



Özgün Araştırma / Original Article

Valproik asidin ferroptozregülasyonu yoluyla C6 glioblastoma hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri

Ceyhan Hacıoğlu¹, Bahtiyar Çorbacı², Merve Canayakın², Özge Güler², Zeynep Yağmur Hazar²,
Ece Yakupoğlu², Gizem Ceylan², Esra Kütük²

1 Düzce Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Düzce Türkiye

2 Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye

Geliş: 09.05.2022; Revizyon: 27.09.2022; Kabul Tarihi: 03.10.2022

Öz

Amaç: Glioblastoma (GBM) invaziv karakteriyle ortalama sağ kalım süresinin 1 yıl olduğu en ölümcül beyin tümörleri arasında yer alır. Cerrahi operasyon, radyoterapi ve kemoterapiyi içeren standart tedavi sonrasında bile nüksler çoğunlukla yeniden görülmektedir. Ferroptoz, demir bağımlı olarak farklı hücrel molekülleri hedef alan yeni tanımlanmış bir hücre ölümü şeklidir. Valproik asit (VPA), epilepsi tedavisinde kullanılan histondeasetilaz inhibitörü olan bir yağ asididir. VPA, nöroprotektif ve anti-tümör etkileri sayesinde *in vitro* ve *in vivo* modellerde tümör invazyonunu etkili bir şekilde baskılamaktadır. Bu çalışmada, C6 hücrelerinde VPA'nın ferroptoz uyarıcı bir ajan olarak antiproliferatif etkilerini araştırmayı amaçladık.

Yöntemler: İlk olarak, sitotoksik VPA konsantrasyonunu 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi belirledik. Ardında, 24 saatlik VPA uygulamasıyla C6 hücrelerindeki glutatyonperoksidaz 4 (GPx4), 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) seviyelerini ELİSA yöntemiyle uygun kitler kullanılarak ölçtük.

Bulgular: C6 hücreleri 0.1, 0.5, 1, 2, 4 ve 8 mM VPA konsantrasyonları ile 24 süreyle inkübe edildi. 1 mM ve üzerindeki VPA konsantrasyonlarında hücrel canlılıkta istatistiksel olarak anlamlı düşüş olmuştur ($p<0.05$). MTT analizi doğrultusunda IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ değerleri sırasıyla 2.8 mM, %5,6 mM ve 7.4 mM olarak belirlenmiştir. VPA uygulanan C6 hücrelerinde GPx4 ve GSH seviyelerinde konsantrasyonuna bağımlı şekilde artış olmuştur. Ek olarak GPx4 ve GSH seviyelerindeki en fazla düşüş sırasıyla %64,4 ve %33,5 ile 7.4 mM VPA konsantrasyonunda tespit edilmiştir ($p<0.0001$). Öte yandan, VPA uygulamasıyla C6 hücrelerinde düşen antioksidan kapasite ile birlikte lipid peroksidasyon biyobelirtici olan MDA seviyeleri artmıştır. Benzer şekilde, VPA uygulaması hücrel bütünlüğü bozarak, konsantrasyona bağlı olarak 8-OHdG seviyelerinde arttı.

Sonuç: Sonuçlarımız, sıçan C6 glioblastoma hücrelerinde, VPA uygulamasının ferroptoz sinyal yolağı ile bağlantılı bir şekilde hücrel canlılığı baskıladığını desteklemektedir. Bununla birlikte, VPA'nın daha geniş bir zaman aralığında diğer *in vitro* ve *in vivo* glioma modellerinde etkileri henüz araştırılmamıştır. Bu nedenle, klinik uygulamalarda sağ kalımı nasıl etkileyeceği konusundaki belirsizlik devam etmektedir.

Anahtar kelimeler: Glioblastoma, ferroptoz, valproik asit

DOI: 10.5798/dicletip.1220937

Yazışma Adresi / Correspondence: Ceyhan Hacıoğlu, Düzce Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Düzce Türkiye, e-posta: ceyhanhacioglu@duzce.edu.tr

The effects of valproic acid on C6 glioblastoma cells viability via ferroptosis regulation

Abstract

Objective: Glioblastoma (GBM) is among the deadliest brain tumors with an invasive character and an average survival time of one year. Even after standard treatment including surgery, radiotherapy and chemotherapy, recurrences are mostly re-appeared. Ferroptosis is a newly defined form of cell death that targets different cellular molecules in an iron-dependent manner. Valproic acid (VPA) is a fatty acid that is a histone deacetylase inhibitor used in the treatment of epilepsy. Thanks to its neuroprotective and anti-tumor effects, VPA effectively suppresses tumor invasion *in vitro* and *in vivo* models. In this study, we aimed to investigate the antiproliferative effects of VPA as a ferroptosis stimulating agent in C6 cells.

Method: Firstly, we determined the cytotoxic VPA concentration by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) analysis. Then, we measured glutathione peroxidase 4 (GPx4), 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels in C6 cells with 24-hour VPA treatment using appropriate kits by ELISA method.

