TİROİD KANSERİNDE ANTİPSİKOTİK TİYORİDAZİN İLACININ ANTİKANSER POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşen SAĞNAK

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİROİD KANSERİNDE ANTİPSİKOTİK TİYORİDAZİN İLACININ ANTİKANSER POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşen SAĞNAK
0009-0004-0929-5236

Prof. Dr. Ferda ARI
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2025
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TİROİD KANSERİNDE ANTİPSİKOTİK TİYORİDAZİN İLACININ ANTİKANSER POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşen SAĞNAK

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ferda ARI

Tiroid kanseri, endokrin sistemin en yaygın malignitesi olup genel popülasyonun yaklaşık %2'sini etkilemektedir. Cerrahi rezeksiyon ve radyoaktif iyot tedavisi çoğu hastada başarılı sonuçlar sağlasa da yaklaşık %20'sinde tümör rekürrensi, %10'unda ise uzak organ metastazı gelişebilmektedir. Bu durum, mevcut tedavi yaklaşımlarının yetersiz kaldığı hastalarda alternatif terapötik stratejilerin gerekliliğini ortaya koymaktadır.
Son yıllarda ilacın yeniden konumlandırma stratejisi, yeni antikanser ilaçların keşfinde umut vaat eden bir strateji olarak öne çıkmaktadır. Özellikle dopamin reseptör antagonistleri sınıfına ait antipsikotik ilaçların antitümoral etkileri üzerine yapılan çalışmalar dikkat çekmektedir. Bu tez çalışmasında, antipsikotik bir ilaç olan tiyoridazin hidroklorür (THC)'ün, papiller tiroid kanseri hücre soyu (TPC-1) üzerindeki antikanser etkileri değerlendirilmiştir.
Tez çalışmasında, THC'nin TPC-1 hücrelerinin canlılığını hem doza hem de zamana bağlı olarak anlamlı düzeyde azalttığı bulunmuştur. Buna ek olarak, THC'nin Nthy Ori 3-1 sağlıklı tiroid hücrelerinde, TPC-1 hücre soyuna kıyasla daha düşük düzeyde toksisiteye yol açtığı gözlemlenmiştir. THC'nin hücre ölüm mekanizması olarak apoptozu desteklediği belirlenmiştir. İlacın ayrıca hücrelerin koloni oluşturma kapasitesini ve migrasyon potansiyelini (hücre göçünü) inhibe ettiği saptanmıştır. Western blot analizi ve real-time PCR (qPCR) yöntemleri ile yapılan çalışmalar, THC'nin hem dışsal (ekstrinsik) apoptotik yol üzerinden etkili olan pro-apoptotik gen ve protein ekspresyonlarını artırdığını hem de içsel (intrinsik) yolun önemli bir düzenleyicisi olan anti-apoptotik BCL-2 düzeylerini azalttığını göstermiştir. Sonuç olarak, elde edilen bulgular THC'nin papiller tiroid kanseri hücrelerine karşı güçlü bir antikanser etki gösterdiğini ve potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini ortaya koymaktadır. Ancak bu etkinin klinik geçerliliğinin netleştirilebilmesi için ileri düzey *in vivo* ve farmakodinamik çalışmalarla desteklenmesi büyük önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Antikanser, antipsikotik ilaç, apoptozis, tiroid kanseri, tiyoridazin hidroklorür
2025, xvii + 68 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF ANTICANCER POTENTIAL OF THIORIDAZINE, AN ANTIPSYCHOTIC IN THYROID CANCER

Ayşen SAĞNAK

Bursa Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ferda ARI

Thyroid cancer is the most common malignancy of the endocrine system, affecting approximately 2% of the general population. While surgical resection and radioactive iodine therapy yield successful outcomes in most patients, tumor recurrence occurs in about 20%, and distant organ metastasis develops in approximately 10% of cases. This highlights the need for alternative therapeutic strategies in patients for whom current treatment approaches are insufficient.

In recent years, drug repurposing has emerged as a promising strategy for the discovery of new anticancer agents. Studies investigating the antitumor effects of antipsychotic drugs belonging to the dopamine receptor antagonist class have gained attention. In this thesis, the anticancer effects of the antipsychotic drug thioridazine hydrochloride (THC) on the papillary thyroid cancer cell line (TPC-1) were evaluated.

The findings demonstrated that THC significantly reduced the viability of TPC-1 cells in a dose- and time-dependent manner. Moreover, THC exhibited lower toxicity in healthy thyroid cells (Nthy Ori 3-1) compared to TPC-1 cancer cells. It was determined that THC promotes apoptosis as the primary mechanism of cell death. Additionally, THC was found to inhibit both colony formation capacity and migration potential of the cancer cells. Western blot and real-time PCR (qPCR) analyses revealed that THC increased the expression of pro-apoptotic genes and proteins involved in the extrinsic apoptotic pathway, while decreasing levels of BCL-2, a key anti-apoptotic regulator of the intrinsic pathway. In conclusion, the findings indicate that THC exhibits strong anticancer activity against papillary thyroid cancer cells and may serve as a potential therapeutic agent. However, further advanced in vivo and pharmacodynamic studies are essential to validate its clinical relevance.

Key words: Anticancer, antipsychotic drug, apoptosis, thyorid cancer, thioridazine hydrochloride
2025, xvii + 68 pages.

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimden bu yana bilgi ve deneyimiyle bana her zaman yol gösteren, akademik hayatım boyunca ilham kaynağım olan, yüksek lisans sürecimde de danışmanlığını büyük bir özveriyle sürdüren, ilgisi ve desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ferda ARI'ya

Çalışmalarım süresince her zaman yanımda olan, sürecin her anını benimle yaşayan, sorularımı hiçbir zaman yanıtsız bırakmayan, bilgi ve deneyimlerini içtenlikle paylaşan, desteğiyle motivasyonumu hep yüksek tutan ve heyecanımı yürekten paylaşan Sibel ÇINAR ASA, Emine Gonca TUNA, Halime AKGÜN ve Oğuzhan AKGÜN'e gönülden teşekkür ederim. Ayrıca, çalışmalarımda bana yol gösteren, katkı ve emekleriyle yanımda olan Bursa Uludağ Moleküler Kanser Araştırma Laboratuvarı (BUMKAL) ailesinin tüm üyelerine içtenlikle teşekkür ederim.

Akademik yolculuğuma birlikte başladığım, bu süreçte birçok güzel başarıyı birlikte paylaştığımız, her zaman yanımda olan, desteğini ve dostluğunu hiç eksik etmeyen canım arkadaşlarım Halime Sena EKMEKCİ ve İpek AYDIN'a teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, her zorlukta desteğini ilk hissettiren, yorgunluklarımı paylaşan, beni motive eden, güçlü kalmamı sağlayan ve bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan canım aileme ve bugün sahip olduğum değerlerin temellerini atmamda en büyük katkıyı sağlayan, bana rehberlik eden kıymetli dedelerime de minnettarım; iyi ki hayatımda oldunuz, iyi ki varsınız. Teşekkür ederim.

Bu süreçte akademik çalışmalarımı destekleyen ve yüksek lisans eğitimime katkı sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na 2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında sağladığı destek için teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans tez çalışması, FYL-2024-1691 numaralı yüksek lisans tez projesi olarak Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından desteklenmiştir.

Ayşen SAĞNAK
…/…/2025

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET....viii
ABSTRACT....ix
TEŞEKKÜR....x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ....xiii
1.GİRİŞ....1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI....4
2.1. Kanser....4
2.2. Tiroid Kanseri....5
2.2.1. Tiroid kanseri etiyolojisi....6
2.2.2. Tiroid kanseri epidemiyolojisi....7
2.2.3. Tiroid kanseri moleküler biyolojisi....8
2.3 Apoptozis....9
2.4. Nekroz....13
2.5. Nekroptozis....14
2.6. İlacın Yeniden Konumlandırılması....16
2.7. Tiyoridazin....18
3. MATERYAL ve YÖNTEM....20
3.1. Materyal....20
3.1.1. Kimyasal maddeler....20
3.1.2. Sarf malzemeler....21
3.1.3. Cihazlar....21
3.2. Yöntem....22
3.2.1. Çalışmada kullanılan hücre soyları....22
3.2.2. Kullanılan ilacın hazırlanması....23
3.2.3 Kullanılan besiyerlerinin hazırlanması....23
3.2.4 Hücre soylarının stoktan çıkarılması....24
3.2.5 Hücre soylarının pasajlanması....24
3.2.6. Hücre soyunun stoklanması....24
3.2.7 Hemositometri ile hücrenin sayımı....25
3.2.8. Sulforhadamin B (SRB) metodu....25
3.2.9. Hoechst 33342, propidyum iyodür ve anneksin-V-FITC ile üçlü floresan boyama....26
3.2.10 Apoptozis hücre ölümü Z-Vad-Fmk inhibitör analizi....27
3.2.11 Nekroptozis hücre ölümü MLKL inhibitör analizi....27
3.2.12. Nekroptozis hücre ölümü RIPK1 inhibitör analizi....27
3.2.13. Koloni oluşturma yeteneği testi....28
3.2.14. Hücre migrasyon testi....28
3.2.15. İlacının antikanser mekanizmasının moleküler süreçlerinin protein ve gen seviyesinde incelenmesi....29
3.2.16 Western blot analizi....29
3.2.17 RT-PCR analizleri....31
3.2.18. İstatistiksel analiz....33
4. BULGULAR....34
4.1. SRB Canlılık Testi Bulguları....34
4.2 Hoechst 3342, Propidium İyodür, Anneksin V Floresan Boyama Bulguları....36
4.3. Z-Vad-Fmk Bulguları....38

4.4. Nekrostatin-1 Bulguları....39
4.5. NSA İnhibitör Bulguları....40
4.6. Koloni Oluşturma Yeteneği Analizi....41
4.7. Hücre Migrasyon Analizi....42
4.8. Western Blot Analizi....43
4.9. Genlerin Ekspresyon Profilleri Analizi....45
5. TARTIŞMA ve SONUÇ....47
KAYNAKLAR....59
ÖZGEÇMİŞ....68

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
β	Beta
V	Volt
°C	Santigrat derece
nm	Nanometre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
g	Gravity (yerçekimi ivmesi)
RPM	Dakikada devir
Cu	Bakır
µM	Mikromolar
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
%	Yüzde
IC_{50}	Hücrelerin %50'sini öldüren doz

Kısaltmalar	Açıklama
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AKAP9	A-Kinaz Bağlayıcı Protein 9
APAF-1	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1
BCA	Bisinkoninik Asit
BCL-2	B-Hücreli Lösemi/Lenfoma 2
BRAF	V-Raf Murin Sarkom Viral Onkogen Homolog B
BSA	Sığır Serum Albümini
CDK4	Siklin Bağımlı Kinaz 4
cDNA	Tamamlayıcı DNA
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium F-12
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DR4/5	Ölüm Reseptörü 4/5
DRD2	Dopamin Resptörü 2
FADD	Fas İle İlişkili Ölüm Alanı Proteini
FASR	Fas Reseptörü
FBS	Fetal Sığır Serum
FITC	Floresan İzotiyosiyanat
HMGB1	Yüksek mobilite grubu protein 1
HRP	Horseradish Peroksidaz
LDS	Lityum Dodesil Sülfat
MAPK	Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinazlar
MLKL	Psödokinaz Karışık Kökenli Kinaz
MOMP	Mitokondri Dış Zar Geçirgenliği
mTOR	Rapamisin Hedefi
NCI	Ulusal Kanser Enstitüsü
Nec-1	Nekrostatin-1

NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
Nsa	Nekrosülfonamid
NTRK1	Nörotrofik Reseptör Tirozin Kinaz 1
Parp	Poli(Adp-Riboz) Polimeraz
PBS	Fosfat Tuz Tampon Çözeltisi
PI3K	Fosfatidil İnositol 3-Kinaz
PS	Fosfatidil Serin
RAS	Sıçan Sarkomu Viral Onkogen Homoloğu
RET	Transfeksiyon Sırasında Yeniden Düzenlenen
RIPK1/3	Serin/Treonin-Protein Kinaz 1
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROS	Rektif Oksijen Türleri
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-PCR	Gerçek Zamanalı Polimeraz Zincir Reksiyonu
SD	Standart Sapma
SRB	Sulforhadamine B
TBS-T	Tris-Buffer Saline-Tween20
TCA	Trikloroasetik Asit
THC	Tiyoridazin Hidroklorür
TNF-R	Tümör Nekroz Faktörü Reseptörleri
TRADD	Tümör Nekroz Faktörü Reseptör Tip 1 ile İlişkili Ölüm Alanı Proteini
TRAIL-R	TNF-İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand Reseptörleri
TRK	Tropomozin Reseptör Kinaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	Kanser hücrelerinin ayırt edici özellikleri	5
Şekil 2.2.	Amerika'da cinsiyete göre tahmini kanser vakaları ve ölümleri için önde gelen on kanser türü	8
Şekil 2.3.	Apoptozis mekanizmasının intrinsik yolağı	11
Şekil 2.4.	Apoptozis mekanizmasının ekstrinsik yolağı	12
Şekil 2.5.	Nekroz ve apoptozun farklılıkları	14
Şekil 2.6.	Nekroptozis mekanizması	15
Şekil 2.7.	(A) Kanser tedavisi için geleneksel ilaç keşfi ve ilaç yeniden kullanımında tahmini süre ve ana adımlar. (B) İlaç yeniden kullanımına yönelik ana yaklaşımlar	17
Şekil 2.8.	THC'nin anti-tümör etki mekanizmasının özeti	19
Şekil 3.1.	Tez çalışmasında kullanılan hücre soylarının faz kontrast mikrokopi görüntüleri (10X büyütme)	23
Şekil 3.2.	Tez çalışmasında kullanılan antipsikotik tiyoridazin hidroklorür (THC) ilacının kimyasal yapısı (10-[2-(1-Metil-2-piperidil)etil]-2-(metiltiyo)-10H-fenotiyazin hidroklorür)	23
Şekil 4.1.	TPC-1 hücre soyunda tiyoridazin hidroklorür (THC) uygulamasının 24 (A.), 48 (B.), 72 (C.) saatlik SRB testi sonrası alınan canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (**p<0,01, ***: p<0,001) ifade etmektedir	35
Şekil 4.2.	Nthy-Ori 3-1 hücre soyunda tiyoridazin hidroklorür (THC) uygulamasının 48 saatlik SRB testi sonrası alınan canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (** p<0,01) ifade etmektedir	36
Şekil 4.3.	Hücre ölüm modunun üçlü floresan boyama ile belirlenmesi. TPC-1 hücrelerinin 24 saatlik tiyoridazin hidroklorür (THC) ile tedavisi (5, 10 ve 15 μM) sonrasında floresan boyama görüntüleri. Sağ paneller Hoechst 33342 boyamalarını (mavi), orta paneller Anneksin-V boyamalarını (yeşil) ve sol panel PI boyamasını (kırmızı) gösterir (20X)	38
Şekil 4.4.	TPC-1 hücrelerinin pan-kaspaz inhibitörü Z-Vad-Fmk (10 μM) ile 24 saat tedavisi sonrasında, tiyoridazin hidroklorür (THC)'e 48 saat maruz bırakılmasının tedavi sonrası hücre canlılığı sonuçları. *Aynı zaman periyotları içinde eşit dozlarda inhibitör uygulanmış [Z-Vad-Fmk (+)] ve uygulanmamış [Z-Vad-Fmk (-)] THC muamelelerin etkisi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*** p<0,001) ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir	39
Şekil 4.5.	TPC-1 hücrelerinin nekroptoz inhibitörü Nec-1 (50 μM) ile 24	40

saat tedavisi sonrasında, tiyoridazin hidroklorür (THC)'e 48 saat maruz bırakılmasının tedavi sonrası hücre canlılığı sonuçları. *Aynı zaman periyotları içinde eşit dozlarda inhibitör uygulanmış (Nec-1(+)) ve uygulanmamış (Nec-1(-)) THC muamelelerin etkisi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*** p<0,001) ifade etmektedir. Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma

Şekil 4.6. TPC-1 hücrelerinin MLKL inhibitörü NSA (1,5 μM) ile 4 saat tedavisi sonrasında, 48 saat boyunca tiyoridazin hidroklorür (THC)'e maruz bırakılmasının hücre canlılığına etkisi. Aynı zaman periyotları içinde eşit dozlarda inhibitör uygulanmış [NSA(+)] ve uygulanmamış [NSA(-)] THC muamelelerin etkisi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*** p<0,001) ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir 41

Şekil 4.7. TPC-1 hücreleri üzerinde tiyoridazin hidroklorür (THC) tedavisinin koloni oluşturma yeteneği: (A.) Tedavi sonrası hücrelerin ışık mikroskopu görüntüleri (10X büyütme) ve (B) doza bağlı koloni sayısı değişimi grafiği. THC muameleleri ve kontroller karşılaştırıldığında, aynı zaman periyotlarında ***p < 0,001 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı farklar gözlenmiştir 42

Şekil 4.8. TPC-1 hücreleri üzerinde tiyoridazin hidroklorür (THC) tedavisinin göç etme yeteneği üzerindeki etkisinin mikroskop görüntüleri (A) (4X büyütme) ve yara iyileşmesi grafiği (B). *Aynı zaman periyotları içinde kontrollerine göre ve THC ile muamelelerin etkisi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*** p<0,001) ifade etmektedir 43

Şekil 4.9. Tiyoridazin hidroklorür (THC) tedavisi sonrası TPC-1 hücrelerinde apoptotik proteinlerin ekspresyon değişimleri. (A) Western blot bantları, (B) Bant yoğunluğu değişim grafikleri. Dansitometrik analiz ImageJ yazılımı ile gerçekleştirildi ve bant yoğunlukları β-AKTİN'e normalize edildi 45

Şekil 4.10. Tiyoridazin hidroklorür (THC)'ün antikanser mekanizmasının gen seviyesinde incelenmesi. CT değerleri β-Aktin'e göre normalize edilmiş olup kontrole göre katlık artış verilmiştir. *Aynı zaman periyotları içinde kontrollerine göre ve THC ile muamelelerin etkisi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*** p<0,001) ifade etmektedir 46

Şekil 5.1. Tiyoridazin Hidroklorür (THC)'ün TPC-1 hücre soyu üzerindeki apoptotik etki mekanizmaları. 58

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin listesi	20
Çizelge 3.2.	Çalışmada kullanılan sarf malzemelerin listesi	21
Çizelge 3.3.	Çalışmada kullanılan cihazların listesi	21
Çizelge 3.4.	cDNA çevrimi aşamaları	32
Çizelge 3.5	RT-PCR için Gerekli Bileşenler	33
Çizelge 3.6.	RT-PCR koşulları	33
Çizelge 4.1.	TPC-1 hücre soyunda THC uygulamasının 24, 48 ve 72 saatlik SRB testi sonrası hücrelerin %50'sini öldüren dozlar.	35

1.GİRİŞ

Tiroid kanseri, son yıllarda artış eğilimi göstererek küresel düzeyde yaygınlığını artırmaktadır (Chen ve ark., 2023). Papiller tiroid karsinomu, tiroid foliküler epitelinden köken alan en yaygın patolojik alt tip olup, tüm tiroid malignitelerinin %80–90'ını oluşturmaktadır (Abdullah ve ark., 2019).

Papiller tiroid kanserli hastaların prognozu genellikle iyi olmakla birlikte, uzun dönem takiplerde hastaların yaklaşık %25'inde nüks geliştiği bildirilmektedir (Dedivitis ve ark., 2020). Cerrahi rezeksiyon ve radyoaktif iyot tedavisi çoğu hastada etkili sonuçlar verse de %20'sinde tümör rekürrensi, %10'unda ise uzak organ metastazı gelişebilmektedir (Lee ve ark., 2020). Xie ve arkadaşlarının (2020) 27 yıllık medyan takip süresine sahip çalışmasında, hastaların %28'inde rekürrens görüldüğü ve %9'unun papiller tiroid kanserine bağlı olarak yaşamını yitirdiği bildirilmiştir (Xie ve ark., 2020). Son 20 yılda, papiller tiroid kanserinin moleküler temellerine yönelik birçok önemli bilgi elde edilmiş ve bu alan halen önemli bir araştırma konusu olmaya devam etmektedir (Prescott & Zeiger, 2015).

Kanserin artan insidansı ve önde gelen ölüm nedenlerinden biri olması, yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Tümör büyümesini ve proliferasyonunu etkili bir şekilde inhibe eden yeni kemoterapötik ajanlar piyasaya sürülmüş olmakla birlikte, antikanser ilaç keşfi ve geliştirilmesi yüksek maliyetli ve zaman alıcı bir süreçtir. Bu dezavantajlar göz önüne alındığında, kanser dışı endikasyonlar için onaylanmış ilaçların yeniden konumlandırılması stratejisi, birçok açıdan avantaj sağlamaktadır. Bu ilaçların güvenliği daha önce test edildiğinden, başarılı preklinik çalışmaların ardından faz 3 klinik çalışmalara daha hızlı ve daha düşük maliyetle geçiş sağlanabilmektedir. Bu durum, kanser tedavisinde ilaç yeniden konumlandırılmasını optimal bir alternatif haline getirmektedir (Preti & Wilson, 2011).

Bu yaklaşım çerçevesinde farklı ilaç sınıfları üzerinde yoğunlaşılmış, özellikle antipsikotik ilaçların antikanser potansiyelleri araştırmalarda ön plana çıkmıştır (Masuda ve ark., 2020; Vlachos ve ark., 2021). Şizofreni ve kanser arasındaki ilişkiler uzun yıllardır kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır (Preti & Wilson, 2011). İsrail ve Amerika

popülasyonunda yapılan çalışmada şizofreni hastalarında şizofreni olmayanlara göre daha düşük kanser riski olduğu görülmüştür (Barak ve ark., 2005; Cohen ve ark., 2002). Chou ve arkadaşlarının (2011) dokuz yıllık takip sonunda buldukları sonuçlarda da şizofreni hastalarının kansere yakalanma riskinin (%1,93) şizofreni olmayan hastalara (%2,97) göre daha düşük olduğu sonucunu bulmuşlardır (Chou ve ark., 2011). Bununla birlikte, Wootten ve arkadaşlarının (2022) gerçekleştirdiği sistematik derleme ve meta-analiz çalışmasında, psikotik bozukluğu olan bireylerde meme, yemek borusu, kolorektal, testis, rahim ve serviks kanseri insidansının daha yüksek; cilt, prostat ve tiroid kanseri insidansının ise daha düşük olduğu belirlenmiştir (Wootten ve ark., 2022).

Tiyoridazin hidroklorür (THC), fenotiyazin türevi klasik bir antipsikotik olup, şizofreni ve psikoz tedavisinde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, THC'nin çeşitli kanser hücre hatları üzerinde antiproliferatif etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu etkilerin, birden fazla moleküler mekanizma aracılığıyla gerçekleştiği bildirilmektedir:

1. Hücre döngüsü arresti: THC, özellikle G1 fazında hücre döngüsünü durdurarak hücre proliferasyonunu baskılayabilmektedir. Bu etki, Akt/CDK2 ya da PI3K/Akt/mTOR/p70S6K gibi sinyal yollarının aşağı regülasyonu ile ilişkilidir.

2. Apoptoz indüksiyonu: THC'nin kaspaz aktivasyonu veya mitokondri aracılı yollar üzerinden apoptozu tetiklediği gösterilmiştir. Bu süreç, Wnt/β-katenin, PI3K/Akt ve NF-κB sinyal yollarının inhibisyonu ile ilişkilendirilmiş; bazı çalışmalarda ise apoptozun reaktif oksijen türleri (ROS) aracılığıyla başlatıldığı öne sürülmüştür. Öte yandan bazı veriler, THC'nin apoptozdan bağımsız mekanizmalarla da antiproliferatif etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

3. Otofaji aktivasyonu: THC'nin, PI3K/Akt/p70S6K yolunu modüle ederek otofajiyi teşvik edebildiği bildirilmiştir.

4. Kök hücre farklılaşması: Kanser kök hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda, THC'nin sağlıklı kök hücreleri korurken kanser kök hücrelerinin seçici farklılaşmasını indükleyebileceği gösterilmiştir (Vlachos ve ark., 2021).

Bu tez çalışmasında, papiller tiroid kanseri hücre soyu (TPC-1) üzerinde THC'nin potansiyel antikanser etkileri kapsamlı olarak değerlendirilmiştir. Çalışmanın amacı, THC'nin hücre canlılığı, apoptoz, koloni oluşturma ve hücre göçü üzerindeki etkilerini hem fonksiyonel hem de moleküler düzeyde inceleyerek, bu ilacın tiroid kanseri tedavisinde yeniden konumlandırılabilmesine yönelik bilimsel bir temel oluşturmaktır.

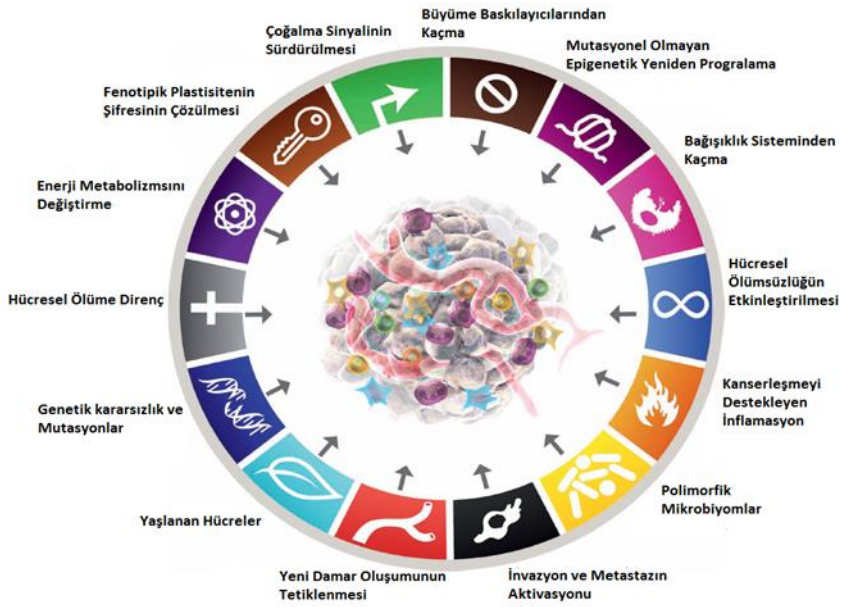
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser

Kanser, dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu olup Amerika'da ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır (Siegel ve ark., 2023). Hücrelerde meydana gelen mutasyonlar, genomik kararsızlıklar ve epigenetik mekanizmalar gibi çok çeşitli etmenlerle gelişen kanser, multifaktöriyel etiyolojiye sahip, karmaşık ve ölümcül bir hastalıktır. Hanahan ve Weinberg tarafından tanımlanan kanserin 14 ayırt edici özelliği, hastalığın tanı, tedavi ve prognozu açısından kapsamlı bir çerçeve sunmaktadır (Şekil 2.1) (Fouad & Aanei, 2017; Hanahan, 2022).

