

T.C.  
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜMÖR HÜCRELERİ APOPTOZ FAKTÖRÜ'NÜN (TCApF)  
İNSAN KARACİĞER KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNE  
SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN  
BELİRLENMESİ

Damra ÇETİNTAŞ

Danışman: Doç. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK

GENETİK VE BİYOTEKNOLOJİ  
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN  
2022  
Her Hakkı Saklıdır.

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### **TÜMÖR HÜCRELERİ APOPTOZ FAKTÖRÜ'NÜN (TCApF) İNSAN KARACİĞER KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNE SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Damra ÇETİNTAŞ

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Genetik ve Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK

Karaciğer kanseri dünya genelinde ölüm oranının en fazla olduğu kanser türüdür. Tek bir tedavi yönteminin tatmin edici iyileştirici etkilere ulaşması oldukça zordur. Bu nedenle, anti-tümör ilaçlarının araştırılması ve geliştirilmesi acil karşılanması gereken bir ihtiyaçtır. Anti-kanser peptitleri (ACP'ler) olarak sınıflandırılan, anti-tümör aktivitesine sahip katyonik düşük molekül ağırlıklı peptitler bu ihtiyaçtan ortaya çıkmıştır. Yeni bir tümör hücresi apoptoz faktörü (TCApF), insanlar üzerinde yapılan akut myeloid lösemi, meme, glioblastom, nöroblastom, prostat ve akciğer kanserleri üzerinde apoptoza uğrattığı belirlenmiştir. Katı malignitelerin tedavisinde en çok kullanılan kemoterapötik ajan olan 5-Fluorourasil (5-FU), birçok kanser hastalığında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında önemli anti kanser etkilere sahip olduğu bilinen ve son yapılan çalışmalarda gittikçe önemi artan anti kanser peptit olan TCApF'in antikanser ilaç olan 5-FU ile kombine kullanımının karaciğer kanser hücreleri (HepG2) üzerindeki sitotoksik etkisi MTT, genotoksik etkisi Comet yöntemiyle araştırılmıştır. MTT analiz sonuçlarına göre, HepG2 hücre hattı üzerinde TCApF ve 5-FU kombinasyonunun sitotoksik etkisinin en uzun maruz kalma süresi olan 72 saatin sonunda 1750 ng/mL TCApF+ 3,5 mg/mL 5-FU deney grubunda olduğu gözlenmiştir. Ayrıca 1250- 1750 ng/mL+ 3,5 mg/mL 5-FU kombinasyonunun uygulandığı HepG2 hücrelerinde pozitif kontrole göre daha fazla genotoksik etkinin olduğu DNA kuyruk yoğunluğu ve DNA kuyruk göçü parametreleri kullanılarak gösterilmiştir.

**2022, 67 Sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** 5-Fluorourasil, Antikanser peptitler, Apoptoz faktörü (TCApF), Genotoksisite, Karaciğer kanseri, Sitotoksisite

## ABSTRACT

Master Thesis

### DETERMINATION OF CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF TUMOR APOPTOSIS FACTOR (TCApF) ON HUMAN LIVER CANCER CELL LINE

Damra ÇETİNTAŞ

Erzincan Binali Yıldırım University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Genetic and Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK

Liver cancer is the type of cancer with the highest mortality rate worldwide. It is very difficult for a single treatment method to achieve satisfactory curative effects. Therefore, research and development of anti-tumor drugs are an urgent need. Cationic low molecular weight peptides with anti-tumor activity, classified as anti-cancer peptides (ACPs), emerged from this need. A new tumor cell apoptosis factor (TCApF) has been determined to cause apoptosis in acute myeloid leukemia, breast, glioblastoma, neuroblastoma, prostate, and lung cancers in humans. 5-Fluorouracil (5-FU), which is the most widely used chemotherapeutic agent in the treatment of solid malignancies, is widely used in many cancer diseases. In this thesis study, the cytotoxic effect of TCApF, which is known to have important anti-cancer effects and has been increasing in importance in recent studies, in combination with the anticancer drug 5-FU, on liver cancer cells (HepG2), the cytotoxic effect was investigated by MTT and the genotoxic effect by Comet method. According to the MTT analysis results, the cytotoxic effect of the combination of TCApF and 5-FU on the HepG2 cell line was observed in the experimental group at 1750 ng/mL TCApF+ 3,5 mg/mL 5-FU after the longest exposure time of 72 hours. In addition, using DNA tail density and DNA tail migration parameters, it has been shown that more genotoxic effects occur in HepG2 cells in which 1250-1750 ng/mL + 3,5 mg/mL 5-FU combination is applied compared to the positive control.

**2021, 67 Pages**

**Keywords:** 5-Fluorouracil, Anticancer peptides, Apoptosis factor (TCApF), Cytotoxicity, Genotoxicity, Liver cancer.

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimi boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, yetişmemde büyük emekleri olan, yanında çalışmaktan onur duyduğum ayrıca bilgi ve tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli danışman hocam, Doç. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK'a, çalışmamızda kullanılan hücre hattının teminini sağlayan Doç. Dr. Selcen ÇELİK UZUNER'e ve laboratuvar çalışmalarımda desteğini esirgemeyen Tuğba ATICI'ya katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecimde en büyük fedakarlığı gösteren güzel kızım Buğlem ÇETİNTAŞ'a ve sevgili eşim Serdar ÇETİNTAŞ'a başta olmak üzere desteklerini her zaman hissettiğim kıymetli annem, babam ve kardeşlerime yürekten minnetlerimi sunuyorum.

Damra ÇETİNTAŞ  
Ocak, 2022

## İÇİNDEKİLER

|                                                                           |      |
|---------------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZET.....                                                                 | i    |
| ABSTRACT .....                                                            | ii   |
| TEŞEKKÜR .....                                                            | iii  |
| İÇİNDEKİLER .....                                                         | iv   |
| ŞEKİLLER LİSTESİ.....                                                     | vii  |
| TABLolar LİSTESİ.....                                                     | viii |
| SİMGELER ve KISALTMALAR .....                                             | ix   |
| 1. GİRİŞ.....                                                             | 1    |
| 2. KURAMSAL TEMELLER.....                                                 | 3    |
| 2.1. Karaciğer Anatomisi ve Histolojisi .....                             | 3    |
| 2.2. Kanser Nedir? .....                                                  | 3    |
| 2.3. Tümör Gelişimi .....                                                 | 4    |
| 2.3.1. İyi huylu (benign) tümörler .....                                  | 4    |
| 2.3.2. Kötü huylu (malign) tümörler.....                                  | 5    |
| 2.4. Karaciğer Tümörleri .....                                            | 5    |
| 2.5. Hepatosellüler Kanser (HCC) .....                                    | 5    |
| 2.6. Hepatoselüler Karsinomun Genetik ve Moleküler Yapısı .....           | 6    |
| 2.7. Patogenezi .....                                                     | 8    |
| 2.7.1. Hepatit B.....                                                     | 8    |
| 2.7.2. Hepatit C.....                                                     | 9    |
| 2.7.3. Siroz.....                                                         | 9    |
| 2.7.4. Alkol .....                                                        | 9    |
| 2.7.5. Aflatoksin .....                                                   | 10   |
| 2.7.6. Obezite .....                                                      | 10   |
| 2.8. Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi .....                                 | 10   |
| 2.9. Tedavi.....                                                          | 10   |
| 2.9.1. Karaciğer transplantasyonu .....                                   | 11   |
| 2.9.2. Cerrahi rezeksiyon .....                                           | 11   |
| 2.9.3. Radyofrekans ablasyonu (RFA) ve perkütan etanol enjeksiyonunu..... | 11   |
| 2.10. Anti Kanser Peptitler .....                                         | 12   |
| 2.11. Anti Kanser Peptit Mekanizmaları .....                              | 16   |

|                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.11.1. Tümör anjiyogenezinin inhibisyonu .....              | 16        |
| 2.11.2. Tümör apoptozunun indüksiyonu .....                  | 16        |
| 2.11.3. Tümör nekrozunun indüksiyonu .....                   | 17        |
| 2.11.4. İmmünomodülatör fonksiyon .....                      | 17        |
| 2.11.5. Kinazların/proteaz aktivitelerinin inhibisyonu ..... | 17        |
| 2.11.6. Fonksiyonel proteinlerle etkileşim .....             | 18        |
| 2.12. Anti Kanser Peptitlerin Sınıflandırılması .....        | 18        |
| 2.12.1. $\alpha$ -sarmal ACP'ler .....                       | 18        |
| 2.12.2. $\beta$ kıvrımlı levha ACP'ler .....                 | 19        |
| 2.12.3. Rastgele bobin ACP'ler .....                         | 19        |
| 2.12.4. Döngüsel ACP'ler .....                               | 19        |
| 2.13. TCApF .....                                            | 20        |
| 2.14. 5-Fluorourasil .....                                   | 23        |
| 2.14.1.5-FU'nun etki mekanizması .....                       | 25        |
| 2.15. Hücre Kültürü ve Sitotoksosite .....                   | 25        |
| 2.15.1. MTT testi .....                                      | 26        |
| 2.16. Hücre Kültürü ve Genotoksosite .....                   | 27        |
| 2.16.1.Comet testi .....                                     | 28        |
| <b>3. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>                           | <b>31</b> |
| 3.1.Materyal .....                                           | 31        |
| 3.1.1. Hücre hattı .....                                     | 31        |
| 3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar .....                     | 31        |
| 3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler .....                    | 32        |
| 3.2. Yöntem .....                                            | 32        |
| 3.2.1. Hücrelerin çözdürülmesi .....                         | 33        |
| 3.2.2. Hücre hattının pasajlanması .....                     | 33        |
| 3.2.3. Hücre sayımı .....                                    | 34        |
| 3.2.4. Sitotoksosite çalışmaları .....                       | 35        |
| 3.2.4.1.Hücre canlılık testi .....                           | 35        |
| 3.2.5. Genotoksosite Çalışmaları .....                       | 36        |
| 3.2.5.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması .....          | 36        |
| 3.2.5.2. Alkali Comet assay testi .....                      | 38        |

|                                                                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.6. İstatistiksel Analiz .....                                                                                              | 41        |
| <b>4. BULGULAR .....</b>                                                                                                       | <b>42</b> |
| 4.1. Sitotoksisite Bulguları .....                                                                                             | 42        |
| 4.1.1. TCApF'in HepG2 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetteki sitotoksik etkilerin belirlenmesi .....                  | 42        |
| 4.1.2. 5- Fluorourasil'in (5-FU), HepG2 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetteki sitotoksik etkilerin belirlenmesi..... | 44        |
| 4.1.3. HepG2 hücrelerinde TCApF ve 5- FU kombinasyonunun sitotoksik etkilerinin belirlenmesi .....                             | 46        |
| 4.2. Genotoksisite Çalışmaları.....                                                                                            | 48        |
| 4.2.1. Alkali Comet analizi bulguları.....                                                                                     | 48        |
| <b>5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....</b>                                                                                               | <b>52</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                                                                                         | <b>60</b> |
| <b>EKLER.....</b>                                                                                                              | <b>66</b> |
| Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar .....                                                                | 67        |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. ACP'lerin anti-tümör mekanizmasının şematik diyagramı.....                                                         | 16 |
| Şekil 2.2. ACP'lerin yapısal sınıflandırmasının şematik diyagramı.....                                                        | 19 |
| Şekil 2.3. TCApF'in iki boyutlu kimyasal yapısı.....                                                                          | 20 |
| Şekil 2.4. TCApF'in (Nerofe) farklı hücre tipleri üzerine etkisi .....                                                        | 23 |
| Şekil 2.5. 5-Fluorourasil'in kimyasal yapısı.....                                                                             | 24 |
| Şekil 2.6. Comet yönteminin işlem basamakları.....                                                                            | 29 |
| Şekil 3.1. HepG2 hücre hattının mikroskopik görüntüsü.....                                                                    | 33 |
| Şekil 3.2. Hücre kültür laboratuvarında steril kabin içerisinde hücre sayımı.....                                             | 34 |
| Şekil 3.3. Comet Assay sonucu DNA hasarlarının sınıflandırılması.....                                                         | 39 |
| Şekil 4.1. TCApF konsantrasyonlarının 24 saat sonucunda HepG2 hücre canlılığına etkisi.....                                   | 42 |
| Şekil 4.2. TCApF konsantrasyonlarının 48 saat sonucunda HepG2 hücre canlılığına etkisi.....                                   | 43 |
| Şekil 4.3. TCApF konsantrasyonlarının 72 saat sonucunda HepG2 hücre canlılığına etkisi.....                                   | 43 |
| Şekil 4.4. 5-FU konsantrasyonlarının 24 saat sonucunda HepG2 hücre canlılığına etkisi.....                                    | 44 |
| Şekil 4.5. 5-FU konsantrasyonlarının 48 saat sonucunda HepG2 hücre canlılığına etkisi.....                                    | 45 |
| Şekil 4.6. 5-FU konsantrasyonlarının 72 saat sonucunda HepG2 hücre canlılığına etkisi.....                                    | 45 |
| Şekil 4.7. TCApF ve 5-FU kombinasyonlarının 24 saat sonucunda HepG2 hücre canlılığına etkisi .....                            | 46 |
| Şekil 4.8. TCApF ve 5-FU kombinasyonlarının 48 saat sonucunda HepG2 hücre canlılığına etkisi .....                            | 47 |
| Şekil 4.9. TCApF ve 5-FU kombinasyonlarının 72 saat sonucunda HepG2 hücre canlılığına etkisi .....                            | 47 |
| Şekil 4.10. Comet yöntemiyle HepG2 hücrelerinin etidyum bromür ile boyanma sonrası floresans mikroskopundaki görüntüler ..... | 49 |
| Şekil 4.11. HepG2 hücrelerinde oluşan DNA hasarına ait DNA kuyruk yoğunluğu.....                                              | 50 |
| Şekil 4.12. HepG2 hücrelerinde oluşan DNA hasarına ait DNA kuyruk göçü.....                                                   | 51 |

## TABLÖLAR LİSTESİ

|                                                                                       | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Tablo 2.1. Karaciğer tümörlerinin sınıflandırılması.....                              | 6     |
| Tablo 3.1. Çalışmalarda kullanılan alet ve cihazlar .....                             | 31    |
| Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar ..... | 32    |



## SİMGELER ve KISALTMALAR

### Simgeler

|    |             |
|----|-------------|
| °C | Celsius     |
| %  | Yüzde       |
| ng | Nano gram   |
| nm | Nano metre  |
| µg | Mikro gram  |
| µl | Mikro litre |
| µM | Mikro molar |
| dk | Dakika      |
| L  | Litre       |
| M  | Molar       |
| ml | Mili litre  |

### Kısaltmalar

|        |                                           |
|--------|-------------------------------------------|
| ACP    | Anti Kanser Peptit                        |
| AML    | Akut Miyeloid Lösemi                      |
| BMI    | Vücut Kitle İndeksi                       |
| cDNA   | Komplementer DNA                          |
| DMSO   | Dimetil Sülfoksit                         |
| DNA    | Deoksiribonükleik Asit                    |
| dTCapF | Tümör Hücreleri Apoptoz Faktörü Türevleri |
| EGFR   | Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü         |
| EMEM   | Eagle's Minimum Essential Medium          |
| ER     | Endoplazmik Retikulum                     |
| EMEM   | Eagle's Minimum Essential Medium          |
| FDA    | Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi             |
| FGFR   | Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü       |
| HBV    | Hepatit B Virüsü                          |
| HCC    | Hepatosellüler Karsinom                   |

|       |                                     |
|-------|-------------------------------------|
| HCV   | Hepatit C Virüsü                    |
| HBsAg | Hepatit B Yüzey Antijeni            |
| HepG2 | Hepatosellüler Karsinom Hücre Hattı |
| MOA   | Etki Mekanizması                    |
| LMA   | Düşük Kaynama Dereceli Agar         |
| LOH   | Heterozigotluk Kaybı                |
| NMA   | Normal Kaynama Dereceli Agar        |
| PBS   | Fosfat Tamponlu Salin               |
| PDGF  | Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü   |
| PEI   | Perkütan Etanol Enjeksiyonunu       |
| RFA   | Perkütan Radyofrekans Ablasyonu     |
| TCApF | Tümör Hücreleri Apoptoz Faktörü     |
| VEGF  | Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü  |

## 1. GİRİŞ

Kanser, birçok tedavi yöntemlerinin olmasına karşın başta gelişmiş ülkeler olmak üzere tüm dünyanın en büyük sağlık problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Hastalıklara bağlı ölümler arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra en fazla ikinci ölüm oranına sahip olan kanser, halk sağlığı açısından önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Özellikle, sanayileşmiş ülkelerde kanser insidansı az gelişmiş ülkelere göre çok daha yüksektir. Hepatoselüler karsinom (HCC), primer (birincil) karaciğer kanserinin en yaygın olanıdır. HCC, dünya çapında en yaygın beşinci kanser ve kanserin neden olduğu ölümlerde ise üçüncü sırada yer alan en yaygın kanser türüdür. Hem teşhis hem de tedavide yeni teknolojik gelişmelere rağmen, hastalığın insidansı ve mortalitesi artmaya devam etmektedir. Gelişmiş Batı ülkelerinde daha az olmasına rağmen giderek görülme sıklığı önemli ölçüde artmaktadır. Bu kanser türü, erkekler ve yaşlılarda daha fazla oranda görülmektedir. HCC görülme oranı, özellikle Doğu ve Güneydoğu Asya ve Afrika'da yüksek, Güney Avrupa'da orta ve çoğu yüksek gelirli ülkelerde daha düşüktür. Bu kanser için en belirgin risk faktörleri hepatit B virüsü (HBV) ve hepatit C virüsü (HCV) olmasına karşın siroz, sigara ve alkol kullanımı, obezite, aflatoksin maruziyeti, ailesel ve genetik faktörler ile metabolik bozukluklar gibi bazı diğer faktörler yüksek HCC insidansında yer almaktadır.

Son yıllarda bazı kanser türlerinin tanı, tedavi ve önlenmesinde önemli bir ilerleme kaydedilmiştir. Günümüzde kanser tedavileri, cerrahi, kemoterapi, radyasyon, biyolojik ve hormonal tedaviyi içermektedir. 5-Fluorourasil (5-FU), dünya çapında katı malignitelerin tedavisinde en çok kullanılan üçüncü kemoterapötik ajandır. 5-FU, uzun yıllardan beri klinik olarak kullanılmaktadır. 5-FU, meme, mide, pankreas, özofagus, karaciğer, anüs, baş ve boyun kanserlerini içeren katı tümörlerin birçoğunda aktiviteye sahiptir. Birçok avantajı bulunmasına rağmen, geleneksel kanser tedavileri, ilaç direnci, tümör seçiciliği ve çözünürlüğünün olmaması nedeniyle terapötik kullanımlarını kaybetmekte ve bu nedenle yeni ajanların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Anti-kanser peptitler (ACP), kanser tedavisini kolaylaştırıcı moleküllerin geliştirilmesi açısından günümüzde önemli bir yere sahiptir. Yeni kanser tedavi yaklaşımlarının kaynağı olarak düşünülen anti kanser peptitlerin avantajları; vücutta kolaylıkla metabolize olmaları, özellikle karaciğer veya böbrekler gibi hayati fonksiyonlara sahip

organlarda birikmemesi ve toksik etki göstermemesidir. Buna ilave olarak ACP'ler hızlı sentezlenmesi, kolayca modifiye edilebilmesi ve rekombinant antikorlardan veya proteinlerden daha az immünojenik olması diğer avantajları arasındadır. ACP'lerin boyutlarının küçük olması, hücre zarlarına etkilerinin daha kolay olması ve aynı zamanda yüksek aktivite, özgüllük ve afiniteye sahip olmaları sebebiyle diğer ilaçlarla etkileşimleri epeyce düşüktür. Nispeten yüksek doku penetrasyonu ve düşük ilaç direnci oluşumu ile birleştiğinde, ACP'lerin klinik uygulama beklentisi umut vericidir.

Anti kanser bir peptit olan tümör hücreleri apoptoz faktörü (TCApF), timus, kolon ve beynin frontal lobunda ekspresyonu gösterilen 84 aminoasitlik peptit yapılı yeni bir hormondur. Bu hormon ve türevleri (kısa formları) üzerine yapılan az sayıdaki çalışma ile söz konusu olan bu peptitin T1/ST2 reseptörü (İnterlökin 1 reseptör ailesinin bir üyesi) üzerinden hücreye etki gösterdiği bildirilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda, T1/ST2 reseptör grubunun en önemli hastalıkların başında kanser, kardiyovasküler ve inflamatuvar hastalıklar gibi çeşitli hastalıklarda önemli roller üstlendiği rapor edilmiştir (Erden ve Günay, 2020).

Kanser, yüksek insidansa ve özellikle geç evrede yüksek mortaliteye sebep olması yüzünden dünya çapında ciddi bir sağlık sorunu olmuştur. Bu hastalığın mortalitesinin düşürülmesi için teşhis ve tedavide yeni gelişmelere ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni birçok teknolojik gelişmelerle bu hastalık grubuna ait etkilerin belirlenmesi amacıyla birçok çalışma ile henüz çözüm yolları tam anlamıyla bulunamamasına rağmen yine de umut verici niteliktedir. Bununla birlikte en büyük problemlerden birisi kemoterapötiklerin sağlıklı hücreler üzerinde olumsuz sonuçlar bırakmasıdır. Bu yüzden biyouyumluluğu yüksek yeni terapötiklerin keşfi gelecekte kansere bakış açısının değiştirilebileceğini düşünmemizi sağlayacaktır. Bu tez çalışmamızda, karaciğer kanser hücre hattı (HepG2) kullanılarak genomumuz tarafından sentezlenen TCApF'in, hücre canlılık değişimleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazoliumbromid) ve genotoksik etkisi Comet Assay (tek hücre jel elektroforezi) yöntemiyle incelenmiştir.

## **2. KURAMSAL TEMELLER**

### **2.1. Karaciğer Anatomisi ve Histolojisi**

Karaciğer, anatomi ve işlevi açısından olağandışı bir özelliğe sahip olan karmaşık bir organdır. Kan miktarı bakımından zengin olan arteriyel ve venöz kaynakları olağanüstü bir düzen içinde işler. Vücudumuzdaki salgı yapan katı organların en büyüğü ve en ağır olanıdır (Mahadevan, 2020). Ağırlığı insanlarda genel olarak ortalama 1,2- 1,8 kg arasındadır. Yetişkin erkeklerde 1,4- 1,8 kg, yetişkin kadınlarda 1,2- 1,4 kg arasındadır (Mitra ve Metcalf, 2009). Karaciğer kahve renkte olup pürüzsüz bir dış yüzeye sahiptir. Karın boşluğunun sağ üst kısmında diyaframın hemen altında yer almaktadır. Karaciğer uygun bir pozisyonda kalabilmesi için falciparum ligament adı verilen bir periton kıvrımı ile örtülüdür (Humagain, 2021, Taylor, 2021).

Karaciğer histolojik olarak hepatosit adı verilen kordonların meydana getirdiği lobüllerden meydana gelmektedir. Boyutları poligonal prizmatik bir katı bez kitlesidir. Vena sentralis, lobülün orta kısmında bulunur. Lobüller karaciğerin büyük bir alanında birbirlerine yakın yerlerde bulunur. Bazı alanlarda fibröz doku ve damarlar birbirinden ayrılırlar. Lobüller arasındaki bu alanlara portal aralık denir. İnsan karaciğerinde her lobülünün etrafında 5 veya 6 tane portal aralık yer almaktadır. Bu portal aralıklarda portal ven adı verilen venül bulunmaktadır. Arteriol, safra kanalı ve lenfatikler hepatik arterin bir dalıdır. Bu yapılar fibröz dokudan oluşan bir kılıf içinde bulunurlar. Küçük portal aralıklardaki safra kanallarına interlobüler duktus adı verilir. Büyük portal aralıklara da septal duktuslar denilmektedir. İnter lobüler duktuslar ise kübik veya basık silindirik yapıdadır. Septal duktuslar ise epitel ile döşeli yüksek silindirik şekildedir (Aksoy, 2020, Gerber ve Thung, 1987).

### **2.2. Kanser Nedir?**

Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünyada ikinci sırada gelen ölüm sebeplerinden biridir. Kanser, eski çağlardan beri bilinen bir hastalıktır ve tüm dünyadaki insanları etkilemeye devam etmektedir. Kanser kelimesi, Yunanca karkinos kelimesinden gelen (M.Ö. 460-370) karsinom tümörlerini tanımlamak için kullanılmıştır. M.Ö. 1600 civarında, eski Mısır mumyalarında insan kemik kanserinin en eski kanıtlarından olan el yazmaları bulunmuştur. Dünya tarihimizin en eski meme kanseri vakası da M.Ö. 1500'de

eski Mısır tarafından bulunmuş fakat köklü bir tedavi yönteminin bulunamamıştır (Akulapalli, 2009). Kanser, trilyonlarca hücreden oluşan vücuttaki bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğaldığı ve vücutta diğer organlara yayılabilen bir hastalıktır. Normal olarak insan vücudu ihtiyaç duyduğu yeni hücreleri çoğaltmak ve büyütmek için hücre bölünmesi yoluyla yeni hücreler üretir. Hasar görmüş ve yaşlanmış hücreler ölürler ve böylelikle yerine yeni hücreler oluşur. Bazen bu düzenli hücre bölünmelerinde anormal ya da hasarlı hücreler çoğalır ve büyümeye başlar. Bu hücreler, kontrolsüz büyüme sonucu vücudumuzda oluşmaması gereken tümör adı verilen doku parçacıkları oluşur (NCI, 2021, Weinber, 1996). Diğer hastalıklarla karşılaştırıldığımızda kanser kendini göstermesi, ilerlemesi ve neden olduğu sonuç bakımından diğerlerinden farklılık gösteren, genetik, kimyasal ve çevresel koşullardan etkilenen, diğer doku ve organlara metastaz yapabilme özelliğine sahip kompleks bir hastalık türüdür. Kanserin oluşmasında genellikle tümör baskılayıcı genlerdeki meydana gelen inaktivasyon, onkogenlerde oluşan aktivasyon, hücre bölünmesinde önemli olan kontrolü sağlayan genlerde ve DNA’da oluşabilecek hasarlardan ve onarımında görev alan genlerde meydana gelen mutasyon veya anormal olaylar sonucu oluşmaktadır. Karsinogenez oluşumu, normal hücrelerden anormal özellikte hücrelerin değişim göstermesine denir ve bu gelişen olayda hücrel değişiklikler meydana gelmektedir (Demirkaya vd., 2019).

### **2.3. Tümör Gelişimi**

Dokudaki tümörlerin iyi huylu mu kötü huylu mu olduğuna, hücrenin farklılaşma derecesi ve yayılma alanları incelenmektedir. Bu kapsamda kullanılan iki teknik bulunmaktadır. Tümör evrelemesi, tümörlerin diğer doku ve organlara yayılma derecesini inceler ve buna göre değerlendirilir. Histolojik ve sitolojik kriterlere dayanan tümör derecelendirme, tümörlerde farklılaşma derecesini ölçer. Histolojik farklılaşma, dokunun yapısındaki değişikliklere dayanır. Sitolojik derecelendirme belirli tümör hücrelerinin yapısına benzer olanakların uygulanmasına dayanan bir tekniktir.

#### **2.3.1. İyi huylu (benign) tümörler**

İyi huylu tümörler, sağlıklı hücrelerinden büyük oranda farklılık göstermezler. İyi huylu tümörler çevre dokuyu istila etmezler, fakat boyutları büyürse, kalan normal hücrelere veya üstteki sinir dokusuna baskı yaparak onlara zarar verebilir ve normal fonksiyon kaybına neden olabilir.

