

**WARFARİN'İN SİTOTOKSİK ETKİSİNİN K562 LÖSEMİK HÜCRE SOYUNDA ÇALIŞILMASI**  
**Evaluation of the Effect on the Cell Cytotoxicity of Warfarin in K562 Leukemia Cell Line**

Sevide ŞENCAN<sup>1</sup>, İlhan ONARAN<sup>2</sup>, Halil DEMİRTAŞ<sup>3</sup>

**Özet :** Klinik ve hayvan model laboratuvar çalışmalarında antikoagülanların dolaylı olarak primer tümörlerin ve metastazın gelişmesini önlediği belirtilmiştir. Bu antikoagülanlardan biri olan warfarinin normal hücrelerden farklı olarak malignan hücrelerde sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu sitotoksik etkinin warfarinin elektron transfer etme özelliğiyle kanser hücrelerinde superoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerini artırarak meydana geldiği öne sürülmüştür. Buna rağmen bu görüş hakkında hiçbir literatüre rastlanmamıştır. Çalışmamızda, warfarinin kanser hücrelerinde serbest radikal oluşumunu artırabilir hipotezini test etmek için myeloid löseminin blastik kriz evresinden kaynaklanan K562 hücreleri ile HL-60 promyelositik lösemi hücreleri ve insan lenfositleri 72 saat warfarinin çeşitli konsantrasyonları ile (0-200 µM) inkübe edildi. Warfarinin K562 hücrelerinde oksidatif stres üzerine etkisi lüminol ve lüsijenine bağlı kemilüminesans oluşumu ve 2', 7'-dichlorofluoresceinhidrodiasetat oksidasyonu ile değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirme ANOVA testi ile yapıldı ve p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlarımız, warfarinin lösemik hücrelerde farmakolojik dozlara yakın konsantrasyonlarda (<50µM) reaktif oksijen türevlerinin üretiminde doğrudan bir etkisi olmadığını göstermektedir. Ancak yüksek dozlarda warfarin (50-200 µM), 2', 7'-dichlorofluoresceinhidrodiasetat oksidasyonunu lösemik hücrelerde lenfositlere göre anlamlı olarak artırmıştır. Her ne kadar bu artışın nedenin oksidatif stres ile ilişkili olmadığı görülmekle birlikte, bu artışın mekanizmasını açıklamak için daha fazla çalışmaya gerek duyulmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Warfarin, K562, kanser, sitotoksite, serbest radikal

**Summary :** In the experimental studies of clinical and animal models, it has been reported that anticoagulants have prevented development of primary tumors and metastasis indirectly. It has been shown that warfarin (which is a well-known oral anticoagulant) have a cytotoxic effect on malignant cells, sparing normal cells. It has been suggested that this cytotoxic effect may be due to reactive oxygen species as superoxide and hydrogen peroxide produced in the malignant cells by warfarin, which is a potent electron transferring substance. However, this view is not encountered in literature. This study examined the oxidative and apoptotic potentials of warfarin on three cell types in vitro, namely, human chronic myelogenous leukemic K562 cells, promyelocytic leukemic HL-60 cells, and normal human peripheral blood mononuclear cells. The effects of warfarin were also compared with acetylsalicylic acid (ASA). The cells were incubated with 0-200 µM concentrations of warfarin and 100 µM ASA for 72 h at 37°C. The luminol and lucigenin-dependent chemiluminescence assay and 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) method were used as biomarkers of oxidative stress. Statistical analysis of data was performed by analysis of variance (ANOVA) and p<0.05 was considered statistically significant for all experiments. The present results indicate that the warfarin at the pharmacological concentrations (<50µM) have no prooxidant on K562 cells and HL-60 cells. However, DCFH oxidation was increased when cells were incubated with high concentrations (50-200 µM) of warfarin. On the other hand, our study suggests that oxidative stress does not seem to be involved in warfarin-induced DCFH of both cell lines. Therefore, the specific source(s) responsible to DCFH oxidation in leukemic cells in response to in vitro warfarin require future studies.

