



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

YENİ BİR ANTİMİKROBİYAL PEPTİDİN A549 HÜCRE SOYUNDA OLASI ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayan HUSEYİNZADE

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT**

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

Ocak, 2022

İSTANBUL

İntihal Programı Beyanı

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

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2020-36963 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

The Antiproliferative and Cytotoxic Effect of Cryptonin on the A549 Cell Line
Huseynzade A., Sancar S., Bolkent Ş.
4. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences-EurasianBioChem
2021, 24-26 November.

ÖNSÖZ

İlk önce en büyük ve sonsuz teşekkürlerimi Azerbaycan'dan Türkiye'ye gelip eğitimimi geliştirmem için hep bana destek olan, her zaman yanımda olan aileme; bana öğrenmeyi, her zaman nasıl ileri gidebileceğimi öğreten, herkese örnek olan babam Akif GULİYEVA'ya; küçüklüğümünden beri her zaman benim elimden tutup bana okumam için destek olan annem Samira GULİYEVA'ya ve tatlı kız kardeşim Nermin GULİYEVA'ya bildiriyorum.

Yüksek lisansa kabul olduğum ilk günden beri her zaman bilgilerini, zamanını esirgmeden bana her koşulda, her sorunumda destek olan, bilimde bana yol gösteren, bilgileriyle bana katkıda bulunan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT'e çok çok teşekkür ederim.

Tüm zorluklara rağmen tatlı, pozitif enerjisiyle laboratuvarımıza güzel enerji saçan, tüm bilgilerini bana aktaran ve yardım eden, beni motive eden canım hocam Dr. Öğr. Üyesi Serap SANCAR'a büyük teşekkürlerimi sunarım.

Çalıştığım zamanlarda ne zaman bir sorum olsa, yardım istesem hep bana güler yüzüyle, canla başla yardım eden Prof. Dr. Selda OKTAYOĞLU'na; yardımlarından dolayı Prof. Dr. Füsun ÖZTAY'a; Doç. Dr. Ayşe Karatug KAÇAR'a sonsuz teşekkürlerimi iletiyorum.

Anlamadığım yöntemleri sorduğumda, herhangi bir sorunum olduğunda hemen bana yardım eden sadece hocam değil, aynı zamanda çok çok sevdiğim birisi olan Araş. Gör. Merve ERÇİN'e; tatlı gülüşüyle laboratuvarımıza güzel enerji saçan yardımsever sevgili Araş. Gör. Merve YILDIRIM'a; çok yardımcı olan Araş. Gör. Öyküm GENÇ'e; beni ara sıra sinirlendirse de yardım istediğimde her zaman yardımcı olan Uzm. Biyolog Ertan ÇELİK'e ve Uzm. Biyolog Suna BEKTAŞ'a teşekkür etmeyi borç bilirim.

İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Prof. Dr. Ercan Arıcan'a proteomik laboratuvarında fluorometre cihazını, buz makinesini ve görüntüleme cihazını kullanmama izin verdiği için, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Pınar AKSOY'a deneylerim sırasında görüntüleme cihazını kullandırdıkları için teşekkürlerimi sunuyorum.

Hem ev, hem çalışma, hem yakın arkadaşım her şeyimizi birlikte böldüğümüz; her zaman birlikte olduğum, dertlerimizi bölüştüğümüz canım arkadaşım Uzm. Biyolog Gülnar MAHMUDOVA'ya büyük teşekkürlerimi sunarım.

Ocak 2022

Ayan HUSEYİNZADE

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xiii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. KANSER	4
2.2. AKCİĞER KANSERİ	6
2.3. HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARININ KANSERDE ROLÜ	9
2.3.1. Apoptotik Hücre Ölümü ve Kanser	10
2.3.2. Nekrotik Hücre Ölümü ve Kanser	14
2.3.3. Otofajik Hücre Ölümü ve Kanser	16
2.4. ANTİMİKROBİYAL PEPTİDLER VE MEKANİZMALARI	19
2.4.1. Akciğer Kanserinde Antimikrobiyal Peptidler	21
2.4.2. Antikanser İlaçlar	22
2.5. KRİPTONİN	22
2.6. DOKSORUBİSİN	24
3. MALZEME VE YÖNTEM	26
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	26
3.2. KRİPTONİN'İN ÇÖZÜLMESİ VE SULANDIRILMASI	27
3.3. HÜCRE CANLILIK TESTİ	27
3.4. LAKTAT DEHİDROGENAZ SALINIMININ ÖLÇÜMÜ	28
3.5. AKRİDİN ORANJ VE ETİDYUM BROMİD İLE HÜCRE ÖLÜM ŞEKLİNİN MORFOLOJİK TAYİNİ	29
3.6. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN HÜCRE İÇİ SEVİYELERİNİN ÖLÇÜLMESİ	30
3.7. PROTEİN MİKTARININ BRADFORD YÖNTEMİ İLE TAYİNİ	30

3.8. WESTERN BLOTLAMA YÖNTEMİ	31
3.8.1. SDS-PAGE Jelin Hazırlanması	32
3.9. İSTATİKSEL ANALİZ.....	34
4. BULGULAR	35
4.1. KRİPTONİN'İN A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARINDA HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ.....	35
4.2. KRİPTONİN'İN A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARINDA SİTOTOKSİK ETKİSİ.....	37
4.3. KRİPTONİN'İN A549 HÜCRELERİNİN SİTOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİLERİ	39
4.4. KRİPTONİN'İN A549 HÜCRE İÇİ REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ	42
4.5. A549 HÜCRELERİNDE KRİPTONİN'İN HÜCRE ÖLÜMÜ İLE İLGİLİ BAZI PROTEİN SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ	43
4.6. A549 HÜCRELERİNDE TEK BAŞINA DOKSORUBİSİN'İN VE DÜŞÜK DOZLARDA DOKSORUBİSİN İLE KRİPTONİN'İN HÜCRE CANLILIK TESTİ BULGULARI.....	46
4.7. A549 HÜCRELERİNDE DÜŞÜK DOZLARDA DOKSORUBİSİN İLE KRİPTONİN'İN BİRLİKTE UYGULAMASININ HÜCRE ÖLÜMÜ İLE İLGİLİ BAZI PROTEİNLERİN SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ.....	48
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	50
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ	70

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** 2020'de (A) erkekler ve (B) kadınlar arasında yüksek/çok yüksek İnsan Gelişim Endeksi (İGE) ülkelerine karşı düşük/orta İGE ülkelerinde yaşa göre standardize edilmiş görülme sıklığı (insidans) oranı ve ölüm oranı (mortalite). Dünyada en yaygın 15 kanser, her iki cinsiyet için toplam yaşa göre standardize edilmiş oranda azalan sıraya göre gösterilmiştir.....7
- Şekil 2.2:** 2020'de erkekler ve kadınlar arasında akciğer kanseri için cinsiyet ile bölgeye özgü yaşa göre standartlaştırılmış insidans oranları. Bu oranlar, erkeklerde yaşa göre standardize edilmiş oran olup dünyada azalan düzene göre gösterilmiştir, erkekler ve kadınlar arasındaki en yüksek ulusal oranlar ise üst üste bindirilmiştir.....8
- Şekil 2.3.1:** Apoptoz hücrelerde mitokondriyal (içsel) ve ölüm reseptörü (dışsal) yolları ile gerçekleşir. Mitokondriyal yol Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından düzenlenir.....13
- Şekil 2.3.2:** Nekroinflamasyonun sistemik yayılımı. Programlanmış nekroz veya ölmekte olan hücrelerin kusurlu efferositozu lokal inflamasyonu başlatabilir. Nekrotik hücrelerden ve daha sonra aktive edilen immün hücrelerden türetilen Damp'lar ve proinflamatuvar sitokinler, daha fazla hücrede programlanmış nekrozu güçlendiren sinyallerdir. Kısır ölüm döngüsünün devam etmesi, bariyer fonksiyonunun zarar görmesine, nekroinflamasyonun sistemik olarak yayılmasına ve sonuçta yıkıcı çoklu organ yetmezliğine neden olabilir.....15
- Şekil 2.3.3:** Otofaji yolağı. Otofaji, yukarıdaki adımları içeren çok adımlı bir işlemdir: başlatma, çekirdeklenme, uzama, olgunlaşma ve lizozom ile füzyon. Otofajiye bağlı genler olarak adlandırılan birkaç protein bu süreci düzenler. Otofaji bazal koşullar altında uyarılır ve stres, örneğin besin yoksunluğu ile indüklenir. ATG: Otofaji ile ilişkili genler; ER: Endoplazmik retikulum; Atg1 homologu olan 200 kD'luk ULK ile etkileşen protein; LC3: Hafif zincir 3; PE: Fosfatidiletanolamin; PI3P: Fosfatidilinositol-3-fosfat 3; ULK1: Unc-51 benzeri kinaz 1; VPS34: Vakuol protein PI3K, PI3-kinaz aktivitesine sahip vakuolar protein 34.....17
- Şekil 2.4:** Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin membran sistemleri ve AMP'lerin sitoplazmik membran üzerindeki etki mekanizmaları. Gram negatif bakteriler için, AMP'nin sitoplazmik membrana ulaşmadan önce dış membrana nüfuz etmesi gerekirken, gram pozitif bakteriler için AMP'nin sadece nano boyutlu gözenekler yoluyla peptidoglikan tabakadan yayılması gerekir. AMP sitoplazmik membrana adsorpsiyondan sonra, membran gözeneklerini indükleyebilir veya membranı birleştirebilir.....20
- Şekil 2.5:** Kriptinin'in α -sarmal tekerlek diagramı. α -sarmalın oluşturulmasını ve hidrofilik özelliğin belirlenmesini öngören katyonik amino asitler kalın olarak temsil edilir.....23
- Şekil 2.6:** Doksorubisin'in formülü.....25
- Şekil 4.1.** (A) 6, 12 ve 24 saat boyunca uygulanan kriptonin A549 hücre canlılığını doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$). (B) 6, 12 ve 24 saat boyunca uygulanan kriptonin BEAS-2B hücre canlılığını doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$).....36

- Şekil 4.2.** 6, 12 ve 24 saat boyunca kriptonin uygulaması hücrelerden salınan LDH enzimini doza bağlı olarak (A) A549 hücrelerinde ve (B) BEAS-2B hücrelerinde anlamlı bir şekilde arttırmıştır (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$).....38
- Şekil 4.3.1:** Kriptonin ile 24 saat boyunca peptid uygulaması sonrası hücrelerin ışık mikroskopundaki görüntüleri. (A) Kontrol grubu, (B) 10 µg/ml konsantrasyonda peptid uygulanan hücreler; (C) 25 µg/ml konsantrasyonda peptid uygulanan hücreler; (D) 50 µg/ml konsantrasyonda peptid uygulanan hücreler; (E) 100 µg/ml konsantrasyonda peptid uygulanan hücreler; (F) 200 µg/ml konsantrasyonda peptid uygulanan hücreler. ➡ : Normal şeklini kaybeden hücreler. Bar: 100 µm.....40
- Şekil 4.3.2:** Kriptonin ile 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda uygulanmış ve peptid uygulaması sonrası Akridin Oranj ve Etidyum Bromür ile hücreler boyanarak floresan mikroskopunda görüntülenmiştir. Artan peptid konsantrasyonuna paralel olarak canlı hücre (beyaz ok) sayısı azalmış ve nekrotik hücre (sarı ok) sayısı artmıştır. Bar: 100µm.....41
- Şekil 4.4:** 24 saat boyunca uygulanan kriptonin hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerini kontrole göre sadece 100 ve 200 µg/ml dozlarında anlamlı olarak arttırmıştır (* $p<0.05$).....42
- Şekil 4.5.1** (A) 24 saat kriptonin uygulaması sonrası hücre lizatında kaspaz-3, Bax, Atg5 ve Beclin-1 protein ifadelerindeki değişimler (* $p<0.05$) (** $p<0.01$) (** $p<0.001$). Yükleme kontrolü olarak β-Aktin kullanılmıştır. (B) 24 saat kriptonin uygulaması sonrası hücre lizatında LC3I/II protein ifadesindeki değişimler (** $p<0.01$). Yükleme kontrolü olarak β-Aktin kullanılmıştır.....44
- Şekil 4.5.2.** (A) 24 saat kriptonin uygulaması sonrası hücre lizatında HMGB1 protein ifadelerindeki değişimler (* $p<0.05$). Yükleme kontrolü olarak β-Aktin kullanılmıştır. (B) Kriptonin uygulaması sonrası hücre kültür medyumunda belirlenen HMGB1 seviyelerindeki değişimler (* $p<0.05$). Eşit protein yüklemesi membranların Ponceau S boyanması ile kontrol edilmiştir.....45
- Şekil 4.6.** (A) Doksorubisin'in A549 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri. 48 saatlik uygulamada 5 µM ve 10 µM doksorubisin uygulamasından itibaren (** $p<0.001$), 72 saatlik uygulamada ise 0.1 µM doksorubisin uygulamasından itibaren (** $p<0.01$, *** $p<0.001$) hücre canlılığında azalma gözlenmiştir. (B) 1 µM doksorubisin ve 1, 2.5, 5 ve 10 µg/ml kriptonin kombinasyonları tek başına doksorubisin uygulamasına göre hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azaltmıştır (# $p<0.05$; ## $p<0.01$; ### $p<0.001$). C. 5 µM doksorubisin ve 1, 2.5, 5 ve 10 µg/ml kriptonin kombinasyonları uygulandığında ise sadece 5 µg/ml kriptonin uygulanan dozda doksorubisine göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir.....47
- Şekil 4.7:** (A) 48 saat doksorubisin ve doksorubisin+kriptonin uygulaması sonrası hücre lizatında aktif kaspaz-3 ifadelerindeki değişimler (* $p<0.05$) (** $p<0.001$) kontrole göre; (### $p<0.001$) 1 µM doksorubisine göre. Yükleme kontrolü olarak β-Aktin kullanılmıştır. (B) 48 saat doksorubisin ve doksorubisin+kriptonin uygulaması sonrası hücre lizatında LC3I/II ifadelerindeki değişimler (# $p<0.05$) 1 µM doksorubisine göre; (** $p<0.001$) kontrole göre; (ψψψ $p<0,01$) 5 µM doksorubisine göre . Yükleme kontrolü olarak β-Aktin kullanılmıştır.....49

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.8.1.A: SDS-PAGE içeriği.....33

Tablo 3.8.1.B: Western blotlama esnasında kullanılan antikorlar.....33



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

α	: Alfa
β	: Beta
%	: yüzde

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
AMP	: Antimikrobiyal peptid
APAF-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör
ATG	: Otofajiyle ilişkili gen
ATP	: Adenozin trifosfat
BSA	: Sığır serum albumin
C-FLIP	: FLICE-inhibitör protein
CO ₂	: Karbon dioksit
CQ	: Klorokin
DCDFA	: 2',7' diklorofloresin diasetat
DISC	: Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye Eagle medyum
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
ER	: Endoplazmik retikulum
FBS	: Fetal sığır serumu
HDP	: Konak savunma peptidleri

HMGB1	:Yüksek mobilite grup B1 proteini
IAP	: Apoptoz proteinlerinin inhibitörü
İGE	: İnsan gelişim endeksi
KHAK	: Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	: Küçük hücre dışı akciğer kanseri
LDH	: Laktat dehidrogenaz
ml	: Mililitre
mTOR	: Rapamisinin memeli hedefi
mTORC	: Memeli hedefli rapamisin kompleksi
MTT	: 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il] -2,5 difeniltetrazolyum bromid
NF	: Normal fibroblast
nm	: Nanometre
PBS	: Fosfat tamponlu tuz
PE	: Fosfatidiletanolamin
PES	: Penisilin streptomisin
PI3P	: Fosfatidilinositol-3-fosfat
RNA	: Ribonukleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi
TCA	: Trikarboksilik asit
TNBC	: Üçlü negatif meme kanseri
ULK1	: Unc-51 benzeri kinaz 1
VPS34	: Vakuol protein sıralama 34

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YENİ BİR ANTİMİKROBİYAL PEPTİDİN A549 HÜCRE SOYUNDA OLASI ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayan HUSEYNZADE

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT

II. Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Serap SANCAR

Antimikrobiyal peptitler (AMP), böceklerden memelilere kadar doğuştan gelen bağışıklık sisteminde önemli roller oynayan moleküllerdir. Bu peptitlerin inflamasyon ve enfeksiyonlarda bağışıklık sistemini düzenlediği, lipopolisakkaritleri nötralize ettiği ve adaptif immün yanıtları düzenleyerek gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkili olduğu bilinmektedir. Akciğer kanseri dünya çapında %14'lük bir prevalansa sahip olup, küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olmak üzere iki alt tipi vardır. Son yıllarda, AMP'ler potansiyel antikanser ilaçlar olarak dikkat çekmektedir. Bu çalışmanın amacı, kriptonin'in A549 hücrelerinde olası antikanser etkilerini araştırmaktır. Bu AMP ilk olarak *Cryptotympana dubia*'nın hemolenfinde tanımlanmış olup, 24 amino asit uzunluğunda, %50 hidrofobik ve +8 net yüke sahiptir. Bu peptit, gram negatif ve gram pozitif bakteriler üzerinde de etkilidir ve antibakteriyel aktiviteye sahiptir. Kriptonin'in antikanser aktivitesini belirlemek için hücre kültüründe büyütülen A549 ve BEAS-2B hücreleri, bu AMP'ye farklı konsantrasyonlarda maruz bırakıldı. Peptit uygulaması sonrası hücre canlılığı, laktat dehidrogenaz salınımı (LDH), reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu ve morfolojik değişiklikler araştırıldı. Morfolojik değişiklikler invert mikroskop ve akridin oranj/etidyum bromür boyama yöntemi ile incelenmiştir. Kriptonin doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttı ve LDH salınımını artırdı. Kriptonin ayrıca yüksek dozlarda ROS'u yükseltti ve şişmiş hücre morfolojisine neden oldu. 24 saat boyunca artan peptit konsantrasyonuna paralel olarak etidyum bromür ile boyanmış çekirdeklere sahip nekrotik hücre sayısında artış gözlemlendi. A549 hücrelerinde kaspaz-3, Bax, Atg5, Beclin1, LC3B, HMGB1 ekspresyonunu saptamak için kullanılan western blot analizi ile kriptonin'in A549 hücrelerinde bütün bu proteinleri doza bağlı anlamlı olarak azalttığını ve

hücre ölümünün apoptoz ve otofaji ile değil, nekroz ile oluştuğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, kriptonin'in doksorubisin ile olası sinerjistik etkileri de araştırılmıştır. 24, 48 ve 72 saat doksorubisin uygulaması doza bağlı olarak hücre canlılığını azaltmıştır. Ayrıca 48 saat 1, 2.5, 5 ve 10 µg/ml kriptonin ile 1µM doksorubisin kombine uygulaması tek başına doksorubisin uygulamasına kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya yol açarken, 48 saat aynı düşük dozlarda kriptonin ile 5µM doksorubisin kombine uygulaması sonucu sinerjistik etki sadece 5µg/ml kriptonin ve 5µM doksorubisin kombinasyonu dozda gözlenmiştir. 48 saat 1 µM doksorubisin uygulanması ile aktif kaspaz 3 protein seviyesi kontrole göre anlamlı olarak artarken, LC3B protein seviyesi azalmıştır. 1 µM doksorubisin ile 5 µg/ml kriptonin uygulaması ise tek başına 1 µM doksorubisin uygulanmasına göre kaspaz-3 seviyesini anlamlı olarak azaltırken, LC3B seviyelerini anlamlı olarak artırmıştır. 5 µM doksorubisin ile 5 µg/ml kriptonin uygulamasının ise kontrole göre kaspaz-3 ve LC3B seviyelerini anlamlı olarak azaltırken, tek başına 5 µM doksorubisin uygulanmasına göre sadece LC3B seviyelerini anlamlı olarak azaltmıştır. Sonuç olarak, bu bulgular kriptonin'in akciğer kanseri hücreleri üzerinde antikanserojen bir etki gösterdiğini ve kemoterapötik etki potansiyeline sahip olduğunu, ayrıca kriptonin ve doksorubisin kombine uygulamasının ise sinerjistik antikanser etki göstererek daha düşük dozlarda etkili olduğunu göstermiştir.

Ocak 2022, 85 sayfa.

Anahtar kelimeler: Akciğer kanseri, antimikrobiyal peptitler, kriptonin, A549 hücreleri, doksorubisin, sinerjistik etki, sitotoksosite, hücre ölümü.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF POSSIBLE EFFECTS OF A NEW ANTIMICROBIAL PEPTIDE ON A549 CELL LINE

Ayan HUSEYNZADE

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT

Co-Supervisor : Assist. Prof. Dr. Serap SANCAR

Antimicrobial peptides (AMP) are molecules that play important roles in the innate immune system from insects to mammals. It is known that these peptides regulate the immune system in inflammation and infections, neutralize lipopolysaccharides, and are effective against gram positive and gram negative bacteria by regulating adaptive immune responses. Lung cancer has a prevalence of 14% worldwide and has two subtypes as small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC). In recent years, antimicrobial peptides have gained attention as potential anticancer drugs. The aim of this study was to investigate the possible anticancer effects of cryptonin in A549 cells. This AMP is firstly defined in hemolymph of Cicada, *Cryptotympana dubia* and has 24 amino acids long, 50% hydrophobicity and +8 net charge. This peptide is also effective on gram-negative and gram-positive bacteria and has antibacterial activity. In order to determine the anticancer activity of cryptonin, A549 cells grown in cell culture were exposed to this AMP at different concentrations. Cell viability, LDH release, ROS levels and morphological changes after peptide treatment were investigated. Morphological changes were examined by inverted microscope and acridine orange/ethidium bromide staining method. Cryptonin reduced cell viability and increased LDH release in dose dependent manner. Cryptonin also increased the reactive oxygen species in high doses and led swollen cell morphology. Increased number of necrotic cells having nuclei stained with ethidium bromide was observed parallel to increasing peptide concentration for 24h. Western blot analysis used to detect the expression of Caspase-3, Bax, Atg5, Beclin1, LC3B, HMGB1

in A549 cells revealed that all these proteins were dose-dependently decreased in A549 cells by cryptonin, and cell death occurred by necrosis, not apoptosis and autophagy. The possible synergistic effects with doxorubicin were also investigated. Doxorubicin administration for 24, 48 and 72 hours decreased cell viability in a dose-dependent manner. In addition, the combined application of 1, 2.5, 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$ cryptonin and 1 μM doxorubicin for 48 hours caused a significant decrease in cell viability compared to doxorubicin alone, while the synergistic effect as a result of the combined application of 5 μM doxorubicin and cryptonin at the same low doses for 48 hours was only observed at the combined application of 5 $\mu\text{g/ml}$ cryptonin and 5 μM doxorubicin. With the administration of 1 μM doxorubicin for 48 hours, the level of active caspase 3 protein increased significantly compared to the control, while the level of LC3B protein decreased. The combined application of 1 μM doxorubicin and 5 $\mu\text{g/ml}$ cryptonin significantly decreased caspase-3 levels and significantly increased LC3B levels compared to the application of 1 μM doxorubicin alone. Application of 5 μM doxorubicin and 5 $\mu\text{g/ml}$ cryptonin significantly decreased caspase-3 and LC3B levels compared to the control and LC3B levels compared to the application of 5 μM doxorubicin. In conclusion, these findings showed that cryptonin has an anticarcinogenic effect on lung cancer cells and has the potential for chemotherapeutic effects, also showed that the combined application of cryptonin and doxorubicin was effective at lower doses by showing a synergistic anticancer effect.

January 2022, 85 pages.

Keywords: Lung cancer, antimicrobial peptides, cryptonin, A549 cells, doxorubicin, synergistic effect, cytotoxicity, cell death.

1. GİRİŞ

2020 yılında dünya çapında yaklaşık 19.3 milyon yeni kanser vakası ve 10 milyon kanser kaynaklı ölüm olduğu tahmin edilmektedir. 75 yaş öncesi bir insanın ömrü boyunca kansere yakalanma riski yaklaşık %20 iken, kanserden ölme riski %10'dur. Bu da beş kişiden birinin yaşamı boyunca kanser olacağı ve her 10 kişiden birinin bu hastalıktan öleceği anlamına gelir. 2020'de tahmini 2.26 milyon yeni vaka ile kadınlarda meme kanseri dünya çapında en sık teşhis edilen kanser haline gelmiştir ve onu 2.21 milyon ile akciğer kanseri ve 1.41 milyon ile de prostat kanseri yakından takip etmiştir. Kanserden ölümün en yaygın nedeni ise açık farkla akciğer kanseri (1.80 milyon) idi. Bunu sırasıyla, karaciğer (0.83 milyon) ve mide kanseri (0.77 milyon) izlemiştir (Ferlay ve diğ., 2021). Akciğer kanseri vakalarının %80-85'ini KHDAK oluşturur ve çoğu hastada genellikle ileri evre akciğer kanseri olarak gözlenir. Akciğer kanserini erken evrede teşhis etmek zordur ve ilerlemiş akciğer kanseri olan hastaların 5 yıl sağkalım oranı sadece %5'tir. Akciğer kanserli hastalarda, uzak organlara metastazın yanı sıra yüksek invazyon potansiyelinin mevcut olması, yukarıda belirtilen yüksek ölüm oranının nedenidir (Chen ve Lu, 2020). Akciğer kanseri, 1985'ten beri hem insidans hem de mortalite açısından dünya çapında en yaygın kanser olmuştur (Jemal ve diğ., 2011). Tüm maligniteler arasında, akciğer kanseri 2018'de bildirilen en yüksek insidans ve ölüm oranına sahip kanser olmuştur (Bray ve diğ., 2018).

İleri evre ve tekrarlayan akciğer kanserinin prognozu kötüdür ve sitotoksik antikanser ilaçları ile standart tedavilerin sınırlı terapötik etkileri vardır. Son zamanlarda, kanser için genetik testin ve immünoterapilerin sonuçlarına dayanan moleküler olarak hedeflenen ilaçların geliştirilmesiyle, KHDAK tedavileri dikkate değer bir gelişme göstermiştir. Kanser için moleküler olarak hedeflenen ilaçlar, kanser hücreleri ile normal hücreler arasında genom ve molekül seviyelerde ayırım yapabilir. Moleküler hedefli bu ilaçlar kanser büyümesi ve metastazı için gerekli molekülleri spesifik olarak baskılayarak etkilerini gösterirler. Sitotoksik ilaçlar, ilaç keşfi ve terapi tasarımı aşamasından moleküler hedefleri tanımladıkları için birbirinden farklıdır ve bu ilaçların hedefleri genellikle özellikle tedavi için öngörülen biyobelirteçlerdir (Onoi ve diğ., 2020). Akciğer kanseri, KHDAK ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olmak üzere iki farklı histolojik alt tipden oluşur. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki tüm akciğer kanseri vakalarının sırasıyla %76'sını KHDAK ve %13'ünü KHAK oluşturur (Howlader ve

diğ., 2020). Bu alt tipler için insidans eğilimleri iyi tanımlanmış olsa da, mortalite eğilimleri hakkında daha az şey bilinmektedir (Meza ve diğ., 2015; Lewis ve diğ., 2014; Yu ve diğ., 2014). Hedefli tedaviler ve immünoterapilerin ortaya çıkmasıyla KHDAK tedavisinde önemli gelişmeler kaydedilmiştir.

Konakçı savunma peptitleri olarak da adlandırılan antimikrobiyal peptitler (AMP'ler) antifungal, antiviral, antibakteriyel ve antikanser aktivite bakımından geniş bir spektruma sahiptirler. Akciğer kanseri küresel kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir. Ne yazık ki, akciğer kanseri kemoterapisine ciddi yan etkiler, spesifik olmayan toksisite ve çoklu ilaç direnci eşlik etmektedir. Bu nedenle, bu dezavantajların üstesinden gelmek için, AMP'lerden türetilen antikanser peptitlerin (ACP'ler), akciğer kanseri için potansiyel umut verici bir sinerjistik tedavi stratejisi olabileceği ileri sürülmektedir (Zandsalimi ve diğ., 2020). Antimikrobiyal peptidler amino asit dizisi ve sekonder yapıları bakımından önemli farklılıklar göstermektedir (Falanga ve diğ., 2017). Bu peptidlerin çoğunun net yükleri nötral pH'da +2 ila +9 arasında değişmektedir (Bahar ve diğ., 2013). Antimikrobiyal peptidlerin bu katyonik özelliği lizin ve arjinin gibi sahip oldukları bazik amino asitlerden kaynaklanmaktadır (Graf ve diğ., 2019). Diğer yandan, bu peptidler 5-40 arasında amino asit içeren kısa peptidlerdir ve amino asitlerin %30 veya daha fazlası hidrofobik özelliktedir (Aisenbrey ve diğ., 2019). Amfipatiklik dışında, amino asit dizisi, hidrofobiklik, net yük, membranla etkileşim esnasındaki yapısal katlanma, membran kompozisyonu, oligomerizasyon ve peptid konsantrasyonu gibi fizikokimyasal özellikler antimikrobiyal etkinin ortaya çıkmasında rol oynar. AMP'ler antiviral, antifungal, antimitojenik, antikanser ve antienflamatuvar özellikleri içeren geniş bir biyolojik aktivite yelpazesi gösterir. Terapötik potansiyellerinin yanı sıra, AMP'ler gıda koruyucu ve bağışıklık modülatörleri olarak da işlev görebilir. AMP'ler negatif yüklü mikrobiyal membranlara elektrostatik çekim sağlayan net pozitif yüke sahiptirler ve nötr yük içeren memeli hücre zarlarına ise nispeten zarar vermezler yani etkisizdirler (Jenssen ve diğ., 2006). AMP'lerin önemli bir özelliği de hücrelere nüfuz etmelerini ve membran lizisini indüklemelerini sağlayan hidrofobiklikleridir (Epand ve diğ., 2011). AMP'lerin amino asit dizisinin hidrofobikliğindeki artış, memeli hücrelerine karşı düşük seçicilik ve toksisitesi ile ilişkilidir (Koczulla ve diğ., 2003).

Bir antimikrobiyal peptit olan kriptonin iltihap önleyici, spazm giderici ve ateş düşürücü bir ajan olarak kullanılmıştır (Park, 2004). Kriptonin'in antibiyotik aktivitesi birçok farklı

mikroorganizma üzerinde test edilmiştir. Kriptinin 24 amino asit'ten oluşur ve lineer α -sarmal yapı oluştura bilen bir peptiddir (Park ve diğ., 2007). Sancar Baş (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, kriptinin'in meme kanseri hücrelerinde (MCF-7 ve MDA-MB-231) membranlarda por oluşturarak nekrotik yolla hücrelerin ölümüne yol açtığı gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı ise kriptinin'in akciğer A549 hücre soyunda antikanser aktiviteye sahip olup olmadığını, eğer antikanser aktivite var ise bu etkinin bu kanser hücre soyunda hangi hücre ölüm mekanizması üzerinden etkili olduğunu ve kriptinin ile doksorubisin'in sinerjistik antikanser etkisi olup olmadığını ortaya koymaktır.



2. GENEL KISIMLAR

2.1. KANSER

Kanser dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi ve biyolojik olarak hedefli tedavi, kanser tedavisi için yaygın yöntemlerdir. Bununla birlikte, kanser direnci kemoterapide yaygındır ve sıklıkla terapötik başarısızlığa yol açar (Chen ve diğ., 2018). ABD’de akciğer kanserinin her yaşta ilk önde gelen ölüm nedeni olduğu ve 5 yıllık sağ kalım oranının ise yaklaşık %18 olduğu gösterilmiştir. Yüksek ölümün ana nedeni ise çoğu kanserin, tümör biyobelirteç seviyesindeki hafif değişiklikler ve belirgin olmayan semptomlar nedeniyle erken dönemde rutin muayeneler ile teşhis edilmesinin zor olmasıdır. Kanser tedavisindeki ilerlemelerden ve kişisel alışkanlıklardaki değişikliklerden (örneğin sigara içiminin azaltılması) dolayı kanser ölümü son yirmi yılda azalmıştır (Siegel ve diğ., 2015).

