KALKON KOMPLEKSİNİN HİSTON DEASETİLAZ İNHİBİTÖRÜ İLE KOMBİNASYONUNUN TİROİD KANSERİNDE ANTİKANSER ETKİ VE MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Halime Sena EKMEKCİ

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALKON KOMPLEKSİNİN HİSTON DEASETİLAZ İNHİBİTÖRÜ İLE KOMBİNASYONUNUN TİROİD KANSERİNDE ANTİKANSER ETKİ VE MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Halime Sena EKMEKCİ
0000-0001-9439-428X

Prof. Dr. Ferda ARI
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2025
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KALKON KOMPLEKSİNİN HİSTON DEASETİLAZ İNHİBİTÖRÜ İLE KOMBİNASYONUNUN TİROİD KANSERİNDE ANTİKANSER ETKİ VE MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Halime Sena EKMEKCİ

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ferda ARI

Papiller Tiroid Karsinomu (PTK), tiroid kaynaklı malignitelerin en yaygın formudur ve bazı alt tiplerinin agresif seyretmesi, mevcut tedavi yöntemlerini yetersiz kılabilmektedir. Bu nedenle nüks eden ve metastatik PTK vakaları için yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Kalkonlar, flavonoid ailesine ait olup çeşitli yapısal modifikasyonlarla geniş bir biyolojik aktivite yelpazesi gösteren ve antikanser potansiyele sahip bileşiklerdir. Valproik asit (VPA), bir antikonvülsan olarak kullanılmakla birlikte, histon deasetilaz inhibitör aktivitesi sayesinde çeşitli moleküler yolları etkileyerek antitümör etkiler sergilemektedir. Bu tez çalışmasında, 3-(3-metoksi-4-hidroksifenil)-1-(benzofuran-2-il)-2-propen-1-on kalkon kompleksi ile VPA kombinasyonunun, insan papiller tiroid kanseri hücre hattı TPC-1 üzerindeki sitotoksik etkileri ve bu etkilerin altında yatan moleküler mekanizmalar araştırılmıştır. Bu doğrultuda, kombinasyon tedavisinin hücre canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla Sulforhodamine B testi, hücre migrasyonu üzerindeki etkilerini belirlemek üzere yara iyileşme ve transwell analizleri yapılmıştır. Hücre ölüm modunu incelemek amacıyla Anneksin V/Propidyum İyodür floresan boyama yöntemi; ayrıca Z-VAD-FMK, N-Asetil Sistein ve Nekrostatin-1 inhibitörleri kullanılmıştır. Kombine tedavinin hücrede reaktif oksijen türü (ROS) üretimi üzerindeki etkisini değerlendirmek için dihidroetidyum boyaması yapılmıştır. Son olarak hücre ölüm mekanizmalarının protein düzeyinde incelenmesi için Western blot analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, kalkon kompleksi ve VPA kombinasyonunun TPC-1 hücrelerinde sitotoksisiteyi artırdığı, metastatik potansiyeli baskıladığı, koloni oluşumunu azalttığı, ROS üretimini tetiklediği ve apoptozu indüklediğini göstermiştir. Bu bulgular, kombine tedavinin ROS aracılı endoplazmik retikulum stresine yol açtığını ve bu durumun Reseptörle etkileşen serin/treonin protein kinaz 1 aracılı dışsal apoptoz yolunu aktive ederek hücre ölümüne neden olduğunu ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, kalkon kompleksi ile VPA kombinasyonu PTK tedavisinde etkili bir terapötik yaklaşım potansiyeli sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kalkon, Valproik Asit, Tiroid Kanseri, Epigenetik, Sitotoksisite
2025, xviii + 70 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE ANTICANCER EFFECTS AND MECHANİSMS OF THE COMBINATION OF THE CHALCONE COMPLEX WITH THE HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR IN THYROID CANCER

Halime Sena EKMEKCİ

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

Supervisor: Prof. Dr. Ferda ARI

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common form of thyroid-derived malignancies, and the aggressive behavior of certain subtypes can render current treatment strategies insufficient. Therefore, there is a need for novel therapeutic approaches for recurrent and metastatic PTC cases. Chalcones, belonging to the flavonoid family, are compounds with anticancer potential that exhibit a wide range of biological activities through various structural modifications. Valproic acid (VPA), although used as an anticonvulsant, exhibits antitumor effects by affecting various molecular pathways through its Histone deacetylase inhibitory activity. In this thesis study, the cytotoxic effects of the combination of the chalcone complex 3-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propen-1-one and VPA on the human papillary thyroid cancer cell line TPC-1, as well as the molecular mechanisms underlying these effects, were investigated. In this context, the Sulforhodamine B assay was performed to evaluate the effect of the combination treatment on cell viability, and wound healing and transwell assays were conducted to assess its impact on cell migration. To investigate the mode of cell death, the Annexin V/Propidium Iodide fluorescent staining method was used; in addition, the inhibitors Z-VAD-FMK, N-acetyl-L-cysteine and Necrostatin-1 were employed. Dihydroethidium staining was performed to assess the effect of the combination treatment on intracellular reactive oxygen species (ROS) production. Finally, western blot analysis was carried out to investigate cell death mechanisms at the protein level. The obtained data demonstrated that the combination of the chalcone complex and VPA increased cytotoxicity, suppressed metastatic potential, reduced colony formation, triggered ROS production, and induced apoptosis in TPC-1 cells. These findings indicate that the combined treatment leads to ROS-mediated endoplasmic reticulum stress, which in turn induces cell death by activating the Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 mediated extrinsic apoptotic pathway. In conclusion, the combination of the chalcone complex and VPA offers the potential of an effective therapeutic approach for the treatment of PTC.

Key words: Chalcone, Valproic Acid, Thyroid Cancer, Epigenetics, Cytotoxicity
2025, xviii + 70 pages.

TEŞEKKÜR

İlim öğrenmeye ve bilim yapmaya talip oldum. Bu talebimi güzellikle karşılayan, bizlere huzurlu bir şekilde çalışma imkânı sunan ve yüksek lisans sürecim boyunca her türlü desteği veren danışmanın Prof. Dr. Ferda Arı'ya çok teşekkür ediyorum.

Diğer bir teşekkürüm elbette Bursa Uludağ Moleküler Kanser Araştırma Laboratuvarı (BUMKAL) ailesine… Başta, böylesine zorlu bir yolda beni hiç yalnız bırakmayan, tecrübesinden ve bilgisinden ziyadesiyle faydalandığım Dr. Oğuzhan Akgün'e, tez çalışmamda birlikte yola çıktığım Dr. Gonca Tuna'ya, her durumda yanımda olduklarını bildiğim Dr. Sibel Çınar Asa'ya, Halime Akgün'e ve kıymetli BUMKAL üyelerine,

Sevgileri ve destekleriyle her zaman benimle olan, birlikte üzülüp birlikte sevindiğim dostlarım Ayşen Sağnak ve İpek Aydın'a,

Tez çalışmamda kullandığım kimyasalın sentezini ve teminini sağlayan Doç. Dr. Demet Coşkun'a,

Küçüklüğümden itibaren biyoloji ve bilim sevgisini bana aşılayan, her koşulda varlığını hissettiren canım babama, desteğini ve fedakarlıklarını buralara sığdıramayacağım, hayatımın her yönündeki danışmanım sevgili anneme, canımdan çok sevdiğim, benim güçlü kalmamı sağlayan biricik kardeşime çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim sürecinde Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na 2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında sağladığı destek için teşekkür ederim.

Tez çalışmamı, FYL-2024-1705 numaralı proje ile destekleyen Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Halime Sena EKMEKCİ
18/08/2025

İçindekiler Tablosu

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 Epidemiyolojisi....5
2.2.2.Tiroid Kanseri Etiyolojisi....6
2.2.3. Tiroid Kanseri Sınıflandırması....7
2.2.4. Tiroid Kanserinin Genetik Özellikleri 7
2.2.5. Tiroid Kanserinde Değişen Sinyal Yolakları 9
2.3. Hücre Ölüm Mekanizmaları....10
2.3.1. Nekroz....11
2.3.2. Nekroptoz....11
2.3.3. Apoptoz....13
2.3.3.1. İçsel Yolak 14
2.3.3.2. Dışsal Yolak....14
2.4. Epigenetik 16
2.4.1. DNA Metilasyonu 17
2.4.2. Kromatin Modifikasyonları....18
2.5. Epigenetik İlaçlar 19
2.5.1. VPA….....21
2.6. Kalkonlar....22
2.7. Kombine Tedavi....22
2.8. Tez Çalışmasında Kullanılan Kalkon Kompleksinin Yapısı 23
3. MATERYAL ve YÖNTEM....24
3.1. Materyal 24
3.2. Yöntem....26
3.2.1. Hücrelerin Kültürde Çoğaltılması ve Kullanılması....26
3.2.2. Kullanılan Kimyasalların Hazırlığı....27
3.2.3. SRB (Sulforhodamine B) Canlılık Analizi 28
3.2.3. Migrasyon Analizleri 29
3.2.3.1. Yara İyileşme Analizi 29
3.2.3.2. Transwell Analizi “Boyden Chamber” 29
3.2.4. Koloni Oluşumu Analizi 30
3.2.5. Floresan Boyama....30
3.2.5.1. Hoechst 33342/Anneksin/PI Boyama 30
3.2.5.2. DHE (Dihidroetidyum) Boyama....32
3.2.6. İnhibitör Uygulamaları....32
3.2.6.1. Z-VAD FMK Uygulaması 32
3.2.6.2. N-Asetil Sistein (NAC) Uygulaması....33
3.2.6.3. Nekrostatin-1 (Nec-1) Uygulaması....33
3.2.7. Western Blot Analizi....33
3.2.8. İstatistiksel Analiz....36
4. BULGULAR....37

4.1. TPC-1 Hücrelerin Kültürde Çoğaltılması 37
4.2. SRB Analizi Bulguları 37
4.3. Migrasyon Analizleri Bulguları 39
4.3.1. Kombine Tedavinin Hücre Göçü Üzerindeki Etkisine İlişkin Yara İyileşme Analizi Bulguları……..... 39
4.3.2. Kombine Tedavinin Hücre Göçü Üzerindeki Etkisine İlişkin Transwell Analizi Bulguları……..... 41
4.4. Koloni Analizi Bulguları..... 42
4.5. Floresan Boyama Bulguları..... 43
4.5.1. Hücre Ölüm Modunun Belirlenmesine Yönelik Hoechst/Anneksin/PI Bulguları 43
4.5.2. ROS Tespitine Yönelik DHE Boyama Bulguları..... 45
4.6. İnhibitör Bulguları..... 46
4.6.1. Z-VAD FMK Bulguları..... 46
4.6.2. NAC Bulguları 47
4.6.3. Nec-1 Bulguları..... 48
4.7. Western Blot Bulguları 49
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 52
KAYNAKLAR 61
ÖZGEÇMİŞ.. 71

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
cm^2	Santimetrekare
°C	Santigrat derece
ml	Mililitre
dk	Dakika
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µg/ml	Mikrogram/militre
w/v	Ağırlık/Hacim (weight/volume)
M_A	Mol kütlesi

Kısaltmalar	Açıklama
ATK	Anaplastik Tiroid Karsinomu
BSA	Bovin Serum Albümini
CYLD	Cylindromatosis
DD	Ölüm Domaini (Death Domain)
DHE	Dihidroetidyum
DISC	Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi (Death-Inducing Signaling Complex
dk	Dakika
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium F12
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNMTi	DNA Metiltransferaz inhibitörleri
ER	Endoplazmik Retikulum
ERK	Hücre Dışı Sinyal İle Düzenlenen Kinaz
FasL	Fas ligandı
FBS	Fetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum)
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration
FTK	Foliküler Tiroid Karsinomu
GABA	Gama aminobütirik asit
HAT	Histon Asetiltransferaz
HDAC	Histon Deasetilaz
HDACi	HDAC inhibitörleri
IC_{50}	Yarı Maksimal İnhibitör Konsantrasyonu (Half Maximal Inhibitory Concentration)
IFN	İnterferon
IKK	IκB kinaz
LPS	Lipopolisakkarit
LUBAC	Doğrusal Ubikuitin Zinciri Montaj Kompleksi (Linear ubiquitin chain assembly complex)
MAPK	Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz

MTK	Medüller Tiroid Karsinomu
NAC	N-Asetil Sistein
Nec-1	Nekrostatin-1
PBS	Fosfat tuz tamponu (Phosphate Buffered Saline)
PI	Propidyum İyodür
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PS	Fosfatidilserin
PTK	Papiller Tiroid Karsinomu
RIPK1	Reseptörle etkileşen serin/treonin protein kinaz 1
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
Rpm	Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions Per Minute)
SD	Standart Sapma
SRB	Sulforhodamine B
TCA	Trikloro asetik asit
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TNFR1	Tümör Nekroz Faktörü Reseptör 1
TNFR1-SC	TNFR1 sinyal kompleksi
TLR3	Toll-benzeri reseptör 3
TLR4	Toll-benzeri reseptör 4
TPC-1	İnsan Papiller Tiroid Karsinoma Hücre Soyu
TRAF2	TNFR ile ilişkili faktör 2
TRAF5	TNFR ile ilişkili faktör 5
TRAIL	Tümör nekroz faktörü ilişkili apoptoz indükleyici ligand
VPA	Valproik Asit
ZBP1	Z-DNA Bağlayıcı Protein 1

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	Kanserin 14 temel ayırt edici özelliği (Hanahan 2022'den değiştirilerek alınmıştır)	5
Şekil 2.2.	Tiroid hücrelerinin büyüme ve proliferasyonunu düzenleyen MAPK ve PI3K/AKT yolları (Nylén 2020'den değiştirilerek alınmıştır)	10
Şekil 2.3.	Nekroptozun moleküler mekanizması (Yuan ve Ofengeim 2023'den değiştirilerek alınmıştır)	13
Şekil 2.4.	Dışsal ve İçsel Apoptoz Yolakları (Eskander 2025'den değiştirilerek alınmıştır)	16
Şekil 2.5.	Gen transkripsiyonel aktivitesi, HAT'lar tarafından gerçekleştirilen asetilasyon ve HDAC'lar tarafından gerçekleştirilen deasetilasyon süreçleriyle düzenlenir. HAT, Histon Asetiltransferaz. HDAC, Histon Deasetilaz. (Şekil, Hai ve ark., 2021'den değiştirilerek alınmıştır)	19
Şekil 2.6.	VPA'nın kimyasal yapısı (Adewole ve ark., 2023)	22
Şekil 2.7.	"3-(3-metoksi-4-hidroksifenil)-1-(benzofuran-2-il)-2-propen-1-on" yapısı (Coşkun & Ahmedzade, 2008)	23
Şekil 3.1.	TPC-1 hücreleri mikroskop görüntüleri (Cytion Biosciences, 2025)	26
Şekil 4.1.	TPC-1 hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri (10x)	36
Şekil 4.2.	TPC-1 hücrelerinde 8–0,25 mM konsantrasyon aralığında uygulanan VPA muamelesinden 48 saat sonra gerçekleştirilen SRB analizi yüzde (%) canlılık grafiği. Veriler, ortalama ± standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir (n = 3). Aynı zaman dilimi içerisinde farklı dozların kontrol grubuna göre karşılaştırılması sonucunda elde edilen istatistiksel anlamlılık düzeyleri şu şekilde belirtilmiştir: **p<0,01; ***p<0,001. VPA, Valproik Asit.	38
Şekil 4.3.	TPC-1 hücre soyunda kalkon kompleksinin 50-0,78 µM doz aralığı ile 500 µM VPA'nın kombine şekilde uygulanmasından 48 saat sonra gerçekleştirilen SRB analizi yüzde (%) canlılık grafiği. Veriler, ortalama ± SD olarak ifade edilmiştir (n = 3). Kalkon kompleksi+VPA'nın; VPA'ya göre anlamlılık düzeyleri ***p<0,001; kalkon kompleksinin tek başlarına etkilerine göre anlamlılık düzeyleri ###p<0,000 olarak gösterilmiştir. VPA, Valproik Asit.	38
Şekil 4.4.	TPC-1 hücrelerinde kalkon kompleksinin 1,56 µM dozu ile VPA 500 µM kombinasyonunun yara iyileşmesi analizi ile değerlendirilmesi. (A) 12 saat aralıklar (0-12-24-36h) ile kaydedilen mikroskop görüntüleri (4x). (B) Yara iyileşmesi yüzde canlılık grafiği. Kalkon kompleksi+VPA, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında ***p<0,001 istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. VPA, Valproik Asit.	40
Şekil 4.5.	TPC-1 hücrelerinde kalkon kompleksinin 1,56 µM dozu ile VPA 500 µM kombinasyonunun transwell analizi ile	41

değerlendirilmesi. Göç eden TPC-1 hücrelerinin (A) mikroskop görüntüleri (20X). (B) Göç eden hücre oranı % grafiği. Kalkon kompleksi+VPA, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında ***p<0,001 istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. VPA, Valproik Asit.

Şekil 4.6. TPC-1 hücrelerinde, kalkon kompleksi (3,12 µM) ve VPA (500 µM) kombinasyonunun koloni oluşturma yeteneği üzerindeki etkileri. (A) Kuyu (9.6 cm2) ve 10x mikroskop görüntüleri. (B) Koloni sayısının yüzde (%) grafiği. (**p< 0,01; ***p<0,001). VPA, Valproik Asit. 42

Şekil 4.7. Kalkon kompleksinin 6,25 ve 12,5 µM dozları ile 500 µM VPA kombine tedavisine maruz bırakılan TPC-1 hücrelerinin Hoechst 33342 ve Anneksin V/PI boyama sonrasında elde edilen floresan mikroskop görüntüleri (20x). VPA, Valproik Asit. 44

Şekil 4.8. NAC varlığı (NAC+) ve NAC yokluğunda (NAC-), kalkon kompleksi 6,25 ve 12,5 µM dozları ile 500 µM VPA kombine tedavisine maruz bırakılan TPC-1 hücrelerinin DHE ve Hoechst 33342 ile boyanmasının ardından elde edilen floresan mikroskop görüntüleri (20x). VPA, Valproik Asit. 45

Şekil 4.9. TPC-1 hücrelerine genel kaspaz inhibitörü 10 µM Z-VAD-FMK ile 24 saatlik ön muamelenin ardından, kalkon kompleksinin 6,25 µM ve 12,5 µM dozları ile 500 µM VPA'nın 48 saat süreyle uygulanması sonucu elde edilen SRB analizi % canlılık grafiği. Veriler, ortalama ± SD olarak ifade edilmiştir (n = 3). Z-VAD uygulanmayan gruplar (zvad–) ile Z-VAD uygulanan gruplar (zvad+) arasındaki karşılaştırmalar sonucunda elde edilen istatistiksel anlamlılık düzeyleri şu şekilde sunulmuştur: **p<0,01; ***p<0,001. VPA, Valproik Asit. 46

Şekil 4.10. TPC-1 hücrelerine, 10 mM NAC ile 3 saatlik ön muamelenin ardından, 6,25 µM ve 12,5 µM dozlarında kalkon kompleksi ile 500 µM VPA'nın 48 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen SRB analizine ait hücre canlılık yüzdeleri (%). Veriler, ortalama ± SD olarak ifade edilmiştir (n = 3). NAC uygulanmayan (NAC–) ve uygulanan (NAC+) gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık düzeyleri şu şekilde sunulmuştur: ***p<0,001. VPA, Valproik Asit. 47

Şekil 4.11. TPC-1 hücrelerine, 50 µM Nec-1 ile 24 saatlik ön muamelenin ardından, 6,25 µM ve 12,5 µM dozlarında kalkon kompleksi ile 500 µM VPA'nın 48 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen SRB analizine ait hücre canlılık yüzdeleri (%). Veriler, ortalama ± SD olarak ifade edilmiştir (n = 3). Nec-1 uygulanmayan (Nec–) ve uygulanan (Nec+) gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık düzeyleri şu şekilde sunulmuştur: ***p<0,001. VPA, Valproik Asit. 48

Şekil 4.12. TPC-1 hücrelerinde NAC varlığında (NAC+) ve yokluğunda (NAC-), 12,5 µM kalkon kompleksi ve 500 µM VPA 50

kombinasyonunun hedef proteinlerin ekspresyon düzeylerine etkisinin incelenmesi. Referans (housekeeping) protein olarak β-aktin kullanılmıştır. VPA, Valproik Asit.

Şekil 5.1. Kalkon kompleksi ile VPA kombinasyonunun TPC-1 hücreleri üzerinde etki ettiği moleküler mekanizmalar. Şekil, BioRender kullanılarak hazırlanmıştır. VPA, Valproik Asit. 58

ÇİZELGELER DİZİNİ

			Sayfa
Çizelge	3.1.	Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Malzemeler	24
Çizelge	3.2.	Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Malzemeler (devam)	25
Çizelge	3.3.	Tez Çalışmasında Kullanılan Kitler	25
Çizelge	3.4.	Tez Çalışmasında Kullanılan Sarf Malzemeler	25
Çizelge	3.5.	Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar	26

1. GİRİŞ

Tiroid karsinomu en yaygın endokrin malignitelerinden biridir (Huang ve ark., 2021). 2022 yılında dünya genelinde bildirilen 821.000'den fazla yeni vakayla tiroid kanseri, genel insidans açısından yedinci, kadınlarda ise beşinci en yaygın kanser türü olarak sınıflandırılmıştır (Bray ve ark., 2024). Tiroid kanserinin etiyolojisi, dış radyasyona maruz kalma, iyot eksikliği olan bölgelerde yaşama, ailede tiroid kanseri öyküsünün olması gibi faktörleri içerir (Rodríguez-Rodero ve ark., 2017). Tiroid karsinomu, histopatolojik özelliklerine göre Papiller Tiroid Karsinomu (PTK), Foliküler Tiroid Karsinomu (FTK), Anaplastik Tiroid Karsinomu (ATK) ve Medüller Tiroid Karsinomu (MTK) olmak üzere dört tipe ayrılmaktadır. PTK, FTK ve ATK, foliküler hücrelerin malign transformasyonundan kaynaklanırken, MTK kalsitonin üreten parafoliküler C hücrelerinden türetilir. Tiroid karsinomlarının %80-85'ini PTK'lar oluşturmaktadır (Veschi ve ark., 2020). Tüm tiroid kanserlerinin büyük bir kısmını temsil eden PTK'nın gelişimi, genetik değişiklikler, büyüme faktörleri ve radyasyon dahil olmak üzere çeşitli faktörler ile ilişkilidir. Bu türün prognozu; yaş, tümör boyutu, lenf nodu invazyonu, uzak metastaz ve histolojik varyantlar gibi klinik değişkenlerle güçlü bir şekilde ilişkilidir (Gonzalez-Gonzalez ve ark., 2011). PTK'da prognoz genellikle iyi seyretmekle birlikte, bazı tümörlerin agresif olarak mevcut olması, bunların ameliyat veya radyasyon ile tedavi edilmesini zorlaştırabilmektedir. Bu tümörlerin geleneksel tedavilere direncinin altında yatan mekanizmalar ve faktörler tam olarak anlaşılamamıştır. Tekrarlayan ve metastatik karakter gösteren PTK tedavisi için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (Cha ve ark., 2016).

Epigenetik etkiler, genetik mutasyondan farklı olarak, genomik dizide kalıcı değişiklikler olmaksızın gen ifadesinin değiştirilmesini ifade eder (Lu ve ark., 2020). Hücre büyüme ve farklılaşma yollarını düzenleme yeteneği nedeniyle, mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama, kanserin ayırt edici özelliği olarak eklenmiştir (Hanahan, 2022). Kanser hücresinde gerçekleşen epigenetik değişiklikler, kontrolsüz büyüme, ölüme karşı direnç, komşu dokulara invazyon, diğer organlara yayılma gibi kanser hücrelerine spesifik bir fenotip kazandırabilmektedir. Epigenetik mekanizmanın bozulması, küresel epigenetik işaretlerin kaybına, büyümeyle ilişkili genlerin aktivasyonuna ve hücre döngüsü kontrol genlerinin ve DNA onarım genlerinin susturulmasına yol açarak tümör

oluşumunu başlatabilmekte ve yayabilmektedir (Costa ve ark., 2023). Epigenetik değişimlerin hedef alınması, kanser tedavileri için umut verici yaklaşımlar sağlayabilir. Epi-ilaçlar adı verilen epigenomu hedef alan ilaçlar 40 yılı aşkın süredir geliştirilmektedir. Şimdiye kadar kanser tedavilerine yönelik klinik çalışmalarda test edilmiş ve bir dereceye kadar olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Lu ve ark., 2020). Epi-ilaçlardan Histon Deasetilaz (HDAC) inhibitörleri (HDACi), tümör baskılayıcı genlerin yeniden aktivasyonu yoluyla kanserlerdeki histonların ve histon olmayan proteinlerin anormal asetilasyon durumunu düzeltebilir (Suraweera ve ark., 2018). Bir yağ asidi türevi olan Valproik Asit (VPA), epileptik nöbetler ve bipolar bozuklukta görülen manik atakların tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta olup, aynı zamanda kanser hücreleri üzerinde HDACi olarak gösterdiği etkilerle de dikkat çekmektedir (Safdar & Ismail, 2023; Singh ve ark., 2021). Bununla birlikte, HDACi'lerin tek başlarına kullanımlarındaki antikanser etki sınırlıdır. HDACi'ler, özellikle diğer anti-kanser ilaçlar ve/veya radyoterapi ile kombine edilerek uygulandığında çok daha umut verici sonuçlar ortaya çıkmaktadır (Eckschlager ve ark., 2017).

Kalkon, pek çok bitkide bulunan basit bir kimyasal iskeledir. Flavonoid ailesine ait olan ve flavonoidlerin biyosentezinde ara maddeler olarak görev alan kalkonlar, yapısal heterojenlik sergiler ve çeşitli ilaç hedeflerine göre hareket edebilirler (Ouyang ve ark., 2021). Kalkonların farklı moleküler hedeflere bağlanabilme ve çeşitli biyomoleküllerle etkileşime girebilme yeteneklerini artırmak amacıyla, yapısal modifikasyonlar yoluyla aril, halojen, hidroksil, karboksil ve fenil gibi çeşitli fonksiyonel gruplar eklenerek geniş bir biyolojik aktivite spektrumu elde edilmektedir (Gomes ve ark., 2017). Kalkon ailesi, hücre döngüsü bozulması, otofaji regülasyonu, apoptoz indüksiyonu ve immünomodülatör ve inflamatuar mediatörler dahil olmak üzere çoklu mekanizmalar yoluyla kansere karşı *in vitro* ve *in vivo* aktiviteler göstermiştir. Ayrıca, kalkon komplekslerinin diğer tedavi edici ajanlar ile kombine şekilde uygulanmasının antikanser aktiviteyi arttırması beklenmektedir (Ouyang ve ark., 2021).

