

**BAZI SENTETİK BİLEŞİKLERİN
ANTI-KANSER ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ
Nur İpek ÖNDER**

Yüksek Lisans Tezi

**BAZI SENTETİK BİLEŞİKLERİN
ANTI-KANSER ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Nur İpek Önder

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı

Eskişehir, Aralık 2013

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Zerrin İncesu

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir. (Proje No. 1201S004)

ÖZGEÇMİŞ

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nur İpek ÖNDER'in "Bazı Sentetik Bileşiklerin Anti-Kanser Özelliklerinin Belirlenmesi" başlıklı, Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki Yüksek Lisans tezi, 26.12.2013 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

İmza Sahipleri

Yatılılar Mahallesi Barışçık
Çınarlıca Apartmanı No: 118
Tuzluca İSKİŞEHİR

Telefon

0222 2241089
0334 5311409

E-posta

nuripekonder@gmail.com

Eğitim Durumu

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı): Prof. Dr. Zerrin İNCESU

Anadolu Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Yusuf ÖZKAY

Anadolu Üniversitesi

Üye: Yrd. Doç. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Anadolu Üniversitesi

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
16.12.2013. tarih ve4.3./8..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Zahir Asım KAPLANCIKLİ
Müdür

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı : Nur İpek ÖNDER
Doğum tarihi ve yeri : 1985, İSTANBUL
Uyuğu : Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresleri : Yenibağlar Mahallesi Beraberlik
Gündoğdu Apartmanı No: 51/8
Tepebaşı ESKİŞEHİR
Telefon : 0222 2241688
0554 5511409
E-posta : nuripekonder@gmail.com

Eğitim Durumu

İlköğretim :1991- 1992 Ülkü İlkokulu
1992-1996 Dobruca İlkokulu
Ortaokul :1996-1997 Kadriyörüköğlü Ortaokulu
1997-1999 Hüdaverdi Aydın
İlköğretim Okulu
Lise :1999-2003 H. Hatice Bayraktar Lisesi
(Yabancı Dil Ağırlıklı Bölümü)
Lisans : 2004-2009 Eskişehir Osmangazi
Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : 2009-2013 Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Biyokimya Anabilim Dalı
Yabancı Dil : İngilizce

Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler:

Özkay, Y., İncesu, Z., Önder, N. İ., Tunalı, Y., Karaca, H., Işıkdag, İ., Uçucu, Ü.,
Antimicrobial and anticancer effects some 2 (substitutedsulfanyl)-N-(5-methyl-
isoxazol-3-yl)acetamide derivatives, Medicinal Chemistry Research, Vol. 22,
issue 1, pp 211-218 (2013).

Uluslararası bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

Özkay, Y., İncesu, Z., Önder, N. İ., Işıkdag, İ., Anticancer activity of some isoxazole derivatives, International Symposium on Drug Research and Development “From Chemistry to Medicine” DRD (2011).

Ulusal bildiri kitabında basılan bildiriler:

Şen, M., Bayburt, C., Aydın, S., Önder, N. İ., İncesu, Z., Atlı, B., Yamaç, M., Düzkır Mağarası'ndan (Aladağlar) Elde Edilen Bakteri İzolatlarının Biyolojik Aktiviteleri, İTÜ 5.Ulusal Speleoloji Sempozyumu (2011).

Diğer Yayınlar :

“Ç-viniferinein in combination with vincristine displace synergy and anti- tumor effects at lower dose: An integrative study in HepG2 cells” başlıklı makale hakemlerce basım aşamasındadır.

Bilimsel Etkinlikler

Ödüller :

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Yüksek Şeref Öğrencisi (2008-2009)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Şeref Öğrencisi (2006-2008)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mezuniyeti Bölüm 4.cülüğü

Projeler:

Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) komisyonu tarafından desteklenen 090306 nolu “Hepatoselüler Karsinomada Oksidatif Stres ve Apoptoz” başlıklı genel amaçlı proje (2009-2012).

Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) komisyonu tarafından desteklenen 1201S004 nolu “Bazı Sentetik Bileşiklerin Anti-kanser Özelliklerinin Belirlenmesi” başlıklı tez projesi (2012-2013).

Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) komisyonu tarafından desteklenen 1207S137 nolu “Kombine Cis-platin ve Viniferin Kullanımının Sıçan Glioma Hücreleri Üzerine Apoptotik Etkileri” başlıklı genel amaçlı proje (2012-Devam ediyor).

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, yeni sentezlenen antrakınon türevlerinin HeLa hücre hattı (Serviks kanseri) üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Türevlerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacı ile öncelikle mitokondriyal aktivite ölçümüne dayanan 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5 difenil tetrazolium bromid (MTT) metodu uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, düşük dozda daha yüksek kemoterapötik etkiye sahip olan sekiz antrakınon türevinden üçünün apoptotik etkileri araştırılmıştır.

Ant 3, Ant 4 ve Ant 6 türevlerinin HeLa hücreleri üzerinde tetiklediği erken apoptoz, akım sitometrisi ile ölçülen Anneksin V-FITC metoduyla belirlenmiştir. Ayrıca madde uygulaması yapılan HeLa hücrelerinin lüminometre ile ADP/ATP oranı ölçülmüştür. Diğer yandan, kaspaz-3 aktivasyonu akım sitometrisi ile DNA fragmentasyonu ise Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling metodu (TUNEL) ile belirlenmiştir. Tez kapsamında bir antrakınon türevi olan ve kemoterapötik etkisi bilinen mitoksantron kontrol maddesi olarak kullanılmıştır.

Yüksek lisans eğitimim süresince ilmi ve fikirleri ile beni yönlendiren, insani, ahlaki ve mesleki değerleri ile örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum, hoşgörü ve sabrını hiçbir zaman eksik etmeyen, ilgisi ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan ve her şeyden önemlisi bana bilimi sevdiren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zerrin İncesu'ya,

Yüksek lisans eğitimim süresince çalışmış olduğumuz projelerde, benden bilgi ve tecrübesini esirgemeyen, ihtiyacımın olduğu her an yardımını eksik etmeyen, arkadaşça yaklaşımı ile her türlü sorunumu rahatça paylaşabildiğim, sabrı ve anlayışıyla her zaman yanımda olan değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Filiz Özdemir'e,

Deneysel çalışmalarım esnasında her türlü konuda bana yardımcı olan, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, verdikleri manevi destek ile moral ve motivasyonumu asla kaybetmememi sağlayan, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Sayın Biyolog Mesut Şen'e, Sayın Biyolog Elif Apaydın'a, Sayın Biyolog Aysun Ayrım'a, Sayın Biyolog Erman Özer'e,

Okul hayatım boyunca bana yardımcı olan ve emeği geçen bütün hocalarıma,

Sonsuz sevgisiyle her an beni saran biricik annem ve halama, canım kardeşlerime,

Hayatıma girdiği günden beri bana verdiği mutlulukla en sıkıntılı anlarımda dahi beni gülümsetebilen, anlayışı ve sabrıyla her zaman destekleyen, sonsuz sevgisini esirgemeyen nişanlım Ahmet Mert'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

BAZI SENTETİK BİLEŞİKLERİN ANTI- KANSER ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

ÖZET

Günümüzde çeşitli kanser türlerinde yoğun olarak kullanılan antrakınon grubu ilaçlara farklı yan zincirlerin eklenmesiyle, terapötik etkilerinin artacağı, oluşturulan yeni antrakınon türevlerinin kanser hücrelerinde direnç gelişiminin engellenebileceği bilinmektedir. Bu nedenle, çok sayıda yeni antrakınon türevleri sentezlenmekte ve apoptotik etki mekanizmaları ayrıntılı olarak araştırılmaktadır.

Bu tez kapsamında, yeni sentezlenen sekiz antrakınon türevinin HeLa hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılmıştır. Türevlerin IC_{50} değerleri 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5 difenil tetrazolium bromid (MTT) metodu ile belirlenmiş olup, 24 saatlik sitotoksik dozlara göre en etkili bileşiklerin Ant 3 (IC_{50} ; 10 μ M), Ant 4 (IC_{50} ; 8 μ M) ve Ant 6 (IC_{50} ; 8 μ M) olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, bu türevlerin IC_{50} ve daha düşük dozlarının HeLa hücre apoptozu üzerine etkileri ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Anneksin V-FITC yöntemi ile ölçülen erken apoptotik hücre oranı, 6 saat Ant 6 (3 μ M) inkübasyonu sonrasında % 12.9'a yükselmiştir. Bu oran 2.6 μ M mitoksantron ile % 2.0 olarak tespit edilmiştir. Buna göre Ant 6 türevi, mitoksantron ve diğer türevlere göre hücre erken apoptozunu etkili bir şekilde uyarmıştır. Bununla birlikte Ant 6 (3 μ M) ile 24 saat inkübasyona tabi tutulan hücrelerdeki DNA kırıklarına dayalı apoptotik indeks % 54 olarak belirlenmiştir. Akım sitometrisi tarafından ölçülen kaspaz-3 aktivasyon düzeyine bakıldığında ise, 6 μ M Ant 3'ün 12 saat inkübasyonu sonrasında kaspaz 3 düzeyi % 18'e kadar yükselmiştir.

Sonuç olarak, her üç türev de mitoksantrona oranla, kısa inkübasyon süresi sonrasında, HeLa hücrelerindeki apoptozu daha etkili bir şekilde uyarmıştır. Kemoterapötik potansiyele sahip bu antrakınon türevleri *in vivo* çalışmalar sonrasında kanser tedavisine fayda sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: HeLa, apoptoz, antrakınon, hücre kültürü

DETERMINATION of ANTICANCER ACTIVITIES of SOME SYNTHETIC COMPOUNDS

ABSTRACT

Nowadays, it is known that therapeutic activity of drugs of the anthraquinone group which are widely used in various cancer types could increase by adding different side substitute to them and these new synthesized anthraquinone derivatives could prevent development of resistance in cancer cells. Therefore, a wide range of anthraquinone derivatives are synthesized and their apoptotic effect mechanisms are studied in details.

In this thesis, cytotoxic and apoptotic effects of newly synthesized anthraquinone eight derivatives on HeLa cell line were investigated. IC₅₀ values of derivatives were investigated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolium bromid (MTT) method. After 24 hour, Ant 3 (IC₅₀; 10 µM), Ant 4 (IC₅₀; 8 µM) and Ant 6 (IC₅₀; 8 µM) were detected that the most effective derivatives compared to others. In line with these results, the effects on HeLa cell apoptosis of IC₅₀ values and lower doses of these derivatives were investigated in details. Early apoptotic cell ratio, which was measured by Annexin V-FITC method, increased to % 12.9 after incubation time for 6 hour of Ant 6. This ratio was detected as % 2.0 for 2.6 µM mitoxantrone. According to this, Ant 6 induced early apoptosis of cells effectively relatively mitoxantrone and the other derivatives. At the same time, apoptotic index based on DNA fragments in cells which were incubated with Ant 6 (3 µM) in 24 hour was indicated as % 54. As for results of caspase-3 activation, caspase-3 level increased to % 18 after incubation of Ant 3 for 12 hour.

As a result, each of three derivatives induced apoptosis of HeLa cells more effectively than mitoxantrone at lower doses after short incubation time. These anthraquinone derivatives, which have chemotherapeutic potential, will be useful for cancer treatment after *in vivo* studies.

Keywords: HeLa, apoptosis, anthraquinone, cell culture

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	3
Apoptoz	3
<i>Tarihçe ve terminoloji</i>	3
<i>Fizyolojik bir işlem olarak apoptoz</i>	3
Apoptozun Aşamaları	4
<i>Ölüm reseptörü yolu</i>	6
<i>Mitokondri yolu</i>	6
<i>Apoptoza giden hücrelerin fagositler tarafından bulunması</i>	7
Apoptoz Sinyalinin İletim Kaskadı	7
<i>Kaskad sistemi</i>	7
<i>Kaspazlar</i>	8
<i>Kaspaz bağımlı apoptoz</i>	8
Hücre Döngüsü ve Apoptoz	8
Apoptoz ile Nekroz Arasındaki Farklar	9
Kanser ve Apoptoz	9
Serviks Kanseri	10

<i>HeLa (İnsan servikal karsinoma) hücreleri</i>	11
Kemoterapi Tedavisinde Antrakinonlar	11
GEREÇLER	14
Hücre Hattı	15
Kullanılan Kimyasal Madde ve İlaçlar	15
Kullanılan Cihazlar	15
YÖNTEMLER	15
Hücre Kültürü	15
Antrakinon Türevlerinin ve Mitoksantronun Hazırlanması	15
Mitokondriyal aktivite 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5 difenil tetrazolium bromid (MTT) testi	15
Anneksin V-FITC/PI Yöntemi	15
Sitoplazmik ADP/ATP Seviyesinin Belirlenmesi	16
Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi	16
TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) Yöntemi	16
Verilerin İstatiksel Analizi	18
BULGULAR ve TARTIŞMA	18
Antrakinon Türevlerinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	18
Antrakinon Türevlerinin Erken Apoptoz Üzerine Etkileri	31
Antrakinon Türevlerinin Sitoplazmik ADP/ATP Seviyesi Üzerine Etkileri	38
Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi	40
DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi	50
SONUÇ ve ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR	60
EKLER	68
EK 1 Mitoksantron ve Antrakinon Türevlerinin Sitotoksik Etki Grafikleri	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA
Çizelge 1 Mitoksantron ve Antrakinon Türevlerinin % 50, % 60 ve % 80 HeLa Hücre Canlılık Oranına Neden Oldukları Konsantrasyon Aralıkları	27
Çizelge 2 Mitoksantron ve Antrakinon Türevleri ile 6 Saat Stimülasyon Sonrasında Erken ve Geç Apoptotik HeLa Hücre Oranları	34
Çizelge 3 Mitoksantron ve Antrakinon Türevleri ile 12 Saat Stimülasyon Sonrasında Erken ve Geç Apoptotik HeLa Hücre Oranları	36
Çizelge 4 Mitoksantron ve Antrakinon Türevleri ile 24 Saat Stimülasyon Sonrasında Erken ve Geç Apoptotik HeLa Hücre Oranları	38
Çizelge 5 Mitoksantron ve Antrakinon Türevleri ile Muamele Edilen HeLa Hücrelerinde ADP/ ATP Oranı	39
Çizelge 6 Mitoksantron ve Antrakinon Türevleri ile 6 Saat Stimülasyon Sonrasında Kaspaz-3 Aktivitesi Gösteren HeLa Hücre Oranları	43
Çizelge 7 Mitoksantron ve Antrakinon Türevleri ile 12 Saat Stimülasyon Sonrasında Kaspaz-3 Aktivitesi Gösteren HeLa Hücre Oranları	46
Çizelge 8 Mitoksantron ve Antrakinon Türevleri ile 24 Saat Stimülasyon Sonrasında Kaspaz-3 Aktivitesi Gösteren HeLa Hücre Oranları	50
Çizelge 9 Mitoksantron ve Antrakinon Türevleri ile 6, 12 ve 24 Saat Stimüle Edilen HeLa Hücrelerinin TUNEL Apoptotik İndeksi	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 Kaspazlar ve DNA Çözülmesi	5
Şekil 2 İç (mitokondri) ve Dış (Ölüm Reseptörü) Apoptotik Sinyal Yolları	7
Şekil 3 Antrakınon Grubunun Genel Yapısı	12
Şekil 4 Mitoksantron ve Antrakınon Türevlerinin Kimyasal Yapı Formülleri	18
Şekil 5 Mitoksantronun Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlılık Oranı	21
Şekil 6 Ant 1 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlılık Oranı	21
Şekil 7 Ant 2 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlılık Oranı	22
Şekil 8 Ant 3 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlılık Oranı	23
Şekil 9 Ant 4 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlılık Oranı	23
Şekil 10 Ant 5 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlılık Oranı	24
Şekil 11 Ant 6 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlılık Oranı	25
Şekil 12 Ant 7 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlılık Oranı	26
Şekil 13 Ant 8 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlılık Oranı	26
Şekil 14 Ant 3 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlılık Oranlarının İstatiksel Analizi	29
Şekil 15 Ant 4 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlılık Oranlarının İstatiksel Analizi	29
Şekil 16 Ant 6 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlılık Oranlarının İstatiksel Analizi	30

ŞEKİLLER DİZİNİ DEVAM

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 17 Ant 3, Ant 4, Ant 6 ve Mitoksantronun Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen Yüzde Canlılık Oranlarının İstatiksel Analizi	31
Şekil 18 FITC ile İşaretlenmiş Anneksin V ve Propidyum İyodür Boyaması	32
Şekil 19 Mitoksantron ve Antrakinin Türevlerinin HeLa Hücreleri ile 6 Saat İnkübasyonu Sonrası Gözlenen Anneksin V-FITC/PI Boyamasının Akım Sitometrisi Analizi	33
Şekil 20 Mitoksantron ve Antrakinin Türevlerinin HeLa Hücreleri ile 12 Saat İnkübasyonu Sonrası Gözlenen Anneksin V-FITC/PI Boyamasının Akım Sitometrisi Analizi	35
Şekil 21 Mitoksantron ve Antrakinin Türevlerinin HeLa Hücreleri ile 24 saat İnkübasyon Sonrası Gözlenen Anneksin V-FITC/PI Boyamasının Akım Sitometrisi Analizi	37
Şekil 22 Mitoksantron ve Antrakinin Türevlerinin Farklı Doz ve Zaman Aralıklarında İnkübasyonu Sonrası Belirlenen ADP/ATP Oranının İstatiksel Analizi	40
Şekil 23 6 Saat İnkübasyon Sonrasında Mitoksantronun Kaspaz-3 Aktivitesi Üzerine Etkisi	41
Şekil 24 6 Saat İnkübasyon Sonrasında Antrakinin Türevlerinin Kaspaz-3 Aktivitesi Üzerine Etkisi	42
Şekil 25 12 Saat İnkübasyon Sonrasında Mitoksantronun Kaspaz-3 Aktivitesi Üzerine Etkisi	44
Şekil 26 12 Saat İnkübasyon Sonrasında Antrakinin Türevlerinin Kaspaz-3 Aktivitesi Üzerine Etkisi	45
Şekil 27 24 Saat İnkübasyon Sonrasında Mitoksantronun Kaspaz-3 Aktivitesi Üzerine Etkisi	47
Şekil 28 6 Saat İnkübasyon Sonrasında Antrakinin Türevlerinin Kaspaz-3 Aktivitesi Üzerine Etkisi	48

ŞEKİLLER DİZİNİ DEVAM

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 29 Mitoksantronun HeLa Hücreleri ile 6 Saat İnkübasyonu Sonrası Gözlenen DNA Fragmentasyonunun Floresan Mikroskobu ile Analizi	51
Şekil 30 Antrakinon türevlerinin HeLa Hücreleri ile 6 Saat İnkübasyon Sonrası Gözlenen DNA Fragmentasyonunun Floresan Mikroskobu ile Analizi	52
Şekil 31 Mitoksantronun HeLa Hücreleri ile 12 Saat İnkübasyon Sonrası Gözlenen DNA Fragmentasyonunun Floresan Mikroskobu ile Analizi	53
Şekil 32 Antrakinon Türevlerinin HeLa Hücreleri ile 12 Saat İnkübasyon Sonrası Gözlenen DNA Fragmentasyonunun Floresan Mikroskobu ile Analizi	54
Şekil 33 Mitoksantronun HeLa Hücreleri ile 24 Saat İnkübasyon Sonrası Gözlenen DNA Fragmentasyonunun Floresan Mikroskobu ile Analizi	55
Şekil 34 Antrakinon Türevlerinin HeLa Hücreleri ile 24 Saat İnkübasyon Sonrası Gözlenen DNA Fragmentasyonunun Floresan Mikroskobu ile Analizi	56
Şekil 35 Antrakinon Türevlerinin HeLa Hücrelerinde Tetikledikleri Apoptoz Mekanizması	57
Şekil 36 Antrakinon türevlerinin HeLa Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri	67
Şekil 37 Mitoksantronun HeLa Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi	68

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
ADP	: Adenozin Difosfat
AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
APAF-1	: Apoptoz Aktive Edici Faktör
ATP	: Adenozin Trifosfat
Bcl-2	: B-Hücre Lemfoma 2
BCRP	: Meme Kanseri Direnç Proteini
Ca	: Kalsiyum
CAD	: Kaspazla Aktifleşen Deoksribonükleaz
CKI	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü
cm ²	: Santimetrekare
CTL	: Sitotoksik T Lenfosit
DISC	: Sinyal Kompleksi İçeren Ölüm Kompleksi
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DR5	: Ölüm Reseptörü 5
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
ELISA	: Enzim Bağlı İmmunosorbent Yöntem
FADD	: Ölüm Bölgesi Protein ile İlişkili Fas Adaptör Molekülü
Fas	: Tümör Nekrozis Faktör Ailesine Ait Tip 2 Transmembran Proteini
FBS	: Fetal Sığır Serum
FITC	: Floresanizosiyanat
HeLa	: İnsan Servikal Adenokarsinoma Hücre Hattı
HPV	: İnsan Papilloma Virüsü
ICAD	: Kaspazla Aktifleşen Deoksribonükleaz İnhibitörü
ICE	: İnterlökin Beta Dönüştürücü Enzim
IC ₅₀	: Maksimum Yarı İnhibitör Konsantrasyon
IC ₈₀	: Maksimum % 20 İnhibitör Konsantrasyon
MCF-7	: İnsan Meme Adenokarsinoma Hücre Hattı

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ DEVAM

MEM	: Minimal Temel Solüsyon
Mg	: Magnezyum
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Yl)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromid
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NK	: Doğal Öldürücü (Natural Killer)
nm	: Nanometre (dalga boyu)
nM	: Nanomolar
p21	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 1A
P ₅₃	: TP 53 (Tümör Protein 53)
PBS	: Fosfat Tuzlu Tampon
PI	: Propidyum İyodür
PRB	: Retinoblastoma Baskılayıcı Gen
PS	: Fosfatidil Serin
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
siklin-CDK	: Siklin-Bağımlı Serin/Treonin Protein Kinazlar
TdT	: Deoksinükleotidil transferaz
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TNFR-1	: Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü 1
TRADD	: Ölüm Bölgesi Proteini İlişkili Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü Tip 1
TRAIL	: Tümör Nekroz Faktör- α - İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand
Tween 20	: Polioksietilen 20

GİRİŞ VE AMAÇ

Gen mutasyonu sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasıyla meydana gelen çağımızın en önemli hastalıklarından biri kanserdir. Yaygın görülen kanser türlerinden biri olan serviks kanseri, dünya ölçeğinde 45 yaş altı kadınlarda en sık görülen ikinci kanser türüdür (http-3). Bu nedenle, kansere yönelik yeni kemoteröpatik ajanların sentezi ve bunların etki çalışmaları yoğun bir şekilde devam etmektedir.

Kanser tedavisinde kullanılan kemoteröpatik ajanların genel amacı, kanserli doku hücrelerini programlı hücre ölümüne (apoptoz) sürüklemektedir (http-10, Park ve ark., 1997; Thompson, 1995; Yıldırım ve ark., 2010). Apoptoz, son yıllarda kanser tedavisi için daha efektif terapötik modelleri araştırmaya yönelik çalışmaların hedefi olmuştur. Apoptoz, normal yetişkin dokuların erken gelişim ve büyüme döneminde önemli rol oynayan morfolojik olarak farklı bir çeşit hücre ölümüdür (Gerschenson ve Rotello, 1992).

Tez çalışması kapsamında, yeni sentezlenen antrakininon bileşiklerinin HeLa kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Antrakininonlar, $C_{14}H_8O_2$, antrasenin en önemli kinon türevleri olup, düzlemsel trisiklik yapıları DNA iplikçikleri ile etkileşime geçmektedir. Bu özelliklerinden dolayı kanser tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Ayrıca kemoterapide kullanılan bir antrakininon bileşiği olan antrasiklin grubu ilaçlar DNA onarım mekanizmasından sorumlu Topoizomera II inhibitörüdürler. Sitotoksitelerinin önemli bir kısmı topoisomera II inhibisyonu ile sağlanır. Çift iplikli DNA arasında interkalasyona neden olarak DNA ve RNA sentezini etkileyen yapısal değişiklikleri ve reaktif oksijen türleri oluşturabilirler. Bu nedenle, bir antrakininon bileşiği olan antrasiklin ile tedavi görmüş kanserli hastalarda kardiyotoksisite göz ardı edilemeyecek kadar fazla görülmekte (Gharib ve Burnett, 2002; Faulds ve ark., 1997) ve kendini çoğunlukla konjestif kalp yetmezliği şeklinde göstermektedir (Hannun, 1997). Antrakininon türevlerinin sitotoksik etkilerine sebep olan redoks bir süreç geçirdiği ve reaktif oksijen türleri oluşturdukları bilinmektedir (Ross ve ark., 1997; Burden ve Osheroff, 1999). Ayrıca, son dönemde yaygın olarak kullanılan ve sentetik bir antrakininon türevi olan mitoksantronun siklik türevlerinin DNA'ya kovalent olarak bağlandığı ve bu durumun sitotoksiteye sebep olduğu bildirilmiştir (Rosenberg ve Hittelman, 1983).

Kardiyotoksisite tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması nedeniyle hem ilacın total dozu sınırlandırılmakta ve buna bağlı olarak ilacın terapötik potansiyeli azalmaktadır. Daha ucuz ve kemoterapötik olarak etkili bileşiklerin bulunması için pek çok analog denenmiştir ve kinon modifikasyonları ile ilgili çabalar sürmektedir. Bununla birlikte metal iyonları kullanılarak süperoksit oluşumunun ve kardiyotoksisitenin daha az olduğu antrasiklin bileşikler üretilmiştir (Guin ve ark., 2012).

Diğer yandan etkin özellikleri nedeniyle antrakininon bileşiklerinin yoğun kullanımı sonucu tedaviye karşı direnç gelişmiştir. Antrakininonlar öncelikle DNA'ya bağlanarak daha sonra topoisomera II ile bağlandıkları bildirilmiştir. Bu sürecin DNA'nın çift iplikliğinde kırılma, devamında apoptoz ve hücre ölümü ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Joseph ve ark., 2010). Yapılan bir çalışmada Meme Kanseri Direnç Proteini (BCRP), Adenozin Trifosfat (ATP) bağımlı bir

ksenobiyotik transport proteininin de direnç gelişiminde aktif rol oynadığı bildirilmiştir (Ross ve ark., 1997). Literatürde bu direnç mekanizmalarının, antrakınon iskeletine farklı yan zincirlerin eklenmesiyle DNA çift ipliği ve topoizomeraz II ile farklı etkileşimler meydana getirmesiyle engellenebileceği öngörülmektedir (Willette, 1998).

Antrasiklin kombinasyonlarının hastaneye yatış gereği olmadan ayaktan rahat uygulanabilmesi önemli bir avantajdır. Bazı çalışmalarda antrasiklin içeren kombinasyon kemoterapilerle % 10-20 gibi daha yüksek yanıtlar ve 14-16 aylık medyan sağkalım artışı sağladığı da gösterilmiştir (Işıkdoğan ve ark., 2003; Loi ve ark., 2004).

Doğal kaynaklı antrakınon bileşikleri çok sayıda olmasının yanı sıra çok sayıda ve farklı süstitüentlere sahip sentetik antrakınon bileşiği sentezlenmiştir. Bunlardan bir kısmı oldukça ümit verici anti-kanser özellikler göstermiştir (Ehninger ve ark., 1990).

Antrakınonlar en küçük yapısal değişikliklerle farklı biyolojik etkilerde bulunduklarından farklı türevlerinin araştırılması kemoterapi tedavilerinin geliştirilmesi açısından gerekli görülmüştür (Huang ve ark., 2004).

Bu nedenle tezde kullanılan yeni antrakınon türevlerinin HeLa hücreleri üzerine tespit edilecek olası sitotoksik etkileri ya da apoptotik uyarıcı özelliklerinin serviks kanser tedavisinde ilaç geliştirme alanında önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAK BİLGİSİ

Apoptoz

Apoptoz, çoğunlukla letal bir genetik programı işaret eden “programlanmış hücre ölümü” ile sinonim kullanılan, normal yetişkin dokuların erken gelişim ve büyüme döneminde önemli rol oynayan morfolojik ve fizyolojik olarak farklı bir çeşit hücre ölümüdür (Gerschenson ve Rotello, 1992).

Hücre ölümünün belirtileri çoğunlukla çevresel faktörler veya hastalık durumlarına maruz kalma ile birlikte görülür. Hücre döngüsünün düzenlenmesinde, istenmeyen hücrelerin uygun zamanda, çevre dokularda herhangi bir hasara neden olmaksızın ortadan kaldırılması esnasında apoptoz etkili rol oynamaktadır. Sonuç olarak apoptoz terimi, canlıların gelişme ve büyüme düzeninde önemli rolü olan spesifik bir hücre ölüm şeklini ifade etmektedir (Allen ve ark., 1993; Cohen, 1993).

Tarihçe ve terminoloji

Omurgalı ve omurgasız canlıların normal gelişimlerdeki hücrelerin ölümü, 1951 yılında Glucksmann, 1966 yılında Saunders tarafından tanımlanmıştır. 1965 yılında Kerr, portal ven ligasyonundan sonra karaciğer hücresinde çeşitli ölüm tipleri olduğunu göstermiştir.

1971 yılında yine Kerr, "büzüşme nekrozu" olarak adlandırdığı yapıyı, kondanse kromatin parçaları içeren ve organelleri korunmuş nüklear kümeleri hücre membranına ilişik cisimler olarak tanımlamıştır (Kerr, 1971).

Bu morfolojik değişimler, fizyolojik stimuluslar altında çeşitli hayvan dokularında da görülmüştür. Bu duruma, Yunancada bozulmak, azalmak anlamına gelen "apoptoz" adı verilmiş ve bunun mitoz bölünmeye aksi bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Kerr, 1972). Yapılan çalışmalar ise, apoptoz mekanizmasının, nekroz mekanizmasından farklı bir hücre ölüm tipi olduğunu göstermiştir (Allen ve ark., 1993; Schwartz ve Osbourne, 1966).

Fizyolojik bir işlem olarak apoptoz

Apoptoz, organizmaların normal gelişimi esnasında ve yetişkin organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi esnasında spesifik hücrelerin kaybindan sorumludur. Apoptozun fonksiyonel mekanizmaları hücrede denge unsurunu oluşturmaktadır (Thompson, 1994).

Apoptoz tek hücreli canlılarda hücre ölümünün tek yoludur (Lumachi ve Basso, 2002). Çok hücreli canlılarda ise genetik kaynaklı hücre hasarının engellenmesi veya hücrenin tamamen ortadan kaldırılması apoptoz vasıtasıyla gerçekleşir. Böylece hasarın yayılması ve tümör oluşumu gibi zararlı olasılıkların önüne geçilmiş olur (Evan ve Littlewood, 1998).

Apoptozun oluşmasından önce hücresel replikasyon işlemi durur, bu esnada DNA tamiri gerçekleşemezse apoptoz ile sonuçlanan olaylar serisi başlar. Bu sırada apoptozun başlayıp başlamaması genetik hasarın boyutuna, hücrenin tipine ve hücrenin üretkenlik potansiyeli olan tümör geliştirme riskine bağlıdır (Evan ve Littlewood, 1998).

Apoptoz yalnızca organogenez ve sinaptogenez olaylarında değil, farklılaşmış dokuların olgunlaşmasında da önemli bir işleve sahiptir. Çünkü apoptoz vücuttaki

tüm hücrelerin sabit sayıda tutulmasını ve immün sistem faaliyetlerinin gerçekleşmesini sağlar (Evan ve Littlewood, 1998). Aktive edilmiş lenfositlerin doğrudan apoptoz vasıtasıyla kendi antijenlerini elimine etmeleri bu duruma örnek olarak verilebilir (Wyllie, 1980a).