Kanser gelişiminde ortaya çıkan esas anormallik, kanser hücrelerinin sürekli kontrol edilemeyen çoğalmasındır. Normal hücre davranışını kontrol eden sinyallere uygun şekilde cevap vermek yerine, kanser hücreleri kontrolsüz bir şekilde büyür, bölünür, normal dokuları ve organları istila eder ve sonunda vücuda yayılır. Kanser hücrelerinde kontrolsüz büyüme ve bölünme, çoklu hücre düzenleyici sistemlerde biriken anormalliklerin sonucudur ve bu kontrolsüz değişikliklerin tamamı kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran hücre davranışının tamamına yansır. Kanser, vücuttaki farklı hücre türlerinden herhangi birinin anormal çoğalmasından kaynaklanabilir, bu nedenle davranışları ve tedaviye yanıtları farklı olan yüzden fazla farklı kanser türü vardır. Kanser patolojisinde en önemli konu iyi ve kötü huylu tümörler arasındaki ayrımdır. Bir tümör, iyi huylu veya kötü huylu olabilen anormal hücre çoğalmasındır. İyi huylu tümörden farklı olarak kötü huylu bir tümör onu çevreleyen normal dokuyu istila edebilir, dolaşım veya lenfatik sistemler (metastaz) yoluyla vücuda yayılabilir. Kötü huylu tümörleri tehlikeli kılan istila etme ve metastaz yapma yetenekleridir (Jones ve Baylin, 2007). Metastaz, kanser hücrelerinin primer tümörden çevre dokulara ve uzak organlara yayılması olup, kanser morbidite ve mortalitesinin birincil nedenidir (Seyfied ve diğ., 2013).

Devam eden demografik ve epidemiyolojik geçişler nedeniyle, küresel kanser yükü hızla artmaktadır ve 2012'de 14 milyon olan yeni kanser vakasının 2035'de 24 milyona yükselmesi beklenmektedir (Ferlay ve diğ., 2015). 2012 yılında 14 milyon kanser vakasından 8 milyon kişi kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir. 2012 yılında dünya çapında erkekler arasında en yaygın beş kötü huylu kanser akciğer, prostat, kolorektal, mide ve karaciğer kanserleridir. 2012 yılında, 65 yaş ve üstü yetişkinlerde yaklaşık 6.7 milyon yeni kanser vakası teşhis edilmiştir. 2035 yılına gelindiğinde, yaşlılar arasındaki yeni kanser vakalarının sayısının iki katına çıkması beklenmektedir. Daha az gelişmiş ülkelerde göreceli artış daha fazla olmakla birlikte, daha gelişmiş ülkelerdeki yaşlı insanların daha yüksek oranda olması, bu bölgelerdeki mutlak artışın önemli olacağını göstermektedir (Pilleron ve diğ., 2019).

Daha yüksek İnsan Gelişim Endeksi (İGE)'ne karşı daha düşük İGE'ye sahip ülkelerde erkekler ve kadınlar için yaşa göre standartlaştırılmış kanser insidansı ve mortalite oranları belirlenmiştir. Yüksek İGE ülkelerinde erkeklerdeki insidans oranına göre akciğer kanseri ilk sırada (100.000'de 39) yer alırken, prostat kanseri ikinci sırada (100.000'de 37.5) yer almaktadır. Düşük İGE ülkelerinde ise erkeklerde insidans oranı prostat kanseri (100.000'de 11.3) ve akciğer kanseri için (100.000'de 10,3) tam tersidir (Şekil 2.1.A). Yüksek İGE ülkelerindeki kadınlara ait insidans oranlarına göre, meme kanseri ilk sırada yer alırken (100.000'de 55.9), kolorektal kanser (100.000'de 20.0) ikinci sırada yer alır. Düşük İGE ülkelerindeki kadınlarda ise insidans oranına göre ise meme kanserini (100.000'de 29.7) serviks kanseri (100.000'de 18.8) izlemektedir (Şekil 2.1.B) (Sung ve diğ., 2021).

Yüksek İGE ülkelerinde erkeklerdeki mortalite oranına göre akciğer kanseri ilk sırada (100.000'de 31.6) yer alırken, karaciğer kanser ikinci sırada (100.000'de 15.1) yer almaktadır. Düşük İGE ülkelerindeki erkeklerde ise mortalite oranı bakımından yine akciğer kanseri (100.000'de 9.4) ilk sırada yer alırken, karaciğer kanseri (100.000'de 6.7) ikinci sıradadır (Şekil 2.1.A). Yüksek İGE ülkelerindeki kadınlara ait mortalite oranlarına göre, akciğer kanseri ilk sırada yer alırken (100.000'de 13.7), meme kanseri (100.000'de 12.8) bunu izlemektedir. Düşük İGE ülkelerindeki insidans oranına göre ise meme kanserini (100.000'de 15.0) serviks kanseri (100.000'de 12.4) izlemektedir (Şekil 2.1.B) (Sung ve diğ., 2021).

Akciğer kanseri erkeklerde kanser morbidite (belirli bir zaman dilimi içerisinde hastalığa tutulanların sayısının sağlıklı kalmış nüfusa oranı) ve mortalitesinin (hastalığa bağlı bin kişi başına ölüm sayısı) önde gelen nedeni iken, kadınlarda meme ve kolorektal kanserden sonra

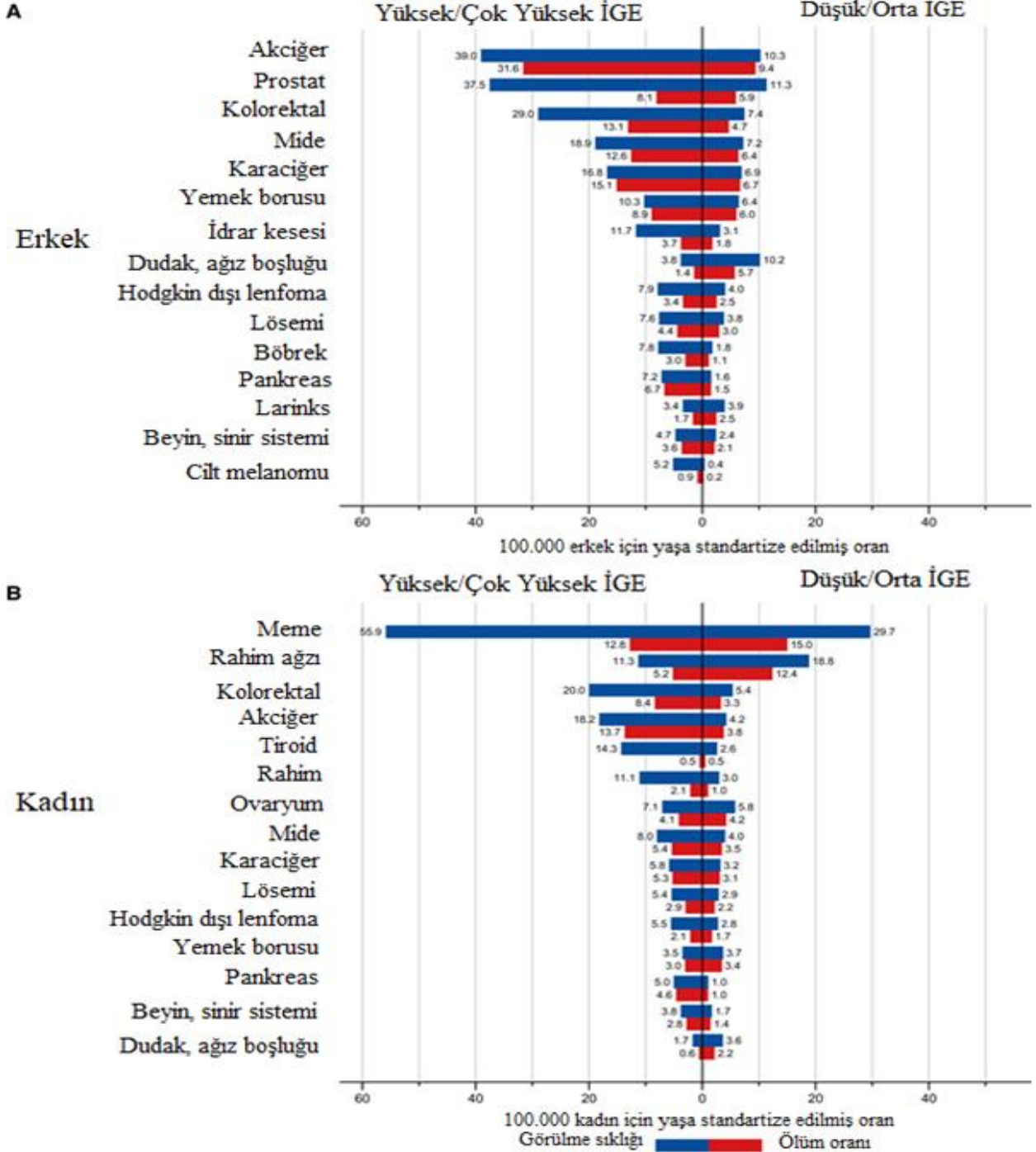
insidans açısından üçüncü, ölüm oranı açısından ise meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. İnsidans ve ölüm oranları, erkeklerde kadınlara göre yaklaşık 2 kat daha yüksektir. Ancak erkek-kadın oranı, Kuzey Amerika'da 1,2'den Kuzey Afrika'da 5,6'ya kadar, bölgeler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. En yüksek insidans oranları Mikronezya/Polinezya, Doğu ve Güney Avrupa, Doğu Asya ve Batı Asya, burada Türkiye, dünyada erkekler arasında en yüksek orana sahiptir. En yüksek insidans oranları ise Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa, Mikronezya/Polinezya ve Avustralya/Yeni Zelanda ile Macaristan, ülkeye özgü en yüksek oranlara sahiptir (Şekil 2.2) (Sung ve diğ., 2021).

Türkiye'de akciğer kanseri erkeklerde en sık görülen kanser olup, 2016 yıllık sağlık istatistiklerine göre oran %52.5'tir. Akciğer kanserini sırasıyla prostat, kolorektal, mesane ve mide kanseri takip eder. Kadınlarda, en sık görülen kanser %43'lük oran ile meme kanseridir. Meme kanserini sırasıyla tiroid, kolorektal, uterus korpus ve akciğer kanseri takip eder. Kanser, yüksek mortalite ve morbiditenin yanı sıra tedavi, süre ve yan etkilerin maliyeti nedeniyle en önemli sağlık sorunlarından biridir. Birçok kanser türünden sigara, enfeksiyon, radyasyon gibi risk faktörlerine maruz kalmaktan kaçınarak korunabilir (Serin ve diğ., 2018).

2.2. AKCİĞER KANSERİ

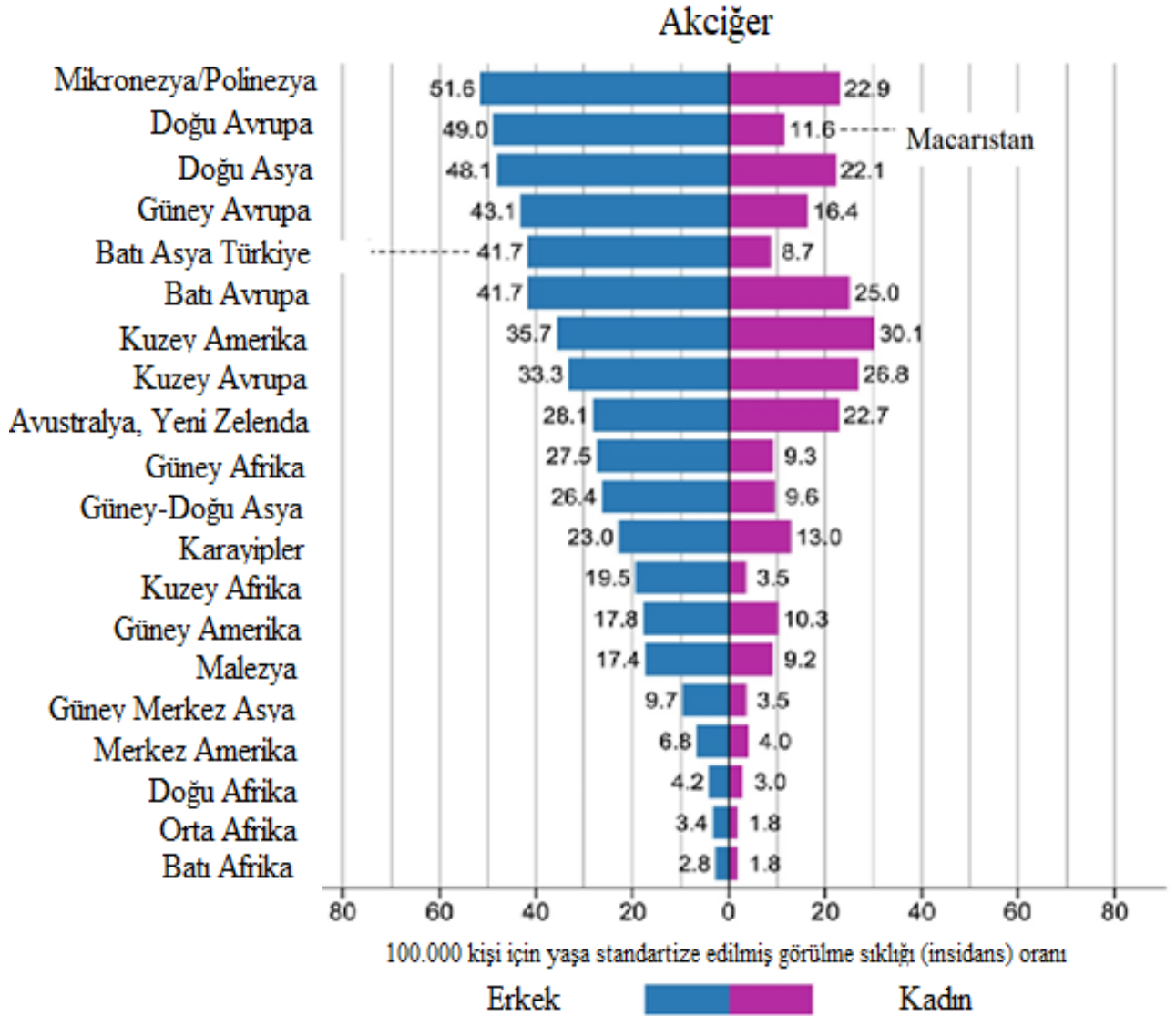
1985'ten beri akciğer kanseri dünya çapında en yaygın ve ölümcül kanser olmuştur. Kanser tedavisindeki ilerlemelere rağmen, akciğer kanseri hala geç tanı nedeniyle kötü prognoza sahiptir (Fitzmaurice ve diğ., 2015). Epidemiyolojik çalışmalar, zaman içinde akciğer kanserinin çeşitli patolojik alt tiplerindeki farklılıklar özellikle sigara içimi olmak üzere çeşitli risk faktörlerine maruz kalmadaki değişikliklere atfedilir (Debieuvre ve diğ., 2016). Sigaraya maruz kalmadaki herhangi bir değişiklik, 5 ile 50 yıl sonra akciğer kanseri insidansına ve ölümüne yansiyabilir (Mowls ve diğ., 2015). Kimyasallar, hava kirliliği, kapalı alanlarda radon, akciğer hastalığının diğer risk faktörleri ve genetik yatkınlık ile birlikte radyasyon akciğer kanserine neden olabilir (Schwartz ve diğ., 2016). Akciğer kanseri, hem ABD'de hem de dünya çapında kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir ve 5 yıllık sağ kalım oranı %20'dir. Akciğer kanseri dünya çapında tüm yeni kanser vakalarının yaklaşık %14'ünü oluşturmaktadır. Akciğer kanseri, hem Amerika Birleşik Devletleri (ABD) hem de Çin'deki tüm kanserler arasında en yüksek ölüm oranına sahiptir. Akciğer kanseri, ABD'deki tüm kanser ölümlerinin

%25'ine ve Çin'de %30'una katkıda bulunur. İnsidans açısından, akciğer kanseri ABD'de ikinci ve Çin'de ilk sırada yer almaktadır (Zeng ve diğ., 2016). Hastalık etkisi benzer olsa da, iki ülke farklı zamansal eğilimler söz konusudur (Barta ve diğ., 2019).



Şekil 2.1: 2020'de (A) erkekler ve (B) kadınlar arasında yüksek/çok yüksek İnsan Gelişim Endeksi (İGE)'ne sahip ülkelere karşı düşük/orta İGE ülkelerinde yaşa göre standardize edilmiş görülme sıklığı oranı (insidans) ve ölüm oranı (mortalite). Dünyada en yaygın 15 kanser, her iki cinsiyet için toplam yaşa göre standardize edilmiş oranda azalan sıraya göre gösterilmiştir (Sung ve diğ., 2021).

ABD’de 2000’li yıllarda zirveye ulaştıktan sonra hem ölüm oranı hem de insidans azalırken, Çin’de her iki oran da kademeli olarak artmaktadır. ABD’de akciğer kanseri insidansındaki düşüş için bir sigara bırakma kampanyası önemliyken, Çin’de sigara içme yaygınlığı artmaya devam etmektedir (Youlden ve diğ., 2008).



Şekil 2.2: 2020’de akciğer kanseri için erkekler ve kadınlar arasında cinsiyet ile bölgeye özgü olacak şekilde yaşa göre standartlaştırılmış insidans oranları. Bu oranlar, erkeklerde yaşa göre standardize edilmiş oran olup dünyada azalan düzene göre gösterilmiştir, erkekler ve kadınlar arasındaki en yüksek ulusal oranlar ise üst üste bindirilmiştir (Sung ve diğ., 2021).

Akciğer kanseri, her yıl yaklaşık 1,6 milyon ölümle dünya çapında en yaygın gözlenen kanser ölüm nedenidir (Torre ve diğ., 2015). Hastaların yaklaşık %85'inde KHDAK ve yaklaşık %15'lik kısmında ise KHAK gözlenir (Molina ve diğ., 2008). Akciğer kanserinin en yaygın nedeni, Amerika Birleşik Devletleri ve sigara içiminin yaygın olduğu diğer ülkelerde vakaların %80'inden fazlasını oluşturan tütün içimidir (Alberg ve diğ., 2013). KHDAK'nin tüm majör histolojik alt tiplerinin yanı sıra KHAK sigara ile ilişkilidir (Sun ve diğ., 2007).

KHDAK hastaları için 5 yıllık sağ kalım oranı ileri evre III ve IV için %15-20'dir (CancerNet, 2019). Akciğer kanseri için tedavi stratejileri cerrahi, kemoterapi, radyasyon tedavisi, adjuvan kemoterapi, hedefe yönelik tedavi, immünoterapi ve palyatif tedaviyi kapsar. Akciğer kanseri olan hastalar için tedavi seçimi kanserin evresine, hastanın sağlığına ve hastalığın moleküler profiline oldukça bağlıdır (Ruiz-Ceja ve Chirino, 2017; Lee ve diğ., 2018). Erken evre akciğer kanseri olduğu tespit edilen hastalar ameliyata tabi tutulur; bununla birlikte, çoğu hastanın akciğer kanserinin daha ileri bir evrede olduğu saptanmıştır. Tedavi seçeneği olarak kanserli dokunun çıkarılmasını takiben kemoterapi, akıllı ilaç ve radyoterapi tedavileri gibi koruyucu tedavi yöntemleri kullanılır, Tedavi seçeneklerindeki ilerlemelere rağmen, başarı sınırlıdır ve tedaviye bağlı yan etkiler nedeniyle hastanın yaşam kalitesi önemli ölçüde tehlikeye girer (Kunda, 2020). Akciğer kanseri moleküler heterojen bir hastalık olup, biyolojisini anlamak için etkili tedavilerin geliştirilmesi çok önemlidir. Akciğer kanseri, farklı moleküler özelliklere sahip hücrelerin veya klonların alt popülasyonlarından oluşur ve intratümöral heterojenite ile sonuçlanır (Herbst ve diğ., 2018).

2.3. HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARININ KANSERDE ROLÜ

Hücre ölümü sürecin morfolojik görünümüne (apoptotik, nekrotik veya otofajik), enzimolojik kriterlere (nukleazlar, kaspazlar veya katepsinler gibi farklı proteaz sınıflarının katılımı), fonksiyonel olarak (programlanmış veya rasgele, fizyolojik veya patolojik) veya immünolojik özelliklere (immünojenik veya immünojenik olmayan) göre sınıflandırılabilir (Galluzzi ve diğ., 2007). Hücre ölümü programlanmış hücre ölümü ve nekroz olmak üzere tipik olarak iki iyi tanımlanmış mekanizmayı içerir (Trump ve diğ., 1997). Belirli sinyallere yanıt olarak genetik olarak hücre ölümüne programlanmış hücre ölümüne apoptoz denir. Genellikle programlanmış hücre ölümü, hücre ortamı ve hücre içi sinyaller tarafından yönlendirilen çeşitli hücre dışı ve

hücre içi sinyaller tarafından kontrol edilir (LeBlanc, 2003). Biriken kanıtlar, programlanmış hücre ölümünün apoptoz ile sınırlı olmadığını, ancak hücrelerin aktif olarak kendini yok etmek için farklı yollar kullandığını göstermektedir (Bursch ve diğ., 2000).

2.3.1. Apoptotik Hücre Ölümü ve Kanser

Programlanmış hücre ölümü gelişim, doku homeostazının korunması ve hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılması sırasında önemli bir rol oynayan temel biyolojik bir süreçtir. Programlanmış hücre ölümünü sınıflandırmak için çeşitli isimlendirme sistemleri önerilmiştir. Yaygın olarak kabul edilen bir sistem, programlanmış hücre ölümünün üç ana morfolojisini tanımlar ve programlanmış hücre ölümü tip I (apoptoz); tip II (otofaji); ve tip III (programlanmış nekroz) olarak sınıflandırılır. Programlanmış hücre ölümü çeşitli hücre içi organelleri, zarları ve hücre çekirdeğini etkileyen çeşitli hücre fenotipleri gösterir. Örneğin; sitoplazmik ve kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanma, membranda kabarcık oluşumu ve membrana bağlı apoptotik cisimlerin oluşumu iyi karakterize edilen süreçler olup, apoptozu tanımlar (Sun ve diğ., 2009).

Kanser hücreleri her zaman bir dizi biyokimyasal değişiklik yoluyla apoptotik sinyallere dirençlidir. Kanser hücreleri, yukarı regüle edilen antiapoptotik sinyaller ve aşağı regüle edilen proapoptotik sinyaller, hatalı apoptotik sinyalleme, hatalı apoptoz başlatma ve uygulama gibi çoklu mekanizmalar yoluyla güçlü apoptoz indükleyiciler olan kemoterapötik ajanlara karşı dirençlidir (Chen ve diğ., 2018). Ayrıca, büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, bir trofik hormonun yani tümör hücrelerinin çoğalmasına sebep olan hormonu salgılayan bezin tahribi, cerrahi olarak çıkarılması ya da radyasyonla yıkımı, glukokortikoidler ile tedavi ve matrikse bağlanma kaybı gibi iç dengesizlikler apoptozu tetikleyebilir (Neuman ve diğ., 2002). Her ne kadar çeşitli araştırma grupları genellikle programlanmış hücre ölümü apoptozla yönelmiş olsa da, son çalışmalar programlanmış hücre ölümünün apoptotik olmayan formlarının da var olduğunu kanıtlamıştır. Bu nedenle, programlanmış hücre ölümü ve apoptoz asla eş anlamlı kabul edilmemelidir (Bredesen ve diğ., 2006). Kerr ve ark. (1972) morfolojik olarak farklı bir hücre ölüm modelini tanımlamak için apoptoz terimini önerdi. Apoptoz sadece hücre hasarı veya dış stresin bir sonucu olarak değil, aynı zamanda normal gelişim ve morfogenez sırasında da gözlenir (Nikoletopoulou ve diğ., 2013). Apoptoz normal hücrelerde temel düzenleyici bir

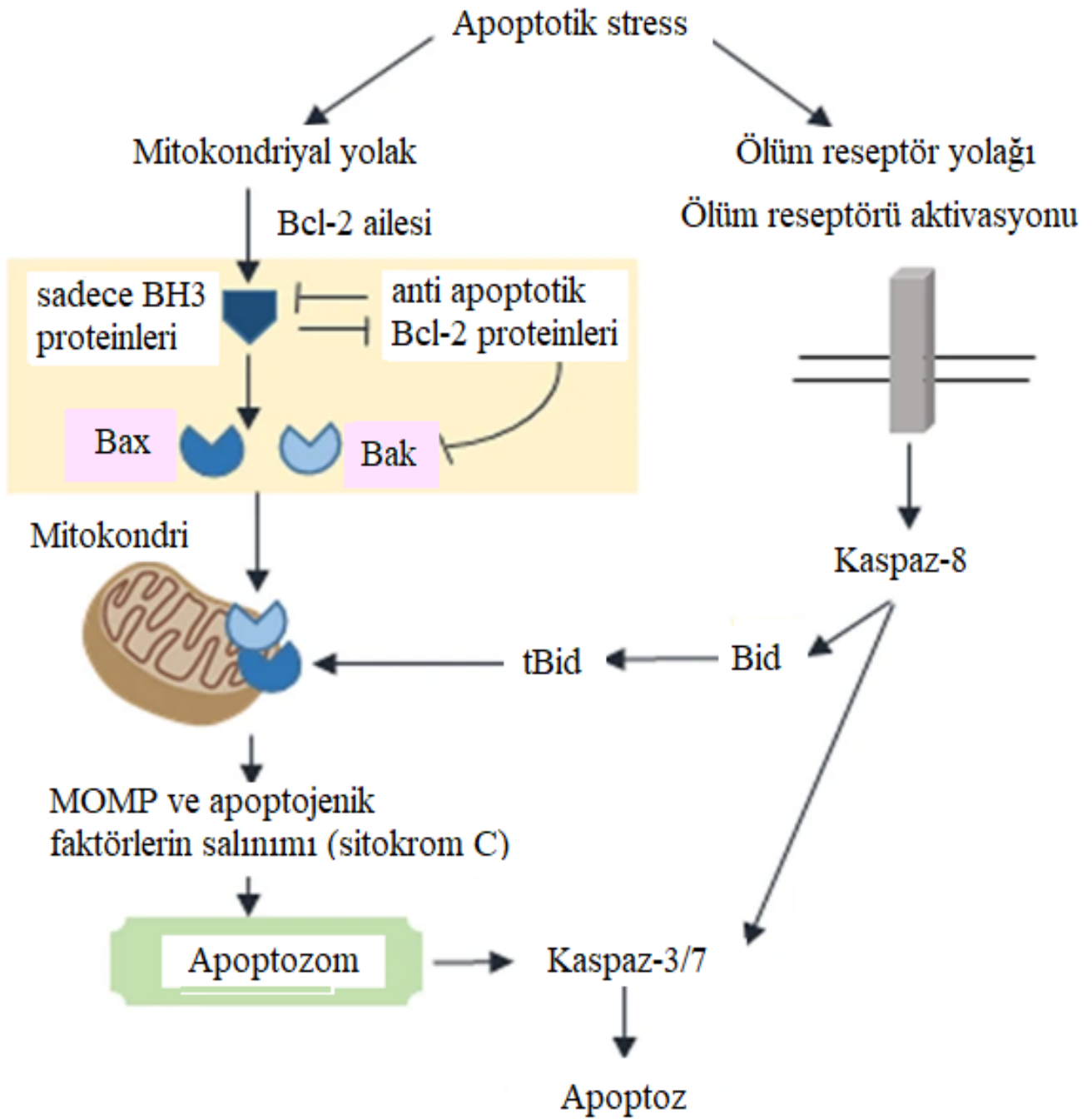
mekanizmadır, apoptozdaki herhangi bir düzensizlik, hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını tetikleyebilir (Jan, 2019). Apoptoz, programlanmış hücre ölümünün ilk keşfedilen ve en iyi çalışılan şeklidir (Degterev ve diğ., 2005).

Apoptoz, uygulayıcı ve düzenleyici moleküllerin farklı grupları tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Apoptoz, hücre ölümü ve bölünmesi arasındaki dengenin korunmasında çok önemli bir rol oynar. Apoptozdan kaçınma kanser gibi çeşitli hastalıklara yol açan kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açar. Antikanser ilaçlarla hedef alınan apoptoz gelişimi, apoptozun neden olduğu hücre ölümünün minimal inflamasyona neden olması nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Apoptoz mekanizmasının karmaşıklığını çözmek ve hücre ölümüne karşı koymak için tümör hücreleri tarafından apoptozun nasıl evrimleştiğini anlamak için, son yıllarda kanser hücrelerinde apoptozu indüklemek için tasarlanan yeni stratejilere odaklanılmıştır. Apoptoz morfolojik olarak hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, kromozomal DNA'nın internukleozomal fragmanlara bölünmesi, membranda bleb oluşumu, plazma membranında parçalanma olmadan apoptotik cisimlerin oluşumu ile tanımlanır. Biyokimyasal düzeyde ise apoptoz için kaspaz aktivasyonu gereklidir ve bu aktivite pankaspaz inhibitörleri (Z-VAD-FMK) veya cowpox virüse ait serpin (CrmA) gibi kaspazların viral inhibitörlerinin ekspresyonu ile bastırılabilir. Apoptotik hücreler ve/veya apoptotik cisimler, antijen sunan hücreler veya komşu hücreler tarafından fosfatidil serin aracılı bir mekanizma yoluyla hızla fagosit edilir. İmmünojenik apoptoz, apoptoz ile majör morfolojik ve biyokimyasal özellikleri paylaşan bir alt tip apoptozdur. Bu tip apoptoz kaspaz inhibitörlerine duyarlılık gibi sadece antikanser tedavi bakımından tanımlanmıştır. İmmünojenik apoptoz antrasiklinler, fotodinamik tedavi gibi sadece birkaç antikanser tedavi ile indüklenebilir. İmmünojenik apoptotik kanser hücreleri, DAMP'lar (kalretikülin, ATP ve HMGB1) ve sitokinler/kemokinler'in yayılımı ile karakterize edilir. Bu hücreler, fare modellerinde profilaktik bir aşı olarak kullanıldığında etkili antitümör bağışıklığa neden olabilir (Krysko ve diğ., 2017).

Apoptotik stres altında, sadece pro-apoptotik BH3 proteinleri, anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerini inhibe ederek etki eder, böylece efektör pro-apoptotik Bax ve Bak proteinleri anti-apoptotik Bcl-2 protein inhibisyonundan kurtulur ve/veya doğrudan Bax ve Bak'ı aktive eder. Aktive edilen Bax ve Bak daha sonra oligomerizasyona ve ardından mitokondriyal dış membran permeabilizasyonuna (MOMP) ve ardından sitokrom c gibi apoptozu uyarıcı faktörlerin sitozole salınmasına yol açan biçimsel değişikliklere uğrar. Sitokrom c daha sonra Apaf1'e

bağlanır ve kaspaz aktive edici apoptozomunun oluşumunu teşvik eder. Sonra sırası ile kaspaz-9 ve sonlandırıcı kaspaz-3/7'nin aktivasyonuna yol açarak apoptotik ölüme yol açar. Ölüm reseptörü yolunda ise ligandın, hücre zarı ölüm reseptörlerine bağlanmasının ardından, ölümü indükleyen sinyal kompleksi (DISC) oluşur ve kaspaz-8 aktive edilir. Aktive edilen kaspaz-8, kaspaz-3/7'yi doğrudan aktive ederek önce tBid, daha sonra Bax/Bak'ı aktive ederek mitokondriyal yolu uyarır (Lindenboim ve diğ., 2020) (Şekil 2.3.1).

