

KLORO[1-(2-METİL-2-PROPENİL)-3-(2-KLOROBENZİL) BENZİMİDAZOL-2-İLİDEN] Ag(I) BİLEŞİĞİNİN SH-SY5Y NÖROBLASTOM HÜCRELERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Batuhan Yıldız¹, Serap Şahin-Bölükbaşı^{1*}, Neslihan Şahin²

¹ Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 58140, SİVAS

² Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Sınıf eğitimi Anabilim Dalı, 58140, SİVAS

Öz

Bu çalışmada klor içeren benzimidazol-temelli N-heterosiklik karben (NHC) ligandı (1) ve ligandın gümüş-(I) kompleksinin (2) antiproliferatif aktiviteleri araştırılmıştır. Hem ligand (1) hem de kompleksin (2), SH-SY5Y nöroblastom hücrelerine ve WI-38 insan sağlıklı fibroblast hücrelerindeki antiproliferatif aktiviteleri 24 saat, 48 saat ve 72 saat boyunca (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue (MTT) ölçümü kullanılarak test edilmiştir. Deney sonuçlarına göre ligand (1), tüm zaman noktalarında WI-38 sağlıklı hücrelerde antiproliferatif aktivite göstermemiş ancak SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde konsantrasyona ve zamana bağlı antiproliferatif aktivite göstermiştir. Sonuçlarımız, kompleksin (2), hem SH-SY5Y nöroblastom hücrelerine hem de WI-38 sağlıklı hücrelerine karşı doza ve zamana bağlı bir antiproliferatif aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca kompleksin (2), SH-SY5Y nöroblastom hücreleri ve WI-38 normal hücrelerinde liganda (1) göre daha yüksek antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Kompleks (2), SH-SY5Y nöroblastom hücreleri için 24 ve 48 saat zaman noktalarında 4 kattan fazla seçicilik göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: SH-SY5Y, MTT, Antiproliferatif aktivite, N-heterosiklik karben, Gümüş

INVESTIGATION on THE ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF CHLORO[1-(2-METHYL-2-PROPENYL)-3-(2-CHLOROBENZYL) BENZIMIDAZOLE-2-YLIDENE Ag(I) COMPOUND on SH-SY5Y NEUROBLASTOMA CELLS

Extended Abstract

In this study, it has been investigated the antiproliferative activities of benzimidazole-based NHC ligand (1) and its silver(I) complex (2) having chloride. Both ligand (1) and complex (2) have been tested for their antiproliferative activity on SH-SY5Y neuroblastoma cells and WI-38 human healthy fibroblast cells for 24 h, 48 h and 72 h using the (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. According to the experimental results, ligand (1) has not shown antiproliferative activity on WI-38 healthy cells in all-time points but has shown concentration- and time-dependent antiproliferative activity on SH-SY5Y neuroblastoma cells. Our results have shown that complex (2) has a dose and time-dependent antiproliferative activity against both SH-SY5Y neuroblastoma cells and WI-38 healthy cells. It has also been found that complex (2) has more antiproliferative activity than ligand (1) on SH-SY5Y neuroblastoma cells and WI-38 healthy cells. The IC₅₀ value of the ligand (1) towards the SH-SY5Y neuroblastoma cell line was calculated > 20, 8.90, and 4.28 µM for 24 h, 48 h, and 72 h, respectively. IC₅₀ values of ligand (1) against WI-38 normal lung fibroblast cell lines were calculated > 20 µM for 24, 48, and 72 hours. IC₅₀ values of the complex (2) against SH-SY5Y neuroblastoma and WI-38 normal lung fibroblast cell lines were found to be 3.80, 3.15, and 2.21 µM; and 16.9, 14.6, and 8.34 µM for 24 h, 48 h and 72 h, respectively. The selectivity index (SI) was determined from the ratio of the IC₅₀ value obtained from normal cells and IC₅₀ value for cancer cells. Selectivity indexes of ligand (1) and complex (2) were calculated as >1, > 2.24, and >4.67; 4.44, 4.63 and 3.77 for 24 h, 48 and 72 h, respectively. These results indicated that complex (2) has shown good selectivity (more than 4-fold) between SH-SY5Y neuroblastoma cells and normal cells for 24 h and 48 h incubation time.

Key Words: SH-SY5Y, MTT, Antiproliferative activity, N-heterocyclic carben, Silver

*Sorumlu Yazar (Corresponding Author):

Serap ŞAHİN-BÖLÜKBAŞI; Sivas Cumhuriyet Üniversitesi,
Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 58140, SİVAS

Geliş (Received) : 16.04.2020

Kabul (Accepted) : 14.10.2020

Basım (Published) : 31.12.2020

1. Giriş

Embriyonik gelişim sırasında, nöral krest hücreleri gelişmekte ve melanositik, duyuşal, enterik ve sempatik nöronlar da dahil olmak üzere birkaç farklı türe gelişmektedirler (Nakagawara vd., 2018). Ancak, embriyogenez sırasında nöral krest hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda, 'nöroblastom kök hücreleri' tarafından oluşturulan malign bir kanser türü olan nöroblastom gelişebilmektedir (Matthay vd., 2016). Nöroblastom, 4 yaşın altındaki çocukları etkileyen en sık tanımlanan nöroendokrin tümör olup 100.000 vakanın yaklaşık üçte birinde görülmektedir (Bernstein vd., 1992; Gutierrez vd., 2007). Bu oran, tüm pediatrik tümörlerin yaklaşık % 6 ila % 10'unu ve çocuklarda tümörle ilişkili ölümlerin ise % 15'ini oluşturmaktadır (Kim ve Chung, 2006). Nöroblastom vakalarında ortalama yaş 18 ay olup hastaların %90'ının 10 yaşın altında olduğu bildirilmiştir (Matthay vd., 2016). Nöroblastom, sempatik sinir sisteminin herhangi bir yerinde ortaya çıkabilen nöroendokrin tümör olmakla birlikte en yaygın olarak adrenal bezlerden birinde bulunmaktadır. Pirimer tümör bölgesi ve metastaz yaptığı alana bağlı olarak hastalığın fenotipi değişkenlik göstermektedir. Lenf düğümleri, kemik ve kemik iliğine daha sıklıkla, akciğer, karaciğer ve santral sinir sistemine ise daha az oranda metastaz yapmakta ve bu metastaz bölgeleri hem klinik semptomlar hem de sağkalım üzerinde önemli etken olmaktadır (DuBois vd., 1999). Tedavide hasta ve hastalığın durumuna göre cerrahi ile primer tümörün çıkarılması, otolog hema topoietik kök hücre nakli, radyoterapi ve kemoterapi gibi farklı yöntemler tercih edilebilmektedir. Tedavi sürecinde kemoterapötiklere karşı direnç gelişmesi ve tedavi sonrasında ise nüks sıklıkla karşılaşılan durumlardır. Bu durumların üstesinden gelebilmek için nöroblastom tedavisi için yeni tedavi stratejileri ve aday ilaç moleküllerinin geliştirilmesi önemini korumaktadır.

