

**BAZI SENTETİK BİLEŞİKLERİN
TOPOİZOMERAZ ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ
Mesut ŞEN**

Yüksek Lisans Tezi

**BAZI SENTETİK BİLEŞİKLERİN
TOPOİZOMERAZ ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Mesut ŞEN

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı




Eskişehir, Ocak 2015

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Zerrin İncesu

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir. (Proje No. 1210S166)

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Mesut Şen'in "Bazı Sentetik Bileşiklerin Topoizomeraz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi" başlıklı, Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki Yüksek Lisans tezi, 19.01.2015 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı):	Prof. Dr. Zerrin İNCESU Anadolu Üniversitesi	
Üye:	Doç. Dr. Yusuf ÖZKAY Anadolu Üniversitesi	
Üye:	Doç. Dr. Ferda ARI Uludağ Üniversitesi	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 09.01.2015 tarih ve1..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü


Prof. Dr. Dilek AK
Müdür


ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı	: Mesut ŞEN
Doğum tarihi ve yeri	: 1988, BULGARİSTAN
Uyruğu	: Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu	: Bekar
İletişim adresleri	: Çankaya Mahallesi Tekşen Sokak No: 2 Odunpazarı ESKİŞEHİR
Telefon	: 0222 2190402 05374954288
E-posta	: mesutsen@anadolu.edu.tr

Eğitim Durumu

İlköğretim	: 1994- 2002 Plevne Özel İdare İlköğretim Okulu
Lise	: 2002-2006 Muzaffer Çil Anadolu Lisesi
Lisans	: 2006-2010 Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans	: 2010-2015 Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı
Yabancı Dil	: İngilizce

Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler:

Özdemir, F., Akalın, G., Sen, M., Onder, N.I., Işcan, A., Kutlu, H. M., İncesu, Z., Towards novel anti-tumor strategies for hepatic cancer: ϵ -viniferin in combination with vincristine displays pharmacodynamic synergy at lower doses in HepG2 cells, OMICS: A Journal of Integrative Biology,18(5): 324-334 (2014)

Uluslararası bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

Akalın Çiftçi G., Özdemir F., Şen M., İncesu Z., Combination Effects of Cis-Platinum and Viniferin for Glioma in Vitro, International Symposium on Drug Research & Development, From Chemistry to Medicine, Antalya-Turkey, (2011)

Onder-Mert N.I., Şen M., Apaydın E., İncesu Z., Özdemir F., Effects on Caspases Activation of Using in Combination Cis-platin with ϵ -viniferin in Rat Glioma Cells, Anticancer Research, Sithonia/Greece, 34:5761-6258 (2014)

Apaydın E., Ayrım A., Şen M., İncesu Z., Özdemir F., Kombine Sisplatin ve e-Viniferinin in vitro Uygulamasının Mitokondriyel Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi, 5th Multidisciplinary Cancer Research Congress, Bodrum/Muğla (2014)

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).

Bilimsel Etkinlikler

Ödüller :

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mezuniyeti Bölüm 2.ciliği

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 1207S137 nolu “Kombine Cis-platin ve Viniferin Kullanımının Sıçan Glioma Hücreleri Üzerine Apoptotik Etkileri” başlıklı genel amaçlı proje (2012-2014).

Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) komisyonu tarafından desteklenen 1210S166 nolu “Bazı Sentetik Bileşiklerin Topoizomeraz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri” başlıklı tez projesi (2012-2015).

Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) komisyonu tarafından desteklenen 1301S011 nolu “Ovaryum Kanseri Hücrelerinde alfa4beta1 ve alfavbeta6 İntegrin-Fibronektin Etkileşiminin Sinyal İletimindeki Rolü” başlıklı genel amaçlı proje (2013-...)

TEŞEKKÜR

2009 yılından bu yana bana bilimi sevdiren ve bilim etiğini öğreten, bilgisini ve tecrübelerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, çalışma disiplini örnek edindiğim, kendimi geliştirmem için fırsatlar sunan, laboratuvarında bizim için her türlü imkanı sağlayabilmek için çaba sarfeden, hoşgörü, güven ve sabırla bana her zaman destek olan, birlikte çalışmaktan onur duyduğum değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zerrin İncesu'ya,

Tez çalışmamda kullandığım, kanser tedavisinde büyük gelecek vadeden antrakinin türevlerini sentezleyen, bilgisini, tecrübelerini ve her konuda desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Yusuf Özkay'a

Birlikte yapmış olduğumuz tüm çalışmalarımızda bana her türlü desteği sağlayan, içten yaklaşımıyla motivasyonumu arttıran, bilgisini ve tecrübelerini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Filiz Özdemir'e,

Sabahlara kadar yanımda kalıp deneysel çalışmalarımda bana yardımcı olan laboratuvar arkadaşım Bio. Erman Özer'e, yeri geldiğinde kültürdeki hücrelerime gözü gibi bakan laboratuvar arkadaşım Bio. Elif Apaydın'a, tez çalışmamda yaptığı bilimsel katkılardan dolayı laboratuvar arkadaşım Bio. Nur İpek Önder Mert'e, benden hiçbir yardımı esirgemeyen laboratuvar arkadaşım Bio. Aysun Ayrım'a,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca idari işlemlerde bana yardımcı olan Anadolu Üniversitesi personeli Sayın Füsun Yumrukçal'a,

Okul hayatım boyunca üzerimde emeği geçen tüm hocalarıma,

Kendi hayatlarından fedakarlık ederek okul hayatıma sorunsuz bir şekilde devam etmemi sağlayan, beni büyütüp bugünlere getiren sevgili aileme,

En zor anlarımda bile yanımda olan, çalışmalarımda beni motive edip umut etmemi sağlayan, her zaman yüzümü güldürmesini bilen, sonsuz sevgisini benden esirgemeyen hayat arkadaşım Öykü Göz'e

Teşekkürü bir borç bilirim.

BAZI SENTETİK BİLEŞİKLERİN TOPOİZOMERAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

ÖZET

Çağımızın en önemli hastalıklarından birisi olan kanserin tedavisinde antrakinin türevleri sıklıkla kullanılmaktadır. Antrakininlerin ana yapılarına yan zincirlerin eklenmesi, türevlerin çok farklı biyolojik aktiviteler kazanmasını sağlamaktadır. Bu nedenle yeni sentezlenen antrakinin türevlerinde gözlemlenen yüksek anti-kanser aktivite, ilaç direnci mekanizmalarının engellenmesi ve düşük sitotoksik etki, türevlerin kemoterapötik ajan araştırmalarında önemli yer teşkil etmesini sağlamaktadır.

Yapılan tez çalışmasında, daha önce serviks adenokarsinoma hücre hattı üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılan yeni sentezlenmiş 3 adet antrakinin türevinin topoizomeraz I enzim inhibisyonu ve hücre içi apoptotik mekanizma üzerindeki etkileri incelenmiştir. Tüm deneysel çalışmalarda türevlerin maksimum yarı ve maksimum %20 inhibitör konsantrasyonları kullanılmıştır. Plazmid süperheliks gevşeme analizi ile türevlerin topoizomeraz I inhibitör etkileri tespit edilmiştir. Türevlerin her iki konsantrasyonda da topoizomeraz I enzimini inhibe ettiği belirlenmiştir. Türevlerin hücre içi apoptotik proteinler üzerindeki etkilerinin incelenmesi için Western Blot metodu kullanılmıştır. Yapılan çalışmada antiapoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-xL ile proapoptotik proteinler olan p53, Bax ve BID'in ekspresyon düzeyleri tespit edilmiştir. En yüksek apoptotik etki 4-Metilpiperazin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester'de gözlenmekte iken türevlerin tümü hücre içi apoptotik mekanizmayı uyarmaktadır. Serviks adenokarsinoma hücre hattı ile türevlerin 12 saatlik inkübasyonu sonrasında p53 ve Bax ekspresyonlarında artış gözlenirken, Bcl-2 ve Bcl-xL ekspresyon seviyelerinin sabit kaldığı tespit edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonrasında ise p53 ve Bax proteinlerindeki artış korunurken Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin düştüğü tespit edilmiştir.

Türevlerin düşük konsantrasyonda kamptotesin ve mitoksantrondan daha yüksek topoizomeraz I enzim inhibisyonu göstermesi, kanser tedavisinde kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Aynı zamanda apoptotik etkiye sahip olmaları, sentezlenen yeni antrakinin türevlerinin diğer bir yoldan kemoterapide kullanılabilme potansiyellerini arttırmaktadır.

Anahtar Kelimeler: HeLa, topoizomeraz I, apoptoz, antrakinin, hücre kültürü

EFFECT of SOME SYNTHETIC COMPOUNDS on TOPOISOMERASE ENZYME ACTIVITY

ABSTRACT

Anthraquinone derivatives are often used in therapy of cancer, which is one of the most important diseases of our century. Adding substituents to the main structure of anthraquinone, provides very different biological activities to them. Thus, the observed high anti- cancer activity of the newly synthesized derivatives of anthraquinone, prevention of drug resistance mechanisms and low cytotoxic effect, provides an important place in the research of chemotherapeutic agents to derivatives.

In this thesis, topoisomerase I enzyme inhibition and effects on intracellular apoptotic mechanisms of newly synthesized 3 anthraquinone derivative were investigated. Their cytotoxic and apoptotic effects on the cervix adenocarcinoma cell line were studied before. Half maximum and maximum 20% inhibitory concentrations of derivatives were used in all experimental studies. Topoisomerase I inhibition of derivatives were determined in both concentration by using plasmid supercoil relaxation assay. Western blot method was used to analyse the effects of derivatives on intracellular apoptotic proteins. In this study, expression levels of Bcl-2, Bcl-xL, Bax, p53 and BID which are apoptotic proteins were analysed. While the highest apoptotic effect is observed on 4-Methylpiperazine-1-dithiocarbamic acid 6,11-Dioxo-6,11-dihydro-1H-anthra[1,2-d]imidazole-2-yl-methyl ester, all derivatives are inducing intracellular apoptotic mechanism. An increase in expression levels of Bax and p53 was observed whereas a stability in expression levels of Bcl-2 and Bcl-xL was determined after 12 hours incubation of cervix adenocarcinoma cell line with derivatives. After 24 hours incubation, the increase of Bax and p53 expression levels was protected, but a decrease in expression levels of Bcl-2 and Bcl-XL was determined.

Showing higher topoisomerase inhibition than mitoxantrone and camptothecin in lower concentration, allows derivatives to use in cancer treatment. Also having an apoptotic effect, increases the potentials of newly synthesized anthraquinone derivatives to be used in chemotherapy in another way.

Keywords: HeLa, topoisomerase I, apoptosis, anthraquinone, cell culture

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	2
Kanser	2
<i>Kanserin Mekanizması</i>	3
<i>Kanserin Nedenleri</i>	4
Kanser Türleri	5
Servikal Kanser	5
Antrakınonlar	7
Topoizomeraz I	8
Apoptoz	11
<i>Hücre Ölüm Şekilleri</i>	11
<i>Apoptozun Mekanizması</i>	12
Apoptozda Görev Alan Proteinler	14
<i>Kaspazlar</i>	14
<i>Bcl-2 Ailesi</i>	15
<i>P₅₃</i>	17

	SAYFA
GEREÇLER	18
Hücre Hattı	18
Kullanılan Kimyasal Madde ve İlaçlar	18
Kullanılan Cihazlar	19
YÖNTEMLER	19
Hücre Kültürü	19
Antrakınon Türevleri, Mitoksantron ve Kamptotesinin Hazırlanması	19
Plazmid Superheliks Gevşeme Analizi	19
Western Blot Yöntemi	20
BULGULAR ve TARTIŞMA	21
Antrakınon Türevlerinin Topoizomeraz I İnhibitör Etkileri	21
Antrakınon Türevlerinin Bazı Apoptotik Proteinler Üzerine Etkileri	25
SONUÇ ve ÖNERİLER	39
KAYNAKLAR	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA
Çizelge 1 12 ve 24 Saat İnkübasyon Sonrasında HeLa Hücrelerinden Elde Edilen Total Protein Miktarları (mg/ml)	27
Çizelge 2 Türevler ile 12 Saat İnkübe Edilen HeLa Hücrelerinde Proteinlerin Ekspresyon Seviyeleri	41
Çizelge 3 Türevler ile 24 Saat İnkübe Edilen HeLa Hücrelerinde Proteinlerin Ekspresyon Seviyeleri	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 Kanserleşme Mekanizmasındaki Etkenler	4
Şekil 2 Antrakininonların Kimyasal Yapısı	8
Şekil 3 Topoizomeraz II ve DNA'nın Yapısal Şekli	10
Şekil 4 Topoizomeraz I ve DNA'nın Yapısal Şekli	11
Şekil 5 Apoptozun Aşamaları Esnasında Hücrenin Faz Kontrast Mikroskop Görüntüleri	13
Şekil 6 Apoptotik Sinyal Mekanizmaları	14
Şekil 7 Proapoptotik ve Antiapoptotik Proteinler	16
Şekil 8 Mitoksantron ve Antrakininon Türevlerinin Kimyasal Yapı Formülleri	25
Şekil 9 Supersarmal DNA ve Gevşemiş DNA Formu	25
Şekil 10 Maksimum Yarı İnhibitör Konsantrasyonlarında Ant 3, Ant 4 Ant 6 ve Mitoksantron ile Kamptotesinin Jel Görüntüleri	26
Şekil 11 Maksimum %20 İnhibitör Konsantrasyonlarında Ant 3, Ant 4 Ant 6 ve Mitoksantron ile Kamptotesinin Jel Görüntüleri	26
Şekil 12 HeLa Hücreleri ile Antrakininon Türevlerinin 12 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen Aktin Proteini Ekspresyonu	28
Şekil 13 HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın 12 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen Aktin Proteini Yoğunluk Grafiği	28
Şekil 14 HeLa Hücreleri ile Antrakininon Türevlerinin 24 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen Aktin Proteini Ekspresyonu	29
Şekil 15 HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın 24 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen Aktin Proteini Yoğunluk Grafiği	29
Şekil 16 HeLa Hücreleri ile Antrakininon Türevlerinin 12 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen Bax Proteini Ekspresyonu	30
Şekil 17 HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın 12 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen Bax Proteini Yoğunluk Grafiği	30
Şekil 18 HeLa Hücreleri ile Antrakininon Türevlerinin 24 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen Bax Proteini Ekspresyonu	31
Şekil 19 HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın 24 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen Bax Proteini Yoğunluk Grafiği	31

ŞEKİLLER DİZİNİ DEVAM

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 20 HeLa Hücreleri ile Antrakininon Türevlerinin 12 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen Bcl-2 Proteini Ekspresyonu	32
Şekil 21 HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın 12 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen Bcl-2 Proteini Yoğunluk Grafiği	32
Şekil 22 HeLa Hücreleri ile Antrakininon Türevlerinin 24 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen Bcl-2 Proteini Ekspresyonu	33
Şekil 23 HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın 24 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen Bcl-2 Proteini Yoğunluk Grafiği	33
Şekil 24 HeLa Hücreleri ile Antrakininon Türevlerinin 12 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen Bcl-xL Proteini Ekspresyonu	34
Şekil 25 HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın 12 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen Bcl-xL Proteini Yoğunluk Grafiği	34
Şekil 26 HeLa Hücreleri ile Antrakininon Türevlerinin 24 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen Bcl-xL Proteini Ekspresyonu	35
Şekil 27 HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın 24 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen Bcl-xL Proteini Yoğunluk Grafiği	35
Şekil 28 HeLa Hücreleri ile Antrakininon Türevlerinin 12 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen BID Proteini Ekspresyonu	36
Şekil 29 HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın 12 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen BID Proteini Yoğunluk Grafiği	36
Şekil 30 HeLa Hücreleri ile Antrakininon Türevlerinin 24 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen BID Proteini Ekspresyonu	36
Şekil 31 HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın 24 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen BID Proteini Yoğunluk Grafiği	37
Şekil 32 HeLa Hücreleri ile Antrakininon Türevlerinin 12 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen p53 Proteini Ekspresyonu	37
Şekil 33 HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın 12 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen p53 Proteini Yoğunluk Grafiği	38
Şekil 34 HeLa Hücreleri ile Antrakininon Türevlerinin 24 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen p53 Proteini Ekspresyonu	38
Şekil 35 HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın 24 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen p53 Proteini Yoğunluk Grafiği	39
Şekil 36 HeLa Hücreleri ile Antrakininon Türevlerinin 12 Saat İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen Tüm Proteinlerin Ekspresyonları	39

ŞEKİLLER DİZİNİ DEVAM

ŞEKİL NO ve ADI

SAYFA

Şekil 37 HeLa Hücreleri ile Antrakinon Türevlerinin 24 Saat
İnkübasyonu Sonucunda Elde Edilen Tüm Proteinlerin Ekspresyonları 40

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

μ l	: Mikrolitre
μ m	: Mikrometre
μ M	: Mikromolar
Aktin	: Hücre iskeleti proteini
APAF-1	: Apoptoz Aktive Edici Faktör
ATP	: Adenozin Trifosfat
Bax	: Bcl-2 bağlantılı protein
Bcl-2	: B-Hücre Lemfoma 2
BCRP	: Meme Kanseri Direnç Proteini
BID	: Ölüm bölgesi bağlantılı BH3 proteini
Ca	: Kalsiyum
CAD	: Kaspazla Aktifleşen Deoksiribonükleaz
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
FADD	: Ölüm Bölgesi Protein ile İlişkili Fas Adaptör Molekülü
Fas	: Tümör Nekrozis Faktör Ailesine Ait Tip 2 Transmembran Proteini
FBS	: Fetal Sığır Serum
FITC	: Floresanzosiyanat
HeLa	: İnsan Servikal Adenokarsinoma Hücre Hattı
HPV	: İnsan Papilloma Virüsü
IC ₅₀	: Maksimum Yarı İnhibitör Konsantrasyon

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ DEVAM

IC ₈₀	: Maksimum % 20 İnhibitör Konsantrasyon
ICAD	: Kaspazla Aktifleşen Deoksribonükleaz İnhibitörü
MEM	: Minimal Temel Solüsyon
Mg	: Magnezyum
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
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	: Deoksiribonükleotidil 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

Sağlıklı hücrelerin anormal bir şekilde büyüme ve kontrolsüz çoğalmalarını sağlayarak, buldukları dokuyu işgal etmelerine ve vücudun diğer dokularına yayılmalarına sebep olan kanser çağımızın en önemli sağlık sorunlarından birisidir (http-1). 2012 yılında dünya üzerinde 14,1 milyon yeni kanser vakası meydana gelirken, bunların yaklaşık olarak 8,2 milyonu ölümle sonuçlanmıştır. Kanser sebebiyle gerçekleşen ölümlerin toplam ölüm vakalarının %14,1'ini oluşturduğu tespit edilmiştir. Servikal kanser, hem kadınlar arasında görülen en yaygın, hem de en yüksek ölüm oranına sahip kanser sıralamasında, dördüncü sırada gelmektedir. 2012 yılında 528,000 servikal kanser vakası meydana gelirken bunların 266,000'i ölümle sonuçlanmıştır. Kanser sebebiyle gerçekleşen ölümlerin %8'ini servikal kanser oluşturmaktadır (Anonim, 2014)

Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan yöntemlerin başında kemoterapi ve radyoterapi gelmektedir. Hastalığın ilerlediği vakalarda kemoterapi ve radyoterapi ya da farklı kemoterapötik ajanlar kombine kullanılmaktadır. Fakat her iki yöntemin de büyük yan etkileri bulunmaktadır. Bu sebeple tedavide kullanılan kemoterapötik ajanlardan daha düşük yan etkilere sahip yeni kemoterapötiklerin araştırmaları kanser çalışmalarının birincil konusudur (Poggi ve ark., 2001).

Fizyolojik süreçte hücrelerin doğal bir ölüm şekli olan, programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptozu uyaran anti-kanser ajanların kullanılması, yeni kemoterapötik ilaç geliştirilmesi çalışmalarında etkili bir yöntemdir. Bu sayede kanserli hücreler ölürken buldukları dokuya zarar vermemekte, ilacın yan etkileri azalmaktadır (Ellis ve ark., 1997).

Anti-kanser ajan ve antibiyotik olarak da kullanılabilen topoizomeraz inhibitörleri, kanserle mücadelede geniş bir yer edinmektedir. Hücre bölünmesi esnasında DNA sarmalının düz iplikçikler halinde açılmasını sağlayan topoizomerazların inhibisyonu, bölünmeyi durdurarak hücrenin çoğalmasını engellemektedir (Potmesil ve Pinedo, 1995)

Antrakınonlar, anti-kanser aktiviteleri sebebiyle 30 yılı aşkın süredir kemoterapötik çalışmalarında önemli yer teşkil etmektedir. Antrasenin en önemli kinon türevleri olan antrakınonların düzlemsel trisiklik yapıları DNA iplikçikleri ile etkileşime geçmektedir. Bu sayede topoizomeraz I ve topoizomeraz II türevi enzimlerin çalışmasını inhibe ederek hücre çoğalmasını engellemekte, dolayısıyla kanserin ilerlemesini durdurmaktadır (Alibadi ve ark., 2004). Buna karşın diğer anti-kanser ajanlar gibi saç kaybı, kusma, mide bulantısı ve vücut direncini azaltmaları yanında kardiyotoksik etkileri bulunmaktadır. Antrakınonların, özellikle kalpte serbest radikal oluşturarak kardiyotoksik etki göstermektedirler (Zhang ve ark., 2012). Yan etkileri sebebiyle hayat boyu alınabilecek antrakınon miktarı sınırlandırılmaktadır. Tedavi esnasında kullanılan antrakınon miktarı hayat boyu alınabilecek miktara ulaştığında antrakınon türevleri ile yapılan tedavi durdurulmaktadır (Minotti ve ark., 2004).

Bu tez kapsamında etkileri araştırılan antrakınon türevlerinin HeLa hücre hattı üzerindeki apoptotik etkileri laboratuvarımızda yapılan bir yüksek lisans tezi ile gösterilmiştir (Önder, 2013). Bu tez kapsamında da Antrakınon türevlerinin pro-ve anti-apoptotik protein ekspresyonu üzerine etkilerinin araştırılması ve topoizomeraz inhibitör etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu sayede ilaç aday

olan Antrakinon bileşiklerinin apoptotik etki mekanizmasının belirli düzeyde aydınlatılması sağlanacak ve topoizomeraz inhibitör etkisi literatüre kazandırılacaktır.

KAYNAK BİLGİSİ

Kanser

Neoplazi, bir doku veya organı oluşturan hücrelerin anormal ve kontrolsüz şekilde çoğalmasdır. Neoplazmalar çoğunlukla ayırt edilebilecek kitleler yani tümörler oluşturacak şekilde büyürler. Kötü huylu olarak nitelendirilen neoplazmalar yüksek derecede değişim gösterirler ve lenf sistemi ve kan dolaşımı yolu ile metastaz oluştururlar ya da başka bir deyişle ikincil organlara yayılarak vücudu işgal ederler. Kanser terimi neoplazma ile aşağı yukarı eş anlamlıdır ve kontrolsüz, anormal hücre çoğalması ile karakterize edilen birçok hastalık için genel bir terim olarak kullanılır.

Sık görülmesi ve öldürücülüğünün yüksek olması nedeniyle kanser günümüzün en önemli sağlık sorunudur. Tanı olanaklarının gelişmesi ve sağlık kuruluşlarından yararlanma olanaklarının artması ile her yıl daha çok kanser vakası teşhis edilmektedir. Ayrıca enfeksiyon hastalıklarının kontrol altına alınması; diğer hastalıklara karşı etkin tedavi yöntemlerinin kullanıma girmesi ve yaşam standardının yükselmesi ile ortalama yaşam süresinin uzaması, dolayısı ile yaşlı nüfusun artması; toplumun bilgi seviyesinin yükselmesi ve kanser tedavisindeki gelişmeler sebebi ile daha çok hastanın hekime başvurması ve gelişen teknoloji ile çevresel karsinojenlere maruziyetin artışı kanser teşhisi sıklığını arttıran etkenlerdir (http-2).

