

H-RAS Aktif Fibroblast Hücre Apoptozunun Bazı 1,3-bis (Heteroaril Sübstitüe) Benzen Türevleri ile Uyarılması

[Apoptosis of H-RAS Fibroblast Cells is Stimulated by Some 1,3-bis-(Heteroaryl Substituted) Benzene Derivatives]

Gülşen Akalın,
Zerrin İncesu

Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı, Eskişehir

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Doç.Dr Zerrin İncesu
Anadolu Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
26470 Eskişehir
Tel: 0222 335 05 80/ 3722
Faks: 0222 335 07 50
e-mail: zseller@anadolu.edu.tr

Kayıt tarihi 1 Ocak 2005; kabul tarihi 7 Mart 2006
[Received 1 January 2005; accepted 7 March 2006]

ÖZET

Apoptoz embriyonik gelişim ve doku homeostazın düzenlenmesi esnasında oluşan normal fizyolojik bir olaydır. Günümüzde bazı kemotröpatik ajaların hücre içerisinde apoptoz yolaklarını stimüle edebilme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle anti-tümör etkiye sahip olabilecek ilaç adayı bazı 1,3-bis- (heteroaril sübstitüe) benzen türevlerinin (MBİS1, MBİS2 ve MBİS8) sıçan embriyo fibroblast F2408 (normal hücre hattı) ve 5RP7 (H-ras transform hücre hattı) üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması önemli görülmektedir. Bulgular, yalnızca MBİS1 ve MBİS8'in 24 saat stimülasyonu sonucu 5RP7 hücrelerinde seçici ve anlamlı bir sitotoksik etki oluşturduğunu göstermiştir. Aynı şekilde 0,001 ve 0,002 mg/ml MBİS1 veya 0,0006 mg/ml MBİS8 ile uyarılan bu hücrelerde morfolojik olarak apoptotik belirteçlerin oluştuğu tespit edilmiştir. Fakat her iki türevinde 24 saat sonra hem F2408 hem de 5RP7 hücrelerinde pozitif kontrole (Etoposid 25 µM) göre erken apoptozu tetiklemediği tespit edildi. Diğer yandan yalnızca MBİS8'in (0,005 mg/ml) 9 ve 24 saat inkübasyon süresinden sonra 5RP7 hücrelerinde DNA kırıklarına neden olduğu gözlenmiştir. Elde edilen bu bulgular göstermiştir ki; bu iki benzen türevi anti-tümör ajan olabilme yeteneğine sahip olduğundan daha detaylı deneysel çalışmaları gerektirmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, sitotoksosite, H-ras, benzen

ABSTRACT

Apoptosis is a normal physiological process which occurs during embryonic development and the maintenance of tissue homeostasis. Nowadays, it is known that some chemotherapeutic agents are able to activate the pathway of apoptosis in cells. Therefore, it is valuable to investigate the cytotoxic and apoptotic effects of some 1,3-bis- (heteroaryl substituted) benzene derivatives (MBİS1, MBİS2 and MBİS8) that might be potential anti-tumour drugs, on rat embryo fibroblast F2408 (normal cell line) and 5RP7 (H-ras transformed cell line). The results showed that the selective and significant cytotoxic effects were observed by treatment of 5RP7 cells with either MBİS1 or MBİS8 for 24 hours. Correspondingly, incubation with 0,001 and 0,002 mg/ml MBİS1 or 0,0006 mg/ml MBİS8 lead to the appearance of morphological apoptotic changes. However the mechanism of early apoptosis on both F2408 and 5RP7 cell lines was not triggered in the presence of both derivatives compared to positive control (Etoposid 25 µM). On the other hand, the DNA fragmentation on genomic DNA of 5RP7 cells was observed with only MBİS8 (0,005 mg/ml) treatment for 9 or 24 hours. This observations indicated that these two benzene derivatives might be useful in chemotherapy therefore it may be useful to carry out further investigations on these agents.

Key Words: Apoptosis, cytotoxicity, H-ras, benzene

GİRİŞ

Apoptoz (programlı hücre ölümü) ve nekroz memeli hücrelerini ölüme götüren iki önemli olaydır ve özellikle apoptoz; gelişim, homeostaz ve patojenezde önemli rol oynayan hücre intihar mekanizmasıdır [1,2]. Bu iki ölüm mekanizması arasındaki farklar yapılan deneysel çalışmalar ile ortaya konmuştur. Bu çalışmalara göre, nekrotik hücrelerin karakteristik özellikleri; şişme, sitoplazma organellerinin dağılması, hücre zar yapısının bozulması ve patlamasıdır. Dokunun nekroza verdiği cevap ise inflamasyon oluşumu tarzındadır [3]. Apoptotik hücrelerde gözlenen erken safha morfolojik değişimler ise kromatin materyalinin kondensasyonu ile ilişkili olarak çekirdeğin küçülmesi ve kırılması (karyoheksis) [4], sitoplazmik hacmin kaybolmasından dolayı hücrenin küçülmesi ve sitoplazmik proteinlerin kondensasyonudur. Bunun yanı sıra plazma ve hücre zarında kabarcıkların ve hücre zarına bitişik hücrelerarası ortama uzanan “apoptotik cisimciklerin” oluşmasıdır [5]. Apoptotik hücrede görülen yapısal değişimlerden bir tanesi ise normalde hücre zarının iç yüzünde bulunan negatif yüklü fosfatidilserinin apoptozun erken safhalarında hücre plazma zarının iç yüzeyinden dış yüzeyine doğru yer değiştirmesidir [6]. Apoptoz mekanizmasının son aşamasında ise biyokimyasal bir değişim olan kromozomal DNA'nın hücrede internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180–200 baz çifti veya bunların katları boyutunda DNA kırıkları oluşturacak şekilde parçalanmalar meydana gelir [7] ve bu DNA kırıklarının oluşup oluşmaması hücre tipine bağlı olarak değişim göstermektedir [1–5] -bis (sübtitüe) benzen çekirdeği bulunan bileşiklerin çeşitli farmakolojik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir bunlar; antitümör [8,9], sitotoksik [10], antiviral [11], fungusit [12,13], kas gevşetici [14], lipoksijenaz inhibitörü [15] ve gençlik hormon aktivitesi [16] gibi etkilidir.