**Key words :** Warfarin, K562, cancer, cytotoxicity, free Radicals effect on cleft segments, back and medial alveolar widths

<sup>1</sup> Bilim Uz.Erciyes Ün.Sağlık Bil.Ens, Tıbbi Biy. AD, Kayseri

<sup>2</sup> Doç.Dr.Cerrahpaşa Ün.Tıp Fak, Tıbbi Biy. AD, İstanbul

<sup>3</sup> Prof.Dr.Erciyes Ün.Sağlık Bil.Ens, Tıbbi Biy. AD, Kayseri

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu Birimi tarafından SBT.06.01 nolu proje ile desteklenmiş olup, 14-18 Mayıs 2006 tarihleri arasında İsrail'de düzenlenen "19th International Congress on Trombosis" Kongresi'nde bildiri olarak sunulmuştur.**

Bir vitamin K antogonisti olan warfarin, tromboembolik bozuklukların önlenmesinde ve korunmasında en sık kullanılan oral antikoagülanlardandır. Vitamin K pıhtılaşma faktörleri II, VII, IX, X ve antikoagülan protein C ve S'in sentezi için gerekli bir kofaktördür. Warfarin K vitamininin siklik rejenerasyonunu bloke ederek dolaylı yoldan bu faktörlerin sentezinde hız sınırlayıcı olarak rol oynar (1,2).

Birçok araştırmacının sonuçlarına dayanarak, antikoagülanların metastatik tümör oluşumunu dolaylı yoldan inhibe edebilecekleri öne sürülmüştür (3). Literatürü incelediğimizde warfarinin de bu şekilde dolaylı yoldan antimetastatik bir etkisi olduğunu ileri süren çalışmalar görülmektedir (4). Bu etkinin hangi mekanizmayla gerçekleştiğine dair kısıtlı bir bilgiyle karşılaşmaktayız.

Ancak Berkarda ve arkadaşları (5) tek dozluk warfarin uygulamasından sonra kronik ve akut lenfositik lösemili hastalardan ve kontrol olarak da sağlıklı bireylerden elde ettikleri lenfositlerde elektron mikroskopik değerlendirme sonucu ilacın potent bir elektron transfer etme yeteneği ile kanserli hücrelerde mitokondrideki hücresel solunumu uyarmak ve oksijenin kullanımını artırmak suretiyle, hücre içi oksidatif stres artışı ile doğrudan bir antitümoral etki ortaya çıkarabileceğini öne sürmüşlerdir. Hayvan çalışmaları ve hücre soyları ile warfarinin etkisini araştıran çeşitli çalışmalar bulunmakla birlikte, ilacın doğrudan etkisi ile tümör hücrelerinde oksidatif stres üretme potansiyeli üzerine bir çalışma göze çarpmamaktadır.

Farklı görüşler olmakla birlikte kanserli hücrelerde antioksidan savunma sisteminde bir yetersizlik söz konusudur. Ancak kanserli hücrelerde elektron transport sisteminde oluşan defektlerin sonucu olarak, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunun azalmış olması nedeniyle bu hücrelerin antioksidan sistemdeki yetersizlikten etkilenmediği öne sürülmüştür. Radyoterapi ve bazı antikanser ilaçlar, kanserli hücrelerde oksidatif stres oluşturmak suretiyle oksidatif hasarla sitotoksik etkilerini ortaya çıkarabilmektedir (6,7). Bu görüşün doğrultusunda, eğer warfarinin kanserli hücrelerde süperoksit radikalının artışıını indükleyebilme özelliği varsa bu hücreler için sitotoksik bir etki ortaya çıkarması

beklenebilir.

