

Bazı Schiff Bazlarının *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 Kültür Ortamlarında Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkileri

Ayşe Dilek ÖZŞAHİN¹ , Nesrin BOZHAN¹ 

¹ Bitlis Eren Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitlis
✉ : molekuler@gmail.com

ÖZET

Yeni sentezlenmiş bazı Schiff bazlarının kullanılmadan önce canlılar üzerindeki biyokimyasal etkilerinin incelenmesi gerekir. Bu amaçla *Saccharomyces cerevisiae* en önemli hücre modeli içinde yer alır. *S. cerevisiae*'daki metabolik özellikler, yüksek yapıli organizmalara benzerlik gösterdiği için elde edilen sonuçlar da paralellik göstermektedir.

Çalışmada; yeni sentezlenmiş Schiff bazlarının *S. cerevisiae* BY4741 kültür ortamlarında lipit peroksidasyon (MDA), total protein ve glutatyon analizleri yapılmıştır. Bu amaçla; deneyde kullanılan *S. cerevisiae* BY4741'in gelişimi ve çoğalması için YEDP besiyeri ortamı hazırlandı. Uygulama grupları için; schiff bazların her birinden 2ppm, 4 ppm ve 8 ppm olacak şekilde kültür ortamına ilave edildi. Elde edilen süpernatant ile; GSH, total protein ve MDA analizleri yapıldı.

Lipid peroksidasyon sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında schiff bazı gruplarının lipit peroksidasyon önleme etkilerinin olmadığı belirlenirken, yeni sentezlenen schiff bazlarının kontrol grubuna göre glutatyon ve total protein miktarlarının oldukça belirgin düzeyde yüksek olduğu saptandı ($p < 0.0001$).

Sonuç olarak; yeni sentezlenmiş Schiff bazlarının *S. cerevisiae*'nın biyokimyasal ve savunma sistemi üzerinde farklı etkilere sahip olduğu gözlemlendi. Özellikle antioksidan savunma sistemi üzerinde açığa çıkan sonuçların diğer canlı modelleri üzerindeki benzer çalışmalara kaynak olacağı ve in vivo sistemler kullanılarak yapılacak ileriki çalışmalara destek olarak, literatür bilgisine katkıda bulunulacağı düşünülmektedir.

DOI:10.18016/ksudobil.304125

Makale Tarihçesi

Geliş : 20.01.2017

Kabul : 27.04.2017

Anahtar Kelimeler

Schiff bazı,
Saccharomyces cerevisiae,
MDA,
GSH,
Toplam Protein

Araştırma Makalesi

The Effects of Some Schiff Bases on Biochemical Parameters in *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 Cultural Environments

ABSTRACT

Biochemical effects of newly synthesized some Schiff bases on living creatures need to be investigated before their use. For this purpose, *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the most important cell model. Because metabolic properties of *S. cerevisiae* are similar to the highly organized organisms, the results show parallelism, as well.

In the present study; lipid peroxidation (MDA), total protein, and glutathione analyses of newly synthesized Schiff bases were analysed in *S. cerevisiae* BY4741 culture media. For this purpose, YEDP medium was prepared for development and growth of *S. cerevisiae* BY4741 used in the experiment. In the study, 2 ppm, 4 ppm, and 8 ppm from each of Schiff bases were added in to culture medium for application groups. GSH, total protein and MDA analyses were carried out with the obtained supernatant.

As the results of lipid peroxidation were compared to the control group, it was concluded that the Schiff base groups had no lipid peroxidation inhibition effects, and the newly synthesized schiff

Article History

Received: 20.01.2017

Accepted: 27.04.2017

Keywords

Schiff base,
Saccharomyces cerevisiae,
MDA,
GSH,
Total Protein

Research Article

bases were found to have significantly greater amounts of glutathione and total protein than the control group ($p < 0.0001$). As a result, newly synthesized Schiff bases were determined to have different effects on biochemical and defense system of *S. cerevisiae*. In particular, the results of the antioxidant defense system will be a source for similar studies on other living models and will contribute to the literature for future studies using in vivo systems.

To Cited :Özşahin AD, Bozhan N 2018. Bazı Schiff Bazlarının *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 Kültür Ortamlarında Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkileri. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 21(2):131-140, DOI:10.18016/ksudobil.304125.

GİRİŞ

İlk kez 1864'te Schiff tarafından bir primer amin ve bir aktif karbonil grubunun kondensasyonundan elde edilen ve azometin grubu içeren ligandlara "Schiff Bazları" denir. Çok esnek ve değişken yapısal özelliklerinden dolayı çok sayıda Schiff bazı ve kompleksi sentezlenmiş ve incelenmiştir (Raman ve ark., 2003). Koordinasyon bileşiklerinin sentezinde ligand olarak kullanılan Schiff bazları konusuyla birçok bilim adamı ilgilenmiş ve çeşitli kompleksler elde etmişlerdir (Serin, 1980). Schiff bazlarının ve metal komplekslerinin kullanım sahası oldukça geniştir. Biyolojik ve yapısal önemlerinden dolayı üzerinde çok çalışılan bileşiklerdir (Helmut ve ark., 1976; Metzler ve ark., 1980).

Ligand olarak kullanılan Schiff bazları serbest oksijen, askorbik asit, katekol ve aminoasitler gibi biyolojik açıdan önemli moleküllerin oksidasyonunda rol oynamaktadır (Niederhoffer ve ark., 1984; Karlin ve ark., 1993). Özellikleri arasında en çok önemli olanı biyolojik sistemlerdeki aktiviteleridir. Özellikle; heterosiklik tiyo-semikarbazitler ve onların metal kompleksleri antitümör, bakteriyal ve antiviral aktivite gibi potansiyel tedavi yöntemlerinde kullanımı için üzerinde çokça çalışılan bileşiklerdir. Son zamanlarda bazı metal kompleksleri; ilaç sanayiinde, hastalıkların teşhis ve tedavisinde önem kazanmaya başlamıştır. Özellikle kükürt içeren Schiff bazı metal komplekslerinin antikanser özelliğinin ortaya çıkarılmasından sonra bu komplekslere olan ilgi daha da artmıştır (Klayman ve ark., 1983; Scovill ve ark., 1984; Mirabelli ve ark., 1987; Patel ve ark., 1989; Kim ve Lee, 1992; Amirkhanov ve ark., 1999). Schiff bazlarının platin komplekslerinin antitümöral aktivite (Kuduk ve ark., 1994), nitro ve halo türevlerinin hem antimikrobiyal hem de anti tümöral aktivite gösterdiği bilinmektedir.

