



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Yüksek Lisans Tezi

**FK-16-FRENATİN 2.1S HİBRİT PEPTİDİN HEPATOSELÜLER
KARSİNOMADA ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tuba ÇAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Programı

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Serap SANCAR**

Ocak, 2024

İSTANBUL

Bu çalışma, 19.01.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Dr. Öğr. Üyesi Serap SANCAR (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Engin KAPTAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Süreyya BOZKURT
İstinye Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmî Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--	--

ÖNSÖZ

Yükseköğretim sürecinde emeğini, tecrübesini, gülümsemesini ve sevgisini benimle paylaşan biricik danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Serap SANCAR'a sonsuz sevgilerimi iletirken çok teşekkür ederim.

İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümündeki tüm saygıdeğer hocalarıma ve laboratuvar arkadaşlarıma lisansım ve yüksek lisansım süresince cesaretlendirici yardımları için teşekkür ederim. ELİSA kitleri desteği için Doç. Dr. Ayşegül KAPUCU'ya, akım sitometri cihazı kullanım yardımı için Dr. Öğr. Üyesi Ezgi ÖZTAŞ'a, ve monodansilkadeverin boyası için Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezim süresinde BİDEB 2210-A Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Program dahilinde maddi desteğiyle yanımda olan TÜBİTAK'a teşekkür ederim. Türk Petrol Vakfı'na sağladıkları kısa dönem yüksek lisans bursu için teşekkür ederim.

Üniversite hayatımın yegâne dostu Uzman Biyolog Nazlı TAYYAN'a, yüksek lisans tezim boyunca kocaman desteğiyle yanımda olan Uzman Biyolog Ayça TURAN'a ve laboratuvarı renklendiren yoldaşım Biyolog Melisa MANAV'a minnettarlığımı sunuyorum.

Hayatım boyunca gösterdikleri sabır ve destekleriyle yanımda olarak hayallerime ışık tutan değerli annem Şazimet ÇAN'a, değerli babam Altan ÇAN'a ve kız kardeşlerim Selin ÇAN ile Betül ÇAN'a sonsuz minnettarlığımı sunuyorum. Dualarıyla yanımda olan canım anneannem ve canım babaanneme çok teşekkür ederim. |

Ocak 2024

[Tuba ÇAN]

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1 :** Kanser Gelişim Süreci. Normal doku açık sarı renk ile; farklılaşan hücreler yeşil renk ile, kanser hücreleri mor renk ile gösterilmiştir (Benjamin Cummings, 2003'ten değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).....5
- Şekil 2.2 :** Tümör Metastaz Süreci. Birincil tümör pembe renk ile; metastatik hücreler yeşil renk ile gösterilmiştir (Cauli ve diğ., 2023'ten değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).....6
- Şekil 2.3 :** Kanserin Özellikleri. Kanserin sahip olduğu belirleyici özellikleri şematize edilerek gösterilmiştir (Hanahan, 2022'den değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).....7
- Şekil 2.4 :** Kanser Mikro Çevresi. Tümör, çeşitli hücrelerle sitokin ve kemokin gibi büyüme faktörlerini içeren, kan damarlarıyla sarılı bir mikro çevrenin merkezinde oksijence fakir, hipoksik ve asidik pH mikro çevresi tasvir edilmektedir (Piñeiro Fernández ve diğ., 2019'dan değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).....8
- Şekil 2.5 :** 2020 Yılında Dünyadaki Yeni Kansere Vakalarının ve Kanserden Ölümlerin Oranları. (Globocan, 2020'den değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).....10
- Şekil 2.6 :** 2020 Yılında Dünyada ve Türkiye'deki Kansere İnsidans ve Mortalite Oranları. (Globocan, 2020'den değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).....11
- Şekil 2.7 :** Karaciğerin Fonksiyonel Birimi Olan Hepatik Lobül Organizasyonu. Hepatositler mavi renkte; kolanjiyositler yeşil renkte; yıldız (Stellat) hücre mor renkte; Kupffer hücresi sarı renkte; endotel hücreleri turuncu renkte gösterilmiştir (Trefts ve diğ., 2017'den değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).....12
- Şekil 2.8 :** Karaciğerdeki Kronik Viral Enfeksiyonun HCC'ye Dönüşümü. Karaciğer inflamasyonun şiddetlenmesiyle artan nekroz üzerine başlayan rejeneratif proliferasyon tümöre gidebilirken fibröz veya karaciğer yağlanmasına (karaciğer steatozu) da gidebilmektedir. Fibröz ise siroza evrilirken sirozdan sonra karaciğerde HCC olduğu gösterilmektedir (D'souza ve diğ., 2020'den değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).....16
- Şekil 2.9 :** Karaciğerin Siroz Etkisinde veya Siroz Olmadan HCC Geliştirmesi. Sirozla başlayan TERT promotör mutasyonu ve somatik değişimlerle başlayan displastik nodüller ilerleyerek HCC gelişimine neden olmaktadır. Siroz olmadan da HBV enfeksiyonuna ve AFB1'e bağlı mutasyonlar ile HCC oluşumu gösterilmiştir (Zucman-Rossi ve diğ., 2015'ten değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).....19
- Şekil 2.10 :** Apoptozun İki Farklı Sinyal Yolağı. Ekstrinsik yol ile hücre dışı uyarılarla başlayan apoptoz sinyal kaskadı iletimi ve intrinsik yol ile hücre içi uyarılarla

başlayan diğer apoptoz sinyal kaskadının kesişimleri söz konusudur (Park ve diğ., 2023'ten değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).....	26
Şekil 2.11 : Programlanmış Nekroz Ölüm Yolağı. Nekroptoz indükleyicisi olan nekrozom oluşumuna giden sinyal iletimi ve viral enfeksiyon proteinlerinin bu oluşuma ilgisi gösterilmiştir (Linkermann, 2014'ten değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).....	29
Şekil 2.12 : Makrotofaji Oluşum Mekanizması. Hücrede en sık karşılaşılan otofaji türü olan makrotofaji PI3K ve mTOR sinyalleşmesiyle birlikte çeşitli ubikinyon sistemlerinin vakuol oluşumuna katılması ile başlayan otofagozomdan otolizozoma kadar giden süreç şematize edilmiştir (Park ve diğ., 2023'ten değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).....	34
Şekil 2.13 : AMP'lerin İkincil Konformasyonları. Şekil olarak AMP'ler doğrusal, α -helikal, β -katmanlı ve ilmek (saç tokası) dörde ayrılmış hali resmedilmektedir (Lopes ve diğ., 2022'den değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).....	37
Şekil 2.14 : Antikanser Peptitlerin HCC Hücrelerine Etki Modelleri. Numaralandırılmış etki modellerinden 1.'si reseptöre veya membrandaki negatif yüklü fosfolipitlere bağlanmasıyla oluşturduğu hücre içine girdikten sonra organelleri, RNA'yı veya DNA'yı hedefleyerek oluşturduğu tepkilerle olmaktadır (Zhang ve diğ., 2019'dan değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).....	40
Şekil 2.15 : Antikanser Peptitlerin Kanser Hücre Zarına Etki Modelleri. Peptidin zarla etkileşiminden doğan farklı zar etki senaryoları sonunda bozulan hücre zarı ile ölüme giden süreç resmedilmiştir (Tripathi ve Vishwanatha, 2022'den değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).....	42
Şekil 2.16 : Çok İşlevli Hibrit Peptit Tasarımı. Farklı fonksiyona sahip peptitlerin hibridizasyonu sinerjistik etkisi sunulmuştur (Wang ve diğ., 2019'dan değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).....	43
Şekil 4.1 : FK-16-Frenatin 2.1S peptidinin HUVEC'lerde hücre canlılığı üzerine etkisi. 6 saat için % hücre canlılık değerleri Kontrol:100±9,1; 1 µg/ml peptit: 105,8±14,4; 2,5 µg/ml peptit: 91,5±4,7; 5 µg/ml peptit: 92,2±3,9; 10 µg/ml peptit: 97,8±18,2; 20 µg/ml peptit: 84,6±9,4; 40 µg/ml peptit: 100±14,6; 60 µg/ml peptit: 113±14,5; 80 µg/ml peptit: 113,1±3,7; 100 µg/ml peptit: 91,2±1,1. 12 saat için % hücre canlılık değerleri Kontrol:100±2,4; 1 µg/ml peptit: 98,5±3,6; 2,5 µg/ml peptit: 93,46±5,1; 5 µg/ml peptit: 100,1±4,2; 10 µg/ml peptit: 102,3±4,6; 20 µg/ml peptit: 107,1±3,9; 40 µg/ml peptit: 109,5±1,2; 60 µg/ml peptit: 110,8±3,2; 80 µg/ml peptit: 104,2±1,1; 100 µg/ml peptit: 103,8±2,7. 24 saat için % hücre canlılık değerleri Kontrol:100±6,8; 1 µg/ml peptit: 87,5±3,8; 2,5 µg/ml peptit: 102,1±8,1; 5 µg/ml peptit: 85,1±11,3; 10 µg/ml peptit: 107±18,2; 20 µg/ml peptit: 79,5±2,3; 40 µg/ml peptit: 81,78±2,8; 60 µg/ml peptit: 80,62±1,2; 80 µg/ml peptit: 81,9±1,5; 100 µg/ml peptit: 80,27±2,3. *p<0,05; **p<0,01 Kontrole göre anlamlı derecede farklılık.....	57

- Şekil 4.2 :** FK-16-Frenatin 2.1S peptidinin HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi. 6 saat için % hücre canlılık değerleri Kontrol:100±4,9; 1 µg/ml peptit: 94,6±4,4; 2,5 µg/ml peptit: 91,8±5,4; 5 µg/ml peptit: 95,6±7,4; 10 µg/ml peptit: 99,7±11,7; 20 µg/ml peptit: 80,5±12,1; 40 µg/ml peptit: 52,2±5,6; 60 µg/ml peptit: 52,7±2,5; 80 µg/ml peptit: 28,7±3,9; 100 µg/ml peptit: 11,9±2,2. 12 saat için % hücre canlılık değerleri Kontrol:100±7,1; 1 µg/ml peptit: 90,43±2; 2,5 µg/ml peptit: 103,6±4,7; 5 µg/ml peptit: 102,9±5,3; 10 µg/ml peptit: 100,7±2,5; 20 µg/ml peptit: 85,85±7,6; 40 µg/ml peptit: 63,07±14,12; 60 µg/ml peptit: 58,85±5,7; 80 µg/ml peptit: 33,88±3,3; 100 µg/ml peptit: 12,32±2,5. 24 saat için % hücre canlılık değerleri Kontrol:100±3,6; 1 µg/ml peptit: 93,1±9,5; 2,5 µg/ml peptit: 75,4±1,3; 5 µg/ml peptit: 74,26±0,5; 10 µg/ml peptit: 96,5±3,5; 20 µg/ml peptit: 73,4±13,3; 40 µg/ml peptit: 62,96±8,8; 60 µg/ml peptit: 60,5±7,3; 80 µg/ml peptit: 40,1±8,9; 100 µg/ml peptit: 13,27±6,1. *p<0,05; **p<0,01 Kontrole göre anlamlı derecede farklılık.58
- Şekil 4.3 :** 5-Florourasil (5-FU) 'in HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi. 24 saat için % hücre canlılık değerleri: Kontrol:100±2,3; 1 µg/ml 5-FU: 69,87±11,32; 2,5 µg/ml 5-FU: 60,5±12,1; 5 µg/ml 5-FU: 64,9±3,5; 10 µg/ml 5-FU: 63,3±2,3; 25 µg/ml 5-FU: 55,8±5,8; 50 µg/ml 5-FU: 52,8±7,5; 100 µg/ml 5-FU: 57,5±5,3; 200 µg/ml 5-FU: 50,41±5,3. 48 saat için % hücre canlılık değerleri: Kontrol:100±10,6; 1 µg/ml 5-FU: 68,40±3,5; 2,5 µg/ml 5-FU: 55,65±3,4; 5 µg/ml 5-FU: 61,7±3,2; 10 µg/ml 5-FU: 65,1±10,4; 25 µg/ml 5-FU: 45,6±2,1; 50 µg/ml 5-FU: 44,4±3,7; 100 µg/ml 5-FU: 33,4±3,7; 200 µg/ml 5-FU: 34,9±1,6. **p<0,01; ***p<0,01 Kontrole göre anlamlı derecede farklılık.59
- Şekil 4.4 :** FK-16-Frenatin 2.1S peptidinin HepG2 hücrelerinde LDH salınımı üzerine etkisi. 24 saat için % LDH salınım değerleri: Kontrol:55,4±1,2; 10 µg/ml peptit: 54,8±5,2; 20 µg/ml peptit: 52,1±2,5; 40 µg/ml peptit: 51,8±0,3; 80 µg/ml peptit: 45,8±1,5; Pozitif kontrol: 100±11,8. *p<0,05; **p<0,01 Kontrole göre anlamlı derecede farklılık.60
- Şekil 4.5 :** HepG2 hücrelerinde FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptidinin 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonrası hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. Bar: 100µm.62
- Şekil 4.6 :** FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptidinin farklı konsantrasyonları, 100 µg/ml 5-FU uygulaması ve FBS eksikliğine 24 saat süresince maruz kalan hücrelerin akrinin oranj-etidyum bromür ile boyanmasını takiben elde edilen görüntüleri. A) Kontrol grubu; B) 10 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S uygulanan hücreler; C) 20 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S uygulanan hücreler; D) 40 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S uygulanan hücreler; E) 80 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S uygulanan hücreler; F) 100 µg/ml 5-FU uygulanan hücreler; G) FBS içermeyen medyumda inkübe edilen hücreler.63
- Şekil 4.7 :** A-G: HepG2 hücrelerinin, 24 saat FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptidinin farklı konsantrasyonlarına, 100 µg/ml 5-FU uygulamasına ve FBS eksikliğine maruz bırakıldıktan sonra uygulanan MDC boyası ile elde edilen görüntüleri. A) Kontrol grubu; B) 10 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S uygulanan hücreler; C) 20 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S uygulanan hücreler; D) 40 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S uygulanan hücreler; E) 80 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S uygulanan hücreler; F) 100 µg/ml 5-FU uygulanan hücreler; G) FBS içermeyen medyumda inkübe edilen

hücreler. H) NIS Elements yazılım programı ile farklı maruziyet koşullarında MDC floresan yoğunluğu: Kontrol: $19,6 \pm 6,4$; 10 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $21,5 \pm 2,7$; 20 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $26,5 \pm 3,2$; 40 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $38,9,1 \pm 2,3$; 80 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $34,5 \pm 4,6$; 100 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU: $21,7 \pm 0,4$; FBS (-): $21,4 \pm 1,7$. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ Kontrole göre anlamlı derecede farklılık.65

Şekil 4.8 : FK-16-Frenatin 2.1S peptitinin farklı konsantrasyonları ile 100 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU ile FBS yokluğunun HepG2 hücrelerinde apoptotik ölüm üzerine etkisinin Anneksin V/FITC-PI metodu ile değerlendirilmesi. A) Farklı koşullarda 24 saat maruziyet sonrası elde edilen histogramlar. B) Canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin yüzde değerlerine ait grafikler. Canlı hücreler için yüzde değerler: Kontrol: $79 \pm 3,5$; 10 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $79,7 \pm 2,7$; 20 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $68,1 \pm 5,9$; 40 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $81,5 \pm 0,4$; 80 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $78,3 \pm 0,3$; 100 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU: $55,9 \pm 4,7$; FBS (-): $78,8 \pm 2,3$. Erken apoptotik hücreler için yüzde değerler: Kontrol: $0,7 \pm 0,6$; 10 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $4 \pm 0,2$; 20 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $5,7 \pm 0,01$; 40 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $2,1 \pm 0,5$; 80 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $5,1 \pm 0,08$; 100 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU: $1,5 \pm 0,2$; FBS (-): $1,2 \pm 0,03$. Geç apoptotik hücreler için yüzde değerler: Kontrol: $14,7 \pm 5,6$; 10 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $13,4 \pm 1,5$; 20 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $18,7 \pm 1,8$; 40 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $10,5 \pm 3,2$; 80 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $12,04 \pm 1,8$; 100 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU: $14,8 \pm 0,7$; FBS (-): $14,7 \pm 0,9$. Nekrotik hücreler için yüzde değerler: Kontrol: $5,5 \pm 1,6$; 10 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $2,9 \pm 1,1$; 20 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $7,5 \pm 4,1$; 40 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $5,8 \pm 3,3$; 80 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $4,5 \pm 1,6$; 100 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU: $27,7 \pm 5,2$; FBS (-): $5,3 \pm 1,5$. * $p < 0,05$ Kontrole göre anlamlı derecede farklılık. ** $p < 0,01$ Kontrole göre anlamlı derecede farklılık. * $p < 0,05$ Kontrole göre anlamlı derecede farklılık. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ Kontrole göre anlamlı derecede farklılık.67

Şekil 4.9 : FK-16-Frenatin 2.1S peptitinin HepG2 hücrelerinde hücre içi reaktif oksijen seviyeleri üzerine etkisi. 24 saat için kontrole göre normalize edilen değerler: Kontrol: $1 \pm 0,23$; 10 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $1,58 \pm 0,3$; 20 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $1,85 \pm 0,43$; 40 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $1,61 \pm 0,25$; 80 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $1,88,8 \pm 0,26$; Pozitif kontrol: $1,9 \pm 0$. * $p < 0,05$ Kontrole göre anlamlı derecede farklılık.....68

Şekil 4.10 : FK-16-Frenatin 2.1S peptitinin HepG2 hücrelerinde hücre hareketliliğinin yara kapanma testi ile belirlenmesi. A) HepG2 hücrelerinde yara iyileşmesinin 0., 24. ve 48. saatteki mikroskop görüntüleri (4X büyütme). B) FK-16-Frenatin 2.1S peptitinin HepG2 hücrelerinde yara kapanmasına ilişkin grafiği. 10 $\mu\text{g/ml}$ FK-16-Frenatin 2.1S peptitinin 24. ve 48. saat uygulaması sonucu elde edilen sonuçlar: 24 saat için Kontrol: $10,34 \pm 1,7$; 10 $\mu\text{g/ml}$: $7,06 \pm 1,5$. 48 saat için: Kontrol: $19,06 \pm 1,9$; 10 $\mu\text{g/ml}$: $9,8 \pm 1,9$. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Kontrole göre anlamlı derecede farklılık.69

Şekil 4.11 : HepG2 hücrelerinde FK-16-Frenatin 2.1S'in koloni oluşturma yeteneği üzerine etkileri. A) HepG2 hücrelerine 24 saat uygulanan 10, 40 ve 80 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyondaki FK-16-Frenatin 2.1S'in koloni oluşturma yeteneği bulgusu. B) Her kuyucuktaki koloni sayımı ile hesaplanan % koloni oluşturma verimi. Kontrol: $100 \pm 33,3$ 10 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $35,2 \pm 3,2$; 40 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $5,5 \pm 5,5$; 80 $\mu\text{g/ml}$ peptit: 0. * $p < 0,05$ ve ** $p < 0,01$ Kontrole göre anlamlı derecede farklılık.70

Şekil 4.12 : HepG2 hücrelerinde düşük konsantrasyonda 48 saat uygulanan 1-10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlardaki FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptitinin ve 5-FU'nun hücre canlılığına etkisi. FK-16-Frenatin 2.1S için 48 saat sonunda elde edilen hücre

canlılık değerleri: Kontrol: $100 \pm 4,2$; 1 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $70,96 \pm 4,2$; 2,5 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $75,65 \pm 3,4$; 5 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $82,74 \pm 8,9$; 10 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $85,7 \pm 3,4$. 5-FU için 48 saat sonunda elde edilen hücre canlılık değerleri: 1 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $68,4 \pm 3,5$; 2,5 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $55,65 \pm 3,4$; 5 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $61,71 \pm 3,2$; 10 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $65,1 \pm 10,4$. ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$ Kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklılık.71

Şekil 4.13 : HepG2 hücrelerinde 1 ve 2.5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda 48 saat uygulanan 5-FU'nun ve 1-10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlardaki FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptitinin birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisi. Hücre canlılık değerleri Kontrol: $100 \pm 4,2$; 1 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU: $68,4 \pm 3,4$; 1 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU+1 $\mu\text{g/ml}$ FK-16-Frenatin 2.1S: $72,9 \pm 1,9$; 1 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU+2,5 $\mu\text{g/ml}$ FK-16-Frenatin 2.1S: $77,8 \pm 5,2$; 1 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU+5 $\mu\text{g/ml}$ FK-16-Frenatin 2.1S: $74,5 \pm 4$; 1 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU+10 $\mu\text{g/ml}$ FK-16-Frenatin 2.1S: $70,4 \pm 1,6$; 2,5 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU: $55,6 \pm 3,4$; 2,5 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU+1 $\mu\text{g/ml}$ FK-16-Frenatin 2.1S: $74,8 \pm 4,1$; 2,5 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU+2,5 $\mu\text{g/ml}$ FK-16-Frenatin 2.1S: $76,2 \pm 3,5$; 2,5 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU+5 $\mu\text{g/ml}$ FK-16-Frenatin 2.1S: $72,3 \pm 1,3$; 2,5 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU+10 $\mu\text{g/ml}$ FK-16-Frenatin 2.1S: $66,6 \pm 4$. *** $p < 0,001$ Kontrol grubuna göre; # $p < 0,05$ ve ## $p < 0,01$ 2,5 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU uygulanan grubu göre.....72

Şekil 4.14 : HepG2 hücrelerinde 5 ve 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda 48 saat uygulanan 5-FU'nun ve 1-10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlardaki FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptitinin birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisi. Hücre canlılık değerleri Kontrol: $100 \pm 4,2$; 5 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU: $61,7 \pm 3,2$; 5 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU+1 $\mu\text{g/ml}$ FK-16-Frenatin 2.1S: $53,7 \pm 6,7$; 5 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU+2,5 $\mu\text{g/ml}$ FK-16-Frenatin 2.1S: $71,6 \pm 2,8$; 5 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU+5 $\mu\text{g/ml}$ FK-16-Frenatin 2.1S: $68,1 \pm 5,7$; 5 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU+10 $\mu\text{g/ml}$ FK-16-Frenatin 2.1S: $68 \pm 5,5$; 10 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU: $69,5 \pm 6,7$; 10 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU+1 $\mu\text{g/ml}$ FK-16-Frenatin 2.1S: $66,6 \pm 2,8$; 10 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU+2,5 $\mu\text{g/ml}$ FK-16-Frenatin 2.1S: $71,3 \pm 5,8$; 10 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU+5 $\mu\text{g/ml}$ FK-16-Frenatin 2.1S: $58,4 \pm 2,7$; 10 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU+10 $\mu\text{g/ml}$ FK-16-Frenatin 2.1S: $48 \pm 0,3$. *** $p < 0,001$ Kontrol grubuna göre; $\Psi p < 0,05$ 5 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU uygulanan grubu göre; # $p < 0,05$ 10 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU uygulanan grubu göre.....73

Şekil 4.15 : ELISA yöntemi ile hücre kültür medyumunda ölçülen IL-1 β , TNF- α ve IL-8 seviyeleri. A) IL-1 β seviyeleri (pg/ml) Kontrol: $42,2 \pm 6,7$; 10 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $49,9 \pm 0,9$; 20 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $51,7 \pm 2,8$; 40 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $54 \pm 0,6$; 80 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $67,4 \pm 1,3$. B) TNF- α seviyeleri (pg/ml) Kontrol: $269,1 \pm 3,03$; 10 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $281,2 \pm 3,03$; 20 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $420,6 \pm 3,03$; 40 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $525,2 \pm 128,8$; 80 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $794,9 \pm 110,6$. C) IL-8 seviyeleri (pg/ml) Kontrol: $1182 \pm 33,2$; 10 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $1149 \pm 72,1$; 20 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $1259 \pm 56,1$; 40 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $1208 \pm 35,5$; 80 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $1444 \pm 53,6$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Kontrole göre anlamlı derecede farklılık. * $p < 0,05$ Kontrole göre anlamlı derecede farklılık.75

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
İÇİNDEKİLER.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xiii
ÖZET	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. KANSER	4
2.1.1. Kanser Oluşumu	4
2.1.2. Kanser Türleri.....	6
2.1.3. Kanserın Özellikleri ve Mikro Çevresi.....	7
2.1.4. Kansere Neden olan Etmenler (Kanserın Etiyolojisi)	8
2.1.5. Kanserın Tedavi Yöntemleri	9
2.1.6. Kanser Epidemiyolojisi	10
2.1.7. Karaciğer Kanseri	11
2.1.7.1. Karaciğer Fizyolojisi ve Histolojisi.....	11
2.1.7.2. Karaciğer Kanseri.....	12
2.1.7.3. Karaciğer Metastazları.....	13
2.1.7.4 Hepatoselüler Karsinoma ve Moleküler Biyolojisi.....	14
2.1.7.5. Hepatoselüler Karsinoma Metastazları.....	19
2.1.7.6. Hepatoselüler Karsinoma Neden Olan Etmenler	20
2.1.7.7. Hepatoselüler Karsinom Tedavi Yöntemleri	21
2.1.7.8. Hepatoselüler Karsinom Epidemiyolojisi.....	22
2.2. HÜCRE ÖLÜMÜ MOLEKÜLER MEKANİZMALARI	23
2.2.1. Apoptotik Hücre Ölümü	24
2.2.1.1. Apoptoz ve Kanser	26
2.2.2. Nekrotik Hücre Ölümü	28
2.2.2.1. Nekroz ve Kanser	29
2.2.3. Otofajik Hücre Ölümü.....	30

2.2.3.1. Otofaji ve Kanser	34
2.2.4. Apoptoz, Nekroz ve Otofaji Arasındaki İlişki.....	35
2.3. ANTİMİKROBİYAL PEPTİTLER	36
2.3.1. Antimikrobiyal Peptitlerin Yapısal Özellikleri	38
2.3.2. Antimikrobiyal Peptitlerin Etki Mekanizmaları	39
2.3.3. Katelisidin (LL-37) ve FK-16 Antimikrobiyal Peptitleri	43
2.3.4. Frenatin 2.1S Antimikrobiyal Peptiti	44
2.4. 5-FLOROURASİL	45
3. MALZEME VE YÖNTEM	46
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	46
3.1.1. Hücre Kültür Medyumlarının Hazırlanması.....	46
3.1.2. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekilmesi.....	46
3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması	46
3.1.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması.....	47
3.2. HİBRİT PEPTİTİN ÇÖZÜLMESİ VE SULANDIRILMASI.....	47
3.3. HÜCRE CANLILIĞI VE SİTOTOKSİSİTE TESTİ.....	47
3.3.1. Hücre Canlılık Testi (MTT Testi)	47
3.3.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Sitotoksosite Testi.....	49
3.4. HÜCRE ÖLÜM ŞEKLİNİN HÜCRESEL BOYAMA YÖNTEMLERİ İLE MORFOLOJİK TAYİNİ.....	50
3.4.1. Akridin Oranj/Etidyum bromür (AO/EB) İkili boyama.....	50
3.4.2. Monodansilkadeverin (MDC) Boyası ile Otofajik Vakuollerin İşaretlenmesi.....	50
3.5. ANNEKSİN V/ PROPİDYUM İYODÜR (PI) İLE AKIM SİTOMETRİSİ ÖLÇÜMÜ	51
3.6. HÜCRE İÇİ REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN SEVİYELERİNİN ÖLÇÜLMESİ.....	52
3.7. YARA KAPANMA DENEYİ (MİGRASYON TESTİ).....	53
3.8. KOLONİ OLUŞTURMA VERİMLİLİĞİ TESTİ.....	53
3.9. SİTOKİN SEVİYELERİNİN ENZİME BAĞLI İMMÜNOSORBENT TESTİ (ELISA) İLE BELİRLENMESİ.....	54
3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	56
4. BULGULAR	57
4.1. HÜCRE CANLILIK TESTİNE AİT BULGULARI	57
4.2. SİTOTOKSİSİTE TESTİNE AİT BULGULAR	60

4.3. FK-16-FRENATİN 2.1S PEPTİTİ İLE İNDÜKLENEN HÜCRE ÖLÜMÜNÜN MORFOLOJİK VE AKRIDİN ORANJ/ETİDYUM BROMÜR İKİLİ BOYAMA YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ	61
4.4. MONODANSİLKADEVERİN İLE OTOFAJİK VAKUOLLERİN BELİRLENMESİNE İLİŞKİN BULGULAR	64
4.5. ANNEKSİN V/FITC-PI AKIM SİTOMETRİSİNE İLİŞKİN BULGULAR.....	66
4.6. HÜCRE İÇİ REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN (ROS) SEVİYELERİNE AİT BULGULAR	68
4.7. YARA KAPANMA (MİGRASYON) DENEYİNE AİT BULGULAR	69
4.8. KOLONİ OLUŞTURMA VERİMLİLİĞİNE AİT BULGULAR.....	70
4.9. FK-16-FRENATİN 2.1S'İN VE 5-FU'NUN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE SİNERJİSTİK ETKİLERİNE AİT BULGULAR.....	71
4.10. SİTOKİN SEVİYELERİNE AİT BULGULAR.....	74
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	76
KAYNAKLAR.....	86
ÖZGEÇMİŞ	104

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
<	: Küçüktür
>	: Büyüktür
µg/mL	: Mikrogram/mililitre
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
°C	: Derece Santigrat
IC ₅₀	: Hücre canlılığını %50 oranında azaltan konsantrasyon
kDA	: Kilodalton
mg/l	: Miligram/Litre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
pg/ml	: Pikogram/mililitre
U/ml	: Ünite/mililitre
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
µm	: Mikrometre

Kısaltmalar	Açıklama
.O ₂	: Süperoksit
·OH	: Hidroksil
5-FU	: 5-florourasil
ACP	: Antikanser peptit
AFB1	: Aflatoksin B1
AMP	: Antimikrobiyal peptit
AMPK	: Adenozinmonofosfat kinaz

AO/EB	: Akridin oranj/etidyum bromür
ATG	: Otofajiyle ilişkili genler
ATP	: Adenozin trifosfat
CA	: Kekropin A
CDKN2A	: Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A
CO₂	: Karbondioksit
CY3	: Siyanin 3
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DCFH-DA	: 2',7'-diklorodihidroflorescein diasetat
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumumu
DMEM-F12	: F12 besin karışımı Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumumu
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ECGS	: Endotel hücre büyüme takviyesi
ECM	: Ekstraselüler matriks
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
ER	: Endoplazmik retikulum
FADD	: Fas ile ilişkili ölüm alanını
FBS	: Fetal sıgır serumu
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
FITC	: Floresan izotiyosiyanat
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HBV	: Hepatit B virüsü
hCAP18	: İnsan katyonik antimikrobiyal peptidi 18
HCC	: Hepatoselüler karsinom
HCV	: Hepatit C virüsü
HDV	: Hepatit D virüsü
HepG2	: Hepatoselüler karsinoma hattı
HUVEC	: İnsan göbek kordonu veni endotel hücreleri
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansına
IKK	: İκB kinazı
IL	: İnterlökin
INT	: Tetrazolyum tuzu
IFN-γ	: İnterferon gama

iCCA	: İntrahepatik kolanjiyokarsinom
LAMP1/LAMP2	: Lizozomla ilişkili membran proteini 1/2
LC3	: Mikrotübülle ilişkili protein hafif zinciri 3
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LL-37	: Lösin-lösin-37
MA	: Magainin 2
MDC	: Monondansilkadaverin
ME	: Melittin
MLKL	: Karışık soy kinaz domain benzeri protein
MOMP	: Mitokondriyal dış membran geçirgenliği
MPO	: Miyeloperoksidaz
M.Ö.	: Milattan önce
mTORC1	: Rapamisin kompleksi 1'in memeli hedefi
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NH₂	: Amin grubu
NK	: Doğal öldürücü hücreler
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PE	: Fosfatidiletanolamin
PES	: Penisilin\streptomisin
pH	: Potansiyel Hidrojen
PI	: Propidyum iyodür
PI3K	: Fosfoinositid 3-kinaz
PI3P	: Fosfatidilinositol 3-fosfat
RCD	: Düzenlenmiş hücre ölümü
RHIM	: RIP Homotipik Etkileşim Motifi
RIP1	: Reseptörle etkileşime giren protein 1
RIP3	: Reseptörle etkileşime giren protein 3
RIPK1	: RIP1 kinaz
RIPK3	: RIP3 kinaz
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri

Rpm	: Bir dakikada gerçekleşen devir
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
SOD₂	: Süperoksit dismutaz 2
TACE	: Transarteriyel kemoembolizasyon
TERT	: Telomeraz ters transkriptaz
TGF-β	: Dönüştürücü büyüme faktörü β
TKI	: Tirozin kinaz inhibitör
TMB	: Renk geliştirme reaktifi
TME	: Tümör mikro çevresi
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü- α
TRADD	: TNF reseptörüyle ilişkili ölüm domaini
ULK1	: Unc-51 benzeri kinaz 1
WCRFI	: Uluslararası Dünya Kanseri Araştırma Fonu
XIAP	: X'e bağlı apoptoz proteini inhibitörü

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FK-16-FRENATİN 2.1S HİBRİT PEPTİDİN HEPATOSELÜLER KARSİNOMADA ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tuba ÇAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Serap SANCAR

Antimikrobiyal peptitler bakterilerden memelilere kadar pek çok canlıda tanımlanan doğal immün sistemin unsurudur. Bu peptitlerin iki veya daha fazla hibrid kombinasyonları, antimikrobiyal özelliklerini arttırdığı gözlenmiştir. Son çalışmalar bazı antimikrobiyal peptitlerin kanser hücreleri üzerinde de sitotoksik etkisini göstererek bu peptitlerin antikanser aktiviteli olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmanın amacı ilk kez tasarlanan bir hibrit peptitin hepatosellüler karsinoma hücreleri olan HepG2 hücre soyundaki antikanser etkilerini araştırmaktır. Tasarlanan hibrit peptit, epidermal antimikrobiyal peptit olan insan katelisinidin hCAP-18 ailesine ait peptiti LL-37'nin, 17- 32 amino asit aralığındaki aktif bölgesini temsil eden FK-16 peptiti ile kurbağa derisinden elde edilen Frenatin 2.1S antimikrobiyal peptitinin prolin aminoasidine bağlı hibridizasyonu sonucu elde edilen toplam 35 amino asitli bir peptittir. FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptitin, en yaygın karaciğer kanseri olan hepatoselüler karsinom hücre hattı olan HepG2 hücrelerinde sitotoksik etkisi ilk kez araştırılmıştır. Hibrit peptitin farklı konsantrasyonlarda uygulanmasına bağlı HepG2 hücrelerinde etkileri ilk olarak hücre canlılık testi ve laktat dehidrogenaz salınımına dayanan sitotoksikite testi ile ölçüldü. Ayrıca normal hücre soyu olarak insan göbek kordonu ven endotel hücreleri (HUVEC) kullanıldı ve hibrit peptitin hücre canlılığına etkisi de araştırıldı. Hücre ölümü ile ilişkili morfolojik değişiklikler başta ışık mikroskopunda, akridin oranj/etidyum bromür ikili boyama yöntemi ve monodansilkadaverin boyama yöntemi sonrası floresan mikroskopta gözlenmesi ile araştırıldı.

Hücre canlılığındaki azalmanın apoptoz ile ilişkisi AnnexinV-FITC/PI boyaması ile akım sitometrisinde analiz edildi ve hibrit peptit uygulanan hücrelerde hücre içi ROS miktarındaki değişiklikler spektrofloreometre ile ölçüldü. Ayrıca *in vitro* çizik testi ile hücre hareketliliğine olan olası etkiler araştırıldı ve koloni oluşturma verimliliği testi ile tek bir hücrenin proliferatif etkinliği üzerine hibrit peptitin etkileri incelendi. Bir antineoplastik ajan olan 5-florourasil ile peptitin düşük konsantrasyonlarda sinerjistik etkisinin olup olmadığı hücre canlılık testi ile araştırıldı. FK-16-Frenatin 2.1S peptidinin kanser hücrelerinden IL-1 β , TNF- α ve IL-8 salınımı üzerine olan etkileri ise bu sitokinlerin hücre kültür medyumunda ELISA yöntemi ile ölçülmesi ile belirlendi.

Elde ettiğimiz sonuçlar FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptidinin doza ve zamana bağlı olarak HepG2 hücrelerinde canlılığı azalttığını göstermiştir. Hücre canlılığındaki azalma HUVEC’lerde de gerçekleşmiştir, ancak HepG2 hücrelerine kıyasla hücre canlılığı HUVEC’lerde daha az azalma gözlenmiştir. Laktat dehidrogenaz salınımında doza bağlı bir artış gözlenmemiştir. Akım sitometrisi ve AO/EB boyası ile apoptotik hücre sayısında doza bağlı bir artış ve fragmente nükleus sayısında da bir artış gözlenmiştir. Ayrıca hibrit peptit uygulanan hücrelerde hücre içi ROS seviyelerinin de kontrol hücrelere kıyasla arttığı belirlenmiştir. Diğer taraftan uygulanan FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptidinin dozuna bağlı olarak MDC ile boyanmış otofajik vakuollerde anlamlı bir artış da gözlenmiştir. Migrasyon testi, toksik olmayan düşük peptit konsantrasyonunda hücre hareketliliğinin baskılandığını göstermiştir. FK-16-Frenatin 2.1S’in artan konsantrasyonu HepG2 hücrelerinde koloni oluşturma verimliliğini azaltmıştır. Antineoplastik ajanlar ile olası sinerjistik etkileri araştırmak için, düşük konsantrasyonlarda FK-16-Frenatin 2.1S (10 μ g/ml) ile bir antineoplastik ajan olan 5-FU (10 μ g/ml) ile uygulandığında tek başına daha yüksek konsantrasyonlardaki 5-FU uygulamasına kıyasla hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda peptite maruz bırakılan HepG2 hücrelerinden IL-1 β , TNF- α ve IL-8 sitokinlerinin arttığı ELISA yöntemi ile belirlenmiştir ve peptit maruziyetinin, immün cevapları indükleyebileceğini göstermektedir.

Çalışmamız FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptidinin hepatoselüler karsinoma için terapötik bir molekül olarak potansiyel taşıdığını göstermektedir. Bununla birlikte, kanser hücreleri üzerindeki etkilerin daha ayrıntılı çalışılması ve peptitin immün hücreler üzerindeki olası etkilerinin araştırılması önem taşımaktadır. |

Ocak 2024, |24| sayfa.

Anahtar kelimeler: Hepatoselüler Karsinoma, Antimikrobiyal Peptitler, FK-16-Frenatin 2.1S, Hücre Ölümü, Hibrit Peptit

SUMMARY

[M.Sc. THESIS]

**[INVESTIGATION OF THE ANTICANCER EFFECTS OF FK-16-
FRENATIN 2.1S HYBRID PEPTIDE IN HEPATOCELLULAR
CARCINOMA]**

[Tuba ÇAN]

Istanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

[Department of Biology]

Supervisor : [Assist. Prof. Dr.] [Serap SANCAR]

[Antimicrobial peptides are elements of the innate immune system defined in many living things, from bacteria to mammals. Hybrid combinations of two or more of these peptides have been observed to increase their antimicrobial properties. Recent studies have shown that some antimicrobial peptides have cytotoxic effects on cancer cells, revealing that these peptides have anticancer activity. The aim of this study is to investigate the anticancer effects of a hybrid peptide designed for the first time in the HepG2 cell line, which are hepatocellular carcinoma cells. The designed hybrid peptide is the result of the proline amino acid-dependent hybridization of the FK-16 peptide, which represents the active site between 17 and 32 amino acids, of the human cathelicidin hCAP-18 family peptide LL-37, which is an epidermal antimicrobial peptide, and the Frenatin 2.1S antimicrobial peptide obtained from frog skin. The resulting peptide is a peptide with a total of 35 amino acids. The cytotoxic effect of FK-16-Frenatin 2.1S hybrid peptide was investigated for the first time in HepG2 cells, the hepatocellular carcinoma cell line, the most common liver cancer. The effects of the hybrid peptide on HepG2 cells due to application at different concentrations were first measured by cell viability test and cytotoxicity test based on lactate dehydrogenase release. In addition,

human umbilical cord vein endothelial cells (HUVEC) were used as a normal cell line, and the effect of the hybrid peptide on cell viability was also investigated. Morphological changes related to cell death were investigated initially under a light microscope, followed by the acridine orange/ethidium bromide double staining method and the monodansylcadaverine staining method, under a fluorescent microscope. The relationship between the decrease in cell viability and apoptosis was analyzed by flow cytometry with AnnexinV-FITC/PI staining, and changes in the amount of intracellular ROS in hybrid peptide-applied cells were measured by spectrofluorometer. In addition, possible effects on cell motility were investigated with the *in vitro* scratch test, and the effects of the hybrid peptide on the proliferative activity of a single cell were examined with the colony formation efficiency test. Whether the peptide has a synergistic effect at low concentrations with 5-fluorouracil, an antineoplastic agent, was investigated by cell viability test. The effects of FK-16-Frenatin 2.1S peptide on the release of IL-1 β , TNF- α and IL-8 from cancer cells were determined by measuring these cytokines in cell culture medium by ELISA method.

Our results showed that FK-16-Frenatin 2.1S hybrid peptide reduced the viability of HepG2 cells in a dose- and time-dependent manner. The reduction in cell viability occurred in HUVECs, but less reduction in cell viability was observed in HUVECs compared to HepG2 cells. No dose-dependent increase in lactate dehydrogenase release was observed. A dose-dependent increase in the number of apoptotic cells and an increase in the number of fragmented nuclei were observed by flow cytometry and AO/EB staining respectively. In addition, it was determined that intracellular ROS levels in cells treated with hybrid peptide increased compared to control cells. On the other hand, a significant increase in MDC-stained autophagic vacuoles was observed depending on the dose of FK-16-Frenatin 2.1S hybrid peptide administered. Migration testing showed suppression of cell motility at low non-toxic peptide concentration. Increasing concentration of FK-16-Frenatin 2.1S decreased colony formation efficiency in HepG2 cells. To investigate possible synergistic effects with antineoplastic agents, it has been observed that cell viability decreases when FK-16-Frenatin is administered with 2.1S (10 μ g/ml) at low concentrations with 5-FU (10 μ g/ml), an antineoplastic agent, compared to 5-FU administration at higher concentrations alone. It was determined by ELISA method that IL-1 β , TNF- α and IL-8 cytokines increased in HepG2 cells exposed to different concentrations of peptide, indicating that peptide exposure can induce immune responses.

Our study shows that the FK-16-Frenatin 2.1S hybrid peptide has potential as a therapeutic molecule for hepatocellular carcinoma. However, it is important to study the effects on cancer cells in more detail and to investigate the possible effects of the peptide on immune cells. |

January 2024, |24| pages.

Keywords: |Hepatocellular carcinoma, Antimicrobial Peptides, FK-16-Frenatin 2.1S, Cell Death, Hybrid Peptide |

1. GİRİŞ

Kanser, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelere halk sağlığı ve ekonomik açıdan zarar veren bir sağlık sorunu olmakla birlikte dünya çapında önde gelen ikinci ölüm nedenidir (Aljurf ve diğ., 2022). Kanser, farklı birçok hücresel ve moleküler yolların anormal aktivasyonu, proto-onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonu/inaktivasyonu arasındaki dengenin bozulması ile ilişkili ortaya çıkan karmaşık bir süreçtir (Alqahtani ve diğ., 2019). Kanser hangi tipi olursa olsun erken teşhis, tarama ve tedavi önemlidir. Kanser tedavisi, ilerleyen teknolojiyle uzmanlaşarak daha da karmaşık şekilde gelişti. Bununla birlikte, hedefe yönelik terapi, biyolojik, hücresel ve gen terapileri gibi yeni tedaviler, ileri patoloji, radyoloji ve radyasyon tedavisi gibi gelişmiş destek sistemlerine olan ihtiyaç multidisipliner tedavilere katkıda bulunmaktadır. İnsan vücudunun metabolizmasını ve bağışıklığını korumaya yönelik yeni tedavi yöntemleri ise sürekli araştırma konusudur. Günümüzde immün sistem üzerine artan çalışmalarla kanser tedavileri sıklıkla kesişmekte olup insan doğasına yararlı kombinasyonlar araştırılmaktadır (Aljurf ve diğ., 2022).

Uluslararası Dünya Kanser Araştırma Fonunun (WCRF International) son verilerine göre karaciğer kanseri dünya çapında en sık görülen altıncı kanser türü olmakla beraber kansere bağlı ölümlerin en yaygın üçüncü nedenidir. Karaciğer kanserlerinden biri olan hepatosellüler karsinom ise dünyada en sık görülen beşinci kanser türüdür (Asafo-Agyei ve Samant, 2023). Karaciğer birincil epitel hücresi olan hepatosit hücrelerinde başlayan ve hepatosellüler karsinom (HCC) adını alan bu birincil kanser hem erişkin hem çocuklarda görülmektedir (Lotfollahzadeh ve diğ., 2022; WCRF, 2023). Hepatosellüler neoplazmalar arasında hepatosellüler karsinom (HCC), intrahepatik kolanjiyokarsinom (iCCA), hepatoblastoma ve hepatosellüler adenom yer alır. En yaygın olanı HCC iken iCCA ikinci en yaygın primer karaciğer kanseridir (Alqahtani ve diğ., 2019). Hepatosellüler karsinomun en sık görülen nedenleri ise; hepatit B/C virüsü, siroz, kronik inflamasyon, fibröz, aflatoksin B1, alkolik olmayan karaciğer yağlanması, alkol/sigara tüketimi ve genetik yatkınlık durumlarıdır (Lotfollahzadeh ve diğ., 2022; WCRF, 2023).

Hepatit B/C virüsüyle kronik viral enfeksiyon ortamında gelişen HCC immünomodülatör bir mikro çevreye sahip olan heterojen bir kanserdir. Artan immün baskılayıcı etkiler HCC karsinogenezine ve hastalığın ilerlemesine neden olur. Tümöre özgü immün yanıtları

güçlendirici yaklaşımlar HCC kanserinin terapötik stratejileri olarak araştırılmaktadır (Makarova-Rusher ve diğ., 2015). Hepatosellüler karaciğer karsinomu (HCC) tedavileri; rezeksiyon, transplantasyon, ablasyon, transarteriyel embolizasyon ve radyoterapi, sistemik kemoterapi olmak üzere sınıflandırılabilir (Kole ve diğ., 2020).

