

PIRAZOL-AKRİDİN TÜREVİ SENTEZİNİN SKBR-3 İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA POTANSİYEL ANTİKANSER AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Evaluation of the Potential Anticancer Activity of Pyrazole-Acridine Derivative Synthesis on SKBR-3 Human Breast Cancer Cell Line

Yusuf KÜÇÜKBAĞRIÇIK¹  Mohammadreza DASTOURI²  Muna ELMUSA³ 
Fatıma ELMUSA⁴  Hümeysra YILMAZ⁵  Rahmi KASIMOĞULLARI⁶ 

¹ Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi, Biyofizik ABD, ANKARA, TÜRKİYE

² Ankara Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, ANKARA, TÜRKİYE

³ Elfurat Mühendislik Araştırma ve Geliştirme Limited Şirketi, ANKARA, TÜRKİYE

⁴ Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Bölümü, ESKİŞEHİR, TÜRKİYE

⁵ Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Bölümü, ANKARA, TÜRKİYE

⁶ Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, KÜTAHYA, TÜRKİYE

ÖZ

Amaç: Antikanser aktiviteye sahip heterosiklik bileşikler arasında yer alan, içerdikleri iki nitrojen atomu ile pirazol ve bir nitrojen atomu ile akridin türevleri, kanser, nörolojik bozukluklar ve bulaşıcı hastalıkların tedavisinde umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmanın temel hedefi, sentezlenen pirazol ve akridin bileşiğinin, özellikle insan meme kanseri (SKBR-3) hücreleri üzerindeki antikanser aktivitesini araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntemler: Bu çalışma kapsamında, 2-hidrazinobenzotiyazol ve 4-kloroasetofenon kullanılarak sentezlenen hidrazona dayalı olarak pirazol-4-karbaldehit elde edilmiştir. Pirazol-4-karbaldehit, 5,5-dimetilsikloheksan-1,3-dion ve 4-nitroanilin kullanılarak halkalandırma yöntemiyle yeni bir pirazol-akridin türevine (3-ACH) dönüştürülmüştür. 3-ACH, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi, Nükleer Manyetik Rezonans, Kütle Spektrometrisi ve elemental analiz kullanılarak karakterize edilmiştir. Bu çalışmada, SKBR-3 hücrelerinde 3-ACH'nin sitotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla farklı dozlarda (50, 100 ve 150 µg/mL) ve farklı sürelerde (12 ve 24 saat) hücre canlılığı testi ile analiz edilmiştir. Ayrıca, 3-ACH uygulamasının ardından BAX, Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 apoptoz yollarını immün boyama yöntemiyle incelemiştir.

Bulgular: 3-ACH'nin insan meme kanseri hücrelerinde sitotoksik etkiler gösterdiğini, bu etkilerin dozaj ve süre ile ilişkili olduğunu gösterdik. Apoptozun içsel yollardan sorumlu olan Kaspaz-9 ve BAX, dışsal yollardan sorumlu olan Kaspaz-8 sentezi immün boyama yöntemi ile artışı gösterilmiştir. Ayrıca hem içsel hem de dışsal yollardan sorumlu olan Kaspaz-3'ün protein sentezi de belirgin bir şekilde artmıştır.

Sonuç: Bu bulgular, 3-ACH'nin hem içsel hem de dışsal apoptoz yollarını aktive ederek sitotoksik etkilerine katkıda bulunabilir. Araştırmamızın bulguları, 3-ACH'in kanser tedavisi için umut verici bir ajan olarak değerlendirilmesine yönelik kanıtlar sunmaktadır. 3-ACH tedavisinin apoptotik yanıtındaki rolü daha detaylı şekilde anlamak için ek araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: SKBR-3, akridin, pirazol, sitotoksiste, apoptoz

ABSTRACT

Objective: Among heterocyclic compounds with anticancer activity, derivatives of pyrazole containing two nitrogen atoms and acridine containing one nitrogen atom have shown promising results in the treatment of cancer, neurological disorders, and infectious diseases. The main objective of this study is to investigate the anticancer activity of the synthesized pyrazole and acridine compound, particularly on human breast cancer (SKBR-3) cells.

Material and Methods: In this study, pyrazole-4-carbaldehyde was obtained based on hydrazone (HT) synthesized using 2-hydrazinobenzothiazole and 4-chloroacetophenone. Pyrazole-4-carbaldehyde was converted to a new pyrazole-acridine derivative (3-ACH) by cyclization using 5,5-dimethylcyclohexane-1,3-dione and 4-nitroaniline. 3-ACH was characterized using Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Nuclear Magnetic Resonance, Mass Spectrometry, and elemental analysis. The cytotoxic effects of 3-ACH on SKBR-3 cells were evaluated using the cell viability test at different doses (50, 100, and 150 µg/mL) and durations (12 and 24 hours). Additionally, the synthesis of BAX, Caspase-3, Caspase-8, and Caspase-9 apoptotic pathways was examined through immunostaining after 3-ACH application.

Results: We demonstrated that 3-ACH exhibits cytotoxic effects on human breast cancer cells, and these effects are dose and duration-dependent. The synthesis increase of Caspase-9 and BAX responsible for intrinsic pathways and Caspase-8 responsible for extrinsic pathways was shown through immunostaining. Moreover, the protein synthesis of Caspase-3, responsible for both intrinsic and extrinsic pathways, significantly increased.

Conclusion: These findings suggest that 3-ACH may contribute to its cytotoxic effects by activating both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. The results of our study provide strong evidence for considering 3-ACH as a promising agent for cancer treatment. Further research is needed to understand the role of 3-ACH in the apoptotic response in more detail.

Keywords: SKBR-3, acridine, pyrazole, cytotoxicity, apoptosis



Yazışma Adresi / Correspondence:

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi, Biyofizik ABD, ANKARA, TÜRKİYE

Tel / Phone: +905448602389

Geliş Tarihi / Received: 04.02.2024

Dr. Yusuf KÜÇÜKBAĞRIÇIK

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi, Biyofizik ABD, ANKARA, TÜRKİYE

E-posta / E-mail: yusufba@gmail.com

Kabul Tarihi / Accepted: 01.04.2024

GİRİŞ

Kadınlarda meme kanseri, yaklaşık 2,3 milyon yeni vaka (%11,7) ile en yaygın teşhis edilen kanser türü olarak bulunmuştur. Ardından akciğer (%11,4), kolorektal (%10), prostat (%7,3) ve mide (%5,6) kanserleri gelmiştir (1). Meme kanseri tedavisinde cerrahi müdahale, radyasyon terapisi, kemoterapi, hormonal terapi ve hedefe yönelik tedaviler gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Multidisipliner yaklaşım, hastaların bireysel ihtiyaçlarına göre en etkili ve koordineli tedavi planını oluşturmayı amaçlar. Bu yaklaşım, meme kanseri üzerine yapılan araştırmaları ve tedavi seçeneklerini kapsar. Cerrahi müdahale, radyasyon tedavisi, kemoterapi, hormonal tedavi ve hedefe yönelik tedavilerin uyumlu bir şekilde bir araya getirildiği multidisipliner yaklaşım, hastaların yaşam kalitesini artırabilir ve sağkalım oranlarını iyileştirebilir. Moleküler biyoloji ve ilaç kimyasındaki hızlı ilerlemeler, yeni biyolojik hedeflere yönelik terapötik stratejilerin geliştirilmesine olanak tanımaktadır. Bu bağlamda, özellikle heterosiklik bileşiklerin sentezi ve biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesi, ilaç tasarımı ve geliştirilmesinde kritik bir rol oynamaktadır (2). Heterosiklik bileşikler sınıfına giren akridin ve türevleri, meme kanseri ve diğer kanser türleriyle mücadelede potansiyel terapötik ajanlar olarak önemli bir araştırma alanını oluşturmaktadır (3). Akridinler hem doğal kaynaklardan elde edilebilen hem de sentetik yollarla üretilebilen polisiklik aromatik bileşiklerdir ve antimikrobiyal, antipsikotik, antioksidan ve antitümör gibi birçok aktivite sergiledikleri bildirilmiştir (4-6). Akridin ve türevlerinin kanser hücrelerine karşı gösterdiği aktivitenin arkasındaki etki mekanizmaları çeşitlilik göstermektedir (3). Ancak bu bileşiklerin antikanser aktivitesi DNA'ya bağlanma ve topoizomera inhibitasyonu üzerine dayandığı, bunun da apoptoz ve hücre döngüsü arestine neden olabileceği belirtilmiştir (7).

