

# O-Vanilin İçeren Schiff Bazı Ligandı ve Pd(II) Kompleksinin Glioblastoma Multiforme Hücrelerindeki Tedavi Potansiyelinin İncelenmesi ve Elektroporasyonun Etkinliği

## Investigation of Treatment Potential of O-Vanillin Containing Schiff Base Ligand and Pd(II) Complex in Glioblastoma Multiforme Cells and Efficiency of Electroporation

Mehmet Eşref Alkış

Muş Alparslan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Muş, Türkiye

### Özet

**Giriş:** Glioblastoma multiforme (GBM) sık görülen ve en ölümcül primer beyin tümörlerindedir. Cerrahi rezeksiyon, radyasyon ve yüksek-doz kemoterapi gibi standart tedavilere rağmen, tanı konulduktan sonra hastaların ortalama sağ kalım süresi on iki ay civarındadır.

**Amaç:** Bu çalışmada, Metil 2-Amino-6-Metil-4,5,6,7-Tetrahidrotieno[2,3-c] Piridin-3-Karboksilat bazlı ligand ve Pd(II) kompleksinin kemoterapiye dirençli GBM hücrelerindeki tedavi potansiyellerini araştırmak ve elektroporasyonun (EP) bu bileşiklerin sitotoksiteleri üzerindeki etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Ligand ve Pd(II) kompleksinin sitotoksik aktivitesi T98G insan GBM hücre hattına karşı araştırılırken, biyouyumluluk için sağlıklı fibroblast hücreleri (L-929) kullanıldı. MTT testi kullanılarak Ligand ve Pd(II) kompleksinin tek başına veya EP ile kombinasyon halindeki sitotoksiteleri belirlendi.

**Bulgular:** Pd(II) kompleksi T98G hücrelerinde iyi düzeyde anti-kanser aktivite gösterirken ( $IC_{50}= 394.67$ ), L-929 fibroblast hücrelerinde sitotoksik aktivite göstermemiştir ( $IC_{50}= 1449.28$ ). Ligand ise T98G ve L-929 hücre hatlarında sırasıyla  $IC_{50}= 1126.79$  ve  $IC_{50}= 1283.36$  düzeyinde sitotoksik aktivite göstermiştir. T98G GBM tedavisinde Pd(II) kompleksinin EP ile kombine uygulanması tek başına Pd(II) kompleksin uygulanmasından çok daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Sağlıklı hücrelerde (L-929) sitotoksik aktivite göstermeyip, T98G hücre hattında sitotoksik aktivite gösteren Pd(II) kompleksi GBM tedavisi için olası kemoterapötik ajan olarak geliştirilebilir ve EP ile kombine kullanılması durumunda umut vaat eden sonuçlar verebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Schiff bazları; hücre kültürü teknikleri; glioblastoma; ilaç tedavisi; elektroporasyon

### Giriş

Kanser, dünya genelinde ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almakta ve dünya çapında halk sağlığı için bir tehdit olmaya devam etmektedir. Glioblastoma multiforme (GBM) en yaygın primer

### Abstract

**Introduction:** Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most common and deadliest primary brain tumors. Despite standard treatments such as surgical resection, radiation, and high-dose chemotherapy, the average survival time of patients after diagnosis is around twelve months.

**Objective:** The aim of this study was to investigate the chemotherapy potential of Methyl 2-Amino-6-Methyl-4,5,6,7-Tetrahydrothieno[2,3-c] Pyridine-3-Carboxylate-based ligand and its Pd(II) complex in chemotherapy-resistant GBM cells and to investigate the efficacy of electroporation (EP) on the cytotoxicity of these compounds.

**Material and Method:** The cytotoxic activity of the ligand and Pd(II) complex was investigated against T98G human GBM cell line, while healthy fibroblast cells (L-929) was used for biocompatibility. The cytotoxicities of Ligand and Pd(II) complex, alone or in combination with EP, were determined by MTT test.

**Results:** Pd(II) complex showed good anti-cancer activity in T98G cells ( $IC_{50}= 394.67$ ), while it didn't show cytotoxic activity in L-929 fibroblast cells ( $IC_{50}= 1449.28$ ). The ligand showed cytotoxic activity at  $IC_{50}= 1126.79$  and  $IC_{50}= 1283.36$  levels in T98G and L-929 cell lines, respectively. In the treatment of T98G GBM, the combined application of Pd(II) complex with EP was found to be much more effective than the application of Pd(II) complex alone ( $p<0.05$ ).

**Conclusion:** The Pd(II) complex, which didn't show cytotoxic activity in healthy cells (L-929), but showed good cytotoxic activity in the T98G cell line, can be developed as a possible chemotherapeutic agent for GBM treatment and may give promising results when used in combination with EP.

