

**THE EFFECTS OF 1,3 BIS (HETEROARYL SUBSTITUED) BENZENE  
DERIVATIVES ON APOPTOSIS OF N-RAS TRANSFORMED MOUSE  
SKELETAL MUSCLE CELL**

1,3-BİS (HETEROARİL SÜBSTİTÜE) BENZEN TÜREVLERİNİN N-RAS  
TRANSFORM FARE KASI HÜCRE APOPTOZU ÜZERİNE ETKİLERİ

**Gülşen AKALIN, Zerrin İNCESU\***

Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, 26470

Eskişehir, TURKEY

**ÖZET**

*Aşırı hücre bölünmesinden dolayı hücre sayısındaki artış fonksiyonel olmayan ve yaşlı olan hücrelerin eliminasyonu ile dengelenmektedir. Bu denge apoptoz (programlı hücre ölümü) mekanizmasının tetiklenmesi ile sağlamaktadır. Günümüzde gerçekleştirilmek istenen birçok kemoterapi tedavisinin hedefi kanserli hücrelerin apoptozunu indüklemektir. Bu amaçla, çalışmamızda kemoterapötik ajan olarak kullanılabilirliği düşünülen 1,3-bis (heteroaril süstitüe) benzen türevi olan MBİS1, MBİS2 ve MBİS8'in sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, MBİS8'in CO25 hücre hattında 0,01 mg/ml ve MBİS1'in 0,1 mg/ml konsantrasyonlarında anlamlı bir şekilde sitotoksositeye neden olduklarını göstermiştir. Ayrıca morfolojik olarak apoptozun belirlenmesinde kullanılan akridin oranj / etidyum bromür boyama sonuçlarına göre sırasıyla 0,05 ve 0,1 mg/ml konsantrasyonlarında MBİS1 ve MBİS8'in 8 ve 24 saat inkübasyon sonrası etkili oldukları gözlenmiştir. Ancak her iki madde de 24 saat inkübasyon sonrası C2 ve CO25 hücrelerinde, kontrole göre anlamlı erken apoptotik hücreye neden olmamıştır. Aynı zamanda geç apoptozun belirteci olan apoptotik DNA merdiveni görüntüsüne de rastlanmamıştır. Morfolojik olarak apoptotik hücrelerin belirlenmesi haricinde, incelenen diğer apoptotik belirteçlerin, MBİS1 veya MBİS8 stimülasyonu sonucu bu hücre hatlarında var olmadığı tespit edilmiştir.*

**Anahtar kelimeler:** Apoptoz, Sitotoksosite, N-ras, Benzen

\* Correspondence

**ABSTRACT**

*Increasing number of the cells , results of excess dividing of the cells, is balanced by apoptosis which causes elimination of old cells and unfunctional cells. Apoptosis is a programmed cell death obtaining this balance. In our age lots of used chemoterapeutic's target is to increase cancer cell's apoptosis. Therefore MBİS1, MBİS2 ve MBİS8 were used to investigate apoptotic and cytotoxic effects on both C2 and CO25 cell lines. These findings showed that MBİS8 and MBİS1 had cytotoxic effects respectively 0,01 mg/ml and 0,1 mg/ml doses in CO25 cell line. Also acridine orange / ethidium bromide metod which is used to determine morphological changes in apoptotic cells showed that 0,05 mg/ml and 0,1 mg/ml MBİS1 and MBİS8 were effective on CO25 cells after 8 and 24 hour incubation. However neither MBİS1 nor MBİS8 showed any early apoptotic cell on C2 and CO25 cell lines at the end of the 24 hour incubation time. Likewise DNA ladder pattern which is determinant of late apoptosis was not appear in CO25 cells. Except proving some apoptotic cells morphologically, the stimulation of cells by either MBİS1 or MBİS8 did not cause any other apoptotic changes.*

**Keywords:** Apoptosis, Sitotoksosite, N-ras, benzene

**GİRİŞ**

Hücreler belli bir süre yaşar ve sonra da ölürlür. Hücrelerin yaşamını sonlandırmada rol oynayan iki önemli olay; apoptoz ve nekrozdur. Programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz fizyolojik bir olaydır ve gelişim; homeostaz ve patojenezde önemli roller üstlenmektedir (1,2). Aşırı hücre bölünmesinden dolayı hücrelerdeki artış, fonksiyonel olmayan veya yaşlı olan hücrelerin eliminasyonu ile dengelenmektedir. Bu dengeyi sağlayan işlem apoptotik programdır ve bu programdaki hasarlar hücrelerde patolojik azalışa veya artışa neden olarak hastalıklara yol açmaktadırlar. Apoptoz hasarlı DNA'ya sahip hücrelerin yıkımını da sağlamaktadır. Wyllie tarafından yapılan bir çalışmada bu mekanizmanın dört saat kadar kısa bir sürede tamamlandığı gösterilmektedir (2).

Nekrotik hücrelerde şişme, sitoplazma organellerinin dağılması, hücre membranının bozulması ve patlaması karakteristik özelliklerdir. Dokunun nekroza verdiği cevap ise inflamasyon oluşumu tarzındadır (3). Apoptotik hücrelerde kromatin materyalinin kondensasyonu ile ilişkili olarak çekirdeğin küçülmesi ve kırılması (4), sitoplazmik hacmin kaybolmasından dolayı hücrenin küçülmesi ve sitoplazmik proteinlerin kondensasyonudur. Bunun yanı sıra plazma ve hücre zarında kabarcıkların ve hücre zarına bitişik hücrelerarası ortama uzanan 'apoptotik cisimciklerin' oluşmasıdır (5). Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden bir diğeri, normalde hücre zarının iç yüzünde bulunan negatif yüklü fosfatidilserinin apoptozun erken safhalarında hücre

plazma zarının dış yüzeyine doğru yerleşmesidir (6). En önemli biyokimyasal özellik ise kromozomal DNA'nın hücrede morfolojik değişimlerle birlikte görülen internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti boyutunda DNA kırıkları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır (7).