Bir diğer heterosiklik bileşikler sınıfına giren pirazol, beş üyeli heterosiklik bir halka yapısına sahiptir ve bu özelliği, moleküler etkileşimlerde çeşitlilik sağlayarak çeşitli biyolojik aktiviteler sergilemesine katkıda bulunmuştur (8). Bu çerçevede, pirazol türevlerinin biyolojik aktiviteleri geniş bir yelpazede incelenmiş ve antibakteriyel, antifungal, antiparazitik, antiviral ve anti-inflamatuar gibi çeşitli yönlerden etkili olduğu bulunmuştur (9). Buna ek olarak, yapılan çalışmalar, pirazol türevlerinin kanser hücrelerinde apoptozu indükleyebildiğini ve bazı kanser hücrelerinin büyümesini engellediğini ortaya koymuştur (10).

Pirazol-4-karbaldehit genellikle pirazol içeren organik bileşiklerin sentezinde başlangıç maddesi olarak kullanılmaktadır (11). Ayrıca, akridin içeren bileşiklerin sentez yöntemlerinden biri olan Hantzsch reaksiyonunda aldehit, 1,3-sikloheksadion ve amin

kullanılmaktadır (6). Aldehit türevi olarak pirazol-4-karbaldehit kullanmak hem pirazol hem akridin içeren bileşik sentezi sağlayacağından bu çalışmada kullanılmıştır. 1,3-sikloheksadion türevi olarak 5,5-dimetil-1,3-sikloheksadion (dimedon) ve amin olarak 4-nitroanilin kullanılmıştır.

Bu çalışmada, 3-ACH'nin SKBR-3 hücrelerindeki sitotoksitesi ve apoptozu indükleyebilme kapasitesi araştırıldı. 3-ACH, farklı dozlarda (50, 100 ve 150 µg/mL) ve farklı sürelerde (12 ve 24 saat) uygulanarak sitotoksik etkileri, WST-1 testi kullanılarak analiz edildi. Apoptoz belirtilerini değerlendirmek amacıyla, içsel ve dışsal yollardan sorumlu kaspaz yolları (BAX, kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9) immün boyama yöntemi ile araştırıldı. Bu çalışma, 3-ACH'in SKBR-3 hücrelerindeki biyolojik etkilerini anlamak ve potansiyel antikanser özelliklerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kimyasal Sentez

Çalışma boyunca kullanılan çözücüler damıtılarak kullanılmıştır. 2-(2-(1-(4-klorofenil)etilidin)hidrazino)benzo[d]tiyazol (HT) sentezi için bir balon içerisine 1 g (6 mmol) 2-hidrazinobenzotiyazol ve 0,94 g (6 mmol) 4-kloroasetofenon karıştırılarak, 20 mL etanol içerisinde çözüldü. Üzerine 0,4 mL asetik asit ilavesi yapılarak 3 saat geri soğutucu altında ısıtıldı. Oluşan bej renkli çökelek 2:1 oranında su-etanol karışımında yıkandı. Daha sonra bütanolde kristallendirilerek saflaştırıldı.

1-(benzo[d]tiyazol-2-il)-3-(4-klorofenil)-1H-pirazol-4-karbaldehit (P4C) sentezi için buz banyosunda 20 dakika bekletilen 0,55 mL (6 mmol) POCl₃ (fosforil klorür)'ün üzerine 2 mL soğutulmuş DMF (*N,N*-dimetil formamit) damla damla ilave edildi. Birkaç dakika karıştırıldıktan sonra, karışımın üzerine 0,301 g (1 mmol) HT bileşiği eklendi. Karışım 30 dakika buz banyosunda ve 30 dakika oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra 5 saat yağ banyosunda 80-90 °C'de reflüks edildi. Karışım oda sıcaklığına getirildikten sonra buzlu su eklendi ve oluşan kahverengi çökelek tolüende kristallendirilerek saflaştırıldı.

9-(1-(benzo[d]tiyazol-2-il)-3-(4-klorofenil)-1H-pirazol-4-il)-3,3,6,6-tetrametil-10-(4-nitrofenil)-3,4,6,7,9,10-hekzahidroakridin-1,8(2*H*,5*H*)-dion (3-ACH) sentezi için 0,340 g (1 mmol) (P4C) ve 0,019 g (0,1 mmol) *P*-TSA (tolüensülfonik asit), 10 mL THF (tetrahidrofuran) içerisinde çözüldü. Karışımın üzerine 0,280 g (2 mmol) 5,5-dimetilsikloheksan-1,3-dion eklenerek 5 dakika karıştırıldı. Daha sonra 0,138 g (1 mmol) 4-nitroanilin ilave edilerek 6 saat geri soğutucu altında ısıtıldı. Oluşan sarı çökelek su ile yıkandı ve etanolde kristallendirilerek saflaştırıldı (12).

Karakterizasyon

Çalışmada gerçekleştirilen reaksiyonların ilerlemesini takip etmede DC-Alufolien 20x20 cm Kieselgel 60 F254

analitik ince tabaka kromatografisi (TLC) plakaları ve Camag (254-366 nm) UV lambası kullanıldı. Elde edilen bileşiklerin erime noktası Barnstead Electrothermal 9200 cihazı ile ölçüldü.

Sentezlenen bileşiklerin yapılarını karakterize etmek için FT-IR (Bruker Optics Vertex 70), HPLC-TOF/MS (Agilent 6530) ve NMR (Agilent 600 MHz) kullanıldı. ¹H-NMR analizinde 600 MHz, ¹³C-NMR analizinde 150 MHz kullanıldı. NMR analizlerinde tüm bileşikler CDCl₃ ile çözüldü (¹H-NMR'da çözücünün kimyasal kayma değeri 7.26 ppm ve ¹³C-NMR'da 77.2 ppm). Son olarak Leco CHNS-932 cihazı ile bileşiklerin elementel analizi gerçekleştirildi.

Hücre Kültürü

Çalışmada Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC)'nden temin edilen SKBR-3 İnsan meme kanseri hücre hattı (ATCC® HTB-30™) kullanıldı. Hücreler, %10 FBS (Biowest, S181H-500), %1 penisilin/streptomisin (10.000 U/mL-10.000 µg/mL) (Gibco, 10378016) ve %1 L-glutamin (Gibco, 25030081) içeren McCoy's 5A medyumunda kültür edildi. Hücreler 37°C'de %5 CO₂ ile inkübe edildi ve 2 günde bir medyumunu değiştirilerek çoğaltıldı. Hücre canlılığı ve büyüme oranları mikroskop altında incelendi. %90 konfluensiye ulaşan hücreler (Pasaj 1-3) sitotoksosite ve immün boyama deneylerinde kullanıldı. Bu çalışma *in vitro* olarak gerçekleştirildiğinden etik kurul izni gerekmemektedir.

