

**KÖPEK MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE  
HİSTON DEASETİLAZ  
İNHİBİTÖRLERİNİN (HDACi)  
KEMOTERAPOTİK AJANLARLA  
KOMBİNASYONLARININ SİTOTOKSİK  
ETKİLERİNİN VE MOLEKÜLER  
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

**Sena ARDIÇLI**



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÖPEK MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE HİSTON  
DEASETİLAZ İNHİBİTÖRLERİNİN (HDACi)  
KEMOTERAPOTİK AJANLARLA  
KOMBİNASYONLARININ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN VE  
MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Sena ARDIÇLI  
0000-0003-2758-5945

Prof. Dr. Ferda ARI  
(Danışman)  
000-002-6729-7908

Prof. Dr. Hale ŞAMLI  
(2. Danışman)  
0000-0003-4728-0735

DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA– 2025  
**Her Hakkı Saklıdır.**

## ÖZET

Doktora Tezi

### KÖPEK MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE HİSTON DEASETİLİZ İNHİBİTÖRLERİNİN (HDACi) KEMOTERAPOTİK AJANLARLA KOMBİNASYONLARININ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

**Sena ARDIÇLI**

Bursa Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman Prof. Dr. Ferda ARI**

**İkinci Danışman: Prof. Dr. Hale ŞAMLI (Bursa Uludağ Üniversitesi)**

Meme kanseri, hem insanlarda hem de köpeklerde, genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi ile birlikte çok sayıda moleküler mekanizmanın etkili olduğu oldukça yaygın ve kompleks bir hastalıktır. Ancak köpek meme karsinomlarında histon deasetilaz inhibitörleri gibi epigenetik ilaçlar ve kemoterapi ilaçları ile kombinasyonların etkinliği hakkında yeterli bilgi mevcut değildir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında, bir histon deasetilaz inhibitörü olan valproik asitin, köpek meme epitel-benzeri karsinom hücrelerindeki etkinliği değerlendirilmiştir. Aynı zamanda, valproik asitin yaygın olarak kullanılan kemoterapötikler olan vinkristin sülfat ve dosetaksel ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının sitotoksik etkileri ve mekanizmaları araştırılmıştır. Valproik asit, vinkristin sülfat ve dosetaksel ve kombinasyonların sitotoksik aktiviteleri, XTT hücre canlılık testiyle taranmıştır. Hücrelerde apoptoz ve nekroz varlığı Hoechst 33342/Annexin-V/Propidium iyodür üçlü floresan boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Hücre ölüm yollarında önemli rol oynayan genler olan *BCL-2*, *NOXA*, *MCL-1*, *BAX*, *BID*, *PUMA*, *ATM*, *CASP3*, *P53*, *P21*'e ait ekspresyon profilleri gerçek zamanlı PCR kullanılarak değerlendirilmiş ve deneysel koşullar temelinde karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, valproik asitin ve aynı zamanda dosetaksel ile kombinasyonunun çok güçlü bir sitotoksik etki yarattığı gözlenmiştir. Bu kombinasyonda, *BCL-2* ve *MCL-1* gibi anti-apoptotik genlerde çok belirgin aşağı regülasyon ve buna karşın *NOXA*, *BAX*, *BID* ve *PUMA* gibi pro-apoptotik genlerde dikkat çekici bir yukarı regülasyon hücrelerin apoptozis lehine programlandığını ve direnç geliştirme kapasitesinin azaldığını göstermektedir. Bu durum, *ATM*, *CASP3*, *P53* ve *P21* gibi genlerdeki aktivasyon ve aynı zamanda *BAX/BCL-2* eksenindeki rölatif artış ile doğrulanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada valproik asit ve dosetaksel kombinasyon tedavisinin, köpek meme karsinomunda etkin bir tedavi seçeneği potansiyeli olabileceği ortaya konulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Köpek, Meme Kanseri, Valproik Asit, Dosetaksel, Apoptozis  
2025, xxii +185 sayfa.

## ABSTRACT

PhD Thesis

### INVESTIGATION OF CYTOTOXIC EFFECTS AND MOLECULAR MECHANISMS OF HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS (HDACi)-CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS COMBINATIONS IN CANINE BREAST CANCER CELLS

**Sena ARDIÇLI**

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

**Supervisor:** Prof. Dr. Ferda ARI

**Second Supervisor:** Prof. Dr. Hale ŞAMLI (Bursa Uludag University)

Breast cancer, both in humans and dogs, is a highly prevalent and complex disease influenced by numerous molecular mechanisms alongside the accumulation of genetic and epigenetic alterations. However, there is insufficient information regarding the efficacy of epigenetic drugs such as histone deacetylase inhibitors in combination with chemotherapeutic agents in canine mammary carcinomas. Therefore, this thesis study evaluated the effectiveness of valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, on canine mammary epithelial-like carcinoma cells. Furthermore, the cytotoxic effects and mechanisms of valproic acid in dual and triple combinations with widely used chemotherapeutic agents, vincristine sulfate and docetaxel, were investigated. The cytotoxic activities of valproic acid, vincristine sulfate, docetaxel, and their combinations were screened using the XTT cell viability assay. The presence of apoptosis and necrosis in the cells was determined using the triple fluorescence staining method with Hoechst 33342/Annexin-V/Propidium iodide. Expression profiles of genes playing crucial roles in cell death pathways, including *BCL-2*, *NOXA*, *MCL-1*, *BAX*, *BID*, *PUMA*, *ATM*, *CASP3*, *P53*, and *P21*, were evaluated using real-time PCR and compared under experimental conditions. The findings revealed that valproic acid, particularly in combination with docetaxel, exhibited a potent cytotoxic effect. In this combination, significant downregulation of anti-apoptotic genes such as *BCL-2* and *MCL-1* and marked upregulation of pro-apoptotic genes like *NOXA*, *BAX*, *BID*, and *PUMA* indicated a shift in cellular programming towards apoptosis and reduced resistance capacity. This was corroborated by the activation of genes such as *ATM*, *CASP3*, *P53*, and *P21*, as well as a relative increase in the *BAX/BCL-2* axis. In conclusion, this study demonstrated the potential of valproic acid and docetaxel combination therapy as an effective treatment option for canine mammary carcinoma.

**Key words:** Dog, Breast Cancer, Valproic Acid, Docetaxel, Apoptosis  
**2025, xxii +185 pages.**

## TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarında her zaman yanımda olan, güler yüzünü ve desteğini esirgemeyen, bana farklı bir bilim alanından ve fakülteden olduğumu hiçbir zaman hissettirmeyen ve sabırla bu eğitimi tamamlamamı sağlayan değerli danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Ferda ARI'ya,

İkinci bir doktora fikrimi her zaman destekleyen ve bu eğitimi tamamlamamı sağlayan, kendisinden çok şey öğrendiğim ve halen öğrenmekte devam ettiğim; hem hocam hem de ailemin bir üyesi olarak gördüğüm, aynı zamanda ikinci danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Hale ŞAMLI'ya,

Akademik hayatıma başlamamı sağlayan ve en önemlisi bu uzun yolculukta bana her zaman güvenen ve destekleyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Faruk BALCI'ya,

Her zaman yanımda olan, dertlerimi dinleyen, desteklerini ve fikirlerini mutlulukla paylaşan hocalarım ve aynı zamanda değerli dostlarım, Sayın Prof. Dr. Cenk AYDIN, Sayın Prof. Dr. Hakan ÜSTÜNER, Sayın Prof. Dr. Murat CENGİZ'e,

Fen Fakültesi Biyoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyesi değerli hocam Sayın Doç. Dr. Egemen DERE'ye,

Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Fen Fakültesi Biyoloji Ana Bilim Dalı ve İsviçre Alerji ve Astım Enstitüsündeki değerli arkadaşlarıma,

Akademik hayatımdaki büyük şanslarımdan birisi olarak nitelendirdiğim ve hocası olmaktan gurur duyduğum değerli öğrencim Nursen ŞENTÜRK'e,

Bilimsel çalışmalarında hem maddi hem manevi desteğini benden esirgemeyen ve her soruma sabırla cevap veren değerli dostum Berkay BOZKURT'a,

Hem yurt içi hem de yurt dışı yoğun çalışmalarında ve yaşadığım problemlerde bana destek olan, güvenini ve samimiyetini her zaman hissettiğim, değerli hocam Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanı, Sayın Prof. Dr. Bayram ŞENLİK'e,

Tanımdan her zaman gurur duyacağım ve benim için sadece bir hoca değil aynı zamanda bir ağabey olan çok değerli bilim insanı, İsviçre Alerji ve Astım Enstitüsü Direktörü, Sayın Prof. Dr. Cezmi AKDİŞ'e; saygıdeğer bilim insanı ve çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mübeccel AKDİŞ'e,

Bana her zaman güvenen ve destek olan; benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayarak her zaman yanımda olan, iyi dileklerini ve sevgisini her zaman kalbimde hissettiğim, sevgili annem Nuran ARDIÇLI, sevgili babam Ali İhsan ARDIÇLI ve ablam Seda YILMAZ'a,

Sadece bu tez çalışmasında değil her zaman yanımda olan ve sonsuz desteğini benden hiçbir zaman esirgememiş çok değerli eşim Özge ARDIÇLI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezi, Veteriner Hekimlik onkolojisi ve klinik genetik konularına destek ve daha kapsamlı araştırmalara yardımcı olması amacı dileğiyle; her ikisini de meme kanseri nedeniyle kaybettiğim, her önemli anımı benimle paylaşan, can dostlarım Hera ve Rita'ya ithaf ediyorum.

**Sena ARDIÇLI**

14/01/2025

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                     | Sayfa |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET.....                                                                                           | viii  |
| ABSTRACT.....                                                                                       | ix    |
| TEŞEKKÜR .....                                                                                      | x     |
| SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....                                                                    | xiii  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                                                | xvi   |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....                                                                              | xix   |
| 1. GİRİŞ.....                                                                                       | 1     |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ.....                                                                             | 6     |
| 2.1. Kanser .....                                                                                   | 6     |
| 2.2. Kanser Genetiği .....                                                                          | 7     |
| 2.3. Kanserde Epigenetik: Mekanizmalar, Sonuçlar ve Terapötik Potansiyel. ....                      | 8     |
| 2.3.1. Epigenetik Düzenleme Mekanizmaları .....                                                     | 9     |
| 2.3.1.1. DNA Metilasyonu .....                                                                      | 10    |
| 2.3.1.2. Kanserde Global Hipometilasyon .....                                                       | 10    |
| 2.3.1.3. Genomik Kararsızlık ile İlişkisi.....                                                      | 10    |
| 2.3.1.4. Gen-Spesifik Hipermetilasyon ile Etkileşim.....                                            | 11    |
| 2.3.1.5. Kanserin Erken Evreleri ile İlişki.....                                                    | 11    |
| 2.3.1.6. Global Hipometilasyonun Mekanizmaları.....                                                 | 11    |
| 2.4. Tümör Oluşumunda Epigenetik Değişiklikler.....                                                 | 12    |
| 2.4.1. Kanserin Başlangıcı .....                                                                    | 12    |
| 2.4.2. Tümör İlerlemesi.....                                                                        | 12    |
| 2.4.3. Metastaz.....                                                                                | 13    |
| 2.5. Tümör Mikroçevresi ile Epigenetik Etkileşim.....                                               | 13    |
| 2.6. Ökaryotik Kromatin Yapısı.....                                                                 | 14    |
| 2.7. Histonların Yapı ve Özellikleri.....                                                           | 16    |
| 2.8. Histon Modifikasyonları.....                                                                   | 19    |
| 2.9. Histon Asetillenmesi ve Histon Asetiltransferazların (HAT'ler) Kansere Gelişimindeki Rolü..... | 23    |
| 2.10. Histon Deasetilasyonu ve HDAC'lerin Kansere Gelişimindeki Rolü.....                           | 26    |
| 2.11. Valproik Asit (VPA).....                                                                      | 29    |
| 2.11.1. VPA'nın Anti-kanser Etkisi.....                                                             | 34    |
| 2.12. Apoptozis ve Moleküler Regülasyonu.....                                                       | 36    |
| 2.13. Köpeklerde Kansere.....                                                                       | 41    |
| 2.13.1. Köpek Meme Tümörleri.....                                                                   | 42    |
| 2.13.2. Köpek Meme Tümörü Moleküler Biyolojisi .....                                                | 44    |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM.....                                                                          | 55    |
| 3.1. Materyal .....                                                                                 | 55    |
| 3.1.1. Hücre Hattı.....                                                                             | 55    |
| 3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Kitler.....                                                             | 56    |
| 3.1.3. Sarf Malzemeler.....                                                                         | 57    |
| 3.1.4. Cihazlar ve Ekipmanlar.....                                                                  | 58    |
| 3.2. Yöntem .....                                                                                   | 59    |
| 3.2.1. Hücre Kültürü.....                                                                           | 59    |
| 3.2.1.1. Hücre Hatlarının Stoktan Çıkarılması ve Çözdürülmesi.....                                  | 59    |
| 3.2.1.2. Hücre Hatlarının Pasajlanması ve Alt Kültürlerin Oluşturulması.....                        | 60    |
| 3.2.1.3. Hücre Hatlarının Dondurulması ve Saklanması.....                                           | 60    |

|                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2.1.4. Tripan Mavisi Boyası ile Canlı Hücrelerin Sayılması.....                      | 61  |
| 3.2.1.5. Sitotoksik Etkiyi Belirlemek Üzere Hücrelerin Ekimi.....                      | 62  |
| 3.2.2. Test Bileşiklerinin Hazırlanması ve Hücrelere Uygulanması.....                  | 62  |
| 3.2.2.1. Vinkristin Sülfatın Hazırlanması.....                                         | 62  |
| 3.2.2.2. Dosetakselin Hazırlanması.....                                                | 63  |
| 3.2.2.3. Valproik Asidin Hazırlanması.....                                             | 63  |
| 3.2.3. Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi.....                                            | 63  |
| 3.2.3.1. XTT Hücre Canlılık Testi.....                                                 | 64  |
| 3.2.3.2. Hücre Canlılığının Hesaplanması.....                                          | 64  |
| 3.2.4. Kombinasyon Analizi.....                                                        | 65  |
| 3.2.5. Hücre Morfolojisinin Değerlendirilmesi.....                                     | 66  |
| 3.2.6. Floresan Mikroskobunda Hücre Ölüm Modunun Belirlenmesi.....                     | 66  |
| 3.2.7. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (Quantitative PCR: QPCR).....                     | 69  |
| 3.2.7.1. RNA İzolasyonu.....                                                           | 70  |
| 3.2.7.2. Komplementer DNA (Complementary DNA: cDNA) Sentezi.....                       | 71  |
| 3.2.7.3. Primer Dizaynı ve Optimizasyonu.....                                          | 72  |
| 3.2.7.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Analizi.....                                    | 73  |
| 3.2.7.5. Veri Analizi.....                                                             | 74  |
| 3.2.8. İstatistiksel Analiz.....                                                       | 74  |
| 4. BULGULAR .....                                                                      | 76  |
| 4.1. Hücre Kültürü Çalışmalarına İlişkin Bulgular.....                                 | 76  |
| 4.1.1. Vinkristin Sülfatın Sitotoksik Etkisi ile İlgili Bulgular.....                  | 76  |
| 4.1.1.1. XTT Hücre Canlılık Testi Bulguları.....                                       | 76  |
| 4.1.2. Dosetakselin Sitotoksik Etkisi ile İlgili Bulgular.....                         | 78  |
| 4.1.2.1. XTT Hücre Canlılık Testi Bulguları.....                                       | 78  |
| 4.1.3. Valproik Asitin Sitotoksik Etkisi ile İlgili Bulgular.....                      | 80  |
| 4.1.3.1. XTT Hücre Canlılık Testi Bulguları.....                                       | 80  |
| 4.1.4. Kombinasyon Analizleri ile İlgili Bulgular.....                                 | 82  |
| 4.1.4.1. VPA ile Dosetaksel Kombinasyonunun XTT Testi Bulguları.....                   | 82  |
| 4.1.4.2. VPA ile Vinkristin Sülfat Kombinasyonunun XTT Testi Bulguları...              | 83  |
| 4.1.4.3. VPA, Vinkristin Sülfat ve Dosetaksel Kombinasyonunun XTT Testi Bulguları..... | 84  |
| 4.2. Hücre Morfolojisi Değişikliklerine Ait Bulgular.....                              | 85  |
| 4.2.1. Vinkristin Sülfatın CMT-U27 Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisi.....               | 86  |
| 4.2.2. Dosetakselin CMT-U27 Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisi.....                      | 88  |
| 4.2.3. Valproik Asitin CMT-U27 Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisi.....                   | 89  |
| 4.2.4. Kombinasyonların CMT-U27 Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisi.....                  | 91  |
| 4.3. Floresan Mikroskobunda Hücre Ölüm Modunun Belirlenmesi ile İlgili Bulgular.....   | 93  |
| 4.4. Gen Ekspresyonu Analizi ile İlgili Bulgular.....                                  | 95  |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....                                                              | 111 |
| KAYNAKLAR.....                                                                         | 135 |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                                          | 170 |

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

### Açıklama

|                 |                  |
|-----------------|------------------|
| %               | Yüzde            |
| °C              | Santigrad Derece |
| ml              | Mililitre        |
| µl              | Mikrolitre       |
| cm <sup>2</sup> | Santimetrekare   |
| mm <sup>2</sup> | Milimetrekare    |
| mm              | Milimetre        |
| nm              | Nanometre        |
| g               | gram             |
| mM              | Milimolar        |
| µM              | Mikromolar       |
| nM              | Nanomolar        |

### Kısaltmalar

### Açıklama

|                 |                                      |
|-----------------|--------------------------------------|
| ATM             | Ataksi-Telenjiektazi Mutasyonu       |
| BAK             | BCL-2 Homologu Olan Antagonist/Katil |
| BAX             | BCL-2 İle İlişkili X Proteini        |
| BCL-2           | B Hücreli Lenfoma 2                  |
| BD              | Border Disease                       |
| BID             | BH3 Etkileşimli Domain Ölüm Agonisti |
| BRD             | Bromodomain                          |
| BSA             | Sığır Serum Albümin                  |
| CAF             | Kanser İlişkili Fibroblast           |
| CASP3           | Kaspaz 3                             |
| CBP             | CREB'e Bağlanan Protein              |
| CDKN1A          | Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1A   |
| CDKN2A          | Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A   |
| CO <sub>2</sub> | Karbondioksit                        |
| CT              | Döngü Eşik                           |
| DMSO            | Dimetilsülfoksit                     |
| DNA             | Deoksiribonükleik Asit               |
| DNMT            | DNA Metiltransferaz                  |
| DNMTi           | DNA Metiltransferaz İnhibitörü       |
| ECM             | Hücre Dışı Matriks                   |
| EDTA            | Etilendiamin Tetrasetik Asit         |
| EMT             | Epitel-Mezenkimal Geçiş              |
| FDA             | Food And Drug Administration         |
| GSK3β           | Glikojen Sentaz Kinaz 3 Beta         |
| HAT             | Histon Asetiltransferaz              |
| HDAC            | Histon Deasetilaz                    |
| HDACi           | Histon Deasetilaz İnhibitörü         |
| HIF             | Hipoksi-İndüklenebilir Faktör        |

|                   |                                                          |
|-------------------|----------------------------------------------------------|
| IC50              | Yarı-Maksimum İnhibisyon Konsantrasyonu                  |
| IL-6              | İnterlökin-6                                             |
| InsP <sub>3</sub> | Inositol 1,4,5-Trisfosfat                                |
| KHAK              | Küçük Hücreli Akciğer Kanseri                            |
| ChIP              | Kromatin İmmünopresipitasyon                             |
| LncRNA            | Uzun Kodlama Yapmayan RNA                                |
| MBD               | Metil-CpG Bağlayıcı Proteinler                           |
| MCL-1             | Myeloid Hücre Lösemisi 1                                 |
| MDSC              | Miyeloid Kaynaklı Baskılayıcı Hücreleri                  |
| MTHFR             | Metilentetrahidrofolat Redüktaz                          |
| MIP               | Miyo-İnositol 1-Fosfat                                   |
| MiRNA             | Mikro RNA                                                |
| MLL               | Karışık Soy Lösemisi                                     |
| MOMP              | Mitokondri Dış Zar Geçirgenliği                          |
| MTMCD             | N-Metil-2,2,3,3-Tetrametilsiklopropankarboksamid         |
| MUC1              | Musin-1                                                  |
| NTD               | Nöral Tüp Defektleri                                     |
| PBS               | Fosfat Tamponlu Tuzlu Çözelti                            |
| PCR               | Polimeraz Zincir Reaksiyonu                              |
| PI                | Propidyum İyodür                                         |
| PIKKs             | Fosfatidilinozitol 3-Kinaz İle İlişkili Protein Kinazlar |
| PKA               | Protein Kinaz A                                          |
| PLA2              | Fosfolipaz A2                                            |
| PMS               | N-Metil Dibenzopirazin Metil Sülfat                      |
| PUMA              | P53 Yukarı Regüle Edilmiş Apoptoz Modülatörü             |
| RNA               | Ribonükleik Asit                                         |
| ROS               | Reaktif Oksijen Türevleri                                |
| RPM               | Dakikadaki Devir Sayısı                                  |
| RPMI              | Roswell Park Memorial Institute                          |
| SAHA              | Suberoylanilid Hidroksamik Asit                          |
| TBP               | TATA-Box Bağlanma Proteini                               |
| TGF- $\beta$      | Transformasyon Büyüme Faktörü-Beta                       |
| TNBC              | Üçlü Negatif Meme Kanseri                                |
| TNF               | Tümör Nekrozis Faktör                                    |
| TRAIL             | TNF-İlişkili Apoptozis İndükleyici Ligand                |
| TSP-1             | Trombospondin-1                                          |
| TSA               | Trichostatin A                                           |
| VEGF              | Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü                       |
| VPA               | Valproik Asit                                            |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|             |                                                                                                                                                                                                                                                           | Sayfa |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.1.  | Kromatin organizasyon düzeyleri ve kromatinin yapısı yapısal birimler – nükleozomlar                                                                                                                                                                      | 15    |
| Şekil 2.2.  | Histonun üç boyutlu düzeni ve nükleozom yapısının düzenlenmesi                                                                                                                                                                                            | 17    |
| Şekil 2.3.  | Histon modifikasyonu çapraz konuşması                                                                                                                                                                                                                     | 21    |
| Şekil 2.4.  | Histon asetillenmesi / deasetillenmesi ile histon metillenmesi / demetillenmesinin, histon asetiltransferazlar (HAT'ler) / deasetilazlar (HDAC'ler) ve metiltransferazlar (HMT'ler) / demetilazlar (HDMT'ler) tarafından kontrol edildiğini gösteren şema | 22    |
| Şekil 2.5.  | Kanserde tümör baskılayıcı genlerin metilasyona bağlı susturulması.                                                                                                                                                                                       | 27    |
| Şekil 2.6.  | Valproik asidin (VA) kimyasal yapısı                                                                                                                                                                                                                      | 30    |
| Şekil 2.7.  | Apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yollarının şematik diyagramı                                                                                                                                                                                            | 40    |
| Şekil 3.1.  | Çalışmada kullanılan köpek meme epitel – benzeri karsinom hücre hattı, CMT-U27 (x10)                                                                                                                                                                      | 55    |
| Şekil 4.1.  | Vinkristin Sülfat tedavisi sonrasında CMT-U27 hücrelerinin canlılığının XTT testiyle elde edilen doza ve zamana göre değişimi                                                                                                                             | 77    |
| Şekil 4.2.  | CMT-U27 hücrelerinde Dosetakselin zamana ve doza bağlı olarak değişimi                                                                                                                                                                                    | 79    |
| Şekil 4.3.  | Valproik asidin CMT-U27 hücreleri üzerinde doza ve zamana bağlı değişimi                                                                                                                                                                                  | 81    |
| Şekil 4.4.  | CMT-U27 hücrelerine uygulanan Dosetaksel ve Valproik Asit kombinasyonunun 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanması sonrası XTT testi ile elde edilen hücre canlılığı verileri                                                                                | 83    |
| Şekil 4.5.  | Vinkristin Sülfat ve Valproik Asit kombinasyonu uygulanan CMT-U27 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat sonrası XTT testi ile elde edilen hücre canlılığı verileri                                                                                               | 84    |
| Şekil 4.6.  | Dosetaksel, Vinkristin Sülfat ve Valproik Asit üçlü kombinasyonu sonucu CMT-U27 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat sonrası XTT testi ile elde edilen hücre canlılığı verileri                                                                                 | 85    |
| Şekil 4.7.  | Vinkristin sülfatın, köpek meme karsinomu (CMT-U27 hücre hattı) hücreleri üzerine morfolojik etkileri                                                                                                                                                     | 87    |
| Şekil 4.8.  | Dosetakselin, köpek meme karsinomu (CMT-U27 hücre hattı) hücreleri üzerine morfolojik etkileri.                                                                                                                                                           | 89    |
| Şekil 4.9.  | Valproik asitin, köpek meme karsinomu (CMT-U27 hücre hattı) hücreleri üzerine morfolojik etkileri                                                                                                                                                         | 90    |
| Şekil 4.10. | Valproik asit (VPA), Vinkristin Sülfat (VVK) ve Dosetaksel (DOK) üçlü kombinasyonunun köpek meme karsinomu (CMT-U27 hücre hattı) hücreleri morfolojisi üzerine etkileri                                                                                   | 92    |
| Şekil 4.11. | Vinkristin sülfat (VVK), Dosetaksel (DOK) ve Valproik Asit (VPA) ile kombinasyon gruplarının köpek meme karsinomu (CMT-U27) hücreleri üzerinde floresan mikroskopunda üçlü boyama yöntemi görüntüleri.                                                    | 95    |
| Şekil 4.12. | Köpek meme karsinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15                                                                                                                                              | 98    |

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 4.13. | mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında <i>BCL-2</i> gen ekspresyon profillerindeki değişim<br>Köpek meme kansinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında <i>NOXA</i> gen ekspresyon profillerindeki değişim | 99  |
| Şekil 4.14. | Köpek meme kansinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında <i>MCL-1</i> gen ekspresyon profillerindeki değişim                                                                                                                                                                                                                             | 100 |
| Şekil 4.15. | Köpek meme kansinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında <i>BAX</i> gen ekspresyon profillerindeki değişim                                                                                                                                                                                                                               | 101 |
| Şekil 4.16. | Köpek meme kansinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında <i>BID</i> gen ekspresyon profillerindeki değişim                                                                                                                                                                                                                               | 102 |
| Şekil 4.17. | Köpek meme kansinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında <i>PUMA</i> gen ekspresyon profillerindeki değişim                                                                                                                                                                                                                              | 103 |
| Şekil 4.18. | Köpek meme kansinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında <i>ATM</i> gen ekspresyon profillerindeki değişim                                                                                                                                                                                                                               | 104 |
| Şekil 4.19. | Köpek meme kansinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında <i>CASP3</i> gen ekspresyon profillerindeki değişim                                                                                                                                                                                                                             | 105 |
| Şekil 4.20. | Köpek meme kansinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında <i>P53</i> gen ekspresyon profillerindeki değişim                                                                                                                                                                                                                               | 106 |
| Şekil 4.21. | Köpek meme kansinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 107 |

- mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında *P21* gen ekspresyon profillerindeki değişim
- Şekil 4.22. Köpek meme karsinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında *BAX/BCL-2* ekseninin rölatif olarak değerlendirilmesi. 108
- Şekil 4.23. Köpek meme karsinomu hücrelerinde, Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında gen ekspresyon profillerindeki değişime ait ısı haritası grafiği (heatmap) 110

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                            | Sayfa |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve ticari kitler           | 56    |
| Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler                                       | 57    |
| Çizelge 3.3. Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar ve ekipmanlar                          | 58    |
| Çizelge 3.4. Kombinasyon analizi için oluşturan tedavi grupları                            | 66    |
| Çizelge 3.5. Üçlü boyama yöntemiyle hücre ölüm modunun tespiti                             | 68    |
| Çizelge 3.6. Komplementer DNA sentezinde kullanılan malzemeler ve miktarları               | 71    |
| Çizelge 3.7. Kantitatif gerçek zamanlı PCR analizinde kullanılan genler ve primer dizileri | 72    |
| Çizelge 3.8. Kantitatif gerçek zamanlı PCR analizinde kullanılan reaksiyon karışımı        | 73    |
| Çizelge 3.9. Kantitatif gerçek zamanlı PCR analizi için cihaz protokolü                    | 74    |
| Çizelge 4.1. XTT testi sonucu elde edilen vinkristin sülfat IC <sub>50</sub> dozları       | 78    |
| Çizelge 4.2. Dosetakselin XTT testi sonucu elde edilen IC <sub>50</sub> dozları            | 80    |
| Çizelge 4.3. Valproik Asidin XTT testi sonucu elde edilen IC <sub>50</sub> dozları         | 82    |
| Çizelge 4.4. RNA izolasyonu sonucu Nanodrop ölçümleri                                      | 95    |

## 1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyümesi, doku invazyonu ve metastaz özellikleriyle tanımlanan karmaşık bir hastalık grubudur. Genetik mutasyonlar, epigenetik düzenlemeler ve tümör mikroçevresi arasındaki dinamik etkileşimler, kanserin biyolojik temelini oluşturan en önemli faktörlerdir. Günümüzde kanser biyolojisinin anlaşılmasındaki ilerlemeler, moleküler düzeydeki bu süreçlerin keşfi sayesinde mümkün olmuştur (Weinstein vd., 2013). Bu süreçler, kanser hücrelerinin proliferasyon, hayatta kalma, metastaz ve bağışıklık sisteminden kaçış gibi özelliklerini nasıl kazandığını ortaya koyarken, aynı zamanda terapötik hedeflerin geliştirilmesine olanak tanımaktadır (Jain vd., 2021).

Kanserde genetik faktörler, proto-onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile ilişkilidir. Bu durum, hücresel sinyal yollarını bozar ve tümör hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasına neden olur (Shen vd., 2018). Özellikle *P53* gibi tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar, DNA hasarına verilen hücresel yanıtın etkisiz hale gelmesine yol açar. Bu tür genetik değişiklikler, kanserin başlangıcında ve ilerlemesinde kritik bir rol oynar (Lawrence vd., 2014). Bunun yanı sıra, kritik genlerdeki germ hattı mutasyonları, DNA onarım mekanizmalarını bozarak genomik instabiliteye ve dolayısıyla kanser riskinin artmasına neden olur (Chong vd., 2014). Ancak, yalnızca genetik değişiklikler değil, epigenetik düzenlemeler de kanser biyolojisinde önemli bir yer tutar. Epigenetik, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmadan gen ekspresyonunu düzenleyen bir mekanizma olarak, kanser hücrelerinin fenotipik özelliklerini ve terapötik yanıtlarını şekillendirebilir (Baylin ve Jones, 2016).

Epigenetik mekanizmalar arasında DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatin yeniden düzenlenmesi ve kodlama yapmayan RNA'lar yer alır. Bu mekanizmalar, hücrelerin hangi genlerin aktif veya inaktif olacağını belirlemesini sağlar (Feng ve De Carvalho, 2022). DNA metilasyonu, genellikle tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına neden olarak kanser oluşumunu destekler. Histon modifikasyonları ise kromatin yapısını doğrudan etkileyerek gen ekspresyonunu düzenler. Histon asetilasyonunun azalması ve buna bağlı olarak kromatinin daha sıkı bir yapıya

bürünmesi, gen ekspresyonunu baskılar ve kanser hücrelerinin malign özelliklerini artırır (Rosenthal vd., 2023). Histon deasetilazlar (HDAC'lar), bu süreçte histonlardan asetil gruplarını uzaklaştırarak gen ekspresyonunu baskılayan enzimlerdir. HDAC'ların aşırı aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına ve kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasına katkıda bulunur (Song vd., 2017).

Epigenetik düzenlemelerin tedavi edilebilir ve geri döndürülebilir doğası, bu mekanizmaları hedef alan terapötik yaklaşımlar geliştirilmesine olanak tanımıştır. HDAC inhibitörleri (HDACi), histon deasetilazların aktivitesini inhibe ederek kromatini gevşetir ve gen ekspresyonunu yeniden düzenler. Bu ilaçlar, özellikle tümör baskılayıcı genlerin yeniden aktif hale getirilmesinde önemli bir rol oynar (Berger vd., 2020). HDACi'ler, kanser hücrelerinde apoptozun tetiklenmesi, hücre döngüsünün durdurulması, anjiyogenezin baskılanması ve immün sistemin modüle edilmesi gibi etkiler gösterir. Bu ajanlar, kanser hücrelerinin epigenetik düzenlemesini hedef alarak kanser biyolojisinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmuştur.

HDACi'lerin yanı sıra DNA metiltransferaz inhibitörleri (DNMTi) de kanser tedavisinde umut vaat eden bir diğer epigenetik ajan sınıfıdır. DNMTi'ler, DNA metilasyonunu azaltarak tümör baskılayıcı genlerin yeniden aktifleşmesine olanak tanır. Bu ilaçlar, genetik mutasyonların tedavi edilemez olduğu durumlarda, epigenetik değişiklikleri hedef alarak hücrel mekanizmaları yeniden düzenler (Rosenthal vd., 2023). Bu tür epigenetik düzenleyiciler, özellikle epigenetik değişikliklerin heterojen olduğu tümörlerde kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (Baylin ve Jones, 2016).

Kanser biyolojisinde epigenetik düzenlemelere ek olarak, tümör mikroçevresi de önemli bir yere sahiptir. Tümör mikroçevresi, kanser hücreleri ve stromal hücreler arasındaki etkileşimlerle şekillenir. Mikroçevrede yer alan bağışıklık hücreleri, fibroblastlar ve ekstraselüler matriks bileşenleri, tümör büyümesini ve metastazı destekleyen bir ortam yaratır (Lee ve Beatty, 2021). Hipoksi, tümör mikroçevresindeki önemli bir faktör olup, HIF-1 $\alpha$  gibi transkripsiyon faktörlerinin stabilize olmasına ve anjiyogenez süreçlerinin aktive edilmesine yol açar (Semenza, 2012). Ayrıca, kanser ilişkili fibroblastlar

(CAF'ler), salgıladıkları sitokinler ve büyüme faktörleri aracılığıyla tümör hücrelerinin invazyon ve metastaz potansiyelini artırır. Bu bağlamda, epigenetik düzenlemeler ve tümör mikroçevresi arasındaki ilişki, kanserin sistemik bir hastalık olarak ele alınmasını gerekli kılar.

Kanser biyolojisi, genetik mutasyonlar, epigenetik değişiklikler ve tümör mikroçevresinin karmaşık etkileşimleriyle şekillenen çok yönlü bir süreçtir. HDACi'ler ve DNMTi'ler gibi epigenetik hedefli ilaçlar, kanser tedavisinde yeni fırsatlar sunarken, mikroçevresel faktörlerin terapötik etkiler üzerindeki rolü, tedavi yaklaşımlarının daha kapsamlı bir şekilde ele alınmasını gerektirir. Veteriner hekimlik alanında, epigenetik ve genetik odaklı araştırmaların sınırlı kalması, bu alandaki bilgi birikimini ve yenilikçi tedavi yaklaşımlarını derinlemesine geliştirme çabalarını zorlaştırmaktadır. İnsan tıbbında genetik ve epigenetik araştırmaların güçlü bir finansal destek ve disiplinler arası iş birliği ile ilerlemesi, bu alanda geniş bir klinik uygulama ve bilimsel keşif yelpazesi sunarken; veteriner hekimliğinde aynı düzeyde bir ilerleme henüz sağlanamamıştır. İnsan tıbbında DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve mikroRNA düzenlemeleri gibi epigenetik mekanizmaların detaylı bir şekilde incelenmesi, hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesine öncülük etmiştir. Buna karşın, veteriner hekimliğinde bu tür çalışmaların sayıca azlığı, özellikle köpeklerde kansere yönelik tedavi seçeneklerinin sınırlı olmasına neden olmaktadır.

Köpekler, insanların yaşamına entegre olmuş önemli dostlar olarak görülmekte, bu nedenle onların sağlığıyla ilgili araştırmalar hem bilimsel hem de toplumsal bir öneme sahiptir. Köpeklerde görülen kanserler, insanlardaki gibi genetik yatkınlıklar, çevresel maruziyetler, beslenme alışkanlıkları ve virüs kaynaklı enfeksiyonlar gibi çeşitli faktörlerle ilişkilidir (Pastor vd., 2018; Schneider vd., 1969; Vazquez vd., 2023; Zheng vd., 2022). Ancak köpeklerdeki kanser türlerinin genetik ve epigenetik arka planını anlamadaki bilgi eksikliği, hastalığın biyolojik mekanizmalarının aydınlatılmasını ve daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. İnsan tıbbından elde edilen bulguların veteriner hekimliğinde uygulanabilirliğini artırmak, bu alandaki bilgi boşluklarını doldurmanın en etkili yollarından biridir. Epigenetik düzenleme

mekanizmaları, türler arasında benzerlik gösterdiği için, insanlardaki verilerin köpeklerle uyarlanması mümkündür.

Epigenetik düzenlemelerin, özellikle DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarının, köpeklerdeki kanser biyolojisi üzerindeki rolünün aydınlatılması büyük bir potansiyel taşımaktadır. Bu çalışmalar sadece köpeklerin sağlığına yönelik önemli klinik faydalar sağlamakla kalmayacak, aynı zamanda insan ve köpeklerde ortak çevresel maruziyetlerin etkisini anlamaya da katkıda bulunacaktır. Köpekler, binlerce yıldır insanların en yakın yoldaşları olmuştur ve benzer çevresel koşullara maruz kalmışlardır. Bu nedenle, köpeklerdeki tümörlerin epigenetik mekanizmalarının aydınlatılması, insan ve veteriner tıbbı arasında karşılıklı bir model oluşturma potansiyeline sahiptir. Bu tür çalışmalar, iki disiplin arasında bir köprü işlevi görerek hem hayvan hem de insan sağlığına hizmet edecektir.

Veteriner hekimliğinde epigenetik araştırmaların artırılması, multidisipliner bir yaklaşımı gerektirmektedir. Moleküler tanı araçlarından kişiselleştirilmiş tedavi yöntemlerine kadar uzanan geniş bir araştırma ve uygulama yelpazesi oluşturulmalıdır. DNA metilasyon profilleri, histon modifikasyon paternleri ve kodlama yapmayan RNA analizlerini kapsayan epigenetik çalışmalar, köpek kanserlerinde hedefe yönelik tedaviler için temel oluşturacaktır. Bu tür araştırmaların sonuçları, biyoinformatik ve biyostatistik araçlarla derinlemesine analiz edilerek, genetik ve epigenetik düzenlemelerin klinik uygulamalarla entegrasyonu sağlanmalıdır. Ayrıca, farmakogenomik veriler doğrultusunda her köpeğin genetik ve epigenetik özelliklerine göre özelleştirilmiş tedaviler tasarlanabilir. Bu tür bir yaklaşım, hem köpeklerin hem de sahiplerinin kanserle mücadelede daha etkin, güvenli ve hedefe yönelik tedavilere erişimini sağlayacaktır. Epigenetik temelli tedaviler, yalnızca hayvan sağlığını değil, aynı zamanda insanların psikolojik refahını da olumlu yönde etkileyecek önemli bir gelişme olarak değerlendirilmektedir.

Karsinogenezis, çok sayıda genetik mekanizmanın rol oynadığı kompleks bir biyolojik süreçtir. Veteriner hekimlikte epigenetik araştırmaların sınırlı olması önemli bir eksikliktir ve bu alanda yapılacak çalışmaların sadece köpeklerin değil, bu hayvanlarla

birlikte yaşayan insanların da yaşam kalitesini artıracadı açıktır. Tıpta elde edilen epigenetik ve genetik bulguların veteriner hekimliğine aktarılması, bu alandaki bilgi birikimini derinleştirecek ve daha bütüncül bir sağlık yaklaşımına hizmet edecektir. Bu sebeple, köpeklerde kansere yönelik epigenetik temelli araştırmaların artırılması, hem hayvan hem de insan sağlığı için büyük bir potansiyel taşımaktadır. Tıpta kaydedilen ilerlemeler, veteriner hekimliği alanına aynı şekilde tesir etmemiştir. Özellikle veteriner onkolojisi ve daha spesifik olarak da köpeklerde meme tümörleri konusunda moleküler genetik çalışmalara ihtiyaç oldukça büyüktür. Bu nedenle bu tezin amacı, köpek meme karsinomu hücrelerinde VPA ve yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ilaçlar (vinkristin sülfat ve dosetaksel) ile kombinasyonlarının etkisinin incelenmesidir.



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Kanser

Kanser, kontrolsüz hücre büyümesi ve vücudun diğer bölgelerini istila etme veya yayılma yeteneği ile karakterize kompleks bir hastalıktır. Karmaşık biyolojisi ve heterojen doğası nedeniyle, bu hastalık modern tıbbın en zorlu sorunlarından biri olmaya devam etmektedir. Son birkaç on yılda kanser anlayışı, basit bir tümör oluşumu algısından, genetik ve çevresel faktörleri içeren çok daha nüanslı bir perspektife doğru önemli ölçüde evrilmiştir. Bu değişim, büyük ölçüde genomik ve sistem biyolojisindeki ilerlemeler sayesinde olmuştur. Bu ilerlemeler, kanserin moleküler temelleri ve çeşitli biyolojik sistemlerle etkileşimi hakkında daha derin bilgiler sağlamıştır (Imielinski vd., 2012; Weinstein vd., 2013). Genetik ve biyoteknolojideki gelişmeler, somatik mutasyonların ve tümör oluşumunu yönlendiren genomik değişikliklerin tanımlanmasını mümkün kılarak kanser araştırmalarında devrim yaratmıştır (Weinstein vd., 2013). Bu bulgular, kanserin sadece anormal hücrelerin bir koleksiyonu olarak değil, genetik yatkınlıklar ve çevresel maruziyetler de dahil olmak üzere sayısız faktörden etkilenen karmaşık bir sistem olarak anlaşılmasının önemini vurgulamaktadır (Boddy, 2023). Bu bakış açısı, bu kompleks sistemi etkili bir şekilde bozabilecek hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi ve hastaların iyi oluşları için çok önemlidir (Du ve Elemento, 2015; Werner vd., 2014).

Genetik ve sistem biyolojisi perspektiflerine ek olarak, kanserin evrimsel dinamikleri son yıllarda giderek artan bir ilgi görmüştür. Kanser evrimsel bir süreç olarak kavramı, tümör davranışını şekillendirmede doğal seçilimin rolünü vurgulayarak, terapötik müdahalelerden kaçabilen agresif fenotiplerin ortaya çıkmasına yol açar (Aktipis ve Nesse, 2013; Shpak ve Lu, 2016). Bu evrimsel çerçeveye, tümör heterojenitesini anlama yeteneğimizi artırmakla kalmaz, aynı zamanda tedavinin uyguladığı evrimsel baskılara karşı koyabilecek uyarlanabilir tedavi stratejilerinin geliştirilmesine de katkıda bulunur (Pepper vd., 2014). Ayrıca, bağışıklık sistemi ile kanser arasındaki etkileşim oldukça kritik bir noktadır. İmmün hücreler, stromal hücreler ve ekstraselüler matriks bileşenlerini içeren kanser mikroçevresi, tümör

progresyonunu ve tedaviye yanıtı önemli ölçüde etkiler (Jain vd., 2021; Lee ve Beatty, 2021).

## 2.2. Kanser Genetiği

Kanser, temel olarak çoğalma, apoptozis ve DNA onarımı gibi kritik hücresel süreçleri düzenleyen genlerdeki mutasyonların birikimiyle karakterize edilen genetik bir hastalıktır. Bu mutasyonlar ağırlıklı olarak proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olmak üzere iki farklı gen sınıfını etkiler. Proto-onkogenler normalde hücre büyümesi ve farklılaşmasını destekleyen proteinleri kodlarken, işlev kazandırıcı (“gain-of-function”) mutasyonlar geçirdiklerinde onkogenlere dönüşerek malign transformasyonu tetikleyebilirler (Shen vd., 2018). Buna karşılık, tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsünde olumsuz (negatif) düzenleme yapmak veya DNA onarımını kolaylaştırmakla görevlidir. Bu genlerdeki işlev kaybı (“loss-of-function”) mutasyonları, hayati önem taşıyan kontrol noktalarını ortadan kaldırarak genomik değişiklik taşıyan hücrelerin normal büyüme kısıtlamalarını aşmasına izin verir (Sonkin vd., 2013).

Kanserin ortaya çıkışı, kalıtsal (germ hattı) mutasyonlar ile bireyin yaşamı boyunca DNA replikasyon hataları veya çevresel kanserojenlere maruziyet sonucu biriken sporadik (somatik) mutasyonların bir kombinasyonundan kaynaklanabilir (Hassan vd., 2019). Bu sürücü (“driver”) mutasyonların kademeli birikimi ve ortaya çıkan genomik kararsızlık, normal hücrelerin giderek daha agresif hale gelen klonlara adım adım evrimleşmesini destekler (Lawrence vd., 2014). Örneğin, sürücü genlerin keşfi, belirli mutasyonların seçici bir büyüme avantajı sağladığını ve bunun onkogenezin ayırt edici özelliklerinden biri olduğunu göstermiştir (Yang vd., 2010). Ayrıca hem yaygın hem de nadir sürücü mutasyonların tespit edilmesi, tümör oluşumunu anlamak ve hedefe yönelik tedaviler geliştirmek açısından kritik önem taşır (Buisson vd., 2019).

Spesifik genetik lezyonları ve bunların bozduğu moleküler yolları anlamak, kanser sürecinin erken aşamalarında müdahaleyi hedefleyen akılcı ilaç tasarımı ve kişiselleştirilmiş tıp stratejileri için esastır (Sanchez-Vega vd., 2018). Örneğin, *BRCA1*

ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonlar doğrudan tümör oluşumuna yol açmasa da genomik kararsızlığı artırarak diğer tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu veya onkogenlerin aktivasyonu gibi ek değişiklikleri tetikler ve bu durum, bu genlerin genomik stabiliteyi korumadaki rolünü vurgular (Chong vd., 2014). Ek olarak, sürücü mutasyonlarla tümör mikroçevresi arasındaki etkileşim, tedaviye yanıtları ve klinik sonuçları etkileyebilir; bu da kanser tedavisinde kapsamlı genomik profillemenin önemini ortaya koymaktadır (Laddha vd., 2014).

Proto-onkogenlerdeki ve tümör baskılayıcı genlerdeki genetik mutasyonlar arasındaki karmaşık ilişki, kanser biyolojisinin zorlu yapısının temelini oluşturur. Bu genetik değişikliklerin ve işlevsel sonuçlarının derinlemesine anlaşılması, kanser araştırmalarını ilerletmek ve tedavi stratejilerini iyileştirmek için hayati öneme sahiptir. Kanser oluşumundaki diğer çok önemli bir biyolojik süreç ise epigenetik düzenlemedir.

### **2.3. Kanserde Epigenetik: Mekanizmalar, Sonuçlar ve Terapötik Potansiyel**

Kanser, genetik mekanizmalardan olduğu kadar epigenetik değişimlerden de etkilenen karmaşık bir hastalıktır. Genetik mutasyonlar uzun süredir tümör oluşumunun birincil nedenleri olarak görülse de, epigenetik, temel DNA dizisini değiştirmeden gen ekspresyonunu düzenleyen kritik bir faktör olarak öne çıkmıştır. Bu epigenetik düzenleme, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatin yeniden düzenlenmesi ve kodlama yapmayan RNA'ların etkisi gibi çeşitli mekanizmaları kapsamaktadır. Bu mekanizmaların tamamı çevresel uyaranlara duyarlıdır ve geri döndürülebilir niteliktedir (Baylin ve Jones, 2016; Feng ve De Carvalho, 2022; Skourti ve Dhillon, 2022).

Epigenetik modifikasyonlar, kanserin kademeli olarak ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Örneğin, bazı histon modifikasyonlarının düzensizleşmesi, meme kanseri alt tiplerinin invazivliği ile ilişkilendirilmiştir (Berger vd., 2020). Ayrıca, kromatin yeniden düzenlenme proteinleri genellikle kanser hücrelerinde aşırı ifade edilir ve bu durum, tümör büyümesini destekleyen gen ekspresyonuna yönelik artan metabolik talebi gösterir (Eubanks vd., 2017). Genetik mutasyonlar ile epigenetik değişimler arasındaki

etkileşim kritik bir öneme sahiptir; çünkü epigenetik değişiklikler, tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına veya onkogenlerin aktifleşmesine yol açarak malign fenotipe katkıda bulunabilir (Baylin ve Jones, 2016; Toh vd., 2017).

Epigenetik değişimlerin geri döndürülebilirliği, kanser tedavisi için yeni fırsatlar sunmaktadır. Hatta, günümüzde bazı epigenetik temelli tedaviler onay almıştır. Bu tedaviler, çeşitli kanserlerin tedavisinde umut vaat etmektedir (Song vd., 2017; Szczepanek vd., 2023; Zhang vd., 2022). Epigenetik yaklaşım, kanser hücrelerinde hücre döngüsünü durdurma, farklılaşma ve apoptozu indükleyebilir ve genellikle ciddi yan etkilere sahip olan geleneksel kemoterapilere göre stratejik bir avantaj sunar (Rosenthal vd., 2023). Ayrıca, epigenetik ilaçların immünoterapi veya sitotoksik ajanlar gibi diğer tedavi modülleriyle birleştirilmesi, tedavi etkinliğini artırmak ve ilaç direncini aşmak için önerilmiştir (Leary vd., 2018).

Kanserde kodlama yapmayan RNA'ların ve kromatin yeniden düzenlenmesinin rolünün anlaşılmasındaki son gelişmeler, araştırma ve terapötik müdahale için yeni alanlar açmıştır. Örneğin, belirli kodlama yapmayan RNA'ların yukarı regüle edilmesi, terapötik dirence bağlı olan kanser kök hücresi fenotiplerinin sürdürülmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Toh vd., 2017; Wang ve Han, 2021). Ayrıca, epigenetik belirteçlerin kanser teşhisi ve prognozu için potansiyel biyobelirteçler olarak tanımlanması, epigenetik araştırmaların klinik ortamda önemini vurgulamaktadır (Pathak vd., 2023; Szczepanek vd., 2023). Epigenetik regülasyonun detaylı bir özeti sonraki bölümlerde sunulmuştur.

### **2.3.1. Epigenetik Düzenleme Mekanizmaları**

Epigenetik düzenleme, gen ekspresyonunu topluca etkileyen çeşitli mekanizmaların karmaşık bir etkileşimidir. Bu mekanizmalar arasında DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatin yeniden düzenlenmesi ve kodlama yapmayan RNA'ların etkinliği temel bir rol oynar.

### **2.3.1.1. DNA Metilasyonu**

DNA metilasyonu, sitozin rezidülerinin 5-karbonuna bir metil grubunun eklenmesini içerir ve ağırlıklı olarak CpG dinükleotitlerinde gerçekleşir. Bu modifikasyon, DNA metiltransferazlar (DNMT) olarak bilinen bir enzim ailesi tarafından katalize edilir. DNA metilasyonunun dinamik yapısı, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, genomik stabilite ve hücre kimliğinin korunması gibi hücresel süreçlerde önemli bir rol oynamasına olanak tanır. Kanseri olgularında, DNA metilasyon paternlerindeki anormallikler sıklıkla gözlemlenir ve bu durum tümör oluşumu ve kanser ilerlemesine katkıda bulunur (Yan vd., 2020).

### **2.3.1.2. Kanserde Global Hipometilasyon**

Global hipometilasyon, genom boyunca DNA metilasyon seviyelerinde yaygın bir azalma ile karakterize edilen önemli bir epigenetik değişimdir ve çeşitli kanser türlerinde sıklıkla gözlemlenir (Buj vd., 2016). Bu fenomen, tümör oluşumu ve kanser ilerlemesine katkıda bulunan birkaç kritik sonuçla ilişkilendirilmiştir.

### **2.3.1.3. Genomik Kararsızlık ile İlişkisi**

Global hipometilasyonun birincil etkilerinden biri, genomik kararsızlık ile olan ilişkisidir. Araştırmalar, global DNA hipometilasyonunun artan kromozomal kararsızlık ve mutasyon oranlarına yol açabileceğini göstermektedir; bunlar, kanser gelişiminde kritik faktörlerdir. Örneğin, fare embriyonik kök hücrelerinde DNMT1'in yok edilmesinin, global hipometilasyon ve artmış genomik kararsızlık ile sonuçlandığı ve T hücre lenfomaları gibi malign dönüşümlere yol açtığı gösterilmiştir (Funaki vd., 2015; Sheaffer vd., 2016). Ayrıca, global hipometilasyonun, genomik bütünlüğü bozabilen ve karsinogenezi teşvik edebilen transpozabl elemanların yeniden aktifleşmesi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Shen vd., 2017).

#### **2.3.1.4. Gen-Spesifik Hipermetilasyon ile Etkileşim**

Genomik kararsızlığın yanı sıra, global hipometilasyon genellikle gen-spesifik hipermetilasyon ile birlikte görülür ve kanser ilerlemesini etkileyen karmaşık bir etkileşim yaratır. Örneğin, diffüz büyük B hücreli lenfomada, global hipometilasyon bağımsız bir prognostik faktör olarak tanımlanmış ve belirli gen promotörlerinin hipermetilasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Wedge vd., 2017). Bu metilasyon paternlerinin ikiliği, global hipometilasyonun onkogen ekspresyonunu kolaylaştırırken, aynı zamanda lokalize hipermetilasyon yoluyla tümör baskılayıcı genleri susturabileceğini ve böylece tümör oluşumuna katkıda bulunabileceğini göstermektedir (Wedge vd., 2017).

#### **2.3.1.5. Kanser Erken Evreleri ile İlişki**

Global hipometilasyon, mide, kolorektal ve over kanserleri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde karsinogenik sürecin erken bir olayı olarak tanınmaktadır. Bu durum sıklıkla prekanseröz durumlarla ilişkilendirilir ve kanser hücrelerinin ayırt edici bir özelliği olarak kabul edilir (Compare vd., 2011; Thumbovorn vd., 2022). Örneğin, oral skuamöz hücreli karsinom bağlamında, global hipometilasyonun kanser gelişiminin erken evreleri ile bağlantılı olduğu ve kanser riski için bir biyobelirteç olarak potansiyel rolünü gösterdiği belirtilmiştir (Foy vd., 2015). Ayrıca, global hipometilasyonun kanser oluşumundan önce meydana gelebileceği ve erken tespit ile risk değerlendirmesi açısından önem taşıdığı gösterilmiştir (Zhu vd., 2011).

#### **2.3.1.6. Global Hipometilasyonun Mekanizmaları**

Kanserde global hipometilasyonun altında yatan mekanizmalar çok yönlüdür. Bu mekanizmalar, DNA metilasyon paternlerinin korunması için kritik olan DNA metiltransferazların, özellikle DNMT1'in, aşağı regüle edilmesini içerir (Hervouet vd., 2010). DNMT1 ile diğer düzenleyici proteinler arasındaki etkileşimlerin bozulmasının, hipometilasyon yoluyla tümör oluşumunu teşvik ettiği de belirtilmiştir (Hervouet vd., 2010). Ayrıca, sigara dumanı ve kirleticilere maruz kalma gibi çevresel faktörler ve

yaşam tarzı seçimlerinin, global DNA metilasyon seviyelerini etkileyerek kanser riskini artırabileceği gösterilmiştir (Shen vd., 2017).

## **2.4. Tümör Oluşumunda Epigenetik Değişiklikler**

Epigenetik değişiklikler, tümör oluşumunun başlangıcından metastaza kadar tüm aşamalarda kritik bir rol oynar.

### **2.4.1. Kanserın Başlangıcı**

Kanserın erken evrelerinde, tümör baskılayıcı genlerin promotör hipermetilasyonu ve global DNA hipometilasyonu gibi belirli epigenetik değişiklikler sıklıkla gözlemlenir. Promotör hipermetilasyonu, kritik tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına yol açan iyi belgelenmiş bir mekanizmadır. Örneğin, siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A: *CDKN2A*) geninin hipermetilasyonu, hücre döngüsünün düzenlenmesi için hayati öneme sahip olan P16 ekspresyonunun kaybına neden olur. P16 kaybı, normal hücre döngüsü kontrolünü bozarak kontrolsüz hücresel proliferasyona ve tümör oluşumuna katkıda bulunur (Vidal vd., 2017). Buna karşılık, global DNA hipometilasyonu, *RAS* gibi onkogenlerin aktivasyonu ile ilişkilidir ve bu durum hücresel dönüşüm ve kanser ilerlemesine yol açabilir. Hipometilasyon, genellikle susturulmuş olan onkogenlerin ekspresyonuna izin vererek, kanserin ayırt edici bir özelliği olan genomik kararsızlığı teşvik edebilir (Baba vd., 2014; Royston vd., 2018). Çalışmalar, global hipometilasyonun çeşitli kanserlerde yaygın bir özellik olduğunu ve malign fenotipe önemli ölçüde katkıda bulunduğunu göstermiştir (Lesch vd., 2019; McDonald vd., 2017).

### **2.4.2. Tümör İlerlemesi**

Histon modifikasyonları ve kromatin yeniden düzenlenmesi, onkojenik yolları aktiveştirerek ve farklılaşma ile ilişkili genleri susturarak tümör ilerlemesini kolaylaştırır. EZH2'nin aşırı ekspresyonu, baskılayıcı H3K27me3 işaretlerini yerleştirerek agresif tümör fenotipleri ile ilişkilendirilmiştir (Varambally vd., 2002).

Benzer şekilde, MALAT1 gibi uzun kodlama yapmayan RNA'lar (long non-coding RNA: lncRNA) hücre proliferasyonu ve metastazı teşvik eder (Tripathi vd., 2010).

### **2.4.3. Metastaz**

Epigenetik düzenleme, metastaz için kritik bir süreç olan epitel-mezenkimal geçişin (EMT) ayrılmaz bir parçasıdır. E-kaderinin promotör hipermetilasyonu veya histon deasetilasyonu yoluyla susturulması, EMT'nin ayırt edici bir özelliğidir. Ayrıca, tümör mikroçevresinin indüklediği hipoksi, epigenetik ortamı değiştirerek metastatik potansiyeli artırır (Deng vd., 2017; Ji vd., 2015; Kokura vd., 2010).

### **2.5. Tümör Mikroçevresi ile Epigenetik Etkileşim**

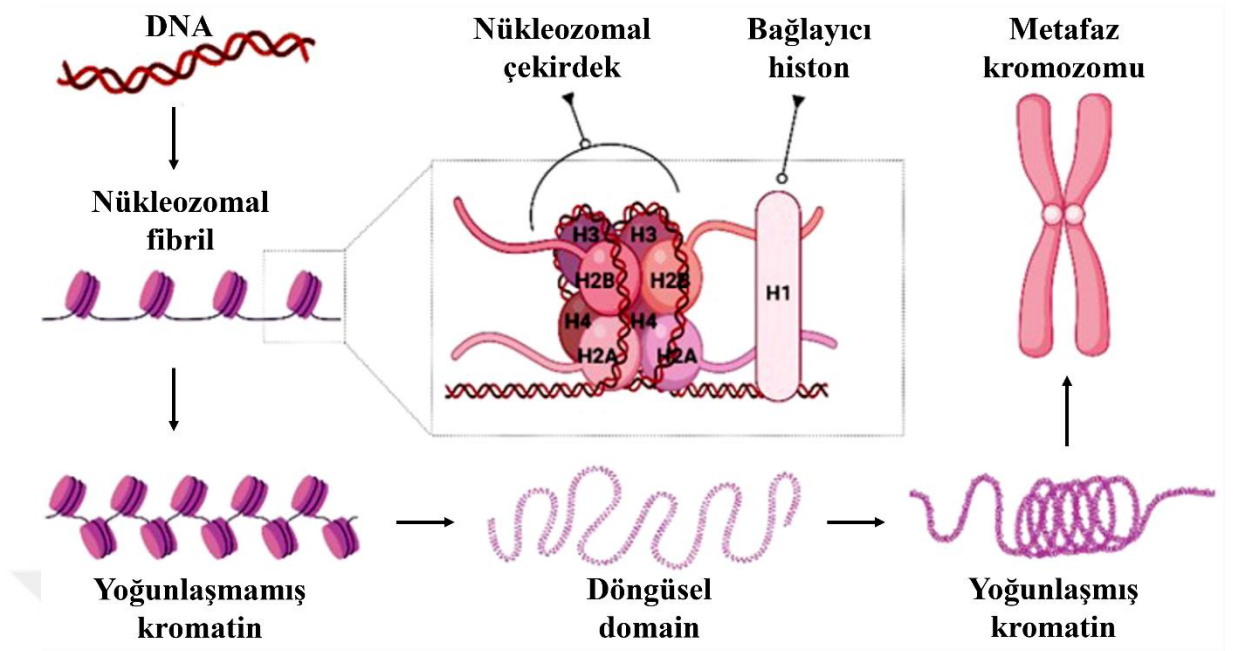
Tümör mikroçevresi, epigenetik düzenlemeyi önemli ölçüde etkiler. Hipoksi, hızlı tümör büyümesi ve anormal damarlanma nedeniyle yetersiz oksijen kaynağından kaynaklanan katı tümörlerin yaygın bir özelliğidir. Hipoksik koşullarda, HIF-1 $\alpha$  stabilize olur ve çekirdeğe taşınır; burada anjiyogenez, metabolizma ve hayatta kalmayla ilgili çeşitli hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Önemli olarak, HIF-1 $\alpha$ , DNMT'ler ve HDAC'ler belirli gen promotörlerine çeker ve trombospondin-1 (TSP-1) ve E-kaderin gibi anti-anjiyojenik genlerin susturulmasına yol açar. Bu süreç, artan DNA metilasyonu ve histon deasetilasyonu ile sonuçlanarak, tümör ilerlemesini ve anjiyogenezini destekleyen bir epigenetik ortam yaratır (Kumar vd., 2019; Semenza, 2012).

CAF'ler, tümör mikroçevresinin ana bileşenlerinden biridir ve kanser hücrelerinin davranışını etkileyen çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri salgılar. Bu salgılanan faktörler, tümör hücrelerindeki kromatin durumlarını daha da değiştirebilir ve tümör büyümesini ve bağışıklık sisteminden kaçışı teşvik edebilir (Halim vd., 2017; Kalluri ve Zeisberg, 2006). Örneğin, CAF kaynaklı sitokinler olan transformasyon büyüme faktörü-beta (TGF- $\beta$ ) ve interleukin-6 (IL-6), kanser hücrelerinin invaziv ve metastatik potansiyelini artıran epigenetik değişiklikleri indüklediği gösterilmiştir. Özellikle TGF- $\beta$ , epigenetik düzenleyicilerin toplanmasına yol açan sinyal yollarını aktive edebilir ve

bu da tümör baskılayıcı genlerin baskılanmasına ve EMT'nin teşvik edilmesine neden olur (Elliott ve Blobel, 2005). Dahası, CAF'ler ile tümör hücreleri arasındaki etkileşim, tümörlerin agresif davranışını sürdüren bir geri besleme döngüsü oluşturur. CAF'ler tarafından salınan sitokinler, kanser hücrelerindeki epigenetik düzenleyicilerin ekspresyonunu değiştirebilir ve bu da tümör büyümesini ve bağışıklık sisteminden kaçışı destekleyen gen ekspresyonundaki kalıcı değişikliklere yol açar (Elliott ve Blobel, 2005; Halim vd., 2017; Kalluri ve Zeisberg, 2006; Kumar vd., 2019; Semenza, 2012).

## **2.6. Ökaryotik Kromatin Yapısı**

Ökaryot kromatini, DNA ve histon proteinlerinden oluşan sofistike bir yapı olup, genomun çekirdek içinde paketlenmesini sağlarken aynı zamanda gen erişilebilirliğini ve ekspresyonunu düzenlemede kritik bir rol oynar (Mei vd., 2019). Kromatinin temel birimi olan nükleozom, ~146 baz çifti uzunluğundaki DNA'nın, histon proteinlerinden (H2A, H2B, H3 ve H4) oluşan bir oktamer etrafına sarılmasıyla oluşur (Mei vd., 2019). Bu organizasyon (Şekil 2.1), histonların çeşitli post-translasyonel modifikasyonları aracılığıyla kromatin yapısının ve fonksiyonunun dinamik olarak düzenlenmesini mümkün kılar (Sonraki bölümlerde ayrıntılı bir şekilde ele alınacaktır). Ayrıca H2B Tyr37 fosforilasyonu gibi spesifik modifikasyonlar, replikasyona bağımlı çekirdek histon genlerinin baskılanmasında rol oynayarak histon modifikasyonları ile gen düzenlenmesi arasındaki karmaşık ilişkiyi ortaya koymaktadır (Mahajan vd., 2012).



**Şekil 2.1.** Kromatin organizasyon düzeyleri ve kromatinin yapısı yapısal birimler – nükleozomlar (Neganova vd., 2022).

Kromatin, iki temel formda bulunur: ökromatin ve heterokromatin. Ökromatin daha az yoğunlaşmıştır ve transkripsiyonel olarak aktiftir, gen ekspresyonuna izin verirken; heterokromatin sıkı bir şekilde paketlenmiştir ve genellikle transkripsiyonel olarak sessizdir. Mitotik kromozom oluşumu, iki aşamalı bir süreçtir; bu süreçte, histonların translasyon sonrası modifikasyonlarındaki değişiklikler mitotik kromatin sıkışmasını yönlendirirken, kondensin gibi histon olmayan proteinlerin etkisi, sıkışmış kromozomları klasik mitotik morfolojilerine dönüştürebilir (Zhiteneva vd., 2017).