1,2(3)(4)(5)-bis (süstitüe) benzen ana yapısına sahip bileşiklerin farklı farmakolojik etkilere sahip olduğu gözlenmiştir. Bunlar; anti tümör (8, 9), sitotoksik (10), antiviral (11), fungusit (12, 13), kas gevşetici (14), lipoksijenaz inhibitörü (15) ve gençlik hormon aktivitesi (16) gibi etkilere sahiptir. Çalışmamızda kullanılan 1,3-bis (heteroaril süstitüe) benzen türevlerinin hücre içi  $Ca^{+2}$  seviyesini plazma zarındaki  $Ca^{+2}$  kanallarını etkileyerek artırdıkları gözlenmiştir (17). Yapılan bir çalışmada hücre içi artan kalsiyum düzeyinin apoptoza yol açtığı ve bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinin  $Ca^{+2}$ u tekrar depolarına gönderip hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu düzenlediği ve bunun sonucu olarak da apoptozun engellediği gözlenmiştir (18). Hücre içi  $Ca^{+2}$  etkilerinden dolayı (17), bu sentetik moleküllerin sitotoksik ve apoptotik etkileri *in vitro* ortamda kontrol (C2) ve N-ras aktif (CO25) hücreleri kullanılarak araştırılmıştır.

## MATERYAL-YÖNTEM

### Hücre kültürü ve bileşiklerin hazırlanması

C2 ve CO25 hücreleri Dr. I. Gibson'dan East Anglia Üniversitesi (İngiltere) Biyolojik Bilimler Okulu, Moleküler Biyoloji bölümünden sağlanmıştır. C2 hücreleri (19) fare bacak kasından izole edilmiş olup, CO25 hücreleri ata hücre olan C2 hücresine (20, 21) 61. kodonundan mutant N-ras onkogeni taşıyan bir plazmidin aktarılması ile elde edilmiştir.

C2 ve CO25 % 10 fetal dana serumu (FCS) ve 100 ünite/ml penisilin-streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's solüsyonu (DMEM) içerisinde 37 °C' de ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatör ortamında tutulmuşlardır. Hücreler daha sonra 2 × tripsin/EDTA solüsyonu ile 1:3 oranında alt kültürlerine ayrılmışlardır.

CO25 hücre transformasyonunun indüklenmesi için, hücreler 1µM dekzametazon içeren %10 at serum besisi ortamında 4-7 gün inkübe edilmişlerdir ve bu sürenin sonunda transformasyona uğrayan hücreler diğer deney aşamalarında kullanılmak üzere ayrılmışlardır (22). Benzen türevlerinin stok solüsyonları dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde hazırlandı ve daha sonraki dilüsyonlar taze kültür vasatları kullanılarak yapılmıştır.

### **MTT ölçümü**

$2 \times 10^4$  hücre/ml de olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonundan, 100µl 96 kuyulu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğuna aktarılmış ve aynı zamanda hücrelere 0,0002-0,001-0,002-0,01-0,02-0,1 mg/ml konsantrasyonlarında bileşenler eklenerek 37 °C' de inkübe edilmişlerdir. 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 20 µl MTT boyası (5 mg/ml) ilave edilmiş ve 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 inkübe edilmişlerdir. Renk değişimi, ELx808-IU Bio-Tek plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyu ile belirlenmiştir. Bileşen ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edilmiştir (22). Doz ve zaman aralığı, literatürdeki benzer türlerinin çeşitli kanser (HeLa S3) hücre tiplerine karşı gösterdikleri sitotoksik konsantrasyonlara bağlı olarak belirlenmiştir (9,10).

### **Akridin oranj boyama**

$1 \times 10^6$  hücre/ml de olacak şekilde hücreler, steril lamellerin yerleştirildiği cam petri kaplarına aktarılmış ve test maddeleri eklenerek belli zaman aralıklarında inkübe edilmişlerdir. Hücreler  $1 \times$  PBS solüsyonu ile 3 kez yıkandıktan sonra cam petrilere 1 ml % 70 etanol eklenerek 5 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılmışlardır. Daha sonra,  $1 \times$  PBS içersinde seyreltilen 200 µl akridin oranj (100 µg/ml) ve etidyum bromür (100 µg/ml) karışımı ile oda ısısında 5 dakika inkübe edilmişlerdir. Hücreler son kez  $1 \times$  PBS ile yıkama işlemine tabi tutulduktan sonra hücre preparatı hazırlanmış ve bu aşamadan sonra preparatlar ya hemen floresan mikroskop (Olympus) altında incelemeye alınmış ya da +4 °C de 1 hafta saklanmıştır (23).

### **Akım sitometri analizi**

Hücreler, 800 rpm de 4 dakika santrifüj edildikten sonra  $1 \times$  PBS ile 2 kez yıkanmışlardır ve  $2-3 \times 10^6$  hücre/ml de olacak şekilde  $1 \times$  Annexin-V bağlanma çözeltisinde süspansiyon edilindikten sonra hücre solüsyonundan 100 µl alınarak tüplere aktarılmıştır. Daha sonra her bir tüpe, 5 µl Annexin-V FITC ve 10 µl propidyum iyodür çözeltisi eklenmiştir. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildikten sonra her bir tüpe 400 µl  $1 \times$  Annexin-V bağlanma çözeltisi ilave edilmiş ve hücreler 1 saatlik boyama süresi içerisinde akım sitometrisi (Calibur, B.D) ile analiz edilmiştir.

### **DNA ekstraksiyonu ve elektroforetik analiz**

$1 \times 10^6$  hücre/ml de olacak şekilde hücreler 24 saat uygun besi ortamlarında bekletilmişlerdir. Belli konsantrasyondaki bileşenler ile muamele edilen hücreler, tripsin ile toplanarak 1.5 ml' lik ependorf tüplere aktarılmışlardır. Daha sonra 800 rpm de 4 dakika santrifüj

edildikten sonra,  $1 \times$  PBS çözeltisinde yıkanmış ve % 0.5 sarkosil, 20 mg/ml proteinaz K (24), 50 mM Tris (hidroksimetil) aminometan (pH 8.0) ve 10 mM EDTA 55 °C de 3 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda RNaz A (10 mg/ml) (24) eklenmiş ve 55 °C de 24 saat inkübe edilmiştir. İzole edilen DNA, fenol/kloroform/izoamilalkol (25:24:1) ile ekstrakte edilerek etidyum bromür içeren (500 µg/ml) % 1.2' lik agaroz jelde 50 V uygulanarak 120 dakika yürütülmüştür (25).

