



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA ÜSNİK ASİT VE
SORAFENİB'İN KOMBİN TEDAVİ OLARAK ANTI-
TÜMÖRAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Beste YURDACAN

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2017

Beste YURDACAN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2017



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA ÜSNİK ASİT VE
SORAFENİB'İN KOMBİN TEDAVİ OLARAK ANTI-
TÜMÖRAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Beste YURDACAN

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**DANIŞMAN:
Prof.Dr. Ünal EGELİ**

BURSA-2017

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “Hepatosellüler Karsinomada Üsnik Asit ve Sorafenib’in Kombin Tedavi Olarak Anti-Tümöral Etkilerinin Araştırılması“ adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.


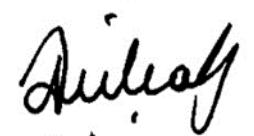

Adı Soyadı
Beste YURDACAN

Tarih ve İmza
12.06.2017



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Beste YURDACAN tarafından hazırlanan Hepatosellüler Karsinomada Üsnik Asit ve Sorafenibin Kombin Tedavi Olarak Anti-Tümöral Etkilerinin Araştırılması konulu Yüksek Lisans tezi 12/06/2017 günü, 14:00-15:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof.Dr. Ünal EGELİ	
Üye	Prof.Dr. Gülşah ÇEÇENER	
Üye	Doç. Dr. Didem TURGUT COŞAN	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

05.../06.../2017

Adı Soyadı: Beste YURDACAN

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Tez Konusu: Hepatosellüler Karsinomada Üsnik Asit ve Sorafenib'in Kombin
Tedavi Olarak Anti-Tümöral Etkilerinin Araştırılması

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof.Dr. Ünal EGELİ

İmza:



İÇİNDEKİLER

Dış Kapak
İç Kapak

ETİK BEYAN	II
KABUL ONAY.....	III
TEZ KONTROL BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V
TÜRKÇE ÖZET	VIII
İNGİLİZCE ÖZET	IX
1. GİRİŞ	X
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Karaciğerin Yapısı ve Fonksiyonu	4
2.2 HSK'nın Dünyadaki İnsidansı ve Epidemiyolojisi	5
2.3 Risk Faktörleri	6
2.3.1 Hepatosellüler Karsinomada Hepatit B ve Hepatit C Enfeksiyonlarının Rolü.....	7
2.3.2 Alkol ve Sigara	8
2.3.3 Diyabet ve Obezite	8
2.3.4 Beslenme	9
2.3.5 Aflatoksin.....	9
2.3.6. Metabolik Hastalıklar.....	10
2.4 HSK' da Tanı ve Tedavi	10
2.4.1. Cerrahi rezeksiyon.....	11
2.4.2. Karaciğer nakli.....	11
2.4.3. Kemoterapi	11
2.5. HSK Tedavinde Kombin Terapi.....	15
2.5.1 MEK/ERK İnhibitörleri.....	15
2.5.2 PI3K/AKT /mTOR İnhibitörleri	16
2.5.3 EGFR ve cMET İnhibitörleri.....	16
2.5.4 Anjiyogenez İnhibitörleri	17
2.5.5 Histon Deasetilaz İnhibitörleri.....	17
2.6. HSK' da Genetik ve Epigenetik Değişimler.....	18
2.6.1 Kromozomal Değişimler.....	19

2.6.2 Gen Mutasyonları	19
2.6.3 Epigenetik Değişimler	20
2.7. Hücre Ölüm Yolakları ve Kanser ile İlişkisi.....	22
2.7.1. Apoptoz	22
2.7. Nekroz	30
2.8. Otofaji	32
2.9. Apoptoz, Nekroz ve Otofaji Arasındaki Farklar	33
2.10. Bitkisel Bileşiklerin Kanser Tedavilerinde Rolü	35
2.11. Üsnik Asit.....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
3.1. Kullanılan Cihazlar	39
3.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	39
3.3. Hücre Kültürü.....	40
3.3.1. Hücre Hatlarının Temini ve Hücrelerin Özellikleri	40
3.3.2 Besiyerlerinin Hazırlanması ve İnkübasyon Koşulları.....	40
3.3.3 Hücrelerin Pasajlanması	41
3.3.4 Hücrelerin Sayımı, Dondurulması ve Saklanması	41
3.3.5 Üsnik Asit Stoğunun Hazırlanması	42
3.3.6. Sorafenib Stoğunun Hazırlanması	43
3.3.7. Sorafenib ve Üsnik Asitin Kombinasyonu	43
3.3 Hücre Proliferasyonu Analizleri.....	44
3.3.1 WST-1 Testi.....	44
3.4 Apoptozun Belirlenmesi	46
3.4.1 Annexin V	46
3.4.2 Acridine Orange-Etidyum Bromür (AO / EB) Floresan Boyaması	47
3.5 Hücre Döngüsü Analizi.....	48
4. BULGULAR.....	50
4.1. Hücrelerde Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi	50
4.1.1. Üsnik Asidin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	50
4.1.2. Sorafenibin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	52
4.1.3. Sorafenib ve Üsnik Asitin Kombinasyonlarının Belirlenmesi	55
4.1.4. Sorafenib ve Üsnik Asidin Kombinasyonunun Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	56
4.2 Hücrelerde Apoptotik Etkinin Belirlenmesi.....	60
4.2.1. Üsnik Asidin Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	60
4.2.2. Sorafenibin Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi.....	65
4.2.3. Sorafenib ve Üsnik Asitin Kombinasyonunun Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	69

4.3. Hücrelerde Hücre Döngüsü Üzerindeki Değişimlerin Belirlenmesi.....	73
4.3.1. Üsnik Asitin Hücre Döngüsü Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi	73
4.3.2 . Sorafenibin Hücre Döngüsü Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi.....	77
4.3.3. Sorafenib ve Üsnik Asitin Kombin Olarak Hücre Döngüsü Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi	81
4.4. Hücrelerde Meydana Gelen Morfolojik Değişimlerin Belirlenmesi.....	85
4.4.1. Üsnik Asidin Hücre Morfolojileri Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	85
4.4.2. Sorafenibin Hücre Morfolojileri Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	87
4.3.3. Sorafenib ve Üsnik Asitin Kombin Olarak Hücre Morfolojileri Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi.....	89
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	92
6. KAYNAKLAR	100
7. SİMGELER VE KISALTMALAR	112
8. TEŞEKKÜR	113
9. ÖZGEÇMİŞ.....	114

TÜRKÇE ÖZET

Günümüzde hepatasellüler karsinomanın (HSK) tümörün heterojen yapısı ve tedavide tek bir kemoterapik ajan olarak sorafenibin (SOR) kullanılması, HSK tedavisinde başarıyı kısıtlamakta olup güncel tedavi sorunlarını oluşturmaktadır. Bu nedenle HSK’da mevcut kemoterapik ajanlar ile birlikte çeşitli kemoterapik ilaç kombinasyonlarının, bitkisel özütlerin ve etken maddelerinin terapötik etkilerinin araştırıldığı çalışmalar önem kazanmaktadır. Bu nedenle, mevcut tez kapsamında HSK’da güncel tedavi sorunlarına çözüm getirmek, SOR’un kontrol hücrelerinde sitotoksik etkisi azaltmak ve HSK hücrelerinde terapötik etkisini arttırmak amacıyla ilk kez üsnik asit (UA) ile SOR’un kombin terapötik etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Mevcut tez kapsamında belirlenen süre ve konsantrasyonlarda UA ve SOR’un ayrı ayrı ve kombin uygulamalarının HSK ve kontrol hücre hatlarında hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri WST-1 analizi ile belirlenmiş olup, apoptotik etkilerinin ve hücre siklusu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için Annexin V ve hücre siklusu analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, hücrelerde meydana gelen morfolojik değişimler akridin oranj-etidyum bromür floresan boyaması ile görüntülenmiştir.

WST-1 analizi sonuçlarına göre, UA ve SOR kombin uygulanan HSK hücrelerinde canlılık oranının tek SOR ve UA uygulanan hücelere göre daha fazla oranda azaldığı ve HUVEC kontrol hücrelerinde SOR’un toksik etkisinin azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, kombin SOR ve UA’nın HSK hücrelerinde geç apoptotik ve nekrotik ölüme neden olarak, HSK hücrelerinin özelliklerine göre G0/G1 ve G2/M evresinde hücre miktarında artış tespit edilmiştir. Son olarak, SOR ve UA kombin uygulanan HSK hücrelerinde geç apoptotik ve nekrotik ölümün yanı sıra vakuol sayısında belirgin seviyede artış görüntülenmiştir.

Sonuç olarak, mevcut tez çalışmasında ilk kez SOR ve UA’nın HSK hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkileri *in vitro* olarak değerlendirilerek sinerjik etkiye sahip oldukları belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: HSK, Sorafenib, Üsnik Asit, Kombin etki.

İNGİLİZCE ÖZET
“INVESTIGATION OF THE ANTI-TUMORAL EFFECTS OF USNIC ACID
AND SORAFENIB AS COMBINATION THERAPY ON
HEPATOCELLULER CARCINOMA”

The heterogeneous structure of hepatocellular carcinoma (HCC), the use of sorafenib (SOR) as a single chemotherapeutic agent have been limited the success of treatment of HCC and have been linked to current treatment problems. Thus, the studies investigating therapeutic effects of various chemotherapeutic drug combinations, herbal extracts and active ingredients together with existing chemotherapeutic agents in HCC has recently gained importance. In the present thesis, we aimed to determine the combinational therapeutic effect of SOR with usnic acid (UA) for the first time in order to solve the current treatment problems in HCC, to reduce the cytotoxic effect of SOR in normal cells and to increase the therapeutic effect in HCC cells.

The effects of SOR or UA or their combination on cell proliferation in HCC and HUVEC normal cell lines were determined by WST-1 assay at specified times and concentrations, and then Annexin V and cell cycle analyses were performed to demonstrate the effects on apoptosis and cell cycle in the present thesis. In addition, the morphological changes in the treated cells were visualized by acridine orange-ethidium bromide staining.

According to the results of WST-1 analysis, we determined that the viability ratio of HCC cells treated with a combination of UA and SOR was more decreased than SOR and UA alone treated cells and the toxic effect of SOR was reduced in HUVEC control cells. In addition, a increase in the percentage of cells in the G0/G1 and G2/M phase according to HCC cells characteristics was analyzed by inducing to late apoptotic and necrotic death in HSC cells treated with a combination of SOR and UA. Finally, in addition to late apoptotic and necrotic death, a significant increase in the number of vacuole was observed in HCC cells treated with a combination of SOR and UA.

In conclusion, we determined for the first time the synergistic effect of a combination of SOR and UA on HCC cells by evaluating *in vitro* the cytotoxic and apoptotic effects in the present thesis.

Key words: HCC, Sorafenib, Usnic acid, Combined effect.

1. GİRİŞ

Hepatoselüler karsinoma (HSK) tüm kanserlerin %5.4'ünü oluşturmaktadır. HSK gelişiminde bilinen en önemli risk faktörü siroz olup, hastaların yaklaşık % 80'i kronik hepatit B virüsü (HBV) ve/veya hepatit C virüsü (HCV) enfekte durumdadır (Chang ve ark. 1997; Nguyen ve ark. 2009). Ayrıca yaş, obezite, alkol kullanımı ve bunlara bağlı eşlik eden başka hastalıklar gibi ek faktörler de HSK gelişiminde katkıda bulunmaktadır (Mahmood 2005). HSK ile ilgili risk faktörlerinin azaltılması ile HSK önlenebilir bir kanser tipi olmasına rağmen, ileri evrede tanı, heterojen tümör yapısı, yüksek rekürrens riski ve mevcut kemoterapi ve radyoterapiye karşı direnç gelişmesi uygulanan HSK tedavilerini başarısız kılmakta ve hastaların sağ kalım süresinin kısaltılmaktadır. Günümüzde HSK tedavisi için FDA onaylı tek kemoterapik ajan olan sorafenib, HSK gelişimine neden olan farklı onkogenetik yolları bloke ederek, hem tümör hücrelerinin çoğalmasını hem de anjiyogenezini baskılamaktadır (Gong ve ark, 2017). Son yıllarda HSK tedavisinde kombin ilaç uygulamalarına odaklanılmış olup SOR ile birlikte MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR, EGFR, histon deasetilaz ve anjiyogenez inhibitörlerinin kombin etkileri üzerinde çeşitli araştırmalar gerçekleştirilmektedir. Bu kapsamda araştırmaların bir kısmı klinik çalışmalara devam ederken bir kısmında olumlu sonuçlar elde edilememiştir. Bu nedenle HSK'da tedavi başarısını olumlu yönde etkileyebilecek yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Chang ve ark. 1997; Nissen ve Martin 2002; Nguyen ve ark. 2009).

Kanser tedavisinde kullanılan pek çok kemoterapik ajanın bitkisel kaynaklı olduğu bilinmektedir. Bitkilerin kanser tedavilerindeki terapötik etkileri ile ilgili literatürde çok sayıda *in vitro* ve *in vivo* çalışma mevcuttur. Örneğin, kurkumin (*Curcuma longa*), paklitaksel (*Pacific yew*), kamptoteksin (*Camptotheca acuminata*) ve vinkristinin (*Catharanthus roseus*) çeşitli kanser türlerinde etkinliği belirlenen bitkisel orijinli kemoterapik ajanlardır. Bitkisel özütler, mantar ve liken metabolitleri ve etken maddeleri kanser tedavisinde potansiyel terapötik etkilerinden dolayı yeni nesil

kemoterapik ajanların geliştirilmesinde hala önem taşımaktadır. Kanser tedavisinde mevcut kemoterapik ajanların neden olduğu çoklu ilaç direnci, normal hücrelerde ortaya çıkan toksik etkiler gibi dezavantajlardan dolayı, son yıllarda HSK tedavisinde güncel yaklaşım olarak kemoterapik ajanlar ile birlikte çeşitli kemoterapik ilaç kombinasyonlarının, bitkisel özütlerin veya etken maddelerinin etkilerinin araştırıldığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar dikkat çekmektedir (Miao ve ark. 2001; Shrestha ve Clair, 2013; Solowey ve ark. 2014).

Üsniik asit (UA), *Usnea* cinsine ait liken türlerinden elde edilen bir liken sekonder metabolitidir. UA, anti-kanserojen özelliği nedeniyle son yıllarda dikkat çeken sekonder metabolitler arasında yer almıştır (Cansaran ve ark. 2006). Kanser hücrelerinde sitotoksik, apoptotik ve otofajik etkisinin belirlendiği çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar (Ahmadian ve Hale, 1973; Manojlovic ve ark, 2002) mevcut olmasına rağmen literatürde UA'nın kanser hücrelerinde kemoterapik bir ajanla kombin tedavide potansiyel etkisinin belirlendiği herhangi bir çalışma mevcut değildir.

Mevcut tez çalışmasında, HSK'da güncel tedavi yaklaşımındaki sorunlara çözüm getirmek, SOR'un normal hücrelerdeki sitotoksik etkisini azaltmak ve HSK hücrelerinde terapötik etkisini arttırmak amacı ile potansiyel anti-kanserojen özelliğinden dolayı UA ile kombin terapötik etkisinin Hep G2, SNU-449 HSK ve HUVEC kontrol hücre hatlarında belirlenmesi hedeflenmiştir. Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücrelerinde SOR'un, UA'nın ve SOR+UA'nın kombin sitotoksik etkisi WST-1 analizi ile; apoptotik ve hücre siklusu üzerindeki etkileri akım sitometrik Annexin V ve hücre siklusu analizleri ile değerlendirilmiştir. Ayrıca, hücrelerde SOR ve UA'nın ve kombin uygulamalarının neden olduğu apoptotik ve nekrotik etkinin morfolojik analizi için akridin oranj- etidyum bromür (AO/EB) boyama yapılmıştır.

Mevcut tez çalışmasında ilk kez HSK hücre hatlarında UA ve SOR'un kombin sitotoksik ve apoptotik etkileri *in vitro* olarak değerlendirilmiş ve ajanların sinerjik etkiye sahip oldukları saptanmıştır. HSK tedavisinde kullanılan SOR'un, UA ile birlikte kullanıldığında terapötik etkisinin daha düşük konsantrasyonlarda arttığı ve normal hücrelerde SOR'un tek başına kullanıldığında ortaya çıkan toksik etkinin kombin uygulama yapıldığında azaldığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, mevcut tez

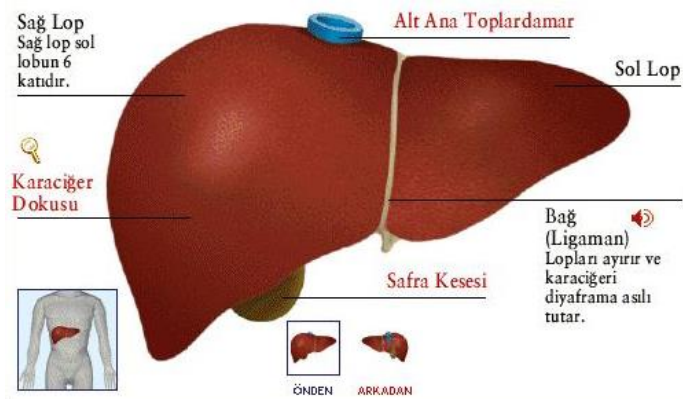
alışmasında belirlenen sinerjistik etkinin HSK'da daha etkin tedavi sağlayabilecek potansiyele sahip ileri araştırmalar için ışık tutabileceği düşünölmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğerin Yapısı ve Fonksiyonu

Karaciğer, birçok farklı işlevin gerçekleştirildiği aynı zamanda bu işlevlerin birbiriyle bağlantısının da sağlandığı vücudun en büyük organdır. Kırmızı-kahverengi renge sahip, kabaca 2 parça halinde, karın boşluğunun üst kısmında, diyaframın hemen altında yer alan erişkindeki ağırlığı yaklaşık olarak 1,5 kg olan vücudun en ağır organıdır (Şekil 1). Karaciğerin işlevsel birimine karaciğer lobülü denir, bu yapıdan insan karaciğerinde 50.000-100.000 adet bulunur. Karaciğer ürettiği safra nedeniyle ekzokrin bir bez; glikoz, lipoprotein ve plazma proteinlerini kana vermesi nedeniyle endokrin bir bez niteliği taşımaktadır. Vucudumuzdaki görevleri genişleyebilen bir organ olması sebebiyle kan depolama, bağırsak kapillerlerinden portal venlere akan kanın karaciğerde temizlenmesi sayesinde kan temizleme, karbonhidrat metabolizması, yağ metabolizması ve protein metabolizmasını düzenleyecek birçok madde sentezlemesiyle metabolik düzenlemede görev almaktadır. Ayrıca kan glikozunun fazlasını kandan alıp glikojen olarak depolama veya ihtiyaç halinde glikoza çevirme, A, D ve B vitaminlerini ve demiri depolama gibi hayati rolleri vardır. (Deniz, 2017)



Şekil 1. Karaciğerin yapısı (Anonim A, 2017)

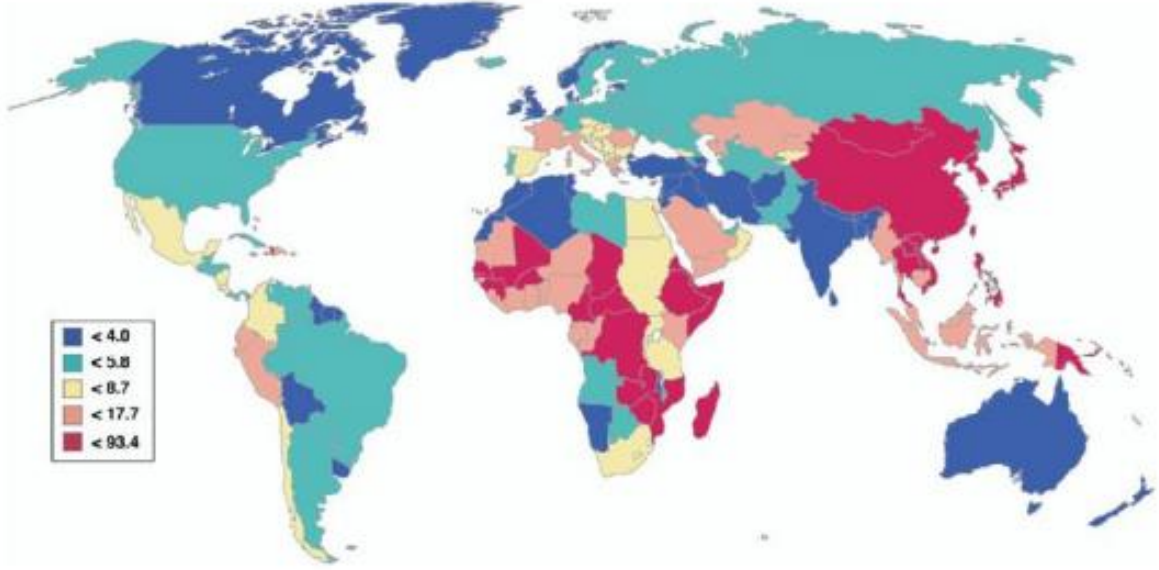
2.2 Hepatosellüler Karsinoma

Hepatosellüler karsinoma (HSK), dünya genelinde mevcut kanser tipleri arasında beşinci sırada yer alan ve kronik karaciğer problemleriyle birlikte görülen tümör tipidir (Parkin ve ark., 2000; Sherman, 2005). HSK gelişiminde bilinen en önemli risk faktörü siroz olup hastaların yaklaşık % 80' inde kronik hepatit B virüsü (HBV) ve / veya hepatit C virüsü (HCV) enfekte durumdadır (Chang ve ark., 1997; Nguyen ve ark., 2009). Ayrıca yaş, obezite, alkol kullanımı ve bunlara bağlı eşlik eden başka hastalıklar gibi ek faktörlerde HSK gelişiminde katkıda bulunmaktadır (Mahmood, 2005). HSK ile ilgili risk faktörlerinin azaltılması ile HSK önlenebilir bir kanser tipi olmasına rağmen, ileri evrede tanı konduktan sonra karaciğer fonksiyon bozukluklarının eşlik etmesiyle, uygulanan tüm HSK tedavileri başarısız olmaktadır. Bu nedenle, günümüzde yapılan çalışmalar da HSK gelişimi ile ilişkili genetik ve epigenetik değişimlerin rol aldığı moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına odaklanılmaktadır (Balogh ve ark., 2016).