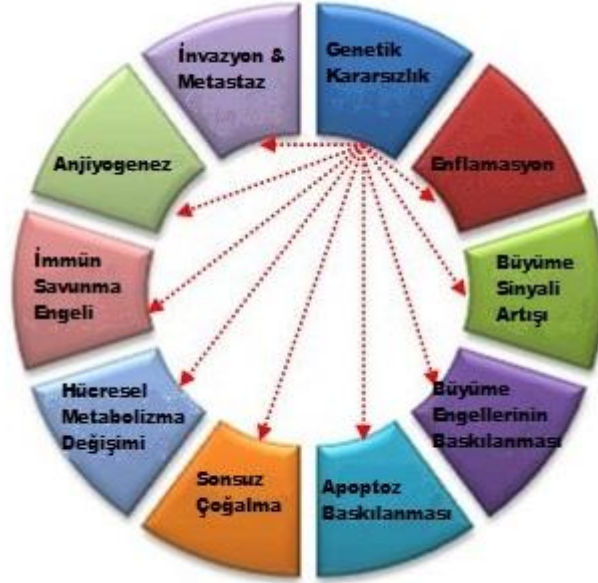
Dünyadaki kanser vakasının sayısı geçtiğimiz 30 yıl içinde iki kattan daha fazla artmıştır. 2008'de 12 milyon yeni kanser vakasının teşhis edildiği, kanserden kaynaklanan 7 milyon ölümün gerçekleştiği ve kanserli 25 milyon kişinin halen hayatta olduğu tahmin edilmektedir. Dünya nüfusunun süregelen artışı ve yaşlanması kanser yükü üzerinde de büyük değişikliklere yol açacaktır. 2030'a gelindiğinde 27 milyon kanser vakası, kanserden kaynaklanan yıllık 17 milyon ölüm ve son beş yıl içinde kanser tanısı konmuş 75 milyon kişi rakamlarına ulaşılması beklenmektedir. Bu artışın etkilerinin çoğu kaynakları az ya da orta seviyede olan ülkeler üzerinde gerçekleşecektir. Bu tür ülkelerin kaynakları çok olan ülkelere oranla kanserden daha büyük ölçüde etkilendiği söylenebilir. Bu ülkelerin sağlık bütçeleri genellikle kısıtlı olup bulaşıcı hastalıklar yüksek düzeyde seyretmektedir. Kanser tedavi klinikleri herkesin erişimine açık olmayıp hayat kurtarıcı tedaviler çoğu zaman ekonomik nedenlerle ulaşılamaz durumda olmaktadır (Boyle ve Levin, 2008).

Ülkemizde 1970'li yıllarda sebebi bilinen ölümler arasında 4. sırada yer alan kanser, son yıllarda kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra 2. sıraya yükselmiştir. Erkeklerde en sık rastlanan kanserler nefes borusu, bronş ve akciğer (%33), mide (%9), idrar torbası (%9), kalın bağırsak ve rektum (%8), prostat (%6), ve larinks kanserleridir. Kadınlarda en sık rastlanan kanserler meme (%24), kalın bağırsak ve rektum (%9), mide (%7), yumurtalık (%6), nefes borusu, bronş ve akciğer (%6), lösemi (%5) ile serviks (%5) ve korus (%5) kanserleridir (Tuncer, 2009).

Kanserin Mekanizması

Kanser oluşumunu hızlandıran onkogenler genellikle mutasyon ya da başka nedenlerle yeni bir işlev veya aktivite kazanarak otozomal dominant etki

gösterirler. Normal hücrede çoğalmanın kontrolü için gerekli olan ve hasara uğradıkları veya ortadan kalktıkları zaman hücrenin denetimsiz çoğalmasına neden olan ve otozomal resesiflik gösteren genlere de **tümör süpresör genler** denir. Onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresör gen inaktivasyonları, hücrenin kontrolsüz çoğalması, kontak inhibisyonun kaybolması, invazyon ve metastaz yeteneği kazanması gibi malign özellikler kazanmasına yol açmaktadır (**Şekil 1**). Hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasında rolü olan proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar tümör gelişimine, tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar ise hücre siklusunun inhibisyonunu engelleyerek anormal hücre büyümesine neden olur (Ringer ve Schnipper, 2001).



Şekil 1. Kanserleşme Mekanizmasındaki Etkenler

Kanserli hücrelerde meydana gelen mutasyonlar sonucu hücre işlevini kaybetmekle birlikte metabolizmasında anormal durumlar ortaya çıkmaktadır. Bu anormallikler kanserli hücrelerin çoğalmasını hızlandırdığı gibi bölünme sonrasında oluşan yeni hücreler de aynı anormallikleri taşımaktadır. Mutasyona uğrayan hücrelerin bazıları ölürken bazıları sağlıklı hücrelere göre daha hızlı çoğalma yeteneği kazanmaktadır. Hücreler eğer kanserleştikleri bölgede kalırsa bunlar iyi huylu; invazyon yani dokuyu istila etme eğilimi göstererek oluştukları dokudan farklı dokulara göç ederlerse kötü huylu olarak adlandırılmaktadırlar (Hartwell, 2003).

Kanserin ölümlere sebep olmasının ana nedenlerinden birisi metastaz yaparak diğer dokulara yayılmasıdır. Oluştugu dokuda büyümesi bu olayın ilk aşamasıdır. Daha sonra bağlanma yeteneklerini kaybederek kılcal kan damarları aracılığı ile dolaşım sistemine girmektedirler. Damar sisteminde integrin, selektinler ve CD44 gibi hücre bağlanma molekülleri ile bazal membrana bağlanma özelliği kazanan tümör hücreleri dokuya nüfuz ederek çoğalmalarına devam etmektedirler. Bu durum kanserli hücrenin farklı bir dokuda çoğalarak vücuttaki olumsuz etkilerini arttırmasına sebep olmaktadır (Tracey ve ark., 2013)

Tümör hücreleri de sağlıklı hücreler gibi besin ve oksijene ihtiyaç duymaktadırlar. Anormal hücre büyüme ve çoğalmalarını devam ettirmeleri için

ihtiyaçları normal düzeyin üzerine çıkmaktadır. Vcttaki tüm dokuların besin ve oksijen ihtiyaını kılcal damarlar karşılamaktadır. Var olan kılcal damarlar kanserli hücrelerin besin ve oksijen ihtiyaçlarını karılamadıkları durumda, kanserli hücreler yüksek miktarda büyüme faktörü sentezleyerek çevrelerindeki kılcal damar sayısını arttırmaktadırlar. Bu olay “Anjiyogenez” olarak adlandırılmaktadır (Birbrair ve ark., 2013).

Kanserin Nedenleri

Kanserin oluşum nedenleri çok çeşitli olup, bunlar arasında bakteri, virüs, radyasyonun etkileri, kalıtım, beslenme alışkanlığı ve kimyasallar sayılabilir (Williams 2001).

Kalıtım yoluyla kanser meydana gelme olasılığı yaklaşık olarak % 15, çevresel faktörler sebebiyle meydana gelme olasılığı ise % 85’tir. Normalde tümör gelişimini önleyen tümör baskılayıcı genlerdeki bir bozukluğun, kalıtımsal olarak aktarılması ve sigara gibi bir karsinojenin ilave katkısı ile bireyler kansere yatkın bir hale gelebilmektedirler. Meme ve yumurtalık kanseri gibi bazı kanser türlerinde, kanserin kalıtımsal geçişine ait bazı genler tespit edilmiştir. Benzer şekilde, lösemiler ve Wilms tümörü, retinoblastoma gibi bazı çocukluk ağı tümörleri de kalıtımsal özellik gösterir. Kalın barsakta polip gelişimine olan genetik yatkınlıkta, kalın barsak kanseri diğerk adıyla kolon kanserlerinin gelişim riskini arttırmaktadır. Her ne kadar kalın barsak kanserlerinin oğru (yaklaşık % 85-90’ı) doğumdan sonra meydana gelen mutasyonların bir sonucu olsa da geriye kalan kısmı kalıtsaldır. (Yokuş ve akır, 2012).

Kimyasal kanserojen ajanlar çevresel faktörlere dahil olup, ya DNA molekülünün yapı taşları ile reaksiyona girerler ya da kromozomların yapısında bulunan proteinlerle çapraz bağlar oluşturarak DNA molekülünde baz delesyonlarına, zincir kırıklarına, inversiyon gibi yapısal değişikliklere yol açar. Meydana gelen bu mutasyonlar sonucunda DNA’nın replikasyonu, genlerin transkripsiyonu ve translokasyonu veya aktivasyonunda anormal durumlar meydana gelebilir (Ringer ve Schnipper 2001).

Kanserojen özelliğe sahip bazı kimyasal ajanlar şunlardır; alfatoksinler gibi bazı küfler, yanmış yağları içeren besinler, sigara, alkol, hardal gazı, benzen, kömür tozu ve zifti, madeni yağlar ve naftalin (Yokuş ve akır, 2012).

Özellikle her yıl yaklaşık bir milyon insanın sigara kullanımına bağlı olarak kanserden yaşamını yitirdiği tahmin edilmektedir. Tüm kanser tiplerinde artışa sebep olan sigara kullanımı öncelikle akciğer kanserinde etki göstermektedir. Sigara dumanının içerisinde bulunan polisiklik aromatik hidrokarbonlar, özellikle benzopiren, DNA hasarı meydana getirerek ve hücre döngüsünün korunmasında görev alan p53 proteinini üreten geni mutasyona uğratarak kansere sebep olmaktadır. Sigara kullanımı olmayan akciğer kanseri vakalarında DNA üzerinde guanin timin nükleik asitlerinin yer değiştirmesiyle meydana gelen mutasyon %12 oranında iken, sigara kullanımı olan vakalarda bu oran %30’a çıkmaktadır (Pfeifer ve ark, 2002).

Radyasyon, ısı, güneş ışığı, mekanik darbeler kansere sebep olan başlıca fiziksel etmenlerdir. X ışını, gamma ışınları, nükleer emisyonlar, ultraviyole ışınları gibi iyonize radyasyon ışınları biyolojik makromoleküllere direkt olarak

etki edebilecek yeterli enerjiye sahiptirler. Böylelikle biyolojik makromoleküllerin kimyasal yapılarında değişime neden olabilirler. Örneğin; molekülden elektron kopartabilir ya da moleküllü pozitif yükle yükleyebilir. Bu tür değişimler DNA yapısında tek ve çift zincir kırıklarının oluşmasına ya da baz ve deoksiriboz şeker yapısında modifikasyonlara sebep olur (Heynick ve ark., 2003) .

Helicobacter pylori, T hücreli lösemi virüsü, human papilloma virüsü, servikal kanser gibi virüs ve bakteriler de fiziksel ve kimyasal etkenler gibi, biyolojik olarak normal karaktere sahip bir hücre kültürünü transforme ederek kanser oluşturabilirler (Yokuş ve Çakır, 2012).

Kanser Türleri

En sık rastlanan kanser türü, derideki epitel hücreleri, gastrointestinal sistem ve iç organlarda ortaya çıkan kötü huylu tümörler, yani karsinomlardır. Sarkomların kaynağı kaslar, kan damarları, yağ dokusu gibi yumuşak dokular ve kemik dokusudur. Merkezi sinir sisteminde bulunan glia hücrelerinin değişimi sonucu ise gliomalar ortaya çıkmaktadır (Boyle ve Levin, 2008).

Midenin epitel dokusunda oluşan karsinoma genellikle uzun süren gastritin ardından meydana gelmektedir. Diğer organlara doğrudan yayılabildiği gibi metastaz yoluyla da yayılım göstermektedir. Kan damarlarında invazyon ve lenf dokusunda metastaz gerçekleştirmektedir. Karsinomlar kolon ve rektumda da meydana gelebilmektedir. Bulunduğu bölgede kas dokusuna nüfuz ettiği zaman kötü huylu olarak sınıflandırılmaktadır. Kolonda bulunan karsinoma farklılaşarak adenokarsinoma şekline dönüşebilmektedir (Hamilton ve Aaltonen 2000).

Glia hücreleri ve beyin destek dokularından oluşan tüm tümörler glioma olarak adlandırılır ve köken aldığı dokuya göre isimlendirilmektedir. En sık karşılaşılan glioma tipi yıldız şeklindeki astrosit hücrelerinden oluşan astrositomlardır. Gliomaların tümörlerin derecelendirilme sistemlerine göre 4 ayrı dereceye ayrılır. Tümörün derecesi yükseldikçe büyüme ve çoğalma hızı ile vücutta meydana getirdiği tehlike artmaktadır. Beyin tümörleri arasında en tehlikeli olanı 4. derece glioma olan glioblastomlardır. Glioblastomalar, büyümeleri için çevrelerinde bulunan kan damarı sayısını arttırdıkları gibi nekroz mekanizması ile beyinde ölü dokuya sebebiyet vermektedirler. Glioma tedavisinde birincil olarak cerrahi müdahale kullanılmaktadır. Bunun yanında radyoterapi ve kemoterapi de ileri derecedeki beyin tümörlerinde kullanılan tedavilerdir (Anonim, 2012)

Servikal Kanser

Rahim ağzında hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla oluşan serviks kanseri vücudun diğer kısımlarına yayılabilme özelliğine sahip bir kanser türüdür (http-3). Serviks kanseri oluşumunda en büyük faktörün Human Papilloma Virüs (HPV) olduğu bilinmektedir. Yüksek, orta ve düşük risk kategorilerine ayrılan HPV tiplerinin hepsi serviks kanserine sebep olmamaktadır. Düşük risk faktörü HPV tipleri olan HPV6 ve 11 **condyloma acuminatum** adı verilen siğillere sebep olmaktadır ve nadiren kansere sebep olmaktadır. Bunun aksine HPV 16, 18, 31, 33 ve 45 gibi yüksek risk faktörü HPV tipi olanların kanserle ilişkisi yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bazen kanserin gelişme evresine kadar hiçbir belirti meydana getirmeden çoğalabilmektedirler (http-4). HPV enfeksiyonu her zaman kanser oluşumunda yeterli olmayabilir, kanserin oluşabilmesi için bazı yan

etkenlere ihtiyaç duyar. Sigara kullanımı, cinsel yolla bulaşan diğer çevresel ajanlar ve bazı genetik ve hormonal faktörler serviks kanseri oluşumundaki yan faktörler arasındadır (Çalışkan ve ark., 2010).

Serviks kanserinden gerçekleşen ölümler tüm kanser ölümlerinin % 8'ini oluşturmaktadır. 2014 yılında yapılan istatistiklere göre dünya çapında kadınlarda kanserden gerçekleşen ölüm vakalarında dördüncü sırada serviks kanseri yer almaktadır. 2012 yılında 528 bin serviks kanseri vakası tespit edilmiş olup bunların 266 bin'i ölümle sonuçlanmıştır. Gelişmekte olan ülkelerde gözlemlenen serviks kanseri vakaların toplamın % 70'ini oluşturmakta iken ölümlerin büyük bir kısmı düşük gelirli ülkelerde yaşanmaktadır (Stewart ve Wild, 2014).

Serviks kanserinin büyük bir kısmı adenokarsinomdan meydana gelebildiği gibi rahim ağzının dış yüzeyinde bulunan yassı karaktere sahip sküamoz hücrelerde de meydana gelebilir ve sküamoz karsinom adını alır. Son yapılan çalışmalara göre serviks kanseri adenosküamoz tipte yani hem salgı hücrelerinde hem de sküamoz hücrelerde oluşabilmektedir (Tang ve ark. 2013).

Serviks kanserinin büyüme fazında oksijensiz kalması yani hipoksi durumunda lenf damarları üzerinden anjiojenez gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Hipoksiye maruz bırakılmış serviks kanser hattında vasküler endotelial büyüme faktörü 3'ün aşırı ekspresyonu gözlemlenmektedir (Chaudary ve ark., 2011).

Servikal kanserin oluşumunda en büyük faktör olan HPV, hücrenin kanserleşmesini sentezlediği E6 ya da E7 proteinleri aracılığıyla ya da doğrudan hücrenin genomuna entegre olarak gerçekleştirmektedir. E6 ve E7 proteinleri birbirilerinden bağımsız olarak ya da sinerjistik etki ile keratinosit, servikal epitel ve meme epitelini dönüşüme uğratarak ölümsüzleştirmektedir. Yapılan çalışmalarda E7 proteinin insan servikal epitelinde Ras proteinini aktive ettiği gözlemlenmiştir. Hücre içi proteinleri aktive edebildikleri gibi hücrenin genomunda da değişikliklere sebep olmaktadır. Çoğunlukla 1, 3 ve 5. kromozomlar üzerinde kromatin boşluklarına ve kırılmalara sebep olmaktadır. Bunun yanında kromozomlar üzerinde meydana getirdikleri hasarın ardından hücrenin DNA tamir mekanizmasını engellemektedirler. E6 proteini inaktif formda bulunan p53 proteinine, E7 proteini ise inaktif formda bulunan p21 proteinine bağlanarak, p53 proteinin hücre döngüsü esnasında döngüyü durdurmasının ardından gerçekleştirdiği DNA tamirini engellemektedir. Kansereleşmenin ileri aşamalarında HPV genomu konak hücrenin DNA'sına entegre olmaktadır. Kötü huylu karsinomlarda HPV'nin DNA'ya bağlanması daha sık gözlenirken, yayılıcı olmayan tümörlerde gözlemlenmemektedir. Buna karşın her iki tip tümörde de HPV, Ras genini mutasyona uğratmaktadır (Münger ve ark., 2004).

Cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi serviks kanseri tedavisinde kullanılan yöntemlerdir. Sıvı nitrojen ile soğutulmuş metal bir sonda aracılığıyla yapılan operasyon, odaklanmış lazer kullanılarak kanserli hücrelerin yakılmasıyla yapılan operasyon, konik yapıda olan kanserleşmiş dokuların alınması ve uterus ya da serviksin doğrudan alınması, serviks kanseri tedavisinde kullanılan cerrahi müdahalelerdir. Kansereleşmenin aşamalarına göre bazen radyoterapi kullanılsa da kemoterapi çoğunlukla daha iyi sonuç vermektedir. Sisplatin, karboplatin, paklitaksel, topotekan ve gemsitabin gibi ve bu ilaçların kombinasyonları tedavide

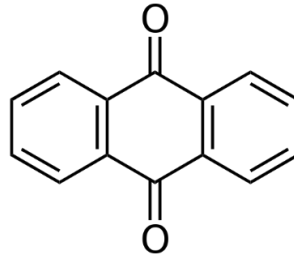
sıklıkla kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra dosetaksel, ifosfamid, 5-florourasil, mitomisin ve irinotekan da tedavide kullanılan ilaçlardır (http-4).

Son yapılan çalışmalarda, serviks kanseri tedavisinde antrakinon-tiyosemikarbazon bileşiklerinin etkili olduğu gözlemlenmiştir. Bu bileşikler kanserli hücreleri bölünme esansında durdurarak proliferasyonlarını önlemekte aynı zamanda kaspaz-bağımlı yolak üzerinden apoptoza sürüklemektedir. Meme kanseri hücre hattı antrakinon-tiyosemikarbazon bileşiklerine karşı direnç gösterirken serviks kanseri hücre hattının tedaviye yanıt verdiği gözlenmektedir (Markovi ve ark., 2013)

Antrakinonlar

Açık sarı renkte kristal yapıda olan antrakinon, $C_{14}H_8O_2$, ilk olarak 1834 yılında A. Laurent tarafından antrazenin oksitlenmesiyle hazırlanmıştır. Geniş kullanım alanına sahip olan antrakinon 1868 yılında boya sanayisinde, 1977 yılında ise kağıt sanayisinde kullanılmaya başlanmıştır. Türevlerinin yüksek biyolojik aktivite göstermesinin aksine, antrakinon ana yapısı biyolojik olarak hiçbir etki göstermemektedir (Vogel, 2000).

Polisiklik bir yapıya sahip olan antrakinon (**Şekil 2**) türevlerinin bazıları doğal olarak bitki ve böceklerde bulunmakta olup sentetik olarak da üretilmektedir. Biyolojik olarak aktif olan türevler, tıbbi ve biyolojik ürün olarak kullanılmaktadır. 1939'da antibakteriyel özellikleri tanımlanan antrakinon türevlerinin, 1960'larda anti-kanser etkisi bulunmuştur. *Streptomyces peucetius varcaesitue*'den izole edilen doksorubisin ve daunorubisin kemoterapide sıklıkla kullanılan anti-kanser antrakinon türevleridir. Kardiyotoksik yan etkiye sahip olmalarına rağmen çok sayıda kanser tipine etki etmektedirler (Rabbani ve ark., 2004).



Şekil 2. Antrakinon'un Kimyasal Yapısı (http-5)

30 yılı aşkın bir süredir antrakinon türevi olan doksorubisin ve onunla aynı sınıfta yer alan daunorubisin kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Doksorubisin daha çok meme kanseri, akciğer kanseri, endometriyal dokularda ve osteosarkoma gibi kanser türlerinin tedavisinde kullanılmakta iken daunorubisin lösemi tedavisinde kullanılmaktadır. Antrakinon türevleri çok sayıda mekanizma ile antiproliferatif ya da sitotoksik etkiye sahiptirler. Makromolekül sentezini inhibe etmeleri, DNA hasarı aracılığıyla ya da lipid peroksidasyonu yaparak serbest radikal oluşturmaları, DNA'yı alkilemeleri, DNA üzerinde çapraz bağlanmaya sebep olmaları, DNA iplikçiklerinin açılmasını engellemeleri ya da helikaz aktivitesini baskılamaları, doğrudan membran hasarı oluşturmaları, topoizomerez I veya II'yi inhibe ederek hücre döngüsünü durdurmaları ve bu etkilerinin bir üst

basamağı olarak apoptoza sebep olmaları gibi aktiviteleri ile ilaç etkisi göstermektedirler (Gewitz, 1999).

Cilt kanseri (M14, LOX IMVI, MALME-3M, SK-MEL-2), kolon kanseri (HT29, KM12, SW-620, HCT-116, HCT-15), akciğer kanseri (A549, EK VX, HOP-62, HOP-92, NCI-H226) ve beyin tümörüne (U251, SF-268, SF-295, SNB-19, SNB-75) ait çok sayıda hücre hattı ile yapılan bir çalışmada katyonik antrakinin türevlerinin cilt kanseri haricinde diğer tüm kanser türevlerinde düşük dozda yüksek anti-kanser aktivite gösterdikleri, aynı zamanda antibakteriyel etkiye de sahip oldukları bulunmuştur. Çalışmada kullanılan antrakinin türevleri antrakinin ana yapısı üzerinde alkil zinciri yerine aromatik grup taşımaktadır. Yapı-etki ilişkileri (SAR) çalışmaları, aromatik halka üzerinde elektron verici süstitüentın anti-kanser aktiviteyi arttırdığını ortaya koymaktadır (Jaya ve ark., 2014)

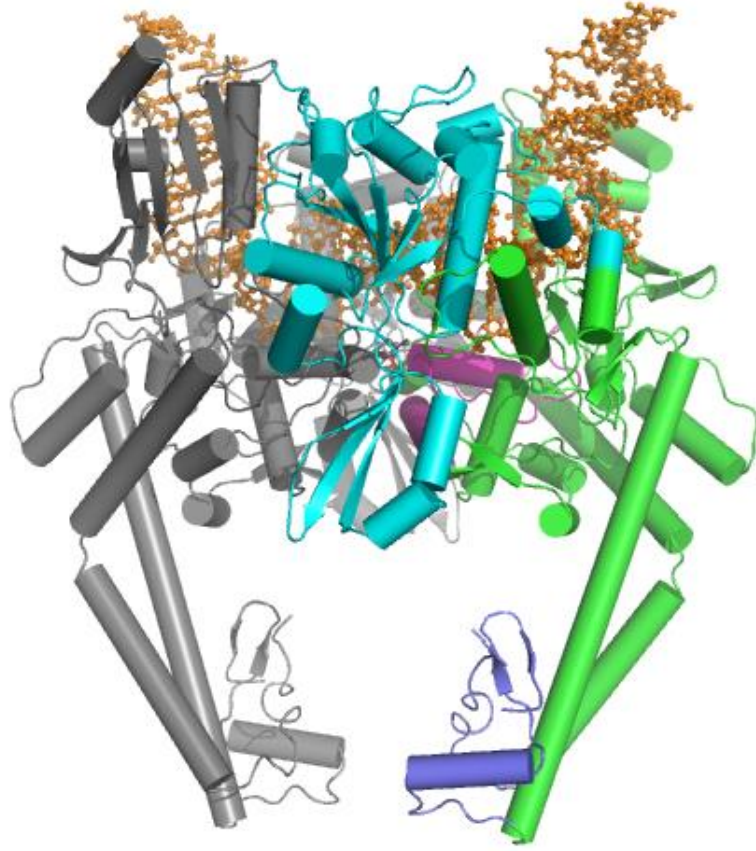
Antrakinin'un platinli bileşiği insan kolon kanseri hücre hattı üzerinde denendiğinde kemoterapide sıklıkla kullanılan sisplatine göre ve bileşiğin antrakinin kısmını oluşturan 1-[(3-Aminopropyl)amino]-anthracene-9, 10-dione'a göre daha yüksek sitotoksositeye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Platin içeren antrakinin türevinin DNA hasarı oluşturarak hücreyi apoptoza sürüklediği düşünülmektedir. Diğer bir yandan bileşiğin platin grubu içermesi, hücre tarafından kısa sürede inaktif hale getirilmesine sebep olmaktadır. Doksorubisin hücre çekirdeğinde yer alırken, platinli antrakinin bileşiği lizozomda yer almaktadır (Alderden ve ark., 2006)

Tirozin ya da fenilalanin içeren antrakinin türevlerinin, topoizomeraz I inhibitörü olarak kullanılan kamptotesinden daha yüksek derecede inhibitör özelliğe sahip olduğu da gözlenmiştir (Giles ve Sharma, 2005).

