



*Original Article / Araştırma Makalesi*

**TÜMÖR HÜCRELERİ APOPTOZ FAKTÖRÜ (TCApF)'NÜN İNSAN PROSTAT VE MEME KANSERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNE SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Determination of Cytotoxic and Genotoxic Effects of Tumor Cells Apoptosis Factor (TCApF) on Human Prostate and Breast Cancer Cell Lines**

Yavuz ERDEN<sup>1</sup>  Sevilay GÜNAY<sup>2</sup>   
<sup>1,2</sup>Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Bartın

*Geliş Tarihi / Received:* 20.04.2020

*Kabul Tarihi / Accepted:* 26.05.2020

*Yayın Tarihi / Published:* 21.06.2020

**ÖZ**

Antikanser peptidler (ACP), moleküler hedefli kanser ilaç keşif ve gelişim süreci için önemli bir strateji olarak görülmektedir. ACP'ler kullanılarak normal hücrelere toksik etkileri azaltılmış yeni terapötik ilaçların tasarlanabileceği öngörülmektedir. Tümör hücreleri apoptoz faktörü (TCApF), 84 aminoasit uzunluğunda peptid yapısına sahip yeni bir hormondur. Bu hormon üzerine yapılan az sayıdaki araştırma TCApF'nin potansiyel bir ACP olabileceğini bildirmektedir. Bu çalışmanın amacı, insan meme (MCF-7) ve prostat kanseri (PC-3) hücre hatları üzerine TCApF'nin muhtemel sitotoksik ve genotoksik etkilerini belirlemektir. Çalışmada insan meme ve prostat kanser hücre hatları üzerine TCApF'nin 1, 10 ve 100 ve 1000 ng/ml'lik konsantrasyonları ile referans ilaç (5-Fluorourasil) 24 ve 48 saat süreyle uygulandı. Uygulamayı takiben TCApF'nin hücre canlılıkları üzerine etkileri MTT yöntemiyle, DNA hasarına etkisi ise tek hücre jel elektroforezi yöntemi (Comet Assay) ile belirlendi. Sonuç olarak uygulanan 1000 ng/ml'lik dozun her iki hücre hattında da hücre canlılığını azalttığını ve düşük seviyede DNA hasarına neden olduğunu tespit ettik. Bu sonuçlar TCApF'nin potansiyel bir ACP olabileceğini ancak düşük dozlarda etki sergilemediğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Antikanser peptid, Genotoksisite, Meme kanseri, Prostat kanseri, TCApF

**ABSTRACT**

Anticancer peptides (ACP) are thought as an important strategy for molecular targeted cancer drug discovery and development process. It is predicted that new therapeutic drugs with reduced toxic effects to normal cells can be designed by using ACPs. Tumor cells apoptosis factor (TCApF) is a new peptide structured hormone with a length of 84 amino acids. Few studies on this hormone report that TCApF may be a potential ACP. The aim of this study is to determine the possible cytotoxic and genotoxic effects of TCApF on human breast (MCF-7) and prostate cancer (PC-3) cell lines. In the present study, concentrations of 1, 10 and 100 and 1000 ng/ml of TCApF, as well as a reference drug (5- fluorouracil), were applied on human breast and prostate cancer cell lines for 24 and 48 hours. Following the application, the effects of TCApF on cell viability were determined by MTT method, and the effect on DNA damage was determined by single cell gel electrophoresis method (Comet Assay). As the result, we determined that the applied dose of 1000 ng/ml reduces cell viability in both cell lines and causes low level of DNA damage. These results show that TCApF may be a potential ACP, but it does not exhibit effect at low doses.