Kanser ülkemizdeki ve dünyada en büyük sağlık problemlerinden birisidir. Araştırmacılar, bu hastalığın tedavisi için yeni yöntemler bulmak, tabiatta doğal olarak var olan bitkisel tedavi edicileri keşfetmek veya yeni sentetik tedavi edici ilaçlar sentezlemek için çalışmalar yapmaktadırlar. N-heterosiklik karbenlerin metal kompleksleri (M-NHC), hidrojenasyon, hidroformilasyon, olefin metatezi, hidrosilasyon ve C-C eşleme gibi önemli birçok organik sentez reaksiyonlarında katalizör olarak kullanılmaları yanında bazı biyolojik aktivitelerinden dolayı tıbbi kimyada yoğun olarak çalışılmaktadır (Şahin et vd., 2015; Bortenschlager vd., 2005; Gürbüz vd., 2015; Clavier vd., 2009; Betzer vd., 2016; Haque vd., 2014). Benzimidazol, ilaç keşfi ve tıbbi biyokimyada önemli bir yapı taşı olup farklı süstitüent içeren benzimidazol türevlerinin antikanser, antiproliferatif, antimikobakteriyel, antioksidan, antikolinesteraz, antibakteriyel ve antifungal gibi farklı biyolojik aktivitelere sahip oldukları bilinmektedir (Kumar vd., 2018; Rao vd., 2018; Alpan vd., 2017; Shi vd., 2019). Diğer metaller ile kıyaslandığında düşük toksiteye sahip olan gümüş ve türevi bileşiklerin yüksek biyolojik aktivitesinin, gümüş iyonlarının hastalıklı bölgeye yavaş salınımdan olduğu düşünülmektedir. Hem benzimidazolün hemde gümüşün yararlı biyolojik aktiviteleri nedeniyle; benzimidazol içeren gümüş-NHC komplekslerine olan ilgi artmaktadır (Achar vd., 2018; Kalinowska-Lis vd., 2016; Haque vd., 2015; Jakobsen vd., 2018).

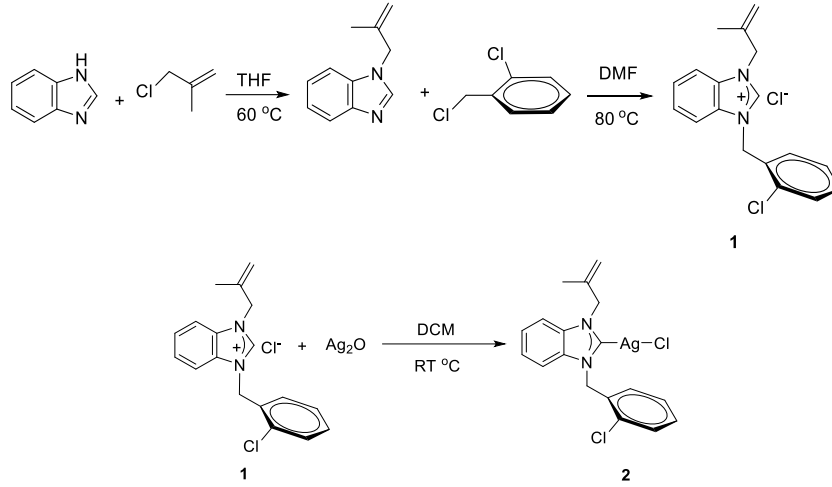
Çalışmamızda; benzimidazol içeren ligand (1) ve bu ligandın Ag(I) kompleksinin (2) SH-SY5Y nöroblastom hücreleri üzerine antiproliferatif aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca ligand (1) ve kompleksin (2) WI-38 normal insan akciğer fibroblast hücreleri üzerine antiproliferatif aktivitesi de çalışılarak ligand ve kompleksin nöroblastom hücreleri ve sağlıklı hücreler arasında olası seçici özelliği olup olmadığının araştırılması da amaçlanmıştır

2. Materyal ve Metod

2.1. [1-(2-metil-2-propenil)-3-(2-klorobenzil)benzimidazolyumklorür ligandı (1) ve Ag(I) Kompleksinin (2) sentezi

Ligand ve kompleks literatüre göre sentezlenmiştir (Şahin vd., 2019). Bir şilenk içinde heksan ile yıkanıp kurutulan sodyum hidrür (0.48 g, 20 mmol) üzerine THF (30 mL) eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat karıştırıldı. Karışım üzerine benzimidazol (2.36 g, 20 mmol) azar azar ilave edildi. Çözeltiye 2-metil-2-propenilklorür (1.82 g, 20 mmol) eklendi ve 60 °C'de 24 saat karıştırıldı. Çözelti soğutuldu ve THF vakumda uzaklaştırıldı. Elde edilen katı üzerine DCM (50 mL) ilave edildi ve filtreden selit üzerinde süzüldü. Vakum altında önce DCM uzaklaştırıldı, kalan sıvı kısım ise damıtılarak sıvı halde N-(2-metil-2-propenil)benzimidazol (% 76, 2.62 g) elde edildi. N-(2-metil-2-propenil)benzimidazol (0.34 g, 2 mmol) ve 2-klorobenzilklorür (0.32 g, 2 mmol) DMF (5 mL) içinde 80 °C'de 24 saat karıştırıldı. Soğutulan çözelti üzerine Et₂O eklendi ve çöken beyaz katı filtreden süzüldü. Elde edilen [1-(2-metil-2-propenil)-3-(2-klorobenzil)benzimidazolyumklorür (1) ligandı birkaç defa Et₂O ile yıkandı ve vakumda kurutuldu. [1-(2-metil-2-propenil)-3-(2-klorobenzil)benzimidazolyumklorür (1) (0.30 g, 1 mmol) ve Ag₂O (0.12 g, 0.5 mmol) DCM (30 mL) içerisinde 2 gün oda sıcaklığında alüminyum folyoya sarılı olarak karıştırıldı. Bu süre sonunda, reaksiyon karışımı selit üzerinden süzüldü ve çözücü vakumda uzaklaştırıldı. Ham

ürün DCM/Et₂O karışımında kristallendirildi ve kloro[1-(2-metil-2-propenil)-3-(2-klorobenzil)benzimidazol-2-iliden]gümüş(I) (**2**) kompleksi elde edildi.



Şema 1. NHC ligandının (**1**) ve Ag-NHC kompleksinin (**2**) sentezi

2.2. Antiproliferatif Aktivite

SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattı (ATCC® CRL-2266™) ve WI-38 insan normal akciğer fibroblast hücre hattı WI-38 (ATCC® CCL-75™) (Manassas, VA, USA)'dan, Dulbecco's modified Eagle media (DMEM), Fetal bovine serum (FBS), antibiyotik çözeltisi, tripsin/EDTA, MTT ve DMSO Sigma-Aldrich den ticari olarak satın alınmıştır.

