

Atf İçin: Ertürk, E., Sağnak, A., Yıldız, Y., Akgün, O., Coşkun, D. ve Arı, F. (2023). Kalkon Bileşiklerinin Prostat Kanseri Hücrelerinde Antiproliferatif ve Nekroptotik Etkilerinin Belirlenmesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(3), 1552-1561.

To Cite: Ertürk, E., Sağnak, A., Yıldız, Y., Akgün, O., Coşkun, D. & Arı, F. (2023). Determination of Antiproliferative and Necroptotic Effects of Chalcone Compounds on Prostate Cancer Cells. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(3), 1552-1561.

Kalkon Bileşiklerinin Prostat Kanseri Hücrelerinde Antiproliferatif ve Nekroptotik Etkilerinin Belirlenmesi

Elif ERTÜRK¹, Ayşen SAĞNAK², Yaren YILDIZ², Oğuzhan AKGÜN², Demet COŞKUN³, Ferda ARI^{2*}

Öne Çıkanlar:

- Kalkon bileşikleri nekroptozisi indükler
- Kalkon bileşikleri anti-proliferatif etkiye sahiptir
- Kalkon bileşikleri anti-kanser aktiviteye sahiptir

Anahtar Kelimeler:

- Prostat kanseri
- Kalkonlar
- Antiproliferatif
- Antikanser
- Nekroptozis

ÖZET:

Kanser, genetik ve çevresel koşullar ile hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalmasıyla ortaya çıkan çok basamaklı ölümcül bir hastalıktır. Prostat kanseri, erkekleri etkileyen ve küresel olarak erkeklerde artan ölüm oranlarına önemli ölçüde katkıda bulunan malignitelerden biridir. Prostat kanserinde, uzun bir hastalık geçmişi, genetik-fenotipik çeşitlilik ve hastaların klinik ilerlemesindeki belirsizlik nedeniyle yeni yaklaşımların geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Kalkonlar, bitkilerde bulunan, farmakolojik aktif bileşiklerdir. Doğal ya da sentetik kalkon türevlerinin kanser hücrelerinde anti-kanser aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Mevcut çalışmada, sentezi ve karakterizasyonu yapılmış iki kalkon türevinin (Bileşik 1 ve Bileşik 2) anti-kanser ve anti-proliferatif etkileri insan prostat kanseri hücre soylarında (LNCaP ve PC-3) araştırıldı. Bileşiklerin hücre canlılığı üzerindeki anti-proliferatif etkisi 48 saatlik tedavi sonrası SRB canlılık analizi ile değerlendirildi. Kalkon bileşiklerinin sitotoksik etkilerinden sorumlu hücre ölüm modunu belirlemek amacıyla floresan boyama (Hoechst 33342+Annexin-V+Propidyum iyodür) yöntemi ve gen ekspresyonlarında meydana getirdiği değişiklikleri saptamak için de RT-PCR analizi gerçekleştirildi. Bileşiklerin, LNCaP ve PC-3 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak anti-proliferatif etkileri saptandı. Üçlü floresan boyama sonucu ile bileşiklerin LNCaP ve PC-3 hücrelerinde sekonder apoptozisi teşvik ettiği tespit edildi. Hücre ölümü yolak genleri BCL-2, MLKL, FAS ve PARP ekspresyon seviyelerinde anlamlı artışlar belirlendi. Elde edilen sonuçların ışığında, Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin prostat kanserinde anti-proliferatif etki gösterdiği ve nekroptozisi indüklediği sonucuna varıldı.

Determination of Antiproliferative and Necroptotic Effects of Chalcone Compounds on Prostate Cancer Cells

Highlights:

- Chalcone compounds induce necroptosis
- Chalcone compounds have anti-proliferative effect
- Chalcone compounds have anti-cancer activity

Keywords:

- Prostate cancer
- Chalcones
- Antiproliferative
- Anticancer
- Necroptosis

ABSTRACT:

Cancer is a multistage fatal disease that occurs with genetic and environmental conditions and uncontrolled division and proliferation of cells. Prostate cancer is one of the malignancies that affects men and contributes significantly to the increasing mortality rates in men globally. Due to a long disease history, genetic-phenotypic diversity, and uncertainty in the clinical progression of patients in prostate cancer, the necessity of developing new approaches arises. Chalcones are pharmacologically active compounds found in plants. It has been observed that natural or synthetic chalcone derivatives have anti-cancer activity in cancer cells. In the current study, the anti-cancer and anti-proliferative effects of two synthesized and characterized chalcone derivatives (Compound 1 and Compound 2) were investigated in human prostate cancer cell lines (LNCaP and PC-3). The anti-proliferative effect of the compounds on cell viability was assessed by SRB viability assay after 48 hours of treatment. Fluorescent staining (Hoechst 33342+Annexin-V+Propidium iodide) method was used to determine the cell death mode responsible for the cytotoxic effects of chalcone compounds, and RT-PCR analysis was performed to determine the changes in gene expressions. Anti-proliferative effects of the compounds were detected in LNCaP and PC-3 cells in a dose- and time-dependent manner. It was determined by triple fluorescent staining that the compounds induced secondary apoptosis in LNCaP and PC-3 cells. Significant increases in expression levels of cell death pathway genes BCL-2, MLKL, FAS and PARP were determined. In the light of the results obtained, it was concluded that Compound 1 and Compound 2 showed anti-proliferative effect and induced necroptosis in prostate cancer.