Kanserin ayırt edici özellikleri, hastalığın karmaşık biyolojisini anlamak için kritik bir temel oluşturmaktadır. Bu özelliklerin başında, kanser hücrelerinin sürekli olarak çoğalma sinyallerini sürdürmesi gelmektedir. Bu süreç, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesine ve çoğalmasına yol açarak tümör oluşumunu tetikler. Bunun yanı sıra kanser hücreleri, proliferatif sinyallerin sürekliliğini sağlama, büyümeyi baskılayıcı sinyallere karşı duyarsızlık geliştirme ve mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama gibi mekanizmalar aracılığıyla normal hücre döngüsü regülasyonunu bozarak kontrolsüz çoğalmayı sürdürür. Kanser hücreleri ayrıca, bağışıklık sisteminden kaçış mekanizmaları geliştirerek vücudun savunma sistemlerini atlatır. Bu durum, tümörlerin bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını ve yok edilmesini engeller. İnvazyon (malign hücrelerin çevre dokulara yayılması) ve metastaz (uzak dokulara yayılım) gibi süreçler, kanserin lokal bir hastalık olmaktan çıkıp sistemik bir hastalığa dönüşmesine neden olur. Bu süreçler, kanser hücrelerinin çevre dokulara infiltrasyonu ve uzak organlara yayılımı ile karakterizedir. Kanserleşmeyi destekleyen inflamatuar süreçler, tümör mikroçevresinde önemli bir rol oynar. Kronik inflamasyon, tümör büyümesini destekleyen bir ortam oluştururken, polimorfik mikrobiyomların varlığı da kanser gelişimine katkıda bulunabilir. Enerji metabolizmasında meydana gelen değişiklikler, kanser hücrelerinin hızlı büyüme ve çoğalma ihtiyaçlarını karşılamak için metabolik yollarını yeniden programlamasına neden olur. Bu durum, özellikle glikoliz ve diğer metabolik süreçlerdeki artışla kendini gösterir. Fenotipik plastisitenin düzenlenmesi, kanser hücrelerinin farklı çevresel koşullara uyum sağlama yeteneğini ifade eder. Bu özellik,

tümör hücrelerinin tedavilere karşı direnç geliştirmesine ve hastalığın ilerlemesine katkıda bulunur. Anjiyogenez yoluyla düzensiz yapıda yeni kan damarları oluşturma, tümörlerin beslenmesini ve büyümesini sağlar. Bu süreç, tümör mikroçevresinde yeni damar oluşumunu tetikleyerek kanser hücrelerinin hayatta kalmasını kolaylaştırır. Kanser hücreleri, hücre ölümüne karşı direnç geliştirerek apoptoz gibi programlanmış hücre ölümü mekanizmalarından kaçınır. Bu durum, hücresel ölümsüzlüğün sağlanmasına ve tümörlerin sürekli büyümesine yol açar. Son olarak, kanser hücreleri, mutasyon geliştirme yeteneği sayesinde genetik ve epigenetik düzeyde değişikliklere uğrayarak tedavilere karşı direnç kazanır. Bu mekanizmalar, kanser hücrelerinin biyolojik olarak son derece karmaşık ve dirençli yapılar olduğunu ortaya koymaktadır. Kanserin bu çok yönlü özellikleri, hastalığın tanı ve tedavisinde multidisipliner bir yaklaşımın gerekliliğini vurgulamaktadır (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011; Hanahan & Weinberg, 2000).



Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin ayırt edici özellikleri (Hanahan, 2022)

2.2. Tiroid Kanseri

Tiroid kanseri, foliküler epitel hücrelerinden veya parafoliküler C hücrelerinden kaynaklanan bir malignitedir. Foliküler epitel hücrelerinden köken alan tiroid kanserleri histolojik olarak dört ana gruba ayrılmaktadır: papiller (%80-85), foliküler (%10-15),

kötü diferansiye (<%2) ve anaplastik (<%2) tiroid kanserleri. Papiller ve foliküler tiroid kanserleri, iyi diferansiye tiroid kanserleri olarak sınıflandırılır ve vakaların büyük çoğunluğunu oluşturur. Özellikle papiller tiroid kanseri, tiroid malignitelerinin %80'inden fazlasını temsil etmekte olup, genellikle uzun süreli sağkalım oranlarıyla (> %90) iyi bir prognoza sahiptir. Ancak, hastaların %25-35'inde hastalık tekrarlayabilmektedir (Prete ve ark., 2020; Laha ve ark., 2020).

Papiller tiroid kanseri, yavaş büyüyen bir tümör olup çoğunlukla tiroid beziyle sınırlı kalmasına rağmen, lenfatik damarlar aracılığıyla servikal lenf düğümlerine metastaz yapabilmektedir. Bu durum, hastalığın seyri ve prognozunu olumsuz etkileyebilmektedir (Shi ve ark., 2019). Medyan takip süresi 27 yıl olan bir çalışmada, hastaların %28'inde nüks tespit edilirken, %9'unun papiller tiroid kanserine bağlı olarak hayatını kaybettiği bildirilmiştir (Xie ve ark., 2020).

Çoğu hasta için prognoz olumlu olmakla birlikte, hastalığın tekrarladığı vakalarda mortalite riski devam etmektedir. Bu nedenle, papiller tiroid kanserinin karsinogenezi ve tedavisine yönelik araştırmalar önemini korumakta, hedefe yönelik tedaviler ve yenilikçi yaklaşımlar üzerinde çalışmalar sürmektedir (Prescott & Zeiger, 2015).

2.2.1. Tiroid kanseri etiyolojisi

Tiroid karsinogenezinde çeşitli çevresel ve genetik risk faktörleri rol oynamaktadır. Yaş, cinsiyet, aile öyküsü, iyonize radyasyona maruziyet, obezite, hormonal değişiklikler, sigara ve alkol tüketimi gibi faktörler hastalığın gelişiminde etkili olabilmektedir (Rebaï ve ark., 2016).

Radyasyon maruziyeti, tiroid kanseri için en iyi bilinen risk faktörlerinden biridir. Bu riskin artmasında iki temel etken öne çıkmaktadır: radyasyon dozu ve maruziyet yaşı. Özellikle bebeklik ve çocukluk döneminde iyonize radyasyona maruz kalmak, hastalık gelişimi açısından yüksek risk taşımaktadır (Lubin ve ark., 2017). İyonize radyasyon, biyolojik sistemler üzerinde doğrudan DNA hasarına neden olabileceği gibi, dolaylı olarak oksidatif stres mekanizmalarını tetikleyerek lokal ve sistemik etkiler oluşturabilmektedir (Islam, 2017).

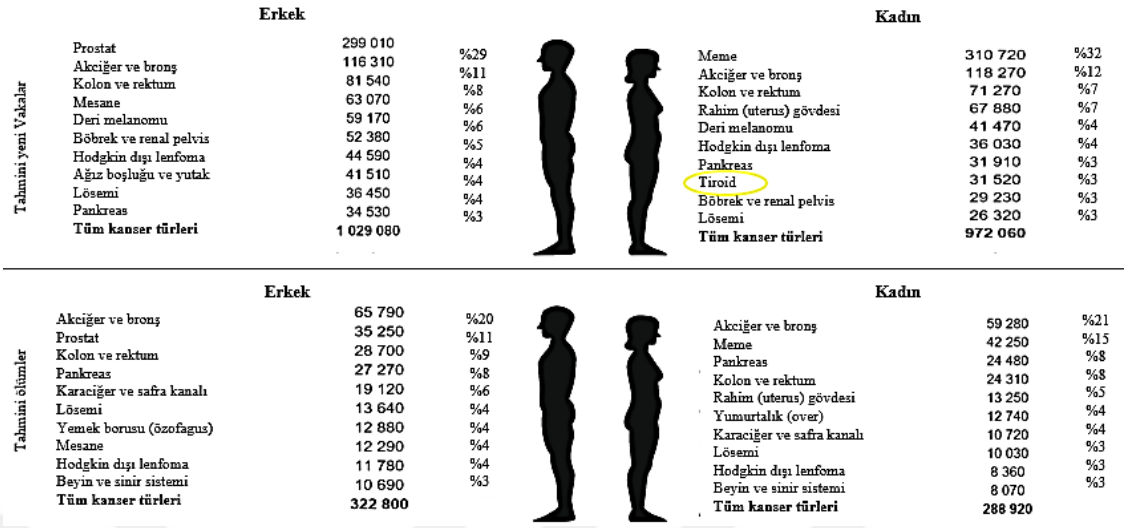
İyot, tiroid hormonlarının biyosentezi için gerekli olan temel bir eser elementtir. Yetersiz iyot alımı, hipotiroidizm ve guatr gibi benign tiroid hastalıklarının gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Diğer yandan, aşırı iyot alımı da özellikle yenidoğanlar ve yaşlılar gibi duyarlı gruplarda tiroid fonksiyon bozukluklarına yol açabilmektedir (Nikiforov, 2010).

Tiroid kanseri gelişiminde etkili olabilecek bir diğer önemli faktör ise obezitedir. Son yıllarda dünya genelinde obezite ve morbid obezite sıklığında belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Artan vücut yağ oranı; insülin direnci, hormonal dengesizlikler ve kronik inflamasyon gibi metabolik bozukluklara yol açarak diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve bazı kanser türleri için predispozisyon oluşturmaktadır (Franchini ve ark., 2022). Prospektif çalışmalarda, yüksek vücut kitle indeksinin cinsiyetten bağımsız olarak diferansiye tiroid kanseri riskini artırdığı gösterilmiştir (Meinhold ve ark., 2010). Obez bireylerin, normal kilolu bireylere göre yaklaşık %53 daha yüksek tiroid kanseri riski taşıdığı bildirilmiştir (Kitahara & Schneider, 2022). Obezite ve tiroid kanseri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, inflamasyon, sinyal yolaklarındaki düzensizlikler, immün sistem yanıtı ve oksidatif stres kaynaklı DNA hasarının, tiroid kanseri gelişiminde potansiyel etiyolojik faktörler olduğu öne sürülmektedir (Zhao ve ark., 2020; Pappa & Alevizaki, 2014).

2.2.2. Tiroid kanseri epidemiyolojisi

1990'ların başlarından itibaren Amerika'da nadir görülen tiroid kanseri, ölüm oranlarında belirgin bir değişiklik olmamasına rağmen insidansını üç katından fazla artırmıştır. Benzer eğilimler dünya genelindeki birçok ülkede de gözlemlenmiştir (Leclair ve ark., 2021). Günümüzde en sık rastlanan endokrin malignite olan tiroid kanseri, genel popülasyonun yaklaşık %2'sinde görülmektedir (Prete ve ark., 2020). Teşhis edilen hastaların medyan yaşı erken 50'li yaşlar olarak bildirilmektedir. Bununla birlikte, 16–33 yaş arasındaki ergenler ve genç yetişkinler arasında en sık görülen malignite olarak öne çıkmaktadır (Araque ve ark., 2017). ABD'de 2024 yılında kadınlar arasında en sık görülen sekizinci kanser türü olarak bildirilmektedir (Siegel ve ark., 2024) (Şekil 2.2).

Tiroid kanserinin alt tipleri ülkeler arasında değişiklik gösterebilse de papiller tiroid kanseri vakaların yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır (Chen ve ark., 2023).



Şekil 2.2. Amerika'da cinsiyete göre tahmini kanser vakaları ve ölümleri için önde gelen on kanser türü (Siegel ve ark., 2024)

2.2.3. Tiroid kanseri moleküler biyolojisi

Genom dizilimi teknolojisinde kaydedilen ilerlemeler, tiroid kanserinin moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Tiroid kanseri, genetik açıdan nispeten basit bir hastalık olarak kabul edilmekte olup, düşük somatik mutasyon yükü ile karakterizedir. Vakaların %90'ından fazlasında sürücü mutasyonlar tespit edilmiş olup, bu mutasyonlar tümör hücrelerine seçici büyüme avantajı sağlayarak kanser gelişimini tetiklemektedir (Mazzaferri, 1999).

Tiroid tümörlerinin oluşumunda onkogen aktivasyonu, füzyon gen oluşumları, tümör baskılayıcı genlerin işlev kaybı, epigenetik modifikasyonlar ve mitokondriyal DNA mutasyonları gibi çeşitli moleküler mekanizmalar rol oynamaktadır (Xing, 2013).

Tiroid kanserinin gelişimi, invazyonu ve metastazı, çok sayıda hücresel sinyal yolakları ile ilişkilidir. Bu yolaklar, hücresel süreçlerin düzenlenmesini sağlayan karmaşık bir yapı sergilemektedir (Zaballos & Santisteban, 2017).

Papiller tiroid kanserinin moleküler alt yapısında, Transfeksiyon Sırasında Yeniden Düzenlenen (RET) proto-onkogen ile Sıçan Sarkomu Viral Onkogen Homoloğu (RAS) ve V-Raf Murin Sarkom Viral Onkogen Homolog B (BRAF) proto-onkogenlerindeki

nokta mutasyonlarının önemli olduğu belirlenmiştir. Bu genetik değişiklikler, Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinazlar (MAPK) ve Fosfatidil İnositol 3-Kinaz (PI3K) sinyal yolaklarının sürekli aktivasyonuna yol açarak tümör gelişimine katkı sağlamaktadır (Zou ve ark., 2014). Papiller tiroid karsinomlarında özellikle MAPK yolağındaki genetik değişiklikler dikkat çekmektedir. Bu yolakta yer alan RET, Nörotrofik Reseptör Tirozin Kinaz 1 (NTRK1), RAS ve BRAF genlerindeki mutasyonlar, tiroid kanseri gelişiminde belirleyici unsurlar arasında yer almaktadır (Rebaï ve ark., 2016).

Bu mekanizmaların anlaşılması hem tümör etiyolojisinin aydınlatılmasına hem de hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesine önemli katkılar sunmaktadır (Xing, 2013).

2.3 Apoptozis

Kanser araştırmalarında ilaç tedavilerinin temel hedeflerinden biri, kanser hücrelerinde apoptozu düzenleyerek tümör büyümesini kontrol altına almaktadır Apoptozisi indükleyen terapiler, insan tiroid kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünün önlenmesi ve tedavisinde giderek daha kritik bir rol oynamaktadır. Günümüzde, antikanser ilaçların çoğunun hücresel hedefler üzerinde etki ederek apoptozisi tetiklediği ve bu yolla tümör hücrelerinin eliminasyonuna katkı sağladığı gösterilmiştir. Hücre ölümü mekanizmaları, radyoterapi ve kemoterapi gibi geleneksel tedavi yaklaşımlarıyla uzun süredir ilişkilendirilmiş olup, bu stratejiler malign hücrelerin ölümünü tetiklemeyi amaçlar. Dolayısıyla, apoptozisin hedeflenmesi, kanser tedavisinde klasik ve yeni nesil yaklaşımlar açısından temel bir strateji olarak kabul edilmektedir. (Yang ve ark., 2013; Lazebnik, 2010; O'Connor, 2015).

Apoptoz, ilk olarak 1972'de, embriyogenez sırasında ölen hücrelerde fizyolojik ya da patolojik uyarıcılara yanıt olarak gözlemlenen morfolojik özelliklere dayanarak tanımlanmıştır. Bu süreç, birçok sağlıklı yetişkin dokusunda hücre döngüsünün önemli bir parçası olup, aynı zamanda malign tümörlerde de önemli bir rol oynamaktadır. Bu süreç dokuların homeostazını sürdürmede kritik bir rol oynamakla kalmaz, aynı zamanda tümör büyümesini ve tedaviyle indüklenen tümör regresyonunu da etkiler (Kerr ve ark., 1972; Moyer ve ark., 2025).

Apoptozis, kaspazların proteolitik aktivasyonu ile düzenlenen programlı ve enerji gerektiren bir hücre ölümü mekanizmasıdır. Bu süreç, hücrede bir dizi morfolojik ve biyokimyasal değişikliği beraberinde getirir. Apoptotik hücrelerde sırasıyla hücrenin yuvarlaklaşması, psödopodların geri çekilmesi, hücresel hacmin azalması (piknoz), kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanma (karyoreksis) ve plazma membranında tomurcuklanma gibi yapısal dönüşümler meydana gelir. Sitoplazmik organellerde yalnızca sınırlı düzeyde ultrastrüktürel değişiklik gözlenirken, hücre yapısı genellikle bozulmadan, membranla çevrili veziküller olan apoptotik cisimciklere ayrılır. Bu cisimcikler *in vivo* ortamda rezidan fagositler tarafından hızla fagosite edilerek ortadan kaldırılır ve böylece hücre içi içeriklerin bağışıklık sistemi ile temas etmesi engellenir. Ancak bu fagositik temizleme süreci geciktiğinde, apoptotik cisimcikler sekonder nekroza uğrayarak membran bütünlüklerini kaybedebilir ve çevrede inflamatuar yanıta neden olabilecek içeriklerini salabilir (Van Loo ve ark., 2002).

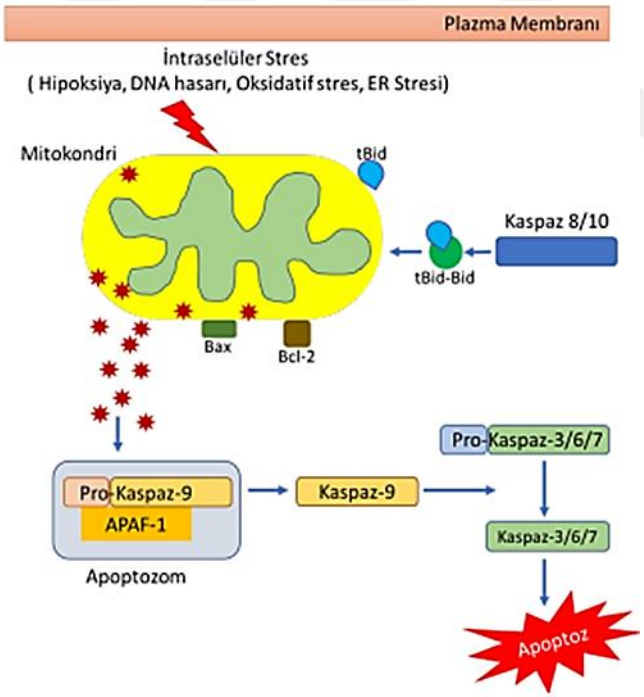
Apoptozun en ayırt edici moleküler özelliklerinden biri DNA'nın kontrollü bir şekilde parçalanmasıdır. Bu süreçte DNA, internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180–200 baz çifti uzunluğunda veya katları şeklinde kesilerek, agaroz jel elektroforezinde karakteristik bir merdiven deseni oluşturur (Ulukaya, 2003).

Apoptotik hücrelerde gözlenen önemli biyokimyasal değişimlerden bir diğeri, fosfatidilserin (PS) translokasyonudur. Normal koşullarda plazma membranının iç yüzeyinde bulunan PS, apoptotik sürecin erken evrelerinde dış yüzeye taşınarak apoptotik hücrelerin fagositik hücreler tarafından tanınmasını sağlar. Bu sayede, apoptotik hücreler hızlı ve etkin bir şekilde temizlenir, çevre dokularda inflamatuar yanıt oluşması önlenmiş olur (Ulukaya, 2003).

Apoptoz mekanizması son derece karmaşık bir süreç olup, çeşitli sinyal yollarını içermektedir. Bu süreç, hücre içinde kaspazlar aracılığıyla düzenlenen intrinsik (içsel) ve ekstrinsik (dışsal) apoptotik yollar olmak üzere iki ana yoldan ilerler. Her iki yolak da efektör kaspazların aktivasyonunda birleşerek hücresel düzeyde morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin başlamasına neden olur ve sonuç olarak programlı hücre ölümünü tetikler (Babacan, 2023). Ayrıca, bu iki temel apoptotik yolak arasında,

birbirlerine kontrollü sinyal iletim mekanizmaları aracılığıyla bağlanabildikleri gösterilmiştir (Igney & Krammer, 2002).

Apoptoz DNA hasarı ve oksidatif stres gibi içsel uyarıcılar tarafından da düzenlenebilir veya aktive edilebilir (Fulda ve ark., 2010). Bu apoptoz yolu, intrinsik/mitokondriyal yol olarak adlandırılmaktadır. Bcl protein ailesinin üyeleri olan Bax ve Bcl-2, sırasıyla proapoptotik ve antiapoptotik proteinler olarak bilinir ve mitokondriyal membranda bulunarak intrinsik apoptotik yolun temel düzenleyicileri olarak görev yaparlar (Kashyap ve ark.,2018). Bu proteinlerin aktivitesi, mitokondriyal membranın bozulmasına neden olarak sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasını sağlar. Sitoplazmaya salınan sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (APAF1) ve prokaspaz-9 ile birleşerek apoptozom adı verilen bir kompleks oluşturur. Bu kompleks, prokaspaz-9'u aktif kaspaz-9'a çevirir. Aktif kaspaz-9 ise kaspaz-3, -6 ve -7 gibi efektör kaspazları parçalayarak aktive eder ve sonuç olarak hücre apoptozunu indükler (Wang & Youle, 2009) (Şekil 2.3).

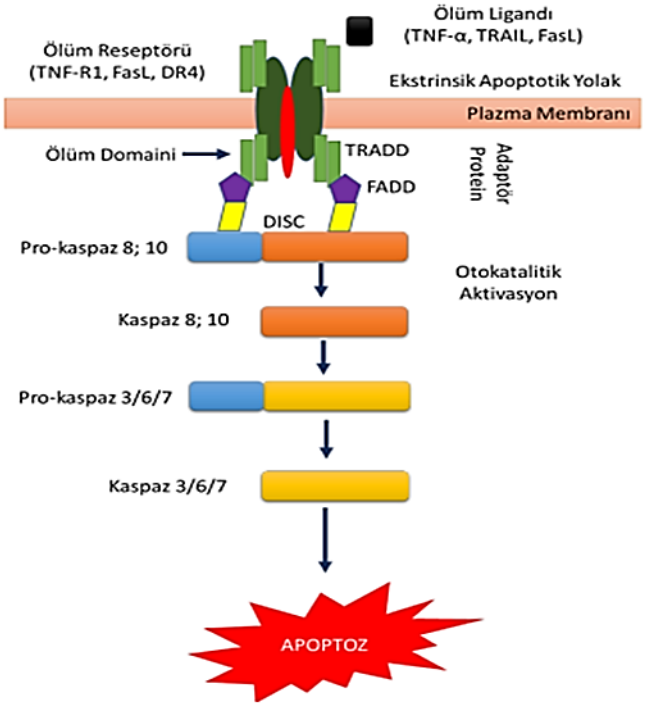


Şekil 2.3. Apoptozis mekanizmasının intrinsik yolağı (Babacan, 2023)

Apoptozda ekstrinsik yolak, hücre dışı sinyallerin ölüm reseptörlerine bağlanan ligandlar aracılığıyla tetiklenmesiyle başlar. Ekstrinsik apoptoz yolu, Fas reseptörü (FasR), DR4/DR5, tümör nekroz faktörü reseptörleri (TNF-R) ve TNF-ilişkili apoptoz

indükleyici ligand reseptörleri (TRAIL-R) gibi hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörleri aracılığıyla dışsal uyarıcılar tarafından yönlendirilir (Zhou ve ark., 2017).

Hücre yüzeyinde, ölüm reseptörleri spesifik ligandlarıyla etkileşime girerek Fas ile ilişkili ölüm alanı proteini (FADD) ve tümör nekroz faktörü reseptör tip 1 ile ilişkili ölüm alanı proteini (TRADD) gibi adaptör proteinleri ve ardından kaspaz-8'i hücresel sinyal iletim yoluna dahil eder (Guicciardi & Gores, 2009). Son aşamada, aktif kaspaz-8 ve kaspaz-10, efektör kaspazlar olan kaspaz-3, -6 ve -7'yi keserek aktive eder ve böylece apoptoz sürecini başlatır (Brentnall ve ark., 2013) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Apoptozis mekanizmasının ekstrinsik yolağı (Babacan, 2023)

Önümüzdeki yıllarda, apoptozu tetikleyen çeşitli ajanların, özellikle doğrudan bu süreci hedef alan tedavilerin, ek klinik onaylar alması beklenmektedir. Tedavi seçeneklerinin giderek genişleyen yelpazesiyle birlikte, biyobelirteç tanımlama ve kişiselleştirilmiş tıp teknolojilerindeki eş zamanlı ilerlemeler, her hasta için optimum tedavi rejiminin belirlenmesinde kritik bir rol oynayacaktır. Bu alanlardaki araştırmalar ve klinik çalışmalar ilerledikçe, yalnızca apoptozun kanser patogenezindeki rolüne dair bilimsel

anlayış derinleşmekle kalmayacak, aynı zamanda kanser tedavilerinin etkinliği artırılarak hasta sonuçlarının iyileştirilmesi sağlanacaktır (Moyer ve ark., 2025).

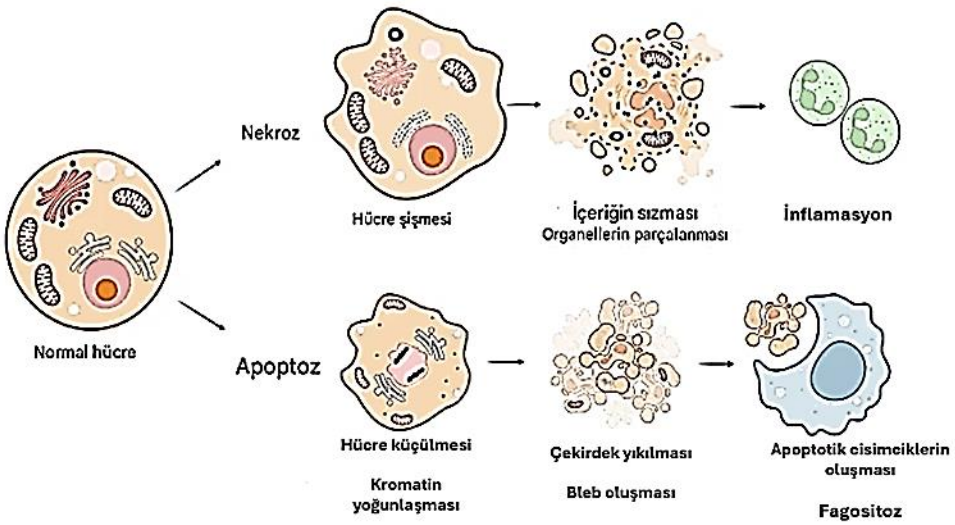
2.4. Nekroz

Kanser hücreleri, çevresel koşulları değiştirerek büyümelerini destekleyen mekanizmalar geliştirme yetisine sahiptir. Tümör dokusunun genişlemesiyle birlikte artan besin ve oksijen ihtiyacının karşılanamaması, hipoksi ve metabolik stres gibi durumları beraberinde getirir. Özellikle tümörün merkezine kan damarlarının ulaşamaması, hücre ölümünü tetikleyen başlıca faktörlerden biri olarak tanımlanmaktadır (Cho & Park, 2014). Pek çok tümörde, özellikle p53 mutasyonları gibi genetik değişikliklerin varlığı apoptoz direncine yol açarken, hücre ölümünde nekrozun baskın mekanizma olarak ortaya çıktığı bildirilmektedir (Ozaki & Nakagawara, 2011). Bu çerçevede, sitotoksik tedavilerin tümör hücrelerinde nekrozu artırarak hücre ölümünü indüklemede etkili olduğu gösterilmiştir (Karsch-Bluman & Benny, 2020).

Klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan anti-anjiojenik ve sitotoksik tedavi ajanlarının büyük bir bölümü, nekrozun indüksiyonu yoluyla tümör hacminde küçülme sağlamaktadır (Facciabene ve ark., 2011). Ancak, uzun süreli anti-kanser tedavilerin ardından elde edilen bulgular, nekrozun yalnızca tümör eliminasyonuna katkı sağlamakla kalmayıp aynı zamanda tümör progresyonu ve tedaviye direnç gibi olumsuz sonuçlara da yol açabileceğini göstermektedir (Hernandez ve ark., 2016; Karsch-Bluman & Benny, 2020).

Hücre ölüm mekanizmaları biyokimyasal ve morfolojik özellikler bakımından değerlendirildiğinde, apoptoz ve nekroz arasında belirgin farklılıklar olduğu görülmektedir. Nekrozda hücre içine aşırı sıvı girişi nedeniyle hücre şişmesi meydana gelirken, apoptozda hücre küçülmesi gözlemlenir. Apoptotik hücrelerde kromatin yoğunlaşması ve nükleer membran çevresinde agregasyon meydana gelirken, nekrotik hücrelerde kromatin yapısı büyük ölçüde korunur. Ayrıca, nekroz sürecinde plazma membranı bütünlüğünü kaybederek hücre içeriği dış ortama salınır ve bu durum inflamatuar yanıtı tetiklerken, apoptozda membran yapısı korunur ve membran yüzeyinde blebler oluşur. Nekrotik hücreler lizise uğrayarak çevre dokuda inflamatuar bir yanıtın

gelişmesine neden olurken, apoptozda hücre membranı ile çevrili apoptotik cisimcikler oluşur. Bu yapılar değişen miktarlarda nükleer materyal ve hücre içi bileşenler içerebilir ve genellikle komşu hücreler ya da makrofajlar tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılır. Bu nedenle apoptoz, inflamasyona yol açmayan hücre ölüm süreci olarak değerlendirilmektedir (Park ve ark., 2009; Ulukaya, 2003) (Şekil 2.5).



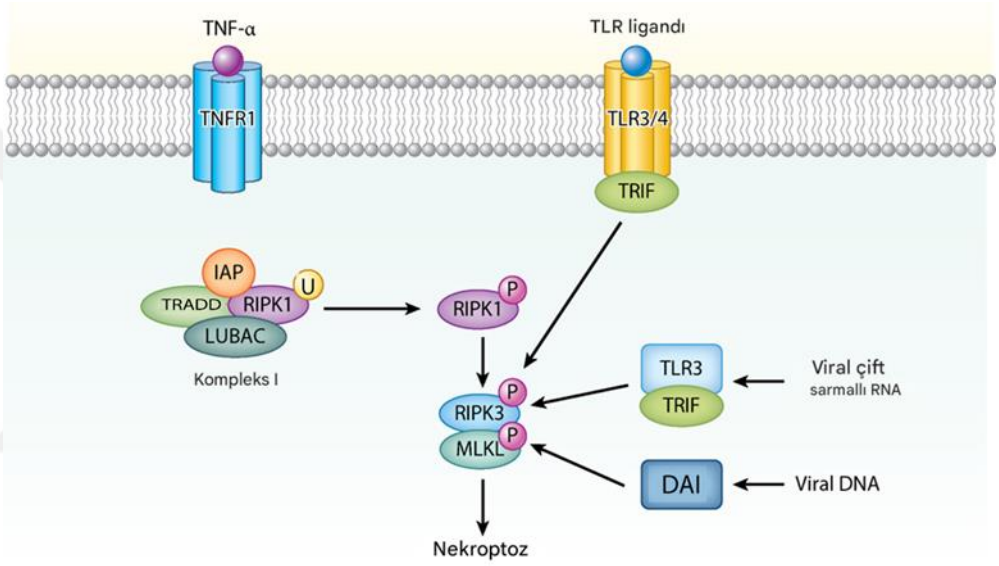
Şekil 2.5. Nekroz ve apoptozun farklılıkları (Park ve ark., 2023)

2.5. Nekroptozis

Nekroptozis, 2005 yılında keşfedilen ve tanımlanan programlanmış nekrotik hücre ölüm mekanizmasıdır (Degterev ve ark., 2005). Kaspazdan bağımsız olarak düzenlenen bu süreç, morfolojik ve mekanik açıdan hem apoptoz hem de nekroz ile benzerlikler taşımaktadır (Christofferson & Yuan, 2010). Nekroptozis, apoptozu düzenleyen moleküller tarafından kontrol edilmekle birlikte, nekrozom adı verilen kompleksin oluşumu ile aktive olur. Bu kompleksin temel bileşenleri reseptör etkileşen serin/treonin-protein kinaz 1 (RIPK1/RIP1) ve serin/treonin-protein kinaz 3 (RIPK3)'dir. RIPK3, psödokinaz karışık kökenli kinaz (MLKL) aktivasyonunu sağlayarak hücresel içeriklerin salınımına aracılık eder ve nekroptotik sürecin ilerlemesine neden olur (Pasparakis & Vandenabeele, 2015; Gong ve ark., 2019) (Şekil 2.6).

Ancak, nekroptozis faktörleri her kanser türünde aynı şekilde indüklenmemektedir. Bazı malignitelerde yüksek düzeyde ekspresyon göstererek tümör büyümesi ile pozitif bir

ilişki sergilediği bildirilmiştir. Örneğin, glioblastomda RIPK1 ekspresyonunun vakaların yaklaşık %30'unda artış gösterdiği ve kötü prognoza neden olduğu tespit edilmiştir (Park ve ark., 2009). Yapılan çalışmalar, nekroptozis ile ilişkili gen imzalarını belirleyerek bazı kanser türlerinde prognoz tahmini ve tedavi stratejileri geliştirilmesine yönelik veriler sunmaktadır. Pankreas adenokarsinomu için bu doğrultuda bir öngörü oluşturulmuş olup, prostat kanserinde nekroptozis ile ilişkili genlerin tümör bağışıklığında önemli bir rol oynadığı ve hastalık prognozunu tahmin etmek için kullanılabileceği belirlenmiştir (Wu ve ark., 2022; Li ve ark., 2022).



Şekil 2.6. Nekroptozis mekanizması **(**Sauler ve ark., 2019)

Hücrede apoptoz proteinlerinin hücresel inhibitör proteinleri kaybolduğunda ya da engellendiğinde, RIPK1 proteini ilk bağlı olduğu kompleksten ayrılır ve RIPK3 ile kaspaz-8 proteinleriyle birlikte ikinci bir kompleks (ripoptosom) oluşturur. Eğer kaspaz-8 aktifleşirse, bu durum hücrede apoptoz başlatır. Ancak kaspaz-8 yoksa ya da çalışmıyorsa, RIPK1 ve RIPK3 birlikte özel bir protein yapısı oluşturur ve RIPK3, MLKL'yi bu yapıya ekleyerek hücreyi nekroptoz ölüm yoluna yönlendirir (Speir ve ark., 2021; Grootjans ve ark., 2017). Bu bağlamda, papiller tiroid kanseri hastalarında nekroptozis ile ilişkili gen imzalarının analiz edilmesi, hastalık prognozunun tahmin edilmesi ve immünoterapi yanıtının değerlendirilmesi açısından önemli bir yaklaşım olarak önerilmektedir (Wang ve ark., 2022).

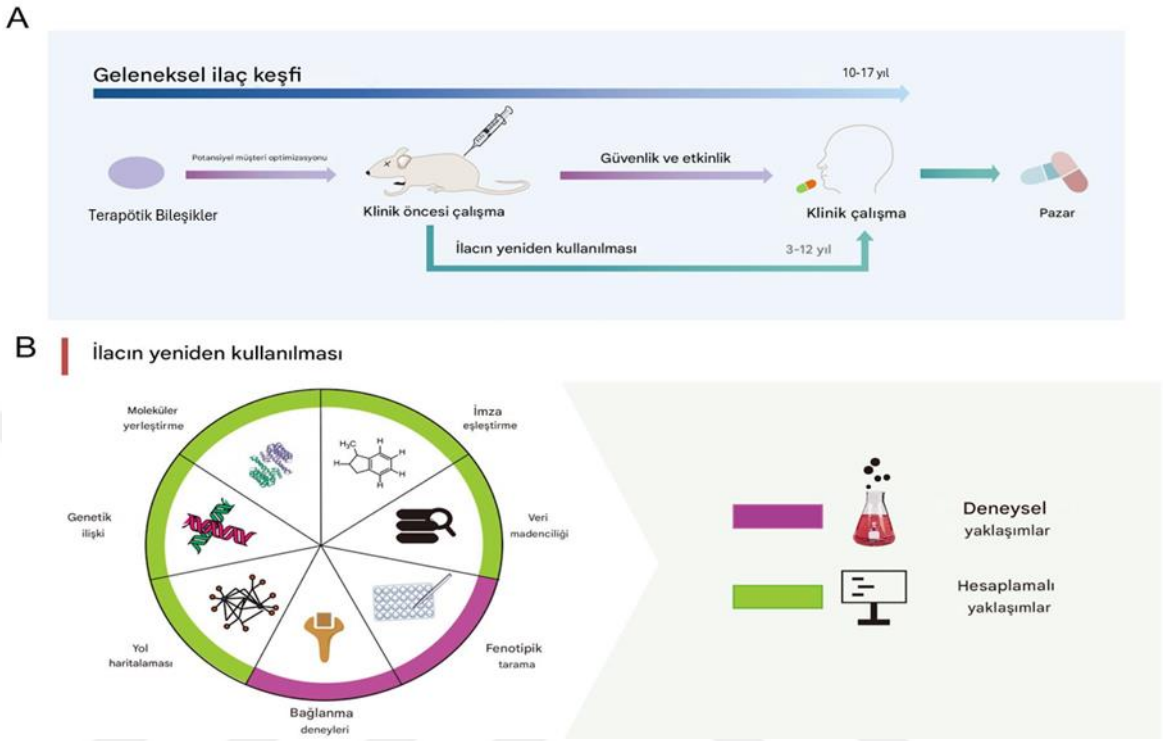
2.6. İlacın Yeniden Konumlandırılması

2040 yılında 29 milyondan fazla insanın çeşitli kanser türleri ile teşhis edileceği tahmin edilmektedir. Cerrahi, radyoterapi ve immünoterapi gibi yöntemlerde önemli ilerlemeler kaydedilmiş olsa da ilaç tedavisi kanser yönetiminde temel bir bileşen olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, ilaç tedavisinin etkinliği sıklıkla ilaç direnci ve yan etkilerle sınırlanmaktadır. Bu durum, yeni ilaç geliştirme süreçlerinin maliyet ve zaman açısından zorluklarını artırmakta, alternatif yaklaşımlara olan ilgiyi yükseltmektedir. Son yıllarda dikkat çeken yaklaşımlardan biri, mevcut klinik onaylı ilaçların yeni kullanım alanlarının keşfini içeren ilaç yeniden konumlandırma yöntemidir. Bu yaklaşım, ilaçların güvenlik profillerinin daha önce belirlenmiş olması nedeniyle preklinik aşamalardan klinik çalışmalara daha hızlı ve düşük maliyetle geçilmesini sağlamaktadır (Xia ve ark., 2024; Rodrigues ve ark., 2022; Preti & Wilson, 2011) (Şekil 2.7 A).

Biyoinformatik ve bilgisayar teknolojileri gibi yeni teknolojilerin gelişimi ilaç yeniden kullanım araştırmalarında süreci büyük ölçüde iyileştirmiştir (Corsello ve ark., 2017). Tipik olarak, kanser genom veritabanı ve diğer biyomedikal veritabanları kullanılarak hastalığın gen ekspresyon profili belirlenir. Daha sonra, PubChem, PharmGKB ve DrugBank gibi çeşitli ilaç veritabanlarından Connectivity Map ligatogramı kullanılarak aday bileşikler hesaplanır. Aday ilaçların moleküler mekanizmasını değerlendirmek amacıyla yol analizi ve moleküller arası etkileşim modellemesi yöntemleri uygulanabilir. Ayrıca, bu bileşiklerin yeni hastalıklara karşı etkisini doğrulamak için *in vitro* ve *in vivo* deneyler gerçekleştirilir. Bu süreçlerin tamamlanmasının ardından, ilaçların insan vücudundaki farmasötik etkilerini belirlemek amacıyla klinik denemelere geçilir (Issa ve ark., 2021).

Günümüzde ilaç yeniden kullanım yaklaşımları hesaplamalı ve deneysel olmak üzere iki ana kategoriye ayrılmaktadır. Bu iki yaklaşım genellikle araştırmaların verimliliğini artırmak amacıyla birlikte kullanılmaktadır. İmza eşleme, moleküller arası etkileşim modellemesi, genetik ilişki analizi, yol haritalama ve veri madenciliği gibi hesaplamalı yaklaşımlar, eski ilaçların yeni endikasyonlarını belirlemek için büyük veri analizlerini içermektedir. Bu analizler; gen ekspresyonu, kimyasal yapı, genotip ve proteomik veri

gibi çeşitli biyolojik bilgilerin sistematik olarak değerlendirilmesini kapsamaktadır (Fu ve ark., 2022) (Şekil 2.7. B).



Şekil 2.7. (A) Kanser tedavisi için geleneksel ilaç keşfi ve ilaç yeniden kullanımında tahmini süre ve ana adımlar. **(B)** İlaç yeniden kullanımına yönelik ana yaklaşımlar (Fu ve ark., 2022)

İlaç yeniden konumlandırma çalışmalarında incelenen ilaç gruplarından biri de antipsikotik ilaçlardır. Antipsikotikler, psikotik bozuklukların tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaç grubudur. Yapılan araştırmalarda, antipsikotik ilaçlarla tedavi edilen şizofreni hastalarının belirli kanser türlerine karşı daha düşük insidansa sahip olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle gastrointestinal ve beyin tümörlerinin daha düşük oranlarda görülmesi, bu ilaçların potansiyel antikanser etkisine işaret etmektedir (Lianos ve ark., 2022).

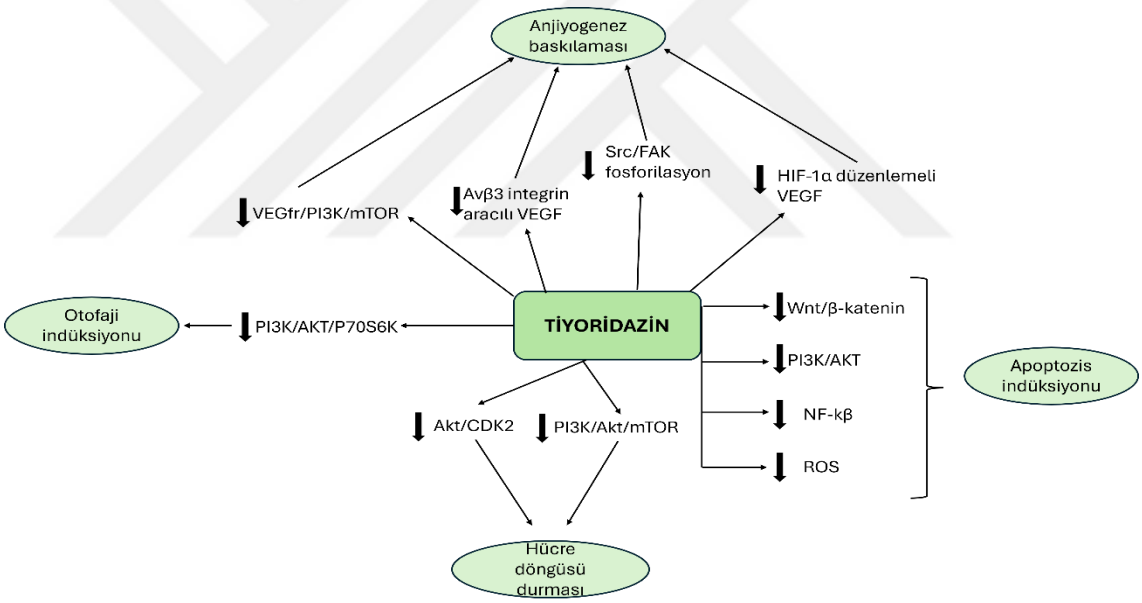
Chou ve arkadaşlarının dokuz yıllık takip çalışmasında, şizofreni hastalarının kansere yakalanma riskinin (%1,93), şizofreni olmayan hastalara (%2,97) kıyasla daha düşük olduğu bildirilmiştir (Chou ve ark., 2011). Bu bulgular, şizofreni hastalarının belirli kanser türlerine karşı korunmuş olabileceği hipotezini desteklemektedir. Muhtemel açıklamalardan biri, antipsikotik ilaçların antineoplastik özellikler sergileyerek kanser

gelişim riskini azaltabilmesidir. Araştırmalar, bu ilaçların histon deasetilasyon inhibisyonu, dopamin reseptör yolakları ve kolesterol homeostazının bozulması gibi mekanizmalar aracılığıyla kanser hücrelerini hedef aldığını göstermektedir (Huang ve ark., 2018). 2022 yılında araştırmacılar kanser insidansı ve tanı anındaki evreleri psikotik bozukluğu olanlarla olmayanlar arasında karşılaştırmak amacıyla sistematik bir derleme ve meta-analiz yapmışlardır. MEDLINE, EMBASE, PsycINFO ve CINAHL veri tabanlarını taramışlardır. Derlemede toplamda 40 makale incelenmiş ve bunların 31'i meta-analizlere dahil edilmiştir. Psikotik bozukluğu olan insanlarda meme, yemek borusu, kolorektal, testis, rahim ve serviks kanseri insidansının daha yüksek olduğu; cilt, prostat ve tiroid kanseri insidansının daha düşük olduğu bulunmuştur (Wootten ve ark., 2022).

2.7. Tiyoridazin

Birçok antipsikotik ilaç kanser için yeniden konumlandırılmaya dahil edilmektedir. Bu ilaç tiplerinden THC 1950'lerde geliştirilen, fenotiyazin sınıfına ait bir bileşiktir (Sarkar ve ark., 2008). Dopamin resptörü 2 (DRD2)'yi bloke ederek şizofreni ve yaygın anksiyete bozukluğunu tedavi etmek için kullanılmaktadır (Cheng ve ark., 2015). Başlangıçta psikotik hastalık tedavisinde kullanılmış olsa da şu an etki durumu genişletilmiştir. Çeşitli kanser türleri üzerindeki güçlü etkileri bildirilmiştir ve bunun üzerine çeşitli çalışmalar halen devam etmektedir (Shen ve ark., 2017) (Şekil 2.8). THC'nin koruyucu etki mekanizmaları net olmamakla birlikte, PI3K/Akt/mTOR/p70S6K sinyal yolunu hedefleyerek tümör büyüme aktivitesini etkili bir şekilde baskıladığı bildirilmiştir (Kang ve ark., 2012). Glioblastoma ve glioblastoma kök hücrelerinde THC tedavisi tümör büyümesini inhibe etmiştir, otofaji ve apoptozu da indüklemiştir (Cheng ve ark., 2015). THC kolorektal kanser kök hücrelerinde (HCT116) tümör çoğalmasını ve istilasını önemli ölçüde bastırmıştır. Bazı apoptoz genlerinin (Bax ve kaspaz-3) ekspresyonunu, tedaviden sonra yukarı regüle etmiş, anti-apoptoz geni Bcl-2'nin ekspresyonunu aşağı regüle ederek hücre apoptozunu indüklemiştir. Ayrıca, kolorektal kanser kök hücresinde mitokondriyal membran potansiyelini aşağı regüle etmiştir. Genel olarak, bu çalışma, THC'nin apoptozu indükleyerek HCT116 hücre soyundan türetilen kanser kök hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini ve bu sayede kolon kanserinin tedavisi için umut verici bir ajan olabileceğini ve ileriye dönük klinik çalışmalarda keşfedilmeye değer

olduğunu göstermiştir (Zhang ve ark., 2017). Üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde (MDA-MB-231 ve 4T1) *in vitro* ve *in vivo* yapılan antikanser çalışmalarında THC, proliferasyon ve tümör hücrelerinin göçünü inhibe etmiştir. PI3K/AKT sinyal yolağı, hem MDA-MB-231 hem de 4T1 hücrelerinde THC'nin hedefi olarak tanımlanmıştır. İleri analizler, hücre proliferasyonunun inhibisyonunun, CDK4/ siklin D1'in aşağı regülasyonunun eşlik ettiği mitokondri ile ilişkili apoptoz ve G0/G1 tutuklaması ile ilişkili olduğunu göstermiştir. *İn vivo* çalışmalarda ise THC'nin apoptozu indükleyerek ve hücre proliferasyonu inhibe ederek tümör büyümesini önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Bu ilaç sadece deri altı tümörlerin büyümesini değil, aynı zamanda akciğer metastazını da inhibe etmiştir (Song ve ark., 2020). Ayrıca akciğer kanseri hücrelerinde (A549) THC'nin tümör hücre büyümesini inhibe ettiği, koloni oluşturma yeteneğini belirgin şekilde azalttığı ve apoptozu indüklediği tespit edilmiştir (Shen ve ark., 2017).



Şekil 2.8. THC'nin anti-tümör etki mekanizmasının özeti (Vlachos ve ark., 2021)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal maddeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin listesi

Kimyasal maddeler	Menşe
Tiyoridazin Hidroklorür (THC)	Sigma/ABD
Fetal Bovine Serumu (FBS)	Gibco/ABD
Penisilin-Streptomisin	Gibco/ABD
Fosfat Tuz Tampon Çözeltisi (PBS)	Thermo Fisher Scientific/ABD
Tripsin-EDTA	Gibco/ABD
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640)	Gibco/ABD
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Gibco/ABD
Tripan mavisi	Gibco/ABD
DAPI	Thermo Fisher Scientific/ABD
Tris Bazı	Sigma/ABD
Dulbecco's Modified Eagle's Medium F-12 (DMEM/F-12)	Gibco/ABD
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific/ABD
Bovine Serum Albumin (BSA)	Cell Signalling/ABD
SDS	BioChemica/Almanya
Anneksin V	Fluos, Roche/ABD
Propidium İyodür	Cell Signalling/ABD
Sulforhodamine B (SRB)	Santa Cruz/ABD
Z-Vad-FMK, pan-kaspaz inhibitörü	Enzo/ABD
Esansiyel olmayan aminoasit	Gibco/ABD
Trikloroasetik Asit (TCA)	Isolab/Almanya
Asetik asit	Isolab/Almanya
Kristal Viyole	Hyclone/ABD
Nekrostatin-1	Enzo/ABD
Reducing Agent	Thermo Fisher Scientific/ABD
Sample Buffer	Thermo Fisher Scientific/ABD
RIPA Lizis tampon, Sodyum Ortovanadat, FenilMetilSülfonil Florür (PMSF), Proteaz İnhibitör	Santa Cruz/ABD
Nekrosülfonamid	RayBiotech/ABD
β-merkaptoetanol	Sigma/ABD

3.1.2. Sarf malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan sarf maddeler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemelerin listesi

Sarf Malzemeler	Menşe
25cm² ve 75cm²'lik flask	Thermo Fisher Scientific/ABD
6 ve 96 kuyulu plate	Thermo Fisher Scientific/ABD
5 ve 10 ml enjektör	Genject/Türkiye
15 ve 50 ml'lik steril santrifüj tüpleri	Thermo Fisher Scientific/ABD
10 ve 25 ml hacimli serolojik pipet	Thermo Fisher Scientific/ABD
10, 200 ve 1000 µl'lik pipet uçları	SSIBIO/ABD
2 ml'lik cam pastör pipetler	Isolab/Almanya
Kriyovial	Thermo Fisher Scientific/ABD
Thoma lamı	Hausser Scientific Horsham/UABD
iBlot™ Gel Transfer Stacks	Thermo Fisher Scientific/ABD
NuPAGE™ Novex™ 4-12% Bis-Tris Protein Jel	Thermo Fisher Scientific/ABD

3.1.3. Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan cihazların listesi

Cihazlar	**Menşe**
Class II Laminar Flow	Haier/Çin
CO_2 inkübatörü	Panasonic/ABD
Inverted mikroskop	Olympus CKX41/Japonya
Santrifüj	Rotina 35R/Almanya
Saf su cihazı	Direct-Q 3 UV, Merck/Almanya
Hassas terazi	SHIMADZU AUW220D/Japonya
Aspiratör	Rocker 300/Tayvan
Spektrofotometre (FLASHScan S12)	Analytik Jena/Almanya
RT-PCR sistemi (StepOne Plus)	Applied Biosystems/Singapur
Mikroplaka çalkalayıcı	Heidolph/Almanya
Buharlı sterilizatör (Otoklav)	Nüve OT4060/Türkiye
10µl, 100µl ve 1000µl'lik pipet seti	Axygen/ABD
Microspin, mini-santrifüf/vorteks	FV-2400, Biosan/Letonya
Otomatik Pipetör	Axygen/ABD

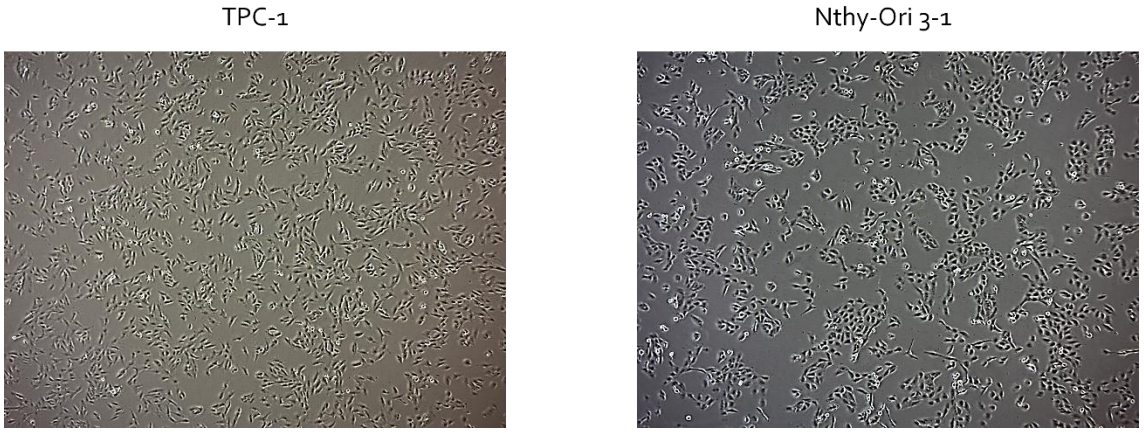
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan cihazların listesi (devam)

20-200µl Transferpipet	Axygen/ABD
Mini santrifüj	Scan Speed/ABD
Güç kaynağı 300 Plus 300V	Labnet/ABD
Manyetik mini-karıştırıcı	HI190M, Hanna Instruments/ABD
Eksi 4/20 Buzdolabı	Arçelik/Türkiye
Eksi 86 Buzdolabı	Haier/Çin
Evos M5000	Thermo Fisher Scientific/ABD
Kuru hava sterilizatörü	Elektro-mag M 420/Türkiye
Görüntüleme cihazı (Fusion FX-7)	Vilber Lourmat/Fransa
Western Blot Dikey Elektroforez Sistemi	Thermo Fisher Scientific/ABD
Iblot Transfer Cihazı	Thermo Fisher Scientific/ABD
Soğutmalı santrifüj NF 800R	Nüve/Türkiye
Ph metre	Hanna Edge/ABD
Nanodrop 2000 spektrofotometre	Thermo Fisher Scientific/ABD

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışmada kullanılan hücre soyları

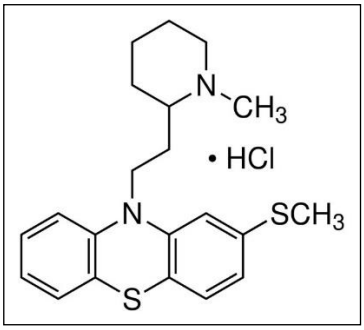
TPC-1 iyi diferansiye bir papiller tiroid karsinomu metastazından türetilmiş olup epitelyal morfolojiye sahiptir (Şekil 3.1). Bu hücre soyu, tiroid kanser biyolojisinin *in vitro* olarak modellenmesinde yaygın biçimde kullanılmaktadır (Ribeiro ve ark., 2008). Nthy-ori 3-1 hücre soyu, normal insan tiroid foliküler epitelinden türetilmiş olup aynı şekilde epitelyal morfoloji gösterir (Şekil 3.1). Bu hücre soyu, 35 yaşındaki sağlıklı bir kadın donörden izole edilen primer tiroid hücrelerinin SV40 büyük T antijen ile transformasyonu sonucu elde edilmiştir ve kontrol grubu olarak kullanılmaktadır (Zhao ve ark., 2020).