Results: C6 cells were incubated with VPA concentrations of 0.1, 0.5, 1, 2, 4 and 8 mM for 24 hours. There was a statistically significant decrease in cellular viability at 1 mM VPA concentrations and above ($p < 0.05$). According to MTT analysis, IC₂₅, IC₅₀ and IC₇₅ values were determined as 2.8 mM, 5.6 mM and 7.4 mM, respectively. There was a concentration-dependent increase in GPx4 and GSH levels in C6 cells treated with VPA. In addition, the highest decreases in GPx4 and GSH levels were detected with 64.4% and 33.5% at the 7.4 mM VPA concentration, respectively ($p < 0.0001$). On the other hand, MDA levels, a lipid peroxidation biomarker, increased with increased antioxidant capacity in C6 cells with VPA treatment. Similarly, VPA treatment by disrupting cellular integrity increased concentration-dependently in 8-OHdG levels.

Conclusion: Our results support that VPA treatment suppresses cellular viability in a manner associated with the ferroptosis signaling pathway in rat C6 glioblastoma cells. However, the effects of VPA over a wider time range in other *in vitro* and *in vivo* glioma models have yet to be investigated. Therefore, uncertainty about how it will affect survival in clinical practice remains.

Keywords: Glioblastoma, ferroptosis, valproic acid.

GİRİŞ

Glioblastoma (GBM), erişkinlerde merkezi sinir sisteminin en sık görülen, infiltratif büyüme özelliklerine sahip en malign primer evre IV beyin tümörüdür¹. Başlıca özelliği, tam bir cerrahi rezeksiyonu imkansız kılan yüksek malignite ve invazyon yeteneğidir. GBM hastalarının sağ kalımı genellikle tanıdan itibaren 15 aydan azdır ve 5 yıllık adjuvan radyoterapi ve kemoterapi ile kombine cerrahiden sonra bile hayatta kalma oranı %10'un altındadır². Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidaki son gelişmelere rağmen, glioblastoma için etkili bir tedavi yoktur ve klinik sonucu iyileştirmek için GBM ilerlemesinin moleküler mekanizmasının ileri düzeyde anlaşılması esastır.

Ferroptoz apoptotik olmayan hücre ölümünün bir formu olarak, hücre ölümünün yeni tanımlanmış bir şeklidir³. Apoptoz, nekroptoz ve piroptoz ile karşılaştırıldığında, ferroptoz demir bağımlı bir şekilde lipid

peroksidasyonunu içeren bir dizi karmaşık hücre içi değişiklikler tarafından tetiklenir⁴. Sitoplazmik serbest ferröz demir (Fe²⁺) metabolik olarak aktiftir ve DNA sentezi, hücre döngüsü ilerlemesi ve anjiyogenezdahil olmak üzere bir dizi enzimatik süreçte yer alabilir ve Fenton reaksiyonuna katılabilir⁵. Fenton reaksiyonu sırasında Fe²⁺ hidrojen peroksit bağlanır, bu da hidroksit ve reaktif bir oksijen türü (ROS) olan bir hidroksil radikalinin oluşmasına neden olur⁶. ROS üretimi, lipid peroksidasyonuna ve membran geçirgenliğinin kaybına yol açar. Membranlardaki doymamış çoklu yağ asitleri lipid peroksidasyonu için ana substrat olduklarından ferroptoz için hayati öneme sahiptir. Açıl-KoA sentetaz uzun zincirli aile üyesi 4 (ACSL4), ferroptozu yol açan fosfolipitlerin oksidasyon reaksiyonlarına arttırdığından, ferroptoz için spesifik bir biyobelirteçtir⁷. Ferroptozun diğer önemli biyobelirteç olan glutatyon peroksidaz 4 (GPx4), lipid peroksitlerini substrat olarak iki

glutasyon (GSH) molekülü yardımıyla lipid alkollerine dönüştürür⁸. Önceki çalışmalar, glioblastoma hücre hatlarında artan ferroptoz aktivitesinin artması tümör büyümesinin ve saldırganlığın azalmasına neden olduğunu göstermeleri nedeniyle^{9,10}, ferroptoz mevcut tedavilere yardımcı olacak potansiyel bir terapötik strateji oluşturabilir.