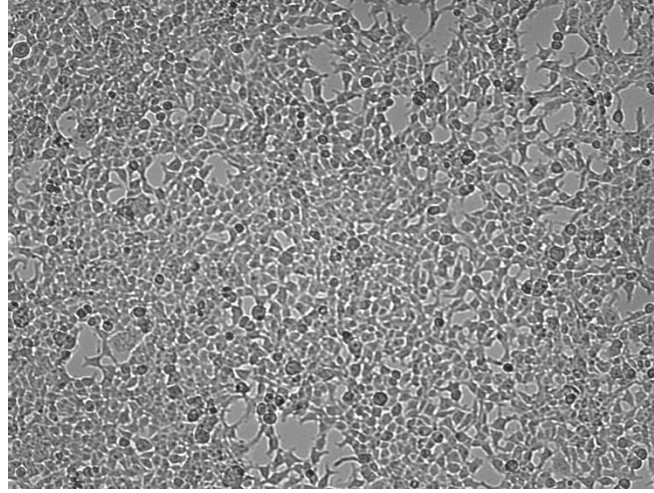
Ligand (**1**) ve kompleksin (**2**) SH-SY5Y ve WI-38 hücre hatları üzerine antiproliferatif aktiviteleri MTT ölçümüyle belirlendi (Skehan vd., 1990). Üstel olarak büyüyen SH-SY5Y ve WI-38 hücreleri pasajlandı. Hücreler, 1x10⁵ hücre/mL olacak şekilde 96-kuyulu plakalara ekildi ve hücrelerin plakalara tutunmaları için 24 saat inkübe edildi. 24 saatin bitiminde, hücrelere bileşiklerin farklı derişimleri (1–20 µM, DMSO içerisinde çözölen), uygulandı ve 5% CO₂ içeren 37°C inkübatörde 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. Kontrol kuyucuklarına DMSO (% 0.5 v/v) eklendi. 24, 48 ve 72 saatin sonunda MTT ölçümü yapıldı. MTT çözeltisinden (5 mg/mL, PBS içerisinde) herbir kuyucuğa 10 µL eklendi ve hücreler, 5% CO₂ içeren 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Besiyeri ve MTT aspire edildikten sonra 100 µL DMSO eklendi, 15 dk boyunca oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde inkübe edildi ve 570 nm dalga boyunda örneklerin absorbansları alındı. Herbir bileşik için bu ölçümler 9 tekrarlı olarak yapıldı (n=9).

2.3. İstatistik

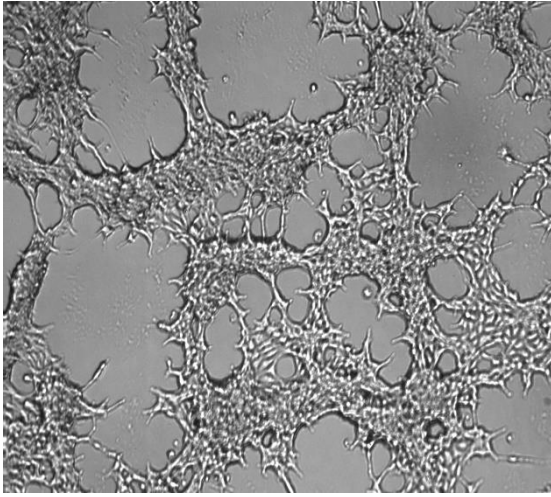
IC₅₀ değerlerinin saptanması ve istatistiksel analizler GraphPad Prism7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde One Way ANOVA ve çoklu karşılaştırmalarda Dunnett's multiple comparison test kullanıldı. Nicel veriler, ortalama ± standart hata ortalaması (Ort. ± SEM) olarak verildi ve anlamlılık için; *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001 kabul edildi.

3. Bulgular

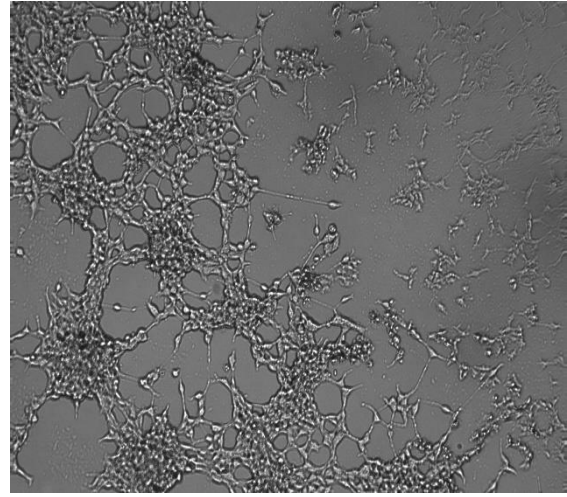
Ligand (**1**) ve kompleksin (**2**) SH-SY5Y nöroblastom ve WI-38 normal akciğer fibroblast hücre morfolojileri üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla, hücrelere ligand (**1**) ve kompleks (**2**) uygulamasından 72 saat sonra gerçek zamanlı hücre görüntüleme cihazı ile alınan görüntüleri Şekil 1. ve Şekil 2.'de verilmiştir. Kontrol hücrelerine bileşiklerin çözölmesinde kullanılan DMSO (% 0.5 v/v) eklenmiştir. SH-SY5Y nöroblastom hücre hattına farklı derişimlerde ligand (**1**) ve kompleks (**2**) uygulanmasından 72 saat sonra kontrolle karşılaştırıldığında hücre canlılığında önemli azalış gözlenmiştir (Şekil 1. ve Şekil 2.). Kompleks (**2**) uygulanan SH-SY5Y insan nöroblastom hücre canlılığındaki azalmanın, ligand (**1**) uygulamasına göre daha fazla olduğu belirlenmiştir.



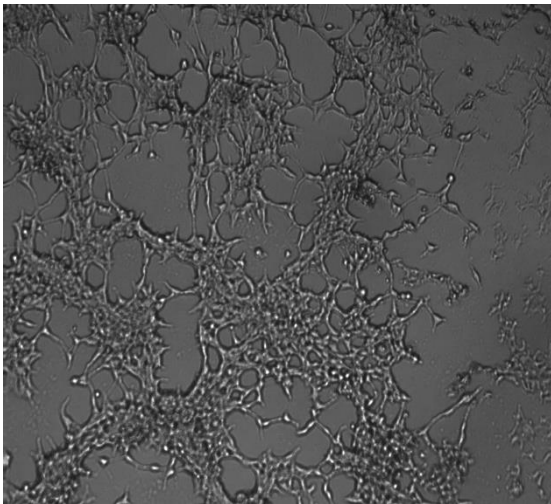
(a)



