

# Papain HepG2 Hücrelerinde Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Genlerini Düzenleyerek Apoptozu İndükler

*Papain Induces Apoptosis by Regulating Caspase-3 and Caspase-9 Genes in HepG2 Cells*

<sup>1</sup>Meliha Koldemir Gündüz, <sup>1</sup>Fatih Kar, <sup>2</sup>Güllü Kaymak

<sup>1</sup>Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi,  
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi,  
Mühendislik Temel Bilimleri Bölümü,  
Kütahya, Türkiye

<sup>2</sup>Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi,  
Simav Sağlık Hizmetleri Meslek  
Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler  
Bölümü, Kütahya, Türkiye

## Özet

Hepatosellüler karsinom (HCC), kansere bağlı ölüm sıralamasında ikinci sırada yer alır ve dünya genelinde sıklığı artmaktadır. Papain proteolitik bir enzimdir ve potansiyel antikanser ajanıdır. Çalışmanın amacı, papainin insan hepatom HepG2 hücre hatındaki sitotoksik etkisinin apoptoz üzerinden değerlendirilmesidir. Papainin sitotoksitesi MTT yöntemi ile belirlendi. Papain uygulanan HepG2 hücrelerinin morfolojik değişiklikleri, akrinin portakalı ve etidyum bromür (AO/EB) ikili boyaması ile değerlendirildi. Apoptotik aktivite qPCR yöntemi ile apoptoz düzenleyici kaspaz-3 ve kaspaz-9 genlerinin anlatımları ile tespit edildi. HepG2 hücrelerine 48 saat boyunca 500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml ve 10 µg/ml papain uygulaması sonucunda IC50 değeri 53 µg/ml bulundu. Apoptotik belirteçler olan kaspaz 3 ve 9 gen ifadeleri, HepG2 hücrelerinde papain uygulaması sonucunda önemli ölçüde arttı. Sonuç olarak, papain HCC tedavisi için, apoptoz düzenleyici genlerin anlatımını indükleyerek antikanser etkiye sahip olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Papain; HepG2; Hepatosellüler karsinom; Sitotoksite; Apoptoz.

## Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) ranks second in cancer-related death and its incidence is increasing worldwide. Papain is a proteolytic enzyme and a potential anticancer agent. The aim of the study is to evaluate the cytotoxic effect of papain in human hepatoma HepG2 cell line through apoptosis. The cytotoxicity of papain was determined by the MTT method. Morphological changes of Papain-treated HepG2 cells were evaluated by acridine orange and ethidium bromide (AO/EB) dual staining. Apoptotic activity was determined by the expression of apoptosis regulator caspase-3 and caspase-9 genes by qPCR method. As a result of the administration of 500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml and 10 µg/ml papain to HepG2 cells for 48 hours, the IC50 value was found to be 53 µg/ml. Caspase 3 and 9 gene expressions, which are apoptotic markers, were significantly increased as a result of papain administration in HepG2 cells. In conclusion, papain may have anticancer effect for HCC treatment by inducing expression of apoptosis regulatory genes.

**Keywords:** Papain; HepG2; Hepatocellular carcinoma; Cytotoxicity; Apoptosis.

## Correspondence:

Meliha KOLDEMİR GÜNDÜZ-  
Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi,  
Mühendislik ve Doğa Bilimleri  
Fakültesi, Mühendislik  
Temel Bilimleri Bölümü, Kütahya,  
Türkiye  
e-mail:  
meliha.koldemirgunduz@ksbu.edu.tr