Valproik asit (VPA), GBM dahil olmak üzere beyin cerrahisi sonrası nöbet profilaksisinde yaygın olarak kullanılmıştır. VPA'nın ayrıca, bozulmuş epigenetik modifikasyona neden olan ve hücre büyümesini baskılayan histondeasetilaz (HDAC) aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir¹¹. Dahası VPA'nın, DNA onarımını baskılamayı ve pro-apoptotiksinyallemeyi aktive etmesiyle GBM hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapiye duyarlı hale geldiği ortaya konmuştur¹². Son yıllarda, VPA'nın nöroprotektif mekanizması ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Travmatik bir beyin hasarı modelinde VPA'nın, Nrf2/ARE sinyal yolunu aktive ederek antioksidatif kapasitesi arttırdığı ve sonuçta nöroproteksiyonu sağladığı gösterilmiştir¹³. Öte yandan, lipid peroksidasyonu aracılı oksidatif hasarın nöronal hasarda önemli bir hasar türü olabileceği tahmin edilebilir. Ayrıca VPA'nın lipid peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu engelleyerek nöron hücrelerini oksidatif hasara karşı koruyabildiği bildirilmiştir¹⁴. Bu da, VPA'nın lipid peroksidasyonu tarafından düzenlenen ferroptozu inhibe ederek nöroprotektif bir etki üretebileceğini düşündürmektedir.

VPA, epileptik hastaların tedavisinde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, etkilerin altında yatan hücresel mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemektedir. Daha da önemlisi, gliomadaki kötü prognozu ve kemoterapi veya radyoterapi direncini önleme de etkili henüz etkin bir tedavi bulunmamaktadır. Bununla birlikte, ferroptoz ile bu prognostik/tanısal faktörler arasındaki

ilişki daha önce araştırılmamıştır ve ferroptozis ile glioma arasındaki moleküler ilişki üzerine az sayıda çalışma yapılmıştır. Ek olarak, glioma hücrelerinde ferroptoz ile ilişkili sinyal yolları üzerinde etkili terapötik ajanlarla ilgili çok az araştırma yapılmıştır. Yukarıda bahsi geçen VPA'nın özellikleri göz önüne alındığında, bu çalışmada, C6 glioblastoma hücrelerinde VPA'nın ferroptoz sinyal yolağı bağlantılı olan GPx4, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), GSH ve malondialdehit (MDA) gibi biyobeliteler üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladık. Ayrıca, glioma hücrelerindeki ferroptozun yeniden programlanmasının altında yatan potansiyel mekanizmaları tetiklemede VPA'nın rolünü ortaya çıkaran ve glioma tedavisinde ferroptozisin rolünü gösteren verileri ortaya koyduk.

YÖNTEMLER

Hücre kültürü ve VPA inkübasyonu

Sıçan C6 glioblastoma hücre hattı, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATCC, Rockville, MD, ABD) satın alındı ve %1 fetal sığır serumu (FBS) ve penisilin/streptomisin (100 IU/mL/100 IU/mL) ile takviye edilmiş Dulbecco'nun modifiye Eagle besiyerinde (DMEM), 37°C'de %95 hava ve %5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde proliferasyonu sağlandı.

Hücreler (2 x 10³), bir gece boyunca 96 kuyucuklu plakalara ekildi. Üstel büyüme fazındaki hücreler %60-80 yoğunluğa ulaştığında 0.1, 0.5, 1, 2, 4 ve 8 mM VPA (Sigma-Aldrich) konsantrasyonlarında 24 saat süreyle inkübe edildi. Inkübasyonu takiben, her bir kuyucuğa 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) solüsyonu eklendi 4 saat 37°C'de inkübasyona devam edildi. Ardında hücre kültürü ortamına, dimetilsülfoksit (DMSO) ilave edildi ve oda sıcaklığında 30 dakika karıştırıldı. Hücre canlılığı, 570 nm'de absorbans ölçülerek belirlendi.

Biyokimyasal Analizler

Hücreler (5 x 103) öncelikle 96 kuyucuklu plakalarda 24 saat süreyle MTT sonuçlarına göre belirlenen IC25, IC50 ve IC75 konsantrasyonları ile inkübe edildi. Ardından, kültür kabına yapışık hücreler tripsin ile ayrıldı ve daha sonra süspansiyon halindeki hücreler santrifüj ile toplandılar. Hücreler pH 7'de fosfat tamponu (PBS) ile üç kez yıkandı. PBS içinde hücreler yeniden süspanse edilerek üç kez dondurma/çözülme döngüsünün tekrarlanmasıyla hücrelerin parçalanması sağlandı. Parçalanmış hücreler 4°C'de 15 dakika 1000×g'de santrifüj edilerek hücre kalıntılarından arındırıldı ve elde edilen süpernatant biyokimyasal analizler sırasında kullanıldı.

