35: 219-228.
  24. Boybay M, Sekerci M. Synthesis and characterization of 1,2-benzylidenedioxy-7-(2-hydroxybenzylideneamino)-4-azaheptane and its complexes with transition metals. *Russian J General Chemistry* 2002; 72: 1266-1270.
  25. Sekerci M, Alkan C, Cukurovali A. Synthesis and metal complexation of a Schiff base derivative of 2-amino-4-(p-tolyl)thiazole. *Russian J Inorganic Chemistry* 2000; 45: 1229-1233.
  26. Temel H, Sekerci M. Novel complexes of manganese(III), cobalt(II), copper(II), and zinc(II) with Schiff base derived from 1,2-bis(p-aminophenoxy)ethane and salicylaldehyde. *Synt and React Inorg and Metal-Org Chem* 2001; 31: 849-857.
  27. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; 89: 271-277.
  28. Horakova K, Sovcikova A, Seemannova Z, et al. Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 650-664.
  29. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983; 65: 55-63.
  30. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnstrom G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* 1996; 12: 89-96.
  31. Devlin HL, Mack PC, Burich RA, et al. Impairment of the DNA repair and growth arrest pathways by p53R2 silencing enhances DNA damage-induced apoptosis in a p53-dependent manner in prostate cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2008; 6: 808-18.
  32. Subbagh HE, Obaid AA. 2,4-Disubstituted Thiazoles II. A New Class of Antitumor Agents, Synthesis and Biological Evaluation. *Eur J Med Chem* 1996; 31: 1017-21.
  33. Garcia-Tojal J, Garcia-Orad A, Diaz AA, et al. Biological activity of complexes derived from pyridine-2-carbaldehyde thiosemicarbazone. *J Inorg Biochem* 2001; 84: 271-278.
  34. Sartorelli AC. Effect of chelating agents upon the synthesis of nucleic acids and protein: inhibition of DNA synthesis by 1-formylisoquinoline thiosemicarbazone. *Biochem Biophys Res Commun* 1967; 27: 26-32.
  35. Sartorelli AC, Agrawal KC, Tsiftoglou AS, Moore EC. Characterization of the biochemical mechanism of action of

- alpha-(N)-heterocyclic thiosemicarbazones. *Adv Enzyme Regul* 1976; 15: 117-139.
36. Durackova Z, Mendiola MA, Sevilla MT, Valent A. Thiohydrazone Copper (II) Complexes. The Relationship Between Redox Properties and Superoxide Dismutase Mimetic Activity. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 1999; 48: 109-116.
37. Rosenberg B, Van Camp L, Trosks JE, Mansour VH. Platinum Compounds : A New Class of Potent Antitumor Agents. *Nature* 1969; 222: 385.
38. Cardia MC, Begala M, Delogu A, et al. Synthesis and Antimicrobial Activity of Novel Arylideneisothiosemicarbazones. *IL Farmaco* 2000; 55: 93-98.
39. Luque de Castro MD, Cosan E, Perez-Bendito D, Valcarcel M. Analytical possibilities of 1,2-naphthoquinone 2-thiosemicarbazone. *An Quim* 1979; 75: 861-864.
40. Saha DK, Padhye S, Sinn E, Newton C. Synthesis, structure, spectroscopy and antitumor activity of hydroxynaphthoquinone thiosemicarbazone and its metal complexes against MCF-7 human breast cancer cell line. *Indian J Chem, Sect A: Inorg., Bio-inorg., Phys.,Theor. Anal. Chem.* 2002; 41: 279-83.
41. Malon M, Travnicek Z, Marysko M, et al. Metal complexes as anticancer agents 2. Iron(III) and copper(II) bio-active complexes with N6-benzylaminopurine derivatives. *Inorg Chim Acta* 2001; 323: 119-29.
42. Chan-Stier CH, Minkel D, Petering DH. Reactions of bis (Thiosemicarbazonato) Copper (II) Complexes with Tumor Cells and Mitochondria. *Bioinorganic Chem* 1976; 6: 203-217.
43. Cory JG, Chiba P. Combination Chemotherapy Directed at The Components of Nucleoside Diphosphate Reductase, In *Inhibitors of Ribonucleoside Diphosphate Reductase Activity*. Eds.; Pergamon Press : Oxford, 1989; pp:245-264.
44. Cory JG., Cory AH., Rappa G., Lorico A., Liu M., Lin TS., Sartorelli AC., Structure - Function Relationships for a New Series of Prydine - 2 - Carboxaldehyde Thiosemicarbazones on Ribonucleotide Reductase Activity and Tumour Cell Growth in Culture and in vivo, *Adv. Enz.Regul*, 35, 55-68, (1995).
45. Finch RA, Liu MC, Cory AH, et al. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone; 3-AP). An inhibitor of ribonucleotide reductase with antineoplastic activity. *Adv Enzyme Regul* 1999; 39: 3-12.
46. Rajabi H, Joshi MD, Jin C, Ahmad R, Kufe D. Androgen receptor regulates expression of the MUC1-C oncoprotein in human prostate cancer cells. *Prostate* 2011; doi: 10.1002/pros.21344.