**Keywords:** Anticancer peptide, Breast cancer, Genotoxicity, Prostate cancer, TCApF

## GİRİŞ

Kanser bir doku veya organdaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ve sonrasında genellikle diğer doku veya organlara metastazı ile karakterize olan büyük bir sağlık problemidir. Bu hastalık süreci DNA hasarı, mutasyonlar, hormonlar ve bağışıklık sistemine bağlı koşullar gibi iç faktörlerden kaynaklanabileceği gibi ultraviyole ve iyonize radyasyon, asbest, sigara dumanı, virüs, bakteri ve parazitler gibi dış faktörler ile de tetiklenebilir (Jackson ve Loeb, 2001). Değişen hücre metabolizması kanserin ayırt edici özelliğidir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Kanser hücreleri, köken aldıkları normal dokularınkine benzer metabolik ağlar kullanır. Örneğin hücre metabolizma, olumsuz ortamlarda çoğalmayı ve hayatta kalmayı kolaylaştırmak için değiştirilir (Jang, Kim ve Lee, 2013). Bir kanser biyobelirteci, vücutta kanserin varlığını gösteren bir madde veya süreç karşılık gelir; malignitenin kendisi tarafından salınan bir molekül veya vücudun kanser varlığına spesifik bir yanıtı olabilir (Wagner ve Srivastava, 2012). Endojen metabolitler, çeşitli hastalıklar için biyobelirteçlerin tanımlanması ve hastalık ilerlemesinin izlenmesi için değerli bir araçtır (Wang, Kaczor-Urbanowicz ve Wong, 2017).

Antikanser peptidler (ACP) genellikle antimikrobiyal peptidlerden (AMP'ler) türetilen (Tyagi, Kapoor, Kumar, Chaudhary, Gautam ve Raghava, 2013) ve çoğunlukla 50 aminoasitten daha kısa yapıları katyonik moleküllerdir (Hayashi, Ducancel ve Konno, 2012). ACP'ler doğada katyonik ve hidrofobiktir. Bu nedenle kanser hücrelerine karşı güçlü toksik aktiviteler gösterirler (Hilchie, Sharon, Haney, Hoskin, Bally, Franco, Corcoran ve Hancock, 2016). Ayrıca ACP'ler katyonik yapıları olduklarından, kanserli hücrelerin anyonik hücre zarı yapıları ile etkileşime girebilir ve daha sonra seçici olarak kanser hücrelerini öldürebilirler (Li ve Wang, 2016). ACP'ler diğer proteinlere veya antikora göre önemli avantajlara sahiptirler. Genel olarak bu avantajlar boyutlarının küçük olması ve hücre zarlarına nüfuz etme kabiliyetlerinin olmasıdır. Ayrıca yüksek aktivite, özgüllük ve afiniteye sahiptirler ve bunların diğer ilaçlarla etkileşimleri oldukça düşüktür (Marqus, Pirogova ve Piva, 2017a). ACP'lerin bir tedavi aracı olarak kullanılmasının ek bir yararı da, vücutta kolaylıkla metabolize olmaları ve özellikle karaciğer veya böbrekler gibi hayati fonksiyonlara sahip organlarda birikmeyerek toksik etki sergilememeleridir (Domingo-Calap ve Delgado-Martínez, 2018). Buna ilave olarak ACP'ler hızlı bir şekilde sentezlenebilir, kolayca modifiye edilebilir (Boohaker, Lee, Vishnubhotla, Perez ve Khaled, 2012) ve rekombinant antikordardan veya proteinlerden daha az immünojeniktirler (McGregor, 2008). Bütün bunlar ACP'lerin kanser tedavisinde kullanımını kolaylaştırıcı bir etken olarak değerlendirilebilir.

Araştırmacılar ACP'leri, anti-kanser ajanların geliştirilmesi için yeni ve umut verici bir molekül grubu olarak görmektedir (Blanco-Miguez vd., 2016; Cicero, Fogacci ve Colletti, 2017).

Tümör hücreleri apoptoz faktörü (TCApF), timus, kolon ve beynin frontal lobunda ekspresyonu gösterilen 84 aminoasitlik peptid yapılı yeni bir hormondur. Bu hormon ve türevleri (kısa formları) üzerine yapılan az sayıdaki çalışma, söz konusu peptidin T1/ST2 (İnterlökin 1 reseptör ailesinin bir üyesi) reseptörü üzerinden hücreye etki gösterdiğini bildirmektedir (Ohana, Sandler, Kass, Stemmer ve Devary, 2017; Sandler vd., 2010). Mevcut literatürler T1/ST2 reseptör grubunun başta kanser, inflamatuvar hastalıklar, travma, sepsis, kardiyovasküler hastalıklar ve idiyopatik pulmoner fibroz olmak üzere çeşitli hastalıklarda önemli roller üstlendiğini bildirmektedir (Meisel vd., 2001; Tominaga, 1989; Xu vd., 1998).