¹ Elif ERTÜRK (Orcid ID: 0000-0001-7668-796X), Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, 16059, Bursa, Türkiye

² Ayşen SAĞNAK (Orcid ID: 0009-0004-0929-5236), Yaren YILDIZ (Orcid ID: 0000-0002-0004-982X), Oğuzhan AKGÜN (Orcid ID: 0000-0002-8410-1786), Ferda ARI (Orcid ID: 0000-0002-6729-7908), Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 16059, Bursa, Türkiye

³ Demet COŞKUN (Orcid ID: 0000-0001-7141-6909), Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 23119, Elazığ, Türkiye

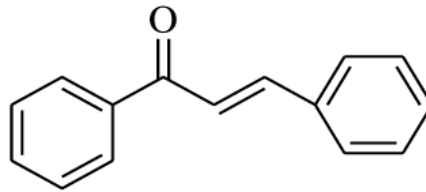
*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ferda ARI, e-mail: ferdaoz@uludag.edu.tr

GİRİŞ

Kanser, dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde ikinci önde gelen ölüm nedenidir. 2023 yılında ABD'de 1.958.310 yeni kanser vakası ve 609.820 kanser ölümünün meydana geleceği tahmin edilmektedir. Prostat kanseri için kanser insidansı, kadınlara kıyasla erkeklerde daha olumlu iken yirmi yıllık düşüşün ardından 2014'ten 2019'a kadar yılda %3 artmıştır ve bu da 99.000 yeni vaka daha anlamına gelmektedir (Siegel ve ark., 2023). 200'den fazla çeşidi olduğu bilinen kansere karşı etkin tedavi stratejilerinin açığa çıkarılması için, kanserin temel özelliklerinin bilinmesi gereklidir. Hanahan ve Weinberg, 2022 yılına kadar kanserin ayırt edici ve etkinleştirici özelliklerini, yaptıkları çalışmalarında ortaya koymuşlardır (Hanahan ve Weinberg, 2011; Hanahan, 2022).

Prostat kanseri, 45 ila 60 yaşları arasındaki orta yaşlı erkekleri etkiler ve batı ülkelerinde kansere bağlı ölümlerin en yüksek nedenidir (Chen ve ark., 2013). Prostat kanseri hem epidemiyoloji hem de genetik olarak heterojen bir hastalıktır. Prostat kanserli birçoğu prostate biyopsisi ve analizi, prostata özgü antijen (PSA) testi, dijital rektal muayene, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) veya sağlık taraması ile teşhis konmaktadır. Bununla birlikte, bu kanser türü için mevcut tedavi seçenekleri aktif gözetim, kemoterapi, radyasyon tedavisi, hormonal tedavi, cerrahi ve kriyoterapidir (Bach ve ark., 2014). Ancak, mevcut tedavi seçenekleri pahalıdır ve ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle, çok daha az yan etkisi olan veya hiç yan etkisi olmayan ve daha yüksek etkinliği olan yeni, uygun maliyetli kemoterapötik ajanların keşfi gereklidir (Termini ve ark., 2020).

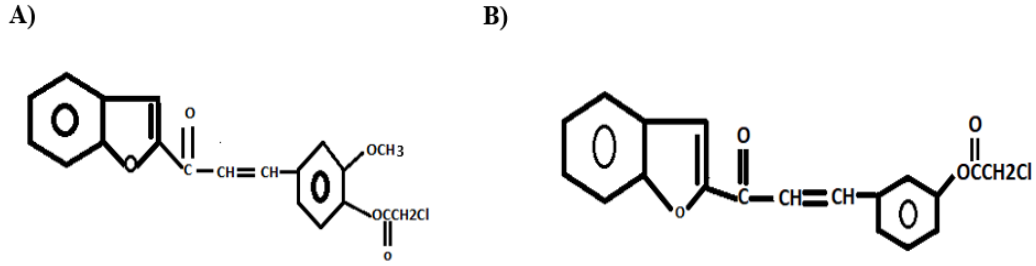
Dünyada ölüme neden olan en yaygın ikinci hastalık olan kanserin tedavisi için anti-kanser ilaçlar geliştirilirken, DNA'nın düzensiz replikasyonu ve hastalıkta, hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve büyümesi dikkate alınarak, DNA yıkımına neden olacak ve bölünen hücreleri hızla öldürecek moleküllerin tasarlanması son yıllarda dikkat çekmektedir (Beytur ve ark., 2022). Flavonoidler, bitkilerden elde edilen doğal biyoaktif ürünlerin en önemli ve en geniş sınıfını oluşturur ve en bilinen alt sınıfı, "açık zincirli flavonoidler" olarak da adlandırılan kalkonlardır (Panche ve ark., 2016). Kalkonlar, geleneksel tıpta birçok hastalığı tedavi etmek için kullanılmaktadır (Zhuang ve ark., 2017). Enon sistemi ile kimyasal olarak birbirine bağlı iki aromatik halka kalkonların temel iskelet yapısını oluşturur (Ducki, 2010) (Şekil 1).



Şekil 1. Kalkon yapısı. (Ducki, 2010)

Kalkonlar ve bunların sentetik türevleri, anti-hipertansif, anti-diyabetik, anti-retroviral, anti-histamin, anti-inflamatuar, anti-oksidan, anti-tüberküloz, anti-fungal, anti-ülser ve anti-kanser gibi geniş bir biyoaktivite spektrumuna sahiptir (Wan ve ark., 2014; Coşkun ve ark., 2016; Zhuang ve ark., 2017; Özen ve ark., 2018; Arif ve ark., 2020). Literatürde kalkon türevlerinin biyolojik özelliklerinin araştırılmasına yönelik birçok çalışma bulunmaktadır. Buna rağmen, çok çeşitli biyolojik özelliklere sahip olan bu bileşiklerin yeni türevlerinin sentezlenmesine hâlâ ihtiyaç olduğu açıktır.

Buradan yola çıkarak mevcut çalışmada, sentezi ve karakterizasyonu yapılmış olan iki yeni kalkon türevinin (Bileşik 1 (Şekil 2A) ve Bileşik 2 (Şekil 2B)) anti-kanser etkileri, prostat kanseri hücrelerinde (LNCaP ve PC-3) incelenmiştir.