Hücre içi kalsiyum iyon seviyesindeki artış apoptoz mekanizmasını tetiklemekte ve bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinin Ca^{+2} u tekrar depolarına gönderip hücre içi kalsiyum seviyesini düşürerek apoptozu engellediği gösterilmiştir [17]. Bu çalışmada kullanılan 1,3-bis (heteroaril sübtitüe) benzen türevlerinin hücre içi Ca^{+2} seviyesini plazma zarındaki Ca^{+2} kanallarını etkileyerek arttırdığı tespit edilmiştir [18]. Hem literatürde yer alan hem de kendi laboratuvarımızda yapılan deneysel çalışmalar göstermiştir ki, 1,3-bis (heteroaril sübtitüe) benzen türevleri apoptozu tetikleyici sentetik moleküller olabilme özelliğine sahiptir. Bu nedenle çalışmamızda, bu sentetik moleküllerin sitotoksik ve apoptotik etkileri *in vitro* ortamda kontrol (F2408) ve H-ras aktif (5RP7) hücreleri kullanılarak araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hücre kültürü ve bileşiklerin hazırlanması

Sıçan embriyo fibroblast F2408 ve 5RP7 [19] hücreleri

%10 fetal dana serumu (FCS), 100 ünite/ml penisilin-streptomisin, %1 glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle's solüsyonu (DMEM) içersinde 37°C'de kültürde tutuldular. Her 3 günde bir hücreler, tripsin/EDTA solüsyonu ile muamele edilerek 1:3 ile 1:6 oranları arasında alt kültürlere ayrıldılar.

Hücreler, bileşenler ile muamele edilmeden önce, hücre sayısı toma lam ile belirlenerek deney koşullarına uygun ortamlara ekildikten sonra 24 saat 37°C'de %5 CO₂ içeren atmosfer ortamında inkübe edildiler.

Benzen türevlerinin stok solüsyonları dimetil sülfoksit (DMSO) içersinde hazırlandı ve daha sonraki dilüsyonlar ise taze kültür vasatları kullanılarak yapıldı.

MTT ölçümü

2×10^4 hücre/ml %10 FCS içersinde süspansiyon haline getirildikten sonra 100 µl hücre süspansiyonu 96 kuyulu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğuna aktarıldı ve eş zamanda 100 µl 0,0002–0,001–0,002–0,01–0,02–0,1 mg/ml konsantrasyonlarında benzen türevleri hücreler eklenerek 37°C'de 24 veya 48 saat inkübasyona tabi tutuldular. Bu sürenin bitiminde, her bir kuyucuğa 20 µl MTT boyası (5 mg/ml) eklenerek hücreler 37°C'de 2 saat daha inkübe edildiler. Daha sonra, canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözülmesi için her bir kuyuya 200 µl DMSO eklenerek oda ısısında 10 dakika bekletilen hücrelerdeki renk değişimi, EL×808-IU Bio-Tek plaka okuyucu da 540 nm dalga boyu ile belirlendi. Her bir konsantrasyon deney içersinde üç farklı kuyuda tekrarlandı ve bileşen ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edildi [20].

Akridin oranj boyama

1×10^6 hücre/ml steril lamellerin yerleştirildiği cam petri kaplarına aktarıldı ve belirlenen konsantrasyonlardaki test maddeleri hücrelere eklenerek belli zaman aralıklarında 37°C'de inkübasyona tabi tutuldular. Bu sürenin bitiminde hücreler 3 defa 2 dakika süre ile $1 \times$ PBS solüsyonu ile yıkandılar ve son yıkama işleminden sonra cam petrilere 1 ml %70 etanol eklenerek 5 dakika oda ısısında inkübe edildiler. Bir seri yıkama işleminden sonra, 2 dakika $1 \times$ PBS'de bekletilen hücreler $1 \times$ PBS içersinde seyreltilen 200 µl akridin oranj (100 µg/ml) ve etidyum bromür (100 µg/ml) karışımı ile oda ısısında 5 dakika inkübe edildiler. Preparat haline getirilen hücreler immüno-floresan mikroskop (Olympus) altında incelendi [21]. Daha sonra preparattan, yaşayan hücreler (LN), apoptotik hücreler (A), ölü hücreler normal çekirdekli (DN) ve ölü hücreler apoptotik çekirdekli (DA) hücrelerin sayımı gerçekleştirildi ve aşağıdaki şekilde apoptotik indeks hesaplandı.

Apoptotik indeks = $(A+DA) / (LN+A+DN+DA) \times 100$

Akım sitometri analizi

800 rpm de 4 dakika santrifüj edilerek 2 kez $1 \times$ PBS ile yıkanan hücreler $2-3 \times 10^6$ hücre/ml olacak şekilde

1 × Annexin-V bağlanma çözeltisinde süspansedildiler. Daha sonra hücre solüsyonundan 100 µl alınarak tüplere aktarıldı ve her bir tüpe, 5 µl Annexin-V FITC + 10 µl propidyum iyodür karışımı eklendi. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildikten sonra her bir tüpe 400 µl 1 × Annexin-V bağlanma çözeltisi ilave edilerek hücreler akım sitometrisi (Calibur, B.D) ile analiz edildiler.

DNA ekstraksiyonu ve elektroforetik analiz

1 × 10⁶ hücre/ml cam petrilere ekim yapıldıktan sonra belli konsantrasyonlarda benzen türevleri eklenerek 9, 12 ve 24 saat inkübe edildiler. Daha sonra tripsinlenen hücreler 1 × PBS çözeltisinde yıkanarak liziz solüsyonu (%0.5 sarkosil, 20 mg/ml proteinaz K, 50 mM Tris aminometan (pH 8.0) ve 10 mM EDTA) içerisinde 55°C'de 3 saat inkübe edildiler. Bu sürenin sonunda RNaz A (10 mg/ml) eklenerek 55°C'de 24 saat inkübasyona tabi tutuldular. İzole edilen DNA, fenol-kloroform-izoamilalkol (25:24:1) ile ekstrakte edilerek etidyum bromür içeren (500 µg/ml) %1.2'lik agaroz jelde 50 V uygulanarak 120 dakika yürütüldü [22].

İstatistiksel değerlendirmeler

Deney sonuçları, SPSS (Statistics Program for Social and Science) istatistik programında günler ve gruplar parametrelerine karşı tek yönlü ANOVA ve Post-Hoc testlerinden Tukey kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