Topoizomeraz I

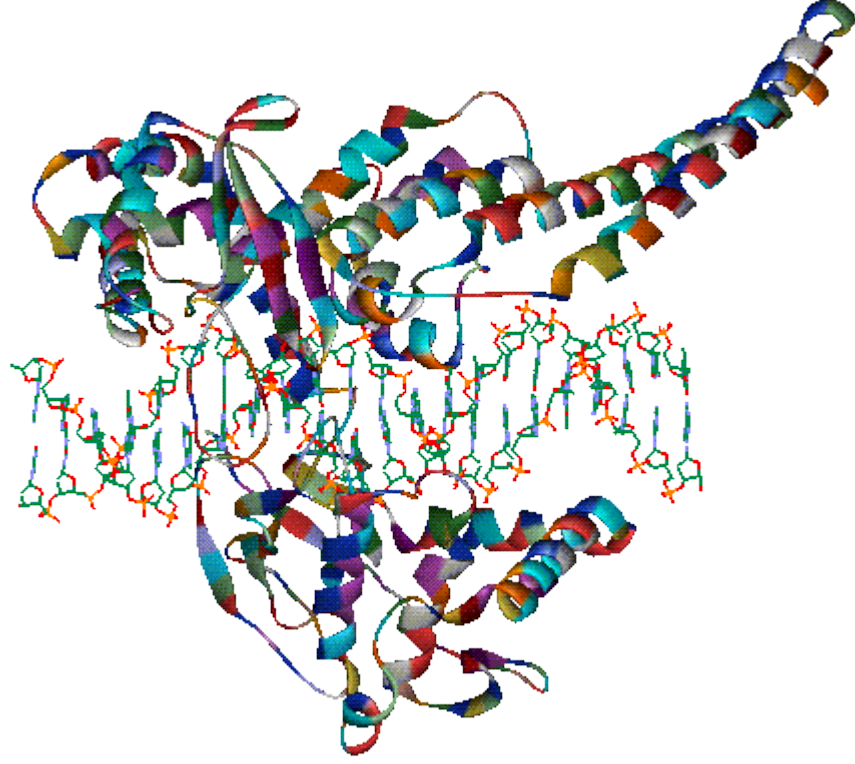
Topoizomerazlar tüm prokaryot ve ökaryotlarda bulunan, yüksek derecede korunan bir enzim ailesidir. İnsan genomu 7 adet topoizomeraz geni taşımaktadır. Bu genler nükleer topoizomeraz I, mitokondriyel topoizomeraz I, topoizomeraz II α ve β , topoizomeraz III α ve β ve üreme hücreleriyle sınırlı Spo11'i kodlamaktadır. Topoizomerazlar DNA'nın tek ya da çift iplikçiği üzerindeki kesme ve bağlama işlemlerine göre iki ana gruba ayrılmaktadır (Hande, 2008)

Birinci grupta topoizomeraz I, mitokondriyel topoizomeraz I ve topoizomeraz III α/β yer alırken, ikinci grup topoizomeraz II α/β ve Spo11'dan oluşmaktadır. Tip I topoizomerazlar ise tip IA ve topoizomeraz I ve mitokondriyel topoizomeraz I'i içeren tip IB olarak iki alt gruba ayrılmaktadır. Topoizomeraz IB grubu DNA'nın 3' ucu ile kovalent bağ kurarken, diğer tüm topoizomerazlar tirozin aminoasidi aracılığı ile DNA'nın 5' ucuna 5'-fosfotirozil kovalent bağ kurmaktadır. Topoizomeraz II (**Şekil 3**), DNA çift iplikçiğinin ikisini de kopararak disülfid bağıyla tamir için köprüler kurmaktadır. Bu sayede replikasyon ve transkripsiyon esnasında oluşan DNA bükülmelerini düzeltmektedirler ve yapılan işlemler ATP bağımlıdır (Elsea ve ark., 1997)



Şekil 3. Topoizomeraz II ve DNA'nın Yapısal Şekli (http-6)

1971'de James C. Wang tarafından keşfedilen, ATP'ye ihtiyaç duymadan süpersarmal DNA'yı gevşemiş forma çeviren topoizomeraz I (Şekil 4) başlangıçta omega proteini olarak adlandırılmıştır. İnsan topoizomeraz I geni kromozom 20q11.2–13.1 üzerinde yer almaktadır ve 100 kDa'lık bir protein sentezlemektedir (Burt ve ark., 1991). Protein, ATP'ye ihtiyaç duymadan DNA'nın tek iplikçiği üzerinde endonükleaz aktivitesi göstermektedir. Topoizomeraz I'in hücre canlılığı için en önemli görevlerinden biri DNA tamiri esnasında süpersarmalı gevşetmesidir. Ökaryotlar DNA'sının kromatin şeklinde bükülmesi, bazı durumlarda süpersarmal yapının açılmasını gerektirmektedir. Topoizomeraz I'in katalitik kısmında yer alan tirozil kalıntısı kovalent bağ ile DNA'nın 3' ucuna bağ kurarak kırmaktadır. Enzim aktivasyonun geri dönüşümlü olması inhibitörlerin etkili olabilmelerini sağlamaktadır. Aktivasyon için ATP'ye ihtiyaç duyulmadığı gibi Mg^{2+} da kullanılmamaktadır. DNA'nın serbestleştirilmesinin ardından topoizomeraz I iplikçiğin geri bağlanmasını sağlamaktadır. Geri bağlanma hızı iplikçiğin koparılma hızından çok daha hızlıdır. Topoizomeraz I ekspresyonu bölünme fazında olan ve olmayan hücrelerde proliferasyondan bağımsız bir şekilde yapılmaktadır (Tao ve ark., 2003).



Şekil 4. Topoizomeraz I ve DNA'nın Yapısal Şekli (http-7)

Topoizomerazların ekspresyonu tümör ile bağlantılı olmamasına rağmen, kanserli dokularda normal dokulara göre daha yüksektir. Topoizomeraz I ekspresyonunun hücre döngüsü ile bağımsız olmasına karşın Topoizomeraz II α hücre döngüsünün S fazında ve kanserli dokularda artmaktadır. Aynı zamanda yüksek metabolik aktiviteye sahip hücrelerde topoizomeraz I ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Topoizomeraz I geninin bozulması erken embriyonik evrede fare ve sineklerde ölüme sebep olmaktadır. Topoizomeraz II geninde bozulma ise embriyonik ve perinatal evrede ölüme sebep olmaktadır (Korwek ve ark., 2012).

En iyi bilinen topoizomeraz I inhibitörü olan kamptotesin, topoizomeraz I'in DNA tek iplikçliğini 3' ucundan koparması ardından geri bağlama aşamasında enzimi inhibe etmektedir (Hsiang ve ark., 1985) Kamptotesinin topoizomeraz I ile oluşturduğu kompleks, DNA'nın transkripsiyonu yapılacak olan iplikçigi üzerinde olduğu zaman RNA polimerazın aktivasyonu sebebiyle DNA üzerinde geri dönüşümsüz kırıklar oluşmaktadır. Kamptotesin-topoizomeraz I kompleksi transkripsiyon esnasında transkripsiyonda kullanılmayacak olan DNA iplikçigi üzerinde yer alıyorsa RNA polimeraz ile etkileşime girmemektedir. Topoizomerazın inhibisyonu ile dolaylı yoldan oluşan DNA kırıkları transkripsiyonun durmasına sebep olmaktadır (Wu ve Liu, 1997).

Topoizomeraz ve p53 hem aktivasyon hem de inhibisyon aşamalarında birbiri ile bağlantılıdır. Yapılan çalışmalarda topoizomeraz I'in çalışmasının p53 ile doğrudan bağlantılı olduğu anlaşılmıştır. Hücrede transkripsiyon faktörü olarak görev alan p53 bağlandığı bölgede tomoizomeraz I'in uyarılmasını sağlamaktadır (Gobertz ve ark., 1999). Topoizomeraz I'in inhibe edilmesi durumunda ise oluşan topoizomeraz-inhibitör kompleksi dolaylı yoldan hücrede p53 düzeyinin artmasını

sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar, kamptotesin gibi topoizomeraz I inhibitörleri ile topoizomeraz I'in oluşturduğu kompleksin doğrudan p53 ekspresyonunu etkilemediği göstermektedir. Buna karşın topoizomeraz I-inhibitör kompleksinin dolaylı yoldan oluşturduğu DNA kırıkları p53 ekspresyonunun artış sebebidir (Nelson ve Kastan, 1994).

Apoptoz

Hücre ölüm şekilleri

Hücre ölümü gelişme, homeostazi ve immün düzenlemede kritik bir işlemdir. Genellikle vücudun savunma sisteminin patojen enfeksiyonlara karşı savaşmasıyla oluşan hücre ölümü üç ana başlıkta toplanmaktadır. Bunlar programlı hücre ölümü apoptoz, çoğunlukla kontrolsüz olarak gerçekleşen hücre ölümü nekroz ve hücrenin kendi kendini parçalaması anlamına gelen otofajidir. Hücre ölüm şekilleri ölüm esnasındaki morfolojik değişimler ile hücrede aktive olan proteazlar ve nükleazlara göre sınıflandırılmaktadır. Kaspaz-bağımlı apoptoz en sık görülen hücre ölüm şekli mekanizmasıdır. Nekrozda görülen sinyal yolu ise serin/treonin kinaz reseptörü üzerinden gerçekleşmekte iken otofajik hücre ölümü otofaji vakuelleri ile gerçekleşmektedir (Galluzi ve ark., 2007).

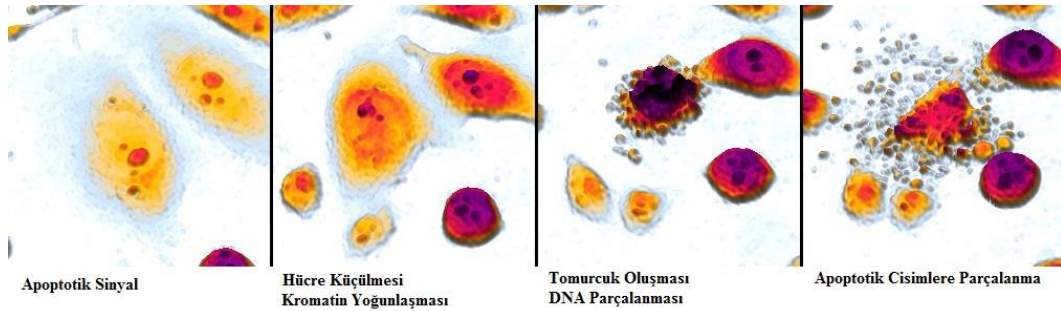
Otofaji, hücre içeriğini yeniden kullanmak üzere ökoryatlarda evrimsel olarak korunmuş bir ölüm şeklidir. Vücutta düşük seviyelerde meydana gelen otofaji hücreler arası homeostazi korumak için gerçekleşmektedir. Bunun yanı sıra yapılan çalışmalar otofajinin hücrel stres, farklılaşma ve immün savunma da görev aldığını göstermektedir (Maiuri ve ark., 2007). Şaperonların düzenlediği otofaji, makrotofaji ve mikrotofaji olmak üzere 3 farklı şekilde gerçekleşen otofajinin en çok bilinen tipi makrotofajidir. Makrotofaji, proteinleri lizozomlardan koruma amaçlı özelleşmiş vakuollerin düzenlenmesi ardından gerçekleşmektedir. Otofajinin gerçekleşmesinde sinyal, bir protein kinaz olan mTOR'un (memelilerde rapamisin hedefi) inhibe edilmesi ile gerçekleşmektedir. Bunun ardından ULK-Atg13-FIP200 kompleksi aktive olarak hücrede otofajik düzenlemeyi başlatmaktadır (Jung ve ark., 2009)

Nekroz uzun bir süre boyunca moleküler mekanizması olmayan, kazara ve kontrol dışı gerçekleşen bir hücrel ölüm şekli olarak bilinmesine karşın kaspazlardan bağımsız olan bir mekanizma ile gerçekleşebilmektedir. Fiziksel hasar, hipertermi ve deterjan kaynaklı hücrelerin lizisi moleküler sinyal yolağına bağlı olmadan gerçekleşen nekroz tipleridir. Nekroz sitoplazma ve organelleri şişmesi ardından hücre zarının geçirgenliğini kaybetmesi ve hücrel içeriğin hücre dışına çıkması ile karakterize edilir (ChFautan ve ark., 1999). Tümör nekroz faktör reseptörü tip 1'in (TNF1) aktive olması hücre içinde nekrotik sinyali başlatmaktadır. Programlı nekrozda hücre içinde görev alan en önemli molekül olan RIP1'in (reseptör etkileşimli serin/treonin kinaz 1) aktif kaspaz 8 tarafından parçalanıyor olması onun anti-apoptotik özelliğini göstermektedir (Degterev ve ark., 2005)

Hücre ölüm tiplerinden biri olan apoptoz yunanca ağaçtan düşen yaprak veya çiçekten ayrılan petal anlamına gelir. Apoptoz terimi ilk kez 1972'de Avustralyalı bir patolog olan J.F.K. Kerr tarafından tanımlanmıştır. Apoptoz mekanizması hücre düzeyinde uyarılmakta ve hücrelerin buldukları dokuya zarar vermeden kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, protein sentezi ve

enerjiye gereksinim duyan, organizmada homeostazı koruyan bir olaydır. Apoptoz ile ilgili yapılan ilk çalışmalar *Caenorhabditis elegans* nematodu ile gerçekleştirilmiştir. Çok basit yapıda ve birçok hücreli olan bu nematodlarda yer alan ced-3, ced-4 ve ced-9 genlerinin apoptozu kontrol ettiği bulunmuştur. Mutasyon ile inaktif olmuş ced-3 ve ced-4 genlerini taşıyan nematodlarda apoptozun meydana gelmediği ve normalde ölmesi gereken hücreler yaşamaya devam ettiği görülmüştür. Bu nedenle ced-3 ve ced-4'ün ölüm genleri olup apoptozu indükledikleri, ced-9'un ise ölüme karşı koruyan gen olup apoptozu inhibe ettiği belirlenmiştir. Bugün bu genlerin insan genomundaki karşılıkları ced-3 için kaspazlar, ced-4 için Apaf-1 ve ced-9 için Bcl-2 olduğu tanımlanmıştır. Apoptoz mitoz gibi normal gelişim için gerekli olduğu gibi organizmanın bütünlüğüne karşı tehdit oluşturan hücreleri uzaklaştırmak için de gerekli bir mekanizmadır (Yuan ve ark., 1993)

Apoptozun uyarıldığı hücreler bulunduğu ortamdan uzaklaşır, komşu hücrelerle bağlantısını koparır ve büzülür, kromatini yoğunlaştırır piknotik bir görünüm almaktadır (**Şekil 5**).



Şekil 5. Apoptozun Aşamaları Esnasında Hücrenin Faz-Kontrast Mikroskobu Görüntüleri (Janicke, 2012)

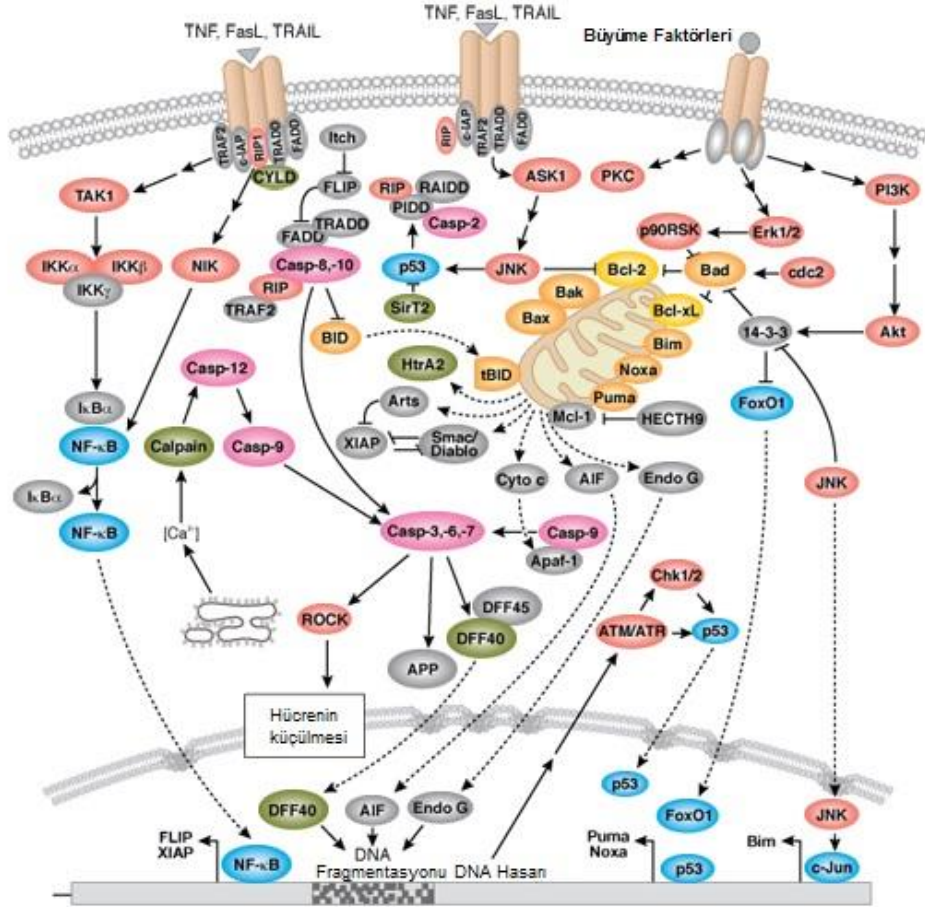
Hücre organelleri yapısal bütünlüklerini korumakta ancak hücre zarının iç kısmında lokalize olmuş fosfolipid serin molekülü apoptotik uyarılar sonrasında hücre zarının dış yüzüne transloke olur. Çekirdek küçülür, parçalara ayrılır. Hücre zarla sarı tomurcuklar halinde kopar, apoptotik cisimciklere ayrılır. Apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir, bu sayede hücrenin ölümü inflamasyona sebep olmamaktadır (Kerr ve ark., 1972).

Apoptoz Mekanizması

Apoptoz, intrinsik (hücre içi uyarıların mekanizması) ve ekstrinsik (hücre dışı uyarıların mekanizması) olmak üzere iki tip mekanizma ile gerçekleşmektedir. Apoptozu tetikleyen hücre içi sinyaller; DNA hasarı, hücre içi Ca^{2+} düzeyi artışı, pH azalışı, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları ve hipoksidir. Hücre dışı sinyaller ise büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, TNF ya da FAS ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, sitotoksik T lenfosit ve iskemi, toksinler, UV, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon gibi dış etkenlerdir. Her iki sinyal yolunda da kaspaz enzimleri görev almaktadır. Hücre içi sinyaller intrinsik apoptoz yolunu devreye sokarken, hücre dışı sinyaller ekstrinsik yol ile apoptozu indükler (Scaffidi ve ark., 1998).

Hücre içi sinyallerle apoptotik uyarı alınmasından sonra proapoptotik proteinlerden Bid; bir antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktive eder, Bax ve

Bak'ı aktifleştirir. Aktifleşen Bax ve Bak mitokondri membranında por oluşumunu indükleyip zar potansiyelini değiştirir (Spierings ve ark., 2004). Böylelikle mitokondri membranındaki porlardan sitokrom-c, Smac (Mitokondriyel ikincil kaspaz aktivatörü), Endo-G (Endonukleaz-G), Ca^{2+} ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımını uyarır. Sitokrom-c, oksidatif fosforilasyon için elektron taşır. SMAC, IAF (İnhibitör apoptotik faktör)'ü inhibe eder ve apoptozu hızlandırır. IAF'nin ortamda bulunması ise kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonunu engeller. AIF, çekirdeğe transloke olarak kromatin yoğunlaşmasına ve DNA fragmentasyonuna sebep olmaktadır. Endo-G de DNA'yı fragmentasyona uğratar. Mitokondriyal porlardan salınan sitokrom-c, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve ATP'nin katılımıyla sitozolde Apoptozom kompleksini meydana getirir. Apoptozom, kaspaz-9'un aktifleşmesini kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir. Aktif kaspaz-3 de ICAD (İnaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ı inaktifleştirerek CAD (Kaspaz aktive edici DNaz)'ı serbestleştirir. CAD ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına neden olmaktadır (Şekil 6) (Adams ve Cory, 2001).



Şekil 6. Apoptotik Sinyal Mekanizmaları (http-5)

Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (Fas, TNFR, DR5) ölüm sinyallerinin (FasL, TNF-alfa, TRAIL) bağlanmasıyla reseptörler trimerik yapı kazanır. Bu şekilde trimerik yapı kazanan reseptör; adaptör molekülleri ve prokaspaz-8 ile birleşerek DISC (Ölüm Uyarıcı Sinyal Kompleksi) adı verilen yapıyı oluşturur. Bu birleşmeden sonra inaktif durumdaki prokaspaz-8'in uzun ve kısa kolları

kesilerek aktif kaspaz-8'in oluşması sağlanır. Aktif kaspaz-8 doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki yolla kaspaz-3'ü aktive eder. Kaspaz-8 ya doğrudan kaspaz-3'ü aktive eder ya da Bid'i keserek dolaylı olarak instrinsik mekanizma ile kaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive eder. Her iki yolla da aktive olan kaspaz-3 yine CAD aktivasyonu ile DNA fragmentasyonuna neden olur. Ekstrinsik yollardan biriside sfingolipid yoludur. Sfingomyelin, hücre zarı yapı taşlarından biridir. Radyasyon, kemoterapi, ölüm reseptörleri ile aktive olan sfingomyelinaz, sfingomyelini seramid'e dönüştürür. Seramid seramidaz ile sfingozine dönüşerek, Bid sentezini uyarır ve apoptozu tetikler (Sellers ve Fisher, 2014).

Fas, 24 üyeli TNF reseptör ailesinin en iyi tanımlanmış üyesidir. Bağışıklık sisteminde hücre ölümünü kontrol eden Fas hücre reseptörü, sitotoksik T hücreleri ve naturel killer hücreleri üzerinde bulunur. 43 kDa molekül ağırlığındaki Fas proteini hücre yüzeyinde kendi reseptörüne bağlanır ve reseptör trimerizasyonunu sağlar. Aktive olmuş reseptörler Fas-iliği ölüm domain proteini (FADD) reseptör molekülü ile birleşir. Bu şekilde; Fas reseptörünün karboksil ucun yakın 80 aminoasitlik bölgenin uyarılmasıyla prokaspazlar aktive olur ve apoptoz başlar. Fas ve TNF- α dışında TRAIL ve TRAIL reseptörleri de benzer yolla apoptozu uyarabilmektedir. (Scaffidi ve ark., 1998).