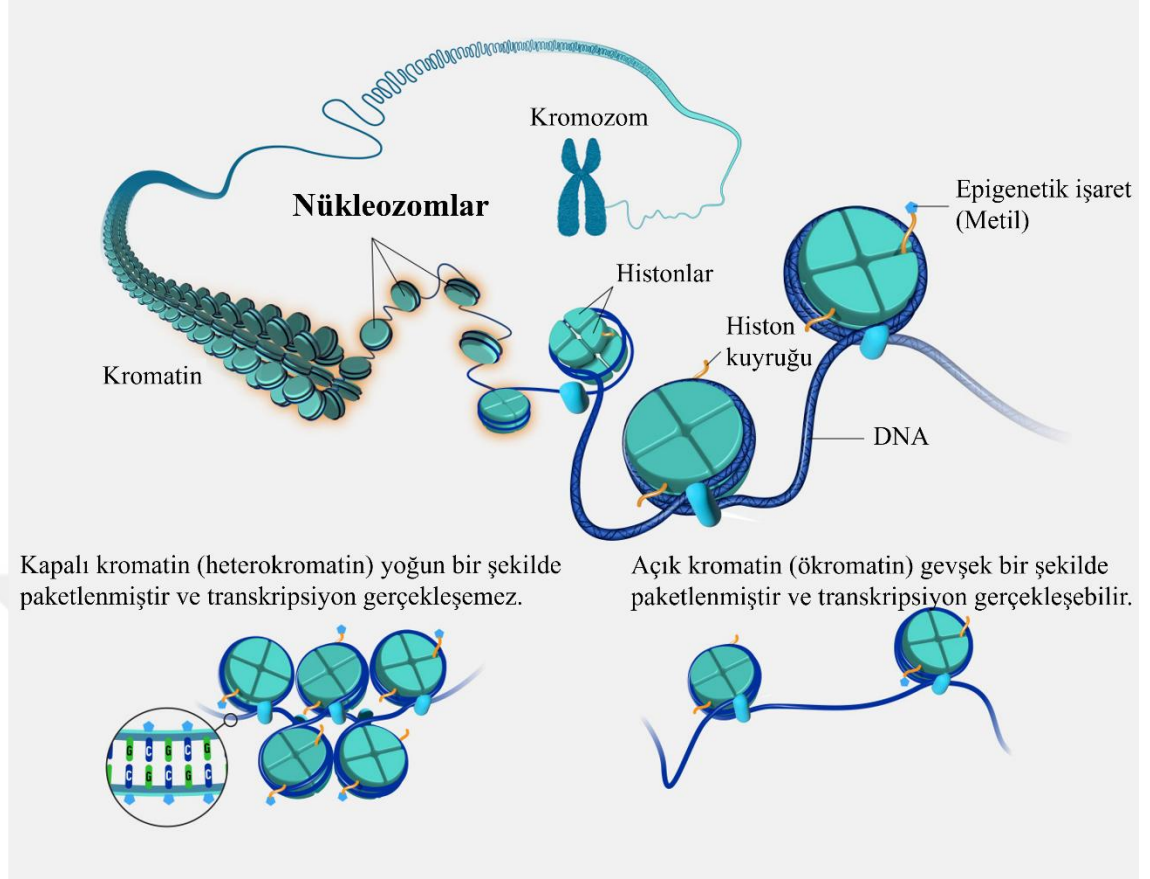
Kromatinin yoğunlaşma düzeyindeki bu dinamik doğa, hücre döngüsü sırasında, özellikle mitozda kromatinin belirgin kromozomları oluşturacak şekilde önemli bir yeniden organizasyona uğradığı zaman kritik önem taşır. Bu yoğunlaşma, hücre bölünmesi sırasında kromozomların doğru ayrılmasında gerekli olan kondensin gibi çeşitli protein kompleksleri tarafından kolaylaştırılır (Gibcus vd., 2018). Araştırmalar, mitotik kromatinin transkripsiyon faktörleri için erişilebilir kalmaya devam ettiğini, dolayısıyla yüksek derecede yoğunlaşmış durumda bile düzenleyici işlevlere katılabildiğini göstermektedir. Buna ilaveten, mitoz sırasında belirli post translasyonel

modifikasyonlar, kromatin yoğunlaşmasını teşvik ederek bu modifikasyonların kromatin yapısının korunmasındaki rolünü öne çıkarmaktadır (Zhiteneva vd., 2017).

Kromatinin hiyerarşik organizasyonu, DNA'nın verimli bir şekilde paketlenmesini sağlamakla kalmaz, aynı zamanda gen düzenlenmesinde de kritik bir rol oynar. Örneğin, erken gelişim sırasında epigenetik işaretlemeye başlatılan aktif kromatin bölgelerinin oluşumu, gen ekspresyon kalıplarını etkiler (Szutorisz vd., 2005). Ek olarak, kromatinin yoğunlaşma derecesinin uzaysal ve zamansal dinamikleri, hücre kimliğinin korunmasında ve farklılaşma süreçlerinin kolaylaştırılmasında önemlidir (Nicetto ve Zaret, 2019). Kromatin yapısı ile gen ekspresyonu arasındaki etkileşim, kromatin mimarisinin farklılaşma sırasında hücre kaderini öngörebileceğini gösteren çalışmalarla daha da vurgulanmakta ve kromatin organizasyonunun gelişim biyolojisindeki öneminin altını çizmektedir (Fujimori vd., 2023).

## **2.7. Histonların Yapı ve Özellikleri**

Histonlar, ökaryotik hücre çekirdeğinde DNA'nın düzenlenmesi ve paketlenmesi sürecinde kritik bir rol oynayan temel proteinlerdir. Özellikle lizin ve arjinin gibi bazik amino asitler bakımından zengin olmaları sayesinde net pozitif yüke sahiptirler; bu da histonların negatif yüklü DNA fosfat iskeletiyle elektrostatik etkileşime girmesini kolaylaştırır (Bannister ve Kouzarides, 2011; Jeanteur, 2005; Neganova vd., 2022; Nunes vd., 2023; Tung ve Winn, 2011). Bu etkileşim, DNA'nın yoğun biçimde organize edildiği ve düzenlendiği kromatin adı verilen yüksek yapıli bir düzenek oluşturur (Şekil 2.2). H2A, H2B, H3 ve H4 olarak bilinen başlıca histon proteinleri, kromatinin temel tekrar birimi olan nükleozomun çekirdek kısmını oluşturur (Bannister ve Kouzarides, 2011; Bonasio vd., 2010; Gibcus vd., 2018; Van Attikum ve Gasser, 2009).



**Şekil 2.2.** Histonun üç boyutlu düzeni ve nükleozom yapısının düzenlenmesi (National Institutes of Health, Educational Resources, 2025)

Nükleozomlar, iki H3-H4 dimeri ve iki H2A-H2B dimerinden oluşan sekizli (oktamerik) bir yapıdan meydana gelir. Yaklaşık 146 baz çifti uzunluğundaki DNA, bu çekirdek yapının etrafına sol-elli bir süperhelikal dönüş yapacak şekilde sarılır (Bannister ve Kouzarides, 2011; Gibcus vd., 2018; Go vd., 2011; Neganova vd., 2022; Tanoshima vd., 2016). Bu yapı, nükleozomlar arasındaki DNA'ya bağlanarak kromatin lifinin daha yüksek düzeyde katlanmasına ve sıkılaşmasına katkı sağlayan H1 adlı “bağlayıcı histon” sayesinde daha da stabilize olur (Bannister ve Kouzarides, 2011; Colleoni vd., 2012; Jeanteur, 2005; Neganova vd., 2022; Turgut vd., 2019). Nükleozomdan başlayarak solenoid veya zikzak benzeri daha karmaşık düzenlere kadar uzanan bu hiyerarşik organizasyon; gen düzenlenmesi, DNA replikasyonu ve tamir mekanizmaları gibi temel biyolojik süreçlerin sağlıklı bir şekilde işlemesi açısından yaşamsaldır (Bannister ve Kouzarides, 2011; Furnari vd., 2014; Gibcus vd., 2018; Jeanteur, 2005; Neganova vd., 2022; Tung ve Winn, 2011).

Histon biyolojisinin önemli bir yönü, bu proteinlerin evrimsel açıdan büyük oranda korunmuş olması ve belirli koşullarda veya genomik bağlamlarda kanonik histonların yerine geçebilen özel histon varyantlarının (örneğin H2A.Z ve H2A.X) varlığıdır (Amarin ve Obeidat, 2010; Yan vd., 2012). Bu varyantlar, nükleozomun fiziksel özelliklerini değiştirebilir ve DNA hasar onarımı (örneğin H2A.X) veya transkripsiyonel düzenleme (örneğin H2A.Z) gibi belirli işlevlerde uzmanlaşmış roller üstlenebilirler. Böylece histonlar, hem kararlı hem de hücrenin ihtiyaçlarına duyarlı, dinamik bir kromatin yapısının sürdürülmesini sağlar (Algahtani vd., 2019; Zhang vd., 2022).

Histon-DNA etkileşimlerinin dinamik niteliği, büyük ölçüde histon kuyrukları üzerinde gerçekleşen asetillenme, metillenme, fosforillenme ve ubiquitinlenme gibi çeşitli translasyon sonrası modifikasyonlar ile yönetilir. Bu modifikasyonlar, özgül enzim aileleri (örneğin histon asetiltransferazlar, histon deasetilazlar, metiltransferazlar, kinazlar ve ubiquitin ligazlar) tarafından gerçekleştirilir ve kromatinin yapısını ve işlevini derin bir şekilde etkileyebilir (Nunes vd., 2023; Tung ve Winn, 2011). Örneğin, lizin kalıntılarının asetillenmesi genellikle histonun pozitif yükünü azaltarak DNA ile etkileşimin gevşemesine ve transkripsiyon faktörlerinin kromatine daha kolay erişebilmesine yol açar. Buna karşılık, belirli metillenme işaretleri, hangi kalıntıların modifiye edildiğine bağlı olarak gen susturulması veya aktifleşmesi ile sonuçlanabilir (Algahtani vd., 2019; Zhang vd., 2022). Bu translasyon sonrası modifikasyonlar, hücrelerin gelişim, farklılaşma ve çevresel uyarılara karşı yanıt gibi süreçlerde gen ekspresyonunu zamanlama ve mekânsal boyutlarda koordine etmesine yardımcı olan epigenetik sinyaller olarak işlev görür (Amarin ve Obeidat, 2010; Yan vd., 2012).

Histon bileşimi, histon varyantları ve translasyon sonrası modifikasyonlar arasındaki etkileşim, son derece düzenli bir epigenetik kontrol sistemi oluşturur. Bu sistem, hücrelerin iç ve dış uyaranlara hızlı bir şekilde uyum sağlaması için hangi genlerin, ne zaman ve ne ölçüde ifade edileceğini düzenler (Furnari vd., 2014; Tung ve Winn, 2011). Histon biyolojisine dair bilgilerimiz arttıkça, gelişimsel biyolojiden kanser tedavisine dek uzanan pek çok alanda hedefe yönelik yeni müdahalelere kapı aralanmakta; böylece

histonların hem normal fizyoloji hem de hastalık patogenezi açısından ne denli merkezi bir önem taşıdığı bir kez daha anlaşılmaktadır (Algahtani vd., 2019; Zhang vd., 2022).

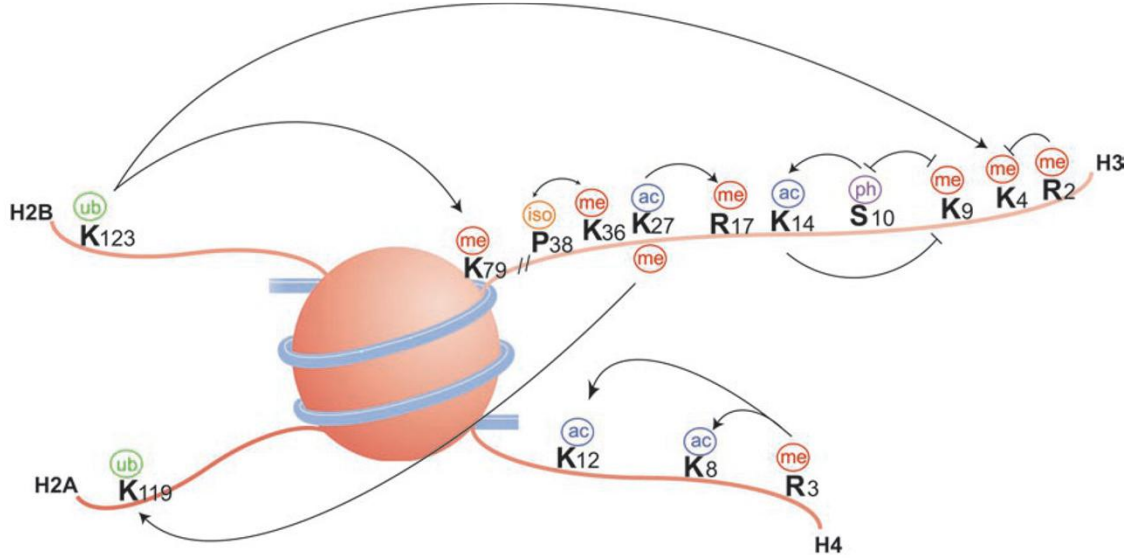
## **2.8. Histon Modifikasyonları**

Histon modifikasyonları, ökaryotik hücrelerde kromatin yapısını ve fonksiyonunu derinden etkileyen, histon proteinlerinin N-terminal kuyruklarında gerçekleşen kritik translasyon sonrası (post-translasyonel) düzenlemelerdir. Asetillenme, metillenme, fosforillenme ve ubiquitinlenme gibi çeşitli modifikasyonlar, gen ifadesinin düzenlenmesinde, kromatin mimarisinin belirlenmesinde ve DNA onarımı ile replikasyon gibi yaşamsal hücresel süreçlerde önemli roller oynar (Teng ve Tan, 2012; Ucar vd., 2011). Bu modifikasyonların dinamik doğası, genlerin aktif hâle getirilmesi ya da susturulması üzerinde hassas bir kontrol kurulmasını sağlar ve böylece hücre gelişim, farklılaşma ve özellikle kanser ile nörodejeneratif hastalıklar gibi patolojik durumların ilerlemesinde belirleyici etkiler gösterir (Tan vd., 2011; Teng ve Tan, 2012).

Histon modifikasyonlarının çeşitliliği oldukça yüksektir ve her bir tip, kromatin dinamiklerine kendine özgü bir katkıda bulunur. Örneğin, temel olarak lizin kalıntılarında gerçekleşen asetillenme, histonun pozitif yükünü nötralize ederek kromatinin gevşemesine ve transkripsiyon için daha elverişli bir ortam oluşmasına yol açar (Meng vd., 2010; Zhu vd., 2013). Metillenme ise hem lizin hem de arjinin kalıntılarında meydana gelebilir ve tekli, ikili veya üçlü metil grubu eklenmesi söz konusu olabilir. Bu süreç, spesifik konum ve metil grubu sayısına bağlı olarak gen ekspresyonunda aktivasyon ya da baskılama şeklinde farklı sonuçlar doğurabilir (Masumoto vd., 2011; Prakash ve Fournier, 2017). Fosforillenme, genellikle serin, treonin veya tirozin kalıntılarında gerçekleşir ve DNA hasar yanıtı ile hücre döngüsü düzenlenmesi gibi çeşitli hücresel olaylarla ilişkili bulunur (Cao vd., 2016; Hayakawa vd., 2017). Histonlarda daha az incelenmiş olmasına karşın, ubiquitinlenme de histon işlevlerini ve kromatin yapısını etkileyebilen önemli bir modifikasyondur (Yuan vd., 2014).

Farklı histon modifikasyonları arasındaki karşılıklı etkileşim, “histon kodu” olarak adlandırılan karmaşık bir düzenleyici ağı oluşturur. Bu kod, yalnızca bireysel modifikasyonların toplamından ibaret değildir; aksine, belirli bir anda bir araya gelen modifikasyon kombinasyonları, özgün biyolojik sonuçları tayin eder (Arita vd., 2012; Shan vd., 2012). Örneğin, bazı modifikasyonların varlığı, spesifik bağlanma proteinlerini (reader proteinler) bölgeye çekerek kromatinin daha da açılmasına veya sıkılaşmasına sebep olabilir, böylece gen ifadesini etkinleştirir veya susturur (Raynal vd., 2012; Zhang vd., 2015). Bu modifikasyonların dinamik niteliği, hücrelerin çevresel değişimlere ve internal uyarılara hızlı bir şekilde yanıt vermesini mümkün kılar; dolayısıyla homeostazın korunmasında ve adaptasyonun sağlanmasında kilit rol oynar (Bannister ve Kouzarides, 2011; Zhang vd., 2015; Zheng vd., 2010).

Histon modifikasyonları diğer modifikasyonları olumlu veya olumsuz etkileyebilir. Histonlar (H2A, H2B, H3 ve H4), DNA’nın sarıldığı protein çekirdeğini oluşturur ve nükleozom olarak bilinen temel kromatin birimini oluşturur. Her histonun, dışarıya doğru uzanan ve farklı enzimler tarafından kimyasal olarak değiştirilebilen “kuyruk” bölgeleri (amino asitlerin amino-terminal uzantıları) vardır. Bu değişiklikler, DNA ve histonlar arasındaki etkileşimi gevşetebilir veya sıkılaştırabilir, böylece gen ifadesini, DNA onarımını, replikasyonu ve diğer önemli süreçleri etkileyebilir (Bannister ve Kouzarides, 2011) (Şekil 2.3).

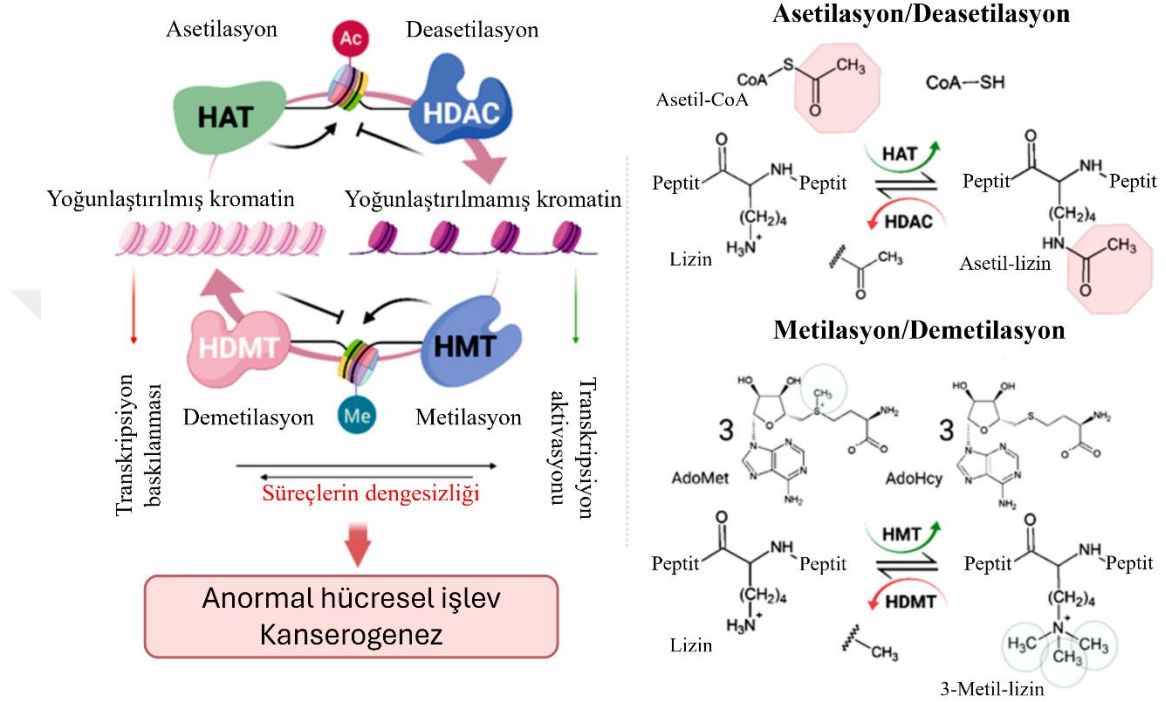


**Şekil 2.3.** Histon modifikasyonu çapraz konuşması (Bannister ve Kouzarides, 2011). H, histon proteinlerini (H2A, H2B, H3, H4) ifade eder. K, lizin; R, arjinin; S ise serin amino asitlerini temsil eder. Bu harfleri izleyen sayılar (örneğin, K4, R17, S10), histon dizisinde bu kalıntıların bulunduğu konumu gösterir. Ub: ubikütinasyon; me: metilasyon; ac: asetillenme; ph: fosforilasyon; iso: izomerizasyon. Olumlu bir etki okucuyla, olumsuz bir etki ise düz bir kafa ile gösterilmiştir.

Histon modifikasyonlarının DNA hasar yanıtında da önemli görevleri vardır. Belirli modifikasyonlar, onarım proteinlerini hasar bölgelerine çekerek onarım mekanizmalarını etkinleştirir (Ezziane, 2012; Meyer vd., 2014). Örneğin, histon H2AX'in fosforillenmesi ( $\gamma$ H2AX oluşumu), çift zincirli DNA kırıklarına karşı klasik bir yanıttır; bu değişiklik hasar bölgesini “işaretler” ve onarım faktörlerinin toplanmasını sağlar (Cao vd., 2016; Z.-F. Yuan vd., 2014). Ayrıca, histon modifikasyonları ile DNA metilasyonu arasındaki etkileşim (Şekil 2.4), hücrelerin genomik bütünlüğünü korumasında ve gen ifadesini hücrel strese göre ayarlamasında kritik öneme sahiptir (Cao vd., 2016; Mariño-Ramírez vd., 2011).

Mass spektrometri ve kromatin immünopresipitasyonu (chromatin immunoprecipitation: ChIP) gibi teknolojik gelişmeler, histon modifikasyonlarının genom çapında yüksek çözünürlüklü haritalanmasını mümkün kılarak bu modifikasyonların dağılımına ve işlevlerine ilişkin önemli bulgular ortaya koymuştur (Agudelo Garcia vd., 2019; Maekawa vd., 2016). Söz konusu teknikler, histon modifikasyonlarının genom boyunca tekdüze bir şekilde dağılmadığını, aksine belirli genetik bölgelerde ve transkripsiyonel durumlarla ilişkili özel “imza”lar oluşturduğunu

göstermektedir (Cheung vd., 2018; Hennig ve Weyrich, 2013). Örneğin, aktif promotör bölgeleri asetillenme ve metillenme açısından özgül kalıplar gösterirken, baskılanmış bölgeler farklı modifikasyonlara sahip olarak transkripsiyonu durgun hâle getirebilir (Erdel, 2017; Flensburg vd., 2014).



**Şekil 2.4.** Histon asetillenmesi/deasetillenmesi ile histon metillenmesi/demetillenmesinin, histon asetiltransferazlar (HAT'ler)/deasetilazlar (HDAC'ler) ve metiltransferazlar (HMT'ler)/demetilazlar (HDMT'ler) tarafından kontrol edildiğini gösteren şema (Neganova vd., 2022).

Hücre bölünmesi esnasında histon modifikasyonlarının kalıtımı, epigenetik düzenlemenin önemli bir boyutunu oluşturur. Yapılan araştırmalar, ana hücredeki histonların kendi modifikasyon örüntülerini koruyarak yeni hücrelere aktarabildiğini ve böylece izleyen kuşaklarda gen ekspresyonunu etkileyebildiğini göstermektedir (Asim vd., 2023; Masumoto vd., 2011). Bu epigenetik bellek, özellikle kök hücreler ve gelişim aşamaları bakımından büyük önem taşır; çünkü hücre karakterinin ve işlevselliğinin sürekliliğini garanti eder (Govind vd., 2012; Hung vd., 2014).

Özetle, histon modifikasyonları gen ifadesi ve kromatin dinamiklerinin düzenlenmesinde başlıca unsurlardan biridir. Çeşitlilikleri ve birbirleriyle etkileşimleri, hücre içinde son derece karmaşık ve ileri düzeyde bir kontrol mekanizması kurulmasını sağlar ve bu mekanizma gelişimden hastalık süreçlerine kadar pek çok olayı şekillendirir. Mevcut araştırmalar, “histon kodu”nun tüm yönleriyle anlaşılmasına yönelik çabalarını sürdürmekte ve bu alanda elde edilen bilgiler, kanser ve nörodejeneratif rahatsızlıklar dahil olmak üzere birçok hastalıkta terapötik hedeflerin belirlenmesi açısından büyük vaat sunmaktadır (Bornelöv vd., 2015; Khare vd., 2012; Tan vd., 2011).

## **2.9. Histon Asetillenmesi ve Histon Asetiltransferazların (HAT’ler) Kanser Gelişimindeki Rolü**

HAT’ler, asetil-CoA molekülünden aldıkları asetil grubunu histon proteinlerinin amino-terminal bölgelerindeki iç lizin kalıntılarındaki bulunan  $\epsilon$ -amino grubuna ekleyerek lizin asetillenmesini gerçekleştirir (Di Martile vd., 2016). Bu süreçte eklenen asetil grubu, lizin kalıntısının pozitif yükünü nötralize eder; böylece histonların DNA ile kurduğu elektrostatik bağlar zayıflar ve kromatin yapısı daha gevşek bir hâl alır. Bu gevşeme, gen düzenlenmesini (“gene assembly”) etkileyip transkripsiyon akışında değişiklikler meydana getirmektedir (Narita vd., 2019) (Şekil 2.4). Histonlardaki transkripsiyon sonrası modifikasyonlar, aynı zamanda histon dışı proteinlerde de görülerek kromatin organizasyonunun ve yeniden şekillenmesinin (“remodeling”) düzenlenmesinde kilit bir rol oynar. Sonuç olarak, histon asetillenmesinin genellikle ökromatin olarak adlandırılan açık ve aktif kromatin yapısını desteklediği; öte yandan histon deasetillenmesinin, heterokromatin diye bilinen yoğun ve pasif kromatin formuna yol açtığı bilinmektedir (Neganova vd., 2022).

HAT’lerin temel işlevi, transkripsiyonun aktif hâle getirilmesidir. Dolayısıyla bu enzim ailesi, hücre içinde çok çeşitli süreçleri düzenlemede kritik roller üstlenir (Barnes vd., 2019; Sapountzi ve Côté, 2011; Trefely vd., 2019). Hücre içindeki konumlarına göre iki ana gruba ayrılırlar: sitoplazmada yer alan tip B (HAT1, HAT2, HatB3.1, Rtt109 ve

HAT4) (Tafrova ve Tafrov, 2014; Yang vd., 2011) ve büyük oranda çekirdekte bulunan tip A (Neganova vd., 2022).

Tip A, yapı ve işlevleri benzer beş ana aile olarak tanımlanmaktadır.

**Aile I [CREB'e bağlanan protein (CREB-binding protein: CBP)/p300 grubu]:** Bu ailede, yapısal ve işlevsel bakımdan benzerlik gösteren CBP ve p300 bulunur. İki proteinde de HAT bölgesi, bromodomain (BRD) ve protein-protein etkileşimlerinde görev alan üç farklı sistein ve histidin zengini alan (TAZ, PHD, ZZ) yer alır (Dancy ve Cole, 2016).

**Aile II (GNAT: GCN5 ile ilişkili N-asetiltransferaz):** Bu aile, hem histonları hem de histon dışı proteinleri asetilleyeabilen 12 enzimi içerir. HAT bölgesine ek olarak, C-terminalde asetillenmiş lizin kalıntılarını tanıyan ve bağlanan korunan bir BRD bulunur (Salah Ud-Din vd., 2016).

**Aile III (MYST):** MYST ailesi, yüksek oranda korunmuş MYST bölgesine ve protein tanımasında önemli ilave alanlara sahiptir (Sapountzi ve Côté, 2011).

**Aile IV (NCOA ile ilişkili HAT):** Steroid reseptör koaktivatörleri (SCR1, SCR2 ve SCR3) bu gruptadır ve kromatin yeniden düzenlenmesi ile transkripsiyon faktörlerinin toplanması/stabilizasyonunda rol oynarlar (Wang ve Dent, 2014).

**Aile V (Transkripsiyon faktörü ilişkili HAT):** TAFII250 ve TFIIC gibi TATA-box bağlanma proteinine (TBP) ilişkin faktörleri içerir (Hsieh vd., 1999).

HAT ailesindeki genetik değişiklikler ve fonksiyonel bozukluklar kanserle yakından ilişkilidir (Di Martile vd., 2016; Guo vd., 2018). Farklı HAT üyeleri, tümörlerde çeşitli mutasyon biçimleri gösterebilir ve kanserin başlangıcı ile ilerleyişinde, hatta metastazında rol alabilir (Calcagno vd., 2019; Gruber vd., 2019; Shanmugam vd., 2018). Örneğin CBP/p300 genlerindeki mutasyonlar farklı lösemi tipleri ile B hücreli non-Hodgkin lenfomasında görülmüş; ayrıca solid tümörlerde de rapor edilmiştir (Chen

vd., 2015; Li vd., 2019; Pasqualucci vd., 2011; Sin vd., 2019). GNAT ailesine ait enzimler de geniş hücresel işlevleri nedeniyle çeşitli kanser patolojilerinde etkindir. GCN5 insan glioma, kolon, meme ve akciğer kanserlerinde aktive olurken (Mustachio vd., 2019), pCAF over , mide ve özofagus gibi bazı solid tümörlerde baskılanmış şekilde tespit edilmiştir (Li vd., 2016). ATAT1 de kötü huylu tümörlerin yayılmasıyla bağlantılı birçok hücresel süreçte (hücre yapışması, göç ve invazyon) kilit rol oynar; meme kanseriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Aguilar vd., 2014; Boggs vd., 2015; Venuta ve Rendina, 2008). KAT4, KAT5, MYST1, MYST3 ve MYST4 gibi diğer HAT'lerin de ekspresyon bozuklukları kolorektal kanserde belirgindir. Ek olarak, kötü huylu böbrek tümörlerinde KAT2A, KAT2B, KAT4 ve MOF'un aşırı ifade edildiği bilinmektedir (Audia ve Campbell, 2016). MYST ailesinin alt grupları da malign tümörlerde sıkça mutasyona uğrayabilir; hibrid proteinlerin ortaya çıkmasına neden olan kromozomal anomaliler lösemi gelişimini hızlandırabilir (Borrow vd., 1996; Chaffanet vd., 2000). MOF aktivitesinin artması, karışık soy lösemisi (mixed line leukemia: *MLL*) genindeki onkojenik yeniden düzenlemelerle karakterize bir lösemi alt tipini desteklemektedir (Valerio vd., 2017). Aynı zamanda MOF'un ekspresyonunun meme, böbrek, mide ve kolorektal kanserlerin yanı sıra küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve medulloblastoma gibi solid tümörlerde de değiştiği görülmüştür (Avvakumov ve Cote, 2007).

Yakın dönem çalışmaları, *hMOF* geninin HCP5'i (insandaki 5 farklı HLA kompleksinin birleşimi) hedef aldığına işaret etmektedir. Over kanserinde *hMOF* ve HCP5'in baskılanması sonucunda epitel dokularda H4K16 asetillenmesinde azalma meydana gelebilir (Cai vd., 2015; Liu vd., 2013). Bağışıklık sistemi, anormal hücreleri tespit ederek tümör gelişimini engellemeye çalışır; fakat HLA I ve II sınıf moleküllerdeki anormallikler over kanserlerinde tanımlanmıştır (Kübler vd., 2008). Öte yandan HCP5, MHC sınıf I bölgesinde yer alır ve retroviral enfeksiyonlara karşı bağışıklıkta kilit rol oynar (Kulski ve Dawkins, 1999). Dolayısıyla *hMOF*, hedefi olan *HCP5* geninin ifadesini düzenleyerek over kanserinde antijenlere bağlanma yoluyla gelişen immün tepkileri değiştirebilir. Ayrıca *hMOF* düzeyindeki azalma, hastaların genel sağkalım oranının düşmesiyle de ilişkilidir (Cai vd., 2015). Bu nedenle *hMOF* proteininin ekspresyonu, over kanserinin prognozunu etkileyen bağımsız bir risk faktörü olabileceği

gibi tanı ve tedavi yaklaşımlarında “epigenetik biyobelirteç” olarak da dikkate alınabilir (Cai vd., 2015; Neganova vd., 2022).

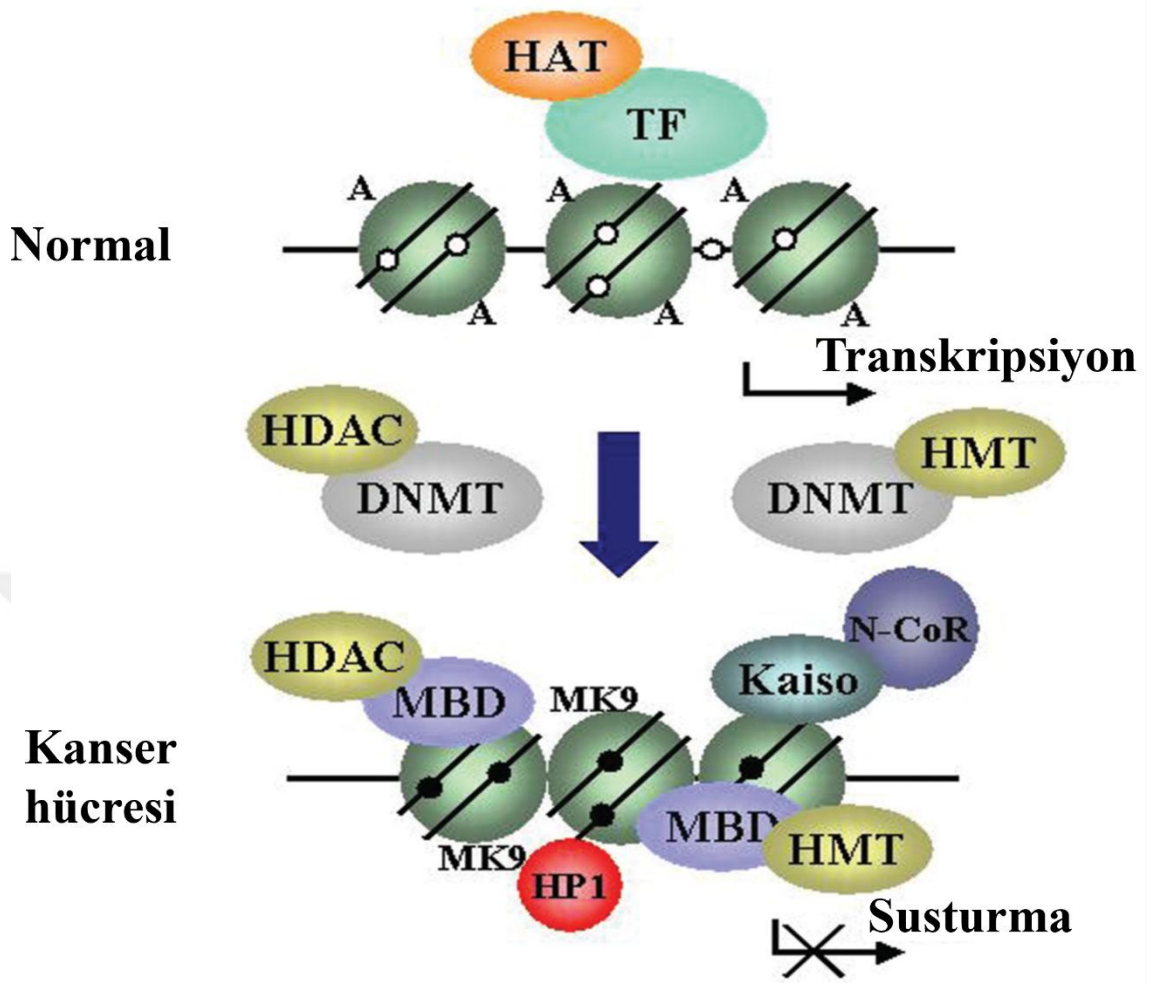
## **2.10. Histon Deasetilasyonu ve HDAC’lerin Kansere Gelişimindeki Rolü**

Asetillenmenin tersi olarak tanımlanan histon deasetillenmesi, histon proteinlerinin lizin kalıntılarından asetil gruplarının uzaklaştırılmasıyla gerçekleşir ve bu süreçte genellikle HDAC enzimleri görev alır (Di Martile vd., 2016; Huang vd., 2019; Neganova vd., 2022). Deasetillenen histonlar, pozitif yüklerini koruyarak DNA ile daha güçlü elektrostatik etkileşim kurar, sonuçta kromatin daha kompakt hâle gelir ve bu sıkı yapı gen transkripsiyonunun baskılanmasına katkıda bulunur (Şekil 2.5). Dolayısıyla HDAC enzimleri, gen ifadesi gibi temel hücresel süreçlerin düzenlenmesinde kritik bir rol oynar (Di Martile vd., 2016; Huang vd., 2019).

Önceki araştırmalar, insanlarda 18 farklı HDAC üyesi bulunduğunu ve bu üyelerin yapısal özellikleri ile hücre içi lokalizasyonlarına göre dört ana sınıfa ayrıldığını göstermiştir (Rana vd., 2020).

**Sınıf I (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8):** Büyük oranda çekirdek içinde işlev görür. Bu enzimlerde, oldukça korunmuş bir deasetilaz alanı (domain) bulunur ve amino ile karboksi terminalleri nispeten kısadır (Yang ve Seto, 2008). Bu sınıf, gen ekspresyonu kontrolünde doğrudan rol aldığı için özellikle önem taşır.

Kanserde, DNMT ile birlikte, HDAC ve histon metiltransferazlar (HMT) devreye girer. Metillenmiş promotörler, HDAC ve HMT’leri sürece dahil eden metil-CpG bağlayıcı proteinlere (MBD) bağlanır. Bu süreçte histonlar deasetillenir ve histon H3, K9 (MK9) pozisyonunda metillenir; bu da HP1 proteininin bağlanmasını kolaylaştırır. Kaiso da metillenmiş DNA’ya bağlanabilir ve N-CoR baskılayıcı kompleksini sürece dahil eder (Jeanteur, 2005) (Şekil 2.5).



**Şekil 2.5.** Kanserde tümör baskılayıcı genlerin metilasyona bağlı susturulması. Burada bir nükleozom dizisi gösterilmektedir. Histon oktameleri yeşil dairelerle, DNA ise siyah bir çizgi şeklinde temsil edilmiştir; bu çizgi üzerinde metillenmemiş CpG dinükleotitleri beyaz daireler, metillenmiş CpG'ler ise siyah daireler olarak gösterilmektedir. Yukarıda, metillenmemiş bir promotörde transkripsiyon faktörlerinin ve histon asetiltransferazların (HAT) bağlandığı ve histonların asetillendiği durum yer almaktadır. “Epigenetics and Chromatin” adlı kitaptan uyarlanmıştır (Jeanteur, 2005).

**Sınıf II (HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9 – alt grup IIa; HDAC6, HDAC10 – alt grup IIb):** Hem çekirdek hem de sitoplazmada bulunabilirler. Korunmuş deasetilaz alanına ek olarak, N-terminal kısımda dokuya özgü transkripsiyon faktörleri ve korepresörlerle etkileşimi sağlayan düzenleyici bölgeler içerirler (Parra ve Verdin, 2010). Bu sayede farklı sinyal yollarını eşzamanlı düzenleyerek hücrenin gelişim, farklılaşma ve stres yanıtlarında önemli roller üstlenirler.

**Sınıf III (SIRT ailesi):** Yedi üyeden oluşan bu grup (SIRT1–7), NAD<sup>+</sup> bağımlı deasetilaz ve/veya ADP-ribozilaz etkinliği gösterir. Farklı hücrel kompartmanlarda yer alır, bu da her bir SIRT üyesine özgü fonksiyonların ortaya çıkmasına olanak tanır. Hücre döngüsü, metabolizma, stres yanıtı ve yaşlanma gibi geniş bir yelpazede etkili olurlar (Neganova vd., 2022).

**Sınıf IV (HDAC11):** Yapısal olarak sınıf I ve II HDAC'lere benzer konservatif kalıntılara sahip tek üyedir. HDAC11'in işlevleri henüz tam olarak açıklığa kavuşmasa da böbrek, beyin, testis, kalp ve iskelet kasları gibi çeşitli dokularda ifade edildiği bilinmektedir (Gao vd., 2002).

HDAC'lerin insan hastalıklarının gelişimindeki rolleri arasında kanser patogenezi en sık tartışılan konulardan biridir. DNA ve histonu modifiye eden enzimlerdeki mutasyonlar veya işlev bozuklukları, çeşitli malignite türlerine yol açabilir (Cress ve Seto, 2000; Dawson ve Kouzarides, 2012; Liu vd., 2019). Örneğin bazı onkogenik füzyon proteinleri (ör. PML-RAR $\alpha$ , AML1-ETO) HDAC'leri doğrudan hedefleyerek tümör hücresinin büyümesini, farklılaşmasını ve metastazını destekleyen süreçleri aktive eder (Cress ve Seto, 2000). HDAC ifadelerindeki artış veya azalış, çeşitli kanser türlerinde (prostat, mide, meme, kolon gibi) normal dokulara kıyasla belirgin biçimde gözlemlenmiştir. Bu değişimler, onkogenlerin aktivitesini ve tümör baskılayıcı genlerin ifadesini etkileyerek kanserin başlangıcından metastazına kadar farklı aşamalarında rol oynar (Benedetti vd., 2015; Dovey vd., 2013; Duan vd., 2019; Yu vd., 2019). Örneğin, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5 gibi enzimlerin yüksek ekspresyonu veya aktivitesi, hastalığın ileri evrelere taşınması ve hastaların daha kötü prognozla karşı karşıya kalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Audia ve Campbell, 2016; Benedetti vd., 2015). HDAC6 ve HDAC10, hücrenin iskelet ve taşıyıcı sistemlerine müdahale ederek onkogenik dönüşüm, metastaz ve anjiyogenez gibi süreçlerde anahtar görevler üstlenir (Duan vd., 2017; Liu vd., 2019). HDAC4 mutasyonları meme ve rektal kanserlerde görülürken, HDAC8 ekspresyonunun artması nöroblastomda agresif seyir ve düşük sağkalım oranıyla bağlantılı bulunmuştur (Hrabeta vd., 2014; Rettig vd., 2015).

Hücre döngüsünü düzenleyen p21 gibi baskılayıcı moleküllerin ekspresyonunun, HDAC aktivitesiyle ters orantılı olduğu gösterilmiştir. Örneğin kolorektal kanser

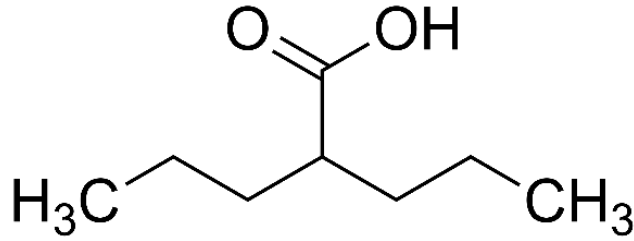
hücrelerinde p21 seviyesi, HDAC2 ekspresyon düzeyi arttıkça azalmaktadır (Neganova vd., 2022). SIRT (Sınıf III) ailesindeki bazı üyeler, çeşitli kanserlerde farklı şekillerde ifade edilmektedir. SIRT1, SIRT4 ve SIRT7 yüksek aktivite seviyelerine ulaşarak myeloid lösemi, prostat ve over (yumurtalık) karsinomlarında, ayrıca non-melanom cilt kanserlerinde rol oynayabilir. SIRT2 ise gliom, mide kanseri ve melanom gibi tümörlerde baskılanmış durumdadır (Barber vd., 2012; Benedetti vd., 2015). Anormal SIRT düzeyleri, otofaji dâhil pek çok hücresel süreçte bozulmalara yol açabilmektedir (Suzuki vd., 2015). Özellikle SIRT7nin histon H3K18 asetillenmesini anormal biçimde deasetillemesi, hücresel transformasyona katkıda bulunmakta ve SIRT7 seviyesinin azaltılması, farelerdeki insan kaynaklı tümör hücre ksenograftlarında tümör aktivitesini belirgin biçimde düşürmektedir (Barber vd., 2012). Sınıf IV  yesi HDAC11 ise miyeloproliferatif hastalıklar ve Hodgkin lenfomasında aşırı ifade edildiği tespit edilen bir diğer HDAC olarak öne çıkar (Huang vd., 2018). Bu tür bulgular, HDAC11'in de tıpkı diğer sınıflara ait HDAC'ler gibi kanser oluşumu ve ilerlemesinde dikkate değer bir işlev ta ıyabilece ini göstermektedir.

HDAC düzeyindeki veya aktivitesindeki değişimler, onkogen transkripsiyonunun artı ı ve tümör baskılayıcı genlerin baskılanması gibi etkilere yol açarak çeşitli kanserlerin patogenezinde yer alır. Bu nedenle HDAC hedefli tedavi yaklaşımları (HDAC inhibitörleri gibi), hem solid tümörlerde hem de hematolojik kanserlerde araştırılmaya devam etmekte ve klinik uygulamalarda kullanılmak üzere farklı ilaç adayları geliştirilmektedir (Neganova vd., 2022). Gelecekte yapılacak  alı malar, HDAC'lerin kanser gelişimiyle ilişkili mekanizmalarını daha ayrıntılı aydınlatarak, kişiye özgü ve daha etkili tedavi protokolleri geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

### **2.11. Valproik Asit (VPA)**

Valproik asit (VPA), kimyasal adıyla 2-propilpentanoik asit olarak bilinen kısa zincirli bir ya  asididir. Be  karbonlu bir ana gövde (pentanoik asit)  zerinde, ikinci karbondan yer alan propil (   karbonlu) bir yan grup bulunur. Molek l n karboksilik asit ( COOH) ucu, asit özelliğini belirlerken; orta bölümdeki dallanma (2-propil grubu) bile i in fonksiyonel özelliklerini etkiler ( ekil 2.6). Bu yapı, VPA'nın hem biyolojik

aktivitesini hem de fizikokimyasal özelliklerini (örneğin lipofiliklik ve suda çözünürlük) belirlemede önemlidir.



**Şekil 2.6.** Valproik asidin (VPA) kimyasal yapısı

Özellikle epilepsinin uzun süreli tedavisinde oldukça etkili ve genellikle iyi tolere edilen bir antiepileptik ilaç olarak geniş çapta tanınmaktadır (Diliberti vd., 1984; Goyal vd., 2016; Nunes vd., 2023). VPA ilk olarak 1881 yılında sentezlenmiş, 1962’de ise tıbbi kullanıma girmiştir (Scott, 1993). Başlangıçta organik çözücü olarak araştırılırken, nöbet önleyici (antikonvülsan) özelliklerinin tesadüfen fark edilmesi üzerine antiepileptik tedavide yaygın şekilde kullanılmaya başlamıştır. Zaman içinde mani tedavisi ve bipolar bozukluk yönetimi gibi psikotropik alanlarda da klinik uygulama alanı bulmuştur. Dünya Sağlık Örgütü’nün “Temel İlaçlar Listesi”nde yer alması (WHO, 2019), küresel sağlık açısından kritik bir ilaç olduğunu göstermektedir. Ayrıca jenerik ilaç olarak da temin edilebilmektedir (Manoguerra vd., 2008). 2022 yılında, ABD’de en sık reçete edilen 174. ilaç konumunda olması (The ClinCalc DrugStats Database, 2022), VPA’nın uzun süredir devam eden klinik önemini ve yaygın kullanımını yansıtmaktadır. Klinik faydalarına rağmen, birçok araştırma VPA’nın erken gebelik dönemindeki kullanımının önemli teratojenik riskler taşıdığını ortaya koymuştur. Bu riskler arasında nöral tüp defektleri (NTD’ler) ve diğer konjenital malformasyonlar öne çıkmakta olup (DiLiberti vd., 1984; Tung ve Winn, 2011; Werler vd., 2011), VPA’ya gebelik süresince maruz kalınması, kraniyofasiyal ve ekstremiteler anomalilerini de içeren geniş bir gelişimsel bozukluk yelpazesini tanımlayan fetal valproat sendromuna yol açabilmektedir (Goyal vd., 2016; Nunes vd., 2023; Tung ve Winn, 2011). Bu teratojenik etkiler, embriyonik gelişimin ve nöral tüpün kapanmasının en kritik aşamalarından biri olan gebeliğin ilk trimesterinde özellikle belirgin hale gelmektedir (Tanoshima vd., 2016).

VPA’nın teratojenitesini açıklayan mekanizmalar oldukça karmaşıktır. Önemli bir etki yolu, VPA’nın alifatik asit kategorisinde bir HDACi olarak işlev görme kapasitesidir

(Colleoni vd., 2012; Göttlicher, 2004; Göttlicher vd., 2001). Histon deasetilazlar, HAT'ler ile birlikte kromatin yeniden şekillenmesini düzenler ve hücre büyümesi ile farklılaşma için kritik olan pek çok genin ekspresyonunda rol alır (Krämer vd., 2003; Turgut vd., 2019). VPA, HDAC aktivitesini inhibe ettiğinde histon asetilasyon seviyeleri artar; bu durum, nöral tüpün sağlıklı biçimde kapanması ve normal embriyogenezin sürdürülmesi için gerekli olan sinyal yollarının işleyişini bozabilir (Nau vd., 1991; Tung ve Winn, 2011). Ayrıca, VPA'nın HDAC inhibisyonu, reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasına neden olarak hücrel apoptozu tetikleyebilir ve böylece teratojenik etkiyi güçlendirebilir (Furnari vd., 2014; Tung ve Winn, 2011). Bu moleküler bozulmalar, spina bifida ve anensefali gibi nöral tüp defektlerinin ortaya çıkmasında kritik bir rol oynamaktadır (Tung ve Winn, 2011). VPA'nın teratojenik etkisi yalnızca farmakolojik özellikleriyle sınırlı değildir; genetik ve çevresel faktörler de bu süreçte belirleyicidir. Örneğin, metilentetrahidrofolat redüktaz (*MTHFR*) geninde görülen bazı polimorfizmlerin, VPA'ya bağlı NTD gelişiminde artmış yatkınlıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Yan vd., 2012). Bunun yanı sıra, maternal obezite ve diyabet gibi ek risk faktörleri de olumsuz gelişimsel sonuçların ortaya çıkma olasılığını artırabilir (Algahtani vd., 2019; Amarın ve Obeidat, 2010). Folik asit takviyesi, genel popülasyonda NTD insidansının azaltılmasında etkili olduğundan, VPA'ya bağlı konjenital malformasyonları önlemedeki rolü de araştırma konusu olmuştur. Kimi çalışmalar, folik asidin insan pluripotent kök hücrelerinden türetilmiş nöral rozetlerin morfogenezine olumlu katkı sağlayarak VPA kaynaklı gelişimsel anormallikleri kısmen hafifletebileceğini öne sürerken, diğer araştırmalar folatın tek başına ilacın nöral tüp kapanmasına yönelik spesifik müdahalesini yeterince engelleyemeyeceğini göstermektedir (Akimova vd., 2017; Lee vd., 2023; Turgut vd., 2019; Zhang vd., 2022). Bu çelişkili sonuçlar, VPA'nın teratojenik mekanizmalarının yalnızca folat takviyesiyle düzeltilebilen süreçlerden daha geniş kapsamlı olduğunu düşündürmektedir.

Özellikle üreme çağındaki kadınlarda antiepileptik tedavi ihtiyacı, klinik açıdan önemli bir zorluk oluşturmaktadır. Mevcut kılavuzlar, önceki gebeliklerde NTD öyküsü olan hastalar başta olmak üzere, gebelik planlayan ya da gebe kalması muhtemel bireylerin daha güvenli bir profil sunan antiepileptik ilaçlara geçmesini önermektedir (Tanoshima vd., 2016; Tomson vd., 2019). VPA'nın teratoloji alanındaki etkilerine ek olarak, bir

HDACi olarak tanımlanması bu ilacın ününü ve kullanıma yaygınlığını oldukça artırmıştır. 1990'ların başlarında, tümör hücrelerinin büyüme ve hayatta kalma yeteneklerinin HDAC aktivitesinin baskılanmasıyla zayıfladığı ortaya konmuş, bu da doğal kaynaklardan HDACi elde etmeye veya yeni bileşikler sentezlemeye yönelik çalışmaları hızlandırmıştır (Göttlicher vd., 2001; Krämer vd., 2003). HDAC1'in prostat, mide, kolon ve meme kansinomlarında; HDAC2'nin ise kolorektal, servikal ve mide kanserlerinde aşırı eksprese olduğu bildirilmektedir (Akgün, 2017; Halkidou vd., 2004; Song vd., 2017; Zhang vd., 2005; Zhu vd., 2004). Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi'nin ("United States Food and Drug Administration": FDA), trichostatin A (TSA) ve suberoylanilid hidroksamik asidi (SAHA) antikanser ilaçlar olarak onaylaması, bu alandaki araştırmaları daha da canlandırmıştır. Alifatik asitler arasında yer alan VPA, bütirat ve fenilbütirat gibi ajanlar, TSA veya SAHA'ya kıyasla genellikle daha yüksek konsantrasyonlarda etki eden daha zayıf HDACi'ler olarak kabul edilseler de, VPA hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamda servikal, prostat, nöroblastom, medüller tiroit, miyelom, kolon, gliom, lösemi, meme, akciğer, mesane ve melanom gibi çok sayıda kanser türünde antikanser aktivite göstermiştir (Duenas-Gonzalez vd., 2008).

1989 yılında, inositol geri dönüşümünün azalmasına bağlı olarak hücrel inositolün tükenmesinin, Border hastalığı (Border disease: BD) tedavisinde lityumun etki mekanizması olabileceği öne sürülmüştür (Berridge vd., 1989). Bu tarihten itibaren lityum, VPA ve karbamazepinin birçok model sistemde InsP3 seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Eickholt vd., 2005; Galit vd., 2007; Shimshoni vd., 2007; Williams vd., 2002). Nöronlarda inositol tükenmesi için gereken yapısal koşullara bakıldığında, karboksil baş grubun (karboksilik asit grubu) gerekli olduğu ve  $\beta$ -konumundaki dallanmanın etki gücünü artırdığı görülmektedir (Li vd., 2012). Karboksilik asit grubunun amid veya hidroksamit gruplarına dönüştürülmesi genelde aktiviteyi oldukça azaltırken, siklopropil analoglarda (örneğin MTMCD [N-metil-2,2,3,3-tetrametilsiklopropankarboksamid]) karboksil grubunun değiştirilmesi gerektiği istisnai durumlar söz konusudur (Shimshoni vd., 2007). Ayrıca, doymamış VPA analoglarında etki stereoselektivite gösterir; S enantiyomerleri daha etkilidir ve (teratojenite durumunun aksine)  $\beta$ -konumunda bir hidrojen bulunması inositol tükenmesi için zorunlu değildir (Eickholt vd., 2005). VPA'nın inositol-tüketici etkisinin, miyo-inositol

1-fosfat (MIP) sentaz aktivitesini azaltan henüz bilinmeyen bir mekanizmayla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Galit vd., 2007; Vaden vd., 2001).

VPA gibi, BD tedavisinde kullanılan ilaçların hücresel hedeflerini inceleyen birçok çalışma, hücre döngüsünde, nöron yapısında ve hücre sağkalımında rol oynayan lityuma duyarlı glikojen sentaz kinaz 3 beta (GSK3 $\beta$ ) enzimine odaklanır. VPA'nın GSK3 $\beta$ 'yı hem doğrudan hem de dolaylı mekanizmalarla inhibe edebileceği belirtilmiştir (Chen vd., 2000); ancak bu etki tartışmalıdır (Jonathan Ryves vd., 2005). VPA ve diğer BD ilaçlarının MAPK yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (Akgün, 2017; Boeckeler vd., 2006; Einat vd., 2003; Hao vd., 2004; Terbach ve Williams, 2009). Bu etki, BD ile ilişkili olabilecek beyin bölgesel hacim kayıplarını önlemede (nöroproteksiyon) rol oynayabileceği için önemlidir (Manji ve Duman, 2001). Söz konusu aktivasyonun altında yatan mekanizma net olmasa da, bazı veriler VPA'nın bu etkiyi *Dictyostelium* gibi basit bir biyomedikal model organizmada protein kinaz A (PKA) yolağını zayıflatarak gerçekleştirebileceğini öne sürmektedir (Boeckeler vd., 2006). VPA, aynı zamanda, fosfolipaz A2 (PLA2) aracılı arakidonik asit salınımını azaltmaktadır (Chang vd., 2001). Diğer BD tedavilerinin de PLA2 transkripsiyonunu baskıladığı bilindiğinden, bu yolun BD tedavisindeki olası bir hedef olabileceği düşünülmektedir (Chang vd., 2001; Rao vd., 2008; Terbach ve Williams, 2009).

VPA'nın farmakolojik profili oldukça çeşitlilik sergilemektedir. Bir yandan epilepsi tedavisinde etkili ve görece iyi tolere edilen bir ajan iken, diğer yandan erken gebelikte kullanımının özellikle nöral tüp defektleri gibi ciddi teratojenik risklere yol açtığı bilinmektedir. Öte yandan, bir HDACi olarak tanımlanması, özellikle kombine tedavi yaklaşımlarında, kanser tedavisi için cazip fırsatlar sunmaktadır. Bu bağlamda yürütülen araştırmalar, VPA'nın hem gelişimsel hem de kanserle ilgili süreçleri hangi kesin moleküler yollarla etkilediğini daha detaylı olarak ortaya koyarken, epilepsi ve onkoloji alanlarındaki terapötik potansiyelini en iyi şekilde kullanmayı ve aynı zamanda teratojenik etkilerini azaltmaya yönelik stratejiler geliştirmeyi amaçlamaktadır.

### 2.11.1. VPA'nın Anti-kanser Etkisi

VPA, geleneksel olarak epilepsi tedavisinde uzun yıllar boyunca başarıyla kullanılan ve güvenlik profili iyi tanımlanmış bir ilaç olmakla birlikte (Aztopal vd., 2018; Han vd., 2013; Vecht vd., 2003), son dönemdeki çalışmalar, VPA'nın sadece antikonvülsan etkileriyle sınırlı kalmayıp, aynı zamanda çeşitli kanser türlerinde antitümör potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (Akbarzadeh vd., 2016; Sun ve Coy, 2014). Bu antikanser etkiler, büyük ölçüde VPA'nın HDACi olma kapasitesine dayansa da (Gan vd., 2012; Guadalupe vd., 2012; Hu vd., 2024; Juengel vd., 2013; Kostrouchova vd., 2007; Witt vd., 2013; Yagi vd., 2010), hücredeki pek çok önemli sinyal yolunu aynı anda etkilemesi de bu özelliğin altında yatan temel mekanizmalardan biridir. Özellikle Wnt/ $\beta$ -katenin, PI3K/AKT, p21WAF1/CDKN1A ve MAPK/ERK gibi yollar, kanser hücrelerinin proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptoz gibi süreçlerini düzenleyerek tümör gelişiminde kritik roller oynarlar (Akgün, 2017; Chou vd., 2011; Sidana vd., 2012).

VPA'nın HDAC inhibitör etkisi, histon asetilasyon seviyelerini yükselterek gen ekspresyon düzenini değiştirebilmekte, böylece tümör baskılayıcı genlerin yeniden etkinleşmesi ve onkogen ekspresyonunun baskılanması mümkün olmaktadır (Hu vd., 2024; Yagi vd., 2010). Bunun yanında, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun VPA tarafından modüle edildiği gösterilmiştir (Akbarzadeh vd., 2016; Sun ve Coy, 2014). Kanserde sıklıkla hatalı biçimde aktive olan Wnt/ $\beta$ -katenin yolunun inhibisyonu ya da doğru regülasyonu, hücre proliferasyonunun yavaşlatılması ve hücre farklılaşmasının artırılması gibi yararlar sağlayabilir (Crosby ve Deas, 2018; Yuan vd., 2014). Benzer şekilde, kanser hücrelerinin hayatta kalma mekanizmalarından biri olan PI3K/AKT sinyal yolunun VPA aracılığıyla baskılanabildiği, dolayısıyla AKT aktivasyonunun azalmasına bağlı olarak hücrelerin apoptoza daha duyarlı hale geldiği bildirilmiştir (Crosby ve Deas, 2018; Zhao vd., 2014).

VPA ayrıca p21WAF1/CDKN1A yolağı üzerinden hücre döngüsünü durdurma ("cell cycle arrest") etkisi gösterebilirken, MAPK/ERK yolağını da etkileyerek tümör hücrelerinin çoğalmasını ve hayatta kalmasını çeşitli düzeylerde baskılayabilmektedir (Kostrouchova vd., 2007; Sun ve Coy, 2014). Dahası, Notch sinyal yolu da VPA'nın

hedef aldığı önemli yollardan biridir ve bu yolun uyarılması, bazı kanser türlerinde tümör baskılayıcı bir etki gösterebilir (Cesar Machado vd., 2011; Greenblatt vd., 2007; Gunel vd., 2021). Örneğin, VPA'nın serviks kanseri ve nöroblastoma hücrelerinde Notch1 sinyalini aktive ettiği ve aynı zamanda histon H3 asetilasyonunu artırdığı saptanmıştır (Franko-Tobin vd., 2012; Sami vd., 2008). Bu çift yönlü etki, VPA'nın epigenetik düzenleyici fonksiyonuyla hücre içi sinyal iletim mekanizmalarını aynı anda kontrol edebildiğini, dolayısıyla çok katmanlı bir tümör baskılama stratejisi geliştirebildiğini göstermektedir (Kwiecińska vd., 2016).

VPA'nın kemoterapiyle kombine kullanımı, özellikle küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) gibi agresif tümörlerde dikkat çekici sonuçlar doğurmuştur (Chu vd., 2013; Hashemi-Sheikhshabani vd., 2019; Leiva vd., 2012; Münster vd., 2007). Örneğin, cisplatin ve etoposid gibi standart kemoterapötik ajanlara yanıtı artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, VPA ve niklosamid kombinasyonunun, A549 akciğer kanseri hücre hattında ekstrasik apoptozu indükleyerek güçlü bir sitotoksik etki oluşturduğu gösterilmiştir (Akgün vd., 2019). Klinik olarak ulaşılabilir dozda (0.6 mM) VPA kullanımının, farklı dozlarda FEC (5-Fluorourasil + Epirubisin + Siklofosamid) ile birlikte uygulandığında FEC'in sitotoksik etkisini artırdığı ATP testi ile gösterilmiştir. Ancak, bu etkinin MTT testinde doğrulanmamış olması VPA'nın hücre hatlarındaki sitotoksik etkisinin değerlendirilmesinde dikkatli olunması gerektiğinin altını bir kez daha çizmektedir (Arı vd., 2010). Klinik araştırmalar da bu durumu doğrular niteliktedir. Daha önce tedavi almış KHAK hastalarında doxorubicin tek başına etkisiz kalırken, VPA ile kombine edildiğinde yaklaşık %16 oranında yanıt elde edilmesi, VPA'nın olası bir "kemosensitizer" ya da ek tedavi ajanı olarak rol oynayabileceğini göstermektedir (Berghmans vd., 2015; Hajikazemi vd., 2018; Su vd., 2011). Benzer şekilde, VPA'nın başka birçok standart ya da hedefe yönelik tedaviyle birlikte kullanıldığında terapötik etkinliği artırabileceği bildirilmiştir (Juengel vd., 2013; Nilubol vd., 2017; Park vd., 2020; Shan vd., 2012).

VPA'nın antikanser gücünün göreceli olarak sınırlı olduğu bazı durumlar mevcuttur; ancak uzun dönemli epilepsi tedavisi geçmişi sayesinde geniş çaplı güvenlik ve farmakokinetik verilerinin bulunması, kanser tedavilerinde de kullanımını nispeten

güvenli kılmaktadır (Saha vd., 2017; Xie vd., 2020). Ayrıca, birçok klasik antiepileptik ilacın aksine, kurtarma kemoterapisi (salvage chemotherapy) ile daha az etkileşime girerek onkoloji pratiği içerisinde avantaj sağlar (Vecht vd., 2003). VPA'nın aynı anda birden çok sinyal yolunu hedefleyebilmesi, kanserin karmaşık doğasıyla çok yönlü bir şekilde mücadele etme olanağı sunmakta, bu da tek bir hedefe odaklanan monoteraplere kıyasla daha kapsamlı bir yaklaşım sağlamaktadır (Sun vd., 2015; Sun ve Coy, 2014; Wedel vd., 2011).

VPA'nın antikonvülsan etkilerinin yanı sıra, Wnt/ $\beta$ -katenin, PI3K/AKT, Notch ve MAPK/ERK gibi temel sinyal yollarını aynı anda modüle ederek antikanser potansiyel ortaya koyduğu görülmektedir. HDAC inhibisyonu ile histon asetilasyonunu artırarak gen ekspresyonunu düzenlemesi, onkogenleri baskılayıp tümör baskılayıcı genleri aktif hale getirmesine yol açmaktadır. Bununla birlikte, diğer kemoterapötik ajanlarla kombine tedavide gösterdiği sinerjik veya ek katkı potansiyeli de VPA'yı birçok malignitede umut vadeden bir yardımcı tedavi seçeneği hâline getirmektedir. Geniş güvenlik profili, iyi tanımlanmış farmakokinetiği ve birden çok sinyal yoluna etkisi, VPA'nın önümüzdeki dönemde onkolojik tedavilerde daha yaygın biçimde değerlendirilebileceğini göstermektedir. Özellikle VPA'nın en umut verici klinik sonuçlarının, sitotoksik kemoterapiler, immünoterapiler ya da diğer epigenetik düzenleyicilerle birlikte kullanıldığı kombinasyon tedavilerinde gözlemlendiği bildirilmektedir (Fenaux vd., 2009). VPA'nın uzun süredir epilepside kullanılan bir ilaç olması ve belirli ölçüde güvenlik verisine sahip bulunması, doğru doz ayarlamaları ve ayrıntılı risk-fayda analizleriyle birlikte değerlendirildiğinde, onkoloji alanında yeniden konumlandırılmasını kolaylaştırabilir.

## **2.12 Apoptozis ve Moleküler Regülasyonu**

Apoptozis, programlanmış hücre ölümü olarak bilinen, hücresel homeostaz, gelişim ve bağışıklık savunması gibi çeşitli fizyolojik işlevlerin temelini oluşturan kritik bir biyolojik süreçtir. Bu oldukça iyi düzenlenmiş mekanizma, istenmeyen, hasar görmüş veya potansiyel olarak zararlı hücrelerin seçici olarak ortadan kaldırılmasını sağlar ve çevredeki dokulara verilen hasarı en aza indirir. Yaralanma veya travma sonucu ortaya

ıkan, kontrolsüz ve genellikle zararlı bir hücre ölümü şekli olan nekrozdan farklı olarak, apoptoz enerjiye bağılı bir süreçtir ve hücrelerin düzenli bir şekilde ortadan kaldırılmasını sağlar; üstelik bu süreç inflamatuvar bir yanıt tetiklemez (Goldar vd., 2015; Martinez vd., 2010).

Apoptozisin morfolojik özellikleri belirgin ve iyi tanımlanmıştır. Apoptotik hücreler tipik olarak küçülme, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimcikler olarak bilinen membranla çevrili veziküllerin oluşumu gibi değişiklikler gösterir. Bu cisimcikler daha sonra komşu hücreler, özellikle de makrofajlar tarafından fagosite edilir. Bu mekanizma, hücre kalıntılarının etkin bir şekilde temizlenmesini sağlar ve inflamasyonu tetiklemeden gerçekleşir (Martinez vd., 2010). Bu süreç, doku homeostazının korunması ve hücre içi potansiyel olarak zararlı içeriklerin ekstrasellüler alana salınmasını engelleyerek inflamasyon ve doku hasarını önlemesi açısından kritik öneme sahiptir (Zhang vd., 2018).

Moleküler düzeyde, apoptozis esas olarak hücre ölüm programını yöneten sistein proteaz ailesi olan kaspazların aktivasyonu ile gerçekleşir. Kaspazlar, inaktif öncüler olarak sentezlenir ve içsel veya dışsal ölüm sinyallerine yanıt olarak aktif hale gelir (Chen ve Wang, 2002; Li ve Yuan, 2008). Bu enzimlerin aktivasyonu, apoptozisle ilişkili karakteristik morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle sonuçlanan spesifik substratların parçalanmasına yol açar (Chen ve Wang, 2002; Creagh vd., 2003). Ayrıca, DNA parçalanması bu sürecin önemli bir göstergesidir; endonükleazlar kromozomal DNA'yı oligomerik fragmanlara ayırır ve bu, jel elektroforezi ile gözlemlenebilen belirgin bir "merdiven" desenine yol açar (Martinez vd., 2010; Walker ve Sikorska, 1997). Bunun yanı sıra, fosfatidilserinin plazma zarının iç yüzeyinden dış yüzeyine geçişi, fagositik hücreler için bir "beni ye" sinyali olarak işlev görür ve apoptotik hücrelerin tanınmasını ve temizlenmesini kolaylaştırır (Park ve Kim, 2017).

