

Bazı Tiyohidantoin Türevlerinin Apoptotik Etkileri

[Apoptotic Effects of Some Thiohydantoin Derivatives]

Zerrin İncesu,
Gülşen Akalın

Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı, Tepebaşı, 26470,
Eskişehir, Türkiye

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Doç.Dr Zerrin İncesu

Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyoki-
mya Anabilim Dalı, Tepebaşı, Eskişehir, Türkiye
Tel: (222) 335 05 80
E-mail: zseller@anadolu.edu.tr

Kayıt Tarihi : 17 Aralık 2009; Kabul Tarihi : 14 Haziran 2010
[Registered: 17 December 2009; Accepted: 14 June 2010]

ÖZET

Amaç: Bu çalışma, yeni sentezlenen 3-fenil- ve 3-(4-metoksifenil)-2-tiyohidantoin türevlerinin 5RP7 ve CO25 hücre apoptozu üzerine etkilerini incelemeyi amaçlamaktadır.

Gereç ve Yöntemler: Tiyohidantoin türevleri daha önce belirtildiği gibi sentezlenmiştir. % 10 fetal dana serumu içeren besi ortamında hücreler çoğaltılmış ve bileşikler ile farklı zaman aralıklarında inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonrasında, tiyohidantoin türevlerinin 5RP7 ve CO25 hücre canlılığı üzerine etkileri MTT deneyi ile belirlenmiştir. Bileşiklerin (IC_{50} ve $IC_{50}/2$ konsantrasyonları) kanser hücre apoptozu üzerine etkileri ise, akridin oranj-etidyum bromür boyama yöntemi ve annexin-V'in akım sitometrisinde analizi ile incelenmiştir.

Bulgular: Tiyohidantoin türevleri, her iki hücre tipinin hücre canlılığını zamana- ve doza-bağlı olarak azaltmış ve türevlerin IC_{50} değerleri, 0.01-0.07 mg/ml konsantrasyon aralığında bulunmuştur. 3-fenil-2-tiyohidantoin türevi ile 8 ya da 24 saat muamele edilen her iki hücre tipide, apoptozunun karakteristik morfolojik değişimlerini örneğin, kromatin kondensasyonu ve apoptotik tomurcuklanma, göstermiştir. Ancak, 3-(4-metoksifenil)-2-tiyohidantoin türevi bu tür morfolojik değişimlerin oluşumunu yalnızca 5RP7 hücrelerinde uyarırken, CO25 hücrelerinde uyarmamıştır. Bunun aksine, her iki türev ile 24 saat muamele edilen CO25 hücrelerinin erken apoptotik hücre oranında pozitif kontrol (14.7 mg/ml etoposid) düzeyinde bir artış gözlenmiştir.

Sonuçlar: Her iki tiyohidantoin türevi de hem 5RP7 hem de CO25 hücre canlılığını düşük dozlarda baskılamıştır bu da yeni sentezlenen tiyohidantoin türevlerinin antikanser etkili olabileceğini göstermiştir. Bileşiklerin hücre apoptozu üzerine etkileri ise, hücre tipine ve türevin kimyasal yapı özelliğine bağlı olarak değişmiştir.

Anahtar Kelimeler: Tiyohidantoin, apoptoz, hücre kültürü, *N-ras*, *H-ras*

ABSTRACT

Objectives: The aim of this study is to investigate the effects of newly synthesized 3-phenyl- and 3-(4-methoxyphenyl)-2-thiohydantoin derivatives on 5RP7 and CO25 cell apoptosis.

Methods and Materials: Thiohydantoin derivatives were synthesized as reported previously. The cells were grown in DMEM cell culture medium supplemented with % 10 foetal bovine serum and incubated with compounds for different time intervals. After incubation time, the effects of thiohydantoin derivatives on the viability of 5RP7 and CO25 cells determined by MTT assay. The effects of IC_{50} and $IC_{50}/2$ concentrations of compounds on cancer cell apoptosis were investigated by using acridine orange-ethidium bromide staining and annexin-V with flow cytometry analysis.

Results: Thiohydantoin derivatives reduced viability of both cell lines in a time- and dose-dependent manner with their IC_{50} values of 0.01-0.07 mg/ml. Both cell lines treated with 3-phenyl-2-thiohydantoin derivative for 8 or 24 h exhibited the morphological changes characteristics of cell apoptosis such as chromatin condensation and apoptotic bodies. However, 3-(4-methoxyphenyl)-2-thiohydantoin derivative only induced these sort of morphological changes in 5RP7 cancer cells, but not in CO25 cells. To the contrary, CO25 cells treated with either both derivatives for 24 h resulted in increment of early apoptotic cell rates as much as positive control (14.7 mg/ml etoposid).

Conclusions: Both thiohydantoin derivatives were inhibited the cell viability of both 5RP7 and CO25 cells at lower doses that has showed that these newly synthesized derivatives could have anti-cancer effects. The effects of compounds on cell apoptosis have altered depending on the cell type and substituent properties of chemical structure.