**Key Words:** Schiff bases; cell culture techniques; glioblastoma; drug therapy; electroporation

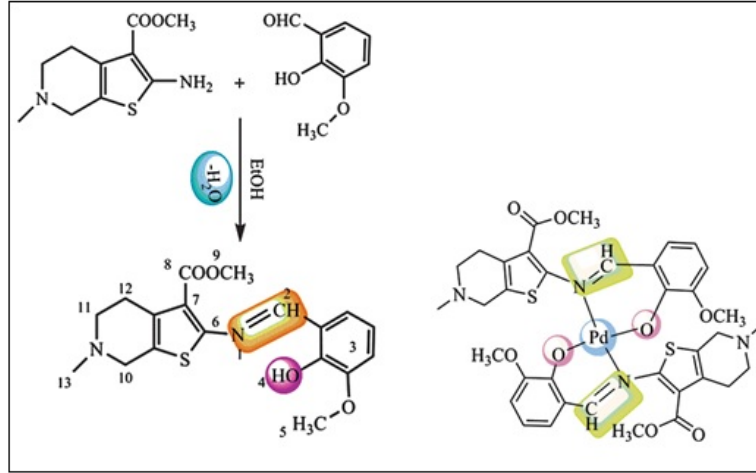
beyin tümörü olduğu bilinmektedir (1). GBM hastaları için cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapi gibi modern tedavi yöntemleri uygulanmasına rağmen, hastaların ortalama yaşam süreleri 2 yılı aşmamaktadır (2). Kemoterapi, kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemek ya da ortadan kaldırmak için sitotoksik ilaçların

kullanıldığı bir tedavi yöntemidir. Temozolomide (TMZ), GBM tedavisinde standart kemoterapötik ajan olarak kabul edilmektedir; ancak GBM tümörlerinin neredeyse yarısı TMZ tedavisine direnç göstermektedir (3). Ayrıca, hemen hemen tüm tümörler sonunda geri gelir ve tekrarlayan tümörlerin büyük çoğunluğu kemoterapiye direnç gösterir (4). Bu nedenle tedaviye dirençli GBM tümörleri için yeni antikanser ajanlarla yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine acil ihtiyaç vardır. Schiff bazıları antioksidan, antibakteriyel, antifungal, anti kanser ve anti diyabetik gibi önemli biyolojik aktiviteleri nedeniyle tıp ve farmasötik alanlarda önemli bir yere sahiptir. Son zamanlarda, birçok pirimidin içeren bileşik ve bunların türevlerinin, farklı enzimler ve reseptörler ile etkileşim yoluyla anti kanser aktivite sergiledikleri bildirilmektedir (5). Metal kompleksleri DNA sarmalı ile kovalent olmayan interkalasyon, oluk veya dış elektrostatik bağlanma yoluyla etkileşebilmektedirler. Önceki çalışmalarda Paladyum(II) kompleksinin çeşitli kanser hücrelerine karşı iyi düzeyde sitotoksikite gösterdiği, sağlıklı hücreleri ise pek etkilemediği rapor edilmiştir (6). Bununla birlikte Pd(II) kompleksi sentezi kolay ve suda çözünebilmektedir. Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda Schiff bazı ligandı ve Pd(II) kompleksi kullanılmıştır. Elektroporasyon (EP), biyolojik bir hücre veya dokuya kısa süreli ve hücre zarının kapasitansını aşacak yoğunlukta elektrik darbelerinin uygulanmasıyla, membran geçirgenliğinin artırılması işlemidir (7). Bu yöntem, hücre zarında geçici nanometre boyutunda küçük porlar oluşturarak, genellikle hücre zarını geçmekte zorlanan ya da geçemeyen iyon ve moleküllerin hücreye girişini kolaylaştırır. Reversible EP (<1500 V/cm), hücre canlılığına zarar vermeden kemoterapötik ilaçların hücrelere transferi için kullanılabilir. Kanser tedavisinde, kullanılan ajanın sitotoksik etkisini artırmak için EP ile kombine kullanılmasına Elektrokemoterapi (ECT) denir (8). EP etkinliği; elektrik alan kuvveti, hücre konsantrasyonu, akım tipi, akım süresi, sıcaklık ve elektroporasyon sıvısı gibi koşullara göre değişiklik göstermektedir (9). ECT için genellikle, 100 µs süreli, 1 Hz veya 5 kHz frekanslı, 1000-1300 V/cm elektrik alana sahip kare dalgalı elektrik darbeleri kullanılmaktadır (7). Kemoterapötik ajanın hücre dışı konsantrasyonu en yüksek düzeyde olduğu sırada elektrik alan uygulaması yapılırsa, ilacın zardan geçişi artarak sitotoksitesisi önemli derecede yükselebilir.