Apoptoziste anahtar düzenleyici proteinler kaspazlardır (Li ve Yuan, 2008). Memelilerde kaspazlar, farklı yollardaki özel işlevlerine göre üç gruba ayrılır: gelişimsel, inflamatuvar ve apoptotik yollar (Goldar vd., 2015; Weyhenmeyer vd., 2012). Bu nedenle, kaspaz-1 gibi bazı kaspazlar apoptozun uygulanmasında bir rol

oynamazken, bazı kaspazlar hem apoptotik hem de apoptotik olmayan sinyal yollarında çift rol oynar. Ek olarak, kaspazlar apoptotik sinyal kaskadındaki konumlarına göre başlatıcı (kaspaz-8 ve -9) ve etkileyici veya uygulayıcı kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7) olarak sınıflandırılır (Hu vd., 2013). Başlatıcı kaspazlar, oto-parçalanma ile aktive olduktan sonra, sırasıyla aşağı akışta yer alan "uygulayıcı" kaspazları parçalayarak aktif hale getirir. Ardından, uygulayıcı kaspazlar, hücrenin proteolitik olarak parçalanmasını düzenlemek için temel hücresel bileşenleri parçalar (Goldar vd., 2015; Green ve Evan, 2002).

Apoptozis, özellikle embriyonik gelişim olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerde hayati bir rol oynar. Gereksiz veya düzgün bir şekilde oluşmamış hücrelerin ortadan kaldırılması yoluyla dokuların ve organların şekillendirilmesine katkıda bulunur ve böylece uygun bir organogenezis sağlanır (Exbrayat vd., 2012; Goldar vd., 2015). Bağışıklık sisteminde ise, apoptozis, otoimmün hastalıkları önleyerek, kendine tepki veren T ve B lenfositlerinin ortadan kaldırılmasıyla öz toleransı korumada hayati bir öneme sahiptir (Chaurio vd., 2009; Chen ve Wang, 2002; Feig ve Peter, 2007; Opferman, 2008). Ayrıca, apoptozis, DNA mutasyonları veya viral enfeksiyonlar gibi onarılamaz hasarlar taşıyan hücrelere karşı bir savunma mekanizması olarak işlev görür ve böylece kanser gibi hastalıklardan ve viral patojenlerin yayılmasından organizmayı korur (Chen ve Wang, 2002; Goldar vd., 2015).

Apoptotik mekanizmaların tanımlanması, işlev bozukluğu sonucu gelişen hastalıkların patogenezinin anlaşılmasını kolaylaştırır. Bu da, belirli apoptotik yolları veya genleri hedef alan yeni ilaçların geliştirilmesine katkı sağlayabilir (Goldar vd., 2015). Memelilerde iki temel apoptotik yolak bulunmaktadır: ekstrinsik yolak (ölüm reseptörü aracılı yolak) ve intrinsik yolak (mitokondriyal aracılı yolak) (Şekil 2.7) (Hassen vd., 2012). Ekstrinsik yol, hücre dışından gelen sinyallerin transmembran ölüm reseptörlerine bağlanması ile başlar. Bu reseptörler, hücre dışı ligandların spesifik bağlanma bölgelerine sahip olup, ligandların bağlanması sonucu hücre içinde ölüm sinyali başlatan bir dizi reaksiyonu tetikler. Bu süreç genellikle bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve hedef hücrelerin yok edilmesi gibi dış kaynaklı ihtiyaçlara yanıt verir. İntrinsik yol, hücre içinden kaynaklanan uyarılarla başlatılır ve mitokondriyal apoptoz

olarak da bilinir. Bu yol, genellikle DNA hasarı, oksidatif stres, büyüme faktörü eksikliği veya toksik maddelere maruz kalma gibi içsel stres faktörleri tarafından tetiklenir. Bu tür uyaranlar, mitokondri zarının geçirgenliğini artırarak apoptotik faktörlerin, özellikle sitokrom c'nin, salınımını başlatır. Mitokondriyal yol, hücrenin kendi içsel durumuna yanıt veren bir mekanizma olarak görev yapar ve hücrenin yaşamını sürdüremeyeceği durumlarda ölüm sinyallerini devreye sokar (Goldar vd., 2015).

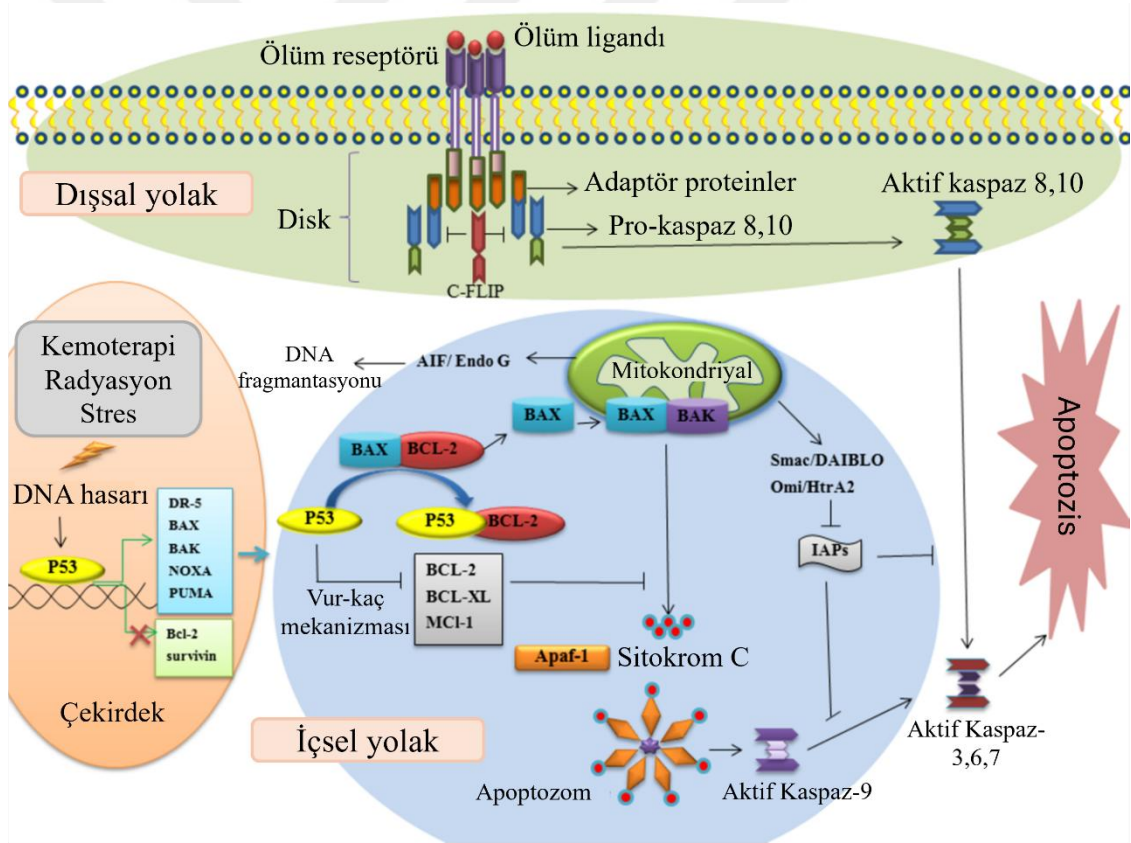
Bu iki yolak dışında, endoplazmik retikulum stresi tarafından aktive edilen apoptoziste, kaspaz-12 veya kaspaz-2'nin başlatıcı rol oynadığı daha az bilinen kaspaz aktivasyonu yolları da vardır (Szegezdi vd., 2006). Perforin/granzim yolu, T-hücreleri aracılığıyla sitotoksikiteyi içeren bir diğer yoldur. Bu yol, apoptozu granzyme A veya granzyme B aracılığıyla başlatabilir. Tüm bu apoptotik yollar (ekstrinsik, intrinsik ve granzyme B yolları), aynı terminal veya uygulayıcı yola birleşir (Jin ve El-Deiry, 2005).

İki temel apoptotik yolak olan ekstrinsik ve intrinsik yollar aynı terminal veya uygulayıcı yolda birleşir. Ekstrinsik yol, hücre dışı ligandların transmembran reseptörlerinin hücre dışı bölgelerine bağlanmasıyla başlarken, mitokondriyal apoptoz çeşitli hücre içi uyaranlarla başlatılır. Her iki yolağın başlatıcı kaspazları (kaspaz 8, 9 ve 10), etkileyici kaspazların (örneğin kaspaz 3, 6, 7) proteolitik olgunlaşmasını katalize edebilir, bu da bir kaspaz kaskadının başlatılmasına ve sonunda hücrenin yıkımına yol açar (Goldar vd., 2015; Reed, 2000).

DNA hasarı, tümör baskılayıcı protein P53'ün aktivasyonu ile apoptozu tetikler. P53 ise, DR-5, BCL-2 ile ilişkili X proteini (BCL-2-associated X protein: BAX), BCL-2 homologu olan antagonist/katil (BCL-2 homologous antagonist/killer: BAK), NOXA ve P53 yukarı regüle edilmiş apoptoz modülatörü geninin (P53-upregulated modulator of apoptosis: PUMA) transkripsiyonunu indüklerken, B hücreli lenfoma 2 (B-cell lymphoma 2: BCL-2) ve survivin gibi anti-apoptotik genlerin transkripsiyonunu inhibe edebilir (Goldar vd., 2015; Wang vd., 2021). P53'ün mitokondrideki anti-apoptotik BCL-2 ailesi proteinleri ile sitoplazmik etkileşimi, mitokondri dışı membranından sitokrom C gibi apoptotik faktörlerin salınımını tetikler. Buna ek olarak, P53 doğrudan

BAK ve/veya BAX ile etkileşime girerek, bu proteinleri "vur-kaç" mekanizmasıyla aktive eder ve mitokondri dış membranının geçirgenliğini artırır (Goldar vd., 2015) (Şekil 2.7).

Apoptozis, gelişim, bağışıklık ve doku homeostazında hücrelerin düzenli bir şekilde ortadan kaldırılmasını sağlayan vazgeçilmez bir süreçtir. Bu sürecin düzenlenmesi, sinyal yolları ve moleküler bileşenler arasında karmaşık bir etkileşim içerir ve sağlık ve hastalık anlayışında merkezi bir odak noktasıdır. Apoptozun dengesi kritik öneme sahiptir; bu dengenin bozulması ciddi patolojik sonuçlara yol açabilir ve temel biyoloji ile klinik araştırmalardaki önemini daha da pekiştirir (Chaurio vd., 2009; Chen ve Wang, 2002; Goldar vd., 2015; Martinez vd., 2010; J. Wang vd., 2021).



**Şekil 2.7.** Apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yollarının şematik diyagramı. Apoptozis, hücre ölümü sürecini düzenleyen iki ana yolak olan ekstrinsik ve intrinsik yollar aracılığıyla gerçekleşir ve bu iki yolak, sonunda aynı terminal veya uygulayıcı yolda birleşerek hücrenin sistematik bir şekilde yıkımını sağlar (Goldar vd., 2015).

### 2.13. Köpeklerde Kanser

Kanser, insanlarda olduğu diğer bir çok türde de yaygın olarak görülebilir. Köpeklerde de benzer şekilde, karsinogenezis, progresyon ve prognozu açısından değerlendirildiğinde oldukça kompleks, öldürücü bir hastalıktır. Genetik ve epigenetik faktörlerin yanı sıra, çevresel etkenler, beslenme alışkanlıkları, radyasyon maruziyeti ve bağışıklık sistemi durumu gibi unsurlar, tümör oluşumu ve yayılım sürecinde kritik rol oynar (Hanahan ve Weinberg, 2011). Köpeklerde özellikle bazı ırklarda belirli kanser türlerinin daha sık görüldüğü bilinmekte ve bu durum ırk predispozisyonu olarak adlandırılmaktadır (Dobson, 2013). Örneğin Golden Retriever ırkında lenfoma, Rottweiler ırkında osteosarkom ve Boxer ırkında mast hücreli tümörlerin daha yaygın ortaya çıkması, genetik faktörlerin önemini vurgular (Dobson, 2013). Karsinogenez, yani kanserleşme süreci, normal hücrelerin genetik ve epigenetik değişiklikler sonucu kontrolsüz çoğalmasıyla başlar ve bu aşamalı ilerleyiş; erken dönemde teşhis edilebildiğinde, tedavinin başarısını artırabilmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Köpeklerde en sık rastlanan kanser tipleri arasında, meme tümörleri, lenfoma, melanoma ve osteosarkom gibi maligniteler ön plana çıkar (Sorenmo, 2003). Lenfoma, lenfositlerin malign bir hastalığı olarak lenf düğümlerini, karaciğer, dalak ve diğer organları etkileyebilir ve sıklıkla hızlı seyirli olup agresif tedavi protokollerine gereksinim duyar (Meuten, 2020). Köpeklerde, melanomalar ise özellikle ağız boşluğu ve ciltte ortaya çıkabilen yüksek metastaz riskli tümörler olup, klinik seyri genellikle ciddidir ve tedavi seçenekleri arasında cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi kombinasyonları yer alır (Smith vd., 2002). Büyük ve dev ırk köpeklerde sıklıkla görülen osteosarkom ise kemik dokusundan kaynaklanır ve uzun kemiklerde şiddetli ağrı, topallık gibi semptomlara neden olurken, akciğer başta olmak üzere diğer organlara metastaz riski taşır (Thrall, 2012). Kanser gelişiminde rol oynayan çoklu genetik mutasyonlar, kansere giden süreçte pek çok basamağın aşılmasına imkân verdiğinden, erken tanı ve düzenli veteriner kontrolleri köpeklerin yaşam kalitesini ve süresini önemli ölçüde etkileyebilir (Hanahan ve Weinberg, 2011; Sorenmo, 2003; Withrow vd., 2012).

### 2.13.1. Köpek Meme Tümörleri

Farklı dokudan köken alan çok sayıda kanser çeşidi bulunmaktadır. Bunlar arasında, köpek meme tümörleri, dişi köpekleri etkileyen en yaygın neoplazmlardır ve dünya çapında veteriner hekimliğinde önemli bir sağlık sorununu temsil etmektedir (Gray vd., 2020; Klopfleisch vd., 2010). Bu tümörlerin görülme sıklığı, kısırlaştırma uygulamaları, ırka yatkınlık, yaş, hormonal etkiler, diyet ve obezite gibi faktörlerden büyük ölçüde etkilenecek küresel olarak değişmektedir (Spoerri vd., 2015). Özellikle, köpeklerde meme tümörlerinin yaklaşık %50'si kötü huyludur ve bölgesel lenf düğümlerine ve uzak organlara metastaz yapma kapasitesine sahiptir, dolayısıyla bu durum hayatta kalma oranlarını önemli ölçüde etkiler (Mucha vd., 2016; Peña vd., 2013). Aşırı kilolu köpeklerde, özellikle de genç yaşta, meme tümörü gelişme olasılığı daha yüksektir. Adipoz doku, periferik aromatisasyon nedeniyle östrojenler için bir rezervuar görevi görür ve tümör gelişimini teşvik edebilecek adipokinler ve enflamatuar aracılar salgılar (Santander vd., 2015; Takahashi vd., 2015). Obez bireylerde leptin ve TNF- $\alpha$  gibi pro-enflamatuar adipokinlerin varlığının tümörü destekleyen bir mikro çevre oluşturduğu gösterilmiştir (de Oliveira dos Santos vd., 2021; Fuentes-Mattei vd., 2014). Yağ oranı yüksek diyetler, meme tümörü riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir ve bu da beslenme müdahalelerinin önlenmesinde bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Sundaram ve Yan, 2016; Kim vd., 2011). Spesifik olarak, yüksek yağlı diyetler, meme tümörigenezinin artması ve enflamatuar profillerdeki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir; bu da diyet yönetiminin aşırı kilolu köpeklerde kanser riskini azaltmada çok önemli olabileceğini göstermektedir (Kim vd., 2011; Sundaram ve Yan, 2016).

Köpeklerde, meme tümörleri insanlarda olduğu gibi sıklıkla ileri yaşta görülmekte; özellikle beş yaşından önce nadir olarak rastlanmaktadır (Melin vd., 2016). Bu tümörlerin tipik başlangıç yaşı yaklaşık 10 olup, İngiliz Springer Spaniel, Doberman Pinscher, Poodle, Alman Çoban Köpeği ve Boxer gibi bazı ırklarda daha yüksek bir insidans gözlenmektedir ve hatta bazı çalışmalarda insidansın %40'a yaklaştığı bildirilmiştir (Biondi vd., 2021; Borge vd., 2011; Pastor vd., 2018). Bu durum, köpek meme tümörlerinin gelişiminde ırk ve yaşın kritik faktörler olarak önemini vurgulamaktadır (Biondi vd., 2021; Pastor vd., 2018). Ayrıca, hormonal faktörler,

özellikle de östrojenin etkisi, bu tümörlerin gelişiminde çok önemli bir rol oynamakta ve kısırlaştırmanın riski azaltmadaki önemini vurgulamaktadır (De Araújo vd., 2015; Silva vd., 2019). Meme dokusunun gelişimi, steroid, peptid hormonlar ya da büyüme faktörleri tarafından stimüle edilmektedir (Hellmén, 2005). Hormonlar meme dokusunun gelişimi için her ne kadar gerekli olsalar da; ileri dönemlerde meme tümörlerinin gelişiminde predispoze olmaktadır. Köpeklerde görülen meme kanserlerinin yaklaşık %60'ının abdominal ve inguinal meme bezi kökenli olduğu; söz konusu dokuların aktif olarak östrojen stimülasyonuna maruz kalmasının bu durumun muhtemel nedeni olduğu bildirilmiştir (Dias vd., 2016). Östrojen, progesteron, prolaktin ve epidermal büyüme faktörlerine ait reseptörlere neoplastik meme bezlerinde rastlandığı bildirilmiştir (Aydoğan, 2010). Bu hormonların meme karsinogenezisindeki rolü birçok çalışma ile ortaya konulmuştur (Illera vd., 2006; Thuróczy vd., 2007). Hormonal dalgalanmaların, köpeklerde meme kanseri üzerine olan etkileri elimine etmek açısından, erken dönemde yapılan ovaryohistektominin (1. ve 2. östrüstan önce); meme tümörü gelişmesinde koruyucu rol oynadığı bilinmektedir (Schneider vd., 1969). Çalışmalar, dişi köpeklerin ilk kızgınlık döngüsünden önce kısırlaştırılmasının meme tümörü gelişme riskini önemli ölçüde azalttığını, kısırlaştırma birinci veya ikinci kızgınlıktan sonra yapılırsa koruyucu etkinin azaldığını göstermektedir (Burrai vd., 2020; Salas vd., 2015). Meme tümörlerinin önemli bir yüzdesi kısırlaştırılmamış köpeklerde teşhis edilmiş olması, önleyici bir tedbir olarak erken cerrahi müdahalenin önemini vurgulamaktadır (Burrai vd., 2020). Ayrıca, cinsel olgunluğa erişmeden önce kısırlaştırılan dişilerde meme tümörlerinin görülme sıklığı neredeyse tamamen ortadan kalkmakta, bu da hormonal maruziyetin tümör gelişimindeki kritik rolünü vurgulamaktadır (Belanger vd., 2017; Sorenmo vd., 2000).

Köpek meme tümörlerinin görülme sıklığı, büyük ölçüde kısırlaştırma uygulamalarındaki farklılıklar, kısırlaştırmaya yönelik kültürel tutumlar ve köpek nüfus demografisindeki farklılıklar nedeniyle farklı coğrafi bölgeler arasında önemli ölçüde değişmektedir. Avrupa ve Asya'nın bazı bölgeleri gibi kısırlaştırmanın rutin olarak yapılmadığı ülkelerde, köpek meme tümörü insidans oranları, Amerika Birleşik Devletleri gibi yaygın kısırlaştırma uygulamalarının olduğu bölgelere kıyasla belirgin şekilde daha yüksektir (Downes vd., 2015; Wongsangchan ve McKeegan, 2019).

Araştırmalar, kısırlaştırma oranlarının düşük olduğu bölgelerde, dişi köpeklerde meme tümörü prevalansının, östrus döngüleriyle ilişkili hormonal maruziyetin etkisini yansıtacak şekilde ve önemli ölçüde yüksek olabileceğini göstermektedir (Wongsaengchan ve McKeegan, 2019). Ayrıca, evcil hayvanlara sahip olma ve veteriner hekimliği uygulamalarına yönelik kültürel tutumlar da kısırlaştırma uygulamalarını etkilemede önemli bir rol oynamakta ve bu da farklı popülasyonlarda meme tümörlerinin genel insidansını etkilemektedir (Wongsaengchan ve McKeegan, 2019). Birçok ülkede kapsamlı köpek meme tümörü kayıtlarının bulunmaması, güvenilir epidemiyolojik verilerin elde edilebilirliğini sınırlamakta ve köpek meme tümörlerinin gerçek küresel yükünü değerlendirmeyi zorlaştırmaktadır (Di Cerbo vd., 2014; Raposo vd., 2015). Birçok çalışmada, veriler veteriner hastanelerinden veya üniversitelerden alınan örneklerle dayanmaktadır; dolayısıyla istatistikler özellikle çok sayıda kayıtsız ve/veya sokak köpeğinin bulunduğu ülkelerde daha geniş köpek popülasyonunu temsil etmeyebilir (LeBlanc vd., 2016; Regan vd., 2018). Veri toplamadaki bu sınırlama, köpek meme tümörü insidansını azaltmayı ve etkilenen köpekler için sonuçları iyileştirmeyi amaçlayan etkili halk sağlığı stratejilerinin ve müdahalelerinin geliştirilmesini engellemektedir (Salas vd., 2015).

### **2.13.2. Köpek Meme Tümörü Moleküler Biyolojisi**

Köpek ve insan kanserleri, köpekleri onkolojik araştırmalar için istisnai modeller haline getiren derin benzerliklere sahiptir. Bu bağlamda, %80'in üzerinde (%82-84) genetik benzerliğe sahip olan her iki tür de, özellikle kritik genlerde karşılaştırılabilir kanserle ilişkili genetik mutasyonlar sergiler ve benzer tümör tipleri geliştirir. Kanser ilerlemesinin moleküler mekanizmaları, metastatik modeller ve bağışıklık sistemi tepkileri köpekler ve insanlar arasında dikkat çekici derecede tutarlıdır. Bu çarpıcı paralellikler, karşılaştırmalı onkolojiyi kanser gelişimi, ilerlemesi ve potansiyel tedavileri incelemek için benzersiz fırsatlar sunan kritik bir alan olarak konumlandırmıştır. Köpeklerde hastalığın daha hızlı ilerlemesi ve paylaştıkları çevresel maruziyetler, araştırma modelleri olarak değerlerini daha da artırarak, hem veteriner hekimliği hem de insan tıbbına fayda sağlayabilecek yeni terapötik stratejilerin keşfini potansiyel olarak hızlandırır.

Köpekler ve insanlar arasındaki genomik benzerlikler, özellikle kanser araştırmaları bağlamında önemlidir. Bu iki türün yüksek derecede moleküler homolojiye sahip olması, insan hastalıklarını incelemek için köpek modellerinin kullanımını kolaylaştırır. Örneğin, çalışmalar köpek tümörlerinin, osteosarkom ve meme karsinomu gibi insan kanserlerinde bulunanlara benzer genomik dinamikler sergilediğini göstermiştir; bu da ortak yolakları ve potansiyel terapötik hedefleri işaret etmektedir (Angstadt vd., 2011; Beck vd., 2013; Shao vd., 2019). Köpek genomunun yüksek doğrulukla dizilenmiş olması, insan genomuyla korunmuş senteniye ortaya çıkarmıştır. Bu durum gen ifadesi ve mutasyon profillerinin karşılaştırmalı analizlerine olanak tanır (Briggs vd., 2011; Sakthikumar vd., 2023). Bu korunmuş bölgeler, özellikle tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerde belirgindir. Her iki türde de benzer mutasyonların tespit edilmiş olması, kanser biyolojisi ve tedavi stratejilerinin anlaşılmasını artırmıştır (Megquier vd., 2019; C. Wang vd., 2021; Wu vd., 2023). Dahası, binlerce yıldır bir arada var olan köpekler ve insanlar arasındaki evrimsel ilişki, özellikle çevresel faktörlere yanıt olarak gelişen genomik yapı ve işlevlerin benzer bir şekilde gelişmesine olanak sağlayan adaptasyonlara yol açmıştır (Jagannathan vd., 2021; C. Wang vd., 2021). Bu bağlamda, köpekler, insan hastalıklarını, özellikle insanlarda nadir görülen ancak köpeklerde yaygın olan kanserleri incelemek için paha biçilmez bir model haline gelmiştir. Aynı zamanda, bu yaklaşım Tek Sağlık (“One Health”) kapsamında, veteriner ve insan tıbbı arasındaki boşluğu kapatır (Beck vd., 2013; Klopffleisch vd., 2010; Wu vd., 2023).

Köpek meme tümörlerinin hücresel ve moleküler dinamikleri, tümör başlangıcını, ilerlemesini ve metastazını yönlendiren bir dizi yakından bağlantılı süreçle karakterizedir. Bu dizinin merkezinde, kümülatif genetik ve epigenetik değişikliklerden kaynaklanan meme epitel hücrelerinin malign dönüşümü yer alır. Bu değişiklikler; onkogenlerde veya tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonları, DNA metilasyonunda ve histon modifikasyonlarında ortaya çıkan farklılıkları ve düzensiz miRNA ekspresyon profillerini içerir. Bir arada ele alındığında, söz konusu faktörler malign hücreleri normal muadillerinden ayıran kontrolsüz çoğalma, apoptozdan kaçış ve invazif özelliklerin kazanılmasına yol açar. Onkogen mutasyonları genellikle hücre büyümesi ve bölünmesini sürekli olarak destekleyen sinyal yollarını aşırı etkin hâle

getirirken, tümör baskılayıcı genlerdeki değişiklikler de kanser oluşumunu normalde engelleyen kritik kontrol noktalarını devre dışı bırakır. Örneğin, köepklerde de çeşitli kanser türlerinde yaygın olarak görülen *TP53* mutasyonları, DNA onarım mekanizmalarını, hücre döngüsü durdurma işlevini ve apoptozu zayıflatarak genomik kararlılığı tehlikeye atar (Gherman vd., 2023). Bu mutasyonlar, hücrenin malign transformasyona karşı en güçlü koruyucularından birini ortadan kaldırarak denetimsiz çoğalmaya ve ek genetik bozuklukların birikmesine olanak tanır. Bununla birlikte, *HER2* (diğer adıyla *ERBB2*) gibi onkogenler amplifikasyon veya aşırı ifade yoluyla etkinleştğinde, hücre göçü ve tedavi direnci gibi agresif tümör özelliklerini destekleyen reseptör tirozin kinaz yollarının aktivitesi artar (Pond vd., 2010). Benzer şekilde, hücre döngüsü ilerlemesi, metabolizma ve ribozomal biyogenezin düzenlenmesinden sorumlu bir transkripsiyon faktörünü kodlayan *MYC* onkogenindeki aşırı aktivasyon, hücreleri hiperproliferatif bir duruma sürükler (Gracanin vd., 2014). Onkogenler hücreyi sürekli bölünmeye iterken, tümör baskılayıcı genler önemli bir karşı denge görevi görür; ancak *TP53* veya *BRCA1* gibi genler nokta mutasyonları, delesyonlar ya da epigenetik baskılanma aracılığıyla etkisiz hâle getirildiğinde, hücrenin genomu replikasyon hatalarına açık hâle gelir ve kromozomal anormallikler ile diğer mutasyonel olaylar ortaya çıkarak malign evrimi tetikler (Hallett vd., 2012). Bu doğrudan mutasyonların ötesinde, epigenetik modifikasyonlar da gen regülasyonunda bir başka güçlü katman sunar; zira DNA dizisini değiştirmeden belirli genomik bölgelerin transkripsiyona açık olup olmayacağını etkiler. Genellikle CpG adacıklarındaki sitozin rezidülerinde gerçekleşen DNA metilasyonu, kritik tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgelerinde yer aldığı takdirde, genomik bütünlük için gerekli proteinleri devre dışı bırakarak gen ifadesini baskılayabilir. Örneğin, DNA hasar tamirinde kilit rol oynayan bir proteini kodlayan *BRCA1* geninin promotör bölgesindeki hipermetilasyon, hücrelerde ek mutasyonların birikmesini hızlandırarak maligniteyi tetikleyebilir (Hallett vd., 2012). Tersine, hipometilasyon ise onkogenlerin veya tekrarlı genomik unsurların hatalı ifadesine yol açarak genomik istikrarsızlığı artırabilir. Asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ubiquitinasyon gibi çeşitli histon modifikasyonları da kromatinin erişilebilirliğini şekillendirir. Genellikle belirli lizin kalıntılarındaki histon asetilasyonu, transkripsiyona elverişli gevşek bir kromatin yapısı ile ilişkilendirilirken, histon deasetilasyonu gen ifadesini baskılayan yoğun bir yapı ortaya çıkarır (Hu vd., 2021).

Köpeklerde de birçok kanserde, HAT'ler ile histon deasetilazlar HDAC'ler arasındaki denge bozulur; bu durum, proliferatif yolları aktive eden veya apoptozla ilişkili genleri baskılayan epigenetik profilleri ortaya çıkararak malign fenotipin pekişmesine katkıda bulunur. Histonlar üzerindeki metilasyon olayları ise bağlama göre farklı, hatta bazen zıt etkiler doğurabilir: Örneğin, histon H3'ün 27. lizini (H3K27me3) üzerindeki trimetilasyon, genellikle gen baskılanmasıyla ilişkiliyken, H3K4me3 çoğunlukla aktif transkripsiyona işaret eder (Xu vd., 2021). Bu işaretleri ekleyen veya kaldıran enzimlerdeki düzensizlikler, meme epitel hücrelerinde anormal gen ifadesi programlarını tetikleyerek tümörleştirme potansiyelini yükseltebilir. Her ne kadar insan tıbbındaki kümülatif bilgi köpekler için bulunmasa da, epigenetik bozukluklar sıkça genetik anormalliklerle iş birliği yapar; örneğin, mutasyona uğramış bir onkogeni barındıran bir hücre, yakındaki tümör baskılayıcı yolları susturan epigenetik değişiklikler de kazanabilir ve bu durum ilerlemeyi hızlandırır.

Köpek meme tümörlerinde, regülasyondaki üçüncü bir boyut ise, insanlarda olduğu gibi, küçük, kodlamayan RNA'lar olan miRNA'lardır. Bu moleküller, hedef mRNA'ların 3' UTR bölgelerine bağlanarak gen ifadesini transkripsiyon sonrası seviyede modüle eder. Meme kanseri dâhil olmak üzere birçok kanserde düzensiz miRNA ifadesi, tümör oluşumunda önemli bir katkı sağlar. Bazı miRNA'lar, tümör baskılayıcı genleri baskılayarak "onkomiR" işlevi görürken, diğerleri onkogenik transkriptlerin ifadesini kısıtlayarak tümör baskılayıcı rol üstlenir. Örneğin, miR-21 hem apoptozu azaltan hem de hücre çoğalmasını yükselten kilit tümör baskılayıcı genleri ve apoptoz düzenleyicilerini hedef alır; bu nedenle memede yüksek seviyede ifadesi, agresif tümör fenotipleriyle bağlantılıdır (Saito vd., 2013). Buna karşılık, miR-145 gibi normalde invazyon ve metastaz davranışlarını baskılayan miRNA'ların azalması, EMT ve metastatik yayılımı destekleyen çok sayıda genin etkinleşmesine yol açar (Noguchi vd., 2012). Bazı hücre fenotipleri de karsinogenezi spesifik ilişkiler gösterebilir. Hem CD44<sup>+</sup> hem de CD24<sup>+</sup>, daha az agresif histolojik tiplerle, düşük dereceyle ve triple negatif olmayan bir alt tip ile ilişkilendirilebilir. Her iki belirteç de köpek meme karsinomunda kanser kök hücresi özelliklerini tanımlar. Öte yandan, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> fenotipinin daha yüksek dereceli karsinomlar ile ilişkilendirildiği bildirilmiştir (Im vd., 2015). Zaten kanserin mihenk taşlarından biri olarak kabul edilen EMT'de, epitel

hücreleri kutuplaşmalarını ve hücre-hücre bağlantılarını yitirip mezenkimal özelliklere bürünerek hareketlilik ve invazyon kapasitesi kazanırlar (Du vd., 2017). Bu süreç, Snail, Slug, Twist ve Zeb1/2 gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin kontrolünde gerçekleşir; ayrıca miRNA'lar, histon modifikasyonları ve DNA metilasyonu, E-cadherin gibi EMT düzenleyicilerinin ekspresyonunu etkileyerek sürecin ilerleyişini belirler. Malign meme hücrelerinde, transkripsiyon faktörleri, miRNA'lar ve epigenetik düzenleyiciler arasında sıklıkla karmaşık bir moleküler iletişim yaşanır; döngüler hâlinde interaksiyona girerek EMT'yi kalıcı kılar ve hücrelerin çevre dokuya nüfuz etmesini, dolaşıma karışmasını ve nihayetinde uzak organları kolonize etmesini mümkün kılar. Bu ana mekanizmalara ek olarak, son çalışmalar bazı miRNA'ların eksozomlara paketlenerek tümör hücreleri tarafından salgılanabileceğini göstermektedir; bu eksozomlar, stromal hücreler, endotel hücreler veya diğer tümör hücreleri tarafından alınarak lokal ve sistemik ortamı tümör büyümesi ve metastaz lehine değiştirebilir (Gherman vd., 2023). Bu hücreler arası iletişim, miRNA'ların kanser ilerlemesindeki çok yönlü rolünü vurgularken, erken tespit veya metastatik yayılımı engelleme amaçlı terapötik hedef olarak bu moleküllerin kullanımına da kapı aralar. Önemli olan bir nokta, söz konusu genetik ve epigenetik değişikliklerin yalıtılmış şekilde meydana gelmemesidir; tam aksine, hücre döngüsü ilerlemesini, stres yanıtlarını, metabolik yeniden programlamayı ve tümör mikroçevresiyle etkileşimleri yöneten karmaşık bir sinyal ağı içinde birleşirler. Örneğin, köpek meme tümörlerinde de rol aldığı bilinen Wnt/ $\beta$ -katenin yolu, onkogenlerde veya tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar  $\beta$ -kateninin kararlılığını veya hücre içi konumunu değiştirdiğinde güçlenebilir (Gracanin vd., 2014). Kararlı hâle gelen  $\beta$ -katenin çekirdeğe taşınarak TCF/LEF transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girer ve çoğalma, hayatta kalma ve "kök hücre benzeri" özellikleri destekleyen genlerin ifadesini tetikler. Dikkat çekici biçimde, düzensiz Wnt aktivitesi çoğunlukla değişmiş miRNA profilleriyle de uyumlu çalışır; bazı miRNA'lar yolun negatif düzenleyicilerini baskılayarak Wnt sinyalini güçlendirirken, diğer miRNA'lar ise tümör büyümesini tetikleyen Wnt hedeflerini baskılayarak bu etkiyi sınırlayabilir (Hu vd., 2021). Benzer bir etkileşim PI3K/AKT ve MAPK yollarında gözlemlenebilir; bu yollar HER2 veya EGFR gibi reseptör tirozin kinazlar aracılığıyla etkinleşebilir. Bu reseptörlerdeki mutasyonlar veya amplifikasyonlar hücre büyümesi ve bölünme sinyallerini katlarken, buna eşlik eden epigenetik değişiklikler veya miRNA düzensizlikleri, normalde

PI3K/AKT yolunu sınırlandıran PTEN gibi tümör baskılayıcı genlerin ifadesini düşürebilir. Sonuçta, normal epitel hücrelerde ölüm sinyallerine yol açacak koşullara rağmen büyüme ve hayatta kalma kapasitesi yüksek olan kanser hücreleri ortaya çıkar. Bu tür değişiklikler, kemoterapi veya hedefe yönelik inhibitörler gibi tedavi baskılarını aşabilen, uyum yeteneği yüksek hücre topluluklarının gelişmesini sağlar. Tedaviye direnç mekanizmaları genellikle epigenetik esneklik, alternatif ekleme olayları veya miRNA ağlarının yeniden düzenlenmesiyle bağlantılıdır; bunların tümü, inhibe edilen nodu atlayacak şekilde sinyal yollarını yeniden kurgulayabilir. Dahası, hem köpek hem de insan meme tümörlerinde gözlemlenen kanser kök hücreleri, popülasyonun az bir bölümünü oluştursa da öz-yenilenme ve çoklu farklılaşma potansiyeliyle standart tedavilere oldukça dirençlidir (Du vd., 2017). Genetik mutasyonlar (ör. Wnt/ $\beta$ -katenin sinyallerini veya MYC'i etkinleştiren) ile epigenetik durumlar (ör. "kök hücre benzeri" genleri destekleyen histon işaretleri) arasındaki etkileşim, bu kök hücre benzeri fenotipi perçinleyerek nüksü ve metastazı teşvik eder. Klinik açıdan bakıldığında, genetik ve epigenetik düzensizliklerin bu karmaşık ağını çözmek, daha iyi tedavi stratejileri geliştirme yolunda önemli bir adımdır. Onkogenler, tümör baskılayıcılar, epigenetik düzenleyiciler ve miRNA'lardan oluşan bu çoklu katmanlı yolları kavrayarak, araştırmacılar ve klinisyenler köpek meme tümörlerindeki malignitenin temel dayanaklarını daha kapsamlı biçimde ortadan kaldıracak ve bu bulguları insan meme kanserlerine de uyarlayabilir. Aslında, biyolojik ve moleküler açıdan insan meme tümörlerine büyük benzerlik gösteren köpek meme tümörleri, önemli bir karşılaştırmalı model işlevi görür. Veteriner ve insan onkolojisi arasındaki bu yakınsama, "Tek Sağlık" (One Health) kavramını destekleyerek köpek kanserlerinde elde edilen keşiflerin insan klinik çalışmalarında hızlıca uygulanmasının önünü açar.

Malign bir meme epitel hücresinin ortaya çıkışı, onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki genetik değişimlerin kontrolsüz hücresel bölünme itici gücünü sağlamasıyla başlar. Buna ek olarak, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarını içeren bir dizi epigenetik ayar, gen ifadesi ve erişilebilirlik örüntülerini düzenleyerek habis fenotipleri pekiştirir. Bu süreci daha da karmaşık hâle getiren, hücre döngüsü denetimi, apoptoz ve metastatik yayılmada rol alan sayısız genin ifadesini ince ayar yapan RNA ağlarının bozulmasıdır. Tüm bu faktörler bir araya geldiğinde, hücreleri sınırsız çoğalma

kapasitesiyle donatırken, standart tedavilere karşı koruyan bir döngü ortaya çıkar; hastalık ilerledikçe genomik ve epigenomik esneklik de artar. Dolayısıyla, ister köpek meme tümörleri ister insan meme kanserleri olsun, etkili bir tedavi, bu çok katmanlı onkojenik düzenlemeleri aynı anda hedefleyebilmelidir. Böyle yapıldığında dirençli klonların ortaya çıkışı önlenabilir, yanıt oranları iyileştirilebilir ve nihayetinde sağkalım süreleri uzatılabilir. Bu keşifleri başarılı terapilere dönüştürme yolunda bazı zorluklar bulunsa da, epigenomu hedefleyen ilaçlar, miRNA temelli yaklaşımlar ve kanserin hem genetik hem de epigenetik temellerini hedef alan kombinasyon stratejileri üzerine yürütülen araştırmalar, gelecek için sağlam bir çerçeve sunar (Samli vd., 2019). Tümör biyolojisinin karmaşıklığı benimsendikçe, farklı moleküler manzaralara sahip meme kanserleri ve diğer kanser türlerine yanıt verebilecek, kişiselleştirilmiş onkoloji çözümlerine gitgide yaklaşılmaktadır (Du vd., 2017; Gherman vd., 2023; Gracanin vd., 2014; Hallett vd., 2012; Hu vd., 2021; Im vd., 2015; Pond vd., 2010; Saito vd., 2013).

Köpek meme kanserlerinin invazif doğasının temelinde yatan önemli bir mekanizma olan EMT süresince, tümör hücreleri fenotipik olarak köklü bir dönüşüm geçirir; özellikle E-kaderin gibi epitel belirteçlerini kaybederek N-kaderin gibi mezenkimal belirteçleri kazanır (Gherman vd., 2023). EMT, insan kanserlerinde de olduğu üzere tümör hücrelerinin primer lezyondan kopmasına, komşu dokuları istila etmesine ve damarlar veya lenfatik sistem aracılığıyla yayılmasına imkân tanıyarak metastazın kritik bir tetikleyicisi haline gelir. Köpek meme tümörü patofizyolojisinin bir diğer önemli boyutu, tümörlerin artan oksijen ve besin ihtiyacını karşılamak için başvurduğu anjiyogenezdır. Yeni kan damarı oluşumu, genellikle hipoksik tümör bölgelerinde yükselen vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi pro-anjiyojenik araçların kontrolü altındadır (Gherman vd., 2023; Pond vd., 2010). Düşük oksijen koşullarında artan hipoksi-indüklenebilir faktörler (HIF'ler), VEGF üretimini uyarır ve endotelial hücrelerin çoğalarak yeni damarlar oluşturmaya önayak olan bir sinyal kaskadını harekete geçirir. Bu yeni vasküler ağ, tümör büyümesini sürdürmekle kalmaz, dolaşımdaki tümör hücrelerine primer bölgeden ayrılıp uzak organlara yayılmaları için de bir yol sunar. VEGF'nin ötesinde, tümör hücrelerinin salgıladığı eksozomlar ilave pro-anjiyojenik faktörler ve kodlamayan RNA'lar taşıyabilir ve anjiyogenezi daha da şiddetlendirebilir. Bu nedenle, VEGF veya HIF yollarını hedefleyen anti-anjiyojenik

tedaviler, tümörlerin temel kaynaklardan mahrum bırakılarak metastatik yayılımının önlenmesi açısından dikkat çekmektedir. Bozulan sinyal iletim yolları, köpek meme tümörlerinin belirleyici bir özelliği olup, bu tümörlerin karmaşıklığını daha da ortaya koyar. Özellikle Wnt/ $\beta$ -katenin yollarının önemi büyüktür; bu yollar hücre çoğalması, farklılaşma ve hayatta kalma süreçlerini düzenler (Gracanin vd., 2014; Hallett vd., 2012; Xu vd., 2021). Köpek meme tümörlerindeki Wnt sinyalinin anormal şekilde etkinleşmesi,  $\beta$ -kateninin çekirdek içinde birikmesiyle kendini gösterir ve hücre döngüsü ilerlemesi ile artan tümör saldırganlığıyla ilişkili genlerin transkripsiyonunu tetikler. Ancak bu yollar, tek başına faaliyet göstermez; PI3K/AKT ve MAPK gibi diğer önemli kaskadlarla da kesişir (Hu vd., 2021). Bu etkileşim ağı, tümör büyümesini teşvik eden sinyalleri çoğaltırken tek bir hedefe yönelik tedavilere karşı direnç gelişimini kolaylaştırabilir. Bu nedenle, Wnt inhibitörlerini PI3K/AKT veya MAPK yolu modülatörleriyle birleştiren çok hedefli yaklaşımlar, tümör hücrelerinin birden fazla hayatta kalma yolunu keserek tedavi etkinliğini artırabilir. Tümör mikroçevresi, stromal hücrelerden (örneğin, kanser ilişkili fibroblastlar), bağışıklık hücrelerinden ve hücre dışı matriks (ECM) bileşenlerinden oluşan karmaşık bir ekosistemi temsil eder. Kanser ilişkili fibroblastlar, sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri salgılayarak tümör genişlemesini güçlendirirken Wnt dahil olmak üzere önemli sinyal yollarını da değiştirebilir (Du vd., 2017; Du ve Elemento, 2015; Pond vd., 2010). Hyaluronan gibi ECM bileşenleri, CD44 gibi yüzey reseptörlerine bağlanarak tümör hücresi hareketliliğini teşvik eder ve metastaza zemin hazırlar (Saito vd., 2013). Tümör hücreleri, ECM ile dinamik etkileşimler yoluyla aynı zamanda kanser kök hücresi popülasyonlarını destekleyen özel nişler oluşturarak ilaç direncini artırır ve nüks olasılığını yükseltir (Du vd., 2017).

Kanser kök hücreleri, köpek meme tümörlerindeki belirleyici alt hücre popülasyonlarından biridir. Öz-yenilenme, farklılaşma potansiyeli ve yüksek tümörijenite ile karakterize olan bu hücreler, sıklıkla CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> gibi yüzey belirteçleri taşır (Im vd., 2015; Du vd., 2017). Özellikle DNA tamir mekanizmalarının güçlülüğü, düşük çoğalma hızı (quiescence) ve aktif ilaç atım taşıyıcıları gibi etkenler sebebiyle klasik kemoterapi ve radyoterapi yaklaşımlarına karşı dikkat çekici bir direnç gösterirler. Köpek meme tümörlerinde bu CSC'lerin genişlemesi, daha yüksek tümör

dereceleri ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Üstelik, Wnt/ $\beta$ -katenin yolunun tümörün genel kitlesinde zaten önemli bir rol oynadığı bilinmekle birlikte, CSC'lerin sürdürülmesinde de özellikle kritik olduğu gösterilmiştir (Du vd., 2017). Bu nedenle Wnt, Notch veya Hedgehog gibi CSC ilişkili yolların hedeflenmesi, tümörün en dirençli ve malign hücrelerini ortadan kaldırarak klinik sonuçları iyileştirebilecek güçlü bir strateji sunabilir. Ek olarak, TME içindeki iltihaplanma ve immünosupresyon, KMT gelişiminin önemli düzenleyicilerindendir (Gherman vd., 2023). Kronik inflamasyon, DNA hasarını, sitokin salınımını ve anjiyogenezi kolaylaştırarak tümör oluşumunu hızlandırır. T hücreleri ve makrofajlar gibi bağışıklık hücreleri antitümör savunma mekanizmalarında rol alabilseler de, kanser hücreleri sıklıkla düzenleyici T hücreleri (Treg) veya miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücreleri (myeloid-derived suppressor cells: MDSC) devreye sokarak immün yanıtı zayıflatır. Ayrıca salgılanan bazı faktörler, sitotoksik T lenfositleri ve doğal öldürücü hücreleri baskılayarak bu immüno-kaçış ortamını güçlendirir. Yakın dönemde yapılan çalışmalar, bu baskılayıcı engelleri aşarak köpek meme tümörlerinde etkili antitümör bağışıklığı yeniden kurmayı hedefleyen immünoterapötik yaklaşımların (örneğin, immün kontrol noktası inhibitörleri) umut vadettiğini göstermiştir.

Köpek meme tümörlerinin patobiyolojisi; genetik mutasyonlar, epigenetik değişiklikler, bozulan sinyal yolları, tümör mikroçevresi etkileşimleri ve bağışıklık sistemi aksamalarının bir birleşimi şeklinde ortaya çıkar. Bu faktörlerin her birini ayrı ayrı anlamak yeterli değildir; onların karşılıklı etkileşimlerine odaklanan bütüncül bir yaklaşım, yeni tanı araçları ve hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesinde en büyük umut kaynağıdır. EMT inhibisyonu, anti-anjiyogenez, Wnt/ $\beta$ -katenin blokajı ve kanser kök hücrelerinin ortadan kaldırılması gibi çok yönlü müdahaleleri içeren kombine tedaviler, özellikle yararlı olabilir. Buna ek olarak, bağışıklık sisteminin kontrol noktası blokajları veya adaptif hücre transferi aracılığıyla güçlendirilmesi, bu hedefe yönelik stratejileri tamamlayarak Köpek meme tümörleri daha kalıcı yanıtlar ve iyileşmiş sağkalım oranlarına zemin hazırlayabilir. Köpek ve insan meme kanserleri arasındaki benzerlikler göz önünde bulundurulduğunda, karşılaştırmalı onkoloji modellerinde köpek meme tümörlerinin incelenmesiyle elde edilen bilgiler, insan hastalar için de yeni ve gelişmiş tedavi yaklaşımlarının şekillenmesine katkıda bulunabilir. Tümör

mikroçevresi, stromal hücreler, ECM bileşenleri ve bağışıklık hücrelerinin katılımıyla tümör büyümesini, anjiyogenezi ve metastazı destekleyerek önemli bir rol oynar. Bu hücreler sıklıkla, tümörün hayatta kalmasını ve yayılmasını destekleyen immünoşüpresif bir niş oluşturur (Pimentel vd., 2024; Rodríguez-Bejarano vd., 2024). Lenfatik sistemin katılımı, köpek meme tümörü metastazında önemli bir faktördür ve lenf düğümleri birincil metastatik bölgeler olarak işlev görür. Lenfografik teknikler, lenfatik yayılımın anlaşılmasını ve prognostik önemini artırmaktadır (Pimentel vd., 2024; Rodríguez-Bejarano vd., 2024). Özellikle östrojen ve progesteron reseptör ekspresyonu gibi hormonal etkiler, insan meme kanserindeki benzerlikleri yansıtarak terapötik hedefler sunarken, Wnt/ $\beta$ -katenin ve PI3K/AKT gibi düzensiz yollar tümör agresifliğini ve tedaviye direnci artırmaktadır (Rodríguez-Bejarano vd., 2024; Vafaei vd., 2022). Köpek meme tümörleri, mucin-1 (MUC1) gibi moleküler belirteçleri insan meme kanserleri ile paylaşır. Bu durum aynı zamanda insan hastalar için köpek modellerin tanı ve tedavi geliştirmede değerlerini vurgular (Pimentel vd., 2024). Bununla birlikte, sınıflandırma ve tedavi protokollerinin standartlaştırılmasında zorluklar devam etmektedir. Gelecekteki yönelimler, yeni hedefleri belirlemek ve bağışıklığa dayalı tedavileri ve epigenetik yeniden programlama stratejilerini daha iyi sonuçlar için entegre etmek amacıyla genomik ve proteomik çalışmalara işaret etmektedir (Pimentel vd., 2024; Rodríguez-Bejarano vd., 2024; Vafaei vd., 2022).

Köpek meme tümörleri epidemiyolojik, klinik, histopatolojik ve moleküler düzeylerde insan meme kanseri ile dikkate değer benzerlikler paylaşmaktadır. Bu benzerlikler, köpek meme tümörlerini karşılaştırmalı onkolojide değerli bir model olarak konumlandırmış ve insan tıbbına aktarılabilecek tümör biyolojisi, ilerlemesi ve terapötik yanıtların incelenmesini kolaylaştırmıştır (Di Cerbo vd., 2014; Pimentel vd., 2024; Regan vd., 2018; Rodríguez-Bejarano vd., 2024; Vafaei vd., 2022). İnsanlara benzer şekilde köpeklerde meme tümörlerinin kendiliğinden gelişmesi, karsinogenezi doğal olarak oluşan bir ortamda keşfetmek için eşsiz bir fırsat sunmakta ve *in vitro* modellerinde tam olarak değerlendirilemeyen biyolojik veriler sunmaktadır (Di Cerbo vd., 2014; Regan vd., 2018). Bu karşılaştırmalı yaklaşım, kanser mekanizmalarına ilişkin anlayışımızı geliştirmekte ve yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır (LeBlanc vd., 2016).

Köpek meme tümörlerinin yüksek insidansına ve klinik önemine rağmen, karmaşık biyolojilerini anlamada ve teşhis, prognostik ve terapötik stratejileri geliştirmede önemli zorluklar devam etmektedir. Bu tümörlerin hem histolojik hem de moleküler olarak heterojen olması, standartlaştırılmış tedavi protokollerinin ve prognostik değerlendirmelerin oluşturulmasını zorlaştırmaktadır (Burrai vd., 2015; Vazquez vd., 2023). Ayrıca, özellikle sınırlı kaynaklara veya farklı kısırlaştırma uygulamalarına sahip bölgelerde kapsamlı epidemiyolojik verilerin eksikliği, köpek meme tümörlerinin küresel etkisini tam olarak kavrama ve evrensel olarak uygulanabilir yönetim stratejileri geliştirme yeteneğini engellemektedir (Birdi vd., 2019; Salas vd., 2015; Zheng vd., 2022). Farklı popülasyonları ve tümör özelliklerini kapsayan daha kapsamlı çalışmalara duyulan ihtiyaç, veteriner onkolojisi alanını ilerletmek için kritik öneme sahiptir (Kaszak vd., 2022; Reis vd., 2020).

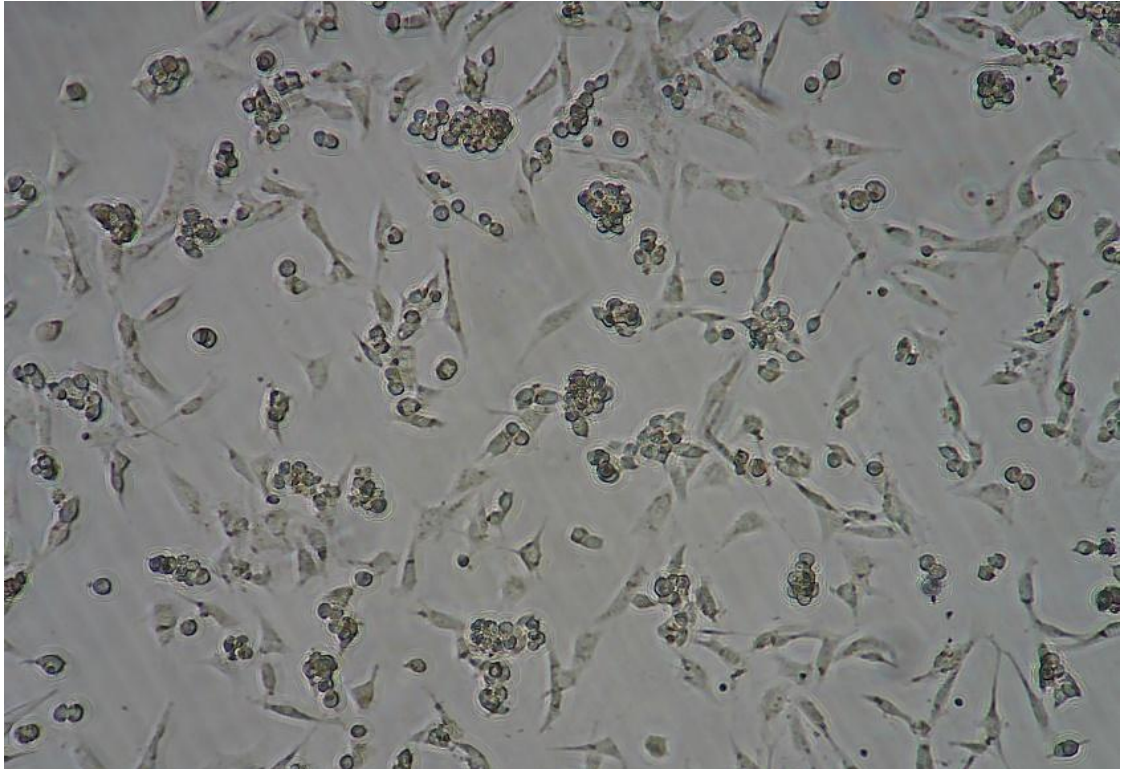
### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Hücre Hattı

Deneysel çalışmalarda, köpek meme epitel – benzeri karsinom hücre hattı kullanıldı.

**CMT-U27 köpek meme epitel – benzeri karsinom hücre hattı:** CMT-U27 hücre hattı (ATCC, katalog numarası: CRL-3456<sup>TM</sup>), 14 yaşında bir dişi köpeğin meme dokusundan izole edilen epitel morfoloji gösteren bir hücre hattıdır. Bu hücre hattı, meme karsinomları üzerindeki çalışmalar, meme tümörlerinin karşılaştırmalı *in vitro* çalışmaları ve veteriner onkoloji için ilaçların klinik öncesi testleri için kullanılmaktadır (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1.** Çalışmada kullanılan köpek meme epitel – benzeri karsinom hücre hattı, CMT-U27 (x10).

### 3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Kitler

Tez çalışması süresince kullanılan kimyasal maddeler ve kitler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve ticari kitler

| <b>Kimyasal Madde ve Ticari Kit</b>               | <b>Üretici Firma</b>  | <b>Katalog Numarası</b>             |
|---------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| 2- Merkaptotanol                                  | Amresco               | CAS# : 60-24-2<br>CODE: M131-100 ml |
| Annexin V                                         | Elobscience           | Cat No: E-CK-A211                   |
| Cell proliferation XTT kit                        | Cayman                | Item: 10010200                      |
| Dosetaksel (Doxel Ready)                          | Gensenta              |                                     |
| Fetal Sığır Serum (FBS) ısı ile inaktive edilmiş) | Gibco                 | REF: 10270-106<br>LOT: 2540730      |
| Hoechst 33342, 20 mM                              | Thermo Scientific     | REF: 62249<br>LOT: YK4114517        |
| Kloroform                                         | Sigma- Aldrich        | LOT: SZBB2910V                      |
| Metanol                                           | Sigma- Aldrich        | Code: 24229 Cas#: 67561             |
| Penisilin (10 000 U/ml) - streptomisin (10 mg/ml) | Serex                 | Cat No: SLP- 508-100                |
| Pierce TM dimetilsülfoksit (DMSO), LC-MS grade    | Thermo Scientific     | REF: 85190<br>LOT: TE266318         |
| Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640       | Serex                 | Cat No: SLR- 563-500                |
| Trypsin- EDTA, %0,05                              | Multicell             | CAT- 325-542-EL                     |
| Tris                                              | Amresco               | Code: 0826 Cas#77-861               |
| Trypan Blue solution, %0,5                        | Biological Industries | REF: 03-102-1B<br>LOT:1305817       |
| Valproik asit                                     | Sigma – Aldrich       | 1069-66-5                           |
| Vinkristin                                        | Selleck chemical      | S1241<br>LOT:S124108                |

### 3.1.3. Sarf Malzemeler

Deneyisel uygulamalar boyunca kullanılan sarf malzemeler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler

| Sarf Malzemeler                                           | Üretici Firma       |
|-----------------------------------------------------------|---------------------|
| Cam pastör pipet (230 mm)                                 | Isolab              |
| Cam şişeler (100, 250, 500 ml)                            | Isolab              |
| Falkon tüpler (15 ml)                                     | Isolab ve LABSELECT |
| Filtreli steril pipet uçları (10, 200 ve 1000 µl)         | ATS ve Corning      |
| Flasklar (25 ve 75 cm <sup>2</sup> )                      | NEST                |
| Kriyoviyal tüpler (2 ml)                                  | CRY.S               |
| Mikroplakalar (6 ve 96 kuyucuklu)                         | NEST ve COSTAR 3599 |
| Neubauer hemositometresi (0,1 mm 0,0025 mm <sup>2</sup> ) | Isoterm             |
| PCR tüpleri (0,2 µl)                                      | Thermo Scientific   |
| Santrifüj tüpleri (0,5, 1,5 ve 2 ml)                      | Eppendorf           |
| Serolojik pipetler (5 ve 10 ml)                           | NEST ve Isolab      |
| Steril enjektörler (5, 10 ve 20 ml)                       | Hayat               |
| Steril filtre (0,2 µm)                                    | Corning             |
| Steril küvet (50 ml)                                      | Isolab              |

### 3.1.4. Cihazlar ve Ekipmanlar

Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar ve ekipmanlar Çizelge 3.3'te verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar ve ekipmanlar

| Cihaz ve Ekipmanlar                        | Model ve Üretici Firma                         |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Buzdolabı (4 °C)                           | Arçelik                                        |
| Buz üretme cihazı                          | AF-80-AS, Scotsman                             |
| Çok kanallı pipetler (200 µl)              | Axygen                                         |
| Derin Dondurucu (-20°C)                    | Arçelik                                        |
| Görüntüleme cihazı                         | Wifi telescope camera, Y28442-2                |
| LightCycler 480 II                         | Roche Diagnostics                              |
| Hassas terazi                              | Shidmadzu-AUX320                               |
| Inverted mikroskop                         | CKX41, Olympus                                 |
| Karbondioksitli (CO <sub>2</sub> ) etüv    | BB-15 Thermo Scientific                        |
| Kuru etüv                                  | Binder                                         |
| Laminer flow                               | Esco Lab Culture Class II BSC                  |
| Mikroplaka okuyucu                         | iMark, Biorad                                  |
| Mikrosantrifüj                             | Scanspeed- Miniblue                            |
| Otoklav                                    | OT4060V, Nüve                                  |
| Otomatik pipetler (10-100 µl, 100-1000 µl) | Rainin                                         |
| Saf su cihazı                              | Millipore/MiliQ- RIOS DI3 Gradient             |
| Soğutmalı santrifüj                        | 5500, Kubota                                   |
| Spektrofotometre                           | NanoDrop 2000C, Thermo Scientific              |
| Su banyosu                                 | Nüve BM402                                     |
| Tıbbi soğutma cihazı (-80°C)               | MDF-U7386S, Sanyo                              |
| Vorteks                                    | Scientific Industries/ Vortex Genie 2<br>G560E |

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Hücre Kültürü

Deneysel çalışmalarda, köpek meme epitel-benzeri karsinom hücre hattı (CMT-U27) hücre kültürü teknikleri kullanılarak çoğaltıldı. CMT-U27 hücreleri, %10 fetal sıgır serumu (fetal bovine serum, FBS; ısı ile inaktive edilmiş), %1 L-glutamin solüsyonu (200 mM) ve %1 penisilin (10000 U/ml) – streptomisin (10 mg/ml) solüsyonu içeren fenol kırmızısı ilaveli Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 besiyerinde kültüre edildi. Hücre hattı, aynı büyüme şartları için 37 °C’de %95≤ nem ve %5 karbondioksit (CO<sub>2</sub>) içeren etüvde çoğaltıldı. Hücre proliferasyonu, morfolojisi ve kontaminasyon durumu inverted mikroskop ile günlük olarak kontrol edildi. Hücre canlılığının kaybedilmesine sebep olan besiyerindeki bileşenlerin büyük ölçüde tüketilmesi, hücrelerde toksik atık maddelerinin birikmesi ve besiyerinin pH seviyesinin değişmesi durumlarına karşılık büyüme ortamı her 48-72 saatte bir taze besiyeri ile değiştirildi (Ardicli vd., 2021).

Hücre kültürü uygulamaları, *in vitro* koşullarda gerçekleştirildiğinden dolayı etik kurul onayına ihtiyaç duyulmamıştır ve tez çalışması etik açıdan hiçbir sakınca doğurmamıştır.

##### 3.2.1.1. Hücre Hatlarının Stoktan Çıkarılması ve Çözdürülmesi

-80°C’lik soğutma cihazında kriyoviyal tüpler içerisinde dondurma ortamı (9:1 (h/h) oranında FBS:DMSO karışımından oluşan) içerisinde stoklanan CMT-U27 hücreleri sıcak su banyosunda çözdürüldü. 4°C’nin üzerindeki DMSO hücrelere toksik etki gösterir. Bunu önlemek için hücreler çözdürülürken seri hareket edildi. Çözünme işlemi sonrasında hücre süspansiyonları, 8-10 ml RPMI 1640 besiyerinin (%10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin solüsyonları içeren) olduğu 15 ml’lik falkon tüpler içerisine alındı. Hücre süspansiyonlarını dondurma ortamından kalan DMSO’dan uzaklaştırmak için falkon tüpler 2000 rpm devirde 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonucunda, süpernatant kısımları aspire edildi. Falkon tüplerdeki hücre

peletinin üzerine 1 ml besiyeri eklenerek hücreler süspanse hale getirildi. Daha sonra, falkon tüpüne 7-9 ml taze besiyerine eklenerek tüm hücreler 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara ekildi. Flasklar, 37°C, %95≤ nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüve alındı ve hücrelerin büyümeleri takip edildi (Ardicli vd., 2021).

### **3.2.1.2. Hücre Hatlarının Pasajlanması ve Alt Kültürlerin Oluşturulması**

Hücreler flask yüzeyini %80-90 oranında kapladıklarında başka bir ifade ile, hücre hatları %80-90 oranında konfluent olduklarında canlılıklarını korumak için tripsinizasyon yöntemi ile pasajlama yapıldı. Pasajlama yönteminde ilk olarak flask içindeki besiyeri aspire edildi. Flask içinde besiyeri kaynaklı FBS kalıntılarının bulunması, tripsin aktivitesini engeller. Bunu engellemek için, flaskların içine 2 ml 1X fosfat tamponlu tuz solüsyonu (fosfat tamponlu tuzlu çözelti: phosphate buffered saline: PBS, pH:7,4) eklendi ve hücre yüzeyi çok zarar vermeden hafifçe yıkandı. Yıkama sonrası PBS flask içinden aspire edildi. Daha sonra, flask yüzeyinden hücreleri ayırmak için 1 – 1,5 ml %0,05 tripsin-etilendiamin tetrasetik asit (EDTA) solüsyonu eklendi ve inkübasyon için 5 dakika 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde bekletildi. 5 dakika sonunda, flask yüzeyi kontrol edildi. Flask yüzeyinden ayrılan hücrelerin üzerine, tripsin–EDTA aktivitesini durdurmak için 10 ml besiyeri eklendi. Flask içerisinde hücrelerin homojenize olarak dağılması için pipet yardımıyla flask yüzeyi birkaç kez besiyeri ile yıkandı. Homojenize edilen hücre süspansiyonu, 15 ml'lik falkon tüplere alınarak 2000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, süpernatant kısımları aspire edildi, pellet kısımları hücre yoğunluğuna göre taze besiyeri eklenerek homojenize edildi. Oluşturulacak alt kültür sayısına göre hücre süspansiyonları, her biri 8-10 ml besiyeri içeren yeni 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara bölündü. Alt kültürler, uygun koşullar için 37 °C'ye ayarlı, %95≤ nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüve kaldırıldı.

### **3.2.1.3. Hücre Hatlarının Dondurulması ve Saklanması**

Hücre kültürü çalışmanın en büyük sorunlarından olan kontaminasyonun önüne geçebilmek için çalışmayı güvence altına almak ve ihtiyaç duyulduğunda geri dönebilmek adına hücrelerin dondurularak yedeklenmesi ve saklanması gereklidir. Bu

bağlamda, hücre hatları bir kriyoprotektan madde olan DMSO içeren ortamda donduruldu ve stoklandı. Hücreler flask yüzeyini %80-90 oranında kapladıkları zaman standart prosedür takip edilerek tripsinize edildi. Flasktaki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı. Hücreler 1X PBS ile yıkandı ve 37°C'ye ayarlı etüvde 5 dakika boyunca %0,05 tripsin-EDTA solüsyonu içinde inkübe edildi. Yüzeyden ayrılan hücreler 15 ml'lik falkon tüplere alınarak 2000 rpm devirde 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Kalan pellet üzerine, hücre yoğunluğuna göre FBS:DMSO (9:1, *h/h*) karışımından oluşan dondurma ortamı eklendi. Pipetajla homojenize edilen hücre süspansiyonu, buz üzerinde bekletilen kriyoviyal tüplere, tüp başına 800 µl hacminde  $1-2 \times 10^6$  hücre olacak şekilde bölündü. İşlem sonrası, kriyoviyal uzun dönem saklamak için -80°C'lik tıbbi soğutma cihazına kaldırıldı. DMSO, ışığa duyarlı olduğu için hücrelerin dondurulması karanlıkta gerçekleştirildi.