Bu tez çalışması kapsamında, PTK tedavisinde yeni bir potansiyel kombine tedavi yaklaşımı araştırılmıştır. Bu amaçla, bir kalkon kompleksi olan 1-(1-benzofuran-2-il)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)prop-2-en-1-on ile VPA kombinasyonunun, insan papiller

tiroid kanseri hücre hattı TPC-1 üzerindeki sitotoksik etkileri ve bu etkinin altında yatan olası moleküler mekanizmalar incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

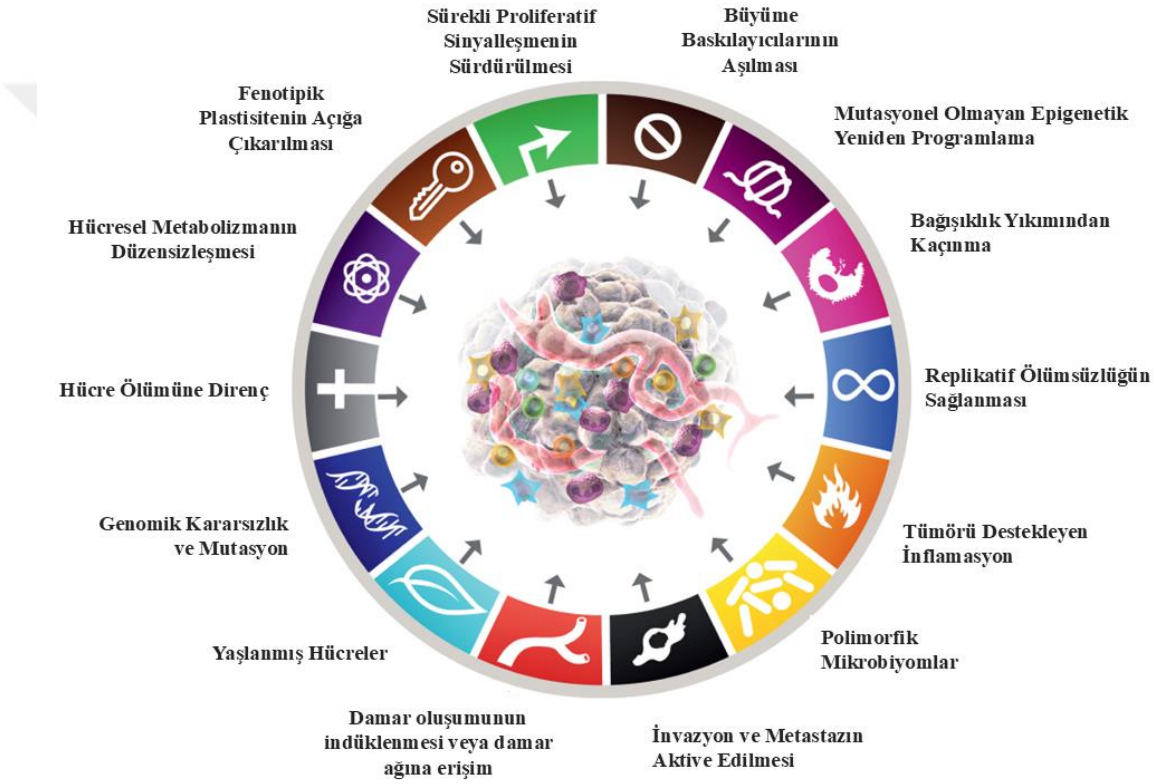
2.1 Kanser

Kanser, dünya genelinde yaygın görülen bir hastalık olmasına rağmen, moleküler patolojisi oldukça karmaşıktır ve kontrolü zorlaştıran geniş bir biyolojik saldırganlık yelpazesi gösterir; bu nedenle yaşamı tehdit eden ciddi bir hastalık olarak kabul edilir. Kanserle ilgili etiyolojik çalışmaların raporları, kansere neden olan etkenlerin heterojen olabileceğini desteklemektedir. Bu etkenler, genetik mutasyonlardan (örneğin, somatik mutasyonlar, kalıtsal mutasyonlar, kaçınılmaz DNA replikasyon hataları), epimutasyonlardan (onkogenlerin hipometilasyonu, tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyon yoluyla susturulması, kromatin yeniden düzenlenmesi), viral enfeksiyonlardan (Hepatit B/C, İnsan Papilloma Virüsü), aflatoksin B maruziyetine kadar çok çeşitli biyolojik ve çevresel faktörlere dayanabilir. Bununla birlikte, dışsal risk faktörleri ve yaşam tarzı da belirli kanser türlerinin erken başlamasına zemin hazırlayabilir (Diori Karidio & Sanlier, 2021).

Kanser, karsinogenez olarak da bilinen bir süreç aracılığıyla genler ve organizmanın çevresi arasındaki etkileşimleri içeren çok adımlı ve çok faktörlü moleküler olaylar sonucunda meydana gelir. Bu süreç kontrolsüz hücre proliferasyonuna ve homeostatik dengesizliğe yol açar. Kansere neden olan modifikasyonlar, hücre metabolizmasını ve davranışlarını kademeli olarak değiştirir. Bu değişiklikler, hücrelerin çoğalma kontrolünü bozarak onlara sınırsız bir yaşam süresi kazandırır, komşu hücrelerle olan iletişimlerini değiştirir ve bağışıklık sisteminden kaçmalarına olanak tanır (Hong, 2018; Puneet ve ark., 2018).

Çok hücreli organizmalarda farklılaşma süreci, yaygın bir hücresel çeşitlilik oluştursa da hücreler, hücre çoğalmasını ve ölümünü düzenleyen temel süreçleri ortak mekanizmalarla yürütür. Ancak kanser hücreleri, çok hücreli bir organizmadaki homeostaz için gerekli olan hücre içi düzenlemelere uymamaktadır. Bunun sonucunda, kanser hücreleri uyum sağlamaya, çevredeki dokuları istila ederek çoğalmaya ve bağışıklık sistemine karşı koymaya çalışır. Hanahan ve Weinberg, kanser hücrelerinde yaygın olarak görülen hücresel değişikliklerin karmaşıklığını görselleştirerek, bunları kanserin ayırt edici özellikleri olarak tanımlamıştır (Diori Karidio & Sanlier, 2021; Hanahan & Weinberg,

2011). İlk olarak kanserin ayırt edici özellikleri 2000 yılında tümörlerin malign başlangıç ve ilerleme sürecinde edindikleri altı temel işlevsel özellik olarak tanımlanmıştır. Bu model, 2011 ve 2022 yıllarında yapılan güncellemelerle genişletilmiş, kanser hücrelerinin bu işlevleri kazanmasını sağlayan ek temel özellikler ve tanımlayıcı faktörler eklenerek tümör biyolojisinin daha kapsamlı anlaşılmasına katkı sağlamıştır (Alcolea ve ark., 2024). 2022 yılında Hanahan ve Weinberg tarafından güncellenen kanserin ayırt edici özellikleri Şekil.2.1'de verilmiştir (Hanahan, 2022).



Şekil 2.1. Kanserin 14 temel ayırt edici özelliği (Hanahan 2022'den değiştirilerek alınmıştır)

2.2 Tiroid Kanseri

2.2.1. Tiroid Kanseri Epidemiyolojisi

Tiroid karsinomu en yaygın endokrin malignitelerinden biridir (Huang ve ark., 2021). 2022 yılında dünya genelinde bildirilen 821.000'den fazla yeni vakayla tiroid kanseri, genel insidans açısından yedinci, kadınlarda ise beşinci en yaygın kanser türü olarak

sınıflandırılmıştır. Kadınlardaki insidans oranı, erkeklere kıyasla üç kat daha yüksektir. Hastalığa bağlı ölüm oranı ise insidansa göre oldukça düşüktür. 2022 yılında her iki cinsiyet için tahmini olarak toplam 44.000 ölüm meydana gelmiş olup tiroid kanseri bu yönüyle kanser kaynaklı ölümler arasında 24. sırada yerini almıştır. Her iki cinsiyette de en yüksek tiroid kanseri insidans oranları Doğu Asya'da görülmektedir; bu bölgedeki oran, ikinci sırada yer alan Kuzey Amerika'dakinin yaklaşık iki katıdır (Bray ve ark., 2024).

2.2.2.Tiroid Kanseri Etiyolojisi

Tiroid kanserinin etiyolojisi, dış radyasyona maruz kalma, iyot eksikliği olan bölgelerde yaşama, ailede tiroid kanseri öyküsünün olması gibi faktörleri içerir. Ancak bu süreçte yer alan mekanizmalar halen tam olarak anlaşılamamıştır (Rodríguez-Rodero ve ark., 2017).

Tiroid kanseri kadınlarda daha sık görüldüğü için, cinsiyet olası bir risk faktörü olarak öne sürülmüştür. Ancak, iki cinsiyet arasındaki insidans farkı, hasta yaşı ilerledikçe azalmaktadır. Bazı çalışmalar, Asya ırkının tiroid kanseri açısından daha yüksek risk taşıdığını da ileri sürmektedir. Tiroid kanserine bağlı mortalite oldukça düşük olduğundan, bu kanser türünün etiyolojisi, diğer organlarda gelişen kanserlere kıyasla daha az araştırılmıştır. Bununla birlikte tiroid kanserinin en önemli ve en iyi belgelenmiş sebebi radyasyona maruziyettir. İyonlaştırıcı radyasyona çevresel maruziyet, hem PTK hem de FTK alt türleri için iyi bilinen bir risk faktörüdür, ancak FTK gelişme riski, PTK'ye kıyasla çok daha düşüktür. Öte yandan, MTK alt türü ile iyonlaştırıcı radyasyon maruziyeti arasında herhangi bir ilişki bulunmamaktadır.

Bebeklik ya da çocukluk döneminde baş ve boyun bölgesindeki iyi huylu hastalıkların tedavisi amacıyla uygulanan radyoterapinin ilerleyen yıllarda tiroid kanseri riskini artırdığı görülmüştür. Bu kişilerde, maruziyetten yalnızca 5 yıl sonra bile kanser teşhisi konulabilmektedir. Nükleer serpinti sonucu meydana gelen radyasyon maruziyeti de özellikle çocuklar arasında tiroid kanseri riski ile yüksek oranda ilişkilendirilmiştir. Yetersiz iyot alımı ise FTK için önemli bir risk faktörüdür. Obezite, diyabet, üreme faktörleri, sigara kullanımı, alkol tüketimi ve diyetle alınan nitratlar gibi çeşitli etmenler

de PTK için potansiyel risk faktörleri olarak tanımlanmıştır. Ancak, bu etmenlerle hastalık arasındaki ilişki henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Szymańska & Bosman, 2019).

2.2.3. Tiroid Kanseri Sınıflandırması

Tiroid karsinomu, histopatolojik özelliklerine göre PTK, FTK, ATK ve MTK olmak üzere dört tipe ayrılmaktadır. PTK, FTK ve ATK, foliküler hücrelerin malign transformasyonundan kaynaklanırken, MTK kalsitonin üreten parafoliküler C hücrelerinden türetilir. Tiroid karsinomlarının %80-85'ini PTK'lar oluştururken %10-15'ini FTK'lar oluşturmaktadır. ATK ise, agresif bir fenotip ve zayıf prognoz ile karakterize edilen nadir ve farklılaşmamış tiroid karsinom tipidir (Veschi ve ark., 2020).

2.2.4. Tiroid Kanserinin Genetik Özellikleri

Tiroid kanserinde noktasal mutasyonlar ve kromozomal yeniden düzenlenmeler (füzyon genleri) olmak üzere başlıca iki moleküler mekanizma rol oynamaktadır. Noktasal mutasyonlarda tek bir nükleotid değişime uğrar. Kromozomal yeniden düzenlenmelerde ise iki farklı gen birleşerek tek bir füzyon geni oluşturur. Bu genetik değişimlerin çoğu kalıtsal değil, doğrudan tiroid dokusunda meydana gelen somatik mutasyonlardır. Kalıtsal germline mutasyonlar, ailesel MTK ve multipl endokrin neoplazi sendromları gibi durumlara özgüdür. Günümüzde, BRAF, RAS, TERT, RET, TP53'teki noktasal mutasyonlar ile RET/PTC, PAX8/PPAR-γ, NTRK füzyon genleri, tiroid kanserinin bilinen başlıca genetik nedenleri arasında yer almaktadır (Prete ve ark., 2020; Wu ve ark., 2014).

BRAF geni, hücre içi bir kinazı kodlayan bir proto-onkogen olup, hücresel proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi temel süreçlerin düzenlenmesinde rol oynayan Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz (MAPK) sinyal yolağında görev almaktadır. Bu genin 15. ekzonunda valin yerine glutamat amino asidinin geçtiği noktasal mutasyon (BRAF V600E), BRAF proteininin sürekli olarak aktifleşmesine neden olmaktadır (Pekova ve ark., 2019; Prete ve ark., 2020). Bu mutasyon, tiroid fonksiyonu için önemli olan genlerin ekspresyon düzeylerindeki azalma ile ilişkilendirilmiştir (Song ve ark., 2018; Xing ve ark., 2013). PTK tümörlerinin yaklaşık %50'sinde ve ATK'ların %23'ünde tek bir

nükleotid mutasyonu mevcutken FTK'larda ve iyi huylu tiroid nodüllerinde mevcut değildir. BRAF V600E mutasyonu ile daha kötü klinik seyir, daha sık nüks, tümörün agresif karakterde olması, tiroid dışına yayılım ve hem lokal hem de uzak lenf nodu metastazları arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (Xing ve ark., 2015). BRAF mutasyonu; anjiyogenez, hücre dışı matris değişikliği ve tümör invazyonunu desteklemesindeki rolleri nedeniyle, PTK ve ATK tümörlerinin agresif fenotipi için spesifik bir belirteç gibi görünmektedir (Rodríguez-Rodero ve ark., 2017).

RAS genleri, hücre zarındaki tirozin kinaz reseptöründen çekirdeğe kadar MAPK veya Fosfatidilinositol 3-Kinaz (PI3K)-AKT yolu aracılığıyla sinyal ileten bir grup proteini kodlar ve bu nedenle hücre büyümesi ve farklılaşmasında önemli roller oynamaktadırlar. Bu genlerde meydana gelen bir nokta mutasyonu, bir proto-onkogeni bir onkogene dönüştürebilir ve bunun sonucunda hücrecel proliferasyon teşvik edilebilir. HRAS, KRAS ve NRAS genlerinde en sık tespit edilen mutasyonlar, hem benign hem de malign tiroid tümörlerinde görülebilir (Hlozek ve ark., 2022; Liu ve ark., 2011). RAS mutasyonlarının görülme oranı; PTK'ların yaklaşık %20'sinde, FTK'ların %40–50'sinde ve ATK'ların %20–40'ında bildirilmiştir (Prete ve ark., 2020; Xing, 2016). RAS mutasyonları, BRAF mutasyonundan sonra, tiroid biyopsilerinde en sık tespit edilen genetik değişikliktir. Tiroid biyopsilerinde bu mutasyonların malignite ile ilişkili riski, HRAS için %70,7, NRAS için %63,4 ve KRAS için %33 olarak rapor edilmiştir (Cohen ve ark., 2019).

RET/PTC kromozomal yeniden düzenlenmesi, çocuklar ve ergenlerde en sık görülen tiroid kanseri mutasyonudur (Pekova ve ark., 2019). Bu füzyon geni, daha çok klasik PTK varyantı ile ilişkilidir ve genellikle daha agresif tümör davranışı ile birlikte sık metastatik yayılım göstermektedir. Özellikle radyasyon maruziyeti sonrasında gelişen karsinom vakalarında RET/PTC füzyonlarına rastlandığı bildirilmiştir (Vlček ve ark., 2017; Zitzelsberger ve ark., 2010).

PAX8/PPAR-γ, 2. ve 3. kromozomlar arasında gerçekleşen bir kromozomal yeniden düzenlenme sonucu oluşan bir füzyon genidir. PAX8 geni, tiroglobulin, tiroid peroksidaz ve sodyum iyodür simporteri gibi proteinlerin üretilmesinin düzenlenmesinde görevli bir transkripsiyon faktörüdür (Prete ve ark., 2020). PPAR-γ ise lipid metabolizması, hücre

farklılaşması, büyüme inhibisyonu ve apoptoz süreçlerinde rol oynar (Asya ve ark., 2022). Bu füzyon, PTK olgularının %1–5'inde ve FTK'ların %60'ına kadarında bildirilmiştir (Mitsiades & Fagin, 2010).

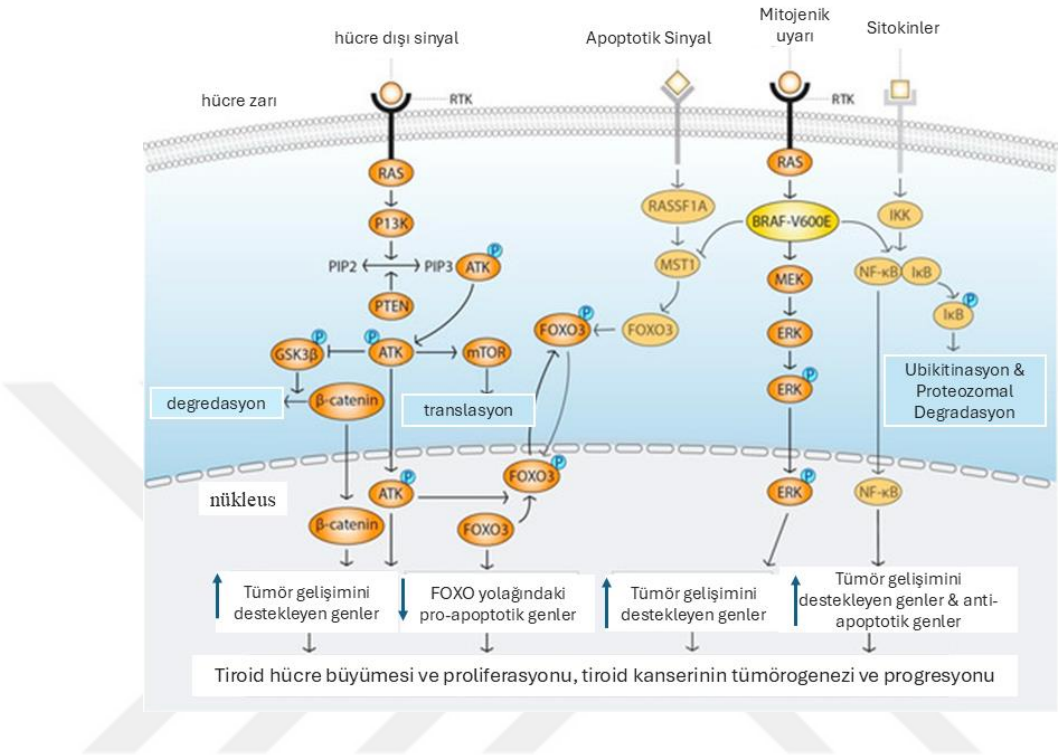
2.2.5. Tiroid Kanserinde Değişen Sinyal Yolakları

Kanser Genom Atlası çalışması kapsamında tanımlanan mutasyonlar, çoğunlukla tiroid hücrelerinin büyüme ve proliferasyonunu düzenleyen iki temel sinyal yolunu etkilemektedir: MAPK ve PI3K/AKT yolları (Şekil 2.2) (Giordano, 2016). Bu sinyal yollarına bağlı kinazlarda ve transkripsiyon faktörlerinde gözlenen genetik ve epigenetik düzensizlikler, bu yolların sürekli aktivasyonuna sebep olarak tiroid kanserinin başlangıcını ve ilerlemesini tetiklemektedir (Nylén ve ark., 2020).

MAPK sinyal yolakları, hücre büyümesi ve proliferasyonu için kritik öneme sahiptir. Bu sinyal iletim kaskadı, hücre yüzeyinde bir büyüme faktörünün tirozin kinaz reseptörüne bağlanmasıyla başlar. Bu durum, Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz Kinaz ya da diğer adıyla MEK ve onun ardından gelen hücre dışı sinyal ile düzenlenen kinazın (ERK) fosforilasyonu ve aktivasyonuyla sonuçlanır. ERK'nın fosforilasyonu, hücre döngüsüne girişte rol oynayan genleri aktive eden transkripsiyon faktörlerini etkinleştirir ve hücre döngüsünü engelleyen düzenleyicilerin baskılanmasına neden olur (Braicu ve ark., 2019). Tiroid kanserinde MAPK yolu, BRAF ve RAS mutasyonları, RET–PTC füzyonları ve bazı durumlarda yeni keşfedilen ALK mutasyonları gibi aktive edici genetik değişiklikler tarafından tetiklenmektedir (Murugan & Xing, 2011). MAPK aracılı tiroid tümör oluşumu, genom çapında hipermetilasyon ve hipometilasyon gibi bu yolun onkojenik aktivitesini sinerjize eden ve güçlendiren çok çeşitli ikincil moleküler değişiklikleri de içermektedir (Xing, 2013).

PI3K/AKT sinyal yolu, apoptoz, hücre proliferasyonu, hücre döngüsü ilerlemesi, anjiyogenez, hücre iskeleti bütünlüğü ve enerji metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Nylén ve ark., 2020). Bu yol, aktive edici RAS nokta mutasyonları ile yönlendirilebilir. PTEN tümör baskılayıcı geninde meydana gelen inaktive edici mutasyonlar veya delesyonlar, PI3K/AKT yolunu aktive edebilmektedir. PIK3CA genindeki aktive edici mutasyonlar, FTK ve ATK'da yaygındır (Şekil 2.2). Bu yolağa

dahil olan proteinlerin aşırı ekspresyonu, sıklıkla agresif tiroid kanserlerinde gözlemlenmektedir (Younis, 2017).



Şekil 2.2. Tiroid hücrelerinin büyüme ve proliferasyonunu düzenleyen MAPK ve PI3K/AKT yolları (Nylén 2020'den değiştirilerek alınmıştır)

2.3. Hücre Ölüm Mekanizmaları

Hücre ölümü, hücre fonksiyonunun durması ve nihayetinde hücre ölümü ile sonuçlanan biyolojik bir süreçtir. Ana işlevi, işlevsel olmayan, hasarlı ve zararlı hücreleri ortadan kaldırarak doku homeostazını korumaktır. Hücre ölümü, doku oluşumu, bakımı ve onarımında yer alan doğal bir süreç olmasına rağmen, yaralanma, hastalık veya hasara yanıt olarak da tetiklenebilir ve patolojik hücre ölümüne yol açabilir (Park ve ark., 2023).

Hücre ölümü iki şekilde gerçekleşir; programlanmış hücre ölümü, farklı sinyallere yanıt olarak büyüme, bakım ve vücudun fizyolojik istikrarını sağlamak amacıyla planlanan ve organize edilen bir süreçtir. Diğer bir yol ise, genellikle ani bir yaralanma veya travma sonucu meydana gelen, programlanmamış veya kazara gerçekleşen hücre ölümü olan nekrozdur. Programlanmış hücre ölümü; apoptoz, otofaji, mitofaji, nekroptoz, piroptoz ve ferroptoz olarak sınıflandırılır (Eskander ve ark., 2025).

2.3.1. Nekroz

Hücresel nekroz veya nekrotik hücre ölümü, çeşitli hücre ölümü süreçlerini kapsayan geniş bir kavramdır. Bu süreçlerin ortak noktası, plazma membran bütünlüğünün kaybı ve ardından sitoplazmik içeriğin hücre dışına sızmasıdır (Christofferson & Yuan, 2010). Nekroz, bazen hücre bütünlüğünün bozulmasına yol açan aşırı hasarın bir sonucu olarak meydana gelebilir. Örneğin, yüksek sıcaklığa maruz kalma, donma-çözülme döngüleri veya mekanik stres gibi durumlar hücresel yapının bütünlüğünü bozarak nekrotik hücre ölümüne neden olabilir. Bu tür vakalarda hücre ölümü pasif bir süreç olup, belirli bir sinyal yolunun aktivasyonunu gerektirmez. Bununla birlikte, nekrotik morfoloji (plazma membranının yırtılması), apoptotik veya otofajik hücre ölümü programlarının ileri evrelerinde de gözlemlenebilir. Sekonder nekroz olarak adlandırılan bu durum, ölü hücrelerin fagositoz yoluyla sistemden temizlenemediğinde meydana gelir. Bu süreç, başlangıçta tetiklenen (apoptotik veya otofajik) sinyaller dışında başka herhangi bir sinyal olayından bağımsızdır. Ayrıca, nekrotik hücre ölümü her zaman tesadüfi veya pasif bir süreç değildir; aynı zamanda yönlendirilmiş bir sinyal kaskadının sonucu da olabilir (Green & Llambi, 2015).

2.3.2. Nekroptoz

2000'li yılların ortalarından itibaren yapılan çalışmalar, memelilerin ve daha yüksek omurgalıların genomlarında kodlanan RIPK1 (RIP1), RIPK3 ve MLKL'nin, nekroptoz olarak bilinen programlı bir nekrotik hücre ölümü yolunu yönettiğini ortaya koymuştur (Yuan & Ofengeim, 2023). Nekroptoz, Fas reseptörü, Tümör nekroz faktörü reseptör 1 (TNFR1), İnterferon (IFN) reseptörleri ve Toll benzeri reseptörler gibi ölüm reseptörleri ile ligandların etkileşimi sonucu veya IFN düzenleyici faktörlerin DNA'ya bağımlı aktifleştiricisi, aynı zamanda Z-DNA bağlayıcı protein 1 (ZBP1) olarak da bilinir, gibi DNA'ya duyarlı moleküller aracılığıyla meydana gelir (Pasparakis & Vandenabeele, 2015).

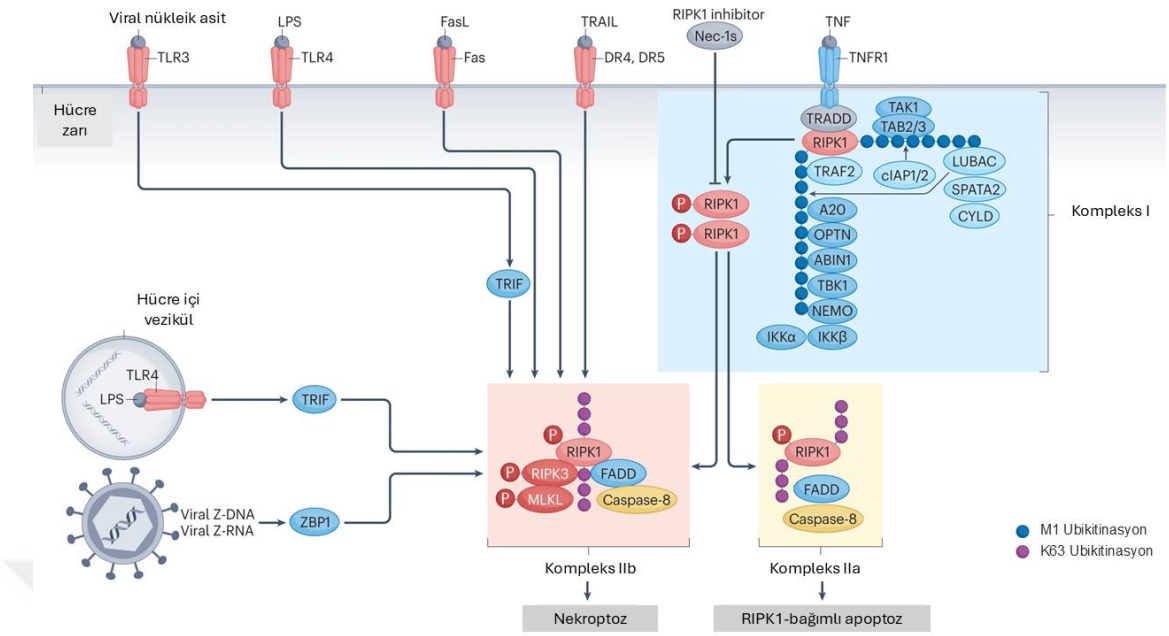
Tümör nekroz faktörü (TNF) tarafından aktive edildiğinde, TNFR1'in sitoplazmik ölüm domaini (DD, Death Domain), Kompleks I olarak adlandırılan geçici bir hücre içi kompleksin oluşumunu sağlar. Bu kompleks; adaptör protein TRADD, DD içeren protein kinaz RIPK1 ve birkaç E3 ubikuitin ligazını içerir. Bunlar arasında TNFR ile ilişkili

faktör 2 (TRAF2), cIAP1, cIAP2, doğrusal ubikuitin zinciri montaj kompleksi (LUBAC), ubikuitin düzenleyici enzim A20 ve deubikuitinasyon enzimi cylindromatosis (CYLD) kompleksi bulunur. Ayrıca, NEMO, ABIN1 ve OPTN gibi birçok ubikuitin bağlayıcı protein de bu komplekste yer alır.