Genetik yapısından dolayı *Saccharomyces cerevisiae*

Çalışmada

2-(2-(3 hydroxy-4- methoxyphenyl)ethylidene)hydrazinecarbothioamide,

2-(2-(4 benzyloxy)-3-methoxyphenyl)ethylidene)hydrazinecarbothioamide

2-(2-(4benzyloxy-3-methoxyphenyl)ethylidene)hydrazinecarboxamide olmak üzere 3 adet Schiff bazı kullanıldı. Sentezlenen Schiff bazlarının yapısal formülleri ve formül ağırlıkları Şekil 1' de verilmiştir.

Deneyde kullanılan Schiff bazları çalışmada aşağıdaki şekilde belirtilmiştir:

yararlı bir araştırma mikroorganizmasıdır. Bu bilimsel kaynak, hücre genetiği ve fizyolojisinin yapısı ve organizasyonu hakkında temel bilgilerin geliştirilmesinde çok önemli bir konuma sahiptir. *S. cerevisiae*; mantarlar, bitkiler ve hayvansal organizmalar üzerinde yapılan genomik, proteomik ve metabolik çalışmalarda muhtemel biyolojik mekanizmaların ortaya çıkarılmasında en iyi karakterize edilen organizma olarak kabul edilmektedir (Braconi ve ark., 2006; Braconi ve ark., 2015; Kireççi, 2017). Yeni sentezlenmiş bazı Schiff bazlarının kullanılmadan önce canlılar üzerindeki toksik ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi gerekir. Bu amaçla *S. cerevisiae* en önemli hücre modeli içinde yer alır. Genellikle ksenobiyotik, toksikolojik, biyokimyasal ve moleküler çalışmalarda bu hücre modeli kullanılmaktadır. *S. cerevisiae*'daki metabolik özellikler yüksek yapıli organizmalara benzerlik gösterdiği için buradan alınan sonuçlar da paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada; yeni sentezlenmiş Schiff bazı bileşiklerinin canlı organizmalar üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Çalışmamızda, yeni sentezlenmiş Schiff bazlarının *S. cerevisiae* BY4741 kültür ortamlarında lipit peroksidasyon (MDA), total protein ve glutatyon analizleri yapılmıştır. Bu yeni sentez maddelerin biyokimyasal parametreler üzerine etkileri belirlenmeye çalışılarak ileriki dönemlerde diğer canlı modelleri üzerindeki çalışmalara da ışık tutulması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

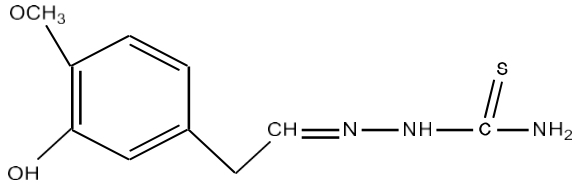
Schiff Bazları

Kullanılan maddeler BEBAP 2014.09 No'lu proje kapsamında sentezlenerek elde edilmiştir.

2-(2-(3 hydroxy-4- methoxyphenyl)ethylidene)hydrazinecarbothioamide: E1

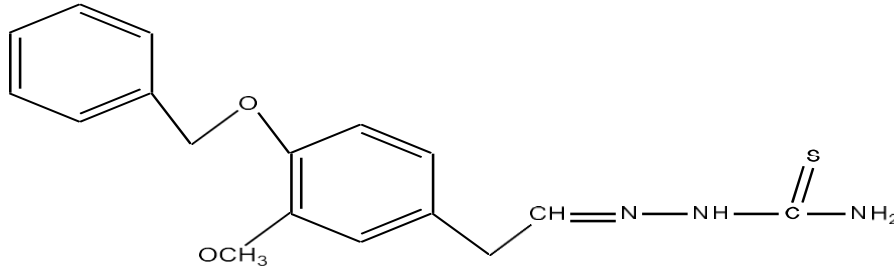
2-(2-(4 benzyloxy)-3- methoxyphenyl)ethylidene)hydrazinecarbothioamide: E2

2-(2-(4 benzyloxy-3- methoxyphenyl)ethylidene)hydrazinecarboxamide: E3

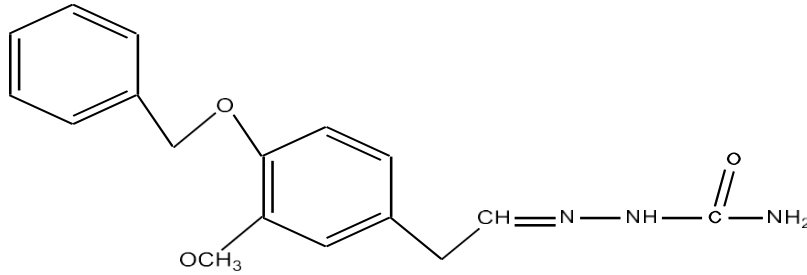


E1:2-(2-(3hydroxy-4-methoxyphenyl)ethylidene)hydrazinecarbothioamide

(Ma:239.29)



E2: 2-(2-(4 benzyloxy)-3-methoxyphenyl)ethylidene)hydrazinecarbothioamide (Ma:329.42)



E3: 2-(2-(4benzyloxy-3-methoxyphenyl)ethylidene)hydrazinecarboxamide (Ma: 313.35)

Şekil 1. Çalışmada kullanılan Schiff bazlarının molekül formülleri ve mol kütleleri

Maya Örnekleri

Çalışmada kullanılan *S. cerevisiae* BY4741- Yabani Tıp maya hücresi (Genotip: MATA his3 leu2 met15 ura3) İzmir Yüksek Teknoloji Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

Metot

Schiff Bazı Solüsyonlarının Hazırlanması

E₁; MA: 239.29

E₂; MA: 329.42

E₃; MA: 313.35 molekül ağırlıklarına sahip Schiff bazlarından DMSO 'da çözülerek 2 ppm, 4 ppm ve 8 ppm'lik konsantrasyonları hazırlanmıştır.

Saccharomyces cerevisiae BY4741'in Gelişme ve Uygulama Ortamının Hazırlanması

Öncelikle deneyde kullanılacak olan *S. cerevisiae* BY4741- Yabani Tıp maya hücresinin (Genotip: MATA his3 leu2 met15 ura3) gelişimi ve çoğalması için YEPD (200 mL için; 2 gr maya ekstrak, 4 gr baktipepton, 4

gr glukoz) besiyeri ortamı her grup için tekrar sayısı (n) = 5 olacak şekilde hazırlandı. Besiyeri ortamı hazırlandıktan sonra aşağıdaki gruplara ayrıldı:

Kontrol grubu: Bu gruptaki *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su 2 g maya ekstraktı, 4 g baktipepton ve 4 g glukoz içeren besiyeri ortamı hazırlandı.