GPx4 (MBS934198), 8-OHdG (CSB-E10526r), GSH (MBS265966) ve MDA (MBS268427) seviyelerinin biyokimyasal analizinde enzim bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) yöntemiyle ticari olarak mevcut kitler kullanılarak gerçekleştirildi. Kısaca, analizler, nicel sandviç enzim immünolojik tekniğini kullanılarak gerçekleştirildi. Analizler sırasında GPX4, 8-OHdG, GSH ve MDA'ya özgü antikorlarla kaplanmış mikropalakalar kullanıldı. Standartlar ve numuneler pipetlenerek, kuyucuklara aktarıldı ve antikorlara bağlanması sağlandı. Ardından bağlanmamış moleküllerin uzaklaştırmak için mikropalakalar 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Bu işlemi takiben kuyucuklara sırasıyla biotin-konjuge antikorlar ve avidin-konjuge yabanturpu peroksidazı eklendi. Kuyucuklara substrat solüsyonunun eklenmesiyle ilk aşamada bağlanan GPX4, 8-OHdG, GSH ve MDA miktarlarıyla orantılı olarak renk gelişir. Ardından renk oluşumu stop solüsyonu ile durduruldu ve rengin yoğunluğu üreticinin talimatlarına göre prosedürler takip edilerek ilgili dalga boylarında mikropalaka okuyucu yardımıyla absorban ölçümleri gerçekleştirildi.

Süpernatantlardaki protein içeriği Lowry ve ark.¹⁵ yöntemine göre belirlendi.

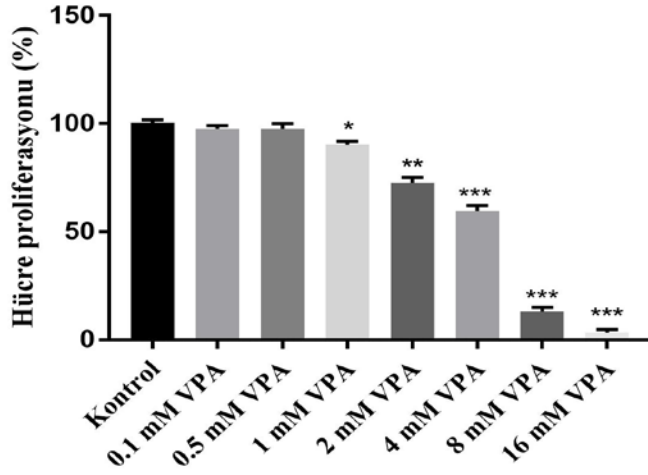
İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için GraphPadPrism 7 programı kullanıldı. Tüm değerler (üçlü tekrarlar olarak) ortalama ± standart sapma olarak ifade edilir. Ortalama değerlerin normallik analizi Shapiro-Wilk normallik testi ile gerçekleştirildi. Deney grupları arasındaki farklılıkları belirlemek için Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) kullanıldı, ardından Tukey Post hoc analizi yapıldı. P<0.05, istatistiksel olarak anlamlı bir farkı belirtmek için kabul edildi.

BULGULAR

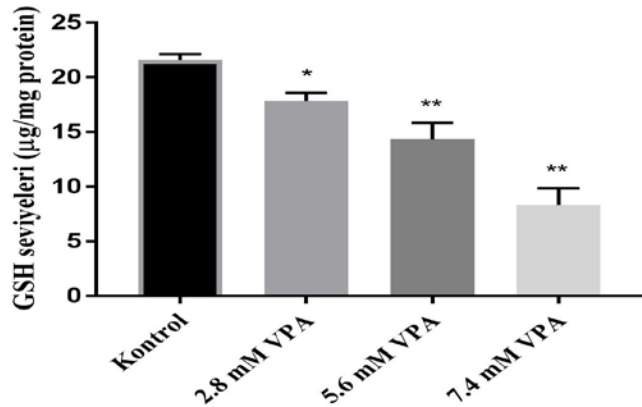
İlk olarak, VPA'nın C6 hücrelerinin canlılığını engelleyip engellemediğini araştırdık. C6 hücre canlılıklarının farklı VPA konsantrasyonlarına göre değişimi Şekil 1'de gösterilmektedir. C6 hücre hattı 24 saat süreyle 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 8 ve 16 mM VPA ile inkübe edildi. MTT analizi kullanılarak, hücre canlılığı, VPA inkübasyonunu takiben C6 hücrelerinde 1 mM ve üzerindeki VPA konsantrasyonları önemli ölçüde azaldı. 24 saatlik VPA uygulamasının MTT sonuçlarına göre 0.1 ve 0.5 mM konsantrasyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı (p>0.05). Ancak hücre canlılığının %91,4 olduğu 1 mM konsantrasyonunda, kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir fark tespit edildi (p<0.01). 2 mM VPA konsantrasyonunda, hücre canlılığı daha da dramatik bir şekilde %73,8'e düşüş gösterdi (p<0.001). Dahası, 4 ve 8 mM VPA konsantrasyonlarında hücre canlılığı kontrol grubuna göre sırasıyla %59,7 ve %12,1 oranında azalış gösterdi (p<0.0001). Son olarak, 16 mM VPA konsantrasyonunda hemen hemen hiç hücre canlılığı saptanmadı (kontrolle karşılaştırıldığında %3,8; p<0.0001). MTT analizine göre, 24 saatlik VPA uygulaması sonra C6 hücreleri için IC25 konsantrasyonunu 2.8 mM, IC50 konsantrasyonunu 5.6 mM ve IC75

konsantrasyonunu 7.4 mM olduğunu belirledik. Sonraki biyokimya analizlerinde bu konsantrasyonlar kullanılmıştır.