1,3-Bis (heteroaril sübtitüe) benzen türevlerinin sitotoksik etkileri

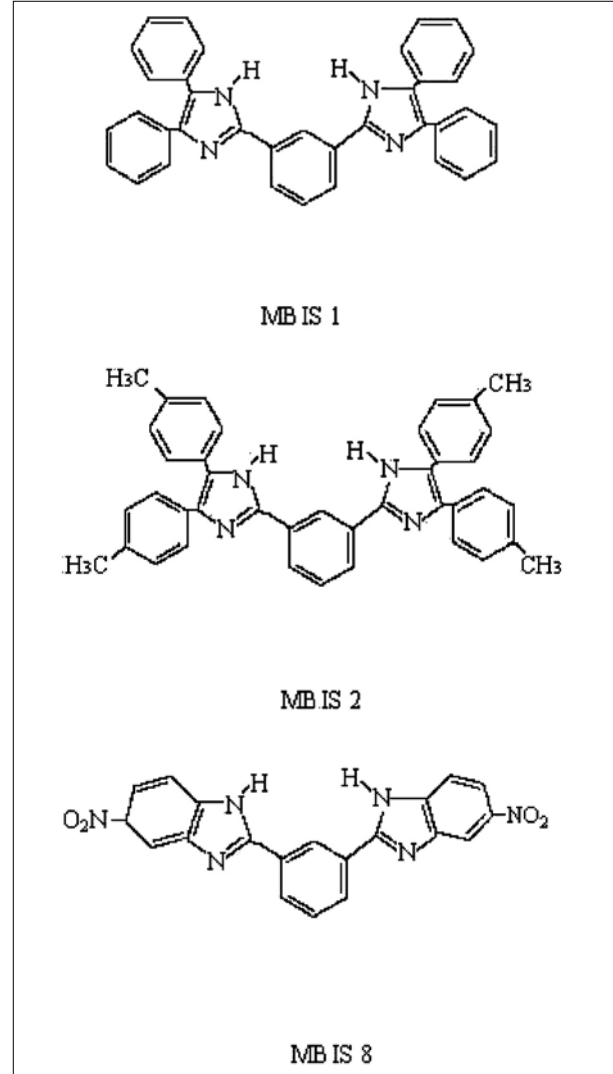
Hücreler farklı konsantrasyonlardaki benzen türevleri (MBİS1, MBİS2 ve MBİS8) (kimyasal formülleri Tablo 1'de gösterilmiştir) ile 24 ve 48 saat, 37°C'de inkübe edildiler ve daha sonra test maddelerinin sitotoksik etkileri tetrazolyum (MTT) deneyi ile belirlendi. Hücre sayısını ve canlılığını ölçen indikatör bir boya olan MTT, canlı hücre mitokondrial dehidrogenaz enzimlerin aktivitesi ile renkli bir formazan tuzuna dönüşür.

Şekil 1'de, MBİS1, MBİS2 ve MBİS8'in F2408 ve 5RP7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri görülmektedir. F2408 (Şekil 1a) hücrelerinin 24 saat MBİS1 (0,0002 mg/ml) ile inkübasyonu sonucu herhangi bir sitotoksik etki gözlenmezken, aynı deneysel koşulları altında 5RP7 (Şekil 1b) hücrelerinde ise %25 (p < 0,05) sitotoksosite tespit edilmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda MBİS1'in, her iki hücre tipinde de zamana ve konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını inhibe ettiği gözlenmiştir.

Test maddesinin F2408 hücreleri (24 saat) için IC₅₀ değeri 0,04 mg/ml, 5RP7 hücreleri (24 saat) için ise 0,002 mg/ml olarak bulunmuştur (Tablo 2).

MBİS2'nin ise 5RP7 hücrelerinde 24 saat sonra konsantrasyona bağlı olarak anlamlı ve kararlı bir eğri ver-

Tablo 1. Benzen türevlerinin kimyasal yapı formülleri

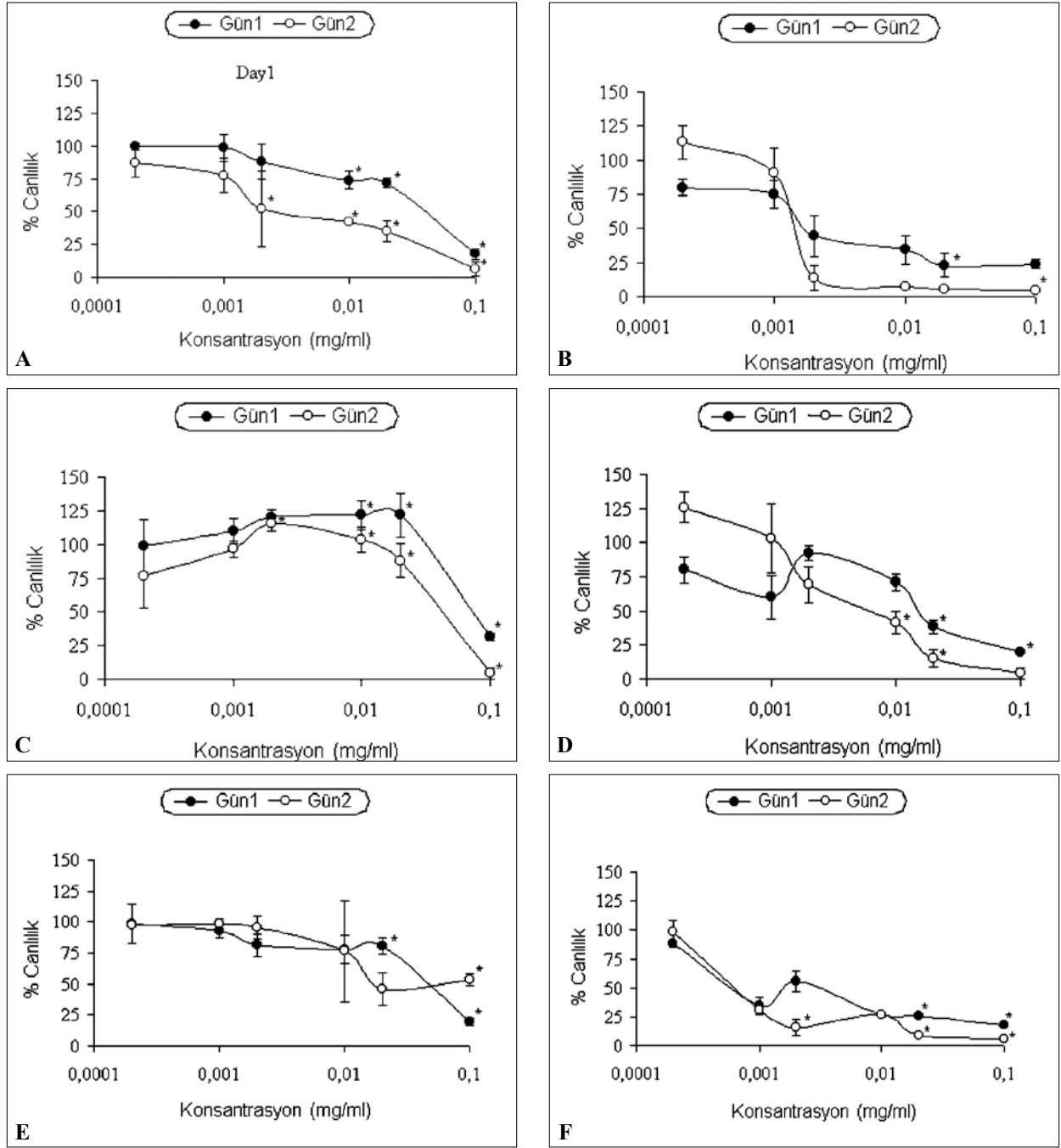


mediği ve dalgalanma gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 1d). Canlılık oranının 48 saat sonra konsantrasyona bağlı olarak azaldığı görülmektedir. 24 saat inkübasyondan sonra MBİS2'nin (0,0002 mg/ml) 5RP7 ve F2408 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisine bakılacak olursa, 5RP7 hücrelerinde %25 (p < 0,05) sitotoksositeye neden olurken F2408 hücrelerinde sitotoksik etki gözlenmemiştir. IC₅₀ değerleri F2408 hücreleri için 0,07 mg/ml,