### **2.3.2. Kötü huylu (malign) tümörler**

Kötü huylu tümörler, hücrel anormalliklere sahip ve bazı durumlarda da çevre dokuları istila edebilir. Tanı koymak kolaydır. Standart hücrel kriterler, hücre sayısında yerel bir artış, hücrelerin normal düzeninin kaybı, hücre şekli ve boyutunda değişikliklere sahip olabilir. Çoğunlukla DNA içeriğindeki artışı, artan hücre bölünmesini ve anormal mitoz ve kromozomların varlığını anlamamızı sağlar. Kötü huylu tümörlerin bir kapsülü yoktur ve tümör hücreleri, iyi huylu tümörlerden daha fazla düzensizdirler. Bazı tümör hücreleri, kan veya lenf damarlarını istila edebilir. Kan veya lenf yoluyla vücudun diğer bölgelerine taşınabilirler ve bu uzak bölgelerde sekonder (ikincil) tümörlere dönüşebilirler. Bu tür yayılmaya metastaz denir ve kötü huylu tümörlerin özelliğidir (Selby ve Knowles, 2005).

### **2.4. Karaciğer Tümörleri**

Karaciğerin sahip olduğu hepatosit, biliyer epitelyum, vasküler endotel, kupffer hücresi, stellat hücreler, lenfoid hücreler ve nöroendokrin hücreler gibi değişik hücre gruplarından oluşmaktadır. Tablo 2.1’de sınıflandırıldığı gibi karaciğer hücrelerinden herhangi birinde benign veya malign tümör oluşabilmektedir (Klatskin ve Conn, 1993).

### **2.5. Hepatosellüler Kanser (HCC)**

Hepatosellüler kanser (HCC), karaciğer kanserlerinin %80-90’ını oluşturan ve karaciğerin en sık rastlanan primer tümörüdür. Karaciğer kanseri, 2020 yılında dünya genelinde 905.677 yeni vaka sayısı ile en sık teşhis konulan altıncı kanser, 830.180 ölüm sayısı ile en ölümcül kanser olarak üçüncü sırada yer almıştır. En yüksek görülme sıklığı Batı Afrika ve Çin ülkeleridir. Son on yılda ise kansere bağlı ölüm sebeplerinden ikinci sırada yer almaktadır (Chen vd., 2021).

HCC’ye yakalanma riskini artıran en önemli faktörler; dünyada en sık görülen hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonu, siroz gelişimi, alkol, hepatit C virüsü (HCV) gibi viral hepatit ve alkolsüz yağlı karaciğer hastalığıdır (Ghourı vd., 2017). HCC’un kesinleşmiş semptomları bulunmamaktadır. Genellikle hastalarda en yaygın bulunan siroz hastalığının semptomlarının kendini göstermesiyle hastalığın teşhisi yapılabilir. Hastalığın geç fark edilmesinden dolayı iyileştirici tedaviler uygulanamadığından hastalık ileri boyutlara taşınmaktadır (Tinkle ve Haas-Kogan, 2012).

**Tablo 2.1.** Karaciğer tümörlerinin sınıflandırılması (Varolgüneş vd., 1997).

| <b>Malign tümörler</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>Benign tümörler</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Primer</b></li><li>• <b>Epitelyal</b><ul style="list-style-type: none"><li>○ Hepatosellüler Karsinom (HCC)</li><li>○ Fibrolamellar kanser</li><li>○ Hepatoblastom</li><li>○ Kolanjiosellüler kanser</li><li>○ Kistadeno kanser</li><li>○ Karsinoid</li></ul></li><li>• <b>Mezodermal</b><ul style="list-style-type: none"><li>○ Hemanjiosarkoma</li><li>○ Epitelyal hemanjioendotelyoma</li><li>○ İndiferansiye sarkom</li><li>○ Lenfoma</li></ul></li><li>• <b>Metastatik</b></li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Epitelyal</b><ul style="list-style-type: none"><li>○ Hepatosellüler adenom</li><li>○ Fokal nodüler hiperplazi</li><li>○ Hepatoblastom</li><li>○ Bilier kanal adenoma</li><li>○ İntrahepatik bilier Paapillomatozis</li><li>○ Nodüler rejeneratif hiperplazi</li></ul></li><li>• <b>Mezodermal</b><ul style="list-style-type: none"><li>○ Hemanjiom (Kavernöz)</li><li>○ İnfantil hemanjioendotelyoma</li></ul></li></ul> |

## 2.6. Hepatoselüler Karsinomun Genetik ve Moleküler Yapısı

Hepatosellüler karsinomun gelişimi, birçok sayıda genomik lokusta epigenetik ve genetik değişiklikleri içermesi sonucu oluşan ve sinyal yollarında değişikliklere sebep olan karmaşık bir yapıdır. Eğer bu karmaşık yapıya, hepatosellüler karsinomun genetik anormalliklerini, etnik kökeni, etiyolojisini ve çevresel etkileri açısından oluşan farklılıkları da eklersek hastalık önemli derecede heterojen yapının oluşmasına neden olur (Yim ve Lee, 2021). Çeşitli genetik değişimlere sahiptir. En karakteristik olanı p53 tümör baskılayıcı genidir. Bu genin mutasyonu HCC'lı hastaların %29'unda bulunur. Genellikle ileri evrede görülür. Retinoblastoma gen (Rb) ve tümör baskılayıcı gen AXINI, hastalarda %50 oranında görülmektedir. DNA metilasyonu malign değişimlerde önemlidir. Hipermetilasyon, tümör baskılayıcı genleri bozar ve tümörün büyüme ve metastazına yardımcı olur. DNA hipermetilasyonu HCC kadar sirotik karaciğer açısından da önemlidir. DNA hipermetilasyonu tedavinin etkinliğini değerlendirmede yarar sağlar. Tümörün çıkartılması sonrasında ilk aylarda görülen kanserin tekrar nüks etme nedeni, operasyon sonrası kalan mikroskobik tümör kalıntılarıdır. Ancak geç ortaya çıkmış bu seyirlerde Fenetti ve Gish'e göre tümöre komşu olan dokunun genetik durumu açısından önemlidir. Bu komşu dokudaki genetik değişimler, tümörlü bölgelerin çıkarılmasından

aylar-yıllar sonra nüks HCC gelişimine sebep olur. Bu da geç nüksetmesinin gerçekte yeni malign lezyonlar oluşabileceğini göstermektedir (Tüzün vd., 1999). Hepatosellüler karsinoma sebep olan genetik etkilere biri de heterozigotluk kaybıdır. Bir kişinin hücre genomunun oluşumuna katkı yapan kısmının kaybolmasına heterozigotluk kaybı (LOH) denir. Normal koşullarda, her bir bireyden bir kopya geldiğinden dolayı, bir genin iki kopyası arasında küçük farklılık bulunmaktadır. Bu heterozigotluğun kaybolması bir mutasyon olabileceği anlamına gelmektedir. Bu durum, delesyon, gen dönüşümü ve kromozom kaybı gibi çeşitli sebeplerden dolayı ortaya çıkabilir. HCC tanısı varlığını tespit etmede Avrupa ve Asya’da LOH için yapılan genom taramalarında lokuslarda en yüksek yüzdeler 8p23, 4q22-24, 4q35, 17p13, 16q23-24, 6q27, 1p36 ve 9p12-14 kromozomlarında görülmüştür. HCC’de amplifikasyon oranları %58 ile %78 arasında değişiklik göstermektedir (Metodieva, 2008). Hepatit B virüsü (HBV) sonucu oluşan tümörler, genellikle konak transkripsiyon faktörlerinin, güçlendiricilerin ve protoonkogenlerin aktivitesini değiştiren hepatit BX (HBX) proteini tarafından indüklenir. Aflatoksin maruziyetinde ise genellikle tümör baskılayıcı TP53’ün erken mutasyonlarına sebebiyet vermektedir. Bütün bu farklılıklar, HCC’nin heterojenliğinde önemli olduğunu göstermektedir (Marks ve Yee, 2016). En sık delesyona uğrayan kromozom kolları 17p, 8p, 16q, 16p, 4q, 9p, 13q, 1p ve 6q’dur. En sık kromozomal kazanımlar 1q, 7q, 8q ve 17q üzerinde bulunmaktadır. HCC vakalarında mutasyonlar sonucu oluşan anomaliliklerin %30’u p53’te mutasyonların görülmesidir. Vakaları, %14 ila %44’ünde CTNNB1 geninin ekson 3 bölgesinde meydana gelen mutasyonlar oluşturmaktadır. PI3KCA, AXIN1 ve KRAS’da görülen mutasyonlara daha az oranda rastlanmaktadır (Mínguez vd., 2009).

Genetik değişiklikler tarafından yaygın olarak değiştirilen yollar arasında sorumlu süreçler bulunmaktadır. Bu yollar Wnt/beta-katenin yolu, p53 yolu, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) /Ras sinyal yolları, oksidatif ve endoplazmik retikulum stres modülatörleri ve kromatin yeniden modellenmesidir. Enteresan bir şekilde, farklı mutasyonlar hastanın sahip olduğu altta yatan karaciğer hastalığının sebebiyetine göre farklılık gösterir. Buna örnek verirsek, kromatin yeniden düzenlenmesine dahil olan genlerin inaktivasyonu, alkolik sirozlu hastalarda daha fazla görülürken, HBV-pozitif hastalarda p53 yolu düzensizliği ve HCV’li hastalarda daha fazla Ras geni baskındır. HCC’nin başlatılması, büyümesi ve yayılmasında VEGF ve reseptörleri önemli olduğu bilinmektedir. Fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve onun reseptör ailesi, HCC büyümesini, istilasını ve

anjyogenezisini arttırmada önemli bir rol almaktadır. Eğer artan serum FGF seviyeleri veya reseptörlerinin aktivasyonu nüks, tedaviye direnç ve kötü prognozla ilgilidir (Mínguez, 2016). WNT/ $\beta$ -katenin yolu, soy spesifikasyonu, farklılaşma, kök hücre yenilenmesi, epitelyal mezenkimal geçiş, bölgeleme, proliferasyon, hücre yapışması ve karaciğer rejenerasyonu gibi karaciğer fizyolojik olaylarında önemli bir göreve sahiptir (Zucman-Rossi, 2010). WNT/ $\beta$ -katenin yolu ile anormal sinyalleşme HCC’de yaygın olarak görülmektedir. Bu yol, tümör gelişiminde önemli bir yere sahiptir. Fakat karsinogeneze nasıl düzensiz hale geldiği bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarda, WNT/ $\beta$ -katenin sinyalleme anormalliklerinin tümör gelişimi esnasında her aşamasında rastlanmaktadır. Bu yolda meydana gelen değişiklikler, genomun kararsızlığına ve TP53 mutasyonu gibi HCC gelişimine yön vererek diğer dönüşümlerden bağımsız olarak gelişir (Marks ve Yee, 2016). Çeşitli rapor sonuçlarına göre mutasyonların prevalansının %26 ile %41 arasında olduğu düşünülmektedir. Bazı raporlarda ise yüksek oranda aflatoxin B1 ve HCV enfeksiyonuna maruz kalma sonucu oluşan mutasyonlarla yakından ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (Teufel vd., 2007).

TP53, HCC’de en sık mutasyona uğramış tümör baskılayıcı gendir. TP53’ün kodon 249’unda R249S amino asit ikamesine yol açan bu mutasyon, AFB1 maruziyeti olmayan coğrafi bölgelerde HCC’de nadiren rastlanır. Genellikle, belirli bir coğrafi alanda, R249S mutasyonunun sıklığı, tahmin edilen AFB1 maruziyet düzeyine paralel olduğu görülmektedir (Zucman-Rossi, 2010).

Sirotik karaciğer hastalarında görülen bir başka kromozom anomalisi ise telomer kısalmasıdır. Telomer kısalması sonucunda hücrelerin hücre bölünmelerinin sayısını kısıtlar. Yaşlanmış ve kronik hastalığı bulunan kişilerde organ sistemlerinin yenilenme seviyesini etkileyebilir. Yapılan bir çalışmada telomer kısalması, hepatokarsinogenez sırasında telomerde seviyeli bir kısalma görülmektedir (Chun-Ming ve Irene, 2008).

## **2.7. Patogenezi**

### **2.7.1. Hepatit B**

Hepatit B virüsü, 3.2 kb uzunluğundadır. RNA ara maddesi yoluyla çoğalan bir DNA virüsüdür. Hepatit B virüsü (HBV) ile akut enfeksiyondan sonra, hastaların yaklaşık

%10'unda virüsü vücutlarından tamamıyla dışarı atamadıkları için kronik bir enfeksiyona dönüşür. Kronik hepatit B, HCC ile yakından ilişkilidir (Balogh vd., 2016).

### **2.7.2. Hepatit C**

Hepatit C virüsü (HCV), birçok Batı ülkesinin kronik karaciğer hastalığı olan ve artan HCC vakalarından dolayı önemli bir risk faktörü olarak görülmektedir. Dünya nüfusunun yaklaşık %3'ü HCV ile enfektedir (Balogh vd., 2016). Hepatit C virüsü (HCV), tek sarmallı bir RNA virüsü olan ve genetik değişkenlik gösteren küçük bir virüstür (Balogh vd., 2016). HBV'den farklı olarak HCV, konakçı DNA'ya entegre olmaz. HCV çekirdek proteini doğrudan HCC'ye neden olmaktadır. Ras proteini ile birlikte birincil hücreleri dönüştürebilir. Ayrıca p53 transkripsiyonuna müdahale edebilir (Cha ve Dematteo, 2005).

### **2.7.3. Siroz**

Siroz, hepatosellüler karsinom gelişimi için bir risk faktörüdür. Belirli bir bölgede yaşayan sirozlu hastalarda, kronik hepatitli hastalarla karşılaştırdığımızda riski 3-4 kat daha fazladır. Hepatosellüler proliferasyondaki artış, onkogenlerin aktivasyonuna ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyona sebep olabilir (Gurakar vd., 2021). Siroz tanısı bulunan hastalarda çoğunlukla sağ üst kadranda ağrısı, kilo kaybı ve karaciğer fonksiyonlarının bozulması görülür (Siddiqui vd., 2018). Eğer ailede hemokromatoz veya Wilson hastalığı gibi genetik hastalıkları olan hastaların akrabaları için genetik test ve önleyici tavsiyelerin dikkate alınmasına da olanak sağlamaktadır (Schuppan ve Afdhal, 2008).

### **2.7.4. Alkol**

Alkole bağlı siroz, hepatosellüler karsinomun en yaygın üçüncü nedeni olarak bilinir. Alkolün etkisi günde 60 gramdan fazla tüketen kişilerde daha fazla görülmektedir. Kronik HCV enfeksiyonu olan aşırı alkol kullanıcıları arasında HSK geliştirme riskini inceleyen bir çalışmada, bireylerin aşırı alkol kullanmaları durumunda HSK geliştirme riskinin 2,3 kat daha yüksek olduğunu göstermiştir (Ghoury vd., 2017).

### 2.7.5. Aflatoksin

Aflatoksinler, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* mantarlarının doğal olarak baskın yan metabolitleridir. Bir gıda kontaminasyonu olarak bilinmektedir. Bu faktörlerden biri de kuraklık durumudur. Aflatoksin B1 (AFB1), bir kez tüketildiğinde, DNA'ya bağlanabilen fonksiyonel bir geçiş bileşiği olan AFB1-exo-8,9-epoksite metabolize olur. AFB1, aflatoksinin yaygın olduğu bölgedeki, çoğu HBV hastalığından şikayetçi olan insanlardan toplanan HCC örneklerinin %30-60'ında teşhis edilir (Jindal vd. 2019).

### 2.7.6. Obezite

Karaciğer kanseri belirtileriyle ilgili yapılan bir çalışmada, vücut kitle indeksinin (VKİ)  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ 'den daha yüksek olan kişilerde primer karaciğer kanseri geliştirme riskinin ilişkili olduğunu göstermiştir. BMI ve HCC arasındaki ilişki, HCV enfeksiyonu olan bireylerde, HBV enfeksiyonu olan bireylere göre çok daha fazladır. Obez erkeklerin, obez kadınlara göre karaciğer kanseri riski daha yüksektir (Jindal vd. 2019).

## 2.8. Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi

HCC etiyolojisi ile ilişkili birçok faktör vardır. Hastalığın ilerlemesi ve hastaların özellikleri üzerinde doğrudan etkisi vardır. En büyük küresel HCC insidansı, Sahra altı Doğu ve Batı Afrika, Moğolistan, Çin ve Asya-Pasifik bölgelerindedir (Jindal vd., 2019). Kadınlarda ve erkeklerde görülme olasılığı farklılık göstermektedir. Cinsiyet farkı, kadın ve erkek arasındaki hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) taşıyıcı oranı, yaşam tarzları, mesleki mazuriyet ve hormon durumlarındaki farklılıklardan kaynaklanabilir (Chien-Jen vd., 1997). Fransa, Japonya ve İtalya dışındaki gelişmiş ülkelerde HCC'nin yaygınlığı daha azdır. Karaciğer sirozu vakaların yaklaşık %80-90'ında HCC oluşturma yolunda ilerler (Jindal vd. 2019). HCC dünyada en sık görülen kanserlerden beşinci sırada, ölüm oranı bakımından üçüncü sırada yer almaktadır. Hastalığın sağkalım medyanı 6 ile 20 ay arasındadır (Yazıcı ve Bahar, 2008, Bosetti vd., 2014).

## 2.9. Tedavi

Hepatosellüler karsinom, benzersiz bir kanser türüdür. Bu nedenle tedavi yöntemi seçilirken hem tümörün evrenmesi hem de karaciğer hasarının bilinmesi aynı oranda

önem arz etmektedir. Hasta için, farklı tedavi yöntemlerinden en uygun olanı seçilmesi çok önemlidir. Karaciğer transplantasyonu, HCC tanılı hastalarda seçim kriterlerinin karşılayan en iyi tedavi şeklidir (Takayama, 2011). Birçok hasta transplantasyon için uygun değildir. Çünkü yeterli donör bulunamaması bu tedavi seçeneğini engellemektedir. Rezeksiyon yapılamayan hastalarda etanol enjeksiyonu, radyo frekans ablasyonu, transarteriyel embolizasyon, transarteriyel kemoterapi, rutin için yapılacak transplantasyonda en önemli kriterlerdir. Buna göre 5 yıllık sağkalım süresi %58-74 arasında olduğu bildirilmiştir (Uzunköy, 2009).

### **2.9.1. Karaciğer transplantasyonu**

Yaklaşık yirmi yıldır, HCC'nin tedavisinde karaciğer transplantasyonu önemli bir yere sahiptir. Fakat tüm HCC vakalarında kullanılabilen bir tedavi seçeneği değildir. HCC'nin çapı 5 cm'yi geçmemesi, üçten fazla olmamak kaydıyla birden fazla tümör nodülü bulunanlarda her bir nodül çapının 3 cm'den fazla olmaması HCC hastalar için yapılacak transplantasyonda en önemli kriterlerdir. Buna göre 5 yıllık sağkalım oranı %58-74 arasında bildirilmiştir (Uzunköy, 2009).

### **2.9.2. Cerrahi rezeksiyon**

Hepatosellüler karsinoma sahip hastalar cerrahi tedavi en önemli olanların arasındadır. Çünkü karaciğer rezeksiyonu sayesinde hastalar minimal mortalite ve sağkalım oranının artması nedeniyle günümüzde en fazla kullanılan bir tedavi yöntemidir. Aslında önemli olan tümörlerin erken aşamada farkedilmesi sayesinde hastalara erken müdahale edilmesidir (Takayama, 2011). Cerrahi rezeksiyon, iyi korunmuş karaciğer fonksiyonu ve normal portal basıncı olan katı tümörlü hastalar için önemli bir tedavi yöntemidir. Hastaların sağ kalımları 5 yılda %60-70'i ulaşabilir (Bruix vd., 2004). Yeterli fonksiyonel rezerv kapasitesi olan hastalarımızda ve ekstra hepatik tümör büyümesi olmayan hastalarda tekrar rezeksiyon yapılması sonrasında hastanın 5 yıllık sağkalım oranı %86 kadar yükseldiği görülmüştür (Rampone vd., 2009).

### **2.9.3. Radyofrekans ablasyonu (RFA) ve perkütan etanol enjeksiyonunu**

En sık kullanılan iki yöntem, perkütan radyofrekans ablasyonu (RFA) ve perkütan etanol enjeksiyonunu (PEI) içerir. Önemli komplikasyonların genellikle RFA için %10'dan ve

PEI için %3'ten az olduğu ve morbidite oranlarının RFA için %1'in altında ve PEI için oldukça nadir olduğu bir durumdur. RFA ile üstün lokal tümör kontrolü göstermiştir. RFA ve PEI arasındaki tam kontrol oranlarının etkinliği oldukça benzer görünmektedir. 2 cm'den küçük tümörler için bu yöntem kullanılır. Bu yöntemlerin her ikisinde de tümör boyutu ve yerleşimi ile sınırlı olduklarını bilinmesi gerekmektedir (Tinkle ve Haas-Kogan, 2012).

## **2.10. Anti Kanser Peptitler**

Kanser, vücutta hücrelerin istenmeyen şekilde kontrolsüzce hücrelerin aşırı çoğalması sonucu oluşan bir dizi hastalıktan oluşur. Günümüze kadar birçok kanser hastalığına henüz kalıcı bir tedavi bulunamamıştır. Yapılan istatistiklere göre, 2018'de dünya genelinde kanserden ölümler 9,56 milyon vakaya ulaşmışken, aynı yıl içinde 18,07 milyon yeni kanser vakası kaydedilmiştir (Xie vd., 2020).

Bir hücrenin kanserli olabilmesi için, onun hücre fizyolojisinin değişmiş olması gerekir (Weinber, 1996). Kanser hücrelerinin kendi büyüme sinyallerini üretme veya sağlıklı hücreler tarafından göz ardı edilen zayıf büyüme sinyallerine yanıt verme yeteneği olması, antiproliferatif sinyallere karşı duyarsızlık, normal olarak anormal hücrelerin apoptoz yoluyla ölmesine neden olan hücresel intihar mekanizmalarına direnç, sınırsız çoğaltma kapasitesi, tümör büyümesine izin vermek için yeni kan damarı gelişimini uyarma yeteneği ve dokuları önce lokal olarak istila etme ve daha sonra tüm vücuda yayılma veya metastaz yapma kapasitesi gibi özellikleri olmalıdır (Hoskin ve Ramamoorthy, 2008). Kanser, kodladıkları proteinlerin işlevini değiştiren somatik genlerin mutasyonları ile karakterize edilmiştir. Kolon, meme, beyin ve pankreas gibi katı tümörlerin çoğunda somatik değişiklikler gözlenmiştir. Bu değiştirilmiş mutasyonların neredeyse tamamı (%95) tek baz değişimidir. Diğer %5'i ise bir veya birkaç baz çiftinin eklenmesi veya çıkarılmasından kaynaklanır. Bilinen 200'den fazla çeşidi olan kanser, sadece bir hastalık değildir. Farklı bireylerde aynı tip tümör arasında ve aynı tümör içindeki kanser hücreleri arasında geniş bir heterojenliğe sahiptir (Marqus vd., 2017).

Moleküler biyolojinin gelişmesi sayesinde, birçok organizmada çok sayıda kısa peptidin bulunduğu keşfedilmiştir. Bu peptitler bakteri, mantar ve tümör hücrelerini öldürebilirler. Aynı zamanda bağışıklık sistemini düzenlenmesini de sağlayabilirler. Bütün bu bilgi birikimlerinin sonucu anti-kanser peptitler (ACP'ler) olarak adlandırılan, anti-tümör

aktivitesine sahip katyonik düşük moleküler ağırlıklı peptitlerin oluşması keşfedilmiştir. Bu peptitler ilk olarak antimikrobiyal aktiviteler olarak değerlendirilmiştir. Çeşitli organizmalar tarafından izole edilen bu katyonik peptitler, ilk olarak 1985 yılında güçlü bir anti-kanser ajanı olarak incelenmiştir (Xie vd., 2020). Araştırmalar sonucunda ACP'lerin eşsiz bir mekanizması olduğu keşfedildi. ACP'lerin, tümör hücresi proliferasyonunu, göçünü ve tümör anjiyogenezini daha iyi inhibe edebildikleri keşfedilmiştir. Geleneksel kemoterapi tedavi yöntemlerine göre ACP'lerin üretim maliyeti düşük olması, değiştirilmesinin kolay olması, yüksek doku penetrasyonu ve düşük ilaç direnci gibi avantajlara sahiptir. Tüm bu avantajlarından dolayı klinik açıdan uygulama beklentisinin umut verici olduğu görülmektedir.

Bu zamana kadar kanser tedavisi için uygulanan cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve immünoterapi gibi tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Cerrahi tedavi, katı tümörlere sahip olan hastaların tedavi edilmesinde kullanılır. Bu tedavi şekli, erken ve hatta orta tümörler için kullanılan etkili bir tedavi yöntemidir. Bu tür tedavilerde genellikle travma, kanama, enfeksiyon, zayıflamış bağışıklık ve diğer risklere neden olan yan etkilere sebebiyet vermektedir. Bu yüzden ilerlemiş tümör hücreleri bulunan birçok hasta için güvenilir bir tedavi yöntemi değildir. Radyasyon tedavisi gören hastalar genellikle cerrahi tedavi yönteminden fayda görmemiş kanserli hastalar için uygulanan bir tedavi yöntemidir. Fakat radyoterapi genellikle komplikasyonlara sebep olabilmektedir. Aynı zamanda bu tedavi yöntemi pahalı ve tedavi süresi uzundur (Xie vd., 2020). Kemoterapi, kanser hücreleriyle başa çıkmak için vücuda verilen kimyasallarla yapılan sistemik bir tedavidir. Bu tedavi uzun süre kullanıldığında ilaç direnci oluşur ve hastalık tekrar nükseder. Ayrıca, ilaçlar tümör ve normal hücrelerini ayırmaksızın öldürdüğünden yan etkilere sebep olmaktadır (Thundimadathil, 2012). İmmünoterapi, çeşitli kanserler üzerinde etkili olduğu bulunmuştur. İmmünoterapi genellikle radyoterapi ya da kemoterapi ile kullanılmaktadır. Eğer iki tedavide başarısız olduğu zaman alternatif olarak immünoterapi kullanılmaktadır (Charneau vd., 2021). İmmünoterapi ise hastanın bağışıklık sistemine uyarlanarak anti tümör etkisini kolaylaştırmaktır. Bu tedavide uzun süreli olup kemoterapi ve radyoterapiye göre daha az yan etkisi bulunmaktadır. Kullanılmakta olan tedavi yöntemlerinin her birinin kendine göre avantajları, dezavantajları ve farklı uygulamalara sahiptir. Bu yüzden tek bir tedavi yönteminin yeterli olması zordur fakat yapılan birleştirilmiş tedavi yöntemleriyle daha iyi bir tedavi

sağlanabilir. Bu nedenle, yeni terapötik yöntemlerin, antikanser ilaçların araştırılması ve geliştirilmesi kanser hastaları açısından çok önemlidir.