Key Words: Thiohydantoin, apoptosis, cell culture, *H-ras*, *N-ras*

Giriş

Fizyolojik ve patolojik durumlarda meydana gelen apoptoz, bağışıklık sistemi ile ilişkili olmayan programlı hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptoz, organizmada taahhüt fazı (erken evre) ve infaz fazı (geç evre) olmak üzere iki fazda meydana gelmektedir. Taahhüt fazında, hücre morfolojik değişime uğramazken apoptotik sinyal iletiminin gerçekleştiği ve infaz fazında ise, hücre içi substrat degradasyonu ve morfolojik değişimlerin meydana geldiği gösterilmiştir [1]. Hücre apoptoz mekanizması, apoptotik ve apoptotik-önleyici sinyal dengesinin sağlanması ile kontrol altında tutulmaktadır [2]. Günümüzde, apoptotik sinyal yolları; mitokondriyal yolak (içsel yolak) [3], ölüm reseptörleri-ilişkili yolak (dışsal yolak) [4], ve endoplazmik retikulum-ilişkili yolak [5] olmak üzere üç ana başlık altında toplanmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, $[Ca^{2+}]_i$ artışın hidrolitik enzimleri aktive ettiğini ve sitoskelet degradasyonunu başlattığını bu bağlamda da apoptoz mekanizmasını uyardığını vurgulamaktadır. T-limfositlerde [6], pankreatik β -hücrelerinde [7] ve limfoit hücrelerinde [8], $[Ca^{2+}]_i$ değişimine bağlı olarak apoptozun uyarıldığı gösterilmiştir. Ancak, Ca^{2+} 'un bu etkisi, apoptoz yollarına özgüllük göstermemektedir [1,9].

Günümüzde, hidantoin ve 2-tiyohidantoin türevleri birçok biyolojik aktiviteye sahip olmaları ve tedavide kullanılmalarından dolayı, ilaç geliştirme ve araştırma alanlarında ilgi çekmektedir [10]. Hidantoinlerin; antimikrobia, antikonvulzan ve antiepileptikal etkileri bilinmekle beraber bazı hidantoin ilaçları bu alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır [11-13]. Ancak, günümüzde halen birçok hidantoin türevi araştırmaya açıktır. 5,5'-hidantoin türevlerinin HIV proteaz [14] ve aldolaz redüktaz inhibisyon yapıcı [15], sodyum kanal blokörü, trombosit agregasyon aktivitesine [16] sahip olduğu gösterilmiştir.

Hidantoin ve türevlerinin; antitümör etkileri [17,18] ile birlikte, insan servikal (SKOV-03, OVSAHO), fare osteosarkoma (LM8, LM8G7) [19] ve A549 akciğer [20] gibi tümör hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı ve ras onkogeni farnesil transferaz [21] ile nekroptozise [22] karşı inhibitör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan orijinal tiyohidantoin türevlerinin sentezi ve $[Ca^{2+}]_i$ arttırdığı tarafımızdan gösterilmiştir [23]. Yukarıda belirtilen literatür analizi sonrasında ve

$[Ca^{2+}]_i$ artışına neden olan orijinal 3-fenil-2-tiyohidantoin ve 3-(4-metoksi-fenil)-2-tiyohidantoin türevlerinin anti-kanser ve apoptotik etkileri *in vitro* ortamda H-ras (SRP7 hücreleri) ve N-ras (CO25 hücreleri) transform edilmiş hücreler kullanılarak yapı-etki ilişkisi incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem

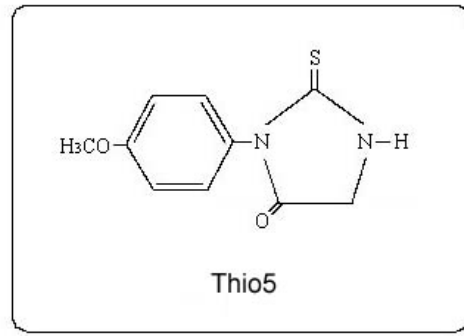
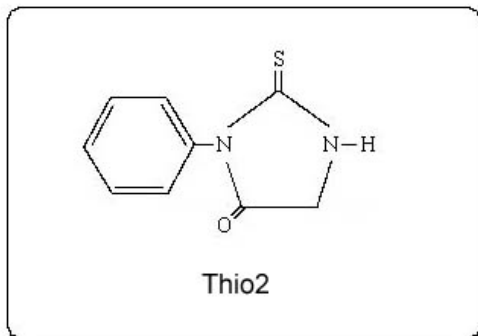
Hücre kültürü ve bileşiklerin hazırlanması

Fare iskelet kas hücre hatları CO25 (Dr. I. Gibson, University of East Anglia) ve sıçan embriyo fibroblast hücre hatları SRP7, % 10 fetal dana serumu (FCS) (Gibco, UK), 100 ünite/ml penisilin-streptomisin ve % 1 glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle's solüsyonu (DMEM) (Sigma, UK) içerisinde 37°C de, 5% CO_2 / 95% hava ortamında kültürde tutulmuşlardır. CO25 hücreleri, ata hücre olan C2 hücresine 61. kodonundan mutant insan N-ras onkogeni taşıyan bir plazmidin aktarılması ile elde edilmiştir [24]. CO25 hücreleri % 10 at serumu içerisinde 4 ila 7 gün inkübasyona tabi tutularak miyotüb oluşumu sağlanmıştır. Bu süre sonunda, hücre ortamına sentetik glikokortikoid olan dekzametazon ($1\mu M$, Dex) (Sigma) eklenerek N-ras'ın aktivasyonu sağlanırken hücre farklılaşması durdurulmuştur. SRP7 hücreleri ise, ata hücre olan F2408 hücrelerinin c-Ha-ras onkogenini aktif halde içeren pEI plazmidi ile transfeksiyonu sonucunda elde edilmiştir.

Tiyohidantoin türevlerinin kimyasal formülleri Tablo 1'de verilmiştir. İncesu ve ark., (2004) tarafından [23] belirtildiği üzere, sentezlenen tiyohidantoin türevlerinin stok solüsyonları dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde hazırlanıp, deney dilüsyonları ise taze kültür vasatları kullanılarak yapılmıştır. Deneylerde kullanılan DMSO konsantrasyonu <1% oranında daha düşüktür.

