

AKÜ FEMÜBİD 20 (2020) 011202 (30-34)

AKU J. Sci. Eng. 20 (2020) 011202 (30-34)

DOI: 10.35414/akufemubid.629432

Araştırma Makalesi / Research Article

## Kükürt İçeren Ligand ve Bakır Kompleksine Ait Antioksidan ve Topoizomeraz I İnhibitör Aktivitelerin Karşılaştırılması

Ufuk YILDIZ<sup>1</sup><sup>1</sup> Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Zonguldak.

e-posta: ufukyildiz@beun.edu.tr ORCID ID: http://orcid.org/0000-0002-0419-0011

Geliş Tarihi: 04.10.2019 ; Kabul Tarihi: 29.01.2020

### Öz

Bu çalışmada antikanser ve antioksidan ajan olarak kullanılabilir dtb ligandı ve bu ligandın [Cu(dtb)(phen)]<sup>2+</sup> kompleksi ile çalışılmıştır. Antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için DPPH radikali süpürme yöntemi kullanılmıştır. Dtb ligandı düşük antioksidan aktivite gösterirken bu ligandın Cu(II) kompleksinin iyi bilinen bir antioksidan olan C vitamini kadar yüksek antioksidan aktivite gösterdiği görülmüştür. Topoizomeraz-I inhibisyonu aktivitesi çalışmada pBR322 plazmid DNA'sının relaksasyonu agaroz jel elektroforez yöntemiyle takip edilmiştir. Antioksidan aktivitede olduğu gibi topoizomeraz-I inhibisyonu aktivitesinde de dtb ligandı düşük etki gösterirken bakır kompleksi  $\mu\text{M}$  gibi düşük derişimde bile inhibisyon gerçekleştirebilmiştir. [Cu(dtb)(phen)]<sup>2+</sup> kompleksinin ileri *in-vivo* ve *in-vitro* antikanser çalışmalarının yapılması halinde antikanser ve antioksidan ajan olarak kullanılabilir potansiyelinin yüksek olduğu görülmüştür.

### Anahtar kelimeler

Antioksidan; Topo-I;  
Cu(II); Benzimidazol

## Comparison of Antioxidant and Topoisomerase I Inhibitor Activities of Sulfur Containing Ligand and Copper Complex

### Abstract

In this study, dtb ligand and its [Cu (dtb) (phen)]<sup>2+</sup> complex which can be used as anticancer and antioxidant agent were studied. DPPH radical scavenging method was used to determine the antioxidant activities. The dtb ligand had low antioxidant activity, while the Cu (II) complex of this ligand had as high antioxidant activity as vitamin C, a well-known antioxidant. In the topoisomerase-I inhibition activity study, relaxation of pBR322 plasmid DNA was followed by agarose gel electrophoresis method. In addition to antioxidant activity, dtb ligand had a low effect on topoisomerase-I inhibition activity, while the copper complex was able to inhibit even at low concentrations such as 10  $\mu\text{M}$ . The obtained results show [Cu (dtb) (phen)]<sup>2+</sup> complex has a high potential to be used as an anticancer and antioxidant agent.

### Keywords

Antioxidant; Topo-I;  
Cu(II); Benzimidazole

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

### 1. Giriş

Antioksidanlar için genel tanım reaktif oksijen türlerinin (ROS) insan normal fizyolojik fonksiyonları üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmaya veya en aza indirmeye yardımcı olan maddeler olarak bilinmektedir (Cornelli 2009).

ROS kendini daha kararlı hale getirebilmek için oktet tamamlamak amacıyla karşısındaki molekül oksitler ve bu durum bir zincir reaksiyonunun oluşumuna neden olur. Bu zincir reaksiyon,

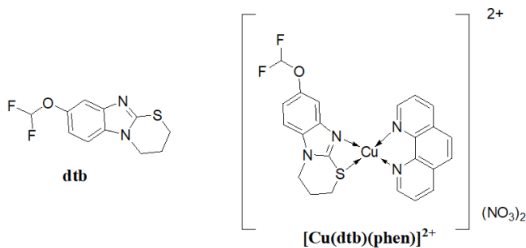
antioksidanlar veya ROS ile birleştirilebilecek eşleşmemiş elektron içeren moleküller gibi maddeler olduğunda durdurulabilir.