Received 28.09.2022 Accepted 25.10.2022 Online published 27.10.2022

## 1. Giriş

Kanser, halk sağlığı ve ekonomide ciddi etkisi olan küresel bir sorundur. Hepatoselüler karsinom (HCC), karaciğerin ana hücre tipi olan hepatositlerden kaynaklanan malign bir tümördür. Dünyada en sık görülen primer karaciğer tümörü ve beşinci en yaygın tümördür (1). Moleküler düzeyde, HCC heterojen bir hastalıktır. Karaciğer karsinogenezi, sonunda malign transformasyona yol açan farklı genetik değişikliklerin ilerleyici birikimi yoluyla onlarca yıl sürebilir (1). Diğer kanser türlerinde olduğu gibi karaciğer kanserinin tedavisinde yan etkileri nedeniyle toksik olmayan, çok hedefli ve ilaç direnci olmayan tedavilere ihtiyaç vardır. Bu nedenle sınırlı toksik etkiye sahip doğal etken madde kullanımı önemlidir. Beslenme veya diyet faktörleri, oldukça etkili kemopreventif ajanlar olarak hareket etme yetenekleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir (2). Kanser tedavisinde doğal etken maddelerin diyetle olası kullanımları, tedavide yeni çözümlerin geliştirilmesine katkı sağlayabilir. HCC' nin çeşitli etkenlerini hedef alan birçok bitkisel bileşiğin HCC' ye karşı etkili olduğu kanıtlanmıştır (3, 4). Bitkisel ilaçların antikanser etkisi temel olarak immünomodulasyon, hücre döngüsünü durdurma ve kanser hücrelerinde apoptozu indüklemeye ile gerçekleşir (5).

Papain (EC 3.4.22.2), papaya (*Carica papaya* L.) lateksinden izole edilen bir endolitik bitki sistein proteaz enzimidir. Papain enzimi papain süper ailesine ait proteolitik bir enzimdir. Canlılarda birçok biyolojik süreçte önemli göreve sahiptir (6). Papain, tıpta yaygın kullanılan bir enzimdir ve proteinlere, kısa zincirli peptitlere, amino asit esterlerine ve amid bağlantılarına karşı kapsamlı proteolitik aktivite gösterir (7). Papain, sağlıklı dokularda proteolizi engeller ve sağlam dokular üzerinde zararlı etkisi olmayan kalıntı giderici ajan olarak görev yapar (8). Papain enzimi uzun zamandır yaralanma, travma ve alerjileri tedavi etmek için kullanılmaktadır (7). Kanser hücrelerinin çoğunda, onları koruyan ve uzun süre fark edilmeden çoğalmalarını sağlayan fibrin kaplamalar bulunur. Papain kanser hücrelerindeki bu fibrin yapıyı kırma

yeteneğine sahiptir. Papainin bu özelliği potansiyel bir kanser önleyici madde olduğunu gösterebilir (9). Papainin sitokinler ile iletişim kurduğu düşünülmektedir. Papain  $\alpha$ -2-makroglobulinlere kolayca bağlanabilir ve sitokinlere karşı daha yüksek afiniteye sahip  $\alpha$ -2-makroglobulin-proteinaz kompleksleri oluşturabilir. Papain ayrıca tümör gelişimi ve metastazında anahtar rol olan CD-44, CD-49, CD-54 ve CD-58 gibi adezyon molekülleri ile etkileşime girerek aktivitelerini azaltır ve tümör metastazını önleyebilir (10).

Apoptoz mekanizması üzerinde kaspaz-3 ve kaspaz-9 proteinleri önemli rol oynar. Kaspazlar, sistein proteazlar olarak da adlandırılırlar ve hücre sitoplazmasında lokalize olurlar. Kaspazların temel görevi DNA polimeraz enzim aktivitesini önleyerek hücrenin apoptoza gitmesini sağlamaktır (11). Hücrede meydana gelen patolojik durumlardaki sinyaller kaspazları aktif hale getirir (kaspaz-8, kaspaz-9). Aktif kaspazlar, apoptoz aktive edici faktör-1 (apaf-1) aktifleştirerek sitokrom c'nin serbest hale gelmesini sağlar. Daha sonra apaf-1, sitokrom c ve kaspaz-9 apoptozomu oluşturur. Apoptozom böylece kaspaz-3 aktifleştirir ve hücrenin apoptoza uğramasına neden olur (12). Bu çalışmada HepG2 hücrelerinde papainin olası sitotoksik ve apoptozu indüklemeye potansiyeli kaspaz-3 ve kaspaz-9 üzerinden araştırıldı.

## 2. Gereç ve Yöntemler

### *Hücre Kültürü*

İnsan hepatoselüler karaciğer kanseri (HepG2, ATCC® HB-8065™) hücre soyu, *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manassas, USA) temin edildi. HepG2 hücreleri EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*; ATCC, USA) + %10 Fetal Bovin Serum (FBS; ATCC, USA) ve penisilin / streptomisin (100 µg/ml; Gibco, US) içeren besi yerinde tutuldu. Hücreler, 37 ° C'de % 5'lik CO<sub>2</sub> etüvde kültürlendi.