#### **3.2.1.4. Tripın Mavisı Boyası ile Canlı Hücrelerin Sayılması**

Hücre canlılıklarının belirlenmesi ve hücre süspansiyonundaki canlı ve/veya ölü hücre sayılarının tespiti için bu tez çalışması kapsamında tripan mavisı boyası kullanıldı. Tripın mavisı ile boyamanın temel prensibi, hücre membran bütünlüğüne dayanmaktadır. Buna göre, hasar görmemiş (intakt) hücre membranlarına sahip canlı hücrelerde, tripan mavisı boyası hücre membranına nüfuz edemez ve sitoplazmaya geçemez. Tripın mavisı boyası, hasar görmüş ve bundan dolayı hücre membranı geçirgenliği olan ölü hücrelerde ise porlu hücre membranından geçip sitoplazmaya girer ve intraselüler proteinlere bağlanır. Bu sebeple, mikroskop altında incelendiğinde ölü hücreler büyük, şişmiş ve mavi renkli olarak, canlı hücreler ise küçük, yuvarlak ve refraktil olarak görülür (Jain vd., 2018; Louis ve Siegel, 2011).

Çalışma boyunca planlanan tüm testlerde, tripan mavisı boyası kullanılarak hemositometre ile hücre sayımı yapıldı. Bu amaçla, ilk olarak CMT-U27 hücreleri tripsinizasyon prosedürü ile flask yüzeyinden kaldırıldı. Santrifüj sonrası süpernatant kısımları uzaklaştırılarak pelletler RPMI 1640 besiyeri ile sulandırıldı ve pipetaj yapılarak homojen hücre süspansiyonu elde edildi. Elde edilen hücre süspansiyonunda 20 µl alınarak bir ependorf tüpe aktarılıp üzerine de 20 µl %0,5 (*a/h*) tripan mavisı

solüsyonu eklendi. Pipetaj yapılarak süspansiyonun boya ile karışması sağlandı. Sonrasında, karşımdan 10 µl alınarak Neubauer tip hemositometrenin sayım bölmelerinden birine yüklendi. Ardından inverted mikroskopta x10 objektif kullanılarak 2 köşe karede canlı hücre sayımı gerçekleştirildi. Tripan mavisi boyasını içine alıp mavi renk görünen hücreler ölü, boyayı almadığı için parlak renkte görünen hücreler ise canlı olarak değerlendirildi. Toplam canlı hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Canlı hücre sayısı} = (\text{iki karede sayılan toplam hücre sayısı} / 2) \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4$$

### **3.2.1.5. Sitotoksik Etkiyi Belirlemek Üzere Hücrelerin Ekimi**

Sitotoksosite deneylerinde kullanılacak hücre sayısı, hücre ekiminde önce optimizasyon yapılarak tespit edildi. Öncelikle, canlı hücre sayısı belirlenen süspansiyondan gereken besiyeri hacmine ve hücre sayısına göre seyreltme işlemi uygulandı. Sonrasında, 96 kuyucuklu mikrolakalara CMT-U27 hücreleri 100 µl RPMI 1640 besiyeri içerisinde  $5 \times 10^3$  hücre/kuyucuk olarak ekildi. Testte bulunan her konsantrasyon için 3 tekrarlı hücre ekimi yapıldı. Negatif kontrol (tedaviye dahil edilmemiş hücre kontrolü) için 100 µl RPMI 1640 besiyeri içerisinde  $5 \times 10^3$  hücre/kuyucuk yoğunlukta hücre ekimi ile kör (blank) kuyucuklar için ise sadece 100 µl RPMI 1640 besiyeri (hücre içermeyen) ilave edildi. 96 kuyucuklu mikrolaka inverted mikroskopta kontrol edilerek, hücrelerin yüzeye yapışmaları ve büyümeleri için 24 saat boyunca 37 °C’de, CO<sub>2</sub>’li etüvde inkübasyon edildi.

### **3.2.2. Test Bileşiklerinin Hazırlanması ve Hücelere Uygulanması**

#### **3.2.2.1. Vinkristin Sülfatın Hazırlanması**

Kanser tedavisinde kemoterapötik ilaç olarak kullanılan vinkristin, köpek meme kanseri tedavisi için deneysel çalışmalarda kullanıldı. Selleckchem firmasından temin edilen toz halindeki vinkristin (molekül ağırlığı: 923,04 g/mol), 1,0834 ml DMSO içinde çözdürülerek 10 mM konsantrasyonda ana stok solüsyonu hazırlandı ve alikotlanarak -80°C’de saklandı.

### 3.2.2.2. Dosetakselin Hazırlanması

Tedavi için tercih edilen önemli kemoteröpatik ilaçların başında gelen dosetaksel köpek meme kanseri tedavisi için kullanıldı. Bunun için DoxelReady firmasından temin edilen 80 mg/4 mL infüzyon konsantre çözelti içeren flakon kullanıldı. Alikotlanarak -80°C’de saklandı.

### 3.2.2.3. Valproik Asidin Hazırlanması

Sigma - Aldrich firmasından temin edilen VPA (molekül ağırlığı:166,19 g/mol), 1 gram tartılıp 3 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürülerek 1,9997 molar konsantrasyonda ana stok hazırlandı ve aikotlanarak oda sıcaklığında saklandı.

Ana stok solüsyonu RPMI 1640 besiyeri içerisinde dilüe edilerek çalışma solüsyonları, her uygulama öncesi taze olacak şekilde hesaplamalara uygun ara stoklar halinde oluşturuldu. Böylece vinkristin için, 1,56-100 nM aralığında, dosetaksel 25 -200 µM aralığında ve VPA 1,56-100 mM aralığında final dozları hazırlanarak test edildi. Hücre ekiminden 24 saat sonra, final konsantrasyonlardaki test bileşikleri 100 µl/kuyucuk olacak şekilde CMT-U27 hücrelerine uygulandı. Test bileşiklerinin eklenmesinden sonra, tüm kuyucuklardaki son hacimin 200 µl olması için negatif kontrol ve kör için ayrılan kuyucuklara 100 µl besiyeri ilave edildi. Uygulama boyunca hücreler, 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Test bileşiklerinin tüm dozları, negatif kontrol ve kör için 96 kuyucuklu mikrolakalarda, 3 farklı kuyucuk (3 tekrar) uygulandı.

### 3.2.3. Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

Vinkristin, dosataksel ve VPA’nın köpek meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerin belirlenmesi için *in vitro* hücre canlılık deneyleri yürütüldü. Çalışma kapsamında kolorimetrik testlerden XTT testi uygulandı.

### 3.2.3.1. XTT Hücre Canlılık Testi

XTT (2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfüfenil)-5-[(fenilamino)karbonil]-2H-tetrazolyum hidroksit) hücre canlılık testi; tetrazolyum tabanlı olmasının yanı sıra hızlı, güvenilir, kullanışlı bir testtir. XTT reaktifi, metabolik olarak aktif hücreler tarafından turuncu renkli, suda çözünür formazan kristallerine indirgenir. Oluşan formazan yoğunluğunun spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle canlılık değerlendirilmesi yapılmaktadır (Scudiero vd., 1988). Bunun yardımıyla; XTT testi, hücre canlılığı/sitotoksite hakkında hassas ve doğru bilgi sunmaktadır (Berridge vd., 1996; Tokur ve Aksoy, 2017).

Test bileşiklerinin CMT-U27 hücreleri üzerindeki olası sitotoksik etkileri, XTT hücre canlılık testi kullanılarak gerçekleştirildi. Test, 'Cell Proliferation XTT' kit içeriğinde bulunan protokole göre uygulandı. Test bileşiklerinin ilgili tedavi süresi (24, 48 ve 72 saatlik) sonrası, XTT reaktifi ve PMS (N-metil dibenzopirazin metil sülfat) içeren aktivasyon solüsyonu 37°C'lik su banyosunda çözdürüldü. Çözünme sonrası, 96 kuyucuklu mikrolaka için hesaplama yapıldı. Buna göre; 2,5 µl/kuyucuk (XXT developer), 2,5 µl/ kuyucuk (Electron mediator solution) olacak şekilde her kuyucuk için 5 µl XTT mix hazırlandı. Mikroplakaların içinde bulunan besiyerleri aspire edildi ardından her kuyucuğa 50 µl RPMI 1640 besiyeri (FBS, L-Glutamin ve penisilin-streptomisin bileşenlerini içeren) eklendi. Hazırlanan reaksiyon karışımı 5 µl/kuyucuk olacak şekilde ilave edildi. Hücreler 4 saat boyunca 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucu oluşan renk değişimi miktarı (optik yoğunluk), mikrolaka okuyucu kullanılarak 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Kör (background) absorbans değerleri 655 nm dalga boyunda ölçüldü ve 450 nm' de kaydedilen değerden çıkarılarak kantitatif absorbans değerleri elde edildi. XTT, ışığa duyarlı olduğu için tüm işlemler karanlık ortamda gerçekleştirildi.

### 3.2.3.2. Hücre Canlılığının Hesaplanması

XTT canlılık testi sonrası elde edilen ham veriler, Microsoft Office Excel programı kullanılarak işlendi. Test bileşikleri uygulanmamış kontrol hücreleri yani canlılığın

%100 olarak kabul edildiği hücreler, referans alınarak test bileşikleri uygulanan hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

$$\%Canlılık = (ortalama Abs_{bileşik} - ortalama ABS_{kör}) / (ortalama Abs_{kontrol} - ortalama ABS_{kör})$$

(Abs: Absorbans değerlerini ifade etmektedir)

Hesaplanan canlılık sonuçları ile, Microsoft Office Excel programında doza karşı yüzde canlılık grafikleri çizildi. Tahmin fonksiyonu kullanılarak, bu grafiklerden test bileşiklerinin IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı.

#### 3.2.4. Kombinasyon Analizi

Çalışma kapsamında araştırılan test bileşiklerinin CMT-U27 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri XTT hücre canlılık testi ile belirlendi. Dosataksel, vinkristin ve VPA kombinasyonunun hücre canlılıkları üzerindeki muhtemel sinerjik etkisinin araştırılması hedeflendi. Kombinasyon çalışmasında kullanılması hedeflenen dozlar, XTT hücre canlılık testi sonuçlarına göre belirlendi. Bu amaçla, CMT-U27 hücreleri 100 µl RPMI 1640 besiyeri içerisinde, 5x10<sup>3</sup> hücre/kuyucuk yoğunlukta ve 3 tekrarlı olarak 96 kuyucuklu mikropalakaya ekildi. 37°C’de, nemli ve %5 CO<sub>2</sub>’li etüvde 24 saat inkübasyon sonunda dosataksel, vinkristin ve VPA’nın doz kombinasyonları 100 µl besiyeri içinde hücrelere Çizelge 3.4’te gösterildiği gibi uygulandı. Negatif kontrol için 200 µl besiyeri içinde kültüre edilen hücreler ve kör için ise sadece 200 µl besiyeri uygulandı. Pozitif kontrol için dosetaksel, vinkristin ve VPA’nın IC<sub>50</sub> dozları kullanıldı. 24, 48 ve 72 saat süren kombinasyon tedavisinden sonra hücrelerin canlılıkları XTT testi ile değerlendirildi. Veri işlenmesi, hücre canlılık yüzdelelerinin ve IC<sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesi daha önce açıklanan formülle hesaplandı.

**Çizelge 3.4.** Kombinasyon analizi için oluşturan tedavi grupları

| Tedavi Grupları                                                        | Tedavi Dozları |            |               |
|------------------------------------------------------------------------|----------------|------------|---------------|
|                                                                        | Dosetaksel     | Vinkristin | Valproik Asit |
| 1. <b>Negatif Kontrol</b> (Sadece hücreler)                            | -              | -          | -             |
| 2. <b>Pozitif Kontrol</b><br>(Hücreler +<br>Dosetaksel/Vinkristin/VPA) | 110 µM         | 18 nM      | 15 mM         |
| 3. <b>Kombinasyon Grubu</b>                                            | 110 µM         | 18 nM      | -             |
|                                                                        | 110 µM         | -          | 15 mM         |
|                                                                        | -              | 18 nM      | 15 mM         |
|                                                                        | 110 µM         | 18 nM      | 15 mM         |

### 3.2.5. Hücre Morfolojisinin Değerlendirilmesi

VPA, vinkristin ve dosetakselin hücre morfolojileri ve canlılıkları üzerindeki etkileri, inverted mikroskopta XTT canlılık testi ile eş zamanlı olarak analiz edildi. Test bileşikleri ve kombinasyon grupları ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreci tamamlandığında, XTT hücre canlılık testi uygulanmadan önce CMT-U27 hücreleri inverted mikroskopta x10'luk büyütme kullanılarak fotoğraflandı. Hücrelerin adezyon durumları, şekil ve boyut değişimleri, negatif kontrol hücreleri birbirleriyle karşılaştırılarak test edilen bileşiklerin sitotoksik aktivitelerinin mikroskobik olarak da doğrulanması sağlandı.

### 3.2.6. Floresan Mikroskobunda Hücre Ölüm Modunun Belirlenmesi

Test bileşiklerine maruz kalmış hücrelerin ölüm modlarının değerlendirilmesi için morfoloji tabanlı testlerden biri olan floresan mikroskopi yöntemi kullanıldı. Bu yöntemin prensibi, floresan boyaların DNA'ya bağlanmasıyla kromatini ve nükleusu görünür kılmasıdır. Bu sayede, hem canlı/ölü hücre ayrımı yapılmakta hem de hücrelerin ölüm şekilleri belirlenmektedir (Atale vd., 2014; Cummings vd., 2012).

Floresan boyama uygulamasında, kemoterapötik ajanlar dosataksel, vinkristin ve VPA'nın tek ve kombine tedavilerinin köpek meme karsinom hücreleri üzerindeki apoptotik ve nekrotik hücre ölüm etkinlikleri; Annexin-V, Propidyum iyodür (PI), Hoechst kullanılarak belirlendi. Annexin-V, apoptoz ile ölen hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir proteindir. Bu sayede, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücreler görünür hale getirir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Annexin-V bağlanması görülebildiği için yöntem çalışılırken ikinci boya olarak PI kullanıldı. PI, DNA fragmentasyonu ve hücre döngüsü analizleri için sıklıkla kullanılan floresan bir nükleik asit boyasıdır ve çift sarmal DNA'nın baz çiftleri arasına yerleşir. İntakt membrana sahip olan canlı hücreler PI geçirmez, bu nedenle; PI, sadece membran hasarlı hücrelere girebilmektedir. Dolayısıyla; PI, tüm ölü hücreleri (primer nekrotik veya geç apoptotik/sekonder nekrotik) boyayarak hücrelerin apoptotik ya da nekrotik olmaları hakkında bilgi vermektedir (Ulukaya vd, 2011). Bu amaçla, hücreler eş zamanlı olarak Annexin-V (yeşil floresan) ve PI (kırmızı floresan) ile boyanarak hücrelerde tetiklenen ölüm modu belirlendi. Hücrelerdeki membran bütünlüğünü analiz etmeye olanak sağlayan Annexin-V ve PI boyalarının yanı sıra, nükleus morfolojisini araştırmak için Hoechst 33342 boyama yöntemi de kullanıldı. Hoechst 33342, DNA'ya bağlanabilen hücreden geçebilen bir boyadır ayrıca canlı veya ölü (apoptotik/nekrotik) hücrelerin çekirdeklerini boyamak için kullanılmaktadır. Apoptotik hücrelerde çekirdeğin normal hücrelere göre daha küçük olması nekrotik hücrelerde ise çekirdeğin normal hücrelerden biraz daha büyük olması ve daha az boya alması özellikleri karşılaştırılarak Hoechst 33342 boyama yöntemi çalışıldı (Ulukaya vd., 2011). Bu bağlamda, üçlü boyama yöntemiyle hücre canlılığının ve ölüm modunun tespiti nükleus morfolojisi dikkate alınarak, aşağıdaki durumlara göre Çizelge 3.5'te özetlendi.

**Canlı hücreler:** Nükleusları normal boyuttur. Hoechst 33342 boyası ile boyanır, PI boyasıyla boyanmazlar.

**Erken apoptotik hücreler:** Apoptozun erken safhasındaki hücrelerde membran bütünlüğü korunduğundan hücreler PI boyasıyla boyanmazlar. Ancak hücreler Hoechst 33342 boyası için pozitifler. Kromatin yoğunlaşması, piknotik ve/veya fragmente

nükleus gibi apoptotik değişikliklerin olması, erken apoptotik hücrelerin teşhisinde en önemli bulgudur.

**Geç apoptotik/sekonder nekrotik hücreler:** Sekonder nekroz, apoptozun geç safhasıdır. Bu evrede, hücrelerin membran bütünlüğü bozulduğu için hücreler PI boyası için pozitifdir. Ayrıca, hücreler Hoechst 33342 boyasıyla da boyanırlar. Bunun yanı sıra, geç apoptotik veya sekonder nekrotik hücrelerde, apoptoza özgü belirteçler de mevcuttur.

**Nekrotik (Primer) hücreler:** Hem PI boyası hem de Hoechst 33342 boyası ile boyanarak ölü oldukları belirlenen hücrelerin nükleuslarında apoptotik görünüm yoktur. Apoptotik hücrelerden farklı olarak, nekrotik hücrelerin nükleusları canlı hücrelerin nükleuslarından göreceli olarak daha büyüktür. Nekrotik hücrelerin gerçekleştirdiği floresan ışımaya ilk başta normaldir, ancak nekroz süreci ilerledikçe hücrelerin lizise uğramalarından dolayı floresan ışımaya yoğunluğu azalır.

**Çizelge 3.5.** Üçlü boyama yöntemiyle hücre ölüm modunun tespiti

|                                           | <b>Annexin-V</b> | <b>Propidyum İyodür (PI)</b> | <b>Hoechst 33342</b> |
|-------------------------------------------|------------------|------------------------------|----------------------|
| <b>Erken apoptotik hücreler</b>           | +                | -                            | +                    |
| <b>Geç apoptotik ve nekrotik hücreler</b> | +                | +                            | +                    |
| <b>Normal hücreler</b>                    | -                | -                            | +                    |

+, boyama; -, boyanmama durumunu ifade etmektedir.

Test bileşiklerinin CMT-U27 hücreleri üzerindeki etkilerini üçlü boyama yöntemiyle saptamak amacıyla ilk olarak, tripan mavisi boyası ile Neubauer hemositometresinde canlı hücre sayımı yapıldı. Daha sonra, 96 kuyucuklu mikropłakanın her bir kuyucuğuna 200 µl içersinde  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde 3 tekrarlı ekim yapıldı. 24 saat boyunca 37°C’de %5 CO<sub>2</sub>’li etüvde inkübe edildi. İnkübasyonu takiben kuyucuklarda bulunan tüm besiyeri aspire edildi. İnkübasyon sonrası, hücreler dosataksel, vinkristin

ve VPA'nın ve bu bileşiklerin kombinasyon gruplarının IC50 dozları ile muamele edildi. Negatif kontrol kuyularında yer alan tüm besiyeri aspire edildi ve taze 100 µl taze besiyeri ilave edildi. 16 saat süren inkübasyon periyodunun sonunda kuyucuklarda kalan besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı. Bu tez çalışmasında, apoptotik ve nekrotik hücre ölüm etkinliklerini belirlemek için Elabscience Anneksin V kiti (Annexin V-FITC/PI Apoptosis Kit) kullanıldı. Kit içerisinde bulunan tampon çözelti içerisinde 10x olacak şekilde anneksin V boyası ve PI boyası (50 µg/ml) hazırlandı. Hoeschst 33342 boya çözeltisi son konsantrasyonu 3 µg/ml olacak şekilde Anneksin V kiti içerisinde bulunan tampon çözelti içerisinde hazırlandı. CMT-U27 hücreleri boya solüsyonundan 20 µl eklenerek 15 dakika karanlıkta inkübe edildi. Inkübasyon sonrası 361/497 nm dalgaboyu aralığına sahip floresan mikroskop altında fotoğraflandı.

### **3.2.7. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (Quantitative PCR: QPCR)**

Test bileşiklerinin, hücre ölüm yollarında (apoptoz, nekroz ve otofaji) görevli genlerin ekspresyon profili üzerindeki etkileri, kantitatif gerçek zamanlı PCR ile belirlendi. Kantitatif gerçek zamanlı PCR, nükleik asit dizilerinin kantifikasyonu ile gen ekspresyonunun gerçek zamanlı olarak saptanmasında kullanılan bir yöntemdir (Hawkins ve Guest, 2017; Rodríguez vd., 2015). Bu yöntemde, reaksiyon boyunca PCR ürünü yapısına dahil olan floresan boyalar kullanılarak DNA miktarı izlenmektedir. Floresan sinyalindeki artış, PCR ürünü miktarı ile doğru orantılıdır (Fraga vd., 2008). Hidrolizis problemleri, kantitatif gerçek zamanlı PCR prosedürlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Navarro vd., 2015; Rodríguez vd., 2015). Bu problemler, iki etiket ile işaretlidir. Bunlardan; 5' ucundaki floresan 'haberci' (raportör, reporter) molekül, 3' ucundaki ise 'baskılayıcı' ("quencher") moleküldür. Prob intakt iken haberci moleküle yakın olan baskılayıcı molekül, haberci molekülün floresan sinyal oluşturmalarını engellemektedir. PCR reaksiyonu sırasında, primer uzaması probun hedef diziye bağlandığı noktaya geldiği zaman, Taq polimeraz enzimin 5' → 3' ekzonükleaz aktivitesi hidrolizis probunu yıkar. Böylece haberci ve baskılayıcı moleküller birbirinden ayrılır ve serbest hale geçen haberci molekül floresan sinyal oluşturur. Her PCR döngüsü boyunca, hedef dizi miktarı arttıkça daha fazla prob yıkılır ve floresan sinyal miktarı artar. Dolayısıyla, floresan sinyal şiddeti örnekte bulunan ampikon

miktarı ile doğru orantılıdır. Sonuç olarak; kantitatif gerçek zamanlı PCR yöntemlerinden prob tabanlı olanları, boya tabanlı olanlarından daha spesifik olduğu için analizlerde daha çok tercih edilmektedir. Bu amaçla, hücre ölüm yollarında kilit rol üstlenen bazı genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimler, prob tabanlı PCR yöntemiyle analiz edildi (Hawkins ve Guest, 2017; Holland vd., 1991; Livak vd., 1995).

### 3.2.7.1. RNA İzolasyonu

Hücrelerden RNA izolasyonu, 'PureLink RNA Mini Kit' kullanılarak gerçekleştirildi. İlk olarak, CMT-U27 hücreleri sayılarak 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara 7 ml RPMI 1640 besiyeri içinde 5x10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin izolasyon için gerekli proliferasyonu sağlayabilmeleri için 16 saat boyunca 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, kontrol edilen hücrelerin RNA izolasyonu için uygun olduğu belirlendikten sonra, XTT hücre canlılık testi yöntemiyle test bileşiklerinin tespit edilen ortalama IC<sub>50</sub> değerleri baz alınarak belirlenen dozlarda hücrelerin bulunduğu 3 ml RPMI 1640 besiyeri içerisinde karıştırılarak 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara eklendi. RNA izolasyonu uygulamasında da negatif (sadece besiyerindeki hücreler) ve pozitif (sadece dosataksel, vinkristin ve VPA uygulanan hücreler) gruplar kontrol için çalışıldı. 16 saat inkübasyon sonucunda, CMT-U27 hücreleri, tripsinizasyon işlemi ile flasklardan 15 ml'lik falkon tüplere toplandı ve 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, falkon tüp içerisinde bulunan besiyeri uzaklaştırıldı. Kit protokolüne uygun olarak, falkon tüp başına hücre sayısına göre ifade edilen 0.6 ml Lizis Buffer ve 6 µl 2-mercaptoethanol ilave edildi. Hücre pelleti dağılana kadar vorteks yapıldı. Oluşan süspanse karışım, homojenizasyonun sağlanması için temiz eppendorf tüpe aktarılarak 12000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 600 µl %70 etil alkol eppendorflara ilave edildi ve vortekslendi. Eppendorf içerisinden 700 µl santrifüj kolon tüplerine aktarıldı. 12000 x g'de 15 saniye santrifüj edilerek koleksiyon tüpündeki kısım boşaltıldı. 700 µl Wash Buffer I santrifüj kolon tüplere eklendi ve tekrar 12000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü boşaltıldıktan sonra, santrifüj kolon tüpe 500 µl Wash buffer II ilave edildi. 12000 x g'de 15 saniye santrifüj edildikten sonra koleksiyon tüp boşaltıldı. Santrifüj kolon tüpünün içerisindeki alkolü uzaklaştırmak için en yüksek g'de 1-2 dakika santrifüj edildi. Koleksiyon tüp santrifüj

sonrası değiştirildi. Santrifüj kolon tüpüne 50 µl Rnaz-ari su ilave edildi. 1 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra 2 dakika boyunca 12000 x g’de santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından koleksiyon tüp içerisinde toplanan süzüntü total RNA’yı içermektedir. İzole edilen RNA’ların miktarı (ng/µl) ve saflığı (260/280 nm dalga boyundaki absorbans değeri) spektrofotometrede ölçüldü. Total RNA örnekleri -80°C’de saklandı.

### 3.2.7.2. Komplementer DNA (Complementary DNA: cDNA) Sentezi

Elde edilen RNA örneklerinden ‘Thermo Scientific™ RevertAid RT Reverse Transcription Kit’ kullanılarak ters transkripsiyon (“reverse transcription”) yöntemiyle komplementer DNA (complementary DNA: cDNA) sentezlendi. RNA örneği cDNA dönüşümü için 1000 ng konsantrasyonda kullanıldı. Her örnek için RNA+Random Hexamer primer (0,5 µl) + Oligo dT (0,5 µl) + nükleaz-ari sudan 12 µl eklenerek karışım hazırlandı. Hazırlanan karışım, 65°C’de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası buz üzerinde soğutma işlemi gerçekleştirildi.

**Çizelge 3.6.** Komplementer DNA sentezinde kullanılan malzemeler ve miktarları

| Bileşenler (Tek reaksiyon için)    | Hacim        |
|------------------------------------|--------------|
| RNA örneği                         | 12 µl        |
| 5X Reaction Buffer                 | 4 µl         |
| RiboLock Rnase Inhibitor (20 U/µL) | 1 µl         |
| 10 mM dNTP Mix                     | 2 µl         |
| RevertAid RT (200 U/µL)            | 1 µl         |
| <b>Toplam Hacim</b>                | <b>20 µl</b> |

Son hacim 20 µl olacak şekilde reaksiyon bileşenleri RNA örnekleri üzerine eklenerek 0,2 µl’lik PCR tüplerinde karıştırıldı ve Thermal Cycler cihazına yerleştirildikten sonra 25°C’de 5 dakika priming, 42°C’de 60 dakika ters transkripsiyon ve 70°C’de 5 dakika ters transkripsiyon inaktivasyonu aşamalarından oluşan programa tabi tutularak

reaksiyon gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA örnekleri, kantitatif gerçek zamanlı PCR analizine kadar -20°C’de saklandı.

### 3.2.7.3. Primer Dizaynı ve Optimizasyonu

Kantitatif gerçek zamanlı PCR testlerinin spesifikliği, tasarlanan primer ve problemlerin uygunluğu ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle, primer ve problemlerin optimum tasarımı, test başarısında önemlidir (Rodríguez vd., 2015; Rosadas vd., 2013). Hedef gen bölgeleri ve referans gen bölgeleri için kullanılacak olan primerler, ‘NCBI’ ve ‘Ensembl’ veri bankaları kullanılarak *Canis* cinsine spesifik olarak dizayn edildi. Hedef genlere ait primer dizileri Çizelge 3.7’de sunulmuştur.

**Çizelge 3.7.** Kantitatif gerçek zamanlı PCR analizinde kullanılan genler ve primer dizileri

| Genler        | Primer Dizileri                                          |
|---------------|----------------------------------------------------------|
| <i>NOXA</i>   | F: GAAGAGCTCGAAGTGGAGTG<br>R: GTTCCTGAGCGGAAGAGTT        |
| <i>PUMA</i>   | F: CTCAACGCGCTGTACGA<br>R: GGAGTCCCATGATGAGATTGT         |
| <i>CASP3</i>  | F: CTGACAGTGGAATTGAGGATGA<br>R: CCTTTGAATTTGCGCCAGGAATAG |
| <i>ATM</i>    | F: CAGTGGAGATGACCAGGAATG<br>R: CAAGACACGCTCTGCTACTT      |
| <i>P53</i>    | F: GAATGAAGCCTTGGAGCTGA<br>R: TTTATGGCGAGAGGTAGATTGC     |
| <i>P21</i>    | F: AGACGGTGGCTTGGAGA<br>R: TTGCTGCCATGAGGGATG            |
| <i>BID</i>    | F: CACCCAGGACTGGTGAATAAC<br>R: CGAGATGCTTCCTTCTGTCTTC    |
| <i>BCL-2</i>  | F: GTGGATGACTGAGTACCTGAAC<br>R: GACAGCCAGGAGAAGTCAAA     |
| <i>MCL</i>    | F: GAAAGCTGCATCGAACCATTAG<br>R: AGAACTCCACAAACCCATCC     |
| <i>BAX</i>    | F: AACTGGACTTCCTTCGAGA<br>R: TAAGCACTCCAGCCACAAAG        |
| <i>GAPDH*</i> | F: GAACATCATCCCTGCTTCCA<br>R: CAGGTCAGATCCACAACCTGATAC   |

*ACTB*\*

F: GCCAACCGTGAGAAGATGA

R: CAGAGGCGTACAGGGACA

\*Housekeeping gen

Elde edilen primerlerin spesifikliği, BLAST programı ile kontrol edildi. Optimizasyon için tasarlanan primerler, 100 µM'a sulandırıldı. Sulandırılan primerlerden her parametre için 10 µM ara stoklar oluşturuldu ve kantitatif geręek zamanlı PCR için hazır hale getirildi.

#### 3.2.7.4. Kantitatif Geręek Zamanlı PCR Analizi

Sentezlenen cDNA'lar, belirtilen gen bölgeleri için dizayn edilen primerler ile LightCycler® 480 SYBR Green I Master kullanılarak Roche LightCycler 480 II cihazı ile çalışıldı. Çalışmada kullanılacak olan her bir primer, spesifik olduğu canis cDNA'sı ile aşağıda belirtilen şekilde hazırlanıp cihaza yüklendi. Bileşenlere ait detaylar Çizelge 3.8'de sunulmuştur.

**Çizelge 3.8.** Kantitatif geręek zamanlı PCR analizinde kullanılan reaksiyon karışımı

| Bileşenler (Tek reaksiyon için)                       | Hacim        |
|-------------------------------------------------------|--------------|
| Su, PCR-grade                                         | 5,8 µl       |
| Forward Primer(F) (ara stok 10 µM)                    | 0,6 µl       |
| Reverse Primer(R) (ara stok 10 µM)                    | 0,6 µl       |
| Enzim Karışımı (LightCycler® 480 SYBR Green I Master) | 10 µl        |
| cDNA                                                  | 3 µl         |
| <b>Toplam Reaksiyon Hacim</b>                         | <b>20 µl</b> |

cDNA hariç tüm reaksiyon bileşenleri (17 µl) 96 kuyucuklu PCR mikrolakasının tüm kuyucuklarına dağıtıldı. Son reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde her kuyucuğa 3 µl cDNA örneği son hacim 20 µl olacak şekilde ilave edildi. Hazırlanan pleytlerin üzeri kapatılarak kısa süreli santrifüj edildi. Santrifüj sonrası mikrolaka Roche LightCycler

480 II cihazına yerleştirildi ve Çizelge 3.9’da sunulan cihaz protokolüne göre gerçek zamanlı olarak cDNA amplifikasyonu gerçekleştirildi.

**Çizelge 3.9.** Kantitatif gerçek zamanlı PCR analizi için cihaz protokolü

| Program Adı                       | Pre-inkübasyon | Amplifikasyon       |     |     |     | Erime Eğrisi      |      |          | Soğutma |
|-----------------------------------|----------------|---------------------|-----|-----|-----|-------------------|------|----------|---------|
| <b>Analiz Modu</b>                | Yok            | Kuantifikasyon Modu |     |     |     | Erime Eğrisi Modu |      |          | Yok     |
| <b>Döngü Sayısı</b>               | 1              | 45                  |     |     |     | 1                 |      |          | 1       |
| <b>Hedef Sıcaklık [°C]</b>        | 95             | 95                  | 57  | 72  | 95  | 62                | 97   | 40       |         |
| <b>Süre</b>                       | 5dk            | 10s                 | 15s | 10s | 5s  | 1dk               | 0s   | 00:00:30 |         |
| <b>Sıcaklık Artış Hızı [°C/s]</b> | 4,8            | 4,8                 | 2,5 | 4,8 | 4,8 | 2,5               | 0,11 | 2,5      |         |
| <b>Okuma Modu</b>                 | Yok            | Yok                 | Yok | Tek | Yok | Yok               | Yok  | Yok      |         |

### 3.2.7.5. Veri Analizi

Kantitatif gerçek zamanlı PCR analizi sonunda elde edilen veriler Mutlak Kantitasyon (“Absolute Quantification”) ve Gelişmiş Göreceli Kantitasyon (“Advanced Relative Quantification”) yöntemleri ile analiz edildi (Whelan vd., 2003). Elde edilen sonuçlarda “Relative Quantification” yapabilmek için target gen döngü eşiği (cycle threshold: Ct) değerleri, referans gen Ct ile normalize edilerek ekspresyon değerleri bulundu. Bu bağlamda, her bir örneğin Ct değeri, hedef genin ortalama Ct değerinden referans genin (housekeeping gen, *ACTB* ve *GAPDH*) ortalama Ct değerinin çıkarılmasıyla hesaplandı. Her grup için  $\Delta Ct$  değeri, bu değerden grup ortalamasının çıkarılmasıyla belirlendi. Hedef genin örneğe göre ekspresyon seviyesi ise  $2^{-\Delta Ct}$  olarak belirlendi (Tellmann, 2006).

### 3.2.8. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler, GraphPad Prism, versiyon 9.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, ABD) programı kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermedikleri, Anderson-Darling testi ile incelendi. İki den fazla grubun

karşılaştırıldığı durumlarda, normal dağılım gösteren verilerin kıyaslanması için tek yönlü varyans analizi testi uygulandı. Normal dağılıma uymayan verilerde ise Kruskal Wallis testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $P<0,05$  olarak kabul edilmiştir.



## **4. BULGULAR**

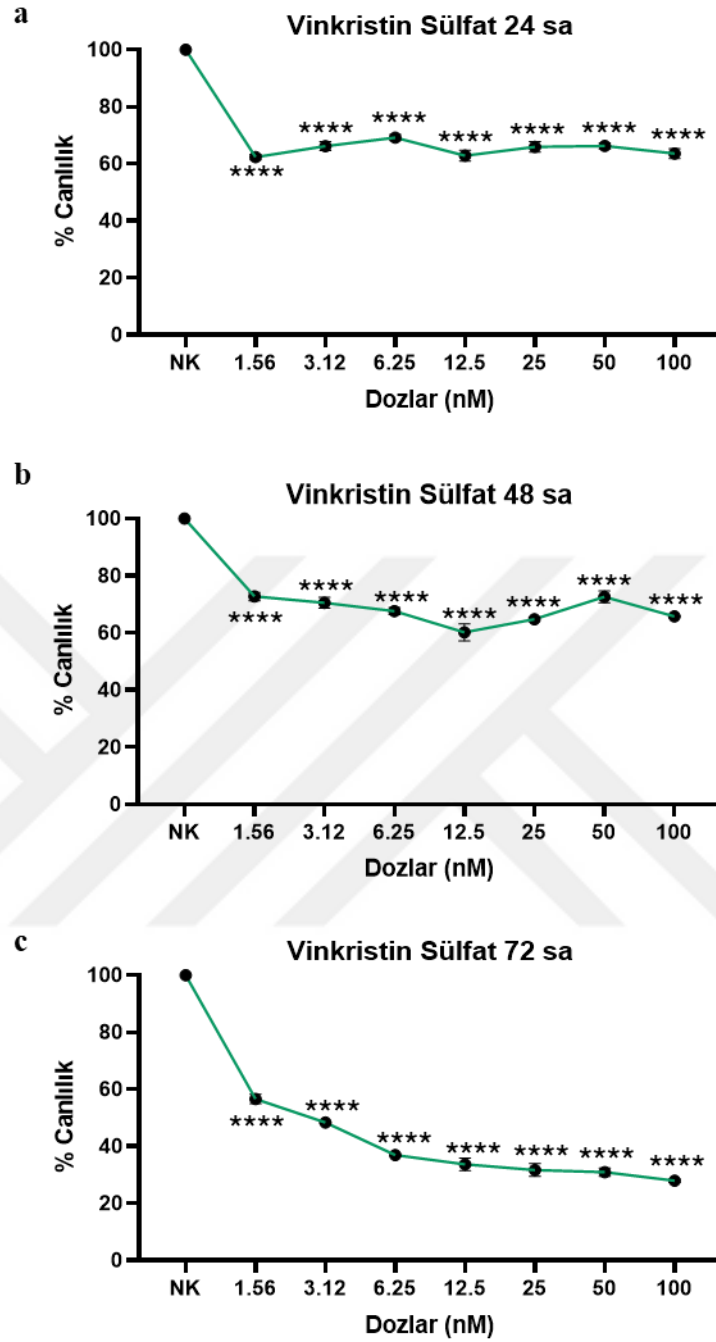
### **4.1. Hücre Kültürü Çalışmalarına İlişkin Bulgular**

Bu çalışmada, VPA, vinkristin sülfat ve dosetakselin farklı konsantrasyonlarda CMT-U27 hücrelerine karşı sitotoksik etkileri, XTT hücre canlılık testi kullanılarak değerlendirilmiştir. VPA, vinkristin sülfat ve dosetakselin CMT-U27 hücrelerine etkisi 24, 48 ve 72 saat boyunca aynı ortam koşullarında araştırılmıştır.

#### **4.1.1. Vinkristin Sülfatın Sitotoksik Etkisi ile İlgili Bulgular**

##### **4.1.1.1. XTT Hücre Canlılık Testi Bulguları**

Vinkristin sülfatın, CMT-U27 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için vinkristin sülfat 1,56-100 nM konsantrasyon aralığında hazırlanmıştır. Vinkristin sülfat DMSO'da çözülürerek hazırlandığı için sitotoksikite sonucunu kontrol etmek amacıyla öncelikle DMSO ile karşılaştırılması yapılmıştır. Vinkristinin çözülmesi için gerekli DMSO dozunun sitotoksik olmadığı gözlenmiştir. Şekil 4.1'de gösterildiği gibi, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, vinkristin uygulanmış CMT-U27 hücrelerinin canlılıklarındaki azalışların istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı olduğu saptanmıştır ( $P<0,0001$ ). 24 saatlik tedavi incelendiğinde, CMT-U27 hücrelerinin neredeyse tüm dozlarda benzer seviyede sitotoksik etkisi olduğu gözlemlenmiştir. 48. saatte 24 saatlik tedaviye kıyasla hücresel canlılıklarının yüzdeleri tedavi süresine bağlı olarak benzer oranda azalmıştır. Tedavide 72 saatlik süre sonucunda CMT-U27 hücrelerinin sitotoksik aktiviteleri bağlamında daha iyi sonuçlar elde edilmiş ve 1,56 nM'lık dozdan itibaren artan dozlarda önemli sitotoksik etkiler gözlenmiştir.



**Şekil 4.1.** Vinkristin sülfat tedavisi sonrasında CMT-U27 hücrelerinin canlılığının XTT testiyle elde edilen doza ve zamana göre değişimi. NK, Vinkristin sülfat uygulanmayan, sadece besiyeri ve hücre hattını içeren negatif kontrolü temsil etmektedir. **(a)** 24 saatlik inkübasyon **(b)** 48 saatlik inkübasyon **(c)** 72 saatlik inkübasyon. \*\*\*\* $P < 0,0001$  istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama $\pm$ SD (n=3) olarak sunulmuştur.

Çizelge 4.1’de, vinkristin sülfatın CMT-U27 hücrelerine maruz bırakılması sonucu elde edilen IC<sub>50</sub> dozları yer almaktadır. Tedavinin 24. ve 48. saatinde IC<sub>50</sub> değeri tespit edilememiştir. 72 saatlik tedavide çalışılan doz aralığında önemli sitotoksik etkiler saptanmış olup IC<sub>50</sub> değeri 18 nM’dir.

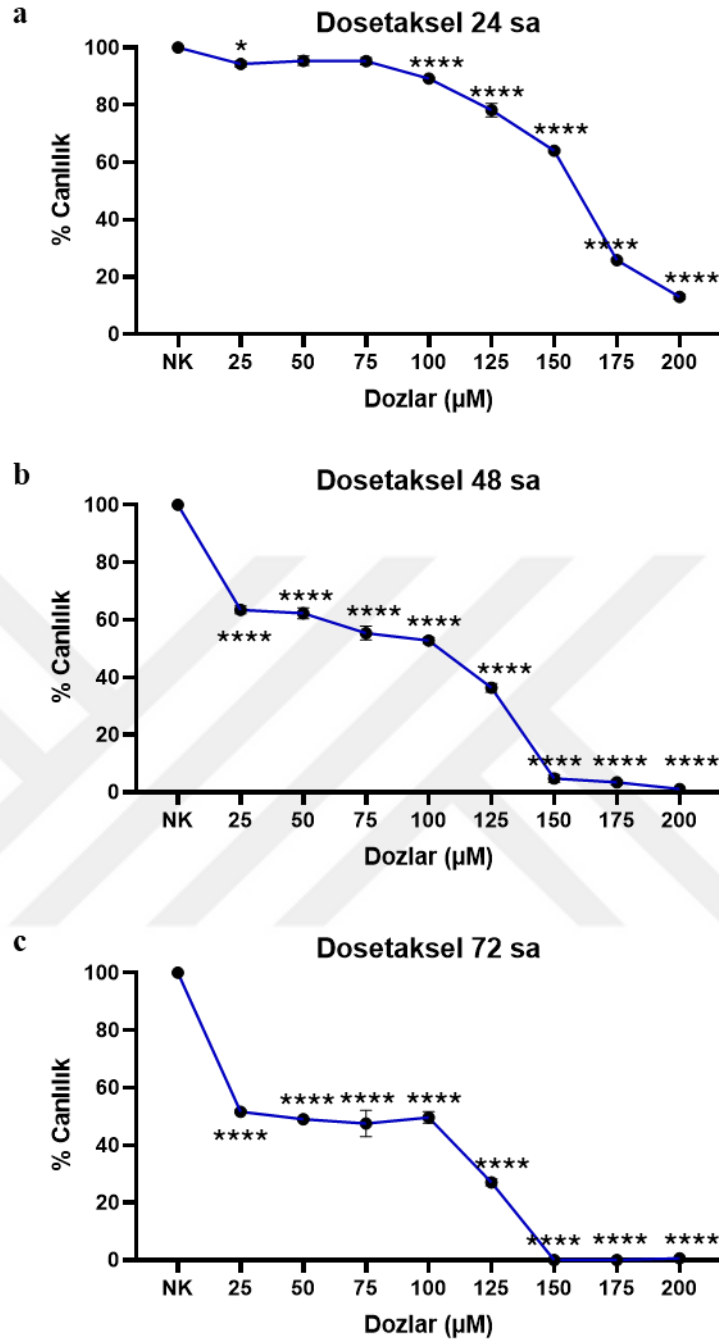
**Çizelge 4.1.** XTT testi sonucu elde edilen vinkristin sülfat IC<sub>50</sub> dozları

| CMT-U27 | IC <sub>50</sub> Dozları (nM) |      |      |
|---------|-------------------------------|------|------|
|         | 24sa                          | 48sa | 72sa |
|         | >100                          | >100 | 18   |

#### **4.1.2. Dosetakselin Sitotoksik Etkisi ile İlgili Bulgular**

##### **4.1.2.1. XTT Hücre Canlılık Testi Bulguları**

Dosetakselin, CMT-U27 hücre hattındaki sitotoksitesini saptamak amacıyla 25 – 200 µM konsantrasyon aralığında dosetaksel hazırlanmıştır. CMT-U27 hücreleri üzerinde dosetakselin zamana ve doza bağlı olarak sistotoksik etkisi Şekil 4.2’de gösterilmiştir. XTT testi sonuçları incelendiğinde, 24 saatlik tedaviye göre 48 ve 72 saatlik tedavide negatif kontrol grubuna karşı hücre canlılığının ciddi anlamda düştüğü gözlenmiştir. 25 -100 µM doz aralığında, tüm tedavi gruplarında sitotoksik etkinin benzer seviyede devam ettiği, 125 µM dozdan itibaren giderek artan dozlarda yüzde canlılık oranının azaldığı belirlenmiştir. 72. saatte 150 µM dozdan itibaren artan dozlarda canlılık tespit edilmemiştir. Çalışmadaki 24, 48 ve 72 saatlik tedavi gruplarında 150-200 µM dozlar arasında en güçlü sitotoksik aktiviteler tespit edilmiştir.



**Şekil 4.2.** CMT-U27 hücrelerinde dosetakselin zamana ve doza bağlı olarak değişimi. NK, dosetaksel uygulanmayan negatif kontroldür. **(a)** 24 saatlik inkübasyon **(b)** 48 saatlik inkübasyon **(c)** 72 saatlik inkübasyon.

\* $P < 0,05$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$  istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama $\pm$ SD (n=3) olarak sunulmuştur.

Çizelge 4.2, dosetaksel tedavisi uygulanan CMT-U27 hücrelerinde XTT canlılık testi sonucunda elde edilen IC<sub>50</sub> dozlarını göstermektedir. Uygulanan 24, 48 ve 72 saatlik tedavi gruplarının üçünde de dosetakselin CMT-U27 hücreleri üzerindeki IC<sub>50</sub> değerleri belirlenmiştir.

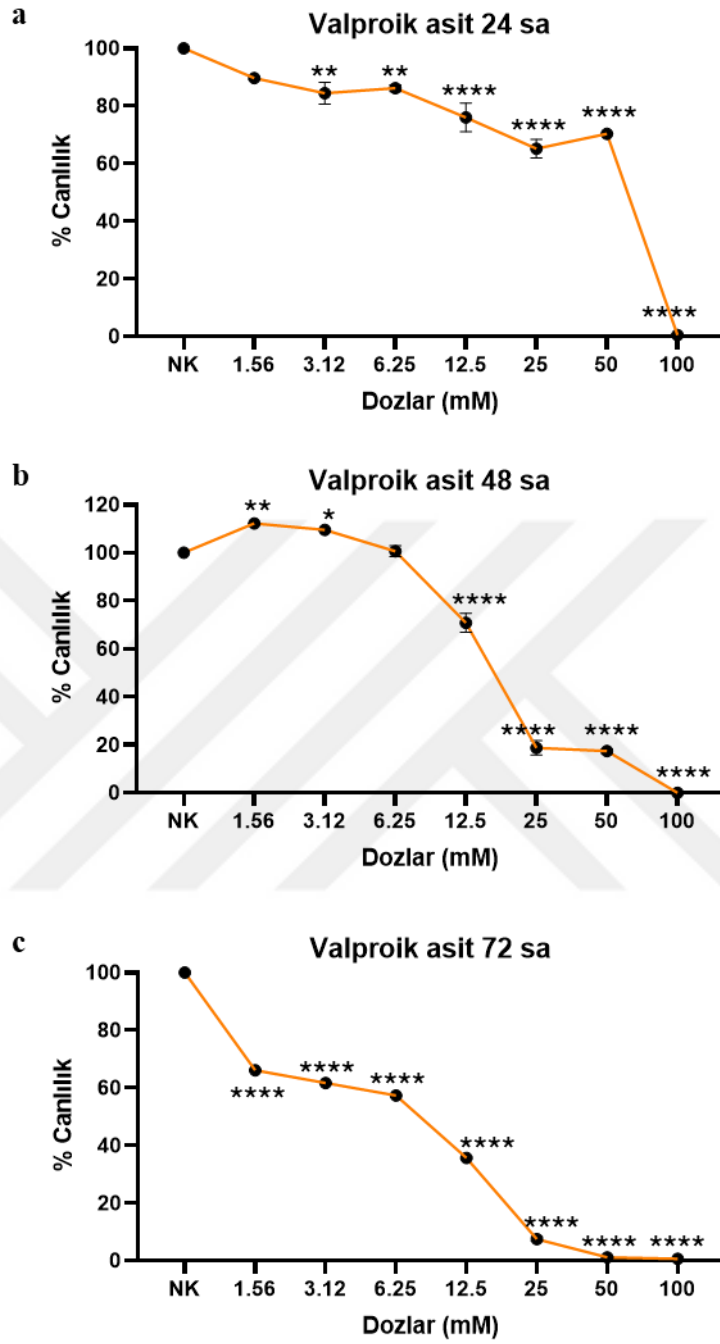
**Çizelge 4.2.** Dosetakselin XTT testi sonucu elde edilen IC<sub>50</sub> dozları

| CMT-U27 | IC <sub>50</sub> Dozları (µM) |        |        |
|---------|-------------------------------|--------|--------|
|         | 24sa                          | 48sa   | 72sa   |
|         | 160,99                        | 116,87 | 110,99 |

#### 4.1.3. Valproik Asitin Sitotoksik Etkisi ile İlgili Bulgular

##### 4.1.3.1. XTT Hücre Canlılık Testi Bulguları

CMT-U27 hücreleri üzerinde VPA'nın sitotoksik aktivitesini saptamak amacıyla 1,56 – 100 mM konsantrasyon aralığında VPA hazırlandı. VPA'nın zamana ve doza bağlı olarak CMT-U27 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi Şekil 4.3'te gösterilmiştir. XTT testi sonuçlarında görüldüğü gibi, 24, 48 ve 72 saatlik tedavi gruplarında sitotoksik etkinin doz artışına paralel olduğu gözlenmiştir. 24 saatlik tedavi grubunda 50 mM'lık doza kadar canlılık yüzdesinin benzer oranda azaldığı ancak 50 mM'lık dozdan sonra keskin bir şekilde düştüğü ve 100 mM'lık dozda yüzde canlılık oranının sıfırlandığı gözlenmiştir. 48. saatte, VPA'nın bazı dozlarında negatif kontrole göre yüksek canlılık yüzdesi elde edilmiştir. Bu, VPA'nın doza ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonuna değişen oranlarda etki gösterdiği şeklinde ifade edilebilir. 72 saatlik tedavinin ardından 25 mM'lık dozdan itibaren artan dozlarda canlılık %10'un altına kadar düşmüştür. Özellikle, 100 mM'lık VPA dozunun tüm tedavi gruplarında hücreleri öldürdüğü gözlenmiştir.



**Şekil 4.3.** Valproik asidin CMT-U27 hücreleri üzerinde doza ve zaman bağlı değişimi. NK, valproik asit uygulanmayan negatif kontrol grubunu temsil etmektedir. **(a)** 24 saatlik inkübasyon **(b)** 48 saatlik inkübasyon **(c)** 72 saatlik inkübasyon. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$  istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama $\pm$ SD (n=3) olarak sunulmuştur.

VPA'nın CMT-U27 hücreleri üzerinde sitotoksik aktivitesini belirlemek için uygulanan XTT testi sonucu elde edilen IC<sub>50</sub> dozları Çizelge 4.3'te verilmiştir. Tedavi grubunda yer alan 24, 48 ve 72 saatlik süreçlerin hepsinde IC<sub>50</sub> dozları hesaplanmıştır.

**Çizelge 4.3.** Valproik asidin XTT testi sonucu elde edilen IC<sub>50</sub> dozları

| CMT-U27 | IC <sub>50</sub> Dozları (mM) |       |       |
|---------|-------------------------------|-------|-------|
|         | 24sa                          | 48sa  | 72sa  |
|         | 66,69                         | 16,84 | 11,77 |

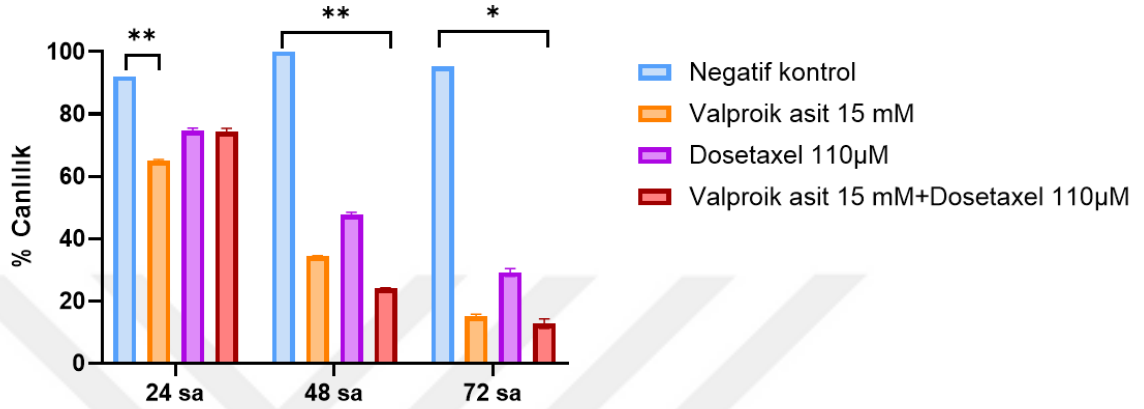
#### 4.1.4. Kombinasyon Analizleri ile İlgili Bulgular

Dosetaksel ile VPA'nın, VPA ile vinkristin sülfatın ve dosetaksel, VPA ve vinkristin sülfat kombinasyonlarının CMT-U27 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri XTT canlılık testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Kombinasyon tedavisinde, dosetaksel, VPA ve vinkristin sülfat için XTT testi ile belirlenen IC<sub>50</sub> dozları 1:1 oranda dilüe edilerek kombinasyon dozları hazırlanmıştır. 24, 48 ve 72 saat olarak belirlenen tedavi süreci sonrası kombine etkiler, VPA, dosetaksel ve vinkristin sülfatın bireysel etkisinin incelendiği sitotoksik etkiler ile kıyaslanmıştır.

##### 4.1.4.1. VPA ile Dosetaksel Kombinasyonunun XTT Testi Bulguları

Dosetaksel ve VPA kombinasyonu uygulaması, iki kemoterapötik ajanın bireysel etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan XTT testi ile hesaplanan IC<sub>50</sub> dozları olan 110 µM ve 15 mM ile hazırlanmıştır. Şekil 4.4'te verildiği gibi kombine etki 24, 48 ve 72 saatlik tedavi süreçlerinde takip edilmiştir. Negatif kontrol grubuna göre tüm tedavi gruplarında canlılık yüzdeleri düşük bulunmuştur. 24. saatte, VPA'ya maruz kalan CMT-U27 hücrelerinin yüzde canlılığı, dosetaksele ve kombine etkiye tabi tutulmamış olan negatif kontrol hücrelere göre oldukça düşüktür ( $P<0.01$ ). Bireysel etkileri ile karşılaştırıldığında ilk 24 saatlik tedavide sadece dosetaksel ve kombine grubunun yüzde canlılığının negatif kontrole göre düşük olduğu ancak istatistiksel fark olamadığı tespit edilmiştir ( $P>0.05$ ). Ancak 24 saatin aksine 48 ve 72 saatlik tedavide kombine etki bireysel etkilere göre düşüktür. Aynı zamanda her iki zaman diliminde de ikili

kombinasyonun yüzde canlılık bakımından etkisinin negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. 48. saate gelindiğinde tedavi gruplarının canlılıklarının kayda değer ölçüde azaldığı, tüm grupların canlılığının %50'nin altında olduğu tespit edilmiştir. 72 saatin sonunda meydana gelen kombine etkinin CMT-U27 hücreleri üzerinde yüksek düzeyde sitotoksik olarak etkili olduğu gözlenmiştir.



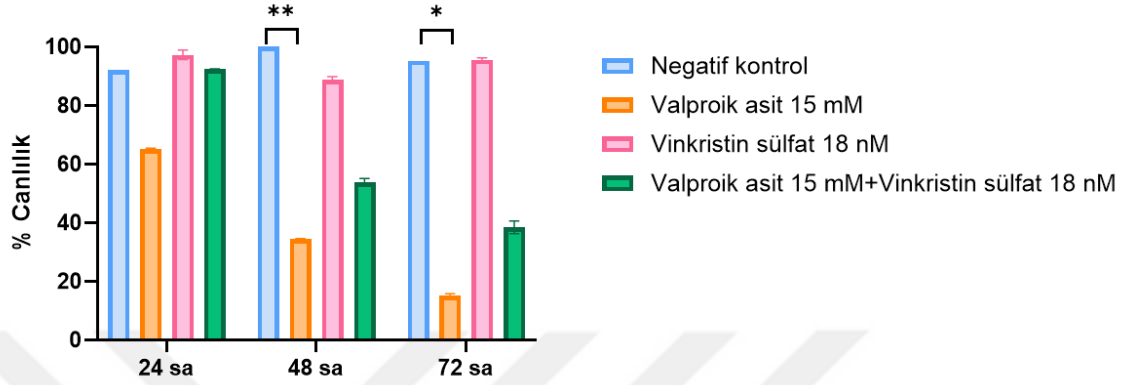
**Şekil 4.4.** CMT-U27 hücrelerine uygulanan dosetaksel ve valproik asit kombinasyonunun 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanması sonrası XTT testi ile elde edilen hücre canlılığı verileri. NK, dosetaksel ve valproik asit uygulanmayan kontrol grubudur. Kruskal-Wallis testi sonuçları gösterilmektedir.

\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama $\pm$ SD (n=3) olarak sunulmuştur.

#### 4.1.4.2. VPA ile Vinkristin Sülfat Kombinasyonunun XTT Testi Bulguları

VPA ile vinkristin sülfat kombinasyonu, iki bileşenin XTT testi ile belirlenen  $IC_{50}$  dozları olan, sırasıyla, 15 mM ve 18 nM olacak şekilde hazırlanarak uygulanmıştır. Şekil 4.5, 24, 48 ve 72 saatlik tedavi süreçlerinde kombine etkileri göstermektedir. 24 ve 72. saatlerde vinkristin sülfata karşı CMT-U27 hücrelerinin, negatif kontrol grubuna göre daha yüksek yüzde canlılığa sahip olduğu gözlemlenmiştir. Buna karşın, VPA'nın negatif kontrol grubuna kıyasla süreç ilerledikçe yüzde canlılığın oldukça azaldığı tedavi grubu olduğu belirlenmiştir. VPA'nın etkisi hem 48. saat ( $P < 0.01$ ) hem de 72. saat ( $P < 0.05$ ) için negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır. VPA ve vinkristin sülfat kombinasyonu incelendiğinde, ilk 24 saatteki yüzde canlılık VPA'nın bireysel etkisine göre oldukça yüksektir. Buna göre, ilk 24 saatte bu kombinasyon grubunda vinkristin sülfatın VPA'nın etkisini zayıflattığı söylenebilir. Ancak 48 ve 72. saatler incelendiğinde VPA'nın etkisinin arttığı gözlenmiştir. Bunun sebebinin iki

kemoterapötik ajanın interaksiyonundan kaynaklandığı (potansiyel bir erken antagonistik etki) söylenebilir. Hem VPA'nın bireysel etkisinde hem de üçlü kombinasyonda çok net bir doz yanıtı görülmektedir.



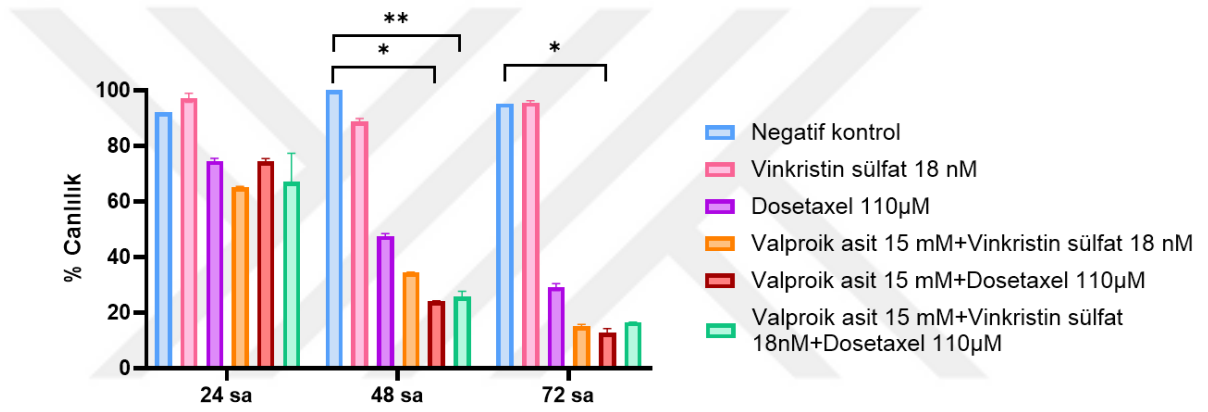
**Şekil 4.5.** Valproik asit ve vinkristin sülfat kombinasyonu uygulanan CMT-U27 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat sonrası XTT testi ile elde edilen hücre canlılığı verileri. NK, sadece besiyeri içeren CMT-U27 hücreleridir. Kruskal-Wallis testi sonuçları gösterilmektedir.

\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama $\pm$ SD (n=3) olarak sunulmuştur.

#### 4.1.4.3. VPA, Vinkristin Sülfat ve Dosetaksel Kombinasyonunun XTT Testi Bulguları

İlaçların kombine etkisini araştırmak amacıyla, üçlü kombinasyon her bir bileşenin XTT testi sonucu elde edilen  $IC_{50}$  dozu olan VPA 15 mM, vinkristin sülfat 18 nM ve dosetaksel 110  $\mu$ M olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu kombinasyonun sitotoksik aktivitesi 24, 48 ve 72 saatlik tedavi süreçlerinde takip edilmiştir. Tedavinin ilk 24 saatinde, vinkristin sülfatın yüzde canlılığının diğer bileşenlere göre yüksek olduğu belirlenmiştir. İlk 24 saat için yüzde canlılık değerlerinde herhangi bir istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir ( $P > 0.05$ ). Başlangıçta, üçlü kombinasyon grubundaki canlılık yüzdesinin, VPA'nın canlılık yüzdesi ile benzer seviyede olduğu gözlenmiştir. Süreç ilerlediğinde, 48. saat için üçlü kombinasyonun daha etkili olduğu; 72. saatte ise üçlü kombinasyon ile VPA'nın yine benzer bir etki gösterdiği görülmektedir. 48. saat için, VPA'nın dosetaksel ile ikili kombinasyonunun ( $P < 0.05$ ) ve üçlü kombinasyonun etkisinin ( $P < 0.01$ ) istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6).

Tüm zaman dilimlerinde, vinkristin sülfat negatif kontrole benzer canlılık yüzdeleri göstermiştir. VPA + dosetaksel kombinasyon grubundaki yüzde canlılık, 72. saatte negatif kontrole göre oldukça düşüktür ( $P<0,01$ ). Bunun sebebi, VPA ile dosetakselin kombine etkisinin oldukça sitotoksik olmasıdır. 72. saatte, üçlü kombinasyon grubunun yüzde canlılığının dosetaksel ile VPA'nın yüzde canlılığının arasında ve VPA + vinkristin kombinasyonuna yakın olduğu gözlenmiştir. Sadece vinkristin sülfat uygulaması dışındaki tüm deneysel grupların etkisinin zamana bağlı olarak çok net bir şekilde arttığı görülmektedir (Şekil 4.6). Sonuç olarak, üçlü kombinasyon grubundaki bileşenlerin farklı süreçlerde, değişen oranlarda sinerjistik etki gösterdiği söylenebilir.



**Şekil 4.6.** Valproik asit, vinkristin sülfat ve dosetaksel üçlü kombinasyonu sonucu CMT-U27 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat sonrası XTT testi ile elde edilen hücre canlılığı verileri. NK, sadece besiyeri içeren CMT-U27 hücreleridir. Kruskal-Wallis testi sonuçları gösterilmektedir.

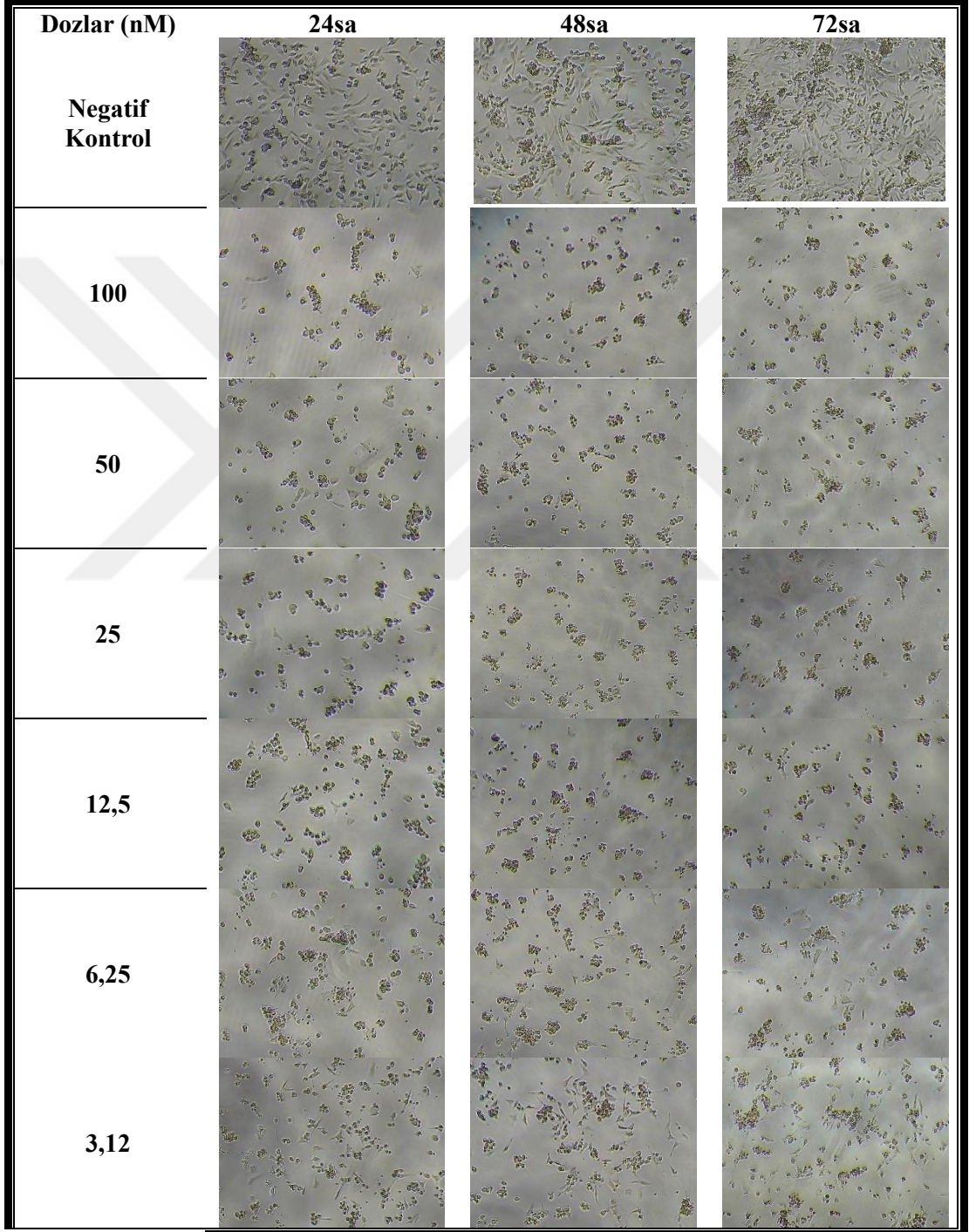
\* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$  istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama $\pm$ SD (n=3) olarak sunulmuştur.

