

## Caspases Activities in TNF- $\alpha$ Applied HepG2 Hepatocellular Carcinoma Cell

Burcu Menekşe BALKAN<sup>1\*</sup>, Öğünç MERAL<sup>2</sup>, Görkem KISMALI<sup>2</sup>, Deniz TURAN<sup>3</sup>, Tevhide SEL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, 15030, Burdur, Turkey

<sup>2</sup>Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, 06110, Ankara, Turkey

<sup>3</sup>Republic of Turkey, Ministry of Agriculture and Forestry, İzmir Bornova Veterinary Control Institute, 35010, İzmir, Turkey

### ABSTRACT

Purpose: Tumor necrosis factor (TNF) plays a key role in cellular events such as cell survival, proliferation, differentiation, inflammation, immunity, and apoptosis. Although named Tumor necrosis factor for its tumor cytotoxicity, TNF has been implicated in a wide spectrum of other diseases. The aim of the present study is to determine the effects of TNF- $\alpha$  on caspase 3, 9, and 1 enzyme activities in HepG2 cells. Materials and methods: Hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was used and cells were cultured in the absence (control) or presence of TNF- $\alpha$  for 24 h. The effect of TNF- $\alpha$  on caspase 3, caspase 9, and caspase 1 enzyme activities in hepatocarcinoma cells were examined in TNF- $\alpha$  treated and control cells using colorimetric assay kits. Results: There were significant increases in caspases 1 and 3 levels in TNF- $\alpha$  treated HepG2 cells compare to control cells. Conclusions: TNF- $\alpha$  is a pro-inflammatory cytokine, secreted by inflammatory cells. This mechanism may be involved in inflammation-associated carcinogenesis. TNF could act both as tumor promoter, and cancer killer. Presented findings suggest that caspases-dependent cell death occurs in TNF- $\alpha$  applied HepG2 cells.

**Keywords:** HepG2, Cancer, Caspases, TNF- $\alpha$

\*\*\*

### TNF- $\alpha$ Uygulanan HepG2 Hepatoselüler Karsinoma Hücrelerinde Kaspaz Aktiviteleri

#### ÖZ

Amaç: Tümör nekroz faktörü (TNF), hücre sağkalımı, proliferasyon, farklılaşma, inflamasyon, bağışıklık ve apoptoz gibi hücrel olaylarda anahtar rol oynar. Tümör sitotoksitesindeki etkisinden dolayı Tümör nekroz faktörü olarak adlandırılmasına rağmen, TNF geniş bir yelpazede birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Çalışmada, hepatoselüler karsinoma hücrelerinde TNF- $\alpha$ 'nın kaspaz 1, 3 ve 9 enzim aktiviteleri üzerindeki etkilerini belirlemek amaçlanmıştır. Materyal ve metod: Çalışmada TNF- $\alpha$  uygulanmayan (kontrol) ve 24 saat boyunca TNF- $\alpha$  uygulanan hepatoselüler karsinoma hücre hattı HepG2 hücreleri kullanılmıştır. TNF- $\alpha$ 'nın kaspaz 1, kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri kolorimetrik olarak ticari kit ile gerçekleştirilmiştir. Bulgular: TNF- $\alpha$  uygulanan HepG2 hücrelerinde kaspaz 1 ve kaspaz 3 enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre anlamlı artış gözlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Sonuç: TNF- $\alpha$  inflamatuvar hücreler tarafından salınan pro-inflamatuvar bir sitokindir. Bu mekanizma, yangıya bağlı şekillenen karsinogenezde rol oynayabilir. TNF, hem tümör oluşumunu destekleyebilir hem de kanser hücrelerini öldürücü etki gösterebilir. Sunulan bulgular, TNF- $\alpha$  uygulanan HepG2 hücrelerinde kaspaz bağımlı hücre ölümünün meydana geldiğini ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** HepG2, Kanser, Kaspaz, TNF- $\alpha$

To cite this article: Balkan B.M, Meral Ö, Kısmalı G, Turan D, Sel T. Caspases Activities in TNF- $\alpha$  Applied HepG2 Hepatocellular Carcinoma Cell. Kocatepe Vet J. (2020) 13(1):86-91.