ROS'un neden olduğu DNA hasarı, yaşlanmaya ve hastalığa katkıda bulunan bir faktördür (Katekhay and Kale 2012). Birikmiş ROS miktarı antioksidanlara galip geldiğinde, oksidatif stres olarak bilinen bir durum oluşur. Bu oksidatif stres sonunda iltihaplanma, kardiyovasküler hastalık, karsinogenez, nörodejeneratif hastalıklar ve

ateroskleroz gibi patolojik durumlara yol açacaktır (Giugliano, Ceriello et al. 1995, Reuter, Gupta et al. 2010).

DNA-topoizomerazlar replikasyon, transkripsiyon, rekombinasyon ve kromatin düzenlenmesi gibi DNA metabolizması olaylarında sıkça görev alan çok önemli enzimlerdir. Tip I enzimler (TOPO I) monomeroiktir ve DNA süper sarmalını ATP-bağımsız bir şekilde tek zinciri geçici olarak kırarak kıvrımı rahatlatır. Tip II (TOPO II) topoizomerazlar ise dimeriktir ve ATP-bağımlı şekilde DNA çift zincirinin geçici olarak kesilmesini katalizler. Topoizomerazların DNA düzenlenmesi ve replikasyonu üzerindeki bu son derece önemli görevleri sebebiyle bu enzimlerin fonksiyonunu kaybetmesi hücreleri tamamen savunmasız bırakır. Sonuç olarak topoizomerazları hedefleyen ajanlar topoizomeraz aktivitesini sınırladığı için kanser tedavisindeki etkinliklerini kanıtlamışlardır (Fortune, Velea et al. 1999, Suzuki and Uyeda 2002).

Kükürt birçok biyolojik ve kimyasal reaksiyonda rol oynar. Kükürt içeren bileşiklerin antioksidan aktivite gösterdikleri bilinmektedir ve antioksidan aktivitelerinin F ve Br gibi halojen atomları varlığında yükseldiği gösterilmiştir (Bhaskara Reddy, Srinivasulu et al. 2015, Joseph and Janaki 2016). Kükürtlü bileşiklerin bakır (II) kompleksleri yüksek antioksidan aktivite ve kalp koruyucu etkiler gösterebilmektedir (Sas, Robotka et al. 2007, Srivastava, Blower et al. 2016). Metal koordinasyonu birçok durumda ligandların farmakolojik aktivitesini artırmaktadır. Yapılan antioksidan çalışmalarında bakır komplekslerinin tek başına ligandlara kıyasla daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldukları görülmüştür (Martínez Medina, Naso et al. 2019).



Şekil 1. Çalışmada incelenen bileşikler.

Bu çalışmada daha önce sentezlenmiş (Yıldız and Coban 2019), yapısında antioksidan aktivite gösterebilecek kükürt ve azot gibi atomların yanında buna katkı sağlayacak flor atomu barındıran 8-(diflorometoksi)-3,4-dihidro-2H-[1,3]tiazino[3,2-a]benzimidazol (dtb) (Şekil 1) ligandının antioksidan ve topoizomeraz I inhibisyonu aktivitesi çalışılmış ve bakır (II) metal kompleksinin ([Cu(dtbb)(phen)]<sup>2+</sup>) bu aktiviteler üzerine etkisi belirlenmiştir.

## 2. Materyal ve Metot

Kullanılan kimyasallar aksi belirtilmedikçe Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. UV-Vis absorpsiyon ölçümleri Varian Cary 100 spektrofotometre cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yatay elektroforez çalışmasında Thermo Electron Corporation EC-330 Midicell Primo sistemi kullanılmıştır.

