

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İMİN TAŞIYAN FENOKSİ SUBSTİTÜE SİKLOTRİFOSFAZENLERİN
KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Nida Esra CAN AKTAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2013**

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İMİN TAŞIYAN FENOKSİ SUBSTİTÜE SİKLOTRİFOSFAZENLERİN
KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Nida Esra CAN AKTAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2013**

Doç. Dr. Faruk SÜZERGÖZ danışmanlığında, Nida Esra CAN AKTAN' ın hazırladığı “İmin Taşıyan Fenoksi Substitüe Siklotrifosfazenlerin Kansere Hücresel Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması” konulu bu çalışma 12.02.2013 tarihinde aşğıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Faruk SÜZERGÖZ

Üye: Doç. Dr. Çiğdem KÜÇÜK

Üye: Doç. Dr. Fatih ASLAN

Bu Tezin Biyoloji Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım

Prof. Dr. Seyit TEMİR
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 12050

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.1.1. Lösemi	3
2.1.2. Kronik miyeloid lösemi	5
2.2. K562 Hücre Serisi.....	5
2.3. Hücre Kültürü Tarihçesi	7
2.3.1. Hücre kültürü.....	8
2.3.1.1. Primer hücre kültürleri	9
2.3.1.2. Devamlı hücre kültürleri	10
2.3.1.3. Diploid hücre kültürleri	10
2.3.2. Hücre kültürlerinin kullanım alanları	11
2.3.2.1. Hücre kültürlerinin günümüzdeki yaygın kullanım alanları.....	11
2.3.2.2. Hücre kültürlerinin yeni kullanım alanları	11
2.3.3. Hücre kültürlerinin avantajları.....	11
2.3.4. Hücre kültürlerinin dezavantajları	12
2.4. Sitotoksosite.....	13
2.5. Fosfazenler.....	15
2.6. Genel Sitotoksosite Tarama Yöntemleri	17
2.6.1. Tripan mavisi ile boyama	17
2.6.2. Mitokondriyal aktiviteye dayalı mtt testi.....	17
2.6.3. Doksorubisin' in sitotoksik özellikleri.....	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
3.1. Yeni Sentezlenen Siklotriofosfazen Bileşikleri	20
3.2. Kimyasalların Sterilizasyonu	22
3.3. Doksorubisin ve Kimyasalların Doz Ayarlaması.....	22
3.3.1. 96 kuyucuklu kültür plaklarının hazırlanması	22
3.4. Hücre Kültür Ortamının Hazırlanması.....	23
3.4.1. MTT testi	23
3.4.2. Kültür plağı kuyucuklarının görüntülenmesi	24
3.5. İstatistiksel Analizler	24
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	25
4.1. Doksorubisin' in Sitotoksik Etkisi	25
4.2. Bileşik 1' in Sitotoksik Etkisi	27
4.3. Bileşik 2' nin Sitotoksik Etkileri.....	31
4.4. Bileşik 3' ün Sitotoksik Etkileri.....	34
4.5. Bileşik 4' ün Sitotoksik Etkileri.....	37
4.6. Bileşik 5' in Sitotoksik Etkileri.....	40
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR	49

ÖZGEÇMİŞ	54
ÖZET	55
SUMMARY	56

ÖZ

Yüksek Lisans Tezi

İMİN TAŞIYAN FENOKSİ SUBSTİTÜE SİKLOTRİFOSFAZENLERİN KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nida Esra CAN AKTAN

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Faruk SÜZERGÖZ
Yıl: 2013, Sayfa: 56

Günümüzde kanser tedavisinde kullanılmakta olan ve modern tıpta alternatifi olmayan kemoterapi daha uzun yıllar kanser tedavisinde en etkili tedavi yöntemi olacak gibi görünmektedir. Bu çalışmada, yeni sentezlenen imin taşıyan fenoksi substitüe siklotrifosfazenlerin ($[N_3P_3Cl_6]$, $[N_3P_3(O-C_6H_4-o-CHO)_6]$, $[N_3P_3(O-C_6H_4-o-CH=N-o-C_6H_5)_6]$, $[N_3P_3(O-C_6H_4-p-CHO)_6]$ ve $[N_3P_3(O-C_6H_4-p-CH=N-o-C_6H_5)_6]$) kronik myeloid lösemi kökenli K562 hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırması amaçlanmıştır. Bileşiklerin sitotoksik etkileri canlı hücrelerin mitokondrisi aracılığıyla metil tiyazol tetrazolium tuzlarının indirgenmesine dayanan kolorimetrik bir yöntem olan MTT yöntemiyle analiz edilmiştir. Bileşiklerden $N_3P_3(O-C_6H_4-o-CH=N-o-C_6H_5)_6$ K562 hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterirken, diğer bileşiklerin hücre hattı üzerinde anlamlı bir sitotoksik etkisine rastlanmamıştır.

ANAHTAR KELİMELEER: Siklotrifosfazen, sitotoksikite, mtt, k562.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC EFFECTS OF THE IMIN CONTAINING PHENOXY SUBSTITUTED CYCLOTRIOPHOSPAZENES ON CANCER CELLS

Nida Esra CAN AKTAN

Harran University
Institute of Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ

Year: 2013, Page: 56

Chemotherapy, currently using for cancer treatment, has no alternative in modern medicine and it seems that it will continue to be the most effective treatment method in cancer therapy for years. In this study, we aimed to investigate the cytotoxic effects of the newly synthesized imin containing phenoxy substituted cyclophosphasenes ($[N_3P_3Cl_6]$, $[N_3P_3(O-C_6H_4-o-CHO)_6]$, $[N_3P_3(O-C_6H_4-o-CH=N-o-C_6H_5)_6]$, $[N_3P_3(O-C_6H_4-p-CHO)_6]$ ve $[N_3P_3(O-C_6H_4-p-CH=N-o-C_6H_5)_6]$) on K562 cells derived from chronic myeloid leukemia cell line. Cytotoxicity of the compounds were analyzed by colorimetric MTT assay which is based on reduction of MTT salt by mitochondria of alive cells. While $N_3P_3(O-C_6H_4-o-CH=N-o-C_6H_5)_6$ had cytotoxicity effects on K562 cells, others didn't have any significant cytotoxicity on the cell line.

KEY WORDS: Cyclophosphasenes, cytotoxicity, mtt, k562.

TEŞEKKÜR

Öncelikle akademisyenlik yolunu seçmemde en büyük destekçi ve en büyük yardımcı olan, her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, hayatımda geldiğim tüm noktaları ona borçlu olduğum kıymetlim babam Rifat CAN' a bütün yüreğimle sonsuz teşekkür ederim. O olmasaydı olamazdım, yapamazdım. Bu sebeple tezimi babam Rifat CAN' a atfediyorum.

Eğitimin boyunca ilminden faydalandığım, yanında geçirdiğim her dakika yeni bir şeyler öğrendiğim, gerçek şu ki tüm çalışmamızın asli mimarı, danışman hocam Doç. Dr. Faruk SÜZERGÖZ' e sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmamızda kullandığımız kimyasalları sentezleyip bize temin eden Doç. Dr. Fatih ASLAN' a ve benzer şekilde güler yüzü ve anlayışlı ile bize destek olan Doç. Dr. Veli KASIM Hocama teşekkür etmeyi borç bilirim.

Gittiğim yolda benden önce giderek bana ışık olan çok kıymetli arkadaşım, dostum, Ayfer ÖZÇELİK MERCANDAĞI' na teşekkür ederim.

Başarı ekip işidir. Eğer bugün bir başarı varsa benim değil ekibimin başarısıdır. Bu sebeple Ekip arkadaşlarım, meslektaşlarım olan Fatma TÜMEN, Yusuf VARİS ve Meryem KOYUNCU DOĞAN' a teşekkür etmeyi borç bilirim.

Çalışmamın her aşamasında yanımda olan, tüm tezim sürecinde yaşadığım tüm zorluklara benimle beraber göğüs geren, benden her daim her türlü yardımını ve desteğini esirgemeyen, hayatımın en büyük hazineleri olan annem Ayşegül CAN' a, kardeşim Mesut CAN' a, ablam Nimet CAN' a bütün içtenliğimle teşekkür ederim.

Son olarak sabrı, anlayışı ve hoşgörüsü ile her daim yanımda olan, hayat arkadaşım, mutluluk kaynağım eşim Ali AKTAN' a bütün kalbimle teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. K562 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü.....	6
Şekil 2.2. Çeşitli fosfazen bileşikleri.....	15
Şekil 2.3. Doksorubisin’in moleküler yapısı	16
Şekil 3.1. Bileşik 2	20
Şekil 3.2. Bileşik 3	21
Şekil 3.3. Bileşik 4	21
Şekil 3.4. Bileşik 5	22
Şekil 4.1. MTT sonrası doksorubisinin kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri	25
Şekil 4.2. MTT formazan OD değerlerinin karşılaştırılması.....	26
Şekil 4.3. Bileşik 1’ in kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri	28
Şekil 4.4. Bileşik 1’ in K562 hücreleri MTT Formazan OD Değerlerinin Karşılaştırması	29
Şekil 4.5. Bileşik 1 korelasyon grafiği	30
Şekil 4.6. Bileşik 2’ nin kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri	31
Şekil 4.7. Bileşik 2’ nin K562 hücreleri üzerindeki MTT Formazan OD Değerlerinin	32
Karşılaştırılması	32
Şekil 4.8. Bileşik 2 ile Doksorubisin’in korelasyon grafiği.....	33
Şekil 4.9. Bileşik 3 ‘ün MTT sonrası kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri	34
Şekil 4.10. Bileşik 3’ ün K562 hücreleri üzerine OD değerlerinin karşılaştırılması	35
Şekil 4.11. Bileşik 3’ e ait korelasyon grafiği	36
Şekil 4.12. Bileşik 4’ ün kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri.....	37
Şekil 4.13. Bileşik 4’ ün K562 hücreleri üzerine OD’ nin karşılaştırılması.....	38
Şekil 4.14. Bileşik 4 ile Doksorubisin arasındaki korelasyon grafiği.....	39
Şekil 4.15. Bileşik 5’ in kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri	40
Şekil 4.16. Bileşik 5 ile Doksorubisin’ in OD değerlerinin karşılaştırılması	41
Şekil 4.17. Bileşik 5 ait Korelasyon Grafiği.....	41
Şekil 4.18. Bileşiklerin sitotoksik etki grafiği	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 4.1. Doksorubisin' in K562 hücreleri üzerine % sitotoksik etkileri	27
Çizelge 4.2. Bileşik 1' in K562 hücreleri üzerine % sitotoksik etkileri	30
Çizelge 4.3. Bileşik 2' nin K562 hücreleri üzerine % sitotoksik etkileri	33
Çizelge 4.4. Bileşik 3' ün K562 hücreleri üzerine % sitotoksik etkileri	36
Çizelge 4.5. Bileşik 4' ün K562 hücreleri üzerine % sitotoksik etkileri	39
Çizelge 4.6. Bileşik 5' in K562 hücreleri üzerine % sitotoksik etkileri	42

SİMGELER DİZİNİ

DMSO	Dimetilsülfoksit
DOX	Doksorubisin
FCS	Fetal Calf Serum
KML	Kronik Myeloid Lösemi
ml	Mililitre
mM	Millimolar
MTT	[3-(4,5-Dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue]
OD	Optik Dansite
PBS	Phosphate Buffered Saline

1. GİRİŞ

Kanser köken aldığı dokuya hatta uzağındaki dokulara nüfuz edebilen, tümörleşmiş hücrelerin anormal büyümeleri ile karakterize edilen ve sonuç olarak ölüme bile sebep olabilen bir seri kötü huylu hastalık olarak ele alınabilir (Mathur ve ark., 2006).

Son zamanlarda kanserin etiyojisi, patogenezi ve tedavisindeki umut verici gelişmelere rağmen kanser, halen tüm dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra en önemli mortalite (ölüm) nedenidir. Kanser, ülkemizde de kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır (Yalçın ve ark., 2003).

Kanserin tedavi yöntemleri kemoterapi, radyoterapi ve cerrahidir. Kemoterapi, cerrahi öncesi, sonrası ya da metastaz gelişmiş hastalarda uygulanan tedavi yöntemi olup, kanser tedavisi için büyük önem arz etmektedir. Dolayısıyla kemoterapötik bileşiklere duyulan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır (Pors ve ark., 2005). Bu noktada birçok bilim insanı için yeni kemoterapötik arayışları her geçen gün daha da önem kazanmaktadır (Johnson ve ark., 1997).

Kanser ilaçlarının çoğu, kanser hücrelerinin bölünme fazları üzerine etkilerini gösterirler. Bazı kemoterapi ajanları, bazı spesifik kanser hücreleri üzerine etkiliyken diğer kanser hücrelerinde etkileri daha sınırlı olabilir. Bu nedenle farklı sitotoksik maddelerin, farklı hücrelerdeki etkilerinin tam olarak aydınlatılması oldukça önemlidir.

Çalışmamızda imin taşıyan fenoksi substitüe siklotrifosfazen bileşiklerinin, kronik miyeloid lösemi blastik kriz evresi kökenli K562 hücre dizisine olan sitotoksik etkisini saptamayı hedefledik.

Çalışmamız, yeni sentezlenen siklotrifosfazen bileşiklerinin antikanser ajan adayı olarak araştırılmasında önemli bir adım olacaktır. Antikanser etkisi olabilecek

yeni bir bileşğin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi, antikanser ajan araştırmasında ilk ve öncelikli adımdır.

Bu çalışmadan elde edilecek verilerin diğer ileri düzeyde *in vitro* ve *in vivo* testlerle desteklenmesi ile kanser tedavisi için yeni kemoterapötik ajan olabilecek kimyasal bileşikler tıbbın hizmetine sunulmuş olabilecektir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Kanser

Çevresel veya genetik faktörlerin etkisiyle normal hücrelerde nükleer ya da sitoplazmik onkogenlerin aktifleşmesi, transkripsiyonu düzenleyen sinyal moleküllerin etkilenmesi, tümör supressör genlerinin aktivitesinin baskılanması sonucu hücrelerin kontrol dışı çoğalmasıyla oluşan durum kanser olarak tanımlanmaktadır (Sadiqov, 2001).

Kanser, hematolojik ve solid doku kanserleri olmak üzere iki grup altında incelenmektedir. Hematolojik kanserler de kendi içerisinde lösemi ve malign lenfomalar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Şencan, 2006).

2.1.1. Lösemi

Lösemi, kemik iliği kanseri ve kan kanseri olarak adlandırılmaktadır. 19. yy' da Avrupalı hekimler, beyaz kan hücrelerinin önemli oranda arttığı hastaları gözlemlediklerinde bu hastalığı 'beyaz kan' olarak adlandırmışlardır. Daha sonraları anlamı 'beyaz' olan Yunanca'da 'Leukos' kelimesini, 'kan' anlamına gelen 'haima' kelimesiyle birleştirerek 'leukemia (lösemi)' olarak isimlendirmişlerdir (Reyhani, 2011).

Hücre tiplerine göre lösemiler 'myeloid' ve 'lenfositik' olarak ikiye, ayrıca myeloid ve lenfositik lösemilerin her biri de 'akut' veya 'kronik' olarak kendi aralarında ikiye ayrılmaktadır (Reyhani, 2011).

Bu özelliklerine göre lösemiler dört gruba ayrılmaktadır:

1. Akut Lenfositik (Lenfoblastik) Lösemi (ALL)
2. Akut Myeloid Lösemi (AML)
3. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)
4. Kronik Myeloid Lösemi (KML)

Erişkinlerde en sık görülen tipler AML ve KLL' dir. ALL lösemisinin çocuklarda en yaygın görülen şeklidir (Reyhanî, 2011).

AML ve ALL'de lökositler normal fonksiyon gösterememektedirler. Ayrıca aynı zamanda kanserleşen hücreler kemik iliğinde yeni gelişen normal hücrelere yer bırakmamakta ve bu yüzden de kemik iliğinde yeni oluşan normal hücrelerin sayısında azalmalar görülmektedir. Bu durum aynı zamanda kırmızı kan hücrelerinin azalmasına da yol açmaktadır (Reyhani, 2011).

KML'de hücreler genelde normal hücre fonksiyonu göstermektedir. Alyuvarların sayısı genellikle normalin altındadır ve anemiye neden olabilmektedir. Bununla birlikte birçok akyuvar tipinin ve kan pulcuklarının üretimin devam ettiği gözlenmektedir. Akyuvarların fonksiyonları normale yakın olsa da sayıları yüksektir ve artmaya da devam etmektedir. Hasta tedavi edilmezse bu durum ciddi problemlere yol açabilmektedir. Beyaz hücre sayısı kan akımını yavaşlatacak kadar yükselebilmekte ve şiddetli anemi gelişimine neden olabilmektedir (Reyhani, 2011).

KLL'de lösemik hücrelerden fonksiyonsuz çok sayıda lenfosit gelişebilmektedir. Bu hücreler kemik iliği ve lenf nodlarındaki normal hücrelerin yerlerini alabilmektedirler. Bunun sonucunda lenfositlerin normal çalışma düzeni bozulur hastanın immün sistemi zayıflar. Ayrıca kemik iliğinde oluşan çok sayıda lösemik hücre nötrofil ve trombosit sayılarının düşmesinde de etkili olmaktadır (Reyhanî, 2011).

Sitogenetik çalışmalarda lösemilerin yaklaşık yarısında sık tekrarlayan translokasyonlar, inversiyonlar ve delesyonlar şeklinde kromozom anormalliklerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Etkilenen bölgelerde bulunan genler incelendiğinde hematopoetik sistemin gelişimi ve normal işlevi sırasında kromozom anomalilerin ortaya çıktığı belirlenmiştir (Yakıcıer, 2005).

Lösemilerin moleküler biyolojisi hakkında bugüne kadar yapılmış olan çalışmalar sonucunda şu genel bilgiler elde edilmiştir (Yakıcıer, 2005).

- Somatik dokularda kromozom anomalisi sonucu gen ifadesi kontrol mekanizmalarının bozulması ya da kesilmesiyle özel bir hematopoetik farklılaşma hattının gelişimi lösemiyle sonuçlanabilmektedir.
- Gen düzenlenmesinin kesintiye uğraması ya da bozulmasıyla oluşan lösemi hücrelerinde farklı kromozomlardaki genlerin birleşmesiyle kimerik gen bölgelerinin ortaya çıktığı da tespit edilmiştir. Bu gen bölgelerinin malign dönüşüme neden olabileceği tespit edilmiştir.
- Hücrede normal transkripsiyonu kontrol eden bir genin başka bir genin kontrolüne girmesiyle oluşan anormal gen aktivasyonları gerçekleşebilmektedir.