Submission: 04.11.2019

Accepted: 21.02.2020

Published Online: 29.02.2020

**ORCID ID;** BMB: 0000-0002-0206-6455, ÖM: 0000-0001-8813-4991, GK: 0000-0003-3414-4697,

TS: 0000-0002-9753-779X, DT: 0000-0003-3248-1032

\*Corresponding author e-mail: burcualpaslan@yahoo.com

## GİRİŞ

Kanserde tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde oluşum mekanizmalarının aydınlatılması önem taşımaktadır. İnflamasyon süreci kanser oluşumunda önemli rol oynar. Kanser oluşumu ve inflamasyon süreci arasındaki ilişkinin gösterilmesinin ardından (Mantovani ve ark. 2008, Mauer ve ark. 2015) bu konu ile ilgili çalışmalar artmıştır. İmmün sistem dokularda meydana gelen hasara karşı inflamasyon yanıtının oluşmasını sağlar. Tümör oluşum sürecinde immün yanıt ile tümör baskılanabilir, ya da bazı durumlarda inflamasyon tümör gelişiminde artış da meydana getirebilmektedir (Mantovani ve Pierotti 2008). İnflamasyona bağlı gelişen kanser sürecinde tümör nekroz faktör-alfa gibi moleküller bulunmaktadır (Dranoff 2004). 157 amino asitten oluşan Tümör Nekroz Faktörü (TNF, TNF- $\alpha$  olarak da anılır), memeli canlılarda bağışıklık ve hücreyel homeostazda merkezi rolleri olan en yoğun incelenen pro-enflamatuar sitokinlerden biridir (Silke ve Hartland 2013) ve hücre sağ kalımı, proliferasyon, farklılaşma, inflamasyon, bağışıklık ve apoptoz gibi birçok hücreyel olaylarda anahtar rol oynar (Aggarwal 2003, Brenner ve ark. 2015). Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar, kronik inflamasyonun tümör gelişimini ve ilerlemesini arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. Pro-enflamatuar sitokin olan TNF, inflamasyon ve karsinogenez arasında bir köprü kuran endojen bir tümör promotörü olarak hareket edebilir. Gerçekten de, çalışma sonuçları TNF'nin aşağıda özetlendiği gibi karsinogenezde hücreyel dönüşüm, hayatta kalma, proliferasyon, anjiyogenez ve metastaz gibi süreçlerde rol aldığını göstermiştir. TNF- $\alpha$ 'nın kanser hücresi ölümünü indüklemekteki özelliği, bunun potansiyel bir kanser terapötik olmasını sağlar (Wang ve Lin 2008).

Apoptotik süreçte önemli rol oynayan kaspazlar, sistein-proteaz grubu enzimlerdendir. İnaktif proteinler olarak sentezlenirler. Çeşitli yollarla aktive edilirler ve substratlarını bir aspartat kalıntısının karboksil ucundan ayırırlar. Kaspazların aktivasyonu hücre ölümünde birçok hücreyel ve morfolojik değişimlerin meydana gelmesine neden olur (Nicholson 1999). Kaspazlar farklı moleküler özelliklere sahiptirler ve buna göre farklı gruplarda sınıflandırılır. Apoptozdaki (kaspaz-3, -6,-7, -8 ve -9 memelilerde), ve yangıdaki (kaspaz-1, -4, -5, -12 insanlarda ve kaspaz -1, -11 ve -12 farelerde) rollerine göre iki ana sınıfa ayrılırlar. Apoptoz mekanizmasındaki rollerine göre ise başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8 ve -9) ya da sonlandırıcı kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7) olarak iki sınıfa ayrılırlar (McIlwain ve ark. 2013). Kaspazlar apoptoz için çok önemli olduğundan, hatalı kaspaz aktivasyonu ve sonuçta ortaya çıkan yetersiz hücre ölümü, tümör oluşumunu hızlandırabilir, mutasyona uğramış hücrelerin kalıcılığına yardımcı olabilir ve tümör oluşumunu destekleyebilir (McIlwain ve ark. 2013).

