



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**DOKSORUBİSİN İÇEREN NANOPARTİKÜLLERİN
KARACİĞER KANSERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN PROTEOMİK ÇALIŞMALARLA
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Doktora Tezi

Gülçe ÖZMEN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İzmir
2024

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**DOKSORUBİSİN İÇEREN NANOPARTİKÜLLERİN
KARACİĞER KANSERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN PROTEOMİK ÇALIŞMALARLA
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Gülçe ÖZMEN

Danışman: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Doktora Programı

İzmir
2024



Gülçe ÖZMEN tarafından doktora tezi olarak sunulan “Doksorubisin İçeren Nanopartiküllerin Karaciğer Kanseri Üzerindeki Etkilerinin Proteomik Çalışmalarla Değerlendirilmesi” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 22/08/2024 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

.....

Raportör Üye : Prof. Dr. Seçil ÖNAL

.....

Üye : Prof. Dr. Nurdan PAZARLIOĞLU

.....

Üye : Prof. Dr. Gülşah Şanlı MOHAMED

.....

Üye : Prof. Dr. Ayşe DİNÇER

.....



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Doksorubisin İçeren Nanopartiküllerin Karaciğer Kanseri Üzerindeki Etkilerinin Proteomik Çalışmalarla Değerlendirilmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

22/ 08/ 2024

İmzası

Gülçe ÖZMEN

ÖZET**DOKSORUBİSİN İÇEREN NANOPARTİKÜLLERİN
KARACİĞER KANSERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
PROTEOMİK ÇALIŞMALARLA DEĞERLENDİRİLMESİ**

ÖZMEN, Gülçe

Doktora Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

Ağustos 2024, 169 sayfa

Hepatoselüler karsinom (HCC), dünya çapında en yaygın kanser türlerinden olup, kansere bağlı ölümlerde dördüncü sıradadır. HCC'un karmaşık prognoza sahip olması ve ölüm oranının yüksek olması, büyük ölçüde geç tanı eğiliminden veya tedavinin çok yönlü ve karmaşık yapısından kaynaklanmaktadır. HCC'un erken tanısının yanı sıra tedavi yaklaşımlarının anlaşılması için yeni biyobelirteçlerin bulunması, söz konusu mekanizmaların daha iyi anlaşılması yeni ve daha etkili terapötik ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için önem teşkil etmektedir. Böylece kanserle ilgili kullanılan ilaç etkin madde ile terapötik etkinliğinin ya da kanser-protein ağındaki değişikliklere dayalı tedavinin belirlenmesi için genomik analizlerin ötesinde proteomik analizlere ihtiyaç vardır. Bu tez çalışması ile daha önce etkinliği kanıtlanan doksorubisin yüklü arabinogalaktan kaplı manyetik nanopartiküler formülasyonunun (DANP) karaciğer kanser dokusu üzerinden farklı protein ekspresyonunun karşılaştırmalı proteomik yaklaşımları ile araştırılması amaçlanmıştır. HCC tedavi etkinliği kanıtlanmış doksorubisin içeren nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemin uygulama sonrası kanser doku ve serbest doksorubisin uygulaması ile proteomik profillerinin karşılaştırılmıştır. Protein yanıtlarındaki değişimler jel bazlı LC-MS ve solüsyon bazlı LC-MS yaklaşımları ile analiz edilmiş ve komplementar veri elde edilmiştir. Kantitatif proteomik veriler,

Doksorubisin-tedavisi sonrası ve DANP-tedavisi sonrası dokuda hepatoselüler karsinomdaki heterojenliği vurgulamaktadır. Çalışma sonucunda, solüsyon bazlı LC-MS yaklaşımları ile DANP ile tedavi sonrasında kanser dokuya göre 22 adet proteinin yukarı seviyede eksprese olduğu ve 12 adet proteinin ise aşağı seviyede eksprese olduğunu tespit edilmiştir. Tez çalışması HCC'un moleküler düzeyde tümör biyolojisine dair bilgiler sunmakta ve onu hedef alan tedaviler için fikir vermektedir. Sonuç olarak tasarlanan DANP taşıyıcı sistemin doksorubisin tedavisine göre avantaj sağlama potansiyeli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmada sunulan proteomik yaklaşımların değerlendirilmesi, HCC'un moleküler düzeyde anlaşılmasında ve biyobelirteç niteliğinde yeni tedavi hedeflerinin geliştirilmesinde katkı sağlayacaktır.

Anahtar sözcükler: Proteomik, hepatoselüler karsinom (HCC), 2D elektroforez, kütle spektrometresi, doksorubisin, manyetik ilaç taşıma sistemleri, biyobelirteç

ABSTRACT**EVALUATION OF THE EFFECTS OF DOXORUBICIN
LOADED NANOPARTICLES ON LIVER CANCER BY
PROTEOMIC STUDIES**

ÖZMEN, Gülçe

PhD in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

August 2024, 169 pages

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common cancers worldwide and ranks fourth in cancer-related deaths. The complex prognosis and high mortality rate of HCC is maximized due to the tendency for late diagnosis or the multifaceted, and complex nature of treatment. The discovery of new biomarkers for the early diagnosis of HCC as well as the understanding of treatment approaches, and a better understanding of these mechanisms are important for the development of new and more effective therapeutics in addition to treatment methods. Thus, proteomic analyses are needed beyond genomic analyses to determine the therapeutic efficacy of the active ingredients of drugs used in cancer or treatment based on changes in the cancer-protein network. In this thesis, we aimed to investigate the differential protein expression of the previously proven doxorubicin-loaded arabinogalactan-coated magnetic nanoparticulate formulation (DANP) on liver cancer tissue by comparative proteomics approaches. The proteomic profiles of DANP treatment were compared with cancer tissue and doxorubicin treatment. Differential protein responses were analysed by gel-based LC-MS and solution-based LC-MS approaches and complementary data were obtained. Quantitative proteomics data highlights the heterogeneity of HCC after DANP and doxorubicin treatment. Our results can be concluded as 22 proteins were

upregulated and 12 proteins were downregulated after DANP treatment compared to cancer tissue with solution-based LC-MS approaches. Our study provides information about the tumour biology of HCC at molecular level and ideas for targeted therapies. As a result, it is thought that the designed DANP carrier system has potential to express an advantage over doxorubicin treatment. In addition, the evaluation of the proteomic approaches presented in this study will contribute to understanding of HCC at the molecular level and the development of new treatment targets as biomarkers.

Keywords: Proteomics, hepatocellular carcinoma (HCC), 2D electrophoresis, mass spectrometry, doxorubicin, magnetic drug delivery systems, biomarker



ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında Prof. Dr. Şenay ŞANLIER' in yürütücülüğünde gerçekleştirilmiş 119 S 496 nolu TÜBİTAK projesi ile tümör dokuya hedeflemenin sağlandığı nanopartikül sistem kullanılarak tasarlanan Doksorubisin Yüklü Arabinogalaktan Kaplı Manyetik Nanopartikül formülasyonu kullanılmıştır. Tasarlanan nanopartiküller taşıyıcı sistemin karaciğer kanser dokusu üzerindeki etkisinin karşılaştırmalı proteomik yaklaşım ile araştırılması hedeflenmiştir. Dolayısıyla hedeflenen sonuca ulaşılmıştır.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 123S070 Numaralı proje ile desteklenmiştir. Projeye verdiği destekten ötürü TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi sunarız.

Bilginin sonsuz; emekle işlenen, geliştirilen ve paylaşılan bilginin ise çok değerli olduğunu düşünmekteyim. Dolayısıyla bir nebze dahi olsa topluma ve bilim insanlarına yapmış olduğum katkıdan dolayı onur duymaktayım.

İZMİR

22/ 08/ 2024

Gülçe ÖZMEN



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ.....	xi
İÇİNDEKİLER.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
TABLolar DİZİNİ.....	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Kanser Metabolizması.....	5
2.1.1 Hepatoselüler karsinom ve ilişkili sinyal yolları	9
2.1.2 HCC ve biyobelirteçler.....	11
2.1.3 HCC tedavisinde kullanılan ilaç taşıyıcı sistemler ve doksorubisin	13

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.2	Proteomik.....	16
2.2.1	Proteomik yaklaşımda kullanılan temel teknikler	19
2.2.1.1	İki boyutlu sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (2D SDS-PAGE).....	20
2.2.1.2	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC).....	21
2.2.1.3	Kütle spektrometresi (MS).....	22
2.2.1.4	Kanser ilaç geliştirme araştırmalarında proteomik yaklaşım	26
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1	Gereç.....	34
3.2	Yöntem.....	34
3.2.1	Hepatosellüler karsinoma tümör modeli oluşturulması ve ilaç taşıyıcı sistemin uygulanması.....	34
3.2.2	Örnek hazırlama ve proteinlerin izolasyonu	38
3.2.3	Proteinlerin SDS-PAGE tekniği ile kütlelerine göre ayrılması	38
3.2.4	Proteinlerin kütle spektrometresi ile tayini	42

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.	BULGULAR	47
4.1	Hepatosellüler Karsinom Tümör Modelinin Oluşturulması ve İlaç Taşıyıcı Sistemin Uygulanması.....	47
4.2	Örnek Hazırlama ve Protein İzolasyonu.....	57
4.3	Proteinlerin SDS-PAGE Tekniği ile Kütlelerine Göre Ayrılması.....	57
4.4	Proteinlerin Kütle Spektrometresi ile Tayini.....	63
4.4.1	Poliakrilamid jelden proteinlerin ayrıştırılması ve kütle spektrometresi ile tanımlanması.....	64
4.4.2	Karaciğer dokusundan proteinlerin kütle spektrometresi ile belirlenmesi.....	65
5.	TARTIŞMA.....	86
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	122
	KAYNAKLAR DİZİNİ	127
	TEŞEKKÜR.....	168
	ÖZGEÇMİŞ.....	169
	EKLER.....	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1.	Kanser hücrelerinde metabolik modeller (Yang et al., 2024'den uyarlanmıştır.).....5
2.2.	HCC'da başlıca büyüme faktörü reseptörü ve sinyal yolları (Omar et al., 2023)10
2.3.	Hepatoselüler karsinom (HCC) KEGG sinyal yolağı (KEGG, 2024).....11
2.4.	Biyokimyasal Yapısına Göre HCC Biyobelirteç Sınıflandırması (Omar M.A. et al., 2023)13
2.5.	Kanser hücresinde doksorubisinin etkisine katılan aday genlerin temsili şeması (Thorn et al., 2011; Whirl-Carrillo et al., 2021).16
2.6.	Tez çalışmasına ait uygulanan aşağıdan yukarıya proteomik yaklaşımların şematik gösterimi19
3.1.	HepG2 hücrelerinin fareye enjeksiyonu.....35
3.2.	Kuyruk veninden prob ve ilaç uygulaması için farenin hazırlanması.....36
3.3.	Farelere isofluran uygulaması.....36
3.4.	Farelere mıknatıs uygulaması37
3.5.	Proteomik verilerinin STRING analizi45

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.1.	Kanser kontrol grubu (1) <i>in vivo</i> görüntüleri 50
4.2.	Kanser kontrol grubu (2) <i>in vivo</i> görüntüleri 50
4.3.	Kanser kontrol grubu (3) <i>in vivo</i> görüntüleri 51
4.4.	Kanser kontrol grubu (4) <i>in vivo</i> görüntüleri 51
4.5.	Kanser kontrol grubu (5) <i>in vivo</i> görüntüleri. 52
4.6.	Doksorubisin grubu (1) <i>in vivo</i> görüntüleri 52
4.7.	Doksorubisin grubu (2) <i>in vivo</i> görüntüleri. 53
4.8.	Doksorubisin grubu (3) <i>in vivo</i> görüntüleri. 53
4.9.	Doksorubisin grubu (4) <i>in vivo</i> görüntüleri. 54
4.10.	Doksorubisin grubu (5) <i>in vivo</i> görüntüleri. 54
4.11.	DANP grubu (1) <i>in vivo</i> görüntüleri 55
4.12.	DANP grubu (2) <i>in vivo</i> görüntüleri 55
4.13.	DANP grubu (4) <i>in vivo</i> görüntüleri 56
4.14.	DANP grubu (5) <i>in vivo</i> görüntüleri 56
4.15.	Bradford tayini standart grafiği..... 57

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.16.	Protein örneklerinin deney grupları bazında jel görüntüsü (Soldan sağa bantlar: Marker-Sağlıklı grup-DANP tedavi grup-Doksorubisin tedavi grup-Kanser grup).....58
4.17.	Sağlıklı grup (n=3), Kanser grup(n=3), Doksorubisin grup (n=3) ve DANP grup (n=3) 2D jel görüntüleri (pH 3-10, 11 cm IPG Strip jel ile).....60
4.18.	Kanser gruba karşı DANP tedavi grubu dağılım grafiğinden ilgili spot yerinin tanımlanmasına ait PdQuest temsili görüntüsü (spot 5502) ...61
4.19.	Kansere karşı Doksorubisin tedavi grubu dağılım grafiğinden ilgili spot yerinin tanımlanmasına ait PdQuest temsili görüntüsü (spot 3403)...62
4.20.	Sağlıklı grup, Kanser grup, Doksorubisin grup (n=3) ve DANP grup (n=3) 2D jel görüntüleri (pH 3-10, 11 cm NL (non lineer) IPG Strip jel ile).....63
4.21.	FASP protokolünde başlangıç peptid sayısı ile triptik parçalama sonrası elde edilen PSMS sayısına ait grafik.....65
4.22.	Kanser gruba karşı DANP ile tedavi grubunu LC-MS ile proteom analizi sonucu volkan grafiği.68
4.23.	Kontrol kanser grubuna göre DANP ile tedavi edilen iki farklı koşuldaki proteom arasındaki ilişki69
4.24.	Kanser gruba karşı Doksorubisin ile tedavi grubu LC-MS ile proteom analizi sonucu volkan grafiği.70

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.25.	Kontrol kanser grubuna göre Doksorubisin ile tedavi edilen iki farklı koşuldaki proteom arasındaki ilişki 70
4.26.	Kontrol kanser örneğine göre sağlıklı grubun iki farklı koşuldaki proteom arasındaki ilişki..... 71
4.27.	a) Etiketsiz kütle spektrometresi ile tespit edilen DANP grup yukarı regüle proteinlerin proteomik verilerin STRING analizi b) Doksorubisin grup yukarı regüle proteinlerin STRING Analizi (10.05.2024 tarihli STRING version 12.0)..... 73
4.28.	DANP tedavi grubu yukarı regüle proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre renklendirilmiş STRING analizi (10.05.2024 tarihli STRING version 12.0).....74
4.29.	DANP grup yukarı regüle proteinlerin biyolojik prosesler doğrultusunda renklendirilen ve protein-protein etkileşimini gösteren STRING analizi (10.05.2024 tarihli STRING version 12.0)..... 75
4.30.	Doksorubisin tedavi grubu yukarı regüle proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre renklendirilmiş STRING analizi (10.05.2024 tarihli STRING version 12.0).....76
4.31.	Doksorubisin grup yukarı regüle proteinlerin biyolojik prosesler doğrultusunda renklendirilen ve protein-protein etkileşimini gösteren STRING analizi (10.05.2024 tarihli STRING version 12.0)..... 77

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

4.32.	a) Etiketsiz kütle spektrometresi ile tespit edilen DANP tedavi grubu aşağı regüle proteinlerin STRING analizi b) Doksorubisin tedavi grubu aşağı regüle proteinlerin STRING analizi (10.05.2024 tarihli STRING version 12.0).....	79
4.33.	DANP tedavi grubu aşağı regüle proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre renklendirilmiş STRING analizi (10.05.2024 tarihli STRING version12.0).....	80
4.34.	DANP tedavi grubu aşağı regüle proteinlerin görevli biyolojik proseslerine göre renklendirilmiş STRING analizi (10.05.2024 tarihli STRING version 12.0)	81
4.35.	Doksorubisin tedavi grubu aşağı regüle proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre renklendirilmiş STRING analizi (10.05.2024 tarihli STRING version 12.0).....	82
4.36.	Doksorubisin tedavi grubu aşağı regüle proteinlerin görevli biyolojik proseslerine göre renklendirilmiş STRING analizi (10.05.2024 tarihli STRING version 12.0).....	83
5.1.	SitokromC oksidazın ilişkili metabolik yollar (10.05.2024 tarihli STRING version 12.0).....	92

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. HCC’ da protein ekspresyonu değişimleri ve ilgili sinyal yolları çalışmalarına dair literatürler	29
3.1. Rehidrasyon hacmi, Protein miktarı ve mineral yağ hacmi (BIORAD, 2011)	39
3.2. 11 cm pH:3-10 IPG strip jel için uygulanan izoelektrik fokuslama programı (BIORAD, 2011)	40
4.1. Kontrol grubu (kanser) <i>in vivo</i> sonuçları.	47
4.2. Doksorubisin grubu <i>in vivo</i> sonuçları.....	48
4.3. DANP grubu <i>in vivo</i> sonuçları.	49
4.4. Jel bazlı LC-MS sonucu DANP tedavisi sonrası değişen proteinler	64
4.5. Jel bazlı LC-MS sonucu Doksorubisin tedavisi sonrası değişen proteinler	65
4.6. Etiketsiz nLC MS sonucu elde edilen regüle proteinler (koyu pembe dolgulu değerler: yukarı regüle protein değerlerini, yeşil dolgulu değerler: aşağı regüle protein değerlerini ifade etmektedir.)	67
4.7. DANP tedavi grubu yukarı regüle proteinler (etiketsiz nLC-MS analizi ile).....	72

TABLOLAR DİZİNİ (devam)

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
4.8. Doksorubisin tedavi grubu yukarı regüle proteinler (etiketsiz nLC-MS analizi ile)	72
4.9. DANP tedavi grubu aşağı regüle proteinler.....	78
4.10. Doksorubisin tedavi grubu aşağı regüle proteinler	78
4.11. DANP tedavi grup yukarı regüle proteinlerin hücrel lokalizasyonu gösteren STRING analiz.....	84
4.12. Doksorubisin tedavi grup yukarı regüle proteinlerin hücrel lokalizasyonu gösteren STRING analizi	84
4.13. DANP tedavi grup aşağı regüle proteinlerin hücrel lokalizasyonu gösteren STRING analizi	84
4.14. Doksorubisin tedavi grup aşağı regüle proteinlerin hücrel lokalizasyonu gösteren STRING analizi	85

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Acıklamalar</u>
M	Molar
μm	Mikrometre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
$nmol$	Nanomol
μL	Mikrolitre
nm	Nanometre
g	Gravite
mg	Miligram
$^{\circ}C$	Santigrat derece
Da	Dalton
kDa	Kilo dalton
ppm	Milyonda bir
kV	Kilovolt
λ_{em}	Emisyon dalga boyu
λ_{ex}	Eksitasyon dalga boyu

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Acıklamalar</u>
DANP	Doksorubisin Yüklü Arabinogalaktan Kaplı Manyetik Nanopartikül
2DG-750 Prob	Floresans boya işaretli glukoz molekülü
HCC	Hepatoselüler karsinom
NP	İlaç taşıyıcı sistem nanopartikül
ROS	Reaktif oksijen türlerinin
MS	Kütle spektrometrisi
PTM	Translasyon sonrası modifikasyonlar
2D SDS-PAGE	İki boyutlu sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
IF	İzoelektrik fokuslama
2D DIGE	İki boyutlu ayırıcı jel elektroforezi
TMT	Tandem kütle etiketleri
ESI	Elektrosprey iyonizasyon
PBS	Fizyolojik tamponlu çözelti
APCI	Atmosferik basınçta kimyasal iyonizasyon
SEC	Boyut dışlama kromatografisi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Acıklamalar</u>
RPLC	Ters faz sıvı kromatografisi
FT-ICR	Fourier dönüşümü iyon siklotron rezonansı
TOF	Uçuş süresi
m/z	Kütle-yük oranı
LC/MS	Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi
nLC/MS	Etiketsiz sıvı kromatografisi kütle spektrometresi
SELDI TOF-MS	Yüzeyle geliştirilmiş lazer desorpsiyon/İyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometresi
SRM	Seçici reaksiyon izleme
TIMS	Tuzaklanmış iyon hareketlilik spektrometresi
MALDI-TOF	Matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon-uçuş süresi-uçuş süresi
2D-DIGE	Floresan ayırıcı iki boyutlu jel elektroforezi
ICAT	Izotopla kodlanmış afinite işaretleme
iTRAQ	Göreceli ve mutlak kantitatif izobarik işaretleme
SILAC	Amino asitler tarafından stabil izotop etiketleme

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
Mr	Bağıl molar kütle
NASH	Nonalkolik steatohepatit
i.v.	İntravenöz/damariçi
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi



1. GİRİŞ

Kanser, vücuttaki bazı hücrelerin anormal ve düzensiz büyüyerek çoğaldığı ve gen mutasyonu veya ekspresyonundaki değişikliklerle metabolik yolların tekrardan programlandığı hücre büyümesi ve gelişimini sağlayan kontrol mekanizmalarının bozulduğu bir hastalıktır. Kanserli hücrelerin istemsiz hızla bölünmesi sırasında ihtiyaç duydukları glukoz ihtiyacı normal hücreye göre çok daha fazladır ve enerjiyi çoğu normal hücreden farklı bir şekilde aerobik glikoliz, oksidatif fosforilasyondan glikolize geçiş ya da kombine metabolik yollarla üretir (Yang et al., 2024). Kanser hücreleri, sağlıklı şekilde elde edemediği enerjiyi karşılaması, kanser hücresinin çoğalması ve hayatta kalması için gereken oksidatif stresi azaltmak amacıyla glukoz, glutamin ve lipid metabolizmaları üzerinden yeniden programlanır. Metabolik yeniden programlamanın yanısıra çeşitli kanser hücreleri normal hücrelerin aksine büyüme sinyallerin yokluğunda büyür ve büyüme süpresörlerinden kaçma eğilimindedir (Navarro et al., 2022). Kanser hücrelerinde, programlanmış hücre ölümü veya apoptoz olarak bilinen süreçlerin inhibisyonu, yakındaki vücut bölgesine yayılım, anjiyogenez indüksiyonu ile kan damarları ile tümörlere oksijen ve besin sağlaması ve atık ürünleri tümörlerden uzaklaştırması, bağışıklık hücrelerini manupüle ederek kanser hücrelerinin hayatta kalması, kromozom parçalarının kopyalanması ve silinmesi gibi özelliklerin birkaçı veya tümü bulunmaktadır (Chaudhry et al., 2022; Ada vd., 2021).

Yeni biyokimyasal ve moleküler biyoloji tekniklerinin yardımıyla, kanser hücresi metabolizması, tümör oluşumunun çeşitli aşamalarında tümörle ilişkili metabolik değişikliklerin mekanizmaları ve fonksiyonel sonuçlarına ilişkin bilgilerin elde edilmesi ile son on yılda kanser metabolizmasına ilişkin çeşitli veriler elde edilmiştir (Yang et al., 2024). Özellikle, tümör oluşumuyla ilişkili metabolik yollardaki değişiklikler, gerekli besin maddelerini elde etme yeteneğini artırarak metabolit akışını etkilemesi, besinlerin hücresel tümör oluşumuna katkıda bulunan metabolik yollara tercihli olarak atanma şeklini şekillendirmesi, kanser hücrelerinin farklılaşması gibi hücre-metabolit etkileşiminin tüm aşamalarını kapsamaktadır. Bu yüzden ki; Warburg etkisi ve kanser hücrelerindeki sözkonusu metabolik değişiklikler kanser dokunun yapısını etkilemektedir (Wang et al., 2023).

Hepatoselüler karsinom (HCC), dünya çapında altıncı en yaygın kanser türü olup, tüm primer karaciğer kanserlerinin %75-85'ini oluşturur ve kansere bağlı

ölümlerde dördüncü sıradadır (Bray et al., 2018; Villanueva et al., 2019; Ogunwobi et al., 2019; Craig et al., 2020). Hepatokarsinogenezde telomer onarımı, Wnt/ β -katenin, P53/hücre döngüsü düzenlemesi, oksidatif stres, epigenetik değiştiriciler, AKT/mTOR ve MAP kinaz gibi çeşitli sinyal yollarından gelen genlerin HCC'da sıklıkla mutasyona uğraması gibi nedenlerle HCC patogenezinin moleküler mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır (Rebouissou et al., 2020). Genelde, kanser oluşum mekanizmasında görev alan bazı reaksiyonların inhibisyonu ya da hedef protein üzerinden reaksiyonların değiştirilmesi prensibi ile ilaç tasarım ve tedavi yaklaşımları oluşturulmakta ve araştırılmaktadır. Örneğin glikolizin doğrudan inhibisyonu kanser için potansiyel bir strateji olarak kabul edilmiştir. Glikoliz metabolizmasında sinyal yollarını inhibe eden 2-deoksi glikoz DG, 3-bromopiruvat, lonidamin gibi moleküller tedavi için aday moleküller olarak seçilmiştir. Amino asit metabolizmasında; glutamin kullanımını arttıran fenilasetat, yağ metabolizmasında ATP sitrat liyazı inhibe eden orlistat, yağ asidi sentazı inhibe eden C75 gibi moleküller araştırılmıştır (Tennant et al. 2010).

HCC tedavisi özelinde de bazı ilgili sinyal yollarının değerlendirilmesi ve biyobelirteç niteliğindeki proteinlerin belirlenmesi ile; multikinaz inhibitörleri; sorafenib, regorafenib, lenvatinib, cabozantinib, VEGFR2 antagonisti ramucirumab, immün kontrol noktası inhibitörleri; pembrolizumab, nivolumab, atezolizumab ve bevacizumab, antrasiklinlerden Doksorubisin, Floksuridin, Sisplatin, 5-florurasil gibi Food and Drug Administration (FDA) onaylı ilaçlar veya bunların kombinasyonları kullanılmaktadır (Llovet vd, 2018; Bruix et al., 2017; Kudo et al., 2017; Zhu et al., 2018; 2017; Abou-alfa et al., 2018). Ancak kanser tedavisinde kullanılan bu ilaçlar ile kimi zaman hedef içi, kimi zaman hedef dışı toksisite gibi çeşitli yan etkiler görülmektedir. Bu tür yan etkilerin hafifletilmesi için bazen ek ilaç kullanımı istenir ki, bu da genellikle tedavide potansiyel etkinliği azaltan dar bir terapötik pencere sunar (Manzari et al., 2021). Söz konusu geleneksel antitümör ilaçları, zayıf biyodağılım ve farmakokinetik göstermesi, zayıf hedef seçiciliği, yüksek direnç ve hedeflenmemiş dokularda yüksek toksisite gibi dezavantajlara sahiptir (Basak et al., 2022). Hedeflenen bir ilaç taşıyıcı sistem tasarımıdaki kilit konular, etken maddenin farmakokinetiği, biyodağılımı, toksisite kontrolü (özellikle doz sınırlayıcı toksisiteleri) ve ilaç direncidir (Manzari et al., 2021). Bu yüzdendir ki, ilaç taşıyıcı sistemlerinin gelişimi ile ilaç aktif maddelerin farmakokinetik ve biyodağılım profilleri iyileştirilmiş, sitotoksik ajanların tümör bölgelerinde seçici olarak birikimi ve tümör bölgelerine ilaç dağıtımı önemli ölçüde iyileştirilmiştir (Alibolandi et al., 2015; Tuomela et al.,

2016; Dong et al., 2016; Williams et al., 2018). Örneğin; tedavi sırasında doksorubisin'in doksorubisinol metaboliti oluşumu (Minotti et al., 2004) ve/veya mitokondriyal bozulma) sonucu oluşan doza bağlı kardiyotoksisite gibi yan etkileri olduğu belirlenmiştir (Wallace, 2007). Doksorubisinin kardiyotoksisite sorunlarına ek olarak doksorubisine direnç de kullanımını sınırlayan diğer bir sorundur (Weiss, 1992).

Tüm bu yan etkiler sonucu tedavi indeksinin kısıtlanması, bu tarz etkin maddeler için farklı ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır (Yang et al., 2022). Özellikle kanser ilaçlarının bu farmakolojik özelliklerini modüle etmek için hedefli ilaç tedavisinde biyouyumlu nanoparçacıkları kullanan nano ölçekli partiküller geliştirilmiştir ve son yıllarda kanser tedavisi için potansiyel bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Shao et al., 2019; Yao et al., 2020; Gavas et al., 2021;).

Prof. Dr. Şenay Şanlıer' in yürütücülüğünde gerçekleştirilen 119 S 496 nolu TÜBİTAK projesinde ile fiziksel hedefleme ile tümör dokuya ulaşımının sağlandığı nanopartikül sistem kullanılarak tasarlanan Doksorubisin Yüklü Arabinogalaktan Kaplı Manyetik Nanopartikül (DANP) geliştirilmiştir. Bu tez çalışmasında HCC için tedavi edici ajan olarak sözkonusu formülasyon olan DANP kullanılmıştır.

Tanı, hastalık evrelendirmesi, risk belirlenmesi ve hastalık prognozu süresinde tanımlanan biyobelirteçlerin yanında aynı zamanda uygulanan tedavi yaklaşımlarının değerlendirilmesi için de biyobelirteçlerden faydalanılmaktadır. Yeni terapötik hedefler ve HCC'un ilaç etkisiyle değişen proteomun incelenmesi yeni biyobelirteçlerin tanımlanmasında önem teşkil etmektedir. Bu yaklaşımla; HCC tedavisi sürecinde uygulanan ilacın karaciğer hücrelerinde farklı moleküler imzalar sergilemesi ve HCC' un başlangıcı veya ilerlemesi açısından izlenebilecek tümörle ilişkili ve belirteç niteliğindeki proteinlerin kanser dokusu üzerinde aşağı ya da yukarı regüle olması muhtemeldir. Bu doğrultuda, bu tez kapsamında belirlenen deney gruplarından (sağlıklı karaciğer, kanserli karaciğer, serbest doksorubisin uygulanan karaciğer, DANP uygulanan karaciğer) elde edilecek karaciğer dokusu üzerinden yukarı & aşağı regüle protein profilini belirlemek ve farklılaşan proteinlerin tanımlanması amaçlanmıştır. Böylece tez çalışması ile; söz konusu ilaç taşıyıcı sistemin (DANP) HCC dokuya göre protein regulasyonundaki değişim ile tümör dokusu üzerinde etkisinin aydınlatılması ve biyobelirteç niteliğinde proteinlerin tespiti hedeflenmiştir. Böylece tez ile elde edilen veriler,

ilaç tedavisinde ilaçla hedeflenebilir aday proteinlerin tanımlanmasını ve ilgili ilacın tedavi etkinliği hakkında bilgi edinilmesine olanak sağlamaktadır.

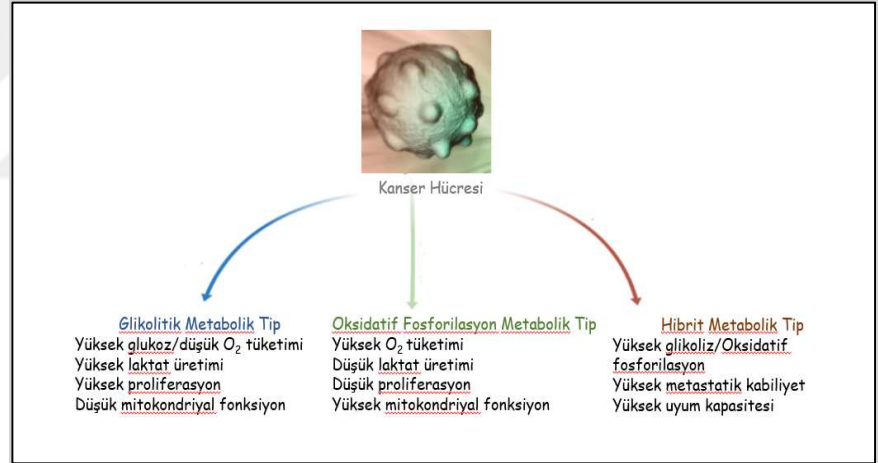
Tez kapsamında; DANP formülasyonun moleküler düzeydeki etkisi aşağıdan yukarı proteomik yaklaşımın iki farklı yöntemi olan jel bazlı ve solüsyon bazlı karşılaştırmalı proteomik analizleri ile araştırılmıştır (Bkz. Bölüm 3: Gereç ve Yöntem). DANP formülasyonunun HCC üzerindeki etkisinin incelenmesi ve bu etkinin hangi protein ve metabolik süreçlerden ileri geldiği saptanmış olup, elde edilen veriler Bölüm 4: Bulgular ve Bölüm 5: Tartışma' da ayrıntıları ile sunulmuştur.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser Metabolizması

Normal vücut hücresinde glukoz yıkımı glikoliz ve trikarboksilik asit çevrimi aşamalarını içermektedir. Glikoliz tepkimelerinde glukoz pirüvata çevrilir ve oluşan pirüvat matrikste oksidatif dekarboksilasyon ile asetil CoA'ya dönüşmektedir. Farklı metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan asetil CoA'nın tamamen oksitlenmesi için trikarboksilik asit döngüsüne girmesi ile karbondioksit, su ve enerji açığa çıkmaktadır. Glukozun pirüvata dönüşmesi aşamasında 2 ADP'den 2 ATP üretimi reaksiyonlarının tümünü içeren glikoliz kanser hücresinde farklı şekilde programlanmıştır. Kanser hücrelerinin karbohidrat metabolizması hücre durumu ve dış etkenlere bağlı olarak değişen ve birbirlerine geçiş yapabilen üç ana türü içerir: glikolitik metabolik tip, oksidatif fosforilasyon metabolik tip ve hibrit metabolik tip (Yang et al., 2024) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kanser hücrelerinde metabolik modeller (Yang et al., 2024'den uyarlanmıştır.)

Aerobik glikoliz, kanser hücrelerinin çok fazla oksijen tüketmeden kolayca çalışmasına olanak tanır ve aynı zamanda tümör büyümesine ve metastazına da yardımcı olur. Kanser hücreleri glikozu tümör mikroortamından alır ve hücrelerin dışına atılan laktat üretir (Feng et al., 2020) Glikolitik metabolik düzendeki kanser hücreleri, enerji ve sentez taleplerini karşılamak için yüksek düzeyde glukoz alır ve yüksek düzeyde laktat üretir (Yang et al., 2024). Bunu farklı şekilde glukoz taşıyıcılarının (GLUT1, GLUT3 ve GLUT4) aktivasyonlarıyla ve/veya glikolizde hız kısıtlayıcı allosterik enzimlerin kontrolü kaybetmesi ile gerçekleştirir. DNA

onarımı ve hücrel metabolizmayı düzenleyen, tümör baskılayıcı gen olan p53'ün glukoz taşıyıcıları inhibe etmesi durduğunda glukoz taşıyıcıların aktivasyonu gerçekleşir (Zhang et al., 2010). Glikolizde hız kısıtlayıcı enzimlerden Hekzokinaz-2 (HK2), fosfofruktokinaz-1 (PFK1), fosfofruktokinaz-2 (PFK2), piruvat kinaz, laktat dehidrogenaz (LDH) enzimlerinin tümör hücrelerinin glikolitik mekanizmasının yeniden programlanmasında görev alır.

Hekzokinaz-2 glukozdan glukoz-6-fosfat oluşumunu katalizler. HK2'nin artışı glikolizisi artırır ve dış mitokondrial membrandaki voltaj bağımlı anyon kanalları ile mitokondriden sitokrom c salınmasını engelleyerek apoptozun inhibe edilmesine neden olmaktadır. PFK1 Fruktoz-6-fosfatın, fruktoz-1,6-fosfata dönüşümünü katalizler. PFK1 aktivitesi, PFK2 tarafından düzenlenen fruktoz-2,6-bifosfat tarafından arttırılmaktadır. Fosfofruktokinaz 2, FBPaz ile birlikte 6-Fosfofrukto-2-kinazın tümörlerde aşırı eksprese olması ve kinaz aktivitesindeki artış ile tümörlerde glikolitik aktivitenin artışını sağlar, metastaz gelişir (Ros et al., 2013).

Kanser dokularda baskın piruvat kinazın M2 izoformunun düşük aktivitesi nedeniyle piruvat-asetil-CoA dönüşümünde azalma olur. Böylece piruvatın pentoz fosfat yolu (TCA) girişi engellendiğinden sonucunda laktat oluşumu artar. Piruvatın geri dönüşümlü olarak laktata dönüşümünü katalizleyen LDH enziminin LDH-A izoformunun kanserlerde aşırı ekspresyonu ile hücre proliferasyonu gerçekleşerek, düşük oksijen durumunda da tümörün devamlılığını sağlar (Granchi et al., 2014).

Yeterince oksijen bulamayan kanser hücrelerinin mitokondri fonksiyonları bozularak, hipoksi ile indüklenebilir faktör 1-alfa (HIF-1 α) HIF1 α 'nın LDH enzim hızını düzenlemesi ile mitokondri fonksiyonları baskılanabilir ve kanser hücresinden türetilen laktat, HIF-1a sinyal yoluyla vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) ve arginaz 1'in ekspresyonunu indükleyebilir. Bu durum, tümörle ilişkili makrofajların (TAM) M2 fenotipine doğru polarizasyonunu teşvik ederek TAM'ların tümör büyümesini teşvik eder (Zhang et al. 2022).

Oksidatif fosforilasyon metabolik sürecinde kanser hücreleri, yüksek mitokondriyal fonksiyon ile daha fazla oksijen tüketir. Kanser hücrelerinin metabolik hızı, kanser kök hücreleri (CSC'ler) gibi normal dokularinkine eşit veya bundan düşük olduğunda, kanser hücrelerinin oksidatif fosforilasyon yoluna geçtiğine yaygın olarak inanılmaktadır (Kuntz et al., 2017). Bu yolun avantajı, aşırı

çoğalma gerektirmeyen kanser hücrelerine daha fazla enerji sağlayabilmesi ve besinlerin daha verimli bir şekilde yakılmasına olanak sağlamasıdır.

Kombine hibrit metabolik yolda metabolik düzendeki kanser hücreleri esnek şekilde yüksek glikoliz ve mitokondriyal metabolizma özelliklerine sahiptir. Benzer şekilde, bazı kanser hücreleri, genellikle iki yol arasında bir geçiş durumu olarak kabul edilen hibrit bir durumdadır. Genel olarak kanser kök hücrelerinin geçiş sırasında hem glikolize hem de oksidatif fosforilasyona dayandığı bu hibrit duruma maruz kalabilir ve ters Warburg etkisi yoluyla, hareketsiz ve çoğalan CSC'ler, kanserle ilişkili stromal hücrelerden gelen katabolitleri kullanabilirler (De Francesco et al., 2018).

TCA, kanser hücrelerini oksidatif stresten korumak için kritik öneme sahiptir. Glikolizdeki değişimin yanı sıra TCA da kanser hücrelerinde değişkenlik gösterir; oksidatif ve oksidatif olmayan iki farklı fazda TCA başlayabilir. Oksidatif fazda, Glukoz-6-fosfat (G6P)'dan, ribuloz-5-fosfat (R5P) ile NADPH üretilir; oksidatif olmayan fazda sadece R5P'yi üretir. NADPH, glutatyonun (GSH) üretimi ve yağ asidi sentezi için gereklidir. TCA döngüsünde yer alan çeşitli enzimler ve metabolitler bozularak anormal metabolizmaya yol açabilir. Bunun bir örneği, bazı kanserlerde süksinat dehidrojenazın (SDH) aşağı regülasyonu veya kaybıdır. SDH, TCA döngüsünde süksinatı fumarata dönüştüren anahtar bir enzimdir ve kaybı, döngü boyunca metabolitlerin normal akışını bozar (Moreno et al., 2020). Sitrat ve fumarat gibi ara metabolitlerin birikmesi, izositrat dehidrojenaz (IDH) veya fumarat hidrataz (FH) gibi TCA döngüsünü düzenleyen enzimlerdeki genetik veya epigenetik değişikliklerden kaynaklanabilir. FH aktivitesinin kaybı, fumarat birikimine yol açar ve hücrel metabolizmayı ve enerji üretimini etkileyerek potansiyel olarak kanser hücresi büyümesini ve hayatta kalmasını teşvik eder (Choi et al., 2021).

Glutamin metabolizması, TCA döngüsü için önemli bir hücrel karbon kaynağıdır nükleotid, amino asit ve lipid biyosentezi için bir nitrojen donörüdür ve aynı zamanda NADPH seviyelerinin korunması için de kritik öneme sahiptir. Nükleik asit sentezinde nitrojen taşıyıcısı, aminoasit transportu regülasyonu (azotun organlar arasında taşınması), glukoneogenez ve protein sentezinde düzenleyici olarak görev alan glutamin prolife olan hücrelerde ATP üretimine ek olarak sitrat oluşumu ile *de novo* lipogenezisi de destekler. Çoğalan kanser hücreleri aerobik glikoliz sergiler, bu da glukoz karbonunun TCA döngüsünden

uzaklaşmasına yol açar, bu da artan NADPH ve amonyak üretimi ile hızlı hücre büyümesini desteklemek için anabolik süreçleri beslemek için glutamin kullanımının artmasına neden olur. Kanseri hücrelerinde amino asit metabolizmasındaki değişiklikler, onların metabolik yeniden yapılanmasına katkıda bulunur ve yüksek proliferatif ve istilacı davranışları için gerekli yapı taşlarını ve enerjiyi sağlar. Bu metabolik değişiklikler, kanser hücrelerini öldürmek veya büyümelerini seçici olarak engellemek için glutamin metabolizmasını hedef alan inhibitörlerin veya amino asit taşıyıcılarının kullanılması gibi terapötik müdahaleler için hedeflenebilir (Peng et al., 2020). Glutamin yanısıra serin ve glisin, hücreler için kritik olan ve nükleotid sentezini, protein sentezini ve redoks dengesini destekleyen iki aminoasittir (Sun et al., 2023). Triptofan, kinurenin yolu da dahil olmak üzere farklı yollardan metabolize edilebilen başka bir esansiyel amino asittir (Bender et al., 2023). Kanseri hücrelerinde triptofan metabolizması değişebilir, bu da immünosupresyon ve immün kaçışta rol oynayan metabolitlerin üretiminin artmasına yol açabilir. Kanseri hücreleri, hızlı çoğalmalarını desteklemek için dallı zincirli aminoasitlerin alımını artırabilir. Özellikle lösin, hücre büyümesi ve protein sentezinde rol oynayan rapamisin (mTOR) yolunun memeli hedefini aktive edebilir (Guri vd, 2017).

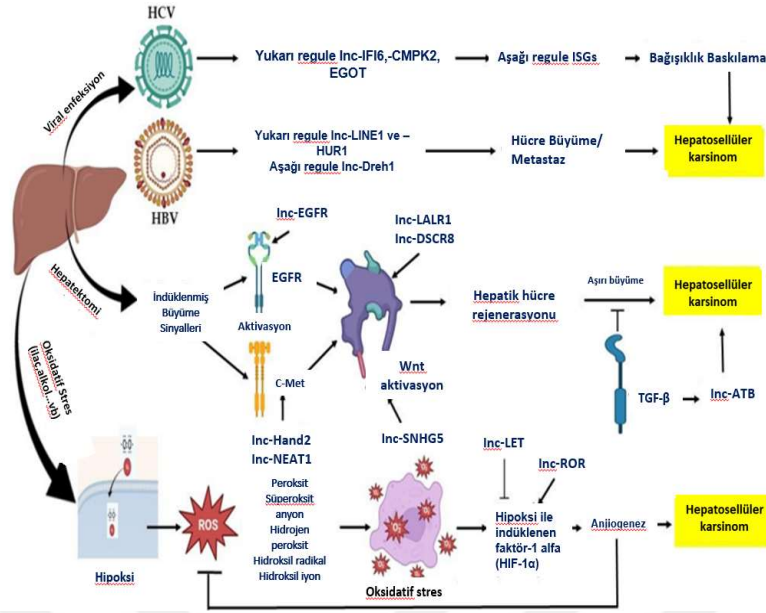
Yüksek proliferatif kanseri hücreleri aynı zamanda enerji, membran sentezi ve lipit sinyali sağlamak için yüksek bir lipit içeriğine (yağ asitleri ve kolesterol) sahip olma eğilimindedir. Kanseri hücreleri lipogenezi artırır ve hayatta kalmak için daha fazla lipit modifikasyonuna ihtiyaç duyar. Önemli bir modifikasyon, lipitlerin biyosentezinde kritik bir rol oynayan yağ asidinin zincirine çift bağların eklenmesiyle ilgili önemli bir süreç olan lipit desatürasyonudur. Lipid desatürasyonu, hücre zarının akışkanlığını ve esnekliğini artırır, zarın yeniden şekillenmesini ve zarla ilişkili proteinlerin ve lipitlerin transferini kolaylaştırır, böylece ortama uyumu, göçü, istilayı ve hayatta kalmayı teşvik eder (Corn et al., 2020). Lipid desatürasyonu sürecinde önemli bir desatüraz, stearoil-CoA desatüraz 1'dir. Lipid metabolizması, özellikle kolesterol metabolizması, kanserde lipit sinyallemesinin yanı sıra membran sentezinde de kritik bir rol oynar. Diğer bir modifikasyon ise yağ asidi sentezidir, hipoksik stres altında AKT ve HIF-1 aracılığıyla indüklenebilir ve tümör mikroçevresinde adaptasyonlara izin verir (Menendez et al., 2022). Yağ asidi sentezinin yeniden programlamasına ilişkin çelişkili kanıtlar vardır; bazıları artan endojen yağ asidi sentezinin, kanserin ilerlemesini ve tümör oluşumu için bir yol olduğunu belirtirken (Tan et al., 2022) diğer taraftan tersini ifade eden çalışmalar da mevcuttur (Hopperton et al., 2014).

Tümörün progresinde, yağ asidi membran biyogenezi, hücre proliferasyonu ve farklılaşında rol oynayan kolesterol ile ilgili enzimlerin aşırı eksprese olduğunu bildirmiştir (Yang et al., 2020).

2.1.1 Hepatoselüler karsinom ve ilişkili sinyal yolları

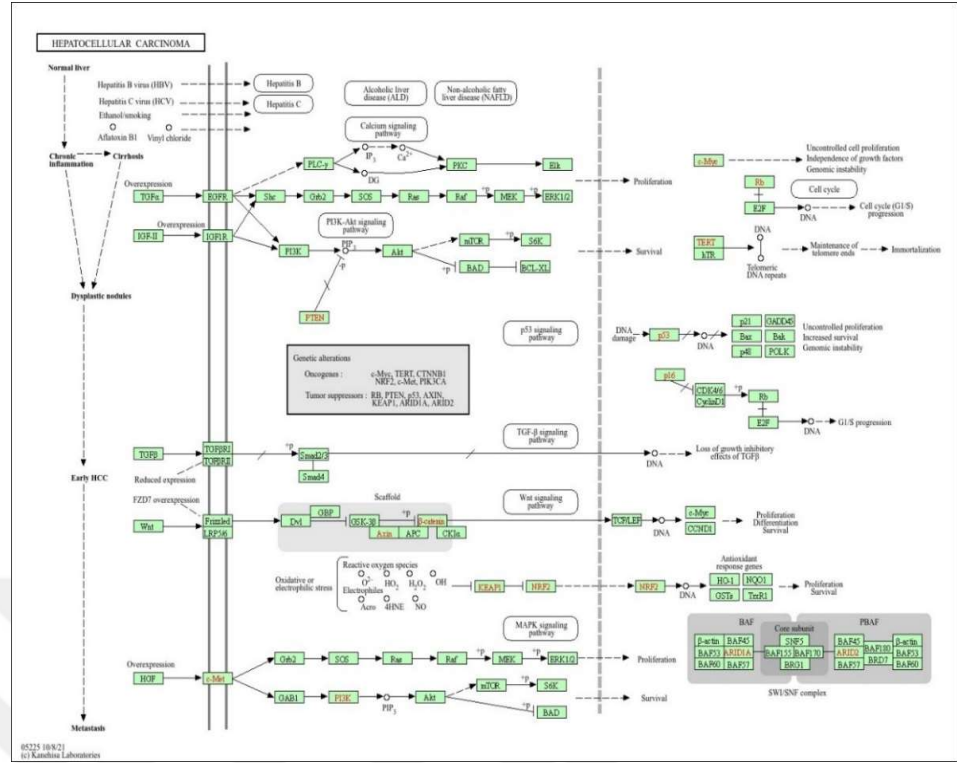
HCC'da ölüm oranının yüksek olması, büyük ölçüde geç tanı eğiliminden ve tedavinin çok yönlü ve karmaşık yapısından kaynaklanmaktadır (Ladju et al., 2022). Hepatit B (HBV) ve /veya hepatit C (HCV) virus enfeksiyonu, alkolik siroz, nonalkolik steatohepatit (NASH) HCC'un başlıca nedeni olup, hastalık için bilinen diğer risk faktörleri ağır alkol tüketimi, aflatoksin maruziyeti, obezite, tip 2 diyabet ve tütün kullanımıdır (Sung et al., 2021; Villanueva et al., 2017). Toplam HCC vakalarının %54'ü HBV ve %31'i HCV kökenli olup, %15'i diğer nedenlerle ilişkilidir (Hiotis et al., 2012).

HCC'un diğer kanser türlerinde olduğu gibi oluşumu ve ilerlemesinde rol oynayan çeşitli biyolojik mekanizmalar mevcuttur. Bunlar epitelyalden mezenkimal geçiş, tümör-stromal etkileşimler, tümör mikroçevresi, kanser kök hücreleri ve mikroRNA'ların ve bazı sinyal yollarının düzensizliğidir (Llovet et al., 2018). HCC'da büyüme faktörleri EGF ve ilişkili reseptörlerde düzensizlik ve/veya sıklıkla aşırı ekspresyon tanımlanmıştır (Daveau et al., 2003). HCC'da viral enfeksiyon sonrası, oksidatif stres ya da ilgili sinyal yollarındaki sıklıkla aşırı ekspresyon gösteren başlıca büyüme faktörü reseptörü Şekil 2.2'de gösterilmiştir (Omar et al., 2023). Bu mekanizmaların araştırılması yeni ve daha etkili terapötik ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için önem teşkil etmektedir.



Şekil 2.2. HCC'da başlıca büyüme faktörü reseptörü ve sinyal yolları (Omar et al., 2023)

Alkol dışı yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD)'nın ilk evresinde insülin direncinin indüklenmesi ve aşırı lipid birikimi ile transkripsiyon faktörü; SREBP-1c ve PPAR-alfa, lipogenezin anahtar enzimlerini aktive eder ve karaciğerde serbest yağ asidi sentezini artırır. İkinci aşamada, yağ asitlerinin mitokondriyal beta-oksidasyonu ve endoplamik retikulum stresi yoluyla oksidasyon stresi nedeniyle reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi artar ve bu da lipid peroksidasyonuna yol açar. Lipid peroksidasyonu sitokinlerin (Fas ligandı, TNF-alfa, IL-8 ve TGF) üretimine neden olarak hücre ölümünü, inflamasyonu ve fibrozisi teşvik edebilir. Endoplamik retikulum stresi, TNF-alfa ve FAA'lar tarafından indüklenen JNK'nin aktivasyonu sitokin üretimini ve HCC'nin başlatılmasını da teşvik eder. HCC'da tekrarlayan mutasyona uğramış genlerin, telomer bakımı, TP53, hücre döngüsü düzenlemesi, Wnt/beta-katenin yolu (CTNNB1 ve AXIN1), fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K)/AKT/ rapamisin memeli hedefi (mTOR) dahil birçok temel yollarında bulunduğu görülmektedir (Şekil 2.3). Ayrıca tam ekzom dizilimini kullanan son çalışmalar, kromatin yeniden yapılanmasında (ARID1A ve ARID2) ve oksidatif stres (NFE2L2) yollarında yer alan yeni sürücü genlerde tekrarlayan mutasyonları ortaya çıkarmıştır (KEGG, 2024).



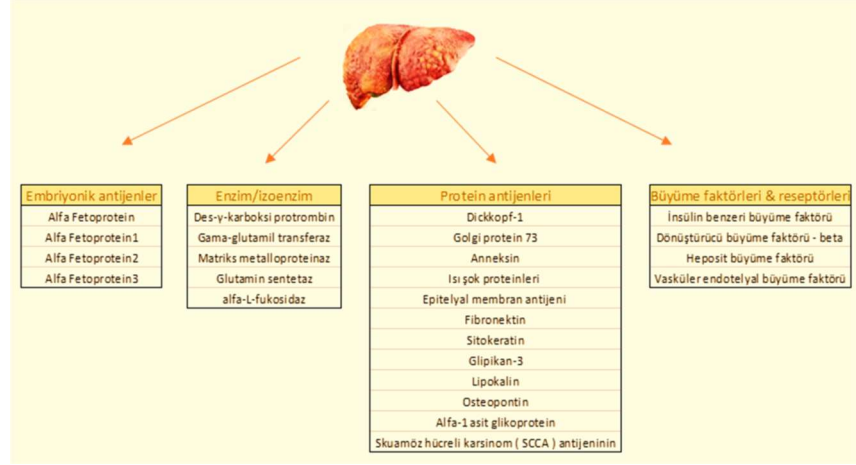
Şekil 2.3. Hepatoselüler karsinom (HCC) KEGG sinyal yolağı (KEGG, 2024)

2.1.2 HCC ve biyobelirteçler

Biyobelirteçler, normal biyolojik sürecin, patolojik sürecin ve tedaviye verilen farmakolojik yanıtların değerlendirilmesinde objektif olarak ölçülen anatomik, serolojik veya fizyolojik göstergelerdir. Biyobelirteçler ilaçların, biyolojik ürünlerin ve bazı tıbbi cihazların geliştirilmesi için oldukça önemlidir. Hastalık tanısı, hastalık evrelendirmesi, risk belirlenmesi, hastalık prognozu, tedavi değerlendirmesi, tedavi izlemi, populasyon taraması için kullanılmaktadır. Biyobelirteçler klinikteki kullanım alanlarına göre; diagnostik (teşhis), prognostik (tedavi), prediktif (öngörücü) ve farmakodinamik olarak sınıflandırılmaktadır (Louie et al., 2021). Ayrıca, BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource yedi biyobelirteç kategorisini tanımlar: 1) Duyarlılık/risk: Belirgin bir hastalığı veya tıbbi durumu olmayan kişide bir hastalık veya tıbbi durumun gelişme potansiyelini gösteren bir biyobelirteçlerdir. 2) Teşhis: Bir hastalığın veya ilgilenilen durumun varlığını tespit etmek veya doğrulamak veya bireyleri tanımlamak için kullanılan bir biyobelirteçlerdir. 3) İzleme: Bir hastalığın veya tıbbi durumun değerlendirilmesi veya tıbbi ürün, çevresel bir maddeye veya etkisine maruz kalma kanıtını belirlemek için ölçülen biyobelirteçlerdir. 4)

Prognostik: Hastalarda ilgilenilen hastalık veya tıbbi duruma göre klinik bir olayın, hastalığın tekrarlamasının veya ilerlemesinin olasılığını belirlemek için kullanılan bir biyobelirteçtir. 5) Öngörücü: Tıbbi bir ürün ya da çevresel bir maddeye maruz kalmanın olumlu veya olumsuz bir etkisine maruz kalma, biyobelirteçe maruz kalmayan muhtemel olan bireyleri tanımlamak için kullanılan biyobelirteçlerdir. 6) Farmakodinamik/yanıt: Bir tıbbi ürüne veya çevresel bir ajana maruz kalmadan önce veya sonra ölçülen bir biyobelirteçtir. 7) Güvenlik: Bir tıbbi ürüne veya çevresel bir maddeye maruz kalmadan önce veya sonra ölçülen olumsuz bir etki olarak toksisitenin olasılığı, varlığı veya kapsamı için kullanılan biyobelirteçtir. Farklı bir sınıflandırma ile Tip 0 biyobelirteçler; bir hastalığın klinik belirtilerini yani doğal seyrinini ve zaman içinde bilinen klinik göstergelerle korelasyonu gösterirken, Tip I biyobelirteçler; Müdahale/İlaç aktivite belirteçleri olup terapötik bir ilacın müdahale etkisini (HbA1c vb.) belirtirken, Tip II biyobelirteçler ise ikame son nokta belirteçleri olup epidemiyolojik, patofizyolojik, terapötik veya diğer bilimsel kanıtlara dayalı klinik yarar/zarar tanımlayan belirteçler olarak kabul edilir (Naylor, 2003). Belirteçlerin belirlenmesi ve tanımlanması için genomik (DNA, Tek Nükleotid Polimorfizmi), transkriptomik (RNA ekspresyon profilleri), proteomik (protein profillerinin analizi) ve metabolomik (metabolit analizler) yaklaşımlardan faydalanılır.

HCC'un teşhisi ve sürveyansı invazif (karaciğer doku biyopsisi) ve noninvaz (görüntüleme, kan testi, mikrobiota analizleri) değerlendirme ile yapılmaktadır. HCC'de yaygın olarak kullanılan invaziv olmayan biyobelirteçler, vücut sıvısı örneklerinden (plazma, serum, idrar, feçes) tespit edilen, Alfa-fetoprotein (AFP), AFP-L3, des-γ-karboksi protrombin (DCP) ve yakın zamanda belirlenen 5-hidroksimetilsitozin'dir (Pan et al., 2020). Hastalığın teşhisi ve prognozunda kullanılabilen başlıca invaziv biyobelirteçler; Golgi protein-73 (GP73), Glikan 3 (GPC-3), Alfa-1 fukosidaz (AFU), ve Skuamöz hücreli karsinom antijen (SCCA) gibi protein yapısındaki moleküller (Bruix et al., 2017; Omar et al., 2023) ile tümör hücreleri, hücresiz DNA bütünlüğü, somatik mutasyonlar, hücresiz tümör DNA metilasyonu ve dolaşımdaki RNA'lar, AFP mRNA, gamma glutamil transferaz mRNA, toll like reseptör mRNA'lardır. Biyokimyasal yapısına göre invaziv HCC biyobelirteç sınıflandırması Şekil 2.4'de verilmiştir. Bu yöntemlerle HCC'yi tanımlamak yetersiz kalırsa, karaciğer biyopsisi ile immunohistolojik değerlendirme yapılmaktadır.