2.3 HSK'nın Dünyadaki İnsidansı ve Epidemiyolojisi

HSK'nın insidansı etiyolojik faktörler ve kronik viral enfeksiyonlardan dolayı coğrafik bölgelere göre farklılık göstermektedir (Şekil 2). Dünyada her yıl 600.000'den fazla yeni HSK tanısı konmaktadır. Ayrıca, HSK, Doğu ve Güneydoğu Asya ile Orta ve Batı Afrika yüksek insidansa sahip olmasına rağmen, Güney Avrupa dışındaki gelişmiş bölgelerde ise daha düşük insidansa sahiptir. Türkiye'de Sağlık Bakanlığı verilerine göre, HSK'nın görülme sıklığı 2009 yılında erkeklerde 2,1/100.000, kadınlarda 1,2/100.000 olarak analiz edilmiştir (Tözün, 2012). Siroz ile ilişkili olarak gelişen HSK'nın sirotik hastalarda yıllık insidansı % 1-6'dır. Türkiye'de bu oran yıllık % 5,4 olarak belirtilmiştir (Arhan ve ark., 2009; Yang ve ark., 2002). Ayrıca, erkeklerde görülme sıklığının kadınlara göre daha fazla olduğu ve bunun sebebi olarak da erkeklerde androjenik hormonların ve genetik yatkınlığın HSK'ya yakalanma riskini arttırdığı belirtilmektedir (McGlynn ve London, 2011). Günümüzde artan risk faktörlerine bağlı olarak HSK'nın insidansı artmasına rağmen, hepatit B aşısının gelişimi ve hepatit C virüsünün tedavisi için geliştirilen yeni tedavi stratejileri ile

gelecekte HSK insidansının kademeli olarak düşmesi beklenmektedir (Pascual ve ark., 2016).

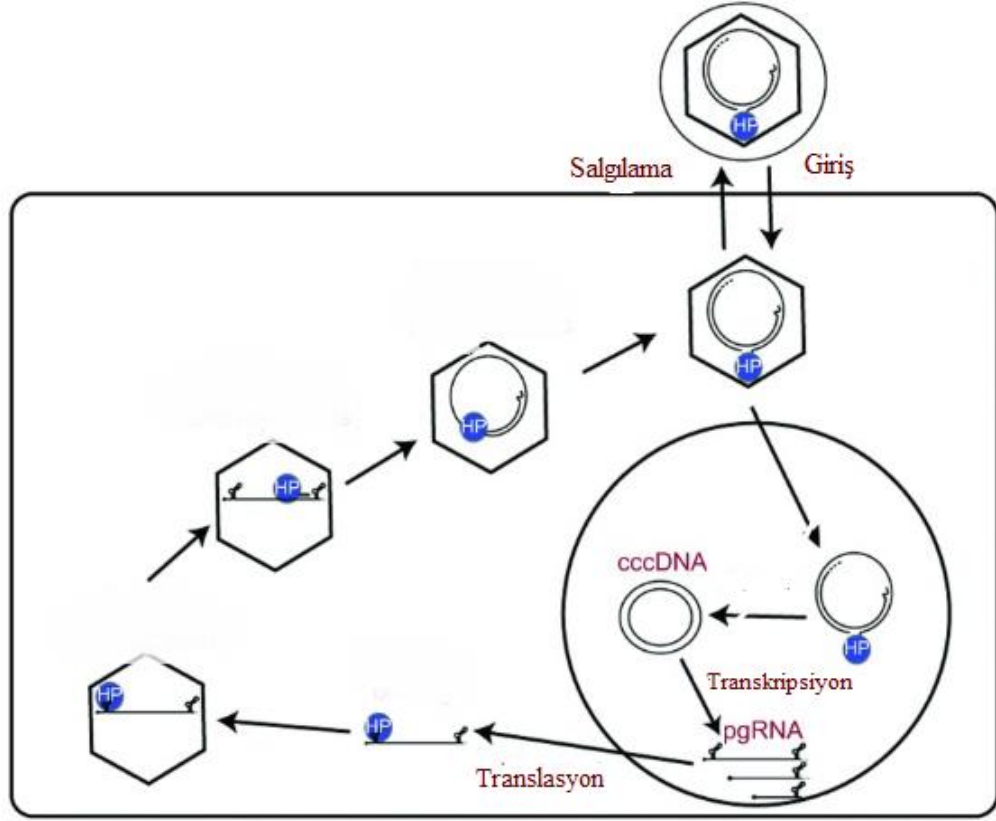


Şekil 2. HSK'nın Dünya Genelindeki Yaygınlığı ve Görülme Sıklığı (Sümbül, 2008)

2.4 Risk Faktörleri

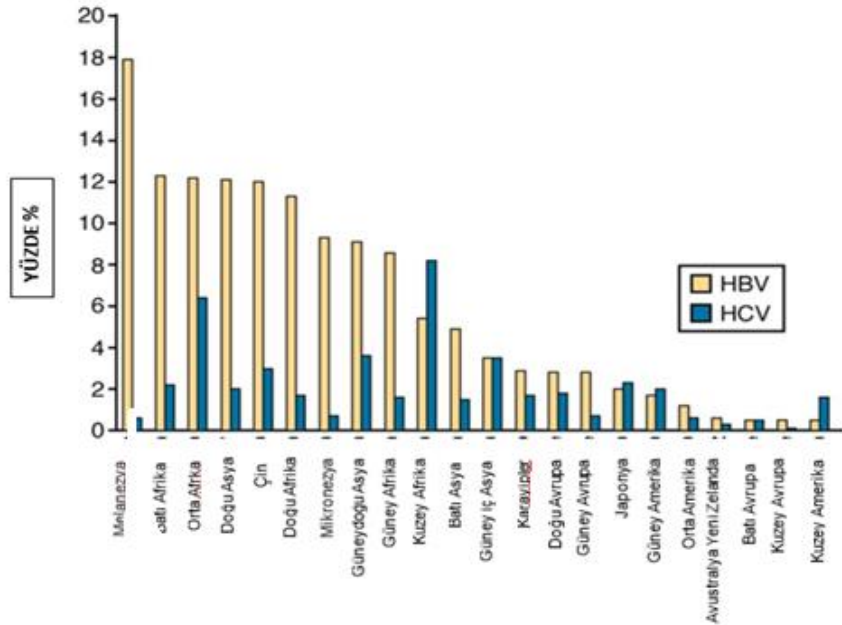
2.4.1 Hepatosellüler Karsinomada Hepatit B ve Hepatit C Enfeksiyonlarının Rolü

HSK'nın gelişmesinde en önemli risk faktörü Viral DNA' lar olup, hepatosit hücrelerinde gen stabilitesini değiştirmektedirler. Şekil 3'de Hepatit B virüsü'nün (HBV) üreme döngüsünde görüldüğü gibi çift iplikli DNA'ya sahip olan HBV karaciğer hücrelerine enfekte olduktan sonra RNA replikasyonu için hücre genomunda kalıcı olan minik kromozomlar oluşturmaktadır (Bozdayı ve Karataylı, 2009). Yapılan çalışmalarla HSK hastalarının % 90 oranında HBV ile enfekte oldukları tespit edilmiştir ve HBV' li hastalara uygulanan tedavinin HSK riskini azaltılmasında da rol aldığı literatürde belirtilmiştir (Liaw ve ark., 2004).



Şekil.3 HBV' nin üreme döngüsü (Jones ve Hu, 2013)

Hepatit C virüsü (HCV) ise tek iplikli bir genoma sahip olup ve replikasyon ve transkripsiyon süreçlerini konak hücrenin proteinlerinin yoğun olduğu bölgede gerçekleştirmektedir. HBV hastalarının aksine, kronik HCV hastalarının dağılımı, hastalığın endemik olduğu ülkelerdeki bölgeler ve etnik gruplar arasında değişmektedir ve hastalığın bulaşmasında sosyal veya davranışsal bileşenlerin etkili olduğu belirtilmektedir (Byam ve ark., 2013). Ayrıca, anti-HCV pozitif olgularda HSK gelişme riskinin anti-HCV negatif olanlara kıyasla 20 kat daha fazla olduğu belirtilmektedir (El-Serag, 2002; Sherman ve Takayama, 2004). Türkiye yaklaşık % 5 HBV taşıyıcısı bireye sahip olduğu için Viral Hepatitle Savaşım Derneğinin verilerine göre HBV açısından Türkiye' nin endemik bir ülke olduğu belirtilmektedir (Tabak ve ark., 2012). Ülkemizde HCV pozitiflik oranı ise yaklaşık % 0,5 - % 0,7 olarak bildirilmiştir ve bu oranlar dünyada da bölgesel farklılıklar göstermektedir (Şekil 3) (Mıstık, 2007). Bu nedenle, HSK için başlıca risk faktörünün Türkiye'de HBV enfeksiyonu olduğu ve HSK olgularında HBV sıklığının, % 42-68 oranında değiştiği belirlenmiştir (Yang ve ark., 2002; Sherman, 2005).



Şekil 4. Farklı coğrafik bölgelerde HBV taşıyıcılığı ve kronik HCV yaygınlığı (Mittal ve El-Serag, 2012).

2.3.2 Alkol ve Sigara

Alkol tüketimi HSK gelişiminde diğer önemli bir risk faktörüdür. Alkol ve karaciğer hastalığı arasındaki ilişki, yaşam boyu tüketilen alkol miktarı ile ilişkilidir; ağır alkol kullanımının yanı sıra, günde üç veya daha fazla alkollü içeceğin tüketilmesinin HSK riskini % 16 oranında, günde altı veya daha fazla alkollü içeceklerin tüketilmesinin ise HSK riskini % 22 oranında arttırdığı belirlenmiştir. HSK'ya yakalanma riski fazla alkol tüketen bireylerde hafif içicilere oranla % 20 daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Balogh ve ark., 2016). Sigara ise, içerdiği zararlı maddeler sebebiyle bir karaciğer kanserojenidir. Bu sebeple sigara içiminin, sıklığı ve süresine bağlı olarak HSK gelişme riskini arttırdığı ve HSK gelişiminde sigara sinerjik bir faktör olarak kabul edilmektedir (Chuang ve ark., 2010).

2.3.3 Diyabet ve Obezite

Karaciğer glikoz metabolizmasında temel rol aldığından dolayı, *Diabetes mellitus* doğrudan karaciğeri etkileyerek karaciğer yağlanması ve karaciğer yetmezliğine sebep olarak siroza yol açan bir hastalıktır. Amerika'da yapılan bir popülasyon çalışması sonucunda, şeker hastalığının HSK için bağımsız bir risk faktörü olduğu ve HSK riskini 2-3 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Obezitenin ise alkolik olmayan yağlı

karaciğer hastalığı steatoz ve kriptojenik siroz da dahil olmak üzere birçok hepatobiliyer hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir. Genel olarak, obezitenin 1,5- 4 kat HSK riskini arttırdığı ve aşırı kilolu bireylerde HSK riskinin % 11,7, obez hastalarda ise % 18,9 olduğu belirtilmektedir (Balogh ve ark., 2016).

2.3.4 Beslenme

Birçok epidemiyolojik çalışmada beslenme şekli ve HSK arasındaki ilişkinin belirlenmesine odaklanılmaktadır. Aynı zamanda HSK riskinin azalmasında diyet ve beslenmenin rollerinin analiz edilmesi amacıyla diyet kalıplarının rollerinin ve farklı besin maddelerinin etkilerinin araştırıldığı popülasyon ve az sayıda prospektif çalışmalar gerçekleştirilmiş ve beslenme ile HSK arasındaki anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir (Schütte ve ark., 2016) Yapılan çalışmalarda, sebze ağırlıklı beslenmenin HSK riskini azalttığı ve meyve ve et ağırlıklı beslenmenin ise HSK üzerinde etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Zhang ve ark., 2013). Sharp ve ark., soyalı gıdaların tüketilmesinin HSK riskinin azalmasında etkili olduğunu ve diğer bir meta-analiz çalışmasında ise, kafein ve kahve çekirdeklerinden gelen antioksidan maddelerin HSK riskini % 41 oranında azalmasında rol aldığını belirtilmiştir (Sharp ve ark., 2013; Bravi ve ark., 2007).

2.3.5 Aflatoksin

Aflatoksin, *Aspergillus* (*Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*) türlerinin bir mikotoksinidir ve karaciğer kanserojenidir. Sıcak ve nemli ortamlarda mısır, yerfıstığı, fındık gibi kuruyemişler ile baharatlar da oluşan aflatoksinler HSK riskini arttırmaktadır. Dört temel aflatoksin bulunur. Bunlar B₁, B₂, G₁ ve G₂'dir. B₁'in (ARB₁) hayvan deneyleriyle en güçlü aflatoksin olduğu ve diğer aflatoksinlere göre HSK riskinin artmasında temel rol aldığı belirtilmiştir (Gomaa, 2008). Ayrıca diğer bir çalışmada, dünyadaki tüm HSK vakalarının % 28,2' sinde HSK gelişiminde aflatoksinlerin rol aldığı belirlenmiştir (Liu ve Wu, 2010).

2.3.6. Metabolik Hastalıklar

Metabolizma hastalıklarından olan, kalıtsal tirozinemi tip 1 (HT1) tirozin bozunumunun son enzimi olan fomalilasetoasetat hidrolaz (FAH) eksikliğinden kaynaklanan otozomal resesif bir hastalıktır. Hastalık yeni doğanda karaciğer yetmezliği ve hipoglisemi şeklinde görülebilir. Tedavide geç kalınırsa bireylerde siroz görülmektedir. Bu nedenle, HSK gelişiminde en yüksek risk oluşturan hastalıktır. En sık gözlenen kalıtsal hastalıklardan bir diğeri AAT eksikliği; kademeli olarak yükselmiş karaciğer enzimleri, neonatal hepatit, kronik karaciğer hastalığı, siroz ve HSK gelişime neden olmaktadır. Karaciğerde fazla miktarda demir birikimine neden olan kalıtsal hemokromatoz ise, HFE genindeki mutasyonların neden olduğu demir metabolizması bozukluğudur. Aşırı demir, mitokondriyal fonksiyon bozukluklarına ve hücre ölümüne yol açan, serbest radikallerin ve lipid peroksidasyonunun üretilmesi yoluyla karaciğer hasarına neden olarak HSK gelişiminde rol almaktadır (Schady ve ark., 2015; Wallace ve Subramaniam, 2009). Wilson hastalığı (WH) ise, bakır metabolizma bozukluğuna bağlı gelişen otozomal resesif bir hastalıktır. Bireylerde, karaciğer ve beyin başta olmak üzere pek çok organ bakır birikiminden etkilenebilir ve tedavi edilmezse siroz ve HSK gelişimi kaçınılmazdır (Hanağası ve Hanağası, 2013; Chuang ve ark., 2010).

2.4 HSK' da Tanı ve Tedavi

Hastalığın seyri HSK' da tanı ve tedavi için önemli bir basamaktır. Ancak, geç tanı konulması, kötü prognoza sahip olması ve mevcut kemoterapi ve radyoterapiye dirençli olması hastaların çoğunda tedavinin başarısız olmasına neden olmaktadır (Nissen ve Martin, 2002). HSK tanısında görüntüleme yöntemleri, biyobelirteçler ve biyopsi kullanılmaktadır. Nodül tespiti yapılan hastalarda, <1 cm olan nodüller her 3-6 ayda bir ultrason ile rutin olarak takip edilmektedir. İlerleyen aşamalarda ise, HSK tanısı konduktan sonra hastaların % 0-10'unun yaşam süresi 5 yıldır. Eğer tümör boyutları küçük iken HSK tanısı konulabilirse, hastalarda 5 yıllık yaşam süresinin daha yüksek olması HSK' da erken tanı ve tedavinin önemini göstermektedir (Akyıldız ve ark., 2011). HSK' da hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak veya durdurmak için tedavi basamaklarını uygulamak ilk hedeftir (Chok ve ark., 2014). Bu tedaviler sırasıyla; karaciğer rezeksiyonu, radyofrekans ablasyon (RFA), perkutan alkol ya da asetik asit

ablasyonu, transarteriyel kemoembolizasyon (TACE), kryoablasyon, radyasyon terapisi, sistemik kemoterapidir.

2.4.1. Cerrahi rezeksiyon

Sirotik olmayan ve tek lezyona sahip hastalar için cerrahi rezeksiyon iyi bir tedavi seçeneğidir. Ancak hastaların çok büyük bir kısmı tanı anında sirotiktir. Geri kalan küçük gruptaki hastalarda ise rezeksiyona rağmen nüks sık olarak gözlemlenmektedir. Rezeksiyon sonrası sağ kalım oranı ise ilk 1 yılda ortalama % 55-80 iken, üçüncü yılda % 42-49, 5. yılda ise % 25-39 olarak belirtilmektedir (Monden ve ark., 1992).

2.4.2. Karaciğer nakli

Karaciğer nakli 5 cm'den küçük tek tümöre veya 3 cm'den küçük en fazla 3 tümöre sahip hastalar için yapılabilmektedir. Nakil işlemi, hastalıklı karaciğerin uzaklaştırılması sağlamakla birlikte kemoterapi için de tedaviye yanıt oranının artmasında rol oynamaktadır. Ancak, transplantasyon sırasında ve sonrasında immun sistem problemleri HSK tedavisinde kısıtlamalara neden olmaktadır (Byam ve ark., 2013). Bununla birlikte nakil süreci uzun olup, bekleme süresinde tümör büyümesini engelleyecek tedavi seçenekleri olarak peruktan ablasyon ve kemoterapi uygulanmaktadır (Akyıldız ve ark., 2011).

2.4.3. Kemoterapi

HSK hücreleri oldukça iyi farklılaşma gösteren hücreler olduğu için birçok kemoterapik ilaca karşı direnç geliştirmektedirler (Yıldırım, 2007). Bu güne kadar HSK' da sisplatin, doksorubisin, etoposid ve 5-Fluorourasil gibi birçok ilacın etkinliği araştırılmıştır ve yanıt oranlarının % 8-18 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Abou-Alfa, 2004). Yeo ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada, doksorubisin ve PIAF (Sisplatin / İnterferon α -2b / Doksorubisin / 5-Fluorourasil, Capecitabine 5-Fluorouracil) 'ın HSK'da etkisi araştırılmasına rağmen, her iki ilacında hastalarda sağkalım süresinin artmasında herhangi bir etkiye sahip olmadığı ve yanıt oranlarının doksorubisin ve PIAF için sırasıyla %10.5 ve % 20.9 olduğu belirlenmiştir (Yeo ve ark., 2005). Diğer bir kemoterapik ajan olan Kapesitanib ise HSK hastalarının yanıt oranlarının 5-FU'ya benzer oranda olduğu belirlenmiştir (Lozano ve ark., 2000). Bu

nedenle, HSK tedavisinde kombin tedavi seçeneği kemoterapik ajanların tek kullanımına göre alternatif bir tedavi stratejisi olarak kabul edilmektedir. Ancak kombin tedavide kullanılan kemoterapik ajanların sahip olduğu ciddi yan etkilerden dolayı, HSK' nin moleküler mekanizmasında rol alan sinyal yollarını hedefleyen ajanların geliştirilmesine odaklanılmaktadır (Brown, 2006).

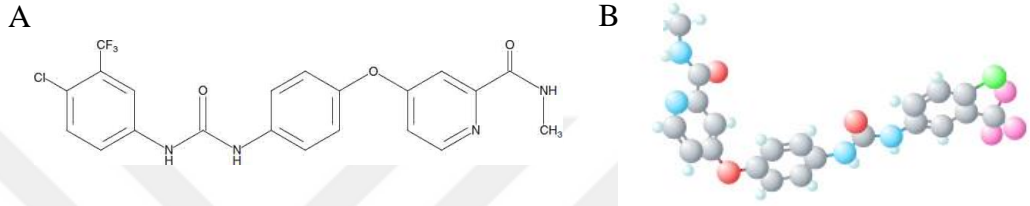
Bu amaçla yapılan çalışmalarda HSK gelişiminde rol alan temel sinyal yolları olarak, epidermal büyüme faktörleri (EGFR)'nin düzenlediği PI3K / Akt / mTOR, Ras / Raf / MEK / ERK ve Wnt / β -katenin yolları ile VEGFR ve PDGFR' nin düzenlediği anjiyogenik sinyal yollarının önemli rol oynadığını bilinmektedir (Avila ve ark., 2006). Ayrıca HSK' da EGFR yüksek derecede eksprese olduğu için son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar tirozin kinaz inhibitörlerine yoğunlaşmaktadır.

2.4.3.1. Sorafenib ve Farmokodinamiği

Sorafenib (SOR), Avrupa Birliği tarafından HSK tedavisinde onaylanan ve günümüzde kullanılan bir multikinaz inhibitörüdür (Şekil 4). SOR, genellikle cerrahi müdahale yapılamayacak seviyede olan ileri evre HSK hastalarının sağkalımını uzatmak ve hastalığın ilerlemesini önlemek amacıyla kullanılan bir inhibitördür (Gillian ve ark., 2009). SOR dışında HSK tedavisinde henüz FDA onayı almamış bazı aday inhibitörlerde bulunmaktadır. Bunlar: bevacizumab, cetuximab, erlotinib, sunitinib olarak sıralanabilir. Faz II klinik denemeleri devam eden cetuximab ve erlotinib ile tedavi edilen HSK hastalarının ortalama sağkalım sürelerinin sırasıyla 9-6 ve 13 ay olduğu belirlenmiştir (Yau ve ark., 2009; Cervello ve ark., 2012).

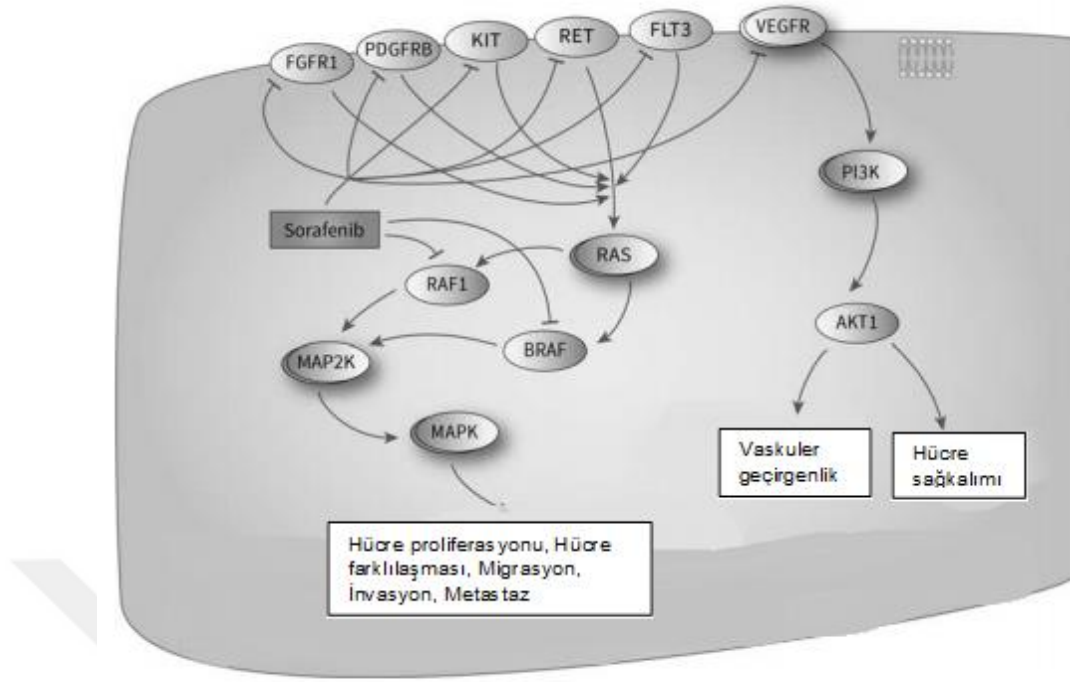
SOR'un etkisinin araştırıldığı HCC Assesment Randomized Protocol (SHARP) çalışmasında, 602 ileri evre HSK hastası içerisinde, sorafenib uygulanan HSK hastalarında toplam sağkalım süresinin 46,3 hafta ve plasebo grubunda ise sağ kalım süresi 34,4 hafta olarak belirlenmiştir. Hastalığın ilerlemesine kadar geçen süre sorafenib uygulanan HSK hastalarında 24 hafta iken, plasebo grubunda 12,3 hafta olarak belirlenmiştir. SOR uygulanan HSK hastalarında tedaviye yüksek oranda bir yanıt alınamamasına rağmen, ileri evre HSK hastalarında toplam sağkalım süresinde anlamlı bir artış sağlayan ilk kemoterapik ilaç sorafenibtir (Sunar, 2011). İleri evre HSK hastalarının sağkalım oranı ile ilgili olarak tedavide kesin bir yanıt olmamasına

rağmen, tümör boyutunda azalma belirtilmiştir (Abdel-Rahman, 2013). Bu nedenle, erken evre tanı alan hastalarda cerrahi uygulamaların yanında SOR uygulanması HSK hastalarında sağkalım süresinin 19-20 ay, orta evrede tanı alan ve rezeksiyon yapılamayacak hastalarda SOR'un sağkalım süresini 1 yıla kadar uzattığı belirtilmektedir. Son evredeki hastalarda ise SOR tek tedavi yolu olup hastaların sağkalımını 3-4 ay uzatabilmektedir (El-Serag ve ark., 2008; Llovet ve ark., 2008).