TNF- $\alpha$ 'nın kanser hücreleri üzerinde farklı etkiler yapabileceği çalışmalarda bildirilmiştir. Ancak TNF- $\alpha$ 'nın HepG2 hücre hatlarında kaspaz aktiviteleri üzerine etkilerinin incelendiği çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, TNF- $\alpha$  ilavesinin hepatocelüler karsinoma hücrelerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla, hücre ölümünde önemli rol oynayan ve çeşitli yollarla aktive edildiklerinde hücre ölümünde birçok hücreyel ve morfolojik değişimlerin meydana gelmesinde rol oynayan kaspaz enzim aktivitelerindeki değişim ölçülmesi amaçlanmıştır. Bu hücrelerde TNF- $\alpha$ 'nın yangısal ve hücre ölümü süresinde etkilerini gösterebilmek amacıyla, yangı ilişkili kaspazlardan kaspaz-1, başlatıcı kaspazlardan özellikle mitokondriyal yolda aktivitesi artan kaspaz-9 ve hücre ölümünün geri dönüşümsüz basamağını gösteren ve sonlandırıcı kaspazlardan olan kaspaz-3 aktivitelerinin ölçülmesi hedeflenmiştir.

## MATERYAL ve METOT

HepG2 hepatocelüler karsinoma hücre hattı (American Type Culture Collection, ATCC Cat No. HB- 8065) hücreleri çalışma materyali olarak kullanılmıştır. Hücreler 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub> varlığında hücre kültürü inkübatöründe üretilmiştir. Kontrol grubu ve çalışma grubu olarak iki grup oluşturulmuştur. Kontrol grubu hücrelere % 10 Fetal Dana Serum (FBS), 300 mg/l L-glutamin, 50 mg/l Gentamisin sülfat içeren RPMI 1640 Medium (Sigma-Aldrich) besi yeri eklenmiştir. Çalışma grubuna ise kontrol grubuna uygulanan aynı içerikli besi yeri içine 1µg/ml TNF- $\alpha$  ilave edilmiştir.

Kullanılan TNF- $\alpha$  dozu MTT hücre canlılık testi ile belirlenmiştir. MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) hücre canlılık testi 96 kuyucuklu mikropalakalarda gerçekleştirildi. Hücreler 96 kuyucuklu mikropalakanın her kuyucuğunda 100.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Bu hücreler 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde çoğaltıldı. Hücreler 24 saat süresince farklı dozlarda TNF- $\alpha$  uygulandı. Uygulama sonrasında her bir kuyucuğa MTT eklendi ve 4 saat 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvide inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda bütün kuyucuklara % 10'luk SDS çözeltisi eklendi ve 12 saat inkübe edildi. Hücrelerin canlılık ölçümü spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda yapıldı. MTT hücre canlılık testi sonucu inkübasyon süresi 24 saat ve uygulanacak TNF- $\alpha$  dozu 1 mikrogram/ml olarak belirlenmiş ve analizler bu şartlarda gerçekleştirilmiştir.

TNF- $\alpha$  içeren (çalışma grubu) ve TNF- $\alpha$  içermeyen (kontrol grubu) besi yeri hücrelere ilave edilerek, 24 saat beklendikten sonra her iki grupta da kaspaz 1 (cat no:K111), kaspaz 3 (cat no: K106) ve kaspaz 9 (cat no:K119) enzim aktiviteleri "BioVision kaspaz colorimetric assay" kitleri ile ölçülmüştür. Her bir

analiz için üç ayrı tekrar yapılarak ortalama değerler alınmıştır.

Çalışma grubu ve kontrol grubunda ölçülen kaspaz 1, kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktiviteleri arasındaki farklılığın belirlenmesi için, istatistiksel analizlerde Mann-Whitney U testi kullanılmış ve  $p < 0,05$  düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Kontrol grubunda ölçülen enzim aktiviteleri ve çalışma grubunda ölçülen enzim aktiviteleri kontrol grubuna göre % değişim olarak hesaplanmıştır (Tablo 1). TNF- $\alpha$  uygulanan çalışma grubu HepG2 hücrelerinde kaspaz 1 enzim aktivitesi kontrol grubuna göre yaklaşık olarak 2 kat artmıştır. Kontrol grubu kaspaz 3 enzim aktivitesi %100 olarak alındığında çalışma grubunda kaspaz 3 enzim aktivitesi kontrol grubuna göre %174 olarak tespit edilmiştir. Çalışma grubunda kaspaz 1 ve 3 enzim aktivitelerindeki bu artışlar TNF- $\alpha$  uygulanmayan kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı bulunurken ( $p < 0,05$ ) (Şekil 1 ve 2), kaspaz 9 aktivasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir (Şekil 3).