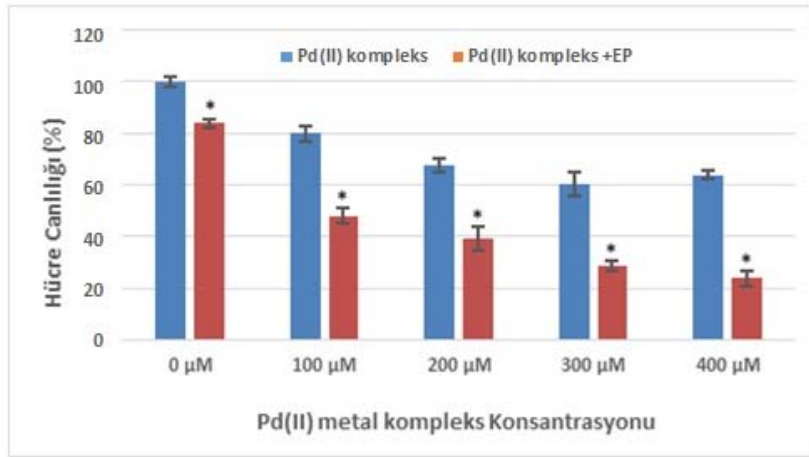
Böylece daha kısa sürede ve daha düşük doz anti kanser ajanla etkili tedavi sağlanarak, kemoterapötik ajanların yan etkileri de minimize edilmiş olur. EP, hücre ölümünü tetiklemede sağlıklı hücrelere göre kanserli hücrelerde daha etkilidir. Bunun muhtemel nedeni farklı membran bileşimleri, membran onarım kapasiteleri, enerji rezervleri gibi kanser hücrelerini sağlıklı hücrelerden ayıran faktörlerdir (10,11). Birçok araştırmacı yeni, güvenli ve etkili kemoterapötik ajan geliştirmek için farklı Schiff bazı ve metal kompleksleri çalışmalarını yapmışlardır (12). Fakat sentezledikleri schiff bazı ve metal komplekslerin anti-kanser özelliklerini incelerken elektrokemoterapi gibi büyük moleküllerin kanser hücrelerine girişini kolaylaştıracak yöntemlerin etkinliğine bakmamışlar. Günümüzde, ECT daha çok deri ve deri altındaki derin yerleşimli tümörler ile iç organlardaki tümörler için araştırılmaktadır. Farklı kemoterapötik ilaçlarla birçok in-vivo ve in-vitro çalışmada ECT'nin etkinliği gösterilmiştir (7,13). Bununla birlikte, ECT sınırlı sayıda kanser türü ve anti kanser ilacı için araştırılmıştır. ECT'yi farklı kanser türleri ve diğer hastalıklar için daha uygulanabilir hale getirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışmadaki önemli amaçlarımızdan bir tanesi de elektroporasyonun Schiff bazı ligandı ve Pd(II) metal kompleksinin anti-kanser aktiviteleri üzerindeki etkinliğini araştırmaktır. Çalışmada, Metil 2-Amino-6-Metil-4,5,6,7-Tetrahidrotieno [2,3-c] Piridin-3-Karboksilat ana maddesinden daha önce sentezlenip, yapıları aydınlatılan Schiff bazı Ligandı ve Pd(II) kompleksinin insan T98G GBM hücre hattında anti-kanser etkinlikleri belirlendi ve elektroporasyonun bu bileşiklerin sitotoksitesileri üzerindeki etkinliği araştırıldı.

## Gereç ve Yöntem

**Hücre kültürü deneyleri:** Hücre kültürü deneylerimizde model olarak pasaj sayısı 6-8 arasında değişen T98G ve L-929 hücreleri kullanıldı. T98G hücreleri Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezinden, L-929 hücreleri ise İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalından temin edildi. Hücrelerin gelişimi her gün inverted mikroskop altında incelendi. Hücreler 75 cm<sup>2</sup> kültür flasklarında, içerisine %10 FBS (Fetal Bovine Serum) (Pan Biotech, Avrupa), %1 penisilin streptomisin (Sigma, ABD) ilave edilerek hazırlanan DMEM medyumunu ile beslendiler.



**Şekil 1.** Metil 2-(2-hidroksi-3 metoksibenzilidenamino)-6-metil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3 c]piridin-3-karboksilatın (L) ve Pd(II) metal kompleksinin yapısı.



**Şekil 2.** T98G glioblastoma hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 300 ve 400 µM) yalnız Pd(II) kompleksi ve Pd(II) kompleksi+1000 V/cm EP ile 24 saatlik tedaviden sonraki hücre canlılığı. Veriler, üç bağımsız deneyden elde edilerek ortalama ± SD olarak sunuldu. \*: Pd(II) ve Pd(II)+EP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu gösteriyor (p<0.05).

Hücrelerin gelişimi, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde (Esco, Singapur), 37 °C'de ve %95 nemli ortamda gerçekleşti.