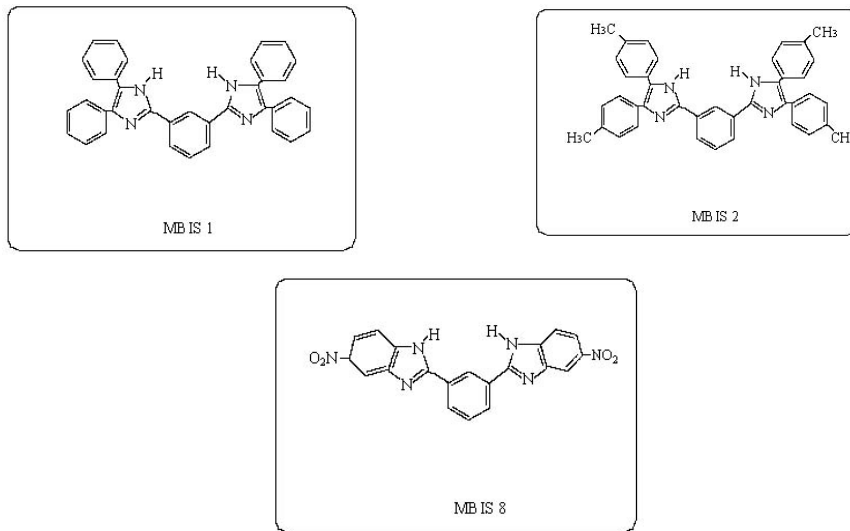
### İstatistiksel değerlendirmeler

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

### SONUÇ

#### 1,3-bis (heteroaril süstitüe) benzen türevlerinin sitotoksik etkileri

Şekil 1'de kimyasal yapı formülleri verilen MBİS1, MBİS2 ve MBİS8'in farklı konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat inkübe edilen C2 ve CO25 hücre hatları MTT boyası ile inkübe edildikten sonra % hücre canlılığı tespit edilmiştir. MTT boyası mitokondriyal dehidrogenazların etkisiyle (26) 2 saat sonunda sarı renkli kristaller oluşturur ve oluşan formazan tuzları DMSO ile çözdürüldükten sonra renk değişimi 540 nm dalga boyunda ölçülür. DMSO da hazırlanana benzen türevlerinin ileri dilüsyonları kültür besisi solüsyonunda yapıldığından DMSO'nun konsantrasyonu % 1 den küçüktür (27) bu nedenle, deney düzeneğinde çözücü olarak kullanılan DMSO 'in herhangi bir etkisi gözlenmemiştir.



Şekil 1. Benzen türevlerinin kimyasal yapı formülleri

MBİS1'in *N-ras* aktif hücreler üzerine olan sitotoksik etkileri doza bağımlı olarak ortaya çıkmıştır (Şekil 2b). 24 saat sonra benzen türevi (0,02 mg/ml) CO25 hücreleri üzerine % 13 sitotoksosite gösterirken, bu oran zamana bağımlı olarak 48 saat sonra % 42'ye kadar yükselmiştir. MBİS1 türevi CO25 hücrelerinde olduğu gibi C2 kontrol hücrelerinde de zamana ve doza bağımlı sitotoksik bir etkiye sahip olduğu (Şekil 2a) tespit edilmiştir. MBİS1'in C2 hücreleri (24 saat) için  $IC_{50}$  değeri 0,09 mg/ml, CO25 hücreleri için ise 0,1 mg/ml olarak bulunmuştur (Tablo 1).

Bir diğer benzen türevi olan MBİS2'in *N-ras* aktif ve kontrol hücre sitotoksitesisi üzerine etkisi Şekil 2c, d gösterilmiştir. CO25 hücrelerinde, MBİS2 türevi konsantrasyona ve zaman bağımlı sitotoksik etkiye sahipken benzer etki C2 kontrol hücrelerinde de görülmektedir bu nedenle bu benzen türevinin *N-ras* aktif hücreleri üzerine seçici bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu söylemek mümkün değildir.  $IC_{50}$  değerleri C2 ve CO25 hücreleri için sırasıyla 0,06 ve 0,1 mg/ml olarak bulunmuştur (Tablo 1).