Yapılan çalışmaların çoğu TNF- $\alpha$  'nın tümör oluşumunu desteklediğini göstermesine rağmen, TNF- $\alpha$  bazı deney sistemlerinde anti-onkojenik etki gösterdiği de bildirilmiştir (Lin ve Karin 2007). Bizim çalışmamızda da kontrol grubuna kıyasla çalışma grubunda kaspaz 3 enzim aktivitesinde ölçülen anlamlı artış, TNF- $\alpha$ 'nın HepG2 hücre hatlarında hücre ölümünü arttırdığını göstermesi Lin ve Karin (2007)'in bildirdiği çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Farklı kanser hastalarında serum TNF- $\alpha$  konsantrasyonu artmış ve meme ve prostat kanseri hastalarında kemoterapi sırasında belirgin şekilde azalmıştır (Ahmed ve ark. 2001, Ferrajoli ve ark. 2002). TNF- $\alpha$  ekspresyonu ayrıca çeşitli pre-neoplastik ve tümör dokularında daha yüksek seviyelerde eksprese edilmiştir. Bu artış kronik lenfositik lösemi, Barrett'in adenokarsinomu, prostat kanseri, meme kanseri ve servikal karsinom gibi malign hastalıkların ilerlemesi ile ilişkili bulunmuştur (Ahmed ve ark. 2001, Ferrajoli ve ark. 2002). Bu hastalarda mevcut durumda TNF- $\alpha$  düzeylerinde ya da ekspresyonlarındaki değişimler incelenmiş, ancak HepG2 hücre hatlarında TNF- $\alpha$  ilavesinin hücre canlılığı üzerine etkileri incelenmemiştir. TNF- $\alpha$  uygulamasının yapıldığı Wang ve ark. (2005)'nin yaptıkları çalışmada TNF- $\alpha$  uygulamasının kornea epitel hücre hatlarına hücre sağ kalımını desteklediğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak hücre sağ kalımını arttırması farklı hücre hattında uygulanmasına bağlı olabilir (Wang ve ark. 2005).

McIlwain ve ark. (2016), kaspazların kesilmesinin, yangısal sürecin ilk 2 günü boyunca önemli ölçüde arttığını ve sonrasında hücre sağ kalımını sağlayan proteinlerin ekspresyonunu arttırdığını bildirmiştir (McIlwain ve ark. 2016). Çalışmamızda da kaspaz 1 ve 3 enzim aktivitelerinin ikisinde meydana gelen artış, TNF- $\alpha$  uygulamasının HepG2 hücrelerinde yangısal süreçle birlikte hücre ölümüne neden olmasından dolayı olabilir.

Tümör nekroz faktör- $\alpha$ 'nın (TNF- $\alpha$ ) fare osteoblast MC3T3-E1 hücrelerinde apoptoz ve otofajideki rolünün araştırıldığı çalışmada, TNF- $\alpha$ , osteoblastlarda hem otofaji hem de apoptozu indüklediği bildirilmiştir. TNF- $\alpha$ 'nın osteoblastlarda bölünmüş kaspaz-3 ekspresyonunun arttırarak hücre apoptozunu indüklediğini ortaya koymuşlardır (Zheng ve ark. 2017). Bu çalışma sonuçları da kaspaz-3 aktivitesinin artması bakımından çalışmamızla benzerlik göstermiştir.