Apoptoz, çok hücrelilerde sağlıklı hayatta kalma/ölüm dengesini koruyan programlanmış hücre ölümüdür (Cotter, 2009). Apoptozdaki kusur kansere veya otoimmüniteye neden olabilirken, gelişmiş apoptoz dejeneratif hastalıklara neden olabilir. Apoptotik sinyaller genomik bütünlüğün korunmasına katkıda bulunurken, kusurlu apoptoz karsinogenezi teşvik edebilir (Halazonetis ve diğ., 2008; Negrini ve diğ., 2010). Apoptotik sinyaller karmaşıktır ve çeşitli seviyelerde düzenlenir. Karsinogenez sinyalleri, apoptoz (IAP) proteinlerinin inhibitörü ve FLICE-inhibitör protein (C-FLIP) de dahil apoptotik yolların merkezi kontrol noktalarını modüle eder. Apoptoz mekanizmalarındaki kusurlar, tümör patogenezinde önemli rol oynar, neoplastik hücrelerin normal yaşam süreleri boyunca hayatta kalmasına izin verir, eksojen sağ kalım faktörlerine olan ihtiyacı ortadan kaldırır ve tümör kütlesi genişledikçe oksidatif stres ve hipoksiden korunma sağlar. Apoptoz defektleri artık protoonkogen aktivasyonunun önemli bir tamamlayıcısı olarak kabul edilmektedir, çünkü Myc, E1a ve Siklin-D1 gibi hücre bölünmesini yönlendiren birçok deregüle onkoprotein de apoptozu tetikler.



Şekil 2.3.1: Apoptoz hücrelerde mitokondriyal (içsel) ve ölüm reseptörü (dışsal) yolları ile gerçekleşir. Mitokondriyal yol Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından düzenlenir. MOMP: Mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu (Lindenboim ve diğ., 2020).

Öte yandan, kanser olmayan hücreler bir DNA onarım makinesine sahiptir. DNA onarımında kusurlu ve genetik olarak dengesiz hücrelerin ortadan kaldırılması için bir savunma mekanizması olarak hücre intiharındaki kusurlar tumorigenezi teşvik edebilir. Tümör hücrelerinin apoptozu bastırmak için kullandığı moleküler mekanizmaların çeşitleri vardır.

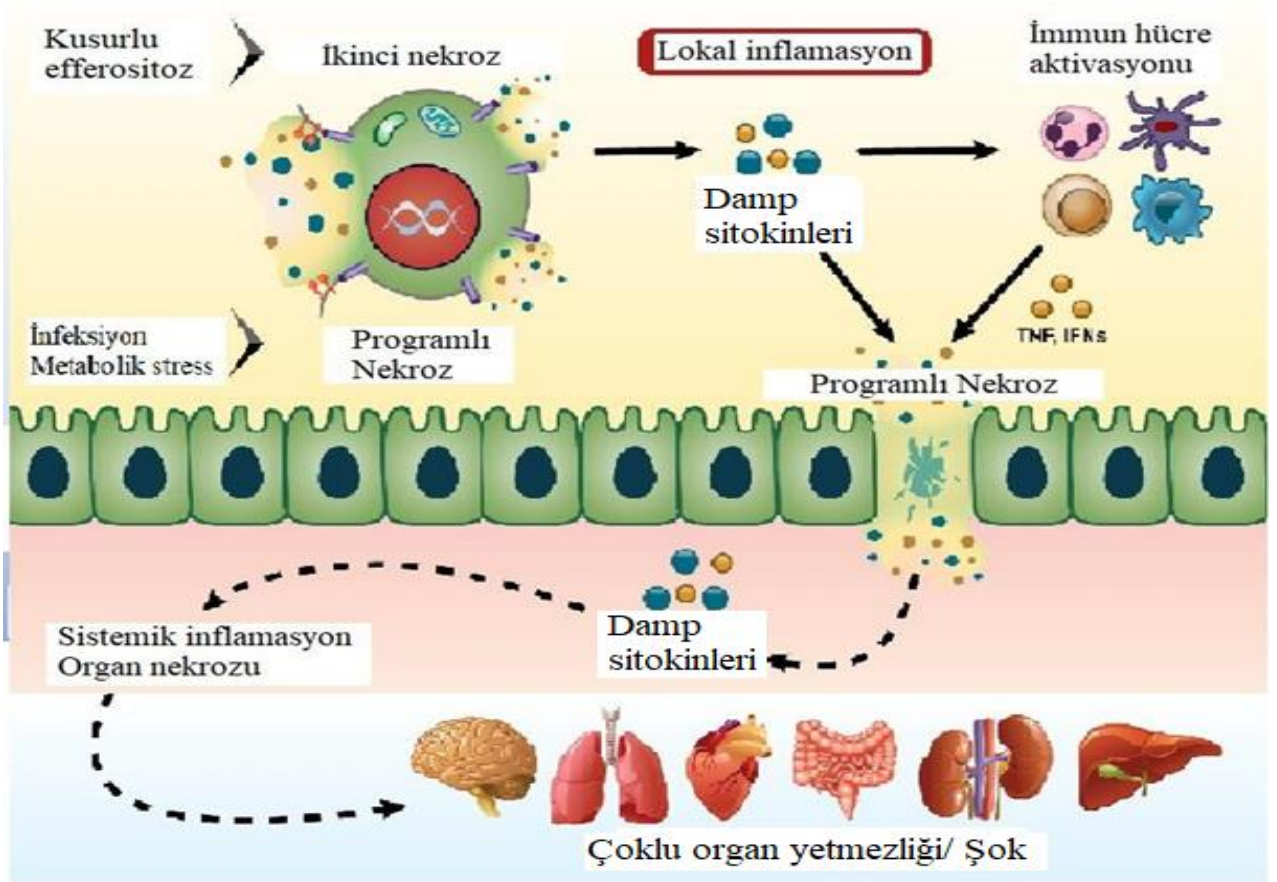
Tümör hücreleri, Bcl-2 gibi antiapoptotik proteinlerin ekspresyonu veya Bax gibi proapoptotik proteinlerin akış aşağı regülasyonu veya mutasyonu ile apoptoza direnç kazanabilirler. Hem Bcl-2 hem de Bax'ın ifadesi p53 tümör baskılayıcı gen tarafından düzenlendiğinden, bazı insan B hücreli lenfoma formları Bcl-2'nin aşırı ekspresyonuna sahiptir. Bu örnek, hücre ölümünün başarısızlığının kansere katkıda bulunduğu dair ilk ve en güçlü kanıtı oluşturur. Apoptoz kusurları, epitel hücrelerinin metastazını kolaylaştırır ve hücre dışı matrikse bağlanmanın azalması ile hayatta kalmasına izin verebilir. Ayrıca, tümörlere saldırmak için birçok sitolitik T hücresi ve doğal öldürücü hücreler de bağışıklık sistemine karşı direnci teşvik ederler. Apoptozdaki kanserle ilişkili kusurlar, kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel tedavilerle tedavi direncinde rol oynar, hücre ölümü eşiğini arttırır ve böylece tümör hücrelerinin ölümünü indükleyen ajanlar için daha yüksek dozlar gerektirir. Kanser hücrelerinin cerrahi olmayan yollarla başarılı bir şekilde ortadan kaldırılması sonucu apoptoz indüksiyonu gelişebilir. Bu nedenle, tüm kanser ilaç tasarımcıları inaktif apoptotik mekanizmayı aktive etmeye veya kusurlu olanı düzeltmeye çalışırlar. Bu nedenle, şu anda klinik kullanımda olan tüm sitotoksik antikanser terapileri, malign hücrelerin apoptozunu indüklerler. Bu nedenle, apoptozun moleküler mekanizmalarının ve kusurlu durumunun daha derin anlaşılması, yeni hedeflenen terapötik ajanların gelişimine yol açar (Hassan ve diğ., 2014).

2.3.2. Nekrotik Hücre Ölümü ve Kanser

Tesadüfî nekroz, çeşitli morfolojik özellikler ve plazma membran bütünlüğünün kaybedilmesi ve ardından Damp'ların salınması ile karakterizedir. Genellikle aşırı fizikokimyasal koşullarla indüklenir ve farmakolojik veya genetik stratejilere duyarsızdır. Programlanmamış bir hücre ölümü şeklidir. Düzenlenmiş nekroz, bu nedenle nekrotik olarak adlandırılan hücresel şişme ve plazma membran geçirgenliği gibi ortak morfolojik özellikleri paylaşan çeşitli nekroz türleri (örneğin; nekroptoz, ferroptoz, piroptoz) için genel bir terimdir. Bu hücre ölüm formlarının genetik kontrolü, düzenlenmiş yani programlanmış yapının temelini oluşturur. Genellikle, bu hücre ölümü türleri de bloke edilebilir veya belirli hücre ölümü inhibitörleri tarafından azaltılabilir (Krysco ve diğ., 2017).

Programlanmış nekroz, şişmiş organellerinin varlığı ve ardından sitoplazmada birleşen ve hücre dışı boşlukla bağlantı kuran boşlukların ortaya çıkması ile karakterizedir. Plazma zarı

parçalanmış, ancak çekirdek nispeten korunmuştur (Sun ve diğ., 2009) (Şekil 2.3.2). Nekrotik hücre ölümü genellikle programlanmamış hücre ölümü olarak adlandırılır ve çok hücreli organizmalarda düzensiz bir süreç olarak tanımlanır. Nekrotik hücre ölümünün karakteristiği olan plazma membranının bozulması, konakçı bağışıklık sisteminden kaynaklanan bir hasara karşı gelişen tepkiyi aktive eden hücre içi proteinlerin salınmasına yol açar (Amaravadi ve diğ., 2007).



Şekil 2.3.2: Nekroinflamasyonun sistemik yayılımı. Programlanmış nekroz veya ölmekte olan hücrelerin kusurlu efferositozu lokal inflamasyonu başlatabilir. Nekrotik hücrelerden ve daha sonra aktive edilen immün hücrelerden türetilen Damp'lar ve proinflamatuvar sitokinler, daha fazla hücrede programlanmış nekrozu güçlendiren sinyallerdir. Kısır ölüm döngüsünün devam etmesi, bariyer fonksiyonunun zarar görmesine, nekroinflamasyonun sistemik olarak yayılmasına ve sonuçta yıkıcı çoklu organ yetmezliğine neden olabilir (Kim ve diğ., 2019).

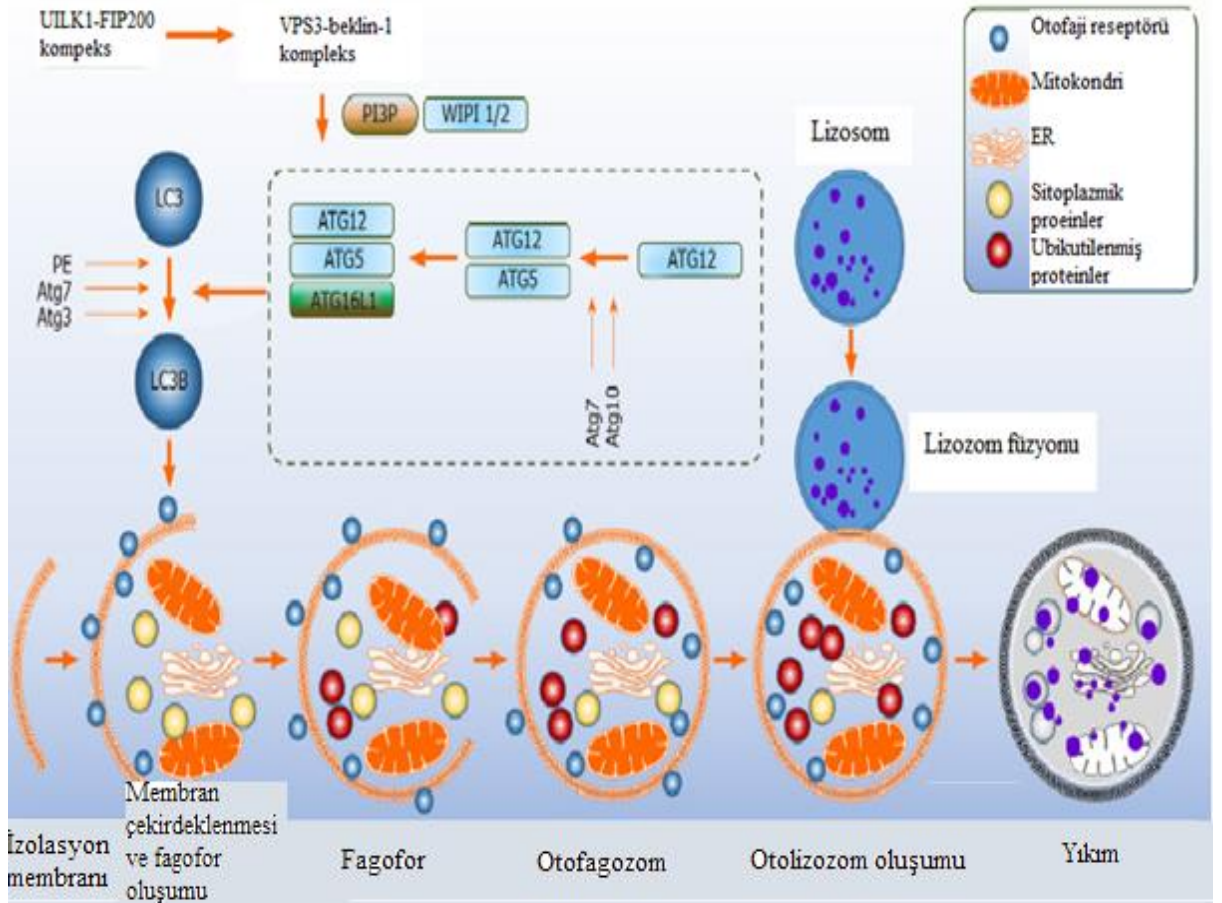
TNF birçok hücre tipinde (KYM, MCF-7, PC60) tipik apoptotik ölümü indüklerken, L929 ve diğer fibrosarkom hücrelerinde tipik nekroza neden olur. TNF ile aktive olan farklı yollar için en basit açıklama, ikinci tip hücrelerde apoptotik yolun önemli bir bileşeni olan, FADD veya

kaspaz-8 eksikliğidir. L929.hCD95, insan CD95 geninin yapısal olarak ifade edildiği transfekte edilmiş bir L929 türevidir. Monoklonal anti-CD95 ile tedavi üzerine, bu hücreler tipik apoptoz ile hızla öldüler (Vercammen ve diğerleri., 1998). Dolayısıyla apoptotik yol için gerekli tüm mekanizma hücrelerde mevcuttur. İnsan CD95 geninin eklenmesi, TNF'ye verilen nekrotik yanıtı hiç etkilememiştir (Fiers ve diğ., 1999).

2.3.3. Otofajik Hücre Ölümü ve Kanser

Otofaji, hasar gören organellerin ve yanlış katlanmış ya da kümelenmiş proteinlerin çift katlı membranla çevrelendikten sonra lizozomla kaynaşması sonucu parçalanarak ortadan kaldırılması işlemidir. Böylece sağlıklı hücrelerin hayatta kalması ya da ortadan kaldırılması söz konusudur. Otofaji ile hücre içeriğinin kendiliğinden parçalanması ve geri dönüşümünün sağlanması sonucu enerji kaynağı dengelenir ve doku homeostazı düzenlenir. Otofaji organellerin, lipidlerin ve proteinlerin geri dönüşümünden sorumlu olan ve böylece hücre homeostazın korunmasına ve enerji üretimi için substratların sağlanmasına yardımcı olan hücresel katabolik bir mekanizmadır. Kanserle ilişkili fibroblastlar örneğin; tümör mikro çevresindeki komşu hücrelerin artan enerji taleplerini karşılamak için, adenozin monofosfat (AMP) ile aktive edilen protein kinaz (AMPK)'den bağımsız mTORC1 sinyal yollarını inhibe ederek, otofajiyi aktive eden metabolik strese maruz kalırlar (Su ve diğ., 2016). Otofaji hücre büyümesinde önemli bir faktördür; bu nedenle, otofajinin inhibisyonu tümör büyümesini azaltabilir. Kanserle ilişkili fibroblastlar malign kanser ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır (Sousa ve diğ., 2016). Kanserle ilişkili fibroblastlarda Beclin1 ve LC3-II/I protein dönüşüm seviyeleri normal fibroblastlardan daha yüksektir. Bu fibroblastlar otofajiyi uyararak üçlü negatif meme kanserinde (TNBC) hücre çoğalmasını artırabilir. Buna ek olarak, antikanser tedavisinin tümör hücresi proliferasyonunu etkileyen otofajiyi nasıl indükleyebileceği araştırılmıştır (Peters ve diğ., 2019). Bu nedenle, otofaji inhibisyonu ve kemoterapi kombinasyonu meme kanseri için etkili bir tedavi haline gelebilir. Bir otofaji inhibitörü olan klorokin (CQ), DNA metilasyonunu değiştirerek epigenetik mekanizma aracılığıyla kanser kök hücrelerini açığa çıkarır. CQ, mitokondriyal hasara neden olur ve TNBC kanser kök hücrelerde aşırı oksidatif DNA hasarına ve daha sonra hücre ölümüne neden olur (Yan ve diğ., 2019).

Otofaji metabolik, proteotoksik veya diğer stres altındaki hücrelerin fonksiyonlarını kaybetmiş organelleri ve/veya yanlış katlanmış/poliubikutinlenmiş proteinleri, otofagozomlar olarak adlandırılan özel yapılar aracılığıyla bozunum için lizozom ile birleşerek otolizozomu oluşturur ve strese bağlı bir hücre sağkalım programı gerçekleşir (Şekil 2.3.3) (Mandhair ve diğ.,2020). Sonuç, hücre sağkalımında kullanılmak üzere serbest amino asitlerin ve metabolitlerin salınmasıdır. Tümör hücreleri için, otofaji iki ucu keskin bir kılıçtır: otofaji genleri sıklıkla insan tümörlerinde mono-allel olarak silinir, susturulur veya mutasyona uğrar ve DNA hasarı, genomik instabilite ve tümör ilerlemesi için uygun olan gittikçe artmış oksidatif stres ortamına neden olur. Bu nedenle, otofaji tümör baskılayıcıdır. Beclin-1, Bcl-2 ailesi, mTOR, PI3K, P53, ARF gibi diğer moleküller hem otofajide hem kanserde rol alırlar. Tümör baskılanmasında otofajinin rolünü açıklamak için en az üç mekanizma tanımlanmıştır: 1) nekroz aracılı inflamasyonun inhibisyonu, 2) genom bütünlüğünün korunması ve 3) otofaji aracılı hücre ölümü ve yaşlanması (Kung ve diğ., 2011).



Şekil 2.3.3: Otofaji yolağı. Otofaji, yukarıdaki adımları içeren çok adımlı bir işlemdir: başlatma, çekirdeklenme, uzama, olgunlaşma ve lizozom ile füzyon. Otofajiye bağlı genler olarak adlandırılan birkaç protein bu süreci düzenler. Otofaji bazal koşullar altında uyarılır ve stres, örneğin besin yoksunluğu ile indüklenir. ATG: Otofaji ile ilişkili genler; ER: Endoplazmik retikulum; Atg1 homoloğu olan 200 kD'luk ULK ile etkileşen protein; LC3: Hafif zincir 3; PE: Fosfatidiletanolamin; PI3P: Fosfatidilinositol-3-fosfat 3; ULK1: Unc-51 benzeri kinaz 1; VPS34: Vakuol protein PI3K, PI3-kinaz aktivitesine sahip vakuolar protein 34 (Mandhair ve diğ., 2020).

Tümörlerde ve kanser metabolizmasında otofajinin rolü. (a) normal dokuda, otofaji protein ve organel kalite kontrolü gibi homeostatik işlevleri yerine getirir. (b) dokularda otofaji bastırılırsa, normal homeostaz bozulur ve artmış DNA hasarına (genomik instabilite ve anöploidi), reaktif oksijen türlerine (ROS) ve inflamasyona neden olur. Bu değişikliklerin tamamı tümör başlangıcını teşvik edebilir ve erken tümör oluşumuna yol açabilir. (c) iyonlaştırıcı radyasyon (IR), kemoterapi ve çeşitli hedefli ajanlar da dahil olmak üzere kansere yönelik tedaviler, terapötik dirence katkıda bulunan bir sitoprotektif otofajiyi indükleyebilir. (d) aktive edilmiş otofaji, tümör hücrelerinin metabolik taleplere ayak uydurmasına ve oksidatif stresi düzenlemesine izin vererek, yerleşik tümörlerde tümör büyümesini ve ilerlemesini teşvik edebilir. Spesifik olarak, amino asitler gibi geri dönüşüm ürünleri, trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne yakıt oluşturabilir; yağ asidi sentezi için yapı taşları TCA döngüsü, geri dönüştürülmüş nükleotidler, DNA sentezi ve onarımı için ve ayrıca glikolizi destekleyen pentoz fosfat yolunun nonoksidatif kısmı için kullanılabilir. Otofajik degradasyon (mitofaji) için hasarlı mitokondriyi hedeflemek, tümördeki ROS seviyelerini de düzenleyebilir. (e) Otofaji, tümör büyümesini ve ilerlemesini desteklemek için otonom olmayan bir şekilde hareket eder. Tümör olmayan hücrelerde otofaji aktivasyonu, kritik metabolik destek ile tümör oluşturma bilir. Ayrıca, otofaji, tümör ilerlemesi için uygun bir ortam üretmede rol oynayabilir (Santana-Codina ve diğ., 2017).

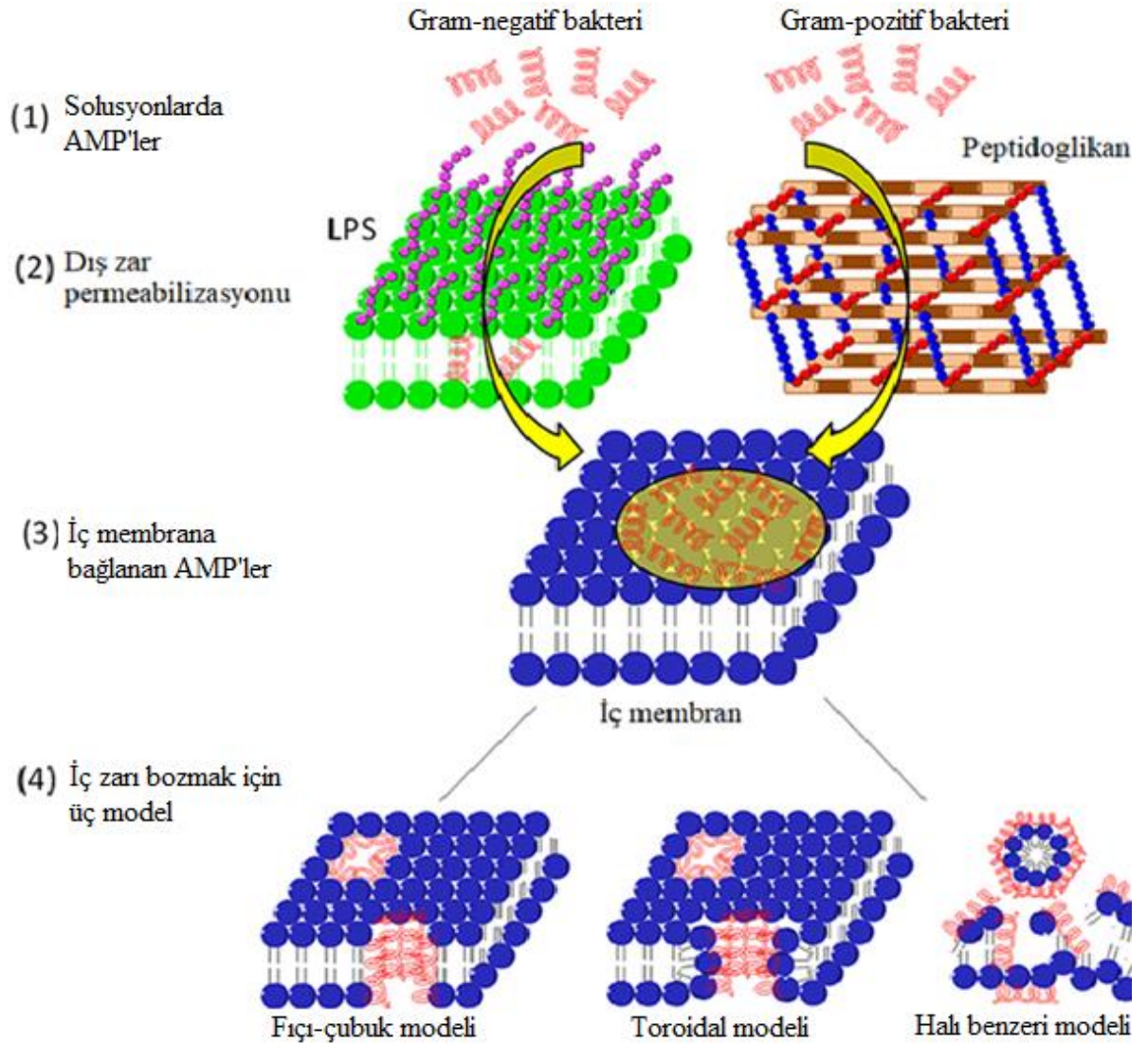
Otofaji, KHDAK'de apoptozu teşvik etmede olumlu ve olumsuz bir rol oynayabilir. Genel olarak, otofajinin inhibisyonu, hücrelerin stresin üstesinden gelme ve homeostazı sürdürme yeteneğini sınırlar. Bununla birlikte, otofajinin hücre ölümünü teşvik ettiği durumlar da vardır. Gerçekten de, otofaji karsinogenezde iki ucu keskin bir kılıç olarak işlev görür. Bir yandan, otofaji her zaman aç veya stresli tümör hücrelerinde aşırı protein bozulmasını önleyebilen AKT, PI3K, Bcl-1 ve mutant p53 gibi farklı onkoproteinler tarafından inhibe edilir. Öte yandan, otofajinin kalıcı aktivasyonu, otofajik programlanmış hücre ölümüne veya apoptoza neden olur (Liu ve diğ., 2017).

2.4 ANTİMİKROBİYAL PEPTİDLER VE MEKANİZMALARI

AMP'ler doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin korunmuş bir unsuru olan bir grup bileşiktir (da Silva ve Machado., 2012). Bakteriler, mantarlar, bitkiler, böcekler, kuşlar, balıklar, amfibiler ve memeliler gibi incelenen tüm türlerde bulunan bu küçük peptitler 12-50 amino asit arasındadır ve virüsler, mantarlar ve hem gram-negatif hem de gram-pozitif bakteriler gibi çok çeşitli mikroorganizmaları etkili bir şekilde öldürdüğü gösterilmiştir (İzadpanah ve Gallo, 2005). Bu peptitler yabancı parçacıkları tanımada ilk sırada yer alır ve gram-negatif bakterilerden lipopolisakkarit, gram-pozitif bakterilerden lipoteikoik asit, mikobakterilerden glikolipitler, mayadan β -glikan ve virüslerden RNA iplikleri gibi bakteriyel hücre duvarının bileşenlerine özgüllük gösterirler; mikroorganizmaların çoğunu tanıyabilirler (Kim ve diğ., 2009). Peptitler düşük molekül ağırlığındadır (2-50 kDa), ancak bazıları daha ağır olabilir. AMP'ler esas olarak genomda bir veya birkaç kopya olarak kodlanır. Tüm amplifikatörler, bir sinyal dizisi de dahil olmak üzere daha büyük öncüllerden türetilir (Zasloff, 2002). Amplifikatörler farklı ikincil yapılar gösterir. 1- α -sarmal, 2- β -pilili tabaka, 3- β -levha ve α -sarmal karışımı, 4- doğrusal veya rastgele olmak üzere 4 tipe ayrılır. Bu peptitlerin çoğu, çözelti içinde serbest olduklarında belirli bir yapı göstermezler ve membrana doğrudan bağlandıklarında son yapılarını kazanırlar (Guntupalli ve diğ., 2013). AMP'ler genellikle cilt, bağırsak, akciğerler ve kırmızı kan hücreleri gibi maruz kaldıkları dokularda sentezlenir (Huerta-Kantillo ve Navarro-Garcia, 2016).

Hayvanlardaki AMP'ler mide, deri ve solunum yollarının epitel hücreleri, mast hücreleri, monositler ve nötrofiller gibi çok çeşitli hücrelerde ifade edilir. Bugüne kadar, 5000'den fazla AMP keşfedilmiş veya sentezlenmiştir (Zhao ve diğ., 2013). AMP'ler bakteri ve kanser hücrelerine karşı toksik olanlar, ancak memeli hücrelerine değil, ya da bakterilere, kanser hücrelerine ve normal memeli hücrelerine karşı sitotoksik olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Hoskin ve Ramamoorthy, 2008). Amplifikatörler çeşitli fiçı-çubuk, toroidal ve halı benzeri modeli gibi çeşitli mekanizmalarla çalışır (Şekil 2.4). Fiçı-çubuğu modeli hariç, diğer modeller hala işleme tarzlarıyla ilgili anlaşmazlıklara açıktır ve şu anda özellikleri arasında net bir ayrım yoktur (Gaspar ve diğ., 2013). Bununla birlikte, AMP'ler tarafından tercih edilen genel mekanizmanın amino asit sekansına, amfipatikliğe, katyonik yüke ve AMP'lerin boyutuna bağlı olduğu anlaşılmaktadır (Park ve Hahm, 2005). En yaygın olarak kabul edilen mekanizma olan fiçı-çubuğu, membran parçalanma süreci ile karakterize edilir ve oldukça organize bir

silindirik gözenek oluşturur (Mihajlovic ve Lazadiris, 2010). AMP (aşağıda belirtilen özellikler aracılığıyla) kanser hücrelerine çekilir. Peptitlerin hidrofobik amino asitleri zar içindeki lipid çift tabakasına maruz kaldığında, iki zarı birbirine bağlar, zarda bir konformasyonel değişiklik yaparak transmembran bir gözenek oluşturur (Su ve diğ., 2011). Gözenek oluşumu hücrel materyalin hücre dışına sızmasına ve hücre ölümüne neden olur.



Şekil 2.4: Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin membran sistemleri ve AMP'lerin sitoplazmik membran üzerindeki etki mekanizmaları. Gram-negatif bakteriler için, AMP'nin sitoplazmik membrana ulaşmadan önce dış membrana nüfuz etmesi gerekirken, gram-pozitif bakteriler için AMP'nin sadece nano boyutlu gözenekler yoluyla peptidoglikan tabakadan yayılması gerekir. AMP sitoplazmik membrana adsorpsiyondan sonra, membran gözeneklerini indükleyebilir veya membranı birleştirebilir (Li ve diğ., 2017).