Şekil 2.4. Biyokimyasal Yapısına Göre HCC Biyobelirteç Sınıflandırması
(Omar M.A. et al., 2023)

HCC kanser tipinin doğası göz önüne alındığında, hastalığın karmaşıklığı ve risk faktörlerinin çeşitliliği nedeniyle HCC hastalarının tanı için tek ve evrensel bir biyobelirteç tanımlamak zordur. Bilinen belirteçlerin özgüllük ve duyarlılık açısından HCC için tanısal performansta hala yetersiz olduğu görülmektedir ve ilgili belirteçlere ait validasyon çalışmaları halen devam etmektedir (Elmas et al., 2022). 2019'da Cai ve arkadaşları, dolaşımdaki hücreli DNA'yı kullanarak invazif olmayan 5-hidroksimetilsitozin belirtecinin HCC tanısı için uygun bir belirteç olduğunu araştırmışlardır. Hatta HCC'un erken tespiti için bazı belirteçlerin diğer belirteçlerle kıyaslamalarına ilişkin çalışmalar da mevcuttur. 2020'de Ali ve arkadaşları, dolaşımdaki golgi protein 73'ün HCC tanısında AFP'e karşı daha uygun bir belirteç olduğunu araştırmışlardır. Parikh ve arkadaşları (2020) biyobelirteçlerin tam bir biyobelirteç olarak tanımlanması için duyarlılık ve özgüllük değerlerinin hesaplanması ve validasyon çalışmalarının yapılması gerektiğini vurgulayarak, HCC erken tanısında kullanılan AFP, DCP, MDK, DKK1, AFU, GP-3, SCCA, Osteopontin biyobelirteçlerini duyarlılık, kesinlik değerleri ve biyobelirteç validasyonu faz çalışmalarına göre sınıflandırmışlardır.

2.1.3 HCC tedavisinde kullanılan ilaç taşıyıcı sistemler ve doksorubisin

İlaç taşıyıcı sistem nanopartikülleri (NP'ler), 10-500 nm çapında, ilaç etken maddeleri çözünme veya enkapsülleme yoluyla içine alan veya adsorpsiyon ya da birleştirme yoluyla yüzeyinde tutan partiküllerdir (Manzari et al., 2021). Geleneksel ilaçlarla karşılaştırıldığında NP'ler normal dokularda tümörlü bölgelere göre daha

az ilaç salınımı yaparken, tümör bölgelerinde ilaç salınımını artırıp, ilaç etkinliğini güçlendirmek ve ilaç stabilitesini korumak için tasarlanmıştır (Almeida et al., 2017; Usmani et al., 2018; Pan S. et al., 2018). NP'ler spesifik tanıya, ilaç dağıtımının gerçek zamanlı izlenmesine ve daha az yan etki ile tedaviye olanak sağlamıştır. 1995 yılında FDA, kemoterapötik bir ilaç olan Doksorubisin içeren lipozomlardan oluşan ilk nanopartikül ilaç formülasyonu Doksorubisinil'i onaylamıştır. Bu ilaç formu; toksisiteyi azaltarak kemoterapötiklerin farmakokinetik ve biyodağılım özelliklerinin iyileştirilmesinin önemini göstermiştir. Çalışmada serbest doksorubisin kardiyotoksitesisi kardiyomiyopati ile sonuçlanırken, pasif olarak hedeflenmiş bir lipozomal formülasyonun uygulanması toksisiteyi hafifleterek kalp üzerindeki olumsuz etkileri önlemiştir (Gabizon et al., 2003). Bu kapsamda, literatürleri incelediğimizde doksorubisin için eksozom aracılı ilaç dağıtım sistemleri (Yongle et al., 2018), altın nanopartikül ile kaplama (Zhang et al., 2020), kitosan ile modifiye edilmiş nanoboyutlu peptit kullanımı (Wang et al., 2021), manyetik poli(laktik-ko-glikolik asit) kullanımı (Mosafer et al., 2017) gibi etkin bir tedavi sağlayabilecek çeşitli ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarlandığı görülmektedir. HCC'da hedefe yönelik çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler ile tedaviler tasarlanmış, Doksorubisin gibi etken madde yüklü çeşitli termal duyarlı lipozom ve suda çözünmeyen polimer gibi nanoyapılara ait faz çalışmaları yapılmış olsa da (Yang et al., 2022), HCC tümörlerinin çoğu klinik olarak tedavi edilebilir mutasyonlara cevap vermemektedir. HCC tedavisinde ilaç ya da ilaç taşıyıcı sistem tasarımındaki en büyük zorluk, sınırlı mutasyonlara cevap verebilen ilaçların tasarlanmasıdır.

Kanser ilacının ilaç taşıyıcı sistemden salınım mekanizmaları fiziksel, aktif ve pasif hedefleme olarak sınıflandırılmaktadır. Fiziksel hedeflemede nano ilaç taşıyıcı sistemlerin dış etkenlerle belirli bir hedef bölgeye yönlendirilmesi mümkündür. Fiziksel hedefleme için radyasyon ve manyetik alanlar gibi harici uyarımlar kullanılır. Harici mıknatıslar kullanılarak, bazı süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller fiziksel hedefleme için çalışılmıştır. Örneğin; polietilen glikol fosfolipidler ile modifiye edilmiş Mn-Zn ferrit nanosistem sentezlenmiş ve uygulamanın belirli bir süre boyunca tümör büyümesini baskılayabildiği bildirilmiştir (Xie et al., 2014).

Aktif hedefleme de ise nano-sistem hedefi tanır, hedefe bağlanır ve son aşamada kontrollü ilaç salımı gerçekleştirilir, ilacın kanser hücrelerinde, intrasellüler organellerde veya spesifik moleküllerde birikimi sağlanır. Yapılan çalışmalarda nanosistemlerin yüzeyine modifiye edilmiş folik asit, transferrin,

arginin-glisin-aspartat (RGD/integrin reseptörü), laktobiyonik asit (akialoglikoprotein reseptörü) ve aptamer ligandları gibi moleküller aktif hedefleme ajanları olarak kullanılmıştır (Dutta et al., 2021).

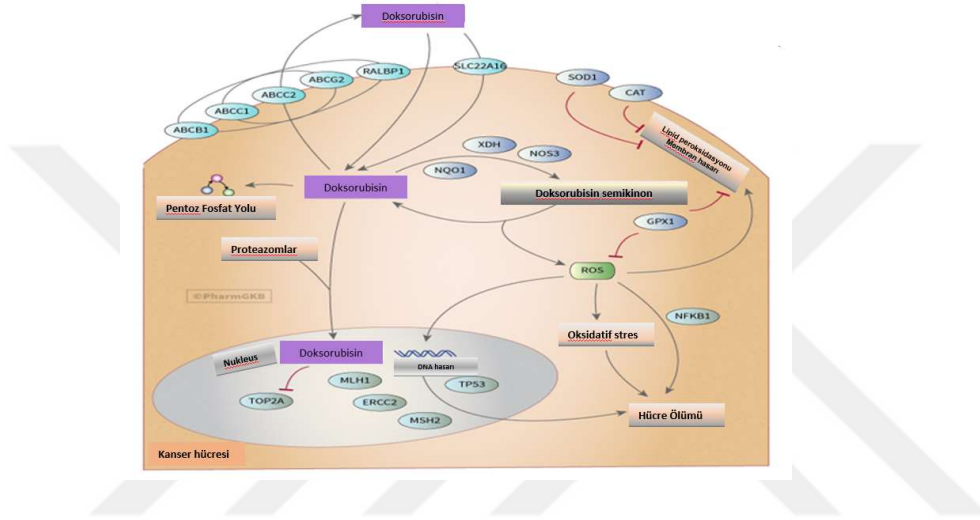
Pasif hedeflemede ise artan geçirgenlik ve alıkonma etkisi etkileri ile ilaç hedef hücrelere taşıyabilir ve hücre mikroçevresindeki değişiklikler (pH, redoks veya enzimatik) yoluyla ilaç salınımı gerçekleşir (Tsujimoto et al., 2021).

Streptomyces peucetius'tan elde edilen antineoplastik antibiyotik olan Doksorubisin karaciğer kanseri hücreleri üzerindeki etki mekanizmaları; kanser hücresi üzerinde DNA'ya girmesi (interkalasyon) ile topoizomeraz-II aracılı DNA onarımını bozması ya da serbest radikallerin oluşumu ile DNA, hücresel yapılara zarar vermesidir (Gewirtz, 1999) .

Bilinen etki mekanizmaları; Doksorubisin, DNA sarmalındaki baz çiftleri arasına girerek DNA replikasyonunu önler ve sonuçta protein sentezini inhibe eder. Ek olarak doksorubisin, topoizomeraz II'yi inhibe eder; mekanizma şu şekildedir: DNA replikasyonu sırasında artan ve stabilize edilmiş bölünebilir enzim-DNA bağlantılı kompleksle sonuçlanır ve ardından çift sarmal kırılmasından sonra Doksorubisin ayrıca kovalent topoizomeraz II kompleksi oluşumu ile nükleotid sarmalının ligasyonunu önler. Böylece DNA replikasyonunda DNA iplikleri ligasyonunun inhibisyonuna yol açar. Topoizomeraz II aracılı DNA hasarını hücre ölümü takip eder. Tümör baskılayıcı gen olan TP53'ün ayrıca bu doksorubisin-apoptoz yolunda rol oynadığı gösterilmiştir (Perego et al., 2001).

Doksorubisin aynı zamanda hücre zarı lipitlerinin lipid peroksidasyonuna ikincil olarak sitotoksositeye yol açan oksijensiz radikaller oluşturur; doksorubisin, bir doksorubisin-semikinon radikali oluşturmak için çeşitli oksidoredüktazlar (endotelial nitrik oksit sentaz, NADH dehidrojenazları, NAD(P)H dehidrojenaz, ksantin oksidaz) tarafından indirgenir. Kinon halkası oksidasyona uğrayarak hidrojen peroksit ve diğer reaktif oksijen metabolitlerini üretir. Doksorubisin-semikinon radikalının Doksorubisin'e yeniden oksidasyonu ile oksidatif strese neden olan ROS ve hidrojen peroksit açığa çıkar (Minotti et al., 1998). ROS, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalazlar tarafından devre dışı bırakılabilir (Şekil 2.5) (Miyamoto et al., 2003; Thorn et al., 2011). Bazı araştırmacılar Doksorubisin serbest radikal oluşumunu sitotoksositeyle ilişkilendirmiştir; bu çalışmalar Doksorubisin hücresel direncini ROS'u devre dışı

bırakan enzimlerle ilişkilendirir. Doksorubisinin, NF-kB'nin (NFKB1, p50) aktivasyonu yoluyla ROS ve hidrojen peroksit oluşumu yoluyla tedavi edilen endotelial hücrelerde ve miyositlerde apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir. Ancak NF-kB'nin aktivasyonu, doksorubisin ile tedavi edilen kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü bloke etmiştir (Wang et al., 2022). Bu da sitotoksosite ve kardiyotoksosite için olası farklı bir mekanizmaya işaret etmektedir. Gewirtz (1999), serbest radikal oluşumunun rolünün öncelikle sitotoksositeyle değil kardiyotoksositeyle ilişkili olduğunu ileri sürmüştür.



Şekil 2.5. Kanser hücresinde doksorubisinin etkisine katılan aday genlerin temsili şeması (Thorn et al., 2011; Whirl-Carrillo et al., 2021).

2.2 Proteomik

Proteomik; belli bir zaman (farklı gelişim süreçleri, çevresel etmenler, çeşitli hastalıklar, yaşlılık gibi süreçler) ve yerde (farklı proteinlerin farklı hücre kompartmanlarında hücre, doku, vücut sıvısı ve farklı hücre tiplerinde) bulunan proteinlerin yapılarını, miktarlarını, doku ve hücrelerdeki işlevlerini, yerleşimlerini, translasyon sonrası modifikasyonlarını ve diğer proteinlerle ya da makro moleküllerle olan etkileşimini açıklar. Proteom deneyleri ve veri analizinin birleşimi olarak proteomik, protein bileşimini, yapısını, ifadesini, modifikasyon durumunu ve proteinler arasındaki etkileşimleri ve bağlantıları genel düzeyde kalitatif ve kantitatif verilerle analiz eder (Wilhelm et al., 2014). Proteomiks sonuçlar hem hücre üzerindeki genetik etkiyi hem de hücre ortamının etkisini ifade eder. Proteomik tabanlı profil oluşturma, transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası kontrol, translasyon sonrası modifikasyonlar ve ekspresyon değişikliklerinin

tanımlanmasına yardımcı olur. Bu yüzden, genomik ve transkriptomiğe tamamlayıcı bilgiler sunar. Aynı zamanda hücre çoğalması, farklılaşması, yaşlanma ve apoptoz gibi temel yaşam aktivitelerini doğrudan kontrol eden karmaşık, birbirine bağlı yolların ve moleküler sistemlerin bir haritasını oluşturmak için de gereklidir.

Genel ifade olarak proteomik yapısal proteomiks, fonksiyonel (konvansiyonel) proteomiks ve ekspresyonel (kıyaslamalı/karşılaştırmalı) proteomiks gibi çeşitli yaklaşımlar ile sınıflandırılmaktadır (Al-Amrani et al., 2021). Yapısal proteomikte proteinlerin üç boyutlu yapısı, multi protein yapıları, fonksiyonel (konvansiyonel) proteomikte; proteinlerin lokasyonu, protein-protein veya protein-DNA/RNA etkileşimlerini etkileşimi, modifikasyonu ve proteinlerin fonksiyonları, ekspresyonel (kıyaslamalı) proteomikte ise; proteinlerin ekspresyon düzeyleri iki farklı durum arasındaki (sağlıklı / hasta, yaşlı / genç vb.) ekspresyonun karşılaştırılması incelenir. Kanser gibi çeşitli protein ekspresyonunda değişikliklerin etkin olduğu durumlarda hastalığın erken tanı ve/veya tedavisinde kullanılabilecek biyobelirteçlerinin belirlenmesinde ekspresyonel (kıyaslamalı) proteomiks yaklaşımından faydalanılır.

Kütle spektrometrisinin (MS) bir dizi ayırma yöntemiyle birlikte kullanılması, proteomik için ana temel metodolojidir. MS kullanarak proteinleri tanımlamak ve karakterize etmek için iki temel yaklaşım kullanılmaktadır. Bunlar peptidleri proteolitik parçalama yoluyla analiz eden “aşağıdan yukarıya” ve intak proteinleri analiz eden “yukarıdan aşağıya” yaklaşımlardır.

Yukarıdan aşağıya proteomikte protein, hücre veya doku lizatlarından ekstrakte edilir, jel veya genellikle sıvı kromatografisi (LC) ile ayrılır ve post translasyonel modifikasyon (PTM) ve sekans varyasyonları dahil tüm proteoformların tam bir görünümü için doğrudan MS ile analiz edilir. Daha sonra, belirli bir proteoform, veri tabanı araştırması yoluyla proteini tanımlamak ve PTM'leri lokalize etmek için kullanılabilecek sekans bilgisini elde etmek üzere MS/MS tarafından izole edilebilir ve parçalanabilir (Fornelli et al., 2018).

Aşağıdan yukarıya proteomikte hücrelerden veya dokulardan ekstrakte edilen proteinler tripsin, endoproteinazlar Glu-C ve Lys-C vb. enzimler ile proteolitik parçalamaya tabi tutulur ve elde edilen peptitler, LC kullanılarak ayrılır ve MS tarafından analiz edilir. Daha sonra, en bol peptitler parçalanır ve peptit sekansı

bilgisi, numunede mevcut proteinleri tanımlamak ve bunların PTM'lerini haritalamak için kullanılır, ancak eksik sekans kapsamı bu yöntemle PTM analizini engelleyebilir. Büyük ölçekli PTM çalışmasına uygundur, ancak sınırlı dizi kapsamı ile numune hazırlama, numunenin enzimatik parçalanması sırasında peptit kaybından kaynaklanan PTM arasındaki bağlantı kaybı bu tekniği sınırlandırmaktadır.

Protein tanımlamasında yukarıdan aşağı proteomikte özellikle yüksek sekans benzerliğine sahip protein izoformlarının tanımlanması yapılabilir ancak nispeten daha düşük verim sağlayan proteinler için daha güvenilir protein tanımlaması sunar. Ayrıca yukarıdan aşağıya MS için protein ayırma stratejilerinin ve biyoinformatik araçlarının az gelişmiş olması, geleneksel olarak bu yöntemin verimini sınırlayarak büyük ölçekli protein tanımlamayı zorlaştırmıştır (Gregorich et al., 2014). Aşağıdan yukarıya proteomik yaklaşım ise protein tanımlamasında mevcut olan daha iyi biyoinformatik araçlarla protein tanımlamaya yönelik daha sağlam ve yüksek verimli analiz sağlar (Zhang et al., 2013). Yukarıdan aşağı proteomik yaklaşımda intak protein üzerinden analiz yapılması nedeniyle enzimatik parçalama prosesi uygulanmaz ancak nispeten daha pahalı ve karmaşık iyon analizi gerçekleştirilir.

Aşağıdan yukarıya proteomik yaklaşım ile proteinlerin hem bağıl hem de mutlak niceliklendirilmesi için üç genel nicelik belirleme stratejisi geliştirilmiştir; kimyasal etiketleme, metabolik etiketleme veya etiketsiz ölçüm. Prototip kimyasal etiketleme stratejisi izotop kodlu afinite etiketlerini (iCAT) içeren kimyasal etiketleme stratejilerinde, farklı deneyleri temsil eden hücre veya doku lizatlarından proteinleri etiketlemek için “ağır” veya “hafif” izotoplar içeren tiyol veya amin reaktif etiketler kullanılır. MS modunda etiketli peptitler için sinyal yoğunluklarının doğrudan karşılaştırılmasıyla göreceli nicelik elde edilir (Ong ve Mann, 2005).

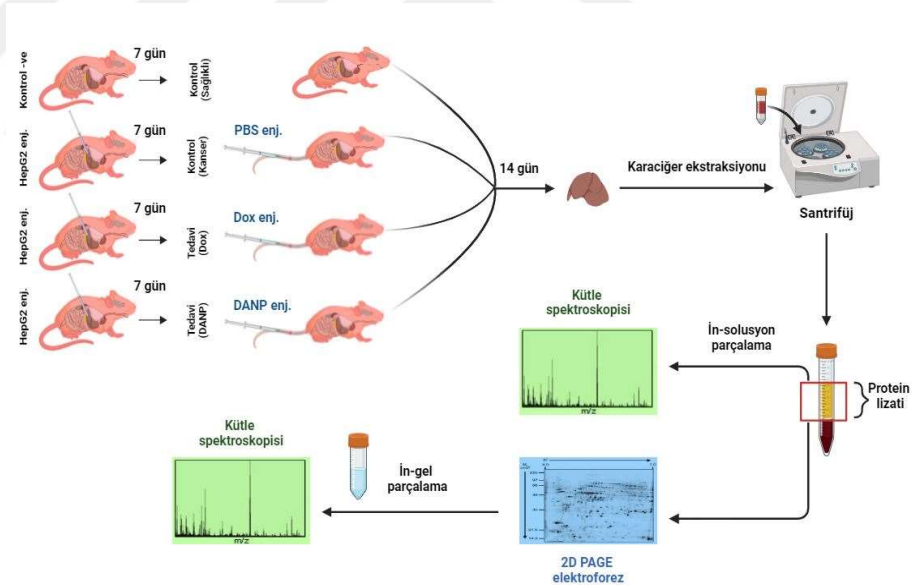
MS/MS modunda niceliksel verilerin elde edildiği kimyasal etiketleme stratejisinde göreceli ve mutlak kantitatif izobarik işaretleme (iTRAQ) ve tandem kütle etiketleri (TMT) için izobarik etiketleri içeren izobarik kütle etiketleme stratejileri, etiketli peptidlerin parçalanmasının ardından salınan iyonların sinyal yoğunluklarının doğrudan karşılaştırılmasına dayanır.

Hücre kültüründeki amino asitler tarafından stabil izotop etiketleme (SILAC) ile örneklendiği gibi metabolik etiketleme stratejisinde kimyasal etiketler yerine ağır ve hafif stabil izotoplarla etiketlenmiş amino asitler (tipik olarak lizin veya

arginin) kullanılır ve hücresel proteinlerin etiketlenmesi, hücrelerin etiketli amino asitlerle desteklenmiş ortamda kültürlenmesiyle elde edilir. Protein türlerinin göreceli ölçümü her ne kadar metabolik olarak etiketlenmiş numuneler sağlam hücreler seviyesinde birleştirilebilse de, bu da bu stratejiyi kimyasal etiketleme stratejilerine göre numune hazırlama sırasında ortaya çıkan hatalara daha az eğilimli hale getirir ve metabolik etiketleme hücre kültürüyle sınırlıdır (Addona et al., 2011).

Etiketsiz ölçüm iki ayrı kategoriye ayrılabilir: MS analizinden önce protein ölçümü için 2DGE kullanan stratejiler ve belirli bir protein için elde edilen parçalanma spektrumlarının sayısını (spektral sayım) veya öncül iyonların yoğunluğunu kullanan stratejiler (Langley et al., 2013).

Aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya yaklaşımları kullanarak proteinlerin/peptitlerin hem göreceli hem de mutlak miktarının belirlenmesi için çok sayıda strateji mevcuttur. Çalışmamızda aşağıdan yukarı proteomik yaklaşımın jel bazlı ve solüsyon bazlı iki farklı stratejisi uygulanmıştır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Tez çalışmasına ait uygulanan aşağıdan yukarıya proteomik yaklaşımların şematik gösterimi

2.2.1 Proteomik yaklaşımda kullanılan temel teknikler

Proteomik, genomik sonrası dönemde teknolojinin gelişimi ile ortaya çıkan hesaplamalı ve istatistiksel modellerle birlikte son on yılda büyük gelişim

göstermiştir. Kütle spektrometresinin keşfi ile başlayan süreçte yine kütle spektrometresi başta olmak üzere ; protein yolu dizisi, yeni nesil doku mikrodizileri, tek hücreli proteomik, tek moleküllu proteomik, Luminex, Simoa ve Olink Proteomik dahil olmak üzere mevcut ve yeni ortaya çıkan hesaplama yöntemlerini ve istatistiksel algoritmaları içeren yüksek verimli proteomik yaklaşımlar literatüre eklenmiştir (Cui et al., 2022). Protein karakterizasyonu için kullanılan güvenilir ve doğrulanmış yöntemler, protein biyobelirteçlerini tanımlamanın anahtarıdır. Yaygın olarak kullanılan en temel üç teknik kompleks protein veya peptit numunelerinin ayrılması için kullanılır: İki Boyutlu Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (2D SDS-PAGE), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Kütle Spektrometri (MS).

2.2.1.1 İki boyutlu sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (2D SDS-PAGE)

2D SDS-PAGE binlerce proteini aynı anda boyutlarına göre ayırma imkanı sunan ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Normalde, proteinler çözelti içindeyken, amino asit bileşimlerine bağlı olarak net bir pozitif veya negatif yük taşırlar. Tek boyutlu ayırmada (1D elektroforez) İzoelektrik nokta (pI), bir proteinin net yükünün sıfır olduğu pH seviyesini ifade eder. Bu özellik, numuneyi belirlenmiş bir pH gradyanından (genellikle bir tüp veya şerit jel içinde) örneğin IPG jellerden geçirerek protein karışımını ayırmak için kullanılabilir. Bir protein ilgili pI'sine ulaştığında belirli bir pH noktasında odaklanır ve bu işlem izoelektrik odaklama (IEF) olarak adlandırılır. IEF sonunda tek boyutlu (1D) ayırım sağlanmış olur.

1D elektroforez özellikle biyobelirteçleri keşfetmek ve geliştirmek için karmaşık protein karışımlarının derinlemesine analizi için yeterli değildir. IEF, SDS-PAGE ile birleştirmek, proteinleri sırasıyla yük ve boyuta göre ayırmayı sağlar. Bu iki boyutlu yöntem; 2D SDS-PAGE, tek bir analitik çalışmada binlerce proteini çözme kabiliyeti nedeniyle uzun süredir proteomikte kullanılan yöntemdir. Birinci boyutta IPG şeritleri (izoelektrik gradient jel) üzerinde izoelektrik noktalarına göre ayrıştırılan proteinler, SDS poliakrilamid jeline uygulanır ve birinci boyuta dik bir yönde proteinler boyutuna (molekül ağırlığı) göre ayrılır. Protein karışımı numuneler, disülfid bağlarını parçalamak için bir denatüre edici ajan ve numunedeki proteinlere tek tip bir net negatif yük vermek için bir deterjan SDS ile muamele edilir. İkinci boyut jelinin gözenekleri, proteinleri boyutlarına göre elekten geçirir çünkü SDS, tüm proteinleri esas olarak kütleleriyle orantılı olarak negatif bir yükü kaplar. Net etki, proteinlerin, hareketliliğin logaritmik olarak kütleyle ilişkili

olduğu, tekdüze bir negatif yük-kütle oranına sahip elipsoidler olarak göç etmesidir (BIORAD, 2024).

Katlanmamış ve negatif yüklü proteinlerin, uygulanan bir elektrik akımı ile bir jel matrisinden (yani poliakrilamid) geçmesine izin verilir, bu da daha küçük proteinlerin daha az direnç nedeniyle daha hızlı göç etmesine neden olur.

Elektroforezi takiben, ayrılan proteinler, jelin görüntülenmesi için özel boyalar (Coomassie mavisi, Ruby vb.) ile boyanmasıyla görselleştirilir ya da yeni nesil boyasız jeller ise geliştirilmiş görüntüleme sistemlerinde boyanmadan görüntülenebilir. Analiz amacına göre istenildiğinde immünoiblottlama için bir membran üzerine elektroblotlanabilir veya MS gibi tekniklerle daha ileri analiz için kullanılabilir.

2D-PAGE yaygın olarak kullanılmasına rağmen, sınırlamaları vardır. Örneğin, bazı yüksek asidik veya bazik proteinlerin ayrılması zordur ve düşük bolluktaki proteinler kolayca tespit edilemez. Daha çok protein profili çıkarma, diferansiyel görüntüleme (biyobelirteç keşfi), protein fonksiyonu (protein posttranslasyonel modifikasyon) için kullanılmaktadır.

2.2.1.2 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

Proteomiks kapsamında proteinler ve peptitler gibi küçük ve büyük boyutlu biyomoleküller, boyut, şekil, yük ve hidrofobik gruplara dayalı olarak karmaşık bir karışımdan Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile ayrılabilir. MS ile kombine kullanımı binlerce protein bileşiğinin ayrılması, saflaştırılması/tanımlanmasını sağlar.

HPLC sistemi, sabit faz olarak adlandırılan, polar olmayan (hidrofobik) genelde silika bazlı tanecikler dolu bir kolondan, basınç oluşturan ve polar mobil fazı kolon boyunca hareket ettiren bir pompadan ve alıkonma süresini tespit eden bir detektörden oluşur. Hareketli fazda çözünen örnek kolondan yüksek basınç altında geçirilerek, ayrıştırılır ve/veya saflaştırılır. Örnek cinsi ve kolon cinsine göre afinite kromatografisi, boyut dışlama kromatografisi (SEC) ve ters faz sıvı kromatografisi (RPLC), iyon değiştirme kromatografisi teknikleri uygulanabilir. Güçlü katyon değişim (SCX) kromatografisi genellikle ilk ayırma adımı olarak kullanılır ve RPLC, tuzları uzaklaştırma kabiliyeti ve elektrosprey iyonizasyon

(ESI) yoluyla kütle spektrometresi ile uyumluluğu nedeniyle ikincil ayırma adımı olarak kullanılır (Lee et al., 2006). SCX'in RPLC ile kombinasyonu, çok boyutlu protein tanımlama teknolojisi (MudPIT) yaklaşımının temelini oluşturur ancak daha büyük numune miktarları ve daha fazla analiz süresi gereksinimi mevcuttur (Washburn et al., 2001).

HPLC, yüksek çözölleme gücü, tekrarlanabilirlik ve geniş dinamik aralığa sahip bir teknolojiyi temsil eder ve güçlü bir proteomik iş akışı oluşturmak için kütle spektrometresi ile birleştirilebilir (Karpievitch et al. 2010).

2.2.1.3 Kütle spektrometresi (MS)

Kütle spektrometresi (MS), proteomiks yaklaşımında; bir proteinin ve translasyon sonrası modifikasyonlar (PTM) bölgelerinin amino asit dizisini belirlemek için kullanılabilen protein karakterizasyon tekniğidir. MS yüklü molekülleri kütle-yük oranlarına (m/z) göre ölçer; peptidler önce iyonize edilir, kütle analizörü molekülleri kütle-yük oranlarına göre karakterize eder ve yüklü peptidlerin sinyal yoğunlukları miktarı yansıtır. Yüksek verim kapasitesine sahip az miktar numunede kantitatif analiz gerçekleştirilen yöntemdir. Fosforilasyon, metilasyon, glikosilasyon, ubikuitinilasyon ve asetilasyon gibi birçok PTM kütle spektrometresi ile tespit edilebilir. MS bazlı proteomik, proteinlerin, etkileşimlerinin ve modifikasyonlarının kantitatif profilinin çıkarılması için en kapsamlı yaklaşımdır. Karşılaştırmalı proteomik çalışmalarında gerek proteinlerin jelden, gerek ise lizattan enzimatik parçalama sonrasında karakterizasyonu kütle spektrometresi ile gerçekleştirilmektedir. MS tabanlı proteomik, kanser, nörodejenerasyon, kalp ve böbrek bozukluğu gibi karmaşık hastalıkların tedavi seyrinin izlenmesi için plazma, beyin veya karaciğer dokusu gibi karmaşık biyolojik örneklerden biyobelirteç keşfi sağlamaktadır (Crutchfield et al.,2016) Ayrıca, kütle spektrometresi her zaman araştırmacıların hangi proteinleri aradıklarını önceden bilmelerini gerektirmez, bu da bu tekniği biyobelirteç keşfi ve karakterizasyonu için çok daha uygun hale getirir.

Kütle spektrumu, m/z oranının bir fonksiyonu olan iyon sinyallerinin grafiğidir. Bu spektrumlar, bir numunenin izotopik parmak izini, parçacıkların ve moleküllerin kütlelerini belirlemek ve moleküllerin kimyasal yapılarını ortaya çıkarmak için kullanılır.

MS sistemi bir iyonlaşma kaynağı (ESI, APCI vb.), kütle analizatörü (uçuş süresi (TOF), Fourier dönüşümü iyon siklotron rezonansı (FT-ICR) ve Orbitrap) ve iyon dedektörü bileşenlerinden oluşmaktadır. Peptidler N_2 , He veya Ar gibi inert gazlarla çarpışma yoluyla parçalanır. Bu onların en düşük enerji bağlarında (tipik olarak amino asit kalıntıları bağlayan bazı amid bağları (peptit bağları)) parçalanmalarına neden olur. Proteinlerin ve peptitlerin iyonizasyonu, m/z oranlarına göre kütle analizörü tarafından ayrılan yüklü gaz iyonları üretir. Temel olarak tüm iyonlar, elektrik alanlarındaki yörüngeleri modüle edilerek ayrılır. Kütle analizörleri iyonları ayırmak için kullandıkları prensipte farklılık gösterir ve bu onların tercih edilen uygulama alanlarını belirler. Genellikle uçuş süresi (TOF) veya Orbitrap analizörleri ile birleştirilen dört kutuplu (quadrapol) kütle analizörleri, paralel bir düzenlemedeki dört silindirik çubuk arasındaki salınımlı bir elektrik alanını kullanarak iyonları ayırır; burada her bir çubuk çifti, faz kaymalı bir radyo frekansı elektrik alanı üretir. Ortaya çıkan elektrik alanları tüm iyonların iletilmesine veya belirli bir m/z penceresinin iyonlarının seçici olarak iletilmesine izin verir.

TOF kütle analizörleri iyonları, yaklaşık 20 kV'a kadar hızlanma sonrasındaki hız farklılıklarına ve ardından dedektöre farklı varış zamanlarına göre ayırır. TOF, mikrosaniyenin altındaki zaman farklarını tespit ederek ppm oranındaki kütle farklarını ölçebilir. Buna karşılık Orbitrap kütle analizörü iyonları salınım frekanslarına göre ayırır. İyonlaşma sonrası iyonlar Orbitrap'te tutulur ve merkezi metal milin uzunluk eksenini boyunca hareket ederler. Orbitrap yalnızca birkaç santimetre uzunluğunda olmasına rağmen iyonlar hızla birkaç kilometreye kadar hareket edebilir, bu da çok yüksek çözünürlük ve düşük ppm kütle doğruluğu sağlar. Orbitrap analizörlerinde hızla salınan iyonlar tarafından indüklenen görüntü akımı ölçülür ve akım, zaman alanına kaydedilir ve Fourier dönüşümü kullanılarak frekans alanına dönüştürülür. Elde edilen sonuçlar m/z oranının bir fonksiyonu olan iyonların bağıl çokluğu/abundans spektrumları şeklinde görüntülenir.

Bu teknikte, biyolojik numunelerden alınan proteinler izole edilir ve kütle spektrometresine girmek üzere LC ve elektrosprey iyonizasyonu ile ayrılmadan önce, en yaygın olarak trypsin ile enzimatik olarak peptitler halinde parçalanır. Peptit tanımlama, MS1 spektrumundaki öncül iyonların m/z belirlenmesi, bir çarpışma hücresindeki öncül iyonların seçimi ve parçalanması, ardından MS2 spektrumları çarpışmadan üretilen ürün iyonlarının m/z'sinin belirlenmesi yoluyla

gerçekleşir. Son olarak, protein tanımlaması, ilgili peptit verilerinin analizinden çıkarılır (Macklin et al., 2020).

Aşağıdan yukarı proteomik yaklaşımında etiketli/etiketsiz kütle spektrometresi ile karşılaştırmalı proteomik deneyleri protein tanımlama ve miktarının belirlenmesinde her zaman önemli olmuştur. Protein seviyelerindeki diferansiyel ekspresyonun tespit edilmesi, önemli biyolojik mekanizmalar hakkında bilgi vermektedir. Doğrulama deneylerinin yüksek maliyetli oluşu istatistiksel yöntemlerle ilgilenilen proteinlerin analizlenmesinde önem teşkil etmektedir. Etiketli ve etiketsiz kantifikasyon metodunun birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Etiketli sıvı kromatografisi kütle spektrometresi (LC-MS) metodunun gen ürün kopyalarının tanımlanması, karmaşık bileşenlerin büyük ölçekli analizi, yüksek doğruluk sağlaması gibi avantajlarının yanında farklı örneklerde farklı iyonlaşma verimliliği, hassasiyet ve çözünürlükte değişkenlik, kimyasal etiketlemedeki zorluklar gibi dezavantajları bulunmaktadır. Etiketsiz sıvı kromatografisi kütle spektrometresi (nLC-MS) metodunun kimyasal müdahale olmadan örnek hazırlama, hata oranının azaltılması, çoklu istatistiksel doğrulama sunması ve nispeten düşük maliyetli olması gibi avantajlarının yanı sıra analiz sisteminin karmaşıklığı, hesaplamaların zaman alması, etiketleme yöntemi göre nispeten düşük doğruluk, çoklanmış analizin mümkün olmaması gibi dezavantajları mevcuttur (Kwon et al., 2021).

LC-MS başlangıçta küçük moleküller için geliştirildi, ancak aynı zamanda geniş fizikokimyasal özellik ve moleküler ağırlık aralığına sahip çeşitli protein türlerini karakterize etmek, peptitler halinde enzimatik parçalanmış proteinleri de tespit etmektedir için kullanılmaktadır (Manes ve Nita-Lazar, 2018).

Karşılaştırmalı proteomik çalışmalarında LC-MS/MS verileri genellikle MS/MS tanımlamasından elde edilen spektral sayım spektrumlar veya LC-MS verilerinden türetilen iyon bolluğu (abundans) şeklinde iki ölçümden biri veya her ikisi kullanılarak ölçülür. Mascot, SwissProt, NCBI, UniProt, MetaboScape, MassLynx gibi veritabanı araması sonucu elde edilen verilerde diferansiyel ifadeyi tespit etmek için Student t-testi, mikrodizilerin anlamlılık analizi (SAM), normalleştirilmiş spektral bolluk faktörü (NSAF), normalleştirilmiş spektral bolluk faktörü-güç yasası küresel hata modeli (NSAF-PLGEM), spektral indeks (SpI), DESeq ve QSpec. gibi spektral sayım ölçümü ya da iyon bolluğunun ölçümü gerçekleştirilmektedir. (Langley et al., 2015) Çoğu çalışmada spektral sayım

kullanılarak veri kümelerinin kolaylıkla görülememesi nedeniyle abundans ölçümünün daha hassas olduğuna dair değerlendirmeler mevcuttur (Milac et al., 2012).

ProteinChip teknolojisi olarak da bilinen yüzeyle geliştirilmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş süresi kütle spektrometresi (SELDI TOF-MS), biyobelirteç keşfinde yaygın olarak kullanılan başka bir kombinasyon yaklaşımıdır (Issaq et al., 2002). Bu yüksek verimli teknik, proteinleri fiziksel ve kimyasal özelliklere (hidrofobik, hidrofilik, asidik, bazik, yüzey afinitesi) göre ayırmak için farklı kromatografik yüzeylere sahip çipler kullanır. Kirleticileri ve bağlanmamış proteinleri uzaklaştırmak için bir yıkama adımını takiben, numune enerji emici bir matris ile kristalleştirilir ve TOF-MS ile analiz edilir. Minimum numune materyali gereklidir ve doku biyopsileri ve vücut sıvıları gibi ham numuneler kolayca analiz edilebilir. Ek olarak, teknoloji düşük moleküler ağırlıklı proteinlerin tespiti için yüksek hassasiyete sahiptir.

Antikor bazlı proteomikler, yüksek hassasiyete sahip çok sayıda proteinin profilini hızlı bir şekilde çıkarmak için immünolojik testlerin ve MS'in güçlü yönlerini içeren yaklaşım oluşturmak için MS yöntemleriyle de birleştirilebilir. Bu teknolojilere örnek olarak antikorla zenginleştirilmiş seçici reaksiyon izleme (SRM) ve afinite MS verilebilir (Weiss et al., 2015). Peptit zenginleştirmenin, afinite kolonları ve MS üzerinde hareketsiz hale getirilmiş antikorlarla kombinasyonu, özellikle geniş bir dinamik aralığı kapsayan konsantrasyonlarda binlerce protein içeren serum gibi karmaşık numuneler için biyobelirteç tayininde kullanılabilir (De Marchi et al., 2016). Bunun yanı sıra, antikor özgüllüğündeki belirsizlikler nedeniyle, üretilen verilerin yalnızca mevcut antikorlar kadar iyi olması, karmaşık olan verilerin yorumlanması gibi dezavantajları vardır.

MS tabanlı teknikler, elektroforez ve HPLC gibi ayırma yöntemleriyle de birleştirilir. MS'den önce LC kullanmanın kritik bir faydası, analitlerin uygun bir kromatografi kullanılarak tuzlar ve iyon eşleştirme ajanları gibi müdahale eden endojen bileşiklerden ayrılmasıyla matris etkisinin hafifletilmesi ve iyon baskılanmasıdır. Bu kombinasyonlar, her iki tekniğin de tek başına yeterli olmadığı özellikle karmaşık protein karışımlarına uygulanan sinerjik bir yaklaşım sunar.

Ticari olarak temin edilebilen çeşitli kütle spektrometreleri vardır. Bunlar LTQ™Orbitrap™ (Wilhelm et al., 2014), matris destekli lazer desorpsiyon

iyonizasyon-uçuş süresi-uçuş süresi (MALDI-TOF) (Darie-Ion et al., 2022), Fourier dönüşümü iyon siklotron rezonansı (FT-ICR) (Guan et al., 1994), tandem kütle spektrometresi (Hernandez et al., 2006), tuzaklanmış iyon hareketlilik spektrometresi (TIMS), uçuş süresi (TOF) spektrometresi (Spraggins et al., 2019) gibi yüksek çözünürlüklü MS yöntemleri yer almaktadır.

2.2.1.4 Kanser ilaç geliştirme araştırmalarında proteomik yaklaşım

Çoğu kanser hücresi de normal hücreler gibi hayatta kalmaları için kritik olan fonksiyonların sürdürülmesini ve yaşamını sürdürmek için yedek hücre içi sinyal yolu kullanır ve biyokimyasal süreçlerin doğrusal olmayan reaksiyon kinetiği hücrelerin bir takım protein yapısını değiştirebilir. Kanser hücreleri evrelerinin önemli bir biyolojik göstergesi olan biyobelirteçlerin keşfi hastalığın ilerlemesinin izlenmesi, risk değerlendirmesi, prognoz belirlenmesi ve kanser ilaç geliştirme için önemli araçlardır. Bu yüzden ki; onkoproteomik, kanser hücresindeki protein etkileşimlerini inceleyen, çeşitli proteomik tekniklerin kullanıldığı proteomiklerin bir kolu haline gelmiştir. Kanser patogenezinin daha iyi anlaşılması için, tanı ve tedavide yeni tümör biyobelirteçleri tanımlamak ve geliştirmek, proteomik veriler aracılığıyla hastalığın erken teşhis ve tanısını sağlamak, hastanın tedaviye nasıl cevap verdiğini belirlemek proteomik uygulamalardaki temel amaçlardır. Yeni terapötik ajanların güvenliğini ve etkinliğini ölçmek için ayırıcı tanı, tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde aday proteinlerin veya protein paternlerinin tanımlanması, spesifik protein yollarının hedeflenmesi gibi birçok potansiyel uygulama alanı için de kullanılmaktadır.

Bireyin tedavide kullanılan ilaçlara yanıt verip vermeyeceğinin ve bireyin yaşayabileceği yan etkilerin tahmin edilmesini içeren bireyselleştirilmiş tedavi planları geliştirmek için de kullanılmaktadır. Onkolojide hassas tıp tekniklerinin gelişimi büyük ölçüde genetiğe odaklanmıştır. Yeni nesil dizilemedeki ilerlemeler, katı tümör kanserlerinin belirli genetik varyantlar açısından taranmasını nispeten basit hale getirdi. Örneğin HER2 mutasyonu pozitif meme kanseri olan bireyler, HER2 proteinini hedef alan ilaçlarla tedavi edilebilir (Goutsouliak et al., 2020). Ancak pek çok kanser hastası için (özellikle hematolojik kanser hastaları için) yerleşik bir genetik belirteç mevcut değildir. Bu eksiklikle mücadele etmek için onkologlar genellikle farklı sonuçlar veren daha geniş tedaviler uygularlar. Aslında biyobelirteç keşfinde nihai amaç, biyobelirteç ile hastanın belirli bir tedaviye iyi yanıt verme olasılığı arasında korelasyon kurmaktır. Bu tür sorunların çözümü için

araştırmacılar artık genetiğin de ötesinde tıpta proteomik, lipidomik ve metabolomik bilimlerinin kullanılmaktadırlar. Bu yaklaşımlar, zamanla değişme eğiliminde olan ve hastalık ya da tedavi durumundan etkilenebilen proteinlerin, hücrel lipitlerin veya metabolitlerin yukarı veya aşağı düzenlenmesine dayanır. Araştırmacılar, belirteçleri ve hastalığın ilerleyişini veya tedavi yanıtını nasıl takip ettiklerini inceleyerek hastalıkların çözümlenmesine katkıda bulunacaklardır (Hernandez-Valladares et al., 2020).

Genel ifade ile kanser ilaç geliştirme araştırmalarında proteomik yaklaşım hastalık süreci boyunca ekspresyonu etkilenen proteinlerin belirlenmesi ve ilaç yanıtının proteom düzeyde değerlendirilmesini kapsamaktadır. Prognoz ve ilaç direnci ile ilişkili kanser-protein arasındaki değişikliklere dayalı kanser tedavisi, terapötik etkinliğin ve toksisitenin gerçek zamanlı değerlendirmesi ve kişisel tedavi seçimine yol gösteren ve histopatolojisinin tamamlayıcısı olan proteomik çalışmalar klinik kanser çalışmalarında önemli bir yere sahiptir (Cho, 2007).

Genetik profillerden farklı olarak protein ekspresyonu, hastalığın ilerlemesi veya tedaviye yanıt sürecinde değişir. Proteomik biyobelirteçler, hastalığın ilerlemesine bağlı olarak hastaların tedaviye ne kadar iyi yanıt verdiğini tahmin etmeye yardımcı olabilir. Teorik olarak herbir kanser tipine özgü metabolizma tarafından üretilen biyobelirteç potansiyeli olan birçok özgün protein çıkabilir. Diğer bir yaklaşım ise hastalığa özgü bir proteinin yanı sıra hastalık süresince ya da tedavi sırasında posttranslasyonel modifikasyonlarla değişmiş olan bir protein(ler) olabilir. Bu nedenle proteinlerin tanısal araç olarak potansiyelinin bilinmesi ve proteomik tekniklerle araştırması her geçen gün literatürlerde artmaktadır. Bu nedenle tez kapsamında da DANP ilaç molekülünün HCC tedavi sırasında değişen protein ekspresyonu çalışılmıştır.

1D / 2D poliakrilamid jel elektroforezi,, floresan ayırıcı 2D jel elektroforezi (2D-DIGE), kütle spektrometresine dayalı yöntemler ESI-TOF-MS (elektrosprey iyonizasyon uçuş zamanı), MALDI-TOF-MS (matriks destekli lazer desorpsiyon/ iyonizasyon uçuş zamanı), SELDI-TOF-MS (yüzey geliştirilmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı), tandem MS vb., protein/doku mikroarray, izotopla kodlanmış afinite işaretleme (ICAT), (iTRAQ) ve hücre kültüründe amino asitler ile izotopik işaretleme (SILAC) vb. teknikler ayrıntılı proteom analizlerinin yapılmasına imkan sağlamak ve aday tümör biyobelirteçlerinin belirlenmesinde çözümler sunmaktadır.

Genel proteomik analiz aşamaları; protein ekstraksiyonu, proteaz ile parçalama, peptid fraksiyonasyonu ve LC-MS analizini kapsar. Proteinler doku veya hücre lizatlarından santrifüjleme/ filtreleme yoluyla ekstrakte edilir ve örnek özelinde zenginleştirme ve saflaştırma çeşitli C8 yada C18 kolonlardan geçirilerek ya da iki boyutlu jel elektroforezi ile ayrıştırılır ve saflaştırılır. Elde edilen proteinler, enzimatik parçalama ile üretilen peptitlerin LC-MS analizi ile tanımlanabilir ve veriler bir proteom veri tabanı kullanılarak yorumlanır (Kwon et al., 2021).

Tanısal bir biyobelirteç, vücutta tespit edilebilen veya ölçülebilen herhangi bir madde, yapı veya süreç olarak tanımlanır ve hastalığın oluşumu ya da tanısının yanı sıra ilerlemesini veya kullanılan ilaç doğrultusunda tedavi etkinliğini göstermeyi ve tahmin etmeyi amaçlar. HCC tedavisi için kullanılacak potansiyel biyobelirteçler için ilgili proteinlerin araştırılması ile fonksiyonel bilgi sağlanmaktadır. Bu fonksiyonel bilgiye, hepatokarsinogenezin moleküler temelini araştırmak ve tanı için yeni tümör biyobelirteçleri geliştirmek adına yapılan protein ekspresyon analizleri ile ulaşılmaktadır (Brizard et al., 2009; Du et al., 2020). Bu analizler ile elde edilen proteomik veriler, hasta hücrelerin sınıflandırılmasında ve kanserli hücrelerin protein yapısı, etkileşimleri ve fonksiyonları gibi farklı biyolojik mekanizmaların anlaşılmasında son derece faydalıdır. HCC patogenezinde eksprese protein değişimleri ve ilgili sinyal yollarının belirlenmesine yönelik yapılan protein ve genom ekspresyon çalışmalarına dair literatür özeti Tablo.2.1.'de sunulmuştur.

Tablo 2.1. HCC’ da protein ekspresyonu değişimleri ve ilgili sinyal yolları çalışmalarına dair literatürler

Yazar/Yıl	Kaynak	Sinyal yolağı / farklanan proteinler
Xiao Yi et al., 2023	Proteome Landscapes of Human Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma	EIF2 sinyali, eIF4E ve p70S6K sinyali, spliceozomal döngüsü, sirtuin sinyali, mTOR sinyali /farklanan 2951 protein
Qiu Y. et al., 2022	Proteomic study of hepatic apoptosis induced by overexpression of G0S2	Nfkb1, Plac8, Cdc34, Yme111, Nqo, Naca, CtSC, Taok3, Ctsc, Taok3, ArL6ip1, Bad, Ddx5, Ptpfrf, ıgbp1, ciapin1, Npm1, Nqo2, Htatip2, Nduft1, Ubqln1, Pura, Tlr3, Hmox1, Arf4, Dapk2, Ece1, Bax, HK1, akt1, Ccar1, Nod1, Cd38, Dpep1, Deptor, Ptgis...
Wang, M. et al., 2022	Proteomic overview of hepatocellular carcinoma cell lines and generation of the spectral library	10.098 protein içeren HCC spektral kütüphanesi oluşturulmuştur.
Elmas A. et al., 2022	Proteomic Analyses Identify Therapeutic Targets in Hepatocellular Carcinoma	kinase and non-kinase proteins
Zhong et al., 2021	HBO1 overexpression is important for hepatocellular carcinoma cell growth	HBO1 (lizin açıltransferaz 7/KAT7) proteinini
Cho H. J. et al., 2021	Overexpressed Proteins in HCC Cell-Derived Exosomes, CCT8 and Cofilin-1 are Potential Biomarkers for Patients with HCC	CCT8, Cofilin-1 proteinleri, hücre kaynaklı eksozomlar
Farzaneh et al., 2021	Critical signaling pathways governing hepatocellular carcinoma behavior; small molecule-based approaches	Hepatosit büyüme faktörü (HGF) sinyal yolağı/ c-Met (mezenkimal-epitelyal geçiş faktörü)
Wang et al., 2020	The function of the HGF/c-met axis in hepatocellular carcinoma	

Tablo 2.1. HCC’ da protein ekspresyonu değişimleri ve ilgili sinyal yolları çalışmalarına dair literatürler (devam)

Yazar/Yıl	Kaynak	Sinyal yolağı / farklı proteinler
Setayesh Y. et al. 2020	Overexpression of Galectin-1 and Galectin-3 in hepatocellular carcinoma	Galectin-1 ve Galectin-3
Siracusano G. et al. 2020	Cell Surface Proteins in Hepatocellular Carcinoma: From Bench to Bedside	Hücre yüzey proteinleri Tirozin Kinaz Reseptör Ailesi (TRK) -EGFR, G-Proteine Bağlı Reseptörler (GPCR), Kemokin Reseptörleri -CCR’ler, CCL2, CXCR, E-Prostanoid Reseptörleri- EP1, EP2, EP3 ve EP4, Lizofosfatidik Asit Reseptörleri (LPAR1-6)), Adezyon Reseptörleri (CD97), CD44, Endoglin (CD105), Kemik İliği Stromal Hücre Antijeni 2 (BST2)
		Hücre adezyon proteinleri (Integrins-ITGB1-4)
		Taşıyıcı proteinler- (ANX’ler), Çözünen Taşıyıcı Taşıyıcılar (SLC’ler- SLC29A1), Müsinler-MUC1-13
		Glikosilfosfatidilinositol-Bağlantılı Proteinler Glypican-3 (GPC-3)
Shi L.W. vd. 2020	Overexpression of Rab40b Promotes hepatocellular Carcinoma Cell Proliferation and Metastasis via PI3K/AKT Signaling Pathway	İnsan Tetraspanin Transmembran 4 Üst Ailesi (TM4SF), CD 147, Glukoz Düzenlenmiş Protein 78 (GRP78)
Delgado E.R. 2020	Deletion and overexpression of the scaffolding protein IQGAP1 promotes HCC	IQGAP1(IQ motifi içeren GTPaz aktive edici protein 1)
Guo Y. et al. 2020	Hypoxia-inducible factors in hepatocellular carcinoma	Hipoksi ve Wnt sinyal yolağı/ HIF-1A
Peng H. 2019	Serum and tissue proteomic signatures of patients with hepatocellular carcinoma using 2-D gel electrophoresis	onkogenik RAS Sinyal Yolağı/ Oksisterol bağlayıcı protein benzeri 11(OSBPL11), apolipoprotein ailesi özellikle APOE
Ai X. et al., 2018	Overexpression of PIK3R1 promotes hepatocellular carcinoma progression	PI3K/AKT/mTOR/Fosfoinositid-3-kinaz, düzenleyici alt birim 1 (PIK3R1)
Chen, Y. et al. 2018	SKA1 overexpression is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma	AKT sinyal yolağı/ SKA1
Shan L. et al. 2017	Huaier restrains proliferative and migratory potential of hepatocellular carcinoma cells partially through decreased yes-associated protein	Hippo Sinyal Yolağı/ YAP 1 (Yes-associated protein-1), PDZ-binding motif (TAZ)

Tablo 2.1. HCC’ da protein ekspresyonu değişimleri ve ilgili sinyal yolakları alışmalarına dair literatürler (devam)

Yazar/Yıl	Kaynak	Sinyal yolağı / farklanan proteinler
Serova M. et al., 2015	Effects of TGF-beta signalling inhibition with galunisertib (LY2157299) in hepatocellular carcinoma models and in ex vivo whole tumor tissue samples from patients	TGF- β sinyal yolağı/ E-kadherin
Komposch K. ve Sibilis, M., 2015	EGFR Signaling in Liver Diseases	Epidermal büyüme faktörü (EGF)sinyal yolağı / EGFR
Effendi K. et al., 2014	Overexpression of Leucine-Rich Repeat-Containing G Protein-Coupled Receptor 5 (LGR5) Represents a Typical Wnt/ β -Catenin Pathway-Activated Hepatocellular Carcinoma	Wnt/B-katenin sinyal yolağı /Lösinden zengin tekrar içeren protein G (LGR5)
Stamos J. ve Weis W., 2013	The β -Catenin Destruction Complex	Wnt/B-katenin sinyal yolağı/ β -katenin
Chen Y-L. et al., 2013	Overexpression of CTHRC1 in hepatocellular Carcinoma Promotes Tumor Invasion and Predicts Poor Prognosis	Wnt sinyal yolağı/ Kollajen üçlü sarmal -1 (CTHRC1)
Sasaki M., 2008	The overexpression of polycomb group proteins Bmi1 and EZH2 is associated with the progression and aggressive biological behavior of hepatocellular carcinoma	Bmi1, EZH2
Lee I-N. et al., 2005	Identification of Human Hepatocellular Carcinoma-Related Biomarkers by Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry	16 adet yukarı regule proteinve 15 adet aşağı regule protein
Huynh H., 2004	Overexpression of tumour suppressor retinoblastoma 2 protein (pRb2/p130) in hepatocellular carcinoma	retinoblastom 2 (pRb2/p130)

Kanser ilaç geliştirme araştırmalarında ilaç tedavi etkinliği, ilaç direnci ile ilişkili kanser-protein ağındaki değişikliklerin tanımlanması, toksisitenin gerçek zamanlı değerlendirmesi, ilaç yanıtının proteom düzeyde değerlendirilmesini amaçlarıyla son dönemde gerçekleştirilen ve tez kapsamında kullanılan doksorubisini içeren taşıyıcı sistemlerin proteomik çalışmaları incelendiğinde; Doksorubisin ve Doksorubisin-yüklü kalsiyum karbonat nanopartikülleri ile muamele edilen MCF-7 hücresinin LC-MS/MS ile proteomik alışması (Ahmed et al., 2021), fosfolipid nanopartiküllenmiş Doksorubisinin zebra balığı

embriyolarında proteomik profil değişikliklerinin MALDI-MS ile belirlenmesi (Samenkova et al., 2014) araştırmaların yapıldığı görölmektedir. Doksorubisin içeren diğeri taşıyıcı sistemlerin HCC tedavisi için kullanımında da yine proteomik analizlerden faydalanılmıştır (Shen et al., 2022; Kullenberg et al., 2021; Dubbelboer et al., 2019). Gerçekleştirilen bu literatür çalışmalarında kullanılan ilaç etkin maddesi ya da ilaç taşıyıcı sisteme özgü tedavi sonrası protein sinyalleri araştırılmış ve ilgili kanser sinyal yolağındaki değişimler tespit edilmeye çalışılmıştır.

Biyobelirteçler onkolojide tarama, ayırıcı tanı, tedaviye yanıtın tahmin edilmesi gibi birçok potansiyel uygulamada kullanılır (Henry et al., 2012). Bu biyobelirteçlerin tanımlanması, spesifik protein yolaklarının hedeflenmesi için gerekli bilgi bu proteomik veriler ile sağlanacaktır. Bu kapsamda, yapılan son çalışmalarda kanser tedavisinde kullanılan bazı kemoterapotik ajanların kullanımı proteomik profillemeye ile değerlendirilmiştir. Li et al. (2022) yaptığı çalışmada; mide kanseri hastalardan alınan 206 tümör dokusunun DOS, XELOX ve anti-HER2 bazlı tedavi sonrası proteomu değerlendirmiştir. Proteomik değerlendirme için tümör doku tripsin ile parçalanarak, kütle spektrometresi ile protein ekspresyon değişimi araştırılmıştır. Shenoy, A., et al. (2020), meme kanseri dokularında kemoterapi sonrası LC-MS/MS proteomik analizi ile protein yanıtları araştırmış, kemoterapik ajan kullanımına özgü tedavi sonrası tedaviye dirençli prolin biyosentezi yolağındaki PYCR1 and ALDH18A1 protein yapıları tespit etmişlerdir. Zhang et al. (2018), PC-3M-1E8 insan prostat kanseri hücre dizileri hattı ve zayıf metastatik PC-3M-2B4 hücre hattı kullanılarak prostat kanserine katkıda bulunan aday proteinleri belirlemek için LC MS/MS ile proteomik analiz gerçekleştirilmiştir.

HCC ve proteomiks çalışmalar kapsamında Kuhara ve arkadaşları (2021), kapsüllenmiş ve kapsüllenmemiş HCC Dokuları arasında farklı şekilde eksprese edilmiş 14 adet protein noktası bulmuşlardır. Çalışma sonucu iki boyutlu differansiyel jel elektroforezi ve LC-MS kütle spektrometresi kullanılarak proteinleri belirlemişler ve proteinleri Western Blot ile valide ederek, kapsüle HCC dokusunda lösin aminopeptidaz-3 ve fosfoenolpiruvat karboksikinas-2' in yukarı regüle olduğunu saptamışlardır. Lee ve arkadaşları (2005), HCC'a ilişkin biyobelirteç araştırmalarında iki boyutlu jel elektroforez ve LC-MS kütle spektrometresinden faydalanarak insan karaciğer dokusunda aşağı ve yukarı regüle olan 34 protein saptamışlardır. Karaciğer proteom değişikliklerini karakterize etmek için kanserin ilerlemesi, sıçanlardan alınan karaciğer kanserinin dokusu

proteomik örnekleri 2D DIGE ve MALDI TOF- MS ile analiz edilmiş ve çoğu malign aşamalarda farklı şekilde eksprese edilen proteinler biyobelirteç adayı 15 adet protein belirlenmişlerdir. Proteinlerin dinamik yapıları klinik faydaya yönelik biyobelirteç keşfindeki önemli bir diğer kısıtlama olarak göze çarpmaktadır (Landegren ve Hammond, 2021). Doku biyopsisi ya da likit biyopsi ile elde edilebilen proteinler ile ilgili çalışmalar dokuya özgü biyobelirteçlerin keşfini hızlandırmıştır. Proteogenomik yaklaşımlarla yüksek özgüllüğe sahip ve tümörün doğasını daha iyi ortaya çıkarabilecek protein biyobelirteçlerinin sayısının artırılması hedeflenmektedir (Ding et al., 2022). Örneğin; tümör kökenli eksozomlardan elde edilen proteinler, kanser hücrelerindeki proteom profilini yansıtabilmekte ve tedavi yanında teşhis amaçlı biyobelirteçler olarak uygulanabilecekleri düşünülmektedir (Hu et al., 2022). Sun et al. (2022), çalışmasında kolorektal kanserde yapılmış bir proteomik çalışmasında, hastalık riskinin tespitini sağlayacak dolaşımdaki 6 yeni protein biyobelirteç adayı (LTA4H, DDR1, FLRT2, CD79B, NCR1, EFNA4) keşfedilmiştir.