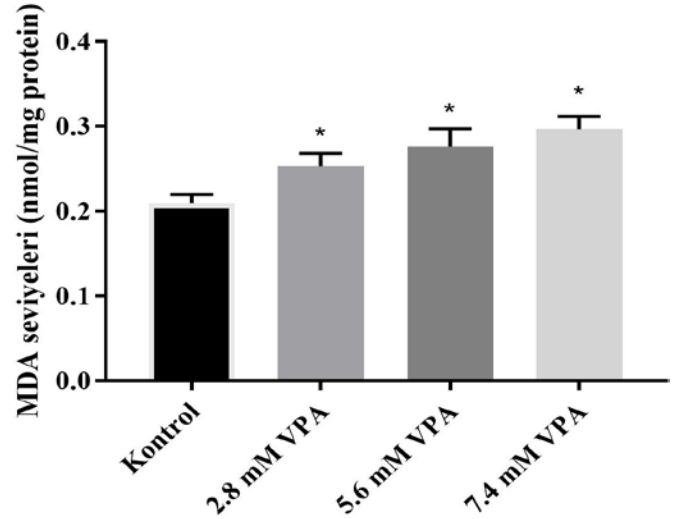
Şekil 1. Valproikasitin C6 glioblastoma hücrelerindeki hücresel canlılık üzerindeki etkileri. * $p<0.01$; ** $p<0.001$; *** $p<0.0001$ kontrol ile karşılaştırıldığında

GPx4 seviyeleri, artan VPA konsantrasyonuna bağımlı bir şekilde düşüş göstermiştir (Şekil 2). Kontrol seviyeleri ile karşılaştırıldığında, GPx4 seviyeleri 2.8, 5.6 ve 7.4 mM VPA konsantrasyonlarında sırasıyla %35,8, %50,2 ve %64,4'lük düşüş göstermiştir. VPA uygulanan tüm deneysel gruplar, kontrol grubundan önemli bir fark gösterdi ($p<0.0001$). GPx4'ün en yüksek ortalama değeri kontrol grubunda 187.3 pg/mg protein ve en düşük ortalama değer 7.4 mM VPA grubunda 71.5 pg/mg protein idi.



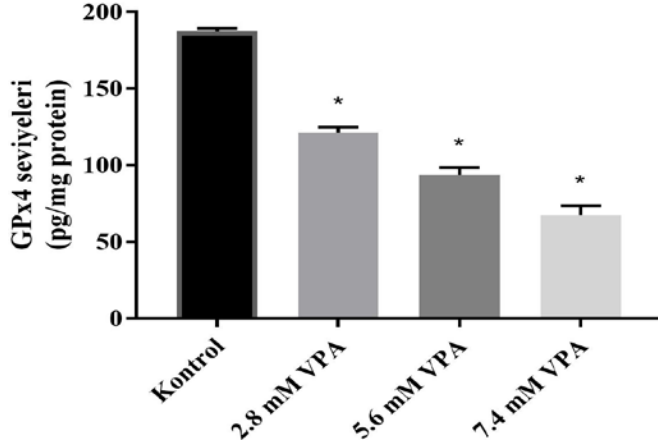
Şekil 2. Valproikasitin uygulamasının C6 glioblastoma hücrelerindeki GPx4 seviyeleri üzerindeki etkisi. * $p<0.0001$ kontrol ile karşılaştırıldığında

IC25, IC50 ve IC75 konsantrasyonlarında VPA ile inkübe edilen C6 hücrelerindeki 8-OHdG seviyeleri Şekil 3'de gösterilmektedir. 24 saat boyunca 2.8, 5.6 ve 7.4 mM VPA konsantrasyonları ile inkübe edilen hücreler, kontrol grubuna kıyasla 8-OHdG seviyelerinde sırasıyla %20,3, %34,1 ve %55,8'lik istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ($p<0.0001$).



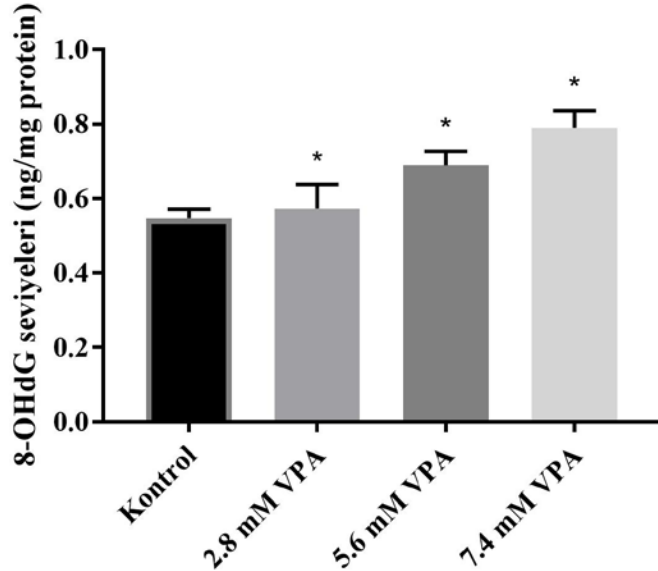
Şekil 3. Valproikasitin uygulamasının C6 glioblastoma hücrelerindeki DNA hasarı üzerindeki etkileri. * $p<0.0001$ kontrol ile karşılaştırıldığında