Anti-kanser peptitler (ACP'ler), tümör hücresi çoğalmasını ya da ilerlemesini engelleyebilen veya tümör kan damarlarının oluşumunu baskılayabilen ve ilaç direncine karşı oranı daha düşük olan 10-60 amino asitten oluşan bir dizi kısa peptitlerdir. Bu zamana kadar birçok kanser tedavi yöntemi kalıcı olmadığından ve her geçen gün kanser vakalarının artmasından dolayı kanser tedavi yöntemlerinin yetersiz olması sebebiyle daha fazla araştırmalar yapılmalıdır (Xie vd., 2020). Anti kanser peptitler (ACP), nötr ve anyonik amino asit kalıntıları ile katyonik olan amino asit kalıntıların yer değiştirmesi sonucu ya da kimyasal bir grup eklenmesi ile oluşabilen hem doğal hem de modifiye olarak oluşan peptitler aracılığıyla oluşmuştur. Anti kanser peptit dizisi üzerinde fizikokimyasal özellikler bulunmaktadır. Bunlar, amino asit bileşimi, kimyasal grupların eklenmesi ve bunların konformasyon şekli, yükü, ikincil yapının yönü peptitlerde etkiye sebep olmaktadır (Chiangjong, 2020). ACP'ler genellikle disülfid bağları ile stabilize olurlar. İlgili proteinler ile etkileşimini sağlamak ve modüle etmek için yüksek özgüllüğe sahip olarak rasyonel yöntemler sayesinde tasarlanırlar (Marqus vd., 2017).

Böylece hedefleme özgüllüğü ve ACP-hücre etkileşiminin yanında peptit nüfuz etme yeteneği üzerinde de bir etkiye sebep olur. Son zamanlarda yapılan birçok araştırmada, peptitlerin farklı aşamalarında tüm kademeleri incelenerek yeni ilaçlar ve aşılar oluşturmak için çalışmalar yapılmaktadır. Bu sayede ACP gelişmesi, yeni oluşabilecek kanser vakaların azaltmak ve ölüm oranını düşürmek için yeni bir uygulama şeklidir. Sürekli bu alanda araştırmalar ve incelemeler yapılmaya devam etmektedir (Chiangjong, 2020).

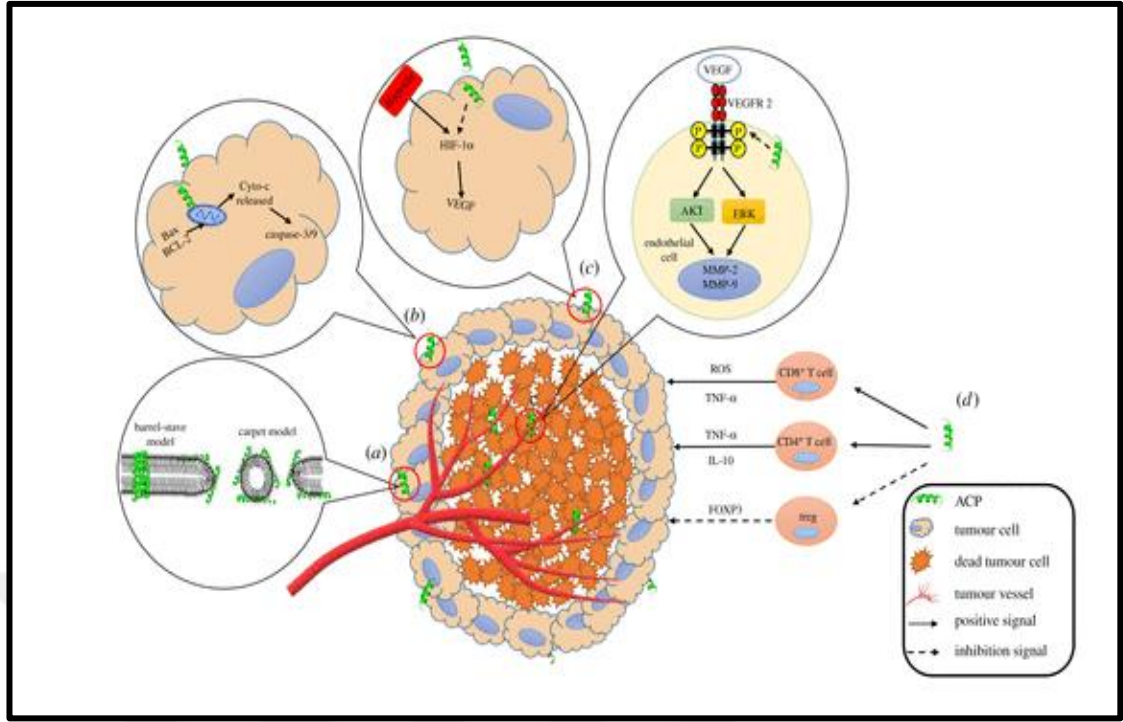
ACP'ler, kanser hücreleri için seçici olan ve toksik özelliğe sahiptirler. Ayrıca, ACP'ler antikorlar ve küçük moleküller ile karşılaştırıldığımız zaman yüksek seçicilikleri ve penetrasyonları ile kolay modifiye edilebilirler (Chen vd., 2016). Anti kanser peptitlerde amaç sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerinin ölmesini sağlamaktır. Kanserli hücre zarı ile normal hücre zar yapısı farklı özelliklere sahiptir. Antikanser peptitler membran lizisi ya da gözenek oluşumu aracılığıyla hücrelerin apoptoz ve nekroz yoluyla yok etmesini sağlar. Ökaryotik hücre zarı, litik olayını korumak için zarın akışkanlığını değiştirerek kolesterol içerir. Kanser hücreleri sağlıklı hücrelere göre hücrenin yüzey alanı artırmak için daha fazla miktarda mikrovillüs içerirler. Ayrıca

sağlıklı hücreler elektriksel olarak nötr duruma sahipken, kanser hücreleri yüzeylerinde negatif yüklü bileşenlere sahiptir. Bu sayede, ACP'ler ile küçük moleküllerin etkileşime girdiği zaman zarın kararsızlaşmış olmasını sağlarlar. Böylece kanser hücresinde sitotoksisine ve lizisine yol açmaktadır. Bununla birlikte, peptitler ve sağlıklı hücre zarı arasında etkileşim hibrofobikken, peptit ile kanser hücreleri arasındaki etkileşim elektrostatiktir. ACP'lerin onarılma mekanizmaları yoktur. Hücre zarı hasarına ve hücre lizisi ya da apoptozu indüklemesine neden olarak kanser hücrelerinin ölmesini sağlar. Birçok ACP, normal dokulara zarar vermeden primer tümörlere ve metastazlarına karşı güçlü anti-tümör aktivite göstermektedir.

Bu zamana kadar yapılan araştırmalarda, kanser hücrelerinin ACP'lere direnç geliştirebileceğini gösteren herhangi bir rapor bulunmamaktadır. Bunun sebebi, ACP'lerin hedef reseptör yerine birkaç farklı yüzey molekülüne çekilmesidir. Bu bulgular ACP'lerin, özellikle doğrudan etkili olanların, farklı kanserlerin tedavisi için yeni ek tedaviler olarak kullanım için önemli bir potansiyel oluşturmaktadır (Hilchie vd., 2016).

Peptitleri tedavi olarak kullanmanın diğer bir faydasıda, toksik yan etkileri en aza indirerek hayati öneme sahip böbrek ve karaciğer gibi organlarda birikmezler. Rekombinant antikorlar veya proteinlerden daha az immünojenik yapıya sahiptirler. Bunun yanı sıra ACP'lerin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. *In vivo* olarak serum proteazları tarafından parçalanmaya karşı çok az veya hiç direnç göstermezler. Ayrıca, kısa yarı ömür zamanı, düşük biyoyararlanım ve üretim zorlukları bulunmaktadır (Marqus vd., 2017).

ACP'ler, belirli bir kanser hücresini iyileştirmeyi hedefleyerek kanser hücresinin atılımı için modifiye edilmiştir (Bkz. Şekil 2.1). Doğal bir hormon peptitin türevidir olan dTCAPF'lerin, gelişmiş ve metastatik katı tümörlerin tedavisi için Toll/interlökin-1 reseptör süper ailesi yoluyla hücrelere girer, onlara anjiyojenik faktörleri baskılar. Antikanser sitokin üretimini ve endoplazmik retikulum stresini indükleyerek kanser hücresini apoptoza uğratar. Ayrıca, ACP'ler immünojenler ile klinik terapötikler iyileştirici olması amacıyla birleştirilmiştir. ACP tedavisinin amacı, kanser hücresi tedavisinde tümör oluşumuna ve dirence katkıda bulunmadan kanser hücresi ölümünü sağlamalı ve tümörün ilerlemesini durdurmalıdır (Chiangjong vd., 2020).



**Şekil 2.1.** ACP'lerin anti-tümör mekanizmasının şematik diyagramı: (a) hücre zarının yapısını yok eder; (b) apoptoz; (c) anjiyogenezin inhibe edilmesi; (d) bağışıklık düzenlemesi (Xie vd., 2020).

## 2.11. Anti Kanser Peptit Mekanizmaları

### 2.11.1. Tümör anjiyogenezinin inhibisyonu

Anjiyogenez, daha önce var olan damar sisteminden yeni kan damarlarının oluşumudur (Bkz Şekil 2.1). Anjiyogenez, gerekli besinleri ve oksijeni sağlayabilen ve metabolik atıkları taşıyabilen, katı tümörlerin büyümesinde, tümör hücrelerinin dokuya girmesi halinde ve metastaz olayında oldukça önemlidir. Tümör anjiyogenezinde rol oynayan fibroblast büyüme faktörü (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), plasental büyüme faktörü (PLGF), tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- $\alpha$ ), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), ve anjiyogenin (Ang) bir dizi büyüme faktörler tanımlanmıştır. Birçok peptit, büyüme faktörleri ve reseptörleri arasındaki etkileşimlere sebep olur. Bu etkileşimler kesintiye uğratarak etkili anti-anjiyogenez ve anti-tümör etkileri gösterebilirler.

### 2.11.2. Tümör apoptozunun indüksiyonu

Apoptoz, çok hücreli organizmalarda hücre proliferasyonunu kontrol etmek için, DNA hasarına yanıt olarak geliştirdikleri hücrenin ölmesi gereken zamanda kontrollü şekilde

hücre ölümünün gerçekleşmesidir. Apoptozun normal ve sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerini yok edebileceğine dair araştırmalar bulunmaktadır. Örneğin; antimikrobiyal peptit olan SALF (karides anti-lipopolisakarit faktörü), ölüm reseptörü/NF-KB (nükleer faktör-kappa B) sinyal yolu yoluyla apoptoza neden olarak bir tümör ksenograft fare modeli üzerinde önemli tümör baskılayıcı görevi görmektedir.

### **2.11.3. Tümör nekrozunun indüksiyonu**

Nekroz, bir veya daha fazla hücrenin geri dönüşümsüz şekilde hasar görmesi sonucu karmaşık düzenleyici mekanizmalara sahip olmadıklarından dolayı hücre ölümüne sebep olmaktadır. Nekroz olayı genellikle fiziksel ve kimyasal yaralanmalar sonucu ya da patolojik durumlarda gözlemlenir. Nekroz indükleyici peptitler ve membran bozucu litik peptitler grubu bulunmaktadır. Kanser hücreleri için geleneksel kemoterapötik ilaçlardan daha yüksek derecede seçiciliğe sahiptirler. Aynı zamanda çoklu ilaç direncini indüklemeyizler. Kahalalide F (KF), deniz kaynaklı bir peptit olan insan prostat ve meme kanseri hücrelerinde güçlü sitotoksik aktivite sahip olan nekroz yoluyla hücre ölümünü sağlar.

### **2.11.4. İmmünomodülatör fonksiyon**

Malign tümör hücreleri, sitokinler ve büyüme faktörleri üreterek endotelial hücreler, inflamatuvar immün hücreler ve fibroblastlar dahil olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerinin toplanmasını sağlarlar. Böylelikle bu farklı hücre türleri ve hücre dışı matris molekülleri, tümör mikro çevresinin oluşmasını sağlar. Tümör mikro çevresinde, antitümör bağışıklığının ilerlemesini sınırlayan antitümör bağışıklığı ile tümör kaynaklı inflamatuvar aktivite arasında, hassas bir denge bulunmaktadır. Bağışıklık yanıtlarını modüle etmek için kanser tedavisi immünoterapisinde yaygın olarak kullanılan biyoaktif peptitler kullanılabilirler. Alloferonlar, böceklerden izole edilirler. Doğal olarak oluşan bir peptittir. Yapılan deneyler sonucu, alloferonların doğal öldürücü lenfositler üzerinde uyarıcı aktiviteleri olduğu gözlemlenmiştir.

### **2.11.5. Kinazların/proteaz aktivitelerinin inhibisyonu**

Kinaz ve proteazların, birçok biyoaktif enzimin tümör büyümesini, istilasını ve metastazı engellediği bilinmektedir. Bu enzimler antikanser tedavisi için ilgi çekici bir niteliktedir.

FGF8b'nin (fibroblast büyüme faktörü 8b) gN sarmal alanından türetilen kısa bir sentetik peptittir. Hücre döngüsünü G0/G1 fazında durdurarak ve Erk1'in aktivasyonunu azaltarak prostat kanseri hücrelerinde antitümör etki sağlayabilirler (Wu vd., 2014).

#### **2.11.6. Fonksiyonel proteinlerle etkileşim**

Çok sayıda fonksiyonel proteinin tümör oluşumunda ve ilerlemesinde varlığı bilinmektedir. Küçük peptitler, bu proteinlerin özel işlevlerine müdahalesiyle tümör hücrelerini öldürmek için yeni bir terapötik tedavi yöntemi olabilecektir (Wu vd., 2014). Pep-7, insan papilloma virüsü tip 16'nın (HPV16E7) E7 onkoproteinine yüksek afinite ve özgüllük ile bağlanan bir peptittir. C7C faj görüntüleme peptit kitaplığındadır. Bu peptit, HPV16E7'nin aktivitelerini geçersiz kılar. E2F transkripsiyon faktörü-retinoblastoma proteini (E2F-pRb) yolunu yeniden etkinleştirerek kanser hücre dizilerinde ve hayvan tümör modellerinde belirgin anti-tümör etkinliği sağlayabilirler (Wu vd., 2014).

#### **2.12. Anti Kanser Peptitlerin Sınıflandırılması**

1980 yılında İsveçli bilim adamı Boman ve meslektaşları tarafından, anti-tümör etkileri ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesi gibi çeşitli biyolojik özelliklere sahip olan birçok biyoaktif bileşikler keşfedilmiştir. Birçok ACP türü, birçok organizmadan tanımlanmış ve çeşitli şekillerde sınıflandırılmıştır. ACP'lerin aktivitesi büyük ölçüde amino asitlerinin tipine, sayısına ve yapısına bağlıdır (Xie vd., 2020). Yapısal sınıflandırmada  $\alpha$ -sarmal,  $\beta$ -pileli levhalar, rastgele bobin ve döngüsel adı verilen dört farklı kategori bulunmaktadır (Bkz. Şekil 2.2).

##### **2.12.1. $\alpha$ -sarmal ACP'ler**

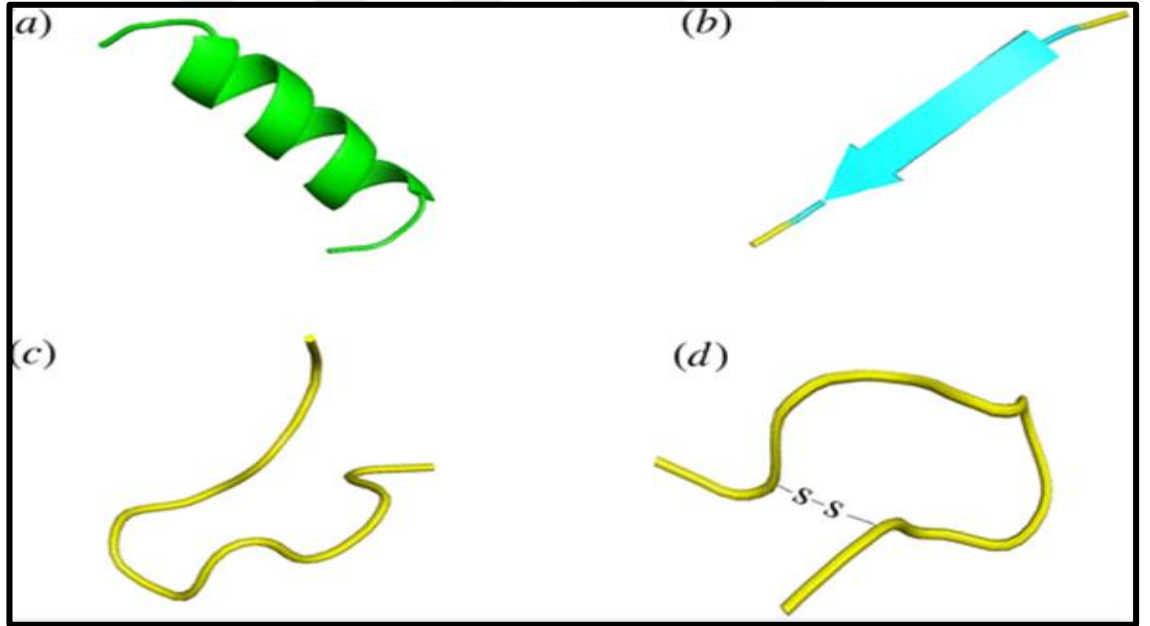
$\alpha$ -sarmal ACP'ler, peptit zinciri çoğunlukla kısa ve yapı olarak basittir. ACP'lerin en tipik yapı tipidir. Amfibilerin epidermisinde daha fazla bulunurlar. Son zamanlarda, artan sayıda  $\alpha$ -sarmal ACP bulunmuştur. Fakat hepsinin güçlü anti-kanser etkileri bulunmamaktadır.  $\alpha$ -sarmal ACP'ler, kapsamlı bir şekilde incelenen tipidir. Birçoğunun tümör hücreleri üzerinde yeterli inhibitör etkileri olmasına rağmen, ACP'lerin sitotoksitesine ve yan etkilerine sebep olmaktadır (Xie vd., 2020).

### 2.12.2. $\beta$ kıvrımlı levha ACP'ler

$\beta$ -kıvrımlı levha ACP'lerin birçoğu, iyi stabiliteye sahiptir. İki veya daha fazla disülfid bağı bulunmaktadır. Bitki ve hayvanlardan üretilen bu yapılar,  $\alpha$ -sarmal ACP'lerden daha karmaşıktır.  $\beta$ -pileli ACP'lerin anti-tümör aktivitesi ise  $\alpha$ -sarmal olanlardan daha düşüktür. Fakat  $\beta$ -pileli ACP'ler, normal doku hücrelerine göre daha az toksik özelliğe sahiptirler. Bu yüzden bu tip ACP'lerin araştırılması gerekmektedir (Xie vd., 2020).

### 2.12.3. Rastgele bobin ACP'ler

Rastgele sarmal ACP'ler genellikle prolin ve glisin bakımından zengindir. İkincil bir yapısı bulunmamaktadır. Böceklerden türetilen glisin açısından zengindir. Rastgele bobin ACP'nin bir türü olan alloferon, hayvan ve insan modellerinde doğal öldürücü hücrelerin aktivasyonunu ve interferon sentezini uyarabilir, bu da farelerde ve insanlarda antiviral ve anti-tümör yeteneklerini daha da artırır (Xie vd., 2020).



**Şekil 2.2.** ACP'lerin yapısal sınıflandırmasının şematik diyagramı: (a)  $\alpha$ -sarmal; (b)  $\beta$ -katlı levhalar; (c) rastgele bobin; (d) döngüsel ACP'ler (Xie vd., 2020).

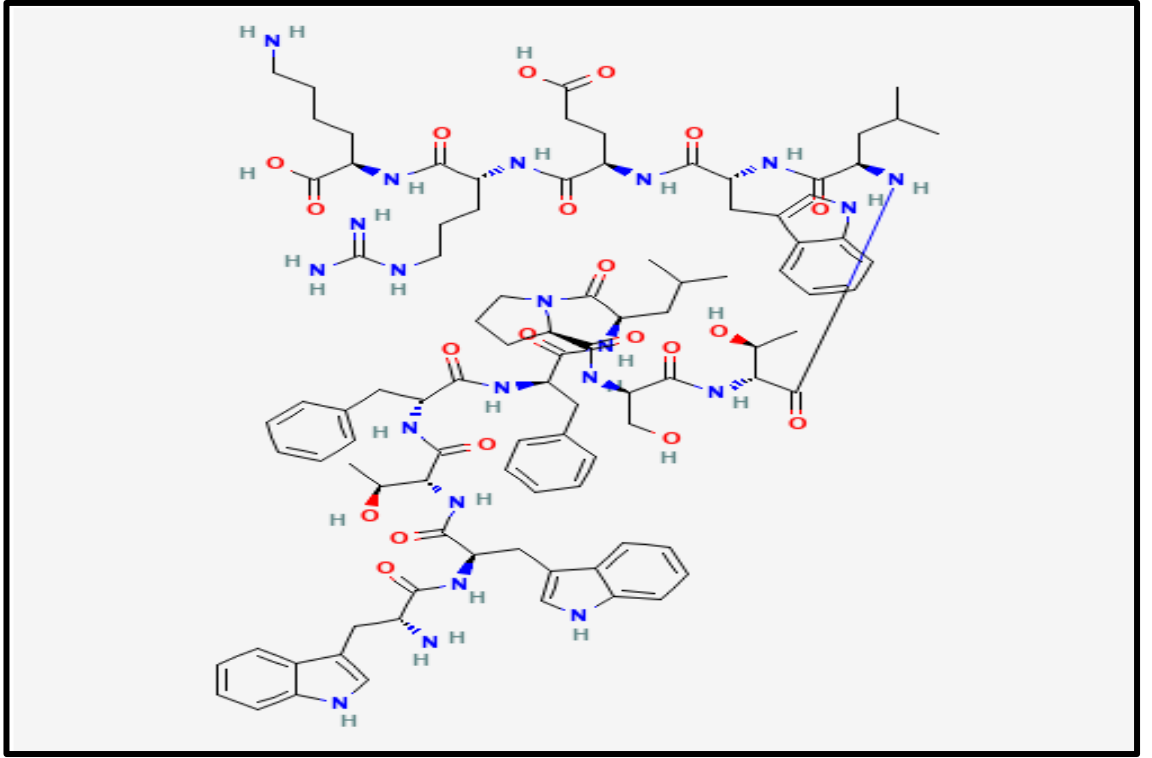
### 2.12.4. Döngüsel ACP'ler

Döngüsel ACP'ler, sistin düğümleri oluşturan baştan sona siklizasyon omurgasından veya disülfid bağlarından oluşan kapalı peptitlerdir. Liner yapısı bulunur ve daha kararlıdır. Üç çeşit prostat kanseri hücresi üzerinde güçlü inhibitör etkiye sahip yeni

siklik peptit olan Diffusa Cytide 1-3 bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda, döngüsel ACP'ler klinik çalışmalarda ACP'lerin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Bu peptitlerin kanser hücreleri üzerinde güçlü bir inhibitör etkisi bulunmaktadır (Xie vd., 2020).

### 2.13. TCApF

Yeni bir tümör apoptoz faktörü (TCApF) olan, proteinin cDNA'sı esas alınarak insan timüs, kolon ve beyin ön lobunda eksprese edilerek hormon benzeri yeni bir peptittir. TCApF 10. kromozomda bulunan ve 84 aminoasit uzunluğunda (HUM: 10q25.3; AL133482.15; GI: 15617233; bölge 16945...17199) bir protein kodlayan N-ucunda bulunan bir sinyal peptit dizisidir. TCApF, bir fare homologuna sahip, suda çözünebilir bir peptittir (NCI, 2021). TCApF'in molekül ağırlığı 5978,79 olup moleküler formülü  $C_{96}H_{129}N_{21}O_{20}$  şeklindedir (Bkz. Şekil 2.3).



Şekil 2.3. TCApF'in iki boyutlu kimyasal yapısı (NCI, 2021).

Bu hormon ve kısa formları üzerinde az sayıda çalışma yapılmıştır. Araştırmada kullanılacak olan peptitimiz TCApF, İnterlökin 1 reseptör ailesinin bir üyesi olan T1/ST2 reseptörüne bağlanır ve tümör hücrelerinde p38, MAPK ve JNK sinyal kaskadlarının aktivasyonuna ek olarak hem kaspaz 8, 3 ve 9 hem de Bcl-2 aracılı apoptozu aktive ettiği

bulunmuştur. Ayrıca bu yeni peptit, vasküler endotelial büyüme faktörü A (VEGFA) ve Fms ile ilişkili tirozin kinaz 1 (VEGFR1) ekspresyonlarını baskılayarak anjiyogenezi inhibe etmektedir. Tümör hücreleri apoptoz faktörü hormon peptiti ayrıca interlökin-10 ve anti-anjiyogenik interlökin ekspresyonlarını artırarak bağışıklık sistemi tepkilerini uygun bir hale uyarlamaktadır. Toll/interlökin-1 reseptör süper ailesinin bir üyesi olan T1/ST2 reseptörü, bazı kanser hücrelerinde daha fazla oranda eksprese edilir (NCI, 2021). T1/ST2 reseptörü, T-yardımcı 2 (Th2) hücrelerinin stabil bir belirteçidir. Ancak Th2 ile ilişkili bağışıklık tepkisinde önemlidir. Th2'nin hem viral antijene hem de alerjenlere verdiği yanıtta önemlidir. ST2 geni içindeki diferansiyel mRNA işlemesi, üç ST2 izoformudur (Ohana vd., 2017). Uzun zamandan beri T1/ST2 liganını tanımlanmamıştı. Fakat T1/ST2 reseptörüne karşı oluşturulan monoklonal antikolar, MAPKinaz ve JNK'yi aktive edebilmiş ancak NF-kB'yi etkinleştirememiştir. Son zamanlarda interlökin ailesinin yeni bir üyesi olan IL-33'ün T1/ST2 reseptörü için bir ligan olduğu tespit edildi. Aynı zamanda monoklonal antikolardan farklı olarak IL-33'ün hem MAP kinazı hem de NF-kB'yi aktive ettiği gösterildi. T1/ST2'nin bağışıklıkta önemli bir rolü olduğu konusunda birçok araştırma vardır. TCApF izolasyonu, kanser hücrelerinde T1/ST2 reseptörünün kanser üzerinde etkisini açığa çıkarmıştır. T1/ST2'nin çoğalan kanser hücrelerinde seçici bir ölüm reseptörü olduğunu keşfedilmiştir. Ayrıca TCApF'nin T1/ST2 reseptörünün saf liganı olduğu da ortaya çıkmıştır (Sandler vd., 2010). Yapılan birçok çalışmada T1/ST2 reseptör grubu öncelikle kanser, inflamatuvar hastalıklar, travma, bağışıklık, kardiyovasküler hastalıklar ve ileri derecede bir akciğer hastalığı olan idiyopatik pulmoner fibroz gibi birçok hastalıkta önemli göreve sahiptir (Erden ve Günay, 2020).

TCApF, akut miyeloid lösemisinin (AML) çoğalan hücrelerinde, insan meme kanserinde (MCF7), insan glioblastomunda, insan nöroblastomunda, insan prostat kanserinde ve insan akciğer kanseri çoğalan kanser hücreleri üzerinde hücrelerin apoptoza uğramasını sağlamıştır (Sandler vd., 2010). Yapılan araştırmalarda TCApF'in kısa türevi olan çoğalan AML hücrelerine uygulanması sonucu, kanser hücrelerinin çoğalmasını durduğu ve sağlıklı hücrelerde etki etmediğini göstermiştir. Bu, T1/ST2 reseptörünü apoptoza bağlayan ilk rapordur.