Schiff Bazı Uygulama Grupları Bu gruptaki *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2 g maya ekstraktı, 4 g baktipepton ve 4 g glukoz içeren besiyeri ortamı içerisine maya hücresi inoküle edildikten sonra OD600 değerleri 0.4-0.6 civarına [yaklaşık olarak 1-3 10⁷ hücre ml (Bergman, 2001)] ulaşınca schiff bazlarının her birinden 2 ppm, 4 ppm ve 8 ppm konsantrasyonları içerecek şekilde eklenerek gruplar hazırlandı. Her konsantrasyon ayrı bir grup olarak belirlenip deneysel çalışma işlemi yürütüldü. Aşılama işleminden sonra kültürler 30 °C'de 72 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda kültürler laboratuvar şartlarında 517 nm'de hücre yoğunlukları ölçüldükten sonra, 6000 rpm'de 5 dakika süreyle +4 °C'de santrifüj edilerek hücreler toplandı. Hücreler

pellet olarak toplandıktan sonra yaş ağırlıkları belirlenip diğer biyokimyasal işlemlerin yapılmasına geçildi.

Hücre pelletleri, 20 mM Tris HCl-baz (pH= 7.4) ve 20 mM EDTA karışımı ile homojenize edilip santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı ile GSH, total protein ve MDA ölçümleri yapıldı. Sonuçlar SPSS istatistik programı kullanılarak analiz edilip farklılıklar istatistik açıdan değerlendirildi.

Maya Hücresinde MDA Miktarının Ölçülmesi

MDA (TBARS) düzeyinin ölçümü, Ohkawa ve ark., (1979) 'nin metoduna göre bazı modifikasyonlar yapılarak spektrofotometre ile ölçüldü.

Maya Hücresinde Glutatyon Miktarının Ölçülmesi

Süpernatant kısım üzerine 0.3 M Na₂HPO₄ çözeltisinden 2 mL ilave edildi ve 0.5 mL % 0.03'lük DTNB çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı 5-10 sn sonra oluşan sarı renk oda sıcaklığında iyice stabil hale geldikten sonra 412 nm'de köre karşı okundu (Elman,1959).

Maya Hücresinde Total Protein Miktarının Ölçülmesi

Örneklerin total protein miktarlarının ölçümü Lowry (1950) yöntemine göre yapıldı.

İstatistik Analizi

Deney sonucunda elde edilen veriler SPSS 15.0 istatistik programı ile değerlendirildi. Kontrol grubu ile uygulanan maruziyet konsantrasyonları gruplarının ortalamaları arası farklar önce tek-yönlü ANOVA ile daha sonra da her bir grubun diğerinden olan farklılıklar post hoc LSD testi yapılarak belirlendi. Değerler ortalama ± standard sapma (mean±S.D.) belirtildi. İstatistik yönden önemli bulunan farklar metin içinde de istatistiksel P (p>0,05, p<0,05, p<0,01, p<0,001) değerleri şeklinde ifade edildi.

BULGULAR

Schiff Bazlarının *S. cerevisiae* BY4741'in Lipit Peroksidasyon Oluşumu Üzerine Etkisi

Schiff bazlarının maya hücresindeki MDA miktarının kontrol grubuna (0.304±0.07) kıyasla tüm **gruplarda** arttığı gözlemlendi. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında E₁ 8 ppm (0.972±0.15 nmol/g), E₃ 8 ppm (0.756±0.04 nmol/g) gruplarında bu artışın kontrole göre istatistiksel açıdan oldukça önemli olduğu (p<0.0001), E₁ 2 ppm (0.682±0.07 nmol/g), E₂ 4 ppm (0.650±0.03 nmol/g), E₃ 4 ppm (0.580±0.10 nmol/g) gruplarında MDA düzeylerindeki artışın ise belirgin düzeyde anlamlı olduğu saptandı (p<0.001).

E₁ schiff bazının 2 ppm, 4 ppm ve 8 ppm konsantrasyonları ilave edilen maya hücre

hücrelerindeki MDA düzeyi incelendiğinde; kontrol grubuna göre tüm gruplarda miktarın arttığı gözlemlendi. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında konsantrasyon arttıkça MDA miktarının E₁ 2 ppm'de (0.682±0.07 nmol/g) belirgin düzeyde arttığı (p<0.001), E₁ 8 ppm'de (0.972±0.15 nmol/g) artışın oldukça belirgin olduğu tespit edildi (p<0.0001) (Şekil 2).

E₂ schiff bazının farklı konsantrasyonları (2 ppm, 4 ppm ve 8 ppm) ilave edilen maya hücrelerindeki MDA düzeyinin kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda belirgin düzeyde arttığı tespit edildi (p<0.001). Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında konsantrasyon arttıkça MDA miktarının arttığı gözlemlendi. E₂ 4 ppm'de (0.650±0.03 nmol/g) miktarın belirgin düzeyde arttığı saptandı (p<0.001) (Şekil 2).

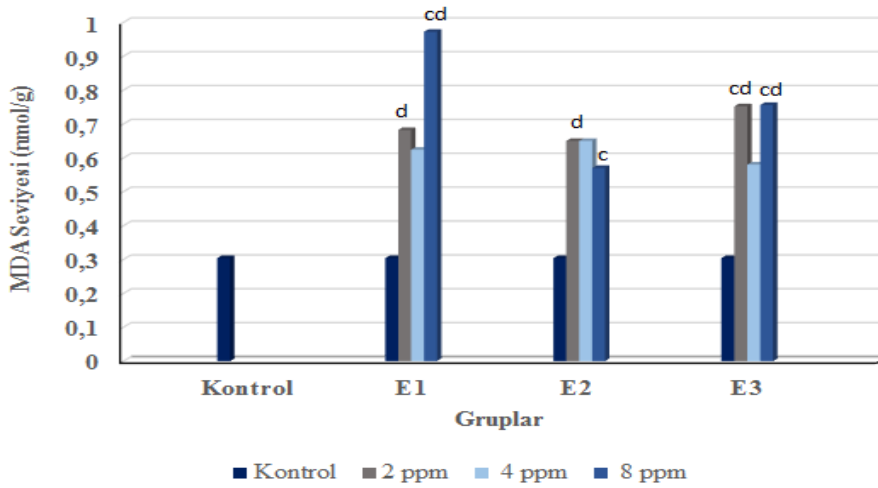
E₃ schiff bazının üç farklı konsantrasyonu ilave edilen maya hücrelerindeki MDA miktarı karşılaştırıldığında; kontrol grubuna göre tüm gruplarda belirgin düzeyde arttığı gözlemlendi (p<0.001). E₃ 4 ppm'de (0.580±0.10 nmol/g) gruplar arasındaki farklılığın çok daha belirgin olduğu (p<0.001), E₃ 8 ppm'de (0.756±0.04 nmol/g) artışın oldukça fazla olduğu tespit edildi (p<0.0001) (Şekil 2).