Apoptotik hücre miktarında görülen bir artış, organizmadaki dengenin olumsuz yönde bozulmasına, Alzheimer ve Parkinson gibi dejeneratif hastalıklardan, Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu (AIDS) gibi kronik hastalıklara ve hatta immünolojik hastalıklara neden olabilir (Saikumar ve ark., 1999; Mountz ve ark., 1996).

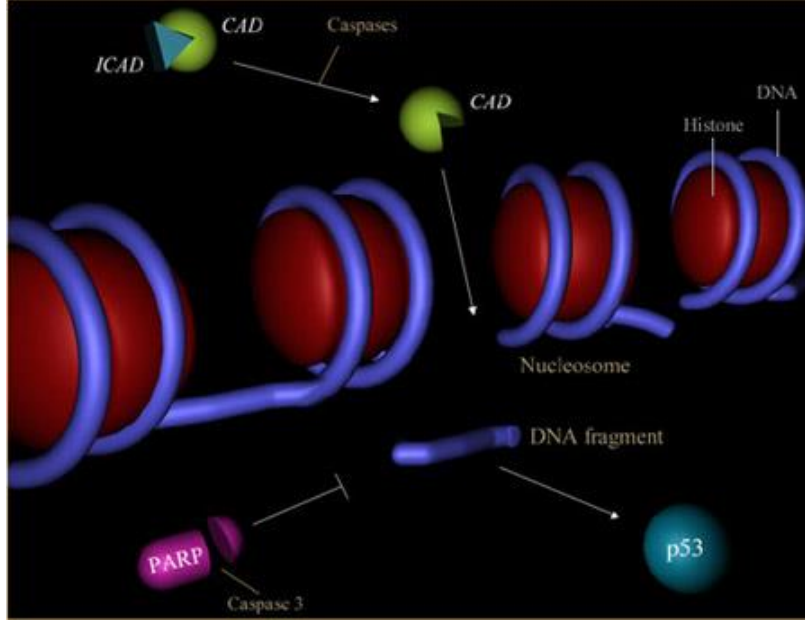
Ayrıca apoptoz; üyelerin oluşumunda, el ve ayak parmak gelişimi sırasında ara dokunun ortadan kalkmasında, omuriliğin biçimlenmesinde, erkek fetüslerde müller kanalının tahribatı sırasında, viral enfeksiyonlarda Councilman cisminin oluşumunda ve menstrual siklus gibi birçok olayda görülmektedir (Marshall ve ark., 2007; Jacobson ve ark., 1997).

Apoptozun Aşamaları

Yapılan *in vitro* çalışmalar apoptozun ani gerçekleşen bir olay olduğunu göstermektedir. Apoptotik uyarıdan sonra hücre hızla ortamından uzaklaşır, morfolojik olarak yuvarlaklaşırken içeriği bir araya toplanır ve sitoplazması büzülür. Protoplazmanın zardan uzaklaşmasından, apoptotik cismin oluşumuna kadar bütün apoptotik olaylar zinciri birkaç dakika içerisinde gerçekleşir. Bununla birlikte apoptotik hücrelerin fagositozu için daha uzun bir zaman gerekir. Hatta bu işlem 12-18 saat sürebilir (Walker ve ark., 1988; Wyllie, 1980a).

Apoptozda temel biyokimyasal olay, nükleusun kondensasyonudur. Apoptozun gerçekleşmesi sırasında oluşan DNA çözülmesi olayı, kromatin yığılmasına dayalı olarak ortaya çıkar. Apoptoz işlemi aktive edildikten bir saat sonrasında DNA'da tek iplikte bir çentik ile başlayan karakteristik ve geri dönüşsüz bir parçalanma görülür. Bu çözülmenin apoptozda anahtar bir rolü olduğu düşünülmektedir (Tilly, 1992).

Kromatin, normalde kondens bir yapıda olup daha diffüz bir görünümündedir. Ancak apoptozda süperkondens bir hal alarak nükleus zarı altında kresentik görünüm oluşturur. Floresan boyamada DNA, boncuklanmalar şeklinde görülür, bunun nedeni DNA'nın endonükleaz ile oldukça özgül şekilde internükleozomal bölgelerden 180-200 bp (baz çifti) büyüklüğünde parçalara ayrılmasıdır (Tilly, 1992).



Şekil 1. Kaspazlar ve DNA Çözülmesi (<http-9>)

DNA çözülmesi, DNA'yı parçalayan enzim olan endonükleaz aktivitesini artırır (Schwartzman ve Cidlowski, 1993). Bu enzimin aktive olması muhtemelen Ca/Mg oranının bir ya da daha fazla bir değerde oluşuna bağlı olarak gerçekleşir. Ancak, sağlıklı bir hücrede basit hücresel veya moleküler bir olay apoptoza neden olabilir. Bu durum hücrelerin sahip oldukları intihar programının aktive olup olmayacağını belirleyen inhibitör bir molekül taşımaları gerektiğini gösterir (Schwartzman ve Cidlowski, 1993; Tilly, 1992; Wyllie, 1980b).

İmmün elektroforez işleminde "ladder patern" olarak isimlendirilen merdiven biçiminde bir görüntü oluşur. Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılırken, apoptozda yaklaşık 300.000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı gerçekleşemez (Allen ve ark., 1993; Wyllie, 1986).

Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma membranındaki değişikliklere göre de gerçekleşir. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yaprağına göç eder (Cohen, 1993; Cohen, 1998).

Hücrelerin apoptoz süreci enerji gerektirir. Yapılan çalışmalara göre ATP'nin hücre içi düzeyinin de hücre ölüm şeklinin seçiminde belirleyici bir rol üstlendiğini göstermektedir (Hetts, 1998). Deneysel çalışmalarda, ATP bulunan ortamlarda seçilen hücre ölüm şekli apoptoz olurken, ATP yoksunluğu olan ortamlarda hücre ölümü daha çok nekroz şeklinde gerçekleşmektedir. Deneysel verilere dayanarak, apoptozun son evresinde çekirdek kondensasyonu ve DNA yıkımı için glikoliz ve mitokondriyal solunum ile ATP sağlanmasının gerekli olduğu ileri sürülmüştür. ATP, apoptozda harekete geçen bazı özel kaspazların aktivasyonunda da önemli bir etmendir (Kerr ve ark., 1972).

Memelilerde iki temel apoptoz mekanizması bulunmaktadır. Bunlardan biri, ölüm reseptörleri yolu (ekstrinsik) olarak ifade edilen, hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile tetiklenen apoptozdur. Diğeri ise, mitokondri yolu (intrinsik) olarak ifade edilen, hücre içinde meydana gelen

sinyallerde mitokondrinin aktif rol oynaması ile tetiklenen apoptozdur (Cohen, 1993; Saikumar ve ark., 1999).

Ölüm reseptörü yolu

Ölüm reseptörü yolunda, apoptoz, hücre dışı ve hücresele seviyede oluşan çeşitli sinyaller yoluyla tetiklenebilir. Hücresele düzeyde etkili ana fizyolojik aktivatörler; Fas Ligant (FasL) ve Tümör Nekrozis Faktör (TNF) adlı proteinlerdir. Ölüm faktörü olarak da adlandırılan bu proteinlerin, hücre yüzeyindeki ilgili reseptörlerine bağlanması ile Sinyal Kompleksi İçeren Ölüm Proteini (DISC) modülü oluşur ve daha sonra apoptoza giden yolda kaspaz-8 aktivasyonu gerçekleşir (Grell ve ark., 1994).

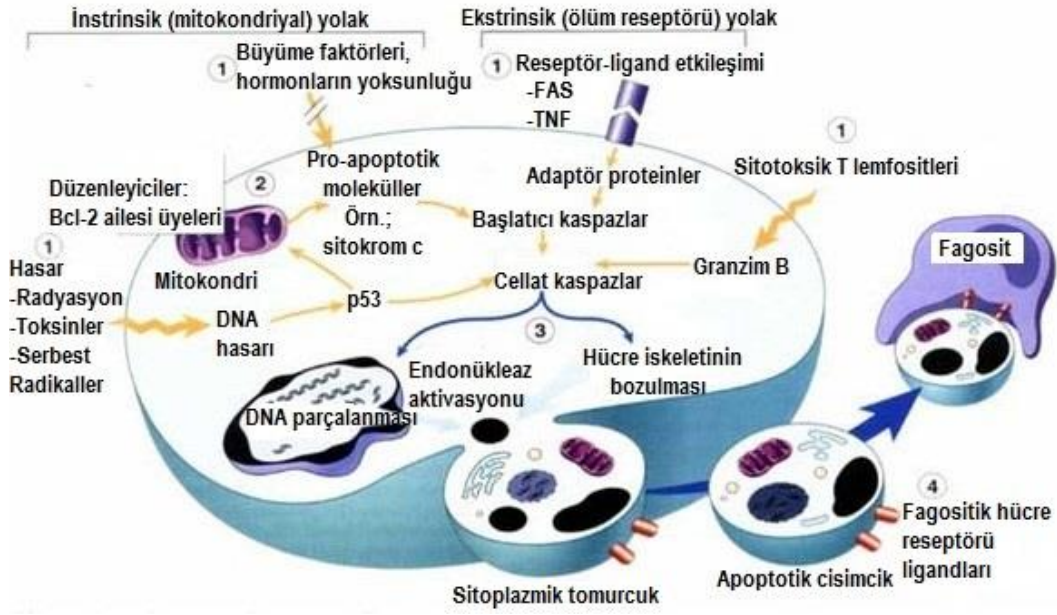
TNF ailesine ait tip 2 transmembran proteini (Fas) lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, miyokartta bulunmaktadır. İlgili ligandına FasL denir. Fas ve TNF 1 öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ölüm bölgeleri (death domain) adı verilen Ölüm Bölgesi Proteini İlişkili Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü Tip 1 (TRADD) ve Ölüm Bölgesi Protein ile İlişkili Fas Adaptör Molekülü (FADD) ile interaksiyona girerler. Bu ölüm bölgeleri prokaspaz-8'i aktiveleştirir ve kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatır. Ayrıca ölüm bölgelerini inhibe eden proteinler de bulunmaktadır (Grell ve ark., 1994).

FasL, immun yanıt sonrası aktif T hücrelerinin, virüs ile enfekte olmuş hücrelerin ve patolojik hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasında kullanılan bir mekanizmadır. FasL, sitotoksik T lenfositlerde (CTL) ve natural killer-doğal öldürücü (NK) hücrelerde bulunur. Hedef hücrede bulunan reseptörü Fas ile bağlandığında apoptozu aktive eder. TNF, hedef hücredeki TNFR-1 ve TNFR-2 adlı reseptörleri ile bağlandığında apoptozu aktive etmektedir (Grell ve ark., 1994).

Apoptoz, ağır DNA hasarına yanıt olarak Tümör Protein 53'ün (p53) indüksiyonuyla da başlatılabilir. p53 pro-apoptotik Apoptoz Düzenleyici Protein Ailesi (bcl-2) üyesi olan Bax'ın indüksiyonuna yol açarak apoptozu başlatır. p53 ayrıca Fas ve Ölüm Reseptörü 5 (DR5) gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna da neden olabilmektedir (Grell ve ark., 1994).

Mitokondri yolu

Hücre içi reaktif oksijen radikallerindeki artış, Adenozin Difosfat/Adenozin Trifosfat (ADP/ATP) oranındaki artış, Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat'ın (NADPH) azalması, Bcl-2 transkripsiyon veya translasyonundaki hatalar, hücre DNA hasarları ile uyarılan hücrelerde mitokondri membranının geçirgenliği bozulmaktadır. Bu durum sitokrom c'nin mitokondri membranından sitoplazmaya geçerek apoptoz aktive edici faktör (Apaf-1) ve kaspaz-9 ile birleşip bir kompleks oluşturmaya neden olur. Bu yapıya apoptozom adı verilmektedir. Apoptozom, inaktif prokaspaz-9'u aktif kaspaz-9'a dönüştürür. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive etmektedir (Patel ve ark., 1996; Alnemri ve ark., 1996).



Şekil 2. İç (mitokondri) ve Dış (ölüm reseptörü) Apoptotik Sinyal Yolları (Kumar, 2005)

Apoptoz giden hücrelerin fagositler tarafından tutulması

Apoptoz giden hücrelerin genel fizyolojik özelliği olan hızlı tanınma mekanizması, lizozomal enzimlerle parçalanmadan önce lokal fagositler tarafından bozulmamış hücrenin içeri alınmasında önemlidir. Ayrıca bu durum, komşu hücrelere zarar verilmemesi ve inflamatuvar cevap oluşmaması noktasında da üzerinde durulması gereken bir konudur. Apoptotik hücreleri alan fagositler, bir veya birden çok tanıma mekanizması oluştururlar (Savill ve ark., 1993).

Apoptotik hücrelerin fagositler tarafından tanınması ve fagositte edilmesi, organizmayı ölen hücrelerin zararlı içeriğine karşı korumaktadır. Çünkü apoptotik hücrelerin temizlenmesindeki defektler tanımlanamayan yollarla hastalıklara yol açabilir (Savill ve ark., 1993).

Apoptoz Sinyalinin İletim Kaskadı

Kaskad sistemi

FasL ve TNF ilgili hücredeki reseptörlere bağlandığında apoptotik sinyal alınmış olur ve hücre ölüme doğru gider. Apoptotik sinyal, hücre içinde Kaspaz-8'e iletilir. Kaspaz-8, ölüm sinyalinin iletiminde rol alan proteinazlardan biridir. Kaspaz-8'in aktive olması ile birlikte diğer proteinazlar kaskad halinde kendi kendine aktive olarak ölüm sinyalinin nükleusa kadar iletirler ve sonuçta kromozomal DNA'nın yıkımına neden olurlar. Kaspazlar, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozda rol almaktadır (Nicholson, 1999).

Kaspazlar

Kaspazlar apoptotik hücre ölümü esnasında önemli rol oynayan multigen ailesinden oluşan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Kelime olarak "Cysteine Aspartate Specific ProteASEs- CASPASE" olarak türetilmiştir. Öncelikle inaktif proteinler olarak sentezlenen bu enzimler çeşitli yollarla aktive edilirler. Aktive olmalarının ardından hücresel hedeflerdeki tetrapeptit motiflerini amino asit spesifitelerine göre tanırlar ve substratı, bir aspartat rezidüsünün karboksil tarafından ayırırlar. Hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok selüler ve morfolojik değişimler, bu enzimlerin rol oynadığı birtakım süreçler sonucunda meydana gelir (Nicholson, 1999).

Kaspaz-1, kaspaz ailesinin prototipidir ve önceleri prointerlökin-1-beta'nın biyolojik aktif formuna dönüşümünden sorumlu, interlökin-1-beta dönüştürücü enzim (ICE) olarak da adlandırılan, bir sistein proteaz olarak tanımlanmıştır. Daha sonraları ise ICE'nin diğer sistein-proteazlardan farklı olarak amid bağının N-terminalindeki p1 pozisyonu olarak bilinen ucunda aspartik asitin varlığını gerektiren farklı bir sistein-proteaz olduğu keşfedilmiştir (Thornberry ve ark., 1992; Cerretti ve ark., 1992).

Kaspazlara ek olarak bir serin proteaz olan granzim-B gibi başka proteazlar da kaspaz aktivasyonunda görev alarak ve bazen de kaspazların yerine fonksiyon görerek apoptotik hücre ölümüne katkıda bulunur. Bu sıralanmanın istisnaları da mevcuttur. Örneğin kaspaz-2 kendiliğinden aktive olabilir. Kaspaz-6 efektör proteaz olarak görev alabilir (Nicholson, 1999).

Kaspaz bağımlı apoptoz

Apoptozom inaktif prokaspaz-9'u aktif kaspaz-9'a dönüştürür. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive eder. Aktif kaspaz-3 kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (inhibitör of caspase-activated deoxyribonuclease, ICAD) inaktifleştirir. Böylece ICAD'ün bağladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) serbestleşir ve bu da apoptozun karakteristik bulgularından olan kromatin kondensasyonu ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olmaktadır (Kelly ve Salvesen, 2003).

Hücre Döngüsü ve Apoptoz

Bu entegrasyonda anahtar faktör bir tümör supressör gen ürünü bir protein olan ve "guardian of the genome" olarak da tanımlanan p53'dür. p53 temel görevi, DNA'nın radyasyon veya bazı ilaçlar ile hasar gördüğü zaman, hücre döngüsünü G1 fazında durdurup hücrenin hasar görmüş olan DNA'sını tamir etmesi için ona zaman kazandırmasıdır. Bu sebeple p53, gen koruyucusu olarak ifade edilmektedir (http-1).

p53 kanser hastalarında mutasyonu en sık görülen proteindir. Kanserlerin yaklaşık % 50'si için mutanttır. p53 normal olarak bir siklin bağımlı kinaz inhibitörü (CKI) olan Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1'in (p21) sentezini artırarak hücre çoğalmasını bloke eder. Siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (siklin-CDK) kompleksine bağlanarak onu inaktive eder. Hücre siklusunun durması hücreye zaman kazandırmakla birlikte hücrenin hasar görmüş olan DNA'sını tamir etmektedir. Ama hasar tamir edilemeyecek kadar büyük ise bu kez p53 hücreyi apoptoza götürür (http-1).

Apoptoz ile Nekroz Arasındaki Farklar

Apoptoz ve nekroz, hücre ölümünün iki formudur. Genel olarak, nekroz; fizyolojik olmayan etkiler sonucu gelişen ve yangıya neden olan bir hücre ölümüdür. Apoptoz ise çevre dokularda yangı olmaksızın tek hücreyi etkileyen fizyolojik olarak programlanmış hücre ölümüdür (http-2).

Bu iki ölüm şekli arasında morfolojik ve biyokimyasal bazı farklılıklar olduğu bilinmektedir. Örneğin, nekrozda hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken, apoptotik hücre tam tersine küçülmektedir. Kromatin şekli nekrozda, normal bir hücredeki görünümüne benzerdir, ancak apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve kondanase olur. Nekrotik hücrede plazma membranı bütünlüğünü kaybeder. Bu durumun aksine apoptotik hücre membranı bütünlüğünü korur (Wyllie ve ark., 1980).

Nekrotik hücre son aşamada lizize uğrar, ama apoptotik hücre küçük cisimcikler oluşturarak parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplı olan, farklı miktarlarda nükleus veya diğer hücre içi yapıları içeren cisimciklerdir. Nekrozda plazma membranının bütünlüğünün bozulması sebebi ile hücre içeriğinin dış ortama salınması sonucu inflamasyon uyarılır. Apoptozda ise apoptotik hücre ya da cisimcikler plazma membranları hasarlanmaz, komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilerek inflamasyon oluşmasına neden olmazlar (Wyllie ve ark., 1980).

Apoptozun en önemli özgün yönü DNA'nın internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda parçalanmasıdır. Bu durum yatay jel elektroforezinde apoptoza özgü merdiven görüntüsünün ortaya çıkmasına neden olur. DNA'yı parçalayan bir kalsiyum/magnezyum (Ca/Mg) bağımlı endonükleazdır. Ayrıca, DNase I ve II'de DNA parçalanmasından sorumludur. Hangi parçalayıcı enzimin görev alacağı hücre tipine veya uyarının özelliğine bağlı olarak değişebilir (Wyllie ve ark., 1980). Nekrozda DNA fragmentasyonu gerçekleşir, ancak apoptozda olduğu gibi düzenli nükleozomal kırılma gözlenmez (Wyllie ve ark., 1980).

Kanser ve Apoptoz

Apoptoz ve proliferasyon oranındaki dengenin bozulması kanserli hücre gelişiminde rol oynadığından, apoptoz engellendiği takdirde hücre sayısında artış gözlenir. Apoptoz mekanizmasının uyarılamaması (p53 gen defektleri) ya da mekanizmanın herhangi bir basamağında meydana gelen bir hata (Bcl-2'nin artışı, Fas gen defektleri) tümör gelişiminde rol almaktadır. Ayrıca tümör hücrelerinin doğal immün mekanizmalar ile yok edilememesi de tümör gelişiminde, özellikle de tümör hücrelerinin yayılımında önemli olduğu düşünülmektedir. Tümör hücreleri çoğunlukla sitotoksik T lenfositler ya da NK hücreler tarafından Fas/FasL bağımlı apoptoz yoluyla yok edilirler. Ancak tümör hücreleri aksi bir biçimde immün sistemden kaçabilmektedirler. Malign hücrelerin, konak bağışıklık sisteminden kaçışının ve sitotoksik immün sistem hücrelerinin tümör hücreleri tarafından yok edilmesinin kanser gelişimi ve progresyonu açısından önemi büyüktür. Bu hallerde tümör hücrelerinin, ölüm faktörü üreterek sitotoksik T lenfositlerde ve NK hücrelerde apoptozu başlattığı düşünülmektedir (Erdoğan ve Uzaslan, 2003).

Kansere neden olan virüsler enfekte ettikleri hücrelerde fizyolojik apoptozu engellemektedirler. Bu şekilde davranan iki tip insan papilloma virüsünün (HPV) serviks kanseri oluşturdıkları saptanmıştır. HPV virüslerinden biri E6 adında bir protein üreterek apoptozu başlatan p53'e bağlanır ve apoptozu inaktive eder. Bu durum hücreyi apoptoza karşı daha dirençli kılmaktadır. Bu şekilde çoğalmaya devam eden hücre kanser hücresine dönüşmektedir (Erdoğan ve Uzaslan, 2003).

Tümör hücrelerinin apoptoza direnç geliştirmesinin sebebi olarak sitoplazmik membranda FasL artışı ve Fas reseptör düzeyinde azalma gösterilmektedir. Aynı zamanda Fas gen defektlerinin de tümör hücrelerinin yok edilmesini engelledikleri bilinmektedir (Erdoğan ve Uzaslan, 2003).

Fas-FasL bağımlı apoptoz mekanizması doğru düzenlendiği halde kanser hücrelerinin ortadan kaldırılmasında görev almaktadır. Sistemin istenilen düzeyde çalışmaması halinde kanser gelişimi durdurulamazken, sistemin istenilen düzeyden fazla çalışması durumunda doku hasarı meydana gelmektedir (Erdoğan ve Uzaslan, 2003).

Serviks Kanseri

Serviks kanseri (rahim ağzı), dünya ölçeğinde 45 yaş altı kadınlarda en sık görülen ikinci kanser türü, meme ve akciğer kanserinden sonra kanser neden ile gerçekleşen ölüm vakalarında üçüncü sıradadır. Dünya çapında iki dakikada bir, bir kadın serviks kanserinden hayatını kaybetmektedir (<http-3>).

Serviks kanseri, kadın kanserleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Dünyada yılda 493.000 kişi serviks kanser tanısı almakta ve 274.000 kişi hayatını kaybetmektedir (Parkin ve ark., 2005). Ortalama görülme yaşı 52'dir, ancak 35-39 ve 60-64 yaş aralığında görülme sıklığında belirgin bir artış bulunmaktadır (Jemal ve ark., 2010).

Her yıl Avrupa'da 50 bin kadına, dünyada ise 500 bin kadına serviks kanseri tanısı konmaktadır. Avrupa'da yılda 25 bin, dünyada da 250 bin kadın bu nedenle hayatını yitirmektedir. Serviks kanseri gelişmiş ülkelerde kadın kanserlerinin % 3,6'sını, gelişmemiş ülkelerde ise kadın kanserlerinin % 15'ini oluşturmaktadır (<http-3>).

Türkiye'de en güvenilir kanser istatistiklerinin tutulduğu İzmir ilinde 1993-1994 yıllarında yapılan bir değerlendirmede serviks kanserinin; meme kanseri ve kolorektal kanserlerden sonra üçüncü en sık kanser olduğu, insidansı da 100.000'de 5,4 olarak belirlenmiştir (<http-4>).

Serviks kanserinin nedeni genellikle, insan papillomavirüsüdür (HPV) ve bu virüsün şimdiye kadar tanımlanmış 100 farklı türü olduğu bilinmektedir. Bu türlerin çoğu düşük risk içermektedir. Ancak, yüksek riskli türleri serviks kanserine yol açabilen anormal hücrelerin gelişmesine neden olabilmektedir. Gerçekten serviks kanseri vakalarının çoğuna iki tür HPV (HPV 16 ve 18) sebep olmaktadır. Serviks kanseri olgularının yaklaşık % 70'inde bu iki virüs türü bulunmuştur (<http-5>).

HeLa (İnsan servikal karsinoma) hücreleri

1951 yılında Johns Hopkins Üniversitesinden Dr. George Gey ve eşi Margaret Gey, Henrietta Lacks isimli 31 yaşında serviks kanseri olan Afrika kökenli Amerikalı bir kadının rahminden araştırmak üzere İnsan Papilloma Virüsü 18 (HPV 18) ile transforme edilmiş hücre örnekleri almışlardır (http-7). Araştırılmak üzere alınan örneğin laboratuvar ortamında hayatta tutulması ve çoğaltılması ile birlikte, 1952’de Gey ve arkadaşları tarafından, insan servikal karsinomasından türeyen hücrelerin sürekli serisi şeklinde gözlemlenen HeLa hücreleri ilk insan hücre soyu olarak bilim dünyasına kazandırılmıştır (http-6; Gey ve ark., 1952). Son 60 yıldır, 60.000’in üzerinde yapılan ilgili çalışmalar ile dünyanın dört bir yanında bilimsel araştırmalarda kullanılan HeLa hücreleri, kod ismini, alındıkları kişinin isim ve soy isminin ilk harflerinden almıştır (http-7).

HeLa hücreleri dublikasyon süresi yaklaşık 23 saat olan, bulunduğu kültürdeki diğer hücre hatlarını kolayca kontamine edebilmekte ve diğer hücre hatlarına oranla oldukça hızlı proliferasyon olmaktadır (http-8).

Epitel yapıya sahip olan HeLa hücrelerinin % 98’i küçük telosentrik kromozomlar içermektedir (Florea ve ark., 2005; Macville ve ark., 1999).

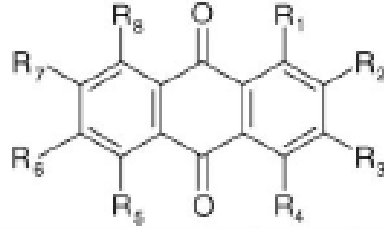
HeLa hücrelerinde p53 düzeyi düşük bulunurken, retinoblastoma baskılayıcı gen (pRB) seviyesi normal olarak tespit edilmiştir (Baldi ve ark., 1996; Scheffner ve ark., 1991).

İnsan papilloma virüs 18 (HPV 18) proteini taşıyan HeLa hücrelerinden yüksek miktarda çözünebilir APO-1/Fas antijeni salgılanmaktadır. Poliovirüsü 1 ve 2, İnsan Poliovirüsü 3, Adenovirüsü Tıp 3, Encephalomyocarditis virüslerine duyarlıdır (Boshart ve ark., 1984; Bruder ve Kovesdi, 1997; Gasowska-Giszczak ve ark., 2000; Macville ve ark., 1999; Scherer ve ark., 1953; Schneider-Gadicke ve ark., 1986).

Sitozolik bir enzim olan açıl fosfataz HeLa hücreleri için güçlü bir apoptoz indükleyicidir (Giannoni ve ark., 2000).

Kemoterapi Tedavisinde Antrakinonlar

Antrakinonlar, $C_{14}H_8O_2$, antrasenin en önemli kinon türevleri olup, düzlemsel trisiklik yapıları DNA iplikçikleri ile etkileşime geçmektedir. Ayrıca kemoterapide yaygın olarak kullanılan bir antrakinon bileşiği olan antrasiklin grubu ilaçlar DNA onarım mekanizmasından sorumlu Topoizomerez II inhibitörüdürler. Sitotoksitelerinin önemli bir kısmı topoizomerez II inhibisyonu ile sağlanır. Aynı zamanda çift iplikli DNA arasında interkalasyona neden olarak DNA ve RNA sentezini etkileyen yapısal değişiklikleri ve reaktif oksijen türleri oluşturabilirler. Bu nedenle bir antrakinon bileşiği olan antrasiklin ile tedavi görmüş kanserli hastalarda kardiyotoksisite göz ardı edilemeyecek kadar fazla görülmekte ve kardiyotoksisite tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması nedeniyle hem ilacın total dozu sınırlandırılmakta hem de terapötik potansiyeli azalmaktadır. Diğer yandan etkin özellikleri nedeniyle antrakinon bileşiklerinin yoğun kullanımı sonucu tedaviye karşı direnç gelişmiştir. Antrakinonlar öncelikle DNA’ya bağlanarak daha sonra topoizomerez II ile bağlandıkları bildirilmiştir. Bu süreç DNA’nın çift iplikçiğinde kırılma, devamında apoptoz ve hücre ölümü ile son bulmakta olduğu bildirilmiştir (Joseph ve ark., 2010).



Şekil 3. Antrakinon Grubunun Genel Yapısı (Deveoğlu ve Karadağ, 2011)

Doğal kaynaklı antrakinon bileşikleri çok sayıda olmasının yanı sıra, şimdiye dek yüzlerce antrakinon bileşiği sentezlenmiştir. Bunlardan bir kısmı oldukça ümit verici anti-kanser özellikler göstermiştir (Ehninger ve ark., 1990).

Kemoterapide en yaygın olarak kullanılan antrakinonlar olan antrasiklinlerin sentetik türevleri üzerinden konuya yaklaşacak olursak, son dönemde kanser tedavisinde antrasiklin içeren kombinasyonların (Luo ve ark., 2005) antrasiklinsiz rejimlere göre daha üstün olduğu bulunmuştur. Bu nedenle antrasiklinli tedaviler meme kanserinde “altın standart” olarak yerini korumaktadır. Antrasiklinlerin 1970’li yıllarda kullanıma girmesi ile meme kanserinin sistemik tedavisine yeni bir perspektif kazandırmıştır. Tek ajan olarak % 40-50 arasında yanıt oranı sağlamış, kombine tedavilerle bu oran % 80’lere ulaşmaktadır (Işıkdogan ve ark., 2003; Perez, 1990).

Antrasiklin kombinasyonlarının hastaneye yatış gereği olmadan ayaktan rahat uygulanabilmesi önemli bir avantajdır. Bazı çalışmalarda antrasiklin içeren kombinasyon kemoterapilerle % 10-20 gibi daha yüksek yanıtlar ve 14-16 aylık medyan sağkalım artışı sağladığı da gösterilmiştir (Işıkdogan ve ark., 2003; Loi ve ark., 2004).

Son dönemde yaygın olarak kullanılan ve sentetik bir antrakinon türevi olan mitoksantronun hepatik veya ilerlemiş ovaryum kanserli hastalarda palyatif tedavide kullanıldığı bildirilmiştir (Coleman ve ark., 1989; Joseph ve ark., 2010). Hepatik karsinomanın intraarteryel ve ovaryum kanserinin intraperitoneal tedavisinde başarılı olduğu görülmüştür (Markman ve ark., 1990; Shepherd ve ark., 1985). Refrakter ve relaps multiply melanomda mitoksantron, deksametazon ve fludarabin kombinasyonu etkin olabilmektedir (Luo ve ark., 2005). Önemli bir sentetik antrakinon olan mitoksantronun, meme kanseri ve ovaryum kanserinde kombine kullanımında olumlu sonuçlar alınmaktadır (Faulds ve ark., 1991; Wojtacki ve ark., 2000).