Kanser, türü ne olursa olsun sonuç olarak yüksek insidansı ve mortalitesi nedeniyle dünya çapında büyük bir sosyoekonomik sorun olarak güncelliğini korumaktadır. Bu hastalık grubunun oluşturduğu potansiyel tehdidin engellenmesi adına teşhis ve tedavideki yeni yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Yeni ilaç modellerinin geliştirilmesi ve söz konusu hastalık grubuna olan etkilerinin belirlenmesini amaçlayan birçok çalışma henüz problemi tam olarak çözemesi de, umut vaat eden sonuçların sayısı hiçte yadırganacak düzeyde değildir. Ancak en büyük engel kanserli hücelere etki eden ilaçların sağlıklı hücreler üzerine gösterdiği olumsuz etkilerdir. Bu nedenle biyouyumluluğu yüksek yeni terapötiklerin keşfi geleceğe daha umutla bakmamıza neden olacaktır. Bu çalışma genomumuz tarafından sentez edilen TCApF'nin potansiyel sitotoksik ve genotoksik etkilerini insan prostat ve meme kanseri hücre hatlarında belirlemeyi amaçlamaktadır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### TCApF Konsantrasyonunun Hazırlanması

Test bileşiği TCApF yüksek saflıkta olarak temin edildi (Phoenix Pharma. Inc. Cat. No: 044-55). Bileşiğin 1, 10, 100 ve 1000 ng/ml konsantrasyonları (Sandler vd., 2010) ve referans ilacın (5-Fluorourasil) 10 µM konsantrasyonu hücre besleme medyumu içerisinde hazırlandı. Çalışma süresince hazırlanan peptid ve referans madde 4°C'de muhafaza edildi.

## Sitotoksikite Analizleri

### *Hücrelerin Çoğaltılması*

Peptidin antikanser etkinliğinin belirlenmesi amacıyla insan meme (MCF-7) ve insan prostat (PC-3) kanseri hücre hatları Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den temin edilip çalışmada kullanıldı. PC-3 hücreleri RPMI-1640 medyumla, MCF-7 hücreleri ise DMEM medyumla beslendi. Hücreler haftada iki defa beslenerek deneysel süreç boyunca hücre flaskları %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 37°C sıcaklıkta (Thermo Forma II CO<sub>2</sub> İnkübatör, ABD) inkübe edildi.

### *TCApF ile Hücrelerin Muamelesi*

TCApF'nin 1, 10, 100 ve 1000 ng/ml konsantrasyonları ile ve referans kanser ilacı 5-Fluorourasil'in 10 µM dozu hücrelerin ekimi yapılan kuyucuklara eklendi. Sonrasında plakalar 24 ve 48 saat süreyle %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda uygulanan bileşiklerin ve referans ilaçların hücre canlılığına olan muhtemel etkileri MTT yöntemi ile belirlendi.

### *MTT yöntemi*

TCApF uygulaması sonrası hücrelerdeki canlılık düzeylerinin analizi için 0,5 mg/ml konsantrasyonda MTT çözeltisi hazırlandı. Uygulama sonrası her bir kuyucuğa 50 µL MTT çözeltisi ilave edilerek 3 saat süresince CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar içindeki solüsyon çekilerek üzerlerine 100 µL DMSO ilave edildi. Kuyucuklardaki hücrelerin optik densiteleri ELISA plaka okuyucuda (Thermo MultiskanGo, ABD) 570 nm dalga boyunda okutuldu (Mosmann, 1983). Kontrol kuyucuklarından elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınıp bu değer %100 hücre canlılığı olarak değerlendirildi. Referans ilaç ve TCApF uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri, kontrol absorbans değerine oranlanarak yüzde canlılık değerleri hesaplandı (Koran, Tekin, Çalışkan, Tekin, Sandal ve Görgülü, 2017; Tekin, Erden, Sandal ve Yılmaz, 2015). Deneyler birbirinden bağımsız olarak farklı günlerde en az 10 kez tekrarlandı.