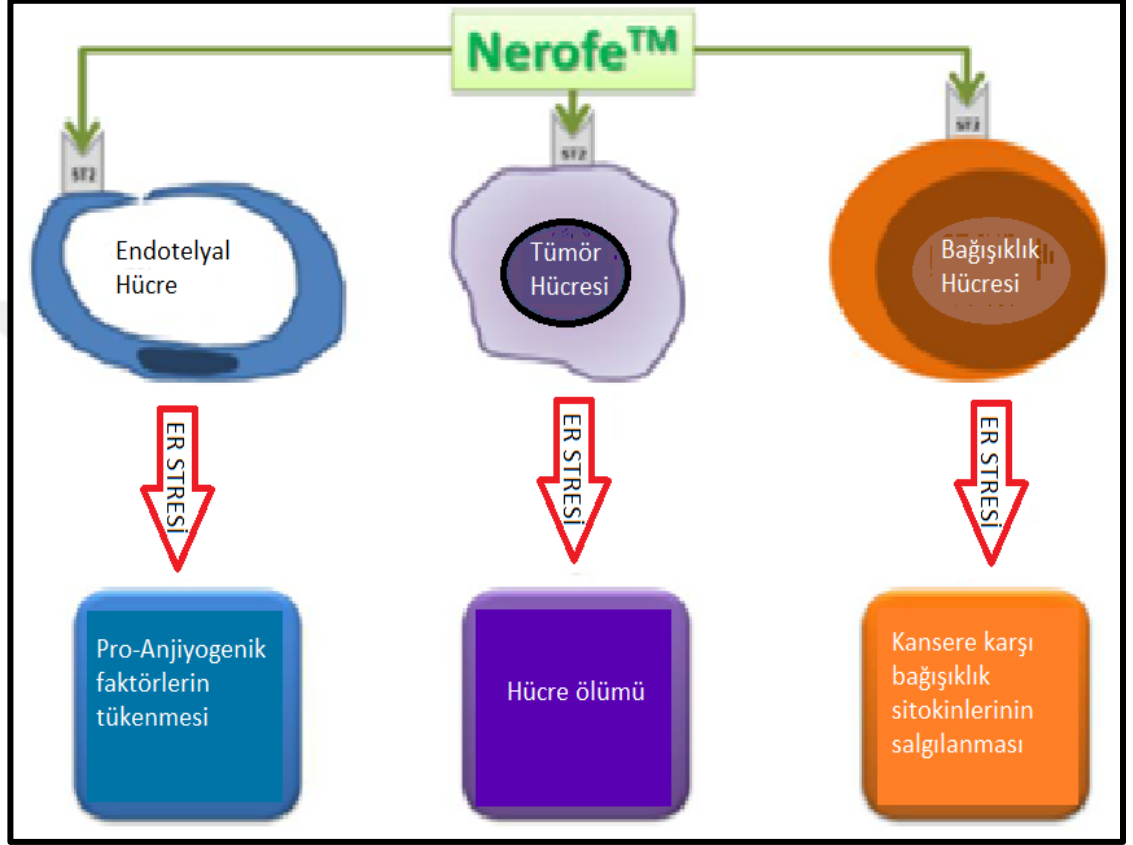
Bir TCApF olan NEROFE™, sinyal dizisi olmayan peptittir. Bu peptidin, fare genomunun 19. kromozomunda tespit edilmiştir. İnsanların farklı dokularından alınan

cDNA kütüphanelerinin RT-PCR ile taranması sonucunda yeni bir peptit dizisinin tanımlanması sağlanmış oldu. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada AML tedavisi için TCAPF'in kanser gelişimini durdurduğu gösterilmiştir (Erden ve Günay, 2020). Fare hayvan modeli üzerinde yapılan hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda, TCAPF ve onun kısa türevlerinin güçlü anti-kanser aktivitesinin olduğu kanıtlanmıştır. TCAPF ve türevleri yalnızca kanser gelişimini baskılamakla kalmaz aynı zamanda tümör hücrelerinin yok edebilmesini de açısından da öneme sahiptir. TCAPF'in, kemik iliği ve dalaktan metastaz kolonilerinin tümünü ortadan kaldırarak kanserin tekrar nüksetmesini önemli derecede azalttığı da gösterilmiştir (Sandler vd., 2010).

İnsanlar üzerinde dTCAPF'lerle yapılan faz 1 çalışmalarının amacı ilerlemiş olan metastatik katı tümörlerin güvenirliliğini ve etkinliğini araştırmaktır. dTCAPF'lerin antikanser etki mekanizmasının araştırıldığı pankreas, meme ve yumurtalık hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, Toll/interlökin-1 reseptör süper ailesinin bir üyesi olan T1/ST2 reseptörü ile dTCAPF'lerin hücre içerisine girdiği belirlenmiştir. Golgi aparatında yapısal değişikliklerin indüklenmesi nedeniyle golgi fonksiyonunun kaybetmesi ve endoplazmik retikulum (ER) stresinin indüklenmesi ile aşağı regülasyonu olan iki karşıt etkinin indüklenmesi sonucu oluşan yeni bir antikanser etki mekanizmasıdır. dTCAPF'lerin, ilerlemiş ve metastatik katı tümörlerin tedavisi için iyi tolere edilebilen ve güvenli olduğu bulunmuştur (Stemmer vd., 2018). Aynı zamanda, dTCAPF'lerin anti-anjiyojenik aktiviteye, ER stresini indükleme becerisine ve antikanser sitokinlerin ekspresyonuna ait veriler bulunmuştur (Bkz. Şekil 2.4). T1/ST2 reseptörü, makrofajlarda, dendritik hücrelerde ve mast hücrelerinde eksprese edilmektedir. Th2'nin viral antijenlere ve alerjenlere önemli yanıt vermektedir. Bu reseptör aynı zamanda meme karsinomu taşıyan BALB/c farelerinde etkisiz hale gelmesini sağlamıştır. Tümör büyümesini ve metastazı azaltmayı sağlamıştır. dTCAPF tedavisi, sayesinde T1/ST2 reseptörünün aşağı regülasyonu nedeniyle antikanser sitokinlerinde serum düzeylerinin artmasına sebep olmuştur. dTCAPF'lerin anjiyojenik faktörlerin ekspresyonunu azaltmasını sağlamıştır (Stemmer vd., 2018).

dTCAPF molekülleri hücrelere ST2 reseptörü yoluyla girer ve sonra, sST2 çözünür ve T1/ST2 reseptörüne bağlanırlar. Golgi aygıtına girerek tahrip olmasına ve golgi işlevinin kaybına yol açmasıyla yapısal değişiklikleri indüklerler. Böylelikle endoplazmik retikulumda proteinlerin birikmesine sebep olmasıyla ER stresine yol açar. dTCAPF'ler

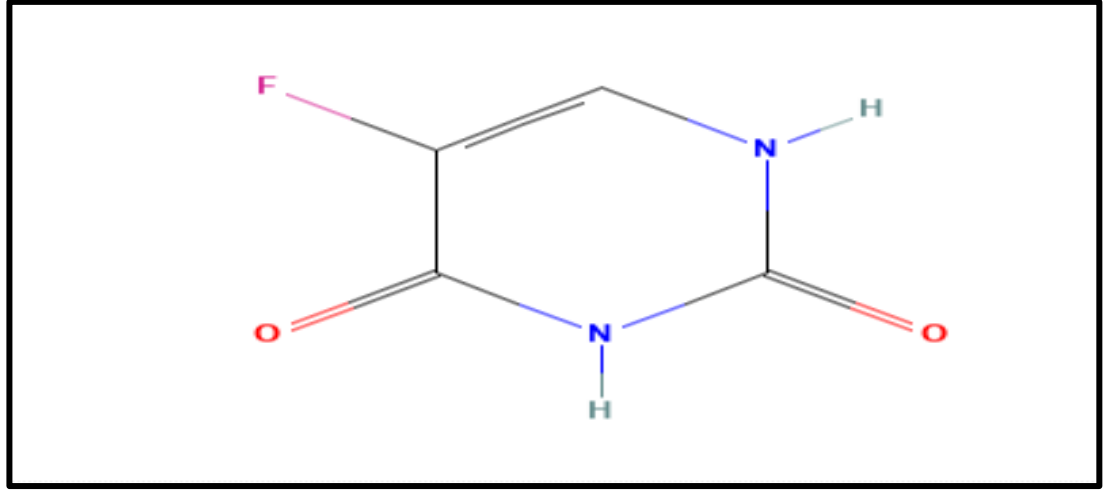
ayrıca sXBP1'i aşağı regüle eder. Böylelikle ER stres onarım mekanizmasını inhibe olması aracılığıyla apoptoza neden olur. dTCApF'lerin anjiyogenezi engelleyerek kanser hücrelerinde endoplazmik retikulumda katlanmamış proteinlerin birikmesiyle ER stresine sebep olmaktadır (Ohana vd., 2017).



Şekil 2.4. TCApF'in (Nerofe) farklı hücre tipleri üzerine etkisi (ISK, 2021).

#### 2.14. 5-Fluorourasil

5-Fluorourasil (5-FU), hem tek başına hem de bir dizi antikanser ajanı ile kombine bir bileşen olarak kullanılan bir antikanser ajanıdır. 5-FU'nun moleküler ağırlığı 130,1'dir (Bkz. Şekil 2.5). 5-FU, dünya çapında katı malignitelerin tedavisinde en çok kullanılan üçüncü kemoterapötik ajandır (Sara vd., 2018, Diasio ve Harris, 1989). Heidelberger ve çalışma arkadaşları, urasilin normal dokuya kıyasla tercihli olarak tümörler tarafından yakalanmasından dolayı urasil analogu 5-FU'yu sentezlemişlerdir (Milano ve Chamorey, 2009). 5-FU, uzun yıllardan beri klinik olarak kullanılmaktadır. 5-FU'nun çok aktif bir ajan olması bu bileşiği en çok çalışılan antikanser ajanlarından biri yapmaktadır (Valeriotte ve Santelli, 1984, Tanaka vd., 2000, Milano ve Chamorey, 2009).



**Şekil 2.5.** 5-Fluorourasil'in kimyasal yapısı (NCBI, 2021).

5-FU, DNA ve RNA'nın pirimidin moleküllerine benzer bir yapıya sahip heterosiklik aromatik bir organik bileşiktir. Hidrojen yerine C-5 konumunda bir flor atomu olan bir urasil analogudur. Saf 5-FU için, bileşiğin asimetrik üniteye dört molekül ile kristalleştiği ve molekülün hidrojen bağlı bir tabaka yapısını benimsediği sadece bir kristal yapı rapor edilmiştir. 5-FU yapısı nedeniyle nükleozid metabolizmasına müdahale eder. RNA ve DNA'ya dahil edilerek sitotoksositeye ve hücre ölümüne yol açar (De Angelis vd., 2006).

5-FU, hücreler G0 veya G1 fazında iken hiçbir aktivitesi bulunmamaktadır. Tamamıyla S fazı aktif bir kemoterapötik ajan olarak kabul edilir. Hücrelerin 5-FU ile tedavisinin, FdUTP'nin DNA'ya yanlış bağlanması sonucunda S fazı sırasında DNA hasarına, özellikle çift iplikli ve tek iplikli kopmalara yol açtığı bilinmektedir. Bu yüzden, çoğalan hücrelerde tüm hücre döngüsü evrelerinde DNA'da hasar meydana gelebilir ve ilgili onarım mekanizmaları hücre döngüsünün farklı evrelerinde değişiklik gösterir. Tümör hücrelerinin hücre döngüsündeki konumu ve ilaç tedavisine yanıt olarak apoptoza girme yeteneği birlikte tümör hücrelerinin kemoterapiye duyarlılığında önemli rol oynar. 5-FU, metabolik aktivasyonunda yer alan çeşitli enzimlerle karmaşık bir etki mekanizmasına sahiptir (De Angelis vd., 2006).

5-FU, meme, mide, pankreas, özofagus, karaciğer, anus, baş ve boyun kanserlerini içeren katı tümörlerin birçoğunda aktiviteye sahiptir. Kemik iliği depresyonu, diyare ve mukozit şeklinde gastrointestinal toksisite, el-ayak sendromu ile kendini gösteren cilt toksisitesi ve nörotoksosite önemli toksik etkileridir (Chu ve Sartorelli, 2014, Cerreri vd., 1958, Longley vd., 2003).

Birçok avantajı bulunmasına rağmen, ilaç direnci nedeniyle klinik uygulamalar büyük ölçüde sınırlandırılmıştır. İlerlemiş kolorektal kanser için tek başına 5-FU'nun genel yanıt oranı sadece %10-15'tir ve 5-FU'nun diğer anti-tümör ilaçlarla kombinasyonu yanıt oranları %40-50'ye yükseltmiştir. Bu nedenle, tedavi ve direncin tersine çevrilmesi için yeni stratejilere acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Bu arada, tümörlerin 5-FU'ya dirençli hale gelme mekanizmalarını anlamak, bu direnci tahmin etmek veya üstesinden gelmek için önemli bir adımdır (Zhang vd., 2008, Mader vd., 1998).

#### **2.14.1.5-FU'nun etki mekanizması**

5-Fluorourasil'in (5-FU), ana formu inaktiftir ve kompleks bir enzimatik reaksiyon serisiyle aktif ribozil ve deoksiribozil nukleotid metabolitlerine dönüşmesi gerekir (Chu, ve Sartorelli, 2014) Memeli hücrelerinde 5-FU, timidilat sentaz (TS) ile stabil bir kompleks oluşturan ve böylece deoksitimidin monofosfat (dTMP) üretimini engelleyen florodeoksiüridin monofosfata (FdUMP) dönüştürülür. dTMP, DNA replikasyonu ve onarımı için esastır. Bu yüzden tükenmesi sitotoksositeye neden olur. 5-FU'nun dihidroflorourasil'e (DHFU) dihidropirimidin dehidrojenaz (DPD) aracılı dönüşümü, normal ve tümör hücrelerinde 5-FU katabolizmasının hız sınırlayıcı aşamasıdır. Uygulanan 5-FU dozunun %80'e kadarı karaciğerde DPD tarafından parçalanır (Zhang vd., 2008, Wei vd., 2018). Kanser hastalarının %5 kadarında kısmi veya tam DPD enzim yetmezliğinin olduğu bir farmakogenetik sendrom görülür. Bu durumda kemikiliği depresyonu, diyare, bulantı, kusma ve nörotoksosite şeklinde ciddi toksisite gözlenir. 5-FU kolorektal kanserin hem kanserin nüks riskini azaltıcı hem de ilerlemiş hastalık durumunda en çok kullanılan ajandır (Chu ve Sartorelli, 2014).

#### **2.15. Hücre Kültürü ve Sitotoksosite**

Hücre kültürü, çok hücreli organizmaların hücrelerine göre tasarlanmış olan laboratuvar ortamında hazırlanan kaplarda, ısı, nem, besin gibi ortam şartlarının sağlanarak kontaminasyondan uzak tutularak hücrelerin çoğaltılması olayıdır. Canlılardan alınan hücrelerin yapay ortamda yaşatıldığı hücre kültürü kanser, aşı ve ilaç geliştirilmesi ve *in vitro* sitotoksosite çalışmaları için yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücreler, sitotoksik maddeye maruz kaldığı zaman apoptoz, otofaji ve nekroz gibi olaylar meydana gelir. Deneyisel olarak hücreler, kimyasal, biyolojik ya da fiziksel etkenlere maruz bırakılır. Buradaki amaç maruziyet durumu sonucunda hücre canlılıklarının belirlenmesidir. Hücre

canlılığının belirlenmesi için birçok test yöntemi vardır. Sitotoksistide yöntem ne kadar farklı olursa olsun testin amacı canlı veya ölü hücre miktarını belirleyerek maddenin hücre ölümüne sebep olma miktarını ölçebilmektir (Tokur ve Aksoy, 2017).

*Laktat Dehidrogenaz Enzim Aktivite Testi:* Tüm hücrelerde bulunan sitoplazmik bir enzim olan laktat dehidrogenaz (LDH), hasarlı ve ölü hücrelerden vasata salınan aktivitenin belirlenmesidir. Hücreler, toksik etkilere maruz kaldığı zaman plazma zarının bozulmasıyla laktat dehidrogenaz enzimi hücrelerden sızarak vasata geçer. Bunun sonucunda LDH enzim aktivitesi ölçülmesi aracılığıyla hücre hasarı belirlenir (Tokur ve Aksoy, 2017).

*Alamar Mavisi Testi:* Alamar mavisi (resazurin) bileşiğinin canlı hücreler tarafından resorufin bileşiğine dönüştürülmesine dayanır. Resazurin, mavi renkte redoks boyası olan ve hücre zarından serbestçe geçerek hücrelere geçer. Böylece indirgeyerek floresans özellikteki pembe renkli resorufine dönüşmektedir. Metabolik aktivitesini kaybeden ölü hücreler resazurini indirgeyemezler. Bu yüzden floresans sinyali oluşturamazlar. Florometre cihazıyla sinyal ölçülür. Sinyal şiddeti canlı hücre sayısına göre değişir (Tokur ve Aksoy, 2017).

*ATP Biyoluminesans Testi:* Adenozin trifosfat (ATP) molekülü, tüm canlı hücrelerde enerji kaynağıdır. Hücre ölümü gerçekleşmesiyle hücrenin ATP sentez yeteneği kaybolur. Böylece ATP'nin hızlı bir şekilde yıkımına sebep olur (Tokur ve Aksoy, 2017).

#### **2.15.1. MTT testi**

MTT testi, günümüzde hücre canlılığını ölçmek için kullanılan en yaygın yöntemdir. MTT testi hücre canlılığı, proliferasyon ve sitotoksiste belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem 1983'de Mosmann tarafından hücre canlılığını ölçmek amacıyla geliştirilmiş ve hücre canlılığının "altın standardı" olarak tanımlanmıştır. MTT testi sadece hücre kültürü değil doku kültürü çalışmalarında da hücre canlılığı ölçümü için kullanılmaktadır. MTT pozitif yüklü bir bileşiktir. Ökaryotik hücre zarından kolaylıkla geçerek hücre içinde indirgenebilir. Fakat indirgenme sonucu oluşan formazan, suda çözünmez. Bu nedenle besiyerde kristal şeklinde çökelmektedir. Canlılık testleri, üç adımda gerçekleştirilir. Birincisi, hücreler belirli bir süre toksik maddeye maruz bırakılır. İkincisi, toksik madde uzaklaştırılıp tetrazolyum bileşiği besiyere eklenir. Ortalama 1-4

saat boyunca inkübe edilir. Bu arada canlı hücreler ilgili bileşikleri indirgerler. Böylece renk değişimi gerçekleşir. Renk değişimi sonucunda spektrofotometrik ölçümler yaparak ölü veya canlı hücre sayısı belirlenir. Ölçüm sonucu oluşan sinyal miktarı, tetrazolyum tuzu konsantrasyonu, hücre tipi, canlı hücre sayısı ve metabolik kapasitesi, besiyerin içeriği, besiyerin pH'ı, plaka-flask ya da kuyucuk yapısı gibi parametrelerle doğrudan ilişkilidir. MTT bileşiği sarı renklidir. Fakat oluşan formazan ise mor renkli olup suda çözünmez. Absorbansın ölçülebilmesi için uygun bir çözücüde çözdürülmesi gerekmektedir. Denizot ve Lang (1986) tarafından, MTT testinde oluşan formazanın çözdürmek için dimetil sülfoksit (DMSO) kullanımını uygun görülmüştür. Çözücü olarak genellikle DMSO ya da izopropil alkol de kullanılır. Aynı zamanda, çözdürmek için yapılan pipetleme esnasında formazan kristallerinin zarar görmesi de testin hassasiyeti açısından oldukça önemlidir (Tokur ve Aksoy, 2017, Boyraz vd., 2021).

## **2.16. Hücre Kültürü ve Genotoksisite**

Genotoksisite, fiziksel ya da kimyasal ajanlarla çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen DNA hasarları, gen mutasyonları, kromozom anormallikleri genetik materyalde değişimlere neden olmaktadır. DNA veya genomun kopyasının çıkarılmasını sağlayan enzimlerle etkileşime giren ve mutasyona neden olan genotoksik maddeler DNA'da hasara neden olur. DNA hasarında doğrudan önemli olan moleküllerde ve yollarda meydana gelen bozukluklar ise doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite ve bazı genetik ve multifaktöryal hastalıklara sebep olmaktadır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). Genotoksisite testlerinin genel amacı, kanserden korunmada çevresel etkenlerin endüstriyel kimyasalların etkisinin azaltılmasında, ilaçların önce toksik etkilerinin ve güvenilirliğinin araştırılmasında kullanılmasıdır. Bu testler, 1970'ten beri kullanılmaktadır (Bedir vd., 2004, Sezginer ve Dane, 2016, Yüzbaşıoğlu vd., 2014).

*Salmonella/Mikrozom Mutajenite (Ames) Testi:* Kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılması amacıyla kullanılan hızlı, ucuz ve uygulanması amacıyla en yaygın kullanılan bakteriyel testlerden biridir (Ames vd., 1975).

*Kromozom Anormallikleri (KA) Testi:* Mutajenler tarafından meydana gelen kromozomlarda çeşitli yapısal ve sayısal anormallikleri sonucu oluşan hasarı tespit etmek için en fazla kullanılan yöntemdir (Evans, 1984).

*Kardeş Kromatit Değişimi (KKD) Testi:* Mutajen maddelere maruz kalmış hücrelerdeki özellikle kardeş kromatitlerin homolog lokusları arasındaki DNA replikasyon ürünlerinin simetrik değişimini ve DNA çift zincirinin kırıklarını homolog rekombinasyon aracılığıyla onarılmasını sağlamak için kullanılır (Smyth ve Evans, 1976).

*Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART):* Mutasyon ve rekombinasyona yol açan kimyasalların belirlenmesinde en yaygın kullanılan *in vivo* testlerden birisidir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

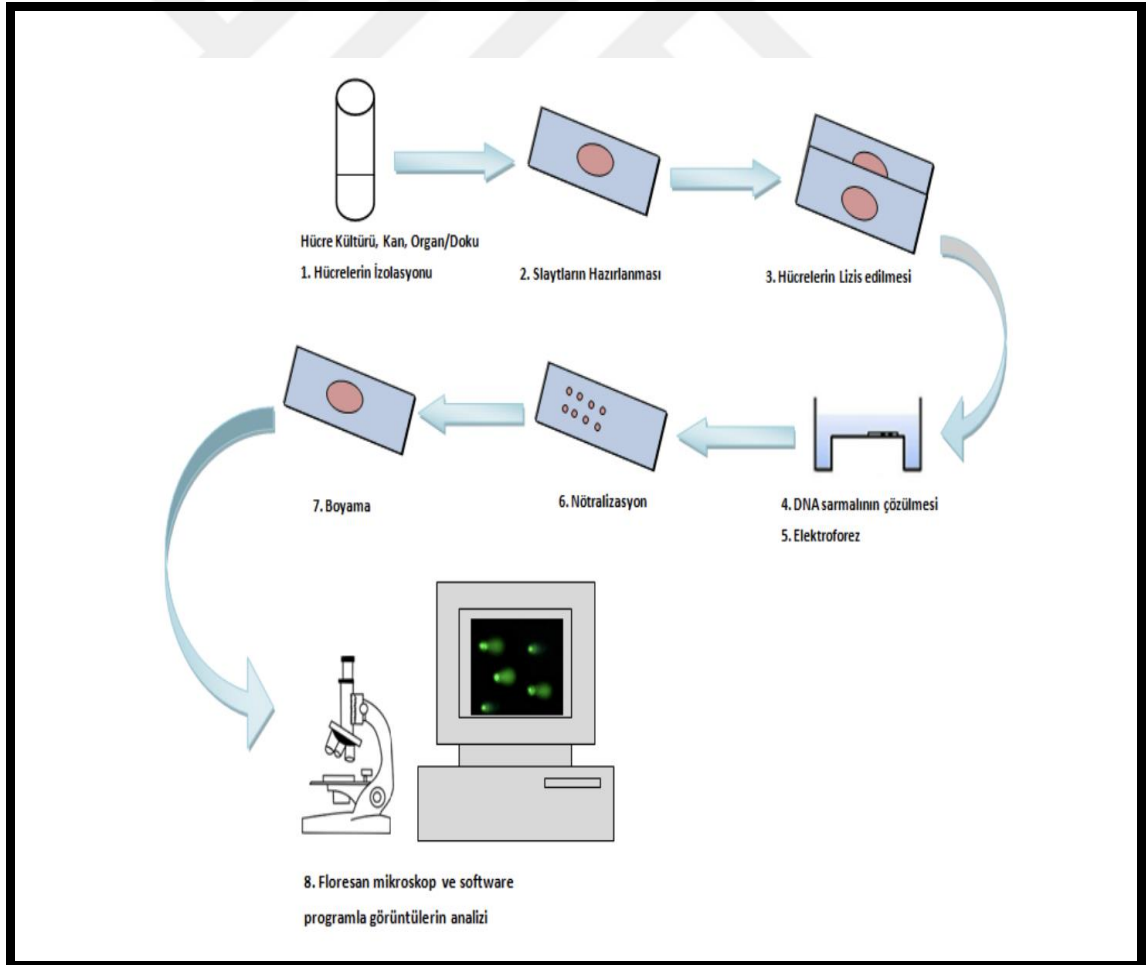
*Mikronükleus (MN) Testi:* Çeşitli mutajenlere maruz kalmış bireylerin kanser ve genomik düzensizliklerini saptanmasında, genellikle hücre döngüsünü kontrol eden genlerdeki meydana gelen eksiklikler, mitotik iğdeki hatalardan dolayı hastalardaki mikronükleus frekansı aracılığıyla anomalinin saptanması amacıyla kullanılır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

#### **2.16.1.Comet testi**

İlk defa insan hücrelerinde Rydenberg ve Johanson tarafından kullanılan comet yöntemi, çeşitli ajanların yol açtığı DNA tek ve çift zincir kırıklarının tespiti için kullanılan hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Tek hücre jel elektroforez (Single cell gel electrophoresis) tekniği olarak da adlandırılan comet yöntemi, *in vivo* ve *in vitro* olarak çeşitli ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarım bozukluğunun tayinini amaçlayan çalışmalarda kullanılmaktadır. DNA kırıklarının tayini prensibine dayanan bu yöntem, pek çok fiziksel ve kimyasal mutajenin özellikle insanlarda yol açtığı DNA hasarının tayininde, bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarını belirlemede ve kanser hastalarında DNA hasarının derecesini ve tamirini tespit etmede kullanılan bir biyoizlem testidir. Ayrıca genotoksinleri ilk etki bölgelerde değerlendirebilmesi, hemen hemen tüm ökaryotik hücrelere uygulanabilmesi, düşük hasar seviyesini ölçebilmesi, az sayıda hücre örneği gerektirdiği için hızlı, basit ve ucuz bir yöntem olması gibi avantajlarından dolayı geniş bir kullanım alanına sahiptir (Fidan, 2008, Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010, Cortés-Gutiérrez vd, 2011, Liao vd., 2009).

Comet yöntemi, alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüke sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde, hücreler veya çekirdekçikler öncelikle agarozda yerleştirilmekte, daha sonra

lizis ve alkali elektroforez tamponunda yürütme ve nötralizasyon işlemlerinden geçirilerek floresan boya ile boyanmaktadır. Floresan mikroskop ile incelenen preparatlarda zarar görmemiş DNA'lar kuyruk oluşturmazken, hasar görmüş DNA moleküllerindeki fragmentler farklı moleküler ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek çekirdekten dışarı doğru göç etmekte ve kuyruklu yıldız görünümü oluşturmaktadırlar (Bkz. Şekil 2.6). Bu görünüm nedeniyle "Comet" adı verilen bu test ile tek bir hücre düzeyinde DNA hasarının meydana geldiğini anlayabilmek için, kuyruk uzunluğu ve şekline göre farklı kategorilere göre sınıflandırma yapılabilir. Hücrelerin görsel olarak puanlanması veya hasarın kantitatif olarak saptanmasında bilgisayar yazılımları kullanılarak kuyruk momenti, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu gibi parametreler hesaplanır. Kuyruklu yıldız içindeki DNA'nın şekli, boyutu ve miktarı, hasar seviyesinin belirlenmesinde önemli göreve sahiptir (Kumaravel vd., 2009).