Bütün bunların sonucunda lenfositlerde kromozomal translokasyonlar meydana gelebilmekte ve gen ifadesinin kontrolü bozulabilmektedir. Ayrıca nokta mutasyonları, gen delesyonları ve epigenetik değişiklikler de löseminin başlaması ya da ilerlemesinde etkili olabilmektedir.

Lösemiler monoklonal karakterdedirler. Translokasyonların bir kısmı, hematopoetik farklılaşmada rol oynayan transkripsiyon faktörlerini etkilemekte ve böylece normal hücrelerin farklılaşma mekanizmaları üzerine olumsuz etkilere neden olmaktadır. Bazı lösemi tipleri, lösemik yönde farklılaşmış kök hücrelerden köken almaktadırlar.

2.1.2. Kronik miyeloid lösemi

KML myeloid, eritroid ve megakaryositik hücrelerinin çoğalmasıyla oluşan bir hastalıktır (Koretzky, 2007). KML kemik iliğinde aşırı çoğalma, periferik kanda olgun miyeloid hücrelerden oluşan yüksek lökosit sayısı ile karakterize edilebilmektedir. Akut lösemide görülen patolojik durumun aksine, KML hücreleri farklılaşma yeteneklerini kaybetmemişlerdir (Haznedaroğlu, 2009).

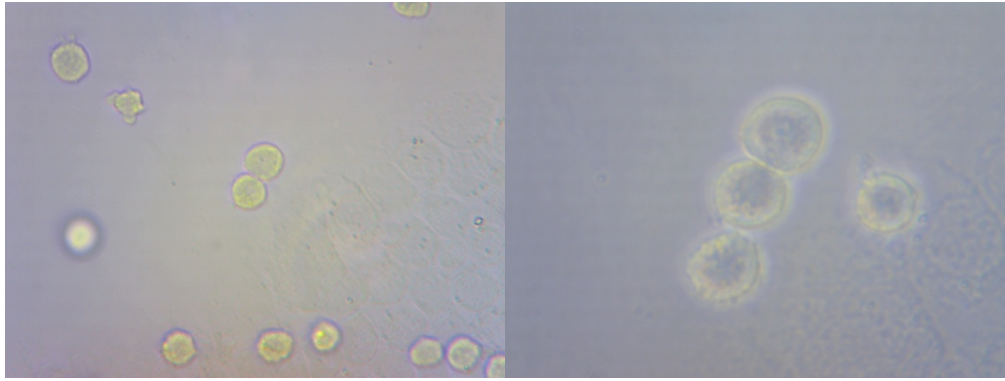
2.2. K562 Hücre Serisi

K562 hücreleri KML' nin blastik kriz evresinden miyeloid kökenli hücre dizisidir (Lozzio ve ark., 1975). Elektron mikroskopunda bakıldığında K562 hücreleri

kolay bağıntılı, düzgün şekilli, kısa mikrovillüslü, farklılaşmış lösemik hücrelere benzer şekilde görülebilmektedir. Giemsa ile hazırlanmış preparatlarda K562 hücreleri yaklaşık 20 µm çapında iki ya da daha fazla parçalı nükleuslu farklılaşmamış blast hücreleri olarak tanımlanabilmektedir. Bazofilik sitoplazmaları granül içermemektedirler (Klein ve ark., 1976; Koeffler ve ark., 1980).

Kültür mediumunda süspansiyon olarak büyüyen K562 hücrelerinin iki kat artma süreleri ortalama 12 saattir (Lowry ve ark., 1951; Singhal ve ark., 1999).

K562 hücrelerinde, normal insan kromozom sayısının yaklaşık 1,5 katı kromozom bulunur. Bundan dolayı bu hücre serisinde abl/bcr füzyon geni ekspresyonu nedeniyle apoptozise karşı dirençlidir (Saydam ve ark., 2003).



Şekil 2.1. K562 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü

(Harran Üniversitesi, Kanser ve Kök Hücre Araştırma Laboratuvarı)

Hematopoetik düzenlemenin anlaşılması için K562 hücrelerinin gen ekspresyonu incelemesi oldukça kullanışlıdır (Koeffler ve ark., 1980).

Normal hücrelerin kültürlerde uzun süre çoğatılması oldukça zordur. Bu nedenle hücre kültüründe kolayca çoğaltılabilen K562 hücrelerinin sitotoksite ve apoptozis çalışmaları için kullanımı yaygındır. Kültürde spontan olarak apoptozise gitmeyen K562 hücrelerinde farklı maddelerle apoptozisi indüklemek başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır (Şencan, 2006).

Kanser ilaçlarının çoğu etkilerini kanser hücresinin proliferasyon ve bölünme fazlarını etkileyerek gösterirler. Bazı kemoterapötik ajanlar bazı spesifik hücrelerde

olumlu sonuç verirken, diğer kanser hücrelerinde etkileri sınırlı olabilmektedir (Oktar, 2009). Bu nedenle farklı sitotoksik maddelerin, farklı hücrelerdeki etkilerinin tam olarak aydınlatılması oldukça önem arz etmektedir.

2.3. Hücre Kültürü Tarihçesi

Hücre kültürü; spontan migrasyon, mekanik veya enzimatik parçalama ile bir dokudan ayrılmış olan hücrelerin üretilmesidir.

Hücre kültürünü tarihçesi 1800' lü yıllara dek uzanmaktadır. İlk olarak 1866 yılında *in vitro* doku kültürü çalışmalarında amfibi kan hücrelerinin 35 gün canlı kalabilmesi başarılmış, ardından Wilhelm Roux 1885 yılında, tavuk embriyosu sinir plaklarının birkaç gün canlı kalabilmesini sağlamış, 1887 yılında Arnold kurbağalara kemik iliği fragmanları implante etmiş, 1898'de Ljungren insan derisini *in vitro* koşullarda bir iki gün yaşatabilmiş ve 1903 yılında Jolly *in vitro* koşullarda hücre canlılığı ve bölünmesi ile ilgili birtakım çalışmalar yaparak semenderden elde ettiği lökositleri bir aydan fazla süreyle canlı tutmayı başarabilmiştir. Bu dönemlerde henüz hücre kültürü mediumlarıyla beraber antibiyotikler kullanılmadığı için, dokuların bu şekilde canlı kalmalarını sağlamak oldukça büyük başarı kabul edilmektedir (Poul, 1970). 1910–1914 yılları arasında temel hücre, doku ve organ kültürlerinde büyük adımlar atılmıştır. Aseptik koşullarda çalışmalar yapılmış ve gerçek anlamda ilk doku kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 1926 yılında çalışmalar hücre üretme mediumları üzerine yoğunlaşmış ve analitik yöntemlerle hücre kültür mediumları hazırlanmıştır. 1952' de insan serviks karsinomasından ilk devamlı hücre kültürü (HeLa) elde edilmiştir. 1955–1960 yılları arasında, hücre kültürü çalışmalarında çok önemli bir adım atılarak günümüzde kullanılan anlamda temel hücre kültürü mediumlarını hazırlanmıştır (Freshney, 1986; Mutlu, 2003). 1960'lı yıllarda hücre füzyonu çalışmaları ile monoklonal antikor üretimine öncülük edilmiş ve Hart'ın (1983) bildirdiğine göre; ilk olarak 1961 yılında Barski ve arkadaşları *in vitro* koşullarda somatik hücre hibridlerini elde etmişlerdir. 1979 yılında Green ve arkadaşları, epidermal hücre kültürleri hazırlamışlardır. 1980' li yıllarda, endotelial hücrelerden kapiller damarların oluşturulmasına çalışılmış ve

1989 yılında, hücre kültürü teknolojisi, homograft yapımında ve rekonstrüktif cerrahide kullanılmaya başlanmıştır (Davis, 1996).

Son 20 yıldır hücre kültürü, yalnızca spesifik araştırmalar için kullanılan bir araç olmaktan çıkarak, dünyanın en hızlı gelişen endüstri alanlarından biri olan biyoteknolojinin temel taşlarından biri haline gelmiştir. Yalnızca akademik araştırmalarda değil, fertilizasyon, yapay organ, medikal ve toksikoloji çalışmalarında hayvanların yerini alması yolunda yeni uygulamalar geliştirilmektedir (Freshney, 1986; Sharp, 1977; Davis, 1996).

2.3.1. Hücre kültürü

Biyolojik özellikleri değerlendirmenin *in vitro* ve *in vivo* olmak üzere iki temel yöntemi bulunmaktadır. *In vitro* deneyler, *in vivo* deneylerin aksine, deney faktörlerinin kontrol edilebilir olması avantajına sahiptirler. Ancak, materyal ve konak doku arasındaki kompleks etkileşimler çalışılmak istendiğinde *in vitro* deneyler yeterli olamamaktadırlar. Doku ve organ kültürü tanımları, doku ve organ parçalarının genel özellik ve normal fonksiyonlarını korumak şartı ile *in vitro* olarak korunmalarını ve kültüre edilmelerini ifade etmektedirler (Sharp, 1977; Freshney, 1986; Davis, 1996).

Hücrelerin, dokudan mekanik yollarla ve bunu takiben de proteolitik enzimlerle muamele edilerek tek hücre veya küçük kümeler halinde ayrıştırılmasına ve bunların bir besiyeri ile cam veya plastik şişelerde doku ile bağlantısı olmadan *in vitro* olarak çoğaltılması hücre kültürü olarak tanımlanabilmektedir (Freshney, 1986).

Hücre ve doku kültürlerinin kullanılması ile son yıllarda moleküler biyoloji ve tıp alanlarında büyük aşamalar sağlanmış, hastalıkların epidemiyolojisi, patogenezi, teşhis ve tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları, hücre metabolizmasının organizmanın ölümünden sonra bir süre daha devam ettiğinin gözlenmesi ile ortaya çıkmıştır (Davis, 1996).

Hücre ve doku kültürü üretmek için kullanılan mediumlarda, hücresel metabolizma faaliyetlerinin devamı ve hücrelerin çoğalması bazı belli maddelerin

varlığı ile sağlanabilmektedir. Hücre bu maddeleri diğer moleküllerden kendi sentezleyememekte ve bu gerekli maddeler ortama ilave edilen mediumlardan sağlanmaktadır. Mediumlar, doğal ve sentetik materyallerin çeşitli kombinasyonlarını kapsamaktadır. Hücre üretme mediumları, hücrenin organlardan ayrılmasından sonra doku tabakası oluşana kadar hücrelerin üretilmesi için kullanılmakta, genel olarak serumla birlikte hücrelerin çabuk üremelerini sağlayan diğer maddeleri içermektedir. Hücrelerin *in vitro* olarak çoğaltılabilmeleri için en uygun ortam, *in vivo* ortamlarına en yakın olan ortamdır. Hücreler günümüzde rutin olarak kültüre edilmektedirler. Medium içerisinde; enerji kaynağı olarak glikoz, plazma ve serum, esansiyel aminoasitler, vitamin, mineraller, şeker, tuz ve antibiyotikler yer almaktadır (Sharp, 1977; Freshney, 1986; Davis, 1996).

Hücre kültürleri; bireysel faktörlerden etkilenmemeleri, materyaller arasında parametrik karşılaştırmalara olanak tanınmaları, tekrarlanabilme özellikleri, çalışma koşullarının standardize edilebilmesi, deneylerde kullanılacak hayvanların öldürülmemesi gibi etik nedenlerden dolayı da tercih edilmektedir (Schmalz, 1997; Browne, 1988; Schmalz, 1994).

Buna karşın, hücre kültürü testleri ile sadece materyallerin ilk toksisite reaksiyonları konusunda bilgi edinilebilmekte, materyalin uzun süreli doku temasında oluşturacağı sitotoksosite düzeyi konusunda ise veri elde edilememektedir (Schmalz, 1994).

Farklı dokulardan üretimi sağlanan hücre kültürleri primer hücre kültürleri, devamlı hücre kültürleri ve diploid hücre kültürleri olmak üzere üç grupta toplanmaktadır.

2.3.1.1. Primer hücre kültürleri

Orjinal dokudan yeni ayrılan ve ilk olarak kültür şartlarında bulunan hücrelerden oluşmaktadır. Dokunun fizyolojik durumunu yansıtan bu hücrelerin genotipi ve fenotipi, orijinal doku hücresi ile aynı özellikleri taşımaktadır. Primer hücre kültürleri ilk pasajdan sonra bir kültür ortamından diğerine taşınmaktadırlar. Bu işleme altkültür adı verilmektedir. Yeni üretilen hücre kültürleri aynı fonksiyonel özelliklere sahip hücre hatlarını oluşturmaktadırlar. Hücre hatları, hücrelerin alındığı dokuların özelliklerine göre değişme şartı ile farklı oranlarda altkültürlere izin vermektedirler. Ancak bu hücrelerin deneysel ortamlarda çoğalmaları sınırlı olmaktadır (Hanks, 1996; Davis, 1996; Spier ve ark., 1985).

Primer hücre kültürleri, üretim aşamalarının zor olmasına, hassas hücreler olmalarına, çalışma esnasında ortaya çıkabilecek sorunlara ve kontrollerinin son derece güç olmasına rağmen orijinal fizyolojik durumu ifade etmeleri nedeniyle değer kazanmışlardır (Browne, 1988; Mjör, 1983).

2.3.1.2. Devamlı hücre kültürleri

Altkültürleri sonsuz olarak yapılabilen ve karyotipleri alındıkları dokulardan farklı olarak geliştirilmiş kültürlerdir. Herhangi bir kültürün, devamlı doku kültürü olabilmesi için en az 70 kere altkültürünün olması gerekmektedir. Hücre dizileri transformasyonları nedeniyle fizyolojik özelliklerini koruyamamaktadırlar (Davis, 1996). Devamlı hücre hatları, standart kültür örnekleri olarak embriyonik veya kanserli dokulardan kodlanmış ve kullanıma sunulmuştur (Spier ve ark., 1985).

2.3.1.3. Diploid hücre kültürleri

Primer kültürlerin altkültürlerinin yapılmasından elde edilmektedirler. Ancak bu kültürlerdeki bütün hücreler, alındıkları dokunun karyotipini % 85 oranında korumaktadırlar. Diploid kültürlerde bazı hücrelerde kromozom tipleri kaybolabilmektedir (Spier ve ark., 1985).

Sitotoksitenin değerlendirilmesinde primer hücrelerin devamlı hücrelere oranla daha etkili oldukları bilinmektedir. Bununla birlikte, primer ve devamlı hücre kültürlerinin sitotoksik maddeye verdikleri metabolik cevaplar arasında bazı farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Devamlı hücre kültürleri genetik ve metabolik olarak stabil olduklarından test sonuçlarının standardizasyonu daha kolaydır (Schmalz, 1994; Feigal ve ark., 1985).

2.3.2. Hücre kültürlerinin kullanım alanları

2.3.2.1. Hücre kültürlerinin günümüzdeki yaygın kullanım alanları

1. Viral aşı üretimi ve viral teşhis amaçlı
2. Monoklonal antikor üretimi
3. İnterferon üretimi
4. Enzim üretimi
5. İnsekt aşı üretimi
6. İnterlökin üretimi
7. Hormon üretimi (İnsülin)
8. Büyüme faktörlerinin üretimi

2.3.2.2. Hücre kültürlerinin yeni kullanım alanları

1. Somatik gen tedavisi
2. Tümör aşıları
3. Canlı hücrelerin graft amaçlı kullanılması
4. Eritrositlerin organizma dışında transfüzyon amacıyla kullanılması
5. Kanser tedavisinde kemik iliğinin kullanılması
6. Parkinson hastalığının tedavisinde beyin hücrelerinin kullanılması
7. Organizma dışında hücre modifikasyonu
8. Kompleks üç boyutlu dokular: Yapay deri, Yapay kıkırdak, Yapay karaciğer, Yapay pankreas (Mutlu, 2003; Poot ve ark., 1992).

2.3.3. Hücre kültürlerinin avantajları

1. Hücre kültürü ortamında fizikokimyasal çevre ve buna bağlı olarak fizyolojik koşullar daha iyi kontrol edilebilmektedir. Sıcaklık, pH, osmotik basınç, oksijen ve karbondioksit kısmi basınçları gibi fizikokimyasal koşullar hücre kültüründe daha kolay sağlanırken, canlı vücudunda sabit bir çevre oluşturarak birtakım testleri yapmak daha zordur.
2. Örneklerin homojenite kontrolü sağlanabilmektedir. Doku örnekleri çoğunlukla heterojendir. Ancak birkaç pasaj sonra kültüre edilmiş hücreler homojen hale gelmektedirler. Hücrelerin homojenitesi, elde edilen ürünlerin homojenitesi açısından son derece önemlidir. Bunun sağlanmasının bir diğer yolu da örnek alınan bireylerin homojenitesi ve çalışmaların aynı koşullarda yapılmasıdır.
3. Hücre kültürleri *in vivo* çalışmalara göre daha ekonomiktir.
4. *In vivo* sistemlerde test için canlı organizmaya verilen maddelerin bir kısmı çeşitli yollarla dışarıya atılacak, bir kısmı da organizmanın bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılacaktır. Bu koşullarda canlı bir organizmada verilen maddenin ancak % 10' una cevap alınabilirken, hücre kültürlerinde bu oran % 90' lara çıkabilmektedir.

Hücre kültürleri ürün elde edilmesinde endüstriyel amaçlı olarak kullanılabilir. Son yıllarda geliştirilen teknikler ile endüstriyel kullanım daha kolay hale getirilmiştir (Özdemir, 2007; Freshney, 1986).

2.3.4. Hücre kültürlerinin dezavantajları

1. Primer kültür ile başladığında, birbirini izleyen pasajlarda hücreler farklılaşmakta ve her zaman bir miktar ölüm gerçekleşmektedir. Yani hücre kültürlerinde zamana bağlı bir kararsızlık söz konusudur.

2. Hücre kültürlerinde hijyen çok önemli olduğundan primer kültürlerin elde edildiği doku ve bunların bulunduğu koşullar hücre kültürlerini etkilemektedir.
3. Deneyim çok önemli bir faktördür. *In vitro* çalışmalarda sterilizasyon, kültürlerin hazırlanması ve mikroskopik inceleme uzmanlık gerektirmektedir.
4. Hücre kültürleri, *in vivo* yöntemlere oranla daha ekonomik olmasına karşın kullanılan hücre üretme mediumları ve diğer malzemeler son derece pahalıdır. Buna rağmen elde edilen ürünün saf olması önemli bir avantajdır.

Ancak son yıllarda bu teknolojinin gelişmesi, kullanılan malzemelerin geliştirilmesine ve giderek daha da ucuzlamasına olanak tanımaktadır (Özdemir, 2007; Sharp, 1977; Freshney, 1986; Davis, 1996).

2.4. Sitotoksiste

Geçmişten bugüne hücre kültürü çalışmalarında hücre canlılığını ve çoğalmasını belirlemek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en kullanışlı olanları 96 kuyucuklu plaklarının kullanıldığı modern deneylerdir.