### *Comet Analizi*

DNA hasar analizi alkali Comet analizi gerçekleştirilerek belirlendi (Singh, McCoy, Tice ve Schneider, 1988). Öncelikle 6 kuyucuklu plakalara ekimi gerçekleştirilen MCF-7 hücreleri kapsantin 500 ve 1000 µM dozları ile 24 saat muamele edildi. Sonrasında iki defa fosfat tamponu ile yıkanan hücreler toplanıp sayıldı. Yaklaşık 10.000 hücre/10 µL

süspansiyon %1'lik 80 µL low melting agaroz (LMA) ile karıştırıldı. Hücre+LMA karışımı %1 normal meltin agaroz kaplı lamlara aktarıldı. Üzeri lamel ile kapatılarak preparatlar hazırlandı. Lamlar lizis solüsyonunda (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, %1 Triton-X ve %10 DMSO, pH: 10) 1 saat süreyle 4°C'de muamele edildi. Lizis sonrası lamlar yatay elektroforez tankına aynı yönde yerleştirilip 25 V'da (maksimum 300mA) 20 dk elektroforez gerçekleştirildi. Son olarak lamlar nötralizasyon solüsyonunda(0.4 M Tris, pH = 7.5) 3x5 dk yıkandı. Etidyum bromid uygulanarak hücre DNA'sında meydana gelen hasar floresans mikroskopta (Zeiss Axioscope, Germany) incelendi. Her gruptan rastgele seçilen 250 hücrenin Tail DNA (%) parametreleri TriTek Comet Score'da değerlendirilerek analiz edildi.

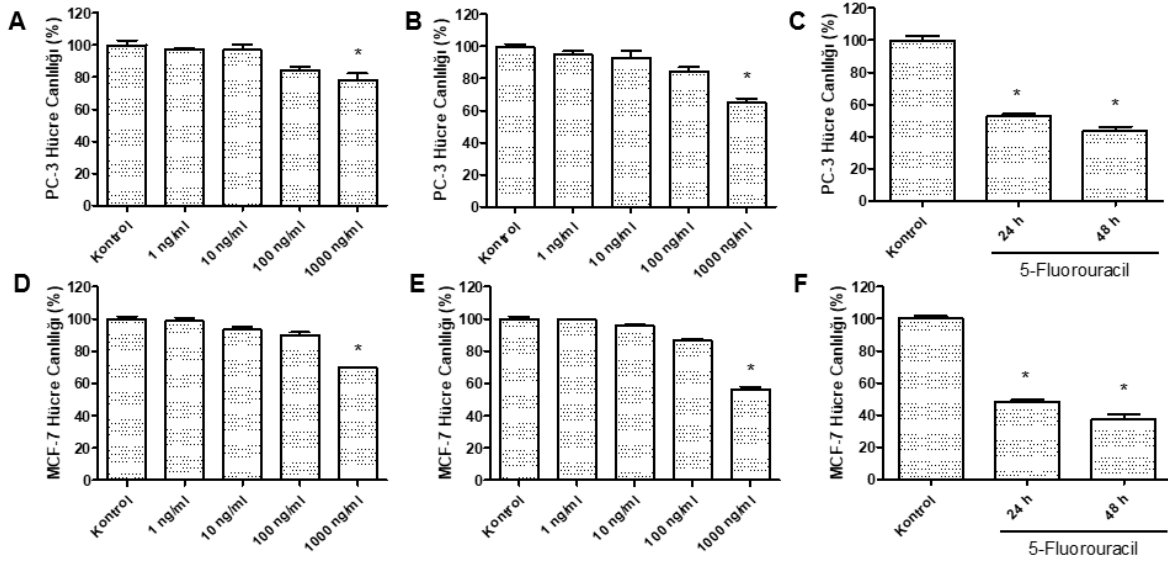
### ***İstatiksel Analiz***

Analizlerde Sigma Plot 12 paket programı kullanıldı. Nicel veriler ortalama±standart sapma ile özetlendi. İncelenen değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmaları yapılmadan önce normal dağılıma uygunluk ve varyansların homojenlik kontrolü yapıldı. Normal dağılıma uygunluk durumunda, ilgili değişkenler için grup ortalamaları arası farklılık, tek yönlü varyans analizi (One Way Anova) ile değerlendirildi. Normallik varsayımlarının sağlanmadığı durumlarda Kruskal Wallis H testi ile analizler gerçekleştirildi. İstatistiksel olarak p<0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