Kompleks I içinde RIPK1, Lys63 bağlı ve lineer Met1 bağlı ubikuitin zincirleri tarafından hızla poliubikuitine edilir. Bu ubikuitin zincirleri, TAK1, TBK1 ve IκB kinaz (IKK) komplekslerinin toplanmasını ve aktivasyonunu düzenler. Canlı hücrelerde RIPK1 kinaz aktive edilmediğinde, IκB'nin fosforilasyonu ve ardından ubikuitin-proteazom sistemi aracılığıyla yıkımı, çekirdekte NF-κB aktivasyonuna yol açar.

Kompleks I'in düzensiz regülasyonu, RIPK1'in aktivasyonunu teşvik eder ve bu da Kompleks IIa veya Kompleks IIb olmak üzere iki alternatif sitoplazmik kompleksin oluşumuna neden olur. Kompleks IIa, FADD adaptör proteini, kaspaz-8 ve RIPK1'i içerir ve kaspaz-8'in aktivasyonunu teşvik eder. Aktive olan kaspaz-8, kaspaz-3 gibi downstream kaspazları keserek apoptozu başlatır. Ancak kaspaz-8'in aktivasyonu inhibe edildiğinde, aktif RIPK1 kinazı, RIPK3'e bağlanarak Kompleks IIb'yi oluşturur. Aktif RIPK3, MLKL'yi fosforile ederek, plazma zarının bütünlüğünü bozmak suretiyle nekroptozun gerçekleşmesini sağlar (Şekil 2.3).

Toll-benzeri reseptör 3 (TLR3) ve Toll-benzeri reseptör 4 (TLR4), sırasıyla viral nükleik asitler ve bakteriyel lipopolisakkaritler (LPS) gibi ligandlarla aktive edildiğinde ve kaspaz fonksiyonundan yoksun hücrelerde, IFN-β üreten ve TIR domaini içeren adaptör proteini, RIPK3'e bağlanarak nekroptozu tetikleyebilir. Ayrıca, viral Z-DNA veya Z-RNA tarafından aktive edildiğinde, ZBP1 kendi reseptörle etkileşen protein homotipik etkileşim (RHIM) motifleri aracılığıyla RIPK3'e bağlanarak, kaspaz fonksiyonunun olmadığı durumlarda nekroptozu teşvik edebilir. Buna ek olarak, Tümör nekroz faktörü ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) tarafından DR4 (TRAIL-R1) veya DR5'in (TRAIL-R2), Fas ligandı (FasL) tarafından Fas'ın ve LPS tarafından TLR4'ün aktivasyonu, belirli koşullar altında nekroptozisi teşvik edebilir (Yuan & Ofengeim, 2023).



Şekil 2.3. Nekroptozun moleküler mekanizması (Yuan ve Ofengeim 2023'den değiştirilerek alınmıştır)

2.3.3. Apoptoz

Tip I hücre ölümü olarak bilinen apoptoz süreci, hücrenin aldığı spesifik sinyaller tarafından tetiklenen programlanmış bir hücre intiharıdır. Çeşitli hücre ölümü türleri arasındaki temel ayırt edici faktörlerden biri hücrenin morfolojisidir. Hücre, apoptoz sürecinde küçülme ve kromatin yoğunlaşması geçirir, ardından apoptotik cisimcikler adı verilen küçük partiküller oluşur. Bu cisimler daha sonra makrofajlar gibi bağışıklık hücreleri tarafından yutulur ve ortadan kaldırılır, bu da nekrozda olduğu gibi inflamasyon ya da doku hasarına yol açmaz (Xu ve ark., 2019).

Memeli hücrelerindeki apoptoz, apoptotik tetikleyicilerin hücreler tarafından nasıl algılanıp entegre edildiğine bağlı olarak içsel (intrinsik) ve dışsal (ekstrinsik) apoptoz olmak üzere ikiye ayrılır. Dışsal apoptoz, plazma zarında lokalize olmuş ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile gerçekleşirken, içsel apoptoz ölüm reseptörleri olmaksızın başlatılır (Yuan & Ofengeim, 2023).

2.3.3.1. İçsel Yolak

Mitokondriyal yolak olarak da adlandırılan içsel yolak, oksidatif stres, DNA hasarı ve/veya mitokondriyal hasar gibi hücre içi bozulmalarla aktive edilir. Hücre içi stres, Bax ailesi (Bax, Bak, Bok) ve BH3-only protein ailesi (Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa ve PUMA) gibi pro-apoptotik proteinlerin yanı sıra Bcl-2 ailesi (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1 ve A1) gibi anti-apoptotik proteinler arasındaki dengenin bozulmasına yol açar. Stres faktörlerinin etkisiyle nükleer P53 aktive olur ve sonrasında, anti-apoptotik protein Bcl-xL'ye bağlanarak onun inhibisyonunu sağlayan PUMA'nın ekspresyonunu uyarır. Böylece sitoplazmik p53, pro-apoptotik proteinler olan Bax ve Bak'ı aktive etme yeteneğini korur. Bax ve Bak'ın aktivasyonu, mitokondriyal geçirgenlik geçiş porunun açılmasına neden olur ve bu durum, sitokrom c'nin sitozole geçişini sağlar. Sitokrom c, apoptoz proteaz aktivasyon faktörü-1 (APAF1) ile birlikte apoptozom kompleksini oluşturur; bu kompleks, kaspaz-9'un aktivasyonunu sağlar ve ardından kaspaz-3'ün aktive edilmesiyle intrinsik apoptotik hücre ölümü gerçekleşir (Şekil 2.4). Dikkat çekicidir ki, anti-apoptotik proteinlerin yokluğunda, Bid, Bim ve PUMA gibi aktivatörler doğrudan Bax ve Bak'a bağlanarak onları aktive edebilir. Ayrıca, Bad, Noxa, Bik ve PUMA gibi duyarlılaştırıcılar, Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1'in Bax ve Bak üzerindeki inhibe edici etkilerini baskılayabilir ve böylece bu proteinlerin dolaylı yoldan aktive edilmesini sağlayabilir. Özellikle PUMA, hem bir aktivatör hem de bir duyarlılaştırıcı olarak görev yapabilir (Eskander ve ark., 2025).

2.3.3.2. Dışsal Yolak

Dışsal apoptoz, hücre zarında lokalize olmuş ve hücre içi protein-protein etkileşim bölgesi olan DD içeren ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile düzenlenir. Bu reseptörler arasında Fas, TNFR1, DR4 ve DR5 bulunur ve bunlar, TNFα veya FasL gibi kendi özgül ligandları tarafından aktive edilir. Bu etkileşim, ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşumuna yol açarak başlatıcı kaspazlar olan kaspaz-8 ve kaspaz-10'un aktivasyonunu sağlar. Son aşamada, başlatıcı kaspazlar tarafından kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 gibi efektör kaspazlar aktive edilir. Poli ADP-riboz polimeraz (PARP) parçalanarak dışsal apoptoz yolunun tetiklenmesine neden olur (Şekil 2.4) (Ghobrial ve ark., 2005; Yuan & Ofengeim, 2023).

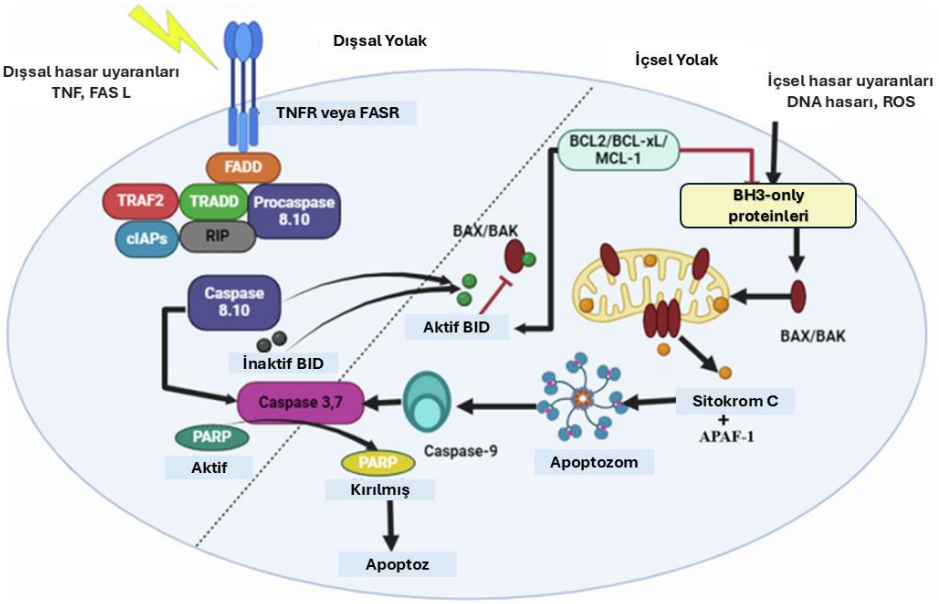
TNFR1'e TNFα'nın bağlanması, RIPK1 ile sitozolik adaptör protein TRADD'nin bir araya gelmesini sağlar. Bu durum TRAF2/5'in bağlanması ve cIAP1 ve cIAP2'nin devreye girmesine yol açar. Bu bileşenler toplu olarak, TNFR1 sinyal kompleksi (TNFR1-SC) olarak da bilinen Kompleksi I'i oluşturur. Oluşan bu kompleks, güçlü bir NFκB aktivasyonu ve hücre hayatta kalımını destekleyen bir sinyal iletimini başlatır.

Dışsal apoptoz yolunda ubikitinasyon, Kompleks I'in hücreyi yaşatmaya yönelik etkisini düzenleyen önemli bir mekanizma olup, Kompleks II aracılığıyla gerçekleşen hücre ölümü için de temel bir kontrol noktasıdır. cIAP1/2; RIPK1 ve kompleks içindeki diğer proteinlerin ubikitinasyonuna aracılık eder ve LUBAC adlı kompleksin bağlanması sağlanır. TNFR1-SC'de cIAP1/2 ve LUBAC'ın yürüttüğü ubikitinasyon, TAK1 ve TAB2/3 kinazlarının IKK kompleksine bağlanmasını ve ardından aktive olmasını sağlar. IKK kompleksi aktive olduğunda, IκBα'yı fosforile ederek NF-κB'nin serbest kalmasını sağlar. NF-κB, çekirdeğe taşınarak hayatta kalma ile ilişkili genlerin ve A20 ile cFLIP gibi negatif düzenleyicilerin transkripsiyonunu başlatır.

Aşırı NFκB sinyalini ve apoptozu önlemek için deubikuitinaz enzim A20, RIPK1'i ubikitinleyerek onun yıkımını sağlamaktadır. Ayrıca A20, LUBAC tarafından oluşturulan M1 poliubikitin zincirlerini güçlendirerek apoptozu baskılayabilir. CYLD, A20'nin prosurvival etkilerine karşı koymak için LUBAC tarafından işe alınır. CYLD, RIPK1'i deubikitine ederek Kompleks I'ten ayrılmasını sağlar. Bu deubikitinasyon süreci, RIPK1'in fonksiyonunu değiştirir ve onun işlevini hücre ölümünü başlatan DISC (diğer adıyla kompleks IIa) oluşumu yoluyla apoptozu başlatmaya doğru dönüştürür.

DISC; TRADD, FADD, kaspaz-8 ve/veya cFLIP alt birimlerinden oluşur. Bu kompleks, FasL veya TRAIL'in kendi özgül reseptörlerine bağlanması sonucu doğrudan ya da TNFR1'in hücre içine alınmasını takiben oluşabilir. Özellikle, ölüm efektör bölgesi içeren FADD proteininin DISC'e katılımı, başlatıcı kaspaz-8 ve cFLIP'in de komplekse dahil edilmesini sağlar. cFLIP, hem apoptozu destekleyen hem de engelleyen çift yönlü etkisiyle dikkat çeken bir DISC bileşenidir. cFLIP izoformları, kaspaz-8 aktivitesini düzenleyerek hücre ölümünü kontrol eder. Uzun izoform (cFLIPL), kaspaz-8'i desteklerken, kısa izoform (cFLIPS) onu baskılar. cFLIP düzeyleri azaldığında kaspaz-8

tam olarak aktive olur ve bu da efektör kaspazların çalışmasını sağlayarak apoptozu başlatır (Koren & Fuchs, 2021).



Şekil 2.4. Dışsal ve İçsel Apoptoz Yolakları (Eskander ve ark., 2025'den değiştirilerek alınmıştır)

2.4. Epigenetik

Epigenetik kavramının ilk tanımı, "genlerin ötesinde" anlamına gelen ve kökeni Antik Yunanca'ya dayanan "Epigenez" terimiyle yapılmış olup, bu terim 1942 yılında biyolog Conrad H. Waddington tarafından ortaya atılmıştır. Günümüzde epigenetik, gen düzenlenmesi, kalıtım ve modern biyoloji ile tıp alanlarındaki anlayışımızı köklü biçimde değiştiren bir bilim dalı haline gelmiştir (Farsetti ve ark., 2023). Epigenetik, genetik mutasyondan farklı olarak genomik dizide kalıcı değişiklikler olmaksızın gen ifadesinin değiştirilmesini ifade eder (Lu ve ark., 2020). Başlıca epigenetik mekanizmalar; DNA metilasyonu, kromatin yapısındaki modifikasyonlar, genomik baskı kaybı ve kodlamayan RNA'lardır (Gibney & Nolan, 2010). Epigenetik modifikasyonların önemli bir özelliği, ana hücre ile yavru hücreler arasında (mitotik kalıtım) ve nesiller arasında (meiotik kalıtım) aktarılabilir olmalarıdır. Epigenetik, aynı DNA dizilimine sahip hücrelerin ve organizmaların nasıl belirgin fenotipik farklılıklar gösterebildiğini açıklayan

mekanizmalardan biridir. Beslenme ve çevresel maruziyetler, epigenetik düzenlemenin düzeyini ve kapsamını potansiyel olarak değiştirebilmektedir (Jirtle & Skinner, 2007).

Mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama, hücre büyüme ve farklılaşma yollarını düzenleme yeteneği nedeniyle, kanserin ayırt edici özelliği olarak eklenmiştir (Hanahan, 2022). Kanser hücresinde gerçekleşen epigenetik değişiklikler, kontrolsüz büyüme, ölüme karşı direnç, komşu dokulara invazyon, diğer organlara yayılma gibi kanser hücrelerine spesifik fenotipler kazandırabilir. Epigenetik mekanizmanın bozulması, küresel epigenetik işaretlerin kaybına, kanser hücrelerinde büyümeyle ilişkili genlerin (onkogenler) aktivasyonuna; hücrelerin kontrolsüz büyümelerinden koruyan genler olarak tanımlanan tümör baskılayıcı genlerin ve DNA onarım genlerinin susturulmasına yol açarak tümör oluşumunu başlatabilmekte ve yayabilmektedir (Costa ve ark., 2023).

2.4.1. DNA Metilasyonu

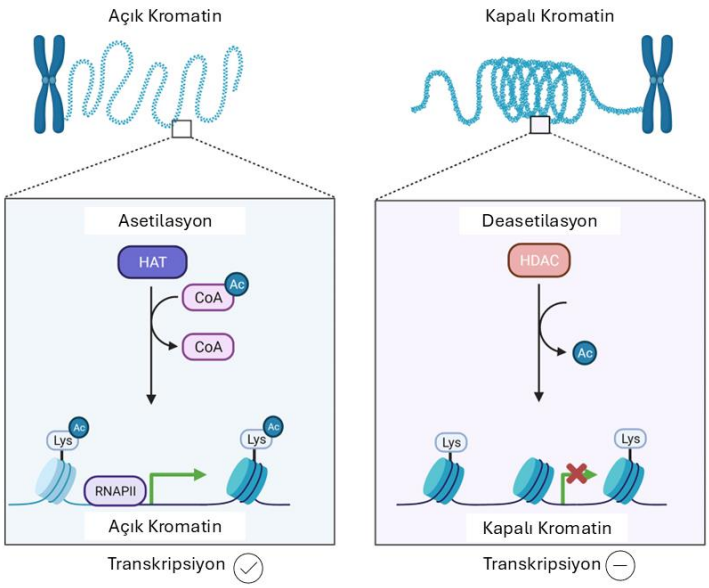
DNA metilasyonu; embriyonik gelişim, X kromozom inaktivasyonu, genomik damgalama (impriting), hücre kimliği oluşumu, epigenetik olarak yeniden programlama gibi süreçlerde temel bir işlev gösterir (Cheng ve ark., 2019). Bu mekanizma ağırlıklı olarak, genlerin promotör bölgelerinde yer alan CpG adalarındaki sitozinlerin 5' pozisyonuna metil gruplarının kovalent bağ ile eklenmesi yoluyla gerçekleşir. Metillenen promotör bölgelerindeki 5' metilsitozin yapısı, transkripsiyon faktörlerinin DNA bağlanma bölgelerine erişmelerini engelleyerek gen susturulmasına yol açabilmektedir. DNA metilasyonu; DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B metiltransferazları tarafından katalize edilmektedir. DNMT1, replikasyon sonrası tercihen yarı metillenmiş DNA'yı metiller ve çoğunlukla metilasyon kalıplarının korunmasından sorumludur. DNMT3A ve DNMT3B ise replikasyondan bağımsız olarak metillenmemiş DNA'yı metilleyerek "de novo" metilasyonu gerçekleştirir (Lu ve ark., 2020).

DNA metilasyonunun gelişim sırasındaki hayati rollerine ek olarak, çoğu kanser hücresi anormal DNA metilasyon kalıpları gösterir. Bu sebeple DNA metilasyon paternlerindeki değişiklikler tümorogenez ile ilişkilendirilmektedir. Bu ilişki, hem genomdaki global hipometilasyonu, hem de promotore özgü hipermetilasyonu içermektedir. Global

hipometilasyonun genomik instabiliteye neden olduğu, genlerin promotor bölgesindeki CpG adalarının hipermetilasyonunun ise gen ekspresyonunun baskılanmasına yol açabileceği bildirilmektedir (Gong ve ark., 2016).

2.4.2. Kromatin Modifikasyonları

Kromatin, DNA ve onun etrafına sarılı olan histon proteinlerinden oluşur; bu histonlar, nükleozom adı verilen DNA/histon kompleksinin dışına uzanan değişken kuyruklara sahip oktamerik yapılardır. Histon kuyruklarını etkileyebilen çeşitli post-translasyonel modifikasyon türleri bulunmaktadır; bunlar arasında metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon ve ubikutinasyon yer almaktadır. Bu modifikasyonlar, DNA onarımında, DNA replikasyonunda ve hatta kromozom organizasyonunda değişikliklere yol açabilmektedir (Esteller, 2008). En iyi çalışılmış histon modifikasyonlarından biri, lizin kalıntısının asetilasyonudur. Genel olarak, histon asetilasyonu transkripsiyonel aktivasyon ile ilişkilendirilirken, deasetilasyon transkripsiyonel baskılama ile bağlantılıdır. Asetilasyon, histon kuyruğundaki pozitif yüklü lizin kalıntısını nötralize ederek histon kuyrukları ile DNA arasındaki bağın gücünü azaltır. Bu durum, DNA/histon kompleksinin açılarak transkripsiyon faktörlerinin erişimine uygun hale gelmesine olanak tanır (Şekil 2.5) (Gibney & Nolan, 2010; Hai ve ark., 2021). Histonların metilasyonu ise transkripsiyonu hem olumlu hem de olumsuz yönde etkileyebilir. Ayrıca, DNA metilasyonu ile histon modifikasyonları arasında iş birliği de söz konusu olabilmektedir (Hamilton, 2010). Histon modifikasyonları, antagonist aktiviteye sahip farklı enzim grupları arasındaki denge ile gerçekleşmektedir. Örneğin, histon asetilasyonu, histon asetiltransferazlar (HAT) tarafından katalize edilir; histonların deasetilasyonu ise histon deasetilazlar (HDAC) tarafından gerçekleştirilmektedir. Anormal HAT ve HDAC aktivitesi kanser gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Rodríguez-Rodero ve., 2017).



Şekil 2.5. Gen transkripsiyonel aktivitesi, HAT'lar tarafından gerçekleştirilen asetilasyon ve HDAC'lar tarafından gerçekleştirilen deasetilasyon süreçleriyle düzenlenir. HAT, Histon Asetiltransferaz. HDAC, Histon Deasetilaz. (Şekil, Hai ve ark., 2021'den değiştirilerek alınmıştır)

2.5. Epigenetik İlaçlar

Epigenetik tedavilerde, nükleotid diziliminde herhangi bir değişiklik gerçekleşmeksizin gen ekspresyonunda değişiklikler tetiklenebilir (Vogelstein ve ark., 2013). Kanserde rol oynayan epigenetik mekanizmaların tanımlanmasıyla birlikte yeni ilaçlar ve tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. Epigenetik mekanizmalar, histon asetilasyonu ve DNA metilasyon paternlerinde meydana gelen değişiklikleri tersine çevirebilmekte ya da mikroRNA düzeylerinde hedeflenen değişiklikleri indükleyebilmektedir (Ghasemi, 2019). Epigenetik ilaçlar, tümör baskılayıcı genlerin yeniden aktif hale getirilmesinden sorumludur. Bu sayede normal hücre fonksiyonlarının geri kazanılması mümkün olabilmektedir. Bu ilaçlar, tek başlarına ya da sinerjistik etkiler oluşturacak şekilde kombinasyon halinde kullanılabilirler (Vijayaraghavalu ve ark., 2013).

Günümüzde, epigenetik ilaçlar çeşitli klinik aşamalardan geçmektedir. Özellikle, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ile Avrupa İlaç Ajansı (EMA), HDACi ve DNA metiltransferaz inhibitörleri (DNMTi) gibi bazı ilaçların kullanımını onaylamıştır (Nervi ve ark., 2015).

DNMTi'ler, tümör baskılayıcı genlerin DNA hipermetilasyonunu tersine çevirerek gen ekspresyonunu yeniden düzenleme potansiyeline sahip güçlü antikanser ajanlardır. DNMTi'ler nükleotitlere etkilerine göre sitozin analoğu inhibitörler ve nükleotid analoğu olmayan inhibitörler olmak üzere iki ana sınıfa ayrılırlar. Genel olarak sitozin analogları, DNA veya RNA zincirine entegre olarak sitozin bazının 5. karbon pozisyonundaki karbon atomunu azot ile değiştirir; bu değişiklik, DNA metilasyonunun bozulmasına ve DNMT enzimlerinin yıkımının tetiklenmesine neden olur. Bu grupta yer alan başlıca bileşikler arasında 5-aza-sitozin (azasitidin), 5-aza-2′-deoksisitidin (desitabin), zebularin, SGI-110, fazarabin ve pseudositozin bulunmaktadır (Lu ve ark., 2020). Azasitidin ve desitabin, sitozin analoğu inhibitörler sınıfında yer almakta olup, hematolojik malignitelerin tedavisinde etkinlikleri kanıtlanmış ve FDA tarafından özellikle miyelodisplastik sendrom ve akut miyeloid lösemi tedavisi için onaylanmıştır (Kantarjian ve ark., 2006; Silverman ve ark., 2002).

HDACi'ler, kanserlerde histonlar ve histon dışı proteinlerdeki anormal asetilasyon durumunu düzeltme yeteneğine sahip olup, tümör baskılayıcı genlerin yeniden aktive edilmesini sağlar. Ayrıca kanser hücrelerinin HDAC inhibitörleri ile indüklenen apoptoza karşı daha yüksek düzeyde duyarlılık göstermesi, bu bileşikleri kanser tedavisinde umut vadeden terapötik ajanlar haline getirmiştir. Yapısal özelliklerine göre HDAC inhibitörleri dört ana grupta sınıflandırılmaktadır: hidroksamik asitler, siklik peptitler, alifatik yağ asitleri ve benzamidler.

Hidroksamik asit grubu HDAC inhibitörleri, HDAC enzimlerinin katalitik bölgelerinde yer alan çinko atomuna bağlanabilen hidroksamik asit yapısı içerir. Bu bağlanma, HDAC enzimlerinin aktivitesini inhibe ederek epigenetik düzenlemeyi modüle eder. Bu gruptaki ajanların, hematolojik malignitelerin yanı sıra çeşitli solid tümörlerin tedavisinde de etkili olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Günümüzde FDA tarafından onaylanmış üç temel hidroksamik asit türevi HDACi bulunmaktadır (Lu ve ark., 2020):

- Vorinostat (SAHA): Kutanöz T-hücreli lenfoma tedavisinde kullanılmaktadır (Mann ve ark., 2007),

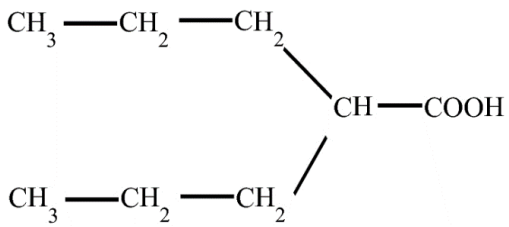
- Belinostat (PXD101): Periferik T-hücreli lenfomaların tedavisinde onaylanmıştır (McDermott & Jimeno, 2014),

- Panobinostat (LBH-589): Multipl miyelom tedavisinde kullanılmaktadır (Richardson ve ark., 2015).

2.5.1. VPA

Bir yağ asidi türevi olan VPA, epileptik nöbetlerin ve bipolar bozuklukta maninin tedavisi için kullanılan antikonvülsan bir ilaçtır (Safdar & Ismail, 2023). VPA insan beyninde, Gama aminobütirik asit (GABA) degredasyonunun inhibisyonu, GABA sentezinin artması ve GABA döngüsünün azalması dahil olmak üzere çeşitli yollar ile nörotransmitter GABA fonksiyonunun aktivitesini etkilemektedir (Duenas-Gonzalez ve ark., 2008). Ayrıca VPA, alifatik yağ asidi grubu HDACi'lere örnek teşkil eder ve özellikle sınıf I/II HDAC'ları hedef alır (Milutinovic ve ark., 2007). Son yıllarda yapılan çalışmalar, VPA'nın çeşitli solid tümörler üzerinde doğrudan ya da sinerjik şekilde antitümör etkiler gösterebildiğini ortaya koymuştur (Iannelli ve ark., 2020; Makarević ve ark., 2019). Örneğin, mide kanseri hücrelerinde VPA, HDAC1/PTEN/Akt sinyal yolu aracılığıyla proliferasyonu baskılamış ve otofajiyi indüklemiştir (Sun ve ark., 2020). Meme kanserinde, VPA'nın inhibitör rolü esas olarak Hsp70 asetilasyonu yoluyla hücresel proliferasyon, hücre döngüsü ve apoptozise yansımıştır (Mawatari ve ark., 2015).

VPA çoğu kanser türünde, kemoterapi, radyoterapi ve diğer tedavilerle birlikte yardımcı (adjuvan) bir ajan olarak değerlendirilmektedir. Örneğin, akciğer kanseri modellerinde VPA ile arsenik trioksit kombinasyonu, hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamlarda hücre ölümünü belirgin düzeyde artırmıştır (Li ve ark., 2019).



Şekil 2.6. VPA'nın kimyasal yapısı (Adewole ve ark., 2023)

2.6. Kalkonlar

Kalkon, pek çok bitkide bulunan basit bir kimyasal iskeledir. Flavonoid ailesine ait olan ve flavonoidlerin biyosentezinde ara maddeler olarak görev alan kalkonlar, yapısal heterojenlik sergiler ve çeşitli ilaç hedeflerine göre hareket edebilirler (Ouyang ve ark., 2021). Kalkonların farklı moleküler hedeflere bağlanabilme ve çeşitli biyomoleküllerle etkileşime girebilme yeteneklerini artırmak amacıyla, yapısal modifikasyonlar yoluyla aril, halojen, hidroksil, karboksil ve fenil gibi çeşitli fonksiyonel gruplar eklenerek geniş bir biyolojik aktivite spektrumu elde edilmektedir (Gomes ve ark., 2017). Bu nedenle, kalkonlar yeni antikanser ajanlarının geliştirilmesi için yararlı şablonlardır. Kalkon üyeleri, antikanser, anti-enflamatuar, antidiyabetik, antioksidan, antimikrobiyal ve antimalaryal gibi biyolojik faaliyetleri nedeniyle büyük ilgi görmektedirler. Kalkon ailesi, hücre döngüsü bozulması, otofaji regülasyonu, apoptoz indüksiyonu ve immünomodülatör ve inflamatuar mediatörler dahil olmak üzere çoklu mekanizmalar yoluyla kansere karşı *in vitro* ve *in vivo* aktiviteler göstermiştir (Ouyang ve ark., 2021). Yapılan pek çok çalışma, kalkonların çok sayıda kinaz, mikrotübül, politerapi dirençli proteinler, hücre yaşamı ve ölümü ile ilişkili çeşitli sinyal yolakları üzerindeki hedefli aktivitelerini göstermiştir (Takac ve ark., 2020). Kalkonlar MDM2/p53, tubulin, NF-κB, ABCG2/P-GP/BCRP, VEGF, VEGFR-2 kinaz ve MMP-2/9 gibi çoklu hücresel molekülleri hedefleyebilmiştir. Ayrıca, kalkon komplekslerinin diğer tedavi edici ajanlar ile kombine şekilde uygulanmasının antikanser aktiviteyi arttırması beklenmektedir (Ouyang ve ark., 2021).