Sitotoksiste deneyleri değişik parametreleri kullanarak hücre ölümünü ve çoğalmasını belirler (Weyermann ve ark., 2005). Sitotoksik etki, hücre yapısı ya da fonksiyonunda hasar oluşturan kimyasal bileşiğin sıklıkla bölünmekte olan hücreleri selektif olarak ortadan kaldırmak için kullanılan antikanser ilaçları tanımlamak için de kullanılmaktadır. Ne tüm antikanserler sitotoksiktir, ne de tüm sitotoksik bileşikler kanser tedavisinde kullanılmaktadır.

Sitotoksiste çalışmaları kimyasalların hücreler ve dokular üzerindeki aktivasyon mekanizmasının anlaşılmasında önemli bir faktördür. Sitotoksiste çalışmaları karsinogenesis ve inflamasyonun da içinde bulunduğu patolojik proseslerin anlaşılmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Aynı zamanda

serbest radikaller, irritantlar ve genotoksinlerinde içinde bulunduğu diğer ajanların aktivitelerinin belirlenmesinde de kullanılmakta olan etkili bir yöntemdir (Putnam ve ark., 2002).

Ayrıca sitotoksosite deneyleriyle balık hücre hatlarını kullanarak farklı ağır metallerin ve organik fosin bileşiklerinin de içinde bulunduğu birçok çevresel kimyasalın sitotoksik etkisi de belirlenebilmektedir (Fent, 2001).

Sitotoksitenin *in vitro* testler ile ölçülmesinin birçok faydası bulunmaktadır. Bunlardan biri, toksisite testleri için kullanılan hayvan sayısının en aza indirilmesidir. *In vitro* testlerin bir diğer avantajı hücre ya da organın toksik etkiye karşı mekanizmasının belirlenebilmesidir. Yeni ürünlerin toksisitesinin *in vitro* yöntemlerle üretimin erken evrelerinde belirlenebilmesi ile harcanan paradan, zamandan ve deney hayvanlarından kazanç sağlanabilmektedir (Putnam ve ark., 2002).

In vitro sitotoksosite testleri hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, membran bütünlüğü, DNA sentezi ya da hücrel metabolizma gibi çeşitli parametrelerin ölçülmesiyle birlikte temel hücre toksisitesini de belirlemede yardımcı olmaktadır. Bu parametreleri ölçen çeşitli sitotoksosite deneyleri vardır. En çok kullanılan yöntemler neqtral red uptake deneyi (hücre canlılığı için), Lowry Coomassie Blue ve Kenacid blue deneyleri (toplam hücre proteini ve hücre proliferasyonunu belirlemek için), MTT (mitokondriyal aktivite ve hücrel metabolizmayı belirlemek için) ve intraselüler laktat dehidrogenaz (LDH) aktivite testleridir (Gad, 2000).

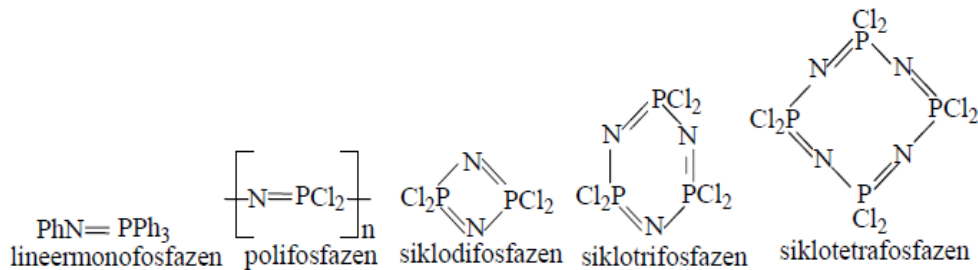
Kimyasalların sitotoksitesi hücre ölümünün, canlılığının, hücre yapısının, morfolojisinin, enerji metabolizmasının ve hücre çoğalmasının ölçülmesi gibi çeşitli farklı yöntemlerle belirlenebilmektedir. Bir bileşiğin sitotoksik etkisi test edilirken hücrelerin genel mekanizması ve hücre tiplerine özgü mekanizmalar göz önünde tutulmalıdır (Putnam ve ark., 2002). Hücre canlılığının belirlenmesi mutagenesiz, malignant transformasyon, apoptosis, hücrel patoloji ve farmosötik toksisiteyi değerlendirmede oldukça önemlidir. Ölü hücrelerdeki sinyaller ve diğer değişimler karsinogenez araştırmalarında dikkate alınmamaktır (Komissarova ve ark., 2005).

Sitotoksosite deneyleri *in vitro* çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Neutral Red (NR) ve MTT (tetrazolyum tuz redüksiyon) deneyleri monolayer kültürlerde sitotoksosite ölçümleri ya da toksik madde varlığında hücre canlılığının belirlenmesinde sık kullanılan yöntemlerdir (Fotakis ve Timbrell, 2005; Fent 2001). Neutral Red deneyi boyanın yaşayan hücrelerin lizozomlarında birikmesi temeline dayanır (Borenfreund ve Puerner, 1985). MTT yöntemi ise mitokondriyal aktivitenin ölçülmesi temeline dayanmaktadır (Fent, 2001).

2.5. Fosfazenler

Fosfor bileşikleri ile azotlu nükleofillerin reaksiyonlarından fosfor azot bağı bulunduran bileşikler oluşmaktadır. Fosfor azot arasında çift bağı bulunduran bileşikler fosfazenler olarak adlandırılmaktadırlar. Fosfazenler organik bileşiklerde çözüldükleri için organik, yapılarında P=N grubu bulundurmaları nedeniyle anorganik karakter taşımaktadırlar.

Fosfazenler genel olarak lineer ve halkalı yapılarda bulunurlar. Bununla birlikte fosfazen bileşikleri içerisinde genel formülleri $(\text{PNC}_2)_n$ olan halkalı fosfazenler akademik ve bilimsel çalışmalarda ayrı bir öneme sahiptirler.

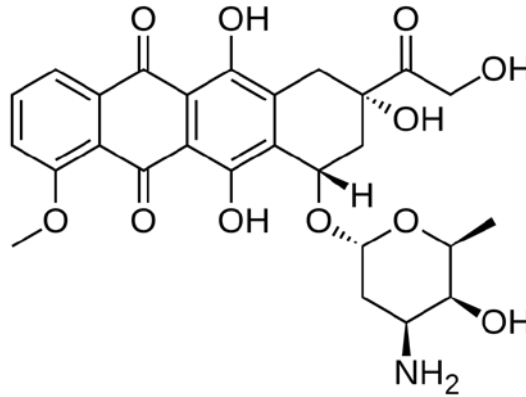


Şekil 2.2. Çeşitli fosfazen bileşikleri

Fosfazen türevleri, genellikle kristal yapıdadır ve organik çözücülerde çözünürler (Shaw ve ark., 1962). Polimerik fosfazenler, halkalı fosfazenlerin uygun şartlarda ısıtılarak halka açılması sonucunda düz zincirli yapıya dönüştürülmesiyle elde edilirler (Shaw ve ark., 1962; Potin ve ark., 1991).

Bağlanan ligandlara göre değişik özellikler gösteren fosfazenler, çok çeşitli alanlarda kullanılabilmektedirler. Fosfor azot sinerjisinden dolayı ısıya ve yanmaya karşı dirençli bileşikler sentezlenerek (Walker, 1972), patenti alınmıştır (Allcock ve ark., 1999). Fosfazenlerin ısıya ve yanmaya karşı gösterdikleri dirençten yola çıkılarak tribolojik özellikleri araştırılmış ve yağlama maddesi olarak kullanılmışlardır (Jiaa ve ark., 1999). Fosfazenlerin sıvı kristal ve gaz geçirgenlik özellikleri üzerine araştırmalar da bulunmaktadır (Moriya ve ark., 2003; Allcock ve ark., 1993; Peterson ve ark., 1993). Biyolojik aktiviteye sahip olan antibakteriyel, antikarsinojenik (Van der Huizen, 1984), anti-HIV maddeler elde edilmiştir (Brandt ve ark., 2001).

Organ nakillerinde biyo uyumluluğu sağlayıcı özellikleri tespit edilmiştir (Langone ve ark., 1995). Bazı fosfazen türevlerinin suni kemik yapımında kullanıldığına dair bilgiler mevcuttur (Lakshmi ve ark., 2003; Bernheim ve ark., 1999). Yeşilot (2003) tarafından bildirildiğine göre; Wunsch ve Kiene (1975) fosfazen türevlerini insektisit olarak kullanmış, Kusuda ve ark., (1992) fosfazenleri kontakt lenslerin yapımında kullanarak patent almış, Anzai ve ark., (1986) bazı fosfazen türevlerini ise diş dolgu maddesi olarak kullanılabilişliğini göstermişlerdir.



Şekil 2.3. Doksorubisin'nin moleküler yapısı

2.6. Genel Sitotoksosite Tarama Yöntemleri

2.6.1. Tripan mavisi ile boyama

Hem hücre sayısının hem de canlı ve ölü hücre oranının elde edildiği bu yöntemde % 4' lük Tripan mavisinden 50 µl alınarak içinde 50 µl hücre süspansiyonu ile karıştırılarak Thoma lamında hücrelerin sayımı yapılabilmektedir.

Canlılık için boyayı almış ve almamış hücre sayıları karşılaştırılarak canlı hücre oranı elde edilebilmektedir. Hücreler canlılıklarını kaybetmemişlerse membran bütünlükleri ve permeabiliteleri bozulmadığı için boyayı hücre içine almamaktadırlar. Bu özelliklerine dayanarak boyanmış ve boyanmamış hücre oranı ile hücre canlılığı % olarak hesaplanabilmektedir (Şencan, 2006).

2.6.2. Mitokondriyal aktiviteye dayalı MTT testi

Canlı hücre sayısını belirlemek için direk ve indirek olmak üzere iki yöntem kullanılmaktadır. Direk yöntemde tüm hücreler sayılırken indirek yöntem de ise canlı hücrelerin kültür parametrelerinde meydana getirdiği değişiklikler araştırılır (Genç ve ark., 2002). İndirek metod olarak tetrazolyum boyasının (MTT) hücre sayısını belirleyen bir indikatör olarak kullanımı ilk olarak 1980' li yılların başında rapor edilmiştir (Langdon, 2004).

MTT deneyi, sık sık hücre proliferasyonunu ölçen indirek indikatör olarak kullanılmasına rağmen aslında MTT mitokondriyal aktivasyonu ölçen bir indikatördür (Wu ve ark., 1999).

MTT testi hücre kültürü esasına dayanan indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan bir ilaç duyarlılık testi olarak kullanılmaktadır (Doğan ve ark., 2004). Birçok araştırmacı tarafından sitotoksosite araştırmalarında kullanılmaktadır (Mohamed ve ark., 2000; Ali ve ark., 2001).

MTT yöntemi ile bir hücre topluluğundaki canlı hücreler kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam mitokondrinin MTT

boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır (Genç ve ark., 2002; Özçelik, 2011).

MTT yöntemiyle dehidrogenaz aktivitesi doğrudan ölçülebilmektedir. Tetrazolyum tuzlarının formazana dönüşümü, NADH veya NADPH' in azalmasıyla meydana gelir. NADH dehidrogenazları solunumun enerji üreten reaksiyonlarında: glikoliz, krep döngüsü ve oksidatif fosforilasyonda rol almaktadır. NADPH dehidrogenazları ise biyosentetik üretim reaksiyonlarında görev alır. Bu dehidrogenazlar genelde mitokondrilerde yer almaktadırlar (Wu ve ark., 1999). Bu nedenle MTT tekniği mitokondriyal enzim sistemleri tarafından kataliz edilen tetrazolyum tuzlarının indirgenmesine dayanır. Kolorimetrik ölçümlerde tercih edilen renksiz substrat kullanılarak canlı hücrelerde renkli ürünler elde edilmektedir. Tetrazolyum tuzları bu amaçla kullanılan, substrat olarak renksiz, canlı hücrelerin sağlam mitokondrilerinde renkli ürünler veren maddelerdir (Özçelik, 2011).

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) bu amaçla kullanılan sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olup sağlam mitokondrilerde süksinatdehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlandığında suda çözünmeyen mavi mor formazan tuzları oluşturur (Shi ve ark., 2006; Langdon, 2004; Korkmaz, 2002).

Dehidrogenazlar NADH ya da NADPH kullanarak sarı renkteki MTT tuzlarını mor formazan kristallerine dönüştürülebilmektedir. Formazan kristalleri DMSO, izopropanol ya da formazan ürünlerinin çözölebildiği ve rapor edilen diğer uygun çözücülerde çözüldükten sonra çözünen boyanın konsantrasyonu spektrofotometrik olarak ölçölebilinmektir (Barile, 1994; Subhashini, 2005). Oluşan formazan tuzlarının miktarı direk olarak hücre sayısının oranını gösterir (Holst ve ark., 2005).

Bu teknik düşük maliyetli, hızlı, hassas, güvenilebilir ve çok sayıda örnekle çalışma imkânı sağladığından tercih edilen bir yöntemdir (Collier ve ark., 2003; Yano ve ark., 2005).

2.6.3. Doksorubisin' in sitotoksik özellikleri

Doksorubisin, *Streptomyces peucetius* türlerinden *caesius* tarafından üretilen sitotoksik antrasiklin grubundan antibiyotik bir ilaçtır (Raymond ve ark., 1992). Doksorubisin, antiinfektif özelliklere sahip olmasına rağmen, sitotoksitesi antiinfektif ajan olarak kullanılmasına engel olmaktadır (Lomovskaya ve ark., 1999).

Etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak, doksorubisinin, DNA' ya bağlanarak çift sarmalın bağlanma noktalarından açılmasına neden olduğu görülmektedir. Ayrıca doksorubisin topoizomerez II ile etkileşime girerek enzimi inhibe ederek, DNA' nın tamir etme mekanizmasını engellemektedir. DNA' ya bağlanma ve topoizomerez II inhibisyonu, DNA ve RNA sentezini inhibe ederek, DNA' nın parçalanmasına neden olmaktadır. Doksorubisin ayrıca demir ile güçlü bir şekilde şelat oluşturup DNA' ya ve hücre membranlarına bağlanabilmekte ve DNA' yı ve hücre membranlarını kolayca parçalayabilen serbest radikallerin üretimine yol açabilmektedir (Arcamone, 1969; Momparler ve ark., 1976; Fornari ve ark., 1994).

Doksorubisini endikasyonları, akut lenfoblastik lösemi, akut miyeloblastik lösemi, Wilms tümörü, neuroblastom, yumuşak doku ve kemik iliği sarkomu, göğüs kanseri, over kanseri, değişim gösteren hücre mesane kanseri, tiroid kanseri, Hodgkin ve non-Hodgkin lenfoma, diğer hücresel tiplerle karşılaştırıldığında daha çok cevap veren histolojik tipi küçük hücre olan bronkojenik karsinomlar ve gastrik karsinomlar gibi yayılmış neoplastik durumlarda gerileme oluşması için kullanılmaktadır. (Lomovskaya ve ark., 1999).

Doksorubisin' nin kimyasal formülü $C_{27}H_{29}NO_{11}$ olup moleküler ağırlığı $543.52 \text{ g.mol}^{-1}$ dür. IUPAC sistematğine göre adı ise, (8S,10S)-10-(4-amino-5-hydroxy-6-methyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-6,8,11-trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-7,8,9,10-tetrahydrotetracene-5,12-dione' dur.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

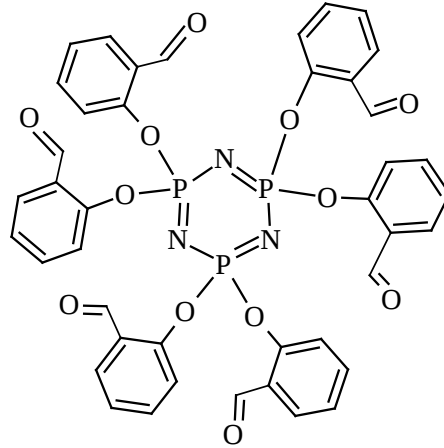
Çalışmamızda yeni sentezlenen İmin Taşıyan Fenoksi Substitüe Siklotrifosfazenlerin miyelositik lösemi hücre dizisi olan K562 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

3.1. Yeni sentezlenen Siklotrifosfazen Bileşikleri

Yeni sentezlenen bileşikler Harran Üniversitesi Kimya Bölümü Anorganik Kimya Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir..

Bileşik 1: Hekzaklorosiklotrifosfazen [$N_3P_3Cl_6$], Bileşiklerin sentezlenmesinde temel madde olarak kullanılmıştır.

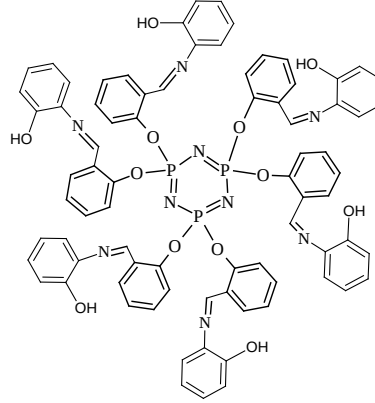
Bileşik 2: Hexa(2-formilfenoksi)siklotrifosfazen [$N_3P_3(O-C_6H_4-o-CHO)_6$] (Şekil 3.1)



Şekil 3.1. Bileşik 2

Çalışmamızda kullandığımız yeni sentezlenen bileşik 2' nin açık formülünü göstermektedir.

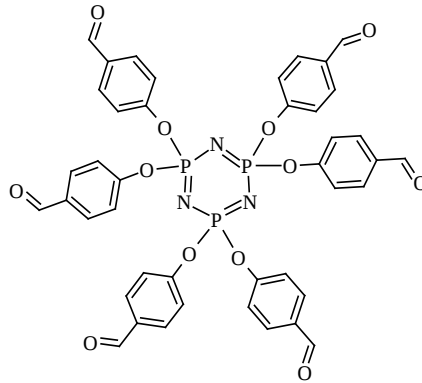
Bileşik 3: Hekza[2-(2-hidroksifenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen $[N_3P_3(O-C_6H_4-o-CH=N-o-C_6H_5)_6]$ (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Bileşik 3

Çalışmamızda kullandığımız yeni sentezlenen bileşik 2' nin açık formülünü göstermektedir.

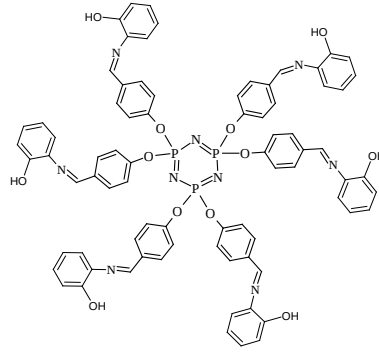
Bileşik 4: Hexa(4-formilfenoksi)siklotrifosfazen $N_3P_3(O-C_6H_4-p-CHO)_6$ (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Bileşik 4

Çalışmamızda kullandığımız yeni sentezlenen bileşik 2' nin açık formülünü göstermektedir.