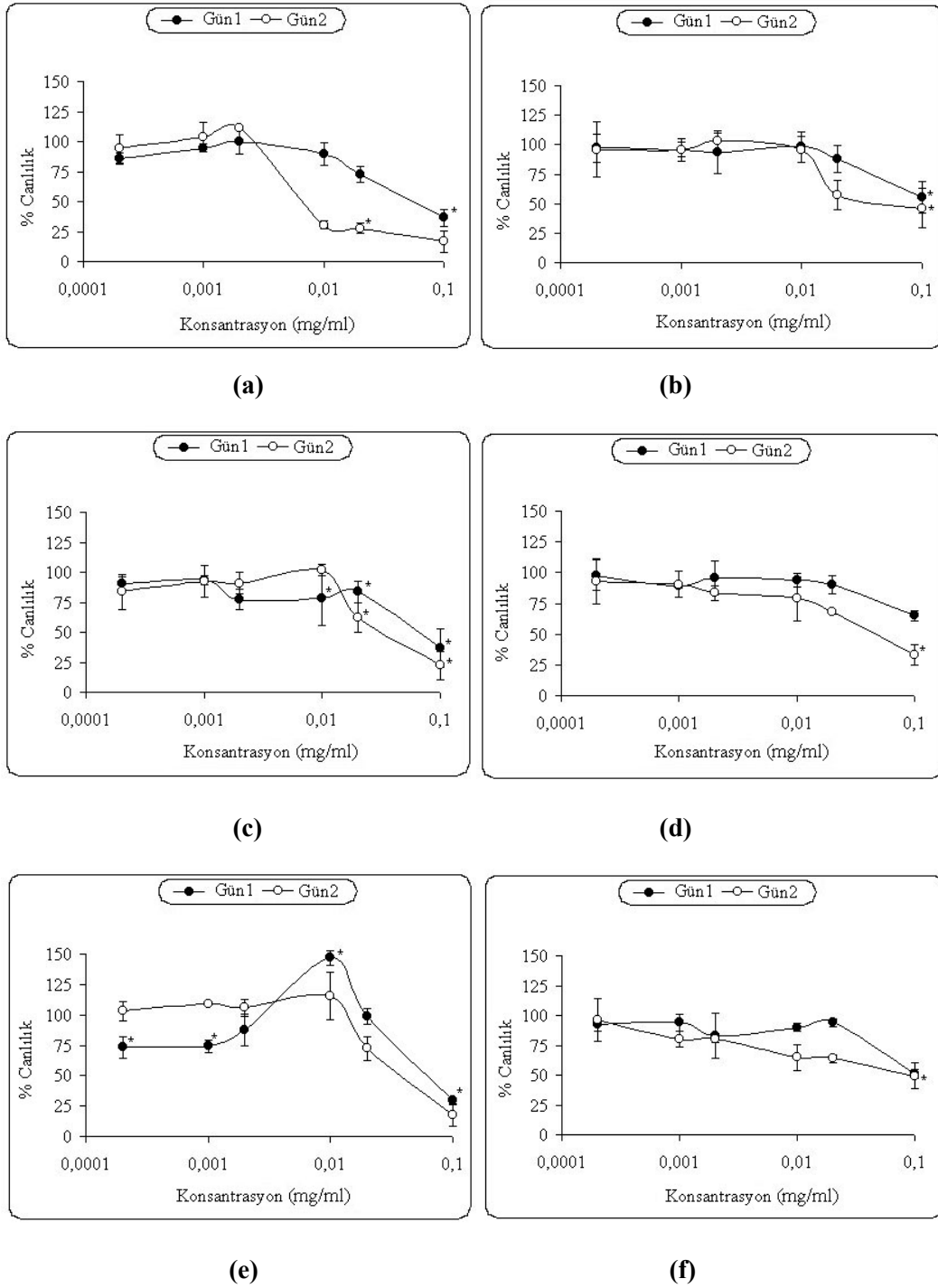
Diğer benzen türevi olan MBİS8'in, *N-ras* aktif hücreler ve C2 kontrol hücreler ile 24 saat inkübasyonu spesifik bir sitotoksosite göstermemektedir. Fakat 48 saat sonraki veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde MBİS8'in özellikle 0,0002-0,001 mg/ml konsantrasyon aralığında C2 kontrol hücrelerde sitotoksositeye neden olmadığını, CO25 hücrelerinde ise % 4-36 oranında hücre çoğalmasını inhibe ettiği gözlenmektedir. Bu konsantrasyon aralığına ve zamana bağımlı olarak MBİS8, *N-ras* aktif hücre çoğalmasını seçici olarak inhibe etmektedir ( $p<0,05$ ).  $IC_{50}$  değerleri olarak C2 hücreleri için 0,06 mg/ml, CO25 hücreleri için ise 0,1 mg/ml olarak bulunmuştur (Tablo 1).

Hücre canlılık oranı tripan mavi boyama yöntemi ile mikroskopik olarak da incelenmiştir ve yukarıda elde edilen sitotoksik etki sonuçlarına paralel sonuçlar elde edilmiştir (sonuçlar verilmemiştir).

**Tablo 1.** Bazı benzen türevlerinin % 50 ölüm oranına ( $IC_{50}$ ) neden olduğu konsantrasyonu

Benzen Türevleri (mg/ml)	Hücre Hatları	
	C2	CO25
MBİS1	0,09	0,1
MBİS2	0,06	0,1
MBİS8	0,06	0,1

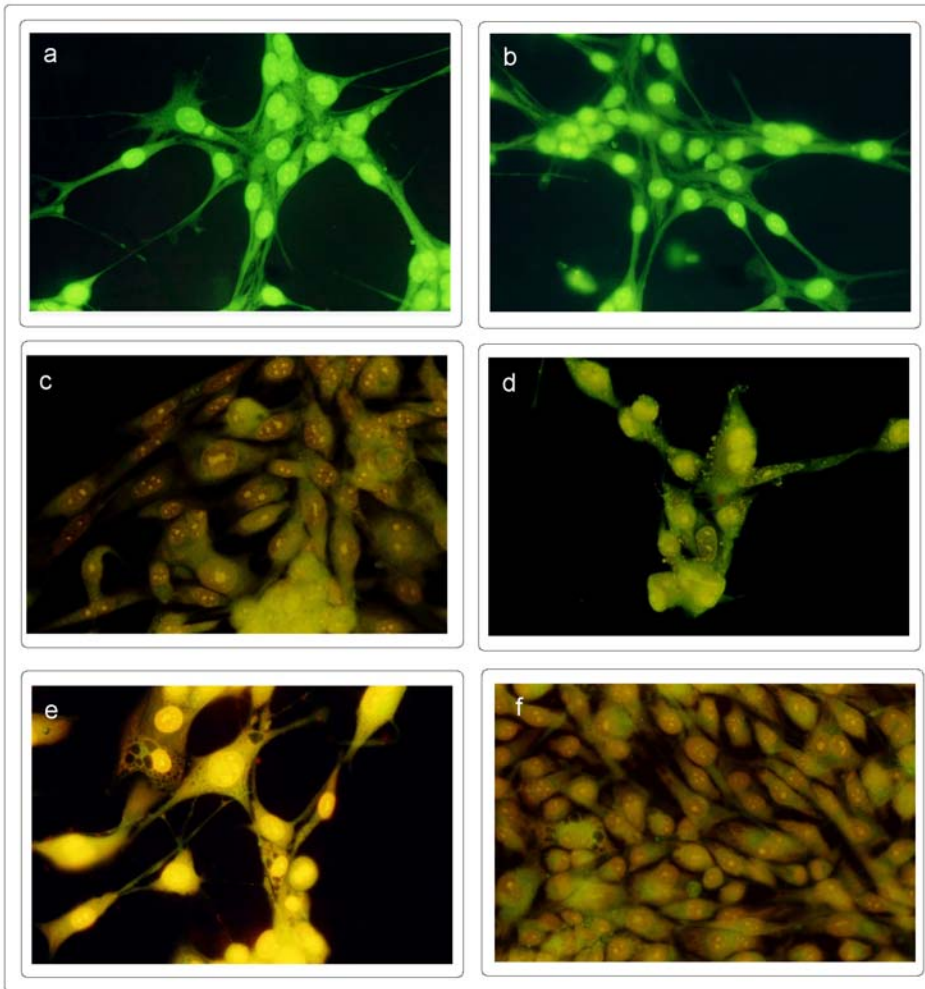
Tüm değerler, 24 saat inkübasyon sonrası  $IC_{50}$  değerini (mg/ml) belirtmektedir.