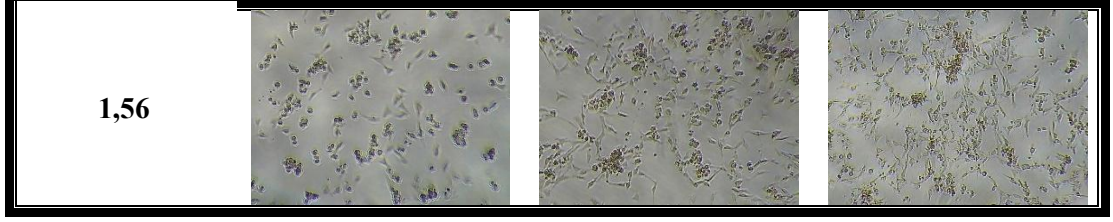
#### 4.2. Hücre Morfolojisi Değişikliklerine Ait Bulgular

Vinkristin sülfatın, dosetakselin, VPA'nın ve kombinasyon gruplarının CMT-U27 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik tedavi süresince neden olduğu morfolojik değişimler inverted mikroskop kullanılarak (10x) görüntülenmiş ve XTT testi uygulanmadan önce fotoğrafları kaydedilmiştir. Sonuçlar, negatif kontrol ile karşılaştırılmıştır. Vinkristin sülfat, dosetaksel ve VPA'nın 24, 48 ve 72. saatte elde edilen sitotoksik aktiviteleri, fotoğraflarla da desteklenmiştir.

#### 4.2.1. Vinkristin Sülfatın CMT-U27 Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisi

Vinkristin sülfatın, CMT-U27 hücreleri üzerine morfolojik etkileri Şekil 4.7’de verilmiştir. Zamana ve doza bağlı olarak CMT-U27 hücrelerinin canlılıklarını büyük oranda kaybettiği, hücresel yapılarının yuvarlak ve küçük hale gelmesinden anlaşılmaktadır.

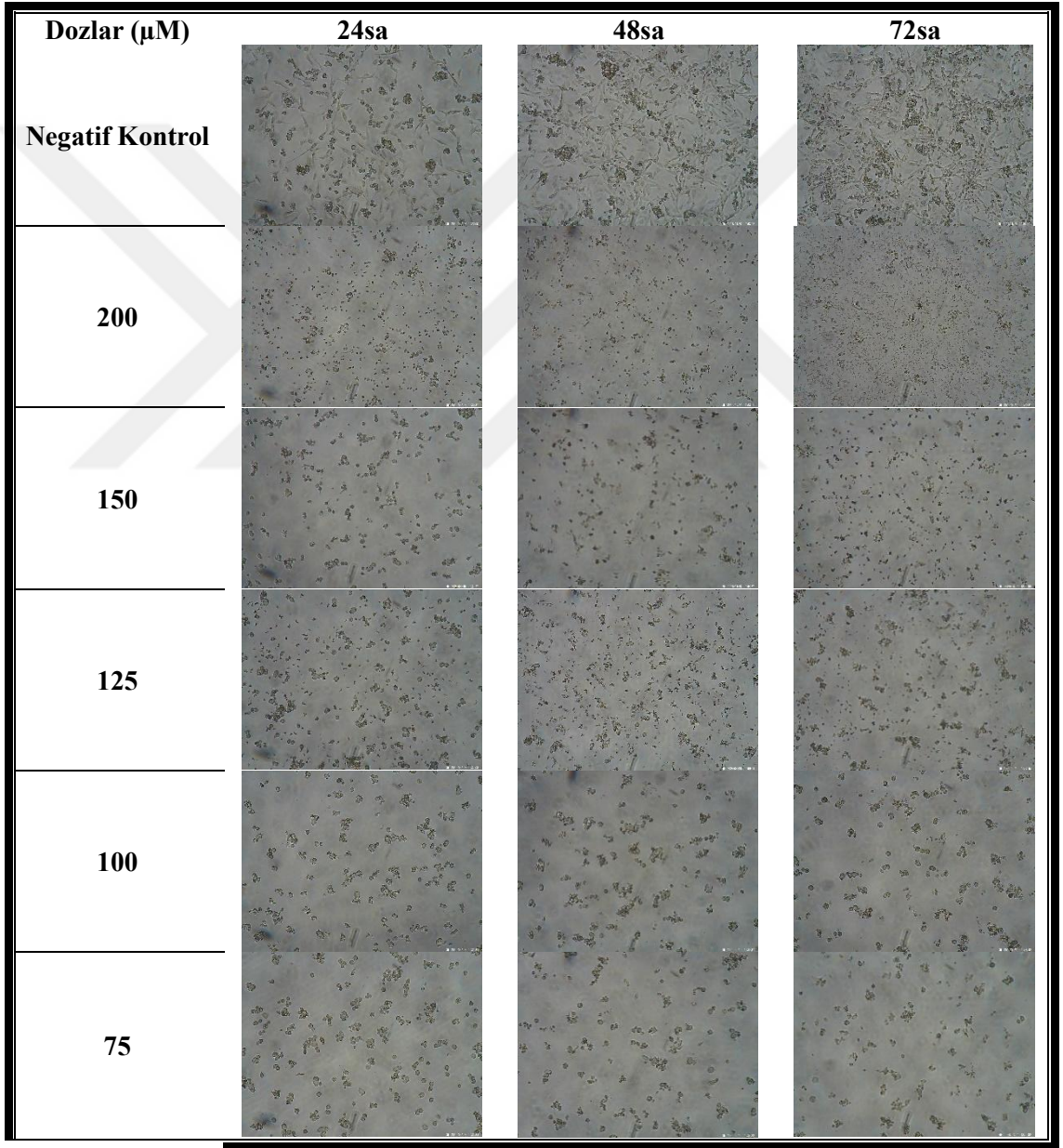




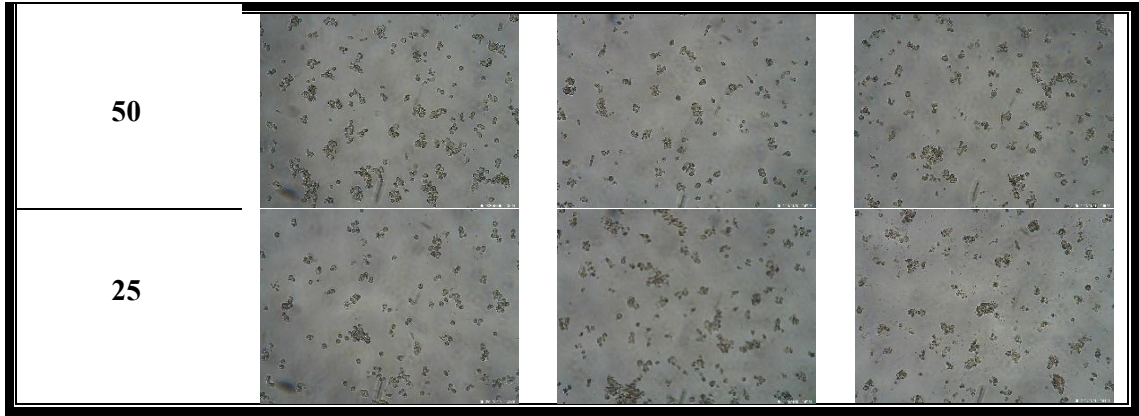
**Şekil 4.7.** Vinkristin sülfatın, köpek meme karsinomu (CMT-U27 hücre hattı) hücreleri üzerine morfolojik etkileri.

#### 4.2.2. Dosetakselin CMT-U27 Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisi

Şekil 4.8, dosetakselin CMT-U27 hücreleri üzerindeki morfolojik etkisini göstermektedir. Doz miktarı ve süreç arttıkça hücrelerde meydana gelen değişiklikler kaydedilmiştir. Dosetakselin doz yükseldikçe etkisinin arttığı hücrelerin membran bütünlüğünün bozulduğu görüntülenen alanlardaki hücre artıklarından anlaşılmaktadır. Özellikle, en yüksek iki dozu olan 150  $\mu\text{M}$  ve 200  $\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonlarda hücrelerin adezyon yeteneğini kaybettiği CMT-U27 hücrelerinin besiyeri içinde yüzdüğü gözlenmiştir.



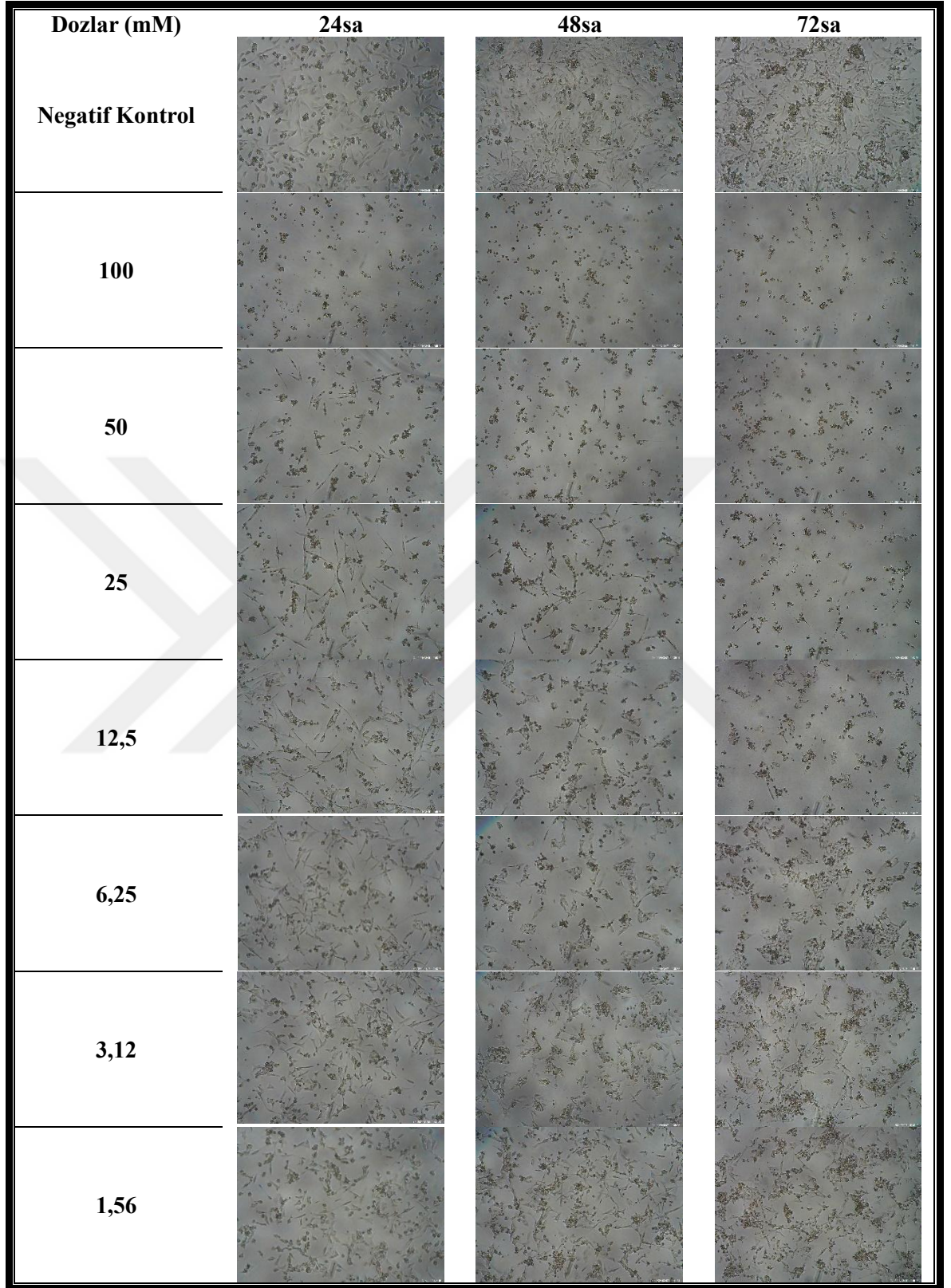
**Şekil 4.8.** Dosetakselin, köpek meme karsinomu (CMT-U27 hücre hattı) hücreleri üzerine morfolojik etkileri



**Şekil 4.8.** Dosetakselin, köpek meme karsinomu (CMT-U27 hücre hattı) hücreleri üzerine morfolojik etkileri. (devam)

#### 4.2.3. Valproik Asitin CMT-U27 Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisi

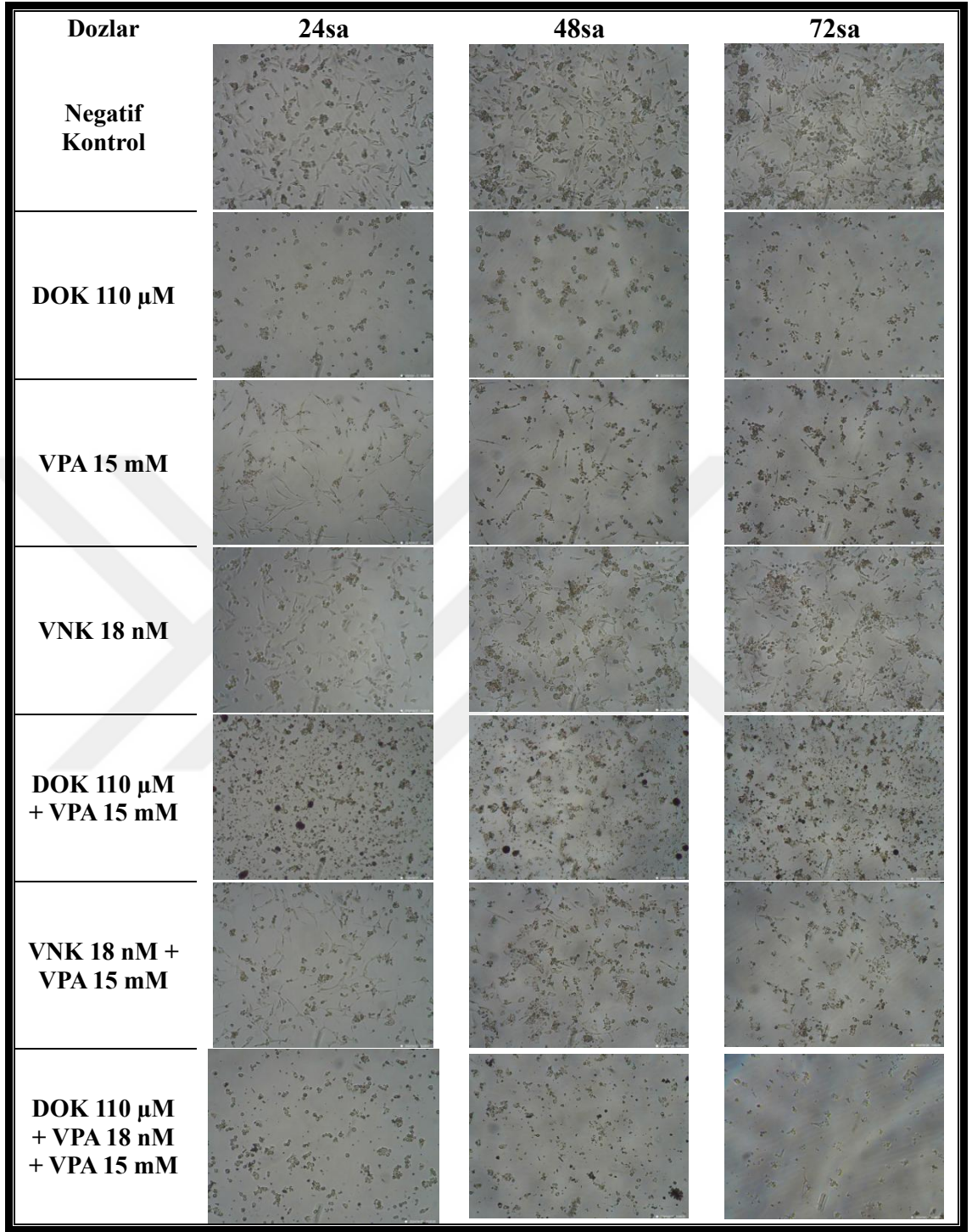
CMT-U27 hücreleri üzerine VPA'nın morfolojik etkisi Şekil 4.9'da yer almaktadır. Şekil 4.9'dan anlaşılabileceği üzere, VPA tedavisinin köpek meme karsinomu (CMT-U27 hücre hattı) hücreleri üzerinde doz ve zaman bağımlı morfolojik değişikliklere yol açtığı görülmektedir. Negatif kontrolde, hücreler düzenli morfolojilerini korurken, yoğunlukları yüksek ve sağlıklı bir görünümündedir. Artan dozlarda, hücrelerde küçülme, yuvarlaklaşma ve yapışkanlığın azalması gibi apoptoza özgü değişiklikler belirgin hale gelmiştir. Daha uzun süreli inkübasyonlarda, morfolojik bozulmalar daha yaygın olup hücre ölümünün arttığı izlenmiştir. Bu veriler, VPA'nın hücre morfolojisi üzerindeki etkilerinin hem konsantrasyon hem de süreye bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Yüksek dozlar ve uzun inkübasyon süreleri, hücrelerin apoptoza yönlendirildiğini ve proliferasyonlarının engellendiğini düşündürmektedir. Bu durum, VPA'nın kanser tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olarak kullanılabilirliğini destekler niteliktedir.



**Şekil 4.9.** Valproik asitin, köpek meme karsinomu (CMT-U27 hücre hattı) hücreleri üzerine morfolojik etkileri.

#### 4.2.4. Kombinasyonların CMT-U27 Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada, vinkristin sülfatın, dosetakselin ve VPA'nın bireysel etkileri yanında kombine etkilerinin de CMT-U27 hücreleri üzerinde morfolojik etkileri de araştırılmıştır. Bu bağlamda, vinkristin sülfat ile VPA, dosetaksel ile VPA ve vinkristin sülfat, dosetaksel, VPA kombinasyonları hazırlanmıştır. Kemoterapötik ajanların IC<sub>50</sub> dozlarının bireysel olarak CMT-U27 hücrelerine etkisi incelendiğinde, morfolojik olarak da ölü ve canlı hücreler gözlenmiştir. Kombine etkilerde ise, dosetaksel ve VPA kombinasyonunun, XTT testi sonucunu destekler nitelikte olduğu belirlenmiştir. Dosetaksel ve VPA kombinasyonunda, hücrelerin ölüm yüzdesinin fazla olduğu, süreç arttıkça hücre artıklarının arttığı gözlenmiştir. Vinkristin sülfat ve VPA kombinasyonunda, VPA'nın vinkristin sülfatın etkisini baskıladığı hücre morfolojilerindeki farklılıktan anlaşılmaktadır. Üçlü kombinasyon incelendiğinde, üç tedavi grubunda da canlılıkların büyük oranda kaybedildiği hücre morfolojileri ile belirlenmiştir. 72. saatte canlı hücrelerde dikkate değer değişiklik olduğu belirgindir (Şekil 4.10).

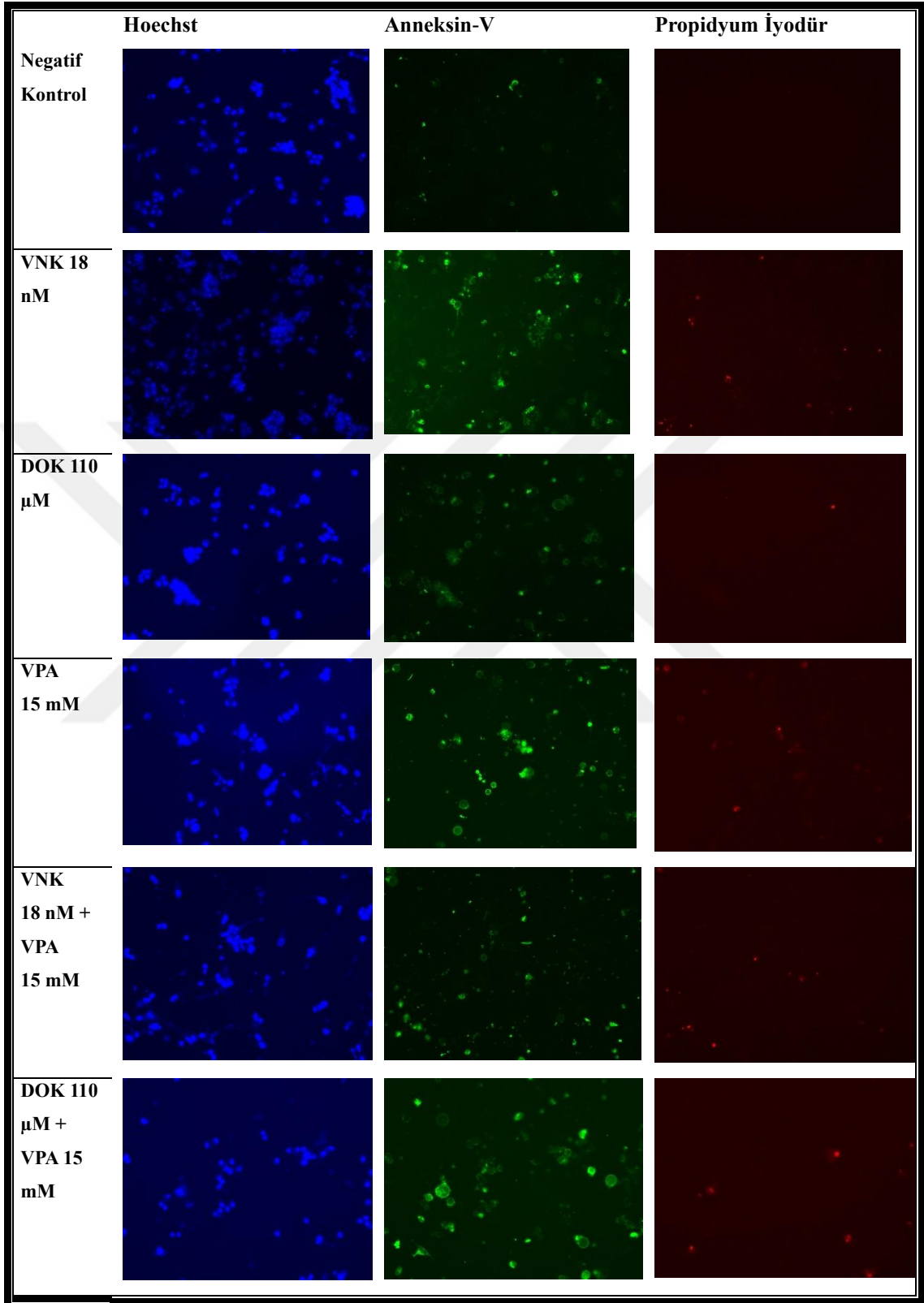


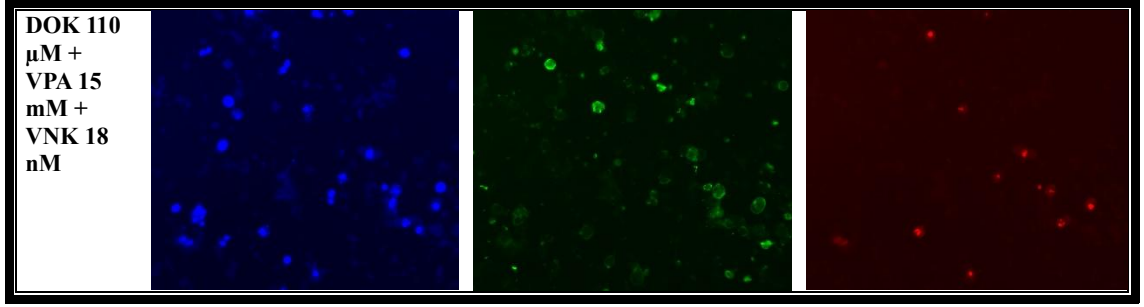
**Şekil 4.10.** Valproik asitin (VPA), vinkristin sülfat (VNK) ve dosetaksel (DOK) üçlü kombinasyonunun köpek meme kansinomu (CMT-U27 hücre hattı) hücreleri morfolojisi üzerine etkileri.

### 4.3. Floresan Mikroskopunda Hücre Ölüm Modunun Belirlenmesi ile İlgili Bulgular

XTT hücre canlılık testi sonuçlarına göre, hücre ölüm modunun değerlendirilmesi için floresan mikroskobu ile üçlü boyama yöntemi (Hoechst 33342, Annexin V ve PI) uygulanmıştır. Vinkristin sülfat, dosetaksel ve VPA'nın bireysel ve kombine etkileri için tespit edilen IC<sub>50</sub> dozları ile 16 saat muamele edilen CMT-U27 hücrelerinin, nükleus yapıları ve membran bütünlükleri negatif kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır.

Şekil 4.11'de sunulduğu şekilde, CMT-U27 hücrelerinin negatif kontrol grubunun yuvarlak nükleus morfolojisine sahip olduğu gözlenmiştir. Vinkristin sülfat, dosetaksel, VPA ve kombinasyonlarının tedavi ettiği CMT-U27 hücrelerinde ise, geç apoptotik ve nekrotik hücreler ve apoptoza özgü morfolojik değişiklikler saptanmıştır. Membran bütünlüklerini kaybeden hücreler PI boyasının hücre içine girmesi ile boyanır ve nükleusları kırmızı renkte görünür. Bu sebeple, XTT testi ile belirlenen IC<sub>50</sub> dozlarının özellikle kombine etkilerinin CMT-U27 hücrelerinde apoptotik/sekonder nekrotik hücre ölüm modunun etkin olduğu gözlenmektedir. Bireysel ve kombine etkiler karşılaştırıldığında; vinkristin sülfat ve VPA kombinasyon grubuna kıyasla vinkristin sülfat ve VPA'nın bireysel etkilerinde daha fazla hücrenin PI boyasıyla boyandığı gözlenmiştir. Bunun aksine, dosetaksel ve VPA kombinasyon grubunun bireysel etkilerine göre daha fazla hücrenin PI boyasıyla boyandığı saptanmıştır. Üçlü kombinasyon grubuna ait verilerin (Vinkristin sülfat, dosetaksel ve VPA) hem sitotoksosite sonuçlarını hem morfolojik değişimleri destekler nitelikte olduğu belirlenmiştir. Özetle; tüm test bileşiklerinin tedavi sonrası CMT-U27 hücrelerinde gözlenen hücre ölüm şekli için genel olarak geç apoptotik/nekrotik hücreler olduğu anlaşılmaktadır.





**Şekil 4.11.** Vinkristin sülfat (VNK), dosetaksel (DOK) ve valproik asit (VPA) ile kombinasyon gruplarının köpek meme karsinomu (CMT-U27) hücreleri üzerinde floresan mikroskopunda üçlü boyama, Hoechst 33342 (mavi), Annexin-V-FITC (yeşil) ve PI (kırmızı), görüntüleri. Negatif kontrol, sadece besiyeri içeren CMT-U27 hücrelerini ifade etmektedir. Büyütme 200X. (devam)

#### 4.4. Gen Ekspresyonu Analizi ile İlgili Bulgular

Bu tez çalışmasında, VPA, vinkristin sülfat ve dosetaksel ile 18 saat tedavi sonrası köpek meme karsinomu (CMT-U27) hücrelerinde aktive olan ölüm modunun (nekroz, apoptoz, otofaji) mRNA düzeyinde belirlenmesi için kantitatif gerçek zamanlı PCR analizi uygulanmıştır. Hücre ölüm yollarında çok önemli roller oynayan genler seçilerek, bu genlerin ekspresyonları “housekeeping” genler olan *GAPDH* ve *ACTB* ile rölatif olarak değerlendirilmiştir. Bu bağlamda, *BCL-2*, *NOXA*, Myeloid Hücre Lösemisi 1 (Myeloid Cell Leukemia 1: *MCL-1*), *BAX*, BH3 etkileşimli domain ölüm agonisti (BH3-interacting domain death agonist: *BID*), *PUMA*, Ataksi-telenjektazi Mutasyonu (Ataxia-Telangiectasia Mutation: *ATM*), Kaspaz 3 (Caspase 3: *CASP3*), *P53*, and *P21* genlerinin ekspresyon profilleri değerlendirilmiştir. Kantitatif gerçek zamanlı PCR uygulaması için izole edilen RNA’ların saflıkları (260/280) ve miktarları (ng/μl) Çizelge 4.4’te gösterilmektedir.

**Çizelge 4.4.** RNA izolasyonu sonucu Nanodrop ölçümleri

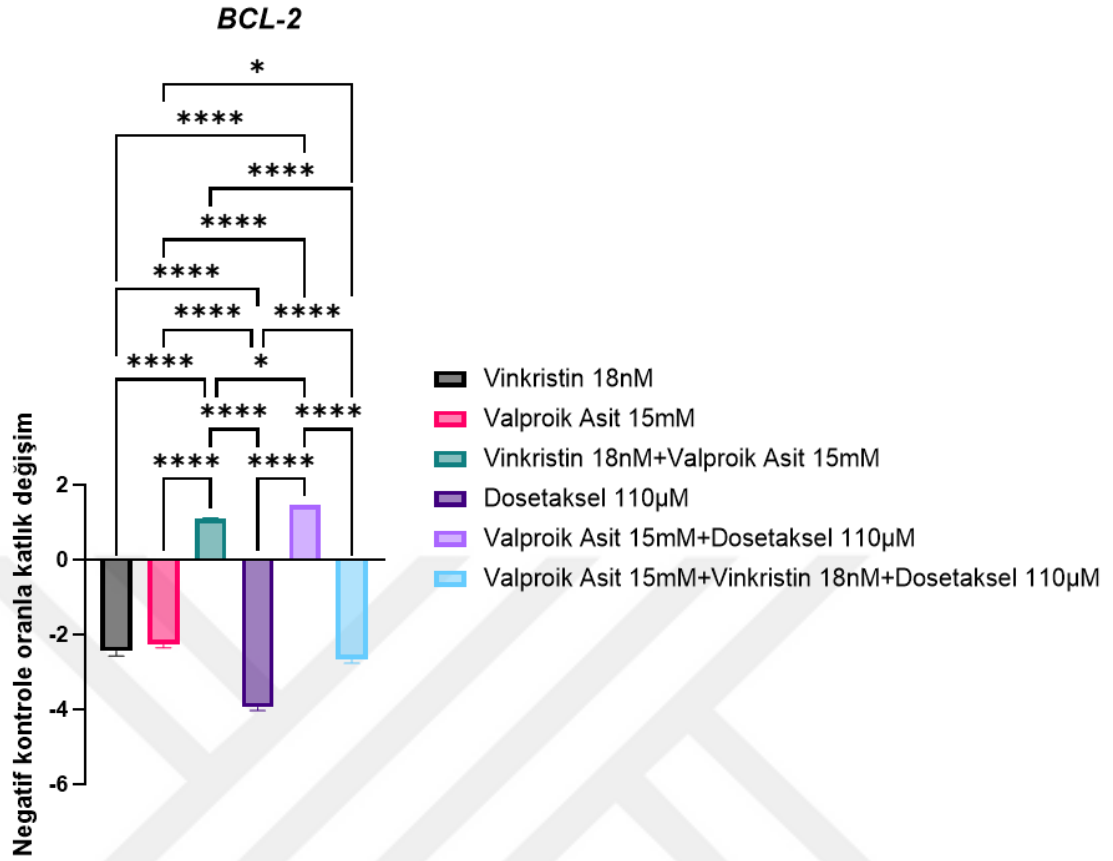
| Test Bileşikleri                                               | Konsantrasyon<br>(ng/μl) | Saflık<br>(260/280)* |
|----------------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------|
| Negatif Kontrol                                                | 293,7                    | 2,10                 |
| Vinkristin 18 nM                                               | 113,7                    | 2,23                 |
| Dosetaksiel 110 μM                                             | 97,0                     | 2,09                 |
| Valproik Asit 15 mM                                            | 142,2                    | 2,08                 |
| Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM                         | 109,8                    | 2,11                 |
| Dosetaksiel 110 μM + Valproik Asit 15 mM                       | 50,6                     | 2,11                 |
| Dosetaksiel 110 μM + Valproik Asit 15 mM<br>+ Vinkristin 18 nM | 66,7                     | 2,10                 |

\*RNA örnekleri için, Nanodrop 260/280 absorbands oranı genellikle 2.0 civarında olmalıdır. Bu değerin 2.0 civarında (2.0-2.1) olması durumunda, RNA örneği oldukça saf kabul edilir. 1.8-2.0 arası, kabul edilebilir bir saflık aralığıdır ancak hafif protein kontaminasyonu olabilir. Bu değerin 1.8'in altında olması, protein veya diğer moleküllerin RNA örneğinde mevcut olduğunu gösterebilir.

Apoptozis mekanizmalarını baskılayan önemli bir anti-apoptotik gen olan *BCL-2*'nin ekspresyonundaki azalma, kanser hücrelerinin kemoterapiye daha duyarlı hâle gelmesine katkıda bulunabilir. Şekil 4.12, köpek meme kanseri hücre hattında farklı tedavi koşullarının *BCL-2* gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimleri göstermektedir. Yalnızca vinkristin ve VPA uygulanan hücrelerde, *BCL-2* ifadesinde belirgin bir aşağı regülasyon gözlenmiştir. Bu iki ilacın etkisinin birbirinden istatistiksel olarak farklı olmadığı belirlenmiştir. VPA'nın vinkristin ve dosetaksiel ile her iki kombinasyonunda da *BCL-2* geni ekspresyonunun yukarı regülasyon gösterdiği görülmüştür. Ancak, üçlü kombinasyon (dosetaksiel 110 μM+ VPA 15 mM + vinkristin 18 nM) ile tedavi sonrasında *BCL-2* gen ekspresyonun dikkat çekici bir şekilde aşağı regüle olduğu belirlenmiştir. Bu durum, üçlü kombinasyonun beklendiği şekilde kanser hücrelerinde apoptotik yanıtı artırmaya yönelik etkili olabileceğini göstermiştir. *BCL-2* proteini, anti-apoptotik rolüyle hücreyi ölüm sinyallerine karşı dirençli hâle getirir. Bu nedenle, *BCL-2* seviyesinin kontrol grubuna göre düşmesi, kombinasyonun hücreyi birçok yönden baskılayarak güçlü bir pro-apoptotik ortam yaratmakta olduğunu ve hücreyi hayatta kalma sinyallerinden mahrum bırakarak apoptozisi tetikleme yönünde

etkili olduğuna işaret eder. Burada dikkat çekici bir diğer bulgu ise, tek başına dosetaksel (110  $\mu$ M) uygulamasının *BCL-2* ekspresyonunu en belirgin şekilde azaltmış olmasıdır (Şekil 4.12). Genel olarak elde edilen bu veriler, vinkristin, dosetaksel ve VPA'nın tekli veya üçlü kombine kullanımının *BCL-2* ekspresyonu üzerinde dikkat çekici düşümlere yol açtığını göstermiştir. İkili kombinasyonlarda (VPA + vinkristin ve VPA + dosetaksel) görülen yukarı regülasyonun aksine üçlü kombinasyondaki belirgin aşağı regülasyon, kemoterapi dinamiklerinin ne kadar karmaşık olabileceğinin güzel bir örneğidir.

Üçlü kombinasyondaki belirgin aşağı regülasyon, tedavinin hücre için çok daha yoğun ve eşzamanlı bir “ölüm sinyali” oluşturmaktan kaynaklanıyor olabilir. İkili kombinasyonlarda (VPA + vinkristin ve VPA + dosetaksel), VPA'nın epigenetik etkileri bazı hücrel koruma veya adaptasyon mekanizmalarını kısmen yukarı regüle edip hücre ölüm sinyallerine karşı bir direnç geliştirmeye çalışıyor olabilir. Üç ajanın birlikte kullanılmasıyla (üç farklı mekanizmanın aynı anda devreye girmesi), bu hücrel savunma mekanizmalarının üstesinden gelinerek *BCL-2*'de belirgin bir aşağı regülasyon sağlanması mümkün hâle gelmiş olabilir. Ancak bunun doğrulanabilmesi için farklı yolların da ele alındığı daha kapsamlı genetik analizlere ihtiyaç vardır (Şekil 4.12).



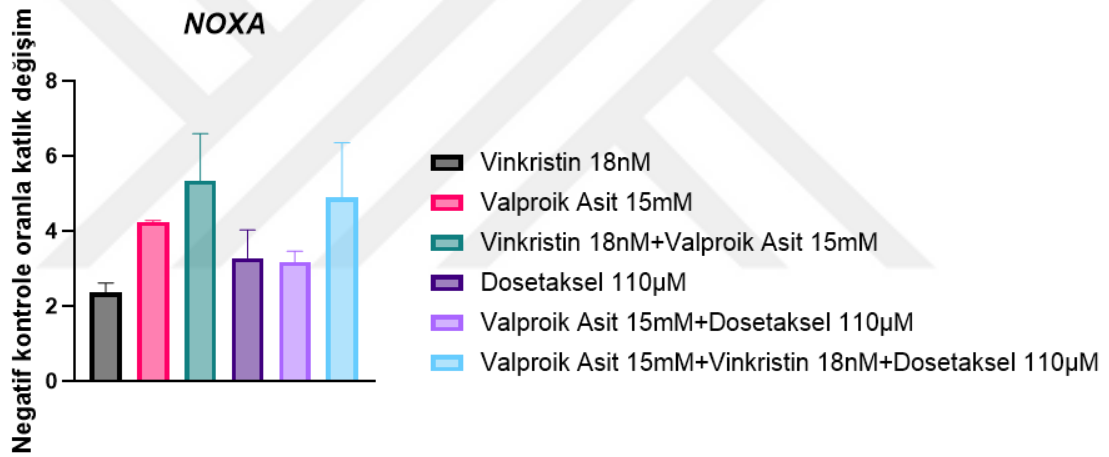
**Şekil 4.12.** Köpek meme kansinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında *BCL-2* gen ekspresyon profillerindeki değişim.

\* $P < 0,05$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$  istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama  $\pm$  SD (n=3) olarak sunulmuştur.

Köpek meme kansinomu (CMT-U27) hücrelerinde, VPA, vinkristin ve dosetaksel ile bu kemoterapötiklerin kombinasyonlarının uygulamasının *NOXA* gen ekspresyonu profillerinde önemli değişiklikler yarattığı ancak bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ( $P > 0.05$ ). Bu bağlamda, yalnızca vinkristin sülfat (18 nM) uygulanan hücrelerde, *NOXA* ifadesinde orta düzeyde bir artış gözlenmiştir. Vinkristinin mikrotübül dinamiklerini bozarak hücre içi stres yanıtını tetiklemesi, pro-apoptotik genlerden biri olan *NOXA*'nın transkripsiyonunu belirgin biçimde artırabilir. Buna karşın tek başına VPA uygulanan ikinci koşulda, *NOXA* ekspresyonu yüksek değerlere ulaşmıştır. Bu sonuç, VPA'nın HDAC inhibisyonu sayesinde epigenetik düzeyde *NOXA* transkripsiyonunu güçlü biçimde indükleyebildiğini ortaya

koymaktadır. Üçüncü koşulda vinkristin ve VPA'nın birlikte uygulanması, tek başına her iki ajanın yarattığı artışlara kıyasla *NOXA* ifadesinde görece daha etkin bir yükselmeye neden olmuştur. Bu bulgu, vinkristin ve VPA'nın sinerjik etkisini göstermiştir. Dördüncü koşulda tek başına ve VPA ile birlikte dosetaksel uygulandığında, *NOXA* ekspresyonu sınırlı bir yükselme göstermiştir (Şekil 4.13).

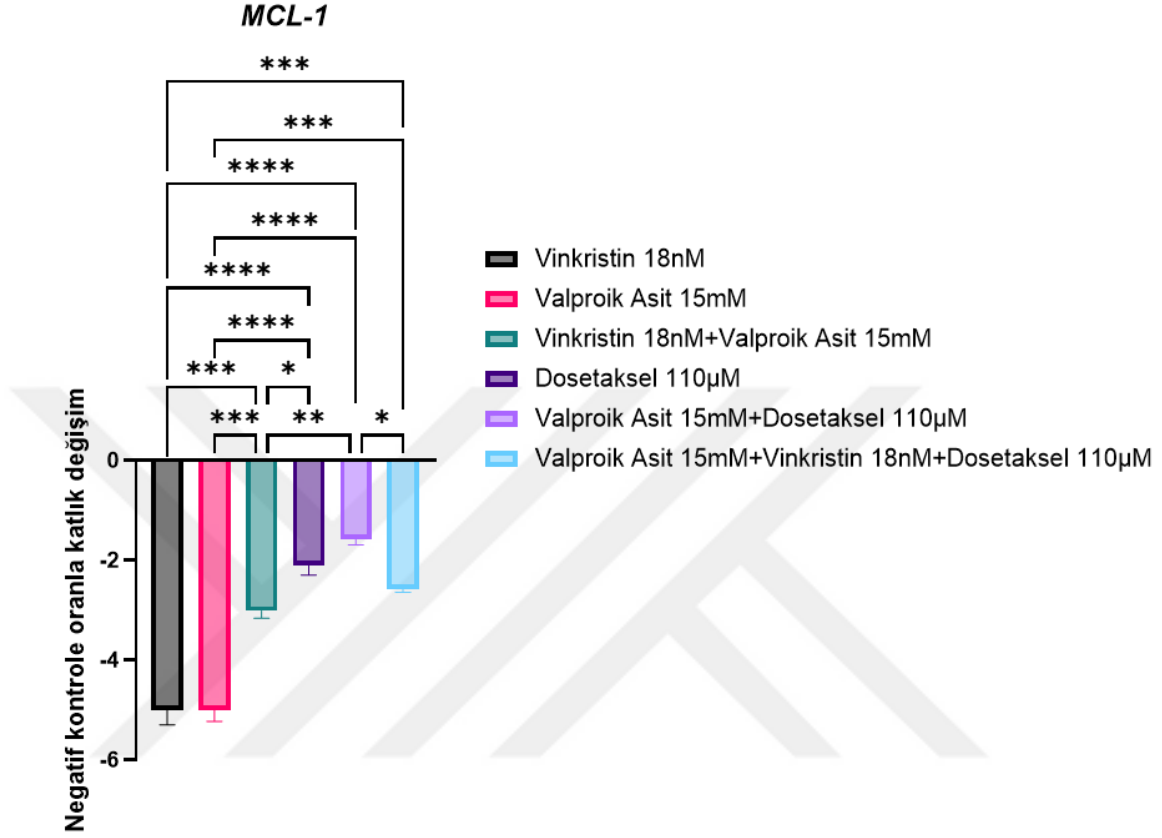
Son olarak, üçlü kombinasyon (VPA + vinkristin + dosetaksel) ile *NOXA* ifadesi, yüksek düzeyde bir değere ulaşmıştır. Üç ajanın aynı anda uygulanmasıyla oluşan çoklu mekanizmaların (mikrotübül bozukluğu, mikrotübül stabilizasyonu ve epigenetik düzenleme) *NOXA* ekspresyonuna etki etmesi, tek veya ikili kombinasyonlarda gözlenen düzeylerden farklı, karmaşık bir etkileşim modelini ortaya çıkarmıştır.



**Şekil 4.13.** Köpek meme karsinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında *NOXA* gen ekspresyon profillerindeki değişim. Sonuçlar negatif kontrol olarak kullanılan hücrelerdeki ekspresyon seviyelerine göre normalize edilmiştir. Veriler ortalama ± SD (n=3) olarak sunulmuştur.

*MCL-1* geni için, vinkristin sülfat ve VPA uygulamalarının çok belirgin bir aşağı regülasyon (>4 kat) meydana getirdiği görülmektedir (Şekil 4.14). Vinkristin + VPA kombinasyonu, her iki ajanın tekli kullanımına kıyasla *MCL-1* ifadesinde, görece daha düşük bir azalma göstermektedir. Benzer şekilde, VPA'nın dosetaksel ile kombinasyonunun da çok belirgin bir aşağı regülasyona yol açmadığı belirlenmiştir.

Üçlü kombinasyon her ne kadar anlamlı bir aşağı regülasyona neden olsa da (>2,5 kat) VPA ve vinkristinin tekli uygulamalarındaki etkinin sağlanamadığı görülmüştür.

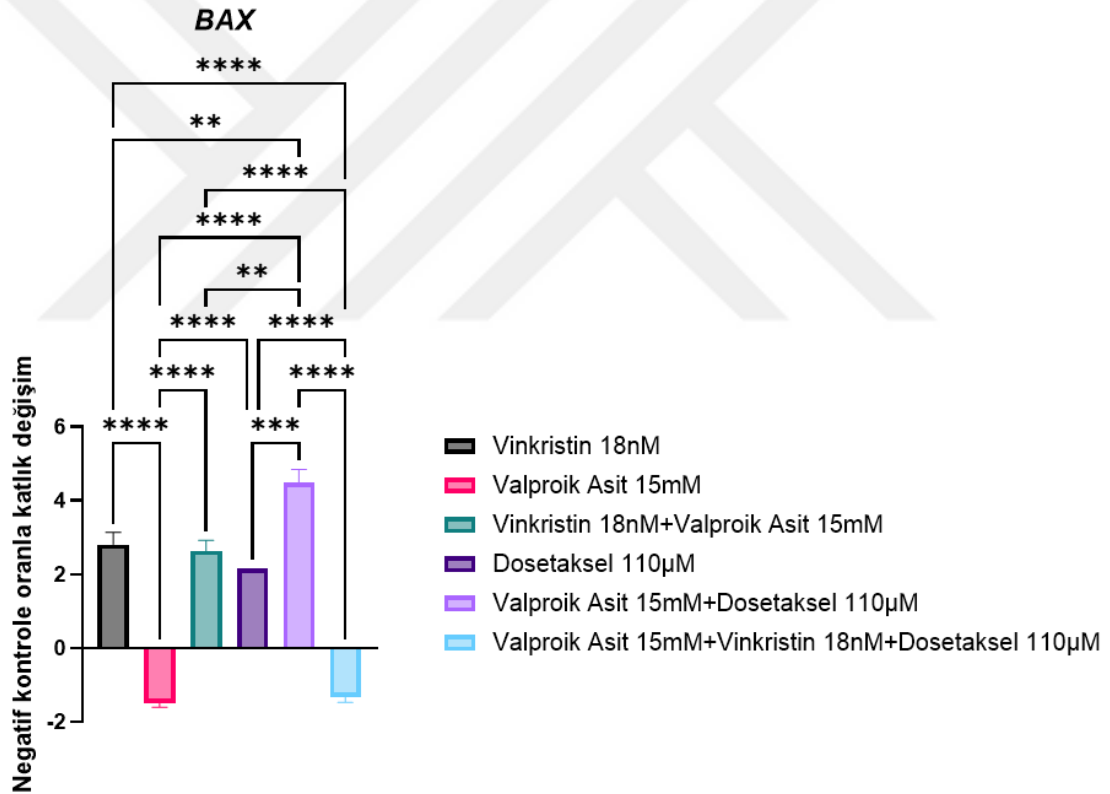


**Şekil 4.14.** Köpek meme karsinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında *MCL-1* gen ekspresyon profillerindeki değişim. Sonuçlar negatif kontrol (hiçbir tedavi uygulanmayan) olarak kullanılan hücrelerdeki ekspresyon seviyelerine normalize edilmiştir.

\* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ ; \*\*\* $P<0,001$ ; \*\*\*\* $P<0,0001$  istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama  $\pm$  SD (n=3) olarak sunulmuştur.

Şekil 4.15, köpek meme karsinomu hücrelerinde vinkristin, VPA ve dosetaksel uygulamalarının *BAX* geni ekspresyonuna etkisini göstermektedir. *BAX* ekspresyonundaki bu değişimler, farklı tedavi kombinasyonlarının hücresel yanıtlarda ne kadar karmaşık etkileşimlere yol açabileceğini göstermektedir. Sadece vinkristin sülfat ve dosetaksel uygulamalarının *BAX* geninde anlamlı düzeyde bir yukarı regülasyon (>2 kat) meydana getirdiği görülmektedir (Şekil 4.15). Ancak tek başına

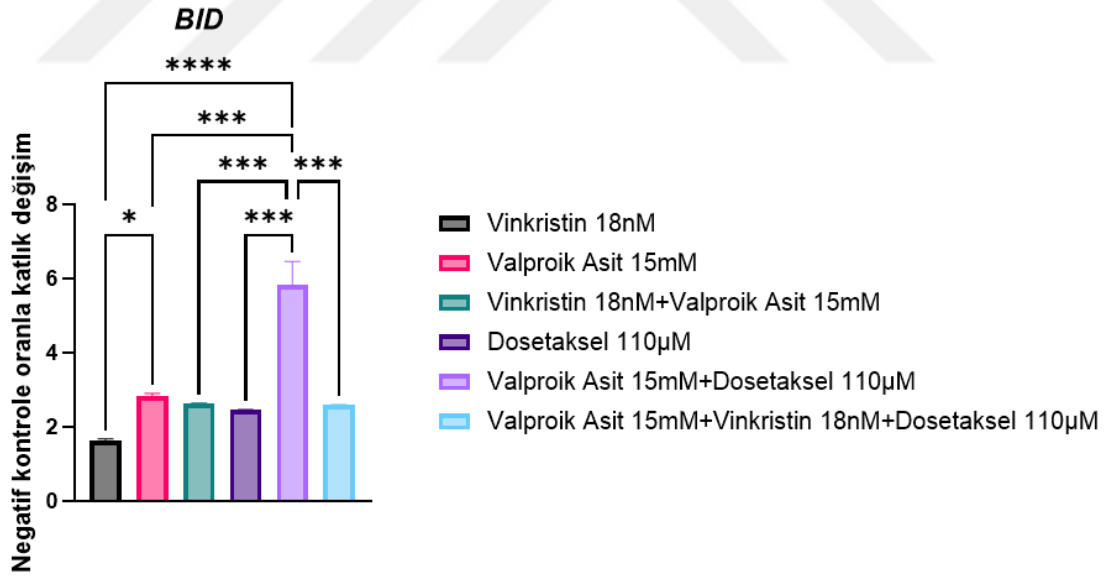
VPA uygulaması bu etkiyi yaratmamıştır. *BAX* geninin hücrede pro-apoptotik bir rol oynadığı ve özellikle kanser hücrelerinin tedaviye yanıtında yukarı regüle olmasının, apoptozun tetiklenmesi açısından önemli bir gösterge olduğu düşünüldüğünde, en belirgin ve istenen etkinin VPA + dosetaksel kombinasyonunda olduğu belirlenmiştir. Bu kombinasyonun, *BAX* geni ekspresyonunu 4 kattan fazla yukarı regüle ettiği görülmektedir. Şaşırtıcı şekilde, bu kombinasyona vinkristinin dahil edilmesinin bu gende aşağı regülasyona yol açtığı belirlenmiştir. Bu bulgular, *BAX* ekspresyonunun “tek ilaç” gruplarında farklı derecelerde artış veya azalış gösterebildiğini, ancak kombine tedavilerde her zaman “beklenen” sinerjik veya katlanmış bir etkiyi yansıtmayabileceğini ortaya koymaktadır.



**Şekil 4.15.** Köpek meme karsinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında *BAX* gen ekspresyon profillerindeki değişim. Sonuçlar negatif kontrol (hiçbir tedavi uygulanmayan) olarak kullanılan hücrelerdeki ekspresyon seviyelerine normalize edilmiştir.

\*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$  istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama  $\pm$  SD (n=3) olarak sunulmuştur.

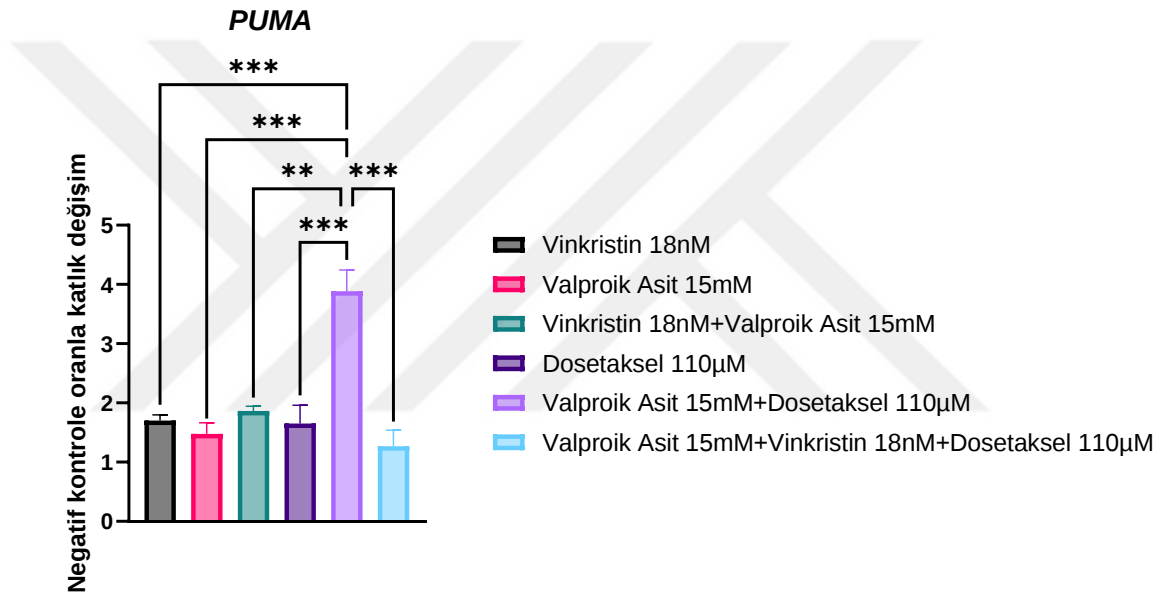
Çalışmada uygulanan kemoterapötiklerin *BID* gen ekspresyon profillerine etkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Şekil 4.16'da sunulmuştur. Çalışmadaki tüm koşullar *BID* genini yukarı regüle etmiştir. Tek başına vinkristin sülfat belirgin düzeyde bir etki göstermezken, yalnızca VPA ve dosetaksel kısmen daha yüksek bir ekspresyon ( $\geq 2,5$  kat) düzeyine neden olmuştur. Vinkristin + VPA'nın birlikte uygulandığı koşul yine orta seviyede bir yükselme sağlamıştır. En çarpıcı sonuç ise, VPA ve dosetakselin kombinasyonu olup, bu koşulda en yüksek değer ( $>5,8$  kat) elde edilmiştir. Buna karşın üçlü kombinasyon (VPA + vinkristin sülfat + dosetaksel), beklentinin aksine sinerjik zirve düzeyini yakalayamamakta; bu durum, çoklu ajanların hücrede tetiklediği olası direnç veya telafi mekanizmalarının devreye girerek genel etkiyi sınırlandırdığını düşündürmektedir. Meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde, pro-apoptotik bir gen olan *BID* ekspresyonunun yukarı regüle olmasının tedavi açısından olumlu bir işaret olarak kabul edildiği göz önüne alınırsa, burada en etkili uygulamanın VPA + dosetaksel kombinasyonu olduğu söylenebilir.



**Şekil 4.16.** Köpek meme karsinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında *BID* gen ekspresyon profillerindeki değişim. Sonuçlar negatif kontrol olarak kullanılan hücrelerdeki ekspresyon seviyelerine normalize edilmiştir.

\* $P<0,05$ ; \*\*\* $P<0,001$ ; \*\*\*\* $P<0,0001$  istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama  $\pm$  SD (n=3) olarak sunulmuştur.

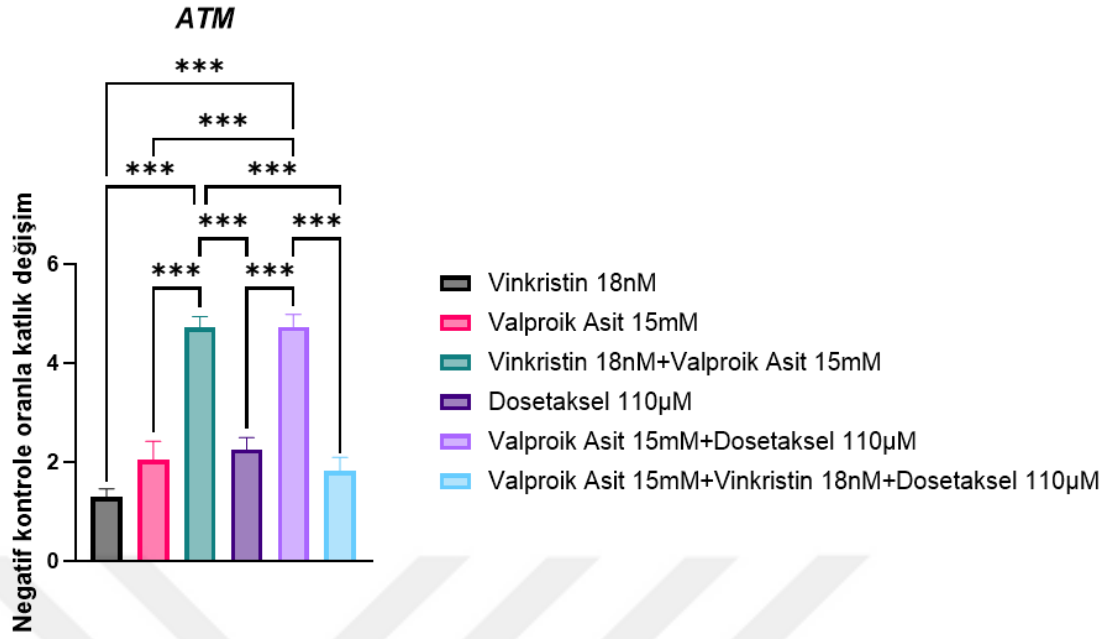
*PUMA* geni ekspresyon verileri incelendiğinde, çok belirgin bir sonuç olduğu görülmektedir (Şekil 4.17). VPA + dosetaksel kombinasyonunun bu geni dikkat çekici bir şekilde yukarı regüle ettiği belirlenmiştir (~4 kat). Diğer tüm koşullarda ise *PUMA* gen ekspresyonu 2 kat değişikliğin altında kalmıştır. VPA + dosetaksel kombinasyonunun diğer tüm koşullardan farklı olduğu istatistiksel analizlerde de doğrulanmıştır ( $P<0,01$ ,  $P<0,001$ ).



**Şekil 4.17.** Köpek meme karsinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında *PUMA* gen ekspresyon profillerindeki değişim. Sonuçlar negatif kontrol (hiçbir tedavi uygulanmayan) olarak kullanılan hücrelerdeki ekspresyon seviyelerine normalize edilmiştir.

\*\* $P<0,01$ ; \*\*\* $P<0,001$  istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama  $\pm$  SD (n=3) olarak sunulmuştur.

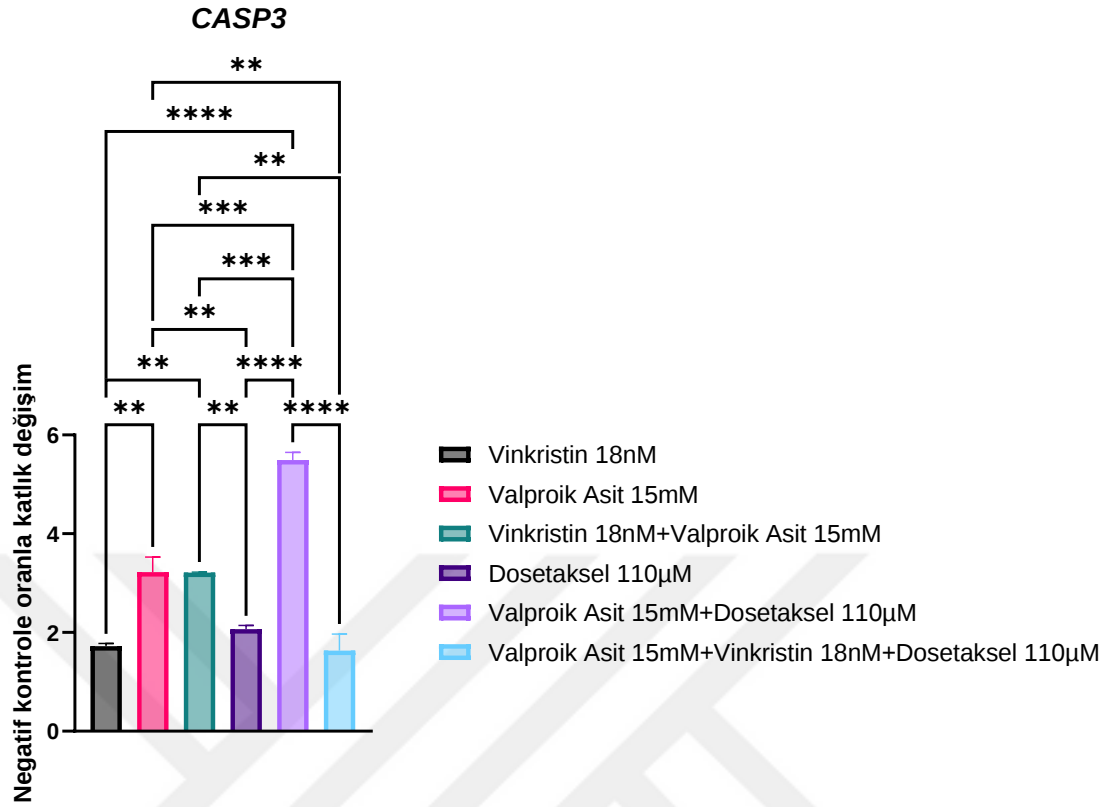
Bu tez çalışmasında yer alan tüm koşullar, kontrole göre *ATM* geni ekspresyonunu farklı oranlarda yukarı regüle etmiştir (Şekil 4.18). Daha önemlisi, VPA'nın hem vinkristin sülfat hem de dosetaksel ile ikili kombinasyonları belirgin bir şekilde (>4,7 kat) *ATM* genini aktive etmiştir. Ancak üçlü kombinasyonda benzer etki tespit edilememiştir.



**Şekil 4.18.** Köpek meme karsinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında *ATM* gen ekspresyon profillerindeki değişim. Sonuçlar negatif kontrol (hiçbir tedavi uygulanmayan) olarak kullanılan hücrelerdeki ekspresyon seviyelerine normalize edilmiştir.

\*\*\* $P < 0,001$  istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama  $\pm$  SD (n=3) olarak sunulmuştur.

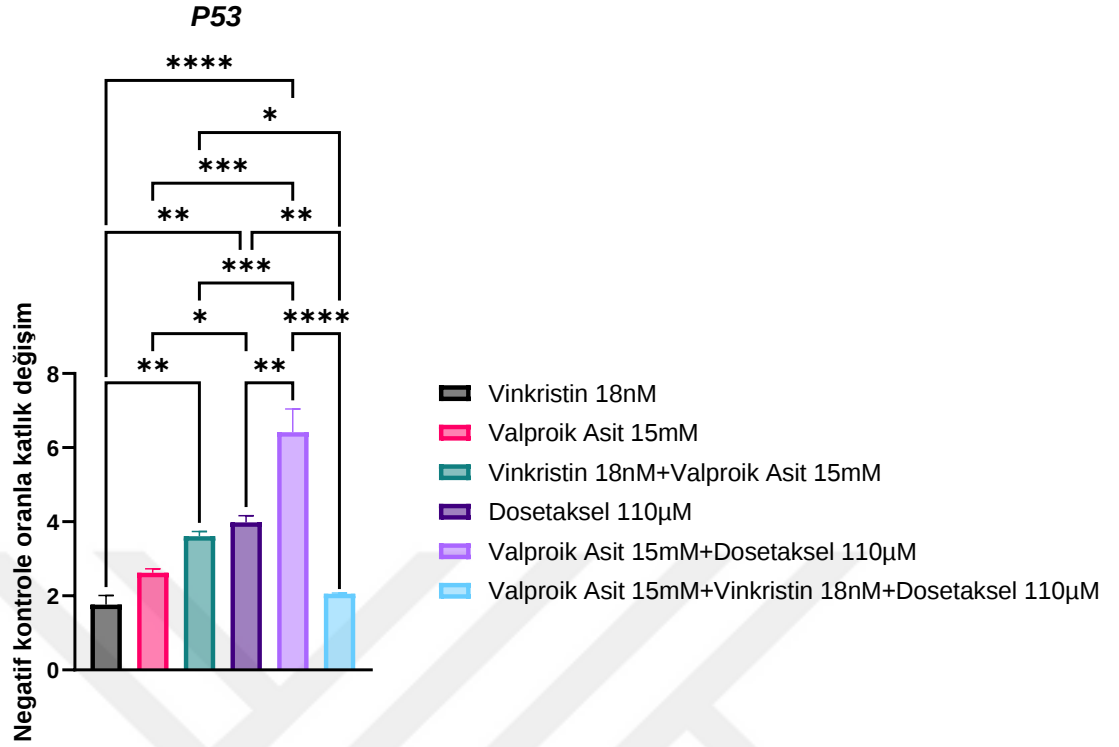
Şekil 4.19’da de açıkça görüldüğü üzere, VPA + dosetaksel kombinasyonu net bir *CASP3* gen aktivasyonu (~5,50 kat) gerçekleştirmiştir. Her ne kadar VPA’nın hem tek başına, hem de vinkristin sülfat ile kullanımı oldukça anlamlı bir *CASP3* yukarı regülasyonuna neden olsa da VPA’nın dosetaksel ile kullanımındaki yanıt oldukça dikkat çekicidir.



**Şekil 4.19.** Köpek meme karsinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında *CASP3* gen ekspresyon profillerindeki değişim. Sonuçlar negatif kontrol (hiçbir tedavi uygulanmayan) olarak kullanılan hücrelerdeki ekspresyon seviyelerine normalize edilmiştir.

\*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$  istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama  $\pm$  SD (n=3) olarak sunulmuştur.