Şekil 4. A Sorafenibin Kimyasal Yapısı (C₂₁H₁₆ClF₃N₄O₃) B. Sorafenibin 3 boyutlu yapısı. (Gillian ve ark., 2009)

SOR'un moleküler mekanizması incelendiğinde, kanser fenotipinin gelişmesinde rol alan hücre yüzey kinazlarını (VEGFR 1, 2 ve 3, PDGFR, KIT, FLT3, FGFR1 ve RET) bloke ederek tümörün büyümesini ve ilerlemesini engellediği bilinmektedir. Ayrıca, CRAF ve BRAF kinazlarda dahil olmak üzere RAF / MEK / ERK sinyal yollarını inhibe eden bir inhibitör olduğu için multikinaz inhibitörü olarak yer almaktadır. Bu nedenle Şekil 5' te özetlendiği gibi, SOR HSK gelişimine neden olan farklı onkogenetik yolları bloke ederek, hem tümör hücrelerinin çoğalmasını hem de anjiyojenezini engellemektedir (Gong ve ark., 2017).



Şekil 5. SOR'un farmakodinamik yolları. (FLT3; FMS ile ilgili tirozin kinaz 3 reseptörü, KIT; kök hücre faktörü reseptörü, PDGFR; büyüme faktörü reseptörü RET; RET proto-onkogen, VEGFR; vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü.) (Gong ve ark., 2017).

2.4.3.1.1 Sorafenibin HSK Tedavisinde Önemi

İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hatlarında sorafenibin etkisinin araştırıldığı *in vitro* çalışmalar sonucunda, SOR'un kanser hücrelerinde uygulanan doza ve zamana bağlı olarak artan sitotoksik aktiviteye sahip olduğu ve hücrelerde apoptozu uyardığı tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2010). Fernando ve ark. 2012 yılında Hep3B, HepG2, SK-Hep1 ve PLC / PRF / 5 hücre hatlarında yaptıkları çalışmada SOR'un kanser hücrelerinde büyüme sinyallerin salınmasını engelleyerek anti-kanserojen etki sergilediğini ve hücrelerde apoptotik ölüme neden olduğunu belirlemiştir (Fernando ve ark., 2012). Ayrıca SOR'u nanotaşıyıcı sistemlerle kullanıldığı başka bir çalışma sonucu dirençli HSK hücrelerinde klasik nano formülasyonlarının etken kemoterapi ajana göre daha güçlü olduğu ve apoptozu indüklediği tespit edilmiştir (Zhang ve ark., 2012) Yapılan başka bir çalışmada SOR'un vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) reseptörleri üzerine etkili olup anti-anjiyojenik bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Wilhelm ve ark., 2008). Liu ve ark. (2006) tarafından, SOR'un, PLC / PRF / 5 HSK hücre hattı ve ksenograft fare modelinde RAF/ERK/MEK sinyal yollarını bloklayarak

doza bağımlı olarak antitümör aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Liu ve ark., 2006). Aynı zamanda daha sonraki yıllarda gerçekleştirilen çeşitli *in vivo* deneylerde de benzer sonuçlar elde edilmiştir (Miao ve ark., 2001). Ancak son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda SOR'un hücrelerde apoptotik ölüm dışında otofajik ölüme neden olduğu ve bu konuda detaylı çalışmaların yapılması gerektiği belirtilmiştir (Shimizu ve ark., 2011).

2.5. HSK Tedavinde Kombin Terapi

Tümörü oluşturan kanser hücreleri başlangıçta tek kökenli klonal yapıya sahip olmasına rağmen, hücrelerin sınırsız bölünme yetenekleri sonucunda neoplazinin başlangıcı ile artan DNA kararsızlığı, tümör dokusunun heterojen yapı kazanmasına yol açmaktadır. Sonuçta, kanser hücreleri daha yüksek bir proliferatif kapasiteye, apoptoza karşı dirence, daha fazla oranda metastatik veya invaziv ve anjiyogenez potansiyeline sahip olduklarından dolayı tedavide başarının elde edilmesine engel oluşturmaktadır. Bu sebeple, günümüzde tek tedavi seçeneği yerine kombinasyonel kemoterapik tedavi uygulamaları dikkat çekmektedir (Frei ve Eder, 2003). HSK, günümüzde kullanılan çoğu geleneksel kemoterapik ilaçlara karşı duyarlı olmamasından veya tedavinin ilerleyen sürecinde direnç kazanmasından dolayı son yıllarda kombin ilaç tedavilerine HSK tedavisinde odaklanılmaktadır. Günümüzde HSK tedavisinde sorafenib ile birlikte kombin tedavi olarak MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR, EGFR, histon deasetilaz ve anjiyogenez inhibitörlerin etkisi üzerinde çeşitli araştırmalar gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmalar Tablo1'de özetlenmiştir.

2.5.1 MEK/ERK İnhibitörleri

RAS/RAF/MEK/ERK yolakları hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde ve hücrenin hayatta kalmasında rol alan temel sinyal yollarıdır. Bu sinyal yollarını hedef alan birçok inhibitör ile ilişkili olarak çeşitli *in vitro*, *in vivo* ve klinik faz deneyleri devam etmektedir. Huynh ve ark. (2010) sorafenib' in HSK tedavisinde insülin benzeri büyüme faktörü reseptör 1 (IGF-1R) ve fosfo-c-RAF Ser338 seviyelerini (aktive edilmiş c-RAF formu) ve MEK ve ERK'nin fosforilasyonunu arttırarak hücrelerde anti-proliferatif etki gösterdiğini ve HSK tedavisinde sorafenib

ve MEK inhibitörlerinin kombin tedavi olarak etkisinin belirlendiği çalışmaların gerçekleştirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Bu nedenle, MEK inhibitörü olan AZD6244' ün HSK tedavisinde sorafenib ile kombin tedavi olarak etkisini araştırdıkları çalışmalarında, AZD6244 ve sorafenibin sinerjik etkisi gösterdiği belirlenmiştir (Huynh ve ark., 2010). Schmieder ve ark. (2013) ise, MEK inhibitörü olan refametinib ile sorafenibin HSK hücre hatlarında sinerjik etki gösterdiğini belirlemişlerdir (Schmieder ve ark., 2013).

2.5.2 PI3K/AKT /mTOR İnhibitörleri

PI3K/AKT/mTOR, hücre çoğalması, motilitesi, sağkalımı, apoptozis, otofaji ve anjiyogenez gibi farklı hücre fonksiyonları düzenleyen önemli bir hücre içi sinyal yolağıdır. HSK gelişiminde önemli rol aldığını bilinen bu sinyal yolağının HSK olgularının % 30-50'sinde aktive olduğu tespit edilmiştir (Bernstam ve ark., 2009; Ge ve ark., 2015). Gerçekleştirilen çalışmalarda, sorafenibe dirençli HSK hücrelerinde mTOR fosforilasyonunun arttığı ve bu nedenle mTOR inhibitörlerinin HSK tedavisinde özellikle sorafenibe yanıtın düşük olduğu veya transplantasyona karşı immün yanıt oluşturan bireylerde kombin tedavi olarak kullanılmasının önemli olduğu belirtilmiştir. Sorafenib ile sirolimus, everolimus ve temsirolimus gibi mTOR inhibitörlerinin kombin tedavi olarak etkisinin araştırıldığı çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalarda, HSK hücrelerinde sorafenibin antitümör etkisini arttırarak sinerjik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Huynh ve ark. 2009; Piguet ve ark. 2011).

2.5.3 EGFR ve cMET İnhibitörleri

Epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR) çeşitli kanser tiplerinde eksprese edilen reseptör tirozin kinazların (TK) geniş bir familyasıdır. EGFR üyeleri, kanser hücrelerinin büyüme, sinyalleşme, farklılaşma, göç ve hayatta kalmayı düzenlenmesinde rol almaktadır. Özellikle EGFR' nin aşırı ekspresyonu, proliferasyon ve apoptoz gibi birçok hücre sel süreçlede etkilidir (Seshacharyulu ve ark., 2012) EGFR aktivitesinin HSK tedavisinde kullanılan sorafenibe karşı yanıtta etkili olduğu ve bu nedenle EGFR inhibitörlerinin sorafenib ile birlikte kombin tedavi olarak kullanılmasının önemli olduğu literatürde belirtilmiştir (Ezzoukhry ve ark. 2012). EGFR inhibitörü olan erlotinib ile sorafenibin kombin tedavi olarak etkisinin

araştırıldığı faz I çalışmasında, erlotibinin sorafenibin antitümör etkinin arttmasında rol aldığı ve bu sebeple sinerjik etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Sonrasında gerçekleştirilen faz II ve III klinik denemelerinde ise sorafenib ve erlotinib arasında herhangi bir sinerjik etki belirlenemediğinden dolayı henüz FDA tarafından onaylanmış bir kombin tedavi mevcut değildir. Mezenkimal epitelyal geçiş faktörü (c-Met) ise, hücre proliferasyonunu, sağkalımı ve motiliteyi arttırarak kanserin ilerlemesinde ve metastazında kritik bir rol oynamaktadır. c-Met' in yüksek seviyede ekspresyonunun, c-Met-transgenik farelerde HSK gelişimi için yeterli olduğu ve ayrıca HSK hastalarının % 20-66'sında ekspresyon seviyesinin yüksek olduğu gözlenmektedir. HSK tedavisinde, c-Met inhibitörü olan Tivantinib ile yapılan araştırmalar devam etmekte olup, diğer bir c-Met inhibitörü olan DE605'in HSK tedavisinde teröpatik potansiyele sahip olduğu belirtilmektedir.

2.5.4 Anjiyogenez İnhibitörleri

HSK hipervasküler bir tümördür ve bu nedenle anjiyogenez, hastalığın ilerlemesinde önemli bir rol almaktadır. Sorafenib' in antianjiyojenik etkisi esas olarak VEGFR-2, PDGFR ve RAF/ MEK/ERK yolağını inhibe etme potansiyeline bağlıdır. Axitinib, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR ve c-Kit' i hedef alan tirozin kinaz inhibitörüdür. Gerçekleştirilen faz II klinik denemelerinde axitinib' in ilerlemiş HSK tedavisinde etkili olduğuna dair sonuçlar elde edilmiştir. Seçici olarak VEGFR2'yi hedef alan diğer bir tirozin kinaz inhibitörü olan apatinib ile yapılan çalışmalarda ise, apatinibin tümör dokularının büyümesini inhibe ettiği ve hastalarda düşük toksisite göstermesi sebebiyle HSK tedavisinde potansiyel terapötik bir ajan olarak kullanılabilceği belirtilmiştir (Minguet ve ark., 2015; McNamara ve ark., 2015).

2.5.5 Histon Deasetilaz İnhibitörleri

Histon deasetilazlar (HDAC) ve histon asetiltransferazlar, nükleozomların pozitif yüklü NH₂-terminal histon kuyruklarının asetilasyonunu düzenlemektedir. Histonların HDAC' ler ile asetillenmesi, histonların DNA'ya bağlanma afinitesini düşürerek açık bir DNA yapısının oluşmasına yol açar. HDAC inhibitörleri günümüzde umut verici antikanser ajanlar içerisinde kabul edilmektedir. HDAC

inhibitörlerinin HSK tedavisinde etkinliği ve güvenilirliği ile ilgili çeşitli çalışmalar devam etmektedir (Bolden ve ark., 2006; Yeo ve ark., 2012; Zhao ve ark., 2015).

Tablo 1. HSK tedavisinde sorafenib ile kombin tedavi olarak etkili olan ve çeşitli araştırmaları devam eden inhibitörler (Gao ve ark., 2015).

KOMBİN İLAÇLAR	TEDAVİ ŞEKLİ	MEVCUT AŞAMA
ANTIANKJYOGENENİK AJANLAR		
Dalantercep	Eş zamanlı	Bekleniyor
Axitinib	Başarısız tedavi sonrası	İleri klinik denemeleri
Apatinib	Başarısız tedavi sonrası	Bekleniyor
MEK/ERK İNHİBİTÖRLERİ		
AZD6244	Eş zamanlı	Bilinmiyor
Refametinib	Eş zamanlı	İleri klinik denemeleri
MTOR İNHİBİTÖRLERİ		
Sirolimus	Eş zamanlı	Sinerjik
Everolimus	Eş zamanlı	Bekleniyor
Temsirolimus	Eş zamanlı	Bekleniyor
PI-103	Eş zamanlı	Sinerjik
PIK-587	Eş zamanlı	Sinerjik
HİSTON DEASETİLAZ İNHİBİTÖRLERİ		
Panobinostat	Eş zamanlı	Faz 2
Vorinostat	Eş zamanlı	İleri klinik denemeleri
Resminostat	Eş zamanlı	Bilinmiyor
MPT0E028	Eş zamanlı	Sinerjik
EGFR İNHİBİTÖRLERİ		
Erlotinib	Eş zamanlı	Uygun bulunmadı
c-MET İNHİBİTÖRLERİ		
MSC2156119J	Başarısız tedavi sonrası	Bekleniyor
Tivantinib	Başarısız tedavi sonrası	Bekleniyor
DE605	Eş zamanlı	Sinerjik

2.6. HSK' da Genetik ve Epigenetik Değişimler

HSK' nın moleküler temelini hem genetik hem de epigenetik faktörler oluşturmaktadır. HBV dizileri HSK hücrelerinin genomuna entegre olduğu için virüse bağlı dış kaynaklı mutagenезin HSK' da sıklıkla görüldüğü bilinmektedir (Paterlini-Bréchet ve ark., 2003). Gen dizileri veya yakınındaki bölgelere viral DNA dizilerinin girişi, genin bütünlüğünü ve ekspresyonu değiştirebilmektedir.

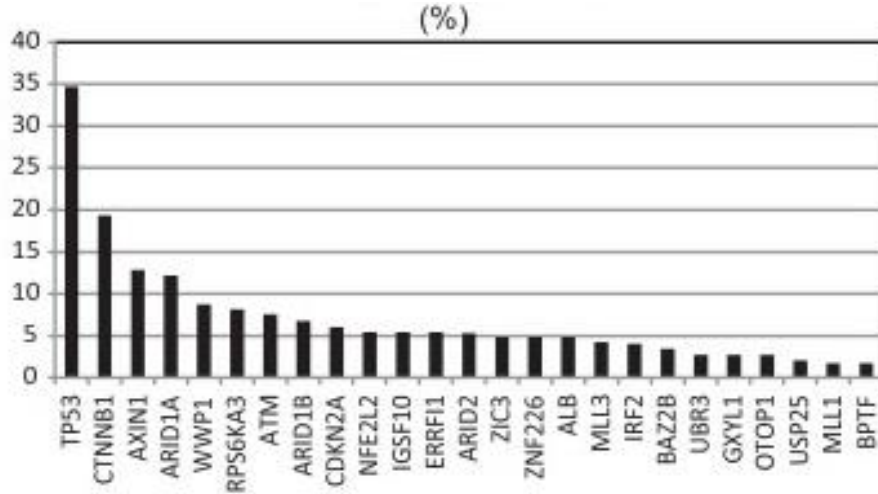
Yapılan genom çalışmalarında, viral dizilerin kromozomların yapısal bütünlüğünü bozarak hücrelerde kromozomal kararsızlığa neden olduğu düşünülmektedir. HSK hücrelerinde bu değişimler, genlerin yanlış aktivasyonu veya inaktivasyonuna yol açarak, doğrudan tümör gelişimi ile ilişkili olan telomeraz reverse transkriptaz (TERT) gibi önemli genlerin aktivitesinde değişikliklere yol açabileceği belirtilmektedir. Kronik karaciğer hasarına neden olan ajanlar (HBV, HCV, aflatoksinler ve alkol) ve konak DNA'nın dizisi ve epigenetik faktörler ile etkileşimi HSK'nın heterojenitesini sağlayan önemli faktörler olarak yer almaktadır. Ancak yinede hepatoselüler karsinogenezin moleküler mekanizmaları, kanser hücrelerinin heterojenitesi yüzünden net olarak tanımlanamamıştır (Özen ve ark., 2013).

2.6.1 Kromozomal Değişimler

HSK'da kromozomal değişikliklere sık rastlanmaktadır. İlk çalışmalarda HBV enfeksiyonu ile ilişkili tümörlerde kromozom stabilitenin azaldığını ve delesyonlar sonucu oluşan çok sayıda kromozomal anomaliler tespit etmiştir. En fazla değişiklikler 1q, 8q ve 17q kromozom insersiyonları ve 4q delesyonları olarak tespit edilmiştir. Son zamanlarda, yeni nesil dizileme verileri; 1q, 5, 6p, 7, 8q, 17q ve 20 kromozomal insersiyonlar, 1p, 4q, 6q, 8p, 13q, 16, 17p ve 21' kollarında ise delesyonlar analiz edilmiştir (Özen ve ark., 2013).

2.6.2 Gen Mutasyonları

P53 geni, HSK'da en sık değişime uğramış gen olarak bilinmektedir. Yeni nesil gen dizileme sistemlerinin geliştirilmesine kadar HSK'da Şekil.6 'da gösterilen en yüksek mutasyona uğrayan dört gende mutasyonların HSK gelişiminde etkili olduğu bilinmesine rağmen, yeni yapılan çalışmalar sonucunda birçok farklı gende farklı mutasyonların olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6) (Özen ve ark., 2013).



Şekil 6. HSK' da en sık mutasyona uğrayan genler (Özen ve ark., 2013).

HSK' da en yüksek mutasyon oranına sahip olan genler *P53* ve *CTNNA1* genleridir. *AXIN1* ve *ARID1A* genlerinde ise daha az oranda mutasyon belirlenmesine rağmen, HSK vakalarının % 10'undan fazlasında bu genlerde mutasyonların olduğu belirlenmiştir. Diğer 22 gende ise, tümörlerin % 10'undan daha azında mutasyonlar analiz edilmiştir. Guichard ve ark. (2012), genlerde meydana gelen mutasyonların Wnt / β -katenin, p53, PI3K / Ras sinyalleri, oksidatif ve endoplazmik retikulum stres yolları ile oluşarak kromatinleri etkilediğini tespit etmişlerdir (Guichard, 2012). Ayrıca, HSK' nın başlamasına katkıda bulunan HBV X proteininin (HBx), Raf-1 kinazın mitokondriyal translokasyonundan ve tüm viral genom transfeksiyonlarından sorumlu olduğu için viral yaşam döngüsünde çok önemli bir rol aldığı bilinmektedir (Miura ve ark., 1997; Chen ve Siddiqui, 2007). HCV çekirdek proteinlerinin MAP kinaz sinyal yolağını ve özellikle Raf-1'i doğrudan aktive ettiğini ve mitojenik uyarılara yanıt oranını arttırdığını belirlenmiştir. Bu nedenle, HCV ile enfekte olan karaciğer hücrelerinin neoplastik dönüşümüne katkıda bulunabileceğini belirtilmiştir (Chen ve Siddiqui, 2007).

2.6.3 Epigenetik Değişimler

"Epigenetik" terimi, DNA dizilerinde değişim olmaksızın gen ekspresyonundaki kalıtsal değişimlerdir. Epigenetik mekanizmalar, genomik DNA modifikasyonları (DNA sitozin bazlarının metilasyonu), histonların kimyasal modifikasyonları ve miRNA'ların ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişimleri kapsamaktadır.

(Egger ve ark., 2004) HSK gelişiminde hipometilasyon ve spesifik promotör bölgelerin hipermetilasyonu, genomik instabilite ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu gibi değişimlerin etkili olduğu belirlenmiştir. *RASSF1A*, *p16*, *CRABP1*, *GSTP1*, *CHRNA3*, *DOK1*, *SFRP1*, *GAAD45a* ve *p15* tümör baskılayıcı genlerin metilasyonu HSK gelişimi ile ilişkili olmasına rağmen, *CHFR* ve *SYK*'nin hipermetilasyonunun HSK'nin ileri evrelerinde rol aldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, HSK gelişiminde DNA metilasyonu kademeli olarak gerçekleştiği için, erken tanı da klinikte öneme sahiptir (Tablo 2) (Zdenko ve Paliwala, 2011; Pogribny ve ark., 2012).



Tablo 2. HSK ile ilişkili epigenetik değişimler ve başlıca risk faktörleri ile ilişkisi (Zdenko ve Paliwala, 2011).