Toroidal model, hedef hücrenin zarı içinde gözenekler oluşturması nedeniyle, fıçı-çubuğu modelinin özelliklerine çok benzer. Bununla birlikte, bu iki modeli ayırt eden bazı önemli farklılıklar vardır. Toroidal modelde, peptitler hidrofobik amino asit kalıntılarını membranın lipit çekirdeğine maruz bıraktığında - konformasyonel bir değişikliği zorlamak yerine—peptitler ve lipitler, membranı kapsayan torus gözenekleri oluşturmak için bir araya gelirler. Hedef hücre zarı incelirken, lipidlerin fosfat baş grupları genişler ve iki tabakalı membranı bükülmeye zorlar (Mihajlovic ve Lazadiris, 2010). Toroidal gözenekler karakteristik olarak membran içinde çok kısa ARG Cz p mesafeleri oluşturur (Su ve diğ., 2011).

Halı benzeri model hem fıçı-çubuğu hem de toroidal modele göre çok farklıdır. AMP dizilerindeki hidrofilik amino asitler membran çift tabakasının fosfolipid baş kısımlarına çekilir. Bağlı amplifikatörler, hedef hücrenin iç membranı ile ilişkili kavisli anyonik membranı bozar. Peptitler hücre zarını çevrelemek için yeniden düzenlenir ve dolaylı olarak hücre zarını bozarak hedef hücreyi öldürür (Swithenbank ve Morgan, 2017).

2.4.1. Akciğer Kanseri Antimikrobiyal Peptidler

AMP'nin akciğer kanseri hücre hatları üzerindeki etkisini araştıran birkaç in vitro çalışma yapılmıştır. Ohsaki ve arkadaşları tarafından yapılan bir ön çalışmada (1992) 6 insan KHAK hücre hatları ve 4 normal insan fibroblast hücre hatları kullanılarak magainin A ve magainin G'nin antitümör aktivitesi incelendi. Bu çalışmanın sonuçları, magainin A ve magainin G'nin tüm KHAK hücre hatlarında anti-tümör aktiviteye sahip olduğunu, ancak normal insan fibroblast hücre hatları için toksik olmadığını göstermiştir. Akciğer kanseri hücre hatlarına karşı magainin A ve magainin G'nin ortalama IC₅₀'si sırasıyla 8.64 ve 8.82 μ M iken, normal insan fibroblastlarına karşı magainin A ve magainin G'nin IC₅₀'si sırasıyla 21.1 ve 29.2 μ M idi. Ayrıca, magainin A ve magainin G, kombinasyon halinde kullanıldığında kemoterapötik ajanlardan sisplatin ve etoposidin sitotoksitesini arttırmıştır (Ohsaki ve diğ., 1992).

2.4.2. Antikanser İlaçlar

Kanser hücreleri bir hastada ilk keşfedildiğinde, birçok ilaç etkin olabilir. Ancak zamanla, kanser hücreleri bu birinci basamak ilaca direnç göstermeye başlar ve böylece kanser hücre popülasyonu büyümeye ve yayılmaya devam eder. Yapılan çalışmalar, kanser hücresi popülasyonunun heterojenliğinin kemoterapötik ilaçlara hücresel yanıtı etkilediğini göstermiştir. Antikanser ilaçlara direnci açıklamak için çeşitli hücresel değişiklikler önerilmiştir (Lu ve Chao, 2012). Antikanser ilaçlar spesifik ve kanser hücrelerine yönelik olmadığından, antikanser ilaçların insanlarda tümör dokularına daha etkin bir şekilde verilmesi makul ve ulaşılabilir görünmektedir (Zee-Cheng ve Cheng, 1989).

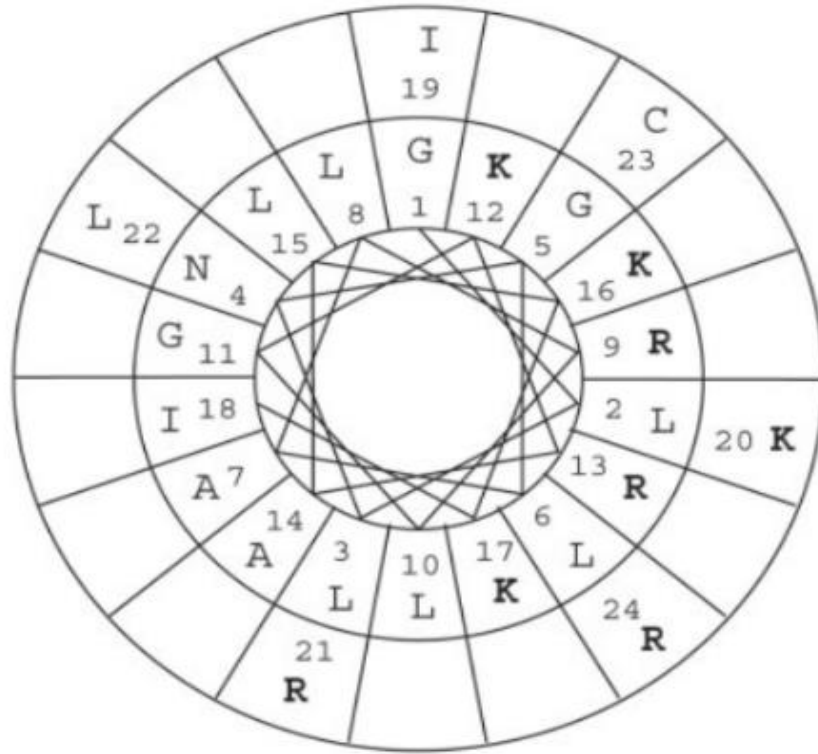
Antikanser ilaçları, DNA etkileşimli ajanlar, antimetabolitler, antitubulin ajanları, moleküler hedefleme ajanları, hormonlar, monoklonal antikorlar ve diğer biyolojik ajanlar gibi etki mekanizmalarına göre sınıflandırılabilirler (Thurston ve Pysz, 2021). Antimetabolitler, etki mekanizması temel biyosentez yolları ile etkileşime dayanan en eski antikanser ilaç ailelerinden biridir. DNA etkileşimli ajanlar, çeşitli mekanizmalarla hareket eden en büyük ve en önemli antikanser ilaç ailelerinden birini oluşturur. Antikanser ilaçları belirlemek için analitik yöntemlere duyulan ihtiyaç dikkate alınmalıdır. Sitotoksik bileşiklerin analizi için geliştirilen ilk yöntemler, UV tespiti (LC-UV) ile sıvı kromatografinin kullanımına dayanmaktadır. Bu yöntemler, yüksek konsantrasyonlarda hedef ilaç içeren numunelerin analizi için tatmin edici farmasötik formülasyonların geliştirilmesi ve stabilite çalışmaları için nicel bir performans sergilemiştir (Nussbaumer ve diğ., 2011).

2.5. KRİPTONİN

Kore siyahımsı ağustosböceği, *Cryptotympana dubia*, meyve ağaçlarının ve diğer ağaçların ciddi, meyve suyu emici bir homopteran zararlısıdır. 6-7 yıl larva yeraltında yaşarlar ve Haziran-Ağustos aylarında ortaya çıkıp yetişkin olarak vücut uzunluğu 45 mm'ye ulaşır (Lee ve Jeong, 1997). Doğu Asya'da, kalp hastalıklarını tedavi etmek ve doğumu kolaylaştırmak için geleneksel bir ilaç olarak kullanılmıştır. Özellikle, ağustosböceklerinin dökülme kabukları olan Seontoi, anti-inflamatuvar, spazmolitik ve anti-febril ajan olarak kullanılmıştır (Ho, 1610; Park, 2004). Ayrıca, antioksidan bileşikler izole edilmiş ve antiaterosklerotik özelliklerini anlamak

için çalışılmıştır (Xu ve ark., 2006). Ağustos böceği (*Cryptotympana dubia*) hemolenfine ait 24 amino asitden oluşan amino asit dizilimi şöyledir: Gly-Leu-Leu-Asn-Gly-Leu-Ala-Leu-Arg-Leu-Arg-Leu-Gly-Lys-Arg-Ala-Leu-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Arg-Leu-Cys-Arg. Bu peptit +8 net yükle, α -heliks sekonder yapıya ve %50 hidrofobik özelliğe sahip bir AMP'dir (Park ve diğ., 2007).

İzole edilmiş peptidin N-terminal amino asit sekans analizi, 23. pozisyonda tanımlanamayan bir kalıntı ile 24 amino asit kalıntısı gösterir. Peptidin moleküler kütlesi MALDI-TOF/kütle spektrometresi ile tahmin edilmiş ve 2,704 Da bulunmuştur. Bu sonuçlardan 23. kalıntının sistein olduğu tahmin edilmiştir. Aslında bu tanımlanan sekansa dayanan sentetik peptid, kütle spektrometrisinde 2,704 Da'luk bir moleküler kütle göstermiş ve izole edilen kriptoninin spesifik



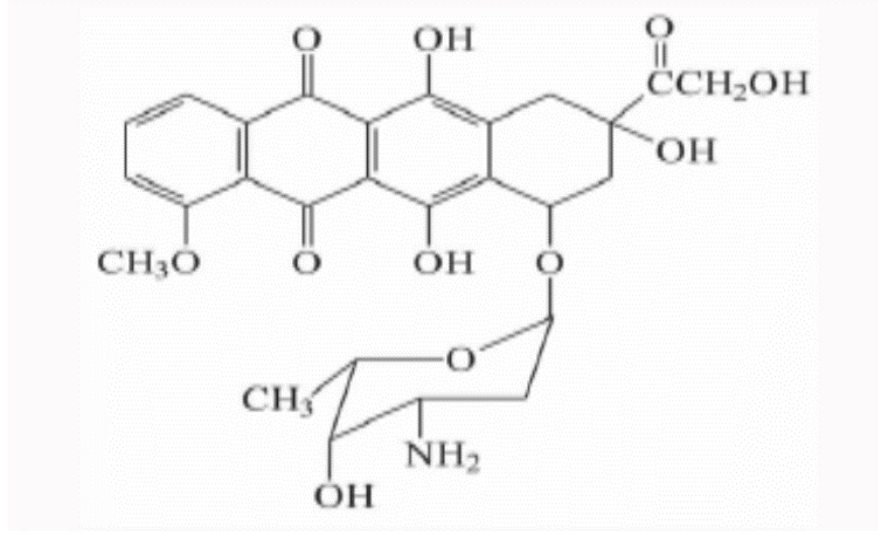
Şekil 2.5: Kriptonin'in α -sarmal tekerlek diagramı. α -sarmalın oluşturulmasını ve hidrofilik özelliğin belirlenmesini öngören katyonik amino asitler kalın olarak temsil edilir (Park ve diğ., 2007).

bir modifikasyona sahip olmadığı öne sürülmüştür. Bir tekerlek diyagramı ile analiz edilen kriptonin'in öngörülen α -sarmal yapısı tipik amfipatik bir sarmal yapı gösterir ve ana katyonik amino asitler, r9, K12, r13, k16, K17, K20, R21 ve r24, sarmalın bir tarafında görülmektedir

(Şekil 2.5). Kriptonin'in antibiyotik aktivitesi, gram-negatif bakteriler, gram-pozitif bakteriler ve mantarlar olarak iki antibiyotiğe dayanıklı bakteri türleri (methicilin'e dirençli *Staphylococcus aureus*, Ampisilin'e dirençli VRE birçok farklı mikroorganizmalar) üzerinde test edilmiştir. Yeni bir antimikrobiyal peptid olan kriptonin yetişkin Kore siyahımsı ağustosböceği *Cryptotympana dubia*'dan izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Kriptonin 24 amino asitten oluşur ve kütle spektroskopisinde 2.704 Da moleküler ağırlığa sahiptir. Öngörülen α -sarmal yapı analizi ve kriptoninin %40 trifloroetanolünde artan sarmal yüzdesi, tipik doğrusal α -sarmal oluşturan peptide ait olduğunu göstermektedir. Biotin işaretli kriptonin'in *E. coli* hücrelerinin yüzeyine bağlanması ve kriptonin tedavisinden sonra *E. coli*'de propidyum iyodürün artan akışı, bakteriyel hücre yüzeylerini bağlayarak ve hücre geçirgenliğini bozarak mikrobiyal hücreleri öldürdüğünü gösterir (Park ve diğ., 2007).

2.6. DOKSORUBİSİN

Doksorubisin, *Streptomyces peucetius* bakterisinden elde edilen bir antibiyotik olup, 1960'lardan beri kemoterapötik bir ajan olarak yaygın bir kullanıma sahiptir (Şekil 2.6). Kombinasyon kemoterapisi, azaltılmış yan etkiler ve artan terapötik etkinlik ile daha iyi ve uzun vadeli prognoz için önemli bir strateji olarak ortaya çıkmaktadır. Doksorubisin, farklı kanserleri tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır. İlaç kombinasyonları çoğunlukla AIDS, kanser gibi hastalıkların tedavisinde kullanılır. Bu kombinasyonlardan bazıları sitotoksitede etkinliği artırırken, bazıları dozu azaltarak yan etkilerin önlenmesine yardımcı olur ve bazı kombinasyonlar ilaç direncinin üstesinden gelinmesine yardımcı olur. Tümör büyümesi ve ilerlemesi ile mücadelede etkilidir. Doksorubisin ile farklı etki mekanizmalarına sahip kanser ilaçlarının kombinasyonu, ilaçların kabul edilemez yan etkilerinden kaçınırken terapötik etkinliği artırmak için uygun bir strateji olup, çoklu hücre içi tepkilere yol açar (Wakharde ve diğ., 2018).



Şekil 2.6: Doksorubisin'in formülü (Zhao ve diğ., 2018).

Doksorubisin'in birincil etki mekanizması, ilacın DNA baz çiftleri arasına girerek, DNA zincirlerinin kırılmasına ve hem DNA hem de RNA sentezinin inhibisyonuna neden olma yeteneğidir. Adriamisin ticari adı verilen bir antrasiklin antibiyotik olan doksorubisin en etkili antikanser ilaçlarından biri olup, kanserli hastalarını tedavi etmek için çeşitli kemoterapötik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Doksorubisin'in antitümör aktiviteleri öncelikle topoizomerez II enzimini inhibisyonundan kaynaklanan DNA hasarına ve apoptoz indüksiyonuna neden olur. Ayrıca demir ile birleştirildiğinde, doksorubisin DNA'da serbest radikal aracılı oksidatif hasara neden olur ve DNA sentezini daha da sınırlar (Park ve diğ., 2014; Sritharan ve Sivalingam, 2021). Doksorubisin'in etki mekanizması halen araştırılmasına rağmen, önerilen mekanizmalar arasında DNA'ya interkalasyon yolu ile DNA sentezi ve gen ekspresyonunda inhibisyona yol açması, reaktif oksijen türlerinin yani ROS üretilmesi, DNA sentezi ve replikasyonu için önemli bir giraz olan topoizomerez II'nin inhibisyonu yer almaktadır (Zhao ve diğ., 2018).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Bu çalışmada akciğer kanser hücre soyu olan A549 hücre soyları kullanılmıştır. A549 hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin (PES) içeren Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumunu (DMEM) içerisinde 75'lik flasklarda %5 CO₂ içeren inkübatörde ve 37 °C'de inkübe edilerek çoğaltılmıştır. Hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştıklarında kalsiyum-magnezyum içermeyen steril PBS ile yıkandı. Daha sonra %0.25 tripsin-etilen diamin tetra asetik asit (Trypsin-EDTA) ile kaldırılan hücreler 1500 g'de 5 dakika santrifüj edilerek peletlendirildi. Thoma hemasitometresinde sayımı yapıldı ve yeni flasklara pasajlandı.

Hücrelerin dondurularak saklanması için tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler 1500 g'de 5 dakika santrifüjlenerek peletlendirildi, sayıldı ve uygun hacimde kriyomedyum içerisinde süspanse edildi. Dimetil sülfoksit (DMSO) %10 oranında içeren soğuk FBS dondurma medyumunu olarak kullanıldı. Hücre peleti dondurma medyumunda 1,5-2 milyon hücre/ml yoğunluğunda süspanse edilip kriyotüplere aktarıldı. Kriyotüpler 1 gece -86 °C'de bekletilip, 24 saat sonra ise -152°C'ye uzun süre saklamak amacı ile aktarıldı.

Kademeli olarak dondurduğumuz hücreleri açmak için ise kriyotüpler hızlı bir şekilde 37°C'ye getirildi ve dondurma medyumundaki hücre süspansiyonu, içinde 5ml medyum içeren santrifüj tüpüne aktarılıp 1500 g'de 5 dakika santrifüj yapıldı. DMSO tam uzaklaşmadığı için ikinci kez yıkama yapıp hücreler santrifüj edildi. İkinci hücre peleti az miktarda medyum ile süspanse edilerek 25 cm² ve ya 75 cm² flasklara aktarıldı.

BEAS-2B hücre soyu insan akciğer dokusundan türetilmiş bir insan tümörüjenik olmayan akciğer epitel hücre soyudur. BEAS-2B hücresi için %10 FBS ve %1 penisilin streptomisin (PES) içeren RPMI Medium 1640 (1X) (Roswell Park Memorial Institute) medyumunu hazırlandı ve 175 cm²'lik büyük flasklarda ekilen hücreler %5 CO₂ içeren inkübatörde, 37°C'de inkübe edilerek çoğaltıldı. Hücreler yukarıda belirtilen şekilde dondurularak saklandı.

3.2. KRİPTONİN'İN ÇÖZÜLMESİ VE SULANDIRILMASI

Yurt dışında kriptonin Elabscience üretici firma tarafından %95 saflıkta HPLC yöntemi ile sentezlendi. Peptid hidrofilik-hidrofobik durumu göz önüne alınarak konsantrasyon 1 mg/ml olacak şekilde PBS'te stok (1mg/ml) olarak çözüldü. Sterilizasyon amacı ile peptid çözeltisi 0,22 µm por çaplı membran filtreden geçirildi ve alikotlanarak -20'ye kaldırıldı.

3.3. HÜCRE CANLILIK TESTİ

MTT (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il] -2,5 difenil tetrazolyum bromür) testi, MTT'nin mitokondriyal aktiviteyi belirleyen canlı hücreler tarafından formazan kristallerine dönüştürülmesine dayanır (Van Meerloo ve diğ., 2011). Tetrazolyum tuzu olan MTT sarı rektir. MTT, metabolik olarak aktif hücrelerde bulunan dehidrojenazlar ve indirgeyici ajanlarla indirgendiğinde, suda çözünmeyen mor-mavi formazan kristallerini oluşturur (Stockert ve diğ., 2012). Formazan kristallerinin organik çözücülerde çözünmesi ile oluşan mor rengin yoğunluğu canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Antimikrobiyal peptidin A549 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisini öğrenmek için MTT testi yapılmıştır. MTT testi 96 kuyucuklu pleytlerde yapılır. Bunun için 75 cm² flasklarda çoğaltılan A549 ve BEAS-2B hücreleri tripsin- EDTA ile kaldırılır ve santifüj yapılır. Toplanmış hücre pelletleri medyum ile süspanse edildikten sonra sayım yapılır.

Hücreler her kuyucukta 100 µl'de 10000 hücre olacak şekilde ekildi ve ertesi gün kuyucuklardaki medyum alınıp, kontrol grubuna yeni medyum, diğer kuyucuklarına ise 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200 µg/ml doz konsantrasyonunda kriptonin uygulanmıştır. Kriptonin uygulanmasından 6, 12 ve 24 saat sonra her kuyucuğa 30 µl hacminde 5 mg/ml konsantrasyonda MTT eklendi ve 4 saat %5 CO₂'li inkübatörde, 37°C'de bekletildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklarda oluşan formazan kristalleri, her kuyucuğa 100 µl DMSO eklenmesi ile çözüldürüldü ve pleytler 5 dakika boyunca 300 rpm'de orbital çalkayıcıda çalkalandı. Optik yoğunluk 570 nm test dalgaboyu ve 630 nm referans dalga boyunda okundu. Bu testte, kriptoninin 8 farklı konsantrasyonunun her biri için her pleytte 5 kuyu çalışılmış ve her deney 3 kez yapılmıştır.

Antikanser ilaç olan doksorubisin'in kriptonin ile etkisini öğrenmek için hücre canlılık analizi yaptık. İlk önce ekilen hücelere doksorubisin'in 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 100 μM konsantrasyonları uygulandı, her pleytte 5 kuyu çalışıldı ve 3 tekrar yapıldı; 48 ve 72 saat sonra hücre canlılık analizi sonuçları alındı. Doksorubisin'in dozuna karar verdikten sonra sinerjik etkiye bakmak için kontrol grubu, 1 μM DOX, 1 μM DOX + 5 $\mu\text{g/ml}$ kriptonin, 5 μM DOX, 5 μM DOX + 5 $\mu\text{g/ml}$ kriptonin konsantrasyonları uygulandıktan 48 saat sonra hücre canlılığı ölçüldü.

Hücre canlılığı kontrol kuyucuklarının absorbansına kıyaslanarak % hücre canlılığı olarak ifade edilmiştir ve kriptonin peptidi uygulanmış kuyucuklardan elde edilen değerler kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir.

3.4. LAKTAT DEHİDROGENAZ SALINIMININ ÖLÇÜMÜ

Laktat dehidrogenaz (LDH) salınım testi, hücre dışı ortamdaki laktat dehidrogenaz aktivitesinin ölçülmesine dayanır. Güvenilirlik, hız ve basit değerlendirme bu testin özelliklerinden bazılarıdır. Hücre içi LDH kaybı ve kültür ortamına salınması, hücre zarı hasarına bağlı geri dönüşümsüz hücre ölümünün bir göstergesidir (Fotakis ve Timbrell, 2006). Bu peptidin A549 akciğer kanser hücre soyu üzerine sitotoksik etkisi hasarlı hücrelerden salınan LDH aktivitesini ölçülmesi ile belirlenmiştir ve bunun için Sitotoksite Saptama Kiti, LDH (Pierce) kullanılmıştır.

LDH testinde kriptoninin uygulandığı grupların yanı sıra negatif kontrol, hücrelerden spontan salınım için kontrol grubu ve maksimum LDH salınımı için ise pozitif kontrol grubu çalışıldı. 75 cm^2 'lik flaskta çoğaltılan A549 hücreleri %0.25 tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırıldıktan sonra 96 kuyucuklu pleyte her kuyucukta 100 μl 'de 10000 hücre olacak şekilde ekildi ve ertesi gün kontrol grubunun medyumunu değiştirildi. Deney gruplarına ise 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 $\mu\text{g/ml}$ dozlarda 6, 12, 24 saat boyunca kriptonin uygulandı. Tüm saatlerde, tüm deney grupları 5 kuyucuk çalışıldı ve 3 tekrar yapıldı. Pozitif kontrol grubunda ise kuyucuklara 5 μl lizis solüsyonu (%2'lik Triton-X-100) eklendi ve %5 CO_2 'li inkübatörde, 37°C'de inkübe edildi. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda Pierce LDH Sitotoksisite Ölçüm kiti içinde bulunan 11.4 ml substrat karışımı 0.6 ml ölçüm tamponu ile karıştırılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Deney sonrası tüm kuyucuklardan 50 μl kültür medyumunu alınıp başka bir 96

kuyucuklu pleyte aktarıldı ve üzerine 50 µl reaksiyon karışımı eklendi. Oda ısısında karanlıkta 30 dakika inkübasyon sonrası her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve optik yoğunluk 490 nm test dalga boyu ve 690 nm referans dalga boyunda ölçüldü. Pozitif kontrol, kontrol ve deney gruplarından negatif kontrolün ortalama absorbans değerleri çıkarıldı ve pozitif kontrol grubu % 100 sitotoksik olduğu kabul edilerek, kontrol ve deneyli gruplar pozitif kontrol grubuna göre kıyaslanarak sitotoksisiteyi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ Sitotoksisite} = \frac{\text{Kontrol/Deney} - \text{Negatif kontrol} \times 100}{\text{Pozitif kontrol} - \text{Negatif kontrol}}$$

3.5. AKRIDİN ORANJ VE ETİDYUM BROMİD İLE HÜCRE ÖLÜM ŞEKLİNİN MORFOLOJİK TAYİNİ

A549 hücrelerinde apoptozda nukleus morfolojisindeki değişiklikler ve apoptotik cisim benzeri vesiküllerin oluşumu veya nekrotik hücre ölümü gibi sitolojik etkilerin araştırılması amacı ile hücreler peptid uygulamasını takiben 100 µg/ml Akridin Oranj ve ardından 100 µg/ml Etidyum Bromür ile boyandı. Ayrıca hücresel değişiklikler invert ışık mikroskopunda da görüntülendi.

A549 hücreleri yukarıda açıklandığı gibi 96 kuyucuklu pleyte ekildi. 24 saat sonra kontrol grubunun medyumunu tazelendi, diğer kuyucuklara ise farklı (10, 25, 50, 100, 200 µg/ml) konsantrasyonlarda uygulanarak 24 saat inkübasyon yapıldı. Ardından PBS içinde 100 µg/ml Akridin Oranj boyası hazırlandı, her kuyucuğa 10 µl uygulandı ve 7 dakika inkübasyon yapıldı. Aynı şekilde PBS içinde 100 µg/ml Etidyum Bromid boyası hazırlayıp 10 µl kuyucuklara eklendi ve 5 dakika daha inkübasyon yapıldı. Hücreler floresan mikroskop (Nikon DS5MCU2)'ta FITC/CY3 filtresi kullanılarak görüntülendi ve NIS Elements yazılımı ile fotoğrafları alındı.

3.6. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN HÜCRE İÇİ SEVİYELERİNİN ÖLÇÜLMESİ

Mitokondri reaktif oksijen türlerinin (ROS) ana kaynaklarından biri olarak kabul edilir. ROS'un aşırı üretimi hücre içi oksidatif stres durumuna neden olabilir ve bu da kalıcı hücre hasarına neden olabilir. Bu nedenle, ROS'un hücre içi birikimi sadece belirli doku ve organların işlevlerini bozmakla kalmaz, aynı zamanda tüm organizmanın erken ölümüne de yol açabilir (Wojtala ve diğ., 2014). Antimikrobiyal peptidlerin hücre içerisinde mitokondri membran hasarına yol açması ROS miktarının artmasına ve apoptotik hücre ölümünün indüklenmesine yol açabilir. Bu olası etkileri araştırmak için peptid uygulaması sonrası hücre içi ROS seviyesi ölçülmüştür. Bu amaçla hücre içinde ROS ile parçalanmış ve floresan ışığa veren hidrofobik 2',7'- Diklorofluoresin Diasetat (DCDFA) boyası kullanılmıştır (Mittler, 2017). Yukarıda açıklandığı şekilde hücreler farklı konsantrasyonlarda peptid ile 24 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası hücrelere %10 FBS içeren PBS içerisinde hazırlanmış 10 μ M DCDFA uygulandı. DCDFA ile 45 dakika 37C'de inkübasyon sonrası kuyucuklar tekrar yıkanarak parçalanmış DCDFA'dan salınan floresan ışığa 485 nm eksitasyon/535 nm emisyon dalga boylarında fluometre (BioTek, ABD) yardımı ile ölçüldü. Her kuyucuktaki protein miktarı ayrıca Bradford yöntemi ile belirlendi ve kontrol grubundaki optik yoğunluk proteine normalize edilerek hesaplama yapıldı.

3.7. PROTEİN MİKTARININ BRADFORD YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

Örneklerdeki protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile ölçüldü. Bradford yönteminde "Coomassie Brilliant Blue G-250" boyası aromatik amino asitler ile reaksiyona girerek renk değiştirmektedir ve bu renk protein miktarı ile doğru orantılıdır. Standart olarak sığır serum albumin (BSA) kullanıldı. 1.46 mg/ml stok solüsyonundan 8, 10, 20, 40, 80 μ g/ml olarak 5 farklı konsantrasyonda standart solüsyonlar hazırlandı. 160 μ l standart solüsyonlar ve 1:50 oranında sulandırılan örneklerden 160 μ l 96 kuyucuklu pleyttteki kuyucuklara eklendi ve her kuyucuğa 40 μ l Bradford boyası eklenerek pipetaj yapıldı. Optik yoğunluk 595 nm dalga

boyutunda mikroplyt okuyucuda (BioTek, ABD) ölçüldü. Standart solüsyonların absorbandsından elde edilen standart grafik yardımı ile örneklerdeki protein miktarı hesaplandı.

Tüm örneklerdeki protein yukarıda açıklandığı gibi Bradford yöntemi ile hesaplandı ve her örnekten 40 µg protein içeren hacim hesaplanarak ultrasaf su ile 20 µl'ye tamamlandı. Eşit hacimde "laemmlı solüsyonu" eklenerek 10 dakika 100⁰ C'de proteinler denature edildi.

3.8. WESTERN BLOTLAMA YÖNTEMİ

75 cm² flasklarda çoğaltılan A549 hücreleri 25 cm² flasklara her flaskta 1 milyon hücre olacak şekilde ekildi. Ertesi gün kontrol grubundaki flaskların medyumunu değiştirildi ve diğer flasklara ise 25, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda kriptonin uygulandı.

24 saat sonra hücreler, hücre lizis tamponu (Invitrogen) eklenerek kazıyıcı ile kazındı ve küçük endorflara alındı. 30 dakika buzda bekletilen lizat 50 saniye boyunca sonike edildi ve daha sonra 13.000 g'de 10 dakika +4⁰ C'de santrifüj edildi ve supernatant toplandı.

Tüm örneklerdeki protein yukarıda açıklandığı gibi Bradford yöntemi ile hesaplandı ve her örnekten 40 µg protein içeren hacim hesaplanarak ultrasaf su ile 20 µl'ye tamamlandı. Eşit hacimde laemmlı solüsyon eklenerek 10 dakika 100⁰ C'de proteinler denatüre edildi.

Nekrotik hücre ölümü esnasında hücrelerden salınan ve kültür medyumuna geçen HMGB1'i belirlemek amacı ile peptid uygulamasını takiben hücre kültür medyumlarında HMGB1 protein varlığı araştırılmıştır. A549 hücreleri 25, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarındaki peptid ile inkübe edildikten sonra hücre kültürü medyumlarından 500 µl alındı ve Amicon 10K ultrafiltrasyon sistemi kullanılarak 15.000 g'de 10 dakika +4⁰ C santrifüj yapılarak ultrafiltrasyon yapıldı. Medyum yoğunlaştırıldıktan sonra Bradford yöntemiyle protein miktarı hesaplandı ve denatüre edilerek jele yüklendi.

3.8.1. SDS-PAGE Jelin Hazırlanması

Proteinlerin hücre içi seviyeleri araştırmak için Tablo 3.8.1.A'de içeriği belirtilen %10'luk SDS-PAGE hazırlandı ve proteinler jele yüklendi. Proteinler kademeli olarak arttırılan elektriksel alan uygulanarak büyüklüklerine göre ayrıştırıldı ve daha sonra yarı ıslak aktarım ile jelden nitroselülöz membrana aktarım yapıldı.

Membranlar aktarım sonrası TBS (pH 7.8)'e alındı ve %10'luk Tween 20 içeren TBS (TBST) içerisinde hazırlanan %5'lik yağsız süt tozu solüsyonunda 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bloklama solüsyonu sonrası, Tablo 3.8.1.B'de belirtilen primer antikorlar % 2,5'luk yağsız süt tozu içeren TBST içerisinde (antikor dilüsyon solüsyonu) sulandırıldı ve membranlar primer antikor solüsyonunda bir gece +4 °C'de inkübe edildi. Primer antikor sonrası membranlar TBST ile üç kez yıkandı. Her primer antikora uygun yaban turpu peroksidazı (HRP) konjuge sekonder antikorlar, antikor dilüsyon solüsyonunda 1:5000 oranında sulandırıldı ve membranlar oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. TBST ile yine üç kez yıkanan membranlar, TBS ile 10 dakika daha yıkadıktan sonra kemiluminesans görüntüleme için HRP'nin substratı olan Luminol solüsyonu ile 5 dakika inkübe edildi. İmmünpozitif bantlar ChemiDoc™ MP görüntüleme cihazında (Bio-Rad, ABD) görüntülendi ve Image Lab 6.1 (Bio-Rad, 2020, ABD) yazılımı kullanılarak bant yoğunlukları hesaplandı. Her örnekten 40 µg eşit protein yüklemesinin kontrolü olarak membranlara β-aktin antikoruna uygulandı ve protein miktarı immünpozitif bandın β-aktin immünpozitif bandına bölünmesiyle belirlendi.