Tablo 2. Bazı benzen türevlerinin %50 ölüm oranına (IC₅₀) neden olduğu konsantrasyon aralıkları

Benzen Türevleri (mg/ml)	Hücre Hatları	
	F2408	5RP7
MBİS1	0,04 ^a	0,002
MBİS2	0,07	0,02
MBİS8	0,02	0,0006

F2408 kontrol sıçan fibroblast hücre hattı
0,04^a 24 saat inkübasyon sonrası IC₅₀ değeri



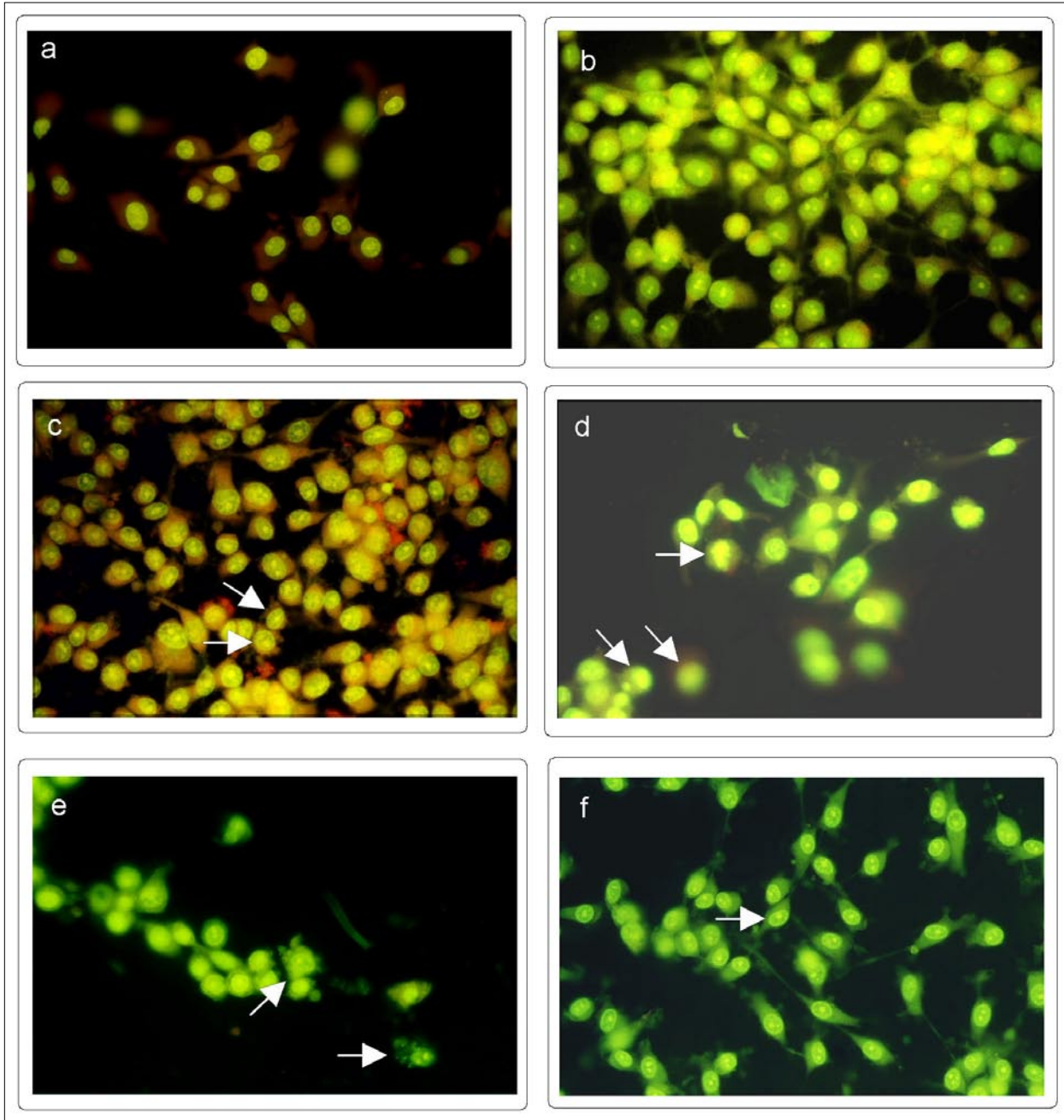
Şekil 1. MBİS1'in F2408 (a), 5RP7 (b); MBİS2'nin F2408 (c), 5RP7 (d) ve MBİS8'in F2408 (e), 5RP7 (f) sitotoksik etkilerinin MTT yöntemi ile belirlenmesi. Hücere hatları 96 kuyulu tabakalara ekildikten sonra 0,0002–0,001–0,002–0,01–0,02 ve 0,1 mg/ml konsantrasyonlarındaki benzer türevleri ile 24 ve 48 saat inkübe edildiler. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir. Kontrol grubun hücre çoğalma oranı %100 olarak kabul edilmiştir. Anlamlılık değeri p < 0,05, ortalama değerler ±St. Hata (n = 3).

5RP7 hücreleri içinde 0,02 mg/ml olarak bulunmuştur (Tablo 2).

MBİS1 ve MBİS2'nin etki mekanizmasının aksine MBİS8'in, H-ras aktif hücreler üzerine spesifik ve anlamlı (0,0002–0,01 mg/ml F2408 kontrol hücrelerde %10–25 oranında sitotoksik etkiye sahip) bir sitotoksik etkiye sahip olduğu Şekil 1f'de görülmektedir. 0,001 mg/ml konsantrasyonunda (48 saat) MBİS8, F2408 kontrol hücrelerinde sitotoksik etki göster-

mezken (%100 canlılık), H-ras aktif hücrelerinde %71 oranında sitotoksik bir etkiye neden olmaktadır. IC₅₀ değerleri olarak F2408 hücreleri için 0,02 mg/ml, 5RP7 hücreleri için ise 0,0006 mg/ml olarak bulunmuştur (Tablo 2).

%Hücre canlılık oranı tripan mavi boyama yöntemi ile mikroskopik olarak da tespit edildi ve yukarıda elde edilen sitotoksik etki sonuçlarına benzerlik gösterdiği belirlendi (sonuçlar verilmemiştir).



Şekil 2. MBİS1'in SRP7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler. Hücreler akridin oranj / etidyum bromür ile boyanıp immüno-floresan mikroskopta (Olympus) incelendi. **A:** 8 saat kontrol hücreleri, **B:** 24 saat kontrol hücreleri, **C:** 0,001 mg/ml MBİS1 ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, **D:** 0,002 mg/ml MBİS1 ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, **E:** 0,001 mg/ml MBİS1 ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler, **F:** 0,002 mg/ml MBİS1 ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler.