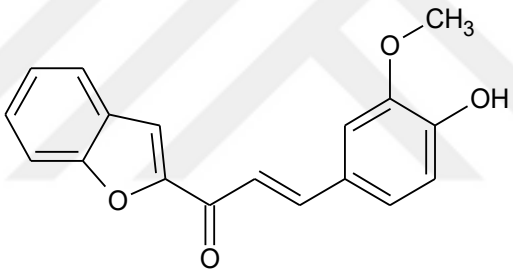
2.7. Kombine Tedavi

Malign hastalıkların çoğu, cerrahi, radyasyon tedavisi ve/veya ilaç tedavisinin bir kombinasyonu ile tedavi edilir. Cerrahi ve radyasyon, lokal olarak sınırlı kanseri tedavi etmek için kullanılırken, ilaç tedavisi, vücuttaki uzak bölgelere yayılmış kanser hücrelerini öldürmek için gereklidir. Fakat ilaç tedavisi, hem tümör hem de normal hücrelerde sitotoksik etkiler gösterebilmektedir. Bununla birlikte hayvan modelleri tarafından desteklenen klinik deneyim, sitotoksik ilaçların sinerjistik etkiler elde etmek için kombinasyon halinde verildiğinde çok daha etkili olduğunu göstermiştir. Farklı moleküler mekanizmalar tarafından çalışan ilaçların kombinasyon halinde uygulanması

ilaç direncinin gelişme olasılığını azaltırken, ilaçların tek başlarına uygulandıklarında meydana getirdikleri toksik etkiyi de indirmektedir (Al-Lazikani ve ark., 2012). Birden fazla epigenetik ilacın tek başına ya da kemoterapi ve immünoterapi ile kombinasyon halinde uygulanması, antikanser etkileri artırması ve ilaç direncini aşma potansiyeli sayesinde yeni bir tedavi yaklaşımı olarak öne çıkmaktadır (Lu ve ark., 2020).

2.8. Tez Çalışmasında Kullanılan Kalkon Kompleksinin Yapısı

Coşkun ve Ahmedzade (2008) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, 1-benzofuran-2-il'in vanilin ile reaksiyonu sonucunda 3-(3-metoksi-4-hidroksifenil)-1-(benzofuran-2-il)-2-propen-1-on (Şekil.2.6) adlı kalkon kompleksi sentezlenmiş ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen kalkon kompleksi Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Demet Coşkun tarafından tez çalışması için temin edilmiştir.



Şekil 2.7. "3-(3-metoksi-4-hidroksifenil)-1-(benzofuran-2-il)-2-propen-1-on" yapısı (Coşkun & Ahmedzade, 2008)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler (Çizelge 3.1, Çizelge 3.2**)**, kitler (Çizelge 3.3) ve sarf malzemeleri (Çizelge 3.4) aşağıda belirtilen çizelgelerde verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Kimyasal Malzemeler	Temin Edildiği Firma/Lokasyon
Sulforhodamine B (SRB)	Santa Cruz Biotechnology/ABD
Trikloroasetik asit (TCA)	Sigma/ABD
TRIS (Base), Ultra Pure	BioShop/Kanada
Skim milk	
Kristal viyole	Sigma/ABD
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco/ABD
Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 (DMEM-F12)	
Fosfat tuz tamponu (PBS)	
%0,05 Tripsin-EDTA	
%0,5 Tripan mavisi	
Dimetil sülfoksit (DMSO)	
Metanol	Merck/Almanya
Asetik asit	
Hoechst 33342	ThermoFisher/ABD
Reducing agent	
Sample Buffer	
SuperSignal West Pico PLUS	
Bolt Bis-Tris Plus Gels	
Primer Antikorlar: HDAC1, BiP, IRE1α, RIP, Cleaved Caspase-8, DR5, β-aktin	Cell Signalling/ABD

Çizelge 3.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Malzemeler (devam)

Bovine Serum Albumin (BSA)	Cell Signalling/ABD
Opti-Protein XL Marker	Abm/Kanada
Skim milk	BioShop/ABD

Çizelge 3.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Kitler

Kitler	**Temin Edildiği Firma/Lokasyon**
Anneksin V-FITC/PI Apoptozis Kit	Elabscience/ABD
RIPA lizis tampon sistemi	SantaCruz Biotechnology/ABD
BCA Protein Tayini Kiti	ThermoFisher/ABD

Çizelge 3.4. Tez Çalışmasında Kullanılan Sarf Malzemeler

Sarf Malzeme	**Temin Edildiği Firma/Lokasyon**
6 kuyulu hücre kültür kabı	SPL, Güney Kore
24 kuyulu hücre kültür kabı	
96 kuyulu hücre kültür kabı	
75 cm_2'lik flask	
15 ml'lik steril tüp	CAPP ApS, Danimarka
10µl'lik, 100µl'lik, 1000µl'lik pipet uçları	Corning, ABD
Transwell insert	
Cryovial	ISOLAB/Almanya
10 ml'lik Serolojik pipet	NEST/Çin
Scraper	
Thoma lamı	Hausser Scientific Horsham/ABD
iBlot™ Transfer Stack	ThermoFisher/ABD

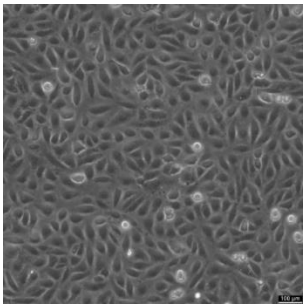
Çizelge 3.5. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

Soğutmalı Santrifüj NF800R	Nüve/Türkiye
-86˚C derin dondurucu	Haier/Çin
Class II laminer akım kabini	
Hassas terazi	Sartorius/Almanya
Saf Su Chazı, Q3UV	Merck/Almanya
Isıtıcılı blok	Biosan/Letonya
10µl, 100µl ve 1000µl'lik pipet seti	Axygen/ABD
Mikro plaka spektrofotometre	Biotek/ABD
Inverted mikroskop	Euromex/Hollanda
EVOS M5000 hücre görüntüleme sistemi	ThermoFisher/ABD
iBlot transfer cihazı	
Güç kaynağı 300 Plus 300V	Labnet/ABD

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücrelerin Kültürde Çoğaltılması ve Kullanılması

Bu tez kapsamında deneysel çalışmalar TPC-1 hücre hattı üzerinde gerçekleştirilmiştir. TPC-1, kadın bir hastadan izole edilmiş PTK'ya ait, iyi karakterize edilmiş ve literatürde yaygın olarak yer alan bir hücre hattıdır (Davies & Welch, 2006). TPC-1 hücre hattı fibroblast benzeri bir morfoloji sergilemekte olup (Şekil 3.1), yaklaşık 21,4 saatlik ikiye katlanma süresi ile yüksek proliferasyon kapasitesine sahiptir (Gonçalves ve ark., 2011).



Şekil 3.1. TPC-1 hücreleri mikroskop görüntüleri (Cytion Biosciences, 2025)

TPC-1 hücre soyu %1 penisilin streptomisin, %0.25 non-esansiyel aminoasit ve %10 fetal sığır serum (FBS) içeren DMEM-F12 besiyeri ortamında 37°C'de, %5 CO_2'li ortamda kültüre edildi. Kültüre edilen hücreler -86°C dondurucularda muhafaza edilmektedir. Stoklanan TPC-1 hücreleri -86°C dondurucudan tez çalışmasında kullanılmak üzere çıkarıldı. Kısa sürede ılık su banyosunda çözdürülen hücreler 1000g'de 5 dakika (dk) santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pelet, besiyeri ile çözüldü. Hücreler toplam besiyeri hacmi 10 ml olacak şekilde 75 cm^2'lik flaska aktarıldı. Hücreler 37°C'de, %5 CO_2'li ortamda kültüre edildi.

Hücreler flask yüzeyinde %70-90 konfluent olduklarında, ileride yapılacak analizlerde kullanılmak üzere %0.05'lik tripsin ile yüzeyden kaldırılmaları amacıyla biyogüvenlik kabinine alındı. Hücreler öncelikle 1X PBS ile yıkandı. Sonrasında flask yüzeyini kaplayacak şekilde tripsin ile muamele edilen hücreler, inkübatörde 3 dk bekletildi. Ardından besiyeri ile tripsin ile muamele edilmiş hücreler sulandırıldı ve bu karışım 15 ml'lik falkona aktarıldı. 1000g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pelet, besiyeri ile çözüldü. Bu işlem ile elde edilen hücrelerin sayımı için hemositometre metodu kullanıldı. Bunun için 0,5 ml'lik ependorfa 10 µl hücre, 10 µl tripan mavisi boya eklendi ve karıştırıldı. Bu karışım thoma lamına konuldu ve mikroskop altında sayımı yapıldı. Elde edilen sayı sulandırma katsayısı ile çarpıldı ve 1 ml'de mevcut hücre sayısı hesaplandı. Yapılacak deneye göre kullanılması gereken hücre sayısı değişmektedir. Deney planına göre hücre hesabı yapıldı. Geri kalan hücrelerin bir kısmı tekrardan kültüre edilmek üzere inkübatöre kaldırıldı. Bir kısmı ise stoklanmak üzere %10 FBS, %10 DMSO'lu besiyeri içinde -86°C'de muhafaza edildi.

3.2.2. Kullanılan Kimyasalların Hazırlığı

VPA'nın stok çözeltileri 300 mM olacak şekilde dH_2O ile hazırlandı. Coşkun ve Ahmedzade (2008) tarafından sentezlenen 3-(3-Metoksi-4-hidroksifenil)-1-(benzofuran-2-il)-2-propen-1-on kalkon kompleksi tez çalışması için temin edildi. Mol kütlesi (M_A) 294 g/mol olan kalkon kompleksinin stok çözeltileri, DMSO ile 50 mM olacak şekilde hazırlandı. DMSO, hücrelerde toksisite oluşturmaması için %0,01'i geçmeyecek şekilde kullanıldı. Stok çözeltiler -20°C'de saklandı.

3.2.3. SRB (Sulforhodamine B) Canlılık Analizi

SRB testi, toplam protein içeriğini ölçen ve bu yolla hücre proliferasyonunun tespit edilmesine olanak sağlayan kolorimetrik bir analiz yöntemidir. Bu yöntem, hücre sayısındaki artışla protein miktarının doğru orantılı olduğu varsayımına dayanır (Vichai & Kirtikara, 2006).

İlk olarak kombine uygulamada VPA'nın toksik olmayan dozunun belirlenmesi amaçlandı. VPA'nın histon H3 ve H4'ün N-terminal kuyruklarının hiperasetilasyonuna neden olduğu ve 0,5 mM VPA konsantrasyonunda HDAC enzimatik aktivitesini doğrudan inhibe ettiği kanıtlanmıştır (Göttlicher ve ark., 2001). TPC-1 hücrelerinde, 0,5 mM dozunu dahil edecek şekilde geniş bir aralıkta doz cevabının görülmesi için VPA'nın 8-0,25 mM aralığındaki dozları seri dilüsyon ile 96 kuyucuklu hücre kültür kabında hazırlandı. Ardından kültüre edilen TPC-1 hücreleri her kuyuya 5000 hücre gelecek şekilde ekildi. 37°C'de, %5 CO_2'li ortamda 48 saat inkübasyon süresi sonrasında hücre canlılığının ölçümü için SRB testine geçildi. İlk olarak her kuyucuğa 50 µl %10'luk Trikloro asetik asit (TCA) eklendi. Kültür kabı, 4°C de 1 saat bekletildi ve her kuyucuk 200 µl deiyonize H_2O ile 5 defa yıkandı. Her yıkama sonunda kültür kabı ters çevrilerek içeriği atıldı. %0,4 (w/v) SRB çözeltisinden her kuyucuğa 50 µl eklendi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dk bekletildi. Süre bitiminde kültür kabı ters çevrilerek içeriği atıldı. Her kuyucuk, 100 µl %1'lik asetik asit çözeltisiyle 5 defa yıkandı. Yıkama sonrası kuyucuklar tamamen kuruduktan sonra her kuyucuğa 150 µl, 10 mM Tris baz eklendi. Kültür kabı, karıştırıcıda 10 dk boyunca 600 rpm devirde çalkalandı. Hücre canlılığı, 564 nm dalga boyunda, mikroplaka spektrofotometresi ile ölçülen optik yoğunluk (absorbans) değerleri kullanılarak değerlendirildi. Canlılık yüzdesi, aşağıdaki formül ile hesaplandı:

Hücre canlılığı (%) = [100 × (Kimyasal uygulanan hücrelerin ortalama absorbansı – kör kontrol absorbansı) / (Negatif kontrol hücrelerinin ortalama absorbansı – kör kontrol absorbansı)]

VPA'nın toksik olmayan dozunun belirlenmesine yönelik SRB analizinden sonra kombine uygulamanın etkinliğinin değerlendirilmesi için kimyasal hazırlığı yapıldı. Bunun için kalkon kompleksinin 50-0,78 µM aralığındaki dozları seri dilüsyonla 96

kuyucuklu hücre kültür kaplarında hazırlandı. Kombine tedavinin gerçekleşmesi planlanan kuyucuklara 0,5 mM dozunda VPA eklemesi yapıldı. Kimyasallar hazırlandıktan sonra üzerlerine kültüre edilen TPC-1 hücreleri kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde ekildi. 37°C'de, %5 CO_2'li ortamda 48 saat inkübasyon süresi sonrasında hücre canlılığının ölçümü için SRB testine geçildi. Test yukarıda açıklandığı şekilde tekrar gerçekleştirildi.

3.2.3. Migrasyon Analizleri

3.2.3.1. Yara İyileşme Analizi

Yara iyileşmesi analizi, *in vitro* ortamda hücre göçünü (migrasyonunu) değerlendirmek amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Temel adımlar; hücrelerle kaplı tek katmanlı bir yüzeyde çizik oluşturulması, hücrelerin bu boşluğu kapatmak üzere hareket ettikleri süre boyunca, başlangıçta ve belirli zaman aralıklarında görüntülerin alınması ve bu görüntülerin karşılaştırılarak hücre göç hızının ölçülmesini içerir (Liang ve ark., 2007). Kombine tedavinin TPC-1 hücrelerinde göç etme üzerindeki etkilerinin incelenmesi için yara iyileşme analizi yapılmıştır. Kalkon kompleksinin toksik etki göstermeyen 1,56 µM dozu migrasyon analizleri için seçilmiştir. İlk olarak hücreler 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarında kuyu başına $2x10^5$ adet gelecek şekilde 2 ml besiyeri içerisinde ekildi ve 37°C %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Kuyucuklardaki hücreler %80-90 oranında bir yoğunluğa ulaştığında 1000 µl'lik pipet uçları ile kuyulara enlemesine ve boylamasına düz iki çizgi çekildi ve her kuyudan belirli bir alan seçilerek 0. saat fotoğrafları çekildi. Ardından kalkon kompleksinin 1,56 µM dozu ve VPA (500 µM) kuyulara eklendi ve her bir grup için 0-12-24-36 saat aralıklarında belirlenen alanların fotoğrafları mikroskop altında çekildi. Kontrol grubunda yara kapanması 36. saatte gerçekleştiği için bu saatte fotoğraflama durduruldu. Alınan fotoğraflar ImageJ v1.54g programı ile analiz edildi.

3.2.3.2. Transwell Analizi "Boyden Chamber"

"Boyden Chamber" olarak da adlandırılan transwell analizinde hücreler gözenekli membranlara sahip özel haznelere (insert) ekilir. Ardından alt bölmelere kemotaktik ajanlar konur ve bu sayede hücrelerin membranın gözeneklerinden kemotaktik ajanların bulunduğu alt bölmeye göç etmeleri sağlanır. Uygun bir inkübasyon süresinden sonra, iki

bölme arasındaki membran sabitlenir ve boyanır. Boyama sonrası membranın alt tarafına göç eden hücre sayısı belirlenir (Chen, 2005). Kombine tedavinin migrasyon üzerindeki etkisinin incelenmesi için transwell analizi yapıldı. Öncelikle 24 kuyucuklu hücre kültür kabında kuyucukların içerisine insertler yerleştirildi. Her inserte $1,5x10^5$ hücre gelecek şekilde ekim yapıldı. Kalkon kompleksinin 1,56 µM dozu ve 500 µM VPA tek başlarına ve kombine olacak şekilde serumsuz besiyeri içerisinde hazırlandı ve hücrelere uygulandı. Ardından her insertin dışına 750 µl %10 FBS'li besiyeri konuldu. Hücreler 48 saat 37°C %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldıktan sonra %100 metanol ile 20 dk fikse edildi. Süre sonunda insertler 2 kez 1X PBS ile yıkandı. Ardından kuyular %0.05 kristal viyole ile boyandı ve 15 dk bekletildi. Süre sonunda tekrar 1X PBS ile yıkama gerçekleştirildi. Ardından boyanan hücreler mikroskop altında görüntülendi ve fotoğraflandı.

3.2.4. Koloni Oluşumu Analizi

Koloni oluşum deneyi, tek bir hücrenin çoğalarak yeni bir koloni oluşturma kapasitesine dayanan, *in vitro* koşullarda uygulanan bir hücre sağkalım testidir. Bu yöntemde, koloni oluşumu genellikle en az 50 hücre içeren yapılar şeklinde tanımlanır (Franken ve ark., 2006). Bu analiz ile kombinasyon tedavisinin, TPC-1 hücreleri üzerindeki koloni oluşturma yeteneği incelendi. Bunun için ilk olarak TPC-1 hücreleri kuyu başına $3x10^3$ gelecek şekilde 6 kuyulu hücre kültür kaplarına ekildi. Hücreler 1 gece 37°C %5 CO_2'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrası kalkon bileşiğinin 3,12 µM dozu ve VPA'nın 500 µM dozu tek başına ve kombine şekilde hücrelere uygulandı. 48 saat sonunda ilaçlar kuyulardan çekildi. Ardından hücreler kendi besiyeri içerisinde 3 gün boyunca inkübe edildi. 3. günün sonunda 1 kere soğuk 1X PBS ile yıkanan kuyular, soğuk %100 metanol ile 10 dk fikse edildi. Ardından 15 dk oda sıcaklığında %0,05 kristal viyole ile boyandı ve koloni oluşumu ışık mikroskobu ile fotoğraflandı.

3.2.5. Floresan Boyama

3.2.5.1. Hoechst 33342/Anneksin/PI Boyama

Kalkon kompleksi ve VPA kombinasyonunun etki ettiği ölüm mekanizmasının belirlenmesi amacıyla Anneksin V/Propidyum İyodür (PI) boyaması ve ek olarak Hoechst

3342 boyaması yapıldı. Hoechst 33342 ile tüm (ölü/canlı) hücreler, PI ile geç apoptotik/sekonder nekrotik veya primer nekrotik hücreler; Anneksin V ile erken apoptoz aşamasında olan hücreler belirlenir. Apoptozun erken evrelerinde, plazma membranı yapısal değişikliklere uğrar ve bu süreçte fosfatidilserin (PS), plazma membranının iç sitoplazmik yüzeyinden hücrenin dış yüzeyine transloke olur. PS dış yüzeye geçtikten sonra, anneksin V konjugatları PS kalıntılarına bağlanarak apoptotik hücreleri boyar (Brumatti ve ark., 2008). Floresan boyama sonucunda Hoechst+, Anneksin V− ve PI− olarak boyanan hücreler, canlı ve zar bütünlüğü bozulmamış hücrelerin varlığını gösterir. Annexin V+ ve PI− boyananlar, zar asimetrisini kaybeden ancak zar bütünlüğü halen korunan erken apoptoz sürecinde olan hücrelere işaret eder. Anneksin V+, PI+ boyama ise, membran bütünlüğünü kaybetmiş primer nekrotik veya geç apoptotik/sekonder nekrotik hücrelerin varlığını temsil eder. Ayrıca, Hoechst boyaması ile hücre morfolojileri değerlendirilerek ölüm modları hakkında yorumlar yapılabilir. Erken apoptotik hücreler, sağlıklı hücrelere kıyasla küçülmüş ve piknotik nükleus içerir. Buna karşın, primer nekrotik hücreler genellikle hacimlerinin arttığı bir morfoloji sergiler. Erken apoptozda görülen piknotik nükleus morfolojisi gözlemlenmez. Sekonder nekroz veya geç apoptoz aşamasındaki hücreler ise, hem Anneksin V hem de PI ile boyanır ve piknotik veya fragmentasyon göstermiş nükleuslarla karakterize edilirler.

SRB canlılık analizi sonuçları değerlendirilerek istatistiksel olarak anlamlı ve toksisitenin daha fazla olduğu 6,25 ve 12,5 µM dozları Anneksin V/PI boyama analizi için seçildi. TPC-1 hücreleri, 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kuyu başına 5000 hücre gelecek şekilde ekilerek 48 saat, 37°C %5 CO_2'li ortamda kalkon kompleksinin 6,25 ve 12,5 µM dozları ile VPA'nın toksik olmayan dozuna (500 µM) maruz bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından hücreler 1X PBS ile yıkandı. 500 µl inkübasyon tampon çözeltisi içerisine 5 µl Anneksin-V ve 5 µl PI boyası eklendi. Ayrıca nükleus morfolojilerinin incelenmesi amacıyla boya karışımına Hoechst 33342, son konsantrasyon 5 µg/ml olacak şekilde eklendi. Hazırlanan bu boya karışımından her bir kuyuya 20 µl eklendi ve hücreler 37°C'de 20 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra, hücreler EVOS M5000 floresan mikroskobu altında değerlendirildi.

3.2.5.2. DHE (Dihidroetidyum) Boyama

Reaktif Oksijen Türleri (ROS), hücre zarı bariyer fonksiyonunun bozulması, genetik hasar ve immünolojik hücre ölümü gibi karmaşık olaylarla ilişkilidir. DHE, hücrelerde ROS düzeylerini izlemek amacıyla yaygın olarak kullanılan bir boyadır (Sözer ve ark., 2024). Kombine tedavinin ROS düzeylerine etkisinin incelenmesi için eş zamanlı olarak Hoecst 33342 ve DHE boyaması yapıldı. Kalkon kompleksinin 6,25 ve 12,5 µM dozları ile 500 µM VPA bu metod için seçildi. Ayrıca, oksidatif stresi inhibe etmek için N-Asetil Sistein (NAC) inhibitörü ikinci bir grup olarak kimyasallar ile birlikte uygulandı ve bu koşul altında hücrelerdeki ROS varlığının değerlendirilmesi amaçlandı. Bu amaç ile TPC-1 hücreleri, 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kuyu başına $5x10^3$ gelecek şekilde ekilerek 48 saat süre ile 37°C %5'lik ortamda kalkon kompleksi ile VPA'ya ayrıca farklı bir grup olarak bu kimyasallar ile birlikte NAC'a maruz bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından hücreler 1X PBS ile yıkandı. 2 ml 1X PBS içerisine 2 µl DHE (10 µM) ve 30 µl Hoechst 33342 (3µg/ml) eklendi. Hazırlanan bu boya karışımından her bir kuyuya 20 µl eklendi ve hücreler 37°C 20 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonrası, hücrelerdeki ROS varlığı floresan mikroskop altında değerlendirildi.

3.2.6. İnhibitör Uygulamaları

3.2.6.1. Z-VAD FMK Uygulaması

Genel kaspaz inhibitörü olan Z-VAD-FMK, kaspaz aktivitesini engelleme yoluyla apoptozu inhibe etmektedir (Christofferson & Yuan, 2010). Kombine tedavinin kaspaz bağımlı apoptozla ilişkisini değerlendirmek için Z-VAD-FMK inhibitörü kullanıldı. SRB canlılık analizi sonucuna göre kombine tedavilerdeki toksisitenin daha fazla olması sebebiyle inhibitör uygulamalarında kalkon kompleksinin 6,25 ve 12,5 µM dozları ile ilerlenmesine karar verildi. Bu doğrultuda ilk olarak TPC-1 hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde ekildi. Eş zamanlı olarak hücrelere 10 µM (Ling ve ark., 2025) z-VAD-FMK uygulandı. 37°C'de, %5 CO_2'li ortamda 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrasında kalkon kompleksinin 6,25 ve 12,5 µM dozu ile VPA (500 µM) kuyucuklara eklendi. 37°C'de, %5 CO_2'li ortamda 48 saat inkübe edildi. Ardından SRB analizi ile hücre canlılıklarındaki değişim tespit edildi.

3.2.6.2. N-Asetil Sistein (NAC) Uygulaması

NAC, ROS indükleyicilerini tanımlamak, test etmek ve ROS'u inhibe etmek amacıyla yaygın olarak kullanılır (Halasi ve ark., 2013). Kombine tedavinin ROS düzeyleri üzerine etkisinin belirlenmesi için NAC uygulaması yapıldı. Bunun için öncelikle TPC-1 hücreleri 96 kuyucuklu kültür kaplarına kuyu başına 5000 hücre gelecek şekilde ekildi. Hücreler 3 saat 10 mM NAC ile 37°C'de, %5 CO_2'li ortamda inkübe edildi. Süre sonrasında kalkon kompleksinin 6,25 ve 12,5 µM dozu ile VPA (500 µM), 10 mM (Boz ve ark., 2020) NAC içeren besiyerinde hazırlanarak kuyucuklara eklendi. 48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında SRB analizi ile hücre canlılığındaki değişimler tespit edildi.

3.2.6.3. Nekrostatin-1 (Nec-1) Uygulaması

Nec-1, programlanmış hücre ölümü türlerinden biri olan nekroptozu, RIP1 molekülünü hedef alarak inhibe eden bir bileşiktir. Bununla birlikte, Nec-1'in yalnızca nekroptozu değil, aynı zamanda RIP1 aracılı apoptoz mekanizmasını da hedef aldığı bilinmektedir (Cao & Mu, 2020). Kombine tedavinin RIP1 aracılı hücre ölümü üzerindeki etkisinin belirlenmesi için Nec-1 kullanıldı. Bu amaçla ilk olarak 96 kuyucuklu kültür kaplarına kuyu başına 5000 hücre, 50 µM (Lin ve ark., 2016) Nec-1 ile ekildi. 24 saat 37°C'de, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldıktan sonra kalkon kompleksinin 6,25 ve 12,5 µM dozu ile VPA (500 µM) hücrelere uygulandı. 48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında SRB canlılık analizi gerçekleştirildi.

3.2.7. Western Blot Analizi

Western blot, hücre ve moleküler biyoloji alanında yaygın olarak kullanılan önemli bir tekniktir. Bu teknik aracılığıyla hücrelerden elde edilen karmaşık protein karışımları içerisinden hedef proteinler seçici olarak tespit edilebilmektedir. Western Blot analizi; proteinlerin önce moleküler ağırlıklarına göre ayrılması, ardından katı bir yüzeye (membran) transfer edilmesi ve son olarak hedef proteinin, özgül bir birincil ve ikincil antikor aracılığıyla işaretlenerek görselleştirilmesi olmak üzere üç temel basamaktan oluşur (Mahmood & Yang, 2012).