Şekil 2.6. Comet yönteminin işlem basamakları (Üzen vd., 2019).

Bu bilgiler doğrultusunda, 5-FU ve insan timüs, kolon ve beyin ön lobunda eksprese edilerek yeni bir tümör hücreleri apoptoz faktörü olan TCApF peptidinin epitelyum kökenli insan erkek hastadan alınan dokudan üretilip ticari olarak satın alınmış karaciğer kanser hücre hattı (HepG2) üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Sitotoksik etkisi, hücre canlılık değişimlerini göstermek amacıyla MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazoliumbromid) testi yöntemiyle ve genotoksik etkisi Alkali Comet Assay (tek hücre jel elektroforezi) yöntemiyle belirlenmiştir.



### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

Tez çalışmasında, HepG2 insan karaciğer kanseri hücre hattı üzerinde 5-Fluorourasil (5FU) ve tümör hücreleri apoptoz faktörünün (TCApF) sitotoksik ve genotoksik etkileri incelenmiş olup, deneysel çalışmalar Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Hücre hattı

Tez kapsamında kullanılan HepG2 hücre hattı orijin olarak epitelyum kökenli insan erkek hastadan dokudan üretilmiş olup American Type Culture Collection'dan (ATCC) ticari olarak satın alınmıştır.

##### 3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan alet ve cihazlar Tablo 3.1'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Çalışmalarda kullanılan alet ve cihazlar

| Alet ve cihazlar              | Firma adı                    |
|-------------------------------|------------------------------|
| Mikroskop                     | Nikon Eclipse Ti-2U Inverted |
| CO <sub>2</sub> inkübatörü    | Nüve EC 160                  |
| Kabin                         | Bil-ser B2 Class II          |
| Otomatik pipet                | Eppendorf Research Plus      |
| Şarjlı otomatik pipet         | Isolab                       |
| Buzdolabı                     | Arçelik                      |
| Derin dondurucu (-80 °C)      | Haer Medical                 |
| Vorteks                       | Heidolph Reaxtop             |
| Saf su cihazı                 | Nüve                         |
| Hassas terazi                 | Shimadzu ATX224              |
| Su banyosu                    | Memmert                      |
| Thoma Camı (Hücre sayım camı) | Marienfeld                   |
| Otoklav                       | Rodwell Monarch              |
| Mikrodalga fırın              | Vestel                       |
| Işık Mikroskobu               | Leica DM4000B                |
| Floresan Mikroskop            | Leica                        |
| Elektroforez                  | Biometra Analitik            |
| Terazi                        | Schimadzu Libror             |

### 3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar Tablo 3.2’de verilmiştir.

**Tablo 3.2.** Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar

| Kimyasal maddeler                         | Firma adı             |
|-------------------------------------------|-----------------------|
| Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) | Biological Industries |
| 5-Fluorourasil                            | Roche                 |
| TCApF                                     | Phoenix Pharma        |
| Trypsin-EDTA                              | Sigma Aldrich         |
| Cell Proliferation Kit (MTT)              | Biological Industries |
| Penisilin-Streptomisin                    | Biological Industries |
| Fetal Sığır Serum (FBS)                   | Sigma Aldrich         |
| L-Glutamin                                | Biological Industries |
| Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline      | Biowest               |
| Trypan Mavi                               | Sigma Aldrich         |
| Triton X-100                              | Sigma Aldrich         |
| Normal Erime Noktalı Agar (NMA)           | Sigma Aldrich         |
| Düşük Erime Noktalı Agar (LMA)            | Sigma Aldrich         |
| Dimetil sülfoksit (DMSO)                  | Sigma Aldrich         |
| Etidyum Bromür                            | Sigma Aldrich         |
| Sodyum Klorür (NaCl)                      | Sigma Aldrich         |
| Sodyum Hidroksit (NaOH)                   | Sigma Aldrich         |
| Triton X-100                              | Sigma Aldrich         |
| Etil Alkol                                | Sigma Aldrich         |

### 3.2. Yöntem

Hücre kültür çalışmalarında yapılan tüm işlemler, laminar hava akışlı kabin içerisinde ve steril koşullarda olmasına dikkat edilerek yapılmıştır. Bunun için her çalışma öncesi ve sonrası kabinin U.V. (ultraviyole ışık) lambası 15 dakika açılmıştır. Kabin içerisi ve kabin içerisine alınacak tüm çözelti ve araç-gereçler %70’lik etanol ile temizlenerek aseptik koşullarda çalışılmıştır.

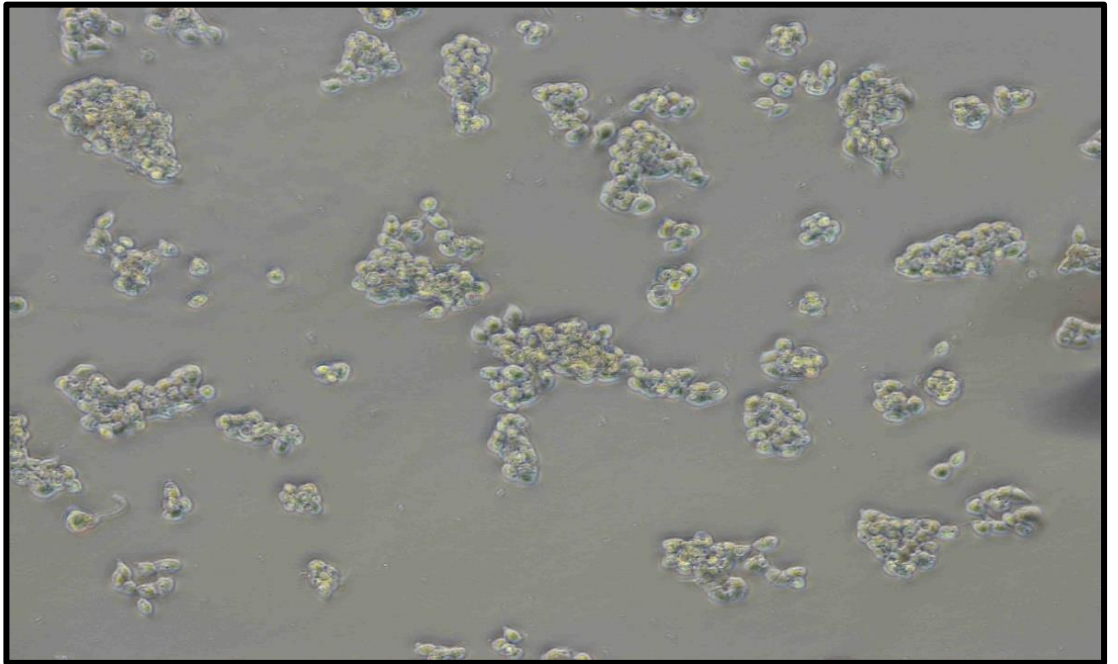
Çalışmamızda kullanılan HepG2 hücre hattı için besiyeri olarak Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) tercih edilmiştir. 500 mL DMEM içerisine 10 mL penisilin streptomisin (%1), 5 mL L-glutamin (0,01) ve 50 mL FBS (%10) eklenerek hazırlanan besiyeri ile hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır.

### 3.2.1. Hücrelerin çözündürülmesi

-80 °C’de 2 mL’lik hacimlere ayrılarak muhafaza edilen hücre hatları çözününceye kadar 37°C sıcaklıktaki su banyosunda bekletildi. Çözünen hücreler 15 mL’lik falkon tüpüne 5 mL DMEM ile karıştırılarak aktarıldı ve 1200 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Süpernetan uzaklaştırıldıktan sonra 75 cm<sup>2</sup>’lik flasklara ekim yapıldı. Flaskların üzerine tarih ve hücre ismi yazılarak inkübatöre kaldırıldı.

### 3.2.2. Hücre hattının pasajlanması

Flasklar içerisindeki hücreler %90 yoğunluğa ulaştıktan sonra pasajlama yapıldı. İnkübasyon koşulları %95 nem, %5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C’ye ayarlanmıştır. Pasajlama işlemi için ilk önce medyum atık kutusuna döküldü. Flasklar 5-6 mL fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı ve yıkama işleminin ardından PBS’in tekrar çekilerek alınması ve son olarak 8 mL taze besiyerinin eklenmesi ile gerçekleştirildi. Hücrelerin büyüme hızları dikkate alındığında ortalama bir hafta boyunca pasajlama işlemine devam edildi. Işık mikroskopunda, HepG2 hücre hattının yaklaşık bir haftada 75 cm<sup>2</sup>’lik flaskın yüzeyinin %90’lık kısmını hücrelerin kapladığı görüldüğünde pasajlama işlemine başlandı. (Bkz. Şekil 3.1).

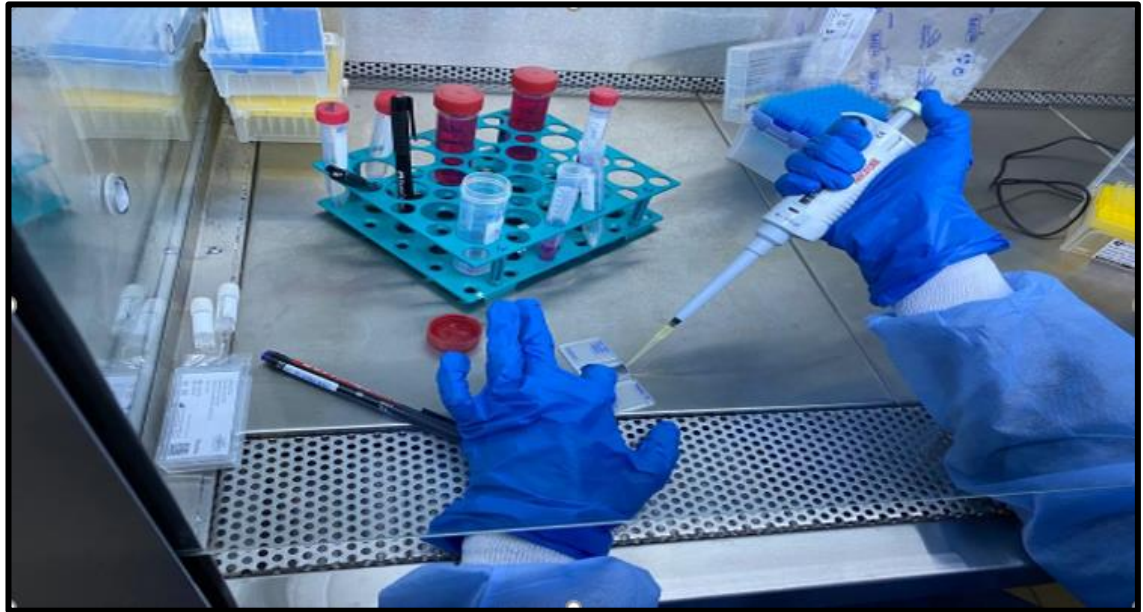


Şekil 3.1. HepG2 hücre hattının mikroskopik görüntüsü

Besiyeri otomatik pipet ile uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 6 mL tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 5 dk tripsin inkübasyonundan sonra hücrelerin yapıştıkları yerden kalkmaları sağlandı. Kalkmayan hücreler için toksik olan tripsin ile uzun süre bekletilemeyeceği için kültür kabının tabanına hafifçe vuruldu. Hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı mikroskop altında kontrol edildi. Tamamen flask yüzeyinden ayrılmış olan hücrelerin tripsinden zarar görmemesi için 12 mL besiyeri eklendi ve 50 mL'lik falkon tüpe alınarak 1200 rpm'de 25°C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından falkon tüp içerisindeki süpernetan atılarak ve içerisine 12 mL besiyeri ekleyip pipetaj yapılarak hücreler homojen hale getirildi. Daha sonra 12 mL'lik homojenat, 3-4 adet 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara paylaştırıldı ve DMEM eklenerek her birinin hacmi 8 mL'ye tamamlandı. Pasajlama işlemi sonunda flasklar 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübasyona bırakıldı.

### 3.2.3. Hücre sayımı

İnkübe edilen flasklar yeterli hücre yoğunluğuna ulaştıktan sonra flasklarda bulunan besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Hücre bulunan flasklar PBS ile yıkandıktan sonra PBS ortamdan uzaklaştırıldı. Flask yüzeyine yapışan hücreleri kaldırmak için tripsin-EDTA kullanıldı. Yüzeyden ayrılan hücrelere besiyeri eklendi ve steril falkon tüpüne konarak santrifüj edildi. (Bkz. Şekil 3.2).



**Şekil 3.2.** Hücre kültür laboratuvarında steril kabin içerisinde thoma lamı ile hücre sayımı

Santrifüj sonrası hücrelerin üst kısmında oluşan süpernetan kısmı bir otomatik pipet aracılığıyla atıldı. Hücre pelleti üzerine 1 mL besiyeri konularak hücrelerin homojenize edilmesi sağlandı. Sonra bu oluşan süspansiyondan 50 µL alınıp ependorf tüpe konuldu. Tripan mavisi solüsyonundan 50 µL eklenerek homojen bir karışım elde etmek için pipetaj yapıldı. Elde edilen bu süspansiyondan 10 µL alınarak hücre sayım işlemi için thoma lamına bırakıldı. Sayım işlemini gerçekleştirmek için thoma lamındaki merkez çizgilerin kesiştiği 1 mm'lik alandaki 16 kare içinde bulunan parlak beyaz renkteki hücreler sayılarak ortalamaları alındı Sayma işleminde mikroskop altında ölü hücreler membran zarının bozulmasından dolayı tripan mavi boya sayesinde koyu mavi renkte görünürken canlı hücreler beyaz parlak bir şekilde görünür.

### **3.2.4. Sitotoksikite çalışmaları**

Sitotoksikite analizleri için 5-FU'nun 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 ve 5 mg/mL konsantrasyonları ile TCApF'in 250, 500, 1000, 1250, 1500,1750 ve 2000 ng/mL konsantrasyonları çalışılmıştır. 5-FU ve TCApF'in IC<sub>50</sub> değerleri ile hücre canlılığına etkisini belirlemek için 96 kuyucuklu mikro plakaların bütün kuyucuklarına 200 µL besiyeri konularak tüm kuyucukların içerisinde 5x10<sup>3</sup> hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı ve 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. Kontrol, 5-FU, TCApF ve TCApF+5-FU kombinasyonlarını içeren deney grupları oluşturuldu.

#### **3.2.4.1.Hücre canlılık testi**

Hücre canlılık testi için MTT kiti (Biological Industries) kullanıldı. MTT testi (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)2,5-difenil tetrazolyum bromür), kimyasal maddelerin sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle, canlı ve çoğalan hücre oranını belirlenerek sitotoksik etki değerlendirilir. MTT ve diğer tetrazolyum tuzları canlı hücrelerin solunum ve elektron transport sistemleri tarafından indirgenerek suda çözünmeyen mavi formazan kristalleri oluşturur. Oluşan kristallerin miktarı kolorimetrik olarak tayin edilerek mitokondri canlılığı ve buna bağlı hücre canlılığı değerlendirilir (Tokur ve Aksoy, 2017, Boyraz vd., 2021).

5-FU, TCApF ve TCApF+5-FU uygulaması sonrası hücrelerdeki canlılık düzeylerinin analizi için, madde uygulaması ardından gerçekleştirilen inkübasyondan sonra plakalarda yer alan her bir kuyucuktaki medyum uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa taze 100 µL

medyum eklendi ve 10 µL MTT Reaktifi (Bileşen A) ekleyip hafifçe pipetaj yapıldı ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda kuyucuklara doğrudan 100 µL Deterjan Reaktifi (Bileşen B) ekleyip ve mikropipet kullanarak iyice karıştırıldı. Mikroplakayı 37°C'de gece boyunca karanlıkta inkübe edildi. 24 saat süre sonunda plak yatay çalkalayıcıda 10 dakika çalkalandı. Boya ışıktan etkilenmesi nedeniyle, deneyin her aşaması karanlıkta yapıldı. Örneklerin absorbans değerleri spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda ölçüldü. Kontrol kuyucukları sadece medyum bulunan kuyucuklardır. Bu kuyucuklar okutuldu. Etkin maddenin her bir konsantrasyonu için ölçülen absorbans değerinin kontrol absorbans değerine oranı 100 ile çarpıldı, % hücre canlılığı ve hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) değerleri de hesaplandı. Elde ettiğimiz absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu değer %100 canlı hücre olarak kabul edildi. Referans ilacımız 5-FU, TCApF ve TCApF+5-FU uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri, kontrol absorbans değerine oranlanarak yüzde canlılık değerleri hesaplandı. Bu deneyler farklı günlerde, birbirinden bağımsız olarak 3 kez tekrarlandı.

### **3.2.5. Genotoksisite Çalışmaları**

#### **3.2.5.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması**

➤ Fosfat Tamponu (10mM, pH 7.4, 1000mL)

Hazır toz formda bulunan fosfat tamponu 1 litre distile su ile çözdürülür.

➤ Lizis Çözeltisi (pH 10, 500mL)

Bir behere;

-136 mM (7,937 g) NaCl,

-100 mM, (18,6 g) EDTA,

-10 mM, (0,6 g) Tris,

-350 mL distile su tartılarak konuldu.

Üzerlerine 350 mL distile su eklenerek karıştırıcı yardımı ile çözünmeleri sağlandı. Çözelti pH'sı 10'a ayarlandıktan sonra karışım cam şişeye aktarılarak son hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan bu çözelti stok çözeltimiz olacak ve 2- 8°C'de buzdolabında saklandı.

Kullanılmadan yaklaşık bir saat önce;

-1mL %1'lik Triton-X100'den 1 mL,

-%10'luk DMSO'dan 10 mL alınıp mezürde son hacim 100 mL olacak şekilde stok liziz çözeltisiyle tamamlandı.

➤ Elektroforez Tamponu (pH 13.1, 1000 mL)

-Elektroforez tamponunu hazırlamak için;

-Stok 1: 10 N (200 g) NaOH ile 500 mL distile su karıştırıldı.

-Stok 2: 200 mM (14.89 g) EDTA ile 200 mL distile su karıştırıldı.

Her iki stok oda sıcaklığında saklandı. Kullanım esnasında Stok 1'den 30 mL, Stok 2'den 5 mL bir mezüre konuldu ve üzeri 1000 mL distile su ile tamamlandı ve karıştırıldı. Tamponun pH 13'ten büyük olması sağlandı. Toplam hacim elektroforez tankının hacmine göre ayarlandı.

➤ Nötralizasyon tamponu (pH 7.5, 250 mL)

Nötralizasyon tamponu hazırlamak için;

-0.4 M, (15.76 g) Tris,

-250 mL distile su tartılarak bir behere aktarıldı.

Üzerine 150 mL distile su eklendi. Karıştırıcı yardımıyla eritilerek, pH'sı kalibre edilmiş pH metre ile 7.5'e ayarlandı. Ağzı kapaklı cam şişeye aktarılarak üzeri distile su ile 250 mL'ye tamamlandı. Kullanılncaya kadar 2- 8°C'de saklandı.

➤ Düşük kaynama dereceli agar (LMA)

Düşük kaynama dereceli agarozdan 0.75 g tartıldı; üzerine 10 mL PBS (10mM, pH 7.5) eklenerek 400 Watt mikrodalga fırında bir taşım kaynatıldıktan sonra ağzı parafilm ile kapatıldı. Kullanılana kadar 2- 8 C'de buzdolabında saklandı.

➤ Normal kaynama dereceli agar (NMA)

Normal kaynama dereceli agarozdan 1 g tartıldı; üzerine 100 mL PBS (10 mM, pH 7.5) eklendi. Mikrodalga fırında 400 Watt’ da bir taşım kaynatıldı. Kullanılana kadar beherin ağzı parafilm ile kapatılarak 2-8 C’ de buzdolabında saklandı.

➤ Etanol Çözeltisi

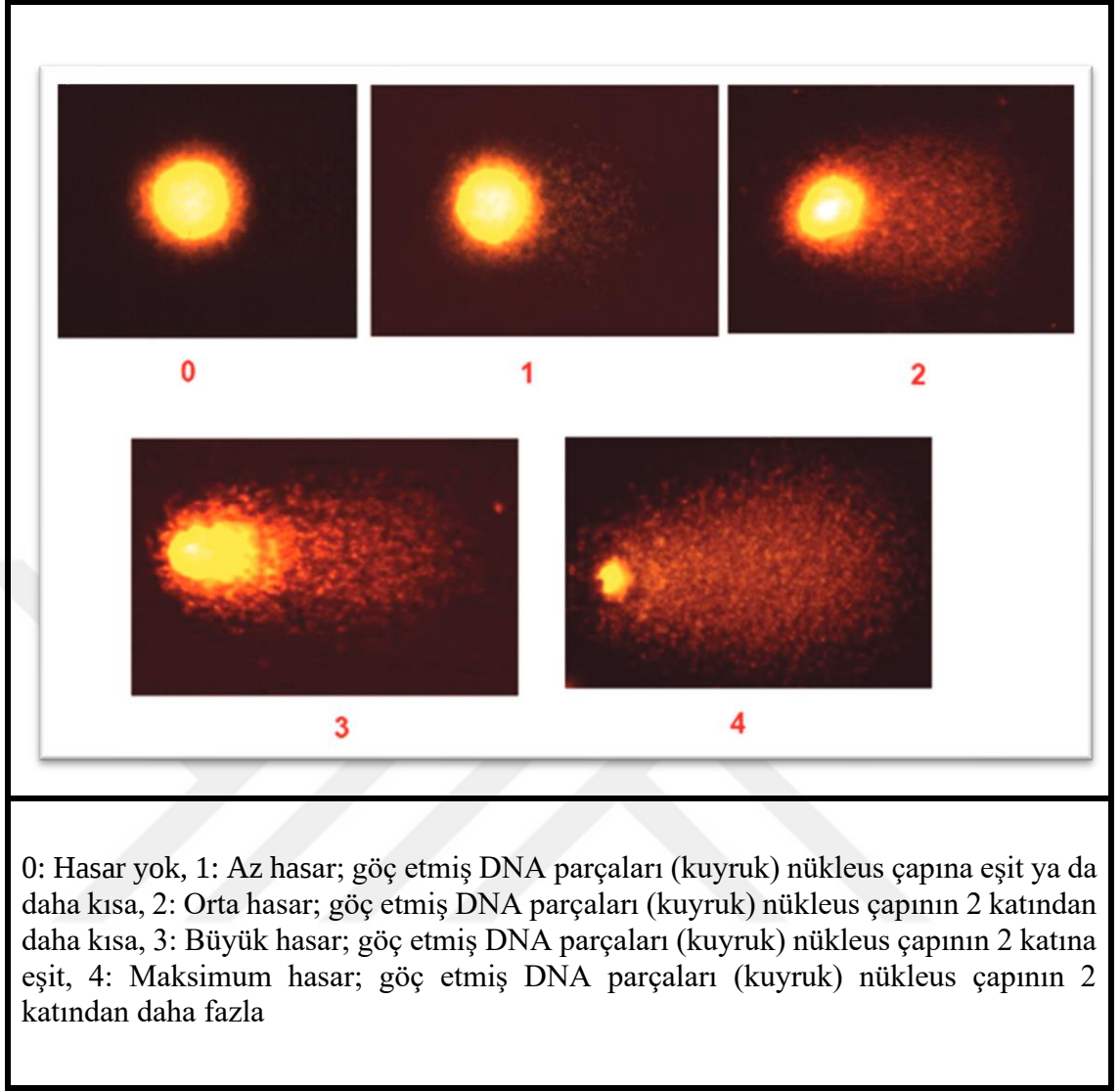
%99,8’lik etanol çözeltisinden 225,5 mL alınıp 300 mL distile su ile tamamlanarak %75’lik; 150,3 mL alınıp 300 mL distile su ile tamamlanarak ise %50’lik etanol çözeltisi hazırlanır.

➤ Boyama çözeltisi

Sıvı etidyum bromür için şişedeki sıvı etidyum bromürden 20 µL alındı ve üzerine 9,980 µL distile su eklendi ve kimyasalın ışık almaması için cam şişenin yüzü alüminyum folyo ile sarılarak buzdolabında saklandı.

### **3.2.5.2. Alkali Comet assay testi**

Tek hücre jel elektroforezi olarak da bilinen Comet Assay, memelilerin DNA hasarını belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Moleküler düzeyde genotoksik incelemeler yaptığımızda hücrelerin DNA'sındaki kuyruklu yıldızların meydana gelmesi için jel elektroforezi yöntemiyle gerçekleşir. Comet yönteminde kromozomal bozuklukların belirlenmesi için, hücrelerdeki, tek veya çift sarmallı DNA kırılmalarına bağlı olarak değerlendirilir (Fidan, 2008, Cortés-Gutiérrez vd, 2011, Liao vd., 2009). Hücreler agar jele gömülü şekildedir. Genomik DNA’ların parçalanması için serbest bırakılır. Jel aracılığıyla DNA’yı elektroforezlemek için jel boyunca elektrik akımı uygulanır. Boyutla elektroforezin hızı ters orantılıdır. Elektroforez sırasında hasarlı DNA, hasar görmemiş DNA'dan farklı bir hızda göç eder. Bu durum DNA iplikçik kırılmalarını gösterir. Sağlıklı kromozom iplikleri elektrofezde en yavaş hareket edenlerdir. Çift zincir kırıklı DNA’lar ise, jeldeki gözeneklerden bir fonksiyon parçası boyutu olarak hareket edecektir. Elektroforezden sonunda, jel boyunca hareketi gözlemlemek için DNA boyanır. Parçalanmış DNA’lar, DNA'nın kütlesinden uzakta hasarlı DNA çizgisine kuyruk adı verilir (Beedanagari vd., 2014, Loomis ve Hayes, 1996, Duez vd., 2003, Kumaravel vd., 2009). Eğer hücrede hasar yoksa boyama sonrası, DNA nokta şeklinde görülür ve fragmentasyonu yoktur. Fakat DNA’da hasar mevcutsa fragmentasyon görülür ve boyama sonrası jelde kuyruklu yıldız benzer yapılar ortaya çıkar (Bkz. Şekil 3.3).



**Şekil 3.3.** Comet Assay sonucu DNA hasarlarının sınıflandırılması (Dinçer ve Kankaya, 2010).

Genotoksisite analizleri için TCAPF'in 250-1750 ng/mL konsantrasyon aralıkları çalışılmıştır. Bununla birlikte alkali comet analizi için çalışılacak TCAPF+ 5-FU kombinasyonları belirlenirken sitotoksisite çalışmaları sonucu elde edilen değerler dikkate alınarak TCAPF'in 1250- 1750 ng/mL konsantrasyonları ile 5-FU'nun 3,5 mg/mL konsantrasyonları uygulanmıştır. Öncelikle normal kaynama noktalı agaroz 70°C'deki su banyosunda bekletildi. Hazırlanan lamalar tıraşlı olan bölgeleri yarısına kadar agarozla batırılarak ve alt yüzeyleri gazlı bezle silinerek düz bir zeminde oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Bir gün sonra lamalar toplanıp kutularda toz almayacak şekilde oda sıcaklığında ve aşırı nemli olmayan ortamlarda saklandı. Burada dikkat edilmesi gereken nokta lamalar üzerinde kabarcıkların kalmamasıdır.