**Şekil 2.** MBİS1'in C2 (a), CO25 (b); MBİS2'nin C2 (c), CO25 (d) ve MBİS8'in C2 (e), CO25 (f) sitotoksik etkilerinin MTT yöntemi ile belirlenmesi. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$ ; ortalama değerler  $\pm$  Standart Hata (n=3), gün1: 24saat, gün2: 48saati belirtmektedir.

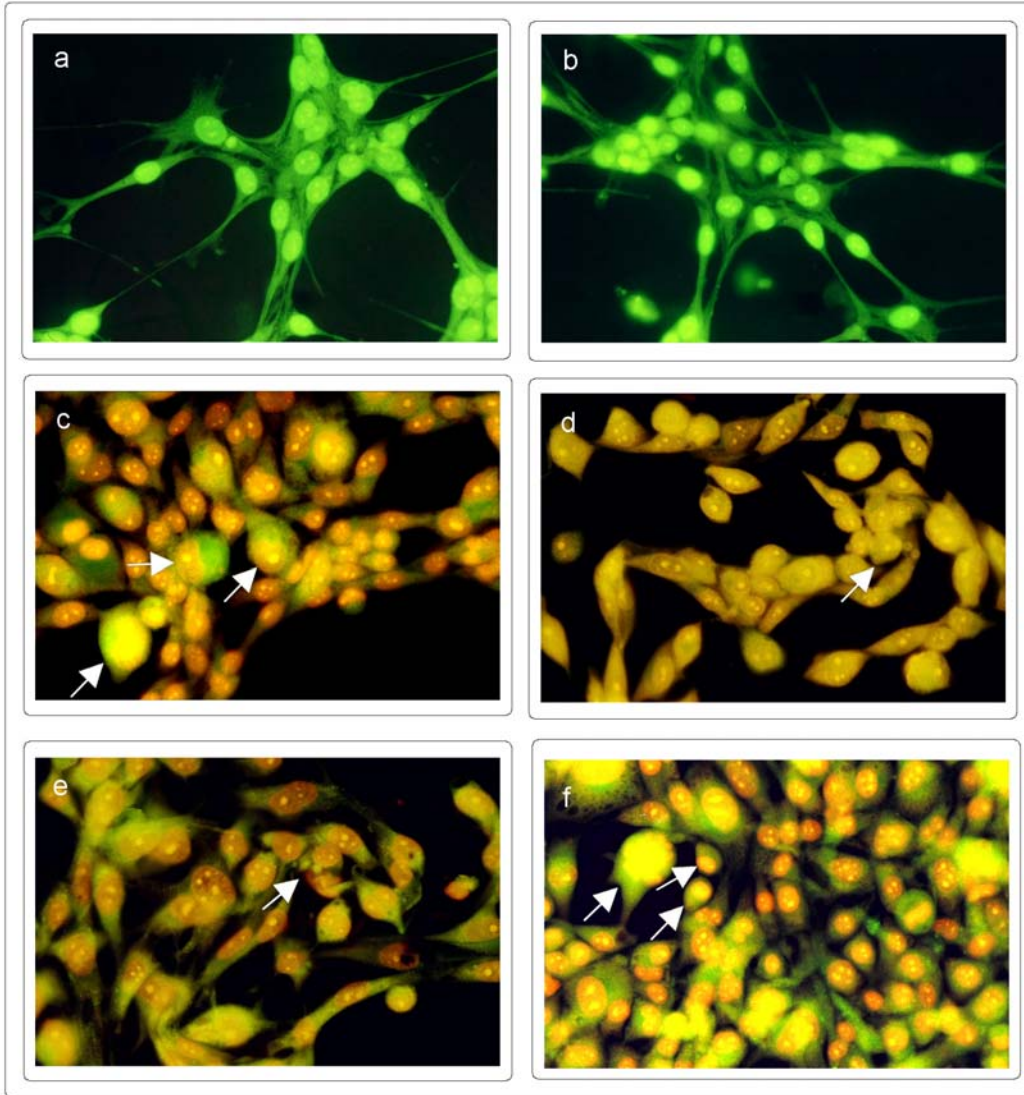
### Apoptozun morfolojik olarak belirlenmesi

Morfolojik olarak apoptotik hücreler, 8 ve 24 saat benzen türevleri ile inkübasyon sonucunda tespit edilmiştir. 0,05 ve 0,1 mg/ml (doz aralıkları MTT ve tripan mavi canlılık deneyleri ile belirlenmiştir) MBİS1 ve MBİS8'in 8 saat (Şekil 3c, d ve 4c, d) ve 24 saat (Şekil 3e, f ve 4e, f) muamelesi sonucunda hücre sitoplazmasının ve çekirdeğinin küçülmesi, apoptotik yapıların hücre zarı etrafında toplanması ve hücre çekirdeğinin böbrek şeklini alması gibi apoptotik morfolojik değişiklikler gözlenmiştir. Bu morfolojik değişimler özellikle 8 saat inkübasyon sonunda başlamış olup 24 saat inkübasyon süresi sonunda da gözlenmiştir. Her iki benzen türevi de C2 hücreleri üzerinde morfolojik bir değişime neden olmamıştır (sonuçlar verilmemiştir).