## **BULGULAR VE TARTIŞMA**

### **Hücre Canlılık Değişimleri**

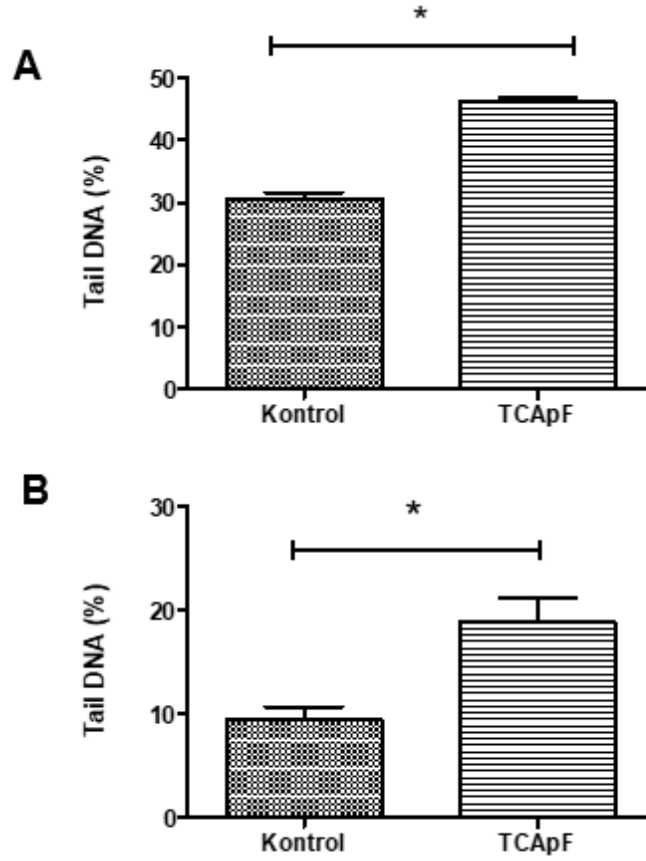
TCApF uygulamasından 24 ve 48 saat sonra insan prostat ve meme kanseri hücre hatlarında canlılık değişim değerleri Şekil 1'de gösterilmiştir. Buna göre test bileşiğinin sadece 1000 ng/ml konsantrasyonu hem PC-3 hem de MCF-7 hücrelerinde 24 ve 48. saatlerde canlılığı anlamlı düzeyde azalttı (p<0.05). 5-Fluorourasil'in uygulanan 10 µM'lık dozu hücre canlılığını yaklaşık %50 inhibe etti (p<0.05). Standart anti-kanser ilacı olan 5-Fluorourasil'e kıyasla TCApF kısmen daha zayıf bir anti-kanser etki sergiledi.



**Şekil 1.** TCaP Uygulaması Sonrası Hücre Canlılık Düzeyleri. (Uygulamadan 24 ve 48 saat sonra PC-3 (A ve B, sırasıyla) ve MCF-7 (D ve E, sırasıyla) hücrelerindeki canlılık değişimi sadece 1000 ng/ml'de anlamlı düzeyde azaldı. 5-Fluorourasil (10 µM) uygulaması her iki hücrede ve zamanda hücre canlılığı anlamlı düzeyde düşürdü. Değerler Ort.±Standart Sapma olarak ifade edildi. \*p<0.05)