Peptit bazlı ilaçlarının avantajları, iyi biyoaktivite uyumları ve protein ilaçlarına kıyasla daha yüksek stabiliteye sahip olmalarıdır. Doğal peptitlerin dezavantajları ise zayıf kimyasal/fiziksel stabilite, kısa plazma yarı ömrü ve normal hücrelere karşı oluşabilen sitotoksitesi ile terapötik kullanım için doğrudan uygun olmamalarıdır. Bu gibi sorunlara çözüm sağlayabilecek şekilde yapay olarak tasarlanmış hibrit peptitler; antibakteriyel, antitümör ve antimetabolik hastalıklar için terapötik açıdan yüksek potansiyele sahiptir. Son zamanlarda oldukça ilgi gören hibrit peptit kavramı, iki veya daha fazla farklı peptit dizisini çeşitli biyolojik fonksiyonlarla birleştirerek yeni biyolojik etkiler elde etmeyi amaçlamaktadır (Fosgerau ve Hoffmann, 2015; Wang ve diğ., 2019).

AMP'lerin bir ailesi olan katelisinlerin, insanda belirlenen tek örneği/üyeleri katelisin hCAP-18 (pro-LL-37), antimikrobiyal peptit LL-37'nin pro-proteinidir (Dürr ve diğ., 2006). Bu 18-kDa preproprotein, bir N-terminal sinyal dizisi, katelin benzeri bir dizi ve bir C-terminal AMP dizisinden oluşarak proteolitik bölünmesi sonucu, LL-37 olarak bilinen 37 birimli, amfipatik, sarmal bir peptiti ortaya çıkarır. Bu peptit, kemik iliği hücreleri, dolaşımdaki lökositler ve cilt ve gastrointestinal mukoza gibi çok sayıda epitel dokusu hücreleri tarafından salgılanır. LL-37, lökositlerin (örn. nötrofiller, monositler, T-hücreleri, eozinofiller ve mast hücreleri) enfeksiyon bölgelerine kemotaksisini ve bu bölgedeki sitokin üretimini düzenleyerek yara iyileşmesi sırasında yeniden epitelizasyonu teşvik eder. İlişkili birçok çalışma ile, LL-37'nin endojen bir tümör baskılayıcı peptit özelliği gösterilmiştir (Ren ve diğ., 2013).

Peptitlerin, terapötik ilaç olarak kullanılmasını sınırlayıcı etmenlerden biri kimyasal sentezleriyle ilişkili maliyetleridir. Bir peptitin biyolojik aktivitesini yansıtabilecek şekilde daha kısa fragmanların daha düşük maliyetle üretilebilmesi adına LL-37'nin fonksiyonel bölgesini belirlemek oldukça önemlidir. Li ve ark. (2006) LL-37'nin 17-32 kalıntılarına karşılık gelen FK-16'nın antibakteriyel ve antitümör etkilerini koruduğunu gösterdi. Daha sonraki çalışmalar ise bu fragmanın, prokaryotlara ve ökaryotlara karşı tam uzunluktaki peptitten daha iyi bir aktiviteye sahip olduğunu kanıtlamıştır. Bu sonuca göre FK-16'nın yeni bir antikanser peptit

olarak umut verici bir aday olabileceğini düşündürürken, FK-16'nın *in vitro* antikanser etkisi araştırmalarına ilgi artmıştır (Ren ve diğ., 2013).

İmmünmodölatör etkilere sahip birçok antimikrobiyal peptit kurbağa deri salgılarından elde edilmektedir. Terapötik potansiyele sahip olan çeşitli peptitler üzerine çalışmalar devam etmektedir. Bu antimikrobiyal peptitlerin bir grubu; Orinoco ıhlamur ağacı kurbağası *Sphaenorhynchus lacteus*'un (Hylidae) deri salgılarından elde edilen Frenatin ailesindeki üç peptit Frenatin 2.1S, 2.2S ve 2.3S'dir (Conlon ve diğ., 2014). Frenatinler immün sistem ile ilişkili uyarıcı etkilerine ek olarak birçok tümör dizisine sitotoksik yani antikanser aktivite göstermiştir (Vacchelli ve diğ., 2015). Frenatinler arasında yoğunlukla çalışılan peptit ise Frenatin 2.1S'dir. 2.1S, mononükleer hücrelerin (makrofajlar, T hücreleri, doğal öldürücü hücreler vb.) inflamatuvar fenotiplerini kuvvetlendirir. Özellikle, doğal öldürücü hücrelerin (NK) aktivasyonlarını arttırıp birikmesini sağlayarak tümörisidal potansiyellerini desteklemektedir (Pantic ve diğ., 2017).

1957'den günümüze kadar çeşitli kanser türlerini tedavi etmek amaçlı yaygın olarak kullanılan 5-florourasil (5-FU), antimetabolit bir kanser ilacıdır. Kemoterapötik olan 5-FU'nun ilaç direnci gelişimiyle birlikte sınırlayıcı etkisi sürmektedir (Sethy ve diğ., 2021). En yüksek etkiyi kolorektal kanserde gösteren 5-FU, farklı ilaç kombinasyonlarıyla birlikte kullanımı sonucu tedaviye yanıt oranı yükselmiştir (Gu ve diğ., 2019). Bu sebeple kanser hücrelerindeki 5-FU'ya duyarlılığın artmasıyla ilaca yanıtı güçlendirilmesi ve ilaç direncini önlemeye yönelik kombinasyon içerikli terapötik yaklaşımlara potansiyel bir antikanser ilacı olarak önemlidir.

Bu çalışmanın amacı sentetik hibrit antikanser peptiti olan FK-16-Frenatin 2.1S'in HepG2 hücre soyunda antikanser aktivitesinin varlığının incelenmesini, var ise bu etkinin hangi hücre ölüm mekanizması üzerinden etkili olduğunu, immünmodölatör etkilerine bakılması ve 5-FU ile sinerjistik antikanser aktivitesinin incelenmesini ortaya koymaktadır. |

2. GENEL KISIMLAR

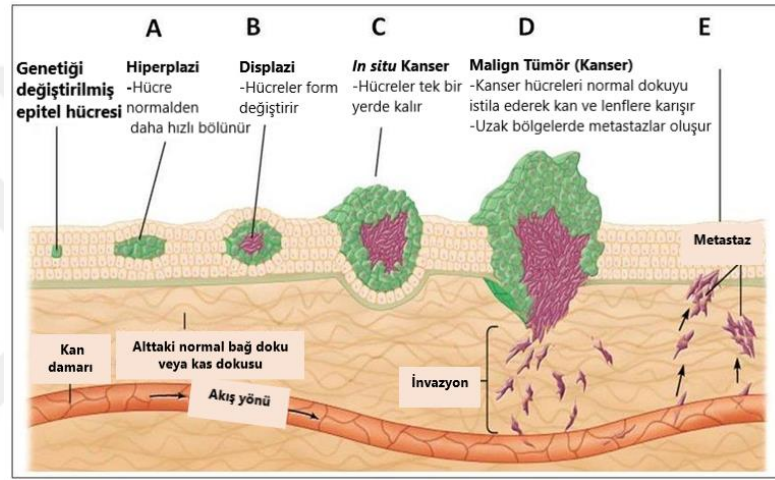
2.1. KANSER

Hipokrat (M.Ö. 460-375) ilk kez meme kanserinde gözlemleyerek yengece benzeyen kan damarlarıyla yavaş büyüyen ağrılı şişliklere karsinoma (carcinoma) terimini kullanmıştır. Romalı tıp doktorlarından Celsus (M.Ö. 25-M.S. 50) ve Galen (130-200) de çevresine pençeleriyle yapışan bir yengeç tasvirinden dolayı kanser (cancer) terimini kullanmıştır. Türk tıp tarihinde ise küçük yumrulu, ağrılı ve kan damarlı şişliklere seretan denilmesi ile başlayan kanser, yıllar içinde evrensel kullanımına uygun ismini almıştır. Kanserın ilk mikroskopik incelemesini Marcello Malpighi (1628-1694), ilk kez anatomik farklılıklarını inceleyen Laönnec'dir (1781-1826). Primer ve sekonder tümörleri birbirinden ayıran Morgagni (1682-1771), günümüzde de bilinen birçok kanser türünü tanımlamıştır (Sigerist, 1932; Atıcı, 2007; Hajdu, 2011).

2.1.1. Kanser Oluşumu

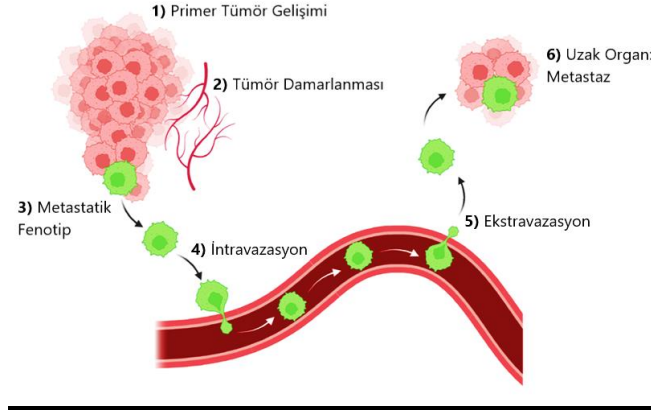
Çevresel risk faktörleri, kalıtım ve genlerde biriken mutasyonlar sonucu hücrel bölünme süreci kontrolden çıkarak hücreler, anormal ve hasarlı şekilde çoğaldığında büyüüp dokulara ulaşarak vücudun çeşitli yerlerine yayılabilen ve yaşamı tehdit eden bir hastalık grubu olan kanser ortaya çıkmaktadır. Ulusal Kanser Enstitüsü, kanseri anormal hücrelerin çoğaldığı ve komşu dokuları istila ettiği bir grup hastalık olarak tanımlamaktadır. Vücudun her dokusunda görülebilen kanser gelişimi türüne özgü özelliklerin yanı sıra hastalığı oluşturan benzer temel süreçler içermektedir. Bir ana hücrenin kusurlu bölünmesiyle oluşan aşırı çoğalma (hiperplazi) ile değişen hücrel formlarla (displazi) seyreden anormal hücrelerden tümör oluşur. Tümörler, iyi huylu (benign) be kötü huylu (malign) olarak ikiye ayrılmaktadır. Bir tümör kaynaklandığı doku içinde kalırsa, in situ kanser durumunda benign tümör olmaktadır. Yakınlardaki dokulara yayılmaya başlırsa, invaziv kanser durumu veya damar sistemi ile vücutta yeni tümörler oluşmasıyla metastaz kanser durumu olarak malign tümör şeklinde görülmektedir (NIH, 2007) (Şekil 2.1). Buna göre kanser oluşumu hücrel düzeyde çoğalma, sağkalım, invazyon ve metastaz yetenekleriyle giderek artan hücrelerin mutasyonunu ve seçimini içeren çok aşamalı bir süreçtir (Cooper, 2000).

Kanserin oluşum sürecine karsinogenez denilir ve dört aşamaya ayrılmıştır; tümörün başlatılması, tümörün ilerlemesi, malign dönüşüm ve tümörün ilerlemesidir (Weston ve Harris, 2003). Tümörün başlaması, hücreyi mutasyona götüren genotoksik ajanlar gibi faktörlerle karşılaşarak oluşan mutasyonların birikmeye başladığı ve bölünme kontrolünün kaybedildiği evredir. Artan tümör başlatıcıları maruziyetiyle anormal hücre popülasyonu genişleyerek malign dönüşüme doğru ilerler. Tümörün ilerlemesi, artık malignant fenotipte olan tümör agresif özellikler kazanarak invazyon, anjiogenez (damar oluşumu) ve metastaz yapma eğilimiyle canlı hayatını riske ettiği evredir (Weston ve Harris, 2003; Baba ve Catoi, 2007).



Şekil 2.1 : Kanser Gelişim Süreci. Normal doku açık sarı renk ile; farklılaşan hücreler yeşil renk ile, kanser hücreleri mor renk ile gösterilmiştir (Benjamin Cummings, 2003'ten değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).

Kanser, bulunduğu dokudan köken alıyorsa primer tümör, birincil organ ve dokulardan kaynaklanıp vücudun diğer bölgelerine yayıldığında sekonder ya da metastatik tümör olarak incelenmektedir. Metastaz kaskadı genel olarak istila, intravazasyon ve ekstravazasyon olarak üç ana aşamadan oluşur. Hücre-hücre yapışma bağlantılarının kaybıyla birincil tümör kitlesinden ayrılan hücreler, hücre-matriks etkileşimindeki farklılıklarla stromayı istila etmektedir. Anjiogenez ile tümörün yakınındaki kan damarına giderek taşınmasıyla intravazasyon süreci ile uzak bölgelere taşınmaktadır. Endotel hücresi ile kanser hücresinin etkileşime girmesi ve yapışma bağı oluşturarak dokuya geçmesi ile ekstravazasyon süreci tamamlanarak farklı dokuda ikincil bir tümör oluşumu başlamaktadır (Martin ve diğ., 2013; Cauli ve Polidoro, 2023) (Şekil 2.2).



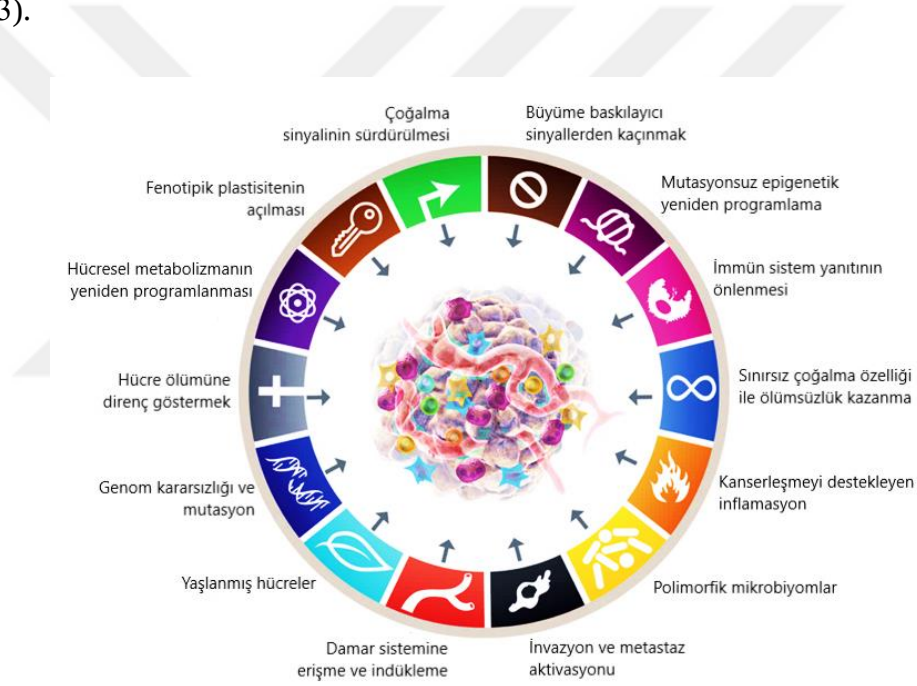
Şekil 2.2 : Tumor Metastaz Süreci. Birincil tumor pembe renk ile; metastatik hücreler yeşil renk ile gösterilmiştir (Cauli ve diğ., 2023'ten değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).

2.1.2. Kanser Türleri

Kanserler köken aldıkları dokuya ya da birincil bölgelerine göre sınıflandırılır. Buna göre tümörler altı ana gruba ayrılmaktadır; karsinoma, sarkoma, miyelom, lösemi ve lenfoma. Ayrıca bu türlerin birleşimi olarak yer alan adenoskuamöz karsinom, karsinosarkom ve teratokarsinom gibi kanser türleri de bulunmaktadır (SEER, 2023). Epitelyal hücrelerden köken alan malignanlardan olan karsinomlar, insan kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. Karsinomlar iki alt tipe ayrılır; bir organ veya bezden gelişenler adenokarsinom iken skuamöz epitelden gelişenler skuamöz hücreli karsinomlardır. Karsinoma örnek olarak meme, akciğer, kolon, prostat ve mesane gibi salgılama yeteneğine sahip organların kanserleri verilebilir. Sarkomlar kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi bağ dokulardan meydana gelen tümörler olup insanlarda nadir görülen kanserlerin yaklaşık %2'sini oluşturmaktadırlar. Geliştikleri yere göre bu kanserler; osteosarkom (kemik), kondrosarkom (kıkırdak) ve fibrosarkom (fibröz doku) gibi örneklendirilebilir. Miyelom ise kemik iliğinde bulunan plazma hücrelerinde başlayan bir kanserdir. Lösemi, kan oluşturan hücrelerden kökenlenerek olgunlaşmamış beyaz kan hücrelerinin aşırı üretimiyle oluşur. Lenfoma ise bağışıklık sistemi hücrelerinde veya organlarında ortaya çıkan kanser türüdür. (Cooper, 2000; SEER, 2023) Lösemiler ve lenfomalar insandaki malignitelerin yaklaşık %8'ini oluşturan kanserlerdir (Cooper, 2000).

2.1.3. Kanserin Özellikleri ve Mikro Çevresi

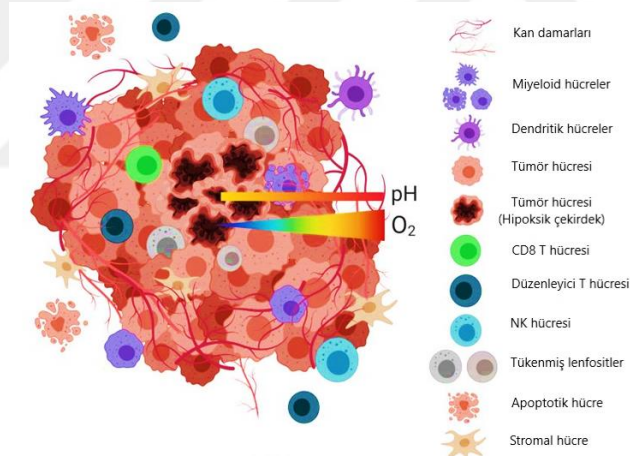
Normal hücrelerden şekil, içerik ve işleyiş bakımından farklı olan kanser hücreleri ayırt edici özellikler kazanmıştır. Bu özellikleri tanımlamada Hanahan'ın (2022) makalesinde; çoğalma sinyalinin sürdürülmesi, büyüme baskılayıcı sinyallerden kaçınmak, hücre ölümüne direnç göstermek, sınırsız çoğalma özelliği ile ölümsüzlük kazanma, damar sistemine erişme ve indüklemeye, invazyon ve metastaz aktivasyonu, hücre metabolizmasının yeniden programlanması, immün sistem yanıtının önlenmesi, kanserleşmeyi destekleyen inflamasyon, genom kararsızlığı ve mutasyon, fenotipik plastisitenin açılması, mutasyonsuz epigenetik yeniden programlama, polimorfik mikrobiyomlar ve yaşlanmış hücreler olarak yer almaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 : Kanserin Özellikleri. Kanserin sahip olduğu belirleyici özellikleri şematize edilerek gösterilmiştir (Hanahan, 2022'den değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).

Tümörün büyüyüp gelişmesiyle içinde çeşitli hücre ve salgıların bulunduğu yüksek etkileşimli ve karmaşık ortama tümör mikro çevresi (TME) denilmektedir. Sürekli gelişen bu ortamın içeriği kanser türüne göre değişiklik göstermesi belli ayırt edici özellikler mevcuttur. TME ana yapısını bağışıklık hücreleri, stromal hücreler, kan damarları ve ekstraselüler matris (ECM) oluşturmaktadır. Bağışıklık hücreleri (T ve B hücreleri, doğal öldürücü hücreler, makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler vb.) tümör büyümesini baskılayabildiği gibi teşvik de edebilir.

Stromal hücreler, tümör türleri arasında farklılık içermesine karşın belli başlı şunları içerir: vasküler endotelial hücreler, fibroblastlar, adipositler ve yıldız hücreleri (Şekil 2.4). Bu hücreler anjiogenezi, çoğalmayı, invazyonu ve metastazı etkileyen çeşitli salgılar üretir ve TME genişlemesini sağlarlar. Tümör gelişmesiyle oluşan ortamda oksijen yetersizleşir ve metabolik atıklarda birikince TME hipoksik ve asidik hale gelir. Bunun üstesinden gelmek isteyen tümör kan damarlarına ulaşmak ve yeni kan damarları filizlendirmek için çeşitli faktörlerin salınmasını indükler. Hücre dışı matris ise TME içerisinde sadece hücreler için fiziksel bir iskelet sağlamakla kalmaz, aynı zamanda tümörün yayılmasını teşvik etmektedir. ECM, kollajen, fibronektin, elastin ve laminin moleküllerinden oluşarak normalden fazla bu molekülleri taşıyan TME katılaşarak kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir. TME tanımak, kansere katkısını gözlemleyerek ve kanser türüne göre kişiselleştirerek biyobelirteç keşfine katkısının yanı sıra tedavide spesifik hedefe yönelik yaklaşımların önünü açmaktadır (Anderson ve Simon, 2020).



Şekil 2.4 : Kanser Mikro Çevresi. Tümör, çeşitli hücrelerle sitokin ve kemokin gibi büyüme faktörlerini içeren, kan damarlarıyla sarılı bir mikro çevrenin merkezinde oksijenle fakir, hipoksik ve asidik pH mikro çevresi tasvir edilmektedir (Piñeiro Fernández ve diğ., 2019'dan değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).

2.1.4. Kansere Neden olan Etmenler (Kanserin Etiyolojisi)

Kanserin tetiklenmesinde iki gen ve üç farklı hücresel sistem rol oynar. Bu iki genden biri olan proto-onkogenler, hücre bölünmesini teşvik ederken bir diğeri olan tümör baskılayıcı genler bunu engeller. Bu iki genle sağlanan proliferasyon kontrollerinin yanı sıra hücreler, kontrolsüz hücre bölünmesini önlemeye yardımcı olan üç başka sisteme de sahiptir. Bunlardan ilki olan

deoksiribonükleik asit (DNA) onarım sistemi, DNA'daki hataları tespit ederek düzeltmektedir. İkinci hücrel sistem kontrol sisteminin kurlsızlaşmasıyla hücreye ölüm emri vererek apoptoza yönlendirir. Üçüncü hücrel sistem ise, hücrenin bölünmesini sınırlayan kromozom uçlarındaki telomer adlı DNA parçaları olup kromozomun kopyalanma ömrünü belirlemektedir. Bu iki gen ve üç hücrel sistemdeki mutasyonların birikmesi ile sürecin bozulmasıyla kanser oluşumu tetiklemektedir (NIH, 2007).

Kanser oluşumuna neden olan ajanlar yani karsinojenler, deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalar ve insanların kanser sıklıklarının epidemiyolojik analiziyle tespit edilmiştir (Cooper, 2000). Karsinojenlere maruziyetle birlikte mutasyon olasılığındaki artış kansere yakalanma riskini arttırmaktadır. Bu karsinojenler kimyasal (benzen, aflatoksin, arsenik, asbest vb.), fiziksel (ultraviyole ışını vb.), biyolojik (pirolizidin alkaloitleri, kafein, nikotin vb.) ve radyoaktifler olarak üç grupta incelenebildiği gibi risk dahilinde grupları da mevcuttur. Bunun yanı sıra beslenme alışkanlıkları, alkol tüketimi, enfeksiyonlar ve virüsler de kanser oluşumuna önemli ölçüde etki etmektedir. Aynı şekilde kansere yatkınlık taşıyan mutasyonun kalıtsal olarak taşınması da bu olasılığı arttırmaktadır (Baba ve Catoi, 2007; NIH, 2007). İnflamasyon altında olan dokunun artan DNA replikasyonu ve DNA hasarıyla viral genomun konakçı genomuna entegrasyon süreci kolaylaşarak oluşturulan viral proteinlerle onkogenik sürece ilerlenmiş olmaktadır (Tsai ve Chung, 2010).

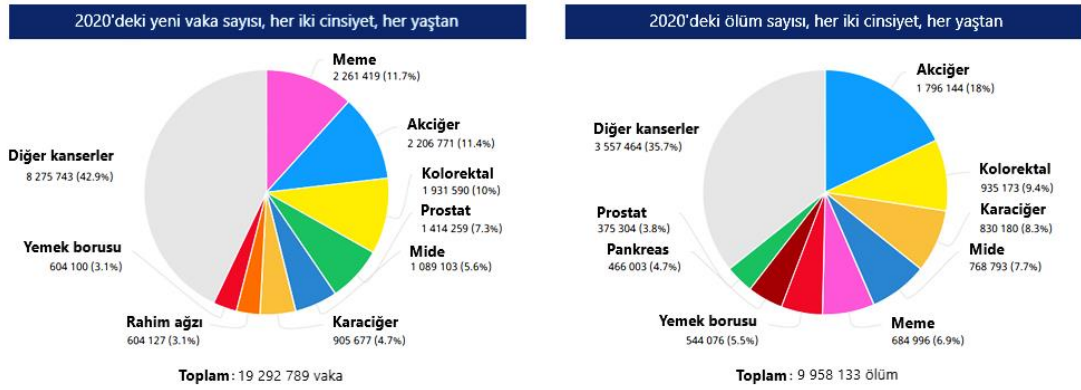
2.1.5. Kanserın Tedavi Yöntemleri

Geleneksel kanser tedavilerinden olan cerrahi operasyon, kemoterapi ve radyoterapi gibi yaklaşımlar kullanılmakta iken modern tedavilerden hormon tedavisi, anti-anjiyojenik, kök hücre tedavileri, immünoterapi gibi yaklaşımlarda mevcuttur (Charmsaz ve diğ., 2019). Cerrahi operasyon erken evrede en etkili yöntem olarak yer alırken, radyasyon ve kemoterapi tedavisi sağlıklı dokulara da zarar vermektedir. Kanser kaynaklı zararları gidermek, tedavi sorunlarını ortadan kaldırmak ve ilaç direncini önlemek için yeni tedavi arayışları gün geçtikçe artmış ve yenilikçi, gelişmiş bakış açısıyla çeşitli tedavi yöntemleri ve bunların kombinasyonel yaklaşımları ortaya çıkmıştır. Son zamanlarda hedefe yönelik tedavi, ablasyon tedavisi, epigenetik tedaviler, nanopartiküller, gen terapisi, doğal antioksidanlar, radyonik, kemodinamik tedavi, sonodinamik terapi, ferroptoz bazlı tedavi ve dendritik hücre bazlı immünoterapi gibi önemli ilerlemeler kaydedilmektedir. Hedefe yönelik yaklaşımlar içinde moleküler hedefli ilaçlar, antikor ilaçları ve küçük molekül inhibitörleri yer alırken,

kemoterapötikler ile sinerjistik stratejileri üzerine de yaklaşımlar da dikkat çekmektedir (Debela ve diğ., 2021).

2.1.6. Kanser Epidemiyolojisi

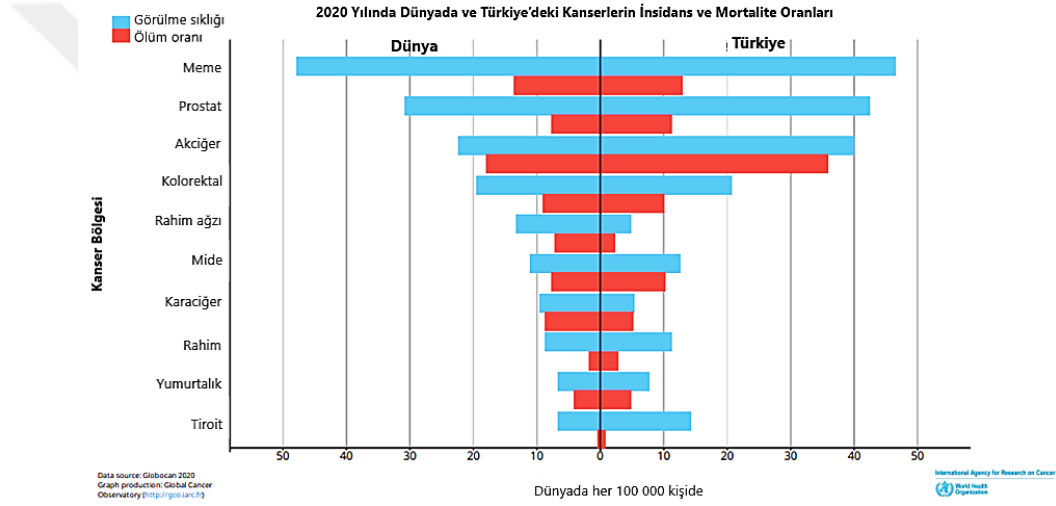
Uluslararası Kanser Araştırma Ajansına (IARC) göre her beş kişiden birinin yaşamı boyunca kansere yakalanacağı tahmin edilirken, Dünya Sağlık Örgütü'ne göre 2020 yılında yaklaşık 20 milyon yeni kanser vakası ve 10 milyon kanserden ölüm ile kanser, dünya çapında ikinci önde gelen ölüm nedenidir. Prostat ve tiroid kanserleri 5 yıllık sağkalım ~%100 ile en iyi prognoza sahipken, yemek borusu, karaciğer ve özellikle pankreas kanserleri en kötü prognoza sahip olup ilerlemiş mide, mesane, yemek borusu, karaciğer ve pankreas kanserlerinin 5 yıllık sağkalım $\leq$ %5'tir (Mattiuzzi ve Lippi, 2019). En sık teşhis edilen kanser kadınlarda olup meme kanseridir (toplam vakaların %11,7'si). Bunu sırasıyla akciğer (%11,4), kolorektal (%10,0), prostat (%7,3) ve mide (%5,6) kanserleri takip etmektedir (Şekil 2.5). Erkeklerde en sık karşılaşılan akciğer kanseri (toplam kanser ölümlerinin %18,0'ı), kanser kaynaklı ölümlerin başında gelmektedir. Bunu sırasıyla kolorektal (%9,4), karaciğer (%8,3), mide (%7,7) ve kadın meme (%6,9) kanserleri takip etmektedir. Kanser ölüm oranları cinsiyet farkına göre, kısmen kanser türlerinin dağılışındaki farklılıklar nedeniyle erkeklerde kadınlara göre %43 daha yüksek insidansla iki kat daha fazladır (Sung ve diğ., 2021).



Şekil 2.5 : 2020 Yılında Dünyadaki Yeni Kanser Vakalarının ve Kanserden Ölümlerin Oranları. (Globocan, 2020'den değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).

Dünyada her altı ölümden biri kanserle ilişkili iken Türkiye'de bu oran her beş ölümden biri şeklindedir. Türkiye'de 2020 yılında kansere bağlı ölüm sayısı yaklaşık 126.335 olup akciğer,

mide, pankreas, meme ve kolon kanserlerinin en yüksek ölüm oranına sahip vakalardır (Şekil 2.6). 2009-2019 yılları arasında değerlendirilen Türkiye verilerine göre 2009 ile 2014 yılları arasında kansere bağlı toplam ölümlerde bir artış olurken 2014-2019 yıllarında ise düşüş yaşanmıştır. Erkeklerde akciğer, mide ve kolon kanserine bağlı ölümler 2014 ve 2015 yılı itibarıyla azalmış olup, pankreas kanserine bağlı ölümler ise tüm dünyada olduğu gibi her iki cinsiyette de artış göstermektedir. Kadınlarda meme ve akciğer kanserine bağlı ölümlerde yüksek bir eğilim söz konusu iken erkeklerde yıllar içinde artış, azalma şeklinde seyreden akciğer kanseri için değişkenlik söz konusu olup en yüksek oranda ölüme sebebiyet veren kanserdir (Tekere ve Ay, 2022).



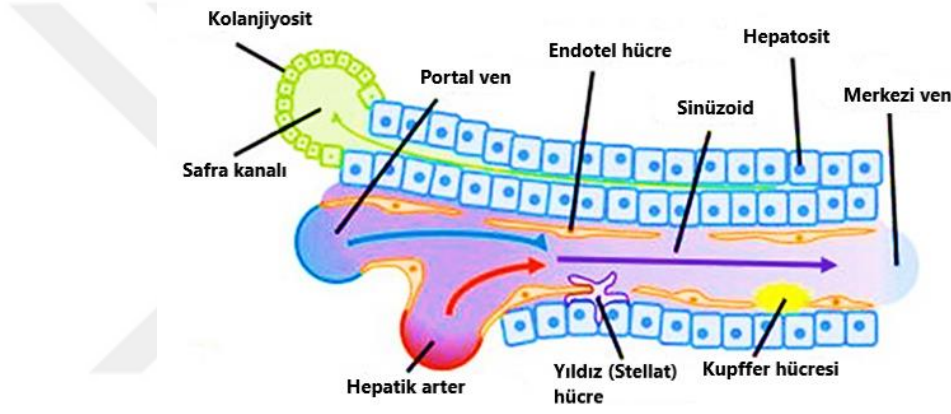
Şekil 2.6 : 2020 Yılında Dünyada ve Türkiye'deki Kanserlerin İnsidans ve Mortalite Oranları. (Globocan, 2020'den değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).

2.1.7. Karaciğer Kanseri

2.1.7.1. Karaciğer Fizyolojisi ve Histolojisi

Karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasında önemli bir yere sahip olan karaciğer; hepatositler, safra epitel hücreleri (kolanjiyositler), yıldız (Stellat) hücreler, Kupffer hücreleri ve karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerinden oluşmaktadır (Trefts ve diğ., 2017) (Şekil 2.7). Yetişkin karaciğerinde kök hücrelerin varlığı tartışılmakta iken progenitor hücrelerin varlığı da söz konusudur. Karaciğer gelişimi sırasında hepatositler ve kolanjiyositler ortak bir öncü/kök hücreden kaynaklanmaktadır (Sia ve diğ., 2017). Karaciğer

hacminin çoğunluğunu oluşturarak fonksiyonel çalışmanın çoğunu üstlenen hepatositler, granüler sitoplazmalı ve bir/iki nükleuslu poliploid hücrelerdir. Karaciğerin birincil epitel hücre popülasyonu olan hepatositler ve daha az yoğunlukla diğer hücre tipleri birlikte sinüzoid alanları oluştururlar (Trefts ve diğ., 2017; Jiang ve diğ., 2018). Normal karaciğer içinde hareketsiz olan hepatositlerin, hepatik hasar durumunda veya parsiyel hepatektomiyle birlikte karaciğer kütleğinde oluşan azalma sonucunda karaciğerdeki hücresel dönüşümleri hızla artmaktadır. Yüksek proliferatif potansiyele sahip olan bu hücreler sayesinde karaciğer hastalıklarının artık standart bir tedavisi olan insan karaciğer organ nakline olanak sağlamaktadır (Sia ve diğ., 2017).



Şekil 2.7 : Karaciğerin Fonksiyonel Birimi Olan Hepatik Lobül Organizasyonu. Hepatositler mavi renkte; kolanjiyositler yeşil renkte; yıldız (Stellat) hücre mor renkte; Kupffer hücresi sarı renkte; endotel hücreleri turuncu renkte gösterilmiştir (Trefts ve diğ., 2017'den değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).

2.1.7.2. Karaciğer Kanseri

Genomik profil ve mikro çevre olarak incelendiğinde heterojen olan karaciğer tümörleri aynı veya farklı tümör içinde bulunabilirken, aynı tümör tipine sahip hastalar arasında dahi oldukça moleküler heterojeniteye sahiptir. Karaciğer kanserleri, köken aldıkları hücreye ve histolojik özelliklerine göre sınıflandırılan olumsuz prognoza sahip malign tümör grubunu içermektedir (Sia ve diğ., 2017; Sevic ve diğ., 2019). Epitelyal olmayan karaciğer kanserleri oldukça nadir görülmektedir (Srivatanakul ve diğ., 2004). Karaciğer mezenkimal kanserleri tüm karaciğer malignitelerinin çok azını kapsamakla birlikte bunlar; anjiyosarkom, leiomyosarkom, embriyonal sarkom ve lenfoma kanserleridir. Oldukça nadir rastlanan bu tümörler karaciğer

tümörleri ile aynı özellikleri taşıırken daha hızlı ilerleme göstererek erken metastazla yüksek maligniteye sahiptirler (Watson ve diğ., 2016).

Hepatoselüler karsinom (HCC), hepatositlerden kökenlenerek primer karaciğer kanserinin en yaygın türü olarak tüm karaciğer kanserlerinin yaklaşık %75'ini oluşturmaktadır. Fibrolameller karsinom diğer karaciğer kanseri türlerine göre tedaviye daha duyarlı olan nadir bir karaciğer karsinom türüdür (Srivatanakul ve diğ., 2004; Ananthakrishnan ve diğ., 2006; Markman, 2023). Kolanjiyokarsinom, safra kanalı kanseri olarak da bilinir ve karaciğerde safrayı safra kesesine taşıyan safra kanallarındaki epitel hücreler olan kolanjiyositlerden kökenlenerek meydana gelir. İntrahepatik safra kanalı kanseri karaciğerde bulunan kanallarda gelişirken ekstrahepatik safra kanalı kanseri, karaciğer dışındaki kanallarda gelişerek iki tipe ayrılmaktadır (Srivatanakul ve diğ., 2004; Markman, 2023). Hepatik anjiyosarkomu, karaciğerin kan damarlarında başlar ve hızla büyüyüp genellikle ileri evrede teşhis edilerek karaciğer kanserlerinin yaklaşık %1'ini oluşturan nadir bir yumuşak doku sarkomudur (Srivatanakul ve diğ., 2004; Chaudhary ve diğ., 2015; Markman, 2023). Hepatoblastoma, karaciğerin loblarında meydana gelen ve bir hepatosit öncüsü olan hepatoblastlardan kaynaklandığı düşünülen malign bir embriyonal tümördür. Görülmesi nadir olsa da pediatrik hastalarda sık görülen karaciğer kanseridir. (Srivatanakul ve diğ., 2004; López-Terrada ve diğ., 2014; Markman, 2023). Nadir oluşumlardan biri de karışık hepatoselüler kolanjiyokarsinom olarak adlandırılan, hepatoselüler ve kolanjiyoselüler özelliklerin birleştiği tümörlerdir (Maximin ve diğ., 2014).

2.1.7.3. Karaciğer Metastazları

Karaciğerin metastatik (ikincil) tümörleri birincil tümörlerinden daha yaygın görülmektedir (Watson ve diğ., 2016). Karaciğere metastazlar iki önemli duruma bağlanmıştır. İlki karaciğerin hem portal ven dolaşımını hem de kan dolaşımının damarlanarak karaciğerde metastaz olasılığını arttırmaktadır. Diğeri ise hepatik sinüzoidal epitelin sahip olduğu, metastatik hücrelerin karaciğer parankimine daha kolay nüfuz etmesini sağlayan damarın iki bölüme ayrılıp paralel seyretmesi ve birleşmesiyle sonlanan fenestrasyonlardır (Ananthakrishnan ve diğ., 2006). Karaciğere metastaz yapan en yaygın kanser kolorektal kanseri olmakla birlikte pankreas kanseri, meme kanseri, melanom ve akciğer kanseri de bunu izlemektedir. Özellikle gastrointestinal sistem kanserleri portal ven dolaşımı aracılığıyla venöz kandan karaciğere metastaz yapma eğilimi taşımaktadır. Karaciğer, kemik ve akciğerlerden sonra meme kanseri metastazının en çok karşılaşıldığı üçüncü organdır (Tsilimigras ve diğ., 2021).

2.1.7.4 Hepatoselüler Karsinoma ve Moleküler Biyolojisi

Hepatoselüler karsinoma, genetik faktörler, çevresel karsinojenler, çeşitli virüsler ve inflamasyonla birlikte bir çeşit prokarsinojenik alan oluşturan kronik karaciğer hastalıklarından gelişerek oluşum süreci hepatokarsinogenez adıyla anılan malign bir primer karaciğer kanseridir (Zucman-Rossi ve diğ., 2015). Hepatokarsinogenez sürecinde, tümör mikro çevresindeki farklılıklarla birlikte inflamasyon, oksidatif stres ve hipoksi gibi birçok hücrel koşulların yanı sıra sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörlerinin transkripsiyonu ve aktivasyonu, DNA hasarı ve DNA metilasyonu dahil diğer pek çok moleküler mekanizmaların birbiriyle etkileşimini içermektedir. Pek çok araştırma inflamasyon ile kanser gelişimi arasında güçlü korelasyon ortaya koyduğundan içlerinden hepatik hasar ve inflamasyon ilişkisiyle HCC, karsinogenezde önemli bir araştırma konusudur (Alqahtani ve diğ., 2019). Hepatoselüler karsinom, sitolojik olarak hepatositlerin farklılaşmasıyla oluşan tümör olarak morfolojik, genetik ve terapötik yanıtlarıyla heterojendir (Calderaro ve diğ., 2017; Asafo-Agyei ve Samant, 2023). Hepatokarsinogenezin aşamaları; erken lezyonlar seyreden düşük dereceli makronodüller ilerleyerek yüksek dereceli makronodüllere dönüşmesiyle, farklılaşan displastik hepatositlerle oluşan erken evre HCC daha sonra hepatik neoplazmayla gelişen ilerlemiş HCC olarak bilinmektedir (Alqahtani ve diğ., 2019; Calderaro ve diğ., 2019). Genellikle doğum kontrol hapı kullanan genç kadınlarda, hepatositlerin nadir bir monoklonal benign proliferasyonu olan hepatoselüler adenomun malign dönüşümünden kökenlenen HCC'lerde görülmektedir (Nault ve diğ., 2013; Zucman-Rossi ve diğ., 2015). Prognozu tümör yüküne ve karaciğer fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak değişmektedir (Asafo-Agyei ve Samant, 2023). Hepatoselüler karsinom genomu, tümör başına 35 ila 80 arasında değişen kodlama bölgelerindeki ortalama mutasyonla somatik genetik değişikliklerin eşsiz bir kombinasyonudur (Zucman-Rossi ve diğ., 2015).

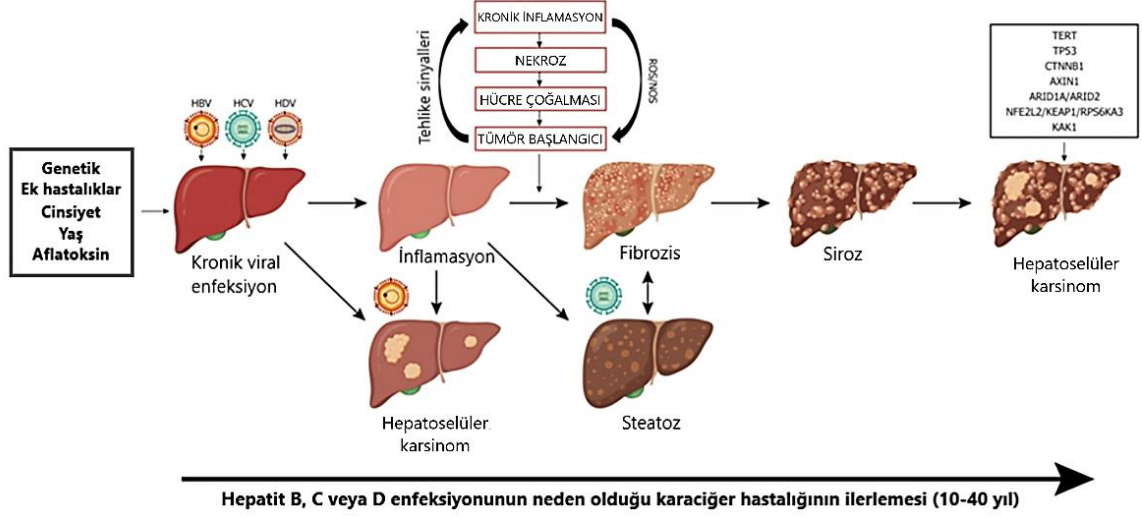
Hepatik progenitör (öncü) hücrelerin, karaciğer kök hücrelerinin veya hepatositlerin hepatokarsinogenezi başlatabilen tümör başlatan ana hücre olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (Köhn-Gaone ve diğ., 2016). Hücrel heterojenite sergilediklerinden HCC üzerinde yapılan yüzey belirteci çalışmalarıyla birlikte kanser kök hücreleri varlığıyla hepatokarsinogeneze öncü olabileceğine dair bulgular artmaktadır (Schneller ve Angel, 2019). Hepatik kanser kök hücreleri aşırı çoğalma yetenekleriyle, tümör oluşumundan nüksetmeye, metastaz ve kemorezistans dahil karsinogenezin birçok sürecinden sorumludur. Karaciğer

hasarının devamında gelen karaciğer rejenerasyon uyarısıyla başlayarak, karaciğer kök/progenitor hücrelerinin aktivasyonu ile aşırı ve sürekli sinyalin kendini yenilemeyi sürdürerek düzensiz hepatosit proliferasyonunun ardından hepatik inflamasyonu tetikleyip hepatokarsinogenezi indüklediği bir mekanizma söz konusudur (Wang ve Sun, 2018; Alqahtani ve diğ., 2019).

İyi farklılaşma gösteren HCC hücreleri normalden küçük ve daha yoğun iken orta derece farklılaşmaya geldiğinde hücreler daha çok eozinofilik sitoplazmaya, psödoglandlara, farklı nükleollere, safraya sahip olarak daha hacimlidir. Kötü farklılaşmış hücreler ise hiperkromatik çekirdeklere sahip büyük tümör hücreleri, belirgin pleomorfizmle birlikte iç hücreli alanları oluşturmaktadır. Daha çok görülen trabeküler görüntüsünün aksine psödoasinar, kompakt veya sarkomatoid modellerde HCC'lerde mevcuttur (Asafo-Agyei ve Samant, 2023). Hepatokarsinogenez içinde hepatositler klonal proliferasyonla farklılaşır ve olgunlaşmamış fenotip edinerek yüksek bir proliferatif kapasite kazanmaktadır (Köhn-Gaone ve diğ., 2015). Hepatoselüler karsinom genel olarak iki moleküler gruba ayrılmaktadır. Proliferatif olan grupta, hücre çoğalması/hayatta kalması ve hücre döngüsündeki ilerlemeyle ilgili sinyallerin aktivasyonu ve artışı görülmektedir. Kötü prognoza sahip olarak agresif fenotipli bu grup, hepatit B virüsü (HBV) ilişkili HCC'lerde çoğunlukla bulunmaktadır. Diğer proliferatif olmayan grupta ise WNT sinyalinin aktivasyon baskınlığı söz konusu iken tümörlerin transkriptomu normal hepatik fizyoloji özelliklerini taşımaktadır. Etiyolojik olarak hepatit C virüsü (HCV) ilişkili HCC'lerde ve alkolle ilişkili HCC'lerde sıklıkla görülen gruptur (Zucman-Rossi ve diğ., 2015).