Schiff Bazlarının *S. cerevisiae* Hücresindeki GSH Miktarı Üzerine Etkisi

Kontrol grubuna (12.01±2.26 µg/g) göre E₁, E₂ ve E₃ schiff bazlarının farklı konsantrasyonları ilave edilen maya hücrelerindeki GSH düzeyleri karşılaştırıldığında tüm gruplarda artış olduğu belirlendi. GSH miktarlarının; E₁ ve E₂ schiff bazlarını içeren gruplarda konsantrasyon arttıkça arttığı, buna karşılık E₃ grubunda ise azaldığı belirlendi (Şekil 2).

E₁ schiff bazının farklı konsantrasyonları (2 ppm, 4 ppm ve 8 ppm) ilave edilen maya hücrelerindeki GSH düzeyi incelendiğinde; kontrol grubuna kıyasla miktarın tüm gruplarda arttığı gözlemlendi. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında konsantrasyon arttıkça GSH miktarının arttığı belirlendi. E₁ 4 ppm (19.72±1.45 µg/g) grubunda belirgin düzeyde arttığı, E₁ 8 ppm (20.85±2.13 µg/g) grubunda bu artışın istatistiksel açıdan oldukça önemli olduğu saptandı (p<0.001; p<0.0001) (Şekil 2).

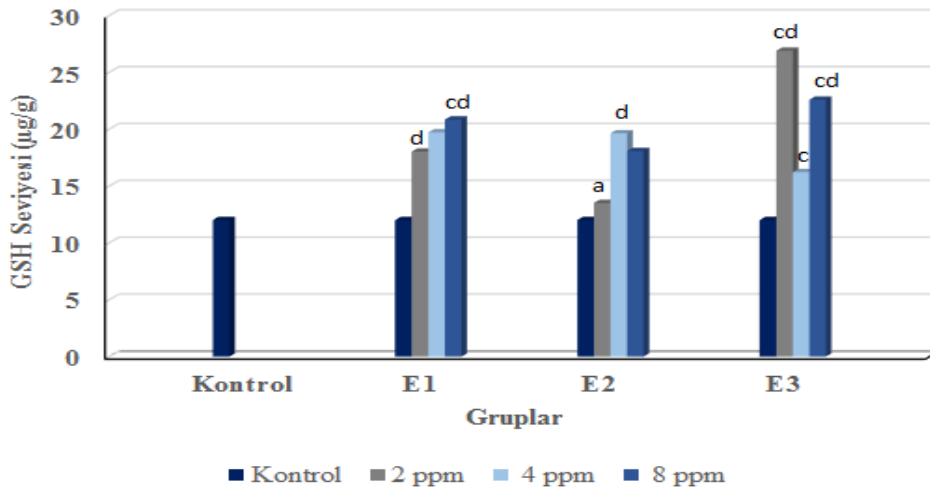
E₂ schiff bazı ilave edilen maya hücre hücrelerindeki GSH düzeyinin kontrol grubuna göre tüm gruplarda belirgin düzeyde arttığı tespit edildi (p<0.001). Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında konsantrasyon arttıkça GSH miktarının arttığı saptandı. E₂ 2 ppm'de (13.51±1.95 µg/g) istatistiksel farklılık bulunmadığı (p>0.05), E₂ 4 ppm'de (19.64±2.43 µg/g) miktarın belirgin düzeyde arttığı tespit edildi (p<0.001) (Şekil 2).



Şekil 2. Schiff bazlarının *S. cerevisiae* hücreindeki MDA-TBA miktarı üzerine etkisi

E₃ schiff bazının maya hücre hücrelerindeki GSH düzeyine bakıldığında kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda belirgin düzeyde arttığı gözlemlendi (p<0.001). Gruplar kendi aralarında

karşılaştırıldığında konsantrasyon arttıkça GSH miktarının azaldığı tespit edildi. E₃ 2 ppm'de (26.90±6.88 µg/g) miktarın oldukça fazla olduğu, E₃ 4 ppm'de (16.22±1.72 µg/g) anlamlı derecede farklılık olduğu saptandı (p<0.0001; p<0.01) (Şekil 2).



Şekil 2. Schiff bazlarının *S. cerevisiae* hücreindeki glutatyon miktarı üzerine etkisi

Schiff Bazlarının *S. cerevisiae* Hücreindeki Total Protein Miktarı Üzerine Etkisi

Kontrol grubuna (0.776±0.06 mg/g) göre E₁, E₂ ve E₃ schiff bazlarının farklı konsantrasyonları ilave edilen maya hücrelerindeki total protein miktarı üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında tüm gruplarda belirgin düzeyde arttığı gözlemlendi (p<0.001).

Kontrol grubuna kıyasla E₁ schiff bazının maya hücrelerindeki total protein düzeyi üzerine etkisi incelendiğinde; tüm gruplarda belirgin düzeyde artış olduğu belirlendi (p<0.001). E₁ 4 ppm'de (0.900±0.05 mg/g) bu artışın çok daha belirgin düzeyde olduğu gözlemlenirken (p<0.001), E₁ 8 ppm'de (1.156±0.06 mg/g) miktarın istatistiksel açıdan oldukça önemli

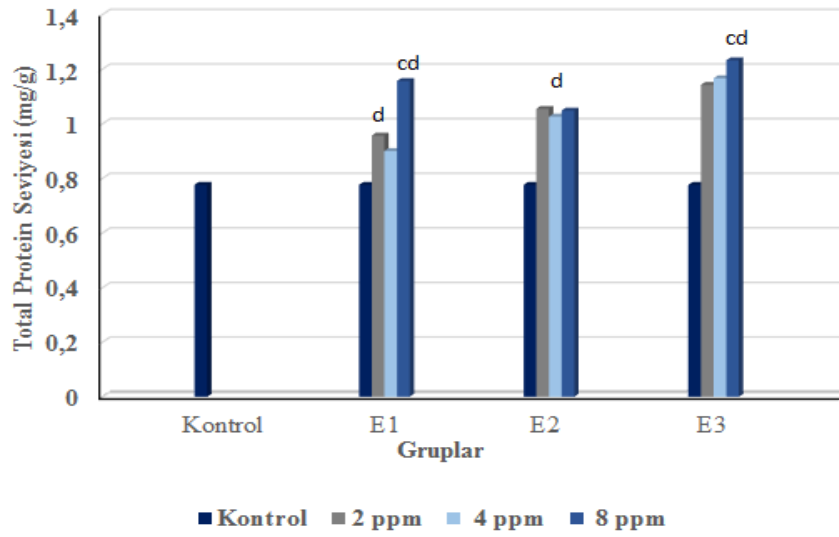
olduğu saptandı (p<0.0001) (Şekil 3).