MTT ölçümü

96-kuyulu plakaların her bir kuyucuğuna 2×10^4 hücre/ml hücre ekim yapıldıktan sonra 0.0002-0.001-0.002-0.01-0.02 ve 0.1 mg/ml konsantrasyon aralığında hazırlanan tiyohidantoin türevleri kuyucuklara eklenerek her bir plaka 24 ve 48 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 20 μl MTT boyası (5 mg/ml) eklenerek hücreler 2 saat 37°C de inkübasyona tabi tutulmuşlardır. Bu süre sonrasında, kuyucuklarda oluşan formazan tuzları DMSO ile çözdürülmüştür [25]. Kuyucuklarda oluşan renk değişimi, 540



Tablo 1. 3-substitüe-2-tiyohidantoin türevlerinin kimyasal yapı formülleri. 3-fenil-2-tiyohidantoin (Thio2) ve 3-(4-metoksifenil)-2-tiyohidantoin (Thio5).

nm dalga boyunda mikropilaka okuyucuda (Elx808-IU Bio-Tek) ölçülmüştür. Bileşiklerle muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak aşağıda belirtilen formül yardımı ile hesaplanmıştır. Deney içerisinde her bir konsantrasyon aralığı birbirinden bağımsız üç farklı kuyuda tekrarlanmıştır.

% canlı hücre = (bileşikle muamele edilen hücre absorbansı) — (boş kuyucuğun absorbansı) / (kontrol hücre absorbansı) — (boş kuyucuğun absorbansı) × 100.

Akridin oranj boyama

Hücre süspansiyonundan 1×10^6 hücre/ml hücre steril lamellerin yerleştirildiği cam petri kaplarına aktarılmıştır. Belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan tiyohidantoin türevleri, hücrelere eklenerek belli zaman aralıkların da 37°C 'de inkübe edilmişlerdir. Bu sürenin bitiminde, hücreler $1 \times$ fosfat solüsyonu (PBS) ile yıkanarak %70 etanol içerisinde 5 dakika oda ısısında fiksasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Etanol'ün fazlası distille su ile ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler 200 μl akridin oranj (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ve etidium bromür (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) karışım solüsyonu ile 5 dakika oda ısısında inkübe edilmişlerdir. Hücrelerdeki apoptoza yönelik morfolojik değişimler floresan mikroskop (Olimpus) altında incelenmiştir (200 \times).

Akım sitometri analizi

Tripsin yardımı ile süspansiyon halinde toplanan hücreler, 2 kez $1 \times$ PBS ile 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkanmışlardır. Daha sonra, $1 \times$ Annexin-V bağlanma çözeltisi kullanılarak, 1 ml'de $2-3 \times 10^6$ hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 100 μl hücre alınarak tüpe aktarılmış ve içerisine 5 μl Annexin-V FITC ile 10 μl propidyum iyodür karışımı eklendikten sonra akım sitometrisinde (Calibur, B.D) erken apoptotik hücre sayısı belirlenmiştir.

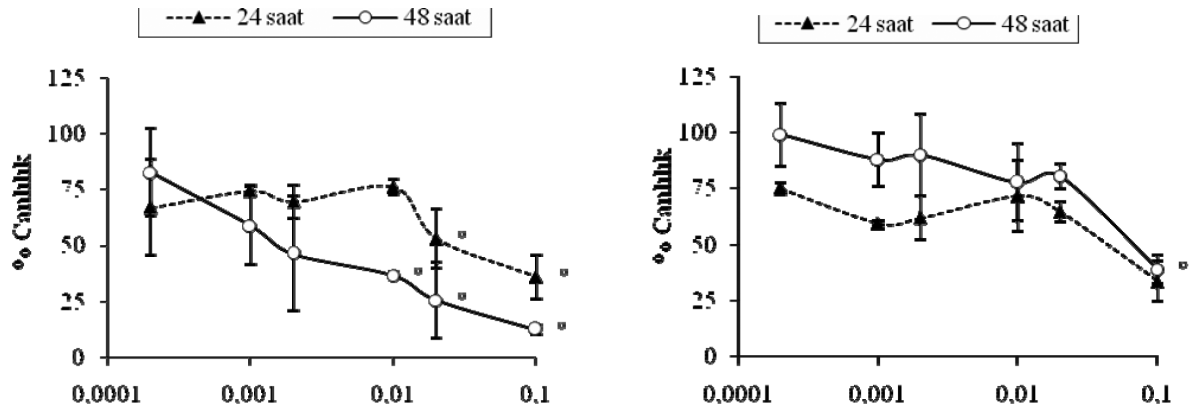
İstatistiksel değerlendirme

Deney sonuçları, SPSS (Statistics Program for Social and Science) istatistik programında günler ve gruplar parametrelerine karşı tek yönlü ANOVA ve Post-Hoc testlerinden Tukey kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, üç bağımsız deneyin ortalaması ve \pm S.D. alınarak hesaplanmıştır.