HSK için risk faktörleri	Epigenetik Değişim	HSK gelişimine katkısı
HBV	DNA metilasyonu	Önemli tümör süpresör genlerin (p16, p21, E-kaderin ve GSTP1) susturulmasına bağlı olarak RB1, p53 ve Wnt yolaklarındaki değişiklikler meydana getirmektedir.
	Histon modifikasyonu	Önemli hücrel genlerin (hTERT, IGFBP-3 interlökin-4 reseptörü ve metalotiyonein-1F ve CDH6) ekspresyon seviyelerinde değişimlere neden olmaktadır.
	RNA etkileşimi	miR-152, miR-602 ve miR-143 MIR, DNMT1, RASSF1A ve FNDC3B' deki değişimler, DNA hasarı, rekombinasyon ve sinyal iletimi ile ilgili yolları etkileyen önemli hücrel genleri etkilemektedir.
HCV	DNA metilasyonu	Gadd45beta ekspresyonunun hipermetilasyonu ile hücre döngüsünün duraklatılması DNA eksizyon tamirinde azalmasına neden olmaktadır. STAT1'in hipometilasyonu ise interferon-alfa sinyalini engellenmektedir.
	Histon modifikasyonu	Artan histon deasetilasyon aktivitesi, demir metabolizmasını düzenlemektedir. Protein Fosfataz 2A'nın fazla sentezi (PP2Ac), H4 asetilasyonu ve metilasyonu ve histon H2AX fosforilasyonu etkilemektedir.
	RNA etkileşimi	miR-122, HCV replikasyonunu, miR-196 ise, HMOX1 / Bach1 ve HCV ifadesini düzenlemektedir.
Alkolizm	DNA metilasyonu	MGMT'nin hipermetilasyonu DNA tamir mekanizmalarının aktivitesini etkilemektedir.
	Histon modifikasyonu	CYP2E1 regülasyonunun azalması mitokondriyal oksidatif stres ve apoptotik potansiyelin azalmasına neden olmaktadır. Adh, GST-yc2 pozitif yönde düzenlerken, Lsdh sitP4502c11negatif yönde düzenlemektedir.
Aflotoksin Maruziyeti	DNA metilasyonu	p16'nın susturulması ve hipometilasyon ile aşırı ekspresyonu gerçekleşmektedir.
	RNA etkileşimi	miR-122 ekspresyonu ve fonksiyonunu etkilemektedir.

2.7. Hücre Ölüm Yolları ve Kansere İlişkisi

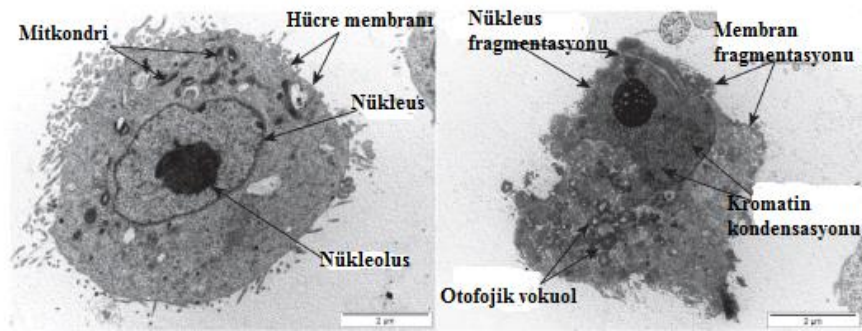
2.7.1. Apoptoz

Apoptoz, hücre içinde bir dizi hücrel sinyal yolları tarafından düzenlenen ölüm yolağı olduğu için, 'programlanmış hücre ölümü' olarak tanımlanmaktadır (Edinger ve Thompson, 2004). Normal fizyolojide apoptozun rolü, en az mitoz kadar önemlidir. Yetişkin insan vücudunda homeostazın sürdürülmesi için her gün sadece

10 milyar hücre, apoptotik ölüme giderek denge sağlanmaktadır (Renehan ve ark, 2001). Apoptoz, canlılarda embriyogenez, gelişme, homeostazis, yenilenme ve tamir olaylarında, organların büyüklüklerinin korunmasında organların patofizyolojisinde kritik öneme sahiptir (Kinloch ve ark., 1999). Bu programlı hücre ölümünün işleyişinde yaşanan anormallikler, kanser, otoimmün lenfoproliferatif sendrom, AIDS, iskemi ve Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı ve Amyotrofik Lateral Skleroz gibi hastalıkların gelişmesinde rol almaktadır. Hastalıkların bazılarında hücreler apoptoza karşı dirençli iken, bazılarında hücrelerde aşırı apoptoz görülmektedir.

2.7.1.1 Apoptozun Morfolojisi

Hücrelerde apoptotik ölüm, hücre boyutunda küçülme ve yuvarlaklaşma, hücre yüzeyindeki mikrovillüsler ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlantıların ortadan kalkması, apoptotik cisimcikler oluşması ve nükleusta kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonu ile karakterizedir (Şekil 8) (Kerr ve ark., 1997). Apoptotik hücreler makrofajlar tarafından tanınarak fagosite edilir. Apoptotik hücrelerde DNA'nın fragmente yapısı elektroforezde artan DNA kırıklarından dolayı merdiven şeklinde bir gözlemlenmektedir. Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılırken, apoptoziste yaklaşık 300.000 kırılma meydana gelmektedir ve bu nedenle DNA kırıkları onarılamaz (Akşit ve Bildik, 2008) Bu morfolojik değişiklikler yapısal proteinlerin, tamir enzimlerinin ve DNA'nın parçalanmasına neden olan kaspazların ve endonükleazların aktivasyonu ile gerçekleşmektedir.

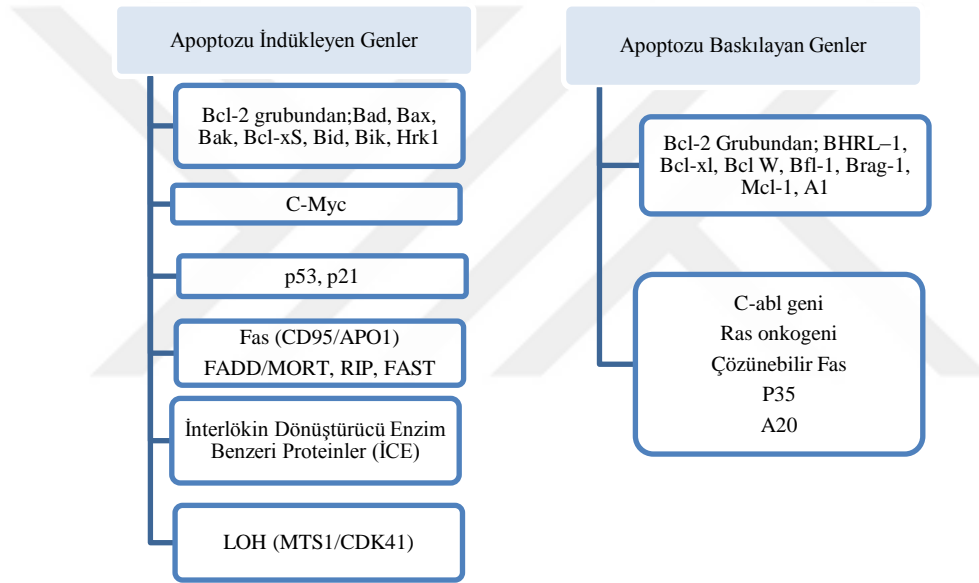


Şekil.8 Normal hücre ve apoptoza uğramış hücre (Vorster ve Joubert, 2010).

2.7.1.2 Apoptozun Moleküler Mekanizması

Apoptoz çevreden gelen sinyallerle başlamaktadır. Önceden hazır olan hücrelerde primer başlatılabilir ya da bir uyarın sonucu sekonder olarak gelişebilmektedir. Apoptoz, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) ile düzenlenmektedir. Düzenleyiciler hücre tipine özgü olabileceği gibi apoptotik uyarının çeşidine görede farklılık gösterebilir. (Balkan ve Menekşe, 2012). Hücrede apoptozun düzenlenmesinde görev alan genler Tablo 3’de özetlenmiştir.

Tablo 3. Apoptoz mekanizması ile ilişkili genler.

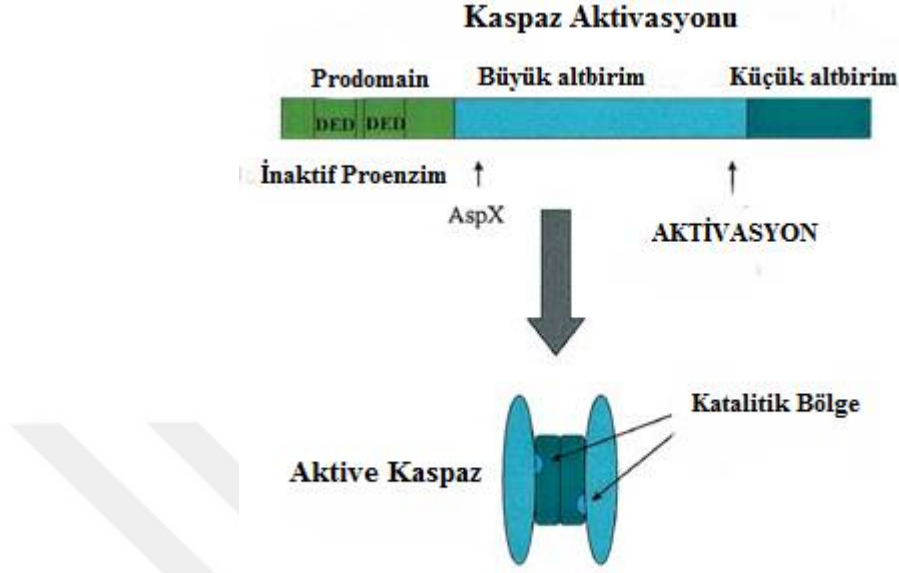


2.7.1.3. Apoptozun Düzenlenmesinde Rol Alan Genler

2.7.1.3.1. Kaspazlar

Sağlıklı bir hücrelerde kaspazlar inaktif zimojenler şeklinde bulunurlar ve bunların çok az enzimatik aktivitesi vardır. Kaspazlar, Şekil 9’de gösterildiği gibi prokaspazlar olarak sentezlendikten sonra belirli bir kısımları kesilip uzaklaştırılarak aktif kaspaz halini almaktadır (Chowdhury ve ark., 2006). Kaspazların proteaz aktivitesi apoptozun morfolojik ve biyokimyasal özelliklerini belirlemede önemlidir. Kaspazların

aktivitesi, dış (ölüm reseptörleri) ve iç (mitokondrial) yollar sonucunda sağlanmaktadır.



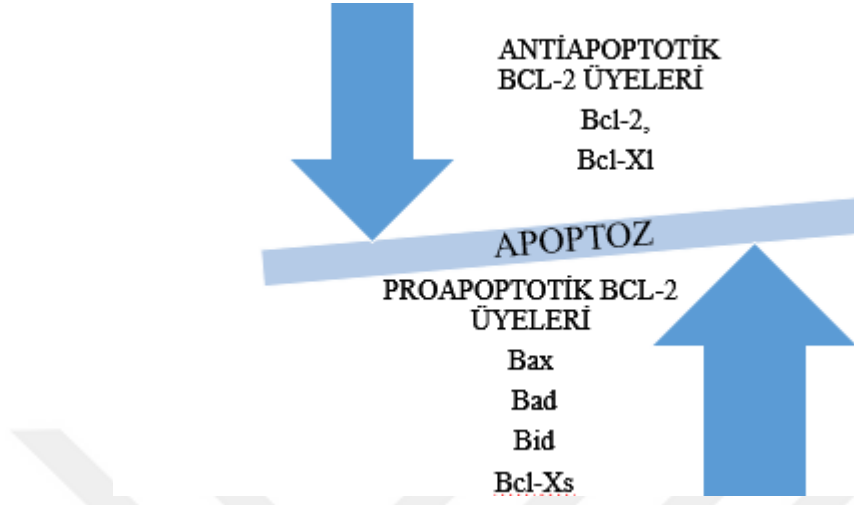
Şekil 9. Kaspazların aktivasyonu (Hui ve ark., 2004)

Apoptoz regülasyonu kaspazlar tarafından yapılmakta olup dış yolda; birbirini tamamlayan ölüm aktivatörlerinin (Fas-L ve TNF) hücre yüzeyindeki Fas ve TNF reseptörlerine bağlanmasıyla sitoplazmaya kaspaz- 8'i aktive eden sinyaller yayılmaktadır. Böylece diğer kaspazların aktive olması ile ölümü indükleyen sinyaller oluşturmaktadır. İç yolda ise mitokondri tarafından regüle edilen apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ve kaspaz 9 mitokondride mevcut olan sitokrom C ile Apaf-1 kompleks oluşturarak kaspaz yolağının aktifleşmesini sağlamaktadır. Böylece hücrelerde kaspazlar sayesinde proteinlerin yıkılması ve DNA fragmentasyonu meydana gelmesi ile apoptotik ölüm meydana gelmektedir (Antar, 2005).

2.7.1.3.2. Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 ailesi, pro-apoptotik ve anti-apoptotik etki gösteren farklı genlerden oluşan geniş bir ailedir. Bcl-2, 26 kDa büyüklüğünde, mitokontri, endoplazmik retikulum ve çekirdek membranlarında yerleşmiş olan proteinlerdir. Normal hücrelerde eksprese edilen Bcl-2 hücrenin canlılığının sağlanmasında görev almaktadır. Dış etkenlerle başlatılan hücre ölümünü baskılamaktadır. Bax proteini ise, Bcl-2 proteinine yapısal olarak çok benzemesine rağmen, işlev olarak tam tersi görev almaktadır. Bax, Bcl-2

ile homodimer yapı oluşturarak Bcl-2'yi inaktive etmesi sonucunda hücrede apoptoz gerçekleşmektedir (Tilli ve ark., 2002).



Şekil 9. Antiapoptotik ve proapoptotik Bcl-2 proteinleri

Bcl-2 gen ailesi 3 alt gruba ayrılmaktadır;

Grup I antiapoptotik Bcl-2 ailesi: Apoptozisi inhibe eden proteinlerdir ve hücreyi farklı uyarılara karşı koruyarak böylece hücrenin yaşamı için önem arz etmektedir. Bu grupta Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w ve Mcl-1 yer alır. Grupta yer alan Bcl-xl mitokondri membran dışında lokalize olup önemli bir apoptoz inhibitörüdür. Bcl-xl ve Bcl-2 mitokondri membran geçirgenliğini korunmasında proapoptotik proteinleri (Bax ve Bad) inhibe ederek apoptozun engellenmesinde rol alır (Keane ve ark., 2001).

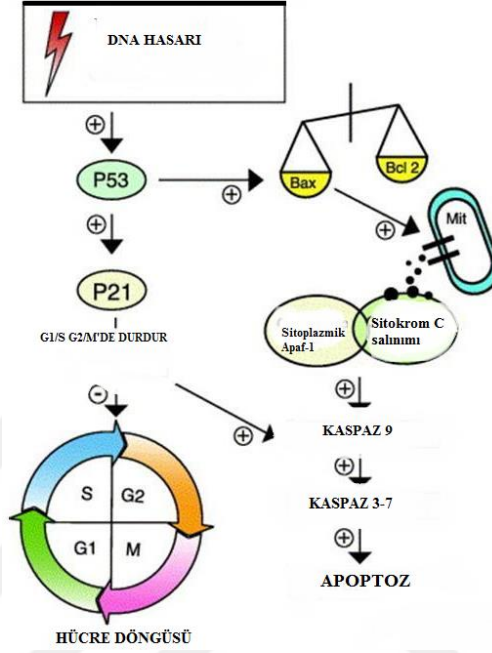
Grup II proapoptotik Bcl-2 ailesi: Apoptozisi uyarıcı özellik gösteren proteinlerdir. Bu grupta Bax, Bak, Bok/Mtd proteinleri yer almaktadır.

Grup III BH3 only-Bcl-2 ailesi: Proapoptotik etki göstererek apoptozun indüklenmesinde görev alan genleri içermektedir. Bu grupta, Bad, Bid, Bim, Bik, Hrk, Bcl-XS Noxa, Bcl-G, Nip3, Bmf ve PUMA yer almaktadır.

2.7.1.3.3 p53

p53 geni apoptozda hem iç hem dış yolda görevli almaktadır. P53'ün apoptoz mekanizmasında etkisi 2 şekilde gerçekleşmektedir: 1) hücre siklusunun durdurularak hücrede tamirin gerçekleşmesi 2) apoptotik ölüm (Çefle, 2003). Hücrede herhangi bir DNA hasarı meydana geldiğinde, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre

siklusunu G1 fazında durdurarak ve hücreye DNA hasarının tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 apoptozu indükler. Bax'ın ekspresyonunu artırması ile hücrede Bcl-2/Bax oranını değişmesi sonucu apoptotik ölüm gerçekleşir (Şekil 10) (Ulukaya, 2001).

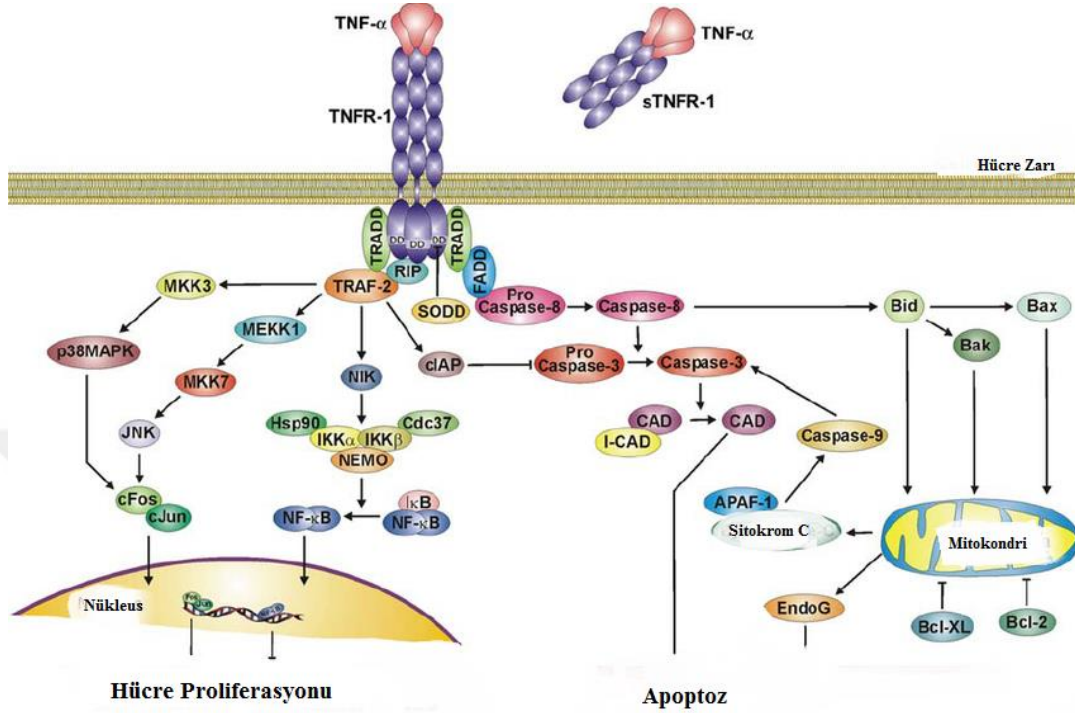


Şekil. 10: p53 geninin apoptoz mekanizmasındaki işlevi

2.7.1.3.4. Tümör Nekrozis Faktör (TNF) Ailesi

TNF ailesi, apoptoz, hücre proliferasyonu, inflamasyon, alerji ve otoimmün hastalıklarda rol alan bir gen ailesidir. TNF, biyolojik fonksiyonlarını iki farklı reseptör aracılığıyla gerçekleştirmektedir; tip 1 (TNF-R1) ve tip 2 (TNF-R2) (Aggarwal, 2000). TNF ailesi üyeleri kaspaz aktivasyonuna neden olarak ölüm reseptörleri aracılı apoptoza neden olmaktadır. Bu ailenin üyeleri; Fas (CD95,APO-1), tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR1, p55, CD120a), DR3 (Apo3, WSL-1, TRAMP, LARD), DR4, DR5 (Apo2, TRAILR2, TRICK2, KILLER), ve DR6'dır. Bu reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNRF1'dir. Bu reseptörler aktive olduklarında, hücrenin sitoplazmasında bulunan, "adaptör proteinlere" bağlanarak apoptozun başlamasında görev almaktadırlar (Şekil 11). Hepatositlerdeki apoptotik olaylar ise, hücre zarındaki ölüm reseptörlerine bağlanan farklı uyarıcılarla düzenlenir.

Hepatositlerdeki apoptotik ölümü aktive eden reseptörler, FasL, TNF- α veya TNF ilişkili apoptotik uyarıcı ligandlardır (TRAIL). (Van Horssen ve ark., 2006)



Şekil.11 TNF ailesinin hücre proliferasyonu ve apoptoz mekanizmasındaki işlevleri (Van Horssen ve ark., 2006)

2.7.1.4. Apoptoz Yolakları

2.7.1.4.1. Dış Yolak

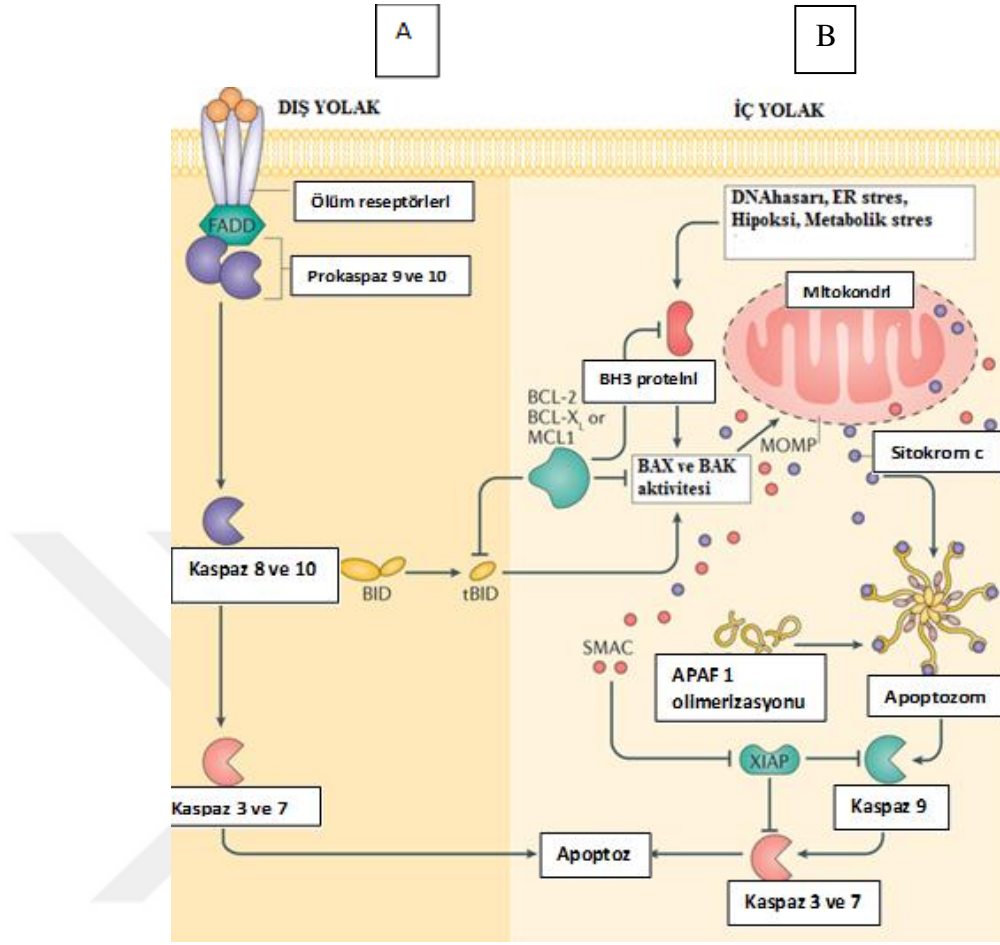
Dış yolak, hücre dışı bir uyarıcı ile aktive olmaktadır. Apoptozu başlatan sinyal yolları, transmembran reseptör etkileşimleri ile gerçekleşmektedir. Hücre dışı uyarıcılar arasında; koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), interlökin-2 (IL-2) gibi maddelerin ortamda azalması ve glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenlerin etkisi önemli yere sahiptir. (Chinnaiyan, 1999). Dış yolakta, en önemli reseptörler arasında tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör gen ailesi yer almaktadır. TNF reseptör ailesinin üyeleri sistince zengin hücre dışı alana ve "ölüm bölgesi" olarak adlandırılan yaklaşık 80 aminoasitden oluşan sitoplazmik alana sahiptirler. Bu ölüm alanı, ölüm sinyallerini hücre yüzey reseptörlerine ve hücre içine iletilmesinde büyük öneme sahiptir. Bugüne kadar en iyi tanımlanmış ligandlar ve bunlara karşılık gelen ölüm reseptörleri arasında FasL / FasR, TNF- α / TNFR1, Apo3L / DR3, Apo2L / DR4 ve Apo2L/

DR5 sayılabilir. Apoptozun dış yolağının aktivitesi FasL/ FasR ve TNF- α /TNFR1 modelleri ile karakterizedir. Bu reseptörlerin aktivitesinde, reseptör kümelenmesi ve homolog trimerik ligand ile bağlanma gerçekleşmektedir. Bu proteinler Fas ligandının Fas reseptörüne bağlanması, adaptör proteininin FADD'sinin bağlanmasına ve TNF ligandının TNF reseptörüne bağlanmasında görevlidir. Sonrasında, aktif kaspaz-8, kaspaz-10 ve kaspaz 9'un, kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi proteolitik olarak aktifleştirmesi sonucu olarak DNA fragmente olarak apoptotik ölüm gerçekleşir (Şekil 12 A).