Şekil 3.1. Tez çalışmasında kullanılan hücre soylarının faz kontrast mikrokopi görüntüleri (10X büyütme)

3.2.2. Kullanılan ilacın hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan antipsikotik ilaç, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD) firmasına ait tiyoridazin (Thioridazine Hydrochloride, THC) bileşiğidir (Şekil 3.2). İlacın stok çözeltileri, distile su (dH2O) kullanılarak 50 mM derişimde hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler, -20°C'de saklanarak ışık ve sıcaklık gibi çevresel etmenlere karşı korunmuştur.



Şekil 3.2. Tez çalışmasında kullanılan antipsikotik tiyoridazin hidroklorür (THC) ilacının kimyasal yapısı (10-[2-(1-Metil-2-piperidil)etil]-2-(metiltiyo)-10H-fenotiyazin hidroklorür)

3.2.3 Kullanılan besiyerlerinin hazırlanması

TPC-1 hücre soyu, %1 penisilin streptomisin (Gibco), %0,25 esansiyel olmayan aminoasit (Gibco) ve %10 fetal sığır serum (FBS) (Gibco) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium F-12 (DMEM/F-12) (Gibco) besiyerinde kültüre edilmiştir. Sağlıklı

tiroid hücre soyu olan Nthy-ori 3-1 ise %1 penisilin streptomisin, %10 FBS içeren Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640) (Gibco) kullanılarak kültüre edilmiştir. Tüm hücre kültürleri, 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş inkübatör koşullarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.4 Hücre soylarının stoktan çıkarılması

TPC-1 tiroid kanseri hücre soyu ile sağlıklı tiroid hücresi Nthy-ori 3-1 hücre soyu, -80°C'de kriyovial tüpler içerisinde stoklanmış olarak muhafaza edilmiştir. Deneysel çalışmalarda proliferasyonlarının sağlanması amacıyla, hücreler sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözdürülmüştür. Çözülen hücre süspansiyonları uygun besiyeri içerisine alınarak 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında, tüpün üst kısmındaki süpernatan dikkatlice aspire edilerek atılmış, oluşan hücre peleti 1 mL taze besiyeri ile resüspanse edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonu, 5 mL taze besiyeri içeren 25 cm^2 yüzey alanına sahip kültür flasklarına aktarılmış ve 37 °C sıcaklıkta, %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş inkübatör ortamında inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.5 Hücre soylarının pasajlanması

TPC-1 ve Nthy-ori 3-1 hücreleri, kültür flaskının %80–90'ını kapladığında pasajlanmıştır. Önce besiyeri aspire edilerek hücreler 2 ml PBS ile yıkanmış, ardından 0,5 ml %0,05 Tripsin-EDTA eklenip 37°C'de 3–4 dakika inkübe edilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrılması mikroskopla kontrol edilmiştir. Ardından, iki katı kadar besiyeri eklenerek tripsin inaktive edilmiş ve süspansiyon 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra hücreler 1 ml besiyeri ile süspanse edilerek 9 ml taze besiyeri içeren 75 cm^2'lik flasklara alınmış ve inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemle birlikte hücreler istenilen sayıya gelene kadar hücrelerin proliferasyonu sağlanmıştır.

3.2.6. Hücre soyunun stoklanması

Flask yüzeyini kaplayan hücreler (TPC-1 ve Nthy-ori 3-1), %0,05 Tripsin-EDTA ile ayrıldıktan sonra 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant aspire edilerek pelet, %10 DMSO içeren dondurucu medium (5 ml DMSO + 10 ml FBS + 35 ml RPMI) ile süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonu kriyovial tüplere aktarılıp -80°C'de saklanmıştır.

3.2.7 Hemositometri ile hücrenin sayımı

Hücre sayımı, tripsinizasyon işleminden sonra elde edilen hücre süspansiyonunun %0,5 tripan mavisi ile 1:1 oranında karıştırılmasıyla gerçekleştirildi. Hazırlanan karışımdan 10 µl alınarak temizlenmiş thoma lamına koyuldu ve mikroskop altında beş farklı alanda hücre sayımı yapıldı. Canlı (membran bütünlüğünü korunduğu için parlak renkli) ve ölü (mavi renkli) hücreler ayırt edilerek toplam hücre sayısı sulandırma katsayısı dikkate alınarak 1 ml besiyeri içerisindeki hücre yoğunluğu hesaplandı.

3.2.8. Sulforhadamin B (SRB) metodu

SRB metodu, hücrelerdeki total protein miktarının ölçümüne dayanarak hücre canlılığını belirlemek için kullanılmaktadır. (Vichai & Kirtikara, 2006). Bu metot, Amerika'da bu alanda referans merkez olarak kabul edilen NCI (Ulusal Kanser Enstitüsü)'nın da çalıştığı bir yöntem olduğundan, ilaç kaynaklı sitotoksisite ve anti-kanser etkinin belirlenmesinde kullanılan temel bir analiz yöntemidir (Orellana & Kasinski, 2016). SRB, asidik koşullar altında membran bütünlüğü bozulmamış hücrenin yüzeyindeki bazik aminoasit gruplarına bağlanan ve bazik koşullar altında ayrışan iki sülfonil gruba sahip parlak-pembe bir aminoksanten boyadır ve spektrofotometre ile ölçüm sonucunda bağlanan boyanın miktarı, hücre yoğunluğunun kantitatif analizinin yapılmasına imkân sağlar (Kamiloglu ve ark., 2020).

Çalışmada, THC'nin farklı dozları TPC-1 (100-1,56 µM) ve Nthy-Ori 3-1 (15- 1,25 µM) hücre soylarına eş zamanlı olarak 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kuyu başına $5x10^3$ hücre olacak şekilde ekilerek 37°C'de, %5 CO_2'li ortamda kültüre edildi. Belirlenen tedavi sürelerinin sonunda hücre canlılığı SRB testiyle değerlendirildi. Tedavilerinin sonunda her bir kuyuya fiksasyon için 50 µl %10 (W/V) trikloroasetik asit (TCA) (Isolab) eklendi ve yaklaşık bir saat +4°C'de bekletildi. Fiksasyon sonunda kuyular distile su ile en az 5 kez yıkanarak pleyt kurumaya bırakıldı. Ardından %0,4 w/v SRB boyası (Santa Cruz) her bir kuyuya 50 µl olacak şekilde eklendi ve 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda fazla boyanın uzaklaştırılması amacıyla %1 asetik asit (Isolab) ile kuyular 5 kez yıkanarak pleyt tekrar kurumaya bırakıldı. SRB boyasının çözülmesi için her bir kuyuya 150 µl 10 mM tris baz (Sigma) solüsyonu eklendi ve en az

5 dakika boyanın çözünmesi için hafifçe karıştırıldı. Oluşan renk şiddeti 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda (FLASH Scan S12, AnalytikJena, Almanya) ölçüldü. Elde edilen optik dansite değerleri kullanılarak yüzde canlılık hesaplaması yapıldı. % Canlılık aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

Hücre canlılığı (%) = [100 × (Örnek absorbans) / (Kontrol absorbans)]

3.2.9. Hoechst 33342, propidyum iyodür ve anneksin-V-FITC ile üçlü floresan boyama

THC uygulaması ile TPC-1 hücrelerinde hücre ölümünün fenotipik karakteristikleri floresan boyama yöntemiyle araştırıldı. Apoptozis/nekrozis için Hoechst-33342, Propodium iyodür (PI) ve Annexin-V-FITC boyaması yapıldı. Apoptozis ve nekrozis için kullanılan Hoechst-33342 ve PI floresan boyaları DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini görünür hale gelebilmektedir. Hoechst 33342, DNA'ya bağlanabilen hücreden geçebilen bir boyadır ayrıca canlı veya ölü (apoptotik/nekrotik) hücrelerin çekirdeklerini boyamak için kullanılmaktadır. PI, sadece hasarlı hücrelerin membranlarından geçebilen, ölü tüm hücreleri (geç apoptotik/sekonder nekrotik veya primer nekrotik) boyayabilen floresan nükleik asit boyasıdır. Bu boya canlı hücreler tarafından membrandan içeriye alınmaz. Anneksin-V-FITC ile de erken apoptozis belirlenebilmektedir (Güleş ve ark., 2008; Ulukaya ve ark., 2011). Böylelikle üçlü boyama yöntemi kullanılarak THC'ye maruz kalmış hücrelerin apoptozisle veya nekrozis ile ölüp ölmediklerinin ayrımı nükleus morfolojisine ve membran bütünlüğüne bakılarak gerçekleştirildi.

THC ilacı (5, 10 ve 15 µM) TPC-1 hücre soyuna eş zamanlı olarak 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kuyu başına $5x10^3$ hücre olacak şekilde 3 tekrarlı ekilerek 37°C'de, %5 CO_2'li ortamda 24 saat kültüre edildi. İnkübasyon sürelerinin sonunda hücrelerin üzerlerinden dikkatlice tüm besiyeri uzaklaştırılarak Anneksin-V-FLUOS Staining Kit (Roche, Manheim, Germany) içeriğine uygun olarak hazırlanan 500 µl 10X Incubation Buffer içerisine; 3 µg/ml Hoechst 33342, 1 µg/ml PI ve 3 µg/ml Annexin-V boyalarından oluşan çalışma çözeltisi hazırlandı. Her kuyuya boya karışımından 20 µL pipetlenerek, 30 dakika 37°C'de %5'lik CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda

tedavilerin hücrelerde sebep olduğu ölüm şekli EVOS M5000 (Invitrogen) floresan mikroskobu ile değerlendirildi.

3.2.10 Apoptozis hücre ölümü Z-Vad-Fmk inhibitör analizi

THC uygulanmasının hücre ölüm modu üzerine etkisini belirlemek için apoptozis ölüm yolağına ait kaspaz aktivitesini baskılamak için hücrelere pan-kaspaz inhibitörü (Z-Vad-Fmk) (Enzo) uygulandı. TPC-1 hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültür kabına kuyu başına $5x10^3$ hücre olacak şekilde ekildi. Z-Vad-Fmk eş zamanlı olarak 10 µM konsantrasyonda hücrelere uygulandı (Vanderlaag ve ark., 2010). 24 saat boyunca inhibitör uygulanan hücreler 37°C'de, %5 CO_2'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra THC'nin farklı konsantrasyonları (15, 10 ve 5 µM) ile 48 saatlik tedavi süresinin sonunda inhibitör uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasındaki farkı gözlemleyebilmek için SRB canlılık analizi yapıldı.

3.2.11 Nekroptozis hücre ölümü MLKL inhibitör analizi

Nekroptozis, kaspazdan bağımsız bir şekilde düzenlenen nekrotik hücre ölümü türüdür ve büyük ölçüde RIPK1, RIPK3 ve MLKL proteinleri tarafından yönetilmektedir (Gong ve ark., 2019). MLKL'yi seçici olarak hedef alan bir nekroptoz inhibitörü olan Nekrosülfonamid (NSA), MLKL-RIPK1-RIPK3 nekrozom kompleksinin aşağı akış molekülleri ile etkileşime girmesini önleyerek NSA'nın nekroptozu inhibe ettiği gösterilmiştir (Yang ve ark., 2022).

THC'ye maruziyet sonucu hücre ölümünün nekroptozis ile olduğunu göstermek için NSA (Raybiotech) kullanıldı. TPC-1 hücre soyları üzerinde NSA (1,5 µM) ile 4 saat uygulandı (Akgun ve ark., 2019). Ardından THC (5, 10 ve 15 µM) 48 saat maruz bırakıldı. Tedavi sonrası MLKL inhibitörü ile ön tedavi görmüş ve görmemiş hücrelerdeki canlılık SRB canlılık analizi ile tayin edildi.

3.2.12. Nekroptozis hücre ölümü RIPK1 inhibitör analizi

Nekrostatinler RIPK1'in kinaz aktivitesini inhibe eden triptofan bazlı bileşiklerdir. Nekrostatin-1 (Nec-1), 5-(1Hindol-3-ilmetil)-3-metil-2-sülfanilidenimidazolidin-4-on,

özel bir nekroptoz inhibitörü olduğu doğrulanan RIPK1 kinazın seçici ve güçlü bir allosterik inhibitörüdür (Liu ve ark., 2015).

Nekroz ve nekroptoz aktivitesini bastırmak için Nec-1 (Enzo) hücrelere ön uygulama ile (30 dk) 50 µM dozunda uygulandı (Akgun ve ark., 2019). İnkübasyon süreleri bitiminden sonra inhibitörler kuyulardan uzaklaştırıldı ve THC'ye (5, 10 ve 15 µM) 48 saat maruz bırakıldı. Süre sonunda kaspaz ve RIPK1 inhibitörünün etkisi SRB hücre canlılığı tespiti ile incelendi.

3.2.13. Koloni oluşturma yeteneği testi

THC'nin koloni oluşumuna etkisini gözlemlemek için koloni oluşumu analizi yapılmıştır. Koloni oluşumu analizi veya klonojenik metod, tek bir hücrenin koloni haline gelme kabiliyetine dayanan bir *in vitro* analizdir. Bu yöntem en az 50 hücreden oluşan hücre kolonilerinin temel olarak popülasyondaki her hücreyi sınırsız bir bölünmeye girme kabiliyeti açısından test eder (Crowley ve ark., 2016). TPC-1 hücresi sayısı $3x10^3$ olacak şekilde 6 kuyulu hücre kültür kaplarına ekim yapıldı, 24 saat 37°C, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda SRB canlılık analizi sonucunda belirlenen doz değerlerine (5, 10 ve 13 µM) göre THC uygulanarak ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. 48 saat sonunda ilaçlar kuyulardan çekilerek serum içeren besiyeri içerisinde 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1 kere soğuk PBS ile yıkanan kuyular, soğuk metanol ile 10 dakika fikse edildi. %0,05 kristal viyole (Hyclone) ile boyanıp 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonuçlar, ışık mikroskopisi ile değerlendirilip görüntülendi.

3.2.14. Hücre migrasyon testi

THC'nin hücre göçü ve hücre-hücre etkileşimlerine etkisinin belirlenmesi amacıyla tek tabakalı yara iyileşmesi deneyi yapıldı. TPC-1 hücresi her kuyucukta 1 ml'de $15x10^4$ hücre 2 tekrarlı olacak şekilde 6 kuyulu platelere ekildi ve 37ºC'de %5'lik CO_2'li inkübatöre kaldırıldı. Kuyulardaki hücre alanı %90 doluluk oranına ulaşınca 1000 µl'lik pipet ucuyla yüzeyde dikkatlice yatay ve dikey çizgiler oluşturulup kalkan hücreler 1X PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Ardından kontrol grubundaki hücrelere kendi besiyerleri eklenirken tedavi kuyularına da hücre canlılık dozlarına göre (5 ve 10 µM) belirlenen THC uygulandı. Yara oluşturulmuş hücrelerin 0. saat görüntüleri invert mikroskopla 4X

objektifte fotoğraflandı. THC'nin doza ve zamana bağlı olarak hücrelerin yayılmaları üzerindeki etki oranı değerlendirildi. Hücre görüntüleri 0, 12, 24 ve 36 saatte aynı noktadan görüntüleri alındı. Görünümdeki yaranın genişliği ölçüldü ve iyileşme genişliği kontrolle karşılaştırılarak hesaplandı. Hücrelerin migrasyon için yara kapanma alanı, aşağıdaki formülle ImageJ yazılımı kullanılarak hesaplandı;

β (t) = A (t) / A (0) × 100 β (t) = % yara birleşimi

A (t) = t zamanındaki yara alanı, A (0) = başlangıç alanı

3.2.15. İlacının antikanser mekanizmasının moleküler süreçlerinin protein ve gen seviyesinde incelenmesi

$15x10^4$ hücre 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına THC (5, 10 ve 15 μM) ile eş zamanlı şekilde ekildi ve 37°C'de %5'lik CO_2 içeren şartlandırılmış ortama sahip inkübatörde 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrasında 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarındaki hücreler tripsin enzimi kullanılarak kuyucukların zemininden kaldırıldı. 1000 g'de 5 dakika santrifüj sonrasında tüm örneklere ait hücre pelletleri western blot ve Real time PCR reaksiyonu (RT-PCR) çalışmalarında kullanılmak üzere 2 ayrı tüplere ayrıldı.

3.2.16 Western blot analizi

Western blot tekniği, proteinlerin ayrılması ve tanımlanması amacıyla araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu teknikte, protein karışımı öncelikle jel elektroforezi ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılır. Ayrılan proteinler daha sonra membrana aktarılır ve her bir proteine özgü bantlar oluşturulur. Membran, hedef proteine özgü birincil antikorlar ile inkübe edilir ve ardından HRP substratı içeren ikincil antikor inkübasyonu uygulanır. İşaretli antikorlar, kemilüminesans özellikli bir görüntüleme sistemi kullanılarak analiz edilir.

Western blot analizi, temel olarak birkaç aşamadan oluşan bir yöntemdir. İlk olarak, analiz edilecek proteinlerin elde edilebilmesi için protein izolasyonu gerçekleştirilir. İzole edilen proteinler, moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılmak amacıyla jel elektroforezi işlemine tabi tutulur. Jel üzerinde ayrıştırılan proteinler, daha sonra uygun bir membrana aktarılır. Membran üzerindeki hedef proteini tespit edebilmek için birincil antikor

inkübasyonu yapılır. Ardından, birincil antikora bağlanacak şekilde tasarlanmış ikincil antikor inkübasyonu gerçekleştirilir. Son aşamada ise, membran üzerindeki protein bantları uygun yöntemlerle görüntülenir ve analiz edilir.

Bu yöntem, protein ekspresyonunun doğrulanması, hücre içi sinyal yolaklarının incelenmesi ve biyobelirteçlerin tespiti gibi çeşitli biyolojik araştırmalarda kritik bir rol oynamaktadır.

3.2.15'te açıklandığı gibi western blot analizler için ayrılan hücre pelletlerinden protein izolasyonları RIPA Lizis tampon sistemi (Santa Cruz) kullanılarak gerçekleştirildi. Her 1 mL lizis tamponu için 15 µL 200 mM fenilmetilsülfonil florür (PMSF) (Santa Cruz), 15 µL 100 mM sodyum ortovanadat (Santa Cruz) ve 45 µL proteaz inhibitör (Santa Cruz) karışımı +4°C'de hazırlanmıştır:

İzolasyon işlemi kapsamında, hücre pelletleri üzerine 50 µL lizis tamponu eklenmiş ve numuneler karanlık ortamda, buz üzerinde 30 dakika bekletilmiştir. Bu süre zarfında, her 10 dakikada bir pipetleme işlemi uygulanmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda, lizis edilmiş hücre süspansiyonları +4°C'de, 12.000 g'de, 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası, proteaz içermeyen steril 0,5 mL'lik tüplere süpernatantlar toplanarak protein miktarları belirlenmiştir.

Protein miktar tayini, bisinkoninik asit (BCA) Protein Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. BCA Protein Testi, alkalin ortamda proteinlerin Cu^{2+} iyonlarını Cu^{+} iyonlarına indirgemesi ve oluşan Cu^{+} iyonlarının BCA ile kompleks oluşturması sonucu kolorimetrik olarak tespit edilmesine dayanır. Deneysel işlemde, kit içerisinde bulunan BCA tamponu ve Cu^{2+} içeren çözelti 1:50 oranında karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan 190 µl çalışma solüsyonuna 10 µl protein lizatı eklenerek karanlık ortamda 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda, mikroplaka spektrofotometresi kullanılarak 564 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, protein standardı oluşturmak amacıyla sığır serum albümini (BSA) (Cell Signaling) kullanılmış ve 2 mg/ml konsantrasyonundan başlanarak logaritmik seyreltiler hazırlanmıştır. Elde edilen standart

eğriye bağlı olarak, protein konsantrasyonları y = m.ln(x) + b denklemine göre hesaplanmıştır.

Konsantrasyonu belirlenen protein örnekleri, her bir jel kuyusuna 20 µg protein gelecek şekilde 4X LDS Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific) ve 10X (Thermo Fisher Scientific) reducing agent ile hazırlanmış ve 95°C'de 7 dakika süreyle denatüre edilmiştir.

Denatürasyon işleminin ardından, örnekler %4-12 Bis-Tris poliakrilamid jelin kuyularına yüklenmiş ve elektroforez tankında 200 V değişken akımda 50 dakika boyunca yürütülmüştür. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra, proteinlerin membrana aktarımı iBlot kuru transfer sistemi (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak nitroselüloz membranlara gerçekleştirilmiştir.

Proteinlerin aktarıldığı membranlar, %5 BSA içeren 1X TBS-T çözeltisi içerisinde 1:1000 oranında seyreltilerek hazırlanan birincil antikor +4°C'de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, membranlar %5 BSA içeren 1X TBS-T çözeltisi içerisinde 1:1000 oranında seyreltilmiş ikincil antikor (Cell Signaling) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon işlemleri tamamlandıktan sonra, membranlar Fusion FX kemilüminesans görüntüleme sistemi (Vilbert) kullanılarak görüntülenmiştir. Protein bantlarının kantifikasyonu ve normalizasyonu, ImageJ yazılımı ile housekeeping protein olarak kullanılan β-aktin seviyelerine göre gerçekleştirilmiştir.

3.2.17 RT-PCR analizleri

RT-PCR; DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklıkla birbirinden ayrılmasını (denatürasyon), sonra sırasıyla sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyon), zincirin uzamasını (polimerizasyon, çift iplikçikli DNA'ların sentezi) ve tüm bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasını kapsamaktadır.

RNA izolasyonu, 3.2.15 bölümünde detaylandırıldığı şekilde RT-PCR analizleri için ayrılan hücre pelletlerinden gerçekleştirildi. Hücre pelletleri, 1:10 oranında β-merkaptoetanol (Sigma) içeren 500 µl hücre lizis tamponu içerisinde parçalanarak lizise

uğratıldı. Lizis işleminin ardından, örnekler izolasyon kolonlarına aktarıldı ve 12.000 g hızında 15 saniye süreyle santrifüj edildi. Ardından, sırasıyla yıkama solüsyonu I ve yıkama solüsyonu II eklenmiş ve her yıkama adımından sonra 12.000 g hızında 15 saniye süreyle santrifüj işlemi uygulandı. Kalan tamponların uzaklaştırılması amacıyla membranlar 14.000 g hızında 1 dakika süreyle santrifüj edildi. Son olarak, 40 µl nükleaz içermeyen steril su eklenerek 12.000 g hızında 1 dakika santrifüj işlemi uygulandı ve saf RNA elde edildi.

İzolasyon sonrası RNA kalitesi ve konsantrasyonu, Nanodrop™ (Thermo Fisher Scientific) cihazı kullanılarak belirlenmiş olup, 260/280 nm oranının ≈ 2.00 olduğu tespit edildi. İzolasyonu yapılan RNA'lar yüksek kapasite cDNA ters transkripsyon kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak çift zincir cDNA yapılarına çevrildi. Çevrim için kullanılan solüsyonlar ve çevrim süreci Çizelge 3.4'te gösterildiği gibi yapıldı.

Çizelge 3. 4 cDNA çevrimi aşamaları

cDNA Çevrimi Bileşenleri	**Kullanılacak Hacimler**	**cDNA Çevrimi**			
10X RT Buffer	2 µl	25°C 10 dakika	37°C 120 dakika	85°C 5 dakika	4°C ∞
25X dNTP Karışımı (100mM)	0,8 µl				
10X RT Random Primer	2 µl				
MultiScribe Reverse Transkriptaz	1 µl				
RNase İnhibitör	1 µl				
Nükleazdan arındırılmış H_2O	3,2 µl				
RNA örnekleri (500 ng)	10 µl				

Çalışmada RT-PCR ile mRNA ekspresyonu analizi için "GoTaq® qPCR Master Mix" kiti kullanıldı. cDNA'lar reaksiyon başına 100 ng olacak şekilde kullanıldı. Tek reaksiyon için gerekli malzemeler Çizelge 3.5'te belirtildiği şekilde stripler içinde hazırlandı.

Çizelge 3.5: RT-PCR için Gerekli Bileşenler

Bileşenler	Hacim (µl)
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
Nükleaz içermeyen H_20	6,8
cDNA	1
Master Mix	10
CXR Boya	0,2
Toplam	20

Hazırlanan stripler StepOnePlus™ Real-Time PCR cihazına yerleştirildi ve Çizelge 3.6'teki PCR koşullarına göre RT-PCR gerçekleştirildi.