Kombine tedavinin TPC-1 hücreleri üzerine etki ettiği ölüm modunun hedeflenen proteinler üzerinden tespit edilmesi için western blot analizi yapılmıştır. Bu analiz için

SRB canlılık analizi, floresan boyama ve inhibitör uygulama bulguları değerlendirilerek kalkon kompleksinin kombine tedavideki en etkili dozu olarak belirlenen 12,5 µM dozu kullanıldı. Ek olarak, DHE boyama ve NAC bulgularının kombinasyon tedavisinin ROS aracılı bir mekanizma ile etkili olduğunu göstermesi üzerine, Western blot analizine kombinasyon tedavisine ek olarak NAC uygulanan bir grup da dahil edildi. Belirlenen gruplardan protein izolasyonunun yapılması için öncelikle 12,5 µM kalkon kompleksinin 500 µM VPA kombinasyonu 6 kuyulu hücre kültür kaplarında hazırlandı. Kuyu başına $1.25x10^5$ hücre gelecek şekilde ekim yapıldı. Ek olarak NAC'lı grubun hazırlanması için tedavi uygulanmadan önce 6 kuyulu kültür kaplarındaki hücreler 3 saat 10 mM NAC'a maruz bırakıldı. Ardından 12,5 µM kalkon kompleksinin 500 µM VPA kombinasyonu 10 mM NAC'lı besiyeri içinde hücrelere uygulandı. Hücreler 48 saat 37°C %5 CO_2'li ortamda inkübe edildi; ardından protein izolasyonu aşamasına geçildi.

Protein İzolasyonu: Protein lizatı hazırlama aşaması buz üzerinde gerçekleştirilir. İlk olarak 6 kuyulu kültür kaplarındaki hücreler scraper ile kaldırıldı. 15 ml'lik falkonlara toplanan hücreler +4 °C'ye soğutulmuş santrifüjde 1000g'de 5 dk santrifüj edildi. Protein ekstraksiyonu, SantaCruz üretimi RIPA lizis tampon sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Toplam 400 µl RIPA tamponu içerisine, 45 µl proteaz inhibitör kokteyli, 15 µl 100 mM sodyum ortovanadat ve 15 µl 200 mM fenilmetilsülfonil florür (PMSF) eklenerek lizis tamponu hazırlandı. Santrifüj sonrası elde edilen hücre peleti hazırlanan liziz tamponu ile buz üzerinde çözüldü. Ardından 30 dk boyunca 10 dk'da bir olmak üzere pipet ile karıştırıldı. Süre sonunda 10.000 g'de 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlar toplanarak -20 °C dondurucuda saklandı.

Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi: Hücre lizatlarında bulunan toplam protein miktarı, ThermoFisher (ABD) firmasına ait BCA Protein Tayini Kiti kullanılarak belirlendi. Bu yöntem, proteinlerin bakır (II) iyonları ile reaksiyona girerek renk değişimi oluşturması prensibine dayanmakta olup, oluşan renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülerek protein konsantrasyonu hesaplanmıştır.

Jel Elektroforezi: Western blot analizi için örnek hazırlığında; %25 oranında 4X örnek tamponu (sample buffer), %10 oranında 10X indirgeme ajanı (reducing agent) ve %65 oranında protein lizatı kullanılarak örnek karışımı hazırlandı. Her bir örnekte için 20 ng

protein kullanılmıştır. Hazırlanan karışımlar, 70°C'ye ayarlanmış ısı bloğunda 10 dk inkübe edilerek proteinlerin denatürasyonu sağlandı. Western blot sistemi kurulduktan sonra, elektroforez için poliakrilamid jeller sisteme yerleştirildi. İlk kuyucuğa 3 µl Opti-Protein XL Marker; diğer kuyucuklara ise her bir örnek, hesaplanan protein miktarına uygun olacak şekilde dikkatlice yüklendi. Tüm örnekler yüklendikten sonra, güç kaynağı sisteme 180 V sabit voltajda çalışacak şekilde bağlandı. Elektroforez işlemi, proteinlerin jel içerisinde ayrışmasını sağlamak amacıyla yaklaşık 1 saat boyunca sürdürüldü.

Transfer Aşaması: Elektroforez sonrası, jel içerisindeki proteinlerin membrana aktarılması amacıyla Invitrogen iBlot transfer cihazı kullanılmıştır. Transfer düzeneği sırasıyla şu şekilde oluşturuldu: en altta iBlot anode stack bottom (nitroselüloz membran), üzerine sırasıyla elektroforezden elde edilen jel, filtre kağıdı ve iBlot cathode tab yerleştirildi. Transfer işlemi, iBlot cihazında P3 programı seçilerek 7 dk boyunca sürdürüldü. Transfer işlemi sonrası membran, 1X TBST tamponu ile yıkanarak bir sonraki aşamaya hazırlandı.

Birincil ve İkincil Antikorla Muamele Edilme ve Görüntüleme: Membrandaki hedef proteinin tespiti amacıyla, membran %5 BSA (bovin serum albümini) içeren 1X TBST tamponu içerisinde, 1:1000 dilüsyonda hazırlanmış birincil antikor ile +4°C'de gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından, membran 1X TBST ile 15 dk süre ile yıkandı. Ardından membranlar aynı tampon koşullarında hazırlanmış (%5 BSA içeren 1X TBST), 1:2000 oranında seyreltilmiş ikincil antikor ile oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübasyona tabi tutuldu. Süre sonunda yıkama işlemi tekrarlandı. Membranlar, kemilüminesans sinyali oluşturması amacıyla görüntüleme solüsyonu ile muamele edildi. Ardından oluşan sinyalin tespiti ve protein bantlarının görselleştirilmesi için Vilbert Lourmat (Fransa) üretimi Fusion FX görüntüleme sistemi kullanıldı. Kullanılan primer antikorlar (Cell Signaling, ABD) şu şekilde sıralanmıştır: Histone Deacetylase 1 (HDAC1), BiP (C50B12), IRE1α (14C10), RIP, Cleaved Caspase-8 (Asp374) (18C8), DR5 (D4E9).

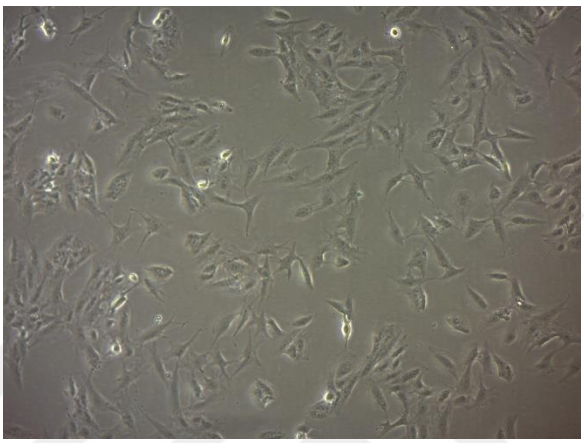
3.2.8. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism v10.1.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki farkların değerlendirilmesinde tek yönlü (One-way ANOVA) ve çift yönlü varyans analizi (Two-way ANOVA) testleri uygulanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyleri *$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$ olarak kabul edilmiştir. Veriler, ortalama ± standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir ($n = 3$).

4. BULGULAR

4.1. TPC-1 Hücrelerin Kültürde Çoğaltılması

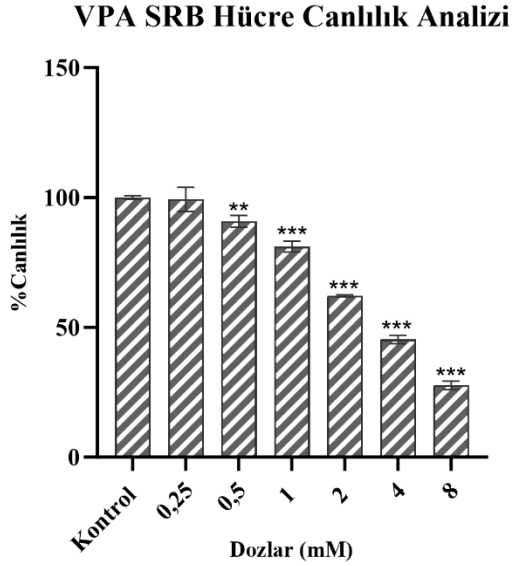
Tez çalışmasında kullanılmak üzere 37°C %5 CO_2'li ortamda %1 penisilin streptomisin, %0.25 non-esansiyel aminoasit ve %10 FBS içeren DMEM-F12 besiyeri ortamında kültüre edilen TPC-1 hücreleri ışık mikroskobu ile görüntülendi (Şekil 3.1).



Şekil 4.1. TPC-1 hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri (10x).

4.2. SRB Analizi Bulguları

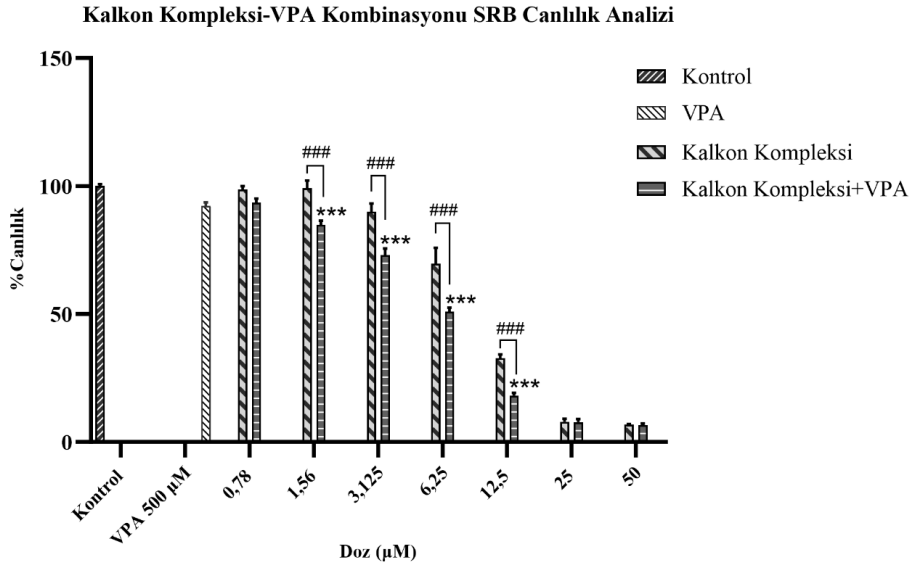
Kombinasyon uygulaması öncesi VPA'nın toksik olmayan dozunun tespit edilmesi amacıyla VPA'nın 8-0,25 mM aralığındaki doz cevapları SRB analizi yapılarak değerlendirildi (Şekil 4.2). Öncesinde 300 mM olarak hazırlanan VPA, -20°C dondurucudan çıkarılarak belirlenen dozlar hazırlandı ve TPC-1 hücrelerine eş zamanlı olarak uygulandı. 48 saat inkübasyon süresi sonrasında SRB analizi yapıldı. SRB analizi sonuçlarına göre, VPA'nın hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyonu (IC_{50}) 3,44 mM olarak belirlendi. VPA'nın sitotoksik etkisinin doz artışına bağlı olarak yükseldiği tespit edildi. 1 mM, 2 mM, 4 mM ve 8 mM VPA uygulamalarının sırasıyla %79,90, %66,26, %45,25 ve %27,68 oranlarında canlılık verdiği görüldü, bu da söz konusu dozların, doza bağımlı olarak sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur (***$p<0,01$). Buna karşın, en düşük doz olan 0,25 mM VPA uygulamasında hücre canlılığı %99,72 olarak saptandı. 0,5 mM dozunda ise hücre canlılığı %90,84 olarak ölçüldü. 0,5 mM doz cevabının istatistiksel olarak anlamlı olduğu (**$p<0,01$) ve toksik etki göstermediği değerlendirilerek bu dozun kombinasyon uygulamaları için seçilmesine karar verildi.



Şekil 4.2. TPC-1 hücrelerinde 8–0,25 mM konsantrasyon aralığında uygulanan VPA muamelesinden 48 saat sonra gerçekleştirilen SRB analizi yüzde (%) canlılık grafiği. Veriler, ortalama ± standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir (n = 3). Aynı zaman dilimi içerisinde farklı dozların kontrol grubuna göre karşılaştırılması sonucunda elde edilen istatistiksel anlamlılık düzeyleri şu şekilde belirtilmiştir: **p<0,01; ***p<0,001. VPA, Valproik Asit.

TPC-1 üzerinde kombine tedavinin etkilerinin gözlemlenmesi için kalkon kompleksinin 50-0,78 µM aralığındaki dozları ve VPA'nın 500 µM dozu hücrelere eş zamanlı olarak uygulandı. 48 saat inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, tedaviye ilişkin hücresel etkiler SRB analizi ile değerlendirildi (Şekil 4.3). SRB analizi sonuçlarına göre, kalkon kompleksinin 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,12 µM ve 1,56 µM konsantrasyonlarında hücre canlılık oranları sırayla %6,74, %7,90, %33,05, %69,65, %90,01 ve %99,07 gözlendi. Bu sonuçlar kalkon kompleksinin TPC-1 hücrelerini doz konsantrasyonuna bağımlı şekilde etkilediğini göstermektedir. Bununla birlikte kalkon kompleksinin 12,5 µM, 6,25 µM, 3,12 µM ve 1,56 µM dozlarının 500 µM VPA ile kombine uygulaması sonucunda hücre canlılık oranları sırasıyla %18,15, %50,89, %73,04 ve %84,80 değerlerinde gözlendi. Bu kombinasyon gruplarında gözlenen hücre canlılık düzeyleri, hem kalkon kompleksinin hem de VPA'nın tek başına uygulanmasına kıyasla anlamlı şekilde daha düşük bulundu ($^{###}$p<0,001, ***p<0,001). Ayrıca kalkon kompleksinin tek başına uygulandığındaki yarı maksimal inhibitör konsantrasyonu (IC_{50})

değeri 9,61 µM olarak hesaplanmışken, kombine uygulamada bu değer 6,42 µM'a düştüğü gözlendi.



Şekil 4.3. TPC-1 hücre soyunda kalkon kompleksinin 50-0,78 µM doz aralığı ile 500 µM VPA'nın kombine şekilde uygulanmasından 48 saat sonra gerçekleştirilen SRB analizi yüzde (%) canlılık grafiği. Veriler, ortalama ± SD olarak ifade edilmiştir (n = 3). Kalkon kompleksi+VPA'nın; VPA'ya göre anlamlılık düzeyleri ***p<0,001; kalkon kompleksinin tek başlarına etkilerine göre anlamlılık düzeyleri $^{###}$p<0,000 olarak gösterilmiştir. VPA, Valproik Asit.

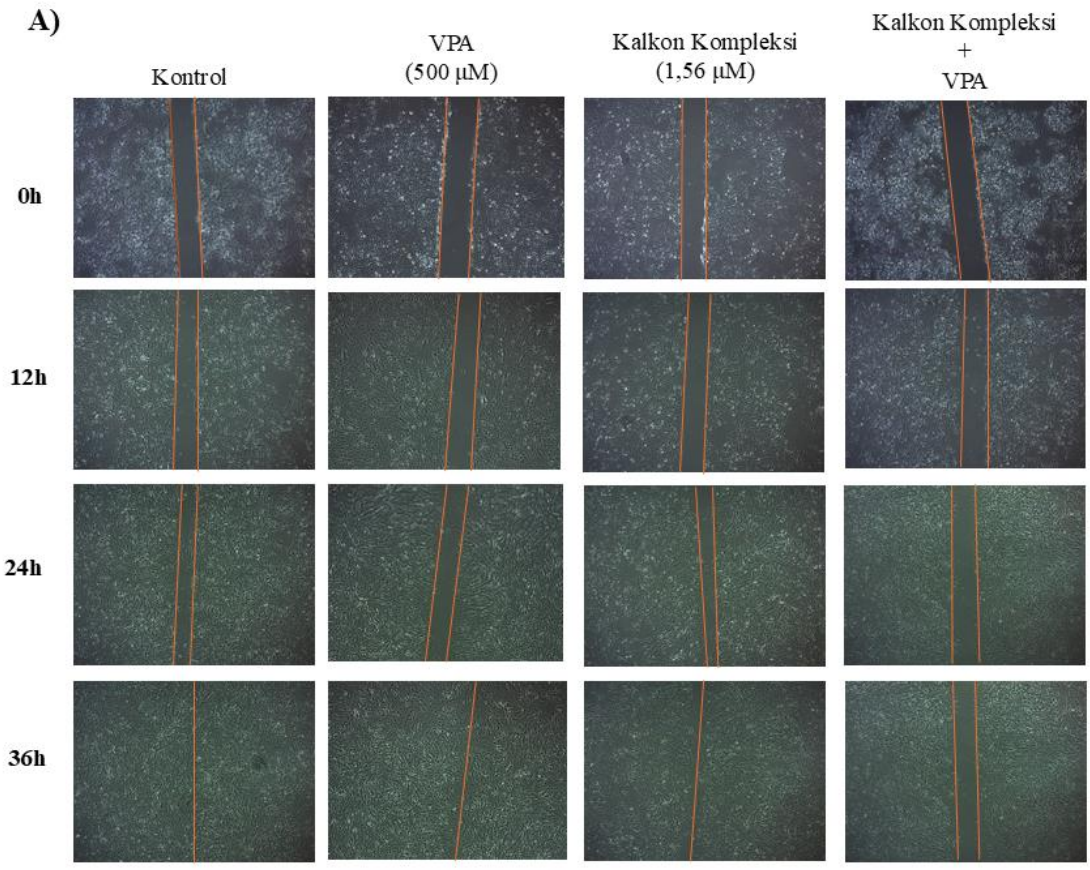
Sonuç olarak kalkon kompleksinin 12,5, 6,25, 3,12 ve 1,56 µM dozları ile 500 µM VPA'nın TPC-1 hücreleri üzerindeki kombine etkisinin, kalkon kompleksinin ve VPA'nın tek başına uygulamasına kıyasla istatiksel olarak anlamlı düzeyde hücre canlılığını düşürdüğü görüldü ($^{###}$p<0,001, ***p<0,001). Bu durum, kombine tedavinin TPC-1'de sitotoksiteyi artırdığını ortaya koymaktadır.

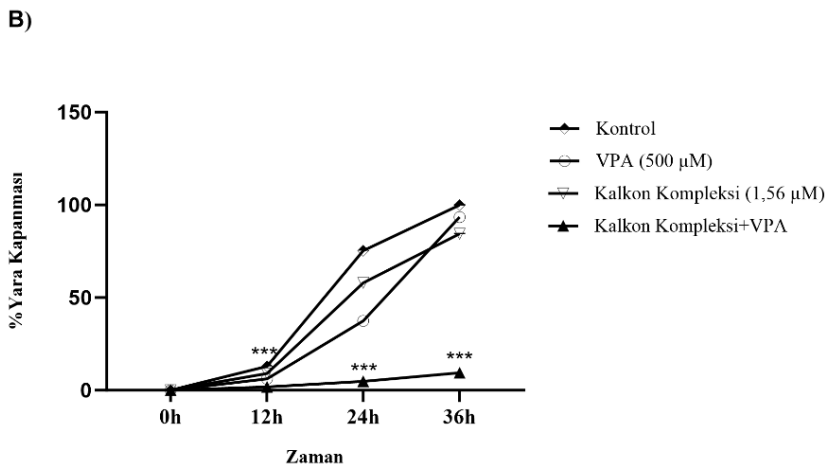
4.3. Migrasyon Analizleri Bulguları

4.3.1. Kombine Tedavinin Hücre Göçü Üzerindeki Etkisine İlişkin Yara İyileşme Analizi Bulguları

Kombine tedavinin TPC-1 hücrelerinin migrasyon yeteneği üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla yara iyileşme analizi yapılmıştır. Bunun için kalkon kompleksinin toksik olmayan 1,56 µM ve VPA'nın 500 µM dozu kullanıldı. Farklı tedavi gruplarının (kalkon kompleksi, VPA ve kalkon kompleksi+VPA) 0-12-24 ve 36. saatlerde

yara kapanma süreci üzerindeki etkileri mikroskop ile görüntülendi (4x) (Şekil 4.4.A). İlk 12 saatte, kontrol grubunda yara kapanması belirgin bir şekilde artarken, diğer gruplarda bu artış daha sınırlıydı. 24 saat itibarıyla, kombinasyon uygulamasının, kontrole ve kimyasalların tek başlarına uygulamalarına kıyasla yara kapanmasını daha fazla inhibe ettiği görüldü. 36. saate ulaşıldığında kontrol, VPA ve kalkon kompleksinin tek başlarına uygulamalarında yara kapandı; fakat kombine tedavide belirgin bir şekilde yara kapanması engellendi. 0-12-24 ve 36. saatlerde elde edilen görüntülerindeki yara iyileşme oranları ImageJ v1.54g yazılımı kullanılarak hesaplandı. Yara iyileşmesi yüzde canlılık grafiğine bakıldığında kombine tedavinin 12-24-36. saatlerde kontrol, VPA ve kalkon kompleksine kıyasla anlamlı derecede yara kapanmasını engellediği tespit edildi (***p<0,001) (Şekil 4.4.B).

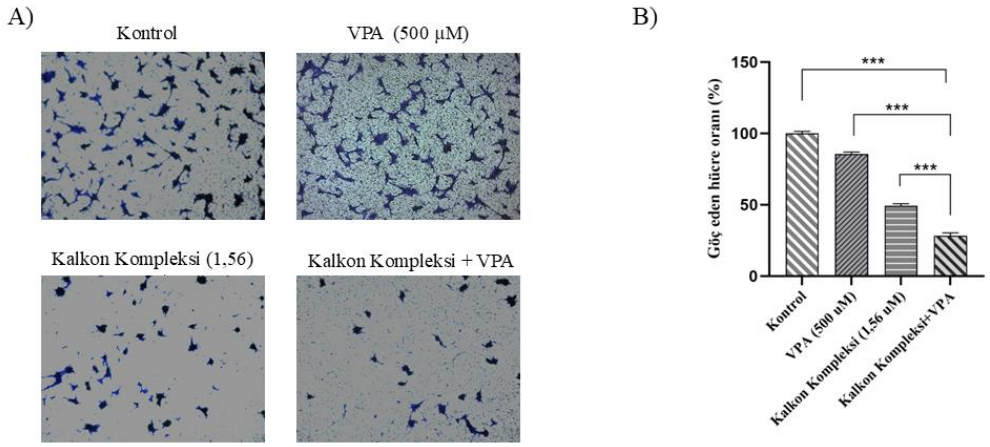




Şekil 4.4. TPC-1 hücrelerinde kalkon kompleksinin 1,56 µM dozu ile VPA 500 µM kombinasyonunun yara iyileşmesi analizi ile değerlendirilmesi. (A) 12 saat aralıklar (0-12-24-36h) ile kaydedilen mikroskop görüntüleri (4x). (B) Yara iyileşmesi yüzde canlılık grafiği. Kalkon kompleksi+VPA, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında ***p<0,001 istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. VPA, Valproik Asit.

4.3.2. Kombine Tedavinin Hücre Göçü Üzerindeki Etkisine İlişkin Transwell Analizi Bulguları

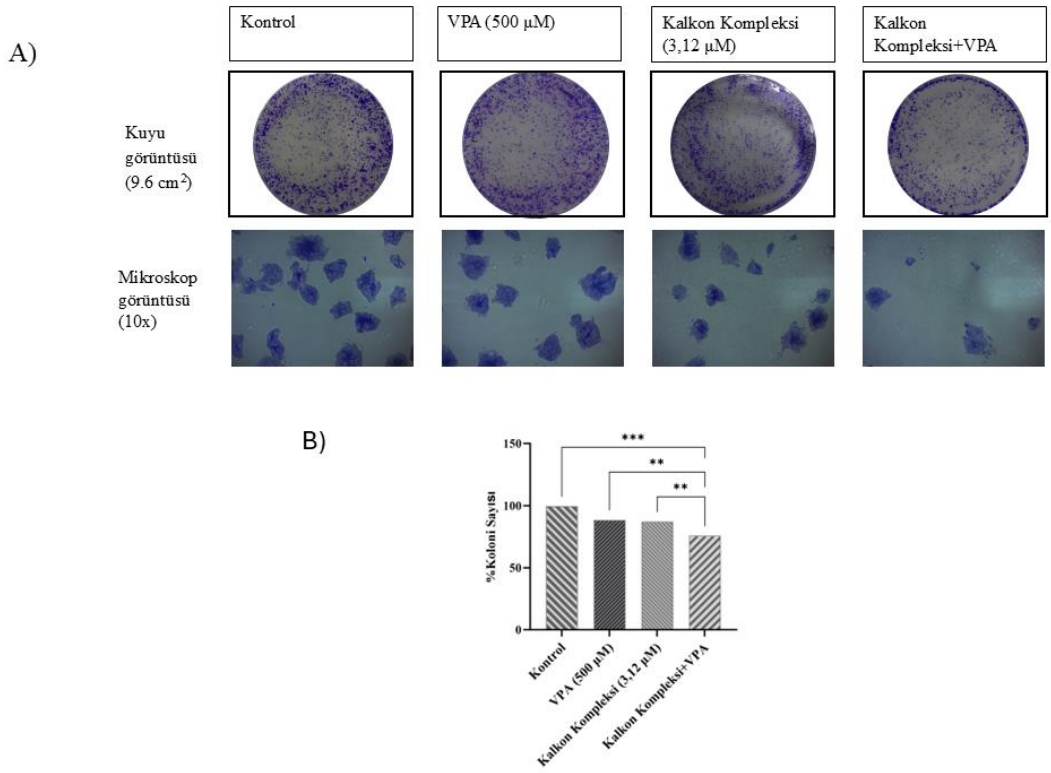
Kalkon kompleksi ve VPA kombinasyonunun TPC-1 hücreleri üzerindeki migrasyon kapasitesine etkisinin değerlendirilmesi için Transwell analizi yapıldı. Bu analizde kalkon kompleksinin toksik olmayan dozu (1,56 µM) kullanıldı. Mikroskobik incelemeler, göç eden hücre sayısında VPA uygulamasıyla hafif, kalkon kompleksiyle belirgin ve kombinasyon tedavisiyle en yüksek düzeyde azalma meydana geldiğini ortaya koymuştur (Şekil 4.5.A). VPA'da göç eden hücre oranı %85,54, kalkon kompleksinde %49,40, kombinasyon uygulamasında %27,71 değerlerini verdi. Bu bulgular kombinasyon tedavisinin kontrol, VPA ve kalkon kompleksinin tek başına uygulamasına kıyasla hücre göçünü anlamlı derecede düşürdüğünü gösterdi (***p<0,001) (Şekil 4.5.B).



Şekil 4.5. TPC-1 hücrelerinde kalkon kompleksinin 1,56 µM dozu ile VPA 500 µM kombinasyonunun transwell analizi ile değerlendirilmesi. Göç eden TPC-1 hücrelerinin (A) mikroskop görüntüleri (20X). (B) Göç eden hücre oranı % grafiği. Kalkon kompleksi+VPA, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında ***p<0,001 istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. VPA, Valproik Asit.

4.4. Koloni Analizi Bulguları

Kalkon kompleksi ile VPA kombinasyonunun koloni oluşturma yeteneği üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla koloni oluşumu analizi yapılmıştır. TPC-1 hücrelerinde kalkon kompleksinin 3,12 µM dozu, VPA'nın 500 µM dozu ve bu kimyasalların kombine uygulamaları altında koloni oluşturan hücrelerin mikroskop ve kuyu taban görüntüleri Şekil 4.6.A'da gösterilmektedir. Bulgulara göre kontrol grubunda hücrelerin yoğun bir şekilde koloni oluşturduğu gözlendi, bu da tedavi uygulanmayan hücrelerde normal proliferasyon kapasitesinin korunduğunu gösterir. Kalkon kompleksinin 3.12 µM dozunda ve VPA'nın tek başına uygulamasında, kontrol grubuna kıyasla belirgin bir azalmanın olmadığı görüldü. Bununla birlikte, 3,12 µM kalkon kompleksi ve VPA kombinasyonunun, her iki kimyasalın tek başına uygulamalarına kıyasla koloni oluşumunu daha belirgin şekilde azalttığı gözlendi (Şekil 4.6.B) (**p<0,01). Bu sonuçlar, kombine tedavinin hücre proliferasyonunu daha etkili bir şekilde engellediğini göstermektedir.