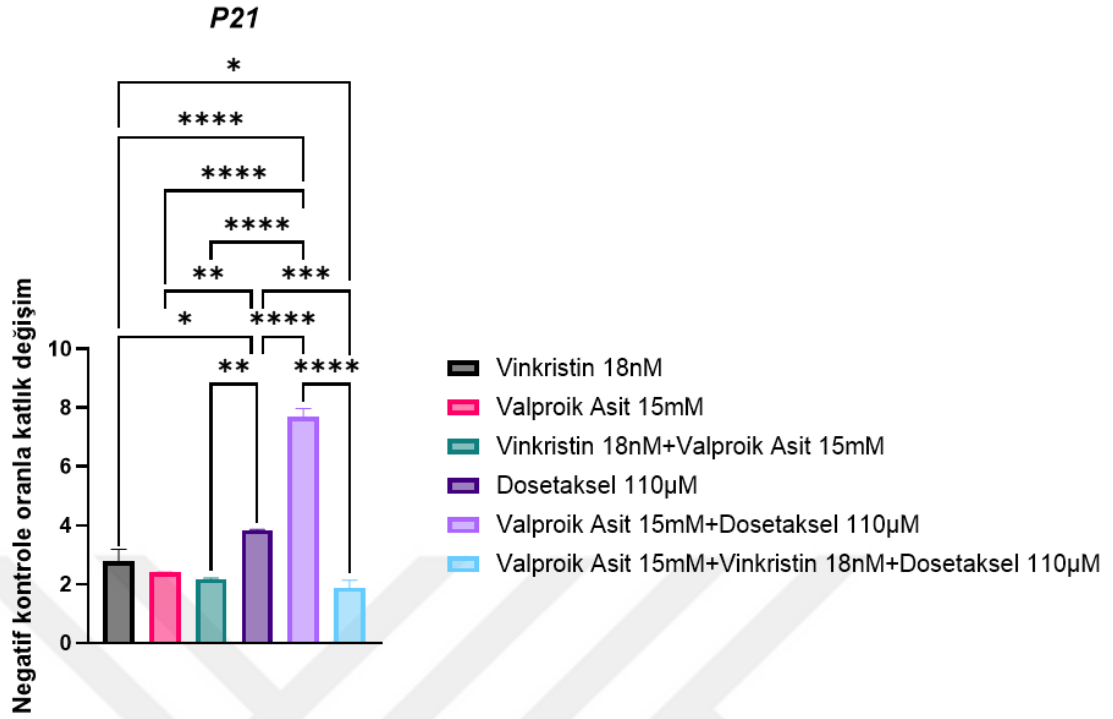
Bu çalışmada, çok önemli bir tümör baskılayıcı gen olan *P53*'e ait ekspresyon profili *CASP3* genine benzer bir kalıp sergilemiştir (Şekil 4.20). Tüm deneysel koşulların *P53* geninde yukarı regülasyona yol açtığı görülmektedir. Ancak VPA + dosetaksel kombinasyonu, *P53* gen ekspresyonunu negatif kontrole oranla yaklaşık 6,5 kat artırmıştır. Üçlü kombinasyonun da bu geni yaklaşık 2 kat yukarı regüle ettiği belirlenmiştir. Ancak, VPA'nın dosetaksel ile kombinasyonunun diğer tedavi koşullarından istatistiksel olarak dikkat çekici düzeyde anlamlı farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir ( $P < 0,001$ ;  $P < 0,0001$ ).



**Şekil 4.20.** Köpek meme karsinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında *P53* gen ekspresyon profillerindeki değişim. Sonuçlar negatif kontrol (hiçbir tedavi uygulanmayan) olarak kullanılan hücrelerdeki ekspresyon seviyelerine normalize edilmiştir.

\* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ ; \*\*\* $P<0,001$ ; \*\*\*\* $P<0,0001$  istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama  $\pm$  SD (n=3) olarak sunulmuştur.

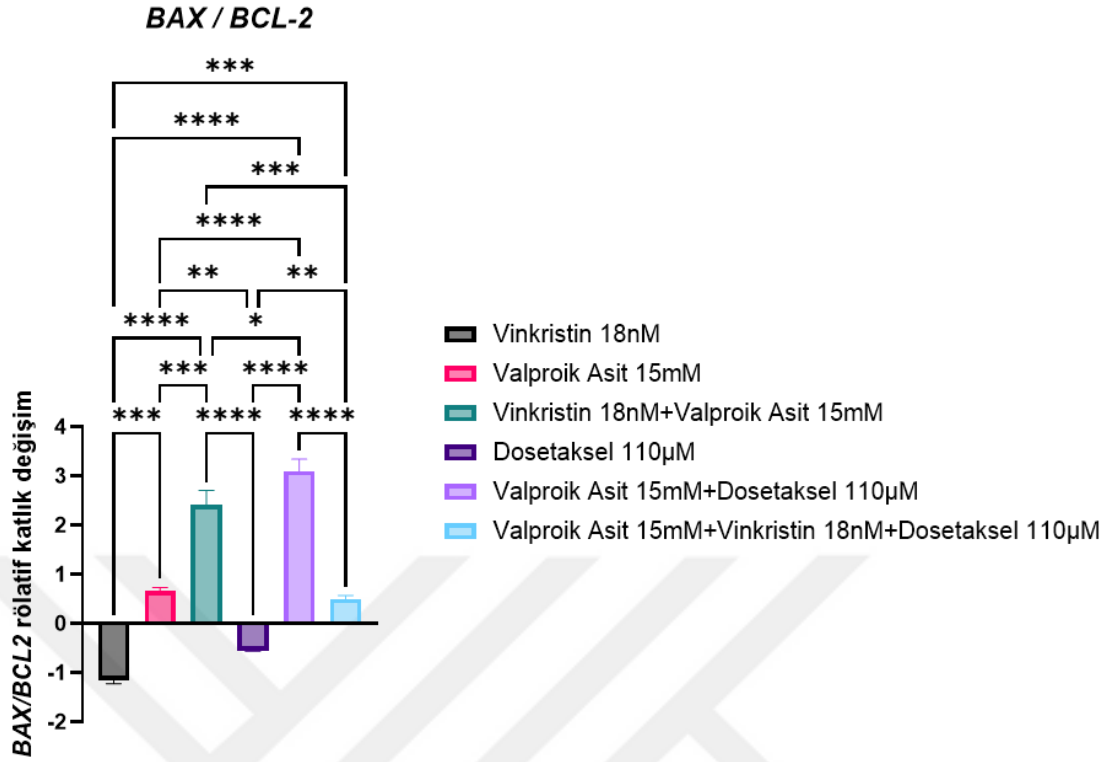
Bu çalışmada *P21* geninde *P53*'e benzer ancak daha belirgin bir gen ekspresyon profili gözlenmiştir (Şekil 4.21). VPA ve dosetakselin kombinasyon şeklinde uygulanmasıyla negatif kontrole rölatif olarak yaklaşık 8 kat yukarı regülasyon görülmesi dikkat çekici bir sonuçtur. Diğer koşullar ile karşılaştırıldığında, bu kombinasyonun yüksek düzeyde bir istatistiksel anlamlılık göstererek farklılık yarattığı belirlenmiştir ( $P<0,0001$ ).



**Şekil 4.21.** Köpek meme karsinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında *P21* gen ekspresyon profillerindeki değişim. Sonuçlar negatif kontrol (hiçbir tedavi uygulanmayan) olarak kullanılan hücrelerdeki ekspresyon seviyelerine normalize edilmiştir.

\* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ ; \*\*\* $P<0,001$ ; \*\*\*\* $P<0,0001$  istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama  $\pm$  SD (n=3) olarak sunulmuştur.

Meme kanseri hücrelerinde, apoptozis oranı ve kemoterapiye alınan yanıtlarla ilişkilendirilen *BAX/BCL-2* oranının değerlendirilmesi önemlidir. Bu bağlamda, yüksek *BAX/BCL-2* oranı daha yüksek apoptozis ve daha iyi tedavi yanıtları demektir. *BAX/BCL-2* ekseninde en yüksek rölatif değerin (>3 kat) VPA ve dosetaksel kombinasyonunda elde edildiği tespit edilmiştir ( $P<0,0001$ ). Benzer şekilde, VPA ve vinkristin sülfat kombinasyonu da yüksek bir oran sergileyerek dikkat çekmiştir (Şekil 4.22).

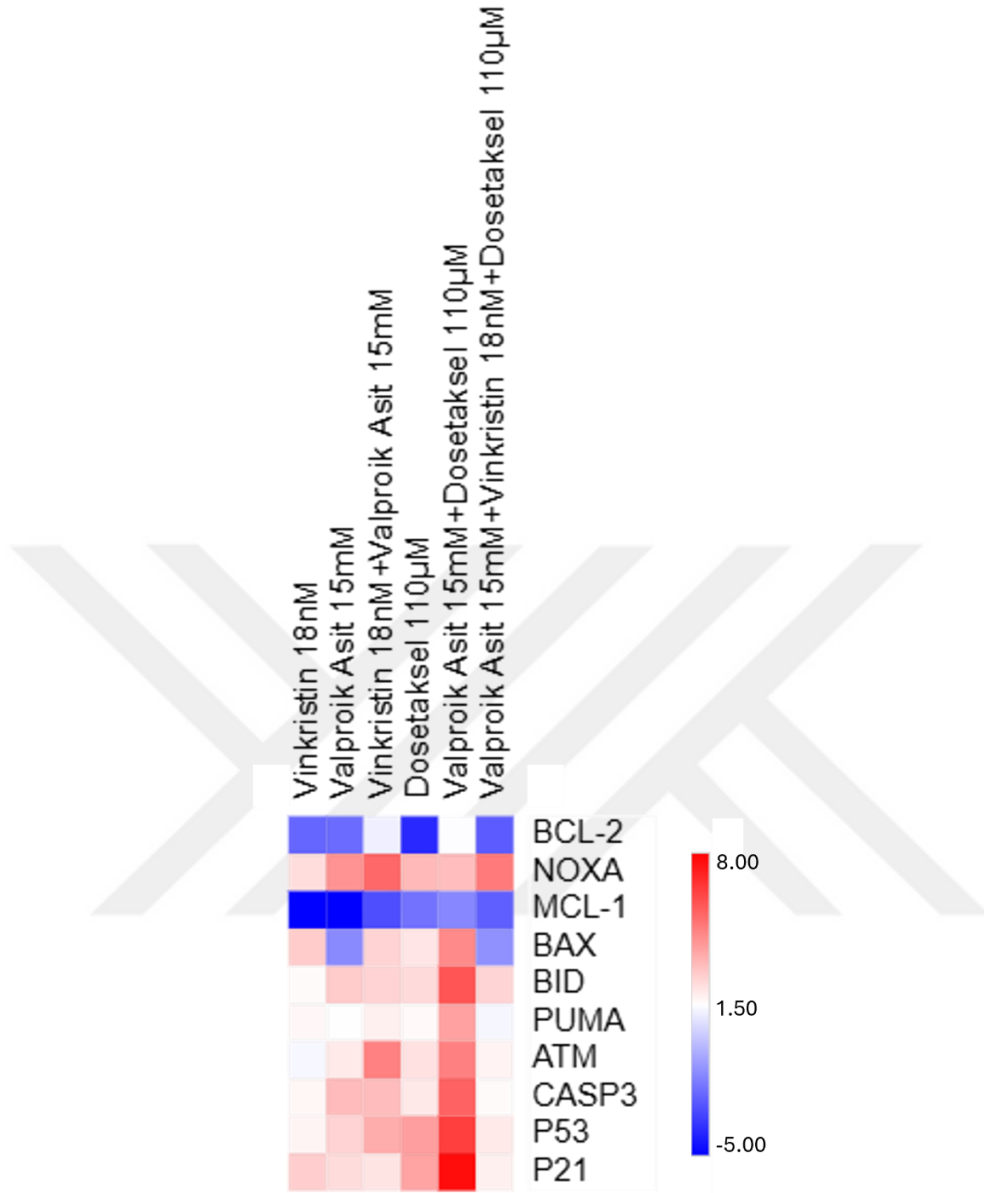


**Şekil 4.22.** Köpek meme karsinomu hücrelerinde Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında *BAX/BCL-2* ekseninin rölaf olarak değerlendirilmesi.

\* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ ; \*\*\* $P<0,001$ ; \*\*\*\* $P<0,0001$  istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama  $\pm$  SD (n=3) olarak sunulmuştur.

VPA ve dosetaksel kombinasyonunun, köpek meme karsinomu hücrelerinde güçlü bir sinerjik etki gösterdiği ve özellikle *P53*, *P21*, *CASP3*, *ATM*, *PUMA*, *BID* ve *BAX* gibi tümör baskılayıcı genlerde belirgin bir yukarı regülasyona neden olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, hücrelerin apoptoza yönlendirilmesinde önemli bir rol oynayan bu genlerin, VPA ve dosetakselin birlikte kullanımıyla aktivasyonunun arttığını göstermektedir. Bununla birlikte, bu kombinasyonun etkinliği, hücrelerin apoptoza karşı direnç mekanizmalarını destekleyen *BCL-2* ve *MCL-1* gibi anti-apoptotik genlerde gözlenen anlamlı negatif regülasyonla da güçlendirilmiştir. Bu negatif regülasyon, tümör hücrelerinin hayatta kalma sinyallerinin baskılandığını ve bu sayede apoptozun daha etkin bir şekilde tetiklendiğini ortaya koymaktadır.

Şekil 4.23 incelendiğinde, VPA + dosetaksel kombinasyonun gen ekspresyonlarına ait ısı haritası grafiğindeki özgün desen açıkça görülmektedir. Bu kombinasyonun apoptozisin indüklenebilmesi için pro-apoptotik genlerdeki aktivasyon; buna karşın anti-apoptotik sistemlerdeki fonksiyon kaybı yoluyla etki gösterebileceğine işaret etmektedir. VPA, HDACi olarak histon asetilasyonunu artırarak kromatin yapısını daha erişilebilir hale getirmekte ve bu durum tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu teşvik etmektedir. Öte yandan, dosetaksel, mikrotübül stabilizasyonu yoluyla hücre döngüsünde mitotik duraklama oluşturarak apoptozu indüklemektedir. Bu iki farklı mekanizmanın birleşimi, hem genetik hem de epigenetik seviyelerde sinerjik bir etki yaratarak hücrelerin ölümüne yol açmaktadır. Bu sonuçlar, VPA ve dosetaksel kombinasyonunun, köpek meme karsinomlarının tedavisinde umut verici bir yaklaşım olabileceğini göstermektedir.



**Şekil 4.23.** Köpek meme karsinomu hücrelerinde, Vinkristin 18 nM; Valproik Asit 15 mM; Vinkristin 18 nM + Valproik Asit 15 mM; Dosetaksel 110 µM; Dosetaksel 110 µM + Valproik Asit 15 mM ve üçlü kombinasyon (Valproik Asit 15 mM + Vinkristin 18 nM + Dosetaksel 110 µM) ile tedavi sonrasında gen ekspresyon profillerindeki değişime ait ısı haritası grafiği (heatmap). Sonuçlar negatif kontrol (hiçbir tedavi uygulanmayan) olarak kullanılan hücrelerdeki ekspresyon seviyelerine normalize edilmiştir.

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme kanseri, günümüzde insanlarda olduğu gibi diğer birçok türde de en yaygın görülen öldürücü hastalıklardan birisidir. Tüm dünyada yaygın olarak yetiştirilen bir evcil hayvan türü olan köpekte de insanlarda olduğu gibi hayatı tehlikeye sokan en yaygın ve önemli hastalıkların başında kanser gelmektedir. Belirli bir yaşın üzerindeki dişi köpeklerde oldukça sık gözlenen meme kanserine ilişkin klinik çalışmalar literatürde olmasına rağmen; moleküler düzeydeki çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Buna ek olarak, köpek meme kanserinde, VPA'nın yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ilaçlar üzerine moleküler düzeyde etkileri hakkında mevcut bilgi tamamen yetersizdir.

HDACi'lerin, köpek kanser hücre hatlarından elde edilen hücrelerde histon asetilasyonunu artırdığı, hücre proliferasyonunu azalttığı ve apoptozu indüklediğine dair *in vitro* kanıtlar bulunmaktadır. Bu etkilerin, insan kanser hücre hatlarında gözlemlenen etkilerle benzer olduğu görülmüştür (Kisseberth vd., 2008). Köpeklerde VPA'nın etkinliğiyle ilgili mevcut literatürde bildirilen son derece sınırlı *in vivo* çalışmalarda, osteosarkom üzerine odaklanılmıştır. Bu çalışmalarda VPA'nın oldukça iyi tolere edildiği ve serum VPA konsantrasyonlarının artan dozlarla birlikte lineer olarak artış gösterdiği gözlenmiştir (Wittenburg vd., 2010). Köpeklerde VPA'nın kemoterapötiklerle olan potansiyel sinerjist etkisinden de bahsedilmiştir. Örneğin, VPA'nın, köpek osteosarkomunu, insandaki çalışmaları destekler nitelikte, doksorubisine karşı daha duyarlı hale getirdiği belirlenmiştir (Wittenburg vd., 2011). Bu sonuçlar, mevcut köpek osteosarkom tedavi protokollerine HDACi'lerin eklenmesinin potansiyel faydasını ve insan ile köpek osteosarkomunun VPA'ya verdiği yanıtta benzerlikleri ortaya koymaktadır (Wittenburg vd., 2011; Wittenburg vd., 2010). Bu sınırlı sayıdaki çalışma, aslında VPA'nın meme kanseri için de oldukça mantıklı bir seçenek olduğuna dair ipuçları sunmakla birlikte, bildiğimiz kadarıyla, köpek meme kanserlerinde VPA'nın direkt etkisi ya da kemoterapötikler ile kombinasyonlarının incelendiği herhangi bir *in vitro* ya da *in vivo* çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, köpek meme karsinomu hücrelerinde (CMT-U27 hücre hattı), VPA ve yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ilaçlar olan vinkristin sülfat ve dosetakselin

VPA ile kombinasyonlarının terapötik etkinliği, moleküler yöntemler yardımıyla incelenmiştir. Bu yönüyle, bu çalışma, klinik uygulamalarda kullanılabilecek yenilikçi moleküler destekli tedavilere *in vitro* düzeyde veri sağlayacak ve aynı zamanda köpeklerde kanser tedavisinde HDACi moleküllerin potansiyel etkilerinin değerlendirilmesi ile klinik tedavi süreci ve prognoza da olumlu katkılar yapacaktır. Kanser biyolojisi, genomik, epigenetik, sistem biyolojisi, evrim ve immünoloji gibi farklı alanları içinde barındıran oldukça karmaşık bir konudur. Bu kapsamlı bir çerçeve, kanser anlayışımızı geliştirmekle kalmayıp bu hastalığın çok yönlü doğasını değerlendirmemizde önemli faydalar sağlamıştır (Maley vd., 2017; Prokop, 2021). Kanser araştırmalarının manzarası, teknolojik ilerlemeler ve tümör oluşumunun altında yatan biyolojik süreçlerin daha derin bir anlayışıyla hızla evrilmektedir. Moleküler genetik ve epigenetik regülasyon perspektiflerini benimseyerek ve kanserin evrimsel dinamiklerini dikkate alarak yapılan çalışmalar korunma, tanı ve tedavi için daha etkili stratejilerin geliştirilebilmesine olanak sağlar (Du ve Elemento, 2015; Siegel vd., 2018; Varmus, 2017).

Köpek meme kanserlerinde, HDACi etkinliği ve kemoterapötiklerle kombinasyonlarına ait oldukça az bilimsel verinin olmasından hareketle, bu çalışmada, VPA, vinkristin sülfat ve dosetakselin köpek meme karsinomu (CMT-U27) hücreleri üzerindeki etkilerini anlamaya yönelik kapsamlı bir değerlendirme yapılmıştır. Bu ajanların tekli ve kombinasyon halinde uygulanmasının hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek, hücre morfolojisindeki değişiklikleri incelemek, üçlü boyama yöntemi ile floresan mikroskopik analizler kullanarak apoptoz ve nekroz süreçlerini değerlendirmek ve gerçek zamanlı PCR ile apoptotik mekanizmalarda rol oynayan anti-apoptotik ve pro-apoptotik genlerin ekspresyon profillerini analiz etmek amaçlanmıştır. Bu kapsamlı yaklaşım, köpek meme kanseri hücrelerinde apoptotik yanıtların moleküler mekanizmalarını daha iyi anlamayı ve bu ajanların kanser tedavisindeki potansiyelini ortaya koymayı hedeflemektedir.

Hücre morfolojilerinin değerlendirilmesi, kanser tedavisinde uygulanan ilaçların etkinliğini anlamak için önemli bir araçtır. Kanser hücreleri, tedaviye maruz kaldıklarında karakteristik morfolojik değişiklikler sergiler. Apoptozun bir göstergesi

olarak hücrelerde çekirdek yoğunlaşması, parçalanma ve hacim küçülmesi gibi değişiklikler gözlenebilir. Ayrıca, sitoplazmik yapının bozulması ve hücre zarının yuvarlaklaşması gibi durumlar, hücrelerin apoptoza yönlendirildiğini işaret eder (Chen ve Wang, 2002; Opferman, 2008). Bu değişiklikler, tedavi edilen hücrelerin ölüm mekanizmasını ortaya koyarak ilacın etkinliği hakkında bilgi verir. Apoptozis, programlanmış hücre ölümü olarak bilindiğinden, ilaçların bu süreci tetikleme yeteneği, kanser tedavisindeki başarıları için önemli bir göstergedir. Apoptoza ek olarak, nekroz gibi diğer hücre ölümü türlerine özgü morfolojik değişikliklerin tespiti, ilacın sitotoksik etkilerinin daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesini sağlar. Hücre morfolojisi, yalnızca ilacın etkinliğini değil, aynı zamanda tedaviye hücrelerin nasıl tepki verdiğini ve yanıtın hangi yollarla gerçekleştiğini anlamak için de önemlidir. Bu bilgiler, kanser tedavisine yönelik stratejilerin optimize edilmesine yardımcı olur (Chen ve Wang, 2002; Goldar vd., 2015; Hassen vd., 2012; Ulukaya vd., 2011).

Bu bağlamda, bu tez çalışmasındaki tedaviler ve kombinasyonlar hücre morfolojisi açısından kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır. Bulgular, köpek meme karsinomu hücrelerinde değerli sonuçlara ulaşılmasına yardımcı olacaktır. Vinkristin sülfatın köpek meme karsinomu hücre hattı (CMT-U27) üzerindeki morfolojik etkilerinin doz (1,56–100 nM) ve zaman (24, 48, 72 saat) bazında değerlendirildiğinde, negatif kontrol grubunda hücreler düzenli morfolojilerini korurken, artan dozlarda ve sürelerde hücrelerde belirgin apoptoz belirtileri gözlenmiştir. Düşük dozlarda (1,56–6,25 nM) minimal değişiklikler görülürken, 25 nM ve üzeri dozlarda hücrelerde yoğunlaşma, küçülme ve yapışkanlık kaybı gibi apoptotik değişiklikler meydana gelmiştir. 72 saat sonunda yüksek dozlarda (50–100 nM), hücrelerde yaygın çekirdek yoğunlaşması ve sitoplazmik bozulma izlenmiştir. Bu sonuçlar, vinkristin sülfatın, insanlarda yapılan çalışmalarda olduğu gibi (Zeng vd., 2017; Zeng vd., 2015), CMT-U27 hücrelerinde de apoptozisi indüklediğini ve doz ile zamana bağlı etkili bir sitotoksik ajan olduğunu göstermektedir.

Düşük dozlarda (25–50  $\mu$ M) dosetaksel uygulanmasının ardından, hücrelerde ilk 24 saat içinde belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Bununla birlikte, 48 saat ve sonrasında bazı hücrelerde hafif yoğunlaşma ve yuvarlaklaşma gibi apoptoz belirtileri görülmeye

başlanmıştır. Bu durum, düşük dozlarda dosetakselin etkisinin zamanla ortaya çıktığını ve hücre ölümünü yavaş bir şekilde tetiklediğini göstermektedir. 75–125  $\mu$ M arası dozlarda, apoptoza özgü değişiklikler daha belirgin hale gelmiştir. Hücrelerin bir kısmında çekirdek yoğunlaşması, sitoplazmik küçülme ve yapışkanlığın kaybolması gibi morfolojik bozulmalar gözlenmiştir. Bu etkiler, özellikle 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde daha belirgin hale gelmiş ve hücre yoğunluğunda kayda değer bir azalma olmuştur. 150–200  $\mu$ M dozlarda ise, dosetakselin etkileri hızlı ve yoğun bir şekilde kendini göstermiştir. İlk 24 saatten itibaren hücrelerde yaygın çekirdek parçalanması ve sitoplazmik bozulma görülmüştür. 48 ve 72 saatlik sürelerde ise hücrelerin çoğunun apoptoz ve nekroz belirtileri sergilediği dikkat çekmiştir. Bu doz aralığında, hücre ölüm süreci çok daha hızlı ilerlemiştir. Özetle, dosetakselin etkisi hem doza hem de süreye bağlı olarak değişmiştir. Düşük dozlarda hücre ölümünün başlangıcı daha yavaş ve kademeli iken, yüksek dozlarda bu süreç hızlanmış ve yaygın hale gelmiştir. Bu sonuçlar, dosetakselin apoptotik mekanizmalar yoluyla kanser hücrelerini etkili bir şekilde yok edebildiğini ve tedavi stratejilerinde potansiyel bir ajan olduğunu göstermektedir.

VPA için, düşük dozlarda (1,56–6,25 mM) ilk 24 saat içerisinde hücre morfolojisinde belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak, inkübasyon süresi 48 ve 72 saate uzadıkça bazı hücrelerde hafif küçülme ve yuvarlaklaşma gibi apoptoza özgü değişiklikler görülmeye başlanmıştır. Bu, VPA'nın düşük konsantrasyonlarda zamanla etkili olmaya başladığını göstermektedir. Orta dozlarda (12,5–25 mM) 24 saatlik tedavi süresi sonunda hücrelerde hafif morfolojik değişiklikler fark edilmiştir. 48 ve 72 saatlik sürelerde bu değişiklikler belirginleşmiş, hücre yoğunluğunda azalma, yuvarlaklaşma ve yapışkanlığın kaybolması gibi apoptoz belirtileri artmıştır. Bu, VPA'nın orta dozlarda hücre ölümünü daha etkili bir şekilde başlattığını göstermektedir. Yüksek dozlarda (50–100 mM), 24 saat içerisinde hücrelerde yaygın sitoplazmik küçülme ve çekirdek yoğunlaşması gibi apoptotik değişiklikler izlenmiştir. 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde ise hücrelerin büyük bir kısmı apoptoz belirtileri göstermiş, bazı hücreler nekroza yönelmiştir. Bu durum, yüksek dozlarda VPA'nın daha hızlı ve yoğun bir etki yarattığını ortaya koymaktadır. Genel olarak, VPA'nın doz ve zaman bağımlı bir şekilde hücre morfolojisi üzerinde güçlü apoptotik etkiler oluşturduğu görülmüştür.

Hücrelerdeki çekirdek küçülmesi, yuvarlaklaşma ve yapışkanlığın kaybolması, VPA'nın kanser hücrelerini apoptoza yönlendirdiğini desteklemektedir. Bu bulgular, VPA'nın tek başına veya diğer kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde terapötik potansiyelini araştırmak için önemli bir temel sunmaktadır.

VPA'nın, dosetaksel ve vinkristin sülfat ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının hücrelerde doz ve süreye bağlı olarak apoptotik değişiklikler gözlenmiştir. İkili ve üçlü kombinasyon gruplarında hücrelerde yoğun apoptoz belirtileri, çekirdek yoğunlaşması ve yapışkanlığın kaybı gibi morfolojik bozulmalar artmıştır. Özellikle VPA + dosetaksel kombinasyonu ve üçlü kombinasyon grubunda hücre ölümünün maksimum düzeye ulaştığı ve kombinasyonların sinerjik bir etki yarattığı anlaşılmaktadır. Bu bulgular, bu ajanların birlikte kullanımının tedavi etkinliğini artırabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada, hücre morfolojisindeki elde edilen veriler, sitotoksikite sonuçlarıyla örtüşür niteliktedir. Öncelikle, vinkristin sülfat tedavisinin CMT-U27 köpek meme karsinomu hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini, XTT testi sonuçlarına dayanarak doz ve zamana bağlı bir şekilde gösterilmiştir. Negatif kontrol grubunda hücre canlılığı yüksek seviyelerde korunurken, artan dozlarda ve inkübasyon süresi uzadıkça hücre canlılığında belirgin bir azalma gözlenmiştir. Bu azalma, vinkristin sülfatın hücre proliferasyonunu baskıladığı ve apoptoz veya nekroz gibi hücre ölüm mekanizmalarını tetiklediğini işaret etmektedir. Sonuçlar, vinkristin sülfatın köpek meme kanser hücrelerine karşı da güçlü bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu ve bu etkinin hem doz hem de zamana bağımlı olarak arttığını göstermektedir. Benzer şekilde, dosetaksel uygulaması ile artan dozlarda ve uzun inkübasyon sürelerinde hücre canlılığında belirgin bir düşüş kaydedilmiştir. Bu durum, dosetakselin kanser hücreleri üzerinde güçlü bir sitotoksik etki gösterdiğini ve apoptoz mekanizmalarını tetiklediğini düşündürmektedir. Bulgular, dosetakselin yalnızca hücre ölümünü artırmakla kalmayıp, aynı zamanda tedaviye bağlı olarak kanser hücrelerinin proliferasyon kapasitesini ciddi şekilde sınırladığını göstermektedir. Dosetaksel, mikrotübül stabilizasyonunu sağlayarak hücre bölünmesini durduran ve apoptozu tetikleyen bir kemoterapötik ajandır. Özellikle birçok solid tümörün tedavisinde etkilidir. Dosetaksel, hücre döngüsünü G2/M fazında durdurarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu engeller ve

apoptoz mekanizmalarını aktif hale getirir (Crown vd., 2004). Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular da bu bilgileri doğrulayan ve bu ajanın aynı zamanda köpek meme karsinomu için de oldukça etkili olabileceğini gösteren bir potansiyele işaret etmiştir.

VPA için elde edilen veriler oldukça orjinal ve dikkat çekicidir. Negatif kontrol grubunda hücre canlılığı yüksek seviyede korunurken, VPA için artan dozlarında ve uzayan inkübasyon sürelerinde canlılıkta belirgin bir düşüş kaydedilmiştir. Bu durum, bu ajanın hücre ölümünü teşvik eden etkili bir HDACi olduğunu ve kanser hücrelerinde apoptoz gibi ölüm yollarını etkin bir şekilde aktif hale getirebildiğini göstermektedir. Kullanılan dozların hızlı ve belirgin sitotoksik etki yarattığı, tedavinin etkinliğini ortaya koymaktadır. Literatürde, köpek meme karsinomları için yeterli bilginin bulunmadığı göz önüne alındığında elde edilen bu verilerin oldukça değerli olduğu düşünülmektedir. VPA'nın, köpek meme kanseri hücrelerinde ölüm yollarını aktif hale getirerek önemli bir sitotoksikite yaratması, hem veteriner onkolojisi hem de translasyonel kanser araştırmaları için önemli bir bulgu sunmaktadır. Elde edilen sonuçlar, dosetaksel ve VPA kombinasyonunun, tek başına uygulamalara göre hücre canlılığını daha etkili bir şekilde azalttığını göstermiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hafif etkiler gözlenirken, 48 ve 72 saatlik sürelerde hücre ölüm oranında belirgin bir artış kaydedilmiştir. Bu durum, dosetakselin mikrotübül stabilizasyonu yoluyla hücre döngüsünü bloke etmesi ve VPA'nın epigenetik düzenleyici özellikleriyle apoptotik genlerin ekspresyonunu artırması ile açıklanabilir. Vinkristin sülfat ve VPA kombinasyonu da hücre canlılığını azaltmada etkili bulunmuştur. Özellikle düşük dozlarda ve erken sürelerde bile hücre canlılığında düşüş gözlenmiş, bu da vinkristin sülfatın mikrotübül dinamiğini bozarak apoptozu teşvik eden etkisi (Setthawongsin vd., 2019; Zeng vd., 2017; Zeng vd., 2015) ile ilişkilendirilmiştir. VPA ile birlikte kullanımı, apoptotik genlerin aktivasyonunu (sonraki bölümlerde ayrıntılı olarak tartışılacaktır) daha da artırarak bu etkinin güçlenmesini sağlamış olabilir.

VPA, vinkristin sülfat ve dosetaksel üçlü kombinasyonu, VPA'nın dosetaksel ile kombinasyonu ile birlikte en güçlü sitotoksik etkiyi göstermiştir. 24 saatten itibaren belirgin bir hücre canlılığı azalması kaydedilmiş ve bu etkinin, kombinasyondaki her bir ajanın farklı mekanizmalarla apoptozu indüklemesi sonucu olduğu düşünülmektedir.

Dosetakselin mitotik duraklamayı indüklemesi, vinkristin sülfatın mikrotübül organizasyonunu bozması ve VPA'nın epigenetik düzenleyici etkisi birlikte değerlendirildiğinde, bu kombinasyonun sinerjik bir etki yarattığı görülmektedir.

Bu sonuçlar, hem tekli hem de kombinasyon tedavilerinin, köpek meme karsinomu hücrelerinde etkili apoptoz indüksiyonu sağladığını ortaya koymaktadır. Özellikle VPA'nın dosetaksel ile kombinasyonu ve üçlü kombinasyon, köpeklerde meme kanseri tedavisi için umut verici bir strateji olarak değerlendirilebilir. Gelecekte, bu kombinasyonların etkinliğini artırmak ve spesifik biyobelirteçler üzerindeki etkilerini incelemek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Ancak bu üçlü tedavide vinkristin sülfat yerine daha yüksek bir sinerjik etki yaratabilecek bir ajan için değerlendirmeler devam etmelidir. Ayrıca, bu tedavilerin klinik uygulanabilirliğini desteklemek için *in vivo* modellerde kapsamlı çalışmalar yürütülmesi önemlidir. Bu bulgular, köpeklerde kişiselleştirilmiş ve hedefe yönelik kanser tedavilerinin geliştirilmesi için yardımcı olacaktır.

Bu çalışmada, floresan mikroskopunda yapılan ve ölüm modunun incelenmesi amacıyla yapılan değerlendirmelerde, VPA, vinkristin sülfat ve dosetaksel kombinasyonlarının önemli etkileri olduğu görülmüştür. Yalnızca besiyeri içeren sağlıklı CMT-U27 hücrelerinde herhangi bir tedavi uygulanmadığı için morfoloji korunmaktadır. Hücre çekirdekleri düzenli, sitoplazmik yapı sağlam ve apoptoz ya da nekroz gibi ölüm belirtileri gözlenmemektedir. Vinkristin sülfat (18 nM) tedavisi uygulanan hücrelerde, belirgin sitoplazmik daralma ve çekirdek yoğunlaşması gözlemlenmiştir. Bu morfolojik değişiklikler, hücrelerin apoptoza yöneldiğinin ilk göstergelerindendir. Annexin-V boyamasında, erken apoptoz göstergesi olan pozitif hücrelerin sayısında artış gözlenirken, PI boyaması geç apoptoz ve nekrozda minimal bir artış olduğunu işaret etmektedir. Bu sonuçlar, vinkristin sülfatın hücre ölümüne yol açmada etkin bir ajan olduğunu göstermektedir. İnsan meme kanseri hücre hatlarında, vinkristin tedavisinin erken apoptozu artırdığı gösterilmiştir (Zeng vd., 2017; Zeng vd., 2015). CMT-U27 hücrelerinde de benzer bir erken apoptoz yanıtı gözlenmiştir, bu da vinkristinin geniş bir tür yelpazesinde benzer mekanizmalarla etkili olduğunu göstermektedir.

Dosetaksel (110  $\mu$ M) tedavisi uygulanan hücrelerde, apoptotik değişikliklerin daha yaygın olduğu gözlemlenmiştir. Annexin-V ve PI sinyallerinde belirgin bir artış, hem erken hem de geç apoptoz oranlarının yükseldiğini göstermektedir. Bu durum, dosetakselin mikrotübül stabilizasyonu yoluyla hücre döngüsünü bloke ettiği ve böylelikle apoptozu etkin bir şekilde indüklediğini ortaya koymaktadır. VPA (15 mM) tedavisi, hücrelerde apoptoza özgü belirgin değişikliklere yol açmıştır. Annexin-V pozitif hücrelerin artışı, VPA'nın erken apoptozu indüklediğini göstermektedir. PI boyası ile geç apoptozda bir miktar artış olduğu, VPA'nın yalnızca erken değil, geç apoptoz mekanizmalarını da desteklediği anlaşılmaktadır. Ayrıca, VPA'nın histon asetilasyonu artırarak tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu teşvik ettiği bilinmektedir (Aztopal vd., 2018). VPA, vinkristin sülfat ve dosetaksel kombinasyonlarının kullanıldığı gruplarda, tedavilerin sinerjik etkileri gözlemlenmiştir. Bu kombinasyonlar, özellikle Annexin-V ve PI boyamalarında apoptoz oranında belirgin bir artış göstermiştir. Üçlü kombinasyonda, hem erken hem de geç apoptoz oranlarının maksimum seviyeye ulaştığı görülmüştür. Kombinasyonların, hücrelerin apoptoz lehine programlanmasında daha etkili olduğu ve bu durumun hücre ölümünü hızlandırdığı anlaşılmaktadır. Bu bulgular, tedavi kombinasyonlarının köpek meme karsinomu gibi kanserlerin yönetiminde umut vadettiğini göstermektedir.

Hoechst, Annexin-V ve PI üçlü boyama yöntemi, hücre ölüm modlarını, özellikle apoptoz (erken ve geç) ve nekrozu, nükleer morfoloji ve membran bütünlüğüne dayalı olarak ayırt etmek için güçlü bir araçtır. Hoechst boyası, DNA'ya bağlanarak apoptoz için tipik olan nükleer yoğunlaşma ve parçalanmayı ortaya çıkarır (Zhao vd., 2019). Annexin-V, apoptozun erken aşamalarında hücre zarının dış yüzeyine taşınan fosfatidilserine bağlanarak erken apoptotik hücreleri tespit eder (Tsai vd., 2010). Zar geçirgen olmayan bir boya olan PI, zarı hasar görmüş hücrelerin DNA'sını boyayarak nekrotik veya geç apoptotik hücreleri tanımlar (Mustufa vd., 2016). Bu kombinasyon, hücrelerin sağlıklı (Hoechst+, Annexin-V-, PI-), erken apoptotik (Hoechst+, Annexin-V+, PI-), geç apoptotik/sekonder nekrotik (Hoechst+, Annexin-V+, PI+) ve nekrotik (Hoechst+/-, Annexin-V-, PI+) olarak sınıflandırılmasını sağlar (Orsolya vd., 2016). Bu yöntem, kanser araştırmaları ve toksikoloji alanlarında ilaçların ve tedavilerin sitotoksik etkilerini değerlendirmek, hücre ölüm yollarını ve terapötik etkinliği anlamak için

yaygın olarak kullanılmaktadır (Yan ve Efferth, 2018). Bu çalışmada da, üçlü boyama yöntemi kullanılan ilaç ve kombinasyonların etkinliğini başarılı bir şekilde ortaya koymuştur.

Tümör hücrelerinin apoptozu, kemoterapötik ilaçlar tarafından indüklenebilir (Setthawongsin vd., 2019). İntrinsik yolak, BCL-2 ailesi tarafından düzenlenmektedir. BAX, apoptotik uyarılara yanıt olarak mitokondriyal membran geçirgenliğini tetikleyen pro-apoptotik bir proteindir. Buna karşılık, BCL-2, hücre ölümünü engelleyen anti-apoptotik bir proteindir (Krampe ve Al-Rubeai, 2010). Bu nedenle, bu iki protein arasındaki denge büyük önem taşımaktadır (Basu ve Haldar, 1998; Kirkin vd., 2004). Diğer çalışmalarda, *BAX* ve *BCL-2* ekseninin *BAX* lehine değişimi ve *BCL-2* gibi anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarının aşağı regülasyonu malignite veya hayatta kalma kriterlerinin öngörüsü ile ilişkilendirilmiştir (Goldar vd., 2015; Kordezangeneh vd., 2015; Yao vd., 2011). Bu nedenle apoptozis yollarında yer alan genlerin tartışılması büyük önem taşımaktadır.

BCL-2 protein ailesi, dokuların homeostazını korumak ve hasarlı ya da potansiyel olarak zararlı hücreleri ortadan kaldırmak için gerekli olan apoptozun düzenlenmesinde hayati bir rol oynar. Bu aile, işlevleri ve yapısal bölgelerine göre üç alt gruba ayrılır: mitokondriyal bütünlüğü koruyarak hücre sağkalımını destekleyen anti-apoptotik proteinler (BCL-2, BCL-xL, MCL-1); mitokondri dış zar geçirgenliğini (mitochondrial outer membrane permeabilization: MOMP) kolaylaştırarak apoptozisi başlatan pro-apoptotik efektörler (ör. Bax, Bak); ve anti-apoptotik proteinleri inhibe ederek veya pro-apoptotik efektörleri aktive ederek düzenleyici rol oynayan proteinler (NOXA, PUMA, BID) (Koehler vd., 2013; Wolfsperger vd., 2016). Bu hassas sistemin bozulması, kanserin ayırt edici özelliklerinden biridir ve tümör hücrelerinin genetik, metabolik ve çevresel strese rağmen apoptozdan kaçmasına olanak tanır.

BCL-2 ailesindeki anti-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonu, birçok malignitede yaygın olarak görülür ve kanser hücrelerinin kemoterapi, radyoterapi veya bağışıklık sisteminin gözetiminden kaynaklanan apoptotik sinyallere direnç göstermesini sağlar (Kennedy vd., 2015; Liu vd., 2018; Xiao vd., 2015). Bunun aksine, pro-apoptotik efektörlerdeki

mutasyonlar veya azalmış ekspresyon, hücrelerin apoptoz gerçekleştirme yeteneğini zayıflatır ve kontrolsüz çoğalma ile tümör progresyonuna katkıda bulunur. Bu dengesizlik, genellikle terapötik direnç yol açar, çünkü kanserler, hayatta kalmak için bu karşıt güçler arasındaki etkileşimden yararlanır (Wang vd., 2024; Young vd., 2016). BCL-2, BCL-xL ve MCL-1 gibi birden fazla aile üyesini aynı anda hedef alan kombinasyon terapileri, redundans ve direnç mekanizmalarının üstesinden gelmek için araştırılmaktadır (Louault vd., 2019; Munkhbaatar vd., 2020). BCL-2 ailesinin, hücre sağkalımını destekleme ve apoptozu düzenleme konusundaki çift yönlü rolü, kanser biyolojisindeki kritik önemini ve onkolojideki terapötik potansiyelini vurgulamaktadır. Bu tez çalışmasında, VPA, vinkristin sülfat ve dosetakselin BCL-2 gen ekspresyonu üzerindeki etkileri dikkat çekici sonuçlar ortaya koymuştur. Tek başına vinkristin ve VPA uygulamaları, BCL-2 ekspresyonunda belirgin bir azalma sağlarken, bu iki ilacın kombinasyonu BCL-2 seviyelerinde yukarı regülasyon göstermiştir. Benzer şekilde, VPA ve dosetaksel kombinasyonunda da BCL-2 gen ekspresyonu artmıştır. Ancak, üçlü kombinasyon (VPA + vinkristin + dosetaksel) BCL-2 geninde belirgin bir aşağı regülasyona yol açmıştır, bu da kombinasyonun kanser hücrelerinde pro-apoptotik bir yanıtı etkili bir şekilde tetiklediğini göstermektedir. Tek başına dosetaksel uygulamasının BCL-2 ekspresyonunu en güçlü şekilde azaltması da dikkat çekici bir bulgudur. Genel olarak, üçlü kombinasyonun, ikili kombinasyonlarda gözlenen yukarı regülasyondan farklı olarak, hücre hayatta kalma sinyallerini baskılayarak güçlü bir apoptotik ortam oluşturduğu söylenebilir. Bu sonuçlar, kemoterapi stratejilerinde kombinasyonların karmaşık dinamiklerini anlamının önemini bir kez daha vurgulamaktadır.

Bu tez çalışmasında, BCL-2 ailesine ait bir üye olan NOXA geninde dikkat çekici ekspresyon değişiklikleri gözlenmiştir. Tek başına vinkristin sülfat, mikrotübül dinamiklerini bozarak hücre içi stres yanıtını tetikleyip NOXA ekspresyonunu artırırken, VPA, HDACi etkisiyle NOXA transkripsiyonunu güçlü bir şekilde indüklemiştir. Vinkristin ve VPA'nın birlikte uygulanması, sinerjik bir etkiyle NOXA seviyelerinde daha belirgin bir artış sağlamıştır. Üçlü kombinasyon (VPA + vinkristin + dosetaksel), NOXA ekspresyonunu en yüksek düzeye çıkararak, mikrotübül bozukluğu, mikrotübül stabilizasyonu ve epigenetik düzenlemenin birlikte çalıştığı karmaşık bir etkileşim

modeli sergilemiştir. *NOXA* geni, bir diğer adıyla forbol-12-miristat-13-asetat ile indüklenen protein 1 (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1: *PMAIP1*), önemli bir pro-apoptotik üyedir ve apoptoz süreçlerinin mitokondriyal apoptotik yolak üzerinden düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. *NOXA*'nın ekspresyonu, genellikle DNA hasarı, oksidatif stres ve hipoksi gibi çeşitli hücrel streslere yanıt olarak aktive edilen tümör baskılayıcı protein P53 tarafından düzenlenir. Bu koşullarda *NOXA* proteini, anti-apoptotik proteinlere, özellikle *MCL-1*'e bağlanarak onların koruyucu etkilerini nötralize eder ve mitokondri dışı membran geçirgenliğini artırır. Bu geçirgenlik, apoptogenik faktörlerin, özellikle sitokrom C'nin serbest bırakılmasına yol açar. Serbest bırakılan sitokrom C, kaspaz kaskadını aktive ederek hücre ölümünü başlatır (Lin vd., 2012; Weller vd., 2022). *NOXA*, anti-apoptotik proteinlerin, özellikle *MCL-1* ve *BCL-2*'nin etkilerini dengeleyen kritik bir apoptoz mediyatörüdür. Ancak birçok kanser türünde, *P53* geni mutasyonları, anti-apoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu veya *NOXA* promotör bölgesindeki epigenetik susturma mekanizmaları nedeniyle *NOXA* ekspresyonu azalır. Bu bozukluklar, kanser hücrelerinin hayatta kalma mekanizmalarını güçlendirerek konvansiyonel tedavilere karşı direnç oluşumuna katkıda bulunur (Al Shboul vd., 2023; Torres-Adorno vd., 2017). Örneğin, *NOXA*'nın ekspresyonunun artırılması, özellikle HDACi'leri ve proteazom inhibitörleri gibi ajanlarla yapılan tedavilere kanser hücrelerinin duyarlılığını artırabilir. Bu ajanlar, dirençli kanser türlerinde bile standart tedavilere alternatif olarak etkili olduğunu göstermiştir (Contreras vd., 2022; Torres-Adorno vd., 2017).

İnsanlarda meme kanseri dahil olmak üzere meme tümörleri, moleküler özellikleri ve tedaviye yanıtları açısından önemli bir heterojenlik sergiler. *NOXA* proteini, bu tümörlerde apoptotik yolları düzenleyerek önemli bir rol oynar. Üçlü negatif meme kanseri (Triple-negative breast cancer: TNBC; Östrojen reseptörü (ER) negatif, Progesteron reseptörü (PR) negatif, Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) negatif) gibi agresif alt tiplerde *NOXA* ekspresyonu sıklıkla azalır ve bu durum kötü prognoz ve tedavi direnci ile ilişkilidir. HDACi'ler gibi *NOXA* ekspresyonunu artırmayı hedefleyen terapötik stratejiler, TNBC'nin kemoterapiye duyarlılığını artırmada umut vaat etmektedir (Lee vd., 2014; Torres-Adorno vd., 2017). Ayrıca, anti-apoptotik proteinlerin, özellikle *MCL-1*'in yüksek seviyelerde olduğu hormon pozitif meme

kanserleri de *NOXA-MCL-1* eksenini hedefleyen tedavilerden yararlanabilir. NOXA ve bu anti-apoptotik proteinler arasındaki denge, hücresel kaderi belirlemede hayati öneme sahiptir ve bu dengeyi apoptoz lehine değiştirmeye yönelik stratejiler, tedavi için umut verici yollar sunmaktadır (Campbell vd., 2018; Nakajima vd., 2016).

*NOXA* geninin köpek meme tümörlerindeki rolü, insan kanserlerine benzer bir işlevi olduğu varsayılmakla birlikte, henüz spesifik olarak yeterince çalışılmamıştır. Köpek meme tümörleri, insan meme kanserleriyle önemli biyolojik benzerlikler taşır; bu benzerlikler arasında apoptozis yollarının düzenlenmesindeki bozukluklar ve MCL-1 gibi anti-apoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu bulunur. İlk bulgular, NOXA ekspresyonunun artırılmasının, köpek meme tümörlerinde apoptozisi destekleyebileceğini ve terapötik sonuçları iyileştirebileceğini göstermektedir (Al Shboul vd., 2023; Lee vd., 2014; Torres-Adorno vd., 2017). Sonuç olarak, bu çalışmadaki, VPA'nın hem ikili hem de üçlü kombinasyonlarında gözlenen anlamlı *NOXA* yukarı regülasyonu, önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

MCL-1, BCL-2 ailesine ait kritik bir anti-apoptotik proteindir ve hücre sağkalımı ile apoptozisin regülasyonunda temel bir rol oynar. Mitokondri dış zarında bulunan MCL-1, BAX ve BAK gibi pro-apoptotik proteinlerle etkileşime girerek onların aktivasyonunu etkili bir şekilde engeller. Bu etkileşim, mitokondri bütünlüğünü korumak, sitokrom C gibi apoptogenik faktörlerin salınımını inhibe etmek ve sonuç olarak apoptozis için merkezi bir mekanizma olan kaspaz kaskadının aktivasyonunu engellemek için kritik öneme sahiptir (Campbell vd., 2018). MCL-1 ekspresyonu, transkripsiyon, translasyon ve protein yıkımı olmak üzere birçok seviyede sıkı bir şekilde düzenlenir. Bu düzenleme, hücrelerin büyüme faktörleri, sitokinler ve DNA hasarı gibi stres sinyallerine hızlı bir şekilde yanıt vermesine olanak tanır (Floros vd., 2021).

Kanser bağlamında, *MCL-1*'in düzenlenmesindeki bozukluklar yaygın bir durumdur ve tümör gelişimi, ilerlemesi ve tedaviye direnç üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Lösemi, lenfoma ve multipl miyelom gibi hematolojik maligniteler ile meme, akciğer ve pankreas kanseri gibi solid tümörler de dahil olmak üzere birçok kanser türü, *MCL-1*

ekspresyonunun artışı göstermektedir. Bu aşırı ekspresyon, kanser hücrelerinin apoptozdan kaçmasına olanak tanır ve bu da kanserin bir ayırt edici özelliği olan kontrolsüz çoğalmayı ve sağkalımı kolaylaştırır. Üstelik, yüksek MCL-1 seviyeleri genellikle agresif tümör davranışı, kötü prognoz ve kemoterapi ile hedefe yönelik tedavilere direnç ile ilişkilidir. Bu direnç, onkolojide önemli bir zorluk teşkil eder çünkü birçok kanser tedavisi, malign hücrelerin ortadan kaldırılması için apoptozu indüklemeye dayanır (Louault vd., 2019; Williams vd., 2018).

Meme tümörlerinde, *MCL-1* aşırı ekspresyonu özellikle dikkate değerdir ve tedavi seçeneklerini sınırlayarak kötü prognoza katkıda bulunur. Yüksek *MCL-1* seviyeleri, kanser hücrelerinin apoptozdan kaçmasına olanak tanıyarak standart kemoteraplere karşı dirençli hale gelmelerine neden olur (Liu vd., 2019; Zhou vd., 2020). Benzer şekilde, hormon pozitif meme kanserlerinde *MCL-1*, tamoksifen veya aromataz inhibitörleri gibi anti-östrojen tedavilere karşı direnç katkıda bulunur ve tümör hücrelerinin apoptotik yolları atlayarak tedaviye rağmen yaşamaya devam etmesini sağlar (Habata vd., 2016; Nakano vd., 2020). Ayrıca, *MCL-1*'in metastatik potansiyeli artırdığı ve tümör hücrelerinin uzak dokuların zorlu ortamlarında hayatta kalmasını sağladığı gösterilmiştir (Tron vd., 2018). MCL-1 inhibitörlerinin BCL-2 gibi diğer anti-apoptotik proteinleri hedef alan bileşiklerle kombinasyonunun, apoptozun indüksiyonunu artırarak sinerjik etkiler üretme potansiyeli vardır (Anderson vd., 2016; Levenson vd., 2015; Li vd., 2018). Ayrıca, HDACi kullanımının *MCL-1* seviyelerini azaltarak meme kanseri modellerinde yanıtları iyileştirdiği gözlenmiştir (Merino vd., 2017). Bu çalışmada uygulanan tüm deneysel tedaviler, *MCL-1* geninin aşağı regüle olmasına neden olmuştur. Bu tedavilerin etkinliği açısından önemli bir bulgudur. Ancak burada tartışılması gereken bir diğer kritik nokta ise kombinasyonların etkinliğidir. *MCL-1* geni, vinkristin ve VPA'nın tekli uygulamalarında belirgin bir şekilde (>4 kat) aşağı regüle olmuştur, bu da her iki ajanın *MCL-1*'in anti-apoptotik etkisini baskılayarak apoptozun indüklenmesinde güçlü bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Ancak, VPA + vinkristin sülfat kombinasyonu, her iki ilacın tek başına kullanımına kıyasla *MCL-1* ifadesinde daha az bir azalma sağlamış, bu da kombinasyonun sinerjik bir avantaj yaratmadığına işaret etmiştir. Benzer şekilde, VPA ve dosetaksel kombinasyonu da anlamlı bir aşağı regülasyon sağlamamış ve etkisi sınırlı kalmıştır. Üçlü kombinasyon

ise *MCL-1* ekspresyonunu  $>2,5$  kat azaltarak belirgin bir etki göstermiş olsa da, tekli VPA veya vinkristin uygulamalarındaki güçlü etkilerle karşılaştırıldığında daha zayıf kalmıştır. Bu sonuçlar, VPA ve vinkristinin tekli kullanımının *MCL-1* üzerindeki anti-apoptotik etkileri baskılamada daha etkili olduğunu ve kombinasyonların bu etkinliği tam olarak yansıtamadığını göstermektedir. İnsan ve köpek meme tümörlerinde, *NOXA-MCL-1* ekseninin düzenlenmesindeki bozukluklar, tümör progresyonunda ve tedavi direncinde kritik bir rol oynar. İnsan meme kanseri üzerine yapılan araştırmalar oldukça ileri düzeyde olsa da, köpek meme tümörleri üzerindeki çalışmalar sınırlıdır. Buna rağmen, bu tümörlerin karşılaştırmalı onkoloji modeli olarak potansiyeli büyüktür. Örneğin, her iki tümör tipi de agresif formlarda *MCL-1*'in aşırı ekspresyonunu ve muhtemelen *NOXA* protein seviyelerinin azalmasını sergileyerek, bu yolun hedeflenmesinin geniş terapötik bir öneme sahip olabileceğini düşündürmektedir (Al Shboul vd., 2023; Kawiak vd., 2019; Torres-Adorno vd., 2017). Bu çalışmadaki bulgular *MCL-1-NOXA* eksenini açısından özellikle uygulanan kombinasyonların moleküler etkilerinin daha kapsamlı çalışmalarla araştırılması gerekliliğini göstermektedir.

BCL-2 ile ilişkili X proteini (BCL-2-associated X protein: BAX) adlı proteini kodlayan *BAX* geni, BCL-2 protein ailesinin bir pro-apoptotik üyesi olup apoptozun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. *BAX*, öncelikle MOMP'u teşvik ederek işlev gösterir. Bu olay, apoptotik yolda kilit önem taşır. Meme kanserinde, *BAX*'ın ekspresyonu ve işlevi, çeşitli genetik ve epigenetik faktörler nedeniyle önemli ölçüde değişebilir ve bu durum tümör davranışını ve hasta sonuçlarını etkiler (Bhatt vd., 2021; Yao vd., 2011). Bu çalışmada, *BAX* gen ekspresyonundaki değişimler, tedavi kombinasyonlarının hücrel yanıtarda karmaşık etkileşimlere yol açabileceğini göstermektedir. Vinkristin sülfat ve dosetakselin tek başına uygulamaları *BAX* geninde anlamlı bir yukarı regülasyon ( $>2$  kat) sağlamış, ancak VPA bu etkiyi yaratmamıştır. En güçlü etki, VPA ve dosetaksel kombinasyonunda görülmüş ve *BAX* ekspresyonu 4 kattan fazla artmıştır. Buna karşın, vinkristinin bu kombinasyona eklenmesi, *BAX* geninde aşağı regülasyona neden olmuştur. Bu bulgular, *BAX* geninin pro-apoptotik rolü göz önüne alındığında, tekli ve kombine tedavilerin her zaman sinerjik bir etki yaratmadığını ve hücrel dinamiklerin karmaşıklığını vurgulamaktadır.

*BAX* ekspresyonunun genellikle *BCL-2* gibi anti-apoptotik proteinlerin düzeyiyle ters orantılı olduğu ve hücre kaderini belirleyen kritik bir denge oluşturduğu tespit edilmiştir. Meme kanseri hücrelerinde ise yüksek *BAX/BCL-2* oranının artan apoptozis ve kemoterapiye daha iyi yanıtlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Jalili vd., 2016; Sharifi vd., 2015). Bu çalışmada *BAX/BCL2* dengesi değerlendirildiğinde, en yüksek rölatif değer (>3 kat) VPA'nın dosetaksel ile kombinasyonunda olduğu belirlenmiştir ( $P<0,0001$ ). Benzer şekilde VPA + vinkristin sülfat kombinasyonu da yüksek bir oran sergilemiştir (Şekil 4.22). Bu sonuçlar, VPA'nın, özellikle de yaygın olarak kullanılan kemoterapötikler ile kombinasyonlarının, köpek meme kanseri tedavisinde çok önemli ve değerli bir potansiyel taşıdığını açıkça göstermektedir.

*BAX* ekspresyonu aynı zamanda tümör mikroçevrelerinde sıkça görülen hipoksi koşulları da dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilenebilir. Hipoksi altında *BAX*'ın yukarı regüle olması muhtemel olup, bu durum apoptozu teşvik ederek anti-apoptotik proteinlerin etkisini potansiyel olarak dengeleyebilir (Ghanbariasad vd., 2016; Rana vd., 2019). Bu bulgular, *BAX*'ın yalnızca pro-apoptotik bir faktör olarak değil, aynı zamanda köpek meme kanseri tedavi stratejilerinde hedeflenebilecek önemli bir molekül olduğunu vurgulamaktadır.

Çalışmalar, *BAX* ekspresyonunu veya aktivitesini artırmanın özellikle kemoterapi bağlamında meme kanseri hücrelerini apoptoza karşı daha duyarlı hale getirebileceğini göstermiştir. Örneğin, *BAX* düzeylerini yükselten tedaviler, doksorubisin gibi ilaçlara karşı gelişen direnci aşma konusunda umut verici bulunmuş; bu da *BAX*'ın tedaviye yanıtı öngörmede bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür (Kordezangeneh vd., 2015; Sharifi vd., 2015). Bu bağlamda, *BAX* gen ifadesi ve *BAX/BCL2* ekseni çerçevesinde, bu çalışmada VPA'nın dosetaksel ile birlikte kullanımının köpek meme karsinomu kapsamında umut vadeden bir yaklaşım olduğu söylenebilir.

Bir diğer önemli pro-apoptotik BCL-2 aile üyesi gen ise *BID*'dir. *BID*, ekstrinsik ve intrinsik apoptotik yolları birbirine bağlayan kritik bir aracı olarak işlev görür. Aktive olduğunda, BID kaspaz-8 tarafından kesilerek tBID'yi oluşturur ve tBID mitokondriye

geçerek BCL-2 ve BCL-xL gibi anti-apoptotik proteinlerle etkileşime girip MOMP'u tetikler (De Silva vd., 2014). Meme kanserinde, *BID*'in ekspresyonu ve aktivitesi; hormonal sinyalizasyon ve diğer apoptotik düzenleyicilerin varlığı gibi çeşitli etkenlerden etkilenebilir. Yapılan çalışmalar, *BID* ekspresyonunun normal meme dokularına kıyasla meme kanseri dokularında sıklıkla değiştiğini ve bu değişimin tümörlerde gözlenen apoptoz bozukluğuna katkı sunabileceğini göstermiştir (Shao vd., 2021). Örneğin, özellikle hormon reseptör-pozitif bazı meme kanseri alt tiplerinde *BID* düzeylerinin baskılanması, kanser hücrelerinin uzun süre hayatta kalmasına ve apoptozu indükleyen tedavilere karşı direnç kazanmasına yol açabilir (Salhia vd., 2014; Wu vd., 2018).

*BID*'in meme kanserindeki rolü, kemoterapiye verilen yanıtla da ilişkilendirilmektedir. Araştırmalar, daha yüksek *BID* düzeylerine sahip meme kanseri hücrelerinin kemoterapötik ajanlara karşı daha duyarlı olduğunu, çünkü *BID*'in bu tedavilere verilen apoptotik yanıtı güçlendirdiğini göstermiştir (Fu vd., 2021). Buna karşılık, *BID* ekspresyonunun düşük olduğu tümörlerde ise kemoterapiye direnç artarak kanser hücrelerinin tedaviye rağmen hayatta kalması kolaylaşabilir (De Silva vd., 2014; Fu vd., 2021; Salhia vd., 2014). Bu durum, *BID*'in meme kanseri hastalarında tedavi yanıtını öngörebilecek bir biyobelirteç olarak potansiyelini vurgulamaktadır. Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada, özellikle de VPA + dosetaksel kombinasyonu açısından son derece değerli bilgiler elde edilmiştir. Çalışmada *BID* gen ekspresyonu tüm koşullarda yukarı regüle olmuştur. Tek başına VPA ve dosetaksel daha sınırlı bir artış sağlarken ( $\geq 2,5$  kat), vinkristin sülfat + VPA kombinasyonu orta düzeyde bir yükselme göstermiştir. Diğer gen belirteçlerinde olduğu gibi, en yüksek artış, VPA ve dosetaksel kombinasyonunda ( $> 5,8$  kat) gözlenmiş ve bu kombinasyon, en etkili uygulama olarak öne çıkmıştır. Yüksek *BID* düzeylerine sahip meme kanseri hücrelerinin kemoterapötik ajanlara karşı daha duyarlı olduğu göz önüne alındığında VPA'nın dosetaksel ile kombinasyonunun yeni tedavi bakış açıları için potansiyel bir hedef olabileceği sonucuna varılmıştır.

PUMA, apoptozis sürecinde önemli rol oynayan bir diğer pro-apoptotik BCL-2 ailesi üyesidir. Özellikle meme kanseri bağlamında dikkat çekicidir. Tümör baskılayıcı protein

P53 tarafından hücresel stres veya DNA hasarına yanıt olarak aktive edilen PUMA, BCL-2 ve BCL-XL gibi anti-apoptotik proteinleri inhibe ederek BAX ve BAK gibi pro-apoptotik proteinlerin aktivasyonunu destekler (Fricker vd., 2010; Schubert vd., 2018). Meme kanserinde *PUMA* geni ekspresyonu ve aktivitesi sıklıkla baskılanmıştır; bu durum kanser hücrelerinin hayatta kalma kabiliyeti ve kemoterapi direncinin artmasına neden olur (Al-Bahlani vd., 2011; Um vd., 2011). Ayrıca, meme tümörlerindeki kanser kök hücrelerinin düzenlenmesinde *PUMA*'nın önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir (Sun vd., 2014). Araştırmalar, *PUMA* fonksiyonunun yeniden sağlanmasının bu tedavilere duyarlılığı artırabileceğini (Ma vd., 2013; Roberts vd., 2011) ve dolayısıyla meme kanseri tedavilerinde apoptozise aracılık ettiği için etkili bir belirteç olabileceğini göstermiştir (Roberts vd., 2011; Zhang vd., 2010). Ek olarak, *PUMA*'nın da ekspresyon seviyeleri meme tümörlerinin agresifliği ile ilişkilidir. Yüksek *PUMA* ekspresyonu, tümör hücrelerinin strese yanıt olarak apoptoza uğrama eğiliminde artış gösterdiği daha iyi bir prognoz ve tedavi sonuçları ile ilişkilidir (Bektas vd., 2015; Sun vd., 2014). Buna karşılık, düşük *PUMA* seviyeleri, daha agresif tümör davranışı ve daha zayıf tedavi yanıtı ile ilişkilidir (Ambroise vd., 2015; Thorburn vd., 2014). Bu tez çalışmasındaki bulgular, VPA + dosetaksel kombinasyonu açısından yine oldukça dikkat çekici bir veriye işaret etmektedir. *PUMA* gen ekspresyonu sonuçlarında, bu kombinasyon en güçlü etkiyi göstererek ~4 kat yukarı regülasyon sağlamıştır. Diğer tüm koşullarda, *PUMA* ekspresyonu 2 katın altında kalmıştır. Düşük *PUMA* ekspresyonunun, daha agresif tümör özellikleri ve daha düşük tedavi etkinliğine neden olabileceği düşünüldüğünde bu VPA kombinasyonunun ileri tekniklerle araştırılmaya değer bir tedavi seçeneği olabileceği sonucuna varılmıştır.

*ATM*, fosfatidilinozitol 3-kinaz ile ilişkili protein kinazlar (phosphatidylinositol 3-kinases: PIKKs) süper ailesine ait önemli bir onkosupresör gendir (Moslemi vd., 2021; Stucci vd., 2021). Normal fizyolojik koşullarda memeli hücreleri, hasara karşı hücre döngüsünün ilerlemesini durdurarak, DNA hasarını onararak veya eğer DNA onarılamayacak kadar hasar görmüşse apoptozu indükleyerek yanıt verir. *ATM*'nin, bu süreçte kilit roller oynadığı açıkça gösterilmiştir (Angèle ve Hall, 2000). Bu gen, meme kanserlerinde genomik stabiliteyi koruyarak ve DNA hasarına karşı hücresel yanıtı düzenleyerek kritik bir tümör baskılayıcı olarak işlev görür. *ATM*, DNA çift zincir

kırıkları gibi durumlarda hücre döngüsünün durdurulması, DNA onarımı ve apoptoz gibi DNA hasar yanıt yollarını aktive etmek için gerekli olan bir serin/treonin kinazı kodlar (Balmus vd., 2019; Moslemi vd., 2021). *ATM* mutasyonları veya işlev kaybı, tümör oluşumuna yol açabilir (Liu vd., 2014).