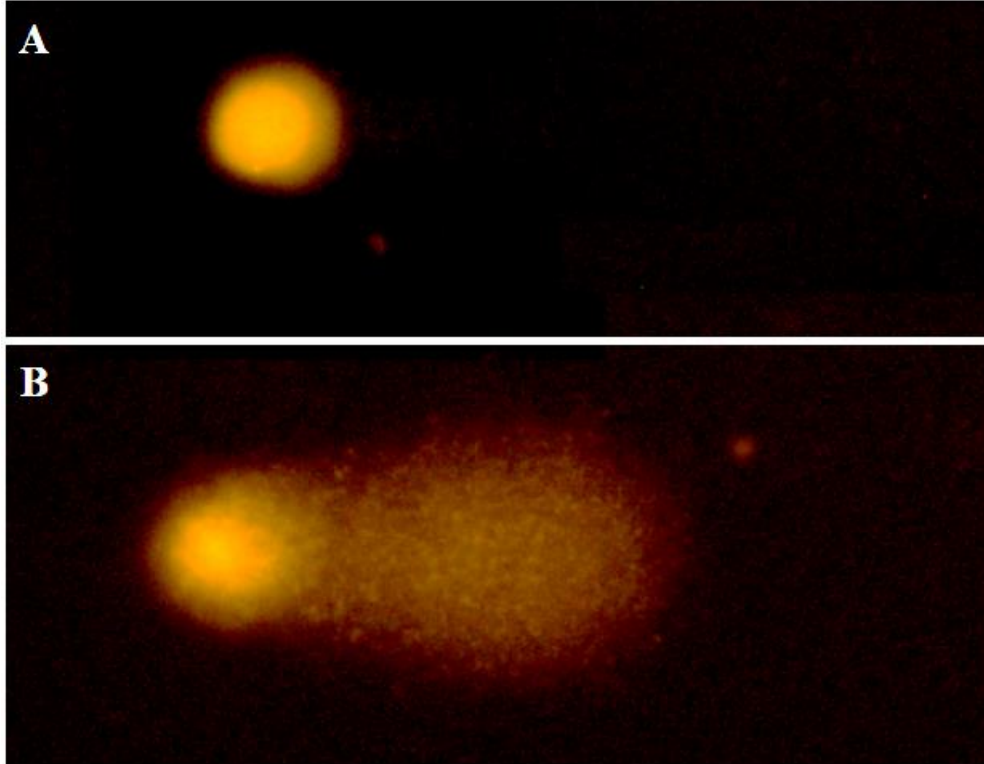
### DNA Hasarı Düzeyi

MTT analizlerinden sonra etkin doz olarak belirlenen 1000 ng/ml'lik konsantrasyonun PC-3 ve MCF-7 hücrelerinde sergilediği genotoksisite sonuçları Şekil 2'de gösterilmektedir. Buna göre uygulanan bileşiğin 24 saatlik muamelesinden sonra her iki hücre hattının DNA hasarına uğradığı belirlendi. DNA hasar göstergesi olarak değerlendirilen Tail DNA (%) düzeyi kontrol grubuna kıyasla tedavi grubunda anlamlı bir artış sergiledi ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 2.** TCApF Uygulaması Sonrasında DNA Hasar Düzeyi. (PC-3 (A) ve MCF-7 (B) hücrelerine 1000 ng/ml TCApF uygulaması DNA hasarında artışa neden oldu. Değerler Ort.±Standart Sapma olarak ifade edildi. \*p<0.05)

Uygulama sonrasında meydana gelen DNA hasarının örnek mikroskopik görüntüsü Şekil 3'de gösterilmiştir. Şekil 3A'daki görselde kontrol grubunda yer alan sağlam bir DNA yapısını, Şekil 3B'de hasarlı bir DNA yapısının örnek mikroskop görüntüsü yer almaktadır.



**Şekil 3.** DNA Hasar Analizi Görüntü Örnekleri. (A: Sağlam bir DNA'nın Comet analizi sonrası mikroskop görüntüsü. B: Hasarlı bir DNA örneği. DNA kırıklarına bağlı olarak oluşan kuyruk uzunluğu, DNA hasarının bir göstergesidir. Mikroskop görüntüleri x20 büyütmede kaydedildi.)

TCApF üzerine yapılan az sayıdaki çalışma bu sonuçları elde ettiğimiz bulguları destekler niteliktedir. Sandler ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmayla TCApF'nin insan akut miyeloid lösemi, meme karsinoması, glioblastoma ve prostat kanseri hücre serilerinde proliferasyonu inhibe ettiğini rapor etmektedir (Sandler vd., 2010). Ayrıca diğer bir çalışmada 14 aminoasitlik uzunluğa sahip TCApF türevinin (dTCApF) hücresel etkileri araştırılmıştır (Ohana vd., 2017). Araştırmacılar dTCApF'nin, köken aldığı TCApF gibi T1/ST2 reseptörü aracılığıyla hücreye etki gösterdiğini bildirmiş ve pankreas tümörü hücre serisine uygulanan dTCApF'nin golgi aracılı hücre ölümünü gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Ohana vd., 2017). Stammer ve arkadaşları ise gerçekleştirmiş oldukları çalışmada, daha önce tedavisi başarısız olan veya önceki standart tedaviye tahammül edemeyen ileri/metastatik solid maligniteli hastalara TCApF uygulaması gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar hastalara 12-48 mg/m<sup>2</sup>'lik TCApF uygulaması sonrası anti-kanser sitokin düzeylerinin ve endoplazmik retikulum (ER) stres biyobelirteçlerinin (GRP78 / BiP) arttığını, buna karşın anjiyojenik faktörlerin seviyelerinde ise azalmanın olduğunu rapor etmektedir (Stemmer vd., 2018).