Apoptozun Morfolojik Olarak Belirlenmesi

Benzen türevlerinin apoptotik etkileri, sitoplazmik boya olan akridin oranj ve DNA boyası olan etidyum bromürün beraber kullanılması sonucu immüno-floresan mikroskop ile morfolojik olarak incelenmiştir. 8 ve 24 saat inkübasyon sürelerinin sonucunda hem yüzeye bağlı hücreler hem de yüzen hücreler toplanarak mikroskopik olarak incelenmiştir ve her bir örnekten 100 hücre/alan sayılarak Gereç ve Yöntemler de belirtildiği gibi Apoptotik İndeks belirlenmiştir (Tablo 1). SRP7 hücrelerinin

MBİS1'in 0,001 mg/ml ve 0,002 mg/ml ile 8 saat (Şekil 2c, d) ve 24 saat (Şekil 2e, f) muamelesi sonucunda hücre sitoplazmasının ve çekirdeğinin küçülmesi, apoptotik yapıların hücre zarı etrafında toplanması ve hücre çekirdeğinin böbrek şekli alması gibi apoptoza özgü morfolojik değişikliklere neden oldukları saptanmıştır. Bu çalışmaya paralel olarak 0,001 ve 0,002 mg/ml MBİS1 ile 8 saat muamele edilen SRP7 hücrelerinin apoptotik indeksi sırasıyla $16 \pm 1,57^*$ ve $23,07 \pm 2,09^*$ olarak bulunmuştur (kontrol hücrelerin apoptotik indeksi ise $4 \pm 0,57^*$ olarak tespit edilmiştir). Bu oranlar

Tablo 3. Morfolojik boyama sonrası apoptotik hücrelerin mikroskopik olarak sayılması

İnkübasyon	Apoptotik Hücre İndeksi (ortalama + S.D)
8 saat	
kontrol hücreler	4 + 0,57
MBİS1 (0,001 mg/ml)	16 + 1,57*
MBİS1 (0,002 mg/ml)	23,07 + 2,09*
MBİS8 (0,0003 mg/ml)	15,6 + 3,51*
MBİS8 (0,0006 mg/ml)	18+ 4,00*
24sa	
kontrol hücreler	5,1 + 0,56
MBİS1 (0,001 mg/ml)	27,25 + 2,73*
MBİS1 (0,002 mg/ml)	28 + 4,00*
MBİS8 (0,0003 mg/ml)	17,5 + 3,5
MBİS8 (0,0006 mg/ml)	36,65 + 3,91*

Her bir uygulamadan toplam 100 hücre sayılmıştır.

Herhangi bir madde ile muamele edilmeyen 5RP7 hücreleri kontrol olarak alınmıştır.

S.D: standart hata p <0,005.

İnkübasyon süresinin uzamasına (24 saat) paralel olarak artmaktadır (Tablo 3).

Yine benzer morfolojik değişimler 0,0006 mg/ml MBİS8 ile 24 saat inkübe edilen 5RP7 hücrelerinde de gözlenmiştir (Şekil 3f) ve bu morfolojik değişimlerin zamanla paralellik gösterdiği tespit edilmiştir. 0,0006 mg/ml MBİS8'in ise 24 saat inkübasyon süresi sonucunda en yüksek apoptotik indekse sahip olduğu tespit edilmiştir (apoptotik indeks $36,65 \pm 3,91^*$). Her iki benzen türevi de F2408 hücreleri üzerine morfolojik bir değişime neden olmamıştır (sonuçlar verilmemiştir).

Tablo 4. Benzen türevleri ile stimüle edilen erken apoptotik F2408 hücrelerinin belirlenmesi

%(24 saat)	F2408					
	Kontrol	Etoposid	MBİS1 ^a	MBİS1 ^b	MBİS8 ^a	MBİS8 ^b
Tanımlanmamış hücre oranı	6.77	2.93	5.17	5.58	3.29	5.43
Canlı hücre oranı	88.11	94.21	91.33	91.20	91.93	88.96
Erken apoptotik hücre oranı	0.38	0.17	0.25	0.28	0.19	0.16
Geç apoptotik veya nekrotik hücre oranı	4.74	2.70	3.25	2.94	4.59	5.45

K Madde ile stimüle edilmemiş kontrol hücreler

E 25 µM Etoposid (pozitif kontrol)

MBİS1^a, 0,02 mg/ml; MBİS1^b, 0,04 mg/ml; MBİS8^a, 0,01 mg/ml, MBİS8^b, 0,02 mg/ml

Bileşiklerin Erken Apoptoz Üzerine Etkileri

Benzen türevlerinin F2408 ve 5RP7 hücre apoptozu üzerine olan etkilerinin incelenmesi, Annexin-V'in fosfatidilserine bağlanma oranının akış sitometrisi ile ölçülmesine dayanmaktadır. Aynı deney ortamına propidyum iyodürün eklenmesi ile de geç apoptotik yada nekrotik hücre oranları da ölçülmüştür (Tablo 4 ve 5).

MBİS1 ve MBİS8'in iki farklı konsantrasyonu ile 24 saat stimüle edilen F2408 hücrelerinde gözlenen erken ve geç apoptotik hücre oranları pozitif kontrol (25 µM etoposid) ve negatif kontrol (madde ile uyarılmamış hücreler) ile karşılaştırıldığında bu maddelerin erken veya geç apoptozu stimüle etmediği tespit edildi (Tablo 4). Buna paralel olarak MBİS1 (0,001 veya 0,002 mg/ml), MBİS8 (0,0003 veya 0,0006 mg/ml) benzen türevleri ile stimüle edilen 5RP7 hücrelerinde de Annexin-V bağlı ve Annexin V-Propidyum iyodüre bağlı hücre oranında negatif kontrole yada etoposide göre herhangi bir değişim tespit edilememiştir (Tablo 5). Negatif kontroldeki Annexin-V bağlı hücre oranı %5.58 iken Annexin-V ve propidyum iyodüre bağlı hücre oranı %11.03 olarak bulunmuştur. Bu oranlar pozitif kontrol olan etoposidin eklenmesi ile sırasıyla %12.28 ile %32.59 olarak tespit edilmiştir (Tablo 5). Her iki benzen türevinin de kontrol ve H-ras aktif hücrelerde erken apoptozu stimüle etmediği bulunmuştur.

Bileşenlerin Geç Apoptoz Üzerine Etkileri

Erken apoptotik hücre çalışmalarında elde ettiğimiz bulgulara paralel olarak MBİS1'in farklı konsantrasyon aralıkları ve farklı inkübasyon süreleri (9,16 ve 24 saat) F2408 ve 5RP7 hücre DNA'sı üzerinde kırılmalara neden olmadığı gözlemlendi (Şekil 4a, b). Yalnızca 25 µM etoposid ile 24 saat muamele edilen F2408 hücre DNA'sında kırılmaların olduğu şekil 4a'da gösterilmektedir.