**Ajan:** Bu çalışmada, Metil 2-Amino-6-Metil-4,5,6,7-Tetrahidrotieno [2,3-c] Piridin-3-Karboksilat ana maddesinden sentezlenen ve spektroskopik yöntemlerle yapıları aydınlatılan Ligand ve Pd(II) kompleksi kullanılmıştır (Şekil 1) (14). Stok solüsyonunu hazırlamak için ligand ve Pd(II) kompleksi RPMI-1640 ortamında (Sigma, ABD) çözündürüldü. Kemoterapi ve elektrokemoterapi tedavi için hücreler, farklı konsantrasyonlarda ligand ve Pd(II) kompleksine tabi tutuldu.

**Ligand ve Pd(II) kompleksinin anti-kanser aktivitelerinin belirlenmesi:** Hücre sayım cihazı ile hücre sayımı yapıldı ve %0.4 trypan blue kullanılarak canlılık oranı belirlendi. Tüm deneyler canlılık oranı %90'ın üstünde olduğu durumlarda

yaşandı. Hücre ekimi 96 kuyucuklu plakalara (1x10<sup>4</sup> hücre / kuyucuk) yapıldı. Ekimi yapılan hücreler 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 24 saat süreyle inkübe edildi. 24 saat sonra ortam sıvıları çekilip 0, 100; 200; 300; 400 ve 500 µM konsantrasyonlara sahip besiyerinde (DMEM) hazırlanmış madde çözeltilerinden her kuyucuğa 100 µL ilave edilerek 24 saat süreyle tekrar inkübasyona bırakıldı. Kontrol kuyularındaki hücrelerin üzerine ise sadece 100 µL besiyeri (DMEM) ilave edilmiştir (15). İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra bileşiklerin sitotoksisiteleri MTT testi ile belirlendi.

**Elektroporasyon protokolü:** Çalışmada kullanılmak üzere inkübasyona bırakılan T98G hücreleri %80-90 konfluent haline ulaşınca %0.05'lik Tripsin-EDTA ile kaldırıldı ve hücre solüsyonu falkon tüplere alınarak 1000 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. 1x10<sup>6</sup>

hücre/ml yoğunlukta madde eklenmiş (son konsantrasyon 0, 100, 200, 300 ve 400  $\mu\text{M}$  olacak şekilde) 400  $\mu\text{l}$  hücre süspansiyonu 0.4  $\text{cm}^2$ 'lik elektroporasyon kuvvetlerine (BTX) aktarıldı. Elektrik alan uygulaması için kuvvetler BTX Gemini X<sup>2</sup> EP cihazı (Harvard Apparatus, USA) cihazındaki yerine yerleştirildi. Hücre süspansiyonlarına, klinik EP parametrelerine karşılık gelen 100  $\mu\text{s}$  süreli 1000V/cm elektrik alana sahip kare dalgalı sekiz puls treni uygulandı (16). Kontrol hücreleri de aynı şartlarda kuvvetlere yerleştirildi, ancak elektrik alan uygulanması yapılmadı. Deneyler üçer defa tekrarlandı. Elektroporasyon işleminden 10-15 dakika sonra hücreler 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ( $1 \times 10^4$  hücre/kuyucuk) ekildi ve inkübasyona bırakıldı. Deneye tabi tutulan hücrelerin canlılığı 24 saatlik inkübasyondan sonra MTT analiz yöntemi ile değerlendirildi.

**MTT analizi (sitotoksosite testi):** Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ligand ve Pd(II) kompleksine ait çözeltilerin sitotoksitesilerinin belirlenmesi için MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) testi (AppliChem, Almanya) uygulanmıştır. Bu amaçla 12 ml PBS içinde 60 mg MTT tozu olacak şekilde (5 mg/ml) MTT çözeltisi hazırlandı. 24 saat'lik inkübasyon için daha önce inkübatöre bırakılan plakalar alınarak, kuyucukların içerisindeki besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 10  $\mu\text{L}$  MTT çözeltisi ve 90  $\mu\text{L}$  RPMI-1640 ilave edilerek 4 saat süreyle tekrar inkübasyona bırakıldı. 4 saat sonunda MTT ihtiva eden besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve MTT maddesinin uygulanması sonucu oluşan formazan kristallerini çözünür duruma getirmek için her kuyucuğa 100  $\mu\text{l}$  DMSO (Dimetilsülfoksit) ilave edildi ve 570 nm dalga boyunda, mikropilaka okuyucu ile optik yoğunlukları (OD) ölçüldü (17). Kontrol grubu olarak sadece taze besiyeri kullanıldı. Boya ışıktan etkilendiği için deneyler karanlık ortamda yapıldı. Ligand ve Pd(II) komplekslerine ait çözeltilerin eklenmiş olduğu kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlandı ve % canlılık değeri aşağıdaki formül ile hesaplanarak bulundu. % Canlılık = (İncelenen grup OD/Kontrol grubu OD) x 100 Madde konsantrasyonuna karşı inhibisyon yüzdesi çizilerek grafik aracılığıyla %50 inhibisyon sağlayan madde konsantrasyonu ( $\text{IC}_{50}$ ) hesaplanmıştır. Bütün analizler üç paralel olarak çalışılmış ve her bir paralel deney 6-8 arası tekrarı içermektedir. Sonuçlar ise ortalama  $\pm$  standart sapma (Mean  $\pm$  SD.) olarak ifade edilmiştir.