İlerleyen karaciğer hasarıyla birlikte yıldız hücreleri aktifleşerek retinoid içeren lipid damlacıklarını kaybederler ve ekstraselüler matris üreten miyofibroblast benzeri hücrelere dönüşümleriyle hepatik fibrozisin başlamasına neden olurlar. Farklılaşan yıldız hücreleri, fibroenez sırasında yukarı regüle edilen ve immün hücrelerinden gelen inflamatuvar sinyallerin düzenlenmesini sağlayan proliferatif (platelet türevli büyüme faktörü ve fibrojenik dönüştürücü büyüme faktörü β , TGF- β) sitokinlere daha duyarlı olmaktadır (Parsons ve diğ., 2007; Tsai ve Chung, 2010). Kontrolsüz ilerleyen fibrozdan sonra siroza geçişle gözlenen karaciğer dokusundaki azalma, toksik metabolit birikimiyle HCC riskini arttırmaktadır (Friedman, 2008; Tsai ve Chung, 2010). Sirozdan malign dönüşüme geçerken, fibrozisle çevrili ve portal sistem aracılığıyla aşırı proliferatif hücrelere farklılaşan hepatositler, artan invazyon

ve metastatik yetenekleriyle yeni arteriyel damarlar tarafından vaskülarize edilmektedir (Zucman-Rossi ve diğ., 2015).



Şekil 2.8 : Karaciğerdeki Kronik Viral Enfeksiyonun HCC'ye Dönüşümü. Karaciğer inflamasyonunun şiddetlenmesiyle artan nekroz üzerine başlayan rejeneratif proliferasyon tümöre gidebilirken fibröz veya karaciğer yağlanması (karaciğer steatozu) da gidebilmektedir. Fibröz ise siroza evrilirken sirozdan sonra karaciğerde HCC olduğu gösterilmektedir (D'souza ve diğ., 2020'den değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).

Kronik inflamasyonu takiben fibrozis, siroz, nekroz ve rejenerasyon aracılığıyla gelişen HCC; rejeneratif nodüllerin, displazinin ve kanseri teşvik eden hayatta kalma ve proliferasyon sinyallerinin üretilmektedir (Sia ve diğ., 2017; Asafo-Agyei ve Samant, 2023) (Şekil 2.8). Bu koşullar altında oluşan tümörler spesifik bir mikro çevre içinde karaciğer ve kanser hücrelerinin yanı sıra çeşitli sitokinler, kemokinler, hücre dışı matris, immün hücreler ve diğer bileşenlerle birlikte hücrel ve hücrel olmayan yapıların oluşturduğu dinamizmle tümöral ortamın gelişmesine ve ilerlemesine uygun farklılaşma ortamı sağlamaktadır (Sia ve diğ., 2017; Fu ve diğ., 2019; Sevic ve diğ., 2019). Kronik inflamasyon, sürekli aktif haldeki immün hücrelerin DNA'ya zarar veren ve neoplastik farklılaşmaya neden olan serbest radikallerinin ortama yayılımını ortaya koymaktadır. Birçok kronik karaciğer hastalığında aşırı ekspresyonuyla ECM'deki değişiklikler hepatositlerin tümöral dönüşümünü kolaylaştırmaktadır (Sevic ve diğ., 2019). Karaciğer, patojen saldırısını ve tümör oluşumunu önlemek için baskılayıcı immün yanıt oluşturabilen tolerojenik, toleransı indükleyen antijenlere sahip, bir yapıya sahiptir. Buna rağmen inflamasyona bağlı tümör oluşumunda HCC'de ortaya çıkan immün kaçış özelliği söz

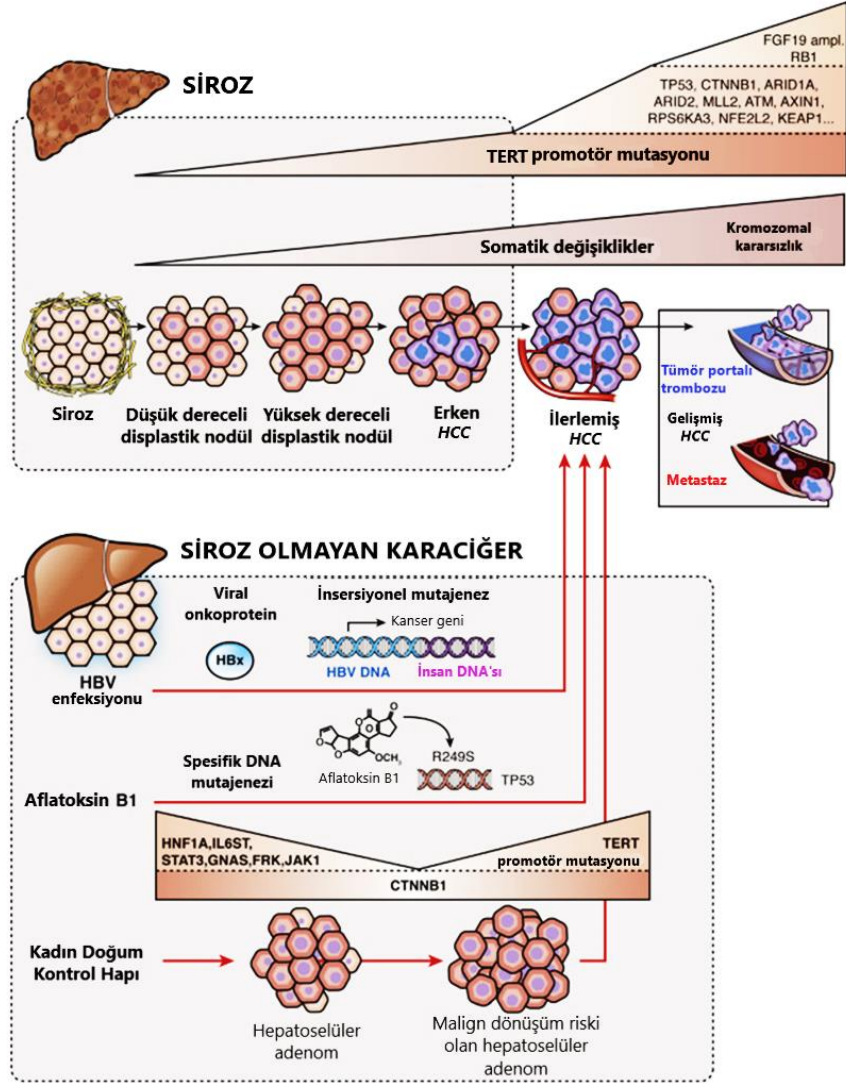
konusudur. Tümör mikro çevresinde immünsüpresif hücreler biriktikçe, hatalı antijen sunumuyla beraber inhibitör reseptör-ligand yollarının aktivasyonu dahil birçok immün baskılayıcı mekanizmanın kazandırdığı immün toleransla HCC'nin ilerlemesi teşvik edilmektedir. Bu sebeple antitümöral bağışıklığı uyandırmak için HCC'nin mikro çevresindeki bastırılan immün ortam açıklığa kavuşturulmalıdır (Fu ve diğ., 2019). HCC vasküler anormallere sahip olduğu bilinen hepatik hiyalüronik asit birikimiyle de tümör dokusu sertliği artan en vaskülarize katı tümörlerdendir. Tümörün ilerlemesiyle uyarılan ECM ile yeni damar oluşum süreci başlamaktadır (Sevic ve diğ., 2019) HCC'nin gelişimi ve ilerlemesi açısından büyük önem taşıyan proliferasyonun yanında anjiogenezde oldukça önemli bir mekanizmadır. Hipervaskülarize bir tümör olan HCC içinde, orta derece farklılaşma aşamasındaki malign hücrelerin damarları istila ederek metastaz yapmasına anjiogenez neden olmaktadır. Damarlanmayı ve tümör ilerlemesini teşvik edici en önemli faktör olarak vasküler endotelial büyüme faktörü olmakla birlikte sirotik karaciğerde yüksek düzeyde seyrederek kötü prognozla ilişkilidir. Sirozda meydana gelen rejeneratif nodüller, normal hepatositlerden displastik hepatositlere dönüşümü başlatırken neoplastik lezyonların oluşumu için uygun bir mikro çevre oluşturarak genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesiyle HCC ile sonuçlanmaktadır (Alqahtani ve diğ., 2019) (Şekil 2.9).

Telomer kısalması gösteren sirotik dokuda telomeraz aktivitesinin azalmasıyla telomeraz ters transkriptaz (TERT) mutasyonları sonrası telomeraz reaktivasyonu, siroz patogenezi ve tümör gelişiminde oldukça önemlidir (Satyanarayana ve diğ., 2004; Zucman-Rossi ve diğ., 2015). HBV viral genomun insan genomunun TERT promoterine eklenmesiyle oluşan mutasyonlar HCC hastalarının %60'ında görülmektedir (Asafo-Agyei ve Samant, 2023). Hepatit B virüsü kaynaklı HCC, onkogenik viral proteinlerin aracılığıyla kanser genlerinde HBV insersiyonel mutagenezi olan viral genomdan kökenlenerek ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.9). Hepatoselüler karsinoma neden olan tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) bulunmaktadır. Polimorfizmler, kanser risk faktörlerine olan yatkınlığı, kronik karaciğer hastalığının ciddiyetine ve siroza evrimiyle malign dönüşüm ve tümör ilerlemesi aşamalarında HCC gelişimini düzenlemektedir. SNP'lerden tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), interleukin (IL)1- β veya TGF- β yoluyla iltihaplanma içeren karsinogenezin biyolojik yollarını değiştirirken, süperoksit dismutaz 2 (SOD₂) veya miyeloperoksidaz (MPO) aracılığıyla oksidatif stres üzerinden bu yolları düzenlemektedir (Zucman-Rossi ve diğ., 2015).

HepG2 hücrelerinde interferon (IFN)- γ , TNF- α , TGF- β , makrofaj koloni faktörü, oncostatin-M, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12 ve IL-6R gibi birçok faktörün mRNA ekspresyonları gösterilmiştir (Russwurm ve diğ., 1998). IL-10, immün yanıtı susturabilen bir sitokin olarak immün hücrelerin inflamatuvar sitokinlerinin üretimini azaltmaktadır (Zhang ve diğ., 2021). Yapılan çalışmalar sonucunda IL-10'nun HepG2 hücrelerinde nükleer faktör kappa B (NF- κ B)'yi aktifleştirerek apoptozdan korunmasını sağlamaktadır. Böylece kanser sağkalımı artmaktadır (Santiago-Lomelí ve diğ., 2005). IL-8, tümörlerin gelişmesi ve ilerlemesi için önemli olup, kanser hücresinde ekspresyonu arttıkça proliferasyon, tümör büyümesi, tümör inflamasyonu, anjiyogenez ve metastazda da artışlar gözlenmektedir (Lima ve diğ., 2016). Lima ve arkadaşları (2016), IL-8 azalmasına bağlı hücre büyümesinin azabildiğini göstermişlerdir.

Epigenetik modifikasyonlar, HCC'de sıklıkla karşılaşılmaktadır. Çeşitli epigenetik kompleksler fizyolojik rolü kromatin yapısını ve nükleozom pozisyonunu değiştirdiğinden hücrenin transkripsiyon kaderini belirlerler. Mikotoksin aflatoksin B1 (AFB1) ile ilişkili HCC, guanindeki AFB1-DNA eklentileri sebebiyle, yüksek oranda C>A mutasyonlarına ve TP53'te R249S mutasyonlarının spesifik bir noktasına yol açan spesifik bir mutasyon imzası mevcuttur (Zucman-Rossi ve diğ., 2015) (Şekil 2.9).

HCC'nin moleküler özellikleri, prognozu ve tedaviyi etkilediği bilindiğinden hepatokarsinogenezin mekanizmalarını anlamak ve hepatokarsinogenez sırasında kronik doku hasarı, inflamasyon ve immün tepkiyi kontrol eden sinyal yollarını incelemek oldukça önemlidir. Örneğin, HCC hücrelerinde vasküler endotelyal büyüme faktörü A gen amplifikasyonunu barındırdığından, anti-anjiyogenik bir multikinaz inhibitörü olan sorafenib tedavisine karşı daha duyarlı olduğu bulunmuştur (Horwitz ve diğ., 2014; Alqahtani ve diğ., 2019) ve Rudalska ve arkadaşları (2014) mitojenle aktive olan protein kinaz 14'ü tedavi direncine karşı bir çözüm olarak yeni bir hedef olarak tanımlamışlardır.



Şekil 2.9 : Karaciğerin Siroz Etkisinde veya Siroz Olmadan HCC Geliştirmesi. Sirozla başlayan TERT promotör mutasyonu ve somatik değişimlerle başlayan displastik nodüller ilerleyerek HCC gelişimine neden olmaktadır. Siroz olmadan da HBV enfeksiyonuna ve AFB1'e bağlı mutasyonlar ile HCC oluşumu gösterilmiştir (Zucman-Rossi ve diğ., 2015'ten değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).

2.1.7.5. Hepatoselüler Karsinoma Metastazları

HCC ilerledikten sonra metastaz yapma eğilimi artar, karaciğerin dışına olan metastazlarına ekstrahepatik metastazlar denilmektedir (Kummar ve Shafi, 2003). Ekstrahepatik metastazlar, HCC'nin periton boşluğuna yırtılarak metastatik fenotipli tümör hücrelerinin birikip yayılım göstermesiyle peritoneal yüzeylere yerleşip doğrudan yayılabilmektedir. Periton, karın duvarı ve diyafram haricinde safra kesesi, kolon, mide ve adrenal bezler gibi diğer komşu organlara

da doğrudan yayılımı göstermektedirler (Arora ve diğ., 2021). Bunun yanı sıra diğer iki yayılım şekli kan ve lenf damarlarını kullanarak invazyonla gelişmektedir (Becker ve diğ., 2014). HCC öncelikle hematojen, arterlerden venlere geçerek, yayılımla metastazlarının en yaygını akciğer ve kemiktir. Portal venin tümöral invazyonun daha yaygın iken hepatik venlerde de invazyonla yayılım görülmektedir (Arora ve diğ., 2021). En yaygın HCC ekstrahepatik metastazı sırasıyla akciğer, lenf nodu, kemik, adrenal bezler ve beyin iken (Harding ve diğ., 2018; Asafo-Agyei ve Samant, 2023) rektum, dalak, diyafram, duodenum, özofagus, pankreas, seminal vezikül ve mesane gibi nadir görülen ekstrahepatik metastazlar mevcuttur (Becker ve diğ., 2014).

2.1.7.6. Hepatoselüler Karsinoma Neden Olan Etmenler

Hepatoselüler karsinom, birçok risk faktörlerinin neden olduğu kronik karaciğer hastalığından gelişmektedir. Bunlardan özellikle viral hepatit enfeksiyonlarına neden olan HBV, HCV ve hepatit D (HDV) virüsüyle birlikte başka bir nedene bağlı kronik hepatit ve kriptojenik sirozu olan hastalarda da hepatoselüler karsinom ortaya çıkmaktadır (D'souza ve diğ., 2020; Lotfollahzadeh ve diğ., 2023) (Şekil 2.8). Dünyada tanımlanan HCC olgularının %20'sine HCV neden olduğu bilinmektedir. HCV ilişkili HCC çoğunlukla sirozlu hastalarda veya ileri evre fibrozlu hastalarda görülmektedir (Asafo-Agyei ve Samant, 2023). Son dönemlerdeki çalışmalar karaciğer kanserinin %56'sının HBV ile ilişkili bulurken, %20'sinin ise HCV ile ilişkili olduğu görülmüştür (Maucourt-Boulch ve diğ., 2018). HCC'nin yaklaşık %20 ila 25'i fibrotik olmayan karaciğerlerde ortaya çıkmaktadır. Bununla beraber HBV ilişkili HCC'ler fibrotik olmayabilirken, HCV ilişkili HCC'lerin çoğunluğu sirotik karaciğerlerde gelişmektedir (Ananthakrishnan ve diğ., 2006).

Mantar metaboliti AFB1, alkol ve sigara tüketimi gibi faktörlerin yanı sıra alkolsüz karaciğer steatohepatiti, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı, siroz, obezite ve diyabet gibi hastalıklarda hepatoselüler karsinom yakalanma riskini artırmaktadır (Lotfollahzadeh ve diğ., 2023). AFB1, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* mantarları tarafından üretilen bir mikotoksin olup, hepatokarsinogenezi çoğunlukla tümör baskılayıcı genin (p53) mutasyonu yoluyla gerçekleşmektedir. AFB1, kronik HBV hastaların HCC riskinin artmasıyla da ilişkilidir. Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı, adından da anlaşıldığı üzere alkol kullanımı olmaksızın hepatositlerin aşırı yağlanmasıyla ortaya çıkan metabolik sendromlara bağlı olarak gelişmektedir. Bu metabolik sendromlar ise insülin direnci, hipertansiyon, hipertrigliseridemi

ve abdominal obezitesi olan hastalarda bulunmaktadır. Alkol doğrudan veya dolaylı olarak siroz yoluyla HCC'ye neden olabilmektedir (Asafo-Agyei ve Samant, 2023).

Meme veya kolorektal kanserlerinde olduğu gibi kanserlere yatkınlıklardan yaygın görülen monojenik sendromlar, karaciğerde nadir görülürken kanser gelişimine etki etmemektedir (İstisnai olarak, APC mutasyonları mevcuttur) (Zucman-Rossi ve diğ., 2015). HCC yatkınlıkları ise çeşitli genetik metabolik hastalıklarla birlikte gözlenmekte olup, nadir görülen monojenik hastalıklar arasında vücutta aşırı demir birikimi (hemokromatoz) veya aşırı bakır yüklenmesi (Wilson hastalığı), tirozinemi tip 1, akut aralıklı porfiri veya porfiria kutenea tarda ve $\alpha 1$ antitripsin eksikliği bulunmaktadır. Ayrıca glikoz metabolizmasında meydana gelen genetik değişikliklerle, örneğin glikojen depo, genetik karaciğer adenomatozis oluşumuyla beraber sonrasında siroz olmadan nadiren malign olan HCC'ye dönüşüm teşvik edilmektedir (Zucman-Rossi ve diğ., 2015; Asafo-Agyei ve Samant, 2023). Hemokromatoz hastalarının karaciğerinde biriken demir serbest radikallerin üretimine yol açarak yüksek seviyelerde nitrik oksite bağlı p53 mutasyonlarının görülme sıklığı arttırarak karsinogeneze katkıda bulunmaktadır. Hastaların çoğunda siroza bağlı HCC gelişimi görülürken sirozdan bağımsız HCC vakaları da saptanmıştır (Ananthakrishnan ve diğ., 2006).

2.1.7.7. Hepatoselüler Karsinom Tedavi Yöntemleri

Genellikle HCC vakaları, etkili tedavinin artık sınırlı olduğu ileri evrelerde teşhis edilmektedir (Schneller ve Angel, 2019). Kronik hepatit antiviral/anti-inflamatuvar tedavisi, alkolün veya sigaranın bırakılması ve HBV aşılması ile HCV/HDV taraması HCC gelişimini azaltmaktadır. Hepatoselüler karsinomun genomik heterojenliği nedeniyle zorlaşan, potansiyel hedefe yönelik tedavi çalışmaları devam etmektedir (Ananthakrishnan ve diğ., 2006; Lotfollahzadeh ve diğ., 2023). İnterferon bazlı tedaviler hakkındaki çalışmasında Nahon ve arkadaşları (2017), HCV'ye karşı uygulanan antiviral tedaviden oluşan viral yanıtın fibrozdan bağımsız HCC riskini azalttığını bildirmişlerdir.

HCC hastalarının çoğu (%70) cerrahi tedavi olan rezeksiyon veya transplantasyona uygun değilken uygun adaylar erken evreye sahip olanlardır. Cerrahi tedavi dışındaki terapötik yaklaşımlar ise ablasyon, radyofrekans ablasyonu, transarteriyel kemoembolizasyon ve inhibitörler gibi farklı lokal tedavi çeşitleri bulunmaktadır (Lotfollahzadeh ve diğ., 2023).

Transarteriyel kemoembolizasyon (TACE), sitotoksik ajanların intraarteriyel infüzyonuyla besleyici arterin tümöre embolizasyonudur (Asafo-Agyei ve Samant, 2023).

HCC için hedefe yönelik sistemik tedavi alanları geliştirilmekte olup tirozin kinaz inhibitörleri, monoklonal antikorlar (ramucirumab) ve immün kontrol noktası inhibitörleri (nivolumab ve pembrolizumab) gibi terapötik yaklaşımlar üzerine çalışılmaktadır. 2007 yılında HCC'nin sistemik tedavisi için Gıda ve İlaç İdaresi'nden (FDA) onay alan ilk tirozin kinaz inhibitör (TKI) sorafenibtir (Wai Ling Khoo ve diğ., 2019). Bir multikinaz inhibitörü olan sorafenibe karşı intolerans gösteren hastalar veya tümör ilerlemesi gösteren hastalara ikinci basamak tedavi uygulanmaktadır. Başka multikinaz inhibitörleri olan regorafenib ve lenvatinib, ileri evre HCC tedavisinde ikinci basamak tedavidir. Diğer ikinci basamak antikanser ilaçlar arasında kabozantinib, ramucirumab ve nivolumab yer almaktadır (Asafo-Agyei ve Samant, 2023). Tümör hücrelerinin kendilerini immün sistemden koruyup kaçmak için kullandığı immün kontrol noktasını bloke eden ilaçlarla immünoterapik hedefleme sonucu HCC vakalarında araştırılmaktadır. Hali hazırda nivolumab bir kontrol noktası inhibitörü olarak TKI'lerle tedavi edilmiş HCC'li bireylerin ikinci basamak tedavisi için FDA tarafından onaylanmaktadır (Alqahtani ve diğ., 2019).

2.1.7.8. Hepatoselüler Karsinom Epidemiyolojisi

2020'de dünyada yaklaşık 900.000 kişiye karaciğer kanseri teşhisi konulurken yaklaşık 830.000 kişi bu hastalıktan öldü. Dünyadaki en yaygın beşinci kanser olan hepatoselüler karsinom, kansere bağlı ölümlerdeki sıralaması her geçen yıl yükselmektedir. Yeni vakaların %80'inden fazlası, Sahra Altı Afrika, Güneydoğu Asya ve Çin gibi HBV enfeksiyon yükünün fazla olduğu gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir. HCC'nin beş yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %18'dir (Asafo-Agyei ve Samant, 2023). Erkeklerde görülme sıklığı 100.000'de 11,5 iken kadınlarda bu oran 3,9'dur (Lotfollahzadeh ve diğ., 2023). HCC, erkeklerde akciğer kanserinden sonra kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir. (Asafo-Agyei ve Samant, 2023). Genellikle devam eden kronik karaciğer hastalığından sonra yaşlı popülasyonda ortaya çıkan HCC'nin (Lotfollahzadeh ve diğ., 2023) sirozlu hastalarda yıllık görülme sıklığı %2-4'tür. Yerleşen beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak obezite ve diyabetin artmasıyla 2016-2030 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri'nde HCC görülme sıklığının %122 oranında artması öngörülmektedir. (Asafo-Agyei ve Samant, 2023).

2.2. HÜCRE ÖLÜMÜ MOLEKÜLER MEKANİZMALARI

Homeostazın sağlanması için hücre çoğalmasındaki dengeye bağlı olarak hücrelerin ölümü gerekmektedir. İnsan vücudunda sıklıkla gerçekleşen bu döngü patolojik şartlarda düzensizleşebilmektedir. Onkogeneze varlığında ise susturulan hücre ölümü, ilaç direncine neden olarak hastanın kaderini belirlemektedir (Galluzzi ve diğ., 2007). Büyüme faktörleri (sitokinler gibi) tarafından aktive edilmesi gereken bir sinyalin eksikliği sonucu hücre ölümü görülmektedir. Bu durum omurgalılarıdaki sinir sisteminin gelişimindeki nöronların bir kısmı bu süreçte nörotrofik faktör eksikliğinden öldüğünden önemlidir (Buss ve diğ., 2006; Green ve Llambi, 2015).

Hücrenin ölümü, bu süreçteki morfolojik değişimlere göre, apoptotik, nekrotik ve otofajik; bu süreçteki enzim ölçütüne göre, nükleazlar, kaspazlar veya katapsinler; bu süreçteki fonksiyonel özelliğine göre, programlı, kazara, fizyolojik veya patolojik; bu süreçteki immünolojik özelliklerin varlığına/yokluğuna bağlı olarak sınıflandırılmaktadır (Galluzzi ve diğ., 2007). Hücre ölümüne büyük ölçekli bakıldığında morfolojik değişikliklerle üç farklı biçimde ele alınarak genel olarak apoptoz (tip I hücre ölümü), otofajik hücre ölümü (tip II hücre ölümü) ve nekrozdur (tip III hücre ölümü) başlıkları olarak sınıflandırılmaktadır. (Green ve Llambi, 2015; Galluzzi ve diğ., 2018)

İpekböceği *Antheraea pernyi*'de gelişim esnasında kaslardaki segmentler arası hücre ölümünü tanımlamak için ilk kez 'programlı hücre ölümü' terimi kullanılmıştır (Lockshin ve Williams, 1965). Böcek kasındaki bu ölüm otofajik görünürken kullanılan programlı hücre ölümü terimi genelleşerek *Caenorhabditis elegans* nematodu ve memelilerde apoptozun yerine de kullanılmıştır. Nekroz ise kazara hücre ölümü olarak fizyolojik olmayan stresin sonucunda değerlendirilmiştir. Ancak nekroz sürecine göre genetik olarak önceden belirlenip programlı olmaktadır (Galluzzi ve diğ., 2007). Buna örnek olarak memeli gelişimindeki kondrositlerin ölümü (Roach ve Clarke, 2000) veya bağırsak epitel hücrelerini homeostazisinde meydana gelen nekrozun programlı hücre ölümü gösterilmektedir (Barkla ve Gibson, 1999).

2.2.1. Apoptotik Hücre Ölümü

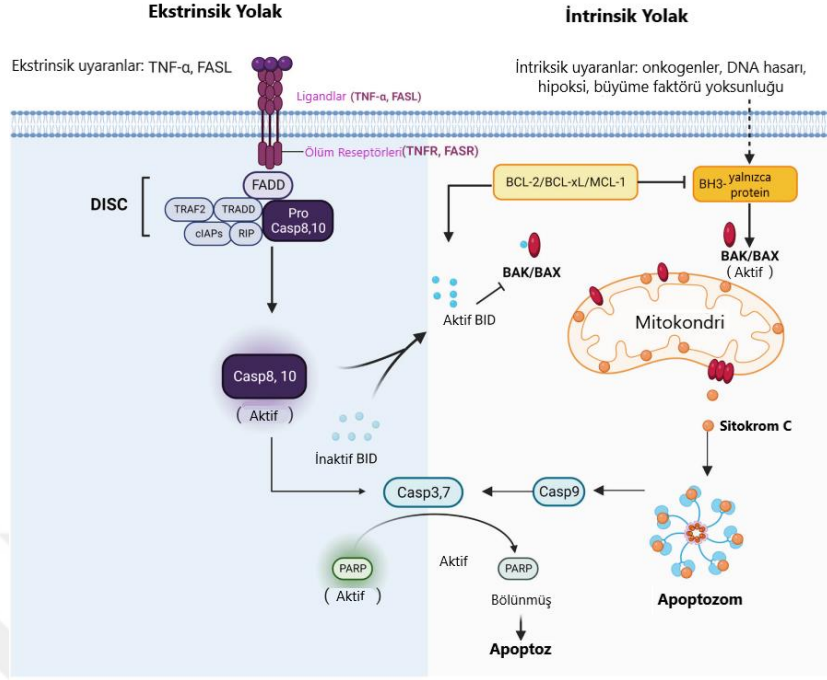
Kerr ve arkadaşlarının (1972) yayınladığı makalede ilk kez kullanılan ‘apoptoz’ terimi farklı bir hücre ölümünü adlandırmaktadır. Apoptoz, Yunanca yaprak anlamına gelen ‘apo’ ve Yunanca düşme anlamına gelen ‘ptosis’ kelimelerinden bir ağaçtan düşen yapraklar anlamına gelerek hücrelerin kendilerini kontrollü olarak yok etme sürecini tanımlamak için kullanılmaktadır (Kerr ve diğ., 1972; Alberts ve diğ., 2002). En çok çalışılan hücre ölümünden biri olan apoptozun spesifik morfolojik özellikleri kromatin yoğunlaşması (nükleer piknoz), nükleer parçalanma (karyoreksis) ve apoptotik cisimciklerdir. Hücresel yoğunlaşmanın ilerleyerek plazma zarının taşmasıyla oluşan tomurcuklanmadan kaynaklanan apoptotik cisimcikler, fagositik hücrelerce yutularak lizozomlarında parçalanmaktadır. (Galluzzi ve diğ., 2007; 2018).

Apoptoz dışsal (ekstrinsik) yol ve içsel (intrinsik, mitokondriyal) yol olarak iki farklı sinyal yolu ile tetiklenmektedir (Park ve diğ., 2023). Her iki sinyal yolu da kaspaz proteazları aktive olur ve hücre içi proteinlerin bölünmesiyle hücrenin parçalanması ile sonuçlanmaktadır. Başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, kaspaz-8 ve kaspaz-9) ve efektör kaspazlar (kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7) olarak apoptozda göre almaktadırlar (Green ve Llambi, 2015). Sistein proteazlar olan kaspazların bir kısmı, aktifleşebilmek için büyük ve küçük alt birimleri arasında proteolitik bölünmektedirler (Salvesen ve Riedl, 2008). Başlatıcı kaspazlar bölünmeyle değil adaptör moleküllerce aktifleşerek konformasyonel olarak değişmektedirler (Green ve Llambi, 2015).

Dışsal yolak, hücre dışından gelen ligandların (TNF; Fas ligandı, TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand) hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (TNF ve Fas reseptörlerine) bağlanarak aktifleşmektedir (Park ve diğ., 2023). Ligand-reseptör bağlantısıyla ölüme giden sinyal kompleksleri oluşturularak adaptör protein (Fas ile ilişkili ölüm alanını, FADD; TNF reseptörüyle ilişkili ölüm domaini, TRADD) aracılığıyla, kaspaz-8 ve kaspaz-10 gibi başlatıcı kaspazları yaklaştırır ve proteaz aktivitesi ile harekete geçirmektedir (Dickens ve diğ., 2012). Başlatıcı kaspazların aktif domaini, kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 gibi efektör kaspazların öncü formlarını parçalayarak aktive ederek apoptozu indüklemektedir (Park ve diğ., 2023) (Şekil 2.10).

Mitokondriyal yol olarak da bilinen içsel yol, apoptozun en yaygın mekanizması olarak DNA hasarı (genotoksik ajanlar veya DNA onarımındaki kusurlar) oluşması, büyüme faktörü

eksikliği veya endoplazmik retikulum (ER) stresi (katlanmamış proteinlerin birikmesi) gibi birçok hücrel stres içinde hücrenin onarılamayacak kadar hasara varan durumlarında apoptoz etkinleşmektedir (Green ve Llamby, 2015). Mitokondriyal dış membran geçirgenliğini (MOMP) indükleyici, Bcl-2 protein ailesinden anti-apoptotik proteinler (Bcl-2 ve Bcl-xL), pro-apoptotik proteinler (Bax ve Bak) ve BH3 proteinlerine (Bim, Bid, Bad ve Noxa) bağlı olarak apoptoz düzenlenmektedir. Bcl-2 proteinleri otofaji ve mitokondriyal füzyon gibi hücrel diğer olayları da regüle etmektedir (Chipuk ve diğ., 2010). MOMP, mitokondri zarları arasındaki proteinlerin (sitokrom c, Smac ve Omi) sitoplazmaya salınmasını sağlamaktadır (Tait ve Green, 2010). Bu süreçte pro-apoptotik BH3 proteinlerinin aktivasyonu, anti-apoptotik proteinleri inhibe ettiğinden Bax ve Bak proteinleri harekete geçmektedir. Mitokondri dış membrana bağlı olan Bak ve sitozolde çözünebilen Bax inaktif halde bulunurken oligomerize olarak aktifleşip mitokondri membranında gözenekler oluşturmasıyla MOMP'a neden olmasıyla sitokrom c sitoplazmaya salınmaktadır. Mitokondri zarları arasından sitoplazmaya geçen sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1'e bağlanarak oligomerizasyonla apoptozom oluştururken kaspaz-9'u etkinleştirmektedir (Green ve Llamby, 2015; Park ve diğ., 2023). Smac ve Omi proteinleri ise, X'e bağlı apoptoz proteini inhibitörünü (XIAP) baskılayarak apoptozom etkinliğini arttırmaktadır (Eckelman ve diğ., 2006). Kaspaz-9 ise efektör kaspazları bölerek aktifleştirir ve apoptozu ilerletmektedir (Green ve Llamby, 2015; Park ve diğ., 2023) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 : Apoptozun İki Farklı Sinyal Yolağı. Ekstrinsik yol ile hücre dışı uyarılarla başlayan apoptoz sinyal kaskadı iletimi ve intrinsik yol ile hücre içi uyarılarla başlayan diğer apoptoz sinyal kaskadının kesişimleri söz konusudur (Park ve diğ., 2023'ten değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).

2.2.1.1. Apoptoz ve Kanser

Kanserin ayırt edici özelliklerinden kontrolsüz büyüme, anjiyogenez ve apoptozdan kaçınmak yer almaktadır. Apoptotik kontrol kaybedilince kanser hücresi uzun süre hayatta kalmaktadır. Tümörün ilerlemesiyle biriken mutasyonlar, istilayı artırırken anjiyogenez uyarımı ile hücre proliferasyonu desteklenmektedir (Pfeffer ve Singh, 2018). Apoptoz, kansere karşı bir savunma mekanizması olarak onkogenlerin aşırı ekspresyonu veya mutasyonuyla olağandışı mitojenik sinyallere yanıt olarak aktifleşen p53'e bağlı olarak da indüklenmektedir. Bu sebeple apoptozdan kaçınmak kanserogenez için önemli olup kanserin ilerlemesine karşı bir engel olarak çıkmaktadır. Örneğin; epitel veya endotel hücrelerin ECM'den kopmasıyla, bağlanmamış integrin reseptörleri hayatta kalma sinyal uyarımını bırakarak apoptoza neden olduğundan metastatik kanseri önlemektedir (Sever ve Brugge, 2014). Birçok kanser türünde kaspaz genlerinde mutasyon ve delesyonlar görüldüğünden yaygın olarak kanserde apoptozun içsel yolu baskılanmaktadır (Pfeffer ve Singh, 2018). Bazı kanser hücrelerin MOMP'den sonra bile ölümden kaçabildiğini araştırmalar göstermektedir (Lopez ve Tait, 2015).

Hepatokarsinogenezi teşvik eden birçok karaciğer hasar ve hastalık türleriyle ilişkili hücre ölümü yanıtları tanımlanmıştır (Kondylis ve Pasparakis, 2019). Karaciğer kanseri gelişiminde sinyal yollarının yanı sıra hücre ölümü süreçleri de önemlidir. Bunlardan en çok apoptoz ve nekroz temelde yer alsa da otofaji, piroptoz gibi diğer hücre ölüm türlerinin de HCC gelişimi ve ilerlemesi üzerine ilişkisi yer almaktadır (Galluzzi ve diğ., 2018). HCC'deki hücre ölüm yollarının önemini anlamak hücre ölümü regülasyonu ve beraberinde gelen değişiklikler tanı ve tedavi açısından değerli olmaktadır. Karaciğerdeki aşırı hücre ölümü de kanser gelişimini tetiklemektedir (Marquardt ve Edlich, 2019). Artan hepatosit hasarıyla birlikte gelen hücre ölüm sinyalinin ardışık aktivasyonu, kanserin başlaması için bir ortam sağlarken tedavi etkinliğine de engel olmaktadır (Pinyol ve diğ., 2014).

Karaciğer kanserinde hepatositlerin genomik kararlılığı için önemli bir yere sahip olan Bcl-2 proteinlerinin aşırı ekspresyonu ve dengesizliğiyle ilgili değişiklikler, apoptoz yanıtının bozulmasıyla kronik karaciğer hastalıklarıyla da ilişkili olmaktadır (Marquardt ve Edlich, 2019). Bcl-2 onkogen olmamasına rağmen uğradığı mutasyonel değişimlerle tümör başlangıcını arttırmaktadır. Çoğu kanser tipinde aşırı ekspresyonu söz konusu (Lopez ve Tait, 2015) olduğundan içsel apoptoza karşı dirençli tümör hücreleri oluşmaktadır (Pfeffer ve Singh, 2018). Ölüm reseptörüyle aktifleşen apoptoz sinyal yolunda dahi hücreler Bax/Bak etkinliğiyle apoptotik yanıtlarını güçlendirmeye gittiklerinden hedefe yönelik antitümöral stratejilerin terapötik yaklaşımları hücrelerde Bax/Bak etkileşimine dayanmaktadır. İleri HCC durumlarında Bcl-x aktivasyonu yükselirken Bax'ın aşağı regüle olduğu ve p53'e bağlı değişiklikler gözlenmektedir. HCC'de yaygın olarak görülen XIAP'a bağlı kaspaz inhibisyonu ile prometastatik özellikler sergilemektedir (Marquardt ve Edlich, 2019). Hepatositlerdeki oksidatif strese bağlı olarak oluşan NF- κ B, kronik hasara karşı hayatta kalma sinyaline aracılık ederken baskılanmasıyla malign dönüşüme aracılık etmeye başlamaktadır (Luedde ve Schwabe, 2011).

Geleneksel antikanser ilaçları kanser hücrelerindeki Bcl-2/Bax üzerindeki mekanizma ile kanser hücrelerini öldürmeyi hedeflemektedir (Yip ve Reed, 2008). Bu hedefli mekanizmanın bozulmasıyla ilaçlara karşı içsel bir kemorezistans oluşmaktadır. Apoptoz mekanizmasındaki bozukluklar, tümörlere uygulanan kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavilerin ilaca karşı dirençe karşılaşmasına neden olmaktadır. Oluşan bu direnç ayrıca immün yanıtı karşı direnci de etkilemektedir (Pfeffer ve Singh, 2018).

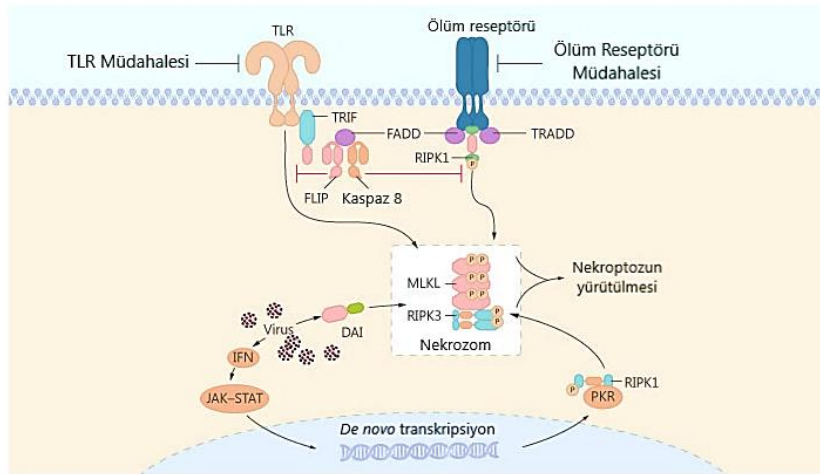
2.2.2. Nekrotik Hücre Ölümü

Yunanca ölü veya ceset anlamında ‘nekros’ ile yıkım ve dejenerasyon anlamındaki ‘osis’ kelimelerinin birleşmesiyle oluşan ‘nekroz’ (necrosis) terimini başlangıçta kimin kullandığı tam bilinmemekle birlikte en eski kullanım cerrah Bousselin tarafından 1786'da yazılan makalede geçmektedir (Bousselin, 1789; Park ve diğ., 2023). Bu makalede nekroz enfeksiyon kapsamındaki doku ölümü manasında kullanıldığından hücresel düzeydeki nekroz terimini ilk kez Rudolf Virchow kullanmıştır (Park ve diğ., 2023). Nekroz, geri döndürülemez hücre hasarına bağlı mitokondri fonksiyon bozukluğu, artan hücre hacmi (onkoz) ile ATP tükenmesi, organellerin şişmesi ve plazma zarı bütünlüğünün kaybolarak yırtılmasıyla hücre içeriğinin dokuya yayılıp doku hasarına neden olan bir hücre ölüm türü olarak tanımlanmaktadır (Ruffolo, 1964; Galluzzi ve diğ., 2007; Tonnus ve diğ., 2019). Nekroz, yaralanma, travma veya enfeksiyona bağlı oluşan bir yanıt olarak ortaya çıkmaktadır (Park ve diğ., 2023). Geri dönüşümsüz hücre bütünlüğünü bozan bu hasarlar; hipoksi, yüksek sıcaklık, mekanik stres ve ağır metal maruziyeti ile karşı karşıya kaldığında sinyal yolu gerektirmeksizin ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte nekroz her zaman kazara değil bir sinyal kaskadı ile de oluşmaktadır (Green ve Llambi, 2015; Khalid ve Azimpouran, 2023).

En yaygın nedeni hipoksi olan nekroz sırasında oksijen eksikliğinden ötürü iyon dengesi bozulan hücrede, mitokondri içinde reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi artarken adenosin trifosfat (ATP) gittikçe tükenmektedir. Buna göre plazma zarındaki enerjiye bağlı sodyum pompasının arızalanması hücreye kalsiyum ve su girişinin artmasına neden olmaktadır (Nicotera ve diğ., 2004; Golstein ve Kromer, 2007; Khalid ve Azimpouran, 2023). Sıvı artışıyla hücredeki organeller şişer ve artan sitozolik kalsiyum, membranların ve proteinlerin parçalanmasına neden olan fosfolipazlar ve proteazlar gibi enzimlerin etkinleşmesine yol açmaktadır. (Khalid ve Azimpouran, 2023). Plazma membran bütünlüğü ve organel zarlarının bozulmasıyla hücre patlamaktadır (Nicotera ve diğ., 2004; Golstein ve Kromer, 2007; Khalid ve Azimpouran, 2023).

Programlanmış nekrotik hücre ölümü, kontrolsüz nekrozdan farklı olarak apoptozla ortak birkaç basamak paylaşmaktadır (Khalid ve Azimpouran, 2023). Ölüm reseptörleri, Toll benzeri reseptörler ve T hücresi reseptörü gibi hücre yüzey reseptörlerin ligasyonu, reseptörle etkileşime giren protein 1'in (RIP1) kinazın aktifleşmesine neden olmaktadır (Green ve Llambi, 2015; Khalid ve Azimpouran, 2023). Aktifleşen RIP1 kinaz (RIP1K), RIP Homotipik Etkileşim

Motifi (RHIM) etkileşimi sonucu reseptörle etkileşime giren protein 3 (RIP3) ile birleşerek, RIP3 otofosforilasyonunu yönlendirmektedir. Aktif RIP3 kinaz (RIPK3), karışık soy kinaz domain benzeri proteinin (MLKL) fosforilasyonunu katalizlemektedir. Bunun sonucunda programlı nekrozun sinyalleşme yolunu yürüten bir nekrozom kompleksi (RIPK1-RIPK3-MLKL, Kompleks IIB) oluşmaktadır (Negroni ve diğ., 2015; Liu ve Jiao, 2019). MLKL oligomerleri plazma zarında, belirli fosfatidilinositollerin fosfat türlerine çevrilmesine neden olarak plazma zarı geçirgenliğini tetiklemektedir (Galluzzi ve diğ., 2018). RIP kinaza bağlı programlanmış nekroz, nekroptoz adıyla anılmaktadır (Degterev ve diğ., 2005). Bu mekanizmanın yürümesi için kaspaz 8 inhibisyonuyla apoptozun bloke edilmesi gereklidir. DNA hasar sinyali, hiçbir reseptör sinyali olmadan da nekrozom oluşumuna neden olmaktadır (Tenev ve diğ., 2011; Green ve Llambi, 2015). Nekroptoz, ölüm reseptörünün yanı sıra viral enfeksiyon gibi patolojik şartlarda oluşurken RIPK1 tetikleyicisine ihtiyaç duymamaktadır (Wallach ve diğ., 2016) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 : Programlanmış Nekroz Ölüm Yolağı. Nekroptoz indükleyicisi olan nekrozom oluşumuna giden sinyal iletimi ve viral enfeksiyon proteinlerinin bu oluşuma ilgisi gösterilmiştir (Linkermann, 2014'ten değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).

2.2.2.1. Nekroz ve Kanser

Büyüyen tümördeki vaskülarizasyon eksikliğiyle besin yoksunluğu ve hipoksi oluşumu görülen tümör merkez alanı, hücre ölümlerinin odağı olmaktadır. Bu alandaki ölü hücre morfolojisi nekrotik bir görünüme sahip olduğu için hücre ölüm odaklarına tümör nekrozu denilmektedir (Jiao ve diğ., 2018; Liu ve Jiao, 2019). Tümör nekroz alanındaki hücreler, hücre içi ROS artışına

bağlı olarak mitokondri fonksiyon bozukluğunun beraberinde ATP tükenmesiyle tetiklenen nekroz ortaya çıkmaktadır. Serbest kalan hücre içi bileşenler de inflamasyonu artırıp, immüniteyi baskılayabilecek şekilde mikro çevre içindeki kanser hücrelerinin hayatta kalmasını etkilemektedir. Nekroinflamasyon adıyla bu durum kronik ve düzensiz hale ilerleyerek kanserde prognozunu kötüleşmesine neden olmaktadır (Yee ve Li, 2021).

Tümör nekroz alanında, MLKL fosforilasyonu tespit edildiğinden tümör nekrozunda nekroptozun da devreye girdiği anlaşılmaktadır (Jiao ve diğ., 2018; Liu ve Jiao, 2019). Tan ve arkadaşlarının, (2020) yapmış oldukları çalışma, hücre ölümünden sorumlu RIPK1'in inflamasyonu ayrıca karaciğer fibrozisi ve HCC'yi teşvik edici özelliklerini tanımlamaktadır. RIPK1 aktivitesiyle proinflamatuvar kemokinlerin transkripsiyonu, makrofaj infiltrasyonu ve hepatik yıldız hücrelerinin aktivasyonu düzenlenmektedir (Tan ve diğ., 2020).