E₂ schiff bazının farklı konsantrasyonları ilave maya gelişme ortamındaki total protein miktarı karşılaştırıldığında; kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda belirgin düzeyde arttığı gözlemlendi (p<0.001). Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında konsantrasyon arttıkça total protein miktarının azaldığı saptandı. E₂ 2 ppm'de (1.054±0.004 mg/g) miktarın belirgin düzeyde arttığı tespit edildi (p<0.001) (Şekil 3).

E₃ schiff bazının üç farklı konsantrasyonu ilave edilen *S. cerevisiae* hücrelerindeki total protein düzeyinin kontrol grubuna göre tüm gruplarda belirgin düzeyde arttığı belirlendi (p<0.001). Gruplar kendi aralarında

karşılaştırıldığında konsantrasyon arttıkça total protein miktarının arttığı tespit edildi. E₃ 8 ppm'de miktarın belirgin düzeyde arttığı (p<0.001), E₃ 8

ppm'de (1.232±0.21 mg/g) miktarın istatistiksel açıdan oldukça önemli olduğu saptandı (p<0.0001) (Şekil 3).



Şekil 3. Schiff bazlarının *S. cerevisiae* hücrendeki total protein miktarı üzerine etkisi

TARTIŞMA ve SONUÇ

Canlı yapılarda koordinasyon bileşikleri hayati öneme sahip olan bileşiklerdir. Koordinasyon kimyasında Schiff bazları ligand olarak kullanılmaktadır. Schiff bazlarının değişik metallerle oluşturdukları kompleksler, biyolojik ve katalitik uygulamaları birçok bilimsel çalışmanın temelini oluşturmuş ve oluşturmaya da devam etmektedir (West ve Panel, 1989; Chohan ve Praveen, 2001; Takani ve ark., 2002; Mukherjee ve ark., 2006; Silva ve ark., 2006; Li-Juan ve ark., 2009; Reiss ve ark., 2009; Shayma ve ark., 2009; Dolaz ve ark., 2010; Mounika ve ark., 2010; Prashanthi ve Raj, 2010; Ceyhan ve ark., 2011; Chavan ve Mehtan, 2011).

Canlı sistemlerde enzimler oldukça önemli yer tutan biyomoleküllerdir. Bu biyomoleküllerin birçoğu kofaktör olarak metal iyonu ihtiva ederler. Bu nedenle enzimler metal iyonlarından kolayca etkilenebilen moleküllerdir ve birçok metal iyonu belirli konsantrasyonda bir enzimin inhibitörü veya aktivatörü olarak davranmaktadır. Modern tıpta birçok hastalığın tedavisi bazı enzimlerin inhibisyonu veya aktivasyonu üzerinden gerçekleşmektedir. Bu nedenle koordinasyon bileşikleri farmakolojide önemli yer tutmaktadır. Bu bağlamda bazı komplekslerin biyolojik aktivitesi üzerine yapılacak çalışmalar yeni ilaçların sentezi ve bazı hastalıkların tedavisi açısından oldukça önemlidir (Dominguez-Vera ve ark., 1998; You ve Zhu, 2004; Xu ve ark., 2005; Peralta ve ark., 2006; Chu ve Huang, 2007; Wang ve Zheng, 2007). Farklı Schiff bazlarının Cu(II) kompleksleri, biyolojik sistemlerin fiziksel ve kimyasal

davranışlarının incelenmesinde önemli bir model oluşturmuştur (Reddy ve Reddy, 2000). Bazı ligandların dinükleer Cu(II) komplekslerinin antitümör, antiviral ve antiinflamatuvar ajanlar olarak davrandığı tespit edilmiştir (Zishen ve ark., 1990). Ayrıca heteronükleer komplekslerin biyolojik aktiviteleri üzerine yapılan araştırmalarda ümit verici sonuçlar elde edilmiştir. Schiff bazlarının polinükleer komplekslerinin biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Sağlam ve ark., 2002; Mathur ve Tabassum, 2006).

Birçok araştırmacı metal komplekslerinin sitotoksik özellikte olduğunda birleşmektedirler (Treshchalina ve ark., 1979; Kelland ve ark., 1994; Rho ve ark., 2002). Yapılan birçok araştırma Schiff bazlarının metal komplekslerinin mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Bunun da nedeni olarak lipid zarlardan pozitif yüklü metal iyonlarının geçerek enzimleri bloke etmesi gösterilmektedir (Raman ve ark., 2003).

Son zamanlarda canlılar üzerinde yapılan antikanser çalışmaları hem maliyet hem de etik unsurlar açısından sorun oluşturmaktadır. Bu nedenle *in vitro* şartlarda yapılan sitotoksik ve antimutajenik testler daha yaygın olarak tercih edilir hale gelmiştir (Kaya, 2003; Ahmed ve Ezer, 2008; Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). Araştırmacılar tıbbi bitkilerin ve değişik kimyasalların mutajenik-antimutajenik özelliklerinin belirlenmesinde, esas olabilecek kısa zamanda sonuç verebilen ve düşük maliyetli test sistemleri geliştirmişlerdir. *S. cerevisiae*'nin kullanıldığı test sistemi de bakteriyel test sistemlerine ilave olarak

mutajenik antimutajenik maddelerin araştırılmasında kullanılmaya başlanmıştır (Bakkali ve ark., 2006).

Schiff bazlarının, *S. cerevisiae*'nin biyokimyasal parametreleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmamızda elde edilen değerlere bakıldığında kontrol grubu ve ile schiff bazı grupları arasında istatistiksel farklılıklar olduğu görülmektedir.