**Şekil 3.** MBİS1'in CO25 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler. Hücreler akridin oranj /etidyum bromür ile boyanıp immünofloresan mikroskopta incelendi. a. 8 saat maddesiz CO25 hücreleri (kontrol), b. 24 saat maddesiz CO25 hücreleri (kontrol), c. 0,05 mg/ml-8 saat, d. 0,1 mg/ml-8 saat, e. 0,05 mg/ml-24 saat, f. 0,1 mg/ml-24 saat inkübasyon sonrası hücrelerin morfolojik görüntüleri.





**Şekil 4.** MBİS8'in CO25 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler. Hücreler akridin oranj /etidyum bromür ile boyanıp immünofloresan mikroskopta incelendi. a. 8 saat maddesiz CO25 hücreleri (kontrol), b. 24 saat maddesiz CO25 hücreleri (kontrol), c. 0,05 mg/ml-8 saat, d. 0,1 mg/ml-8 saat, e. 0,05 mg/ml-24 saat, f. 0,1 mg/ml-24 saat inkübasyon sonrası hücrelerin morfolojik görüntüleri.

#### **Bileşiklerin erken apoptoz üzerine etkileri**

MBİS1 ve MBİS8'in C2 ve CO25 hücre apoptozu üzerine olan etkileri, apoptoz mekanizmasının tetiklenmesi ile hücre dış yüzeyine hareket eden fosfatidilserine karşı yüksek affiniteye sahip Annexin-V ile incelenmiştir. Annexin-V ile eş zamanda deney ortamına propidyum iyodürün eklenmesi ile hem geç apoptotik hem de nekrotik hücre oranları da ölçülmüştür (Tablo 2 ve 3). Test maddelerinin ve pozitif kontrol etoposidin ( $25 \mu\text{M}$ , etken konsantrasyon hem

literatür çalışmalarından hem de etoposidin farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş CO25 hücrelerindeki apoptotik oran MTT ve akridin oranje yöntemleri ile belirlenmiştir) (28), CO25 ve C2 hücrelerinde erken apoptoza neden olmadıkları gözlenmiştir.

**Tablo 2.** Benzen türevleri ile stimüle edilen erken apoptotik C2 hücre oranları.

% (24 saat)	C2					
	Kontrol	Etoposid	MBİS1 <sup>a</sup>	MBİS1 <sup>b</sup>	MBİS8 <sup>a</sup>	MBİS8 <sup>b</sup>
Tanımlanmamış hücre oranı	7,97	3,95	4,44	2,32	10,15	13,76
Canlı hücre oranı	64,99	73,23	72,67	81,73	77,60	70,62
Erken apoptotik hücre oranı	2,28	2,57	2,12	2,10	1,61	2,90
Geç apoptotik veya nekrotik hücre oranı	24,76	20,25	20,76	3,85	10,15	12,71

Kontrol, madde ile stimüle edilmemiş hücreler

Etoposid 25  $\mu$ M (pozitif kontrol)

MBİS1<sup>a</sup> 0,045 mg/ml; MBİS1<sup>b</sup> 0,09 mg/ml; MBİS8<sup>a</sup> 0,03 mg/ml; MBİS8<sup>b</sup> 0,06 mg/ml

**Tablo 3.** Benzen türevleri ile stimüle edilen erken apoptotik CO25 hücre oranları.

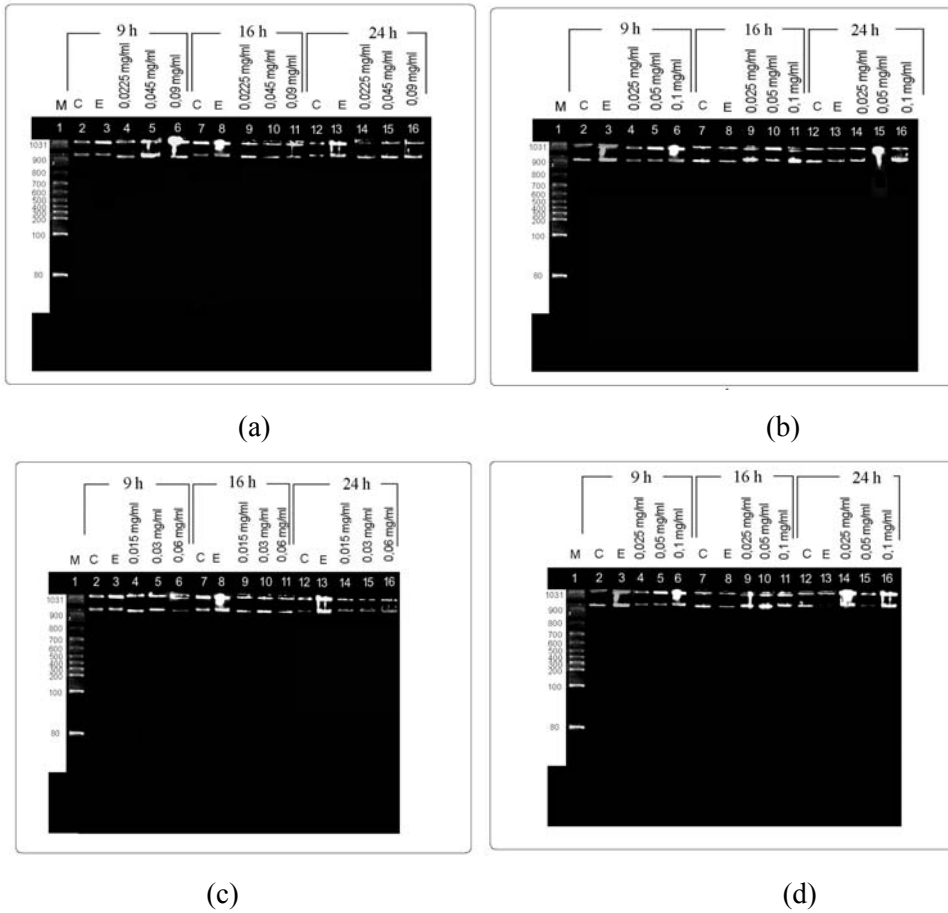
% (24 saat)	CO25					
	Kontrol	Etoposid	MBİS1 <sup>a</sup>	MBİS1 <sup>b</sup>	MBİS8 <sup>a</sup>	MBİS8 <sup>b</sup>
Tanımlanmamış hücre oranı	5,12	4,46	4,60	10,72	3,38	3,79
Canlı hücre oranı	63,83	64,09	63,88	65,90	64,75	73,41
Erken apoptotik hücre oranı	2,36	3,43	3,73	3,03	3,92	2,52
Geç apoptotik veya nekrotik hücre oranı	28,69	28,02	27,79	20,35	27,96	20,29