Bileşik 5: Hekza[4-(2-hidroksifenilimino)metil]fenoksi]siklotrifosfazen $N_3P_3(O-C_6H_4-p-CH=N-o-C_6H_5)_6$ (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Bileşik 5

Çalışmamızda kullandığımız yeni sentezlenen bileşik 5' nin açık formülünü göstermektedir.

3. 2. Kimyasalların Sterilizasyonu

Kimyasallar 10 mM olacak şekilde dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldükten sonra 20 µm por çaplı enjektör tipi filtre ile (Minisart®, Biotech, 16534, USA) sterilize edilerek stok solüsyonlar hazırlandı.

3. 3. Doksorubisin ve Kimyasalların Doz Ayarlaması

Pozitif kontrol olan doksorubisin ve kimyasallar 1.000 mM, 0.500 mM, 0.250 mM, 0.100 mM, 0.050 mM, 0.25 mM olacak şekilde DMSO içerisinde dilüe edilerek stok solüsyonları hazırlandı.

3.3.1. 96 kuyucuklu kültür plaklarının hazırlanması

96 kuyucuklu kültür plağının birinci sırasındaki ilk üç kuyucuğu kontrol olarak ayrılarak sadece çözücü olarak kullanılan DMSO eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak doksorubisin ve kimyasallar 1.000 mM, 0.500 mM, 0.250 mM, 0.100 mM, 0.050 mM, 0.025 mM olacak şekilde 10 µl hacimlerde üçlü düzende (triple) eklendi.

3.4. Hücre Kültür Ortamının Hazırlanması

Seri pasajlarını sürdürmekte olduğumuz K562 KML hücre dizisinden alınan hücreler % 10 fetal dana serumu (FCS) ve antibiyotik içeren kültür medyumuna alındıktan sonra santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı atıldıktan sonra hücreler 1 ml medyumda sulandırılıp Thoma lamında sayım işlemine tabii tutuldu. Sayım için hücre süspansiyonuna % 10' luk trypan mavisi solüsyonu yarı yarıya eklenerek hücrelerin sayımı esnasında canlı ölü ayrımı gerçekleştirildi. Trypan mavisi ile yapılan sayım işleminde hücrelerin canlılık oranı yaklaşık % 96 olarak tesbit edilmiştir. Kültüre eklenecek hücre sayısının belirlenmesinde sadece canlı hücreler dikkate alınmıştır. Sayım işleminden sonra kültür plağına ekim için hücreler 10^5 hücre/ ml olacak şekilde RPMI-1640 medyum ile sulandırılmıştır.

3.4.1. MTT testi

Triple düzende hazırlanmış olan 96 kuyucuklu kültür plağına K562 hücre süspansiyonu her bir kuyucuğa 90 µl gelecek şekilde 8 kanallı otomatik pipetle dağıtıldı. Bu esnada sürekli çalkalama işlemi ile hücrelerin kuyucuklara eşit dağılımı sağlandı.

Kültür flaskları 37 °C' de % 5 CO₂ içeren inkübatörde (Heal Force, HF 212 UV, Çin), nemli ortamda 96 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kültür plakları 3000 RPM' de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı taze kültür mediumu ile değiştirilmiştir. Böylece kullanılan doksorubisinin ve kullanılan kimyasalların doğal renkleriyle MTT' den oluşacak formazanın renklerinin karışması önlenmiştir.

Kültürün 96. saatinde % 0.5' lik MTT ([3- (4,5-dimetiltiyazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolium], Sigma, M2128-1G, USA) solüsyonunda her bir kültür kuyucuğuna 10 µl eklendikten sonra 4 saat daha inkübasyona bırakılmıştır.

Bu süre sonunda kültür plağı kuyucuklarında canlı ve aktif hücreler tarafından hücre mitokondrisinde meydana getirilen MTT formazanın çözünmesi için kuyucuklara 100' er ml Dimetil sülfoksit (Sigma, D5879, Fransa) eklenmiştir.

Kolorimetrik değerlendirme amacıyla kültür plakları ELİZA mikropalak okuyucuda (SpectraMax- Molecular Devices, M5, ABD) 570 nm dalga boyunda okutulmuştur.

Kontrol ve test kuyucuklarından elde edilen optik dansite (OD) değerlerinden solvent körü kuyucuklarının OD değerleri çıkarılmıştır. Kontrol ve test kuyucuklarına ait OD değerleri grafikler halinde sunulmuştur. Pozitif kontrol (Doksorubisin) ve çalışmamızda kullandığımız fosfazen bileşiklerinin gösterdiği sitotoksik etki düzeyleri aşağıdaki formülle hesaplanmıştır. Bu formülde elde edilen değer hücrelerin % sitotoksosite düzeyini göstermektedir. Bu değerler 100' den çıkarıldığında % sitotoksosite oranına ulaşmak mümkündür.

$$\% \text{ SİTOTOKSİSİTE} = 100 - \frac{\text{Ortalama OD (test kuyucukları)}}{\text{Ortalama OD (kontrol kuyucukları)}} \times 100$$

3.4.2. Kültür plağı kuyucuklarının görüntülenmesi

Kültür flasklarının kuyucukları inverted mikroskopta (Motic, AE31, Çin) dijital görüntüleme aygıtıyla görüntülendi. Elde edilen görüntüler bilgisayara kaydedildi. Görüntüleme işlemi kültürün 96. saatlerinde gerçekleştirildi.

3.5. İstatistiksel Analizler

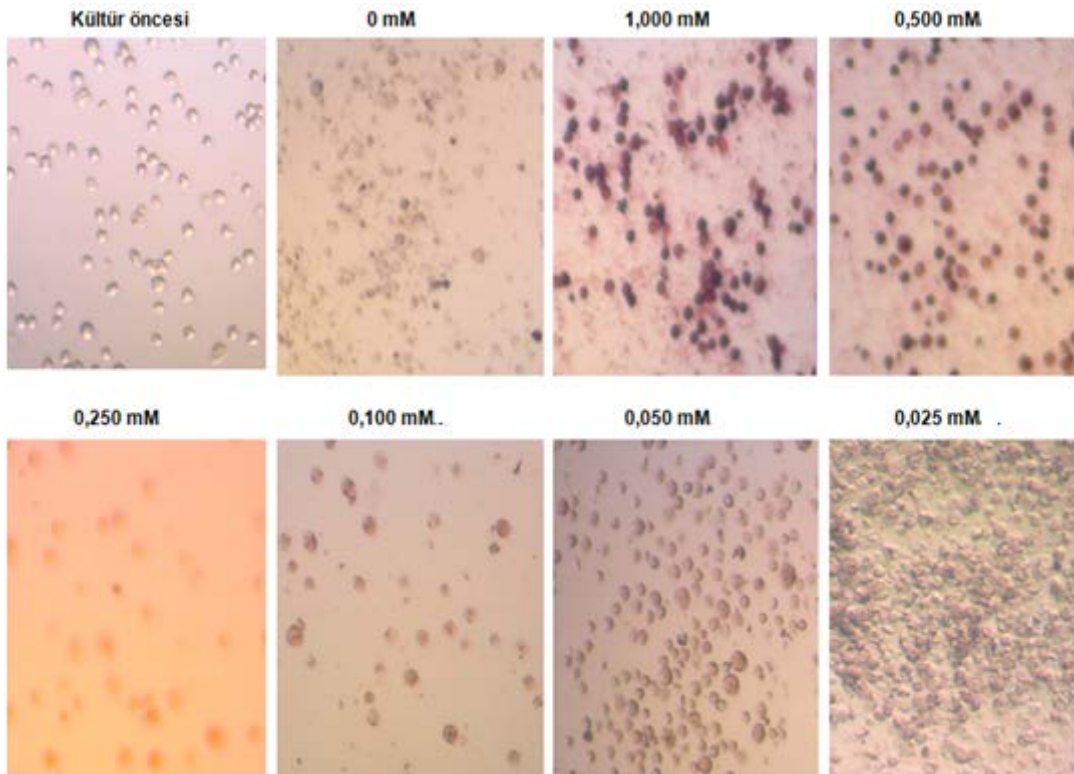
Elde edilen OD değerleri ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir. Verilerin analizlerinde pozitif kontrol (Doksorubisin) ve bileşiklerin sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması ANOVA testi ile gerçekleştirilmiştir. ANOVA testi sonucunda anlamlı bulunan pozitif kontrol ve bazı siklotriofosfazen bileşiklerinin değişen dozlarının sitotoksik etkinlikleri 'post hoc' testlerden olan 'TUKEY' testi ile gerçekleştirilmiştir. Her bir bileşiğin pozitif kontrol ile karşılaştırılmasında pearson korelasyonu kullanılmıştır. "p" değerinin 0.05' ten küçük bulunması durumunda veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Doksorubisin' in Sitotoksik Etkisi

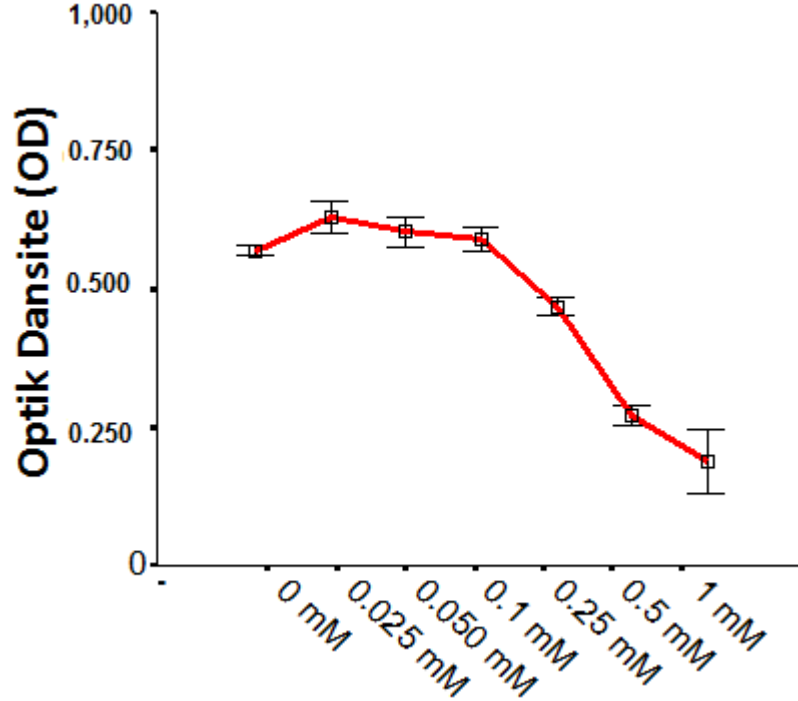
Değişen dozlarda (1.000 mM, 0.500 mM, 0.250 mM, 0.100 mM, 0.050 mM, 0.025 mM) doksorubisinin kültür ortamında K562 kanser hücre serisinin gelişimleri üzerine etkilerinin belirli zaman aralıklarında inverted mikroskopta incelenmesi gerçekleştirilmiş ve bu değişimler görüntüleme sistemi ile kaydedilmiştir (Şekil 8).

Doksorubisinin değişen dozlarda K562 hücreleriyle 96 saat inkübasyon sonunda ortama MTT eklendikten 4 saat sonra hücrelerin ürettiği MTT formazana ait görüntüler aşağıda verilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. MTT sonrası doksorubisinin kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri (HRÜ Kanser ve kök hücre laboratuvarı MTT sonrası K562 Hücrelerinin görüntüsü)

Doksorubisinin değişen dozlarda K562 hücreleriyle inkübasyonu sonunda hücrelerin üretmiş oldukları MTT formazana ait OD değerleri Şekil 4.2.' de görölmektedir.



Şekil 4.2. MTT formazan OD değerlerinin karşılaştırılması

Doksorubisin K562 hücreleri üzerindeki doza bağımlı sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için kontrol ve test kuyucuklarında oluşan MTT formazan OD değerlerinin karşılaştırılması. ANOVA ** $p < 0.001$.

Kontrol kuyucuklarına ait ortalama OD değeri 0.547 ± 0.017 olarak saptanmıştır. Doksorubisinin 1.000 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.180 ± 0.095 , [$p < 0.001$] 0.500 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.261 ± 0.031 , [$p < 0.001$], 0.250 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.449 ± 0.028 , [$p < 0.242$], 0.100 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.566 ± 0.036 , [$p < 0.999$], 0.050 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.578 ± 0.044 , [$p < 0.981$], 0.250 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.604 ± 0.049 , [$p < 0.771$], ANOVA $p < 0.001$ olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Doksorubisin' in K562 hücreleri üzerine % sitotoksik etkileri

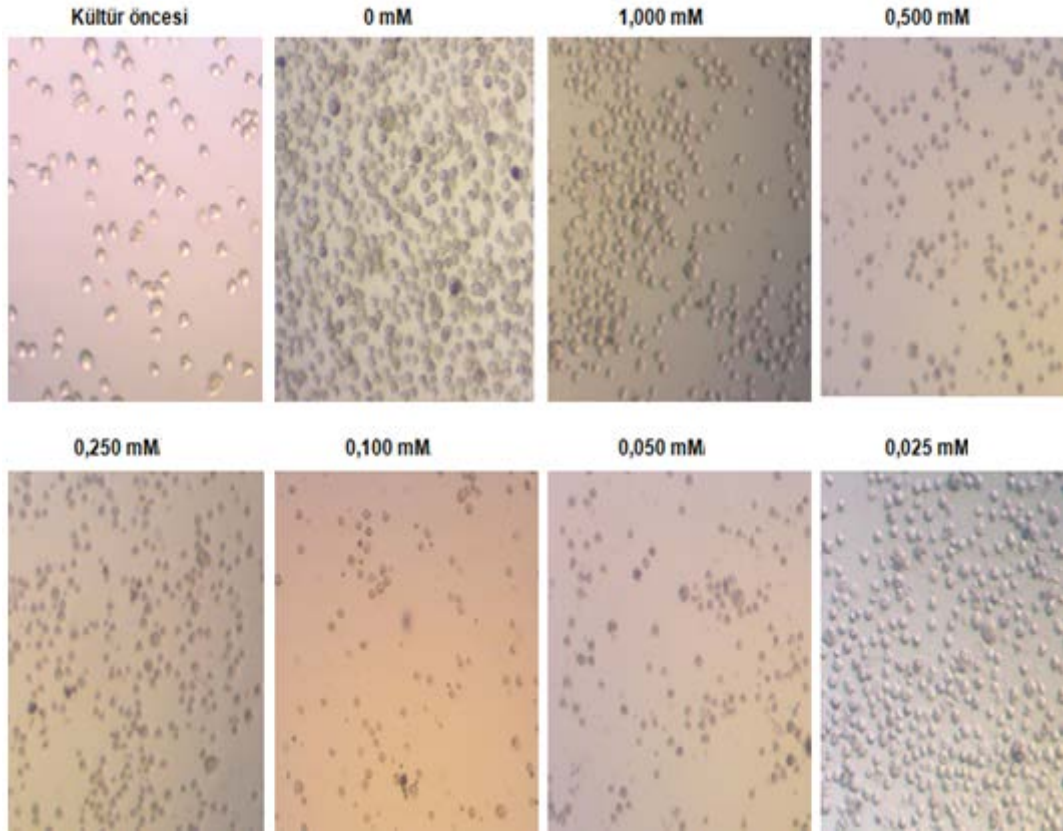
% sitotoksosite	Kimyasal Dozları (mM)						ANOVA 0.001
	1.000 mM	0.500 mM	0.250 mM	0.100 mM	0.050 mM	0.025 mM	
	67.1	52.3	17.9	-3.5	-5.8	-10.5	

Elde edilen verilere göre, Doksorubisin 1.000 mM ve 0.500 mM dozlarında ileri düzeyde sitotoksikite gözlemlenmişken, 0.250 mM dozunda daha az sitotoksikite görülmüştür. 0.100 mM, 0.050 mM, 0.025 mM dozlarında ise doksorubisinin sitotoksik etkisi gözlenmemiştir (Çizelge 4.1)

4.2. Bileşik 1' in Sitotoksik Etkisi

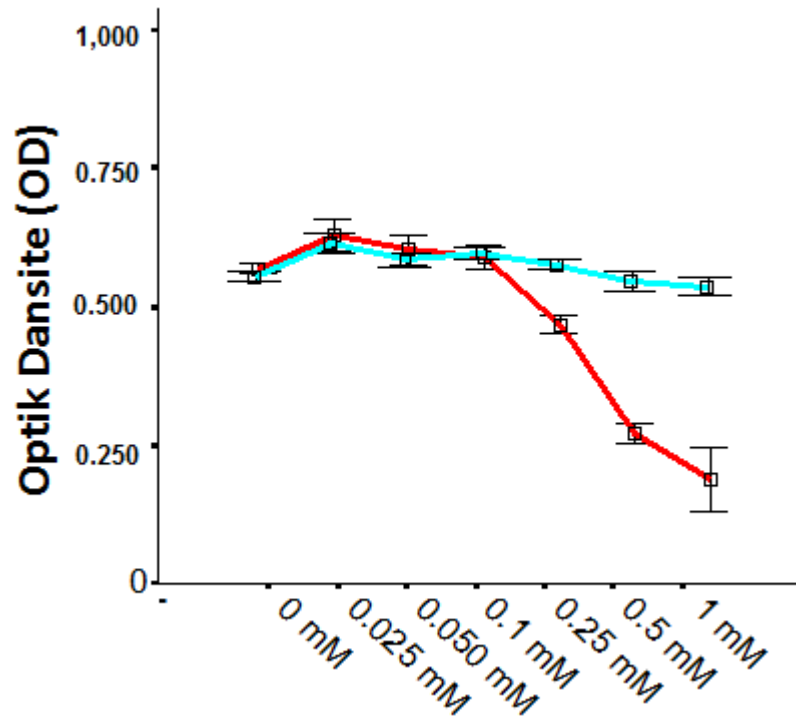
Değişen dozlarda (1.000 mM, 0.500 mM, 0.250 mM, 0.100 mM, 0.050 mM, 0.025 mM) Bileşik 1' in kültür ortamında K562 kanser hücre serisinin gelişimleri üzerine etkilerinin belirli zaman aralıklarında inverted mikroskopta incelenmesi gerçekleştirilmiş ve bu değişimler görüntüleme sistemi ile kaydedilmiştir (Şekil 4.3).

Bileşik 1' in değişen dozlarda K562 hücreleriyle 96 saat inkübasyon sonunda ortama MTT eklendikten 4 saat sonra hücrelerin ürettiği MTT formazana ait görüntüler aşağıda verilmiştir (Şekil 4.3).