Apoptozda Görev Alan Proteinler

Kaspazlar

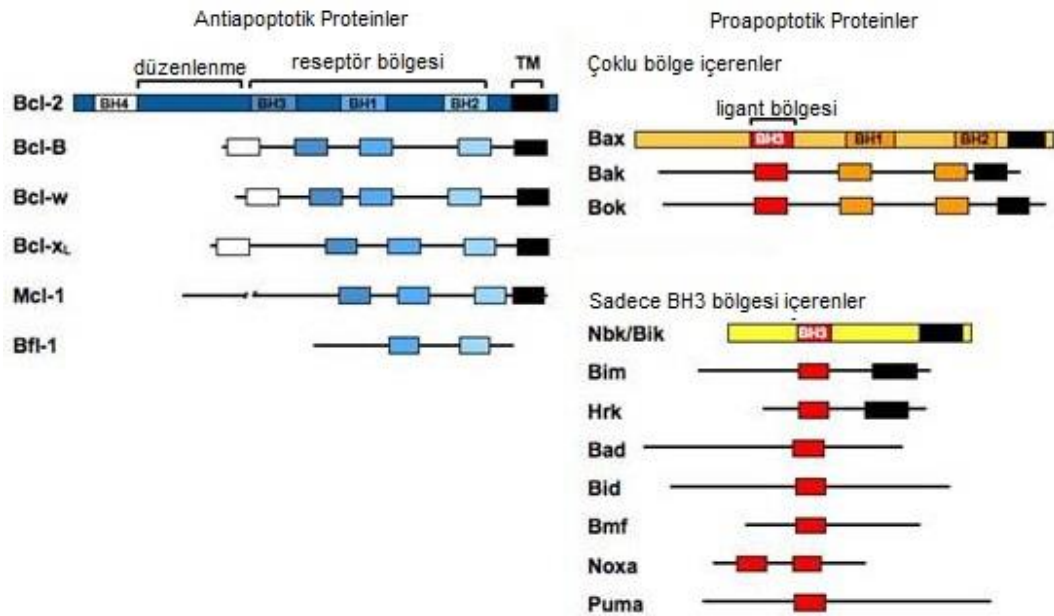
Sistein proteaz olan kaspazlar, aspartik asitten sonraki peptit bağıcı kırarlar. Normal durumlarda hücrede inaktif halde bulunurlar, ancak proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. 100 farklı hedef proteini keserek apoptozu neden olurlar. Kaspaz 2, 8, 9 ve 10'u içeren başlatıcı kaspazlar, kaspaz 3, 6 ve 7'yi içeren efektör kaspazlar ve kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14'ü içeren inflamatuvar kaspazlar olarak 3 gruba ayrılmaktadırlar. DNA tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimleri inaktive ederler. Hücre iskeleti proteinlerini keserek hücre zarının tomurcuklanmasına neden olmaktadır (Li ve Yuan, 2008).

Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarı ile başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletmektedir. Efektör kaspazlar ise hücre iskeleti proteinleri, nükleer membran proteini laminin A ve DNA tamirinde rol alan poli ADP-riboz polimeraz (PARP) gibi ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olmaktadır. İlk tanımlanan enzim ICE'dir (interlökin 1- β dönüştürücü enzim) ve prokaspaz 1 olarak bilinmektedir. Kaspaz kaskadı, sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasıyla aktifleştirildiği gibi, kaspazlar da sitokrom c salınımına neden olabilmektedir. Bir kaspaz inhibitör ailesi olan IAP (apoptoz inhibitörleri), kaspazları seçici olarak inhibe ederler, böylece apoptotik mekanizmayı durdurmaktadırlar. Bu inhibitörler tümörlerde yüksek ekspresyon düzeylerini sahiptir. IAP'ler ayrıca hücre siklusunu da etkileyerek apoptozu durdurabilmektedir. Kaspazlardaki bozukluklar otoimmün hastalıklara, kansere ve bazı nörolojik bozuklukların oluşumuna sebebiyet vermektedir (Reed, 2000).

Bcl-2 Ailesi

Bir hücrenin apoptoza sürüklenmesi B-hücre lenfome 2 (Bcl-2) ailesi genlerinin heterodimer ya da homodimer formuna bağlıdır. Bcl-2 ailesi proapoptotik ve antiapoptotik olmak üzere iki alt gruba ayrılır.

Proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyon düzeyleri hücrenin ölüm ve yaşam arasındaki seçiminden sorumludur. Proapoptotik üyeler Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa'dır. Bu proteinler sitozolde yer alırlar. Sitokrom-c ve AIF salınımını artırarak apoptozu indüklerler. Antiapoptotik üyeler ise Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1'dir (Şekil 7). Bu proteinler de mitokondri membranının dışında, endoplazmik retikulumda ve çekirdek zarında yer alırlar. Por oluşumunu sağlayıp iyon transportunu düzenlerler. Özellikle hücredeki Ca^{2+} oranını kontrol ederler. Ayrıca kaspazların öncü formlarıyla AIF ve sitokrom-c salınımını bloke ederek apoptozu inhibe ederler (Taneja ve ark., 2001).



Şekil 7. Proapoptotik ve Antiapoptotik Proteinler (http-8)

Bax ve Bak gibi proapoptotik Bcl-2 protein ailesi üyeleri ise antiapoptotik proteinlerden daha yüksek oranda eksprese edildiği takdirde mitokondri membranını depolarize ederek kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktivasyonunu sağlamaktadır (Tsujimoto, 1998). Heterodimer yapı oluşturmuş Bcl-2 ve Bax proteinleri apoptoz üzerinde etki göstermezken, apoptozun baskılanması heterodimer yapıdan serbestleşmiş Bcl-2 proteinlerinin miktarına bağlıdır. Buna karşın Bax'ın aşırı ekspresyonu serbestleşmiş olan Bcl-2'nin antiapoptotik aktivitesine etki göstermemektedir (Otter ve ark., 1998).

Bir onkogen olan Bcl-2 geni ilk kez B hücreli foliküler lenfomada klonlanmıştır. Aşırı sentezi apoptozu engelleyerek lenfomaya neden olmaktadır. Lenfoma ve lösemiler yanında barsak, meme, akciğer ve deri kanserinde de aşırı sentezi gözlemlenmiştir. Normalde ektoserviksın skuamöz epitelinin bazal katında yüksek seviyede, endoservikal hücrelerde de düşük seviyede sentezlenmektedir. Bcl-2'nin serviks kanserinde normale göre daha az sentezlendiğini bildiren çalışmalar olsa da pek çok çalışmada yayılma eğilimi olan kanserde ve yüksek dereceli

lezyonlarda daha fazla sentezlendiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar Bcl-2 aşırı sentezinin serviks kanserinde rol oynadığı düşündürmektedir. Bcl-2'nin serviks kanserinin prognozu ile ilişkisine baktığımızda prognozu etkilemediğini bildiren çalışmalar yanında pozitif veya negatif yönde etkilediğini bildiren çalışmalar da mevcuttur (Burt ve ark., 1991).

Bcl-2 proteini çoğu hücre tipi için en bilinen antiapoptotik proteindir. Yapay olarak Bcl-2 ekspresyonu artırılmış serviks adenokarsinoma hücre hattının (HeLa) yaşam süresinin, doğal HeLa'ya göre daha kısa olduğu tespit edilmiştir. Hücre hatları yüksek konsantrasyonda H₂O₂ ile inkübe edildiğinde, doğal HeLa hücrelerinde apoptoz gözlenmekte iken Bcl-2 ekspresyonu yüksek olan HeLa hücrelerinde nekroz gözlenmektedir. Bu durum Bcl-2'nin yüksek antiapoptotik aktivitesini kanıtlamaktadır (Du ve ark., 2006).

Bcl-2 ilgili-x protein anlamına gelen Bax, proapoptotik bir proteindir. Bcl-2 ile % 43 yapısı aynıdır ve Bcl-2 ile homodimerler ve heterodimerler oluşturabilir. Bax predominant olduğunda apoptoz artmaktadır. Hücre ölüm sinyali geldiği durumlarda Bax sentezi artar ve Bcl-2'nin etkisini nötralize ederek apoptozu artırır. Normalde sitozolde bulunan Bax proteininin apoptoz sırasında mitokondri membranına transloke olur. İyon kanallarını açarak mitokondriden sitokrom c salınımına gerçekleştirir (Gültekin ve ark., 2008). Sitokrom c salınımı kaspaz 3'ü aktive ederek membranın kabarcıklar oluşturmaya, nükleer parçalanmaya sebep olarak hücrede apoptozu gerçekleştirmektedir. Kaspaz 3 inhibitörleri Bax'ın sitokrom c salınımını engellemekte fakat apoptozu durdurmaktadırlar. Bcl-2'nin hücrede aşırı eksprese edilmesi, Bax'ın sitokrom c salınımını başlatmasını engellemektedir. Buna karşın hücrede yüksek Bcl-2 ekspresyonu gözlemlendiğinde Bax sitokrom c salınımına sebep olsa da hücrenin apoptozu sürüklenmesi ya da hayatta kalmasına dair herhangi bir sinyal gözlemlenmemektedir (Rosse ve ark., 1998).

Isı şok proteinlerinin (Hsp105 α ve Hsp105 β) nöronları stres tarafından indüklenen apoptozu karşı koruduğu bilinmektedir. Serviks adenokarsinoma hücre hattı üzerinde yapılmış olan bir çalışmada Hsp105'in apoptozu nasıl engellediği ortaya konmuştur. Apoptozun gerçekleşebilmesi için kaspaz-3 ve kaspaz-9'un aktive olması gerekir. Hsp105, Bax'ın mitokondriye lokalizasyonunu engelleyerek sitokrom c salınımını engellemektedir. Bu sayede sitokrom c salınımı gerçekleşmediği için kaspaz-3 aktive olmamakta ve apoptoz baskılanarak hücrenin stres anında ölmesi engellenmiş olur (Yamagishi ve ark., 2006).

Servikste Bax sentezini inceleyen az çalışma olmasına karşın bu çalışmaların çoğunda normal ve neoplastik dokuda Bax sentezinin farklı olmadığı gösterilmiştir. Literatürde Bax proteininin serviks kanserinde prognoza etkisine baktığımızda hemen bütün çalışmalarda Bax pozitifliğinin iyi prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca Bax eksikliğinde serviks kanseri gelişiminin arttığı görülmüştür (Tunç ve ark., 2004)

Antikanser etkisi bilinen bir kimyasal olan indirubin'in bir türevi indirubin-3'-monoxime'nin (I3M), serviks kanseri, kolon kanseri ve karaciğer kanseri üzerinde doza ve zamana bağlı olarak etki gösterdiği saptanmıştır. Hem ekstrinsik hem de intrinsik yolla üzerinden kanserli hücreleri apoptozu sürüklemektedir. Serviks kanseri hücre hattında kaspaz-8 aktivasyonu Bid'in (BH3 interacting-death domain agonist) ayrılmasına yol açmaktadır. Aktifleştiğinde alt birimlerine

ayrılan Bid, Bax üzerinde değişiklere sebep olarak mitokondriyel yolak üzerinden apoptoza yol açmaktadır (Shi ve Shen, 2008)

T lenfositlerinin tümörlü dokuda hayatta kalabilmeleri için yapılmış bir çalışmada, siRNA ve shRNA kullanılarak serviks adenokarsinoma hücre hattında Bid ekspresyonu baskılanmış, CD8⁺ lenfosit hücrelerinde ise Bid geni susturulmuştur. HeLa, Fas reseptörü üzerinden gerçekleşen apoptoza kısmen direnç gösterirken, CD8⁺ lenfosit hücrelerinin apoptoz karşısında belirgin bir şekilde hayatta kalma oranlarının arttığı gözlemlenmiştir (Lei ve ark., 2009).

Antiapoptotik bir protein olan Bcl-xL'nin aktivasyonu hücre döngüsü bağımlıdır. Bcl-xL'nin fosforilasyonu hücre döngüsünün S ve G2 fazlarında gözlemlenmektedir. Metafaz evresinde kaybolan Bcl-xL, telofazda yeniden ortaya çıkmaktadır. DNA hasarı durumunda G2 fazında hücre döngüsü durdurularak Bcl-xL ekspresyonu artmaktadır (Wang ve ark., 2011).

Nükleer faktör kappa B (NF-κB), hücrenin hayatta kalması için önemli bir rol oynamaktadır. NF-κB'nin inhibisyonu durumunda TNFα reseptörü üzerinden sitotoksisite gerçekleşebilmektedir. NF-κB'nin ve Bcl-2 protein ailesinin antiapoptotik proteinlerinden olan Bcl-2, Bcl-w ve Mcl-1'in aktif olduğu durumda bile, Bcl-xL'nin tek başına devredışı bırakılması durumunda TNFα üzerinden apoptoz gerçekleşmektedir. Bcl-xL'nin TNFα üzerinden gerçekleşen apoptozda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Casanelles ve ark., 2013).

P₅₃

Hücrede DNA hasarı oluştuğunda hücre siklusunu G1 fazında durdurup hücreye DNA tamiri için zaman veren bir transkripsiyon faktörüdür. Hasar tamir edilemeyecek durumda ise Bax, Apaf-1 ve Fas yapımını artırıp Bcl-2 ve Bcl-xL'yi baskılar ve apoptozu indükler. Birçok anti-tümör ilaç, hedef olarak hücre DNA'sını seçer ve p53 seviyesini artırır. Bu aktivasyon ya hasarın tamirine ya da apoptoza yol açar. Bu aktivasyon aynı zamanda kromozom-17'nin kısa kolundaki bir genin (17p53) üretimi ile ilgilidir. Bu genin mutasyonu p53 salgılanmasına büyük ölçüde katkıda bulunur. Bu katkı hasarı onarabilir veya apoptozu uyarabilir. Bu ihtimallerin ikisi de Bax, p53, p21 ve farklı birkaç gene bağlıdır. Sadece p53 geninin mutasyonundan kaynaklanan birkaç tür tümör belirlendiğinden ve bu mutasyon tüm tümör türlerinde de gerçekleşen en yaygın mutasyon olduğundan önemlidir. p53, genomun içeriğini sürdürerek görev yapar. Hücrenin belli noktalarında malign tip p53 bulunması, DNA tamir mekanizmasının doğru hasarı tamir etmesinde kontrol noktasıdır. Mutant p53 geni taşıyan hücreler, artık genom içeriğini garanti edemez. Çünkü onlar artık hücre döngüsünün durma sinyallerini alamazlar. Sonuç olarak hücre genomu stabil değildir ve bütün hücreler potansiyel olarak tümör oluşturabilir. Ek olarak p53 ile aynı işlevi gören p63 ve p73 genleri de tespit edilmiştir (Miyashita ve Reed, 1995).

Serviks kanserinde HPV, % 90'ın üzerinde bir oranla p53 proteinin tümör baskılayıcı etkisini ortadan kaldırmaktadır. HPV E6 proteini p53'ün bozulmasına sebep olarak proteinin stabil yapısını ve aktivasyonunu bozmaktadır. 11-keto-β-boswellic asit (BCDD), E6 ekspresyonunu düşürerek DNA hasarı ile p53'ün nükleusta aktif hale gelmesini sağlamaktadır (Khan ve ark., 2011). Nükleer bir protein olan HMGB2'nin (High mobility group protein B2) aşırı ekspresyonu,

HPV pozitif serviks kanseri hücrelerinde p53'ün aktivitesini korumaktadır. Buna karşın meme kanseri hücrelerinde aynı yanıt gözlenememektedir. HMGB2'nin artışıyla, serviks kanserinin hücre çoğalma hızında yavaşlama ve p53 ekspresyonunda artış meydana gelmektedir. p53'ün aktifleşmesiyle birlikte hücre döngüsü erken G1 fazında durdurulmaktadır (Lee ve ark., 2010).

Tez çalışmasının amacı, yeni sentezlenen antrakınon türevleri olan Morfolin-4-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 3), Piperidin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 4) ve 4-Metilpiperazin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 6)'nın, hücre içi apoptotik proteinler olan Bax, p53 ve Bid ve anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-xL ekspresyon düzeylerinin tespiti ve antrakınon türevlerinin hücre bölünmesinde görev alan bir enzim olan Topoizomeraz I inhibitör etkilerinin saptanmasıdır.

GEREÇLER

Hücre Hattı

HeLa (A3, CRL-2570, ATCC, A.B.D.)(Servikal adenokarsinoma) hücre hattı Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Antrakinin türevleri Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Meslek Bilimleri Bölümü Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Yusuf ÖZKAY tarafından sentezlenmiştir.

Dana timüs topoizomerazı I (Takara-Japonya); pBR322 plasmid DNA'sı (Sigma-A.B.D.); aprotinin (Sigma- A.B.D.); leupeptin (Sigma- A.B.D.), sodyum dodesil sülfat ($C_{12}H_{25}NaSO_4$) (Merc-A.B.D.); aktin antikoru (Santa Cruz Bio.-A.B.D.); p53 antikoru (Santa Cruz Bio.-A.B.D.); Bax antikoru (Santa Cruz Bio.-A.B.D.); Bid antikoru (Santa Cruz Bio.-A.B.D.); Bcl-xL antikoru (Santa Cruz Bio.-A.B.D.); Bcl-2 antikoru (Santa Cruz Bio.-A.B.D.); anti-fare antikoru (Santa Cruz Bio.-A.B.D.); anti-tavuk antikoru (Santa Cruz Bio.-A.B.D.); Colorburst Elektroforez İşaretleyicisi (Sigma, A.B.D.), dimetilsülfoksit (DMSO) (Applichem-Almanya); Disodyumbifosfat (Na_2HPO_4) (Merck-A.B.D.); Metil alkol (Sigma-, Aldrich-A.B.D.), Fetal Bovine Serum (FBS) (Biochrom-Germany); Minimal Essential Medium (MEM) (Gibco-İskoçya); akrilamid/bis-akrilamid karışımı (Sigma, Aldrich-A.B.D.); polivinilidin florür (PVDF) membran (GE-Heathcare-A.B.D.) tetrametilbenzidin (Sigma-A.B.D.); 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-A.B.D.); sodyum hidroksit (NaOH) (Merck- Almanya); sodyum klorür (NaCl) (Detsan-Türkiye); sodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7$) (Merck- Almanya); triton X-100 (Sigma- A.B.D.); tripsin (Biochrom- Almanya); TUNEL hücre ölüm tespiti kiti (Roche-Almanya); tween 20 (Sigma- A.B.D.); Bradford boyası (Sigma, Aldrich-A.B.D.); fenilmetilsülfonilflorit (Sigma- A.B.D.)

Kullanılan Cihazlar

Jel görüntüleme sistemi BioSpectrum 510 (UVP-İngiltere); Dikey jel elektroforez ünitesi SE 260 (Hofer-A.B.D.); Blotlama ünitesi (Biometra-Almanya); akım kaynağı E844 (Consdet-A.B.D.); yatay jel elektroforezi ünitesi (Consdet-A.B.D.); ultraviyole spektrofotometre UV-2450 (Shimatzu-Japonya); Azot Tankı (Taylor Wharton-Almanya); buzdolabı (Arçelik- Türkiye); karbondioksitli (CO_2 'li) etüv (Hera Cell 240 Thermo Scientific-Almanya); derin dondurucu ($-20^\circ C$) (Arçelik No Frost-Türkiye); distile su cihazı (Nüve- Türkiye); etüv (Nüve- Türkiye); hassas terazi (Ohaus-İsviçre); inverted mikroskop (Leica-Almanya); laminar kabin (Steril Kabin) (Heal Force-Çin); otoklav (ALP-Japonya); santrifüj (Hettich-Almanya); sterilizatör (Nüve FN 500-Türkiye); su banyosu (Nüve BM 302-Türkiye); vorteks (Yellowline- Belçika).

YÖNTEMLER

Hücre Kültürü

Servikal adenokarsinoma hücreleri (HeLa), % 20 fetal bovine serum (FBS), % 1 penisilin-streptomisin ve % 4 sodyum bikarbonat içeren Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) besiyeri içerisinde, % 5 CO₂ iç atmosfere sahip inkübatörde 37 °C de kültürde tutulmuştur. Her 3 günde bir hücreler tripsin/EDTA solüsyonu ile muamele edilerek 1:3 oranda alt kültürlere ayrılarak pasajlanmıştır.

Antrakınon Türevleri, Mitoksantron ve Kamptotesinin Hazırlanması

Deneysel olarak kullanılan antrakınon türevleri ve kontrol bileşiği olan mitoksantron'un stok çözeltileri 1 mM derişimde bidistile suda hazırlanmıştır. HeLa hücre hattı kullanılarak yapılan deneylerde kimyasalların alt derişimleri hücre besiyeri kullanılarak hazırlanmış olup, topoizomera I enzim inhibisyonu deneylerinde kullanılacak kimyasal maddelerin alt derişimleri ise bidistile su kullanılarak seyreltilmiştir. Kamptotesin 1mM stok çözeltisi 4:1 oranında kloroform/metanol kullanılarak hazırlanmış olup, alt derişimleri bidistile su kullanılarak yapılmıştır.

Apoptotik etki mekanizmaları ve topoizomera I enzim inhibisyonunun saptanması için daha önce sitotoksikite değerleri ölçülen antrakınon türevlerinden en etkili olan Ant 3, Ant 4 ve Ant 6 kullanılmıştır (Önder, 2013). Mitoksantron için maksimum yarı inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) 4,4 µM, maximum %20 inhibitör konsantrasyon (IC₂₀) 2,6 µM, Ant 3 için için maksimum yarı inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) 10 µM, maximum %20 inhibitör konsantrasyon (IC₂₀) 6 µM, Ant 4 için için maksimum yarı inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) 8 µM, maximum %20 inhibitör konsantrasyon (IC₂₀) 5 µM, Ant 6 için için maksimum yarı inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) 8 µM, maximum %20 inhibitör konsantrasyon (IC₂₀) 3 µM olarak kullanılmıştır.

Plazmid Superheliks Gevşeme Analizi

Test gruplarında oluşturulan topoizomera I enzim reaksiyonu için 35 mM Tris-HCl (pH: 8.0), 72 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 5 mM spermidine ve 0.1% BSA içeren reaksiyon tamponu kullanılmıştır. Bir ünite dana timüs topoizomera I ile 0.5 µg plazmid DNA'sı (pBR322) 25 µl reaksiyon tamponu içerisinde 37 °C'de 30 dk'da reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Kamptotesin (1 µg/ml) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Reaksiyon ürünleri %1 agaroz jelde, 45 mM Tris borat ve 1 mM EDTA'dan (pH: 8.0) oluşan TBE tamponu içinde, 5 V/cm akım kullanılarak yatay jel elektroforez ünitesinde 1 saat yürütülmüştür. Jel 0.5 µg/ml etidyum bromür ile 15 dk muamele edildikten sonra UVP Jel Görüntüleme Sistemi'nde görüntülenmiştir. Bir ünitenin aktivitesi 250 ng plazmid DNA substratında süper heliks ayrılma aktivitesiyle 30 dk 37 °C'de tanımlanır. Bütün reaksiyonlar DNase-free durumda gerçekleştirilmiştir.

Western Blot Yöntemi

Antrakınon türevlerinin varlığında apoptotik etki mekanizmalarının araştırılması için hücreler Ant 3, Ant 4 ve Ant 6, pozitif kontrol olarak da mitoksantron kullanılarak 12 ve 24 saatlik inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon 37 °C sıcaklıkta 75 cm² taban alanına sahip flasklarda 5 × 10⁶ hücre ile

gerçekleştirilmiştir. Test edilen kimyasal maddeler hücreler pasajlandıktan 2 saat sonra ortama eklenmiştir.

İnkübasyon sonrasında hücreler, soğuk $1 \times$ PBS ile 2 defa yıkandıktan sonra PBS flaklardan mikropipet yardımı ile uzaklaştırılmıştır. 50mM Tris-HCl (pH: 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, % 1 Triton X-100, % 0,1 SDS, 1 mM PMSF ve 10 μ g/ml leupeptin içeren liziz solüsyonundan 500 μ l hücelere eklenerek 20 dk buz üstünde inkübasyona tabi tutulmuş olup her 5 dk'da bir flaklar yavaşça çalkalanmıştır. Hücreler, hücre kazıma aparatı kullanılarak flask yüzeyinden kazındıktan sonra toplanarak kapaklı küçük santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Lizatlar +4 °C'de 10 dk 15000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant alındıktan sonra protein miktarı ölçümü spektrofotometre yardımıyla Bradford boyası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonrasında her örnek 50 μ g total protein içerecek şekilde kapaklı tüplere ayrılmıştır. Örnekler çalışma öncesi -20 °C buzdolabında saklanmıştır.