### *Hücrelere Papain Uygulanması*

Ticari olarak temin edilen papain (Sigma) besi yeri içinde çözündürülerek mekanik olarak

hazırlandı. HepG2 kanser hücrelerine 500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml ve 10 µg/ml papain ilave edildi ve hücreler 48 saat inkübe edildi. Kontrol hücrelerine sadece kültür ortamı eklendi.

### **Sitotoksosite Analizi**

MTT [3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid] yöntemi ile hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik olarak tespit edildi. Flasklarda çoğaltılan hücreler uygulama yapılmadan 24 saat önce 96 kuyucuklu mikrolakalara 5000 hücre /200µl besi yeri olacak şekilde ekilerek inkübasyona bırakıldı. Hücrelere farklı dozlarda papain özütleri uygulandı. HCl/izopropanol yöntemi kullanılarak elde edilen boya yoğunluğu spektrofotometre ile 570 nm dalga boyundaki absorbansta ölçüldü ve canlı hücre oranı tespit edildi (13). Veriler, GraphPad Prism 7.0 programı (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, ABD) ile analiz edildi. IC<sub>50</sub> değerinin hesaplanması için, GraphPad Prism 7.0 programı kullanılarak doğrusal olmayan regresyon analizi ile veriler normalize edildi.

### **Hücre Canlılık Analizi**

Papain uygulaması sonucunda hücrelerin canlılık oranları, tedavi edilmemiş kontrol hücrelere kıyasla hesaplandı. Tedavi edilmemiş hücrelerin yaşamsallığı %100 kabul edilerek ve hücrelerin canlılık yüzdeleri aşağıdaki şekilde hesaplandı.

*% canlılık oranı: (Tedavi edilen hücre/ tedavi edilmemiş hücre)X100*

### **Akridin Oranj/ Etidyum Bromid Boyama**

Hepatosit hücrelerindeki apoptozun belirlenmesi için floresan mikroskopta görüntüleme sağlayan Akridin Oranj - Etidyum Bromid boyama tekniği kullanıldı. Akridin Oranj (AO) 100 µg/ml ve Etidyum Bromid (EB) 100 µg/ml fosfat tamponunda (PBS) hazırlandı. 6 kuyucuklu mikrolakalara 50000 hücre ekildi ve 24 saat inkübasyon yapıldı. 48 saat papain uygulanmasının ardından besi yeri uzaklaştırıldı ve HepG2 hücreleri üzerine 200 µl EB/AO ilave edildi.

Floresan mikroskop (Zeiss Axio Vert A.1) kullanılarak 480-505-535 nm'de analiz edildi.

### **RNA İzolasyonu ve Real-Time PCR Analizi**

HepG2 hücrelerinden total RNA, *RNeasy Protect Mini Kit* (Qiagen, Germany) kiti kullanılarak üretici firmanın yöntemine göre elde edildi. Total RNA örnekleri analiz yapılabildiye kadar -80°C saklandı. cDNA sentezi, *transcriptor HiFi cDNA synthesis* kit kullanılarak yapıldı (Roche). RT-qPCR reaksiyon karışımı (BlaSTaq 2X qPCR MasterMix (G890, Applied Biological Materials Inc) RT-qPCR çalışması için hazırlandı. Kaspaz-3 ve kaspaz-9 gen anlatımları qPCR kullanılarak ABI StepOnePlus (Applied Biosystems, Germany) cihazı ile analiz edildi. Analiz edilen her numune için en az üç kez ölçüm yapıldı. 40 ve üzerindeki Ct değerleri matematiksel hesaplamalara dahil edilmedi. Gen anlatım oranları, referans gen ( $\beta$ -aktin) ifadesi kullanılarak hesaplandı. Spesifik gen ürünlerinin varlığı,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  yöntem analizi ile doğrulandı. Primer dizileri: Kaspaz-3 (F) 5'-GCTCCTAGCGGATGGGTGCTA-3' ve (R) 5'-GATTTCAAGGCGACGCCAACCA-3'; Kaspaz-9 (F) 5'-AGCCACCTGAGTAGCTTGGA-3' ve (R) 5'-CTGCACTTTGGGAGGCTAAG-3';  $\beta$ -Aktin (F) 5'-AGCAAGAGAGGCATCCTCACC-3' ve (R) 5'-ACAGGGATAGCACAGCCTGGA-3'.