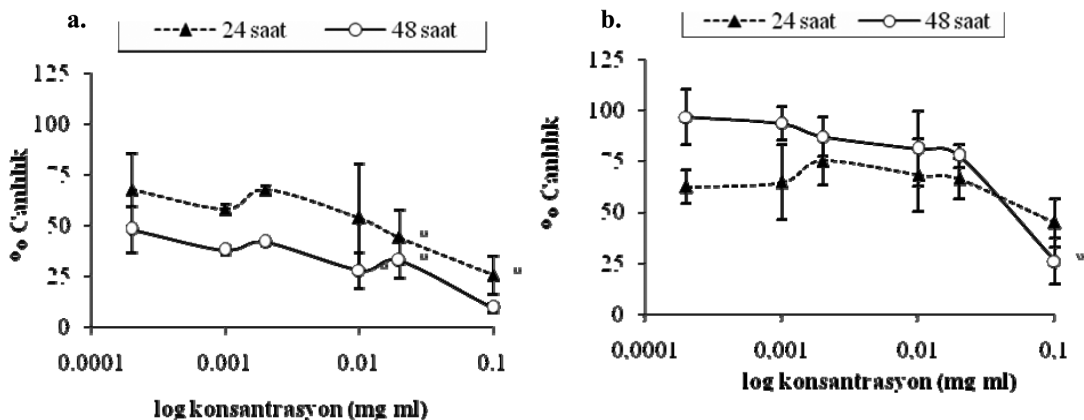
Bulgular

Tiyohidantoin türevlerinin 5RP7 ve CO25 hücre canlılığı üzerine etkileri

3-fenil- ve 3-(4-metoksifenil)-2-tiyohidantoin türevlerinin sitotoksik etkisi, *in vitro* ortamda MTT yöntemi ile belirlenmiş olup elde edilen sonuçlar Şekil 1 ve 2 'de gösterilmiştir.



Şekil 1. 3-fenil-2-tiyohidantoin bileşiğinin (a) SRP7 ve (b) CO25 hücre canlılığı üzerine etkisi. Hücreler 24 ya da 48 saat artan konsantrasyondaki bileşik ile inkübe edildikten sonra MTT yöntemi ile hücre canlılığı tespit edilmiştir. Kontrol grubun hücre çoğalma yüzdesi % 100 olarak kabul edilmiştir. Anlamlılık değeri $p < 0.05$ dir. Ortalama değerler + St.Hata (n=6)



Şekil 2. 3-(4-metoksifenil)-2-tiyohidantoin bileşiğinin (a) SRP7 ve (b) CO25 hücre canlılığı üzerine etkileri. Kontrol grubun hücre çoğalma yüzdesi % 100 olarak kabul edilmiştir. Anlamlılık değeri $p < 0.05$ dir. Ortalama değerler + St.Hata (n=6)

3-fenil-türevi ile 24 saat inkübe edilen her iki hücrenin, canlılık oranının benzer şekilde azaldığı gözlenmiştir (Şekil 1a ve b). Ancak, inkübasyon süresinin uzaması ile (48 saat) fenil-türevinin 5RP7 hücre canlılık oranını daha anlamlı bir şekilde baskılamıştır. 3-fenil-türevinin en düşük dozu (0.002 mg/ml) ile 48 saat muamele edilen 5RP7 hücre canlılığı % 82.6 bulunurken (Şekil 1a), konsantrasyonunun artırılması ile (0.1 mg/ml) bu oran anlamlı ($p < 0.05$) bir şekilde düşüş göstermiştir (% 12). Diğer taraftan, CO25 hücreleri ile 48 saat muamele edilen 3-fenil-türevi en düşük dozda (0.002 mg/ml) % 97 canlılık oranı gösterirken, konsantrasyonun artırılması (0.1 mg/ml) ile bu oran ancak % 33'e düşmüştür (Şekil 1b). 3-fenil-2-tiyohidantoin türevinin IC_{50} değeri 5RP7 hücreleri için 0.03 mg/ml ve CO25 hücreleri için 0.04 mg/ml olarak bulunmuştur (Tablo 2).

Tablo 2. Tiyohidantoin türevlerinin 5RP7 ve CO25 hücrelerinde %50 ölüm oranını (IC_{50}) neden olduğu konsantrasyon aralıkları

Tiyohidantoin Türevleri (mg/ml)	Hücre Hatları	
	5RP7	CO25
3-fenil-substitüe	0.03 ^a	0.04
3-(4-metoksifenil)-substitüe	0.01.83	0.07

5RP7 and CO25 cells treated either 3-fenil-substitüe or 3-(4-metoksifenil)-substitüe.

^a 24 saat inkübasyon sonrası IC_{50} değeri

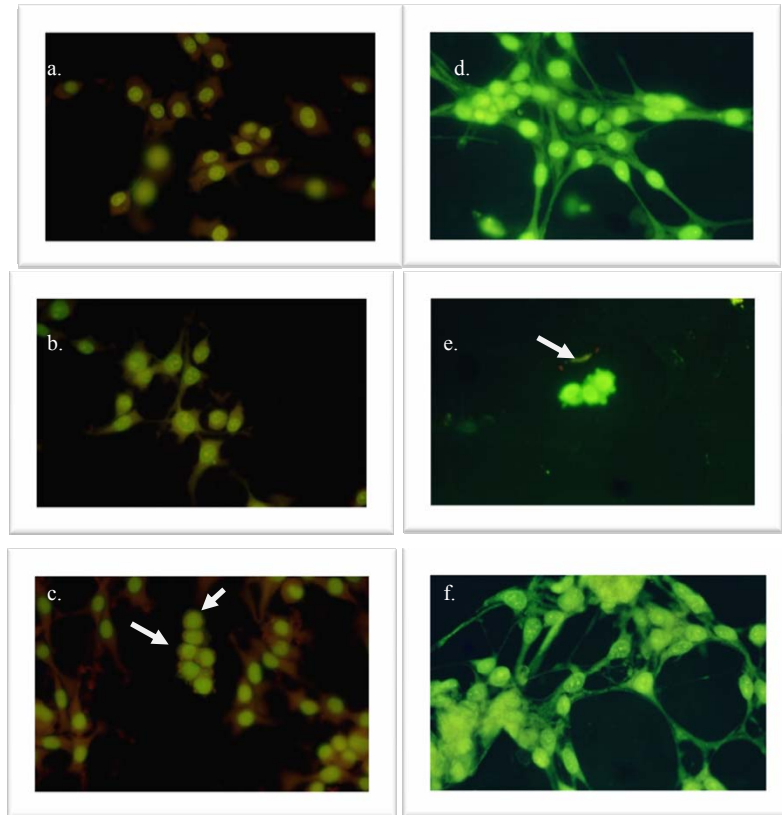
2-tiyohidantoin bileşiğine hidrofilik yapı özelliğine sahip metoksifenil yan grubunun eklenmesi (48 saat) ile CO25 hücre canlılığı baskılanması diğer bileşiğin etkisine benzerlik gösterirken (Şekil 2b), 5RP7 hücre canlılığı daha anlamlı ($p < 0.05$) bir şekilde baskılamıştır (Şekil 2a).