Diğer yandan -NO₂ yan grubuna sahip MBİS8 (0,005 mg/ml) ile 9 ve 24 saat inkübasyon sonucu 5RP7 hücrelerinde DNA kırıklarına neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 4d). Bunun aksine bu türevin F2408 (Şekil 4c) hücre DNA'sı üzerine etkisiz olduğu tespit edilmiştir.

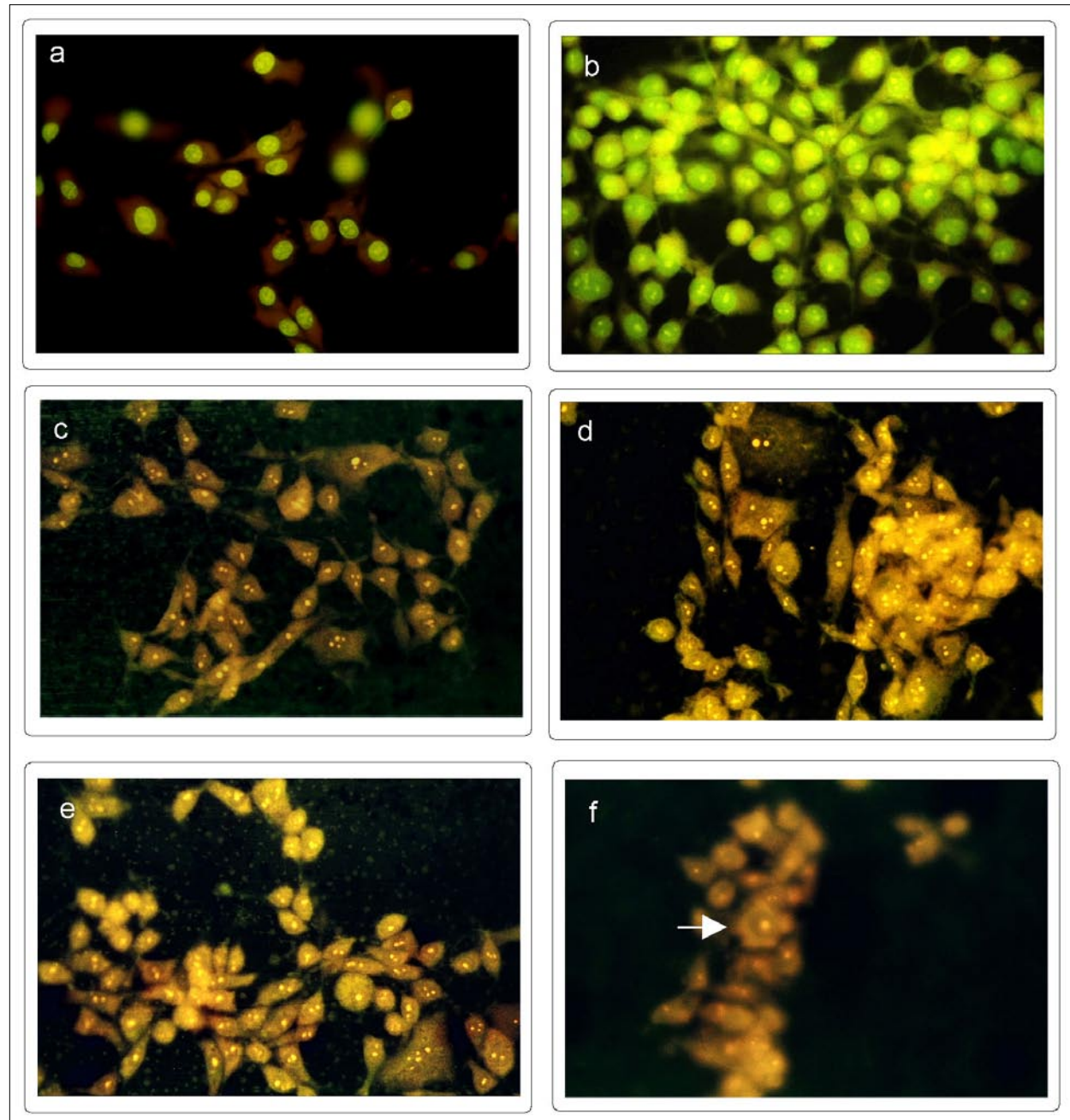
Tablo 5. Benzen türevleri ile stimüle edilen erken apoptotik SRP7 hücrelerinin belirlenmesi

% (24 saat)	SRP7					
	Kontrol	Etoposid	MBİS1 ^a	MBİS1 ^b	MBİS8 ^a	MBİS8 ^b
Tanımlanmamış hücre oranı	1.98	2.24	1.31	0.59	0.59	0.96
Canlı hücre oranı	81.40	52.90	95.24	96.45	94.49	97.84
Erken apoptotik hücre oranı	5.58	12.28	1.33	1.90	3.46	0.63
Geç apoptotik veya nekrotik hücre oranı	11.03	32.59	2.12	1.05	1.47	0.56

K Madde ile stimüle edilmemiş kontrol hücreler

E 25 μ M Etoposid (pozitif kontrol)

MBİS1^a, 0,001 mg/ml; MBİS1^b, 0,002 mg/ml; MBİS8^a, 0,0003 mg/ml, MBİS8^b, 0,0006 mg/ml



Şekil 3. MBİS8'in SRP7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler. **A:** 8 saat kontrol hücreleri, **B:** 24 saat kontrol hücreleri, **C:** 0,0003 mg/ml MBİS8 ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, **D:** 0,0006 mg/ml MBİS8 ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, **E:** 0,0003 mg/ml MBİS8 ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler, **F:** 0,0006 mg/ml MBİS8 ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler.