Elektroforez işlemi için % 12'lik yürütme jeli ve % 5'lik yükleme jeli hazırlanmıştır. 5 ml % 12'lik yürütme jeli, 1,65 ml bidistile su, 2 ml % 30 akrilamid/bisakrilamid karışımı, 1,25 ml 1,5 M Tris (pH: 8,8), 50 μ l % 10 SDS, 50 μ l % 10 amonyum persülfat ve 2 μ l TEMED içermektedir. 2 ml %5'lik yükleme jeli, 1,35 ml bidistile su, 335 μ l % 30 akrilamid/bisakrilamid karışımı, 250 μ l 1 M Tris (pH: 6,8), 20 μ l %10 SDS, 20 μ l %10 amonyum persülfat ve 2 μ l TEMED içermektedir. Hazırlanan yürütme jeli, jel kasetine döküldükten sonra yüzeyinin düz olması ve hava ile temas etmemesi için üzerine 1 ml bidistile su dökülüp jelin polimerize olması için 30 dk beklenmiştir. Daha sonra 2 ml % 5'lik stacking jel hazırlanarak resolving jelin üzerinde dökülmüş ve jel tarağı hava kalmayacak şekilde kasete yerleştirilmiştir. 20 dk jelin polimerize olması için oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Protein örnekleri 10:3,32 oranında $2 \times$ 'lik 2-merkaptolanol ile karıştırıldıktan sonra 95 °C suda kaynatma ile denatüre edilmiştir. Daha önce hazırlanan jel kaseti dikey elektroforez tankına yerleştirilip, tank 500 ml'sinde 1,515 gr Tris, 7,2 gr glisin ve 0.5 gr SDS (pH: 8,3) içeren yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Proteinlerin jel içerisinde yürütülerek moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılması için protein örneklerinin jel üzerine yüklenmesinden sonra, yükleme jeli için 80V, yürütme jeli için 120V olacak şekilde 3 saat süresince elektrik akımı verilmiştir. Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre tespiti için 8-220 kDa aralığında elektroforez işaretleyicisi kullanılmıştır.

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılan proteinleri içeren jel yürütme sonrası kasetten çıkartılmıştır. Yükleme jeli kesildikten sonra jelin boyutu ölçülerek aynı boyutta 6 adet filte kağıdı ve poliviniliden florür (PVDF) membran kesilmiştir. Saf metanol içerisinde ıslatılan PVDF membran ve kasetten çıkartıldıktan sonra bidistile su ile yıkanan jel, kalibrasyonlarının yapılması için $1 \times$ transfer tamponunda oda sıcaklığında 15 dk bekletilmiştir. Filtre kağıtları transfer ünitesine yerleştirilmeden önce transfer tamponu ile ıslatılmıştır. $1 \times$ transfer tamponu, 2,93 gr glisin, 5,81 gr Tris, 0,37gr SDS, 200 ml saf metanol ve 800 ml bidistile su içermektedir. Kalibrasyon sonrasında transfer tamponu ile ıslatılan transfer ünitesinin içerisine sırasıyla, 3 adet filte kağıdı, PVDF membran, jel ve 3 adet kağıdı yerleştirilmiştir. 30 mA elektrik akımı 12 saat süresince uygulanarak proteinlerin membrana transfer edilmesi sağlanmıştır.

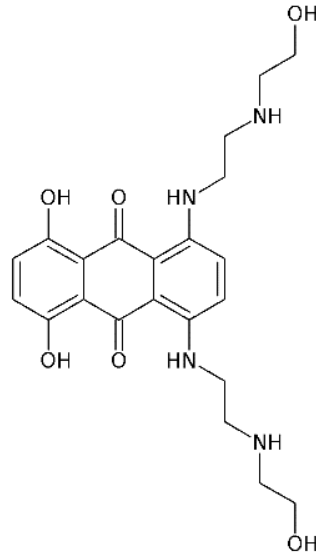
Proteinlerin analizi için membran, 500 ml bidistile su içerisinde 1,57 gr Tris-HCl, 4 gr NaCl ve 500 µl Tween 20 içeren yıkama tamponunda 3 defa hızlı ve 15 dk hızlı çalkalamada yıkanmıştır. Yıkama tamponu dökülüp % 5 BSA içeren 10 ml bloklama tamponunda 1 saat hafifçe çalkalanacak şekilde çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. 1 saat sonunda hızlıca 3 defa yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. Ardından 15 dk yıkama solüsyonu ile çalkalayıcı üzerinde hızlı çalkalamada yıkanmıştır. Protein örneklerine spesifik birincil antikor solüsyonu 1:500 dilüsyonda yıkama solüsyonu ile hazırlanarak oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir. Önceki basamaklardaki gibi yıkama işlemlerinden sonra, 1:200 dilüsyon oranında olan HRP konjuge ikincil antikor ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 1 saat sonunda önce yıkama solüsyonu daha sonra bidistile su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Üzerindeki bidistile su tamamen uzaklaştırılan membran, analiz edilmesi istenen protein bandı görünür hale gelene kadar 5 ml 3,3',5,5' tetrametilbenzidin (TMB) ile muamele edildikten sonra bidistile suda yıkanmıştır. Protein bantlarının görüntülenmesi ve moleküler ağırlıklarının elektroforez işaretleyicisine göre tespiti UVP Jel Görüntüleme Sistemi ile yapılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

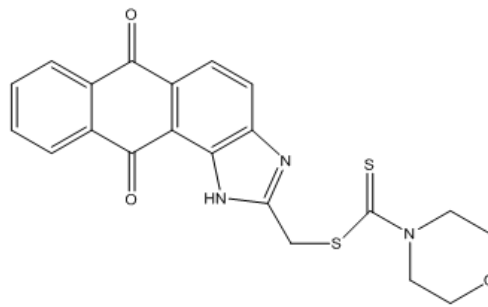
Antrakinon Türevlerinin Topoizomeraz I İnhibitör Etkileri

Yeni sentezlenen antrakinon türevleri olan Morfolin-4-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 3), Piperidin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 4) ve 4-Metilpiperazin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 6)'in topoizomeraz I inhibitör etkileri daha önce belirlenen (Önder, 2013) maksimum yarı inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) ve maksimum %20 inhibitör konsantrasyonunda (IC_{20}), Plasmid Süperheliks Gevşeme Reaksiyonu ile belirlenmiştir. Yapılan deneylerde yapısal benzerliklerinden dolayı Mitoksantron (Şekil 8) ve metodun kontrol etken maddesi olan Kamptotesin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

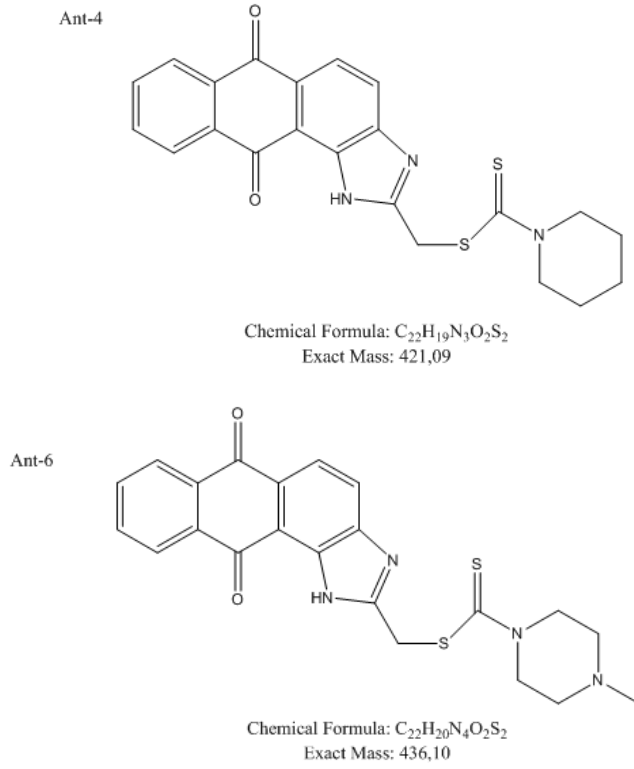
Mitoksantron



Ant-3

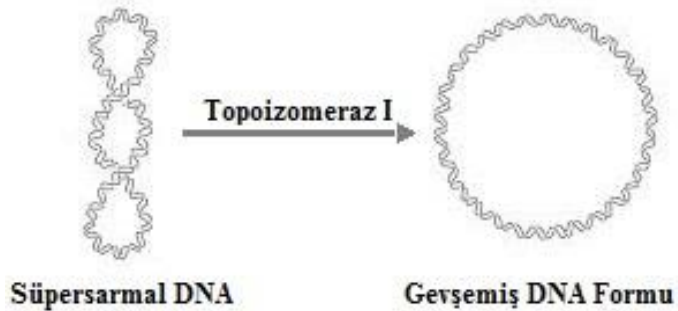


Chemical Formula: C₂₁H₁₇N₃O₃S₂
Exact Mass: 423,07



Şekil 8. Mitoksantron ve Antrakınon Türevlerinin Kimyasal Yapı Formülleri

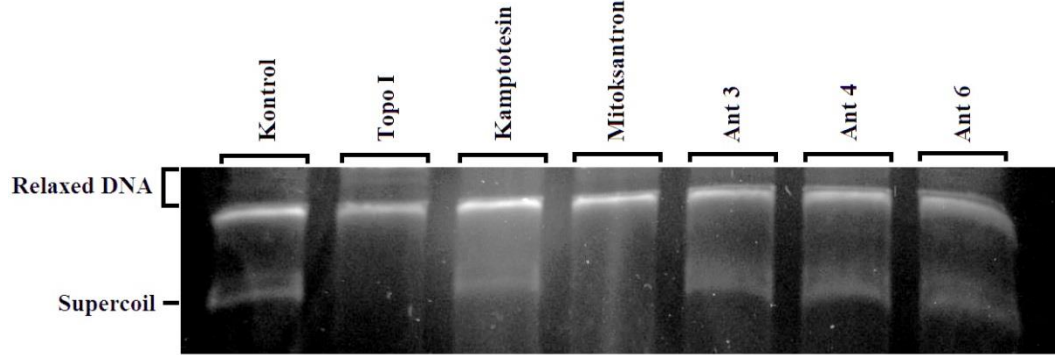
Reaksiyon tamponu içerisinde 1 unite dana timüs topoizomerazı I, 0,25 µg plazmid DNA'sı ve test gruplarının 30 dk inkübe edilmesinin ardından elde edilen sonuçlara göre antrakınon türevlerinin hem IC₅₀ hem de IC₂₀ dozunda topoizomeraz I inhibitör etkisi gösterdikleri tespit edilmiştir. Kontrol grubunda süpersarmal halde bulunan plazmid DNA'sı topoizomeraz I'in etkisiyle gevşemiş DNA formuna geçmektedir (**Şekil 9**). Kamptotesin gibi topoizomeraz I inhibitörü olan etken maddeler enzimin aktivitesini inhibe ederek plazmid DNA'sının süpersarmal formda kalmasını sağlamaktadırlar.



Şekil 9. Süpersarmal DNA ve Gevşemiş DNA Formu

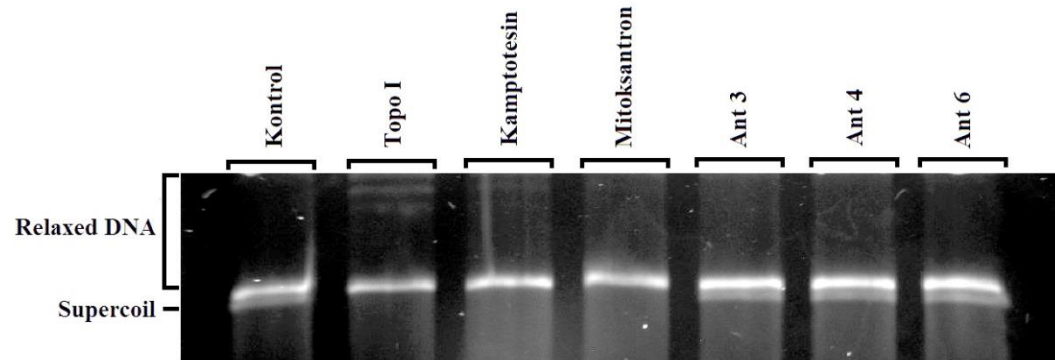
Maksimum yarı inhibitör konsantrasyonlarının kullanıldığı çalışmada (**Şekil 10**), Ant 3 için 10 µM, Ant 4 için 8 µM, Ant 6 için 8 µM, Mitoksantron için 4,4 µM ve deneyin pozitif kontrolü olan Kamptotesin 1 µg/ml konsantrasyon kullanılmıştır. Tüm test gruplarının, Ant 3, Ant 4 ve Ant 6'nın topoizomeraz I inhibitör etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Test gruplarında süpersarmal DNA

formunda kalan plazmid DNA'sına bakıldığında antrakinon türevlerinin Kamptotesin'e benzer aktivite göstermiştir. Buna karşın türevler ile yapısal benzerlik gösteren Mitoksantron maksimum yarı inhibitör konsantrasyonu olan 4,4 μM konsantrasyonda inhibitör etki göstermemiştir.



Şekil 10. Maksimum Yarı İnhibitör Konsantrasyonlarında Ant 3, Ant 4, Ant 6 ve Mitoksantron ile Kamptotesinin (1 $\mu\text{g/ml}$) Jel Görüntüsü

Topoizomeraz I DNA üzerinde aktive olduğunda DNA topolojisi aşamalı bir şekilde değişmektedir. Süpersarmal DNA formundan Gevşemiş DNA formuna geçişteki topolojik dönüşler farklı büyüklüklere sahip DNA moleküllerinin meydana gelmesine sebep olmaktadır. Antrakinon türevlerinin maksimum % 20 inhibitör konsantrasyonlarının test edildiği çalışmada, iki DNA formu arasındaki farklı büyüklükteki DNA molekülleri basamak şeklinde gözlenmiştir (**Şekil 11**). Yapılan çalışmada Ant 3 için 6 μM , Ant 4 için 5 μM , Ant 6 için 3 μM ve Mitoksantron için 2,6 μM konsantrasyon kullanılmıştır. Antrakinon türevleri düşük sitotoksositeye sahip maksimum % 20 inhibitör konsantrasyonunda da topoizomeraz I inhibitör etkisi gösterirken, Mitoksantron içeren test grubunda inhibitör etki gözlenmemiştir.



Şekil 11. Maksimum %20 İnhibitör Konsantrasyonlarında Ant 3, Ant 4, Ant 6 ve Mitoksantron ile Kamptotesinin (1 $\mu\text{g/ml}$) Jel Görüntüsü

Farklı antrakinon türevlerinin topoizomeraz I ve II üzerinde inhibitör etki gösterdiği daha önce yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. Ana antrakinon yapısına eklenen sübtitüente göre bazı türevler doğrudan DNA'ya bağlanarak topoizomeraz inhibisyonunu gerçekleştirirken (Gheeya ve ark., 2010) bazıları enzime bağlanarak inhibisyon gerçekleştirmektedirler. Yapılan bir çalışmada, yan grup olarak serin amino asidi içeren antrakinon türevi, 3,4 μM konsantrasyonda hem topoizomeraz I hem de topoizomeraz II üzerinde inhibitör etki gösterirken,

yan grup olarak tirozin içeren antrakinin türevi, 7,4 µM konsantrasyonda topoizomeraz I'in enzim aktivitesini stabil tutmakta, inhibitör etki göstermemektedir (Meikle ve ark., 1995). Oligopirol karboksamid içeren antrakinin türevinin ise 50 µM konsantrasyonda DNA'ya bağlanarak topoizomeraz I inhibitör etkisi gösterdiği ortaya konulmuştur (Hotzel ve ark., 2003). Epoksi antrakinin türevi ile yapılan bir çalışmada topoizomeraz I inhibisyonunun test edilen en yüksek doz olan 100 µM konsantrasyonda gerçekleştiği görülmüştür (Gheeya ve ark., 2010) Morfolin-4-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 3)'ün 6 µM, Piperidin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 4)'ün 5 µM, 4-Metilpiperazin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 6)'nın 3 µM konsantrasyonda topoizomeraz I inhibisyonu gerçekleştirmektedir. Ant 6'nın inhibitör etki meydana getirdiği konsantrasyonun daha önce çalışılan antrakinin türevlerinden daha düşük olması türevin etkili bir topoizomeraz I inhibitörü olduğunu göstermektedir.

Antrakinin Türevlerinin Bazı Apoptotik Proteinler Üzerindeki Etkileri

Antrakinin türevleri ile muamele edilen HeLa hücreleri liziz edilerek zamana bağlı protein izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonda her bir test grubu için 7×10^6 hücre/ml kullanılmıştır. Elde edilen proteinlerin miktarları (**Çizelge 1**), hazırlanan BSA protein standartlarının spektrofotometrede verdiği absorbans/konsantrasyon grafiği kullanılarak Bradford yöntemi ile tayin edilerek, jel elektroforezinde kullanılmak üzere 50 µg protein içerecek şekilde eşit olarak hazırlanmıştır.

Çizelge 1. 12 ve 24 saat inkübasyon sonrasında HeLa hücrelerinden elde edilen total protein miktarları (mg/ml).

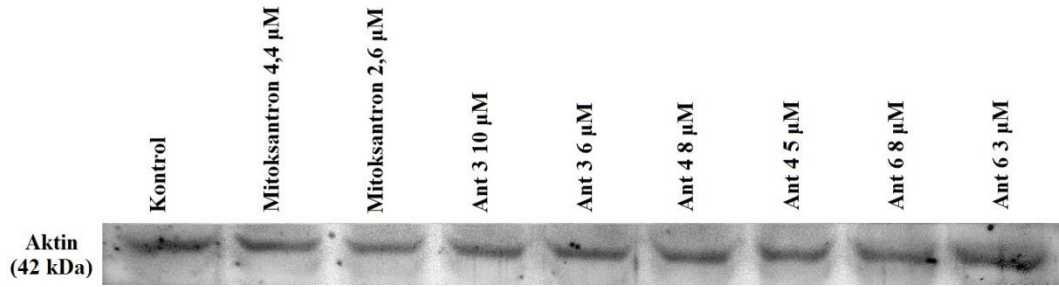
	Kontrol	Mito. 4,4 µM	Mito. 2,5 µM	Ant3 10 µM	Ant 3 6 µM	Ant 4 8 µM	Ant 4 5 µM	Ant 6 8 µM	Ant 6 3 µM
12 saat	2,4	2,8	2,8	2,7	2,8	2,8	3	2,7	2,7
24 saat	3,1	3,7	3,7	3,1	3,4	3,6	3,4	3,7	3,7

Protein izolasyonları sonrası elde edilen protein miktarlarına göre, 12 saatlik inkübasyon sonrasında kontrol grubu ile test grupları karşılaştırıldığında, antrakinin türevlerinin total protein ekspresyonunda belirgin bir artış gözlenmemiştir. 24 saatlik inkübasyon sonrasında kontrol grubundan elde edilen protein miktarlarına göre, Mitoksantron, Ant 4 ve Ant 6 test grupları protein ekspresyonlarında düşük düzeyde bir artış gözlenmiştir.,

Elde edilen proteinler, her bir örnek için 50 µg protein olacak şekilde, inkübasyon saatlerine göre gruplandırılarak SDS-PAGE yöntemi ile % 12'lik poliakrilamid jel içerisinde 4 saat süreyle akım uygulanarak ayrıştırılmıştır. Daha sonra Western Blot yöntemi ile proteinler polişvinilidin diflorür (PVDF) membrana transfer edilmiştir. Ekspresyon düzeyleri belirlenecek olan spesifik proteinlerin belirlenebilmesi için istenilen proteine özel birincil antikor ve peroksidaz tabanlı ikincil antikorlar kullanılmıştır. PVDF membran üzerindeki proteinler Western Blot yöntemi için özel 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) kullanılarak görünür hale getirilmiştir. Üzerinde protein bantları bulunan membranların (**Şekil 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34**) görüntülenmesi

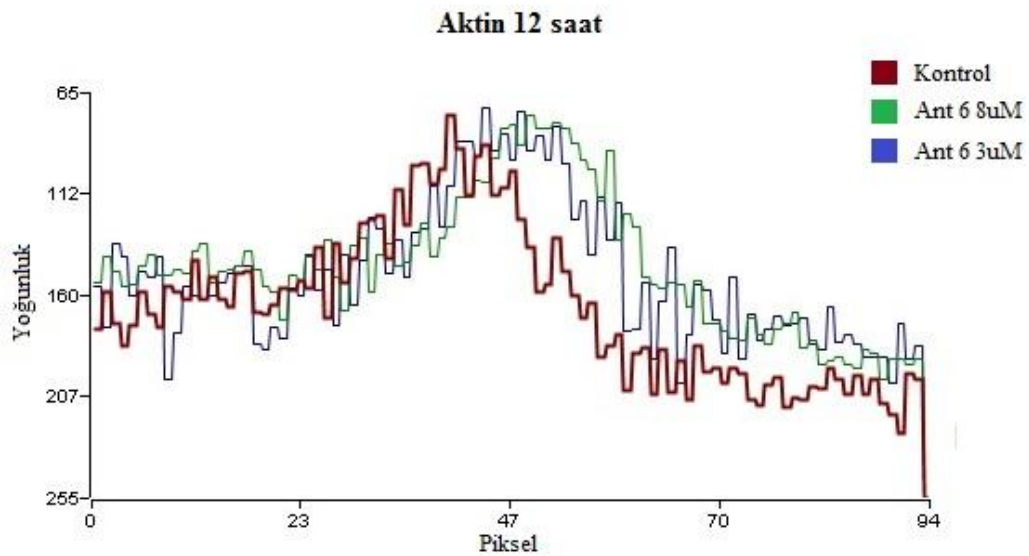
UVP Biochem 510 jel görüntüleme sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Membran üzerindeki proteinlerin karşılaştırmalı yoğunluk grafikleri (Şekil 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35) ve proteinlerin büyüklüklerinin belirlenmesi ColorBurst Electrophoresis Marker dikkate alınarak UVP Biochem 510 jel görüntüleme sisteminde yapılmıştır.

Öncelikle yapılan çalışmada kullanılan toplam proteinden eşit miktarda yükleme yapıldığını kontrol etmek amacıyla, hücrelerin yapısal proteinlerinden biri olan aktin proteininin düzeylerine bakılmıştır. 12 saatlik inkübasyona tabi tutulmuş örnekleri içeren membran aktin proteinine özel birincil antikor (H-196, Santa Cruz, A.B.D.) ile işaretlenerek hücrelerin aktin miktarları tespit edilmiştir (Şekil 12). Antrakınon türevlerinin ve Mitoksantron'un maksimum yarı inhibitör ve maksimum %20 inhibitör konsantrasyonunu içeren örnekler ile hiçbir etken madde içermeyen kontrol grubundaki aktin ekspresyonunun eşit olduğu belirlenmiştir.



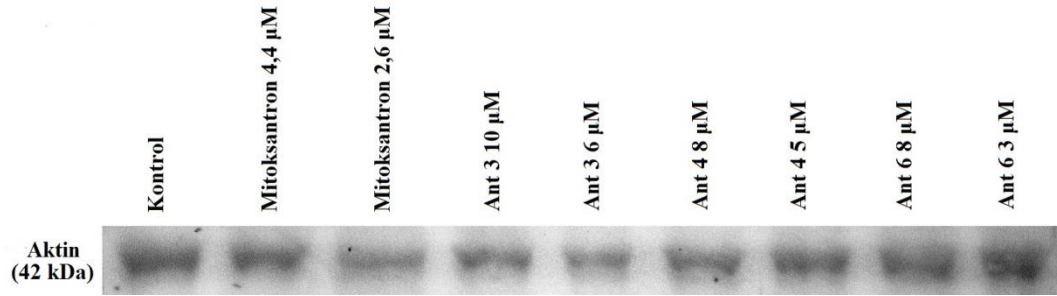
Şekil 12. HeLa Hücreleri ile Antrakınon Türevlerinin 12 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen Aktin Proteini Ekspresyonu

Türevlerin olası en etkili üyesi olan 4-Metilpiperazin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1Hantra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 6)'in 8 µM ve 3 µM konsantrasyonlarını içeren 12 saatlik inkübasyona tabi tutulmuş örnekler ile kontrol grubundaki aktin yoğunlukları grafik üzerinde karşılaştırıldığında (Şekil 13), test gruplarındaki aktin ekspresyonlarının eşit olduğu tespit edilmiştir.