*ATM*'nin inaktivasyonu, hücrenin DNA hasarına etkili bir şekilde yanıt verme yeteneğini zayıflatarak daha agresif meme tümörleri ve kötü prognoz ile ilişkilendirilir (Ma vd., 2016). Araştırmalar, *ATM* mutasyonlarının meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde yaygın olduğunu ve DNA'ya zarar veren ajanlara karşı artan duyarlılığa yol açabileceğini göstermektedir (Angèle ve Hall, 2000; Xu vd., 2013). Örneğin, patojenik *ATM* mutasyonları taşıyan kadınların meme kanseri geliştirme riski yüksektir ve bu mutasyonlar özellikle kalıtsal meme kanseri bağlamında önemlidir (Lawrence vd., 2014; Stucci vd., 2021). Bazı meme kanserlerinde *ATM*'nin inhibe edilmesi, kanser hücrelerini seçici olarak öldüren ve normal hücreleri koruyan sentetik letaliteyi indükleyebilir (Sun vd., 2012). Bu tez çalışmasında VPA'nın vinkristin sülfat ve dosetaksel ile ikili kombinasyonları çok belirgin bir şekilde *ATM* ekspresyonunu aktive etmiştir. İnsan meme karsinomu hakkında yukarıda da özetlendiği üzere, *ATM* gibi oncospresör genlerin ekspresyon durumu ve klinik süreçler hakkında dikkate değer bir kümülatif bilgi mevcuttur. Ancak köpek meme karsinomlarında bu konu hakkında bilgi oldukça yetersizdir. Yukarıda da açıklandığı gibi meme kanserlerinde *ATM* geninin yukarı regülasyonu veya aşağı regülasyonu, tedavi etkinliğini belirlemede kritik bir role sahiptir ve bu durum tümörün moleküler özelliklerine bağlı olarak değişiklik gösterir. *ATM*'nin yukarı regülasyonu, DNA hasar yanıtını güçlendirerek DNA onarımı ve apoptoz mekanizmalarını aktive edebilir, bu da DNA'ya zarar veren kemoterapötik ajanların etkisini artırabilir. Ancak, *ATM*'nin yüksek aktivitesi bazı durumlarda hasarın onarılmasını kolaylaştırarak kanser hücrelerinin hayatta kalmasına ve tedaviye direnç gelişmesine neden olabilir. Buna karşılık, *ATM*'nin aşağı regülasyonu veya inhibisyonu, özellikle *BRCAl/2* mutasyonu taşıyan tümörlerde, DNA onarım yollarını devre dışı bırakarak kanser hücrelerinin ölümüne yol açabilir. Bu nedenle, *ATM*'nin yukarı veya aşağı regülasyonuna yönelik tedavi yaklaşımlarının etkinliği, kanser hücresinin genetik yapısına ve tedaviye verdiği yanıtı bağlıdır. Tedavi stratejileri, tümör alt tipi ve moleküler profiline göre dikkatle planlanmalıdır. Bu çalışmada, her ne kadar VPA

kombinasyonlarının belirgin bir etki gösterdiği belirlenmiş olsa da ATM belirteci bakımından kesin bir yargıya varmak doğru değildir. Dolayısıyla, daha farklı kemoterapötik kombinasyonları ile daha mekanistik yaklaşımlara sahip kapsamlı moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmadaki dikkat çekici sonuçlardan birisi de apoptozis mekanizmalarında dolayısıyla kanser olgularında önemli bir belirteç olan *CASP3* genindeki, VPA + Dosetaksel kombinasyonu uygulamasıyla meydana gelen oldukça belirleyici yukarı regülasyondur. *CASP3* geni, apoptozis sürecinde temel bir rol oynayan ve hücre sel dengeyi koruyarak kanser gelişimini önleyen kaspaz-3 enziminin üretiminden sorumludur. Bu enzim, hücre ölüm sinyalleri ile aktive olur ve hücre sel yapıların parçalanmasını sağlayarak hücre sağkalımını regüle eder. Meme kanserinde *CASP3* çift yönlü bir rol üstlenir. Bir yandan, aktivasyonu kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavilerin etkinliğini artırarak kanser hücrelerinin ölümünü destekler. Örneğin, *CASP3* aktivitesinin artırılması, meme kanseri hücrelerinin tedavilere duyarlılığını önemli ölçüde yükseltebilir (Nan vd., 2019). Diğer yandan, *CASP3* ekspresyonunun azalması veya düzensiz çalışması, tedavi direnci ve kanser ilerlemesiyle ilişkilendirilmiştir. Azalmış kaspaz-3 seviyeleri, daha agresif tümör türleri ve kötü klinik sonuçlarla bağlantılıdır (Aushev vd., 2018). Ayrıca, *CASP3*'ün bağışıklık sistemi ve tümör mikroçevresi arasındaki etkileşimlerde rol oynayarak bağışıklık yanıtından kaçış veya metastaz gibi süreçlere katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (Zhou vd., 2022).

Tedavi açısından bakıldığında, *CASP3* aktivitesini artırmaya yönelik stratejiler, özellikle düşük kaspaz-3 enzimi seviyelerinin neden olduğu dirençli tümörlerde tedavi etkinliğini artırabilir (Kim vd., 2010). Bu tez çalışmasındaki tüm deneysel koşullar *CASP3* geninde yukarı regülasyona neden olmakla birlikte bu ikili kombinasyon uygulamasıyla negatif kontrole göre yaklaşık 5,50 kat yukarı regülasyon gözlenmiştir. Bu sonuç özellikle veteriner onkolojisi açısından değerlidir. Çünkü epigenetik temelli kemoterapötik ajanların kullanımı insan tıbbına göre sınırlıdır. Bu tez çalışmasındaki *CASP3* aktivasyonu bulgusu, VPA'nın yaygın kullanılan diğer kemoterapi ajanları ile kombinasyonlarının özellikle de *CASP3* hedefi açısından köpeklerde de etkin bir şekilde kullanılabileceği potansiyelini açığa vurmaktadır.

VPA'nın dosetaksel ile kombinasyonu uygulaması, karsinogenezis konusunda çok önemli iki gen olan *P53* ve *P21* ekspresyonlarında dikkat çekici sonuçlara yol açmıştır. *P53* gen ekspresyonunu yaklaşık 6,5 kat, *P21* gen ekspresyonunu ise yaklaşık 8 kat artırarak en güçlü etkiyi göstermiştir. Her iki gen için de bu kombinasyon, diğer koşullardan istatistiksel olarak anlamlı farklılık yaratmıştır ( $P<0,001$ ;  $P<0,0001$ ). *P53* geni, genellikle “genomun koruyucusu” olarak adlandırılan ve meme kanseri de dahil olmak üzere kanser gelişimini önlemede merkezi bir rol oynayan önemli bir tümör baskılayıcı gendir. *P53*, DNA hasarı, oksidatif stres veya onkogen aktivasyonu gibi hücrel streslere yanıt olarak aktive olan bir proteini kodlar (Sato vd., 2018; Wang vd., 2021). Aktivasyon sonrasında *P53*, transkripsiyon faktörü olarak işlev görerek hücre döngüsünün durdurulması, DNA onarımı, apoptoz ve yaşlanma süreçleri ile ilgili birçok hedef genin ekspresyonunu düzenler (Sato vd., 2018; Wang vd., 2021).

Bu çalışmada *P21* geninde VPA + dosetaksel kombinasyonu diğer deneysel koşullara kıyasla çok daha belirgin bir yukarı regülasyon göstermiştir ( $P<0,0001$ ). Bu kullanılan kombinasyonun köpek meme karsinomundaki etkinliği hakkında oldukça değerli ipuçları sunmaktadır. *P53* geninin önemli bir downstream hedefi olan *P21* geni (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A: *CDKN1A*), siklin-bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olan *P21* proteinini kodlar. *P21*, *P53*'e bağlı hücre döngüsü duraklamasını CDK aktivitesini inhibe ederek aracılık eder ve böylece hücre döngüsünün G1/S ve G2/M kontrol noktalarında durmasını sağlar (Wang vd., 2021). Bu süreç, hücreye DNA replikasyonu veya mitoz öncesinde hasarlı DNA'yı onarma zamanı tanır. Meme kanserinde *P53* ve *P21* arasındaki ilişki önemlidir, çünkü etkili hücre döngüsü kontrolü için işlevsel bir *P53-P21* eksenine gereklidir. Bu çalışmada, VPA + dosetaksel kombinasyonunun hem *P53* hem de *P21* genlerini çok belirgin bir şekilde yukarı regüle etmesi, bu kombinasyonun tümör baskılayıcı yolları aktif hale getirdiğini göstermektedir. *P53*'ün yukarı regülasyonu, DNA hasar yanıtlarını güçlendirerek hücre döngüsünün durdurulmasını ve apoptozun indüklenmesini sağlayabilir, böylece kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesi engellenebilir. Bununla birlikte, *P21*'in yukarı regüle edilmesi, hücre döngüsünü siklin-bağımlı kinazları inhibe ederek durdurur ve hücrelerin DNA onarımı veya apoptozis sürecine geçişini kolaylaştırır. HDACi'ler, histon asetilasyonunu

artırarak tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu teşvik eder. Bu durum, HDACi'nin kanser hücrelerinde genetik stabiliteyi artırarak büyüme kontrolü ve tedavi etkinliğini sağlama potansiyelini ortaya koymaktadır. Bu çalışmadaki bulgular, VPA'nın dosetaksel ile kombinasyonunun, *P53-P21* eksenini hedef alarak etkili bir terapötik strateji olabileceğini desteklemektedir.

Bu tez çalışmasında, VPA ve dosetaksel kombinasyonunun, köpek meme karsinomu hücrelerinde güçlü bir sinerjik etki yarattığı ve *P53*, *P21*, *CASP3*, *ATM*, *PUMA*, *BID*, *BAX* gibi tümör baskılayıcı genlerde, diğer deneysel koşullar ile karşılaştırıldığında belirgin bir yukarı regülasyon sağladığı görülmüştür. Bu istenen sonuç aynı zamanda *BCL-2* ve *MCL-1* gen ifadelerindeki anlamlı negatif regülasyon ile de desteklenmiştir (Şekil 4.23). Bu durum, VPA'nın güçlü bir HDACi olarak histon asetilasyonunu artırarak tümör baskılayıcı gen ekspresyonunu teşvik etmesi ve dosetakselin mikrotübül stabilizasyonu yoluyla mitotik duraklama ve apoptozu indüklemesi ile ilişkilendirilebilir. Ancak, üçlü kombinasyonda (VPA, vinkristin sülfat ve dosetaksel) bu genlerde beklenen yukarı regülasyonun gözlenmemesi, ilaçların birbirinin etkilerini baskılaması veya hücre sinyal yollarında olası bir negatif geri besleme mekanizmasının devreye girmesiyle açıklanabilir. Özellikle vinkristin sülfat, mikrotübül dinamiklerini bozarak mitotik duraklama sağlasa da, diğer ilaçların etkisini azaltmış veya hücrel stres yanıtlarını değiştirmiş olabilir. Üçlü kombinasyonun daha az etkili olması, gen ekspresyon profillerinde ve apoptoz sinyal yollarında yetersiz aktivasyona yol açmış ve tedavi etkinliğini sınırlamıştır.

Bu tez çalışması, VPA ve dosetaksel kombinasyonunun köpek meme karsinomu hücrelerinde güçlü bir terapötik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir; ancak üçlü kombinasyonun etkinliğini artırmak için ilaç dozlarının ve uygulama protokollerinin optimize edilmesi gereklidir. Bu bağlamda, vinkristin sülfat yerine daha uyumlu bir ajan seçilmesi veya alternatif kombinasyonların denenmesi mantıklı bir yaklaşım olabilir. Örneğin, başka bir mikrotübül hedefleyici ajan ya da DNA hasarını artırarak *P53* ve *P21* gibi genlerin aktivitesini destekleyen farklı bir kemoterapötik ilaç, sinerjik etkiyi artırabilir. Yeni kombinasyonlarla daha kapsamlı araştırmalar yapmak, tedavi stratejisini geliştirmek için önemli bir adım olacaktır.

VPA'nın kemoterapiyle kombine kullanımı, özellikle agresif tümörler gibi zorlu tedavi gerektiren kanser türlerinde etkileyici sonuçlar vermektedir. SCLC hastalarında yapılan çalışmalar, bu stratejinin önemini göstermiştir (Chu vd., 2013; Hashemi-Sheikhshabani vd., 2019; Leiva vd., 2012; Münster vd., 2007). Ayrıca, VPA'nın sadece kemoterapi ile değil, hedefe yönelik diğer standart tedavilerle de kombinasyon halinde terapötik etkinliği artırabileceği bilinmektedir (Juengel vd., 2013; Park vd., 2020; Song vd., 2017). Bu bulgular, VPA'nın benzer moleküler dinamikleri barındıran köpek kanserleri için kemoterapi rejimlerinde önemli bir destekleyici ajan olabileceğini ve kanser tedavisinde daha etkili stratejiler geliştirilmesine katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

Günümüzde, kanser araştırmaları insan tıbbında büyük ilerlemeler kaydetmiştir ve özellikle epigenetik temelli kemoterapotik ajanlar, klasik tedavilere ek olarak önemli bir alternatif ya da destek tedavi unsuru hâline gelmiştir. Epigenetik düzenlemeleri hedef alan ilaç ve yaklaşımlar—HDACi, DNMTi veya diğer kromatin yeniden şekillendirme stratejileri—hem laboratuvar çalışmaları hem de klinik denemeler açısından oldukça detaylı biçimde incelenmektedir. İnsan tıbbında bu gelişmeler, kanser dâhil birçok kompleks hastalığın tedavisinde yeni ufuklar açarken aynı zamanda daha kişiselleştirilmiş, yan etkileri daha az, hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin de önünü açmıştır. Ne yazık ki veteriner hekimliği alanında, epigenetik ve genetik temelli araştırmalar henüz beklenen düzeye ulaşamamıştır. Bu durumun birçok nedeni bulunabilir. Bir yandan, insan tıbbındaki araştırmaların yüksek finansal destek ve çok disiplinli iş birliği ağlarıyla ilerlemesi, temel bilimlerden klinik uygulamalara kadar geniş bir araştırma yelpazesi sunmaktadır. Diğer yandan, veteriner hekimliği alanında araştırma fonlarının, yetkin araştırma ekiplerinin ve yaygın çalışma gruplarının görece kısıtlı olması, epigenetiği merkeze alan projelerin sayısını oldukça sınırlandırmaktadır.

Köpekler, özellikle son yıllarda “ailenin bir üyesi” olarak kabul edildiği için, onların sağlığıyla ilgili yapılacak her türlü yenilikçi araştırma büyük önem taşımaktadır. Pek çok insan için, bir köpeğin hastalanması, özellikle de kanser gibi zorlayıcı bir hastalıkla karşılaşması, hem hayvan hem de sahibi için son derece yıpratıcı bir süreçtir (Ardicli

vd., 2024). Köpeklerde kanser, tıpkı insanlardaki gibi çok çeşitli alt türlere ve biyolojik karmaşıklığa sahiptir. Bazı türleri genetik yatkınlıklara, bazıları ise çevresel veya beslenme faktörlerine, hatta virüs kaynaklı etkenlere kadar değişen faktörlerle ilişkilendirilmektedir. Ancak köpek genomu ve özellikle de epigenomuna dair bilgi eksikliği, hastalık mekanizmalarını tam olarak anlamada ve hedefe yönelik tedaviler geliştirmede önemli bir engel oluşturmaktadır. Bu noktada, insan tıbbında elde edilen bulguların, veteriner hekimliğine uyarlanması gerekmektedir; çünkü epigenetik düzenleme mekanizmaları evrenseldir ve köpekler gibi memeli türlerinde de benzer rol oynamaktadır. Epigenetik temelli kemoterapotik ajanlar—örneğin HDACi veya DNMTi—köpeklerde de potansiyel ilaçlar olarak kullanılabilir (Biondi vd., 2021). Nitekim sınırlı sayıda çalışmada, bu ilaçların bazı kanser türlerinde (lenfoma, mast hücre tümörleri vb.) kısmi faydalar sağladığı rapor edilmiştir. Ancak bu çalışmaların kapsamının darlığı ve uzun vadeli takip sonuçlarının yetersizliği, henüz net bir kanıya varmayı güçleştirmektedir. Üstelik her kanser türü farklı epigenetik imzaya sahip olduğundan, tek bir ilacın bütün köpek kanserleri için etkili olması beklenemez. Bu da daha fazla moleküler düzeyde araştırma, biyobelirteç tespiti ve hedef keşfi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Köpeklerde kansere yönelik epigenetik araştırmalar sadece klinik fayda açısından değil, aynı zamanda insan tıbbıyla da doğrudan ilişkili bir “karşılıklı model” oluşturma potansiyeline sahiptir. Çünkü köpekler, insanların ev ortamındaki en yakın yoldaşlarıdır ve benzer çevresel faktörlere maruz kalırlar. Dolayısıyla, benzer yaşam koşullarında gelişen tümörlerin epigenetik mekanizmalarının aydınlatılması, hem veteriner hem de insan tıbbı için karşılıklı yarar sağlayabilir. Üstelik bir köpeğin kanserle mücadelesi yalnızca tıbbi ve veteriner hekimliği boyutuyla değil, duygusal ve ekonomik boyutlarıyla da oldukça yıpratıcı olabilir. Sahipler, “ailenin bir üyesi” gibi gördükleri dostlarının sağlığı için her türlü fedakârlığı yapmaya hazırdır; ancak mevcut tedavi seçenekleri yetersiz kaldığında yaşanan acı ve belirsizlik, çok daha derin bir probleme dönüşür.

Bu sebeple, köpeklerde (ve genel olarak veteriner hekimliğinde) epigenetik temelli çalışmaların artması büyük önem taşır. Moleküler tanı yöntemlerinden hedefe yönelik

ilaç geliştirmeye, klinik araştırmalardan uzun süreli takip çalışmaları oluşturmaya kadar pek çok aşamada multidisipliner bir yaklaşıma ihtiyaç vardır. Genetik analizlerin yanında epigenetik profil çıkarmaya (DNA metilasyon haritaları, histon modifikasyon paternleri, non-kodlayıcı RNA'ların analizi vb.) yönelik altyapılar kurulmalı, sonuçlar biyoinformatik ve biyostatistik araçlarla derinlemesine incelenmelidir. Ayrıca, farmakogenomik veriler ışığında, her köpeğın kendi genetik ve epigenetik özelliklerine göre tedavi almasına yönelik kişiselleştirilmiş veteriner uygulamaları kurgulanabilir.

Sonuç olarak, insan tıbbında epigenetik temelli kemoterapotik ajanlar ve genetik-epigenetik odaklı çalışmalar hayli gelişmişken, veteriner hekimliğı alanında özellikle köpek kanserlerinde benzeri düzeyde araştırma ve veri bulunmaması önemli bir eksikliktir. Bu alanda yapılacak geniş çaplı çalışmalar, sadece evcil hayvanların değıl, aynı zamanda bu hayvanlarla bir arada yaşayan insanların da refahını artıracak, daha bütüncül bir sağılık anlayışına (Tek Sağılık Konsepti Kapsamında) hizmet edecektir. Bu nedenle, köpeklerde kansere yönelik kapsamlı moleküler çalışmaların değıeri büyüktür ve bu çalışmalar, tıp ve veteriner hekimliğı arasındaki araştırma köprülerini güçlendirecek büyük bir potansiyele sahiptir. Bu tez çalışmasının sonuçlarından yola çıkarak, VPA ve dosetaksiel kombinasyonunun önemli bir tedavi seçeneğı olabileceğı görülmüştür. Elde ettiğimiz bu sonuç, hem sitotoksikite hem de karsinogenezis mekanizmaları bakımından önemli genlerin ekspresyon profillerinin değıerlendirilmesiyle doğırulanmıştır. Bu ikili kombinasyona vinkristin sülfatın eklenmesi beklenen etkiyi yaratmasa da bu konuda daha kapsamlı moleküler analizlere ihtiyaç vardır. Aynı zamanda, bir sonraki inceleme basamağı olarak bu kombinasyonun kliniğı uyarlanabilmesi için *in vivo* olarak araştırılması gerekliliğı açıktır. Diğeri çok önemli bir nokta ise VPA ve dosetaksiel kombinasyonunun köpek meme kanseri üzerindeki etkilerini doğırudan inceleyen spesifik bir bilimsel çalışma bulunmamasıdır. Dolayısıyla, bu çalışmadan elde edilen bulgular veteriner klinik genetik ve onkoloji alanlarına yenilikçi bakış açıları getirme ve ileride yapılacak çalışmalara rehber olma potansiyeline sahiptir. Aynı zamanda, bu çalışmanın sonuçları, köpek meme tümörlerinde epigenetik düzenlemenin ve ilgili ilaçların kliniğı uyarlanmasının ne kadar önemli olduğunu ve konvansiyonel tedavi yaklaşımlarının yenilikçi kemoterapi bakış açısı ile desteklenmesinin gerekliliğini vurgulamaktadır.

## KAYNAKLAR

- Agudelo Garcia, P. A., Gardner, M., Freitas, M. A., & Parthun, M. R. (2019). Isolation of proteins on nascent chromatin and characterization by quantitative mass spectrometry. *Protein Acetylation: Methods and Protocols*, 17-27. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9434-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9434-2_2)
- Aguilar, A., Becker, L., Tedeschi, T., Heller, S., Iomini, C., & Nachury, M. V. (2014).  $\alpha$ -Tubulin K40 acetylation is required for contact inhibition of proliferation and cell–substrate adhesion. *Molecular Biology of the Cell*, 25(12), 1854-1866. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-10-0609>
- Akbarzadeh, L., Zanjani, T. M., & Sabetkasaei, M. (2016). Comparison of anticancer effects of carbamazepine and valproic acid. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 18(10). <https://doi.org/10.5812/ircmj.37230>
- Akgün, O. (2017). Kök hücre WNT yolak inhibitörü olan niklozamidin, histon deasetilaz inhibitörü (hdac) olan valproik asit ile kombinasyonlarının akciğer kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması. Bursa Uludağ Üniversitesi.
- Akgun, O., Erkisa, M., & Ari, F. (2019). Effective and new potent drug combination: histone deacetylase and Wnt/ $\beta$ -catenin pathway inhibitors in lung carcinoma cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(9), 15467-15482. <https://doi.org/10.1002/jcb.28813>
- Akimova, D., Wlodarczyk, B. J., Lin, Y., Ross, M. E., Finnell, R. H., Chen, Q., & Gross, S. S. (2017). Metabolite profiling of whole murine embryos reveals metabolic perturbations associated with maternal valproate-induced neural tube closure defects. *Birth Defects Research*, 109(2), 106-119. <https://doi.org/10.1002/bdra.23583>
- Aktipis, C. A., & Nesse, R. M. (2013). Evolutionary foundations for cancer biology. *Evolutionary Applications*, 6(1), 144-159. <https://doi.org/10.1111/eva.12034>
- Al-Bahlani, S., Fraser, M., Wong, A., Sayan, B., Bergeron, R., Melino, G., & Tsang, B. (2011). P73 regulates cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells via a calcium/calpain-dependent mechanism. *Oncogene*, 30(41), 4219-4230. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.134>
- Al Shboul, S., El-Sadoni, M., Alhesa, A., Abu Shahin, N., Abuquteish, D., Abu Al Karsaneh, O., Alsharaiah, E., Ismail, M. A., Tyutyunyk-Massey, L., & Alotaibi, M. R. (2023). NOXA expression is downregulated in human breast cancer undergoing incomplete pathological response and senescence after neoadjuvant chemotherapy. *Scientific Reports*, 13(1), 15903. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42994-2>
- Algahtani, H., Shirah, B., Alkahtani, F., Alrefaei, K., Alamri, A., & Aldarmahi, A. (2019). Antiepileptic drugs usage in pregnant women with epilepsy in Saudi Arabia. *Journal of Epilepsy Research*, 9(2), 134. <https://doi.org/10.14581/jer.19014>
- Amarin, Z. O., & Obeidat, A. Z. (2010). Effect of folic acid fortification on the incidence of neural tube defects. *Paediatric and perinatal epidemiology*, 24(4), 349-351. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3016.2010.01123.x>
- Ambroise, G., Portier, A., Roders, N., Arnoult, D., & Vazquez, A. (2015). Subcellular localization of PUMA regulates its pro-apoptotic activity in Burkitt's lymphoma B cells. *Oncotarget*, 6(35), 38181. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5901>

- Anderson, G. R., Wardell, S. E., Cakir, M., Crawford, L., Leeds, J. C., Nussbaum, D. P., Shankar, P. S., Soderquist, R. S., Stein, E. M., & Tingley, J. P. (2016). PIK3CA mutations enable targeting of a breast tumor dependency through mTOR-mediated MCL-1 translation. *Science Translational Medicine*, 8(369), 369ra175. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aae0348>
- Angèle, S., & Hall, J. (2000). The ATM gene and breast cancer: is it really a risk factor? *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 462(2-3), 167-178. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(00\)00034-X](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00034-X)
- Angstadt, A. Y., Motsinger-Reif, A., Thomas, R., Kisseberth, W. C., Guillermo Couto, C., Duval, D. L., Nielsen, D. M., Modiano, J. F., & Breen, M. (2011). Characterization of canine osteosarcoma by array comparative genomic hybridization and RT-qPCR: signatures of genomic imbalance in canine osteosarcoma parallel the human counterpart. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 50(11), 859-874. <https://doi.org/10.1002/gcc.20908>
- Ardicli, S., Ardicli, O., Yazici, D., Pat, Y., Babayev, H., Xiong, P., Zeyneloglu, C., Garcia-Sanchez, A., Shi, L. L., & Viscardi, O. G. (2024). Epithelial barrier dysfunction and associated diseases in companion animals: Differences and similarities between humans and animals and research needs. *Allergy*, 79:3238–3268. <https://doi.org/10.1111/all.16343>
- Ardicli, S., Samli, H., Mecitoglu, G., Vatansever, B., & Mutlu, A. M. (2021). The establishment of primary cell culture from canine mammary gland tumor. *Journal of Cellular Biotechnology*, 7(1), 57-65. <https://doi.org/10.3233/JCB-210036>
- Arı, F., Ikitimur, E., & Ulukaya, E. (2010). The ATP assay, but not the MTT assay, detects further cytotoxicity of the combination of anthracycline-based therapy with histone deacetylase inhibitor (valproic acid) in breast cancer cells. *Turkish Journal of Biochemistry-Türk Biyokimya Dergisi*, 35(4), 293-299.
- Arita, K., Isogai, S., Oda, T., Unoki, M., Sugita, K., Sekiyama, N., Kuwata, K., Hamamoto, R., Tochio, H., & Sato, M. (2012). Recognition of modification status on a histone H3 tail by linked histone reader modules of the epigenetic regulator UHRF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(32), 12950-12955. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203701109>
- Asim, M. N., Ibrahim, M. A., Malik, M. I., Razzak, I., Dengel, A., & Ahmed, S. (2023). Histone-net: a multi-paradigm computational framework for histone occupancy and modification prediction. *Complex ve Intelligent Systems*, 9(1), 399-419. <https://doi.org/10.1007/s40747-022-00802-w>
- Atale, N., Gupta, S., Yadav, U., & Rani, V. (2014). Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *Journal of microscopy*, 255(1), 7-19. <https://doi.org/10.1111/jmi.12133>
- Audia, J. E., & Campbell, R. M. (2016). Histone modifications and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(4), a019521. 1. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019521>
- Aushev, V. N., Lee, E., Zhu, J., Gopalakrishnan, K., Li, Q., Teitelbaum, S. L., Wetmur, J., Degli Esposti, D., Hernandez-Vargas, H., & Herceg, Z. (2018). Novel predictors of breast cancer survival derived from miRNA activity analysis. *Clinical Cancer Research*, 24(3), 581-591. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0996>

- Avvakumov, N., & Cote, J. (2007). The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene*, 26(37), 5395-5407. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210608>
- Aydoğan, A. (2010). Köpek meme tümörlerinin tanısında histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler.
- Aztopal, N., Erkisa, M., Erturk, E., Ulukaya, E., Tokullugil, A. H., & Ari, F. (2018). Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis in breast cancer stem cells. *Chemico-Biological Interactions*, 280, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.003>
- Baba, Y., Watanabe, M., Murata, A., Shigaki, H., Miyake, K., Ishimoto, T., Iwatsuki, M., Iwagami, S., Yoshida, N., & Oki, E. (2014). LINE-1 hypomethylation, DNA copy number alterations, and CDK6 amplification in esophageal squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 20(5), 1114-1124. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1645>
- Balmus, G., Pilger, D., Coates, J., Demir, M., Sczaniecka-Clift, M., Barros, A. C., Woods, M., Fu, B., Yang, F., & Chen, E. (2019). ATM orchestrates the DNA-damage response to counter toxic non-homologous end-joining at broken replication forks. *Nature communications*, 10(1), 87. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07729-2>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, 21(3), 381-395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Barber, M. F., Michishita-Kioi, E., Xi, Y., Tasselli, L., Kioi, M., Moqtaderi, Z., Tennen, R. I., Paredes, S., Young, N. L., & Chen, K. (2012). SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature*, 487(7405), 114-118. <https://doi.org/10.1038/nature11043>
- Barnes, C. E., English, D. M., & Cowley, S. M. (2019). Acetylation ve Co: an expanding repertoire of histone acylations regulates chromatin and transcription. *Essays in biochemistry*, 63(1), 97-107. <https://doi.org/10.1042/EBC20180061>
- Basu, A., & Haldar, S. (1998). The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Molecular human reproduction*, 4(12), 1099-1109. <https://doi.org/10.1093/molehr/4.12.1099>
- Baylin, S. B., & Jones, P. A. (2016). Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(9), a019505. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019505>
- Beck, J., Hennecke, S., Bornemann-Kolatzki, K., Urnovitz, H. B., Neumann, S., Stroebel, P., Kaup, F.-J., Brenig, B., & Schuetz, E. (2013). Genome aberrations in canine mammary carcinomas and their detection in cell-free plasma DNA. *PloS one*, 8(9), e75485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075485>
- Bektas, O., Uner, A., Buyukasik, Y., Uz, B., Bozkurt, S., Eliacik, E., Işik, A., Haznedaroglu, I. C., Goker, H., & Demiroglu, H. (2015). Clinical and pathological correlations of marrow PUMA and P53 expressions in myelodysplastic syndromes. *Apmis*, 123(5), 445-451. <https://doi.org/10.1111/apm.12369>
- Belanger, J. M., Bellumori, T. P., Bannasch, D. L., Famula, T. R., & Oberbauer, A. M. (2017). Correlation of neuter status and expression of heritable disorders. *Canine genetics and epidemiology*, 4, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s40575-017-0044-6>

- Benedetti, R., Conte, M., & Altucci, L. (2015). Targeting histone deacetylases in diseases: where are we? *Antioxidants and redox signaling*, 23(1), 99-126. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5776>
- Berger, L., Kolben, T., Meister, S., Kolben, T. M., Schmoeckel, E., Mayr, D., Mahner, S., Jeschke, U., Ditsch, N., & Beyer, S. (2020). Expression of H3K4me3 and H3K9ac in breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 146, 2017-2027. <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03265-z>
- Berghmans, T., Lafitte, J.-J., Scherpereel, A., Ameye, L., Paesmans, M., Meert, A.-P., Colinet, B., Tulippe, C., Willems, L., & Leclercq, N. (2015). VAC chemotherapy with valproic acid for refractory/relapsing small cell lung cancer: a phase II study. *ERJ Open Research*, 1(2). <https://doi.org/10.1183/23120541.00029-2015>
- Berridge, M. J., Downes, C. P., & Hanley, M. R. (1989). Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. *cell*, 59(3), 411-419. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90026-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90026-3)
- Berridge, M. V., Tan, A. S., McCoy, K. D., & Wang, R. (1996). The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*, 4(1), 14-19.
- Bhatt, D., Verma, A. K., Bharti, P. S., Goyal, Y., Alsahli, M. A., Almatroudi, A., Rahmani, A. H., Almatroodi, S., Joshi, P. C., & Alam, M. M. (2021). BCL-2 (-938C> A), BAX (-248G> A), and HER2 Ile655Val Polymorphisms and Breast Cancer Risk in Indian Population. *Journal of Oncology*, 2021(1), 8865624. <https://doi.org/10.1155/2021/8865624>
- Biondi, L. R., Tedardi, M. V., Gentile, L. B., Chamas, P. P. C., & Dagli, M. L. Z. (2021). Quantification of global DNA methylation in canine mammary gland tumors via immunostaining of 5-methylcytosine: Histopathological and clinical correlations. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 628241. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.628241>
- Birdi, R., Kumar, B. S., Gupta, K., Kashyap, N., & Kumar, A. (2019). Circulating level of heat shock protein 27 is elevated in dogs with mammary tumors. *3 Biotech*, 9, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1765-x>
- Boddy, A. M. (2023). The need for evolutionary theory in cancer research. *European Journal of Epidemiology*, 38(12), 1259-1264. <https://doi.org/10.1007/s10654-022-00936-8>
- Boeckeler, K., Adley, K., Xu, X., Jenkins, A., Jin, T., & Williams, R. S. (2006). The neuroprotective agent, valproic acid, regulates the mitogen-activated protein kinase pathway through modulation of protein kinase A signalling in *Dictyostelium discoideum*. *European journal of cell biology*, 85(9-10), 1047-1057. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.04.013>
- Boggs, A. E., Vitolo, M. I., Whipple, R. A., Charpentier, M. S., Goloubeva, O. G., Ioffe, O. B., Tuttle, K. C., Slovic, J., Lu, Y., & Mills, G. B. (2015).  $\alpha$ -Tubulin acetylation elevated in metastatic and basal-like breast cancer cells promotes microtentacle formation, adhesion, and invasive migration. *Cancer Research*, 75(1), 203-215. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3563>
- Bonasio, R., Tu, S., & Reinberg, D. (2010). Molecular signals of epigenetic states. *Science*, 330(6004), 612-616. <https://doi.org/10.1126/science.1191078>
- Borge, K., Børresen-Dale, A., & Lingaas, F. (2011). Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour. *Veterinary and comparative oncology*, 9(4), 241-250. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2010.00250.x>

- Bornelöv, S., Komorowski, J., & Wadelius, C. (2015). Different distribution of histone modifications in genes with unidirectional and bidirectional transcription and a role of CTCF and cohesin in directing transcription. *BMC genomics*, 16, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1485-5>
- Borrow, J., Stanton Jr, V. P., Andresen, J. M., Becher, R., Behm, F. G., Chaganti, R. S., Civin, C. I., Distech, C., Dubé, I., & Frischauf, A. M. (1996). The translocation t (8; 16)(p11; p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nature genetics*, 14(1), 33-41. <https://doi.org/10.1038/ng0996-33>
- Briggs, J., Paoloni, M., Chen, Q.-R., Wen, X., Khan, J., & Khanna, C. (2011). A compendium of canine normal tissue gene expression. *PloS one*, 6(5), e17107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017107>
- Buisson, R., Langenbucher, A., Bowen, D., Kwan, E. E., Benes, C. H., Zou, L., & Lawrence, M. S. (2019). Passenger hotspot mutations in cancer driven by APOBEC3A and mesoscale genomic features. *Science*, 364(6447), eaaw2872. <https://doi.org/10.1126/science.aaw2872>
- Buj, R., Mallona, I., Díez-Villanueva, A., Barrera, V., Mauricio, D., Puig-Domingo, M., Reverter, J. L., Matias-Guiu, X., Azuara, D., & Ramírez, J. L. (2016). Quantification of unmethylated Alu (QUAlu): a tool to assess global hypomethylation in routine clinical samples. *Oncotarget*, 7(9), 10536. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7233>
- Burrai, G., Tanca, A., De Miglio, M., Abbondio, M., Pisanu, S., Polinas, M., Pirino, S., Mohammed, S., Uzzau, S., & Addis, M. (2015). Investigation of HER2 expression in canine mammary tumors by antibody-based, transcriptomic and mass spectrometry analysis: is the dog a suitable animal model for human breast cancer? *Tumor Biology*, 36, 9083-9091. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3661-2>
- Burrai, G. P., Gabrieli, A., Moccia, V., Zappulli, V., Porcellato, I., Brachelente, C., Pirino, S., Polinas, M., & Antuofermo, E. (2020). A statistical analysis of risk factors and biological behavior in canine mammary tumors: a multicenter study. *Animals*, 10(9), 1687. <https://doi.org/10.3390/ani10091687>
- Cai, M., Hu, Z., Liu, J., Gao, J., Tan, M., Zhang, D., Zhu, L., Liu, S., Hou, R., & Lin, B. (2015). Expression of hMOF in different ovarian tissues and its effects on ovarian cancer prognosis. *Oncology reports*, 33(2), 685-692. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3649>
- Calcagno, D. Q., Wisniewski, F., Mota, E. R. d. S., Maia de Sousa, S. B., Costa da Silva, J. M., Leal, M. F., Gígek, C. O., Santos, L. C., Rasmussen, L. T., & Assumpção, P. P. (2019). Role of histone acetylation in gastric cancer: implications of dietetic compounds and clinical perspectives. *Epigenomics*, 11(3), 349-362. <https://doi.org/10.2217/epi-2018-0081>
- Campbell, K. J., Dhayade, S., Ferrari, N., Sims, A. H., Johnson, E., Mason, S. M., Dickson, A., Ryan, K. M., Kalna, G., & Edwards, J. (2018). MCL-1 is a prognostic indicator and drug target in breast cancer. *Cell death & disease*, 9(2), 19. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0035-2>
- Cao, L.-L., Shen, C., & Zhu, W.-G. (2016). Histone modifications in DNA damage response. *Science China Life Sciences*, 59, 257-270. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-5011-z>

- Cesar Machado, M. C., Bellodi-Privato, M., Kubrusly, M. S., Trindade Molan, N. A., Junior, T. T., de Oliveira, E. R., & Carneiro D'Albuquerque, L. A. (2011). Valproic acid inhibits human hepatocellular cancer cells growth in vitro and in vivo. *Journal of experimental therapeutics ve oncology*, 9(2).
- Chaffanet, M., Gressin, L., Preudhomme, C., Soenen-Cornu, V., Birnbaum, D., & Pébusque, M. J. (2000). MOZ is fused to p300 in an acute monocytic leukemia with t (8; 22). *Genes, Chromosomes and Cancer*, 28(2), 138-144. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2264\(200006\)28:2%3C138::AID-GCC2%3E3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2264(200006)28:2%3C138::AID-GCC2%3E3.0.CO;2-2)
- Chang, M. C., Contreras, M. A., Rosenberger, T. A., Rintala, J. J., Bell, J. M., & Rapoport, S. I. (2001). Chronic valproate treatment decreases the in vivo turnover of arachidonic acid in brain phospholipids: a possible common effect of mood stabilizers. *Journal of neurochemistry*, 77(3), 796-803. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00311.x>
- Chaurio, R. A., Janko, C., Muñoz, L. E., Frey, B., Herrmann, M., & Gaipf, U. S. (2009). Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation. *Molecules*, 14(12), 4892-4914. <https://doi.org/10.3390/molecules14124892>
- Chen, G., Huang, L. D., Jiang, Y. M., & Manji, H. K. (2000). The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3. *Journal of neurochemistry*, 72(3), 1327-1330. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0721327.x>
- Chen, M., & Wang, J. (2002). Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis*, 7, 313-319. <https://doi.org/10.1023/A:1016167228059>
- Chen, M. K., Cai, M. Y., Luo, R. Z., Tian, X., Liao, Q. M., Zhang, X. Y., & Han, J. D. (2015). Overexpression of p300 correlates with poor prognosis in patients with cutaneous squamous cell carcinoma. *British Journal of Dermatology*, 172(1), 111-119. <https://doi.org/10.1111/bjd.13226>
- Cheung, P., Vallania, F., Dvorak, M., Chang, S. E., Schaffert, S., Donato, M., Rao, A. M., Mao, R., Utz, P. J., & Khatri, P. (2018). Single-cell epigenetics–chromatin modification atlas unveiled by mass cytometry. *Clinical Immunology*, 196, 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.06.009>
- Chong, H. K., Wang, T., Lu, H.-M., Seidler, S., Lu, H., Keiles, S., Chao, E. C., Stuenkel, A., Li, X., & Elliott, A. M. (2014). The validation and clinical implementation of BRCAplus: a comprehensive high-risk breast cancer diagnostic assay. *PloS one*, 9(5), e97408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097408>
- Chou, C.-W., Wu, M.-S., Huang, W.-C., & Chen, C.-C. (2011). HDAC inhibition decreases the expression of EGFR in colorectal cancer cells. *PloS one*, 6(3), e18087. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018087>
- Chu, B., Karpenko, M., Liu, Z., Aimiwu, J., Villalona-Calero, M., Chan, K., Grever, M., & Otterson, G. (2013). Phase I study of 5-aza-2'-deoxycytidine in combination with valproic acid in non-small-cell lung cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 71, 115-121. <https://doi.org/10.1007/s00280-012-1986-8>
- Colleoni, S., Galli, C., A Gaspar, J., Meganathan, K., Jagtap, S., Hescheler, J., Sachinidis, A., & Lazzari, G. (2012). Characterisation of a neural teratogenicity assay based on human ESCs differentiation following exposure to valproic acid. *Current medicinal chemistry*, 19(35), 6065-6071. <https://doi.org/10.2174/092986712804485926>

- Compare, D., Rocco, A., Liguori, E., D'Armiento, F. P., Persico, G., Masone, S., Coppola-Bottazzi, E., Suriani, R., Romano, M., & Nardone, G. (2011). Global DNA hypomethylation is an early event in *Helicobacter pylori*-related gastric carcinogenesis. *Journal of Clinical Pathology*, 64(8), 677-682. <https://doi.org/10.1136/jcp.2010.087858>
- Contreras, L., Medina, S., Schiaffino Bustamante, A. Y., Borrego, E. A., Valenzuela, C. A., Das, U., Karki, S. S., Dimmock, J. R., & Aguilera, R. J. (2022). Three novel piperidones exhibit tumor-selective cytotoxicity on leukemia cells via protein degradation and stress-mediated mechanisms. *Pharmacological Reports*, 74(1), 159-174. <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00322-3>
- Creagh, E. M., Conroy, H., & Martin, S. J. (2003). Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunological reviews*, 193(1), 10-21. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2003.00048.x>
- Cress, W. D., & Seto, E. (2000). Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 184(1), 1-16. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200007\)184:1%3C1::AID-JCP1%3E3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200007)184:1%3C1::AID-JCP1%3E3.0.CO;2-7)
- Crosby, B., & Deas, C. (2018). Repurposing medications for use in treating HIV infection: A focus on valproic acid as a latency-reversing agent. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 43(5), 740-745. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12726>
- Crown, J., O'Leary, M., & Ooi, W.-S. (2004). Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience. *The oncologist*, 9(S2), 24-32. [https://doi.org/10.1634/theoncologist.9-suppl\\_2-24](https://doi.org/10.1634/theoncologist.9-suppl_2-24)
- Cummings, B. S., Wills, L. P., & Schnellmann, R. G. (2012). Measurement of cell death in mammalian cells. *Current protocols in pharmacology*, 56(1), 12.18. 11-12.18. 24. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph1208s25>
- Dancy, B. M., & Cole, P. A. (2016). Protein Lysine Acetylation by p300/CBP (2015). *Chemical Reviews*, 115, 2419–2452. <https://doi.org/10.1021/cr500452k>
- Dawson, M. A., & Kouzarides, T. (2012). Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *cell*, 150(1), 12-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>
- De Araújo, M., Campos, L., Ferreira, E., & Cassali, G. (2015). Quantitation of the regional lymph node metastatic burden and prognosis in malignant mammary tumors of dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(5), 1360-1367. <https://doi.org/10.1111/jvim.13576>
- De Oliveira dos Santos, A. R., de Oliveira Zanuso, B., Miola, V. F. B., Barbalho, S. M., Santos Bueno, P. C., Flato, U. A. P., Detregiachi, C. R. P., Buchaim, D. V., Buchaim, R. L., & Tofano, R. J. (2021). Adipokines, myokines, and hepatokines: crosstalk and metabolic repercussions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2639. <https://doi.org/10.3390/ijms22052639>
- De Silva, S., Tennekoon, K. H., Karunanayake, E. H., Amarasinghe, I., & Angunawela, P. (2014). Analysis of BRCA1 and BRCA2 large genomic rearrangements in Sri Lankan familial breast cancer patients and at risk individuals. *BMC Research Notes*, 7, 1-5. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-344>
- Deng, B., Zhang, S., Zhang, Y., Miao, Y., Meng, X., & Guo, K. (2017). Knockdown of Tripartite Motif Containing 28 suppresses the migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinoma cells through down-regulation of

- Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Neoplasma*, 64(6), 893-900. [https://doi.org/10.4149/neo\\_2017\\_611](https://doi.org/10.4149/neo_2017_611)
- Di Cerbo, A., Palmieri, B., De Vico, G., & Iannitti, T. (2014). Onco-epidemiology of domestic animals and targeted therapeutic attempts: Perspectives on human oncology. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 140, 1807-1814. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1664-9>
- Di Martile, M., Del Bufalo, D., & Trisciuglio, D. (2016). The multifaceted role of lysine acetylation in cancer: prognostic biomarker and therapeutic target. *Oncotarget*, 7(34), 55789. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10048>
- Dias, M. L. d. M., Andrade, J. M. L., Castro, M. B. d., & Galera, P. D. (2016). Survival analysis of female dogs with mammary tumors after mastectomy: epidemiological, clinical and morphological aspects. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36, 181-186. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000300006>
- DiLiberti, J. H., Farndon, P. A., Dennis, N. R., & Curry, C. J. (1984). The fetal valproate syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 19(3), 473-481. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320190308>
- Dobson, J. M. (2013). Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. *International Scholarly Research Notices*, 2013(1), 941275. <https://doi.org/10.1155/2013/941275>
- Dovey, O. M., Foster, C. T., Conte, N., Edwards, S. A., Edwards, J. M., Singh, R., Vassiliou, G., Bradley, A., & Cowley, S. M. (2013). Histone deacetylase 1 and 2 are essential for normal T-cell development and genomic stability in mice. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 121(8), 1335-1344. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-441949>
- Downes, M. J., Devitt, C., Downes, M. T., & More, S. J. (2015). Neutering of cats and dogs in Ireland; pet owner self-reported perceptions of enabling and disabling factors in the decision to neuter. *PeerJ*, 3, e1196. <https://doi.org/10.7717/peerj.1196>
- Du, H., Zhou, B., Zhang, H., Jin, Y., Zhang, D., & Lin, D. (2017). Salinomycin inhibits canine mammary carcinoma in vitro by targeting cancer stem cells. *Oncology Letters*, 14(1), 427-432. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6164>
- Du, W., & Elemento, O. (2015). Cancer systems biology: embracing complexity to develop better anticancer therapeutic strategies. *Oncogene*, 34(25), 3215-3225. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.291>
- Duan, B., Ye, D., Zhu, S., Jia, W., Lu, C., Wang, G., Guo, X., Yu, Y., Wu, C., & Kang, J. (2017). HDAC10 promotes angiogenesis in endothelial cells through the PTPN22/ERK axis. *Oncotarget*, 8(37), 61338. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18130>
- Duan, H., Zhou, K., Zhang, Y., Yue, P., Wang, T., Li, Y., Qiu, D., Hua, Y., & Wang, C. (2019). HDAC1 was involved in placental breast cancer resistance protein regulation in vitro: A preliminary study. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(8), 5818. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14414>
- 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>
- Eickholt, B. J., Towers, G., Ryves, W. J., Eikel, D., Adley, K., Ylinen, L., Chadborn, N., Harwood, A., Nau, H., & Williams, R. (2005). Effects of valproic acid

- derivatives on inositol trisphosphate depletion, teratogenicity, glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibition, and viral replication: a screening approach for new bipolar disorder drugs derived from the valproic acid core structure. *Molecular pharmacology*, 67(5), 1426-1433. <https://doi.org/10.1124/mol.104.009308>
- Einat, H., Yuan, P., Gould, T. D., Li, J., Du, J., Zhang, L., Manji, H. K., & Chen, G. (2003). The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. *Journal of Neuroscience*, 23(19), 7311-7316. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-19-07311>
- Elliott, R. L., & Blobe, G. C. (2005). Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23(9), 2078-2093. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.047>
- Erdel, F. (2017). How communication between nucleosomes enables spreading and epigenetic memory of histone modifications. *BioEssays*, 39(12), 1700053. <https://doi.org/10.1002/bies.201700053>
- Eubanks, C. G., Dayebgadoh, G., Liu, X., & Washburn, M. P. (2017). Unravelling the biology of chromatin in health and cancer using proteomic approaches. *Expert review of proteomics*, 14(10), 905-915. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1374860>
- Exbrayat, J.-M., Moudilou, E. N., Abrouk, L., & Brun, C. (2012). Apoptosis in amphibian development. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3(06), 669-678. <https://doi.org/10.4236/abb.2012.326087>
- Ezziane, Z. (2012). Analysis of the Hox epigenetic code. *World journal of clinical oncology*, 3(4), 48. <https://doi.org/10.5306/wjco.v3.i4.48>
- Feig, C., & Peter, M. E. (2007). How apoptosis got the immune system in shape. *European journal of immunology*, 37(S1), S61-S70. <https://doi.org/10.1002/eji.200737462>
- Fenaux, P., Mufti, G. J., Hellstrom-Lindberg, E., Santini, V., Finelli, C., Giagounidis, A., Schoch, R., Gattermann, N., Sanz, G., & List, A. (2009). Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *The lancet oncology*, 10(3), 223-232. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70003-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70003-8)
- Feng, S., & De Carvalho, D. D. (2022). Clinical advances in targeting epigenetics for cancer therapy. *The FEBS journal*, 289(5), 1214-1239. <https://doi.org/10.1111/febs.15750>
- Flensburg, C., Kinkel, S. A., Keniry, A., Blewitt, M. E., & Oshlack, A. (2014). A comparison of control samples for ChIP-seq of histone modifications. *Frontiers in genetics*, 5, 329. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00329>
- Floros, K. V., Jacob, S., Kurupi, R., Fairchild, C. K., Hu, B., Puchalapalli, M., E. Koblinski, J., Dozmorov, M. G., Boikos, S. A., & Scaltriti, M. (2021). Targeting transcription of MCL-1 sensitizes HER2-amplified breast cancers to HER2 inhibitors. *Cell death & disease*, 12(2), 179. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03457-6>
- Foy, J.-P., Pickering, C. R., Papadimitrakopoulou, V. A., Jelinek, J., Lin, S. H., William Jr, W. N., Frederick, M. J., Wang, J., Lang, W., & Feng, L. (2015). New DNA methylation markers and global DNA hypomethylation are associated with oral cancer development. *Cancer Prevention Research*, 8(11), 1027-1035. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0179>

- Fraga, D., Meulia, T., & Fenster, S. (2008). Real-time PCR. *Current protocols essential laboratory techniques*(1), 10.13. 11-10.13. 34. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et1003s08>
- Franko-Tobin, L. G., Mackey, L. V., Huang, W., Song, X., Jin, B., Luo, J., Morris, L. M., Liu, M., Fuselier, J. A., & Coy, D. H. (2012). Notch1-mediated tumor suppression in cervical cancer with the involvement of SST signaling and its application in enhanced SSTR-targeted therapeutics. *The oncologist*, 17(2), 220-232. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2011-0269>
- Fricker, M., Papadia, S., Hardingham, G. E., & Tolkovsky, A. M. (2010). Implication of TAp73 in the p53-independent pathway of Puma induction and Puma-dependent apoptosis in primary cortical neurons. *Journal of neurochemistry*, 114(3), 772-783. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06804.x>
- Fu, F., Zhang, D., Hu, L., Sundaram, S., Ying, D., Zhang, Y., Fu, S., Zhang, J., Yao, L., & Xu, Y. (2021). Association between 15 known or potential breast cancer susceptibility genes and breast cancer risks in Chinese women. *Cancer Biology ve Medicine*, 19(2), 253. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2021.0358>
- Fuentes-Mattei, E., Velazquez-Torres, G., Phan, L., Zhang, F., Chou, P.-C., Shin, J.-H., Choi, H. H., Chen, J.-S., Zhao, R., & Chen, J. (2014). Effects of obesity on transcriptomic changes and cancer hallmarks in estrogen receptor-positive breast cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 106(7), dju158. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju158>
- Fujimori, T., Rios-Martinez, C., Thurm, A. R., Hinks, M. M., Doughty, B. R., Sinha, J., Le, D., Hafner, A., Greenleaf, W. J., & Boettiger, A. N. (2023). Single-cell chromatin state transitions during epigenetic memory formation. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.10.03.560616>
- Funaki, S., Nakamura, T., Nakatani, T., Umehara, H., Nakashima, H., Okumura, M., Oboki, K., Matsumoto, K., Saito, H., & Nakano, T. (2015). Global DNA hypomethylation coupled to cellular transformation and metastatic ability. *FEBS letters*, 589(24), 4053-4060. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.11.020>
- Furnari, M. A., Saw, C. L.-L., Kong, A.-N., & Wagner, G. C. (2014). Altered behavioral development in Nrf2 knockout mice following early postnatal exposure to valproic acid. *Brain research bulletin*, 109, 132-142. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2014.10.006>
- Galit, S., Shirley, M., Ora, K., Belmaker, R. H., & Galila, A. (2007). Effect of valproate derivatives on human brain myo-inositol-1-phosphate (MIP) synthase activity and amphetamine-induced rearing. *Pharmacological Reports*, 59(4), 402.
- Gan, C. P., Hamid, S., Hor, S. Y., Zain, R. B., Ismail, S. M., Wan Mustafa, W. M., Teo, S. H., Saunders, N., & Cheong, S. C. (2012). Valproic acid: growth inhibition of head and neck cancer by induction of terminal differentiation and senescence. *Head ve neck*, 34(3), 344-353. <https://doi.org/10.1002/hed.21734>
- Gao, L., Cueto, M. A., Asselbergs, F., & Atadja, P. (2002). Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25748-25755.
- Ghanbariasad, A., Bandehpour, M., & Kazemi, B. (2016). Hypoxia response elements can cause the overexpression of the BAX mRNA under hypoxic condition. *Iranian Journal of Cancer Prevention*, 9(5). <https://doi.org/10.17795/ijcp-4554>

- Gherman, M. L., Zanoaga, O., Budisan, L., Raduly, L., & Berindan-Neagoe, I. (2023). Doxorubicin as a Potential Treatment Option in Canine Mammary Tumors. *Veterinary Sciences*, 10(11), 654. <https://doi.org/10.3390/vetsci10110654>
- Gibcus, J. H., Samejima, K., Goloborodko, A., Samejima, I., Naumova, N., Nuebler, J., Kanemaki, M. T., Xie, L., Paulson, J. R., & Earnshaw, W. C. (2018). A pathway for mitotic chromosome formation. *Science*, 359(6376), eaao6135. <https://doi.org/10.1126/science.aao6135>
- Go, H. S., Seo, J. E., Kim, K. C., Han, S. M., Kim, P., Kang, Y. S., Han, S. H., Shin, C. Y., & Ko, K. H. (2011). Valproic acid inhibits neural progenitor cell death by activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway and up-regulation of Bcl-XL. *Journal of Biomedical Science*, 18, 1-13. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-18-48>
- Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., & Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(6), 2129-2144. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.6.2129>
- Göttlicher, M. (2004). Valproic acid: an old drug newly discovered as inhibitor of histone deacetylases. *Annals of hematology*, 83, S91-92. <https://doi.org/10.1007/s00277-004-0850-2>
- Göttlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Krämer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J. P., Coco, F. L., Nervi, C., & Pelicci, P. G. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *The EMBO journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.6969>
- Govind, C. K., Ginsburg, D., & Hinnebusch, A. G. (2012). Measuring dynamic changes in histone modifications and nucleosome density during activated transcription in budding yeast. *Chromatin Remodeling: Methods and Protocols*, 15-27. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-477-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-477-3_2)
- Goyal, M., Gupta, A., Sharma, M., Mathur, P., & Bansal, N. (2016). Fetal valproate syndrome with limb defects: an Indian case report. *Case Reports in Pediatrics*, 2016(1), 3495910. <https://doi.org/10.1155/2016/3495910>
- Gracanin, A., Timmermans-Sprang, E. P., van Wolferen, M. E., Rao, N. A., Grizelj, J., Vince, S., Hellmen, E., & Mol, J. A. (2014). Ligand-independent canonical Wnt activity in canine mammary tumor cell lines associated with aberrant LEF1 expression. *PloS one*, 9(6), e98698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098698>
- Gray, M., Meehan, J., Martínez-Pérez, C., Kay, C., Turnbull, A. K., Morrison, L. R., Pang, L. Y., & Argyle, D. (2020). Naturally-occurring canine mammary tumors as a translational model for human breast cancer. *Frontiers in Oncology*, 10, 617. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00617>
- Green, D. R., & Evan, G. I. (2002). A matter of life and death. *Cancer cell*, 1(1), 19-30.
- Greenblatt, D. Y., Vaccaro, A. M., Jaskula-Sztul, R., Ning, L., Haymart, M., Kunnimalaiyaan, M., & Chen, H. (2007). Valproic acid activates notch-1 signaling and regulates the neuroendocrine phenotype in carcinoid cancer cells. *The oncologist*, 12(8), 942-951. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-8-942>
- Gruber, J. J., Geller, B., Lipchik, A. M., Chen, J., Salahudeen, A. A., Ram, A. N., Ford, J. M., Kuo, C. J., & Snyder, M. P. (2019). HAT1 coordinates histone production and acetylation via H4 promoter binding. *Molecular cell*, 75(4), 711-724. e715. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.034>

- Guadalupe, D., Alma, C., Erick, C., Jose, D., Luis, G., Pablo, M., & Alfonso, D. (2012). Effects of valproic acid upon the PI3K/PTEN/AKT pathway in MCF-7 breast cancer cells. *International Research Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 153-159.
- Gunel, N. S., Birden, N., Kurt, C. C., Bagca, B. G., Shademan, B., Sogutlu, F., Ozates, N. P., & Avci, C. B. (2021). Effect of valproic acid on miRNAs affecting histone deacetylase in a model of anaplastic thyroid cancer. *Molecular Biology Reports*, 48(8), 6085-6091. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06616-2>
- Guo, P., Chen, W., Li, H., Li, M., & Li, L. (2018). The histone acetylation modifications of breast cancer and their therapeutic implications. *Pathology ve Oncology Research*, 24, 807-813. <https://doi.org/10.1007/s12253-018-0433-5>
- Habata, S., Iwasaki, M., Sugio, A., Suzuki, M., Tamate, M., Satohisa, S., Tanaka, R., & Saito, T. (2016). BAG3-mediated Mcl-1 stabilization contributes to drug resistance via interaction with USP9X in ovarian cancer. *International Journal of Oncology*, 49(1), 402-410. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3494>
- Hajikazemi, M., Sohrabi, H., Yamchi, A., & Saeedi, M. (2018). The effects of valproic acid on the mRNA expression of Natriuretic Peptide Receptor A and KQT-like subfamily Q-1 in human colon cancer cell lines. *Alexandria Journal of medicine*, 54(1), 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.04.002>
- Halim, L., Romano, M., McGregor, R., Correa, I., Pavlidis, P., Grageda, N., Hoong, S.-J., Yuksel, M., Jassem, W., & Hannen, R. F. (2017). An atlas of human regulatory T helper-like cells reveals features of Th2-like Tregs that support a tumorigenic environment. *Cell Reports*, 20(3), 757-770. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.079>
- Halkidou, K., Gaughan, L., Cook, S., Leung, H. Y., Neal, D. E., & Robson, C. N. (2004). Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *The Prostate*, 59(2), 177-189. <https://doi.org/10.1002/pros.20022>
- Hallett, R. M., Kondratyev, M. K., Giacomelli, A. O., Nixon, A. M., Girgis-Gabardo, A., Ilieva, D., & Hassell, J. A. (2012). Small molecule antagonists of the Wnt/beta-catenin signaling pathway target breast tumor-initiating cells in a Her2/Neu mouse model of breast cancer. *PloS One*, 7(3), e33976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033976>
- Han, B. R., You, B. R., & Park, W. H. (2013). Valproic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via caspase-dependent apoptosis. *Oncology Reports*, 30(6), 2999-3005. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2747>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hao, Y., Creson, T., Zhang, L., Li, P., Du, F., Yuan, P., Gould, T. D., Manji, H. K., & Chen, G. (2004). Mood stabilizer valproate promotes ERK pathway-dependent cortical neuronal growth and neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, 24(29), 6590-6599. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5747-03.2004>
- Hashemi-Sheikhshabani, S., Amini-Farsani, Z., Shamsara, M., Sajadpoor, Z., Sangtarash, M. H., & Teimori, H. (2019). Effect of valproic acid on cisplatin-resistant ovarian cancer cell lines. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*, 21(1), 39-44. <https://doi.org/10.34172/jsums.2019.07>
- Hassan, R., Morrow, B., Thomas, A., Walsh, T., Lee, M. K., Gulsuner, S., Gadiraju, M., Panou, V., Gao, S., & Mian, I. (2019). Inherited predisposition to malignant mesothelioma and overall survival following platinum chemotherapy.