MBİS1<sup>a</sup> 0,05 mg/ml; MBİS1<sup>b</sup> 0,1 mg/ml; MBİS8<sup>a</sup> 0,05 mg/ml; MBİS8<sup>b</sup> 0,1 mg/ml

### Bileşenlerin geç apoptoz üzerine etkileri

Test bileşenlerinin C2 ve CO25 hücrelerinin DNA'sı üzerine etkileri agaroz jel elektroforez yöntemi ile incelenmiştir. Bu yöntem DNA merdiveni yada oligonükleozomal bantların oluşumuna bağlı olarak apoptozu tespit eden klasik bir yöntemdir. Hücreler her bir madde ile 9, 16 ve 24 saat inkübe edildikten sonra hücrelerin genomik DNA'ları fenol/kloroform/izoamilalkol ekstraksiyon yöntemi ile izole edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 5'de gösterilmiştir.

MBİS1 veya 25 µM etoposid ile 24 saat inkübasyon sonrasında C2 veya CO25 hücrelerinde DNA kırıkları tespit edilememiştir (Şekil 5a, b).



**Şekil 5.** Genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi. (a) MBİS1'in farklı konsantrasyonları (0,0225-0,045-0,09 mg/ml) ile 9, 16, 24 saat muamele edilmiş C2 hücreleri, (b) MBİS1'in farklı konsantrasyonları (0,025-0,05-0,1mg/ml) ile 9, 16, 24 saat muamele edilmiş CO25 hücreleri, (c) MBİS8'in farklı konsantrasyonları (0,015-0,03-0,06 mg/ml) ile 9, 16, 24 saat muamele edilmiş C2 hücreleri, (d) MBİS8'in farklı konsantrasyonları (0,025-0,05-0,1 mg/ml) ile 9, 16, 24 saat muamele edilmiş CO25 hücreleri. Genomik DNA fenol/kloroform/izoamilalkol ekstraksiyon yöntemi ile izole edildi. Daha sonra % 1,2'lik agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutulan genomik DNA etidyum bromür ile boyandı. M, marker; K, maddesiz kontrol hücreler; E, Etoposid 25 □M.

Diğer bir benzen türevi olan ve  $-NO_2$  yan grubuna sahip MBİS8'in de C2 (Şekil 5c) veya CO25 (Şekil 5d) hücre DNA'sı üzerine etkisiz olduğu tespit edilmiştir.

## TARTIŞMA

Bu çalışmada 1,3-bis (heteroaril süstitüe) benzen türevi olan MBİS1, MBİS2 ve MBİS8'in apoptotik ve sitotoksik etkileri karşılaştırmalı olarak CO25 ve C2 hücreleri kullanılarak araştırılmıştır. Test edilen türevlerden MBİS1 ve MBİS8'in yalnızca N-ras onkogeni taşıyan CO25 hücre hattında düşük dozlarda anlamlı ve sitotoksik etki gösterdikleri gözlenmiştir. MBİS2'nin ise özellikle normal C2 hücrelerinde daha fazla sitotoksositeye neden olduğundan, bu türevin apoptoz mekanizması üzerine etkilerinin araştırılması uygun görülmemiştir. Kullanılan benzen türevleri ile aynı çekirdek yapısını taşıyan benzer bileşenlerin de anti tümör (8,9) ve sitotoksik (10) etkilere sahip oldukları literatürde yer almaktadır.

MBİS1 ve MBİS8 ile muamele edilen hücrelerin akridin oranj /etidyum bromür ile boyanması sonucunda apoptotik hücrelerin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 3,4). Her iki (0,05 ve 0,1mg/ml) benzen türevinin N-ras transform edilmiş CO25 hücreleri ile inkübasyonu sonrası, hücrelerin apoptotik belirteç olan kromatin kondensasyonu, apoptotik cisimcikler, böbreksi yapılar ve daralmış sitoplazma gibi morfolojik değişiklikler gösterdiği gözlenmiştir.

Morfolojik değişimin deneysel olarak desteklenmesi için, Annexin V / Propidyum iyodür ile boyanan hücreler akım sitometri analizine tabi tutularak erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre oranları tespit edilmiştir (Tablo 2 ve 3). Fakat alınan sonuçlar, MBİS1 veya MBİS8 ile stimüle edilen hücre grubunda erken apoptotik hücre oranının, pozitif kontrol olan 25  $\square$ M Etoposid'e göre anlamlı olmadığını göstermektedir. Aynı şekilde her iki benzen türevi, deneysel doz ve zaman aralıklarında CO25 ve C2 hücre genomik DNA'sında kırıklara neden olmamıştır (Şekil 5).

MBİS1 ve MBİS8 bileşenlerinin, CO25 hücrelerinde apoptotik mekanizmayı indüklemedikleri tespit edilmiştir (morfolojik bulgular hariç). Elde edilen bulgular, N-ras aktif hücrelerde  $Ca^{+2}$  artışına neden olan (MBİS1) ve neden olmayan (MBİS8) iki benzen türevinin apoptotik mekanizmayı uyarmaması,  $Ca^{+2}$  'a bağlı apoptotik yolağın hücre tipine göre farklılık gösterdiğini düşündürmektedir. MBİS1'in etki mekanizmasına farklı bir yaklaşım da, N-ras aktif hücrelerde bcl-2 proteininin aktif olması sonucu  $Ca^{+2}$  'un hücre içi depolarına (18) gönderildiği ve bu şekilde apoptotik sinyalin önlendiği şeklinde olabilir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Anadolu Üniversitesi Araştırma fonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 03 03 45). 1,3-bis (heteroaril süstitüe) benzen türevlerini sağlayan Prof. Dr. İlhan Işıkdağ ve Yrd. Doç. Dr. Asiye Meriç'e, hücre kültürü laboratuvar imkanlarını kullanma olanağı veren BİBAM'a ve Akış sitometri çalışmalarını gerçekleştirildiği Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkürü borç biliriz.