Şeki 4.3. Bileşik 1' in kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri

Bileşik 1'in değişen dozlarda K562 hücreleriyle inkübasyonu sonunda hücrelerin üretmiş oldukları MTT formazana ait OD değerleri Şekil 4.4' de görülmektedir.



Şekil 4.4. Bileşik 1' in K562 hücreleri MTT Formazan OD Değerlerinin Karşılaştırması

Bileşik 1'in K562 hücreleri üzerindeki doza bağımlı sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için kontrol ve test kuyucuklarında oluşan MTT formazan OD değerlerinin karşılaştırılması ANOVA $**p < 0.014$ (Şekil 4.4)

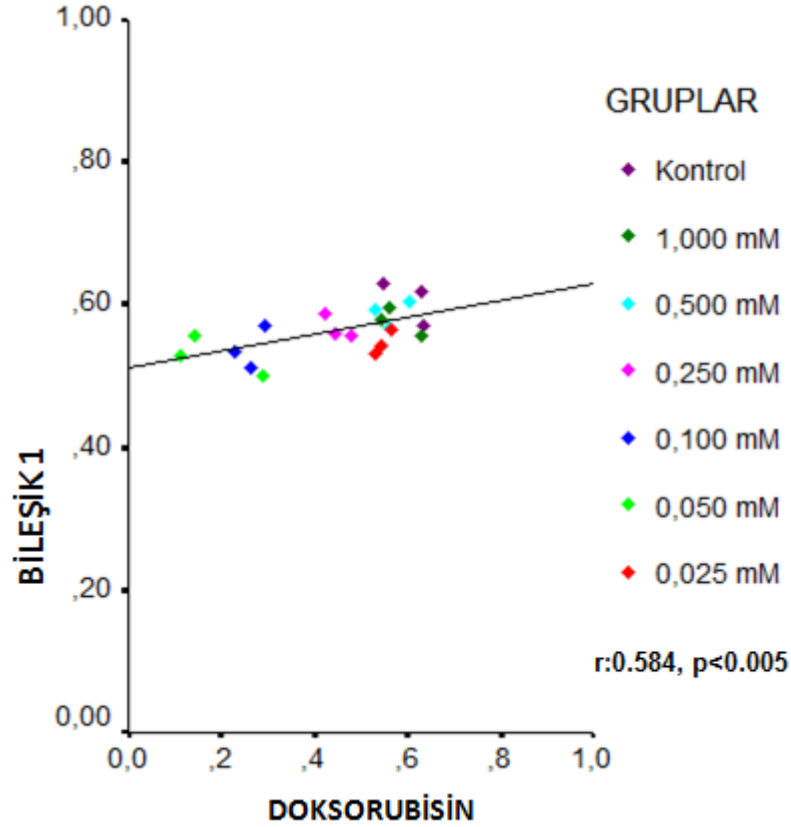
Kontrol kuyucuklarına ait ortalama OD değeri 0.547 ± 0.017 , kontrol grubunun p değeri < 0.005 olarak saptanmıştır. Bileşik 1' nin 1.000 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.528 ± 0.029 , $[p < 0.959]$ 0.500 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.539 ± 0.030 , $[p < 1.000]$, 0.250 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.568 ± 0.017 , $[p < 0.924]$, 0.100 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.588 ± 0.018 , $[p < 0.399]$, 0.050 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.576 ± 0.020 , $[p < 0.727]$, 0.025 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.606 ± 0.031 , $[p < 0.097]$, ANOVA $p < 0.014$ olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Bileşik 1' in K562 hücreleri üzerine % sitotoksik etkileri

Kimyasal Dozları (mM)						
% sitotoksosite	1.000 mM	0.500 mM	0.250 mM	0.100 mM	0.050 mM	0.025 mM
	3.4	1.4	-3.8	-7.5	-5.4	-10.8

ANOVA
0.014

Elde edilen verilere göre, Bileşik 1' in 1.000 mM ve 0.500 mM dozlarında düşük düzeyde sitotoksik etkileri gözlemlenmişken, 0.250 mM, 0.100 mM, 0.025 mM dozlarında ise bileşik 1' in sitotoksik etkisi gözlenmemiştir (Çizelge 4.2).



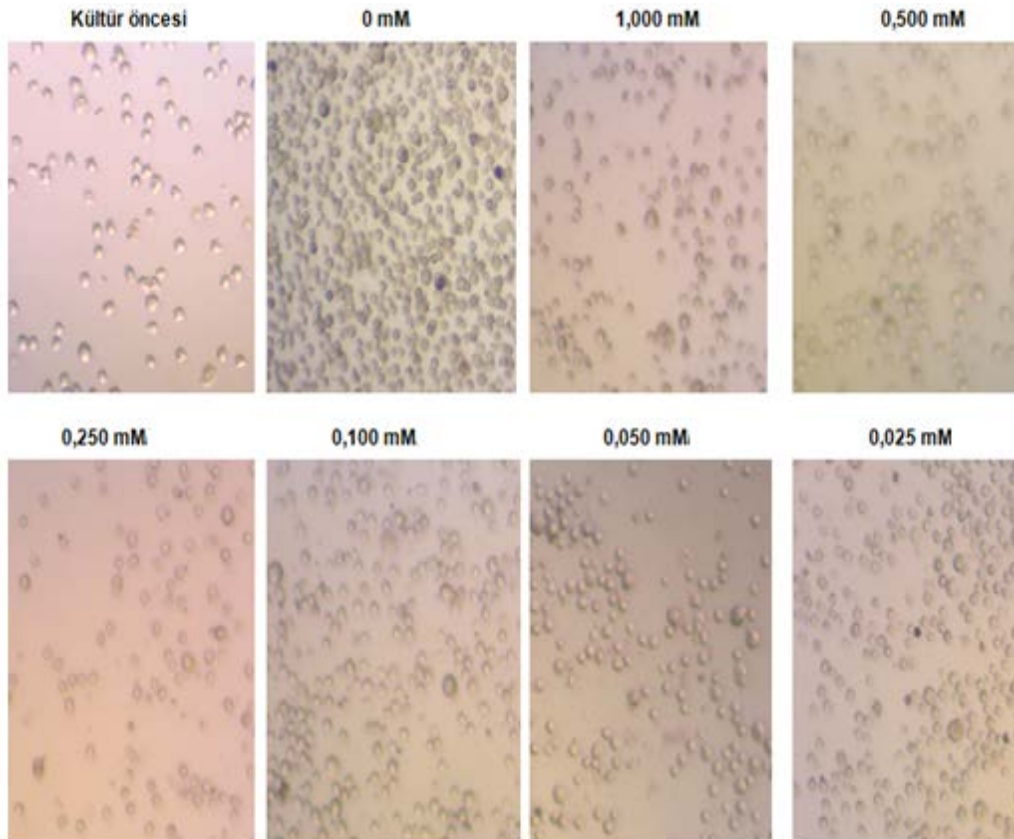
Şekil 4.5. Bileşik 1 korelasyon grafiği

Değişen dozlarda bileşik 1' in uygulandığı test kuyucuklarından elde edilen OD değerlerinin pozitif kontrol olan doksorubisinden elde edilen OD değerleriyle arasındaki bağıntı analizinde, bileşik 1 ile doksorubisinin etkinlikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif bağıntının olduğu ($r:0.584$, $p<0.005$) da gözlenmektedir (Şekil 4.5).

4.3. Bileşik 2' nin Sitotoksik Etkileri

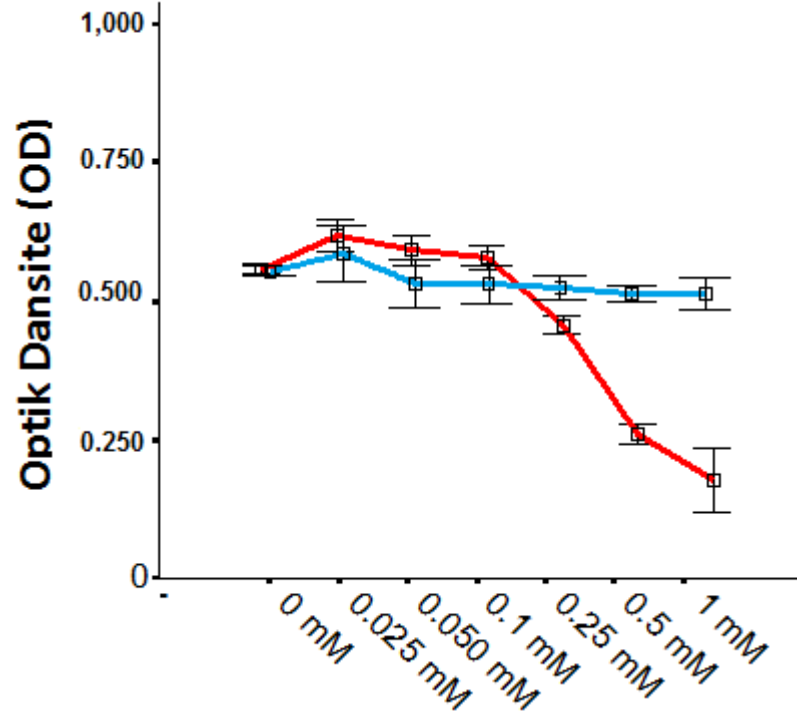
Değişen dozlarda (1.000 mM, 0.500 mM, 0.250 mM, 0.100 mM, 0.050 mM, 0.025 mM) bileşik 2' nin kültür ortamında K562 kanser hücre serisinin gelişimleri üzerine etkilerinin belirli zaman aralıklarında inverted mikroskopta incelenmesi gerçekleştirilmiş ve bu değişimler görüntüleme sistemi ile kaydedilmiştir (Şekil 4.6).

Bileşik 2' nin değişen dozlarda K562 hücreleriyle 96 saat inkübasyon sonunda ortama MTT eklendikten 4 saat sonra hücrelerin ürettiği MTT formazana ait görüntüler aşağıda verilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Bileşik 2' nin kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri

Bileşik 2' nin değişen dozlarda K562 hücreleriyle inkübasyonu sonunda hücrelerin üretmiş oldukları MTT formazana ait OD değerleri şekil 4.7' de görölmektedir.



Şekil 4.7. Bileşik 2' nin K562 hücreleri üzerindeki MTT Formazan OD Değerlerinin Karşılaştırılması

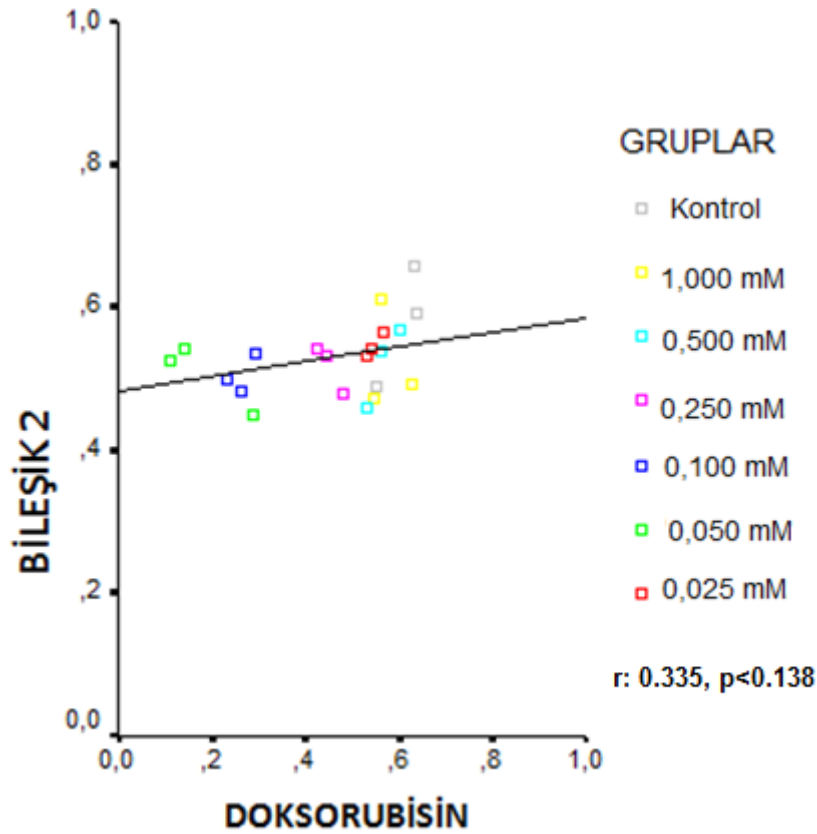
Bileşik 2' nin K562 hücreleri üzerindeki doza bağımlı sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için kontrol ve test kuyucuklarında oluşan MTT formazan OD değerlerinin karşılaştırılması ANOVA $**p < 0.663$ (Şekil 4.7).

Kontrol kuyucuklarına ait ortalama OD değeri 0.547 ± 0.138 olarak saptanmıştır. Bileşik 2' nin 1.000 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.505 ± 0.049 , $[p < 0.960]$ 0.500 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.506 ± 0.028 , $[p < 0.963]$, 0.250 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.516 ± 0.035 , $[p < 0.992]$, 0.100 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.522 ± 0.056 , $[p < 0.997]$, 0.050 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.525 ± 0.074 , $[p < 0.999]$, 0.025 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.578 ± 0.086 , $[p < 0.990]$, ($r: 0.335$; ANOVA $p < 0.663$) olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Bileşik 2' nin K562 hücreleri üzerine % sitotoksik etkileri

% sitotoksosite	Kimyasal Dozları (mM)						ANOVA 0.663
	1.000 mM	0.500 mM	0.250 mM	0.100 mM	0.050 mM	0.025 mM	
	7.6	7.5	5.5	4.6	4	-5.8	

Elde edilen verilere göre, bileşik 2' nin 1.000 mM, 0.500 mM, 0.250 mM, 0.100 mM dozlarında düşük düzeyde sitotoksik etkileri gözlemlenmişken, 0.025 mM dozlarında ise bileşik 2' nin sitotoksik etkisi gözlenmemiştir. (Çizelge 4.3)



Şekil 4.8. Bileşik 2 ile Doksorubisin'nin korelasyon grafiği

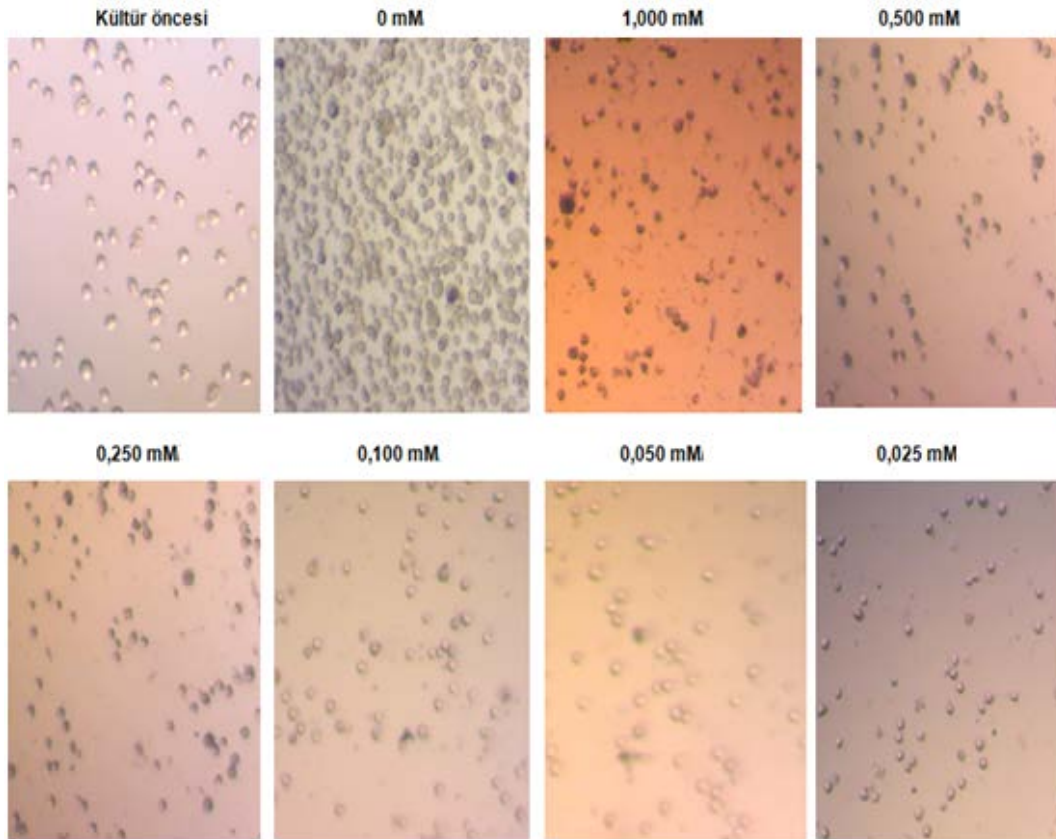
Değişen dozlarda bileşik 2' in uygulandığı test kuyucuklarından elde edilen OD değerlerinin pozitif kontrol olan doksorubisinden elde edilen OD değerleriyle arasındaki bağıntı analizinde, bileşik 2 ile doksorubisinin etkinlikleri arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif bağıntının olduğu ($r: 0.335$, $p<0.138$) de gözlenmektedir (Şekil 4.8).

4.4. Bileşik 3' ün Sitotoksik Etkileri

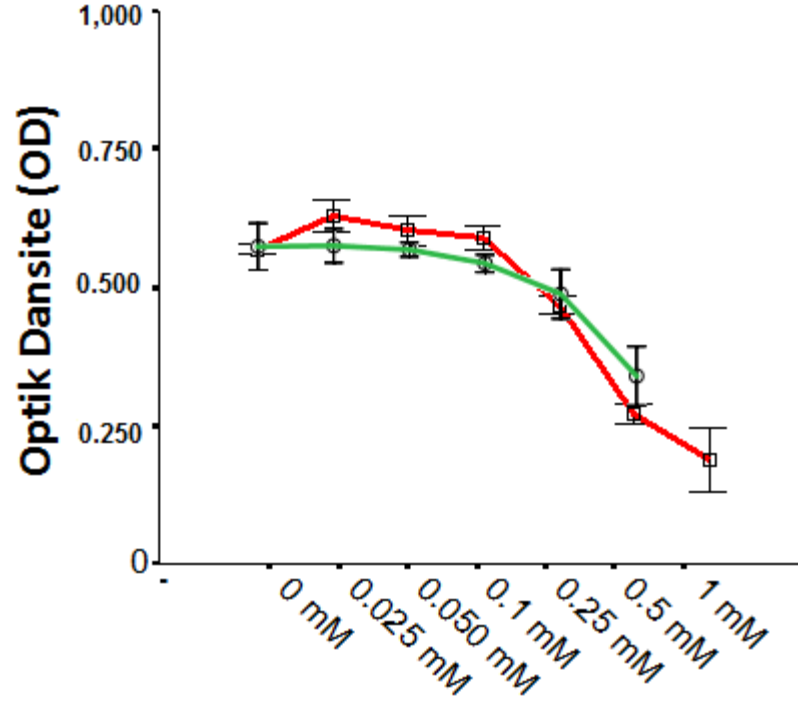
Değişen dozlarda (1.000 mM, 0.500 mM, 0.250 mM, 0.100 mM, 0.050 mM, 0.025 mM) Bileşik 3' ün kültür ortamında K562 kanser hücre serisinin gelişimleri üzerine etkilerinin belirli zaman aralıklarında inverted mikroskopta incelenmesi gerçekleştirilmiş ve bu değişimler görüntüleme sistemi ile kaydedilmiştir (Şekil 4.9).