Tablo 3.8.1.A: SDS-PAGE içeriği.

Malzeme	%10 Alt jel	%3 Üst jel
Su	4.81ml	3.262 ml
Akrilamid/Bis-Akrilamid, (37.5:1) 40% (BioShop)	2.49 ml	412.5 µl
Ph 8.8, 1.5M Tris-HCL, (Bio-Rad)	2.5 ml	-
pH 6.8, 0.5M Tris-HCL, (Bio-Rad)	-	980µl
%10 Sodyum Dodesil Sülfat	100µl	50µl
%10 Amonyum Persülfat	66µl	50µl
Tetra Etilen Metilendiamin	5µl	7µl

Tablo 3.8.1.B: Western blotlama esnasında kullanılan antikorlar.

Antikor	Konak	Dilüsyon	Marka-katalog numarası
ATG5	Tavşan	1:200	BosterBio, PA2260
Aktif kaspaz 3	Tavşan	1:200	BosterBio, M00334-3
Beclin 1	Tavşan	1:200	BosterBio, PA1847
BAX	Tavşan	1:200	BosterBio, A00183
HMGB1	Tavşan	1:500	Biossusa, bs-0664R
β aktin	Fare	1:500	SantaCruz, 471778
LC3B	Tavşan	1:1000	Sigma, L8918
Anti-tavşan	Keçi	1:5000	BosterBio, BA 1054
Anti-fare	Keçi	1:5000	BosterBio, BA 1050

3.9. İSTATİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analiz eşleştirilmemiş çift kuyruklu Student T-testi kullanılarak GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA) programı ile gerçekleştirilmiştir. Üç bağımsız deneyin sonuçları ortalama±standart sapma olarak sunulmuştur ve 0.05'ten küçük olan p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



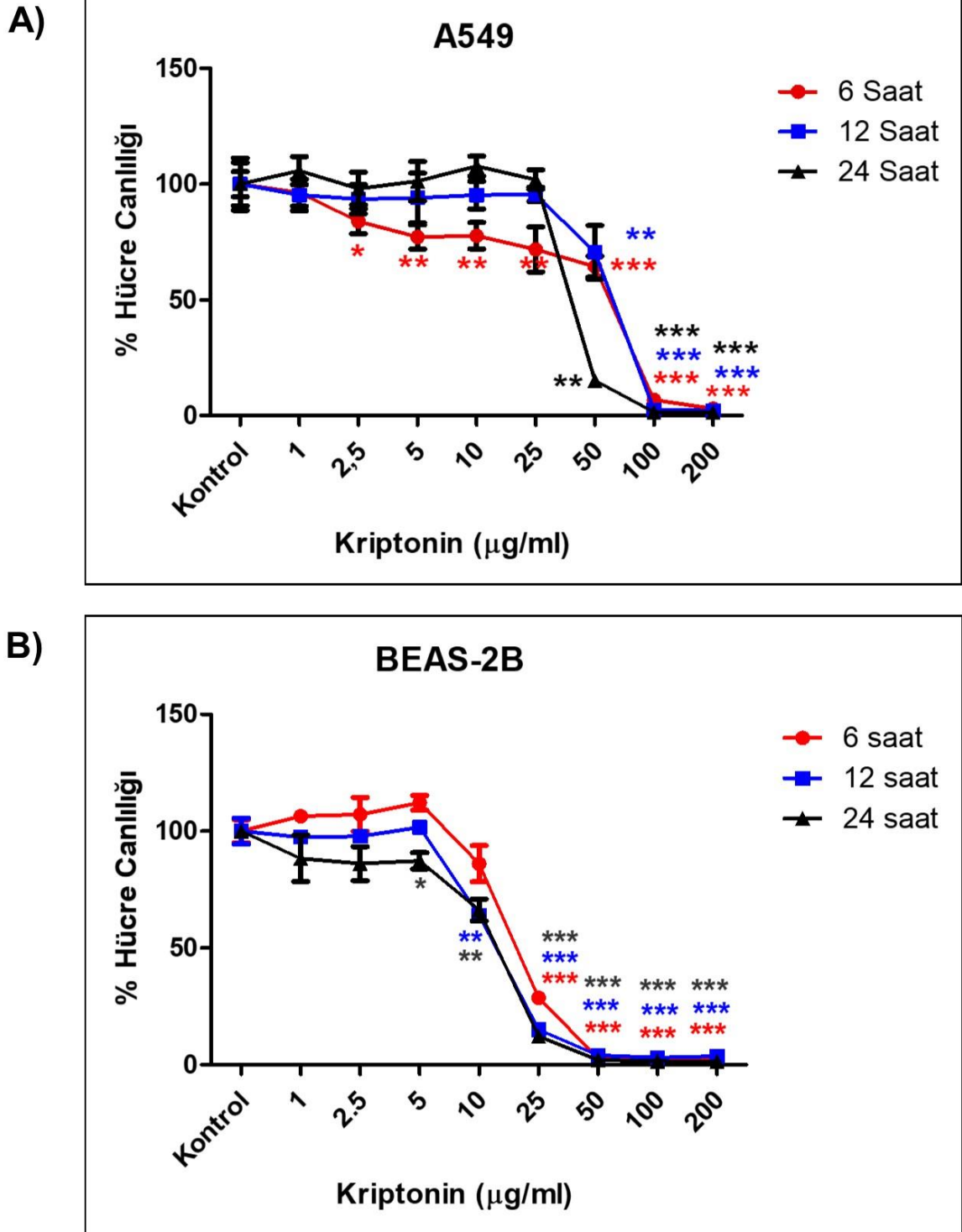
4. BULGULAR

4.1. KRİPTONİN'İN A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARINDA HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ

A549 hücrelerine 6, 12 ve 24 saat boyunca kriptonin uygulaması kontrol grubuna göre, hücre canlılığını doza bağlı olarak düşürmüştür. 12 ve 24 saat peptid uygulaması 50, 100 ve 200 µg/ml dozlarında hücre canlılığını anlamlı olarak azaltırken, 6 saatlik uygulamada hücre canlılığındaki anlamlı azalma 2.5 µg/ml konsantrasyondaki dozdan itibaren gözlenmiştir (Şekil 4.1.A). Hücre canlılığındaki bu azalmalarda 6 saatlik 50, 100 ve 200 µg/ml dozlarında peptit uygulamasından sonra ileri düzeyde bir anlamlılık ($p<0.001$) gözlenmiştir. 12 ve 24 saatlik 50 µg/ml dozda peptit uygulamasından sonra orta düzeyde bir anlamlılık ($p<0.01$) gözlenirken, 100 ve 200 µg/ml dozlarda peptit uygulamasından sonra ileri düzeyde bir anlamlılık ($p<0.001$) gözlenmiştir.

A549 hücrelerine 6, 12 ve 24 saat boyunca kriptonin uygulaması sonucu hücre canlılık değerleri 6 saat için kontrol: 100 ± 9.3 ; 1 µg/ml: 96.3 ± 5.8 ; 2.5 µg/ml: 83.98 ± 5.4 ; 5 µg/ml: 77.2 ± 5.3 ; 10 µg/ml: 77.74 ± 5.7 ; 25 µg/ml: 71.82 ± 9.8 ; 50 µg/ml: 64.4 ± 4.6 ; 100 µg/ml: 6.85 ± 1.7 ; 200 µg/ml: 3.1 ± 0.28 'dir. Hücre canlılık değerleri 12 saat için kontrol: 100 ± 11 ; 1 µg/ml: 95.3 ± 6.8 ; 2.5 µg/ml: 93.55 ± 6.4 ; 5 µg/ml: 94.07 ± 10.7 ; 10 µg/ml: 95.3 ± 5.9 ; 25 µg/ml: 95.6 ± 3.1 ; 50 µg/ml: 70.6 ± 11 ; 100 µg/ml: 2.6 ± 0.4 ; 200 µg/ml: 2.16 ± 0.13 'dür. Hücre canlılık değerleri 24 saat için kontrol: 100 ± 5.4 ; 1 µg/ml: 105.8 ± 6.1 ; 2.5 µg/ml: 98.1 ± 7.1 ; 5 µg/ml: 101.3 ± 8.5 ; 10 µg/ml: 107.8 ± 4.3 ; 25 µg/ml: 102 ± 4.2 ; 50 µg/ml: 15.2 ± 0.8 ; 100 µg/ml: 1.5 ± 0.2 ; 200 µg/ml: 1.3 ± 0.3 'tür (Şekil 4.1.A).

Normal insan akciğer hücreleri olarak kullandığımız insan bronşiyal epitel hücreleri (BEAS-2B) üzerinde kriptonin'in hücre canlılığı üzerindeki etkileri benzer şekilde 6, 12 ve 24 saat boyunca araştırıldı. 6 saat boyunca kriptonin uygulanması 25 µg/ml kriptonin konsantrasyonundan itibaren ($p<0.001$), 12 saat boyunca kriptonin uygulanması 10 µg/ml konsantrasyondan itibaren ($p<0.01$) ve 24 saat kriptonin uygulanmasında ise 5 µg/ml kriptonin konsantrasyondan itibaren ($p<0.05$) hücre canlılığında anlamlı bir azalma gözlenmiştir. 12 ve 24 saat kriptonin uygulaması ile 25 µg/ml konsantrasyondan itibaren hücre canlılığı ileri düzeyde azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.1.B).



Şekil 4.1: (A) 6, 12 ve 24 saat boyunca uygulanan kriptonin A549 hücre canlılığını doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). (B) 6, 12 ve 24 saat boyunca uygulanan kriptonin BEAS-2B hücre canlılığını doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

BEAS-2B hücrelerine 6, 12 ve 24 saat boyunca kriptonin uygulaması sonucu hücre canlılık değerleri 6 saat için kontrol: 100 ± 8.6 ; 1 $\mu\text{g/ml}$: 106.5 ± 1.9 ; 2.5 $\mu\text{g/ml}$: 107.2 ± 12.5 ; 5 $\mu\text{g/ml}$: 112.2 ± 5.5 ; 10 $\mu\text{g/ml}$: 86 ± 13.4 ; 25 $\mu\text{g/ml}$: 28.7 ± 4.1 ; 50 $\mu\text{g/ml}$: 2.9 ± 0.6 ; 100 $\mu\text{g/ml}$: 2.5 ± 0.6 ; 200 $\mu\text{g/ml}$: 2.5 ± 0.6 'dır. Hücre canlılık değerleri 12 saat için kontrol: 100 ± 9.6 ; 1 $\mu\text{g/ml}$: 97.42 ± 4.2 ; 2.5 $\mu\text{g/ml}$: 97.85 ± 1 ; 5 $\mu\text{g/ml}$: 101.7 ± 2.4 ; 10 $\mu\text{g/ml}$: 64.1 ± 4.2 ; 25 $\mu\text{g/ml}$: 15.05 ± 3.3 ; 50 $\mu\text{g/ml}$: 4.1 ± 0.7 ; 100 $\mu\text{g/ml}$: 3 ± 1 ; 200 $\mu\text{g/ml}$: 3.6 ± 1 'dir. Hücre canlılık değerleri 24 saat için kontrol: 100 ± 3.5 ; 1 $\mu\text{g/ml}$: 88.4 ± 17.2 ; 2.5 $\mu\text{g/ml}$: 86.2 ± 12.7 ; 5 $\mu\text{g/ml}$: 87.3 ± 6.1 ; 10 $\mu\text{g/ml}$: 66.3 ± 8.1 ; 25 $\mu\text{g/ml}$: 12.2 ± 2 ; 50 $\mu\text{g/ml}$: 2.04 ± 0.8 ; 100 $\mu\text{g/ml}$: 1.6 ± 0.3 ; 200 $\mu\text{g/ml}$: 1.4 ± 0.3 'tür (Şekil 4.1.B).

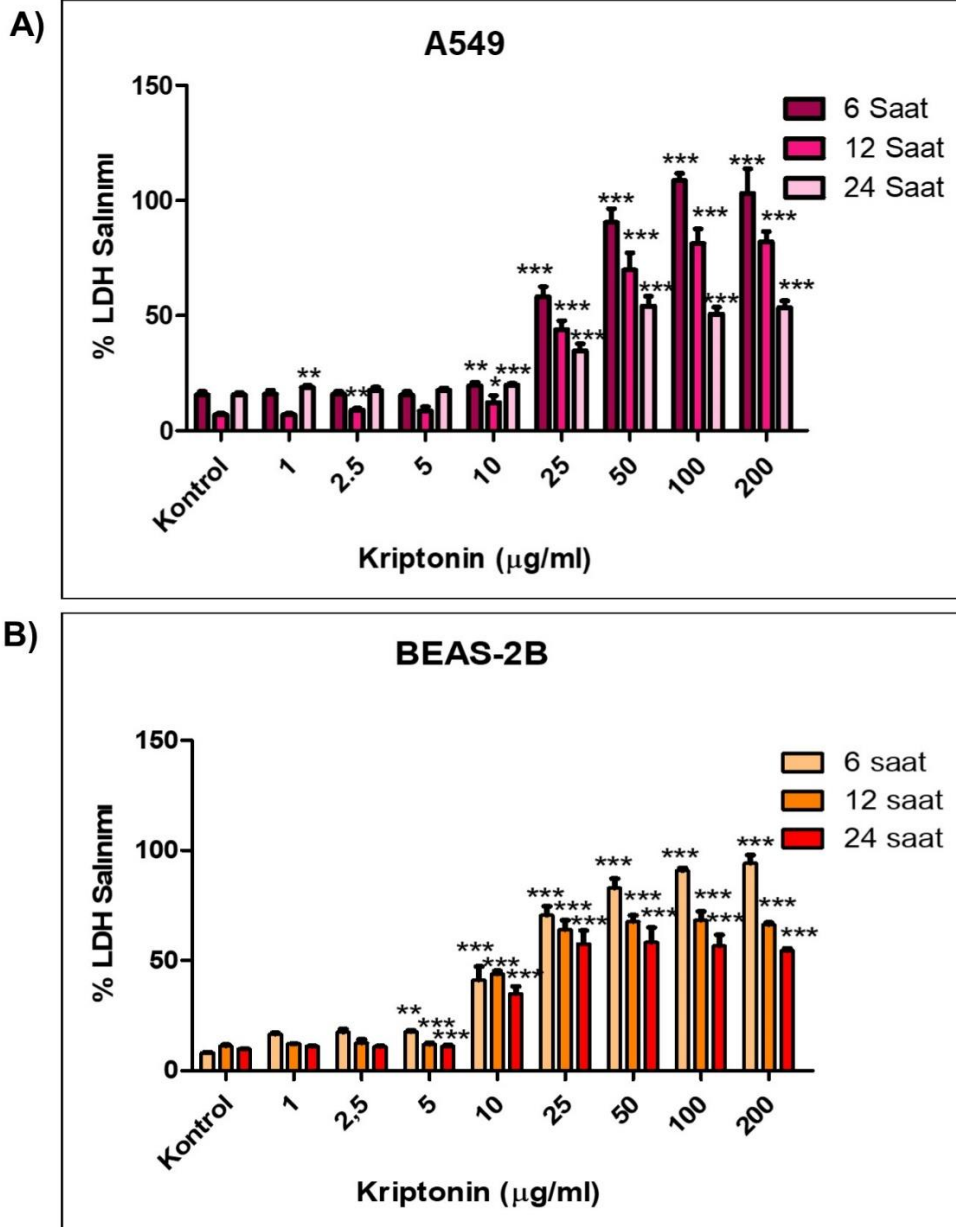
4.2. KRİPTONİN'İN A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARINDA SİTOTOKSİK ETKİSİ

Kriptonin ile gözlemlediğimiz hücre ölümünde peptidin hücre membranı ile etkileşmesini ve hücre ölümünün nekrotik yolla gerçekleşip gerçekleşmediğini anlayabilmek için peptid ile muamele sonrası hücre kültür medyumuna geçen laktat dehidrogenaz (LDH) enziminin aktivitesinin ölçülmesi gerçekleştirilmiştir. 6 saat peptide maruz kalan hücrelerde kontrole göre 10 $\mu\text{g/ml}$ dozda salınan LDH miktarı orta derecede anlamlıyken ($p < 0.01$), 12 saat peptid uygulamasında kontrole göre 2.5 $\mu\text{g/ml}$ dozda salınan LDH miktarı orta derecede anlamlı iken ($p < 0.01$), 10 $\mu\text{g/ml}$ dozda salınan LDH miktarı ise az anlamlı ($p < 0.05$) olup, her iki dozda da 25 $\mu\text{g/ml}$ dozdan itibaren ileri düzeyde bir anlamlılık ($p < 0.001$) gözlenmiştir. Farklı dozlarda 24 saat boyunca peptide maruz kalan hücrelerde kontrol grubuna göre, doza bağlı olarak hücrelerden salınan LDH enziminin miktarı ölçülen aktivite ile paralel olarak artış göstermiştir ($p < 0.01$; $p < 0.001$). LDH aktivitesindeki bu artış 1 $\mu\text{g/ml}$ dozda orta derecede anlamlı ($p < 0.01$) iken, 10 $\mu\text{g/ml}$ dozdan itibaren ileri düzeyde bir anlamlılık ($p < 0.001$) gözlenmiştir (Şekil 4.2.A).

A549 hücreleri için sitotoksikite değerleri 6 saat için kontrol: 15.5 ± 1.6 ; 1 $\mu\text{g/ml}$: 16 ± 1.5 ; 2.5 $\mu\text{g/ml}$: 15.8 ± 1.3 ; 5 $\mu\text{g/ml}$: 15.6 ± 1.4 ; 10 $\mu\text{g/ml}$: 19.6 ± 1.5 ; 25 $\mu\text{g/ml}$: 58.2 ± 4.3 ; 50 $\mu\text{g/ml}$: 90.4 ± 6 ; 100 $\mu\text{g/ml}$: 108.6 ± 3.2 ; 200 $\mu\text{g/ml}$: 103.1 ± 10.6 'dır. A549 hücreleri için sitotoksikite değerleri 12 saat için kontrol: 6.9 ± 0.7 ; 1 $\mu\text{g/ml}$: 6.9 ± 0.6 ; 2.5 $\mu\text{g/ml}$: 9 ± 0.8 ; 5 $\mu\text{g/ml}$: 8.5 ± 1.9 ; 10 $\mu\text{g/ml}$: 12.2 ± 3.1 ; 25 $\mu\text{g/ml}$: 44 ± 3.8 ; 50 $\mu\text{g/ml}$: 70 ± 7.4 ; 100 $\mu\text{g/ml}$: 81.4 ± 6.4 ; 200 $\mu\text{g/ml}$: 82.1 ± 4.5 'dir.

A549 hücreleri için sitotoksosite değerleri 24 saat için kontrol: 15.72 ± 0.8 ; 1 $\mu\text{g/ml}$: 19 ± 1 ; 2.5 $\mu\text{g/ml}$: 17.6 ± 1.3 ; 5 $\mu\text{g/ml}$: 17.6 ± 1 ; 10 $\mu\text{g/ml}$: 19.8 ± 0.7 ; 25 $\mu\text{g/ml}$: 34.7 ± 3.1 ; 50 $\mu\text{g/ml}$: 54.2 ± 4.3 ; 100 $\mu\text{g/ml}$: 51 ± 3 ; 200 $\mu\text{g/ml}$: 53.5 ± 2.9 'dur (Şekil 4.2.A).

BEAS-2B hücreleri üzerinde kriptonin'in hücre sitotoksitesitesi üzerindeki etkileri benzer şekilde 6, 12 ve 24 saat boyunca araştırıldı. Sadece 6 saatlik 5 $\mu\text{g/ml}$ kriptonin uygulanması sonucu kontrole göre LDH salınımı anlamlı olarak artarken (** $p < 0.01$), 10-200 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlardan itibaren LDH salınımının oldukça anlamlı bir artış gösterdiği (** $p < 0.001$) dikkati çekmektedir (Şekil 4.2.B).

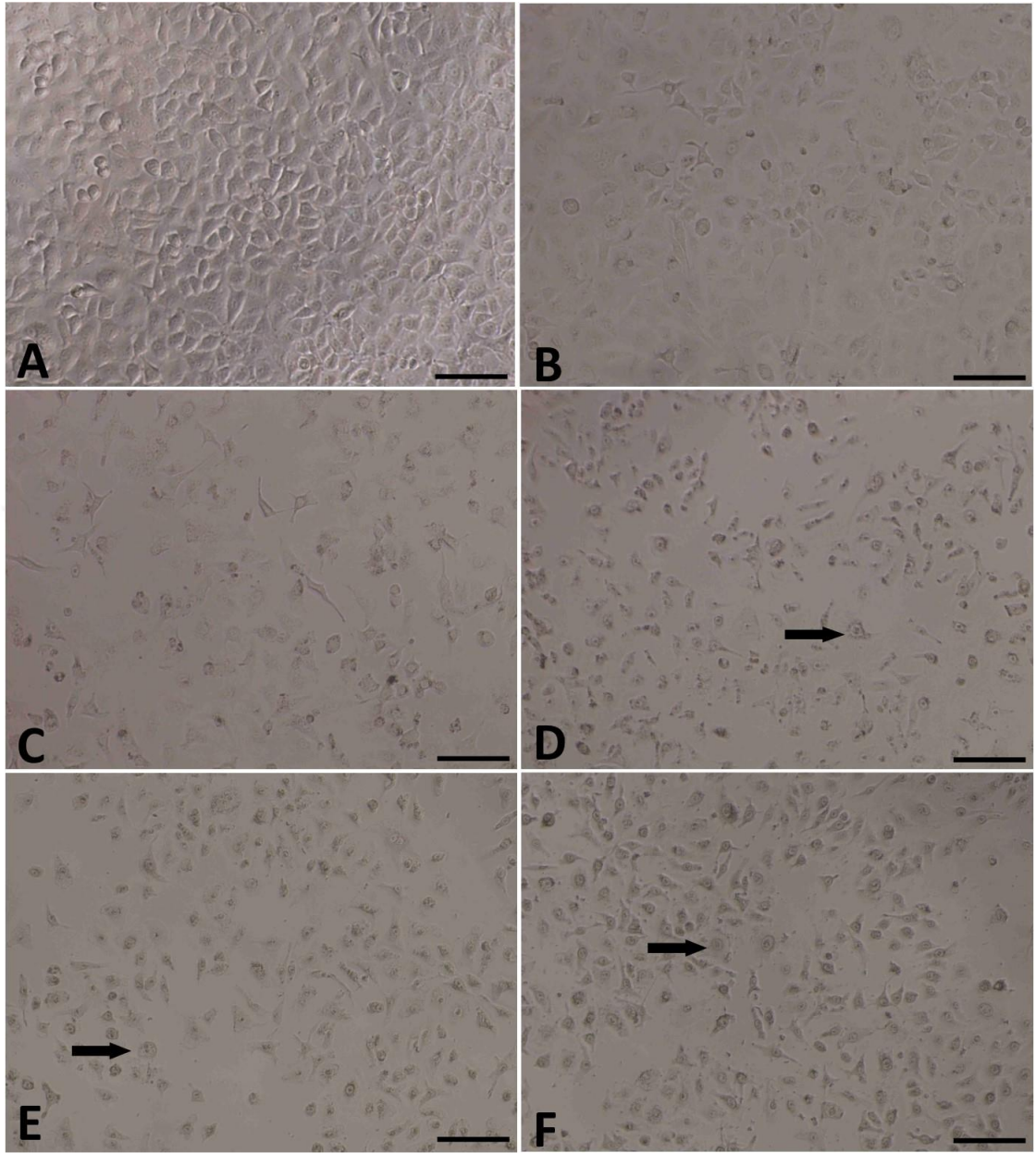


Şekil 4.2: 6, 12 ve 24 saat boyunca kriptonin uygulaması hücrelerden salınan LDH enzimini doza bağlı olarak (A) A549 hücrelerinde ve (B) BEAS-2B hücrelerinde anlamlı bir şekilde arttırmıştır (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$).

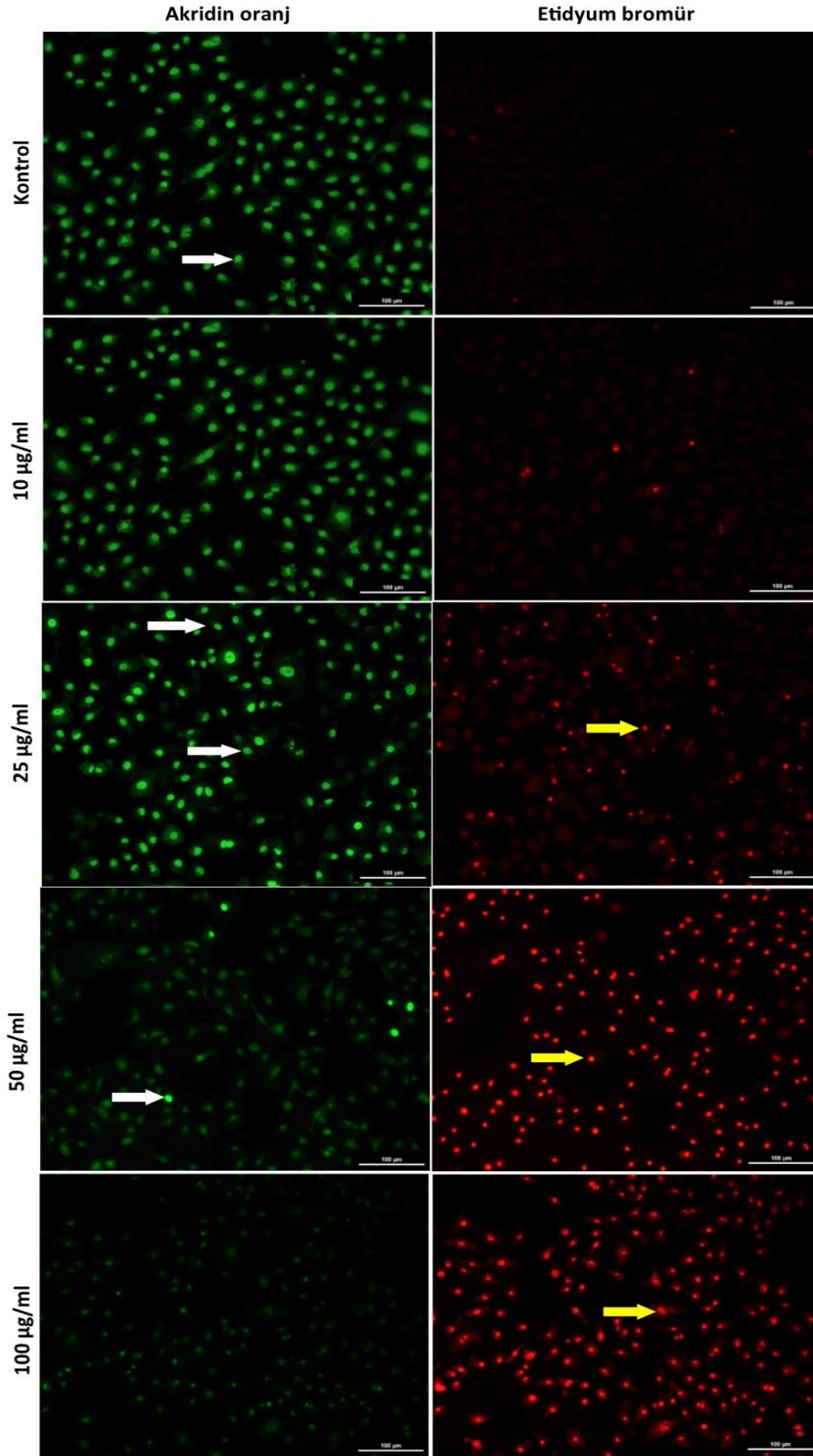
BEAS-2B hücreleri için sitotoksosite değerleri 6 saat için kontrol: 8.1 ± 0.3 ; 1 $\mu\text{g/ml}$: 16.6 ± 0.6 ; 2.5 $\mu\text{g/ml}$: 17.4 ± 1.5 ; 5 $\mu\text{g/ml}$: 17.7 ± 0.6 ; 10 $\mu\text{g/ml}$: 41.1 ± 6.2 ; 25 $\mu\text{g/ml}$: 70.5 ± 4.2 ; 50 $\mu\text{g/ml}$: 83 ± 4.2 ; 100 $\mu\text{g/ml}$: 90.8 ± 1.3 ; 200 $\mu\text{g/ml}$: 94.2 ± 3.7 'dir. BEAS-2B hücreleri için sitotoksosite değerleri 12 saat için kontrol: 11.2 ± 0.6 ; 1 $\mu\text{g/ml}$: 12.2 ± 0.1 ; 2.5 $\mu\text{g/ml}$: 12.6 ± 1.5 ; 5 $\mu\text{g/ml}$: 12 ± 0.7 ; 10 $\mu\text{g/ml}$: 44 ± 1.3 ; 25 $\mu\text{g/ml}$: 64 ± 4.3 ; 50 $\mu\text{g/ml}$: 68 ± 2.9 ; 100 $\mu\text{g/ml}$: 68.3 ± 3.9 ; 200 $\mu\text{g/ml}$: 66.3 ± 1 'dir. BEAS-2B hücreleri için sitotoksosite değerleri 24 saat için kontrol: 9.8 ± 0.3 ; 1 $\mu\text{g/ml}$: 11 ± 0.2 ; 2.5 $\mu\text{g/ml}$: 10.9 ± 0.3 ; 5 $\mu\text{g/ml}$: 11 ± 0.7 ; 10 $\mu\text{g/ml}$: 35 ± 3.4 ; 25 $\mu\text{g/ml}$: 57.6 ± 6.1 ; 50 $\mu\text{g/ml}$: 58.3 ± 6.7 ; 100 $\mu\text{g/ml}$: 56.6 ± 5 ; 200 $\mu\text{g/ml}$: 54.5 ± 1.1 'dir (Şekil 4.2.B).

4.3. KRİPTONİN'İN A549 HÜCRELERİNİN SİTOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Kriptonin ile indüklenen hücre ölümü sonucu A549 hücrelerinin morfolojilerinde meydana gelen değişiklikler farklı dozlarda 24 saat boyunca peptid uygulamasını takiben hem ışık mikroskopunda hem de floresan mikroskopta hücrelerin boyanmasını takiben incelenmiştir. Işık mikroskopundaki gözlemlerimize göre, 24 saat peptid uygulaması A549 hücre sayısında azalmaya yol açmış ve normal hücre şeklinin kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 4.3.1). Hücrelerin nekrotik ya da apoptotik yoldan ölümlerini nukleus şekli ve boyanma özelliklerine dayanarak incelemek için, hücreler peptid uygulamasını takiben 100 $\mu\text{g/ml}$ Akridin Oranj ve ardından 100 $\mu\text{g/ml}$ Etidyum Bromür ile boyandı ve floresan mikroskopta fotoğraflandı. A549 hücrelerinde büzülme, kondensasyon ve fragmentasyon gibi nukleus morfolojisindeki değişiklikler veya nekrotik hücre ölümü gibi sitolojik etkiler araştırıldı. Artan peptid konsantrasyonuna paralel olarak canlı hücre (beyaz ok) sayısı azalmış ve nekrotik hücre (sarı ok) sayısı artmıştır (Şekil 4.3.2). Bu bulgu hücrelerden salınan LDH enziminin yine doza bağlı olarak artması ile uyumludur.