Antrakinon türevlerinin sitotoksik etkilerine sebep olan redoks bir süreç geçirdiği ve reaktif oksijen türleri oluşturdukları bilinmektedir (Ross ve ark., 1997; Burden ve Osheroff, 1999). Ayrıca, mitoksantronun siklik türevlerinin DNA’ya kovalent olarak bağlandığı ve bu durumun sitotoksiteye sebep olduğu da bildirilmiştir (Rosenberg ve Hittelman, 1983).

Bu türevlerin kullanılmasında kardiyotoksikite en önemli yan etkilerden birisi olup, kendini çoğunlukla konjestif kalp yetmezliği şeklinde göstermektedir (Hannun, 1997; Faulds ve ark., 1997). Daha ucuz ve kemoterapötik olarak etkili bileşiklerin bulunması için pek çok analog denenmiştir ve kinon modifikasyonları ile ilgili

çabalar sürmektedir. Bununla birlikte metal iyonları kullanılarak süperoksit oluşumunun ve kardiyotoksisitenin daha az olduğu antrasiklin bileşikler üretilmiştir (Guin ve ark., 2012). Örneğin, Epirubisin ve doksurubisinin yapısı içerisindeki daunozaminin 4 no'lu karbon atomuna bağlı hidroksil grubunun epimerizasyonu sonucu elde edilmiş semisentetik bir türevi olarak yapısal farkları nedeni ile farmakokinetik ve metabolik değişiklikler göstermektedir. Bu nedenle yan etkilerinde artış olmaksızın doksurubisinden iki kat daha yüksek dozlarda kullanılabilir (Robert, 1993).

Yapılan bir çalışmada en az kardiyotoksik etkiye sahip, antrakınon bileşiği bulunması amacıyla geliştirilen antrakınon türevi mitoksantronun, rat kalp dokusunda ATP miktarı ölçülerek, mitoksantronun dokuda önemli derecede düşüş meydana getirdiği bildirilmiştir (Longueville, 1985; Lawton ve ark., 1990). Mitoksantron ile ATP düşüşü nedeniyle DNA tamir mekanizmalarının enerji üretimi düşüşü gerçekleştiği tespit edilmiştir (http-4).

Kardiyotoksisite dışında antrakınon bileşikleriyle karşılaşılan sorunlardan bir diğeri ise çoklu ilaç direncidir. Özellikle meme kanserinde kombine ilaç kullanımında ilaçlara karşı direnç gelişimi olduğu bildirilmiştir (Ross ve ark., 1997). İnsan Meme Adenokarsinoma Hücre Hattındaki (MCF-7) çoklu ilaç direnci gelişiminin iki transmembran ksenobiyotik protein, ABC transport proteinleri ve P glikoproteini ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada BCRP, ATP bağımlı bir ksenobiyotik transport proteininin de direnç gelişiminde aktif rol oynadığı bildirilmiştir (Ross ve ark., 1997).

Tümör hücrelerinde P-glikoprotein ekspresyonunun artışı sonucunda mitoksantrona direnç olabildiği, bunun yanında topoizomera II aktivitesindeki ya da seviyesindeki değişiklik, DNA onarım mekanizmalarının geliştirilmesi ile mitoksantrona tümör hücre direnci gelişebileceği bildirilmiştir (Fidler ve ark., 1986; Jamison ve ark., 1990). Literatürde bu direnç mekanizmalarının, antrakınon iskeletine farklı yan zincirlerin eklenmesiyle DNA çift ipliği ve topoizomera II ile farklı etkileşimler meydana getirmesiyle engellenebileceği öngörülmektedir (Willette, 1998).

Yapılan bir çalışmada sisplatine dirençli hücrelerin sisplatin-antrakınon kompleksi yeni bileşiklere karşı aynı direnci göstermediği ve bu platin komplekslerin nükleer lokalizasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Gately ve Howell, 1993).

Mitoksantron ile yapılan bir çalışmada tufts ve retro tufts türevlerine kovalent olarak bağlı antrakınon türevlerinin çoklu ilaç direncine çözüm olabileceği önerilmektedir (Dzierzbicka ve ark., 2006).

Bu çalışmada, yeni sentezlenen antrakınon türevlerinin HeLa hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerinin araştırılması ve daha sonra etkili bileşiklerin belirlenerek, bu türevlerin HeLa kanserli hücre apoptozu üzerindeki rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇLER

Hücre Hattı

HeLa (Servikal adenokarsinoma) hücre hattı Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sitotoksik ve apoptotik etkileri incelenecek olan antrakinon türevleri Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Meslek Bilimleri Bölümü Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Yusuf ÖZKAY tarafından sentezlenmiştir.

ADP/ATP seviyesi tespit kiti (Biovision-A.B.D.); Anneksin V-Floresanizosiyanat (FITC)/Propidyum İyodür (PI) apoptoz kiti (BD-A.B.D.); dimetilsülfoksit (DMSO) (Applchem-Almanya); Disodyumbifosfat (Na_2HPO_4) (Merck-A.B.D.); Etil alkol (Necm Kimya-Türkiye), Fetal Bovine Serum (FBS) (Biochrom-Germany); Minimal Essential Medium (MEM) (Gibco-İskoçya), kaspaz-3 ölçüm kiti (BD-U.S.A); MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid)] (Applchem-Almanya); mitoksantron (Sigma, Aldrich-A.B.D.); penisilin-streptomisin solüsyonu (Gibco-İskoçya); potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Merck-A.B.D.) sodyum bikarbonat (NaHCO_3) (Merck-A.B.D.); sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) (Merck-U.S.A); sodyum hidroksit (NaOH) (Merck- Almanya); sodyum klorür (NaCl) (Detsan-Türkiye); sodyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) (Merck-Almanya); paraformaldehid (Sigma, Aldrich-A.B.D.); tripsin (Biochrom-Almanya); TUNEL hücre ölüm tespiti kiti (Roche-Almanya); tween 20 (Sigma-A.B.D.)

Kullanılan Cihazlar

Akım sitometri cihazı (Becton Dickinson FACS Aria II-Kanada), Azot Tankı (Taylor Wharton-Almanya); buzdolabı (Arçelik- Türkiye); karbondioksitli (CO_2 'li) etüv (Hera Cell 240 Thermo Scientific-Almanya); derin dondurucu (-20°C) (Arçelik No Frost-Türkiye); distile su cihazı (Nüve- Türkiye) Enzim Bağlı Immunosorbent Yöntem (ELISA) reader (BioTek ELx800-US); etüv (Nüve-Türkiye); filtre (Sartorius-Almanya); floresan mikroskop (Leica DMI 4000B-Almanya) hassas terazi (Ohaus-İsviçre); inverted mikroskop (Leica-Almanya); laminar kabin (Steril Kabin) (Heal Force-Çin); lüminometre (Perkin Elmer Victor X5-USA); otoklav (ALP-Japonya); santrifüj (Hettich- Almanya); sterilizatör (Nüve FN 500-Türkiye); su banyosu (Nüve BM 302-Türkiye); vorteks (Yellowline-Belçika).

YÖNTEMLER

Hücre Kültürü

HeLa hücreleri % 20 FBS, % 1 penisilin-streptomisin, % 1 L-glutamin içeren MEM besiyerinde, % 5 CO₂'li etüvde 37°C'de kültür ortamında tutulmuştur. Hücreler 1x tripsin-EDTA solüsyonu ile her 3 günde bir 1:3 ile 1:6 oranları arasında alt kültürlerle ayrılarak pasajlanmışlardır.

Antrakinin Türevlerinin ve Mitoksantronun Hazırlanması

Yeni sentezlenen antrakinin türevlerinin 1 mM solüsyonları bidistile suda hazırlanmıştır. Türevlerin farklı konsantrasyon aralıkları ise (5, 10, 15, 20, 30 ve 50 µM) hücre besiyeri kullanılarak hazırlanmıştır. Pozitif kontrol maddesi olarak son dönemde yaygın olarak kullanılan ve sentetik bir antrakinin türevi olan mitoksantron kullanılmıştır. Mitoksantronun bidistile su ile hazırlanan 1 mM stok solüsyonundan hücre besiyeri ile seyreltme işlemi yapılarak, 0.25, 0.5, 1, 5, 10 µM konsantrasyonları hazırlanmıştır.

Mitokondriyal aktivite 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Yl)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromid (MTT) Sitotoksite Testi

Antrakinin türevlerinin ve mitoksantronun sitotoksik etkilerinin araştırılması için 8×10^5 hücre/ml de olacak şekilde hazırlanan HeLa hücre süspansiyonundan, 100 µl alınarak 96 kuyulu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğuna aktarılmıştır. Daha sonra, hücrelere 5, 10, 15, 20, 30 veya 50 µM konsantrasyonlarında antrakinin türevleri ya da 0.25, 0.5, 1, 5, 10 µM konsantrasyonlarında mitoksantron eklenerek 37°C'de 24 ve 48 saat süre ile inkübe edilmişlerdir. Bu sürelerin sonunda, her bir kuyucuğa 20 µl MTT boyası (stok konsantrasyonu 5 mg/ml) ilave edilerek hücreler 37°C'de 2 saat daha inkübe edilmişlerdir. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmış ve her bir kuyuya 200 µl DMSO eklenerek 10 dakika karıştırıcıda bekletilmiştir. Renk değişimi, ELx800 Bio-Tek plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyu ile ölçülmüştür. Maddeler ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edilmiştir. Deney sonuçları pozitif kontrole göre değerlendirilmiştir. Deneyler her seferde üç bağımsız kuyucukta gerçekleştirilmekle birlikte iki kez tekrarlanmıştır.

Anneksin V-FITC/PI Yöntemi

Hücreler farklı zaman aralıklarında (6, 12 ve 24 saat) etkili antrakinin türevleri ile ya da mitoksantronun farklı konsantrasyonları ile 37°C'de, % 5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrasında hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkanmış ve sonra 1×10^6 hücre/ml sayılarak bağlanma solüsyonu ile dilüe edilmiştir. Hücrelere 5 µl Anneksin V-FITC ve 5 µl PI ilave edilerek hücreler oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 15 dakika inkübasyona tabi tutulmuştur. 400 µl hücre çözeltisi akım sitometri tüplerine aktarıldıktan bir saat içinde analiz edilmiştir. Erken ve geç apoptotik hücre miktarı pozitif kontrole göre hesaplanmıştır.

Sitoplazmik ADP/ATP Seviyesinin Belirlenmesi

1×10^5 hücre/ml de olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonundan 100 μ l alınarak 96 kuyulu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğuna aktarılmıştır. Hücreler farklı konsantrasyon aralığındaki (3-10 μ M) antrakınon türevleri ya da mitoksantron (2.6-4.4 μ M) ile 6, 12 veya 24 saat 37°C’de inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklardaki hücre kültürü besiyeri uzaklaştırılmış ve 50 μ l nükleotid serbestleştirici solüsyon eklenerek 5 dakika oda ısısında yavaşça çalkalanarak inkübe edilmiştir. ATP ölçümü için örnekler lüminometre plakalarına transfer edilerek bir dakika sonra örnekler Perkin Elmer Victor X5 model lüminometrede okunmuştur (Veri A). ADP ölçümü için ise örnekler 10 dakika İnkübasyondan sonra okunmuştur (Veri B). Daha sonra 1 μ l ADP dönüştürücü enzim eklendikten sonra tekrar hücreler cihaza alınarak okunma işlemine tabi tutulmuştur (Veri C). ADP/ATP oranı, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{ADP/ATP} = \text{Veri C} - \text{Veri B/Veri A}$$

Deney birbirinden bağımsız olarak 8 kez yapılmış, elde edilen sonuç verilerinin ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi

Hücreler farklı konsantrasyon aralığındaki (3-10 μ M) antrakınon türevleri ya da mitoksantron (2.6-4.4 μ M) ile 6, 12 veya 24 saat 37°C’de inkübasyona tabi tutulmuştur. Kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesinde (BD Pharmingen PE) Aktif Kaspaz-3 Apoptoz Kit kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kültür tüpüne alınan hücreler 3 dakika 1200 rpm hızında santrifüj edilmiştir. Üzerine 3 ml soğuk Fosfat Tuzlu Tampon (PBS) ilave edilerek 3 dakika 1200 rpm’de santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Daha sonra 500 μ l Cytofix/Cytoperm içerisinde süspansiyon haline getirilmiştir ve Thoma lamında hücre sayımı yapılmıştır. Hücre süspansiyonu 500 μ l solüsyonun içerisinde 1×10^6 hücre olacak şekilde dilüe edilmiştir. Örneklerden 500 μ l alınarak farklı kültür tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra hücrelere 500 μ l Cytofix/Cytoperm eklenerek 20 dakika buzda inkübasyona tabi tutulmuştur. 3 dakika 1200 rpm’de santrifüj işleminden sonra, süpernatant atılarak, 500 μ l Perm/Wash buffer eklenmiştir. Yıkama işleminden sonra örnekler daha önce hazırlanan 100 μ l Perm/Wash ve 20 μ l antibody eklenip 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Her bir örneğe 500 μ l Perm/Wash eklenerek akım sitometrisinde okuma gerçekleştirilmiştir.

TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) Yöntemi

Hücreler farklı konsantrasyon aralığındaki (3-10 μ M) antrakınon türevleri ya da mitoksantron (2.6-4.4 μ M) ile 6, 12 veya 24 saat 37°C’de inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon süresi sonunda hücreler % 2’lik paraformaldehit içeren PBS ile 15 dakika 15-25 °C’de fiksasyona tabi tutulmuştur. Fiksasyon işlemi sonrasında PBS ile yıkanan hücreler permeabilizasyon için 2 dakika buzda % 0.1 polioksietilen 20 (Tween 20) ve % 0.01 sodyum sitrat ile inkübe edilmişlerdir. Daha sonra hücrelere 50 μ l TUNEL reaksiyon karışımı eklenerek 37°C’de karanlık ortamda 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun bitiminde, floresan işaretli DNA kırıkları floresan mikroskopunda 40x büyütmede incelenmiş ve

fotoğraflanmıştır. Görüntülerin yatay eksen ölçeği 164 µm uzunluğundadır. **Çizelge 9**'un oluşturulmasında kullanılan apoptotik indeks verileri floresan görüntülerde, birim alanda sayılan apoptotik hücre sayısının, aynı alanda sayılan toplam hücre sayısına oranının yüzde değer elde edecek şekilde hesaplanması ile bulunmuştur.

VERİLERİN İSTATİKSEL ANALİZİ

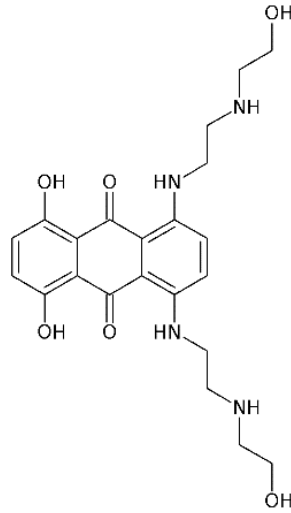
İstatiksel değerlendirmeler için Graphpad 6 programı kullanılmıştır. Elde edilen verilerin iki yönlü ANOVA ile tekrarlı ve çoklu karşılaştırmaları uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

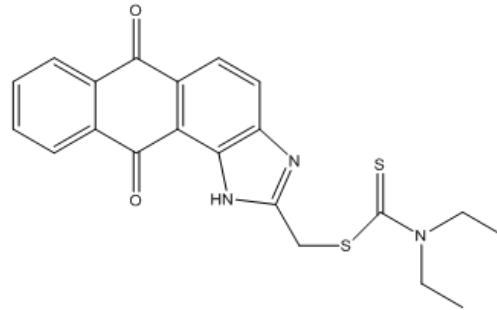
Antrakinon Türevlerinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

Farklı konsantrasyonlardaki yeni sentezlenen antrakinon türevlerinin (Şekil 4) ve pozitif kontrol maddesi olan mitoksantronun HeLa hücre canlılığı üzerine etkileri zamana bağlı olarak MTT deneyi ile belirlenmiştir.

Mitoksantron

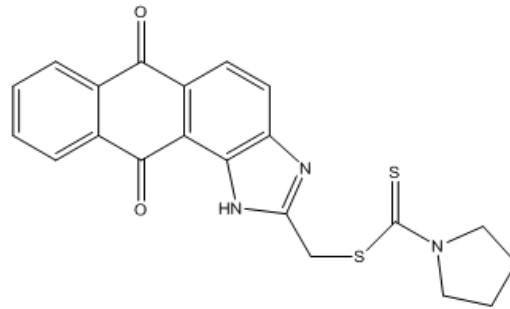


Ant-1



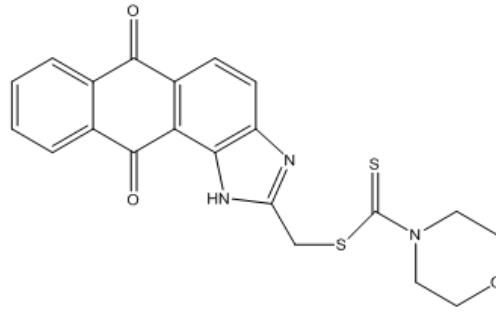
Chemical Formula: $C_{21}H_{19}N_3O_2S_2$
Exact Mass: 409,09

Ant-2



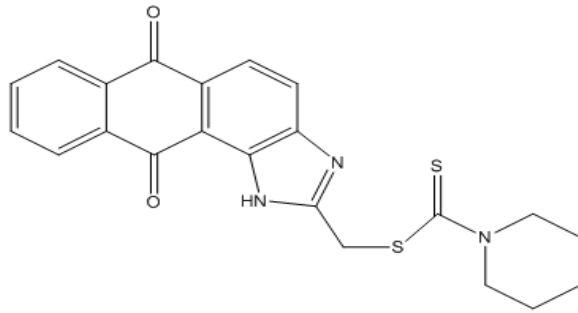
Chemical Formula: $C_{21}H_{17}N_3O_2S_2$
Exact Mass: 407,08

Ant-3



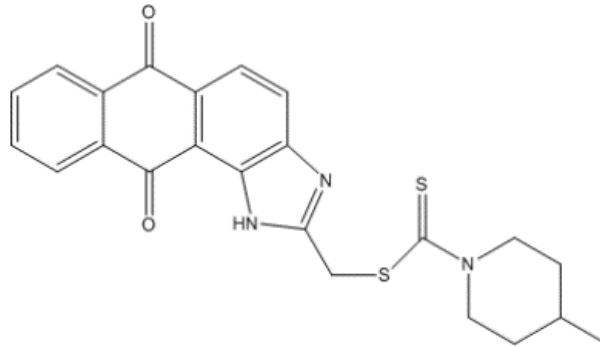
Chemical Formula: $C_{21}H_{17}N_3O_3S_2$
Exact Mass: 423,07

Ant-4



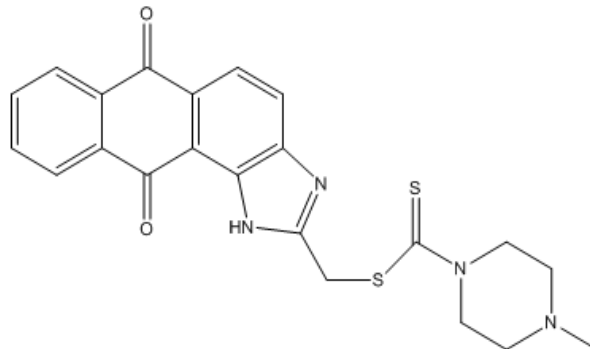
Chemical Formula: $C_{22}H_{19}N_3O_2S_2$
Exact Mass: 421,09

Ant-5



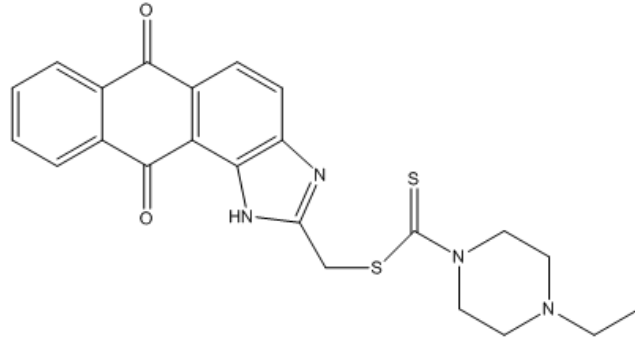
Chemical Formula: $C_{23}H_{21}N_3O_2S_2$
Exact Mass: 435,11

Ant-6



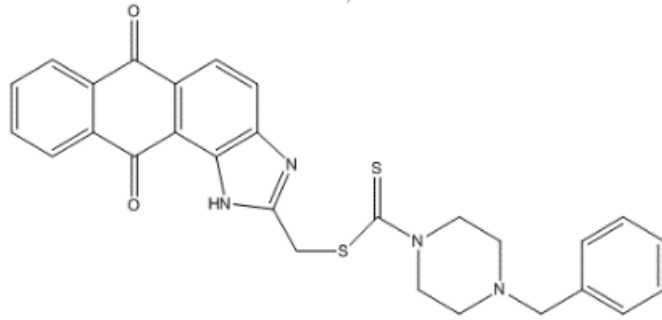
Chemical Formula: $C_{22}H_{20}N_4O_2S_2$
Exact Mass: 436,10

Ant-7



Chemical Formula: $C_{23}H_{22}N_4O_2S_2$
Exact Mass: 450,12

Ant-8

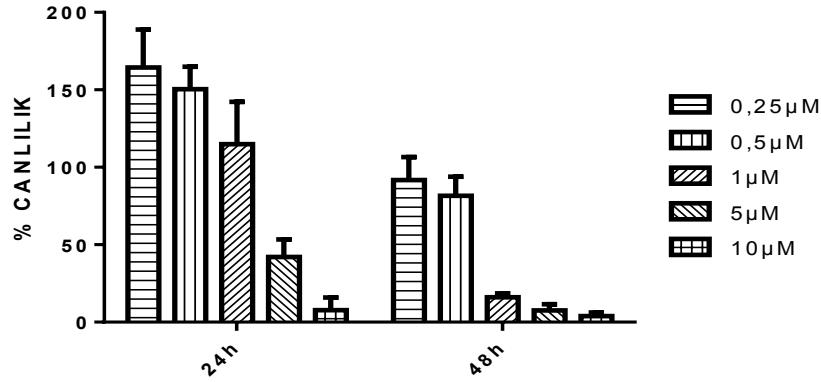


Chemical Formula: $C_{28}H_{24}N_4O_2S_2$
Exact Mass: 512,13

Şekil 4. Mitoksantron ve Antrakinon Türevlerinin Kimyasal Yapı Formülleri

Elde edilen sonuçlar, 0.5 μ M mitoksantron ile muamele edilen HeLa hücrelerinin, 24 saatte % 151.35 canlılık gösterdiğini inkübasyon süresinin 48 saatte uzatılması ile hücre canlılığının % 81.62'ye düştüğünü göstermiştir (**Şekil 5**). Mitoksantronun konsantrasyonunun 10 kat artırılması ile (5 μ M) HeLa hücre canlılığı maddesiz kontrol hücrelerine göre zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde inhibe edilmiştir ($p < 0.0001$) (**Şekil 5**). Mitoksantron için maksimum yarı inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değeri 4,4 μ M, % 80 hücre canlılığının tespit edildiği maksimum % 20 inhibitör konsantrasyon (IC_{80}) değeri ise 2,6 μ M olarak belirlenmiştir (**Çizelge 1**).

MİTOKSANTRON



Şekil 5. Mitoksantronun Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlılık Oranı. Kontrol grubunun hücre çoğalma oranı % 100 olarak kabul edilmiştir. Her bir veri noktası 8 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir

Dimetilditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 1) bileşiğinin 5 μM dozu 24 saat inkübasyonu süresi HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine anlamlı bir etki oluşturmamıştır. Ancak 5 μM dozda inkübasyon süresi 48 saatte uzatıldığında zamana bağlı olarak, Ant 1 türevi hücre canlılığı % 60 olarak bulunmuştur (**Şekil 6**). Bununla birlikte, 10-50 μM yüksek doz uygulaması her iki inkübasyon süresinde de HeLa hücre canlılığının doza bağlı olarak % 60 ile % 20 oranında bulunmuştur (**Şekil 6**). Ant 1 için IC₅₀ 18 μM olarak, IC₈₀ değeri ise 7 μM olarak belirlenmiştir (**Çizelge 1**).

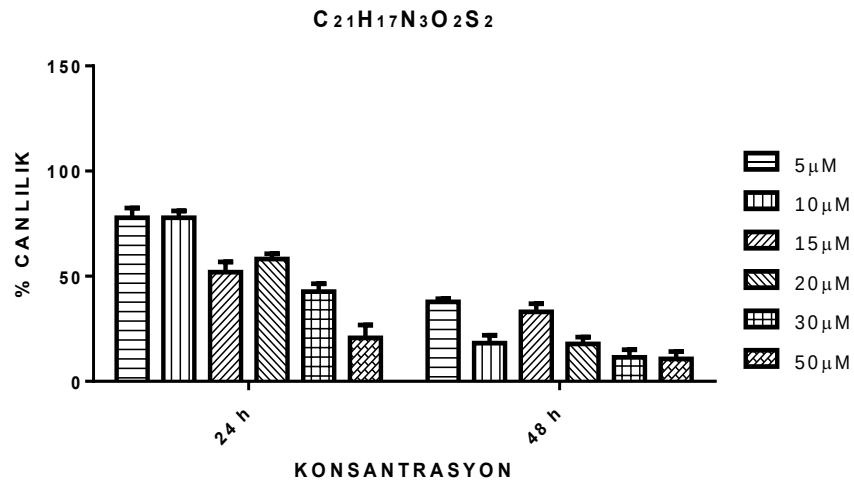
ANT 1



Şekil 6. Ant 1 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlılık Oranı. Kontrol grubunun hücre çoğalma oranı % 100 olarak kabul edilmiştir. Her bir veri noktası 8 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir

Pirolidin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 2) bileşiğinin 5, 10 15, 20, 30 ve 50 μM ile 24 ve 48 saat inkübe edilen HeLa hücrelerinin canlılık oranları zamana ve doza bağlı olarak azalış göstermiştir (**Şekil 7**). 10 μM Ant 2 ile muamele edilen HeLa hücre canlılığı % 77.79 olarak bulunurken, 15 μM Ant 2 ile 24 saat inkübe edilen HeLa hücre canlılığının % 51.77 olduğu tespit edilmiştir. Ant 2 türevinin düşük dozu Ant 1 türevine göre daha sitotoksik etki göstermiştir. Bu sonuç, Ant 2'ye eklenen pirolidin substitüentinin sitotoksite üzerinde daha etkili olduğunu göstermektedir. Ant 2 için IC_{50} 25 μM olarak, IC_{80} değeri ise 8 μM olarak belirlenmiştir (**Çizelge 1**).

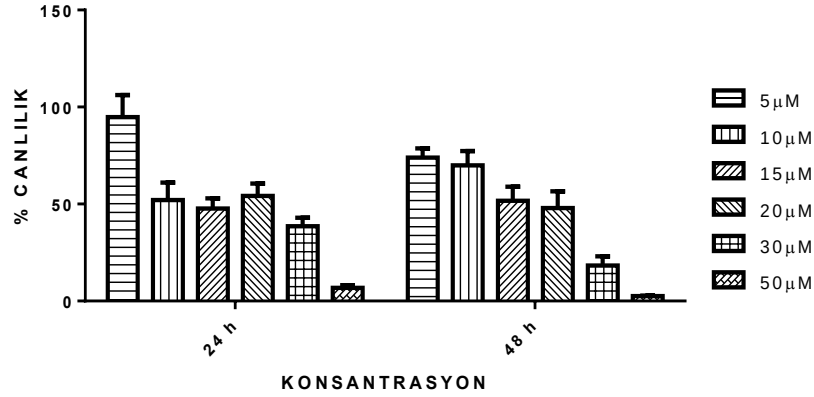
ANT 2



Şekil 7. Ant 2 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlılık Oranı. Kontrol grubunun hücre çoğalma oranı % 100 olarak kabul edilmiştir. Her bir veri noktası 8 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir

Morfolin-4-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 3) bileşiğinin uygulanan tüm konsantrasyonları (5, 15, 20, 30, 50 μM) ile 24 ve 48 saat inkübe edilen HeLa hücrelerinin canlılık oranları zamana ve doza bağlı olarak azalış göstermiştir (**Şekil 8**). Bu türevin IC_{50} değeri diğer türevlere (Ant 1, 2, 5, 7, 8) oranla daha düşük bulunmuştur, yani HeLa hücre canlılığı üzerine düşük dozda etkili bir türev olduğu tespit edilmiştir. Ant 3 için IC_{50} 10 μM olarak, IC_{80} değeri ise 6 μM olarak belirlenmiştir (**Çizelge 1**).

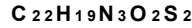
ANT 3



Şekil 8. Ant 3 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlilik Oranı. Kontrol grubunun hücre çoğalma oranı % 100 olarak kabul edilmiştir. Her bir veri noktası 8 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir

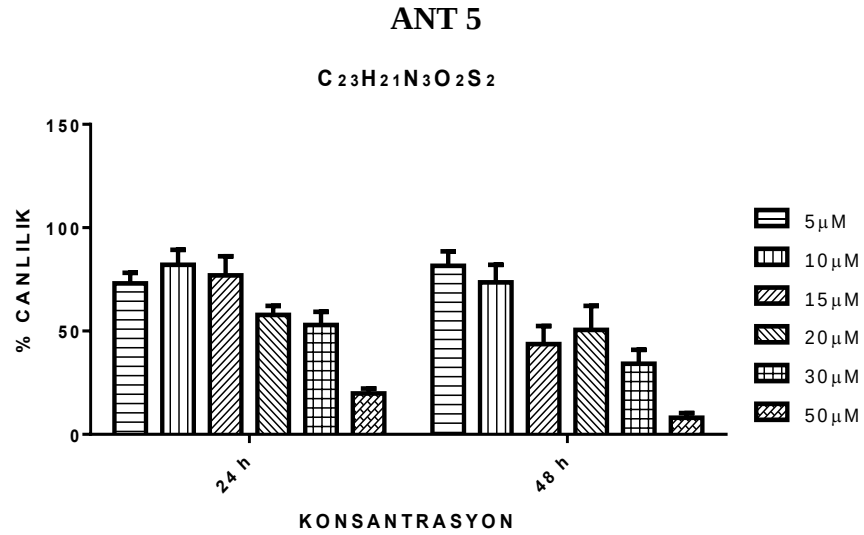
Piperidin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 4) bileşiğinin, HeLa hücreleri üzerinde, doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkide artış göstermiştir (**Şekil 9**). Bu türevin IC_{50} değeri 8 μ M ve % 80 hücre canlılığının tespit edildiği konsantrasyon değeri ise 5 μ M olarak bulunmuştur (**Çizelge 1**). Bu türev diğer antrakinon türevlerine oranla (Ant 1, 2, 5, 7, 8) daha düşük dozlarda etki göstermiştir. Ant 3 türevine benzer şekilde HeLa hücrelerinin canlılığı üzerinde düşük dozda etkili bir türev olduğu tespit edilmiştir.