**İstatiksel analiz:** İstatistiksel analizler Graph Pad Prism yazılımı (Graph Pad Software Inc., San

Diego, ABD) ile yapıldı. Veriler, tek yönlü ANOVA ve ardından yerine göre Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi veya Unpaired Parametrik two-tailed t-testi ile analiz edildi.  $P < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

**Anti-kanser aktivite:** Ligand ve Pd(II) kompleksinin altı farklı konsantrasyona sahip çözeltisi (0; 100; 200; 300; 400 ve 500  $\mu\text{M}$ ) T98G ve L-929 hücreleri ile 24 saat boyunca muamele edilmiş ve spektrofotometrik olarak absorbansları ölçülmüştür. Ölçülen absorbanslar ile T98G ve L-929 hücrelerine ait % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Hücre proliferasyonunda meydana gelen inhibisyon MTT testi ile belirlenmiştir. Test maddelerinin GBM ve fibroblast hücreleri

**Tablo 1:** Ligand ve Pd(II) kompleksinin T98G ve L-929 hücrelerindeki  $\text{IC}_{50}$  değerleri

Schiff bazı Ligand ve kompleksi	T98G $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	L-929 $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
Ligand	1126.79	1283.36
Pd (II) kompleksi	394.67	1449.28

üzerinde sitotoksik etkilerinin olup olmadığı veya ne ölçüde olduğu  $\text{IC}_{50}$  değerleri hesaplanarak tespit edilmeye çalışılmıştır (Tablo 1). Bu araştırmada, *in vitro* olarak T98G ve L-929 hücrelerine uygulaması yapılan kimyasal test ajanlarının  $\text{IC}_{50}$  değerlerine bakılmıştır. Tablo 1 'deki yüksek  $\text{IC}_{50}$  değeri düşük sitotoksiteyi gösterirken, düşük  $\text{IC}_{50}$  değeri yüksek sitotoksiteyi göstermektedir.  $\text{IC}_{50}$  değerlerine göre, en iyi sitotoksik etkiyi ligandın Pd(II) kompleksi T98G GBM hücrelerinde göstermiştir. Aynı zamanda bu kompleks L-929 sağlıklı hücre hattında çok düşük sitotoksik etki göstermiştir. Bu özelliklerinden dolayı Pd(II) kompleksi potansiyel anti-kanser ajan olarak geliştirilebilir. Ligand ise her iki hücre hattında da en yüksek  $\text{IC}_{50}$  değeri ile en düşük sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Ligand sağlıklı hücreyi de (L-929) hemen hemen T98G GBM hücresi kadar etkilediğinde anti-kanser ajan olma özelliği taşımamaktadır. Bundan dolayı ECT çalışmalarına Pd(II) kompleksi ile devam edilmiştir.

**Elektroporasyonun tedavideki etkinliği:** Pd(II) ve Pd(II) + EP gruplarının 24 saatlik inkübasyondan sonraki hücre canlılık yüzdeleri MTT analizi ile belirlendi ve veriler ortalama  $\pm$

standart sapma (SD) olarak Şekil 2'de sunulmuştur. Pd(II) metal kompleksinin anti-kanser aktivitesi EP ile önemli derecede artmıştır ( $p < 0.05$ ). Şekil 2'de de görüldüğü gibi genel itibarıyla Pd(II) kompleksi standart kemoterapiye göre elektrokemoterapide [Pd(II)+EP] çok daha yüksek anti-kanser aktivite göstermiştir. ECT'de düşük doz anti-kanser ajanla tedavi sağlanabildiğinden, kemoterapi ajanların yan etkileri de minimize edilebilir.