Şekil 4.3.1: Kriptinin ile 24 saat boyunca peptid uygulaması sonrası hücrelerin ışık mikroskopundaki görüntüleri. (A) Kontrol grubu, (B) 10 µg/ml konsantrasyonda peptid uygulanan hücreler; (C) 25 µg/ml konsantrasyonda peptid uygulanan hücreler; (D) 50 µg/ml konsantrasyonda peptid uygulanan hücreler; (E) 100 µg/ml konsantrasyonda peptid uygulanan hücreler; (F) 200 µg/ml konsantrasyonda peptid uygulanan hücreler. ➡ : Normal şeklini kaybeden hücreler. Bar: 100 µm.

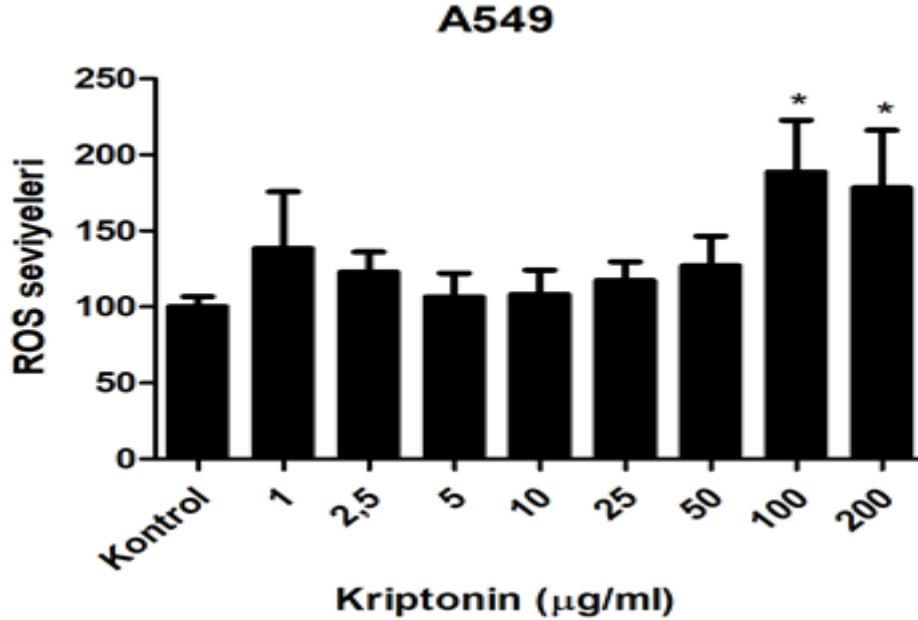


Şekil 4.3.2: Kriptonin ile 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda uygulanmış ve peptid uygulaması sonrası Akridin Oranj ve Etidyum Bromür ile hücreler boyanarak floresan mikroskopunda görüntülenmiştir. Artan peptid konsantrasyonuna paralel olarak canlı hücre (beyaz ok) sayısı azalmış ve nekrotik hücre (sarı ok) sayısı artmıştır. Bar: 100 µm.

4.4. KRİPTONİN'İN A549 HÜCRE İÇİ REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Kriptonin ile indüklenen hücre ölümü sonucu A549 hücrelerinin hücre ölümü ile artabilecek reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerini ölçmek için farklı dozlarda 24 saat boyunca peptid uygulanmış ve ardından hücre içi ROS ile parçalanıp floresan ışıma veren DCDFDA uygulanmıştır. Farklı kuyucuklardan elde edilen floresan ışıma protein miktarına bölünmüş ve elde edilen değerler kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. Kriptonin uygulaması ROS seviyelerinde değişiklik oluşturmuş, ancak bu değişiklik sadece 100 ve 200 µg/ml dozlarında anlamlı olarak artmıştır (*p<0.05) (Şekil 4.4).

24 saat kriptonin uygulaması sonucunda kontrol grubuna göre normalize edilen hücre içi ROS değerleri: Kontrol: 100±6.9; 1 µg/ml: 138.3±37.4; 2.5 µg/ml: 122.7±13.3; 5 µg/ml: 106.6±15.6; 10 µg/ml: 108.2±16.2; 25 µg/ml: 117.3±12.4; 50 µg/ml: 127±19.7; 100 µg/ml: 188.7±34.2; 200 µg/ml: 178.2±37.9'dur (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: 24 saat boyunca uygulanan kriptonin hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerini kontrole göre sadece 100 ve 200 µg/ml dozlarında anlamlı olarak arttırmıştır (*p<0.05).

4.5. A549 HÜCRELERİNDE KRİPTONİN'İN HÜCRE ÖLÜMÜ İLE İLGİLİ BAZI PROTEİN SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Çalışmada ATG5, Beclin1, LC3B, kaspaz3, Bax, HMGB1 proteinleri Western Blotlama yöntemi ile belirlendi ve kriptonin'in A549 hücrelerinde apoptotik (kaspaz3 ve Bax) (Şekil 4.5.1A) ve otofajiyle ilişkili proteinlerin (ATG5, Beclin1, LC3B) seviyelerini azalttığı (Şekil 4.5.1A ve B) gözlemlendi. Apoptotik protein olarak aktif kaspaz-3 seviyeleri 50 µg/ml ve 100 µg/ml kriptonin verilmesi ile anlamlı olarak azalmış ($p<0.01$; $p<0.001$), proapoptotik bir protein olan Bax ise sadece 100 µg/ml kriptonin verilmesi ile anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.01$) (Şekil 4.5.1A).

Belirlenen aktif kaspaz-3 seviyeleri (AU): Kontrol: 0.20 ± 0.01 ; 25 µg/ml: 0.14 ± 0.06 ; 50 µg/ml: 0.11 ± 0.02 ; 100 µg/ml: 0.04 ± 0.03 'tür. Belirlenen Bax seviyeleri (AU): Kontrol: 0.91 ± 0.09 ; 25 µg/ml: 0.93 ± 0.06 ; 50 µg/ml: 0.64 ± 0.23 ; 100 µg/ml: 0.37 ± 0.09 'dur (Şekil 4.5.1A).

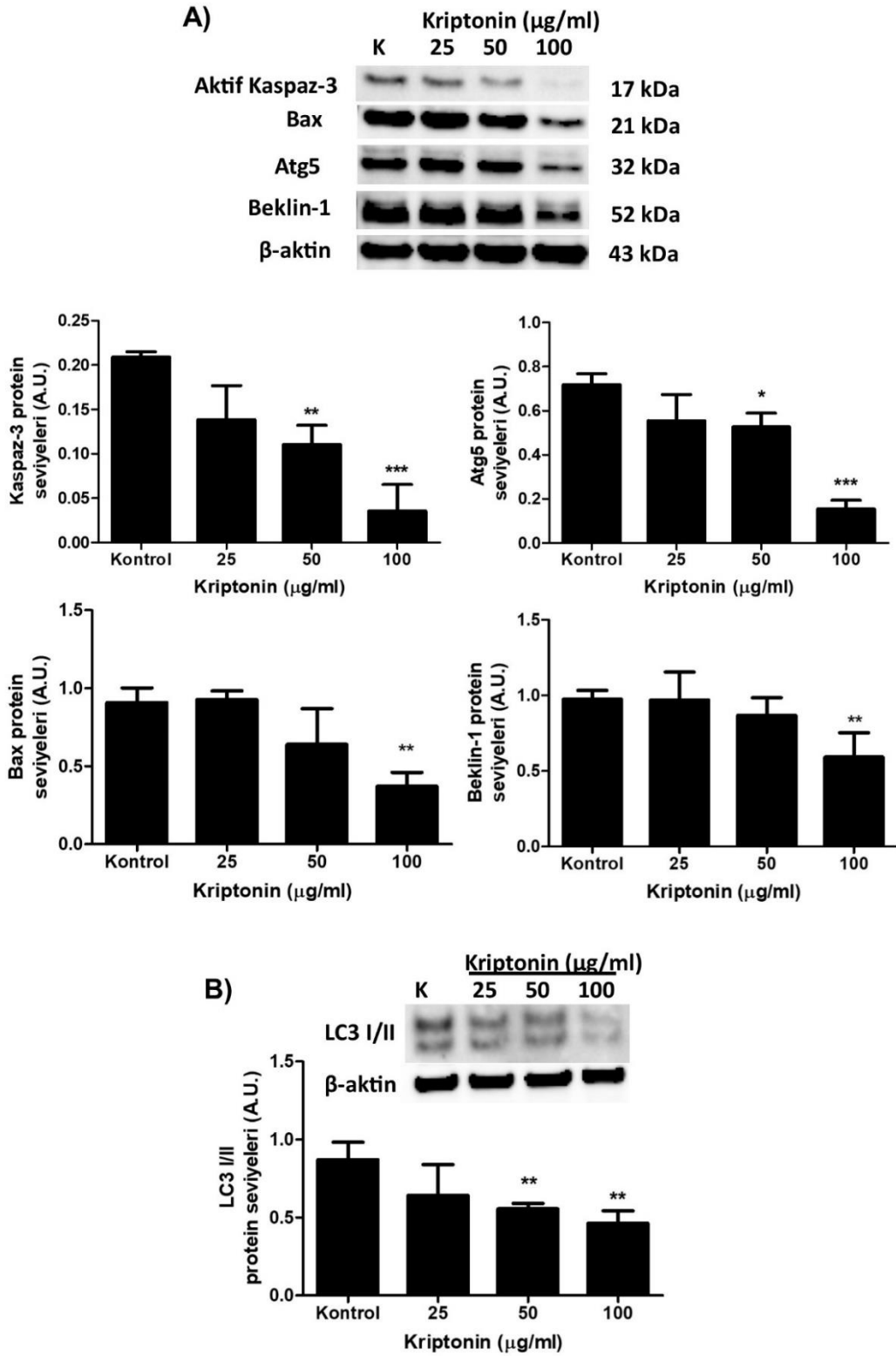
Otofaji ile ilişkili proteinlerden Atg5 ve LC3 50 µg/ml ($p<0.05$ ve $p<0.01$) ve 100 µg/ml ($p<0.001$ ve $p<0.01$) kriptonin verilmesi ile anlamlı olarak azalırken, Beclin-1 sadece 100 µg/ml ($p<0.01$) kriptonin verilmesi ile anlamlı olarak azalmıştır (Şekil 4.5.1A ve B).

Belirlenen Atg5 seviyeleri (AU): Kontrol: 0.72 ± 0.05 ; 25 µg/ml: 0.56 ± 0.2 ; 50 µg/ml: 0.53 ± 0.06 ; 100 µg/ml: 0.15 ± 0.04 'tür. Belirlenen Beclin-1 seviyeleri (AU): Kontrol: 0.97 ± 0.06 ; 25 µg/ml: 0.97 ± 0.18 ; 50 µg/ml: 0.87 ± 0.12 ; 100 µg/ml: 0.59 ± 0.16 'dır (Şekil 4.5.1A). Belirlenen LC3II/II seviyeleri (AU): Kontrol: 0.87 ± 0.11 ; 25 µg/ml: 0.64 ± 0.2 ; 50 µg/ml: 0.55 ± 0.03 ; 100 µg/ml: 0.46 ± 0.08 'dir (Şekil 4.5.1B).

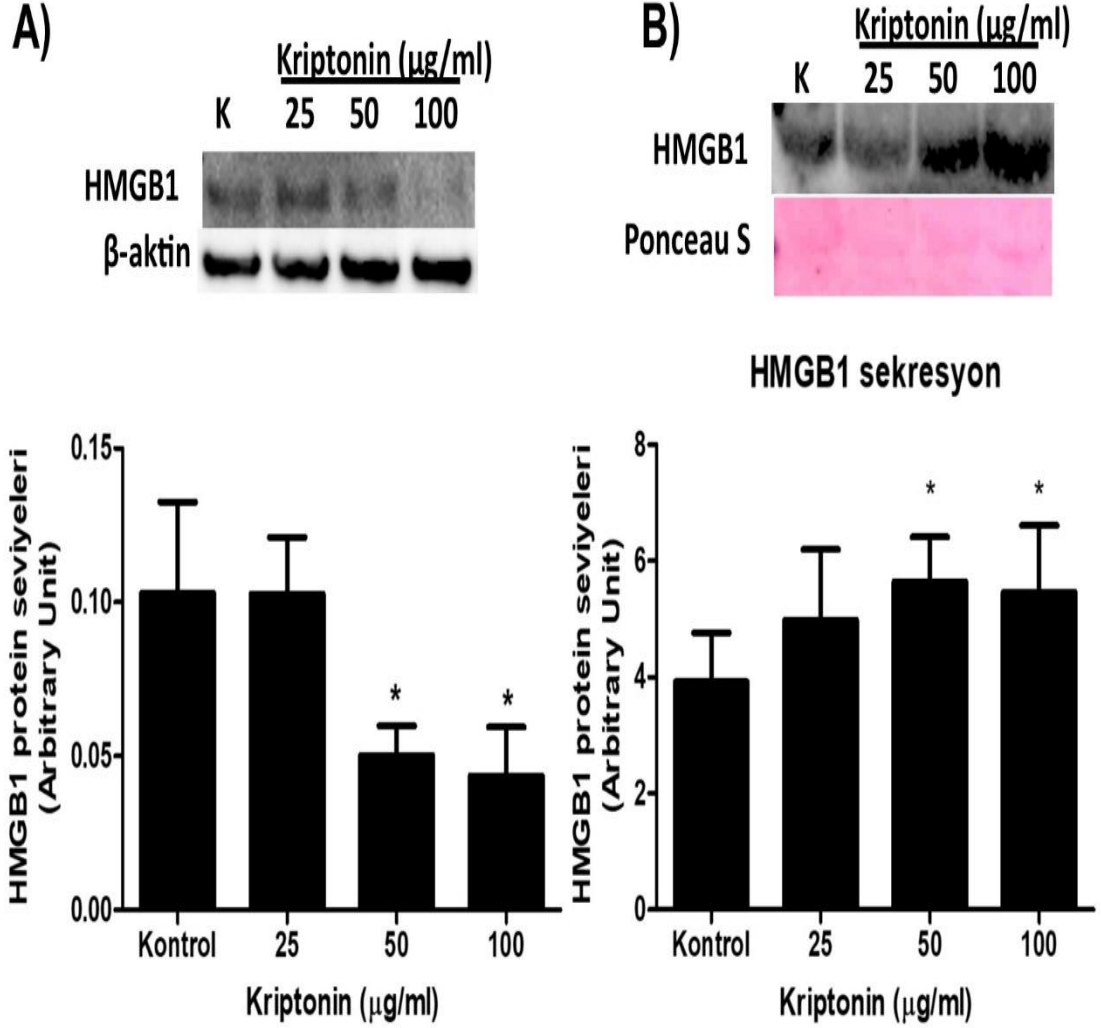
Histon olmayan bir DNA bağlayıcı protein olup, ROS artışına bağlı olarak gerçekleşen programlanmamış bir hücre ölüm tipi olan nekroz sonucu hücre lizatında belirenen HMGB1, 24 saat 50 ve 100 µg/ml kriptonin uygulanması ile anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.05$) (Şekil 4.5.2A). 24 saat kriptonin uygulanması sonrası hücrelerden salınan ve kültür medyumunda belirlenen HMGB1 50 ve 100 µg/ml kriptonin uygulanması ile anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$) (Şekil 4.5.2B).

Hücre lizatında belirlenen HMGB1 seviyeleri (AU): Kontrol: 0.10 ± 0.03 ; 25 µg/ml: 0.10 ± 0.02 ; 50 µg/ml: 0.05 ± 0.01 ; 100 µg/ml: 0.04 ± 0.02 'dir (Şekil 4.5.2.A). Ayrıca, hücre kültür

medyumunda belirlenen HMGB1 seviyeleri (AU): Kontrol: 3.9 ± 0.8 ; 25 $\mu\text{g/ml}$: 5 ± 1.2 ; 50 $\mu\text{g/ml}$: 5.6 ± 0.7 ; 100 $\mu\text{g/ml}$: 5.4 ± 1.1 'dir (Şekil 4.5.2B).



Şekil 4.5.1: (A) 24 saat kriptonin uygulaması sonrası hücre lizatında kaspaz-3, Bax, Atg5 ve Beklin-1 protein ifadelerindeki değişimler (* $p<0.05$) (** $p<0.01$) (** $p<0.001$). Yükleme kontrolü olarak β -Aktin kullanılmıştır. (B) 24 saat kriptonin uygulaması sonrası hücre lizatında LC3I/II protein ifadesindeki değişimler (** $p<0.01$). Yükleme kontrolü olarak β -Aktin kullanılmıştır.

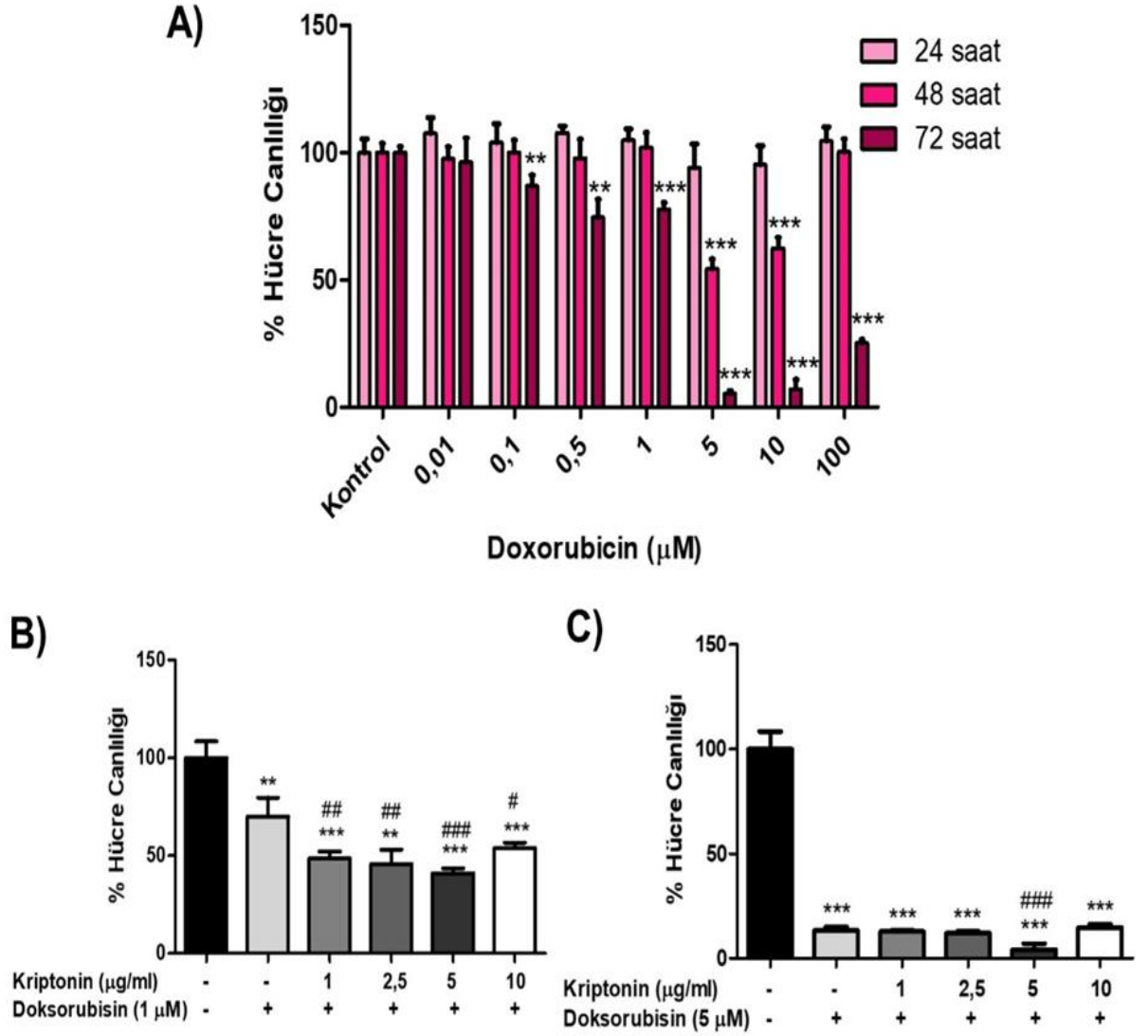


Şekil 4.5.2: (A) 24 saat kriptonin uygulaması sonrası hücre lizatında HMGB1 protein ifadelerindeki değişimler (* $p<0.05$). Yükleme kontrolü olarak β -Aktin kullanılmıştır. (B) Kriptonin uygulaması sonrası hücre kültür medyumunda belirlenen HMGB1 seviyelerindeki değişimler (* $p<0.05$). Eşit protein yüklemesi membranların Ponceau S boyanması ile kontrol edilmiştir.

4.6. A549 HÜCRELERİNDE TEK BAŞINA DOKSORUBİSİN'İN VE DÜŞÜK DOZLARDA DOKSORUBİSİN İLE KRİPTONİN'İN HÜCRE CANLILIK TESTİ BULGULARI

24 saat 0.01 μM , 0.1 μM , 0.5 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM ve 100 μM doksorubisin uygulaması hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya yol açmamıştır. 48 saat 5 μM ve 10 μM doksorubisin uygulaması hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azaltmıştır (** $p < 0.001$). 72 saat 0.1 μM ve 0.5 μM ve 1 μM doksorubisin uygulaması hücre canlılığında hafif bir azalmaya yol açarken, 5 μM , 10 μM ve 100 μM doksorubisin uygulaması hücre canlılığını belirgin bir şekilde azaltmıştır (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) (Şekil 4.6.A).

Doksorubisin uygulamasında hücre canlılık değerleri 24 saat için kontrol: 100 ± 5.4 ; 0.01 μM : 107.5 ± 6.2 ; 0.1 μM : 104 ± 7.3 ; 0.5 μM : 107.8 ± 2.6 ; 1 μM : 105 ± 4.3 ; 5 μM : 94.11 ± 9.4 ; 10 μM : 95.31 ± 7.4 ; 100 μM : 104.5 ± 5.5 'dir. Hücre canlılık değerleri 48 saat için kontrol: 100 ± 3.5 ; 0.01 μM : 97.6 ± 4.7 ; 0.1 μM : 100.1 ± 4.8 ; 0.5 μM : 97.8 ± 7.4 ; 1 μM : 102 ± 5.8 ; 5 μM : 54.35 ± 3.9 ; 10 μM : 62.4 ± 4.3 ; 100 μM : 100.35 ± 5.1 'dir. Hücre canlılık değerleri 72 saat için kontrol: 100 ± 2.4 ; 0.01 μM : 96.3 ± 9.5 ; 0.1 μM : 87 ± 4.2 ; 0.5 μM : 74.6 ± 7.1 ; 1 μM : 77.7 ± 2.8 ; 5 μM : 5.3 ± 1.1 ; 10 μM : 7.1 ± 3.7 ; 100 μM : 25.2 ± 1.4 'dür (Şekil 4.6A).



Şekil 4.6. (A) Doksorubisin'in A549 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri. 48 saatlik uygulamada 5 μM ve 10 μM doksorubisin uygulaması ($***p<0.001$), 72 saatlik uygulamada ise 0.1 μM doksorubisin uygulamasından itibaren ($**p<0.01$, $***p<0.001$) hücre canlılığında azalma gözlenmiştir. (B) 1 μM doksorubisin ve 1, 2.5, 5 ve 10 $\mu\text{g/ml}$ kriptonin kombinasyonları tek başına doksorubisin uygulamasına göre hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azaltmıştır ($^{\#}p<0.05$; $^{\#\#}p<0.01$; $^{\#\#\#}p<0.001$). (C) 5 μM doksorubisin ve 1, 2.5, 5 ve 10 $\mu\text{g/ml}$ kriptonin kombinasyonları uygulandığında ise sadece 5 $\mu\text{g/ml}$ kriptonin uygulanan dozda doksorubisine göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

48 saat düşük dozlarda kriptonin ile 1 μM doksorubisin'in kombine uygulaması tek başına doksorubisin uygulamasına kıyasla hücre canlılığında daha fazla azalmaya yol açmıştır ($p<0.05$; $p<0.01$; $p<0.001$) (Şekil 4.6.B). Oysa, 48 saat düşük dozlarda kriptonin ile 5 μM doksorubisin kombine uygulaması sonucu sinerjistik etki sadece 5 $\mu\text{g/ml}$ kriptonin ve 5 μM doksorubisin kombinasyonu dozda gözlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4.6.C).

1 μ M doksorubisin ve düşük dozlarda kriptonin kombine uygulamasında hücre canlılık değerleri 48 saat için kontrol: 100 ± 8.5 ; 1 μ M doksorubisin: 70 ± 9.8 ; 1 μ M doksorubisin+ 1 μ g/ml kriptonin: 48.5 ± 3.7 ; 1 μ M doksorubisin+2.5 μ g/ml kriptonin: 45.7 ± 7.3 ; 1 μ M doksorubisin+ 5 μ g/ml kriptonin: 41.1 ± 2.4 ; 1 μ M doksorubisin+10 μ g/ml kriptonin: 53.9 ± 2.8 'dir (Şekil 4.6.B). Oysa, 5 μ M doksorubisin ve düşük dozlarda kriptonin kombine uygulamasında hücre canlılık değerleri 48 saat için kontrol: 100 ± 8.4 ; 5 μ M doksorubisin: 13.3 ± 1.6 ; 5 μ M doksorubisin+ 1 μ g/ml kriptonin: 12.8 ± 0.6 ; 5 μ M doksorubisin+ 2.5 μ g/ml kriptonin: 12.1 ± 0.9 ; 5 μ M doksorubisin+ 5 μ g/ml kriptonin: 4.2 ± 2.9 ; 5 μ M doksorubisin+ 10 μ g/ml kriptonin: 14.7 ± 1.6 'dır (Şekil 4.6.C).

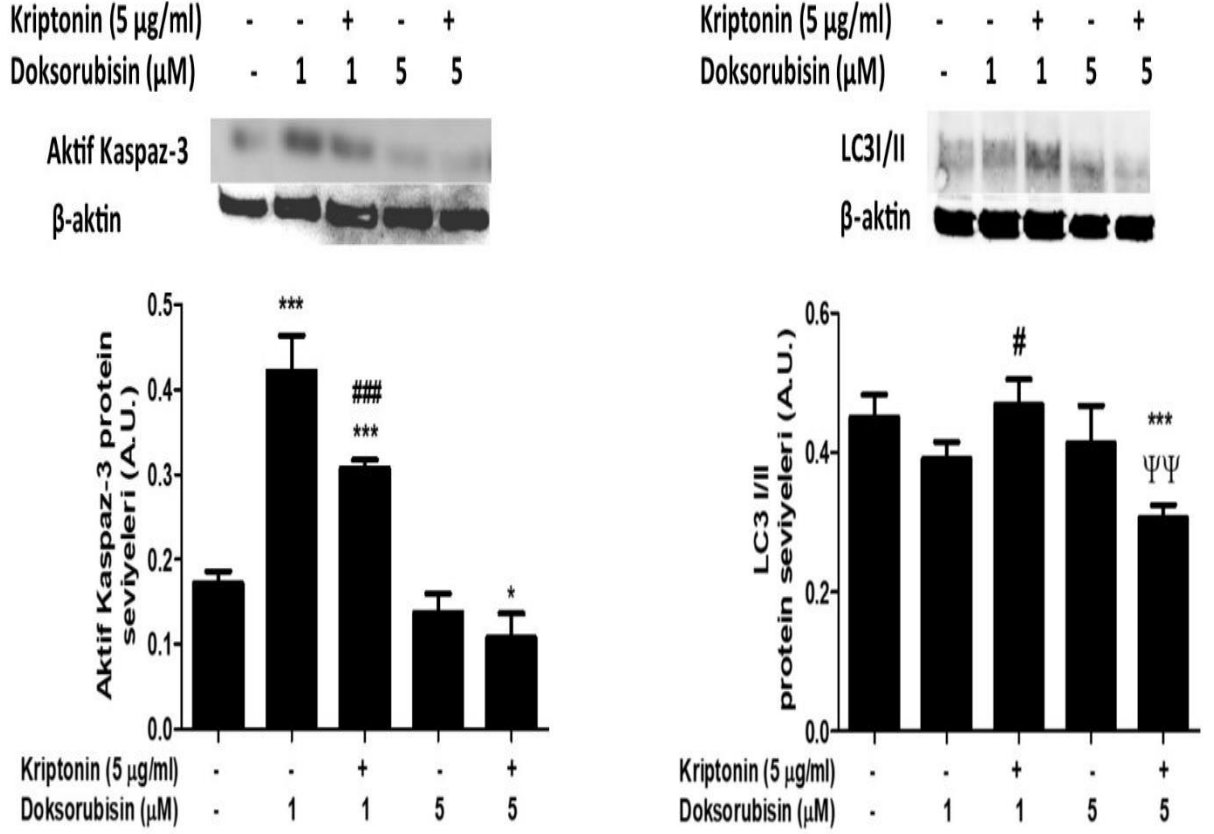
4.7. A549 HÜCRELERİNDE DÜŞÜK DOZLARDA DOKSORUBİSİN İLE KRİPTONİN'İN BİRLİKTE UYGULAMASININ HÜCRE ÖLÜMÜ İLE İLGİLİ BAZI PROTEİNLERİN SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

A549 hücrelerinde 48 saat 1 μ M doksoribosin uygulanması ile aktif kaspaz 3 protein seviyesi kontrole göre anlamlı olarak artmıştır ($***p < 0.001$) (Şekil 4.7). A549 hücrelerinde 1 μ M doksoribosin ile 5 μ g/ml kriptonin uygulamasının kontrole göre ($***p < 0.001$) ve tek başına 1 μ M doksorubisin uygulanmasına göre ($###p < 0.001$) kaspaz-3 seviyesini anlamlı olarak azalmıştır. 5 μ M doksoribosin ile 5 μ g/ml kriptonin uygulamasının ise kontrole göre kaspaz-3 seviyesini az anlamlı olarak azalttığı gözlenmiştir ($*p < 0.05$) (Şekil 4.7).

Belirlenen aktif kaspaz-3 seviyeleri (AU): Kontrol: 0.17 ± 0.01 ; 1 μ M doksorubisin: 0.42 ± 0.04 ; 1 μ M doksorubisin+5 μ g/ml kriptonin: 0.31 ± 0.01 ; 5 μ M doksorubisin: 0.14 ± 0.02 ; 5 μ M doksorubisin+5 μ g/ml kriptonin: 0.11 ± 0.03 'dür (Şekil 4.7).

A549 hücrelerinde 48 saat 1 μ M doksoribosin uygulanması ile LC3B protein seviyesi azalmıştır (Şekil 4.7). A549 hücrelerinde 1 μ M doksoribosin ile 5 μ g/ml kriptonin uygulamasının ise tek başına 1 μ M doksorubisin uygulanmasına göre LC3B seviyelerini anlamlı olarak artırdığı ($\#p < 0.05$) ve 5 μ M doksoribosin ile 5 μ g/ml kriptonin uygulamasının ise kontrole göre ($***p < 0.001$) ve tek başına 5 μ M doksorubisin uygulanmasına göre ($^{***}p < 0.01$) LC3B seviyelerini anlamlı olarak azalttığı gözlenmiştir (Şekil 4.7).