Çizelge 3.6: RT-PCR koşulları

Basamak	Döngü	Sıcaklık	Zaman
GoTaq® Hot Start Polimeraz Aktivasyonu	1	95 ^{0}C	2 dakika
Denatürasyon	40	95 ^{0}C	15 saniye
Uzaman ve Sonlanma		60 ^{0}C	1 dakika

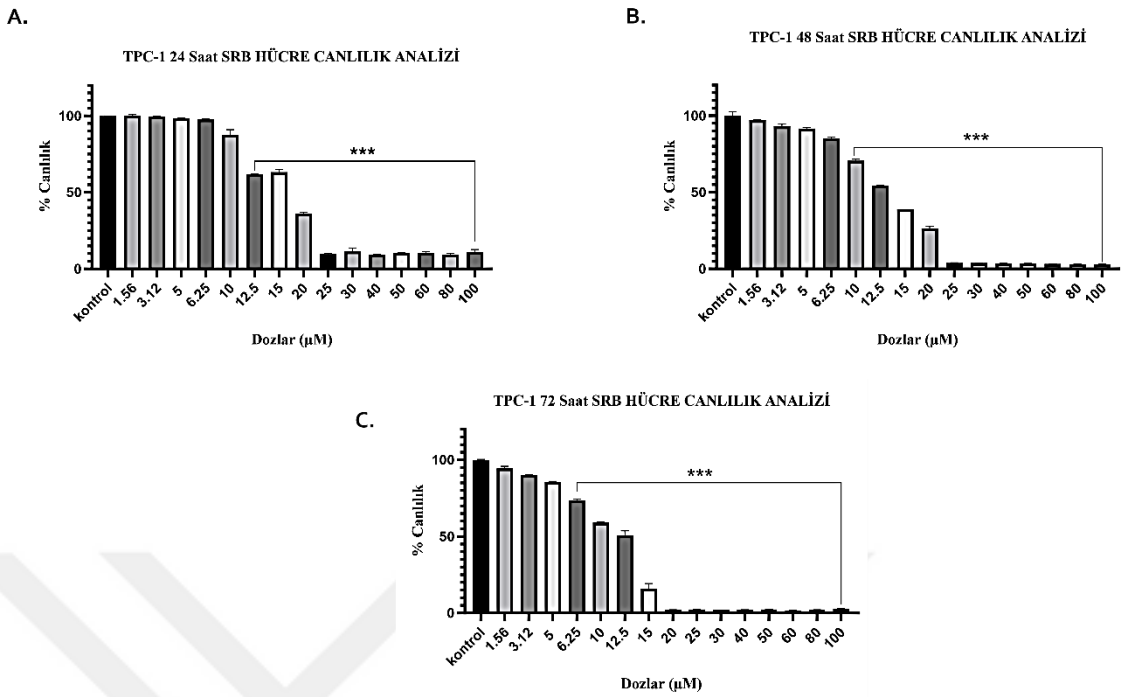
3.2.18. İstatistiksel analiz

Tüm deneysel veriler GraphPad programı kullanılarak çoklu veri analizi ANOVA ile değerlendirildi. 3 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ değerine göre belirlendi. Western blot protein bantları İmage-J yazılımı kullanılarak β-AKTİN kontrol gruplarına göre normalize edilerek kantifiye edildi. RT-PCR analizlerinde elde edilen CT ("cycle threshold value") değerleri StepOnePlus Software V2.3 ile katlık değişim yöntemi kullanılarak hesaplandı. Hücrelerin migrasyon için yara kapanma alanı ImageJ yazılımı kullanılarak hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. SRB Canlılık Testi Bulguları

THC'nin doz ve zamana bağlı sitotoksik etkilerini ortaya koymak amacıyla yapılan SRB hücre canlılık testi sonuçları, bu ajanın tiroid kanseri hücrelerinde (TPC-1) belirgin bir sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. TPC-1 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanan farklı dozlarda THC, hücre canlılığını anlamlı şekilde azaltmıştır (Şekil 4.1). Ayrıca sağlıklı tiroid hücreleri (Nthy-ori 3-1) üzerinde yapılan 48 saatlik test, ilacın sağlıklı hücreler üzerindeki toksisite profilini ortaya koymuştur. Elde edilen sonuçlar, THC'nin seçici toksisite potansiyelini ve tedavi edici penceresini değerlendirmek açısından önem taşımaktadır. 24 saatlik uygulamada, 12,5-100 µM arasındaki THC konsantrasyonları hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olmuştur (***p<0,001). Özellikle 12,5 µM'de %61 ve 15 µM'de %63 oranında canlılık gözlenmiş; 20 µM ve üzerindeki dozlarda ise hücre canlılığı %50'nin altına düşmüştür (Şekil 4.1.A). 48 saatlik uygulama sonrasında, THC'nin 10-100 µM arasındaki konsantrasyonlarda anlamlı sitotoksik etki oluşturduğu belirlenmiştir (**p<0,01; ***p<0,001). 1,56 µM'de %97, 3,12 µM'de %93, 6,25 µM'de %85 ve 10 µM'de %70 canlılık oranları kaydedilmiş; 12,5 µM dozunda %54'e, 15 µM ve üzerindeki dozlarda ise %50'nin altına indiği saptanmıştır (Şekil 4.1.B). 72 saatlik inkübasyonda ise 6,25-100 µM aralığındaki tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etkiler gözlenmiştir (***p<0,001). 1,56 µM dozunda %94, 3,12 µM'de %90, 6,25 µM'de %73, 10 µM'de %59 ve 12,5 µM'de %50 canlılık oranları tespit edilmiş; 15 µM ve üzerindeki dozlarda ise %15'in altına düştüğü belirlenmiştir (Şekil 4.1.C).



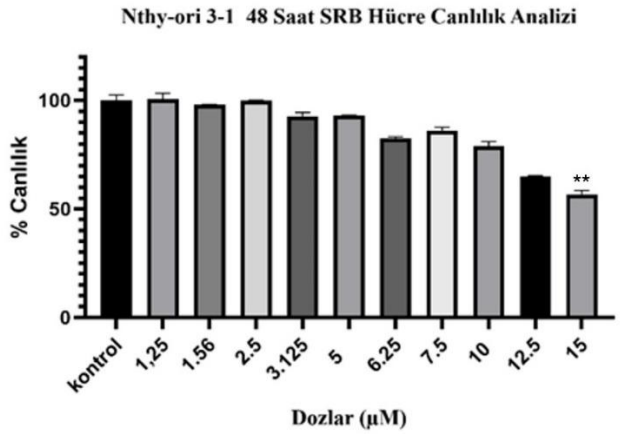
Şekil 4.1. TPC-1 hücre soyunda tiyoridazin hidroklorür (THC) uygulamasının 24 (A.), 48 (B.), 72 (C.) saatlik SRB testi sonrası alınan canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. **Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (**p<0,01, ***: p<0,001) ifade etmektedir*

Bu bulgular ışığında, THC'nin tiroid kanseri hücrelerinde zamana ve doza bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığı net bir şekilde ortaya konmuştur. TPC-1 hücreleri için hesaplanan IC_{50} değerleri de THC'nin etkisinin zamana bağlı olarak arttığını göstermektedir. 24 saatlik uygulama sonrası IC_{50} değeri 17,42 µM, 48 saat sonrasında 13,20 µM ve 72 saatlik inkübasyon süresinde ise 12,57 µM olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1). Bu değerler, THC'nin tedavi edici potansiyelini ve zaman faktörünün önemini vurgulamaktadır.

Çizelge 4.1 TPC-1 hücre soyunda tiyoridazin hidroklorür (THC) uygulamasının 24, 48 ve 72 saatlik SRB testi sonrası hücrelerin %50'sini öldüren dozlar.

Saat	IC_{50} (µM)
24 Saat	17,42
48 Saat	13,20
72 Saat	12,57

Sağlıklı tiroid hücre soyu (Nthy-ori 3-1) üzerinde, 48 saatlik THC uygulaması sonrasında gerçekleştirilen SRB testi sonuçları, ajanın sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin düşük seviyede olduğunu ortaya koymuştur. THC'nin 1,25–10 µM arasındaki düşük konsantrasyonlarında, hücre canlılığı değerleri kontrol grubuna yakın seyretmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Ancak, THC'nin daha yüksek konsantrasyonlarında (12,5 ve 15 µM), hücre canlılığında azalma gözlenmiştir. 12,5 µM konsantrasyonda sağlıklı hücrelerde canlılık %65 iken, kanser hücrelerinde %55 olarak saptanmıştır. Benzer şekilde, 15 µM konsantrasyonda sağlıklı hücrelerde canlılık %55 iken, kanser hücrelerinde %38 olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, THC'nin düşük konsantrasyonlarda sağlıklı tiroid hücrelerini koruyabildiğini; ancak daha yüksek konsantrasyonlarda seçici sitotoksisite özelliği sergileyerek hücre canlılığını azaltabildiğini düşündürmektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Nthy-Ori 3-1 hücre soyunda tiyoridazin hidroklorür (THC) uygulamasının 48 saatlik SRB testi sonrası alınan canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. **Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (** p<0,01) ifade etmektedir*

4.2 Hoechst 3342, Propidium İyodür, Anneksin V Floresan Boyama Bulguları

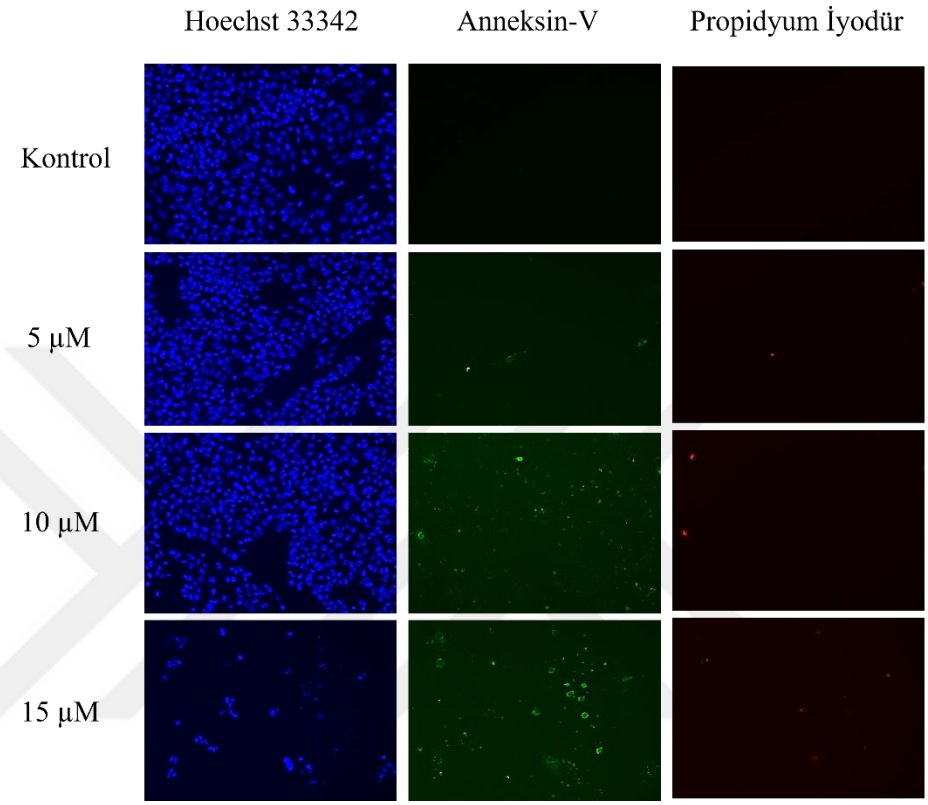
Hücre ölümü modunu belirlemek ve nükleer morfolojik değişiklikleri tespit etmek amacıyla Hoechst 33342, Annexin-V-FITC ve PI kullanılarak üçlü floresan boyama yöntemi uygulanmıştır. Hoechst 33342 boyası hem canlı hem de ölü hücrelerin çekirdeklerini boyayarak nükleer morfolojik değişikliklerin ayrıntılı bir şekilde

izlenmesine olanak tanımaktadır. Apoptotik hücrelerde, boyama sonucunda piknotik ve parçalanmış çekirdek morfolojisi gözlemlenirken; nekrotik hücrelerde daha büyük ve soluk çekirdekler görülmektedir. Apoptoz sürecinde hücre zarının dış yüzeyine taşınan PS'e, Annexin-V bağlanarak floresan sinyal oluşturur ve böylece erken apoptotik hücreler tespit edilebilir. Buna karşılık, PI boyası ise yalnızca membranları hasar görmüş birincil nekrotik veya geç apoptotik (ikincil nekroz) hücreleri işaretlemektedir.

Bu kapsamda, THC'nin toksik olmayan (5 ve 10 µM) ve toksik (15 µM) konsantrasyonları seçilmiş ve TPC-1 hücre soyunda yapılan deneylerde, her bir kuyucuğa 5×10^3 hücre eklenerek 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında kültürlenmiştir. Hücreler, 24 saat boyunca 37°C'de ve %5 CO_2 içeren inkübasyon koşullarında tutulmuştur. İnkübasyon süresinin sonunda, hücre ölüm modları üçlü floresan boyama yöntemiyle floresan mikroskobu altında değerlendirilmiştir (Şekil 4.3). THC'nin 24 saatlik uygulamasının ardından, 5 µM dozdan itibaren hücre sayısında doz artışıyla doğru orantılı olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, THC'nin sitotoksik potansiyelini desteklemektedir. Annexin-V pozitif hücre sayısında gözlenen artış, PI pozitif hücrelerin artışıyla birlikte değerlendirildiğinde, hücrelerin geç apoptotik evreye ilerlediği anlaşılmaktadır. Hoechst boyama sonuçları da THC dozuna bağlı olarak hücre çekirdek yoğunluğunda anlamlı bir azalma olduğunu ortaya koymuş, bu azalma özellikle yüksek doz uygulamalarında daha belirgin hale gelmiştir. Annexin-V ve PI boyamaları sonucunda, THC dozunun artışıyla birlikte yeşil floresan (apoptotik hücreleri gösteren) ve kırmızı floresan (nekrotik hücreleri gösteren) sinyal yoğunluğunda belirgin bir artış meydana gelmiştir. Bu bulgular, THC'nin apoptotik ve nekrotik hücre ölüm oranlarını doz bağımlı olarak artırdığını ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, 5 µM THC dozunda hücre ölüm oranının düşük seviyede kaldığı ve hücre kaybının esas olarak apoptotik mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştiği belirlenmiştir. 10 ve 15 µM'lik dozlarda hücre ölüm oranının anlamlı şekilde arttığı ve bu artışın özellikle apoptotik süreçlerle ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek doz olan 15 µM hem apoptotik hem de nekrotik hücre ölümünü en güçlü şekilde indükleyen konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

Bu sonuçlar, THC'nin düşük dozlarda sağlıklı tiroid hücrelerini koruyabildiğini, ancak tümör hücrelerinde ise doz bağımlı olarak hem apoptotik hem de nekrotik hücre ölümünü indükleyerek seçici sitotoksisite özelliği sergilediğini güçlü bir biçimde desteklemektedir.

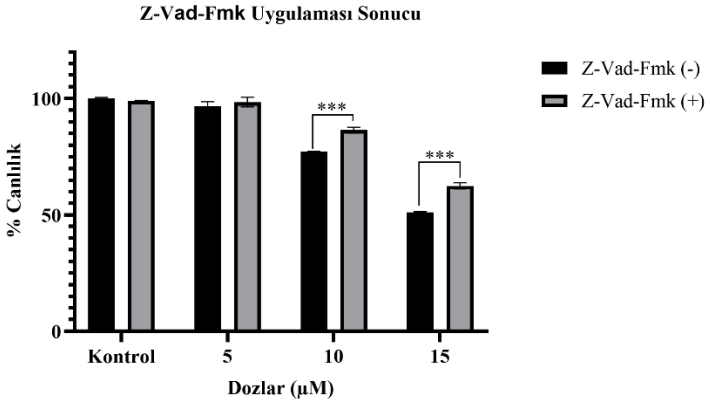


Şekil 4.3. Hücre ölüm modunun üçlü floresan boyama ile belirlenmesi. TPC-1 hücrelerinin 24 saatlik tiyoridazin hidroklorür (THC) ile tedavisi (5, 10 ve 15 µM) sonrasında floresan boyama görüntüleri. *Sağ paneller Hoechst 33342 boyamalarını (mavi), orta paneller Anneksin-V boyamalarını (yeşil) ve sol panel PI boyamasını (kırmızı) gösterir (20X)*

4.3. Z-Vad-Fmk Bulguları

Üçlü floresan boyama verilerini desteklenmesi amacıyla, hücre ölüm sürecinde kaspaz bağımlı yolakların rolünü değerlendirmek üzere pan-kaspaz inhibitörü Z-Vad-Fmk kullanılmıştır. Bu doğrultuda, TPC-1 hücre soyuna 24 saat boyunca 10 µM Z-Vad-Fmk ön uygulaması yapılmış, ardından inhibitör ortamdan uzaklaştırılarak THC'nin farklı konsantrasyonları (5–15 µM) uygulanmıştır. 48 saatlik tedavi süresinin sonunda, inhibitör uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasındaki hücre canlılığı farklarını belirlemek amacıyla SRB canlılık analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen canlılık analizi sonuçları,

THC'nin artan dozlarında Z-Vad-Fmk ön uygulamasının hücre canlılığında anlamlı bir artış sağladığını ortaya koymuştur (Şekil 4.4). Özellikle 10 µM dozunda yaklaşık %9, 15 µM dozunda %11'lik bir canlılık artışı kaydedilmiştir. Bu bulgular, THC'nin TPC-1 hücre soyunda kaspaz bağımlı apoptoz mekanizmalarını aktive ederek hücre ölümünü indüklediğini güçlü bir şekilde desteklemektedir. Çalışmanın genel bulguları, THC'nin seçici sitotoksik etkisinin özellikle apoptoz üzerinden gerçekleştiğini ve bu sürecin kaspaz aktivitesi aracılığıyla düzenlendiğini açıkça göstermektedir.

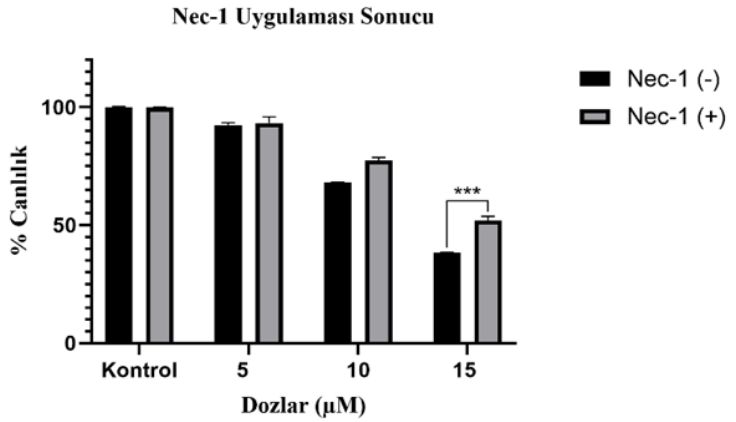


Şekil 4.4. TPC-1 hücrelerinin pan-kaspaz inhibitörü Z-Vad-Fmk (10 µM) ile 24 saat tedavisi sonrasında, tiyoridazin hidroklorür (THC)'e 48 saat maruz bırakılmasının tedavi sonrası hücre canlılığı sonuçları. **Aynı zaman periyotları içinde eşit dozlarda inhibitör uygulanmış [Z-Vad-Fmk (+)] ve uygulanmamış [Z-Vad-Fmk (-)] THC muamelelerin etkisi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*** p<0,001) ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir*

4.4. Nekrostatin-1 Bulguları

Hücre ölümünün nekroptoz yoluyla gerçekleşip gerçekleşmediğini değerlendirmek amacıyla RIPK1 inhibitörü Nec-1 kullanıldı. Nec-1, RIPK1 sinyal yolaklarını inhibe ederek nekroptoz sinyalleşmesini durdurur. Ayrıca, Nec-1 reaktif oksijen türlerini (ROS) hedef alarak nekroptozu etkiler ve RIPK1 aracılığıyla apoptozu da inhibe eder. RIPK1 aktivasyonu, hücreyi dışsal apoptotik yolak veya nekroptotik hücre ölümüne yönlendirmede kavşak bir molekül olarak görev almaktadır (Cao & Mu, 2021). Bu doğrultuda TPC-1 hücreleri Nec-1 ile 30 dakika boyunca muamele edilip ardından 48 saat boyunca THC'ye maruz bırakıldı. Hücre canlılığı, SRB canlılık analizi ile değerlendirildi. Sonuçlar, Nec-1'in 15 µM dozunda TPC-1 hücrelerinde %13 oranında canlılık artışı sağladığını gösterdi. Bu bulgu, yüksek doz Nec-1 uygulamasının RIPK1 aracılığıyla

gerçekleşen nekroptoz veya apoptoz süreçlerini engellediğini düşündürmektedir (Şekil 4.5).



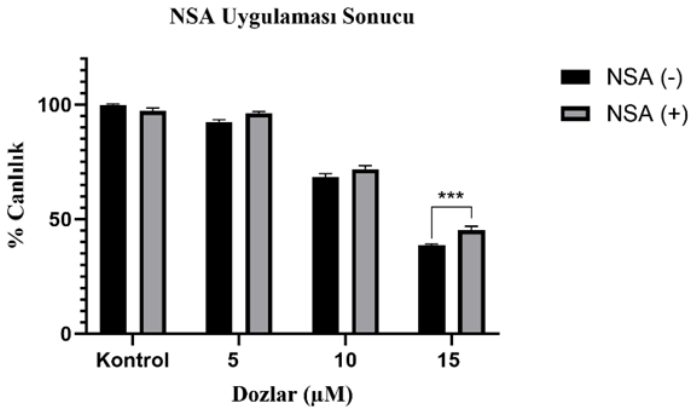
Şekil 4.5. TPC-1 hücrelerinin nekroptoz inhibitörü Nec-1 (50 µM) ile 24 saat tedavisi sonrasında, tiyoridazin hidroklorür (THC)'e 48 saat maruz bırakılmasının tedavi sonrası hücre canlılığı sonuçları. **Aynı zaman periyotları içinde eşit dozlarda inhibitör uygulanmış (Nec-1(+)) ve uygulanmamış (Nec-1(-)) THC muamelelerin etkisi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*** p<0,001) ifade etmektedir. Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma*

4.5. NSA İnhibitör Bulguları

Hücre ölümünün nekroptoz yoluyla gerçekleşip gerçekleşmediğini değerlendirmek amacıyla MLKL inhibitörü NSA kullanıldı. Nekroptoz, RIPK3 bağımlı bir süreç olup, MLKL proteininin aktivasyonu ile karakterize programlı nekrotik hücre ölümüdür.

Bu çalışmada, TPC-1 tiroid kanser hücrelerinde 1,5 µM dozunda NSA uygulanarak THC ile indüklenen hücre ölümünün nekroptotik mekanizmalara bağımlılığı araştırılmıştır. TPC-1 hücreleri, önce 4 saat boyunca NSA ile muamele edilmiş, ardından 48 saat süreyle farklı THC konsantrasyonlarına (5, 10 ve 15 µM) maruz bırakılmıştır. Hücre canlılığı, SRB analizi ile ölçülmüştür.

SRB canlılık analizi sonuçlarına göre, NSA (+) gruplarında özellikle 15 µM THC uygulaması altında hücre ölümünde anlamlı derecede azalma (%6) gözlenmiştir (***p <0.05) (Şekil 4.6).

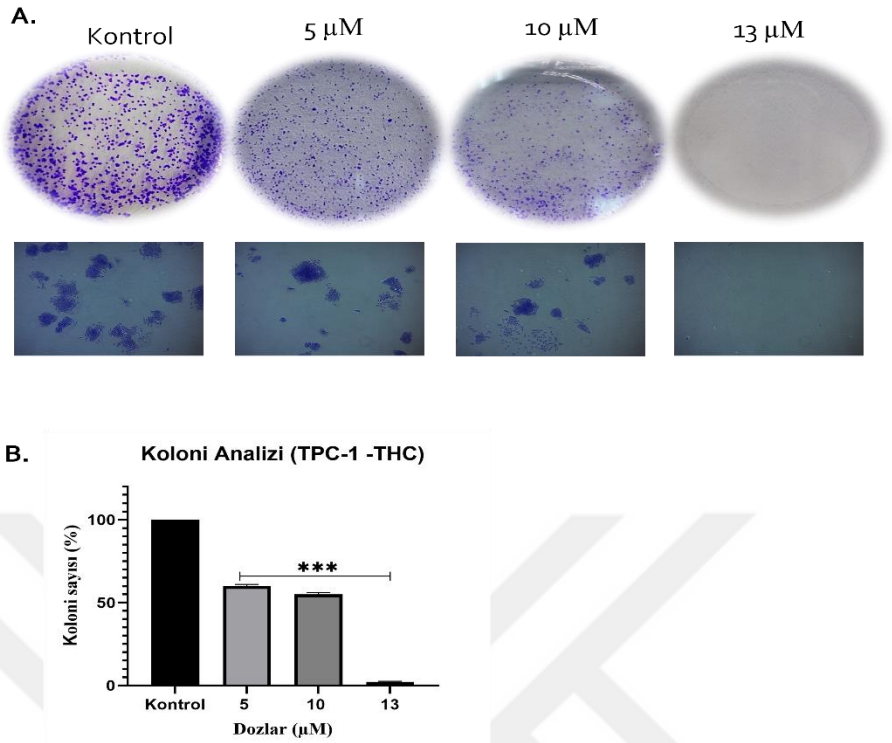


Şekil 4.6. TPC-1 hücrelerinin MLKL inhibitörü NSA (1,5 µM) ile 4 saat tedavisi sonrasında, 48 saat boyunca tiyoridazin hidroklorür (THC)'e maruz bırakılmasının hücre canlılığına etkisi. Aynı zaman periyotları içinde eşit dozlarda inhibitör uygulanmış [NSA(+)] ve uygulanmamış [NSA(-)] *THC muamelelerin etkisi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*** p<0,001) ifade etmektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir*

4.6. Koloni Oluşturma Yeteneği Analizi

Koloni oluşum kapasitesini belirlemek amacıyla koloni oluşturma yeteneği analizi gerçekleştirildi. TPC-1 hücreleri, THC'nin toksik olmayan ve %90 canlılık sağlayan 5 µM dozu ile %70 canlılık sağlayan 10 µM dozu ve hücrelerin yaklaşık yarısını öldüren 13 µM dozları ile 48 saat tedavi edildi. Bu sürenin ardından ilaçlar kuyulardan çekilerek, hücreler serum içeren besiyeri ortamında yaklaşık 50 hücreden koloni oluşturana kadar (48 saat) inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda kuyular, 1 kere soğuk 1X PBS ile yıkanarak soğuk metanolde 10 dakika fikse edildi. Ardından %0,05 kristal viyole ile boyanıp 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonuçlar, ışık mikroskopisi ile değerlendirilip görüntülendi. Minimum 50 hücreden oluşan gruplar koloni olarak kabul edildi.

Sonuçlar toksik olmayan 5 µM dozunda %42, 10 µM dozunda ise %39 oranında koloni oluşumu olduğunu göstermiştir. SRB canlılık analizine göre 48 saatte hücrelerin %50'sini öldüren doz olan 13 µM dozunda ise koloni oluşumu gözlenmedi. Bu bulgular, TPC-1 hücrelerinde THC tedavisinin, tedavi uygulanmamış (kontrol) gruba kıyasla doz artışına bağlı olarak hücrelerin bir araya gelip koloni oluşturma yeteneğini anlamlı şekilde azalttığını ortaya koymaktadır (Şekil 4.7).