Bileşik 3' ün değişen dozlarda K562 hücreleriyle 96 saat inkübasyon sonunda ortama MTT eklendikten 4 saat sonra hücrelerin ürettiği MTT formazana ait görüntüler aşağıda verilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Bileşik 3' ün MTT sonrası kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri

Bileşik 3' ün değişen dozlarda K562 hücreleriyle inkübasyonu sonunda hücrelerin üretmiş oldukları MTT formazana ait OD değerleri Şekil 4.10' de görölmektedir.



Şekil 4.10. Bileşik 3' ün K562 hücreleri üzerine OD değerlerinin karşılaştırılması

Bileşik 3 K562 hücreleri üzerindeki doza bağımlı sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için kontrol ve test kuyucuklarında oluşan MTT formazan OD değerlerinin karşılaştırılması. ** $p < 0.001$ (Şekil 4.10).

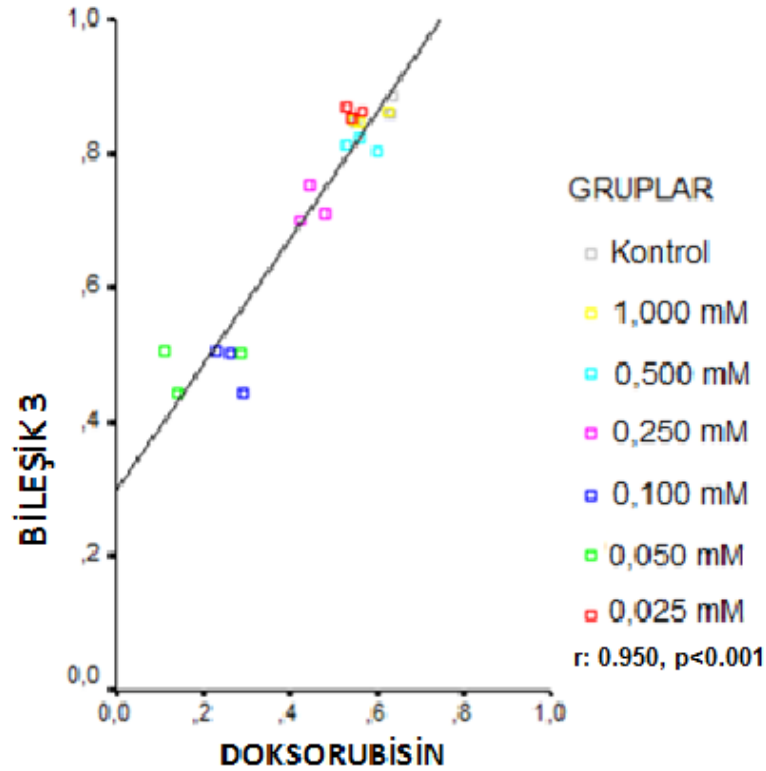
Kontrol kuyucuklarına ait ortalama OD değeri 0.547 ± 0.017 olarak saptanmıştır.

Bileşik 3' nin 1.000 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri ---, [$p < 0.001$], 0.500 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.307 ± 0.022 , [$p < 0.001$], 0.250 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.459 ± 0.018 , [$p < 0.001$], 0.100 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.516 ± 0.007 , [$p < 0.235$], 0.050 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.541 ± 0.005 , [$p < 0.999$], 0.025 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.548 ± 0.013 , [$p < 1.000$], (ANOVA $p < 0.001$) olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Bileşik 3' ün K562 hücreleri üzerine % sitotoksik etkileri

% sitotoksosite	Kimyasal Dozları (mM)						ANOVA 0.001
	1.000 mM	0.500 mM	0.250 mM	0.100 mM	0.050 mM	0.025 mM	
	---	43.8	16.1	5.6	1	-0.3	

Elde edilen verilere göre, bileşik 3' ün 0.500 mM yüksek, 0.250 mM, 0.100 mM dozlarında düşük düzeylerde sitotoksik etkileri gözlemlenmişken, 0.025 mM dozlarında ise bileşik 3' ün sitotoksik etkisi gözlenmemiştir. Bileşik 3' ün 1.000 mM dozunda ELİZA plak okuyucu cihazdan OD değeri alınamamıştır (Çizelge 4.4).



Şekil 4.11. Bileşik 3' e ait korelasyon grafiği

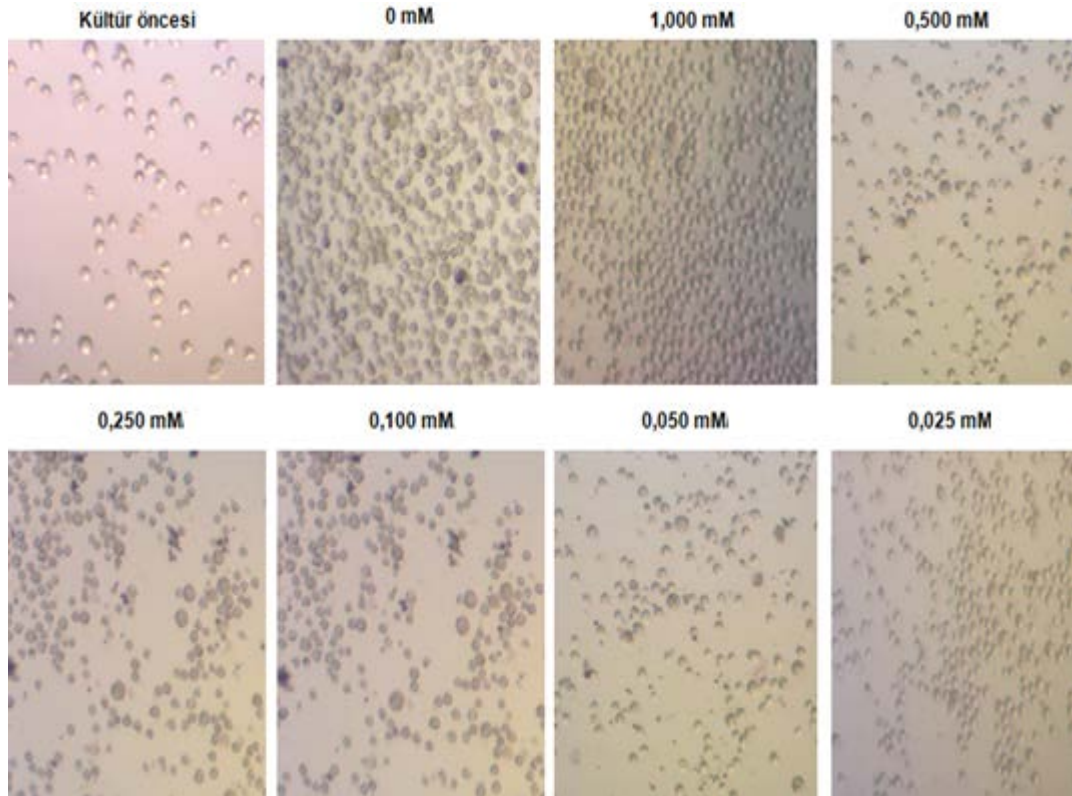
Değişen dozlarda bileşik 3' ün uygulandığı test kuyucuklarından elde edilen OD değerlerinin pozitif kontrol olan doksorubisinden elde edilen OD değerleriyle arasındaki bağıntı analizinde, bileşik 3 ile doksorubisinin etkinlikleri arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif bağıntının olduğu ($r: 0.950$, $p<0.001$) de gözlenmektedir (Şekil 4.11).

4.5. Bileşik 4' ün Sitotoksik Etkileri

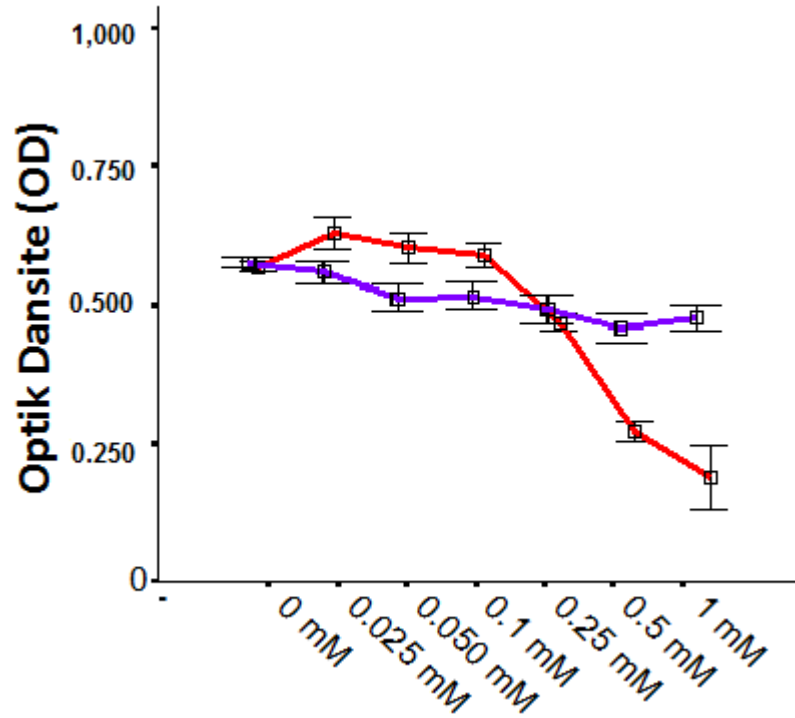
Değişen dozlarda (1.000 mM, 0.500 mM, 0.250 mM, 0.100 mM, 0.050 mM, 0.025 mM) bileşik 4' ün kültür ortamında K562 kanser hücre serisinin gelişimleri üzerine etkilerinin belirli zaman aralıklarında inverted mikroskopta incelenmesi gerçekleştirilmiş ve bu değişimler görüntüleme sistemi ile kaydedilmiştir (Şekil 4.12).

Bileşik 4' ün değişen dozlarda K562 hücreleriyle 96 saat inkübasyon sonunda ortama MTT eklendikten 4 saat sonra hücrelerin üretmiş oldukları MTT formazana ait görüntüler aşağıda verilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Bileşik 4' ün kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri

Bileşik 4' ün değişen dozlarda K562 hücreleriyle inkübasyonu sonunda hücrelerin üretmiş oldukları MTT formazana ait OD değerleri Şekil 4.13' te görölmektedir.



Şekil 4.13. Bileşik 4' ün K562 hücreleri üzerine OD' nin karşılaştırılması

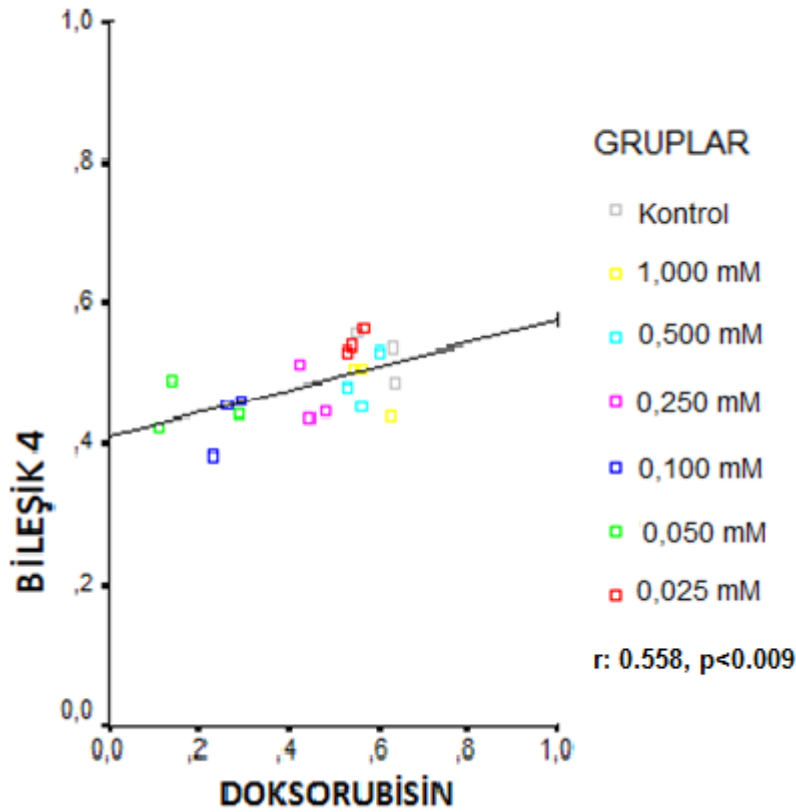
Bileşik 4' ün K562 hücreleri üzerindeki doza bağımlı sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için kontrol ve test kuyucuklarında oluşan MTT formazan OD değerlerinin karşılaştırılması. ANOVA ** $p < 0.026$ (Şekil 4.13).

Kontrol kuyucuklarına ait ortalama OD değeri 0.547 ± 0.017 , kontrol gurubunun p değeri < 0.009 olarak saptanmıştır. Bileşik 4' ün 1.000 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.452 ± 0.036 , [$p < 0.090$] 0.500 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.435 ± 0.044 , [$p < 0.033$], 0.250 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.465 ± 0.043 , [$p < 0.182$], 0.100 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.489 ± 0.041 , [$p < 0.526$], 0.050 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.485 ± 0.040 , [$p < 0.447$], 0.025 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.529 ± 0.036 , [$p < 0.997$], ANOVA $p < 0.026$ olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Bileşik 4' ün K562 hücreleri üzerine % sitotoksik etkileri

% sitotoksosite	Kimyasal Dozları (mM)						ANOVA 0.026
	1.000 mM	0.500 mM	0.250 mM	0.100 mM	0.050 mM	0.025 Mm	
	17.3	20.5	14.9	10.5	11.3	3.2	

Elde edilen verilere göre, bileşik 4' ün 1.000 mM, 0.500 mM, 0.250 mM, 0.100 mM, 0.025 mM dozlarında düşük düzeylerde sitotoksik etkileri gözlemlenmiştir (Çizelge 4.5).



Şekil 4.14. Bileşik 4 ile Doksorubisin arasındaki korelasyon grafiği

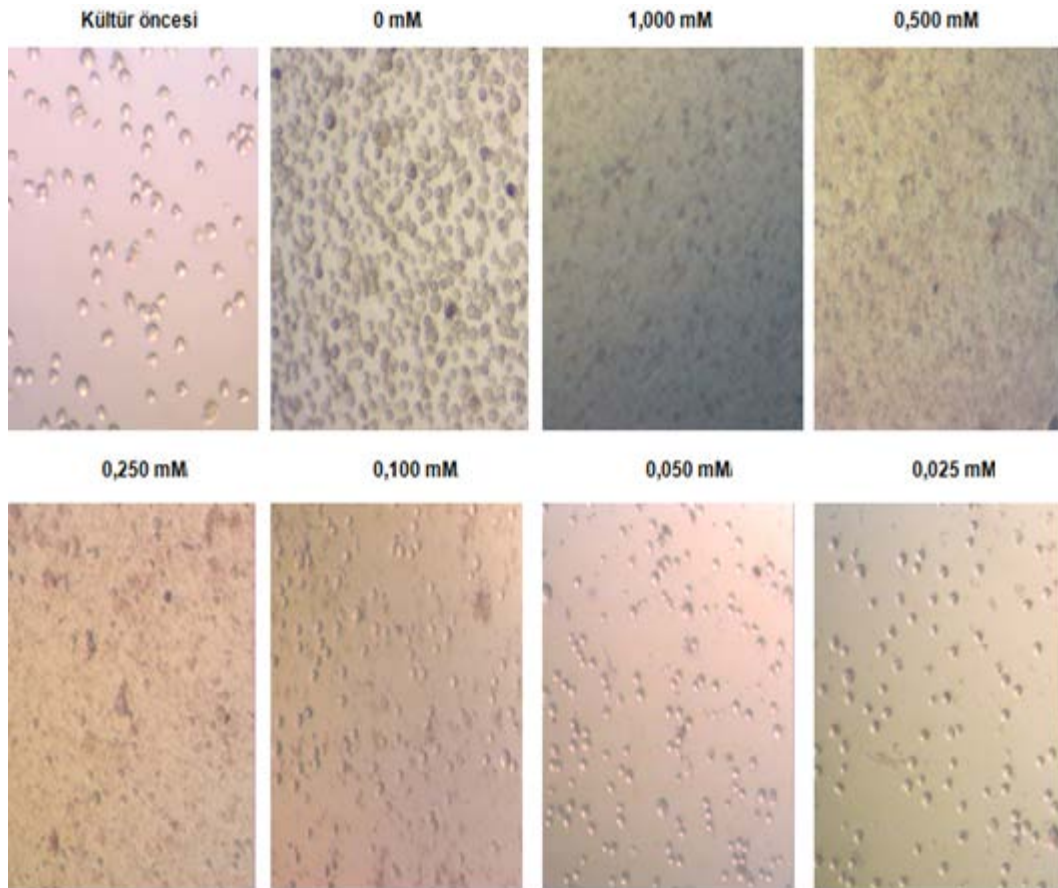
Değişen dozlarda bileşik 4' ün uygulandığı test kuyucuklarından elde edilen OD değerlerinin pozitif kontrol olan doksorubisinden elde edilen OD değerleriyle arasındaki bağıntı analizinde, bileşik 4 ile doksorubisinin etkinlikleri arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif bağıntının olduğu ($r: 0.558$, $p<0.009$) de gözlenmektedir (Şekil 4.14).

4.6. Bileşik 5' in Sitotoksik Etkileri

Değişen dozlarda (1.000 mM, 0.500 mM, 0.250 mM, 0.100 mM, 0.050 mM, 0.025 mM) bileşik 5' in kültür ortamında K562 kanser hücre serisinin gelişimleri üzerine etkilerinin belirli zaman aralıklarında inverted mikroskopta incelenmesi gerçekleştirilmiş ve bu değişimler görüntüleme sistemi ile kaydedilmiştir (Şekil 4.15).