Sitotoksosite Testi

Sentezlenen bileşiklerin anti-kanser aktivitesini belirlemek için, WST-1 kiti (Takara Premix WST-1 MK400) kullanılarak SKBR-3 hücreleri üzerinde sitotoksosite testi gerçekleştirildi. Bunun için hücreler, 96-kuyucuklu plakalara 8000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından hücrelerin medyumunu, dimetil sülfoksit (%0,1 DMSO) içinde çözülmüş, 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 150 µg/mL konsantrasyonlarındaki medyumlar eklendi. 96-kuyucuklu plakalar daha sonra 12 ve 24 saat süreyle 37°C'de %5 CO₂ altında inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlanan hücrelerin üzerine kitin protokolünde açıklandığı gibi WST-1 solüsyonu eklendikten sonra spektrofotometri (Tecan, Infinite® 200Pro) kullanarak 450 nm'de absorbansta ölçüm gerçekleştirildi. Sonuçların tekrarlanabilirliğini doğrulamak için deneyler altı kez tekrarlandı.

İmmün Boyama

SKBR-3 hücreleri *coverslips*lerin olduğu kültür ortamında yetiştirildi ve daha sonra *coverslips*lerin üzerine 3.5x konsantrasyonunda paraformaldehit (Sigma-158127) ile sabitlendi. PBS (Gibco, 14190-094) kullanılarak hücreler yıkanarak sabitleme işlemi sonlandırıldı. Daha sonra hücreler PBS azid (Chemcruc, SC-296028) içinde muhafaza edildi. Sabitlenmiş hücreler, +4 °C'de 24 saat boyunca Bax (Abcam, ab32503, tavşan), kaspaz-3

(Abcam, ab13847, tavşan) kaspaz-8 (Abcam, ab32125, tavşan) ve kaspaz-9 (Abcam, ab202068, tavşan) birincil antikolarla ayrı ayrı inkübe edildi. Bağlanmamış antikoları elimine etmek için iki kez PBS ile yıkandı. Hücreler, 37 °C'de 2 saat boyunca ikincil antikor (Sigma, F9887) ile etiketlenmiş floresein izotiyosiyanat (FITC, anti-tavşan) ile inkübe edildi. PBS ile tekrar yıkandıktan sonra, 30 dakika boyunca 37 °C'de 7- aminoaktinomisin D (7-AAD) DNA boyası ile inkübe edildi. Numuneler, PBS ile üç kez yıkandıktan sonra bir *mounting medium* ile kaplandı. Slaytlar, floresan mikroskop altında incelenene kadar -20 °C'de saklandı. Spesifik olmayan etkileşimi ortadan kaldırmak için negatif kontrol olarak sadece ikincil antikor kullanıldı. *İstatistiksel Analiz* Araştırmada elde edilen sitotoksosite verilerinin istatistiksel analizi, GraphPad Prism 9 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Gruplar arasında karşılaştırmalar yapmak için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yöntemi kullanıldı. Bu deneylerde verilerin normal bir dağılıma sahip olup olmadığını kontrol etmek için Shapiro-Wilk ve Kolmogorov-Smirnov normalite testleri kullanıldı. Verilerin normal bir dağılıma sahip olduğu tespit edildi ve bunlar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak karşılaştırıldı. p<0.05 olan tüm sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Bu çalışmada pirazol-akridin türevi iki aşamada gerçekleştirilmiştir (Şekil 1). Bunun için ilk aşamada 4-kloroasetofenon ve 2-hidrazinobenzotiyazol kullanılarak HT bileşiği sentezlenmiştir. Daha sonra benzotiyazol grubu içeren başlangıç bileşiği olan P4C'nin sentezi için HT bileşiğine Vilsmeier-Haack reaktifi eklenmiştir (13). İkinci aşamada ise sentezlenen P4C, 5,5-dimetilsikloheksan-1,3-dion ve 4-nitroanilin bileşiği ile etkinleştirilerek 3-ACH dönüştürülmüştür. Sentezlenen P4C'in verim %83 ve EN. 224-225 °C bulunurken, sentezlenen 3-ACH'nin verim %62 ve EN.

280-282 °C olarak bulunmuştur.

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Sentezlenen bileşiklerin kimyasal yapısı ve içerdiği fonksiyonel grupları incelemek için FT-IR analizi gerçekleştirildi.

Şekil 2'de gösterildiği gibi P4C, aromatik C-H bağlarının varlığını gösteren, 3066 cm⁻¹'de absorpsiyon piki vermiştir. 1696 cm⁻¹'deki gözlemlenen pik, P4C'in aldehit grubuna ait karbonil grubunun varlığını gösterir. 1600-1450 cm⁻¹ aralığındaki pikler, bileşiğin beklenen yapısı ile tutarlı olan C=C ve C=N bağlarının varlığını göstermektedir.

P4C'nin türevi olan 3-ACH yine 3066 cm⁻¹'de aromatik C-H bağlarına ait piki göstermiştir. 2959 ve 2869 cm⁻¹'deki pikler, alifatik C-H bağlarının varlığını göstermektedir. 1656 cm⁻¹'deki pik, bileşiğin keton

grubuna ait karbonil grubunun varlığını gösterir. 1600-1450 cm^{-1} aralığındaki pikler, bileşikte bulunan $\text{C}=\text{C}$ ve $\text{C}=\text{N}$ bağlarına aittir. Son olarak, 1532 ve 1388 cm^{-1} 'deki absorpsiyon pikleri, molekülde bulunan nitro gruplarının olduğunu göstermektedir.

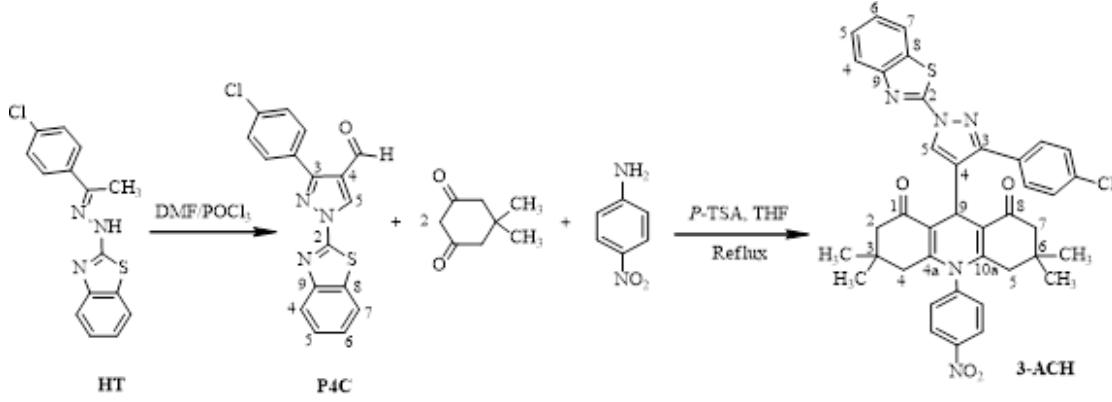
Nükleer Manyetik Rezonans (NMR)

Bu çalışmada, nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi kullanılarak sentezlenen bileşiklerin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR analizleri gerçekleştirilmiştir.