GSH seviyelerindeki azalma, VPA uygulanan hücrelerde oksidatif yükün artmasıyla yakından ilişkilidir. 24 saat boyunca VPA konsantrasyonları (2.8, 5.6 ve 7.4 mM) ile inkübe edilen C6 hücrelerinde GSH seviyeleri düşüş göstermiştir (Şekil 4). GSH seviyelerindeki maksimum düşüş, 7.4 mM VPA uygulanan hücrelerde gözlemlendi; bu değer, kontrol grubunda tespit edilenden %61,4 daha düşüktü ($p<0.0001$). Ayrıca, 24 saat boyunca sırasıyla 2.8 ve 5.6 mM VPA konsantrasyonları uygulanan C6 glioblastoma hücrelerinde GSH seviyelerinde %16,3 ($p<0.001$) ve %33,5 ($p<0.0001$) düşüşler gözlemlendi.



Şekil 4. Valproikasitin uygulamasının C6 glioblastoma hücrelerindeki antioksidan seviyeleri üzerindeki etkileri. * p<0.001; ** p<0.0001 kontrol ile karşılaştırıldığında

Lipit peroksidasyonunu belirlemek için hazırlanan hücre lizatlarından MDA seviyeleri ölçüldü. Şekil 5'te görüldüğü gibi, artan VPA konsantrasyonlarına bağlı olarak C6 hücrelerinde MDA seviyelerinde artış gözlenmiştir. 2.8, 5.6 ve 7.4 mM VPA konsantrasyonları uygulanan C6 hücrelerindeki MDA seviyeleri, kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %26,2, %37,5 ve %53,5 artış göstermiştir (p<0.0001).



Şekil 5. Valproikasitin uygulamasının C6 glioblastoma hücrelerindeki lipit peroksidasyonu üzerindeki etkileri. * p<0.0001 kontrol ile karşılaştırıldığında

TARTIŞMA

VPA, otuz yılı aşkın süredir bir anti-konvülzan ve duygu-durum düzenleyici olarak kullanılmaktadır, ancak çoklu etkilerinin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışmada C6 hücrelerinde hücre çoğalmasının konsantrasyon bağımlı bir şekilde VPA tarafından baskılandığını gösterdik. GPx4 ve GSH seviyelerine düşüşe eşlik eden 8-OHdG ve MDA seviyelerindeki artış, C6 glioblastoma hücrelerinde hücre bütünlüğü etkilemiştir. VPA, diğer ölüm yollarına ek olarak GPx4 ve lipit peroksidasyonu yoluyla ferroptoz aracılı bir şekilde kanser hücresi ölümüne yol açabilmektedir.

Kanser hücrelerinin önemli fizyolojik işlevlerinden biri olan hücre çoğalması, büyüme, gelişme, üreme ve kalıtımın temelidir. Ayrıca, hücre migrasyonu ve invazyon da başlıca kanser metastazında yer alan malign tümörlerin en önemli özellikleridir¹⁶. Çoğu glioblastoma hücresinde ve glioma kök hücresinde, VPA, hücre canlılığını, tümör heterojenitesine bağlı olarak değişen derecelerde doza (2-10 mM) ve zamana bağlı bir şekilde (24, 48, 72 ve 96 saat) baskılandığı ortaya konmuştur¹⁷. VPA uygulaması, glioma kök hücrelerinde laktat dehidrojenaz salınımındaki bir artışla hücre çoğalmasında %10 ila %40 arasında değişen istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olmuştur¹⁸. Benitez ve ark.¹⁹ C6 hücrelerinde azalan hücre proliferasyonu ve artan hücre ölümü arasındaki özel korelasyonu daha da doğrulamıştır. MTT analizlerine dayanarak, C6 hücreleri için VPA IC50'sinin 24 saat boyunca 5.6 mM olduğunu bulduk. Yukarıda bahsi geçen çalışmalarla da tutarlı bir şekilde, GBM hücre hattındaki VPA uygulaması hücre proliferasyonunda konsantrasyona bağlı bir azalmaya neden olduğunu gösterdik.