Karaciğer hasarı düzenleyicisi RIPK1 için inhibitörlerinden nekrostatin gibi terapötik stratejiler üzerine çalışmalar sürmektedir (García-Pras ve diğ., 2021). Programlanmış nekroz oluşturduğu inflamatuvar yanıtlarla karsinojenik ortama katkısının ve HCC'deki rolüne dair Koo ve arkadaşlarının (2015) yapmış olduğu çalışma Huh-7, HepG2 ve Hep3B gibi insan karaciğer hücre hatlarında RIPK3 ekspresyonunun metilasyona kaybı nedeniyle nekroptozun baskılandığını göstermektedir. Kanser hücreleri malign dönüşüm ve hücre ölümünden kaçınmak için RIPK3 ifadesini düzenlerken kemoterapiye de duyarlılık kazanmışlardır (Koo ve diğ., 2015; García-Pras ve diğ., 2021).

Nekrozda dışarı salınan hücre içeriği, lokal inflamasyona neden olurken fagositik özellikli immün hücreleri (makrofaj ve nötrofil gibi) nekrotik dokuya çekerek hücre göçünü başlatmaktadır (Nicotera ve diğ., 2004; Golstein ve Kromer, 2007). Bu sebeple hücre ölümünün oldukça immünojenik bir şekli olarak kabul edilmektedir (García-Pras ve diğ., 2021). Tüm bu ölüm sinyalinin yanı sıra kanser hücrelerinin hayatta kalmasını da sağlayabilen inflamatuvar tepkileri ve immün hücrelerinin infiltrasyonu da indüklenebileceğinden tümör nekroz gelişimi kanser mikro çevresi için modülatör görev görmektedir (Yee ve Li, 2021).

2.2.3. Otofajik Hücre Ölümü

Otofaji, sitoplazmik bileşenler ve organellerin çift katlı membrandan oluşan otofagozom yapılarında tutularak lizozomal parçalanmaya götürdüğü bir hücre ölümü sürecidir. Yunancada benlik anlamındaki 'auto' ve yeme/yutma anlamına gelen 'phagy' sözcüklerinin birleşmesiyle

kendi kendini yiyen anlamında ‘otofaji’ (autophagy) ortaya çıkmaktadır (Galluzzi ve diğ., 2017; Park ve diğ., 2023). Terim olarak otofaji şu anki kullanımına en yakın haliyle ilk kez Christian de Duve tarafından 1963 yılında lizozomlar üzerine yapmış olduğu yayın içerisinde kullanılmıştır (Ktistakis, 2017). Hücre ölümü olarak otofaji ise 1975 yılında Nevalainen tarafından ilk defa tanımlanmıştır. Otofajiyle ilgili mekanizmalar ise 1990'larda Yoshinori Ohsumi tarafından otofajiyle ilişkili genleri tanımlamasıyla çalışmalar hız kazanmıştır (Ohsumi, 2014).

Hücrede otofajinin aktifleşmesiyle oluşmaya başlayan büyük sitoplazmik vakuoller hücre ölümüne neden olmaktadır. Otofaji hücrenin hem hayatta kalması hem ölümü ile ilişkilidir. Normal şartlarda hücredeki toksik bileşenleri yok etmek, enerji için besinlerin geri dönüştürülmesini, homeostaziyi ve hayatta kalmayı sağlamak için kullanılan bir mekanizma iken, besin eksikliği, oksidatif stres, organel hasarı ve çeşitli ajanlara maruz kalan hücre düzensizleşerek otofajik hücre ölümüne gitmektedir (Park ve diğ., 2023). Hücrenin ölümcül stresten kurtulmak için başlattığı bu girişim sürecinin bozulmasıyla başarısızlığa uğrarken, hücre artık kaspazlardan bağımsız olan otofajik ölümü teşvik etmeye başlamaktadır (Shen ve diğ., 2012). Otofaji mayalardan memelilere kadar korunan bir süreçtir (Hurley ve Young, 2017). *Drosophila melanogaster* metamorfozu gibi spesifik olarak gerekli olduğu gelişimsel durumlar da söz konusudur (Berry ve Baehrecke, 2007).

Fagofor olarak başlayan kesecik oluşumu içeriğiyle birlikte kapandığında otofagozom adını almaktadır. Daha sonra lizozom ile birleşerek otolizozom halini alarak parçalanmaya gitmektedir (Green ve Llamby, 2015). Farklı sinyallerle tetiklense dahi otofagozom oluşum yolağında birleşen bir mekanizma olduğu düşünülen seçici olan ve seçici olmayan otofaji olarak bakıldığında; seçici otofaji, hücreye zararlı içerikleri (hasarlı mitokondri, gereksiz peroksizomlar, fazla ribozomlar, lipid damlacıkları ve hücre içi patojenler) uzaklaştırarak geri dönüştürmektedir. Bu içeriklerinin birikiminin kontrolü sağlanmaz ise hastalıklar meydana gelmektedir. Seçici otofajide taşınan materyal otofagozomun boyutunu ve şeklini belirlemektedir (Hurley ve Young, 2017). Ubikitinasyon sistem seçici otofajide paketlerin hedeflenmesi için önem taşımaktadır (Denton ve Kumar, 2019). Seçici olarak gerçekleşen otofajide substratın spesifikliğini, hedeflenen yapı için oluşmakta olan fagofora bağlayan adaptör proteinler belirlemektedir. Örneğin, mitokondrinin otofajik olarak uzaklaştırılması

mitofaji denilen seçici bir süreçtir. (Green ve Llampi, 2015). Seçici olmayan otofaji çoğunlukla besin açlığıyla ilgilidir (Hurley ve Young, 2017).

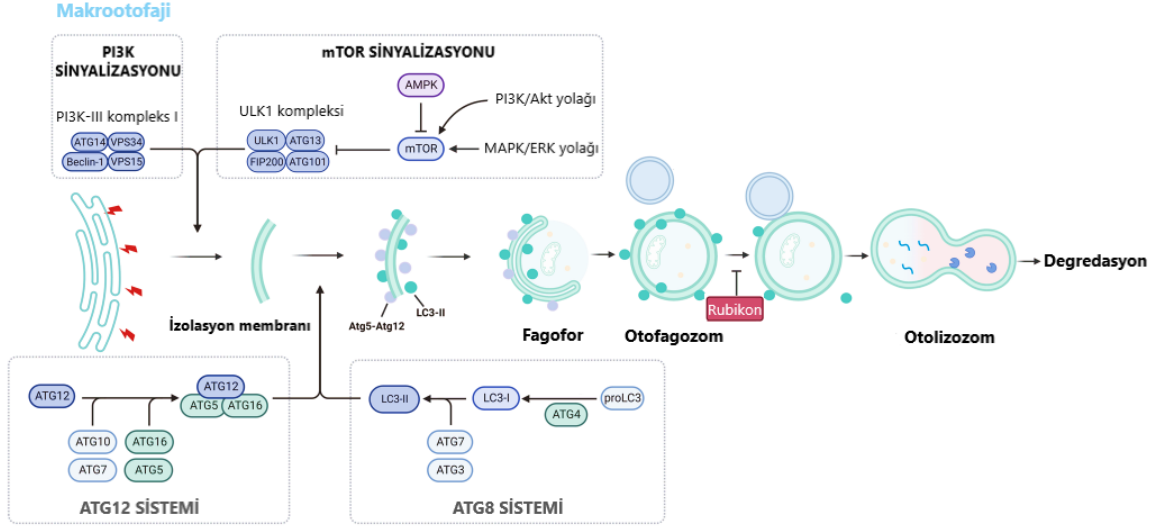
Hücre içi vakuolizasyon ile karakterize edilen (Green ve Llampi, 2015) otofaji üç türe ayrılmaktadır; makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılı otofaji. Yıkıma uğrayacak olan sitoplazmik bileşenleri ortamdan ayırmak için çift katlı membran bir yapı içinde izole edilmesiyle en yaygın olarak görülen makrootofaji süreci başlamaktadır. Mikrootofajide gidişat ayrıca bir kesecik oluşum görülmeden parçalanacak bileşenler direk lizozomlara alınarak olmaktadır. Bir diğer otofaji olarak şaperon aracılığıyla KFERQ benzeri motif içeren proteinleri doğrudan lizozomlara seçici olarak taşıyan bir süreç sonunda yıkıma uğramaktadır (Denton ve Kumar, 2019; Park ve diğ., 2023).

Otofaji, otofajiyle ilişkili genler (ATG) protein ailesi, Beclin-1 ve mikrotübülle ilişkili protein hafif zinciri 3 (LC3) dahil kompleks bir protein ağı ile düzenlenmektedir. ATG proteinleri, fagofor oluşması, uzaması ve kapanması gibi çeşitli aşamalarda bulunmaktadır. Beclin-1 proteini, fagoforun oluşumunda yer almaktadır. LC3 proteini ise fagoforun uzaması, kapanması ve otofagozomun olgunlaşmasında rolü mevcuttur (Park ve diğ., 2023). Otofagozomun, ER zarında omegasom oluşumuyla meydana geldiği yaygın olarak kabul edilmektedir. Öncü kompleksin ER üzerinde ATG9 ile işaretli başka bir yere translokasyonu fosfatidilinositol 3-kinaz içeren ER alanlarında omegasom yapılarını oluşturmaktadır. Golgi-endozomal sistemi, omegasom oluşum alanını çekirdeklendiren, uzamakta olan fagofor membranıyla kaynaşabilen ATG9 keseciklerinin üretimi için oldukça önemlidir (Yu ve diğ., 2018).

Fagoforun oluşması için Unc-51 benzeri kinaz 1 (ULK1), FIP200 ve ATG13'ten oluşan öncü bir başlatma kompleksinin aktive olması gerekmektedir. Bu kompleks, rapamisin kompleksi 1'in memeli hedefi (mTORC1) ve adenosinmonofosfat kinaz (AMPK) ile düzenlenmektedir. ATP sentezi hücredeki tüketim ihtiyacını karşılayamadığında AMP birikerek AMPK'yi aktive etmektedir. Normal şartlarda mTOR aktif sinyali, öncü kompleksin oluşumunu durdurarak otofajiyi baskılamaktayken, stres koşullarında ise mTOR aracılı ULK1 ve ATG13'ün inhibisyonu baskılandığında AMPK, öncü kompleksi aktive etmektedir. Hücrede büyüme faktörleri ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)-AKT yolu, otofajiyi doğrudan beclin-1 aracılığıyla baskılayabilirken dolaylı olarak mTOR aracılığıyla da baskılayabilmektedir. (Green ve Llampi, 2015) (Şekil 2.12).

Öncü kompleks, beclin 1, fosfoinositid 3-kinaz (vakuol protein sınıfı 34, Vps34) ve protein kinaz Vps15'ten meydana gelen başlatma kompleksini aktifleştirerek fosfatidilinositol 3-fosfatın (PI3P) üretilip ATG7'yi fagofora çeken oluşuma neden olmaktadır. Otofagozomun uzayarak kapanması için ATG5-12 ve LC3-fosfatidiletanolamine (PE) ubikuitin benzeri protein konjugasyon sistemlerine ihtiyaç vardır. Her iki sistemde de bulunan ATG7, ligaz benzeri aktive edici enzim olarak gerekli ATG'leri konjuge etmektedir. Son oluşan ATG5-ATG12 konjugatı, fagoforu sabitlemek ve ikinci konjugasyon yolunu bitirebilmek için bir multimerik kompleks oluşturmak amacıyla ATG16L'yi kovalent olmayacak şekilde toplamaktadır (Hanada ve diğ., 2007; Green ve Llambi, 2015). LC3-PE sistemi diğer adıyla LC3 lipidasyonu (Hurley ve Young, 2017) ise LC3, proteaz ATG4 tarafından bölünerek ATG7 ve ATG3'e konjuge olmaktadır. ATG5-ATG12-ATG16L kompleksi, LC3-PE konjugatını (LC3-II) meydana getirmek için LC3'ü PE'ye iletmektedir. LC3-II, otofagozomal membranla birleşip otofagozomların lizozomlara hedeflenerek otolizozomlar halini almasını sağlarken seçici otofaji görevi de görmektedir (Hanada ve diğ., 2007; Green ve Llambi, 2015) (Şekil 2.12).

Otofagozom ve lizozomun kaynaşması için lizozomla ilişkili membran proteini 1/2 (LAMP1/2) gerekli olup (Eskelinen ve diğ., 2004), oluşan otolizozom içindeki izole olan materyaller lizozomal enzimler tarafından parçalanmaktadır (Park ve diğ., 2023). Otofagozom ve lizozom, N-etilmaleimide duyarlı faktör bağlanma protein reseptörü aracılı füzyon oluşumu için önce birbirlerine yaklaşımları gerekmektedir. Bu sebeple otofagozomlar kapandıktan sonra mikrotübüllere bağlanarak lizozomların bulunduğu perinükleer alana taşınmaktadır. Otofagozom-lizozom füzyonu başta dış otofagozomal membran, lizozomun tek membranıyla birleşmektedir. Füzyonun tamamlanması, iç otofagozomal membranın lizozomal hidrolazlar tarafından parçalanıp otofagozomun içeriğini lizozom lümenine boşaltmasıyla meydana gelmektedir (Yu ve diğ., 2018) (Şekil 2.12).



Şekil 2.12 : Makrotofaji Oluşum Mekanizması. Hücrede en sık karşılaşılan otofaji türü olan makrotofaji PI3K ve mTOR sinyalleşmesiyle birlikte çeşitli ubikinyasyon sistemlerinin vakuol oluşumuna katılması ile başlayan otofagozomdan otolizozoma kadar giden süreç şematize edilmiştir (Park ve diğ., 2023'ten değiştirilerek Türkçeştirilmiştir).

Otofajik hücre ölümü aktif H-Ras aracılığıyla dönüşüme uğramış memeli hücrelerinde meydana gelmektedir. ATG5, ATG7 veya beclin 1 inhibe edildiğinde Ras aracılı hücre ölümü de baskılanmaktadır (Elgendy ve diğ., 2011). Apoptoz geçiremeyen memeli hücrelerinde otofaji kaynaklı hücre ölümü ile ilgili genetik kanıtlar bulunmuştur. Otofajiyi sınırlandıran geri bildirim mekanizmaları hasarlandığında otofajik hücre ölümünde artış olmaktadır (Denton ve Kumar, 2019).

2.2.3.1. Otofaji ve Kanser

Onkogenik dönüşüme karşı koruyucu mekanizma olarak düzensiz H-Ras aktivitesine tepki veren otofajik hücre ölümü gözlenmiştir (Elgendy ve diğ., 2011). Transforme hücrelerdeki çalışmalarda aktif Ras ekspresyonu arttıkça otofajik hücre büyümesinin de arttığı desteklenmiştir (Denton ve Kumar, 2019). Otofajik aktivasyon, pro-otofajik genleri aktifleştirip anti-otofajik genleri baskılayarak tümör baskılayıcı olmaktadır (Kundu ve Thompson, 2008). Kanseri hücrelerinde yapılan çalışmalarda otofajiyi karşı karşıya kalınca genetik ve epigenetik düzenlemelerle PI3K-AKT-mTORC1 sinyal yolunda anormaller sergilenmektedir. Hücre, otofaji aracılığıyla inflamasyon ve tümörü baskılanmak amacıyla NF- κ B'yi inhibe ederek ana

düzenleyici I κ B kinazı (IKK) hedefli olarak hasarlamaktadır. Çünkü aktif NF- κ B, inflamatuvar sitokinlerce indüklenen otofajiyi önlemektedir (Ouyang ve diğ., 2012).

Otofaji, tümör gelişimi için gerekli olan oksidatif metabolizmayı çalıştırmaktadır. Karaciğer hasar durumunda iken aktif otofaji, ROS oluşumunu indükleyerek, hücre ölümüne ve ardından gelen hücre çoğalmasına sebep olmaktadır (Kudo ve diğ., 2020). Hücreler, tümör mikro çevresinde alternatif bir enerji kaynağı için kendi kendine sindirim yani otofaji ile hayatta kalmaktadırlar (Liu ve diğ. 2017).

Hepatositlerde displastik aşamasındaki bazal otofaji, yeni hasarlı mitokondriyi ve mutasyonlu hücreleri uzaklaştırmak suretiyle tümör baskılayıcı görevindedir. Diğer bir yandan tümör aşamasındaki dengesiz otofaji, HCC hücresinin hayatta kalmasına sağlarken tümör büyümesini indüklemektedir (Liu ve diğ., 2017). Sun ve arkadaşlarının çalışmasındaki (2013), HCC sıçan modelinde otofaji inhibitörleri, tümör oluşturma aşamasında tümör baskılayıcı iken, displastik aşamada tümörü indükleyici bir etkiye sahiptir. HCC'nin hem oluşumunda hem de gelişiminde otofajinin rolü önemlidir (Liu ve diğ., 2017). Otofaji, HCC hücrelerinin sorafenib gibi sitostatik ilaçlara karşı kemorezistans oluşturduğundan, alternatif terapötik çalışmalar sürmektedir (García-Pras ve diğ., 2021).

2.2.4. Apoptoz, Nekroz ve Otofaji Arasındaki İlişki

Hücre ölümünün çeşitli türleri aynı doku içinde indüklenebilmektedir (Chaabane ve diğ., 2013). Hücrel strese maruziyette apoptozdan önce otofaji öncelik olarak indüklenirken otofajinin etkisiz hale getirilmesiyle nekroz yerine apoptoz oluşmaktadır (Chen ve diğ., 2018). Genetik olarak kontrol edilebilen apoptozun aksine nekroz dış uyaranlara bağlı olarak kontrolsüz oluşmaktadır (Park ve diğ., 2023). Apoptoz veya nekrozdan ziyade otofaji hücrenin hayatta kalmasını veya hücre ölümünü destekleyerek çift taraflı davranmaktadır. Otofaji, nekrotik hücre ölümü üzerinde baskılayıcı olmasıyla hücre hayatta kalmasına daha fazla yardımcı olmaktadır. Otofajinin anti-nekroz işlevi, kanser gibi patolojik durumlarda önemli biyolojik göreve sahiptir (Chaabane ve diğ., 2013).

Apoptoz ve nekrotoz aynı anda oluşabilirken ölüm sinyal yollarının birbiriyle etkileşiminden karşılıklı olarak dönüşebilmektedirler (Chen ve diğ., 2018). Ölüm reseptörleriyle ilişkili bir molekül olan RIPK1, üç ana hücre ölüm yolunu birbirine bağlamaktadır. İncelemeler RIPK1'in kaspazdan bağımsız hücre ölümünde önemli olduğunu

göstermektedir. Nekrotik ve otofajik hücre ölümleri, RIPK1'in varlığında ve kaspaz-8 negatif regülasyonu ile ilişkilidir (Vandenabeele ve diğ., 2006). Kaspaz-8 yokluğunda ise oluşan RIPK1 ve RIPK3 kompleksi nekroptoz ve otofajiyi, apoptoz yerine indüklemektedir (Lu ve diğ., 2011).

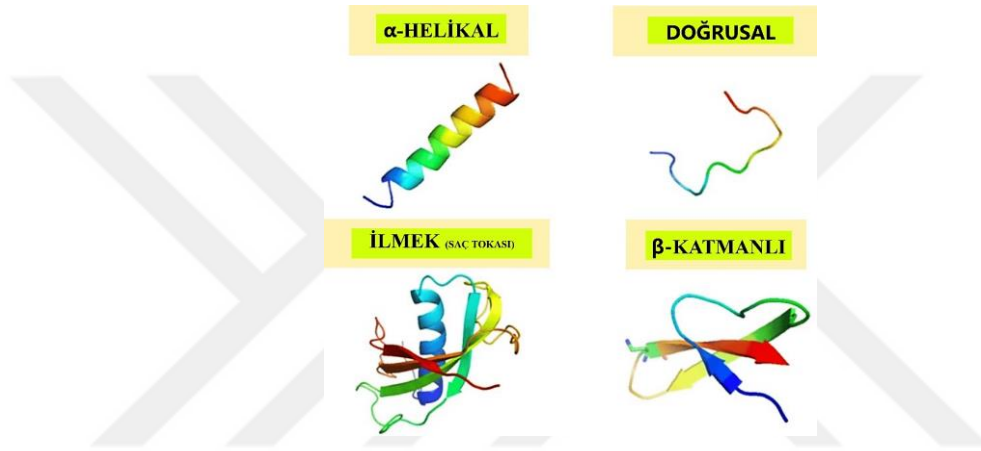
Metabolik stres veya hücre sel ajanlara maruziyetten oluşan ATP tükenmesi, hücre içi kalsiyumun ve ROS'un artmasına neden olurken değişikliklere uyum sağlayamayan hücreler nekroz ile ölmektedir. Hücre sel stres düzenleyicilerinden AMPK aktifleşerek koruyucu görevi görmektedir. AMPK'ye bağlı fosforilasyon, bir yandan mTOR baskılayarak otofajiye neden olurken diğer yandan Bax ve Bak'ı aktifleştirerek, sitokrom c'nin sitozole salınmasıyla kaspaz aktivasyonu ile hücreyi otofajiye veya apoptoza götüren p53'ü de aktive etmektedir. Otofaji baskılanmasıyla p53 aracılı apoptoz artmaktadır. Ayrıca sitoplazmik p53 otofajiyi inhibe etmektedir (Chaabane ve diğ., 2013).

Apoptoza hücre, inhibitörlerle kaspazların baskılanması sonucu nekroza kayabilirken aynı şekilde engellenen erken otofajik aşamada hücre nekrotik bir fenotip kazanabilmektedir (Galluzzi ve diğ., 2007). Beclin1, anti-apoptotik proteinlerle doğrudan etkileşime geçerek otofaji ve apoptozu çapraz düzenlemektedir (Chen ve diğ., 2018). Normal epitelyal hücrelerde FADD aracılı otofaji, apoptoz baskılandığında yani kaspaz inhibisyonu olduğunda belirginleşmektedir (Thorburn, 2008). Fakat apoptoz daha hızla ilerlediği için daha baskındır. Nekroz veya otofaji, apoptoz inhibe edildiğinde meydana gelmektedir (Chaabane ve diğ., 2013). Koruyucu bir mekanizma sahip olan otofaji, nekroptozu engelleyebilirken bazı durumlarda da nekroptozu kolaylaştırdığı görülmektedir (Chen ve diğ., 2018).

2.3. ANTİMİKROBİYAL PEPTİTLER

Antimikrobiyal peptitler (AMP), 100 amino asitten daha kısa, evrimsel olarak korunmuş, pozitif yüklü (katyonik) ve oldukça hidrofobik amino asitlere sahip peptitler olarak karakterize edilmektedir. Geçtiğimiz yıllarda birçok doğal ve sentetik AMP tanımlanmaktadır (Tornesello ve diğ., 2020). İlk tanımlanan AMP, Alexander Fleming'in 1922'de öne sürdüğü lizozim olmaktadır (Fleming ve Allison, 1992). AMP'ler, yapılarına ve aktivitelerine göre sınıflandırılmaktadır (Tornesello ve diğ., 2020). Yapısal özelliklerine göre AMP'ler doğrusal, α -helikal, β -katmanlı ve ilmek (saç tokası) olarak dört gruba ayrılmaktadır (Powers ve Hancock,

2003) (Şekil 2.13). Alanin, lösin ve lizin kalıntılarıyla sarmal yapıyı koruyarak sistein içermeyen ve hücre membranı etkileşimiyle sarmal yapıya gelen α -helikal peptitler en çok çalışılan sınıf olmaktadır (Tornesello ve diğ., 2020). AMP'lerin bir kısmı, bakteriler ve kanser hücrelerine karşı sitotoksik olup normal hücrelere karşı çok daha az sitotoksik iken; bir diğer kısmı bakterilere, kanser hücrelerine ve normal hücrelere de oldukça sitotoksiktir (Hoskin ve Ramamoorthy, 2008). Antimikrobiyal fonksiyonlarının haricinde AMP'lerin, immün hücrelere karşı kemo-çekici aktivite gösterme veya lipopolisakkaritleri nötrleştirme, gibi immünmodülatör yetenekleri de mevcuttur (Zhang ve diğ., 2019).



Şekil 2.13 : AMP'lerin İkincil Konformasyonları. Şekil olarak AMP'ler doğrusal, α -helikal, β -katmanlı ve ilmek (saç tokası) dörde ayrılmış hali resmedilmektedir (Lopes ve diğ., 2022'den değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).

Antikanser peptit (ACP) olarak aktivite gösteren AMP türleri, hücre membranından geçerek hücre içine nüfuz etme gibi kanser hücreleri için öldürücü etkileri mevcuttur (Tornesello ve diğ., 2020). İlk antikanser peptidinin *Xenopus laevis*'ten elde edilen magainin, birçok kanser hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi bulunmaktadır (Gerlach ve diğ., 2010). Tümör hücrelerinin tedavilere karşı gösterdiği ilaç direnciyle yeni terapötik keşifler artmaktadır. İlaç direnciyle baş edebilen peptitlerde, kanser hücrelerine özel hedeflenmesiyle ilgili ilaç çalışmaları söz konusudur (Deslouches ve Di., 2017). Sancar ve Bolkent (2022) yapmış oldukları çalışmada bir AMP olan siklik dodekapeptidin meme kanseri hücre soylarında inceleyerek elde ettikleri kanıtlarla seçici sitotoksitesinin antikanser etkilerini sunmaktadırlar. Antikanser aktivitelerine göre AMP'ler, üç grupta incelenmektedir. Bunlardan ilki doğrudan kanser hücreleri üzerinde etkisiyle sitotoksik, anti-proliferatif ve apoptotik hücre ölümü yoluyla etki gösteren moleküler hedefli peptitlerdir. İkincisi, ilaç bağlayıcı peptitler olarak kanser hücrelerine taşıyıcı olarak

kullanılmaktadır. Sonuncusu ise, kanser hücrelerini öldürmek için immün hücreler gibi etkili hücreleri uyarak tepki oluşturmaya aracı olan grup olmaktadır (Chiangjong ve diğ., 2020).

HCC için yeni tedavi yaklaşımlarından biri olarak değerlendirilen ACP'ler doğrudan öldürme, anti-inflamatuvar özelliği, immünmodülasyonu ve yara iyileştirme adına potansiyel etkileri çalışılmaktadır (Zhang ve diğ., 2019). Mao ve arkadaşlarının (2017) poloxamer 188 içinde kapsüllenen Melittin üzerine yapmış oldukları çalışmada, farelerde inflamatuvar alerjik reaksiyonlar ve toksisite azalmasıyla ilişkili nanolipozomlar formülasyonu oluştururken, HCC büyümesinde baskılanmayla antitümöral aktivite göstermektedir. Bunun gibi peptitlerin spesifik dağıtımı amacıyla nanopartiküller tasarlamak üzerine stratejiler mevcuttur (Deslouches ve Di., 2017).

2.3.1. Antimikrobiyal Peptitlerin Yapısal Özellikleri

Kanser hücresi hedefleyen peptitlerde glisin ve arginin amino asit birimleri ön planda olmaktadır. Glisin, yapısal olarak β -dönüşleri ve siklizasyon için önemliyken; arginin, kanserdeki terapötik yönüyle peptit yapılarında ve biyoaktivitesinde önemlidir. Peptitlerin hücreye nüfuz etme etkinliği arginin sayılarıyla da ilgili olmaktadır. Peptitlerin özelliklerinden biri olan amfipati, hidrofilik ve hidrofobik şartlarda hayatta kalma niteliğidir. Bazı peptitlerin amfipatik α -helikal oluşturan katyonik NH_2 terminalleri, hücre zarındaki anyonik moleküllerle etkileşerek kanser hücrelerine sitotoksik etki gösterme özelliği kazandırmaktadır. ACP aktivitesi için orta derecede (yaklaşık %30) hidrofobik olmaları gerekmektedir (Trinidad-Calderón ve diğ., 2021). AMP'lerin en büyük ikinci grubu olan α -helikal antikanser peptitlerde yaklaşık %40-60 oranında hidrofobik amino asitler mevcuttur (Gabernet ve diğ., 2016). Yapılan çalışmalar sonucunda, α -helikal yapıya sahip olan peptitlerin stabilitesinin daha yüksek olarak peptitlerin antikanser özellikli birçok aktivitesinin ardındaki güç olduğu düşünülmektedir (Li ve Yu, 2015). Nötr pH şartlarında ACP'ler katyonik özellik göstererek yükleri +2 ile +9 aralığında farklılaşırken bunu arginin ve lizin amino asitlerince yapıldığı anlaşılmaktadır (Oelkrug ve diğ., 2015). Farklı çalışmalarda daha büyük pozitif yüklü peptitin potansiyelinin daha fazla olarak hücre seçiciliğini etkilediği incelenmiştir. (Gabernet ve diğ., 2016). Peptitlerin hücre zarı etkileşimini etkileyen bir konu da zardaki peptit-lipid oranıdır. Daha az oranda bir peptit-lipid durumunda ACP, hücre membranına yakın paralel şekilde yer alırken peptit-lipid oranının artışıyla dikey hale yönelenerek zarın hidrofobik merkezine

konumlanmaktadır. Membrana nüfuz edip hücre içine iyonların, metabolitlerin ve hücre içi sentezin sızmasıyla hücre ölümünü ortaya koymaktadır (Zhang ve diğ., 2021).

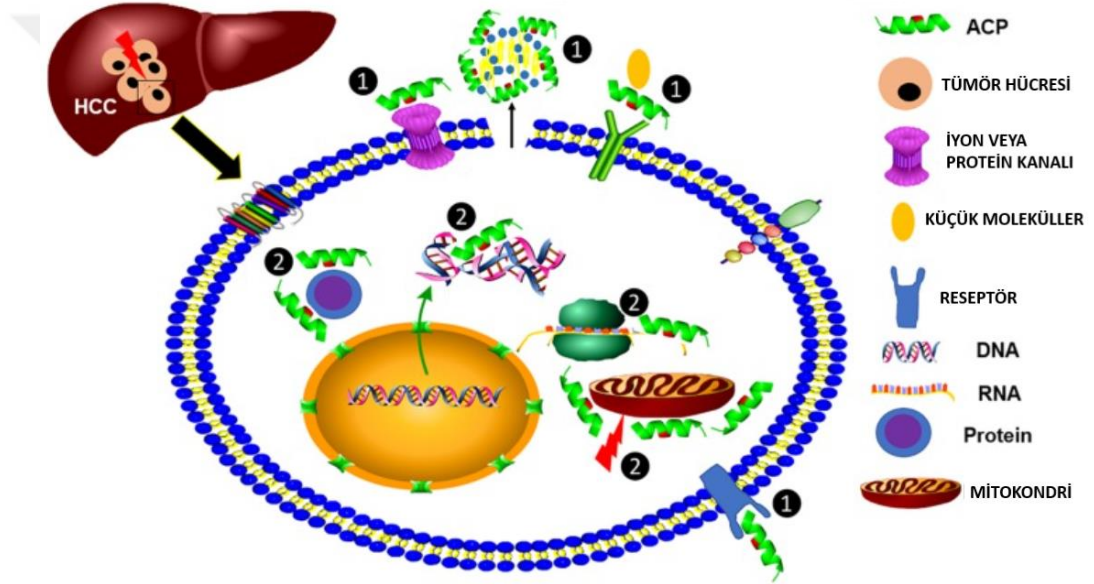
Çoğunlukla peptitler, hücrelere girişini kolaylaştıran hidrofobik bir C terminaline sahip olmalarıyla membranda oligomerizasyon ve gözenek oluşumuna bağlı hücre ölümüne sebep olmaktadır. Oligomerizasyon, peptitlerin işlevselliği için önemli olup, dimerik ve tetramerik peptitlerin kanser hücrelerindeki sitotoksik etkisinin fazla olduğu çalışmalar incelendiğinde antikanser aktivitesi için önemli olduğu vurgulanmaktadır (Trinidad-Calderón ve diğ., 2021). Kanser hücre membranlarındaki fosfatidilserin, O-glikozile edilmiş müsinler, sialile edilmiş gangliosidler ve heparin sülfat bileşenleriyle negatif yük kazanarak orta derecede anyonik olmaktadır (Schweizer, 2009). ACP'ler, kanser hücrelerindeki negatif yüklü yapılara spesifik olmayacak şekilde bağlanarak ilgi çekmektedirler. Kanser hücrelerindeki hücre yüzey mikrovillusların varlığıyla antikanser peptitler için çekici olmaktadır (Piotrowska ve diğ., 2017; Trinidad-Calderón ve diğ., 2021). Kanser hücrelerinin membranlarındaki kolesterol miktarına bağlı olarak artan membran akışkanlığıyla peptitlerin litik etkisi güçlenmektedir (Deslouches ve Di., 2017; Trinidad-Calderón ve diğ., 2021). Kanser hücrelerinin membranlarının dışında lokalize bir fosfolipid olan fosfatidilserinleri bağlayan ACP'ler insan tümör hücrelerini seçici olarak hedefleyebilmektedir (Wodlej ve diğ., 2019). Tümör hücreleri ise durumu tersine çevirmek için membranlarının asimetrisini bozan inflamatuvar sitokinleri, oksidatif stresi, asiditeyi ve benzeri etkileri kullanmaktadır (Ran ve diğ., 2002).

2.3.2. Antimikrobiyal Peptitlerin Etki Mekanizmaları

Antimikrobiyal peptitlerin etki mekanizmaları doğrudan ve dolaylı olarak iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Doğrudan öldürme mekanizması membran hedefleyerek veya membran dışı hedeflemeler ile olmaktadır. Membran hedefli olan etki mekanizması kendi içinde reseptör aracılı olan ve reseptör aracılı olmayan olarak iki kısımda toplanmaktadır (Kumar ve diğ., 2018).

Antikanser peptitlerin doğrudan öldürme mekanizmasından membran etkileşimli olanı, peptitlerin katyonik yapısı gereği negatif yüklü bileşenlerle etkileşime girerek membran bütünlüğü kaybına neden olmaktadır. Diğerleri ise hücre içindeki DNA, ribonükleik asit (RNA) ve proteinlerin aktivitesini etkileyerek baskılanmasını sebep olmaktadır (Bahar ve Ren, 2013; Kumar ve diğ., 2018; Zhang ve diğ., 2019) (Şekil 2.14). İlk temasla birlikte kanser hücre zarında

gözenek oluşturmaya başlayan peptitler hücre ölümüne sebep olmaktadır (Zhang ve diğ., 2019). Sancar ve arkadaşları (2023) böcek AMP'si olan kriptoninin antikanser özelliklerine baktıklarında, melanom hücrelerinde nekrotik ölüm oluşumuna neden olmasıyla ortaya çıkan terapötik potansiyelini vurgulamaktadırlar. Antikanser peptitler dolaylı olarak immünmodülatör etkilerle aktivite sergilemektedirler. Bunlar; immün tepki oluşturmak amacıyla dendritik veya makrofaj hücrelerinin aktivasyonu, tümörün beslenmemesi ve metastazını baskılamak amacıyla anjiyogenez inhibisyonu, kanser hücrelerini ölüme götürmek için hücre ölüm yollarını aktive etmek, tümör hücresi gen ifadesinde görevli proteinlere müdahale etmesi gibi fonksiyonlardır (Kumar ve diğ., 2018; Singh ve diğ., 2022).



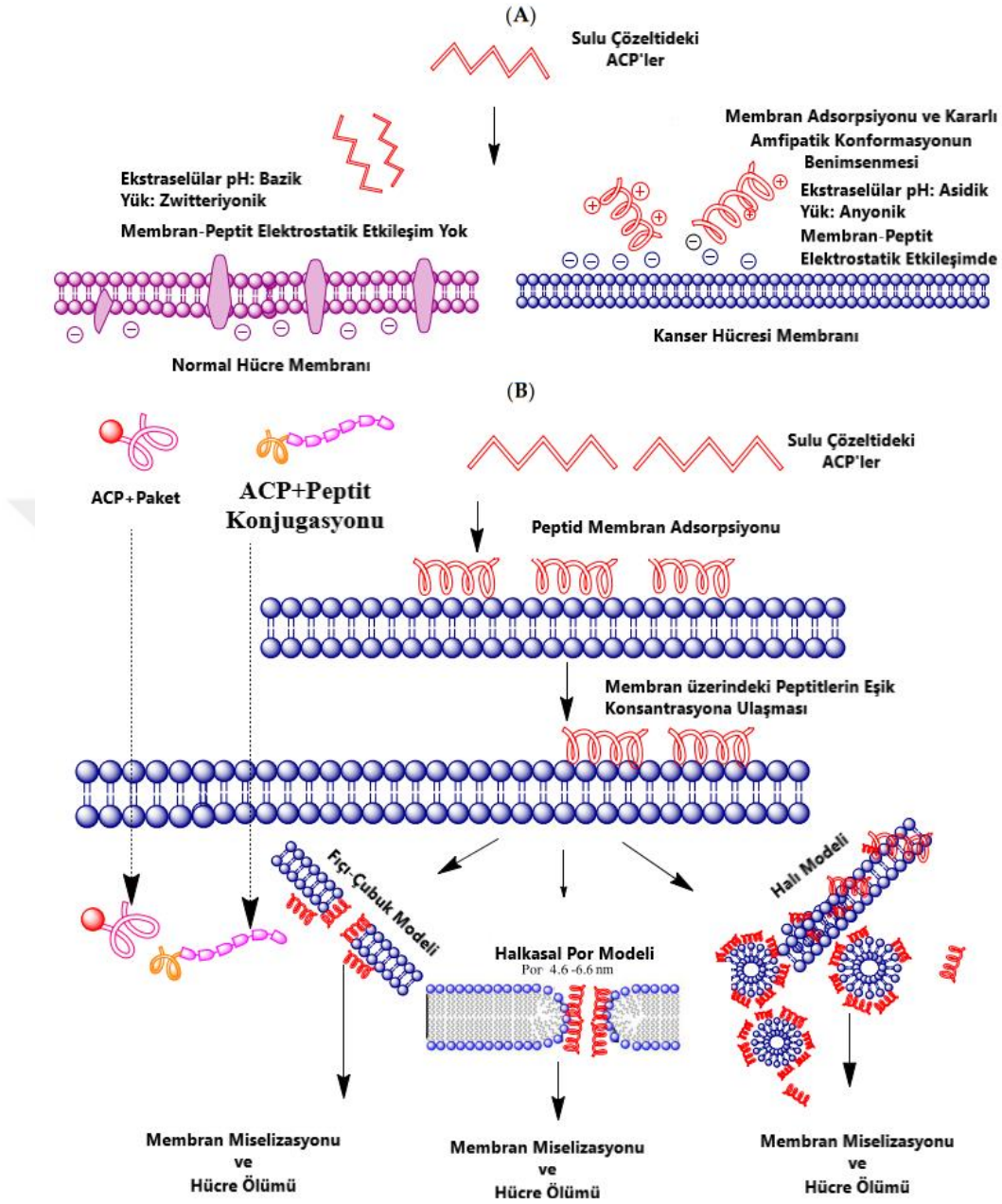
Şekil 2.14 : Antikanser Peptitlerin HCC Hücrelerine Etki Modelleri. Numaralandırılmış etki modellerinden 1.'si reseptöre veya membrandaki negatif yüklü fosfolipitlere bağlanmasıyla oluşturduğu hücre tepkileri olurken 2.'si hücre içine girdikten sonra organelleri, RNA'yı veya DNA'yı hedefleyerek oluşturduğu tepkilerle olmaktadır (Zhang ve diğ., 2019'dan değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).

Membran hedefli etkisinde önce elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerle membran yüzeyinde biriken AMP'ler konformasyonel değişiklik geçirmektedir. Yeterli konsantrasyona ulaştıktan sonra membran ile birleşerek dört farklı etkileşim modeli sergilemektedir. Bunlar, fıçı-çubuk modeli, halı modeli, halkasal por modeli ve deterjan modeli olmaktadır (Kumar ve diğ., 2018). (Şekil 2.15).

Fıçı-çubuk modelinde, membran faz arasında tek yönde yerleşen peptitler birlikte yanal olarak etkileşime girdikten sonra bir iyon kanalı oluşturup yeterli konsantrasyona ulaşan yapı fıçı şeklini almaktadır. Peptitlerin hidrofobik kısmı zarın hidrofobik yüzeyine, hidrofilik kısmı hidrofilik yüzeye bakacak şekilde konumlanarak por oluşturan peptitler hücre içeriğini tehlikeye atarak ölümüne neden olmaktadır (Singh ve diğ., 2022) (Şekil 2.15).

Halkasal por oluşum modelinde, konformasyonel değişikliklerle hidrofobik kısmı zarın hidrofobik yüzeyine, hidrofilik kısmı hidrofilik yüzeyine yerleşmektedir. Peptitlerin hidrofobik kısmı membrandaki fosfolipit başlarına bağlanarak onları konumlarından ayırdığından zarın hidrofobik kısmından yırtılmasıyla gerilime neden olmaktadır. Eşik konsantrasyona ulaşan peptitler, halkasal por kompleksi halini alarak çift katmanlı membranın hidrofobik kısmına erişmeden dik bir şekilde konumlanmaktadır. Kısa yarı ömürlü, geçici porlar oluşturan bu modelde, bazı peptitler membranı aşarak hücre içi bileşenlere saldırmaktadır (Singh ve diğ., 2022) (Şekil 2.15).

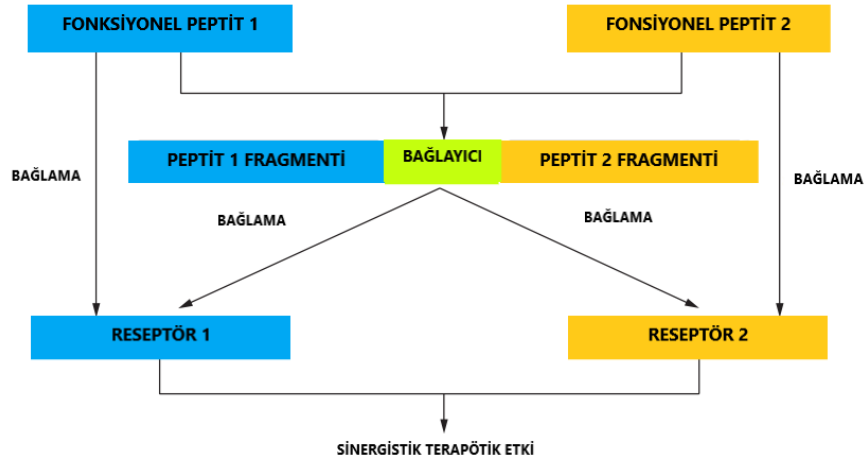
Halı modelinde, membranın dengesizliğini sağlayan peptitler antimikrobiyal aktiviteyi membranda por oluşturmada da yapmaktadırlar. Membranda biriken peptitler halı benzeri örtü şeklinde dış yüzeyi kaplamaktadırlar. Bu örtü membran yüzeyinin bağlanma etkileşimlerini etkilemektedir. (Singh ve diğ., 2022) (Şekil 2.15). Deterjan modelinde, örtü şeklinde yüzeyi kaplayan halı modelinden sonra hücre membran çift katmanının miseller halinde parçalanmasıyla ortaya çıkmaktadır (Kumar ve diğ., 2018) (Şekil 2.15).



Şekil 2.15 : Antikanser Peptitlerin Kanser Hücre Zarına Etki Modelleri. Peptidin zarla etkileşiminden doğan farklı zar etki senaryoları sonunda bozulan hücre zarı ile ölüme giden süreç resmedilmiştir (Tripathi ve Vishwanatha, 2022'den değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).

Peptitlerin özelliklerini düzenleyecek şekilde hibridizasyon, polimerizasyon, parçalanma ve siklizasyon gibi modifikasyonlarla yeniden tasarlanarak stabilitesi geliştirilmek istenmektedir (Kumar ve diğ., 2018; Zhang ve diğ., 2019). Wu ve arkadaşları (2009), bilinen AMP olan Kekropin B'den türetilen modifiye peptit CB1a ile çalışarak normal hücelere daha düşük

sitotoksitesitesiyle karsinom hücrelere karşı potansiyel aktivitesini açığa çıkarmışlardır. Sentetik peptitler doğal peptitlerden gelen sorunlara çözüm olarak birden fazla peptit kombinasyonu ile tasarlanmış hibrit peptitler olarak uygun aktivite potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. Çalışmalarda artan bir ilgiyle hibrit peptitler, iki veya daha fazla farklı peptitin çeşitli biyolojik yöntemlerle bir araya getirilip daha etkili antikanser olarak terapötik stratejiler üzerine hedeflenmektedir. Farklı fonksiyonel özellikleri taşıyan peptitlerin konjugasyonu ile sinerjistik aktiviteleriyle terapötik etkilerin oluşturulması amaçlanmaktadır. Hibrit peptitlerin tasarımında birleştirici faktör olarak uygun bir bağlayıcı kullanılması tasarımın korunması açısından önemlidir (Wang ve diğ., 2019) (Şekil 2.16).



Şekil 2.16 : Çok İşlevli Hibrit Peptit Tasarımı. Farklı fonksiyona sahip peptitlerin hibridizasyonu ile sinerjistik etkisi sunulmuştur (Wang ve diğ., 2019'dan değiştirilerek Türkçeleştirilmiştir).

2.3.3. Katelisidin (LL-37) ve FK-16 Antimikrobiyal Peptitleri

Katelisidinler; korunmuş katelin benzeri bir dizi taşıyan, +6 net pozitif yüklü, (Kuroda ve diğ., 2015) memelilerde makrofaj ve lökositlerde tanımlanan, α -helikal peptitler olarak kanser hücrelerine karşı membranolitikler (Tornesello ve diğ., 2020). Lösin-lösin-37 (LL-37); 37 amino asitli, 18 kDa kadar olan insan katyonik antimikrobiyal peptiti 18'in (hCAP18), proteinaz 3 tarafından parçalanmasından türetilen, insan nötrofillerinin sekonder granüllerinde bulunan tek katyonik katelisidindir (Tornesello ve diğ., 2020; Trinidad-Calderón ve diğ., 2021). LL-37, hem halkasal por oluşum modeliyle aktivite gösterirken hem de membran

inceltme/kalınlaştırma gibi aktivitesi de mevcuttur (Singh ve diğ., 2022). Kanser hücreleri LL-37'ye maruz bırakıldığında, kaspazdan bağımsız apoptozu ve DNA fragmentasyonu indüklemektedir (Tornesello ve diğ., 2020). Jurkat ve insan oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde LL-37'nin kaspazdan bağımsız apoptoz ürettiği anlaşılmıştır (Mader ve diğ., 2009).