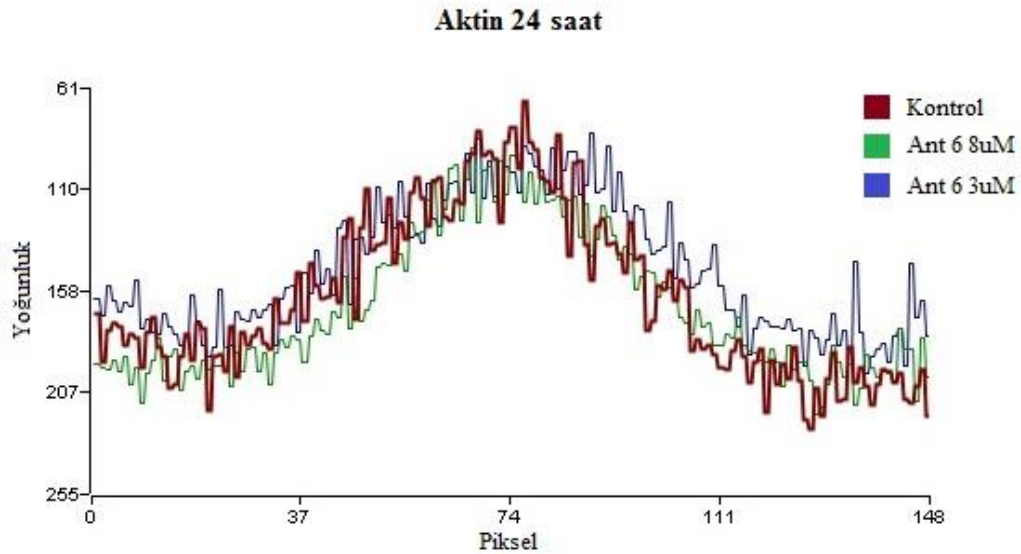
Şekil 13. HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın (8 µM ve 3 µM) 12 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen Aktin Proteini Yoğunluk Grafiği

Antrakininon türevlerinin 24 saatlik apoptotik etkilerinin incelenmesi için HeLa hücreleri türevlerin ve pozitif kontrol olan Mitoksantronun maksimum yarı inhibitör ve maksimum %20 inhibitör konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından yapılan Western Blot çalışmalarının doğruluğunu ve hücrelerden elde edilen protein miktarlarının eşit olduğunu tespit etmek amacıyla Aktin proteini ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. Kontrol, pozitif kontrol ve test gruplarındaki Aktin ekspresyonlarının eşit olduğu tespit edilmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. HeLa Hücreleri ile Antrakininon Türevlerinin 24 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen Aktin Proteini Ekspresyonu

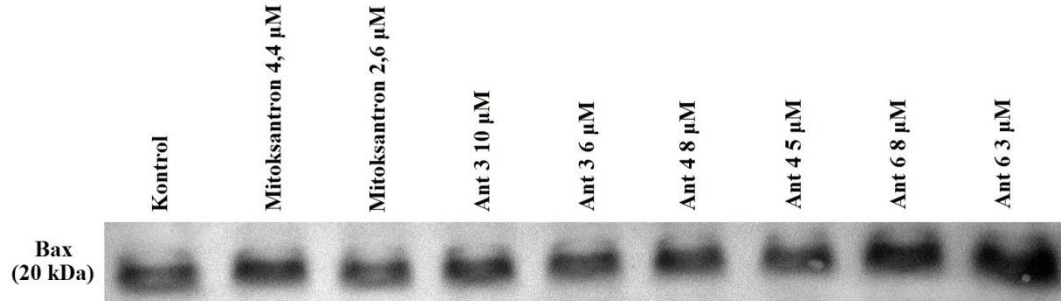
4-Metilpiperazin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 6)'nın 8 ve 3 µM konsantrasyonları ile hiçbir etken madde içermeyen kontrol grubundan elde edilen Aktin miktarları yoğunluk grafiğinde karşılaştırıldığında, Aktin ekspresyon düzeylerinin eşit olduğu belirlenmiştir (Şekil 15).



Şekil 15. HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın (8 µM ve 3 µM) 24 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen Aktin Proteini Yoğunluk Grafiği

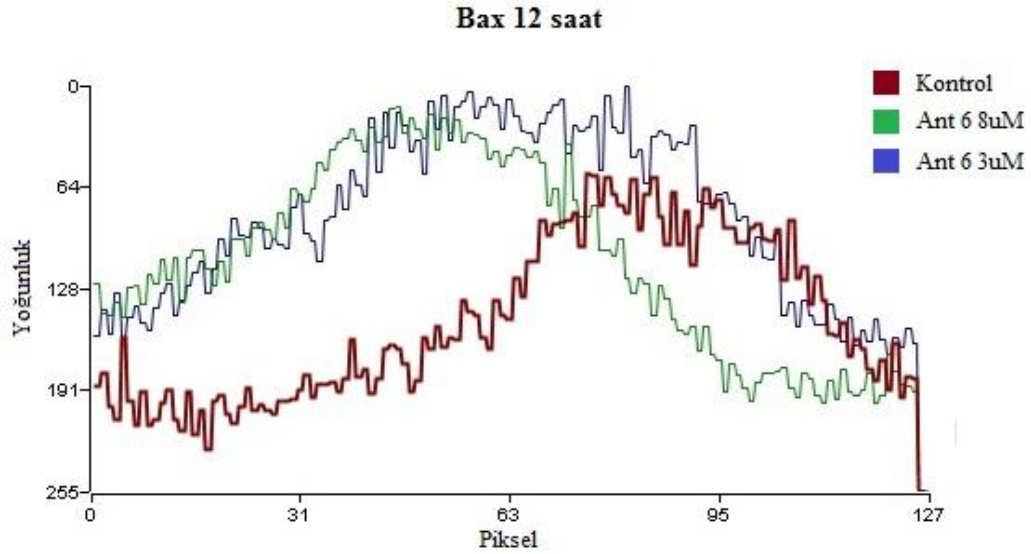
Antrakininon türevlerinin apoptotik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla hücre içi en önemli apoptotik proteinlerden biri olan Bcl-2 bağlantılı x proteininin (Bax) ekspresyon düzeyleri tespit edilmiştir. Bax proteinini işaretlemek için Bax'a özel birincil antikor (B-9 Santa Cruz, A.B.D.) kullanılmıştır. Antrakininon türevleri ile hücrelerin 12 saatlik inkübasyonu sonucunda türevlerin Bax ekspresyonunda

değişikliğe sebep olduğu gözlemlenmiştir. Mitoksantron'un 4,4 μM , Ant 3'ün 10 μM , Ant 4'ün 8 μM , Ant 6'nın 8 ve 3 μM konsantrasyonlarında Bax ekspresyonunun kontrol grubuna göre artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 16).



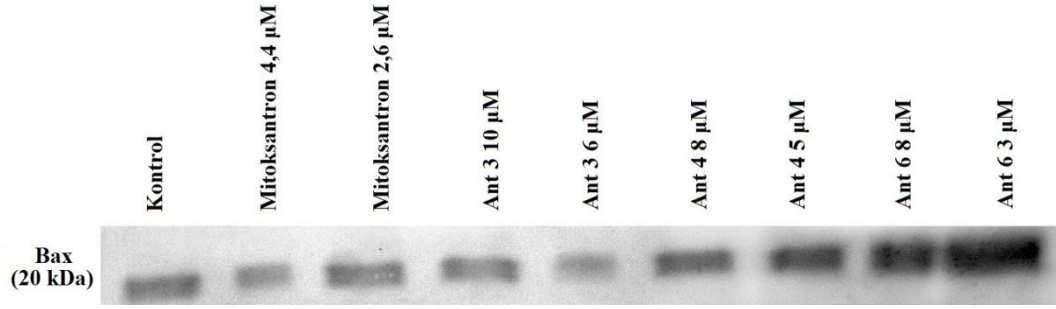
Şekil 16. HeLa Hücreleri ile Antrakinon Türevlerinin 12 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen Bax Proteini Ekspresyonu

Pozitif kontrol olan Mitoksantron ile Ant 3 ve Ant 4, 12 saatlik inkübasyonda Bax proteini ekspresyonunda doza bağlı olarak artış göstermekte iken Ant 6'nın her iki dozda da Bax protein ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır (Şekil 17). Diğer test gruplarının aksine Ant 6, sitotoksitesi daha düşük olan maksimum %20 inhibitör konsantrasyonunda daha yüksek Bax ekspresyonuna sebep olduğu belirlenmiştir.



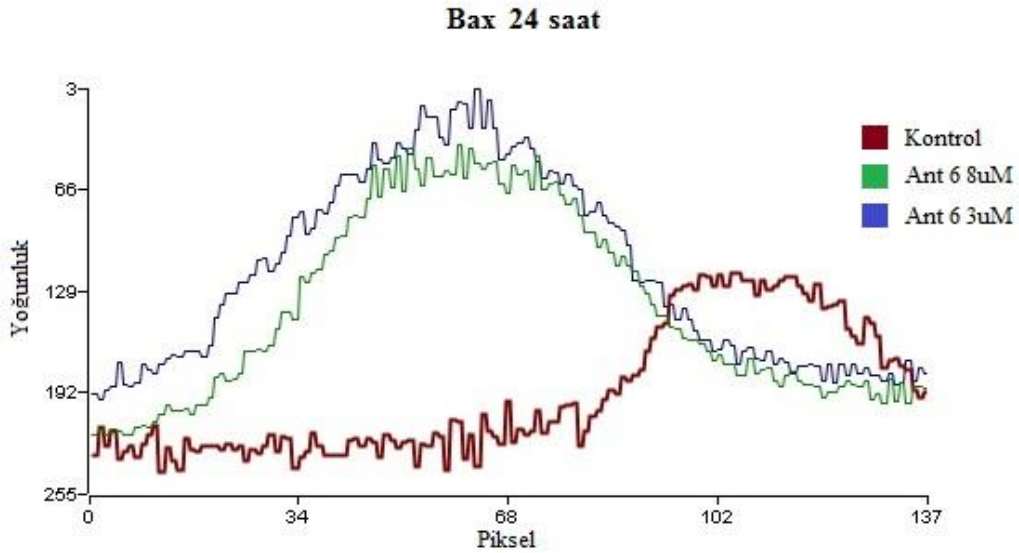
Şekil 17. HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın (8 μM ve 3 μM) 12 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen Bax Proteini Yoğunluk Grafiği

Türevler ile 24 saat inkübasyon sonrasında, Mitoksantron ve Ant 3 test gruplarında belirgin bir Bax ekspresyonu artışı gözlenmezken Ant 4 ve Ant 6'nın Bax ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 18). En yüksek Bax ekspresyonu Ant 6 ile inkübe edilmiş test grubunda olmakla birlikte Ant 6'nın 3 μM konsantrasyonunda 6 μM konsantrasyonuna göre daha yüksek Bax ekspresyonu gözlemlenmiştir.



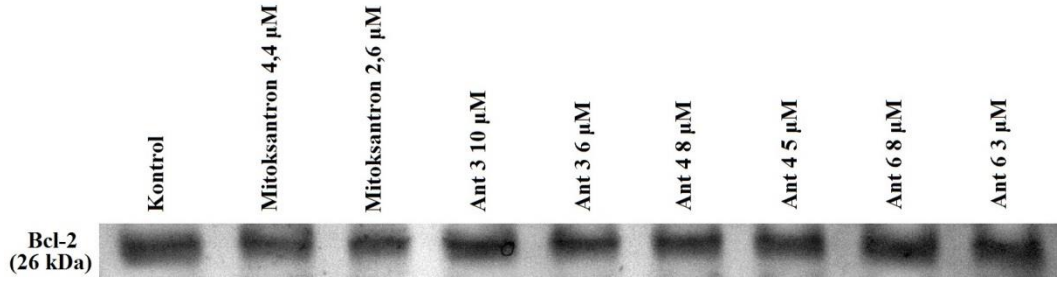
Şekil 18. HeLa Hücreleri ile Antrakinon Türevlerinin 24 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen BAX Proteinini Ekspresyonu

24 saat Ant 6 ile muamele edilen hücrelerden elde edilen Bax miktarları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Ant 6 her iki dozunda da çok yüksek oranda Bax ekspresyonuna sebep olduğu tespit edilmiştir (Şekil 19).



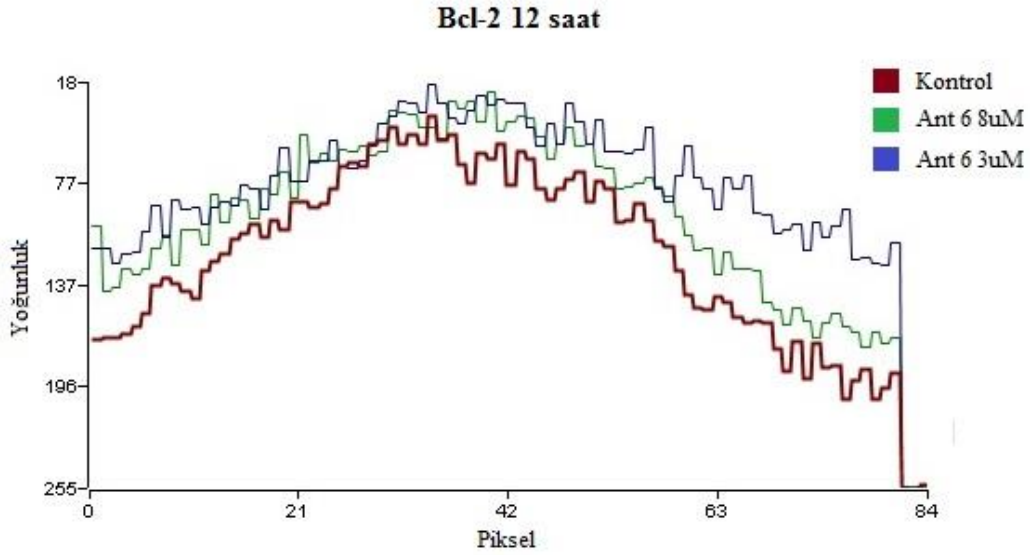
Şekil 19. HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın (8 µM ve 3 µM) 24 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen BAX Proteinini Yoğunluk Grafiği

Apoptotik mekanizma üzerinde apoptotik proteinlerin yanında antiapoptotik proteinlerin de ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Bu bağlamda hücre içinde en önemli anti-apoptotik proteinlerden biri olan Bcl-2'nin ekspresyonuna bakılmıştır. Bcl-2 proteininin tespiti için özel proteine özel birincil antikor kullanılmıştır (N-19 Santa Cruz, A.B.D.). Antrakinon türevleri ile 12 saatlik inkübasyonun ardında test grubu hücrelerin tümünde Bcl-2 ekspresyonlarında belirgin bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 20).



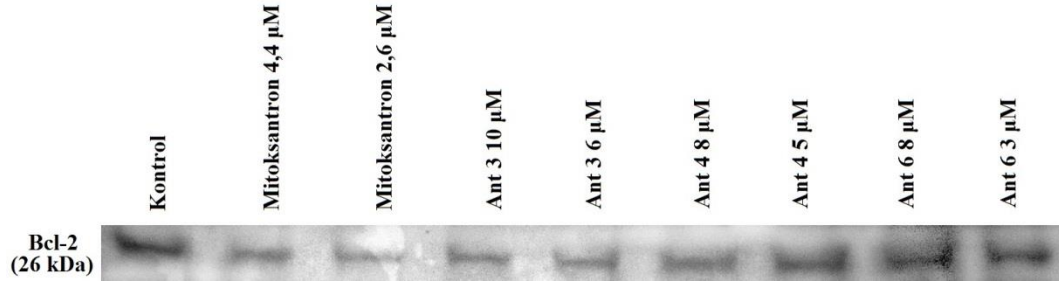
Şekil 20. HeLa Hücreleri ile Antrakininon Türevlerinin 12 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen Bcl-2 Proteini Ekspresyonu

Ant 6 ile 12 saat inkübe edilmiş hücrelerde Bax düzeyinde artış gözlemlenirken (Şekil 17), Bcl-2 düzeylerinde artışın gözlenmemesi (Şekil 21), 4-Metilpiperazin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 6)'in apoptotik etkiye sahip olduğunu göstermiştir.



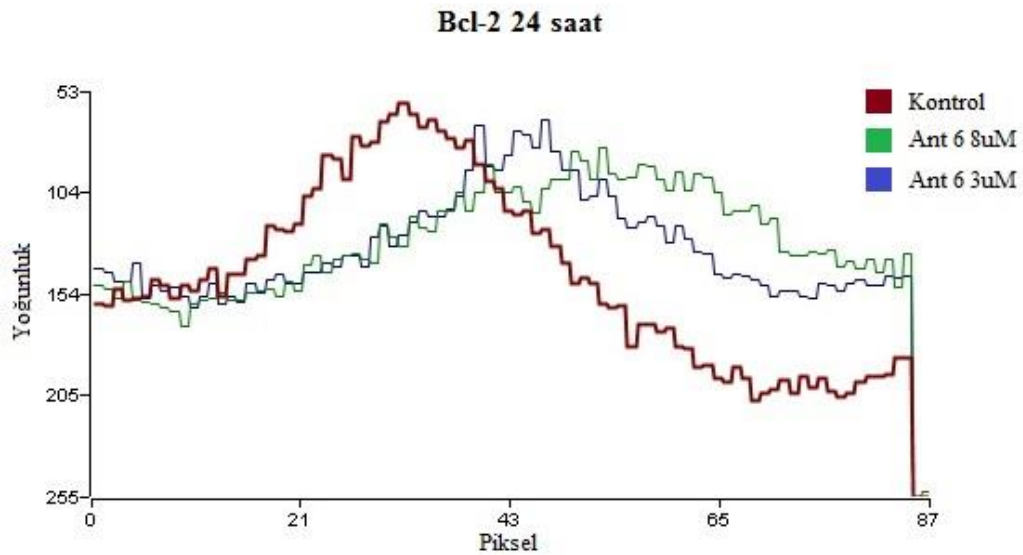
Şekil 21. HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın (8 µM ve 3 µM) 12 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen Bcl-2 Proteini Yoğunluk Grafiği

24 saat antrakininon türevleri ile inkübasyon sonrasında hücrelerdeki Bcl-2 proteini ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. Tüm test gruplarından elde edilen Bcl-2 miktarlarının kontrolden daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 22). 4,4 ve 2,6 µM Mitoksantron ile 10 ve 6 µM Ant 3 test gruplarında en düşük Bcl-2 ekspresyon düzeyleri belirlenirken, Ant 4 ve Ant 6 test gruplarının Bcl-2 ekspresyon düzeylerinin kontrolden daha düşük olduğu tespit edilmiştir.



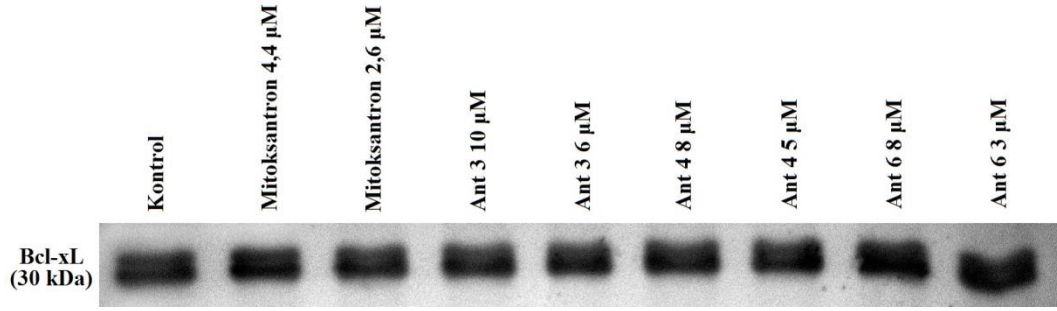
Şekil 22. HeLa Hücreleri ile Antrakinon Türevlerinin 24 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen Bcl-2 Proteini Ekspresyonu

Türevlerden en yüksek apoptotik etkiyi gösteren 4-Metilpiperazin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 6) ile 24 saatlik inkübasyon sonrasında hücrelerden elde edilen Bcl-2 miktarları kontrol grubu ile yoğunluk grafiğinde karşılaştırıldığında Ant 6'nın belirgin bir şekilde Bcl-2 ekspresyon seviyesini düşürdüğü gözlemlenmiştir (**Şekil 23**).



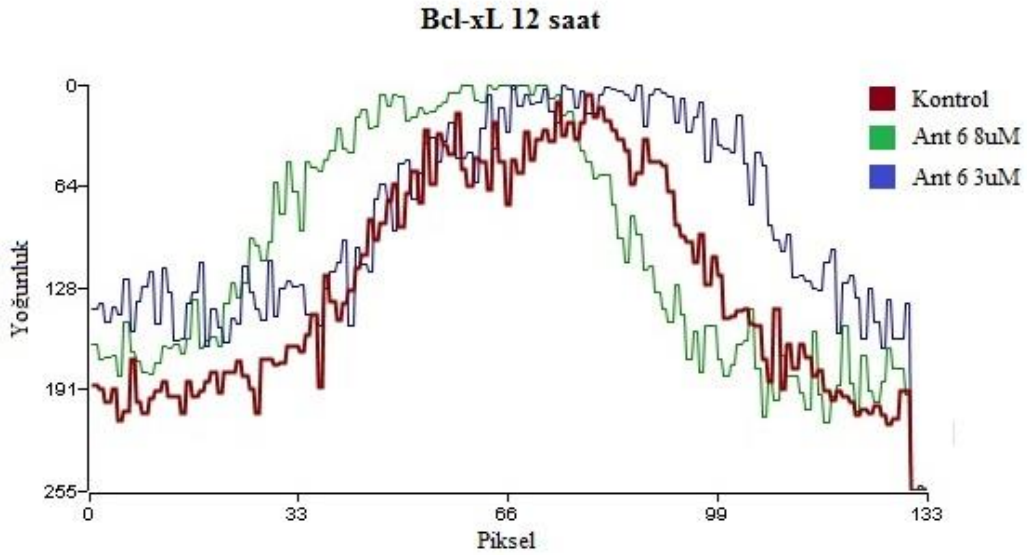
Şekil 23. HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın (8 µM ve 3 µM) 24 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen Bcl-2 Proteini Yoğunluk Grafiği

Apoptotik mekanizmanın protein düzeyinde tam olarak aydınlatılabilmesi için hücre içi diğer bir anti-apoptotik protein olan Bcl-xL ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Bcl-xL proteinin membran üzerinde tespit edilmesi için proteine özel birincil antikor (H-5 Santa Cruz, A.B.D.) kullanılmıştır. Antrakinon türevleri ile 12 saat inkübasyon sonrasında hücrelerden elde edilen Bcl-xL düzeylerine bakıldığında, kontrol grubu ile aralarında belirgin bir fark olmadığı gözlemlenmiştir (**Şekil 24**).



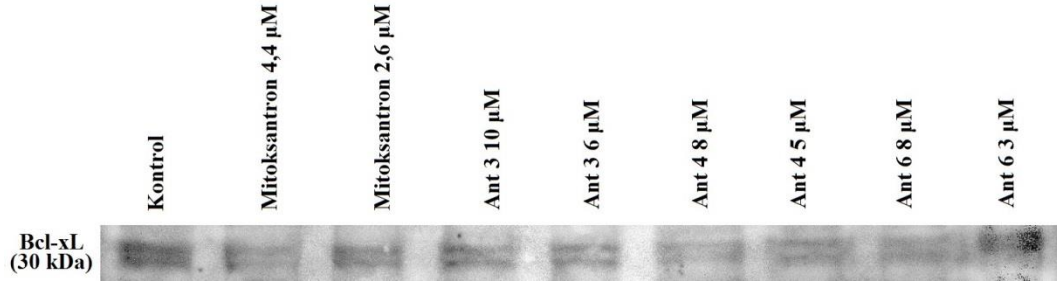
Şekil 24. HeLa Hücreleri ile Antrakinon Türevlerinin 12 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen Bcl-xL Proteini Ekspresyonu

Türevlerden en yüksek apoptotik aktiviteyi gösteren Ant 6'nın 8 ve 3 µM konsantrasyonlarını içeren test grupları ile kontrol grubu yoğunluk grafiğinde karşılaştırıldığında Bcl-xL ekspresyon düzeylerinde belirgin bir değişim olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 25).