### 2.1 Antioksidan Aktivite Belirlenmesi

Bileşiklerin 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal tutma aktivitesi literatürde küçük değişiklikler yapılarak belirlendi (Blois 1958). DPPH 517 nm dalga boyunda absorpsiyon bandı olan kararlı bir serbest radikaldir (DPPH·). Hidrojen atomu verebilecek bir madde varlığında indirgenerek menekşe moru rengini kaybeder. Çalışmada 517 nm dalga boyunda yaklaşık 0,75 absorbans yapan 0,5 mM DPPH çözeltisi etanol içerisinde hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımında sırasıyla 0, 10, 20, 40, 80 ve 100 µM olacak şekilde etanol içerisinde çözülerek hazırlanan örnek çözeltisinin (ligand ya da bakır (II) kompleksi) 0,2 mL'si 1,8 mL DPPH çözeltisi üzerine eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 30 dakika etkileşim için bırakılmış ve 517 nm'deki absorbansı şahit olarak etanol kullanılarak kaydedilmiştir. Tutulan DPPH yüzdesi aşağıdaki gibi belirlenmiştir:

$$\%DPPH = (A_k - A_0) / A_k \times 100$$

A<sub>k</sub> reaksiyon öncesi yalnızca DPPH, A<sub>0</sub> farklı derişimlerde (20-100 µM) örnek eklenmesi sonrası karışımın absorbansını ifade etmektedir. DPPH radikalının yarıya düşmesi için gerekli bileşik derişimi (EC<sub>50</sub>) hesaplanarak bilinen antioksidan maddelerle karşılaştırılmıştır

## 2.2 Topoizomeraz I İnhibisyonu Aktivitesi Belirlenmesi

Topo I inhibisyonu TopoGEN kitinde anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı (10 µL) örnek çözeltisi, DNA, tampon çözeltisi, 1U topo I ve su içermektedir. Karışım 30 dakika 37 C° sıcaklıkta inkübe edildi ve %10 SDS (Sodyum dodesil sülfat), %25 bromofenol mavisi ve %50 gliserol içeren boya çözeltisi ile sonlandırıldı.

Reaksiyon ürünleri %1 agaroz jel üzerine yüklendi. Elektroforez tamponu olarak pH 8,5 TAE (Trisasetat-EDTA) çözeltisi kullanıldı ve 15 voltta 3 saat elektrik akımı uygulandı. Son olarak etidyum bromür çözeltisi banyosunda boyanarak UV ışığı altında fotoğraflandı.

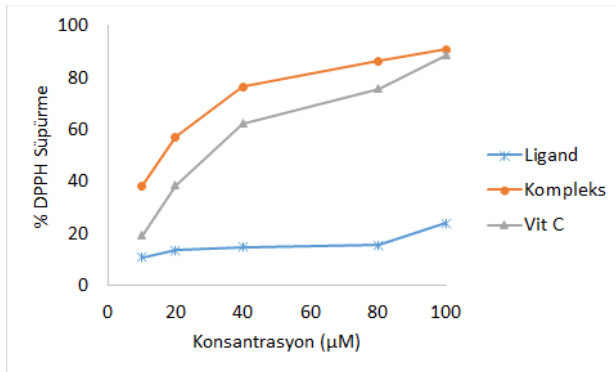
## 3. Bulgular

Ligand ve metal kompleksi için antioksidan ve topo I inhibitör aktivite sonuçları aşağıda açıklanmıştır.

### 3.1 DPPH Radikali Süpürme Sonuçları

Moleküllerin DPPH radikali süpürme yeteneği onların hidrojen ya da radikal elektron verme kapasitelerine bağlıdır (Soare, Dinis et al. 1997). Bu çalışmada diğer metotlara göre çok daha hızlı sonuç verdiği için dtb ligandı ve bakır kompleksinin antioksidan aktivitesinin incelenmesinde DPPH yöntemi kullanılmıştır.