ANT 4



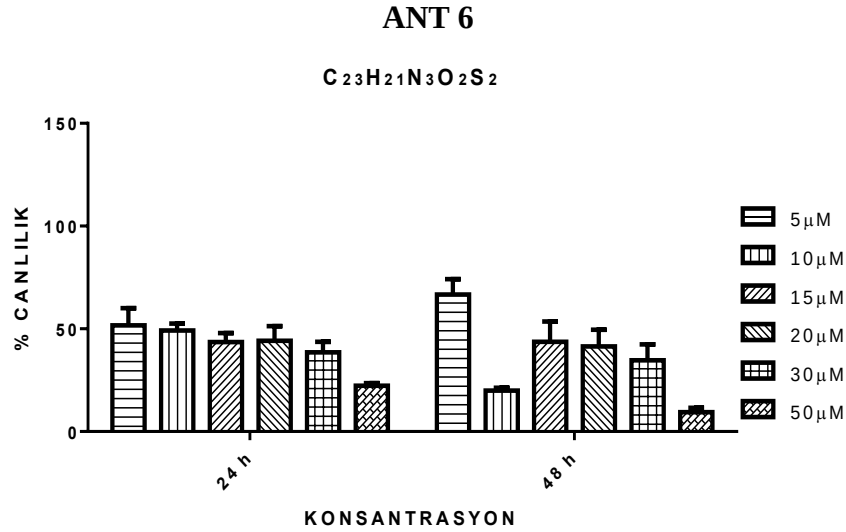
Şekil 9. Ant 4 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlilik Oranı. Kontrol grubunun hücre çoğalma oranı % 100 olarak kabul edilmiştir. Her bir veri noktası 8 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir

4-Metilpiperidin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 5) bileşiğinin HeLa hücreleri canlılığında zamana ve doza bağlı olarak düşüş göstermiştir. 24 saat, 20 μ M ve 30 μ M Ant 5 ile inkübe edilen hücrelerin canlılıkları sırasıyla % 57.84 ve % 52.94 olarak bulunmuştur. Konsantrasyonun 50 μ M çıkarılması ile canlılık % 19.80'e kadar gerilemiştir (Şekil 10). Ant 5 için IC_{50} 34 μ M olarak, IC_{80} değeri ise 8 μ M olarak belirlenmiştir (Çizelge 1).



Şekil 10. Ant 5 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlılık Oranı. Kontrol grubunun hücre çoğalma oranı % 100 olarak kabul edilmiştir. Her bir veri noktası 8 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir

4-Metilpiperazin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 6) bileşiğinin 5 μ M dozu % 51.65 canlılık gösterirken, 10 μ M % 48.28, 15 μ M % 43.67, 20 μ M % 44.20, 30 μ M % 38.66 ve 50 μ M % 22.27 hücre canlılık oranına 24 saat inkübasyon süresi sonrasında ulaşılmıştır. İnkübasyon süresinin 48 saate çıkarılması ile etkili dozun 5 μ M yerine 10 μ M olduğu bulunmuştur. Zamana bağlı olarak diğer Ant 6 konsantrasyonları ile inkübe edilen HeLa hücreleri 24 saat sonuçları ile benzer canlılık oranları göstermiştir (Şekil 11). Bu türevin IC_{50} değeri Ant 4 ve Ant 3 türevlerine benzer şekilde diğer türevlere oranla daha düşük bulunmuştur, yani HeLa hücre canlılığı üzerine düşük dozda etkili bir türev olduğu tespit edilmiştir. Ant 6 için IC_{50} 8 μ M olarak, IC_{80} değeri ise 3 μ M olarak belirlenmiştir (Çizelge 1).

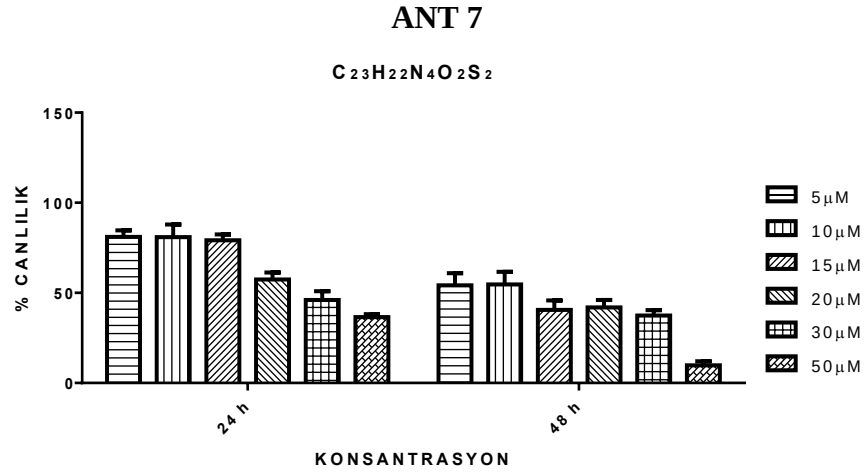


Şekil 11. Ant 6 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlilik Oranı. Kontrol grubunun hücre çoğalma oranı % 100 olarak kabul edilmiştir. Her bir veri noktası 8 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir

4-Etilpiperazin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 7) bileşiğinin 5, 10 ve 15 µM konsantrasyonları HeLa hücre canlılığı üzerine diğer konsantrasyonlara göre daha az etkili bulunmuştur. 5µM Ant 7 ile 24 saat inkübasyona tabi tutulan HeLa hücrelerinin canlılık oranı % 81.04, 10 µM’da % 80.93 ve 15 µM’da ise % 79.04 olarak tespit edilmiştir. Ant 7 türevinin daha yüksek konsantrasyonları ise doza bağlı olarak hücre canlılığını baskılamıştır (20 µM; % 57.40, 30 µM; % 46.07, 50 µM; % 36.51) (**Şekil 12**).

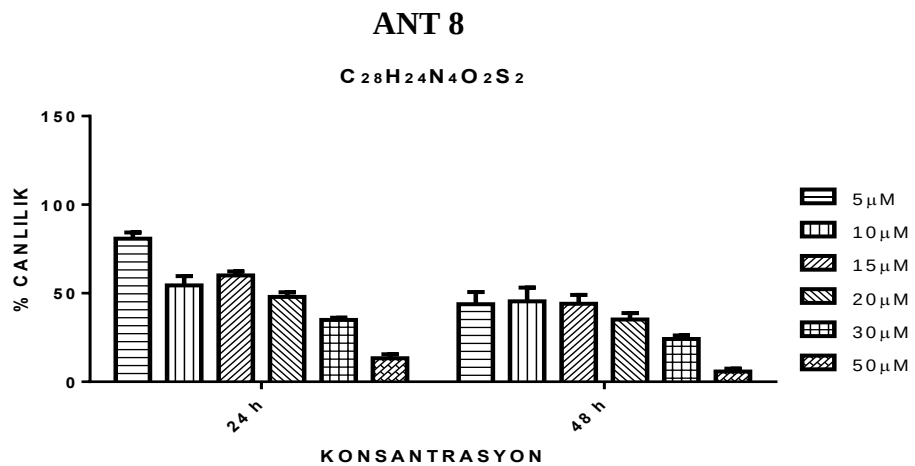
İnkübasyon süresinin 48 saate uzatılması, doza bağlı olarak HeLa hücre canlılığı baskılanmıştır. 5 µM Ant 7 ile 48 saat inkübe edilen HeLa hücre canlılığı % 54.14 iken bu konsantrasyonun iki katına çıkarılması ile canlılık değişmezken, on katına çıkarılması ile de canlılık % 9.76 olarak tespit edilmiştir.

Zamana bağlı olarak Ant 7 türevinin 50 µM dozu haricinde canlılık üzerine etkisinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (**Şekil 12**). Ant 7 için IC₅₀ 25 µM olarak, IC₈₀ değeri ise 6 µM olarak belirlenmiştir (**Çizelge 1**).



Şekil 12. Ant 7 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlilik Oranı. Kontrol grubunun hücre çoğalma oranı % 100 olarak kabul edilmiştir. Her bir veri noktası 8 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir

4-Benzilpiperazin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 8) bileşiği ile 24 saat inkübe edilen HeLa hücre canlılığının doza bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir. 5 μM Ant 8 ile muamele sonrasında HeLa hücre canlılığı % 80.79 bulunurken, konsantrasyonun iki katına çıkarılması ile canlılık % 54.45'e düşmüş ve konsantrasyonun beş kat artırılması ile de canlılık % 13.32'e kadar azalmıştır. HeLa hücrelerinin türev ile 48 saat inkübasyonu sonrasında ise 10 μM konsantrasyonda % 45.66, 15 μM konsantrasyonda % 43.46, 20 μM konsantrasyonda % 35.03, 30 μM konsantrasyonda % 24.17 ve 50 μM konsantrasyonda ise % 5.87 hücre canlılığına neden olmuştur (Şekil 13). Ant 8 için IC₅₀ 18 μM olarak, IC₈₀ değeri ise 6 μM olarak belirlenmiştir (Çizelge 1).



Şekil 13. Ant 8 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen % Canlilik Oranı. Kontrol grubunun hücre çoğalma oranı % 100 olarak kabul edilmiştir. Her bir veri noktası 8 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir

MTT deneyi sonucunda türevlere ait IC₅₀ değerleri sırasıyla şöyledir; Mitoksantron IC₅₀ 4,4 µM, Ant 1 IC₅₀ 18 µM, Ant 2 IC₅₀ 25 µM, Ant 3 IC₅₀ 10 µM, Ant 4 IC₅₀ 8 µM, Ant 5 IC₅₀ 34 µM, Ant 6 IC₅₀ 8 µM, Ant 7 IC₅₀ 25 µM, Ant 8 IC₅₀ 18 µM (**Çizelge 1**). Antrakinon türevlerinin kimyasal yapıları karşılaştırıldığında benzer substitüe gruplara sahip türevlerin IC₅₀ değerleri arasında paralellik görülmektedir. Türevler içerisinde Ant 3, Ant 4 ve Ant 6 bu duruma örnek teşkil etmektedirler. Ancak Ant 1, Ant 2, Ant 5, Ant 7 ve Ant 8 türevleri genel olarak diğer üç türeve oranla daha yüksek dozda sitotoksik etki göstermişlerdir. Aliabadia (2004) tarafından HeLa hücreleri kullanılarak yapılan sitotoksikite çalışması sonucunda, yeni sentezlenen 1, 4-diamino-anthrakinon türevlerinin IC₅₀ değeri 25,2 µM ve 20,3 µM olarak bulunmuştur. Bu çalışmada etkileri araştırılan sekiz antrakinon türevinden beşinin (Ant 1, 3, 4, 6, 8) HeLa hücreleri üzerinde literatüre oranla daha düşük dozda etkili olduğu saptanmıştır.

Çizelge 1. Mitoksantron ve Antrakinon Türevlerinin % 50, % 60 ve % 80 HeLa Hücre Canlılık Oranına Neden Oldukları Konsantrasyon Aralıkları. Bileşiklere ait IC₅₀ ve IC₈₀ değerleri 24 saatlik inkübasyon sonrasında elde edilen verilere göre belirlenmiştir

Uygulanan Bileşikler	Canlılık Yüzdeleri (%)		
	%50	%60	%80
Mitoksantron	4,4 µM	3,7 µM	2,6 µM
Ant 1	18 µM	10 µM	7 µM
Ant 2	25 µM	13 µM	8 µM
Ant 3	10 µM	9 µM	6 µM
Ant 4	8 µM	7 µM	5 µM
Ant 5	34 µM	19 µM	8 µM
Ant 6	8 µM	4 µM	3 µM
Ant 7	25 µM	19 µM	6 µM
Ant 8	18 µM	8 µM	6 µM

Tez kapsamında mitoksantronun 5µM konsantrasyonu ile 24 saat inkübe edilen HeLa hücrelerinin canlılık oranı % 42.06 olarak bulunmuştur ve bu oran inkübasyon süresinin uzatılması ile anlamlı bir şekilde azalış göstermiştir. Benzer şekilde, Kumar ve arkadaşlarının (2011) yaptıkları bir çalışmada 59.36 nM mitoksantronun 24 saat inkübasyon sonrasında HeLa hücrelerinin canlılığında % 50 düşüşe neden olduğu bulunmuştur.

Kinon çekirdeği taşıyan bileşiklerle yapılan öncül çalışmalar, bu bileşiklerin antitümör ve sitotoksik etkilere sahip olabileceğini göstermektedir (Iwamoto ve ark., 1974).

Türevlerin tamamında substitüe düzeyinde sitotoksik etkilerine bakıldığında 1H-Anthra[1,2-d]imidazol anayapısına 2. konumdan substitüe edilmiş çeşitli sekonder amin ditiyokarbamat tuzlarının HeLa hücre

canlılığı üzerine önemli etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir. Ant 1, Ant 2, Ant 5, Ant 7 ve Ant 8 maddelerinin 24 ve 48 saat inkübasyon sonrasında HeLa hücre canlılığını diğer antrakinon türevlerine göre daha yüksek dozlarda inhibe etmiştir (**Çizelge 1**). Bileşiklerden, morfolin, piperidin, 4-metilpiperazin taşıyan Ant 3, Ant 4 ve Ant 6 kodlu türevlerin daha düşük dozlarda etkili türevler olduğu saptanmıştır.

Yapılan literatür taramasında, antrakinon türevlerinin süstitüe düzeyinde etkilerine bakıldığında 1H-Anthra[1,2-d]imidazol anayapısına 2. konumdan süstitüe edilmiş çeşitli sekonder amin ditiyokarbamat tuzlarının HeLa hücre canlılığı üzerine etkilerinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, ovaryum kanser hücrelerinin canlılığı üzerine yapılan deneysel çalışmada, metilpiperazin süstitüe edilmiş antrakinon türevlerinin en etkili bileşikler olduğu gösterilmiştir (Chen ve ark., 2013). Ayrıca, tiyosemikarbazon süstitüe edilmiş yeni sentezlenen antrakinon türevlerinin HeLa hücre canlılığı üzerine etkisinin araştırıldığı bir deneysel çalışmada, en etkili bileşiğin IC₅₀ dozunun, Ant 3, Ant 4 ve Ant 6 türevlerine benzer şekilde 7.66 ± 2.44 olduğu bildirilmiştir (Markoviç ve ark., 2013).

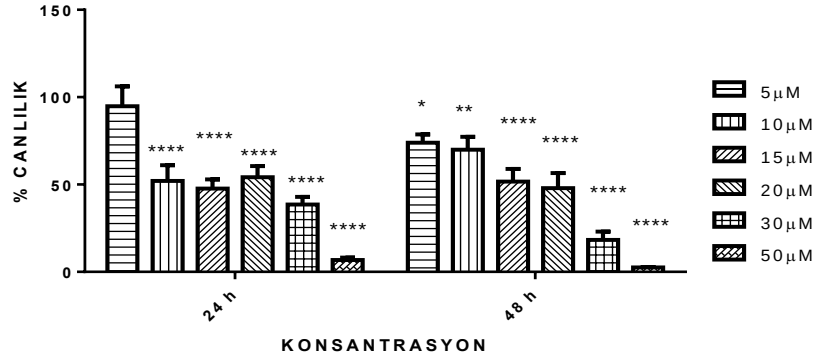
Elde edilen sitotoksite sonuçları, aktivitenin 6 üyeli siklik sekonder amin varlığında arttığına işaret etmektedir. Ayrıca bu siklik aminler 4. konumlarında metil grubundan daha büyük süstitüent taşıdıklarında (Ant 7 ve Ant 8) sitotoksitede azalma göze çarpmaktadır.

Yapılan bir çalışmada yeni sentezlenen antrakinonların metil ve dimetilamino türevlerinin, diğer türevlere oranla daha yüksek anti-proliferatif etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Shchekotikhin ve ark., 2006).

MTT deneyi sonrasında ölçülen absorbans değerleri Graphpad 6 programında iki yönlü ANOVA yöntemi ile tekrarlı ve çoklu karşılaştırma ile analiz edilmiştir. Anlamlılık değerleri; $p > 0.05$ fark yok, $p < 0.05^*$ fark var, $p < 0.01^{**}$ önemli derecede fark var, $p < 0.001^{***}$, $p < 0.0001^{****}$ çok önemli derecede fark var olarak değerlendirilmiştir. **Şekil 14-17'**de istatistiksel değerlendirme sonuçları verilmiştir.

İstatistiksel değerlendirme sonucunda, Ant 3 türevinin 5 μM hariç tüm konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edilen HeLa hücrelerinin canlılık oranları maddesiz kontrol hücrelerinin canlılık oranına (% 100) göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edilmiştir (10, 15, 20, 30, 50 μM için $p < 0.0001$). İnkübasyon süresinin 48 saate uzatılması ile Ant 3'ün uygulanan tüm konsantrasyonları istatistiksel olarak HeLa hücrelerinin canlılığı üzerinde anlamlı bir düşüşe neden olmuştur. 5 μM ile inkübe edilen HeLa hücrelerinin canlılık oranı % 73.92 ($p < 0.05$), 10 μM 'da % 69.95 ($p < 0.01$), 15 μM 'da % 51.67 ($p < 0.0001$), 20 μM 'da % 47.91 ($p < 0.0001$), 30 μM 'da % 18.36 ($p < 0.0001$) ve 50 μM 'da % 2.5 ($p < 0.0001$) olarak bulunmuştur (**Şekil 14**).

ANT 3



Şekil 14. Ant 3 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen Yüzde Canlilik Oranlarının İstatistiksel Analizi

Ant 4 türevinin 5 μM dozu haricinde uygulanan tüm dozları 24 saat inkübasyon sonrasında HeLa hücre canlılığında istatistiksel olarak önemli bir azalışa neden olmuştur (Şekil 15). 10, 15, 20, 30 ve 50 μM konsantrasyonlarında HeLa hücre canlılığı sırasıyla % 43.19, % 34.48, % 30.89, % 24.45 ve % 16.33 olarak bulunmuştur. Bu % canlılık oranlarındaki konsantrasyona bağlı azalış maddesiz kontrol hücre canlılık oranına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (10 μM; $p < 0.001$, 15 μM; $p < 0.001$, 20 μM; $p < 0.0001$, 30 μM; $p < 0.0001$, 50 μM; $p < 0.0001$).

İnkübasyon süresinin iki katına çıkarılması ile hücre canlılık oranlarında 5 ve 10 μM hariç Ant 4 türevinin diğer konsantrasyonları ile inkübasyon sonrasında kontrol hücrelerine göre anlamlı bir azalış olmuştur (15 μM; $p < 0.0001$, 20 μM; $p < 0.0001$, 30 μM; $p < 0.0001$, 50 μM; $p < 0.0001$).

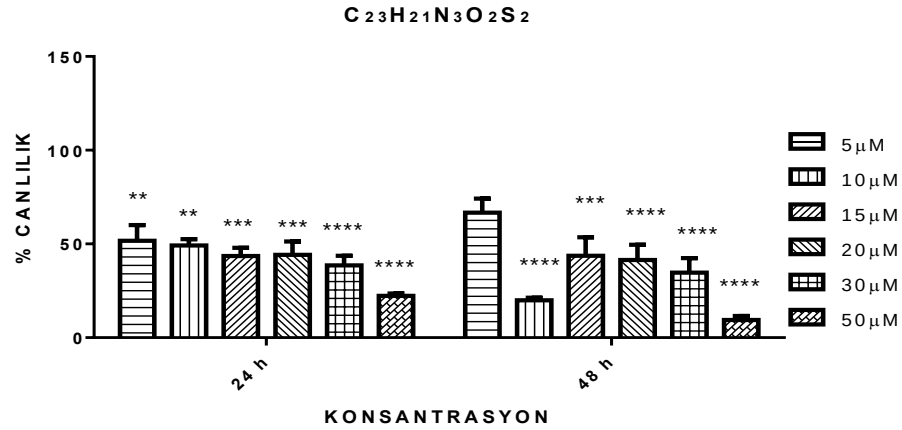
ANT 4



Şekil 15. Ant 4 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen Yüzde Canlilik Oranlarının İstatistiksel Analizi

24 saat inkübasyon süresinde Ant 6 türevinin uygulanan tüm konsantrasyonları, HeLa hücrelerinin canlılık oranı üzerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış göstermiştir (5 μ M; $p<0.01$, 10 μ M; $p<0.01$, 15 μ M; $p<0.001$, 20 μ M; $p<0.0001$, 30 μ M; $p<0.0001$, 50 μ M; $p<0.0001$). Ant 6 türevi ile 24 saat inkübasyon sonrasında elde edilen sonuçlara göre 50 μ M Ant 6 hücre canlılığının % 22.27'ye kadar düşmesine neden olmuştur ve bu değer istatistiksel olarak kontrole göre önemli derecede anlamlıdır ($p<0.0001$) (**Şekil 16**). Ayrıca, inkübasyon süresi 48 saat olduğunda da hücre canlılığı üzerine en etkili Ant 6 dozunun 50 μ M olduğu görülmüştür, bu dozdaki hücre canlılığının % 9.44 olduğu ve bu uygulama ile kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede ($p<0.0001$) anlamlılık saptanmıştır. Sonuçlar **Şekil 16**'da gösterilmiştir.

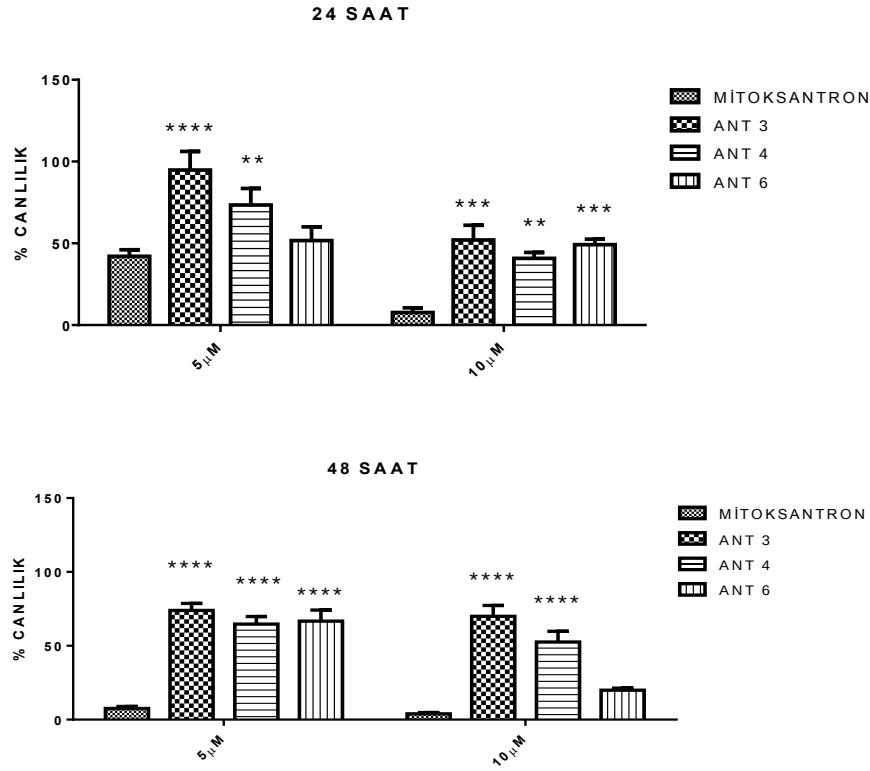
ANT 6



Şekil 16. Ant 6 Türevinin Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen Yüzde Canlılık Oranlarının İstatistiksel Analizi

Antrakınon türevlerinin HeLa hücre canlılığı üzerine etkilerinin mitoksantrona göre değerlendirildiğinde, 5 μ M mitoksantronun 24 saat inkübasyonu sonrasında % 42.06 canlılık gösterirken buna göre en etkili türevin % 51.65 canlılık oranı ile Ant 6 olduğu tespit edilmiştir. 5 μ M Ant 3 veya Ant 4 uygulamalarında canlılık oranları sırasıyla % 94.16 ve % 73.48 oranlarında bulunmuştur. Bundan dolayı, bu türevlerin hücre canlılığı üzerinde mitoksantrondan daha düşük düzeyde etki gösterdikleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (**Şekil 17**). Konsantrasyonun iki katına çıkarılması ile madde uygulanan HeLa hücre canlılığında anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. 10 μ M mitoksantron uygulanan HeLa hücre canlılığı % 7.69, 10 μ M Ant 3 uygulanan HeLa hücre canlılığı % 51.84, 10 μ M Ant 4 uygulanan HeLa hücre canlılığı % 43.29 olarak bulunmuştur. Ancak konsantrasyon artışı ile Ant 6'nın hücre canlılık oranı % 48.28 olarak bulunmuştur.

Dozun iki kat arttırılması ile % 22.10 hücre canlılık oranı ile Ant 6'nın mitoksantronun etkisine en yakın etkili bileşik olduğu görülmüştür. Ancak, hücre canlılığı 10 μ M Ant 3 de % 69.95 ve 10 μ M Ant 4 de ise % 52.52 olarak bulunmuştur (**Şekil 17**).



Şekil 17. Ant 3, Ant 4 ve Ant 6 Türevleri ve Mitoksantronun Farklı Konsantrasyon ve Zaman Aralığında Belirlenen Yüzde Canlilik Oranlarının İstatistiksel Analizi

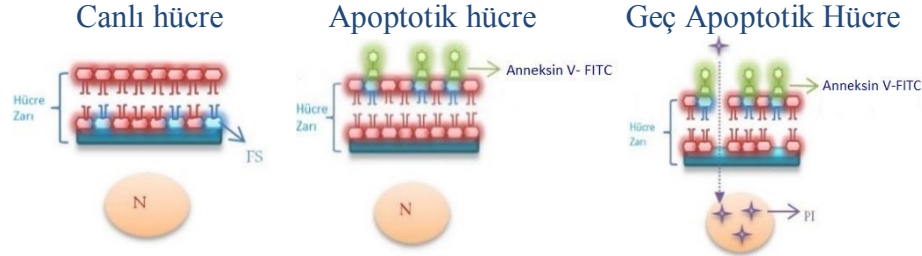
Sonuç olarak; 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında düşük dozda (5 μ M) uygulanan mitoksantron ve Ant 6 türevlerinin HeLa hücre canlılığı üzerine etkisi benzerken, Ant 3 ve Ant 4 türevlerinin onlara oranla etkisi daha düşüktür. Doza bağımlı olarak uygulanan tüm bileşiklerin etkisi artış gösterirken, inkübasyon süresi iki katına çıkarıldığında (48 saat), düşük dozda (5 μ M), tüm antrakinon türevleri mitoksantrona göre HeLa hücre canlılığı üzerinde anlamlı derecede daha düşük seviyede etki göstermektedir ($p < 0,0001$).

Antrakinon Türevlerinin Erken Apoptoz Üzerine Etkileri

Hücre canlılığı üzerine etkileri MTT deneyi ile tanımlanmış ve düşük konsantrasyonda etki düzeyleri yüksek Ant 3, Ant 4 ve Ant 6 türevlerinin, HeLa hücrelerinde apoptozu uyarıp uyarmadığı öncelikle lipid fosfatidil serin (PS) molekülünün translokasyonuna (Overbeeke ve ark., 1998) bağlı olarak belirlenmiştir. Ekstrasellüler membran yüzeyine transloke olmuş PS molekülünün, fluoresans işaretli Anneksin-V ile kompleks oluşturması erken apoptotik hücrelerin, propidyum iyodür ile işaretlenme ise geç apoptotik hücrelerin kantitatif olarak akım sitometrisinde ölçümüne olanak sağlamaktadır.

Canlı hücrelerde PS lokalizasyonu inner membranda yer alırken, erken apoptotik süreçte PS molekülü dış membrana doğru yer değiştirmekte ve böylelikle Ca^{+2} -bağımlı fosfolipit bağlanma proteini olan Anneksin-V ile

kompleks oluşturabilmektedir. Ayrıca membran bütünlüğü bozulan geç apoptotik hücrelerin genetik materyalinin propidyum iyodür ile boyanması mümkün olmaktadır (Overbeeke ve ark., 1998; Tesarik ve ark., 1998) (Şekil 18).



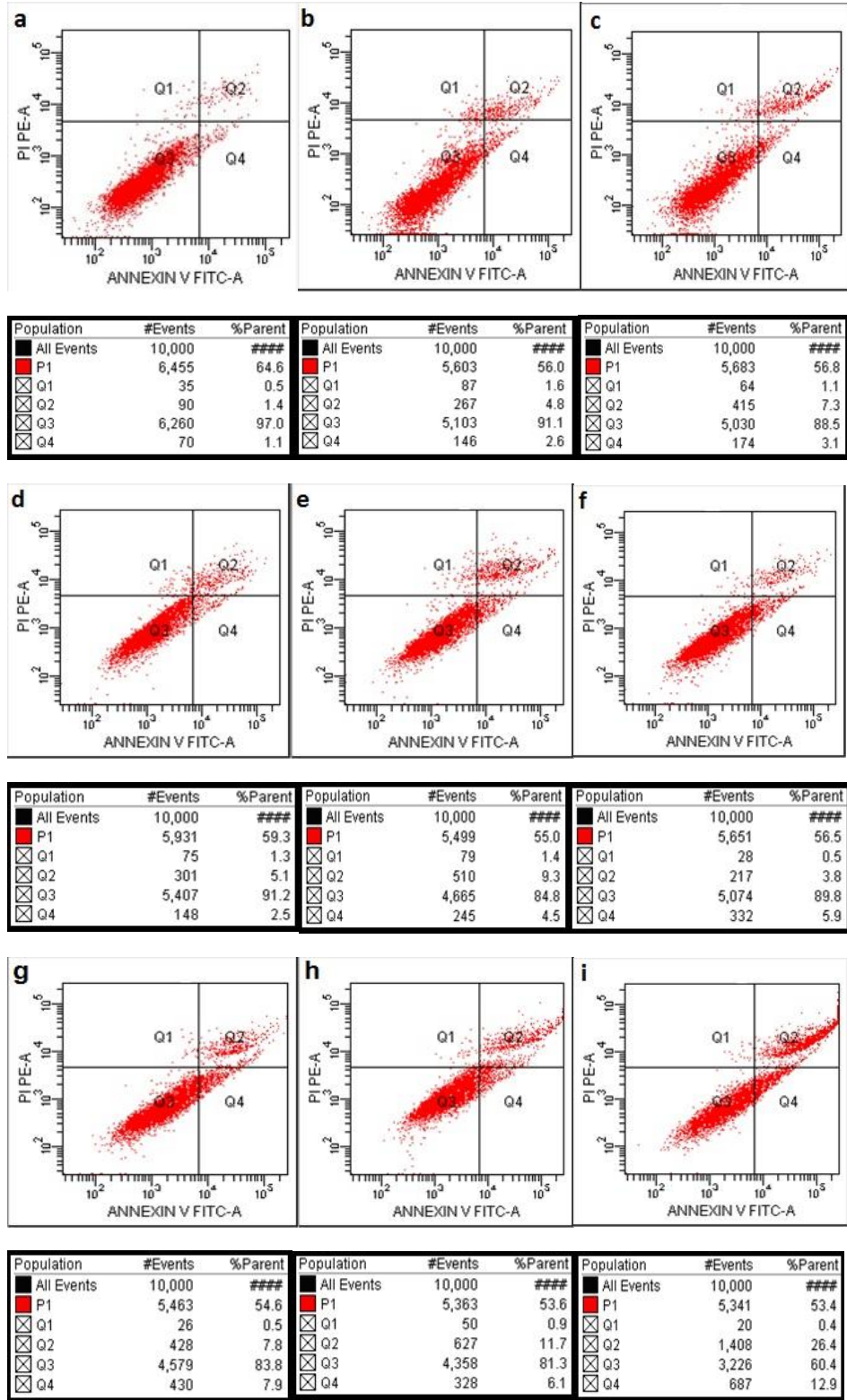
Şekil 18. FITC ile işaretlenmiş Anneksin V ve Propidyum İyodür Boyaması
PS: Fosfatidil serin; N: Nukleus; PI: Propidyum İyodür

HeLa hücrelerinin Ant 3, Ant 4 veya Ant 6 ile 6, 12 veya 24 saat inkübasyonu sonrasında Anneksin-V işaretleme sonuçları Şekil 19-21 ve sayısal verilerde Çizelge 2-4’de gösterilmiştir. Tüm antrakınon türevlerinin HeLa erken apoptoz üzerine etkileri mitoksantron maddesinin etkisine ve zamana bağlı olarak değerlendirilmiştir.