Sunulan bu çalışmada Berkarda ve arkadaşlarının (5) ileri sürdükleri hipotezi tartışmak ve warfarinin etki mekanizmasının açıklamasına katkıda bulunmak üzere; insan myeloid lösemi hücreleri olan K562 hücre soyu ve promyelositik lösemi hücre soyu olan HL-60 hücreleri kullanılarak warfarinin tümör hücreleri üzerine sitotoksik etkisi ve bu etkinin oksidatif stres oluşturma potansiyeli ile olan ilişkisi in vitro bir çalışma ile araştırıldı.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda deney sistemlerimizi uygulamak üzere K562, HL-60 hücre serisi ve sağlıklı bireylerden Ficoll- Histopaque 1077 ile yoğunluk gradienti uygulanarak izole edilmiş periferik kan mononükleer hücreleri (PKMH) kullanıldı. Çalışmada lösemik hücrelerin kontrol hücreleri olarak sağlıklı bireylerden elde edilmiş lenfositler, warfarinin kontrolü olarak ta asetil salisilik asit kullanılmıştır. K562 hücre serisinin kültürü için RPMI 1640 medyumu kullanıldı. Hücreler %5'lik CO<sub>2</sub>, 37 °C'li inkübatörde 72 saat kültür edildi. HL-60, lenfosit kültürü içinde aynı şartlar ve aynı özelliklerdeki besiyeri kullanıldı.

Çeşitli dozlarda (5, 50, 100, 200 µM) warfarin eklenmiş ve eklenmemiş hücre süspansiyonunda oluşan ROS ve lüminol ve lüsigenin kullanılmak suretiyle kemilüminesans şiddetlerinin ölçüldüğü kemilünometrik yöntem vasıtasıyla tespit edildi. Hücre kültür sonrası örnekler, 1/5 oranında PBS ile seyreltilerek polipropilen tüpler içerisine alındı. Son konsantrasyonu 0.1mM olacak şekilde örneklere DMSO içerisinde çözünmüş lüminol yada 0.25 mM olacak şekilde RPMI içerisinde çözülmüş Lüsigenin eklendi. Lüminometrenin kuyucuklarına konulan örneklerin lüminesans şiddetleri 1 dakika boyunca, çeşitli zaman aralıklarında (0, 15, 30, 60. saniyelerde) kaydedildi. DMSO kullanılarak hazırlanan örnekten elde edilen kemilüminesans değerleri kaydedilip örneklerin değerlerinden çıkartıldı.

Sonuçlar  $10^6$  hücre başına düşen Relative Light Unite (RLU) cinsinden verildi (8).

2', 7'-dichlorofluorescindiasetat (DCFH-DA) warfarinle inkübe edilmiş hücrelerde oluşan ROS üretimini ölçmek için kullanıldı. Yöntem kaynağa uygun olarak gerçekleştirildi (9). Floresans bileşik olan ve DCFH-DA okside olmuş şekli dichlorofluorescin floresans şiddeti, süpernatanda 5 bant genişliğinde 480 eksitasyon 500-550 emisyon ile tarama modunda tespit edildi. Veriler warfarinsiz örneklerle göre normalize edilip, nisbi floresans şiddeti olarak  $10^6$  hücre başına ifade edildi

Veriler Windows için SPSS 11,5 programı kullanılarak değerlendirildi. Ortalamalar arasındaki farkın önem kontrolü, ANOVA testi ile yapıldı Bu testte anlamlı çıkan gruplar için posthoc Tukey testi uygulandı.  $P < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul

edildi ve tüm veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edildi.

## BULGULAR

Farmakolojik konsantrasyonlara yakın ve üstündeki çeşitli konsantrasyonlarda (5, 50, 100 ve 200  $\mu$ M) warfarinle 72. saat inkübe edilen K562 ve HL-60 hücrelerinde oksidatif stres göstergesi, lüminol ve lüsigenin varlığında oksidan oluşumunu gösteren kemilüminesans şiddetindeki değişikliklerle incelendi. Lüminol ve lüsigenin eklenmiş örneklerin 0, 15, 30, 60. saniyelerde kemilüminesans şiddetleri analiz edildiğinde warfarinin tüm konsantrasyonlarının bazal şartlardaki hücrelere göre kemilüminesans şiddetlerini değiştirmedeği gözlenmektedir. Aynı şartlar altında asetil salisilik asitle inkübasyon sonrası kemilüminesans şiddetinde de önemli değişiklikler gözlenmemiştir