### **İstatistiksel Analizler**

Tüm deneysel veriler, ortalama  $\pm$  SD olarak sunuldu. İlk olarak, sonuçlar Shapiro-Wilk normallik testi yardımıyla normalize edildi. Normal olarak dağıtılan veriler, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirildi ve çoklu karşılaştırmalarda Tukey post-hoc testi ile analiz edildi. İstatistiksel analizlerde SPSS 21 ve GraphPad Prism 7 programları kullanıldı. p değerleri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3. Bulgular

#### *Papainin HepG2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi*

HepG2 hücrelerine papain uygulamadan önce hücreler 24 saat standart besi yeri içerisinde kültüre edildi. Hücre kültürü ortamına 500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml ve 10 µg/ml papain eklendi ve 48 saat boyunca inkübe edildi. Kontrol hücrelerine sadece kültür medyumunu eklendi. Papain uygulaması sonucunda hücelere MTT testi yapıldı. MTT testi ile elde edilen sonuçların GraphPad Prism 7.0 programı ile istatistiki analizi yapıldı. HepG2 hücrelerine 48 saat 500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml ve 10 µg/ml papain uygulaması sonrasındaki istatistiksel analize göre papainin 48. saatteki IC<sub>50</sub> değeri 53 µg/ml olarak hesaplandı. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, papainin hepatoselüler karsinom hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

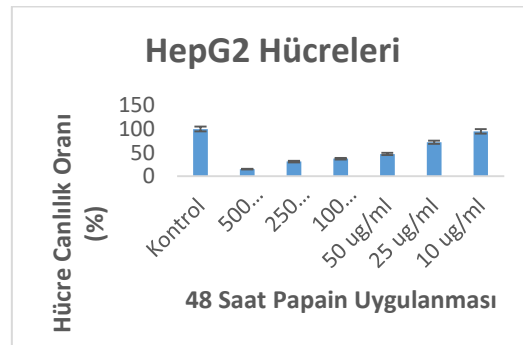
Hepatoselüler karsinoma hücrelerine 500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml ve 10 µg/ml papain uygulanması sonucu kontrol ile kıyaslandığında hücre canlılığı sırasıyla %15, %31, %37, %47, %72 ve %95 olarak tespit edildi. 500 µg/ml, 250 µg/ml ve 100 µg/ml papainin HepG2 hücreleri için öldürücü etkiye sahip olduğu tespit edildi. 50 µg/ml, 25 µg/ml ve 10 µg/ml papain uygulamasının HepG2 hücrelerinde çoğalmayı engelleyici etkiye sahip olduğu tespit edildi (**Şekil 1**).

MTT sonuçlarına göre üç farklı papain konsantrasyonu (26.5 µg/ml, 53 µg/ml, 267 µg/ml) belirlendi ve diğer deneysel prosedürlerde kullanıldı.

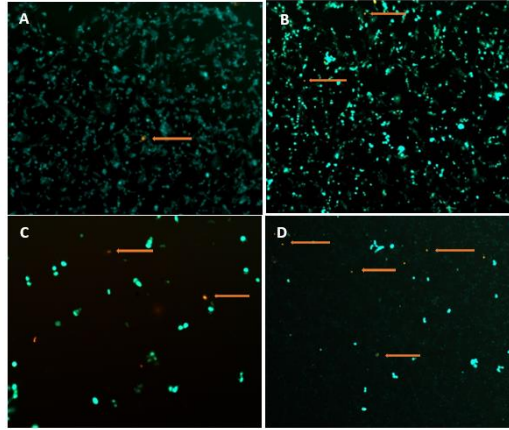
#### *Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi*

Papainin hepatoselüler karsinoma hücre hattında apoptoz üzerindeki etkilerini belirlemek için etidyum bromür/akridin portakal boyaması yapıldı. Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 gen ekspresyon seviyeleri qPCR analizi ile belirlendi. HepG2 hücrelerine 26.5 µg/ml, 53 µg/ml, 267 µg/ml papain uygulaması sonucunda apoptotik boyanmış hücrelerin miktarı, floresan mikroskop analizine göre doza bağlı olarak kontrol hücrelerine kıyasla arttığı tespit edilmiştir (**Şekil 2**).