Maddesiz HeLa hücrelerinin 6 saat inkübasyonu sonrasında hücre canlılığı % 97, erken apoptoz oranı 1.1 ve geç apoptoz oranı ise 1.4 olarak bulunmuştur (Çizelge 2, Şekil 19a). 4.4 μ M mitoksantronun ile 6 saat inkübe edilen HeLa hücrelerinin canlılık oranı kontrole göre daha düşüktür (canlı hücre % 91.1). Buna göre, erken apoptotik hücre sayısı % 2.6’ya ve geç apoptoz hücre oranı ise % 4.8’e çıkmıştır. Mitoksantronun (2.6 μ M) daha düşük dozu ile hücrelerin 6 saat inkübasyonu ise hem erken apoptotik hücre oranında (% 3.1) hem de geç apoptotik hücre oranında (% 7.3) artışa neden olmuştur (Çizelge 2, Şekil 19b,c).

Uygulanan farklı konsantrasyonlardaki antrakınon türevlerinin 6 saat inkübasyon sonrasında kontrole ve mitoksantrona göre erken ve geç apoptoz üzerine etkileri Şekil 19d-i ve Çizelge 2’de gösterilmiştir. Buna göre, 6 μ M Ant 3 türevi ile 6 saatlik inkübasyon sonrasında, HeLa hücrelerinde erken apoptoz mitoksantrona göre daha etkili olarak uyarılmıştır. 6 μ M Ant 3 uygulaması hücre canlılık oranını % 84.8’e düşürürken erken apoptotik hücre oranını % 4.5’a, geç apoptotik hücre oranını ise % 9.3’e çıkarmıştır (Çizelge 2, Şekil 19e). Aynı şekilde, 5 μ M Ant 4 inkübasyonu sonrasında erken apoptotik hücre oranı mitoksantrona (% 3.1) ve Ant 3’e (% 4.5) göre daha yüksektir (% 7.9) Çizelge 2, Şekil 19g). 3 μ M Ant 6 uygulaması sonrasında ise hücre canlılık oranı % 60.4’e kadar gerilemiş olup, erken apoptoz oranı % 12.9’a, geç apoptoz oranı ise % 26.4’e kadar yükselmiştir (Çizelge 2, Şekil 19i).

Sonuç olarak; üç antrakınon türevi de düşük konsantrasyonda HeLa hücre erken apoptozunu mitoksantrona göre daha yüksek oranda uyarmıştır. Bununla birlikte, Ant 6 türevi diğer antrakınon türevlerine oranla HeLa hücre erken apoptozu üzerine en etkili türevidir.



Şekil 19. Mitoksantron ve Antrakinon Türevlerinin HeLa Hücreleri ile 6 Saat İnkübasyon Sonrası Gözlenen Anneksin V-FITC/PI Boyamasının Akım Sitometrisi Analizi. a. Madde eklenmemiş HeLa hücreleri b. Mitoksantron 4.4 μ M c. Mitoksantron 2.6 μ M d. Ant 3 10 μ M e. Ant 3 6 μ M f. Ant 4 8 μ M g. Ant 4 5 μ M h. Ant 6 8 μ M i. Ant 6 3 μ M

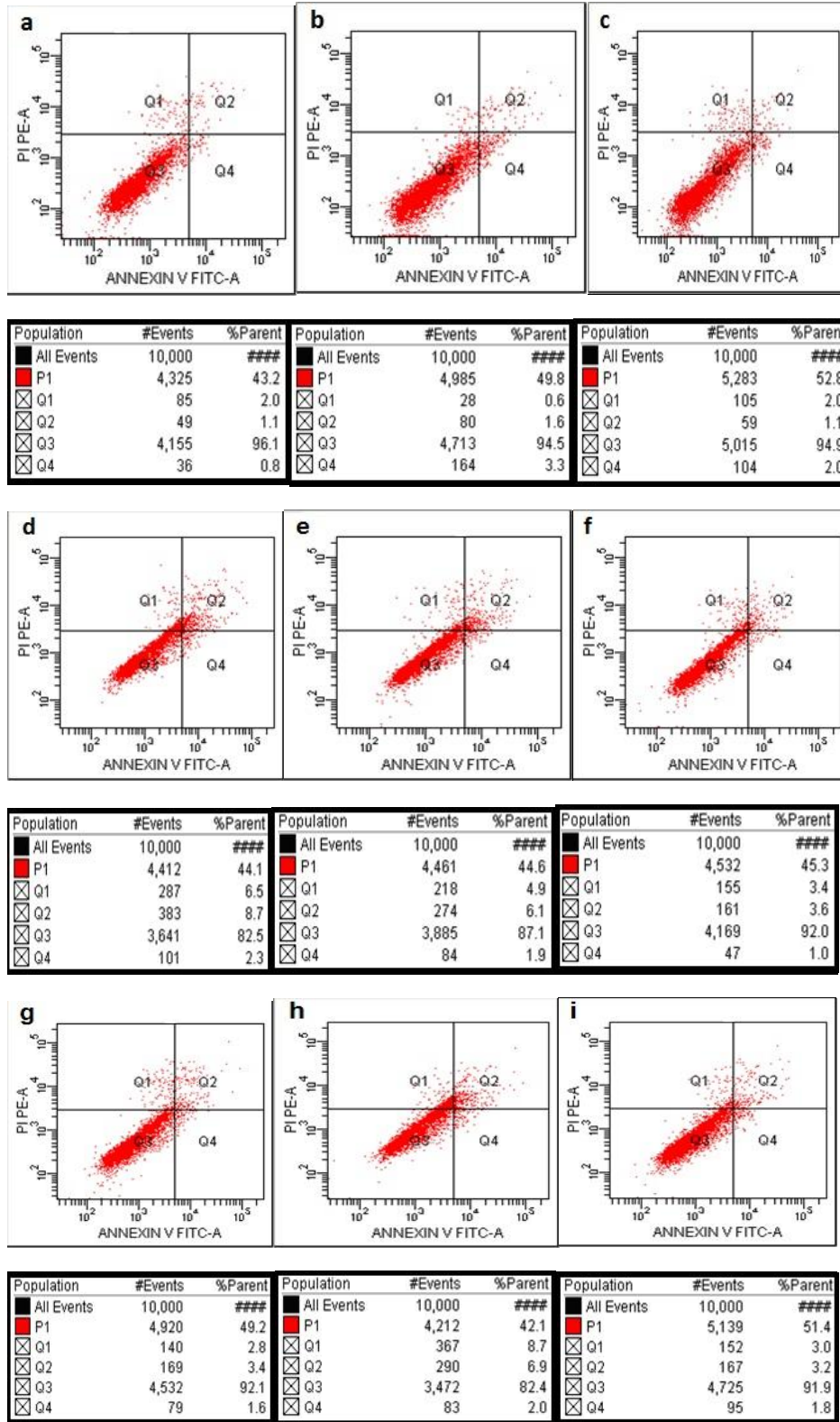
Çizelge 2. Mitoksantron ve Antrakinon Türevleri ile 6 Saat Stimülasyon Sonrasında Erken ve Geç Apoptotik HeLa Hücre Oranları

Zaman Aralığı	6 Saat			
% Değerler	(A ⁺ , PI ⁺) Q1	(A ⁺ , PI [*]) Q2	(A ⁻ , PI ⁻) Q3	(A ⁺ , PI ⁻) Q4
Kontrol	0.5	1.4	97.0	1.1
Mitoksantron 4.4 µM	1.6	4.8	91.9	2.6
Mitoksantron 2.6 µM	1.1	7.3	88.5	3.1
Ant 3 10 µM	1.3	5.1	91.2	2.5
Ant 3 6 µM	1.4	9.3	84.8	4.5
Ant 4 8 µM	0.5	3.8	89.8	5.9
Ant 4 5 µM	0.5	7.8	83.8	7.9
Ant 6 8 µM	0.9	11.7	81.3	6.1
Ant 6 3 µM	0.4	26.4	60.4	12.9

6 saatlik inkübasyon süresi sonunda düşük dozda en yüksek erken veya geç apoptotik oranları gösterilmiştir. A⁺, PI⁺ (Q1); nekroz, A⁺, PI^{*} (Q2); geç apoptoz, A⁻, PI⁻ (Q3); canlı hücre, A⁺, PI⁻ (Q4); erken apoptoz

Mitoksantron ve antrakinon türevleri ile 12 saat inkübasyon sonrasında HeLa erken apoptoz ve geç apoptoz hücre oranı birkaç istisna haricinde önemli ölçüde zamana bağlı bir azalış göstermiştir (**Çizelge 3, Şekil 20**). İnkübasyon süresinin artışı, 4.4 µM mitoksantron ile muamele edilen HeLa erken hücre oranının % 2.6'dan (6 saat inkübasyon sonrası) % 3.3'e yükselmesine neden olmuştur (**Çizelge 3, Şekil 20b**).

12 saatlik inkübasyon sonrasında, Ant 4 ve Ant 6 türevlerinin HeLa erken ve geç hücre apoptoz oranında önemli düzeyde azalış olmuştur. Özellikle 6 saat inkübasyonda en etkili türev olan Ant 6 (3 µM) 12 saat inkübasyon süresi bitiminde % 1.8 erken apoptotik hücre oranına ve % 3.2 geç apoptotik hücre oranına neden olabilmıştır (**Çizelge 3, Şekil 20i**). Halbuki 6 saat inkübasyon sonrasında bu oranlar sırasıyla % 12.9 ve % 26.4 olarak bulunmuştur (**Çizelge 2**). HeLa hücrelerinin apoptotik mekanizmasını, Ant 6 türevi kısa inkübasyon süresinde etkili bir şekilde uyardığı görülmektedir.



Şekil 20. Mitoksantron ve Antrakinon Türevlerinin HeLa Hücreleri ile 12 Saat İnkübasyon Sonrası Gözlenen Annexin V-FITC/PI Boyamasının Akım Sitometrisi Analizi. a. Madde eklenmemiş HeLa hücreleri b. Mitoksantron 4.4 μ M c. Mitoksantron 2.6 μ M d. Ant 3 10 μ M e. Ant 3 6 μ M f. Ant 4 8 μ M g. Ant 4 5 μ M h. Ant 6 8 μ M i. Ant 6 3 μ M

Çizelge 3. Mitoksantron ve Antrakinon Türevleri ile 12 Saat Stimülasyon Sonrasında Erken ve Geç Apoptotik HeLa Hücre Oranları

Zaman Aralığı	12 Saat			
% Değerler	(A ⁺ , PI ⁺) Q1	(A ⁺ , PI [*]) Q2	(A ⁻ , PI ⁻) Q3	(A ⁺ , PI ⁻) Q4
Kontrol	2.0	1.1	96.1	0.8
Mitoksantron 4.4 µM	0.6	1.6	94.5	3.3
Mitoksantron 2.6 µM	2.0	1.1	94.9	2.0
Ant 3 10 µM	6.5	8.7	82.5	2.3
Ant 3 6 µM	4.9	6.1	87.1	1.9
Ant 4 8 µM	3.4	3.6	92.0	1.0
Ant 4 5 µM	2.8	3.4	92.1	1.6
Ant 6 8 µM	8.7	6.9	82.4	2.0
Ant 6 3 µM	3.0	3.2	91.9	1.8

12 saatlik inkübasyon süresi sonunda düşük dozda en yüksek erken veya geç apoptotik oranları gösterilmiştir. A⁺, PI⁺ (Q1); nekroz, A⁺, PI^{*} (Q2); geç apoptoz, A⁻, PI⁻ (Q3); canlı hücre, A⁺, PI⁻ (Q4); erken apoptoz

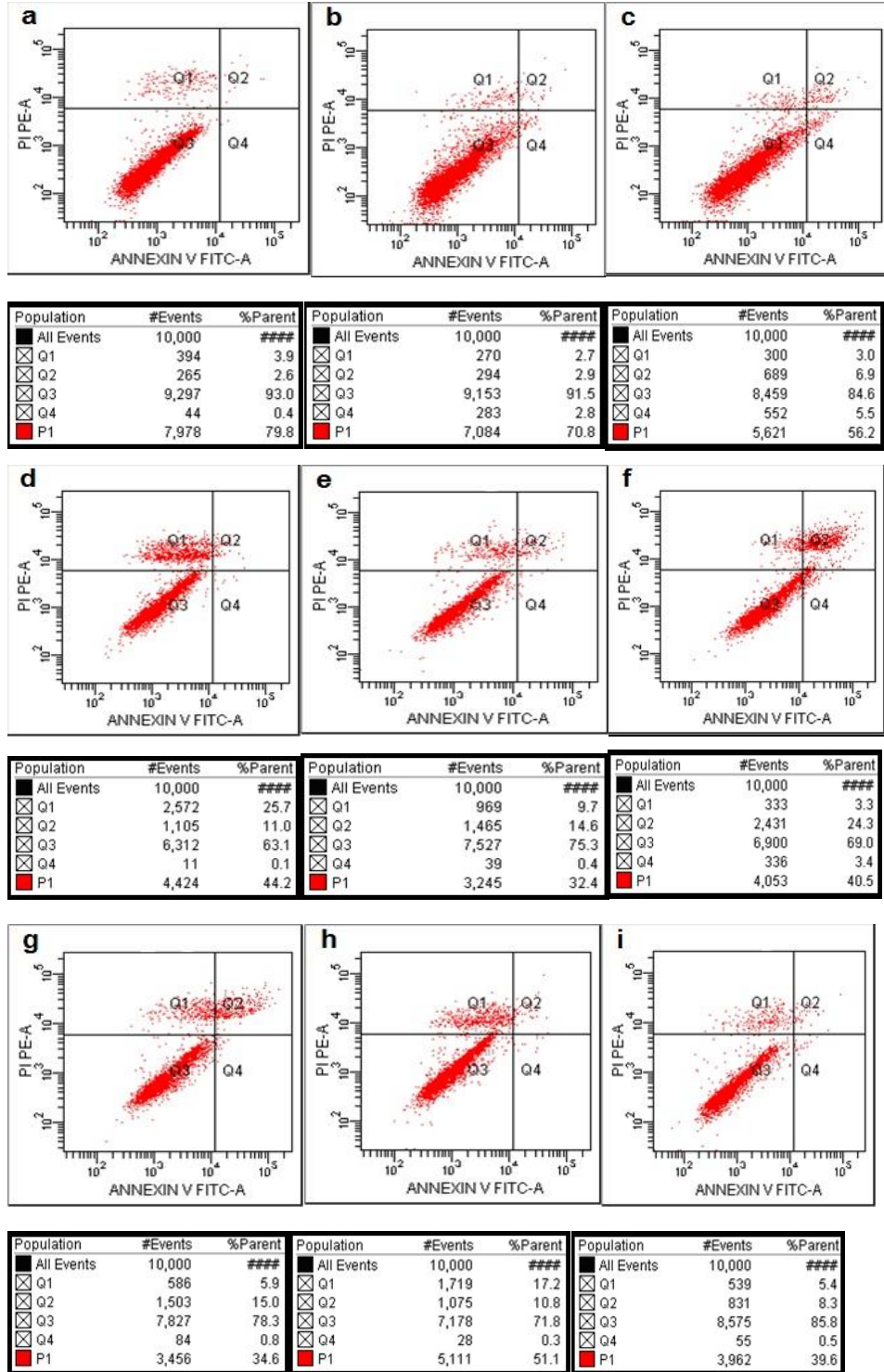
İnkübasyon süresinin 24 saate çıkarılması ile 2.6 µM mitoksantron muamelesi erken apoptotik hücre oranının % 5.5'e yükselmesine neden olmuştur. Bu oran, hem 6 saat (% 3.1) (Çizelge 2) hem de 12 saat (% 2.0) (Çizelge 3) inkübasyon süresine göre daha yüksektir. Bu sonuçlar göstermiştir ki; düşük dozda mitoksantronun uzun süreli uygulaması HeLa hücrelerinde erken apoptozun etkili bir şekilde uyarılmasına neden olmaktadır (Şekil 21c).

Ant 4 türevinin yüksek konsantrasyonu (8 µM) dışındaki diğer iki türevin 24 saat inkübasyonu 12 saat inkübasyon süresine göre hücre erken apoptozunda düşüşe neden olmuştur (Çizelge 4, Şekil 21). Ant 4 türevinin 8 µM konsantrasyonu ile HeLa hücre erken apoptoz oranı 12 saat inkübasyon süresine göre üç katı bir artış göstermiştir (Şekil 21f). Ancak bu artış 6 saat inkübasyon süresi sonrasında elde edilen % 5.9 oranına ulaşamamıştır.

Sonuç olarak, antrakinon türevleri HeLa hücrelerinde erken apoptozu uyardırmada etkili bulunmuşlardır ve bu etkilerini düşük doz aralığında ve mitoksantrona göre daha kısa süreli (6 saat) inkübasyon süresi sonrasında göstermişlerdir. Yapılan bir çalışmada yeni sentezlenen antrakinonların dimetilamino süstitüe türevinin serviks kanser hücrelerinin membranında fosfatidil serin translokasyonuna neden olarak erken apoptotik apoptoz üzerine etkili olduğu belirtilmiştir (Weia ve ark., 2000).

Kimyasal olarak sentezlenmeyen, bitkisel kökenli antrakinon türevlerinin HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri konusunda yapılan çalışmalar da sonuçlarımızı desteklemektedir. *Rheum palmatum* bitkisinden izole edilen doğal bir antrakinon türevi olan Emodin maddesi, HeLa hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak erken apoptotik etkide artış göstermiştir. Ayrıca, emodin HeLa hücreleri üzerindeki geç apoptotik

etkisinin belirlenmesi amacıyla 20, 40, 80 μM dozlarda 48 saatlik inkübasyona tabi tutulmuş, sonuç olarak hem doza hem zamana bağlı olarak artan bir apoptotik indeks vermiştir (Yoaxian ve ark., 2013).



Şekil 21. Mitoksantron ve Antrakinon Türevlerinin HeLa Hücreleri ile 24 Saat İnkübasyon Sonrası Gözlenen Annexin V-FITC/PI Boyamasının Akım Sitometrisi Analizi. a. Madde eklenmemiş HeLa hücreleri b. Mitoksantron 4.4 μM c. Mitoksantron 2.6 μM d. Ant 3 10 μM e. Ant 3 6 μM f. Ant 4 8 μM g. Ant 4 5 μM h. Ant 6 8 μM i. Ant 6 3 μM

Çizelge 4. Mitoksantron ve Antrakinin Türevleri ile 24 Saat Stimülasyon Sonrasında Erken ve Geç Apoptotik HeLa Hücre Oranları

Zaman Aralığı	24 Saat			
% Değerler	(A ⁺ , PI ⁺) Q1	(A ⁺ , PI [*]) Q2	(A ⁻ , PI ⁻) Q3	(A ⁺ , PI ⁻) Q4
Kontrol	3.9	2.6	93	0.4
Mitoksantron 4.4 µM	2.7	2.9	91.5	2.8
Mitoksantron 2.6 µM	3.0	6.9	84.6	5.5
Ant 3 10 µM	25.7	11.0	63.1	0.1
Ant 3 6 µM	9.7	14.6	75.3	0.4
Ant 4 8 µM	3.3	24.3	69.0	3.4
Ant 4 5 µM	5.9	15.0	78.3	0.8
Ant 6 8 µM	17.2	10.8	71.8	0.3
Ant 6 3 µM	5.4	8.3	85.8	0.5

24 saatlik inkübasyon süresi sonunda düşük dozda en yüksek erken veya geç apoptotik oranları gösterilmiştir. A⁺, PI⁺ (Q1); nekroz, A⁺, PI^{*} (Q2); geç apoptoz, A⁻, PI⁻ (Q3); canlı hücre, A⁺, PI⁻ (Q4); erken apoptoz

Antrakinin Türevlerinin Sitoplazmik ADP/ATP Seviyesi Üzerine Etkileri

Apoptozun karakteristik adımlarından biri olan mitokondriyal membran potansiyelindeki değişimlerin ADP/ATP oranındaki artış ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Eguchi ve ark., 1997; Bradbury ve ark., 2000).

Erken apoptotik etkileri belirlenen antrakinin türevlerinin, mitokondriyal membran sistemi üzerine muhtemel etkileri lüsiferin-lüsiferaz enzimi kullanarak biyoluminesans ışınım yöntemi ile sitoplazmik ADP/ATP oranının ölçümü sonrası belirlenmiştir (Siragusa ve ark., 1996).

Sitoplazmik ADP/ATP oranının belirlenmesi için HeLa hücreleri ya maddesiz ya da farklı konsantrasyonlardaki mitoksantron veya antrakinin türevleri ile 6 ya da 12 saat 37 °C’de inkübasyona tabi tutulmuşlardır. Bu sürenin sonunda elde edilen bulgular, madde ile muamele edilmeyen HeLa hücrelerindeki ADP/ATP oranının 6 saatte 0.87, 12 saatte ise 5.38 olduğunu göstermiştir (**Çizelge 5**). Bradbury ve arkadaşlarının (2000) yaptıkları bir çalışmada ADP/ATP oranı canlı hücrelerde 0.1 ile 1.0 değerleri arasında bulunmuştur. Buna göre elde ettiğimiz negatif kontrol hücre verilerinden apoptotik bir etkinin olmadığı görülmektedir.

Çizelge 5. Mitoksantron ve Antrakinon Türevleri ile Muamele Edilen HeLa Hücrelerinde ADP/ ATP Oranı

Maddeler	6 saat	12 saat
	ADP/ATP	ADP/ATP
Kontrol	0.87	5.38
Mitoksantron 4.4 μM	2.77	10.62
Mitoksantron 2.6 μM	1.83	8.95
Ant 3 10 μM	3.51	10.43
Ant 3 6 μM	2.23	9.31
Ant 4 8 μM	2.21	6.00
Ant 4 5 μM	1.84	5.69
Ant 6 8 μM	2.25	4.46
Ant 6 3 μM	2.23	3.71

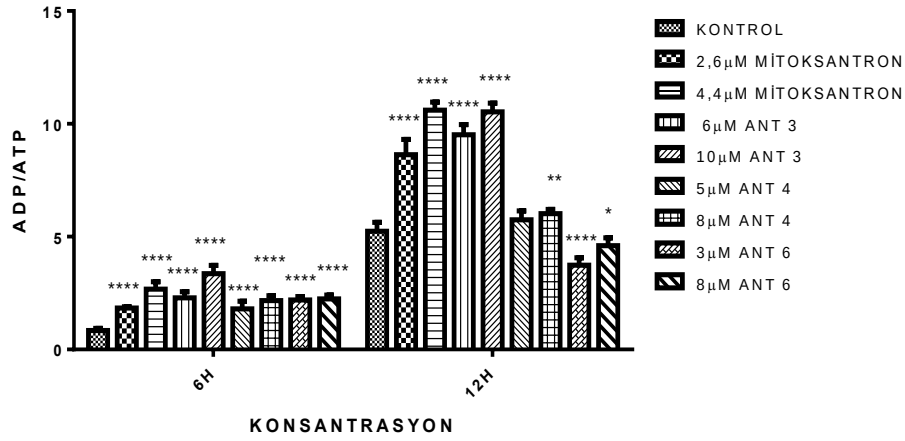
Mitoksantronun 4.4 μ M konsantrasyonu ile 12 saat uygulaması sonrasında ADP/ATP oranının 10.62 ve 2.6 μ M uygulaması sonrasında ise 8.95 olduğu tespit edilmiştir (**Çizelge 5**). Bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$) (**Şekil 22**). Benzer şekilde, Ant 3 türevi (10 ve 6 μ M) ile 12 saat muamele edilen hücrelerin ADP/ATP oranının sırasıyla 10.43 ve 9.31 olduğunu tespit edilmiştir ve bu sonuçlar, Ant 3 türevinin mitokondriyal membran sistemi üzerinde mitoksantrona benzer etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

8 veya 5 μ M Ant 4 türevi ile 12 saat inkübasyon sonrasında ise ADP/ATP oranı sırasıyla 6.00 ve 5.69 olarak tespit edilmiştir. Ant 6 türevi ile 12 saat inkübasyonu ise diğer türevlere göre en düşük ADP/ATP oranına neden olmuştur. Bu türevin 8 μ M konsantrasyonu 12 saatte 4.46 ADP/ATP oranına neden olurken 3 μ M konsantrasyonu ise aynı inkübasyon süresinde 3.71 ADP/ATP oranına neden olmuştur (**Çizelge 5**). Bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$) (**Şekil 22**).

Tüm maddelerin 6 saatlik inkübasyon süreleri sonrasında elde edilen ADP/ATP oranı 12 saatlik inkübasyon süresine göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir ki; buna göre antrakinon türevleri veya mitoksantron ile muamele edilen HeLa hücrelerinde ADP/ATP oranı zaman bağlı olarak bir artış göstermektedir. Madde konsantrasyonunun bu oran üzerine anlamlı bir etkisi tespit edilememiştir. Ancak 6 saatlik inkübasyon süresinde maddelerin HeLa hücrelerinde ADP/ATP oranına etkileri tüm doz aralıklarında (5 veya 8 μ M) madde eklenmemiş hücrelere göre anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$).

Antrakinon türevlerinin HeLa hücrelerinin sitozolik ADP/ATP oranı üzerine yaptıkları etkinin araştırılması sonucu, uygulanan antrakinon türevlerinin her birinin HeLa hücrelerinde mitokondriyal membran değişimine bağlı olarak belli oranlarda apoptozu tetikleme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bradbury ve ark., 2000 yılında yaptıkları çalışmada, ADP/ATP oranı 1.0-15 arasında bulunan hücreler apoptotik olarak tespit edilmişken, ADP/ATP oranı 15 ve üzeri olan hücrelerin nekrotik oldukları belirlenmiştir. Bu çalışma, 6 ve 12 saatlik madde uygulamalarının HeLa hücrelerinin ADP/ATP oranını apoptotik çerçevede

etkilediğini desteklemektedir. Ancak, yapılan literatür taraması sonucunda yeni sentezlenen antrakinon türevlerinin HeLa hücrenin ADP/ATP oranı üzerine etkisini konu alan bir çalışma bulunamamıştır.



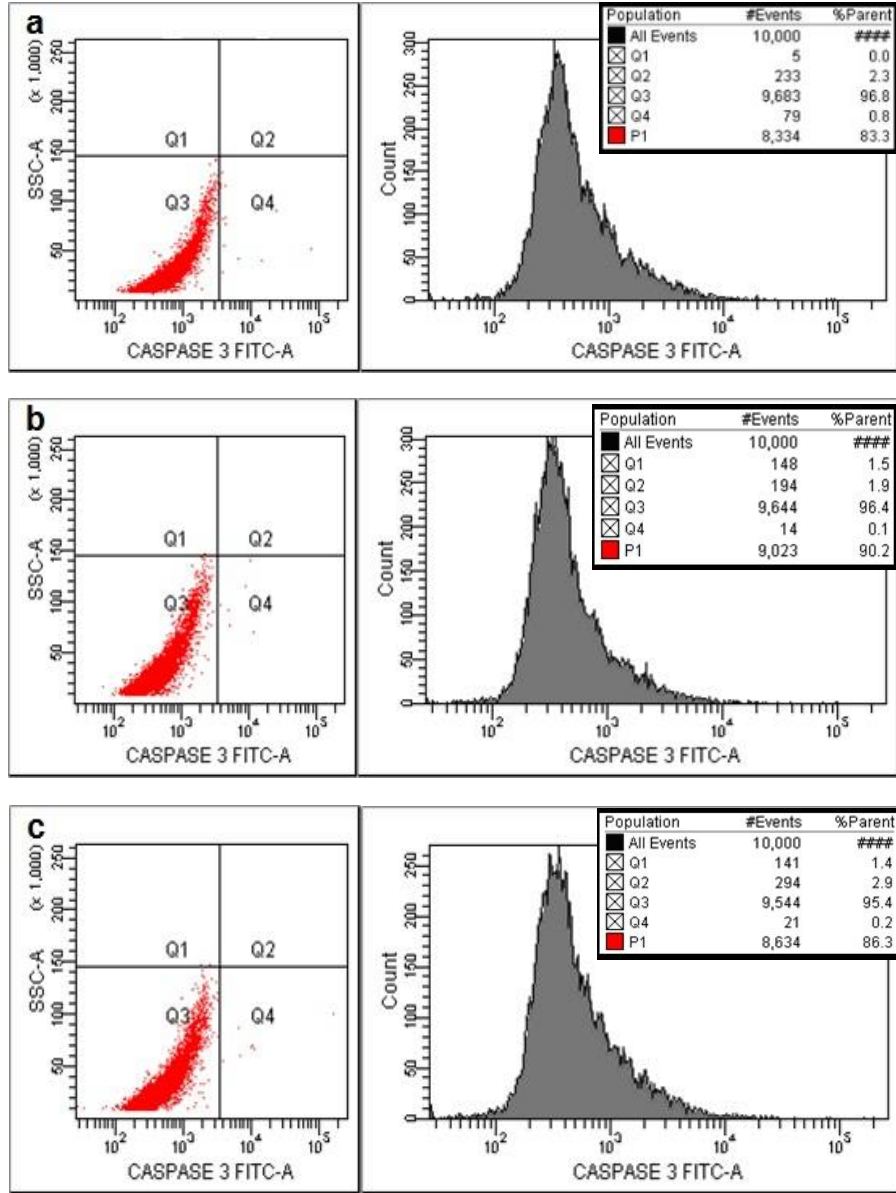
Şekil 22. Mitoksantron ve Antrakinon Türevlerinin Farklı Doz ve Zaman Aralıklarında İnkübasyonu Sonrası Belirlenen ADP/ATP Oranının İstatistiksel Analizi

Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi

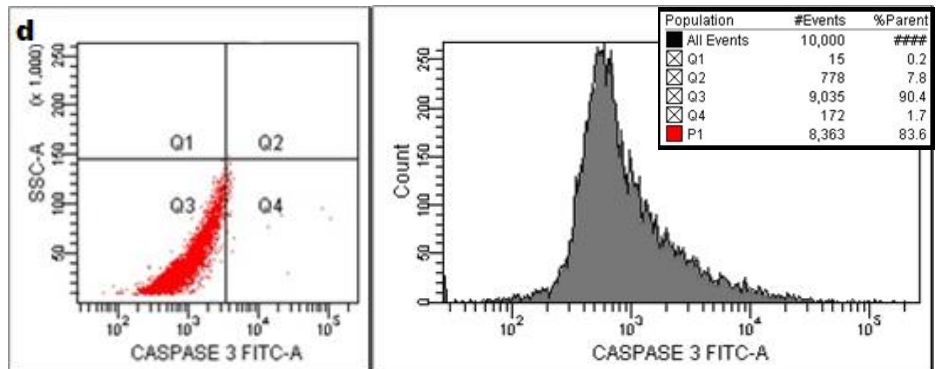
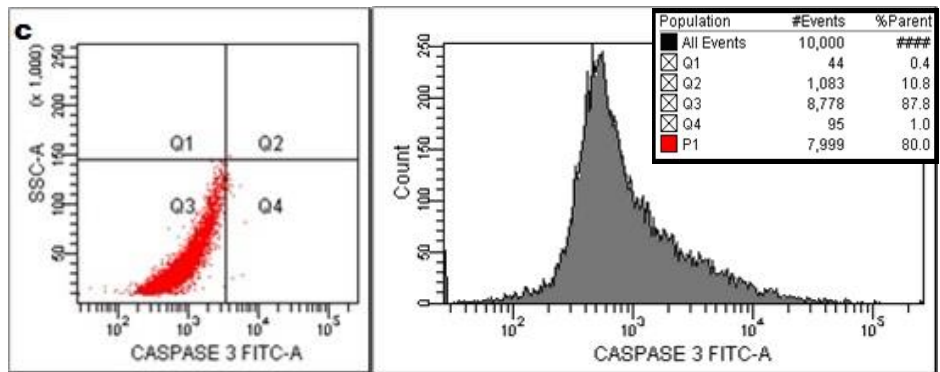
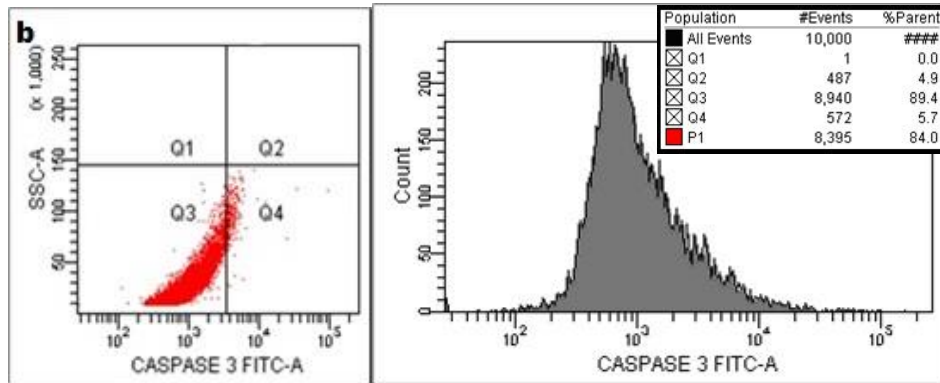
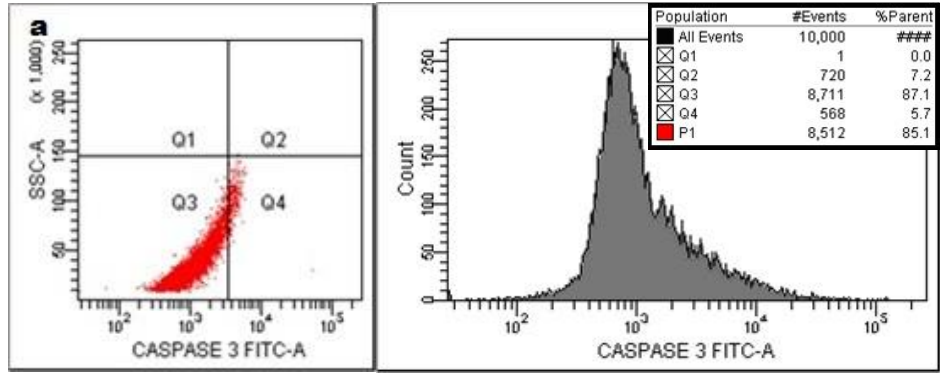
ADP/ATP oranındaki değişimlerin kaspaz-3 aktivasyonunda da etkili olduğu bilinmektedir (Eguchi ve ark., 1997). Bu nedenle antrakinon türevleri ile farklı zaman aralıklarında inkübe edilen HeLa hücrelerindeki kaspaz-3 aktivasyon seviyesi akım sitometrisi kullanılarak ölçülmüştür.