2.7.1.4.2. İç Yolak

Apoptozu başlatan iç sinyal yolları, hücre içindeki hedeflere doğrudan etki etmek amacıyla hücre içi sinyaller üreten ve bu nedenle reseptör aracılı olmayan çeşitli uyarılar dizisini içeren mitokondri temelli ölüm yolağıdır. İç yolağı aktive eden uyarılar, pozitif veya negatif etkiye sahip hücre içi sinyaller üretmektedirler. Negatif sinyaller, bazı ölüm faktörlerinin, hormonların ve sitokinlerin yokluğunda üretilerek, apoptozun indüklenmesine yol açmaktadır. Pozitif apoptoz uyarıları arasında radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve serbest radikaller yer almaktadır.

Tüm bu uyarılar, Şekil 12 (B)'de gösterilen mitokondriyal geçirgenliğin (MPT) artmasını sağlayarak mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybedilmesine ve mitokondri intermembran boşluğundan normalde salıverilmiş pro-apoptotik proteinlerin iki ana grubunun serbest bırakılmasına neden olan iç mitokondriyal membranda değişikliklere neden olmaktadır (Festjens ve ark. 2004).

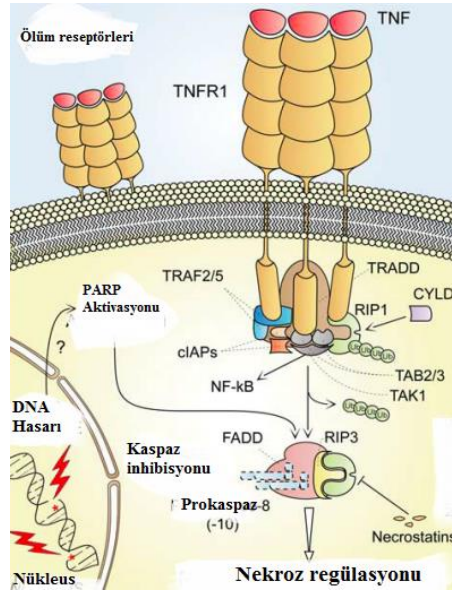


Şekil 12. Apoptozda dış yolak (A) Apoptozda iç yolak (B) (Ichim ve Tait, 2016).

2.7. Nekroz

Nekroz oksijensiz kalma, ısı değişimi, çeşitli toksinler, hücrelerde meydana gelen mutasyonlar, hücre dışından gelen fiziksel ve kimyasal etkenler sonucu hücrede görülen travmatik hücre ölüm tipidir (Walker ve ark., 1998; Nicotera ve ark., 1999, Kaya ve ark., 2012). Hücre canlılığıyla uyumlu olmayan seviyede ATP tükenmesinden kaynaklanan biyoenerjik bir olayın sonucudur. Yüksek oranda düzenlenmiş ve ayrıntılı biyokimyasal olaylar ve basamakların yer aldığı apoptozdan farklı mekanizmalarla düzenlenmektedir. Nekrozda ortaya çıkan morfolojik değişiklikler arasında hücre şişmesi, sitoplazmik vakuollerin oluşumu, bozulmuş endoplazmik retikulum, sitoplazmik kabarcıkların oluşumu, şişmiş veya parçalanmış mitokondri, ribozom, organel membranları ve lizozomlar ile karakterizedir. Hücre membranının parçalanması ve hücrelerin lizisi gözlenmektedir.

Yapılan tanımlar sonucunda nekrozun bir kaza sonucu meydana geldiği düşünülmektedir, fakat nekrozda programlanmış hücre ölüm yolları ile gerçekleşebilmektedir. Bunlarda ilki nekroptoz, sanıldığından daha düzenli bir mekanizma olup hücre yüzey reseptörleri ile başlatılmaktadır. Bunlardan biri olan TNF; bir dizi hücre dışı uyarı meydana getirip ile apoptotik olmayan hücre ölümünü sağlamaktadır (Şekil 13). Bu yolda Fas, TNF reseptörlerinin aktivasyonu veya hücrel stres sonucu RIP1 ve RIP3 (Receptor interacting proteinler) aktive olur. Sonrasında RIP1 ve RIP3 mitokondriyi aktive ederek ya da NADPH oksidazın oluşturduğu ROS ile dolaylı olarak etkileyip nekrozu indüklemektedir. Nekrotik uyarı ayrıca PARP'i aktive etmekte olup PARP1 ile kalpain aktivasyonu, RIP kinazların aktivasyonu ya da PAR polimerazlar ile nekroza yol açmaktadır. Bcl-2 ailesi proteini Nix ise endoplazmik retikülünden Ca^{++} salınımına neden olmaktadır. Kalsiyum, endoplazmik retikülüne yakın olan mitokondriyon matriksine geçer ve mitokondriyal porların açılmasına neden olur. RIP kinazlar da ROS üretimini elektron transport zinciri yoluyla sağlarlar. Aşırı Ca^{++} ve ROS artışı porun uzun süre açık kalmasına neden olur. Bu durumda hücre oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretilmemesine ve nekroza yol açmaktadır (Coşkun ve Özgür, 2011).



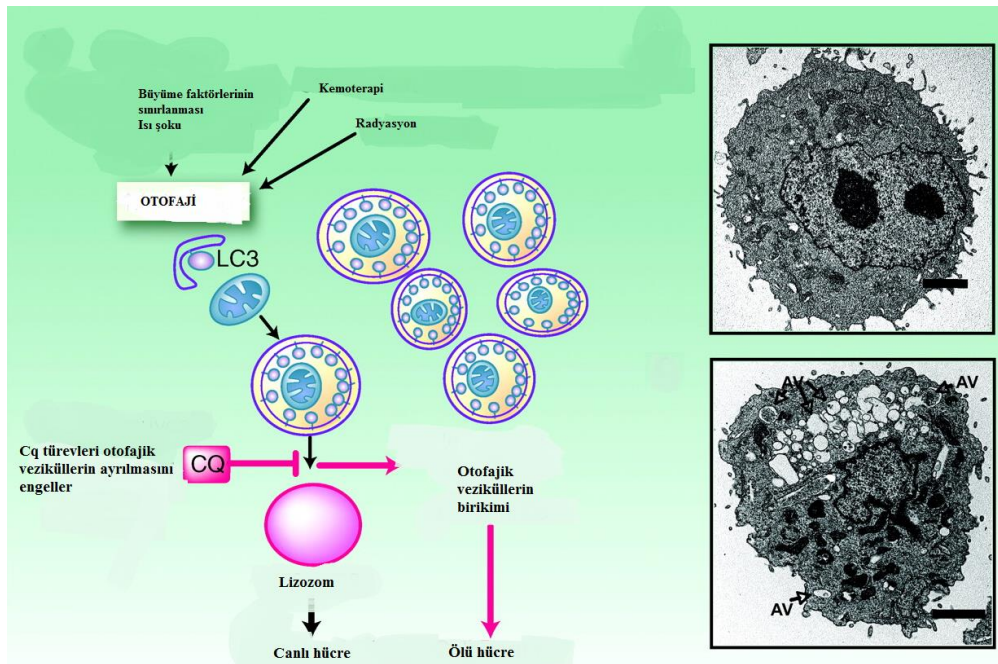
Şekil 13. Nekrozun düzenlenmesi (Türkçapar, 2012)

Kanser hücrelerinde de meydana gelen nekrotik ölümün, hastalara uygulanan antikanser tedavi sonrasında tümör hücrelerine karşı bağışıklık sisteminin aktivitesinde

veya tümör hücreleri üzerinde uyarıcı etki sağlayarak daha agresif hücrelerin meydana gelmesinde rol alabileceği belirtilmektedir (Proskuryakov ve Gabai, 2010).

2.8. Otofaji

Otofaji açlığa veya strese verilen hücrel bir tepkidir, hücre içi proteinleri ve organellerin lizozomlarda parçalanmasına dayanmaktadır. Diğer bir deyişle hasarlı veya gereksiz proteinlerin ve organellerin yıkımı için hücrel bir süreçtir. Kısa ömürlü proteinler ubiquitin-proteozom sisteminde parçalanmasına rağmen, uzun ömürlü proteinler ve hücre içi organeller otofaji ile parçalanmaktadır ve oluşan yapı taşları hücre kullanımı için yeniden kazandırılmaktadır. Diğer yandan, otofaji sonucu hücrelerde ölüme gözlenmektedir. "Otofajik hücre ölümü" olarak adlandırılan ölüm yolağı başka bir "aktif" programlı bir ölüm tipi olarak ileri sürülmektedir. Otofajik hücre ölümünde genellikle çok sayıda otofagozomların ve aktif otofajik özelliklerinin eşlik ettiği gözlemlenmiştir (Yonekawa ve Thorburn, 2013). Otofajik ölüm sırasında meydana gelen morfolojik değişiklikler mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi organellerin ve/veya sitoplazmanın bir kısmının çift veya çok membranlı veziküller içine alınması ile karakterizedir (Şekil 10). Bu veziküller lizozomlar ile birleşerek lizozomal enzimler tarafından deşredildikleri için, bu ölüm yolağına hücrenin kendi kendini yemesi anlamına gelen otofaji denmektedir (Gözüaçık, 2017)



Şekil. 10 Otofajik hücre ölümü (Amaravadi ve Thompson, 2007).

Otofaji üç farklı şekilde gerçekleşebilir.

- Mikro otofaji: Küçük parçacıkların membranda yardımıyla lizozom içine alınıp degradasyona uğratılmasıdır.
- Makro otofaji: Otofajik hücre ölümünü oluşturan temel mekanizmadır. Daha büyük parçacıkların, organellerin otofagozom içine alınıp daha sonra lizozomlarla birleşerek meydana gelen degradasyondur.
- Şapheron aracılı otofaji: Belli bir peptid dizisine sahip sitozolik proteinlerin moleküler şapheronlarla kompleks olan Hsp73 tarafından tanınması ve lizozomlara taşınmasıdır.

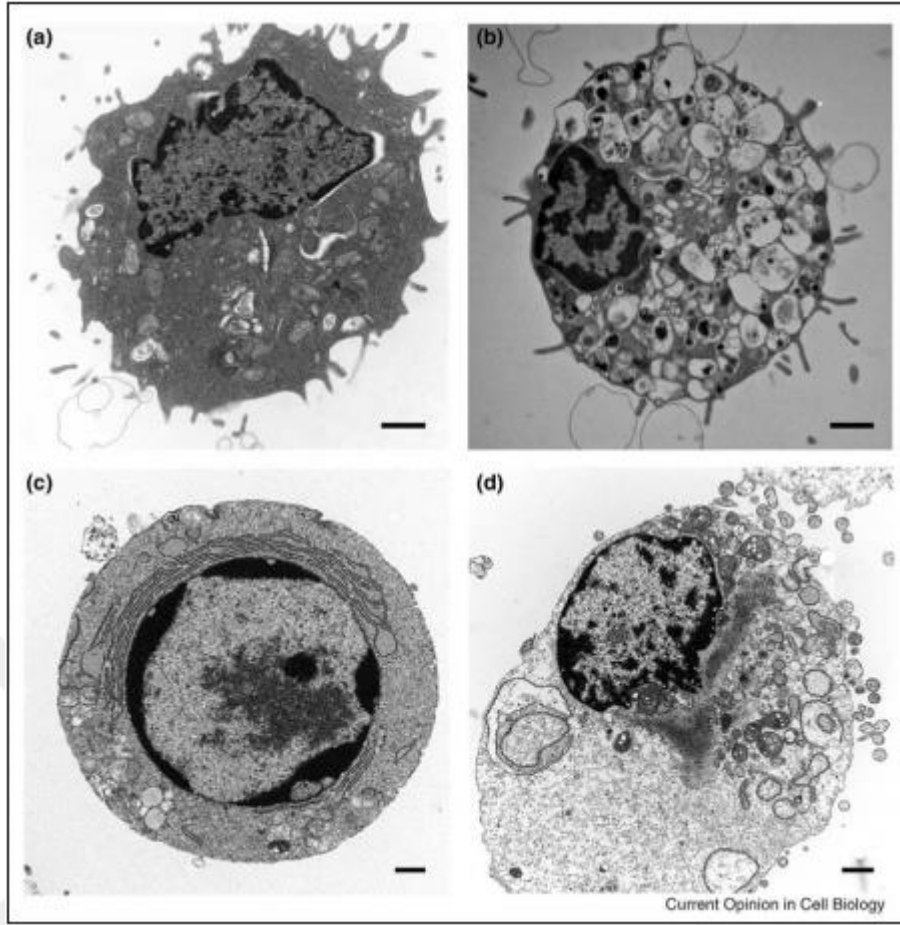
Son yıllarda yapılan çalışmalarda otofajinin apoptoz ile ilişkisi üzerine ve bir ölüm yolağı olarak özellikle kanser gibi hastalıklarda yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalara odaklanılmaktadır (Gözüaçık, 2017).

2.9. Apoptoz, Nekroz ve Otofaji Arasındaki Farklar

Kanser hücrelerinde temel olarak rol alan apoptoz, nekroz ve otofaji arasında temel farklılıklar Tablo 4'te ve Şekil 11'de özetlenmiştir.

Tablo 4. Apoptoz, nekroz ve otofaji ölüm yollarının karşılaştırılması

APOPTOZ	NEKROZ	OTOFAJİ
<ul style="list-style-type: none">• Büyüme faktörü eksikliği,• Hücre yaşlanması, İmmun sistem hastalıkları, Kanser ilaçları,• Radyasyon, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu gibi nedenlerle meydana gelir.• Hücre küçülmesi ve kromatin yoğunlaşması gözlenir.• Apoptotik tomurcuklar gözlenir.• Organellerde hasar bulunmaz. Apoptotik cisimcikler oluşur.• Programlıdır bir mekanizmadır.• Gerçekleşirken ATP'ye ihtiyaç duyulur.• DNA kırıkları meydana gelir ve merdiven şeklini alır, agoroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsünü verir.• Fizyolojik olarak meydana gelir.• Enflamasyon yoktur	<ul style="list-style-type: none">• İskemi, Hipertermi, Hipoksi, viral enfeksiyonlar, Toksik maddeler, Ağır metaller, Şiddetli oksidatif stres,• Membran bütünlüğü yoktur.• Hücrede vakuolleşme gözlenir.• Organeller parçalanır,• Hücre lizisi meydana gelir.• İyon dengesi bozulmaktadır.• ATP'ye ihtiyaç duyulmaz.• DNA rastgele parçalanır ve agoroz jel elektroforezinde smearli bir görüntü vardır.• Patolojik olarak meydana gelir.• Enflamasyon vardır.	<ul style="list-style-type: none">• Besin yetersizliği,• Hatalı protein üretimi,• ATP miktarında azalma nedenleriyle meydana gelir.• Mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi organeller ve/veya sitoplazmanın bir kısmının çift veya çok membranlı veziküller içine alınmaktadır. Bu veziküller lizozomlarla kaynaşır ve aynı hücrenin lizozomal enzimleri tarafından degrade olur.• Kromatin yoğunlaşması son aşamalarında gözlenir.• DNA kırıkları oluşmaz.• ATP seviyelerini düzeltmek için indüklenir.• Fizyolojik olarak meydana gelir.



Şekil. 11 a. Normal hücre b. Otofajik hücre c. Apoptotik hücre d. Nekrotik hücre (Edinger ve Thampson, 2004).

2.10. Bitkisel Bileşiklerin Kanser Tedavilerinde Rolü

Şifalı otlar ve bunların türevi diğer bitkisel ürünler kanser için alternatif tamamlayıcı bir tedavi biçimi olarak kabul edilmektedir. Bitkisel ilaçların halk tarafından güvenli olduğu ve az yan etkiye sahip olduğuna inanılmaktadır. Kanser hastalarında yapılan bir araştırmada, bitkisel kökenli ilaçların kullanımının, kanser teşhisi konmadan % 5.3' den az bir oranda kullanılmasına rağmen, kanser tanısı konduktan sonra bu oranın % 13.9' a yükseldiği belirtilmiştir (Molassiotis ve ark., 2005). İngiltere'de yapılan bir ankette ise, kanser hastalarının yaklaşık % 25'inin bir bitkisel tıbbi danışmana başvurdukları tespit edilmiştir. Bu nedenle kanser tedavisinde alternatif bir tedavi seçeneği olarak bitkisel özütlerin veya bitkilerde bulunan kimyasal bileşenlerin kullanılması mevcut tedavi yöntemlerinin sahip olduğu dezavantajlarının azaltılması amacıyla önem kazanmaktadır. Ancak, bitkisel bileşenlerin sahip olduğu toksik etkilerin belirlenmesi ve kanser hücrelerinde etkili olduğu mekanizmaların

araştırılması ile ilgili detaylı çalışmaların gerçekleştirilmesi gereklidir (Rees ve ark., 2000).

Bitkilerden izole edilen doğal bileşikler, kanser tedavisi için zengin bir terapötik etken madde kaynağı sağlamıştır. Genellikle karasal bitkilerde ekstrakte edilen ve tanımlanan bileşikler arasında polifenoller, brasinosteroidler ve taksoller antikanser özellikleri nedeniyle dikkat çekmektedir (Desai ve ark., 2008). Farklı bitkilerden izole edilen bitkisel bileşenlerin farklı kanser hücre hatlarında sitotoksik etkilerinin araştırıldığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar literatürde mevcuttur (Aiyar ve ark., 2010, Encalada ve ark., 2011, Zhu ve ark., 2016). Ancak kanser hücrelerinde bitkisel bileşiklerinin etkilerinin araştırıldığı çalışmalar içerisinde sağlıklı hücrelerde de etkilerinin belirlendiği çalışmalar sınırlı sayıdadır ve bu konuda detaylı çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

HSK' da tedavi seçeneklerinin kısıtlı ve tedaviye yanıtın düşük olması sebebiyle son araştırmalarda bitkisel içeriklere ve özütlere odaklanılmaktadır. Tıbbi bitkilerden üç tanesi Çin, Japonya ve Asya'nın diğer bölgelerinde HSK tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır, *Salvia miltiorriza* (adaçayı) *Astragalus membranaceus* ve *Spatholobus suberectus* bitkilerinin de bulunduğu bir karışım ise HSK' lı bir hasta grubu üzerinde etkileri araştırılmış ve hastalarda klinik anlamda iyileşme olduğu ve karaciğer fibrozu üzerinde olumlu etkileri olduğu belirtilmiştir (Wang ve ark., 1998) Ayrıca, bazı bitkisel ilaçların HSK tedavisinde uygulanan kemoterapisi sırasında meydana gelen yan etkileri azalttığı da belirtilmektedir. Sonuç olarak, HSK tedavisinde kullanılan kemoterapik ajanların terapötik etkinliğinin daha düşük konsantrasyonlarda sağlanmasında ve bu ajanların neden olduğu ağır yan etkilerin hafifletilmesi amacıyla, kemoterapik ajanlar ile birlikte bitkisel bileşiklerin kombin tedavi olarak kullanılması son yıllarda yapılan kanser araştırmalarında odak noktası haline gelmiştir.

2.11. Üsnik Asit

Likenler, ilaç amaçlı kullanılabilen benzersiz kimyasallar üreten simbiyotik organizmalardır. Yapılan araştırmalar sonucunda yapısı bilinen liken maddelerinin sayısı 1000'e ulaşmıştır (Miao ve ark., 2001). Likenlerde etkin maddeler olarak

aminoasit türevleri, şeker alkolleri, alifatik asitler, γ , δ - ve makrosiklik laktonlar, monosiklik aromatik bileşikler, kinonlar, kromonlar, ksantonlar, dibenzofuranlar, depsidler, depsidonlar, depsonlar, terpenoidler steroidler ve karotenoidler gibi sayılabilir (Oran, 2006). Bu nedenle, dünyada olduğu gibi Türkiye’de de tıbbi açıdan önemli, farmasötik özelliği olan bitkiler gibi likenlerde halk arasında yüzyıllardan beri hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.