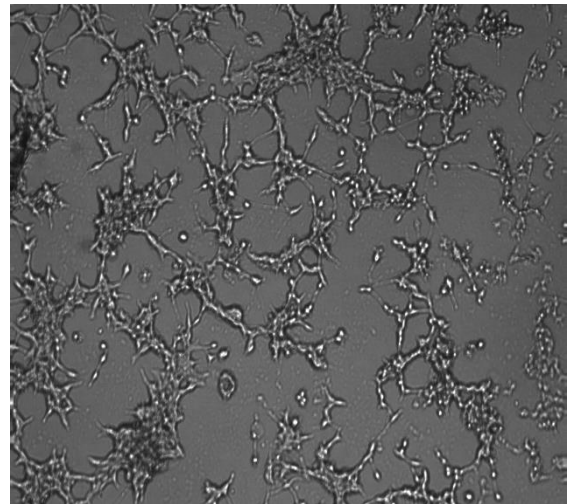
(b)



(c)

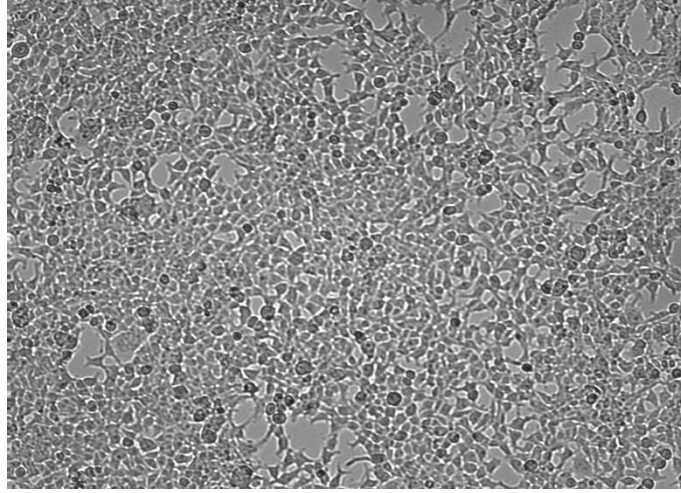


(d)

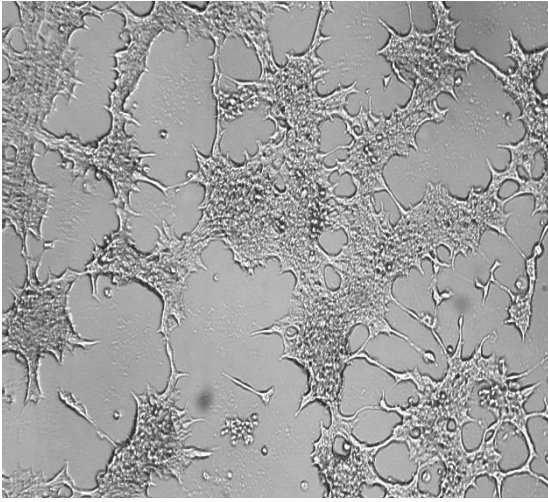


(e)

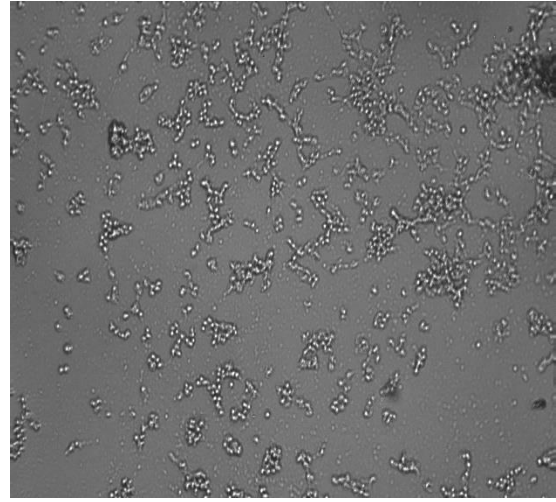
Şekil 1. [1-(2-metil-2-propenil)-3-(2-klorobenzil)benzimidazolyum klorür ligandının (1) SH-SY5Y nöroblastom hücreleri üzerine etkisi (72 saat) (a) Kontrol (b) 1 µM (c) 5 µM, (d) 10 µM, (e) 20 µM



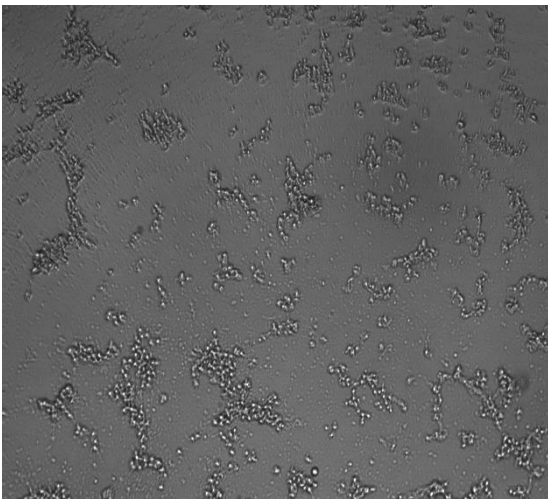
(a)



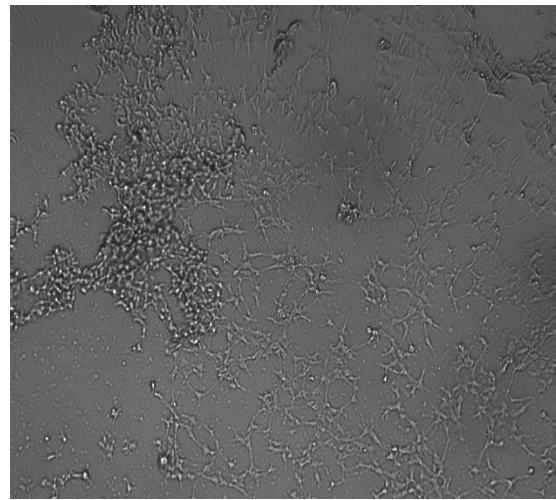
(b)



(c)



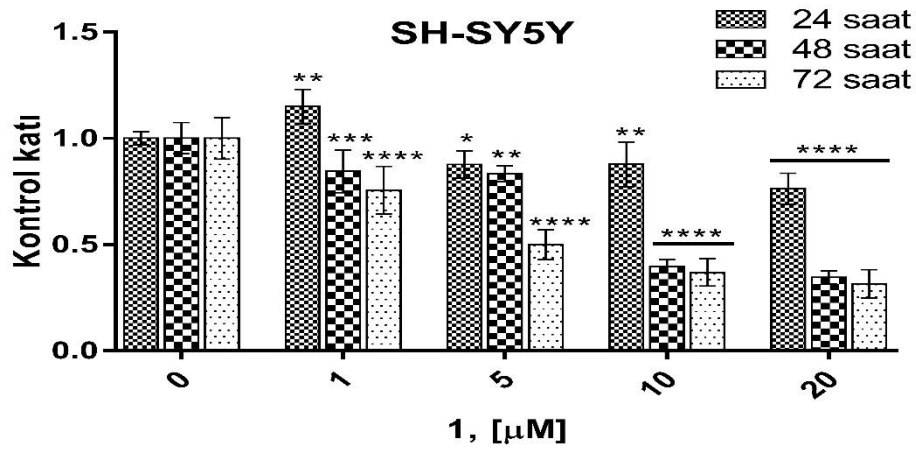
(d)