**Tablo I.** K562, HL-60 ve lenfositlerin 100  $\mu$ M warfarin ve salisilik asit ile inkübasyon sonrası lüsigenin ve lüminol aracılı kemilüminesans oluşumu üzerine etkisi

İn vitro inkübasyon şartları	Kemilüminesans şiddeti (RFU)	Kemilüminesans şiddeti (RFU)
	Lüminol aracılı kemilüminesans şiddeti (n= 5)	Lüsigenin aracılı kemilüminesans şiddeti (n=5 )
Basal Kontrol	0.58 $\pm$ 0.07	0.87 $\pm$ 0.10
<b>Warfarin</b>		
K562	0.74 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.13
HL-60	0.69 $\pm$ 0.10	0.95 $\pm$ 0.14
Lenfosit	0.77 $\pm$ 0.10	0.90 $\pm$ 0.12
<b>Asetil Salisilik Asit</b>		
K562	0.67 $\pm$ 0.07	0.94 $\pm$ 0.11
HL-60	0.61 $\pm$ 0.07	0.88 $\pm$ 0.12
Lenfosit	0.74 $\pm$ 0.13	0.85 $\pm$ 0.13

Sonuçlar birbirinden bağımsız 5 farklı dublike çalışmadan elde edilmiş 1. dakika okumalarının değerlerinin ortalama  $\pm$  SD göstermektedir.

Tablo I' de 100 µM'lık warfarin ve asetil salisilik asitin hücrelere verilmesinden sonraki lüminol ve lüsigenin aracılı kemilüminesans şiddetleri verilmiştir.

Warfarinin hücre içi oksidatif stres üzerine etkisini incelemek amacı ile hücre kültürleri 72 saatlik inkübasyon sonrasında floresans vermeyen bir bileşik olan 2',7' DCFH-DA ile inkübe edildiler.

Çeşitli oksidanların varlığında, floresans veren bir bileşik şekline dönen 2',7' DCFH-DA'nın oksidasyonu spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Sonuçlarımız hücre kültürlerinin warfarinle inkübasyonunun 2',7' DCFH-DA oksidasyonunun warfarin içermeyen kontrol hücrelerine göre, K562 hücrelerinde doza bağımlı olarak % 5-50, HL-60 hücrelerinde ise % 4-45

**Tablo II.** 72 saat warfarinle veya asetil salisilik asit ile inkübe edilmiş K562 ve HL-60 hücrelerinde 2'-7' DCFH-DA oluşumu üzerine warfarinin doza bağımlı etkisi

İn vitro inkübasyon şartları	Nisbi Floresans şiddeti (10 <sup>6</sup> hücre başına)	Nisbi Floresans şiddeti (10 <sup>6</sup> hücre başına)	Nisbi Floresans şiddeti (10 <sup>6</sup> hücre başına)
	K562	HL-60	Lenfosit
<b>Warfarin</b>			
5 µM	5.3 ± 1.9	4.3 ± 1.3	4.7 ± 2.1
50 µM	39.0 ± 5.9	20.2 ± 4.0	14.3 ± 7.1
100 µM	42.0 ± 5.9	34.2 ± 4.9	15.0 ± 8.0
200 µM	50.0 ± 7.5	44.8 ± 5.9	26.4 ± 9.4
<b>Aspirin</b>			
100 µM	9.0 ± 1.0	6.0 ± 0.8	7.0 ± 4.0

Farklı konsantrasyonlarda warfarinle inkübe edilen K562 ve HL-60 hücrelerindeki ROS oluşumu 2'-7' DCFH-DA için DCF-DA ta oksidasyonu ile değerlendirildi ve bazal şartlardan elde edilen değerler blank olarak kabul edilerek 10<sup>6</sup> hücre başına nisbi floresans şiddeti olarak ifade edildi. Veriler birbirinden bağımsız 5 çalışmanın ortalama ± SD değerini göstermektedir.