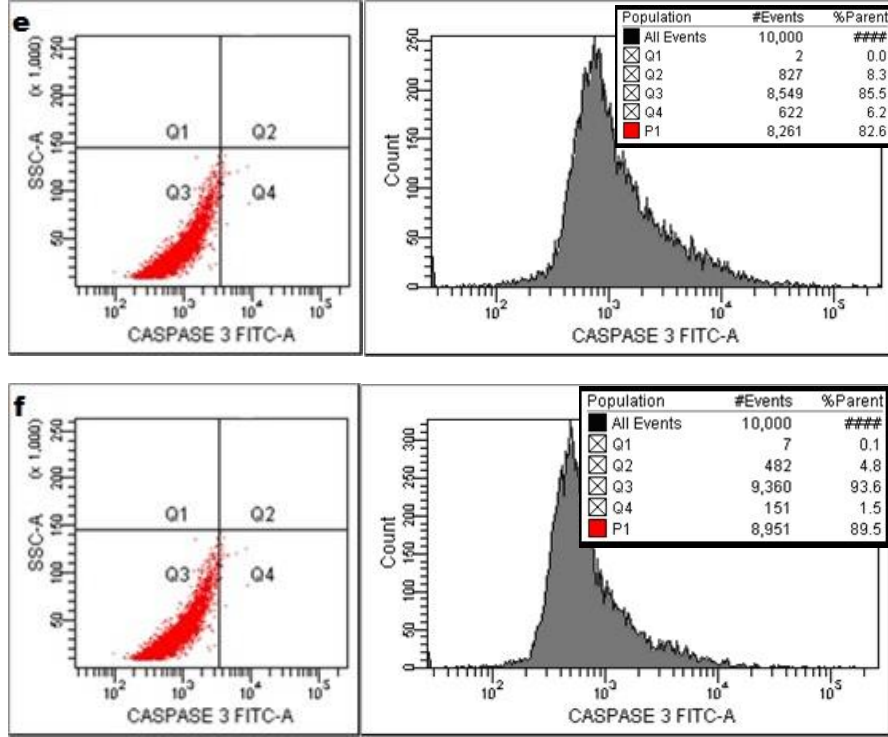
Pro-kaspaz-3 yapısından aktif kaspaz-3 haline gelen molekülü epitop bölgesinden işaretleyen poliklonal antikorlar akım sitometrisinde yüzde değer verecek şekilde analiz edilmektedir. Buna göre elde edilen sonuçlar **Şekil 23-28**'de gösterilmektedir. Kaspaz-3 aktivasyonu, Q2 ve Q4 değerlerinin toplanması ile hesaplanmıştır. Madde ilave edilmeyen HeLa hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyonu 6 saatte % 3.1, 12 saatte % 6.00, 24 saatte ise % 2.0 oranında bulunmuştur (**Şekil 23a**).

HeLa hücrelerinin 2,6 μM mitoksantron ile 6 saatlik inkübasyonu sonrası, 4,4 μM doza oranla daha yüksek kaspaz-3 aktivasyonuna (% 3.1) neden olduğu tespit edilmiştir. Ant 3, Ant 4 ve Ant 6 türevlerinin uygulanan tüm dozlarının ise mitoksantrona oranla 6 saatlik inkübasyon sonrasında daha yüksek kaspaz-3 aktivasyonuna (% 6.3 - % 12.9 arası) neden olduğu bulunmuştur. Tüm türevler içinde ise düşük dozda en yüksek kaspaz aktivasyonu görülen % 10.6 ile Ant 3 maddesi olarak belirlenmiştir (**Şekil 24b**). Bu oran mitoksantronun yaklaşık kaspaz-3 aktivasyonunun üç katıdır.



Şekil 23. 6 Saat İnkübasyon Sonrasında Mitoksantronun Kaspaz-3 Aktivitesi Üzerine Etkisi. a. Madde eklenmemiş HeLa hücreleri, b. 4.4 μ M Mitoksantron c. 2.6 μ M Mitoksantron



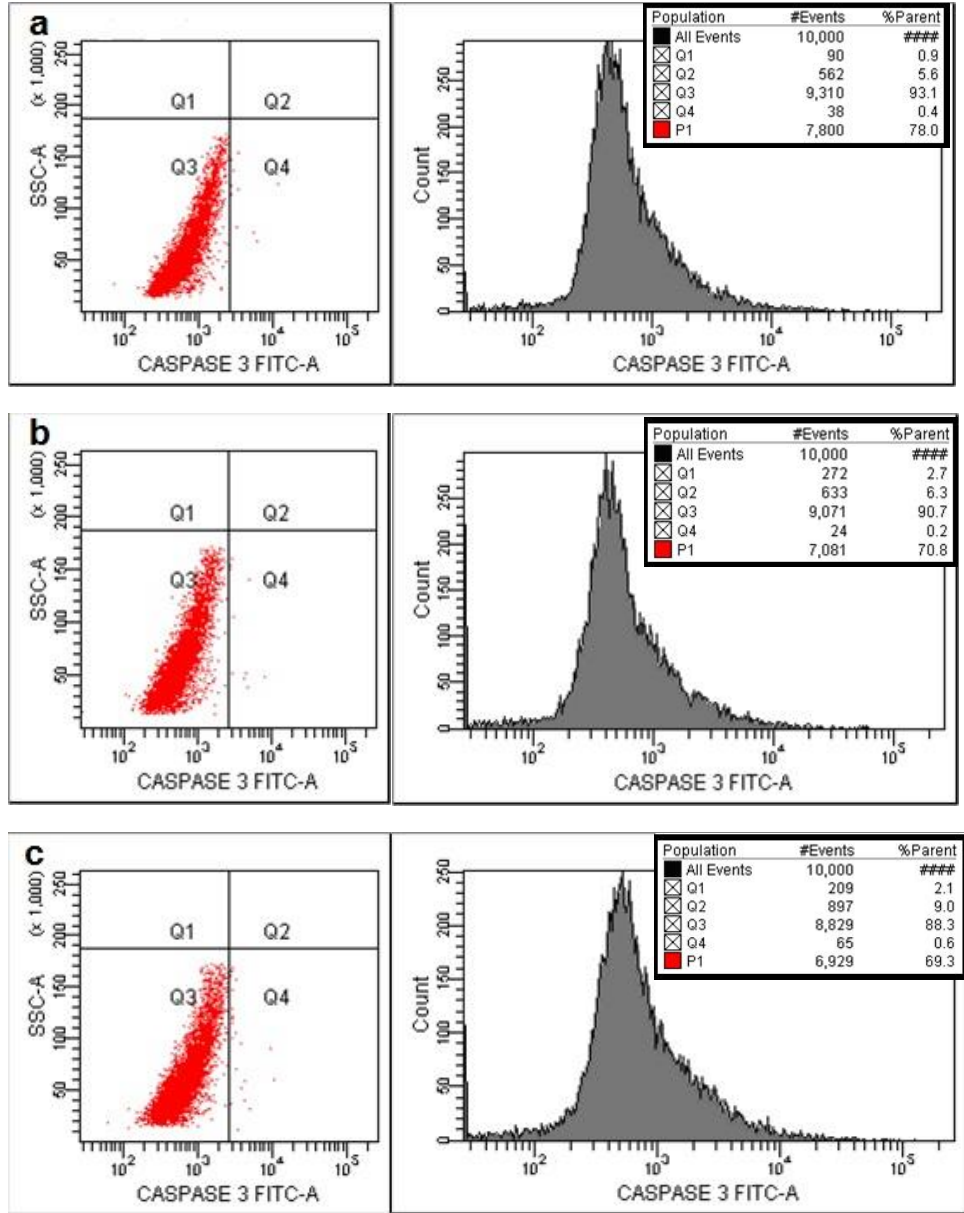


Şekil 24. 6 Saat İnkübasyon Sonrasında Antrakinon Türevlerinin Kaspaz-3 Aktivitesi Üzerine Etkisi. a. 10 µM Ant 3 b. 6 µM Ant 3 c. 8 µM Ant 4 d. 5 µM Ant 4 e. 8 µM Ant 6 f. 3 µM Ant 6

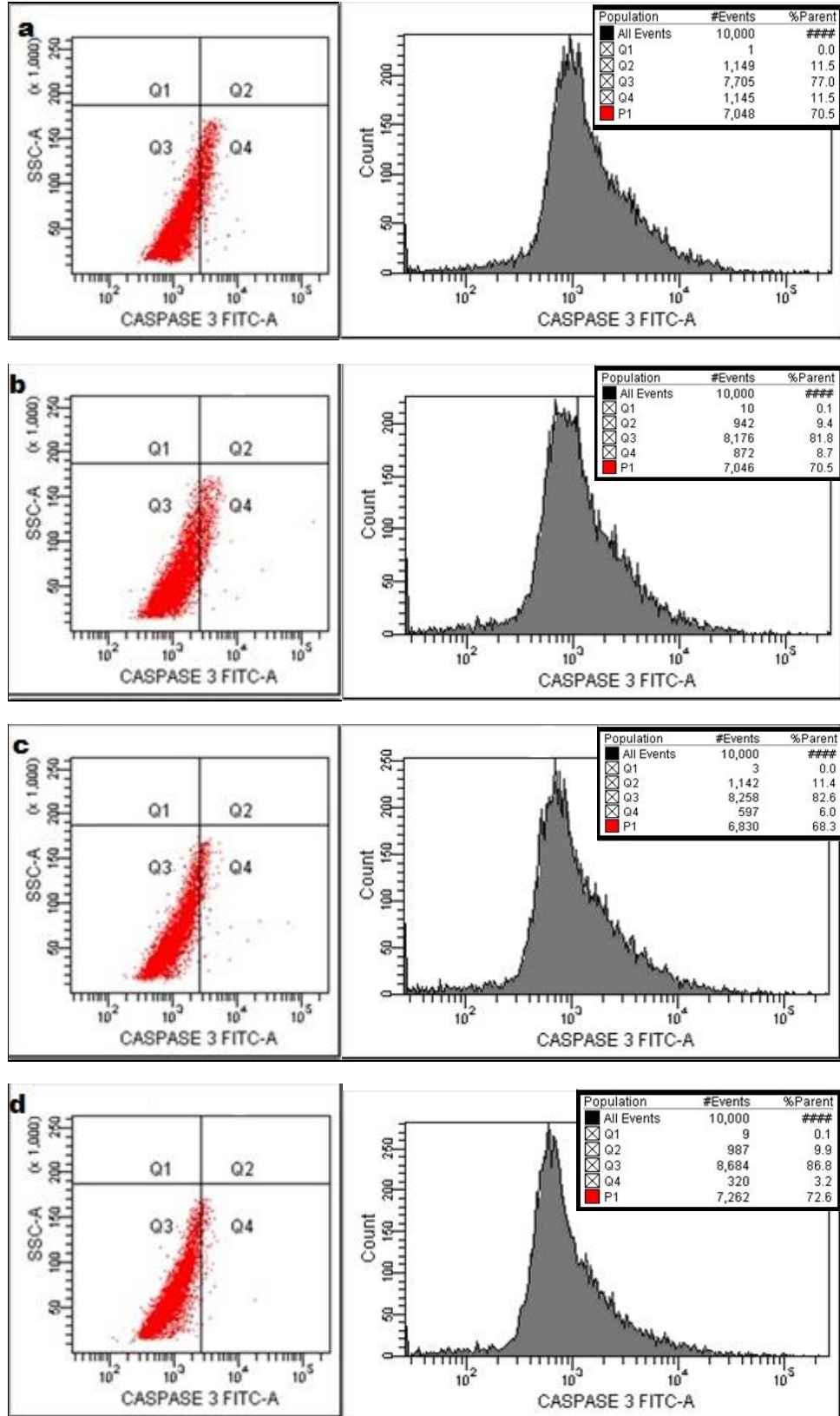
Çizelge 6. Mitoksantron ve Antrakinon Türevleri ile 6 Saat Stimülasyon Sonrasında Kaspaz-3 Aktivitesi

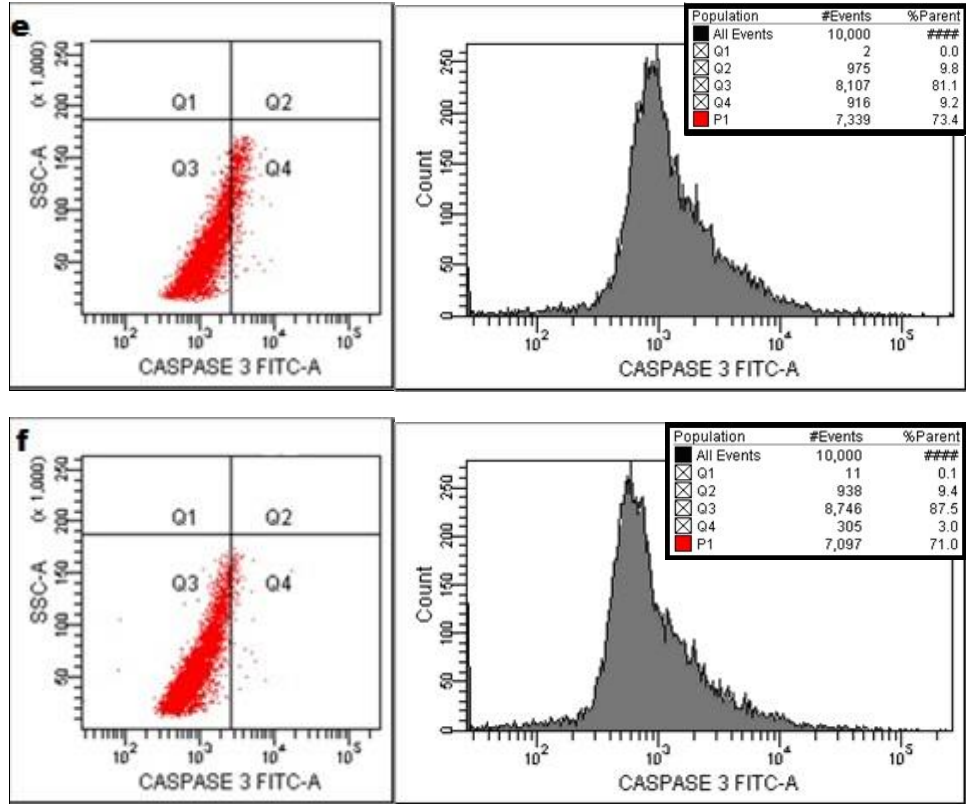
Zaman Aralığı	6 Saat	
% Değerler	Canlılık	Kaspaz-3 Aktivitesi
Kontrol	96.8	3.1
Mitoksantron 4.4 µM	97.9	2.0
Mitoksantron 2.6 µM	96.8	3.1
Ant 3 10 µM	87.1	12.9
Ant 3 6 µM	89.4	10.6
Ant 4 8 µM	88.2	11.8
Ant 4 5 µM	90.6	9.5
Ant 6 8 µM	85.5	14.5
Ant 6 3 µM	93.7	6.3

Mitoksantronun her iki dozu da 12 saat inkübasyon sonrasında 6 saate oranla kaspaz-3 aktivasyonunda artışa neden olmuştur (Çizelge 7, Şekil 26). Ant 4 (5 µM) ve Ant 6 (3 µM) türevlerinin düşük dozlarına tabi tutulan HeLa hücrelerinde sırasıyla 13.1 ve 12.4 oranında kaspaz-3 aktivasyonu gözlenmiştir (Çizelge 7, Şekil 26) ve bu oranlar 6 saat inkübasyon süresine göre artış göstermiştir.



Şekil 25. 12 Saat İnkübasyon Sonrasında Mitoksantronun Kaspaz-3 Aktivitesi Üzerine Etkisi. a. Madde eklenmemiş HeLa hücreleri b. Mitoksantron 4.4 μ M c. Mitoksantron 2.6 μ M





Şekil 26. 12 Saat İnkübasyon Sonrasında Antrakinon Türevlerinin Kaspaz-3 Aktivitesi Üzerine Etkisi. a. 10 μ M Ant 3 b. 6 μ M Ant 3 c. 8 μ M Ant 4 d. 5 μ M Ant 4 e. 8 μ M Ant 6 f. 3 μ M Ant 6

Çizelge 7. Mitoksantron ve Antrakinon Türevleri ile 12 Saat Stimülasyon Sonrasında Kaspaz-3 Aktivitesi

Zaman Aralığı	12 Saat	
% Değerler	Canlılık	Kaspaz-3 Aktivitesi
Kontrol	94.0	6.00
Mitoksantron 4.4 μ M	90.4	9.6
Mitoksantron 2.6 μ M	93.4	6.5
Ant 3 10 μ M	77.0	23.0
Ant 3 6 μ M	81.9	18.1
Ant 4 8 μ M	82.6	17.4
Ant 4 5 μ M	86.9	13.1
Ant 6 8 μ M	81.1	19.0
Ant 6 3 μ M	87.6	12.4

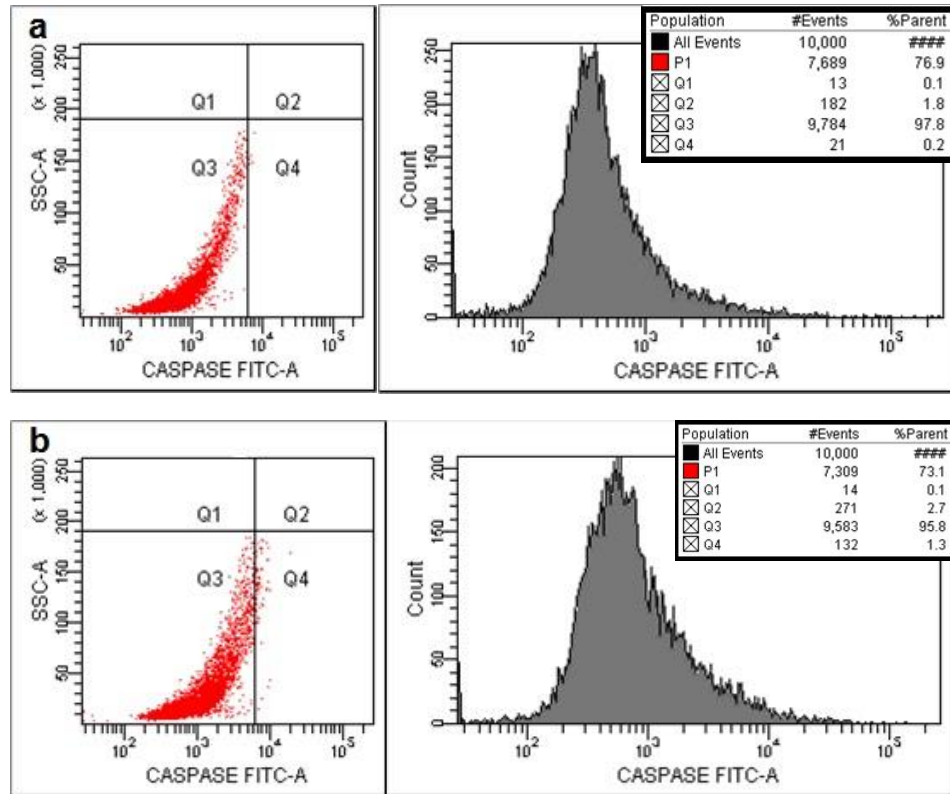
HeLa hücrelerinin mitoksantron ya da antrakinon türevleri ile 24 saat inkübasyonu ise kaspaz-3 aktivasyonunda düşüşe neden olmuştur (Çizelge 8, Şekil 28). Madde uygulaması yapılmayan kontrol hücrelerinde ve 2.6 μ M mitoksantron ile 24 saat inkübasyona tabi tutulan hücrelerde kaspaz-3 aktivasyonu aynı bulunmuştur (% 2.0). Buna göre mitoksantronun düşük konsantrasyonunda kaspaz-3 aktivasyonu gerçekleştirilmemiştir. Ancak

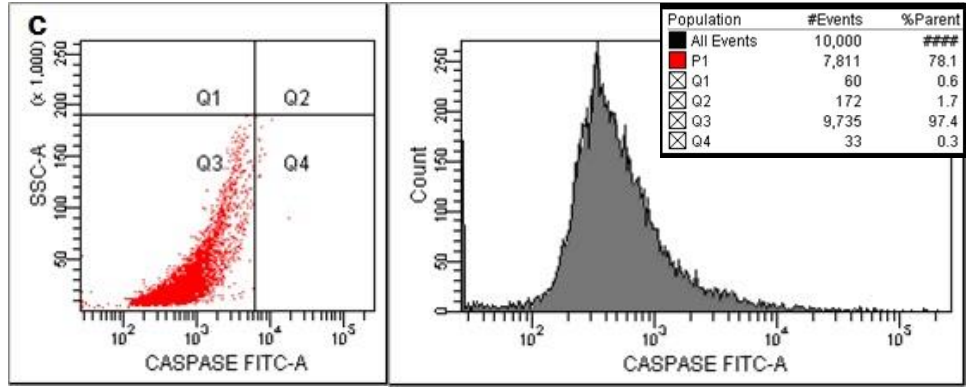
konsantrasyonun iki katına çıkarılması ile % aktivasyon değeri de % 4.0'e çıkmıştır. Bu değer zamana bağlı olarak artış göstermiştir.

6 μ M Ant 3 % 8.1, 5 μ M Ant 4 % 5.3 ve 3 μ M Ant 6 türevi % 6.0 oranında kaspaz-3 aktivasyonuna neden olmuştur (**Çizelge 8, Şekil 28**).

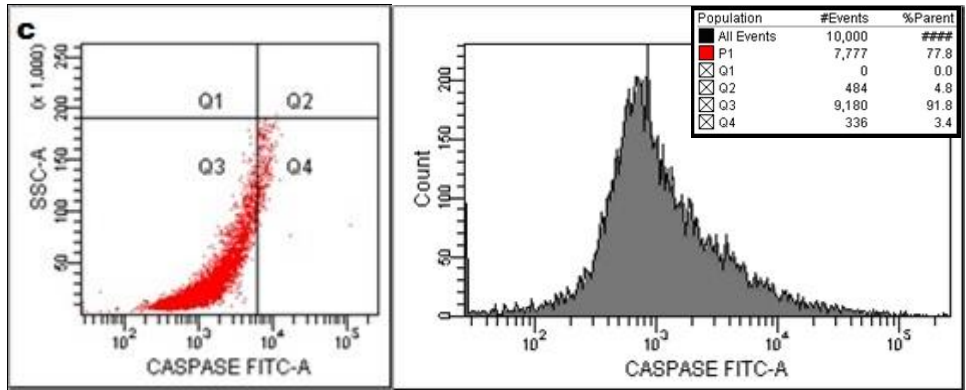
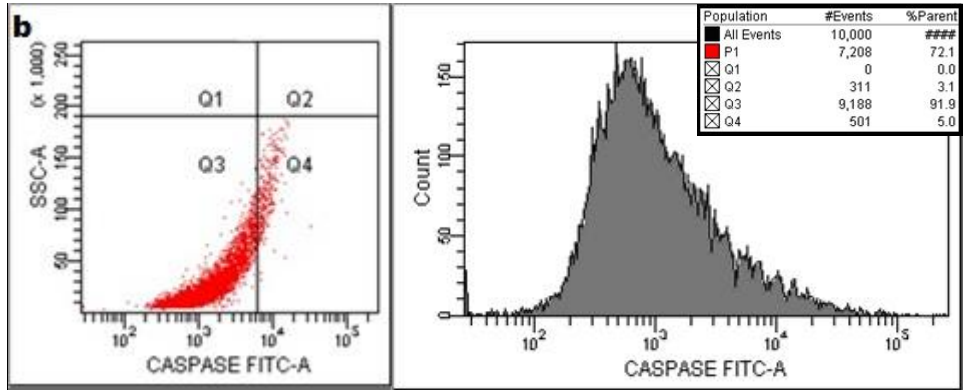
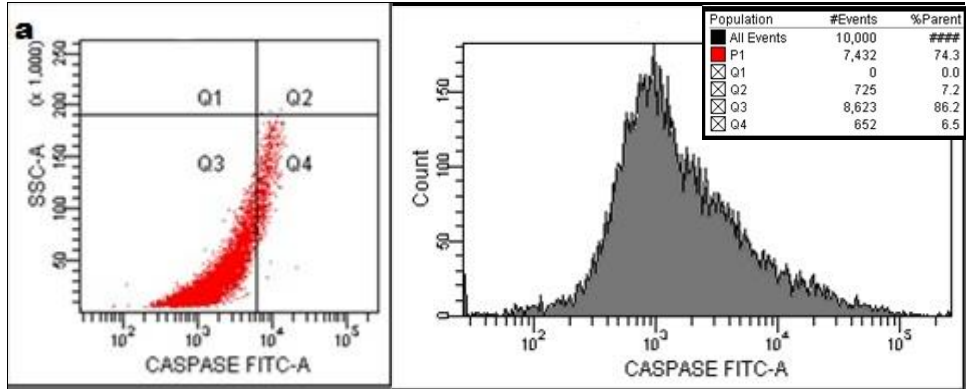
Sonuç olarak; antrokinon türevlerinin HeLa hücrelerindeki kaspaz-3 aktivasyonunu 12 saate maksimum uyardığını ve bu türevlerin mitoksantrondan daha etkili bileşikler olduğunu göstermiştir. Aynı şekilde, türevler içerisinde Ant 3'ün ise kaspaz-3 aktivasyonunda en etkili bileşik olduğu da belirlenmiştir.

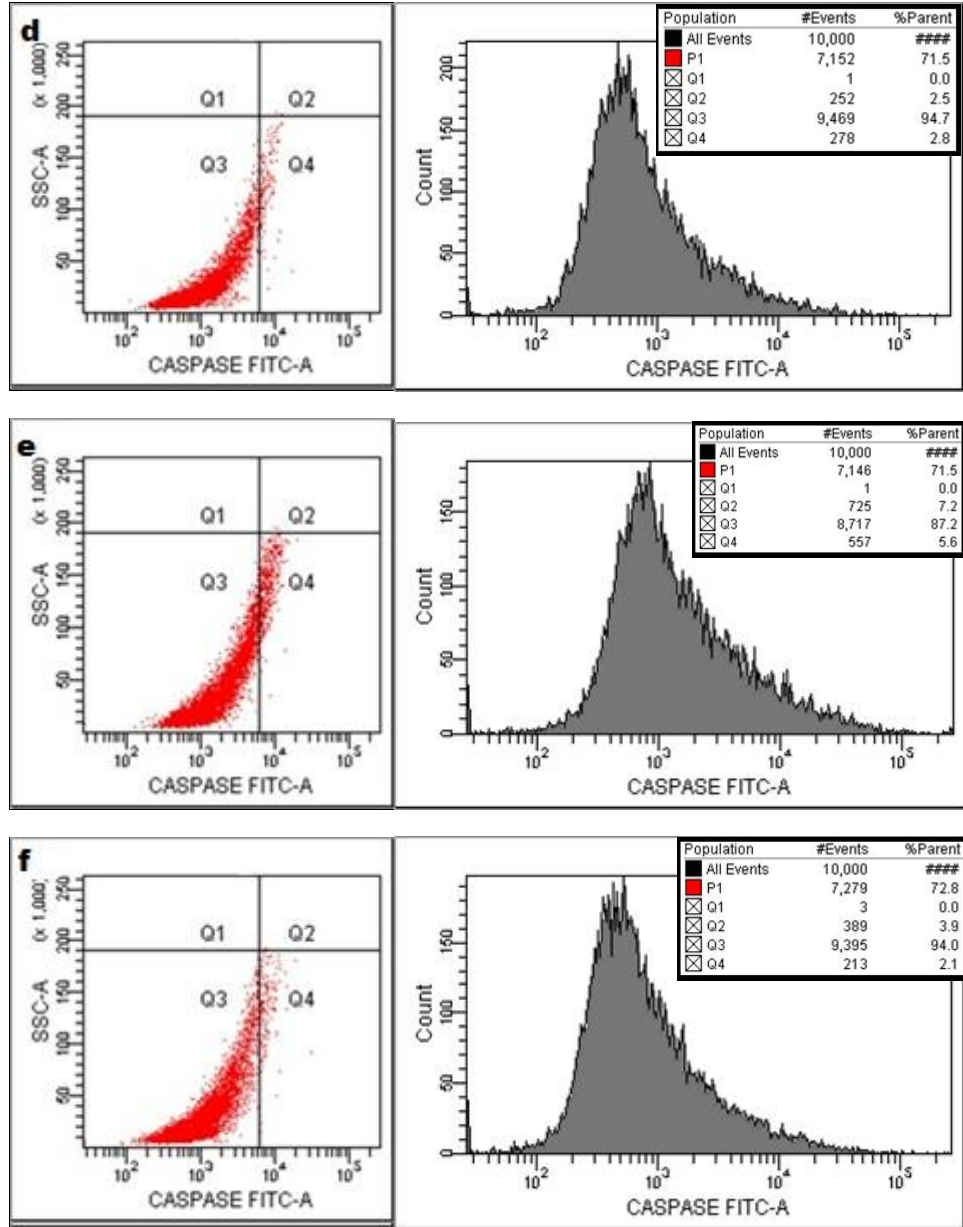
Chang ve ark. (2011) çalışmalarında yeni sentezledikleri 2 adet 1,2 nolu konumdan hetero halkalarla süstitüe antrakinon türevlerinin 16 saat inkübasyon sonrasında HeLa hücreleri üzerinde kaspaz-3 aktivasyonuna neden olduklarını tespit etmişlerdir. Ayrıca pozitif kontrol olarak kullandıkları, mitoksantron ile oldukça benzer kimyasal yapıya sahip doksorubisine göre de bu türevlerin daha yüksek oranda kaspaz-3'ü aktive ettiklerini bildirmişlerdir.