Çalışmamızda TNF- $\alpha$ 'nın HepG2 hücre hatlarında hücre ölümünü arttırması, TNF- $\alpha$ 'nın kanser tedavisinde kullanım potansiyelini göstermektedir. Josephs ve ark. (2018), yayınladıkları derlemede TNF- $\alpha$ 'nın immünolojik olarak temel bir molekül olduğunu, kanser immunoterapisinde kullanılabileceğini, ancak bunun solubl reseptörlerin uzaklaştırılması ve endojen TNF- $\alpha$  aktivitesinin arttırılması ile mümkün olabileceğini bildirmişlerdir.

TNF- $\alpha$ 'nın kronik inflamasyondaki bildirilen rolüne rağmen, TNF - / - fareleri, yabani tip farelere kıyasla 3'-metilkolantren (MCA) ile indüklenen deri sarkomasına karşı daha duyarlı olduğu ve bu da, TNF- $\alpha$ 'nın konakçısı MCA-indüklenen sarkom oluşumuna karşı koruduğunu düşündürmektedir (Swann ve ark. 2008). Ksenografli glioma fare modelinde TNF'nin benzer etkisi gözlenmiştir (Villeneuve ve ark. 2005, Nakagawa ve ark. 2007) TNF'nin antitümör rolü, tümör oluşumunu engelleyen, örneğin sitotoksik T lenfosit (CTL) veya tümör infiltrate edici makrofajlar ile tümör stroma yıkımını teşvik eden ve tümör infiltrate edici dendritik hücreleri (DC'ler) aktive eden, böylece tümöre yol açan güçlü adaptif bir bağışıklık yanıtını tetikleyen immün cevapla ilişkili olabilir (Dace ve ark.2007, Nakagawa ve ark. 2007, Zhang ve ark. 2008).

TNFR-1, -2 veya her ikisi de negatif olan gen knock out farelerde, konakçı doğal bağışıklık hücrelerinde eksprese edilen TNFR-2'nin TNF- $\alpha$ 'nın antitümör etkisine aracılık etmesi yeterli bulunmuştur.

TNF- $\alpha$ 'nın pro- veya anti-tümörögenез rollerindeki farklılıklar organlardaki, hücre bağlamında ve karsinojenlerdeki farklılıklara bağlanabilir. Örneğin, TNF- $\alpha$  ile indüklenen NF- $\kappa$ B aktivitesi farklı rejenerasyon hızlarına sahip organlarda (yani, yavaş rejeneratif kolonda pro-tumoriyenik iken hızlı

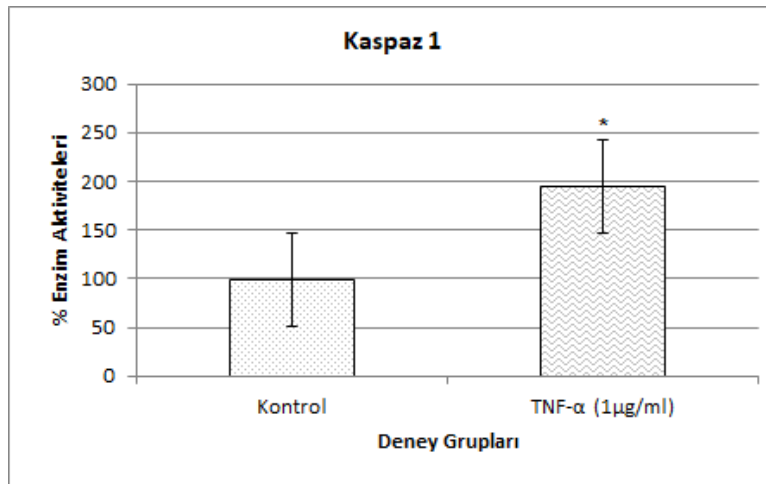
rejeneratif karaciğerde anti-tümörjenik) çelişkili etkilere sahiptir (Karin ve ark. 2006). Sunulan çalışmada kullanılan HepG2 hücre hattında hücre ölümünü arttırıcı etki göstermesinin nedeni bu hücrelerde rejenerasyon hızının fazla olması olabilir.