## Tartışma

Glioblastoma multiforme (GBM) hastaları için cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapi gibi modern tedavi yöntemleri uygulanmasına rağmen, ortalama yaşam süreleri en fazla 24 aya kadar uzatılabilmektedir (18). Günümüzde GBM tedavisinde kullanılan en önemli yöntemlerden biri de kemoterapidir. GBM kemoterapi tedavisinde genellikle alkilleyici bir ajan olan Temozolomid (TMZ) kullanılmaktadır. TMZ, DNA'nın en kritik bölgesindeki guanin'in O6 pozisyonuna metil grubu ekleyerek hasar oluşturup apoptoza yol açmaktadır. Fakat daha önceki çalışmalarda GBM hastalarının uygulanan TMZ kemoterapisine farklı yanıtlar verdikleri, tedavi sürecinde TMZ'ye karşı direnç geliştirdikleri ve hatta bazı hastaların TMZ tedavisine cevap vermediği raporlanmıştır (17, 18). Bu nedenlerden dolayı birçok araştırmacı yeni, güvenli ve etkili kemoterapötik ajan geliştirmek için farklı Schiff bazı ve metal kompleksleri çalışmalarını yapmışlardır. Sentezi kolay ve suda çözünebilen Paladyum(II) kompleksi çeşitli kanser hücrelerine karşı iyi düzeyde sitotoksikite gösterdiği, sağlıklı hücreleri ise pek etkilemediği ortaya konulmuştur (19). Yapılan literatür taranmasında GBM tedavisinde Pd(II) kompleksinin kullanıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Burada ilk kez Metil 2-Amino-6-Metil-4,5,6,7-Tetrahidrotieno[2,3-c] Piridin-3-Karboksilat bazlı ligand ve Pd(II) kompleksinin GBM hücrelerindeki kemoterapi tedavi potansiyelleri araştırıldı ve EP 'nin bu bileşiklerin sitotoksiteleri üzerindeki etkinliği incelendi. Bu çalışmada ligand hem T98G ( $IC_{50} = 1126.79$ ) hem de L-929 ( $IC_{50} = 1283.36$ ) hücre hattında çok düşük sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Ligandın Pd(II) kompleksi ise  $IC_{50} = 394.64$  ile T98G GBM hücrelerine karşı iyi düzeyde sitotoksik etki gösterirken, L-929 fibroblast hücrelerine karşı  $IC_{50} = 1449.28$  ile önemsenmeyecek düzeyde etki göstermiştir. Kemoterapide seçicilik önemli bir özelliktir. Kemoterapötik ilaçlar, sağlıklı hücrelere zarar vermeden tümör hücrelerini yok edebilmelidir (12).  $IC_{50}$  değerleri (Tablo 1), Pd(II) kompleksinin

GBM kemoterapi tedavisinde potansiyel ajan olabileceğini göstermektedir. Hücre zarının kemoterapi ilaçlarına karşı gösterdiği direnç de tedavinin uzamasına ve yüksek doz ilaç kullanımına sebep olarak hastalarda görülen yan etkilerin artmasına neden olup tedaviyi zorlaştırmaktadır. Elektrokemoterapi (ECT), çok düşük doz kemoterapötik ajanlarla kısa sürede ve etkili tedavi sunduğundan kemoterapi ajanlarının olumsuz yan etkilerini minimum düzeye indirebilmektedir. Elektrik alan darbeleri bir hücreye uygulandığında hücre zarı üzerinde bir transmembran voltajı indüklenir. Hücre zarında indüklenen bu voltaj belirli bir değeri geçerse, membranın geçirgenliğinde ve elektriksel iletkenliğinde önemli bir artışa neden olur. Membran geçirgenliğinin artmasıyla molekül yapısı büyük olan nükleik asitler, sitotoksik ilaçlar, proteinler, peptitler ve iyonlar gibi başka şekilde zor taşınan veya taşınamayan moleküller membran boyunca taşınabilirler (20). Uygun genlik ( $< 1500$  V/cm) ve sürede uygulanan elektrik alan maruziyetinden belli bir süre sonra membran normal durumuna geri döner (reversible EP). Bununla birlikte, elektrik alanının genliği çok büyükse ( $1500-3000$  V/cm) veya elektrik alan maruziyeti çok uzunsa, maruziyeten sonra tekrar kapanmaz ve hücre ölümüne neden olur (irreversible EP) (21). Bu çalışmada, T98G GBM hücrelerinin Pd(II)+EP gruplarına Pd(II) kompleksi ile birlikte reversible ve klinik EP parametrelerine karşılık gelen  $100 \mu s$  süreli  $1000$  V/cm elektrik alana sahip kare dalgalı sekiz puls treni uygulandı. Bu çalışmada Pd(II) kompleksinin anti-kanser aktivitesi EP ile önemli derecede artmıştır. DNA, anti-kanser ajanlarının hücre içi en önemli hedefini oluşturur. DNA'nın metal kompleksler ile etkileşimi, DNA parçalanmasına ve hücre ölümüne yol açabilmektedir (22). Pd(II) kompleksinin EP ile daha iyi anti-kanser aktivite göstermesinin muhtemel ana nedeni EP'nin molekül yapısı büyük olan bu bileşiğin T98G hücrelerine girişini kolaylaştırarak hücre içi konsantrasyonunu artırması yoluyla DNA'ya zarar vermesidir. ECT'de uygulanan elektrik darbelerinin tümör kan akışını da düzenlediği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Elektrik darbeleri sonucunda hem tümörlerdeki kan akışında hem de kısmi oksijen basıncında ( $pO_2$ ) azalma görülmektedir (23). Bu da anti-kanser ilaçların etkinliğini artırmaktadır. Çünkü bol oksijenli hücrelerde anti-kanser ilaçlar inaktif kalırlar. Farklı kemoterapötik ilaçlarla birçok in-vivo ve in-vitro çalışmada elektrokemoterapinin etkinliği gösterilmiştir. Mali ve ark. (24) elektrokemoterapinin malign