Şekil 4.6. TPC-1 hücrelerinde, kalkon kompleksi (3,12 µM) ve VPA (500 µM) kombinasyonunun koloni oluşturma yeteneği üzerindeki etkileri. (A) Kuyu (9.6 cm^2) ve 10x mikroskop görüntüleri. (B) Koloni sayısının yüzde (%) grafiği. (**p<0,01; ***p<0,001). VPA, Valproik Asit.

4.5. Floresan Boyama Bulguları

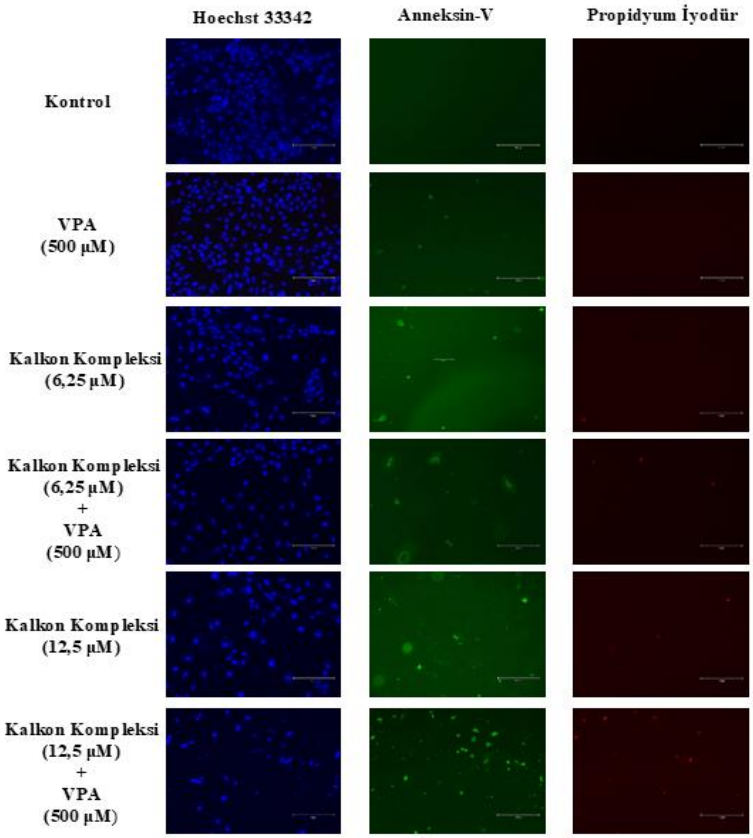
4.5.1. Hücre Ölüm Modunun Belirlenmesine Yönelik Hoechst/Anneksin/PI Bulguları

Kombine tedavinin TPC-1 hücrelerinde etki ettiği hücre ölüm modunu tespit etmek amacıyla Hoechst 33342, Anneksin-V ve PI boyamaları gerçekleştirildi. Hoechst 33342 boyası ile tüm hücre çekirdekleri mavi, Anneksin-V boyası ile apoptoz sürecine giren hücreler yeşil, PI boyası ile membran bütünlüğü bozulmuş hücreler kırmızı floresanla tespit edilmiştir (Şekil 4.7).

Bulgulara göre, 6,25 µM kalkon kompleksi uygulamasında, kontrol grubuna kıyasla Anneksin-V pozitif hücrelerde artış görüldü. Bu dozun VPA ile kombinasyonunda Anneksin-V sinyalinin daha yoğun olduğu gözlendi. Ayrıca bu grupta PI+ hücrelerin varlığı da görüldü. Hoechst 33342 boyaması ile nükleus morfolojileri incelendiğinde

küçülmüş nükleusa sahip hücreler tespit edildi. Bununla birlikte hücre sayısındaki azalış canlılık analizi bulgularını doğrular nitelikteydi.

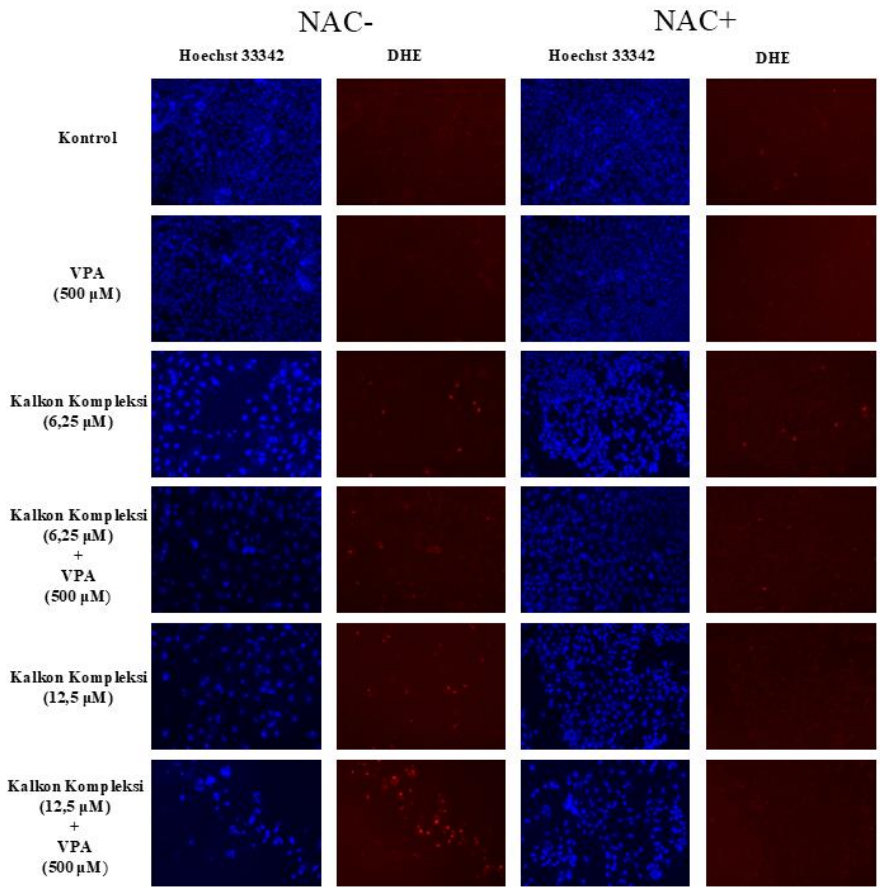
12,5 µM kalkon kompleksinin tek başına uygulaması ise, kontrol ve VPA grubuna kıyasla Anneksin-V oranında artışa sebep olmuştur. VPA'nın kalkon kompleksinin 12,5 µM dozu ile yapılan kombine tedavisi incelendiğinde hem Anneksin-V hem de PI pozitif hücre oranlarında önemli derecede artış gözlendi. Ayrıca, kombine tedavi grubundaki Hoechst 33342 boyama sonuçları, hücre canlılığındaki azalmanın SRB analiziyle uyumlu olduğunu ve nükleuslarda küçülme ile karakterize değişimlerin olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, 12,5 µM kalkon kompleksi ile 500 µM VPA kombinasyonunun, TPC-1 hücrelerinde geç evre apoptoz veya sekonder nekroz oluşumuna neden olduğu değerlendirilmektedir.



Şekil 4.7. Kalkon kompleksinin 6,25 ve 12,5 µM dozları ile 500 µM VPA kombine tedavisine maruz bırakılan TPC-1 hücrelerinin Hoechst 33342 ve Anneksin V/PI boyama sonrasında elde edilen floresan mikroskop görüntüleri (20x) (Ölçek çubuğu: 125 µm). VPA, Valproik Asit.

4.5.2. ROS Tespitine Yönelik DHE Boyama Bulguları

TPC-1 hücrelerinde kalkon kompleksi ve VPA kombinasyonunun ROS düzeyleri üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla DHE boyaması yapıldı. Aynı zamanda hücre canlılığını izlemek için Hoechst 33342 boyası kullanıldı. Yapılan analizler sonucunda, özellikle kombinasyon tedavilerinde ROS üretiminin arttığı gözlemlendi. Kalkon kompleksinin 12,5 µM dozu ile 500 µM VPA uygulamasında, ROS pozitif hücre sayısının her iki kimyasalın tek başına uygulamasına kıyasla belirgin düzeyde arttığı tespit edildi (Şekil 4.8). Buna karşılık, NAC ile birlikte uygulama (NAC+) yapılan gruplarda ROS üretiminin baskılandığı belirlendi. Hücre canlılığına ilişkin değerlendirmelerde ise, NAC+ gruplarda (hem kalkon kompleksi tek başına hem de kombinasyon tedavileri uygulanan örneklerde) hücre canlılığının NAC uygulanmayan (NAC-) gruplara göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu bulgular, özellikle kombine tedavilerin ve ayrıca 12,5 µM kalkon kompleksinin tek başına etkisinin ROS üretimi yoluyla sitotoksisite oluşturduğunu ve NAC uygulamasının oksidatif stresi baskılayarak hücre ölümünü azalttığını ortaya koymaktadır.



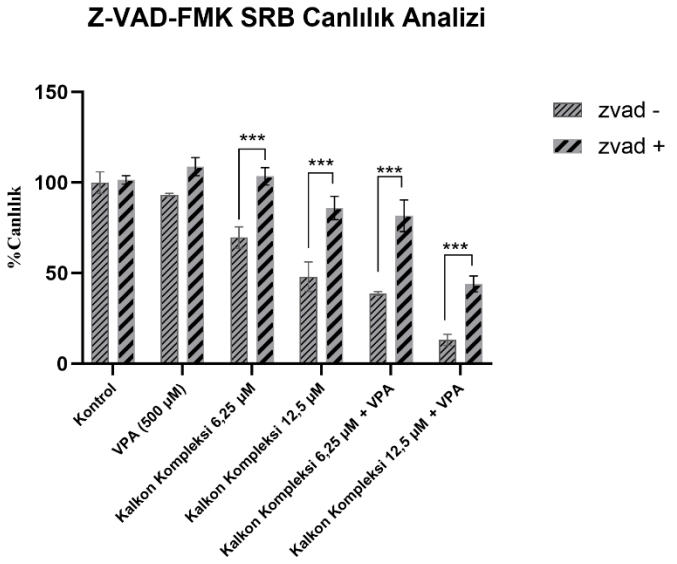
Şekil 4.8. NAC varlığı (NAC+) ve NAC yokluğunda (NAC-), kalkon kompleksi 6,25 ve 12,5 µM dozları ile 500 µM VPA kombine tedavisine maruz bırakılan TPC-1 hücrelerinin DHE ve Hoechst 33342 ile boyanmasının ardından elde edilen floresan mikroskop görüntüleri (20x). VPA, Valproik Asit.

4.6. İnhibitör Bulguları

4.6.1. Z-VAD FMK Bulguları

Kombinasyon tedavisinin TPC-1 hücrelerinde etkili olduğu hücre ölüm mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik kullanılan inhibitörlerden biri genel kaspaz inhibitörü Z-VAD-FMK'dır. İnhibitör uygulamaları sırasında kalkon kompleksinin 6,25 µM ve 12,5 µM dozları kullanıldı. Kalkon kompleksinin tek başına uygulamalarında, 10 µM Z-VAD-FMK ile birlikte kullanımın sitotoksisiteyi düşürdüğü gözlendi (Şekil 4.9). Kombine tedavi bulguları incelendiğinde 6,25 µM kalkon kompleksi ve 500 µM VPA'nın birlikte uygulandığı grupta hücre canlılığı %38,87 iken; Z-VAD-FMK uygulamasıyla bu oran %81,71'e yükseldi (***$p<0,001$). 12,5 µM kalkon kompleksi ve 500 µM VPA

kombinasyonunda ise canlılık oranı %13,28'den %44,05'e çıkmıştır (***p<0,001). Bu bulgular, hem kalkon kompleksinin tek başına oluşturduğu sitotoksisitenin hem de VPA ile kombine uygulandığında ortaya çıkan sitotoksisitenin büyük ölçüde kaspaz aracılı hücre ölümü mekanizmasıyla ilişkili olduğunu göstermektedir.

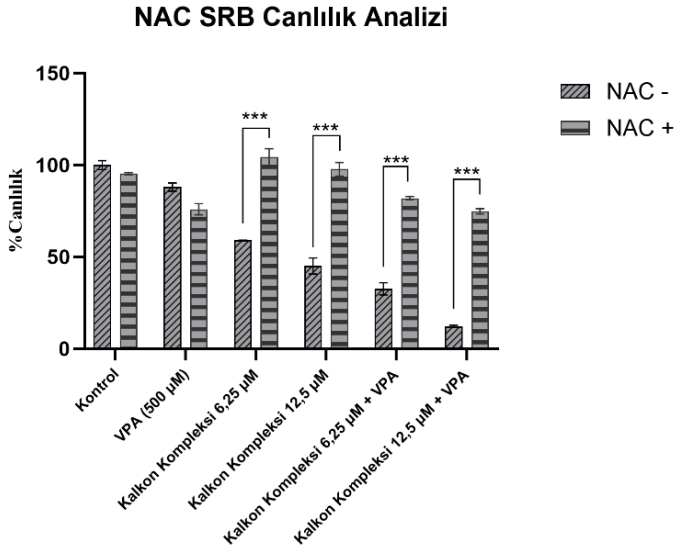


Şekil 4.9. TPC-1 hücrelerine genel kaspaz inhibitörü 10 µM Z-VAD-FMK ile 24 saatlik ön muamelenin ardından, kalkon kompleksinin 6,25 µM ve 12,5 µM dozları ile 500 µM VPA'nın 48 saat süreyle uygulanması sonucu elde edilen SRB analizi % canlılık grafiği. Veriler, ortalama ± SD olarak ifade edilmiştir (n = 3). Z-VAD uygulanmayan gruplar (zvad–) ile Z-VAD uygulanan gruplar (zvad+) arasındaki karşılaştırmalar sonucunda elde edilen istatistiksel anlamlılık düzeyleri şu şekilde sunulmuştur: **p<0,01; ***p<0,001. VPA, Valproik Asit.

4.6.2. NAC Bulguları

Kombinasyon tedavisinin TPC-1 üzerinde ROS aracılı hücre ölümüne etkisini değerlendirmek amacıyla antioksidan özellik gösteren ve genel ROS inhibitörü olan NAC kullanıldı. Kalkon komplekslerinin hem tek başına hem de VPA ile birlikte uygulandığı tüm gruplarda 10 mM Nac uygulaması ile birlikte kimyasalların etkisi belirgin düzeyde azalarak hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı artışlar görüldü (Şekil 4.10) (***p<0,001). 6,25 µM kalkon kompleksi ve 500 µM VPA kombinasyonunda hücre canlılığı %32,60 iken, aynı gruba NAC uygulandığında bu oran %81,95'e yükseldi. 12,5 µM kalkon kompleksi ve 500 µM VPA kombinasyonunda hücre canlılığı %12,24 iken, NAC uygulaması ile bu değer %74,87'ye çıktı. Bu bulgular, kalkon kompleksinin ve

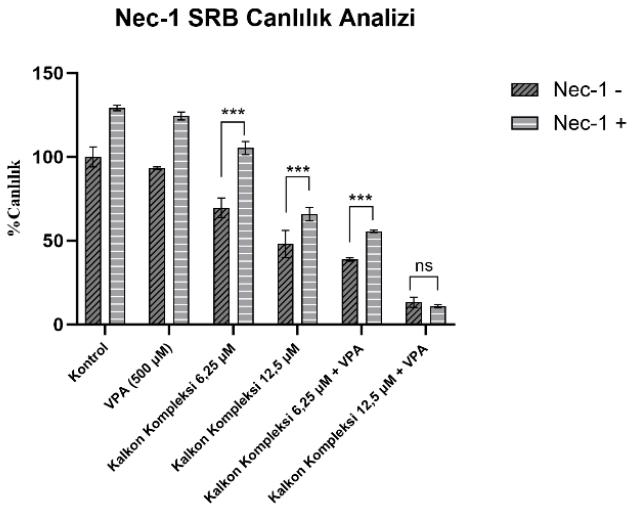
kombinasyon tedavisinin TPC-1 hücrelerinde ROS aracılı hücre ölümünü indüklediğini göstermektedir.



Şekil 4.10. TPC-1 hücrelerine, 10 mM NAC ile 3 saatlik ön muamelenin ardından, 6,25 µM ve 12,5 µM dozlarında kalkon kompleksi ile 500 µM VPA'nın 48 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen SRB analizine ait hücre canlılık yüzdeleri (%). Veriler, ortalama ± SD olarak ifade edilmiştir (n = 3). NAC uygulanmayan (NAC–) ve uygulanan (NAC+) gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık düzeyleri şu şekilde sunulmuştur: ***p<0,001. VPA, Valproik Asit.

4.6.3. Nec-1 Bulguları

Kombinasyon tedavisinin TPC-1 hücrelerinde RIP1 aracılı hücre ölümü üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, spesifik bir RIP1 inhibitörü olan Nec-1 kullanıldı. Kalkon kompleksinin 6,25 µM ve 12,5 µM dozlarının uygulandığı gruplarda, Nec-1 ile ön muamele yapılan hücrelerde hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlendi (Şekil 4.11) (***p<0,001). 6,25 µM kalkon kompleksi ve 500 µM VPA kombinasyonunda ise hücre canlılığı %38,87 iken, Nec-1 uygulaması olan grupta bu oran %55,61'e yükseldi. Ancak 12,5 µM kalkon kompleksi ve 500 µM VPA kombinasyonunda Nec-1 uygulaması, hücre canlılığında anlamlı bir değişikliğe sebep olmadı. Bu bulgular, kalkon kompleksinin tek başına uygulamalarının ve 6,25 µM ile VPA kombine tedavisinin TPC-1 hücreleri üzerinde gözlenen etkinin RIP1 aracılı hücre ölüm mekanizmasıyla ilişkili olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 4.11. TPC-1 hücrelerine, 50 µM Nec-1 ile 24 saatlik ön muamelenin ardından, 6,25 µM ve 12,5 µM dozlarında kalkon kompleksi ile 500 µM VPA'nın 48 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen SRB analizine ait hücre canlılık yüzdeleri (%). Veriler, ortalama ± SD olarak ifade edilmiştir (n = 3). Nec-1 uygulanmayan (Nec–) ve uygulanan (Nec+) gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık düzeyleri şu şekilde sunulmuştur: ***p<0,001. VPA, Valproik Asit.

4.7. Western Blot Bulguları

Kombine tedavinin TPC-1 hücreleri üzerindeki moleküler mekanizmalarını belirlemek amacıyla Western blot analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz kapsamında, kalkon kompleksinin 12,5 µM dozu ve 500 µM VPA kullanıldı. Ayrıca ROS inhibitörü NAC, bu kimyasallarla birlikte uygulanarak deneysel tasarıma dahil edildi.

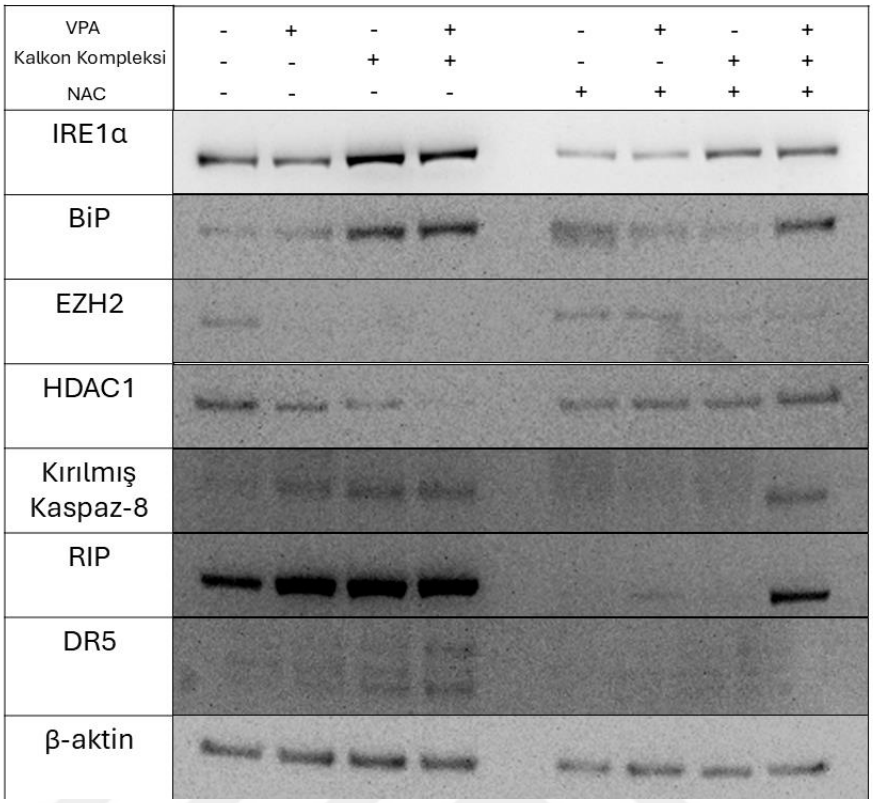
Kombine tedavinin epigenetik düzenleyiciler üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla HDAC1 ve EZH2 protein düzeyleri analiz edilmiştir. EZH2, tümör baskılayıcı genlerin susturulmasıyla ilişkili, epigenetik bir düzenleyicidir (Zhou ve ark., 2015). HDAC1'in VPA tarafından inhibe edildiği bilinmektedir (Phiel ve ark., 2001).

BiP ve IRE1α, endoplazmik retikulum (ER) stresi ile ilişkinin değerlendirilmesi amacıyla analiz edildi. Hücrede katlanmamış protein yanıtı, ER içerisinde düzgün katlanmamış proteinlerin birikmesiyle tetiklenen temel bir hücresel mekanizmadır ve bu durum ER stresi olarak tanımlanır. Bu sürece duyarlı olan ER membran reseptörlerinden biri IRE1, bir ER stres sensörü olarak görev yapar (Ong ve ark., 2024). IRE1α, ER'de BiP ile fiziksel olarak etkileşim halinde tutulur. Ancak katlanmamış proteinlerin ER'de birikmesi, BiP'in

IRE1α’dan ayrılmasına ve bunun sonucunda IRE1α'nın aktifleşmesine yol açmaktadır (Chen & Brandizzi, 2013). BiP'in ER stresini tespit etmede anahtar bir bileşen olduğu bildirilmiştir (Carrara ve ark., 2015).

İnhibitör uygulamaları ve floresan boyama sonuçları doğrultusunda, hücresel ölüm mekanizmalarıyla ilişkili olan RIP, Kırılmış Kaspaz-8 ve DR5 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri analiz edildi. Bu proteinler RIPK aracılı dışsal apoptoz yolu ile bağlantılıdır (Yuan & Ofengeim, 2023).

Analizler sonucunda, IRE1α ve BiP proteinlerinin kalkon kompleksinin tek başına ve kombine tedavi uygulamalarında, kontrol ve VPA gruplarına kıyasla artış gösterdiği gözlemlendi. NAC uygulanan gruplarda ise bu proteinlerin düzeylerinde belirgin bir azalma tespit edildi. EZH2 seviyelerinde VPA, kalkon kompleksi ve kombine tedavi gruplarında kontrol grubuna kıyasla belirgin bir azalma görüldü. HDAC1 düzeylerinde hem VPA hem de kalkon kompleksinin tek başına uygulandığı gruplarda kontrol grubuna göre azalma saptandı. Bununla birlikte kombine tedavi grubunda azalışın daha belirgin olduğu gözlendi. NAC uygulanan gruplarda ise bu azalışın engellendiği görüldü. Kırılmış Kaspaz-8 düzeyleri kombine tedavi grubunda, kontrol grubuna göre artış gösterdi. RIP düzeylerinde ise VPA, kalkon kompleksi ve kombine tedavi gruplarında kontrol grubuna kıyasla artış tespit edilirken, NAC uygulamasının bu artışları engellediği görüldü. DR5 düzeyleri incelendiğinde kombine tedavi grubunda, diğer gruplara kıyasla belirgin bir artışın olduğu; NAC uygulamasının ise bu artışı baskıladığı görüldü.



Şekil 4.12. TPC-1 hücrelerinde NAC varlığında (NAC+) ve yokluğunda (NAC-), 12,5 µM kalkon kompleksi ve 500 µM VPA kombinasyonunun hedef proteinlerin ekspresyon düzeylerine etkisinin incelenmesi. Referans (housekeeping) protein olarak β-aktin kullanılmıştır. VPA, Valproik Asit.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tiroid kanseri, dünya genelinde en hızlı artış gösteren malignitelerden biridir ve son otuz yılda insidansı artmaya devam etmiştir (Bao ve ark., 2021; Bhattacharya ve ark., 2023). PTK'nın prognozu genel olarak olumlu seyretse de, bazı tümörlerin agresif özellik göstermesi, cerrahi ve radyoterapi gibi geleneksel tedavilere karşı direnç gelişmesine neden olabilmektedir. Bu direnç mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte tekrarlayan veya metastatik PTK vakalarının tedavisi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Cha ve ark., 2016).

Kalkonlar yeni antikanser ajanlarının geliştirilmesi için yararlı şablonlardır. Kalkonların fenil halkalarındaki belirli pozisyonlara hidroksil ve metoksi gruplarının eklenmesi, bu sentetik bileşiklerin antikanser potansiyelini artırmaktadır (Gomes ve ark., 2017). Bu tez çalışmasında kullanılan "3-(3-metoksi-4-hidroksifenil)-1-(benzofuran-2-il)-2-propen-1-on" adlı kalkon kompleksi, yapısında metoksi ve hidroksi gibi fonksiyonel gruplar içermesi nedeniyle potansiyel antikanser aktivite gösterebileceği düşünülmüştür. Bir diğer önemli nokta, kalkon komplekslerinin diğer terapötik ajanlarla kombinasyon halinde uygulanmasının antikanser etkinliği artıracağının öngörülmesidir (Ouyang ve ark., 2021).

VPA'nın çeşitli kanser hücre hatlarında sitotoksisiteyi artırdığı; ölüm reseptörleri ve kaspaz yolaklarını aktive ederek apoptozu ve hücre büyümesinin durmasını indüklediği bildirilmektedir (Park vd., 2021). Ayrıca VPA, kombinasyon tedavilerde kullanılabilecek umut verici bir antikanser ajan olarak dikkat çekmektedir (Kwiecińska ve ark., 2016). Kemoterapötik ajanlar, hem tümör hücrelerinde hem de sağlıklı hücrelerde sitotoksik etkilere neden olabilmektedir. Farklı moleküler hedeflere etki eden ilaçların birlikte kullanılması, hem ilaç direnci gelişme riskini azaltmakta hem de monoterapilere kıyasla toksisiteyi azaltarak tedavi etkinliğini artırmaktadır (Al-Lazikani ve ark., 2012). Bu doğrultuda, tez çalışmasında kalkon kompleksi ile VPA kombinasyonunun sitotoksik etkileri ve altta yatan mekanizmaları, bir PTK hücre modeli olan TPC-1 hücre soyunda araştırılmıştır.