Bulgular doğrultusunda karşılaştırma yapılan literatürlere ait bilgiler ayrıca “Tartışma” bölümünde verilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

Çalışmada kullanılan kimyasallardan RIPA Buffer A.B.T' den proteaz inhibitör kokteyli APExBIO' dan, Precision Plus Protein Dual Xtra Standard, pH 8.3 Tris/Glycine/SDS içeren yürütme tamponu, ReadyStrip IPG pH 3-10, 12 x 11cm IPG jeller, rehidrasyon tamponu, laemmli tampon, 4-20% Tris HCL anyKD precast jel, Biosafe Coomassie Brilliant Blue R-250, IEF Dengeleme tamponu I ve II, mineral yağ, 4-20% Crit TGX Stain-Free 11cmIPG/prep+1 jeller BIORAD firmasından temin edilmiştir. HepG2 HB-8065 kanser hücre hattı ATCC'den satın alınmıştır. Isofluran forane likit Abbott'tan, PBS SIGMA'dan temin edilmiştir. Sekanslama dereceli domuz tripsin enzimi Promega'dan temin edilmiştir. İn vivo deneylerdeki floresans boya işaretli glukoz molekülü (2DG-750 Prob) Perkin-Elmer firmasından sağlanmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Hepatosellüler karsinoma tümör modeli oluşturulması ve ilaç taşıyıcı sistemin uygulanması

Prof. Dr. Şenay Şanlıer' in yürütücülüğünde gerçekleştirilen 119 S 496 nolu TÜBİTAK 1001 projesi ile Doksorubisin yüklü arabinogalaktan kaplı manyetik nanopartikül (DANP) geliştirilmiştir ve bu tez çalışması kapsamında tedavi edici ajan olarak bu formülasyon kullanılmıştır.

Tez kapsamında kullanılacak Doksorubisin yüklü ilaç taşıyıcı sistemi (test materyali) 119 S 496 nolu projede geliştirilen Doksorubisin yüklü arabinogalaktan kaplı manyetik nanopartikül (DANP) ilaç taşıyıcı sistemi gibi aynı koşullarda ve nitelikte Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü'nde *in vivo* deney öncesi hazırlanmıştır.

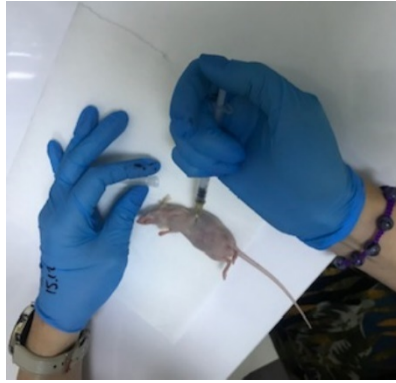
in vivo çalışma için etik kurul izni Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (2022-051R1 nolu 29.03.2023 tarihli etik kurul belgesi) alınmıştır.

in vivo deneyler ve IVIS görüntüleme Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezi'nde (ARGEFAR) Faz Öncesi Araştırmalar Birimi'nde yapılmıştır.

Hepatosellüler karsinoma tümör modeli oluşturulması için HepG2 (İnsan Hepatoma) hücre hattı kullanılarak ortotopik tümör modeli oluşturulmuştur.

Çalışma süresince farelerin bulunduğu kafesler için $24 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık, $\%50 \pm 10$ nem, 12/12 saat ışık/karanlık periyodu uygulanarak kontrollü şartlar sağlanmıştır. Nude fareler steril yem ve su ile beslenmiş olup, kafesler sterilize edilmiştir. Tanımlanan deney gruplarına ait fareler ayrı kafeslerde tutularak kodlanmıştır. 6-8 haftalık erkek-dişi CD1 nude fareler Technical Universal Verification 'dan temin edilmiştir.

Aşağıda ayrıntıları verilen Grup-1 hariç; Grup-2, Grup-3 ve Grup-4 için 6-8 haftalık toplam 15 adet CD-1 nude dişi-erkek farelerde karaciğer tümörü oluşturulması için lusiferaz aktiviteli HepG2 hücreleri kullanılmıştır. Fareler ketamin (40 mg/kg) ve ksilazin (10mg/kg) anestezisi altındayken ortotopik tümör modeli oluşturmak amacıyla 100 μL fosfat tamponu (PBS) içerisindeki 1×10^6 HepG2 hücresi karaciğerin sağ üst lobuna yavaşça enjekte edilmiştir (Liu, L., et al., 2019)(Şekil 3.1). 7 gün boyunca her gün farelerin kilo ve sağkalım kontrolleri yapılmıştır. 7 gün sonrasında farelerin tümör boyutu *in vivo* imaging system (IVIS, Caliper Perkin Elmer) görüntüleme cihazında belirlenmiştir. Tüm çalışma boyunca tümörün yerini, boyutunu ve deney süresince değişimini tespit etmek amacı ile biyoluminesans / floresans optik görüntüleme sistemi IVIS spektrum cihazı (Perkin Elmer) kullanılmıştır.



Şekil 3.1. HepG2 hücrelerinin fareye enjeksiyonu

10^6 lusiferaz aktiviteli HepG2 hücrelerinin uygulanmasını takiben tümör görüntülemeye daha iyi sonuç elde edildiği için glukoz probu (IVISense 2-DG 750 RediJect Floresan Probu (PerkinElmer) kullanımı seçilmiştir. Glukoz probu ana stoğu 100 nmol/100 μ L olacak şekilde 600 μ L serum fizyolojik ile çözündürülmüştür. Herbir fare için 10 nmol/100 μ L prob kuyruk veninden uygulanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Kuyruk veninden prob ve ilaç uygulaması için farenin hazırlanması

Glukoz probu enjeksiyonundan 3 saat sonra fareler deney grupları doğrultusunda isofluran ile uyutularak (Şekil 3.3) , IVIS cihazında λ_{ex} 745 nm/ λ_{em} 820 nm parametreleri set edilerek, tümör boyutlarını değerleri, tümör yüksekliği ve genişliği doğrultusunda tümör hacmi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Tümör Hacmi(mm}^3\text{)} = \frac{(\text{Tümör genişliği})^2 \times \text{Tümör uzunluğu}}{2}$$



Şekil 3.3. Farelere isofluran uygulaması

HepG2 hücrelerinin farelere enjekte edilip başarılı bir şekilde tümör oluşumu gerçekleştirildikten sonra iv uygulama için fareler; serbest Doksorubisin grubu ve

DANP grubu olacak şekilde gruplandırılmıştır. Deney grupları ve belirlenen CD-1 nude fare sayısı ayrıntılı olarak aşağıda verilmiştir:

Grup1:Sağlıklı Grup (n=5)

Grup2:Kanser modeli Oluşturulan grup (n=5)

Grup3:Doksorubisin (Doksorubisin) i.v. grubu (n=5)

Grup4:DANP (Doksorubisin yüklü arabinogalaktan kaplı manyetik nanopartikül) i.v. grubu (n=5)

Tümör boyutu belirlenen farelere Grup 3 için 100 μ L su içerisinde 25 μ g Doksorubisin, Grup 4 için 25 μ g Doksorubisin içeren 100 μ L DANP formülasyonu (serum fizyolojik içerisinde) iv yolla haftada 3 kez olacak şekilde 14 gün boyunca kuyruk veninden uygulanmıştır (Şekil 3.2). Grup 4 için DANP uygulamalarının ardından 30 dakika tümörlü karaciğer bölgesine 0,1 Tesla kuvvette mıknatıs flaster ile fareye bağlanarak bekletilmiştir (Şekil 3.4). Grup 2 için ise farelere sadece 100 μ L serum fizyolojik verilmiştir.



Şekil 3.4. Farelere mıknatıs uygulaması

Tedavinin 14. gününde IVIS cihazı ile farelerin görüntüleri alınarak, bu görüntülerdeki tümör boyutları kontrol edilmiştir. Tedavinin 14. gününde IVIS cihazı ile farelerin görüntüleri alınarak, bu görüntülerdeki tümör boyutlarındaki değişim hesaplanarak, kontrol edilmiştir. 14. günün sonunda fareler kurban olarak edilecek karaciğerleri alınmış ve bekletilmeden -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.2 Örnek hazırlama ve proteinlerin izolasyonu

Karaciğer dokusunun elektroforez öncesi homojenizasyonu için Trikloroasetik asit /aseton çöktürme yöntemi (Vedarethinam et al., 2016; Peng et al., 2019) yerine gerek protein gerikazanımını arttırmak gerekse doku lizatlarında proteaz aktivitesini inhibe etmek gerekçesi ve önemi nedeniyle proteaz inhibitör içeren homojenizasyon yöntemi tercih edilmiştir. Proteaz inhibitörü, peptit bağı hidrolizini ve ardından gelen protein yıkımını önlemek için spesifik proteazları devre dışı bırakarak saflaştırma ve analiz prosedürleri sırasında protein bütünlüğünün korunmasını sağlayacaktır (Zimmerman et al., 2024). Bunun için; her bir test grubuna ait karaciğer dokusu küçük parçalara bölünerek 200 mg karaciğer dokusu 1 ml RIPA Buffer (0.5M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 2.5 % deoksikolic asit, 10% NP-40, 10 mM EDTA) içerisinde 1:100 oranda proteaz inhibitör kokteyli (APExBIO, USA) (Sistein, serin, asit proteazlar ve aminopeptidazlar için geniş özgüllüğe sahip AEBSF, Aprotinin, Bestatin, E-64, Leupeptin ve Pepstatin A içeren) eklenerek sonikatör ile mekanik olarak (10 saniyede 6 vuruş olacak şekilde) buz içerisinde homojenize edilmiştir. Örnekler 13.000 g'de 4°C'de 30 dakika santrifüj edilerek, süpernatantlar ayrılmıştır. Protein miktarları Bradford Yöntemi ile tayin edilmiştir (Bradford., 1976). Protein miktar tayini için; 6 tane test tüpüne derişimi 150 ile 1500 µg/mL olacak şekilde sığır serum albümin standartlarından 100 µL alınmıştır. Elde edilen sonuçlardan standart kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. PBS'den 100 µL kör çözelti hazırlanması için, derişimi ölçülmek istenilen örneklerden de 100 µL ayrı tüplere aktarılmıştır. Her bir tüpe taze hazırlanmış Bradford reaktifinden 3 mL eklenerek, vortekslenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Süre sonunda örnekler bekletilmeden spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda absorbansları okunmuştur. sığır serum albümin standartlarından elde edilen absorbans değerleri derişimine karşı grafiğe aktarılarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Örneklerin absorbansı, elde edilen regresyon denklemi doğrultusunda protein miktarları olarak hesaplanmıştır.

3.2.3 Proteinlerin SDS-PAGE tekniği ile kütlelerine göre ayrılması

➤ Protein örneklerinin kalite kontrolü

Protein örneklerinin kalite kontrolü, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Protein Araştırmaları ve Proteomik Laboratuvarı tarafından yapılmıştır.

Herbir deney grubuna ait RIPA Tamponu içerisinde homojenize edilmiş ve süpernatantı ayrılmış 2 µL örnek (pooled sample) ve 8 µL Laemmli tampon 4-20% Tris HCL anyKD precast jel üzerindeki kuyucuğa konulmuştur. Kontrol marker olarak Precision Plus Protein Dual Xtra Standard (BIORAD) kullanılmıştır. Jel sabit 200 Volt'da 25 mM Tris, 192 mM glisin, 0.1% SDS içeren pH 8.3 Tris/Glisin/SDS içeren yürütme tamponu içerisinde mini Protean Tetra Cell (BIORAD) tankında yürütülmüştür. Örneklerle ait protein bantlarının görüntülenmesi Chemidoc Imaging System (BIORAD) cihazı ile yapılmıştır.

➤ 1D (birinci boyut) jel elektroforezi (izoelektrik fokuslama)

Protein örneklerinin 1D ve 2D jel elektroforezi, Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezi ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Protein Araştırmaları ve Proteomik Laboratuvarı'nda eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Her deney grubundan elde edilen örneklerde proteinlerin izoelektrik noktasını (pI) belirlemek ve ayrımını sağlamak için öncelikle 1D (birinci boyut) elektroforezi gerçekleştirilmiştir. İzoelektrik fokuslama için 11 cm strip boyu ve pH: 3-10 aralığına uygun IPG Stripler (ReadyStrip IPG pH 3-10, 12 x 11cm/ BIORAD) kullanılmıştır. Her bir deney grubu 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. IPG strip jel kullanımı BIORAD Bulletin 6240 (2011) üretici protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. 11 cm IPG strip için 200 µL son hacimde Coomassie (Brilliant) Blue ile boyanacağı için 200 µg protein yüklenmiştir (Tablo 3.1). Her bir deney grubu için örnekler, son hacmi 200 µl olacak şekilde rehidrasyon tamponu (10 ml 8 M üre, %2 CHAPS, 50 mM ditiyotritol (DTT), %0,2 (w/v) Bio-Lyte® 3/10 amfolitler ve Bromofenol mavisi) ile karıştırılarak örnek çözeltisi hazırlanmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Rehidrasyon hacmi, Protein miktarı ve mineral yağ hacmi (BIORAD, 2011)

	IPG Strip Uzunluğu				
	7 cm	11 cm	17 cm	18 cm	24 cm
Rehidrasyon Solüsyonu	125 µl	200 µl	300 µl	315 µl	450 µl
Protein Miktarı					
Coomassie (Brilliant) Blue	50–100 µg	100–200 µg	200–400 µg	200–400 µg	400–800 µg
Fluorescent stains	5–100 µg	20–200 µg	50–400 µg	50–400 µg	80–800 µg
Silver stains	5–20 µg	20–50 µg	50–80 µg	50–80 µg	80–150 µg
Mineral Yağ	4 ml	5 ml	7 ml	7 ml	9 ml

Örnek çözeltisi PROTEAN® IEF System (BIORAD) cihazına uyumlu 11 cm rehidrasyon trayine trayin her bir alanına eşit miktarda şerit şeklinde pipet yardımıyla aktarılmıştır. IPG şeritler, deney sırasında -20 °C' den çıkarılıp, oda sıcaklığında 7 dakika bekletilmiştir. IPG şerit üzerinde bulunan jeli koruyan plaster, pens yardımıyla kaldırılarak, jel yüzü aşağıya bakacak şekilde örnek çözeltisinin üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde bekletilmeden yerleştirilmiştir. Üzerine 5 mL mineral yağı konularak 12-18 saat pasif rehidrasyona/örnek absorpsiyonuna bırakılmıştır. Süre sonunda cihazın odaklanma tablasına jel kısmı aşağıya bakacak şekilde (Gel-Side Down) izoelektrik fokuslama yöntemi seçilmiştir. Fokuslama tablasındaki sağ- sol / anot-katot tellerin üzerine küçük dikdörtgen şeklindeki elektrot kağıtları (wicks) stripi ani voltaj değişiminden korumak için yerleştirilmiştir. Elektrot kağıtları yaklaşık 10 µL ultra safsu ile ıslatılarak yerleştirilmiştir. IPG şeritler, IPG şerit tablasından alınarak fokuslama tablasına hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirilmiştir. Her bir hat üzerine 2.5 mL mineral yağ ilave edilmiştir. Jellerin oynamaması için hatların üzerine elektrot ağırlığı yerleştirilerek, fokuslama tablası cihaza yerleştirilmiştir. PROTEAN® IEF System cihazına 11 cm strip boyu ve pH: 3-10 aralığına uygun program BIORAD Bulletin 6240 (2011) üretici protokolüne göre Tablo 3.2' deki değerler seçilerek fokuslama başlatılmıştır.

Tablo 3.2. 11 cm pH:3-10 IPG strip jel için uygulanan izoelektrik fokuslama programı (BIORAD, 2011)

Step	Voltage (V)	Ramp	Time	Units
1	250	Rapid	0:20	HH:MM
2	8,000	Gradual	1:00	HH:MM
3	8,000	Rapid	26,000	Volt Hr
4	1,500	Hold		

Yükleme sonunda IPG strip trayden alınarak jele zarar vermeyecek şekilde mineral yağı biraz süzdürüldükten sonra jel yüzeyi yukarı bakacak şekilde başka bir traye aktarılarak üzerine 4 mL dengeleme tamponu I (6 M üre, 0,375 M Tris-HCl pH 8.8, %2 SDS %20 gliserol içerisinde çözündürülmüştür ve %2 (w/v) DTT taze olarak eklendi) konularak çalkalayıcıda 10 dakika inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda IPG strip trayden alınarak jele zarar vermeyecek şekilde jel yüzeyi yukarı bakacak şekilde başka bir traye aktarılarak üzerine 4 mL dengeleme tamponunu II (6M üre, 0,375 M Tris-HCl, pH 8.8, 2% SDS %20

gliserol içinde çözündürülmüştür. %2.5 (w/v) iodoasetamid taze olarak eklendi) konularak çalkalayıcıda 10 dakika inkübe edilmiştir.

➤ 2D elektroforez (2D SDS-PAGE)

1D (birinci boyut) elektroforezde IPG Strip jel üzerinden IEF tekniği ile PI (izoelektrik noktası)'na göre ayrımı sağlanan proteinlerin dikey SDS-PAGE poliakrilamid jel kullanımı ile 2D (ikinci boyut) elektroforezi gerçekleştirilmiştir. 2D SDS-PAGE her deney grubu için 4-20% Crit TGX Stain-Free 11cmIPG/prep+1 jeller (BIORAD) precast hazır jel kullanılmıştır. Her bir deney grubu 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. 2D (ikinci boyut) elektroforezi, BIORAD, Bulletin 2651: 2-D Electrophoresis Workflow How-To Guide, Rev.F üretici protokolüne göre uygulanmıştır. Jeller 4 °C'den oda sıcaklığına çıkarılıp, üzerindeki yeşil renkli tarak kaldırılmıştır. Açılan jel üzerine yürütme tamponu ile yıkanmış IPG strip jel kuyucuğa bakacak şekilde yerleştirilmiştir. Yerleştirirken 4-20% Crit TGX Stain-Free 11cmIPG/prep+1 jel ile temasın sağlanması için spatül ile hafifçe itilerek, hava kabarcığı olmaması kontrol edilmiştir. Marker kuyucuğuna kontrol olarak 10 µL Precision Plus Protein Dual Xtra Standard (BIORAD) eklenmiştir. Jel altındaki koruyucu bant çıkarılarak, Criterion™ Dodeca™ Cell (BIORAD, Fransa) tankındaki herbir kaset hücrelerine yerleştirilmiştir. Jel kaseti içerisindeki kuyucuklara yürütme tamponu doldurulmuştur. Jeller 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS içeren pH 8.3 Tris/Glycine/SDS içeren yürütme tamponu eklenerek sabit 120 V' da yürütülmüştür. Elektroforez sonrası jeller 50 ml Biosafe Coomassie Brilliant Blue R-250 (1 g Coomassie Blue R-250, 500 mL su, 100 mL asetik asit, 400 mL metanol) içerisinde gece boyu çalkalayıcıda boyanmıştır. Boyanın fazlasını uzaklaştırmak için jeller 3 kez saf su ile yıkanarak, 20 dakika saf suda çalkalayıcıda bekletilmiştir.

➤ Jel Görüntüleme ve Analizi

Jel görüntüleri Chemidoc Imaging System (BIORAD) ile alındı. Protein spotlarının analizi ve farklılaşan spotların tespiti için PDQuest Advanced 2-D Analysis Software (BIORAD) yazılımı kullanılmıştır. Herbir deney grubu kendi içinde ve ilgili deney grupları kendi arasında karşılaştırılmıştır. Grup 1 (Sağlıklı grup) ile Grup 2 (Kanser modeli oluşturulan grup) karşılaştırıldı. Grup 3 (Doksorubisin i.v. grup) ile Grup 4 (DANP; Doksorubisin yüklü arabinogalaktan kaplı manyetik nanopartikül) i.v. grubu, Grup 2 (Kanser modeli oluşturulan grup)

ile karşılaştırılmıştır. Tüm kontrol (Grup 2) ve test gruplarına (Grup 3 ve Grup 4) ait 3 adet paralel jel görüntüsü PDQuest™ yazılımına yüklenmiştir. Jeller markerdaki belirli protein spotuna (serum albümin) göre hizalanmıştır ve her bir jel için koordinatlar eşleştirilmiştir. Gözle görünebilecek en saydam ve en büyük spot işaretlenerek, hizalama sağlandı ve program tarafından tüm protein spotlarının otomatik belirlenmesi sağlanmıştır. Elektroforez yürütme alanında olmayıp, program tarafından işaretlenen çerçeve noktaları iptal edilmiştir. Grup içinde birbiriyle istatistiksel olarak % 95 güven aralığında intensiteleri (yoğunlukları) uyuşan ve gruplar arasında intensiteleri en az 2 kat farklılaşan spotların seçilmesi için parametreler set edilmiştir. Farklılaştığı tespit edilen spotlar analiz edilemek üzere jelden kesilmiştir. Poliakrilamid jel üzerinde ayrılmış, analiz edilmek istenen proteinlere ait spotlar 1.5 mm çapındaki jel parçaları, 1 mm kalınlığındaki jellerden manuel olarak mikrotom ile kesilmiştir.

3.2.4 Proteinlerin kütle spektrometresi ile tayini

➤ Poliakrilamid jelden proteinlerin ayrıştırılması ve Kütle Spektrometresi ile tanımlanması

Poliakrilamid jelden proteinlerin ayrıştırılması ve Kütle Spektrometresi ile tanımlanması Proteome Factory AG (Berlin, Almanya)'de yapılmıştır.

Protein bantları, tekrarlanan küçültme (%60 asetronitril, 50 mM TEAB) ve şişme aşamaları (50 mM TEAB) yoluyla yeniden tamponlanmıştır. Sistein alkilasyonu için şişme tamponu önce 10 mM TCEP, ardından 10 mM 2-iyodoasetamid içermektedir. Jel içi proteoliz, sekanslama dereceli domuz tripsin enzimi (Promega, Mannheim, Almanya) ile gece boyunca yapılmıştır. Analiz için numuneler %2 formik asit ile asitleştirilmiştir. NanoHPLC-ESI-MS/MS sistemi, bir Dionex Ultimate 3000 nanoHPLC sistemi (Thermo Scientific, Germering, Almanya), nanoelektrosprey yayıcı (Fossiliontech, Madrid, İspanya) ve bir Orbitrap Velos kütle spektrometresinden (Thermo Scientific, Bremen, Almanya) oluşmaktadır. Peptitler ilk önce beş dakika boyunca zenginleştirme kolonunda (PepMap-C18, 0,3 x 5 mm, Dionex) tutularak tuzdan uzaklaştırılmıştır (çözücü: %0,5 asetronitril/%0,5 formik asit), ardından %12 ila %40 B arasında doğrusal bir gradyan kullanılarak (çözücü A: su (%0,1 formik asit içeren), çözücü B: asetronitril (%0,1 formik asit içeren) ReproSil-Pur 120 C18-AQ kolonundan ayrıştırılmıştır (0,075 x 500 mm kolon, Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen, Almanya). İlgili

iyonlar, peptid iyonlarının beklenen yük durumu dağılımına göre verilere bağlı olarak MS/MS'ye tabi tutulmuştur. Proteinler, Mascot arama motorunun (Matrix Science, Londra, İngiltere) MS/MS iyon araması kullanılarak UniProt protein veri tabanının Mus musculus referans proteomuna karşı veri tabanı araştırması ile tanımlanmıştır. Öncü iyonlar için 3 ppm'lik ve parça iyonları için 0,6 Da'lık maksimum kütle sapmasına izin verilmiştir. Yalnızca skoru 20 ve üzeri olan peptit eşleşmeleri kabul edildi. Sistein'deki karbamidometilasyon sabit bir modifikasyon olarak belirlenmiştir. Protein eşleşmelerinin en az iki önemli peptid eşleşmesine sahip olması gerekmektedir.

➤ **Karaciğer dokusundan proteinlerin Kütle Spektrometresi ile belirlenmesi**

Karaciğer dokusundan proteinlerin Kütle Spektrometresi ile tayini Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Protein Araştırmaları ve Proteomik Laboratuvarı tarafından yapılmıştır.

• ***FASP (Filtre Destekli Numune Hazırlama) yöntemi ile proteinlerin trypsin ile kesimleri ve peptitlerin eldesi***

FASP kesimi için 300 ng protein üzerine, 300 µL 8M üre solüsyonu eklenerek özel mikrosantrifüj tüplere yerleştirilen 30 kDa'lık membran filtre üzerine aktarılmıştır. 14000 x g'de oda sıcaklığında 15 dakika santrifüj edilerek filtre altında kalan kısım atılmıştır. Filtre üzerine 200 µL 8M üre solüsyonu eklenerek tekrar santrifüj edilmiştir. İyodoasetamid (IAA) solüsyonu filtre üzerine eklenerek 20 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası santrifüj yapılmıştır. Bu işlem sonrası örneklerin üzerine 3 kez 100 µL 8M üre solüsyonu eklendi ve santrifüj edilmiştir. Ardından yıkama adımı için 3 kez 100µl 50mM Amonyum Bikarbonat (AmBic) solüsyonu eklenerek santrifüj tekrarlanmıştır. Filtre temiz mikrosantrifüj tüpe alınarak üzerine Tripsin enzimi ve 50mM AmBic solüsyonu eklendi, 37°C'de gece boyu kesime tabi tutulmuştur. Kesim sonrası örnekler üzerine 2 kez 40 µL 50 mM Amonyum bikarbonat (AMBIC) solüsyonu ve bir kez 50µl 0.5M NaCl solüsyonu eklenmiştir. Peptitler elüe edilerek temiz mikrosantrifüj tüpler içerisine alınmıştır. SpeedVac vakumlu santrifüj cihazı kullanılarak (Eppendorf, ABD) peptit örnekleri pellet haline getirilmiştir. Kesim sonucunda elde edilen peptitler nLC-MS/MS analizi için 20 µL %0,1 (v/v) 'lik Formik Asit çözeltisi içerisinde çözülmüştür.

- ***Nano-sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi (nLC-MS/MS) Analizi***

Elde edilen peptit yapıları, Q-Exactive kütle spektrometresine (Thermo Scientific, ABD) bağlı Ultimate 3000 RSLC nano sistemi (Dionex, Thermo Scientific, CA, ABD) kullanılarak nLC-MS/MS sistemi kullanılarak analiz edilmiş ve Xcalibur 4.0 yazılımı (Thermo Fisher Scientific, CA, ABD) aracılığıyla kontrol edilmiştir. Peptidlerin, Mobil Faz A (% 0.1 Formik asit) ve Mobil B (%80 Asetonitril ve % 0.1 Formik asit) kullanılarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile ayrımı sağlanmıştır. Kesilmiş peptitler, trap kolonundan geçirilerek tuzdan uzaklaştırılarak ve konsantre edilmiştir. Daha sonra peptidler, Acclaim PepMap RSLC C18 analitik kolonundan (75 μ m x 15 cm x 2 μ m, 100 Å çap, Thermo Scientific, CA, ABD) geçerek kromatografik ayırılma gerçekleştirilmiştir. MS1 spektrumlarının eldesi ve tarama için; çözünürlük 70.000, tarama aralığı 400-2000 m/z, hedef otomatik kazanç kontrolü (AGC) 3×10^6 , maksimum enjeksiyon süresi 60 ms, püskürtme voltajı 2.3 kV. parametreleri seçilmiştir. MS/MS analizi ise; ilk on öncü iyonun seçilmesiyle veriye bağlı edinim yoluyla gerçekleştirilmiştir. Çarpışma kaynaklı ayrışmadan (yüksek enerjili çarpışmalı ayrışma (higher-energy collisional dissociation- HCD)) oluşan MS2 analizi için; çözünürlük 17.500, AGC 1×10^6 ; maksimum enjeksiyon süresi 100 ms, izolasyon penceresi 2.0 m/z normalleştirildi ve çarpışma enerjisi (NCE) 27 olarak seçilmiştir. Cihaz her analizden önce pozitif kalibratör LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution 88323 (Pierce, ABD) ile kalibre edilmiştir.

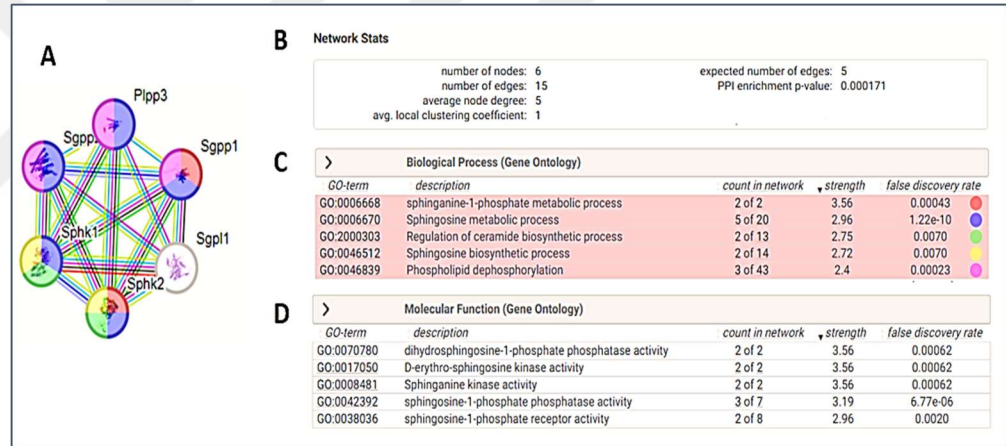
- ***nLC-MS veri analizi***

Elde edilen nLC-MS/MS ham verilerin analizi ve protein tanımlaması için Proteom Discoverer 2.5 yazılımı (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Veri analizi için; peptit kütle toleransı 10 ppm, MS/MS kütle toleransı 0.2 Da, kütle doğruluğu 2 ppm, toleranslı düşük 1, minimum peptit uzunluğu 6 amino asit, sabit değişiklikler sistein karbamidometilasyonu, kararsız değişiklikler metionin oksidasyonu ve asparajin deaminasyonu parametreleri seçilmiştir. Her protein için tanımlanan minimum özgün peptit sayısı 1 olarak alınmıştır ve tüm veriler Uniprot veri tabanında aranmıştır. Protein seviyesinde, ekspresyon değişikliklerinin önemi bir ANOVA p değeri ve bir q değeri hesaplanarak test edilmiştir. Anlamlılık kriterlerini karşılamayan proteinler (ANOVA p değeri $\leq 0,05$ ve q değeri $\leq 0,05$) filtrelenmiştir. Ekspresyonda 2 kattan fazla değişim yukarı regüle, 0.5 kattan az

değişimler ise aşağı regule proteinler olarak kabul edilmiştir ve veri analizi bu kriter doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

• *Biyoinformatik Analizler*

nLC-MS/MS analizi sonucu elde edilen proteinlerin karşılaştırmalı analizi label-free kantifikasyon yöntemi kullanılarak Proteom Discoverer 2.5 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler tüm proteinleri içeren *Mus musculus* (Mouse) referans veri tabanı (Proteome ID UP000000589) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veri analizi sonucu, elde edilen proteinlere ait sonuçlar değerlendirilerek farklılık gösteren proteinler; 59309604 farklı protein içeren, 977339418 etkileşim sayısına sahip (yüksek güven düzeyinde veya daha iyi düzeyde etkileşimler (puan $\geq 0,700$) STRING version:12 platformu ile analizlenmiştir. (Szklarczyk et al.,2023). Analize ait temsili görüntü Şekil 3.5’ te verilmiştir.



Şekil 3.5. Proteomik verilerinin STRING analizi

Proteomik verilerinin STRING analizi : (A) Tanımlanan proteinler arasındaki düğümleri ve kenarları gösteren ağ etkileşimi görüntüsü. Bir çizginin kalınlığı, bağladığı proteinler arasındaki etkileşimin gücünü gösterir. Kürelerin renkleri proteinlerin katıldığı biyolojik süreçleri gösterir. (B) Düğüm ve kenar sayısı, ortalama düğüm derecesi, ortalama yerel kümelenme katsayısı, beklenen kenar sayısı ve protein-protein etkileşimi (PPI) zenginleştirme p değeri ile ilgili verileri bildiren ağ istatistikleri. (C) Ağlardaki her bir proteinin dahil olduğu ana yolları bildiren biyolojik süreç tablosu. Tanımlanan her biyolojik süreç için karşılık gelen Gen Ontolojisi (GO) yolu, proteinlerin sayısı ve kimliği ve yanlış keşif oranı (FDR) raporlanır. Kürelerin renkleri proteinlerin katıldığı biyolojik süreçleri gösterir.

(D) Ağılardaki her bir proteinin dahil olduğu ana yolları bildiren moleküler fonksiyon tablosu. Tanımlanan her moleküler fonksiyon için karşılık gelen Gen Ontolojisi (GO) yolu, proteinlerin sayısı ve kimliği ve yanlış keşif oranı (FDR) raporlanır.

Böylece protein lokasyonları, kütleli ve abondans karşılaştırmaları, kanser kontrol grubuna karşı Doksorubisin tedavi grubu ve kanser kontrol grubuna karşı DANP tedavi grubu için gerçekleştirilmiştir. Birbirleri ile farklılık gösteren proteinler belirlenerek, ilgili biyolojik prosesler belirlenmiştir.



4. BULGULAR

4.1 Hepatosellüler Karsinom Tümör Modelinin Oluşturulması ve İlaç Taşıyıcı Sistemin Uygulanması

Tez çalışması kapsamında herbir grupta 5 adet nüde fare olacak şekilde 3 grupta yeralan nüde farelerde HepG2 hücreleri ile hepatosellüler karsinoma tümör modeli oluşturulmuştur. Sağlıklı nüde fare grubu deneye eklenmiştir. 106 lusiferaz aktiviteli HepG2 hücrelerinin uygulanmasını takiben tümör görüntülemeye lusiferin verilerek izlem yerine daha iyi sonuç elde edildiği için glukoz probu (IVISense 2-DG 750 RediJect Floresan Probu (PerkinElmer) kullanımı tercih edilmiştir. Deney süresince (7. ve 14. gün) tedavi öncesi ve sonrası herbir gruptaki tümörlerin yerini, boyutunu ve değişimini tespit etmek amacı ile IVIS-Spect cihazı ile görüntüler alınmış ve tümör boyutları hesaplanmıştır. Tablo 4.1’de sadece PBS verilen kanser kontrol grubu (Grup 2), Tablo 4.2’de serbest Doksorubisin tedavi grubu (Grup 3) ve Tablo 4.3’de DANP tedavi grubuna (Grup 4) ait farelerin tümör boyutları ve sağkalım sürelerini içeren veriler özetlenmiştir.

Tablo 4.1. Kontrol grubu (kanser) *in vivo* sonuçları.

Nude fare	Görüntüleme zamanı	Tümör hacmi (mm ³)	Sağkalım süresi (gün)
1	7. gün	464,238	14
	14. gün	181,895	
		723,675	
2	7. gün	135,592	14
	14. gün	269,097	
3	7. gün	191,261	9
	14. gün	-	
4	7. gün	112,092	14
	14. gün	326,476	
		329,504	
5	7. gün	105,248	12
		146,316	
		647,500	
	14. gün	-	

Tablo 4.1'deki verilere göre sadece PBS verilen kanser kontrol grubundaki (Grup 2) 1., 2. ve 4. farede 14. günün sonunda tümör boyutunda anlamlı artış gözlemlenmiştir. 3. fare 9.günde, 5. fare ise 12. günde ex olmuştur.

Tablo 4.2. Doksorubisin grubu *in vivo* sonuçları.

Nude fare	Görüntüleme zamanı	Tümör hacmi (mm ³)	Sağ kalım süresi (gün)
1	7.gün	111,946	14
		10,722	
		245,615	
	14. gün	68,862	
2	7.gün	468,605	14
	14. gün	436,247	
3	7.gün	527,100	14
		296,316	
		12,253	
	14. gün	19,017	
		30,561	
		7,701	
4	7.gün	482,524	11
	14. gün	-	
5	7.gün	348,278	9
		599,683	
	14. gün	-	

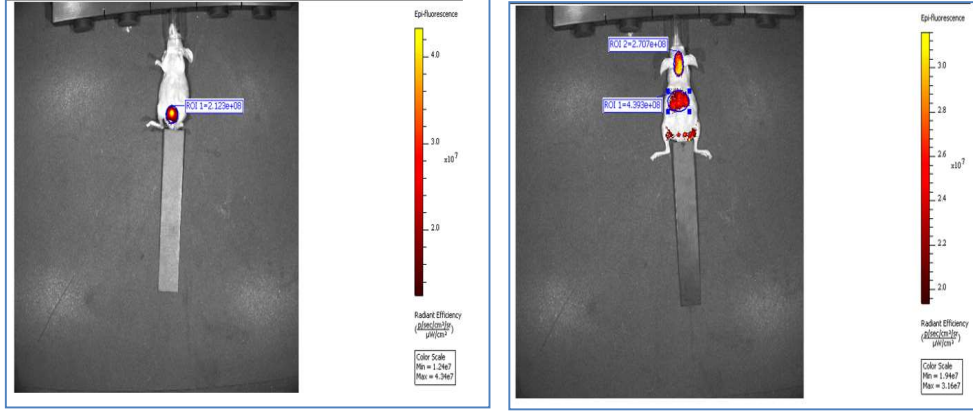
Tablo 4.2'deki verilere göre Doksorubisin uygulanan gruptaki (Grup 3) 1., 2. ve 3. farede 14. günün sonunda tümör boyutunda belirgin şekilde küçülme gözlemlenmiştir. Doksorubisin uygulaması sonrasında 4. fare 11.günde, 5. fare ise 9. günde ex olmuştur.

Tablo 4.3. DANP grubu *in vivo* sonuçları.

Nude fare	Görüntüleme zamanı	Tümör hacmi (mm ³)	Sağ kalım süresi (gün)
1	7.gün	430,216	14
	14. gün	279,318	
2	7.gün	549,568	14
		177,960	
	14. gün	16,552	
3	7.gün	-	6
	14. gün	-	
4	7.gün	295,284	14
	14. gün	91,284	
5	7.gün	326,476	14
	14. gün	25,310	
		49,707	
		30,561	

Tablo 4.3'deki verilere göre DANP uygulanan gruptaki (Grup 4) 1.,2. 4.ve 5. farede 14. günün sonunda tümör boyutlarında belirgin küçülme gözlemlenmiştir. Tümör boyutları ve sağkalım dikkate alındığında Doksorubisin ile tedaviye kıyasla nanopartikül ile tedavinin daha iyi sonuç verdiği görülmüştür.

Kanser kontrol grubu, Doksorubisin grubu ve DANP grubuna ait farelerin 7. gün ve 14. gün IVIS görüntüleri aşağıda verilmiştir. IVIS görüntüleri kontrol (Kanser) grubu için (n=5) Şekil 4.1-4.5' de, Doksorubisin grubu (n=5) için Şekil 4.6-4.10' da ve DANP grubu (n=5) için ise Şekil 4.11-4.14' de verilmiştir.

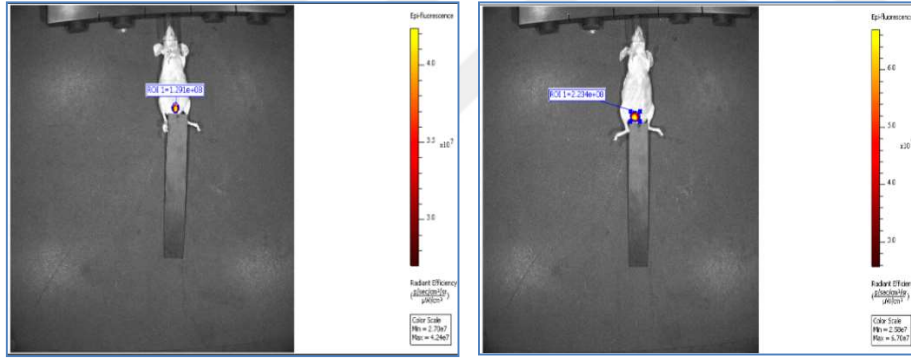


7.gün

14. Gün

Şekil 4.1. Kanser kontrol grubu (1) *in vivo* görüntüleri

Tablo 4.1 ve Şekil 4.1 'den de görüldüğü gibi kanser kontrol grubu 1. farenin 7. günde tümör hacmi 723,7 mm³ iken 14. günde tümör boyutu 723,7 mm³ 'e çıkmıştır. Ayrıca farklı bölgede 181,9 mm³ lük tümör oluşumu gözlemlenmektedir.

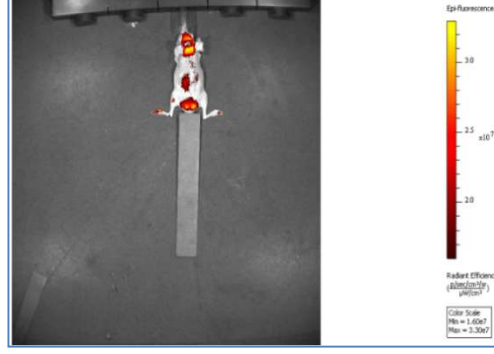


7. gün

14. Gün

Şekil 4.2. Kanser kontrol grubu (2) *in vivo* görüntüleri

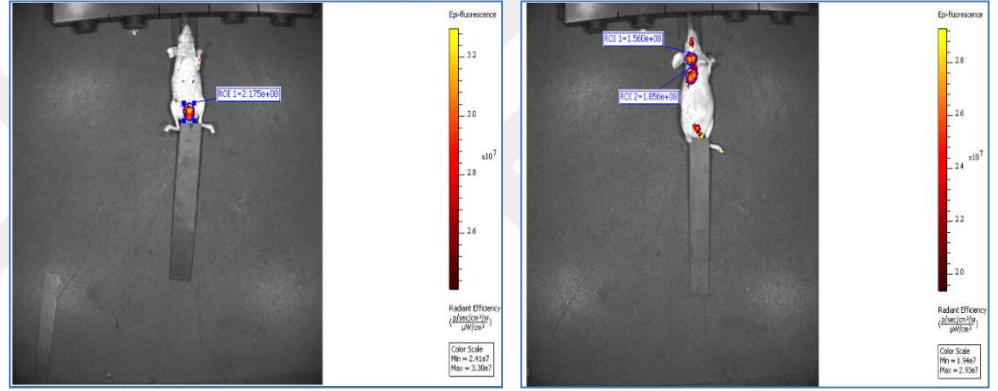
Tablo 4.1 ve Şekil 4.2 'den de görüldüğü gibi kanser kontrol grubu 2. farenin 7. günde tümör hacmi 135,6 mm³ iken 14. günde tümör boyutu 269,1 mm³ 'e çıkmıştır.



7.gün

Şekil 4.3. Kanser kontrol grubu (3) *in vivo* görüntüleri

Kontrol grubunda yeralan 3. nude fare 9.günde ex olmuştur.

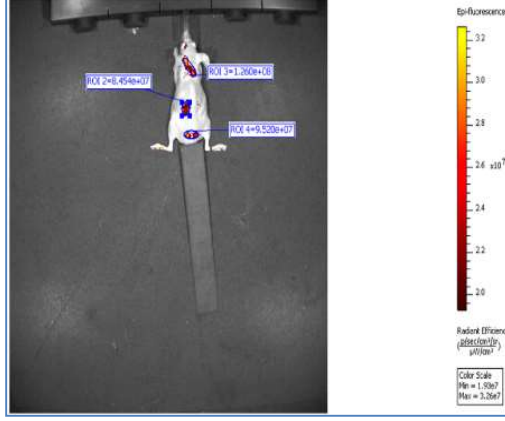


7. Gün

14. Gün

Şekil 4.4. Kanser kontrol grubu (4) *in vivo* görüntüleri

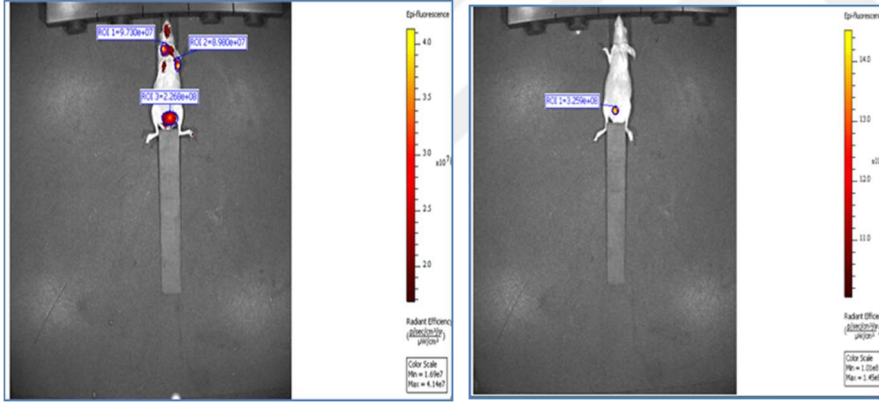
Tablo 4.1 ve Şekil 4.4 'den de görüldüğü gibi kanser kontrol grubu 4. farenin 7. günde tümör hacmi $326,5 \text{ mm}^3$ iken 14. günde tümör boyutu $329,5 \text{ mm}^3$ e çıkmıştır.



7.gün

Şekil 4.5. Kanser kontrol grubu (5) *in vivo* görüntüleri.

Kontrol grubunda yeralan 5. nude fare 12. günde ex olmuştur.

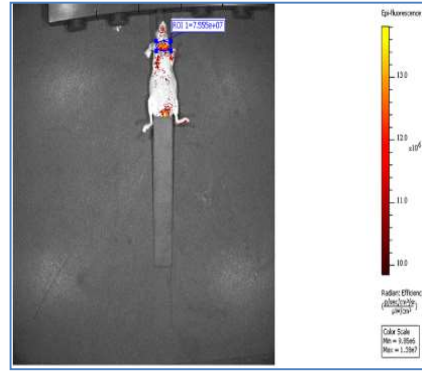


7. Gün

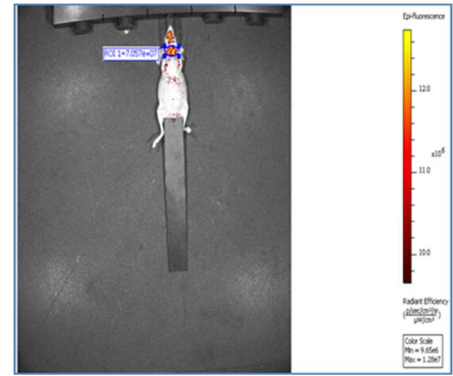
14. Gün

Şekil 4.6. Dokсорubisin grubu (1) *in vivo* görüntüleri

Tablo 4.2 ve Şekil 4.6 'den de görüldüğü gibi Dokсорubisin tedavisinden sonra 1. farenin 7. günde tümör hacmi $111,9 \text{ mm}^3$, $10,7 \text{ mm}^3$, $245,6 \text{ mm}^3$ 3 adet tümör hacmi 14. günde 1 adet tümör olarak boyutu olarak $68,9 \text{ mm}^3$ ' e küçülmüştür.



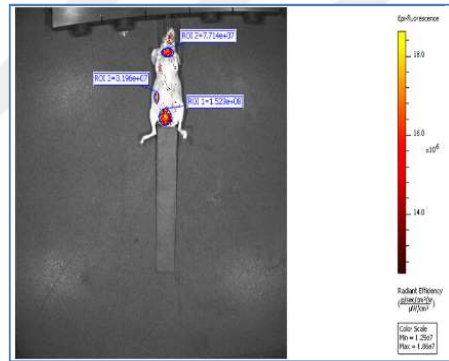
7. Gün



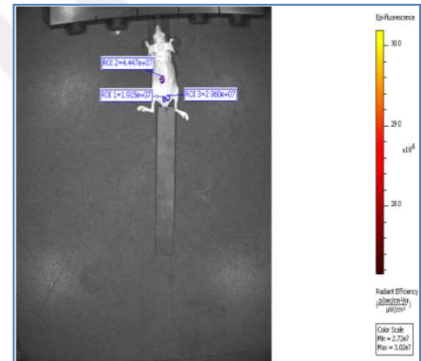
14. Gün

Şekil 4.7. Doksorubisin grubu (2) *in vivo* görüntüleri.

Tablo 4.2 ve Şekil 4.7 'den de görüldüğü gibi Doksorubisin tedavisinden sonra 2. farenin 7. günde tümör hacmi $468,6 \text{ mm}^3$ iken 14. günde tümör boyutu $436,2 \text{ mm}^3$ e küçülmüştür.



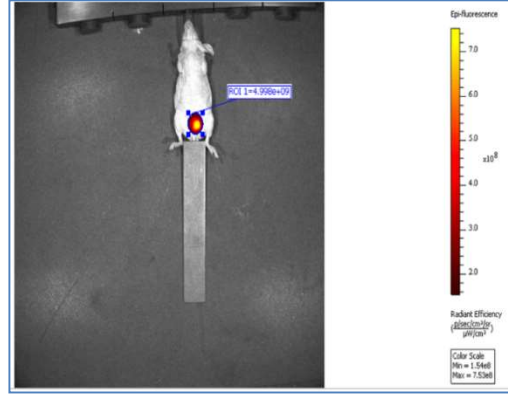
7. Gün



14. Gün

Şekil 4.8. Doksorubisin grubu (3) *in vivo* görüntüleri.

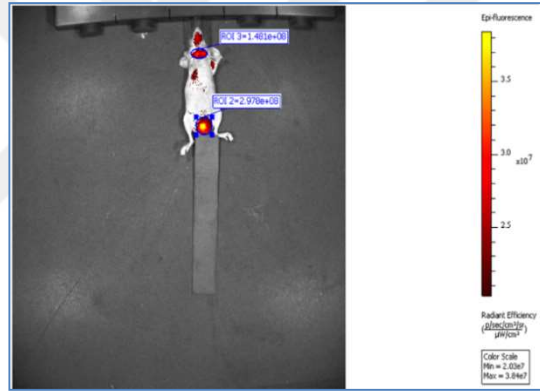
Tablo 4.2 ve Şekil 4.8 'den de görüldüğü gibi Doksorubisin tedavisinden sonra 3. Farenin 1. tümörü $527,1 \text{ mm}^3$ tümör hacminden 14. günde $19,0 \text{ mm}^3$ e küçülmüştür. 2. Tümör $296,3 \text{ mm}^3$ den $30,6 \text{ mm}^3$ e küçülmüştür. 3. Tümör $12,2 \text{ mm}^3$ den $7,7 \text{ mm}^3$ e küçülmüştür.



7. Gün

Şekil 4.9. Doksorubisin grubu (4) *in vivo* görüntüleri.

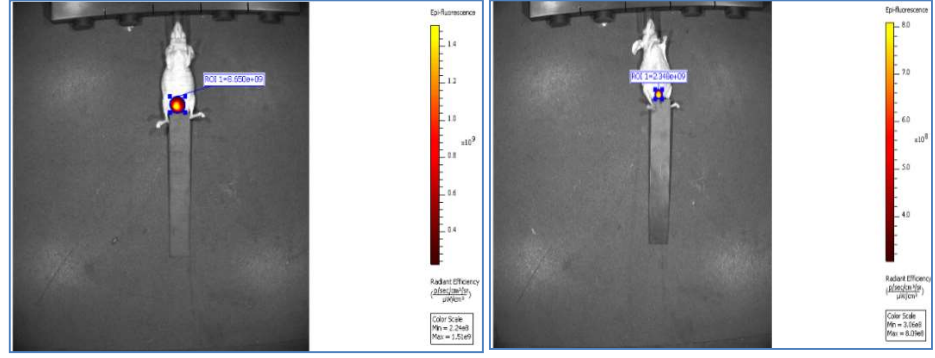
Doksorubisin grubunda yeralan 4. nude fare 11. günde ex olmuştur.



7. Gün

Şekil 4.10. Doksorubisin grubu (5) *in vivo* görüntüleri.

Doksorubisin grubunda yeralan 5. nude fare 9. günde ex olmuştur.

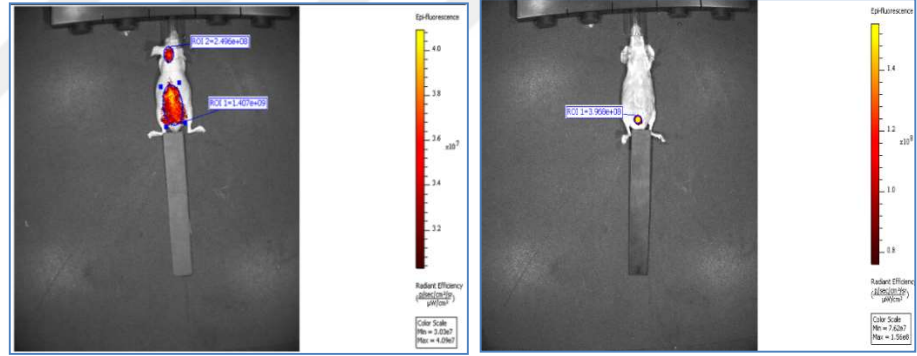


7. Gün

14. Gün

Şekil 4.11. DANP grubu (1) *in vivo* görüntüleri

Tablo 4.3 ve Şekil 4.11' den de görüldüğü gibi DANP tedavisinden sonra 1. farenin 7. günde tümör hacmi $430,2 \text{ mm}^3$ 14. günde tümör boyutu $279,3 \text{ mm}^3$ e küçülmüştür.

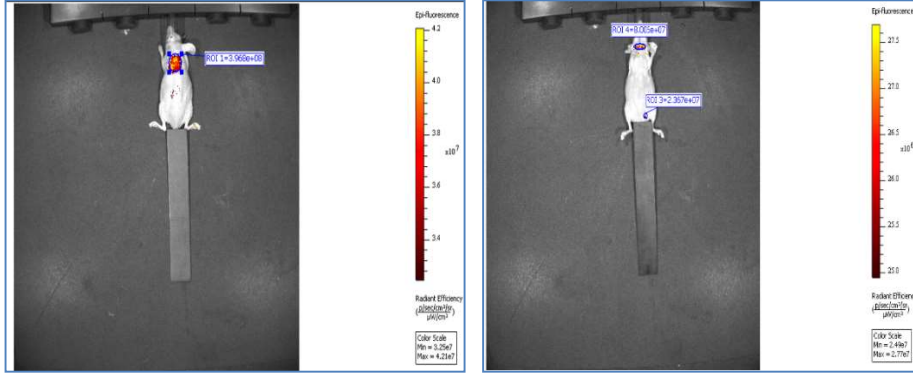


7. gün

14. gün

Şekil 4.12. DANP grubu (2) *in vivo* görüntüleri

Tablo 4.3 ve Şekil 4.12' den de görüldüğü gibi DANP tedavisinden sonra 2. farenin 7. günde hacmi $549,9 \text{ mm}^3$ olan tümör 14. günde $16,5 \text{ mm}^3$ e küçülmüştür. 7. günde 178 mm^3 lük diğer tümörün ise yok olduğu tespit edilmiştir.

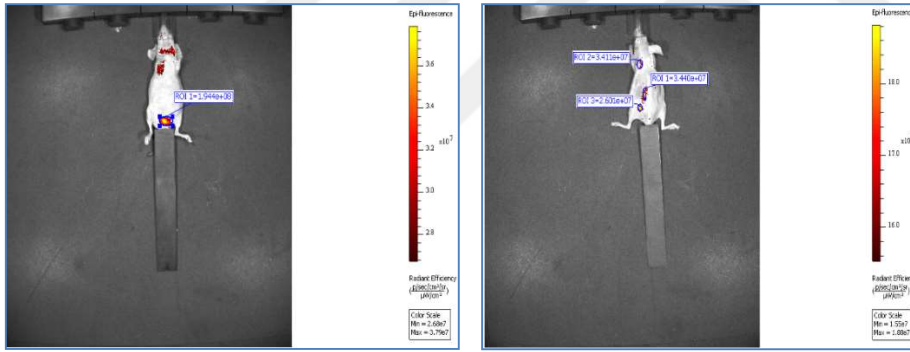


7. gün

14. Gün

Şekil 4.13. DANP grubu (4) *in vivo* görüntüleri

Tablo 4.3 ve Şekil 4.13 'den de görüldüğü gibi DANP tedavisinden sonra 4. farenin 7. günde tümör hacmi 295,3 mm³'den 14. günde tümör boyutu 91,3 mm³'e küçülmüştür.



7. gün

14. gün

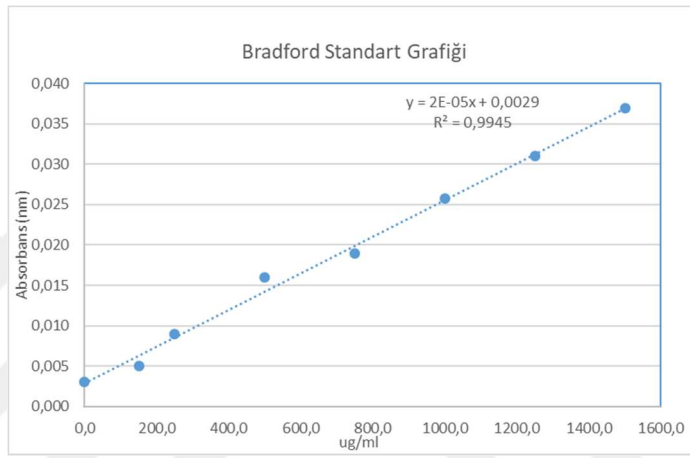
Şekil 4.14. DANP grubu (5) *in vivo* görüntüleri

Tablo 4.3 ve Şekil 4.14 'den de görüldüğü gibi DANP tedavisinden sonra 1. farenin 7. günde tümör hacmi 326,5 mm³ 'den 14. günde tümör boyutu 30,6 mm³'e küçülmüştür. Ayrıca 25,3 mm³ ve 49, mm³'lük küçük tümör oluşumları gözlemlenmektedir.

DANP grubunda yeralan 3. nude fare 6. günde ex olmuştur, bu nedenle görüntü alınamamıştır.

4.2 Örnek Hazırlama ve Protein İzolasyonu

Herbir gruptan elde edilen karaciğer dokuları 14. günün sonunda kendi grubu içinde parçalanarak, birleştirilmiştir (pooled sample). Karaciğer dokularının homojenizasyonu sonrası hazırlanan karaciğer lizatlarının protein miktarının belirlenmesi için standart grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.15). Grafik doğrultusunda herbir deney grubuna ait tüm örneklerin (pooled sample) içerdiği protein miktarı 1D ve 2D elektroforez ve kütle spektroskopisi analizleri için hesaplanmıştır.