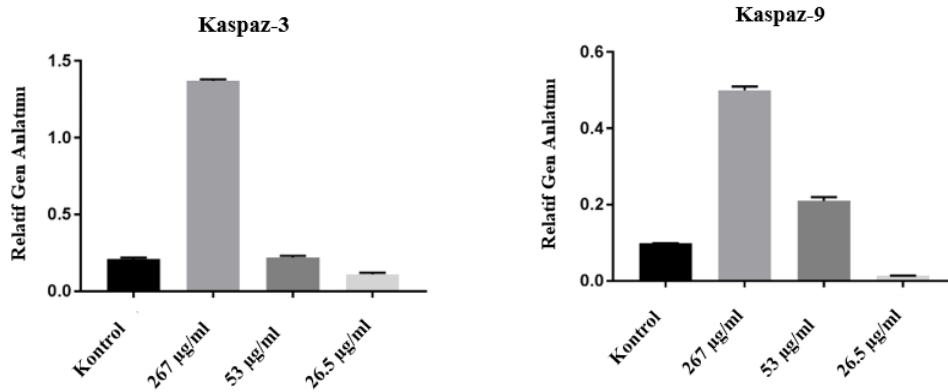
HepG2 hücrelerine hepatoselüler 26.5 µg/ml, 53 µg/ml, 267 µg/ml papain uygulaması sonrasında kaspaz-3 ve kaspaz-9 gen anlatım seviyeleri analiz edildi. 48 saat 26.5 µg/ml papain uygulanan HepG2 hücreleri ile kontrol HepG2 hücreleri karşılaştırıldığında kaspaz-3 ve kaspaz-9 gen anlatım seviyeleri sırasıyla 0.50 ve 0.14 kat azaldığı tespit edildi (p<0.05) (**Şekil 3**). 48 saat 53 µg/ml papain uygulanan hücreler ile kontrol hücreler karşılaştırıldığında kaspaz-3 ve kaspaz-9 gen anlatım seviyeleri sırasıyla 1.03 ve 2.30 kat arttığı tespit edildi (p<0.05) (**Şekil 3**). 48 saat 267 µg/ml papain uygulanan HepG2 hücreleri ile kontrol HepG2 hücreleri karşılaştırıldığında kaspaz-3 ve kaspaz-9 gen anlatım seviyeleri sırasıyla 6.59 ve 5.06 kat arttığı tespit edildi (p<0.05) (**Şekil 3**).



**Şekil 1.** Farklı konsantrasyonlardaki papainin HepG2 hücrelerindeki sitotoksik etkisi. Hücreler, 48 saat süreyle 500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml ve 10 µg/ml papain ile muamele edildikten sonra MTT testi yapıldı.



**Şekil 2.** Papainin apoptotik etkileri. Apoptotik hücre sayılarını belirlemek için HepG2 hücreleri üzerinde EB/AO boyaması yapıldı. Apoptotik hücreler (turuncu) sayıldı ve apoptotik hücrelerin yüzdesi hesaplandı (A. Kontrol hücreler, B. 26.5 µg/ml 48 saat papain uygulanan hücreler, C.53 µg/ml 48 saat papain uygulanan hücreler, D. 267 µg/ml 48 saat papain uygulanan hücreler).



**Şekil 3.** Papain ile tedavi edilen gruplar ve kontrol hücreleri üzerinde kaspaz-3 ve kaspaz-9 genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri. Gen ekspresyon seviyeleri, gerçek zamanlı PCR ile belirlendi ve  $\beta$ -aktin mRNA seviyelerine göre normalize edildi.  $p < 0.05$

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Kanser dünya genelinde en ölümcül hastalıklardan biridir. Radyoterapi, cerrahi ve kemoterapi kanserle mücadelede büyük katkı sağlasa da dünyanın bu en yıkıcı hastalığını durdurmak için yeterli değildir (14). Konvansiyonel kemoterapi, normal hücreler üzerinde seçici olmayan etkisi nedeniyle hasta için gönüllü işkence haline gelmiştir (9). Cerrahi müdahaleler günümüzde, HCC' li bireyin hayatta kalması için en etkili tedavi yöntemidir. Ancak cerrahi müdahale oldukça azdır ve HCC sonrası metastaz oranının çok yüksek olması tedaviyi etkilemektedir (15). HCC' si olan bireylerde

antikanser ilaçlarına karşı bir direnç geliştiği gözlemlenmektedir (16). Bu nedenle yan etkileri minimum ve etkili tedavisi maksimum olan yeni ajanlara ihtiyaç bulunmaktadır.