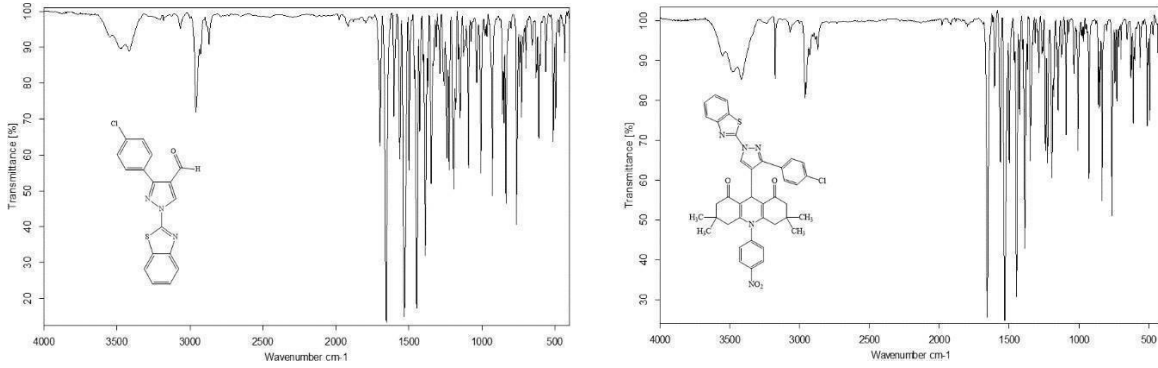
P4C'nin ^1H -NMR spektrumunda aldehit protonuna (CHO) atfedilen 10.08 ppm'de tekli (singlet) bir sinyal

ve pirazolün (C_5H) karbonuna bağlı protona karşılık gelen 9.08 ppm'de başka bir tekli sinyal ortaya çıkarmıştır. Aromatik protonlar 7.97-7.42 ppm aralığında multiplet olarak gözlenmiştir (Şekil 3).

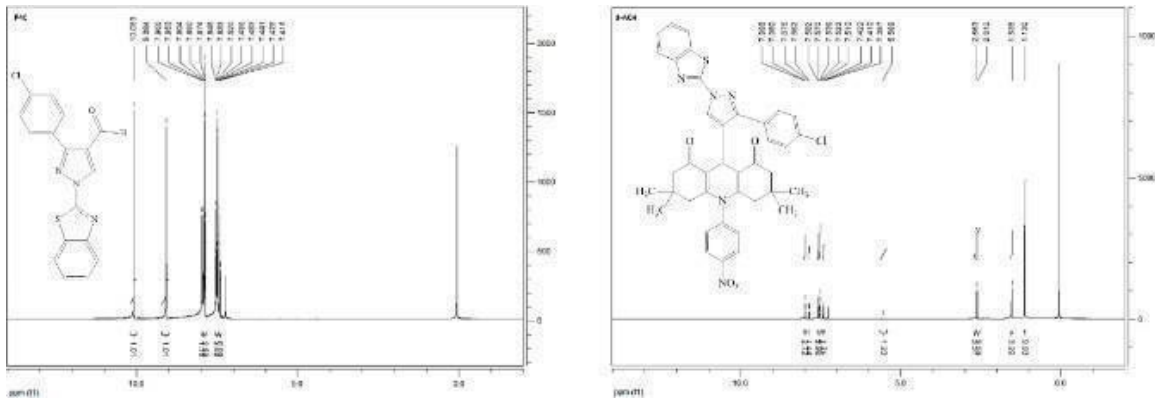
P4C'nin ^{13}C -NMR spektrumu için, 183.73 ppm'deki sinyal aldehit karbona ($\text{C}=\text{O}$) atfedilirken, 168.19 ppm ve 153.94 ppm'deki sinyaller sırasıyla benzotiyazol halkasındaki C_2 ve C_9 karbon atomlarına işaret etmektedir. 150.64 ila 121.78 ppm arasında gözlenen 12 pik, aromatik karbondan kaynaklanmaktadır (Şekil 4).



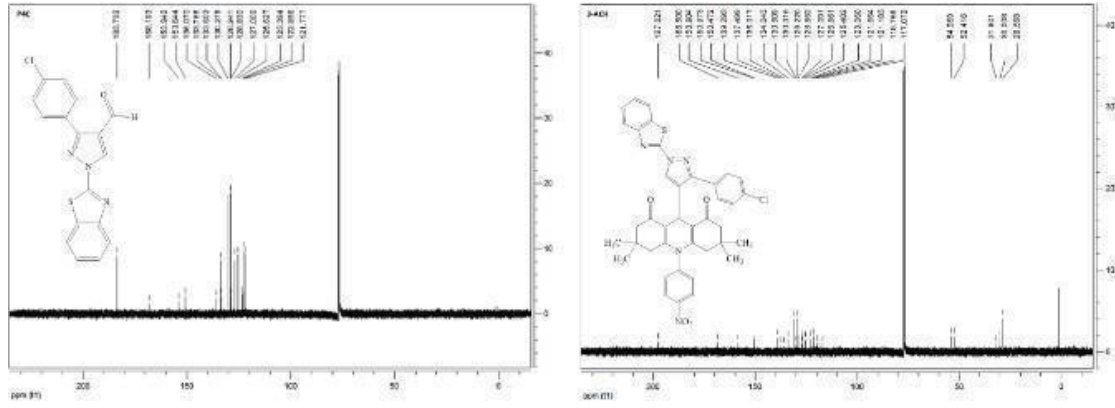
Şekil 1: Hidrazondan pirazol-akridin türevi sentezi



Şekil 2: P4C ve 3-ACH'nin FT-IR spektrumu



Şekil 3: P4C ve 3-ACH'nin ^1H -NMR spektrumu



Şekil 4: P4C ve 3-ACH'nin ¹³C-NMR spektrumu

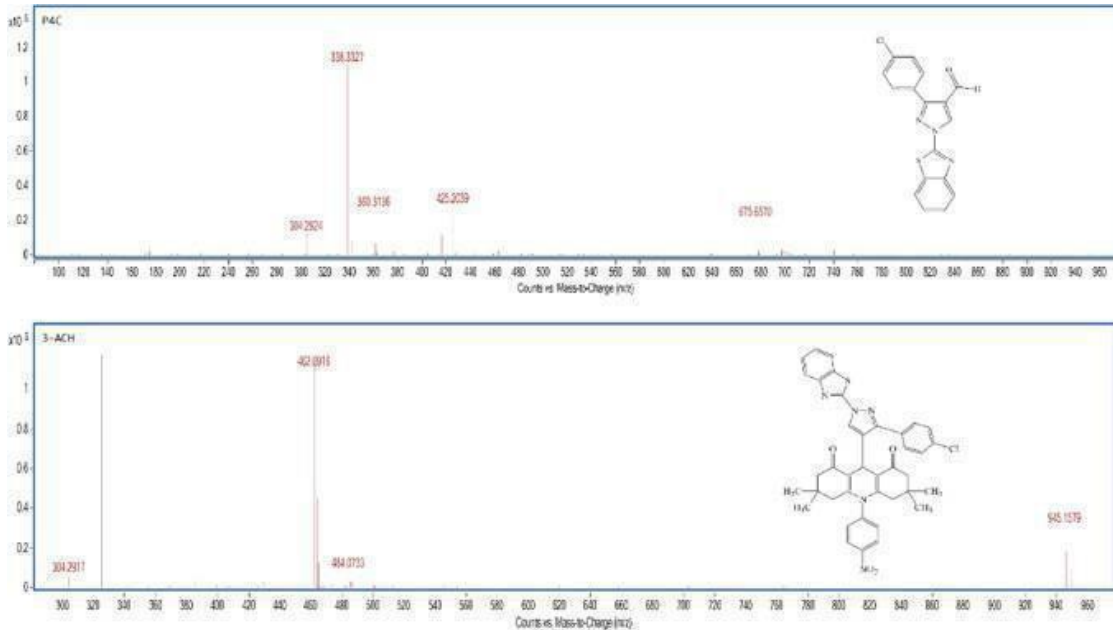
3-ACH'ye ait ¹H-NMR spektrumu, pirazol halkasının (C₅H) karbonuna bağlı protonu 7,99 ppm'de tekli bir sinyal olarak göstermektedir. 7,98-7,40 ppm aralığında gözlemlenen multipllet (çoklu) sinyaller, aromatik protonlara (Ar-H) karşılık gelmektedir. 5,57 ppm'deki singlet, akridin halkasındaki C₉H karbonuna bağlı protondan kaynaklanmaktadır. 2,66 ppm ve 2,61 ppm'deki tekli sinyaller, sırasıyla akridin halkasının C₂-C₇H ve C₄-C₅H karbonlarındaki protonlara atanır. 1,54 ppm ve 1,13 ppm'deki tekli pikler, moleküldeki metil protonlara (CH₃) karşılık gelmektedir (Şekil 3).