0.002 mg/ml 3-(4-metoksifenil)-türevi ile muamele edilen 5RP7 hücre canlılığı % 48 iken, bu oran konsantrasyonun 0.1 mg/ml'ye çıkarılması ile % 9'a kadar düşmüştür.

3-(4-metoksifenil)-2-tiyohidantoin türevinin IC_{50} değeri 5RP7 hücreleri için 0.01 mg/ml ve CO25 hücreleri için 0.07 mg/ml olarak bulunmuştur (Tablo 2).

Apoptozun morfolojik olarak belirlenmesi

Her iki türevin IC_{50} ve $IC_{50}/2$ konsantrasyonları ile 8 veya 24 saat inkübe edilen 5RP7 ve CO25 hücrelerinde apoptotik etkiler, sitoplazmik (akridin oranj) ve çekirdek (etidyum bromür) boya kombinasyonu kullanılarak floresan mikroskop altında morfolojik olarak incelenmiştir (Şekil 3 ve 4). Her iki hücrede, 3-fenil-türevi ile gözlenen apoptotik morfolojik değişimlerin oluşum süreleri hücre canlılık bulguları ile paralellik göstermektedir. 3-fenil-türevi (0.03 mg/ml) ile 8 saat inkübasyona (Şekil 3c) maruz bırakılan 5RP7 hücrelerinde kontrole oranla (Şekil 3a) apoptotik tomurcuklanma gözlenmiştir. 3-fenil-türevi ile muamele edilen CO25 hücrelerinde ise, apoptotik tomurcuklanma 24 saat sonra meydana gelmiştir (Şekil 3e).



Şekil 3. 3-fenil-2-tiyohidantoin bileşiğinin 5RP7 ve CO25 hücrelerinde oluşturduğu apoptotik morfolojik değişimler. Hücreler akridin oranj/etidyum bromür ile boyanıp floresan mikroskopta incelenmiştir. a. 8 saat 5RP7 kontrol hücreleri, b. 0.015 mg/ml bileşik ile 8 saat inkübasyon sonrası, c. 0.03 mg/ml bileşik ile 8 saat inkübasyon sonrası, d. 24 saat CO25 kontrol hücreleri, e. 0.02 mg/ml bileşik ile 24 saat inkübasyon sonrası ve f. 0.04 mg/ml bileşik ile 24 saat inkübasyon sonrası. Oklar, hücre zarındaki apoptotik morfolojik (tomurcuklanma) değişimleri göstermektedir.

3-(4-metoksifenil)-türevi, CO25 hücre morfolojisinde kontrole göre apoptotik bir değişime neden olmamıştır (sonuçlar verilmemiştir). Bunun aksine bu türev (0.005 mg/ml ve 24 saat), 5RP7 hücrelerinde morfolojik olarak apoptotik değişimler göstermiştir (Şekil 4b).

Bileşiklerin Erken Apoptoz Üzerine Etkileri

Her iki tiyohidantoin türevinin erken apoptoz üzerine olan etkileri, Annexin-V ile işaretlenmiş hücrelerin akım sitometri ile analizi sonucunda belirlenmiştir [23]. Ölçüm sırasında deney ortamına propidyum iyodür eklenmesi ile de geç apoptotik ya da nekrotik hücre oranları belirlenmiştir (Şekil 5).

Tablo 3 ve 4'de her iki bileşik ile 24 saat inkübasyon sonucunda elde edilen apoptotik hücre oranını gösterilmiştir. Pozitif kontrol olarak hücreler, 14.7 mg/ml etoposid ile muamele edilirlerken, negatif kontrol olarak da hücreler bileşik ilave edilmemiş besi ortamlarında 24 saat inkübe edilmişlerdir.

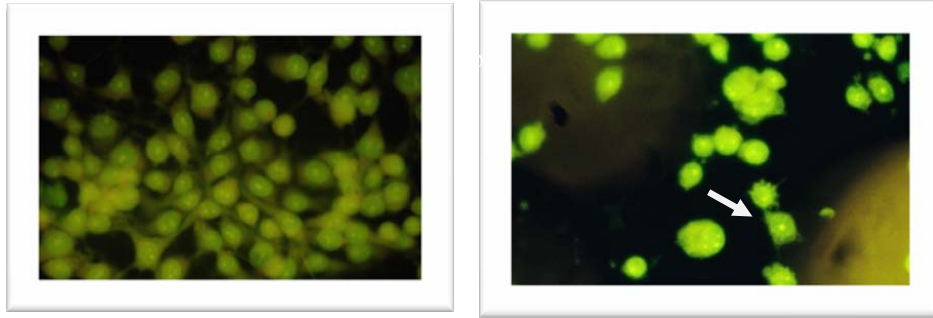
3-fenil-2-tiyohidantoin türevi (0.015 mg/ml ($IC_{50}/2$) ve 0.03 mg/ml (IC_{50})) 5RP7 hücrelerinde morfolojik olarak

apoptotik değişime neden olurken, erken apoptozu indiklemediği tespit edilmiştir (Tablo 3). Ancak bu bileşik, CO25 hücrelerinde erken apoptozu pozitif kontrol ile aynı düzeyde uyarmıştır (% 3.43) (Tablo 4).