6 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına her bir kuyucuğa 200 000 hücre ekilecek şekilde sayılıp ekim işlemi gerçekleştirilerek 24 saatlik inkübasyona bırakılmış HepG2 hücreleri inkübasyondan sonra 1 mL'lik tripsin-EDTA çözeltisi ile plakalardan kaldırıldı ve hücrelere DMEM besiyeri ile seyreltilerek 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Bundan sonraki aşamalar mümkün olduğu kadar karanlıkta gerçekleştirildi. Karanlıkta 1 gün süreyle kurutulan normal kaynama dereceli agar (NMA) ile rodajlı lamalar numaralandırılarak isimlendirildi. Santrifüj sonrasında süpernetan kısımları uzaklaştırıldı ve 40- 42°C sıcaklıktaki low melting agarose ile karıştırılarak, NMA ile kaplanmış lam üzerine yayıldı ve lamaların üzeri hızlı bir şekilde lamelle kapatıldı. Hazırlanan preparatta agarın katılaşması için lamalar 10-15dk süreyle ve karanlıkta bırakıldı. Bu arada stok çözeltiden lizis çözeltisi hazırlandı ve kullanana kadar buzdolabında bekletildi. Süre sonunda lamaların üzerindeki lameller kenarından dikkatlice çekilerek cam şaleye konuldu. Lizis çözeltisi tüm lamaları kaplayacak şekilde ilave edilerek kapağı kapatılır ve +4 °C'de 1 saat bekletildi.

Lizis işleminden sonra, hazırlanan lamalar içerisi soğuk elektroforez tamponu ile dolu yatay bir elektroforez tankına aynı yönlü olacak şekilde yerleştirildi. Lamalar bu çözelti içinde DNA çift sarmalının açılması amacıyla 20 dakika bekletildi. Lamalar tanka yerleştirilmeden önce tankın voltajı 25 V (0.83 V/cm), amperi de 300 mA'de sabitlenip daha sonra lamalar 20 dk çalıştırıldı. Böylece sağlanan elektrik akımı sayesinde negatif yüklü DNA sarmal kırıklarının anoda doğru göç etti. Süre sonunda elektroforez tankından çıkarılan lamalar, kuru bir zemin üzerine alındı. Oluşan kimyasal reaksiyonu stabilize etmek ve fazla tuz ve deterjanı uzaklaştırmak amacıyla lamalar nötralizasyon tamponuyla 3 kez 5'er dakika yıkandı. Takiben lamalar sırasıyla 5'er dakika %50'lik ve %75'lik etanol çözeltisinde bekletildi. Okuma öncesi lamaların kuruması için en az 1 gün bekletildi. Daha fazla DNA hasarını önlemek üzere bütün işlemler karanlıkta yapıldı. Tüm örnekler çift çalışıldı. Bu işlem sonrasında her preparat üzerine floresan renk vermesi için etidyum bromid çözeltisi damlatılarak lamelle kapatıldı ve karanlıkta 15-20 dakika bekletildi. Her lamda toplam 100 hücre 400X objektif kullanılarak floresan mikroskobunda bilgisayarlı görüntüleme sistemi ile (Comet Assay IV, Scientist, Medical Research Centre, USA) değerlendirildi ve DNA hasar derecesinde DNA kuyruk yoğunluğu ve DNA kuyruk göçü esas alındı. Boyama işlemi sonrasında lamalar floresan mikroskop altında incelenerek bilgisayar aracılığı ile resimleri çekilmiş ve çekilen resimler "bmp" formatında kaydedildi.

### 3.2.6. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS (for Windows Release 22.0 Standart Version Copyright © SPSS Inc.) hazır paket programı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen doz-absorbans canlılık verileri, GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA) hazır paket programı kullanılarak IC<sub>50</sub> değerleri nonlinear regresyon analizine göre belirlenmiştir. Varyans analizi uygulanmadan önce, çalışmadaki parametrelerin normal dağılıp dağılmadıkları Kolmogorov-Smirnov testi ile incelenmiştir. Gruplara tek yön varyans analizi One-Way ANOVA uygulanarak sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir.  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



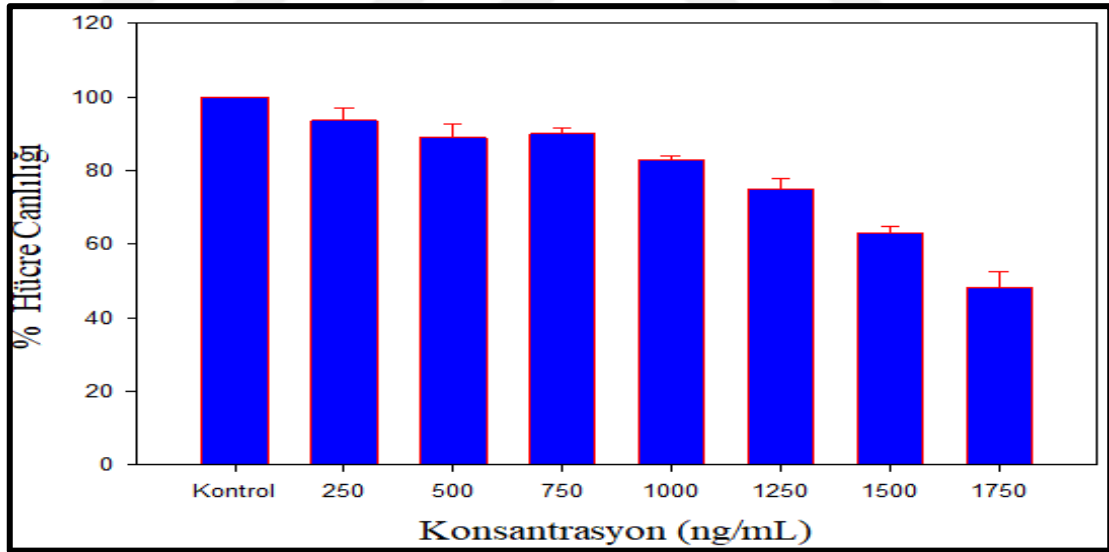
## 4. BULGULAR

### 4.1. Sitotoksisite Bulguları

#### 4.1.1.TCApF'in HepG2 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetteki sitotoksik etkilerin belirlenmesi

HepG2 hücrelerinde TCApF'in, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 ve 1750 ng/mL konsantrasyon aralığında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süresi sonrası MTT yöntemi ile hücre canlılığı üzerindeki etkisi belirlenmiştir.

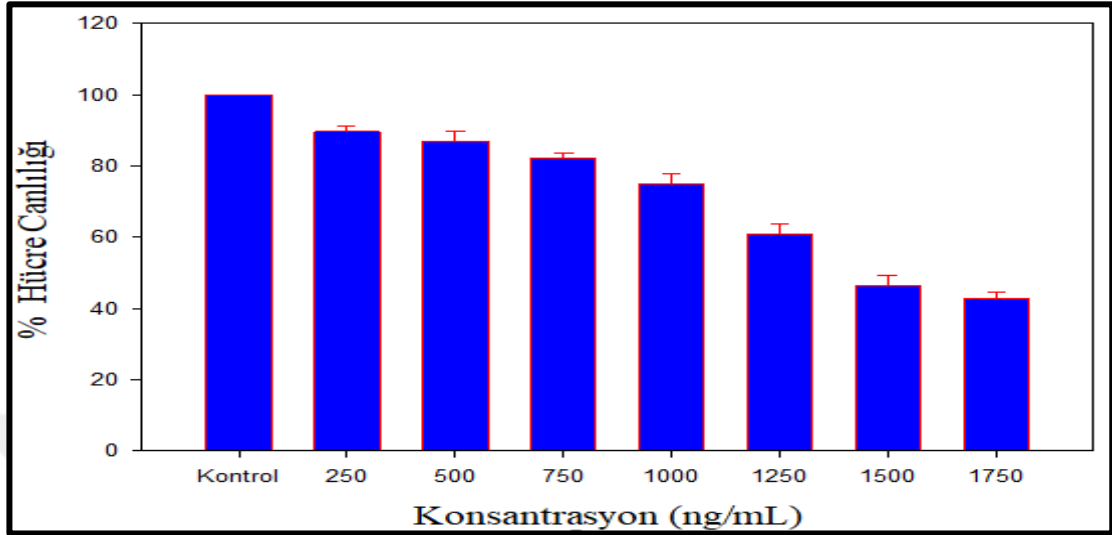
24 saatlik inkübasyon için, TCApF uygulanan HepG2 hücreleri negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 250-1250 ng/mL konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki meydana gelmediği görülmüştür. Fakat 1500 ng/mL konsantrasyondan sonra TCApF'in hücre canlılığını konsantrasyon artışına bağlı olarak istatistiksel olarak azalttığı Şekil 4.1.'de görülmektedir ( $p<0,05$ ). TCApF'in  $IC_{50}$  değeri 1634 ng/mL olarak tespit edilmiştir.



**Şekil 4.1.** TCApF konsantrasyonlarının 24 saat sonucunda HepG2 hücre canlılığına etkisi

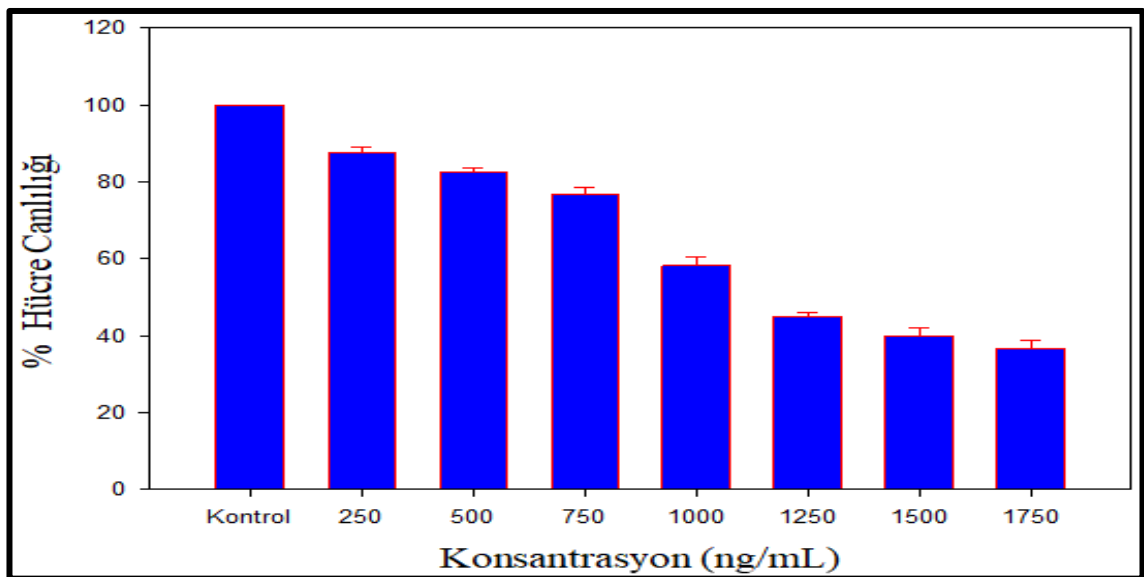
48 saatlik inkübasyon için, TCApF uygulanan HepG2 hücreleri negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 250-1000 ng/mL konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki meydana gelmediği görülmüştür. Fakat 1250 ng/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarında TCApF'in konsantrasyon artışına paralel olarak hücre canlılığını istatistiksel olarak

azalttığı Şekil 4.2.'de görülmektedir ( $p<0,05$ ). TCApF'in  $IC_{50}$  değeri 1292 ng/mL olarak tespit edilmiştir.



**Şekil 4.2.** TCApF konsantrasyonlarının 48 saat sonucunda HepG2 hücre canlılığına etkisi

TCApF uygulanan HepG2 hücreleri 72 saatlik inkübasyon sonunda negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 250-750 ng/mL konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki görülmezken 1000 ng/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda TCApF'in hücre canlılığını konsantrasyon artışına bağlı olarak istatistiksel olarak azalttığı Şekil 4.3.'de görülmektedir ( $p<0,05$ ). TCApF'in  $IC_{50}$  değeri 1120 ng/mL olarak bulunmuştur.

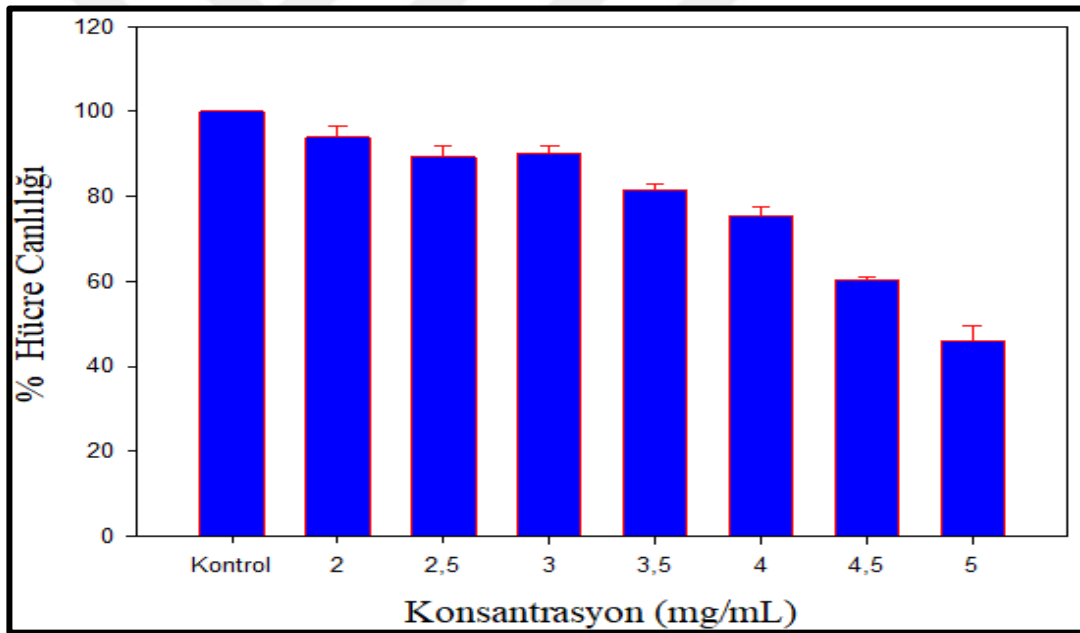


**Şekil 4.3.** TCApF konsantrasyonlarının 72 saat sonucunda HepG2 hücre canlılığına etkisi

#### 4.1.2. 5- Fluorourasil'in (5-FU), HepG2 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetteki sitotoksik etkilerin belirlenmesi

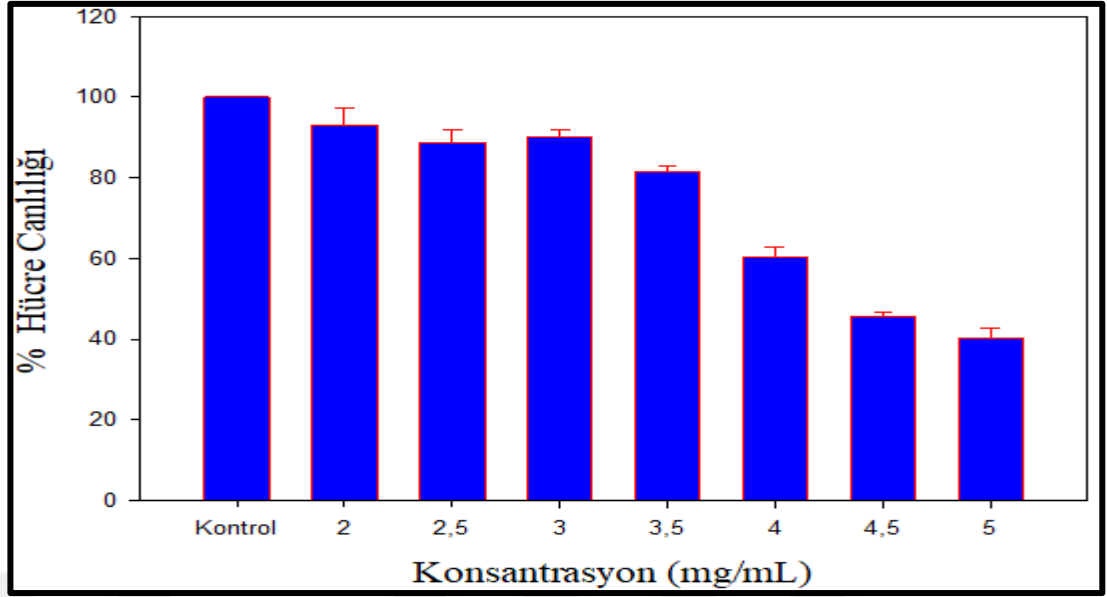
5-FU'nun HepG2 hücrelerinde 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 ve 5 mg/mL konsantrasyon aralığında 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 4.4., Şekil 4.5. ve 4.6.'da verilmiştir.

HepG2 hücreleri 24 saatlik inkübasyon sonrası negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 2-4 mg/mL 5-FU konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki meydana gelmediği görülmüştür. Fakat 4,5 mg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarında 5-FU'nun hücre canlılığını istatistiksel olarak azalttığı Şekil 4.4.'de görülmektedir ( $p<0,05$ ). HepG2 hücrelerinde 5-FU'ya ait  $IC_{50}$  değeri 24 saatlik maruziyette 4,7 mg/mL olarak tespit edilmiştir.



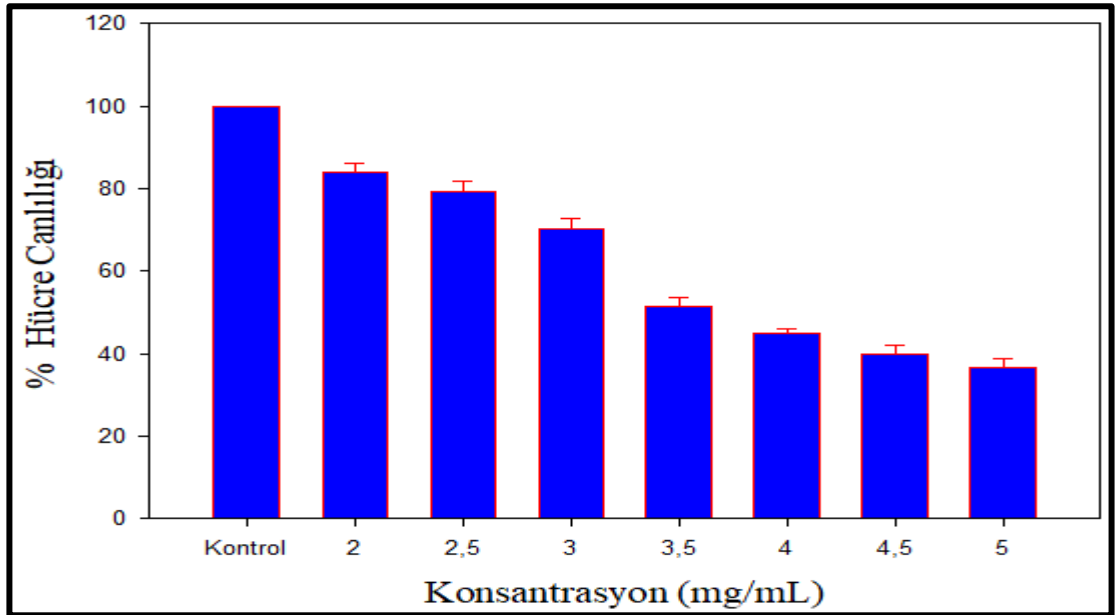
Şekil 4.4. 5-FU konsantrasyonlarının 24 saat sonucunda HepG2 hücre canlılığına etkisi

48 saatlik inkübasyon sonrası 5-FU uygulanan HepG2 hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 2-3,5 mg/mL konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki meydana gelmediği görülmüştür. Fakat 4 mg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarında 5-FU'nun hücre canlılığını istatistiksel olarak azalttığı Şekil 4.5.'de görülmektedir ( $p<0,05$ ). HepG2 hücrelerinde 5-FU'ya ait  $IC_{50}$  değeri 48 saatlik maruziyette 4,1 mg/mL olarak tespit edilmiştir.



**Şekil 4.5.** 5-FU konsantrasyonlarının 48 saat sonucunda HepG2 hücre canlılığına etkisi

72 saatlik inkübasyon için, 5-FU uygulanan HepG2 hücreleri negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 5-FU, 2- 3 mg/mL konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki meydana gelmediği görülmüştür. Fakat 3,5 mg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarında hücre canlılığını 5-FU'nun istatistiksel olarak azalttığı Şekil 4.6.'da görülmektedir ( $p<0,05$ ). HepG2 hücrelerinde 5-FU'ya ait  $IC_{50}$  değeri 72 saatlik maruziyette 3,6 mg/mL olarak tespit edilmiştir.

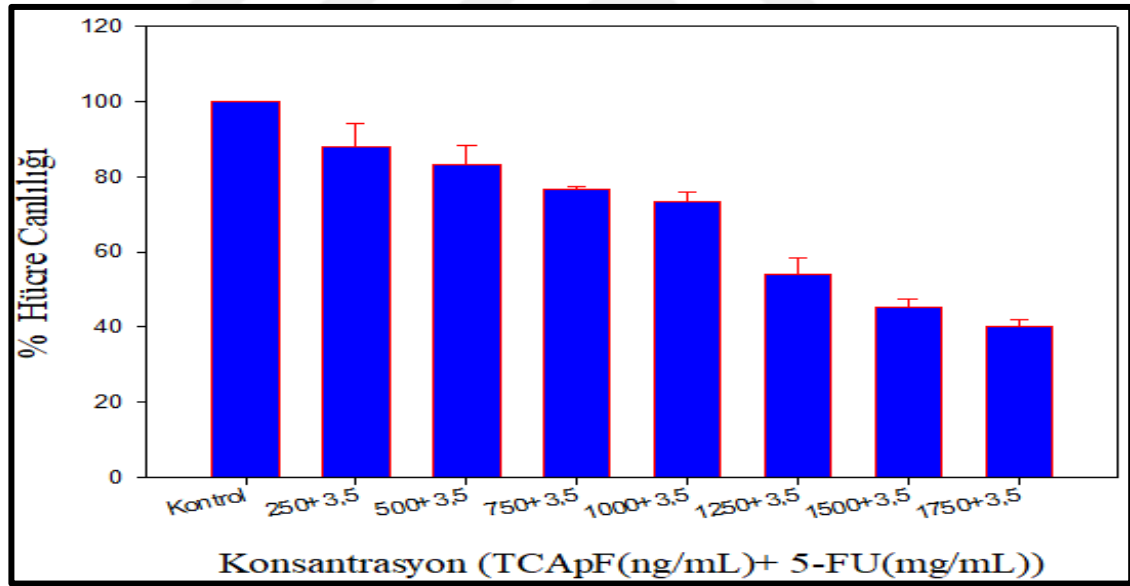


**Şekil 4.6.** 5-FU konsantrasyonlarının 72 saat sonucunda HepG2 hücre canlılığına etkisi

#### 4.1.3. HepG2 hücrelerinde TCApF ve 5- FU kombinasyonunun sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

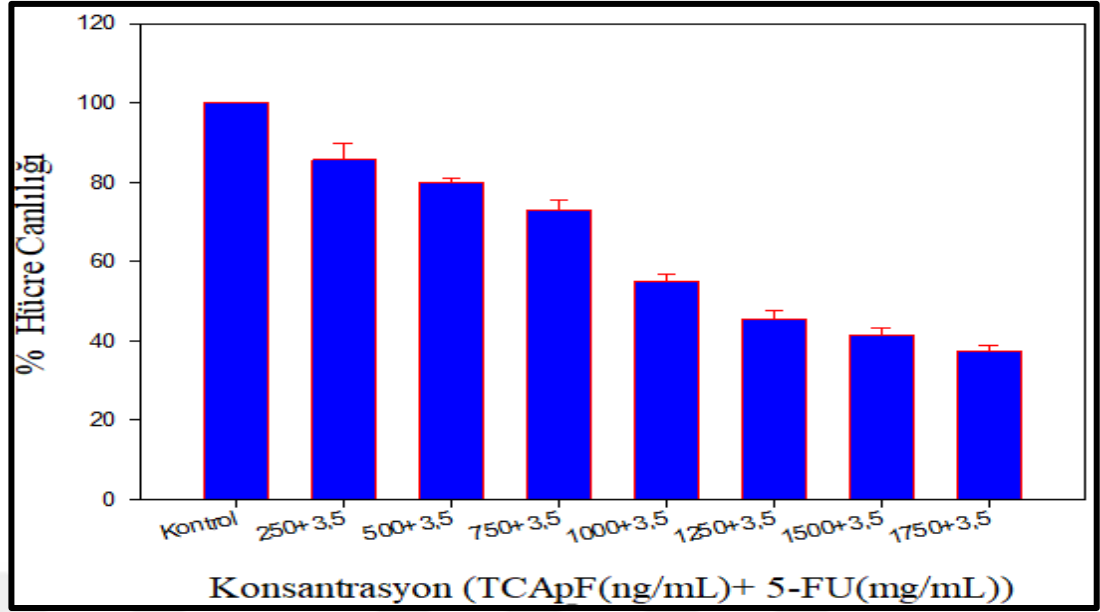
HepG2 hücrelerinde TCApF ve 5- FU kombinasyonu için TCApF'in, 250- 1750 ng/mL konsantrasyonları ile 5- FU'nun en etkili olduğu 3,5 mg/mL konsantrasyonu çalışılmıştır. HepG2 hücrelerinde 250-1750 ng/mL konsantrasyon aralığında TCApF'in 5- FU sitotoksitesitesi üzerine 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucundaki etkileri Şekil 4.7., Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.'da gösterilmiştir.

HepG2 hücrelerinde TCApF+5-FU kombinasyonuna ait 24 saat inkübasyon sonucu yapılan incelemelerde konsantrasyon artışıyla birlikte 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 ve 1750 ng/mL için canlılık yüzdelerinin sırasıyla %84,9; %81,1; %74,8; %70,1; %54,0; %48,4 ve %43,1 olup istatistiksel olarak azaldığı görülmektedir (Bkz. Şekil 4.7). Sitotoksik etkinin istatistiksel olarak önemli olduğu kombinasyonun 1250 ng/mL TCApF+ 3,5 mg/mL 5-FU grubu olduğu belirlenmiştir.