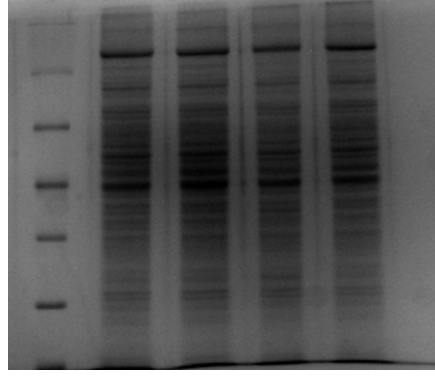


Şekil 4.15. Bradford Tayini Standart Grafiği

$y=2E-05x+0,0029$ bradford standart grafiği denklemi doğrultusunda; Grup 1: Sağlıklı karaciğer dokusu protein miktarı: 21,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Grup 2: Kanser karaciğer dokusu protein miktarı: 38,7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Grup 3: Doksorubisin tedavi sonrası protein miktarı: 33,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Grup 4: DANP tedavi sonrası karaciğer dokusu protein miktarı: 23,45 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ olarak hesaplanmıştır.

4.3 Proteinlerin SDS-PAGE Tekniği ile Kütlelerine Göre Ayrılması

Herbir deney grubundaki karaciğer lizatlarının kalite kontrolü için örnekler 4-20% Tris HCl anyKD precast jelde yürütülmüştür. Görüntülenen jelde proteinlere ilişkin bant ayrımları açıkça görülmektedir. Elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.16' da verilmiştir.



Şekil 4.16. Protein örneklerinin deney grupları bazında jel görüntüsü (Soldan sağa bantlar: Marker-Sağlıklı grup-DANP tedavi grup-Doksorubisin tedavi grup-Kanser grup)

➤ 1D (birinci boyut) jel elektroforezi

1D (birinci boyut) jel elektroforezi izoelektrik fokuslama için iki farklı tipte IPG jel ve iki farklı izoelektrik fokuslama protokolü uygulanmıştır.

Protokol 1 :

Herbir deney grubu için grup içi 3 paralel olacak şekilde 12 adet ReadyStrip IPG pH 3-10, 11 cm (BIORAD) hazır jeller ile; 1. basamakta voltajın sabit olup, akımın değiştiği “rapid mode” modda 20 dakika, 2. basamakta voltajın aşağıdaki formül doğrultusunda arttığı “Gradual ramping mode” modda 1 saat $V = B + (N^2 \times (E - B)/T^2)$ (B = başlangıç voltajı, E = bitiş voltajı, N = deney süresi, T = toplam zaman) ve 3. Basamakta yine rapid modda yaklaşık 2,5 saat izoelektrik fokuslama gerçekleşmiştir (Protean®, 2024). 1D elektroforez sonrası jeller 2D elektroforez yapılacağı için boyanarak kontrolü yapılmamıştır. 2D elektroforez için jeller -20 °C saklanmıştır.

Protokol 2 :

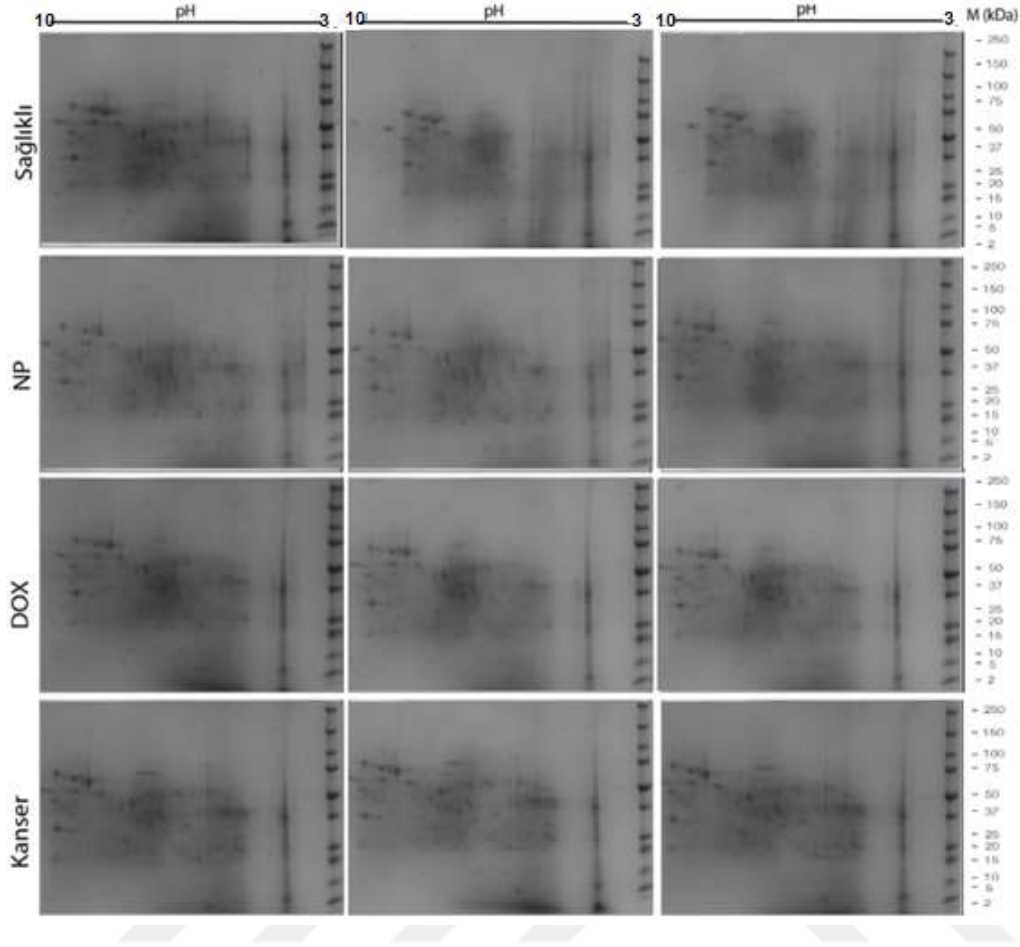
Herbir deney grubu için grup içi 3 paralel olacak şekilde 12 adet ReadyStrip IPG pH 3-10, 11 cm NL (non lineer) (BIORAD) hazır jeller ile 1. basamakta 250 voltajın sabit olup, akımın değiştiği “rapid mode” modda 20 dakika, 2. Basamakta 8000 voltajın sabit modda 2,5 saat 3. Basamakta 30000 voltta izoelektrik fokuslama gerçekleşmiştir.

➤ **2D elektroforez (2D SDS-PAGE)**

Protokol 1 :

IEF sonrası ReadyStrip IPG pH 3-10, 11 cm (BIORAD) hazır jeller bekletilmeden 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS içeren pH 8.3 Tris/Glycine/SDS içeren yürütme tamponu eklenerek Criterion Dodeca BIORAD cihazında ısınmanın kontrolü için sabit 200 V yerine 120 V' da 58 dakika 4-20% Crit TGX Stain-Free 11cmIPG/prep+1 jeller (BIORAD) üzerinden yürütülmüştür. Jellerin stain free özelliğinden dolayı boyama öncesi görüntüleri direk cihaz ekranında alınarak kontrol edilmiştir. Sonrasında Jeller Coomassie(Brilliant) Blue ile boyanarak görüntüleri White screen(BIORAD) kullanılarak alınmıştır.

4-20% Crit TGX Stain-Free 11cmIPG/prep+1 Precast hazır jel kullanımı ile gerçekleştirilen elektroforez sonrası elde edilen jel görüntüleri kontrol grubu (Kanser grup) ve test grupları (DANP tedavi ve Doksorubisin tedavi) doğrultusunda karşılaştırılmıştır. Ayrıca sağlıklı gruba karşı kanser grubunun da karşılaştırılması yapılmıştır. Sağlıklı grup (n=3), Kanser grup(n=3), Doksorubisin grup (n=3) ve DANP grup (n=3) 2D jel görüntüleri Şekil 4.17'de verilmiştir.

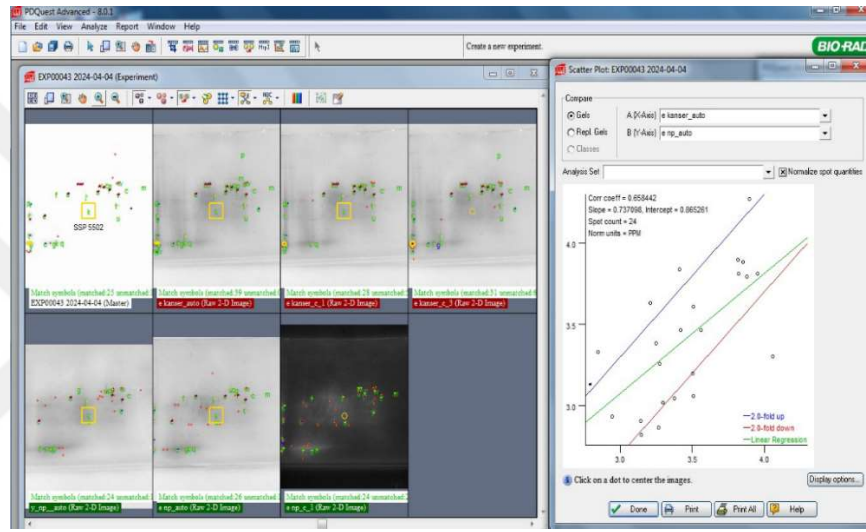


Şekil 4.17. Sağlıklı grup (n=3), Kanser grup(n=3), Doksorubisin grup (n=3) ve DANP grup (n=3) 2D jel görüntüleri (pH 3-10, 11 cm IPG Strip jel ile)

Jel görüntülerinin analizi için kontrol ve test örnekleri tanımlanmıştır. Jel görüntü analizlerinin PdQuest Advance (BIORAD) 8.0 versiyonu ile spot analizleri yapılması için öncelikle görüntüler export edilerek tif uzantısında kaydedilmiştir. Herbir deney grubuna ait master jel seçilerek her bir grup için hem kendi paralel görüntüleri(grup içi) hem de kontrol ve test grupları (gruplar arası) arasında karşılaştırmaları yapılmıştır. Spotların analizi öncesi herbir jel için analizde kullanılan tüm spotlarının toplam intensitelerinin (densitelerinin) her bir spotun intensitelerine (densitite) oranlanması ile normalizasyon seçimi yapılmıştır. Kontrol ve test grupları arasında farklılaşan (artan veya azalan protein ekspresyonları (ifade edilen proteinleri)) proteinlerin tespiti için istatistiksel olarak en az iki kat değişim kriterine uygun olanlar Quant adında analiz kümesinde belirlenmiştir. Kontrol ve test gruplarının kendi içinde istatistiksel olarak % 95 güven seviyesinde intensiteleri aynı olduğu saptanmış spotlar Statistic, Statistic ve Quant kümelerinin kesişim kümesi olan analiz kümesi Booln adı altında grup içinde

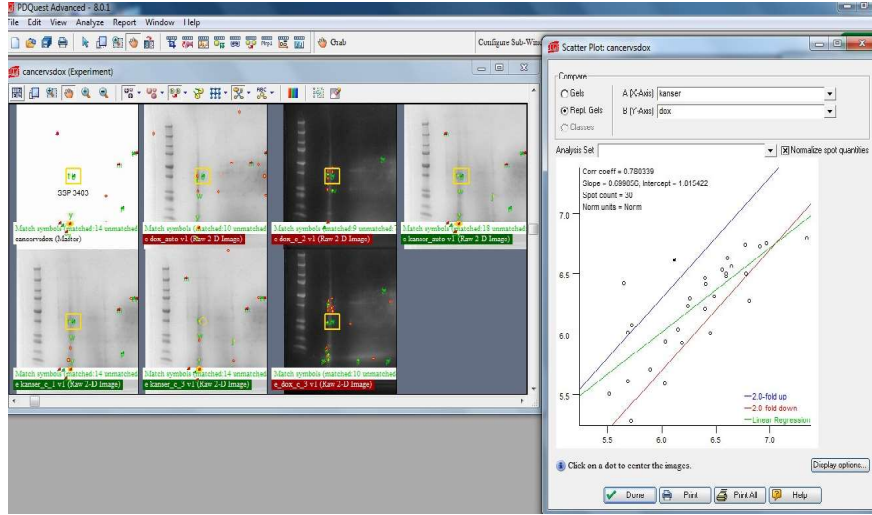
% 95 güven seviyesinde intensiteleri uyuşan, gruplar arasında ise en az 2 kat intensiteleri farklılaşan spot sayıları belirlenmiştir.

Kontrol (Kanser) ve Test (DANP tedavi grubu) grubuna ait herbir grupta 3 paralel jel görüntülerinin değerlendirilmesi PdQuest™ analizi ile gerçekleştirilmiştir. Quant kümesinde 53 adet spot, Statistic kümesinde 21 adet spot ve her iki kümenin kesişim kümesi olan Booln kümesinde ise 11 adet spot saptanmıştır. LC-MS ile karakterize edilmek üzere 8 adet spot seçilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Kanser gruba karşı DANP tedavi grubu dağılım grafiğinden ilgili spot yerinin tanımlanmasına ait PdQuest temsili görüntüsü (spot 5502)

Kontrol (Kanser) ve Test (Doksorubisin tedavi grubu) grubuna ait herbir grupta 3 paralel jel görüntülerinin değerlendirilmesi PdQuest™ ile analizi ile gerçekleştirilmiştir. Quant kümesinde 23 adet spot, Statistic kümesinde 22 adet spot ve her iki kümenin kesişim kümesi olan Booln kümesinde ise 9 adet spot saptanmıştır. LC-MS ile karakterize edilmek üzere 7 adet spot seçilmiştir (Şekil 4.19).

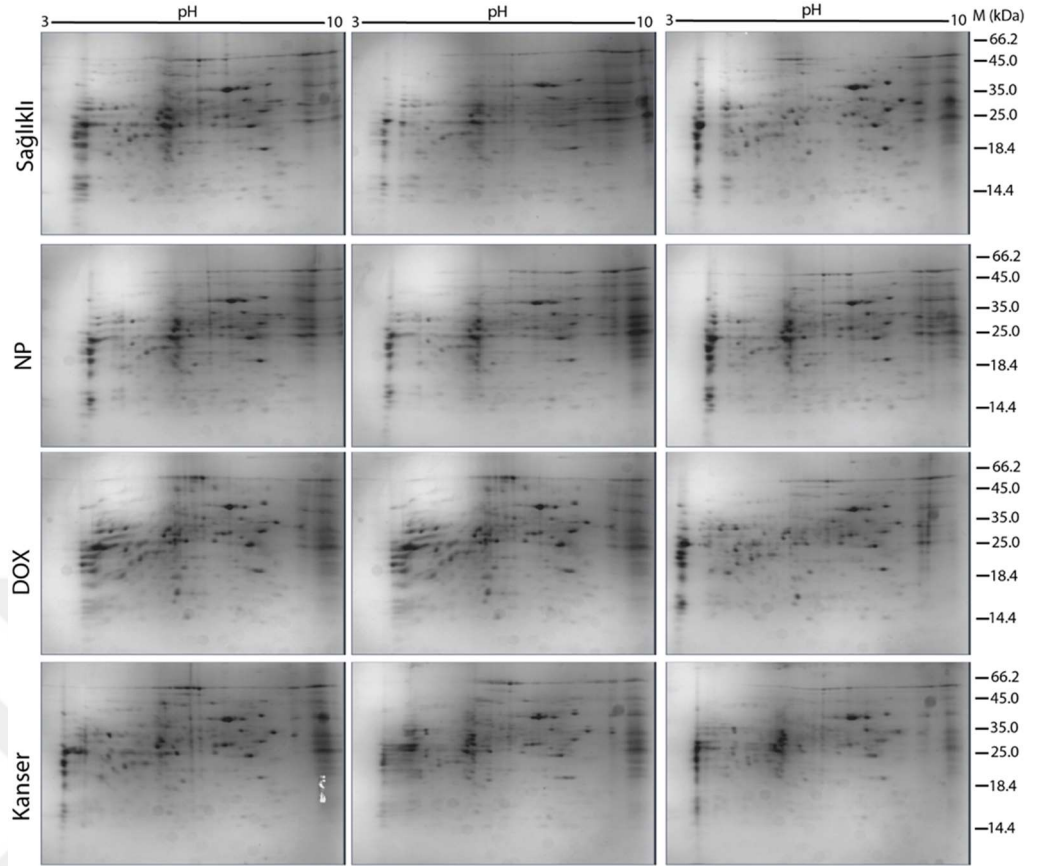


Şekil 4.19. Kanser karşı Doksorubisin tedavi grubu dağılım grafiğinden ilgili spot yerinin tanımlanmasına ait PdQuest temsili görüntüsü (spot 3403)

Protokol 2:

IEF sonrası ReadyStrip IPG pH 3-10, 11 cm NL (non linear) (BIORAD) IPG strip jeller 11 cm 4-20% Criterion TGX Stain-Free 11cmIPG/prep+1 jeller (BIORAD) üzerine yerleştirilerek 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS içeren pH 8.3 Tris/Glycine/SDS içeren yürütme tamponu eklenerek Mini Dodeca BIORAD cihazında sabit 200 V' da 40 dakika yürütüldü. Sonrasında Jeller Coomassie(Brilliant) Blue ile boyanarak görüntüleri White screen(BIOAD) kullanılarak alınmıştır.

Elde edilen jel görüntüleri Kontrol Grubu ve Test grupları doğrultusunda karşılaştırılmıştır. Sağlıklı grup (n=3), kontrol (Kanser) grup (n=3), Doksorubisin tedavi grup (n=3) ve DANP tedavi grup (n=3) elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.20' da verilmiştir



Şekil 4.20. Sağlıklı grup, Kanser grup, Doksorubisin grup (n=3) ve DANP grup (n=3) 2D jel görüntüleri (pH 3-10, 11 cm NL (non lineer) IPG Strip jel ile)

Bu jellerde istenilen spot sayısına ulaşamamıştır. Nokta eşleştirme için kapsanan alanın daraltılması (14-70 kDa arasında) ölçümde istatistiksel olarak değişikliklere yol açmıştır. Bu sebeple, spot seçimi için; izoelektrik fokuslamada 11 cm strip boyu ve pH:3-10 aralığına uygun IPG Stripler (ReadyStrip IPG pH 3-10, 12 x 11cm/ BIORAD), 2D elektroforezde ise marker kuyucuğu içeren 4-20% Crit TGX Stain-Free 11cmIPG/prep+1 jeller (BIORAD)'in kullanımı tercih edilmiştir.

4.4 Proteinlerin Kütle Spektrometresi ile Tayini

Çalışmamızda aşağıdan yukarı proteomik yaklaşımın iki farklı metodu; jel bazlı LC-MS ve etiketsiz nLC-MS karşılaştırmalı proteomik çalışması gerçekleştirilmiştir. Etiketsiz LC-MS çalışmasında tedavi gruplarına ait örnekler kanser örneklerine göre oranlanarak, veriler abundans oranı ölçülerek değerlendirilmiştir. Her iki yaklaşıma ait veriler ve bulgular Tablo 4.4, Tablo 4.5 ve Tablo 4.6' da sunulmuştur.

4.4.1 Poliakrilamid jelden proteinlerin ayrıştırılması ve kütle spektrometresi ile tanımlanması

Jel bazlı yaklaşımda, elde edilen jel haritasında çerçeve noktalarındaki spotların ayıklanması ve çalışma bölgesinde bulunan proteinler gözönünde bulundurularak PDQuest üzerinden tanımlama yapılmıştır. Bunlardan yalnızca $p \leq 0,05$ ve ekspresyonda 2 kat değişiklik gösteren protein noktaları seçilmiştir. Tedavi gruplarında $p \leq 0,05$ ve ekspresyonda 2 kat değişiklik gösteren 15 protein belirlenmiştir.

2D elektroforez sonrası elde edilen spotlar Proteome Factory AG (Almanya)'da LC-MS analizi ile analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular aşağıdaki gibidir:

Jel bazlı yaklaşımda, DANP tedavisi sonrası Kalretikulin, Glutamat dehidrogenaz, fruktoz-bisfosfataz aldolaz B, regukalsin proteinlerinin yukarı ekspresse olduğu 60 kDa ısı şok proteini, 71 kDa ısı şok proteini, yağ asidi bağlama proteini 1 ve endoplazmik retikulum şaperon BiP protein yapılarının ise aşağı ekspresse olduğu Mascot yüksek skor değerlerde tespit edildi (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Jel bazlı LC-MS sonucu DANP tedavisi sonrası değişen proteinler

DANP tedavisi sonrası yukarı regüle olan proteinler (Jel bazlı LC-MS)				
Erişim numarası	Protein	skor	pI	Mr
P14211	Kalretikulin	4146	4,33	48136
P26443	Glutamat dehidrogenaz	11412	8,05	61640
Q91Y97	Fruktoz-bisfosfataz aldolaz B	13191	8,52	39938
Q64374	Regukalsin	33899	5,15	33899
DANP tedavisi sonrası aşağı regüle olan proteinler (Jel bazlı LC-MS)				
Erişim numarası	Protein	skor	pI	Mr
P07724	60 kDa ısı şok proteini,	21809	5,91	61088
P12710	71 kDa ısı şok proteini, yağ asidi bağlama	26945	5,37	71055
P20029	Yağ asidi bağlama proteini 1	3797	8,59	14294
P20029	Endoplazmik retikulum şaperon BiP	26118	5,07	72492

Doksorubisin tedavi grubunda ise hemoglobin alt birim beta yukarı ekspresse olurken; albümin, yağ asidi bağlama proteini 1, serotransferrin, Endoplazmik retikulum şaperon BiP, peroksiredoksin-1, glutamat dehidrojenazın aşağı ekspresse olduğu Mascot yüksek skor değerlerinde tespit edildi (Tablo 4.5).

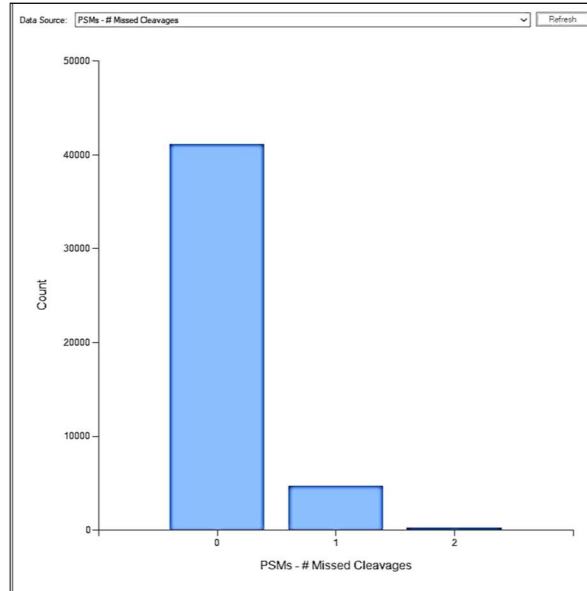
Tablo 4.5. Jel bazlı LC-MS sonucu Doksorubusin tedavisi sonrası değişen proteinler

Doksorubisin tedavisi sonrası yukarı regüle olan proteinler (Jel bazlı LC-MS)				
Erişim numarası	Protein	skor	pI	Mr
P02088	Hemoglobin alt birimi beta	2005	9,14	15944
Doksorubisin tedavisi sonrası aşağı regüle olan proteinler (Jel bazlı LC-MS)				
Erişim numarası	Protein	skor	pI	Mr
P07724	Albümin	28220	5,92	70700
P12710	Yağ asidi bağlama proteini 1	4182	8,59	14294
P20029	Endoplazmik retikulum şaperon BiP	19458	5,07	72492
P35700	Peroksiredoksi-1	6628	8,26	22390
P26443	Glutamat dehidrogenaz 1	11806	8,05	61640
Q92111	Serotransferrin	22947	6,94	78841

4.4.2 Karaciğer dokusundan proteinlerin kütle spektrometresi ile belirlenmesi

➤ FASP ile proteinlerin trypsin ile kesimleri ve peptitlerin eldesi

FASP protokolünde başlangıç peptid sayısı ile triptik parçalama sonrası elde edilen Peptid Spectrum Eşleşmeleri (PSMS) sayısına ait veriler karşılaştırılmış ve triptik parçalama sonunda kalan peptid sayısına ait verilere ait grafik Şekil 4.21’ de sunulmuştur. Grafik, kütle spektrometresi tayini öncesi peptid sayısının triptik parçalanması sonrasında kalmayacak kadar azaldığını ve triptik parçalamanın uygun olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.21. FASP protokolünde başlangıç peptid sayısı ile triptik parçalama sonrası elde edilen PSMS sayısına ait grafik

➤ *Nano-Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi (NLC-MS/MS) analizi ve verileri*

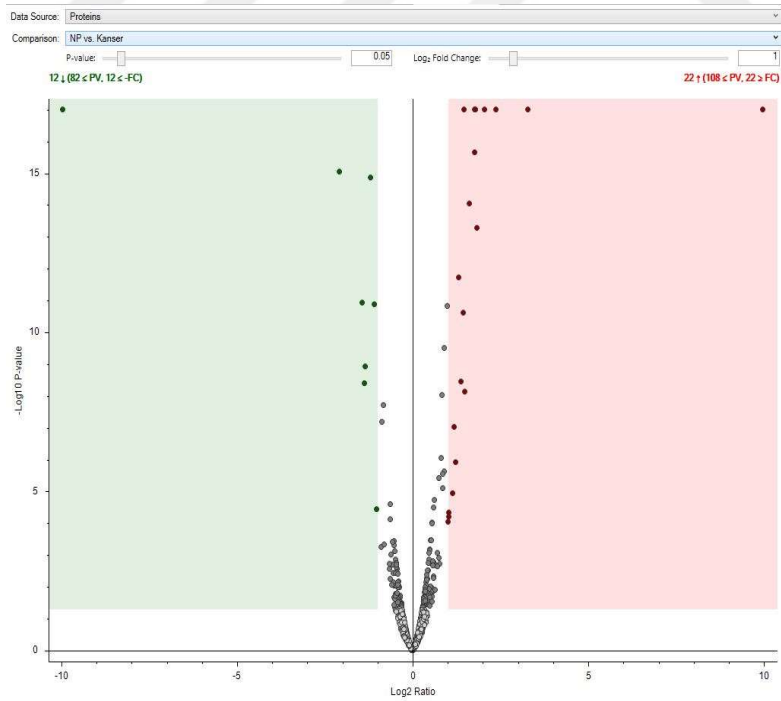
nLC-MS/MS sonucunda veritabanına ait 1434 adet protein yapı üzerinden 1200'e yakın protein için deney gruplarına ait abundans verileri elde edildi. Proteom Discoverer 2.5 yazılımı (Thermo Scientific, ABD) doğrultusunda hesaplanan ve kanser gruba karşı DANP tedavi grubu, kanser gruba karşı Doksorubisin tedavi grubu, kanser gruba karşı sağlıklı grup için değişim gösteren tüm proteinlere ait veriler Tablo 4.6 'de sunulmuştur. Tüm deney gruplarına ait elde edilen abundans verilerine bakıldığında; değişen koşullar altında (tedavi uygulaması öncesi/sonrası) proteomik verilerde regülasyonlar olduğu görülmektedir. Kontrol gruplarına karşı tedavi grupları karşılaştırılarak elde edilen abundance oranları; yukarı regule proteinler için: ≥ 2 aşağı regule proteinler için ≤ 0.5 kriteri seçilmiştir. Elde edilen tüm verilerde PSMS için q değerlerinin (minimum yanlış keşif oranı) 0.05' den çok çok küçük olduğu görülmektedir. Bu da tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen analizin kalitesini ve sonuçların güvenilirliğini ifade etmektedir (Käll et al., 2008).

Etiketsiz nLC MS sonucu elde edilen regüle proteinlerden koyu pembe dolgulu değerler: yukarı regülasyon gösteren protein değerlerini, yeşil dolgulu değerler: aşağı regülasyon gösteren protein değerlerini ifade etmektedir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Etiketsiz nLC MS sonucu elde edilen regüle proteinler (koyu pembe dolgulu değerler: yukarı regüle protein değerlerini, yeşil dolgulu değerler: aşağı regüle protein değerlerini ifade etmektedir.)

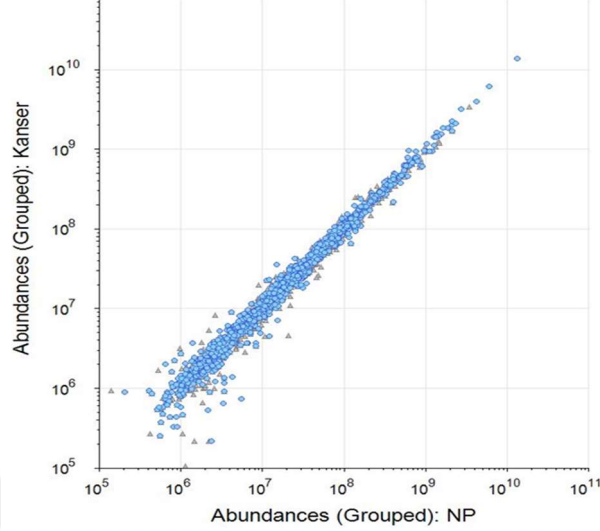
Erişim numarası	Protein	q-değeri	# Aminoasit	MW [kDa]	pI	Abundance Oran: (NP) / (Kanser)	Abundance Oran: (DOX) / (Kanser)	Abundance Oran: (Sağlıklı) / (Kanser)
P56393	Cytochrome c oxidase subunit 7B, mitochondrial OS=Mus musculus OX-10090 GN=Cox7b PE=1 SV=1	0.039	80	9	10.27	1000,000	1000,000	1000,000
Q3UP87	Neutrophil elastase OS=Mus musculus OX-10090 GN=Elane PE=1 SV=1	0.027	265	28.6	10.01	1000,000	1000,000	0,000
Q8RDX7	Sphingosine-1-phosphate lyase 1 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Sgpl1 PE=1 SV=1	0.046	568	63.6	9.1	1000,000	0,000	0,000
Q08692	Neutrophilic granule protein OS=Mus musculus OX-10090 GN=Ngp PE=1 SV=1	0	167	19.3	5.31	9,758	16,754	3,368
P56391	Cytochrome c oxidase subunit 6B1 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Cox6b1 PE=1 SV=2	0.037	86	10.1	8.72	5,195	1,682	3,471
Q8C1M7	Cytochrome P450 2D26 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Cyp2d26 PE=1 SV=1	0	500	56.9	6.64	4,151	0,001	0,001
P09528	Ferritin heavy chain OS=Mus musculus OX-10090 GN=Fhl1 PE=1 SV=2	0	182	21.1	5.88	3,546	33,882	2,820
P31725	Protein S100-A9 OS=Mus musculus OX-10090 GN=S100a9 PE=1 SV=3	0	113	13	7.17	3,438	4,403	1,456
P29391	Ferritin light chain 1 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Fhl1 PE=1 SV=2	0	183	20.8	6	3,415	37,592	2,854
P35576	Glucose-6-phosphatase catalytic subunit 1 OS=Mus musculus OX-10090 GN=G6pc1 PE=1 SV=2	0.001	357	40.4	9.01	3,405	2,399	4,814
P97926	Oxytocin receptor OS=Mus musculus OX-10090 GN=Oxtr PE=2 SV=2	0.024	388	42.8	9.5	3,036	0,001	3,931
Q05117	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Acps PE=1 SV=2	0.037	327	36.8	8.9	2,786	3,719	0,551
Q05816	Fatty acid-binding protein 5 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Fabp5 PE=1 SV=3	0	135	15.1	6.54	2,734	1,222	1,129
Q8BTM8	Filamin-A OS=Mus musculus OX-10090 GN=Flna PE=1 SV=5	0	2647	281	6.04	2,702	2,621	4,345
P10107	Annexin A1 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Anxa1 PE=1 SV=2	0	346	38.7	7.37	2,582	3,504	1,983
AA0A06YW77	Lipocalin 2 (Fragment) OS=Mus musculus OX-10090 GN=Lcn2 PE=1 SV=1	0	271	31	9.38	2,485	5,368	1,697
E9QN37	Macrophage-expressed gene 1 protein OS=Mus musculus OX-10090 GN=Mpeg1 PE=1 SV=1	0.023	720	79.1	6.04	2,319	4,602	2,780
P27005	Protein S100-A8 OS=Mus musculus OX-10090 GN=S100a8 PE=1 SV=3	0.003	89	10.3	5.68	2,256	4,534	1,566
Q91298	Chitinase-like protein 4 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Chil4 PE=1 SV=2	0.017	402	44.9	6.19	2,188	4,375	0,755
Q9R1P1	Proteasome subunit beta type-3 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Psm3 PE=1 SV=1	0.005	205	22.9	6.55	2,043	2,328	1,913
AA0140T8P9	Immunoglobulin kappa variable 14-111 (Fragment) OS=Mus musculus OX-10090 GN=lgkv14-111 PE=4 SV=2	0.017	117	13.2	6.57	2,022	9,845	0,743
Q5S1U0	Phosphoribosylformylglycinamide synthase OS=Mus musculus OX-10090 GN=Pfss PE=1 SV=1	0.018	1337	144.5	5.67	2,001	2,166	1,385
Q3V117	ATP-citrate synthase OS=Mus musculus OX-10090 GN=Acly PE=1 SV=1	0	1101	120.7	7.44	1,963	1,083	1,237
Q9R0H0	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Acox1 PE=1 SV=5	0	661	74.6	8.48	1,875	1,088	2,352
P19639	Glutathione S-transferase Mu 3 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Gstm3 PE=1 SV=2	0	218	25.7	7.77	1,780	3,436	1,274
AA05H1ZK8K	Immunoglobulin kappa constant (Fragment) OS=Mus musculus OX-10090 GN=lgkc PE=1 SV=1	0	107	11.9	5.41	1,666	1,912	0,489
Q91WJ2	Solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 26 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Slc22a26 PE=1 SV=1	0.025	552	61.3	8.27	1,638	1,181	0,388
P60766	Cell division control protein 42 homolog OS=Mus musculus OX-10090 GN=Cdc42 PE=1 SV=2	0	191	21.2	6.55	1,589	1,491	1,062
Q9DC61	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha OS=Mus musculus OX-10090 GN=Pmpca PE=1 SV=1	0.022	524	58.2	6.83	1,551	2,250	1,336
P24721	Asialoglycoprotein receptor 2 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Asgr2 PE=1 SV=1	0.023	301	34.9	5.21	1,514	1,567	0,001
AA0A06YW2R2	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker) (Fragment) OS=Mus musculus OX-10090 GN=lggh1 PE=1 SV=1	0	393	43.4	6.44	1,498	6,140	0,167
P16015	Carbonic anhydrase 3 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Ca3 PE=1 SV=3	0	260	29.3	7.37	1,471	1,099	4,368
AA0A04I0B7	Protein SDA1 OS=Mus musculus OX-10090 GN=SDa1 PE=1 SV=1	0.007	687	79.5	9.2	1,445	0,458	0,062
Q8VCC2	Liver carboxylesterase 1 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Cesl1 PE=1 SV=1	0	565	62.6	6	1,399	0,271	1,534
Q09043	Napsin-A OS=Mus musculus OX-10090 GN=Napsa PE=1 SV=1	0.048	419	45.5	7.5	1,392	1,263	0,001
P12246	Serum amyloid P-component OS=Mus musculus OX-10090 GN=Apcs PE=1 SV=2	0	224	26.2	6.35	1,360	7,179	0,111
P02088	Hemoglobin subunit beta-1 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Hbb-b1 PE=1 SV=2	0	147	15.8	7.65	1,337	0,797	2,492
P68033	Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Actc1 PE=1 SV=1	0	377	42	5.39	1,326	1,084	4,364
Q8CB66	Histone H2B OS=Mus musculus OX-10090 GN=H2bc23 PE=1 SV=1	0	134	14.9	10.37	1,311	1,386	2,165
P02089	Hemoglobin subunit beta-2 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Hbb-b2 PE=1 SV=2	0	147	15.9	8.05	1,277	0,880	2,449
P01897	H-2 class I histocompatibility antigen, L-D alpha chain OS=Mus musculus OX-10090 GN=H2-L PE=1 SV=2	0	362	40.7	6.25	1,248	1,787	0,409
P06801	NADP-dependent malic enzyme OS=Mus musculus OX-10090 GN=Me1 PE=1 SV=2	0	572	63.9	7.44	1,232	2,576	1,813
P70296	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Pebp1 PE=1 SV=3	0	187	20.8	5.4	1,200	2,006	1,417
Q88833	Cytochrome P450 4A10 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Cyp4a10 PE=1 SV=2	0	509	58.3	8.75	1,189	0,480	1,553
Q8Q2R3	Pyrethroid hydrolase Ces2a OS=Mus musculus OX-10090 GN=Ces2a PE=1 SV=1	0	558	61.9	6.16	1,175	1,919	2,527
Q91W54	S-methylmethionine-homocysteine S-methyltransferase BHMt2 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Bhm2 PE=1 SV=2	0	363	39.8	6.54	1,156	2,291	1,989
Q00897	Alpha-1 antitrypsin 1-4 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Serpina1d PE=1 SV=1	0	413	46	5.44	1,154	0,001	2,787
Q4KN81	Histocompatibility 2, Q region locus 2 OS=Mus musculus OX-10090 GN=H2-Q2 PE=1 SV=1	0	360	40.4	5.39	1,145	0,001	0,001
Q91V88	Alpha globin 1 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Hba-a1 PE=1 SV=1	0	142	15.1	8.22	1,095	0,985	0,082
Q8BGL3	Sulfotransferase 2A8 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Sult2a8 PE=1 SV=1	0	282	33.3	7.02	1,066	1,446	10,830
E9F991	Bis(S'-adenosyl)-triphosphatase OS=Mus musculus OX-10090 GN=Fhit PE=1 SV=1	0.017	213	24.5	7.31	1,050	1,528	0,001
Q8R084	UDP-glucuronosyltransferase OS=Mus musculus OX-10090 GN=Ugt2b1 PE=1 SV=1	0	529	60.1	8.37	1,029	0,982	2,573
Q62452	UDP-glucuronosyltransferase 1A9 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Ugt1a9 PE=1 SV=3	0	528	60	8.35	1,027	1,146	2,333
AA047586A0	Immunoglobulin heavy constant mu (Fragment) OS=Mus musculus OX-10090 GN=lghm PE=1 SV=2	0	476	52.6	6.39	1,015	0,710	0,444
Q63880	Carboxylesterase 3A OS=Mus musculus OX-10090 GN=Ces3a PE=1 SV=2	0	571	63.3	6.14	1,003	0,744	6,888
Q60866	Phosphotriesterase-related protein OS=Mus musculus OX-10090 GN=Pter PE=1 SV=1	0	349	39.2	6.67	995	0,484	1,001
Q9CYR9	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial OS=Mus musculus OX-10090 GN=Aco2 PE=1 SV=2	0	453	49.6	7.36	980	1,095	0,998
Q3VQ01	Dynein axonemal heavy chain 12 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Dna12 PE=1 SV=2	0.022	3086	356	6.06	963	0,491	0,778
Q9CWS0	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 OS=Mus musculus OX-10090 GN=DDa1 PE=1 SV=3	0	285	31.4	5.97	932	1,118	0,352
Q9CYW9	All-trans-retinol dehydrogenase [NAD(+)] ADH4 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Adh4 PE=1 SV=4	0.01	377	40.2	7.83	926	1,365	2,054
Q8VCU1	Carboxylesterase 3B OS=Mus musculus OX-10090 GN=Ces3b PE=1 SV=2	0	571	63.3	5.92	0,913	1,756	4,627
Q9P30	Peroxisomal coenzyme A diphosphatase NUDT7 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Nudt7 PE=1 SV=2	0	236	26.8	8.34	0,896	1,029	3,138
Q140H7	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 3, mitochondrial OS=Mus musculus OX-10090 GN=Acs3 PE=1 SV=2	0	282	74.5	6.63	0,891	0,845	0,919
Q3403	Amine sulfotransferase OS=Mus musculus OX-10090 GN=Sult3a1 PE=1 SV=1	0	293	35.2	6.55	0,890	0,624	3,914
Q62351	Transferin receptor protein 1 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Tfr PE=1 SV=1	0.006	763	85.7	6.57	0,880	0,287	0,761
P63325	45S ribosomal protein S10 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Rpl10 PE=1 SV=1	0	165	18.9	10.15	0,873	0,467	0,727
P97501	Flavin-containing monooxygenase 3 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Fmo3 PE=1 SV=1	0	534	60.5	8.37	0,869	0,570	0,017
Q35728	Cytochrome P450 4A14 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Cyp4a14 PE=1 SV=1	0	507	58.7	8.78	0,859	0,529	0,320
Q61792	LIM and SH3 domain protein 1 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Lasp1 PE=1 SV=1	0	263	30	7.05	0,854	0,432	0,661
Q61781	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Krt14 PE=1 SV=2	0	484	52.8	5.17	0,841	3,147	1,662
Q91W52	Transmembrane protein 19 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Tmem19 PE=1 SV=1	0.023	336	36.3	7.72	0,803	1,331	2,387
Q9D566	Sulfotransferase OS=Mus musculus OX-10090 GN=Sult1e1 PE=1 SV=1	0	295	35.6	7.01	0,781	0,492	0,322
Q9IKJ9	24-hydroxycholesterol 7-alpha-hydroxylase OS=Mus musculus OX-10090 GN=Cyp39a1 PE=1 SV=1	0	470	53.5	8.84	0,779	1,364	0,430
D3Y223	Mitochondrial amidoxime-reducing component 1 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Mtar1 PE=1 SV=2	0	342	38	8.32	0,772	0,437	0,649
Q91X75	Cytochrome P450 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Cyp2a5 PE=1 SV=1	0	494	56.7	9.2	0,740	0,482	0,501
Q9EP96	Solute carrier organic anion transporter family member 1A4 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Slco1a4 PE=1 SV=1	0	670	73.9	7.59	0,737	1,851	0,425
P04247	Myoglobin OS=Mus musculus OX-10090 GN=Mb PE=1 SV=3	0	154	17.1	7.62	0,727	1,786	6,187
Q8VCR2	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 13 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Hsd17b13 PE=1 SV=1	0	304	33.4	8.88	0,696	0,496	0,703
AA0A04I0I1	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3K OS=Mus musculus OX-10090 GN=Serpina3k PE=1 SV=1	0	418	46.6	5.16	0,694	2,491	3,293
P41317	Mannose-binding protein C OS=Mus musculus OX-10090 GN=Mbl2 PE=1 SV=2	0	244	25.9	5.06	0,679	2,459	0,776
Q9DCY0	Glycine N-acyltransferase-like protein Kegl1 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Kegl1 PE=1 SV=1	0	295	33.7	8.43	0,650	0,716	3,145
Q92111	Serotransferrin OS=Mus musculus OX-10090 GN=Tf PE=1 SV=1	0	697	76.7	7.18	0,647	0,457	0,578
P05063	Fructose-bisphosphate aldolase C OS=Mus musculus OX-10090 GN=Aldoc PE=1 SV=4	0.001	363	39.4	7.12	0,566	0,530	0,001
Q64464	Cytochrome P450 3A13 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Cyp3a13 PE=1 SV=1	0	503	57.5	8.57	0,547	0,368	0,192
Q8K0R6	Glycolipid transfer protein domain-containing protein 2 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Glt2p2 PE=1 SV=1	0.002	321	34.4	9.16	0,534	0,409	0,916
E9QSP6	Apolipoprotein C-II OS=Mus musculus OX-10090 GN=ApoC3 PE=1 SV=1	0	137	15.2	5.57	0,493	0,713	0,838
AA0A04I039	Histidine-rich glycoprotein OS=Mus musculus OX-10090 GN=Hrg PE=1 SV=1	0	536	60.4	7.61	0,471	0,557	0,509
P06728	Apolipoprotein A-IV OS=Mus musculus OX-10090 GN=Apoa4 PE=1 SV=3	0	395	45	5.47	0,434	0,504	0,382
AA0A06YV00	Immunoglobulin heavy constant gamma 2B (Fragment) OS=Mus musculus OX-10090 GN=lggh2b PE=1 SV=2	0	405	44.3	6.52	0,392	1,137	0,476
AA01Y7VJN6	Immunoglobulin heavy constant gamma 3 (Fragment) OS=Mus musculus OX-10090 GN=lggh3 PE=4 SV=1	0.022	399	44	7.14	0,387	0,598	0,429
ABY5NA	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 13 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Hsd17b13 PE=1 SV=1	0	264	29.4	9.58	0,369	0,555	1,057
Q9D404	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, mitochondrial OS=Mus musculus OX-10090 GN=Oxsm PE=1 SV=1	0.022	459	48.6	7.06	0,234	0,995	1,090
Q9Q0F0	Keratin 78 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Krt78 PE=1 SV=1	0	1068	112.2	7.97	0,001	6,196	1,504
Q9DAK9	14 kDa phosphohistidine phosphatase OS=Mus musculus OX-10090 GN=Phtp1 PE=1 SV=1	0.005	124	14	5.53	0,001	1,103	0,863
AA0AG2JFN8	Immunoglobulin kappa variable 8-19 (Fragment) OS=Mus musculus OX-10090 GN=lgkb8-19 PE=1 SV=4	0.013	121	13.3	4.96	0,001	9,011	5,075
Q61578	NADPH:adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial OS=Mus musculus OX-10090 GN=Fdr PE=1 SV=1	0.03	494	54.2	8.66	0,001	1,469	3,107
Q9CQZ5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Ndufa6 PE=1 SV=1	0.01	131	15.3	10.11	0,001	1,021	0,807
Q9Q282	Cholesterol side-chain cleavage enzyme, mitochondrial OS=Mus musculus OX-10090 GN=Cyp11a1 PE=1 SV=1	0.016	526	60.3	9.39	0,000	0,000	1000,000
Q9Q088	Alpha-1 antitrypsin 1-5 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Serpina1e PE=1 SV=1	0	413	45.9	5.73	0,000	0,000	1000,000
E9Q120	Keratin 90 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Krt90 PE=1 SV=1	0	538	58.2	8.25	0,000	1000,000	1000,000
P04938	Major urinary protein 11 OS=Mus musculus OX-10090 GN=Mup11 PE=1 SV=2	0	181	20.7	4.94	0,000	0,000	51,777

DANP ile tedavi edilmiş karaciğer dokusundan elde edilen proteinler kontrol grubu karaciğer kanser dokusu ile karşılaştırılmıştır. İlaç uygulandığında bazı proteinlerin ifadesinin değişmiş olup, yukarı regüle (upregulated) eksprese olduğu ya da aşağı regüle (downregulated) eksprese olduğu bazılarının ise $p < 0.05$ olarak belirlediğimiz alanda aynı / benzer ölçüde kaldığını tespit edilmiştir. Kanser ve DANP tedavi numuneleri arasındaki karşılaştırmada 34 önemli ölçüde diferansiyel olarak eksprese edilen protein tespit edilmiştir (p değeri) $< 0,05$ ve $|\log_2 FC| > 1$ 'e göre ayarlanmış). $p < 0.05$ olan yukarı-regüle (Kontrol örneğine göre 2 kat ekspresyonun arttığı) 22 adet protein ve aşağı regüle 12 adet protein (Kontrol örneğine göre 2 kat ekspresyonun azalması) saptanmıştır. Elde edilen verilerin görselleştirilmesi adına volkan plot diagramından faydalanılmıştır (Şekil 4.22). Kanser gruba karşı DANP ile tedavi grubunu LC-MS ile proteom analizi sonucu volkan grafiği, kanser gruba karşı DANP ile tedavi grubunu karşılaştırarak ayrı ayrı proteinlerin göreceli bolluğunu (x ekseninde $\log_2$ oranı olarak çizilmiştir) gösterir. Y eksen, kanser ve DANP ile tedavi grubu arasında farklı şekilde ifade edilen her bir protein için Bonferroni'ye göre ayarlanmış P değerini çizer. $\log_2 FC$: $\log_2$ kat değişimi, diferansiyel proteinlerin kat değişiminin (tedavi sonrası/öncesi) $\log_2$ oranına dönüştürülmüş değerlerini temsil eder.



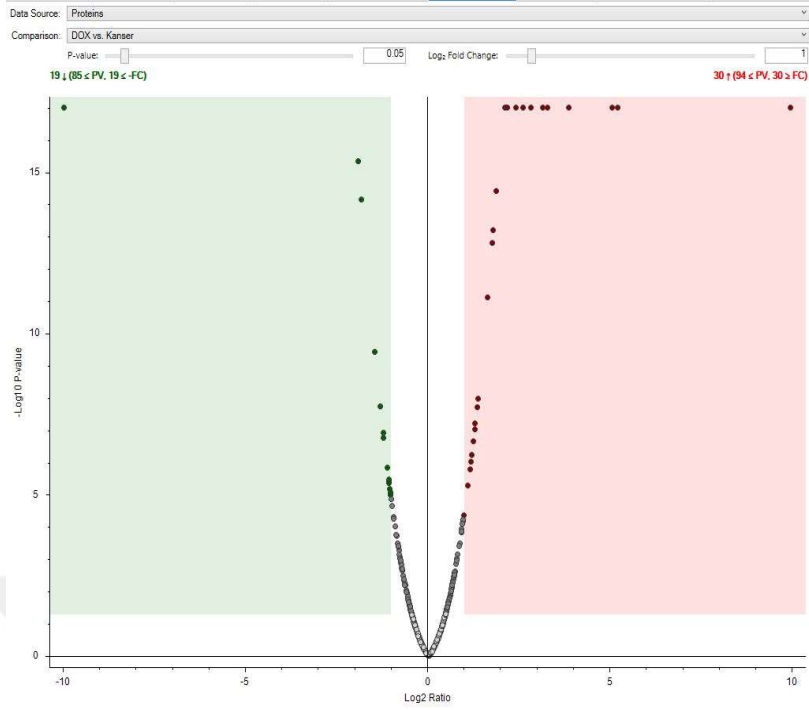
Şekil 4.22. Kanser gruba karşı DANP ile tedavi grubunu LC-MS ile proteom analizi sonucu volkan grafiği.

Kontrol kanser grubuna göre DANP ile tedavi edilen iki farklı koşuldaki proteom arasındaki ilişki ve varyasyonun ifadesi için Şekil 4.23’ de Kanser-DANP (NP) tedavi dağılım grafiği verilmiştir.



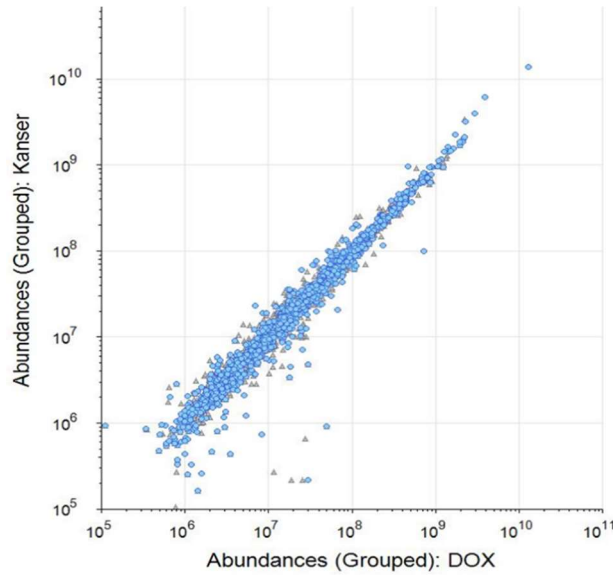
Şekil 4.23. Kontrol kanser grubuna göre DANP ile tedavi edilen iki farklı koşuldaki proteom arasındaki ilişki

Doksorubisin ile tedavi edilmiş karaciğer dokusundan elde edilen proteinler kontrol grubu kanser karaciğer dokusu ile karşılaştırıldı. Kanser ve Doksorubisin tedavi numuneleri arasındaki karşılaştırma, 49 önemli ölçüde diferansiyel olarak eksprese edilen protein tespit edilmiştir (p değeri $< 0,05$ ve $|\log 2 \text{ FC}| > 1$ ’e göre ayarlanmış). $p < 0.05$ olan yukarı-regüle (Kontrol örneğine göre 2 kat ekspresyonun artması) 30 adet anlamlı protein ve 19 adet aşağı-regüle (Kontrol örneğine göre 2 kat ekspresyonun azalması) olmuş protein saptanmıştır. Elde edilen verileri görselleştirilmesi adına volkan plot diagramından faydalanılmıştır (Şekil 4.24). Kanser gruba karşı Doksorubisin ile tedavi grubu LC-MS ile proteom analizi sonucu volkan grafiği kanser gruba karşı Doksorubisin ile tedavi grubunu karşılaştırarak ayrı ayrı proteinlerin göreceli bolluğunu (x ekseninde $\log_2$ oranı olarak çizilmiştir) gösterir. Y eksen, kanser ve Doksorubisin ile tedavi grubu arasında farklı şekilde ifade edilen her bir protein için Bonferroni’ye göre ayarlanmış P değerini çizer.



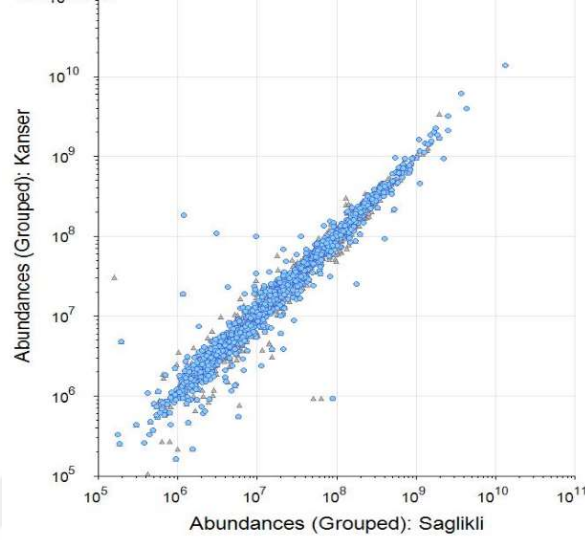
Şekil 4.24. Kanser gruba karşı Doksorubisin ile tedavi grubu LC-MS ile proteom analizi sonucu volkan grafiği.

Kontrol kanser grubuna göre Doksorubisin ile tedavi edilen iki farklı koşuldaki proteom arasındaki ilişki ve varyasyonun ifadesi için Şekil 4.25’ de Kanser-Doksorubisin (DOX) dağılım grafiği verilmiştir.



Şekil 4.25. Kontrol kanser grubuna göre Doksorubisin ile tedavi edilen iki farklı koşuldaki proteom arasındaki ilişki

Kontrol sağlıklı doku grubuna göre kanserli doku arasında iki farklı koşuldaki proteom arasındaki ilişki ve varyasyonun ifadesi için ayrıca şekil 4.26’ de de sağlıklı-kanser doku dağılım grafiğinde verilmiştir.



Şekil 4.26. Kontrol kanser örneğine göre Sağlıklı grubun iki farklı koşuldaki proteom arasındaki ilişki

Şekil 4.22 ve Şekil 4.24 tedavi gruplarında özellikle $\log_2$ kat değişimi, 0.5 ile 2 arasında olan proteinlerin (x ekseninde pembe ve mavi bölge arasında kalan dikey çizgiler arasındaki beyaz bölge ile 0 noktasında kalan alan), değişim miktarının verilen veri seti içinde uyumlu bir şekilde artış gösterdiği ve rastgele olmadığı görülmektedir.

- *Verilerin Biyoinformatik Analizi*

Tedavi sonrası değişen proteinler için fonksiyonel genomik verileri filtreleyerek, değerlendirmek ve proteinlerin yapısal, fonksiyonel ve değişen özelliklerini açıklamak için STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) veritabanından yararlanılmıştır (Szklarczyk et al., 2023). STRING Veritabanı aynı zamanda GO (Gene Ontology), Pfam (protein families database) ve KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) gibi bir dizi fonksiyonel sınıflandırma sistemlerini de kullandığı için verilerimiz bu veri tabanında incelenmiştir.

Etiketsiz nLC-MS yaklaşımla tespit edilen proteinlerden DANP ile tedavi sonrası yukarı ekspresyona uğrayan 22 adet protein tespit edilmiştir (Tablo 4.7).

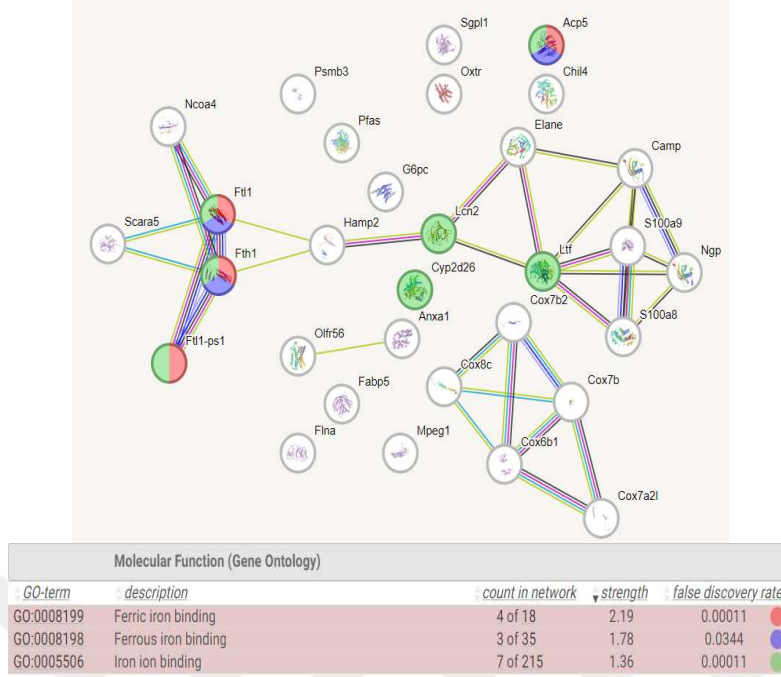
Tablo 4.7. DANP tedavi grubu yukarı regüle proteinler (etiketsiz nLC-MS analizi ile)

Erişim numarası	Protein	MW [kDa]	pI	Abundans Oranı: (NP) / (Kanser)
P56393	Cytochrome c oxidase subunit 7B, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cox7b PE=1 SV=1	9	10,27	1000,000
Q3UP87	Neutrophil elastase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Elane PE=1 SV=1	28,6	10,01	1000,000
Q8ROX7	Sphingosine-1-phosphate lyase 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sgpl1 PE=1 SV=1	63,6	9,1	1000,000
O08692	Neutrophilic granule protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ngp PE=1 SV=1	19,3	5,31	9,758
P56391	Cytochrome c oxidase subunit 6B1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cox6b1 PE=1 SV=2	10,1	8,72	5,195
Q8CIM7	Cytochrome P450 2D26 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cyp2d26 PE=1 SV=1	56,9	6,64	4,151
P09528	Ferritin heavy chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Fth1 PE=1 SV=2	21,1	5,88	3,546
P31725	Protein S100-A9 OS=Mus musculus OX=10090 GN=S100a9 PE=1 SV=3	13	7,17	3,438
P29391	Ferritin light chain 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ftl1 PE=1 SV=2	20,8	6	3,415
P35576	Glucose-6-phosphatase catalytic subunit 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=G6pc1 PE=1 SV=2	40,4	9,01	3,405
P97926	Oxytocin receptor OS=Mus musculus OX=10090 GN=Oxtr PE=2 SV=2	42,8	9,5	3,036
Q05117	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Acp5 PE=1 SV=2	36,8	8,9	2,786
Q05816	Fatty acid-binding protein 5 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Fabp5 PE=1 SV=3	15,1	6,54	2,734
Q8BTM8	Filamin-A OS=Mus musculus OX=10090 GN=Flna PE=1 SV=5	281	6,04	2,702
P10107	Annexin A1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Anxa1 PE=1 SV=2	38,7	7,37	2,582
AOA0A6YW77	Lipocalin 2 (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=Lcn2 PE=1 SV=1	31	9,38	2,485
E9QN37	Macrophage-expressed gene 1 protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mpeg1 PE=1 SV=1	79,1	6,04	2,319
P27005	Protein S100-A8 OS=Mus musculus OX=10090 GN=S100a8 PE=1 SV=3	10,3	5,68	2,256
Q91298	Chitinase-like protein 4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Chil4 PE=1 SV=2	44,9	6,19	2,188
Q9R1P1	Proteasome subunit beta type-3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Psb3 PE=1 SV=1	22,9	6,55	2,043
AOA140T8P9	Immunoglobulin kappa variable 14-111 (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=lgkv14-111 PE=4 SV=2	13,2	6,57	2,022
Q5SUR0	Phosphoribosylformylglycinamide synthase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pfas PE=1 SV=1	144,5	5,67	2,001

Etiketsiz nLC-MS yaklaşımla tespit edilen proteinlerden Doksorubisin ile tedavi sonrası yukarı ekspresyona uğrayan 30 adet protein tespit edilmiştir (Tablo 4.8).