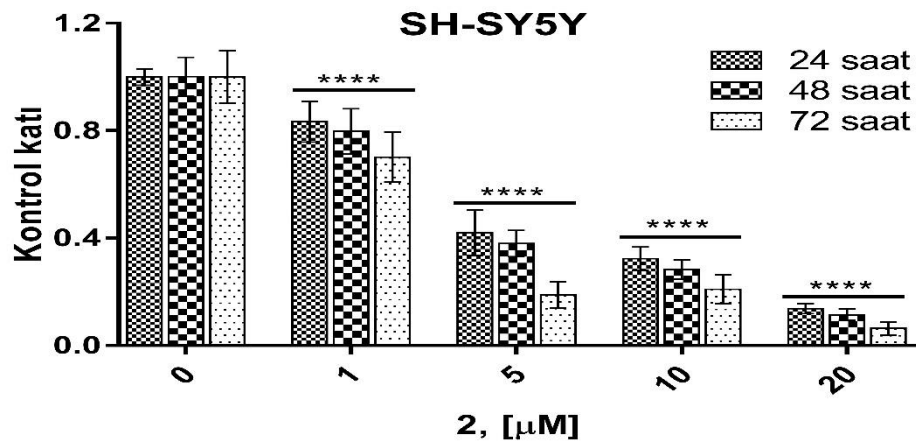
(e)

Şekil 2. Kloro[1-(2-metil-2-propenil)-3-(2-klorobenzil)benzimidazol-2-iliden]Ag(I) kompleksinin (2) SH-SY5Y nöroblastom hücreleri üzerine etkisi (72 saat) (a) Kontrol (b) 1 µM (c) 5 µM, (d) 10 µM, (e) 20 µM

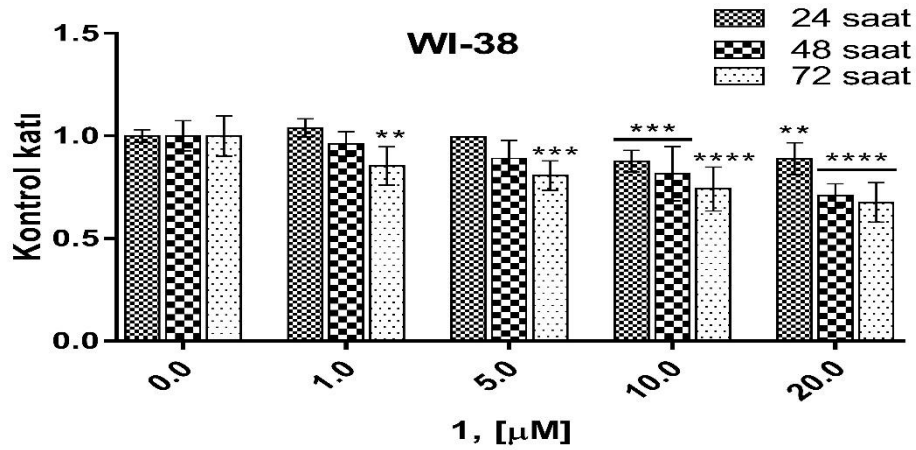
Bileşiklerin SH-SY5Y insan nöroblastom ve WI-38 insan normal akciğer fibroblast hücreleri üzerine antiproliferatif aktivitesi MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 3 - Şekil 6). MTT antikanser aktivitesi değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisi olup, mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin belirlenmesini sağlamaktadır. Şekil 3. ve Şekil 5.'de; x eksenini ligand (1) derişimlerini, y eksenini ise kanser ve sağlıklı hücrelerin kontrole göre canlılık oranlarını göstermektedir. Ligand (1) derişimindeki artışla ve zamanla birlikte Şekil 3. ve Şekil 5.'de sırasıyla SH-SY5Y insan nöroblastom hücreleri ve WI-38 insan normal akciğer fibroblast hücre canlılıklarında azalma gözlenmiştir. Benzer olarak Şekil 4. ve Şekil 6.'da x eksenini kompleks (2) derişimlerini, y eksenini ise SH-SY5Y insan nöroblastom hücreleri ve WI-38 insan normal akciğer fibroblast hücrelerin kontrole göre canlılık oranlarını göstermektedir. Kompleks (2) derişimindeki ve uygulama süresindeki artışla paralel olarak SH-SY5Y insan nöroblastom hücrelerinin (Şekil 4.) ve WI-38 insan normal akciğer fibroblast hücrelerinin (Şekil 6.) canlılık oranlarında azalma gözlenmiştir. Hem ligand (1) hem de kompleks (2) uygulaması sonucunda gözlenen hücre canlılık oranları karşılaştırıldığında; kompleksin (2), SH-SY5Y insan nöroblastom hücreleri üzerinde liganda (1) göre daha yüksek hücre ölüm oranlarına neden olduğu gözlenmiştir. Bu sebeple kompleksin (2), liganda (1) göre daha yüksek antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır.



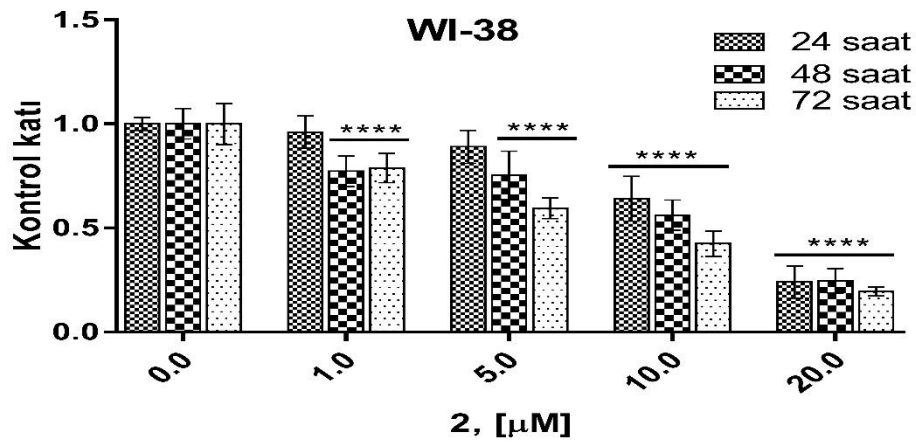
Şekil 3. [1-(2-metil-2-propenil)-3-(2-klorobenzil)benzimidazolium klorür ligandının (1) SH-SY5Y nöroblastom hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi. Deneyler 9 tekrarlı yapılmıştır (n=9) ve sonuçlar \pm SEM verilmiştir. (* p <0.05, ** p <0.005, *** p <0.0005, **** p <0.0001)