Belirlenen LC3 seviyeleri (AU): Kontrol: 0.45 ± 0.03 ; $1 \mu\text{M}$ doksorubisin: 0.39 ± 0.02 ; $1 \mu\text{M}$ doksorubisin+ $5 \mu\text{g/ml}$ kriptonin: 0.47 ± 0.04 ; $5 \mu\text{M}$ doksorubisin: 0.41 ± 0.05 ; $5 \mu\text{M}$ doksorubisin+ $5 \mu\text{g/ml}$ kriptonin: 0.3 ± 0.02 'dir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: (A) 48 saat doksorubisin ve doksorubisin+kriptonin uygulaması sonrası hücre lizatında aktif kaspaz-3 ifadelerindeki değişimler (* $p < 0.05$) (** $p < 0.001$) kontrole göre; (### $p < 0.001$) $1 \mu\text{M}$ doksorubisine göre. Yükleme kontrolü olarak β -Aktin kullanılmıştır. (B) 48 saat doksorubisin ve doksorubisin+kriptonin uygulaması sonrası hücre lizatında LC3I/II ifadelerindeki değişimler (# $p < 0.05$) $1 \mu\text{M}$ doksorubisine göre; (** $p < 0.001$) kontrole göre; ($\Psi\Psi p < 0.01$) $5 \mu\text{M}$ doksorubisine göre. Yükleme kontrolü olarak β -Aktin kullanılmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kansere bağlı ölümün başlıca nedenlerinden biri olan akciğer kanseri hem erkeklerde hem de kadınlarda en sık görülen ikinci kanser olup, vakaların %85'i KHKDAK'dır (Kunda, 2020). Akciğer kanserinin her iki alt tipi (KHKDAK ve KHAK) için kemoterapi önemli bir seçenek olmasına rağmen başarı sınırlıdır (Swithenbank ve Morgan, 2017). Kemoterapi ve radyoterapi prognozu belirgin olarak düzeltilmiş ve sağ kalım oranını artırmış olsa da, bu tedaviler insan vücudu üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle bireyin yaşam kalitesine zarar verir ve bu nedenle uzun süre uygulanamaz (Swithenbank ve Morgan, 2017; Yang ve diğ., 2021). Akciğer kanserinin evrenlenmesine bağlı olarak, hastalara ameliyattan radyasyona, kemoterapiye ve hedefe yönelik tedaviye kadar değişen belirli tedaviler uygulanır. Genetik ve biyobelirteç testlerinin ilerlemesi ile, bireysel olarak hastalar için uygun tedaviyi daha iyi hedeflemek için spesifik mutasyonlar tanımlanmıştır. Cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi gibi güncel tedavilerin yanı sıra biyobelirteç testi KHKDAK hastalarında sağkalımı iyileştirmeye yardımcı olur (Zappa ve Mousa, 2016). Akciğer kanseri dahil birçok kanserde hücre zarıyla ilişkili proteinlerin varlığından dolayı kemoterapötik ajanlara karşı ilaç direnci gelişebilir. Ayrıca kanser tedavisinde karşılaşılan bu ilaç direnci de tedavideki başarıyı olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle, geleneksel kemoterapi ile ilişkili toksisiteye ve direnç mekanizmalarına sahip olmayan yeni ilaç tedavilerinin geliştirilmesi zorunludur (Swithenbank ve Morgan, 2017).

AMP'ler veya konak savunma peptitleri antiinflamatuvar ve immünomodülatör aktivitelerinin yanı sıra bakteri, maya, mantar ve virüslere karşı doğuştan gelen bağışıklık savunmasında önemli rol oynayan, prokaryotik ve ökaryotik organizmalar tarafından üretilen küçük katyonik veya amfipatik moleküller olup, antimikrobiyal ya da antikanser aktiviteye sahiptirler (Kang ve diğ., 2017; Swithenbank ve Morgan, 2017; Tornesello ve diğ., 2020). Bu nedenle, AMP'ler yeni terapötik ajanlar olarak ilgi toplamaktadır ve antikanser ajan olarak AMP'lere yönelik araştırmalar hızla artmaktadır. İlaça dirençli patojenik mikroorganizmalardaki hızlı artış nedeniyle, alternatif antimikrobiyal stratejiler kullanılarak sentetik ve doğal kaynaklardan AMP'ler geliştirilmiştir. Bu konudaki çalışmalarda, araştırmacıların AMP'lerin etkili tasarımına, etki mekanizmasına ve biyolojik evrimindeki evrensel eğilimlerine odaklandığı dikkati çekmektedir (Kang ve diğ., 2017). Bazı AMP'ler kanser hücrelerini seçici olarak öldüren, ancak sağlıklı hücreleri öldürmeyen antikanser ilaçlar olarak oldukça ilgi görmüştür. Ayrıca, AMP'ler

minimum toksisite ve minimum ilaç direnci gösterirler ya da kanser hücrelerinin sergilediği yaygın kemoterapi direnç mekanizmalarından etkilenmezler (Swithenbank ve Morgan, 2017). Kanser tedavisinde karşılaşılan ilaç direnci tedaviyi olumsuz etkilediğinden, AMP'ler potansiyel antikanser ilaçlar olarak umut vermektedirler.

AMP'lerin akciğer kanseri hücre soyaları üzerindeki antikanser etkilerini araştıran çalışmalar umut verici sonuçlar vermiştir. Ayrıca araştırmalar, akciğer kanseri hücre zarlarının özelliği olan kapsamlı glikozilasyon ve düşük kolesterol seviyelerinin AMP'lerin kanser hücresi zarlarına bağlanma afinitesini arttırdığını da göstermiştir. Düşük kolesterol seviyeleri nedeniyle membran akışkanlığı ve yoğunlaşması, yoğun glikozilasyon nedeniyle artan negatif yük içeriğine sahip kanser hücreleri katyonik ve amfipatik AMP'ler ile etkileşime uygun hale gelir. Akciğer salgılarındaki tuz konsantrasyonu, enzimlerin varlığı ve mukus AMP'lerin etkinliğini azalttığından araştırmalar oldukça yavaş ilerlemektedir. AMP'lerin KHDAK tedavisi için potansiyelini bildiren sınırlı sayıda çok az çalışma vardır. Yeni AMP'lerin araştırılması, akciğerdeki fizyolojik koşulları tolere etmek için AMP'lerde bazı kimyasal değişimlerin yapılması ve AMP'lerin akciğerlere verimli bir şekilde iletilmesi için yeni ilaç dağıtım sistemlerinin kullanılması, AMP'lerin akciğer kanserine karşı terapötik potansiyelini gerçekleştirmeye yardımcı olacaktır (Swithenbank ve Morgan, 2017; Kunda, 2020). AMP'lerin antikanser etkisini ortaya koymak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmakla birlikte, bu yeni AMP'lerin moleküler etki mekanizmasının ayrıntılı bir şekilde ortaya konması ile akciğer kanseri tedavisinde potansiyel olarak etkin yeni bir uygulama sunulması her zaman mümkündür. Son birkaç on yılda, kanser tedavisinde önemli gelişmeler olmakla birlikte, kanser ilaçlarına karşı direncin gelişmesi ve toksik yan etkilere yol açan aktif olarak bölünen hücrelerle ilgili bir özgünlüğün olmaması bu başarıları olumsuz yönde etkilemiştir. Bu nedenle, antitümör mekanizmaları olan alternatif yeni ilaçlara ilgi artmaktadır. Ribozomal olarak sentezlenen katyonik antimikrobiyal peptitler (AMP'ler) veya konak savunma peptitleri (HDP), bakteri yüzeyindeki negatif yüklü lipidler ile elektrostatik etkileşimlere girerek mikrobiyal hücre zarlarını bozabilirler ve bakterilere karşı geniş spektrumlu bir aktivite gösterirler. Normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerinin plazma zarının dış yüzeyinde artan negatif yüklü fosfatidilserin kısımlarına seçici olarak bağlanan bu katyonik amfipatik peptitler hem seçici hem de mevcut direnç mekanizmalarına karşı dirençli olan etkin bir antikanser ajan kaynağı olabilirler (Deslouches ve Di, 2017). AMP'ler kanser hücresinin plazma zarının dış yüzeyinde açığa çıkan negatif yüklü fosfatidilserin kısımlarına seçici olarak bağlanarak insan kanser

hücrelerinin sitotoksitesini tetikleyebilirler. LTX-315 gibi bazı AMP'lerin, kanser hücrelerinin organellerinde değişikliklere neden olarak tümör antijenlerinin salınımını ve hasar ile ilişkili güçlü moleküler modelleri indüklediği gösterilmiştir. Yeni antikanser ilaçlara olan bu tıbbi ihtiyaç göz önüne alındığında, AMP'ler onkolojide tek başına veya diğer küçük moleküller ile kombinasyon halinde potansiyel olarak etkili olabilecek terapötik ajanların önemli bir kaynağıdır. AMP'lerin özellikleri araştırılarak ve etki biçimi ortaya konarak, belirli kanser hücrelerine karşı seçiciliklerini artırmaya yönelik yeni stratejiler geliştirilmektedir (Tornesello ve diğ., 2020). Bu nedenle katyonik AMP'lerin etki mekanizmalarına odaklanılarak, kanser tedavisinde farklı AMP uygulamalarının sonuçları ve moleküler etki mekanizmaları incelenmektedir.

AMP'ler yeni antibiyotikler olarak büyük potansiyel gösterse de, terapötik uygulamaları düşük stabiliteleri, toksisite ve yüksek üretim maliyetleri nedeni ile engellenmektedir. Bu problemlerin üstesinden gelmek için kullanılan çeşitli kimyasal modifikasyon stratejileri sınırlı farmakokinetik avantajları nedeni ile AMP'lerin üretim maliyetini önemli ölçüde artırmaktadır. Bu nedenle, ekonomik olarak üretilebilen, gelişmiş stabiliteye ve hücre spesifikliğine sahip AMP'ler geliştirilmektedir. Bu tasarlanan peptitlerden GNU6 ve GNU7, bakteri ve mantarlara karşı güçlü antimikrobiyal aktivite gösteren, 150 mM NaCl ve %10 serum varlığında aktivitelerini sürdüren ve ayrıca eritrositlerin, keratinositlerin ve fibroblastların canlılığını etkilemeyen peptitlerdir. Zar geçirgenliği deneyi ve taramalı elektron mikroskobu analizi sonucu, GNU6 ve GNU7'nin mikroorganizmalarda zar bütünlüğünü ve işlevini tehlikeye attığı gösterildi. Bu çalışma, GNU6 ve GNU7'nin AMP'lerin klinik kullanımını engelleyen ciddi sorunların üstesinden gelebileceğini ve yeni antimikrobiyal ajanlar olarak geliştirilebileceğini düşündürmektedir (Kim ve diğ., 2014). Son yıllarda, AMP'lerin enfeksiyöz patolojileri frenlediği, kanser hücresi proliferasyonunu ve yayılmasını sınırlamada etkili olduğuna dair kanıtlar birikmiştir ve sonuç olarak, insan malignitelerine karşı yeni biyolojik ve immünoterapötik ajan uygulamalarına ilgi gittikçe artmaktadır. Tümör seçiciliklerinin biyokimyasal temelleri açıklanmakta, güvenlik ve tolere edilebilirlik profillerini doğrulayan onkolojik endikasyonların dışındaki son klinik çalışmaların sonuçları tartışılmaktadır. Doğal AMP'lerin ana ve küçük sınıfları tarafından sistematik olarak düzenlenen preklinik antitümör aktiviteler için kanıtlar sunulmakta ve klinik uygulamaların önündeki engeller tartışılmakta ve daha fazla gelişme için yeni yönergeler öngörülmektedir (Roudi ve diğ., 2017). Antimikrobiyal peptitler enfeksiyonla mücadelede, inflamasyonda ve otoimmünitede etkili olmalarına rağmen,

AMP'lerin kanser biyolojisinde de tanıda biyobelirteç olarak ve tedavide kemoterapik ajan olarak kullanımının önemli olabileceği birçok çalışma ile ortaya konmuştur.

Akciğer tarafından inhale edilen çok sayıda patojene sürekli ve büyük ölçekli maruz kalma ile başa çıkmak için akciğerde hava yolu epitel hücreleri ve nötrofiller tarafından üretilen amp'lerin akciğerde kullanılan önemli mekanizmalardan biri olduğu bilinmektedir (Hiemstra ve diğ., 2016). Bugüne kadar 2.000'den fazla doğal olarak oluşan AMP tanımlanmıştır. Akciğer dokularında ve sekresyonlarında tespit edilen bu AMP'ler nötrofil α -defensinler/insan nötrofil peptidleri, insan β -defensinler ve katelisidin hCAP18/LL-37'dir (Hiemstra ve diğ., 2015). Akciğerde, sadece daha küçük AMP'ler değil, aynı zamanda lizozim, laktoferrin, salgı lökosit proteinaz inhibitörü, elafin ve RNAZ 7 dahil olmak üzere diğer daha büyük antimikrobiyal proteinler de üretilir (Amatngalim ve diğ., 2015). İnsan katelisidin hCAP18/LL-37'nin, akciğer doğuştan ve adaptif bağışıklık sisteminde proinflamatuvar faktörlerin salınımını düzenlemedeki rolü nedeniyle büyük ilgi görmüştür. LL-37 peptidi, antitümör ve antimikrobiyal etkilere sahip olup, antimikrobiyal peptid LL-37'nin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak antitümör etkiler gösterebileceği ortaya konmuştur (Gennaro ve Zannetti, 2000). Bu nedenle, LL-37 umut verici bir antitümör ilaç adayıdır. LL-37 antibakteriyel, antitümör, antiparaziter ve antiviral özellik gibi farklı rollere sahip fonksiyonel bileşenlere ayrılabilir. LL-37 türevli peptitlerin en kısası olarak tasarlanan ve sentezlenen bir antimikrobiyal peptid olan 17BİPHE2'in amino asit dizisi GBKRLVQRLKDBLRNLV'dir (Wang ve diğ., 2018). 17BİPHE2'nin mikrobiyal membranların bütünlüğünü bozarak metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'un proliferasyonunu ve biyofilm oluşumunu etkili bir şekilde inhibe edebildiğini gösterilmiştir. 17BİPHE2 peptidinin insan akciğer adenokarsinom hücre soyu A549'a karşı etkisini araştırmak için bir dizi deney yapılmış ve 17BİPHE2'nin bu hücrelerde apoptozu indüklediği mekanizmalar belirlenmiştir. 17BİPHE2'nin proliferasyon, kemotaksi, invazivlik ve ilgili genlerin ve proteinlerin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler dahil tümör biyolojisi üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Daha düşük toksisite ve direnç, daha yüksek güvenlik ve verimlilik ile bu peptidin akciğer kanseri için alternatif bir tedavi olarak kullanılabileceği ve umut verici yeni bir antikanser ilacının geliştirilmesine yardımcı olabileceği ileri sürülmektedir. 17BİPHE2'nin sitotoksik etkisini doğrulamak için (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ve 40 $\mu\text{mol/l}$) ve zamana (24 ve 48 saat) bağlı olarak, tedavi edilen A549 hücrelerinin canlılığı MTT analizi kullanılarak değerlendirilmiş ve 24 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda 17BİPHE2 ile muamele edildikten sonra, A549 hücrelerinin canlılığı düşmüştür. 17BİPHE2 ile muamele edilen NCI-H1975 hücrelerinin

canlılığı üzerinde de inhibe edici bir etki gösterildi. Genel olarak, sonuçlar 17BİPHE2'nin A549 hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir (Yang ve diğ., 2021). Son çalışmalardan biri olan bu çalışma gibi pekçok çalışma AMP'lerin akciğer kanseri dahil pekçok kanserde etkili olduğu ve geleneksel kullanılan pekçok ilacın yerini alabileceği düşünülmektedir.

AMP'ler antimikrobiyal aktiviteye ve kanser hücreleri üzerinde sitotoksik aktiviteye sahip olan küçük moleküllerdir. AMP'ler kanser hücresinin plazma zarının dış yüzeyinde açığa çıkan negatif yüklü fosfatidilserin kısımlarına seçici olarak bağlanarak insan kanser hücrelerinin sitotoksitesini tetikleyebilirler (Tornesello ve diğ., 2020). Antimikrobiyal peptitlerin farklı kanser hücre soyları üzerinde sitotoksik etki gösterdiğine dair çok sayıda çalışma vardır. Cecropin A ve B'nin mesane kanseri hücrelerinin canlılığını doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği (Suttmann ve diğ., 2008), Magainin II peptidi'nin mesane kanseri hücrelerinde düşük bir sitotoksik etki gösterdiği ve insan fibroblastları üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı (Lehmann ve diğ., 2006), Kriptinin'in meme kanseri hücre soylarından MDA-MB 231, MCF-7'de doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı (Sancar Baş, 2013), Temporin-Ra'nın insan akciğer epiteliyal adenokarsinom hücre hattı, A549 hücre hattında doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı (Asadi ve diğ., 2013), bir AMP analogu olan LL 37'nin, eksozom kapsüllü miRNA'lar yoluyla kolon kanseri hücre canlılığı üzerinde inhibe edici sitotoksik bir etki gösterdiği (Hayashi ve diğ., 2018), Nisin Z'nin malign olmayan keratinositlere kıyasla melanom hücreleri için seçici olarak konsantrasyona bağlı olarak daha toksik olduğunu (Lewies ve diğ., 2018), PFR peptidi varlığında üç tip lösemi hücre hattında (MEL, HL-60 ve K562) hücre canlılığında doza bağlı bir azalma gözlemlendiği (Lu ve diğ., 2016), 7BİPHE2 muamelesinin A549 ve NCI-H1975 hücrelerinin canlılığı üzerinde inhibe edici bir etki gösterdiği (Yang ve diğ., 2021), Protonectin (IL-12)'nin A549 hücre hattı üzerinde en yüksek sitotoksiteyi gösterdi ve sağlıklı akciğer hücreleri üzerinde sitotoksite etkisinin olmadığı (Eskandari ve diğ., 2021), Dox ile karşılaştırılan CB1a'nın *in vitro* akciğer kanserinde tümör benzeri büyümelerin önlenmesinde oldukça güçlü bir peptit olduğu (Kao ve diğ., 2012) çeşitli araştırmalar sonucunda ortaya konmuştur. Tüm sitotoksite deneyleri, AMP'lerin kullanılan doza ve süreye bağlı olarak hücre canlılığını azalttığını ve hücreler üzerinde toksik bir etki gösterdiğini açıkça ortaya koymaktadır. Bizim çalışmamızda da kriptonin'in hücre canlılığı üzerindeki etkisi MTT analizi ile belirlendi. Sonuçlar, %100 canlı olarak kabul edilen muamele edilmemiş kontrol gruba göre mukayese edilerek değerlendirildi. A549 hücrelerine 6, 12 ve 24 saat boyunca uygulanan kriptonin peptidi kontrol grubuna göre, hücre canlılığını doza bağlı olarak düşürmüştür. 12 ve

24 saat peptid uygulaması 50, 100 ve 200 µg/ml dozlarında hücre canlılığını anlamlı olarak azaltırken, 6 saatlik uygulamada hücre canlılığındaki anlamlı azalma 2.5 µg/ml konsantrasyondaki dozdan itibaren gözlenmiştir. Çalışmamızda A549 hücrelerine ilk kez uygulanan kriptonin'in doza bağlı olarak hücre canlılığını inhibe ettiği ilk kez ortaya konmuştur. Kriptonin peptiti muamelesi sonrası yapılan morfolojik değerlendirme de MTT sonuçlarını doğrulamıştır.

Hücre zarı hasarının ve nekrotik hücre ölümünün biyolojik belirteci LDH salınımıdır. Kriptonin'in akciğer kanser hücrelerine karşı gözlenen sitotoksitesinin hücresel membran hasarının sonucu olup olmadığını belirlemek için LDH analizi kullanıldı. Diğer AMP'ler ile yapılan çalışmalarda, Cecropin A ve B'nin her ikisinin de doza bağlı bir şekilde bütün idrar kesesi kanser hücrelerinden LDH salınımında bir artışa neden olduğu ve idrar kesesi kanser hücrelerine karşı seçici sitotoksiste gösterdiği (Suttman ve diğ., 2008), Magainin II'nin üç mesane kanseri RT4, 647V ve 486P hücre hatlarında LDH salınımının doza bağlı bir şekilde arttığı (Lehmann ve diğ., 2006), LDH salınımı, akridin oranj / etidyum bromür ikili boyama tekniği ve taramalı elektron mikroskobu sonuçlarına göre meme kanseri hücrelerinde gözlenen toksiste, hücre membran bütünlüğünün peptidler ile bozulması sonucu hücrelerin nekrotik yolla öldüğü (Sancar Baş, 2013), antimikrobiyal peptit A-hBD-2'nin, hBD-2'ye kıyasla daha düşük sitotoksisteye, daha güçlü yapısal stabiliteye ve daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu (Mi ve diğ., 2018), nisin Z'e maruz kalan melanoma hücrelerinin zar hasarını gösteren LDH salınımında belirgin bir artış gösterdiği ve tüm temel sitotoksiste deneylerinin nisin Z'nin malign olmayan keratinositlere kıyasla melanom hücreleri için seçici olarak daha toksik olduğu (Lewies ve diğ., 2018), PFR peptidinin (LF11-322) hem *in vitro* hem de *in vivo* lösemi modellerinde antitümör aktivitesi olduğu ve lösemi hücrelerinde doza ve süreye bağlı olarak hücre içi LDH salınımını artırarak nekroz indüksiyonuna yol açtığı (Lu ve diğ., 2016), antikanser peptit olan CB1a'nın, akciğer kanseri hücreleri NCI-H460 ve NCI-H520'ye karşı yüksek toksisteye sahip olduğu ve normal akciğer hücreleri olan MRC-5'e göre oldukça seçici olduğu (Kao ve diğ., 2012), Magainin analogları, MSI-238'in MSI-136'dan daha güçlü çok sayıda tümör hücre hattına karşı *in vitro* güçlü bir sitotoksiste gösterdiği ve her iki analogun da ana bileşik, Magainin2'den daha sitotoksik olduğu (Baker ve diğ., 1993) tespit edilmiştir. Kriptonin ile gözlemlediğimiz hücre ölümünde peptidin hücre membranı ile etkileşmesi sonucu hücre ölümünün nekrotik yolla gerçekleşip gerçekleşmediğini anlayabilmek için peptid ile muamele sonrası hasar gören hücrelerden kültür medyumuna geçen laktat dehidrogenaz (LDH)

enziminin aktivitesi ölçülmüştür. Farklı dozlarda 24 saat boyunca peptide maruz kalan hücrelerde kontrol grubuna göre, doza bağlı olarak hücrelerden salınan LDH enzim miktarının ölçülen aktivite ile paralel olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0.05$; $p<0.0001$). LDH aktivitesindeki bu artış 1 $\mu\text{g/ml}$ dozda az anlamlı ($p<0.05$) iken, 25 $\mu\text{g/ml}$ dozdan itibaren ileri düzeyde bir anlamlılık $p<0.0001$ olduğu gözlenmiştir. Hücre içi LDH salınımının artması, kriptonin peptidi ile zar geçirgenliğinde artış olduğunun ve hücre zarının bozulması ya da parçalanması ile direkt kanser hücresinde lizisin meydana geldiğinin önemli bir göstergesidir.

Kanser hücreleri yüksek hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerine yol açabilir (Lewies ve diğ., 2018). Düşük ROS seviyeleri apoptoza yol açabilirken, yüksek ROS seviyeleri sıklıkla nekroz veya kaspazdan bağımsız apoptoz yollarıyla ilişkilidir (Fiers ve diğ., 1999). Bir AMP olan Niasin Z hem düşük hem de yüksek konsantrasyonlarda melanom hücrelerinde ROS üretiminde önemli bir artışa sebep olarak apoptozu indüklemiştir (Lewies ve diğ., 2018). Kanser hücrelerinin yüksek enerji talebi nedeniyle, hücre içi reaktif oksijen türlerini (ROS) arttırırken, glikoliz ve/veya ATP tükenmesine yol açan mitokondriyal solunumu hedefleyebilen ve bozabilen antikanser ajanlar özellikle ilgi çekicidir. Bu bileşikler sadece potansiyel olarak alternatif kemoterapötik ajanlar olarak hizmet etmekle kalmaz, aynı zamanda kanser hücrelerinde kemoterapi direncinin üstesinden gelmek ve muhtemelen geleneksel kemoterapötik ajanlarla bağlantılı toksisiteyi azaltmak için geleneksel tedavilerle birlikte kombinasyon halinde kullanılabilir (Indran ve diğ., 2011). AMP olarak magainin ROS üretimini ve insan promyelositik lösemi (HL-60) hücre hattında değiştirilmiş mitokondriyal fonksiyonla ilişkili apoptozu indüklediği bilinmektedir (Cruz-Chamorro ve diğ., 2006). 10, 20 ve 30 dakika boyunca 25 ve 35 $\mu\text{mol/l}$ 17BIPHE2 ile muameleden sonra A549 hücrelerindeki hücre içi kalsiyum aktivitesi ve ROS seviyelerinin zamana ve doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde arttığı ve apoptozun bu artış ile ilişkili olduğu (Yang ve diğ., 2021), yine A549 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak protonektin (IL-12)'in ROS seviyelerini artırdığı (Eskandari ve diğ., 2021) bilinmektedir. Çalışmamızda 24 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan kriptonin ile indüklenen hücre ölümü sonucu A549 hücrelerinde hücre ölümü ile artabilecek reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyeleri ölçülmüş ve hücre içi ROS seviyelerini kontrole göre sadece 100 ve 200 $\mu\text{g/ml}$ dozlarında anlamlı olarak arttığı ve bu artışın hücre ölümündeki artış ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Antikanser ilaç olarak peptit gelişiminde hücresel ölüm mekanizmasını anlamak önemlidir (Kao ve diğ., 2012). Antimikrobiyal etki gibi, sitotoksikite de birçok mekanizma tarafından üretilir. Hücrelerin toksik konsantrasyonlarda AMP ile muamele edilmesi sonucu sitoplazmik hücre içeriğinin sızmasıyla sonuçlanan membran bütünlüğünün bozulması ve hücre lizisi ile sonuçlanan nekroz adı verilen bir hücre ölümüne neden olabilir. Alternatif olarak bileşik, hücrelerin aktif olarak bölünmesini ve dolayısıyla büyümeyi durdurduğu apoptoz olarak adlandırılan genetik olarak programlanmış hücre ölümünü de başlatabilir (Lavery and Gilmore, 2014). ROS hücrelerde sürekli olarak üretilen, temizlenen ve apoptozun oluşumunda önemli rol oynayan hücresel metabolizmanın bir ürünüdür (Dong ve diğ., 2020). Oksidatif stres sonucu hücrenin sitoplazmasında Ca^{+2} seviyesinin artması ile mitokondri matriksinde de aşırı Ca^{+2} birikimi gözlenir. Bu durumda hücre içinde ROS seviyesi daha da artar, bu da hücre içi kalsiyum depolarından Ca^{+2} salınımını uyarır ve hücre içi Ca^{+2} birikimi oluşur (Hong ve diğ., 2020). Taramalı elektron mikroskobu ile Cecropin B'nin 486P mesane tümör hücrelerinin hücre zarında önemli derecede bozulmaya neden olduğu, oysa Cecropin B ile muamele edilen ZF07 hücrelerinde zar hasarı olmayan etkilenmemiş bir hücre morfolojisinin gözlemlendiği (Suttmann ve diğ., 2008), magainin ile tedavi edilen mesane tümör hücrelerinde yine SEM ile gözenek oluşumu sonucu muhtemelen hücre zarının parçalandığı, oysa magainin II ile inkübe edilen normal fibroblastların hücre zarının zarar görmediği (Lehmann ve diğ., 2006), A549 hücrelerinin 50 lg/mL Temporin-Ra'ya maruz bırakılmadan 24 saat önce ve sonra mikroskobik incelemelerinde muamele edilen kültür hücrelerinde kayda değer bir sitotoksik etki gözlenmemiştir (Asadi ve diğ., 2013). PFR peptit tedavisinden 72 saat sonraki morfolojik değerlendirmede PFR peptidi ile muameleden 72 saat sonra MEL ve HL-60 hücrelerinde hücre ölümünün indüklendiğine işaret eden önemli miktarda hücre kalıntı olduğu (Lu ve diğ., 2016) dikkati çekmektedir. Bütün bu çalışmalara benzer şekilde, çalışmamızda farklı dozlarda A549 hücrelerine 24 saat boyunca kriptonin uygulamasını takiben indüklenen hücre ölümü sonucu A549 hücrelerinin morfolojilerinde meydana gelen değişiklikler ışık mikroskobu ve floresan mikroskop ile hücre boyanmasını takiben incelenmiştir. Işık mikroskobu gözlemlerimize göre, 24 saat peptid uygulaması sonucu A549 hücre sayısının azaldığı, aksine çoğu hücrenin nukleusunun ve hücrenin kendinin şiştiği ve normal hücre şeklinin kaybolduğu gözlenmiştir. Ayrıca, hücrelerin nekrotik ya da apoptotik yoldan ölümünü nukleus şekli ve boyanma özelliklerine dayanarak incelemek için, hücreler peptid uygulamasını takiben 10 μ M Akridin Oranj ve ardından 10 μ g/ml etidyum bromür ile boyandı ve floresan mikroskopta

incelenmesi sonucu, artan peptid konsantrasyonuna paralel olarak canlı hücre sayısının azaldığı ve nekrotik hücre sayısının arttığı bulgusu hücrelerden salınan LDH enziminin yine doza bağlı olarak artması ile de desteklenmiştir.

Çalışmada ATG5, Beclin1, LC3B, kaspaz3, Bax, HMGB1 proteinleri western blotlama yöntemi ile belirlendi ve kriptonin'in A549 hücrelerinde apoptotik (kaspaz3 ve Bax) ve otofajiyle ilişkili proteinlerin (ATG5, Beclin1, LC3B) seviyelerini azalttığı gözlemlendi. Kriptonin'in doz ve süreye bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı, hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterdiği, LDH salınımı ve hücre nükleuslarının etidyum bromür ile morfolojik olarak boyanması ile de hücreleri nekrotik yolla öldürdüğü gösterilmiştir. Apoptotik protein olarak aktif kaspaz-3, 50 µg/ml ve 100 µg/ml kriptonin verilmesi ile anlamlı olarak azalmış, proapoptotik bir protein olan Bax ise sadece 100 µg/ml kriptonin verilmesi ile anlamlı olarak azalmıştır. Bu bulgu kripton'in A549 hücrelerinde apoptozu uyarmadığını yani apoptozun A549 hücrelerinin sitotoksitesi üzerine katkıda bulunmadığını gösterir. Ayrıca, apoptoz indüksiyonunun olmaması, proapoptotik protein Bax'ın azalmasıyla da desteklendi. Otofaji ile ilişkili proteinlerden Atg5 ve LC3 50 µg/ml ve 100 µg/ml kriptonin verilmesi ile anlamlı olarak azalırken, Beclin-1 sadece 100 µg/ml kriptonin verilmesi ile anlamlı olarak azalmıştır. ROS gibi stres koşulları altında sitozole geçen yüksek mobilite grubu protein 1 (HMGB1) ise 50 µg/ml ve 100 µg/ml kriptonin verilmesi ile az anlamlı olarak azalmıştır. Bu çalışmada A549 hücrelerinde kriptonin'in 50 µg/ml ve 100 µg/ml yüksek dozlarının uygulanması ile canlı hücrelere göre hücrelerin belirgin bir şekilde nekroz ile öldüğü dikkati çekmiştir. Daha önce yapılan bir çalışmamızda da, kriptonin'in meme kanseri hücrelerinde MCF-7 ve MDA-MB 231 hücrelerinde doza bağlı olarak etidyum bromür boyalı nekrotik hücre nükleus sayısını doza bağlı olarak artırdığı gözlemlenmiştir. Bu her iki meme kanseri hücre soyunda yapılan çalışmamızda da nekroz oluşumunun doza bağlı olarak artan LDH salınımı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Sancar Baş, 2013). Nekroz indükleyici ile muamele edilen nekrotik kanser hücrelerinden salınan HMGB1'in kolon kanser hücrelerinin yeniden büyümesini ve metastazını arttırdığı bilinmektedir (Luo ve diğ., 2013). HMGB1, histon olmayan bir DNA bağlayıcı protein olup, ROS artışına bağlı olarak gerçekleşen programlanmamış bir hücre ölüm tipi olan nekroz sonucu hücreler tarafından salınmıştır. HMGB1 artışı da nekrotik hücrelerden salınan LDH artışı ile uyumlu olup, gerçekleşen hücre ölüm tipinin nekroz olduğunu desteklemektedir.