Kaspazlar apoptotik hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok hücrel ve morfolojik değişimlere yol açan enzimlerdir. TNF- $\alpha$  ve Fas Ligand de novo RNA veya protein sentezi olmadan bir proteolitik sinyalleme kaskadıyla hücre ölümünü tetikleyebilir (Boldin ve ark. 1996, Cleveland ve Ihle 1995). Bu sebeple, yapılan çalışmada TNF- $\alpha$  ilave edilen çalışma grubunda özellikle bir hücrenin apoptotik ölüm sürecinde olduğunu gösteren, sonlandırıcı kaspazlardan olan kaspaz 3'ün aktivitesinin kontrole göre artışı, TNF- $\alpha$  ilavesinin bu hücrelerde apoptotik hücre ölümünü tetiklediğini düşündürülebilir.

TNF-a / FasL ile indüklenen apoptozdaki anahtar oyuncular, kaspaz 1 olarak adlandırılan interlökin-1b

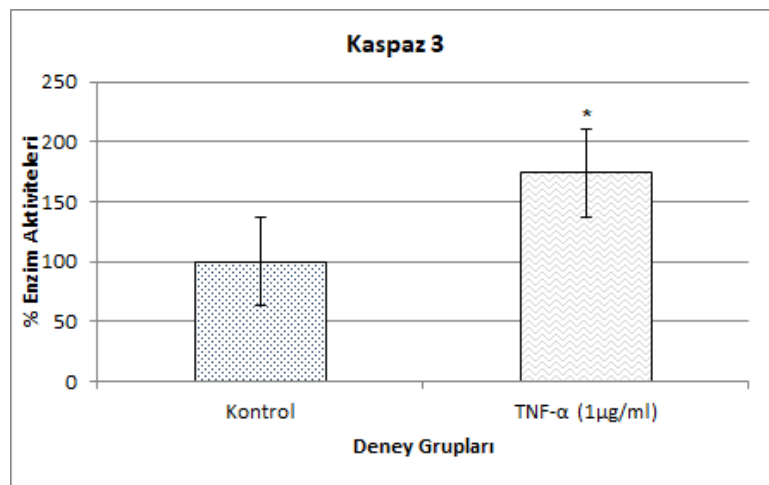
dönüştürücü enzim (ICE) ailesinin üyeleridir (Alnemri ve ark. 1996). Memeli ICE proteaz ailesinin en az 10 üyesi vardır ve bunlar Caenorhabditis elegans programlanmış hücre ölüm geni ced-3'ün homologlarıdır (Yuan ve ark. 1993). Bu farklı ICE ailesi üyelerinin farklı apoptoz yollarında işlev görebilmeleri mümkündür.

Kaspaz 1, çeşitli yollardan kaynaklanan apoptozda rol oynar. Kaspaz 1 gen ekspresyonu (Miura ve ark. 1993) veya sitokin indüksiyonu (Chin ve ark. 1997) ile hücrelerde yüksek ICE ekspresyonu hücre ölümüne yol açabilir. STAT Sinyal yolunun sktivasyonu kaspaz 1 ekspresyonuna ve apoptozu neden olabilir (Chin ve ark. 1997). Chin ve ark. (1997) A549 hücre hatlarında ve Alvarez ve ark. (2013) insan nöroblastom hücre hattında yaptıkları çalışmalar ile benzer olarak, HepG2 hücre hatlarında yapılan sunulan çalışmamızda da TNF- $\alpha$  ilavesi kaspaz 1 enzim aktivitesinde artış meydana getirmiştir.



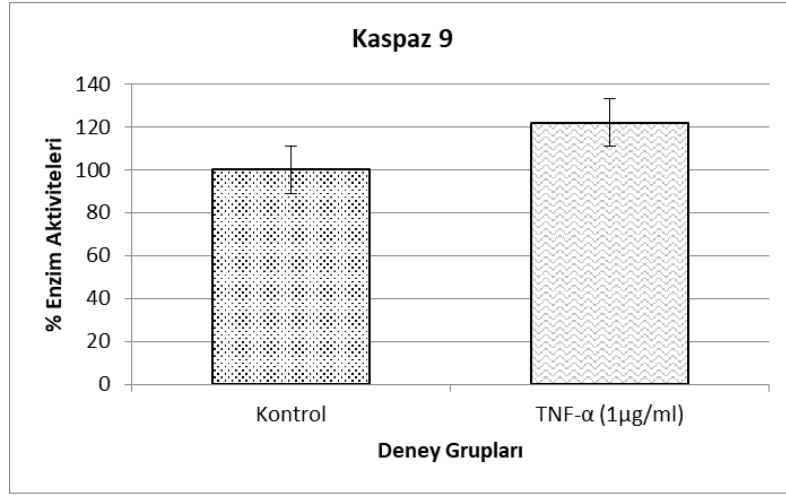
**Şekil 1.** 1 $\mu$ g/ml TNF- $\alpha$  uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrole göre kaspaz 1 değişimi