3-ACH'ye ait ¹³C-NMR spektrumu, akridin halkasındaki keton (C=O) karboniline karşılık gelen 197,62 ppm'de bir sinyal göstermektedir. 168,50 ve 150,97 ppm'de gözlenen sinyaller benzotiyazol halkasında bulunan C₂ ve C₉ karbonlarına işaret etmektedir. 158,90 ve 158,70 ppm'de görülen sinyaller akridin halkasındaki C_{4a}-C_{10a} karbonlarından kaynaklanmaktadır. 150,47'de gözlenen

sinyal nitro atomunun bağlı olduğu (C-NO₂) karbonunu göstermektedir. 54,07 ppm, 52,42 ppm, 31,90 ppm ve 30,01'de ppm gözlenen sinyaller sırasıyla akridin halkasında bulunan alifatik karbon atomlarına (C₂ ve C₇), (C₄ ve C₅), (C₉) ve (C₃ ve C₆) işaret etmektedir. Son olarak spektrumda 28,57 ppm'de görülen sinyal moleküldeki metil karbonlarından kaynaklanmaktadır (Şekil 4).

Kütle Spektrometrisi (ESI-MS)

Sentezlenen P4C ve 3-ACH'nin kütle analizi, Elektrosprey İyonizasyon Kütle Spektrometresi (ESI-MS) ile gerçekleştirilmiştir. P4C'in moleküler iyon zirvesi m/z 338.33 [M-1]'de gözlemlenmiştir; bu da 338,02 kütleyle sahip C₁₇H₁₀ClN₃OS moleküler formülüne karşılık gelmektedir. Dolayısıyla P4C'in kütle spektrumu, yüksek bir saflık derecesine işaret eden teorik moleküler iyon tepe noktası ile tam örtüşme göstermiştir (Şekil 5).



Şekil 5: P4C ve 3-ACH'nin kütle spektrumu

3-ACH'nin analizi sırasında parçalanmaya maruz kaldığı için teorik kütlesi doğrulanamamıştır. Bunun için 3-ACH'nin elementel analizi gerçekleştirildi.

Elementel Analiz

Bileşiklerin bileşimini belirlemek için elementel analizi yapılmıştır. Tablo 1'de gösterildiği gibi hem P4C hem 3-ACH için hesaplanan değerler ve analiz sonucunda elde edilen deneysel değerlerle uyumlu olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu sayede sentezlenen bileşiklerin saflığı ve kimyasal yapılarının doğruluğu kanıtlanmıştır.

Tablo 1: P4C ve 3-ACH elementel analizi

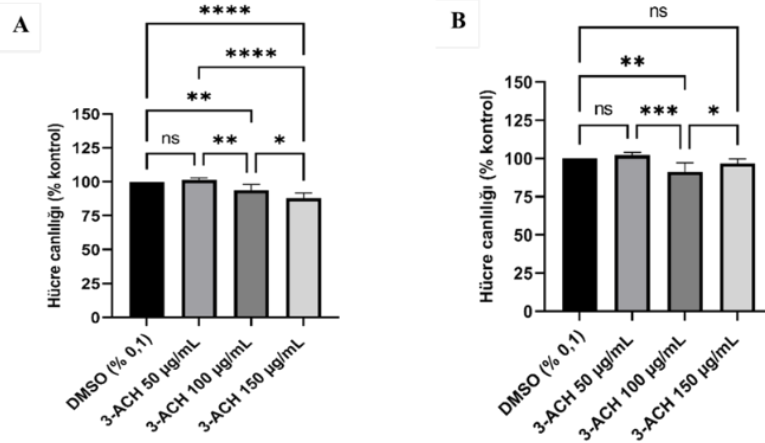
	P4C C ₁₇ H ₁₀ ClN ₃ O ₅		3-ACH C ₃₉ H ₃₄ ClN ₅ O ₄ S	
	Hesaplanan	Bulunan	Hesaplanan	Bulunan
% C	60.09	59.93	66.51	66.32
% H	2.97	3.01	4.87	4.90
% N	12.37	12.42	9.94	10.02
% S	9.44	9.47	4.55	4.61

Sonuç olarak elde edilen bileşiklerin tümü FT-IR, NMR, kütle spektrumları ve elementel analizi bir bütün olarak incelendiğinde, hedeflenen bileşikler başarılı ile sentezlendiği ve literatürle uyumlu değerler verdiği sonucuna ulaşılmıştır (12).

Hücre Canlılığı Sonuçları

WST-1, hücrelerin canlılığını değerlendirmek için kullanılan bir sitotoksikite testidir. Bu çalışmada, 3-ACH uygulamasının farklı dozları ve sürelerinin insan meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini değerlendirmek için WST-1 kullanıldı.

3-ACH'nin 12 saat boyunca uygulanması, 100 µg/mL ve 150 µg/mL dozlarında kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. Ancak, 50 µg/mL 3-ACH uygulamasıyla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmemiştir. 3-ACH'nin 24 saat boyunca uygulanması, 100 µg/mL dozunda kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. 3-ACH'nin SKBR-3 hücrelerinin %50 hücre büyümesini engelleyen konsantrasyon dozu (IC₅₀), doz-hücre canlılığı grafiği aracılığıyla hesaplandı. 3-ACH'nin SKBR-3 hücrelerinde IC₅₀ konsantrasyonu 12 saat sonunda 98,46 µg/mL bulunmuştur. 24 saat boyunca 50 µg/mL ve 150 µg/mL 3-ACH uygulamasıyla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmemiştir. Etkiler karşılaştırıldığında, 150 µg/mL dozunda 3-ACH'nin 12 saatlik uygulamasında istatistiksel olarak azalma görülmüşken, aynı dozda 3-ACH'nin 24 saatlik uygulamasında bu anlamlılık ortadan kalkmıştır (Şekil 6).



Şekil 6: 3-ACH'nin SKBR-3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin 12 saatlik (A) ve 24 saatlik (B) sürelerde değerlendirilmesi (*p < 0.05)

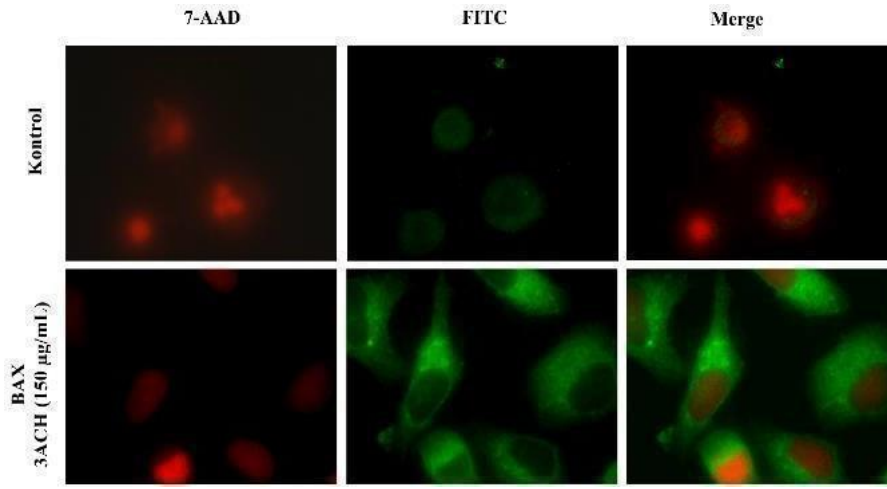
İmmün Boyama Sonuçları

İmmün boyama yöntemi antijen-antikor komplekslerinin oluşumuna dayanan bir immünolojik tekniktir. Bu çalışmada, 3-ACH uygulamasının ardından SKBR-3 hücrelerinde tetiklenen apoptotik mekanizmayı araştırmak için immün boyama yöntemini kullanıldı.