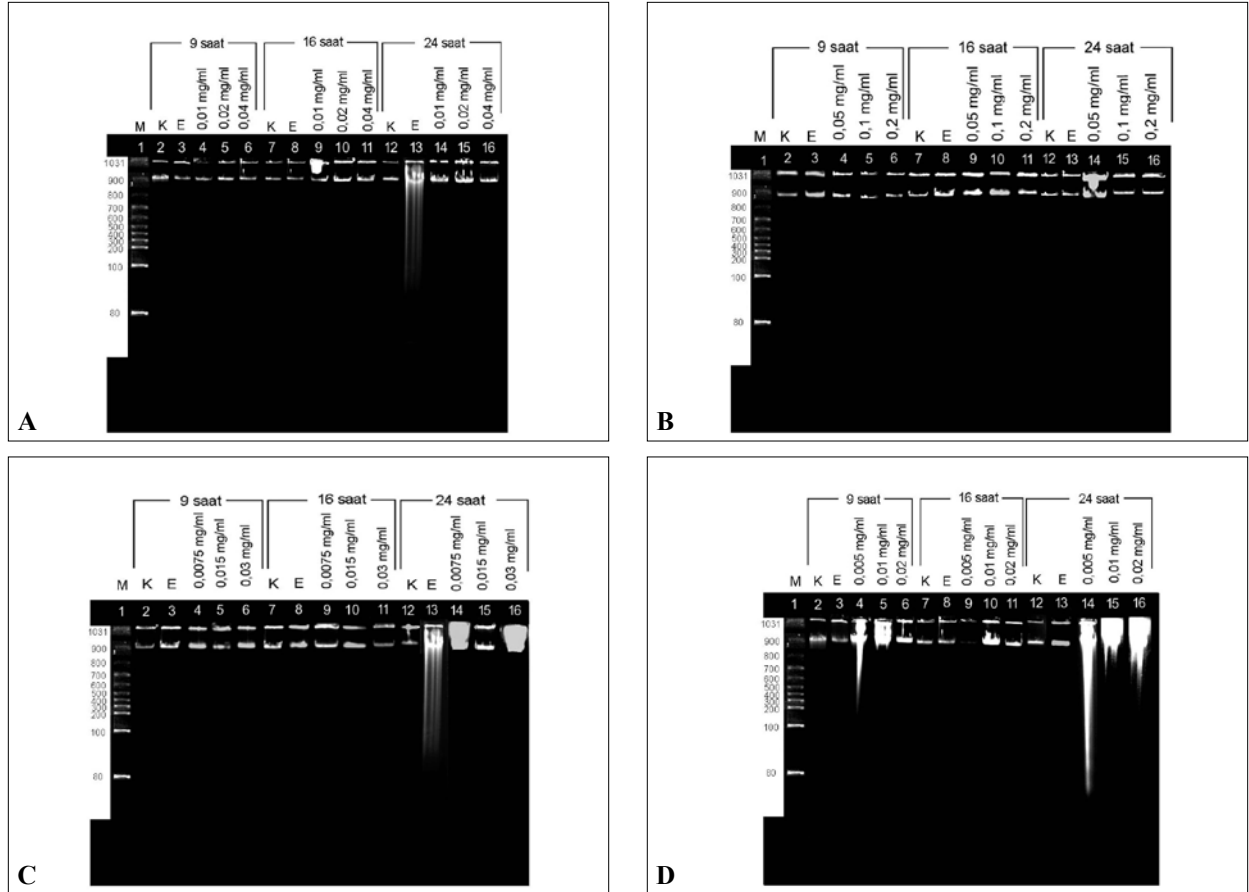
TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında, MBİS1 (-fenil), MBİS2 (-4-metilfenil) ve MBİS8 (-nitro) benzen türevlerinin *H-ras* onkogeni taşıyan 5RP7 ve bunların kontrol hücreleri olan F2408 üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri incelenmiştir.

MBİS1 ve MBİS8 benzen türevlerinin, yalnızca *H-ras* onkogeni taşıyan 5RP7 hücrelerine karşı seçici ve anlamlı bir sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bazı araştırmalar sonucunda da 1,2 (3) (4) (5) -bis (substitüe) benzen çekirdeğini taşıyan bileşiklerin antitümör [8,9] ve sitotoksik [10] etkileri saptanmıştır. 5RP7 hücrelerinin 0,0002 ve 0,001 mg/ml MBİS2 türevi ile 24 saat muamele edilmesi sonucunda %20–40 oranında sitotoksik etkinin oluşmasında rağmen, madde konsantrasyonunun artması ile (0,002 mg/ml) beklenen aksine sitotoksik etkide azalma tespit edilmiştir (Şekil 1d). Konsantrasyona bağımlı olarak, bu türevin 5RP7 hücreleri üzerinde oluşturduğu kararsız sitotoksik etkiden dolayı apoptotik etkilerinin araştırılması uygun görülmemiştir. Bu tür bir etkinin MBİS2 bileşinde yer alan $-CH_3$ substitüentlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Apoptozun morfolojik olarak belirlenmesi için yapılan deneysel çalışmalardan elde ettiğimiz bulgular göstermiştir ki (Şekil 2,3); MBİS1 (0,001 ve 0,002 mg/ml) ve MBİS8 (0,0006 mg/ml) benzen türevleri ile 5RP7 hücrelerinin stimülasyonu sonucu apoptotik yapıların hücre zarı etrafında toplanması ve hücre çekirdeğinin böbrek şeklini alması gibi apoptoza spesifik morfolojik değişikliklere neden olduğu düşünülmektedir [23].

Bundan hareketle benzen türevlerinin erken apoptoz üzerine etkileri Annexin-V/ Propidyum iyodür ile boyalı hücrelerin akış sitometrisinde incelenmesi ile belirlenmiştir. Bu bulgular her iki benzen türevinin morfolojik olarak apoptotik hücre oluşumuna katkıda bulunmasına rağmen erken apoptozu, pozitif kontrole oranla deneysel inkübasyon aralıklarında etkilemediği tespit edilmiştir (Tablo 4 ve 5). Apoptoz mekanizmasının son belirteci olarak tanımlanan genomik DNA kırıklarının oluşması ise bu çalışmada yalnızca MBİS8 (0,005 mg/ml) benzen türevi ile 5RP7 hücrelerinin 9 ve 24 saat inkübasyonu sonunda gerçekleşmiştir. Bu türev MBİS1'in aksine düzlemsel bir yapıya sahip olması ile birlikte substitüe konumda olan $-NO_2$ grubunun e^- çekme özelliğinden



Şekil 4. Genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi. **A:** MBİS1'in farklı konsantrasyonları (0,01–0,02–0,04 mg/ml) ile 9, 16 ve 24 saat muamele edilmiş F2408 kontrol hücreleri, **B:** MBİS1'in 0,05–0,1–0,2 mg/ml konsantrasyonları ile 9, 16 ve 24 saat inkübe edilmiş 5RP7 hücreleri, **C:** MBİS8'in 0,0075–0,015–0,03 mg/ml konsantrasyonları ile 9, 16 ve 24 saat muamele edilmiş F2408 kontrol hücreleri, **D:** MBİS8'in 0,005–0,01–0,02 mg/ml konsantrasyonları ile 9, 16 ve 24 saat inkübe edilmiş 5RP7 hücreleri. Genomik DNA fenol/kloroform/izooamilalkol ekstraksiyonu yöntemi ile izole edildi. Daha sonra %1.2'lik agaroz jel üzerinde elektroforez işlemine tabi tutulan genomik DNA etidium bromür ile boyandı. M, DNA marker; K, maddesiz kontrol hücreler; E, 25 µM Etoposid (pozitif kontrol).

dolayı NH protonunun ortama verilmesi daha kolay gerçekleşecektir ve bu değişimden dolayı aktivitenin artabileceği varsayılmaktadır. Bu çalışmada elde edilen apoptotik indeks [24] (Tablo 3) ve DNA fregmantasyon (Şekil 4) sonuçları bu varsayımları desteklemektedir. Morfolojik olarak MBİS1 türevi apoptotik belirteçlerin oluşmasına neden olurken DNA kırıklarının oluşumunda etkisi gözlenmemiştir. Benzimidazol ve imidazol içeren sentetik bileşenlerle yapılan *in vitro* çalışmalar, bu tür bileşiklerin Jurkat [25] ve timosit [26] hücrelerinde apoptozu stimüle ettiği gösterilmiştir. İmidazol halkasının substitüe olduğu durumda 1,4-benzothiaz-

ne çekirdeğinin apoptotik etkisinin azalmasına rağmen imidazol yerine benzimidazolün transformasyonu sonucunda var olan apoptotik etkinin değişmediği tespit edilmiştir [26].