Şekil 2. Bileşik 1 ve Bileşik 2 yapıları. A) Bileşik 1; [(4)-((1E)-3-(1-benzofuran-2-il)-3-oksoprop-1-en-1-il)-2-metoksifenil kloroasetat), B) Bileşik 2; [3-[(1E)-3-(1-benzofuran-2-il)-3-oksoprop-1-en-1-il)]fenil kloroasetat) (Coskun ve Ahmedzade, 2014)

MATERYAL VE METOD

Kimyasal ve Hücre Kültürü

Coşkun ve ark. tarafından sentezlenen ve karakterizasyonları yapılan kalkon bileşiklerinin (Bileşik 1 ve Bileşik 2) 50 mM ana stok çözeltileri Dimetil sülfoksit (DMSO (Sigma, Almanya)) ile hazırlandı (Alioglu ve ark., 2023). Bileşiklerin stok solüsyonları bölündü ve -20°C'de saklandı. Ardından bileşikler, seri dilüsyon için en yüksek doz olan 100 µM konsantrasyonunda, DMSO oranı %0,01'i geçmeyecek şekilde, çözünerek hazırlandı. İnsan prostat kanseri hücresi LNCaP androjen reseptörü pozitif olmasıyla PC-3 hücre soyundan farklıdır. PC-3 hücre soyu androjene yanıt vermemektedir. Bu iki hücre soyu %1 penisilin (100 U/ml)-streptomisin (100 µg/ml) (Gibco, USA) ve %10 fetal sığır serum (Gibco, ABD) içeren Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640 (Lonza)) besiyeri yerinde 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda kültüre edildi.

Sulforhodamine B (SRB) Canlılık Testi

SRB metodu için, LNCaP ve PC-3 hücreleri 2500-7500 arası değişen yoğunlukta, kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. Sentezlenmiş kalkon bileşiklerinden belirli konsantrasyonlarda (100-1.56 µM) eklendi. 48 saat inkübasyon sonunda, SRB testi ve hücre canlılığının hesaplanması daha önce tarif edilen yöntemle gerçekleştirildi (Erturk ve ark., 2023). Optik yoğunluk (absorbans) spektrofometrede (FLASHScan S12, Analytik Jena, Almanya) 570 nm dalga boyunda okundu. Hücre canlılığı aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = [100 \times (\text{Örnek absorbans}) / (\text{Kontrol absorbans})].$$

Floresan Boyama Yöntemi

Bileşik 1 ve Bileşik 2 uygulaması ile PC-3 ve LNCaP hücrelerinde hücre ölümünün fenotipik özellikleri floresan boyama yöntemi ile araştırıldı. Apoptoz/nekroz için Hoechst, Propidyum iyodür (PI) ve Annexin-V boyamaları (Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche, Mannheim, Germany)) yapıldı. Hoechst 33342, DNA'ya bağlanabilen ve canlı veya ölü (apoptotik/nekrotik) hücrelerin çekirdeklerini boyamak için kullanılan hücre geçirgen bir boyadır. PI, yalnızca birincil nekrotik ve geç apoptotik (ikincil nekroz) hücreleri etiketleyerek sadece hasarlı zarlardan geçebilir. Erken apoptozu tespit etmek için ise Annexin-V boyası kullanılır (Ulukaya ve ark., 2011). Bileşik 1 ve Bileşik 2 tedavisi prostat kanseri hücrelerine 6.25, 12.5 ve 25 µM dozlarında uygulandı. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda, PC-3 ve LNCaP hücreleri, 3 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich), 1 µg/ml PI (Sigma-Aldrich) ve 3 µg/ml Annexin-V (Sigma-Aldrich) boyalarından oluşan bir çalışma solüsyonu ile boyandı. Hücreler floresan mikroskop altında değerlendirildi.

Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) Analizi

48 saatlik Bileşik 1 ve Bileşik 2 uygulamasından sonra, RNA izolasyonu için PC-3 ve LNCaP hücreleri toplandı. Hüresel RNA izolasyonu için PureLink™ RNA Mini Kit (ThermoFisher, ABD) ile üretici yönergeleri izlenerek RNA izolasyonu yapıldı. Ardından High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher, ABD) kullanılarak izolasyonu yapılan ve konsantrasyonu ölçülen RNA'lar, cDNA'ya dönüştürüldü. Çizelge 1'de gösterilen primerler kullanılarak Applied Biosystems Step One Plus Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific) cihazında RT-qPCR analizi yapıldı.

Çizelge 1. RT-qPCR için kullanılan primer setleri

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
BCL-2	5' ATGTGTGTGGAGACCCGTC AA 3'	5' GCCGTACAGTTCCACAAAGG 3'
MLKL	5' GCTGAGTGATGTCTGGAAGG 3'	5' CTTTGGAATCGTCCTCTGGG 3'
FAS	5' GACCCAGAATACCAAGTGCAG 3'	5' GTTCTGCTGTGTCTTGACATTGTC 3'
PARP-1	5' CTCAGGGGAGGGTCTGATGA 3'	5' CTTTGACACTGTGCTTGCCC 3'

İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler Graphpad v9.0 bilgisayar paket programı kullanılarak yapıldı. Yüzde canlılık değerleri, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak hesaplandı ve anlamlılık farklıysa, fark grupları Honest Meaning Test (HSD) ile belirlendi. Analizler, 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve veriler ortalama ve standart sapma ile sunuldu. Sonuçlar, $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirildi. Hücrelerin %50'sini öldüren doz (IC_{50}) değerleri Graphpad v9.0 veri tabanından yararlanılarak hesaplandı.