artırdığı görülmektedir (Tablo II). Aynı şartlarda asetil salisik asit ile inkübasyon sonucu hücre içi 2',7' DCFH-DA oksidasyonunun oluşumunda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

## TARTIŞMA

Kanser hücreleri metabolik ROS üretiminde normal hücrelerden daha aktiftir ve oksidatif stres altında daha karardır (10). Bununla birlikte çeşitli kanser hücrelerinde yapılan çalışmaların sonucu olarak bu hücrelerde ROS'un azaldığı da öne sürülmektedir (11). Hem ROS oluşumundaki yetersizlik hem de antioksidan sisteminin

aktivasyonu hücreyi ölüme kadar götürebilen oksidatif hasarın yıkıcı etkilerinden kanserli hücreyi koruyabilir. Radyoterapi ve çeşitli kanser ilaçlarıyla tedavi yaklaşımlarında kanserli hücrelerde oksidatif stresin sonucu olarak oksidatif hasar artabilmekte ve kanser hücrelerinin ölümü hızlanabilmektedir. Doxorubisin, bleomycin, mitomycin-C gibi ilaçların etki mekanizmaları içerisinde oksidatif hasarın olduğu gösterilmiştir (6,7).

Berkarda ve arkadaşları (5) ALL ve KLL hastalarına 20 mg tek dozluk warfarin verdikten sonra lenfositlerini elektron mikroskopunda

değerlendirmişlerdir. Aynı dozu uyguladıkları normal bireylerden elde ettikleri lenfositlerin mitokondrilerinde herhangi bir değişiklik gözlemezlerken lösemik hücrelerde mitokondrial yıkımı gösteren bir takım önemli değişikliklerin olduğunu bildirmişler ve bu değişikliğin warfarinin elektron transfer etme özelliğinden kaynaklanabileceğini, ilacın bu şekilde mitokondride oksijen kullanımını artırmak suretiyle solunumu uyarak oksidatif stres oluşturabileceğini öne sürmüşlerdir (5). Literatürde çeşitli antikougulanların tümör hücreleri üzerine etkileri olduğuna dair bulgular bulunmakla birlikte, warfarinin tümör hücreleri üzerine doğrudan etkisini ve bunun oksidatif stres ile ilişkisini ortaya koyacak bir çalışmanın olmadığı göze çarpmaktadır. Biz bu amaçla lösemik hücre soylarını kullanarak, bu soruya ip uçları aradık. Çalışmamızda lösemik hücre soyları olan K562 ve HL-60 hücreleri çeşitli dozlarda warfarinin etkisine 72 saat tutuldu ve lüminol ile lüsigenin aracılı kemilüminesans testi ile 2',7' DCFH-DA oksidasyonu testi uygulandı. Kontrol hücre olarak normal insanlardan elde edilen lenfositler, kontrol bileşik olarak başka bir antikougulan olan asetil salisilik asit kullanıldı.

Lüsigenin ve lüminol aralarında  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , singlet oksijen gibi çeşitli reaktif oksijen türlerinin bulunduğu ortamlarda oksitlendiklerinde kemilüminesans çıkaran bileşiklerdir. Öte yandan 2',7' DCFH-DA oksidasyonuna neden olan çeşitli reaktif oksijen türleri bildirilmiştir. Bunlar arasında  $H_2O_2$  spesifik olmakla birlikte  $O_2^-$ ,  $ROO^*$ ,  $NO^*$  radikalleri bulunmaktadır (9). Kemilüminesans ve 2',7' DCFH-DA sonuçlarımız birlikte değerlendirildiğinde, farmakolojik konsantrasyonlarda ( $<50 \mu M$ ) warfarinin bir prooksidan etki göstermediği ortaya çıkmaktadır. Ancak yüksek konsantrasyonda ( $>50 \mu M$ ) warfarin, hücre DCFH oksidasyonunu arttırdığı söylenebilir. Bu artışların lösemik hücrelerde lenfositlere göre daha fazla olduğu görülmüştür. Aynı zamanda iki lösemik hücre soyunu karşılaştırdığımızda bu artışların K562 hücrelerinde daha fazla olduğu dikkat çekmektedir. Etkinin görüldüğü konsantrasyon farmakolojik dozlara göre 10-40 kat daha fazladır. Bu doz aralıklarında hücrelere bir antioksidan olan N- asetil sistein verilmesi ile