Xu ve ark., papain hidrolize sorgum kafirin hidrolizatlarının, HepG2 hücrelerindeki antioksidan ve antikanser etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, 50 ve 200 µg/mL papain hidrolize sorgum kafirin uygulamasının HepG2 hücre büyümesini etkili bir şekilde azaltarak antikanser potansiyeli olduğunu göstermişlerdir (17). Akila ve ark. HepG2 hücreleri üzerinde

papainin sitotoksitesini araştırdıkları çalışmada, 125 µg/ml papain uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisini %49.20, 1000 µg/ml papain uygulamasında inhibisyon konsantrasyonunun %85 olduğunu bu dozun HepG2'ye karşı maksimum (%85) sitotoksitate etkisine sahip olduğunu rapor etmişlerdir (18). Bu çalışmada HepG2 hücrelerine farklı dozlarda papain (500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml ve 10 µg/ml) uygulanması sonucunda yapılan istatistiksel analize göre 48. saatteki IC<sub>50</sub> değeri 53 µg/ml hesaplandı.

Papainin HepG2 hücrelerindeki tedavi edici etkisini apoptoz üzerinden değerlendirmek için apoptozu regüle eden kaspaz-3 ve kaspaz-9 genlerinin anlatımına bakıldı. Ayrıca apoptotik değerlendirme için EB/AO boyama yapıldı. Li ve ark. papain altın nanopartikül kaplı 5-FU'nun akciğer kanserine karşı etkilerini araştırdığı çalışmada, 5-FU'nun antikanser etkisini arttırdığı tespit edilmiştir (9). Al-Fatlawi ve ark. HCC'yi tedavi etmek amacıyla bitkisel ekstraktların HepG2 hücreleri üzerindeki apoptotik etkiyi

araştırdıkları çalışmada bitkisel madde uygulaması sonucunda kaspaz-3 ve kaspaz-9 genlerinin anlatımlarının arttığını tespit etmişlerdir (2). Mansour ve ark. HepG2 hücrelerine verdikleri bitkisel ilaçlar ile standart tedavide kullanılan ilaçların sinerjik etkisini araştırdıkları çalışmalarında kaspaz aktivitesinin arttığını ve kanser tedavisinde etkili olduğunu göstermişlerdir (19). Bu çalışmada HepG2 hücrelerin uygulanan papainin IC<sub>50</sub> dozunun kaspaz 3 ve 9 genlerinin anlatımını arttırdığını rapor ettik. Bu sonuçlar papainin hepatoselüler karsinoma için tedavi edici olduğunu gösterebilir.

Bu çalışma, papainin HepG2 hücrelerine karşı antikanser aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Papain hepatoselüler karsinoma tedavisinde terapötik potansiyel oluşturabilir. Bu gözlem, kanser tedavisinde bitkisel ilaç kullanımında yeni bir boyut kazandırabilir. Bununla birlikte, papainin metabolizma üzerindeki etkilerini belirlemek için daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

