

Özgün Heterosiklik Bileşiklerin Kanser Dizin Hücrelerinde Apoptotik Faktörler Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması

Doç. Dr. Funda KOSOVA
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

- Meme kanseri dünyada en yaygın kanser ölümleri arasında yer almaktadır.
- Kadınlarda birinci sırada en yaygın rastlanan kanser türüdür.
- Son on yılda bu hastaların tanı ve tedavilerinde çok büyük ilerlemeler olmuştur.

- Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucu ortaya çıkan, kimi zaman ölüme varabilen sonuçlar doğuran ve son yıllarda yaygın bir şekilde görülen hastalık çeşididir.
- Bazı kanser türleri ilaç tedavilerine oldukça dirençlidir.

- Onkogenlerin ve daha birçok genin anormal olarak davranmaları halinde tümör aktivitesi ortaya çıkmaktadır.
- Bu genler, hücre proliferasyonunu, invazyonunu, anjiyogenezi kontrol etmektedir

- Kanser, kan damarları ve lenfatik sisteme nüfuz ederek yayılır.
- Programlanmış hücre ölümü olan apoptozis, canlının otonom mekanizması tarafından ayarlanan; zararlı, yaşlanmış ve istenmeyen hücrelerinin enerji (ATP) kullanımı ile öldürülme sürecidir.

- Çoğu kanser türünde apoptozisin azalmış bulunması karakteristik bir bulgudur.
- Tümör hücre popülasyonunda apoptotik hücreler ve kanser hücreleri sıklıkla bir arada bulunurlar.

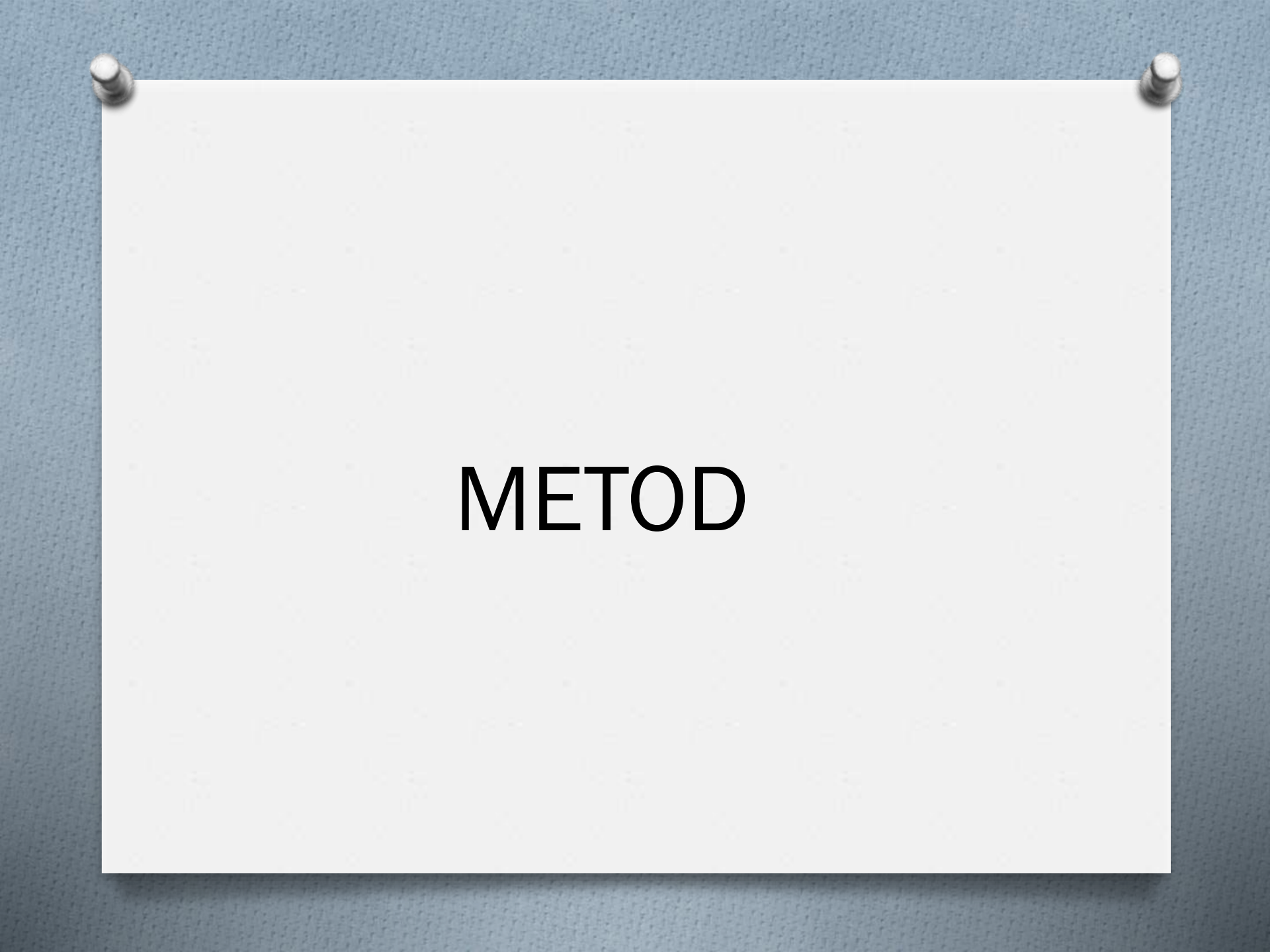
- NF- κ B ise, kanserde anjiyogenez ve apoptozisin oluşum mekanizmalarında önemli rolü olduğu düşünölen bir proteindir.
- Aynı zamanda, bazı heterosiklik bileşiklerin anjiyogenez ve apoptozis üzerinde, sırasıyla, inhıbe ve aktive edici etkilerinin olduğu görölmektedir.

- ◊ Daha önce, heterosiklik yapıda bazı Benzoksazol türevi bileşiklerin antikanser etkinlikleri gösterilmiştir.

- o Bu projemizde, Benzoksazol türevi bazı bileşikler sentez edilerek ve MTT testi ile tarama yapılarak antikanser potansiyeli olanlar ayrıldı.

- Daha sonra, bu potansiyel bileşiklerin farklı meme kanser hücre hattında, NF- κ B, ve apoptozis (APAF-1, sitokrom C, kaspaz-3, bcl-2) ile ilgili proteinler üzerine etkileri western blot yöntemiyle incelenecektir.

o Bu alışmamız Tubitak tarafından desteklendi.