Çalışılan bileşiklerin ve standart antioksidan olarak C vitamininin farklı derişimleri için %DPPH süpürme kabiliyetleri Şekil 2'de gösterilmiştir. Bileşikler için bu grafikten elde edilen EC<sub>50</sub> değerleri çizelge 1'de listelenmiştir.



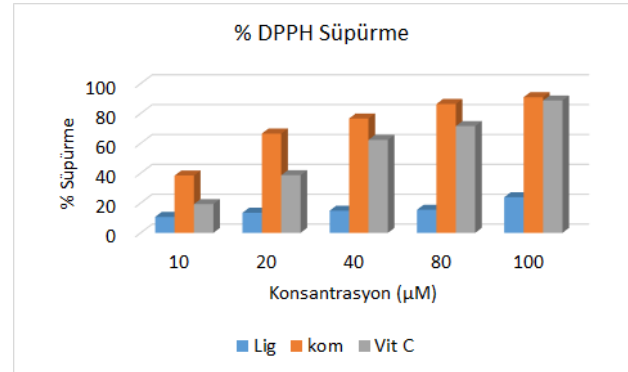
Şekil 2. Bileşiklerin artan konstrasyonlarına karşı %DPPH süpürme oranları.

Standart antioksidan olarak kullanılan C vitamini için EC<sub>50</sub> değeri 38,1 µM olarak hesaplanmıştır. Liganda ait EC<sub>50</sub> değeri ise C vitaminine kıyasla çok yüksek bir değer olan 352,3 µM olarak bulunmuştur. Ancak ligandın bakır fenantrolin yapısına bağlanmasıyla elde edilen kompleksin radikal süpürme kapasitesi liganda göre muazzam bir artış göstermiş ve EC<sub>50</sub> değeri C vitaminin de altına 11,6 µM seviyesine kadar düşmüştür.

Çizelge 1. Bileşiklerin EC<sub>50</sub> değerleri ve 100 µM için toplam süpürme yüzdeleri.

Bileşik	EC <sub>50</sub>	Toplam % Süpürme
dtb	352,3	23,9
[Cu(dtb)(phen)] <sup>2+</sup>	11,6	90,9
Vit C	38,1	88,7

Farklı konsantrasyonlar için bileşiklerin karşılaştırmalı DPPH süpürme yüzdeleri Şekil 3'te görülmektedir. Bu sonuçlara bakıldığında yine metal kompleksin C vitamininden daha iyi bir toplam süpürme yaptığı görülmektedir.



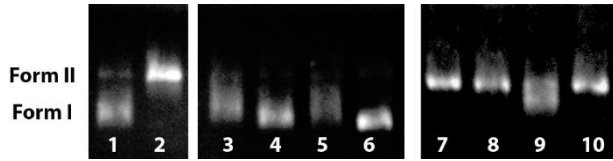
Şekil 3. Bileşiklerin karşılaştırmalı %DPPH süpürme oranları.

### 3.2 Topoizomeraz I İnhibisyonu Sonuçları

Topoizomerazlar DNA topolojisinde önemli bir rol oynayan izomeraz enzimleridir (Cuya, Bjornsti et al. 2017). Topo I DNA süper sarmalındaki tek zinciri keserek yapının replikasyon ve transkripsiyon için hazırlanmasında rol alır. DNA bağlayıcı ajanlar yoluyla bu Topo I aktivitesinin bloke edilmesi kanser tedavisinde dikkat çekici bir yol olmuştur. (Montaner, Castillo-Ávila et al. 2005).