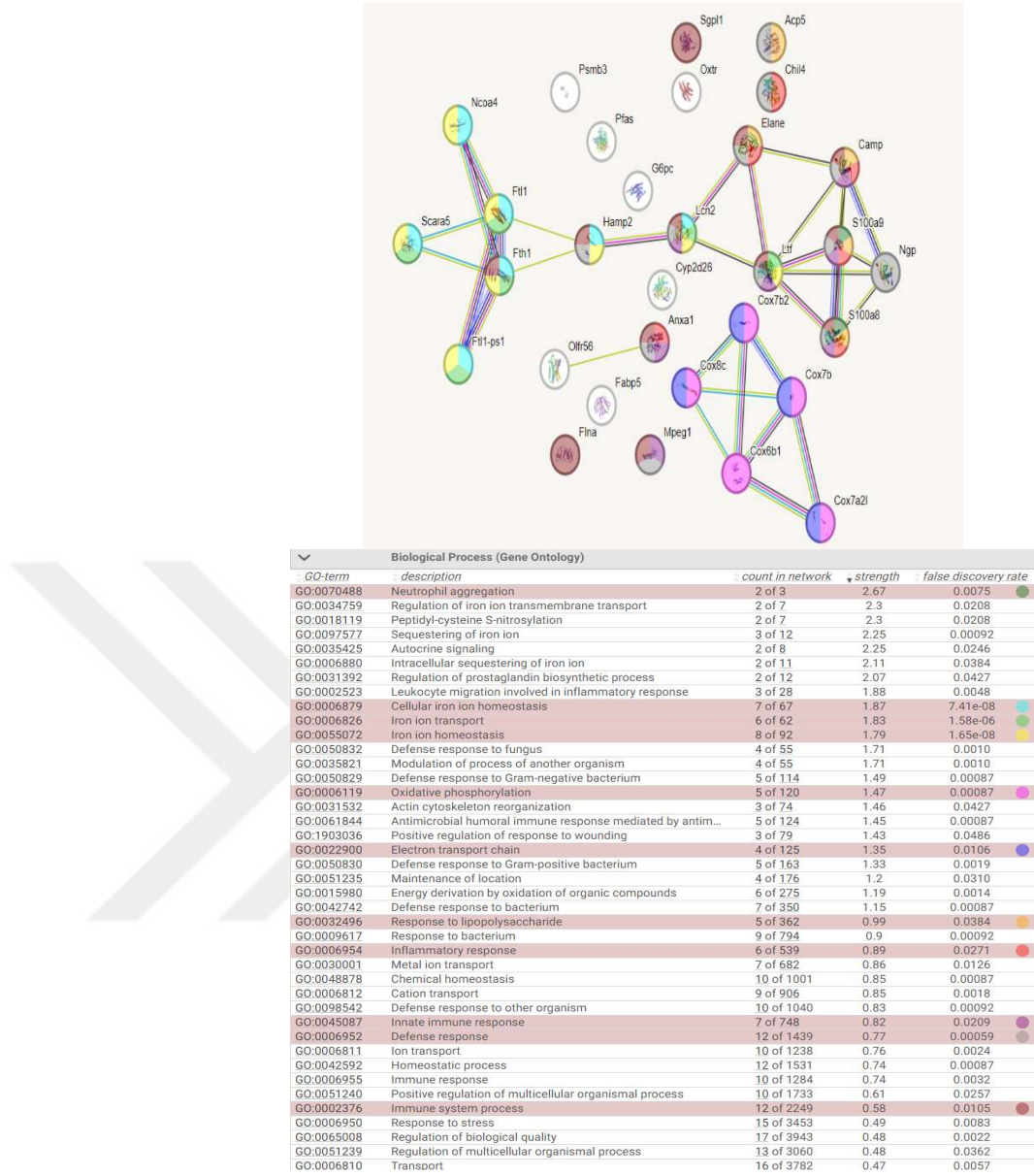
Tablo 4.8. Doksorubisin tedavi grubu yukarı regüle proteinler (etiketsiz nLC-MS analizi ile)

Erişim numarası	Protein	MW [kDa]	pI	Abundance Oranı: (DOX) / (Kanser)
P56393	Cytochrome c oxidase subunit 7B, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cox7b PE=1 SV=1	9	10,27	1000,000
Q3UP87	Neutrophil elastase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Elane PE=1 SV=1	28,6	10,01	1000,000
E9Q120	Keratin 90 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Krt90 PE=1 SV=1	58,2	8,25	1000,000
O08692	Neutrophilic granule protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ngp PE=1 SV=1	19,3	5,31	14,754
P09528	Ferritin heavy chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Fth1 PE=1 SV=2	21,1	5,88	33,882
P31725	Protein S100-A9 OS=Mus musculus OX=10090 GN=S100a9 PE=1 SV=3	13	7,17	4,403
P29391	Ferritin light chain 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ftl1 PE=1 SV=2	20,8	6	37,592
P35576	Glucose-6-phosphatase catalytic subunit 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=G6pc1 PE=1 SV=2	40,4	9,01	2,399
Q05117	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Acp5 PE=1 SV=2	36,8	8,9	3,719
Q8BTM8	Filamin-A OS=Mus musculus OX=10090 GN=Flna PE=1 SV=5	281	6,04	2,621
P10107	Annexin A1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Anxa1 PE=1 SV=2	38,7	7,37	3,504
AOA0A6YW77	Lipocalin 2 (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=Lcn2 PE=1 SV=1	31	9,38	5,368
E9QN37	Macrophage-expressed gene 1 protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mpeg1 PE=1 SV=1	79,1	6,04	4,602
P27005	Protein S100-A8 OS=Mus musculus OX=10090 GN=S100a8 PE=1 SV=3	10,3	5,68	4,534
Q91298	Chitinase-like protein 4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Chil4 PE=1 SV=2	44,9	6,19	4,375
Q9R1P1	Proteasome subunit beta type-3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Psb3 PE=1 SV=1	22,9	6,55	2,328
AOA140T8P9	Immunoglobulin kappa variable 14-111 (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=lgkv14-111 PE=4 SV=2	13,2	6,57	9,845
Q5SUR0	Phosphoribosylformylglycinamide synthase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pfas PE=1 SV=1	144,5	5,67	2,166
P19639	Glutathione S-transferase Mu 3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gstm3 PE=1 SV=2	25,7	7,77	3,436
Q9DC61	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pmpca PE=1 SV=1	58,2	6,83	2,250
AOA0A6YWR2	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker) (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=lgcg1 PE=1 SV=1	43,4	6,44	6,140
P12246	Serum amyloid P-component OS=Mus musculus OX=10090 GN=Apcs PE=1 SV=2	26,2	6,35	7,179
P06801	NADP-dependent malic enzyme OS=Mus musculus OX=10090 GN=Me1 PE=1 SV=2	63,9	7,44	2,576
P70296	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pebp1 PE=1 SV=3	20,8	5,4	2,006
Q91WS4	S-methylmethionine-homocysteine S-methyltransferase BHMT2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Bhmt2 PE=1 SV=2	39,8	6,54	2,291
Q61781	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Krt14 PE=1 SV=2	52,8	5,17	3,147
AOA0A4J01	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3K OS=Mus musculus OX=10090 GN=Serpina3k PE=1 SV=1	46,6	5,16	2,491
P41317	Mannose-binding protein C OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mbl2 PE=1 SV=2	25,9	5,06	2,459
E9Q0F0	Keratin 78 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Krt78 PE=1 SV=1	112,2	7,97	6,196
AOA0G2JFN8	Immunoglobulin kappa variable 8-19 (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=lgkv8-19 PE=1 SV=4	13,3	4,96	9,011



Şekil 4.28. DANP tedavi grubu yukarı regüle proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre renklendirilmiş STRING analizi (10.05.2024 tarihli STRING version 12.0)

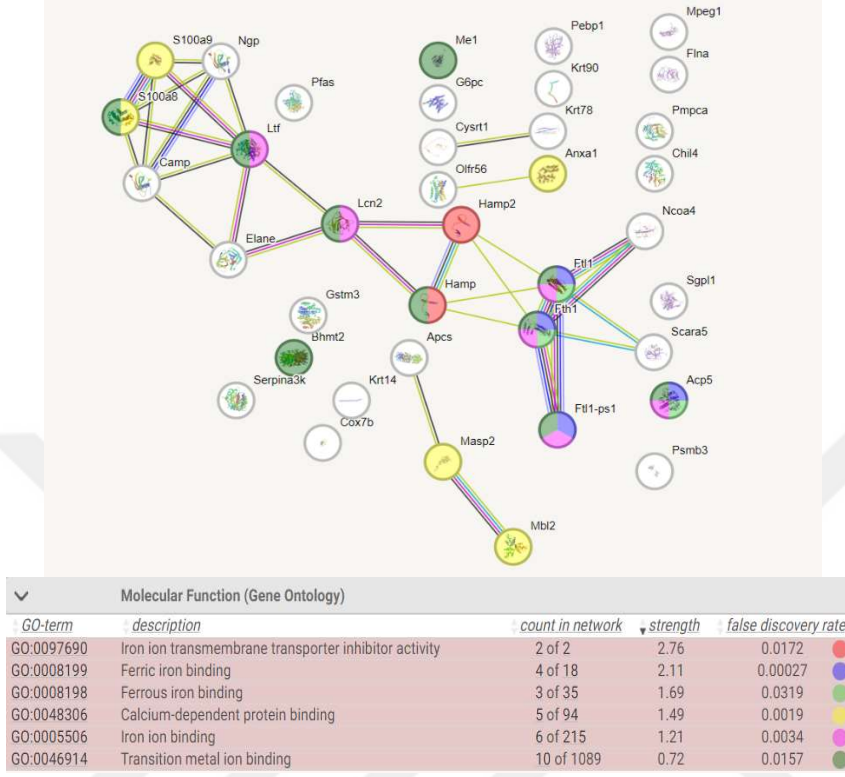
Etiketsiz nLC-MS yaklaşımıyla tespit edilen proteinlerden DANP ile tedavi sonrası yukarı ekspresyona uğrayan proteinlerin özellikle sorumlu olduğu moleküler fonksiyon demir bağlama süreçleri olup, nötrofil agregasyonu, demir iyonu homeostazisi, oksidatif fosforilasyon, elektron taşıma zinciri, lipopolisakarit yanıtı, inflamatuvar yanıt, doğuştan gelen bağışıklık yanıtı, savunma yanıtı, bağışıklık sistemi gibi biyolojik süreçlerde görev alan proteinler olduğunu ve potansiyel protein-protein etkileşimlerini göstermektedir. 22 adet yukarı regüle olmuş proteinlerin moleküler fonksiyonlarına ve hangi metabolik yollarda görev aldığı Şekil 4.28 ve Şekil 4.29’ da verilmiştir.



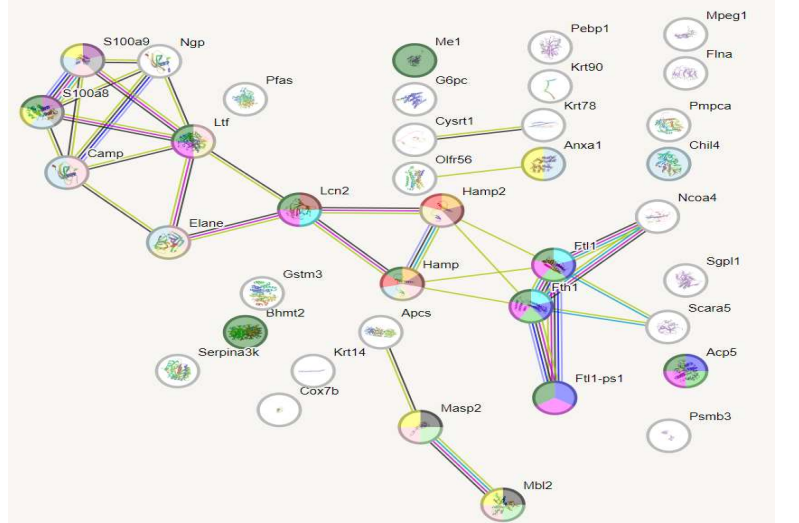
Şekil 4.29. DANP grup yukarı regüle proteinlerin biyolojik prosesler doğrultusunda renklendirilen ve protein-protein etkileşimini gösteren STRING analizi (10.05.2024 tarihli STRING version 12.0)

Etiketsiz nLC-MS yaklaşımıyla tespit edilen proteinlerden Doksorubisin ile tedavi sonrası yukarı ekspresyona uğrayan proteinlerin özellikle sorumlu olduğu moleküler fonksiyonlar demir iyonu transmembran taşıyıcı inhibitör aktivitesi, ferrik/ferröz iyon bağlanması, kalsiyuma bağımlı protein bağlanması, demir iyonu bağlanması, geçiş metali iyonu bağlanması süreçleri olup, nötrofil agregasyonu, demir iyonu transportu, kompleman aktivasyonu, hücre öldürme, humoral bağışıklık tepkisi, hücre yüzeyi tanıma reseptör sinyal yolu gibi biyolojik süreçlerde görev alan proteinler olduğu ve birbirleri ile etkileşimde olduğu tespit edilmiştir.

30 adet yukarı regüle olmuş proteinlerin moleküler fonksiyonlarına ve hangi metabolik yollarda görev aldığı Şekil 4.30 ve Şekil 4.31’ de verilmiştir.



Şekil 4.30. Dokсорubisin tedavi grubu yukarı regüle proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre renklendirilmiş STRING analizi (10.05.2024 tarihli STRING version 12.0)



GO-term	description	count in network	strength	false discovery rate
GO:1904255	Negative regulation of iron ion transmembrane transporter a...	2 of 2	2.76	0.0063
GO:1904039	Negative regulation of iron export across plasma membrane	2 of 2	2.76	0.0063
GO:0070488	Neutrophil aggregation	2 of 3	2.58	0.0089
GO:0034759	Regulation of iron ion transmembrane transport	3 of 7	2.39	0.00030
GO:1904479	Negative regulation of intestinal absorption	2 of 6	2.28	0.0223
GO:0018119	Peptidyl-cysteine S-nitrosylation	2 of 7	2.22	0.0273
GO:0002752	Cell surface pattern recognition receptor signaling pathway	2 of 7	2.22	0.0273
GO:0097577	Sequestering of iron ion	3 of 12	2.16	0.0010
GO:0035425	Autocrine signaling	2 of 8	2.16	0.0325
GO:2000646	Positive regulation of receptor catabolic process	2 of 10	2.06	0.0434
GO:0001867	Complement activation, lectin pathway	2 of 10	2.06	0.0434
GO:0060586	Multicellular organismal iron ion homeostasis	2 of 11	2.02	0.0492
GO:0044793	Negative regulation by host of viral process	2 of 11	2.02	0.0492
GO:0068880	Intracellular sequestering of iron ion	2 of 11	2.02	0.0492
GO:006879	Cellular iron ion homeostasis	8 of 67	1.84	4.63e-09
GO:0006826	Iron ion transport	7 of 62	1.81	8.40e-08
GO:0002523	Leukocyte migration involved in inflammatory response	3 of 28	1.79	0.0067
GO:0051873	Killing by host of symbiont cells	3 of 29	1.77	0.0072
GO:0055072	Iron ion homeostasis	9 of 92	1.75	1.53e-09
GO:0050832	Defense response to fungus	5 of 55	1.72	4.95e-05
GO:0035821	Modulation of process of another organism	4 of 55	1.62	0.0014
GO:0050829	Defense response to Gram-negative bacterium	6 of 114	1.48	4.95e-05
GO:0061844	Antimicrobial humoral immune response mediated by antim...	6 of 124	1.44	6.99e-05
GO:0051702	Biological process involved in interaction with symbiont	5 of 108	1.43	0.00071
GO:0050830	Defense response to Gram-positive bacterium	7 of 163	1.39	1.76e-05
GO:0006959	Humoral immune response	8 of 260	1.25	1.76e-05
GO:0001906	Cell killing	4 of 142	1.21	0.0296
GO:0042742	Defense response to bacterium	9 of 350	1.17	1.30e-05
GO:0030216	Keratinocyte differentiation	4 of 156	1.17	0.0391
GO:0009617	Response to bacterium	12 of 794	0.94	1.14e-05
GO:0051346	Negative regulation of hydrolase activity	6 of 414	0.92	0.0220
GO:0098542	Defense response to other organism	14 of 1040	0.89	2.46e-06
GO:0045087	Innate immune response	10 of 748	0.89	0.00025

Şekil 4.31. Doksorubisin grup yukarı regüle proteinlerin biyolojik prosesler doğrultusunda renklendirilen ve protein-protein etkileşimini gösteren STRING analizi (10.05.2024 tarihli STRING version 12.0)

DANP tedavi grubu yanıtı sonrası yukarı regule proteinlerin, Doksorubisin tedavi grubu yukarı regule proteinlerine göre özellikle oksidatif fosforilasyon, elektron taşıma zinciri reaksiyonlarını ve lipopolisakkarit yanıt reaksiyonlarını içeren biyolojik süreçlerde farklanmaya neden olduğu görülmektedir. Doksorubisin tedavi sonrası protein yanıtında ise DANP tedavi grubu yukarı regule proteinlerine göre kompleman aktivasyonu, humoral bağışıklık tepkisi, hücre yüzeyi tanıma reseptör sinyal yolu gibi metabolik süreçlerde farklanma olduğu tespit edilmiştir.

DANP ile tedavi sonrası aşağı ekspresyona uğrayan anlamlı 12 protein tespit edilmiştir (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. DANP tedavi grubu aşağı regüle proteinler

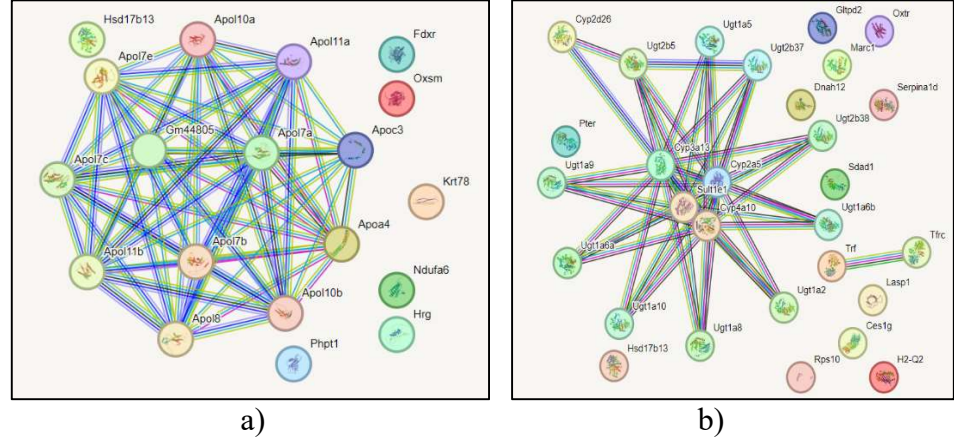
Erişim numarası	Protein	MW [kDa]	pI	Abundans Oranı: (NP) / (Kanser)
E9QP56	Apolipoprotein C-III OS=Mus musculus OX=10090 GN=Apoc3 PE=1 SV=1	15,2	5,57	0,493
AOA0R4J039	Histidine-rich glycoprotein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hrg PE=1 SV=1	60,4	7,61	0,471
P06728	Apolipoprotein A-IV OS=Mus musculus OX=10090 GN=Apoa4 PE=1 SV=3	45	5,47	0,434
AOA0A6YVPO	Immunoglobulin heavy constant gamma 2B (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ighg2b PE=1 SV=2	44,3	6,52	0,392
AOA1Y7VJN6	Immunoglobulin heavy constant gamma 3 (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ighg3 PE=4 SV=1	44	7,14	0,387
A8Y5N4	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 13 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hsd17b13 PE=1 SV=1	29,4	9,58	0,369
Q9D404	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Oxsm PE=1 SV=1	48,6	7,06	0,234
E9Q0F0	Keratin 78 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Krt78 PE=1 SV=1	112,2	7,97	0,001
Q9DAK9	14 kDa phosphohistidine phosphatase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Phpt1 PE=1 SV=1	14	5,53	0,001
AOA0G2JFN8	Immunoglobulin kappa variable 8-19 (Fragment) OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ighv8-19 PE=1 SV=4	13,3	4,96	0,001
Q61578	NADPH:adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Fdxr PE=1 SV=1	54,2	8,66	0,001
Q9CQZ5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndufa6 PE=1 SV=1	15,3	10,11	0,001

Doksorubisin ile tedavi sonrası aşağı ekspresyona uğrayan anlamlı 19 protein tespit edilmiştir (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Doksorubisin tedavi grubu aşağı regüle proteinler

Erişim numarası	Protein	MW [kDa]	pI	Abundance Oranı: (DOX) / (Kanser)
Q8C1M7	Cytochrome P450 2D26 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cyp2d26 PE=1 SV=1	56,9	6,64	0,001
P97926	Oxytocin receptor OS=Mus musculus OX=10090 GN=Oxtr PE=2 SV=2	42,8	9,5	0,001
AOA0R4J0B7	Protein SDA1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sdad1 PE=1 SV=1	79,5	9,2	0,498
Q8VCC2	Liver carboxylesterase 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ces1 PE=1 SV=1	62,6	6	0,271
Q88833	Cytochrome P450 4A10 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cyp4a10 PE=1 SV=2	58,3	8,75	0,48
Q00897	Alpha-1-antitrypsin 1-4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Serpina1d PE=1 SV=1	46	5,44	0,001
Q4KN81	Histocompatibility 2, Q region locus 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=H2-Q2 PE=1 SV=1	40,4	5,39	0,001
Q60866	Phosphotriesterase-related protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pter PE=1 SV=1	39,2	6,67	0,484
Q3V0Q1	Dynein axonemal heavy chain 12 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Dnah12 PE=1 SV=2	356	6,06	0,491
Q62351	Transferrin receptor protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tfrc PE=1 SV=1	85,7	6,57	0,287
P63325	40S ribosomal protein S10 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rps10 PE=1 SV=1	18,9	10,15	0,467
Q61792	LIM and SH3 domain protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Lasp1 PE=1 SV=1	30	7,05	0,432
Q9D566	Sulfotransferase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Sult1e1 PE=1 SV=1	35,6	7,01	0,492
D3Y2Z3	Mitochondrial amidoxime reducing component 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mtar1 PE=1 SV=2	38	8,32	0,437
Q91X75	Cytochrome P450 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cyp2a5 PE=1 SV=1	56,7	9,2	0,482
Q8VCR2	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 13 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hsd17b13 PE=1 SV=2	33,4	8,88	0,496
Q921I1	Serotransferrin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tf PE=1 SV=1	76,7	7,18	0,497
Q64464	Cytochrome P450 3A13 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cyp3a13 PE=1 SV=1	57,5	8,57	0,368
Q8K0R6	Glycolipid transfer protein domain-containing protein 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Glt2 PE=1 SV=1	34,4	9,16	0,409

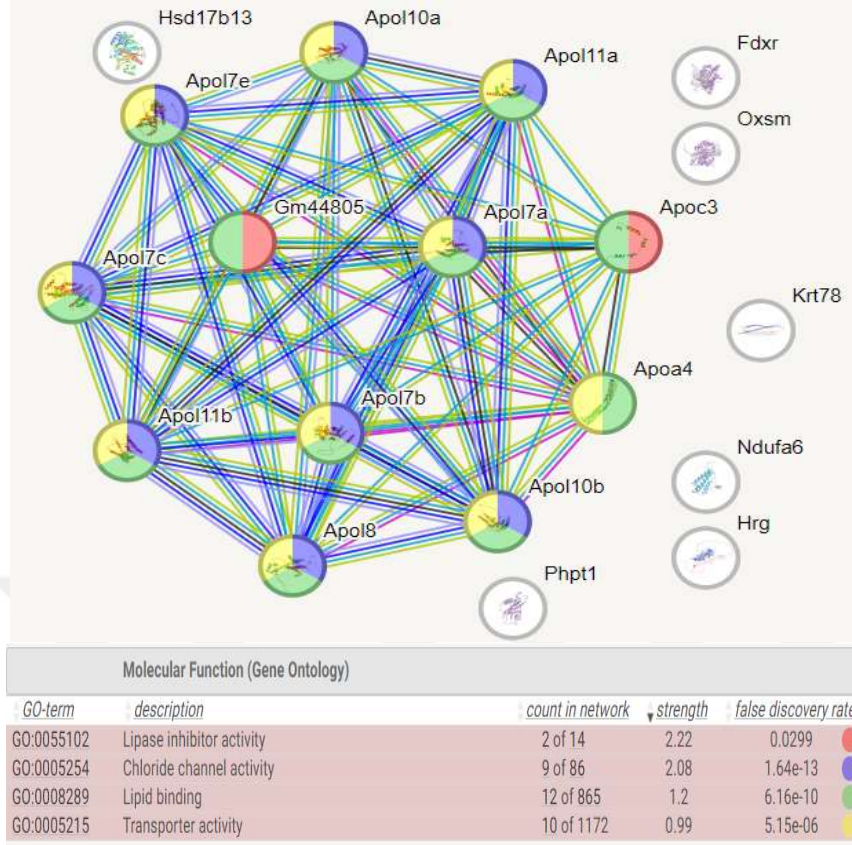
Tablo 4.9 ve Tablo 4.10 verilen DANP ve Doksorubisin grup aşağı regüle proteinlerin STRING analizi yüksek güven aralığında (high confidence=0.700) ve en fazla 10 bağlantı ayarları seçilerek yapılmıştır (Şekil 4.32).



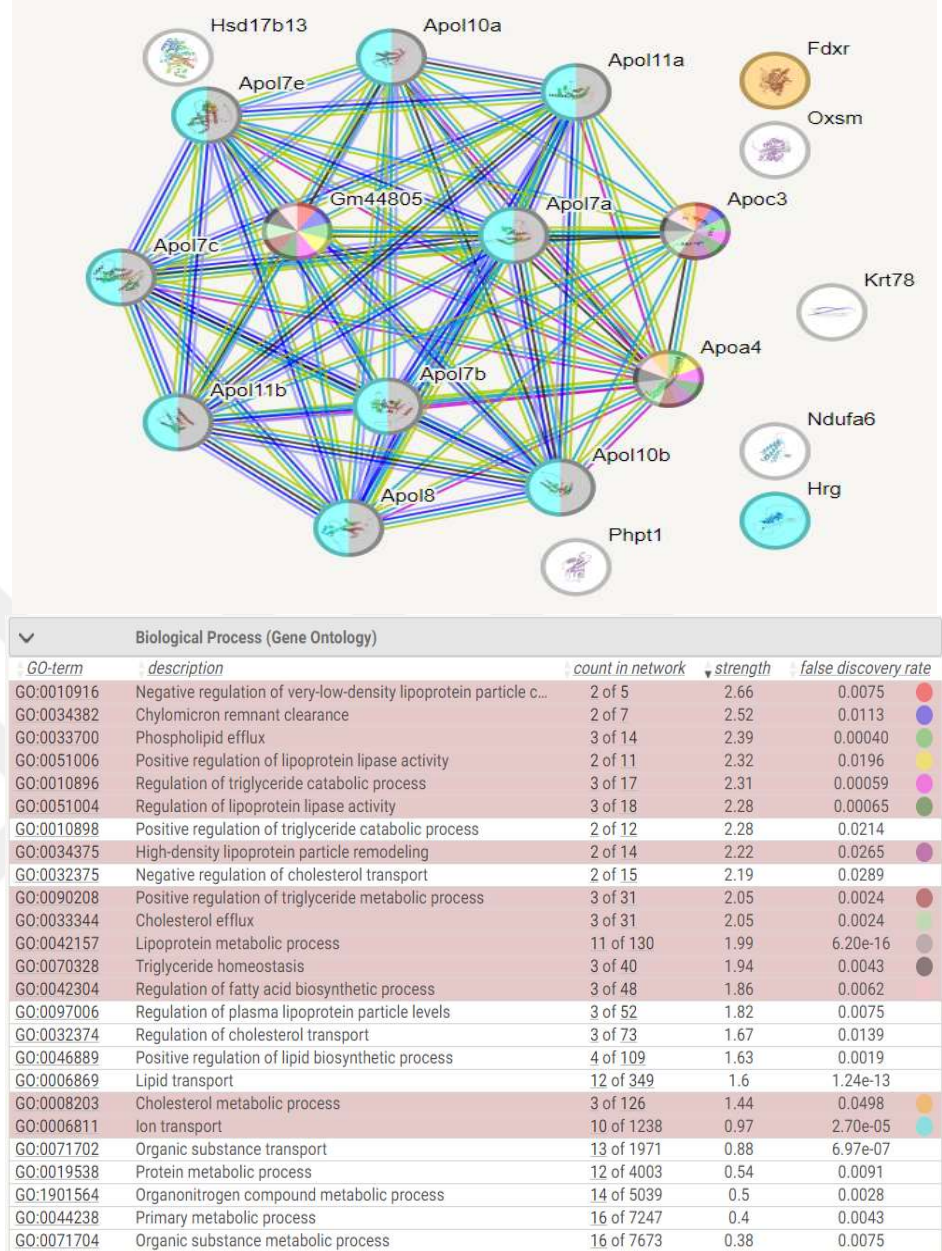
Şekil 4.32. a) Etiketsiz kütle spektrometresi ile tespit edilen DANP tedavi grubu aşağı regüle proteinlerin STRING analizi b) Dokсорubisin tedavi grubu aşağı regüle proteinlerin STRING analizi (10.05.2024 tarihli STRING version 12.0)

DANP ile tedavi sonrası aşağı regülasyona uğrayan proteinler ile Dokсорubisin ile tedavi sonrası aşağı regülasyona uğrayan proteinlerin farklılığı STRING analizi dğrultusunda görölmektedir (Şekil 4.32).

DANP ile tedavi sonrası aşağı ekspresyona uğrayan proteinlerin özellikle yağ metabolizması (lipaz ihibitor aktivite, yağ bağlama, kolestrol metabolizması LDL negatif regülasyonu, Lipoprotein lipaz aktivitenin pozitif regülasyonu, yağ bağlama, yağ taşıma, HDL modülasyon, fosfolipid akışı, trigliserid metabolizmasının pozitif regülasyonu, trigliserid katabolik prosesi, şilomikron kalıntı klirensi), metabolit taşıma ve ion kanal aktivitesi gibi moleküler ve hücreyel süreçlerde görev alan proteinler olduğunu ve birbirleri ile etkileşimde olduğu tespit edilmiştir. 12 adet aşağı regüle olmuş proteinlerin moleküler fonsiyonları ve hangi metabolik yolaklarda görev aldığı Şekil 4.33. ve Şekil 4.34 'de tespit edilmiştir.

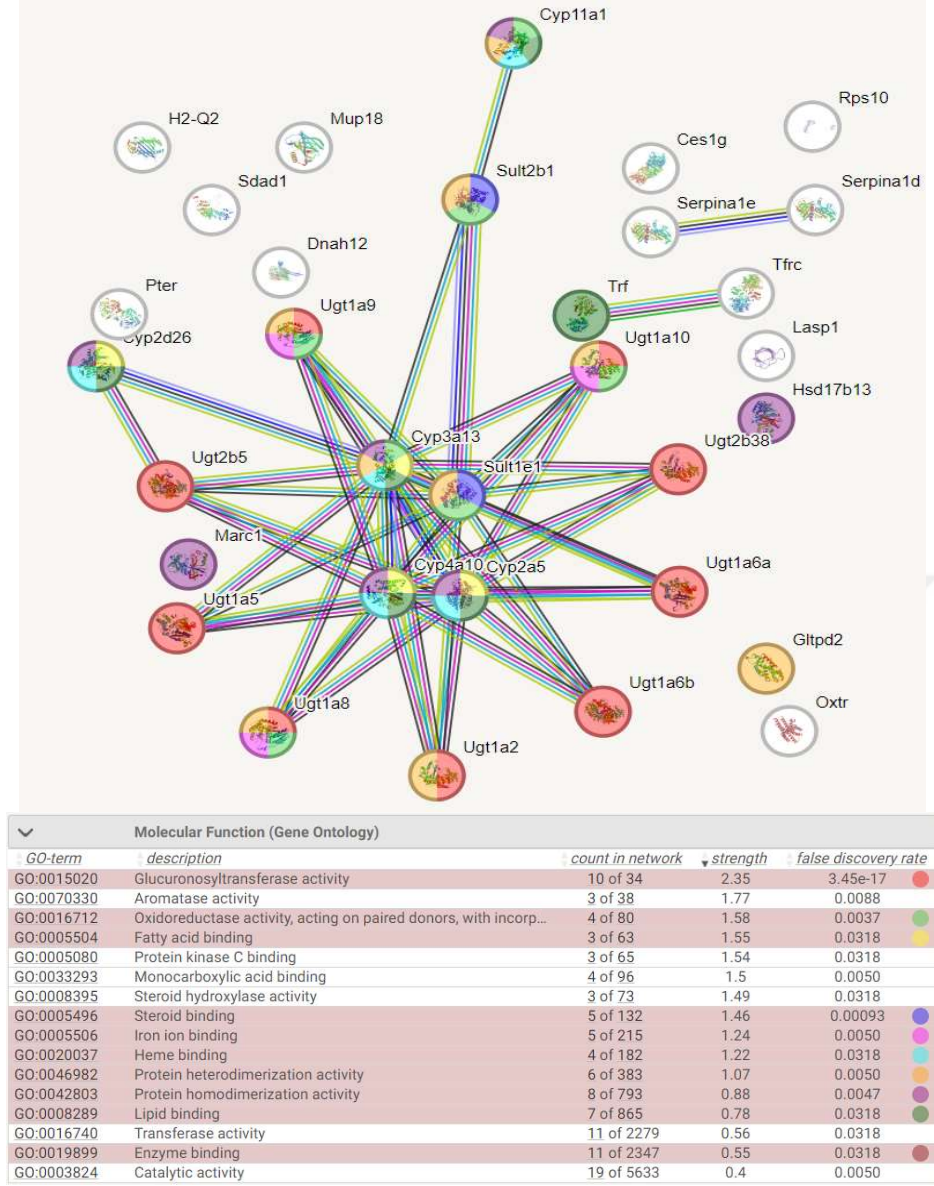


Şekil 4.33. DANP tedavi grubu aşağı regüle proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre renklendirilmiş STRING analizi (10.05.2024 tarihli STRING version 12.0)

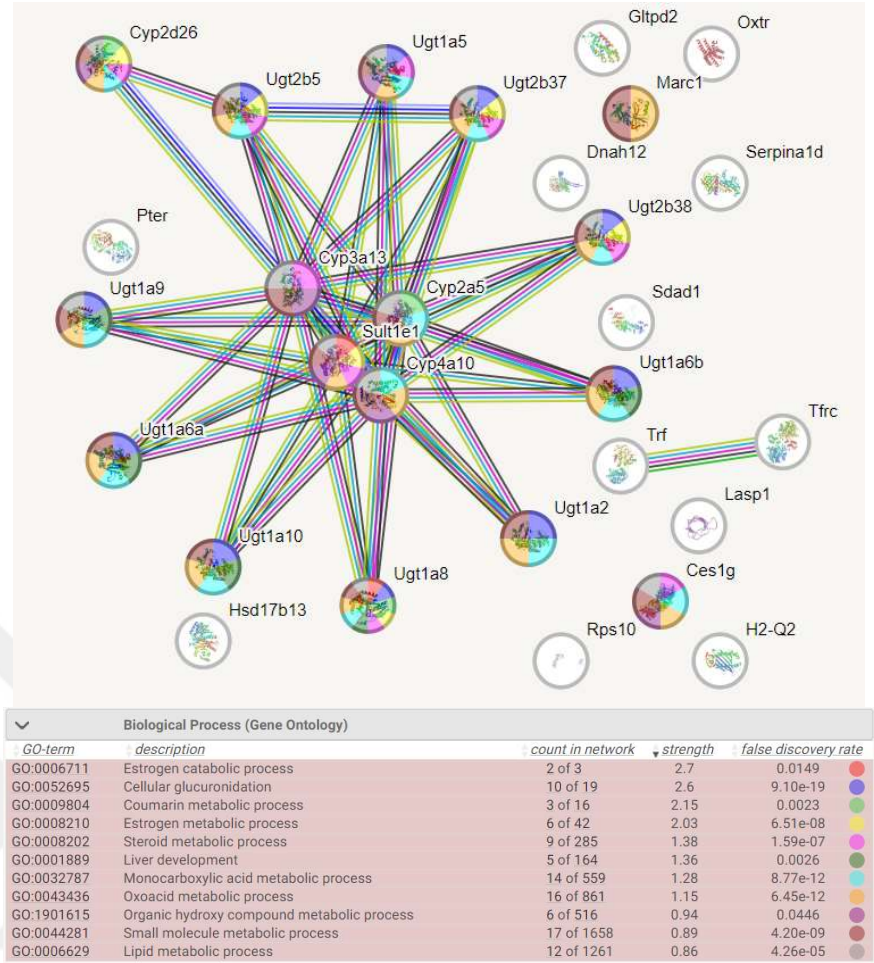


Şekil 4.34. DANP tedavi grubu aşağı regüle proteinlerin görevli biyolojik proseslerine göre renklendirilmiş STRING analizi (10.05.2024 tarihli STRING version 12.0)

Doksorubisin ile tedavi sonrası aşağı ekspresyona uğrayan proteinlerin özellikle steroid bağlama, yağ asidi bağlama, oksidoredüktaz aktivite, demir bağlama, hem bağlama, glukronosiltransferaz aktivite, steroid sulfotransferaz aktivite gibi moleküler ve hücrel süreçlerde görev alan proteinler olduğunu ve birbirleri ile etkileşimde olduğunu tespit ettik. 19 adet aşağı regüle olmuş proteinlerin moleküler fonksiyonları ve hangi metabolik yollarda görev aldığı Şekil 4.35 ve Şekil 4.36’da tespit edilmiştir.



Şekil 4.35. Dokсорubisin tedavi grubu aşağı regüle proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre renklendirilmiş STRING analizi (10.05.2024 tarihli STRING version 12.0)



Şekil 4.36. Dokсорubisin tedavi grubu aşağı regüle proteinlerin görevli biyolojik proseslerine göre renklendirilmiş STRING analizi (10.05.2024 tarihli STRING version 12.0)

DANP tedavi grubu yanıtı sonrası aşağı regüle proteinlerin, Dokсорubisin tedavi grubu aşağı regüle proteinlerine göre özellikle glukuronil transferaz aktivitesi, steroid sulfotransferaz aktivitesi, demir bağlama, lipid metabolik proses reaksiyonlarını içeren metabolik süreçte farklılaşmaya neden olduğu görülmektedir. Dokсорubisin tedavi yanıtı sonrası aşağı regüle proteinlerin östrojen katabolik prosesi, hücresel glukuronidasyon, steroid metabolik proses, sekonder alkol metabolik prosesi, karaciğer gelişimi ve lipid metabolizması reaksiyonlarını içeren süreçlerde farklılaşma olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.11. DANP tedavi grup yukarı regüle proteinlerin hücresel lokalizasyonu gösteren STRING analizi

Cellular Component (Gene Ontology)				
GO-term	description	count in network	strength	false discovery rate
GO:0071682	Endocytic vesicle lumen	2 of 3	2.67	0.0033
GO:0044754	Autolysosome	3 of 15	2.15	0.00061
GO:0045277	Respiratory chain complex IV	5 of 28	2.1	1.93e-06
GO:0005751	Mitochondrial respiratory chain complex IV	4 of 25	2.05	5.22e-05
GO:0042581	Specific granule	2 of 15	1.97	0.0382
GO:0005746	Mitochondrial respirasome	5 of 90	1.59	0.00011
GO:0030139	Endocytic vesicle	4 of 220	1.11	0.0382
GO:0005615	Extracellular space	12 of 1814	0.67	0.00089
GO:0005576	Extracellular region	14 of 2609	0.58	0.00091
GO:0005737	Cytoplasm	28 of 11788	0.22	0.0030

Tablo 4.12. Doksorubisin tedavi grup yukarı regüle proteinlerin hücresel lokalizasyonu gösteren STRING analizi

Cellular Component (Gene Ontology)				
GO-term	description	count in network	strength	false discovery rate
GO:0071682	Endocytic vesicle lumen	2 of 3	2.59	0.0095
GO:0044754	Autolysosome	3 of 15	2.07	0.0024
GO:0001533	Cornified envelope	4 of 63	1.57	0.0025
GO:0005615	Extracellular space	17 of 1814	0.74	1.56e-06
GO:0005576	Extracellular region	20 of 2609	0.66	1.56e-06

Doksorubisin tedavi grubu yukarı regule proteinlerin hücresel lokalizasyonundan farklı olarak DANP tedavi grubu yukarı regule proteinlerin mitokondri ve sitoplazmayı da içeren daha geniş hücresel lokalizasyona yayıldığı görülmektedir (Tablo 4.11 ve Tablo 4.12).

Tablo 4.13. DANP tedavi grup aşağı regüle proteinlerin hücresel lokalizasyonu gösteren STRING analizi

Cellular Component (Gene Ontology)				
GO-term	description	count in network	strength	false discovery rate
GO:0034361	Very-low-density lipoprotein particle	12 of 30	2.66	4.57e-26
GO:0034364	High-density lipoprotein particle	12 of 38	2.56	1.67e-25
GO:0034363	Intermediate-density lipoprotein particle	2 of 7	2.52	0.0053
GO:0042627	Chylomicron	3 of 13	2.42	7.05e-05
GO:0034366	Spherical high-density lipoprotein particle	2 of 9	2.41	0.0073
GO:0005576	Extracellular region	13 of 2609	0.76	3.56e-06
GO:0032991	Protein-containing complex	13 of 5743	0.42	0.0252

Tablo 4.14. Doksorubisin tedavi grup aşağı regüle proteinlerin hücresel lokalizasyonu gösteren STRING analizi

Cellular Component (Gene Ontology)				
GO-term	description	count in network	strength	false discovery rate
GO:1990712	HFE-transferrin receptor complex	2 of 6	2.4	0.0121
GO:0005789	Endoplasmic reticulum membrane	10 of 1100	0.84	0.00062
GO:0005783	Endoplasmic reticulum	16 of 1926	0.8	6.39e-07
GO:0012505	Endomembrane system	19 of 4360	0.52	0.00013
GO:0031090	Organelle membrane	15 of 3373	0.52	0.0021

DANP tedavi grup aşağı regüle proteinlerin hücresel lokalizasyonu hücreler arası bölge , hücre dışı bölgelere yayılırken, Doksorubisin tedavi grubu aşağı regüle proteinlerin hücre içi bölgelerde lokalize olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.13 ve Tablo 4.14).

5. TARTIŞMA

Kapsamlı proteom analizleri, moleküler mekanizmaların ve yolakların kapsamlı bir şekilde incelenmesi yoluyla biyobelirteçleri ve terapötik hedefleri belirlemek için gerekli verileri sağlamaktadır. Bu yaklaşım, özellikle genom karmaşıklığı, gen regülasyonu, epigenetik ve metabolomik konularında tamamlayıcı ve çoğu zaman belirleyici veri sunarak değişen metabolizmanın moleküler düzeyinde anlaşılmasını sağlamaktadır. Son yıllarda analiz teknolojisindeki gelişmeler ve çeşitli yaklaşımların biraraya gelmesi ile tedavi kapsamında hedef moleküller ve biyobelirteçler tanımlanmaktadır. Tek bir proteinin veya biyolojik öneme sahip karışımların analizinde tam protein karakterizasyonu elde etme potansiyeli yukarıdan aşağı kütle spektrometresi yaklaşımında mevcuttur. Ancak, bozulmamış protein seviyesinde proteom çapında analizin teknik zorluğa sahip olmasının yanında proteom kapsamı, hassasiyet ve verim açısından yukarıdan aşağı proteomik yaklaşımının, aşağıdan yukarıya proteomik yaklaşımın gerisinde kalmasına neden olmuştur. Bununla birlikte kütle spektrometre cihazları ve özel biyoenformatik araçlardaki son gelişmeler, aşağıdan yukarı proteomik yaklaşımını tamamlayıcı metod olmanın ötesinde belki de geçerli bir alternatif yöntem haline getirmektedir. Tez çalışmada aşağıdan yukarı proteomik yaklaşımın iki metodu; solüsyon bazlı etiketsiz nLC-MS ve jel bazlı LC-MS yaklaşımları kullanılmıştır. Tıpkı aşağıdan yukarı ve yukarıdan aşağı yaklaşımlarının karşılaştırılmasında olduğu gibi çalışmamızda tespit ettiğimiz gibi; jel bazlı yaklaşımın, solüsyon bazlı yaklaşıma göre sınırlamalarının ve dezavantajlarının olduğu elde ettiğimiz veriler doğrultusunda görülmektedir. Gerek jeller arası varyasyon, gerekse pratikteki ve ilgili software kabiliyeti nedeniyle jel bazlı yaklaşımda az verimle sonuçlar elde edilmiştir. Bunun aksine solüsyon bazlı etiketsiz LC-MS çalışması ile yüksek verimli, güvenilir, kantitatif sonuçlar elde edilmiştir. Etiketsiz nLC-MS proteomik yaklaşımla “Bulgular Bölümü Bkz. Tablo 4.6” da verilen DANP tedavi grubunda kanser grubuna karşı yukarı ekspresse proteinlere ve Doksorubisin tedavi grubu ile karşılaştırılmasına ait bulgular ayrıntıları ile aşağıda değerlendirmiştir:

Sfingozin-1-fosfat liyaz

Özellikle Sfingozin-1-fosfat liyaz (SGPL1) enziminin DANP tedavi grubunda kanser grubuna göre çok yüksek düzeyde yukarı regüle olduğu tespit edilmiştir.

DANP tedavi grubunun aksine Sfingozin-1-fosfat liyaz enziminin Doksorubisin tedavi grubu ve sağlıklı grupta herhangi bir ekspresyonunda artış ya da azalış olmamış, regülasyon tespit edilmemiştir.

Sfingozin-1-fosfat liyaz Sfingozin-1-fosfat gibi fosforile edilmiş sfingoid bazları, yağlı aldehitlere ve fosfoetanolamine bölen enzimdir (Zhou et al.,1998).

Oskouian ve arkadaşları (2006), Sfingozin-1-fosfat liyazın, p53 ve p38'e bağlı sinyal yolları ile apoptozu güçlendirdiğini ve kolon kanserinde aşağı regule olduğunu tespit etmişlerdir. Bektaş et al. (2010) çalışmasında Sfingozin-1-fosfat liyaz eksikliğinin karaciğerde lipid homeostazisini bozduğunu tespit etmişlerdir.

Adamus ve arkadaşları (2020), SGPL1 ekspresyonunun ve mutasyon durumunun pediatrik rabdomyosarkom ve diğer kanser türlerinin metastaz oluşumu olasılığını tahmin edebileceği sonucuna varmışlardır. Mutasyon olmadan yüksek bir SGPL1 ekspresyon durumu düşük metastaz oluşumu olasılığıyla ilişkilidir. Buna karşılık, SGPL1 ekspresyonunun olmaması ve SGPL1 mutasyonları yüksek bir metastaz olasılığının tahminicisi olabilir. Son olarak, işlevsel SGPL1 aktivitesi etkili Sfingozin-1-fosfat (S1P) degradasyonu için esastır ve metastaz kontrolü için sınırlayıcı faktörlerden biridir. Bu nedenle, potansiyel kişiselleştirilmiş bir tedavi yaklaşımının temeli olarak SGPL1 ekspresyonunun ve mutasyon durumunun incelenmesini önermişlerdir.

Sfingozin-1-fosfat liyaz substratı Sfingozin 1-fosfatın kanserle ilişkili olduğuna dair önemli kanıtlar vardır. S1P, tümör oluşumunu yönlendirebilen inflamasyon; kanser hücrelerine besin ve oksijen sağlayan neovaskülarizasyon, hücre büyümesi ve hayatta kalması gibi süreçleri düzenler. S1P birden fazla düzeyde gerçekleşir ve sfingozin kinazlar, S1P fosfatazlar ve S1P liyaz ile bağlantılıdır. Hücrelerde bir seramid-sfingozin-S1P reostası bulunur. Seramid ve sfingozin pro-apoptotiktir, oysa S1P hücrenin hayatta kalmasını destekler. Seramid-sfingozin-S1P'in karşılıklı dönüşümünü düzenleyen ajanlar, reostatın göreceli pozisyonuna bağlı olarak hücreyi apoptotik veya hayatta kalma programına yönlendirebilir (Nigel et al., 2010). Güncel araştırmalar kanserde S1P sinyallemesini ve işlevini değiştirmek üzere tasarlanmış yeni terapötiklerin potansiyelini incelemektedir.

Markowski ve arkadaşları (2003), sfingozin-1-fosfat düzeyinde sfingolipid metabolizmasının modifikasyonunun ve sfingozin fosfat kinaz (SPHK1) veya SGPL1 (Sfingozin-1-fosfat liyaz)'ın susturulması yoluyla sfingozin-1-fosfat/Seramid (S1P/Cer) oranının kanser hücrelerinin apoptozunu etkilediğini doğrulamışlardır. S1P seviyelerindeki ve S1P/Cer oranındaki azalma aynı zamanda kanser kök hücre apoptozunda önemli bir artışa neden olur ve buna uygulayıcı Kaspaz-3'ün aktif formundaki yukarı regülasyon eşlik eder. Tersine, SGPL1 susturulmuş hücrelerde S1P seviyelerindeki ve S1P/Cer oranındaki bir artış, Kaspaz-3 aktif formunun aşağı regülasyonuna ve ardından kanser kök hücrelerinde Katepsin-D protein ekspresyonunda bir artışa yol açtı. Aktif Kaspaz-3'ün aşağı regülasyonu ve Katepsin-D'nin yukarı regülasyonu, bu hücrelerin metastatik pro-metastatik kapasitesinin arttığını gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Sfingozin-1-fosfat liyaz substratı Sfingozin-1-fosfat, stres kaynaklı seramid üretimini ve apoptozu artırır (Zhou et al., 1998; Peng et al., 2019). Karaciğerde global lipid homeostazisi ve fibroblastlarda kolesterol homeostazisi için gereklidir (Vienken et al., 2017). Proinflamatuvar yanıtın ve nötrofil trafiğinin düzenlenmesinde rol oynar (Allende et al., 2011). SGPL1 (sfingozin fosfat liyaz 1), fosfatidiletanolamin üretimi yoluyla nöronal otofajiyi modüle ederek amiloid β [A4] öncü protein (APP) gibi agregat eğilimli proteinlerin birikimini düzenleyen fosfoetanolamin üretimi yoluyla nöronal otofajiyi modüle eder. Nöronal temas bölgelerinin kurulmasında ve aksonal bakımın sağlanmasında rol oynadığı görülmektedir (Mitroi et al., 2017).

Sfingosin-1-fosfat (S1P), inflamasyon, epitelyal ve endotelyal bariyer fonksiyonu, kanser metastaz dahil olmak üzere memeli fizyolojisi ve patofizyolojisinin birçok yönünün düzenlenmesinde rol oynayan iki sfingozin kinaz izoformu (SphK1 ve SphK2) tarafından üretilen pleiotropik bir lipid sinyal molekülüdür. Çok sayıda kanıt, SphK1 ve S1P'nin birçok kanser türünde kanser ilerlemesini ve metastazı desteklediğini göstermektedir. Ancak SphK/S1P'nin HCC'deki rolü daha az araştırılmıştır. Sfingozin ve bir yağ asidinden oluşan S1P ve seramid, karşılıklı hücre kaderi düzenleyicileridir ve S1P sinyalleme, iltihaplanma, kanser ve otoimmün bozukluklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda önemli roller oynar. Dolayısıyla S1P sinyalinin hedeflenmesi patogenezi bloke etmenin bir yolu olabilir ve bu durumlarda terapötik bir hedef olabilir. Giderek daha güçlü kanıtlar, S1P sinyal yolunun kanserin ilerlemesinde ve etkilerinde bir rol oynadığını göstermektedir (Wang et al., 2019).

Maceyka, et al.(2020), çalışmasında karaciğer kanserinin desteklenmesinde S1P'nin rolünü araştırmışlardır. SphK1 ve S1P'nin, HCC gelişimi için bir risk faktörü olan alkol dışı yağlı karaciğer hastalını teşvik ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, karaciğer tarafından artan SphK1 ve S1P üretimi, tümör bölgesine göç eden, orada kalan ve tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'ler) olarak adlandırılan ve bir M2 fenotipini ifade ettiği düşünülen anjiyogeneze yardımcı olan makrofajların toplanmasını artırdığını ileri sürmüşlerdir. Bu yaklaşımla ve Oskouian et al. (2006) çalışmasına göre, Sfingozin-1-Fosfat Liyazın, p53 ve p38'e bağlı sinyal yolları ile apoptozu güçlendirdiğini yola çıkararak; çalışmamızda DANP tedavisinde çok yüksek Sfingozin-1-fosfat liyazın ekspresyonu ile S1P nin ortamdaki konsantrasyonu düşeceğinden HCC tedavisi için olumlu bir sonuç elde edildiğini düşündürmektedir.

Ancak Uranbileg et al. (2022), çalışmasında HCC ve kolon kanserinde SPL'nin, S1P'yi geri döndürülemez biçimde bozundurarak ve gliserolfosfolipitlerin üretimini artırması ile kanserin ilerlemesini desteklediğini ifade etmişlerdir. HCC ve kolon kanserinde yeni bir metabolik yol önererek SPL'nin, S1P'ı gliserol lipidlerine, özellikle lizofosfatidilinositol ve lizofosfatidilgliserol 'e dönüştürerek kanser gelişimini kolaylaştırdığını belirtmişlerdir.

Burada incelendiği gibi, çok sayıda çalışma S1P sinyalleşmesinin kanserin ilerlemesi ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Dahası, artan kanıtlar S1P sinyalleşmesinin potansiyel bir terapötik hedef olduğunu göstermektedir. Şimdiye kadar umut verici bir terapötik hedef olarak S1P sinyalleşmesine odaklanarak iki ana araştırma stratejisi kullanılmıştır. Bunlar; S1P'nin kendi düzeylerini azaltmak ve diğeri ise S1P reseptörlerini agonize etmek/antagonize etmektir. Onkoloji alanında S1P düzeylerini düşürmek için klinik olarak iki ilaç adayı LT1002/sonenpcizumab ve ABC294640 kullanılmıştır. S1P'yi pikomolar afiniteyle seçici olarak bağlayabilen ve S1P'nin indüklediği sitokin salınımını bloke edebilen ilk LT1002/sonenpcizumabın faz II denemesi, etkinlik eksikliği nedeniyle sonlandırılmıştır (O'Brien et al., 2009).

Tez çalışmamızda elde edilen sonuç, S1P liyazın terapötik potansiyeli ve bunun HCC kanser tedavisine yönelik hedefler için kullanılabileceğini düşündürmektedir. Sfingozin-1-fosfat liyaz, Doksorubisin ile tedavide ekspresyonda belirgin farklanmanın olmaması, DANP tedavisinde yukarı regule olması nedeniyle seçici bir belirteç olabilir.

Literatürler doğrultusunda elde ettiğimiz sonuç DANP tedavisinin Doksorubisin tedavisine göre farklı ve olumlu sonuç verdiğini düşündürmektedir.

Sitokromlar P450 2D26

DANP tedavi grubu kontrol kanser grubuna göre Sitokromlar P450 2D26' nın yüksek değerlerde yukarı regule olduğu tespit edilmiştir. Doksorubisin ve sağlıklı grupta ise kanser grubuna göre aşağı ekspresse olmuştur.

Sitokrom P450, bir hemetiolat monooksijenaz grubudur. Karaciğer mikrozomlarında bu enzim, NADPH'ye bağımlı elektron taşıma yolunda rol oynar. Steroidler, yağ asitleri ve ksenobiyotikler dahil olmak üzere yapısal olarak ilgisiz çeşitli bileşikler oksitler. Karaciğer mikrozomlarında bu enzim, NADPH'ye bağımlı elektron taşıma yolunda rol oynar. Steroidler, yağ asitleri ve ksenobiyotikler dahil olmak üzere yapısal olarak ilgisiz çeşitli bileşikler oksitler.

Sitokrom P 450, ilaçlar, pestisitler ve kanserojenler de dahil olmak üzere çeşitli yabancı bileşikler tarafından karaciğerde ve diğer dokularda yüksek düzeylere indüklenabilir Sitokrom P 450 ilaçların ve ksenobiyotiklerin faz I'e dayalı metabolizmasında önemli rol oynar. Substratın oksidasyonunu katalize eder, bazen de indirgeme reaksiyonlarını da katalize eder. Toksisite veya karsinojenite gösteren ara maddeler oluşur ve bunları böbrekler yoluyla atılmaya uygun inaktif polar ürünler haline getirir. Pek çok farklı sitotoksik ilaç, sitokrom P450 ile etkisiz hale getirilirken, birtakım ilaçlar, Sitokrom P 450 'nin etkisi ile aktive edilir ki bu da onları sitotoksik ve kanser kemoterapisinde etkili kılar (McFadyen et al., 2004). Bu nedenle, sitokrom P 450 'lerin kanserojenlerin biyoaktivasyonu ve inaktivasyonunda önemli rol oynaması ve antikanser ilaçların inaktivasyonu veya aktivasyonuna katılmaları nedeniyle kanser tedavisinin belirleyicileri olarak önemli rol oynarlar (Oyama et al., 2004; Rodriguez-Antona et al., 2006).