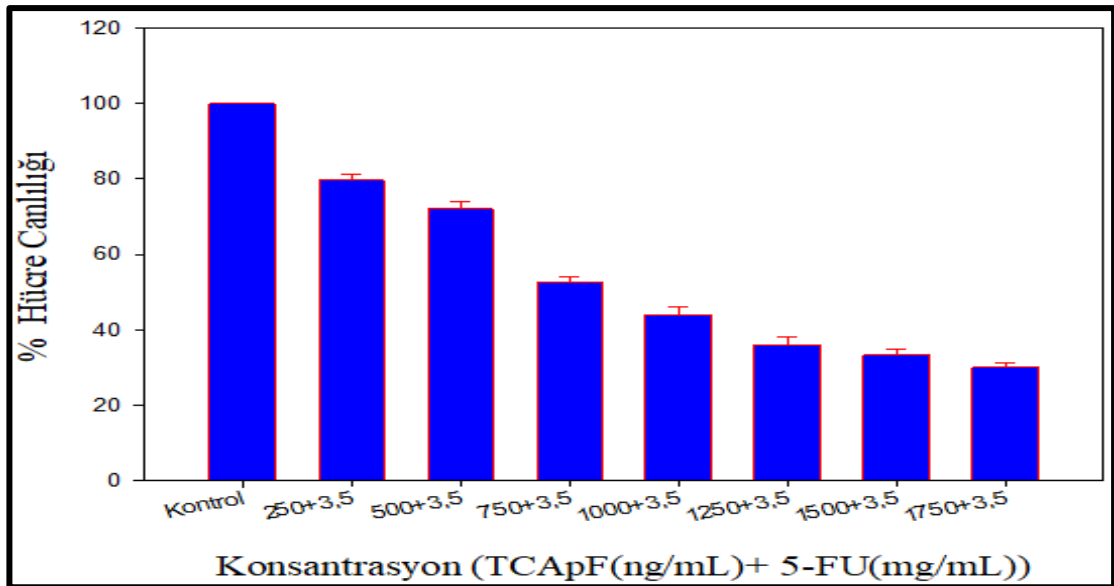
Şekil 4.7. TCApF ve 5-FU kombinasyonlarının 24 saat sonucunda HepG2 hücre canlılığına etkisi

48 saat inkübasyon sonucu yapılan incelemelerde HepG2 hücrelerinde TCApF+5-FU kombinasyonuna ait 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 ve 1750 ng/mL konsantrasyonları için canlılık yüzdelerinin sırasıyla %82,1; %77,9; %74,1; %50,4; %48,9; %45,8 ve %43,3 olup istatistiksel olarak azaldığı görülmektedir (Bkz. Şekil 4.8). Sitotoksik etkinin istatistiksel olarak önemli olduğu kombinasyonun 1000 ng/mL TCApF+ 3,5 mg/mL 5-FU grubu olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 4.8.** TCApF ve 5-FU kombinasyonlarının 48 saat sonucunda HepG2 hücre canlılığına etkisi

Benzer şekilde, TCApF+5-FU kombinasyonuna ait 72 saat inkübasyon sonucu yapılan incelemelerde HepG2 hücrelerinde 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 ve 1750 ng/mL konsantrasyonları için canlılık yüzdelerinin sırasıyla %83,1; %76,4; %51,1; %48,4; %44,9; %41,8 ve %39,3 olup istatistiksel olarak azaldığı görülmektedir (Bkz. Şekil 4.9). Sitotoksik etkinin istatistiksel olarak önemli olduğu kombinasyonun 750 ng/mL TCApF+ 3,5 mg/mL 5-FU grubu olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 4.9.** TCApF ve 5-FU kombinasyonlarının 72 saat sonucunda HepG2 hücre canlılığına etkisi

## 4.2. Genotoksisite Çalışmaları

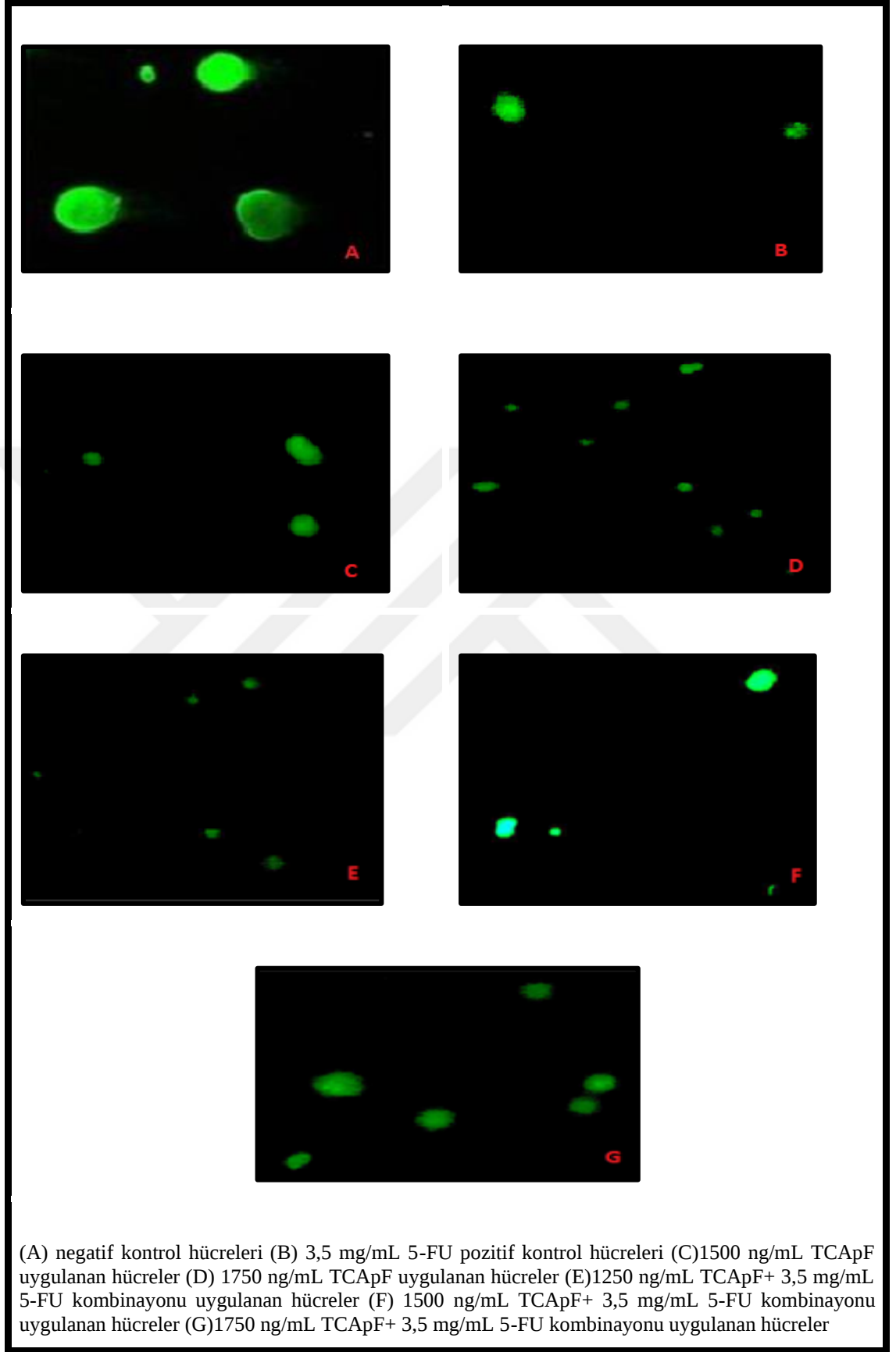
### 4.2.1. Alkali Comet analizi bulguları

Sitotoksisite çalışmalarının sonucunda 5-FU'nun IC<sub>50</sub> değerinin 72 saat inkübasyon süresi sonunda 3,5 mg/mL olduğu tespit edilmiş ve comet analizinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. (Bkz. Şekil 4.10, Şekil 4.12).

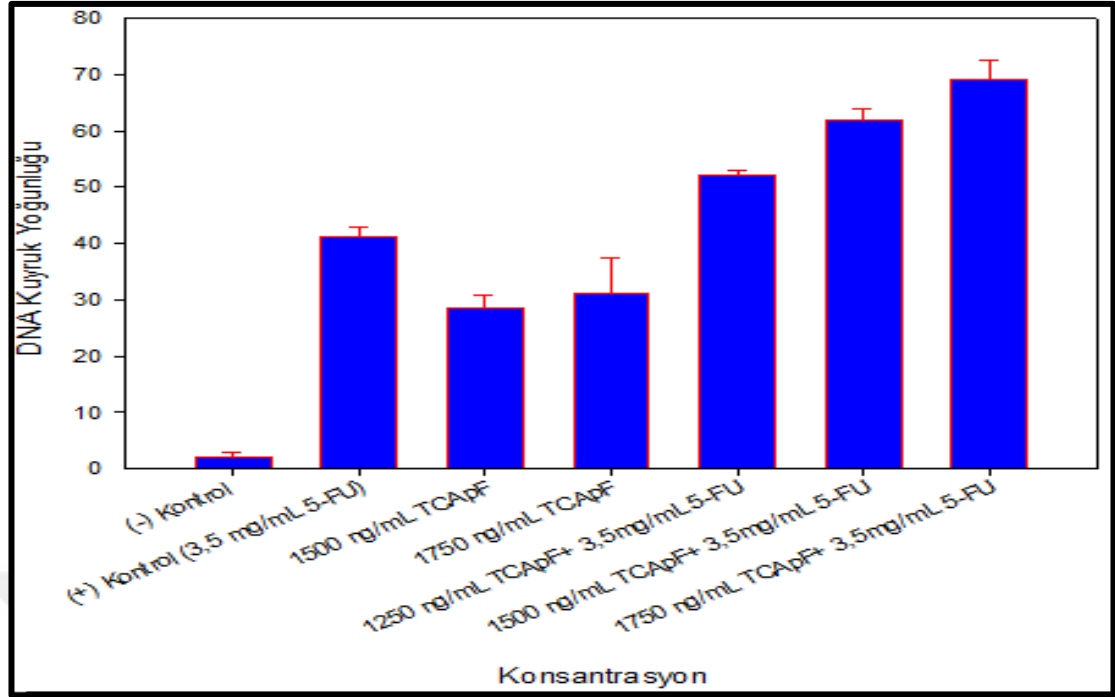
24 saatlik inkübasyon süresi sonunda TCApF'in en anlamlı sitotoksik etki gösterdiği konsantrasyonun 1500 ng/mL olduğu belirlenmiş ve genotoksisite analizinde TCApF'in 250-1750 ng/mL konsantrasyon aralıklarının tamamı tek başına çalışılmıştır. Bununla birlikte comet analizi için çalışılacak TCApF+ 5-FU kombinasyonları belirlenirken sitotoksisite çalışmaları sonucu elde edilen değerler dikkate alınarak TCApF'in 1250-1750 ng/mL konsantrasyonları ile 5-FU'nun 3,5 mg/mL konsantrasyonları kullanılmıştır

Comet analizleri sonucu 24 saat inkübasyon süresi sonunda 250- 1250 ng/mL arası konsantrasyonlarda TCApF uygulanan HepG2 hücrelerinde pozitif kontrole göre genotoksik etki gözlenmemiştir. 1500 ve 1750 ng/mL konsantrasyonlarda genotoksik etkinin konsantrasyon artışına paralel olarak 3,5mg/mL 5-FU değerine yaklaştığı, TCApF+5-FU kombinasyonu uygulanan tüm HepG2 hücrelerinde ise pozitif kontrole göre daha fazla genotoksik etkinin olduğu DNA kuyruk yoğunluğu ve DNA kuyruk göçü parametreleri kullanılarak gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.11, Şekil 4.12).

Yalnızca kuyruk uzunluğu DNA hasarını doğru bir şekilde yansıtmaz ayrıca bu kuyruk bölgesinde sürüklenen DNA'nın yüzdesi de önemlidir. DNA hasarı, migrasyon gösteren hasarlı hücreleri sağlam hücrelere oranlayarak ölçülür. Bu yöntem ile elde edilen sonuçlar genel DNA hasarı hakkında bilgi verirken, hücre düzeyindeki DNA hasarı hakkında bilgi vermez. Migrasyon oranına göre hücreleri skorlayarak hücre bazındaki DNA hasarı ölçülebilmektedir. Göç uzunluğu fragmentasyon oranıyla ve dolayısıyla DNA hasarı ile ilişkilidir. DNA hasarı yüksek olan hücrelerdeki DNA göçü daha fazladır ve bu göç kuyruklu yıldıza benzer. Kuyruktaki % DNA floresansı, DNA zincir kırığı sıklığı ile doğru orantılıdır. DNA kuyruk göçü ya da kuyruk migrasyonu (baş kısmının kenarından küçük saptanabilir fragmana DNA göçünün uzunluğudur).



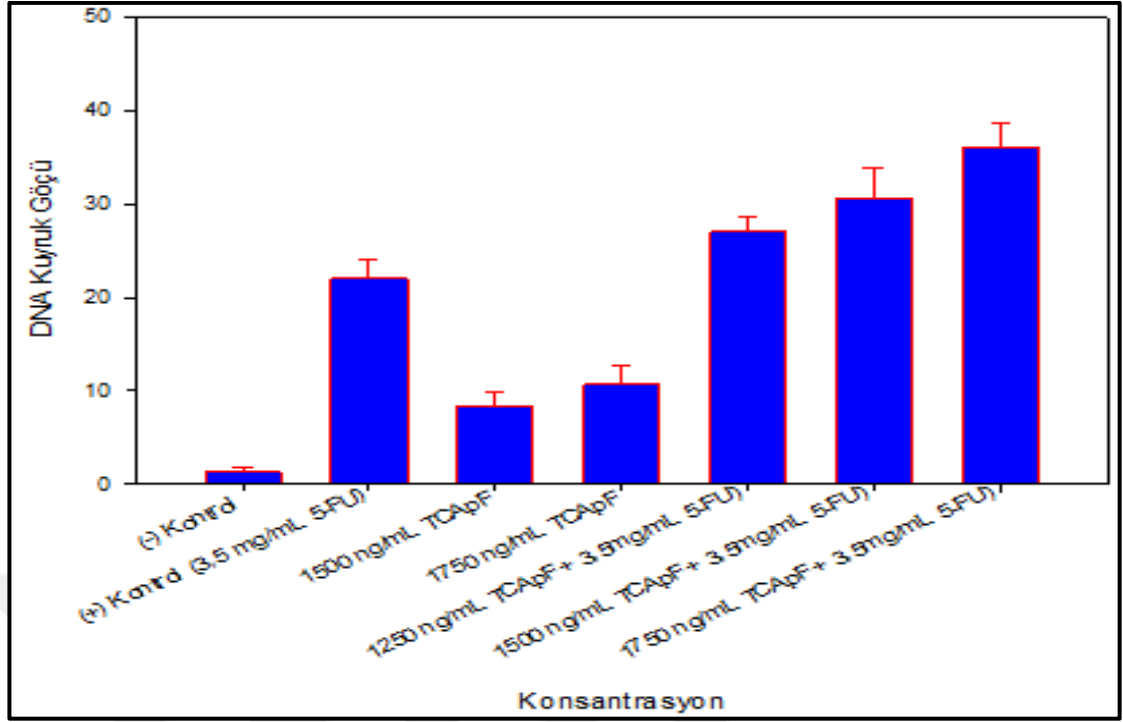
**Şekil 4.10.** Comet yöntemiyle HepG2 hücrelerinin etidyum bromür ile boyanma sonrası floresans mikroskopundaki görüntüler



**Şekil 4.11.** HepG2 hücrelerinde oluşan DNA hasarına ait DNA kuyruk yoğunluğu

Kuyruktaki % DNA floresansı, DNA zincir kırığı sıklığı ile doğru orantılıdır. DNA kuyruk yoğunluğu (kuyruk kısmındaki DNA yüzdesi, %T-DNA olarak ifade edilir) değerinin negatif kontrol için %0,5 iken pozitif kontrol olarak kullanılan 3,5 mg/mL 5-FU uygulanan hücrelerde %41,3 olduğu görülmüştür. Yalnızca 1500 ng/mL TCApF uygulanan hücrelerde bu değer %28,6 ve 1750 ng/mL TCApF uygulanan hücrelerde ise %31'dir. TCApF+ 5-FU kombinasyonlarının kullanıldığı gruplarda DNA kuyruk yoğunluğu değerlerinin sırasıyla 1250 ng/mL TCApF+ 3,5 mg/mL 5-FU'nun uygulandığı hücrelerde %52,1; 1500 ng/mL TCApF+ 3,5 mg/mL 5-FU uygulanan hücrelerde %62 ve 1750 ng/mL TCApF+ 3,5 mg/mL ile 5-FU'nun uygulandığı hücrelerde %69 olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.11).

Benzer şekilde, DNA kuyruk göçü ya da kuyruk migrasyonu (baş kısmının kenarından küçük saptanabilir fragmana DNA göçünün uzunluğudur) yalnızca 1500 ng/mL TCApF uygulaması sonucu pozitif kontrole göre %62 ve 1750 ng/mL TCApF uygulaması sonucu ise %51 azalmıştır. TCApF+ 5-FU kombinasyonlarının kullanıldığı gruplarında ise kuyruk migrasyonunun pozitif kontrole göre sırasıyla 1250 ng/mL TCApF+ 3,5 mg/mL 5-FU uygulamasıyla %18,1; 1500 ng/mL TCApF+ 3,5 mg/mL 5-FU uygulamasıyla %28,3 ve 1750 ng/mL TCApF+ 3,5 mg/mL ile 5-FU uygulamasıyla %38,7 oranında arttığı tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.12).



Şekil 4.12. HepG2 hücrelerinde oluşan DNA hasarına ait DNA kuyruk göçü

## 5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Kanser, vücutta istenmeyen bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde aşırı çoğalması ve vücutta diğer organlara yayılması ile oluşan bir hastalıktır. Günümüze kadar birçok kanser hastalığına henüz kalıcı bir tedavi bulunamamıştır. Kanserın sebep olduğu ölümler gün geçtikçe artmaktadır. Hepatoselüler karsinom (HCC), birincil karaciğer kanserinin en yaygın türüdür. Erkek ve yaşlılarda daha fazla oranda gözlenen HCC tüm insan kanserlerinin yaklaşık %6'sını oluştururken ilerleyen evrelerde hastalığın insidansı ve mortalitesi artmaya devam etmektedir (Siddiqui vd., 2018).

5-Flourourasil (5-FU), hem tek başına hem de bir dizi antikanser ajanı ile kombine bir bileşen olarak kullanılan uzun yıllardan beri klinik olarak kullanılmaktadır (Sara vd., 2018, Diasio ve Harris, 1989). Hücreler G0 veya G1 fazında iken 5 FU'nun hiçbir aktivitesi bulunmayan 5-FU S fazında etkili olan aktif bir kemoterapötik ajan olarak kabul edilir. Hücrelerin 5-FU ile tedavisinde, FdUTP'nin DNA'ya yanlış bağlanması sonucunda S fazında DNA hasarına, özellikle çift iplikli ve tek iplikli kopmalara yol açtığı bilinmektedir. Bu yüzden, çoğalan hücrelerde tüm hücre döngüsü evrelerinde DNA'da hasar meydana gelebilir ve ilgili onarım mekanizmaları hücre döngüsünün farklı evrelerinde değişiklik gösterir. Tümör hücrelerinin hücre döngüsündeki konumu ve ilaç tedavisine yanıt olarak apoptoza girme yeteneği ile tümör hücrelerinin kemoterapiye duyarlılığında 5-FU önemli rol oynar. 5-FU, metabolik aktivasyonunda yer alan çeşitli enzimlerle karmaşık bir etki mekanizmasına sahiptir (De Angelis vd., 2006). 5-FU, meme, mide, pankreas, özofagus, karaciğer, anüs, baş ve boyun kanserlerini içeren katı tümörlerin birçoğunda aktiviteye sahiptir. Kemik iliği depresyonu, diyare ve mukozit şeklinde gastrointestinal toksisite, el-ayak sendromu ile kendini gösteren cilt toksisitesi ve nörotoksisite 5-FU'nun önemli toksik etkilerindendir (Chu ve Sartorelli, 2014, Cerreri vd., 1958, Longley vd., 2003).

Günümüzde kullanılan tedavi yöntemlerinin her birinin avantajları, dezavantajları ve farklı uygulama alanları bulunmaktadır. Bu sebeple tek bir tedavinin yeterli olması zordur ve kombine tedavi yöntemleriyle daha iyi bir tedavi sağlanabilir. Bu bağlamda yeni terapötik yöntemlerin, antikanser ilaçların araştırılması ve geliştirilmesi kanser hastaları açısından oldukça önemlidir.

Transarteriyel kemoembolizasyon (TAKE), sıklıkla hepatosellüler ve kolorektal kanserlerin karaciğer metastazlarında kullanılan bir yöntemdir. Metastatik karaciğer yönelik sitokin sonrası sistemik tedavi ile ardışık olarak uygulanan TAKE ile sağlanan tedavi başarısı araştırılmıştır. İki sekans kemoembolizasyon ve ardışık olarak iki kür interleukin-2 (IL-2) ve 5-Fluorourasil (5-FU) kombinasyonu karaciğer metastazına uygulanmıştır. Metastatik hastalıkta IL-2 kullanımının cevap aralığının %7-27 arasında değiştiği gösterilmekle birlikte 5-FU ile kombine edilen immünoterapötik ajanların (IFN, IL-2) da etkili olduğu bildirilmiştir (Demirci vd., 2011).

Cao ve arkadaşları (2012) tarafından karaciğer kanser hücrelerinde, hücre büyümesinin inhibisyonu ve apoptoza etkileri üzerine 5, 10 ve 20 mg/mL kurkuminin 5-FU ile kombinasyonun uygulandığı bir çalışmada, ilaç kombinasyonunun önemli ölçüde daha fazla büyüme inhibisyonu sağladığı gösterilmiştir. Jing ve Kong (2016) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, kurkumin ile kombine edilen 5-FU'nun HepG2 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki inhibitör etkilerinin tek başına uygulanan 5-FU'dan daha güçlü olduğunu bulunmuştur. Ayrıca kurkuminin karaciğer kanseri hücrelerinin 5-FU'ya duyarlılığını artırarak 5-FU'nun antikanser etkisini iyileştirdiği gösterilmiştir. Yine, karaciğer kanseri SMMC-7721 hücrelerinin tedavisi için SLN-kurkumin ve LDH 5-FU kombinasyonunun apoptoz indüksiyonu üzerinde kurkumin ve 5-FU'nun serbest kombinasyonundan daha güçlü sinerjik etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir (Wei vd., 2018).

Moleküler biyolojinin gelişmesiyle kanser tedavisi için anti kanser peptitler yeni keşfedilmiş bir tedavi yöntemidir. Birçok organizmada çok sayıda kısa peptit bulunmuş ve peptitler sayesinde bakteri, mantar ve tümör hücrelerinde mortalite gözlemlenmiştir. Aynı zamanda anti kanser peptitler, bağışıklık sisteminin düzenlenmesini de sağlayabilirler. ACP'lerin, tümör hücresi proliferasyonunu, göçünü ve tümör anjiyogenezini daha iyi inhibe edebildikleri de tespit edilmiştir (Xie vd., 2020).

Anti kanser peptitler, kanser hücreleri için seçici olan toksik özelliğe sahiptirler. Aynı zamanda, ACP'ler antikorlar ve küçük moleküller ile karşılaştırıldığı zaman daha yüksek seçiciliğe ve penetrasyonlara sahiptir ve kolayca modifiye edilebilirler (Chen vd., 2016). Sentezlenmesi ve üretilmesinin kolay olması yönüyle önemli olan ACP'ler moleküler olarak hedeflenen ilaçların yanında kanser hücresi yüzeyine ilaç iletimi, yüksek özgüllük, yüksek seçicilik ve farklı hedeflenen ilaçlara bağlanma yeteneği özellikleriyle

kullanılmak için geliştirilmiştir (Chiangjong vd., 2020). Peptitleri tedavi edici olarak kullanmanın diğer bir faydası da peptitlerin toksik yan etkileri en aza indirerek hayati öneme sahip böbrek ve karaciğer gibi organların yapılarında birikmemesidir. Rekombinant antikorlar veya proteinlerden daha az immünojenik yapıya sahiptirler (Marqus vd., 2017).

Yeni bir tümör apoptoz faktörü olan TCApF peptiti, bu proteinin cDNA'sı esas alınarak insan timüs, kolon ve beynin ön lobunda eksprese edilerek üretilen hormon benzeri yeni bir peptittir (Erden ve Günay, 2020). TCApF, bir fare homologuna sahip ve suda çözünebilen bir peptittir. Aynı zamanda, anti kanser peptitlerin türevi olan kısa peptitler (dTCApF), kanser çalışmalarında kullanılmıştır. Lösemi kanseri, prostat kanseri, meme kanseri, yumurtalık kanseri ve pankreas kanseri üzerinde sitotoksikite çalışmaları yapılmıştır (Sandler vd., 2010, Erden ve Günay, 2020). Fakat karaciğer kanseri üzerine TCApF ile yapılan sitotoksikite ve genotoksikite çalışmaları bulunmamaktadır.

Sandler ve arkadaşlarının (2020) yaptığı çalışmada, fareler üzerinde AML tedavisi için TCApF peptitinin kanser gelişimini durdurduğu gözlemlenmiştir. Kemik iliği ve metastatik dalak hücre kolonilerinin tümünü ortadan kaldırmıştır. Fare hayvan modeli kullanılarak yapılan hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda, TCApF'in ve onun kısa türevli TCApF'lerinin güçlü anti-kanser aktivitesini olduğu çalışmalarla kanıtlanmıştır. Ayrıca TCApF'lerinin sahip olduğu bu aktivite, kanserin tekrar nüksetmesini önemli derecede azaltmıştır (Sandler vd., 2010).

Ohana ve arkadaşları (2017), dTCApF'lerin, bir antikanser ajanı olarak etki mekanizmasını araştırmıştır. Pankreas kanseri hücre hatları ile yapılan çalışmada, dTCApF'lerin golgi aparatını içeren yeni bir mekanizma yoluyla apoptozu indükleyerek tümör hücreleri üzerinde doğrudan bir etki uyguladığı ve böylece golgi aygıtının tahrip olmasına ve işlevinin kaybına yol açan yapısal değişiklikleri indüklediği belirlenmiştir. TCApF'nin antikanser aktivitesini sağlayan kısa, 14 amino asitli bir türevi olan dTCApF'ler, pankreas tümörü hücre serisine T1/ST2 reseptörü aracılığıyla bağlanarak etki göstermiş ve böylece dTCApF'nin golgi aracılı hücre ölümüne sebep olduğu da gözlemlenmiştir (Ohana vd., 2017).

dTCApF'ler ile insan pankreas, meme ve yumurtalık hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmada ilerlemiş olan metastatik katı tümörlerin güvenilirliği ve etkinliği

araştırılmıştır. dTCApF'lerin antikanser etkilerinin araştırıldığı çalışmada dTCApF'lerin kanserli hücre hatları üzerindeki etki mekanizmasının (MOA), dTCApF'lerin Toll/interlökin-1 reseptör süper ailesinin bir üyesi olan T1/ST2 reseptörü ile hücre içerisine girerek golgi aparatında yapısal değişikliklerin indüklenmesi nedeniyle golgi fonksiyonunun kaybetmesi ve endoplazmik retikulum (ER) stresinin indüklenmesi ile aşağı regülasyonu olan iki karşıt etkinin indüklenmesi sonucu oluşan yeni bir anti kanser etki mekanizması şeklinde olduğu tespit edilmiştir. dTCApF'lerin, ilerlemiş ve metastatik katı tümörlerin tedavisi için güvenli ve iyi tolere edilebilen etkisi olduğu bulunmuştur (Stemmer vd., 2018).

Çalışmamızın ilk basamağı olan sitotoksikite analizinde kullanılan HepG2 hücreleri, uygun kültür koşullarında sürekli yaşam ömürleri, sağlam fenotipi ve kolay kullanım özellikleri ile günümüzde kanser araştırmaları için yaygın olarak kullanılmalarından dolayı tercih edilmiştir (Gökmen ve Güvenç, 2018). Bu tez çalışmasında önemli anti kanser aktivitelerinin olduğu bilinen ve son yapılan araştırmalara göre gittikçe önemi artan anti kanser peptit olan TCApF'in yine bir anti kanser ilaç olan 5-FU ile kombine kullanımının karaciğer kanser hücre hatları (HepG2) üzerindeki sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile incelenmiştir. HepG2 hücre hatlarında farklı konsantrasyonlarda ve farklı inkübasyon sürelerinde TCApF ile 5-FU'nun ayrı ayrı ve kombine uygulamaları ile hücre canlılığı üzerine etkileri incelenerek sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir.