METOD

- Sentez çalışmaları, daha önce bu konuda benzer deneyimleri olan, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim dalındaki araştırmacılar tarafından gerçekleştirilmiştir.

o Sentezlenen Bileşiklerin Yapılarının Aydınlatılması:

- ✓ Sentezlenecek bileşikler uygun çözücülerle kristallendirildikten sonra,
- ✓ İnce tabaka kromatografisi ile saflık kontrolleri yapıldı,
- ✓ Erime dereceleri tayin edildi.

o Daha sonra bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında

- ✓ Infrared (IR),
- ✓ UV Spektrofotometresi,
- ✓ Nükleer Magnetik Rezonans (NMR)
- ✓ Kütle (Mass) spektrumları ile Elemental analizinden yararlanıldı.

- Hücre kültürü çalışmaları, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hücre Kültürü laboratuvarında, bu konuda deneyimli araştırmacılar tarafından gerçekleştirilmiştir.
- Bu çalışmada kullanılacak olan meme kanseri hücre dizileri (MCF-7, MDA-MB) kullanıldı.

- Hücrelerin üremesi her 2 günde bir morfolojik olarak faz kontrast ataçmanlı inverted mikroskopta (CK40-F200, Olympus, Japonya) incelenerek, mikrofotografi ile görüntülendi.
- Konfluent olan hücrelerden pasaj yapılarak hücrelerin çoğaltılması sağlanmıştır.

Heterosiklik bileşiklerin uygulamaları

- Heterosiklik bileşiklerin 50 μ l DMSO ile sulandırılıp çözelti 950 μ l besiyeri ile 1 ml'ye tamamlanarak stok solüsyonu hazırladık.
- Daha sonra hazırlanan bu stok solüsyondan 100, 50, 25, 12.5, 6.25 μ l farklı dozlarda heterosiklik bileşikler tedavi amacıyla kanser hücre dizilerine uyguladık.

Hücre Canlılığı ve Çoğalma Deneyi:

- o MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
- o Bu hücrelerin mitokondrial fonksiyonları, dolayısıyla canlı hücre yoğunluğu kolorimetrik bir test yöntemi olan MTT testi ile belirlendi.
- o Bu test, sarı, suda çözünebilen MTT boyasının aktif mitokondrilerdeki elektron akımı yoluyla mor formazan ürünlerine dönüşmesini ölçmektedir.

İmmunohistokimya

- Hücreler PBS'de hazırlanmış %4'lük paraformaldehid solüsyonu (pH 7,4) ile fikse edildikten sonra 3 defa 5'er dk PBS ile yıkadık.
- Daha sonra bu hücreler çeşitli işlemlerden geçtikten sonra boyama işlemini yaptık
- Distile su ile yıkama işleminden sonra kapatma solusyonu (00-8030, Histomount mounting solution, Sanfransisco, ABD) ile kapatılarak mikroskopta görüntüledik.

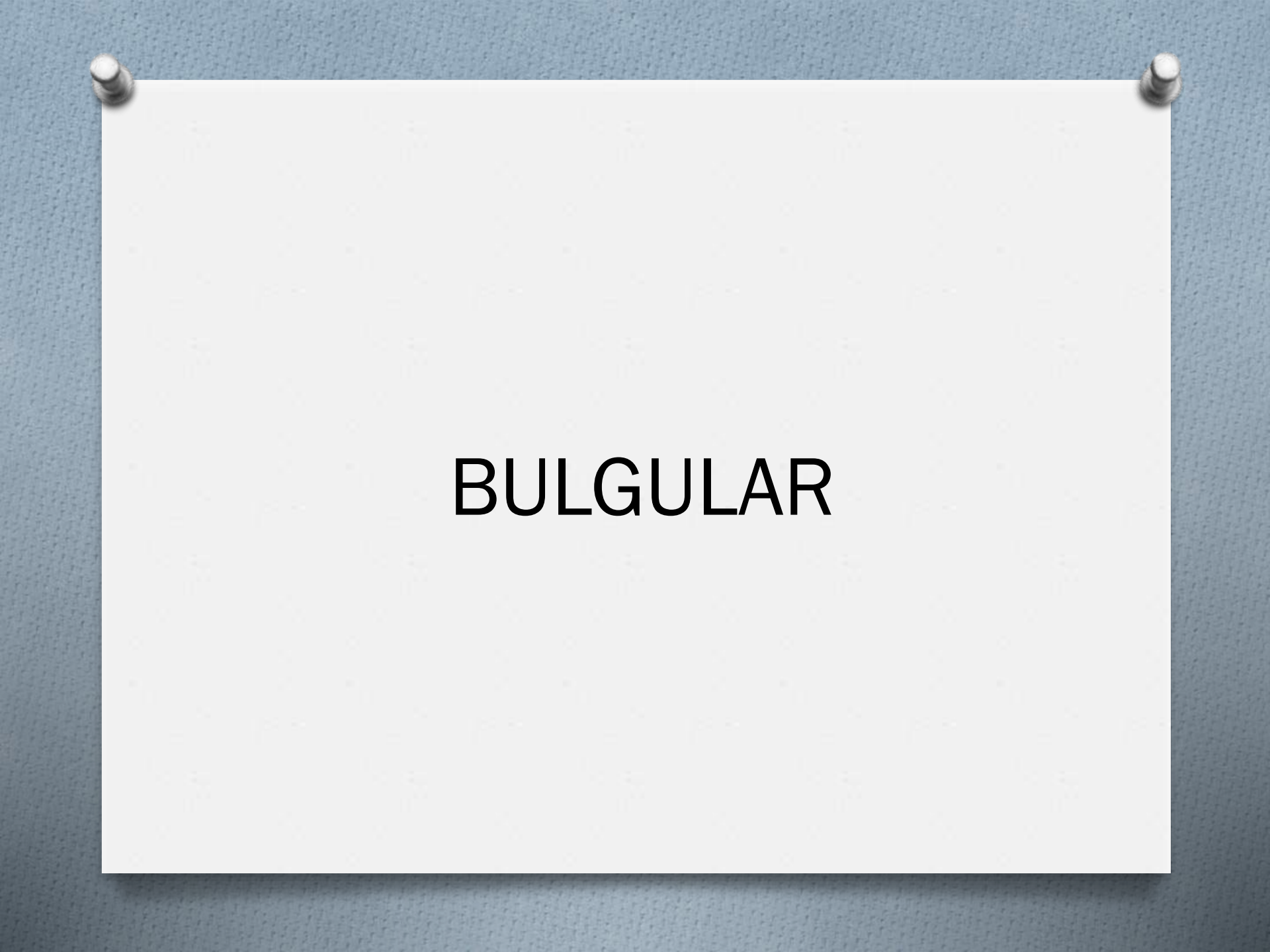
- WESTERN-BLOT alışmaları, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakóltesi Biyokimya laboratuvarında, bu konuda deneyimli araştırıcılar tarafından gerçekleştirildi.