Şekil 4. Kloro[1-(2-metil-2-propenil)-3-(2-klorobenzil)benzimidazol-2-iliden]Ag(I) kompleksinin (2) SH-SY5Y nöroblastom hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi. Deneyler 9 tekrarlı yapılmıştır (n=9) ve sonuçlar \pm SEM verilmiştir. (**** p <0.0001)



Şekil 5. [1-(2-metil-2-propenil)-3-(2-klorobenzil)benzimidazolyum klorür ligandının (1) WI-38 insan normal akciğer fibroblast hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi. Deneyler 9 tekrarlı yapılmıştır (n=9) ve sonuçlar \pm SEM verilmiştir. (**p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001)



Şekil 6. Kloro[1-(2-metil-2-propenil)-3-(2-metilbenzil)benzimidazol-2-iliden]Ag(I) kompleksinin (2) WI-38 normal akciğer fibroblast hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi. Deneyler 9 tekrarlı yapılmıştır (n=9) ve sonuçlar \pm SEM verilmiştir. (****p<0.0001)

Şekil 3 – Şekil 6. 'dan yararlanılarak, ligand (1) ve kompleksin (2) SH-SY5Y nöroblastom ve WI-38 normal akciğer fibroblast hücrelerinin %50'sini öldürdükleri derişim değerleri (IC₅₀) saptanmıştır (Tablo 1.).

Tablo 1. Ligand (1) ve Ag(I)kompleksinin (2) SH-SY5Y nöroblastom ve WI-38 normal akciğer fibroblast hücre hatları için 24 saat, 48 saat ve 72 saat IC₅₀ değerleri

	IC ₅₀ µM ^a				
	SH-SY5Y			WI-38 ^b	
	1	2	5- Fluorourasil	1	2
24 saat	>20	3.80 ± 0.13	42.1 ± 8.72 ^(Mundy vd., 2010)	>20	16.9 ± 1.11
48 saat	8.90 ± 0.30	3.15 ± 0.12	11.9 ± 1.10 ^(Ge vd., 2017)	>20	14.6 ± 0.32
72 saat	4.28 ± 0.23	2.21 ± 1.12	3.26 ± 0.46 ^(Yu vd., 2016)	>20	8.34 ± 0.54

^a24, 48 ve 72 saat için hesaplanan IC₅₀ derişimlerini ifade etmektedir ve sonuçlar \pm SEM olarak verilmiştir (n=9), Deneysel kısımda anlatılan MTT testi ile belirlenmiştir, ^bnormal hücre

Ligandın (1) SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında 24 saat için IC_{50} değeri $>20 \mu M$, 48 saat ve 72 saat için sırasıyla 8.90 ve $4.28 \mu M$ olarak hesaplanmıştır. WI-38 normal akciğer fibroblast hücre hatlarına karşı 24, 48 ve 72 saat için ligandın (1) IC_{50} değerleri; $>20 \mu M$ olarak hesaplanmıştır (Tablo 1). Kompleksin (2) SH-SY5Y nöroblastom hücresi hücre hattına karşı 24, 48 ve 72 saat için IC_{50} değerleri sırasıyla; 3.80, 3.15 ve $2.21 \mu M$ olarak saptanırken; WI-38 normal akciğer fibroblast hücre hattına karşı 24, 48 ve 72 saat için IC_{50} değerleri sırasıyla; 16.9, 14.6 ve $8.34 \mu M$ olarak hesaplanmıştır (Tablo 1).

Kompleksin (2) SH-SY5Y hücre hattı için hesaplanan IC_{50} değerleri, yani nöroblastom hücrelerinin %50'sinin ölmesi için gerekli derişimleri zamanla düşmektedir. Düşük IC_{50} değeri yüksek antikanser aktiviteye işaret etmektedir. Kompleksin (2), SH-SY5Y nöroblastom hücrelerine karşı 24, 48 ve 72 saat için sahip olduğu IC_{50} değerleri WI-38 normal akciğer fibroblast hücreleri için hesaplanan IC_{50} değerinden daha küçüktür. Bu nedenle kompleks (2), SH-SY5Y insan nöroblastom hücreleri göre daha yüksek antiproliferatif aktivite göstermiştir. Kemoterapötik ilaçların en önemli yan etkilerinden birisi, kanserli hücrelerle birlikte sağlıklı hücreleri de öldürmesidir. Bu nedenle ligand ve kompleks, normal fetal akciğer fibroblast hücre (WI-38) hattına uygulanarak, bileşiklerin sağlıklı hücreler üzerine etkileri ve seçicilik indeksleri hesaplanmıştır. Ligand (1), uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra seçicilik indeksleri sırasıyla; >1 , >2.24 ve >4.67 olarak hesaplanırken, kompleks (2), uygulaması seçicilik indeksleri sırasıyla; 4.44, 4.63 ve 3.77 olarak belirlenmiştir. İlaç adayı moleküllerde tercih edilen bir diğer özellik ise hali hazırda kullanılan kemoterapötik ilaçlarla karşılaştırılabilir sitotoksik aktiviteye sahip olmalarıdır. Ligand ve kompleksin aktivitesi kemoterapötik bir ajan olan 5-fluorourasil (5-FU) ile karşılaştırıldığında 24 saat (Mundy vd., 2010) 48 saat (Ge vd., 2017) ve 72 saat (Yu vd., 2016) uygulama zamanları için sırasıyla 11, 3.77 ve 1.47 kat daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