Bu çalışmada doksorubisin ile olası sinerjistik etkiler de araştırılmıştır. Tüm düşük dozlarda kriptonin ile 1 μ M doksorubisin'in kombine uygulaması hücre canlılığını tek başına doksorubisin uygulamasına göre daha fazla anlamlı olarak azaltırken, düşük dozlarda kriptonin ile 5 μ M doksorubisin kombine uygulaması sonucunda sinerjistik etki sadece 5 μ g/ml kriptonin ve 5 μ M doksorubisin kombinasyonu uygulanan dozda gözlenmiştir. Diğer bir deyişle düşük dozlarda kriptonin ve 5 μ M doksorubisin kombine uygulaması, düşük dozlarda kriptonin ve 1 μ M doksorubisin kombine uygulamasına göre hücre canlılığını çok daha belirgin olarak azaltmış olup, belirgin sinerjistik antikanserojen etki göstermiştir. Benzer şekilde, doksorubisin ve HPRP-A1/HPRP-A2 gibi α -helikal peptitlerin kombinasyonel uygulaması ile farklı kanser hücre hatlarına karşı in vitro aktivitesi araştırılmış ve sinerjistik antikanser aktivite ortaya konmuştur (Zhao ve diğ., 2014). AMP'lerin çeşitli antikanser ilaçlarla kombine halde uygulanması ile antikanser aktivite üzerinde belirgin bir sinerjik antikanser etkinin oluşması, çoklu ilaç direnç mekanizmalarının ortaya konması ve sağlıklı dokular ya da organlar üzerinde yan etkilerin az olmasından dolayı önemlidir (Zhu ve diğ., 2019). Doksorubisin'in düşük konsantrasyonlarda kriptonin ile birlikte uygulanması, tek başına doksorubisin uygulanmasından çok daha etkili olduğundan, bu kombine tedavinin önemli klinik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda doksorubisin ve kriptonin'in birlikte uygulanması ile elde edilen kaspaz-3 ve LC3B bulguları kontrol ve doksorubisin grubu ile ayrı ayrı karşılaştırılarak western blotlama yöntemi ile belirlendi. 1 μ M doksorubisin uygulaması ile artan aktif kaspaz-3 seviyelerinin, aynı doz doksorubisin ve 5 μ g/ml kriptonin ile birlikte uygulanması durumunda anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. 5 μ M doksorubisin uygulaması ile aktif kaspaz-3 seviyelerinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Diğer taraftan kriptoninin birlikte uygulanması durumunda bu proteinin seviyelerinin sadece kontrol grubuna göre azaldığı gözlenmiştir. A549 hücrelerinde LC3B seviyeleri 1 μ M doksoribosin uygulaması ile değişmemiştir. Diğer taraftan 1 μ M doksoribosin ve 5 μ g/ml kriptoninin birlikte uygulanması ile doksorubisinin tek başına uygulanmasına kıyasla anlamlı olarak azalmıştır. 5 μ M doksorubisin uygulaması ile LC3B seviyelerinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Diğer taraftan 5 μ g/ml kriptonin birlikte uygulanması durumunda bu proteinin seviyelerinin kontrol grubuna göre de anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Farklı kanser ilaçlarının ya da olası kanser ajanlarının birlikte kullanımı ile farklı etki mekanizmalarını birleştirmek terapötik etkinliğinin artırılmasında önemli bir stratejidir (Al-Lazikani ve diğ., 2012). PC3 ve DU145 prostat kanseri hücrelerinde doksorubisin

ve doksataksel kombinasyonunun toksisiteyi azalttığı ve ilaç sinerjisinin her zaman hücre ölümü ile ilişkili olmadığı da ortaya konmuştur (Tsakalozou ve diğ., 2012). Doksarubisin ve gamitrinib kombine tedavisi ise kardiyotoksik yan etkileri ağırlaştırmadan sinerjistik olarak gelişmiş kansere özgü toksisiteden bahsetmektedir (Park ve diğ., 2014). CRC hücrelerinde doksorubisin ve oksimetrin kombinasyonun tek başına uygulamadan çok daha üstün sinerjistik etki göstererek doksorubisinin inhibitör aktivitesini sinerjistik olarak artırdığı belirtilmektedir (Pan ve diğ., 2021). Çalışmamızda tek başına 24 saat kriptonin uygulamasında apoptoz ve otofaji ile ilgili hücre ölüm proteinleri azalırken nekroz artmıştı. Düşük dozlarda doksorubisin ile kriptonin'in birlikte uygulamasına ait apoptoz ile ilişkili kaspaz-3 azalırken otofajiyle ilişkili LC3B proteinin doza bağlı olarak arttığı, oysa 5 μ M doksorubisin ve 5 μ g/ml kriptoninin birlikte uygulaması ile yüksek dozda azaldığı gözlenmiştir. Bu durumda tek başına kriptonin uygulamasında hücre ölüm tipi olarak nekroz baskın iken, doksorubisin ile kriptonin kombine uygulamasında otofajinin düşük doz doksorubisin ile kriptonin uygulamasında gözlenmiş olması, istenen terapötik etkinin elde edilmesi için kombinasyon halinde düşük dozların kullanılmasıyla ilaç sinerjizmi sonucu öne çıkaran bulgular olup, bu ikili uygulamanın sinerjistik antikanser aktivite bakımından potansiyel bir hedef olabileceğini ve önemli bir klinik potansiyele sahip olabileceğini düşündürmektedir.

SONUÇ

KHDAK tedavisi için AMP'lerin potansiyelini bildiren çok az sayıda çalışma vardır. Bu çalışmada, A549 akciğer kanser hücrelerinde antikanser aktivitesi ilk kez araştırılan kriptonin'in doz ve süreye bağlı olarak A549 hücrelerinde kontrol gruba göre hücre canlılığını azalttığı, hücreler üzerinde sitotoksik bir etki gösterdiği, LDH salınımı ve hücre nükleuslarının morfolojik boyanması ile hücrelerin nekrotik yol ile öldüğü, oysa apoptoz ve otofaji ile ilişkili proteinlerin seviyelerini de azalttığı ve bu peptid ile ilgili *in vitro* ve *in vivo* ilave deneyler yapılarak bu peptidin etkilerinin daha da detaylandırılabilmesi sonucuna varılmıştır. AMP'lerin akciğer kanseri hücre soyları üzerindeki antikanser etkilerini araştıran umut verici çalışmalar dikkate alındığında, kriptonin'in tek başına ve diğer küçük molekül veya antikanser ajanlarla kombine olarak antikanser etkileri daha detaylı olarak araştırılarak sinerjistik antikanserojen moleküler etki mekanizmasına daha ayrıntılı olarak odaklanılarak yeni stratejiler geliştirilebilir.

KAYNAKLAR

- Aisenbrey, C., Marquette, A., & Bechinger, B. (2019). The mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides refined by novel concepts from biophysical investigations. *Antimicrobial Peptides*, 33-64.
- Alberg, A. J., Brock, M. V., Ford, J. G., Samet, J. M., & Spivack, S. D. (2013). Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 143(5), e1S-e29S.
- Al-Lazikani, B., Banerji, U. & Workman, P. (2012) Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nature Biotech.* 30, 679–692.
- Amaravadi, R. K., & Thompson, C. B. (2007). The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clinical Cancer Research*, 13(24), 7271-7279.
- Amatngalim, G. D., van Wijck, Y., de Mooij-Eijk, Y., Verhoosel, R. M., Harder, J., Lekkerkerker, A. N., ... & Hiemstra, P. S. (2015). Basal cells contribute to innate immunity of the airway epithelium through production of the antimicrobial protein RNase 7. *The Journal of Immunology*, 194(7), 3340-3350.
- Asadi, F., Asoodeh, A., Kashef, R., Housaindokht, M. R., Haghparast, A., & Chamani, J. (2013). The effect of antimicrobial peptide Temporin-Ra on cell viability and gene expression of pro-inflammatory factors in A549 cell line. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 19(4), 373-380.
- Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543-1575.
- Baker, M. A., Maloy, W. L., Zasloff, M., & Jacob, L. S. (1993). Anticancer efficacy of Magainin2 and analogue peptides. *Cancer Research*, 53(13), 3052-3057.
- Barta, J. A., Powell, C. A., & Wisnivesky, J. P. (2019). Global epidemiology of lung cancer. *Annals of Global Health*, 85(1).
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.
- Bredesen, D. E., Rao, R. V., & Mehlen, P. (2006). Cell death in the nervous system. *Nature*, 443(7113), 796-802.
- Bursch, W., Ellinger, A., Gerner, C. H., Fröhwein, U., & Schulte- Hermann, R. (2000). Programmed cell death (PCD): apoptosis, autophagic PCD, or others?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 926(1), 1-12.
- Chen, C. H., & Lu, T. K. (2020). Development and challenges of antimicrobial peptides for therapeutic applications. *Antibiotics*, 9(1), 24.
- Chen, J., Wu, L., Zhang, J., Zhang, L., Gong, D., Zhao, Y., ... & Yu, H. (2020). Deep learning-based model for detecting 2019 novel coronavirus pneumonia on high-resolution computed tomography. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11.
- Chen, L., Zeng, Y., & Zhou, S. F. (2018). Role of apoptosis in cancer resistance to chemotherapy. *Current Understanding of Apoptosis-Programmed Cell Death*, 125-133.

- Cotter, T. G. (2009). Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews Cancer*, 9(7), 501-507.
- Cruz-Chamorro, L., Puertollano, M. A., Puertollano, E., de Cienfuegos, G. Á., & de Pablo, M. A. (2006). In vitro biological activities of magainin alone or in combination with nisin. *Peptides*, 27(6), 1201-1209.
- da Silva, F. P., & Machado, M. C. C. (2012). Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides*, 36(2), 308-314.
- Debieuvre, D., Oster, J. P., Riou, R., Berruchon, J., Levy, A., Mathieu, J. P., ... & Grivau, M. (2016). The new face of non-small-cell lung cancer in men: Results of two French prospective epidemiological studies conducted 10 years apart. *Lung Cancer*, 91, 1-6.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., ... & Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*, 1(2), 112-119.
- Deslouches, B., & Di, Y. P. (2017). Antimicrobial peptides with selective antitumor mechanisms: prospect for anticancer applications. *Oncotarget*, 8(28), 46635.
- Dong, Y., Yang, Y., Wei, Y., Gao, Y., Jiang, W., Wang, G., & Wang, D. (2020). Facile synthetic nano-curcumin encapsulated Bio-fabricated nanoparticles induces ROS-mediated apoptosis and migration blocking of human lung cancer cells. *Process Biochemistry*, 95, 91-98.
- Epand, R. M., & Epand, R. F. (2011). Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. *Journal of Peptide Science*, 17(5), 298-305.
- Eskandari, R., Asoodeh, A., & Behnam-Rassouli, F. (2021). The Therapeutic Effects of an Antimicrobial Peptide Protonection (IL-12) on A549 Cancer Cell Line. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(1), 679-688.
- Falanga, A., Nigro, E., De Biasi, M. G., Daniele, A., Morelli, G., Galdiero, S., & Scudiero, O. (2017). Cyclic peptides as novel therapeutic microbicides: engineering of human defensin mimetics. *Molecules*, 22(7), 1217.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-E386.
- Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., & Vandenabeele, P. (1999). More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*, 18(54), 7719-7730.
- Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre, M. F., ... & Global Burden of Disease Cancer Collaboration. (2015). The global burden of cancer 2013. *JAMA Oncology*, 1(4), 505-527.
- Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171-177.
- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation*, 14(7), 1237.

- Gaspar, D., Veiga, A. S., & Castanho, M. A. (2013). From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Frontiers in Microbiology*, 4, 294.
- Gennaro, R., & Zanetti, M. (2000). Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Peptide Science*, 55(1), 31-49.
- Graf, M., & Wilson, D. N. (2019). Intracellular antimicrobial peptides targeting the protein synthesis machinery. *Antimicrobial Peptides*, 73-89.
- Guntupalli, K., Dean, N., Morris, P. E., Bandi, V., Margolis, B., Rivers, E., ... & TLF LF-0801 Investigator Group. (2013). A phase 2 randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of talactoferrin in patients with severe sepsis. *Critical Care Medicine*, 41(3), 706-716.
- Halazonetis, T. D., Gorgoulis, V. G., & Bartek, J. (2008). An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*, 319(5868), 1352-1355.
- Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., & Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Research International*, 23.
- Hayashi, M., Kuroda, K., Ihara, K., Iwaya, T., & Isogai, E. (2018). Suppressive effect of an analog of the antimicrobial peptide of LL-37 on colon cancer cells via exosome-encapsulated miRNAs. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(6), 3009-3016.
- Herbst, R. S., Morgensztern, D., & Boshoff, C. (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, 553(7689), 446-454.
- Hiemstra, P. S., Amatngalim, G. D., van der Does, A. M., & Taube, C. (2016). Antimicrobial peptides and innate lung defenses: role in infectious and noninfectious lung diseases and therapeutic applications. *Chest*, 149(2), 545-551.
- Hiemstra, P. S., McCray, P. B., & Bals, R. (2015). The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *European Respiratory Journal*, 45(4), 1150-1162.
- Hong, Y., Sun, Y., Rong, X., Li, D., Lu, Y., & Ji, Y. (2020). Exosomes from adipose-derived stem cells attenuate UVB-induced apoptosis, ROS, and the Ca²⁺ level in HLEC cells. *Experimental Cell Research*, 396(2), 112321.
- Hoskin, D. W., & Ramamoorthy, A. (2008). Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(2), 357-375.
- Howlader, N., Forjaz, G., Mooradian, M. J., Meza, R., Kong, C. Y., Cronin, K. A., ... & Feuer, E. J. (2020). The effect of advances in lung-cancer treatment on population mortality. *New England Journal of Medicine*, 383(7), 640-649.
- Huerta-Cantillo, J., & Navarro-García, F. (2016). Properties and design of antimicrobial peptides as potential tools against pathogens and malignant cells. *Investigación en Discapacidad*, 5(2), 96-115.
- Indran, I. R., Tufo, G., Pervaiz, S., & Brenner, C. (2011). Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(6), 735-745.
- Izadpanah, A., & Gallo, R. L. (2005). Antimicrobial peptides. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 52(3), 381-390.

- Jan, R. (2019). Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9(2), 205.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69-90.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491-511.
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, 128(4), 683-692.
- Kang, D. W., Adams, J. B., Gregory, A. C., Borody, T., Chittick, L., Fasano, A., ... & Krajmalnik-Brown, R. (2017). Microbiota transfer therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome*, 5(1), 1-16.
- Kao, F. S., Pan, Y. R., Hsu, R. Q., & Chen, H. M. (2012). Efficacy verification and microscopic observations of an anticancer peptide, CB1a, on single lung cancer cell. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1818(12), 2927-2935.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257.
- Kim, E. H., Wong, S. W., & Martinez, J. (2019). Programmed necrosis and disease: we interrupt your regular programming to bring you necroinflammation. *Cell Death & Differentiation*, 26(1), 25-40.
- Kim, H., Jang, J. H., Kim, S. C., & Cho, J. H. (2014). De novo generation of short antimicrobial peptides with enhanced stability and cell specificity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(1), 121-132.
- Kim, J. Y., Park, S. C., Hwang, I., Cheong, H., Nah, J. W., Hahm, K. S., & Park, Y. (2009). Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *International Journal of Molecular sciences*, 10(6), 2860-2872.
- Koczulla, A. R., & Bals, R. (2003). Antimicrobial peptides. *Drugs*, 63(4), 389-406.
- Krysko, O., Aaes, T. L., Kagan, V. E., D'Herde, K., Bachert, C., Leybaert, L., & Krysko, D. V. (2017). Necroptotic cell death in anti- cancer therapy. *Immunological Reviews*, 280(1), 207-219.
- Kunda, N. K. (2020). Antimicrobial peptides as novel therapeutics for non-small cell lung cancer. *Drug Discovery Today*, 25(1), 238-247.
- Kung, C. P., Budina, A., Balaburski, G., Bergenstock, M. K., & Murphy, M. (2011). Autophagy in tumor suppression and cancer therapy. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 21(1).
- Laverty, G., & Gilmore, B. (2014). Cationic antimicrobial peptide cytotoxicity. *SOJ Microbiol Infect Dis*, 2(1), 1-8.
- LeBlanc, A. C. (2003). Natural cellular inhibitors of caspases. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27(2), 215-229.
- Lee, B. Y., & Jeong, Y. J. (1997). Insect pests of trees and shrubs in Korea, Seoul, 692.

- Lee, W. H., Loo, C. Y., Ghadiri, M., Leong, C. R., Young, P. M., & Traini, D. (2018). The potential to treat lung cancer via inhalation of repurposed drugs. *Advanced drug delivery reviews*, 133, 107-130.
- Lehmann, J., Retz, M., Sidhu, S. S., Suttman, H., Sell, M., Paulsen, F., ... & Stöckle, M. (2006). Antitumor activity of the antimicrobial peptide magainin II against bladder cancer cell lines. *European Urology*, 50(1), 141-147.
- Lewies, A., Wentzel, J. F., Miller, H. C., & Du Plessis, L. H. (2018). The antimicrobial peptide nisin Z induces selective toxicity and apoptotic cell death in cultured melanoma cells. *Biochimie*, 144, 28-40.
- Lewis, D. R., Check, D. P., Caporaso, N. E., Travis, W. D., & Devesa, S. S. (2014). US lung cancer trends by histologic type. *Cancer*, 120(18), 2883-2892.
- Li, J., Koh, J. J., Liu, S., Lakshminarayanan, R., Verma, C. S., & Beuerman, R. W. (2017). Membrane active antimicrobial peptides: translating mechanistic insights to design. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 73.
- Lindenboim, L., Zohar, H., Worman, H. J., & Stein, R. (2020). The nuclear envelope: Target and mediator of the apoptotic process. *Cell Death Discovery*, 6(1), 1-11.
- Liu, G., Pei, F., Yang, F., Li, L., Amin, A. D., Liu, S., ... & Cho, W. C. (2017). Role of autophagy and apoptosis in non-small-cell lung cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 367.
- Lu, H. P., & Chao, C. C. (2012). Cancer cells acquire resistance to anticancer drugs: an update. *Biomed J*, 35(6), 464-472.
- Lu, Y., Zhang, T. F., Shi, Y., Zhou, H. W., Chen, Q., Wei, B. Y., ... & Fu, C. Y. (2016). PFR peptide, one of the antimicrobial peptides identified from the derivatives of lactoferrin, induces necrosis in leukemia cells. *Scientific Reports*, 6(1), 1-12.
- Luo, Y., Chihara, Y., Fujimoto, K., Sasahira, T., Kuwada, M., Fujiwara, R., ... & Kuniyasu, H. (2013). High mobility group box 1 released from necrotic cells enhances regrowth and metastasis of cancer cells that have survived chemotherapy. *European Journal of Cancer*, 49(3), 741-751.
- Mandhair, H. K., Arambasic, M., Novak, U., & Radpour, R. (2020). Molecular modulation of autophagy: New venture to target resistant cancer stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 12(5), 303.
- Meza, R., Meernik, C., Jeon, J., & Cote, M. L. (2015). Lung cancer incidence trends by gender, race and histology in the United States, 1973–2010. *PloS One*, 10(3), e0121323.
- Mi, B., Liu, J., Liu, Y., Hu, L., Liu, Y., Panayi, A. C., ... & Liu, G. (2018). The designer antimicrobial peptide A-hBD-2 facilitates skin wound healing by stimulating keratinocyte migration and proliferation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(2), 647-663.
- Mihajlovic, M., & Lazaridis, T. (2010). Antimicrobial peptides in toroidal and cylindrical pores. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1798(8), 1485-1493.

- Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in plant science*, 22(1), 11-19.
- Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., & Adjei, A. A. (2008, May). Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 83, No. 5, pp. 584-594). Elsevier.
- Mowls, D. S., Campbell, J., & Beebe, L. A. (2015). Race and gender disparities in lung cancer incidence rates, 2001–2010. *The Journal of the Oklahoma State Medical Association*, 108(11), 482.
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(3), 220-228.
- Neuman, M. G., Katz, G. G., Malkiewicz, I. M., Mathurin, P., Tsukamoto, H., Adachi, M., ... & Casey, C. A. (2002). Alcoholic liver injury and apoptosis-synopsis of the symposium held at ESBRA 2001: 8th Congress of the European Society for Biomedical Research on Alcoholism, Paris, September 16, 2001. *Alcohol*, 28(2), 117-128.
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(12), 3448-3459.
- Nussbaumer, S., Bonabry, P., Veuthey, J. L., & Fleury-Souverain, S. (2011). Analysis of anticancer drugs: a review. *Talanta*, 85(5), 2265-2289.
- Ohsaki, Y., Gazdar, A. F., Chen, H. C., & Johnson, B. E. (1992). Antitumor activity of magainin analogues against human lung cancer cell lines. *Cancer Research*, 52(13), 3534-3538.
- Onoi, K., Chihara, Y., Uchino, J., Shimamoto, T., Morimoto, Y., Iwasaku, M., ... & Takayama, K. (2020). Immune checkpoint inhibitors for lung cancer treatment: A review. *Journal of Clinical Medicine*, 9(5), 1362.
- Pan, D., Zhang, W., Zhang, N., Xu, Y., Chen, Y. Peng, J., Chen, Y., Zhang, Y. & Shen, X. (2021). Oxymatrine Synergistically Enhances Doxorubicin Anticancer Effects in Colorectal Cancer. *Front. Pharmacol.* 12, 1-14.
- Park HY. 2004. Prescription and efficacy of medicinal insect. Daejeon: Korea-China Bioscience and Biotechnology Co-operation Center. p 204–213.
- Park, D. S., Leem, J. Y., Suh, E. Y., Hur, J. H., Oh, H. W., & Park, H. Y. (2007). Isolation and functional analysis of a 24- residue linear α - helical antimicrobial peptide from Korean blackish cicada, *Cryptotympana dubia* (Homoptera). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 66(4), 204-213.
- Park, H. K., Lee, J. E., Lim, J., Jo, D. E., Park, S. A., Suh, P. G., & Kang, B. H. (2014). Combination treatment with doxorubicin and gamitrinib synergistically augments anticancer activity through enhanced activation of Bim. *BMC Cancer*, 14(1), 1-9.
- Park, Y. K., & Hahm, K. S. (2005). Antimicrobial peptides (AMPs): peptide structure and mode of action. *BMB Reports*, 38(5), 507-516.
- Peters, S., Stahel, R., Bubendorf, L., Bonomi, P., Villegas, A., Kowalski, D. M., ... & Stinchcombe, T. E. (2019). Trastuzumab emtansine (T-DM1) in patients with previously treated HER2-overexpressing metastatic non-small cell lung cancer: efficacy, safety, and biomarkers. *Clinical Cancer Research*, 25(1), 64-72.

- Pilleron, S., Sarfati, D., Janssen- Heijnen, M., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Soerjomataram, I. (2019). Global cancer incidence in older adults, 2012 and 2035: a population- based study. *International journal of cancer*, 144(1), 49-58.
- Roudi, R., Syn, N. L., & Roudbary, M. (2017). Antimicrobial peptides as biologic and immunotherapeutic agents against cancer: a comprehensive overview. *Frontiers in Immunology*, 8, 1320.
- Ruiz-Ceja, K. A., & Chirino, Y. I. (2017). Current FDA-approved treatments for non-small cell lung cancer and potential biomarkers for its detection. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 90, 24-37.
- Sancar-Bas, S., Gezginci-Oktayoglu, S., & Bolkent, S. (2013). 4-Methylcatechol suppresses liver injury through blocking ROS production in the liver of hyperglycemic rats: SW04. S16–52. *The Febs Journal*, 280(1).
- Santana-Codina, N., Mancias, J. D., & Kimmelman, A. C. (2017). The role of autophagy in cancer, 19-39.
- Schwartz, A. G., & Cote, M. L. (2016). Epidemiology of lung cancer. *Lung Cancer and Personalized Medicine*, 21-41.
- Serin, E. K., Ozdemir, A., & Savaş, M. (2018). Cancer risk factors and prevention in Turkey. *International Journal of Health Services Research and Policy*, 3(3), 143-150.
- Seyfried, T. N., & Huysentruyt, L. C. (2013). On the origin of cancer metastasis. *Critical Reviews™ in Oncogenesis*, 18(1-2).
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(1), 5-29.
- Sousa, C. M., Biancur, D. E., Wang, X., Halbrook, C. J., Sherman, M. H., Zhang, L., ... & Kimmelman, A. C. (2016). Pancreatic stellate cells support tumour metabolism through autophagic alanine secretion. *Nature*, 536(7617), 479-483.
- Sritharan, S., & Sivalingam, N. (2021). A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. *Life Sciences*, 119527.
- Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., & Villanueva, Á. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 114(8), 785-796.
- Su, H. Y., Waldron, R. T., Gong, R., Ramanujan, V. K., Pandol, S. J., & Lugea, A. (2016). The unfolded protein response plays a predominant homeostatic role in response to mitochondrial stress in pancreatic stellate cells. *PLoS One*, 11(2), e0148999.
- Su, Y., Waring, A. J., Ruchala, P., & Hong, M. (2011). Structures of β -hairpin antimicrobial protegrin peptides in lipopolysaccharide membranes: mechanism of gram selectivity obtained from solid-state nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, 50(12), 2072-2083.
- Sun, S., Schiller, J. H., & Gazdar, A. F. (2007). Lung cancer in never smokers—a different disease. *Nature Reviews Cancer*, 7(10), 778-790.
- Sun, Y., & Peng, Z. L. (2009). Programmed cell death and cancer. *Postgraduate Medical Journal*, 85(1001), 134-140.

- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249.
- Suttmann, H., Retz, M., Paulsen, F., Harder, J., Zwergel, U., Kamradt, J., ... & Lehmann, J. (2008). Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells. *BMC Urology*, 8(1), 1-7.
- Swithenbank, L., & Morgan, C. (2017). The role of antimicrobial peptides in lung cancer therapy. *J Antimicrob Agents*, 3(134), 2472-1212.
- Thurston, D. E., & Pysz, I. (2021). *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs*. CRC press, 618.
- Tornesello, A. L., Borrelli, A., Buonaguro, L., Buonaguro, F. M., & Tornesello, M. L. (2020). Antimicrobial peptides as anticancer agents: Functional properties and biological activities. *Molecules*, 25(12), 2850.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet- Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87-108.
- Trump, B. E., Berezesky, I. K., Chang, S. H., & Phelps, P. C. (1997). The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicologic Pathology*, 25(1), 82-88.
- Tsakalozou, E., Allison, Eckman, A.M. & Younsoo, B. (2012). Combination Effects of Docetaxel and Doxorubicin in Hormone-Refractory Prostate Cancer Cells. *Biochem. Res. Int.* (7), 1-10.
- Van Meerloo, J., Kaspers, G. J., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. In *Cancer Cell Culture*. Humana Press, 237-245.
- Vercammen, D., Brouckaert, G., Denecker, G., Van de Craen, M., Declercq, W., Fiers, W., & Vandenabeele, P. (1998). Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(5), 919-930.
- Wakharde, A.A., Awad, A.H., Bhagat. A. & Karuppayil, S.M. (2018). Synergistic Activation of Doxorubicin against Cancer: A Review. *Am J Clin Microbiol Antimicrob*, 1(2), 1-6,
- Wang, X., Mishra, B., Lushnikova, T., Narayana, J. L., & Wang, G. (2018). Amino acid composition determines peptide activity spectrum and hot- spot- based design of mercedin. *Advanced Biosystems*, 2(5), 1700259.
- Wojtala, A., Bonora, M., Malinska, D., Pinton, P., Duszynski, J., & Wieckowski, M. R. (2014). Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. *Methods in Enzymology*, 542, 243-262.
- Xu, M. Z., Lee, W. S., Han, J. M., Oh, H. W., Park, D. S., Tian, G. R., ... & Park, H. Y. (2006). Antioxidant and anti-inflammatory activities of N-acetyldopamine dimers from *Periostracum Cicadae*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(23), 7826-7834.
- Yan, Y., Chen, X., Wang, X., Zhao, Z., Hu, W., Zeng, S., ... & Xu, Z. (2019). The effects and the mechanisms of autophagy on the cancer-associated fibroblasts in cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 1-12.
- Yang, T., Li, J., Jia, Q., Zhan, S., Zhang, Q., Wang, Y., & Wang, X. (2021). Antimicrobial peptide 17BIPHE2 inhibits the proliferation of lung cancer cells in vitro and in vivo by regulating the ERK signaling pathway. *Oncology Letters*, 22(1), 1-15.

- Youlden, D. R., Cramb, S. M., & Baade, P. D. (2008). The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *Journal of Thoracic Oncology*, 3(8), 819-831.
- Yu, M., Feuer, E. J., Cronin, K. A., & Caporaso, N. E. (2014). Use of multiple imputation to correct for bias in lung cancer incidence trends by histologic subtype. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 23(8), 1546-1558.
- Zandsalimi, F., Talaei, S., Noormohammad Ahari, M., Aghamiri, S., Raei, P., Roshanzamiri, S., ... & Zohrab Zadeh, Z. (2020). Antimicrobial peptides: a promising strategy for lung cancer drug discovery?. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 15(11), 1343-1354.
- Zappa, C., & Mousa, S. A. (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational Lung Cancer Research*, 5(3), 288.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *nature*, 415(6870), 389-395.
- Zee-Cheng, R. K., & Cheng, C. C. (1989). Delivery of anticancer drugs. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 11(7-8), 439-529.
- Zeng, Z., Bo, H., Gong, Z., Lian, Y., Li, X., Li, X., ... & Xiong, W. (2016). AFAP1-AS1, a long noncoding RNA upregulated in lung cancer and promotes invasion and metastasis. *Tumor Biology*, 37(1), 729-737.
- Zhao, N., Woodle, M. C., & Mixson, A. J. (2018). Advances in delivery systems for doxorubicin. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 9(5).
- Zhao, X., Wu, H., Lu, H., Li, G., & Huang, Q. (2013). LAMP: a database linking antimicrobial peptides. *PloS one*, 8(6), e66557.
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., ... & Tan, W. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England journal of medicine*, 382.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ayan Huseynnzade
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☐ T.C. ☒ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Bakü Devlet Ünivesitesi
Fakülte	Biyoloji
Bölümü	Biyolji öğretmenliği
Mezuniyet Yılı	30.06.2018

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

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı Adı
Programı	Program Adı

Makale ve Bildiriler	
Huseynzade A., Sancar S., Bolkent Ş. The antiproliferative and cytotoxic effect of kryptonin on the A549 cell line. 4. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences-EurasianBioChem 2021, 24-26 November.	