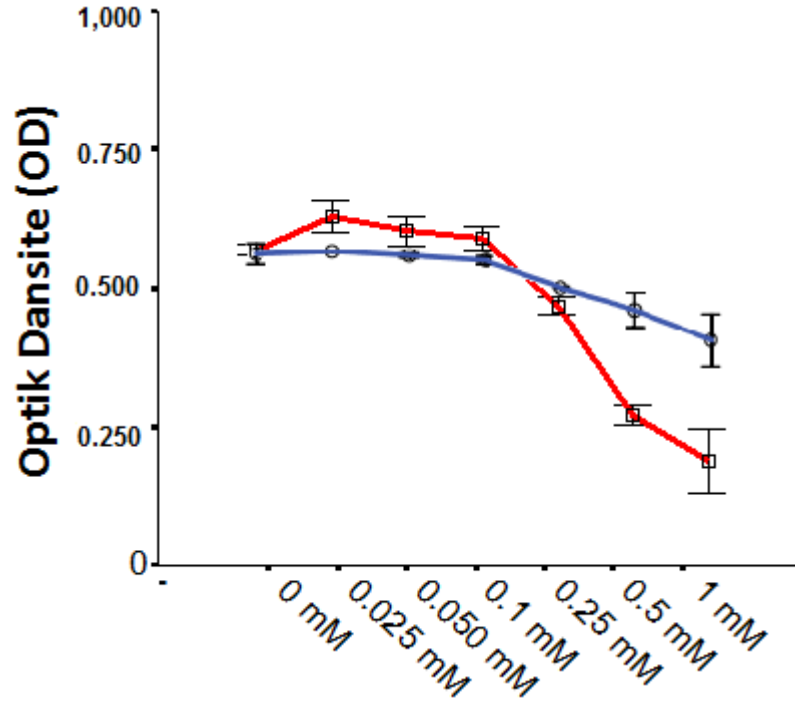
Bileşik 5' in değişen dozlarda K562 hücreleriyle 96 saat inkübasyon sonunda ortama MTT eklendikten 4 saat sonra hücrelerin üretmiş oldukları MTT formazana ait görüntüler aşağıda verilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Bileşik 5' in kültür ortamında K562 hücreleri üzerine etkileri

Kontrol kuyucuklarına ait ortalama OD değeri 0.547 ± 0.017 , kontrol grubunun p değeri <0.001 olarak saptanmıştır.

Bileşik 5' in değişen dozlarda K562 hücreleriyle inkübasyonu sonunda hücrelerin üretmiş oldukları MTT formazana ait OD değerleri Şekil 4.16' da görölmektedir.



Şekil 4.16. Bileşik 5 ile Doksorubisin' in OD değerlerinin karşılaştırılması

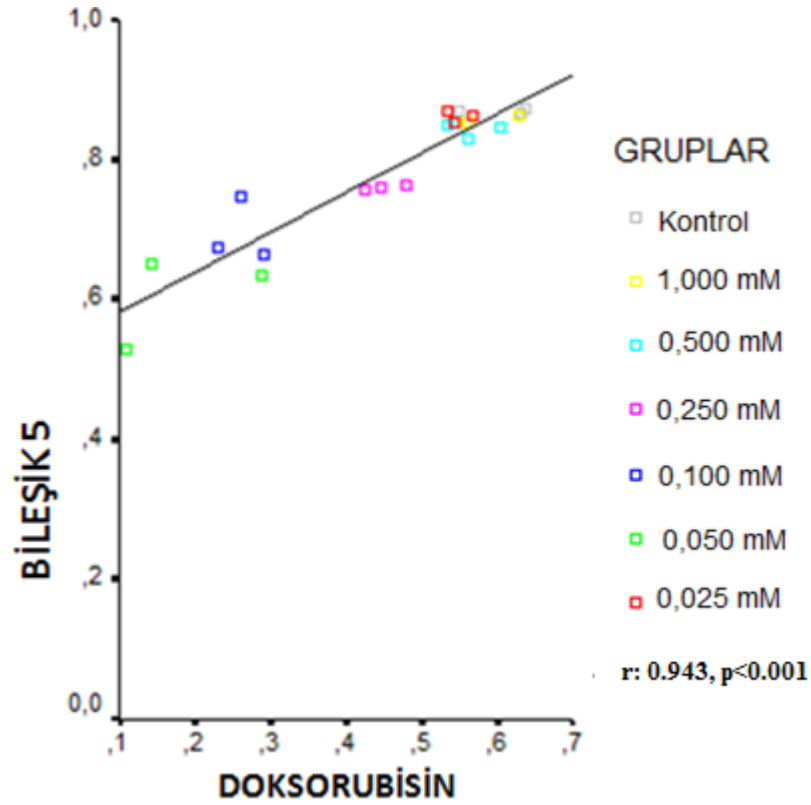
Bileşik 5' in K562 hücreleri üzerindeki doza bağımlı sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için kontrol ve test kuyucuklarında oluşan MTT formazan OD değerlerinin karşılaştırılması. ANOVA ** $p < 0.001$ (Şekil 4.16).

Bileşik 5' in 1.000 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.384 ± 0.043 , [$p < 0.001$] 0.500 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.442 ± 0.028 , [$p < 0.001$], 0.250 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.483 ± 0.002 , [$p < 0.020$], 0.100 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.534 ± 0.006 , [$p < 0.988$], 0.050 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.544 ± 0.004 , [$p < 1.000$], 0.025 mM dozunda eklenen kuyucukların ortalama OD değeri 0.552 ± 0.001 , [$p < 1.000$], ANOVA $p < 0.001$ olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. Bileşik 5' in K562 hücreleri üzerine % sitotoksik etkileri

% sitotoksosite	Kimyasal Dozları (mM)						ANOVA 0.001
	1.000 mM	0.500 mM	0.250 mM	0.100 mM	0.050 mM	0.025 mM	
	29.7	19.2	11.6	2.2	0.6	-1	

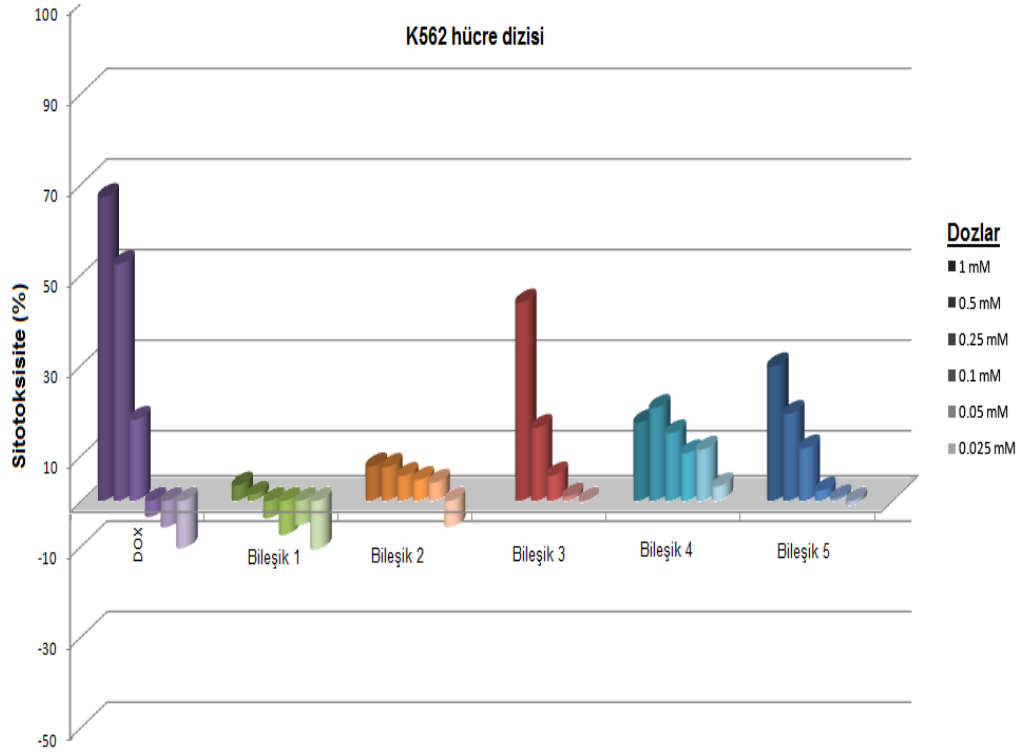
Elde edilen verilere göre, bileşik 5' ün 1.000 mM, 0.500 mM, 0.250 mM, 0.100 mM dozlarında düşük düzeylerde sitotoksik etkileri gözlemlenmişken, 0.025 mM dozunda sitotoksik etki gözlenmemiştir (Çizelge 4.6).



Şekil 4.17. Bileşik 5 ait Korelasyon Grafiği

Değişen dozlarda bileşik 5' in uygulandığı test kuyucuklarından elde edilen OD değerlerinin pozitif kontrol olan doksorubisinden elde edilen OD değerleriyle arasındaki bağıntı analizinde, bileşik 5 ile doksorubisinin etkinlikleri arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif bağıntının olduğu ($r: 0.943$, $p<0.001$) de gözlenmektedir (Şekil 4.17).



Şekil 4.18. Bileşiklerin sitotoksik etki grafiği

Şekil 4.18’ te görüldüğü gibi bileşikler arasından en yüksek sitotoksisite bileşik 3 de gözlenmiştir. Bileşik 5’ te de az da olsa bir sitotoksik etkiye en yüksek dozda rastlanmıştır. Genel olarak bakıldığında halen kanser ilacı olarak kullanılmakta olan doksorubisinin sitotoksik etki düzeyine hiçbir bileşikte ulaşamamıştır.

Kanser; insan sağlığı üzerinde önemli sosyal ve ekonomik etkilere sahip ciddi bir problemdir. Teşhis, korunma yöntemleri ve tedavilerdeki gelişimlere rağmen bu hastalık hala bütün dünyada milyonlarca insanı etkilemekte, onların yaşam kalitesini oldukça düşürmekte ve dünyadaki ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Bu hastalığın tedavisinde, kemoterapi en sık başvuru yöntemidir.

KML hematopoetik kök hücrelerin çoğalması ile oluşan klonal bir hastalıktır (Lanzkowsky, 2005). KML tüm lösemilerin yaklaşık % 15' ini oluşturmaktadır ve ortalama 45-55 yaşlarda görülüp, yaş artışına bağlı olarak insidansı da artmaktadır. Hastaların yaklaşık olarak % 30' u 60 yaş üzerindedir. Vakaların yaklaşık olarak % 3' ü çocukluk çağında görülmektedir (Haznedaroğlu, 2009).

KML 9. kromozomdaki Abl geninin 22. kromozomdaki Bcr genine translokasyonu ile oluşan *Ph* kromozomu ile karakterize edilmektedir (Lanzkowsky, 2005; Haznedaroğlu, 2009). *Ph* füzyon proteini tarafından kodlanan p210 onkogeni, hücrenin apoptoz ve çoğalma mekanizmalarında bozukluklara yol açmaktadır (Nowell, 2002; Chasseriau ve ark., 2004).

Günümüzde antikanser araştırmalarında kullanılmak üzere kanserli hastalardan ve dokulardan izole edilmiş onlarca hücre serisi bulunmaktadır. Çalışmamız için seçtiğimiz K562 hücre serisi KML' nin blastik kriz evresinden köken alan hücre dizisidir (Lozzio ve ark., 1975). Glutasyon sistemi, oksidatif stres, eritroid farklılaşma ve antikanser tedavilerinin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Koeffler ve ark., 1980; Nakajima ve ark., 1993).

Elektron mikroskobu incelemelerinde K562 hücreleri kolay bağıntılı, düzgün şekilli, kısa mikrovillüslü, farklılaşmış lösemik hücrelerine benzer şekilde görülür (Klein ve ark., 1976). Giemsa ile hazırlanmış preparatlarda K562 hücreleri yaklaşık 20 µm çapında iki ya da daha fazla parçalı nükleuslu farklılaşmamış blast hücreleri olarak tanımlanabilir (Klein ve ark., 1976; Koeffler ve ark., 1980).

Hücre kültürü çalışmaları, *in vivo* şartlarda mümkün olmayan, kısa zaman aralığında gerçekleştirilmesi istenen fiziksel ve kimyasal etkenlerin incelenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Anıl, 1986; Bilir, 2010).

Antikanser ajanların *in vitro* etkinlik düzeyinin saptanmasında çok farklı hücre kültürü parametre ve yöntemleri kullanılmaktadır. Bu parametrelerin başında hücrelerin farklı doz ve zaman aralığında ilaçlarla etkilendirilerek doz ve zaman etkileşim grafikleri elde edilmekte ve bu parametrelerden elde edilen sonuçlar ile ilaçların etkileşimlerinin özgünlüğü belirlenebilmektedir (Şencan, 2011).

Çalışmamızda kemoterapötik ajan olarak düşündüğümüz ve imin taşıyan fenoksi substitüe siklotrifosfazenlerin sitotoksik etkisi çalışmamızca ortaya konulmuştur. Benzer bir çalışmada aminometilfosfinleri kullanmış olup katalitik etkisi ve antimikrobiyal, antibakteriyal etkinliği kanıtlanmışlardır. Çalışmamızda kullandığımız fosfozen maddelerin katalitik, antimikrobiyal, antibakteriyal etkinliğine bakmamız açısından yol gösterici bir çalışmadır (Fawcett ve ark., 1993).

K562 insan lösemik hücre soyunda tributylin halo benzoat içeren bazı farklı bileşiklerin sitotoksik etkilerini ve bu hücrelerde ekstraselüler kalsiyum iyon girişini incelenmiş ve K562 hücrelerinin düşük membran kolesterol içeriğine sahip olduğu ortaya konulmuştur. Çalışmada Tributylin benzoatın K562 hücrelerine hücrelerinde toksik etkisinden membran kolesterol içeriğinin sorumlu olduğunu belirtmiştir (Ala ve ark., 2004). Bu çalışma yöntem bakımından bizim çalışmamıza paralellik göstermektedir.

Çalışmalarda kullanılacak kimyasalların yüksek antitümör etki göstermesi için, fosfolipid yapısındaki hücre zarından geçebilmesi önemlidir. Bunun için lipofilik katyonların kullanılması gerekmektedir (Mc Keage ve ark., 2000). Etkinliğine bakacağımız bileşiklerin bu özelliği taşıması büyük önem göstermek arz etmektedir. Nitekim çalışmamızda kullandığımız bileşiklerde bu özelliktedir.

Aminofosfin Pt(II) kompleksleri DNA bazları olan guanin ve timine halka açılma (ring-opening) reaksiyonlarıyla bağlanabilmekte ve kanserli hücrelere karşı sitotoksik etki gösterebilmektedir. Sitotoksik platin komplekslerinin hedefi çoğunlukla DNA olarak görülmektedir (Reedijk, 1999; Garcia ve ark., 2002). Bu çalışma ışığında bir sonraki çalışmalarımızda kullanacağımız maddelerin platinli bileşiklerinin sentezlenerek test edilmesi, hücre ölümlerinin apoptotik mi yoksa nekrotik mi olduğunu ortaya koymamızı sağlayacaktır.

Berkarda ve arkadaşlarının (1992) bir eritrolösemik hücre soyu olan K562 hücrelerinde warfarin uygulanarak, ilacın oksidatif stres oluşturma potansiyeli ve buna bağlı olarak hücre sitotoksitesi oluşturma özelliği araştırılmıştır. Bu çalışma da sitotoksite belirleme, farklı dozlardaki etkiyi gözleme ve K562 hücre soyu üzerinde çalışılmasıyla bizim çalışmamızla benzer özellik taşımaktadır.

Hücre ölümünün değerlendirilmesinde kullanılan ve bizim de çalışmamızda kullandığımız tripan mavi testinde hücre canlılığının değerlendirilmesi hücrelerin boyayı alıp almadığına göre yapılmaktadır. Apoptozun son aşamasındaki hücrelerin bu testle değerlendirilmemesi zorluğu ile MTT yöntemin ölüm nedenini tam gösterememesi, apoptoz göstergesi olarak kabul edilen DNA fragmentasyonu yöntemi ile yaptığımız çalışmanın zenginliğini artıracaktır.

Çalışmamızda kullandığımız imin taşıyan fenoksi substitüe siklotrifosfazenler yeni sentezlenmiş olup, bu nedenle daha önce hiçbir çalışmada kullanılmamıştır. Bu yönüyle çalışmamız özgün bir niteliğe sahiptir.

Çalışmamızda MTT yöntemi kullanılarak, K562 hücre dizisinde yeni sentezlenmiş siklotrifosfazenlerin antitümöral etkinliğinin ortaya konması amaçlanmıştır. Yeni sentezlenen siklotrifosfazen komplekslerinden sadece bileşik 3 olarak adlandırılmış siklotrifosfazen kompleksi en yüksek sitotoksik etkiyi ortaya koymuştur. Diğer yeni sentezlenen siklotrifosfazen komplekslerinin test edilen bütün konsantrasyonlarda önemli bir sitotoksik etki gösterilememiştir. Ancak Bileşik 1' in gösterdiği sitotoksik etkisinin de zayıf olması nedeniyle olması antikanser etkisinin araştırılması için gereken deneysel hayvan modeli araştırması için ümit verici değildir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmamızda kullandığımız ilaç olan doksorubisine paralel sonuç bileşik 3 de görülmüştür.

- ✓ Bu deneyde kullanılan kimyasalların suda çözülebilir tuzlarını sentezlenerek deneyin tekrar edilmesi durumunda sitotoksik etkinin yeniden incelenmesi daha iyi sonuçlar vereceğine inanmaktayız.
- ✓ Ayrıca kullandığımız MTT yöntemi kolorimetrik (renge dayalı) bir yöntem olduğundan seçeceğimiz kimyasalların renksiz olmasına özen gösterilmelidir.
- ✓ Çalışmada sadece kanserli hücrelerin kullanılmasının yerine, kimyasallarımızın sağlıklı hücreler üzerinde denenmesi gereklidir.
- ✓ Sitotoksikite araştırmalarının kanserli hastaların dokularından elde edilecek primer kültürlerde denenmesi daha gerçekçi sonuçlar verebilecektir.
- ✓ Sitotoksitesi yüksek çıkan bileşiklerin TCA-ATP yöntemi uygulanarak bu verilerin desteklenmesi çalışmayı daha da zenginleştirecektir.
- ✓ Doksorubisinin bazı dozlarında proliferasyonu durduramadığından K562 hücreleri üzerinde ilaç direnci gelişimi araştırılmalıdır.
- ✓ Çalışmamızda K562 hücre soyu kullanılmıştır. Literatüre baktığımızda farklı hücre soyları çeşitli kimyasallara karşı farklı cevaplar oluşturabilmektedir. Bu nedenle sonuçlarımız bileşiklerimizin tüm hücre soylarına veya kanser tiplerine karşı sitotoksik cevabı yansıtmayabilir. Bileşiklerimizin değişik kanser hücre soylarında denenmesi ile farklı sonuçlara ulaşılabilmesi mümkündür.
- ✓ Çalışmamızda DNA fragmentasyon yöntemi kullanılmamıştır. Bu yöntem kullanılıp hücre ölümünün apoptozisten kaynaklanıp kaynaklanmadığını ortaya konulmalıdır.