Liken sekonder metaboliti olarak en fazla çalışılan usnik asittir. Usnik asit [2,6-diasetil 7,9-dihidroksi-8,9b-dimetil-1,3(2H9bH)-dibenzofurandion] 1844’de likenden ilk izolasyonundan bu yana üzerinde en çok çalışılan ve ticari olarak üretilen liken metaboliti olmuştur (Şekil 12) (Culberson, 1970). Saf usnik asit krem, diş macunu, deodorant, güneş koruma ürünlerinde aktif bileşen veya koruyucu madde olarak ilaç, parfümeri ve kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır. Ayrıca liken metabolitlerinin özellikle gram-pozitif bakterilere ve bazı funguslara antagonist aktivite gösterdiği belirtilmektedir (Mitrović ve ark, 2011; Knop, 1944).



yapısı. (Koçer, 2012)

Şekil 12 A. Usnea likeni B. Üsnik asidin kimyasal

Üsnik asit anti-kanserojen özelliğinden dolayı son yıllarda kanser çalışmalarında dikkat çekmektedir ve usnik asidin sitotoksik, apoptotik ve otofajik etkisinin belirlendiği çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalar literatürde mevcuttur (Ahmadjian ve Hale, 1973; Manojlovic ve ark., 2002). Mayer ve ark. 2005 yılında MCF7 ve MDA-MB-231 meme hücre hatları ve H1299 akciğer hücre hattıyla yaptıkları çalışma

sonucunda üsrik asidin anti-proliferatif etkisi kanıtlanmış olup yapılan çalışmayla genotoksik hasar vermediği ve bu sebepten iyi bir kanser ajanı olarak kullanılabilceği vurgulanmıştır. Bununla birlikte yapılan diğerk çalışmalar da cilt keratinositleri, fibroblastlar, periferik kan lenfositleri ve sıçan hepatositleri gibi normal hücre hatlarında anti-proliferatif etki göstermiştir (Mayer ve ark., 2005). Meme hücre hattı T-47D ve pankreas kanseri hücre hattı Capan-2 ile yapılan deneylerde üsrik asidin hücre büyümesi, DNA sentezi ve hücre döngüsünün S-fazına üzerindeki etkisi tespit edilmiştir (Einarsdótti ve ark., 2010). Over karsinoma hücre hattı A2780 ve kolon karsinoma hücre hattı HT-29 ile yapılan bir çalışmada HT-29 hücre hatlarında kaspaz -3 aktivasyonu ve fosfatidilserin üzerinde etkisi belirlenmiş ve hem A2780, hemde HT-29 hücre hattında mitokondriyal membran potansiyelinde anlamlı bir değışime neden olduğu analiz edilmiştir (Bačkorová ve ark., 2012).

Sonuç olarak, üsrik asidin farklı kanser hücrelerinde potansiyel terapötik etkisi belirlendiği farklı çalışmalar literatürde mevcut olmasına rağmen, herhangi bir kemoterapik ajanla kombin tedavi de potansiyel etkisinin belirlendiği herhangi bir çalışma mevcut değildir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

- -150°C derin dondurucu (Panasonic, Japonya)
- -20°C derin dondurucu (Bosch, Türkiye)
- Buzdolabı (Samsung, Türkiye)
- Hassas terazi (A&D Company, Japonya)
- Hassas terazi (Radwag, ABD)
- Santrifüj (Nüve NF 800, Türkiye)
- Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter, ABD)
- Su banyosu (Nüve, Türkiye)
- Vorteks (VELP Scientifica, İtalya)
- Orbital Shaker (Cleaver Scientific, Birleşik Krallık)
- CO₂ inkübatör (Panasonic, Japonya)
- Işık mikroskop (Olympus, Japonya)
- İverted mikroskop (Euromex, Hollanda)
- Muse® Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya)

3.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose, With 4500 mg/L glucose, L-glutamine, sodium pyruvate, and sodium bicarbonate, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture, 500ML (Sigma- Aldrich)
- RPMI 1640 with L-glutamine (Lonza)
- Fetal Bovine Serum 500 ML (GIBKO)
- PBS 1X, w/o calcium and magnesium,500m (Wisent)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- Trypsin-EDTA solution 0.25%, (Sigma- Aldrich)
- Antibiotic Antimycotic Solution 100 ML (Sigma- Aldrich)

- WST-1 Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay Kit 100 reaksiyonluk (Boster)
- Muse® Cell Cycle Assay Kit 100 reaksiyonluk (Millipore)
- Muse® Annexin V and Dead Cell Assay Kit 100 reaksiyonluk (Millipore)
- Acridine Orange - (Thermo Fisher Scientific)
- Ethidium Bromide Solution, 10 mg/ml (Vivantis)
- Glutaraldehyde (Sigma-Aldrich)
- Trypan Blue Solution, (Thermo Fisher Scientific)
- Usnic acid 5g (Sigma- Aldrich)
- BAY 43-9006 Free base Sorafenib 25 mg (Biovision)

3.3. Hücre Kültürü

3.3.1. Hücre Hatlarının Temini ve Hücrelerin Özellikleri

Bu çalışmada kullanılan HSK hücre hatları, SNU-449 ve Hep G2 Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet Öztürk tarafından hediye edildi. Kontrol hücre hattı olarak ise endotelial hücre olan Human Umbilical Vein Endotelial Cells (HUVEC) American Type Culture Collection (ATCC, ABD)'den uygun şartlarda temin edildi ve -150°C'de saklandı. Kullanılan SNU-449 hücre hattı viral hepatit B virüsü barındıran SOR ve UA'ya duyarlı olan hücre hattıdır. Kullanılan bir diğer hücre hattı olan HEP G2'de ise viral DNA enfeksiyonu bulunmamaktadır.

3.3.2 Besiyerlerinin Hazırlanması ve İnkübasyon Koşulları

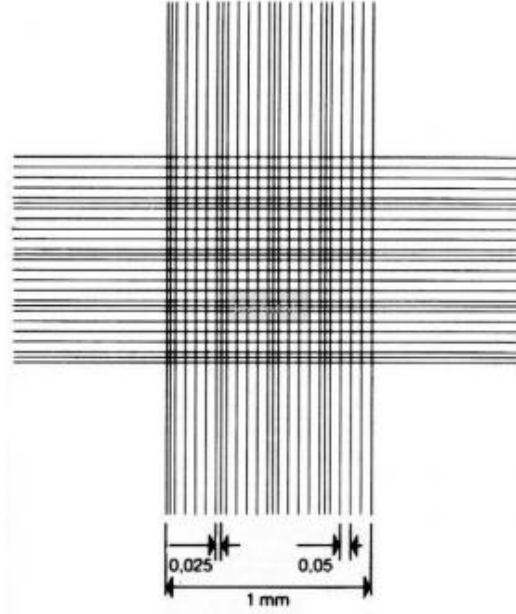
SNU-449 hücre hattına uygun olan besiyeri, sodyum bikarbonat ve L-glutamin içeren RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) medium, % 10 fetal bovine serum (FBS), 10.000 unite/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin eklenerek hazırlandı. Hep G2 ve HUVEC hücre hatlarına uygun olan besiyeri, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) medium içerisinde % 10 fetal bovine serum (FBS), 10.000 unite/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin eklenerek hazırlandı. HEP G2, SNU-449 ve HUVEC hücreleri uygun besiyerleri içerisinde , % 5 CO₂ ve 37°C sıcaklıktaki etüvde 25 cm² 'lik flâsklar içerisinde steril şartlarda inkübe edildi.

3.3.3 Hücrelerin Pasajlanması

Üremekte olan hücre pasajları % 80-90 doyumluğa ulaşınca yeniden pasajlandı. Bu amaçla üremekte olan hücreler istenen çoğunluğa ulaştığında flaskaların içerisindeki besiyeri pipetle alınarak steril fostat tampon solüsyonu (PBS) (25 cm² için 2 ml) ile yıkandı. Ardından PBS pipetle uzaklaştırıldı ve hücrelerin yapıştıkları alandan kaldırılması için 3 ml 1X Tripsin/EDTA solüsyonu ilave edilerek etüvde 5 - 10 dk bekletildi. Tüm yüzeye yapışık olan hücrelerin kaldırılmasının ardından süspansiyon halindeki hücre solüsyonu 15 ml hacimli bir tüp içerisine alındı. Solüsyonun üzerine tripsinin inhibisyonu için tripsin hacminin 2 katı medyum eklendi. Tüpe alınan süspansiyon 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi, ardından tripsin EDTA solüsyonu uzaklaştırıldı ve hücreler taze hücre medyumunu ile süspansiyon edilerek hücre yoğunluğuna uygun olarak 25 cm² 'lik flaska bölünüp yeniden pasajlandı. Yeniden pasajlanan hücreler 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edildi.

3.3.4 Hücrelerin Sayımı, Dondurulması ve Saklanması

Tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırılan hücreler santrifüj edildi ve tripsin besiyerinden uzaklaştırıldı. Sonra hücre pelleti 1 ml besiyeri ile sulandırıldı ve sulandırılan hücre pelletinden 10 µl endorf tüpe konuldu ve üzerine 90 µl tripan blue boyası eklendi. 10 µl hücre/tripan mavi karışımı pipetle çekildi ve pipet ucuyla lamele emdirilerek thoma lamının kenarından aktarıldı Şekil 3.1'de gösterildiği gibi, sadece merkezde çizgilerin keşiştiği 1 mm² 'lik alandaki 16 karenin içindeki canlı hücreler sayıldı. Sayım 3 tekrarlı yapıldı ve ortalamaları alındı.

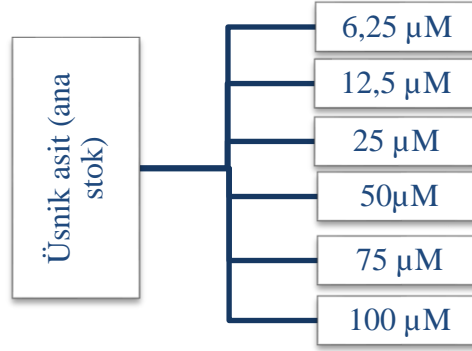


Şekil. 13 Thoma lamının sayım yapılan yüzeyi

Dondurma tüpleri içerisine 100 μ l DMSO ve 900 μ l hücre medyumunu ile süspanse edilen hücre solüsyonu eklendi. Tüpler dondurma kabına yerleştirilerek -150 C’de derin dondurucuda gerektiğinde kullanılmak üzere saklandı. Bu şekilde stoklanan hücreler gerektiğinde hızlıca 37°C’de çözülüp, üzerine 3 ml besi yeri ilave edilerek santrifüj edildi. Süpernatant atılıp, hücre pelleti tekrar 1 ml besi yerinde çözülerek, 25 cm² flaskta pasajlandı.

3.3.5 Üsnik Asit Stoğunun Hazırlanması

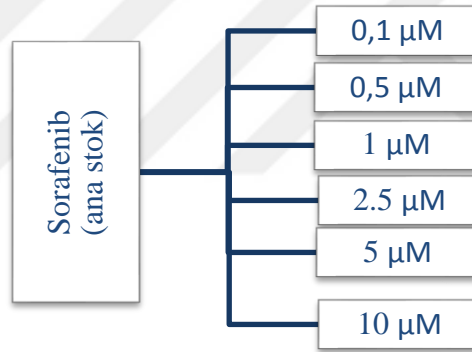
Saf olarak izole edilmiş olan Usnic acid 5g (Sigma- Aldrich) olarak satın alındı. Stoklar 0,0145 M konsantrasyon olacak şekilde DMSO içerisinde çözülerek ana stok solüsyonu hazırlandı. Stok solüsyon steril ortamda hazırlanmış olup -20°C’ de saklandı. Litaretür taraması sonucunda ana stoktan 0-100 μ M arasında 6 farklı konstrantrasyon belirlenmiştir (Sahu ve ark., 2011).



Şekil 14. Çalışmada uygulanan UA konsantrasyonları

3.3.6. Sorafenib Stoğunun Hazırlanması

Steril ortamda 25 mg sorafenib 1mL DMSO içerisinde çözündü ve 100'er µL alikodlanarak -20°C' de saklandı. Daha sonra literatür araştırması sonucunda ara stok konsantrasyonları belirlenerek hazırlandı (Wang ve ark., 2014).

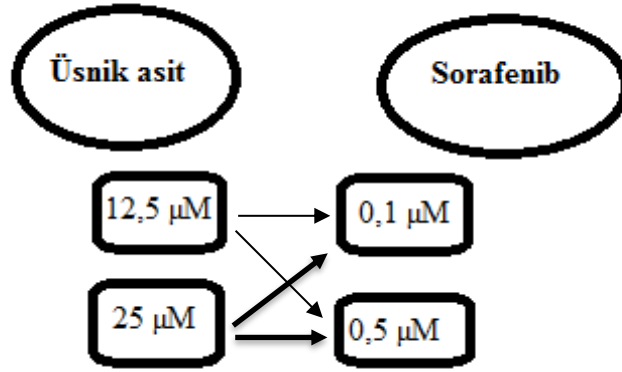


Şekil 15. Çalışmada uygulanan SOR konsantrasyonları

Uygulama süresi literatür araştırmasına dayanarak üsniik asit için 12, 24 ve 48 saat, sorafenib için 12, 24, 48 saat olarak belirlendi. Kontrol grubundaki hücreler üsniik asit ve sorafenib uygulanmadan aynı sürelerde kültürde bekletildi.

3.3.7. SOR ve UA Kombinasyonu

WST-1 testleri sonuçlarına göre üsniik asit ve sorafenibin hücrelerdeki sitotoksik etkisinin en fazla olduğu doz ve saatleri belirlendi. Sorafenibin sitotoksik etkisini azaltılması amaçlanarak doz kombinasyonları belirlendi.

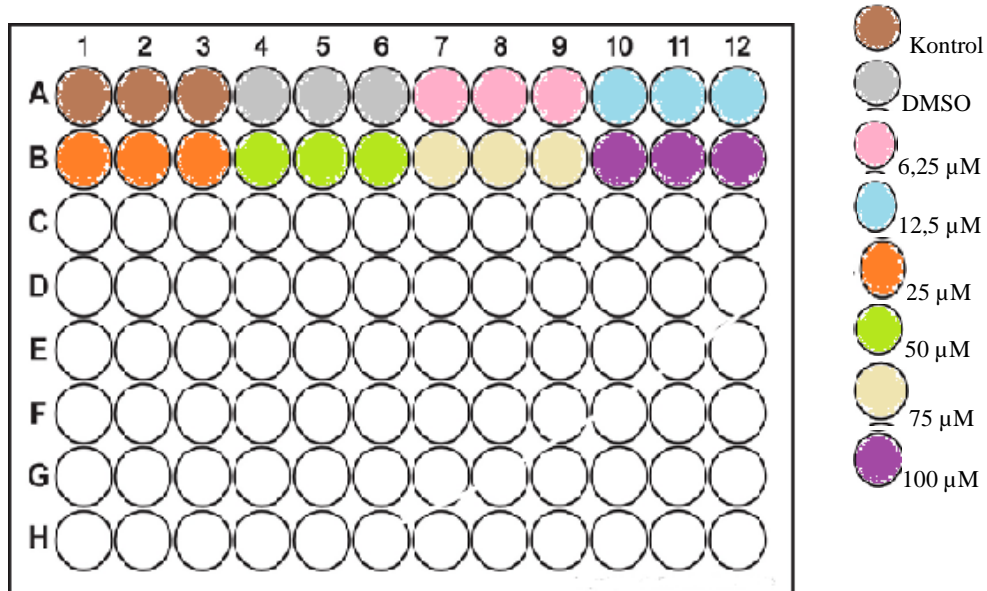


Şekil 16. Çalışmada uygulanan SOR ve UA kombin konsantrasyonları

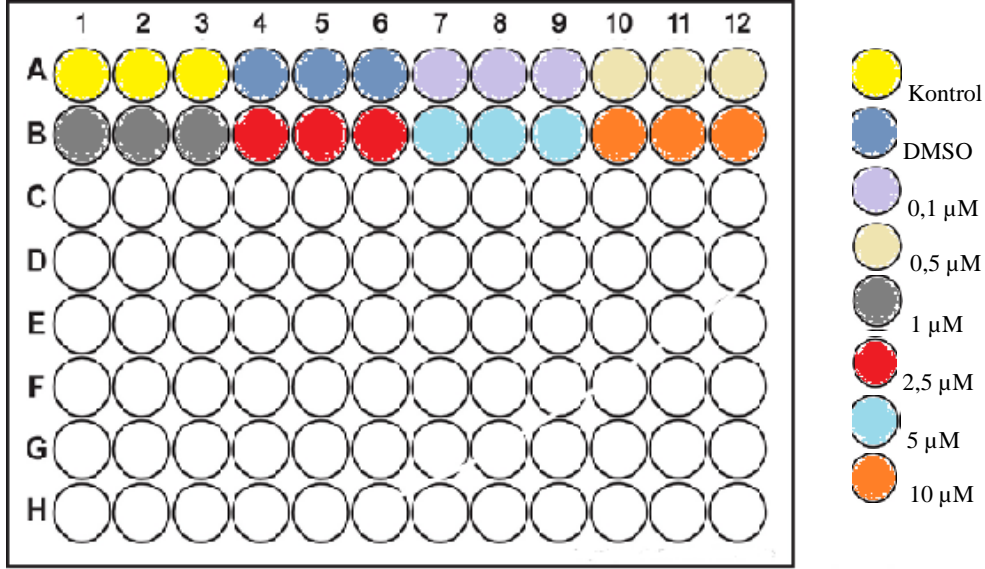
3.3 Hücre Proliferasyonu Analizleri

3.3.1 WST-1 Testi

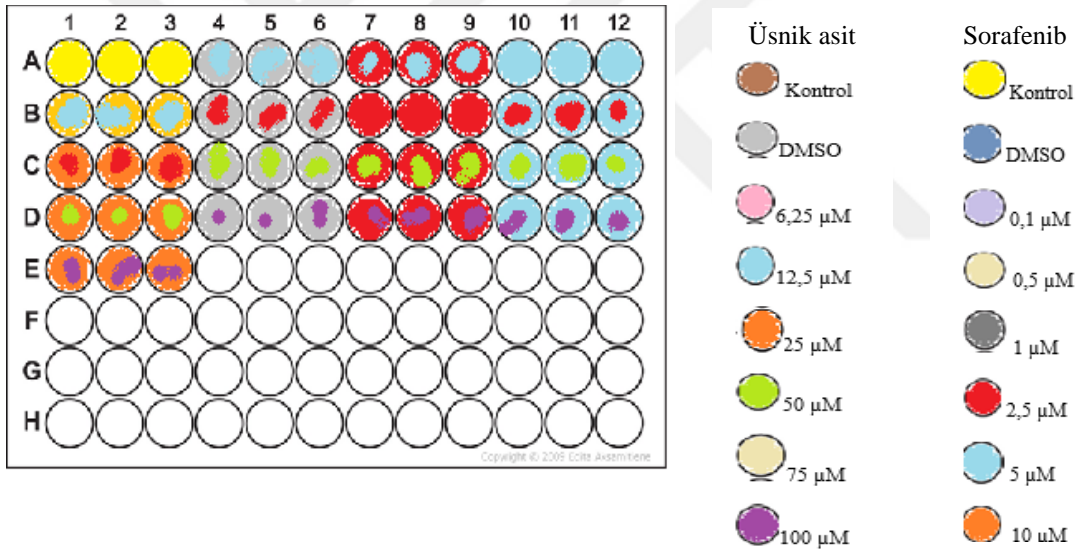
WST-1 reaktifi, hüresel enzimlerle suda çözünür formazana indirgenir. Canlı hücre sayısındaki artış örneklerdeki mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesinde artmaya yol açmaktadır. Metabolik aktivitesi artan hücrelerle doğrudan korele olarak formazan ile boyanan hücre formunda artış meydana gelmektedir. WST-1 zamanının standart inkübasyon süresi 2 – 6 saattir. Sonrasında spektrofotometre ile belirtilen dalga boyunda boyanan hücrelerin absorbansı ölçülmektedir. (Yin ve ark., 2013)



Şekil 17. UA için WST-1 testi plak planı



Şekil 18. SOR için WST-1 testi plak planı



Şekil 19. Kombinasyonlar için WST-1 testi plak planı

Hücreler 96 kuyucuklu plaklara ekildi. Hücre sayıları HEP G2 hücre hattı için 4×10^4 (Wang ve ark., 2014) SNU-449 hücre hattı için 4×10^3 (Toh ve ark., 2011) HUVEC hücre hattı için 5×10^3 (Wang ve ark., 2015) hücre olacak şekilde toplam hacmi 100 µl olan hücre süspansiyonu eklendi. 37°C , % 5 CO_2 içeren inkübatörde 1 gün inkübe edildikten sonra bölüm 3.2.5 3.2.6' da belirtilen konsantrasyonlarda doz uygulamaları yapıldı. Her bir grup için 3 tekrarlı ekim ve doz uygulaması yapıldı. Hücre kültürü plak planı Şekil 17 ve Şekil 18 ' de gösterildi

- Belirtilen saatler sonunda her bir kuyucuk için 10 µl WST-1 solüsyonu eklendi

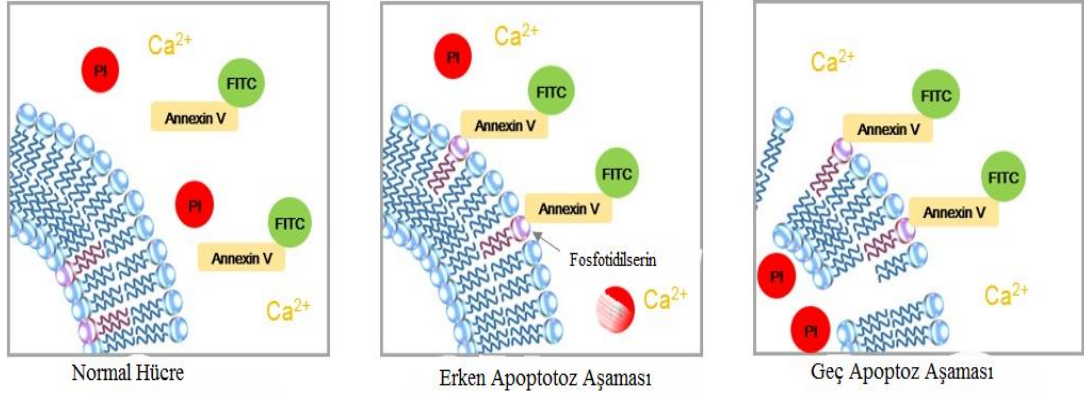
- Plaklar 2 saat 37°C ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildikten sonra TriStar² S LB 942 Modular Monochromator Multimode Reader spektrofotometre cihazı ile 460-620 nm' de ölçüm yapıldı.

WST-1 analizleri sonucunda üsrik asit için 12,5 µM, 25 µM, 50 µM ve 100 µM konsantrasyonları sorafenib için 1 µM, 2,5 µM, 5 µM ve 10 µM konsantrasyonları etkili bulundu ve bundan sonraki analizler bu konsantrasyonlar kullanıldı.

3.4. Apoptozun Belirlenmesi

3.4.1. Annexin V

Apoptoz başladıktan sonra, iç hücre zarındaki fosfatidilserin, lipid çift katmanının hücre zarı boyunca göç eder. Şekil 20. 'de gösterilen Annexin V, spesifik olarak protein bağımlı Ca iyonu varlığında fosfatidilserine bağlanmaktadır. Floresanla işaretlenmiş Annexin V kullanılarak, apoptotik hücreler akış sitometresi veya floresan mikroskopi ile belirlenmektedir. Annexin V yöntemi sayesinde apoptotik yola giren hücreler henüz membran bütünlüklerini kaybetmeden erken apoptoz aşamasında tespit edilebilmektedir (Shounan ve ark., 1998). Bunun yanında nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Annexin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Boyama sonucu Annexin V-FITC (green fluorescence) ve non-vital boya olan propidium iodide (red fluorescence) ile boyanan hücreler ayırt edilmektedir (Güleş ve Eren, 2008).