- Proceedings of the National Academy of Sciences, 116(18), 9008-9013.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1821510116>
- Hassen, S., Ali, N., & Chowdhury, P. (2012). Molecular signaling mechanisms of apoptosis in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 3(3), 71. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v3.i3.71>
- Hawkins, S. F., & Guest, P. C. (2017). Multiplex analyses using real-time quantitative PCR. *Multiplex Biomarker Techniques: Methods and Applications*, 125-133. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6730-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6730-8_8)
- Hayakawa, K., Hirose, M., Tani, R., Yoneda, C., Tanaka, S., & Shiota, K. (2017). H2A O-GlcNAcylation at serine 40 functions genomic protection in association with acetylated H2AZ or  $\gamma$ H2AX. *Epigenetics and Chromatin*, 10, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13072-017-0157-x>
- Hellmén, E. (2005). Complex mammary tumours in the female dog: a review. *Journal of Dairy Research*, 72(S1), 90-97. <https://doi.org/10.1017/S002202990500124X>
- Hennig, W., & Weyrich, A. (2013). Histone modifications in the male germ line of *Drosophila*. *BMC Developmental Biology*, 13, 1-14. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-13-7>
- Hervouet, E., Lalier, L., Debien, E., Cheray, M., Geairon, A., Rogniaux, H., Loussouarn, D., Martin, S. A., Vallette, F. M., & Cartron, P.-F. (2010). Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 interactions promotes tumorigenesis from human and mice glial cells. *PloS One*, 5(6), e11333. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011333>
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16), 7276-7280. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7276>
- Hrabeta, J., Stiborova, M., Adam, V., Kizek, R., & Eckschlager, T. (2014). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. A review. *Biomedical Papers*, 158(2), 161-169. <http://dx.doi.org/10.5507/bp.2013.085>
- Hsieh, Y.-J., Kundu, T. K., Wang, Z., Kovelman, R., & Roeder, R. G. (1999). The TFIIC90 subunit of TFIIC interacts with multiple components of the RNA polymerase III machinery and contains a histone-specific acetyltransferase activity. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.11.7697>
- Hu, M., Cheng, H., Yang, Y., & Xu, L. (2024). Valproic acid increased the efficacy of EGFR TKIs on EGFR/TP53 co-mutated lung cancers and downregulated mutant-p53 levels. *Molecular Carcinogenesis*, 63(2), 275-285. <https://doi.org/10.1002/mc.23651>
- Hu, M., Huang, S., Xu, E., Tong, D., Jin, S., Guan, T., & Liu, Y. (2021). Sox4 Regulates the Sensitivity of Canine Mammary Gland Tumor Cells to Cisplatin via the Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Pathway. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-847008/v1>
- Hu, Q., Wu, D., Chen, W., Yan, Z., & Shi, Y. (2013). Proteolytic processing of the caspase-9 zymogen is required for apoptosome-mediated activation of caspase-9. *Journal of Biological Chemistry*, 288(21), 15142-15147. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.441568>

- Huang, B., Laban, M., Leung, C. H., Lee, L., Lee, C., Salto-Tellez, M., Raju, G., & Hooi, S. (2005). Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death & Differentiation*, 12(4), 395-404. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401567>
- Huang, M., Zhang, J., Yan, C., Li, X., Zhang, J., & Ling, R. (2019). Small molecule HDAC inhibitors: Promising agents for breast cancer treatment. *Bioorganic Chemistry*, 91, 103184. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103184>
- Huang, R., Zhang, X., Sophia, S., Min, Z., & Liu, X. (2018). Clinicopathological features and prediction values of HDAC1, HDAC2, HDAC3, and HDAC11 in classical Hodgkin lymphoma. *Anti-Cancer Drugs*, 29(4), 364-370. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000610>
- Hung, P.-C., Yang, T.-H., Liaw, H.-J., & Wu, W.-S. (2014). The Yeast Nucleosome Atlas (YNA) database: an integrative gene mining platform for studying chromatin structure and its regulation in yeast. *BMC Genomics*, 15, 1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-S9-S5>
- Illera, J. C., Pérez-Alenza, M. D., Nieto, A., Jiménez, M. A., Silvan, G., Dunner, S., & Peña, L. (2006). Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids*, 71(7), 541-548. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2005.11.007>
- Im, K., Jang, Y., Shin, J., Kim, N., Lim, H., Lee, S., Kim, J., & Sur, J. (2015). CD44+/CD24–cancer stem cells are associated with higher grade of canine mammary carcinomas. *Veterinary Pathology*, 52(6), 1041-1044. <https://doi.org/10.1177/0300985815593121>
- Imielinski, M., Berger, A. H., Hammerman, P. S., Hernandez, B., Pugh, T. J., Hodis, E., Cho, J., Suh, J., Capelletti, M., & Sivachenko, A. (2012). Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell*, 150(6), 1107-1120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.029>
- Jagannathan, V., Hitte, C., Kidd, J. M., Masterson, P., Murphy, T. D., Emery, S., Davis, B., Buckley, R. M., Liu, Y.-H., & Zhang, X.-Q. (2021). Dog10K\_Boxer\_Tasha\_1.0: a long-read assembly of the dog reference genome. *Genes*, 12(6), 847. <https://doi.org/10.3390/genes12060847>
- Jain, A. K., Singh, D., Dubey, K., Maurya, R., Mittal, S., & Pandey, A. K. (2018). Models and methods for in vitro toxicity. In *In vitro toxicology* (pp. 45-65). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804667-8.00003-1>
- Jain, T., Sharma, P., Are, A. C., Vickers, S. M., & Dudeja, V. (2021). New insights into the cancer–microbiome–immune axis: decrypting a decade of discoveries. *Frontiers in Immunology*, 12, 622064. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.622064>
- Jalili, A., Irani, S., & Mirfakhraie, R. (2016). Combination of cold atmospheric plasma and iron nanoparticles in breast cancer: Gene expression and apoptosis study. *OncoTargets and Therapy*, 5911-5917. <https://doi.org/10.2147/OTT.S95644>
- Jeanteur, P. (2005). *Epigenetics and chromatin*. Springer.
- Ji, Q., Liu, X., Han, Z., Zhou, L., Sui, H., Yan, L., Jiang, H., Ren, J., Cai, J., & Li, Q. (2015). Resveratrol suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF- $\beta$ 1/Smads signaling pathway mediated Snail/E-cadherin expression. *BMC Cancer*, 15, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1119-y>
- Jin, Z., & El-Deiry, W. S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology ve Therapy*, 4(2), 147-171. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.2.1508>

- Jonathan Ryves, W., Dalton, E. C., Harwood, A. J., & Williams, R. S. (2005). GSK-3 activity in neocortical cells is inhibited by lithium but not carbamazepine or valproic acid. *Bipolar Disorders*, 7(3), 260-265. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2005.00194.x>
- Juengel, E., Makarević, J., Tsaur, I., Bartsch, G., Nelson, K., Haferkamp, A., & Blaheta, R. A. (2013). Resistance after chronic application of the HDAC-inhibitor valproic acid is associated with elevated Akt activation in renal cell carcinoma in vivo. *PloS One*, 8(1), e53100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053100>
- Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(5), 392-401. <https://doi.org/10.1038/nrc1877>
- Kaszak, I., Witkowska-Piłaszewicz, O., Domrazek, K., & Jurka, P. (2022). The novel diagnostic techniques and biomarkers of canine mammary tumors. *Veterinary Sciences*, 9(10), 526. <https://doi.org/10.3390/vetsci9100526>
- Kawiak, A., Domachowska, A., Krolicka, A., Smolarska, M., & Lojkowska, E. (2019). 3-Chloroplumbagin induces cell death in breast cancer cells through MAPK-mediated Mcl-1 inhibition. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 784. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00784>
- Kennedy, R. K., Veena, V., Naik, P. R., Lakshmi, P., Krishna, R., Sudharani, S., & Sakthivel, N. (2015). Phenazine-1-carboxamide (PCN) from *Pseudomonas* sp. strain PUP6 selectively induced apoptosis in lung (A549) and breast (MDA MB-231) cancer cells by inhibition of antiapoptotic Bcl-2 family proteins. *Apoptosis*, 20, 858-868. <https://doi.org/10.1007/s10495-015-1118-0>
- Khare, S. P., Habib, F., Sharma, R., Gadewal, N., Gupta, S., & Galande, S. (2012). Histome—a relational knowledgebase of human histone proteins and histone modifying enzymes. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D337-D342. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1125>
- Kim, E. J., Choi, M.-R., Park, H., Kim, M., Hong, J. E., Lee, J.-Y., Chun, H. S., Lee, K. W., & Yoon Park, J. H. (2011). Dietary fat increases solid tumor growth and metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells and mortality in obesity-resistant BALB/c mice. *Breast Cancer Research*, 13, 1-13. <https://doi.org/10.1186/bcr2927>
- Kim, K. W., Moretti, L., Mitchell, L. R., Jung, D. K., & Lu, B. (2010). Endoplasmic reticulum stress mediates radiation-induced autophagy by perk-eIF2 $\alpha$  in caspase-3/7-deficient cells. *Oncogene*, 29(22), 3241-3251. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.74>
- Kirkin, V., Joos, S., & Zörnig, M. (2004). The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1644(2-3), 229-249. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.08.009>
- Kisseberth, W. C., Murahari, S., London, C. A., Kulp, S. K., & Chen, C.-S. (2008). Evaluation of the effects of histone deacetylase inhibitors on cells from canine cancer cell lines. *American Journal of Veterinary Research*, 69(7), 938-945. <https://doi.org/10.2460/ajvr.69.7.938>
- Klopfleisch, R., Lenze, D., Hummel, M., & Gruber, A. D. (2010). Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. *BMC Cancer*, 10, 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-618>
- Koehler, B. C., Scherr, A.-L., Lorenz, S., Urbanik, T., Kautz, N., Elssner, C., Welte, S., Bermejo, J. L., Jäger, D., & Schulze-Bergkamen, H. (2013). Beyond cell death—

- antiapoptotic Bcl-2 proteins regulate migration and invasion of colorectal cancer cells in vitro. *PloS One*, 8(10), e76446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076446>
- Kokura, K., Sun, L., Bedford, M. T., & Fang, J. (2010). Methyl-H3K9-binding protein MPP8 mediates E-cadherin gene silencing and promotes tumour cell motility and invasion. *The EMBO Journal*, 29(21), 3673-3687. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.239>
- Kordezangeneh, M., Irani, S., Mirfakhraie, R., Esfandyari-Manesh, M., Atyabi, F., & Dinarvand, R. (2015). Regulation of BAX/BCL2 gene expression in breast cancer cells by docetaxel-loaded human serum albumin nanoparticles. *Medical Oncology*, 32, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s12032-015-0652-5>
- Kostrouchova, M., Kostrouch, Z., & Kostrouchova, M. (2007). Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. *Folia Biologica Praha*, 53(2), 37.
- Krämer, O. H., Zhu, P., Ostendorff, H. P., Golebiewski, M., Tiefenbach, J., Peters, M. A., Brill, B., Groner, B., Bach, I., & Heinzel, T. (2003). The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg315>
- Krampe, B., & Al-Rubeai, M. (2010). Cell death in mammalian cell culture: molecular mechanisms and cell line engineering strategies. *Cytotechnology*, 62, 175-188. <https://doi.org/10.1007/s10616-010-9274-0>
- Kübler, K., Arndt, P. F., Wardelmann, E., Landwehr, C., Krebs, D., Kuhn, W., & van der Ven, K. (2008). Genetic alterations of HLA-class II in ovarian cancer. *International Journal of Cancer*, 123(6), 1350-1356. <https://doi.org/10.1002/ijc.23624>
- Kulski, J. K., & Dawkins, R. L. (1999). The P5 multicopy gene family in the MHC is related in sequence to human endogenous retroviruses HERV-L and HERV-16. *Immunogenetics*, 49, 404-412. <https://doi.org/10.1007/s002510050513>
- Kumar, R., Jain, V., Kushwah, N., Dheer, A., Mishra, K. P., Prasad, D., & Singh, S. B. (2019). Role of DNA methylation in hypobaric hypoxia-induced neurodegeneration and spatial memory impairment. *Annals of Neurosciences*, 25(4), 191-200. <https://doi.org/10.1159/000490368>
- 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 Gynecologic Cancer*, 26(9). <https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000814>
- Laddha, S. V., Ganesan, S., Chan, C. S., & White, E. (2014). Mutational landscape of the essential autophagy gene BECN1 in human cancers. *Molecular Cancer Research*, 12(4), 485-490. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0614>
- Lawrence, M. S., Stojanov, P., Mermel, C. H., Robinson, J. T., Garraway, L. A., Golub, T. R., Meyerson, M., Gabriel, S. B., Lander, E. S., & Getz, G. (2014). Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*, 505(7484), 495-501. <https://doi.org/10.1038/nature12912>
- Leary, M., Heerboth, S., Lapinska, K., & Sarkar, S. (2018). Sensitization of drug resistant cancer cells: a matter of combination therapy. *Cancers*, 10(12), 483. <https://doi.org/10.3390/cancers10120483>

- LeBlanc, A. K., Mazcko, C. N., & Khanna, C. (2016). Defining the value of a comparative approach to cancer drug development. *Clinical Cancer Research*, 22(9), 2133-2138. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2347>
- Lee, J.-H., Shaker, M. R., Park, S.-H., & Sun, W. (2023). Transcriptional signature of valproic acid-induced neural tube defects in human spinal cord organoids. *International Journal of Stem Cells*, 16(4), 385-393. <https://doi.org/10.15283/ijsc23012>
- Lee, J., Bartholomeusz, C., Mansour, O., Humphries, J., Hortobagyi, G. N., Ordentlich, P., & Ueno, N. T. (2014). A class I histone deacetylase inhibitor, entinostat, enhances lapatinib efficacy in HER2-overexpressing breast cancer cells through FOXO3-mediated Bim1 expression. *Breast Cancer Research and Treatment*, 146, 259-272. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3014-7>
- Lee, J., & Beatty, G. L. (2021). Serum amyloid A proteins and their impact on metastasis and immune biology in cancer. *Cancers*, 13(13), 3179. <https://doi.org/10.3390/cancers13133179>
- Leiva, M., Moretti, S., Soilihi, H., Pallavicini, I., Peres, L., Mercurio, C., Dal Zuffo, R., Minucci, S., & de Thé, H. (2012). Valproic acid induces differentiation and transient tumor regression, but spares leukemia-initiating activity in mouse models of APL. *Leukemia*, 26(7), 1630-1637. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.39>
- Lesch, B. J., Tothova, Z., Morgan, E. A., Liao, Z., Bronson, R. T., Ebert, B. L., & Page, D. C. (2019). Intergenerational epigenetic inheritance of cancer susceptibility in mammals. *Elife*, 8, e39380. <https://doi.org/10.7554/eLife.39380>
- Levenson, J., Zhang, H., Chen, J., Tahir, S., Phillips, D., Xue, J., Nimmer, P., Jin, S., Smith, M., & Xiao, Y. (2015). Potent and selective small-molecule MCL-1 inhibitors demonstrate on-target cancer cell killing activity as single agents and in combination with ABT-263 (navitoclax). *Cell Death & Disease*, 6(1), e1590-e1590. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.561>
- Li, G., Rauscher, S., Baud, S., & Pomes, R. (2012). Binding of inositol stereoisomers to model amyloidogenic peptides. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(3), 1111-1119. <https://doi.org/10.1021/jp208567n>
- Li, H., Liu, L., Chang, H., Zou, Z., & Xing, D. (2018). Downregulation of MCL-1 and upregulation of PUMA using mTOR inhibitors enhance antitumor efficacy of BH3 mimetics in triple-negative breast cancer. *Cell Death & Disease*, 9(2), 137. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0169-2>
- Li, J., Huang, C., Xiong, T., Zhuang, C., Zhuang, C., Li, Y., Ye, J., & Gui, Y. (2019). A CRISPR interference of CBP and p300 selectively induced synthetic lethality in bladder cancer cells in vitro. *International Journal of Biological Sciences*, 15(6), 1276. <https://doi.org/10.7150/ijbs.32332>
- Li, J., & Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48), 6194-6206. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.297>
- Li, Q., Liu, Z., Xu, M., Xue, Y., Yao, B., Dou, C., Jia, Y., Wang, Y., Tu, K., & Zheng, X. (2016). PCAF inhibits hepatocellular carcinoma metastasis by inhibition of epithelial-mesenchymal transition by targeting Gli-1. *Cancer Letters*, 375(1), 190-198. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.02.053>
- Lin, C., Zhao, X.-y., Li, L., Liu, H.-y., Cao, K., Wan, Y., Liu, X.-y., Nie, C.-l., Liu, L., & Tong, A.-p. (2012). NOXA-induced alterations in the Bax/Smac axis enhance

- sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin. *PloS One*, 7(5), e36722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036722>
- Liu, L., Huang, Z., Chen, J., Wang, J., & Wang, S. (2018). Protein phosphatase 2A mediates JS-K-induced apoptosis by affecting Bcl-2 family proteins in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(8), 6633-6643. <https://doi.org/10.1002/jcb.26845>
- Liu, L., Zhou, W., Cheng, C.-T., Ren, X., Somlo, G., Fong, M. Y., Chin, A. R., Li, H., Yu, Y., & Xu, Y. (2014). TGF $\beta$  induces “BRCAness” and sensitivity to PARP inhibition in breast cancer by regulating DNA-repair genes. *Molecular Cancer Research*, 12(11), 1597-1609. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0201>
- Liu, N., Zhang, R., Zhao, X., Su, J., Bian, X., Ni, J., Yue, Y., Cai, Y., & Jin, J. (2013). A potential diagnostic marker for ovarian cancer: involvement of the histone acetyltransferase, human males absent on the first. *Oncology Letters*, 6(2), 393-400. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1380>
- Liu, S., Chang, W., Jin, Y., Feng, C., Wu, S., He, J., & Xu, T. (2019). The function of histone acetylation in cervical cancer development. *Bioscience Reports*, 39(4), BSR20190527. <https://doi.org/10.1042/BSR20190527>
- Livak, K. J., Flood, S., Marmaro, J., Giusti, W., & Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research*, 4(6), 357-362.
- Louault, K., Bonneaud, T. L., Séveno, C., Gomez-Bougie, P., Nguyen, F., Gautier, F., Bourgeois, N., Loussouarn, D., Kerdraon, O., & Barillé-Nion, S. (2019). Interactions between cancer-associated fibroblasts and tumor cells promote MCL-1 dependency in estrogen receptor-positive breast cancers. *Oncogene*, 38(17), 3261-3273. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0635-z>
- Louis, K. S., & Siegel, A. C. (2011). Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Mammalian cell viability: Methods and Protocols*, 7-12. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_2)
- Ma, B., Shi, J., Jia, L., Yuan, W., Wu, J., Fu, Z., Wang, Y., Liu, N., & Guan, Z. (2013). Over-expression of PUMA correlates with the apoptosis of spinal cord cells in rat neuropathic intermittent claudication model. *PloS One*, 8(5), e56580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056580>
- Ma, J., Setton, J., Morris, L., Albornoz, P. B. C., Barker, C., Lok, B. H., Sherman, E., Katabi, N., Beal, K., & Ganly, I. (2016). Genomic analysis of exceptional responders to radiotherapy reveals somatic mutations in ATM. *Oncotarget*, 8(6), 10312. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14400>
- Maekawa, R., Lee, L., Okada, M., Asada, H., Shinagawa, M., Tamura, I., Sato, S., Tamura, H., & Sugino, N. (2016). Changes in gene expression of histone modification enzymes in rat granulosa cells undergoing luteinization during ovulation. *Journal of Ovarian Research*, 9, 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13048-016-0225-z>
- Mahajan, K., Fang, B., Koomen, J. M., & Mahajan, N. P. (2012). H2B Tyr37 phosphorylation suppresses expression of replication-dependent core histone genes. *Nature Structural ve Molecular Biology*, 19(9), 930-937. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2356>
- Maley, C. C., Aktipis, A., Graham, T. A., Sottoriva, A., Boddy, A. M., Janiszewska, M., Silva, A. S., Gerlinger, M., Yuan, Y., & Pienta, K. J. (2017). Classifying the

- evolutionary and ecological features of neoplasms. *Nature Reviews Cancer*, 17(10), 605-619. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.69>
- Manji, H. K., & Duman, R. S. (2001). Impairments of neuroplasticity and cellular resilience in severe mood disorders: implications for the development of novel therapeutics. *Psychopharmacology Bulletin*, 35(2), 5-49.
- Manoguerra, A. S., Erdman, A. R., Woolf, A. D., Chyka, P. A., Martin Caravati, E., Scharman, E. J., Booze, L. L., Christianson, G., Nelson, L. S., & Cobaugh, D. J. (2008). Valproic acid poisoning: an evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management. *Clinical Toxicology*, 46(7), 661-676. <https://doi.org/10.1080/15563650802178136>
- Mariño-Ramírez, L., Levine, K. M., Morales, M., Zhang, S., Moreland, R. T., Baxevanis, A. D., & Landsman, D. (2011). The Histone Database: an integrated resource for histones and histone fold-containing proteins. *Database*, 2011. <https://doi.org/10.1093/database/bar048>
- Martinez, M. M., Reif, R. D., & Pappas, D. (2010). Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Analytical Methods*, 2(8), 996-1004. <https://doi.org/10.1039/C0AY00247J>
- Masumoto, H., Nakato, R., Kanemaki, M., Shirahige, K., & Hachinohe, M. (2011). The inheritance of histone modifications depends upon the location in the chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS One*, 6(12), e28980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028980>
- McDonald, O. G., Li, X., Saunders, T., Tryggvadottir, R., Mentch, S. J., Warmoes, M. O., Word, A. E., Carrer, A., Salz, T. H., & Natsume, S. (2017). Epigenomic reprogramming during pancreatic cancer progression links anabolic glucose metabolism to distant metastasis. *Nature Genetics*, 49(3), 367-376. <https://doi.org/10.1038/ng.3753>
- Megquier, K., Turner-Maier, J., Swofford, R., Kim, J.-H., Sarver, A. L., Wang, C., Sakthikumar, S., Johnson, J., Koltookian, M., & Lewellen, M. (2019). Comparative genomics reveals shared mutational landscape in canine hemangiosarcoma and human angiosarcoma. *Molecular Cancer Research*, 17(12), 2410-2421. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0221>
- Mei, Q., Xu, C., Gogol, M., Tang, J., Chen, W., Yu, X., Workman, J. L., & Li, S. (2019). Set1-catalyzed H3K4 trimethylation antagonizes the HIR/Asf1/Rtt106 repressor complex to promote histone gene expression and chronological life span. *Nucleic Acids Research*, 47(7), 3434-3449. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz101>
- Melin, M., Rivera, P., Arendt, M., Elvers, I., Muren, E., Gustafson, U., Starkey, M., Borge, K. S., Lingaas, F., & Häggström, J. (2016). Genome-wide analysis identifies germ-line risk factors associated with canine mammary tumours. *PLoS Genetics*, 12(5), e1006029. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006029>
- Meng, C.-F., Zhu, X.-J., Peng, G., & Dai, D.-Q. (2010). Role of histone modifications and DNA methylation in the regulation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression in human stomach cancer cells. *Cancer Investigation*, 28(4), 331-339. <https://doi.org/10.1080/07357900903179633>
- Merino, D., Whittle, J. R., Vaillant, F., Serrano, A., Gong, J.-N., Giner, G., Maragno, A. L., Chanrion, M., Schneider, E., & Pal, B. (2017). Synergistic action of the MCL-1 inhibitor S63845 with current therapies in preclinical models of triple-negative and HER2-amplified breast cancer. *Science Translational Medicine*, 9(401), eaam7049. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aam7049>

- Meuten, D. J. (2020). Tumors in domestic animals (5th Edition). John Wiley ve Sons.
- Meyer, M. B., Benkusky, N. A., & Pike, J. W. (2014). 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 induced histone profiles guide discovery of VDR action sites. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 144, 19-21. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.09.005>
- Moslemi, M., Moradi, Y., Dehghanbanadaki, H., Afkhami, H., Khaledi, M., Sedighimehr, N., Fathi, J., & Sohrabi, E. (2021). The association between ATM variants and risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, 21, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07749-6>
- Mucha, J., Rybicka, A., Dolka, I., Szymańska, J., Manuali, E., Parzeniecka-Jaworska, M., Kluciński, W., & Król, M. (2016). Immunosuppression in dogs during mammary cancer development. *Veterinary Pathology*, 53(6), 1147-1153. <https://doi.org/10.1177/0300985816634808>
- Munkhbaatar, E., Dietzen, M., Agrawal, D., Anton, M., Jesinghaus, M., Boxberg, M., Pfarr, N., Bidola, P., Uhrig, S., & Höckendorf, U. (2020). MCL-1 gains occur with high frequency in lung adenocarcinoma and can be targeted therapeutically. *Nature Communications*, 11(1), 4527. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18372-1>
- Münster, P., Marchion, D., Bicaku, E., Schmitt, M., Lee, J. H., DeConti, R., Simon, G., Fishman, M., Minton, S., & Garrett, C. (2007). Phase I trial of histone deacetylase inhibition by valproic acid followed by the topoisomerase II inhibitor epirubicin in advanced solid tumors: a clinical and translational study. *Journal of Clinical Oncology*, 25(15), 1979-1985. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.08.6165>
- Mustachio, L. M., Roszik, J., Farria, A. T., Guerra, K., & Dent, S. Y. (2019). Repression of GCN5 expression or activity attenuates c-MYC expression in non-small cell lung cancer. *American Journal of Cancer Research*, 9(8), 1830.
- Mustufa, M. A., Ozen, C., Hashmi, I. A., Aslam, A., Baig, J. A., Yildiz, G., Muhammad, S., Solangi, I. B., ul Hasan Naqvi, N., & Ozturk, M. (2016). Synthesis and bio-molecular study of (+)-N-Acetyl- $\alpha$ -amino acid dehydroabietylamine derivative for the selective therapy of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, 16, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2942-5>
- Nakajima, W., Sharma, K., Lee, J. Y., Maxim, N. T., Hicks, M. A., Vu, T.-T., Luu, A., Yeudall, W. A., Tanaka, N., & Harada, H. (2016). DNA damaging agent-induced apoptosis is regulated by MCL-1 phosphorylation and degradation mediated by the Noxa/MCL-1/CDK2 complex. *Oncotarget*, 7(24), 36353. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9217>
- Nakano, T., Go, T., Nakashima, N., Liu, D., & Yokomise, H. (2020). Overexpression of antiapoptotic MCL-1 predicts worse overall survival of patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Research*, 40(2), 1007-1014. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14035>
- Nan, M.-L., Wang, X., Li, H.-J., Yu, D.-H., Sun, W.-Y., Xu, H.-M., He, Y.-F., & Zhao, Q.-C. (2019). Rotundic acid induces Cas3-MCF-7 cell apoptosis through the p53 pathway. *Oncology Letters*, 17(1), 630-637. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9616>
- Narita, T., Weinert, B. T., & Choudhary, C. (2019). Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 156-174. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0081-3>

- National Institutes of Health, Educational Resources. (2025). Talking Glossary of Genomic and Genetic Terms: Nucleosome. Erişim adresi: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Nucleosome>
- Nau, H., Hauck, R. S., & Ehlers, K. (1991). Valproic acid-induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug development, pharmacokinetics and possible mechanisms. *Pharmacology ve Toxicology*, 69(5), 310-321. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1991.tb01303.x>
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M., & Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 439, 231-250. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>
- Neganova, M. E., Klochkov, S. G., Aleksandrova, Y. R., & Aliev, G. (2022). Histone modifications in epigenetic regulation of cancer: Perspectives and achieved progress. *Seminars in Cancer Biology*, 83 (2022) 452–471. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.07.015>
- Nicetto, D., & Zaret, K. S. (2019). Role of H3K9me3 heterochromatin in cell identity establishment and maintenance. *Current Opinion in Genetics ve Development*, 55, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2019.04.013>
- Nilubol, N., Merkel, R., Yang, L., Patel, D., Reynolds, J. C., Sadowski, S. M., Neychev, V., & Kebebew, E. (2017). A phase II trial of valproic acid in patients with advanced, radioiodine-resistant thyroid cancers of follicular cell origin. *Clinical Endocrinology*, 86(1), 128-133. <https://doi.org/10.1111/cen.13154>
- Noguchi, S., Mori, T., Hoshino, Y., Yamada, N., Nakagawa, T., Sasaki, N., Akao, Y., & Maruo, K. (2012). Comparative study of anti-oncogenic microRNA-145 in canine and human malignant melanoma. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(1), 1-8. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0264>
- Nunes, A. C. F., Ribeiro, A. L. d. A., Gonçalves-Mendes, M. T., & Aversi-Ferreira, T. A. (2023). Valproic acid syndrome: a mini review. *International Neuropsychiatric Disease Journal*, 20(3), 35-46. <https://doi.org/10.9734/indj/2023/v20i3398>
- Opferman, J. (2008). Apoptosis in the development of the immune system. *Cell Death and Differentiation*, 15(2), 234-242. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402182>
- Orsolya, B., Minodora, D., Leonard, A., Mihaly, V., & Sanda-Maria, C. (2016). Viability Changes in Leucocytes in a Critical Trauma Patient: Monocyte, Lymphocyte, Granulocyte Response to the Acute Phase: Case Report. *Acta Marisiensis-Seria Medica*, 62(3), 368-372. <https://doi.org/10.1515/amma-2015-0099>
- Park, H. K., Han, B. R., & Park, W. H. (2020). Combination of arsenic trioxide and valproic acid efficiently inhibits growth of lung cancer cells via G2/M-phase arrest and apoptotic cell death. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2649. <https://doi.org/10.3390/ijms21072649>
- Park, S.-Y., & Kim, I.-S. (2017). Engulfment signals and the phagocytic machinery for apoptotic cell clearance. *Experimental ve Molecular Medicine*, 49(5), e331-e331. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.52>
- Parra, M., & Verdin, E. (2010). Regulatory signal transduction pathways for class IIa histone deacetylases. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(4), 454-460. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.04.004>
- Pasqualucci, L., Dominguez-Sola, D., Chiarenza, A., Fabbri, G., Grunn, A., Trifonov, V., Kasper, L. H., Lerach, S., Tang, H., & Ma, J. (2011). Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature*, 471(7337), 189-195. <https://doi.org/10.1038/nature09730>

- Pastor, N., Caballé, N. C., Santella, M., Ezquerra, L. J., Tarazona, R., & Duran, E. (2018). Epidemiological study of canine mammary tumors: age, breed, size and malignancy. *Austral Journal of Veterinary Sciences*, 50(3), 143-147. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-81322018000300143>
- Pathak, A., Tomar, S., & Pathak, S. (2023). Epigenetics and Cancer: A Comprehensive Review. *Asian Pacific Journal of Cancer Biology*, 8(1), 75-89. <https://doi.org/10.31557/apjcb.2023.8.1.75-89>
- Peña, L., Andrés, P. D., Clemente, M., Cuesta, P., & Pérez-Alenza, M. (2013). Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Veterinary Pathology*, 50(1), 94-105. <https://doi.org/10.1177/0300985812447830>
- Pepper, J. W., Dunn, B. K., Fagerstrom, R. M., Gohagan, J. K., & Vydelingum, N. A. (2014). Using systems biology to understand cancer as an evolutionary process. *Journal of Evolutionary Medicine*, 2(Article ID 235678), 1-8. <https://doi.org/10.4303/jem/235678>
- Pimentel, P. A. B., da Silva, P. H. S., de Sena, B. V., Flecher, M. C., Cassali, G. D., & dos Santos Horta, R. (2024). The role of lymph nodes and their drainage in canine mammary gland tumours: Systematic review. *Research in Veterinary Science*, 105139. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105139>
- Pond, A. C., Herschkowitz, J. I., Schwertfeger, K. L., Welm, B., Zhang, Y., York, B., Cardiff, R. D., Hilsenbeck, S., Perou, C. M., & Creighton, C. J. (2010). Fibroblast growth factor receptor signaling dramatically accelerates tumorigenesis and enhances oncoprotein translation in the mouse mammary tumor virus–Wnt-1 mouse model of breast cancer. *Cancer Research*, 70(12), 4868-4879. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4404>
- Prakash, K., & Fournier, D. (2017). Histone code and higher-order chromatin folding: a hypothesis. *Genomics and Computational Biology*, 3(2). <https://doi.org/10.18547/gcb.2017.vol3.iss2.e41>
- Prokop, A. (2021). Towards the first principles in biology and cancer: new vistas in computational systems biology of cancer. *Life*, 12(1), 21. <https://doi.org/10.3390/life12010021>
- Rana, N. K., Singh, P., & Koch, B. (2019). CoCl<sub>2</sub> simulated hypoxia induce cell proliferation and alter the expression pattern of hypoxia associated genes involved in angiogenesis and apoptosis. *Biological Research*, 52, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0221-z>
- Rana, Z., Diermeier, S., Hanif, M., & Rosengren, R. J. (2020). Understanding failure and improving treatment using HDAC inhibitors for prostate cancer. *Biomedicines*, 8(2), 22. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8020022>
- Rao, J., Lee, H., Rapoport, S., & Bazinet, R. (2008). Mode of action of mood stabilizers: is the arachidonic acid cascade a common target? *Molecular Psychiatry*, 13(6), 585-596. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.31>
- Raposo, T., Pires, I., Carvalho, M., Prada, J., Argyle, D., & Queiroga, F. (2015). Tumour-associated macrophages are associated with vascular endothelial growth factor expression in canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 13(4), 464-474. <https://doi.org/10.1111/vco.12067>
- Raynal, N. J.-M., Si, J., Taby, R. F., Gharibyan, V., Ahmed, S., Jelinek, J., Estécio, M. R., & Issa, J.-P. J. (2012). DNA methylation does not stably lock gene

- expression but instead serves as a molecular mark for gene silencing memory. *Cancer Research*, 72(5), 1170-1181. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3248>
- Reed, J. C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 157(5), 1415-1430. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64779-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64779-7)
- Regan, D., Garcia, K., & Thamm, D. (2018). Clinical, pathological, and ethical considerations for the conduct of clinical trials in dogs with naturally occurring cancer: a comparative approach to accelerate translational drug development. *ILAR journal*, 59(1), 99-110. <https://doi.org/10.1093/ilar/ily019>
- Reis, J., Oliveira, T., Pereira, A., Infante, P., Leal, N., & Faisca, P. (2020). Microtomographic characterization of calcifications in canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 18(3), 281-291. <https://doi.org/10.1111/vco.12545>
- Rettig, I., Koeneke, E., Trippel, F., Mueller, W. C., Burhenne, J., Kopp-Schneider, A., Fabian, J., Schober, A., Fernekorn, U., & von Deimling, A. (2015). Selective inhibition of HDAC8 decreases neuroblastoma growth in vitro and in vivo and enhances retinoic acid-mediated differentiation. *Cell Death & Disease*, 6(2), e1657-e1657. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.24>
- Roberts, C. G., Millar, E. K., O'Toole, S. A., McNeil, C. M., Lehrbach, G. M., Pinese, M., Tobelmann, P., McCloy, R. A., Musgrove, E. A., & Sutherland, R. L. (2011). Identification of PUMA as an estrogen target gene that mediates the apoptotic response to tamoxifen in human breast cancer cells and predicts patient outcome and tamoxifen responsiveness in breast cancer. *Oncogene*, 30(28), 3186-3197. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.36>
- Rodríguez-Bejarano, O. H., Roa, L., Vargas-Hernández, G., Botero-Espinosa, L., Parra-López, C., & Patarroyo, M. A. (2024). Strategies for studying immune and non-immune human and canine mammary gland cancer tumour infiltrate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1879(1), 189064. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.189064>
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J. J., & Andrade, M. J. (2015). Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *PCR Primer Design*, 31-56. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3)
- Rosadas, C., Cabral-Castro, M. J., Vicente, A. C. P., Peralta, J. M., & Puccioni-Sohler, M. (2013). Validation of a quantitative real-time PCR assay for HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Virological Methods*, 193(2), 536-541. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.040>
- Rosenthal, A. C., Munoz, J. L., & Villasboas, J. (2023). Clinical advances in epigenetic therapies for lymphoma. *Clinical Epigenetics*, 15(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s13148-023-01452-6>
- Royston, K. J., Paul, B., Nozell, S., Rajbhandari, R., & Tollefsbol, T. O. (2018). Withaferin A and sulforaphane regulate breast cancer cell cycle progression through epigenetic mechanisms. *Experimental Cell Research*, 368(1), 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.04.015>
- Saha, S. K., Yin, Y., Kim, K., Yang, G.-M., Abdal Dayem, A., Choi, H. Y., & Cho, S.-G. (2017). Valproic acid induces endocytosis-mediated doxorubicin internalization and shows synergistic cytotoxic effects in hepatocellular carcinoma cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 1048. <https://doi.org/10.3390/ijms18051048>

- Saito, T., Dai, T., & Asano, R. (2013). The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone exhibits antitumor effects against mesenchymal-like canine mammary tumor cells. *Oncology Letters*, 5(3), 1068-1074. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1124>
- Sakthikumar, S., Facista, S., Whitley, D., Byron, S. A., Ahmed, Z., Warriar, M., Zhu, Z., Chon, E., Banovich, K., & Haworth, D. (2023). Standing in the canine precision medicine knowledge gap: Improving annotation of canine cancer genomic biomarkers through systematic comparative analysis of human cancer mutations in COSMIC. *Veterinary and Comparative Oncology*, 21(3), 482-491. <https://doi.org/10.1111/vco.12911>
- Salah Ud-Din, A. I. M., Tikhomirova, A., & Roujeinikova, A. (2016). Structure and functional diversity of GCN5-related N-acetyltransferases (GNAT). *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1018. <https://doi.org/10.3390/ijms17071018>
- Salas, Y., Márquez, A., Diaz, D., & Romero, L. (2015). Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002-2012: a growing animal health problem. *PloS One*, 10(5), e0127381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127381>
- Salhia, B., Kiefer, J., Ross, J. T., Metapally, R., Martinez, R. A., Johnson, K. N., DiPerna, D. M., Paquette, K. M., Jung, S., & Nasser, S. (2014). Integrated genomic and epigenomic analysis of breast cancer brain metastasis. *PloS One*, 9(1), e85448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085448>
- Sami, S., Höti, N., Xu, H.-M., Shen, Z., & Huang, X. (2008). Valproic acid inhibits the growth of cervical cancer both in vitro and in vivo. *Journal of Biochemistry*, 144(3), 357-362. <https://doi.org/10.1093/jb/mvn074>
- Samli, H., Samli, M., Vatansever, B., Ardicli, S., Aztopal, N., Dincel, D., Sahin, A., & Balci, F. (2019). Paclitaxel resistance and the role of miRNAs in prostate cancer cell lines. *World Journal of Urology*, 37, 1117-1126. <https://doi.org/10.1007/s00345-018-2501-6>
- Sanchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W. K., Luna, A., La, K. C., Dimitriadoy, S., Liu, D. L., Kantheti, H. S., & Saghafeinia, S. (2018). Oncogenic signaling pathways in the cancer genome atlas. *Cell*, 173(2), 321-337. e310. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.035>
- Santander, A. M., Lopez-Ocejo, O., Casas, O., Agostini, T., Sanchez, L., Lamas-Basulto, E., Carrio, R., Cleary, M. P., Gonzalez-Perez, R. R., & Torroella-Kouri, M. (2015). Paracrine interactions between adipocytes and tumor cells recruit and modify macrophages to the mammary tumor microenvironment: the role of obesity and inflammation in breast adipose tissue. *Cancers*, 7(1), 143-178. <https://doi.org/10.3390/cancers7010143>
- Sapountzi, V., & Côté, J. (2011). MYST-family histone acetyltransferases: beyond chromatin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 1147-1156. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0599-9>
- Sato, H., Hiraki, M., Namba, T., Egawa, N., Baba, K., Tanaka, T., & Noshiro, H. (2018). Andrographolide induces degradation of mutant p53 via activation of Hsp70. *International Journal of Oncology*, 53(2), 761-770. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4416>

- Schneider, R., Dorn, C. R., & Taylor, D. (1969). Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of the National Cancer Institute*, 43(6), 1249-1261. <https://doi.org/10.1093/jnci/43.6.1249>
- Schubert, F., Rapp, J., Brauns-Schubert, P., Schlicher, L., Stock, K., Wissler, M., Weiß, M., Charvet, C., Borner, C., & Maurer, U. (2018). Requirement of GSK-3 for PUMA induction upon loss of pro-survival PI3K signaling. *Cell Death & Disease*, 9(5), 470. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0502-4>
- Scott, D. F. (1993). *The history of epileptic therapy: an account of how medication was developed*. CRC Press.
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., & Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*, 48(17), 4827-4833.
- Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 148(3), 399-408. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>
- Setthawongsin, C., Teewasutrakul, P., Tangkawattana, S., Techangamsuwan, S., & Rungsipipat, A. (2019). Conventional-vincristine sulfate vs. modified protocol of vincristine sulfate and L-asparaginase in canine transmissible venereal tumor. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 300. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00300>
- Shan, Z., Feng-Nian, R., Jie, G., & Ting, Z. (2012). Effects of valproic acid on proliferation, apoptosis, angiogenesis and metastasis of ovarian cancer in vitro and in vivo. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(8), 3977-3982. <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.8.3977>
- Shanmugam, M. K., Arfuso, F., Arumugam, S., Chinnathambi, A., Bian, J., Warriar, S., Wang, L. Z., Kumar, A. P., Ahn, K. S., & Sethi, G. (2018). Correction: Role of novel histone modifications in cancer. *Oncotarget*, 9(27), 19460. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23356>
- Shao, Y. W., Wood, G. A., Lu, J., Tang, Q.-L., Liu, J., Molyneux, S., Chen, Y., Fang, H., Adissu, H., & McKee, T. (2019). Cross-species genomics identifies DLG2 as a tumor suppressor in osteosarcoma. *Oncogene*, 38(2), 291-298. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0444-4>
- Shao, Z., Wang, Z., Shao, L., & Jin, X. (2021). Correlation between rs13347 polymorphism of CD44 gene and the risk of occurring breast cancer: A protocol for systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 100(22), e25889. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000025889>
- Sharifi, S., Barar, J., Hejazi, M. S., & Samadi, N. (2015). Doxorubicin changes Bax/Bcl-xL ratio, caspase-8 and 9 in breast cancer cells. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(3), 351. <https://doi.org/10.15171/apb.2015.049>
- Sheaffer, K. L., Elliott, E. N., & Kaestner, K. H. (2016). DNA hypomethylation contributes to genomic instability and intestinal cancer initiation. *Cancer Prevention Research*, 9(7), 534-546. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-15-0349>
- Shen, J., Song, R., Gong, Y., & Zhao, H. (2017). Global DNA hypomethylation in leukocytes associated with glioma risk. *Oncotarget*, 8(38), 63223. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18739>
- Shen, L., Shi, Q., & Wang, W. (2018). Double agents: genes with both oncogenic and tumor-suppressor functions. *Oncogenesis*, 7(3), 25. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0034-x>

- Shimshoni, J. A., Dalton, E. C., Jenkins, A., Eyal, S., Ewan, K., Williams, R. S., Pessah, N., Yagen, B., Harwood, A. J., & Bialer, M. (2007). The effects of central nervous system-active valproic acid constitutional isomers, cyclopropyl analogs, and amide derivatives on neuronal growth cone behavior. *Molecular Pharmacology*, 71(3), 884-892. <https://doi.org/10.1124/mol.106.030601>
- Shpak, M., & Lu, J. (2016). An evolutionary genetic perspective on cancer biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 47(1), 25-49. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-121415-032109>
- Sidana, A., Wang, M., Shabbeer, S., Chowdhury, W. H., Netto, G., Lupold, S. E., Carducci, M., & Rodriguez, R. (2012). Mechanism of growth inhibition of prostate cancer xenografts by valproic acid. *BioMed Research International*, 2012(1), 180363. <https://doi.org/10.1155/2012/180363>
- Siegel, R. L., Jemal, A., Wender, R. C., Gansler, T., Ma, J., & Brawley, O. W. (2018). An assessment of progress in cancer control. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(5), 329-339. <https://doi.org/10.3322/caac.21460>
- Silva, D., Da, M., Juliani, A. I., Riberio, C. L., Guerios, S. D., & Froes, T. R. (2019). Abdominal ultrasonographic findings in dogs with mammary tumors: Association with tumor characteristics and survival. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 43(6), 808-816. <https://doi.org/10.3906/vet-1901-37>
- Sin, T. K., Zhu, J. Z., Zhang, G., & Li, Y.-P. (2019). p300 mediates muscle wasting in Lewis lung carcinoma. *Cancer Research*, 79(7), 1331-1342. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1653>
- Skourti, E., & Dhillon, P. (2022). Cancer epigenetics: promises and pitfalls for cancer therapy. *The FEBS Journal*, 289(5), 1156-1159. <https://doi.org/10.1111/febs.16395>
- Smith, S., Goldschmidt, M., & McManus, P. (2002). A comparative review of melanocytic neoplasms. *Veterinary Pathology*, 39(6), 651-678. <https://doi.org/10.1354/vp.39-6-651>
- Song, K.-H., Choi, C. H., Lee, H.-J., Oh, S. J., Woo, S. R., Hong, S.-O., Noh, K. H., Cho, H., Chung, E. J., & Kim, J.-H. (2017). HDAC1 upregulation by NANOG promotes multidrug resistance and a stem-like phenotype in immune edited tumor cells. *Cancer Research*, 77(18), 5039-5053. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0072>
- Sonkin, D., Hassan, M., Murphy, D. J., & Tatarinova, T. V. (2013). Tumor suppressors status in cancer cell line Encyclopedia. *Molecular oncology*, 7(4), 791-798. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.04.001>
- Sorenmo, K. (2003). Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 33(3), 573-596.
- Sorenmo, K. U., Shofer, F. S., & Goldschmidt, M. H. (2000). Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14(3), 266-270. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2000.tb01165.x>
- Spoerri, M., Guscetti, F., Hartnack, S., Boos, A., Oei, C., Balogh, O., Nowaczyk, R. M., Michel, E., Reichler, I. M., & Kowalewski, M. P. (2015). Endocrine control of canine mammary neoplasms: serum reproductive hormone levels and tissue expression of steroid hormone, prolactin and growth hormone receptors. *BMC Veterinary Research*, 11, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0546-y>

- Stucci, L. S., Internò, V., Tucci, M., Perrone, M., Mannavola, F., Palmirotta, R., & Porta, C. (2021). The ATM gene in breast cancer: Its relevance in clinical practice. *Genes*, 12(5), 727. <https://doi.org/10.3390/genes12050727>
- Su, J. M., Li, X.-N., Thompson, P., Ou, C.-N., Ingle, A. M., Russell, H., Lau, C. C., Adamson, P. C., & Blaney, S. M. (2011). Phase 1 study of valproic acid in pediatric patients with refractory solid or CNS tumors: a children's oncology group report. *Clinical Cancer Research*, 17(3), 589-597. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0738>
- Sun, G., Mackey, L. V., Coy, D. H., Yu, C.-Y., & Sun, L. (2015). The histone deacetylase inhibitor valproic acid induces cell growth arrest in hepatocellular carcinoma cells via suppressing notch signaling. *Journal of Cancer*, 6(10), 996. <https://doi.org/10.7150/jca.12135>
- Sun, J., Knickelbein, K., He, K., Chen, D., Dudgeon, C., Shu, Y., Yu, J., & Zhang, L. (2014). Aurora kinase inhibition induces PUMA via NF- $\kappa$ B to kill colon cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(5), 1298-1308. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0846>
- Sun, L., & Coy, D. (2014). Anti-convulsant drug valproic acid in cancers and in combination anti-cancer therapeutics. *Modern Chemistry and Applications*, 2, 1000118. <http://dx.doi.org/10.4172/2329-6798.1000118>
- Sun, M., Guo, X., Qian, X., Wang, H., Yang, C., Brinkman, K. L., Serrano-Gonzalez, M., Jope, R. S., Zhou, B., & Engler, D. A. (2012). Activation of the ATM-Snail pathway promotes breast cancer metastasis. *Journal of Molecular Cell Biology*, 4(5), 304-315. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjs048>
- Sundaram, S., & Yan, L. (2016). High-fat diet enhances mammary tumorigenesis and pulmonary metastasis and alters inflammatory and angiogenic profiles in MMTV-PyMT mice. *Anticancer Research*, 36(12), 6279-6287. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11223>
- Suzuki, M., Bandoski, C., & Bartlett, J. D. (2015). Fluoride induces oxidative damage and SIRT1/autophagy through ROS-mediated JNK signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 369-378. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.015>
- Szczepanek, J., Skorupa, M., Jarkiewicz-Tretyn, J., Cybulski, C., & Tretyn, A. (2023). Harnessing epigenetics for breast cancer therapy: The role of DNA methylation, histone modifications, and MicroRNA. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7235. <https://doi.org/10.3390/ijms24087235>
- Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., & Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Reports*, 7(9), 880-885. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400779>
- Szutorisz, H., Canzonetta, C., Georgiou, A., Chow, C.-M., Tora, L., & Dillon, N. (2005). Formation of an active tissue-specific chromatin domain initiated by epigenetic marking at the embryonic stem cell stage. *Molecular and Cellular Biology*, 25(5), 1804-1820. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.5.1804-1820.2005>
- Tafrova, J. I., & Tafrov, S. T. (2014). Human histone acetyltransferase 1 (Hat1) acetylates lysine 5 of histone H2A in vivo. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 392, 259-272. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2036-0>
- Takahashi, K., Nagai, N., Ogura, K., Tsuneyama, K., Saiki, I., Irimura, T., & Hayakawa, Y. (2015). Mammary tissue microenvironment determines T cell-dependent

- breast cancer-associated inflammation. *Cancer Science*, 106(7), 867-874. <https://doi.org/10.1111/cas.12685>
- Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J. S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., & Rajagopal, N. (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell*, 146(6), 1016-1028. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.008>
- Tanoshima M, Kobayashi T, Tanoshima R, Beyene J, Koren G, & Itô S. (2016). Risks of congenital malformations in offspring exposed to valproic acid in utero: A systematic review and cumulative meta-analysis. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 98(4), 417-441. <https://doi.org/10.1002/cpt.158>
- Tellmann G. 2006 The E-Method: a highly accurate technique for gene-expression analysis. *Nature Methods*, 3, i-ii.
- Teng, L., & Tan, K. (2012). Finding combinatorial histone code by semi-supervised biclustering. *BMC Genomics*, 13, 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-301>
- Terbach, N., & Williams, R. S. (2009). Structure–function studies for the panacea, valproic acid. *Biochemical Society Transactions*, 37(5), 1126-1132. <https://doi.org/10.1042/BST0371126>
- The ClinCalc DrugStats Database. (2022). The Top 300 of 2022. Erişim adresi: <https://clincalc.com/DrugStats/Top300Drugs.aspx>
- Thorburn, J., Andrysik, Z., Staskiewicz, L., Gump, J., Maycotte, P., Oberst, A., Green, D. R., Espinosa, J. M., & Thorburn, A. (2014). Autophagy controls the kinetics and extent of mitochondrial apoptosis by regulating PUMA levels. *Cell Reports*, 7(1), 45-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.036>
- Thrall, D. E. (2012). *Textbook of veterinary diagnostic radiology-E-book*. Elsevier Health Sciences.
- Thumborn, R., Bhattarakosol, P., & Chaiwongkot, A. (2022). Detection of global DNA methylation in cervical intraepithelial neoplasia and cancerous lesions by pyrosequencing and enzyme-linked immunosorbent assays. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 23(1), 143. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2022.23.1.143>
- Thuróczy, J., Reisvaag, G., Perge, E., Tibold, A., Szilágyi, J., & Balogh, L. (2007). Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 137(2-3), 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.05.005>
- Toh, T. B., Lim, J. J., & Chow, E. K.-H. (2017). Epigenetics in cancer stem cells. *Molecular Cancer*, 16, 1-20. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0596-9>
- Tokur, O., & Aksoy, A. (2017). In vitro sitotoksikite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118. <https://doi.org/10.31196/huvfd.325794>
- Tomson, T., Battino, D., & Perucca, E. (2019). Teratogenicity of antiepileptic drugs. *Current Opinion in Neurology*, 32(2), 246-252. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000659>
- Torres-Adorno, A. M., Lee, J., Kogawa, T., Ordentlich, P., Tripathy, D., Lim, B., & Ueno, N. T. (2017). Histone deacetylase inhibitor enhances the efficacy of MEK inhibitor through NOXA-mediated MCL1 degradation in triple-negative and inflammatory breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(16), 4780-4792. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2622>

- Trefely, S., Doan, M. T., & Snyder, N. W. (2019). Crosstalk between cellular metabolism and histone acetylation. In *Methods in Enzymology* (Vol. 626, pp. 1-21). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.07.013>
- Tripathi, V., Ellis, J. D., Shen, Z., Song, D. Y., Pan, Q., Watt, A. T., Freier, S. M., Bennett, C. F., Sharma, A., & Bubulya, P. A. (2010). The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Molecular Cell*, 39(6), 925-938. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.011>
- Tron, A. E., Belmonte, M. A., Adam, A., Aquila, B. M., Boise, L. H., Chiarparin, E., Cidado, J., Embrey, K. J., Gangl, E., & Gibbons, F. D. (2018). Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. *Nature Communications*, 9(1), 5341. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07551-w>
- Tsai, T.-H., Lin, Y.-C., Sun, C.-K., Chung, S.-Y., Chai, H.-T., Yang, C.-H., Chen, S.-M., Hang, C.-L., Chen, C.-J., & Chua, S. (2010). Prognostic value of circulating dead monocytes in patients with acute st-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Cardiology*, 117(2), 131-139. <https://doi.org/10.1159/000320208>
- Tung, E. W., & Winn, L. M. (2011). Valproic acid increases formation of reactive oxygen species and induces apoptosis in postimplantation embryos: a role for oxidative stress in valproic acid-induced neural tube defects. *Molecular Pharmacology*, 80(6), 979-987. <https://doi.org/10.1124/mol.111.072314>
- Turgut, U., Kazan, S., Cakin, H., & Ozak, A. (2019). Valproic acid effect on neural tube defects is not prevented by concomitant folic acid supplementation: Early chick embryo model pilot study. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 78, 45-48. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2019.05.008>
- Ucar, D., Hu, Q., & Tan, K. (2011). Combinatorial chromatin modification patterns in the human genome revealed by subspace clustering. *Nucleic Acids Research*, 39(10), 4063-4075. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr016>
- Ulukaya, E., Acilan, C., & Yilmaz, Y. (2011). Apoptosis: why and how does it occur in biology? *Cell Biochemistry and Function*, 29(6), 468-480. <https://doi.org/10.1002/cbf.1774>
- Um, H. J., Park, J. W., & Kwon, T. K. (2011). Melatonin sensitizes Caki renal cancer cells to kahweol-induced apoptosis through CHOP-mediated up-regulation of PUMA. *Journal of Pineal Research*, 50(4), 359-366. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00851.x>
- Vaden, D. L., Ding, D., Peterson, B., & Greenberg, M. L. (2001). Lithium and Valproate Decrease Inositol Mass and Increase Expression of the Yeast INO1 and INO2 Genes for Inositol Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(18), 15466-15471.
- Vafaei, R., Samadi, M., Hosseinzadeh, A., Barzaman, K., Esmailinejad, M., Khaki, Z., & Farahmand, L. (2022). Comparison of mucin-1 in human breast cancer and canine mammary gland tumor: a review study. *Cancer Cell International*, 22, 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02398-6>
- Valerio, D. G., Xu, H., Eisold, M. E., Woolthuis, C. M., Pandita, T. K., & Armstrong, S. A. (2017). Histone acetyltransferase activity of MOF is required for adult but not early fetal hematopoiesis in mice. *Blood, The Journal of the American*

- Society of Hematology, 129(1), 48-59. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-05-714568>
- Van Attikum, H., & Gasser, S. M. (2009). Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends in Cell Biology*, 19(5), 207-217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2009.03.001>
- Varambally, S., Dhanasekaran, S. M., Zhou, M., Barrette, T. R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M. G., Ghosh, D., Pienta, K. J., Sewalt, R. G., & Otte, A. P. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, 419(6907), 624-629. <https://doi.org/10.1038/nature01075>
- Varmus, H. (2017). How tumor virology evolved into cancer biology and transformed oncology. *Annual Review of Cancer Biology*, 1(1), 1-18. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-050216-034315>
- Vazquez, E., Lipovka, Y., Cervantes-Arias, A., Garibay-Escobar, A., Haby, M. M., Queiroga, F. L., & Velazquez, C. (2023). Canine mammary cancer: State of the art and future perspectives. *Animals*, 13(19), 3147. <https://doi.org/10.3390/ani13193147>
- Vecht, C. J., Wagner, G. L., & Wilms, E. B. (2003). Interactions between antiepileptic and chemotherapeutic drugs. *The Lancet Neurology*, 2(7), 404-409. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(03\)00435-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(03)00435-6)
- Venuta, F., & Rendina, E. A. (2008). Combined pulmonary artery and bronchial sleeve resection. *Operative Techniques in Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 13(4), 260-273. <https://doi.org/10.1053/j.optechstcvs.2008.12.001>
- Vidal, E., Sayols, S., Moran, S., Guillaumet-Adkins, A., Schroeder, M. P., Royo, R., Orozco, M., Gut, M., Gut, I., & Lopez-Bigas, N. (2017). A DNA methylation map of human cancer at single base-pair resolution. *Oncogene*, 36(40), 5648-5657. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.176>
- Walker, P. R., & Sikorska, M. (1997). New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis. *Biochemistry and Cell Biology*, 75(4), 287-299.
- Wang, C., Wallerman, O., Arendt, M.-L., Sundström, E., Karlsson, Å., Nordin, J., Mäkeläinen, S., Pielberg, G. R., Hanson, J., & Ohlsson, Å. (2021). A novel canine reference genome resolves genomic architecture and uncovers transcript complexity. *Communications Biology*, 4(1), 185. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01698-x>
- Wang, G., & Han, J. J. (2021). Connections between metabolism and epigenetic modifications in cancer. *Medical Review*, 1(2), 199-221. <https://doi.org/10.1515/mr-2021-0015>
- Wang, J., Thomas, H. R., Li, Z., Yeo, N. C., Scott, H. E., Dang, N., Hossain, M. I., Andrabi, S. A., & Parant, J. M. (2021). Puma, noxa, p53, and p63 differentially mediate stress pathway induced apoptosis. *Cell Death & Disease*, 12(7), 659. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03902-6>
- Wang, L., Xi, C., Liu, R., Ye, T., Xiang, N., Deng, J., & Li, H. (2024). Dual targeting of Mcl-1 and Bcl-2 to overcome chemoresistance in cervical and colon cancer. *Anti-Cancer Drugs*, 35(3), 219-226. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000001553>
- Wang, L., & Dent, S. Y. (2014). Functions of SAGA in development and disease. *Epigenomics*, 6(3), 329-339. <https://doi.org/10.2217/epi.14.22>
- Wedel, S., Hudak, L., Seibel, J.-M., Makarević, J., Juengel, E., Tsaur, I., Wiesner, C., Haferkamp, A., & Blaheta, R. A. (2011). Impact of combined HDAC and mTOR

- inhibition on adhesion, migration and invasion of prostate cancer cells. *Clinical and Experimental Metastasis*, 28, 479-491. <https://doi.org/10.1007/s10585-011-9386-8>
- Wedge, E., Hansen, J. W., Garde, C., Asmar, F., Tholstrup, D., Kristensen, S. S., Munch-Petersen, H. D., Ralfkiaer, E., Brown, P., & Grønbæk, K. (2017). Global hypomethylation is an independent prognostic factor in diffuse large B cell lymphoma. *American Journal of Hematology*, 92(7), 689-694. <https://doi.org/10.1002/ajh.24751>
- Weinstein, J. N., Collisson, E. A., Mills, G. B., Shaw, K. R., Ozenberger, B. A., Ellrott, K., Shmulevich, I., Sander, C., & Stuart, J. M. (2013). The cancer genome atlas pan-cancer analysis project. *Nature Genetics*, 45(10), 1113-1120.
- Weller, S., Toennies, A., Schaefer, B., Beigl, T., Muenchow, A., Böpple, K., Hofmann, U., Gillissen, B. F., Aulitzky, W. E., & Kopp, H.-G. (2022). The BCL-2 inhibitor ABT-199/venetoclax synergizes with proteasome inhibition via transactivation of the MCL-1 antagonist NOXA. *Cell Death Discovery*, 8(1), 215. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01009-1>
- Werler, M. M., Ahrens, K. A., Bosco, J. L., Mitchell, A. A., Anderka, M. T., Gilboa, S. M., Holmes, L. B., & Study, T. N. B. D. P. (2011). Use of antiepileptic medications in pregnancy in relation to risks of birth defects. *Annals of Epidemiology*, 21(11), 842-850. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2011.08.002>
- Werner, H. M., Mills, G. B., & Ram, P. T. (2014). Cancer systems biology: a peek into the future of patient care? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 11(3), 167-176. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.6>
- Weyhenmeyer, B., Murphy, A., Prehn, J., & Murphy, B. (2012). Targeting the anti-apoptotic Bcl-2 family members for the treatment of cancer. *Experimental Oncology*.
- Whelan, J. A., Russell, N. B., & Whelan, M. A. (2003). A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*, 278(1-2), 261-269. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(03\)00223-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(03)00223-0)
- Williams, M. M., Lee, L., Werfel, T., Joly, M. M. M., Hicks, D. J., Rahman, B., Elion, D., McKernan, C., Sanchez, V., & Estrada, M. V. (2018). Intrinsic apoptotic pathway activation increases response to anti-estrogens in luminal breast cancers. *Cell Death & Disease*, 9(2), 21. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0072-x>
- Williams, R. S., Cheng, L., Mudge, A. W., & Harwood, A. J. (2002). A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. *Nature*, 417(6886), 292-295. <https://doi.org/10.1038/417292a>
- Withrow, S. J., Page, R., & Vail, D. M. (2012). *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. Elsevier Health Sciences.
- Witt, D., Burfeind, P., von Hardenberg, S., Opitz, L., Salinas-Riester, G., Bremmer, F., Schweyer, S., Thelen, P., Neesen, J., & Kaulfuß, S. (2013). Valproic acid inhibits the proliferation of cancer cells by re-expressing cyclin D2. *Carcinogenesis*, 34(5), 1115-1124. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt019>
- Wittenburg, L. A., Bisson, L., Rose, B. J., Korch, C., & Thamm, D. H. (2011). The histone deacetylase inhibitor valproic acid sensitizes human and canine osteosarcoma to doxorubicin. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 67, 83-92. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1287-z>

- Wittenburg, L. A., Gustafson, D. L., & Thamm, D. H. (2010). Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of combined valproic acid/doxorubicin treatment in dogs with spontaneous cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(19), 4832-4842. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1238>
- Wolfsperger, F., Hogh-Binder, S., Schittenhelm, J., Psaras, T., Ritter, V., Bornes, L., Huber, S., Jendrossek, V., & Rudner, J. (2016). Deubiquitylating enzyme USP9x regulates radiosensitivity in glioblastoma cells by Mcl-1-dependent and-independent mechanisms. *Cell Death & Disease*, 7(1), e2039-e2039. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.405>
- Wongsaengchan, C., & McKeegan, D. E. (2019). The views of the UK public towards routine neutering of dogs and cats. *Animals*, 9(4), 138. <https://doi.org/10.3390/ani9040138>
- World Health Organization (WHO). (2019). World Health Organization model list of essential medicines: 21st list 2019. Erişim adresi: <https://iris.who.int/handle/10665/325771>.
- Wu, K., Rodrigues, L., Post, G., Harvey, G., White, M., Miller, A., Lambert, L., Lewis, B., Lopes, C., & Zou, J. (2023). Analyses of canine cancer mutations and treatment outcomes using real-world clinico-genomics data of 2119 dogs. *NPJ Precision Oncology*, 7(1), 8. <https://doi.org/10.1038/s41698-023-00346-3>
- Wu, Y., Dong, X., Wang, Y., Wang, Q., Gu, H., & Huang, W. (2018). Association between rs120963, rs152451, rs249935, rs447529, rs8053188, and rs16940342 polymorphisms in the PALB2 gene and breast cancer susceptibility: a meta-analysis. *Oncology Research and Treatment*, 41(12), 780-786. <https://doi.org/10.1159/000492827>
- Xiao, Y., Nimmer, P., Sheppard, G. S., Bruncko, M., Hessler, P., Lu, X., Roberts-Rapp, L., Pappano, W. N., Elmore, S. W., & Souers, A. J. (2015). MCL-1 is a key determinant of breast cancer cell survival: validation of MCL-1 dependency utilizing a highly selective small molecule inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(8), 1837-1847. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0928>
- Xie, Z., Ikegami, T., Ago, Y., Okada, N., & Tachibana, M. (2020). Valproic acid attenuates CCR2-dependent tumor infiltration of monocytic myeloid-derived suppressor cells, limiting tumor progression. *Oncoimmunology*, 9(1), 1734268. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1734268>
- Xu, E., Hu, M., & Liu, Y. (2021). Aspirin inhibits proliferation and metastasis of canine mammary gland tumor cells through Wnt signaling axis. *Translational Cancer Research*, 10(2), 589. <https://doi.org/10.21037/tcr-20-3172>
- Xu, R., Huang, Y., Mai, J., Zhang, G., Guo, X., Xia, X., Koay, E. J., Qin, G., Erm, D. R., & Li, Q. (2013). Multistage Vectored siRNA Targeting Ataxia-Telangiectasia Mutated for Breast Cancer Therapy. *Small*, 9(9-10), 1799-1808. <https://doi.org/10.1002/smll.201201510>
- Yagi, Y., Fushida, S., Harada, S., Kinoshita, J., Makino, I., Oyama, K., Tajima, H., Fujita, H., Takamura, H., & Ninomiya, I. (2010). Effects of valproic acid on the cell cycle and apoptosis through acetylation of histone and tubulin in a scirrhous gastric cancer cell line. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 29, 1-11. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-149>

- Yan, G., & Efferth, T. (2018). Cell harvesting methods affect cellular integrity of adherent cells during apoptosis detection. *Anticancer Research*, 38(12), 6669-6672. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13034>
- Yan, L., Zhao, L., Long, Y., Zou, P., Ji, G., Gu, A., & Zhao, P. (2012). Association of the maternal MTHFR C677T polymorphism with susceptibility to neural tube defects in offsprings: evidence from 25 case-control studies. *Plos One*, 7(10), e41689. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041689>
- Yan, Y., He, Y.-Y., Jiang, X., Wang, Y., Chen, J.-W., Zhao, J.-H., Ye, J., Lian, T.-Y., Zhang, X., & Zhang, R.-J. (2020). DNA methyltransferase 3B deficiency unveils a new pathological mechanism of pulmonary hypertension. *Science Advances*, 6(50), eaba2470. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba2470>
- Yang, H., Zhong, Y., Peng, C., Chen, J.-Q., & Tian, D. (2010). Important role of indels in somatic mutations of human cancer genes. *BMC Medical Genetics*, 11, 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-11-128>
- Yang, X.-J., & Seto, E. (2008). The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), 206-218. <https://doi.org/10.1038/nrm2346>
- Yang, X., Yu, W., Shi, L., Sun, L., Liang, J., Yi, X., Li, Q., Zhang, Y., Yang, F., & Han, X. (2011). HAT4, a Golgi apparatus-anchored B-type histone acetyltransferase, acetylates free histone H4 and facilitates chromatin assembly. *Molecular Cell*, 44(1), 39-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.032>
- Yao, Q., Chen, J., Lv, Y., Wang, T., Zhang, J., Fan, J., & Wang, L. (2011). The significance of expression of autophagy-related gene Beclin, Bcl-2, and Bax in breast cancer tissues. *Tumor Biology*, 32, 1163-1171. <https://doi.org/10.1007/s13277-011-0219-9>
- Young, A. I., Law, A. M., Castillo, L., Chong, S., Cullen, H. D., Koehler, M., Herzog, S., Brummer, T., Lee, E. F., & Fairlie, W. D. (2016). MCL-1 inhibition provides a new way to suppress breast cancer metastasis and increase sensitivity to dasatinib. *Breast Cancer Research*, 18, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0781-6>
- Yu, Z., Zeng, J., Liu, H., Wang, T., Yu, Z., & Chen, J. (2019). Role of HDAC1 in the progression of gastric cancer and the correlation with lncRNAs. *Oncology Letters*, 17(3), 3296-3304. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.9962>
- Yuan, Y., Xiang, W., Qing, M., Yanhui, L., Jiewen, L., & Yunhe, M. (2014). Survival analysis for valproic acid use in adult glioblastoma multiforme: a meta-analysis of individual patient data and a systematic review. *Seizure*, 23(10), 830-835. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2014.06.015>
- Yuan, Z.-F., Arnaudo, A. M., & Garcia, B. A. (2014). Mass spectrometric analysis of histone proteoforms. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 7(1), 113-128. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071213-015959>
- Zeng, F., Ju, R.-J., Liu, L., Xie, H.-J., Mu, L.-M., & Lu, W.-L. (2017). Efficacy in treating lung metastasis of invasive breast cancer with functional vincristine plus dasatinib liposomes. *Pharmacology*, 101(1-2), 43-53. <https://doi.org/10.1159/000480737>
- Zeng, F., Ju, R.-J., Liu, L., Xie, H.-J., Mu, L.-M., Zhao, Y., Yan, Y., Hu, Y.-J., Wu, J.-S., & Lu, W.-L. (2015). Application of functional vincristine plus dasatinib liposomes to deletion of vasculogenic mimicry channels in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*, 6(34), 36625. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5382>

- Zhang, C., Zhang, J., Zhang, A., Wang, Y., Han, L., You, Y., Pu, P., & Kang, C. (2010). PUMA is a novel target of miR-221/222 in human epithelial cancers. *International Journal of Oncology*, 37(6), 1621-1626. [https://doi.org/10.3892/ijo\\_00000816](https://doi.org/10.3892/ijo_00000816)
- Zhang, S., Duan, S., Xie, Z., Bao, W., Xu, B., Yang, W., & Zhou, L. (2022). Epigenetic therapeutics targeting NRF2/KEAP1 signaling in cancer oxidative stress. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 924817. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.924817>
- Zhang, T., Cooper, S., & Brockdorff, N. (2015). The interplay of histone modifications—writers that read. *EMBO Reports*, 16(11), 1467-1481. <https://doi.org/10.15252/embr.201540945>
- Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C., & Han, J. (2018). Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Research*, 28(1), 9-21. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.133>
- Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Ando, Y., Mita, K., Hamaguchi, M., Hara, Y., Kobayashi, S., & Iwase, H. (2005). Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Research and Treatment*, 94, 11-16. <https://doi.org/10.1007/s10549-005-6001-1>
- Zhao, H., Chen, G., & Liang, H. (2019). Dual PI3K/mTOR Inhibitor, XL765, suppresses glioblastoma growth by inducing ER stress-dependent apoptosis. *OncoTargets and Therapy*, 5415-5424. <https://doi.org/10.2147/OTT.S210128>
- Zhao, X.-Y., Yang, S., Chen, Y.-R., Li, P.-C., Dou, M.-M., & Zhang, J. (2014). Resveratrol and arsenic trioxide act synergistically to kill tumor cells in vitro and in vivo. *PloS One*, 9(6), e98925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098925>
- Zheng, H.-H., Du, C.-T., Yu, C., Zhang, Y.-Z., Huang, R.-L., Tang, X.-Y., & Xie, G.-H. (2022). Epidemiological investigation of canine mammary tumors in Mainland China between 2017 and 2021. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 843390. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.843390>
- Zheng, S., Wyrick, J. J., & Reese, J. C. (2010). Novel trans-tail regulation of H2B ubiquitylation and H3K4 methylation by the N terminus of histone H2A. *Molecular and Cellular Biology*, 30(14), 3635-3645. <https://doi.org/10.1128/MCB.00324-10>
- Zhiteneva, A., Bonfiglio, J. J., Makarov, A., Colby, T., Vagnarelli, P., Schirmer, E. C., Matic, I., & Earnshaw, W. C. (2017). Mitotic post-translational modifications of histones promote chromatin compaction in vitro. *Open Biology*, 7(9), 170076. <https://doi.org/10.1098/rsob.170076>
- Zhou, T., Zhang, L., Liu, T., Yang, Y., Luo, F., Zhang, Z., Huang, Y., Zhao, H., Zhang, L., & Zhao, Y. (2020). Myeloid cell leukemia-1 is an important predictor of survival and progression of small cell lung cancer. *Annals of Translational Medicine*, 8(23). <https://doi.org/10.21037/atm-20-2305>
- Zhou, Z., Xu, S., Jiang, L., Tan, Z., & Wang, J. (2022). A systematic pan-cancer analysis of CASP3 as a potential target for immunotherapy. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 776808. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.776808>
- Zhu, P., Martin, E., Mengwasser, J., Schlag, P., Janssen, K.-P., & Göttlicher, M. (2004). Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell*, 5(5), 455-463.

- Zhu, S., Wang, G., Liu, B., & Wang, Y. (2013). Modeling exon expression using histone modifications. *PloS One*, 8(6), e67448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067448>
- Zhu, Z.-Z., Sparrow, D., Hou, L., Tarantini, L., Bollati, V., Litonjua, A. A., Zanobetti, A., Vokonas, P., Wright, R. O., & Baccarelli, A. (2011). Repetitive element hypomethylation in blood leukocyte DNA and cancer incidence, prevalence, and mortality in elderly individuals: the Normative Aging Study. *Cancer Causes and Control*, 22, 437-447. <https://doi.org/10.1007/s10552-010-9715-2>