**Figure 1.** Changes in caspase 1 compared to control in 1 $\mu$ g/ml TNF- $\alpha$  treated HepG2 cells



**Şekil 2.** 1 $\mu$ g/ml TNF- $\alpha$  uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrole göre kaspaz 3 değişimi

**Figure 2.** Changes in caspase 3 compared to control in 1 $\mu$ g/ml TNF- $\alpha$  treated HepG2 cells



**Şekil 3.** 1µg/ml TNF-α uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrole göre kaspaz 9 değişimi

**Figure 3.** Changes in caspase 9 compared to control in 1µg/ml TNF-α treated HepG2 cells

**Tablo 1.** 1µg/ml TNF-α uygulanan HepG2 hücrelerinde kaspaz 1, kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktivitelerinin kontrole göre değişimleri

**Table 1.** Changes in caspase 1, 3, and 9 enzyme activities in 1µg/ml TNF-α applied HepG2 cells compare to control cells

Kaspaz	Kontrol grubu	Çalışma grubu	
Kaspaz 1	% 100	% 197	p<0,05
Kaspaz 3	% 100	% 174	p<0,05
Kaspaz 9	% 100	% 122	

## SONUÇ

Çalışmada elde edilen veriler TNF-α ilavesinin HepG2 hücrelerine ölüme neden olabildiğini gösteren veriler sunmaktadır. Kaspaz aile üyeleri, hücre ölümü ve inflamasyonu kontrol eden kritik düzenleyici ağların merkezindedir. Kaspazlarla ilişkili uzun hastalık listesi, kaspazların uygunsuz aktivasyonunun ve kontrol ettikleri hücre ölümünün ve inflamatuvar yolların düzensizliğinin insan sağlığı için doğrudan sonuçlara sahip olduğunu gösterir. Kaspaz 3 enzim aktivitelerindeki artış, TNF-α uygulanan HepG2 hücrelerinde meydana gelen hücre ölümünün kaspaz bağımlı ve kaspaz 1 enzim aktivitesindeki artış ise yangısal süreçle ilgili olabileceğini göstermektedir. Kaspaz 9 enzim aktivitesinde meydana gelen istatistik olarak anlamlı olmayan artış ise, apoptotik süreçte kaspaz aktivasyonunun bir kaskad şeklinde farklı sürelerde artabileceğinden dolayı olabilir.

Ayrıca bu sonuçlar TNF-α'nın HepG2 hücreleri üzerinde hücre ölümü üzerine etkilerinin araştırılması ya da tedavide kullanılabilirliğinin belirlenmesi için planlanacak diğer çalışmalara ışık tutacaktır.

## TEŞEKKÜR

*Bu çalışma 1.Uluslararası Veteriner Biyokimyası ve Klinik Biyokimya Kongresi'nde sunuldu. Hatay, Türkiye, Nisan 2018.*

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Aggarwal BB.** Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(9): 745-56.
- Ahmed MI, Salahy EE, Fayed ST, El-Hefnawy NG, Khalifa A.** Human papillomavirus infection among Egyptian females with cervical carcinoma: relationship to spontaneous apoptosis and TNF alpha. *Clin Biochem.* 2001; 34(6): 491-8.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J.** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 1996; 87(2): 171.
- Álvarez S, Muñoz-Fernández MÁ.** TNF- $\alpha$  may mediate inflammasome activation in the absence of bacterial infection in more than one way. *PLoS One.* 2013; 8(8):e71477.

- Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D.** Involvement of MACH1, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. 1996; 85(6): 803-15.
- Brenner D, Blaser H, Mak T.** Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15(6): 362-374.
- Chin YE, Kitagawa M, Kuida K, Flavell RA, Fu XY.** Activation of the STAT Signaling Pathway Can Cause Expression of Caspase 1 and Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*. 1997; 17(9): 5328-5337.
- Cleveland JL, Ihle JN.** Contenders in FasL/TNF death signaling. *Cell*. 1995; 81(4):479-82.
- Dace DS, Chen PW, Niederkorn JY.** CD8+ T cells circumvent immune privilege in the eye and mediate intraocular tumor rejection by a TNF-alpha-dependent mechanism. *J Immunol*. 2007; 178(10): 6115-22.
- Dranoff G.** Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(1): 11-22.
- Ferrajoli A, Keating MJ, Manshoury T, Giles FJ, Dey A, Estrov Z et al.** The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002; 100(4): 1215-9.
- Josephs SF, Ichim TE, Prince SM, Kesari S, Marincola FM, Escobedo AR, Jafri A.** Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic. *J Transl Med*. 2018; 16(1): 242.
- Karin M, Lawrence T, Nizet V.** Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell*. 2006; 124(4): 823-35.
- Lin WW, Karin M.** A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 2007; 117(5): 1175-83.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F.** Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008; 454(7203): 436-44.
- Mantovani A, Pierotti MA.** Cancer and inflammation: a complex relationship. *Cancer Lett*. 2008; 267(2): 180-1.
- Mauer J, Denson JL, Bruning JC.** Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends Immunol*, 2015; 36(2): 92-101.
- McIlwain DR, Berger T, Mak TW.** Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013, 5(4): a008656.
- McIlwain DW, Zoetemelk M, Myers JD, Edwards MT, Snider BM, Jerde TJ.** Coordinated induction of cell survival signaling in the inflamed microenvironment of the prostate. *Prostate*. 2016; 76(8): 722-734.
- Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig EA, Yuan J.** Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell*. 1993; 75: 653-660.
- Nakagawa J, Saio M, Tamakawa N, Suwa T, Frey AB, Nonaka K et al.** TNF expressed by tumor-associated macrophages, but not microglia, can eliminate glioma. *Int J Oncol*. 2007; 30(4): 803-11.
- Nakagawa J1, Saio M, Tamakawa N, Suwa T, Frey AB, Nonaka K, Umemura N, Imai H, Ouyang GF, Ohe N, Yano H, Yoshimura S, Iwama T, Takami T.** TNF expressed by tumor-associated macrophages, but not microglia, can eliminate glioma. *Int J Oncol*. 2007; 30(4): 803-11.
- Nicholson DW.** Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*. 1999; 6(11): 1028-42.
- Silke J, Hartland EL.** Masters, marionettes and modulators: intersection of pathogen virulence factors and mammalian death receptor signaling. *Curr Opin Immunol*. 2013; 25(4): 436-40.
- Swann JB, Vesely MD, Silva A, Sharkey J, Akira S, Schreiber RD, Smyth MJ.** Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci*. 2008; 105(2): 652-6.
- Villeneuve J, Tremblay P, Vallieres L.** Tumor necrosis factor reduces brain tumor growth by enhancing macrophage recruitment and microcyst formation. *Cancer Res*. 2005; 65(9): 3928-36.
- Wang L, Reinach P, Lu L.** TNF-alpha promotes cell survival through stimulation of K+ channel and NFkappaB activity in corneal epithelial cells. *Exp Cell Res*. 2005; 311(1):39-48.
- Wang X, Lin Y.** Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol Sin*. 2008; 29(11): 1275-1288.
- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The C. elegans cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*. 1993; 75(4): 641-52.**
- Zhang B, Karrison T, Rowley DA, Schreiber H.** IFN-gamma- and TNF-dependent bystander eradication of antigen-loss variants in established mouse cancers. *J Clin Invest*. 2008; 118(4): 1398-404.
- Zheng L, Wang W, Ni J, Mao X, Song D, Liu T, Wei J, Zhou H.** Role of autophagy in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis of osteoblast cells. *J Investig Med*. 2017; 65(6): 1014-1020.