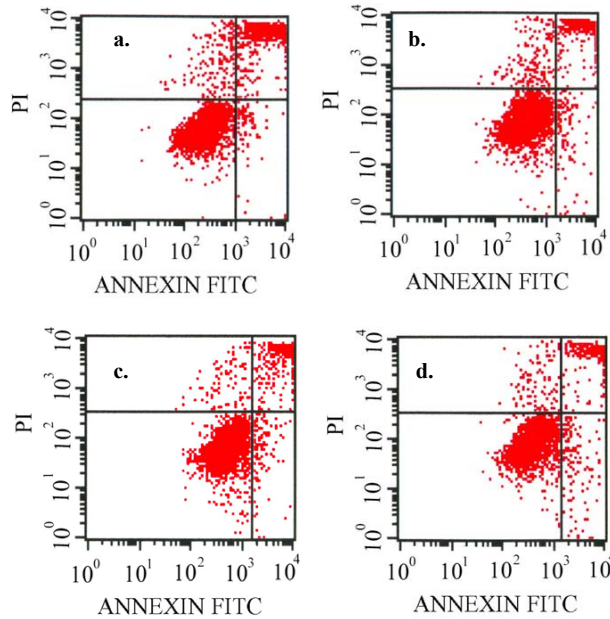
Hidrofilik yan grubun yapıya eklenmesi ile her iki hücre tipinde de gözlenen apoptotik etki 3-fenil-türevinin gösterdiği etki ile paralelik göstermiştir. 3-(4-metoksifenil)-türevi (0.01 mg/ml) ile muamele edilen 5RP7 hücrelerindeki erken apoptoz hücre oranının (% 0.34) çok düşük olduğu tespit edilmiştir (14.7 mg/ml etoposid/erken apoptotik oran % 12.28). Ancak, metoksifenil türevinin (0.07 mg/ml) CO25 hücre erken apoptozu (% 3.47) üzerine etkisi, pozitif kontrol (% 3.43) düzeyinde tespit edilmiştir (Tablo 4).

Tartışma

3-fenil-2-tiyohidantoin ve 3-(4-metoksifenil)-2-tiyohidantoin türevlerinin sitotoksik ve apoptotik etkileri *in vitro* ortamda karşılaştırılmıştır. Her iki türevinde 5RP7 ve CO25 hücre tipine karşı anlamlı bir sitotoksik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Özellikle,



Şekil 4. 3-(4-metoksifenil)-2-tiyohidantoin türevinin 5RP7 hücrelerinde oluşturduğu apoptotik morfolojik değişimler. a. 24 saat 5RP7 kontrol hücreleri b. 0.005 mg/ml bileşik ile 24 saat inkübasyon sonrası.



Şekil 5. 3-fenil-substitüe ve 3-(4-metoksifenil)-2-tiyohidantoin türevlerinin CO25 hücreleri ile 24 saat inkübasyon sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları. a. Kontrol CO25 hücreleri, b. 14.7 mg/ml Eto + CO25, c. 0.04 mg/ml 3-fenil-substitüe + CO25, d. 0.07 mg/ml 3-(4-metoksifenil)-substitüe + CO25 hücreleri.

Tablo 3. Tiyohidantoin türevleri ile stimüle edilen erken apoptotik 5RP7 hücrelerinin belirlenmesi

% (24 saat)	5RP7					
	Kontrol	Etoposit	3-fenil-substitüe ^a	3-fenil-substitüe ^b	3-(4-metoksi fenil)-substitüe ^a	3-(4-metoksi fenil)-substitüe ^b
Tanımlanmamış hücre oranı	1.98	2.24	0.5	0.63	0.67	0.34
Canlı hücre oranı	81.40	52.90	97.07	96.59	95.88	97.68
Erken apoptotik hücre oranı	5.58	12.28	1.35	1.55	1.93	0.34
Geç apoptotik veya nekrotik hücre oranı	11.03	32.59	1.09	1.23	1.52	1.65

K Madde ile stimüle edilmemiş kontrol hücreler

E 14.7 mg/ml Etoposit (pozitif kontrol)

3-fenil-substitüe^a, 0.015 mg/ml; 3-fenil-substitüe^b, 0.03 mg/ml;

3-(4-metoksifenil)-substitüe^a, 0.005 mg/ml; 3-(4-metoksifenil)-substitüe^b, 0.01 mg/ml

Tablo 4. Tiyohidantoin türevleri ile stimüle edilen erken apoptotik CO25 hücrelerinin belirlenmesi

% (24 saat)	CO25					
	Kontrol	Etoposit	3-fenil-substitüe ^a	3-fenil-substitüe ^b	3-(4-metoksi fenil)-substitüe ^a	3-(4-metoksi fenil)-substitüe ^b
Tanımlanmamış hücre oranı	5.12	4.46	1.36	2.50	2.50	2.86
Canlı hücre oranı	63.83	64.09	79.46	66.64	70.12	69.83
Erken apoptotik hücre oranı	2.36	3.43	2.48	3.43	1.98	3.47
Geç apoptotik veya nekrotik hücre oranı	28.59	28.02	16.71	27.43	25.40	23.84

K Madde ile stimüle edilmemiş kontrol hücreler

E 14.7 mg/ml Etoposit (pozitif kontrol)

3-fenil-substitüe^a, 0.02 mg/ml; 3-fenil-substitüe^b, 0.04 mg/ml;