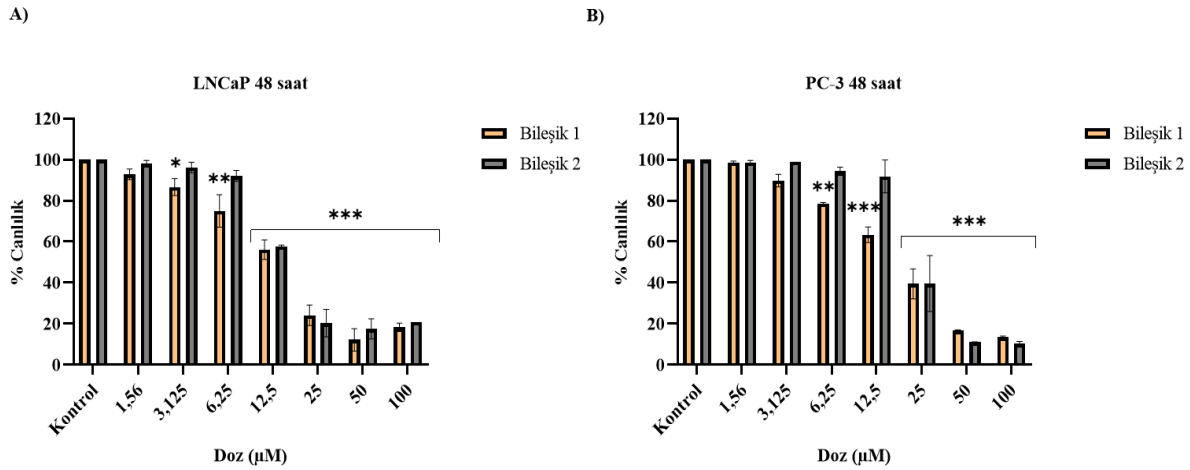
BULGULAR VE TARTIŞMA

Prostat kanseri, ABD'de erkekler arasında en sık görülen katı organ malignitesidir ve bu popülasyonda kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, 2023'te ABD'de yaklaşık 288300 yeni prostat kanseri teşhisi ve 34700 ölüm tahmin edilmektedir (Sung ve ark., 2021). Prostat kanserinde androjen yoksunluğu uygulaması ilk tercih edilen tedavi yöntemlerinden birisidir. Ancak hastaların büyük çoğunluğu bir ila üç yıl içerisinde androjen yoksunluğu tedavisine direnç geliştirebilmektedir. Kanser tedavisinde uygulanan ve olumsuz yan etkileri olan bilimsel tedavilerin yanı sıra son yıllarda kanser tedavisinde bitkisel veya diğer doğal ürünlerin kullanımı giderek önem kazanmaya başlamıştır (Sezgin, 2010; Hussain ve ark., 2019). Son zamanlarda çok sık çalışılan sentetik kalkon türevlerinin antikanser, antimikrobiyal, anjiyogenez inhibisyonu, antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-proliferatif gibi biyolojik aktiviteleri dikkatleri bu bileşiklerin üzerine çekmiştir (Coskun ve ark., 2017). Bu bilgiler doğrultusunda mevcut çalışmamızda, sentezlenmiş ve karakterizasyonları yapılmış kalkon türevlerinin (Bileşik 1 ve Bileşik 2) sitotoksik etkileri insan prostat kanseri (LNCaP ve PC-3) hücrelerinde araştırıldı. Bu bileşikler, 3-(süstitüe aril)-1-benzofuril-2-propenonlar üzerine yapılan çalışmaların bir ürünüdür. Kalkon yapısını içeren α -haloesterlerin sentezi sonucu meydana gelmişlerdir. Kalkon yapısını içeren α -haloesterler, süstitüe hidroksil kalkonların kloroasetil klorür ile Et_3N varlığında reaksiyonuyla sentezlenmiştir (Coskun ve Ahmedzade, 2014).

Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin doza bağlı sitotoksik aktivitesi LNCaP ve PC-3 hücrelerinde SRB canlılık testi ile değerlendirildi. LNCaP ve PC-3 hücreleri 1.56-100 μM 'lık doz aralığında 48 saat boyunca Bileşik 1 ve Bileşik 2 ile tedavi edildi. Benzofuran halkalı kalkon bileşiklerinin konsantrasyon artışına bağlı olarak uygulandıkları hücrelerde canlılığı düşürdüğü tespit edildi. Bileşik 1'in 48 saat boyunca, 3.12-100 μM dozlarında, LNCaP hücrelerine uygulanması sonucu kontrole oranla istatistiksel olarak hücre canlılığında anlamlı bir azalma meydana getirdiği saptandı (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Özellikle Bileşik 1'in 12.5 μM ve artan dozlarının LNCaP hücrelerinde hücre canlılığı

yüzdesini önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi. Bileşik 2'nin LNCaP hücrelerine 48 saatlik uygulanması sonucu ise hücre canlılığındaki anlamlı azalmaların 12.5-100 μM doz aralığından itibaren başladığı belirlendi (**p<0.001) (Şekil 3A).

Bileşik 1'in 48 saat boyunca uygulanmasını takiben PC-3 hücrelerine etkisi değerlendirildiğinde; 6.25-100 μM doz aralığından itibaren kontrol hücrelerine göre anlamlı bir azalma meydana getirdiği saptandı (**p<0.01, ***p<0.001). Bileşik 2'nin, PC-3 hücreleri üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde ise; sadece 25, 50 ve 100 μM dozlarında, hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi (**p<0.001) (Şekil 3B).



Şekil 3. Bileşik 1 ve Bileşik 2 ile 48 saat boyunca muamele edilen LNCaP (A) ve PC-3 (B) hücrelerinin SRB canlılık analizine göre yüzde canlılık grafikleri. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını göstermektedir. *Dozlar kontrole göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