### KAYNAKLAR

1. Ahmed DE, Rashidi FB, Abdelhakim HK, ve ark. An in vitro cytotoxicity of glufosfamide in HepG2 cells relative to its nonconjugated counterpart. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. 2021;33:1-15.
2. Al-Fatlawi AA, Al-Fatlawi AA, Irshad M, ve ark. Rice bran phytic acid induced apoptosis through regulation of Bcl-2/Bax and p53 genes in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014;15:3731-6.
3. Ezhilarasan D. Herbal therapy for cancer. In: Timiri Shanmugam P, ed. *Understanding Cancer Therapies*. Boca Raton: CRC Press; 2018:129-66.
4. Li Y, Martin RC 2nd. Herbal medicine and hepatocellular carcinoma: applications and challenges. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011;2011:541209.
5. Thakur RS, Devaraj E. Lagerstroemia speciosa (L.) Pers. triggers oxidative stress mediated apoptosis via intrinsic mitochondrial pathway in HepG2 cells. *Environmental Toxicology*. 2020;35:1225-33.
6. Tsuge HT, Nishimura Y, Tada T, ve ark. Inhibition mechanism of cathepsin L-specific inhibitors based on the crystal structure of papain-CLIK148 complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1999;266:411-6.
7. Mamboya EAF. Papain, a plant enzyme of biological importance: a review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 2012;8:99-104.
8. Flindt ML. Allergy to alpha-amylase and papain. *Lancet*. 1979;1:1407-8.
9. Li T, Yan G, Bai Y, ve ark. Papain bioinspired gold nanoparticles augmented the anticancer potency of 5-FU against lung cancer. *Journal of Experimental Nanoscience*. 2020;15:109-28.
10. Gebauer F, Micheel B, Stauder G, ve ark. Proteolytic enzymes modulate the adhesion molecule CD44 on malignant cells in vitro. *Int J Immunother*. 1997;13:111-9.
11. Aslan, A. Ratlarda azoksimetan uygulanarak oluşturulan kolorektal kanserde likopenin siklooksijenaz-2 (cox-2), kaspaz-3, kaspaz-9, bax, bcl-2, p53 proteinlerinin ekspresyonu ve DNA hasarı üzerine etkisi/The effect of lycopene on the cyclooxygenase (cox-2), caspase-3, caspase-9, bax, bcl-2, p53 protein expression and DNA damage in rats with azoxymethane-induced colorectal cancer. Doktora tezi, 2011.
12. Abedin MJ, Wang D, McDonnell MA, ve ark. Autophagy Delays Apoptotic Death in Breast Cancer Cells Following DNA Damage, *Cell Death and Differentiation*, 2007;14:500-10.

13. Yerlikaya A, Erin N. Differential sensitivity of breast cancer and melanoma cells to proteasome inhibitor Velcade. *International Journal of Molecular Medicine*. 2008;22:817–23.
14. Famta P, Mishra V, Khatik GL. Formulation and evaluation of 5-fluorouracil and methotrexate gold nanoparticles [doctoral dissertation]. Phagwara (India): Lovely Professional University; 2017.
15. Öner Ç, İsan H, Gülhan Aktaş R, ve ark. The Effect of Vitamin D on Hepatocellular Carcinoma. *Osmangazi Journal of Medicine*. 2020;301-10.
16. Kuş G. Hepatosellüler Karsinom Hücrelerinde Karmofurun Sitotoksik Ve Apoptotik Etkileri. *Kocatepe Medical Journal*. 2017;55-60.
17. Xu S, Shen Y, Xu J, ve ark. Antioxidant and anticancer effects in human hepatocarcinoma (HepG2) cells of papain-hydrolyzed sorghum kafirin hydrolysates. *Journal of functional foods*. 2019;58:374-82.
18. Akila M, Sushama A, Ramanathan K. Study on in vitro cytotoxicity of papain against liver cancer cell line Hep G2. *Cell*. 2014;8: 84-12.
19. Mansour GH, El-Magd MA, Mahfouz DH, ve ark. Bee venom and its active component Melittin synergistically potentiate the anticancer effect of Sorafenib against HepG2 cells. *Bioorganic Chemistry*. 2021;116:105329.

#### Etik Bilgiler

**Etik Kurul Onayı:** Çalışma hücre kültürü çalışması olduğu için etik kurul iznine ihtiyaç duyulmamaktadır.

**Onam:** Yazarlar hücre kültürü çalışması olduğu için olgulardan imzalı onam almadıklarını beyan etmişlerdir..

**Telif Hakkı Devir Formu:** Tüm yazarlar tarafından Telif Hakkı Devir Formu imzalanmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Hakem değerlendirmesinden geçmiştir.

**Yazar Katkı Oranları:** Cerrahi ve Tıbbi Uygulamalar Yok;. Konsept: MKG, FK, GK. Tasarım: MKG, FK, GK. Veri Toplama veya İşleme: MKG, FK, GK. Analiz veya Yorum: MKG, FK, GK. Literatür Taraması: MKG, FK, GK. Yazma: MKG, FK, GK.

**Çıkar Çatışması Bildirimi:** Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

**Destek ve Teşekkür Beyanı:** Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.