GSH enzimatik olmayan önemli bir antioksidandır. Bu antioksidan özelliği ile serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktadır (Akkuş, 1995; Dikici, 1999). Hücre içi ortamın en önemli antioksidan molekülü olan glutatyonun antioksidan aktivite dışında ksenobiyotiklerin etkisizleştirilmesi, aminoasitlerin transportu, proteinlerdeki sülfidril gruplarının indirgenmesinde görev almaktadır (Esterbauer ve ark., 1992). Bu çalışmada Schiff bazı uygulanan gruplarda GSH düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla önemli derecede arttığı tespit edilmiştir. GSH düzeylerinde tespit edilen artış en fazla E₃ 8 ppm grubunda gözlenmiştir. Bu artışın nedenini; *S. cerevisiae*'nin Schiff bazlarına karşı bir savunma mekanizması geliştirerek, oksidatif hasarlara karşı adaptasyon sağlaması ile açıklayabiliriz. Bu görüşümüz, Izawa ve ark., (1995) tarafından yapılan çalışma ile de desteklenmektedir. Bu araştırmacılar, çalışmalarında H₂O₂'ye karşı oluşturulan adaptasyonlardan birinin intraselular glutatyonun artışının olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca, Penninckx (2000) *S. cerevisiae* mayasının farklı besin kaynaklarına ve oksidatif strese cevap olarak glutatyon sentezlediğini saptamıştır. Lee ve ark., (2001) *S. cerevisiae* mayasında iyon radyasyonuna karşı süperoksit radikalının koruyucu etkisinin araştırdıkları çalışmalarında mayada radyasyon sonunda SOD'un yanı sıra katalaz ve glutatyon redüktaz enzimlerinin düzeylerinin yüksek seviyede arttığını gözlemlemişlerdir.

MDA; lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve artmış olması hücrel hasarın bir göstergesidir (Garcia ve ark., 1997). MDA seviyesi lipid peroksidasyonun bir ölçüsü olarak kabul edilmektedir. Araştırmamızda farklı konsantrasyonlarda Schiff bazı uygulanan maya hücrelerinin MDA düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılıklar olduğu gözlemlendi. Şekil 1'e bakıldığında Schiff bazı ilave edilen gruplardaki MDA düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla arttığı görülmektedir. Özellikle E₁ 8 ppm'de artışın istatistiksel açıdan oldukça önemli olduğu belirlenmiştir. MDA düzeyindeki artış kullanılmış olan test maddelerinin lipid peroksidasyonunu artırarak hasar oluşumuna sebep olduğunun göstergesi olabilir. MDA hücre düzeyinde metabolize edilmekte ya da diffüze olmakta ve diğer hücrelerde hasar oluşturmaktadır. MDA pek çok hücrede membran bütünlüğünün bozulmasına sebep olmakta ve bunun sonucunda lizozomal

membranlarda yırtılmaya, hücre membran bütünlüğünün kaybına neden olmaktadır. Ayrıca MDA proteinlerin amino gruplarına ataklar yaparak molekül içi ya da proteinler arası bağlar oluşturarak protein yapısını bozmaktadır. Özellikle zarda bulunan integral ya da periferel oluşturdukları hasarlar, bazı hücrelerde permeabilityyi artırarak hücrenin ölümüne yol açar (Cheeseman ve Slater, 1993).

Yaptığımız çalışmada Schiff bazı uygulanan gruplarda toplam protein miktarının kontrol grubuna kıyasla belirgin olarak arttığı tespit edildi. Protein düzeylerinde izlenen artış en fazla E₁ 8 ppm ve E₃ 8 ppm gruplarında gözlenmiştir. Bu artış schiff bazı ile hasara uğramış proteinlerin birikimi ile açıklanabilir. Kullandığımız schiff bazı etkisi ile hücrede anormal protein birikimi oluşabilir. Bu sonuçta hücrede protein düzeyinin artışı ile sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte oksidatif strese karşı hücrelerde yeni proteinlerin sentezi de protein düzeyinde artışa neden olabilmektedir. Bu hipotez literatürde bazı araştırmacılar tarafından desteklenmektedir. Tamarit ve ark., (1998), oksidatif strese bağlı olarak bir grup oksitlenmiş proteinin ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Ayrıca; *E. coli* hücrelerinin hidrojen peroksit stresine maruz bırakıldığında, alkol dehidrogenaz E, uzama faktörü G, ısı şok proteini DnaK gibi temel proteinlerin sentezinde artış olduğunu belirtmişlerdir.

Sonuç olarak; kimyasal olarak sentezlenen bileşik ya da bileşik gruplarının doğrudan canlı sisteme uygun olduğunu söyleyemeyiz. Bu moleküller değişik biyolojik etkiye sahip olabilirler. Schiff bazı maddeler insan diyetinde kullanılamaz. Fakat bu bileşiklerin çoğunluğu canlı vücudu içerisinde değişik amaçlarla kullanılabilir. Eukaryotik grubundan olan, *S. cerevisiae* hücre döngüsünün kontrolü mekanizmasının açığa kavuşturulmasında başarılı bir model organizma olarak kullanılmış olup; zararlı moleküller ile karşılaştığında ve oksidatif stres ile karşı karşıya kaldığında hücre sisteminde bu zararlı saldırılara karşı cevap verebilecek sistemlerle donatılmıştır. Yeni sentezlenmiş bir bileşik canlı sisteme uyum sağlayıp sağlamadığı bu tip çalışmalarla ortaya çıkarılıp kullanıldığı zaman herhangi bir sorun ile karşılaşmaz.

Canlı organizmalarda antioksidan savunma sisteminin prensiplerini ortaya koymak oldukça güçtür. Schiff bazlarının biyoloji, farmakolojik ve kimya alanlarında kullanımları oldukça yaygındır. Ancak bu maddelerin kullanımlarından önce biyolojik sistemlere, canlıların savunma sistemine uygunluğunun ortaya konulması gereklidir. *S. cerevisiae* mayasının kültür şartlarında elde edilen bu sonuçlar doğrudan *in vivo* şartlar ile ilişkilendirilebilir.

Yaptığımız araştırma kapsamında; yeni sentezlenen Schiff bazlarının *S. cerevisiae*'nin biyokimyasal

sistemi, savunma sistemi üzerinde farklı etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Bu veriler doğrultusunda; ilaç sanayinde sıklıkla kullanılan Schiff bazlı bileşiklerin canlı sistemler üzerindeki biyokimyasal değişimlerinin belirlenmesi ve etkilerinin ortaya konulmasına olumlu katkıda bulunulmuştur. Ayrıca son yıllarda OECD, EPA ve AB gibi kuruluşların 3R prensibini kabul etmelerinden dolayı, memeli hayvanlarda yapılan mekanistik ve metabolizma çalışmalarının sınırlandırılması nedeniyle Schiff bazları araştırmalarının maya model hücrelerinde de standardize, güvenilir ve tekrarlanabilir protokollere göre yürütülebilirliği ortaya konulmuştur.