Sitokromlar P450 4A10, Doksorubisin tedavi grubunda aşağı ekspresyon gösterirken, DANP tedavi grubu ve sağlıklı grupta herhangi bir ekspresyon seviyesinde regülasyon görülmemiştir.

Sitokromlar P450 4A14 ise sağlıklı grupta aşağı ekspresyon gösterirken, DANP ve Doksorubisin tedavi grubunda herhangi bir ekspresyon seviyesinde regülasyon görülmemiştir.

Sitokromlar P450 3A13 Doksorubisin tedavi grubunda aşağı ekspresyon gösterirken, DANP tedavi grubu ve sağlıklı grupta herhangi bir ekspresyon seviyesinde regülasyon görülmemiştir.

Sitokromlar P450 Doksorubisin tedavi grubunda aşağı ekspresyon göstermiştir.

Çalışma kapsamında serbest Doksorubisin yerine çeşitli kimyasal reaksiyonlar sonucu elde edilen Doksorubisin içeren nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemin katabolizması sonucu oluşan moleküllerin karaciğer tarafından detoksifikasyonu sürecinde p450 artışına neden olabileceğini düşündürmektedir, bunun yanında doza bağlı yan etki ile ilişkisi hakkında bilgi verebilir. Doksorubisin tedavisinde String analizi sonucu cyp3a13, cyp2d6, cyp4a10, cyp2a5, cyp11a1, cyp2d26 ilişkili oksidoredüktaz aktivitenin aşağı regule olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Bulgular Şekil 4.36). Böylece serbest Doksorubisin ile tedavide ilacın (Doksorubisin) metabolize edilme kapasitesi azalacak ve doza bağlı yan etkilere karşı daha duyarlı olacaktır (De Leon et al., 2006). Bu durum, DANP formülasyonu ile tedavinin serbest Doksorubisin tedavisine göre daha avantajlı ve üstün olduğunun kanıtıdır.

Sitokrom c oksidaz altbirimi 7B

DANP Tedavi grubu, Doksorubisin tedavi grubu ve sağlıklı grupta kanser gruba karşı yüksek oranla yukarı ekspresyon görülmüştür.

13 alt üniteli bir kompleks olan sitokrom c oksidaz (COX), mitokondriyal elektron taşıma zincirindeki terminal oksidazdır. Oksijenin suya indirgenmesini katalize eden, mitokondriyal elektron taşıma zincirindeki oksidatif fosforilasyonu yönlendiren son enzim olan sitokrom c oksidazın bileşenidir (Jobson et al., 2004). Solunum zinciri, türetilen elektronları aktarmak için işbirliği yapan 3 çok alt birimli kompleks süksinat dehidrojenaz (kompleks II, CII), ubikinol-sitokrom c oksidoredüktaz (sitokrom b-c1 kompleksi, kompleks III, CIII) ve sitokrom c oksidaz (kompleks IV, CIV) içerir. Sitokrom c oksidaz, solunum zinciri, NADH ve süksinattan türetilen elektronları moleküler oksijene aktarmak için işbirliği yapan 3 çoklu alt birimli kompleks süksinat dehidrojenaz (kompleks II, CII), ubikinol-sitokrom c oksidoredüktaz (sitokrom b-c1 kompleksi, kompleks III, CIII) ve sitokrom c oksidaz (kompleks IV, CIV) içerir ve bu kompleksler, transmembran

taşımayı ve ATP sentazı yöneten iç zar üzerinde bir elektrokimyasal gradyan oluşturur. İntermembran boşluktaki indirgenmiş sitokrom c'den kaynaklanan elektronlar, alt birim 2'nin dinükleer bakır A merkezi (CU(A)) ve alt birim 1'in hem A'sı aracılığıyla alt birim 1'deki aktif bölgeye, hem A3 ve bakır B (CU(B)) tarafından oluşturulan bir binükleer merkeze aktarılır. Burada intermembran boşluktaki sitokrom c'den 4 elektron ve mitokondriyal matrinden 4 proton kullanarak moleküler oksijeni 2 su molekülüne indirger. Sitokrom oksidazın artışı mitokondrideki elektron transfer zincirinin ve sonrasında da oksidatif fosforilasyonun artışına sebep olmaktadır (National Center for Biotechnology Information, 2024).

KEGG Pathways				
pathway	description	count in network	strength	false discovery rate
mmu04260	Cardiac muscle contraction	10 of 84	2.37	4.82e-21
mmu00190	Oxidative phosphorylation	10 of 130	2.18	1.53e-19
mmu04932	Non-alcoholic fatty liver disease	10 of 147	2.13	3.32e-19

Şekil 5.1. SitokromC oksidazın ilişkili metabolik yollar (10.05.2024 tarihli STRING version 12.0)

SitokromC oksidazın allosterik düzenlemesinde, doku/tür/gelişime özgü izoformların ekspresyonu, hücre sinyalleme yoluyla geri dönüşümlü fosforilasyon modifikasyonu, protein-protein etkileşimleri ve süper kompleks oluşumu gibi çeşitli mekanizmalar bilinmektedir (Kadenbachand ve Hüttemann, 2015). Ayrıca COX'ın string analizinde ilişkili sinyal yollarından oksidatif fosforilasyonun yanı sıra kalp kası kasılması ve alkol dışı ağırlı karaciğer hastalığı metabolik yollarında görev aldığı tanımlanmıştır (Şekil 5.1). COX'in mitokondriyal solunumu kontrol ederek aerobik enerji metabolizmasında oynadığı kritik rolün önemi göz önüne alındığında, COX'ın DANP tedavisi sonrası yukarı regülasyonu sonucu düzenlenmesi COX'ın enzimatik aktivitesini etkiler, bu da mitokondriyal membran potansiyelini ve dolayısıyla ATP ve ROS üretimini değiştirir. COX disfonksiyonunun, enerji ve ROS üretiminin düzensiz olduğu birçok hastalıkla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Sinkler et al., 2017). Sitokrom c'nin aşırı ekspresyonu kaspaz aktivasyonunu artırır ve apoptotik uyarıya yanıt olarak hücre ölümünü teşvik eder, ancak ekdisonla indüklenebilir bir sistem kullanılarak sitokrom c'nin basit yukarı regülasyonu tek başına apoptozu indüklemek için yetersizdir. Bu sonuçlar birçok uyarı tarafından indüklenen apoptozun, MRC fonksiyonlarının müteakip bozulmasından, Deltapsi(m) ($\Delta\psi_m$) kaybından, sitokrom c salınmasından ve sonuçta hücre ölümünden sorumlu olabilecek erken bir mitokondriyal aktivasyonu içerdiğini göstermektedir (Chandra et al., 2002).

DANP tedavisi sonucunda Sitokrom c oksidaz altbirimi 7B artışı ile kaspas aktivesinde artış ve diğer metabolitlerin de etkisi ile apoptozun indüklenmesi sonucunu doğurabilir.

Sitokrom c oksidaz alt birimi 6B1

DANP tedavi grubu ve sağlıklı grubunda Sitokrom c oksidaz alt birimi 6B1 enziminde yüksek regülasyon görülmüş, Doksorubisin ile tedavi sonrasında ise aksine protein ekspresyonunda belirgin bir artış ya da azalış olmamıştır.

Enzim kompleksinin toplanması ve solunum fonksiyonu için esastır (Li et al., 2006). Sitokrom c mitokondriyal solunum zincirinin bir elektron taşıyıcısıdır. Mitokondriyal dış zarın geçirgenleşmesi üzerine cyt c sitoplazmaya salınır ve burada apoptozun içsel yolunu tetikler. Sitoplazmik cyt c kan dolaşımına daha da ulaşabilir. Apoptoz inhibisyonu, kanserin ayırt edici özelliklerinden biridir ve apoptozun tümörlerde indüksiyonu yaygın olarak kullanılan bir terapötik yaklaşımdır. Apoptoz inhibisyonu ve indüksiyonu, sırasıyla azalmış ve artan serum cyt c seviyeleri ile ilişkilidir. Serumdaki cyt c'nin miktarının belirlenmesi, potansiyel prognoz değeriyle birlikte kemoterapiye hastanın yanıtının izlenmesinde faydalıdır. İnsan serumundaki cyt c seviyelerinin ölçülmesi için çok sayıda yüksek hassasiyetli biyosensör geliştirilmiştir. Ayrıca, eksojen cyt c'nin kanser hücrelerinin sitoplazmasına verilmesi, bunların apoptozunu indüklemek için etkili bir yaklaşımdır. Benzer şekilde, cyt c' nin kanser hücrelerine terapötik olarak iletilmesi için çeşitli protein bazlı ve nanopartikül bazlı sistemler geliştirilmiştir . Bu nedenle cyt c , kanser prognozu ve tedavisinde umut verici değere sahip bir insan proteini (Pessoa, 2022).

Buradaki Sitokrom c oksidaz alt birimi 6B1'in yukarı yönde regülasyonu DANP tedavi ve sağlıklı grupta olumlu yöndedir. Doksorubisin tedavi grubunda ekspresyon seviyesinde değişim bulunmaması, DANP tedavisinin Doksorubisin tedavisine göre farklı ve daha olumlu tedavi olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca Doksorubisin ile tedavide ekspresyonda belirgin farklanmanın olmaması DANP tedavisi için seçici bir belirteç olabilir. Bu yaklaşımla DANP tedavisi sonrası yukarı ekspresyon gösteren Sitokrom c oksidaz alt birimlerinin artışı Doksorubisin tedavisine göre daha üstünlük sağlamaktadır.

Ferritin ağır zincir & Ferritin hafif zincir

DANP, Doksorubisin ve sağlıklı grupta kanser gruba oranla yukarı ekspresyon görülmüş olup Doksorubisin tedavi grubunda yukarı ekspresyon daha yüksek seviyede tespit edilmiştir.

Hücre içi demir deposu görevi gören küresel bir protein olan Ferritin iki farklı alt birimden oluşur: genler ferritin ağır zincir (FTH) ve ferritin hafif zincir (FTL) tarafından kodlanan, boyutları sırasıyla 19 kDa ve 21 kDa olan hafif zincir (L-ferritin) ve ağır zincirden (H-ferritin) oluşmaktadır. Bağlanmamış ferritin, ferritin hafif zinciri (FTL) ve ferritin ağır zincirinden (FTH) oluşan 24 alt birimden oluşur. Normal hücreleri korurken tümör hücrelerinin etkili bir şekilde ortadan kaldırılması amaçla, tümör tedavisi için tanımlanan insan FTH1'in doğuştan gelen tümör hedefleme aktivitesi son derece ilgi çekicidir. Değiştirilmemiş insan FTH1, kanser hücrelerinde sıklıkla aşırı eksprese edilen reseptörü transferrin reseptörü 1'e bağlanır. FTH1-TfR1 bağlanması, ferritin aracılı hedefli teslimatı teşvik ederek ilaç etkinliğinin artmasına izin verir. Ayrıca FTH, birçok kanser türünün prognozu ile de ilişkilidir. FTH1 seviyesi, tümörle ilişkili makrofajların infiltrasyonu ile anlamlı ve pozitif olarak ilişkilidir. FTH1 ayrıca katı kanserin tümör bağışıklığının düzenlenmesinde de önemli bir rol oynar. Bu nedenle, FTH1, antikanser ilaçlarının, teşhis moleküllerinin (örn., radyoizotoplar ve florofonlar) ve inorganik nanopartiküllerin (NP'ler) tümörlere hedeflenen iletiminde yaygın olarak uygulanmıştır (Xiaoyan et al. 2023). Ferritin özellikle programlanmış hücre ölümü modu olan ferroptozda rol oynar. Ferroptoz, demir birikmesiyle ortaya çıkar ve buna eşlik eden lipid peroksidasyonundaki artışla bilinir. Ferritinin ferroptozdaki rolü kanser gibi hastalıklarla ilgilidir ve tümör bağışıklığında temel bir rol içerebilir. Bu nedenle, demir ve ferritin homeostazisini hedef alan terapötik yaklaşımlar, özellikle anti-tümör tepkisini güçlendirmek için hapten tedavisiyle birlikte kanserde faydalı olabilir. Kanser kök hücreleri, düzensiz demir homeostazisi ve artan demir döngüsüyle birlikte normal hücrelere kıyasla yüksek ferritin sergiler (Mai et al., 2017). FTL ve FTH1, birçok tümör tipinde tümörle ilişkili makrofajların ve T düzenleyici hücrelerin infiltrasyonu ile pozitif ve anlamlı bir şekilde ilişkilidir, böylece tümör mikro ortamına odaklanan yeni terapötik olasılıkların önünü açar. Özellikler karaciğer kanserinde kanser hücrelerinin göçü ve yayılımında etki eder. Hu et al., (2021), normal numunelerle karşılaştırıldığında FTH'in primer karaciğer kanseri dokularında anlamlı düzeyde yukarı regüle edildiğini ve ilerlemiş kanserde FTH ekspresyonu önemli ölçüde arttığını belirlemişlerdir. Tang ve arkadaşları

(2023), ferritin hafif zincirinin aşırı ekspresyonu meme kanseri için kötü prognostik faktör olduğunu bulmuşlardır.

Sonuçlar, DANP ya da Doksorubisin tedavisine özgü belirteç olacak metabolik bir aktivite sunmamaktadır. Ancak DANP ve sağlıklı grupta kanser gruba oranla yukarı ekspresyon görülmesi ve Doksorubisin tedavisinde de yukarı ekspresyonun yüksek olması kötü prognozla ilişkisi olduğunu düşündürmektedir.

Protein S100-A9 ve S100A8

Doksorubisin ve DANP grupta kanser gruba oranla yukarı eksprese olduğu tespit edilmiştir.

S100A8 ve S100A9 (kalgranulin A ve kalgranulin B) inflamatuvar süreçlerde nötrofil ve makrofajlar gibi immün sistem hücrelerinde bulunur. fizyolojik koşullar altında S100A8 ve S100A9, nötrofillerde ve miyeloid kökenli dendritik hücrelerde yeterli miktarlarda, monositlerde de düşük miktarlarda bulunurken enfeksiyon, travma, , ısı, stres ve diğer pek çok inflamatuvar süreci tetikleyen koşullarda yoğun şekilde artış gösterir (Wang et al., 2018).

S100A8/A9 ayrıca M1 makrofajlarında reaktif oksijen türleriyle birlikte kanseri baskılamak için de işlev görebilir. Bir fare Lewis akciğer karsinomu modelinde, S100A9'un hem metastatik hastalığın gelişimini hem de miyeloid hücre alımını teşvik ettiği gösterilmiştir Bu modelde S100A9'un ekspresyonu, TGF- β 'ya karşı bir antikor varlığında azaldı. Farelere eksojen TGF- β eklenmesi, VEGF-A ve TNF- α varlığında S100A9 seviyelerini arttırmıştır (Markowitz et al., 2013). Bu nedenle S100A9 muhtemelen metastazı teşvik eden TGF- β yoluna bağlıdır. S100A8/A9, M1 makrofajları içinde kanseri baskılamak için işlev görebilir, ancak kanseri teşvik etmek için TGF- β , VEGF-A ve TNF-a ile birlikte işlev görebilir. Moleküler ortama bağlı olarak S100A9, akciğer kanserinde tümör büyümesini teşvik edebilir veya inhibe edebilir ancak Nemeth et al. (2009)' a göre Hepatoselüler karsinomda NF κ B, S100A9 promotörüne bağlanır ve transkripsiyonu aktive eder. S100A9, hepatoselüler karsinom hücrelerini apoptotik hücre ölümünden koruyan reaktif oksijen türlerine bağımlı sinyal yollarını aktive ederek ilerlemektedir. Bu sistemde S100A9'un S100A8 ile birlikte ifade edildiği görülmektedir. Nemeth et al. (2009) çalışmasında fare ve insan dokusunda hepatoselüler karsinomda artan S100A8 ve S100A9 seviyelerini doğrulamışlardır.

Doksorubisin ve DANP grupta kanser gruba oranla yukarı eksprese olduğu ancak beklenenin ötesinde sağlıklı grupta aşağı ekspresyonun görölmediğı tespit edilmiştir. Bu da bize inflamator etki doğrultusunda artışın farklı bir süreçten gelebileceğini düşündürmektedir.

Glukoz -6-fosfataz katalitik alt birimi 1

Doksorubisin, DANP ve sağlıklı grupta kanser gruba oranla yukarı eksprese olmuştur.

Glukoz -6-fosfataz katalitik alt birimi 1 (G6PC1) , glukoneogenez ve glikojenoliz yollarının terminal adımına aracılık ederek açlık sırasında hepatik glukoz üretiminde kritik bir rol oynar. Yardımcı taşıma proteinleriyle uyum içinde, membrana entegre olan bu enzim kan şekeri homeostazisini desteklemek için Glukoz-6-fosfattan (G6P) glikoz üretimini katalize eder. Metabolik işleviyle uyumlu olarak, G6PC1 gen ekspresyonunun düzensizliğı diyabete katkıda bulunur ve fosfohidrolaz aktivitesini bozan mutasyonlar, glikojen depo hastalığı tip 1a'nın klinik temelini oluşturur.

Sağlık ve hastalıkla olan ilişkisine rağmen, G6PC1 yapısı ve mekanizmasının kapsamlı bir görünümü enzimi fonksiyonel bir biçimde izole eden ekspresyon ve saflaştırma stratejilerinin bulunmaması nedeniyle sınırlıdır. G6PC, G(1)/S faz geçişini inhibe ederek karaciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, hücre döngüsü ile ilişkili ekspresyonunu ve migrasyonunu inhibe eder (Lin et al., 2022). Bu nedenle tıpkı sağlıklı gruptaki gibi DANP ve Doksorubisin tedavileri için yukarı ekspresyonun tedavide olumlu sonuç verdiğini söyleyebiliriz. Ancak sonuçlar Doksorubisin ve DANP tedavisi arasında karşılaştırmaya olanak vermemektedir. DANP ya da Doksorubisin tedavisine özgü belirteç olacak metabolik bir aktivite sunmamaktadır.

Oksitosin reseptör

DANP tedavi grubu ve sağlıklı grubunda oksitosin reseptöründe yüksek regülasyon görölmüş ancak Doksorubisin ile tedavi sonrasında ise aksine protein ekspresyonunda belirgin bir artış ya da azalış olmamıştır.

Oksitosin reseptör (OXTR), G-protein reseptörleri ailesinin bir üyesidir ve gastrointestinal organların hücre yüzeyinde bulunur. Katalinic et al. (2020) çalışmasında normal dokuyla karşılaştırıldığında OXTR, metastatik pankreatik tümörlerde anlamlı düzeyde aşırı ekspresyon göstermiştir. Ayrıca tümör dokusunda OXTR'nin önemli ölçüde aşırı ekspresyonu immünohistokimya ile doğrulandı. Ne yazık ki, OXTR sinyalleşmesinin pankreatik tümörlerin gelişimi üzerindeki etkisi ve gastrointestinal onkogeneizde yer alan altta yatan moleküler mekanizmalar yeterince araştırılmamıştır. Buna rağmen; Zhai et al. (2024) çalışmasında oksitosinin hepatik makrofajlar yoluyla karaciğer fibrozunu hafiflettiğini ve hepatik makrofajların ise karaciğer fibrozunun oksitosin aracılı hafifletilmesinden sorumlu bir merkez olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmalarında, oksitosinin makrofaj fenotipini düzenlediği yeni bir yolu ortaya çıkarmışlardır. Oksitosin reseptör aktivasyonu ile indüklenen kalsiyumun içe doğru akışının, makrofaj fenotipik değişimini kontrol eden nükleer reseptör 4A1 'i aktive ettiğini göstermiştir. OXTR'nin, muhtemelen glikojen seviyelerinin düzenlenmesinde rol oynadığı karaciğer dokularından eksprese edildiği bilinmesine rağmen, HCC'de OXT ve OXTR'nin bir rolü HCC'de umut verici prognostik biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir.

Oksitosin reseptörünün hepatik makrofajlar yoluyla karaciğer fibrozunu hafifletmesi ve DANP tedavisinde yukarı eksprese olup, Doksorubisin tedavi grubunda olmaması, DANP tedavisinin Doksorubisin tedavisine göre farklılaştığını ortaya koymaktadır. Böylece yine hedefli tedavi sistemlerinin metabolik düzeyde farklılaşma yarattığını göstermektedir. Doksorubisin ile tedavide oksitosin reseptör ekspresyonunda belirgin farklılaşmanın olmaması DANP tedavisi için seçici bir biyobelirteç adayı olabilir.

Glutasyon transferaz

Glutasyon transferaz (GST) Doksorubisin tedavi grubunda yukarı eksprese olup, DANP tedavi ve sağlıklı grupta aşağı ya da yukarı regülasyon mevcut değildir.

Glutasyon transferaz klasik indirgenmiş glutasyon (GSH) konjugasyon aktivitesi, ksenobiyotiklere, zararlı bileşiklere ve ayrıca oksidatif strese karşı hücrel detoksifikasyonda kritik bir rol oynar. Ancak bu özellik aynı zamanda kanser hücreleri tarafından ilaca direnç kazanmak ve hayatta kalmalarını artırmak için de kullanılır. Aşırı aktif GST proteinleri birçok insan kanserinin sık görülen bir

özelliğidir. Son kanıtlar çoğu GST proteininin biyolojisinin karmaşık ve çok yönlü olduğunu ve bu proteinlerin hücrenin hayatta kalması, hücre proliferasyonu ve ilaç direnci gibi tümör oluşumu süreçlerine aktif olarak katıldığını ortaya çıkarmıştır (Singh vd, 2021). Yapılan çalışmada glutatyon transferaz aktivitesinin Doksorubisin'e duyarlı lösemi hücrelerinde Doksorubisin'e dirençli lösemi hücrelerine göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (Singh et al., 1989). Çalışmamızda da bunu destekler nitelikte glutatyon-s-transferaz serbest Doksorubisin tedavisinde yukarı regüle olurken DANK tedavisinde regülasyon görülmemiştir. Bu durum yine nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemin DANK tedavisinin serbest ilaca (doksorubisin) göre daha üstün olduğunu göstermektedir.

Ayrıca, antioksidatif sistemde görev alan enzimin HCC'da yukarı eksprese olduğu tespit edilmiştir (Lee et al., 2005). Sonuç olarak, ailenin çeşitli üyelerinin bir takım farklı kanserlerde aşırı eksprese edildiği bulunmuş, mevcut literatürlerde HCC'da glutatyon-s-transferaz yukarı regüle olduğu kanıtlanmıştır (Allocati et al., 2018). Aşırı aktif glutatyon transferaz proteinleri birçok insan kanserinin sık görülen bir özelliğidir. Son çalışmalar, glutatyon transferaz proteininin biyolojisinin karmaşık olduğunu ve bu proteinlerin hücrenin yaşamını devam ettirmesi, hücre proliferasyonu ve ilaç direnci gibi tümör oluşumu süreçlerine aktif olarak katıldığını ortaya çıkarmıştır (Singh et al., 2021).

Doksorubisin ile tedavi sonrası enzim tıpkı sözkonusu literatürlerde belirtildiği gibi hepatokarsinomda olduğu gibi yukarı eksprese olmuştur. Doksorubisin ile tedavinin aksine DANK ile tedavide ve sağlıklı grupta yukarı ya da aşağı regülasyon sözkonusu değildir. DANK tedavisinin yine serbest Doksorubisin tedavisinden farklı olduğu ve bu açıdan üstünlüğünü göstermektedir.

Yağ asidi bağlama proteini 5 (FABP5, orepidermalFABP)

FABP5, DANK Tedavi grubunda yaklaşık 2,7 kat yukarı artış tespit edilmiş olup, Doksorubisin tedavi gruplarında ve sağlıklı grupta ekspresyon düzeyinde kanser kontrol grubuna göre regülasyon tespit edilmemiştir.

Yağ asidi bağlama proteini 5, lipid metabolizmasını ve hücre büyümesini düzenleyen, yağ asidi moleküllerinin hücre içi bir şaperonudur. Hasta kaynaklı tümörlerde, FABP5 ekspresyonu on kata kadar artar ve sıklıkla diğer kanserle ilişkili proteinlerle birlikte eksprese edilir. Yüksek tümöral FABP5 ekspresyonu,

kötü prognozla ilişkilidir. FABP5, tümör oluşumunda yer alan proteinlerin ekspresyonunun artmasına yol açan transkripsiyon faktörlerini (TF'ler) aktive eder (Warren et al., 2023). Genetik ve farmakolojik preklinik çalışmalar, FABP5'in inhibe edilmesinin protümoral belirteçleri azalttığını, oysa FABP5'in yükselmesinin tümör büyümesini ve yayılmasını teşvik ettiğini göstermektedir (Amiri et al., 2018).

DANP Tedavi grubunda yukarı ekspresyon kötü prognoz ile ilişkili olmasına rağmen, FABP ailesine ait yağ asidi bağlama proteini 1 (FABP1) 'in jel bazlı yaklaşımda aşağı regule olduğu saptanmıştır.

Anneksin A1

DANP ve Doksorubisin tedavi gruplarında kanser kontrol grubuna göre yukarı ekspresse olmuştur. Ancak sağlıklı kontrol grubunda da kanser grubuna göre yaklaşık 2 kat yukarı ekspresyon görülmüştür.

Bu, hücre hareketliliğini ve çoğalmasını artıran fosfolipid bağlayıcı bir proteindir, invazyon, adezyon ve metastazda görev alır. HCC'nin genel ciddiyetinin bir göstergesi, anneksin A2 aşırı ekspresyonu HCC'nin büyümesi ve metastazında rol oynar (Sun et al., 2023).

Anneksin A1'in artan ekspresyonu, insan hepatoselüler karsinomunda kötü prognozu öngörür ve hücre malign fenotipini artırır (Lin, Y et al. , 2014).

Glukokortikoid aracılı yanıtların efektörü ve inflamatuvar sürecin düzenleyicisi olarak doğuştan gelen bağışıklık yanıtında önemli roller oynar. Antiinflamatuvar aktiviteye sahiptir. İnflamatuvar yanıtın erken evresinin glukokortikoid aracılı aşağı regülasyonunda rol oynar (Hannon et al., 2023).

T hücresi aktivasyonu tarafından tetiklenen sinyalleşme basamaklarını güçlendirerek adaptif bağışıklık tepkisine katkıda bulunur, aktive edilmiş T hücrelerinin farklılaşmasını ve çoğalmasını düzenler T hücrelerinin Th1 hücrelerine farklılaşmasını destekler ve Th2 hücrelerine farklılaşmayı negatif olarak düzenler (D'Acquisto et al., 2007). Uyarılmamış T hücreleri üzerinde etkisi yoktur. Formil peptid reseptörlerinin aktivasyonu ve aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi yoluyla hormon ekzositozunu negatif olarak düzenler) Fagositik kapların ve

fagozomların oluşumunda rol oynar. Fagozomlar ve aktin hücre iskeleti arasındaki Ca^{2+} bağımlı etkileşime aracılık ederek fagositozda rol oynar (Patel et al., 2011)

Literatürler ışığında beklenilenin aksine tedavi gruplarında artış gözlemlenmiş ve ayrıca sağlıklı grupta da kansere oranda azalış görülmemiştir.

Lipokalin 2

DANP ve Doksorubisin tedavi gruplarında yukarı eksprese olmuştur DANP tedavi grubunda ekspresyon düzeyi sağlıklı gruba yakın olmakla beraber, Doksorubisin tedavi grubunda belirgin bir artış söz konusudur.

Lipokalin 2 (LCN2) veya NGAL, lipokalin alt ailesine ait olan ve 25 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahip bir glikoproteindir Lipokalin taşıma proteini ailesinin bir parçası olan Lipokalin-2, demir taşınmasında ve inflamatuvar yanıtta rolüyle resmi olarak bilinen bir proteindir (Krizanac et al., 2021). Serumda, büyük olasılıkla değişken glikosilasyondan kaynaklanan 30 kDa'lık bir izoform, bir disülfid ile bağlanan 46 kDa'lık bir homodimer ve matrisin aktif olmayan formu olan proMMP-9'a bağlanan 130 kDa'lık bir heterodimer dahil olmak üzere ek LCN2 formları vardır Mevcut literatürlerde LCN2 ekspresyonunun HCC ile ilişkili olduğu, Dertli ve arkadaşları (2020), yaptığı çalışmada HCC hastalarında tanı anında yüksek LCN2 düzeylerinin kötü prognoz ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Zhang et al. (2012), LCN2'in hepatik tümörlerde eksprese edildiğini ve HCC'lu hastalarda kan LCN2 seviyelerinin yükselmesine neden olduğunu tespit etmişlerdir. Son zamanlarda, idrarda salınan LCN2' nin, HCC tespiti için invazif olmayan bir tanı belirteci olduğu ve kronik karaciğer hastalığı olan hastaların, HCC'ü teşhis etmek için üriner LCN2 kullanımından fayda sağlayacağı bulunmuştur (Abdelsameea et al., 2020).

Yakın zamandaki çalışmalar, LCN2'in NAFLD'nin patogenezindeki etkisi belirgin hale gelmiştir. LCN2, çeşitli iyi huylu ve kötü huylu karaciğer hastalıklarında önemli bir artış göstererek, onu NAFLD biyolojik belirteci ve hatta terapötik bir hedef için iyi bir aday haline getiriyor. LCN2'yi çalışmayı daha ilginç kılan şey, kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenlerinden biri olan kronik NASH'ın neden olduğu HCC gelişiminde aşırı eksprese edilmesidir (Krizanac et al., 2021).

Literatürler doğrultusunda HCC’da Lipokalin 2 artışı, sağlıklı grupta azalış beklenmektedir. Beklenenin aksine çalışmamızda; sağlıklı grubun kansere oranında neredeyse 2 kat artışa yani yukarı regüle değere yaklaşmış olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında DANP ve Doksorubisin tedavi gruplarında Lipokalin 2 yukarı eksprese olmuştur. Ancak, Doksorubisin tedavi grubunda ekspresyonda artış belirgindir ve daha fazladır. Sağlıklı grup DANP tedavi grubuna yakın değerdedir. Bu sonuçlar bize yine DANP tedavi yaklaşımının Doksorubisin tedavi yaklaşımından farklı olduğunu göstermektedir.

Nötrofil elastaz

DANP ve Doksorubisin tedavi gruplarında aşırı ekspresyon göstermiştir. Sağlıklı grupta ekspresyon düzeyinde değişim görülmemektedir.

Katepsin B aktivitesinin bir inhibitörü olarak görev yapar. Tümör damar gelişiminin, hücre istilasının ve metastazın negatif düzenleyicisi olarak rol oynar. Nötrofiller ve miyeloid türevli baskılayıcı hücreler dahil olmak üzere sızan bağışıklık hücreleri, tümör mikro ortamına nötrofil elastaz salgılar. Nötrofil elastaz daha sonra, proliferasyonun doğrudan indüksiyonu, tümör baskılayıcıların etkisizleştirilmesi ve anjiyogenezin uyarılması gibi primer tümör büyümesinde yer alan önemli yolaklara aracılık eder. Nötrofil elastaz ayrıca epitelialden mezenkimal geçişe göç, istila ve nihai olarak uzak metastaz bölgelerine yönelme dahil olmak üzere metastatik kaskaddaki önemli adımları kolaylaştırır (Zeng et al., 2023).

Her iki tedavide bu enzimin yukarı regülasyonu beklenenin ötesinde prognozda olumsuz sonuç olarak değerlendirilebilir.

İmmunoglobulin fragmantları

İmmunoglobulin kappa değişken 14-111, DANP tedavisinde yaklaşık 2 kat arttığı, Doksorubisin tedavisinde yaklaşık 10 kat arttığı tespit edilmiştir. İmmunoglobulin ağır zincir gamma 1 Doksorubisin tedavi grubunda yukarı eksprese olmuştur. İmmunoglobulin ağır zincir gamma 2B, DANP ve sağlıklı grupta aşağı eksprese olup, İmmunoglobulin ağır zincir gamma 3 DANP ve sağlıklı grupta aşağı eksprese olduğu tespit edilmiştir. İmmunoglobulin kappa değişken 8-19 (Fragmant) DANP tedavi grubunda aşağı eksprese olup, Doksorubisin ve sağlıklı grupta yukarı eksprese olmuştur.

Geleneksel olarak immünoglobulinin (Ig) yalnızca B-soy hücreleri tarafından üretildiğine inanılıyordu. Bununla birlikte, artan kanıtlar kanser hücrelerinde yüksek düzeyde Ig ekspresyonunu ortaya çıkardı ve bu Ig, kanserden türetilmiş Ig olarak adlandırıldı. Diğer çalışmalar, kanserden türetilen Ig'nin, B hücresinden türetilen Ig ile aynı temel yapıları paylaştığını ancak sınırlı değişken bölge dizileri ve anormal glikosilasyon dahil olmak üzere birçok farklı özellik sergilediğini göstermiştir. Humoral immün yanıtta bir antikor olarak işlev gören B hücresinden türetilen Ig'nin aksine, kanserden türetilmiş Ig, kanser hücrelerinin malign davranışlarını teşvik etmek, tümör immün kaçışına aracılık etmek, inflamasyonu indüklemek dahil olmak üzere birçok mekanizma yoluyla derin protümorijenik etkiler uygular ve trombositlerin toplanmasını aktive eder. Daha da önemlisi, kanserden türetilen Ig, kanser hastalarında teşhis ve tedavi hedefi olarak uygulama açısından umut verici bir potansiyel göstermektedir. Kanserden türetilen Ig'nin, kanser hastalarında umut verici bir teşhis ve prognostik biyobelirteç olarak hizmet edebileceğini göstermiştir. Kanser kaynaklı Ig'yi hedef alan tedaviler klinik öncesi çalışmalarda umut verici etkiler göstermiştir (Cui et al., 2021).

Immunoglobulin kappa değişken 14-111 hariç diğer immunoglobulin fragmantları DANP tedavisinde aşağı ekspresse olmuştur. Doksorubisin tedavisinde tümü yukarı regüle olmuştur. Humoral immün yanıtta bir antikor olarak işlev gören B hücresinden türetilen Ig'nin aksine, kanserden türetilmiş Ig'nin kanser hücrelerinin malign davranışlarını teşvik etmediği gözönüne alındığında, DANP tedavisi ile Doksorubisin tedavi yanıtlarının birbirinden farklı olduğunu söyleyebiliriz.

Tartata dirençli asit ATPaz (TrATPase)

Tartata dirençli asit ATPaz, DANP ve Doksorubisin tedavi gruplarında yukarı ekspresse olmuştur. DANP tedavisi sonucu ekspresyonu sağlıklı gruba yakın olmakla beraber, Doksorubisin tedavi grubunda daha belirgin bir artış sözkonusudur.

Tartrat dirençli asit fosfataz (TRAP, TrATPase veya TRAPase), asit fosfataz 5, tartrat dirençli (ACP5) olarak çeşitli şekillerde adlandırılır. TRAP'ın önerilen işlevleri arasında osteopontin / kemik siyaloprotein defosforilasyonu, ROS üretimi, demir taşınması ve hücre büyümesi ve farklılaşma faktörü olarak yer alır. Tartrat dirençli asit fosfataz tip 5; kemik erimesi sürecinde rol oynayabilir. Osteoklastik

tuzak, diğer substratlarla karşılaştırıldığında daha yüksek afiniteye sahip nükleotid tri- ve difosfatlar üzerinde etki eder. TRAP aşırı ekspresyonlu transgenik farelerde, hafif osteoporoz, artan osteoblast aktivitesi ve kemik sentezi ile birlikte ortaya çıkar (Angel et al., 2020). Reithmeier et al. (2017) çalışmasında, TRAP, TGF β 2/T β R ve CD44 aracılığıyla MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde metastazla ilişkili hücre özelliklerini destekleyerek, meme kanseri hücrelerinde TRAP eylemiyle ilişkili potansiyel bir sinyal mekanizmasını tanımlamışlardır.

Sonuçlar Doksorubisin ve DANP tedavisi arasında karşılaştırmaya olanak vermemektedir, DANP ya da Doksorubisin tedavisine özgü belirteç olacak metabolik bir aktivite sunmamaktadır.

Filamin-A

Filamin-A, DANP ve Doksorubisin tedavi gruplarında yukarı eksprese olmuştur.

Filamin-A, aktin filamentlerinin dik dallanmasını destekleyen ve aktin filamentlerini membran glikoproteinlerine bağlayan aktin bağlayıcı proteindir. Çeşitli transmembran proteinlerini aktin hücre iskeletine tutturur ve çok çeşitli sitoplazmik sinyal proteinleri için bir iskele görevi görür. Filamin B ile etkileşim, nöroblastın ventriküler bölgeden kortikal plakaya geçişine izin verebilir. Hücre yüzeyinde lokalize olan furini bağlar, içselleştirme hızını modüle eder ve hücre içi trafiğini yönlendirir. Siliogenezde rol oynar. Kan damarları, kalp ve beyin organlarının gelişimi sırasında hücre-hücre temaslarında rol oynar ve bağlantılara yapışır (Feng et al., 2006).

FlnA'nın kanser gelişiminde ve metastaz ilerlemesinde önemli bir işlevi olduğu düşünülmektedir ve kanser gelişimindeki rolü hakkında araştırmalar halen devam etmektedir. Sitoplazmada FlnA, hücre iskeletine yapı kazandırmak ve yeniden modellemek için aktin'e bağlanır ve daha da önemlisi, protein etkileşimini kolaylaştıran bir iskele molekülü görevi görür. FlnA'nın birçok proteinle etkileşime girdiği rapor edilmiştir, bu nedenle FlnA'nın etkileyebileceği çok sayıda yola ve hücredeki önemine işaret etmektedir (Zhou vd., 2021). FlnA, β 1 integrini hücre bağlanma bölgesine yönlendirerek ve vimentin ile etkileşimi yoluyla hücre yapışmasını ve göçünü kolaylaştırmada özellikle önemlidir (Kim ve McCulloch, 2011).

FlnA'nın kanser gelişimindeki rolüne bakıldığında, FlnA, hücre altı lokalizasyonuna bağlı olarak iki zıt kanser sonucuna neden olabilir. FlnA, sitoplazmada bulunarak ve hücre sinyal molekülleri ile etkileşime girerek hücre büyümesini ve metastazı destekleyebilir ya da FlnA ise çekirdekte ve transkripsiyon faktörleriyle etki ederek hücre büyümesinin inhibisyonuna neden olur ve dolayısıyla metastazı önler. Sitoplazmada FlnA, çeşitli sinyal yollarında etki eder. K-RAS, VEGF, R-Ras ve c-Met dahil olmak üzere birçok önemli onkogenik protein ile etkileşime girer (Zhou vd 2011 , Nallapalli et al., 2012). Bu etkileşimler sayesinde FlnA işlevlerine yardımcı olur ve hücre büyümesini artırır. FlnA, çekirdekte AR, Pol III ve FOXC1 dahil çeşitli transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girer (Ozanne et al., 2000) FlnA, DNA'nın promotör bölgelerinde aktivitenin inhibisyonuna neden olarak hücre ölümüne neden olur (Wang et al., 2007). Prostat kanserinde bu amaca yönelik çalışmalar hâlihazırda devam etmektedir (Mahaveer et al., 2024).

Tez çalışması kapsamında DANP ve Doksorubisin tedavi gruplarında yaklaşık 2 kat yukarı eksprese olmuştur. DANP ve Doksorubisin tedavisi FlnA'nın yukarı eksprese olmasını hücre sinyal molekülleri ile etkileşime girerek hücre büyümesini ve metastazı desteklemesi sonucu olumsuz prognoz olarak değerlendirebiliriz. Aksine FlnA'nın çekirdekte ve transkripsiyon faktörleriyle etki ederek hücre büyümesinin inhibisyonuna neden olması açısından da olumlu prognoz sonucu verdiğini söyleyebiliriz. Henüz net bir mekanizmanın açıklanmaması açısından sonuçlar Doksorubisin ve DANP tedavisi arasında karşılaştırmaya olanak vermemektedir.

Bulgular bölümü Tablo 4.6' da verilen DANP tedavi grubunda kanser grubuna göre aşağı eksprese proteinlerin Doksorubisin tedavi grubu ile karşılaştırılmasına ait bulgular ayrıntıları ile aşağıdaki gibi değerlendirmiştir:

Apolipoprotein C-III

DANP tedavi grubunda aşağı eksprese olmuştur. Doksorubisin tedavi grubu, sağlıklı grupta kanser gruba karşı ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlemlenmemiştir.

Apolipoproteinler, plazmada trigliserit bakımından zengin çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) ve yüksek yoğunluklu lipoproteinlerin (HDL) bileşenidir. Trigliserit homeostazisinde çok yönlü bir rol oynar. Hücre içi olarak, hepatik çok düşük yoğunluklu lipoprotein 1'in toplanmasını ve salgılanmasını teşvik eder; hücre dışı olarak, trigliseritten zengin lipoproteinlerin (TRL'ler) hidrolizini ve temizlenmesini azaltır. Lipoprotein lipazı ve TRL'lerin kalan reseptörler tarafından hepatik alımını inhibe ederek TRL'lerin lipolizisini bozar. Yağ metabolizması, katabolizması ve transportu metabolik süreçlerinde görev alır. Ligandı sialik asittir.

APOC1'in, MAPK sinyal yolu yoluyla kolorektal kanserde tümör ilerlemesini kolaylaştırdığına dair bazı kanıtlar vardı (Ren et al., 2019; Xue et al., 2012). Ayrıca Peng ve arkadaşları (2019) çalışmasında apolipoprotein ailesinin üyelerinin, özellikle apolipoprotein E'nin (APOE) ve RAS ailesi üyelerinin HCC'da doğrudan veya ferritin ağır polipeptit 1 aracılığıyla yakından ilişkili olduğunu, APOE protein artışının karaciğer kanseri gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir. HCC'da apolipoprotein artışı literatürlerde kanıtlanmış olup, kansere karşı DANP tedavi sonrası azaldığını tespit etmemiz bize DANP tedavisinin etkin ve olumlu sonuç verdiğini göstermektedir.

Literatürler doğrultusunda; DANP tedavi grubunda APOC3'ün aşağı eksprese olması ve Doksorubisin tedavi grubu ile sağlıklı grupta kanser gruba karşı ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlemlenmemiş olması yine DANP tedavisinin serbest Doksorubisin tedavisine göre daha avantajlı ve üstün olduğunun kanıtıdır. Doksorubisin ile tedavide ekspresyonda belirgin farklanmanın olmaması APOC3'ün, DANP tedavisi için seçici belirteç adayı olabileceğini düşündürmektedir.

Apolipoprotein A-IV

DANP tedavi grubunda ve sağlıklı grupta benzer şekilde aşağı eksprese olmuştur. Doksorubisin tedavi grubu, ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlemlenmemiştir.

Apolipoprotein A-IV, şilomikronlar ve düşük yoğunluklu lipoprotein sekresyonu ve katabolizmasında rol oynayabilir. ApoC-II ile lipoprotein lipazın verimli aktivasyonu için gereklidir; Lipoprotein ile ilişkili bir enzim olan lesitin

kolesterol asiltransferaz'ın güçlü aktivatörüdür. Apoa-IV, yüksek yoğunluklu lipoprotein ve şilomikronların önemli bir bileşenidir; Apolipoprotein A1/A4/E ailesine aittir (STRING, 2024).

Apolipoprotein ailesinin kanserle ilişkisine ait çok yakın zamanda literatürde çalışmalar mevcuttur. Bharali, et al. (2018), HCC'u olmayan kontrollerle karşılaştırıldığında HCC hastalarında artan ApoAI ekspresyonu ve azalmış ApoAIV ekspresyonu, HCC'daki anormallikleri ortaya çıkarmıştır. Otofaji ve ayrıca lipidlerin homeostazisinde de rol oynadığını ve apolipoproteinlerin kanser tanısı ve prognozu için biyobelirteçler olarak potansiyel uygulamasını vurgulanmış ve bunların kanser tedavisi için ilaç hedefi olma potansiyellerini araştırılmıştır. Aksine Ni et al. (2020) çalışmasında kronik karaciğer hastalığı ve HCC'da ApoA1, HDL ve LDL gibi dolaşımdaki lipid ve apolipoprotein düzeylerinin çoğunluğunun, benign lezyondakilere kıyasla hafif anlamlı düzeyde azaldığını tespit etmiştir. Ancak kronik karaciğer hepatiti ile HCC arasında lipidlerin ve apolipoproteinlerin anlamlı farklı ekspresyon paternleri gözlenmemiştir.

Ren et al. (2019), apolipoproteinlerin ekspresyonundaki artışın kanserle doğru orantılı olduğu tespit etmiştir. Farklı türdeki apolipoproteinlerin kanserler, otofaji, oksidatif stres, ilaç ve hipolipidemik ajanlara direnç ve kanserlerdeki rolleri olduğunu tespit etmişlerdir.

Bu tez çalışmasında Apolipoprotein C3 ve Apolipoprotein A4, DANP tedavi grubu ve sağlıklı grupta aşağı eksprese olmuştur. Doksorubisin tedavi grubu kanser grubu ile benzer ekspresyon seviyesinde olup, ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlemlenmemiştir. Bu da bize DANP tedavi grubunda apolipoprotein ekspresyonunu düşüren faktörlerin bulunabileceği ve kanser gruba göre ekspresyondaki azalışın tedavi yanıtının olumlu seyri olduğu hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca sağlıklı grubun DANP tedavi grubu ile benzer davranış göstermesi, DANP tedavisi için olumlu veriler ortaya sunmuştur. Ayrıca Apolipoprotein C3 ve Apolipoprotein A4'ün Doksorubisin ile tedavide ekspresyonda belirgin farklanmanın olmaması DANP tedavisi için seçici biyobelirteçler olabileceğini düşündürmektedir.

NADPH:adrenodoksin oksidoredüktaz

DANP tedavi grubunda ve Doksorubisin grubunda NADPH'ın aşağı eksprese olduğu, sağlıklı grupta ekspresyon seviyesinin değişmediği tespit edilmiştir.

Yağ asidi oksidasyon yolu, özellikle metabolik stres altında birçok kanserde vazgeçilmez olan NADPH'nin dolaylı olarak sağlanmasında da anahtardır. Yağ asidi oksidasyonunda NADH, FADH₂ ve asetil koenzim A (CoA) üretir (Xiong et al., 2018) ve NADH ve FADH₂ ETC'ye girerken asetil CoA, ME1 yoluyla NADPH üretimine katılmak üzere sitozole ihraç edilen sitrat üretmek için TCA döngüsüne girer. Yağ asidi oksidasyonu bir dizi döngüsel katabolik reaksiyondan oluşur ve yağ asitlerinin kısalması (döngü başına iki karbon) ile sonuçlanır. İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid (NADH), flavin adenin dinükleotid (FADH₂), NADPH ve ATP'nin önemli bir kaynağıdır. NADH ve FADH₂, ATP üretmek için elektron taşıma zincirine girer ve NADPH, kanser hücrelerini metabolik strese ve hipoksiye karşı korur (Carrecedo et al., 2013). Yağ asidi oksidasyonu ve yağ asidi sentezi, tümörün ilerlemesi için gereklidir ve birbirlerini destekler. Yağ asidi sentezini başlatmak için sitozolde yağ asidi oksidasyonu metabolizmasından biriken asetil CoA ve NADPH'ye ihtiyaç vardır. (Kuo et al., 2018). Yağ asidi oksidasyon yolundaki hız sınırlayıcı enzimler olan karnitin palmitoil transferazlar, uzun zincirli açıl-CoA'yı sitozolden mitokondriye taşır (Carracedo et al., 2013). Karnitin palmitoil transferaz aracılı yağ asidi oksidasyonu aktivasyonunun, NADPH homeostazisinin korunmasında ve gastrointestinal kanser ve melanomda hücre metastazı ve kemorezistansın desteklenmesinde anahtar rol oynadığı rapor edilmiştir (Ju et al., 2020).

Glutamin metabolizması, TCA döngüsü için önemli bir hücresel karbon kaynağıdır; nükleotid, amino asit ve lipit biyosentezi için bir nitrojen donörüdür ve aynı zamanda NADPH seviyelerinin korunması için de kritik öneme sahiptir. Çoğalan kanser hücreleri aerobik glikoliz sergiler, bu da glikoz karbonunun TCA döngüsünden uzaklaşmasına yol açar, bu da artan NADPH ve amonyak üretimi ile hızlı hücre büyümesini desteklemek için anabolik süreçleri beslemek için glutamin kullanımının artmasına neden olur (Schiliro et al., 2021).

Folat aracılı tek karbon metabolizması uzun süredir bilinmektedir ve nükleik asit ve metiyonin sentezi için tek karbonlu birimler üretme işlevine atfedilmiştir; bu yolun bir diğer önemli işlevi NADPH indirgeme gücü üretmektir. Serin ve glisin bu

yolun ana karbon kaynaklarıdır. Serin biyosentez yolunun aktivasyonu, kanser hücrelerinde NADPH oluşumunu artırır. Tersine, serini ortamdan uzaklaştırmak NADPH/NADP⁺ oranını azaltır ve kanser hücresi büyümesini bozar (Ju et al., 2020).

Pentos fosfat yolu , sitozolik NADPH'ye en büyük katkıyı sağlayan glikolizin ilk adımında ayrılır. Çalışmalar, çeşitli kanserlerde pentos fosfat yolunda glukoz akışının artırılmasıyla NADPH üretiminin önemli ölçüde arttığını kanıtlamıştır (Ju et al., 2020).

DANP tedavi grubunda ve Doksorubisin grubunda NADPH'ın aşağı eksprese olduğu, sağlıklı grupta ekspresyon seviyesinin değişmediği tespit edilmiştir. NADPH ekspresyonun aşağı regülasyonu DANP tedavisi yaklaşımının olumlu olduğunun kanıtıdır ancak sonuçlar Doksorubisin tedavisi ile karşılaştırmaya olanak vermemektedir.

NADH dehidrojenaz [ubikinon] 1 alfa alt kompleksi alt birimi 6

DANP tedavi grubunda ve Doksorubisin grubunda aşağı eksprese olduğu, sağlıklı grupta ekspresyon seviyesinin değişmediği tespit edilmiştir.

Mitokondriyal membran solunum zinciri NADH dehidrojenazın (Kompleks I) aksesuar alt birimi olup, katalizde yer almadığına inanılmaktadır. Kompleks I, elektronların NADH'dan solunum zincirine transferinde görev yapar. Enzim için doğrudan elektron alıcısının ubikinon olduğuna inanılmaktadır. Liang et al. (2023) çalışmasında mitokondriyal solunum kompleksi I alt birim eksikliğinin tümör immünojenitesine neden olduğunu tespit etmişlerdir.

DANP tedavi grubunda ve Doksorubisin grubunda aşağı eksprese olduğu, sağlıklı grupta ekspresyon seviyesinin değişmediği tespit edilmiştir. Liang ve arkadaşlarının (2023) çalışmasına göre DANP tedavi grubu ve Doksorubisin grubunda aşağı ekspresyonu tümör büyümesini kısıtladığı yeni bir fonksiyonel yöntem sağlaması gözönüne alınırsa tedavi yanıtını olumlu olarak nitelendirilebilir. Sonuçlar, Doksorubisin ve DANP tedavisi arasında karşılaştırmaya olanak vermemektedir.

Keratin 78

Keratin 78 Doksorubisin tedavi gruplarında yukarı eksprese olmuştur. DANP tedavi grubunda aşağı ekspresyon tespit edilmekle birlikte sağlıklı grupta belirgin artış ya da azalış sözkonusu değildir.

Keratinlerin, apiko-bazal polarizasyon, hareketlilik, hücre boyutu, protein sentezi ve membran trafiği ve sinyalleme dahil olmak üzere diğer hücresel özellik ve fonksiyonların düzenleyicileri olduğu kabul edilmiştir. Kanserde keratinler, tanısal tümör belirteçleri olarak yaygın şekilde kullanılır; çünkü epitelyal maligniteler, ilgili köken hücreleriyle ilişkili spesifik keratin modellerini büyük ölçüde korur ve birçok durumda, tümörlerde tam uzunlukta veya bölünmüş keratin ekspresyonu (veya yokluğu) bulunur ve/veya ya periferik kan, kanser hastaları için prognostik önem taşır. Oldukça ilgi çekici bir şekilde, çeşitli çalışmalar kanser hücresi istilası ve metastazının yanı sıra tedaviye yanıt vermede aktif keratin katılımına dair kanıtlar sunmuş ve epitelyal tümör oluşumunun çok işlevli düzenleyicileri olarak keratinlerin rolünün daha fazla araştırılması için temel oluşturmuştur (Karantza. et al., 2011).

Bu bilgiler doğrultusunda DANP tedavisinde Keratin 78'in aşağı regülasyonu, DANP tedavi yaklaşımının olumlu olduğunun kanıtıdır. Doksorubisin tedavisinde yukarı regülasyon olması yine DANP tedavisi ile Doksorubisin tedavi yanıtlarının birbirinden farklı olduğunu göstermektedir.

14 kDa Fosfohistidin fosfataz

DANP ile tedavi sonrası aşağı eksprese olup, Doksorubisin ile tedavide ekspresyonda belirgin farklanma tespit edilmemiştir.

14 kDa Fosfohistidin fosfataz, fosfohistidin fosfataz aktivitesi gösterir. 14 kDa Fosfohistidin fosfataz'ın bitişik kanserli olmayan insan karaciğer dokusu ve hücreleriyle karşılaştırıldığında hepatoselüler karsinom (HCC) doku ve hücre hatlarında yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiştir (Han et al., 2012). Ayrıca Xu ve arkadaşlarının (2021) çalışmasında, 14 kDa fosfohistidin fosfatazın fibrotik karaciğer dokusunda yukarı regüle edildiğini ve hepatik yıldız hücrelerinin göçü ve

lamellipodia oluşumunda rol oynadığını böylece karaciğer fibrozu için potansiyel bir terapötik hedef olduğu belirtilmiştir. Ekspresyonda aşağı regülasyon DANP tedavisi yaklaşımının olumlu prognozunun kanıtıdır. Doksorubisin ile tedavide ekspresyonda belirgin farklanmanın olmaması DANP tedavisi için seçici bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir.

Makrofajda eksprese edilen gen 1 proteini

DANP, Doksorubisin ve sağlıklı grupta yukarı ekspresyon göstermiştir.

Makrofajda eksprese edilen gen 1 proteini (M1 tipi makrofajlar), tümör hücrelerini normal hücrelerden ayırt edebilen anti-tümör etkilere sahiptir. Tümör hücrelerini tanımlayıp sonuçta tümör hücrelerini öldüren çalışmalarda, M1 tipi makrofajların tümör hücrelerini öldürme mekanizması üzerinde iki farklı etkiye sahip olduğu bulunmuştur. M1 tipi makrofajlar, tümör hücrelerini öldürmek için doğrudan sitotoksositeye aracılık eder: makrofaj aracılı sitotoksosite yavaş ve birden fazla mekanizma içeren süreçtir. Bu mekanizmalar örneğin makrofajlar, tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri olan ROS ve NO gibi tümör öldürücü molekülleri serbest bırakır (Bernsmeier et al., 2020) ya da tümör hücrelerini öldüren antikora bağımlı hücre aracılı sitotoksitedir (ADCC) ki tümör hücrelerini öldürmek için daha az zaman gerektirir (genellikle birkaç saat içinde) ve anti-tümör antikorlarının katılımını gerektirir (Bruns et al., 2015).

DANP, Doksorubisin ve sağlıklı grupta yukarı ekspresyon göstermiştir. Bu nedenle; sonuçlar Doksorubisin ve DANP tedavisi arasında karşılaştırmaya olanak vermemektedir.

Doksorubisin tedavisinde DANP tedavisinden farklı seviyede ekspresse olan proteinler ayrıca aşağıdaki gibidir:

Kitinaz benzeri protein 4

DANP tedavisi ve Doksorubisin tedavisi sonrasında ilgili proteinin yukarı ekspresse olduğu tespit edilmiştir.

Kitinaz benzeri proteinler doku yeniden yapılanması ve iltihaplanma ile ilişkilidir, aynı zamanda fibroz, ateroskleroz, alerji ve kanser gibi çeşitli

bozukluklarla da ilişkilidir. Kitinaz benzeri proteinler, genişlemiş endozomal veziküller yoluyla hücre polaritesinin bozulması yoluyla tümör oluşumunu teşvik eder (Khalili et al., 2023).

Doksorubisin tedavi grubunda ekspresyon seviyesi DANP tedavi grubuna göre yaklaşık iki kat daha fazladır. Sağlıklı Grupta ekspresyon seviyelerinde farklılık gözlemlenmemektedir. DANP tedavisi ve Doksorubisin tedavisi sonrasında ilgili proteinin yukarı ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterebilir.

Proteazom alt birimi beta tip-3

DANP tedavisi ve Doksorubisin tedavisi sonrasında ilgili proteinin yukarı ekspresyonu olduğu tespit edilmiştir. Sağlıklı grupta ekspresyon seviyelerinde farklılık gözlemlenmemektedir.

Proteazom alt birimi beta tip-3, çoğu hücre içi proteinin proteolitik bozunmasında rol oynayan 20S çekirdek proteazom kompleksinin katalitik olmayan bileşenidir. Bu kompleks, farklı düzenleyici parçacıklarla birleşerek hücre içinde çok sayıda önemli rol oynar. İki 19S düzenleyici parçacıkla birleşerek 26S proteazomu oluşturur ve böylece ubiquitinlenmiş proteinlerin ATP'ye bağımlı bozunmasına katılır. 26S proteazomu, hücresel işlevleri bozabilecek yanlış katlanmış veya hasar görmüş proteinleri ve işlevleri artık gerekli olmayan proteinleri uzaklaştırarak protein homeostazisinin korunmasında önemli bir rol oynar. 20S proteazomu, ubiquitinden bağımsız protein bozulmasına aracılık eder. Bu tip proteoliz, spermatogenez veya MHC sınıf I tarafından sunulan antijenik peptitlerin bir alt kümesinin üretilmesi dahil olmak üzere çeşitli yollarda gereklidir (UNIPROT P49720 · PSB3_HUMAN, 2024).

Endometrium kanserlerinde transkriptom çapında en farklı şekilde ekspresye edilen genler arasında PSMB3 tarafından kodlanan proteazom alt birimi beta 3'ü belirlenmiş ve PSMB3, endometriyumla karşılaştırıldığında endometrial tümör dokularında önemli ölçüde daha yüksek seviyelerde ekspresye edildiği tespit edilmiştir (Mamoor, 2021). Buna göre; DANP tedavisi ve Doksorubisin tedavisi sonrasında proteazom alt birimi beta tip-3'ün yukarı ekspresyonu olması ve ekspresyondaki artış seviyelerinin yakın olması Doksorubisin ve DANP tedavisi arasında karşılaştırmaya olanak vermemektedir.