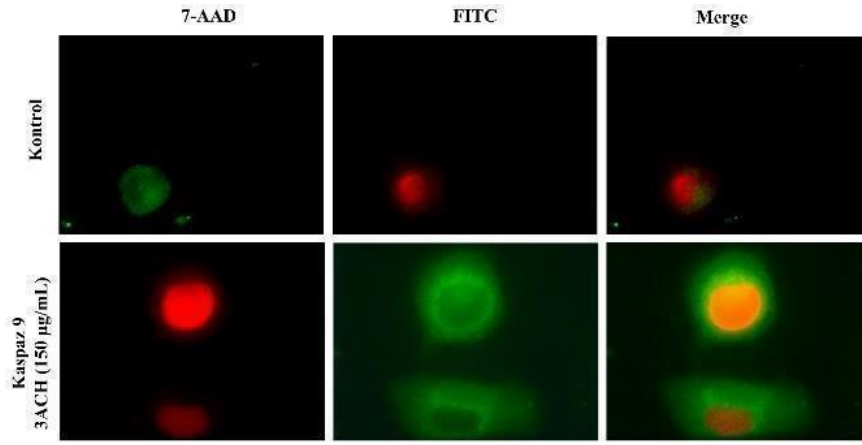
3-ACH'nin SKBR-3 insan meme kanser hücrelerine uygulanmasının ardından BAX, kaspaz-9, kaspaz-8 ve kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri incelendi. İmmün boyama deneyleri, SKBR-3 hücrelerine 3-ACH

(150 µg/mL) uygulandıktan sonra (sitotoksikite testinde en yüksek verilere karşılık gelen) 12 saatlik uygulama sonrası gerçekleştirildi. BAX proteini sentezi, 3-ACH (150 µg/mL) ile 12 saat boyunca tedavi edilen SKBR-3 kanser hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla artış gözlemlenmiştir

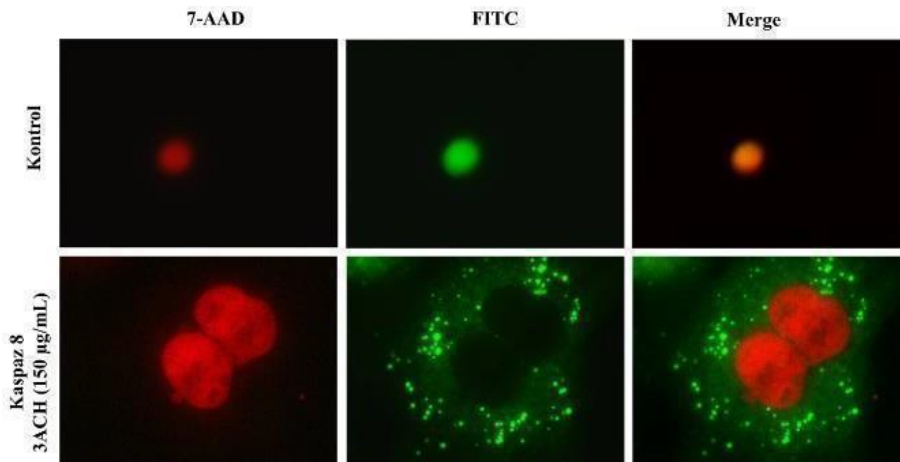
Benzer sonuçlar kaspaz-9 (Şekil 8), kaspaz-8 (Şekil 9) ve kaspaz-3 (Şekil 10) için elde edildi. Kaspaz proteinlerinin sentezi, 3-ACH (150 µg/mL) ile 12 saat boyunca tedavi edilen SKBR-3 insan meme kanseri hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla daha yüksekti.



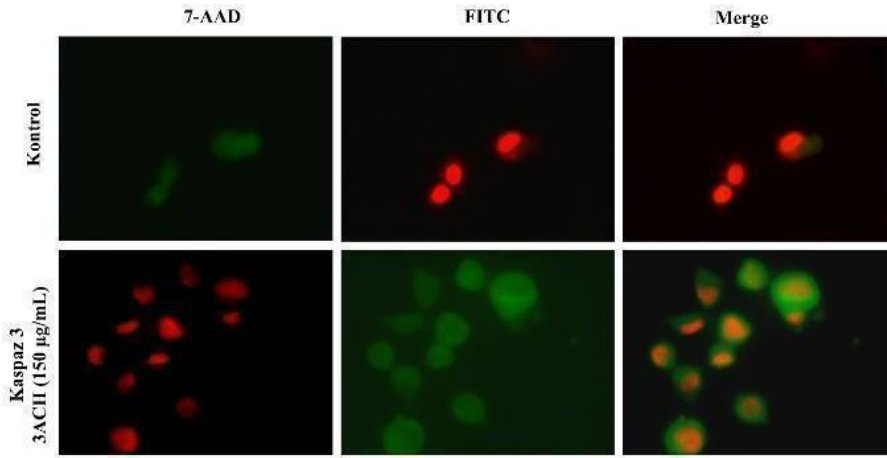
Şekil 7: SKBR-3 hücrelerinde 3-ACH uygulaması ile (150 µg/mL, 12 saat) ve 3-ACH uygulaması olmadan BAX proteinin ekspresyon düzeyinin incelenmesi (100X). 7-ADD: 7-aminoaktinomisin D, FITC: Floresein izotiyosiyanat, Merge: 7-ADD+FITC



Şekil 8: SKBR-3 hücrelerinde 3-ACH uygulaması ile (150 µg/mL, 12 saat) ve 3-ACH uygulaması olmadan Kaspaz-9 proteinin ekspresyon düzeyinin incelenmesi (100X). 7-ADD: 7-aminoaktinomisin D, FITC: Floresein izotiyosiyanat, Merge: 7-ADD+FITC



Şekil 9: SKBR-3 hücrelerinde 3-ACH uygulaması ile (150 µg/mL, 12 saat) ve 3-ACH uygulaması olmadan Kaspaz-8 proteinin ekspresyon düzeyinin incelenmesi (100X). 7-ADD: 7-aminoaktinomisin D, FITC: Floresein izotiyosiyanat, Merge: 7-ADD+FITC



Şekil 10: SKBR-3 hücrelerinde 3-ACH uygulaması ile (150 µg/mL, 12 saat) ve 3-ACH uygulaması olmadan Kaspaz-3 proteinin ekspresyon düzeyinin incelenmesi (100X). 7-ADD: 7-aminoaktinomisin D, FITC: Floresein izotiyosiyanat, Merge: 7-ADD+FITC

TARTIŞMA

Kadınlarda, meme kanseri en yaygın teşhis edilen kanser türüdür. 2020 yılında dünya genelinde 9,23 milyon kadına kanser teşhisi konmuş ve 4,43 milyon kadın kanserden hayatını kaybetmiştir. 2040 yılına gelindiğinde, bu rakamların 13,3 milyon yeni vaka ve 7,1 milyon ölüm olması tahmin edilmektedir (1).