Apoptozis yolağındaki proteinlerin seviyeleri: Western Blot Yöntemi

- o Hücre protein izolasyon kiti kullanarak proteinleri ayırdık
- o Daha sonra QUBİT FLUOROMETER ile protein miktar tayini yaptık.
- o Protein miktar tayini yapılmış olan proteinleri SURELOCK XCELL DİKEY JEL sistemini kullanarak elektroforezi yapmak için jele numuneleri uyguladık.
- o Bu jeli tankın içine koyup 50 dak bekleterek bantların yürümesini sağladık.
- o Daha sonra bu bantları IBLOT DRY BLOTTING sistemi ile WESTERN-BLOTLAMA cihazına uyguluyarak 7 dakika içinde görüntülemeyi yaptık

İstatiksel Yöntem

- Deneylerden elde edilen verileri değerlendirmede SPSS 15.0 istatistik programı kullanıldı. Gruplar arası farkın anlamlılığı Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi.



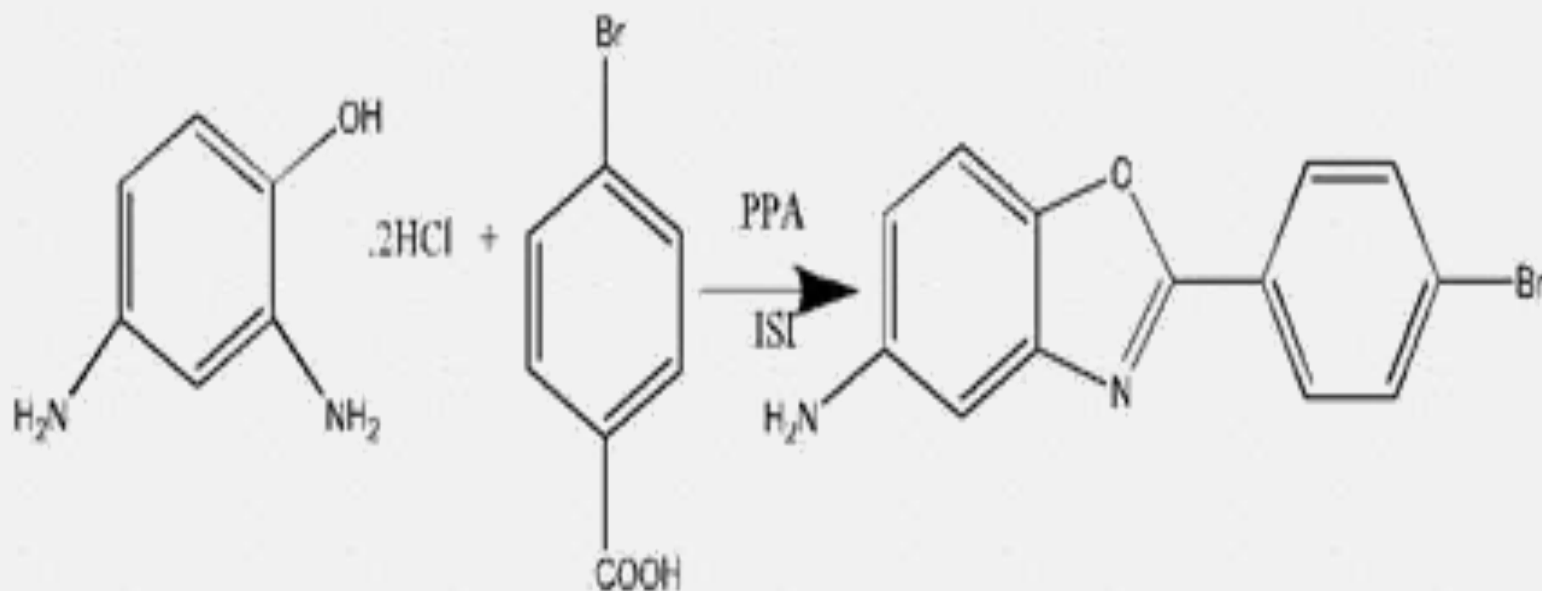
BULGULAR

- o Bu projede, yaklaşık 20 kadar Benzoksazol türevi heterosiklik (BTHB) bileşik sentezledik.
- o Ve bu bileşiklerin saflık kontrolleri için ince tabaka kromatografisi ve erime derecelerine baktık.

- o Benzoksazol türevi heterosiklik (BTHB) bileşiklere MTT testi uyguladık ve bu testle hücrelerin mitokondrial fonksiyonları, dolayısıyla canlı hücre yoğunluğunu kolorimetrik olarak belirledik.
- o Bunlardan yaşama yönünden antikanser potansiyeli olanlar ayrıldı.
- o Daha sonra kalan gruba VEGF, eNOS ve TUNEL yapıldı.