Çalışmada ligand ve bakır kompleksinin Topo-I aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi agaroz jel elektroforezi yöntemiyle bir plazmid DNA'nın form değişimleri takip edilerek araştırılmıştır. Topo-I herhangi bir inhibitör olmadığında süper sarmal DNA formunu (Form I), açık dairesel forma (Form II) çevirmektedir.

Artan derişimlerde ligand ve bakır kompleksi eklenmesinin Topo-I aktivitesi üzerine etkisi şekil 4'te görülmektedir.



**Şekil 4.** Artan derişimlerde ligand ve bakır kompleksi eklenmesinin Topo-I aktivitesi üzerine etkisi (Hat 1: yalnız DNA, hat 2: DNA + 1U topo-I, hat 3-6: DNA + 1U topo-I + 10, 20, 50 ve 100 µM kompleks, hat 7-10: DNA + 1U topo-I + 10, 20, 50 ve 100 µM ligand).

Karışımında topo-I yokken (hat 1) DNA'nın süper sarmal formda olduğu görülmektedir. DNA üzerine yalnız topo-I eklendiğinde tüm DNA'nın açık dairesel forma geçtiği görülmektedir. DNA+topo-I karışımı üzerine artan konsantrasyonlarda bakır kompleksi eklenmesiyle 10 µM gibi düşük bir derişimde bile (hat 3-6) topo-I bloke edilerek form II DNA'nın oluşumunun engellendiği görülmektedir. DNA+topo-I karışımı üzerine artan konsantrasyonlarda ligand eklenmesi (hat 7-10) topo-I aktivitesine belirgin bir inhibitör etkisi yapmayarak form II oluşumunu engelleyememiştir.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Sonuç olarak dtb ligandı ve [Cu(dtb)(phen)]<sup>2+</sup> bakır kompleksinin DPPH radikali süpürme yetenekleri ve topoizomeraz-I enzimini inhibe etme aktiviteleri belirlenmiştir. Dtb ligandı DPPH radikallerinin yarısını süpürmek için 352,3 µM gibi yüksek derişimlere ihtiyaç duyarken bu ligandın bakır (II) fenantrolin ile birleşmesiyle elde edilen [Cu(dtb)(phen)]<sup>2+</sup> kompleksi DPPH radikallerinin yarısını 11,6 µM gibi oldukça düşük bir derişimde süpürebilmiştir. Dtb ligandının radikal süpürme

yeteneği barındırdığı kükürt atomunun elektron verme eğiliminden ileri gelmektedir (Nami, Ullah et al. 2016). Metal komplekslerinde merkezi metal atomunun ligandın proton verme kapasitesini geliştirmesi sonucu antioksidan aktiviteye olumlu katkı yaptığı bilinmektedir (Chen, Sun et al. 2009). Sonuçlar incelendiğinde dtb ligandının bakır kompleksinin hazırlanmasının var olan antioksidan aktivitesi üzerine yaklaşık 30 kat katkı yaptığı görülmektedir. Bu sonuç literatüde anılan merkez metal atomlarının antioksidan aktivite üzerine olumlu etkisini açık bir şekilde göstermiştir.

Bakır kompleksinin düşük derişimde topo-I aktivitesini inhibe etmesi bileşiği bilinen önemli topoizomeraz I inhibitörler kadar etkili olduğunu göstermektedir (Fortune, Velea et al. 1999, Suzuki and Uyeda 2002). Topo-I inhibisyonu çalışmasında yine bakır merkez metali ligandın düşük aktivitesini yükseltmiştir.

Bu sonuçlar ışığında dtb ligandının bakır(II) metal kompleksi topo-I inhibisyonu etkisiyle olası bir antikanser ajan, yüksek antioksidan etkisiyle oksidatif stresi gidermede önemli bir bileşik olarak literatüre kazandırılmıştır.