- ✓ Aynı zamanda etkili olan kimyasallarımızın *in vivo* şartlarda deney hayvanları üzerinde denenerek canlı sistemde aktivite kaybı oluşup oluşmayacağının test edilmesi bizi farklı sonuçlara ulaştırabilir.

KAYNAKLAR

- ALLCOCK, H.R., NELSON, C.J., COQQIO, W.D., MANNERS, I., KOROS, W.J., WALKER, D.R.B., and PESSAN, L.A., 1993. Gas Permeation and Selectivity of Poly(organophosphazene) Membranes. *Macromolecules*, 26(4):1493-1502.
- ALLCOCK, H.R., COLEMAN, M.M., REED, C.S., and GUIGLEY, K.S., 1999. Blends of polyurethane and polyphosphazene and their use as flame-retardant foamed compositions. *Patent*, 5(9):965-967.
- ANZAI, M., HOYA, K., TORIYAMA, F., IDE, K., KIKUCHI, H., HIROSE, H., YUDA, M., and OHASHI, M. A., 1986. Study on crown and bridge resin using PNC-EMA monomer. *Journal Nihon Univ Sch Dent*, 28(4):240-248.
- ARCAMONE, F., CASSINELLI, G., and FANTINI, G., 1969. "Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peuceletius* var. *caesioides*". *Biotechnology Bioeng*, 11(6):1101-1110.
- BARILE, F.A., 1994. Introduction to *in vitro* cytotoxicology mechanisms and methods. CRC Press, Florida, USA. 52p.
- BARUTÇA, B., 2006. Bazı bitki ekstraktlarının memeli hücre kültürlerinde sitotoksik aktivitelerinin *in vitro* araştırılması. Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, Eskişehir. 87s.
- BERKARDA, B., ARDA, O., TASYUREKLI, M., and DERMAN, U., 1992. Mitochondrial-lytic action of warfarin in lymphocytes. *International of Clinical Pharmacology*, 30(8):277-279.
- BERNHEIM, K.A., REED, C.S., and ALLCOCK, H.R., 1999. Synthetic Bone A Polyphosphazene/Hydroxyapatite Composite. *Journal of Investigative Medicine*, 14(2):42-47.
- BRANDT, K., KRUSZYNSKI, R., BARTCZAK, J.T., and CZOMPERLIK, P., 2001. AIDS-related lymphoma screen results and molecular structure determination of a new crown ether bearing aziridinylcyclophosphazene potentially capable of ion-regulated DNA cleavage action. *Inorganic Chimica Acta*, 322(7):138-144.
- BROWNE, R.M., 1988. The *In Vitro* Assessment of the Cytotoxicity of Dental Materials Does It Have a Role. *Int Endod Journal*, 21(5):50-58.
- COLLIER, A.C., and PRITSOS, C.A., 2003, The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. *Biochem Pharmacol*, 66(3):281-287.
- DAVIS, J.M., 1996. Basic Cell Culture A Practical Approach. Oxford University Press INC, New York. 371p.
- ENIMMER, A., 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, 288(5):369-376.
- FEIGAL, R.J., YESILSOY, C., MESSER, H.H., and NELSON, J., 1985. Differential Sensitivity of Normal Human Pulp and Transformed Mouse Fibroblasts to Cytotoxic Challenge. *Arch Oral Biology*, 30(6):609-613.
- FENT, K., 2001. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in vitro*, 15(7):477-488.

- FORNARI, F.A., RANDOLPH, J.K., YALOWICH, J.C., RITKE, M.K., and GEWIRTZ, D.A., 1994. Interference by Doxorubicin with DNA Unwinding in MCF-7 Breast Tumor Cells. *Molecular Pharmacology*, 45(9):649-656.
- FRESHNEY, R.I., 1986. *Animal Cell Culture A Practical Approach*. IRL Press Limited, Oxford. 219p.
- GAD, S.C., 2000. *In vitro toxicology*, Second Edition, Taylor&Francis, New York. 481p.
- GENÇ, S., AKHISAROĞLU, M., ve GENÇ, K., 2002. Eritropoetin'in PC12 hücre Hattında Amiloid-Beta peptid ile olusturulan nörotoksisiteye karşı koruyucu etkisi. *Turkish Journal of Geriatrics*, 5(3):1-4.
- GREEN, H., KEHINDE, O., and THOMAS, J., 1979. Growth of Cultured Human Epidermal Cells into Multiple Epithelia Suitable for Grafting. *Proc Natlional Academy Scicent*, 76(9):5665–5668.
- HANKS, C.T., WATAHA, J.C., and SUN, Z., 1996. *In vitro* Models of Biocompatibility A Review. *Dent Material*, 12(3):186-193.
- HART, I.R., 1983. Tumor Cell Hybridization and Neoplastic Progression. *Symp Fundam Cancer Resource*, 36(7):133-143.
- HOLST, C.M., and OREDSSON, S.M., 2005. Comparison of three cytotoxicity teste in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell lines. *Toxicology in vitro*, 19(3):379-387.
- JIAA, C., and LIU, Y., 1999. Tribological evaluation and anlysis of the head/disk interface with perfluoropolyether and X1-P phosphazene mixed lubricants. *Tribology Letters*, 7(2):11-16.
- JOHNSON, M.G., KIYOKAWA, H., TANI, S., and KOYAMA, J., 1997. Antitumor agents-CLXVII synthesis and structure-activity correlations of the cytotoxic anthraquinone 1,4-bis-(2,3-epoxypropylamino)-9,10-anthracenedione and of related compounds, *Biorganise Medice Chemical*, 5(2):1469-1479.
- KLEIN, E., BEN-BASSAT, H., NEUMANN, H., RALPH, P., ZEUTHEN, J., POLLIACK, A., and VÁNKY, F., 1976. Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *International Journal Cancer*, 18(4):421-431.
- KOEFLER, H.P., and GOLD, D.W.W., 1980. Human myeloid leukemia cell lines. *Blood*, 56(3):344-350.
- KORKMAZ, S., 2002. Paklitaksel, kesretin, ve berberinin A549, HeLa, HT-29 NIH3T3 hücre kültürlerinde sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Eskişehir. 73s.
- LAKSHMI, S., LEE, D.A., BENDER, J.D., ALLCOCK, H.R., and LAURENCIN, C.T., 2003. *In vitro* evaluation of novel biodegradable polyphosphazenes for bone tissue engineering. *Annual Mtg. Of Orthopeadic Resource Social, USA*. 937p.
- LANGDON, S.P., 2004. *Cancer Cell Culture Methods and Protocols*, Humana Press, Otowa, New Jersey. 417p.
- LANGONE, F., LORA, S., VERONESE, F.M., CALICET, P., PORNIGOTTO, P.P., VALENTI F., and PALMA, G., 1995. Peripheral nerve repair using poly(organo)phosphazene tubular prosthesis. *Biomaterials*, 16(5):347-353.

- LOMOVSKAYA, N., OTTEN, S.L., and DOI-KATAYAMA, Y., 1999. "Doxorubicin over production in *Streptomyces peucetius* cloning and characterization of the dnrU ketoreductase and dnrV genes and the doxA cytochrome P-450 hydroxylase gene". *Bacteriol*, 181(1):305–318.
- LOWRY, O.H., ROSBROUGH, N.J., FARR, A.L., and RANDALL, R.S., 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *T. Biology Chemical*, 193(8):265-275.
- LOZZIOI, C.B., and LOZZIO, B.B., 1975. Human chronic myolegenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 45(3):321-333.
- MATHUR, S.P., MATHUR, R.S., CREASMAN, W.T., UNDERWOOD. P.B., and KOHLER, M., 2005. Early non-invasive diagnosis of cervical cancer: beyond Pap smears and human papilloma virus (HPV) testing. *Cancer Biomark*, 1(3):183-191.
- MJOR, I.A., 1983. Hensten-Pettersen The Biological Compatibility of Alternative Alloys. *Int Dent J*, 33(6):35-40.
- MOHAMED, S.M., RAHMANI, M., WIART, C., and DHALIWAL, J.S., 2000. Apoptotic and necrotic cell death manifestations in leukemic cells treated with methylgerambullin a sulphone from *Glycosmis calcicola*. *Journal Biochemical Molecular Biology&Biophys*, 4(3):253-261.
- MOMPARLER, R.L., KARON, M., SIEGEL, S.E., and AVILA, F., 1976. Effect of adriamycin on DNA, RNA and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Research*, 36(7):2891-2895.
- MORIYA, K., YAMANE, T., SUZUKI, T., MASUDA, T., MIZUSAKI, H., YANO, S., and KAJIWRW, M., 2003. Mesogenicity of organophosphazenes the effect of phosphazene ring and side groups on the phase transition. *ChemInform*, 34(4):9-11.
- MUTLU, İ., 2003. Hücre Kültürü ve Diş Hekimliğindeki Uygulamaları. GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Diş Hekimliği Bilimleri Merkezi, Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi A.D. Başkanlığı Semineri, Ankara, 57s.
- OKTAR, N., 2009. K562 hücre dizisinde fosfin bileşiklerinin sitotoksik etkisinin mtt (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide:thiazolylBlue) ile araştırılması. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 47s.
- ÖZÇELİK, A., 2011. Şanlıurfa yöresine ait bazı endemik bitkilerin antineoplastik özellikleri. Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek, Lisans Tezi, Şanlıurfa, 62s.
- ÖZDEMİR, K.G., 2007. Farklı Yumusak Astar Materyallerinin sitotoksitelerinin Fare Fibroblastları Üzerinde Hücre Kültürü Yöntemi ile *in vitro* Olarak Değerlendirilmesi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Protetik Diş Tedavisi Ana Bilim Dalı, Ankara, 128s.
- PETERSON, E.S., STONE, M.L., MC CAFFREY, R.R., and CUMMINGS, D.G., 1993. Mixed-gas separation properties of phosphazene polymer membranes. *Sep. Sci. Technical*, 28(3):411-425.
- POLYZOIS, G.L., HENSTEN-PETTERSEN, A., and KULLMANN, A., 1994. An Assessment of the Physical Properties and Biocompatibility of Three Silicone Elastomers. *Journal Prosthet Dental*, 71(6):500–504.

- POOT, A., BEUGELING, T., DEKKER, A., SPIJKERS, J., FEIJEN, J., and BANTJES, A., 1992. Dependence of Endothelial Cell Growth on Substrate-Bound Fibronectin. *Clin Mate*, 11(3):151–155.
- PORS, K., PLUMB, J.A., BROWN, R., TEESDALE-SPITTLE, P., SEARCEY, M., SMITH, P.J., PATTERSON, L.H., 2005. Development of nonsymmetrical 1,4-disubstituted anthraquinones that are potently active against cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Journal Medicine Chemical*, 48(4):6690-6695.
- POTIN, P., and JAEGER, R., 1991. Poly phosphazenes: Synthesis, structures, properties, applications. *Europe Polythene Journal*, 27(5):341-348.
- POUL, J., 1970. *Cell and Tissue Culture*. 4th ed., Edinburgh, London. 631p.
- PUTNAM, K.P., BOMBICK, D.W., and DOOLITTLE, D.J., 2002. Evaluation of eight *in vitro* assays or assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *in vitro Toxicology*, 16(1):599-607.
- RAYMOND, B., 1992. "The Anthracyclines: Will We Ever Find a Better Doxorubicin". *Seminars in Oncology*, Vol. 19(3):670–686.
- SAYDAM, G., and AYDIN, H., 2003. Involvement of protein phosphatase 2A in interferon alfa2b induced apoptosis in K562 human CML cells. *Leukemia Research*, 27(4):709-717.
- SCHMALZ, G., 1994. Use of Cell Cultures for Toxicity Testing of Dental Materials-Advantages and Limitations. *Journal Dent.*, 22 Suppl 7(2):6-11.
- SCHMALZ, G., 1997. Concepts in Biocompatibility Testing of Dental Restorative Materials. *Clin Oral Investigation*, 6(1):154-162.
- SENCAN, S., 2006. Warfarin' in sitotoksik etkisinin k562 lösemik hücre soyunda çalışılması. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 45s.
- SHARP, J.A., 1977. *An Introduction to Animal Tissue Culture*. The Camelot Press Ltd., Southampton. 381p.
- SHAW, R.A., and WOODS, M., 1975. Phosphorus-Nitrogen compounds Part XLI Reactions of hexachlorocyclotriphosphazatriene with dibenzylamine and benzylamine the importance of steric effects. *Journal Chemical Social Dalton Transmission*, 9(2):2202-2207.
- SHAW, R.A., FITZSIMMON, B.W., and SMITH, B.C., 1962. The Phosphazenes (Phosphonitrilic Compounds). *Chemical Review*, 62(3):242-281.
- SINGHAL, S.S., AWASTHI, S., OANDYA, U., PIPER, J.T., JOHN, M.K., CHENG, J.Z., and AWASTHI, Y.C., 1999. The effect of Curcumin on glutathione-linked enzymes in K562 human leukemia cells. *Toxicology letters*, 109(3):87-95.
- SPIER, R.E., and GRIFFITHS, J.B., 1985. *Animal Cell Biotechnology. Volume 1: Cell Biology Experimental Aspects*, Academic Press Inc., London. 259p.
- SUBHASHINI, J., MAHIPAL, V.K., and REDDANNA, P., 2005. Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia *in vitro*, *Cancer Letters*, 224(1):31-43.
- VAN DER HUIZEN, A.A., 1984. Aziridinly cyclophosphazenes, Synthesis, structure and Cytostatic Activity. PhD Thesis, Groningen, 7-11p.
- WALKER, B.J., 1972. *Organophosphorus Chemistry*. Penguin Books Ltd. Harmondsworth, Middlesex. 120-124p.

- YANO, C.L., ve MARCONDES, C.G., 2005. Cadmium chloride-induced oxidative stress in skeletal muscle cells *in vitro*, Free Radical Biology&Medicine, 39(10):1378-1384.
- YEŞİLOT, S., 2003. Yeni tip fosfazen bileşiklerinin sentezi ve kiral özelliklerinin incelenmesi. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Doktora Tezi, Gebze, Kocaeli, 131s..

ÖZGEÇMİŞ

12 Aralık 1987’de doğdu. İlköğretimini Şanlıurfa Profilo İÖO okudu. Lise öğretimine Şanlıurfa Anadolu Lisesinde devam ederek, 2005 yılında mezun oldu. Harran Üniversitesi Biyoloji bölümünü okudu. Uluslararası Yatırımcılar Derneği’ in Koza Projesi ilk mezunu olarak Nestle Gıda Sanayi AŞ.’ de staj yaptı. T.C. Ticaret Bakanlığı KOSGEB tarafından düzenlenen Genç Girişimci Eğitim Programından başarıyla mezun oldu. Lisans ve Yüksek Lisans eğitimi boyunca Türkiye Erozyonla Mücadele, Ağaçlandırma ve Doğal Varlıkları Koruma Vakfı (TEMA), Young Guru Academy (YGA), HRÜ’ ye bağlı Biyoloji Kulüp’ünde aktif görev aldı. Harran Üniversitesi Biyoloji Bölümünde yüksek lisans eğitimine devam etmektedir. Novartis’in sponsorluğunda, CRM İlaç araştırma şirketinde site kordinatörü olarak çalışmaktadır.

İletişim Bilgileri: nidaesracan@yahoo.com.tr

ÖZET

Bu çalışmada, yeni sentezlenmiş imin taşıyan fenoksi substitüe siklotrifosfazen bileşiklerinin ($[\text{N}_3\text{P}_3\text{Cl}_6]$, $[\text{N}_3\text{P}_3(\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4\text{-}o\text{-CHO})_6]$, $[\text{N}_3\text{P}_3(\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4\text{-}o\text{-CH=N-}o\text{-C}_6\text{H}_5)_6]$, $[\text{N}_3\text{P}_3(\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-CHO})_6]$ ve $[\text{N}_3\text{P}_3(\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-CH=N-}o\text{-C}_6\text{H}_5)_6]$) kronik myeloid lösemi kökenli K562 hücre dizisi üzerine sitotoksik etkilerinin araştırması amaçlanmıştır. Bileşiklerin K562 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri sadece canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrojenazları tarafından metiltiyazol tetrazolium tuzlarının indirgenmesine dayanan kolorimetrik MTT yöntemi ile analiz edildi. Kimyasallar 1.000 mM, 0.500 mM, 0.250 mM, 0.100 mM, 0.050 mM, 0.025 mM dozlarında kullanılmıştır ve doksorubisinde aynı dozlarda pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. En yüksek sitotoksik etki ($\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4\text{-}o\text{-CH=N-}o\text{-C}_6\text{H}_5$)₆'nın 0.500 mM dozunda gözlenmiştir. Pozitif kontrol olan doksorubisinin etkisiyle karşılaştırıldığında kimyasalın bu düzeydeki etkinliği onun sitotoksik antikanser ajan olabilme beklentilerini karşılamamaktadır. Kimyasallardan hiçbirinin K562 hücreleri üzerinde ümit verici sitotoksik etkilere sahip olmamasıyla birlikte bunların olası sitotoksik etkilerinin diğer kanser hücreleri üzerinde test edilmesinin yararlı olabileceğine inanmaktayız.

SUMMARY

In this study, we aimed to investigate the cytotoxic effects of the newly synthesized imin containing phenoxy substituted cyclophosphasenes ($[\text{N}_3\text{P}_3\text{Cl}_6]$, $[\text{N}_3\text{P}_3(\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4\text{-}o\text{-CHO})_6]$, $[\text{N}_3\text{P}_3(\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4\text{-}o\text{-CH=N-}o\text{-C}_6\text{H}_5)_6]$, $[\text{N}_3\text{P}_3(\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-CHO})_6]$ and $[\text{N}_3\text{P}_3(\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-CH=N-}o\text{-C}_6\text{H}_5)_6]$) on K562 cell line derived from chronic myeloid leukemia. Cytotoxicity of the compounds on K562 cells was analyzed by colorimetric MTT assay which is based on reduction of methylthiazole tetrazolium salt by mitochondrial dehydrogenase of only living cells. Chemicals were used in doses of 1.000 mM, 0.500 mM, 0.250 mM, 0.100 mM, 0.050 mM, 0.025 mM and same doses of doxorubicin were used as positive control. The highest cytotoxic effect among chemicals was observed for $\text{N}_3\text{P}_3(\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4\text{-}o\text{-CH=N-}o\text{-C}_6\text{H}_5)_6$ at dose 0.500 mM. When compared with the effect of doxorubicine as control group, such level of cytotoxicity of the chemical did not meet the expectations to be anticancer agent. Although none of the chemicals have promised cytotoxic effects on K562 cells, we believe that examining their probable cytotoxic effects on another cancer cells may be beneficial.