Araştırmamızın temel amacı, 3-ACH'nin SKBR-3 insan meme kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini incelemektir. Bu amaç doğrultusunda, sitotoksik özelliklere odaklanıp 3-ACH'nin apoptozu tetikleme potansiyeline odaklanılmıştır. Morfolojik ve sitotoksik değerlendirmeler yoluyla, 3-ACH'nin SKBR-3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin uygulanan doza ve zamana bağlı olduğunu gözlemlendi. Bu sonuçlar, 3-ACH'nin SKBR-3 hücrelerini hedefleyen potansiyel bir kanser karşıtı madde olarak umut vadettiğini göstermektedir. Sitotoksik etkisinin yanı sıra, 3-ACH uygulamasının BAX (Şekil 7), kaspaz-9 (Şekil 8), kaspaz-8 (Şekil 9) ve kaspaz-3 (Şekil 10) gibi çeşitli apoptozla ilişkilendirilmiş proteinlerin aktivasyonunda artış göstermiştir. Bu proteinler, kanser hücrelerinde sıkça bozulan programlanmış hücre ölümünün sıkı bir şekilde düzenlendiği, hem içsel hem de dışsal apoptotik yollarındaki önemli rolleri olan bileşenlerdir. Bu proteinlerin aktivasyonu, 3-ACH'nin SKBR-3 meme kanseri hücrelerindeki sitotoksik etkisinin sorumlusu olarak apoptozu tetikleyebileceğini göstermektedir.

Son yıllarda bilim insanlarının, pirazol türevlerine olan araştırma ilgisi artmaktadır. Şu anda, klinik uygulamada veya klinik denemelerde incelenen 34 pirazol tabanlı terapötik ilaç bulunmaktadır (14). Farklı farmakolojik alt birimlere sahip olan pirazol, meme kanserinin de dahil olduğu birçok kanser hücre hattında test edilmiştir. Yeni bir dizi 1,2,4-oksadiazol içeren 1,2,3-triazol-pirazol bileşiği sentezinin, insan meme kanseri olan

MCF-7, A549 (akciğer kanseri), PC3 ve DU-145 (prostat kanseri) insan kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik testleri yapılmış ve sentezlenen bileşiklerin tüm hücre hatlarına karşı etkili olduğu gösterilmiştir (15). Yapılan bir çalışmada, N,N-dimetil-N'-(3-(1-(4-(trifluorometil)fenil)-1H-pirazol-4-il)fenil)azansülfonamid pirazol bileşiğinin meme kanserinin birçok onkogenik özelliğini hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, sentezlenen bu bileşiğin apoptozu tetiklediği ve DNA hasarlarından sorumlu olan genleri düzenlediği gösterilmiştir (16). Pirazol türevlerinin meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini gösteren çalışmalarla uyumlu olarak, sentezlediğimiz pirazol-akridin bileşiklerinin meme kanseri hücrelerindeki antikanser etkisini bu çalışma ile doğruladık. Ayrıca, hücre ölümünün altında yatan apoptotik mekanizmayı immün boyama yöntemiyle açıkladık. Metastatik meme kanseri hastalarında pirazoloakridin bileşiğinin klinik faz II çalışmaları devam etmektedir (17). Bu ve benzeri çalışmalar, yeni tedavi yöntemleri ve ilaçların geliştirilmesi konusunda önemli bir adım olup, hastalar için umut verici bir gelecek sunma potansiyeline sahiptir. Bu çalışmaların sonuçları, meme kanseri tedavisinde daha etkili ve güvenilir seçeneklerin ortaya çıkmasına katkıda bulunabilir.

Akridin, 1870 yılında keşfedilen ve tıp ve endüstri gibi birçok alanda kullanılan antimikrobiyal, antiparaziter, antiviral ve antimalaryal özelliklere sahip bir bileşiktir. Akridin türevlerinin kanser karşıtı etkisi, DNA ve DNA ile ilişkili enzimler olan topoizomera II ve telomera ile etkileşimleri nedeniyle bilim insanları tarafından kanser araştırmalarında kullanılmaktadır (3). Potansiyel bir antikanser ajanı olarak sentezlenen 9-aminoakridin türevi 2-((4-[4-(akridin-9-ilamino) feniltiyosülfanil] fenil) (2-hidroksietil)amino)etan-1-ol (CK0402) anti-kanser etkinliği açısından incelenmiştir. Çalışmada,

ER(-) ve HER2 aşırı ifade edilen SKBR-3 insan meme kanseri hücrelerinde, CK0402 tedavisi ile doza ve zamana bağlı olarak antikanser etki göstermiştir. Ayrıca, CK0402, SKBR-3 hücrelerinde ER(+) ve HER2(-) MCF-7 hücre hatlarında apoptozu ve otofajiyi indüklemiştir (18). Diğer bir çalışmada sentezlenen 3-({4-[4-(akridin-9-ilamino)feniltiyosülfanil]fenil}(3-hidroksipropil)amino)propan-1-ol (CK0403), amsakrinin bir sülfür içeren 9-anilinoakridin analogudur. CK0403'ün antikanser etkinliği MCF-7, MDA-MB-231, BT474 ve SKBR-3 meme kanseri hücre hatları ile MCF-10A sağlıklı meme hücre hatlarında test edilmiştir. Sonuçlar, CK0403'ün MCF-7 dışındaki tüm meme kanseri hücre hatlarında CK0402'den daha etkili bir büyümeyi engelleme aktivitesi sergilediğini göstermiştir. Ayrıca, CK0403'ün CK0402'den daha etkili bir şekilde apoptozu indüklediği görülmüştür. Bu yüksek antikanser potansiyeli, CK0403'ün gelecekteki meme kanseri tedavilerinde umut vadeden bir seçenek olabileceğini göstermektedir (19). İki yeni 1-akridin-9-il-3-metiltiyooürea Au(I) DNA interkale edici [Au(ACRTU)2]Cl (2) ve [Au(ACRTU)(PPh3)]PF6 (3) kompleksi hazırlanmıştır. 2. ve 3. bileşikler farklı fenotiplerdeki meme kanseri hücre hatları MDA-MB-231 (triple negatif), SKBR-3 (HER2+, ER α -, ve ER β -), ve MCF-7 (ER+) üzerinde sitotoksik etki göstermiştir. Kaspaz-3 aktivasyonu aracılığıyla apoptozu indüklediği gösterilmiştir (20). Yeni sitotoksik fenantren-füzyonlu-tetrahidrodibenzo-akridinonların hızlı mikrodalga destekli tek aşamalı sentelenen bileşik; rahim (HeLa), prostat (PC-3), fibrosarkom (HT-1080), over (SKOV-3) kanser hücrelerine karşı *in vitro* sitotoksitesiteleri test edilmiş ve normal (HEK-293T) böbrek hücre hattına karşı daha güvenli olduğu belirlenmiştir. Kanser hücrelerinde sitotoksik profil göstermiştir. Kanser hücrelerinin sayısının azaldığı ve apoptoz net bir şekilde ortaya konmuştur. Kaspaz-3 aktivasyonunun artması, apoptoz indüksiyonunu desteklemiştir (21). Yaptığımız çalışmada literatürle uyumlu olarak SKBR-3 hücrelerinde doz ve zaman bağımlı olarak sitotoksitesiteyi artırırken hem içsel hem de dışsal yollardan sorumlu olan kaspaz-3 aktivitesindeki artış ile apoptoz indüklenmiştir. Ayrıca çalışmamızda, kaspaz-3 apoptoz yolağının yanı sıra, apoptozun içsel yollardan sorumlu olan üyeleri kaspaz-9 ve BAX ile dışsal yollardan sorumlu olan kaspaz-8'in protein seviyeleri de artmıştır. Çalışmamızda, 3-ACH'nin insan meme kanseri hücreleri olan SKBR-3 hücrelerinde sitotoksik etkiler gösterdiğini, bu etkilerin dozaj ve süre ile ilişkili olduğunu gösterdik. Apoptozda, başta hem içsel hem de dışsal yollardan sorumlu olan kaspaz-3'ün protein sentezi olmak üzere, içsel yollardan sorumlu olan kaspaz-9 ve BAX ile dışsal yollardan sorumlu olan kaspaz-8 protein sentezinin artığı ortaya konmuştur. Bu