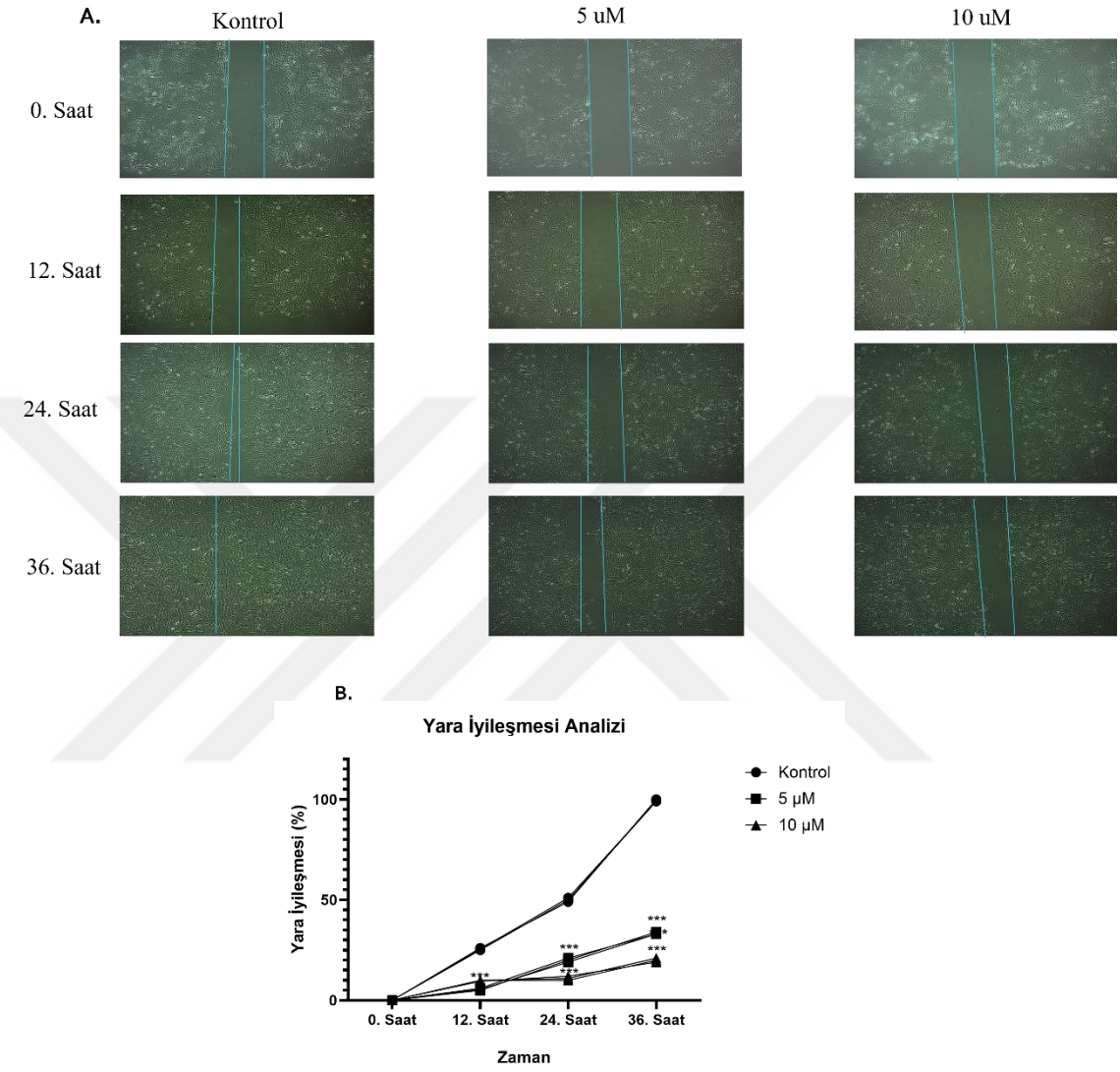


Şekil 4.7. TPC-1 hücreleri üzerinde tiyoridazin hidroklorür (THC) tedavisinin koloni oluşturma yeteneği: **(A.)** Tedavi sonrası hücrelerin ışık mikroskopu görüntüleri (10X büyütme) ve (B) doza bağlı koloni sayısı değişimi grafiği. *THC muameleleri ve kontroller karşılaştırıldığında, aynı zaman periyotlarında ***p<0,001 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı farklar gözlenmiştir*

4.7. Hücre Migrasyon Analizi

Uygulanan ilacın, hücre göçü ve hücre-hücre etkileşimlerine etkisinin belirlenmesi amacıyla tek tabakalı yara iyileşme deneyi gerçekleştirildi. Yara oluşturulmuş hücrelerin 0. saat görüntüleri invert mikroskopla 4X objektifte fotoğraflandı. Yara iyileşmesinin takibi, 12 saat aralıklarla 36 saat boyunca aynı noktadan görüntü alınarak yapıldı. İlacın doza ve zamana bağlı olarak hücrelerin yayılmaları üzerindeki etki oranı değerlendirildi. TPC-1 hücresinde THC ile 36 saat tedavi sonrası mikroskop görüntüleri incelendiğinde, kontrol grubu hücrelerinde, yaranın 12. saatten itibaren kapanmaya başladığı ve 36. saatte ise başlangıca kıyasla %95'ten fazla alanın kapandığı gözlendi (Şekil 4.8.A). THC tedavisi uygulanan hücrelerde %70-90 canlılık sağlayan 10 ve 5 µM dozlarında hücre göçünde belirgin azalmalar görülmüştür. 36. saatte, 5 µM dozunda yara iyileşmesinin %33, 10 µM dozunda ise %21 oranında olduğu ölçülmüştür (Şekil 4.8.B). Sonuçlar,

THC’nin TPC-1 hücre soyunda hücre göçünü baskılayarak yara iyileşmesini engellediğini göstermektedir.



Şekil 4.8. TPC-1 hücreleri üzerinde tiyoridazin hidroklorür (THC) tedavisinin göç etme yeteneği üzerindeki etkisinin mikroskop görüntüleri **(A)** (4X büyütme) ve yara iyileşmesi grafiği **(B)**. **Aynı zaman periyotları içinde kontrollerine göre ve THC ile muamelelerin etkisi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*** p<0,001) ifade etmektedir*

4.8. Western Blot Analizi

SRB yöntemiyle belirlenen sitotoksik etkiler doğrultusunda, THC’nin TPC-1 hücrelerinde indüklediği hücre ölüm mekanizmaları, floresan boyama yöntemleri ve yolak inhibitörleri ile detaylı olarak incelenmiştir. Bu doğrulayıcı çalışmaları takiben,

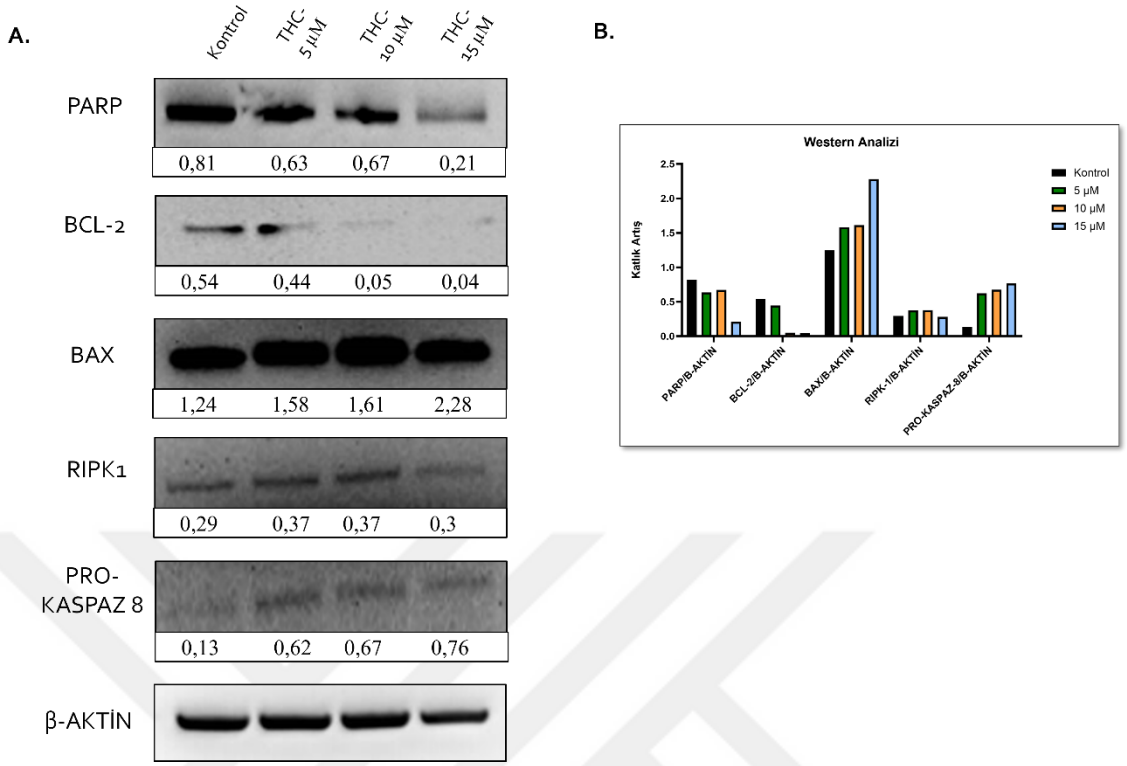
THC’nin hücre ölüm yolakları üzerindeki etkilerini destekleyen moleküler değişiklikler western blot analizi ile değerlendirilmiştir.

Bu amaçla, THC'nin TPC-1 hücrelerine 48 saatlik uygulaması sonrası elde edilen hücresel protein lizatları western blot yöntemiyle analiz edilmiştir. Kullanılan THC konsantrasyonları 5 µM, 10 µM ve 15 µM olup, bu dozlar SRB canlılık analizine dayalı olarak sırasıyla sitotoksik olmayan (5 ve 10 µM) ve sitotoksik (15 µM) seviyeleri temsil etmektedir. Tüm bu protein ekspresyon analizlerinde yükleme kontrolü olarak β-Aktin kullanılmıştır.

Western blot analizleri sonucunda elde edilen bulgular, THC uygulamasının TPC-1 hücrelerinde TNF-R aracılı apoptoz yolağını aktive ettiğini göstermektedir (Şekil 4.9). Apoptotik yolakta görev alan BAX, RIPK1 ve PRO-KASPAZ-8 proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığı tespit edilmiştir. Bu artış, THC’nin doz bağımlı olarak pro-apoptotik yanıtları uyardığını göstermektedir.

Buna karşılık, anti-apoptotik etkiye sahip BCL-2 protein düzeylerinde özellikle 15 µM dozunda belirgin bir azalma gözlenmiştir. Ayrıca, DNA hasarına yanıt olarak aktive olan PARP protein ekspresyonunun da THC uygulamasıyla azaldığı belirlenmiştir. Dansitometrik analizler ImageJ yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve bant yoğunlukları β-AKTİN'e normalize edilmiştir.

Bu bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, THC’nin TPC-1 hücrelerinde apoptoz ve nekroptozu uyararak hücre ölümünü indüklediği görülmektedir. Bu durum, THC’nin tiroid kanseri hücreleri üzerindeki potansiyel antikanser etkisini desteklemektedir.



Şekil 4.9. Tiyoridazin hidroklorür (THC) tedavisi sonrası TPC-1 hücrelerinde apoptotik proteinlerin ekspresyon değişimleri. (A) Western blot bantları, (B) Bant yoğunluğu değişim grafikleri. *Dansitometrik analiz ImageJ yazılımı ile gerçekleştirildi ve bant yoğunlukları β-AKTİN'e normalize edildi*

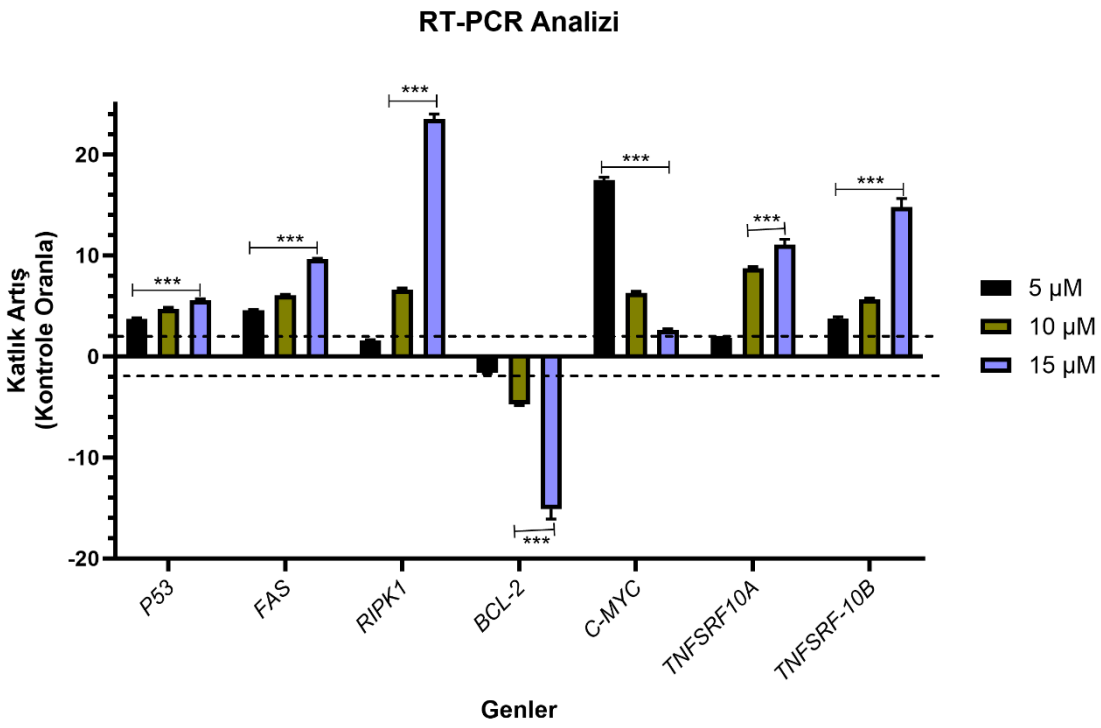
4.9. Genlerin Ekspresyon Profilleri Analizi

THC uygulamasının TPC-1 hücrelerinde hücre ölümüne ilişkin gen ekspresyonları üzerindeki etkisi, RT-PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir. Uygulamalar 5 µM, 10 µM ve 15 µM olmak üzere üç farklı konsantrasyonda gerçekleştirilmiş; gen ekspresyon düzeylerinde ≥2 katlık değişimler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (Erturk ve ark., 2023).

Elde edilen verilere göre, *P53, FAS, RIPK1, TNFRSF10A (TRAIL-R1)* ve *TNFRSF10B (TRAIL-R2)* genlerinin ekspresyon düzeylerinde, özellikle yüksek dozlarda olmak üzere, belirgin ve doz bağımlı artışlar gözlenmiştir. Özellikle 15 µM THC uygulamasında, *TNFRSF10A* gen ekspresyonunda yaklaşık 17 kat, *FAS* gen ekspresyonunda ise yaklaşık 10 kat artış gözlemlenmiştir. Bununla birlikte *P53* geninde de anlamlı artışlar meydana gelmiştir (Şekil 4.10).

Buna karşılık, *BCL-2 VE C-MYC* gen ekspresyonlarında özellikle 10 µM ve 15 µM konsantrasyonlarında olmak üzere anlamlı bir azalma saptanmıştır. En yüksek dozda, *BCL-2* ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 15 kat azaldığı görülmüştür (Şekil 4.10).

Bu sonuçlar, THC'nin TPC-1 hücrelerinde pro-apoptotik yolları (*P53, FAS, TNFRSF10A/B*) aktive ederken, anti-apoptotik *BCL-2* genini baskılayarak hücre ölümünü indüklediğini göstermektedir. Sonuçlar, THC'nin tiroid kanseri hücrelerinde potansiyel apoptotik etkilerini desteklemektedir.



Şekil 4.10. Tiyoridazin hidroklorür (THC)'ün antikanser mekanizmasının gen seviyesinde incelenmesi. *CT değerleri β-Aktin'e göre normalize edilmiş olup kontrole göre katlık artış verilmiştir. *Aynı zaman periyotları içinde kontrollerine göre ve THC ile muamelelerin etkisi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*** p<0,001) ifade etmektedir*

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

2040 yılı itibarıyla dünya genelinde 29 milyondan fazla kişinin çeşitli kanser türleriyle teşhis edileceği öngörülmektedir. Bilimsel topluluk, kanser hastalarının yaşam kalitesini artırma çabalarının yanı sıra, tedavi süreçlerine ilişkin hızla artan maliyetler konusunda da endişe duymaktadır. Bu nedenle, yeni ilaçların geliştirilmesine yönelik alternatif stratejiler arayışı önem kazanmaktadır. Yeni bir ilacın geliştirilmesi, genellikle erken klinik denemelerde başarısızlıkla sonuçlanabilen uzun ve maliyetli bir süreçtir. Bu sürecin zaman ve kaynak açısından oluşturduğu dezavantajları aşmanın etkili yollarından biri ise mevcut onaylı ilaçların farklı endikasyonlarda yeniden kullanımıdır (Rodrigues ve ark., 2022). İlacın yeniden konumlandırılmasında kullanılan ilaç gruplarından birisi de antipsikotik ilaçlardır. Bugüne kadar birçok çalışmanın antipsikotiklerle tedavi edilen şizofreni hastalarının belirli kanser türleri için genel popülasyona göre daha düşük kanser insidansına sahip olduğunu bildirmiştir. Son kanıtlar, antipsikotiklerin potansiyel antikanser özelliklerine büyük bilimsel ilgi olduğunu göstermektedir (Lianos ve ark., 2022).

Antipsikotik bir ilaç olan THC, fenotiyazin ilaç ailesine aittir ve temel olarak DRD2'yi bloke ederek öncelikle şizofreni ve psikoz gibi geniş bir yelpazedeki psikotik bozuklukların tedavisinde kullanılır. Çeşitli kanser hücrelerinde hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak test edilmiştir. THC, başlangıçta antipsikotik ilaç olarak klinik kullanıma sunulmuş olmakla birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalar, bu ilacın çeşitli tümör hücre hatlarında antikanser özellikler sergilediğini ortaya koymuştur (Spengler ve ark., 2016). Glioblastoma hücreleri, over kanseri hücreleri, meme kanseri hücreleri, akciğer kanseri hücreleri, servikal kanser hücreleri, endometrial kanser hücreleri, malign kan hücreleri (lenfoma, lösemi), mide kanseri hücreleri, malign testis germ hücreleri, hepatosellüler karsinoma hücreleri, baş ve boyun kanseri hücreleri, renal kanser hücreleri, prostat kanser hücreleri, nöroblastoma hücreleri ve farklı kanser kök hücrelerinde yapılan çalışmalar, THC'nin antitümör etkinliğini desteklemektedir. Bu çalışmalara göre, THC'nin antiproliferatif özellikleri farklı moleküler mekanizmalar aracılığıyla ortaya konmaktadır (Vlachos ve ark., 2021). Bu tez çalışmasında antipsikotik THC ilacının TPC-1 insan tiroid kanseri hücre soyu üzerinde sitotoksik etkileri ve mekanizmaları araştırılmıştır.

THC'nin, papiller tiroid kanseri hücre soyu olan TPC-1 üzerindeki antikanser etkileri detaylı olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada elde edilen bulgular, literatürde farklı tümör modellerinde bildirilen verilerle büyük ölçüde örtüşmekte ve THC'nin potansiyel bir antikanser ajan olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir.

Bu bağlamda, literatür çalışmaları göz önünde bulundurularak, THC'nin sitotoksik etkisi bu tez çalışmasında SRB canlılık testi yöntemiyle araştırılmıştır. THC'nin hem TPC-1 tiroid kanseri hücre soyu hem de sağlıklı tiroid hücre soyu olan Nthy-ori 3-1 üzerindeki sitotoksik etkileri, doz ve zamana bağlı olarak kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. TPC-1 hücrelerine 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde uygulanan 1,56–100 μM doz aralığındaki SRB canlılık analizleri sonucunda, THC'nin hücre canlılığını anlamlı düzeyde azalttığı ve bu etkinin doz ve zamanla doğrudan korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle 20 μM ve üzeri dozlarda, 24 saatlik uygulama sonucunda hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü gözlemlenirken, 48 saatlik inkübasyonda bu etkinin daha düşük dozlarda başladığı ve 72 saatlik inkübasyon süresinde ise 12,5 μM doz ile %50'nin altına gerilediği tespit edilmiştir. Buna paralel olarak hesaplanan IC_{50} değerlerinin zamanla azaldığı, dolayısıyla ilacın sitotoksik etkisinin inkübasyon süresiyle birlikte arttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Nthy-ori 3-1 sağlıklı tiroid hücrelerinde ise 48 saatlik uygulama sonucunda düşük dozlarda anlamlı bir canlılık kaybı gözlenmemiştir (Şekil 4.2).

Benzer şekilde, literatürde yapılan çalışmalarda da THC'nin çeşitli kanser hücre hatları üzerinde antiproliferatif etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Örneğin, Song ve arkadaşları (2020) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, THC uygulamasının 4T1 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin canlılığını hem konsantrasyon hem de zamana bağımlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Çalışmada, 72 saatlik THC tedavisi sonrası IC_{50} değerleri 4T1 hücreleri için 9,87 μM, MDA-MB-231 hücreleri için ise 18,70 μM olarak raporlanmıştır (Song ve ark., 2020). Benzer şekilde, Mu ve arkadaşlarının (2014) THC'nin mide kanseri hücreleri üzerindeki antikanser etkisini değerlendirmek için yapılan MTT testinde, NCI-N87 ve AGS hücrelerinin canlılığının konsantrasyona bağlı olarak azaldığı ve 15 μM tiyoridazin ile tedavi edilen hücrelerde belirgin morfolojik değişiklikler gözlendiği rapor edilmiştir (Mu ve ark., 2014). Shen ve arkadaşlarının

(2017) çalışmasında da THC'nin akciğer kanseri (A549) kök hücre benzeri hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Çalışmada THC'nin ile muamele edilen hücrelerde belirgin morfolojik değişikliklerin yanı sıra, MTT testi sonuçları da THC'nin konsantrasyona bağlı olarak hücre büyümesini anlamlı düzeyde baskıladığını göstermiştir (Shen ve ark., 2017). Ayrıca, Kang ve arkadaşlarının (2012) servikal (HeLa, Caski, C33A) ve endometrial (HEC-1-A, KLE) kanser hücrelerinde 15 µM THC uygulamasının MTT testiyle hücre canlılığını anlamlı şekilde azalttığı raporlanmıştır (Kang ve ark., 2012). THC'nin glioblastoma hücre hatları (U87MG ve GBM8401) üzerindeki sitotoksik etkisi de SRB analiziyle gösterilmiş ve THC'nin hücre canlılığını doza bağımlı olarak önemli ölçüde baskıladığı gösterilmiştir. Chu ve arkadaşlarının (2019) yaptığı CCK-8 analizinde, 5, 10 ve 15 µM THC uygulamasıyla 24 saatlik tedavi sonucunda anlamlı hücre ölümü gözlenmiş; özellikle 15 µM dozunda, tedavi edilmeyen kontrol hücrelerine kıyasla U87MG ve GBM8401 hücrelerinin canlılığının zamana bağlı olarak anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiştir (Chu ve ark., 2019). Öte yandan, Jiang ve arkadaşlarının (2018) çalışmasında, THC'nin fare melanom hücre soyu (B16-F10) üzerinde doza bağımlı antiproliferatif etkiler oluşturduğu rapor edilmiştir. Çalışmada, farklı konsantrasyonlarda THC ile muamele edilen hücrelerde proliferasyonun anlamlı düzeyde azaldığı saptanmış; yüksek doz THC, melanom tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlardan biri olan Cisplatine kıyasla daha güçlü ve hızlı antiproliferatif etki oluşturduğu gösterilmiştir (Jiang ve ark., 2018). Bu bulgular, çalışmamızda elde edilen THC'nin papiller tiroid kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileriyle uyumlu bulunmuş ve THC'nin farklı kanser türlerinde de benzer antiproliferatif etkilere sahip olabileceğini destekler niteliktedir.

Bu çalışmada, THC'nin TPC-1 papiller tiroid kanseri hücrelerinde hücre ölüm mekanizmaları üzerindeki etkileri çok yönlü olarak değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda, tez kapsamında THC'nin TPC-1 papiller tiroid kanseri hücrelerinde hücre ölüm mekanizmaları üzerindeki etkileri çok yönlü olarak ele alınmıştır. Üçlü floresan boyama yöntemi ile gerçekleştirilen analizlerde, THC'nin 24 saatlik uygulaması sonucunda hücre canlılığında doza bağımlı bir azalma meydana geldiği ve bunun sitotoksik etkinin bir göstergesi olduğu belirlenmiştir. Hoechst 33342 boyası ile yapılan incelemelerde, özellikle yüksek doz uygulamalarında (10 ve 15 µM), nükleer yoğunluğun azalması,

kromatin yoğunlaşmasının artması ve morfolojik değişikliklerin belirginleşmesi, apoptoz sürecinin aktif olduğunu göstermektedir. Anneksin-V-FITC ve PI boyamalarıyla yapılan değerlendirmeler ise THC uygulamasının hem erken hem de geç apoptotik hücre oranlarında anlamlı bir artışa neden olduğunu ortaya koymuştur. Düşük doz uygulamalarında (5 μM) hücre ölümünün büyük oranda apoptoz ile sınırlı kaldığı; ancak doz arttıkça (10 ve 15 μM), apoptotik hücre ölüm oranının belirgin şekilde yükseldiği gözlemlenmiştir. Özellikle 15 μM THC dozunda, apoptoza ek olarak nekrotik hücre oranında da bir artış gözlemlenmesi, THC'nin yüksek doz uygulamalarında apoptoz ile birlikte nekroz mekanizmasını da aktive ettiğini düşündürmektedir (Şekil 4.3).