melanomlar, meme kanseri, baş ve boyun gibi tümörleri tedavisindeki etkinliği üzerine yayınlanmış 44 çalışma sonuçlarını değerlendirmişlerdir. ECT, tümör tipine bakılmaksızın % 84.1'lik objektif yanıt oranı ve % 59.4'lük tam remisyon oranı gösterdiğini tespit etmişler. Mittal ve ark. (25) ECT'nin curcumin'nin etkisini artırdığını ve klinik uygulamalarda ECT'nin curcumin ve diğer çeşitli ilaçlar veya aşularla kullanılmasını artırmak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu söylemişlerdir. Bulgularımız bu çalışmaların bulgularıyla paralellik göstermektedir. Kemoterapiye dirençli T98G hücre hattında, Pd(II) +EP kombine uygulanmasının yalnız Pd(II) metal kompleksi uygulamasına kıyasla sitotoksisiteyi yüksek oranda arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 1). EP GBM tedavisi için gerekli olan minimum Pd(II) dozunu azaltmıştır. Lokal bir tedavi yöntemi olan bu ECT tedavisi son zamanlarda Avrupa'daki birçok klinikte uygulanmaktadır. Sonuç olarak, Metil 2-Amino-6-Metil-4,5,6,7-Tetrahidrotieno [2,3-c] Piridin-3-Karboksilat başlangıç maddesi kullanılarak sentezlenen ligand ve Pd(II) kompleksinin anti-kanser aktiviteleri ilk defa T98G hücre hattında hem standart kemoterapi hem de elektrokemoterapi yöntemleriyle araştırıldı. Yeni Pd(II) kompleksinin anti-kanser özelliklere sahip olduğu belirlendi. Elektrokemoterapinin tedavideki etkinliği standart kemoterapiye göre oldukça yüksek olduğu gözlemlendi. Bu çalışmanın sonuçları, kemoterapiye dirençli glioblastoma multiforme için yeni terapötik çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu bulguları desteklemek için daha fazla in vitro deneyler ve hayvan çalışmaları yapılmalıdır.

**Çıkar çatışması beyanı:** Yazar, bu çalışma kapsamında çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

**Finansal destek:** Çalışmam için hiçbir kurum ya da kişiden finansal destek alınmamıştır.

**Yazar katkıları:** Makalenin ana fikrinin belirlenmesi, literatür taraması, tasarım ve dizayn, deneylerin yapılması ve makale yazımı Mehmet Eşref Alkış tarafından yapılmıştır.

## Kaynaklar

1. Lah TT, Novak M, Pena Almidon MA, Marinelli O, Žvar Baškovič B, Majc B, et al. Cannabigerol is a potential therapeutic agent in a novel combined therapy for glioblastoma. *Cells* 2021; 10(2): 340.
2. Wang H, Zhou H, Xu J, Lu Y, Ji X, Yao Y, et al. Different T-cell subsets in glioblastoma multiforme and targeted

- immunotherapy. *Cancer Lett* 2021; 496: 134-43.
3. Nishikawa R. Standard therapy for glioblastoma- A review of where we are. *Neurol Med Chir* 2010; 50(9): 713-719.
4. Lee SY, Slagle-Webb B, Rizk E, Patel A, Miller PA, Sung S-S, et al. Characterization of a novel anti-cancer compound for astrocytomas. *PLoS One* 2014; 9(9): e108166.
5. Rahmouni A, Souiei S, Belkacem MA, Romdhane A, Bouajila J, Ben Jannet H. Synthesis and biological evaluation of novel pyrazolopyrimidines derivatives as anticancer and anti-5-lipoxygenase agents. *Bioorg Chem* 2016; 66: 160-168.
6. Elsey J, Bublely JA, Zhu L, Rao S, Sasaki M, Pollack BP, et al. Palladium based nanoparticles for the treatment of advanced melanoma. *Sci Rep* 2019; 9(1): 3255.
7. Campana LG, Miklavčič D, Bertino G, Marconato R, Valpione S, Imarisio I, et al. Electrochemotherapy of superficial tumors - Current status: Basic principles, operating procedures, shared indications, and emerging applications. *Semin Oncol* 2019; 46(2): 173-191.
8. Fiorentzis M, Viestenz A, Siebolts U, Seitz B, Coupland SE, Heinzelmann J. The potential use of electrochemotherapy in the treatment of uveal melanoma: In vitro results in 3D tumor cultures and in vivo results in a chick embryo model. *Cancers (Basel)* 2019; 11(9): 1344.
9. Batista Napotnik T, Miklavčič D. In vitro electroporation detection methods - An overview. *Bioelectrochemistry* 2018; 120: 166-182.
10. Frandsen SK, McNeil AK, Novak I, McNeil PL, Gehl J. Difference in membrane repair capacity between cancer cell lines and a normal cell line. *J Membr Biol* 2016; 249(4): 569-576.
11. Zielichowska A, Daczewska M, Saczko J, Michel O, Kulbacka J. Applications of calcium electroporation to effective apoptosis induction in fibrosarcoma cells and stimulation of normal muscle cells. *Bioelectrochemistry* 2016; 109: 70-78.
12. Arafath MA, Adam F, Razali MR, Ahmed Hassan LE, Ahamed MBK, Majid AMSA. Synthesis, characterization and anticancer studies of Ni(II), Pd(II) and Pt(II) complexes with Schiff base derived from N-methylhydrazinecarbothioamide and 2-