Çalışmamız ile elde ettiğimiz verilerin ve sonuçların diğer canlı modelleri üzerindeki benzer çalışmalara kaynak ve yararlı olacağı, hücre kültürü çalışmalarında hücre gelişimine olan etkileri incelenebileceği, *in vivo* test sistemleri kullanılarak yapılacak ileriki çalışmalar ile desteklenebileceği ve literatür bilgisine katkıda bulunulacağı düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Çalışma Bitlis Eren Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün (BEBAP 2016.04) desteği ile gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

Ahmed HJ, Ezer N 2008. Prunella L. türlerinin kimyasal bileşikleri ve biyolojik aktiviteleri. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 28: 93-113.

Akkuş İ 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. Baskı, Mimoza Yayınları, Konya, 3-10s.

Amirkhanov VM, Bundya EA, Trush VA, Ovchynnikov VA, Zaitsev VN 1999. Coordination compounds of Co (II), Ni(II), Mn(II), and Zn(II) with new representative of carbacylamidophosphates-potential anticancer drugs. 5th International symposium on applied bioinorganic chemistry, Greece.

Bakkali F, Averbek S, Averbek D, Zhiri A, Baudoux D, Idaomar M 2006. Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. Mutation Research, 606: 27-38.

Bergman LW 2001. Growth and Maintenance of Yeast. 2001. Methods in Molecular Biology, Vol. 177, Two-Hybrid Systems: Methods and Protocols Edited by: P. N. MacDonald © Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Braconi D, Sotgi M, Millucci L, Paffetti A, Tasso F, Alisi C, Martini S, Rappuoli R, Lusini P, Rosa A, Rossi C, Santucci A 2006. Comparative analysis of the effects of locally used herbicides and their active ingredients on a wild-type wine (*Saccharomyces*

cerevisiae) strain. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 31633172.

Braconi D, Bernardini G, Santucci A 2015. *Saccharomyces cerevisiae* as a model in ecotoxicological studies: A post-genomics perspective. Journal of Proteomics, 137:19-34.

Ceyhan G, Çelik C, Uruş S, Demirtaş İ, Elmastaş M, Tümer M 2011. Antioxidant, electrochemical, thermal, antimicrobial and alkane oxidation properties of tridentate Schiff base ligands and their metal complexes. Spectrochimica Acta Part A, 81: 184-198.

Chavan VL, Mehta BH 2011. X-ray, Thermal and biological studies of Ru (III), Rh(III) and Pd(II) schiff base metal complexes. Research Journal of Chemistry and Environment, 15: 57-61.

Cheeseman KH, Slater TF 1993. An in production to free radical biochemistry. British Medical Bulletin, 49 (3): 481-93.

Chohan ZH, Praveen M 2001. Synthesis, characterization, coordination and antibacterial properties of novel asymmetric 1,1'-disubstituted ferrocene-derived Schiff-base ligands and their Co(II), Cu(II) Ni(II) and Zn(II) complexes. Applied Organometallic Chemistry, 15: 617-625.

Chu Z, Huang W 2007. Syntheses and structures of two new bis-N,O-bidentate schiff base ligands and their respective copper(II) complexes with dinuclear double-helical configuration. Journal of Molecular Structure, 837: 15-22.

Dikci İ 1999. Akut viral hepatitlerle interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlerde oksidatif stresin araştırılması. Selçuk Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 73s.

Dolaz M, McKee V, Uruş S, Demir N, Sabik AE, Golcu A, Tumer M 2010. Synthesis, structural characterization, catalytic, thermal and electrochemical investigations of bidentate Schiff base ligand and its metal complexes. Spectrochimica Acta A, 76: 174-181.

Dominguez-Vera JM, Galvez N, Moreno JM, Colacio E 1998. Copper (II) complexes of two new oxamate bis-tetradentate schiff-base ligands. Polyhedron, 17: 2713-2718.

Ellman GI 1959. Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics, 70-77.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jgens G 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free Radical Biology and Medicine, 13: 341-90.

Garcia JJ, Reiter RJ, Guerrero JM, Escames G, Yu BP, Oh CS 1997. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. FEBS Letters, 408: 297-300.

Helmut S, 1976. Metal ions in biological systems, Marcel Dekker Inc, New York, 2-50s.

Izawa S, Inoue Y, Kimura, A 1995. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaption