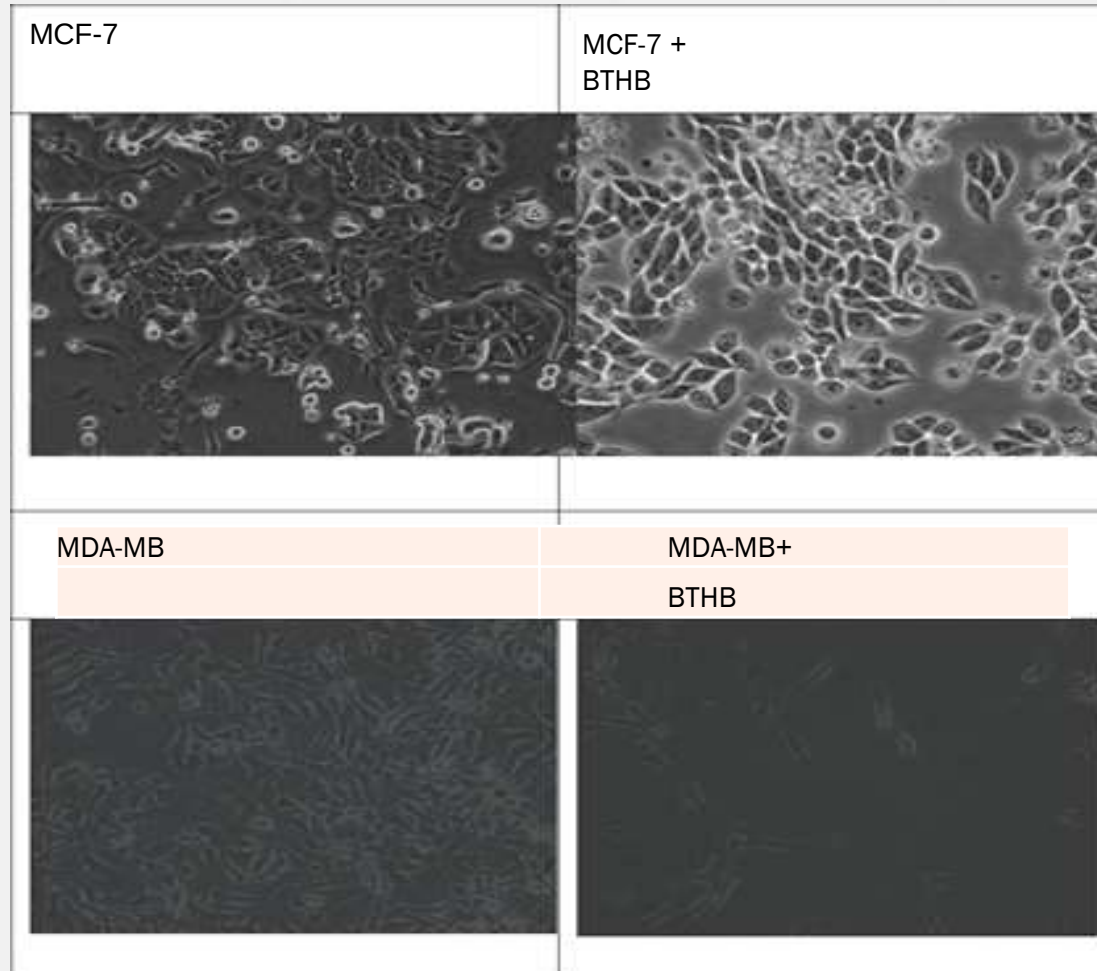
- o Burada IC50 dozuna en uygun cevabı veren türev seçildi.
- o Daha sonra, bioaktivite açısından en uygun olan bileşiğin farklı meme kanser hücre hattında, NF- κ B, ve apoptozis (APAF-1, sitokrom C, kaspaz-3, bcl-2) ile ilgili proteinler üzerine etkilerini western blot yöntemiyle inceledik.

5-AMİNO-2-(P-BROMOFENİL-) BENZOKSAZOLÜN SENTEZ ŞEMASI

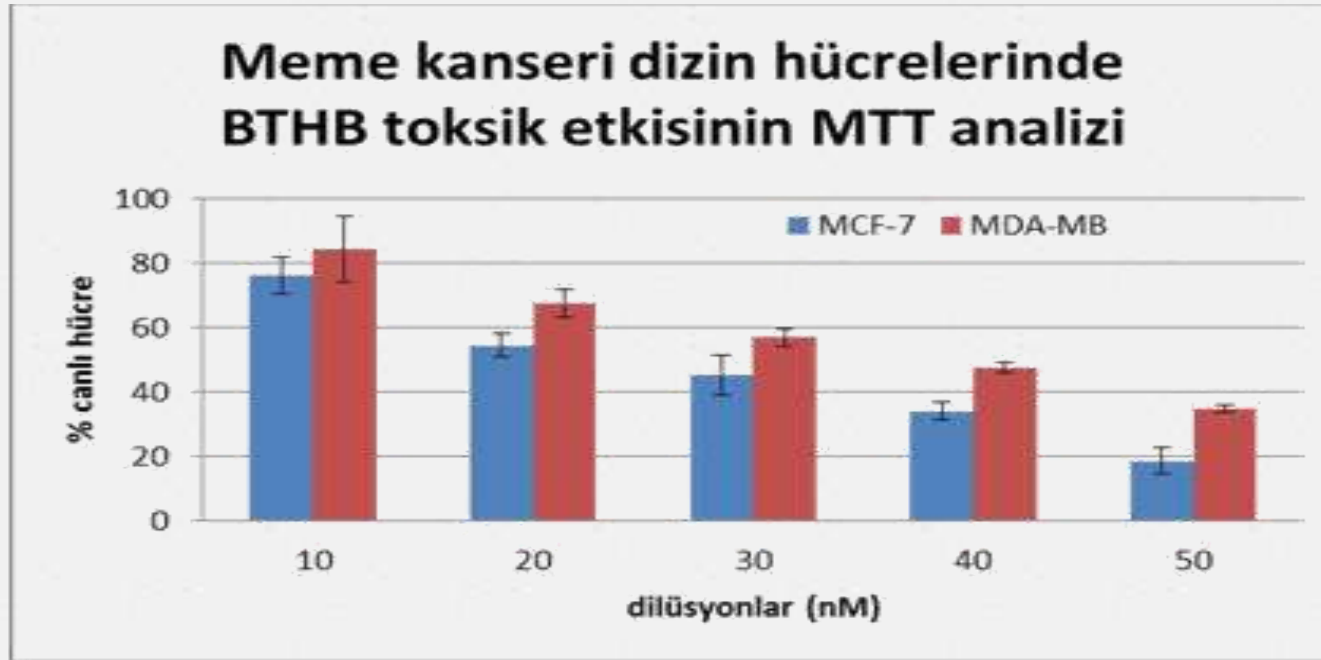


- MTT ile yapılan analizde doz dilüsyona bağlı toksik etkinin var olduğu görüldü.
- Hücrelerin morfolojik incelemesinde MCF-7 hücrelerinin daha bipolar yapıda iken MDA-MB hücrelerinin daha adeziv ve epiteloid oldukları görüldü.
- MDA-MB hücrelerinin BTHB toksik etkisine daha dirençli olduğu saptandı (Tablo 1). IC50 düzeyleri olarak MCF-7 için 28 nM iken MDA- MB için 22 nM olarak saptandı.