- hydroxy-5-methoxy-3-nitrobenzaldehyde. *J Mol Struct* 2017; 1130: 791-798.
13. Cemazar M, Sersa G. Recent advances in electrochemotherapy *Bioelectricity*. 2019; 1(4): 204-213.
  14. Turan N, Buldurun K, Gündüz B, Çolak N. Synthesis and structures of Fe(II), Zn(II) and Pd(II) complexes with a Schiff base derived from methyl 2-amino-6-methyl-4,5,6,7-tetrahydrothieno[2,3-c] pyridine-3-carboxylate and comparison of their optical constants for different solvents and molarities. *J nanoelectron optoelectron* 2017;12(9):1028-1040.
  15. Alkış ME, Buldurun K, Turan N, Alan Y, Yılmaz ÜK, Mantarcı A. Synthesis, characterization, antiproliferative of pyrimidine based ligand and its Ni(II) and Pd(II) complexes and effectiveness of electroporation. *J Biomol Struct Dyn* 2020; 1–11.
  16. Campana LG, Miklavčič D, Bertino G, Marconato R, Valpione S, Imarisio I, et al. Electrochemotherapy of superficial tumors – Current status: *Semin Oncol* 2019; 46(2): 173-191.
  17. Mahajan SD, Law W-C, Aalinkeel R, Reynolds J, Nair BB, Yong K-T, et al. Nanoparticle-mediated targeted delivery of antiretrovirals to the brain. *Methods Enzymol* 2012; 509: 41-60.
  18. Mazor G, Levin L, Picard D, Ahmadov U, Carén H, Borkhardt A, et al. The lncRNA TP73-AS1 is linked to aggressiveness in glioblastoma and promotes temozolomide resistance in glioblastoma cancer stem cells. *Cell Death Dis* 2019; 10(3).
  19. Lasri J, Al-Rasheed HH, El-Faham A, Haukka M, Abutaha N, Soliman SM. Synthesis, structure and in vitro anticancer activity of Pd(II) complexes of mono- and bis-pyrazolyl-s-triazine ligands. *Polyhedron* 2020; 187: 114665.
  20. Saczko J, Kamińska I, Kotulska M, Bar J, Choromańska A, Rembalkowska N, et al. Combination of therapy with 5-fluorouracil and cisplatin with electroporation in human ovarian carcinoma model in vitro. *Biomed Pharmacother*. 2014; 68(5): 573-580.
  21. Bharti SK, Nath G, Tilak R, Singh SK. Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel Schiff bases containing 2,4-disubstituted thiazole ring. *Eur J Med Chem* 2010; 45(2): 651–660.
  22. Abu-Dief AM, Abdel-Rahman LH, Abdel-Mawgoud AAH. A robust in vitro anticancer, antioxidant and antimicrobial agents based on new metal-azomethine chelates incorporating Ag(I), Pd(II) and VO(II) cations: Probing the aspects of DNA interaction: Design, Biological Screening and DNA binding of some metal chelates. *Appl Organomet Chem*. 2020; 34(2): e5373.
  23. Sersa G, Krzic M, Sentjurc M, Ivanusa T, Beravs K, Kotnik V, et al. Reduced blood flow and oxygenation in SA-1 tumours after electrochemotherapy with cisplatin. *Br J Cancer*. 2002; 87(9): 1047-1054.
  24. Mali B, Jarm T, Snoj M, Sersa G, Miklavcic D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol* 2013; 39(1) : 4-16.
  25. Mittal L, Aryal UK, Camarillo IG, Raman V, Sundararajan R. Effective electrochemotherapy with curcumin in MDA-MB-231-human, triple negative breast cancer cells: A global proteomics study. *Bioelectrochemistry* 2020; 13: 107350.