Peptit sentezine bağlı olarak sınırlayıcı faktörlere çözüm düşünüldüğünde tam uzunluktaki peptitin biyolojik fonksiyonu gösteren en kısa fragmentinin tanımlanması önemlidir (Ren ve diğ., 2013). Buna göre yapılan çalışmada LL-37'nin kalıntıları incelendiğinde 17-32. kalıntılara karşılık gelen FK-16 (DQVLRFRNFRIKLVKI-NH₂) adlı peptit fragmentinin antibakteriyel ve antitümör aktivitesini koruduğu anlaşılmıştır (Li ve diğ., 2006). Bu keşiften sonra FK-16 değerlendirildiğinde prokaryot ve ökaryotlarda tam uzunluktaki peptitten daha etkili bir aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Wang, 2008). Böylece yeni bir antikanser peptit olarak literatüre geçen FK-16 çalışılmaya devam etmektedir (Ren ve diğ., 2013).

FK-16, kaspaz aktivasyonu veya içsel yoldan bağımsız olarak DNA fragmentasyonu ve mitokondriyal depolarizasyon ile apoptozu indüklemektedirler (Trinidad-Calderón ve diğ., 2021). FK-16, apoptoz ve otofaji ortak p53-Bcl-2/Bax yoluyla ikisini de aktive edebilmektedir (Ren ve diğ., 2013). Ren ve arkadaşlarının çalışmasında, otofajinin inhibe edilmesiyle kanser hücrelerinin kaspaz bağımsız apoptoza kayan bir ölüm türü sergilediklerini gösterdiğinden iki hücre ölüm sinyalinin de aktifleştirildiği dair kanıtlar sunulmaktadır.

2.3.4. Frenatin 2.1S Antimikrobiyal Peptiti

Kurbağalarda doğal olarak meydana gelen konakçı savunma peptitleri (diğer adıyla antimikrobiyal peptitler), çoğunlukla derilerindeki granüler bezlerde yüksek konsantrasyonlarda sentezlenip, depolandıktan sonra ve stres veya doku yaralanması gibi durumlarda dışarı salınmaktadır (Pantic ve diğ., 2017). Kurbağa derisi peptitlerinin çoğunluğu katyonik olup çok fazla hidrofobik amino asit taşımaktadır. Genellikle sulu çözeltilerde stabil yapıya sahip olmazken fosfolipid ortamında amfipatik bir α -helikal yapıya bürünebilmektedirler (Wang ve diğ., 2016). Bu peptitler memelilerde ise birçok farklı etki göstererek ilk önce hücreleri geçirgenleştirme kabiliyetleri ve sonra da kapsamlı antimikrobiyal (antibakteriyel, antifungal, anti-protozoal ve antiviral) etkileriyle tanınmaktadırlar (Xu ve Lai, 2015). Kurbağa derisinden türevli peptitler ilaç dirençli patojenlere karşı etkileriyle ilgi çekerek

antimikrobiyal özelliği daha fazla, toksisitesi daha az ve dolaşımdaki yarı ömrü daha uzun olarak değerlendirilmektedir (Conlon ve Mechkarska, 2014). Konak savunma peptitleri ayrıca koruyucu immün yanıt uyarımını sağlayarak makrofajlar için kemo-çekici özellikler sergilemektedir. Bu dermal peptitler yara onarımında da görev almaktadırlar (Pantic ve diğ., 2017). Bu peptitler ayrıca birçok tümöre spesifik olarak toksisite gösterdiğinden antikanser peptit olarak kullanılmaktadır (Lu ve diğ., 2008).

Hylinae alt familyasındaki Orinoco ıhlamur ağacı kurbağası *Sphaenorhynchus lacteus*'un deri salgılarından Frenatin ailesinde yapısal olarak ilişkili üç peptit (Frenatin 2.1S, 2.2S ve 2.3S) izole edilmektedir. Frenatin 2.1S (GLVGTLGHIGKAILG.NH₂), C-terminalinde α -amidatlı glisin/lösin amino asitlerince zengin olup immün tepkileri uyarıcı etkisi mevcuttur (Conlon ve diğ., 2014).

2.4. 5-FLOROURASİL

5-Flourourasil (5-FU) bir antimetabolit olarak 1957'den beri kullanılırken son yıllarda antikanser ilaç olan en verimli etkiyi kolorektal kanser üzerinde göstermektedir (Sethy ve Kundu, 2021). Timidilat sentazın etkisini susturan 5-FU aynı zamanda metabolitlerini RNA ve DNA'ya yanlış olarak ekleyerek biyosentetik fonksiyonu bozarak sitotoksosite arttırdığından hücreyi ölüme götürmektedir. Süreçteki enzimler, kanser kök hücreleri, çoklu ilaç direncine sahip taşıyıcılar, çeşitli hayatta kalma sinyal ürünleri, tümör mikro çevresi ve DNA onarımı gibi birçok faktörün 5-FU'ya direnci tetiklediği araştırılmaktadır (Longley ve diğ., 2003; Sethy ve Kundu, 2021).

5-FU'nun daha efektif olarak kanser hücrelerindeki duyarlılığını arttırmak için, sinerjistik kullanımı üzerine çalışmalar mevcuttur (Sethy ve Kundu, 2021). Bartucci ve arkadaşlarının (2017), transkripsiyonel baskılayıcı olan BMI1'in yeni ve daha küçük inhibitörlerini üretmek için yaptıkları çeşitli araştırmalar sonucunda RU-A1 ile potansiyel bir BMI1 inhibitörünü vurgulamaktadırlar. HCC *in vitro* proliferasyonunu ve göçünü engelleyen RU-A1 tedavisi, kanser hücrelerini 5-FU'ya daha duyarlı hale getirmiştir. Böylece BMI1 inhibisyonu, HCC'ler için 5-FU tedavisi için kemoterapötik strateji olarak düşünülebilmektedir (Bartucci ve diğ., 2017).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Bu çalışmada insan hepatosellüler karsinoma hattı (HepG2) hücreleri ve normal hücre soyu olarak insan göbek kordonu veni endotel hücreleri (HUVEC) kullanıldı. Hücreler 37°C’de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde her iki günde bir medyumları tazelenerek inkübe edildi.

3.1.1. Hücre Kültür Medyumlarının Hazırlanması

HepG2 hücreleri için %10 fetal sığır serumu (FBS) 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin (PES) içeren Dulbecco’nun modifiye Eagle medyum (DMEM) hazırlandı. HUVEC hücreleri için %15 FBS, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 25 mg/l Heparin, 15 mg/l endotel hücre büyüme takviyesi (ECGS) içeren F12 besin karışımı Dulbecco’nun modifiye Eagle medyum (DMEM-F12) hazırlandı. Hazırlanan medyumlar +4 °C’de muhafaza edildi.

3.1.2. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekilmesi

Deney öncesinde hücreler muhafaza edildikleri -150°C dondurucudan alınarak hızlıca ve tek seferde çözdürüldü. Kriyotüp içindeki hücre süspansiyonu çözülür çözünmez içinde 5 ml medyum bulunan santrifüj tüpüne aktarıldı ve iki kez yıkama ve santrifüjleme basamakları ile kriyomedyum uzaklaştırıldı. Santrifüj sonrası hücre peleti medyum ile sulandırıldı ve Thoma lamında (hematosimetre) hücre sayımı yapılarak uygun oranda hücre flask içine aktarıldı. Hücreler 37°C’de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde muhafaza edildi.

3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

Işık mikroskopunda incelenen hücreler yaklaşık %80 yoğunluğa ulaştığında, ortamdan medyum uzaklaştırılarak önce kalsiyum-magnezyum içermeyen fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Hücrelere % 0.25 tripsin-etilendiamintetraasetik asit (Trypsin-EDTA) eklenip 3 dakika inkübasyon yapıldı ve tripsin inaktivasyonunu takiben, hücreler pipetajla kaldırılarak santrifüj tüpüne alındı. Hücre süspansiyonu 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra hücre peleti medyum ile süspanse edildi ve Thoma lamında hücre sayımı yapılarak uygun sayıda hücre yeni flask içine pasajlandı.

3.1.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücreler daha sonra kullanılmak üzere dondurularak muhafaza edildi. Hücre kaldırma işlemi sonrası hücre sayımı yapılarak santrifüjlenen hücrelerden medyum uzaklaştırıldı. Pelet, %10 Dimetil sülfoksid (DMSO) içeren soğuk FBS dondurma medyumuna olan kriyomedyumunda sulandırıldı. 1-1,5 milyon hücre/ml yoğunluğunda süspanse edilen hücreler kriyotüplere aktararak 24 saat -80°C 'de bekletildi ve -152°C 'ye konularak donduruldu ve saklandı.

3.2. HİBRİT PEPTİTİN ÇÖZÜLMESİ VE SULANDIRILMASI

Çalışmamızda seçtiğimiz LL-37 türevi FK-16 ve Frenatin 2.1S antikanser peptitlerinin prolin amino asiti olan bağlayıcısı ile hibrit olarak sentezi Elabscience tarafından yurtdışında %90 saflıkta yapıldı. 33 amino asit uzunluğunda FK-16-Frenatin 2.1S (DQVLRFRNFRIKLVKI-P-GLVGTTLLGHIGKAILG.NH₂) hibrit antikanser peptiti, liyofolize halde -20°C 'de muhafaza edildi. Hibrit peptit, hidrofilik-hidrofobik durumuna bağlı olarak 1 mg/ml konsantrasyonda PBS içinde çözündürüldü ve alikotlanarak -20°C 'de muhafaza edildi.

3.3. HÜCRE CANLILIĞI VE SİTOTOKSİSİTE TESTİ

3.3.1. Hücre Canlılık Testi (MTT Testi)

FK-16-Frenatin 2.1S ile HepG2 hücrelerinde indüklenen hücre ölümünü araştırmak için 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) hücre canlılık testi yapıldı. MTT tuzu 5 mg/ml olacak şekilde PBS içinde hazırlandı ve 0,22 µm por çaplı membran filtreden geçirilerek steril edildi.

MTT reaktifi (sarı renkli toz halinde) bir monotetrazolyum tuzudur. MTT solüsyonu fizyolojik olarak dengeli hazırlandığından, pozitif yükü ve lipofilik yapısı sayesinde kültürdeki canlı hücrelerin hücre zarından ve mitokondri iç zarından geçebilir. MTT'nin, mitokondriyal dehidrogenaz olan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidoredüktaz tarafından indirgenmesiyle yapısındaki tetrazol halkası bozulur ve formazan kristali adlı suda çözünmeyen mor-mavi renkli molekülü oluşturur. Formazan miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır.

Hücreler öldüğünde MTT'yi formazana dönüştürmezler ve renk oluşumu gözlenmez. Formazan, hücre yüzeyinde, hücreler içinde ve kültür ortamında bir çökelti olarak birikir. Absorbans okumaları kaydedilmeden önce formazanın çözündürülmesi gerekir. Böylece metabolik olarak aktif hücreler tarafından uygun bir belirteç olarak formazan kristali üretiminin kolorimetrik olarak ölçümü yapılabilir (Riss ve diğ., 2013; Ghasemi ve diğ., 2021).

MTT testi, hücre canlılığını, ilaç sitotoksitesini ve hücrelerin mitokondriyal aktivitesini ölçmek için araştırma laboratuvarlarda popüler olarak kullanılan bir testtir. Ölçüm sonucu değeri; MTT konsantrasyonu, inkübasyon periyodunun uzunluğu, yaşayabilir hücrelerin sayısı ve bunların metabolik aktiviteleri gibi çeşitli uyarılara bağlı olarak değişebilir. Uygun oranda ürün oluşturmak için tahlil ortamını optimizasyonu için bu parametreler dikkate alınmalıdır (Riss ve diğ., 2013; Ghasemi ve diğ., 2021).

Hücre kaldırma işlemi sonrası, hücre sayımı yapıldı ve belirlenen gruplar için HUVEC ve HepG2 hücreleri 96 kuyucuklu pleytin her kuyusunda 100 µl içinde 20 bin hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. 6, 12 ve 24 saatlerinde okutulmak deney gruplarına farklı konsantrasyonlarda (1-2,5-5-10-20-40-60-80-100 µg/ml) medyumda sulandırılmış FK-16-Frenatin 2.1S verildi. Kontrol grubunun sadece medyumunu değiştirildi. 6, 12 ve 24 saatleri sonrasında her kuyucuğa PBS içinde hazırlanan 30 µl MTT solüsyonu (5 mg/ml) eklendi. 4 saat %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyon sonrası kuyucuklardaki sıvılar çekilerek 100 µl DMSO eklendi. 96 kuyucuklu pleytler 5 dakika 270 rpm hızında çalkalayıcıda tutularak formazan kristallerinin DMSO içinde çözünmesi sağlandı. Optik yoğunluk 570 nm test ve 630 nm referans dalga boylarında mikropleyt okuyucuda (BioTek, ABD) ölçüldü. Bu deney 9 konsantrasyonda her pleytte 3 kuyu tekrarlı şekilde 3 kez yapıldı.

Antikanser ilaç 5-Fluorourasil (5-FU)'in HepG2 hücrelerinin aktiviteleri üzerine etkilerini araştırmak için MTT testi uygulandı. 96 kuyucuklu pleyte 100 µl içinde 20 bin hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Kontrol grubuna medyum, diğer gruplara farklı konsantrasyonlarda (1-2,5-5-10-25-50-100-200 µg/ml) hücre kültür medyumunda hazırlanan 5-FU hücrelere verildi. 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri sonunda tüm kuyucuklara MTT solüsyonu eklenerek pleytler inkübe edildi ve mikropleyt okuyucuda ölçüldü.

FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptiti ile 5-Fluorourasilin sinerjistik etkisiyle HepG2 hücrelerinin aktiviteleri üzerine etkilerini araştırmak için MTT testi yapıldı. Yukarıda belirtilen şekilde 96

kuyucuklu pleyte hücre ekimi yapıldı. 5-FU ve FK-16-Frenatin 2.1S'in 1, 2,5, 5 ve 10 µg/ml konsantrasyonları birlikte hücrelere 48 saat boyunca uygulandı. Maruziyet süresi sonunda MTT solüsyonu eklenerek 4 saat inkübasyon yapıldı ve optik yoğunluk mikropleyt okuyucuda ölçüldü. Tüm MTT sonuçlarının analizinde hücre canlılığı, kontrol kuyucuklarının ortalama absorbens değerlerinin %100 kabul edilmesiyle % olarak hesaplandı.

3.3.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Sitotoksosite Testi

Sentezlenen hibrit peptitin HepG2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi hücrelerden salınan Laktat Dehidrogenaz (LDH) aktivitesinin ölçümü (Pierce, Sitotoksosite saptama kiti, 88954) ile yapıldı.

Sitozolik bir enzim olan laktat dehidrojenaz membran bütünlüğü bozulan ölü hücrelerden dış ortama salınmasıyla hücre ölümü ilişkili sitotoksositeyi hesaplamaya yarayan güvenilir kolorimetrik bir testtir. Hücre dışına çıkan LDH, NAD⁺'nın NADH'ye indirilmesiyle laktatın piruvata dönüşmesini katalizlediği enzimatik reaksiyon gerçekleştirir. Bu reaksiyon dahilinde NADH'yi kullanan diaforaz enzimi aracılığıyla bir tetrazolyum tuzunu (INT) ölçülebilen kırmızı bir formazan kristaline dönüştürür (Riss ve diğ., 2019).

Yukarıda anlatıldığı şekilde hücre kaldırma işlemi sonrası hücre sayımı yapıldı ve belirlenen gruplar için 96 kuyucuklu pleyt içine her kuyuda 20 bin hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. HepG2 hücreleri 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (10-20-40-80 µg/ml) FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptidine maruz bırakıldı. Deney süresi dolmadan 45 dakika önce maksimum LDH kontrolleri olan kuyucuklara 10 µl lizis buffer (10x) konuldu ve 45 dakika etüvde bekletildi. Deney süresi sonunda her örneğin kuyucuklarından 50 µl alınıp başka bir 96 kuyucuklu pleyte aktarıldı. Her kuyucuğun üzerine 50 µl reaksiyon karışımı aktarılıp pipetej yapılarak karıştırıldı. 30 dakika karanlıkta oda ısısında inkübasyon yapıldıktan sonra 50 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Optik yoğunluk 490 nm test ve 680 nm referans dalga boylarında mikropleyt okuyucuda (BioTek, ABD) ölçüldü. % sitotoksosite aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\% \text{Sitotoksosite} = (\text{Deneysel absorbens değeri} / \text{Maksimum LDH absorbens değeri}) \times 100$$

3.4. HÜCRE ÖLÜM ŞEKLİNİN HÜCRESEL BOYAMA YÖNTEMLERİ İLE MORFOLOJİK TAYİNİ

3.4.1. Akridin Oranj/Etidyum bromür (AO/EB) İkili boyama

Canlı hücrelere giren AO, DNA'ya eklenerek yeşil ışıma yapmakta ve nukleusun yeşil gözükmesine yola açmaktadır. EB ise sadece ölü hücrelere girerek DNA'ya bağlanıp kırmızı ışıma yapmaktadır. Bu sebeple boyamadan sonra mikroskopta incelenen canlı hücrelerin nukleusları yeşil renkte, erken apoptotik hücrelerin nukleusları DNA fragmentasyonu sebebi ile parçalı yeşil, geç apoptotik nukleuslar ise DNA fragmentasyonu sebebi ile parçalı kırmızı görünmektedir. Nekrotik hücre nukleusları yoğun kırmızı şekilde seçilebilmektedir (Yang ve diğ., 2013). Hücresel ölüm mekanizmasının belirlenmesi için 24 saat peptit maruziyetini takiben hücreler AO/EB ikili boyası ile boyandı ve nukleus morfolojileri floresan mikroskopta incelendi.

HepG2 hücreleri tripsin-EDTA ile kaldırılarak sayıldı ve 96 kuyucuklu pleyte ekildi. 24 saat sonra boyanmak üzere hücrelere medyum içerisinde hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki FK-16-Frenatin 2.1S (10-20-40-80 µg/ml) uygulandı. Kontrol grubuna sadece medyum ve açlık grubuna boyamadan 2 saat önce serumsuz medyum verildi. Stok AO solüsyonundan (1 mg/ml) 100 µl ve 10 mg/ml konsantrasyondaki EB solüsyonundan 10 µl alınarak 890 µl PBS içinde karıştırıldı ve hazırlanan bu boyadan karanlıkta her kuyucuğa 8 µl aktarıldı. 5 dakika inkübe edilen hücreler floresan mikroskop (Nikon DS5MCU2)'ta floresan izotiyosiyanat (FITC) ve siyanin 3 (CY3) filtreleri ile incelendi. NIS Elements yazılımı ile fotoğraf görüntüleri kaydedildi.

3.4.2. Monodansilkadeverin (MDC) Boyası ile Otofajik Vakuollerin İşaretlenmesi

Monodansilkadeverin, hücre içi otofajik vakuolleri işaretleyen mavi renkli floresan bir boyadır. Otofajik vakuollere giren MDC, iyon yakalama mekanizması ve lipidlerle etkileşimi sonucunda birikmektedir. Otofloresan bir boya olan MDC, kadaverin konjuge dansil kalıntısından oluşmakta olup otofajiyi analiz etmek için hızlı ve kolay bir yöntemdir (Biederbick ve diğ., 1995; Murugan ve Amaravadi, 2016).

Otofajik vakuollerin görüntülenmesi için HepG2 hücreleri 24 kuyucuklu pleyt içinde steril olarak yerleştirilen 10 mm çapındaki lamellere ekildi. Ertesi gün hücreler farklı

konsantrasyonlardaki (10-20-40-80 µg/ml) FK-16-Frenatin 2.1S'e maruz bırakıldı. Kontrol grubuna sadece medyum ve açlık grubuna boyamadan 2 saat önce serumsuz medyum verildi. 24 saat sonra 1,5 ml PBS içine 2,7 µl stok MDC boyası eklenerek kuyucuklardaki lamellerin üzerine 0,005 mM 175 µl verildi. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyon sonrasında boya dikkatle çekilerek 4 kez PBS ile yıkandı. Kuyulardaki lameller 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) içeren ve floresan ışımının solmasını engelleyen kapatıcı (Invitrogen, ABD) kullanılarak temiz lamlara kapatıldı. Lamlar kuruduktan sonra immersiyon yağı kullanılarak floresan mikroskop (Nikon DS5MCU2)'ta boyanan otofajik vakuoller DAPI filtresi ile incelendi. Fotoğraf görüntüleri, NIS Elements yazılımı ile kaydedildi ve MDC floresan yoğunluğu her maruziyet grubunda NIS Elements yazılımı ile ölçüldü.

3.5. ANNEKSİN V/ PROPİDYUM İYODÜR (PI) İLE AKIM SİTOMETRİSİ ÖLÇÜMÜ

Anneksin V ve propidyum iyodür (PI) ile boyama, farklı hücre ölümü türleri olan nekroz ve apoptozun tanımlanmasını sağlar. Sağlıklı hücre yüzeyinde plazma membranının sadece iç kısmına asimetrik olarak dağılmış halde bulunan fosfatidilserinler, apoptoz sırasında bozulan lipid asimetrisi nedeniyle plazma membranının dış kısmında da görülür. Anneksin V, fosfatidilserine bağlanarak apoptotik hücrelerin tespitinde kullanılır. Nekrotik hücrelerin hasarlı hücre membranlarının iç yüzeyindeki fosfatidilserinlere de bağlanan Anneksin V, onları da işaretleyebilir. Ancak PI boyası ölü ve nekrotik hücrelerin nükleik asitlerine bağlanırken apoptotik hücrelere giremez. Böylece apoptotik hücreler, PI ile nekrotik hücrelerden ayırt edilebilir (Crowley ve diğ., 2016).

Apoptoz analizi için FITC Annexin V / Dead Cell Apoptoz Kiti (Invitrogen, ABD, V13242) kiti kullanıldı. HepG2 hücreleri 6 kuyucuklu pleytlere hücre ekildi ve ertesi gün hücreler farklı konsantrasyonlarda (10-100 µg/ml) FK-16-Frenatin 2.1S sentetik peptite ve 5-FU (50 ve 100 µg/ml)'ya maruz bırakıldı. Kontrol grubu hücrelere medyum, otofaji indüklemek için bir grup hücreye ise FBS içermeyen medyum uygulandı. İnkübasyon süresi sonunda medyumlar toplanarak hücreler PBS ile yıkandı ve tripsin-EDTA ile kaldırılıp santrifüjlendi. Hücre peleti anneksin bağlayıcı buffer içinde süspanse edilerek her bir örnekteki hücre sayısı belirlendi. 100 µl'de 100 bin hücre olacak şekilde süspanse edilen örneklerle 5 µl FITC Anneksin V boyası ve

1 µl PI solüsyonu eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Her örneğe 400 µl anneksin bağlayıcı buffer eklenerek hücreler ACEA Novo Cyte akım sitometrisi (ABD) ile analiz edildi (Oztas ve diğ., 2019).

3.6. HÜCRE İÇİ REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN SEVİYELERİNİN ÖLÇÜLMESİ

Reaktif oksijen türleri, en çok mitokondrinin elektron taşıma zincirinden sızan elektronlar tarafından üretilir. ROS, DNA baz hasarı, hücre akışkanlığı modifikasyonu ve protein oksidasyonu dahil olmak üzere yüksek konsantrasyonlarda hücrelerde zararlı hasara neden olabilir. Hücrenin bu stres durumu kardiyovasküler hastalıklar, kanser, nörolojik bozukluklar, diyabet ve inflamatuvar hastalıklar gibi hastalıklara neden olabilir. Hücrenin ROS'un zararlı etkilerinden kendini koruması için fazla ROS'u ortadan kaldıran enzimatik ve enzimatik olmayan süreçleri vardır (Gardiner ve diğ., 2020; Murphy ve diğ., 2022).

Birincil ROS olan süperoksit ($\cdot\text{O}_2$), diğer moleküllerle reaksiyona girerek hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri ve alkoksil radikalleri gibi diğer ikincil ROS'ları üretir. Hücre içindeki ROS'u tespit etmek için yaygın olarak kullanılan reaktifler floresan problardır. Bunlardan biri olan 2',7'-diklorodihidrofloresein diasetat (DCFH-DA) membranı aşabilen ve floresan olmayan bir formdadır. Sitoplazmaya giren DCFH-DA hücre içi esterazlar tarafından iki ester bağından ayrılarak DCF'yi oluşturur. DCF, birçok ROS türüyle, özellikle de hidroksil radikalleriyle ($\cdot\text{OH}$) reaksiyona girerek kolayca ölçülebilen güçlü bir yeşil floresan sinyali oluşturur (Gardiner ve diğ., 2020; Murphy ve diğ., 2022).

HepG2 hücrelerinin FK-16-Frenatin 2.1S maruziyeti sonrası hücre içi oksidatif strese bağlı ROS üretiminin ölçülmesi amacıyla hücreler 96 kuyucuklu pleyte hücre ekildi. 24 saat sonra ölçülecek şekilde kontrol ve açlık (serumsuz medyum içinde) grubu hariç farklı konsantrasyonlarda (10-20-40-80-100 µg/ml) FK-16-Frenatin 2.1S sentetik peptite maruz bırakıldı. Süre bitimine 30 dakika kala pozitif kontrol grubunun medyumunu çekilerek 500 µM H_2O_2 verildi. Süre dolunca kuyucuklardan medyumlar çekildi ve %10 FBS içeren 10 µM konsantrasyondaki DCFH-DA uygulandı. 45 dakika 37 °C'de inkübasyon sonrası hücreler bir kez PBS ile yıkandıktan sonra her kuyucuktaki floresan ışımaya 485 nm eksitasyon/535 nm emisyon dalga boylarında spektrofotometre (BioTek, ABD) ile ölçüldü. Kuyucuklarda ölçülen

absorbans değerleri, Bradford yöntemi ile analiz edilen protein konsantrasyonuna bölündü ve FK-16-Frenatin 2.1S'in farklı konsantrasyonlarına maruz kalan hücrelerden elde edilen değerler kontrol grubuna normalize edildi.

3.7. YARA KAPANMA DENEYİ (MİGRASYON TESTİ)

Araştırılan terapötik maddelerin hücre hareketliliğine olası etkisini değerlendirmek için kullanılan *in vitro* bir teknik olan hücre çizik testi kolay ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Oluşturulan çizik (yara modeli) üzerinde azalan mesafenin hesaplanması ile hücre göçünün hızı kantitatif olarak hesaplanabilmektedir. Her ölçüm zamanında çizikin aynı noktasından görüntü alınması esasıyla görüntülenen fotoğrafla yaranın kapanma hızı 2 boyutlu analiz edilmektedir (Liang ve diğ., 2007).

Hücre kültür ortamında çoğalan HepG2 hücreleri kaldırma işlemi sonrası sayılarak her kuyucukta 50 bin hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu pleyte ekildi. Her kuyucukta hücreler tek tabaka oluşturana kadar 2 gün bekletildi. 0. saatte tek hücre tabakasına sarı pipet ucu ile '+' şeklinde çizikler atıldı ve bu işlem ile kaldırılan hücreler PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Kontrol grubuna medyum, deney grubuna ise 10 µg/ml konsantrasyonda FK-16-Frenatin 2.1S içeren medyum uygulandı. 0. saat, 24. saat ve 48. saat olmak üzere ardışık günlerde çiziklerin belirlenen yerlerinden NIS-Elements yazılımı ile fotoğraflar çekildi ve yara açıklığı yazılım yardımı ile ölçülerek aşağıdaki formül ile % olarak hesaplandı:

$$\% \text{ Yara kapanma} = (0. \text{ saat yara genişliği} - 24./48. \text{ saat yara genişliği} / 0. \text{ saat yara genişliği}) \times 100$$

3.8. KOLONİ OLUŞTURMA VERİMLİLİĞİ TESTİ

Koloni oluşturma verimliliği testi, tek bir hücreden koloni oluşum yeteneğini ölçen bir testtir. Oluşan kolonileri boyamak için kullanılan kristal viyole boyası suda çözünebilen yapıda mavi-mor renkli bir doku boyasıdır. Canlı hücre yapısındaki protein ve DNA'lara bağlanarak kolonilerin sayımında kullanıma elverişlidir (Erkekoğlu ve Baydar, 2021).

HepG2 hücreleri 6 kuyucuklu pleyte her kuyucukta 1000 hücre olacak şekilde ekildi. Ertesi gün hücreler 10, 40 ve 80 µg/ml konsantrasyondaki FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptiti ile 24 saat muamele edildi. 21 gün süren inkübasyon sonrası hücreler PBS ile 3 kez yıkanarak %100 metanolde 20 dakika fiks edildi. Fiksasyon işlemi sonrası PBS ile tekrar yıkanan hücreler %20 metanolde hazırlanan % 0.05 kristal viyole boya solüsyonu ile 30 dakika oda ısısında boyandı. Fazla boya 5 kez PBS ile yıkama işlemi ile uzaklaştırıldı. Her kuyucuktaki 50 hücreden fazla sayıda olan koloniler sayıldı ve koloni oluşturma verimliliği aşağıdaki formüller kullanılarak % olarak hesaplandı (Chen ve diğ., 2015).

Koloni inhibisyonu oranı: $[1 - (\text{Deney grubundaki koloni sayısı} / \text{Kontrol grubundaki koloni sayısı})] \times 100$

% Koloni oluşturma verimi: 1 - Koloni inhibisyonu oranı

3.9. SİTOKİN SEVİYELERİNİN ENZİME BAĞLI İMMÜNOSORBENT TESTİ (ELISA) İLE BELİRLENMESİ

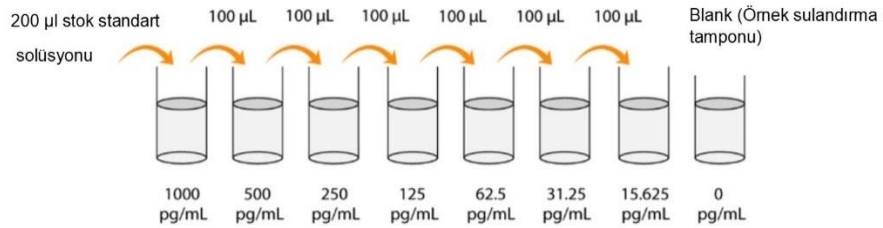
Enzim immünolojik testlerden biri olan ELİSA, antikor/antijen analizleri için kullanılan yaygın bir yöntemdir. ELISA, proteine güçlü şekilde bağlanmak için kaplanmış 96 kuyucuklu pleyt içinde polistiren plakalarda uygulanmaktadır. ELISA tespitinde kullanılan substratlardan biri yabanturpu peroksidazdır. Peroksidazın substratı hidrojen peroksit olup mavi renk değişimiyle gözlenmektedir. Doğrudan, dolaylı, sandviç ve yarışmalı ELİSA olarak dört türü bulunmaktadır (Alhajj ve diğ., 2023).

HepG2 hücrelerine 24 saat boyunca 10, 20, 40 ve 80 µg/ml konsantrasyonlardaki FK-16-Frenatin 2.1S peptiti uygulanmış ve bu hücrelerin kültür medyumuna salgıladıkları IL-1β, TNF-α ve IL-8 seviyeleri insana spesifik sandviç ELISA kitleri kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla Human IL-1 Beta/IL-1F2/IL1B ELISA Kit PicoKine® (Boster Bio, EK0392), TNF Alpha/Tumor Necrosis Factor ELISA Kit PicoKine® (Boster Bio, EK0525) ve Human IL-8/Interleukin-8/CXCL8 ELISA Kit PicoKine® (Boster Bio, EK0413) ELISA kitleri kullanılmıştır.

Kullanılan kitlerin içerikleri şu şekildedir:

İnsan IL-1 β antikorlu kaplı 96-kuyucuklu mikroye
 İnsan TNF- α antikorlu kaplı 96-kuyucuklu mikroye
 İnsan IL-8 antikorlu kaplı 96-kuyucuklu mikroye
 Biotin-konjuge insan IL-1 β antikorlu (100X)
 Biotin-konjuge insan TNF- α antikorlu (100X)
 Biotin-konjuge insan IL-8 antikorlu (100X)
 Örnek sulandırma solüsyonu (30 ml)
 Antikor sulandırma solüsyonu (12 ml)
 Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi (100X)
 Avidin-Biotin-Peroksidaz Sulandırma Solüsyonu (12 ml)
 Renk Geliştirme Reaktif (Tetrametil Benzidin, TMB) (10 ml)
 Reaksiyon Durdurma Solüsyonu (10 ml)
 Yıkama Tamponu (25X, 20 ml)
 4 adet pleit örtücü

Standart Solüsyonların Hazırlanması: Her kitin içinde bulunan 100 μ l stok standart solüsyonu 10 ng/ml olup bu solüsyonun üzerine 900 μ l örnek sulandırma tamponu eklenerek 1000 pg/ml konsantrasyonunda standart 1 solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyondan ependorf tüp içine örnek sulandırma tamponu kullanılarak seri dilüsyonlar ile 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63 pg/ml konsantrasyonlarda standart çalışma solüsyonları elde edildi. Blank olarak örnek sulandırma tamponu kullanıldı.



Avidin-Biyotin-Peroksidaz Kompleks Solüsyonunun Hazırlanması: Her kitin içinde bulunan 100X avidin-biyotin-peroksidaz Kompleksi avidin-biyotin-peroksidaz sulandırma solüsyonu ile 1:100 oranında sulandırılarak hazırlandı.

Yıkama Tamponunun Hazırlanması: 25X yıkama tamponu ultra saf su ile 1:25 oranında sulandırılarak yıkama tamponu hazırlandı.

Yöntem: HepG2 hücreleri her kuyucukta 1,5 milyon hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu pleytlere ekildi ve ertesi gün hücrelere 10, 20, 40 ve 80 µg/ml konsantrasyonda FK-16-Frenatin 2.1S uygulandı. Kontrol grubundaki kuyucuklara ise peptit içermeyen hücre kültür medyumı uygulandı. 24 saat inkübasyon sonrası her kuyucuktaki medyum solüsyonu toplanarak hücresel kalıntıların uzaklaştırılması amacı ile santrifüj edildi ve deney öncesine kadar -20°C’de saklandı. Kit içeriğindeki tüm reaktifler ve mikrolept deney öncesi oda sıcaklığına getirildi. Her bir kuyucuğa 100 µl standart solüsyon veya hücre kültür medyumı eklendi. Blank olarak kullanılan kuyucuklara sadece 100 µl örnek sulandırma tamponu eklendi. 90 dakika 37°C’de inkübasyon sonrası kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırıldı ve yıkama işlemi yapılmadan kuyucuklara hazırlanan 1X biyotin-konjuge antikör solüsyonundan 100’er µl eklendi. 60 dakika 37°C’de mikrolept inkübe edildi. Inkübasyon süresi sonunda her kuyucuk 3 kez 300 µl 1X yıkama tamponu ile yıkandı ve kuyucuklara 100 µl 1X avidin-biyotin-peroksidaz kompleks solüsyonu aktarıldı. 30 dakika 37°C’de inkübe edilen pleytler, bağlanmayan komplekslerin uzaklaştırılması amacı ile yıkama tamponuyla 5 kez yıkandı. Son yıkama sonrası her kuyucuğa 90 µl renk geliştirme reaktifi (TMB) eklenerek 15 dakika karanlıkta 37°C’de inkübasyon yapıldı. Reaksiyon gelişimi mavi renkli ürün oluşumu ile gözlemlendi ve kuyucuklardaki reaksiyon 100 µl reaksiyon durdurma solüsyonu eklenerek durduruldu. Her kuyucuktaki optik yoğunluk 450 nm dalga boyunda mikrolept okuyucu (BioTek, ABD) kullanılarak ölçüldü.

Hesaplama: IL-1β, TNF-α ve IL-8 standart çalışma çözeltilerine göre çizilen standart grafikler yardımıyla, her örnekte bulunan IL-1β, TNF-α ve IL-8 seviyeleri pg/ml olarak hesaplandı.

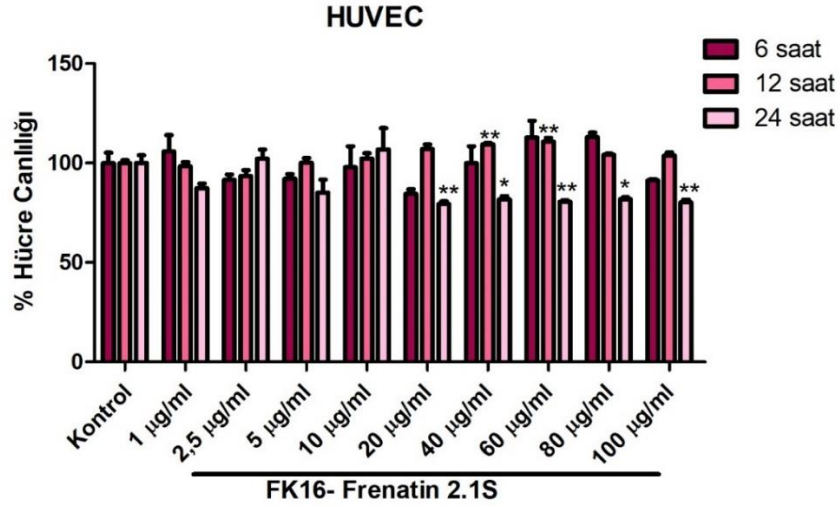
3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Deney sonuçlarından elde edilen veriler ikili karşılaştırmalar için ortalama ± standart sapma, çoklu karşılaştırmalar için ortalama ± standart hata olarak sunulmuştur. Deney grupları arasındaki istatistiksel farklılıkların belirlenmesi için ikili karşılaştırmalar için unpaired Student-t testi, çoklu karşılaştırmalar için tek yönlü ANOVA testini takiben Tukey post hoc testi uygulanmıştır. İstatistiksel analiz ve grafiklerin çizilmesi için GraphPad Prism 5.0 programı kullanılmıştır. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel anlamlı olarak kabul edilmiştir. IC₅₀ değerlerinin hesaplanmasında Microsoft Excel programında “Tahmin” fonksiyonu kullanılmıştır. |

4. BULGULAR

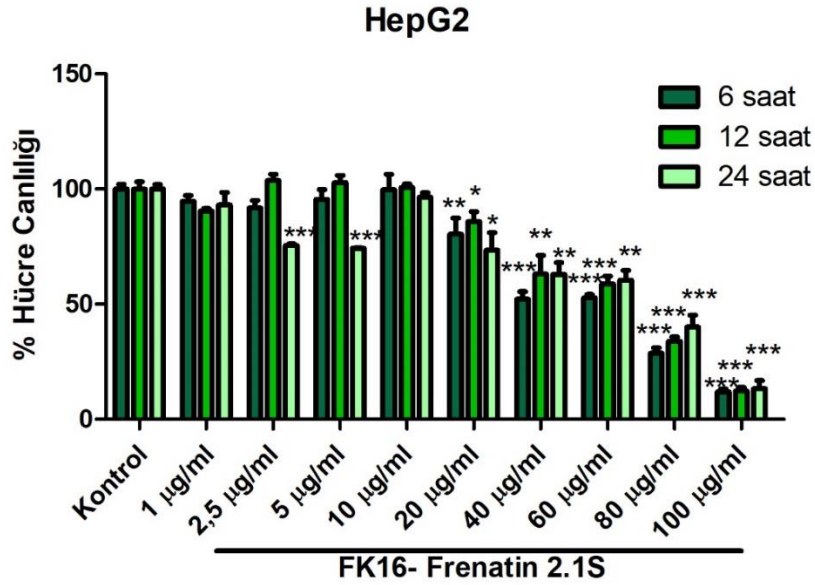
4.1. HÜCRE CANLILIK TESTİNE AİT BULGULARI

FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptidinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi HUVEC ve hepatosellüler karsinoma hücre soyu HepG2 hücrelerinde araştırıldı. Hücre canlılığı üzerine hibrit peptitin etkisi 1-100 µg/ml konsantrasyon aralığında 6, 12 ve 24 saat süresince belirlendi. Normal hücre soyu olarak çalıştığımız HUVEC’lerde 12 saat boyunca uygulanan 40 ve 60 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptiti hücre proliferasyonuna yol açmıştır (**p<0,01). Bununla birlikte 24 saat boyunca 20-100 µg/ml aralığındaki tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ve bu azalma yaklaşık %20 oranındadır (*p<0,05; **p<0,01) (Şekil 4.1). HUVEC’lerde hücre canlılığı üç farklı inkübasyon süreleri sonunda %50’nin altına düşmemiştir.



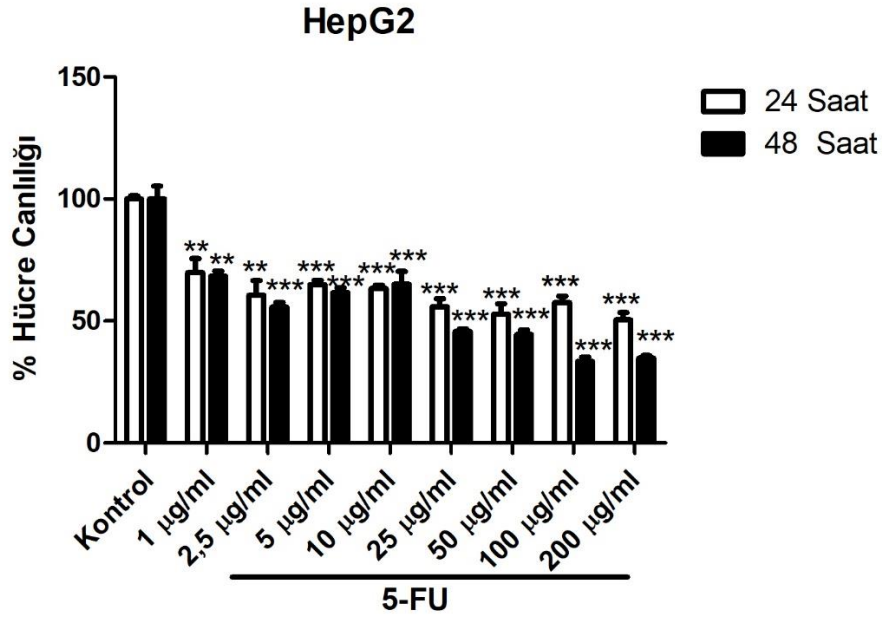
Şekil 4.1 : FK-16-Frenatin 2.1S peptidinin HUVEC’lerde hücre canlılığı üzerine etkisi. 6 saat için % hücre canlılık değerleri Kontrol:100±9,1; 1 µg/ml peptit: 105,8±14,4; 2,5 µg/ml peptit: 91,5±4,7; 5 µg/ml peptit: 92,2±3,9; 10 µg/ml peptit: 97,8±18,2; 20 µg/ml peptit: 84,6±9,4; 40 µg/ml peptit: 100±14,6; 60 µg/ml peptit: 113±14,5; 80 µg/ml peptit: 113,1±3,7; 100 µg/ml peptit: 91,2±1,1. 12 saat için % hücre canlılık değerleri Kontrol:100±2,4; 1 µg/ml peptit: 98,5±3,6; 2,5 µg/ml peptit: 93,46±5,1; 5 µg/ml peptit: 100,1±4,2; 10 µg/ml peptit: 102,3±4,6; 20 µg/ml peptit: 107,1±3,9; 40 µg/ml peptit: 109,5±1,2; 60 µg/ml peptit: 110,8±3,2; 80 µg/ml peptit: 104,2±1,1; 100 µg/ml peptit: 103,8±2,7. 24 saat için % hücre canlılık değerleri Kontrol:100±6,8; 1 µg/ml peptit: 87,5±3,8; 2,5 µg/ml peptit: 102,1±8,1; 5 µg/ml peptit: 85,1±11,3; 10 µg/ml peptit: 107±18,2; 20 µg/ml peptit: 79,5±2,3; 40 µg/ml peptit: 81,78±2,8; 60 µg/ml peptit: 80,62±1,2; 80 µg/ml peptit: 81,9±1,5; 100 µg/ml peptit: 80,27±2,3. *p<0,05; **p<0,01 Kontrole göre anlamlı derecede farklılık.

Hepatosellüler karsinoma HepG2 hücre soyunda 6 saat inkübasyon sonunda 20-100 µg/ml aralığındaki konsantrasyonların tümünde hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir gözlenmiştir (**p<0,01; ***p<0,001). Benzer şekilde 12 saat inkübasyon sonucu hücre canlılığında 20-100 µg/ml aralığındaki konsantrasyonların tümünde hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir belirlenmiştir (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). 2,5 ve 5 µg/ml peptit konsantrasyonları 24 saat süre sonunda hücre canlılığını azaltırken (***p<0,001), 10 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (p>0,05). 20-100 µg/ml aralığındaki konsantrasyonların tümünde hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir belirlenmiştir (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001) (Şekil 4.2). IC₅₀ değerleri 6, 12 ve 24 saat için sırasıyla 62,24, 67,09 ve 70,28 µg/ml olarak hesaplandı.



Şekil 4.2 : FK-16-Frenatin 2.1S peptidinin HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi. 6 saat için % hücre canlılık değerleri Kontrol:100±4,9; 1 µg/ml peptit: 94,6±4,4; 2,5 µg/ml peptit: 91,8±5,4; 5 µg/ml peptit: 95,6±7,4; 10 µg/ml peptit: 99,7±11,7; 20 µg/ml peptit: 80,5±12,1; 40 µg/ml peptit: 52,2±5,6; 60 µg/ml peptit: 52,7±2,5; 80 µg/ml peptit: 28,7±3,9; 100 µg/ml peptit: 11,9±2,2. 12 saat için % hücre canlılık değerleri Kontrol:100±7,1; 1 µg/ml peptit: 90,43±2; 2,5 µg/ml peptit: 103,6±4,7; 5 µg/ml peptit: 102,9±5,3; 10 µg/ml peptit: 100,7±2,5; 20 µg/ml peptit: 85,85±7,6; 40 µg/ml peptit: 63,07±14,12; 60 µg/ml peptit: 58,85±5,7; 80 µg/ml peptit: 33,88±3,3; 100 µg/ml peptit: 12,32±2,5. 24 saat için % hücre canlılık değerleri Kontrol:100±3,6; 1 µg/ml peptit: 93,1±9,5; 2,5 µg/ml peptit: 75,4±1,3; 5 µg/ml peptit: 74,26±0,5; 10 µg/ml peptit: 96,5±3,5; 20 µg/ml peptit: 73,4±13,3; 40 µg/ml peptit: 62,96±8,8; 60 µg/ml peptit: 60,5±7,3; 80 µg/ml peptit: 40,1±8,9; 100 µg/ml peptit: 13,27±6,1. *p<0,05; **p<0,01 Kontrole göre anlamlı derecede farklılık.