Hücre ölüm mekanizmalarının daha ayrıntılı olarak değerlendirilmesi amacıyla, üçlü floresan boyama verileri pan-kaspaz inhibitörü (Z-VAD-FMK), RIPK1 inhibitörü (Nec-1) ve MLKL inhibitörü (NSA) kullanılarak desteklenmiştir. TPC-1 hücrelerinde 24 saatlik Z-Vad-Fmk ön uygulamasını takiben gerçekleştirilen THC tedavisinde, artan dozlarda hücre canlılığında anlamlı artışlar saptanmıştır. Bu bulgu, THC'nin hücre ölümü üzerindeki etkisinin büyük oranda kaspaz bağımlı apoptotik mekanizmalar üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.4). Ayrıca RIPK1 inhibitörü olan Nec-1'in THC ile kullanımı sonucunda özellikle 15 μM dozunda hücre canlılığında %13'lük bir artış gözlenmiştir. Bu durum, yüksek doz THC uygulamasında RIPK1 aracılı nekroptotik ve/veya apoptotik hücre ölüm yollarının aktive olduğunu düşündürmektedir (Şekil 4.5). Bununla birlikte, MLKL inhibitörü Nekrosülfonamid (NSA) uygulaması sonrasında özellikle 15 μM THC dozunda hücre ölümünün azaldığı belirlenmiştir. Bu bulgu, THC'nin hücre ölümü üzerindeki etkisinin yalnızca apoptoz ile sınırlı kalmayıp, aynı zamanda nekroptotik süreçleri de içerdiğini ortaya koymaktadır (Şekil 4.6). Tüm bu inhibitör çalışmaları, THC'nin TPC-1 tiroid kanseri hücrelerinde hücre ölümünü esas olarak kaspaz bağımlı apoptotik mekanizmalar yoluyla gerçekleştirdiğini ve bu etkilerin doz bağımlı olarak değiştiğini göstermektedir.

Literatürde THC'nin çeşitli kanser hücre hatlarında apoptotik ve nekrotik etkiler gösterdiği bilinmektedir. Örneğin, gastrik kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, Z-Vad-Fmk uygulaması ile THC'nin sitotoksik etkisinin anlamlı biçimde azaldığı ve apoptozun kaspaz-bağımlı bir yolla gerçekleştiği ortaya konmuştur (Mu ve ark., 2014).

Kolorektal kanser kök hücrelerinde ise düşük doz THC ile erken evre, yüksek dozlarla ise geç evre apoptotik hücre oranlarında artış gözlenmiştir (Zhang ve ark., 2017). Meme kanseri hücrelerinde yürütülen çalışmalar da THC'nin morfolojik değişikliklere yol açarak, apoptozu konsantrasyona bağlı olarak indüklediği bildirilmiştir (Song ve ark., 2020). Servikal, endometriyal ve yumurtalık kanseri hücre hatlarında da benzer şekilde, THC tedavisinin hücre canlılığını azalttığı ve apoptotik hücre oranlarını artırdığı gösterilmiştir (Kang ve ark., 2012; Yong ve ark., 2017). Glioblastoma ve servikal karsinom hücrelerinde yapılan çalışmalarda ise, THC'nin nekrotik hücre ölümünü de tetiklediği ve bu etkinin servikal karsinom hücrelerinde Yüksek mobilite grubu protein 1 (HMGB1) düzeylerindeki artışla desteklendiği rapor edilmiştir (Chu ve ark., 2019; Mao ve ark., 2015). Böbrek karsinomu hücrelerinde yapılan bir çalışmada, THC'nin TRAIL ile birlikte kullanıldığında apoptotik mekanizmaları sinerjik olarak aktive ettiği ve bu etkinin kaspaz-bağımlı olduğu gösterilmiştir (Min ve ark., 2014). Bu tez kapsamında elde edilen veriler, literatürdeki bulgularla büyük ölçüde örtüşmekte ve THC'nin antitümör etkinliğini desteklemektedir. Bu durum, THC'nin terapötik potansiyeline dair önemli kanıtlar sunmaktadır.

Koloni oluşumu analizi, TPC-1 hücrelerinin THC tedavisine karşı uzun dönem proliferatif kapasitelerini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, SRB analizine göre %90 canlılık sağlayan 5 µM, %70 canlılık sağlayan 10 µM ve %50 canlılık eşiğine karşılık gelen 13 µM THC dozları ile 48 saatlik tedavi uygulanmıştır. Tedavi sonrasında hücreler, ilaçtan arındırılmış ortamda yeniden kültüre edilerek koloni oluşturma potansiyelleri gözlemlenmiştir. Sonuçlar, THC'nin doz bağımlı olarak hücrelerin koloni oluşturma yeteneğini baskıladığını ortaya koymuştur. Kontrol grubuna kıyasla, 5 µM dozunda %42, 10 µM dozunda %39 oranında koloni oluşumu gözlenmiş; 13 µM dozunda ise koloni oluşumu tamamen engellenmiştir (Şekil 4.7). Bu bulgular, düşük doz THC'nin hücrelerin uzun dönem çoğalma potansiyelini belirgin şekilde sınırlandırdığını göstermektedir. Özellikle 13 µM dozunun koloni oluşumunu tamamen inhibe etmesi, bu dozun yalnızca kısa vadeli sitotoksik etki değil, aynı zamanda kalıcı anti-proliferatif etki yarattığını ortaya koymaktadır. THC'nin yalnızca hücre canlılığını azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda TPC-1 hücrelerinin tümör benzeri koloni oluşturma

yeteneğini de engellediği anlaşılmaktadır. Bu veriler, THC'nin antitümöral etkisinin hem sitotoksik hem de antiproliferatif düzeyde anlamlı olduğunu göstermektedir.

THC'nin akciğer kanseri (A549) kök hücre benzeri hücreler üzerinde koloni oluşturma yeteneğini belirgin şekilde azalttığı rapor edilmiştir (Shen ve ark., 2017). Benzer şekilde 5 μM konsantrasyonundaki THC'nin, NCI-N87 ve AGS mide kanseri hücre hatlarında hücre canlılığı üzerinde yalnızca minimal bir etki gösterdiği, ancak koloni oluşturma yeteneklerini anlamlı düzeyde engellediği bildirilmiştir (Mu ve ark.,2014). Ayrıca, THC'nin GBM8401 glioblastoma hücrelerinde 1 ila 10 μM arasında değişen konsantrasyonlarda uygulandığında koloni oluşumunu belirgin şekilde azalttığı gözlemlenmiştir (Cheng ve ark., 2015). Song ve arkadaşlarının (2020) çalışmasında ise, THC'nin 4T1 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde koloni oluşum yeteneğini anlamlı şekilde baskıladığı ve koloni oluşum testiyle yapılan görsel değerlendirmelerde hem koloni sayısı hem de koloni boyutlarında dikkate değer bir azalma sağladığı rapor edilmiştir (Song ve ark., 2020).

Bu tez kapsamında elde edilen bulgular, literatürde bildirilen bu verilerle büyük ölçüde uyumlu göstermektedir. THC'nin TPC-1 papiller tiroid kanseri hücrelerinde koloni oluşturma yeteneğini doza bağımlı olarak baskıladığı ve hücrelerin uzun süreli proliferatif kapasitelerini kısıtladığı saptanmıştır. Bu sonuçlar, THC'nin antitümöral etkinliğini güçlü biçimde desteklemekte ve koloni oluşum testleriyle elde edilen literatür bulgularını doğrulamaktadır.

Hücre hareketliliği, tümör progresyonu ve metastaz süreçlerinde kritik bir rol oynamaktadır. Bu bağlamda, tümör hücrelerinin migrasyon ve invazyon kapasitelerinin baskılanması, etkili antitümöral tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemli bir hedef olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışmada, TPC-1 hücrelerinde THC'nin hücre göçü üzerindeki etkileri yara iyileşmesi analizi ile değerlendirilmiş ve THC'nin bu hücrelerde migrasyon kapasitesini belirgin şekilde azalttığı gösterilmiştir. Monolayer hücre kültüründe oluşturulan yapay yara sonrası kontrol grubunda hücreler 12. saatten itibaren aktif olarak göç göstermiş ve 36. saatte yaranın yaklaşık %95'inden fazlası kapanmıştır. Buna karşın, THC ile tedavi edilen gruplarda yara kapanma oranları doza bağlı olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. %90 hücre canlılığı sağlayan 5 μM dozunda yara kapanma

oranı %33 olarak ölçülürken, %70 canlılık gözlenen 10 µM dozunda bu oran %21'e gerilemiştir. Bu bulgular, THC'nin yalnızca hücre canlılığını azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda migrasyon kapasitesini de belirgin şekilde baskıladığını ve bu etkinin anti-invaziv mekanizmalarla ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Elde edilen bu sonuçlar, literatürde farklı kanser modelleriyle bildirilen verilerle de büyük ölçüde örtüşmektedir. Örneğin, Li ve arkadaşları (2015) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, hepatoselüler karsinom hücre hatları (SNU449, LM3, Huh7) 10 µM konsantrasyonundaki THC ile 72 saat boyunca ön işleme tabi tutulmuş ve sonrasında uygulanan transwell migrasyon analizinde, THC ile muamele edilen hücrelerde kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azalmış hücre hareketliliği gözlenmiştir (Z. Li ve ark., 2015). Benzer şekilde, Zhang ve arkadaşlarının (2017) çalışmasında kolorektal kanser kök hücrelerinde THC'nin invazyonu baskılayıcı etkileri rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 2017). Ayrıca, Song ve arkadaşlarının (2020) meme kanseri üzerine gerçekleştirdiği çalışmada ise, THC'nin yalnızca *in vitro* migrasyon inhibisyonu sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda *in vivo* deneylerde spontan akciğer metastazını %72,58 oranında azalttığı gösterilmiştir. Bu veriler, THC'nin antimetastatik etkinliğini farklı tümör modellerinde de destekler niteliktedir (Song ve ark., 2020). Sonuç olarak, çalışmamızda elde edilen bulgular, THC'nin migrasyon baskılayıcı etkilerini net bir şekilde ortaya koymakta ve bu etkinin literatürde farklı kanser modelleriyle yapılan çalışmalarla tutarlı olduğunu güçlü bir şekilde desteklemektedir.

Apoptoz, hücre ölümünün düzenlenmiş ve kontrollü bir formu olup, içsel (mitokondriyal) ve dışsal (ekstrinsik) olmak üzere iki ana yolak üzerinden gerçekleşmektedir. Ekstrinsik yolak, tümör nekroz faktörü-α ve Fas ligandı gibi dışsal ligandların, hücre yüzeyindeki spesifik ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla başlatılmaktadır. Bu etkileşim, ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşumunu tetiklemekte ve kaspaz-8 ile kaspaz-10 gibi başlatıcı kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Ardından, kaspaz-3, -6 ve -7 gibi yürütücü kaspazlar aktive edilerek apoptoz süreci ilerletilir. Bu sürecin önemli göstergelerinden biri olan PARP proteininin parçalanması, ekstrinsik yolaktaki etkinliğin bir işareti olarak değerlendirilmektedir (Ghobrial ve ark., 2005).

İçsel yolak ise hücre içi stres sonucunda aktive olmaktadır. Bu süreç, pro-apoptotik (BAX, BAK, BOK; BH3-only proteinleri: BİD, BİM, BİK, BAD, BMF, HRK, NOXA ve PUMA) ve anti-apoptotik (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, A1) Bcl-2 ailesi proteinleri arasındaki dengenin bozulmasıyla karakterizedir (Roufayel ve ark., 2022). Hücresel stres yanıtı olarak aktive olan tümör baskılayıcı P53 proteini, PUMA transkripsiyonunu artırarak anti-apoptotik protein BCL-XL'yi inhibe etmekte ve BAX ile BAK proteinlerinin aktivasyonu yoluyla mitokondri zar geçirgenliğini artırmaktadır. Bu olaylar dizisi sonucunda sitokrom c sitoplazmaya salınarak APAF-1 ile birleşip apoptozom kompleksini oluşturmakta ve kaspaz-9'un aktivasyonu yoluyla apoptozu başlatmaktadır (Green & Kroemer, 2009).

MYC onkoproteini, hücreleri DNA hasarı, ölüm reseptörü aktivasyonu, hipoksi ve besin eksikliği gibi çeşitli pro-apoptotik uyaranlara karşı daha duyarlı hale getirmektedir. MYC, mitokondriyal yolakta Bax aktivasyonunu kolaylaştırarak mitokondri dış zar geçirgenliğini (MOMP) arttırmakta ve sitokrom c'nin sitozole geçişini hızlandırmaktadır. Ayrıca MYC, P53/MDM2/ARF aracılığıyla p53 stabilizasyonunu destekleyerek hem p53-bağımlı hem de bağımsız yollarla apoptoz sürecini tetiklemektedir (Ahmadi ve ark., 2021).

Klefström ve arkadaşlarının çalışmaları, MYC'nin serin/treonin kinaz ailesinden RIPK1 ekspresyonunu artırdığını ve bu proteinin FADD ve kaspaz-8 ile etkileşerek apoptoz sürecini başlattığını göstermiştir (Klefstrom ve ark., 1997). Ek olarak, MYC'nin c-FLIP ekspresyonunu baskılayarak, TRAIL aracılı kaspaz-8 aktivasyonu üzerinden apoptozu desteklediği bildirilmiştir (Hughes ve ark., 2016).

Bu çalışmada, Western blot analizleri ile elde edilen bulgular, THC'nin TPC-1 hücrelerinde hem ekstrinsik hem de içsel apoptoz yolaklarını doz bağımlı şekilde aktive ettiğini göstermektedir. Ekstrinsik apoptoz yolunun önemli belirteçlerinden biri olan RIPK1 protein düzeyinde gözlenen anlamlı artış, THC'nin TNF reseptörü aracılığıyla hücre dışı ölüm sinyallerini başlattığını göstermektedir. Bu artışa paralel olarak pro-kaspaz-8 ekspresyonundaki artış, ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşumu sonrası başlatıcı kaspazların aktive edildiğini ve ekstrinsik yolağın aktif olduğunu desteklemektedir.

Bununla birlikte, içsel apoptoz yolunun da THC tarafından aktive edildiği, BAX ve BCL-2 protein düzeylerindeki değişimlerle ortaya konmuştur. Pro-apoptotik bir protein olan BAX'ın ekspresyonundaki artış, MOMP oluşumunu kolaylaştırarak sitokrom c salınımını tetiklemekte ve içsel apoptozu başlatmaktadır. Buna karşılık, anti-apoptotik BCL-2 proteininin seviyesindeki belirgin azalma, hücrenin apoptoza karşı direncinin kırıldığını göstermekte ve BAX ile hücre ölüm sürecini kolaylaştırmaktadır.

Apoptozun terminal göstergelerinden biri olan PARP proteininin seviyesinde gözlenen azalma ise, yürütücü kaspazların aktifleşerek PARP'ı parçalamaya başlamış olduğunu göstermektedir. Bu durum, apoptozun yalnızca başlatılmadığını, aynı zamanda hücredeki DNA onarım mekanizmalarının durdurulmasıyla birlikte sürecin tamamlandığını da ifade etmektedir.

Sonuç olarak, elde edilen bu veriler, THC'nin TPC-1 hücrelerinde hem ekstrinsik (RIPK1 ve kaspaz-8 aracılı) hem de içsel (BAX/BCL-2 dengesine dayalı) apoptoz yolaklarını etkili bir biçimde aktive ettiğini göstermektedir. Ayrıca, bu etkilerin doza bağımlı olarak arttığı ve özellikle 15 µM THC konsantrasyonunda maksimum apoptotik yanıtın elde edildiği belirlenmiştir. Tüm bu bulgular, THC'nin tiroid kanseri hücrelerinde pro-apoptotik mekanizmaları uyararak potansiyel bir antikanser ajan olarak değerlendirebileceğini güçlü bir biçimde desteklemektedir.

RT-PCR analizlerinden elde edilen sonuçlar, THC'nin TPC-1 hücrelerinde hem içsel hem de ekstrinsik apoptoz yolaklarını transkripsiyonel düzeyde aktive ettiğini ortaya koymaktadır. Özellikle 15 µM THC uygulamasında, apoptotik genlerin ekspresyon düzeylerinde anlamlı artışlar gözlenmiştir.

Ekstrinsik apoptoz yolunun önemli bileşenlerinden olan *FAS, TNFRSF10A (TRAIL-R1)* ve *TNFRSF10B (TRAIL-R2)* gen ekspresyonlarında gözlenen belirgin artışlar, THC'nin hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerini aktive ederek apoptozu başlattığını göstermektedir. Bu genlerdeki doz bağımlı artış, özellikle 15 µM THC uygulamasında *FAS* için yaklaşık 10 kat, *TRAIL-R1* için ise 17 kat civarındaki artış ile ekstrinsik yolaktaki güçlü bir aktivasyonu açıkça ortaya koymaktadır.

Aynı şekilde, *RIPK1* gen ekspresyonundaki artış hem apoptotik hem de nekroptotik süreçlerde rol aldığını düşündürmektedir. Bu bulgu, western blot analizlerinden elde edilen verileri destekler nitelikte olup, THC'nin ekstrinsik sinyallemeyi yalnızca kaspaz-bağımlı mekanizmalarla değil, aynı zamanda kaspaz-bağımsız (nekroptotik) yollarla da ilerletebileceğini göstermektedir.

İçsel yolak açısından, *P53* geninin ekspresyonundaki artış, DNA hasarı ve hücresel stres yanıtı sonucu mitokondriyal apoptozun başlatıldığını desteklemektedir. P53'ün transkripsiyonel hedeflerinden biri olan *PUMA* ile *BAX* aktivasyonunu tetikleyerek mitokondri dış zar geçirgenliğini artırabileceği düşünülmektedir. Buna paralel olarak, *BCL-2* geninin ekspresyonunda gözlenen belirgin azalma (15 µM dozda yaklaşık 15 kat) mitokondriyal yolaktaki aktivasyonun ve hücre ölümüne karşı anti-apoptotik direncin kırıldığını açıkça göstermektedir.

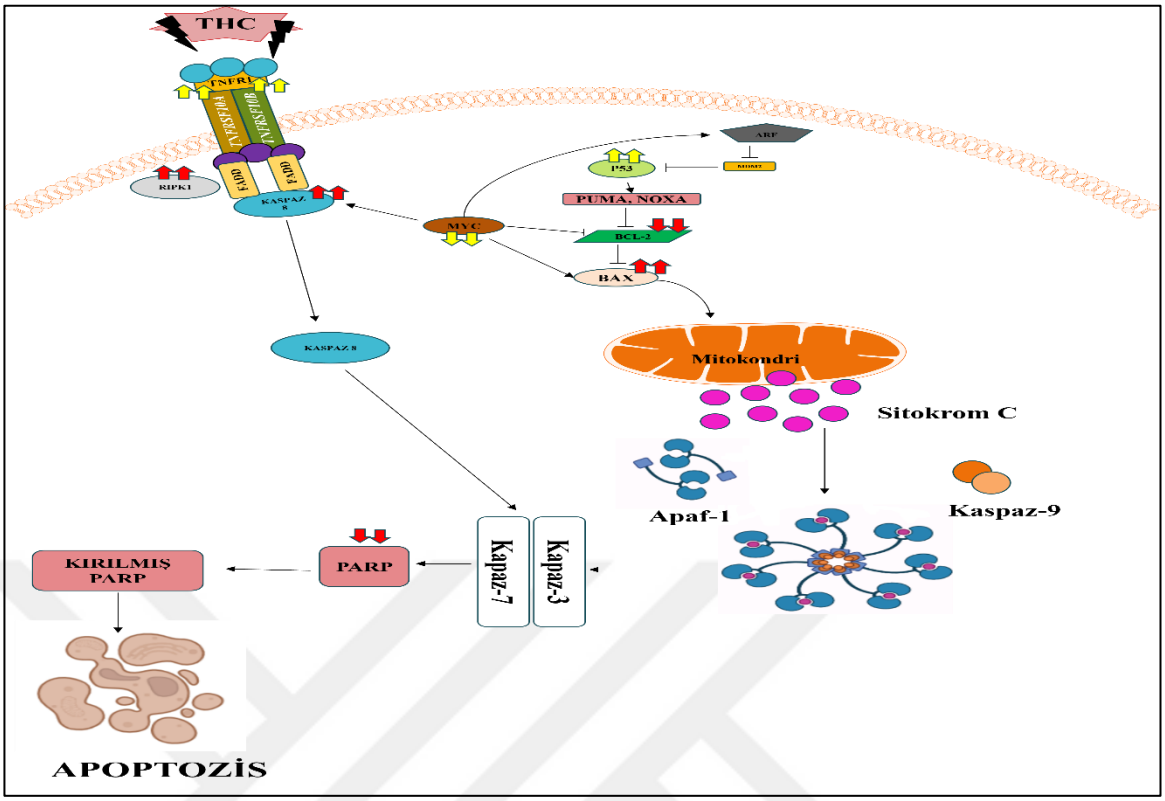
C-MYC gen ekspresyonundaki özellikle yüksek dozda gözlenen azalma, THC'nin proliferatif ve anti-apoptotik etkilerle ilişkili *MYC* aktivitesini baskıladığını ve böylece apoptotik süreci desteklediğini düşündürmektedir. Bu durum, C-*MYC'nin FADD/kaspaz-8* ve *p53* aracılığıyla apoptozla olan ilişkisi göz önünde bulundurulduğunda önemli bir bulgu olarak öne çıkmaktadır.

Sonuç olarak, elde edilen veriler THC'nin TPC-1 hücrelerinde gen düzeyinde hem ekstrinsik (*FAS, RIPK1, TRAIL-R1/2*) hem de içsel (*P53, BCL-2*) apoptoz yolaklarını aktive ettiğini ve aynı zamanda proliferasyonla ilişkili *MYC* genini baskılayarak hücre ölümünü teşvik ettiğini göstermektedir. Bu bulgular, THC'nin tiroid kanseri hücrelerinde güçlü bir pro-apoptotik etki gösterdiğini ve potansiyel bir antikanser ajan olarak değerlendirilebileceğini desteklemektedir (Şekil 4.10).

Literatürde farklı kanser hücre hatlarında yürütülen çalışmalar da bu bulguları desteklemektedir. Örneğin, Kang ve arkadaşları (2012), kolon kanseri hücrelerinde THC'nin kaspaz-3 aktivasyonunu artırdığını, Bax ve p53 ekspresyon seviyelerinde zamana bağlı artış sağladığını ve aynı zamanda PI3K fosforilasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir (Kang ve ark., 2012). Gastrik kanser hücrelerinde ise THC'nin, kaspaz-9, -8

ve -3 öncüllerindeki azalma ve Z-Vad-Fmk inhibitörü ile sitotoksik etkinliğin geri çevrilebilmesi yoluyla kaspaz-bağımlı bir mekanizmayla apoptozu indüklediği ortaya konmuştur (Mu ve ark., 2014). Benzer şekilde, meme kanseri hücrelerinde yapılan çalışmalarda, THC'nin p-AKT düzeylerini baskıladığı, p-ERK1/2 düzeylerini artırarak ERK1/2 aktivasyonu üzerinden apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Song ve ark., 2020). Ayrıca, ışınlama ile kombinasyon halinde uygulanan THC'nin, özofagus skuamöz hücreli karsinom hücrelerinin canlılığını azaltarak G0/G1 fazında hücre döngüsü durmasına, apoptotik proteinlerde artışa ve PI3K-AKT-mTOR yolunun inhibisyonuna neden olduğu gözlemlenmiştir (H. Li ve ark., 2016). Kolon kanseri kök hücrelerinde yapılan çalışmalarda ise THC'nin, pro-apoptotik genlerin (Bax, kaspaz-3) ekspresyonunu artırdığı, Bcl-2'nin ekspresyonunu azalttığı ve mitokondriyal membran potansiyelini düşürdüğü gösterilmiştir. Bu bulgular, THC'nin kolon kanseri kök hücrelerinin proliferasyonunu apoptoz yoluyla baskıladığını ortaya koymaktadır (Zhang ve ark., 2017). Ayrıca, Min ve arkadaşlarının çalışmasında (2014), THC'nin TRAIL ile kombine uygulandığında renal, meme ve glioma hücrelerinde apoptozu ve PARP yıkımını önemli düzeyde artırdığı belirtilmiştir (Min ve ark., 2014).