Şekil 27. 24 Saat İnkübasyon Sonrasında Mitoksantronun Kaspaz-3 Aktivitesi Üzerine Etkisi. a. Madde eklenmemiş HeLa hücreleri b. Mitoksantron 4.4 μ M c. Mitoksantron 2.6 μ M





Şekil 28. 24 Saat İnkübasyon Sonrasında Antrakininon Türevlerinin Kaspaz-3 Aktivitesi Üzerine Etkisi. a. Ant 3 10 μ M b. Ant 3 6 μ M c. Ant 4 8 μ M d. Ant 4 5 μ M e. Ant 6 8 μ M f. Ant 6 3 μ M

Çizelge 8. Mitoksantron ve Antrakinon Türevleri ile 24 Saat Stimülasyon Sonrasında Kaspaz-3 Aktivitesi

Zaman Aralığı	24 Saat	
% Değerler	Canlılık	Kaspaz-3 Aktivitesi
Kontrol	97.9	2.0
Mitoksantron 4.4 μ M	95.9	4.0
Mitoksantron 2.6 μ M	98.0	2.0
Ant 3 10 μ M	86.2	13.7
Ant 3 6 μ M	91.9	8.1
Ant 4 8 μ M	91.8	8.2
Ant 4 5 μ M	94.7	5.3
Ant 6 8 μ M	87.2	13.8
Ant 6 3 μ M	94.0	6.0

DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi

Apoptozun belirlenmesi amacı ile apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarının *in situ* saptanmasında kullanılan TdT-dUTP işaretleme, apoptozun uyarılması ile DNA uçlarının terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak işaretlemesini ve DNA kırıklarının *in situ* tanınmasını sağlamaktadır. Dolayısıyla apoptotik hücreleri diğerlerinden ayırmakta kullanılmaktadır (Elmore, 2007).

Kaspaz-3 aktivasyonu sonucunda inaktifleşen ICAD, CAD'ın aktifleşmesine neden olarak apoptozun karakteristik bulgularından biri olan, kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olmaktadır (Hunot ve Flavell, 2001). Bundan dolayı antrakinon türevleri ya da mitoksantron ile muamele edilen HeLa hücrelerinin DNA uçları terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) ile işaretlenerek oligonükleozomal DNA fragmentlerinin varlığı *in situ* işaretleme yöntemi ile belirlenmiştir.

Farklı doz ve zaman aralıklarında inkübasyona tabi tutulan HeLa hücrelerinin apoptotik indeks verileri **Çizelge 9'da**, floresan görüntüleri ise **Şekil 29-34'de** verilmiştir.

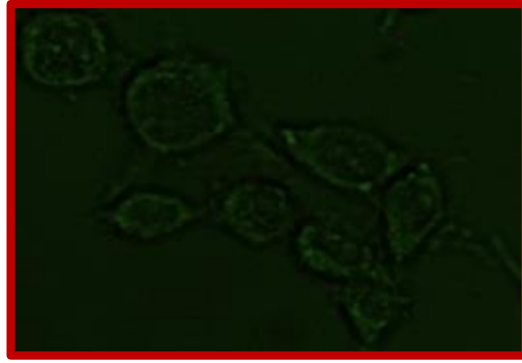
Madde verilmeyen kontrol hücrelerinde 6 saat inkübasyon süresi sonrasında çok düşük oranda apoptotik hücre varlığı tespit edilmiştir (% 6.75) (**Çizelge 9 ve Şekil 29a**). 4.4 μ M mitoksantron ile muamele edilen hücrelerde ise bu oran % 37.5 olarak tespit edilmiştir. Mitoksantronun konsantrasyonunun düşürülmesi ile apoptotik oranın da % 34.1'e düştüğü belirlenmiştir (**Çizelge 9 ve Şekil 29c**). Buna karşılık düşük dozda Ant 3 (6 μ M) türevi HeLa hücreleri üzerinde % 60'lık apoptotik indeks ile mitoksantrona oranla daha yüksek apoptotik etki oluşmuştur (**Çizelge 9, Şekil 30b**). 5 μ M Ant 4 ve 3 μ M Ant 6 da mitoksantrona göre yüksek oranda apoptotik DNA kırıkları göstermiştir. Bu DNA kırılmalarının oranları sırası ile % 57.7 ve % 52.0 olarak hesaplanmıştır (**Şekil 30d ve f**).

Çizelge 9. Mitoksantron ve Antrakinon Türevleri ile 6, 12 ve 24 Saat Stimüle Edilen HeLa Hücrelerinin TUNEL Apoptotik İndeksi

	6 saat	12 saat	24 saat
Apoptotik İndeks (%)			
Kontrol	6.75	8.0	11.1
Mitoksantron 4.4 μM	37.5	44.1	57.3
Mitoksantron 2.6 μM	34.1	40.0	50.0
Ant 3 10 μM	55.0	40.5	44.1
Ant 3 6 μM	60.0	39.6	42.2
Ant 4 8 μM	80.5	75.0	47.0
Ant 4 5 μM	57.7	82.3	51.6
Ant 6 8 μM	78.3	55.1	56.5
Ant 6 3 μM	52.0	46.6	54.0

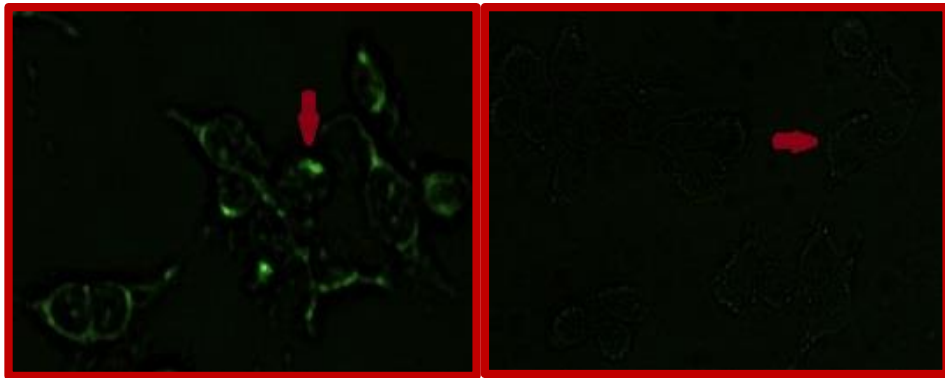
Düşük doz madde uygulamaları sonucu belirlenen en yüksek apoptotik indeks verileri koyu olarak belirtilmiştir.

a)

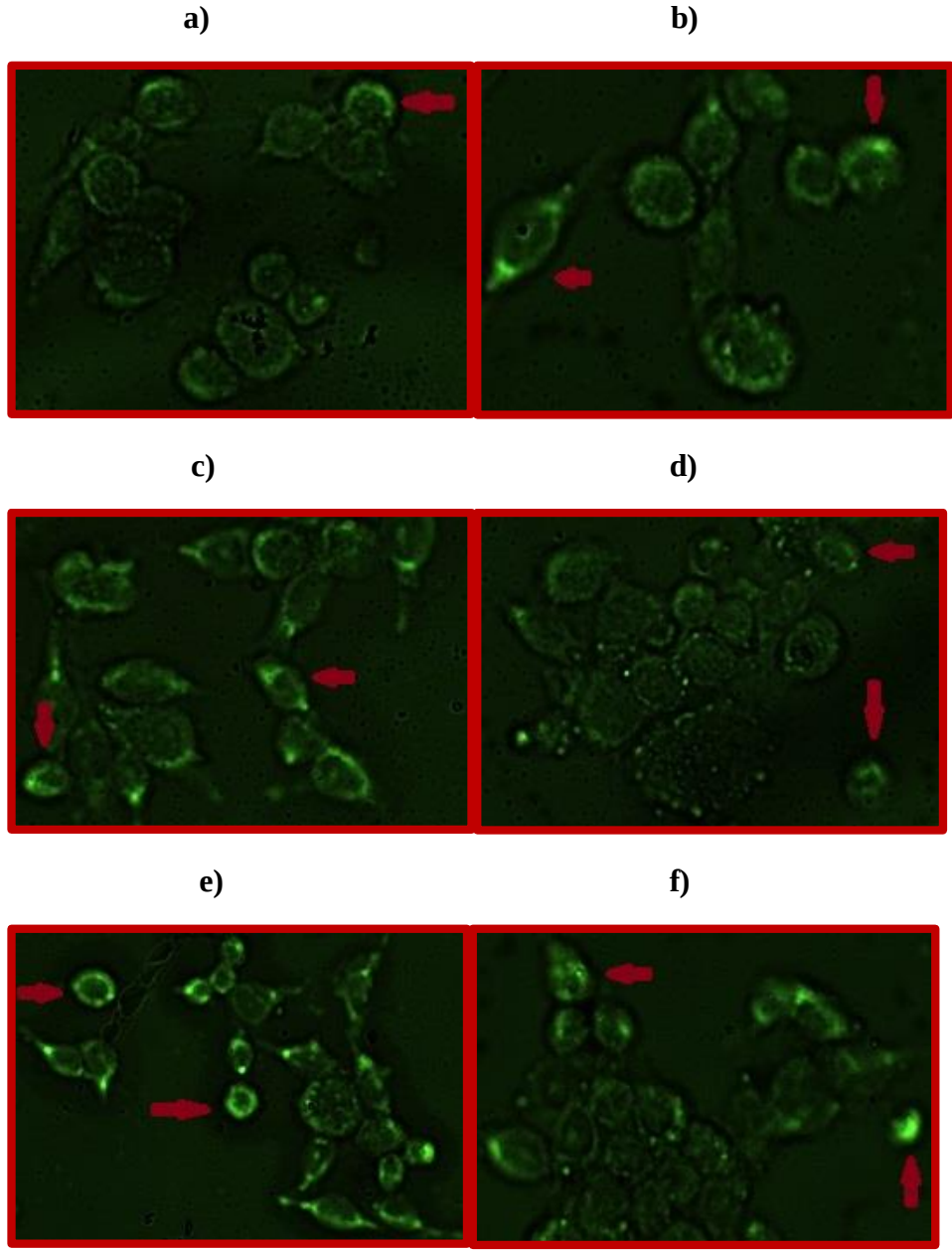


b)

c)



Şekil 29. Mitoksantronun HeLa Hücreleri ile 6 Saat İnkübasyon Sonrası Gözlenen DNA Fragmentasyonunun Floresan Mikroskobu ile Analizi. a) Madde uygulaması yapılmayan HeLa hücreleri b) 4.4 μ M Mitoksantron c) 2.6 μ M Mitoksantron



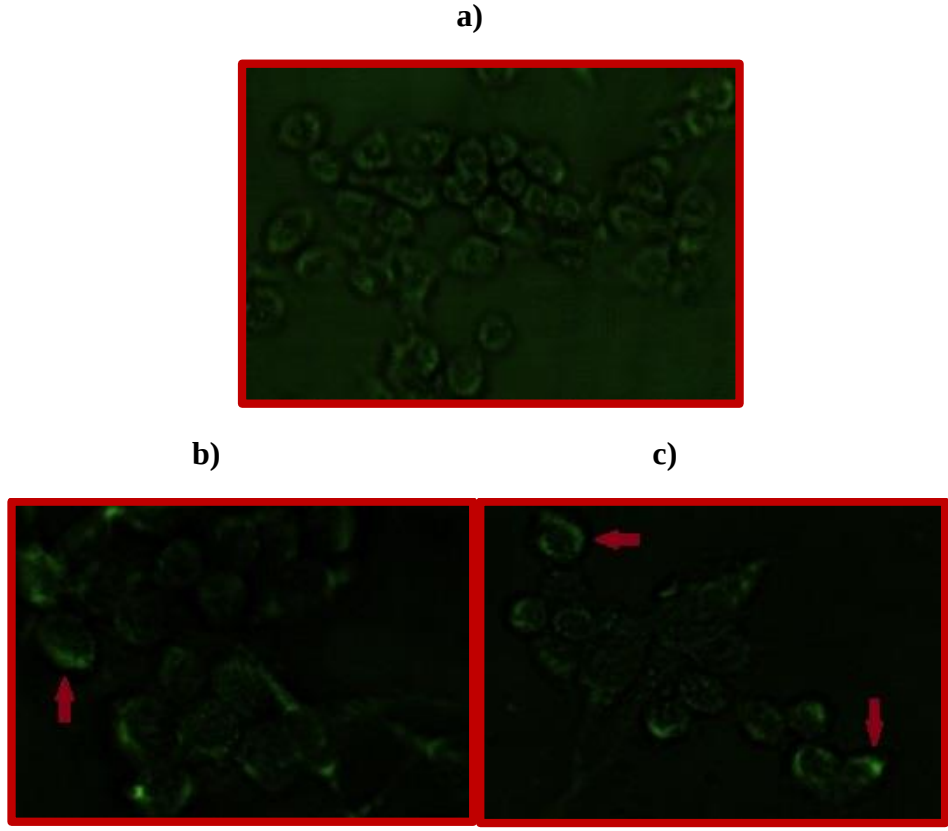
Şekil 30. Antrakinon türevlerinin HeLa Hücreleri ile 6 Saat İnkübasyon Sonrası Gözlenen DNA Fragmentasyonunun Floresan Mikroskopu ile Analizi.
a) 10 µM Ant 3 b) 6 µM Ant 3 c) 8 µM Ant 4 d) 5 µM Ant 4 verilen e) 8 µM Ant 6 f) 3 µM Ant 6

Madde uygulaması yapılmayan HeLa hücrelerinde 12 saat sonrasında apoptotik indeks % 8.0 oranında tespit edilmiştir (**Çizelge 9, Şekil 31a**).

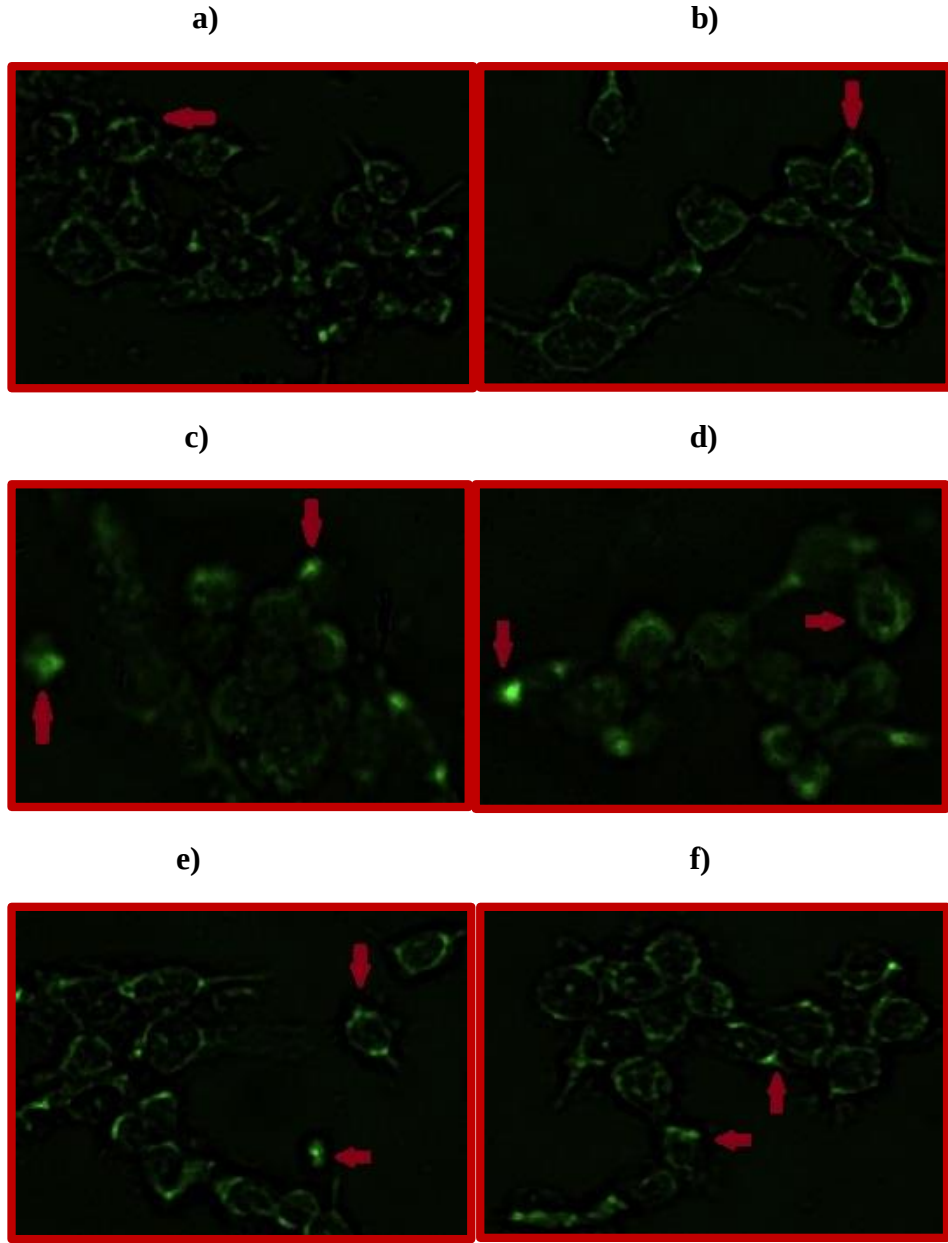
4.4 µM mitoksantron verilen HeLa hücrelerinde ise % 44.1 oranında apoptoz görülmüştür. Mitoksantron konsantrasyonunun 2.6 µM'a düşürülmesi ile apoptotik indeks % 40'a kadar azalmıştır (**Çizelge 9, Şekil 32b**).

Ant 4 türevi düşük dozda (5 µM) daha yüksek etkinlik göstererek % 82.3 oranı ile en etkili madde olarak belirlenmiştir (**Şekil 32d**). Bu oran Ant

4'ün mitoksantrona oranla yaklaşık iki kat daha etkili olduğunu göstermektedir.



Şekil 31. Mitoksantronun HeLa Hücreleri ile 12 Saat İnkübasyon Sonrası Gözlenen DNA Fragmentasyonunun Floresan Mikroskobu ile Analizi. a) Madde uygulaması yapılmayan HeLa hücreleri b) 4.4 µM Mitoksantron c) 2.6 µM Mitoksantron



Şekil 32. Antrakınon Türevlerinin HeLa Hücreleri ile 12 Saat İnkübasyon Sonrası Gözlenen DNA Fragmentasyonunun Floresan Mikroskobu ile Analizi.
a)10 μ M Ant 3 b) 6 μ M Ant 3 c) 8 μ M Ant 4 d) 5 μ M Ant 4 e) 8 μ M Ant 6 f) 3 μ M Ant 6

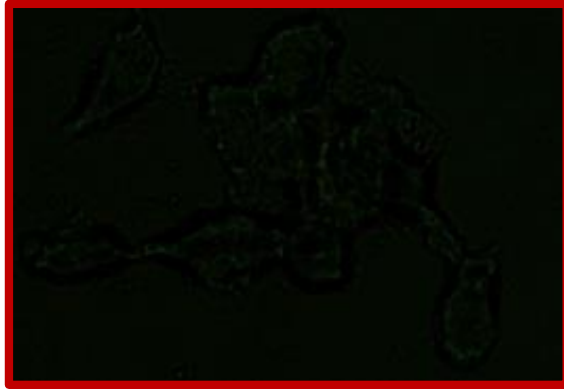
İnkübasyon süresinin 24 saate uzatılması ile madde uygulaması yapılmayan kontrol hücrelerinin apoptotik indeksi % 11.1 olarak tespit edilmiştir (**Çizelge 9, Şekil 33a**). Mitoksantron uygulaması sonrasında ise doza ve zamana bağlı artış gözlenmiştir (**Çizelge 9, Şekil 33b ve c**). Antrakınon türevleri ile muamele edilen HeLa hücrelerinin en yüksek apoptotik indeksi % 54.0 olarak tespit edilmiş olup, bu oran hücrelerin 3 μ M metilpiperazin süstitüe Ant 6 ile inkübasyonu sonrasında bulunmuştur. Chen ve arkadaşlarının (2013) yaptığı çalışmada metilpiperazin taşıyan yeni sentezlenmiş antrakınon türevinin ovaryum

kanser hücrelerinde, DNA'nın kondanse halde bulunmasından sorumlu telomeraz enziminin aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir.

Sonuç olarak; HeLa hücrelerinde, antrakinon türevlerinin zamana bağlı olarak apoptotik etkilerinin azaldığı, mitoksantronun ise apoptotik etkisinin arttığı belirlenmiştir. Ancak bu artış büyük ölçüde olmamakla birlikte antrakinon türevlerinin düşük dozda ve kısa inkübasyon sürelerinde mitoksantrona oranla HeLa hücreleri üzerinde daha yüksek apoptotik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Son dönemde yapılan bir çalışmada, amido mitoksantronların analoglarının DNA bağlantılı topoizomeraz inhibisyonu üzerinde etkin olmadıkları ve bu durumun antrakinon türevlerinin kimyasal yapısına bağlı olarak DNA ile farklı ilişkiler kurabileceğini göstermektedir (Joseph ve ark., 2010).

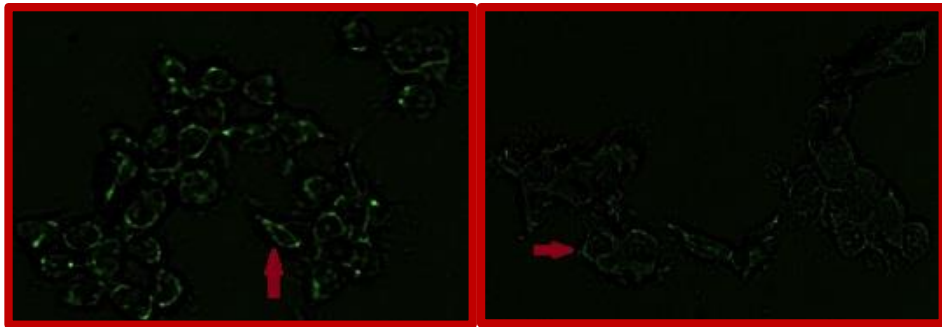
Chang ve ark. (2011) ise 1,2 konumdan siklik halka süstitüe antrakinon türevinin HeLa hücrelerinde hem topoizomeraz hem telomerazı inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca literatürde yer alan bir çalışmada, yeni sentezlenen 1,3-dihidroksi süstitüe antrakinon türevlerinin serviks kanser hücresinde geç apoptozun önemli belirteçlerinden olan DNA fragmentasyonuna neden oldukları tespit edilmiştir (Weia ve ark., 2000).

a)

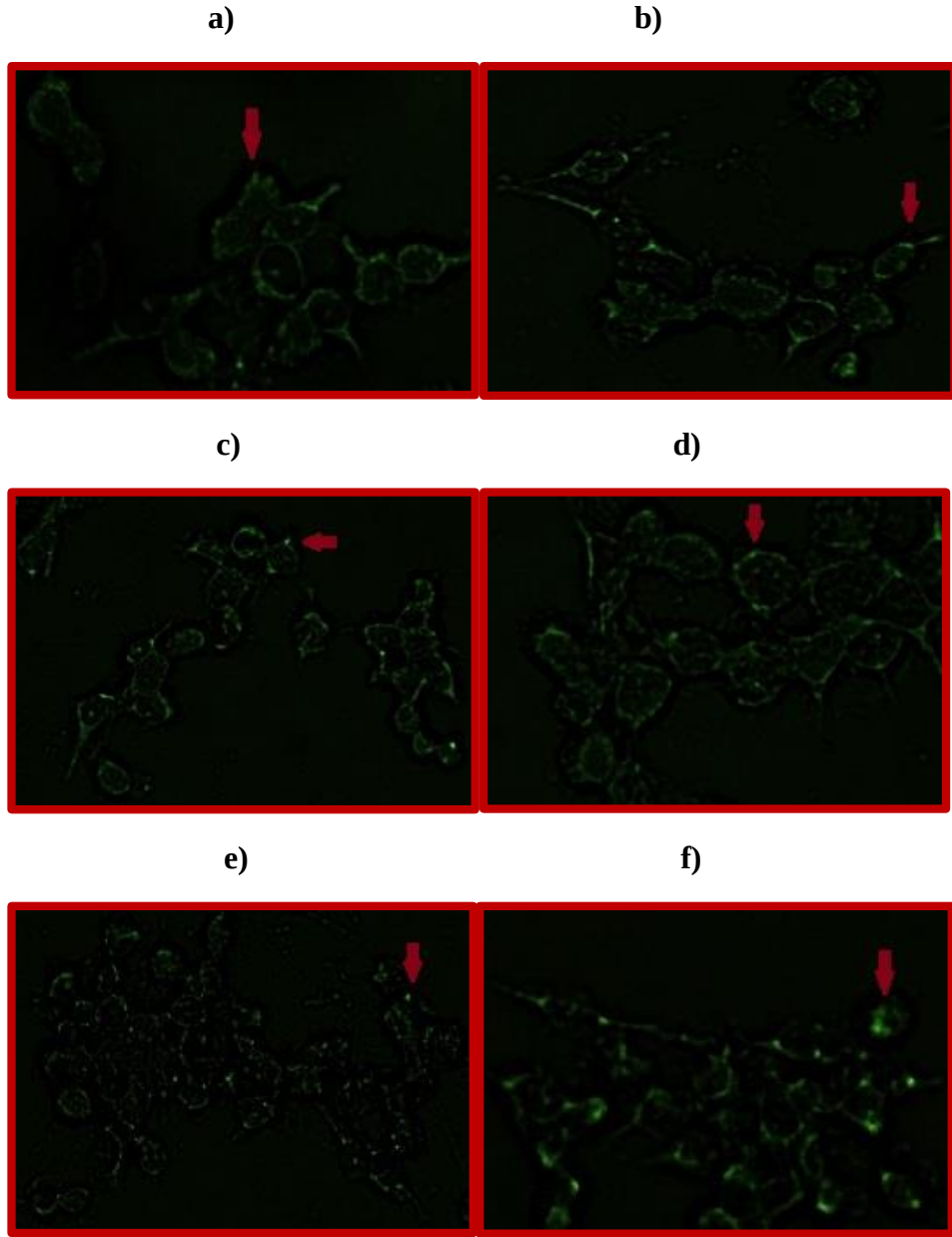


b)

c)

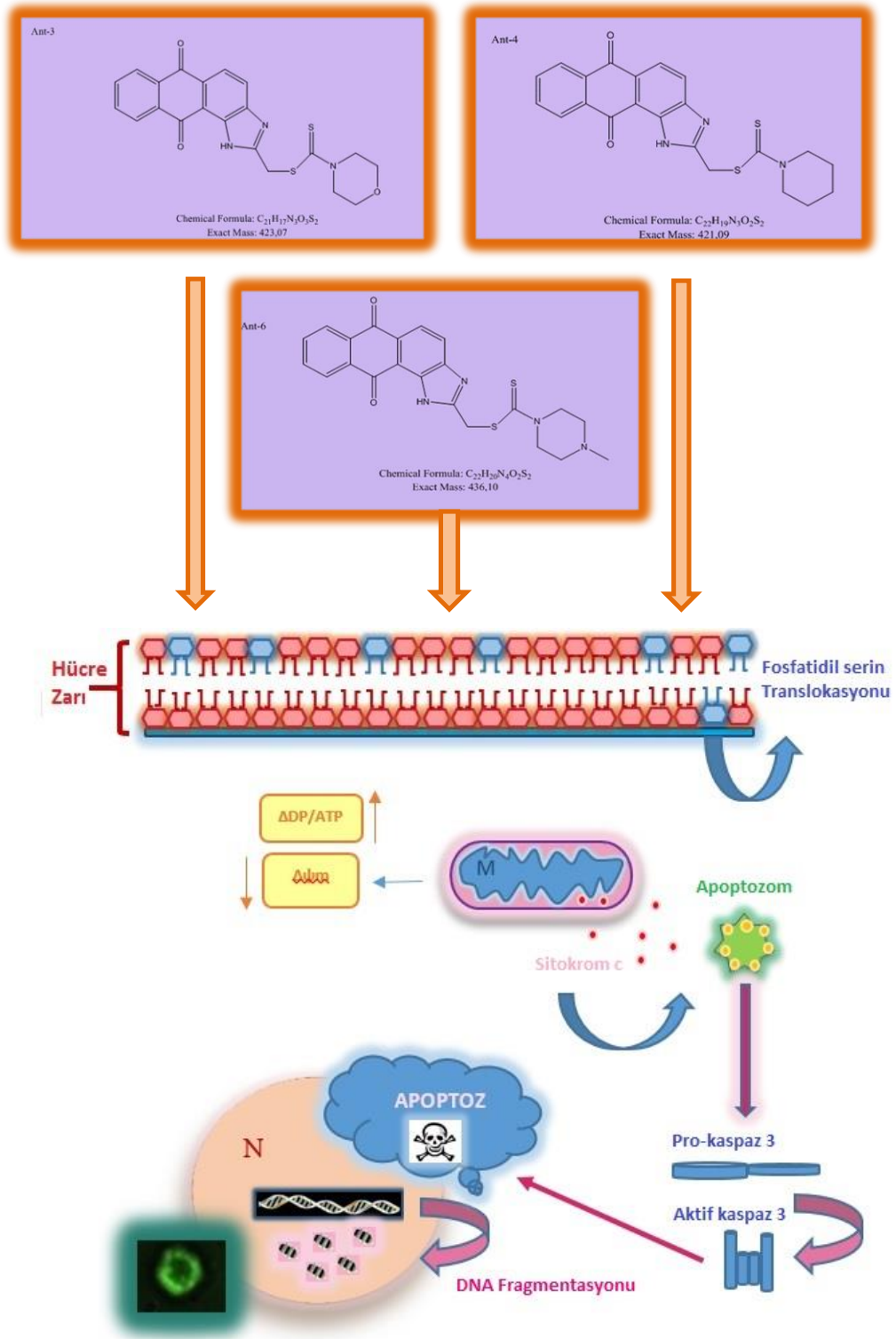


Şekil 33. Mitoksantronun HeLa Hücreleri ile 24 Saat İnkübasyon Sonrası Gözlenen DNA Fragmentasyonunun Floresan Mikroskobu ile Analizi. a) Madde uygulaması yapılmayan HeLa hücreleri b) 4.4 µM Mitoksantron c) 2.6 µM Mitoksantron



Şekil 34. Antrakininon Türevlerinin HeLa Hücreleri ile 24 Saat İnkübasyon Sonrası Gözlenen DNA Fragmentasyonunun Floresan Mikroskobu ile Analizi.
a) 10 μ M Ant 3 b) 6 μ M Ant 3 c) 8 μ M Ant 4 d) 5 μ M Ant 4 e) 8 μ M Ant 6 f) 3 μ M Ant 6

Tez kapsamında, yeni sentezlenen antrakininon türevlerinin HeLa hücre çoğalmasındaki etkileri mitokondriyal aktiviteye bağlı olarak incelenmiş olup, düşük dozda tümör hücreleri üzerine sitotoksik etkili olan Ant 3, Ant 4 ve Ant 6'nın apoptotik süreçteki rolleri ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Bu kapsamda her üç türevin de mitoksantrona göre üstünlükleri olduğu tespit edilmiştir. Antrakininon türevlerinin HeLa hücrelerinin membranında fosfatidil serin translokasyonuna neden oldukları gözlenerek, erken apoptozda, mitoksantrona oranla, daha erken inkübasyon süresinde daha etkili oldukları belirlenmiştir.