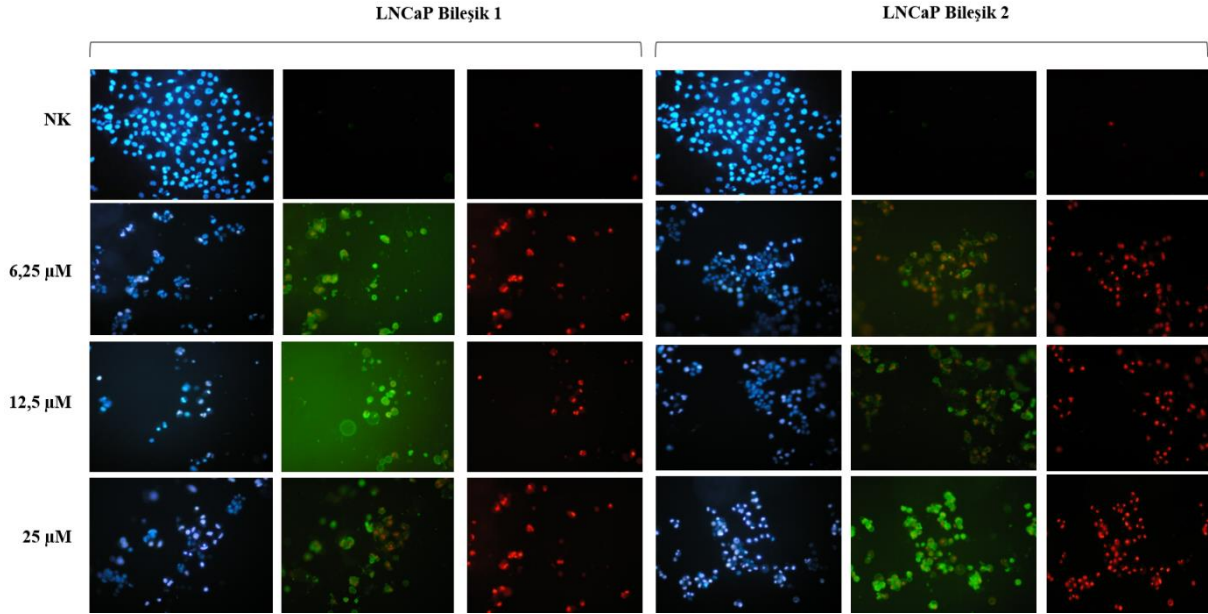
IC_{50} değerleri, 48 saatlik Bileşik 1 ve Bileşik 2 tedavisinden sonra LNCaP ve PC-3 hücrelerinde SRB analizi sonuçlarına göre hesaplandı (Çizelge 2). Yapılan canlılık analizinde, LNCaP ve PC-3 hücrelerinde Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin 25-100 μM dozlarının güçlü büyüme karşıtı etkiler sergilediği gözlemlendi. Belirtilen dozlardan itibaren prostat kanseri hücre hatlarında oluşturduğu anti-proliferatif etki, bu iki ajanın, prostat kanseri tedavisi ve izleminde etkili olabileceğini göstermektedir.

Çizelge 2. Bileşik 1 ve Bileşik 2 uygulanan prostat kanseri hücrelerinin 48 saat tedavi süresindeki IC_{50} değerleri

Bileşik	Hücre	IC_{50} (μM)
Bileşik 1	LNCaP	14.88 μM
	PC-3	19.49 μM
Bileşik 2	LNCaP	15.09 μM
	PC-3	22.50 μM

Bugüne kadar literatürde doğal veya sentetik farklı kalkon türevlerinin kanseri önleyici etkinlikleri araştırılmıştır. Sharma ve arkadaşları 2013 yılında gerçekleştirdikleri çalışmalarında, β -iyonon türevli kalkon bileşiklerinin insan prostat (PC-3), meme (MCF-7), serviks (HeLa), karaciğer ve nöroblastom (IMR-32) hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitelerini göstermişlerdir (Sharma ve ark., 2013). 2017 yılında grubumuzun yaptığı bir diğer çalışmada, yeni sentezi gerçekleştirilen 7-etoksi-1-benzofuran-2-il kalkon türevlerinin antikanser aktivitesi değerlendirilmiştir. Kalkon türevli bileşiklerin anti-büyüme etkisi meme (MCF-7), küçük hücreli akciğer (A549) ve prostat (PC-3) kanser hücrelerinde SRB hücre canlılığı analizleriyle incelenmiştir. Çalışmada, bileşiklerin PC-3 hücre soyunda en fazla büyüme önleyici etkiye neden olduğu görülmüştür (Coskun ve ark., 2017). Hussaini ve arkadaşlarının (2016), 1, 2, 3-triazole bağlı pirazolin kalkon türevleri üzerine yaptıkları çalışmalarında ise pirazolin ve kalkon türevlerinin insan karaciğer (HepG2) ve prostat (DU145) kanseri hücrelerinde yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Hussaini ve ark., 2016).

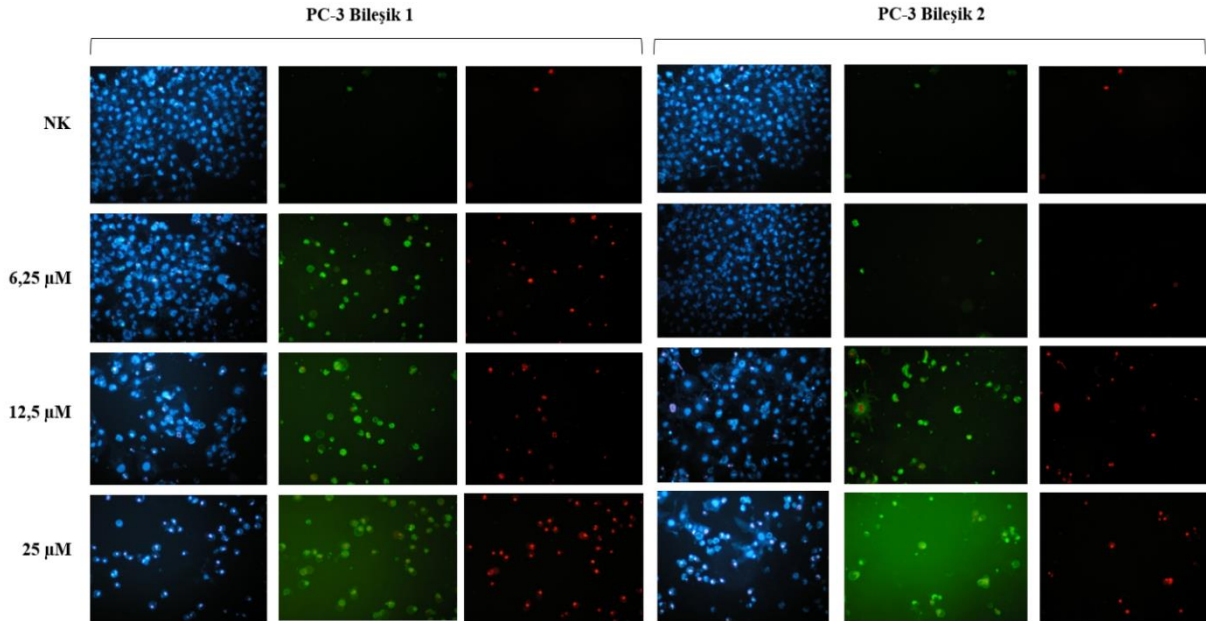
Hücre ölüm modunu araştırmak için LNCaP ve PC-3 hücrelerine Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin 6.25, 12.5 ve 25 μM dozları uygulandı. 48 saatlik Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin uygulanmasını takiben üçlü boyama yöntemi (Hoechst 33342+Annexin-V+PI) ile floresan mikroskopu altında değerlendirmeler yapıldı. Bileşik 1 ve Bileşik 2 ile 48 saat süren tedavi sonrasında LNCaP hücrelerinde, hücre yoğunluğunun canlılık sonuçlarıyla paralel olarak kontrole göre azaldığı gözlemlendi. Hoechst boyaması sonucu apoptozise özgü olan piknozis morfolojisine sahip hücrelerin sayısının kontrole kıyasla arttığı saptandı. Bileşiklerin, belirtilen konsantrasyonlarda 48 saat süreyle uygulanmasını takiben hücrelerde Annexin-V pozitif/ PI pozitif sinyallerin arttığı belirlendi. Bu durum hücrelerde geç apoptozis/sekonder nekrozis oluştuğunu ifade etmektedir (Şekil 4).