Yaptığımız bu çalışmada, özellikle yüksek dozda uygulanan TCApF'nin PC-3 ve MCF-7 hücre canlılığını azalttığını ve artan DNA hasarına neden olduğunu gösterdik. TCApF'nin DNA üzerinde meydana getirdiği hasarın hücre ölümü ile sonuçlandığını söyleyebiliriz.



Yapılacak kapsamlı çalışmalar, söz konusu peptidin fizyolojik ve moleküler mekanizmalarını aydınlatmada yardımcı olacaktır.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

ACP'ler, genellikle 50 aminoasitten daha kısa amino asit zincirlerine sahip moleküllerdir (Hayashi vd., 2012). ACP'ler diğer proteinlere veya antikorlara göre önemli avantajlara sahiptirler. Genel olarak bu avantajlar boyutlarının küçük olması ve hücre zarlarına nüfuz etme kabiliyetlerinin olmasıdır. Ayrıca yüksek aktivite, özgüllük ve afiniteye sahip olup bunların diğer ilaçlarla etkileşimleri oldukça düşüktür (Marqus, Pirogova ve Piva, 2017b).

Çalışmada kullandığımız TCApF'de yapı olarak küçük bir peptiddir. Yapılan çalışmalar bu peptidin potansiyel bir ACP olabileceğini göstermiştir. Yeni kanser tedavi yaklaşımlarının kaynağı olarak düşünülen ACP'lerin, bir tedavi aracı olarak kullanılmasının ek bir yararı da; vücutta kolaylıkla metabolize olmaları ve özellikle karaciğer veya böbrekler gibi hayati fonksiyonlara sahip organlarda birikmeyerek toksik etki sergilememeleridir (Ali, Rani ve Kumar, 2013). Buna ilave olarak ACP'ler hızlı bir şekilde sentezlenebilir, kolayca modifiye edilebilir (Boohaker vd., 2012) ve rekombinant antikorlardan veya proteinlerden daha az immünojeniktirler (McGregor, 2008). Bütün bunlar ACP'lerin kanser tedavisinde kullanımını kolaylaştırıcı bir etken olarak değerlendirilebilir. Araştırmacılar ACP'leri, anti-kanser ajanların geliştirilmesi için yeni ve umut verici bir molekül grubu olarak görmektedir (Blanco-Miguez vd., 2016; Cicero vd., 2017).

Elde ettiğimiz sonuçlar ve mevcut literatür bilgisi dahilinde TCApF'nin gerek yapı gerekse fizyolojik etkileri potansiyel bir APC olabileceğini ve söz konusu etkinin diğer kanser hücrelerinde de denenmesinin faydalı olacağı görüşündeyiz. Ayrıca kapsamlı çalışmalar bu peptidin etkilerini daha iyi anlamamıza olanak sağlayacaktır.

## Teşekkür

Bu çalışma Bartın Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2019-FEN-A-003).

## KAYNAKLAR

Ali, R., Rani, R., Kumar, S. (2013). *New peptide based therapeutic approaches. Advances in Protein Chemistry. Jeddah: OMICS Group eBooks.*

Blanco-Miguez, A., Gutierrez-Jacome, A., Perez-Perez, M., Perez-Rodriguez, G., Catalan-Garcia, S., Fdez-Riverola, F., . . . Sanchez, B. (2016). *From amino acid sequence to bioactivity: The biomedical potential of antitumor peptides. Protein Sci, 25, 1084-1095.*