Bu çalışmada elde edilen bulgular, THC'nin tiroid kanseri hücrelerinde hem dışsal (*FAS*, Pro-Kaspaz-8) hem de içsel (BAX*, P53*) apoptotik yolakları belirgin şekilde aktive ettiğini açıkça ortaya koymaktadır. THC'nin çok yönlü ve güçlü pro-apoptotik etkileri, onu potansiyel bir antikanser ajan olarak ön plana çıkarmakta ve tiroid kanseri tedavisinde değerlendirilmesi gereken önemli bir molekül adayı olarak desteklemektedir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Tiyoridazin Hidroklorür (THC)'ün TPC-1 hücre soyu üzerindeki apoptotik etki mekanizmaları. (Ahmadi ve ark., 2021'den değiştirilerek alınmıştır)

KAYNAKLAR

Abdullah, M. I., Junit, S. M., Ng, K. L., Jayapalan, J. J., Karikalan, B., & Hashim, O. H. (2019). Papillary Thyroid Cancer: Genetic Alterations and Molecular Biomarker Investigations. *International Journal of Medical Sciences*, *16*(3), 450-460. https://doi.org/10.7150/ijms.29935

Ahmadi, S. E., Rahimi, S., Zarandi, B., Chegeni, R., & Safa, M. (2021). MYC: a multipurpose oncogene with prognostic and therapeutic implications in blood malignancies. *Journal of hematology & oncology*, *14*(1). https://doi.org/10.1186/S13045-021-01111-4

Akgun, O., Erkisa, M., & Ari, F. (2019). Effective and new potent drug combination: Histone deacetylase and Wnt/β-catenin pathway inhibitors in lung carcinoma cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *120*(9), 15467-15482. https://doi.org/10.1002/JCB.28813,

Araque, D. V. P., Bleyer, A., & Brito, J. P. (2017). Thyroid cancer in adolescents and young adults. *Future Oncology*, *13*(14), 1253-1261. https://doi.org/10.2217/FON-2017-0024,

Babacan, D. (2023). Apoptozis. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, *49*(1), 1-10. https://doi.org/10.35238/sufefd.1210651

Barak, Y., Achiron, A., Mandel, M., Mirecki, I., & Aizenberg, D. (2005). Reduced cancer incidence among patients with schizophrenia. *Cancer*, *104*(12), 2817-2821. https://doi.org/10.1002/cncr.21574

Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara, R. L., Cepero, E., & Boise, L. H. (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biology*, *14*(1), 32. https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-32

Cao, L., & Mu, W. (2021). Necrostatin-1 and necroptosis inhibition: Pathophysiology and therapeutic implications. *Pharmacological Research*, *163*, 105297. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105297

Chen, D. W., Lang, B. H. H., McLeod, D. S. A., Newbold, K., & Haymart, M. R. (2023a). Thyroid cancer. *The Lancet*, *401*(10387), 1531-1544. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)00020-X

Chen, D. W., Lang, B. H. H., McLeod, D. S. A., Newbold, K., & Haymart, M. R. (2023b). Thyroid cancer. *The Lancet*, *401*(10387), 1531-1544. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)00020-X

Cheng, H.-W., Liang, Y.-H., Kuo, Y.-L., Chuu, C.-P., Lin, C.-Y., Lee, M.-H., Wu, A. T. H., Yeh, C.-T., Chen, E. I.-T., Whang-Peng, J., Su, C.-L., & Huang, C.-Y. (2015a). Identification of thioridazine, an antipsychotic drug, as an antiglioblastoma and anticancer stem cell agent using public gene expression data. *Cell Death & Disease*, *6*(5), e1753-e1753. https://doi.org/10.1038/cddis.2015.77

Cheng, H.-W., Liang, Y.-H., Kuo, Y.-L., Chuu, C.-P., Lin, C.-Y., Lee, M.-H., Wu, A. T. H., Yeh, C.-T., Chen, E. I.-T., Whang-Peng, J., Su, C.-L., & Huang, C.-Y. (2015b). Identification of thioridazine, an antipsychotic drug, as an antiglioblastoma and anticancer stem cell agent using public gene expression data. *Cell Death & Disease*, *6*(5), e1753-e1753. https://doi.org/10.1038/cddis.2015.77

Cho, Y. S., & Park, S. Y. (2014). Harnessing of Programmed Necrosis for Fighting against Cancers. *Biomolecules & Therapeutics*, *22*(3), 167-175. https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.046

Chou, F. H.-C., Tsai, K.-Y., Su, C.-Y., & Lee, C.-C. (2011). The incidence and relative risk factors for developing cancer among patients with schizophrenia: A nine-year follow-up study. *Schizophrenia Research*, *129*(2-3), 97-103. https://doi.org/10.1016/j.schres.2011.02.018

Christofferson, D. E., & Yuan, J. (2010). Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Current Opinion in Cell Biology*, *22*(2), 263-268. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.12.003

Chu, C.-W., Ko, H.-J., Chou, C.-H., Cheng, T.-S., Cheng, H.-W., Liang, Y.-H., Lai, Y.-L., Lin, C.-Y., Wang, C., Loh, J.-K., Cheng, J.-T., Chiou, S.-J., Su, C.-L., Huang, C.-Y. F., & Hong, Y.-R. (2019a). Thioridazine Enhances P62-Mediated Autophagy and Apoptosis Through Wnt/β-Catenin Signaling Pathway in Glioma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(3), 473. https://doi.org/10.3390/ijms20030473

Chu, C.-W., Ko, H.-J., Chou, C.-H., Cheng, T.-S., Cheng, H.-W., Liang, Y.-H., Lai, Y.-L., Lin, C.-Y., Wang, C., Loh, J.-K., Cheng, J.-T., Chiou, S.-J., Su, C.-L., Huang, C.-Y. F., & Hong, Y.-R. (2019b). Thioridazine Enhances P62-Mediated Autophagy and Apoptosis Through Wnt/β-Catenin Signaling Pathway in Glioma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(3), 473. https://doi.org/10.3390/ijms20030473

Cohen, M. E., Dembling, B., & Schorling, J. B. (2002). The association between schizophrenia and cancer: a population-based mortality study. *Schizophrenia Research*, *57*(2-3), 139-146. https://doi.org/10.1016/S0920-9964(01)00308-5

Corsello, S. M., Bittker, J. A., Liu, Z., Gould, J., McCarren, P., Hirschman, J. E., Johnston, S. E., Vrcic, A., Wong, B., Khan, M., Asiedu, J., Narayan, R., Mader, C. C., Subramanian, A., & Golub, T. R. (2017). The Drug Repurposing Hub: a next-generation drug library and information resource. *Nature Medicine*, *23*(4), 405-408. https://doi.org/10.1038/nm.4306

Crowley, L. C., Christensen, M. E., & Waterhouse, N. J. (2016). Measuring Survival of Adherent Cells with the Colony-Forming Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2016*(8), pdb.prot087171. https://doi.org/10.1101/pdb.prot087171

Dedıvıtıs, R. A., Matos, L. L. De, Guımarães, A. V., Castro, M. A. F. De, & Petrarolha, S. P. (2020). Neck recurrence in papillary thyroid carcinoma. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, *47*. https://doi.org/10.1590/0100-6991e-20202545

Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A., & Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*, *1*(2), 112-119. https://doi.org/10.1038/nchembio711

Erturk, E., Onur, O. E., Aydin, I., Akgun, O., Coskun, D., & Ari, F. (2023). Targeting the epithelial–mesenchymal transition (EMT) pathway with combination of Wnt inhibitor and chalcone complexes in lung cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *124*(8), 1203-1219. https://doi.org/10.1002/JCB.30442

Facciabene, A., Peng, X., Hagemann, I. S., Balint, K., Barchetti, A., Wang, L.-P., Gimotty, P. A., Gilks, C. B., Lal, P., Zhang, L., & Coukos, G. (2011). Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and Treg cells. *Nature*, *475*(7355), 226-230. https://doi.org/10.1038/nature10169

Fouad, Y. A., & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research*, *7*(5), 1016-1036.

Franchini, F., Palatucci, G., Colao, A., Ungaro, P., Macchia, P. E., & Nettore, I. C. (2022). Obesity and Thyroid Cancer Risk: An Update. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(3). https://doi.org/10.3390/IJERPH19031116,

Fu, L., Jin, W., Zhang, J., Zhu, L., Lu, J., Zhen, Y., Zhang, L., Ouyang, L., Liu, B., & Yu, H. (2022). Repurposing non-oncology small-molecule drugs to improve cancer therapy: Current situation and future directions. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *12*(2), 532-557. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.09.006

Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., & Samali, A. (2010). Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *International Journal of Cell Biology*, *2010*, 1-23. https://doi.org/10.1155/2010/214074

Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., & Adjei, A. A. (2005). Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *55*(3), 178-194. https://doi.org/10.3322/canjclin.55.3.178

Gong, Y., Fan, Z., Luo, G., Yang, C., Huang, Q., Fan, K., Cheng, H., Jin, K., Ni, Q., Yu, X., & Liu, C. (2019). The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Molecular Cancer*, *18*(1), 100. https://doi.org/10.1186/s12943-019-1029-8

Green, D. R., & Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*, *458*(7242), 1127-1130. https://doi.org/10.1038/nature07986

Grootjans, S., Vanden Berghe, T., & Vandenabeele, P. (2017). Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. *Cell Death and Differentiation*, *24*(7), 1184. https://doi.org/10.1038/CDD.2017.65

Guicciardi, M. E., & Gores, G. J. (2009). Life and death by death receptors. *The FASEB Journal*, *23*(6), 1625-1637. https://doi.org/10.1096/fj.08-111005

Güleş, Ö., Fakültesi, Ü. E.-Y. Y. Ü. V., & 2008, undefined. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *dergipark.org.trÖ Güleş, Ü ErenYüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2008•dergipark.org.tr*, *2*, 73-78. https://dergipark.org.tr/en/pub/yyuvfd/issue/13739/166297

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31-46. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059,

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Hernandez, C., Huebener, P., & Schwabe, R. F. (2016). Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene*, *35*(46), 5931-5941. https://doi.org/10.1038/onc.2016.104

Huang, J., Zhao, D., Liu, Z., & Liu, F. (2018). Repurposing psychiatric drugs as anti-cancer agents. *Cancer Letters*, *419*, 257-265. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.01.058

Hughes, M. A., Powley, I. R., Jukes-Jones, R., Horn, S., Feoktistova, M., Fairall, L., Schwabe, J. W. R., Leverkus, M., Cain, K., & MacFarlane, M. (2016). Co-operative and Hierarchical Binding of c-FLIP and Caspase-8: A Unified Model Defines How c-FLIP Isoforms Differentially Control Cell Fate. *Molecular cell*, *61*(6), 834-849. https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2016.02.023

Igney, F. H., & Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, *2*(4), 277-288. https://doi.org/10.1038/NRC776,

Islam, M. T. (2017). Radiation interactions with biological systems. *International Journal of Radiation Biology*, *93*(5), 487-493. https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1286050,

Issa, N. T., Stathias, V., Schürer, S., & Dakshanamurthy, S. (2021). Machine and deep learning approaches for cancer drug repurposing. *Seminars in Cancer Biology*, *68*, 132-142. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.12.011

Jiang, X., Chen, Z., Shen, G., Jiang, Y., Wu, L., Li, X., Wang, G., & Yin, T. (2018). Psychotropic agent thioridazine elicits potent in vitro and in vivo anti-melanoma effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *97*, 833-837. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.012

Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, *1*(3), 332-349. https://doi.org/10.1002/fft2.44

Kang, S., Dong, S. M., Kim, B.-R., Park, M. S., Trink, B., Byun, H.-J., & Rho, S. B. (2012). Thioridazine induces apoptosis by targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in cervical and endometrial cancer cells. *Apoptosis*, *17*(9), 989-997. https://doi.org/10.1007/s10495-012-0717-2

Karsch-Bluman, A., & Benny, O. (2020). *Necrosis in the Tumor Microenvironment and Its Role in Cancer Recurrence* (ss. 89-98). https://doi.org/10.1007/978-3-030-35727-6_6

Kashyap, D., Tuli, H. S., Garg, V. K., Goel, N., & Bishayee, A. (2018). Oncogenic and Tumor-Suppressive Roles of MicroRNAs with Special Reference to Apoptosis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Molecular Diagnosis & Therapy*, *22*(2), 179-201. https://doi.org/10.1007/s40291-018-0316-1

Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, *26*(4), 239-257. https://doi.org/10.1038/BJC.1972.33,

Kitahara, C. M., & Schneider, A. B. (2022). Epidemiology of Thyroid Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, *31*(7), 1284-1297. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-21-1440,

Klefstrom, J., Arighi, E., Littlewood, T., Jäättelä, M., Saksela, E., Evan, G. I., & Alitalo, K. (1997). Induction of TNF-sensitive cellular phenotype by c-Myc involves p53 and impaired NF-kappaB activation. *The EMBO journal*, *16*(24), 7382-7392. https://doi.org/10.1093/EMBOJ/16.24.7382

Laha, D., Nilubol, N., & Boufraqech, M. (2020). New Therapies for Advanced Thyroid Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00082

Lazebnik, Y. (2010). What are the hallmarks of cancer? *Nature Reviews Cancer*, *10*(4), 232-233. https://doi.org/10.1038/nrc2827

Leclair, K., Bell, K. J. L., Furuya-Kanamori, L., Doi, S. A., Francis, D. O., & Davies, L. (2021). Evaluation of Gender Inequity in Thyroid Cancer Diagnosis: Differences by Sex in US Thyroid Cancer Incidence Compared with a Meta-analysis of Subclinical Thyroid Cancer Rates at Autopsy. *JAMA Internal Medicine*, *181*(10), 1351-1358. https://doi.org/10.1001/JAMAINTERNMED.2021.4804,

Lee, M. A., Bergdorf, K. N., Phifer, C. J., Jones, C. Y., Byon, S. Y., Sawyer, L. M., Bauer, J. A., & Weiss, V. L. (2020). Novel three-dimensional cultures provide insights into thyroid cancer behavior. *Endocrine-Related Cancer*, *27*(2), 111-121. https://doi.org/10.1530/ERC-19-0374

Li, H., Juan, L., Xia, L., Wang, Y., Bao, Y., & Sun, G. (2016). Thioridazine Sensitizes Esophageal Carcinoma Cell Lines to Radiotherapy-Induced Apoptosis In Vitro and In Vivo. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, *22*, 2624. https://doi.org/10.12659/MSM.899950

Li, X., You, J., Zhang, L., Su, L., & Yang, X. (2022). A Novel Model Based on Necroptosis-Related Genes for Predicting Prognosis of Patients With Prostate Adenocarcinoma. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.814813

Li, Z., Lu, M., Luo, Z., Chen, H., Li, J., Zhang, C., Zhang, S., Xue, S., Wang, K., & Shi, Y. (2015). Roles of dopamine receptors and their antagonist thioridazine in hepatoma metastasis. *OncoTargets and Therapy*, 1543. https://doi.org/10.2147/OTT.S77373

Lianos, G. D., Alexiou, G. A., Rausei, S., Galani, V., Mitsis, M., & Kyritsis, A. P. (2022). Repurposing antipsychotic drugs for cancer treatment: current evidence and future perspectives. *Expert Review of Anticancer Therapy*, *22*(2), 131-134. https://doi.org/10.1080/14737140.2022.1987221

Liu, Z.-Y., Wu, B., Guo, Y.-S., Zhou, Y.-H., Fu, Z.-G., Xu, B.-Q., Li, J.-H., Jing, L., Jiang, J.-L., Tang, J., & Chen, Z.-N. (2015). Necrostatin-1 reduces intestinal inflammation and colitis-associated tumorigenesis in mice. *American journal of cancer research*, *5*(10), 3174-3185.

Lubin, J. H., Adams, M. J., Shore, R., Holmberg, E., Schneider, A. B., Hawkins, M. M., Robison, L. L., Inskip, P. D., Lundell, M., Johansson, R., Kleinerman, R. A., De Vathaire, F., Damber, L., Sadetzki, S., Tucker, M., Sakata, R., & Veiga, L. H. S. (2017). Thyroid cancer following childhood low-dose radiation exposure: a pooled analysis of nine cohorts. *academic.oup.comJH Lubin, MJ Adams, R Shore, E Holmberg, AB Schneider, MM Hawkins, LL RobisonThe Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2017•academic.oup.com*, *102*(7), 2575-2583. https://doi.org/10.1210/jc.2016-3529

Mao, M., Yu, T., Hu, J., & Hu, L. (2015). Dopamine D2 receptor blocker thioridazine induces cell death in human uterine cervical carcinoma cell line SiHa. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, *41*(8), 1240-1245. https://doi.org/10.1111/jog.12691

Masuda, T., Tsuruda, Y., Matsumoto, Y., Uchida, H., Nakayama, K. I., & Mimori, K. (2020). Drug repositioning in cancer: The current situation in Japan. *Cancer Science*, *111*(4), 1039-1046. https://doi.org/10.1111/cas.14318

Mazzaferri, E. L. (1999). An overview of the management of papillary and follicular thyroid carcinoma. *Thyroid*, *9*(5), 421-427. https://doi.org/10.1089/THY.1999.9.421,

Meinhold, C. L., Ron, E., Schonfeld, S. J., Alexander, B. H., Freedman, D. M., Linet, M. S., & Berrington De González, A. (2010). Nonradiation risk factors for thyroid cancer in the US radiologic technologists study. *American Journal of Epidemiology*, *171*(2), 242-252. https://doi.org/10.1093/AJE/KWP354,

Min, K. J., Seo, B. R., Bae, Y. C., Yoo, Y. H., & Kwon, T. K. (2014). Antipsychotic agent thioridazine sensitizes renal carcinoma Caki cells to TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated inhibition of Akt signaling and downregulation of Mcl-1 and c-FLIP(L). *Cell Death & Disease 2014 5:2*, *5*(2), e1063-e1063. https://doi.org/10.1038/cddis.2014.35

Moyer, A., Tanaka, K., & Cheng, E. H. (2025). Apoptosis in Cancer Biology and Therapy. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *20*(1), 303-328. https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-051222-115023

Mu, J., Xu, H., Yang, Y., Huang, W., Xıao, J., Lı, M., Tan, Z., Dıng, Q., Zhang, L., Lu, J., Wu, X., & Lıu, Y. (2014). Thioridazine, an antipsychotic drug, elicits potent antitumor effects in gastric cancer. *Oncology Reports*, *31*(5), 2107-2114. https://doi.org/10.3892/or.2014.3068

Nikiforov, Y. E. (2010). Is ionizing radiation responsible for the increasing incidence of thyroid cancer? *Cancer*, *116*(7), 1626-1628. https://doi.org/10.1002/CNCR.24889,

O'Connor, M. J. (2015). Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Molecular Cell*, *60*(4), 547-560. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.040

Orellana, E., & Kasinski, A. (2016). Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *BIO-PROTOCOL*, *6*(21). https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1984

Ozaki, T., & Nakagawara, A. (2011). Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers*, *3*(1), 994-1013. https://doi.org/10.3390/cancers3010994

Pappa, T., & Alevizaki, M. (2014). Obesity and thyroid cancer: A clinical update. *Thyroid*, *24*(2), 190-199. https://doi.org/10.1089/THY.2013.0232,

Park, S., Hatanpaa, K. J., Xie, Y., Mickey, B. E., Madden, C. J., Raisanen, J. M., Ramnarain, D. B., Xiao, G., Saha, D., Boothman, D. A., Zhao, D., Bachoo, R. M., Pieper, R. O., & Habib, A. A. (2009). The Receptor Interacting Protein 1 Inhibits p53 Induction through NF-κB Activation and Confers a Worse Prognosis in Glioblastoma. *Cancer Research*, *69*(7), 2809-2816. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4079

Park, W., Wei, S., Kim, B.-S., Kim, B., Bae, S.-J., Chae, Y. C., Ryu, D., & Ha, K.-T. (2023). Diversity and complexity of cell death: a historical review. *Experimental & molecular medicine*, *55*(8), 1573-1594. https://doi.org/10.1038/s12276-023-01078-x

Pasparakis, M., & Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, *517*(7534), 311-320. https://doi.org/10.1038/nature14191

Prescott, J. D., & Zeiger, M. A. (2015). The *RET* oncogene in papillary thyroid carcinoma. *Cancer*, *121*(13), 2137-2146. https://doi.org/10.1002/cncr.29044

Prete, A., Borges de Souza, P., Censi, S., Muzza, M., Nucci, N., & Sponziello, M. (2020). Update on Fundamental Mechanisms of Thyroid Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00102

Preti, A., & Wilson, D. R. (2011). Schizophrenia, Cancer and Obstetric Complications in an Evolutionary Perspective-An Empirically Based Hypothesis. *Psychiatry Investigation*, *8*(2), 77. https://doi.org/10.4306/pi.2011.8.2.77

Rebaï, M., research, A. R.-G., & 2016, undefined. (2016). Molecular genetics of thyroid cancer. *cambridge.orgM Rebaï, A RebaïGenetics research, 2016•cambridge.org*. https://doi.org/10.1017/S0016672316000057

Ribeiro, F. R., Meireles, A. M., Rocha, A. S., & Teixeira, M. R. (2008). Conventional and molecular cytogenetics of human non-medullary thyroid carcinoma: characterization of eight cell line models and review of the literature on clinical samples. *BMC Cancer*, *8*(1), 371. https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-371

Rodrigues, R., Duarte, D., & Vale, N. (2022a). Drug Repurposing in Cancer Therapy: Influence of Patient's Genetic Background in Breast Cancer Treatment.

International Journal of Molecular Sciences, *23*(8), 4280. https://doi.org/10.3390/ijms23084280

Rodrigues, R., Duarte, D., & Vale, N. (2022b). Drug Repurposing in Cancer Therapy: Influence of Patient's Genetic Background in Breast Cancer Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(8). https://doi.org/10.3390/IJMS23084280,

Roufayel, R., Younes, K., Al-Sabi, A., & Murshid, N. (2022). BH3-Only Proteins Noxa and Puma Are Key Regulators of Induced Apoptosis. *Life*, *12*(2), 256. https://doi.org/10.3390/life12020256

Sarkar, C., Chakroborty, D., Chowdhury, U. R., Dasgupta, P. S., & Basu, S. (2008). Dopamine Increases the Efficacy of Anticancer Drugs in Breast and Colon Cancer Preclinical Models. *Clinical Cancer Research*, *14*(8), 2502-2510. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1778

Sauler, M., Bazan, I. S., & Lee, P. J. (2019). Cell Death in the Lung: The Apoptosis-Necroptosis Axis. *Annual review of physiology*, *81*, 375-402. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114320

Shen, J., Ma, B., Zhang, X., Sun, X., Han, J., Wang, Y., Chu, L., Xu, H., & Yang, Y. (2017a). Thioridazine has potent antitumor effects on lung cancer stem-like cells. *Oncology Letters*, *13*(3), 1563-1568. https://doi.org/10.3892/ol.2017.5651

Shen, J., Ma, B., Zhang, X., Sun, X., Han, J., Wang, Y., Chu, L., Xu, H., & Yang, Y. (2017b). Thioridazine has potent antitumor effects on lung cancer stem-like cells. *Oncology Letters*, *13*(3), 1563-1568. https://doi.org/10.3892/ol.2017.5651

Shi, D., Wang, H., Ding, M., Yang, M., Li, C., Yang, W., & Chen, L. (2019). MicroRNA-26a-5p inhibits proliferation, invasion and metastasis by repressing the expression of Wnt5a in papillary thyroid carcinoma . *OncoTargets and Therapy*, *Volume 12*, 6605-6616. https://doi.org/10.2147/OTT.S205994

Siegel, R. L., Giaquinto, A. N., & Jemal, A. (2024). Cancer statistics, 2024. *CA: a cancer journal for clinicians*, *74*(1), 12-49. https://doi.org/10.3322/caac.21820

Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *73*(1), 17-48. https://doi.org/10.3322/caac.21763

Song, Y., Li, L., Chen, J., Chen, H., Cui, B., Feng, Y., Zhang, P., Zhang, Q., Xia, Y., & Luo, M. (2020). Thioridazine hydrochloride: an antipsychotic agent that inhibits tumor growth and lung metastasis in triple-negative breast cancer via inducing G0/G1 arrest and apoptosis. *Cell Cycle*, *19*(24), 3521-3533. https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1850969

Speir, M., Djajawi, T. M., Conos, S. A., Tye, H., & Lawlor, K. E. (2021). Targeting RIP Kinases in Chronic Inflammatory Disease. *Biomolecules*, *11*(5), 646. https://doi.org/10.3390/BIOM11050646

Spengler, G., Csonka, Á., Molnár, J., & Amaral, L. (2016). The Anticancer Activity of the Old Neuroleptic Phenothiazine-type Drug Thioridazine. *Anticancer Research*, *36*(11), 5701-5706. https://doi.org/10.21873/anticanres.11153

Ulukaya, E. 2003. Apoptozis ders notları. Erişim:[http:... - Google Akademik. (t.y.). Geliş tarihi 26 Nisan 2025, gönderen https://scholar.google.com/scholar?hl=tr&as_sdt=0%2C5&q=Ulukaya%2C+E.+2003.+Apoptozis+ders+notlar%C4%B1.+Eri%C5%9Fim%3A%5Bhttp%3A%2F%2

Fbiyokimya.uludag.+edu.+tr%2F+apoptozis+dersnotu.+%28Eri%C5%9Fim+tarihi%2C+2007%29.&btnG=

Ulukaya, E., Acilan, C., & Yilmaz, Y. (2011). Apoptosis: why and how does it occur in biology? *Wiley Online Library*, *29*(6), 468-480. https://doi.org/10.1002/CBF.1774

Van Loo, G., Demol, H., van Gurp, M., Hoorelbeke, B., Schotte, P., Beyaert, R., Zhivotovsky, B., Gevaert, K., Declercq, W., Vandekerckhove, J., & Vandenabeele, P. (2002). A matrix-assisted laser desorption ionization post-source decay (MALDI-PSD) analysis of proteins released from isolated liver mitochondria treated with recombinant truncated Bid. *Cell Death & Differentiation*, *9*(3), 301-308. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400966

Vanderlaag, K., Su, Y., Frankel, A. E., Burghardt, R. C., Barhoumi, R., Chadalapaka, G., Jutooru, I., & Safe, S. (2010). 1,1-Bis(3'-indolyl)-1-(p-substituted phenyl)methanes induce autophagic cell death in estrogen receptor negative breast cancer. *BMC Cancer*, *10*. https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-669,

Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, *1*(3), 1112-1116. https://doi.org/10.1038/NPROT.2006.179,

Vlachos, N., Lampros, M., Voulgaris, S., & Alexiou, G. A. (2021). Repurposing Antipsychotics for Cancer Treatment. *Biomedicines*, *9*(12), 1785. https://doi.org/10.3390/biomedicines9121785

Wang, C., & Youle, R. J. (2009). The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annual Review of Genetics*, *43*(1), 95-118. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134850

Wang, Z., Wu, P., Shi, J., Ji, X., He, L., Dong, W., Wang, Z., Zhang, H., & Sun, W. (2022). A novel necroptosis-related gene signature associated with immune landscape for predicting the prognosis of papillary thyroid cancer. *Frontiers in Genetics*, *13*. https://doi.org/10.3389/fgene.2022.947216

Wootten, J. C., Wiener, J. C., Blanchette, P. S., & Anderson, K. K. (2022). Cancer incidence and stage at diagnosis among people with psychotic disorders: Systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiology*, *80*, 102233. https://doi.org/10.1016/j.canep.2022.102233

Wu, Z., Huang, X., Cai, M., Huang, P., & Guan, Z. (2022). Novel necroptosis-related gene signature for predicting the prognosis of pancreatic adenocarcinoma. *Aging*, *14*(2), 869-891. https://doi.org/10.18632/aging.203846

Xia, Y., Sun, M., Huang, H., & Jin, W.-L. (2024). Drug repurposing for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *9*(1), 92. https://doi.org/10.1038/s41392-024-01808-1

Xie, Z., Li, X., He, Y., Wu, S., Wang, S., Sun, J., He, Y., Lun, Y., & Zhang, J. (2020). Immune Cell Confrontation in the Papillary Thyroid Carcinoma Microenvironment. *Frontiers in Endocrinology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fendo.2020.570604

Xing, M. (2013). Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nature Reviews Cancer*, *13*(3), 184-199. https://doi.org/10.1038/NRC3431,

Yang, W., Tao, K., Wang, Y., Huang, Y., Duan, C., Wang, T., Li, C., Zhang, P., Yin, Y., Gao, J., & Li, R. (2022). Necrosulfonamide ameliorates intestinal inflammation via inhibiting GSDMD-medicated pyroptosis and MLKL-mediated necroptosis. *Biochemical Pharmacology*, *206*. https://doi.org/10.1016/J.BCP.2022.115338,

Yang, Y., Hu, L., Zheng, H., Mao, C., Hu, W., Xiong, K., Wang, F., & Liu, C. (2013). Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacologica Sinica*, *34*(5), 625-635. https://doi.org/10.1038/aps.2013.5

Yong, M., Yu, T., Tian, S., Liu, S., Xu, J., Hu, J., & Hu, L. (2017). DR2 blocker thioridazine: A promising drug for ovarian cancer therapy. *Oncology Letters*. https://doi.org/10.3892/ol.2017.7184

Zaballos, M. A., & Santisteban, P. (2017). Key signaling pathways in thyroid cancer. *The Journal of endocrinology*, *235*(2), R43-R61. https://doi.org/10.1530/JOE-17-0266

Zhang, C., Gong, P., Liu, P., Zhou, N., Zhou, Y., & Wang, Y. (2017). Thioridazine elicits potent antitumor effects in colorectal cancer stem cells. *Oncology Reports*, *37*(2), 1168-1174. https://doi.org/10.3892/or.2016.5313

Zhao, J., Wen, J., Wang, S., Yao, J., Liao, L., & Dong, J. (2020). Association between adipokines and thyroid carcinoma: A meta-analysis of case-control studies. *BMC Cancer*, *20*(1). https://doi.org/10.1186/S12885-020-07299-X,

Zhou, X., Jiang, W., Liu, Z., Liu, S., & Liang, X. (2017). Virus Infection and Death Receptor-Mediated Apoptosis. *Viruses*, *9*(11), 316. https://doi.org/10.3390/v9110316

Zou, M., Baitei, E. Y., Alzahrani, A. S., Binhumaid, F. S., Alkhafaji, D., Al-Rijjal, R. A., Meyer, B. F., & Shi, Y. (2014). Concomitant RAS, RET/PTC, or BRAF mutations in advanced stage of papillary thyroid carcinoma. *Thyroid*, *24*(8), 1256-1266. https://doi.org/10.1089/THY.2013.0610,