Şekil 4. Bileşik 1; [(4)-((1E)-3-(1-benzofuran-2-il)-3-oksoprop-1-en-1-il)-2-metoksifenil kloroasetat], Bileşik 2 [(3-((1E)-3-(1-benzofuran-2-il)-3-oksoprop-1-en-1-il)]fenil kloroasetat) tedavisinin (6.25, 12.5 ve 25 μM) 48 saat uygulanması sonucu LNCaP hücrelerinde floresan mikroskop görüntüleri

PC-3 hücrelerinde 48 saatlik Bileşik 1 tedavisi sonrası 6.25 μM dozundan başlanarak Annexin V-pozitif/PI-pozitif hücrelerin sayısında bir artış olduğu tespit edildi. Buna ek olarak hücre yoğunluğunun kontrole göre azaldığı ve hücrelerde apoptozise özgü piknotik çekirdek morfolojisi gözlemlendi. Bu durum hücrelerde geç apoptozis/sekonder nekrozis geliştiğini ifade etmektedir. Bileşik 2'nin PC-3 hücrelerinde 48 saat uygulanması sonucunda ise 6.25 μM dozunda özellikle Annexin-V pozitif hücrelerin varlığı görüldü. Bileşik 2'nin 6.25 μM dozunda uygulanması hücrelerin henüz apoptozisin erken aşamasında olduğunu gösterdi. Bileşik 2'nin 12.5 μM dozunda ise Annexin-V pozitif/PI pozitif alanlarda artış belirlendi. Bu durum Bileşik 2'nin 12.5 μM dozundan itibaren hücrelerde geç apoptozis/sekonder nekrozis geliştiğini göstermektedir (Şekil 5).

Bu durum kalkon bileşiklerinin hücrelerde membran hasarına bağlı olarak hücre ölümünü indüklediğini göstermektedir. Abou-Zied ve arkadaşları (2019), insan pankreas kanseri hücrelerinde (PANC-1), 20 farklı ksantin/kalkon türevli bileşikleri sitotoksik etkileriyle değerlendirmişlerdir. Bu bileşikler içinden 1,3-dimetil Ksantin, 0.3 μM IC_{50} dozuyla en güçlü bileşik olarak görülmüştür. Bu bileşiğin hücre döngüsü üzerindeki etkisi, apoptotik ve sitotoksik çalışmalar ile incelenmiş ve 1,3-dimetil ksantin'in apoptozisi indüklediği ortaya konmuştur (Abou-Zied ve ark., 2019).

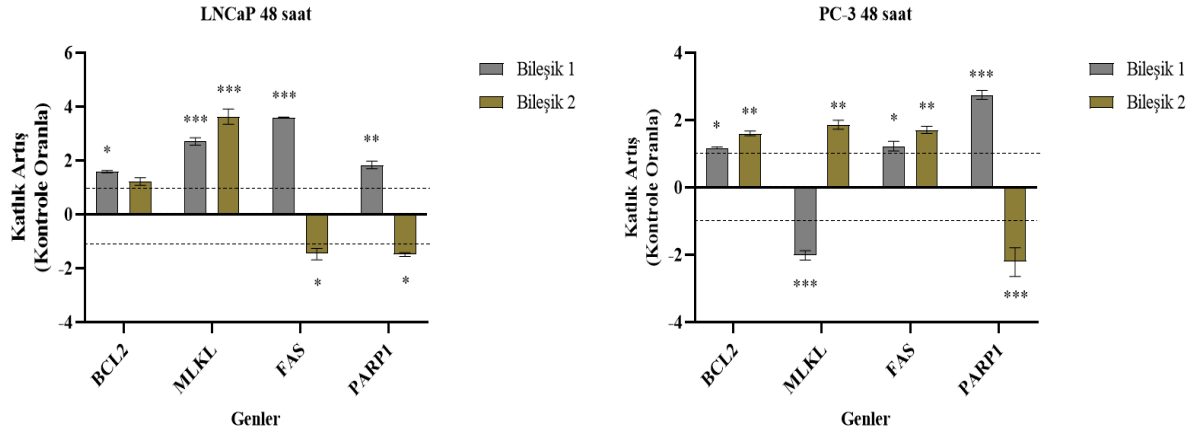


Şekil 5. Bileşik 1; [(4)-((1E)-3-(1-benzofuran-2-il)-3-oksoprop-1-en-1-il)-2-metoksifenil kloroasetat], Bileşik 2 ([3-((1E)-3-(1-benzofuran-2-il)-3-oksoprop-1-en-1-il)]fenil kloroasetat) tedavisinin (6.25, 12.5 ve 25 µM) 48 saat uygulanması sonucu PC-3 hücrelerinde floresan mikroskop görüntüleri

Başka bir çalışmada, aromatik bir keton olan kalkonun, insan hepatik (HEPG2) ve akciğer kanseri (H460) hücrelerinde apoptozisi indüklediği ve kanser hücresi göçünü inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Dong ve ark., 2018).

Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin LNCaP ve PC-3 hücrelerinde 48 saatlik tedavisi sonrası bazı hücre ölüm genlerinin (BCL-2, MLKL, FAS, PARP) ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar, RT- qPCR analizi ile değerlendirildi. Elde edilen gen ekspresyon analizi sonuçlarına göre, LNCaP hücrelerinde Bileşik 1'in uygulamasını takiben (12.5 µM; 48 saat) BCL-2, MLKL, FAS ve PARP gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). 4 gen (BCL-2, MLKL, FAS, PARP1) 48 saatlik Bileşik 1 tedavisi sonrasında 1.5 ila 3.6 kata kadar yukarı regüle edildi. LNCaP hücrelerinde Bileşik 2'nin uygulanması (12.5 µM; 48 saat) sonrası ise sadece MLKL gen ekspresyonunun istatistiksel olarak arttığı (***p<0.001); FAS ve PARP genlerinin ekspresyonlarının azaldığı tespit edildi (*p<0.05). MLKL geni, 48 saatlik Bileşik 2 tedavisi sonrasında 3.4 kat yukarı regüle edildi. Ayrıca FAS ve PARP1 genleri, 1.4 ila 1.6 kat arasında aşağı regülasyon gösterdi. Devamında, PC-3 hücrelerinde Bileşik 1'in uygulamasını takiben (12.5 µM; 48 saat) BCL-2, FAS ve PARP genlerinin ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu (*p<0.05, ***p<0.001), MLKL gen ekspresyonunun ise azaldığı saptandı (***p<0.001). BCL-2, FAS ve PARP1 genlerinde, 48 saatlik Bileşik 1 tedavisi sonrası 1.1 ila 2.8 aralığında katlık artış belirlendi. Ayrıca MLKL geni, 1.9 katlık azalış gösterdi. PC-3 hücrelerinde Bileşik 2'nin uygulanması sonucu ise (12.5 µM; 48 saat) Bileşik 1'den farklı olarak BCL-2, MLKL ve FAS genlerinin ekspresyon düzeylerinin arttığı (**p<0.01); PARP geninin ekspresyon düzeyinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın meydana geldiği belirlendi (***p<0.001) (Şekil 6). BCL-2, FAS ve MLKL genlerinde, 48 saatlik Bileşik 1 tedavisi sonrasında 1.5 ila 1.9 aralığında katlık artış gözlemlendi. Ayrıca PARP1 geni de 2.5 kat aşağı regülasyon gösterdi.

Nekroptozis sırasında aktifleşen RIPK3, MLKL'yi fosforile ederek MLKL'nin oligomerleşmesini yönlendirir. Bu sayede MLKL'nin plazma zarlarına ve organellerine nüfuz etmesini sağlar (Kim ve Li, 2013). Mevcut çalışmada RT-qPCR sonuçlarına göre, artan MLKL gen düzeyleri, hem Bileşik 1 hem de Bileşik 2 tedavisinin LNCaP hücrelerinde nekroptozis hücre ölümünü uyardığını göstermektedir.



Şekil 6. LNCaP ve PC-3 hücrelerinde Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin 48 saatlik tedavisi sonrası gen ekspresyon bulguları. Sonuçlar $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile hesaplandı. Grafikselleştirme katkılı artış olarak gösterildi ve 2/-2 arasındaki değerler dışında kalan sonuçlar anlamlı kabul edilerek yorumlandı. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) ifade etmektedir.

Bileşik 1'in, Bileşik 2'den farklı olarak, FAS geninde meydana getirdiği ekspresyon seviyesindeki artışın, ölümün apoptozisin dışsal yolağından ilerlemiş olabileceğini göstermektedir. PC-3 hücrelerinde ise Bileşik 1'de MLKL gen ekspresyonunun azalması ve PARP ekspresyon düzeyinde artış meydana gelmesi apoptozisin uyarıldığı sonucunu göstermektedir.

Bileşik 2 ile tedavide, anti apoptotik bir gen olan BCL-2'nin ekspresyonundaki artış ve PARP ekspresyon seviyesindeki azalış, apoptozisin baskılandığını ve hücrelerin farklı bir ölüm yolunu tercih ettiğini belirtmektedir. Bu ölüm yolu, MLKL'nin ekspresyon düzeyinde meydana gelen artma sonucu nekroptozis olabilme ihtimalini düşündürmektedir. Mevcut bulguları destekler nitelikte olan bir başka çalışmada, yeni bir kalkon türevi olan kalkon-24 (Chal-24) kullanılarak, otofaji aracılı nekroptozis (RIP1- ve RIP3'e bağlı nekroz) yoluyla yeni bir antikanser mekanizması tanımlanmıştır (He ve ark., 2014). Escobar ve arkadaşları 2019 yılında, 4,2',4'-trihidroksikalkon bileşiğinin insan nöroblastoma hücresi SH-SY5Y'de antiproliferatif ve sitotoksik etkilerini araştırmıştır. Elde edilen verilerde 4,2',4'-trihidroksikalkon bileşiğinin nekroptozis yoluyla nöroblastoma hücrelerinde nekrotik hücre ölümünü arttırdığı görülmüştür (Escobar ve ark., 2019).