3-(4-metoksifenil)-substitüe^a, 0.035 mg/ml, 3-(4-metoksifenil)-substitüe^b, 0.07 mg/ml

3-(4-metoksifenil)-türevinin 5RP7 hücrelerinde sitotoksik etkisinin 3-fenil-türevine kıyasla daha yüksek olduğu bulunmuştur (0.1 mg/ml-% 9 hücre canlılığı). Ancak, 3-fenil-türevi normal F2408 hücrelerinde sitotoksik etkiye sahip olmazken, 3-(4-metoksifenil)-türevi (IC_{50} 60 μ M) bu hücre tipinde sitotoksik etki göstermiştir [23]. Bu nedenle, 3-fenil-türevinin antikanser etkisinin *in vivo* çalışmalarda geniş kapsamlı olarak araştırılması planlanmaktadır. *In vitro* birçok hidantoin ve 2-tiyohidantoin türevinin antikanser ve antiproliferatif etkisi gösterilmiştir. Özellikle, 5-(2-fenil-3-indol)-2-tiyohidantoin bileşiği leukemia, melanoma, meme ve prostat kanser hücreleri üzerinde etkili bir anti-kanser ajan olduğu belirlenmiştir [17]. 5,5-difenil-3-tiyohidantoin (DPTH) ve türevi DPTH-10'un (20 μ M) düşük konsantrasyonda HUVEC hücrelerinin çoğalmasını, kapiller tüplerin formasyonunu ve gelişimini önlemekte yani anti-angiogenik aktivitenin artmasına neden olmuştur [26, 27].

Kemoterapötik ilaçların birçoğu kanser hücrelerinde apoptoz mekanizmasını tetikleyerek anti-tümör aktivitenin başlamasına neden olmaktadır [28]. Bu çalışmada da, sitotoksik etkileri araştırılan bu iki yeni tiyohidantoin türevinin, apoptotik mekanizma üzerindeki etkileri hücre morfolojisi ve erken apoptotik hücre oranlarının

ölçülmesi ile araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, 3-fenil türevinin hem IC_{50} hem de $IC_{50}/2$ değerlerinde sitotoksikite sonuçlarını destekler nitelikte 24 saat inkübasyon süresinde her iki hücrede de morfolojik olarak apoptotik değişimler gözlenmiştir (Şekil 3c,e). 3-(4-metoksifenil) türevi (0.005 mg/ml- 24 saat) ise hücre tipine spesifik bir etki göstererek yalnızca 5RP7 hücrelerinde apoptotik morfolojik değişimlere neden olmuştur (Şekil 4b). Hidantoin bileşikleriyle muamele edilen virüs-transfekte F4N hücrelerinde apoptozun indüklendiği fluoresan PI boyama yöntemi ile gösterilmiştir [28].

Tiyohidantoin türevlerinin her iki hücre apoptozu üzerine olan etkileri, apoptoz mekanizmasının tetiklenmesi ile hücre dış yüzeyine hareket eden fosfolipidlerine karşı yüksek affiniteye sahip Annexin-V'in bağlanması ile araştırılmıştır. Her iki tiyohidantoin türevide 5RP7 hücrelerinde kontrole göre (% 12.28) erken apoptotik hücre oranında herhangi bir artışa neden olmamıştır (Tablo 3). Bunun aksine CO25 hücreleri ile muamele edilen her iki bileşik (3-fenil-; 0.04 mg/ml ve 3-(4-metoksifenil)-; 0.07 mg/ml), erken apoptotik hücre oluşumunda pozitif kontrol kadar etkili bulunmuştur. 3-(4-metoksifenil)- türevi diğer türeve kıyasla hücre içi kalsiyum düzeyinde daha belirgin bir artışa [23] neden olmasına rağmen, bu tü-

revin erken apoptotik mekanizmayı uyarısında kalsiyum artışı ile bir ilişki gözlenmemiştir. Bu etkinin tamamen hücre tipine bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Ancak, her iki türevinde N-ras onkogeni aktif CO25 hücrelerinde erken apoptozu indüklediği ilginçtir. Çünkü son yıllarda bazı hidantoin türevlerinin ras farnesil transferaz inhibitörü olduğu ve buna bağlı olarak da etkili bir antikanser etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [21].

Bu bağlamda, 3-fenil-2-tiyohidantoin türevinin 5RP7 hücrelerinde antikanser etkisinin daha anlamlı olduğu ancak her iki türevinde CO25 hücrelerinde erken apoptozu indüklemesi nedeni ile bu türevlerin özellikle N-ras onkogen farnesil transferaz inhibitör etkisine sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bu alanda çalışmalarımız devam etmektedir.

Teşekkür

Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hematoloji Bölümüne ve AÜBİBAM'a sağladıkları olanaklardan dolayı teşekkür ederiz. Ayrıca Prof.Dr Kadriye Benkli'ye tiyohidantoin bileşiklerinin sentezlediğinden dolayı teşekkür ederiz. Bu çalışma Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonunca (030345) desteklenmiştir.