BTHB toksik etkisinin ÖR+ MCF-7 ile ÖR+ MDA-MB hücreleri üzerine etkilerinin faz kontrast görüntüleri. X 200

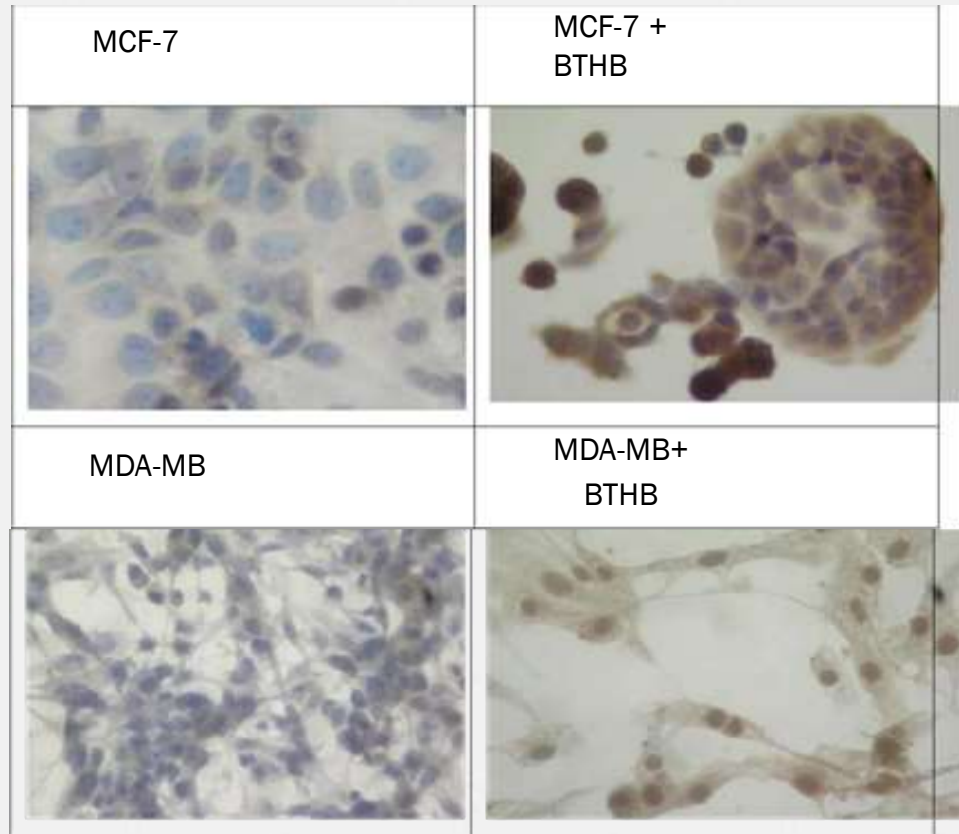


BTHB toksik etkisinin ÖR+ MCF-7 ile ÖR+ MDA-MB hücreleri üzerine etkilerinin formazon oluşumu reaksiyonuna dayanan MTT analizi incelenmesinde absorbans değerlerinin canlı hücre yüzdesi

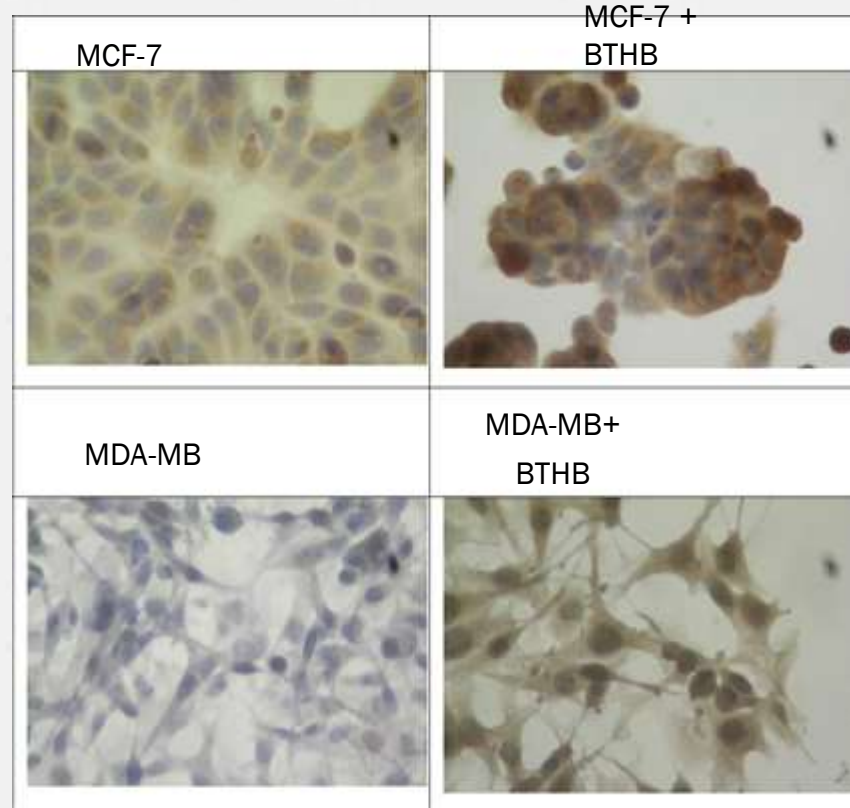


- Hücrelerin IC50 dozunda yapılan incelemelerinde VEGF (Resim 2), eNOS (Resim 3) ve TUNEL (Resim 4) boyamalarında kontrol olarak kullanılan PBS ile karşılaştırıldığında özgün boyamalar gösterdikleri izlendi (Resim 2). VEGF boyamasında azalma saptanırken, eNOS ve TUNEL boyamasında BTHB uygulaması ile artma görüldü (Tablo 2).