Hücre ölümünün yeni bir formu olan ferroptoz, apoptoz, otofaji ve nekrozdan tamamen farklıdır ve benzersiz morfoloji, gen ekspresyonu ve moleküler yollar ile karakterize edilir. Esasen, ferroptoz, biyomembranların peroksidasyon hasarına karşı ana koruyucu mekanizması olan

GPx4'ü etkisiz hale getirerek kanonik bir şekilde veya kararsız demir havuzunu artırarak kanonik olmayan bir şekilde indüklenebilir²⁰. Önceki çalışmalar, GSH, GPx4 aktivite inhibisyonu ve demire bağlı ROS üretimin aşırı artması ferroptozu indükleyen kritik faktörler olduğunu belirlemiştir²¹. Lipit peroksidasyonuna yol açan diğer bir merkezi mekanizma, GSH seviyelerindeki düşüşün aracılık ettiği sinyal yolağıdır. GSH, lipit oksidasyon ürünlerini azaltmak ve ferroptozu bastırmak için bir substrat olarak kullanılır²². GPx4, substrat olarak GSH kullanarak lipit peroksitlerin lipit alkollere dönüştürülmesinde doğrudan yer alır ve GPx4 yokluğunda veya aktivitesindeki azalış durumunda, lipit peroksitlerinin birikimine ve hücre ölümüne yol açan lipit membran hasarına neden olur²³. Yee ve ark. GPx4 ve ACSL4 gibi temel düzenleyici genleri manipüle ederek ferroptozu inhibe ederek GBM saldırganlığını azalttığını ve tümör taşıyan farelerin hayatta kalma süresini uzattığını bildirmişlerdir²⁴.

VPA'nın anti-tümör sitotoksitesi yıllarca çalışılrsa da, tümör hücrelerinin bu koşullar altında nasıl öldüğü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışma, C6 glioblastoma hücrelerinin, artan lipit hidroperoksitleri ve azalmış GSH seviyeleri ile ilişkili kısa dallı zincirli bir yağ asidi olan VPA uygulamasıyla²⁵, ferroptotik ölüme maruz kaldığını ortaya koydu. *In vitro* çalışmamız, VPA'nın GPx4 ve GSH seviyelerinin düşmesine bağlı bir şekilde DNA hasarı ile lipit peroksidasyonu kaynaklı tümör hücresi sitotoksitesini aktive edebildiğini gösterdi. C6 glioblastoma hücrelerinde, VPA konsantrasyonu arttıkça GPx4 ve GSH seviyelerindeki düşüşün giderek daha fazla arttığı gözlemlendi, hasarlı/ölmekte olan tümör hücrelerinin canlılığı ile paralel bir şekilde düştüğü MTT sonuçlarımız tutarlıydı. Unutulmamalıdır ki, bu çalışmada sıçan C6 glioblastoma hücre hattının kullanılması nedeniyle VPA kaynaklı tümör hücresi ferroptozunun, insan kaynaklı glioblastoma hücre hatlarında ve *in vivo* modellerde de benzer etkiler gösterip göstermediğinin araştırılması gerekmektedir.

Özetlemek gerekirse, C6 hücrelerindeki VPA uygulaması, *in vitro* olarak önemli ferroptoz aracılı anti-proliferatif etkiler gösterir. Bu nedenle, VPA'nın radyoterapi veya kemoterapi ile kombinasyon halinde, malign gliomaların büyümesinin inhibisyonu için dikkate değer bir yaklaşım olabilir.

Ferroptoz sinyal yolağının kanser progresyonu ile kesin mekanizmaları ve ilişkisi belirsizdir, ancak bunun daha iyi anlaşılması, kanser karşıtı tedavilerin sonucunu iyileştirmede umut verici bir stratejiyi temsil edebilir. Kanser hücrelerinin kemoterapiye direnci kanser tedavisinde önemli bir sorundur. Ferroptoz sinyal yolunun aktivasyonu, özellikle ilaç direnci bağlamında kanser hücrelerinin ölümüne neden olabilir ve bu da kemoterapi ilaçlarına karşı kanser duyarlılığını artırabilir. Bu nedenle, ferroptoz indükleyicileri, tümör ilaç direnci sorununa yeni çözümler sağlayabilir. Kanser tedavisine ferroptoz indükleyiciler ile kemoterapiyi entegre etmek, sinerjik bir yanıt sağlayarak kemoterapi duyarlılığını teşvik edebilir. Öte yandan, çalışmamızda VPA'nın ferroptoz indükleyici etkileri sadece *in vitro* olarak araştırılmış olması en önemli limitasyonlardan biridir. Ek olarak, GPx4 ve ACSL4 gibi ferroptoz düzenleyici genlerin ekspresyon seviyelerinin analiz edilmemiş olması çalışmamızın bir diğer limitasyonudur. Ancak, elde ettiğimiz sonuçlar bu alanda çalışan araştırmacılara, VPA'nın C6 glioblastoma hücrelerindeki toksik dozlar ve ferroptoz biyobelirteçleri üzerindeki etkileri hakkında önemli kanıtlar sunduğunu düşünmekteyiz. Bu kapsamda, VPA etkinliğinin araştırıldığı moleküler temelleri olan hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Etik Kurul Kararı: Hücre kültürü çalışması olduğu için etik kurul iznine gerek yoktur.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Finansal Destek: Bu çalışma her hangi bir fon tarafından desteklenmemiştir.