Şekil 20. Annexin V yöntemi ile apoptoz aşamaları (Anonim, 2017).

Altı kuyulu plakalara her hücreden her doz için 1×10^5 ekim yapıldı ve 1 mL besiyeri eklendi. Hücreler 37°C , % 5 CO_2 içeren inkübatörde 1 gün inkübe edildikten sonra belirlenen konsantrasyonlarda uygulamalar yapıldı. Minimum (12 saat) ve maksimum (48 saat) sürelerin sonunda hücreler tripsin ile kaldırıldı ve santrifüj işleminden sonra 2 kez PBS ile yıkama yapıldı. Sonrasında süspansiyon halindeki hücrelere her tüp için 100 μL Muse® Annexin V and Dead Cell Assay Kit boyası olan Annexin V reaktifi eklendi. 30' dk oda sıcaklığında bekletildi ve Muse™ Cell Analyzer cihazında analizler alındı.

3.4.2 Acridine Orange-Etidyum Bromür (AO / EB) Floresan Boyaması

Acridine orange, hem canlı hem de canlı olmayan hücreler tarafından absorbe edilmektedir ve RNA veya DNA'ya bağlandığında yeşil floresan yaymaktadır. Etidyum bromür ise yalnızca ölü hücreler tarafından absorbe olur ve DNA'ya interkalasyon ile kırmızı floresan yaymaktadır. Boyama işlemi gerçekleştikten sonra dört tip hücrenin analizi gerçekleştirilebilmektedir. Bunlar;

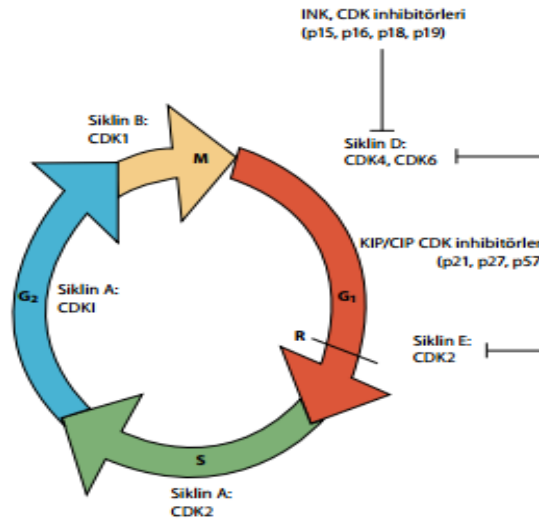
- Canlı hücreler: organize yapıya sahip düz parlak yeşil çekirdeğe sahiptirler.
- Erken apoptotik hücreler: Hala sağlam zarlara sahip olup DNA hasarının görüldüğü yeşil çekirdeklere sahiptirler. Ancak kromatin yoğunlaşması parlak yeşil fragmanlar olarak görülmektedir
- Geç apoptotik hücreler: turuncu- kırmızı renk çekirdeğe, ve fragmente olmuş kromatine sahiptirler.

- Nekrotik hücreler: Yuvarlak kırmızı nükleusa sahiptir ve organize yapıdaki hücrelerdir.

Altı kuyulu plakalara her hücreden 5×10^5 ekim yapıldı ve 1 mL besiyeri eklendi. Hücreler 37°C , % 5 CO_2 içeren inkübatörde 1 gün inkübe edildikten sonra belirlenen konsantrasyonlarda uygulama yapıldı. Minimum (12 saat) ve maksimum (48 saat) sürelerin sonunda hücreler % 4 paraformaldehit ile 15 dk fikse edildi. İki kez PBS ile yıkama yapıldıktan sonra AO / EB boya solüsyonundan 1 mL eklenerek 30 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra Thermo Scientific Fluroscan Ascent FL ile görüntülendi.

3.5 Hücre Döngüsü Analizi

Hücre döngüsü çeşitli evrelerden oluşmakta olup evrelerde kontrol noktaları bulunmaktadır. G1 evresinde DNA bütünlüğü, G2 evresinde S evresindeki DNA replikasyonunun doğruluğu, M evresinde ise bütün kromozomların mitotik iğlere bağlanması ve düzgün şekilde ayrılarak yavru hücrelere dağılması kontrol edilmektedir. Mitozun devam etmesinde siklin bağımlı kinaz (CDK)'lar, onları aktive eden siklinler ve inhibe eden CDK inhibitörleri ile CDK etkileşimli protein/kinaz inhibitörü protein (CIP/KIP) ailesinden inhibitörler görev almaktadır.



Şekil 21. Hücre döngüsü ve kontrol noktaları (Terzioğlu ve ark., 2013)

Hücre bölünme hızı kanser hücrelerinde tümör ikilenme zamanı belirlenebilmek için önemli olup bununla birlikte antikanser ilaçların kanser hücrelerini hücre döngüsünün hangi evresinde etkili olduğu tespit edilmesi için önemlidir (Terzioğlu ve ark., 2013). Muse™ Cell Cycle Kitinde bulunan reaktif propidium iyodür (PI) ve RNAaz A içeren bir karışımdır. Hücre siklusunun farklı fazlarında hücrelerin ayrılmasını sağlayarak hücrelerin hangi fazlarda bulunduğunu tespit etmektedir.

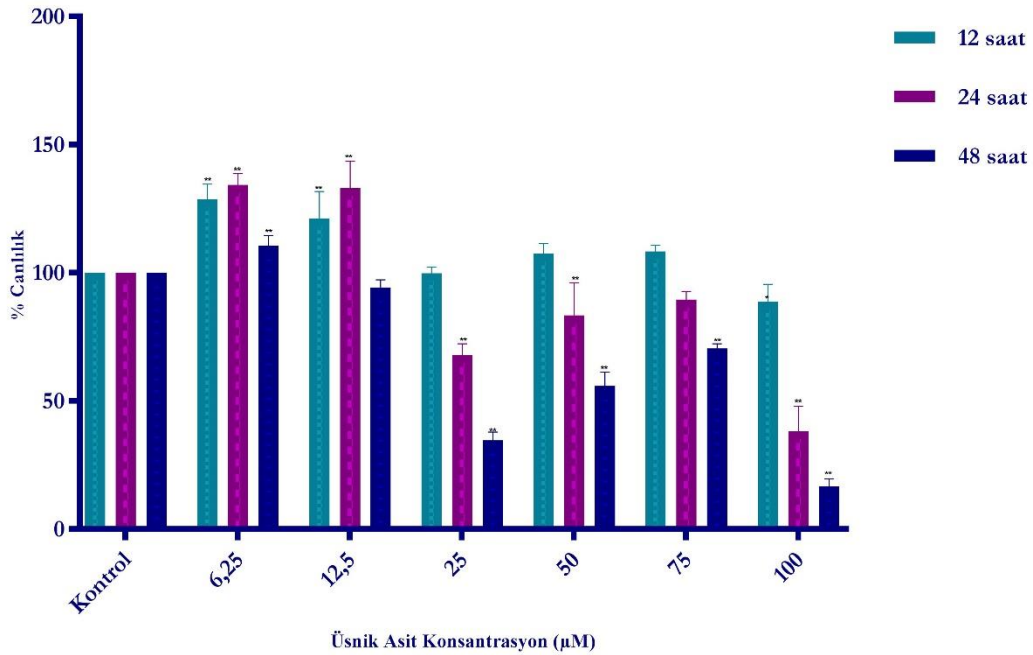
Üsnik asit, Sorafenib ve kombin uygulamaların hücre döngüsü üzerindeki etkileri belirlemek amacıyla 6 kuyulu plakalara her hücreden her doz için 1×10^6 ekim yapıldı ve 1 mL besiyeri eklendi. Hücreler 37°C , % 5 CO_2 içeren inkübatörde 1 gün inkübe edildikten sonra belirlenen doz uygulamaları yapıldı. Muamele saatlerinden sonra hücreler tripsin ile kaldırıldı ve santrifüj işleminden sonra yıkamalar yapıldı. 200 μL hücre süspansiyonuna, yavaş yavaş 1mL % 70'lik soğuk etanol eklendi. -20°C 'de 3 saat inkübe edildi. Muse™ Cell Cycle Reaktifi eklendikten sonra 30 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildikten sonra Muse™ Cell Analyzer cihazında analizler alındı.

4. BULGULAR

4.1. Hücrelerde Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

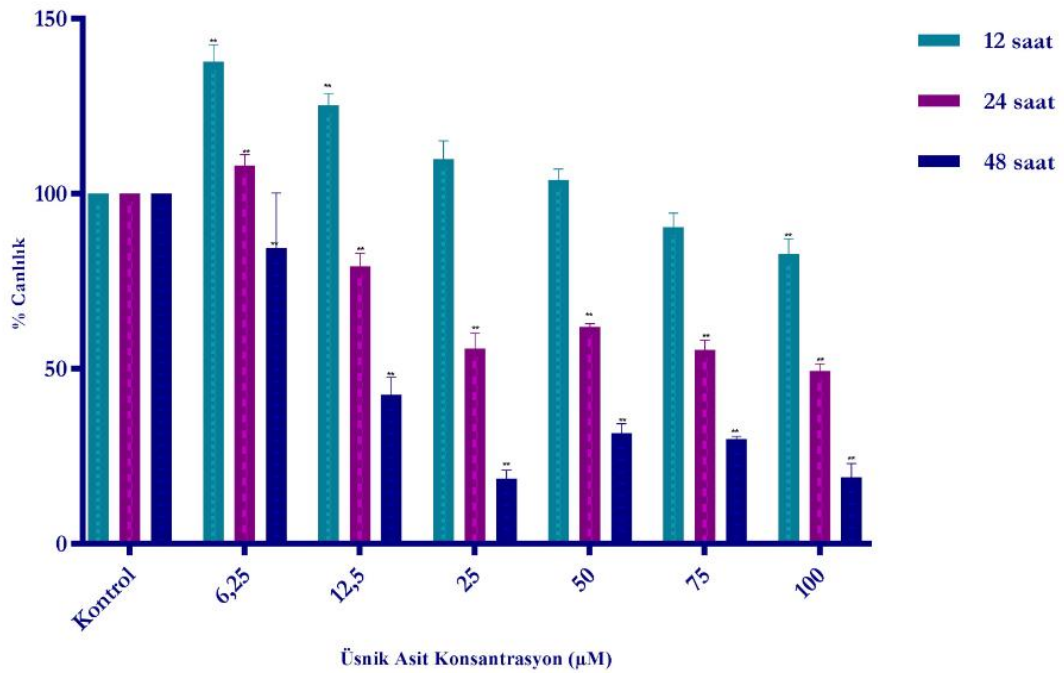
4.1.1. UA'nın Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

UA, Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi doz ve zamana bağlı olarak (12, 24, 48 saat) WST-1 testi ile analiz edildi ve sonuçlar Şekil 22-24' de sunuldu. Hep G2 hücrelerinde UA'nın sitotoksik etkisi incelendiğinde (Şekil 20), 12. saatte en düşük doz (6,25 μ M) ile muamele edilen hücrelerde canlılık oranı % 128,6 iken, en yüksek doz uygulamasında (100 μ M) canlılık oranının % 81,99'a düştüğü ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi. ($p < 0,01$) 48. saatte ise, en düşük doz (6,25 μ M) ile muamele edilen hücrelerde canlılık oranı % 110,6 iken, en yüksek doz uygulamasında (100 μ M) canlılık oranının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde % 15,9'a düştüğü belirlendi ($p < 0,01$). Ayrıca 12,5 ve 25 μ M UA uygulanan hücrelerde 48 saat sonunda canlılık oranlarının sırasıyla % 95,8 ve % 20,0'a düştüğü analiz edildi ($p < 0,01$).



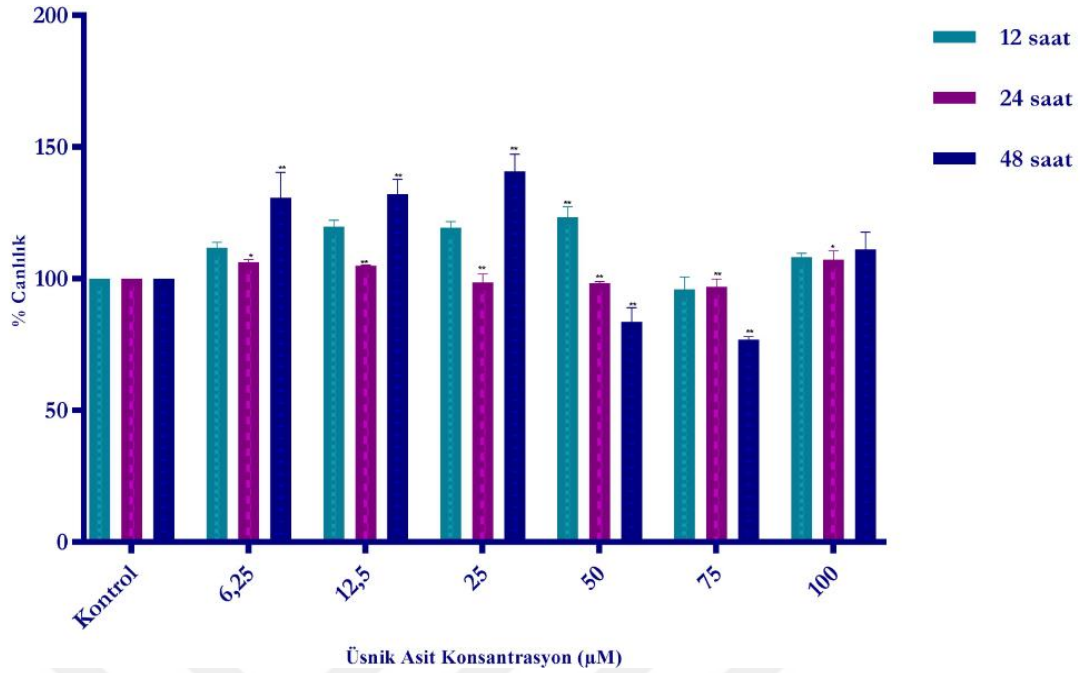
Şekil 22. Hep G2 hücrelerinde UA'nın 12, 24 ve 48. saatte sitotoksik etkisinin belirlenmesi ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$).

UA'nın HBV ile enfekte ve bu nedenle Hep G2 hücrelerine göre ilaca karşı daha duyarlı olduğu bilinen SNU-449 hücrelerinde sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde (Şekil 23), canlılık oranının 12. saatte en düşük dozla (6,25 µM) muamele edilen hücrelerde % 137,7 iken, en yüksek doz uygulamasında canlılık oranının %82,1'e düştüğü ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0,01$). 48. saatte ise en düşük doz ile muamele edilen hücrelerde canlılık oranı % 84,4 belirlenmesine rağmen, en yüksek doz uygulamasında canlılık oranının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde % 13,6'e düştüğü analiz edildi ($p<0,01$).



Şekil 23. SNU-449 hücrelerinde UA'nın 12, 24 ve 48. saatte sitotoksik etkisinin belirlenmesi ($p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$).

UA'nın HUVEC kontrol hücrelerinde sitotoksik etkisi incelendiğinde ise (Şekil 24), 12. saatte en düşük doz ile muamele edilen hücrelerde canlılık oranı % 111,7 iken, en yüksek doz uygulamasında canlılık oranının % 107,8'e düştüğü ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi. 48. saatte ise en düşük doz ile muamele edilen hücrelerde canlılık oranı % 130,7 analiz edilmesine rağmen, en yüksek doz uygulamasında canlılık oranının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde % 106,6'ya düştüğü belirlendi.



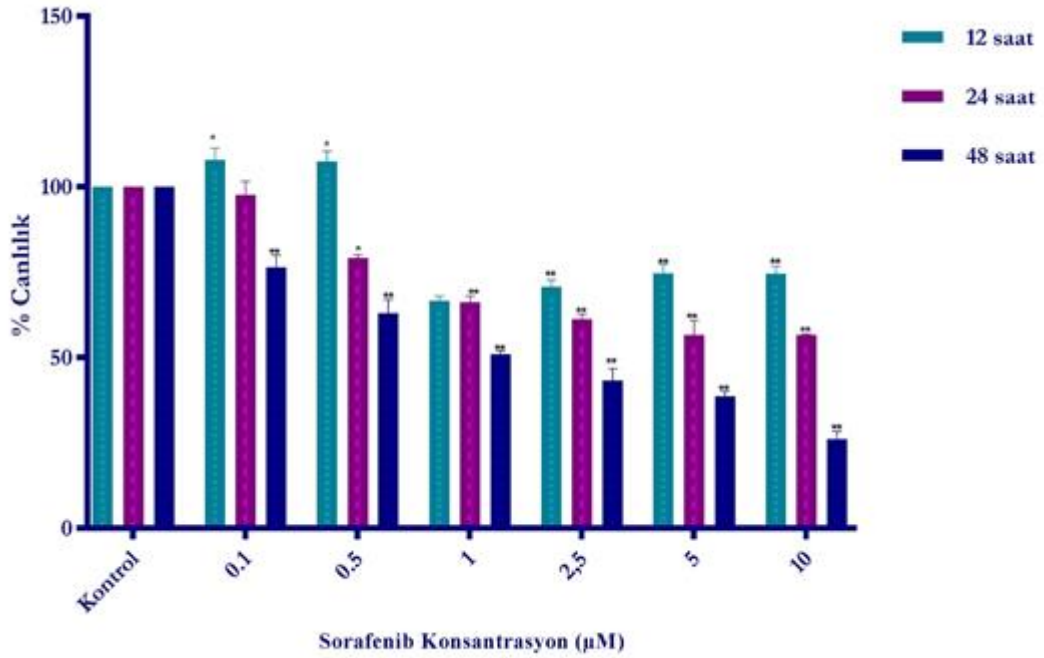
Şekil 24. HUVEC hücrelerinde UA'nın 12, 24 ve 48. saatte sitotoksik etkisinin belirlenmesi (p<0.05*, p<0.01**).

Sonuç olarak, UA' nın Hep G2 ve SNU-449 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde sitotoksik etkiye sahip olmasına rağmen, 25 µM konsantrasyondan itibaren hücrelerin canlılık oranında belirli bir derecede artış analiz edilmiştir. Ancak hücrelere 100 µM UA uygulandığında hücrelerin canlılık oranlarında azalışın 25 µM uygulandığında elde edilen sonuçlarına benzer olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle UA' nın Hep G2 ve SNU-449 hücrelerinde en etkin konsantrasyonu olarak 25 µM belirlenmiştir. Ayrıca, UA' nın SNU-449 hücrelerinde Hep G2 hücrelerine göre daha fazla sitotoksik etkiye neden olduğu ve kontrol grubu olan HUVEC hücrelerinde de özellikle 25 µM konsantrasyona kadar toksik etkiye sahip olmadığı analiz edilmiştir.

4.1.2. Sorafenibin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

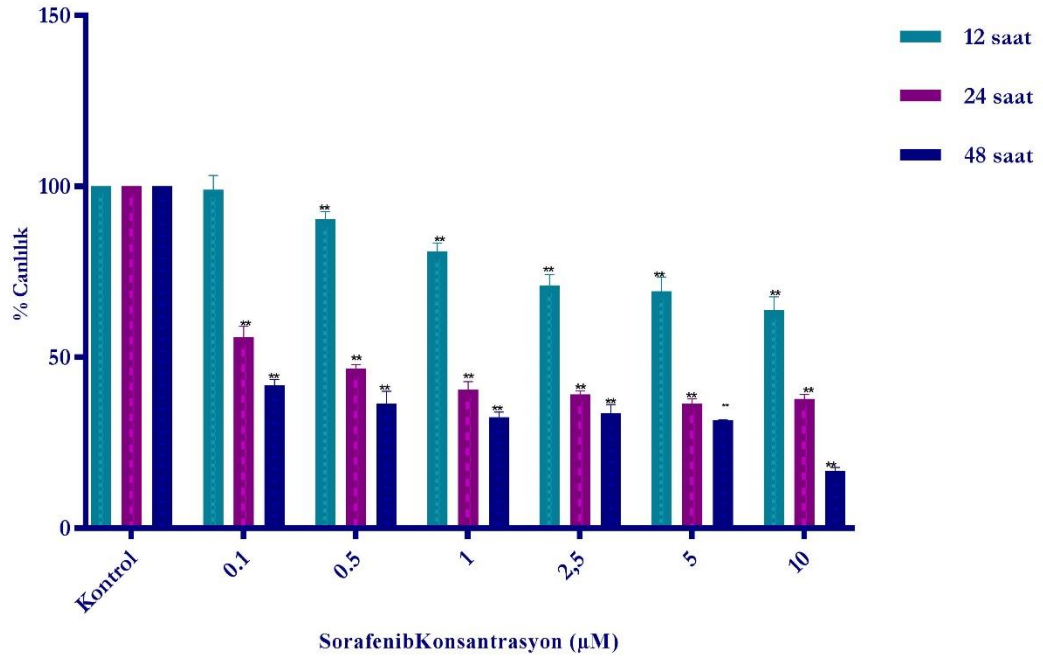
SOR Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi doz ve zamana bağlı olarak (12, 24, 48 saat) WST-1 testi ile analiz edildi ve sonuçlar Şekil 25-27'de gösterildi. Hep G2 hücrelerinde SOR'un sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde (Şekil 25), 12. saatte en düşük doz (0,1 µM) ile muamele edilen hücrelerde canlılık oranı % 107.8 iken, en yüksek doz uygulamasında (10 µM) canlılık oranının % 74,6'a düştüğü ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit

edildi ($p<0,01$). 48. saatte ise, en düşük dozla muamele edilen hücrelerde canlılık oranı % 76,4 olarak belirlenmesine rağmen, en yüksek doz uygulamasında canlılık oranının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde % 26,1'a düştüğü analiz edildi ($p<0,01$). Ayrıca 0,5; 1 ve 2,5 μM SOR uygulanan hücrelerde 48 saat sonunda canlılık oranlarının sırasıyla % 63,2 % 54,1 ve % 46,3 'e düştüğü belirlendi ($p<0,01$).