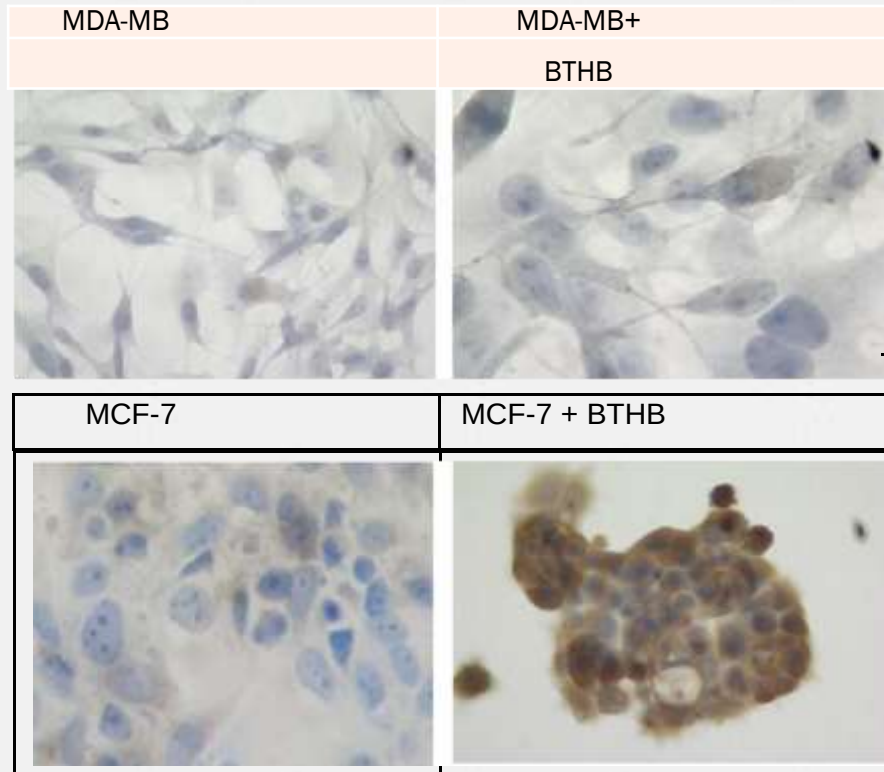
BTHB toksik etkisinin ÖR+ MCF-7 ile ÖR+ MDA-MB hücreleri üzerine etkilerinin VEGF immünboyamasının görüntüleri. X 200



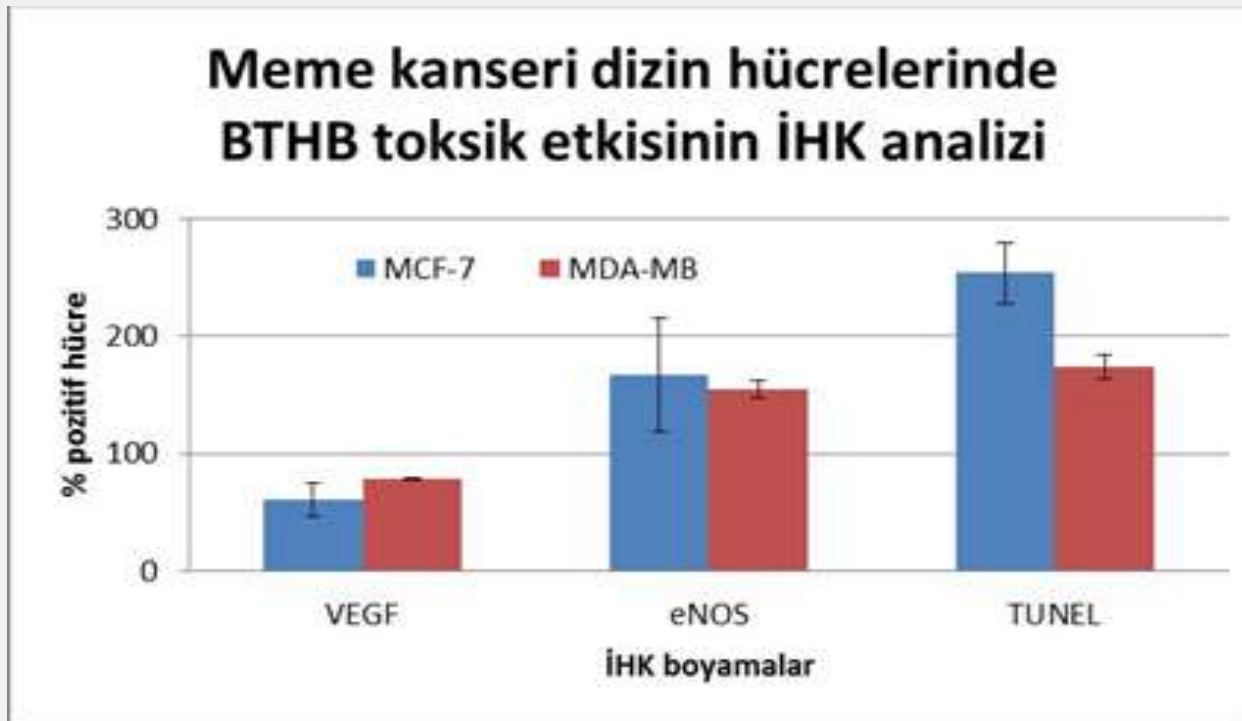
BTHB toksik etkisinin ÖR+ MCF-7 ile ÖR+ MDA-MB hücreleri üzerine etkilerinin eNOS immünboyamasının görüntüleri. X 200



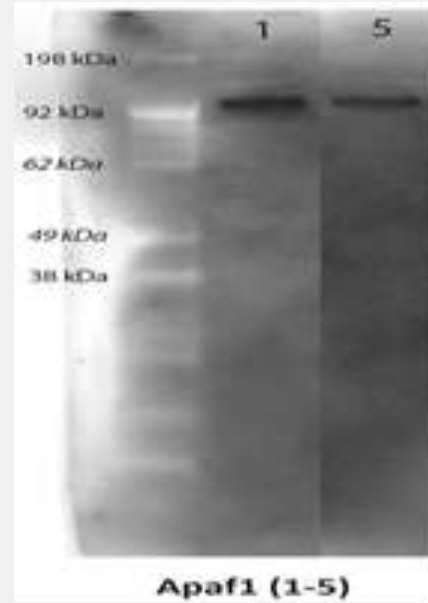
BTHB toksik etkisinin ÖR+ MCF-7 ile ÖR+ MDA-MB hücreleri üzerine etkilerinin TUNEL immünboyamasının görüntüleri. X 200



BTHB toksik etkisinin ÖR+ MCF-7 ile ÖR+ MDA-MB hücreleri üzerine etkilerinin skorlama yöntemi ile İHK boyamalarında karşılaştırılmaları