## KAYNAKLAR

1. **Hu, R., Zhai, Q., Liu, W. and Liu, X.** "An insight into the mechanism of cytotoxicity of ricin to hepatoma cell: roles of bcl-2 family proteins, caspases, Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases and protein kinase C" *Journal of Cellular Biochemistry*, **81**, 583-593 (2001).
2. **Wyllie, A.H.** "Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in associated with endogenous endonuclease activation" *Nature*, **284** (5756), 555-556 (1980).
3. **Dive, C., Gregory, C.D., Phipps, D.J., Evans, D.L., Milner, A.E. and Wyllie, A.H.** "Analyses and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry" *Biochimica Et Biophysica*, **1133**, 275-285 (1992).
4. **Saraste, A. and Pulkki, K.** "Morphological and biochemical hallmarks of apoptosis" *Cardiovascular Research*, **45**, 528-537 (2000).
5. **Kauffmann, Z. A., Rodriguez-Viciana, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey P., Downward, J. and Evan, G.** "Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signaling through PI(3)K and Pkb" *Nature*, **385**, 544-548 (1997).
6. **Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutelingsperger, C.** "A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V" *Journal Immunol. Methods*, **184**, 39-51 (1995).
7. **Walker, P.R. and Sikorska, M.** "Endonuclease activities, chromatin structure and DNA degradation in apoptosis" *Biochem Cell Biology*, **72**, 615-623 (1994).
8. **Hoye, T.R. and Ye, Z.** "Highly efficient synthesis of the potent antitumor annonaceous acetogenin (+)-parviflorin" *J Am. Chem. Soc.*, **118**, 1801-1802 (1996).

9. **Nozoe, S., Takahashi, A., Nunosawa, T. and Endo, T.** " Preparation of diphenoxybenzene derivatives as antitumor agents and their intermediates" *Jpn. Pat.*, 06, 16, 601 (1995).
10. **Sato, R., Ohyama, T. and Ogawa, S.** " Efficient synthesis and biological properties of new benzopentathiepins" *Heterocycles*, **41**, 893-896 (1995).
11. **Girijavallabhan, V.M., Ganguly, A.K., Versace, R., Saksena, A.K. and Pinto, P.A.** " Orally active antiviral phenolic diethers" *Eur. Pat. Appl.*, **519**, 702 (1992).
12. **Enomoto, M., Takahashi, J., Kusaba, T., Sugano, M., Matsunaga, R. and Tamaoki, M.** " Preparation of 2-cyano-1-dimethylsulfamoyl-5,6-bis (1', 1', 2', 2'-tetrafluoroethoxy) benzimidazole as horticultural and agrochemical fungicid" *Jpn. Pat.*, **4**, 308, 580 (1992).
13. **Place, P. and Pepin, R.** " Preparation of (propargyloxy) benzene derivatives as fungicides" *Fr. Pat.*, **2**, 598, 408 (1987).
14. **Kimura, M., Naito, O., Sakuma, T. and Morita, T.** " Preparation of quaternary ammonium compounds as muscle relaxant" *Ger. Offen*, **4**, 010, 925 (1990).
15. **Iwaki, H., Fukuyama, K. and Matsui, K.** " 1,4-benzoquinone derivatives and benzene derivatives" *Eur. Pat. Appl.*, **151**, 995 (1985).
16. **Massardo, P., Bettarini, P., Piccardi, P. and Longoni, A.** " Synthesis and juvenile hormone activities of some new ether derivatives of hydroquinone" *Pestic. Sci.*, **14**, 461-469 (1983).
17. **Meriç, A., İncesu, Z. and Işıkdag, İ.** " Synthesis and effects of intracellular calcium of some 1,3-bis-(heteroarly substituted) benzene derivatives" *IL Farmaco*, **57** (7), 543-548 (2002).
18. **Zang, Q-H., Sheng, H.P. and Loh, T.T.** " Bcl-2 protects HL-60 cells from apoptosis by stabilizing their intracellular calcium pools" *Life Sciences*, **68**, 2873-2883 (2001).
19. **Yaffe, D. and Saxel, O.** " Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle" *Nature*, **270**, 225-227 (1977).
20. **Gossett, L.A., Zhang, W. and Olson, E.** " Dexamethasone-dependent inhibition of differentiation of C2 myoblasts bearing steroid-inducible N-ras oncogene" *J. Cell. Biol.*, **106**, 2127-2137 (1988).
21. **Gerhart, J., Bast, B., Neely, C., Iem, S., Amegbe, P., Niewenhuis, R., Miklasz, S., Cheng, F. and George-Weinstein, M.** " Myod-positive myoblasts are present in mature fetal organs lacking skeletal muscle" *J. Cell Biol.*, **155** (3), 381-392 (2001).

22. **Zeytinoglu, H., İncesu, Z. and Baser, K.H.C.** " Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human N-ras oncogene" *Phytomedicine*, **10** (4), 292-299 (2003).
23. **Cotter T.G. and Martin S.J.** " Techniques in apoptosis (A User's Guide) " Portland Press, London (1996).
24. **Reader, S., Moutardier, V. and Denizeau, F.** " Tributyltin triggers apoptosis in trout hepatocytes: the role of Ca<sup>2+</sup> protein kinase C and proteases" *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1448**, 473-485 (1999).
25. **Wang, I.-K., Lin-Shiau, S.-Y. and Lin, J.-K.** " Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells" *European Journal of Cancer*, **35** (10), 1517-1525 (1999).
26. **Mossmann, T.** " Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays" *Journal of Immunological Methods*, **65**, 55-63 (1983).
27. **Jiang, B., Liu, H., Bao, Y.M. and An, L.J.** " Hydrogen peroxide-induced apoptosis in pc12 cells and the protective effect of puerarin" *Cell Biology International*, **27**, 1025-1031 (2003).
28. **White, K.M., Baireddy, V. and Strayer, S.D.** " Natural protection from apoptosis by surfactant protein A in type II pneumocytes" *Experimental Cell Research*, **263**, 183-192 (2001).

Received: 22.02.2005

Accepted: 17.05.2005