- Boohaker, R. J., Lee, M. W., Vishnubhotla, P., Perez, J. M., Khaled, A. R. (2012). *The use of therapeutic peptides to target and to kill cancer cells. Curr Med Chem, 19, 3794-3804.*
- Cicero, A. F. G., Fogacci, F., Colletti, A. (2017). *Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. Br J Pharmacol, 174, 1378-1394.*
- Domingo-Calap, P., Delgado-Martínez, J. (2018). *Bacteriophages: protagonists of a post-antibiotic era. Antibiotics, 7, 66.*
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). *Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 144, 646-674.*
- Hayashi, M. A., Ducancel, F., Konno, K. (2012). *Natural peptides with potential applications in drug development, diagnosis, and/or biotechnology. Int J Pept, 2012, epub757838*
- Hilchie, A. L., Sharon, A. J., Haney, E. F., Hoskin, D. W., Bally, M. B., Franco, O. L., . . . Hancock, R. E. (2016). *Mastoparan is a membranolytic anti-cancer peptide that works synergistically with gemcitabine in a mouse model of mammary carcinoma. BBA-Biomembranes, 1858, 3195-3204.*
- Jackson, A. L., Loeb, L. A. (2001). *The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. Mutat Res, 477, 7-21.*
- Jang, M., Kim, S. S., Lee, J. (2013). *Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. Exp Mol Med, 45, e45.*
- Koran, K., Tekin, Ç., Çalışkan, E., Tekin, S., Sandal, S., Görgülü, A. O. (2017). *Synthesis, structural and thermal characterizations and in vitro cytotoxic activities of new cyclotriphosphazene derivatives. Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem, 192, 1002-1011.*
- Li, F.-M., Wang, X.-Q. (2016). *Identifying anticancer peptides by using improved hybrid compositions. Sci Rep, 6, 33910.*
- Marqus, S., Pirogova, E., Piva, T. J. (2017a). *Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. J Biomed Sci, 24, 21.*
- Marqus, S., Pirogova, E., Piva, T. J. (2017b). *Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. J Biomed Sci, 24, 21.*
- McGregor, D. P. (2008). *Discovering and improving novel peptide therapeutics. Curr Opin Pharmacol, 8, 616-619.*
- Meisel, C., Bonhagen, K., Lohning, M., Coyle, A. J., Gutierrez-Ramos, J. C., Radbruch, A., Kamradt, T. (2001). *Regulation and function of T1/ST2 expression on CD4+ T cells: induction of type 2 cytokine production by T1/ST2 cross-linking. J Immunol, 166, 3143-3150.*
- Mosmann, T. (1983). *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, 65, 55-63.*
- Ohana, J., Sandler, U., Kass, G., Stemmer, S. M., Devary, Y. (2017). *dTCaP<sup>F</sup>s, a derivative of a novel human hormone peptide, induces apoptosis in cancer cells through a mechanism involving loss of Golgi function. Mol Clin Oncol, 7, 991-999.*
- Sandler, U., Devary, O., Braitbard, O., Ohana, J., Kass, G., Rubinstein, A. M., . . . Devary, Y. (2010). *NEROFE-a novel human hormone-peptide with anti-cancer activity. J Exp Ther Oncol, 8, 327-339.*
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. (1988). *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res, 175, 184-191.*

---

*Semmer, S. M., Benjaminov, O., Silverman, M. H., Sandler, U., Purim, O., Sender, N., . . . Devary, Y. (2018). A phase I clinical trial of dTCAPFs, a derivative of a novel human hormone peptide, for the treatment of advanced/metastatic solid tumors. Mol Clin Oncol, 8, 22-29.*

*Tekin, S., Erden, Y., Sandal, S., Yilmaz, B. (2015). Is irisin an anticarcinogenic peptide? Med-Science, 4, 2172-2180.*

*Tominaga, S. (1989). A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. FEBS Lett, 258, 301-304.*

*Tyagi, A., Kapoor, P., Kumar, R., Chaudhary, K., Gautam, A., Raghava, G. (2013). In silico models for designing and discovering novel anticancer peptides. Sci Rep, 3, 2984.*

*Wagner, P. D., Srivastava, S. (2012). New paradigms in translational science research in cancer biomarkers. Transl Res, 159, 343-353.*

*Wang, X., Kaczor-Urbanowicz, K. E., Wong, D. T. (2017). Salivary biomarkers in cancer detection. Med Oncol, 34, 7.*

*Xu, D., Chan, W. L., Leung, B. P., Huang, F., Wheeler, R., Piedrafita, D., . . . Liew, F. Y. (1998). Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. J Exp Med, 187, 787-794.*