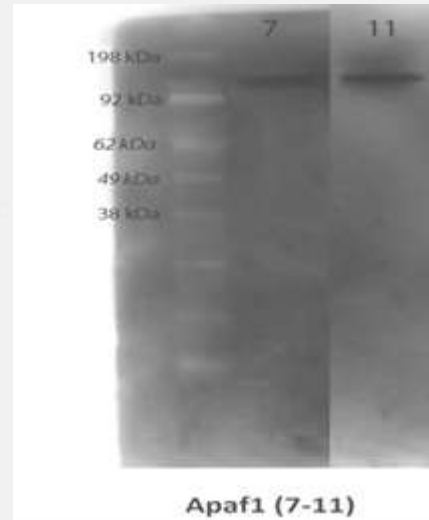


Kontrol grubu(MDA) ile heterosiklik bileşiklerinin Apaf-1 etkisi



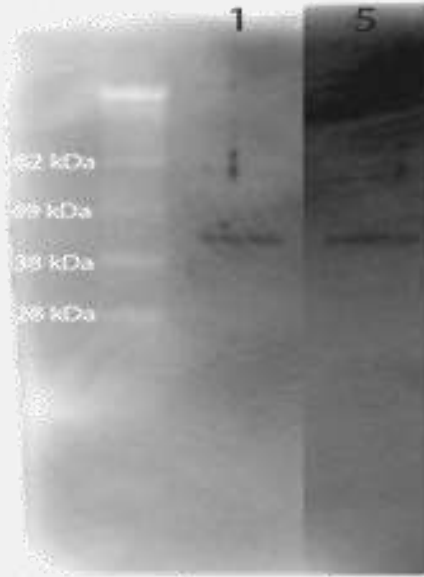
MDA hücre heterosiklik bileşiklerin ilave edildiğinde Apaf-1 seviyesinin kontrol grubu ile benzer olduğunu gördük

Kontrol grubu(MCF-7) ile heterosiklik bileşiklerinin Apaf-1 etkisi



MCF-7 hücre heterosiklik bileşiklerin ilave edildiğinde Apaf-1 seviyesinin kontrol grubu ile benzer olduğunu gördük

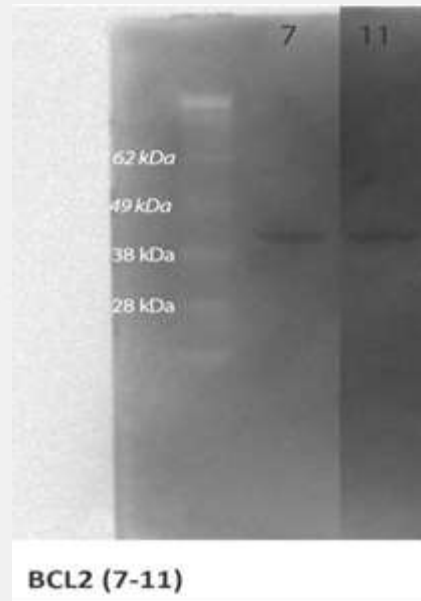
Kontrol grubu(MDA) ile heterosiklik bileşiklerinin BCL-2 etkisi



BCL2 (1-5)

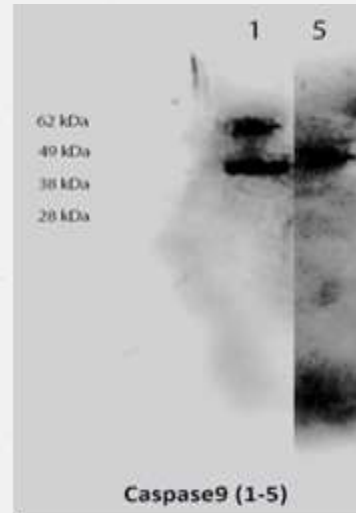
MDA hücre heterosiklik bileşiklerin ilave edildiğinde BCL-2 seviyesinin kontrol grubu ile benzer olduğunu gördük

Kontrol grubu(MCF-7) ile heterosiklik bileşiklerinin BCL-2 etkisi



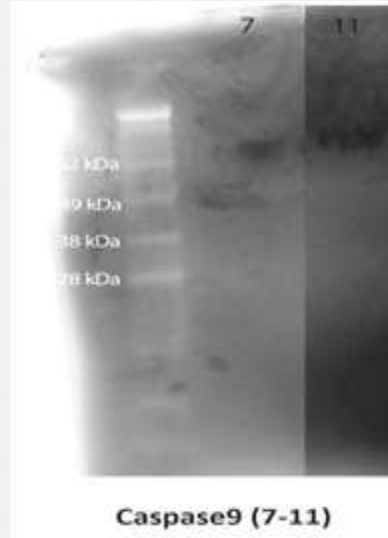
MCF-7 hücre heterosiklik bileşiklerin ilave edildiğinde BCL-2 seviyesinin kontrol grubu ile benzer olduğunu gördük

Kontrol grubu(MDA) ile heterosiklik bileşiklerinin Kaspaz etkisi



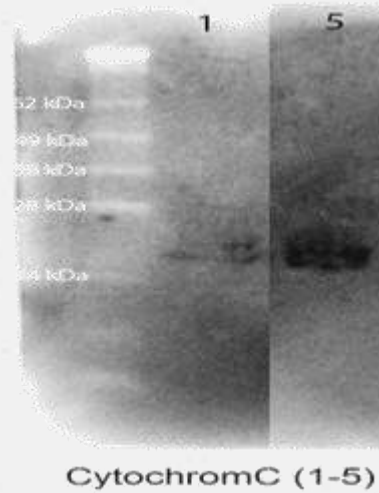
MDA-MB hücre dizilerine heterosiklik bileşiklerin ilave edildiğinde Kaspaz seviyesinin kontrol grubuna göre azaldığını gördük

Kontrol grubu(MCF-7) ile heterosiklik bileşiklerinin Kaspaz etkisi



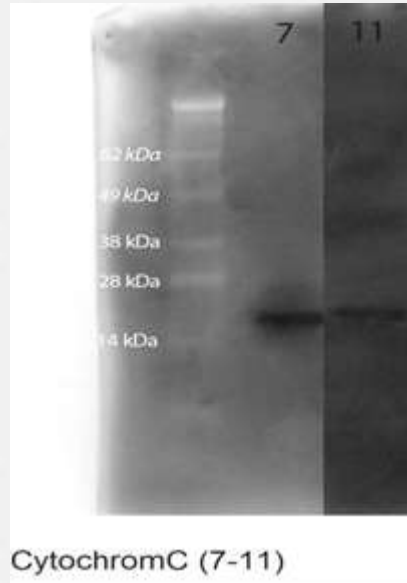
MCF-7 hücre dizilerine heterosiklik bileşiklerin ilave edildiğinde kaspaz seviyesinin kontrol grubuna göre azaldığını gördük