MTT testi, kimyasal maddelerin sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi için canlı ve çoğalan hücre oranının belirlendiği bir yöntemdir. MTT ve diğer tetrazolyum tuzları, canlı hücrelerin solunum ve elektron transport sistemleri tarafından indirgenerek suda çözünmeyen mavi formazan kristallerini oluşturur. Oluşan kristallerin miktarı kolorimetrik olarak tayin edilerek mitokondri canlılığı ve buna bağlı hücre canlılığı değerlendirilir (Tokur ve Aksoy, 2017, Boyraz vd., 2021).

Çalışmamızda yalnızca TCApF uygulanan HepG2 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası hücrelerin absorbans değerleri kontrol ile karşılaştırıldığında TCApF'in 1000 ng/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarında hücre canlılığını istatistiksel olarak azalttığı ve 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonları için IC<sub>50</sub> değerlerinin sırasıyla 1634 ng/mL, 1292 ng/mL ve 1120 ng/mL olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre, HepG2 hücrelerinde TCApF'in sitotoksitesinin hem konsantrasyon hem de zaman bağımlı olduğu görülmektedir.

Benzer şekilde, yalnızca 5- FU uygulanan HepG2 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası hücrelerin absorbans değerleri kontrol ile karşılaştırıldığında ise 5-FU'nun 3,5 mg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarında hücre canlılığını istatistiksel olarak azalttığı ve IC<sub>50</sub> değerlerinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonları için sırasıyla 4,7 mg/mL, 4,1 mg/mL ve 3,6 mg/mL olduğu belirlenmiştir.

TCApF ve 5- FU kombinasyonlarının uygulandığı HepG2 hücrelerinde sitotoksik etkinin istatistiksel olarak önemli olduğu kombinasyonlar sırasıyla 24 saatlik inkübasyon için 1250 ng/mL TCApF+ 3,5 mg/mL 5-FU, 48 saatlik inkübasyon için 1000 ng/mL TCApF+ 3,5 mg/mL 5-FU ve 72 saatlik inkübasyon için 750 ng/mL TCApF+ 3,5 mg/mL 5-FU olarak belirlenmiştir. Sonuçlarımız HepG2 hücrelerinde 5-FU'nun TCApF ile kombinasyonunun sitotoksik olarak daha etkili olduğunu göstermektedir.

Comet yönteminin amacı kimyasal ve fiziksel etkilerle oluşan genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreleri üzerindeki DNA'ların her birini inceleyerek tespit etmektir. (Uzen vd., 2019, Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010). Comet yönteminin, bireylerin hücresel düzeyde DNA hasarını tespit etmek için kullanılan hızlı, hassas ve basit bir yöntem olmasının yanı sıra daha sağlıklı analizler sağlayarak tek hücre düzeyinde veri toplanmasını sağlanması, örnek başına daha az sayıda hücreye ihtiyaç duyulması ve DNA hasarının saptanmasında yüksek hassasiyete sahip olması gibi birçok avantajı da vardır (Fidan, 2008). Çalışmamızda da genotoksik etkilerin belirlenmesi için kullanılan Alkali Comet analiz yöntemi diğer genotoksisite yöntemlerine göre daha az iş yükü gerektirmesi, daha hızlı ve devam ettirilebilir bir sistem olması, sonuçlarda kirlilik azlığı nedeniyle daha kaliteli görüntü alınması ve analiz kolaylığı gibi nedenlerle daha avantajlı bir yöntem olmasından dolayı tercih edilmiştir.

*In vitro* bir çalışmada kitosan ve MMT ayrı ayrı ve bir antikanser ilacı olan 5-Florourasil ile kombine kullanılarak insan lenfositlerindeki DNA hasarı comet yöntemiyle belirlenmeye çalışılmıştır. İnkübasyondan sonra 5-FU'nun DNA hasarı %60 iken kitosan ve MMT tarafından indüklenen DNA hasarının %9 olduğu belirlenmiştir. Kitosan, MMT ve 5-FU'nun kombine uygulaması sonucu pozitif kontrol olarak kullanılan 5-FU'ya göre daha az miktarda DNA hasarına yol açtığı bulunmuştur. Kitosan ve MMT kombinasyonunun yan etkileri azaltılmış kanser kemoterapisinde önemli bir değere sahip olabileceği gösterilmiştir (Kevadiya vd., 2012).

Standart bir kemoterapötik ilaç olarak 5-FU ile metalik altın nanopartikül (AuNP'ler) aracılı foto-termal terapinin (PTT) tümör hücresi öldürme etkinliği her iki ilacın olası genetik anormalliklere sebep olması yönünden değerlendirilmiştir. MCF-7 meme kanseri hücre hattında her bir terapötik maddenin uygulanmasından kaynaklanabilecek olası genotoksik ve mutajenik yan etkileri araştırmak için alkali kuyruklu yıldız tahlili, standart karyotipleme ve multipleks floresan in situ hibridizasyon uygulanmıştır. Sonuçlara göre, 24 saat inkübasyon sonunda kemoterapötik ilaç 5-FU'nun %18,58 olan DNA hasar oranına kıyasla AuNP'lerin %4,6 DNA hasarı değerinin istatistiksel olarak önemli olmadığı gösterilmiştir. İlave olarak, 5-FU ile karşılaştırıldığında, ışıkla aktive olan AuNP'lerin aracılık ettiği PTT'nin, meme kanserinde önemli ölçüde etkinlik sağladığı ve hiçbir genotoksik etkiye yol açmadan tümör hücrelerinin öldürülebileceği konusunda umut verici bir potansiyele sahip olduğu ifade edilmiştir (Gomaa vd., 2015).

DNA-PKcs eksikliğinin insan hepatoma HepG2 hücrelerinin sisplatin (CDDP) ve 5-florourasil (5-FU) kemosensitivitesi üzerindeki etkilerini araştırmak ve altta yatan moleküler mekanizmayı keşfetmek için yapılan başka bir çalışmada ise CDDP ve 5-FU ile kombinasyonun proliferasyon inhibisyonu, ROS üretimi, DNA hasarı ve hücre apoptozunu indüklemekte HepG2 hücreleri üzerinde sinerjistik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Fang vd., 2015).

Çalışmamızın ikinci basamağında ise MTT sonuçlarından elde edilen değerlere göre TCApF konsantrasyonları ayrı ayrı ve 5-FU ile kombine olarak HepG2 hücrelerine uygulanarak alkali Comet yöntemi ile DNA hasarı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. 250- 1250 ng/mL arası konsantrasyonlarda TCApF uygulanan HepG2 hücrelerinde pozitif kontrole göre genotoksik etki gözlenmemiştir. 1500 ve 1750 ng/mL konsantrasyonlarda genotoksik etkinin konsantrasyon artışına paralel olarak pozitif kontrol olarak kullanılan 3,5 mg/mL 5-FU değerine yaklaştığı, TCApF+5-FU kombinasyonu uygulanan tüm HepG2 hücrelerinde ise pozitif kontrole göre daha fazla genotoksik etkinin olduğu DNA kuyruk yoğunluğu ve DNA kuyruk göçü parametreleri kullanılarak gösterilmiştir.

Anti kanser peptitler (ACP), kanser hücreleri için seçici olan ve toksik özelliğe sahiptir. Anti kanser peptitlerde amaç sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerinin ölmesini sağlamaktır. Kanserli hücre zarı ile normal hücre zar yapısı farklı özelliklere sahiptir. Antikanser peptitler membran lizisi ya da gözenek oluşumu aracılığıyla

hücrelerin apoptoz ve nekroz yoluyla yok edilmesini sağlar. Ökaryotik hücre zarı, lizis olayından korumak için zarın akışkanlığını değiştirerek kolesterol içerir. Kanseri hücreleri sağlıklı hücrelere göre hücrenin yüzey alanı artırmak için daha fazla miktarda mikrovilus içerirler. Ayrıca sağlıklı hücreler elektriksel olarak nötr duruma sahipken, kanser hücreleri yüzeylerinde negatif yüklü bileşenlere sahiptir. Bu sayede, ACP'ler ile küçük moleküllerin etkileşime girdiği zaman zarın kararsızlaşmış olmasını sağlarlar. Böylece sitotoksikite ve kanser hücresi lizisine yol açmaktadır. Bununla birlikte, peptitler ve sağlıklı hücre zarı arasındaki etkileşimler hidrofobikken, peptit ile kanser hücreleri arasındaki etkileşimler ise elektrostattır. Sentez ve üretilmesinin kolay olması yönüyle önemli olan moleküller olarak hedeflenen ilaçların yanında, ACP'ler kanser hücresi yüzeyine ilaç iletimi, yüksek özgüllük, yüksek seçicilik ve farklı hedeflenen ilaçlara bağlanma yeteneği özellikleriyle kullanılmak için geliştirilmiştir (Chiangjong vd., 2020).

ACP'lerin, onarılma mekanizmaları yoktur. Hücre zarı hasarına ve hücre lizisine neden olarak ya da apoptozun indüklenmesine neden olarak kanser hücrelerinin ölmesini sağlar. Birçok ACP, normal dokulara zarar vermeden primer tümörlere ve metastazlarına karşı güçlü anti-tümör aktivite göstermektedir. Bu zamana kadar yapılan araştırmalarda, kanser hücrelerinde doğrudan etkili ACP'lere direnç geliştirebileceğini gösteren herhangi bir rapor bulunmamaktadır (Hilchie vd., 2016).

TCApF'in HepG2 hücre hattı üzerinde yüksek konsantrasyonda uygulanması sonucu hücre canlılığını azalttığını ve buna bağlı olarak DNA'da hasara neden olduğu çalışmamızda gösterilmiştir. TCApF'in anti kanser ajanımız olan 5-FU kadar sitotoksik etki göstermediği ve yüksek konsantrasyonlarda kullanılan 5-FU'nun hücrelerde oluşturduğu DNA hasarının TCApF'e göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. 5-FU'nun tedavide yan etkilerini azaltmak amacıyla TCApF ile düşük konsantrasyonlarda 5-FU kombinasyonunun kullanımının uygunluğu daha fazla çalışmalar yapılarak gösterilebilir.

Yapılan tez çalışması sonuçları ve mevcut literatür ile TCApF'in, potansiyel yardımcı bir anti kanser ajan olabileceği ve nanotaşıyıcılara ilaç, görüntüleme maddesi ve hedeflendirici molekül olarak TCApF'lerin bağlanıp çözünürlüğünün ve biyoyararlanımının arttırımı sağlanarak kanser tedavisinde kullanılabileceği düşüncesindeyiz. Ayrıca yapılacak kapsamlı çalışmalar sonucu bu peptitin etki mekanizmasının belirlenmesi ACP'lerin daha iyi anlaşılmasına ve kanser tedavi çalışmalarında alternatif olarak kullanılmasına katkı sağlayacaktır. Yeni bir tümör

apoptoz faktörü olan TCApF peptitinin 5-FU ile yapılan kemoterapi etkinliğini arttırmada önemli bir terapötik ajan olabileceğinin gösterilmesi için 5-FU ve TCApF kombinasyonlarının insan hepatoma HepG2 hücreleri üzerinde sitotoksitesi ve genotoksitesinin araştırıldığı bu çalışmanın sonraki basamağında sağlıklı karaciğer hücre hatları da kullanılarak hücre apoptozu ve apoptozla ilişkili proteinlerin ekspresyonu ile metabolik yolların aktivitesinin değerlendirilmesi şeklinde daha ileri düzeyde çalışmalar yapılarak literatüre katkı sağlanması önemlidir.



## KAYNAKLAR

- Akulapalli, S. (2009) "History of cancer, ancient and modern treatment methods", *Journal of cancer science & therapy* 1;1(2), 1-4.
- Aksoy, F. "Karaciğerin Histolojisi", <http://www.turkjpath.org/pdf/pdf PB 249.pdf>, Son erişim tarihi:16.11.2021
- Ames, B. N., McCann, J., Yamasaki, E. (1975) "Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test". *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31(6), 347-363
- Badvie, S. (2000) "Hepatocellular carcinoma", *Postgraduate Medical Journal*, 76(891), 4-11
- Balogh, J., Victor, D., Asham, E. H., Gordon Burroughs, S., Boktour, M., Saharia, A., Li, X., Ghobrial, R. M., Monsour, H. P. (2016) "Hepatocellular carcinoma", *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, 5(3), 41-53
- Bedir, A., Bilgici, B. Yurdakul, Z., Gürsel, B. Ş., Alvur, M. (2004) "DNA hasarı analizinde f  $\mu$ -FADU ve Comet yöntemlerinin karşılaştırılması", *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2(3), 97-103
- Beedanagari, S., Vulimiri, S. V., Mahadeva, B. B. (2014) "Genotoxicity biomarkers: Molecular basis of genetic variability and susceptibility", *Biomarkers in Toxicology*, 729-742
- Bertram, S. (2001) "The molecular biology of cancer", *Molecular Aspects of Medicine*, 21(6), 167-223
- Bosetti, C., Turati, F., Vecchia, C. L. (2014) "Hepatocellular carcinoma epidemiology", *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 28(5), 753-770
- Boyraz, M.Ü., Shekhany, B., Süzergöz, F. (28 Şubat 2021) "İndirgemesine dayalı MTT testinin hücresel görsel analizleri", *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 18(1), 95-99
- Bruix, J., Boix, L., Sala, M. Llovet J. M. (2004) "Focus on hepatocellular carcinoma", *Cancer Cell*, 5(3), 215-9
- Chen, W., Ding, H., Feng, P., Lin, H. Chou K. (2016) "iACP: a sequence-based tool for identifying anticancer peptides", *Oncotarget*, 7(13), 16895–16909
- Chen, J., Zhu, J., Zhang, Y., Chen, Y., Ding, L., Chen, H., Shen, A., Wang, G. (2021) "Liver cancer survival: A RealWorld observation of 45 years with 32,556 cases", *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, 8, 1023–1034
- 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

- Chu, E., Sartorelli, A. C. (2014) “Kanser kemoterapisi”, Çev. Zeynep Yazıcı, **Temel ve Klinik Farmakoloji**, Ed. 12, 949-975
- Cortés-Gutiérrez, E. I., Dávila-Rodríguez, M. I., Fernández, J. L., López-Fernández, C., Gosálbez, A., Gosálvez, J. (2011) “New application of the comet assay: chromosome–comet assay”, **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**, 59(7), 655-60
- De Angelis, P., Svendsrud, D. H., Kravik, K. L., Stokke, T. (2006) “Cellular response to 5-fluorouracil (5-FU) in 5-FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery”, **Molecular Cancer**, 20
- Demirci, U., Büyükberber, S., Baykara, M., Coşkun, U., Benekli, M. (2011) “Renal Hücreli Kanserın Karaciğer Metastazında Transarteriyel Kemoembolizasyon”, **Gazi Med J**, 22: 130-2
- Diasio, R. B., Harris, B. E. (1989) “Clinical pharmacology of 5-Fluorouracil”, **Clinical Pharmacokinetics**, 16, 215-237
- Dinçer, Y., ve Kankaya, S. (2010) “DNA hasarının belirlenmesinde comet assay”, **Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi**, 30(4), 1365
- Dikilitaş, M., Koçyiğit, A. (18 Mayıs 2010) “Canlılarda tek jel elektroforez yöntemi ile DNA hasar analizi (Teknik Not): Comet analiz yöntemi”, **Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 14(2), 77-89
- Duez, P., Dehon, G., Kumps, A., Dubois, J. (2003) “Statistics of the comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects”, **Mutagenesis**, 18(2), 159-66
- Erden, Y., Günay, S. (2020) “Tümör hücreleri apoptoz faktörü (TCaP)’ nün insan prostat ve meme kanseri hücre hatları üzerine sitotoksik ve genotoksik etkilerin belirlenmesi, **İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi**, 8(2), 356-366
- Evans, H. J. (1984) “Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests”. In Handbook of mutagenicity test procedures.
- Fang, Y., Chai, Z., Wang, D., Kuang, T., Wu, W., & Lou, W. (2015) “DNA-PKcs deficiency sensitizes the human hepatoma HepG2 cells to cisplatin and 5-fluorouracil through suppression of the PI3K/Akt/NF- $\kappa$  B pathway”, **Molecular and cellular biochemistry**, 399(1), 269-278.
- Fidan, A. F. (1 Haziran 2008) “DNA hasar tespitinde jel elektroforezi”, **Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi**, 8(1), 41-52
- Gerber, M. D., Michael, A., Swan N., Thung M.D. (1987) “Histology of the liver” **The American Journal of Surgical Pathology**, 11(9), 709-722
- Ghouri, Y. A., Mian, I., Rowe J. H. (2017) “Review of hepatocellular carcinoma: epidemiology, etiology, and carcinogenesis”, **J Carcinog**, 16(1)

- Gomaa, I. E., Gaber, S. A. A., Bhatt, S., Liehr, T., Gleib, M., El-Tayeb, T. A., Abdel-Kader, M. H. (2015) "In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of gold nanoparticles- mediated photo-thermal therapy versus 5-fluorouracil", **Journal of Nanoparticle Research**, 17:102
- Gökmen, S., Güvenç, D. (2018) "İlaç metabolizması ve toksisite çalışmalarında kullanılan primer hepatosit ve hepatoma hücre hatları", **Türkiye Klinikleri**, Ankara, 1. Baskı, 28-34
- Gurakar, A., Hamilton, J. P., Koteish, A., Li, Z., Mezey, E. "Hepatocellular carcinoma (Liver Cancer): Introduction", hepatocellular carcinoma liver cancer.pdf (hopkinsmedicine.org), Son erişim tarihi: 10.11.2021
- Hilchie, A. L., Sharon, A. J., Haney, E. F., Hoskin D. W., Bally, M. B., Franco, O. L., Corcoran J. A., Hancock, R. E. W. (2016) "Mastoparan is a membranolytic anticancer peptide that works synergistically with gemcitabine in a mouse model of mammary carcinoma", **Biochimica et Biophysica Acta**, 1858(12), 195-3204
- Hoskin, D. W., Ramamoorthy, A. (2008) "Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides", **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, 1778(2), 357-375
- Humagain, S. "Liver (Anatomy, Histology and Functions)", <https://onlinesciencenotes.com/author/sushil/> Liver (Anatomy, Histology and Functions)- Online Science Notes, Son erişim tarihi: 01.11.2021
- Jindal, A., Thadi, A., Shailubhai, K. (2019) "Hepatocellular carcinoma: etiology and current and future drugs", **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, 9(2), 221-232
- Immune System Key. "NEROFE Technology", <https://www.immunesk.com/technology/>, Son erişim tarihi: 21.11.2021
- Klatskin, G., Conn, H.O. (1993) "Histopathology of the liver", **Oxford University Press USA**, 1 (1)
- Kumaravel T. S., Vilhar, B., Faux, S.P., Jha, A. N. (2009) "Comet assay measurements: a perspective", **Cell Biology and Toxicology**, 25(1), 53-64
- Kevadiya, B. D., Patel, T. A., Jhala, D. D., Thumbar, R. P., Brahmhatt, H., Pandya, M. P., Rajkumar, S., Jena, P. K., Joshi, G. V., Gadhia, P. K., Tripathi, C. B., Bajaj, H. C. (2012) "Layered inorganic nanocomposites: A promising carrier for 5-fluorouracil (5-FU)", **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 81(1), 91-101
- Langiel, S. A. S., Azqueta, A., Collins, A. R. (2015) "The comet assay: past, present, and future", **Frontiers of Genetics**, 6:266
- Liao, W., McNutt, M.A., Zhu, W. (2009) "The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells", **Methods**, 48(1), 46-53

- Longley, D. B., Harkin, D. P., Johnston, P. G. (2003) “5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies”, *Nature*, 3, 330-338
- Loomis, T. A., Hayes, A. W. (1996) “Toxicologic testing methods”, *Loomis’s Essentials of Toxicology*, 4th ed., 205-248
- Mader, M. R., Müller, M., Steger, G. G. (1998) “Resistance to 5- Fluorouracil”, *General Pharmacology: The Vascular System*, 31(5), 661-666
- Mahadevan, V. (2020) “Anatomy of the liver”, *Surgery (Oxford)*, 38:8, 427-431
- Marks, E. I., Yee, N. S. (2016) “Molecular genetics and targeted therapy in hepatocellular carcinoma”, *Current Cancer Drug Targets*, 16(1)
- Marqus, S., Pirogova, E., Piva T.J. (2017) “Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment”, *Journal of Biomedical Science*, 21, 24(1):21
- Metodieva, S. (2017) “Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma”, *Balkan Journal of Medical Genetics*, 20(1), 15-22
- Mínguez, B., Tovar, V., Chiang, D., Villanueva, A., Llovet, J. M. (2009) “Pathogenesis of hepatocellular carcinoma and molecular therapies”, *Current Opinion in Gastroenterology*, 25(3), 186-194
- Milano, G., Chamorey, A. L. (2009) “Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil with consideration of chrono pharmacokinetics”, *Chronobiology International*, 19(1), 177-189
- Mitra, V., Metcalf, J. (2009) “Functional anatomy and blood supply of the liver”, *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 10:7, 332-333
- NCBI. “TCApF”, Tcapf | C96H129N21O20- PubChem (nih.gov), Son erişim tarihi:01.11.2021
- NCBI. “What is cancer?”, <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>, Son erişim tarihi: 02.11.2021
- NCBI. “5-Fluorouracil Chemistry Structure”, 5-Fluorouracil | C4H3FN2O2- PubChem (nih.gov), Son erişim tarihi:24.12.2021
- Ohana, J., Sandler, U., Kass, G., Stemmer, S.M., Devary, Y. (2017) “dTCApFs, a derivative of a novel human hormone peptide, induces apoptosis in cancer cells through a mechanism involving loss of golgi function”, *Molecular and Clinical Oncology*, 7(6), 991-999
- Rampone, B., Schiavone, B., Martino, A., Viviano, C., Confuorto, G. (2009) “Hepatoselüler karsinomun mevcut yönetim stratejisi”, *Dünya J Gastroenterol*, 15(26), 3210-3216
- Sandler, U., Devary, O., Braitbard, O., Ohana, J., Kass, G., Rubinstein, A. M., Friedman Z. Y., Devary Y. (2010) “NEROFETM- A novel human hormone-peptide with

anti-cancer activity”, *Journal of Experimental Therapeutics & Oncology*, 8(4), 327-39

Sara, J. D., Kaur, J., Khodadadi, R., Rehman, Lobo, R., Chakrabari, S., Hermann, J., Lerman, A., Grothey, A. (2018) “5-fluorouracil and cardiotoxicity: a review”, *Thraapeutics Advances of Medical Oncology*, 10

Schuppan, D., Afdhal N. H. (2008) “Liver cirrhosis”, *Lancet*, 371, 838–51

Sezginer, H., Dane, F. (2016) “Toksik maddelerin genotoksik analiz yöntemleri”, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 9 (1), 50-55

Siddiqui, M. A., Siddiqui, H. H., Mishra, A., Usmani, A. (2018) “Epidemiology of hepatocellular carcinoma, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(12), 5050-5059

Smyth, D. R., ve Evans, H. J. (1976). “Mapping of sister-chromatid exchanges in human chromosomes using G-banding and autoradiography”. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 35(1), 139-154

Stemmer, S. M., Benjaminov, O., Silverman M. H., Sandler, U., Purim, O., Sender, N., Meir, C., Oren-Apoteker, P., Ohana, J., Devary, Y.(2018) “A phase I clinical trial of dTCaPs, a derivative of a novel human hormone peptide, for the treatment of advanced/metastatic solid tumors”, *Molecular and Clinical Oncology*, 8(1), 22-29

Sezginer, H., Dane, F. (2016) “Toksik maddelerin genotoksik analiz yöntemleri”, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 9 (1), 50-55

Şekeroğlu, Z. A., Şekeroğlu, V. (2011) “Genetik toksisite testleri”, *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4(3), 221-229

Takayama, T. (2011) “Surgical Treatment for hepatocellular carcinoma”, *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 41(4), 447-454

Tanaka, F., Fukuse, T., Wada, H., Fukushima, M. (2000) “The history, mechanism and clinical use of oral 5- Fluorouracil derivative chemotherapeutic agents”, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 1(2), 137-164

Taylor, T. “Liver”, [https://www.innerbody.com/image\\_digeov/card10-new2.html](https://www.innerbody.com/image_digeov/card10-new2.html), Son erişim tarihi:02.11.2021

Teufel, A., Staib, F., Kanzler, S., Weinmann, A., Schulze-Bergkamen, H., Galle, P. R. (2007) “Genetics of hepatocellular carcinoma”, *World J Gastroenterol*, 13(16), 2271-2282

Thundimadathil, J. (2012) “Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects”, *Journal of Amino Acids*, 2012: 967347.

Tinkle, C. L., Haas-Kogan, D. (2012) “Hepatocellular carcinoma: natural history, current management, and emerging tools”, *Biologics*, 6: 207–219

- Tokur, O., Aksoy, A. (2017) “In vitro sitotoksiste testleri”, *Dergipark*, 6(1), 112-118
- Uzen, R., Tomatir, A. G., Cucer, N., Altuntas, H. D. (2019) “Comet assay and applications”, *International Journal of Scientific and Technological Research*, 5(5), 9-16
- Varolgu ne , H., İnan, A., Kaptano lu, E., Demirci, S. (1997) “Primer ve metastatik karaci er t m rlerinde tedavi yöntemleri”, *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 50(4), 209-230
- Valeriote, F., Santelli, G. (1984) “5-Fluorouracil (FUra)”, *Pharmac. Ther.*, 24, 107-132
- Wei, Y., Yang, P., Cao, S., Zhao, L. (2018) “The combination of curcumin and 5-fluorouracil in cancer therapy”, *Archives of Pharmacal Research*, 41:1-13
- Weinber, R. A. (1996) “How cancer arises”, *What you need to know about cancer*, Scientific American, 62-72
- Wu, D., Gao, Y., Qi, Y., Chen, L., Ma, Y., Li, Y. (2014) “Peptide-based cancer therapy: Opportunity and challenge”, *Cancer Letters*, 28;351(1), 13-22
- Uzunköy, A. (2009) “Current management of hepatocellular carcinoma”, *J Surg Arts*, 2(2), 7-1
-  zen, R., Tomatır, A., C cer, N., ve Altunta , H. (2019). “Comet assay and applications”, *International Journal of Scientific and Technological Research*, 5(5).
- Xie, M., Liu, D., Yang, Y. (2020) “Anti-cancer peptides: classification, mechanism of action, reconstruction and modification”, *Open Biology*, 10(7)
- Yazıcı, O., Bahar, K. (Mart 2008) “Hepatosellüler karsinomda yeni tanı ve tedavi yöntemleri”, *G ncel Gastroentoloji*, 12(1), 47-52
- Yim, S. Y., Lee, J. (2021) “An overview of the genomic characterization of hepatocellular carcinoma”, *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, 8, 1077–1088
- Y zba ıo lu, D., Zengin, N.,  nal, F. (2014) “Gıda koruyucuları ve genotoksiste testleri”, *Gıda (Derleme)*, 39 (3): 179-186
- Zhang, N., Yin, Y., Xu, S. J., Chen, W.S. (2008) “5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies”, *Molecules*, 13(8), 1551-1569
- Zucman-Rossi, J. (2010) “Molecular classification of hepatocellular carcinoma”, *Digestive and Liver Disease*, 42(3), 235-41



**EKLER**

### **Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar**

Çetintaş, D., Çolak, D. A., Bayrak, N., Harurluoğlu, Ü. (2021) “Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using Momordica charantia extract: Evaluation of antioxidant activity and survival rate on fruit flies”, **3rd International Conference on Agricultural, Biological and Life Science**, Edirne, pp. 78-85