4. Tartışma

Farklı metalleri içeren metal-NHC kompleksleri, ekonomik kullanımlarıyla birlikte sahip oldukları antikanser aktiviteleri nedeniyle oldukça yaygın olarak çalışılan bileşik sınıfları arasında yer almaktadırlar (Aher vd., 2014). Gümüş-NHC komplekslerinin HCT 116, HL 60, Caki-1, OVCAR-3, MB157, MCF-7 gibi bir dizi insan kanser hücresi üzerinde önemli antikanser aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir (Kankala vd., 2019). H-u vd., (2017) Cu (II)-benzimidazol yapısına dört farklı ligand bağlayarak dört adet yeni kompleks sentezlemiş ve antikanser aktivitelerini MCF7, EC109, SH-SY5Y ve QBC939 kanser hücreleri üzerinde araştırmışlardır. Cu-(II)-benzimidazol yapısına bağlanan ligand içeriğinde brom (Br) bulunduran kompleksin 24, 48 ve 72 saat sonra SH-SY5Y için IC_{50} değerleri sırasıyla 15.98 ± 0.36 , 10.83 ± 0.30 ve $8.25 \pm 0.23 \mu M$ olarak bulunmuştur (Hu vd., 2017). Çalışmamızda kullanılan kompleksin SH-SY5Y hücreleri için IC_{50} değerlerinin her üç uygulama zamanı için Hu vd., tarafından sentezlenen bileşikten daha küçük olduğu, yani SH-SY5Y hücreleri üzerinde daha yüksek antikanser aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Başka bir çalışmada benzimidazol ligandı içeren üç adet yeni gümüş (I) -NHC kompleksi sentezlenerek *in-vitro* antikanser aktiviteleri insan kolorektal kanseri (HCT 116), meme kanseri (MCF-7) ve eritromiyeloblastoid lösemi (K-562) hücre hatları üzerinde 48 saat uygulama zamanı için incelenmiştir (Atif vd., 2020). Bileşiklerin IC_{50} değerleri K-562 ve HCT-116 kanser hücrelerinde $0.31-17.9 \mu M$ aralığında, MCF-7 kanser hücrelerinde ise $15.1-35.2 \mu M$ aralığında olduğu bildirilmiştir. Çalışma bulgularında her üç ligandında Ag komplekslerine göre daha düşük antikanser aktiviteye sahip oldukları belirtilmiştir. Çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiş olup ligandın, Ag kompleksinden daha düşük antikanser aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Fabbrini vd., (2019) tarafından yapılan bir başka çalışmada iki adet antrasen yapısı içeren Ag(I) NHC kompleksi sentezlenmiş ve *in-vitro* antikanser aktivitesi insan SH-SY5Y nöroblastom hücrelerine üzerinde 24 saat uygulama zamanı için araştırılmıştır. Kompleksin 24 saat uygulama zamanı için IC_{50} değeri $1.059 \pm 0.042 \mu M$ olarak bildirilmiş olup çalışmamızda kullanılan kompleksin IC_{50} değerinden 3.60 kat daha küçüktür. Bu nedenle kompleksin *in-vitro* antikanser aktivitesi çalışmamızda kullanılan kompleksten 3.60 kat daha yüksektir. Ligandın (1) MCF-7, MDA-MB-231 meme kanser hücreleri ve DU-145 prostat kanser hücreleri için IC_{50} derişim aralıkları sırasıyla; $>20 - 16.9 \pm 0.21$, $>20 - 18.8 \pm 0.17$ ve $>20 - 6.02 \pm 0.10 \mu M$ aralıklarında değiştiği, kompleksin (2) MCF-7, MDA-MB-231 meme kanser hücreleri ve DU-145 prostat kanser hücreleri için IC_{50} derişim aralıklarının ise sırasıyla; $3.25 \pm 0.28 - <1$, $7.58 \pm 0.23 - <1$ ve $8.03 \pm 0.17 - 1.15 \pm 0.35 \mu M$ aralıklarında değiştiği bildirilmiştir (Şahin vd., 2019).

Çalışma sonuçları, sentezlenen komplekslerin *in-vitro* antikanser aktivitelerinin bileşiği oluşturan grupların kimyasal yapılarına, kompleksin içerdiği metal iyonuna, uygulama zamanına ve çalışılan kanser türüne bağlı olarak değişmekte olduğuna işaret etmektedir. Bileşiğin yapısında yer alan metal iyonu da biyolojik aktivitede önemli rol oynamaktadır. Yeni sentezlenen bileşik, bir kanser türünde aktivite göstermezken başka bir kanser türünde oldukça önemli antikanser aktiviteye sahip olabilmektedir. Bu nedenle antikanser aktivite çalışmalarında farklı kanser türleri ile çalışılarak bileşiğin hangi kanser türünde en yüksek aktiviteye sahip olduğu tesbit edilmeli ve daha sonra zaman bağlı olası aktivite değişimi araştırılmalıdır.

5. Sonuç

Çalışmamızda; benzimidazol içeren ligand (1) ve bu ligandın Ag(I) kompleksinin (2) SH-SY5Y nöroblastom hücreleri üzerine antiproliferatif aktiviteleri incelenmiştir. Ayrıca ligand (1) ve kompleksin (2) WI-38 normal insan akciğer fibroblast hücreleri üzerine antiproliferatif aktivitesi de çalışılarak ligand (1) ve kompleksin (2) nöroblastom hücreleri ve sağlıklı hücreler arasında seçici özellik gösterip göstermeyeceği de araştırılmıştır. SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattına ligand (1) ve kompleksin (2) farklı derişimlerinin uygulanmasından 72 saat sonra kontrolle karşılaştırıldığında hücre canlılığında önemli azalış belirlenmiştir. SH-SY5Y insan nöroblastom hücrelerine kompleks (2) uygulamasının, ligand (1) uygulamasına göre daha yüksek hücre ölüm oranlarına neden olduğu saptanmıştır. Düşük IC₅₀ değeri yüksek antiproliferatif aktiviteyi göstermektedir. Deney sonuçlarına göre; kompleksin (2), SH-SY5Y insan nöroblastom hücreleri için 24, 48 ve 72 saat zaman noktalarında ligandan (1) daha küçük IC₅₀ değerlerine sahip olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, SH-SY5Y insan nöroblastom hücreleri üzerine kompleksin (2) liganda (1) göre daha yüksek antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca, kompleksin (2), WI-38 insan normal akciğer fibroblast hücreleri için gözlenen IC₅₀ değerleri SH-SY5Y insan nöroblastom hücreleri için gözlenen IC₅₀ değerlerine göre daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle kompleks (2), 24, 48 ve 72 saat uygulama zamanlarında WI-38 insan normal akciğer fibroblast hücrelerine, SH-SY5Y insan nöroblastom hücrelerine göre daha düşük antiproliferatif aktivite göstermiştir. Kompleks (2), uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra seçicilik indeksleri 4.44, 4.63 ve 3.77 olarak belirlenmiştir.

Teşekkür

Antiproliferatif aktivite deneyleri Sivas Cumhuriyet Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (CÜTAM)'da yapılmıştır.

Kaynaklar

1. Achar G., Shahini C.R., Patil S.A., Malecki J. G., Pan S.H., Lan A., Chen X.R. & Budagumpi S. (2018). Sterically modulated silver(I) complexes of coumarin substituted benzimidazol-2-ylidenes: Synthesis, crystal structures and evaluation of their antimicrobial and antilung cancer potentials. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 183: 43-57.
2. Aher S.B., Muskawar P.N., Thenmozhi K. & Bhagat P.R. (2014). Recent developments of metal N-heterocyclic carbenes as anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 81: 408-419.
3. Alpan A.S., Sarıkaya G., Çoban G., Parlar S., Armagan G. & Alptüzün V. (2017). Mannich-Benzimidazole Derivatives as Antioxidant and Anticholinesterase Inhibitors: Synthesis, Biological Evaluations, and Molecular Docking Study. *Arch Pharm (Weinheim)*, 350(7), e1600351. doi: 10.1002/ardp.201600351.
4. Atif M., Bhatti H.N., Haque R.A., Iqbal M.A., Ahamed Khadeer M.B. & Majid A.M.S.A. (2020). Synthesis, Structure, and Anticancer Activity of Symmetrical and Non-symmetrical Silver(I)-N-Heterocyclic Carbene Complexes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, doi: 10.1007/s12010-019-03186-9. Online ahead of print.
5. Bernstein M. L., Leclerc J.M., Bunin G., Brisson L., Robison L., Shuster J., Byrne T., Gregory D., Hill G. & Dougherty G. (1992). A population-based study of neuroblastoma incidence, survival, and mortality in North America. *Journal of Clinical Oncology*, 10: 323-329.