Kontrol grubu (MDA) ile heterosiklik bileşiklerinin Sitokrom-C etkisi



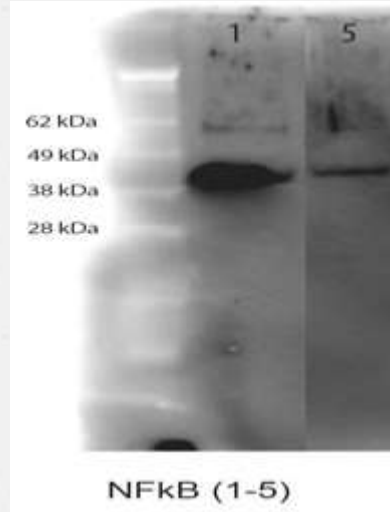
MDA-MB hücre dizilerine heterosiklik bileşiklerin ilave edildiğinde Sitokrom-c seviyesinde kontrol grubuna göre artış olduğunu gördük

Kontrol grubu(MCF-7) ile heterosiklik bileşiklerinin Sitokrom-c etkisi



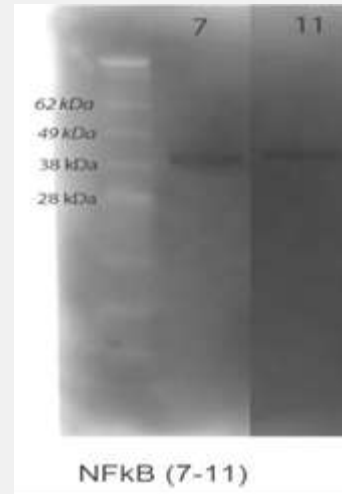
MCF-7 hücre dizilerine heterosiklik bileşiklerin ilave edildiğinde Sitokrom-c seviyesinde kontrol grubuna göre benzer olduğunu gördük

Kontrol grubu(MDA) ile heterosiklik bileşiklerinin Nfk β etkisi



MDA-MB hücre dizilerine heterosiklik bileşiklerin ilave edildiğinde Nfk β seviyesinde kontrol grubuna göre azaldığını gördük

Kontrol grubu(MCF-7) ile heterosiklik bileşiklerinin Nfk β etkisi



MCF-7 hücre dizilerine heterosiklik bileşiklerin ilave edildiğinde Nfk β seviyesinde kontrol grubuna göre azaldığını gördük



TARTIŞMA

- o İlk olarak 1958 yılında, benzoksazol halkasının antitümoral etkiye sahip olduğu saptanmıştır
- o Bu bilgiler ışığında bu çalışmada, farklı mekanizmalar üzerinden antitümoral aktivite gösterebileceği saptanmış benzoksazol halkasını ana yapı olarak taşıyan bazı türevler sentez edilerek ilk kez bu çalışmada antitümoral etkinliklerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

- o Kerr ve arkadaşları, 1970'lerin başında apoptozisin, potansiyel kanser hücrelerinin ve tümör gelişiminin ortadan kaldırılması ile ilişki olduğunu tespit etmişlerdir (Kerr,1972).
- o Adams ve Cory'nin yaptıkları çalışma, apoptozisin düzensizliği ile kanser patogenezi arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu göstermektedir (Adams,2007).
- o Takayama ve arkadaşlarının çalışması, tümör hücrelerinde aşırı proliferasyon ve apoptotik hücre ölümünden kaçış söz konusu olduğunu göstermektedir (Takayama,2003).

- o BTHB uygulamasının MCF-7 ile MDA-MB hücreleri üzerinde toksik etkileri MTT ile çalışılarak kanser tedavi amaçlı çoğalmayı durdurucu ve canlılığı azaltıcı etkileri incelendi.
- o MDA-MB ile karşılaştırıldığında MCF-7 hücrelerine daha toksik etkisi olduğu ve IC50 düzeylerinin daha düşük olduğu izlendi.

- o Yapılan protein immunohistokimyasında VEGF, eNOS ve TUNEL açısından incelemelerde VEGF için azalma ile eNOS ve TUNEL için artmanın sağlandığı görülmüştür. (MCF-7)
- o BTHB uygulamasının bir diğer etkisi hücre ölümü üzerine oldu. Direk toksik etkinin getirdiği dilüsyonel etki IC50 düzeyinde yerini hücre ölüm düzeneklerinde apoptoza bıraktı.

- BTHB kullanımının bazal düzeyde var olan oksidatif stresi arttırdığı ve ortamı serbest radikaller açısından zenginleştirdiği immunohistokimyasal boyamalarla gösterildi.

- o Çalışmamızda proteinlerin western blot ile tayininde ise, MDA ve MCF-7 hücre dizilerine heterosiklik bileşiklerin ilave edildiğinde Apaf-1, BCL-2 seviyesinin kontrol grubu arasında fark yokken, kaspase ve Nfk β seviyesinin kontrol grubuna göre azaldığını gördük.
- o MDA-MB hücrelerine heterosiklik bileşikler ilave edildiğinde Cytochrome C seviyesinde kontrol grubuna göre artış gösterirken MCF-7 hücre dizilerinde ise fark olmadığını gördük

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- o Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre Benzoksazol halka sistemi, nükleik asitlerin yapısında yer alan heterosiklik adenin ve guanin bazlarının yapısal benzeridir.
- o Bu da bu grup bileşiklerin farklı yollar üzerinden kemoterapötik etkiyi gösterebileceğini düşündürmektedir.

- o Yeni elde edilen bu heterosiklik bileşğin MDA-MB hücre dizilerinde daha etkili olduğu gördük.
- o Bu heterosiklik bileşğin $\text{Nfk}\beta$ 'nin aktivasyonunu azaltarak apoptozisi artırdığı bu şekilde de kanser tedavilerinde tümörün büyümesini inhibe ederek etkisini gösterdiğini düşünmekteyiz.

- o Bu çalışmanın ileri bir aşaması olarak heterosiklik bileşğin angiogenik yolaktaki proteinler üzerinde nasıl bir etki gösterebileceğini araştırmayı planlamaktayız.
- o Eğer bu çalışmadan da yararlı sonuçlar elde edersek daha sonra bu çalışmanın bir üst aşaması olan hayvan kanser modellerinde de elde ettiğimiz bulguları desteklemek için çalışmalar yapmayı planlamaktayız.

- o Prof.Dr. Özlem Temiz-Arpacı
- o Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ
- o Doç. Dr. Görkem KISMALI
- o Doç. Dr. Feyzan ÖZDAL KURT
- o Prof. Dr . Zeki ARI
- o Prof. Dr. İbrahim TUĞLU



Dinlediđiniz için Teřekkürler