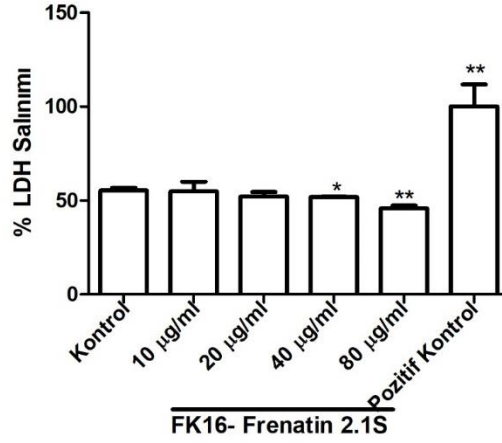
HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine pozitif kontrol olarak bir antineoplastik ilaç olan 5-Florourasil kullanılmıştır. Bu ilacın hücre canlılığı üzerine etkisi 24. ve 48. saatlerde araştırılmıştır. 1-200 µg/ml konsantrasyonlarda uygulanan tüm dozlar 24. saatte hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açmıştır ve 5 µg/ml konsantrasyonlardan itibaren hücre canlılığındaki azalma daha anlamlı olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.1.3) (**p<0,01; ***p<0,001). Bununla birlikte uygulanan tüm dozlarda bu azalma %50 'nin altında gerçekleşmemiştir. 48. saat inkübasyon sonunda 5-FU'nun tüm dozları hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açmıştır ve 2,5 µg/ml konsantrasyonlardan itibaren hücre canlılığındaki azalma daha anlamlı olarak gerçekleşmiştir (**p<0,01; ***p<0,001) (Şekil 4.1.3). Hücre canlılığı 25-200 µg/ml konsantrasyonlarda %50'nin altında daha anlamlı olarak azalmıştır (***p<0,001) (Şekil 4.3). 48 saat için IC₅₀ değeri 20,94 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.3 : 5-Florourasil (5-FU) 'in HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi. 24 saat için % hücre canlılık değerleri: Kontrol:100±2,3; 1 µg/ml 5-FU: 69,87±11,32; 2,5 µg/ml 5-FU: 60,5±12,1; 5 µg/ml 5-FU: 64,9±3,5; 10 µg/ml 5-FU: 63,3±2,3; 25 µg/ml 5-FU: 55,8±5,8; 50 µg/ml 5-FU: 52,8±7,5; 100 µg/ml 5-FU: 57,5±5,3; 200 µg/ml 5-FU: 50,41±5,3. 48 saat için % hücre canlılık değerleri: Kontrol:100±10,6; 1 µg/ml 5-FU: 68,40±3,5; 2,5 µg/ml 5-FU: 55,65±3,4; 5 µg/ml 5-FU: 61,7±3,2; 10 µg/ml 5-FU: 65,1±10,4; 25 µg/ml 5-FU: 45,6±2,1; 50 µg/ml 5-FU: 44,4±3,7; 100 µg/ml 5-FU: 33,4±3,7; 200 µg/ml 5-FU: 34,9±1,6. **p<0,01; ***p<0,01 Kontrolle göre anlamlı derecede farklılık.

4.2. SİTOTOKSİSİTE TESTİNE AİT BULGULAR

FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptidinin HepG2 hücrelerinde plazma membran bütünlüğünün bozulması ve hücrelerin nekrozla ölmesine ilişkin olası etkilerini araştırmak amacı ile peptit maruziyeti sonrası kültür medyumundaki laktat dehidrogenaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. Bu nedenle 24 saat süresince 10, 20, 40 ve 80 µg/ml peptit uygulanmasını takiben hücre medyumlarına geçen LDH aktivitesi araştırıldığında kontrol grubuna kıyasla 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonda anlamlı bir farklılık gözlenmezken, 40 µg/ml konsantrasyonda LDH aktivitesinde hafif bir azalma ($p<0,05$) ve 80 µg/ml konsantrasyonda ise aktivitede daha fazla bir azalma ($p<0,01$) belirlenmiştir (Şekil 4.2). Triton X-100 uygulanan pozitif kontrol grubunda medyuma geçen enzim aktivitesi en yüksek olarak belirlenmiştir ($p<0,01$) (Şekil 4.4).

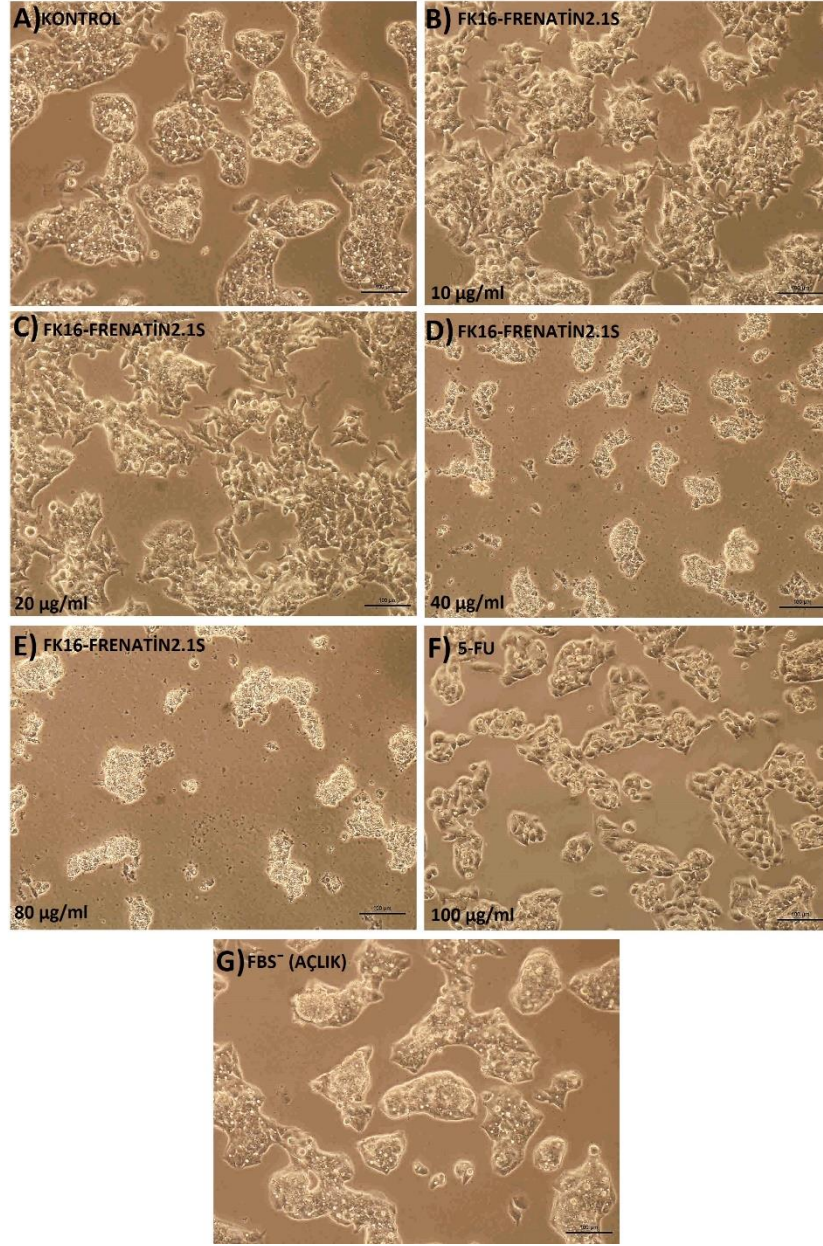


Şekil 4.4 : FK-16-Frenatin 2.1S peptidinin HepG2 hücrelerinde LDH salınımı üzerine etkisi. 24 saat için % LDH salınım değerleri: Kontrol:55,4±1,2; 10 µg/ml peptit: 54,8±5,2; 20 µg/ml peptit: 52,1±2,5; 40 µg/ml peptit: 51,8±0,3; 80 µg/ml peptit: 45,8±1,5; Pozitif kontrol: 100±11,8. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ Kontrole göre anlamlı derecede farklılık.

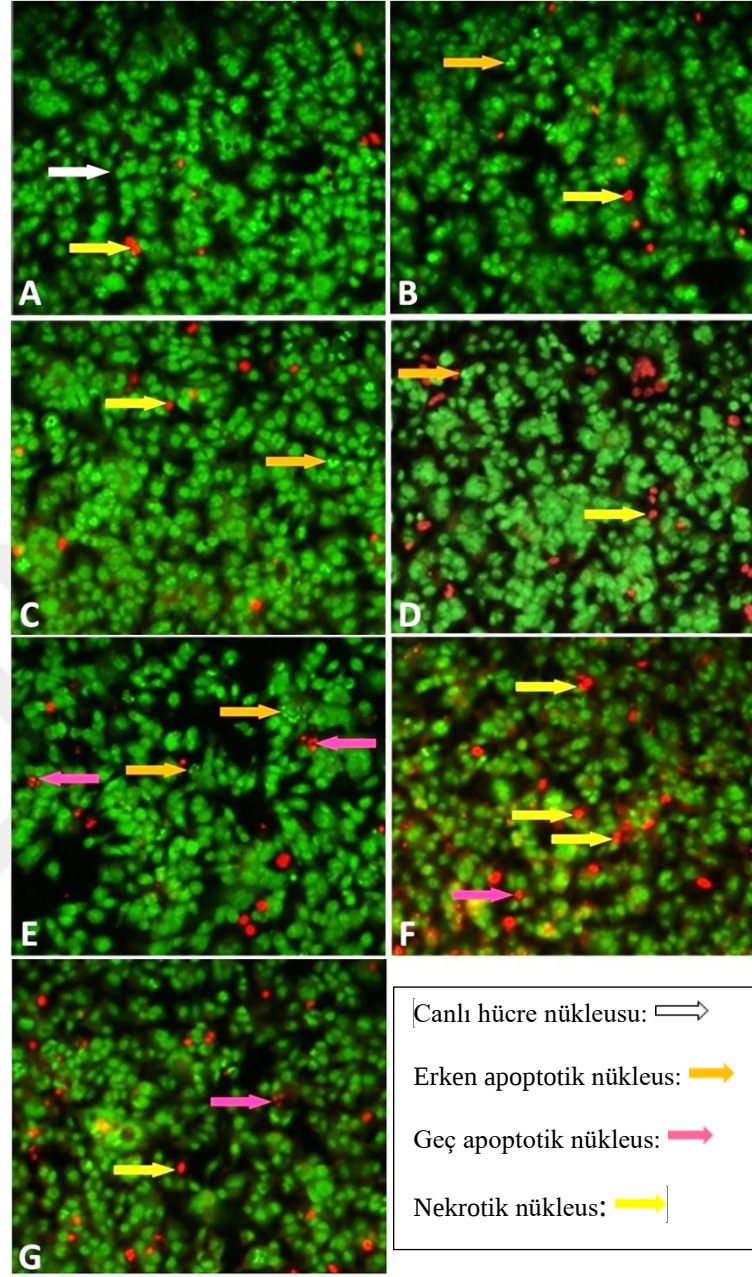
4.3. FK-16-FRENATİN 2.1S PEPTİTİ İLE İNDÜKLENEN HÜCRE ÖLÜMÜNÜN MORFOLOJİK VE AKRİDİN ORANJ/ETİDYUM BROMÜR İKİLİ BOYAMA YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptiti ile indüklenen HepG2 hücrelerindeki morfolojik değişiklikler farklı konsantrasyonlarda 24 saat peptit uygulamasını takiben hem ışık mikroskobunda hem de hücresel boyalar kullanılarak floresan mikroskopta analiz edildi. HepG2 hücreleri kontrol grubundaki morfolojilerini, artan hibrit peptit konsantrasyonuna paralel olarak kaybederek hücresel hacimleri azalmış olarak gözlenmiştir ve oluşturdukları hücresel gruplarında azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.5). 100 µg/ml 5-FU uygulaması HepG2 hücrelerinde hücre şeklinde hafif bir artışa neden olmuştur. Otofojik hücre ölümünü uyarmak için FBS içermeyen medyunda inkübe edilen HepG2 hücrelerinde kontrole kıyasla morfolojik olarak belirgin bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.5).

FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptiti ile indüklenebilecek olası apoptotik ve nekrotik hücre ölümü tipleri akridin oranj ve etidyum bromür ikili boyama uygulaması yapılarak araştırılmıştır ve apoptotik ve nekrotik hücreler nükleus şekli ve boyanma özelliğine göre ayırt edilmiştir. HepG2 hücrelerinde 10-80 µg/ml peptit uygulaması fragmente olmuş ve yeşil olarak boyanan nükleus sayısında (erken apoptotik) artışa neden olmuştur (Şekil 4.6). Nekrotik hücelere ait nükleuslar kırmızı boyanan nükleuslar olarak ayırt edildi ve bu nükleusların sayısında belirgin bir farklılık gözlenmedi. Diğer taraftan 5-FU (50 µg/ml) uygulaması nekrotik nükleus sayısında artışa yol açmıştır (Şekil 4.6). FBS içermeyen medyunda inkübe edilen HepG2 hücrelerinde kontrole kıyasla morfolojik olarak belirgin bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.6).



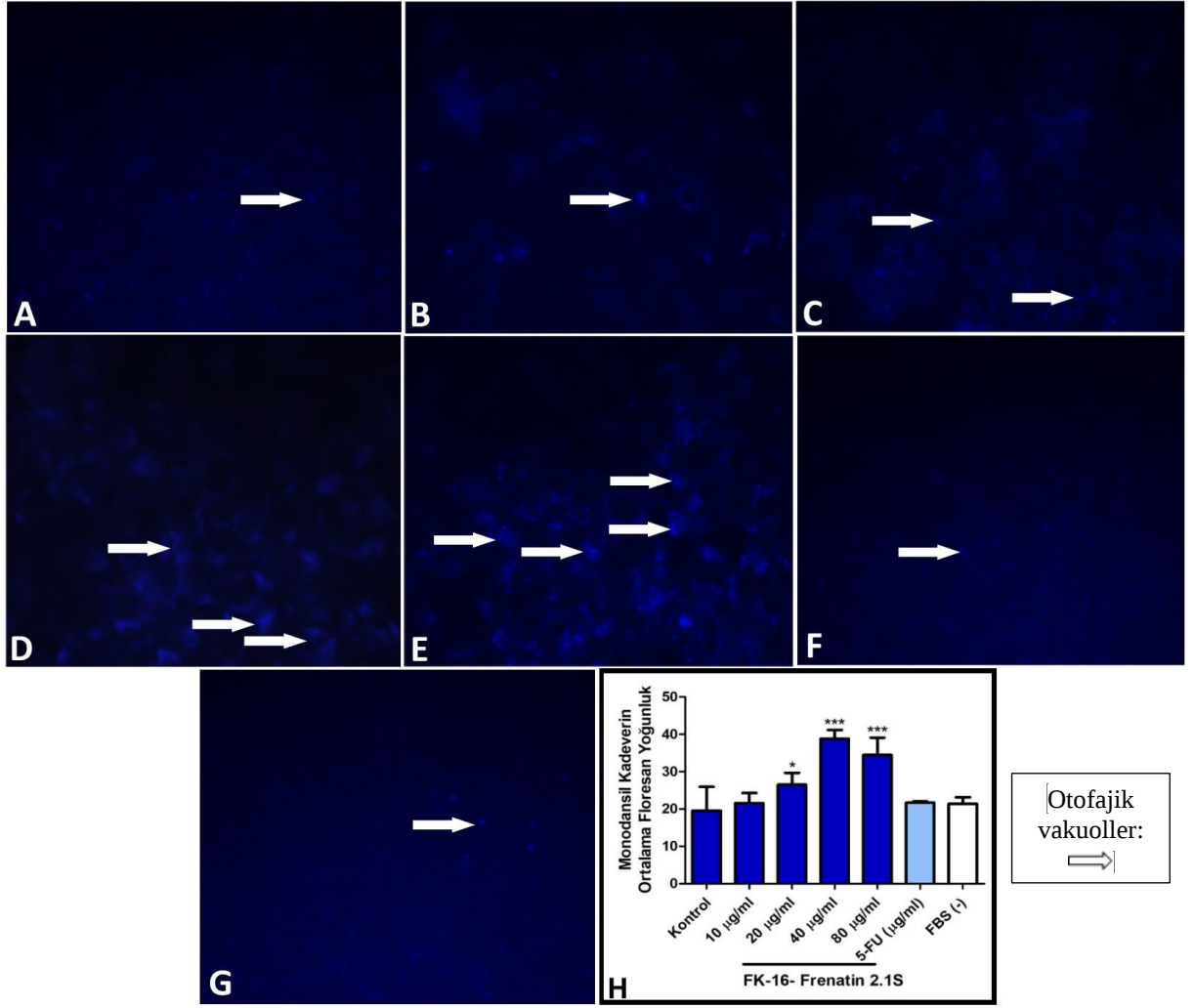
Şekil 4.5 : HepG2 hücrelerinde FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptidinin 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonrası hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. Bar: 100µm.



Şekil 4.6 : FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptidinin farklı konsantrasyonları, 100 µg/ml 5-FU uygulaması ve FBS eksikliğine 24 saat süresince maruz kalan hücrelerin akridin oranji-etidyum bromür ile boyanmasını takiben elde edilen görüntüleri. A) Kontrol grubu; B) 10 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S uygulanan hücreler; C) 20 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S uygulanan hücreler; D) 40 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S uygulanan hücreler; E) 80 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S uygulanan hücreler; F) 100 µg/ml 5-FU uygulanan hücreler; G) FBS içermeyen medyunda inkübe edilen hücreler.

4.4. MONODANSİLKADEVERİN İLE OTOFAJİK VAKUOLLERİN BELİRLENMESİNE İLİŞKİN BULGULAR

Otofojik hücre ölümünün bir belirteci olan otofajik vakuollerin olası varlığını araştırmak için HepG2 hücreleri 24 saat farklı konsantrasyonlarda FK-16-Frenatin 2.1S peptiti ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda yapılan MDC boyamasını takiben hücrelerdeki otofajik vakuoller floresan mikroskopta gözlenerek fotoğraflandı. Artan peptit konsantrasyonuna paralel olarak hücre içinde otofajik vakuollerin kontrol grubu hücrelerdekine kıyasla arttığı ve bu artışın en belirgin olarak 40 ve 80 µg/ml konsantrasyonlarda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.7A-E). 100 µg/ml 5-FU uygulaması ve FBS yokluğunda otofajik vakuol sayısında kontrole kıyasla bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.7F ve G). MDC'nin farklı konsantrasyonlarda peptit uygulandığı gruplarda ortalama floresan yoğunluğu ölçüldüğünde, kontrol grubuna kıyasla 10 µg/ml peptit uygulanan hücrelerde MDC floresan yoğunluğunda anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$) (Şekil 4.7H). MDC floresan yoğunluğu 20 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artarken ($*p<0,05$); 40 ve 80 µg/ml peptit uygulaması ile daha fazla artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak daha anlamlıdır ($***p<0,001$) (Şekil 4.7H). 5-FU uygulaması ve FBS yokluğunda MDC floresan yoğunluğunda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.7H).



Şekil 4.7 : A-G: HepG2 hücrelerinin, 24 saat FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptidinin farklı konsantrasyonlarına, 100 µg/ml 5-FU uygulamasına ve FBS eksikliğine maruz bırakıldıktan sonra uygulanan MDC boyası ile elde edilen görüntüleri. A) Kontrol grubu; B) 10 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S uygulanan hücreler; C) 20 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S uygulanan hücreler; D) 40 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S uygulanan hücreler; E) 80 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S uygulanan hücreler; F) 100 µg/ml 5-FU uygulanan hücreler; G) FBS içermeyen medyumda inkübe edilen hücreler. H) NIS Elements yazılım programı ile farklı maruziyet koşullarında MDC floresan yoğunluğu: Kontrol: 19,6±6,4; 10 µg/ml peptit: 21,5 ±2,7; 20 µg/ml peptit: 26,5±3,2; 40 µg/ml peptit: 38,9,1±2,3; 80 µg/ml peptit: 34,5±4,6; 100 µg/ml 5-FU: 21,7±0,4; FBS (-):21,4±1,7. *p<0,05, ***p<0,001 Kontrole göre anlamlı derecede farklılık.

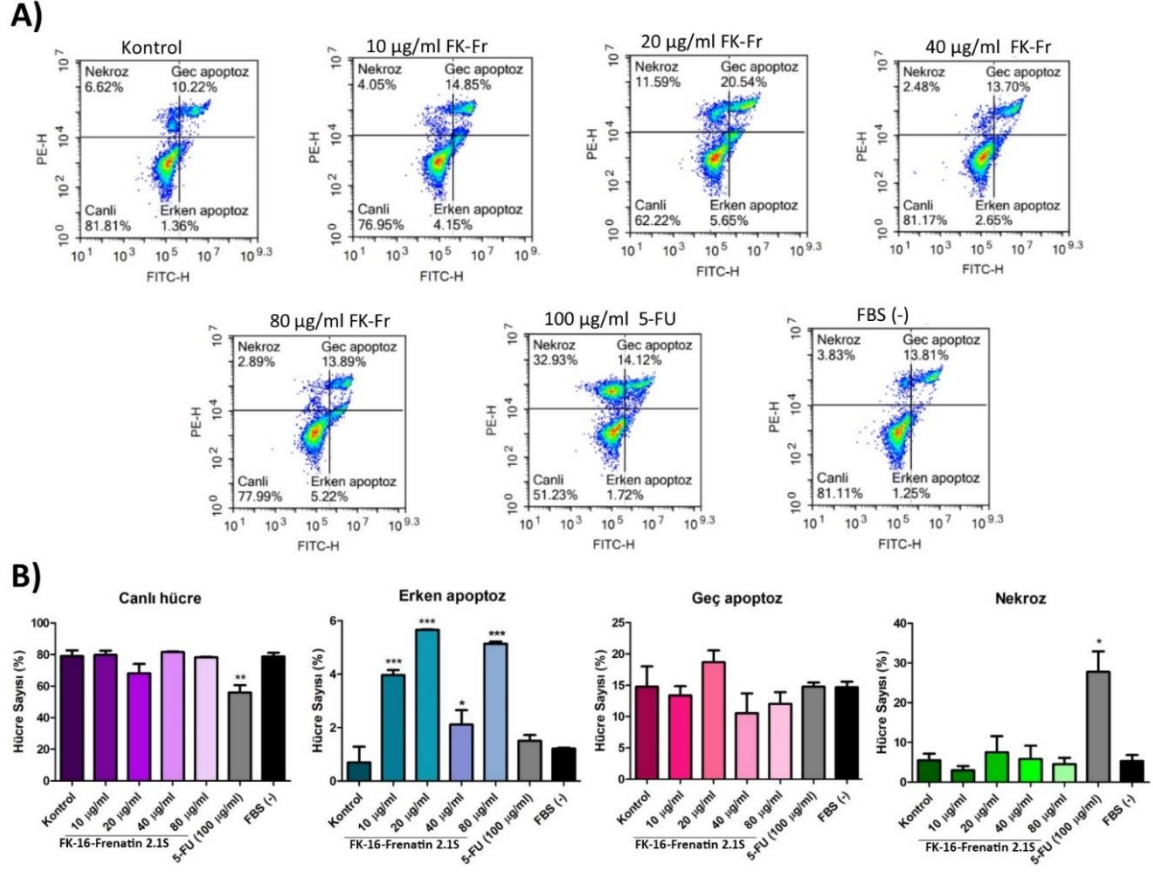
4.5. ANNEKSİN V/FITC-PI AKIM SİTOMETRİSİNE İLİŞKİN BULGULAR

FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptitinin HepG2 hücrelerinde indüklediği hücre ölümünün apoptoz ile ilişkisi, Anneksin V-FITC ile membran asimetrisini kaybetmiş hücrelerin akım sitometri cihazında saptanması yolu ile araştırıldı. Analizde ayrıca nekrotik hücreleri tanımlamak için PI boyası ile hücreler boyandı. Her iki boya negatif hücreler canlı, sadece AnnexinV-FITC pozitif olan hücreler erken apoptotik, hem AnnexinV-FITC hem de PI hücreler geç apoptotik ve sadece PI pozitif hücreler nekrotik olarak kabul edilmektedir.

Farklı konsantrasyonlarda peptit uygulanan hücrelerde kontrol grubuna kıyasla canlı hücre sayısında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.8). Pozitif kontrol olarak oluşturulan 5-FU (100 $\mu\text{g/ml}$) uygulanan grup canlı hücre sayısını anlamlı olarak azaltmıştır ($**p<0,01$) (Şekil 4.8). FBS yokluğunda hücrelerin canlılığında anlamlı bir azalma gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.8).

Erken apoptotik hücrelerin sayısı peptit uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla 10, 40 ve 80 $\mu\text{g/ml}$ peptit konsantrasyonlarında daha fazla ($***p<0,001$), 20 $\mu\text{g/ml}$ peptit uygulanan hücrelerde ise daha az olarak anlamlı artış göstermiştir ($*p<0,05$) (Şekil 4.8). 5-FU ve FBS yokluğu erken apoptotik hücre sayısında anlamlı bir değişime yol açmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.8).

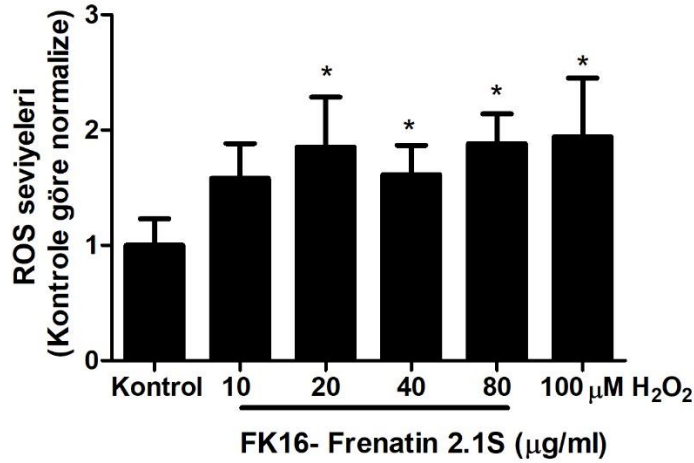
Tüm deneysel koşullarda geç apoptotik hücre sayısında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.8). Nekrotik hücre ölümünü gösteren PI pozitif hücreler kontrol grubuna kıyasla sadece 5-FU uygulanan grupta anlamlı bir artış göstermiştir ($*p<0,05$) (Şekil 4.8). Farklı konsantrasyonlardaki FK-16-Frenatin 2.1S peptiti ve FBS yokluğu nekrotik hücre sayısında anlamlı bir değişime yol açmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 : FK-16-Frenatin 2.1S peptidinin farklı konsantrasyonları ile 100 µg/ml 5-FU ile FBS yokluğunun HepG2 hücrelerinde apoptotik ölüm üzerine etkisinin Anneksin V/FITC-PI metodu ile değerlendirilmesi. A) Farklı koşullarda 24 saat maruziyet sonrası elde edilen histogramlar. B) Canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin yüzde değerlerine ait grafikler. Canlı hücreler için yüzde değerler: Kontrol: 79±3,5; 10 µg/ml peptit: 79,7 ±2,7; 20 µg/ml peptit: 68,1±5,9; 40 µg/ml peptit: 81,5±0,4; 80 µg/ml peptit: 78,3±0,3; 100 µg/ml 5-FU: 55,9±4,7; FBS (-): 78,8±2,3. Erken apoptotik hücreler için yüzde değerler: Kontrol: 0,7±0,6; 10 µg/ml peptit: 4 ±0,2; 20 µg/ml peptit: 5,7±0,01; 40 µg/ml peptit: 2,1±0,5; 80 µg/ml peptit: 5,1±0,08; 100 µg/ml 5-FU: 1,5±0,2; FBS (-): 1,2±0,03. Geç apoptotik hücreler için yüzde değerler: Kontrol: 14,7±5,6; 10 µg/ml peptit: 13,4 ±1,5; 20 µg/ml peptit: 18,7±1,8; 40 µg/ml peptit: 10,5±3,2; 80 µg/ml peptit: 12,04±1,8; 100 µg/ml 5-FU: 14,8±0,7; FBS (-): 14,7±0,9. Nekrotik hücreler için yüzde değerler: Kontrol: 5,5±1,6; 10 µg/ml peptit: 2,9 ±1,1; 20 µg/ml peptit: 7,5±4,1; 40 µg/ml peptit: 5,8±3,3; 80 µg/ml peptit: 4,5±1,6; 100 µg/ml 5-FU: 27,7±5,2; FBS (-): 5,3±1,5. *p<0,05 Kontrole göre anlamlı derecede farklılık. **p<0,01 Kontrole göre anlamlı derecede farklılık. *p<0,05 Kontrole göre anlamlı derecede farklılık. *p<0,05, ***p<0,001 Kontrole göre anlamlı derecede farklılık.

4.6. HÜCRE İÇİ REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN (ROS) SEVİYELERİNE AİT BULGULAR

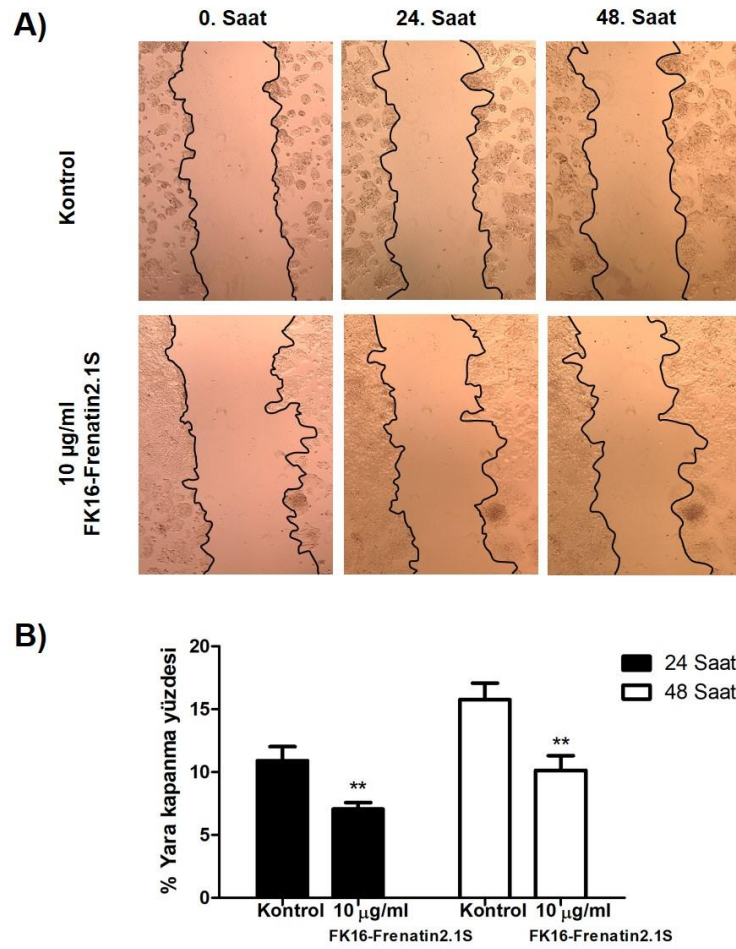
FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptitinin HepG2 hücrelerinde ROS seviyelerindeki olası etkileri hücre ölümü ile ilişkili olarak çalışılmıştır. 24 saat süresince 10, 20, 40 ve 80 $\mu\text{g/ml}$ peptit uygulanmasını takiben hücre içi reaktif oksijen türlerinin seviyesi bir ROS belirteci olan DCFH-DA kullanılarak ölçüldü. 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon hariç, uygulanan tüm peptit konsantrasyonları kontrol grubuna oranla anlamlı olarak ROS seviyelerinde artışa yol açmıştır (* $p<0,05$). Pozitif kontrol olarak bir grup HepG2 hücresine 24 saat boyunca 100 μM H_2O_2 uygulanmış olup, bu grupta ROS seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlenmiştir (* $p<0,05$) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 : FK-16-Frenatin 2.1S peptitinin HepG2 hücrelerinde hücre içi reaktif oksijen seviyeleri üzerine etkisi. 24 saat için kontrole göre normalize edilen değerler: Kontrol: $1 \pm 0,23$; 10 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $1,58 \pm 0,3$; 20 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $1,85 \pm 0,43$; 40 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $1,61 \pm 0,25$; 80 $\mu\text{g/ml}$ peptit: $1,88,8 \pm 0,26$; Pozitif kontrol: $1,9 \pm 0$. * $p<0,05$ Kontrole göre anlamlı derecede farklılık.

4.7. YARA KAPANMA (MİGRASYON) DENEYİNE AİT BULGULAR

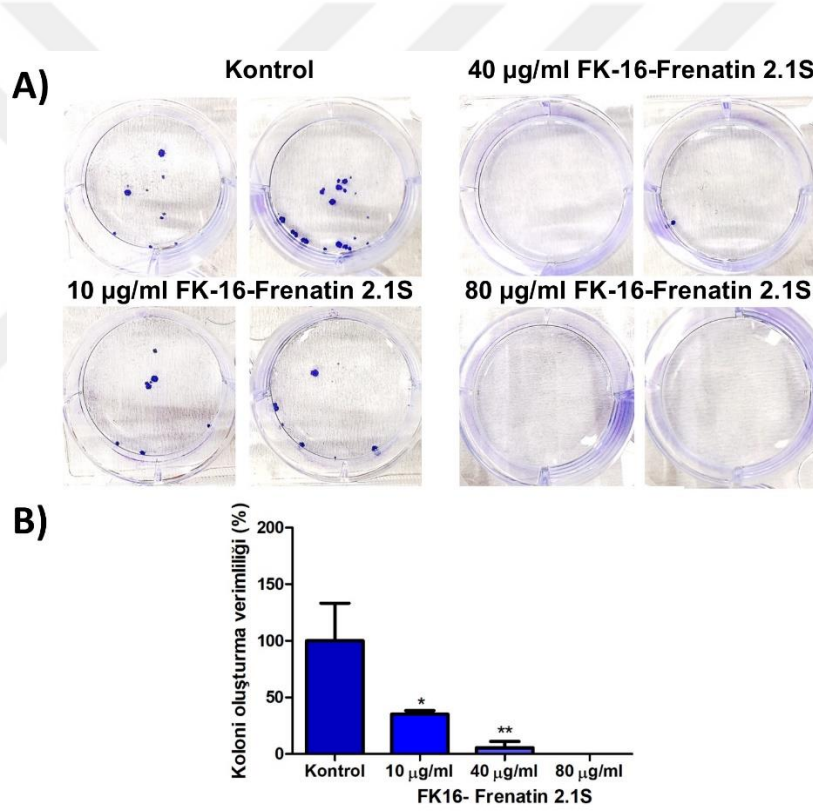
FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptidinin HepG2 hücrelerinde hücre hareketliliği üzerindeki etkileri araştırmak için hücre çoğalmasına etki etmeyen 10µg/ml konsantrasyonu HepG2 hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Hem 24 hem de 48 saat inkübasyon sonucunda deney gruplarında gerçekleşen kapanma, peptidin uygulanmadığı kontrol grubuna kıyasla daha az gözlemlendi (Şekil 4.10A) ve kapanma yüzde olarak hesaplanarak istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu belirlendi (**p<0,01; ***p<0,001) (Şekil 4.10B).



Şekil 4.10 : FK-16-Frenatin 2.1S peptidinin HepG2 hücrelerinde hücre hareketliliğinin yara kapanma testi ile belirlenmesi. A) HepG2 hücrelerinde yara iyileşmesinin 0., 24. ve 48. saatteki mikroskop görüntüleri (4X büyütme). B) FK-16-Frenatin 2.1S peptidinin HepG2 hücrelerinde yara kapanmasına ilişkin grafiği. 10 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S peptidinin 24. ve 48. saat uygulaması sonucu elde edilen sonuçlar: 24 saat için Kontrol:10,34±1,7; 10 µg/ml:7,06±1,5. 48 saat için: Kontrol:19,06±1,9; 10 µg/ml:9,8±1,9. **p<0,01; ***p<0,001 Kontrolle göre anlamlı derecede farklılık.

4.8. KOLONİ OLUŞTURMA VERİMLİLİĞİNE AİT BULGULAR

Tek bir hücreden koloni oluşturma üzerine FK-16-Frenatin 2.1S'in olası inhibitör etkilerini araştırmak için 10, 40 ve 80 µg/ml konsantrasyonlarda peptite 24 saat maruz bırakılan hücreler 21 gün boyunca inkübe edildi ve oluşturdıkları koloniler sayıldı. 50 hücreden fazla sayıda hücreden oluşan koloni sayısında doza bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ve bu azalma 10 µg/ml konsantrasyonda daha az olmakla birlikte 40 µg/ml konsantrasyonda daha belirgin olarak gözlemlendi (*p<0,05; **p<0,01) (Şekil 4.11). 80 µg/ml konsantrasyonda koloni oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 4.11).

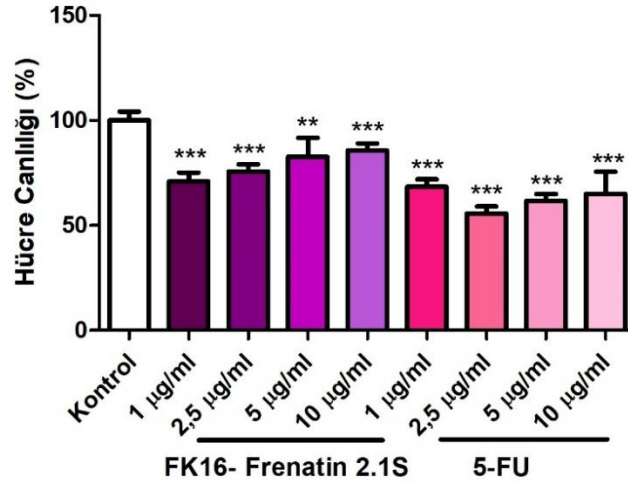


Şekil 4.11 : HepG2 hücrelerinde FK-16-Frenatin 2.1S'in koloni oluşturma yeteneği üzerine etkileri. A) HepG2 hücrelerine 24 saat uygulanan 10, 40 ve 80 µg/ml konsantrasyondaki FK-16-Frenatin 2.1S'in koloni oluşturma yeteneği bulgusu. B) Her kuyucuktaki koloni sayımı ile hesaplanan % koloni oluşturma verimi. Kontrol: 100±33,3 10 µg/ml peptit: 35,2 ±3,2; 40 µg/ml peptit: 5,5±5,5; 80 µg/ml peptit: 0. *p<0,05 ve **p<0,01 Kontrole göre anlamlı derecede farklılık.

4.9. FK-16-FRENATİN 2.1S'İN VE 5-FU'NUN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE SİNERJİSTİK ETKİLERİNE AİT BULGULAR

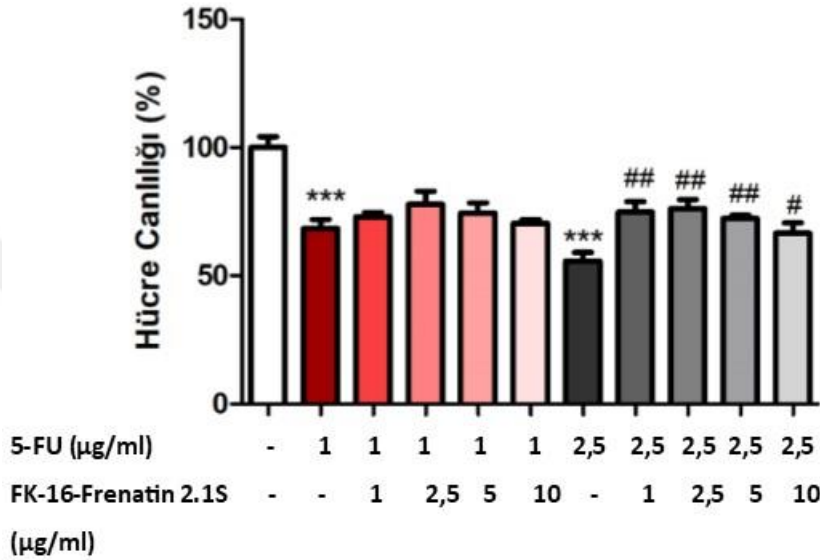
FK-16-Frenatin 2.1S'in antikanser ilaçlar ile olası sinerjistik etkilerini araştırmak amacı ile düşük konsantrasyonlardaki FK-16-Frenatin 2.1S, yine düşük konsantrasyonlarda antineoplastik bir ilaç olan 5-FU ile hücrelere uygulanmıştır. Bu uygulamalar sonucu elde edilen hücre canlılığındaki azalma aynı konsantrasyondaki tek başına 5-FU uygulanan grup ile kıyaslanmıştır.

HepG2 hücrelerinde FK-16-Frenatin 2.1S'in 1-10 µg/ml konsantrasyonlarda 48 saat uygulaması kontrol hücrelerine kıyasla hücre canlılığını anlamlı olarak azalmıştır (**p<0,01; ***p<0,001) (Şekil 4.12). Bu azalma peptitin en düşük dozları olan 1 ve 2.5 µg/ml daha fazla gözlenirken; 5 ve 10 µg/ml dozlarında daha az oranda gerçekleşmiştir (**p<0,01; ***p<0,001) (Şekil 4.12) 48 saat uygulanan düşük konsantrasyonlardaki 5-FU benzer şekilde hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açmıştır (p<0,001) (Şekil 4.12). Bununla birlikte her iki molekülün düşük konsantrasyonlarında yalnız uygulanması hücre canlılığında %50'nin altında bir azalmaya yol açmamıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 : HepG2 hücrelerinde düşük konsantrasyonda 48 saat uygulanan 1-10 µg/ml konsantrasyonlardaki FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptitinin ve 5-FU'nun hücre canlılığına etkisi. FK-16-Frenatin 2.1S için 48 saat sonunda elde edilen hücre canlılık değerleri: Kontrol: 100±4,2; 1 µg/ml peptit: 70,96±4,2; 2,5 µg/ml peptit: 75,65±3,4; 5 µg/ml peptit: 82,74±8,9; 10 µg/ml peptit: 85,7±3,4. 5-FU için 48 saat sonunda elde edilen hücre canlılık değerleri: 1 µg/ml peptit: 68,4±3,5; 2,5 µg/ml peptit: 55,65±3,4; 5 µg/ml peptit: 61,71±3,2; 10 µg/ml peptit: 65,1±10,4. **p<0,01 ve ***p<0,001 Kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklılık.

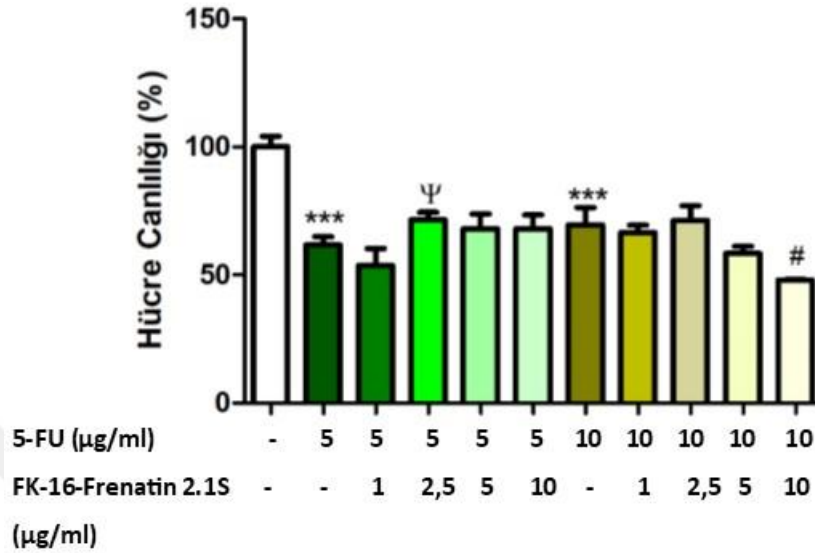
48 saat 1 µg/ml 5-FU ile 1-10 µg/ml dozlarında FK-16-Frenatin 2.1S uygulanması, tek başına 1 µg/ml 5-FU uygulamasına kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya yol açmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.13). 2,5 µg/ml 5-FU ile 1-10 µg/ml dozlarında FK-16-Frenatin 2.1S uygulanması ise tek başına 2,5 µg/ml 5-FU uygulamasına kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir artışa yol açmıştır ($^{\#}p<0,05$; $^{\#\#}p<0,01$) (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 : HepG2 hücrelerinde 1 ve 2,5 µg/ml konsantrasyonda 48 saat uygulanan 5-FU'nun ve 1-10 µg/ml konsantrasyonlardaki FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptidinin birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisi. Hücre canlılık değerleri Kontrol: $100\pm4,2$; 1 µg/ml 5-FU: $68,4\pm3,4$; 1 µg/ml 5-FU+1 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S: $72,9\pm1,9$; 1 µg/ml 5-FU+2,5 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S: $77,8\pm5,2$; 1 µg/ml 5-FU+5 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S: $74,5\pm4$; 1 µg/ml 5-FU+10 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S: $70,4\pm1,6$; 2,5 µg/ml 5-FU: $55,6\pm3,4$; 2,5 µg/ml 5-FU+1 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S: $74,8\pm4,1$; 2,5 µg/ml 5-FU+2,5 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S: $76,2\pm3,5$; 2,5 µg/ml 5-FU+5 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S: $72,3\pm1,3$; 2,5 µg/ml 5-FU+10 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S: $66,6\pm4$. *** $p<0,001$ Kontrol grubuna göre; $^{\#}p<0,05$ ve $^{\#\#}p<0,01$ 2,5 µg/ml 5-FU uygulanan grubu göre.

FK-16-Frenatin 2.1S'in 1, 5 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarının 5 µg/ml 5-FU ile verilmesi, tek başına 5 µg/ml 5-FU verilen gruba kıyasla hücre canlılığında bir değişime yol açmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.14). 2,5 µg/ml peptid konsantrasyonunun 5-FU ile verilmesi, 5 µg/ml 5-FU verilen grupla karşılaştırıldığında hücre canlılığında artışa yol açmıştır ($^{\Psi}p<0,05$) (Şekil 4.14). 10 µg/ml 5-FU ile 1, 2,5 ve 5 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S peptidinin beraber uygulanması ise aynı konsantrasyonda tek başına 5-FU uygulanan hücrelere kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya yol açmamıştır ($p>0,05$). (Şekil 4.14). Sadece 10 µg/ml 5-FU ile birlikte verilen

10 µg/ml peptit hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalmaya yol açmıştır ve bu azalma % 50'nin altında gerçekleşmiştir ($^{\#}p<0,05$) (Şekil 4.14).