Kalkon kompleksinin TPC-1 hücreleri üzerindeki etkisi SRB canlılık analizi ile değerlendirildiğinde doza bağımlı olarak sitotoksik etkinin arttığı görüldü (Şekil 4.3). Kompleksin IC_{50} değeri 9,61 μM olarak hesaplandı. Literatürde, kalkonların tiroid kanserindeki etkinliğini inceleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bir çalışmada, doğal bir kalkon türevi olan butein'in PTK hücrelerinde (NPA hücre hattı), hücre canlılığını etkili bir şekilde azalttığı ve 40 μM dozunda %50 canlılık oranı verdiği gösterilmiştir (Tripathi & Kulkarni, 2021). Bununla birlikte, kalkon komplekslerinin diğer kanser türlerinde etkileri üzerine çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bir çalışmada, florlu kalkonların insan pankreas BXPC-3 kanser hücrelerinde ve insan meme BT-20 kanser hücrelerinde güçlü antioksidan ve antiproliferatif aktivite gösterdiği bulunmuştur (Padhye ve ark., 2010). *In vivo* olarak gerçekleştirilen bir çalışmada, sentezlenen ligustrazin-kalkon türevlerinin üçlü negatif meme kanseri modelinde tümör büyümesini anlamlı düzeyde azalttığı gösterilmiştir (Luo ve ark., 2021). Bu çalışmalar gibi, kalkonların tümör hücrelerinin büyümesini hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak baskıladığını gösteren araştırmalar bulunmaktadır (Constantinescu & Lungu, 2021; Darband vd., 2018). Tez çalışmamızda kalkon kompleksinin TPC-1 hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Bir çalışmada, 2'-hidroksi-2,5-dimetoksikalkon (IC_{50}: 9.76 μM) ve 2'-hidroksi-4',6'-dimetoksikalkon (IC_{50}: 9.18 μM) bileşiklerinin lenfoma hücre hattında antiproliferatif ve proapoptotik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Pawlak ve ark., 2020). Bu bulgu, çalışmamızda elde edilen kalkon kompleksinin IC_{50} değeri (9,61 μM) ile benzerlik göstermektedir.

Tez çalışmasında, kalkon kompleksi ile VPA kombinasyonunun sitotoksik etkileri TPC-1 hücrelerinde araştırıldı. İlk olarak VPA'nın kombine tedavilerde kullanılacak toksik olmayan dozunun belirlenmesi için, 8-0,25 mM aralığındaki doz cevapları SRB analizi ile değerlendirildi (Şekil 4.2). Yapılan analiz sonucunda, hücre canlılığını %90,84 oranında koruyan 0,5 mM dozunun kombinasyon çalışmalarında kullanılmasına karar verildi. Literatürde 0,5 mM VPA'nın HDAC enzimatik aktivitesini doğrudan inhibe ettiği gösterilmiştir (Göttlicher ve ark., 2001). Bu nedenle devam eden tüm analizlerde VPA'nın 0,5 mM dozu kullanılmıştır.

Kalkon kompleksinin VPA ile kombinasyonunun etkisi SRB canlılık analizi ile değerlendirildiğinde kalkon kompleksinin IC_{50} 9,61 µM hesaplanmışken kombine tedavide IC_{50} değeri 6,42 µM'a düştü. Sonuçlar, VPA'nın toksik olmayan dozu ile kalkon kompleksinin kombinasyon halinde TPC-1 hücrelerine uygulanmasının, hücre canlılığını daha etkili bir şekilde düşürerek sitotoksik etkiyi artırdığını göstermiştir (Şekil 4.3). Kalkonların VPA ile kombinasyonunu doğrudan inceleyen bir çalışmaya literatürde rastlanmamış olup, bu durum tez çalışmasının özgünlüğünü ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, VPA'nın farklı antikanser ajanlarla kombinasyonunu değerlendiren çalışmalar mevcut olsa da, bu araştırmalar tiroid kanseri bağlamında sınırlı kalmaktadır. Örneğin bir çalışmada, TRAIL ve VPA (2 ve 5 mM dozlarında) kombinasyonunun TPC-1 hücrelerinde, hücre canlılığını anlamlı düzeyde düşürdüğü görülmüştür (Cha ve ark., 2016).

Kombine tedavinin TPC-1 hücrelerinin migrasyon yapabilme kabiliyeti üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla yara iyileşmesi ve transwell analizi gerçekleştirildi. Migrasyon analizleri için kalkon kompleksinin toksik olmayan dozu 1.56 µM kullanıldı. Elde edilen bulgular, kombinasyon tedavisinin TPC-1 hücrelerinin migrasyon kabiliyetini azalttığını gösterdi (Şekil 4.4-Şekil 4.5). Bir çalışmada VPA, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre göçünü belirgin şekilde inhibe etmiştir. Bu etki, HDAC2'nin hedeflenmesi ile ilişkilendirilmiştir (Zhang ve ark., 2012). Bir kalkon türevinin KYSE-4 özofagus kanseri hücrelerinde migrasyon ve invazyonu baskıladığı gösterilmiştir (Chen ve ark., 2020). PTK hücreleri üzerinde yürütülen bir çalışmada, doğal bir kalkon türevi olan butein'in düşük konsantrasyonlarda hücre migrasyonunu ve glikolizi inhibe ettiği, vimentin fosforilasyonunu baskıladığı ve kanser kök hücre popülasyonunu azalttığı gösterilerek, metastazı önlemeye yönelik potansiyel bir tedavi ajanı olduğu ortaya konmuştur (Tripathi & Kulkarni, 2021). Literatürde, VPA ve kalkon komplekslerinin tek başlarına migrasyonu baskılama yeteneklerinin olduğu bildirilmiştir. Tez çalışmamızda ise kalkon kompleksi ile VPA kombinasyonunun migrasyonu etkili bir şekilde engellediği gösterilmiştir.

Kombine tedavinin TPC-1 hücrelerinde koloni oluşturma üzerindeki etkisinin incelenmesine yönelik koloni oluşumu analizi yapıldı. Analizde, kalkon kompleksinin

toksik olmayan dozu 3,12 μM kullanıldı. Kalkon kompleksi ile VPA'nın birlikte uygulanması, her bir bileşiğin tek başına uygulanmasına kıyasla koloni oluşumunu anlamlı şekilde azalttı (Şekil 4.6). Bu bulgu, kombine tedavinin hücre proliferasyonunu etkili biçimde baskıladığını ortaya koymaktadır. VPA'nın 1 mM konsantrasyonunda, 8305C ve B-CAP tiroid kanseri hücre hatlarında koloni oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (Haghpanah ve ark., 2014). Melanoma hücre hatlarında, lj-1-59 adlı yeni sentezlenmiş bir kalkon türevi koloni oluşumunu azaltmıştır (Li ve ark., 2020). Yeni sentezlenen başka bir kalkon türevinin kastrasyona dirençli prostat kanserinde koloni oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Xiao ve ark., 2023). Gastrointestinal kanserlerde yapılan pek çok çalışmada çeşitli kalkon türevlerinin koloni oluşumunu ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Michalkova ve ark., 2023). Literatürde, hem VPA'nın hem de kalkon komplekslerinin tek başlarına koloni oluşumunu baskılama yeteneğine sahip oldukları bildirilmektedir. Tez çalışmamızda ise, kalkon kompleksi ile VPA'nın kombinasyon halinde uygulanmasının koloni oluşumunu etkili bir şekilde engellediği ortaya konmuştur.

Kombine tedavinin etki ettiği hücre ölümü mekanizmasını belirlemek amacıyla Anneksin-V/PI boyaması yapıldı. Bulgular, özellikle 12,5 μM kalkon kompleksi ile uygulanan kombine tedavinin Anneksin-V(+) ve PI(+) hücre sayısında belirgin artışa neden olduğunu gösterdi (Şekil 4.7). Ayrıca, Hoechst boyaması ile yapılan incelemede, kombine tedavi uygulanan grupta nükleusların küçüldüğü gözlemlendi. Bu bulgular, kombine tedavinin geç apoptoz veya sekonder nekroza yol açtığını düşündürdü. Doğal bir kalkon türevinin insan akciğer kanseri hücre hattı H292 üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, akış sitometriyle yapılan Anneksin-V/PI analizi, apoptozun tetiklendiğini ortaya koymuştur (Chen ve ark., 2017). ATK hücre hatlarında yapılan bir çalışmada, VPA'nın tek başına apoptozu indüklemediği, ancak doksorubisin ile birlikte uygulandığında apoptozu anlamlı düzeyde artırdığı gösterilmiştir. Bulgular, kombine tedavide VPA'nın HDACi etkisi yoluyla doksorubisin aracılı apoptozu güçlendirdiğini düşündürmüştür (Catalano ve ark., 2006). Tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular, VPA'nın tek başına apoptozu indüklemediğini, kalkon kompleksinin ise sınırlı düzeyde apoptotik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Ancak her iki ajanın birlikte uygulanması,

apoptozu belirgin şekilde tetiklemiştir. Bu sonuçlar, literatür ile değerlendirildiğinde apoptotik etkinin kombinasyon tedavisine bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Hücre ölüm mekanizmasının aydınlatılması amacıyla inhibitör analizleri yapılmıştır. Kombine tedavinin kaspazlara bağlı olup olmadığını değerlendirmek amacıyla genel kaspaz inhibitörü Z-VAD-FMK uygulandı. Bulgular, hem kalkon kompleksinin hem de VPA ile kombinasyonun hücre ölümünü büyük ölçüde kaspazlar aracılığıyla indüklediğini ortaya koydu (Şekil 4.9). HT1080 sarkoma hücrelerinde Z-VAD-FMK tedavisi, kalkonla indüklenen hücre ölümünü önemli ölçüde azaltmıştır (Kim ve ark., 2021). Bir çalışmada, bir kalkon türevinin SK-MEL-1 melanom hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiş; ayrıca Z-VAD-FMK uygulandığında, akış sitometrisi ile saptanan apoptotik hücre oranındaki artışın büyük ölçüde engellendiği tespit edilmiştir (Rodríguez ve ark., 2021). Literatürde, kalkonların indüklediği apoptozun Z-VAD-FMK ile inhibe edildiği gösterilmiştir. Bu bulgular, tez çalışmamızda elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.

RIP1 aracılı hücre ölümünü değerlendirmek amacıyla Nec-1 inhibitörü uygulanmıştır. Yapılan analizler, kalkon kompleksinin 6,25 ve 12,5 μM dozlarında gözlemlenen sitotoksik etkinin, RIP1 aracılığıyla gerçekleştiğini gösterdi (Şekil 4.11). Ayrıca, 6,25 μM kalkon kompleksi ile VPA kombinasyonun da RIP1 bağımlı bir ölüm mekanizmasına yol açtığı tespit edildi. Ancak, 12,5 μM kalkon kompleksinin dozu ile yapılan kombine tedavide anlamlı bir etki saptanmadı. Bu durum, bu dozda kullanılan inhibitörün RIP1 aktivitesini yeterince baskılayamamasından veya bu koşullarda farklı ölüm mekanizmalarının da sürece dahil olmasından kaynaklanıyor olabilir. Nec-1, literatürde genel olarak nekroptoz inhibitörü olarak geçse de, giderek artan sayıda çalışma, Nec-1'in sadece nekroptozu baskılamadığını, aynı zamanda apoptozu da inhibe ettiğini göstermektedir (Liang ve ark., 2018; Wang ve ark., 2012). Z-VAD-FMK ve Nec-1 uygulaması ile alınan sonuçlar, kombine tedavinin TPC-1 hücrelerinde kaspaz bağımlı ve RIP1 aracılı dışsal apoptozu tetiklediğini düşündürmüştür.

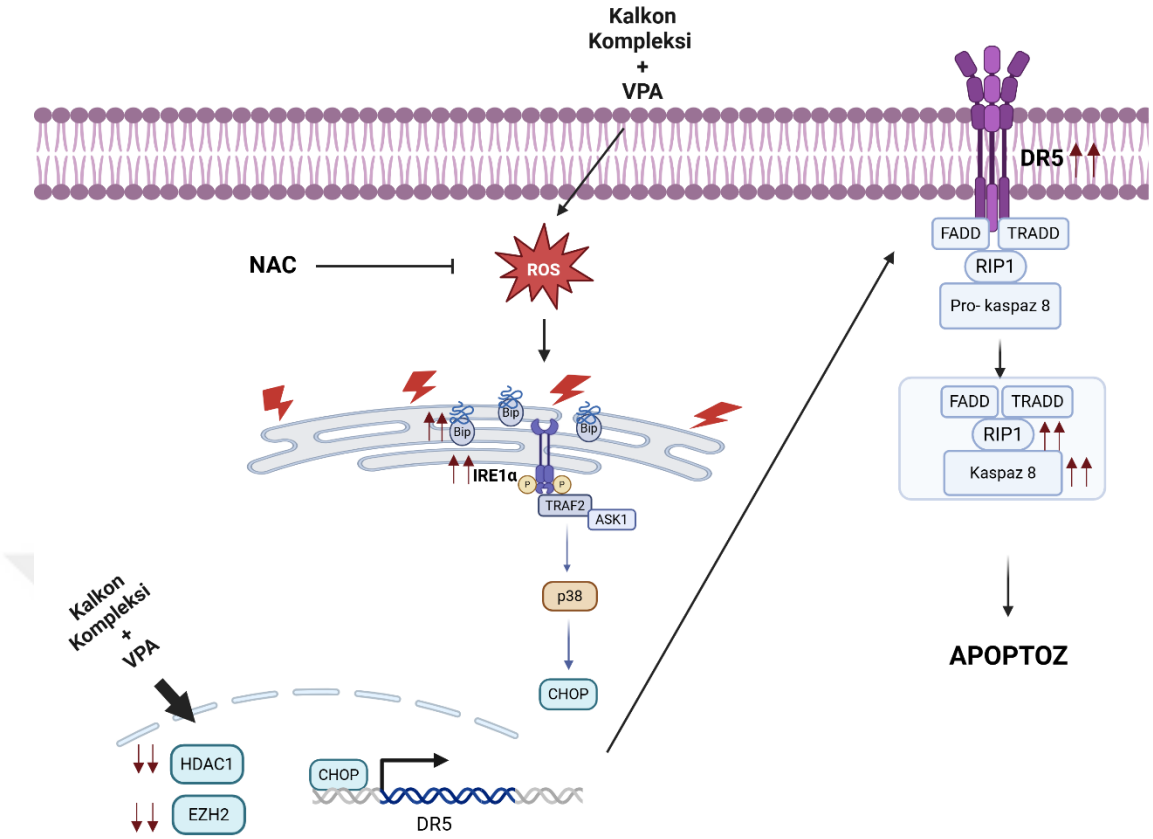
Kombine tedavinin ROS aracılı hücre ölümü üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla NAC uygulaması ile SRB canlılık analizi gerçekleştirildi (Şekil 4.10). Elde edilen veriler, hem kalkon kompleksinin hem de kombine tedavinin, ROS üretimine bağlı olarak

sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koydu. Ayrıca ROS üretimin gözlemlenmesi amacıyla DHE boyama analizi yapıldı. Sonuçlar, hem kalkon kompleksinin hem de kombine tedavilerin DHE (+) hücre sayısını artırdığını gösterdi (Şekil 4.8). Buna karşılık, NAC uygulaması ROS üretimini inhibe ederek hücre ölümünü belirgin şekilde engellemiştir. Bu bulgular kalkon kompleksinin ve kombine tedavilerin TPC-1 hücrelerinde ROS aracılı hücre ölümüne yol açtığını göstermektedir. Eterleştirilmiş bir kalkon türevinin, mide kanseri hücrelerinde mitokondri kaynaklı apoptozu indüklediği, ROS üretimini artırdığı ve bu etkinin NAC uygulamasıyla baskılanabildiğini göstermiştir (Zhang ve ark., 2017). Yapılan başka bir çalışmada, bir kalkon türevinin hem sisplatine duyarlı hem de dirençli yumurtalık kanseri hücrelerinde antiproliferatif etki gösterdiğini ve bu etkinin temelinde ROS birikiminin yer aldığını göstermiştir. Hücre döngüsü durması, apoptoz ve sinyal yolaklarının düzenlenmesi gibi etkilerin çoğunun NAC ile baskılanması, ROS'un bu süreçte belirleyici olduğunu ortaya koymuştur (Salanci ve ark., 2024). Literatürde kalkonların ROS üretimini artırdığı gösterilmiştir; bu durum, elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir. Elde edilen bulgular, literatür ışığında değerlendirilmiş ve kombinasyon tedavisindeki apoptotik etkinin ROS aracılı olduğu sonucuna varılmıştır.

Kombine tedavinin TPC-1 hücrelerinde etki ettiği hücre ölüm modu ilişkili sonuçların doğrulanması ve moleküler mekanizmanın aydınlatılması için western blot analizi yapıldı. ER stresine bağlı IRE1α ve BiP protein düzeylerinin kalkon kompleksi ve kombine tedavi gruplarında arttığı, ancak NAC uygulamasıyla bu artışın azaldığı belirlendi (Şekil 4.12). Bu sonuçlar, kalkon kompleksi ve VPA kombinasyonunun TPC-1 hücrelerinde, Şekil 5.1'de gösterildiği üzere, ROS üretimine sebep olduğunu ve bu durumun IRE1α ve BiP miktarlarını artırarak ER stresine yol açtığını göstermektedir. Literatürde artan ROS düzeylerinin ER stresini şiddetlendirebildiği ve ER içerisinde aşağı akış sinyal yolaklarını aktive edebildiği bildirilmiştir (Ong & Logue, 2023).

Western blot bulgularında apoptoz belirteci kırılmış Kaspaz-8 ve dışsal apoptoz ile ilişkili RIP1, tedavi gruplarında artarken, DR5 düzeyleri özellikle kombine tedaviyle yükseldi. NAC uygulaması ise bu artışları baskıladı (Şekil 4.12). ER stresi sırasında dışsal apoptotik yol, içsel uyarıcılar aracılığıyla tetiklenebilmektedir. Bu süreçle ilişkili temel yolaklardan biri, IRE1 aracılığıyla aktive edilen TRAF2'nin uyarılmasıdır. TRAF2'nin

aktive olmasıyla birlikte Apoptoz Sinyal Düzenleyici Kinaz 1 (ASK1), JNK ve p38 MAPK gibi sinyal yolakları aktive olur. Bu bağlamda, p38 MAPK yolu, CHOP transkripsiyon faktörünün serin 78 ve 81 kalıntılarının fosforilasyonunu teşvik ederek transkripsiyonel aktivitesini artırır. Artan CHOP aktivitesi, DR5 gibi proapoptotik hedef genlerin transkripsiyonunu destekler (Sisinni ve ark., 2019). Bu doğrultuda tez çalışmasında, kombinasyon tedavisinin yol açtığı ER stresinin, CHOP'un transkripsiyonel düzeyde artışını desteklediği ve buna bağlı olarak DR5 ekspresyonunun da arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Artan DR5 miktarının, ilgili sinyal yolunda yer alan RIP ve Kaspaz-8 artışıyla birlikte apoptozu indüklediği ortaya konulmuştur (Şekil 5.1). Mide kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada, yeni sentezlenen bir kalkon türevinin kaspaz 9/3 kaskadını aktive ederek apoptozu indüklediği, ayrıca DR5 ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Bu bileşiğin MGC803 hücrelerinde ROS oluşumunu belirgin şekilde tetiklediği, NAC uygulamasının ise bu etkileri baskıladığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte Z-VAD-FMK uygulamasının apoptozu azalttığı görülmüştür. Sonuç olarak bu kimyasalın mide kanseri hücrelerinde ROS'a bağlı DR5 düzeylerini artırarak apoptoza sebep olduğu bildirilmiştir (Zhang vd., 2017). Bu bulgu, tez çalışmasında varılan sonuçları destekler niteliktedir. Sonuç olarak, kalkon kompleksi ve VPA kombinasyonunun TPC-1 hücrelerinde, Şekil 5.1'de gösterildiği üzere, ROS aracılı ER stresine neden olduğu ve bu durumun RIP1 aracılı dışsal apoptotik yolak üzerinden hücre ölümünü indüklediği ortaya konulmuştur.



Şekil 5.1. Kalkon kompleksi ile VPA kombinasyonunun TPC-1 hücreleri üzerinde etki ettiği moleküler mekanizmalar. Şekil, BioRender kullanılarak hazırlanmıştır.

Western blot analizindeki diğer bir bulguda, epigenetik düzenleyicilerinden EZH2 ve HDAC1 seviyelerinde tüm tedavi gruplarında azalma gözlendi (Şekil 4.12). Özellikle HDAC1'deki azalma, kombine tedavi grubunda çok daha belirgindi; NAC uygulaması ise bu azalışı engelledi. Yapılan bir çalışmada VPA uygulaması, HepG2 hücrelerinde HDAC1, HDAC2 ve HDAC3 düzeylerini azaltarak apoptozu indüklemiştir. Bu etki, tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonu ve mitokondriyal apoptotik yolun uyarılmasıyla ilişkilendirilmiştir (Sanaei & Kavoosi, 2021). Kolon kanseri DLD-1 hücrelerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, bir antineoplastik ajan ile VPA kombinasyonunun, kaspaz bağımlı apoptozu sinerjik olarak indüklediği gösterilmiştir. Bu kombinasyon, HDAC inhibisyonu yoluyla ROS üretimini ve ER stresini artırarak, proapoptotik proteinlerden CHOP ve DR5 seviyelerini yükseltmiştir. Aynı zamanda, bu kombinasyon çeşitli malign kanser hücrelerinde de ROS-bağımlı apoptozu indüklemiştir (Koyama ve ark., 2010). Literatürdeki bulgular değerlendirildiğinde, tez kapsamında araştırılan kombine tedavi

yaklaşımının TPC-1 hücrelerinde HDAC inhibisyonu yoluyla apoptoza katkıda bulunabileceğini düşündürmüştür.

EZH2, birçok kanser türünde aşırı eksprese edilen ve olumsuz prognozla ilişkilendirilen önemli bir prognostik biyobelirteçtir. Baş-boyun yassı hücreli karsinomu (HNSCC) hücrelerinde gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalar, EZH2 inhibisyonunun hücre apoptozunu ve hücre döngüsü duraksamasını tetiklediğini, ayrıca hücre büyümesini azalttığını ortaya koymuştur. EZH2 ifadesinin baskılanması, HNSCC hücrelerini hücre döngüsü duraksamasına ve apoptoza karşı daha duyarlı hale getirmiştir. Bununla birlikte, EZH2'nin tümör baskılayıcı genleri susturarak kanser progresyonuna katkıda bulunduğu bildirilmektedir (Zhou ve ark., 2015). Bu bağlamda, tez çalışmasında tedavi gruplarının EZH2 düzeylerini azaltması, kromatin yapısında değişikliklere yol açarak TPC-1 hücrelerinin apoptoza karşı duyarlılığını artırmış olabilir.

Tez çalışması kapsamında, kalkon kompleksinin VPA ile kombinasyon halinde uygulanmasının TPC-1 hücrelerinde sitotoksik etkiyi artırdığı, hücre migrasyon yeteneğini azalttığı, proliferasyonu baskıladığı ve apoptozu indüklediği belirlenmiştir. Bulgular, kombinasyon tedavisinin antikanser ve antimetastatik açıdan terapötik potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak bu çalışmada elde edilen *in vitro* bulguların kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi ve klinik uygulamalara yönelik daha güçlü kanıtların elde edilebilmesi için *in vivo* çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

Adewole, K. E., Attah, A. F., & Osawe, S. O. (2023). Exploring phytotherapeutic approach in the management of valproic acid-induced toxicity. *Advances in Traditional Medicine*, *23*(2), 347-367. https://doi.org/10.1007/S13596-021-00575-6

Alcolea, M. P., Alonso-Curbelo, D., Ambrogio, C., Bullman, S., Correia, A. L., Ernst, A., Halbrook, C. J., Kelly, G. L., Lund, A. W., Quail, D. F., Ruscetti, M., Shema, E., Stromnes, I. M., & Tam, W. L. (2024). Cancer Hallmarks: Piecing the Puzzle Together. *Cancer Discovery*, *14*(4), 674-682. https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-24-0097

Al-Lazikani, B., Banerji, U., & Workman, P. (2012). Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nature Biotechnology*, *30*(7), 679-692. https://doi.org/10.1038/nbt.2284

Asya, O., Yumuşakhuylu, A. C., Bağcı, P., Kaya, H., Gönen, A., Gündoğdu, Y., Muradov, T., Şahin, A., & Oysu, Ç. (2022). Relationship of PPARG overexpression with prognostic parameters in papillary thyroid carcinoma. *Acta otorhinolaryngologica Italica : organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale*, *42*(1), 34-40. https://doi.org/10.14639/0392-100x-n1034

Bao, W. Q., Zi, H., Yuan, Q. Q., Li, L. Y., & Deng, T. (2021). Global burden of thyroid cancer and its attributable risk factors in 204 countries and territories from 1990 to 2019. *Thoracic Cancer*, *12*(18), 2494. https://doi.org/10.1111/1759-7714.14099

Bhattacharya, S., Mahato, R. K., Singh, S., Bhatti, G. K., Mastana, S. S., & Bhatti, J. S. (2023). Advances and challenges in thyroid cancer: The interplay of genetic modulators, targeted therapies, and AI-driven approaches. *Life Sciences*, *332*, 122110. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122110

Boz, Z., Hu, M., Yu, Y., & Huang, X. F. (2020). N-acetylcysteine prevents olanzapine-induced oxidative stress in mHypoA-59 hypothalamic neurons. *Scientific Reports*, *10*(1), 1-11. https://doi.org/10.1038/S41598-020-75356-3

Braicu, C., Buse, M., Busuioc, C., Drula, R., Gulei, D., Raduly, L., Rusu, A., Irimie, A., Atanasov, A. G., Slaby, O., Ionescu, C., & Berindan-Neagoe, I. (2019). A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers*, *11*(10). https://doi.org/10.3390/cancers11101618

Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *74*(3), 229-263. https://doi.org/10.3322/caac.21834

Brumatti, G., Sheridan, C., & Martin, S. J. (2008). Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods*, *44*(3), 235-240. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.11.010

Cao, L., & Mu, W. (2020). Necrostatin-1 and necroptosis inhibition: Pathophysiology and therapeutic implications. *Pharmacological Research*, *163*, 105297. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105297

Carrara, M., Prischi, F., Nowak, P. R., Kopp, M. C., & Ali, M. M. U. (2015). Noncanonical binding of BiP ATPase domain to Ire1 and Perk is dissociated by unfolded protein CH1 to initiate ER stress signaling. *eLife*, *2015*(4). https://doi.org/10.7554/elife.03522

Catalano, M. G., Fortunati, N., Pugliese, M., Poli, R., Bosco, O., Mastrocola, R., Aragno, M., & Boccuzzi, G. (2006). Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, enhances sensitivity to doxorubicin in anaplastic thyroid cancer cells. *Journal of Endocrinology*, *191*(2), 465-472. https://doi.org/10.1677/joe.1.06970

Cha, H. Y., Lee, B. S., Chang, J. W., Park, J. K., Han, J. H., Kim, Y. S., Shin, Y. S., Byeon, H. K., & Kim, C. H. (2016). Downregulation of Nrf2 by the combination of TRAIL and Valproic acid induces apoptotic cell death of TRAIL-resistant papillary thyroid cancer cells via suppression of Bcl-xL. *Cancer Letters*, *372*(1), 65-74. https://doi.org/10.1016/J.canlet.2015.12.016

Chen, G., Zhou, D., Li, X. Z., Jiang, Z., Tan, C., Wei, X. Y., Ling, J., Jing, J., Liu, F., & Li, N. (2017). A natural chalcone induces apoptosis in lung cancer cells: 3D-QSAR, docking and an in vivo/vitro assay. *Scientific Reports 2017 7:1*, *7*(1), 1-10. https://doi.org/10.1038/s41598-017-11369-9

Chen, H. C. (2005). Boyden chamber assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *294*, 15-22. https://doi.org/10.1385/1-59259-860-9:015

Chen, J., Kang, C. Y., Niu, Z. X., Zhou, H. C., & Yang, H. M. (2020). A chalcone inhibits the growth and metastasis of KYSE-4 esophageal cancer cells. *The Journal of International Medical Research*, *48*(6), 0300060520928831. https://doi.org/10.1177/0300060520928831