Şekil 35. Antrakinon Türevlerinin HeLa Hücrelerinde Tetikledikleri Apoptoz Mekanizması

Aynı şekilde bu 3 türevin, HeLa hücrelerinde apoptotik DNA kırıklarına neden oldukları tespit edilerek, geç apoptozda da, mitoksantrona oranla daha yüksek etkinlik gösterdikleri belirlenmiştir. Antrakınon türevlerinin mitokondriyal membran potansiyeline bağlı olarak HeLa hücrelerinin sitozolik ADP/ATP oranında düşüşe neden olması dolayısı ile apoptozun tetiklenmesinde mitokondri aracılı yolun izlenmiş olabileceği düşünülmektedir. Diğer yandan türevlerin HeLa hücrelerinde kaspaz-3 aktifleşmesine neden olması kaspaz bağımlı apoptoza işaret ederek, kaspazların aktifleşmesinin de diğer verilerden yola çıkarak mitokondriyal yoldan olabileceğini işaret etmektedir. Antrakınon türevlerinin HeLa hücrelerinde tetikledikleri apoptoza ilişkin etki mekanizması **Şekil 35'**de gösterilmiştir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızın sonucunda, yeni sentezlenen antrakinon türevlerinin HeLa hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip oldukları ve özellikle metilpiperazin sübstitüe, piperidin sübstitüe ve morfolin sübstitüe türevlerinin apoptozu mitoksantrona oranla etkili bir şekilde HeLa hücre apoptozunu uyardıkları tespit edilmiştir. Antrakinon türevlerinin HeLa hücreleri üzerinde erken apoptotik etkileri mitoksantrona göre düşük dozda ve erken evrede daha yüksek oranda olduğu, aynı şekilde geç apoptotik etkilerinin de DNA fragmentasyonu tayini ile oluşturulan apoptotik indeks verilerine dayanarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu türevlerin apoptotik yolda DNA kırılmasını uyaran kaspaz-3 aktivitesine neden oldukları deneysel olarak gösterilmiştir. Bu sonuçlar türevlerin apoptotik etki mekanizmasının kaspaz-bağımlı olabileceğini düşündürmektedir. Bunun için intrinsik ve ekstrinsik yolda görev alan diğer kaspaz moleküllerinin aktivasyon seviyelerinin araştırılması gerekmektedir. Bununla birlikte DNA fragmentasyonunda rol oynayan ICAD (inhibitör of caspase-activated deoxyribonuclease) ve CAD (caspase-activated deoxyribonuclease) moleküllerinin aktivasyon seviyeleri belirlenmelidir. Kaspazlar tarafından parçalanarak CAD'ın serbestleşmesini ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olmasını tetikleyen ICAD varlığının tespit edilmesinin önemli olacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte antrakinon türevlerinin hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak apoptozu tetikleyen ölüm aktivatörleri olabilme ihtimalleri ile ilgili çalışmalar yapılması hedeflenmektedir.

Diğer yandan HeLa hücrelerinin, antrakinon türevleri ile 6 ve 12 saatlik inkübasyonu sonrasında ölçülen ADP/ATP oranı, zamana bağlı olarak artmış ve mitokondriyal membran potansiyelinin düşüşü ile ilişkilendirilen bu durum, türevlerin etki mekanizmasında mitokondrinin rolü noktasında ipuçları vermiştir. Bu yolağın tanımlanabilmesi için mitokondriyal kaynaklı sitokrom c molekülünün deneysel olarak ölçülmesi gerekmektedir.

Apoptoz mekanizması aydınlatıldıktan sonra, uygulanan ilaç tedavilerinde etken maddenin terapötik etkinliğini sınırlayan P glikoproteininin etkinliği tespit edilerek, sentezlenen yeni türevlerin, kanser tedavisi noktasında etkinliklerinin detaylı şekilde belirlenmesi, çalışmaların *in vivo* ortamda yürütülmesi, yeni sentezlenen bu türevlerin serviks kanseri için umut vadeden kemoterapötik ajan olabilmeleri yolunda önemli katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Aliabadia, H. S., Tabarzadib, M., Zarghic A., Synthesis and cytotoxic evaluation of two novel anthraquinone derivatives, *Il Farmaco*, Volume 59/ 8, 645–649 (2004).
- Allen, P. D., Bustin, S. A., Newland, A. C. ,The role of apoptosis (programmed cell death) in hemopoiesis and the immune system, *Blood Reviews*,7: 63-73 (1993).
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson D. W., Salvesen G., Thomnberry N. A., Wong W. W., Yuan J., Human ICE/CED-3 Protease nomenclature, *Cell*, 87: 171 (1996).
- Baldi, A., Boccia, V., Claudio, P. P., De Luca, A., Giordano, A., Genomic structure of the human retinoblastoma-related Rb2/p130 gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (10), 4629-4632 (1996).
- Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., Hausen, H., A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer, *Embo J.*, 3 (5), 1151-1157 (1984).
- Bradbury, D. A., Simmons, T. D., Slater, K. J., Crouch, S. P., Measurement of the ADP:ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis, *J. Immunol. Methods.*, 23;240(1-2):79-92 (2000).
- Bruder, J. T., Kovesdi, I., Adenovirus infection stimulates the Raf/MAPK signalling pathway and induces interleukin-8 expression, *J. Virol.*, 71 (1), 398-404 (1997).
- Burden, D. A., Osherooff, N., Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1400:139-154 (1999).
- Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T. A., Molecular cloning of the interleukin1 beta converting enzyme, *Science*, 256: 97-100 (1992).
- Chang, Y. L., Leea, H. J., Liub, S. T., Lina, Y. S., Chenc, T. C., Hsiehd, T. Y., Huanga, H. S., Huanga, S. M., Different roles of p53 in the regulation of DNA damage caused by 1,2-heteroannelated anthraquinones and doxorubicin, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43,1720-1728 (2011).
- Chen, C. L., Chang, D. M., Chen, T. C., Lee, C. C., Hsieh, H. H., Huang, F. C., Huang, K. F, Guh, J. H., Lin, J. J., Huang, H. S., Structure-based design, synthesis and evaluation of novel anthra[1,2-d]imidazole- 6,11-dione derivatives as telomerase inhibitors and potential for Cancer polypharmacology, *European Journal of Medicinal Chemistry* 60, 29e41 (2013).
- Cohen, J. J., Apoptosis, *Immunol Today*, 14: 126-30 (1993).

- Cohen, J.J., Apoptosis. To be or not to be, Postgraduate Syllabus, 1: 1 19 (1998).
- Coleman, R., Clarke, J., Gore, M., A phase II study of mitoxantrone in advanced carcinoma of the ovary, Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 24: 200-202 (1989).
- Deveoğlu, O., Karadağ, R., Genel Bir Bakış: Doğal Boyar Maddeler-Derleme, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 23(1), 21-32 (2011).
- Dzierzbička, K., Sowinski, P., Kołodziejczyk, A. M., Synthesis of analogues of anthraquinones linked to tuftsin or retro-tuftsin residues as potential topoisomerase inhibitors, J. Pept. Sci., 12: 670-678 (2006).
- Eguchi, Y., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis, Cancer Res., 15; 57 (10): 1835-40 (1997).
- Ehninger, G., Schuler, U., Proksch, B., Pharmacokinetics and metabolism of mitoxantrone, Clin. Pharmacokinet., 18(5): 365-80 (1990).
- Elmore, S., Apoptosis: a review of programmed cell death, Toxicol Pathol., 35(4):495-516 (2007).
- Erdoğan, B. B., Uzaslan, E. K., Apoptozis Mekanizmaları: Fas-FasL Bağımlı Apoptozis, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz Anabilim Dalı (2003).
- Evan, G., Littlewood, T. A., Matter of life and cell death, Science, 281: 1317-1321 (1998).
- Faulds, D., Balfour, J. A., Chrisp, P., Langtry, H. D., Mitoxantrone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer., Drugs, 41 (3): 400-449 (1991).
- Faulds, D., Balfour, J. A., Chrisp, P., Langtry, H. D., Mitoxantrone. A review ic and pharmacokinetic properties and Therapeutic potential in the of its one complex, J. Mol. Cell Cardiol., 29: 2415-30 (1997).
- Fidler, J. M., DeJoy, Q. S., Gibbons, Jr. J. J., Selective immunomodulation by the antineoplas agent mitoxantrone. Suppression of B lymphocyte function, Journal of Immunology, 137:727-732 (1986).
- Florea, A., Dopp, E., Büsselberg, D., Elevated Ca^{2+} transients induced by trimethyltin chloride in HeLa cells: types and levels of response, Cell Calcium, 37, 251-258 (2005).
- Gasowska-Giszcza, U., Darmochwal-Kolarz, D., Wasniewska, A., Dziubinska- Giannoni, E., Cirri, P., Paoli, P., Flaschi, T., Camici, G., Manao, G., Raugei, G., Ramponi, G., Acylphosphatase is a strong apoptosis inducer in HeLa cell line, Mol. Cell Biol. Res. Commun., 3, 264-270 (2000).

Gately, D. P., Howell, S. B., Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review, *Br. J. Cancer.*, 67 (6): 1171–6 (1993).

Gerschenson, L. E., Rotello, R. J., Apoptosis: a different type of cell death, *Faseb J.*, 6: 2450-55 (1992).

Gey, G. O., Coffman, W. D., Kubicek, M. T., Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium, *Cancer Res.*, 12: 264-265 (1952).

Gharib, M. I., Burnett, A. K, Chemotherapy-induced cardiotoxicity: current practice and prospects of prophylaxis, *European Journal of Heart Failure*, 4: 235-242 (2002).

Giannoni, E., Cirri, P., Paoli, P., Fiaschi, T., Camici, G., Manao, G., Raugei, G., Ramponi, G., Acylphosphatase Is a Strong Apoptosis Inducer in HeLa Cell Line, *Mol. Cell Bio. Res. Com.*, vol. 3 issue 5 p. 264-270 (2000).

Glucksmann, A., Cell death in normal vertebrate ontogeny, *Biol. Rev.* 1; 26: 59-86 (1981).

Grell, M., Krammer, P.H., Scheurich, P., Segregation of APO-1/Fas antigen and tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis, *Eur. J. Immunol.*, 24 (10): 2563-6 (1994).

Guin, P. S., Das, P., Das, S., Mandal, P. C., Interaction of Calf Thymus DNA with the Ni (II) Complex of Sodium 1,4-Dihydroxy-9,10-Anthraquinone-2-Sulphonate: A Novel Method of Analysis Using Cyclic Voltammetry, *International Journal of Electrochemistry*, 183745, 10 (2012).

Hannun, Y. A. , Apoptosis and the Dilemma of Cancer Chemotherapy, *Blood*, 89; 1845 (1997).

Hetts, S. W., To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease, *Jama*, 279: 300-7 (1998).

http-1 <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/appendixa.asp> (15.07.2013)

http-2 <http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf>
(03.06.2013)

http-3 http://www.servikskanseri.com/serviks_kanseri/temel_bilgiler.aspx
(06.06.2013)

http-4 http://www.irpa.net/irpa7/cdrom/VOL.3/S3_32.pdf (16.07.2013)

http-5 <http://thsk.gov.tr/tr/index.php/kanser-tipleri/337-serviks-kanseri>
(17.07.2013)

http-6 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26851/table/A1516/>
(11.06.2013)

http-7 <http://www.madsci.org/posts/archives/may97/860431113.Cb.r.html>
(02.06.2013)

http-8 <http://ezinearticles.com/?expert=Dr.NishiSingh> (07.06.2013)

http-9 <http://www.reading.ac.uk/cellmigration/apoptosis.html> (09.07.2013)

http-10 http://biyokimya.uludag.edu.tr/Lecture_Cancer_2002.pdf
(05.06.2013)

Huang, H. S., Chiu, H. F., Lee A. L., Guoa, C. L., Yuana C. L., Synthesis and structure–activity correlations of the cytotoxic bifunctional 1,4-diamidoanthraquinone derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12, 6163-6170 (2004).

Hunot, S., Flavell, R. A., Death of a Monopoly? *Science*, 292-5518 pp. 865-866 (2001).

Işıkdogan, A., Zincircioğlu, S. B., Dirier, A., Ayyıldız, O., Metastatik meme kanserinde birinci basamak tedavide antrasiklin içeren kombinasyon kemoterapi sonuçlarımız, *Dicle Tıp Dergisi Cilt 20 Sayı 1-4,(1-4)* (2003).

Iwamoto, Y., Hansen I. L., Porter, T. H., Folkers, K., Inhibition of coenzyme Q10 enzymes, succinoxidase and NADH-oxidase, by adriamycin and other quinones having antitumor activity, *Bioch. and Biophys. Res. Com.*, 58, Issue 3, 633-638 (1974).

Jacobson, M. D., Weil, M., Raff, M. C., Programmed cell death in animal development, *Cell*, 88: 347-54 (1997).

Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E., Cancer statistics, *CA Cancer J. Clin.*, 60:277-300 (2010).

Jamison, J. M., Krabill, K., Flowers, D. G., Enhancement of the antiviral activity of poly. R (A-U) by ametantrone and mitoxantrone, *Life Sciences*, 46: 653-661 (1990).

Joseph, S., Bair, R. P., Hergenrother, P. J., Chemistry and biology of deoxynyboquinone, a potent inducer of cancer cell death, *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 5469-5478 (2010).

Kelly, M., Boatright, G., Salvesen, S., Mechanisms of caspase activation, *Current Opinion in Cell Biology*, 15: 725-731 (2003).

Kerr, J. F. R., A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes, *J. Pathol. Bacteriol*, 90:419-35 (1965).

Kerr, J. F. R., Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death, *J. Pathol.*, 105: 13-20 (1971).

Kerr, J. F. R., Searle, J., A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figure, *J. Pathol.*, 107: 41-4 (1972).

Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R., Apoptosis : A basic biological phenomenon with widespread implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer*, 26: 239-57 (1972).

Kumar, V., Robbins Pathology 7th edition, 2005.

Lai, K. H., Tsai, Y. T., Lee, S.D., Phase II study of mitoxantrone in unresectable primary hepatocellular carcinoma following hepatitis B infection, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 23: 54-56 (1989).

Lawton, P.A., Ostrowski, M. J., Young, T., Efficacy and toxicity of single agent chemotherapy in advanced breast carcinomas, *British Journal of Cancer*, 61: 177 (1990).

Longueville, J., Mitoxantrone: review of effectiveness and side effects, *Proceedings of the International Symposium on Senology, Belgium*, 343-363 (1985).

Lumachi, F., Basso, S., Apoptosis: life through planned cellular death regulating mechanisms, control systems, and relations with thyroid diseases, *Thyroid*, 12 (1): 27-34 (2002).

Luo, S. K., Li, J. Hong, W. D., Preliminary report of fludarabine, mitoxantrone and dexamethasone in treating refractory or relapsed multiple myeloma, *Ai Zheng.*, 24 (12): 1518-21 (2005).

Macville, M., Schrock, E., Padilla-Nash, H., Keck, C., Ghadimi, B. M., Zimonjic, D., Popescu, N., Ried, T., Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping, *Cancer Res.*, 59 (1), 141-150 (1999).

Markman, M., George, M., Hakes., T., Phase II trial of intraperitoneal mitoxantrone in the management of refractory ovarian cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 8: 146-150 (1990).

Markovic, V., Janicijevic, A., Stanojkovic, T., Kolundzija, B., Sladic, D., Vujcic, M., Janovic, B., Joksovic, L., Djurdjevic, P. T., Todorovic N., Trifunovic, N., Joksovic, M. D., Synthesis, cytotoxic activity and DNA-interaction studies of novel anthraquinon ethiosemicarbazones with tautomerizable methylene, *Group European Journal of Medicinal Chemistry* 64, 228-238 (2013).

Marshall, J. C., Malam, Z., Jia, S., Modulating neutrophil apoptosis, *Novartis Found Symp.*, 280: 53-72 (2007).

Mountz, J. D., Zheu, T., Su, X., Wu, J., Cheng, J., The role of programmed cell death as an emerging new concept for pathogenesis of autoimmune disease, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 8: 2-14, (1996).

Nicholson, D. W., Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic cell death, *Cell Death Differ.*, 6: 1028-1042 (1999).

Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., Haanen, C., Early Features of Apoptosis Detected by Four Different Flow Cytometry Assays, *Apoptosis* vol. 3 issue 2, 115-121 (1998).

Park, J. A., Lee, K. Y., Kim ,K.W., Lee, S. K., Activation of caspase-3 protease via a Bcl-2-insensitive pathway during the process of ginsenoside Rh2-induced apoptosis, *Cancer Lett.*, 121: 73-81 (1997).

Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., Global cancer statistics, 2002, *CA Cancer J Clin.*, 55: 74-108 (2005).

- Patel, T., Gores G. J., Kaufmann, S. H., The role of proteases during apoptosis, *Faseb J.*, 10: 587-97 (1996).
- Perez, E. A., Current management of metastatic breast cancer, *Semin. Oncol.*, 12: 10 (1990).
- Robert, J., Epirubicin. Clinical pharmacology and dose-eff, *Drugs*, 45: 20–30 (1993).
- Rosenberg, L. J., Hittelman, W. N., Direct and indirect clastogenic activity of anthracenedione in Chinese hamster ovary cells, *Cancer Research*, 43: 3270-3275 (1983).
- Ross, D., Gao, Y., Yang, Y., Leszyk, J., Shively, J. & Doyle, L. A., The 95-kilodalton membrane glycoprotein overexpressed in novel multidrug-resistant breast cancer cells is NCA, the nonspecific cross-reacting antigen of carcinoembryonic antigen, *Cancer Res.* 57, 5460-5464 (1997).
- Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J. M., Venkatachalam, M. A., Apoptosis definition, mechanism and relevance to disease, *Am. J. Med.*, 107: 489-506 (1999).
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P., Haslett, C., Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis, *Immunology Today*, 14: 131-6 (1993).
- Sauders, J. W., Death in embryonic systems, *Science*, 154: 604-12 (1966).
- Scheffner, M., Munger, K., Byrne, J. C., Howley, P. M., The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 (13), 5523-5527 (1991).
- Scherer, W. F., Syverton J. T., Gey G. O., Studies on the propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of cervix, *J. Exp. Med.*, 97 (5), 695-710 (1953).
- Schneider-Gadicke, A., Schwarz, E., Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes, *Embo J.*, 5 (9), 2285-2292 (1986).
- Schwartz, L. M., Osborne, B. A., Programmed cell death, apoptosis and killer genes, *Immunology Today*, 14: 582-90 (1993).
- Schwartzman, R. A., Cidlowski, J. A., Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death, *Endocrine Review*, 14: 133-150 (1993).
- Shchekotikhin A. D., Glazunova V. A., Luzikov, Y. N., Buyanov, V. N., Susova, O. Y., Shtilb, A. A., Preobrazhenskaya, M. N., Synthesis and structure–activity relationship studies of 4,11-diaminonaphtho[2,3-f]indole-5,10-diones, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, 5241-5251 (2006).
- Shepherd, F. A., Ewans, W. K., Blackstein, M. E., Hepatic arterial infusion (HAI) of mitoxantrone (MIT) in the treatment of primary hepatocellular

carcinoma (HCG), 14th International Congress of Chemotherapy, Japan, 239: 23-28 (1985).

Siragusa, G. R., Cutter C. N., Microbial ATP bioluminescence as a means to detect contamination on artificially contaminated beef carcass tissue, J. Food Prot., 58: 764-769 (1995).

Tesarik, J., Greco, E., Cohen-Bacrie, P., Mendoza, C. Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure, Mol. Hum. Reprod., 4, 757-762 (1998).

Thompson, E. B., Apoptosis and steroid hormones, Mol. Endocrinol., 8: 665-73 (1994).

Thompson, C. B., Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science, 267; 1456-62 (1995).

Tilly, J. L., Ovarian follicular atresia as an apoptotic process, a paradigm for programmed cell death in endocrine tissues, Mol. Cell Endocrinol., 84: 19-23 (1992).

Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard A. D., Kostura, M. J., A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes, Nature; 356: 768-774 (1992).

Walker, N. I., Harnon, B. W., Gobe, G. C., Kerr, J. F. R., Patterns of cell death, Methods Achiev. Exp. Pathol., 13: 18-54 (1988).

Weia, B. L., Wub, S. H., Chungb, M. I., Wonc, S. J., Linb, C. N, Synthesis and cytotoxic effect of 1,3-dihydroxy-9,10-anthraquinone derivatives, Eur. J. Med. Chem., 35 1089-1098 (2000).

Willette, R. E., Analgesic Agents, In Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry; 10th Ed.; Lippincott-Raven; Philadelphia, 687-708 (1998).

Wojtacki J, Lewicka-Nowak E, Lesniewski-Kmak K. Antracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention-review of the literature. Med. Sci. Monit., 6 (2): 411-420 (2000).

Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., Currie, A. R., Cell death: the significance of apoptosis, Int. Rev. Cytol., 68: 251 -306 (1980).

Wyllie, A. H., Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation, Nature, 284: 555-6 (1980).

Wyllie, A. H. , What is apoptosis? Histopathology, 10: 995-8, (1980).

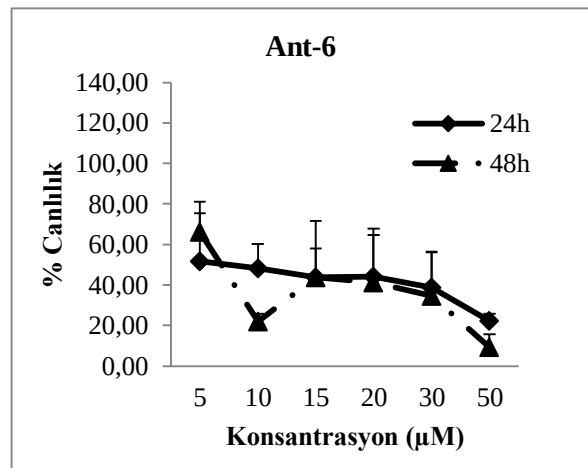
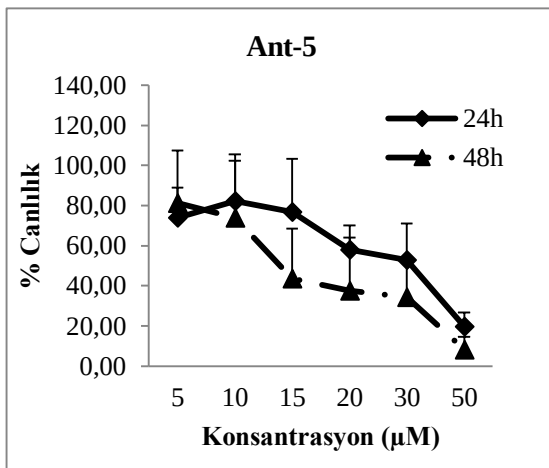
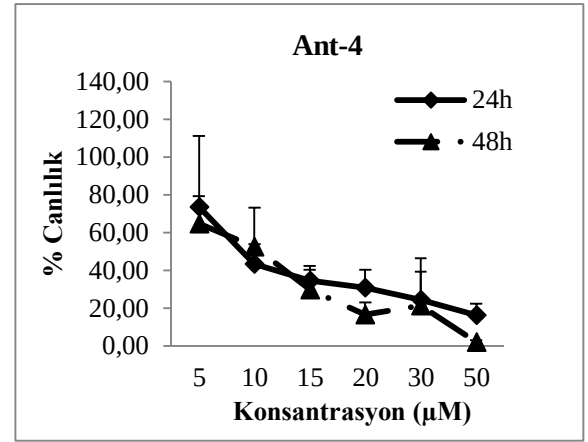
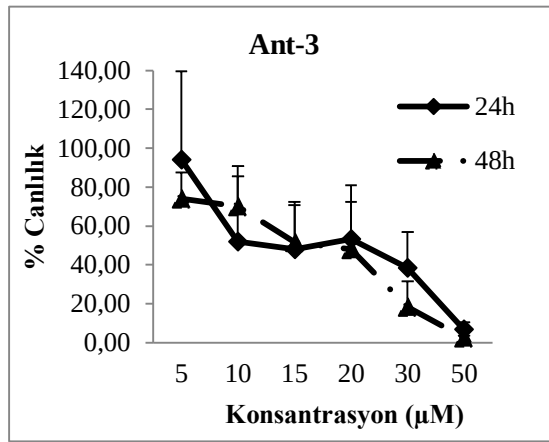
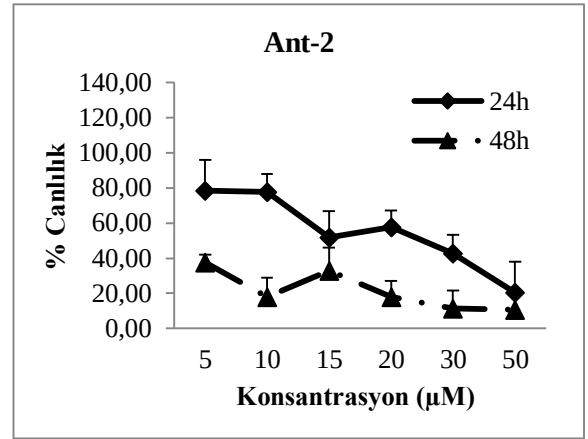
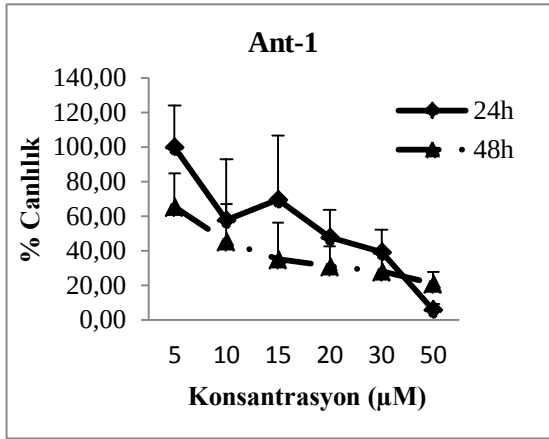
Yaoxian W., Hui Y., Yunyan Z., Yanqin L., Xin G. and Xiaoke W. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer hela cells via intrinsic mitochondrial and extrinsic death receptor pathway, Cancer Cell International, 1475-2867-13-71 (2013).

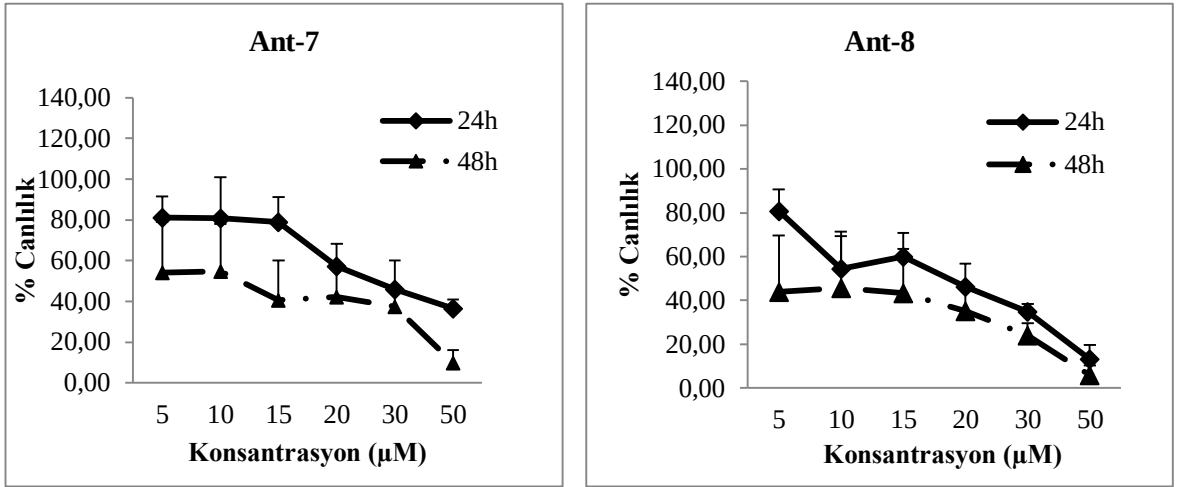
Yıldırım, A., Tunaoglu, F. S, Pınarlı, F. G. , İlhan, M. , Oğuz, A. Karadeniz, C., Olguntürk, R., Oğuz, D., Kula, S., The role of dobutamine

stress echocardiography in early diagnosis of cardiac toxicity in long-term survivors of asymptomatic children treated with anthracycline, Anadolu Kardiyol Derg., 10: 154-62 (2010).

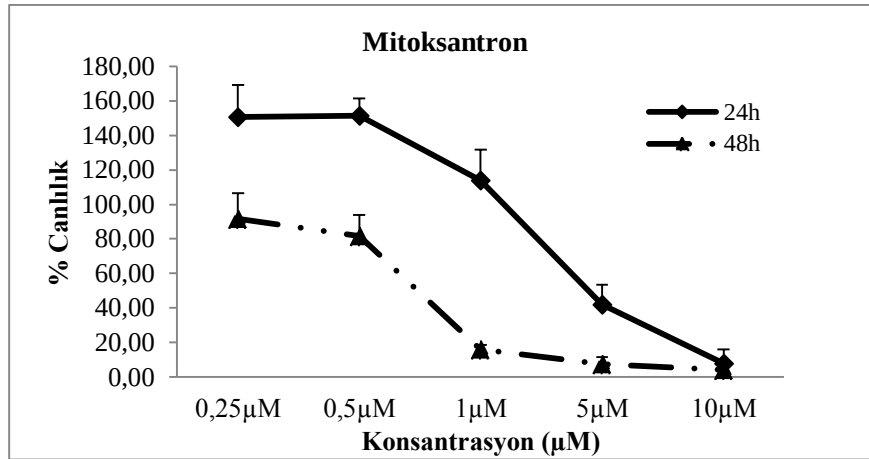
EK 1

Mitoksantron ve Antrakinon Türevlerinin Sitotoksik Etki Grafikleri





Şekil 36. Antrakinon türevlerinin HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkileri. Her bir veri noktası 8 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir. Madde verilmeyen kontrol grubunun hücre çoğalma oranı % 100 olarak kabul edilmiştir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, ortalama değerler $\pm$ St. Hata (n = 8)



Şekil 37. Mitoxsantronun HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkisi. Her bir veri noktası 8 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir. Madde verilmeyen kontrol grubunun hücre çoğalma oranı % 100 olarak kabul edilmiştir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, ortalama değerler $\pm$ St. Hata (n = 8)