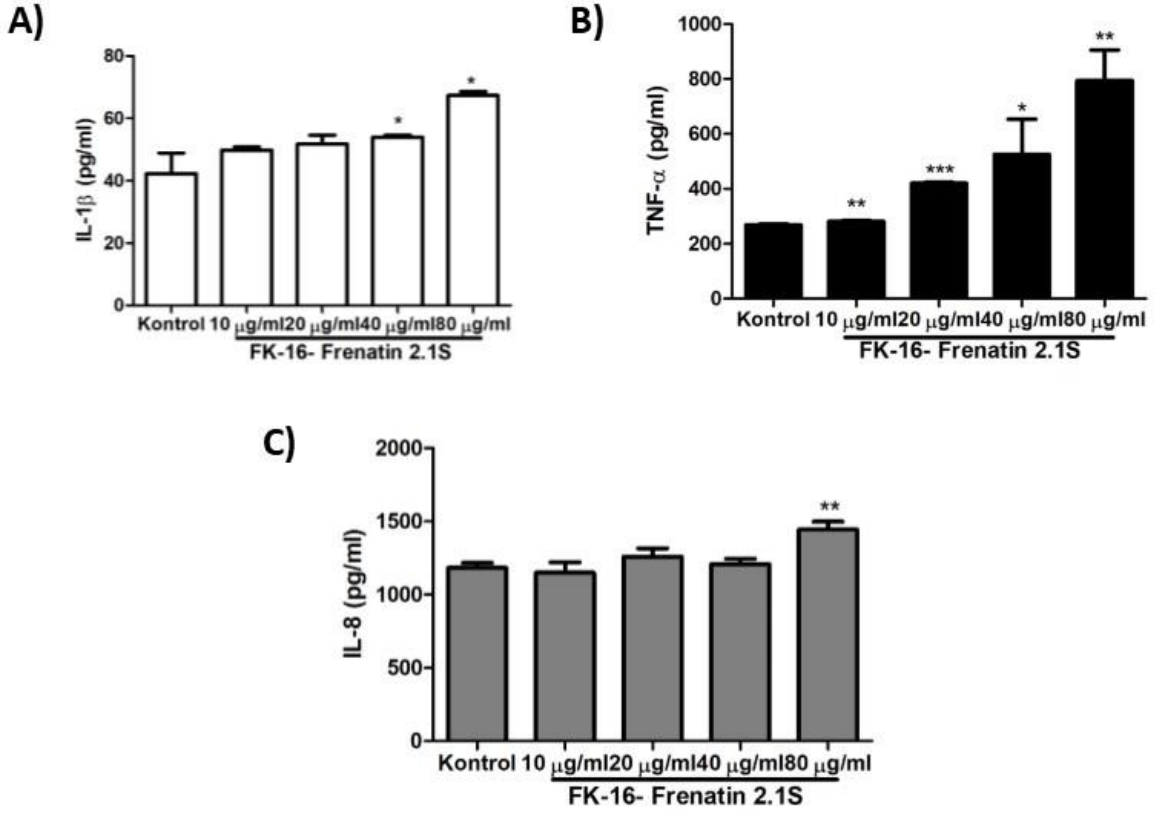
Şekil 4.14 : HepG2 hücrelerinde 5 ve 10 µg/ml konsantrasyonda 48 saat uygulanan 5-FU'nun ve 1-10 µg/ml konsantrasyonlardaki FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptitinin birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisi. Hücre canlılık değerleri Kontrol: 100±4,2; 5 µg/ml 5-FU: 61,7±3,2; 5 µg/ml 5-FU+1 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S: 53,7±6,7; 5 µg/ml 5-FU+2,5 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S: 71,6±2,8; 5 µg/ml 5-FU+5 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S: 68,1±5,7; 5 µg/ml 5-FU+10 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S: 68±5,5; 10 µg/ml 5-FU: 69,5±6,7; 10 µg/ml 5-FU+1 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S: 66,6±2,8; 10 µg/ml 5-FU+2,5 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S: 71,3±5,8; 10 µg/ml 5-FU+5 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S: 58,4±2,7; 10 µg/ml 5-FU+10 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S: 48±0,3. ***p<0,001 Kontrol grubuna göre; Ψp<0,05 5 µg/ml 5-FU uygulanan grubu göre; #p<0,05 10 µg/ml 5-FU uygulanan grubu göre.

4.10. SİTOKİN SEVİYELERİNE AİT BULGULAR

HepG2 hücrelerinde FK-16-Frenatin 2.1S'in 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarının 24 saat uygulanması hücreler tarafından salgılanan IL-1β seviyelerinde artışa yol açmıştır. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$) (Şekil 4.15A). 40 ve 80 µg/ml konsantrasyonları ise kontrol grubuna kıyasla IL-1β seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açmıştır ($*p<0,05$) (Şekil 4.15A).

24 saat uygulanan tüm peptit konsantrasyonları doza paralel olarak hücre kültür süpernatantındaki TNF-α seviyelerini arttırmıştır. Bu artış 40 µg/ml konsantrasyonunda az anlamlı ($*p<0,05$); 10 ve 80 µg/ml konsantrasyonlarında orta derecede anlamlı ($**p<0,01$); 20 µg/ml konsantrasyonunda daha fazla anlamlı olarak ($***p<0,001$) olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.15B).

FK-16-Frenatin 2.1S peptidinin 10, 20 ve 40 µg/ml konsantrasyonları hücreler tarafından salgılanan IL-8 seviyelerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.15C). 80 µg/ml peptit maruziyeti ise kontrol grubuna kıyasla IL-8 seviyesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırmıştır ($**p<0,01$) (Şekil 4.15C).



Şekil 4.15 : ELISA yöntemi ile hücre kültür medyumunda ölçülen IL-1 β , TNF- α ve IL-8 seviyeleri. A) IL-1 β seviyeleri (pg/ml) Kontrol: 42,2 $\pm$ 6,7; 10 μ g/ml peptit: 49,9 $\pm$ 0,9; 20 μ g/ml peptit: 51,7 $\pm$ 2,8; 40 μ g/ml peptit: 54 $\pm$ 0,6; 80 μ g/ml peptit: 67,4 $\pm$ 1,3. B) TNF- α seviyeleri (pg/ml) Kontrol: 269,1 $\pm$ 3,03; 10 μ g/ml peptit: 281,2 $\pm$ 3,03; 20 μ g/ml peptit: 420,6 $\pm$ 3,03; 40 μ g/ml peptit: 525,2 $\pm$ 128,8; 80 μ g/ml peptit: 794,9 $\pm$ 110,6. C) IL-8 seviyeleri (pg/ml) Kontrol: 1182 $\pm$ 33,2; 10 μ g/ml peptit: 1149 $\pm$ 72,1; 20 μ g/ml peptit: 1259 $\pm$ 56,1; 40 μ g/ml peptit: 1208 $\pm$ 35,5; 80 μ g/ml peptit: 1444 $\pm$ 53,6. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 Kontrole göre anlamlı derecede farklılık. *p<0,05 Kontrole göre anlamlı derecede farklılık.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hepatoselüler karsinoma, çeşitli patojenler ve inflamasyonla birlikte kronik karaciğer hastalıklarından türeyerek malign bir primer karaciğer kanseridir. Dünyada kanserlerden ölümlerdeki sıralaması gittikçe yükselmekte iken HCC tedavi çalışmaları yeni teknolojilerle birlikte devam etmektedir (Zucman-Rossi ve diğ., 2015). Hepatokarsinogenez, genetik ve epigenetik değişikliklerle, onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile başlayan çoklu sinyal yollarının düzensizliğiyle ilerleyen karmaşık bir süreç olmaktadır. Bu karmaşık süreci tanımlayan mekanizmalar hala anlaşılmaya devam ederken terapötik stratejiler üzerine yoğunlaşmaktadır (Tsai ve Chung, 2010). Dünyadaki HCC vakalarının birçoğu viral enfeksiyonlarla desteklendiğinden kötü prognozla ilişkilidir (Asafo-Agyei ve Samant, 2023). Tedavinin daha zor olduğu ileri evre kötü prognozda HCC teşhisi daha fazla olmaktadır (Schneller ve Angel, 2019). Karaciğer hali hazırda tümör gelişimini engellemek için baskılayıcı immün yanıt indükleyebilen antijenlere sahiptir. Bu nedenle kanser hücreleri tarafından bastırılan immün yanıtları aktive edici antikanser özellikleri olan çalışmalar yapılmaktadır (Fu ve diğ., 2019). Kontrollü gerçekleşen programlanmış hücre ölümlerinden olan apoptoz, nekroz ve otofajiyi kanser hücrelerinde araştırarak spesifik hücre ölümü hedefli ilaç yaklaşımları söz konusudur (Galluzzi ve diğ., 2018).

Antimikrobiyal peptitler 5-40 amino asitten oluşan küçük ve katyonik (nötr pH'da net yük (+2) ve (+9) arası) peptitler olup, patojen mikroorganizmalara karşı etkili moleküllerdir. Doğal immün sistemin bir unsuru olan bu peptitler bakterilerden memelilere kadar pek çok organizma tarafından üretilmektedirler (Tornessollo ve diğ., 2020). Son yıllarda antimikrobiyal aktivitelerinin yanı sıra antikanser aktiviteye de sahip oldukları da gözlenmektedir. Bu etkileşimde kanser hücre membranındaki negatif yük ve katyonik özellikteki peptit arasındaki elektrostatik etkileşim önem taşımaktadır. Kanser hücrelerinin membranının dış tarafında daha fazla fosfatidilserine sahip olması, tekrarlanmış O-glikozilasyonlu bölgeleri içeren glikoproteinlerin çok fazla eksprese olması ve gangliozid, heparan sülfat gibi diğer anyonik moleküllerin fazla miktarda bulunması kanser hücre yüzeyinin negatif yüklü olmasına katkı sağlamaktadır (Baxter ve diğ., 2017; Groux-Degroote ve diğ., 2017; Vicente ve diğ., 2018). Normal hücre membranlarının zwitter iyonik yapısı antimikrobiyal peptitlerin kanser hücrelerine karşı seçici aktivite göstermesini sağlamaktadır. Bununla birlikte elektrostatik

etkileşim dışında membranın akışkanlığı, kanser hücrelerinde artan yüzey alanı ve transmembran potansiyel bu seçiciliğe katkıda bulunmaktadır (Patrzykat ve diğ., 2002). Bu nedenle kanser hücreleri ile hızlı çoğalan normal hücrelerde de etkili olan geleneksel kemoterapinin aksine, kanser hücrelerine karşı etkili antimikrobiyal peptitler hücresel membranları hedef alarak herhangi bir direnç gelişimi olmaksızın etki etmektedir (Hilchie ve diğ., 2012). Bununla birlikte antikanser aktiviteli bazı antimikrobiyal peptitler, bakteri ve kanser hücrelerinin yanı sıra normal hücrelere de etki gösterebilmektedir (Sancar ve diğ., 2023) Antimikrobiyal peptitler bu bakımdan bakteri, kanser hücreleri ve normal hücrelere sitotoksik olanlar ile bakteri ve kanser hücrelerine etkili olup normal hücreler üzerinde etkili olmayanlar olarak iki gruba ayrılır (Hoskin ve Ramamoorthy, 2008). Son yıllarda artan bir ilgiyle hibrit peptitler, iki veya daha fazla farklı peptitin çeşitli biyolojik yöntemlerle birleştirilip daha etkili yeni biyolojik aktiviteyi hedefleyen terapötik stratejiler üzerine çalışılmaktadır. Çalışmamızda iki farklı peptidin bir araya gelmesi ile oluşan bir hibrit peptidin antikanser aktivitesini hepatosellüler karsinoma hücre hattında araştırdık. Uyguladığımız tüm konsantrasyon (1-100 $\mu\text{g/ml}$) ve farklı inkübasyon periyotlarında (6, 12 ve 24 saat) hücre canlılığında, HUVEC’lerde kontrol hücrelere kıyasla %50’nin altında bir azalma belirlemedik. En düşük hücre canlılığını, 20-100 $\mu\text{g/ml}$ peptit uygulamasını takiben 24 saat inkübasyon sonrası yaklaşık %80 olarak belirledik. Diğer taraftan HepG2’lerde yüksek dozlardan itibaren tüm inkübasyon sürelerinde hücre canlılığında %50’nin altında azalmalar olduğunu gözlemledik ve IC_{50} değerlerini 6, 12 ve 24 saat inkübasyon süreleri için sırası ile 62,24, 67,09 ve 70,28 olarak hesapladık. Bu bakımdan sonuçlarımız hibrit peptidin normal hücrelere daha az toksik etkili olduğunu göstermektedir. FK-16-Frenatin 2.1S peptidin ilk 16 amino asitli kısmını oluşturan FK-16 peptidi normol kolon epitel hücrelerinde hücre canlılığında hafif bir azalmaya yol açarken, kolon kanser hücre hatlarında hücre canlılığını daha fazla azaltmıştır (Ren ve diğ., 2013). Hibrit peptidin 12 amino asitlik son parçası olan Frenatin 2.1S ‘in benzer şekilde eritrositlerdeki IC_{50} değerinin akciğer adenokarsinom hücre soyu olan A549 hücrelerine kıyasla çok daha yüksek olduğu da gözlenmiştir (Conlon ve diğ., 2014). Bu sonuçlar hibrit peptidimizin kendisini oluşturan peptitlere benzer şekilde kanser hücre membranına daha etkili olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte peptitlerin HepG2 hücrelerinde tek başlarına olan etkinliklerinin kıyaslanması da gerekmektedir. Literatürde AMP’lerden kekropin A (CA) NH_2 ucundaki α -sarmal kısmı ile melittin (ME) veya magainin 2’nin (MA) NH_2 ucundaki α -sarmal hidrofobik bölgesiyle birleştirilerek oluşturulan hibrit peptitlerin (CA-ME ve CA-MA) küçük

hücreli akciğer kanserine karşı sitotoksiste sergilediği belirlenmiştir (Shin ve diğ., 1997). Başka bir hibrit peptit olan P18, CA-MA hibrit peptiti üzerinden tasarlanmış ve lösemi kanser türleri üzerinde araştırılarak kanser hücrelerine seçici sitotoksiste gösterdiği anlaşılmıştır (Shin ve diğ., 2001). Normal hücelere karşı toksik etkisinin daha az oluşuyla hibrit ACP antikanser terapötik stratejiler için önemli bir potansiyele sahip oldukları görülmektedir.

Kanser hücrelerine karşı etkili olan antimikrobiyal peptitler etki şekillerine göre farklılık gösterebilmektedir. Bazı antimikrobiyal peptitler kanser hücrelerinde membranolitik etkiler göstererek nekrotik hücre ölümüne yol açabilmektedir. Diğer bazı antimikrobiyal peptitler hücre içindeki hedeflerine ulaşarak apoptozu başlatabilir veya otofajik hücre ölümüne yol açabilmektedir. Kanser hücre membranlarına yukarıda açıklanan sebepler ile bağlanan antimikrobiyal peptitler, kendi hidrofobik kısımlarını membranın hidrofobik kısımlarına yerleştirerek membrana demirledikleri düşünülmektedir (Hilchie ve Hoskin, 2010). Bundan sonraki aşama membranda por oluşturma ve hücre lizisi veya dolaylı olarak hücre membranına zarar vermeden sitoplazmada kaspaz bağımlı ya da bağımsız olarak apoptozu başlatmaktır (Hilchie ve diğ., 2019). Ökaryotik membranların kompleks yapısı sebebi ile antimikrobiyal peptitlerin kanser hücre membranlarına olan etkisini tahmin etmek zordur. Peptit konsantrasyonu, membranın lipid yapısı ve yükü farklı etkilerin ortaya çıkmasına yol açabilmektedir ve bu durum aynı peptidin farklı kanser hücrelerinde farklı etki mekanizmasına sahip olmasına yol açabilmektedir. Örneğin sığır laktoferrisin peptiti nöroblastoma hücrelerinde hücre lizisine yol açarken (Eliassen ve diğ., 2006); aynı peptidin lenfoma, lösemi ve meme kanser hücre soylarında apoptozu indüklediği gözlenmiştir (Mader ve diğ., 2007; Furlong ve diğ., 2006; 2010). Bununla birlikte bazı antimikrobiyal peptitlerin kanser hücrelerinde otofajik hücre ölümü ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Örneğin *Rana ridibunda* türü kurbağa derisinden elde edilen Brevinin-2R peptidinin lizozomal membranlarda yer alarak otofaji-benzeri hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir (Ghavami ve diğ., 2008). Çalışmamızda FK-16-Frenatin 2.1S peptidinin kanser hücre membranları üzerine olası etkileri, sitoplazmik bir enzim olan LDH'nin membran hasarı sonucu salınarak hücre kültür medyumunda aktivitesinin ölçülmesi yolu ile araştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda peptit uygulaması LDH salınımında kontrole kıyasla bir artış meydana getirmemiştir. Bu sonuç, peptidin membranolitik etkili olmadığını göstermektedir. Atlantik pisi balığından izole edilen NRC-03 ve NRC-05 peptitleri meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 hücrelerinde doza ve süreye bağlı olarak LDH salınımının artmasına yol açmışlardır ve membranda por

oluşturdukları gözlenmiştir (Hilchie ve diğ., 2011). Benzer şekilde sığır nötrofillerinde tanımlanan siklik dodekapeptit membranda por oluşturarak meme kanseri hücrelerinde lizisi indüklemektedir (Sancar ve Bolkent, 2022). Membran bütünlüğünün bozulması peptitlerin amfipatik yapıları sayesinde membranda transmembran şeklinde yerleşerek por oluşturma (fıçı-çubuk modeli), membranda kümeleşerek lokal konsantrasyonlarının artması ve sonuçta membranın kıvrılarak halkasal por oluşturmaları (halkasal por modeli) veya deterjan benzeri etki ile lipid membranı küçük parçalara ayırma şeklinde olabilmektedir (Nguyen ve diğ., 2011). Bu etkilerin ortaya çıkmasında amino asit dizisi, net yük, hidrofobiklik oranı, membranla etkileşim halinde iken peptidin sahip olduğu sekonder yapı, membran kompozisyonu ve peptidin oligomerleşmesi pek çok faktör etkili olabilmektedir (Hoskin ve Ramamoothy, 2008). Işık mikroskobu bulgularımızda, hibrit peptit uygulanan hücrelerin membranında bir bozulma olmaması ve hücrelerin artan konsantrasyonlarda hacimsel olarak küçülmesi diğer ölüm tiplerini düşündürmüştür.

FK-16-Frenatin 2.1S peptitinin HepG2 hücrelerinde apoptotik hücre ölüm tipini belirlemek amacı ile AO/EB ikili boyama yöntemini sonrası hücre nükleuslarının morfolojileri ve boyanma özellikleri incelendi. 24 saat süresince farklı konsantrasyonlardaki peptit maruziyeti yeşil renkte fragmente olan nükleusların sayıca artmasına yol açmıştır. Kırmızı renkli nekrotik hücre nükleusu esas olarak 100 µg/ml 5-FU uygulanan grupta arttığı gözlenmiştir. HepG2 hücrelerinde 18 saat FBS yoksunluğu kontrole kıyasla belirgin bir farklılık oluşturmamıştır. Akım sitometri sonuçları bu morfolojik gözlemlerimizi destekler niteliktedir. Apoptotik hücrelerde hücre membranının iç yaprağında yerleşik olan fosfatidilserin bu asimetrisini kaybederek dış yaprağa yerleşir ve bu lipide FITC konjuge Annexin V'in bağlanması erken apoptotik hücrelerin belirlenmesini sağlar. Akım sitometrisi sonuçlarımıza göre erken apoptotik hücre sayısı artan peptit dozuna bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. Nekrotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir. Bu sonuçlarımıza göre FK-16-Frenatin 2.1S peptitinin HepG2 hücrelerinde apoptotik hücre ölümüne yol açtığı ileri sürülebilir. Bununla birlikte apoptotik ölümle ilişkili moleküler mekanizmaların daha ayrıntılı çalışılması gerekmektedir.

Literatürde kanser hücrelerinde antimikrobiyal peptitler ile indüklenen apoptozun yanı sıra otofajik hücre ölümünün de gerçekleşebileceği az sayıda çalışma ile ortaya konmuştur. Akım sitometrisi sonuçlarına göre peptit maruziyeti canlı hücre sayısında anlamlı bir değişime yol

açmamış ve erken apoptotik hücre sayısı hafif düzeyde arttırmıştır. Bu nedenle FK-16-Frenatin 2.1S peptiti ile indüklenebilecek otofajik hücre ölüm tipini belirlemek için peptit maruziyeti sonrası otofajik vakuelleri boyayan MDC boyası hücrelere uygulanmıştır ve otofajik vakuollerden elde edilen floresan ışımının yoğunluğu yazılım programı ile ölçülmüştür. 24 saat uygulanan hibrit peptit özellikle 40 ve 80 µg/ml konsantrasyonlarda otofajik vakuol sayısını anlamlı olarak arttırmaktadır. Bulgularımızla uyumlu olacak şekilde FK-16 peptiti uygulanan kolon kanseri hücrelerinde hem otofajik hücre ölümü hem de kaspaz bağımsız apoptotik hücre ölümü gözlenmiştir. Apoptotik hücre ölümünde rol oynayan Endo G ve AIF genlerinin susturulması ATG5 ve ATG7 protein seviyelerinde artışına, buna karşın ATG5 ve ATG7 genlerinin susturulması nuklear konumlu Endo G ve AIF miktarında artışa yol açmaktadır (Ren ve diğ., 2013). Benzer şekilde *Scorpio maurus palmatus* venomunda belirlenen katyonik antimikrobiyal peptit Smp43, A549 akciğer adenokarsinoma hücrelerinde hem otofajik hücre ölümünü hem de kaspaz bağımlı apoptotik hücre ölümünü indüklemektedir. Smp43 A549 hücrelerinde mitokondri membran potansiyelinde azalma ve ROS üretiminde artışa yol açmıştır (Deng ve diğ., 2023). Kaminsky ve arkadaşlarının (2012), yaptığı çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde otofajinin inhibisyonu sisplatin ile indüklenen apoptozu attırdığı gösterilmiştir. Benzer şekilde glioblastoma hücrelerinde erlotinib hem otofaji hem de kaspaz-bağımsız apoptozu uyarmaktadır ve otofajinin baskılanması erlotinib ile indüklenen apoptozun artmasına yol açtığı görülmüştür (Eimer ve diğ., 2011). Apoptoz ve otofaji arasındaki bu ilişkinin Beclin 1 ve Bcl-2 proteinleri tarafından düzenlendiği ileri sürülmüştür (Kang ve diğ., 2011). Bcl-2 siRNA'sı uygulanan HeLa hücrelerinde açlıkla indüklenen otofajinin arttığı gözlenmiştir. Anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2 proteinin Beclin1 proteinini bağladığı ve pre-otofagozomal yapıların oluşmasını önleyerek otofajiyi inhibe ettiği gösterilmiştir (Pattingle ve diğ., 2005; Yo ve diğ., 2009). Bu nedenle çalışmamızda FK-16-Frenatin 2.1S peptiti ile HepG2 hücrelerinde bu protein seviyelerindeki değişikliklerin araştırılmasının hücre ölüm mekanizmasının aydınlatılması açısından önemli olacağı kanaatindeyiz.

Pozitif kontrol olarak HepG2'lere uyguladığımız 100 µg/ml 5-FU nekrotik ölüme yol açtığı ışık mikroskobu, nekrotik nukleus boyaması ve akım sitometre sonuçları ile anlaşılmaktadır. Hagiwara ve arkadaşları (2007) HepG2 hücrelerinde 5-FU ile indüklenen apoptotik ölüm belirlemişlerdir. Brenes ve arkadaşları (2007) ise hem apoptoz hem de nekrotik ölüm gözlemlemişlerdir. Sonuçlar arasındaki bu farklılık uygulanan dozların ve hücrelerdeki p53 aktivitesinin farklı olmasından kaynaklanabilir. Bununla birlikte otofaji uyarmak için 18 saat

FBS yokluğu otofajik vakuol sayısını kontrole kıyasla değiştirmemiştir ve bu durum maruziyet süresi ile ilgili olabileceğini düşünmekteyiz.

Kanser hücre membranına zarar vermeden hücre içine ulaşan antimikrobiyal peptitlerin ROS üretimine yol açacak şekilde mitokondri membranı ile etkileştiği NRC-03 uygulanan oral yassı hücre karsinoma hücrelerinde (Hou ve diğ., 2022), laktoferrisin uygulanan lösemi hücrelerinde (Mader ve diğ., 2007), Brevinin-2R ve Temporin-1CEa uygulanan meme kanseri hücrelerinde (Ghavami ve diğ., 2008; Wang ve diğ., 2013) gösterilmiştir. Artan ROS seviyeleri antimikrobiyal peptitler ile indüklenen mitokondri membran hasarı sonucu ortaya çıkmaktadır. Laktoferrisin B'nin lösemi, nöroblastoma hücrelerinde (Eliassen ve diğ., 2006; Mader ve diğ., 2007) ve NRC-03 ile NRC-07 meme kanseri hücrelerinde (Hilchie ve diğ., 2011) mitokondride lokalize olduğu konfokal mikroskopi ile gösterilerek hücre ölümüyle ilişkilendirilmiştir. Hücre içi primer ROS kaynağı mitokondri olup, membran hasarı membran potansiyelinin azalması, sitokrom c salınımı ve apoptozun indüklenmesine yol açtığı gözlenmiştir (Zhang ve diğ., 2019). Çalışmamızda HepG2 uygulanan peptit konsantrasyonuna bağlı olarak hücre içi ROS seviyelerinde artış gözlemledik. Pozitif kontrol olarak hücrelere dışarıdan uyguladığımız H₂O₂ da benzer şekilde hücre içi oksidatif stresi arttırdı. Hücre membranında bir hasar olmayışı ve ROS seviyelerinde gözlemlediğimiz artış, hibrit peptidin hücre içi hedeflerinden birinin mitokondri olabileceğini düşündürmektedir. Floresan boya konjuge hibrit peptitlerin kullanılarak tasarladığımız hibrit peptidin hücre içi hedeflerin belirlenmesi gerekmektedir.

Kanser hücrelerinde hücre ölümünü tetikleyen antimikrobiyal peptitlerin diğer bir hücre içi hedefi lizozomlar olabilir. Kekropin türevli M1-8 peptitinin HepG2 hücrelerinde lizozomlarda biriktiği, lizozomlardan katepsin D salınımı ile doğrudan ya da dolaylı olarak mitokondri hasarı ve kaspaz aktivasyonu ile apoptozu indüklediği gözlenmiştir (Zeng ve diğ., 2023). Brevinin-2R uygulanan meme kanseri hücrelerinde lizozomları hedef alarak katepsin B salınımını arttırdığı ve mitokondri hasarı sonucu ATP seviyelerinde azalmaya ve ROS artışına yol açtığı, böylelikle lizozomal membran hasarının daha fazla gerçekleşmesiyle otofagozomların artması yolu ile otofajiyi indüklediği belirlenmiştir (Ghavami ve diğ., 2008). Çalışmamızda peptit uygulamasını takiben gözlemlediğimiz ROS artışı ile otofajik vakuol sayılarındaki artış, FK-16-Frenatin 2.1S peptidinin hücre içi hedeflerinden birinin lizozomlar olabileceğini düşündürmektedir. Bunun kanıtlamak için işaretli bir peptidin lizozom boyası kullanılarak işaretlenen lizozomlarda lokalize olduğunun gösterilmesi gerekmektedir.

Hücre migrasyonunun *in vitro* olarak baskılanması, kanser tedavi stratejilerinden birisi olan metastazın önlenmesinin bir indikatörüdür (Palmer ve diğ., 2011). FK-16-Frenatin 2.1S peptidinin HepG2 hücrelerinde hücre hareketliliğine olan etkisini ölçmek için yara kapanma deneyini gerçekleştirdik. 10 µg/ml peptit uygulamasını takiben 0., 24. ve 48. saatlerde yara genişliğini ölçtüğümüzde hücre hareketliliğinin 24. ve 48. saat sonunda kontrol hücrelere kıyasla anlamlı olarak azaldığını gözlemledik. Sonuçlarımızla paralel şekilde Brevinin-2R'nin gastrik kanser hücre hareketliliğini azalttığı (Gholizadeh ve diğ., 2023); ipek böceği larvalarından elde edilen kekropin A ve D'nin özofagiya kanser hücrelerinde hücre hareketliliğini azalttığı (Xu ve diğ., 2020) ve balık AMP olan hepsidin TH2-3'ün insan fibrosarkoma hücrelerinde motiliteyi azalttığı (Chen ve diğ., 2009) gösterilmiştir. Hücre hareketliliğindeki bu azalma katyonik olan FK-16-Frenatin 2.1S peptidinin, kanser hücre yüzeylerinde arttığı belirtilen ve hücre hareketliliği ile ilişkili negatif yüklü moleküller ile etkileşimi sonucu olabilir. Heparan sülfat ve kondroitin sülfat ile NRC-03 ve -07 peptitlerinin etkileştiği Hilchie ve arkadaşları (2011) tarafından belirlenmiştir. Benzer şekilde sığır nötrofillerinde tanımlanan katyonik siklik dodekapeptit, heparan sülfat ve kondroitin sülfata bağlanabilmektedir (Sancar ve Bolkent, 2022). Tümör hücre yüzeyinde artan negatif yüklü kondroitin sülfat proteoglikanların kanser hücrelerinde adezyon, invazyon ve hareketlilikle ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Iida ve diğ., 1996). Dolayısı ile katyonik peptitlerin hücre yüzeylerindeki bu moleküllerle olası etkileşimi kanser hücre hareketliliğini sınırlandırabilir. Diğer taraftan Xia ve arkadaşları (2014), özofagiya karsinoma hücrelerinde kekropin ailesinden bir AMP olan kekropinXJ'nin hücre içinde mikrotübül ve aktin sentezini engelleyerek migrasyon ve invazyonu inhibe ettiğini göstermiştir. Karasineklerde tanımlanan kekropinin insan hepatoselüler karsinoma hücreleri BEL-7402 hücrelerinde E-kaderin ekspresyonunu arttırarak migrasyonu inhibe ettiği de ileri sürülmüştür (Jin ve diğ., 2013).

Çalışmamızda hücre proliferasyonunun baskılanarak koloni oluşumunun engellenmesi 24 saat 10, 40 ve 80 µg/ml FK-16-Frenatin 2.1S peptiti maruziyeti sonrası 21 gün inkübe edilen hücrelerde araştırıldı. Peptit uygulanmayan kontrol hücrelere kıyasla, 10 ve 40 µg/ml doza bağlı olarak koloni sayısında anlamlı azalma gözlemlendi ve 80 µg/ml peptit uygulanan hücrelerin koloni oluşturmadıkları gözlemlendi. Bulgularımızla paralel olarak özofagiya kanser hücrelerinde kekropin A ve D'nin (Xu ve diğ., 2020) ve gastrik kanser hücrelerinde KekropinXJ 'nin koloni oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (Wu ve diğ., 2015). Lentivirüs vektör kullanılarak insan α -defensin protein DEFA-5 geninin aşırı ekspresyonunun gerçekleştirildiği insan kolon kanseri

hücrelerinde koloni oluşumunun azaldığı gözlenmiştir (Qiao ve diğ., 2021). Benzer şekilde oral yassı hücre karsinoma hücreleri HSC-3 hücrelerinde insan katelisinidin antimikrobiyal peptidinin aşırı ekspresyonunun da koloni oluşumunu azalttığı belirlenmiştir (Chen ve diğ., 2020). Çalışmamızda artan peptit konsantrasyonları ile HepG2 hücrelerinin koloni oluşumu ciddi bir düşüş gösterdiğinden FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptidin, kontrolsüz çoğalarak kolonileşmeye giden tümöral aktiviteyi baskılayıcı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Hücrelerin çoğalmasını veya sinyal yollarını hedef alan geleneksel kanser ilaçlarından farklı bir mekanizma ile kanser hücre canlılığını azaltan antimikrobiyal peptitler kanser ilaçları ile sinerjistik sitotoksiste gösterebilir ve yüksek ilaç konsantrasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan yan etkilerin azalmasına yardımcı olabilir. Sentetik olarak sentezlenen D-K₆L₉ peptidinin androgen reseptör pozitif ve negatif prostat kanser hücrelerinde doksorubisin ile sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir (Papo ve diğ., 2004). Benzer şekilde böceklerde tanımlanan AMP olan kekropin A, insan lenfoblastik lösemi hücrelerinde 5-FU ve sitarabin ile belirli dozlarda sinerjistik etkili olduğu bulunmuştur (Hui ve diğ., 2002). Balık AMP olan NRC-03 meme kanser hücre hattı MDA-MB 231 hücrelerine sisplatinle verildiğinde, tek başına sisplatinin etkin dozunu 5,5 kat azalttığı gözlenmiştir (Hilchie ve diğ., 2011). Huseynzade (2022)'nin yaptığı çalışmada ise A549 hücrelerinde doksorubisin ile ağustos böceği hemolenfinde tanımlı bir AMP olan kriptoninin beraber verilmesi, belirli dozlarda tek başına ilaç uygulamasına göre hücre canlılığında daha fazla azalmaya yol açmıştır. Benzer şekilde besinlere koruyucu olarak eklenen bir AMP olan nisin Z ve kanser ilaçları arasında melanoma hücrelerinde sinerjistik etki olduğu hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalar ile gösterilmiştir (Preet ve diğ., 2017; Lewies ve diğ., 2018). Çalışmamızda düşük konsantrasyonlarda FK-16-Frenatin 2.1S ve düşük konsantrasyonlarda bir antikanser ilaç olan 5-FU 48 saat hücrelere uygulandığında belirli dozlarda hücre canlılığında tek başına 5-FU verilen hücrelere kıyasla hücre canlılığının daha fazla azaldığını gözlemledik. HepG2 hücrelerine uygulanan düşük dozlarda 5-FU (1, 2,5, 5 ve 10 µg/ml)'nin hücre canlılığını %50 'nin altında azaltmadığını gözlemledik. 10 µg/ml hibrit peptit ve 10 µg/ml 5-FU hücre canlılığını %48 oranında azaltırken, tek başına aynı doz 5-FU verilen hücrelerde ise hücre canlılığının %69,5 oranında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığını gözlemledik. Diğer taraftan 48 saat 5-FU'nun HepG2 hücrelerinde IC₅₀ değerini 20,94 µg/ml olarak hesaplamıştık. Dolayısı ile sonuçlarımız 5-FU'nun FK-16-Frenatin 2.1S ile birlikte verilmesinin, belirli dozlarda hücre canlılığında %50 azalmaya yol açan 5-FU konsantrasyon değerini azalttığını göstermektedir. Bununla birlikte bu azalmanın meme

kanserin hücrelerinde membranolitik aktiviteye sahip NRC-03 peptidine kıyasla daha az gözlenmesinin, FK-16-Frenatin 2.1S peptidinin etki mekanizmasındaki farklılık ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir. Diğer doz kombinasyonları, tek başına ilaç verilen grupla kıyaslandığında anlamlı bir azalma gözlenmedi. Sadece 2.5 µg/ml 5-FU ve farklı konsantrasyonlarda peptit uygulanan kombinasyonlarında ise hücre canlılığında hafif artışlar gözlemlendi. Bu durum peptidin konsantrasyona bağlı olarak ilacın hücre içine alınması veya ilaçla indüklenen toksisiteyi engellemesi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Antikanser aktiviteye sahip antimikrobiyal peptitler hücreler üzerindeki sitotoksik ve tümör özelliklerini baskılayıcı etkileri dışında immün yanıtları düzenlemek amacı ile inflamatuvar hücrelerin kemotaksisini uyardığı, kemokin ve sitokinlerin üretimini uyardığı bilinmektedir (Yang ve diğ., 2000; Elssner ve diğ., 2004). Doğal immuniteye uyarmak amacı ile insan beta defensin ve LL-37 antimikrobiyal peptitlerinin keratinositlerden IL-6, IL-10, MCP-1 gibi sitokin ve kemokinlerin üretimini indükleyerek primer doğal immunitiyi sağladıkları belirlenmiştir (Niyonsaba ve diğ., 2007). Sitokinler immün hücreleri tümör hücrelerine karşı aktive eden immün sistemin kritik unsurlarıdır. Antimikrobiyal peptit Brevinin-2R ve Temporin-Ra uygulanan akciğer kanser hücrelerinde IL-1β ve IL-8 ekspresyonlarının arttığını gözlemlenmiştir (Asadi ve diğ., 2013; Asoodeh ve diğ., 2013). Bir antimikrobiyal peptit olan tilapya hepsidin TH1-5 insan fibrosarkoma hücreleri, HT1080 ve serviks adenokarsinoma hücreleri, HeLa hücrelerinde IL-8 de dahil olmak üzere çeşitli interlökinlerin ekspresyonlarında artışa yol açtığı gözlemlenmiştir (Chang ve diğ., 2011). Laktoferrisin B'den türevli LTX-302 peptidinin *in vivo* tümör hücrelerinde litik etkili olduğu ve inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonuna yol açtığı da gösterilmiştir (Camilio ve diğ., 2014). Çalışmamızda FK-16-Frenatin 2.1S peptiti ile uygulamayı takiben HepG2 hücrelerinden salınan IL-1β, TNF-α ve IL-8 seviyelerinde doza bağlı artışlar olduğunu belirledik ve sonuçlarımız hibrit peptitin immün-modülatör etkili olabileceğini göstermektedir. FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptidin ilk kısmı olan 16 amino asitlik F-16 peptidinin immümodülatör etkileri bilinmemekle birlikte, köken aldığı 37 amino asit uzunluğunda LL-37 peptidinin hepatosellüler karsinoma hücrelerinde IL-8 ve IL-6'nın ekspresyonlarının baskılandığı gözlemlenmiştir (Ding ve diğ., 2021). FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptidin ikinci kısmı olan Frenatin 2.1S peptidinin fare makrofajlarında IL-1β, IL-23 ve TNF-α üretimini arttırdığı gösterilmiştir (Conlon ve diğ., 2014). Bununla birlikte kanser hücrelerinde sitokin üretimi üzerine bir çalışma bulunmamaktadır. Peki FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptiti sitokin üretimini nasıl düzenlemektedir? Sitokin üretimi NF-κB sinyal yolağının aktivasyonu

sonucu gerçekleşmektedir ve bu sinyal yolunun önemli bir aktivatörünün ROS seviyelerindeki artış olduğu bildirilmiştir (Wang ve diğ., 2006; Xie ve diğ., 2023). Dolayısı ile çalışmamızda peptit ile indüklenen olası mitokondri ve/veya lizozom membran hasarı sonucu artan ROS seviyeleri bu sinyal yolunu aktive etmiş olabilir. Bununla birlikte FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptitinin immün hücreler üzerindeki etkisinin araştırılması, immünmodülatör etkileri daha iyi bir şekilde ortaya çıkaracaktır.

Çalışmamızın sonuçları FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptidinin yarı-seçici olarak hepatosellüler karsinoma hücre hattı HepG2 hücrelerinde hücre canlılığını azalttığını göstermektedir. HUVEC hücrelerinde benzer doz ve sürelerde gözlenen düşük toksisite hibrit peptidin olası terapötik değerini arttırmaktadır. LDH salınımını olmaksızın 24 saat boyunca uygulanan peptit dozuna bağlı olarak fragmente nukleusların ve otofajik vakuol sayısındaki artış peptitin HepG2 hücrelerinde litik etkisinin olmadığını, hücre canlılığını otofaji ve apoptotik mekanizmalar ile azalttığını göstermektedir. Akım sitometrisi sonuçları erken apoptotik hücre sayısında artış olduğunu da göstermiştir. Farklı konsantrasyonlarda 24 saat uygulanan FK-16-Frenatin 2.1S peptiti HepG2 hücrelerinde koloni oluşumunu azaltmıştır. Hücre canlılığını 24 saat azaltmadığını belirlediğimiz 10 µg/ml peptit konsantrasyonu hücre hareketliliğinde azalmaya yol açmıştır. Bu sonuçlar peptit maruziyetinin hücrelerde proliferasyon ve migrasyon yeteneğinde azalmaya yol açtığını göstermektedir. Çalışmamızın sonuçları hibrit peptitin 5-FU ile uygulandığında belirli konsantrasyonların tek başına 5-FU uygulamasına kıyasla hücre canlılığını daha fazla azalttığını da göstermiştir. Diğer taraftan, peptit uygulamasının bazı sitokin seviyelerinde değişiklikler yapması, peptit ile indüklenen hücre ölümünün immün cevabı değiştirebileceğini de göstermektedir. Elde ettiğimiz sonuçların moleküler mekanizmalarının daha ayrıntılı çalışılması ve peptitin immün hücreler üzerindeki etkilerinin araştırılması, FK-16-Frenatin 2.1S hibrit peptidinin hepatosellüler karsinomda tedavi amaçlı kullanılmasına önemli katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. |

KAYNAKLAR

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., et al., 2002, *Programmed Cell Death (Apoptosis)*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26873/> [Ziyaret Tarihi: 20 Kasım 2023]
- Alhajj, M., Zubair, M., & Farhana, A., 2023, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/> [Ziyaret Tarihi: 27 Kasım 2023]
- Aljurf, M., Majhail, N. S., Koh, M. B. C., Kharfan-Dabaja, M. A., & Chao, N. J., 2022, *The Comprehensive Cancer Center: Development, Integration, and Implementation*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK584200/> [Ziyaret Tarihi: 17 Aralık 2023]
- Alqahtani, A., Khan, Z., Alloghbi, A., Said Ahmed, T. S., Ashraf, M., & Hammouda, D. M., 2019, Hepatocellular Carcinoma: Molecular Mechanisms and Targeted Therapies, *Medicina*, 55(9), 526.
- Ananthakrishnan, A., Gogineni, V., & Saeian, K., 2006, Epidemiology of primary and secondary liver cancers, *Seminars in interventional radiology*, 23(1), 47–63.
- Anderson, N. M., & Simon, M. C., 2020, The tumor microenvironment, *Current biology*, 30(16), R921–R925.
- Arora, S., Harmath, C., Catania, R., Mandler, A., Fowler, K. J., & Borhani, A. A., 2021, Hepatocellular carcinoma: metastatic pathways and extra-hepatic findings, *Abdominal radiology*, 46(8), 3698–3707.
- Asadi, F., Asoodeh, A., Kashef, R., Housaindokht, M. R., Haghparsat, A., & Chamani, J., 2013, The effect of antimicrobial peptide Temporin-Ra on cell viability and gene expression of pro-inflammatory factors in A549 cell line, *International journal of peptide research and therapeutics*, 19, 373-380.
- Asafo-Agyei, K.O., Samant, H., 2023, *Hepatocellular Carcinoma*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559177/> [Ziyaret tarihi: 27 Ekim 2023]
- Asoodeh, A., Haghparsat, A., Kashef, R., & Chamani, J., 2013, Pro-inflammatory cytokine responses of A549 epithelial cells to antimicrobial peptide Brevinin-2R, *International journal of peptide research and therapeutics*, 19, 157-162.
- Atıcı, E., 2007, Tıp tarihinde kanser ve lösemi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 22(4), 197-204.
- Baba, A.I., Cătoi, C., 2007, *Chapter 2 Carcinogenesis*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9552/> [Ziyaret tarihi: 23 Eylül 2023]
- Barkla, D.H., Gibson, P.R., 1999, The fate of epithelial cells in the human large intestine, *Pathology*, 31: 230–238.
- Bartucci, M., Hussein, M. S., Huselid, E., Flaherty, K., Patrizii, M., Laddha, S. V., ... & Sabaawy, H. E., 2017, Synthesis and characterization of novel BMI1 inhibitors targeting cellular self-renewal in hepatocellular carcinoma, *Targeted oncology*, 12, 449-462.

- Baxter, A.A., Lay, F.T., Poon, I.K.H., Kvansakul, M., Hulett, M.D., 2017, Tumor cell membrane-targeting cationic antimicrobial peptides: novel insights into mechanisms of action and therapeutic prospects, *Cellular and molecular life sciences*, 74(20):3809–25.
- Becker, A. K., Tso, D. K., Harris, A. C., Malfair, D., & Chang, S. D., 2014, Extrahepatic metastases of hepatocellular carcinoma: A spectrum of imaging findings, *Canadian association of radiologists journal*, 65(1), 60–66.
- Berry, D. L., & Baehrecke, E. H., 2007, Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*, *Cell*, 131(6), 1137–1148.
- Biederbick, A., Kern, H.F., Elsasser, H.P., 1995, Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles, *European journal of cell biology*, 66, 3–14.
- Bousselin, M., 1786, Observations on Necrosis, *The London medical journal*, 7(Pt 3), 263–279.
- Brenes, O., Arce, F., Gätjens-Boniche, O., & Diaz, C., 2007, Characterization of cell death events induced by anti-neoplastic drugs cisplatin, paclitaxel and 5-fluorouracil on human hepatoma cell lines: Possible mechanisms of cell resistance, *Biomedicine & pharmacotherapy*, 61(6), 347-355.
- Buss, R. R., Sun, W., & Oppenheim, R. W., 2006, Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development, *Annual review of neuroscience*, 29, 1–35.
- Calderaro, J., Couchy, G., Imbeaud, S., Amaddeo, G., Letouzé, E., Blanc, J. F., Laurent, C., Hajji, Y., Azoulay, D., Bioulac-Sage, P., Nault, J. C., & Zucman-Rossi, J., 2017, Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification, *Journal of hepatology*, 67(4), 727–738.
- Calderaro, J., Ziol, M., Paradis, V., & Zucman-Rossi, J., 2019, Molecular and histological correlations in liver cancer, *Journal of hepatology*, 71(3), 616–630.
- Camilio, K. A., Berge, G., Ravuri, C. S., Rekdal, Ø., & Sveinbjørnsson, B., 2014, Complete regression and systemic protective immune responses obtained in B16 melanomas after treatment with LTX-315, *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63, 601-613.
- Cauli, E., Polidoro, M. A., Marzorati, S., Bernardi, C., Rasponi, M., & Lleo, A., 2023, Cancer-on-chip: a 3D model for the study of the tumor microenvironment, *Journal of biological engineering*, 17(1), 53.
- Chaabane, W., User, S. D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J., & Los, M. J., 2013, Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer, *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 61(1), 43–58.
- Chang, W. T., Pan, C. Y., Rajanbabu, V., Cheng, C. W., & Chen, J. Y., 2011, Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) antimicrobial peptide, hepcidin 1–5, shows antitumor activity in cancer cells, *Peptides*, 32(2), 342-352.
- Charmsaz, S., Collins, D. M., Perry, A. S., & Prencipe, M., 2019, Novel Strategies for Cancer Treatment: Highlights from the 55th IACR Annual Conference, *Cancers*, 11(8), 1125.