warfarinin indüklediği gözlenmiştir. DCFH oksidasyonun değişmemesi, ilacı ROS türlerinin artışına neden olmadan bu değişimi ortaya çıkarttığını sezindirmektedir. Bazı araştırmacılar DCFH oksidasyonun bir apoptoz göstergesi olan ve mitokondriden salınan sitozolik sitokrom c tarafından da olabileceğini söylemektedirler (12). Çalışmamızda warfarinin apoptozu artırdığını gözlemlendiğinden, warfarin verilmesi ile gördüğümüz DCF fluoresans artışlarının nedeni sitozolde bu proteinin yükselmesi olabilir. Ancak elimizdeki bulgulardan, warfarinin DCFH oksidasyonunu nasıl etkilediğini söylemek mümkün değildir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz tüm bulguların ışığında sonuç olarak; farmakolojik dozlarda warfarinin lösemik hücreler üzerinde bir oksidan etki göstermediği, üzerindeki dozlarda warfarinin DCFH oksidasyonu artırdığını göstermektedir. Ancak bu artışın nedeni için başka çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

#### Teşekkür

**Makalemize görüş ve desteklerini esirgemeyen Yrd.Doç.Dr.Zuhal HAMURCU'ya katkularından dolayı teşekkür ederiz.**

#### KAYNAKLAR

1. Fuster V, Wayne AR, O'Rourke R. *The Heart*. Cilt 3 2004, pp 1411
2. Ngui JS, Chen Q, Shou M, Wang RW, Stearns RA, Baillie TA, Tang W. *In Vitro Stimulation of Warfarin Metabolism by Quinidine: Increases in the Formation of 4\*- and 10-Hydroxywarfarin*. *Drug Metab Dispos* 2001, 29(6): 877-886
3. Bobek V, Kovarik J. *Antitumor and antimetastatic effect of warfarin and heparins*. *Biomed Pharmacother* 2004, 58: 213-219
4. Zacharski LR, Prandomi P, Monreal M. *Warfarin versus low-molecular weight heparin*

- therapy in cancer. *Oncologist* 2005, 10(1): 72-79
5. Berkarda B, Arda O, Tasyurekli M, Derman U. Mitochondrial-lytic action of warfarin in lymphocytes. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1992, 30(8): 277-279
  6. Dias N, Bailly C. Drugs targeting mitochondrial functions to control tumor cell growth. *Biochem Pharmacol* 2005, 70: 1-12
  7. Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic Biol Med* 2004, 36(6): 718-744
  8. Cam K, Simsek F, Yuksel M, Turker L, Haklar G ve ark. The role of reactive oxygen species and apoptosis in the pathogenesis of varicocele in a rat model and efficiency of vitamin E treatment. *Int J Androl* 2004, 27: 228-33
  9. Ohashi T, Mizutani A, Murakami A, Kojo S, Ishii T, Taketani S. Rapid oxidation of dichlorodihydrofluorescein with heme and hemoproteins: formation of the fluorescein is independent of the generation of reactive oxygen species. *FEBS Lett* 2002, 511: 21-27
  10. Carew JS, Huang P. Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* 2002, 9: 1-9
  11. Muller-Hocker J, Aust D, Rohrbach H, Napiwotzky J, Reith A, Link TA, Seibel R, Holzel D, Kadenbach B. Defects of the Respiratory Chain in the Normal Human Liver and in Cirrhosis During Aging. *Hepatology* 1997, 26(3): 709-719
  12. Lawrence A, et al. Evidence for the role of a peroxidase compound I-type intermediate in the oxidation of glutathione, NADH, ascorbate and dichlorofluorescein by cytochrome c/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Implications for oxidative stress during apoptosis. *J Biol Chem* 2003, 278: 29410-29419