Deamidaz fosforibosilformilglisinamidin sentetaz (PFAS)

DANP tedavisi ve Doksorubisin tedavisi sonrasında ilgili proteinin yukarı ekspresse olduğu tespit edilmiştir. Sağlıklı grupta ekspresyon seviyelerinde farklılık gözlemlenmemektedir.

Fosforibosilformilglisinamidin sentaz (PFAS), *de novo* pürin sentezinin dördüncü adımını katalize eden yüksek oranda korunmuş bir enzimdir. Formilglisinamid ribonükleotid ve glutaminin ATP'ye bağımlı dönüşümünü katalize ederek formilglisinamidin ribonükleotid ve glutamat elde edilmesini sağlar (Chenglong et al., 1999). Human Protein ATLAS' a göre PFAS HCC için olumsuz prognostik belirteç olarak tanımlanmıştır (Human Protein ATLAS, 2024). Ayrıca Chong ve arkadaşları (2020), yaptığı çalışmada *de novo* purin biyosentezinin HCC'da arttığı ve PFAS'ın da içinde bulunduğu birçok enzimin yukarı regule olduğunu belirtmişlerdir. Bu bilgiye dayanarak PFAS'ın yukarı ekspresyonu DANP tedavisi ve Doksorubisin tedavisinin kötü prognozu ile ilişkilendilebilir.

Mitokondriyal işleme peptidaz alt birimi alfa

Doksorubisin tedavisi sonrasında ilgili proteinin yukarı ekspresse olduğu tespit edilmiştir. DANP tedavisi ve sağlıklı grupta ekspresyonda regülasyon görülmemiştir.

Mitokondriyal işleme peptidaz alt birimi alfa, proteolitik bir heterodimerin alfa alt birimini temsil ettiği mitokondride bulunur. Bu heterodimer, transit peptidinin nükleer kodlu mitokondriyal proteinlerden ayrılmasından sorumludur (NIH, 2024). Oksidatif stres varlığında proteinin korunması için önemli bir faktör, oksidatif modifikasyonların ve/veya protein degradasyonunun enzimatik olarak tersine çevrilmesidir. Bu süreçlerdeki bozulma kanser sürecinin kritik bir bileşenidir. Mitokondriyal proteazlar yanlış katlanmış ve bir araya gelmeyen polipeptitleri bozar, böylece organelde kalite kontrol gözetimi gerçekleştirir. Mitokondriyal proteazlar, yakın zamanda Mitokondriyal serin proteazı olan HtrA2/Omi için gösterildiği gibi kanser gelişimine doğrudan dahil olabilir. Hem kaspaz bağımlı hem de bağımsız yollarla apoptoza katkıda bulunup, mitokondriyal homeostazı sağlar (Vande Walle et al., 2008) veya Lon proteaz tarafından parçalanmış sitokrom c oksidaz kompleksinin bir alt birimi olan sitokrom c oksidaz 4 gibi önemli mitokondriyal moleküllü düzenleyebilir (Bulteau et al., 2010).

Doksorubisin tedavisi sonrasında ilgili proteinin yukarı ekspresse olduğu tespit edilmiştir. Doksorubisin tedavisi için olumlu sonuç olmasına rağmen DANP tedavisine ilişkin veri sunmamaktadır.

Serum amiloid P bileşeni

Doksorubisin tedavisi sonrasında ilgili proteinin yukarı ekspresse olduğu tespit edilmiştir. DANP tedavisinde ilgili proteinin ekspresyonunda artış ya da azalış olmamıştır.

Serum amiloid P bileşeni, apoptotik hücrelerin temizlenmesine katkıda bulunur. Ana akut faz reaktanlarından biri olan serum amiloid P bileşeni, inflamasyonun temel yönlerini düzenler ve bağışıklık hücresi aktivasyonu için bir eşik belirler (Zhao et al., 2016).

Solüsyon bazlı nLC-MS analizi sonucu yukarıda değerlendirilen proteinlerin yanında jel bazlı LC-MS yaklaşımda ise; DANP tedavisi sonrası Kalretikulin, Glutamat dehidrogenaz, fruktoz-bisfosfataz aldolaz B, endoplazmik retikulum şaperonu BiP, regukalsin proteinlerinin yukarı ekspresse olduğu 60 kDa ısı şok proteini, 71 kDa ısı şok proteini, yağ asidi bağlama proteinlerinin ise aşağı ekspresse olduğu Mascot yüksek skor değeri tespit edilmiştir.

Doksorubisin tedavi grubunda ise hemoglobin yukarı ekspresse olurken, albümin, yağ asidi bağlama proteini, serotransferrin, Endoplazmik retikulum şaperonu BiP, peroksiredoksin-1, glutamat dehidrogenazın aşağı ekspresse olduğunu Mascot yüksek skor değeri tespit edilmiştir.

Jel bazlı LC-MS proteomik yaklaşımla “Bulgular Bölümü Tablo 4.4 ve 4.5’de verilen DANP ve Doksorubisin tedavi grubunda regule olan proteinlere ait bulgular ayrıca aşağıda değerlendirmiştir:

Kalretikulin

Jel bazlı yaklaşım ile kalretikulinin DANP tedavisi sonrası yukarı ekspresyonu tespit edilmiştir.

Kalretikulin, çeşitli hücrel işlemlere katılan, yüksek oranda korunmuş bir endoplazmik retikulum şaperon proteinidir. İlk olarak 1974 yılında Ca^{+2} bağlayıcı bir protein olarak tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda kalretikulin'in farklı kanserlerin gelişiminde büyük etkileri olduğunu ve tümör oluşumu ve ilerlemesi üzerindeki etkisinin hücre tiplerine ve klinik aşamalara bağlı olabileceğini göstermektedir. Hücre yüzeyi kalretikulin bir “beni ye” sinyali olarak kabul edilir ve kanser hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından fagositik alımını destekler. Ayrıca, çeşitli raporlar, kalretikulin seviyelerinin değişmesinin, kanser hücresi proliferasyonu ve anjiyogenezinin yanı sıra farklılaşmasını da derinden etkilediğini ortaya koymaktadır. İmmünojenite ve tümör oluşumuna ek olarak, kanser metastazı için önemli bir süreç olan hücre yapışması sırasında kalretikulin ve integrinler arasındaki etkileşimler de tanımlanmıştır. Integrinler, hücre dışı matrisi ve hücre içi hücre iskeletini birbirine bağlayan ve içten dışa veya dışarıdan içeriye sinyal iletimini tetikleyen heterodimerik transmembran reseptörleridir. Ayrıca, integrinlere bağlanan proteinlerin integrin-hücre iskeleti etkileşimini etkileyebileceğini ve dolayısıyla hücre yapışma yeteneğini etkileyebileceğini ortaya koymaktadır (Lu et al., 2015). Kalretikulin/kalnexin döngüsü yoluyla endoplazmik retikulumda katlanmayı, oligomerik montajı ve kalite kontrolünü destekleyen kalsiyum bağlayıcı şaperon olup endoplazmik retikulumda sentezlenen monoglikozile glikoproteinlerin neredeyse tamamıyla geçici olarak etkileşime girer (Kozlov et al., 2010).

Feng ve arkadaşları (2005), kalretikulinin, HCC hücre hatlarında anormal derecede aşırı eksprese edildiğini tespit etmişlerdir. Kalretikulinin aşırı ekspresyonu, muhtemelen PI3K/Akt yolu yoluyla, HCC malign davranışına büyük ölçüde katkıda bulunduğunu, kalretikulinin hepatoselüler karsinom için potansiyel bir biyobelirteç ve terapötik hedef olarak hizmet edebileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca, Kalretikulin ekspresyon seviyeleri ile tümör oluşumu arasındaki korelasyon, çeşitli kanserlerde kapsamlı bir şekilde incelenmiştir ve çoğu rapor, tümör dokularının normal dokulara kıyasla önemli ölçüde daha yüksek kalretikulin seviyeleri eksprese ettiğini göstermiştir (Zamanian et al., 2013).

Kalretikulin/kalnexin döngüsünde apolipoprotein bağlama fonksiyonu bulunmakta olup, Wang et al. (2000) çalışmasında, Ko-immunopresipitasyon ve Pulse-chase analizleri sonucu, apolipoprotein A'nın kalretikulin ve kalnexin ile etkileşiminin benzer kinetiği ortaya koyduğunu ve apolipoprotein A sentezinden 15-30 dakika sonra zirveye ulaştığını tespit etmişlerdir. Bu bağlamda, etiketsiz

nLC-MS çalışmamızda Apolipoproteinlerde aşağı ekspresyon kalretikulinin yukarı ekspresyonun sonucunu olabilir.

Kalretikulin ekspresyonundaki artış her ne kadar DANP tedavisi için dezavantaj gibi görülse de apolipoproteinin aşağı regülasyonu DANP tedavisi için olumlu bir sonuç yaratmaktadır (Bkz. Apolipoprotein C3; Apolipoprotein A4).

60 kDa ısı şok proteini, 71 kDa ısı şok proteini

Jel bazlı proteomik yaklaşımla DANP tedavisi sonrası 60 kDa ısı şok proteini, 71 kDa ısı şok proteinlerinin aşağı regüle olduğunu tespit ettik. Ancak çalışmamızda bunun aksine nLC-MC sonuçlarında kanser dokuda ekspresyon seviyesinde belirgin regülasyon tespit edilememiştir. Her ne kadar jel bazlı proteomik yaklaşım ve etiketsiz nLC-MS tayinine dayalı yaklaşım ile komplementar veri elde edilse de farklı sonuçlar değerlendirmeyi zorlamaktadır.

Isı Şoku Proteinleri (HSP) kanserde yüksek seviyelerde eksprese edilir ve tümör gelişimi için gerekli olan destekleyici bir ortam oluşturur. Bu alandaki son verileri, esas olarak Hsp27, Hsp70 ve Hsp90'a yoğunlaşarak inceledik. HSP'lerin kanserdeki en önemli rolü, aşırı eksprese edilmiş ve mutasyona uğramış kanser geninin aktif fonksiyonlarını stabilize etmektir. Dolayısıyla artan büyüme, hayatta kalma ve ikincil kanser oluşumu dahil olmak üzere kanser morbiditesinin altında yatan birçok özellik için yüksek HSP'ler gereklidir. Ek olarak HSP'ler kanser tedavisi direncinin gelişimine de katkıda bulunur. HSP'ler ayrıca kanser hücrelerinden salınır ve reseptör aracılı sinyalleme yoluyla malign özellikleri etkiler (Calderwood et al., 2016). Jel bazlı proteomik yaklaşım DANP tedavisi sonrası 60 kDa ısı şok proteini, 71 kDa ısı şok proteinlerinin aşağı regüle olması tedavi yanıtı için olumlu veri sunmaktadır.

Literatürler doğrultusunda DANP tedavi yaklaşımının, jel bazlı yaklaşım sonucuna göre antikanser yanıtının Doksorubisin tedavi yaklaşımına göre daha iyi olduğunu desteklemektedir.

Yağ asidi bağlama proteini 1

DANP tedavisi sonrası jel bazlı yaklaşımda ekspresyonunda azalış gözlemlenmiştir.

Yağ asidi bağlayıcı protein 1, karaciğer hepatositlerde lipoprotein aracılı kolesterol alımında rol oynar, kolesterolü bağlar. Serbest yağ asitlerini ve bunların koenzim A türevlerini, bilirubini ve sitoplazmadaki diğer bazı küçük molekülleri bağlar. Hücre içi lipit taşınmasında rol oynayabilir (UniProt P12710.FABPL_MOUSE, 2024).

Yağ asidi bağlayıcı proteinler (FABP'ler), hücre içi lokalizasyonu kolaylaştırmak için uzun zincirli yağ asitlerini ve diğer biyolojik olarak aktif ligandları bağlayan küçük, suda çözünür proteinlerdir Bugüne kadar insanlarda 10 izoformu ifade edilen 12 FABP ailesi üyesi tanımlanmıştır Fonksiyonel olarak FABP'ler, yağ asidi metabolizması ve taşınmasında önemlidir; farklı aile üyeleri, gen transkripsiyonunu etkileme kapasitesine sahiptir. FABP ekspresyonunun düzensizliği, genetik mutasyon ve/veya çevresel yaşam tarzı etkileri yoluyla meydana gelebilir. Hücre içi fonksiyona ek olarak, eksojen, dolaşımdaki FABP ekspresyonu da meydana gelebilir ve insülin direnci gibi spesifik hastalık durumlarıyla ilişkilidir. Tümör biyolojisinde FABP'lerin bir rolü giderek daha fazla rapor edilmekte olup, yüksek eksojen FABP ekspresyonu, tümörün ilerlemesi ve istilacılığı ile ilişkilidir. Bununla birlikte, hücre dönüşümü ve erken genişleme sırasında düzensiz FABP ekspresyonunun daha az net bir rolü olduğu belirlenmiştir (McKillop et al. 2019). DANP tedavisi sonrası jel bazlı yaklaşımda ekspresyonunda azalış tedavinin olumlu prognozu ile ilişkili olabilir.

Glutamat dehidrogenaz 1

Jel bazlı yaklaşımda, DANP tedavi grubunda Glutamat dehidrogenaz 1 yukarı eksprese protein olarak tespit edilmiştir. Doksorubisin tedavi grubunda ise aşağı regüle olarak tespit edilmiştir. Megger ve arkadaşları (2013) çalışmasında HCC'da glutamat dehidrogenaz 1'in aşağı ekspresyon gösterdiğini tespit etmiştir. Wu ve arkadaşları (2019), glutamat dehidrogenaz, Notch sinyal yolu yoluyla mide kanserinde tümör büyümesini engellediğini vurgulamışlardır.

Doksorubisin tedavi grubunda aşağı regülasyon göstermesi ve DANP tedavi grubunda ise yukarı regülasyon göstermesi DANP tedavisinin olumlu olduğunu göstermektedir.

Fruktoz bisfosfat aldolaz B

Jel bazlı çalışmamızda DANP tedavi grubunda yukarı eksprese protein olarak tespit edilmiştir.

Fruktoz bisfosfat aldolaz, aldolaz glikolitik yolun ortasında konumlandırılır ve fruktoz-1,6-bisfosfatın dihidroksiaseton-3-fosfat ve gliseraldehit-3-fosfata geri dönüşümlü bölünmesini katalize eder. Hemen hemen tüm kanserlerde en bol bulunan aldolaz izoformu olan kas izoformu (ALDOA), aktin filamentlerini düzenleyebilir, Wnt ve p53 sinyalleşmesini düzenleyebilir. ALDOA'nın hücre döngüsünün S/G1 fazının ilerlemesinde rol oynadığı da gösterilmiştir. ALDOA, kanser hücresinin hayatta kalması ve çoğalması için gerekli olan birçok hücrenel olaya katıldığından, ALDOA'nın fonksiyonlarının bozulmasının, anti-kanser tedavisi için tercih edilebilir bir hedef olabileceği belirtilmiştir. Normal hücrelerde olmasa da kanserli hücrelerde, ALDOA'nın aktin hücre iskeleti ile etkileşiminin bozulmasının, ROS üretiminde önemli bir artış, ATP sentezinin durması ve kaspaz ile sonuçlanan kalsiyum seviyelerinde artış dahil olmak üzere bir dizi hücre içi değişikliği tetiklediğini ortaya koymaktadır. Kanserli hücrelerde ALDOA'nın aşırı ekspresyonunun yüksek glikolitik gereksinimleriyle ilişkili olmadığı, ancak metastatik kanser hücrelerinin aktin hücre iskeletinin bütünlüğünü garanti altına aldığı bir adaptasyonu temsil ettiği belirtilmiştir (Gizak et al., 2019).

Megger et al. (2013)'nin jel bazlı ve etiketsiz nLC-MS çalışmasında HCC' da Fruktoz bisfosfat aldolaz B'nin yukarı eksprese olduğunu tespit etmiştir. Etiketsiz nLC-MS çalışmamızda DANP ve Doksorubisin tedavisinde Fruktoz bisfosfat aldolaz C proteinin ekspresyonunda artış ya da azalış olmamıştır. Fruktoz bisfosfat aldolaz B'nin kanser ile ilişkisine yönelik sınırlı bilgi nedeniyle herhangi bir bulgu tespit edilememiştir.

Endoplazmik retikulum şaperon BiP

Jel bazlı yaklaşımda DANP tedavisinde ve Doksorubisin tedavisinde aşağı regule protein olarak tespit edilmiştir.

Endoplazmik retikulum şaperon BiP (ısı şoku protein ailesi A üyesi 5-HSPA5, GRP78 veya BiP) endoplazmik retikulum lümeninde protein katlanması ve kalite kontrolünde önemli bir rol oynayan endoplazmik retikulum şaperonudur.

ERN1/IRE1 aracılı katlanmamış protein tepkisinin (UPR) önemli bir baskılayıcısı olarak işlev görür (Oikawa et al., 2009).

Protein katlanması ve bozunmasındaki bir dengesizlik, ER’de katlanmamış proteinlerin birikmesine ve bu organelde uygun homeostazı geri kazandıran bir sinyalleme kaskadının aktive olmasına neden olabilir. Endoplazmik retikulum şaperon BiP, bu süreçlerde kritik bir rol oynayan ATP’ye bağımlı bir şaperondur. BiP, BiP’nin ATP’ye bağımlı substrat etkileşimlerini uyaran belirli ER-lokalize DnaJ ailesi üyeleriyle (ERdj) etkileşime girer ve birkaç ERdj de doğrudan katlanmamış protein istemcilerine bağlanır (Pobre et al., 2019). Protein translokasyonu sırasında ER’nin geçirgenlik bariyerini korumaktan, yanlış katlanmış proteinleri retrograd translokasyon için hedefleyerek proteazom tarafından parçalanabilmelerinden sorumludur. Endoplazmik retikulum şaperon BiP ihibisyonu artan kalretikulin ve ATP oluşumu ile immunojenik hücre ölümü ile sonuçlanır (Kepp et al., 2022).

Endoplazmik retikulum (ER) strese girdiğinde, endoplazmik retikulum şaperon BiP hücre yüzeyine, mitokondriye ve çekirdeğe taşınarak işlevlerini yerine getirmek için diğer proteinlerle kompleks oluşturur. Hücre yüzeyinde, endoplazmik retikulum şaperon BiP hücre canlılığı, çoğalma, apoptoz ve hücre çoğalmasında rol oynayabilir (Bailly ve Waring, 2019). Kang et al. (2015) çalışmasında endoplazmik retikulum şaperon BiP’i onkoprotein olarak ifade etmiş ve KIAA1324’in onkoprotein GRP78’i engelleyerek mide kanseri ilerlemesini engellediğini açıklamışlardır. Rangel et al. (2021) çalışmasında Endoplazmik retikulum şaperonu BiP’in mutant Kras kaynaklı akciğer tümör oluşumu için kritik öneme sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Jel bazlı yaklaşım ile tespit edilen endoplazmik retikulum şaperon BiP’in azalışı ve yine Jel bazlı yaklaşım ile tespit edilen kalretikulin artışı sonucu, Kepp et al. (2012) çalışmasındaki verilere dayanarak; DANP tedavisi sonucu hücre ölümü ile sonuçlanabilir. Bu doğrultuda, Jel bazlı yaklaşımda DANP tedavisi ile doksorubisin tedavisinde aşağı regule protein olarak tespit edilmesi tedavilerin olumlu prognozu ile ilişkili olabilir.

Regukalsin

Etiketsiz LC-MS analizinde DANP ve Doksorubisin tedavisinde ekspresyonda değişiklik gözlemlenmemesine rağmen jel bazlı yaklaşımda yukarı regule protein olarak tespit edilmiştir.

Regukalsin (MW ~ 33.38 kDa), sıçan karaciğerinde keşfedilen bir kalsiyum bağlayıcı proteindir. Regukalsin gen ekspresyonu ve protein seviyeleri, hormonlar, hücre içi sinyal faktörleri ve transkripsiyon faktörleri dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından yükseltilebilir. Ayrıca çeşitli patofizyolojik koşullar, yaşlanma ve çevresel bileşenler, alkol ve ilaç kullanımı, diyabet regukalsin geninin ifadesini baskılayabilir. Her ne kadar epigenetik modifikasyon bilinse de tümör dokularındaki aşağı regülasyon, fonksiyonel çalışmalar yoluyla aydınlatılmayı gerektirir (Nitschkowski et al., 2019) . Ekzojen regukalsinin, insan karaciğer kanseri HepG2 hücrelerinin *in vitro* büyümesini baskıladığını tespit etmişlerdir (Yamaguchi et al., 2018).

Regukalsin aşırı ifade edildiğinde, klonlanmış sıçan hepatoma hücrelerinde apoptozu bastırır ve ayrıca çeşitli faktörleri düzenleyerek hiperlipidemi ve osteoblastogenezi indüklediği belirtilmiştir (Danish ve Riaz, 2023).

Değişen regukalsin gen ekspresyonu çeşitli metabolik bozukluklara neden olabilir; kontrolsüz hücre çoğalmasına, tümör oluşumuna ve metastaza yol açar. Yamaguchi ve arkadaşları (2023) çalışmasında, sitotoksik kanser ilaçlarına dirençli insan yumurtalık kanseri SK-OV-3 hücrelerinin büyümesinde regukalsinin baskılayıcı rolünü açıklamışlardır. Kanser önleyici ve tedavi edici etkinliği için regukalsin kullanılabilir olduğunu ve regukalsin seviyelerinin artırılmasıyla kontrolsüz hücre çoğalmasının, tümör oluşumunun ve metastazın bloke edilebileceğini belirtmişlerdir. Aşırı eksprese edilen regukalsin, EGF sinyalleme de dahil olmak üzere çeşitli sinyal yollarını hedefleyerek hücre proliferasyonunu baskıladığını vurgulamışlardır.

Jel bazlı yaklaşımda regukalsin yanıtı yukarı regule olmuştur. DANP tedavi yanıtında regukalsinin yukarı ekspresyonu tedavi etkinliğini destekleyen veri sunmuştur.

Serotrtransferin

Serotrtransferin her iki proteomik yaklaşımda (jel bazlı proteomik yaklaşım ve etiketsiz nLC-MS yaklaşım) Doksorubisin tedavi grubunda aşağı regule olmuştur.

Serotrtransferin, karaciğerde sentezlenen serum transferrindir. Serotrtransferin vücuda demir sağlamada, demir iyonu homeostazisinin sürdürülmesinde, hemoglobin sentezi için demirin eritropoietik hücrelere taşınmasını kolaylaştırmada veya üç değerlikli demir iyonlarının emilim ve depolama alanlarından demir gerektiren diğer bölgelere iletilmesinde önemli bir oyuncudur. Besin metabolizması, embriyogenez, hücre proliferasyonu, mitoz, kemotaksis ve anjiyogenez dahil olmak üzere çok sayıda hücresel süreçte rol oynar (Wallace, 2016).

Son et al. (2020) yaptığı çalışmada, kanserde demir metabolizmasının ve demir düzenleyici proteinlerin değiştiğini ve ekstrahepatik kolanjiyokarsinom hastalarında safranin kantitatif proteomik analizi sonucu serotrtransferin düzeyinin arttığını tespit etmişlerdir.

Serotrtransferin hem jel bazlı proteomik yaklaşım hem de etiketsiz nLC-MS yaklaşımda DANP tedavi grubunda aşağı regule olmuştur. Doksorubisin tedavi yanıtında serotrtransferinin aşağı ekspresyonu tedavi etkinliğini destekleyen veri sunmuştur.

Peroksiredoksin 1

Doksorubisin tedavisinde aşağı regule olduğu tespit edilmiştir.

Peroksiredoksin-1; Hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin sırasıyla suya ve alkollere indirgenmesini katalize eden tiyole özgü peroksidazdır. Peroksitleri detoksifiye ederek ve hidrojen peroksit aracılı sinyal olaylarının sensörü olarak oksidatif strese karşı hücre korumasında rol oynar. H₂O₂'nin hücre içi konsantrasyonlarını düzenleyerek büyüme faktörlerinin ve tümör nekroz faktörü-alfanın sinyalleme basamaklarına katılabilir, oksidatif stres ve redoks yollarında görev alır. Gong et al. (2015) çalışmasında peroksiredoksin 1'in özofagus skuamöz hücreli karsinomunda mTOR/p70S6K yolunu düzenleyerek

tümör oluşumunda rol oynayabileceğini tespit etmişlerdir. Pankreas kanserinde peroksiredoksin 1 seviyeleri yükselir ve potansiyel olarak bu hastalığın tanısı ve prognozu için bir belirteç görevi görebilir. Cai et al. (2015), pankreas kanserinde peroksiredoksin 1 seviyesinin yükseldiği ve potansiyel olarak bu hastalığın tanısı ve prognozu için bir belirteç görevi görebileceğini belirtmişlerdir.

Doksorubisin tedavisinde aşağı regülasyon tedavinin olumlu sonucunu yansıtabilir ancak DANP tedavisi için veri sunmamaktadır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması ile doksorubisin yüklü arabinogalaktan kaplı manyetik nanopartiküler formülasyonunun (DANP) kanser karaciğer dokusu üzerindeki etkisi kanser kontrol grubu ve serbest Doksorubisin tedavi grubu yanıtları ile proteomik düzeyde karşılaştırılmıştır. Öncelikle karaciğer kanser modeli oluşturularak, karaciğer dokusunda farklı protein ekspresyonunun tayini için kantitatif proteomiklerin iki tamamlayıcı tekniği, jel bazlı LC-MS ve solusyon bazlı etiketsiz LC-MS proteomik yaklaşımlarını birleştiren bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Böylece doksorubisin yüklü arabinogalaktan kaplı manyetik nanopartiküler formülasyonun moleküler düzeydeki etkisi ayrıntılı şekilde değerlendirilmiştir.

Jel bazlı yaklaşımda, $p \leq 0,05$ ve ekspresyonda 2 kat yukarı & aşağı regülasyon gösterenler noktalar üzerinden anlamlı proteinler izole edilmeye çalışılmış ancak kütle spektrometresi ile analiz edilmek üzere sınırlı sayıda protein spotu seçilmiştir.

Etiketsiz nano-LC-ESI-MS yaklaşımda DANP ve Doksorubisin tedavi grupları kanser gruba karşı Proteom Discoverer 2.2 yazılımı (Thermo Scientific, ABD) üzerinden değerlendirilmiş ve herbir proteinin abundansları oranlanmıştır. Yukarı regülasyon kriteri $p \leq 0,05$ ve ekspresyonda ≥ 2 kat ve aşağı regülasyon kriteri $\leq 0,5$ kat doğrultusunda değişiklik gösteren 101 adet proteinde DANP ve Doksorubisin tedavisi sonrasında kanser grubuna göre abundans bakımından önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bu analiz 22' sinin DANP tedavi grubunda yukarı regüle edildiği ve 12' sinin aşağı regüle edildiği tespit edilen 34 önemli ölçüde farklı proteinle sonuçlanmıştır. Yine çalışmamız doksorubisin tedavi grubunda da 30' unun yukarı regüle edildiği ve 19' unun aşağı regüle edildiği tespit edilen 49 önemli ölçüde düzenlenmiş proteinle sonuçlanmıştır.

Özetle, uygulanan ölçüm tekniğine bakılmaksızın toplam 116 yukarı & aşağı eksprese edilmiş protein bulunurken, 15 adet farklı protein yalnızca jel bazlı proteomik çalışmada ve 101 adet differansiyel protein ise etiketsiz LC-MS çalışmada tanımlanmıştır. Bu da bize her iki yaklaşımın da tamamlayıcı olduğunu ve özellikle jel bazlı yaklaşımın bu çalışma için tek başına yetersiz olduğunu açıkça göstermektedir. Özellikle, her iki çalışmada da toplam 1200'e

yakın protein sayısının yalnızca %10'una karşılık gelen 116 adet proteinde regülasyonların olduğu tanımlanmıştır. Bu sonuç, farklı tekniklerin kombinasyon halinde kullanılmasının faydasını açıkça göstermektedir, böylece daha fazla proteom kapsamı elde edilecektir. Bu sonuç ayrıca tedavi grupları ile metabolizmada belirli metabolik süreçlerde farklanmanın olduğunu göstermektedir.

Etiketsiz nLC-MS çalışmasında regule olmayan ancak jel bazlı yaklaşımda protein regülasyonları tespit edilen ve literatürlerle de desteklenen sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin; glutamat dehidrogenaz, ısı şok proteinleri (60,71 kDa), endoplazmik retikulum şaperon BiP, regukalsin, kalretikulin proteinlerinin regülasyonu jel bazlı yaklaşımda tespit edilmiştir.

Jel bazlı yaklaşımda, DANP tedavisi sonrası kalretikulin, glutamat dehidrogenaz, fruktoz-bisfosfataz aldolaz, regukalsin proteinlerinin yukarı ekspresse olduğu 60 kDa ısı şok proteini, 71 kDa ısı şok proteini, yağ asidi bağlama proteini-1 ve endoplazmik retikulum şaperon BiP proteinlerinin ise aşağı ekspresse olduğu Mascot yüksek skor değerlerinde tespit edilmiştir.

Doksorubisin tedavi grubunda ise hemoglobin yukarı ekspresse olurken, albümin, yağ asidi bağlama proteini, serotransferrin, endoplazmik retikulum şaperon BiP, peroksiredoksin-1, glutamat dehidrojenazın aşağı ekspresse olduğunu Mascot yüksek skor değerlerinde tespit edilmiştir.

Çok sayıda bağımsız çalışmada hastalıkla ilişkili protein düzensizlikleri rapor edilmiş olan HCC'un, doksorubisin ya da DANP tedavisi sonrası birçok proteinin regule olması beklenmekte olup, çalışmamızda elde edilen sonuçlar bunu destekler niteliktedir. Özellikle yukarı regüle edilen proteinler arasında ilgi çekici olarak DANP tedavisinde regülasyonu yüksek (abundans oranı) olan yukarı ekspresse proteinlerden sfingozin fosfat liyaz, oksitosin ve Sitokrom c oksidaz alt birimi 6B1'in gerek belirgin artışları gerekse serbest Doksorubisin tedavisine göre olumlu sonuçları nedeniyle HCC'un DANP ile tedavisine ilişkin biyobelirteç niteliği taşımaktadır. Ayrıca, Apolipoprotein C3, Apolipoprotein A4, 14 kDa fosfohistidin fosfataz ve Keratin 78 protein yapılarının DANP tedavisinde gerek belirgin azalışı gerekse serbest Doksorubisine göre olumlu sonuçları nedeniyle yine HCC'un DANP ile tedavisinde biyobelirteç niteliği taşıdığını düşünmekteyiz. Doza bağlı yan etki için Sitokrom P450 2D26 ise yine belirgin artışı ve serbest Doksorubisine göre olumlu sonuçları nedeniyle terapötik potansiyeli gösteren biyobelirteç niteliği

taşıdığını düşünmekteyiz. İlaç direnci geliştirme süreçleri için glutatyon-S-transferaz'ın yine tedavi durumunu gösteren biyobelirteç niteliği taşıdığını düşünmekteyiz. Doksorubisin tedavisinde ise her iki yaklaşımda Serotransferin proteinin aşağı regule bir protein olarak tanımlanmış olması ve ayrıca Doksorubisin tedavi grubunda da kanser gruba karşı ekspresyon seviyesindeki azalış nedeniyle bu proteinin Doksorubisin tedavisi için terapötik biyobelirteç adayı olarak klinik açıdan değerlendirilebileceğini düşündürmektedir.

Tezin ana hedefi olan; Doksorubisin içeren nanopartikül uygulanmış ve serbest Doksorubisin uygulanmış kanser karaciğer dokusu üzerinden yukarı & aşağı regule olan protein profillerinin karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir.

Diferansiyel olarak eksprese edilen proteinlerin sonuçları, biyolojik süreçlerle veya proteinlerin moleküler fonksiyonuyla ilgili çeşitli sinyal yollarını yukarı veya aşağı regüle ettiğini gösterdi. DANP tedavisiyle serbest Doksorubisin tedavisinin HCC üzerindeki etkisinin protein yanıtlarındaki heterojeniteden de anlaşılacağı gibi metabolik süreçlerde de farklandığı tespit edilmiştir.

Farklılık gösteren proteinlerin görev aldığı metabolik yollar ve birbirleri ile etkileşimi STRING Analizi ve ilgili mevcut literatürler ışığında araştırılarak, DANP tedavisinin antikanser aktivitesi kanser kontrol grubu ve serbest Doksorubisin tedavisi grubu ile karşılaştırılmıştır.

Etiketsiz nLC-MS yaklaşımıyla tespit edilen proteinlerden DANP ile tedavi sonrası yukarı ekspresyona uğrayan proteinlerin sorumlu olduğu moleküler fonksiyon demir bağlama süreçleri olup, özellikle nötrofil agregasyonu, demir iyonu homeostazisi, oksidatif fosforilasyon, elektron taşıma zinciri, lipopolisakarit yanıtı, inflamatuvar yanıt, doğuştan gelen bağışıklık yanıtı, savunma yanıtı, bağışıklık sistemi gibi biyolojik süreçlerde görev alan proteinler olduğu tespit edilmiştir. Doksorubisin ile tedavi sonrası yukarı ekspresyona uğrayan proteinlerin ise özellikle sorumlu olduğu moleküler fonksiyonlar demir iyonu transmembran taşıyıcı inhibitör aktivitesi, ferrik/ferröz iyon bağlanması, kalsiyuma bağımlı protein bağlanması, demir iyonu bağlanması, geçiş metali iyonu bağlanması süreçleri olup, nötrofil agregasyonu, demir iyonu transportu, kompleman aktivasyonu, hücre öldürme, humoral bağışıklık tepkisi, hücre yüzeyi tanıma reseptör sinyali biyolojik süreçlerde görev alan proteinler olduğunu belirlenmiştir.

DANP tedavi grubu yanıtı sonrası yukarı regule proteinlerin, Doksorubisin tedavi grubu yukarı regule proteinlerine göre özellikle oksidatif fosforilasyon, elektron taşıma zinciri reaksiyonlarını ve lipopolisakkarit yanıt reaksiyonlarını içeren biyolojik süreçlerde farklanmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Doksorubisin tedavi sonrası protein yanıtında ise DANP tedavi grubu yukarı regule proteinlerine göre kompleman aktivasyonu, humoral bağışıklık tepkisi, hücre yüzeyi tanıma reseptör sinyal yolu gibi metabolik süreçlerde farklanma olduğu tespit edilmiştir.

Etiketsiz nLC-MS yaklaşımıyla tespit edilen proteinlerden DANP ile tedavi sonrası aşağı ekspresyona uğrayan proteinlerin özellikle yağ metabolizması (lipaz inhibitör aktivite, yağ bağlama, kolesterol metabolizması LDL negatif regülasyonu, Lipoprotein lipaz aktivitenin pozitif regülasyonu, yağ bağlama, yağ taşıma, HDL modülasyon, fosfolipid akışı, trigliserid metabolizmasının pozitif regülasyonu, trigliserid katabolik prosesi, şilomikron kalıntı klirensi), metabolit taşıma ve ion kanal aktivitesi gibi moleküler ve hücresel süreçlerde görev alan proteinler olduğu tespit edilmiştir. Doksorubisin ile tedavi sonrası aşağı ekspresyona uğrayan proteinlerin ise özellikle östrojen katabolik prosesi, hücresel glukuronidasyon, steroid metabolik proses, sekonder alkol metabolik prosesi, karaciğer gelişimi ve lipit metabolizması, steroid bağlama, steroid sulfotransferaz aktivite, yağ asidi bağlama, oksidoredüktaz aktivite, demir bağlama, hem bağlama, glukronosiltransferaz aktivite gibi biyolojik süreçlerde görev alan proteinler olduğu belirlenmiştir.

DANP tedavi grubu yanıtı sonrası aşağı regüle proteinlerin, Doksorubisin tedavi grubu aşağı regule proteinlerine göre özellikle lipaz inhibitör aktivite, lipit bağlama gibi lipit metabolik proses reaksiyonlarını ile taşıyıcı aktivite içeren metabolik süreçte farklanmaya neden olduğu görülmektedir. Doksorubisin tedavi yanıtı sonrası aşağı regüle proteinlerin oksidoredüktaz aktivite, glukuronosil transferaz aktivite, steroid bağlama, demir ve hem bağlama reaksiyonlarını içeren süreçlerde farklanma olduğu tespit edilmiştir.

DANP ile tedavi sonrası oksidatif fosforilasyon, elektron taşıma zinciri reaksiyonlarında yukarı regülasyonun olması, Doksorubisin tedavisi sonrası ise oksidoredüktaz aktivitenin azalması nedeniyle DANP formülasyonunun, serbest Doksorubisin'e göre daha HCC için üstün bir tedavi protokolü sunduğunu

düşünmekteyiz. Buna rağmen her iki tedavi yaklaşımında Nötrofil elastaz, lipokalin2, FABP5 regülasyon sonuçları kötü prognoz ile ilişkilendirilebilir.

Böylece tez çalışması kapsamında; söz konusu ilaç taşıyıcı sistem (DANP) etkisi ile tedavi sonrası protein regülasyonundaki değişim ile tümör dokusu üzerinde ilaç etkisinin aydınlatılması ve serbest etken madde ile etki ettiği metabolik süreçler karşılaştırılmıştır. Böylece tedavi yanıtının değerlendirileceği biyobelirteç olma potansiyeli yüksek olan sfingozin fosfat liyaz, oksitosin reseptör, Sitokrom c oksidaz alt birimi 6B1, Apolipoprotein C3, Apolipoprotein A4, 14 kDa fosfohistidin fosfataz ve Keratin 78 proteinlerinin tespiti gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak, kantitatif proteomik veriler hepatoselüler karsinomdaki heterojenliği vurgulamaktadır; yukarı ve aşağı regüle edilen proteinler açıkça tanımlanmıştır. Sonuçlarımızın HCC'un düzenlenmiş moleküler yollarının araştırılması ile yeni terapötik hedeflerin geliştirilmesine katkıda bulunması beklenmektedir.

Bu çalışma, HCC metabolizması hakkındaki bilgimizi genişletmemize ve biyobelirteç olma potansiyeli yüksek olan proteinleri önermemize olanak sağlamıştır. Böylece tez çalışması kapsamında; söz konusu ilaç taşıyıcı sistemin HCC protein regülasyonundaki değişim ile tümör dokusu üzerinde etkisi üzerine literatüre katkı sağlanmıştır.

Tanımlanan proteinler ile HCC'daki tedavi farklanmasında rol oynayabilecek biyokimyasal mekanizmalara yönelik bulgular gelecekteki çalışmaları ve literatürü daha da güçlendirecektir.

Tanımladığımız biyobelirteç niteliğindeki proteinlerin antikorları temin edilerek, protein verifikasyon ve sonrasında validasyon çalışmaları yapılmalıdır. Proteom bilgisini genom ve transkriptom verileriyle entegre edilerek, Western blot ile ilgili proteinin validasyonu sonucu elde edildiği takdirde kesin belirteç adı literatüre eklenebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdelsameea, E.; Nada, A.; Omar, N.; Saleh, S.M.; Naguib, M.; El-Ezawy, H.E.M.; Bakry, L.; Elsabaawy, M.,** 2020, Urine Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin a Possible Diagnostic Marker for Egyptian Hepatocellular Carcinoma Patients, *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP*, 21, 2259–2264.
- Abou-Alfa, G. K., Meyer, T., Cheng, A. L., El-Khoueiry, A. B., Rimassa, L., Ryoo, B. Y., Cicin, I., Merle, P., Chen, Y., Park, J. W., Blanc, J. F., Bolondi, L., Klumpen, H. J., Chan, S. L., Zagonel, V., Pressiani, T., Ryu, M. H., Venook, A. P., Hessel, C., Borgman-Hagey, A. E., ... Kelley, R. K.,** 2018, Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma, *The New England journal of medicine*, 379(1), 54–63. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1717002>.
- Ada, S., Ertürk, C., Uçar, A., Akyüz, S., et al.,** 2021, Kanser Hücre Metabolizması, *Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı Dergisi*, 4(3), 66-75. <https://doi.org/10.54537/tusebdergisi.981144>.
- Adamus, A., Engel, N. and Seitz, G.,** 2020, GPL1321 mutation: one main trigger for invasiveness of pediatric alveolar rhabdomyosarcoma, *Cancer Gene Ther* 27, 571–584 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41417-019-0132-8>.
- Addona TA, Shi X, Keshishian H, Mani DR, Burgess M, Gillette MA, Clauser KR, Shen D, Lewis GD, Farrell LA, Fifer MA, Sabatine MS, Gerszten RE, Carr SA .,** 2011, A pipeline that integrates the discovery and verification of plasma protein biomarkers reveals candidate markers for cardiovascular disease, *Nat Biotechnol* 29:635–643.
- Ahmed, H., Ajat, M., Mahmood, R. I., Mansor, R., Razak, I., Al-Obaidi, J. R., Razali, N., Jaji, A. Z., Danmaigoro, A., & Bakar, M.,** 2021, LC-MS/MS Proteomic Study of MCF-7 Cell Treated with Dox and Dox-Loaded Calcium Carbonate Nanoparticles Revealed Changes in Proteins Related to Glycolysis, Actin Signalling, and Energy Metabolism, *Biology*, 10(9), 909. <https://doi.org/10.3390/biology10090909>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ai, X., Xiang, L., Huang, Z., Zhou, S., Zhang, S., Zhang, T., & Jiang, T.,** 2018. Overexpression of PIK3R1 promotes hepatocellular carcinoma progression, *Biological research*, 51(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0202-7>.
- Al-Amrani, S., Al-Jabri, Z., Al-Zaabi, A., Alshekaili, J., & Al-Khabori, M.,** 2021, Proteomics: Concepts and applications in human medicine, *World journal of biological chemistry*, 12(5), 57–69. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v12.i5.57>.
- Alibolandi, M., Ramezani, M., Abnous, K., Sadeghi, F., Atyabi, F., Asouri, M., Ahmadi, A. A., & Hadizadeh, F.,** 2015, In vitro and in vivo evaluation of therapy targeting epithelial-cell adhesion-molecule aptamers for non-small cell lung cancer. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 209, 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.04.026>.
- Allende, M. L., Bektas, M., Lee, B. G., Bonifacino, E., Kang, J., Tuymetova, G., Chen, W., Saba, J. D., & Proia, R. L.,** 2011, Sphingosine-1-phosphate lyase deficiency produces a pro-inflammatory response while impairing neutrophil trafficking, *The Journal of biological chemistry*, 286(9), 7348–7358. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.171819>.
- Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C. et al.,** 2018, Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases, *Oncogenesis* 7, 8,. <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0025-3>.
- Almeida AJ, Souto E.** 2007, Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins, *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(6):478–90.
- Amiri, M., Yousefnia, S., Seyed Forootan, F., Peymani, M., Ghaedi, K., & Nasr Esfahani, M. H.,** 2018, Diverse roles of fatty acid binding proteins (FABPs) in development and pathogenesis of cancers, *Gene*, 676, 171–183. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.07.035>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Angel NZ, Walsh N, Forwood MR, Ostrowski MC, Cassady AI, Hume DA., 2000, Transgenic mice overexpressing tartrate-resistant acid phosphatase exhibit an increased rate of bone turnover, *Journal of Bone and Mineral Research*. 15 (1): 103–110. doi:10.1359/jbmr.2000.15.1.103. PMID 10646119. S2CID 35584934.

Ayako Tsujimoto, Hiroki Uehara, Haruna Yoshida, Misaki Nishio, Kousuke Furuta, Takashi Inui, Akikazu Matsumoto, Shigeaki Morita, Masaru Tanaka, Chie Kojima, 2021, Different hydration states and passive tumor targeting ability of polyethylene glycol-modified dendrimers with high and low PEG density, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 126, 2021, 112159, ISSN 0928-4931, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112159>.

Babak Oskouian, Prathap Sooriyakumaran, Alexander D. Borowsky, Angelina Crans, Lisa Dillard-Telm, Yuen Yee Tam, Padmavathi Bandhuvula, and Julie D. Saba, Sphingosine-1-Phosphate Lyase Potentiates Apoptosis via P53- and P38-Dependent Pathways and Is Down-Regulated in Colon Cancer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, no. 46 (2006): 17384–89. <http://www.jstor.org/stable/30052441>.

Bailly C .and Waring M.J., 2019, Pharmacological effectors of GRP78 chaperone in cancers”, *Biochemical Pharmacology*, 2019, 163, pp.269 - 278. [ff10.1016/j.bcp.2019.02.038](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.02.038)ff. fffhal-03484711.

Basak, D.; Arrighi, S.; Darwiche, Y.; Deb, S., 2022, Comparison of Anticancer Drug Toxicities: Paradigm Shift in Adverse Effect Profile. *Life*, 2022, 12, 48. <https://doi.org/10.3390/life12010048>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bektas, M., Allende, M. L., Lee, B. G., Chen, W., Amar, M. J., Remaley, A. T., Saba, J. D., & Proia, R. L.,** 2010, Sphingosine 1-phosphate lyase deficiency disrupts lipid homeostasis in liver, *The Journal of biological chemistry*, 285(14), 10880–10889. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.081489>.
- Bender, M. J., McPherson, A. C., Phelps, C. M., Pandey, S. P., Laughlin, C. R., Shapira, J. H., Medina Sanchez, L., Rana, M., Richie, T. G., Mims, T. S., Gocher-Demske, A. M., Cervantes-Barragan, L., Mullett, S. J., Gelhaus, S. L., Bruno, T. C., Cannon, N., McCulloch, J. A., Vignali, D. A. A., Hinterleitner, R., Joglekar, A. V., ... Meisel, M.,** 2023, Dietary tryptophan metabolite released by intratumoral *Lactobacillus reuteri* facilitates immune checkpoint inhibitor treatment, *Cell*, 186(9), 1846–1862.e26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.03.011>.
- Bernsmeier C, van der Merwe S, Périanin A.,** 2020, The innate immune cells in cirrhosis, *J Hepatol* (2020) 73(1):186–201. doi: 10.1016/j.jhep.2020.03.027.
- BIORAD.,** 2024, Second-Dimension Separation, <https://www.bio-rad.com/en-tr/applications-technologies/second-dimension-separation?ID=LUSQMI97Q>, Son erişim tarihi:05.05.2024).
- BIORAD.,** 2024, Bulletin 2651: 2-D Electrophoresis Workflow How-To Guide, rev F”, https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2651.pdf, Son erişim tarihi: 18.01.2024).
- BIORAD.,** 2011, Bulletin 6240: 2-D Gel Electrophoresis:First-Dimension Separation Protocol, https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6240.pdf, Son erişim tarihi:05.05.2024).
- BIORAD.,** 2000, ReadyPrep™ 2-D Starter Kit Instruction Manual, <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110009A.pdf>, Son Erişim Tarihi: 18.01.2024).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bouchet, S., & Bauvois, B.**, 2014, Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), Pro-Matrix Metalloproteinase-9 (pro-MMP-9) and Their Complex Pro-MMP-9/NGAL in Leukaemias, *Cancers*, 6(2), 796–812. <https://doi.org/10.3390/cancers6020796>.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A.**, 2018, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- Brizard JP, Ramos J, Robert A, Lafitte D, Bigi N, Sarda P, Laoudj-Chenivesse D, et al.**, 2009, Identification of proteomic changes during human liver development by 2D-DIGE and mass spectrometry, *J Hepatol*. 2009;51:114
- Bruix, J., Qin, S., Merle, P., Granito, A., Huang, Y. H., Bodoky, G., Pracht, M., Yokosuka, O., Rosmorduc, O., Breder, V., Gerolami, R., Masi, G., Ross, P. J., Song, T., Bronowicki, J. P., Ollivier-Hourmand, I., Kudo, M., Cheng, A. L., Llovet, J. M., Finn, R. S., ... RESORCE Investigators**, 2017, Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial, *Lancet (London, England)*, 389(10064), 56–66. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32453-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32453-9).
- Bruns H, Büttner M, Fabri M, Mougiakakos D, Bittenbring JT, Hoffmann MH, et al.**, 2015, Vitamin D-dependent induction of cathelicidin in human macrophages results in cytotoxicity against high-grade B cell lymphoma, *Sci Transl Med* (2015) 7(282):282ra47. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa3230.
- Bulteau, A. L., & Bayot, A.**, 2011, Mitochondrial proteases and cancer, *Biochimica et biophysica acta*, 1807(6), 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.12.011>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cai CY, Zhai LL, Wu Y, Tang ZG.,** 2015, Expression and clinical value of peroxiredoxin-1 in patients with pancreatic cancer, *European Journal of Surgical Oncology*. 41 (2): 228–35. doi:10.1016/j.ejso.2014.11.037. PMID 25434328.
- Calderwood, S. K., & Gong, J.** 2016, Heat Shock Proteins Promote Cancer: It's a Protection Racket, *Trends in biochemical sciences*, 41(4), 311–323. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.01.003>
- Candido, S., Abrams, S. L., Steelman, L. S., Lertpiriyapong, K., Fitzgerald, T. L., Martelli, A. M., Cocco, L., Montalto, G., Cervello, M., Polesel, J., Libra, M., & McCubrey, J. A.,** 2016, Roles of NGAL and MMP-9 in the tumor microenvironment and sensitivity to targeted therapy, *Biochimica et biophysica acta*, 1863(3), 438–448. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.08.010>
- Carracedo, A., Cantley, L. C., & Pandolfi, P. P.,** 2013., Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight, *Nature reviews. Cancer*, 13(4), 227–232. <https://doi.org/10.1038/nrc3483>
- Chandra, D., Liu, J. W., & Tang, D. G.,** 2002, Early mitochondrial activation and cytochrome c up-regulation during apoptosis, *The Journal of biological chemistry*, 277(52), 50842–50854. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207622200>
- Chaudhry, G. E., Akim, A. M., Sung, Y. Y., & Muhammad, T. S. T.,** 2022, Cancer and Apoptosis. *Methods in molecular biology*, (Clifton, N.J.), 2543, 191–210. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2553-8_16
- Chen Y-L, Wang T-H, Hsu H-C, Yuan R-H, Jeng Y-M.,** 2013, Overexpression of CTHRC1 in Hepatocellular Carcinoma Promotes Tumor Invasion and Predicts Poor Prognosis, *PLoS ONE* 8(7): e70324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070324>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chenglong Li, T Joseph Kappock, JoAnne Stubbe, Todd M Weaver, Steven E Ealick**, 1999, X-ray crystal structure of aminoimidazole ribonucleotide synthetase (PurM) from the Escherichia coli purine biosynthetic pathway at 2.5 Å resolution, *Structure*, Volume 7, Issue 9, 1999, Pages 1155-1166, ISSN 0969-2126, [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80182-8](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80182-8).
- Cho W. C.** 2007, Proteomics technologies and challenges. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 5(2), 77–85. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(07\)60018-7](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(07)60018-7)
- Cho, Hyo Jung & Baek, Geum & Yoon, Moon & Ahn, Hye & Son, Ju & Kim, Soon & Cheong, Jaeyoun & Eun, Jung Woo.**, 2021, Overexpressed Proteins in HCC Cell-Derived Exosomes, CCT8, and Cofilin-1 Are Potential Biomarkers for Patients with HCC. *Diagnostics*, 11. 1221. [10.3390/diagnostics11071221](https://doi.org/10.3390/diagnostics11071221).
- Choi, I., Son, H., & Baek, J. H.**, 2021, Tricarboxylic Acid (TCA) Cycle Intermediates: Regulators of Immune Responses, *Life* (Basel, Switzerland), 11(1), 69. <https://doi.org/10.3390/life11010069>
- Chong, Yong Chun; Toh, Tan Boon; Chan, Zhiling; Lin, Quy Xiao Xuan; Thng, Dexter Kai Hao; Hooi, Lissa; Ding, Zhaobing; Shuen, Timothy; Toh, Han Chong; Dan, Yock Young; Bonney, Glenn Kunnath; Zhou, Lei; Chow, Pierce; Wang, Yulan; Benoukraf, Touati; Chow, Edward Kai-Hua; Han, Weiping**, 2020, Targeted Inhibition of Purine Metabolism Is Effective in Suppressing Hepatocellular Carcinoma Progression, *Hepatology Communications*, 4(9), 1362–1381. doi:10.1002/hep4.1559
- Corn, K. C., Windham, M. A., & Rafat, M.**, 2020, Lipids in the tumor microenvironment: From cancer progression to treatment, *Progress in lipid research*, 80, 101055. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101055>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Craig Amanda J, von Felden J, Teresa G-L, et al.,** 2020, Tumour evolution in hepatocellular carcinoma, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*2020;17:139–152).
- Crutchfield, C. A., Thomas, S. N., Sokoll, L. J., & Chan, D. W.,** 2016, Advances in mass spectrometry-based clinical biomarker discovery, *Clinical proteomics*, 13, 1. <https://doi.org/10.1186/s12014-015-9102-9>.
- Cui M, Huang J, Zhang S, Liu Q, Liao Q and Qiu X.,** 2021, Immunoglobulin Expression in Cancer Cells and Its Critical Roles in Tumorigenesis, *Front. Immunol.* 12:613530. doi: 10.3389/fimmu.2021.613530.
- Cui, Miao & Cheng, Chao & Zhang, Lanjing,** 2022, High-throughput proteomics: a methodological mini-review, *Laboratory Investigation.* 102. 10.1038/s41374-022-00830-7.
- D'Acquisto, F., Paschalidis, N., Sampaio, A. L., Merghani, A., Flower, R. J., & Perretti, M.,** 2007, Impaired T cell activation and increased Th2 lineage commitment in Annexin-1-deficient T cells, *European journal of immunology*, 37(11), 3131–3142. <https://doi.org/10.1002/eji.200636792>.
- Darie-Ion, L., Whitham, D., Jayathirtha, M., Rai, Y., Neagu, A. N., Darie, C. C., & Petre, B. A.,** 2022, Applications of MALDI-MS/MS-Based Proteomics in Biomedical Research, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(19), 6196. <https://doi.org/10.3390/molecules27196196>.
- Darie-Ion, L., Whitham, D., Jayathirtha, M., Rai, Y., Neagu, A. N., Darie, C. C., & Petre, B. A.,** 2022, Applications of MALDI-MS/MS-Based Proteomics in Biomedical Research. *Molecules*, (Basel, Switzerland), 27(19), 6196. <https://doi.org/10.3390/molecules27196196>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Daveau, M., Scotte, M., François, A., Coulouarn, C., Ros, G., Tallet, Y., Hiron, M., Hellot, M. F., & Salier, J. P.,** 2003, “Hepatocyte growth factor, transforming growth factor alpha, and their receptors as combined markers of prognosis in hepatocellular carcinoma”, *Molecular carcinogenesis*, 36(3), 130–141. <https://doi.org/10.1002/mc.10103>
- De Francesco, E. M., Sotgia, F., & Lisanti, M. P.,** 2018. Cancer stem cells (CSCs): metabolic strategies for their identification an, eradication, *The Biochemical journal*, 475(9), 1611–1634. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170164>
- De Leon J, Armstrong S, Cozza K.,** 2006, Clinical guidelines for psychiatrists for the use of pharmacogenetic testing for CYP4502D6 and CYP4502C19, *Psychosomatics* 2006;47:75-85
- De Marchi, T. et al.,** 2016, Targeted MS Assay Predicting Tamoxifen Resistance in Estrogen-Receptor-Positive Breast Cancer Tissues and Sera, *J. Proteome Res.* 15, 1230–1242 (2016).)
- Delgado, E.R., Erickson, H., Tao, J., Leek, M., Monga, S. and Duncan, A.,** 2020, Deletion and Overexpression of the Scaffolding Protein IQGAP1 Promotes Hepatocellular Carcinoma, *The FASEB Journal*, 34: 1-1. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.02971>
- Dertli, R., Biyik, M., Yolacan, R., Karakarcayildiz, A., Keskin, M., Kayar, Y., & Asil, M.,** 2020, May Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) Level Predict Mortality in Patients with Hepatocellular Carcinoma (HCC)?, *Journal of gastrointestinal cancer*, 51(3), 932–938. <https://doi.org/10.1007/s12029-019-00323-9>
- Ding, Z., Wang, N., Ji, N., & Chen, Z. S.,** 2022, Proteomics technologies for cancer liquid biopsies, *Molecular Cancer*, 21(1), 53. <https://doi.org/10.1186/S12943-022-01526-8>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dong, M., McGann, P. T., Mizuno, T., Ware, R. E., & Vinks, A. A.,** 2016, Development of a pharmacokinetic-guided dose individualization strategy for hydroxyurea treatment in children with sickle cell anaemia, *British journal of clinical pharmacology*, 81(4), 742–752. <https://doi.org/10.1111/bcp.12851>
- Dubbelboer, I. R., Pavlovic, N., Heindryckx, F., Sjögren, E., & Lennernäs, H.,** 2019, Liver Cancer Cell Lines Treated with Doxorubicin under Normoxia and Hypoxia: Cell Viability and Oncologic Protein Profile, *Cancers*, 11(7), 1024. <https://doi.org/10.3390/cancers11071024>
- Dutta B., Barick K.C and Hassan P.A.,** 2021, Recent advances in active targeting of nanomaterials for anticancer drug delivery, *Advances in Colloid and Interface Science*, Volume 296, 2021, 102509, ISSN 0001-8686, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102509>.
- Effendi, K., Yamazaki, K., Fukuma, M., & Sakamoto, M.,** 2014, Overexpression of Leucine-Rich Repeat-Containing G Protein-Coupled Receptor 5 (LGR5) Represents a Typical Wnt/ β -Catenin Pathway-Activated Hepatocellular Carcinoma, *Liver cancer*, 3(3-4), 451–457. <https://doi.org/10.1159/000343873>
- Elmas, A., Lujambio, A., & Huang, K. L.,** 2022, Proteomic Analyses Identify Therapeutic Targets in Hepatocellular Carcinoma, *Frontiers in oncology*, 12, 814120. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.814120>
- Farzaneh, Z., Vosough, M., Agarwal, T., & Farzaneh, M.,** 2021, Critical signaling pathways governing hepatocellular carcinoma behavior; small molecule-based approaches, *Cancer cell international*, 21(1), 208. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01924-w>
- Feng, R., Ye, J., Zhou, C., Qi, L., Fu, Z., Yan, B., Liang, Z., Li, R., & Zhai, W.,** 2015, Calreticulin down-regulation inhibits the cell growth, invasion and cell cycle progression of human hepatocellular carcinoma cells, *Diagnostic pathology*, 10, 149. <https://doi.org/10.1186/s13000-015-0382-1>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Feng, J., Li, J., Wu, L., Yu, Q., Ji, J., Wu, J., Dai, W., & Guo, C.** 2020, Emerging roles and the regulation of aerobic glycolysis in hepatocellular carcinoma, *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR, 39(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01629-4>
- Feng, Y., Chen, M. H., Moskowitz, I. P., Mendonza, A. M., Vidali, L., Nakamura, F., Kwiatkowski, D. J., & Walsh, C. A.,** 2006, Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(52), 19836–19841. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609628104>
- Fornelli, Luca & Srzentić, Kristina & Huguet, Romain & Mullen, Christopher & Sharma, Seema & Zabrouskov, Vlad & Fellers, Ryan & Durbin, Kenneth & Compton, Philip & Kelleher, Neil.,** 2018, Accurate Sequence Analysis of a Monoclonal Antibody by Top-Down and Middle-Down Orbitrap Mass Spectrometry Applying Multiple Ion Activation Techniques, *Analytical Chemistry*. 90. 10.1021/acs.analchem.8b00984.
- Gabizon, A., Shmeeda, H. & Barenholz, Y.,** 2003, Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin, *Clin. Pharmacokinet.* 42, 419–436, 2003
- Gavas, S., Quazi, S. & Karpiński, T.M.** 2021, Nanoparticles for Cancer Therapy: Current Progress and Challenges, *Nanoscale Res Lett* 16, 173 (2021). <https://doi.org/10.1186/s11671-021-03628-6>
- Gewirtz D. A.,** 1999, A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin, *Biochemical pharmacology*, 57(7), 727–741. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(98\)00307-4](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00307-4)
- Gizak, A., Wiśniewski, J., Heron, P. et al.,** 2019, Targeting a moonlighting function of aldolase induces apoptosis in cancer cells, *Cell Death Dis* 10, 712 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1968-4>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gong F, Hou G, Liu H, Zhang M.**, 2015, Peroxiredoxin 1 promotes tumorigenesis through regulating the activity of mTOR/p70S6K pathway in esophageal squamous cell carcinoma, *Medical Oncology*. 32 (2): 455. doi:10.1007/s12032-014-0455-0. PMID 25579166. S2CID 5123492
- Goutsouliak, K., Veeraraghavan, J., Sethunath, V., De Angelis, C., Osborne, C. K., Rimawi, M. F., & Schiff, R.**, 2020, Towards personalized treatment for early stage HER2-positive breast cancer, *Nature reviews. Clinical oncology*, 17(4), 233–250. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0299-9>
- Granchi, C., Fancelli, D., & Minutolo, F.**, 2014, An update on therapeutic opportunities offered by cancer glycolytic metabolism, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 24(21), 4915–4925. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.09.041>
- Gregorich, Z. R., Chang, Y. H., & Ge, Y.**, 2014, Proteomics in heart failure: top-down or bottom-up?, *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 466(6), 1199–1209. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1471-9>
- Guan S, Marshall AG, Wahl MC**, 1994, MS/MS with high detection efficiency and mass resolving power for product ions in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Anal Chem.* (1994) 66:1363–7. 10.1021/ac00080a024
- Guo, Y., Xiao, Z., Yang, L., Gao, Y., Zhu, Q., Hu, L., Huang, D., & Xu, Q.**, 2020, Hypoxia-inducible factors in hepatocellular carcinoma (Review), *Oncology reports*, 43(1), 3–15. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7397>
- Guri, Y., Colombi, M., Dazert, E., Hindupur, S. K., Roszik, J., Moes, S., Jenoe, P., Heim, M. H., Riezman, I., Riezman, H., & Hall, M. N.**, 2017, mTORC2 Promotes Tumorigenesis via Lipid Synthesis, *Cancer cell*, 32(6), 807–823.e12. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.11.011>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Han, S. X., Wang, L. J., Zhao, J., Zhang, Y., Li, M., Zhou, X., Wang, J., & Zhu, Q.,** 2012, 14-kDa Phosphohistidine phosphatase plays an important role in hepatocellular carcinoma cell proliferation, *Oncology letters*, 4(4), 658–664. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.802>
- Hannon, R., Croxtall, J. D., Getting, S. J., Roviezzo, F., Yona, S., Paul-Clark, M. J., Gavins, F. N., Perretti, M., Morris, J. F., Buckingham, J. C., & Flower, R. J.,** 2003, Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1-/- Mouse, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(2), 253–255. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0239fje>
- Harricharran, T., & Ogunwobi, O. O.,** 2019, Oxytocin receptor genetic alterations in hepatocellular carcinoma, *SN comprehensive clinical medicine*, 1(7), 523–526. <https://doi.org/10.1007/s42399-019-00085-2>
- Henry, N. L., & Hayes, D. F.,** 2012, Cancer biomarkers, *Molecular oncology*, 6(2), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.01.010>
- Hernandez P, Muller M, Appel RD.,** 2006, Automated protein identification by tandem mass spectrometry: issues and strategies, *Mass Spectrom Rev.* (2006) 25:235–54. 10.1
- Hernandez-Valladares, Maria, Øystein Bruserud, and Frode Selheim,** 2020, The Implementation of Mass Spectrometry-Based Proteomics Workflows in Clinical Routines of Acute Myeloid Leukemia: Applicability and Perspectives, *International Journal of Molecular Sciences* 21, no. 18: 6830. <https://doi.org/10.3390/ijms21186830>
- Hiotis, S.P., Rahbari, N.N., Villanueva, G.A. et al.,** 2012, Hepatitis B vs. hepatitis C infection on viral hepatitis-associated hepatocellular carcinoma, *BMC Gastroenterol* 12, 64 (2012). <https://doi.org/10.1186/1471-230X-12-64>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hopperton, K. E., Duncan, R. E., Bazinet, R. P., & Archer, M. C.,** 2014, Fatty acid synthase plays a role in cancer metabolism beyond providing fatty acids for phospholipid synthesis or sustaining elevations in glycolytic activity, *Experimental cell research*, 320(2), 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.10.016>
- Hu, C., Jiang, W., Lv, M., Fan, S., Lu, Y., Wu, Q., & Pi, J.,** 2022, Potentiality of Exosomal Proteins as Novel Cancer Biomarkers for Liquid Biopsy, *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FIM MU.2022.792046>.
- Hu, W., Zhou, C., Jing, Q. et al.,** FTH promotes the proliferation and renders the HCC cells specifically resist to ferroptosis by maintaining iron homeostasis, *Cancer Cell Int* 21, 709 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02420-x>
- Huynh H.,** 2004, Overexpression of tumour suppressor retinoblastoma 2 protein (pRb2/p130) in hepatocellular carcinoma, *Carcinogenesis*, 25(8), 1485–1494. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh154>
- Human Protein ATLAS,** <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000178921-PFAS/patholog>, Son erişim tarihi: 05 Mayıs 2024.
- Hüttemann, M.; Helling, S.; Sanderson, T.H.; Sinkler, C.; Samavati, L.; Mahapatra, G.; Varughese, A.; Lu, G.; Liu, J.; Ramzan, R.; et al.,** 2012, Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: Cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation, *Biochim. Biophys. Acta* 2012, 1817, 598–609.
- Iain H. McKillop, Cara A. Girardi, Kyle J.,** 2019, Thompson, Role of fatty acid binding proteins (FABPs) in cancer development and progression, *Cellular Signalling*, Volume 62, 2019, 109336, ISSN 0898-6568, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.06.001>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- I-Neng Lee, Chien-Hung Chen, Jin-Chuan Sheu, Hsuan-Shu Lee, Guan-Tarn Huang, Chen-Yin Yu, Fung-Jou Lu, and Lu-Ping Chow, 2005,** Identification of Human Hepatocellular Carcinoma-Related Biomarkers by Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry, *Journal of Proteome Research* 2005 4 (6), 2062-2069 DOI: 10.1021/pr0502018
- Issaq, H. J., Veenstra, T. D., Conrads, T. P., & Felschow, D. , 2002,** The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification, *Biochemical and biophysical research communications*, 292(3), 587–592. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6678>
- Jobson RW, Nielsen R, Laakkonen L, Wikström M, Albert VA., 2004,** Adaptive evolution of cytochrome c oxidase: Infrastructure for a carnivorous plant radiation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Dec;101(52):18064-18068. DOI: 10.1073/pnas.0408092101. PMID: 15596720; PMCID: PMC539784.
- Jordi Bruix, Maria Reig, Morris Sherman, 2016,** Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma, *Gastroenterology*, Volume 150, Issue 4, 2016, Pages 835-853, ISSN 0016-5085, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.12.041>.
- Ju, H. Q., Lin, J. F., Tian, T., Xie, D., & Xu, R. H., 2020,** NADPH homeostasis in cancer: functions, mechanisms and therapeutic implications, *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 231. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00326-0>
- Kadenbachand, B.; Hüttemann, M., 2015,** The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase”, *Mitochondrion* 2015, 24, 64–76
- Käll, L., Storey, J. D., MacCoss, M. J., & Noble, W. S., 2008,** Posterior error probabilities and false discovery rates: two sides of the same coin, *Journal of proteome research*, 7(1), 40–44. <https://doi.org/10.1021/pr700739d>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kanehisa Laboratories, KEGG PATHWAY: mmu05225 hepatocellular carcinoma, <https://www.kegg.jp/entry/pathway+mmu05225>, erişim tarihi: 05.05.2024

Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Kawashima, M., & Ishiguro-Watanabe, M., 2023, “KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes”, Nucleic acids research, 51(D1), D587–D592. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac963>

Kang, J. M., Park, S., Kim, S. J., Kim, H., Lee, B., Kim, J., Park, J., Kim, S. T., Yang, H. K., Kim, W. H., & Kim, S. J., 2015, KIAA1324 Suppresses Gastric Cancer Progression by Inhibiting the Oncoprotein GRP78, Cancer research, 75(15), 3087–3097. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3751>

Karantza V., 2011, Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers, Oncogene, 30(2), 127–138. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.456>

Karpievitch, Y. V., Polpitiya, A. D., Anderson, G. A., Smith, R. D., & Dabney, A. R., 2010, Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Based Proteomics: Biological and Technological Aspect, The annals of applied statistics, 4(4), 1797–1823. <https://doi.org/10.1214/10-AOAS341>

Katalinic, Darko & Bildat, Stephan & Kattner, Elke & Soerensen, Lilly & Aleric, Ivan & Vcev, Aleksandar, 2020, The expression of oxytocin receptor (OXTR) in metastatic pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs), Endocrine Abstracts. 10.1530/endoabs.70.AEP731. (11):2245–57.

KEGG, 2024, Hepatoselüler karsinom (HCC) sinyal yolağı, <https://www.kegg.jp/entry/pathway+mmu05225>, Son erişim tarihi: 05.05.2024

Kepp, O., Bezu, L., & Kroemer, G., 2022, The endoplasmic reticulum chaperone BiP: a target for immunogenic cell death inducers?, Oncoimmunology, 11(1), 2092328. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2022.2092328>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Khalili, D., Kunc, M., Herbrich, S., Müller, A. M., & Theopold, U., 2023,** Chitinase-like proteins promoting tumorigenesis through disruption of cell polarity via enlarged endosomal vesicles, *Frontiers in oncology*, 13, 1170122. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1170122>
- Kim Hugh and McCulloch Christopher A., 2011,** Filamin A mediates interactions between cytoskeletal proteins that control cell adhesion, *FEBS Letters*, 585, doi: 10.1016/j.febslet.2010.11.033
- Komposch, K., & Sibilio, M., 2015,** EGFR Signaling in Liver Diseases, *International journal of molecular sciences*, 17(1), 30. <https://doi.org/10.3390/ijms17010030>.
- Kozlov, G., Pocanschi, C. L., Rosenauer, A., Bastos-Aristizabal, S., Gorelik, A., Williams, D. B., & Gehring, K., 2010,** Structural basis of carbohydrate recognition by calreticulin, *The Journal of biological chemistry*, 285(49), 38612–38620. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.168294>
- Krizanac, M., Mass Sanchez, P. B., Weiskirchen, R., & Asimakopoulos, A., 2021,** A Scoping Review on Lipocalin-2 and Its Role in Non-Alcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma, *International journal of molecular sciences*, 22(6), 2865. <https://doi.org/10.3390/ijms22062865>
- Kudo M, Trevisani F, Abou-Alfa G, K, Rimassa L., 2017,** Hepatocellular Carcinoma: Therapeutic Guidelines and Medical Treatment, *Liver Cancer* 2017;6:16-26. doi: 10.1159/000449343
- Kuhara, K., Kitagawa, T., Baron, B., Tokuda, K., Sakamoto, K., Nagano, H., Nakamura, K., Kobayashi, M., Nagayasu, H., & Kuramitsu, Y., 2021,** Proteomic Analysis of Hepatocellular Carcinoma Tissues With Encapsulation Shows Up-regulation of Leucine Aminopeptidase 3 and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase 2, *Cancer genomics & proteomics*, 18(3), 307–316. <https://doi.org/10.21873/cgp.20261>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kullenberg, F., Degerstedt, O., Calitz, C., Pavlović, N., Balgoma, D., Gråsjö, J., Sjögren, E., Hedeland, M., Heindryckx, F., & Lennernäs, H., 2021,** In Vitro Cell Toxicity and Intracellular Uptake of Doxorubicin Exposed as a Solution or Liposomes: Implications for Treatment of Hepatocellular Carcinoma, *Cells*, 10(7), 1717. <https://doi.org/10.3390/cells10071717>
- Kuntz, E. M., Baquero, P., Michie, A. M., Dunn, K., Tardito, S., Holyoake, T. L., Helgason, G. V., & Gottlieb, E., 2017,** Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-resistant chronic myeloid leukemia stem cells, *Nature medicine*, 23(10), 1234–1240. <https://doi.org/10.1038/nm.4399>
- Kuo, C. Y., & Ann, D. K., 2018,** When fats commit crimes: fatty acid metabolism, cancer stemness and therapeutic resistance, *Cancer communications* (London, England), 38(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s40880-018-0317-9>
- Kwon, Y. W., Jo, H. S., Bae, S., Seo, Y., Song, P., Song, M., & Yoon, J. H., 2021,** Application of Proteomics in Cancer: Recent Trends and Approaches for Biomarkers Discovery, *Frontiers in medicine*, 8, 747333. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.747333>
- Ladju, R. B., Ulhaq, Z. S., & Soraya, G. V., 2022,** Nanotheranostics: A powerful next-generation solution to tackle hepatocellular carcinoma, *World journal of gastroenterology*, 28(2), 176–187. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i2.176>
- Landegren, U., ve Hammond, M., 2021,** Cancer diagnostics based on plasma protein biomarkers: hard times but great expectations, *Molecular Oncology*, 15(6), 1715–1726.
- Langley SR, Dwyer J, Drozdov I, Yin X, Mayr M., 2013,** Proteomics: from single molecules to biological pathways, *Cardiovasc Res* 97:612–622.
- Langley, S. R., & Mayr, M., 2015,** Comparative analysis of statistical methods used for detecting differential expression in label-free mass spectrometry proteomics, *Journal of proteomics*, 129, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.07.012>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lee HJ, Lee EY, Kwon MS, Paik YK.,** 2006, Biomarker discovery from the plasma proteome using multidimensional fractionation proteomics, *Curr Opin Chem Biol.* 2006;10:42–49.
- Leihou Shao, Qun Li, Caiyan Zhao, Jianqing Lu, Xianlei Li, Long Chen, Xiongwei Deng, Guanglu Ge, Yan Wu.,** 2018, Auto-fluorescent polymer nanotheranostics for self-monitoring of cancer therapy via triple-collaborative strategy, *Biomaterials*, Volume 194, 2019, Pages 105-116, ISSN 0142-9612, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.12.021>.
- Leng AM, Liu T, Yang J, et al.,** 2012, The apoptotic effect and associated signalling of HSP90 inhibitor 17-DMAG in hepatocellular carcinoma cells, *Cell Biol Int* 2012;36:893–99
- Li, Y., Park, JS., Deng, JH. et al.,** 2006, Cytochrome c oxidase subunit IV is essential for assembly and respiratory function of the enzyme complex, *J Bioenerg Biomembr* 38, 283–291 (2006). <https://doi.org/10.1007/s10863-006-9052-z>
- Li, Youfen, Jeong-Soon Park, Jian-Hong Deng, and Yidong Bai.,** 2006, Cytochrome c Oxidase Subunit IV Is Essential for Assembly and Respiratory Function of the Enzyme Complex, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 38, no. 5-6 (November): 283–91. <https://doi.org/10.1007/s10863-006-9052-z>.
- Li, Y., Xu, C., Wang, B., Xu, F., Ma, F., Qu, Y., Jiang, D., Li, K., Feng, J., Tian, S., Wu, X., Wang, Y., Liu, Y., Qin, Z., Liu, Y., Qin, J., Song, Q., Zhang, X., Sujie, A., Huang, J., ... Ding, C.,** 2022, Proteomic characterization of gastric cancer response to chemotherapy and targeted therapy reveals new therapeutic strategies, *Nature communications*, 13(1), 5723. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33282-0>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liang J, Vitale T, Zhang X, Jackson TD, Yu D, Jedrychowski M, Gygi SP, Widlund HR, Wucherpennig KW, Puigserver P.,** 2023, Selective Mitochondrial Respiratory Complex I Subunit Deficiency Causes Tumor Immunogenicity, *bioRxiv [Preprint]*. 2023 Oct 3:2023.10.02.560316. doi: 10.1101/2023.10.02.560316. PMID: 37873273; PMCID: PMC10592908.).
- Lin, X, X M Pan, Z K Peng, K Wang, and N Tang.,** 2022, [Glucose-6 Phosphatase Catalytic Subunit Inhibits the Proliferation of Liver Cancer Cells by Inducing Cell Cycle Arrest], *PubMed* 30, no. 2 (February): 213–19. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn501113-20210204-00067>.
- Llovet, Josep M., Robert Montal, Daniela Sia, and Richard S. Finn.,** 2018, Molecular Therapies and Precision Medicine for Hepatocellular Carcinoma ,*Nature Reviews Clinical Oncology* 15, no. 10 (July): 599–616. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0073-4>.
- Louie, A. D., Huntington, K., Carlsen, L., Zhou, L., & El-Deiry, W. S.,** 2021, Integrating Molecular Biomarker Inputs Into Development and Use of Clinical Cancer Therapeutics, *Frontiers in Pharmacology*, 12, 2850. <https://doi.org/10.3389/FPH AR.2021.747194>.
- Lu, Y. C., Weng, W. C., & Lee, H.,** 2015, Functional roles of calreticulin in cancer biology, *BioMed research international*, 2015, 526524. <https://doi.org/10.1155/2015/526524>.
- Maceyka, M., Rohrbach, T., Milstien, S., & Spiegel, S.,** 2020, Role of Sphingosine Kinase 1 and Sphingosine-1-Phosphate Axis in Hepatocellular Carcinoma, *Handbook of experimental pharmacology*, 259, 3–17. https://doi.org/10.1007/164_2019_217.
- Macklin, A., Khan, S., & Kislinger, T.,** 2020, Recent advances in mass spectrometry based clinical proteomics: applications to cancer research, *Clinical proteomics*, 17, 17. <https://doi.org/10.1186/s12014-020-09283-w>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mahaveer Chand, Nischal, Poornima K. Tekumalla, Matt T. Rosenberg, Albert Dobi, Amina Ali, Gregory M. Miller, Juan J. Aristizabal-Henao, Elder Granger, Stephen J. Freedland, Mark D. Kellogg, and et al., 2024.,** Filamin A Is a Prognostic Serum Biomarker for Differentiating Benign Prostatic Hyperplasia from Prostate Cancer in Caucasian and African American Men, *Cancers* 16, no. 4: 712. <https://doi.org/10.3390/cancers16040712>
- Mai, T., Hamaï, A., Hienzsche, A. et al., 2017,** Salinomycin kills cancer stem cells by sequestering iron in lysosomes, *Nature Chem* 9, 1025–1033 (2017). <https://doi.org/10.1038/nchem.2778>
- Mamoor, Shahan, 2021,** Over-expression of proteasome subunit beta 3 in human endometrial cancer, 10.13140/RG.2.2.11033.54883.
- Manes, N. P., & Nita-Lazar, A., 2018,** Application of targeted mass spectrometry in bottom-up proteomics for systems biology research, *Journal of proteomics*, 189, 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.02.008>
- Manzari, M. T., Shamay, Y., Kiguchi, H., Rosen, N., Scaltriti, M., & Heller, D. A., 2021.** Targeted drug delivery strategies for precision medicines, *Nature reviews. Materials*, 6(4), 351–370. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-00269-6>
- Markowski, Adam R., Arkadiusz Żbikowski, Piotr Zabielski, Urszula Chlabicz, Patrycja Sadowska, Karolina Pogodzińska, and Agnieszka U. Błachnio-Zabielska 2023,** The Effect of Silencing the Genes Responsible for the Level of Sphingosine-1-phosphate on the Apoptosis of Colon Cancer Cells, *International Journal of Molecular Sciences* 24, no. 8: 7197. <https://doi.org/10.3390/ijms24087197>
- Markowitz, J., & Carson, W. E., 3rd. 2013,** Review of S100A9 biology and its role in cancer, *Biochimica et biophysica acta*, 1835(1), 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.10.003>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- McFadyen, M. C., Melvin, W. T., & Murray, G. I.**, 2004, Cytochrome P450 enzymes: novel options for cancer therapeutics, *Molecular cancer therapeutics*, 3(3), 363–371.
- McKillop, I. H., Girardi, C. A., & Thompson, K. J.** 2019, Role of fatty acid binding proteins (FABPs) in cancer development and progression, *Cellular signalling*, 62, 109336. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.06.001>
- Megger, D. A., Bracht, T., Kohl, M., Ahrens, M., Naboulsi, W., Weber, F., Hoffmann, A. C., Stephan, C., Kuhlmann, K., Eisenacher, M., Schlaak, J. F., Baba, H. A., Meyer, H. E., & Sitek, B.**, 2013, Proteomic differences between hepatocellular carcinoma and nontumorous liver tissue investigated by a combined gel-based and label-free quantitative proteomics study, *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 12(7), 2006–2020. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.028027>
- Menendez JA, Lupu R.** 2022, Fatty acid synthase: a druggable driver of breast cancer brain metastasis, *Expert Opin Ther Targets*. 2022;26(5):427–444.
- Milac, T. I., Randolph, T. W., & Wang, P.**, 2012, Analyzing LC-MS/MS data by spectral count and ion abundance: two case studies, *Statistics and its interface*, 5(1), 75–87. <https://doi.org/10.4310/SII.2012.v5.n1.a7>
- Minotti, G., Recalcati, S., Menna, P., Salvatorelli, E., Corna, G., & Cairo, G.**, 2004, Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone-dependent and independent mechanisms, *Methods in enzymology*, 378, 340–361. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)78025-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(04)78025-8)
- Minotti, G., Recalcati, S., Mordente, A., Liberi, G., Calafiore, A. M., Mancuso, C., Preziosi, P., & Cairo, G.** 1998, The secondary alcohol metabolite of Doksorubisinorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12(7), 541–552. <https://doi.org/10.1096/fasebj.12.7.541>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mitroi, D. N., Karunakaran, I., Gräler, M., Saba, J. D., Ehninger, D., Ledesma, M. D., & van Echten-Deckert, G.,** 2017, SGPL1 (sphingosine phosphate lyase 1) modulates neuronal autophagy via phosphatidylethanolamine production, *Autophagy*, 13(5), 885–899. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1291471>
- Miyamoto, Y., Koh, Y. H., Park, Y. S., Fujiwara, N., Sakiyama, H., Misonou, Y., Ookawara, T., Suzuki, K., Honke, K., & Taniguchi, N.,** 2003, Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses, *Biological chemistry*, 384(4), 567–574. <https://doi.org/10.1515/BC.2003.064>
- Mohd D. ve Riaz A.,** 2023, Functional pleiotropy of calcium binding protein Regucalcin in signaling and diseases, *Cellular Signalling*, Volume 102, 2023, 110533, ISSN 0898-6568, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110533>.
- Moreno, C., Santos, R. M., Burns, R., & Zhang, W. C.,** 2020, Succinate Dehydrogenase and Ribonucleic Acid Networks in Cancer and Other Diseases, *Cancers*, 12(11), 3237. <https://doi.org/10.3390/cancers12113237>
- Mosafer, J., Abnous, K., Tafaghodi, M., Mokhtarzadeh, A., & Ramezani, M. ,** 2017. “In vitro and in vivo evaluation of anti-nucleolin-targeted magnetic PLGA nanoparticles loaded with doxorubicin as a theranostic agent for enhanced targeted cancer imaging and therapy”, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 113, 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.12.009>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Nallapalli, R. K., Ibrahim, M. X., Zhou, A. X., Bandaru, S., Sunkara, S. N., Redfors, B., Pazooki, D., Zhang, Y., Borén, J., Cao, Y., Bergo, M. O., & Akyürek, L. M., 2012, Targeting filamin A reduces K-RAS-induced lung adenocarcinomas and endothelial response to tumor growth in mice, *Molecular cancer*, 11, 50. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-11-50>

National Center for Biotechnology Information, 2024, PubChem Protein Summary for Protein P00403, Cytochrome c oxidase subunit 2 (human), Retrieved July 5, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/protein/P00403>.

Navarro, C., Ortega, Á., Santeliz, R., Garrido, B., Chacín, M., Galban, N., Vera, I., De Sanctis, J. B., & Bermúdez, V. 2022, Metabolic Reprogramming in Cancer Cells: Emerging Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches, *Pharmaceutics*, 14(6), 1303. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061303>

Naylor, Stephen, 2003, Biomarkers: Current Perspectives and Future Prospects, *Expert Review of Molecular Diagnostics* 3, no. 5 (September): 525–29. <https://doi.org/10.1586/14737159.3.5.525>.

Nemeth J, Stein I, Haag D, Riehl A, Longerich T, Horwitz E, Breuhahn K, Gebhardt C, Schirmacher P, Hahn M, Ben-Neriah Y, Pikarsky E, Angel P, Hess J., 2009, S100A8 and S100A9 are novel nuclear factor kappa B target genes during malignant progression of murine and human liver carcinogenesis, *Hepatology*. 2009;50:1251–1262.

NIH, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23203>, Son erişim tarihi: 05 Mayıs 2024

Nitschkowski, D., Marwitz, S., Kotanidou, S. A., Reck, M., Kugler, C., Rabe, K. F., Ammerpohl, O., & Goldmann, T., 2019, Live and let die: epigenetic modifications of Survivin and Regucalcin in non-small cell lung cancer tissues contribute to malignancy, *Clinical epigenetics*, 11(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0770-6>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- O'Brien, N., Jones, S. T., Williams, D. G., Cunningham, H. B., Moreno, K., Visentin, B., Gentile, A., Vekich, J., Shestowsky, W., Hiraiwa, M., Matteo, R., Cavalli, A., Grotjahn, D., Grant, M., Hansen, G., Campbell, M. A., & Sabbadini, R.,** 2009, Production and characterization of monoclonal anti-sphingosine-1-phosphate antibodies, *Journal of lipid research*, 50(11), 2245–2257. <https://doi.org/10.1194/jlr.M900048-JLR20009;50>
- Ogunwobi, O. O., Harricharran, T., Huaman, J., Galuza, A., Odumuwaun, O., Tan, Y., Ma, G. X., & Nguyen, M. T.,** 2019, Mechanisms of hepatocellular carcinoma progression, *World journal of gastroenterology*, 25(19), 2279–2293. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i19.2279>
- Oikawa, D., Kimata, Y., Kohno, K., & Iwawaki, T.,** 2009, Activation of mammalian IRE1alpha upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins, *Experimental cell research*, 315(15), 2496–2504. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.06.009>
- Omar, Mona A., Mohamed M. Omran, Khaled Farid, Ashraf A. Tabll, Yasser E. Shahein, Tarek M. Emran, Ana Petrovic, Nikola R. Lucic, Robert Smolic, Tanja Kovac, and et al.,** 2023, Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma: From Origin to Clinical Diagnosis, *Biomedicines* 11, no. 7: 1852. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11071852>
- Ong SE, Mann M.,** 2005, Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative, *Nat Chem Biol* 1:252–262
- Oyama, T., Kagawa, N., Kunugita, N., Kitagawa, K., Ogawa, M., Yamaguchi, T., Suzuki, R., Kinaga, T., Yashima, Y., Ozaki, S., Isse, T., Kim, Y. D., Kim, H., & Kawamoto, T.,** 2004. Expression of cytochrome P450 in tumor tissues and its association with cancer development, *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 9, 1967–1976. <https://doi.org/10.2741/1378>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ozanne DM, Brady ME, Cook S, Gaughan L, Neal DE, Robson CN., 2000,** Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin, *Molecular Endocrinology*. 2000;14:1618–1626. doi:10.1210/me.14.10.1618.
- Pan C, Liu Y, Zhou M, Wang W, Shi M, Xing M, et al., 2018,** Theranostic pH-sensitive nanoparticles for highly efficient targeted delivery of doxorubicin for breast tumor treatment, *Int J Nanomed*. 2018;13:1119–37
- Pan, Yasi, Huarong Chen, and Jun Yu., 2020,** Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma: Current Status and Future Perspectives, *Biomedicines* 8, no. 12: 576. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8120576>
- Parikh, N. D., Mehta, A. S., Singal, A. G., Block, T., Marrero, J. A., & Lok, A. S., 2020,** Biomarkers for the Early Detection of Hepatocellular Carcinoma”, *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 29(12), 2495–2503. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-20-0005>
- Patel, D. M., Ahmad, S. F., Weiss, D. G., Gerke, V., & Kuznetsov, S. A., 2011,** Annexin A1 is a new functional linker between actin filaments and phagosomes during phagocytosis, *Journal of cell science*, 124(Pt 4), 578–588. <https://doi.org/10.1242/jcs.076208>
- Peng, H., Wang, Y., & Luo, W., 2020,** Multifaceted role of branched-chain amino acid metabolism in cancer, *Oncogene*, 39(44), 6747–6756. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01480-z>
- Peng, H., Yan, Z., Zeng, X., Zhang, S., Jiang, H., Huang, H., & Zhuo, H., 2019,** Serum and tissue proteomic signatures of patients with hepatocellular carcinoma using 2-D gel electrophoresis, *Molecular Medicine Reports*, 20, 1025-1038. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10311>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Perego, P., Corna, E., De Cesare, M., Gatti, L., Polizzi, D., Pratesi, G., Supino, R., & Zunino, F.** 2001, Role of apoptosis and apoptosis-related genes in cellular response and antitumor efficacy of anthracyclines, *Current medicinal chemistry*, 8(1), 31–37. <https://doi.org/10.2174/0929867013373994>
- Pessoa J.**, 2022, Cytochrome c in cancer therapy and prognosis, *Bioscience reports*, 42(12), BSR20222171, <https://doi.org/10.1042/BSR20222171>
- Pobre, K. F. R., Poet, G. J., & Hendershot, L. M.** 2019, The endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP is a master regulator of ER functions: Getting by with a little help from ERdj friends, *The Journal of biological chemistry*, 294(6), 2098–2108. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.002804>
- PROTEAN®**, i12™ IEF Cell System Instruction Manual, Appendix C IEF Protocols, <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006164B.pdf>, Son Erişim Tarihi: 15.03.2024).
- Qiu Y, Zhou X, Zhang Z, Sun W, Ma S.**, 2022, Proteomic study of hepatic apoptosis induced by overexpression of G0S2, doi:10.21203/rs.3.rs-1342968/v1. PPR:PPR473790.
- Rangel, D. F., Dubeau, L., Park, R., Chan, P., Ha, D. P., Pulido, M. A., Mullen, D. J., Vorobyova, I., Zhou, B., Borok, Z., Offringa, I. A., & Lee, A. S.** 2021, Endoplasmic reticulum chaperone GRP78/BiP is critical for mutant Kras-driven lung tumorigenesis, *Oncogene*, 40(20), 3624–3632. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01791-9>
- Rebouissou, S., & Nault, J. C.**, 2020, Advances in molecular classification and precision oncology in hepatocellular carcinoma, *Journal of hepatology*, 72(2), 215–229. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.08.017>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Reithmeier, A., Panizza, E., Krumpel, M., Orre, L. M., Branca, R. M. M., Lehtiö, J., Ek-Rylander, B., & Andersson, G.,** 2017, Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP/ACP5) promotes metastasis-related properties via TGF β 2/T β R and CD44 in MDA-MB-231 breast cancer cells, BMC cancer, 17(1), 650. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3616-7>
- Ren, H., Chen, Z., Yang, L., Xiong, W., Yang, H., Xu, K., Zhai, E., Ding, L., He, Y., & Song, X.,** 2019, Apolipoprotein C1 (APOC1) promotes tumor progression via MAPK signaling pathways in colorectal cancer, Cancer management and research, 11, 4917–4930. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S192529>
- Ren, L., Yi, J., Li, W., Zheng, X., Liu, J., Wang, J., & Du, G.,** 2019, Apolipoproteins and cancer. Cancer medicine, 8(16), 7032–7043. <https://doi.org/10.1002/cam4.2587>
- Rodriguez-Antona, C., & Ingelman-Sundberg, M.,** 2006, Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer, Oncogene, 25(11), 1679–1691. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209377>
- Ros, S., Schulze, A.,** 2013, Balancing glycolytic flux: the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatases in cancer metabolism, Cancer Metab 1, 8 (2013). <https://doi.org/10.1186/2049-3002-1-8>
- Samenkova, N.F., Kisrieva, Y.S., Petushkova, N.A. et al.,** 2014, Analysis of proteomic profile changes of Danio rerio embryos during exposure to doxorubicin, incorporated in the phospholipid transport nanosystem, Biochem. Moscow Suppl. Ser. B 8, 108–114 (2014). <https://doi.org/10.1134/S1990750814020115>
- Sasaki, M., Ikeda, H., Itatsu, K. et al.,** 2008, The overexpression of polycomb group proteins Bmi1 and EZH2 is associated with the progression and aggressive biological behavior of hepatocellular carcinoma, Lab Invest 88, 873–882 (2008). <https://doi.org/10.1038/labinvest.2008.52>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schiliro, C., & Firestein, B. L.**, 2021, Mechanisms of Metabolic Reprogramming in Cancer Cells Supporting Enhanced Growth and Proliferation, *Cells*, 10(5), 1056. <https://doi.org/10.3390/cells10051056>
- Sebestyén, A., Dankó, T., Sztankovics, D., Moldvai, D., Raffay, R., Cervi, C., Krencz, I., Zsiros, V., Jeney, A., & Petővári, G.** 2021. “The role of metabolic ecosystem in cancer progression - metabolic plasticity and mTOR hyperactivity in tumor tissues”, *Cancer metastasis reviews*, 40(4), 989–1033. <https://doi.org/10.1007/s10555-021-10006-2>
- Serova, M., Tijeras-Raballand, A., Dos Santos, C., Albuquerque, M., Paradis, V., Neuzillet, C., Benhadji, K. A., Raymond, E., Faivre, S., & de Gramont, A.**, 2015, Effects of TGF-beta signalling inhibition with galunisertib (LY2157299) in hepatocellular carcinoma models and in ex vivo whole tumor tissue samples from patients”, *Oncotarget*, 6(25), 21614–21627. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4308>
- Setayesh, T., Colquhoun, S. D., & Wan, Y. Y.**, 2020, Overexpression of Galectin-1 and Galectin-3 in hepatocellular carcinoma, *Liver research*, 4(4), 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2020.11.001>
- Shan, L., Li, Y., Jiang, H., Tao, Y., Qian, Z., Li, L., Cai, F., Ma, L., & Yu, Y.**, 2017, Huaier Restrains Proliferative and Migratory Potential of Hepatocellular Carcinoma Cells Partially Through Decreased Yes-Associated Protein 1, *Journal of Cancer*, 8(19), 4087–4097. <https://doi.org/10.7150/jca.21018>
- Shen, Y., Zhang, H., Ni, Y. et al.**, 2022, Tripartite motif 25 ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by degrading p85 α ., *Cell Death and Disease* 13, 643 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05100-4>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shenoy, A., Belugali Nataraj, N., Perry, G., Loayza Puch, F., Nagel, R., Marin, I., Balint, N., Bossel, N., Pavlovsky, A., Barshack, I., Kaufman, B., Agami, R., Yarden, Y., Dadiani, M., & Geiger, T., 2020,** Proteomic patterns associated with response to breast cancer neoadjuvant treatment, *Molecular systems biology*, 16(9), e9443. <https://doi.org/10.15252/msb.20209443>
- Shi, L. W., Zhao, Z. B., Zhong, L., Gao, J., Gong, J. P., Chen, H., Min, Y., Zhang, Y. Y., & Li, Z., 2020,** Overexpression of Rab40b Promotes Hepatocellular Carcinoma Cell Proliferation and Metastasis via PI3K/AKT Signaling Pathway”, *Cancer management and research*, 12, 10139–10150. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S255870>
- Singh, R. R., & Reindl, K. M., 2021,** Glutathione S-Transferases in Cancer, *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 10(5), 701. <https://doi.org/10.3390/antiox10050701>
- Singh, S. V., Nair, S., Ahmad, H., Awasthi, Y. C., & Krishan, A., 1989,** Glutathione S-transferases and glutathione peroxidases in doxorubicin-resistant murine leukemic P388 cells, *Biochemical pharmacology*, 38(20), 3505–3510. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90121-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90121-4)
- Sinkler, C. A., Kalpage, H., Shay, J., Lee, I., Malek, M. H., Grossman, L. I., & Hüttemann, M., 2017,** Tissue- and Condition-Specific Isoforms of Mammalian Cytochrome c Oxidase Subunits: From Function to Human Disease, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 1534056. <https://doi.org/10.1155/2017/1534056>
- Siracusano, G., Tagliamonte, M., Buonaguro, L., & Lopalco, L., 2020,** Cell Surface Proteins in Hepatocellular Carcinoma: From Bench to Bedside, *Vaccines*, 8(1), 41. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010041>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Son KH, Ahn CB, Kim HJ, Kim JS.,** 2020, Quantitative proteomic analysis of bile in extrahepatic cholangiocarcinoma patients, *J Cancer* 2020; 11(14):4073-4080. doi:10.7150/jca.40964. <https://www.jcancer.org/v11p4073.htm>
- Song, G., Shi, Y., Zhang, M. et al.,** 2020, Global immune characterization of HBV/HCV-related hepatocellular carcinoma identifies macrophage and T-cell subsets associated with disease progression, *Cell Discov* 6, 90 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00214-5>
- Spraggins Jeffrey M., Djambazova, Katerina V. Rivera Emilio S., Migas, Lukasz G. Neumann Elizabeth K., Fuetterer Arne, Suetering, Juergen, Goedecke Niels, LyA lice, Plas Raf Van de, and Caprioli Richard M.,** 2019, High-Performance Molecular Imaging with MALDI Trapped Ion-Mobility Time-of-Flight (timsTOF) Mass Spectrometry, *Anal Kimya* 91, 14552–14560 (2019)
- Stamos, J. L., & Weis, W. I.,** 2013, The β -catenin destruction complex, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(1), a007898. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007898>
- STRING,**<https://stringdb.org/cgi/network?taskId=bMipHFGMqxrO&sessionId=bjLNaN1nS74t>, Son erişim tarihi: 05 Mayıs 2024.
- STRING,**https://stringdb.org/cgi/about?sessionId=bNGsPVRRYtkE&footer_active_subpage=statistics, Son erişim tarihi: 05.05.2024)
- Sun, W., Liu, R., Gao, X., Lin, Z., Tang, H., Cui, H., & Zhao, E.,** 2023, Targeting serine-glycine-one-carbon metabolism as a vulnerability in cancers, *Biomarker research*, 11(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s40364-023-00487-4>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sun, X., Shu, X. O., Lan, Q., Laszkowska, M., Cai, Q., Rothman, N., Wen, W., Zheng, W., & Shu, X.,** 2022, Prospective Proteomic Study Identifies Potential Circulating Protein Biomarkers for Colorectal Cancer Risk, *Cancers*, 14(13), 3261. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14133261>
- Sun, Y.; Gao, G.; Cai, J.; Wang, Y.; Qu, X.; He, L.; Liu, F.; Zhang, Y.; Lin, K.; Ma, S.; et al.,** 2013, Annexin A2 is a discriminative serological candidate in early hepatocellular carcinoma, *Carcinogenesis* 2013, 34, 595–604.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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 Cancer J Clin.* 2021; 71: 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C.,** 2023, The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest, *Nucleic acids research*, 51(D1), D638–D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>
- Tang, C., Zhang, B., Yang, Y. et al.,** 2023, Overexpression of ferritin light chain as a poor prognostic factor for breast cancer, *Mol Biol Rep* 50, 8097–8109 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08675-z>
- Tennant, D. A., Durán, R. V., & Gottlieb, E.,** 2010, Targeting metabolic transformation for cancer therapy, *Nature reviews. Cancer*, 10(4), 267–277. <https://doi.org/10.1038/nrc2817>
- Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB.,** 2011, Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects”, *Pharmacogenet Genomics.* 2011 Jul;21(7):440-6. doi: 10.1097/FPC.0b013e32833ffb56.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tuomela, A., Hirvonen, J., & Peltonen, L.,** 2016, Stabilizing Agents for Drug Nanocrystals: Effect on Bioavailability, *Pharmaceutics*, 8(2), 16. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8020016>
- UniProt,** P49720 . PSB3_HUMAN
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P49720/entry>, Son erişim tarihi: 15.05.2024.
- UniProt,** P12710.FABPL_MOUSE,
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P12710/entry> erişim tarihi: 25.05.2024.
- Uranbileg, B., Kurano, M., Kano, K., Sakai, E., Arita, J., Hasegawa, K., Nishikawa, T., Ishihara, S., Yamashita, H., Seto, Y., Ikeda, H., Aoki, J., & Yatomi, Y.** 2022, Sphingosine 1-phosphate lyase facilitates cancer progression through converting sphingolipids to glycerophospholipids, *Clinical and translational medicine*, 12(9), e1056. <https://doi.org/10.1002/ctm2.1056>
- Usmani A., Mishra A. and Ahmad M.,** 2018., Nanomedicines: a theranostic approach for hepatocellular carcinoma, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46:4, 680-690, doi: 10.1080/21691401.2017.1374282
- Vande Walle, L., Lamkanfi, M. & Vandenabeele, P.,** 2008, The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview, *Cell Death Differ* 15, 453–460 (2008). <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402291>
- Vedarethinam, V., Dhanaraj, K., Soundherrajan, I., & Sivanesan, R.,** 2016, Identification of Differential Protein Expression in Hepatocellular Carcinoma Induced Wistar Albino Rats by 2D Electrophoresis and MALDI-TOF-MS Analysis, *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 31(2), 194–202. <https://doi.org/10.1007/s12291-015-0510-4>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vienken, H., Mabrouki, N., Grabau, K., Claas, R. F., Rudowski, A., Schömel, N., Pfeilschifter, J., Lütjohann, D., van Echten-Deckert, G., & Meyer Zu Heringdorf, D.,** 2017, Characterization of cholesterol homeostasis in sphingosine-1-phosphate lyase-deficient fibroblasts reveals a Niemann-Pick disease type C-like phenotype with enhanced lysosomal Ca²⁺ storage, *Scientific reports*, 7, 43575. <https://doi.org/10.1038/srep43575>
- Villanueva A.,** 2009, Hepatocellular Carcinoma, *New Engl J Med* (2019) 380:1450-62. doi: 10.1056/NEJMra1713263
- Wallace, KB.,** 2007, Adriamycin-induced interference with cardiac mitochondrial calcium homeostasis, *Cardiovasc Toxicol* 7:101–107.
- Wallace D. F.,** 2016, The Regulation of Iron Absorption and Homeostasis, *The Clinical biochemist. Reviews*, 37(2), 51–62.
- Wang, B., Chen, L., Ni, Z., Dai, X., Qin, L., Wu, Y., Li, X., Xu, L., Lian, J., & He, F.,** 2014, Hsp90 inhibitor 17-AAG sensitizes Bcl-2 inhibitor (-)-gossypol by suppressing ERK-mediated protective autophagy and Mcl-1 accumulation in hepatocellular carcinoma cells, *Experimental cell research*, 328(2), 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.08.039>
- Wang, H., Rao, B., Lou, J., Li, J., Liu, Z., Li, A., Cui, G., Ren, Z., & Yu, Z.,** 2020, The Function of the HGF/c-Met Axis in Hepatocellular Carcinoma, *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 55. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00055>
- Wang, J., & White, A. L.,** 2000, Role of calnexin, calreticulin, and endoplasmic reticulum mannosidase I in apolipoprotein(a) intracellular targeting, *Biochemistry*, 39(30), 8993–9000. <https://doi.org/10.1021/bi000027v>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, M., Weng, S., Li, C. et al.**, 2022, Proteomic overview of hepatocellular carcinoma cell lines and generation of the spectral library, *Sci Data* 9, 732 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41597-022-01845-x>
- Wang, P., Yuan, Y., Lin, W., Zhong, H., Xu, K., & Qi, X.**, 2019, Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in cancer, *Cancer cell international*, 19, 295. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1014-8>
- Wang, Q., Shao, X., Zhang, Y., Zhu, M., Wang, F. X. C., Mu, J., Li, J., Yao, H., & Chen, K.**, 2023, Role of tumor microenvironment in cancer progression and therapeutic strategy, *Cancer medicine*, 12(10), 11149–11165. <https://doi.org/10.1002/cam4.5698>
- Wang, S., Kotamraju, S., Konorev, E., Kalivendi, S., Joseph, J., & Kalyanaraman, B.**, 2002, Activation of nuclear factor-kappaB during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is proapoptotic: the role of hydrogen peroxide, *The Biochemical journal*, 367(Pt 3), 729–740. <https://doi.org/10.1042/BJ20020752> genesis. *Experimental Hematology & Oncology*. 13. 10.1186/s40164-024-00482-x.
- Wang, S., Song, R., Wang, Z., Jing, Z., Wang, S., & Ma, J.**, 2018, S100A8/A9 in Inflammation, *Frontiers in immunology*, 9, 1298. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01298>
- Wang, S., Wang, J., Chen, Z. et al.**, 2024, Targeting M2-like tumor-associated macrophages is a potential therapeutic approach to overcome antitumor drug resistance, *npj Precis. Onc.* 8, 31 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41698-024-00522-z>
- Wang, Y., & Patti, G. J.**, 2023, The Warburg effect: a signature of mitochondrial overload, *Trends in cell biology*, 33(12), 1014–1020. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.03.013>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, Y., Kreisberg, J. I., Bedolla, R. G., Mikhailova, M., deVere White, R. W., & Ghosh, P. M., 2007,** A 90 kDa fragment of filamin A promotes Casodex-induced growth inhibition in Casodex-resistant androgen receptor positive C4-2 prostate cancer cells, *Oncogene*, 26(41), 6061–6070. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210435>
- Washburn MP, Wolters D, Yates JR., 2001,** 3rd Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology, *Nat Biotechnol.* 2001;19:242–247
- Weiss R. B., 1992,** The anthracyclines: will we ever find a better Doksorubisinorubicin?, *Seminars in oncology*, 19(6), 670–686.
- Weiss, F., Schnabel, A., Planatscher, H. et al., 2015,** Indirect protein quantification of drug-transforming enzymes using peptide group-specific immunoaffinity enrichment and mass spectrometry, *Sci Rep* 5, 8759 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep08759>
- Whirl-Carrillo, M., Huddart, R., Gong, L., Sangkuhl, K., Thorn, C. F., Whaley, R., & Klein, T. E., 2021,** An Evidence-Based Framework for Evaluating Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine, *Clinical pharmacology and therapeutics*, 110(3), 563–572. <https://doi.org/10.1002/cpt.2350>
- Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, Gholami AM, Lieberenz M, Savitski MM, et al., 2014.** Mass-spectrometry-based draft of the human proteome, *Nature*. (2014) 509:582–7. [10.1038/nature13319](https://doi.org/10.1038/nature13319)
- Warren G., W., Osborn, M., Yates, A., Wright, K., & O'Sullivan, S. E., 2023,** The emerging role of fatty acid binding protein 5 (FABP5) in cancers, *Drug discovery today*, 28(7), 103628. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103628>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Williams, R. M., Shah, J., Tian, H. S., Chen, X., Geissmann, F., Jaimes, E. A., & Heller, D. A.**, 2018, Selective Nanoparticle Targeting of the Renal Tubules, *Hypertension* (Dallas, Tex. : 1979), 71(1), 87–94. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09843>
- Wu, Y. J., Hu, Z. L., Hu, S. D., Li, Y. X., Xing, X. W., Yang, Y., & Du, X. H.**, 2019, Glutamate dehydrogenase inhibits tumor growth in gastric cancer through the Notch signaling pathway, *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 26(3), 303–312. <https://doi.org/10.3233/CBM-190022>
- Xiao Yi, Jiang Zhu, Wei Liu, Li Peng, Cong Lu, Ping Sun, Lingling Huang, Xiu Nie, Shi'ang Huang, Tiannan Guo, and Yi Zhu**, 2023, Proteome Landscapes of Human Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma, *Mol Cell Proteomics* 22(8), 100604. <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2023.100604>
- Xiao, M., Xu, J., Wang, W. et al.**, 2023, Functional significance of cholesterol metabolism in cancer: from threat to treatment, *Exp Mol Med* 55, 1982–1995 (2023). <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01079-w>
- Xiaoyan Shi, Anqi Zhang, Jinzhi Lu, Xiaowen Wang, Cunjian Yi, Fuyuan Yang**, 2023, An Overview of Heavy Chain Ferritin in Cancer. *Front. Biosci. (Landmark Ed)* 2023, 28(8), 182. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2808182>
- Xie, J., Zhang, Y., Yan, C., Song, L., Wen, S., Zang, F., Chen, G., Ding, Q., Yan, C., & Gu, N.**, 2014, High-performance PEGylated Mn-Zn ferrite nanocrystals as a passive-targeted agent for magnetically induced cancer theranostics, *Biomaterials*, 35(33), 9126–9136. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.019>
- Xiong J.**, 2018, Fatty Acid Oxidation in Cell Fate Determination, *Trends in biochemical sciences*, 43(11), 854–857. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.04.006>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Xu, A., Zhou, J., Li, Y., Qiao, L., Jin, C., Chen, W., Sun, L., Wu, S., Li, X., Zhou, D., Jia, S., Zhang, B., Yao, J., Zhang, X., You, H., & Huang, J.,** 2021, 14-kDa phosphohistidine phosphatase is a potential therapeutic target for liver fibrosis, *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 320(3), G351–G365. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00334.2020>
- Xue A, Chang JW, Chung L, et al.,** 2012, Serum apolipoprotein C-II is prognostic for survival after pancreatic resection for adenocarcinoma, *Br J Cancer*. 2012;107:1883-1891
- Yamaguchi M.,** 2013, Suppressive role of regucalcin in liver cell proliferation: involvement in carcinogenesis, *Cell proliferation*, 46(3), 243–253. <https://doi.org/10.1111/cpr.12036>
- Yamaguchi, M., & Murata, T.,** 2018, Exogenous regucalcin suppresses the growth of human liver cancer HepG2 cells in vitro, *Oncology reports*, 39(6), 2924–2930. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6357>
- Yang, J., Shay, C., Saba, N. F., & Teng, Y.,** 2024, Cancer metabolism and carcinogenesis, *Experimental hematology & oncology*, 13(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s40164-024-00482-x>
- Yang, J., Wang, L., & Jia, R.** 2020. “Role of de novo cholesterol synthesis enzymes in cancer”, *Journal of Cancer*, 11(7), 1761–1767. <https://doi.org/10.7150/jca.38598>
- Yang, S., Cai, C., Wang, H. et al.,** 2022, Drug delivery strategy in hepatocellular carcinoma therapy, *Cell Commun Signal* 20, 26 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00796-x>
- Yao Y., Zhou Y., Liu L., Xu Y., Chen Q., Wang Y., Wu S., Deng Y., Zhang J. and Shao A.,** 2020, Nanoparticle-Based Drug Delivery in Cancer Therapy and Its Role in Overcoming Drug Resistance, *Front. Mol. Biosci.* 7:193. doi: 10.3389/fmolb.2020.00193

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yongle Du , Long Xia, Ami Jo, Richey M. Davis, Philippe Bissel, Marion F. Ehrich, and David G. I.,** 2018, Kingston Synthesis and Evaluation of Doxorubicin-Loaded Gold Nanoparticles for Tumor-Targeted Drug Delivery, *Bioconjugate Chemistry* 2018 29 (2), 420-430 DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00756
- Zamanian, M., Veerakumarasivam, A., Abdullah, S., & Rosli, R.,** 2013, Calreticulin and cancer, *Pathology oncology research : POR*, 19(2), 149–154. <https://doi.org/10.1007/s12253-012-9600-2>
- Zhai X, Zhang H, Xia Z, Liu M, Du G, Jiang Z, Zhou H, Luo D, Dou D, Li J, Wang W, Li X, Jin B.,** 2024, Oxytocin alleviates liver fibrosis via hepatic macrophages, *JHEP Reports* (2024), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2024.101032>.
- Zhang, C., Song, J., Lou, L., Qi, X., Zhao, L., Fan, B., Sun, G., Lv, Z., Fan, Z., Jiao, B., & Yang, J.,** 2020, Doxorubicin-loaded nanoparticle coated with endothelial cells-derived exosomes for immunogenic chemotherapy of glioblastoma, *Bioengineering & translational medicine*, 6(3), e10203. <https://doi.org/10.1002/btm2.10203>
- Zhang, S., Qin, Y. P., Kuang, J. M., & Liu, Y. H.,** 2018, Proteomic investigation of resistance to chemotherapy drugs in osteosarcoma, *Technology and health care : official journal of the European Society for Engineering and Medicine*, 26(1), 145–153. <https://doi.org/10.3233/THC-171038>
- Zhang, Xd., Qin, Zh. & Wang, J.,** 2010, The role of p53 in cell metabolism, *Acta Pharmacol Sin* 31, 1208–1212 (2010). <https://doi.org/10.1038/aps.2010.151>
- Zhang, Y., Fan, Y., & Mei, Z.,** 2012, NGAL and NGALR overexpression in human hepatocellular carcinoma toward a molecular prognostic classification, *Cancer epidemiology*, 36(5), e294–e299. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2012.05.012>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zhang Y., Cai Q., Luo Y., Zhang Y., Li H., 2023,** Integrated top-down and bottom-up proteomics mass spectrometry for the characterization of endogenous ribosomal protein heterogeneity, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, Volume 13, Issue 1, 2023, Pages 63-72, ISSN 2095-1779. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2022.11.003>.
- Zhang, Y., Zhai, Z., Duan, J., Wang, X., Zhong, J., Wu, L., Li, A., Cao, M., Wu, Y., Shi, H., Zhong, J., & Guo, Z., 2022,** Lactate: The Mediator of Metabolism and Immunosuppression, *Frontiers in endocrinology*, 13, 901495. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.901495>
- Zeng, W., Song, Y., Wang, R., He, R., & Wang, T., 2023,** Neutrophil elastase: From mechanisms to therapeutic potential, *Journal of pharmaceutical analysis*, 13(4), 355–366. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2022.12.003>
- Zhao, J., Chi, A., Mao, R., Hu, G., & Ji, M., 2016,** Serum Amyloid P-component Level May be a Biomarker for Lung Toxicities and Overall Survival after Thoracic Radiotherapy for Non-small Cell Lung Cancer, *Clinical laboratory*, 62(11), 2183–2190. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2016.160411>
- Zhong, W., Liu, H., Deng, L. et al. , 2021,** HBO1 overexpression is important for hepatocellular carcinoma cell growth, *Cell Death Dis* 12, 549 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03818-1>
- Zhou, A. X., Toylu, A., Nallapalli, R. K., Nilsson, G., Atabey, N., Heldin, C. H., Borén, J., Bergo, M. O., & Akyürek, L. M., 2011,** Filamin a mediates HGF/c-MET signaling in tumor cell migration, *International journal of cancer*, 128(4), 839–846. <https://doi.org/10.1002/ijc.25417>
- Zhou, J., & Saba, J. D., 1998,** Identification of the first mammalian sphingosine phosphate lyase gene and its functional expression in yeast, *Biochemical and biophysical research communications*, 242(3), 502–507. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7993>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zhou, J., Kang, X., An, H., Lv, Y., & Liu, X.,** 2021, The function and pathogenic mechanism of filamin A, *Gene*, 784, 145575. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145575>
- Zhu, A. X., Finn, R. S., Edeline, J., Cattan, S., Ogasawara, S., Palmer, D., Verslype, C., Zagonel, V., Fartoux, L., Vogel, A., Sarker, D., Verset, G., Chan, S. L., Knox, J., Daniele, B., Webber, A. L., Ebbinghaus, S. W., Ma, J., Siegel, A. B., Cheng, A. L., ... KEYNOTE-224 investigators,** 2018, Pembrolizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma previously treated with sorafenib (KEYNOTE-224): a non-randomised, open-label phase 2 trial”, *The Lancet. Oncology*, 19(7), 940–952. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30351-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30351-6)
- Zimmerman L., Alon N., et al.,** 2024, Context-Dependent Design of Induced-fit Enzymes using Deep Learning Generates Well Expressed, Thermally Stable and Active Enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2024 Mar 12;121(11):e2313809121. PMID: 38437538

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 123S070 Numaralı proje ile desteklenmiştir. Projeye verdiği destekten ötürü TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi sunarız.

Fakülteye ilk geldiğimde bana biyokimyayı sevdiren, doktora yapmayı hayal edip gerçekleştirmemi sağlayan, hatalarımla beni kabul eden ve her türlü desteğini hiçbir zaman esirgemeyen güçlü bilim kadını, değerli hocam Prof. Dr. Şenay ŞANLIER'e,

Bu süreçte değerli zamanlarını ayırıp, bilgi paylaşımı ve emeği için Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Murat KASAP hocama ve ekibine,

Vermiş olduğu sonsuz destek ve anlayışından dolayı Sayın Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL hocama,

Her zaman verdiği destek için Sayın Doç. Dr. Güliz AK DEMİROZ' e,

Özellikle kriz anlarında sabırla benimle ilgilenen ve beni motive eden canım ablam Doç. Dr. Tuğçe DANACI ÜNAL' a,

Bana hep destek olan ve hep yanımda olan canım arkadaşım Yük. Biyokimyager Selma ŞAHİN' e,

Hücre kültürü çalışmasındaki emeği için Biyolog Gaye HAMARAT'a,

in vivo çalışma sürecindeki emeği için Yük. Biyolog Ebru ŞANCI' ya,

Sağladıkları huzur ortamı için tüm değerli Kordon Kanı Hücre-Doku Uygulama Araştırma Merkezi çalışanlarına,

Ve tabii ki benim ile bu süreci birebir yaşayıp her an yanımda olan en değerlilerim; canım kızım Sare ve canım eşim Gürkan ÖZMEN'e,

teşekkürlerimi sunarım, iyi ki varsınız...

ÖZGEÇMİŞ

2006 yılında Biyokimya Bölümü'nden mezun oldu. 2017 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını tamamladı. 2008-2023 yılları arasında Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi'nde araştırmacı ve kalite yöneticisi olarak görev aldı. Haziran 2023'ten beri Ege Üniversitesi Kordon Kanı Hücre-Doku Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesinde uzman kadrosunda kalite koordinatörü olarak görevine devam etmektedir.