Chen, Y., & Brandizzi, F. (2013). IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends in cell biology*, *23*(11), 10.1016/j.tcb.2013.06.005. https://doi.org/10.1016/J.TCB.2013.06.005

Cheng, Y., He, C., Wang, M., Ma, X., Mo, F., Yang, S., Han, J., & Wei, X. (2019). Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduction and Targeted Therapy 2019 4:1*, *4*(1), 1-39. https://doi.org/10.1038/s41392-019-0095-0

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

Cohen, D. S., Tongson-Ignacio, J. E., Lolachi, C. M., Ghaderi, V. S., Jahan-Parwar, B., & Thompson, L. D. R. (2019). Rethinking Malignancy Risk in Indeterminate Thyroid Nodules with Positive Molecular Studies: Southern California Permanente Experience. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, *161*(3), 419-423. https://doi.org/10.1177/0194599819842859

Constantinescu, T., & Lungu, C. N. (2021). Anticancer Activity of Natural and Synthetic Chalcones. *International journal of molecular sciences*, *22*(21). https://doi.org/10.3390/IJMS222111306

Costa, P. M. da S., Sales, S. L. A., Pinheiro, D. P., Pontes, L. Q., Maranhão, S. S., Pessoa, C. do Ó., Furtado, G. P., & Furtado, C. L. M. (2023). Epigenetic reprogramming in cancer: From diagnosis to treatment. *Frontiers in cell and developmental biology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1116805

Coşkun, D., & Ahmedzade, M. (2008). 3-(Substituted aryl)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propenones, part 1: Synthesis and characterization of some novel chalcones. *Synthetic Communications*, *38*(21), 3613-3622. https://doi.org/10.1080/00397910802178997

Darband, S. G., Kaviani, M., Yousefi, B., Sadighparvar, S., Pakdel, F. G., Attari, J. A., Mohebbi, I., Naderi, S., & Majidinia, M. (2018). Quercetin: A functional dietary flavonoid with potential chemo-preventive properties in colorectal cancer. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(9), 6544-6560. https://doi.org/10.1002/JCP.26595,

Davies, L., & Welch, H. G. (2006). Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *Journal of the American Medical Association*, *295*(18), 2164-2167. https://doi.org/10.1001/jama.295.18.2164

Diori Karidio, I., & Sanlier, S. H. (2021). Reviewing cancer's biology: an eclectic approach. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, *33*(1). https://doi.org/10.1186/s43046-021-00088-y

Duenas-Gonzalez, A., Candelaria, M., Perez-Plascencia, C., Perez-Cardenas, E., de la Cruz-Hernandez, E., & Herrera, L. A. (2008). Valproic acid as epigenetic cancer drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer treatment reviews*, *34*(3), 206-222. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2007.11.003

Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., & Hrabeta, J. (2017). Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *International journal of molecular sciences*, *18*(7). https://doi.org/10.3390/ıjms18071414

Eskander, G., Abdelhamid, S. G., Wahdan, S. A., & Radwan, S. M. (2025). Insights on the crosstalk among different cell death mechanisms. *Cell Death Discovery 2025 11:1*, *11*(1), 1-22. https://doi.org/10.1038/s41420-025-02328-9

Esteller, M. (2008). Epigenetics in Cancer. *New England Journal of Medicine*, *358*(11), 1148-1159. https://doi.org/10.1056/nejmra072067

Farsetti, A., Illi, B., & Gaetano, C. (2023). How epigenetics impacts on human diseases. *European Journal of Internal Medicine*, *114*, 15-22. https://doi.org/10.1016/j.ejım.2023.05.036

Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, *1*(5), 2315-2319. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339

Ghasemi, S. (2019). Cancer's epigenetic drugs: where are they in the cancer medicines? *The Pharmacogenomics Journal 2019 20:3*, *20*(3), 367-379. https://doi.org/10.1038/s41397-019-0138-5

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/canjclın.55.3.178

Gibney, E. R., & Nolan, C. M. (2010). Epigenetics and gene expression. *Heredity*, *105*(1), 4-13. https://doi.org/10.1038/hdy.2010.54

Giordano, T. J. (2016). Follicular cell thyroid neoplasia: Insights from genomics and the Cancer Genome Atlas research network. *Current Opinion in Oncology*, *28*(1), 1-4. https://doi.org/10.1097/cco.0000000000000248

Gomes, M. N., Muratov, E. N., Pereira, M., Peixoto, J. C., Rosseto, L. P., Cravo, P. V. L., Andrade, C. H., & Neves, B. J. (2017). Chalcone Derivatives: Promising Starting Points for Drug Design. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *22*(8). https://doi.org/10.3390/molecules22081210

Gonçalves, A. P., Videira, A., Máximo, V., & Soares, P. (2011). Synergistic growth inhibition of cancer cells harboring the RET/PTC1 oncogene by staurosporine and rotenone involves enhanced cell death. *Journal of Biosciences*, *36*(4), 639-648. https://doi.org/10.1007/S12038-011-9100-7

Gong, F., Guo, Y., Niu, Y., Jin, J., Zhang, X., Shi, X., Zhang, L., Li, R., Chen, L., Ma, R. Z., Gong, F., Guo, Y., Niu, Y., Jin, J., Zhang, X., Shi, X., Zhang, L., Li, R., Chen, L., & Ma, R. Z. (2016). Epigenetic silencing of TET2 and TET3 induces an EMT-like process in melanoma. *Oncotarget*, *8*(1), 315-328. https://doi.org/10.18632/oncotarget.13324

Gonzalez-Gonzalez, R., Bologna-Molina, R., Carreon-Burciaga, R. G., Gómezpalacio-Gastelum, M., Molina-Frechero, N., & Salazar-Rodríguez, S. (2011). Papillary Thyroid Carcinoma: Differential Diagnosis and Prognostic Values of Its Different Variants: Review of the Literature. *ISRN Oncology*, *2011*, 915925. https://doi.org/10.5402/2011/915925

Göttlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Krämer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J. P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P. G., & Heinzel, T. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *The EMBO journal*, *20*(24), 6969-6978. https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.6969

Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *7*(12). https://doi.org/10.1101/cshperspect.A006080

Haghpanah, V., Malehmir, M., Larijani, B., Ahmadian, S., Alimoghaddam, K., Heshmat, R., Ghavamzadeh, A., Adabi, K., & Ghaffari, S. H. (2014). The Beneficial Effects of Valproic Acid in Thyroid Cancer Are Mediated through Promoting Redifferentiation and Reducing Stemness Level: An In Vitro Study. *Journal of Thyroid Research*, *2014*(1), 218763. https://doi.org/10.1155/2014/218763

Hai, R., He, L., Shu, G., & Yin, G. (2021). Characterization of Histone Deacetylase Mechanisms in Cancer Development. *Frontiers in Oncology*, *11*, 700947. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.700947/xml/nlm

Halasi, M., Wang, M., Chavan, T. S., Gaponenko, V., Hay, N., & Gartel, A. L. (2013). ROS inhibitor N-acetyl-l-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors. *The Biochemical journal*, *454*(2), 201. https://doi.org/10.1042/bj20130282

Hamilton, J. P. (2010). Epigenetic mechanisms involved in the pathogenesis of hepatobiliary malignancies. *Epigenomics*, *2*(2), 233-243. https://doi.org/10.2217/epı.10.9

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

Hlozek, J., Pekova, B., Rotnagl, J., Holy, R., & Astl, J. (2022). Genetic Changes in Thyroid Cancers and the Importance of Their Preoperative Detection in Relation to the General Treatment and Determination of the Extent of Surgical Intervention—A Review. *Biomedicines*, *10*(7), 1515. https://doi.org/10.3390/biomedicines10071515

Hong, S. N. (2018). Genetic and epigenetic alterations of colorectal cancer. *Intestinal research*, *16*(3), 327-337. https://doi.org/10.5217/ir.2018.16.3.327

Huang, G., Chen, J., Zhou, J., Xiao, S., Zeng, W., Xia, J., & Zeng, X. (2021). Epigenetic modification and BRAF gene mutation in thyroid carcinoma. *Cancer cell international*, *21*(1). https://doi.org/10.1186/S12935-021-02405-w

Iannelli, F., Roca, M. S., Lombardi, R., Ciardiello, C., Grumetti, L., De Rienzo, S., Moccia, T., Vitagliano, C., Sorice, A., Costantini, S., Milone, M. R., Pucci, B., Leone, A., Di Gennaro, E., Mancini, R., Ciliberto, G., Bruzzese, F., & Budillon, A.

(2020). Synergistic antitumor interaction of valproic acid and simvastatin sensitizes prostate cancer to docetaxel by targeting CSCs compartment via YAP inhibition. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *39*(1). https://doi.org/10.1186/S13046-020-01723-7,

Jirtle, R. L., & Skinner, M. K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews Genetics*, *8*(4), 253-262. https://doi.org/10.1038/nrg2045

Kantarjian, H., Issa, J. P. J., Rosenfeld, C. S., Bennett, J. M., Albitar, M., DiPersio, J., Klimek, V., Slack, J., De Castro, C., Ravandi, F., Helmer, R., Shen, L., Nimer, S. D., Leavitt, R., Raza, A., & Saba, H. (2006). Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: Results of a phase III randomized study. *Cancer*, *106*(8), 1794-1803. https://doi.org/10.1002/cncr.21792

Kim, H. K., Lee, H. Y., Riaz, T. A., Bhattarai, K. R., Chaudhary, M., Ahn, J. H., Jeong, J., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2021). Chalcone suppresses tumor growth through NOX4-IRE1α sulfonation-RIDD-miR-23b axis. *Redox Biology*, *40*, 101853. https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101853

Koren, E., & Fuchs, Y. (2021). Modes of Regulated Cell Death in Cancer. *Cancer discovery*, *11*(2), 245-265. https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-20-0789

Koyama, M., Izutani, Y., Goda, A. E., Matsui, T. A., Horinaka, M., Tomosugi, M., Fujiwara, J., Nakamura, Y., Wakada, M., Yogosawa, S., Sowa, Y., & Sakai, T. (2010). Histone deacetylase inhibitors and 15-deoxy-Δ12,14- prostaglandin J2 synergistically induce apoptosis. *Clinical Cancer Research*, *16*(8), 2320-2332. https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-09-2301

Kwiecińska, P., Taubøll, E., Grzyb, E., Fiedor, E., Ptak, A., & Gregoraszczuk, E. L. (2016). Valproic Acid as a Promising Co-Treatment With Paclitaxel and Doxorubicin in Different Ovarian Carcinoma Cell Lines. *International Journal of Gynecological Cancer*, *26*(9), 1546-1556. https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000814

Li, H., Zhang, Z., Gao, C., Wu, S., Duan, Q., Wu, H., Wang, C., Shen, Q., & Yin, T. (2019). Combination chemotherapy of valproic acid (VPA) and gemcitabine regulates STAT3/Bmi1 pathway to differentially potentiate the motility of pancreatic cancer cells. *Cell and Bioscience*, *9*(1). https://doi.org/10.1186/S13578-019-0312-0

Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, *2*(2), 329-333. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30

Lin, C. Y., Chang, T. W., Hsieh, W. H., Hung, M. C., Lin, I. H., Lai, S. C., & Tzeng, Y. J. (2016). Simultaneous induction of apoptosis and necroptosis by Tanshinone IIA in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Cell Death Discovery*, *2*(1), 1-11. https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.65

Ling, L., Zhang, J., Zhang, X., Wang, P., Ma, M., & Yin, B. (2025). Iodine-131 induces ferroptosis and synergizes with sulfasalazine in differentiated thyroid cancer cells via suppressing SLC7A11. *Frontiers in Oncology*, *15*, 1580828. https://doi.org/10.3389/fonc.2025.1580828

Liu, Y., Marti, A., & Umbricht, C. (2011). Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Archives of pathology & laboratory medicine*, *135*(5), 39-52. https://doi.org/10.5858/2010-0664-raır.1

Lu, Y., Chan, Y. T., Tan, H. Y., Li, S., Wang, N., & Feng, Y. (2020). Epigenetic regulation in human cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy. *Molecular Cancer 2020 19:1*, *19*(1), 1-16. https://doi.org/10.1186/s12943-020-01197-3

Luo, Y., Wu, W., Zha, D., Zhou, W., Wang, C., Huang, J., Chen, S., Yu, L., Li, Y., Huang, Q., Zhang, J., & Zhang, C. (2021). Synthesis and biological evaluation of novel ligustrazine-chalcone derivatives as potential anti-triple negative breast cancer agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *47*. https://doi.org/10.1016/J.bmcl.2021.128230

Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, *4*(9), 429. https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998

Makarević, J., Rutz, J., Juengel, E., Maxeiner, S., Tsaur, I., Chun, F. K. -H, Bereiter-Hahn, J., & Blaheta, R. A. (2019). Influence of the HDAC Inhibitor Valproic Acid on the Growth and Proliferation of Temsirolimus-Resistant Prostate Cancer Cells In Vitro. *Cancers 2019, Vol. 11, Page 566*, *11*(4), 566. https://doi.org/10.3390/cancers11040566

Mann, B. S., Johnson, J. R., Cohen, M. H., Justice, R., & Pazdur, R. (2007). FDA Approval Summary: Vorinostat for Treatment of Advanced Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma. *The Oncologist*, *12*(10), 1247-1252. https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-10-1247

Mawatari, T., Ninomiya, I., Inokuchi, M., Harada, S., Hayashi, H., Oyama, K., Makino, I., Nakagawara, H., Miyashita, T., Tajima, H., Takamura, H., Fushida, S., & Ohta, T. (2015). Valproic acid inhibits proliferation of HER2-expressing breast cancer cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis through Hsp70 acetylation. *International Journal of Oncology*, *47*(6), 2073-2081. https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3213

McDermott, J., & Jimeno, A. (2014). Belinostat for the treatment of peripheral T-cell lymphomas. *Drugs of Today (Barcelona, Spain : 1998)*, *50*(5), 337-345. https://doi.org/10.1358/dot.2014.50.5.2138703

Michalkova, R., Kello, M., Cizmarikova, M., Bardelcikova, A., Mirossay, L., & Mojzis, J. (2023). Chalcones and Gastrointestinal Cancers: Experimental Evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(6), 5964. https://doi.org/10.3390/ijms24065964

Milutinovic, S., Detich, N., & Szyf, M. (2007). Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis*, *28*(3), 560-571. https://doi.org/10.1093/carcin/bgl167

Mitsiades, N., & Fagin, J. A. (2010). Molecular Genetics of Thyroid Cancer: Pathogenetic Significance and Clinical Applications. *Genetic Diagnosis of Endocrine Disorders* (pp. 117–138). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374430-2.00011-0

Murugan, A. K., & Xing, M. M. (2011). Anaplastic thyroid cancers harbor novel oncogenic mutations of the ALK gene. *Cancer research*, *71*(13), 4403-4411. https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-10-4041

Nervi, C., De Marinis, E., & Codacci-Pisanelli, G. (2015). Epigenetic treatment of solid tumours: A review of clinical trials. *Clinical Epigenetics*, *7*(1). https://doi.org/10.1186/S13148-015-0157-2

Nylén, C., Mechera, R., Maréchal-Ross, I., Tsang, V., Chou, A., Gill, A. J., Clifton-Bligh, R. J., Robinson, B. G., Sywak, M. S., Sidhu, S. B., & Glover, A. R. (2020). Molecular Markers Guiding Thyroid Cancer Management. *Cancers 2020, Vol. 12, Page 2164*, *12*(8), 2164. https://doi.org/10.3390/cancers12082164

Ong, G., & Logue, S. E. (2023). Unfolding the Interactions between Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress. *Antioxidants*, *12*(5), 981. https://doi.org/10.3390/antiox12050981

Ong, G., Ragetli, R., Mnich, K., Doble, B. W., Kammouni, W., & Logue, S. E. (2024). IRE1 signaling increases PERK expression during chronic ER stress. *Cell Death & Disease 2024 15:4*, *15*(4), 1-11. https://doi.org/10.1038/s41419-024-06663-0

Ouyang, Y., Li, J., Chen, X., Fu, X., Sun, S., & Wu, Q. (2021). Chalcone Derivatives: Role in Anticancer Therapy. *Biomolecules*, *11*(6). https://doi.org/10.3390/biom11060894

Padhye, S., Ahmad, A., Oswal, N., Dandawate, P., Rub, R. A., Deshpande, J., Swamy, K. V., & Sarkar, F. H. (2010). Fluorinated 2'-hydroxychalcones as garcinol analogs with enhanced antioxidant and anticancer activities. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *20*(19), 5818-5821. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.07.128

Park, S. A., Han, H. R., Ahn, S., Ryu, C. H., & Jeun, S. S. (2021). Combination treatment with VPA and MSCs-TRAIL could increase anti-tumor effects against intracranial glioma. *Oncology Reports*, *45*(3), 869. https://doi.org/10.3892/or.2021.7937

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 2023 55:8*, *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 2015 517:7534*, *517*(7534), 311-320. https://doi.org/10.1038/nature14191

Pawlak, A., Henklewska, M., Suárez, B. H., Łużny, M., Kozłowska, E., Obmińska-Mrukowicz, B., & Janeczko, T. (2020). Chalcone Methoxy Derivatives Exhibit Antiproliferative and Proapoptotic Activity on Canine Lymphoma and Leukemia Cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *25*(19). https://doi.org/10.3390/molecules25194362

Pekova, B., Dvorakova, S., Sykorova, V., Vacinova, G., Vaclavikova, E., Moravcova, J., Katra, R., Vlcek, P., Sykorova, P., Kodetova, D., Vcelak, J., & Bendlova, B. (2019). Somatic genetic alterations in a large cohort of pediatric thyroid nodules. *Endocrine connections*, *8*(6), 796-805. https://doi.org/10.1530/ec-19-0069

Phiel, C. J., Zhang, F., Huang, E. Y., Guenther, M. G., Lazar, M. A., & Klein, P. S. (2001). Histone Deacetylase is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(39), 36734-36741. https://doi.org/10.1074/jbc.m101287200

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

Puneet, Kazmi, H. R., Kumari, S., Tiwari, S., Khanna, A., & Narayan, G. (2018). Epigenetic Mechanisms and Events in Gastric Cancer-Emerging Novel Biomarkers. *Pathology oncology research : POR*, *24*(4), 757-770. https://doi.org/10.1007/S12253-018-0410-z

Richardson, P. G., Laubach, J. P., Lonial, S., Moreau, P., Yoon, S. S., Hungria, V. T., Dimopoulos, M. A., Beksac, M., Alsina, M., & San-Miguel, J. F. (2015). Panobinostat: A novel pan-deacetylase inhibitor for the treatment of relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, *15*(7), 737-748. https://doi.org/10.1586/14737140.2015.1047770

Rodríguez, I., Saavedra, E., Del Rosario, H., Perdomo, J., Quintana, J., Prencipe, F., Oliva, P., Romagnoli, R., & Estévez, F. (2021). Apoptosis pathways triggered by a potent antiproliferative hybrid chalcone on human melanoma cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(24), 13462-13462. https://doi.org/10.3390/ijms222413462/s1

Rodríguez-Rodero, S., Delgado-Álvarez, E., Díaz-Naya, L., Martín Nieto, A., & Menéndez Torre, E. (2017). Epigenetic modulators of thyroid cancer. *Endocrinologia, diabetes y nutricion*, *64*(1), 44-56. https://doi.org/10.1016/j.endinu.2016.09.006

Safdar, A., & Ismail, F. (2023). A comprehensive review on pharmacological applications and drug-induced toxicity of valproic acid. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, *31*(2), 265-278. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2022.12.001

Salanci, Š., Vilková, M., Martinez, L., Mirossay, L., Michalková, R., & Mojžiš, J. (2024). The Induction of G2/M Phase Cell Cycle Arrest and Apoptosis by the Chalcone Derivative 1C in Sensitive and Resistant Ovarian Cancer Cells Is Associated with ROS Generation. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(14). https://doi.org/10.3390/ijms25147541

Sanaei, M., & Kavoosi, F. (2021). Effect of Valproic Acid on the Class I Histone Deacetylase 1, 2 and 3, Tumor Suppressor Genes p21WAF1/CIP1 and p53, and Intrinsic Mitochondrial Apoptotic Pathway, Pro- (Bax, Bak, and Bim) and anti- (Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1) Apoptotic Genes Expression, Cell Viability, and Apoptosis Induction in Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cell Line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *22*(Supplement 1), 89-95. https://doi.org/10.31557/apjcp.2021.22.s1.89

Silverman, L. R., Demakos, E. P., Peterson, B. L., Kornblith, A. B., Holland, J. C., Odchimar-Reissig, R., Stone, R. M., Nelson, D., Powell, B. L., DeCastro, C. M., Ellerton, J., Larson, R. A., Schiffer, C. A., & Holland, J. F. (2002). Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: A study of the cancer and leukemia group B. *Journal of Clinical Oncology*, *20*(10), 2429-2440. https://doi.org/10.1200/jco.2002.04.117

Singh, D., Gupta, S., Singh, I., Morsy, M. A., Nair, A. B., & Ahmed, A. S. F. (2021). Hidden pharmacological activities of valproic acid: A new insight. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *142*. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112021

Sisinni, L., Pietrafesa, M., Lepore, S., Maddalena, F., Condelli, V., Esposito, F., & Landriscina, M. (2019). Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Breast Cancer: The Balance between Apoptosis and Autophagy and Its Role in Drug Resistance. *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 857*, *20*(4), 857. https://doi.org/10.3390/ijms20040857

Song, J. yong, Sun, S. ran, Dong, F., Huang, T., Wu, B., & Zhou, J. (2018). Predictive Value of BRAFV600E Mutation for Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid

Cancer: A Meta-analysis. *Current medical science*, *38*(5), 785-797. https://doi.org/10.1007/S11596-018-1945-7

Sözer, E. B., Semenov, I., & Thomas Vernier, P. (2024). Dihydroethidium-derived fluorescence in electrically stressed cells indicates intracellular microenvironment modifications independent of ROS. *Bioelectrochemistry*, *160*, 108751. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2024.108751

Sun, J., Piao, J., Li, N., Yang, Y., Kim, K. Y., & Lin, Z. (2020). Valproic acid targets HDAC1/2 and HDAC1/PTEN/Akt signalling to inhibit cell proliferation via the induction of autophagy in gastric cancer. *FEBS Journal*, *287*(10), 2118-2133. https://doi.org/10.1111/febs.15122

Suraweera, A., O'Byrne, K. J., & Richard, D. J. (2018). Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi. *Frontiers in Oncology*, *8*(MAR), 92. https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00092

Szymańska, K., & Bosman, F. T. (2019). Thyroid Cancer: Pathology, Genetics, Diagnosis, and Treatment. Içinde *Encyclopedia of Cancer* (3. bs, ss. 471-482). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65745-8

Takac, P., Kello, M., Vilkova, M., Vaskova, J., Michalkova, R., Mojzisova, G., & Mojzis, J. (2020). Antiproliferative Effect of Acridine Chalcone Is Mediated by Induction of Oxidative Stress. *Biomolecules*, *10*(2), 345. https://doi.org/10.3390/biom10020345

Tripathi, D., & Kulkarni, S. (2021). Butein induces intrinsic pathway of apoptosis, vimentin proteolysis, and inhibition of cancer stem cell population in a human papillary thyroid cancer cell line. *Toxicology in Vitro*, *77*. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105244

Veschi, V., Verona, F., Lo Iacono, M., D'Accardo, C., Porcelli, G., Turdo, A., Gaggianesi, M., Forte, S., Giuffrida, D., Memeo, L., & Todaro, M. (2020). Cancer Stem Cells in Thyroid Tumors: From the Origin to Metastasis. *Frontiers in endocrinology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00566

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

Vijayaraghavalu, S., Dermawan, J. K., Cheriyath, V., & Labhasetwar, V. (2013). Highly synergistic effect of sequential treatment with epigenetic and anticancer drugs to overcome drug resistance in breast cancer cells is mediated via activation of p21 gene expression leading to G2/M cycle arrest. *Molecular Pharmaceutics*, *10*(1), 337-352. https://doi.org/10.1021/mp3004622

Vlček, P., Nováková, D., & Katra, R. (2017). Thyroid carcinomas: The present view on diagnostics and therapy. *Vnitr. Lek.*, *63*(9), 572-579.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science*, *340*(6127), 1546-1558. https://doi.org/10.1126/science.1235122

Wu, C., Schwartz, J. M., Brabant, G., & Nenadic, G. (2014). Molecular profiling of thyroid cancer subtypes using large-scale text mining. *BMC medical genomics*, *7 Suppl 3*(Suppl 3). https://doi.org/10.1186/1755-8794-7-S3-S3

Xiao, H., Wu, Z., Wang, Q., Zhou, C., Lu, F., & Xiao, Y. (2023). Chalcone Derivatives Suppress Proliferation and Migration of Castration-resistant Prostate Cancer Cells

Through FAK-mediated DNA Damage. *Anticancer Research*, *43*(1), 389-403. https://doi.org/10.21873/anticanres.16174

Xing, M. (2013). Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nature reviews. Cancer*, *13*(3), 184. https://doi.org/10.1038/nrc3431

Xing, M. (2016). Clinical utility of RAS mutations in thyroid cancer: a blurred picture now emerging clearer. *BMC medicine*, *14*(1). https://doi.org/10.1186/S12916-016-0559-9

Xing, M., Alzahrani, A. S., Carson, K. A., Shong, Y. K., Kim, T. Y., Viola, D., Elisei, R., Bendlová, B., Yip, L., Mian, C., Vianello, F., Tuttle, R. M., Robenshtok, E., Fagin, J. A., Puxeddu, E., Fugazzola, L., Czarniecka, A., Jarzab, B., O'Neill, C. J., … Sýkorová, V. (2015). Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *33*(1), 42-50. https://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.8253

Xing, M. M., Alzahrani, A. S., Carson, K. A., Viola, D., Elisei, R., Bendlova, B., Yip, L., Mian, C., Vianello, F., Tuttle, R. M., Robenshtok, E., Fagin, J. A., Puxeddu, E., Fugazzola, L., Czarniecka, A., Jarzab, B., O'Neill, C. J., Sywak, M. S., Lam, A. K., … Sykorova, V. (2013). Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA*, *309*(14), 1493-1501. https://doi.org/10.1001/JAMA.2013.3190

Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z. C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience reports*, *39*(1). https://doi.org/10.1042/bsr20180992

Younis, E. (2017). Oncogenesis of Thyroid Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, *18*(5), 1191. https://doi.org/10.22034/apjcp.2017.18.5.1191

Yuan, J., & Ofengeim, D. (2023). A guide to cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 2023 25:5*, *25*(5), 379-395. https://doi.org/10.1038/s41580-023-00689-6

Zhang, L., Wang, G., Wang, L., Song, C., Leng, Y., Wang, X., & Kang, J. (2012). VPA inhibits breast cancer cell migration by specifically targeting HDAC2 and down-regulating Survivin. *Molecular and cellular biochemistry*, *361*(1-2), 39-45. https://doi.org/10.1007/S11010-011-1085-x

Zhang, S., Li, T., Zhang, L., Wang, X., Dong, H., Li, L., Fu, D., Li, Y., Zi, X., Liu, H. M., Zhang, Y., Xu, H., & Jin, C. Y. (2017). A novel chalcone derivative S17 induces apoptosis through ROS dependent DR5 up-regulation in gastric cancer cells. *Scientific Reports 2017 7:1*, *7*(1), 1-13. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10400-3

Zhou, X., Ren, Y., Kong, L., Cai, G., Sun, S., Song, W., Wang, Y., Jin, R., Qi, L., Mei, M., Wang, X., Kang, C., Li, M., & Zhang, L. (2015). Targeting EZH2 regulates tumor growth and apoptosis through modulating mitochondria dependent cell-death pathway in HNSCC. *Oncotarget*, *6*(32), 33720. https://doi.org/10.18632/oncotarget.5606

Zitzelsberger, H., Bauer, V., Thomas, G., & Unger, K. (2010). Molecular rearrangements in papillary thyroid carcinomas. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, *411*(5-6), 301-308. https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.11.028