proteinler, kanserli hücrelerde sıkça bozulan programlanmış hücre ölümünün düzenlendiği içsel ve dışsal apoptotik yolların önemli bileşenleridir. Bu bulgular, 3-ACH'nin sitotoksik etkisini hem içsel hem de dışsal yolları aktive ederek gerçekleştirebileceğini göstermektedir. Bu proteinlerin uyarılması, 3-ACH'nin SKBR-3 hücrelerinde apoptozu tetikleme yeteneğine sahip olduğunu ve bu özelliğin sitotoksik etkisinin temel mekanizması olabileceğini düşündürmektedir. 3-ACH'nin insan meme kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini daha iyi anlamak için ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

Çatışma Beyanı: Bu çalışmada herhangi bir potansiyel çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Katkı Oranı Beyanı: Anafikir/Planlama: MD, YK, FE; Analiz/Yorum: YK, FE, MD, ME, HY, RK; Veri Sağlama: YK, FE, MD, ME, HY, RK; Yazım: MD, YK, FE; Gözden Geçirme ve Düzeltme: MD, YK, FE; Onaylama: MD, YK, FE, ME, HY, RK.

Destek ve Teşekkür Beyanı: Çalışmaya ilişkin hiçbir kurum ya da kişiden finansal destek alınmamıştır. Hücre kültürü ve biyokimyasal analizler için altyapısını kullandığımız Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'ne içtenlikle teşekkür ederiz. SKBR-3 insan meme kanseri hücre hattını temin ettiği için Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU'na teşekkür ederiz

Etik Kurul Beyanı: Bu araştırma bir hücre kültürü çalışması olduğundan ve SKBR-3 hücre hattı kullanıldığından etik kurul onayı gerekmemektedir. İnsanlar veya hayvanlar üzerinde herhangi bir deney veya müdahale yapılmamıştır

KAYNAKLAR

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, ve ark. Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249.
2. Kabir E, Uzzaman M. A review on biological and medicinal impact of heterocyclic compounds. *Results in Chemistry.* 2022;4:100606.
3. Varakumar P, Rajagopal K, Aparna B, et al. Acridine as an anti-tumour agent: A critical review. *Molecules.* 2023;28(1):193.
4. Mishra BB, Kumar D, Singh AS, Tripathi RP, Tiwari VK. Ionic liquids-prompted synthesis of biologically relevant five- and six-membered heterocyclic skeletons: An update. In: Brahmachari G, ed. *Green Synthetic Approaches for Biologically Relevant Heterocycles.* 1. basım. Boston. Elsevier, 2015:437-493.
5. Das A, Banik BK. Microwave-assisted synthesis of N-heterocycles. In: Das A, Banik B, eds. *Microwaves in Chemistry Applications.* 1. basım. Amsterdam. Elsevier, 2021:143-198.
6. Khandelwal S, Tailor YK, Rushell E, Kumar M. 9 - Use of sustainable organic transformations in the construction of heterocyclic scaffolds. In: Banik BK, ed. *Green Approaches in Medicinal Chemistry for Sustainable Drug Design.* 1. basım. Amsterdam. Elsevier, 2020:245-352.

7. Duarte SS, Silva DKF, Lisboa TMH, ve ark. Anticancer effect of a spiro-acridine compound involves immunomodulatory and anti-angiogenic actions. *Anticancer Res.* 2020;40(9):5049-5057.
8. Naim MJ, Alam O, Nawaz F, Alam MJ, Alam P. Current status of pyrazole and its biological activities. *J Pharm Bioallied Sci.* 2016;8(1):2-17.
9. Karrassi K, Radi S, Ramli Y, ve ark. Synthesis and pharmacological activities of pyrazole derivatives: A review. *Molecules.* 2018;23(1):134.
10. Ashourpour M, Mostafavi Hosseini F, Amini M, ve ark. Pyrazole derivatives induce apoptosis via ROS generation in the triple negative breast cancer cells, MDA-MB-468. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2021;22(7):2079-2087.
11. Deweshri N, Kishor D, Vijayshri R, Ruchi S, Ujwala M. Pyrazole scaffold: Strategies toward the synthesis and their applications. In: Premlata K, Amit BP, eds. *Strategies for the Synthesis of Heterocycles and Their Applications.* 1. Edition. Rijeka. IntechOpen, 2022:254.
12. Elmusa M, Elmusa S, Mert S, ve ark. One-pot three-component synthesis of novel pyrazolo-acridine derivatives and assessment of their acetylcholinesterase inhibitory properties: An in vitro and in silico study. *J Mol Struct.* 2023;1274:134553.
13. Sachin S. Wazalwar ARB, Franc Perdih. Aqueous phase synthesis, crystal structure and biological study of isoxazole extensions of pyrazole-4-carbaldehyde derivatives. *J Mol Struct.* 2017;1150:258-267.
14. Hongjin Z, Zhang S, Ampomah-Wireko M, ve ark.. Pyrazole: An important core in many marketed and clinical drugs. *Russ J Bioorg Chem.* 2022;48(6):1175-1189.
15. G M, Sridhar G, Laxminarayana E, Chary MT. Synthesis and biological evaluation of 1,2,4-oxadiazole incorporated 1,2,3-triazole-pyrazole derivatives as anticancer agents. *Chem Data Coll.* 2021;34:100735.
16. Kang M, Pandit N, Kim AY, et al. PCW-1001, a novel pyrazole derivative, exerts antitumor and radio-sensitizing activities in breast cancer. *Front Oncol.* 2022;12:835833.
17. Ramaswamy B, Mrozek E, Kuebler JP, Bekaii-Saab T, Kraut EH. Phase II trial of pyrazoloacridine (NSC#366140) in patients with metastatic breast cancer. *Invest New Drugs.* 2011;29(2):347-351.
18. Sun YW, Niu TK, Yang JM, Kwon CH, Chen KY, Chen KM. Potentiation of the growth inhibition activity of 2-({4-[4-(acridin-9-ylamino)phenylthio]phenyl}(2-hydroxyethyl)amino)ethan-1-ol (CK0402) by Herceptin in SKBR-3 human breast cancer cells. *Exp Ther Med.* 2010;1(3):513-518.
19. Sun YW, Chen KY, Kwon CH, Chen KM. CK0403, a 9-aminoacridine, is a potent anti-cancer agent in human breast cancer cells. *Mol Med Rep.* 2016;13(1):933-938.
20. Pérez SA, de Haro C, Vicente C, Donaire A, Zamora A, Zajac J, ve ark. New acridine thiourea gold(I) anticancer agents: Targeting the nucleus and inhibiting vasculogenic mimicry. *ACS Chem Biol.* 2017;12(6):1524-1537.
21. Kumar NP, Sharma P, Reddy TS, Shankaraiah N, Bhargava SK, Kamal A. Microwave-assisted one-pot synthesis of new phenanthrene fused-tetrahydrodibenzo-acridinones as potential cytotoxic and apoptosis inducing agents. *Eur J Med Chem.* 2018;151:173-185.