#### 5. Kaynaklar

- Bhaskara Reddy, M. V., Srinivasulu, D., Peddanna, K., Apparao, C. and Ramesh, P., 2015. Synthesis and Antioxidant Activity of New Thiazole Analogues Possessing Urea, Thiourea, and Selenourea Functionality. *Synthetic Communications*, **45**, 2592-2600.
- Blois, M. S., 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, **181**, 1199-1200.
- Chen, W., Sun, S., Cao, W., Liang, Y. and Song, J., 2009. Antioxidant property of quercetin-Cr(III) complex: The role of Cr(III) ion. *Journal of Molecular Structure*, **918**, 194-197.
- Cornelli, U., 2009. Antioxidant use in nutraceuticals. *Clinics in Dermatology*, **27**, 175-194.
- Cuya, S. M., Bjornsti, M.-A. and van Waardenburg, R. C. A. M., 2017. DNA topoisomerase-targeting

- chemotherapeutics: what's new? *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **80**, 1-14.
- Fortune, J. M., Velea, L., Graves, D. E., Utsugi, T., Yamada, Y. and Osheroff, N., 1999. DNA Topoisomerases as Targets for the Anticancer Drug TAS-103: DNA Interactions and Topoisomerase Catalytic Inhibition. *Biochemistry*, **38**, 15580-15586.
- Giugliano, D., Ceriello, A. and Paolisso, G., 1995. Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: Which role for oxidative stress? *Metabolism*, **44**, 363-368.
- Joseph, J. and Janaki, G. B., 2016. Copper complexes bearing 2-aminobenzothiazole derivatives as potential antioxidant: Synthesis, characterization. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **162**, 86-92.
- Katekhaye, S. D. and Kale, M. S., 2012. Antioxidant and free radical scavenging activity of Pithecellobium dulce (Roxb.) Benth wood bark and leaves. *Free Radicals and Antioxidants*, **2**, 47-57.
- Martínez Medina, J. J., Naso, L. G., Pérez, A. L., Rizzi, A., Okulik, N. B., Valcarcel, M., Salado, C., Ferrer, E. G. and Williams, P. A. M., 2019. Synthesis, characterization, theoretical studies and biological (antioxidant, anticancer, toxicity and neuroprotective) determinations of a copper(II) complex with 5-hydroxytryptophan. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **111**, 414-426.
- Montaner, B., Castillo-Ávila, W., Martinell, M., Öllinger, R., Aymami, J., Giralt, E. and Pérez-Tomás, R., 2005. DNA Interaction and Dual Topoisomerase I and II Inhibition Properties of the Anti-Tumor Drug Prodigiosin. *Toxicological Sciences*, **85**, 870-879.
- Nami, S. A. A., Ullah, I., Alam, M., Lee, D.-U. and Sarikavakli, N., 2016. Synthesis, characterization, molecular docking and biological studies of self assembled transition metal dithiocarbamates of substituted pyrrole-2-carboxaldehyde. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **160**, 392-399.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. and Aggarwal, B. B., 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, **49**, 1603-1616.
- Sas, K., Robotka, H., Toldi, J. and Vécsei, L., 2007. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *Journal of the Neurological Sciences*, **257**, 221-239.
- Soare, J. R., Dinis, T. C. P., Cunha, A. P. and Almeida, L., 1997. Antioxidant Activities of Some Extracts of Thymus zygis. *Free Radical Research*, **26**, 469-478.
- Srivastava, S., Blower, P. J., Aubdool, A. A., Hider, R. C., Mann, G. E. and Siow, R. C., 2016. Cardioprotective effects of Cu(II)ATSM in human vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes mediated by Nrf2 and DJ-1. *Scientific Reports*, **6**, 7.
- Suzuki, K. and Uyeda, M., 2002. Inhibitory Properties of Antitumor Prostaglandins against Topoisomerases. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **66**, 1706-1712.
- Yildiz, U. and Coban, B., 2019. Chemical and photo-induced nuclease activity of a novel minor groove DNA binder Cu(II) complex. *Journal of Serbian Chemical Society*, 2019, **84**, 12.