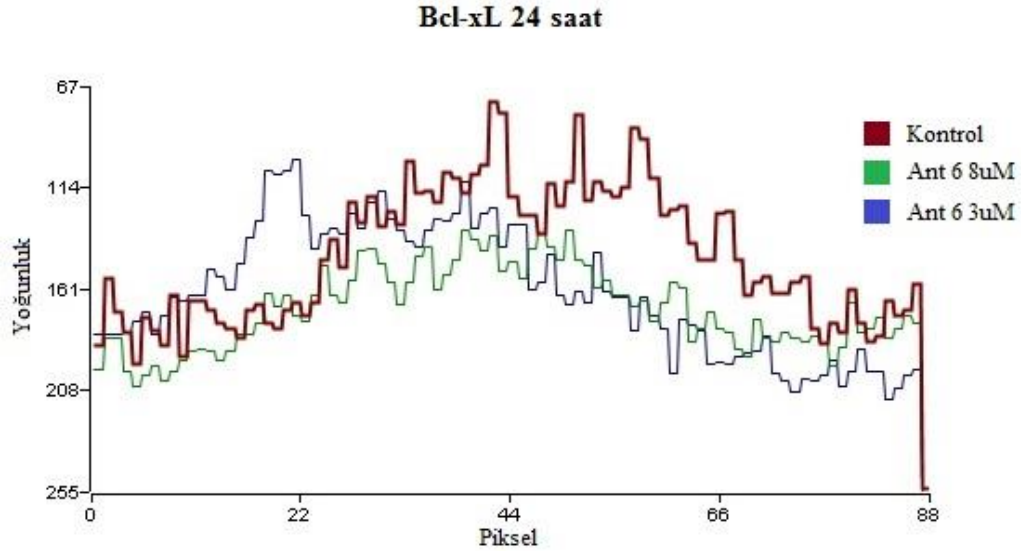
Şekil 25. HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın (8 µM ve 3 µM) 12 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen Bcl-xL Proteini Yoğunluk Grafiği

HeLa hücrelerine antrakinon türevlerinin 24 saat muamele edilmesinin ardından, Mitoksantron'un 4,4 ve 2,6 µM, Ant 3'ün 10 ve 6 µM, Ant 4'ün 8 ve 5 µM, Ant 6'nın 8 ve 3 µM konsantrasyonlarında Bcl-xL ekspresyonlarının kontrol grubundan daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 26).



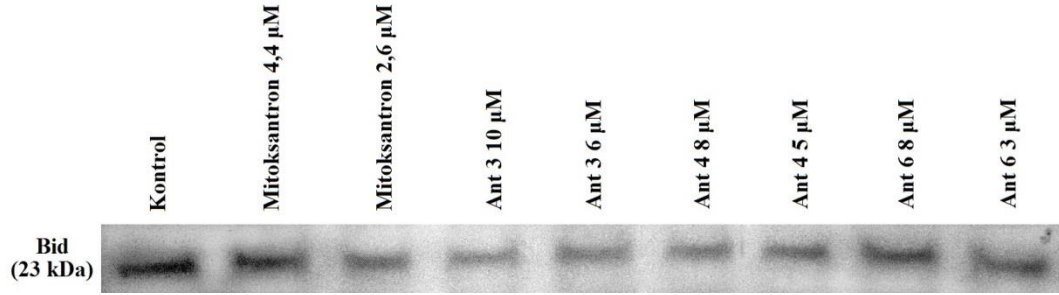
Şekil 26. HeLa Hücreleri ile Antrakinon Türevlerinin 24 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen Bcl-xL Proteini Ekspresyonu

4-Metilpiperazin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 6)'nın 24 saatlik inkübasyonda Bcl-xL ekspresyonu üzerindeki etkileri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Ant 6'nın 8 ve 3 μ M konsantrasyonlarında Bcl-xL ekspresyonunu düşürdüğü gözlemlenmektedir (Şekil 27).



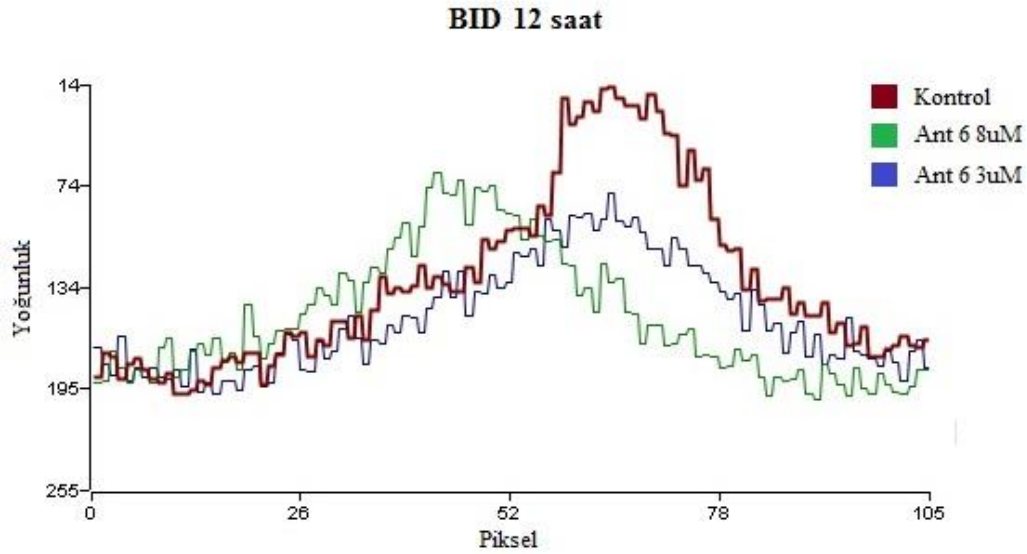
Şekil 27. HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın (8 μ M ve 3 μ M) 24 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen Bcl-xL Proteini Yoğunluk Grafiği

Yapılan çalışmada hücre içinde normal koşullarda inaktif formda bulunan ve hücre apoptoza gideceği zaman iki alt birime ayrılan Bid proteinin varlığı incelenmiştir. Proteinin inaktif halde bulunan Bid molekülüne özel birincil antikor (B-3 Santa Cruz, A.B.D.) kullanılmıştır. Türevler ile 12 saatlik inkübasyonun ardından elde edilen sonuçlara göre hücre içinde Bid proteini seviyeleri test gruplarında kontrol grubuna göre daha düşüktür (Şekil 28). En düşük Bid proteini seviyeleri 10 ve 6 μ M Ant 3 ile 8 ve 5 μ M Ant 4 test gruplarında elde edilmiştir. Mitoksantron ve Ant 6'nın daha düşük sitotoksik etkiye sahip maksimum %20 inhibitör konsantrasyonlarında IC₅₀ dozlarına göre daha düşük Bid proteini seviyesi tespit edilmiştir. Bid proteininin düşük seviyede olmasının sebebi, Bax, Bcl-2, Bcl-xL ve p53 ile yapılan çalışmalar göz önüne alınarak aktivasyon sonucu alt birimlerine ayrılması olduğu belirlenmiştir.



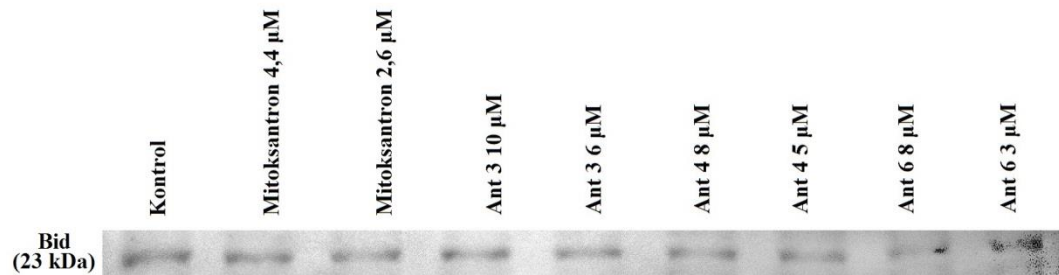
Şekil 28. HeLa Hücreleri ile Antrakininon Türevlerinin 12 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen Bid Proteinini Ekspresyonu

Antrakininon türevlerin içinde en yüksek apoptotik etkiyi gösteren Ant 6 test grubunun sonuçları kontrol ile karşılaştırıldığında Bid seviyesinin belirgin bir şekilde daha düşük olduğu gözlemlenmiştir (**Şekil 29**).



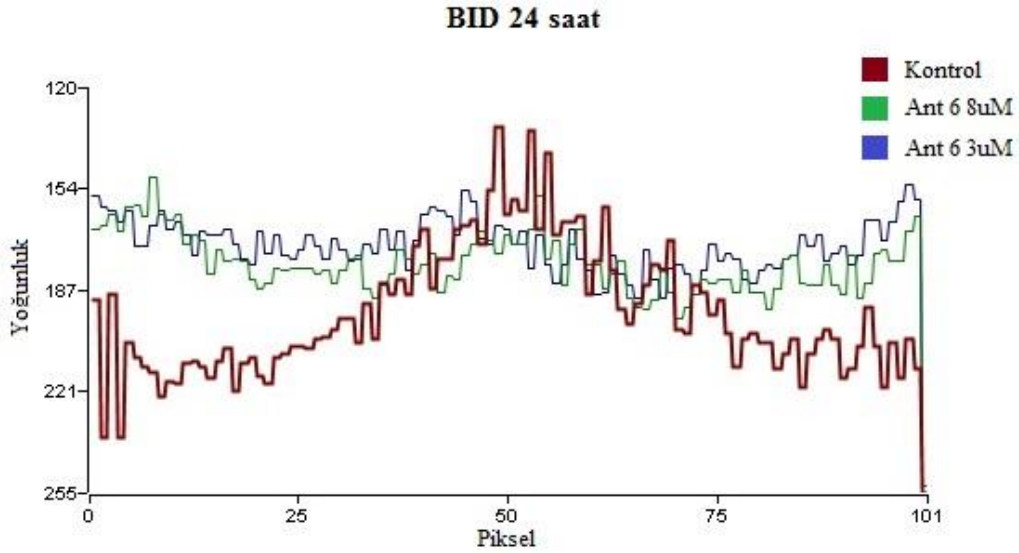
Şekil 29. HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın (8 µM ve 3 µM) 12 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen Bid Proteinini Yoğunluk Grafiği

Türevlerin hücreler ile 24 saatlik inkübasyonu sonucunda hücrelerdeki Bid protein seviyeleri incelenmiştir (**Şekil 30**). Elde edilen sonuçlara göre Ant 4'ün 8 ve 5 µM, Ant 6'nın 8 ve 3 µM konsantrasyonlarını içeren test gruplarının Bid protein seviyelerinin kontrole göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir.



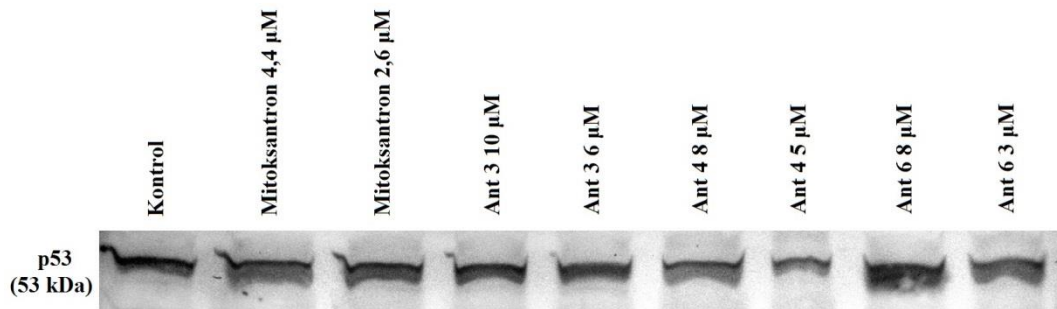
Şekil 30. HeLa Hücreleri ile Antrakininon Türevlerinin 24 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen Bid Proteinini Ekspresyonu

Yapılan çalışmalara göre apoptotik açıdan en etkin olan antrakinon türevi 4-Metilpiperazin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 6)'nın hücreler ile 24 saat muamele edilmesinin ardından elde edilen Bid proteini miktarları kontrol ile karşılaştırıldığında Ant 6'nın 8 ve 3 μ M konsantrasyonlarında kontrole göre Bid miktarlarının daha düşük olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 31).



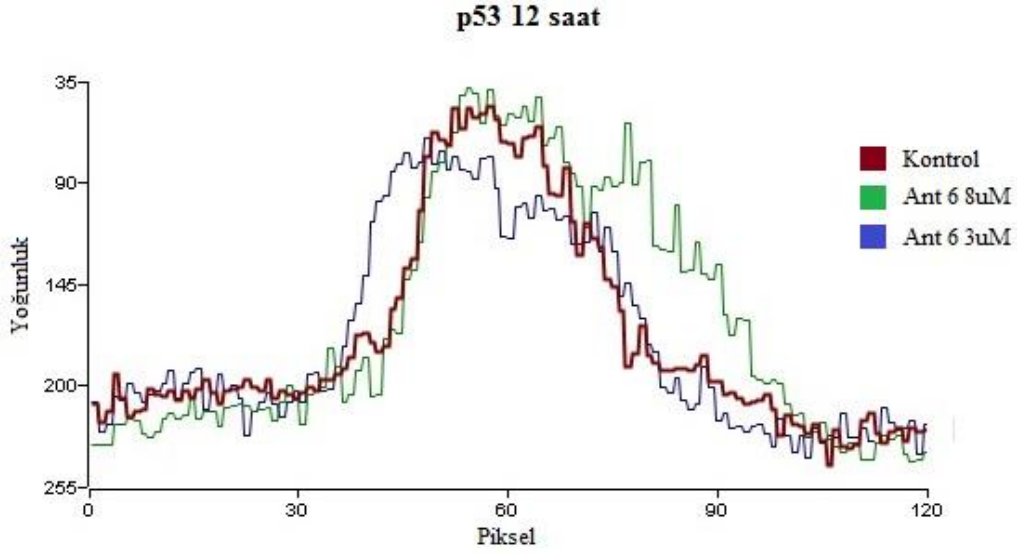
Şekil 31. HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın (8 μ M ve 3 μ M) 24 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen Bid Proteini Yoğunluk Grafiği

DNA düzeyindeki apoptotik etkinin belirlenebilmesi için HeLa hücrelerinde p53 proteini ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. p53 proteinin görüntülenmesi için proteine özel birincil antikor (pab1801 Santa Cruz, A.B.D.) kullanılmıştır. Test grupları ile hücrelerin 12 saat inkübe edilmesinin ardından elde edilen sonuçlara göre 8 μ M Ant 6 içeren test grubunda kontrole göre daha yüksek p53 ekspresyonu olduğu tespit edilmiştir (Şekil 32).



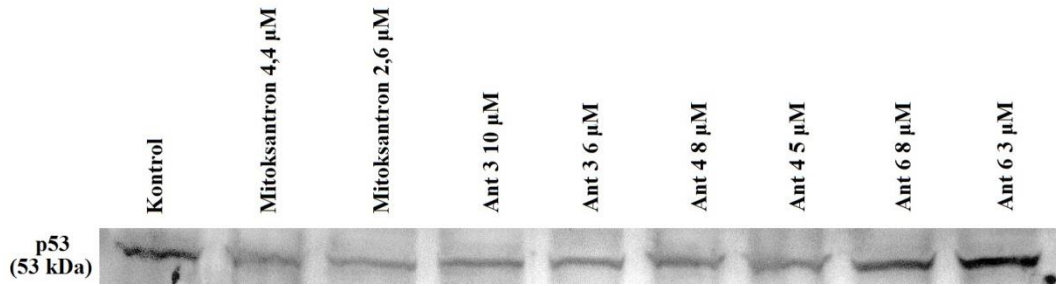
Şekil 32. HeLa Hücreleri ile Antrakinon Türevlerinin 12 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen p53 Proteini Ekspresyonu

Ant 6 ile 12 saat inkübe edilen hücrelerden elde edilen p53 proteini miktarları yoğunluk grafiğinde kontrol ile karşılaştırıldığında 8 μ M Ant 6 içeren test grubunda kontrole göre daha yüksek, 8 μ M Ant 6 içeren test grubunda ise kontrole yakın p53 ekspresyonu olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 33).



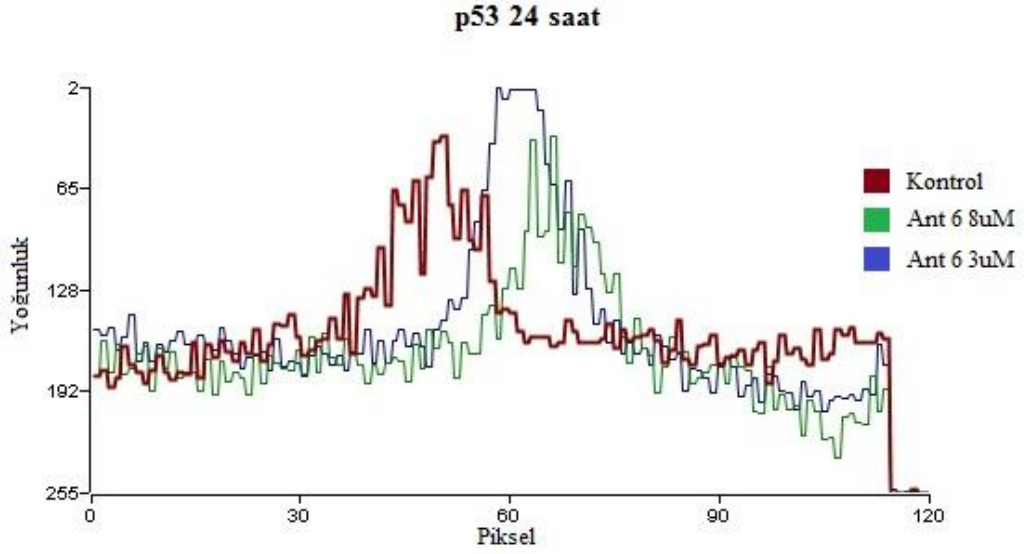
Şekil 33. HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın (8 µM ve 3 µM) 12 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen p53 Proteinini Yoğunluk Grafiği

Apoptotik mekanizmanın tespit edilmesinde en önemli proteinlerden biri olan p53 proteinin 24 saatlik inkübasyon sonrasında ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Mitoksantron, Ant 3 ve Ant 4'ün düşük ve yüksek konsantrasyonlarında p53 seviyeleri kontrole göre düşük bulunurken, Ant 6'nın 8 ve 3 µM konsantrasyonlarında p53 ekspresyonlarının yüksek olduğu bulunmuştur (Şekil 34).



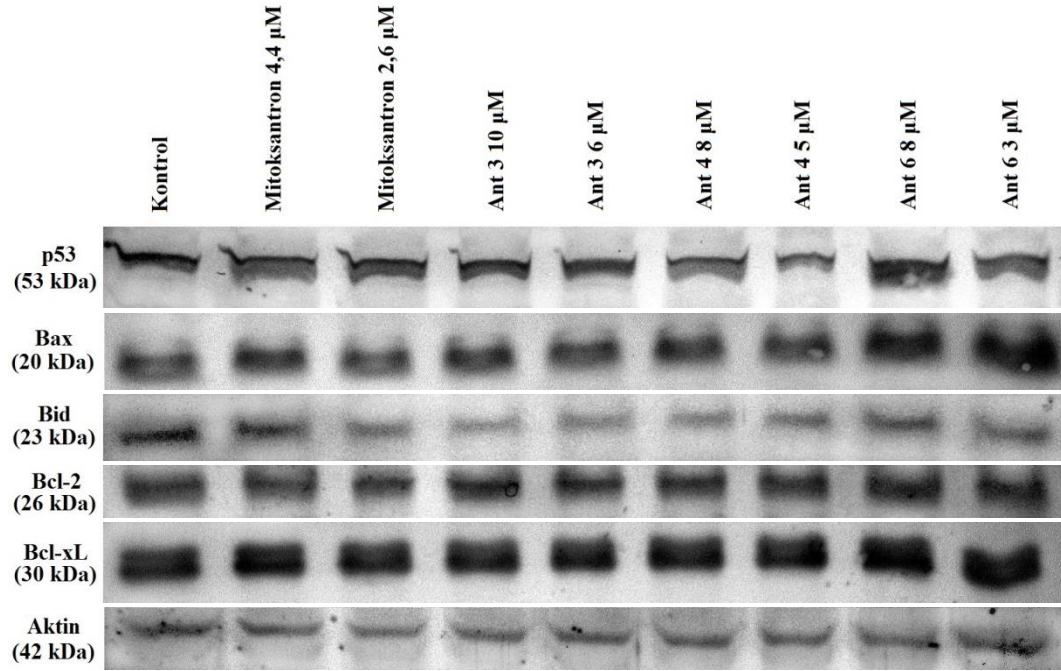
Şekil 34. HeLa Hücreleri ile Antrakinon Türevlerinin 24 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen p53 Proteinini Ekspresyonu

Hücreler ile 24 saat inkübe edilen Ant 6 maksimum inhibitör ve maksimum %20 inhibitör konsantrasyonları yoğunluk grafiğinde kontrol ile karşılaştırıldığında, her iki dozda da p53 ekspresyonunun yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 35). 8 µM Ant 6 içeren test grubunda p53 ekspresyonu kontrole çok yakinken, 3 µM Ant 6 içeren test grubunda kontrole göre belirgin bir şekilde ekspresyonun arttığı gözlemlenmiştir.



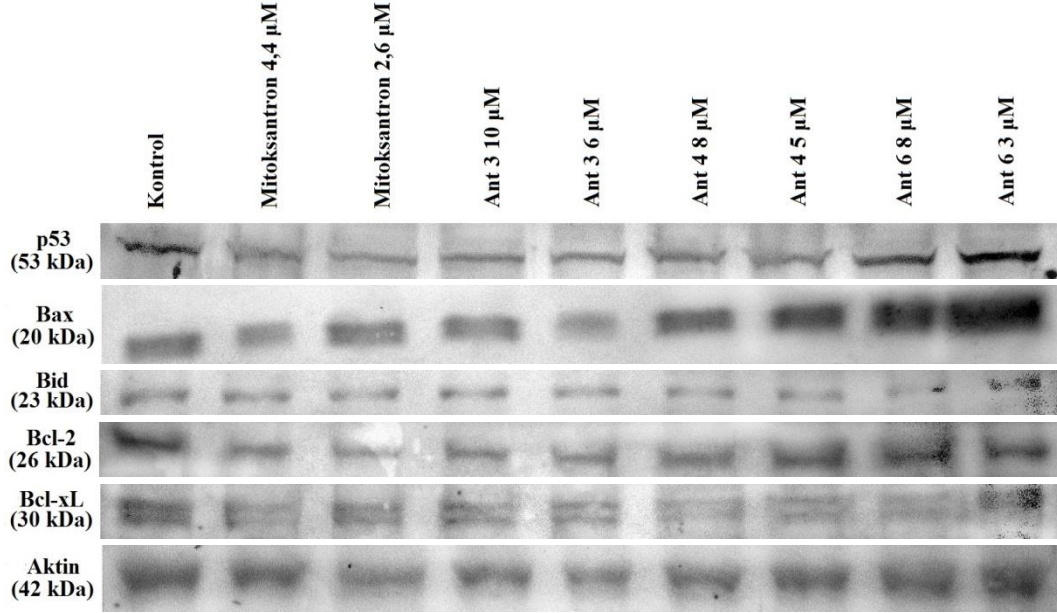
Şekil 35. HeLa Hücreleri ile Ant 6'nın (8 µM ve 3 µM) 24 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen p53 Proteinini Yoğunluk Grafiği

Antrakınon türevlerinin hücelere 12 saat muamele edilmesinin ardından alınan sonuçlara göre (Şekil 36), antiapoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-xL ekspresyon seviyeleri sabit kalırken apoptotik proteinler olan p53 ve Bax'in ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Bunun yanında Bid proteini miktarlarının kontrole göre düştüğü tespit edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre özellikle 6 numaralı antrakınon türevi olan 4-Metilpiperazin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester'in hücrede apoptotik proteinlerin aktivasyonunu gerçekleştirdiği belirlenmiştir.