6. **Betzer J.F., Nuter F., Chtchigrovsky M., Hamon F., Kellermann G., Ali S. & Teulade-Fichou M.P. (2016).** Linking of Antitumor trans NHC-Pt (II) Complexes to G-Quadruplex DNA Ligand for Telomeric Targeting. *Bioconjugate chemistry*, 27(6), 1456-1470.
7. **Bortenschlager, M., Schütz, J., von Preysing, D., Nuyken, O., Herrmann, W.A. & Weberskirch, R. (2005).** Rhodium–NHC-complexes as potent catalysts in the hydroformylation of 1-octene. *Journal of Organometallic Chemistry*, 690(24), 6233-6237.
8. **Clavier H., Urbina-Blanco C.A. & Nolan S.P. (2009).** Indenylidene ruthenium complex bearing a sterically demanding NHC ligand: an efficient catalyst for olefin metathesis at room temperature. *Organometallics*, 28(9), 2848-2854.
9. **DuBois S.G., Kalika Y., Lukens J.N., Brodeur G.M., Seeger R.C., Atkinson J.B., Haase G.M., Black C. T., Perez C., Shimada H., Gerbing R., Stram D.O. & Matthey K.K. (1999).** Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 21(3), 181-9.
10. **Fabbrini M.G., Cirri D., Pratesi A., Ciofi L., Marzo T., Guerri A., Nistri S., Dell'Accio A., Gamberi T., Severi M., Bencini A. & Messori L. (2019).** A Fluorescent Silver(I) Carbene Complex with Anticancer Properties: Synthesis, Characterization, and Biological Studies. *ChemMedChem*. 14(1), 182-188.
11. **Ge B.C., Feng H.F., Cheng Y.F., Wang H.T., Xi B.M., Yang X.M., Xu J.P. & Zhou Z.Z. (2017).** Design, synthesis and biological evaluation of substituted aminopyridazin-3(2H)-ones as G0/G1-phase arresting agents with apoptosis-inducing activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 141: 440-445.
12. **Gutierrez J.C., Fischer A.C., Sola J.E., Perez E.A. & Koniaris L.G. (2007).** Markedly improving survival of neuroblastoma: a 30-year analysis of 1,646 patients. *Pediatric Surgery International*, 23: 637–646.
13. **Gürbüz N., Karaca E.Ö., Özdemir İ. & Cetinkaya B. (2015).** Cross coupling reactions catalyzed by (NHC) Pd (II) complexes. *Turkish Journal of Chemistry*, 39(6), 1115-1157
14. **Haque R.A., Choo S.Y., Budagumpi S., Iqbal M.A. & Al-Ashraf Abdullah A. (2015).** Silver(I) complexes of mono- and bidentate N-heterocyclic carbene ligands: synthesis, crystal structures, and in vitro antibacterial and anticancer studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 90: 82-92.
15. **Hu J., Guo Y., Zhao, J & Zhang J. (2017).** In vitro antitumor activity of novel benzimidazole-based Cu(II) complexes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25: 5733–5742
16. **Jakobsen V., Viganor L., Blanco-Fernández A., Howe O., Devereux M., McKenzie C.J. & McKee V. (2018).** Tetrameric and polymeric silver complexes of the omeprazole scaffold; synthesis, structure, in vitro and in vivo antimicrobial activities and DNA interaction. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 186: 317-328.
17. **Kalinowska-Lis U., Felczak A., Chęcińska L., Szablowska-Gadomska I., Patyna E., Małecki M., Lisowska K. & Ochocki J. (2016).** Antibacterial Activity and Cytotoxicity of Silver(I) Complexes of Pyridine and (Benz)Imidazole Derivatives. X-ray Crystal Structure of [Ag(2,6-di(CH₂OH)py)₂]NO₃. *Molecules*, 21(2), 87.
18. **Kankala S., Thota N., Björkling F., Taylor M.K., Vadde R. & Balusu R. (2019).** Silver carbene complexes: An emerging class of anticancer agents. *Drug Development Research*, 80(2), 188–199.
19. **Kim S. & Chung D.H. (2006).** Pediatric solid malignancies: neuroblastoma and Wilms' tumor. *Surgical Clinics of North America*, 86: 469–487. xi.
20. **Kumar A., Banerjee S., Roy P., Sondhi S.M. & Sharma A. (2018).** Solvent-free synthesis and anticancer activity evaluation of benzimidazole and perimidine derivatives. *Molecular Diversity*, 22(1), 113-127.
21. **Matthey K.K., Maris J.M., Schleiermacher G., Nakagawara A., Mackall C.L., Diller L. & Weiss W.A. (2016).** Neuroblastoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 2: 16078.
22. **Mundy W.R., Radio N.M. & Freudenrich T.M., (2010).** Neuronal models for evaluation of proliferation in vitro using high content screening. *Toxicology*. 270(2-3), 121-130.
23. **Nakagawara A., Li Y., Izumi H., Muramori K., Inada H. & Nishi M. (2018).** Neuroblastoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 48(3), 214-241.
24. **Rao Y.J., Sowjanya T., Thirupathi G., Murthy N.Y.S. & Kotapalli S.S. (2018).** Synthesis and biological evaluation of novel flavone/triazole/benzimidazole hybrids and flavone/isoxazole-annulated heterocycles as antiproliferative and antimycobacterial agents. *Molecular Diversity*, 22(4), 803-814.

25. **Shi Y., Jiang K., Zheng R., Fu J., Yan L., Gu Q., Zhang Y., & Lin F. (2019).** Design, Microwave-Assisted Synthesis and in Vitro Antibacterial and Antifungal Activity of 2,5-Disubstituted Benzimidazole. *Chemistry & Biodiversity* 16(3), e1800510. doi: 10.1002/cbdv.201800510.
26. **Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S. & Boyd, M.R. (1990).** New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107-1112.
27. **Şahin N., Şahin-Bölükbaşı S. & Marsan H. (2019).** Synthesis and antitumor activity of new silver(I)-N-heterocyclic carbene complexes. *Journal of Coordination Chemistry*, 72(22-24), 3602-3613.
28. **Şahin N., Demir S. & Özdemir İ. (2015).** Transfer hydrogenation of ketones in the presence of half sandwich ruthenium (II) complexes bearing imidazoline and benzimidazole ligand. *ARKIVOC*, ii, 20-33.
29. **Yu B., Qi P.P., Shi X.J., Huang R., Guo H., Zheng Y.C., Yu D.Q. & Liu, H.M. (2016).** Efficient synthesis of new antiproliferative steroidal hybrids using the molecular hybridization approach. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 117: 241-255.