- to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisia*. *FEBS Letters*, 368: 73-76.
- Karlin KD, Tyekkerz L 1993. *Bioorganic Chemistry of Copper*. Chapman and Hill, New York.
- Kaya B 2003. Anti-genotoxic effect of ascorbic acid on mutagenic dose of three alkylating agents. *Turkish Journal of Biology*, 27: 241-246.
- Kelland LR, Barnard CF, Mellish KJ, Jones M, Goddard PM, Valenti M, Bryant A, Murrer BA, Harap KR 1994. A novel trans-platinum coordination complex possessing in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Research*, 54: 5618-5622
- Kim C, Yoong-He L 1992. Synthesis and evaluation of uracil-6-carboxaldehyde Schiff bases as potential antitumor agents. *Korean Journal of Medicinal Chemistry*, 2(1).
- Kirecci OA 2017. *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişme ortamına ilave edilen ağır metallerin (Mn, Mg, Cd, Fe) bazı biyokimyasal parametrelere etkileri. *KSU Doğa Bilimleri Dergisi*, 20(3): 175-184.
- Klayman DL, Scovill JP, Bartosevich JF, Bruce J 1983. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones. 1-[1-(2-Pyridyl) ethyl]-3-thiosemicarbazides as potential antimalarial agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 26-35.
- Kuduk J, Trynda L 1994. Impact of K₂PtCl₆ on the structure of human serum albumin and its binding ability of heme and bilirubin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 53: 4, 249-260.
- Lee JH, Choi IY, Kil IS, Kim SY, Yang ES, Park J 2001. Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1526: 191-198.
- Li-Juan C, Fu-Ming M, Guang-Xing L 2009. Co (II) Schiff base complexes on silica by sol-gel method as heterogeneous catalysts for oxidative carbonylation of aniline. *Catalysis Communication*, 10: 981-985.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *The Journal of Biochemistry*, 193: 265-277.
- Mathur S, Tabassum S 2006. New homodi- and heterotrinnuclear metal complexes of Schiff base compartmental ligand: Interaction studies of copper complexes with calf thymus DNA. *Central European Journal of Chemistry*, 4: 502-522.
- Metzler CM, Cahill A, Metzler DE 1980. Equilibria and absorption spectra of Schiff bases. *Journal of The American Chemical Society*, 102(19): 6075-6082.
- Mirabelli CK, Hill DT, Faucette LF, McCabe FL, Girard GR, Bryan DB, Sutton BM, Bartus JO, Crooke ST, Johnson RK 1987. Antitumor activity of bis(diphenylphosphino)alkanes, their gold(I) coordination complexes, and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, 30: 2181-90
- Mounika K, Anupama B, Pragathi J, Gyanakumari C 2010. Synthesis, characterization and biological activity of a Schiff base derived from 3-ethoxy salicylaldehyde and 2-amino benzoic acid and its transition metal complexes. *Journal of Scientific Research*, 2: 513-524.
- Mukherjee S, Samanta, S, Roy, B. C, Bhaumik, A 2006. Efficient allylic oxidation of cyclohexene catalyzed by immobilized Schiff base complex using peroxides as oxidants. *Applied Catalysis A: General*, 301: 79-88.
- Niederhoffer EC, Timmons JH, Martel AG 1984. Thermodynamics of oxygen binding in natural and synthetic dioxygen complexes. *Chemical Reviews*, 84-137.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95: 351.
- Patel VK, Vasanwala AM, Jejurkar CR 1989. Synthesis of mixed Schiff base complexes of Cu (II) and Ni (II) and their spectral, magnetik and antifungal studies. *Indian Journal of Chemistry*, 28A: 719-721.
- Penninckx M 2000. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 737-742.
- Peralta RA, Neves A, Bortoluzzi AJ, dos Anjos A, Xavier FR, Szpoganicz B, Terenzi H, Oliveira MCB, Castellano E, GR, Friedermann, Mangrich, AS, Novak MA 2006. New unsymmetric dinuclear Cu (II)Cu(II) complexes and their relevance to copper(II) containing metalloenzymes and DNA cleavage. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100: 992-1004.
- Prashanthi Y, Raj S 2010. Synthesis and characterization of transition metal complexes with N,O; N,N and S,N-donor Schiff base ligands. *Journal of Scientific Research*, 2: 114-126.
- Raman N, Muthuraj V, Ravichandran S, Kulandaisamy, A 2003. Synthesis, characterization and electrochemical behavior of Cu (II), Co(II), Ni(II) and Zn(II) complexes derived from acetylacetone and p-anisidine and their antimicrobial activity. *Proceedings of the Indian Academy of Science*, 115-161.
- Reiss A, Florea S, Caproiu T, Stanica N 2009. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of some transition metals with the Schiff base N-(2-furanylmethylene)-3-aminodibenzofuran. *Turkish Journal of Chemistry*, 33: 775 - 783.
- Reddy KH, Reddy PS 2000. Nuclease activity of mixed ligand complexes of copper (II) with heteroaromatic derivatives and Picoline. *Transition Metal Chemistry*, 25: 505-510.
- Rho YS, Kim SA, Jung JC, Shin CC, Chang SG 2002. Anticancer cytotoxicity and nephro- toxicity of the

- new platinum (II) complexes containing diaminocyclohexane and glycolic acid. *International Journal of Oncology*, 20: 929-35.
- Sağlam N, Çolak A, Serbest K, Dülger S, Güner S, Karaböcek S, Beldüz AO 2002. Oxidative cleavage of DNA by homo- and heteronuclear Cu(II)-Mn(II) complexes of an oxime-type ligand. *Biometals*, 15: 357- 365.
- Scovill JP, Klayman DL, Franchino F 1982. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones. 4. Complexes with transition metals as antimalarial and antileukemic agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 25: 1261.
- Serin S 1980. 1,3-difenil-2-tio-4,5-bis(hidroksimino)-1,2,4,5-tetrahidroimidazol eldesi, geometrik izomerleri, geçiş metalleri ile kompleks formasyonları. KTÜ. Fen Bil. Ens., Kimya ABD, Doktora Tezi, Trabzon.
- Silva AR, Wilson K, Clark JH, Freire C 2006. Covalent attachment of chiral manganese (III) salen complexes onto functionalised hexagonal mesoporous silica and application to the asymmetric epoxidation of alkenes. *Microporous and Mesoporous Materials*, 91: 128-138.
- Shayma AS, Yang F, Abbas AS 2009. Synthesis and characterization of mixed ligand complexes of 8-hydroxyquinoline and o-hydroxybenzylidene-1-phenyl-2,3-dimethyl-4-amino-3-pyrazolin-5-on with Fe(II), Co(II), Ni(II) and Cu(II) ions. *European Journal of Scientific Research*, 33: 702-709
- Şekeroğlu, ZA, Şekeroğlu V 2011. The in vitro alkaline comet assay in genetic toxicology. *The Journal of Applied Behavioral Science*, 5: 49-54.
- Takani M, Yajimab T, Masudac H, Yamauchi O 2002. Spectroscopic and structural characterization of copper (II) and palladium (II) complexes of a lichen substance usnic acid and its derivatives. Possible forms of environmental metals retained in lichens. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91: 139-150.
- Tamarit J, Cabisco E, Ros J 1998. Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 3027 – 3032.
- Treshchalina EM, Konovalova AL, Presnov MA, Chapurina LF, Belichuk NI 1979. Antitumor properties of mixed coordination compounds of copper (II) and alpha-amino acids. *Doklady Akademii Nauk*, 248: 1273-6).
- Wang XW, Zheng YQ 2007. A dinuclear copper (II) complex and a zigzagchain iron(II) polymer based on the 4-antipyrine derived Schiff base ligands: The hydroxylation and redox occurred under the solvothermal conditions. *Inorganic Chemistry Communication*, 10: 709-712.
- West DX, Pannel LK 1989. Transition metal ion complexes of thiosemicarbazones derived from 2-acetylpyridineN-oxide. II. The N-dimethyl derivative. *Transition Metal Chemistry*, 14: 457-462.
- Xu GJ, Yan SP, Liao DZ, Jiang ZH, Cheng P 2005. A New Schiff Base Copper (II) Complex: Bis [N-(4-hydroxysalicylidene)-N,N-diethylethylenediamine-K 2 N,O]bis[(oxalato- K 2O,O)copper(II)]dihydrate. *Acta Crystallographica*, E61: 933-935.
- You ZL, Zhu HL 2004. Syntheses, crystal structures, and antibacterial activities of four Schiff base complexes of copper and zinc. *Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie*, 630: 2754-2760.
- Zeishen W, Zigi G, Zhenhuan Y 1990. Synthesis, characterization and anticancer activity of L – alanin Schiff base complexes of copper (II), zinc(II), and cobalt (II). *Inorganic Metal Organic Chemistry*, 20 (3): 335 – 344.