Declaration of Conflicting Interests: The authors declare that there is no conflict of interest.

Financial Disclosure: No financial support was received.

KAYNAKLAR

1. Batash R, Asna N, Schaffer P, Francis N, Schaffer M. Glioblastoma multiforme, diagnosis and treatment; Recent literature review. CurrMedChem 2017; 24(27): 3002-9.
2. Alifieris C, Trafalis DT. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. PharmacolTher. 2015; 152: 63-82.

3. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012; 149(5): 1060-72.
4. Tang D, Chen X, Kang R, Kroemer G. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. *Cell Res* 2021; 31(2): 107-25.
5. Chen X, Yu C, Kang R, Tang D. Iron metabolism in ferroptosis. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 590226.
6. Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K, Tsuji Y. Regulators of Iron homeostasis: New players in metabolism, cell death, and disease. *Trends Biochem Sci* 2016; 41(3): 274-86.
7. Doll S, Proneth B, Tyurina YY, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nat Chem Biol* 2017; 13(1): 91-8.
8. Imai H, Matsuoka M, Kumagai T, Sakamoto T, Koumura T. Lipid peroxidation-dependent cell death regulated by GPx4 and ferroptosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2017; 403: 143-70.
9. Qiu C, Zhang X, Huang B, et al. Disulfiram, a ferroptosis inducer, triggers lysosomal membrane permeabilization by up-regulating ROS in glioblastoma. *OncoTargets Ther* 2020; 13: 10631-40.
10. Yuan F, Sun Q, Zhang S, et al. HSP27 protects against ferroptosis of glioblastoma cells. *Hum Cell* 2022; 35(1): 238-49.
11. Yeow WS, Ziauddin MF, Maxhimer JB, et al. Potentiation of the anticancer effect of valproic acid, an antiepileptic agent with histone deacetylase inhibitory activity, by the kinase inhibitor Staurosporine or its clinically relevant analogue UCN-01. *Br J Cancer* 2006; 94(10): 1436-45.
12. Bangert A, Cristofanon S, Eckhardt I, et al. Histone deacetylase inhibitors sensitize glioblastoma cells to TRAIL-induced apoptosis by c-myc-mediated downregulation of cFLIP. *Oncogene* 2012; 31(44): 4677-88.
13. Lee JY, Maeng S, Kang SR, et al. Valproic acid protects motor neuron death by inhibiting oxidative stress and endoplasmic reticulum stress-mediated cytochrome C release after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2014; 31(6): 582-94.
14. Chen X, Wang H, Zhou M, et al. Valproic Acid Attenuates Traumatic Brain Injury-Induced Inflammation in Vivo: Involvement of Autophagy and the Nrf2/ARE Signaling Pathway. *Front Mol Neurosci* 2018; 11: 117.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
16. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging biological principles of metastasis. *Cell* 2017; 168(4): 670-91.
17. Zhang C, Liu S, Yuan X, et al. Valproic acid promotes human glioma U87 cells apoptosis and inhibits glycogen synthase kinase-3 β through ERK/Akt signaling. *Cell Physiol Biochem* 2016; 39(6): 2173-85.
18. Riva G, Cilibrasi C, Bazzoni R, et al. Valproic acid inhibits proliferation and reduces invasiveness in glioma stem cells through Wnt/ β catenin signalling activation. *Genes (Basel)* 2018; 9(11): 522.
19. Benitez JA, Arregui L, Cabrera G, Segovia J. Valproic acid induces polarization, neuronal-like differentiation of a subpopulation of C6 glioma cells and selectively regulates transgene expression. *Neuroscience* 2008; 156(4): 911-20.
20. Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res* 2019; 29(5): 347-64.
21. Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: Death by lipid peroxidation. *Trends Cell Biol* 2016; 26(3): 165-76.
22. Liu MR, Zhu WT, Pei DS. System Xc⁻: a key regulatory target of ferroptosis in cancer. *Invest New Drugs* 2021; 39(4): 1123-31.
23. Li S, He Y, Chen K, et al. RSL3 Drives ferroptosis through NF- κ B pathway activation and GPX4 depletion in glioblastoma. *Oxid Med Cell Longev* 2021; 2021: 2915019.
24. Yee PP, Wei Y, Kim SY, et al. Neutrophil-induced ferroptosis promotes tumor necrosis in glioblastoma progression. *Nat Commun* 2020; 11(1): 5424.
25. Cai Y, Yang Z. Ferroptosis and its role in epilepsy. *Front Cell Neurosci* 2021; 15: 696889.