- Chaudhary, P., Bhadana, U., Singh, R. A., & Ahuja, A., 2015, Primary hepatic angiosarcoma, *European journal of surgical oncology*, 41(9), 1137–1143.
- Chen, J. Y., Lin, W. J., & Lin, T. L., 2009, A fish antimicrobial peptide, tilapia hepcidin TH2-3, shows potent antitumor activity against human fibrosarcoma cells. *Peptides*, 30(9), 1636–1642.
- Chen, Q., Kang, J., & Fu, C., 2018, The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis, *Signal transduction and targeted therapy*, 3, 18.
- Chen, X., Bo, L., Zhao, X., & Chen, Q., 2015, MicroRNA-133a inhibits cell proliferation, colony formation ability, migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase 9 in hepatocellular carcinoma, *Molecular medicine reports*, 11(5), 3900–3907.
- Chen, X., Ji, S., Si, J., Zhang, X., Wang, X., Guo, Y., & Zou, X., 2020, Human cathelicidin antimicrobial peptide suppresses proliferation, migration and invasion of oral carcinoma HSC-3 cells via a novel mechanism involving caspase-3 mediated apoptosis, *Molecular medicine reports*, 22(6), 5243-5250.
- Chiangjong, W., Chutipongtanate, S., & Hongeng, S., 2020, Anticancer peptide: Physicochemical property, functional aspect and trend in clinical application (Review), *International journal of oncology*, 57(3), 678–696.
- Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J., & Green, D. R., 2010, The BCL-2 family Reunion, *Molecular cell*, 37(3), 299–310.
- Conlon, J. M., & Mechkarska, M., 2014, Host-defense peptides with therapeutic potential from skin secretions of frogs from the family pipidae, *Pharmaceuticals*, 7(1), 58–77.
- Conlon, J. M., Mechkarska, M., Radosavljevic, G., Attoub, S., King, J. D., Lukic, M. L., & McClean, S., 2014, A family of antimicrobial and immunomodulatory peptides related to the frenatins from skin secretions of the Orinoco lime frog *Sphaenorhynchus lacteus* (Hylidae), *Peptides*, 56, 132–140.
- Cooper, G.M., 2000, *The Development and Causes of Cancer*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/> [Ziyaret tarihi: 23 Eylül 2023]
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., & Waterhouse, N. J., 2016, Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry, *Cold Spring Harbor protocols*, (11).
- Cummings, B., 2003, Malignant Tumor Development Figure, Pearson Education Inc.
- Debela, D. T., Muzazu, S. G., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K., & Manyazewal, T., 2021, New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives, *SAGE open medicine*, 9.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A., & Yuan, J., 2005, Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury, *Nature chemical biology*, 1(2), 112–119.

- Deng, Z., Gao, Y., Nguyen, T., Chai, J., Wu, J., Li, J., Abdel-Rahman, M.A., Xu, X., Chen, X., 2023, The Potent Antitumor Activity of Smp43 against Non-Small-Cell Lung Cancer A549 Cells via Inducing Membranolysis and Mitochondrial Dysfunction, *Toxins*, 15(5):347.
- Denton, D., & Kumar, S., 2019, Autophagy-dependent cell death, *Cell death and differentiation*, 26(4), 605–616.
- Deslouches, B., & Di, Y. P., 2017, Antimicrobial peptides with selective antitumor mechanisms: prospect for anticancer applications, *Oncotarget*, 8(28), 46635–46651.
- Dickens, L. S., Powley, I. R., Hughes, M. A., & MacFarlane, M., 2012, The 'complexities' of life and death: death receptor signalling platforms, *Experimental cell research*, 318(11), 1269–1277.
- Ding, X., Bian, D., Li, W., Xie, Y., Li, X., Lv, J., & Tang, R., 2021, Host defense peptide LL-37 is involved in the regulation of cell proliferation and production of pro-inflammatory cytokines in hepatocellular carcinoma cells, *Amino acids*, 53, 471-484.
- D'souza, S., Lau, K. C., Coffin, C. S., & Patel, T. R., 2020, Molecular mechanisms of viral hepatitis induced hepatocellular carcinoma, *World journal of gastroenterology*, 26(38), 5759–5783.
- Dürr, U. H., Sudheendra, U. S., & Ramamoorthy, A., 2006, LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides, *Biochimica et biophysica acta*, 1758(9), 1408–1425.
- Eckelman, B. P., Salvesen, G. S., & Scott, F. L., 2006, Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family, *EMBO reports*, 7(10), 988–994.
- Eimer, S., Belaud-Rotureau, M. A., Airiau, K., Jeanneteau, M., Laharanne, E., Véron, N., ... & Belloc, F., 2011, Autophagy inhibition cooperates with erlotinib to induce glioblastoma cell death. *Cancer biology & therapy*, 11(12), 1017-1027.
- Elgendy, M., Sheridan, C., Brumatti, G., & Martin, S. J., 2011, Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival, *Molecular cell*, 42(1), 23–35.
- Eliassen, L. T., Berge, G., Leknessund, A., Wikman, M., Lindin, I., Løkke, C., ... & Rekdal, Ø. 2006, The antimicrobial peptide, lactoferricin B, is cytotoxic to neuroblastoma cells in vitro and inhibits xenograft growth in vivo, *International journal of cancer*, 119(3), 493-500.
- Elssner, A., Duncan, M., Gavrillin, M., & Wewers, M. D., 2004, A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 β processing and release, *The Journal of immunology*, 172(8), 4987-4994.
- Erkekoğlu, P. & Baydar E., 2021, Güncel *In Vitro* Sitotoksikite Testleri, Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy, 41,1,45-63.
- Eskelinen, E. L., Schmidt, C. K., Neu, S., Willenborg, M., Fuertes, G., Salvador, N., Tanaka, Y., Lüllmann-Rauch, R., Hartmann, D., Heeren, J., von Figura, K., Knecht, E., & Saftig, P., 2004, Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts, *Molecular biology of the cell*, 15(7), 3132–3145.

- Fleming, A., Allison, V.D., 1992, Observations on a bacteriolytic substance (“lysozyme”) found in secretions and tissues, *British journal of experimental pathology*, 3:252–260.
- Fosgerau, K., & Hoffmann, T., 2015, Peptide therapeutics: current status and future directions, *Drug discovery today*, 20(1), 122–128.
- Friedman, S. L., 2008, Mechanisms of hepatic fibrogenesis, *Gastroenterology*, 134(6), 1655–1669.
- Fu, Y., Liu, S., Zeng, S., & Shen, H., 2019, From bench to bed: the tumor immune microenvironment and current immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma, *Journal of experimental & clinical cancer research*, 38(1), 396.
- Furlong, S. J., Mader, J. S., & Hoskin, D. W., 2006, Lactoferricin-induced apoptosis in estrogen-nonresponsive MDA-MB-435 breast cancer cells is enhanced by C6 ceramide or tamoxifen, *Oncology reports*, 15(5), 1385–1390.
- Furlong, S. J., Mader, J. S., & Hoskin, D. W., 2010, Bovine lactoferricin induces caspase-independent apoptosis in human B-lymphoma cells and extends the survival of immune-deficient mice bearing B-lymphoma xenografts, *Experimental and molecular pathology*, 88(3), 371–375.
- Gabernet, G., Müller, A.T., Hiss, J.A., Schneider, G., 2016, Membranolytic anticancer peptides, *MedChemComm.* 7:2232–2245.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Kepp, O., & Kroemer, G. 2016. Regulated cell death and adaptive stress responses. *Cellular and molecular life sciences*, 73(11–12), 2405–2410.
- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., & Kroemer, G., 2007, Cell death modalities: classification and pathophysiological implications, *Cell death and differentiation*, 14(7), 1237–1243.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., ... Kroemer, G., 2018, Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018, *Cell death and differentiation*, 25(3), 486–541.
- García-Pras, E., Fernández-Iglesias, A., Gracia-Sancho, J., & Pérez-Del-Pulgar, S., 2021, Cell Death in Hepatocellular Carcinoma: Pathogenesis and Therapeutic Opportunities, *Cancers*, 14(1), 48.
- Gardiner, B., Dougherty, J. A., Ponnalagu, D., Singh, H., Angelos, M., Chen, C. A., & Khan, M., 2020, Measurement of Oxidative Stress Markers In Vitro Using Commercially Available Kits, *Measuring Oxidants and Oxidative Stress in Biological Systems*, Springer, (pp. 39–60).
- Gerlach, S. L., Rathinakumar, R., Chakravarty, G., Göransson, U., Wimley, W. C., Darwin, S. P., & Mondal, D., 2010, Anticancer and chemosensitizing abilities of cycloviolacin 02 from *Viola odorata* and psyle cyclotides from *Psychotria leptothyrsa*, *Biopolymers*, 94(5), 617–625.

Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I., 2021, The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis, *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12827.

Ghavami, S., Asoodeh, A., Klonisch, T., Halayko, A.J., Kadkhoda, K., Krocak, T.J., Gibson, S.B., Booy, E.P., Naderi-Manesh, H., Los, M., 2008, Brevinin-2R(1) semi-selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal-mitochondrial death pathway, *Journal of cellular and molecular medicine*, 12(3):1005-22.

Gholizadeh, S., Jalili, A., Mosaffa, F., & Jamialahmadi, K., 2023, Brevinin-2R: Antimicrobial Peptide with Cytotoxic and Apoptogenic Activity Against Daunorubicin Resistant Gastric Cancer Cells, *Pharmaceutical chemistry journal*, 56(12), 1587-1595.

Globocan 2020, *All Cancer*, World Health Organization (WHO), <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf> [Ziyaret tarihi: 20 Eylül 2023]

Globocan 2020, *Cancer Today*, World Health Organization (WHO), <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-dual-bars-2> [Ziyaret tarihi: 25 Mart 2023]

Golstein, P., & Kroemer, G., 2007, Cell death by necrosis: towards a molecular definition, *Trends in biochemical sciences*, 32(1), 37–43.

Green, D. R., & Llambi, F., 2015, Cell Death Signaling, Cold Spring Harbor perspectives in biology, 7(12), a006080.

Groux-Degroote, S., Guérardel, Y., Delannoy, P., 2017, Gangliosides: structures, biosynthesis, analysis, and roles in cancer. *ChemBioChem*, 18(13):1146–54.

Gu, J., Li, Z., Zhou, J., Sun, Z., & Bai, C., 2019, Response prediction to oxaliplatin plus 5-fluorouracil chemotherapy in patients with colorectal cancer using a four-protein immunohistochemical model, *Oncology letters*, 18(2), 2091–2101.

Hagiwara, S., Kudo, M., Nakatani, T., Sakaguchi, Y., Nagashima, M., Fukuta, N., & Munakata, H., 2007, Combination therapy with PEG-IFN- α and 5-FU inhibits HepG2 tumour cell growth in nude mice by apoptosis of p53, *British journal of cancer*, 97(11), 1532-1537.

Hajdu, S. I., 2011, A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*, 117(5), 1097–1102.

Hanada, T., Noda, N. N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., & Ohsumi, Y., 2007, The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophag, *The Journal of biological chemistry*, 282(52), 37298–37302.

Hanahan, D., 2022, Hallmarks of Cancer: New Dimensions, *Cancer discovery*, 12(1), 31–46.

Harding, J. J., Abu-Zeinah, G., Chou, J. F., Owen, D. H., Ly, M., Lowery, M. A., Capanu, M., Do, R., Kemeny, N. E., O'Reilly, E. M., Saltz, L. B., & Abou-Alfa, G. K., 2018, Frequency, Morbidity, and Mortality of Bone Metastases in Advanced Hepatocellular Carcinoma, *Journal of the national comprehensive cancer network*, 16(1), 50–58.

Hilchie, A. L., & Hoskin, D. W., 2010, The application of cationic antimicrobial peptides in cancer treatment: laboratory investigations and clinical potential, *Emerging cancer therapy: microbial approaches and biotechnological tools*, 309-332.

Hilchie, A. L., Doucette, C. D., Pinto, D. M., Patrzykat, A., Douglas, S., & Hoskin, D. W., 2011, Pleurocidin-family cationic antimicrobial peptides are cytolytic for breast carcinoma cells and prevent growth of tumor xenografts, *Breast cancer research*, 13, R102.

Hilchie, A. L., Power Coombs, M. R., & Hoskin, D. W., 2012, Obstacles and solutions to the use of cationic antimicrobial peptides in the treatment of cancer, In *Small Wonders: Peptides for Disease Control*, American chemical society, (pp. 61-78).

Hilchie, A.L., Hoskin, D.W., Power Coombs, M.R., 2019, Anticancer Activities of Natural and Synthetic Peptides. In: Matsuzaki, K. (eds) *Antimicrobial Peptides*, Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer, vol 1117.

Horwitz, E., Stein, I., Andreozzi, M., Nemeth, J., Shoham, A., Pappo, O., Schweitzer, N., Tornillo, L., Kanarek, N., Quagliata, L., Zreik, F., Porat, R. M., Finkelstein, R., Reuter, H., Koschny, R., Ganten, T., Mogler, C., Shibolet, O., Hess, J., Breuhahn, K., ... Pikarsky, E., 2014, Human and mouse VEGFA-amplified hepatocellular carcinomas are highly sensitive to sorafenib treatment, *Cancer discovery*, 4(6), 730–743.

Hoskin, D. W., & Ramamoorthy, A., 2008, Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides, *Biochimica et biophysica acta*, 1778(2), 357–375.

Hui, L. I. N. G., Leung, K. E. I. T. H., & Chen, H. M., 2002, The combined effects of antibacterial peptide cecropin A and anti-cancer agents on leukemia cells, *Anticancer research*, 22(5), 2811-2816.

Hurley, J. H., & Young, L. N., 2017, Mechanisms of Autophagy Initiation, *Annual review of biochemistry*, 86, 225–244.

Jiang, K., Al-Diffhala, S., & Centeno, B. A., 2018, Primary Liver Cancers-Part 1: Histopathology, Differential Diagnoses, and Risk Stratification. *Cancer control: journal of the Moffitt Cancer Center*, 25(1).

Jiao, D., Cai, Z., Choksi, S., Ma, D., Choe, M., Kwon, H. J., Baik, J. Y., Rowan, B. G., Liu, C., & Liu, Z. G., 2018, Necroptosis of tumor cells leads to tumor necrosis and promotes tumor metastasis. *Cell research*, 28(8), 868–870.

Jin, X. B., Mei, H. F., Pu, Q. H., Shen, J., Lu, X. M., Chu, F. J., & Zhu, J. Y., 2013, Effects of *Musca domestica* cecropin on the adhesion and migration of human hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells, *Biological and pharmaceutical bulletin*, 36(6), 938-943.

Kaminsky, V. O., Piskunova, T., Zborovskaya, I. B., Tchevkina, E. M., & Zhivotovsky, B., 2012, Suppression of basal autophagy reduces lung cancer cell proliferation and enhances caspase-dependent and-independent apoptosis by stimulating ROS formation, *Autophagy*, 8(7), 1032-1044.

Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., & Tang, D. J. C. D., 2011, The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis, *Cell death & differentiation*, 18(4), 571-580.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British journal of cancer*, 26(4), 239–257.

Khalid, N., Azimpouran, M., 2023, *Necrosis*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557627/> [Ziyaret tarihi: 28 Eylül 2023]

Kole, C., Charalampakis, N., Tsakatikas, S., Vailas, M., Moris, D., Gkotsis, E., Kykalos, S., Karamouzis, M. V., & Schizas, D., 2020, Immunotherapy for Hepatocellular Carcinoma: A 2021 Update, *Cancers*, 12(10), 2859.

Kondylis, V., & Pasparakis, M., 2019, RIP Kinases in Liver Cell Death, Inflammation and Cancer, *Trends in molecular medicine*, 25(1), 47–63.

Koo, G. B., Morgan, M. J., Lee, D. G., Kim, W. J., Yoon, J. H., Koo, J. S., Kim, S. I., Kim, S. J., Son, M. K., Hong, S. S., Levy, J. M., Pollyea, D. A., Jordan, C. T., Yan, P., Frankhouser, D., Nicolet, D., Maharry, K., Marcucci, G., Choi, K. S., Cho, H., ... Kim, Y. S., 2015, Methylation-dependent loss of RIP3 expression in cancer represses programmed necrosis in response to chemotherapeutics, *Cell research*, 25(6), 707–725.

Köhn-Gaone, J., Gogoi-Tiwari, J., Ramm, G. A., Olynyk, J. K., & Tirnitz-Parker, J. E., 2016, The role of liver progenitor cells during liver regeneration, fibrogenesis, and carcinogenesis. American journal of physiology, *Gastrointestinal and liver physiology*, 310(3), G143–G154.

Ktistakis, N. T., 2017, In praise of M. Anselmier who first used the term "autophagie" in 1859, *Autophagy*, 13(12), 2015–2017.

Kudo, Y., Sugimoto, M., Arias, E., Kasashima, H., Cordes, T., Linares, J. F., Duran, A., Nakanishi, Y., Nakanishi, N., L'Hermitte, A., Campos, A., Senni, N., Rooslid, T., Roberts, L. R., Cuervo, A. M., Metallo, C. M., Karin, M., Diaz-Meco, M. T., & Moscat, J., 2020, PKC λ /I Loss Induces Autophagy, Oxidative Phosphorylation, and NRF2 to Promote Liver Cancer Progression, *Cancer cell*, 38(2), 247–262.e11.

Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K., 2018, Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo, *Biomolecules*, 8(1), 4.

Kummar, S., & Shafi, N. Q., 2003, Metastatic hepatocellular carcinoma, *Clinical oncology*, 15(5), 288–294.

Kundu, M., Thompson, C.B., 2008, Autophagy: basic principles and relevance to disease, *Annual review of pathology*, 3, 427–455.

Kuroda, K., Okumura, K., Isogai, H., & Isogai, E., 2015, The Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 and Mimics are Potential Anticancer Drugs, *Frontiers in oncology*, 5, 144.

Lewies, A., Du Plessis, L. H., & Wentzel, J. F., 2018, The cytotoxic, antimicrobial and anticancer properties of the antimicrobial peptide nisin Z alone and in combination with conventional treatments, *Cytotoxicity*, 25, 21–42.

- Li, X., Li, Y., Han, H., Miller, D.W., Wang, G., 2006, Solution structures of human LL-37 fragments and NMR-based identification of a minimal membrane-targeting antimicrobial and anticancer region, *Journal of the American chemical society*, 128: 5776–5785.
- Li, Y., & Yu, J., 2015, Research progress in structure-activity relationship of bioactive peptides, *Journal of medicinal food*, 18(2), 147–156.
- Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L., 2007, In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro, *Nature protocols*, 2(2), 329–333.
- Lima, K. G., Krause, G. C., Schuster, A. D., Catarina, A. V., Basso, B. S., De Mesquita, F. C., Pedrazza, L., Marczak, E. S., Martha, B. A., Nunes, F. B., Chiela, E. C. F., Jaeger, N., Thomé, M. P., Haute, G. V., Dias, H. B., Donadio, M. V. F., & De Oliveira, J. R., 2016, Gallic acid reduces cell growth by induction of apoptosis and reduction of IL-8 in HepG2 cells, *Biomedicine & pharmacotherapy*, 84, 1282–1290.
- Linkermann, A., 2014, Scientific Figure on ResearchGate, https://www.researchgate.net/figure/Activators-of-the-Necrosome-as-Therapeutic-Targets-Various-stimuli-lead-to-activation-of_fig2_259982619 [Ziyaret tarihi: 11 Aralık 2023]
- Liu, L., Liao, J. Z., He, X. X., & Li, P. Y., 2017, The role of autophagy in hepatocellular carcinoma: friend or foe, *Oncotarget*, 8(34), 57707–57722.
- Liu, Z. G., & Jiao, D., 2019, Necroptosis, tumor necrosis and tumorigenesis, *Cell stress*, 4(1), 1–8.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G., 2003, 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies, *Nature reviews cancer*, 3(5), 330–338.
- Lopes, B. S., Hanafiah, A., Nachimuthu, R., Muthupandian, S., Md. Nesran, Z. N., & Patil, S., 2022, The Role of Antimicrobial Peptides as Antimicrobial and Antibiofilm Agents in Tackling the Silent Pandemic of Antimicrobial Resistance, *Molecules*, 27(9), 2995.
- Lopez, J., & Tait, S. W., 2015, Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *British journal of cancer*, 112(6), 957–962.
- López-Terrada, D., Alaggio, R., de Dávila, M. T., Czauderna, P., Hiyama, E., Katzenstein, H., Leuschner, I., Malogolowkin, M., Meyers, R., Ranganathan, S., Tanaka, Y., Tomlinson, G., Fabrè, M., Zimmermann, A., Finegold, M. J., & Children's Oncology Group Liver Tumor Committee, 2014, Towards an international pediatric liver tumor consensus classification: proceedings of the Los Angeles COG liver tumors symposium, *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian academy of pathology*, 27(3), 472–491.
- Lotfollahzadeh, S., Recio-Boiles, A., Babiker, H.M., 2022, *Liver Cancer*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448337/> [Ziyaret tarihi: 25 Ekim 2023]
- Lu, C. X., Nan, K. J., & Lei, Y., 2008, Agents from amphibians with anticancer properties, *Anti-cancer drugs*, 19(10), 931–939.
- Lu, J. V., Weist, B. M., van Raam, B. J., Marro, B. S., Nguyen, L. V., Srinivas, P., Bell, B. D., Luhrs, K. A., Lane, T. E., Salvesen, G. S., & Walsh, C. M., 2011, Complementary roles of Fas-

associated death domain (FADD) and receptor interacting protein kinase-3 (RIPK3) in T-cell homeostasis and antiviral immunity, *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 108(37), 15312–15317.

Luedde, T., & Schwabe, R. F., 2011, NF- κ B in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma, *Nature reviews, Gastroenterology & hepatology*, 8(2), 108–118.

Mader, J. S., Mookherjee, N., Hancock, R. E., & Bleackley, R. C., 2009, The human host defense peptide LL-37 induces apoptosis in a calpain- and apoptosis-inducing factor-dependent manner involving Bax activity, *Molecular cancer research*, 7(5), 689–702.

Mader, J. S., Richardson, A., Salsman, J., Top, D., de Antueno, R., Duncan, R., & Hoskin, D. W., 2007, Bovine lactoferricin causes apoptosis in Jurkat T-leukemia cells by sequential permeabilization of the cell membrane and targeting of mitochondria, *Experimental cell research*, 313(12), 2634–2650.

Makarova-Rusher, O. V., Medina-Echeverez, J., Duffy, A. G., & Greten, T. F., 2015, The yin and yang of evasion and immune activation in HCC, *Journal of hepatology*, 62(6), 1420–1429.

Mao, J., Liu, S., Ai, M., Wang, Z., Wang, D., Li, X., Hu, K., Gao, X., & Yang, Y., 2017, A novel melittin nano-liposome exerted excellent anti-hepatocellular carcinoma efficacy with better biological safety, *Journal of hematology & oncology*, 10(1), 71.

Markman, M., 2023, *Liver cancer types*, <https://www.cancercenter.com/cancer-types/liver-cancer/types> [Ziyaret tarihi: 30 Ekim 2023]

Marquardt, J. U., & Edlich, F., 2019, Predisposition to Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma: From Mechanistic Insights to Therapeutic Strategies, *Frontiers in oncology*, 9, 1421.

Martin, T.A., Ye, L., Sanders, A.J., et al., 2000-2013, *Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/> [Ziyaret tarihi: 17 Ekim 2023]

Mattiuzzi, C., & Lippi, G., 2019, Current Cancer Epidemiology, *Journal of epidemiology and global health*, 9(4), 217–222.

Maucourt-Boulch, D., de Martel, C., Franceschi, S., & Plummer, M., 2018, Fraction and incidence of liver cancer attributable to hepatitis B and C viruses worldwide, *International journal of cancer*, 142(12), 2471–2477.

Maximin, S., Ganeshan, D. M., Shanbhogue, A. K., Dighe, M. K., Yeh, M. M., Kolokythas, O., Bhargava, P., & Lalwani, N., 2014, Current update on combined hepatocellular-cholangiocarcinoma, *European journal of radiology open*, 1, 40–48.

Murphy, M. P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C. J., Davies, K. J. A., Davies, M. J., Dick, T. P., Finkel, T., Forman, H. J., Janssen-Heininger, Y., Gems, D., Kagan, V. E., Kalyanaraman, B., Larsson, N. G., Milne, G. L., Nyström, T., Poulsen, H. E., Radi, R., Van Remmen, H., Schumacker, P. T., ... Halliwell, B., 2022, Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo, *Nature metabolism*, 4(6), 651–662.

Murugan, S., & Amaravadi, R. K., 2016, Methods for Studying Autophagy Within the Tumor Microenvironment, *Advances in experimental medicine and biology*, 899, 145–166.

Nahon, P., Bourcier, V., Layese, R., Audureau, E., Cagnot, C., Marcellin, P., Guyader, D., Fontaine, H., Larrey, D., De Lédinghen, V., Ouzan, D., Zoulim, F., Roulot, D., Tran, A., Bronowicki, J. P., Zarski, J. P., Leroy, V., Riachi, G., Calès, P., Péron, J. M., ... ANRS CO12 CirVir Group, 2017, Eradication of Hepatitis C Virus Infection in Patients With Cirrhosis Reduces Risk of Liver and Non-Liver Complications, *Gastroenterology*, 152(1), 142–156.e2.

National Institutes of Health (NIH), 2007, *Understanding Cancer*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/> [Ziyaret Tarihi: 21 Eylül 2023]

Nault, J. C., Bioulac-Sage, P., & Zucman-Rossi, J, 2013, Hepatocellular benign tumors-from molecular classification to personalized clinical care, *Gastroenterology*, 144(5), 888–902.

Negroni, A., Cucchiara, S., & Stronati, L., 2015, Apoptosis, Necrosis, and Necroptosis in the Gut and Intestinal Homeostasis, *Mediators of inflammation*, 2015, 250762.

Nevalainen, T. J., 1975, Cytotoxicity of vinblastine and vincristine to pancreatic acinar cells. Virchows Archiv. B, *Cell pathology*, 18(2), 119–127.

Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J., 2011, The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action, *Trends in biotechnology*, 29(9), 464–472.

Nicotera, P., & Melino, G., 2004, Regulation of the apoptosis-necrosis switch, *Oncogene*, 23(16), 2757–2765.

Niyonsaba, F., Ushio, H., Nakano, N., Ng, W., Sayama, K., Hashimoto, K., ... & Ogawa, H., 2007, Antimicrobial peptides human β -defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines, *Journal of investigative dermatology*, 127(3), 594–604.

Oelkrug, C., Hartke, M., & Schubert, A., 2015, Mode of action of anticancer peptides (ACPs) from amphibian origin, *Anticancer research*, 35(2), 635–643.

Ohsumi, Y., 2014, Historical landmarks of autophagy research, *Cell research*, 24(1), 9–23.

Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B., & Bao, J. K., 2012, Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis, *Cell proliferation*, 45(6), 487–498.

Oztas, E., Abudayyak, M., Celiksoz, M., & Özhan, G., 2019, Inflammation and oxidative stress are key mediators in AKB48-induced neurotoxicity in vitro, *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 55, 101–107.

Palmer, T. D., Ashby, W. J., Lewis, J. D., & Zijlstra, A., 2011, Targeting tumor cell motility to prevent metastasis, *Advanced drug delivery reviews*, 63(8), 568–581.

Pantic, J. M., Jovanovic, I. P., Radosavljevic, G. D., Arsenijevic, N. N., Conlon, J. M., & Lukic, M. L., 2017, The Potential of Frog Skin-Derived Peptides for Development into Therapeutically-Valuable Immunomodulatory Agents, *Molecules*, 22(12), 2071.

- Papo N, Braunstein A, Eshhar Z, Shai Y., 2004, Suppression of human prostate tumor growth in mice by a cytolytic d-, l-amino acid peptide: membrane lysis, increased necrosis, and inhibition of prostate-specific antigen secretion, *Cancer research*, 64: 5779–86.
- Park, W., Wei, S., Kim, B. S., Kim, B., Bae, S. J., Chae, Y. C., Ryu, D., & Ha, K. T., 2023, Diversity and complexity of cell death: a historical review, *Experimental & molecular medicine*, 55(8), 1573–1594.
- Parsons, C. J., Takashima, M., & Rippe, R. A., 2007, Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis, *Journal of gastroenterology and hepatology*, 22 Suppl 1, S79–S84.
- Patrzykat, A., Friedrich, C.L., Zhang, L., Mendoza, V., & Hancock, R.E., 2002, Sublethal Concentrations of Pleurocidin-Derived Antimicrobial Peptides Inhibit Macromolecular Synthesis in *Escherichia coli*, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46, 605 - 614.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., ... & Levine, B., 2005, Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy, *Cell*, 122(6), 927-939.
- Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. K., 2018, Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy, *International journal of molecular sciences*, 19(2), 448.
- Piñeiro Fernández, J., Luddy, K. A., Harmon, C., & O'Farrelly, C., 2019, Hepatic Tumor Microenvironments and Effects on NK Cell Phenotype and Function, *International journal of molecular sciences*, 20(17), 4131.
- Pinyol, R., Nault, J. C., Quetglas, I. M., Zucman-Rossi, J., & Llovet, J. M., 2014, Molecular profiling of liver tumors: classification and clinical translation for decision making, *Seminars in liver disease*, 34(4), 363–375.
- Piotrowska, U., Sobczak, M., & Oledzka, E., 2017, Current state of a dual behaviour of antimicrobial peptides-Therapeutic agents and promising delivery vectors, *Chemical biology & drug design*, 90(6), 1079–1093.
- Powers, J. P., Hancock R. E., 2003, The relationship between peptide structure and antibacterial activity, *Peptides*, 24 1681–1691.
- Preet, S., Bharati, S., Panjeta, A., Tewari, R., Rishi, P., 2015, Effect of nisin and doxorubicin on DMBA-induced skin carcinogenesis—A possible adjunct therapy, *Tumour biology: the journal of the international society for oncodevelopmental biology and medicine*, 36:8301-8308.
- Qiao, Q., Bai, R., Song, W., Gao, H., Zhang, M., Lu, J., ... & Zhao, P., 2021, Human α -defensin 5 suppressed colon cancer growth by targeting PI3K pathway, *Experimental cell research*, 407(2), 112809.
- Ran, S., Downes, A., & Thorpe, P. E., 2002, Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels, *Cancer research*, 62(21), 6132–6140.
- Ren, S. X., Shen, J., Cheng, A. S., Lu, L., Chan, R. L., Li, Z. J., Wang, X. J., Wong, C. C., Zhang, L., Ng, S. S., Chan, F. L., Chan, F. K., Yu, J., Sung, J. J., Wu, W. K., & Cho, C. H., 2013, FK-16 derived from the anticancer peptide LL-37 induces caspase-independent apoptosis and autophagic cell death in colon cancer cells, *PloS one*, 8(5), e63641.

Riss, T., Niles, A., Moravec, R., et al., 2019, *Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540958/> [Ziyaret Tarihi: 2 Aralık 2023]

Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., et al., 2013, *Cell Viability Assays*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/> [Ziyaret Tarihi: 9 Aralık 2023]

Roach, H. I., & Clarke, N. M., 2000, Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. *The Journal of bone and joint surgery*, 82(4), 601–613.

Rudalska, R., Dauch, D., Longerich, T., McJunkin, K., Wuestefeld, T., Kang, T. W., Hohmeyer, A., Pesic, M., Leibold, J., von Thun, A., Schirmacher, P., Zuber, J., Weiss, K. H., Powers, S., Malek, N. P., Eilers, M., Sipos, B., Lowe, S. W., Geffers, R., Laufer, S., ... Zender, L., 2014, In vivo RNAi screening identifies a mechanism of sorafenib resistance in liver cancer, *Nature medicine*, 20(10), 1138–1146.

Ruffolo, P. R., 1964, The Pathogenesis of Necrosis. I. Correlated Light and Electron Microscopic Observations of the Mtocardial Necrosis Induced by the Intravenous Injection of Papain, *The American journal of pathology*, 45(5), 741–756.

Russwurm, S., Stonans, I., Stonane, E. et al., 1998, HepG2 hepatocytes express IFN- γ , TNF- α , TGF- β , M-CSF, oncostatin-M, ICAM-1, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12 and IL-6 receptor genes in vitro, *Critical care* 2, P005.

Salvesen, G. S., & Riedl, S. J., 2008, Caspase mechanisms, *Advances in experimental medicine and biology*, 615, 13–23.

Sancar, S., Bolkent, S., 2022, Cyclic Dodecapeptide Induces Cell Death Through Membrane–Peptide Interactions in Breast Cancer Cells, *International journal of peptide research and therapeutics*, 28, 67.

Sancar, S., Torkay, G., Çan, T., 2023, A Cicada Antimicrobial Peptide, Cryptonin, Exhibits Potent Antitumor Activity by Necrosis on Human Melanoma Cells. *International journal of peptide research and therapeutics*, 29, 68.

Santiago-Lomelí, M., Gómez-Quiroz, L. E., Ortíz-Ortega, V. M., Kershenobich, D., & Gutiérrez-Ruiz, M. C., 2005, Differential effect of interleukin-10 on hepatocyte apoptosis, *Life sciences*, 76(22), 2569–2579.

Satyanarayana, A., Manns, M. P., & Rudolph, K. L., 2004, Telomeres and telomerase: a dual role in hepatocarcinogenesis, *Hepatology*, 40(2), 276–283.

Schneller, D., Angel, P., 2019, *Cellular Origin of Hepatocellular Carcinoma*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549196/> [Ziyaret tarihi: 5 Ekim 2023]

Schweizer, F., 2009, Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity, *European journal of pharmacology*, 625(1-3):190-194.

SEER Training Modules, Module Name. U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute, <<https://training.seer.cancer.gov/>>. [Ziyaret tarihi: 23 Eylül 2023]

Sethy, C., & Kundu, C. N., 2021, 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition, *Biomedicine & pharmacotherapy*, 137, 111285.

Sever, R., & Brugge, J. S., 2015, Signal transduction in cancer, *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(4), a006098.

Sevic, I., Spinelli, F.M., Cantero, M.J., et al., 2019, *The Role of the Tumor Microenvironment in the Development and Progression of Hepatocellular Carcinoma*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549192/> [Ziyaret tarihi: 17 Kasım 2023]

Shen, S., Kepp, O., & Kroemer, G., 2012, The end of autophagic cell death?, *Autophagy*, 8(1), 1–3.

Shin, S. Y., Lee, M. K., Kim, K. L., & HAHM, K. S., 1997, Structure-antitumor and hemolytic activity relationships of synthetic peptides derived from cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides, *The Journal of peptide research*, 50(4), 279-285.

Shin, S. Y., Yang, S. T., Park, E. J., Eom, S. H., Song, W. K., Kim, J. I., ... & Kim, Y., 2001, Antibacterial, antitumor and hemolytic activities of α -helical antibiotic peptide, P18 and its analogs, *The Journal of peptide research*, 58(6), 504-514.

Sia, D., Villanueva, A., Friedman, S. L., & Llovet, J. M., 2017, Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis, *Gastroenterology*, 152(4), 745–761.

Sigerist, H. E., 1932, The Historical Development of the Pathology and Therapy of Cancer, *Bulletin of the New York academy of medicine*, 8(11), 642–653.

Singh, T., Choudhary, P., & Singh, S., 2022, *Antimicrobial Peptides: Mechanism of Action*, IntechOpen, 978-1-83969-714-2.

Srivatanakul, P., Sriplung, H., & Deerasamee, S. 2004. Epidemiology of liver cancer: an overview. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 5(2), 118–125.

Sun, K., Guo, X. L., Zhao, Q. D., Jing, Y. Y., Kou, X. R., Xie, X. Q., Zhou, Y., Cai, N., Gao, L., Zhao, X., Zhang, S. S., Song, J. R., Li, D., Deng, W. J., Li, R., Wu, M. C., & Wei, L. X., 2013, Paradoxical role of autophagy in the dysplastic and tumor-forming stages of hepatocarcinoma development in rats, *Cell death & disease*, 4(2), e501.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F., 2021, Global Cancer Statistics 2020: Globocan Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249.

Tait, S. W., & Green, D. R., 2010, Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond, *Nature reviews, Molecular cell biology*, 11(9), 621–632.

Tan, S., Zhao, J., Sun, Z., Cao, S., Niu, K., Zhong, Y., Wang, H., Shi, L., Pan, H., Hu, J., Qian, L., Liu, N., & Yuan, J., 2020, Hepatocyte-specific TAK1 deficiency drives RIPK1 kinase-dependent inflammation to promote liver fibrosis and hepatocellular carcinoma, *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 117(25), 14231–14242.

- Teker, A. G., & Ay, P., 2022, Has the cancer-related death trend been changing in Turkey? An evaluation of the period between 2009 and 2019, *Cancer epidemiology*, 80, 102228.
- Tenev, T., Bianchi, K., Darding, M., Broemer, M., Langlais, C., Wallberg, F., Zachariou, A., Lopez, J., MacFarlane, M., Cain, K., & Meier, P., 2011, The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs, *Molecular cell*, 43(3), 432–448.
- Thorburn, A., 2008, Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes, *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 13(1), 1–9.
- Tonnus, W., Meyer, C., Paliege, A., Belavgeni, A., von Mässenhausen, A., Bornstein, S. R., Hugo, C., Becker, J. U., & Linkermann, A., 2019, The pathological features of regulated necrosis, *The Journal of pathology*, 247(5), 697–707.
- Tornesello, A. L., Borrelli, A., Buonaguro, L., Buonaguro, F. M., & Tornesello, M. L., 2020, Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities, *Molecules*, 25(12), 2850.
- Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H., 2017, The liver, *Current biology*, 27(21), R1147–R1151.
- Trinidad-Calderón, P. A., Varela-Chinchilla, C. D., & García-Lara, S., 2021, Natural Peptides Inducing Cancer Cell Death: Mechanisms and Properties of Specific Candidates for Cancer Therapeutics, *Molecules*, 26(24), 7453.
- Tripathi, A.K., & Vishwanatha, J.K., 2022, Role of Anti-Cancer Peptides as Immunomodulatory Agents: Potential and Design Strategy, *Pharmaceutics*, 14.
- Tsai, W. L., & Chung, R. T., 2010, Viral hepatocarcinogenesis, *Oncogene*, 29(16), 2309–2324.
- Tsilimigras, D. I., Brodt, P., Clavien, P. A., Muschel, R. J., D'Angelica, M. I., Endo, I., Parks, R. W., Doyle, M., de Santibañes, E., & Pawlik, T. M., (2021), Liver metastases, *Nature reviews, Disease primers*, 7(1), 27.
- Vacchelli, E., Aranda, F., Bloy, N., Buqué, A., Cremer, I., Eggermont, A., Fridman, W. H., Fucikova, J., Galon, J., Spisek, R., Zitvogel, L., Kroemer, G., & Galluzzi, L., 2015, Trial Watch-Immunostimulation with cytokines in cancer therapy, *Oncoimmunology*, 5(2), e1115942.
- Vandenabeele, P., Vanden Berghe, T., & Festjens, N., 2006, Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 2006(358), pe44.
- Vicente, C.M., da Silva, D.A., Sartorio, P.V., Silva, T.D., Saad, S.S., Nader, H.B., et al., 2018 Heparan sulfate proteoglycans in human colorectal cancer, *Analytical cellular pathology*, 2018:8389595.
- Wai Ling Khoo, T. S., Rehman, A., & Olynyk, J. K., 2019, *Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma*, Hepatocellular Carcinoma, Codon Publications, 978-0-9944381-8-8

- Wallach, D., Kang, T.B., Dillon, C. P., & Green, D.R., 2016, Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules, *Science*, 352(6281), aaf2154.
- Wang, C., Tian, L. L., Li, S., Li, H. B., Zhou, Y., Wang, H., ... & Shang, D. J., 2013, Rapid cytotoxicity of antimicrobial peptide tempoprin-1CEa in breast cancer cells through membrane destruction and intracellular calcium mechanism, *PloS one*, 8(4), e60462.
- Wang, C., Yang, C., Chen, Y. C., Ma, L., & Huang, K., 2019. Rational Design of Hybrid Peptides: A Novel Drug Design Approach. *Current medical science*, 39(3), 349–355.
- Wang, G., 2008, Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles, *Journal of biological chemistry*, 283: 32637–32643.
- Wang, G., Li, X., & Wang, Z., 2016, APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1087–D1093.
- Wang, J. Y., Wen, L. L., Huang, Y. N., Chen, Y. T., & Ku, M. C., 2006, Dual effects of antioxidants in neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of gliamediated inflammation, *Current pharmaceutical design*, 12(27), 3521-3533.
- Wang, K., & Sun, D., 2018, Cancer stem cells of hepatocellular carcinoma, *Oncotarget*, 9(33), 23306–23314.
- Watson, J., Hydon, K., Lodge, P., 2016, Primary and secondary liver tumours, *InnovAiT*, 2016;9(8):477-482.
- Weston, A., Harris, C.C., 2003, *Multistage Carcinogenesis*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13982/> [Ziyaret tarihi: 23 Eylül 2023]
- Wodlej, C., Riedl, S., Rinner, B., Leber, R., Drechsler, C., Voelker, D. R., Choi, J. Y., Lohner, K., & Zweglick, D., 2019, Interaction of two antitumor peptides with membrane lipids - Influence of phosphatidylserine and cholesterol on specificity for melanoma cells, *PloS one*, 14(1), e0211187.
- World Cancer Research Fund International (WCRF)., 2023, <https://www.wcrf.org/cancer-trends/worldwide-cancer-data/> [Ziyaret Tarihi: 20 Mayıs 2023]
- Wu, J. M., Jan P. S., Yu H. C., Haung H. Y., Fang H. J., Chang Y. I., et al., 2009, Structure and function of a custom anticancer peptide, CB1a. *Peptides*, 30 839–848.
- Wu, Y. L., Xia, L. J., Li, J. Y., & Zhang, F. C., 2015, CecropinXJ inhibits the proliferation of human gastric cancer BGC823 cells and induces cell death in vitro and in vivo, *International journal of oncology*, 46(5), 2181–2193.
- Xia, L., Wu, Y., Kang, S., Ma, J., Yang, J., & Zhang, F., 2014, CecropinXJ, a silkworm antimicrobial peptide, induces cytoskeleton disruption in esophageal carcinoma cells, *Biochimica et biophysica acta*, 46(10), 867-876.

- Xie, X., He, L., Wang, Y., Ye, X., & Ma, L., 2023, Cbf-14, a cationic peptide derived from cathelin-domain, exhibits anti-inflammation activity via inhibiting PI3K-Akt/ROS/NF- κ B signaling pathway, *Peptides*, 171040.
- Xu, P., Lv, D., Wang, X., Wang, Y., Hou, C., Gao, K., & Guo, X., 2020, Inhibitory effects of Bombyx mori antimicrobial peptide cecropins on esophageal cancer cells, *European journal of pharmacology*, 887, 173434.
- Xu, X., & Lai, R., 2015, The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions, *Chemical reviews*, 115(4), 1760–1846.
- Yang, D., Chen, Q., Schmidt, A. P., Anderson, G. M., Wang, J. M., Wooters, J., ... & Chertov, O., 2000, LL-37, the neutrophil granule–and epithelial cell–derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor–like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells, *The Journal of experimental medicine*, 192(7), 1069-1074.
- Yang, S., Zhao, Q., Xiang, H. et al., 2013, Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of constituents from Toona sinensis on human cancer cells, *Cancer cell international*, 13, 12.
- Yee, P. P., & Li, W., 2021, Tumor necrosis: A synergistic consequence of metabolic stress and inflammation. BioEssays: news and reviews in molecular, *Cellular and developmental biology*, 43(7), e2100029.
- Yip, K. W., & Reed, J. C. 2008, Bcl-2 family proteins and cancer, *Oncogene*, 27(50), 6398–6406.
- Yo, Y. T., Shieh, G. S., Hsu, K. F., Wu, C. L., & Shiau, A. L., 2009, Licorice and licochalcone-A induce autophagy in LNCaP prostate cancer cells by suppression of Bcl-2 expression and the mTOR pathway, *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(18), 8266-8273.
- Yu, L., Chen, Y., & Tooze, S. A., 2018, Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms, *Autophagy*, 14(2), 207–215.
- Zeng, J., Wang, J., Wu, J., Deng, R., Zhang, L., Chen, Q., ... & Lu, X., 2023, A novel antimicrobial peptide M1-8 targets the lysosomal pathway to inhibit autolysosome formation and promote apoptosis in liver cancer cells, *Journal of cellular and molecular medicine*, 27(3), 340-352.
- Zhang, C., Yang, M., & Ericsson, A. C., 2019, Antimicrobial Peptides: Potential Application in Liver Cancer, *Frontiers in microbiology*, 10, 1257.
- Zhang, QY., Yan, ZB., Meng, YM. et al., 2021, Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential, *Military medical research*, 8, 48.
- Zhang, S., Gan, X., Qiu, J., Ju, Z., Gao, J., Zhou, J., Shi, C., Zhu, Y., & Li, Z., 2021, IL-10 derived from Hepatocarcinoma cells improves human induced regulatory T cells function via JAK1/STAT5 pathway in tumor microenvironment, *Molecular immunology*, 133, 163–172.

Zhang, Y., Sun, C., Xiao, G., & Gu, Y., 2019, Host defense peptide Hymenochirin-1B induces lung cancer cell apoptosis and cell cycle arrest through the mitochondrial pathway, *Biochemical and biophysical research communications*, 512(2), 269-275.

Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J. C., & Llovet, J. M. 2015, Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma, *Gastroenterology*, 149(5), 1226–1239.e4.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Tuba ÇAN
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	16.07.2020

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Üniversitesi
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Moleküler Biyoloji

Makale ve Bildiriler
Sancar, S., Torkay, G., Çan T., 2023, A Cidada Antimicrobial Peptide, Cryptonin, Exhibits Potent Antitumor Activity by Necrosis on Human Melanoma Cell, <i>International journal of peptide research and therapeutics</i> , 29, 68.