Kaynaklar

- [1] Guo J, Pu Y, Zhang D. (2005) Calcium signaling in apoptosis. *Acta Biophysica Sinica* 21:1-18.
- [2] de Thonel A, Eriksson JE. (2005) Regulation of death receptors-relevance in cancer therapies. *Toxico and Appl Pharmaco* 207:123-132.
- [3] Wang X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes and Develop* 15:2922-2933.
- [4] Sun XM, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf BB, Green DR, Cohen GM. (1999) Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J of Biolog Chem* 274:5053-5060.
- [5] Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. (2003) Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Annals of the New York Acad of Sci* 1010: 186-194.
- [6] Nakagama T, Ueda Y, Yamada H, Shores EW, Singer A, June CH. (1992) In vivo calcium elevations in thymocytes with T cell receptors that are specific for self ligands. *Science* 257:96-99.
- [7] Juntti-Berggren L, Larsson O, Rorsman P, Ammala C, Bokvist K, Wahlander K, Nicotera P, Dypbykt JM, Orrenius S, Hallberg A, Berggren P-O. (1993) Increased activity of L-type Ca channels exposed to serum from patients with type I diabetes. *Science* 261:86-90.
- [8] Lam M, DUBYAK G, Distelhorst CW. (1993) Effects of glucocorticoid treatment on intracellular calcium homeostasis in Mouse lymphoma cells. *Mol Endocrino* 7:686-693.
- [9] Oakes SA, Opferman JT, Pozzan T, Korsmeyer SL. (2003) Regulation of endoplasmic reticulum calcium Dynamics by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Pharmaco* 66: 1335-1340.
- [10] Thenmozhiyal JC, Wong PTH, Chui WK. (2004) Anticonvulsant activity of phenylmethylenhydantoins: a structure-activity relationship study. *J.Med Chem* 47:1527-1535.
- [11] Theodore WH. (1992) Rational Use of Antiepileptic Drug Levels. *Pharmacology and Therapeut* 54: 297-305.
- [12] Gesler MR, Lints CE, Swinyard EA. (1961) Pharmacology of some substituted 2-thiohydantoins with particular reference to anticonvulsant properties. *Toxico and Appl Pharmaco* 3: 107-121.
- [13] Kiec-Kononowicz K, Szymanska E. (2002) Antimycobacterial activity of 5-arylidene derivatives of hydantoin. *II Farmaco* 57: 909-916.
- [14] Robert NC, Robert CR, Joyce DF, Ruppen Am, Robert WB, Jackie WT, William MS, John AS. (1992) 5-5-Disubstituted hydantoins: syntheses and anti-HIV activity. *J. Med.Chem.* 35: 3567-3572.
- [15] Miwa I, Hirano M, Inagaki K, Belbeoc'h C, Okuda J. (1987) Development of potent aldose reductase inhibitors having a hydantoin structure. *Biochem Pharmaco* 36: 2789-2794.
- [16] Town H-H, Casals-Stenzel J, Schillinger E. (1983) Pharmacological and cardiovascular properties of a hydantoin derivative, BW245 C, with high affinity and selectivity for PGD₂ receptors. *Prostaglandins* 25: 13-28.
- [17] Kushev D, Gorneva G, Enchev V, Naydenova E, Popova J, Taxirow S, Maneva L, Grancharov K, Spassovska N. (2002) Synthesis, cytotoxicity, antibacterial and antitumor activity of platinum (II) complexes of 3-aminocyclohexanespiro-5-hydantoin. *J. of Inorg Biochem* 89: 203-211.
- [18] Suzen S, Büyükbingöl E. (2000) Anti-cancer activity studies of indolalthiohydantoin (PIT) on certain cancer cell lines. *II Farmaco* 55: 246-48.
- [19] Basappa, Ananda Kumar CS, Nanjunda Swamy S, Sugahara K, Rangappa KS. (2009) Anti-tumor and anti-angiogenic activity of novel hydantoin derivatives: Inhibition of VEGF secretion in liver metastatic osteosarcoma cells. *Bioorg and Med Chem* 17: 4928-4934.
- [20] Zuliani V, Carmi C, Rivara M, Fantini M, Lodola A, Vacondio F, Bordi F, Plazzi PV, Cavazzoni A, Galetti M, Alfieri RR, Petronini PG, Mor M. (2009) 5-Benzylidene-hydantoins: Synthesis and antiproliferative activity on A549 lung cancer cell line. *Eur J of Med Chem* 44: 3471-3479.
- [21] Lee J, Kim J, Koh JS, Chung H-H, Kim K-H. (2006) Hydantoin derivatives as non-peptidic inhibitors of Ras farnesyl transferase. *Bio and Med Chem Lett* 16: 1954-1956.
- [22] Teng X, Degterev A, Jagtap P, Xing X, Choi S, Denu R, Yuan J, Cuny GD. (2005) Structure-activity relationship study of novel necroptosis inhibitors. *Bio and Med Chem Lett* 15: 5039-5044.
- [23] İncesu Z, Benkli K, Akalin G, Kaplançıklı ZA. (2004) Modification of intracellular free calcium in cultured F2408 embryo fibroblasts by 3-substituted-2-thiohydantoin derivatives. *Cell Biol Int* 28:267-72.
- [24] Gossett LA, Zhang W, Olson E. (1988) Dexamethasone-dependent inhibition of differentiation of C2 myoblasts bearing steroid-inducible N-ras oncogene. *J Cell Biol* 106: 2127-37.
- [25] Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Met* 65: 55-63.
- [26] Cheng C-K, Wu J, Liu Y, Lee T-S, Kang S-J, Sheu M-T, Lee W-S. (2008) Structure and anti-proliferation function of 5,5-diphenyl-2-thiohydantoin (DPTH) derivatives in vascular endothelial cells. *Vascular Pharmacol* 48 (2-3): 138-42.
- [27] Liu Y, Wu J, Ho P-Y, Chen L-C, Chen C-T, Liang Y-C, Cheng C-K, Lee W-S. (2008) Anti-angiogenic action of 5,5-diphenyl-2-thiohydantoin-N10 (DPTH-N10). *Cancer Lett* 271:294-305.
- [28] Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Emi M, Inoue H, Toge T. (2002) Current status of the molecular mechanisms of anti-cancer drug-induced apoptosis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacol* 50: 343-52.