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje No:030345). 1,3-bis-(heteroaril substitüe) benzen türevlerini sağlayan Prof. Dr. İlhan Işıkdag ve Yrd.Doç.Dr. Asiye Meriç'e, hücre kültürü laboratuvar imkanlarını kullanma olanağı veren BİBAM'a teşekkürü borç biliriz.

Kaynaklar

- [1] Hu R, Zhai Q, Liu W, Liu X. (2001) An Insight into the Mechanism of Cytotoxicity of Ricin to Hepatoma Cell: Roles of Bcl-2 Family Proteins, Caspases, Ca²⁺-Dependent Proteases and Protein Kinase C. *J. of Cellular Biochem.* 81, 583–593.
- [2] Wyllie AH. (1980) Glucocorticoid-induced Thymocyte Apoptosis in Associated with Endogenous Endonuclease Activation. *Nature.* 284 (5756), 555–556.
- [3] Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wyllie AH. (1992) Analyses and Discrimination of Necrosis and Apoptosis (Programmed Cell Death) by Multiparameter Flow Cytometry. *Biochimica et Biophysica.* 1133, 275–285.
- [4] Saraste A, Pulkki K. (2000) Morphological and Biochemical Hallmarks of Apoptosis. *Cardiovascular Research.* 45, 528–537.
- [5] Kauffmann ZA, Rodriguez-Viciana P, Ulrich E, Gilbert C, Coffer P, Downward J, Evan G. (1997) Suppression of c-Myc-induced Apoptosis by Ras Signaling Through PI (3) K and PKB. *Nature.* 385, 544–548.
- [6] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. (1995) A Novel Assay for Apoptosis. Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on Early Apoptotic Cells Using Fluorescein Labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods.* 184, 39–51.
- [7] Walker PR, Sikorska M. (1994) Endonuclease Activities, Chromatin Structure and DNA Degradation in Apoptosis. *Biochem. Cell Biology.* 72, 615–623.
- [8] Hoye TR, Ye Z. (1996) Highly Efficient Synthesis of the Potent Antitumor Annonaceous Acetogenin (+)-Parviflorin. *J Am. Chem. Soc.* 118, 1801–1802.
- [9] Nozoe S, Takahashi A, Nunosawa T, Endo T. (1995) Preparation of Diphenoxybenzene Derivatives as Antitumor Agents and Their Intermediates. *Jpn. Pat.* 06,16,601.
- [10] Sato R, Ohya T, Ogawa S. (1995) Efficient Synthesis and Biological Properties of New Benzopentathiepins. *Heterocycles.* 41, 893–896.
- [11] Girijavallabhan VM, Ganguly AK, Versace R, Saksena AK, Pinto PA. (1992) Orally Active Antiviral Phenolic Diether. *Eur. Pat. Appl.* 519,702–705.
- [12] Enomoto M, Takahasi J, Kusaba T, Sugano M, Matsunaga R, Tamaoki M. (1992) Preparation of 2-cyano-1-dimethylsulfamoyl-5,6-bis (1', 1', 2', 2'-tetrafluoroethoxy) benzimidazole as Horticultural and Agrochemical Fungicid. *Jpn. Pat.* 04,308,580.
- [13] Place P, Pepin R. (1987) Preparation of (Propargyloxy) Benzene Derivatives as Fungicides. *Fr. Pat.*2,598,408.
- [14] Kimura M, Naito O, Sakuma T, Morita T. (1990) Preparation of Quaternary Ammonium Compounds as Muscle Relaxants. *Ger. Offen.* 4,010,925.
- [15] Iwaki H, Fukuyama K, Matsui K. (1985) 1,4-Benzoquinone Derivatives and Benzene Derivatives. *Eur. Pat. Appl.* 151,995.
- [16] Massardo P, Battarini P, Piccardi P, Longoni A. (1983) Synthesis and Juvenile Hormone Activities of Some New Ether Derivatives of Hydroquinone. *Pestic. Sci.* 14, 461–469.
- [17] Zang Q-H, Sheng HP, Loh TT. (2001) Bcl-2 Protects HL-60 Cells from Apoptosis by Stabilizing Their Intracellular Calcium Pools. *Life Sciences.* 68, 2873–2883.
- [18] Meriç A, İncesu Z, Işıkdag İ. (2002) Synthesis and Effects on Intracellular Calcium of Some 1,3-bis- (heteroaril substituted) Benzene Derivatives. *Il Farmaco.* 57 (7), 543–548.
- [19] Garbisa S, Pozzatti R, Muschel RJ, Saffiotti U, Ballin M, Goldfarb RH, Khoury G, Liotta LA. (1987) Secretion of Type IV Collagenolytic Protease and Metastatic Phenotype: Induction by Transfection with c-HA-ras but not c-HA-ras plus Ad2-Ela. *Cancer Research.* 47 (6), 1523–1528.
- [20] Mossmann T. (1983) Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. of Immun. Meth.* 65, 55–63.
- [21] Cotter TG, Martin SJ. (1996) Techniques in Apoptosis (A User's Guide). Portland Press, London.
- [22] Wang I-K, Lin-Shiau S-Y, Lin J-K. (1999) Induction of Apoptosis by Apigenin and Related Flavonoids Through Cytochrome c Release and Activation of Caspase-9 and Caspase-3 in Leukaemia HL-60 Cells. *European Journal of Cancer.* 35 (10), 1517–1525.
- [23] Violeta G, Katarina V, Saraga-Babic' M, Baranovic A, Sapunar, D. (2005) Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. *Fertility and Sterility.* 83 (2), 426–431.
- [24] Diaz JML, Flores GH, Rodriguez JR et al. (2006) In vivo and in vitro sensitization of leukemic cells to adriamycin-induced apoptosis by pentoxifylline Involvement of caspase cascades and IkBa phosphorylation. *Immunology Letters.* 103, 149–158.
- [25] Pagano M, Meggio F, Ruzzene M, Andrzejewska M, Kazimierzuk Z, Pinna L. (2004) 2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole: a novel powerful and selective inhibitor of protein kinase CK2. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 321, 1040–1044.
- [26] Fringuelli R, Schiafella F, Navarro U, Milanese L, Santini C, Rappucci M, Marchetti C, Riccardi C. (2003) 1,4-Benzothiazine analogues and apoptosis: Structure-activity relationship. *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* 11, 3245–3254.