SONUÇ

Sonuç olarak mevcut çalışmada, sentezi ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiş olan kalkon türevli bileşiklerin prostat kanseri hücrelerinde sitotoksik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Prostat kanseri hücrelerinde meydana gelen sitotoksik aktivitenin indüklediği hücre ölüm modu hem floresan boyama hem de RT-qPCR metodu ile tespit edilmiştir. Hücrelerin büyük çoğunluğunun Annexin-V pozitif/PI pozitif boyanmış olması ölüm modunun sekonder nekrozis/geç apoptoz olduğunu göstermektedir. Gen analizi sonuçlarında artan MLKL ekspresyonu da floresan boyama sonuçlarını destekler niteliktedir. Bu durum hücrelerde kalkon bileşiklerinin membran hasarına bağlı olarak hücre ölümünü indüklediğini işaret etmektedir. Sonuç olarak, *in-vitro* yapılan bu çalışmanın umut vaat edici neticelerden ötürü daha ileri analizlerle moleküler etkilerinin değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Böylece ileriki çalışmalarda anlamlı bulguların elde edilmesi ile prostat kanseri, rutin tedavi edilebilir, iyileşme oranı yüksek, ölüm oranı düşük bir hastalık haline gelebilir.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Abou-Zied, H. A., Youssif, B. G., Mohamed, M. F., Hayallah, A. M., & Abdel-Aziz, M. (2019). EGFR inhibitors and apoptotic inducers: Design, synthesis, anticancer activity and docking studies of novel xanthine derivatives carrying chalcone moiety as hybrid molecules. *Bioorganic chemistry*, 89, 102997.
- Alioglu, I., Cinar-Asa, S., Ari, F., Coskun, D. (2023). Benzofuran substituted chalcone derivatives trigger apoptotic cell death through extrinsic pathway in human lung and breast cancer cells. *Iranian Journal of Science and Technology Transactions A: Science*,
- Arif, R., Rana, M., Yasmeen, S., Khan, M. S., Abid, M., & Khan, M. S. (2020). Facile synthesis of chalcone derivatives as antibacterial agents: Synthesis, DNA binding, molecular docking, DFT and antioxidant studies. *Journal of Molecular Structure*, 1208, 127905.
- Bach, C., Pisipati, S., Daneshwar, D., Wright, M., Rowe, E., Gillatt, D., & Koupparis, A. (2014). The status of surgery in the management of high-risk prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 11(6), 342-351.
- Beytur, A., Tekin, Ç., Çalışkan, E., Tekin, S., Koran, K., Görgülü, A. O., & Sandal, S. (2022). Hexa-substituted cyclotriphosphazene derivatives containing hetero-ring chalcones: Synthesis, in vitro cytotoxic activity and their DNA damage determination. *Bioorganic Chemistry*, 127, 105997.
- Chen, J., Zhang, D., Yan, W., Yang, D., & Shen, B. (2013). Translational bioinformatics for diagnostic and prognostic prediction of prostate cancer in the next-generation sequencing era. *BioMed research international*, 2013.
- Coşkun, D., & Ahmedzade, M. (2014). Synthesis of some acylated 2-pyrazoline and chalcone derivatives. *Research on Chemical Intermediates*, 40, 1193-1199.
- Coşkun, D., Tekin, S., Sandal, S., & Coşkun, M. F. (2016). Synthesis, characterization, and anticancer activity of new benzofuran substituted chalcones. *Journal of Chemistry*, 2016.
- Coskun, D., Erkisa, M., Ulukaya, E., Coskun, M. F., & Ari, F. (2017). Novel 1-(7-ethoxy-1-benzofuran-2-yl) substituted chalcone derivatives: synthesis, characterization and anticancer activity. *European journal of medicinal chemistry*, 136, 212-222.
- Dong, N., Liu, X., Zhao, T., Wang, L., Li, H., Zhang, S., & Yang, B. (2018). Apoptosis-inducing effects and growth inhibitory of a novel chalcone, in human hepatic cancer cells and lung cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105, 195-203.
- Ducki, S. (2007). The development of chalcones as promising anticancer agents. *IDrugs*, 10(1), 42.
- Erturk, E., Tuna, G., Coskun, D., & Ari, F. (2023). Investigation of Anti-Cancer Activity of Newly Synthesized 2, 4-pentadien-1-one Derivative Containing Benzofuran in Human Lung and Colon Cancer Cells.
- Escobar, S. J. D. M., Fong, G. M., Winnischofer, S. M., Simone, M., Munoz, L., Dennis, J. M., ... & Witting, P. K. (2019). Anti-proliferative and cytotoxic activities of the flavonoid isoliquiritigenin in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Chemico-Biological Interactions*, 299, 77-87.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31-46.

- He, W., Wang, Q., Srinivasan, B., Xu, J., Padilla, M. T., Li, Z., & Lin, Y. (2014). A JNK-mediated autophagy pathway that triggers c-IAP degradation and necroptosis for anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 33(23), 3004-3013.
- Hussaini, S. M. A., Yedla, P., Babu, K. S., Shaik, T. B., Chityal, G. K., & Kamal, A. (2016). Synthesis and biological evaluation of 1, 2, 3-triazole tethered pyrazoline and chalcone derivatives. *Chemical biology & drug design*, 88(1), 97-109.
- Hussain, S., Singh, A., Nazir, S. U., Tulsyan, S., Khan, A., Kumar, R., ... & Mehrotra, R. (2019). Cancer drug resistance: a fleet to conquer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(9), 14213-14225.
- Kim, S. J., & Li, J. (2013). Caspase blockade induces RIP3-mediated programmed necrosis in Toll-like receptor-activated microglia. *Cell death & disease*, 4(7), e716-e716.
- Özen, F., Günel, A., & Baran, A. (2018). DNA-binding, enzyme inhibition, and photochemical properties of chalcone-containing metallophthalocyanine compounds. *Bioorganic chemistry*, 81, 71-78.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, e47.
- Sezgin, C. (2010). Kanserde bitkilerle tedavide örnek uygulamalar. *Bitkilerle Tedavi*, 73.
- Sharma, V., Chaudhary, A., Arora, S., Saxena, A. K., & Ishar, M. P. S. (2013). β -Ionone derived chalcones as potent antiproliferative agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 69, 310-315.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: a cancer journal for clinicians*, 73(1), 17-48.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
- Termini, D., Den Hartogh, D. J., Jaglanian, A., & Tsiani, E. (2020). Curcumin against prostate cancer: current evidence. *Biomolecules*, 10(11), 1536.
- Ulukaya, E., Acilan, C., & Yilmaz, Y. (2011). Apoptosis: why and how does it occur in biology?. *Cell biochemistry and function*, 29(6), 468-480.
- Zhuang, C., Zhang, W., Sheng, C., Zhang, W., Xing, C., & Miao, Z. (2017). Chalcone: a privileged structure in medicinal chemistry. *Chemical reviews*, 117(12), 7762-7810.
- Wan, M., Xu, L., Hua, L., Li, A., Li, S., Lu, W., ... & Jiao, P. (2014). Synthesis and evaluation of novel isoxazolyl chalcones as potential anticancer agents. *Bioorganic chemistry*, 54, 38-43.