Şekil 36. HeLa Hücreleri ile Antrakınon Türevlerinin 12 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen Tüm Proteinlerin Ekspresyonları

Türevler ile 24 saatlik inkübasyon sonrasında ise Bcl-2 ve Bcl-xL ekspresyon seviyelerinde düşüş gözlenirken, Ant 6 test grubunu içeren örneklerde p53 ve Bax ekspresyonlarının arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 37). 12 saatlik inkübasyon sonrasında apoptotik mekanizmada Ant 6'ya göre daha düşük apoptozu uyarıcı etki gösteren Ant 3 ve Ant 4, 24 saatlik inkübasyonda etkilerini kaybetmektedir. Buna karşın Ant 6'nın apoptozu uyarıcı etkisi 24 saatte yükselmektedir.



Şekil 37. HeLa Hücreleri ile Antrakinon Türevlerinin 24 Saat İnkübasyonu Sonucu Elde Edilen Tüm Proteinlerin Ekspresyonları

Yapılan çalışmada Ant 6'nın 8 ve 3 µM konsantrasyonlarda, deneylerde kontrol grubu olarak kullanılan Mitoksantron'un 4,4 ve 2,6 µM konsantrasyonlarından daha etkili olduğu bulunmuştur. Ant 6 sitotoksitesi daha düşük olan 3 µM konsantrasyonda Mitoksantron'un 4,4 µM konsantrasyonundan daha yüksek apoptozu uyarıcı etki göstermesi çalışma açısından olumlu bir sonuçtur.

HPV pozitif serviks kanseri hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada antrakinon türevlerinin, kemoterapide sıklıkla kullanılan sisplatinden daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. 4-(benzylamino)-9, 10-dioxo-4a, 9, 9a, 10-tetrahydroanthracen-1-yl 4-ethylbenzenesulfonate içeren antrakinon türevi, kanserli hücre hattında %50 inhibitör konsantrasyonu 0,3 µM olup, sisplatinden 20 kat daha etkilidir. Bunun yanında sağlıklı hücre hattında ise (WI-38) sitotoksik etkisi kanserli hücre hattına göre daha düşüktür. Antrakinon türevleri ile inkübe edilen serviks kanseri hücre hattında Bcl-2 ekspresyonu düşmekte iken, p53 ekspresyonu artmaktadır (Shangtong ve ark., 2014).

Hücrelerde p53 proteinin aşırı ekspresyonu sonucu Bax proteini aktive olmaktadır (Miyashita ve ark., 1994). Korosolik asit (CRA), serviks adenokarsinoma hücre hattını doz ve zamana bağlı olarak hücre döngüsünün S fazında döngüyü durdurmakta ve apoptozu sürüklemektedir. CRA ile inkübe edilen hücrelerde Bax miktarının arttığı, hücrenin mitokondriyel membran potansiyelinin bozulduğu ve kaspaz 8, 9 ve 3'ün aktivasyonu gözlenmektedir. CRA, serviks adenokarsinoma hücre hattını mitokondriyel yolak üzerinden apoptozu sürüklemektedir (Xu ve ark., 2009).

Daha önce çalışılmış olan antrakinin türevlerinden elde edilen sonuçlara bakılarak, test edilen antrakinin türevlerinin serviks adenokarsinoma hücre hattında gerçekleştirdiği protein aktivasyonlarına göre (**Çizelge 2 ve 3**) türevlerin hücreleri mitokondriyel yolak üzerinden apoptoza sürüklediği öngörülmüştür.

Çizelge 2. Türevler ile 12 Saat İnkübe Edilen HeLa Hücrelerinde Proteinlerin Ekspresyon Seviyeleri

	Kontrol	Mito. 4,4 μ M	Mito. 2,5 μ M	Ant3 10 μ M	Ant 3 6 μ M	Ant 4 8 μ M	Ant 4 5 μ M	Ant 6 8 μ M	Ant 6 3 μ M
Aktin	++	++	++	++	++	++	++	++	++
p53	++	++	++	++	++	++	++	+++	++
Bax	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++
Bid	++	+	+	+	+	+	+	+	+
Bcl-2	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Bcl-xL	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Çizelge 3. Türevler ile 24 Saat İnkübe Edilen HeLa Hücrelerinde Proteinlerin Ekspresyon Seviyeleri

	Kontrol	Mito. 4,4 μ M	Mito. 2,5 μ M	Ant3 10 μ M	Ant 3 6 μ M	Ant 4 8 μ M	Ant 4 5 μ M	Ant 6 8 μ M	Ant 6 3 μ M
Aktin	++	++	++	++	++	++	++	++	++
p53	+	+	+	+	+	+	+	++	++
Bax	+	+	+	+	+	+	++	+++	+++
Bid	++	++	++	+	+	+	+	+	+
Bcl-2	++	+	+	+	+	+	+	+	+
Bcl-xL	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Aynı zamanda türevlerin topoizomerez I inhibitör etkisi çalışmalarında pozitif sonuç vermesi, mitokondriyel yolak üzerinden gerçekleştirdikleri apoptoz fikrini desteklemektedir. Topoizomerez I inhibitörü olan etken maddelerin DNA üzerinde kırıklar oluşturarak p53 ekspresyonunda artışa sebep oldukları bilinmektedir (Nelson ve Kastan, 1994). Tiyokolşisin dimerleri ile yapılmış bir çalışmada, IDN5404 kodlu tiyokolşisin dimerinin topoizomerez aktivitesi gösterirken hücrede p53 ekspresyonunu da arttırdığı tespit edilmiştir (Raspaglio ve ark., 2005). Kinolin halkası içeren topotekan ile ısı şok proteini inhibitörü olan geldanamisin kolon kanseri hücre hattı üzerinde kombine kullanıldığı bir çalışmada topoizomerez I inhibisyonu, p53 ekspresyonunda artış ve Bcl-2 ekspresyonunda düşüş gözlenmiştir. Topotekanın tek başına kullanımı Bcl-2 ekspresyonunu azaltmadığı gözlemlenmiştir (McNamara ve ark., 2012).

Tez kapsamında test edilen türevlerden Ant 6, 24 saatlik inkübasyon sonrasında p53 ekspresyonunu arttırırken Bcl-2 ekspresyonunu azaltmakta aynı zamanda topoizomerez I üzerinde inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan çalışmalar sonucunda Morfolin-4-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 3), Piperidin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 4) ve 4-Metilpiperazin-1-ditiyokarbamik asit 6,11-Diokso-6,11-dihidro-1H-antra[1,2-d]imidazol-2-il-metil ester (Ant 6)'nin topoizomeraz I enzim inhibitör etkisi gösterdikleri saptanmıştır. Antrakinson türevleri, yüksek inhibitör etki gösterdiği bilinen kamptotesin ile benzer etki göstermektedir. Bunun yanında türevler ile yapısal benzerliğe sahip olan mitoksantrondan daha yüksek aktivite göstermeleri, türevlerin etkili birer topoizomeraz I inhibitörü olduklarını ortaya koymaktadır. Test edilen maddelerin konsantrasyonları maksimum %20 inhibitör konsantrasyona düşürüldüğünde kamptotesin topoizomeraz I inhibitör etkisini kaybederken antrakinson türevleri inhibitör etkilerini korumaktadır.

Antrakinson türevlerinin DNA üzerinde kırıklar meydana getirerek hücrede p53 proteinin aşırı ekspresyonuna sebep olduğu tespit edilmiştir. Yüksek miktarda p53 proteini serviks adenokarsinoma hücre hattında hücre içi apoptotik sinyal yolağını başlatarak proapoptotik bir protein olan Bax'ı uyarmaktadır. Anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-xL ekspresyon seviyelerinin Ant 3, Ant 4 ve Ant 6 ile muamele edilen test gruplarında kontrole göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın hücrede bulunan Bid proteini miktarlarında düşüş ve özellikle Ant 6 içeren test gruplarında p53 ve Bax proteinlerinin ekspresyonlarındaki artış, türevlerin hücre içi apoptotik mekanizmayı uyardığının göstergesidir.

Bid proteininin hücre dışı apoptotik yolak üzerinden de uyarılabilmesi sebebiyle, türevlerin apoptotik mekanizmalarının tam olarak anlaşılabilmesi için kaspaz 8 gibi hücre dışı apoptotik yolak üzerinden uyarılan proteinlerin aktivasyonlarının tespiti gerekmektedir.

Hücre çoğalmasını durdurucu etkilerinin kesin olarak belirlenebilmesi için türevlerin topoizomeraz II inhibitör etkilerine bakılması gerekmektedir. Bu çalışmalar eş zamanlı hücre analiz yöntemi gibi hücre çoğalmasının belirlendiği yöntemler ile desteklenmelidir.

Hücre bölünmesini durdurduğu öngörülen, aynı zamanda hücreyi apoptotoza sürüklediği tespit edilen antrakinson türevleri serviks kanseri tedavisinde büyük umut vadetmektedir. Çalışmaların *in vivo* ortamda devam ettirilmesi yeni sentezlenen antrakinson türevlerinin serviks kanseri tedavisinde kullanılabilirliğine büyük katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Adams J. M., Cory S., Life or death decions by the Bcl-2 family, Trends. Biochem Sci, 6, 26-61 (2001).

Alderden R.A., Mellor H.R., Modok S. , Hambley T.W., Cytotoxic efficacy of an anthraquinone linked platinum anticancer drug, biochemical pharmacology, 71, 1136 – 1145 (2006).

Alibadi S. H., Tabarzadi M., Zarghi A., Synthesis and cytotoxic evaluation of two novel anthraquinone derivatives, Il Farmaco, 59, 645–649 (2004).

Anonim, Glioblastoma and Malignant Astrocytoma, American Brain Tumor Association, 3-12 (2012)

Anonim, World Cancer Report 2014, World Health Organisation, Lyon, France (2014).

Birbrair A., Zhang T., Wang Z., Messi M. L., Olson J. D., Mintz A., Delbono O. Type-2 pericytes participate in normal and tumoral angiogenesis, AJP: Cell Physiology, 307 (2013).

Boyle, P., Levin, B., Dünya Kanser Raporu, Dünya Sağlık Örgütü, Lyon Cedex Fransa (2008).

Burt R.K., Poirier M.C., Bohr V.A., Special article: Antineoplastic drug resistance and DNA repair, Annals of Oncology, 2 (5), 325-334 (1991).

Casanelles E., Gozzelino R., Guimaraes V., Belinchon M.C., Sole C., NF- κ B activation fails to protect cells to TNF α -induced apoptosis in the absence of Bcl-xL, but not Mcl-1, Bcl-2 or Bcl-w, Biochimica et Biophysica Acta, 1833, 1085-1095 (2013).

Chaudary N., Milosevic M., Hill P.P., Suppression of vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3) and vascular endothelial growth factor C (VEGFC) inhibits hypoxia-induced lymph node metastases in cervix cancer, Gynecologic Oncology (2011).

Chautan M., Chazal G., Cecconi F., Gruss P., Golstein P., Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway, Curr. Biol., 9, 967-970 (1999).

Çalışkan G., Çelik O., Erdoğan H, Gölgeci M.H., Kavalcı A., Anormal Servikal sitoloji sonucu olan hastalarda servikal biyopsi ve HPV sonuçlarının korelasyonu, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara (2010).

Degterev A., Huang Z., Boyce M., Li Y., Jagtap P., Mizushima N., Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury, Nat. Chem. Biol., 112-119 (2005).

Du G. J., Lin H., Xu Q., Wang M., Bcl-2 switches the type of demise from apoptosis to necrosis via cyclooxygenase-2 upregulation in HeLa cell induced by hydrogen peroxide, Cancer Letters, 232, 179-188 (2006).

Ellis P. A., Simit I. E., Carthy M. C., Salter D. S., Preoperative chemotherapy induces apoptosis in early breast cancer, *Lancet*, 349 (1997).

Elsea S.H., Westergaard M., Burden D.A., Lomenick J.P., Osheroff N., Quinolones share a common interaction domain on topoisomerase II with other DNA cleavage-enhancing antineoplastic drugs. *Biochemistry*, 36 (29), 19-24 (1997).

Galluzzi L., Maiuri M. Z., Vitale I., Zischka H., Castedo M., Zitvogel L., Kroemer G., Cell death modalities: classification and pathophysiological implications, *Cell Death Differ*, 14, 1237-1243 (2007).

Gewirtz A.D., A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin, *Biochemical Pharmacology*, 57, 727–741 (1999).

Gheeya J., Johansson P., Chen Q., Dexheimer T., Metaferia B., Expression profiling identifies epoxy anthraquinone derivative as a DNA topoisomerase inhibitor, *Cancer Letters*, 293, 124–131 (2010).

Giles G., Sharma R.R., Solid phase synthesis of anthraquinone peptides and their evaluation as topoisomerase I inhibitors, *J. Peptide Sci.*, 11, 417–423 (2005).

Gobertz C., Andrzej S., Larsen A.K., The interaction between p53 and DNA topoisomerase I is regulated differently in cells with wild-type and mutant p53, *Medical Sciences*, 96, 10355–10360 (1999).

Gültekin N., Karaoğlu K., Küçükateş E., Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri, *Türk Kardiyol Dern Arş*, 36, 120-130 (2008).

Hamilton S. R., Aaltonen L. A., Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System, World Health Organization Classification of Tumours, Lyon (2000).

Hande K.R. Topoisomerase II inhibitors. Update on Cancer Therapeutics, 3, 13-26 (2008).

Hartwell L., Cell Biology and Cancer, Oregon Public Broadcasting, 1-2, (2003).

Heynick L.N., Johnston S.A., Mason P.A., Radio Frequency Electromagnetic Fields: Cancer, Mutagenesis, and Genotoxicity. *Bioelectromagnetics*, 6, 74-100 (2003).

Hotzel C., Marotto A., Pindur U., New propylamine oligopyrrole carboxamides linked to a heterocyclic or anthraquinone system: synthesis, DNA binding, topoisomerase I inhibition and cytotoxicity, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 189-197 (2003).

Hsiang Y.H., Hertzberg R., Hecht S., Liu S L., Camptothecin Induces Protein-linked DNA Breaks via Mammalian DNA Topoisomerase I, *The journal of biological chemistry*, 27, 14873-14878 (1985).

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>

http-2, <http://www.turkkanser.org.tr/dosyalar/istatistikler/dunya-kanser-istatistikleri.pdf>

http-3, <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/cervical/Patient/page1/AllPages>

http-4, <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003094-pdf.pdf>

http-5, <http://www.qiagen.com/geneglobe/static/images/Pathways/Cellular%20Apoptosis%20Pathway.jpg>

http-6, <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8c/2rgr.png>

http-7, <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch7D.htm>

http-8, <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/forro-gabriella-2009-1202/HTML/image005.jpg>

Janicke B., Holographic time-lapse video showing live human prostate cells (DU 145) undergoing apoptosis, induced by etoposide, Phase Holographic Imaging AB. (2012).

Jaya P.S., Marina Y.F., Jeremiah B., Chang C.W.T., Synthesis and anticancer structure activity relationship investigation of cationic anthraquinone analogs, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 77, 96-102 (2014).

Jung C. H., Jun C. B., Ro S. H., Kim Y. M., Otto N. M., Cao J., Kundu M., Kim D. H., ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery, *Mol. Biol. Cell*, 20, 1992-2003 (2009).

Kerr J.F.R., Wyllie A.H.A., Currie R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implication in tissue kinetics, *Br. J. Cancer*, 26, 239 (1972).

Khan S., Chib., Shah B., Wani Z. A., Dhar N., A cyano analogue of boswellic acid induces crosstalk between p53/PUMA/Bax and telomerase that stages the human papillomavirus type 18 positive HeLa cells to apoptotic death, *European Journal of Pharmacology*, 660, 241-248 (2011).

Korwek Z., Sewastianik T., Bielak-Zmijewska A., Mosieniak G., Alster O., Inhibition of ATM blocks the etoposide-induced DNA damage response and apoptosis of resting human T cells, *DNA Repair*, 11 (864), 73 (2012).

Lee D., Kwon J. H., Kim E. H., Kim E., Choi K. Y., HMGB2 stabilizes p53 by interfering with E6/E6AP-mediated p53 degradation in human papillomavirus-positive HeLa cells, *Cancer Letters*, 292, 125-132 (2010).

Lei X., Xu Y., Wang T., Xie Q., Jia L., Wang L., Knockdown of human bid gene expression enhances survival of CD8+ T cells, *Immunology Letters*, 122, 30-36 (2009).

Li J., Yuan J., Caspases in apoptosis and beyond, *Oncogene*, 27 (2008).

Meikle I., Cummings J., Macpherson J. S., Hadfield J. A., Smyth J. F., Biochemistry of topoisomerase I and II inhibition by anthracenyl-amino acid conjugates, *Biochemical Pharmacology*, 49 (12), 1747-1757 (1995).

Maiuri M. C., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G., Self-eating and selfkilling: crosstalk between autophagy and apoptosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 741-752 (2007).

Markovi V., Ana J., Stanojkovi T., Branka K., Sladi D., Miroslava V., Janovi B., Ljubinka J., Synthesis, cytotoxic activity and DNA-interaction studies of novel anthraquinoneethiosemicarbazones with tautomerizable methylene group, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 64, 228-238 (2013).

McNamara A.V., Barclay M., Watson A.J., Jenkins J.R., Hsp90 inhibitors sensitise human colon cancer cells to topoisomerase I poisons by depletion of key anti-apoptotic and cell cycle checkpoint proteins, *Biochemical Pharmacology* 83, 355–367 (2012).

Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L., Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity, *Pharmacological Reviews*, 56, 185–229 (2004).

Miyashita T., Krajewski S., Krajewska M., Wang H.G., Lin H.K., Liebermann D.A., Hoffman B., Reed J.C., Tumor suppressor p53 is a regulator of Bcl-2 and Bax gene expression in vitro and in vivo, *Oncogene*, 9, 1799-1805 (1994).

Miyashita T., Reed J.C., Tumor Suppressor p53 Is a Direct Transcriptional Activator of the Human bax Gene, *Cell*, 80, 293-299 (1995).

Münger K., Baldwin A., Edwards M. K., Molecular Mechanisms of HPV-induced Carcinogenesis, *IARC Monographs*, 90, 432-445 (2004).

Nelson W. Kastan M., DNA Strand Breaks: the DNA Template Alterations That Trigger p53-Dependent DNA Damage Response Pathways, *Molecular and Cellular Biology*, 14 (3), 1815-1823 (1994).

Otter I., Conus S., Ravn U., The Binding Properties and Biological Activities of Bcl-2 and Bax in Cells Exposed to Apoptotic Stimuli, *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (11), 6110–6120 (1998).

Önder N. İ, Bazı Sentetik Bileşiklerin Antikanser Özelliklerinin Belirlenmesi, *Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir* (2013).

Pfeifer G.P., Denissenko M.F., Olivier M., Tretyakova N., Hecht S.S., Hainaut P., Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*, 21 (48),7435-51 (2002).

Poggi M. M., Coleman C. N., Mitchell J. B., Sensitizers and Protectors of Radiation and Chemotherapy, *Current Problems in Cancer*, 25 (6), 338-245 (2001).

Potmesil M., Pinedo H., *Camptothecins: New Anticancer Agents*, CRC Press, Boca Raton, USA, 14-17 (1995).

- Rabbani A., Ron M.F., Ausio J., The anthracycline antibiotics: antitumor drugs that alter chromatin structure, *BioEssays*, 27, 50–56 (2004).
- Raspaglio G., Ferlini C., Mozzetti S., Prislei S., Gallo D., Das N., Scambia G., Thiocolchicine dimers: a novel class of topoisomerase-I inhibitors, *Biochemical Pharmacology*, 69, 113–121 (2005).
- Ringer D.P., Schnipper L.E., Principles of Cancer Biology, *Clinical Oncology Atlanta*, American Cancer Society, 21-35 (2001).
- Rossé T., Olivier R., Monney L., Rager M., Conus S., Fellay I., Jansen B., Borner C., Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c, *Nature*, 391, 496-499 (1998).
- Reed J. C., Mechanisms of apoptosis., 157, 1415-1430 (2000).
- Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways, *The EMBO Journal*, 17 (6), 1675–1687 (1998).
- Sellers W.R., Fisher D.E., Apoptosis and cancer drug targeting, *The Journal of Clinical Investigation*, 10, 1172 (2014).
- Shangtong S., Sangphech N., Palaga T., Puthong S., Anthracene-9, 10-dione derivatives induced apoptosis in human cervical cancer cell line (CaSki) by interfering with HPV E6 expression, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 77, 334-342 (2014).
- Shi J., Shen H. M., Critical role of Bid and Bax in indirubin-30-monoxime induced apoptosis in human cancer cells, *Biochemical Pharmacology*, 75, 1729-1742 (2008).
- Stewart B.W., Wild C.P., World Cancer Report 2014, World Health Organization, (2014).
- Spierings D. C., de Vries E. G., Vellenga E., Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors, *J Histochem Cytochem*, 52 (6), 821-831 (2004).
- Taneja N, Tjalkens R, Philbert MA, Rehemtulla A. Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system. *Oncogene*, 20 (2), 167-77 (2001).
- Tang W., Zhenzhen Z., Hongmei Y., Zheng Z., Papillary serous carcinoma of the cervix mixed with squamous cells: A report of the first case, *Gynecologic Oncology Case Reports* (2013).
- Tao W, Hangoc G, Hawes JW, Si Y, Cooper S, et al. Profiling of differentially expressed apoptosis-related genes by cDNA arrays in human cord blood CD34(+) cells treated with etoposide, *Exp Hematol*, 31, 251-260 (2003).
- Tracey A., Martin L. Y., Sanders A. J., Lane J., Jiang W. G., Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective, *Madame Curie Bioscience Database* (2013).
- Tuncer M.A., Türkiye’de Kanser Kontrolü, Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Kanserle Savas Dairesi, Ankara (2009).

Tunç İ., Zergeroğlu S., Daylan B.H., Aydoğdu T., Mollamahmutoğlu L., Serviks Kanserlerinde BCL-2 ve BAX Protein Expresyonlar ve Prognostik Faktörlerle Korelasyonu, Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi, 7 (4), 140-148 (2004).

Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family of proteins in apoptosis, apoptosomes or mitochondria?, Genes Cell, 3, 697-707 (1998).

Yamagishi N., Ishihara K., Saito Y., Hatayama T., Hsp105 family proteins suppress staurosporine-induced apoptosis by inhibiting the translocation of Bax to mitochondria in HeLa cells, Experimental Cell Research, 312, 3215-3223 (2006).

Yokus, B., Çakır, D.Ü., Kanser Biyokimyası, Dicle Üniv Vet Fak Derg, 1(2), 7-18 (2012).

Yuan J., Shaham S.S., Ledoux S., Ellis H.M., Horvitz H.R., The C. elegans Cell Death Gene *ted-3* Encodes a Protein Similar to Mammalian Interleukin-1 p- Converting Enzyme, Cell, 75, 641-652 (1993).

Vogel A., Anthraquinone, Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bayer AG, Leverkusen, Federal Republic of Germany (2000).

Wang J., Beauchemin M., Bertrand R., Bcl-xL phosphorylation at Ser49 by polo kinase 3 during cell cycle progression and checkpoints, Cellular Signalling, 23, 2030-2038 (2011).

Williams G.M., Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment., Toxicology; 14, 3-10 (2001).

Wu J., Liu F. L., Processing of topoisomerase I cleavable complexes into DNA damage by transcription, Oxford University Press Nucleic Acids Research, 25, 4181-4186 (1997).

Xu Y., Ge R., Du J., Xin H., Yi T., Sheng J., Corosolic acid induces apoptosis through mitochondrial pathway and caspases activation in human cervix adenocarcinoma HeLa cells, Cancer Letters, 284, 229-237 (2009).

Zhang S., Liu X., Bawa-Khalfe T., Lu L. S., Lyu Y. L., Liu L. F., Yeh E. T., Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity, Nature Medicine, 18, 1639 (2012)