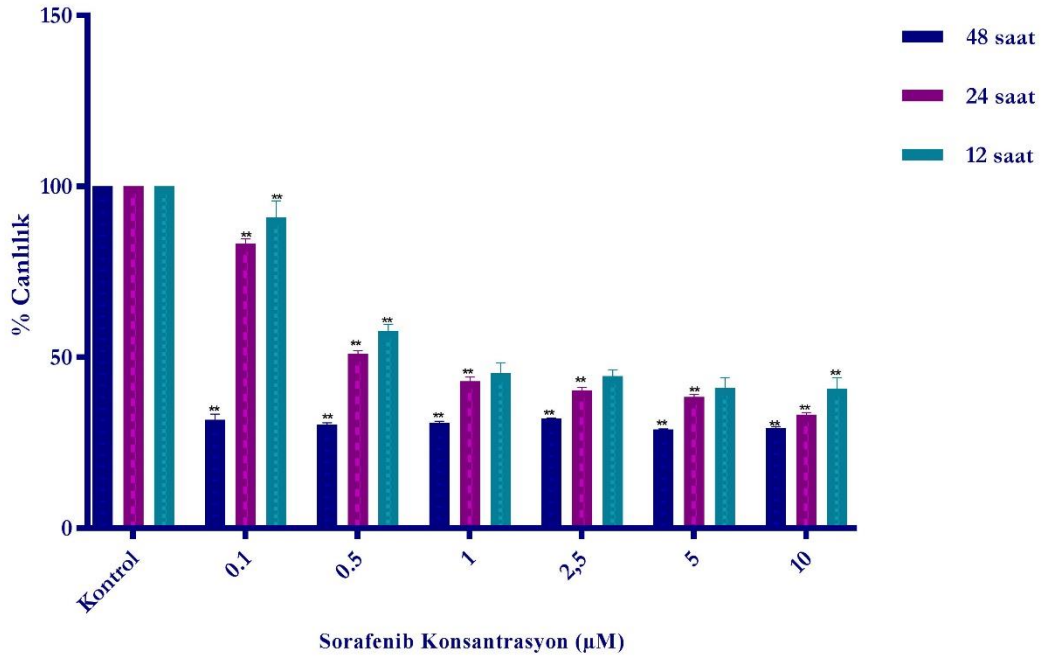
Şekil 25. Hep G2 hücrelerinde SOR'un 12, 24 ve 48. saatte sitotoksik etkisinin belirlenmesi ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$).

SOR'un SNU-449 hücrelerinde sitotoksik etkisi incelendiğinde (Şekil 26), 12. saatte en düşük doz ile muamele edilen hücrelerde canlılık oranı % 99,0 iken, en yüksek doz uygulamasında canlılık oranının % 65,8'e düştüğü ve bu oranların istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0,01$). 48. saatte ise, en düşük doz ile muamele edilen hücrelerde canlılık oranı % 41,8 olarak belirlenmesine rağmen, en yüksek doz uygulamasında canlılık oranının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde % 16,7' ye düştüğü tespit edildi ($p<0,01$). Ayrıca 0,5; 1 ve 2,5 μM SOR uygulanan hücrelerde 48 saat sonunda canlılık oranlarının sırasıyla % 40,8 % 35,4 ve % 39,5 'e düştüğü gösterildi ($p<0,01$).



Şekil 26. SNU-449 hücrelerinde SOR'un 12, 24 ve 48. saatte sitotoksik etkisinin belirlenmesi (p<0.05*, p<0.01**).

SOR'un HUVEC kontrol hücrelerinde sitotoksik etkisi analiz edildiğinde ise (Şekil 27), 12. saatte en düşük doz ile muamele edilen hücrelerde canlılık oranı % 91,0 iken, en yüksek doz uygulamasında canlılık oranının % 40,9' a düştüğü ve bu oranların istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi (p<0,01). 48. saatte ise en düşük doz ile muamele edilen hücrelerde canlılık oranı % 31,7 olarak belirlenmesine rağmen, en yüksek doz uygulamasında canlılık oranının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde % 29,3' e düştüğü analiz edildi (p<0,01). Ayrıca 0,5; 1 ve 2,5 µM SOR uygulanan hücrelerde 48 saat sonunda canlılık oranlarının sırasıyla % 28,3 % 26,9 ve % 27,5 'e düştüğü tespit edildi (p<0,01).



Şekil 27. HUVEC hücrelerinde SOR'un 12, 24 ve 48. saatte sitotoksik etkisinin belirlenmesi ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).

Sonuç olarak, SOR'un Hep G2 ve SNU-449 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde sitotoksik etkiye sahip olmasına rağmen, kontrol grubu olan HUVEC hücrelerinde artan konsantrasyona bağlı olarak toksik etkiye sahip olduğu analiz edilmiştir.

4.1.3. SOR ve UA'nın Kombin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

SOR ve üsrik asidin UA Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi belirlendikten sonra, SOR ve UA'nın sinerjik etki potansiyeline sahip olan konsantrasyonları seçilerek belirlenen konsantrasyonlar Tablo 5'te gösterildi.

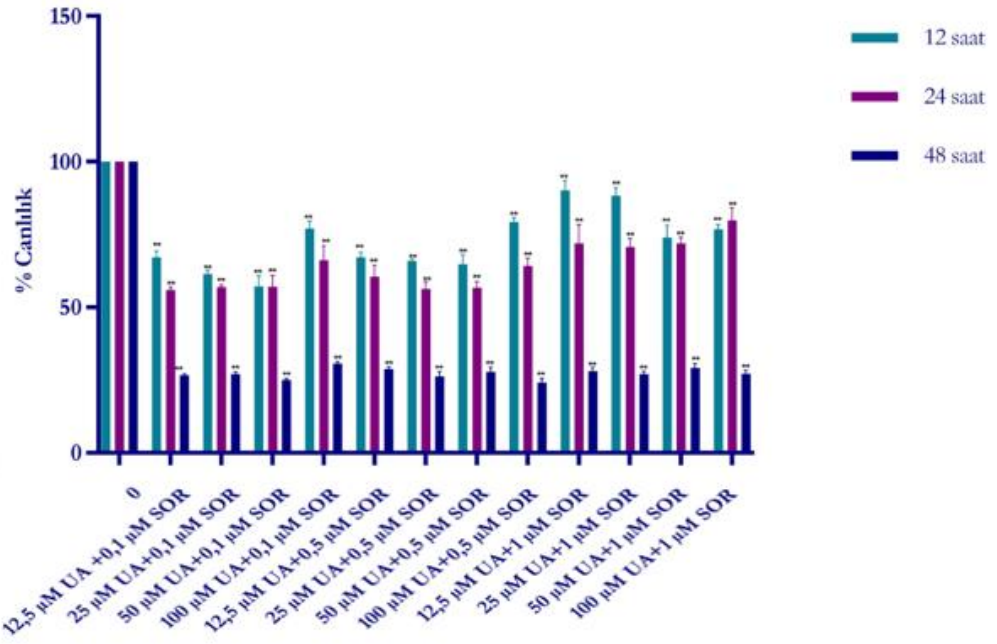
Tablo 5. SOR ve UA'nın WST-1 analizleri sonuçlarına göre belirlenen kombin konsantrasyonları

Kombin doz numarası	UA konsantrasyonları	SOR konsantrasyonları
1	12.5 µM	0.1 µM
2	25 µM	0.1 µM
3	50 µM	0.1 µM
4	100 µM	0.1 µM
5	12.5 µM	0.5 µM
6	25 µM	0.5 µM
7	50 µM	0.5 µM
8	100 µM	0.5 µM
9	12.5 µM	1 µM
10	25 µM	1 µM
11	50 µM	1 µM
12	100 µM	1 µM

4.1.4. SOR ve UA'nın Kombin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

SOR ve UA sinerjik etki potansiyeline sahip belirlenen konsantrasyonlarının Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi doz ve zamana bağlı olarak (12, 24, 48 saat) WST-1 testi ile analiz edildi ve sonuçlar Şekil 28-30' da gösterildi.

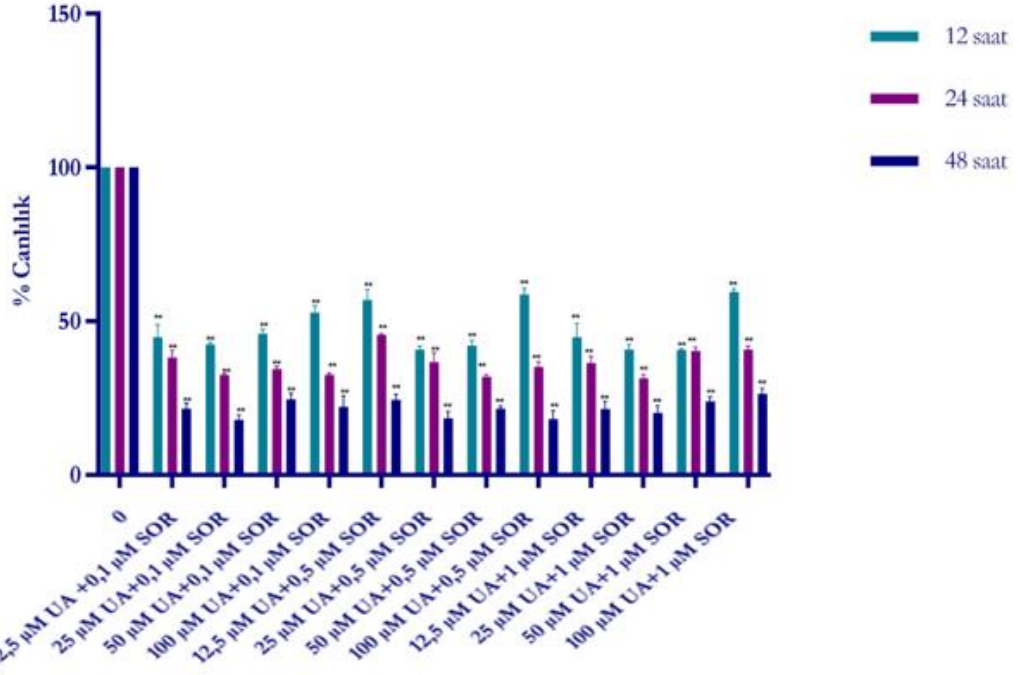
Hep G2 hücrelerinde SOR ve UA'nın kombin sitotoksik etkisi incelendiğinde (Tablo 6, Şekil 28), 12. saatte SOR ve UA'nın en düşük konsantrasyonları (Doz 1) ile muamele edilen hücrelerde canlılık oranı % 67,2 iken, Doz 3 uygulanan hücrelerde canlılık oranının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde % 53,4'e azaldığı tespit edildi ($p<0,01$). Bundan sonraki seçilen kombin konsantrasyonlarda 12. Saatte canlılık oranlarının arttığı ancak kontrole göre canlılık oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış olduğu tespit edildi ($p<0,01$). En yüksek kombin doz uygulamasında (Doz 12) canlılık oranı % 76,9 olarak analiz edildi ($p<0,01$). 48. saatte ise en düşük kombin doz (Doz 1) ile muamele edilen hücrelerde canlılık oranı % 26,7 belirlenmesine rağmen, en yüksek kombin doz uygulamasında (Doz 12) canlılık oranının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde % 26,9' ye düştüğü belirlendi ($p<0,01$).



Şekil 28. Hep G2 hücrelerinde SOR ve UA'nın 12, 24 ve 48. saatte kombin sitotoksik etkisinin belirlenmesi ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).

Tablo 6. Hep G2 hücrelerinde SOR ve UA'nın ayrı ayrı ve kombinlerinin 48. saatte sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).

SOR		UA		SOR+UA	
Konsantrasyon	%Canlılık	Konsantrasyon	%Canlılık	Konsantrasyon	%Canlılık
0	100	0	100	0	100
0,1μM	78,25	12,5μM	94,31	12,5 μM UA +0,1 μM SOR	26,74
0,5μM	49,51	25μM	34,68	25 μM UA+0,1 μM SOR	27,09
1μM	68,81	50μM	55,88	50 μM UA+0,1 μM SOR	25,02
		100μM	16,57	100 μM UA+0,1 μM SOR	30,65
				12,5 μM UA+0,5 μM SOR	28,84
				25 μM UA+0,5 μM SOR	26,31
				50 μM UA+0,5 μM SOR	27,83
				100 μM UA+0,5 μM SOR	24,23
				12,5 μM UA+1 μM SOR	28,05
				25 μM UA+1 μM SOR	27,02
				50 μM UA+1 μM SOR	29,18
				100 μM UA+1 μM SOR	27,21



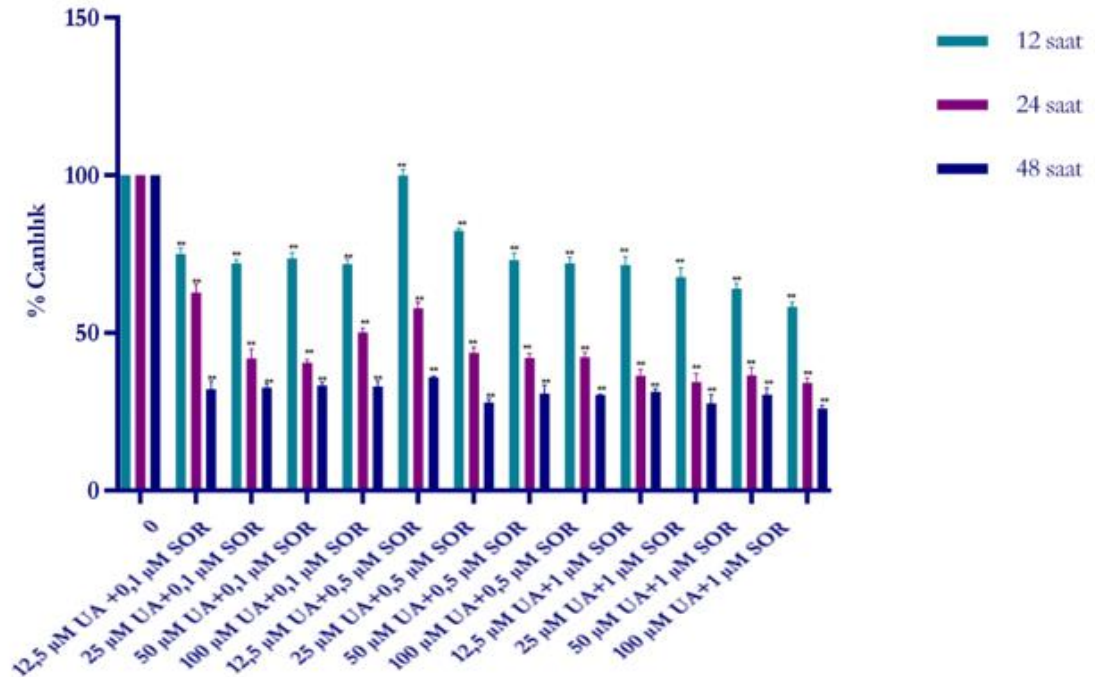
Şekil 29. SNU-449 hücrelerinde SOR ve UA'nın 12, 24 ve 48. saatte kombin sitotoksik etkisinin belirlenmesi ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).

Tablo 7. SNU hücrelerinde SOR ve UA'nın ayrı ayrı ve kombinlerinin 48. saatte sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).

SOR		UA		UA+SOR	
Konsantrasyon	%Canlılık	Konsantrasyon	%Canlılık	Konsantrasyon	%Canlılık
0	100	0	100	0	100
0,1μM	41,78	12,5μM	42,59	12,5 μM UA + 0,1μM SOR	21,49
0,5μM	35	25μM	18,64	25 μM UA + 0,1μM SOR	19,39
1μM	32,50	50μM	31,66	50 μM UA + 0,1μM SOR	22,54
		100μM	19,07	100 μM UA + 0,1μM SOR	22,93
				12,5 μM UA + 0,5μM SOR	24,24
				25 μM UA + 0,5μM SOR	18,08
				50 μM UA + 0,5μM SOR	21,36
				100 μM UA + 0,5μM SOR	17,43
				12,5 μM UA + 1μM SOR	18,47
				25 μM UA + 1μM SOR	17,56
				50 μM UA + 1μM SOR	22,28
				100 μM UA + 1μM SOR	28,04

SNU-449 hücrelerinde SOR ve UA'nın kombin sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde (Şekil 29), 12. saatte en düşük kombin doz (Doz 1) ile muamele edilen hücrelerde canlılık oranı % 44,7 olarak analiz edilmesine rağmen, en yüksek kombin doz (Doz 12) uygulamasında canlılık oranının % 57,5'e düştüğü ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi. ($p<0,01$). 48. saatte ise, en düşük kombin doz ile muamele edilen hücrelerde canlılık oranı % 21,6 iken, en yüksek kombin doz uygulamasında canlılık oranının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde % 26,4'e düştüğü tespit edildi ($p<0,01$).

Kontrol hücresi olan HUVEC hücrelerinde SOR ve UA'nın kombin sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde ise (Şekil 30), 12. saatte en düşük kombin doz (Doz 1) ile muamele edilen hücrelerde canlılık oranı % 75,0 iken, en yüksek kombin doz uygulamasında (Doz 12) canlılık oranının % 88,3'e arttığı ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0,01$). 48. saatte ise, en düşük kombin doz ile muamele edilen hücrelerde canlılık oranı % 32,4 olarak analiz edilmesine rağmen, en yüksek kombin doz uygulamasında canlılık oranının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde % 26,1 olarak belirlendi ($p<0,01$).



Şekil 30. HUVEC hücrelerinde SOR ve UA'nın 12, 24 ve 48. saatte kombin sitotoksik etkisinin belirlenmesi ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$).

Tablo 8. HUVEC hücrelerinde SOR ve UA'nın ayrı ayrı ve kombinlerinin 48. saatte sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması (p<0.05*, p<0.01**).

SOR		UA		SOR+UA	
Konsantrasyon	%Canlılık	Konsantrasyon	%Canlılık	Konsantrasyon	%Canlılık
0	100	0	100	0	100
0,1µM	71,73	12,5µM	140,56	12,5 µM UA+0,1µM SOR	32,24
0,5µM	35,26	25µM	130,54	25 µM UA +0,1µM SOR	32,66
1µM	30,73	50µM	85,12	50 µM UA +0,1µM SOR	33,25
		100µM	108,06	100 µM UA +0,1µM SOR	33,01
				12,5 µM UA +0,5µM SOR	35,96
				25 µM UA +0,5µM SOR	27,96
				50 µM UA +0,5µM SOR	30,87
				100 µM UA +0,5µM SOR	30,29
				12,5 µM UA +1µM SOR	52,92
				25 µM UA +1µM SOR	57,65
				50 µM UA +1µM SOR	50,37
				100 µM UA +1µM SOR	46,11

Sonuç olarak, SOR ve UA'nın sinerjik etki potansiyeline sahip olduğu belirlenen konsantrasyonlarının özellikle 48 saat uygulanan Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücrelerinde doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde sitotoksik etkiye sahip olduğu analiz edilmiştir. Ancak, özellikle SOR'un tek ajan olarak sitotoksik etkisi ile karşılaştırıldığında, UA ile kombin tedavi olarak uygulandığı Hep G2 ve SNU-449 hücrelerinde daha düşük konsantrasyonlarda etkili olduğu ve HUVEC hücrelerinde daha az sitotoksik etkiye neden olduğu analiz edilmiştir.

4.2 Hücrelerde Apoptotik Etkinin Belirlenmesi

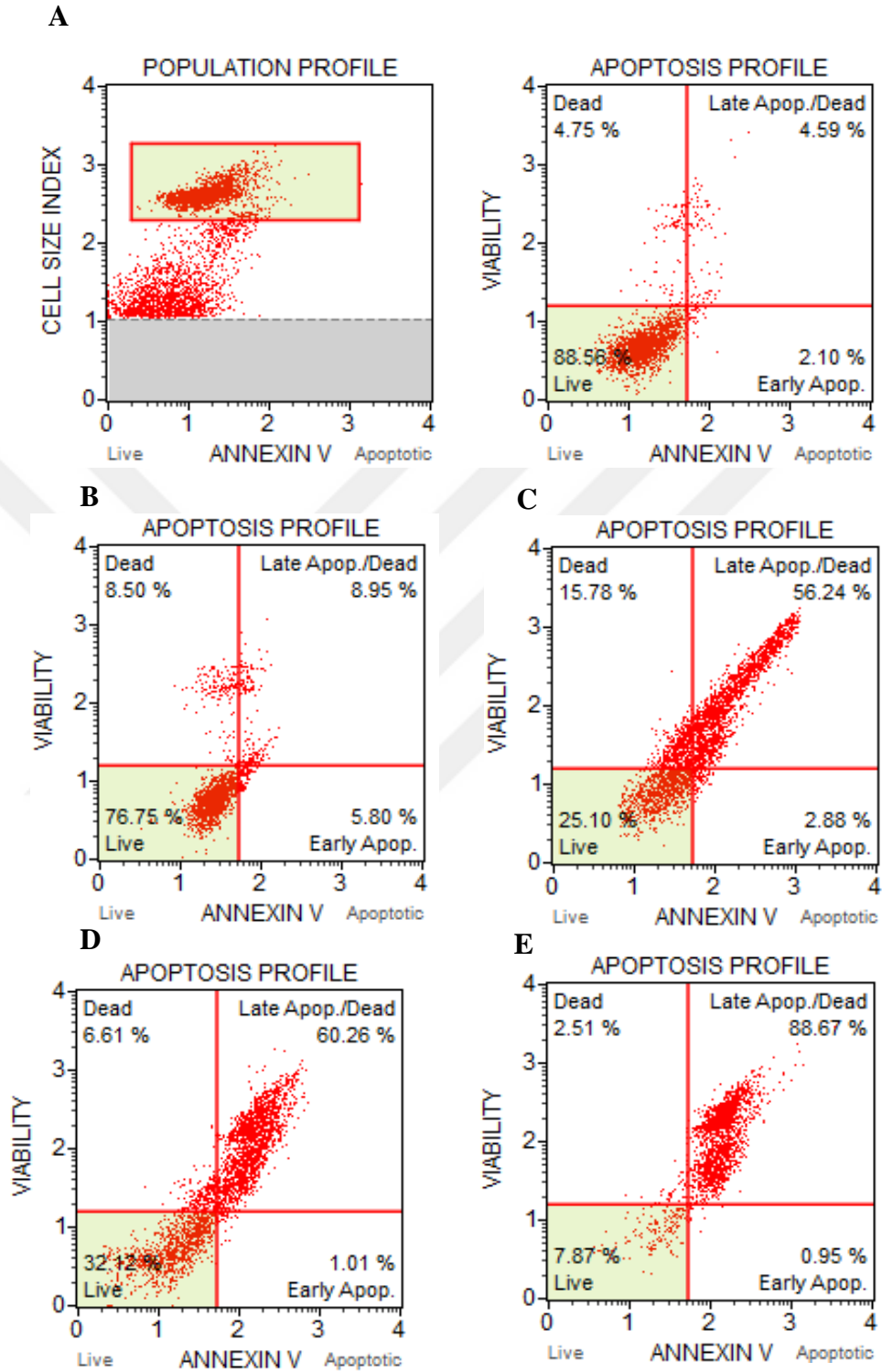
4.2.1. UA'nın Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

Üsnik asidin (UA) Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücrelerinde WST-1 analizi sonuçlarına göre 48. saatte 12,5; 25; 50; 100 µM konsantrasyonlarda apoptotik etkisi Annexin V analizi ile değerlendirildi ve elde edilen bulgular Şekil 31-33'de sunuldu. Hep G2 hücrelerinde UA'nın apoptotik etkisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 48.saatte 12,5 µM UA uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptotik ölüm oranları sırasıyla % 5,80 ve % 8,95 iken, 100 µM UA uygulanan hücrelerde erken ve geç

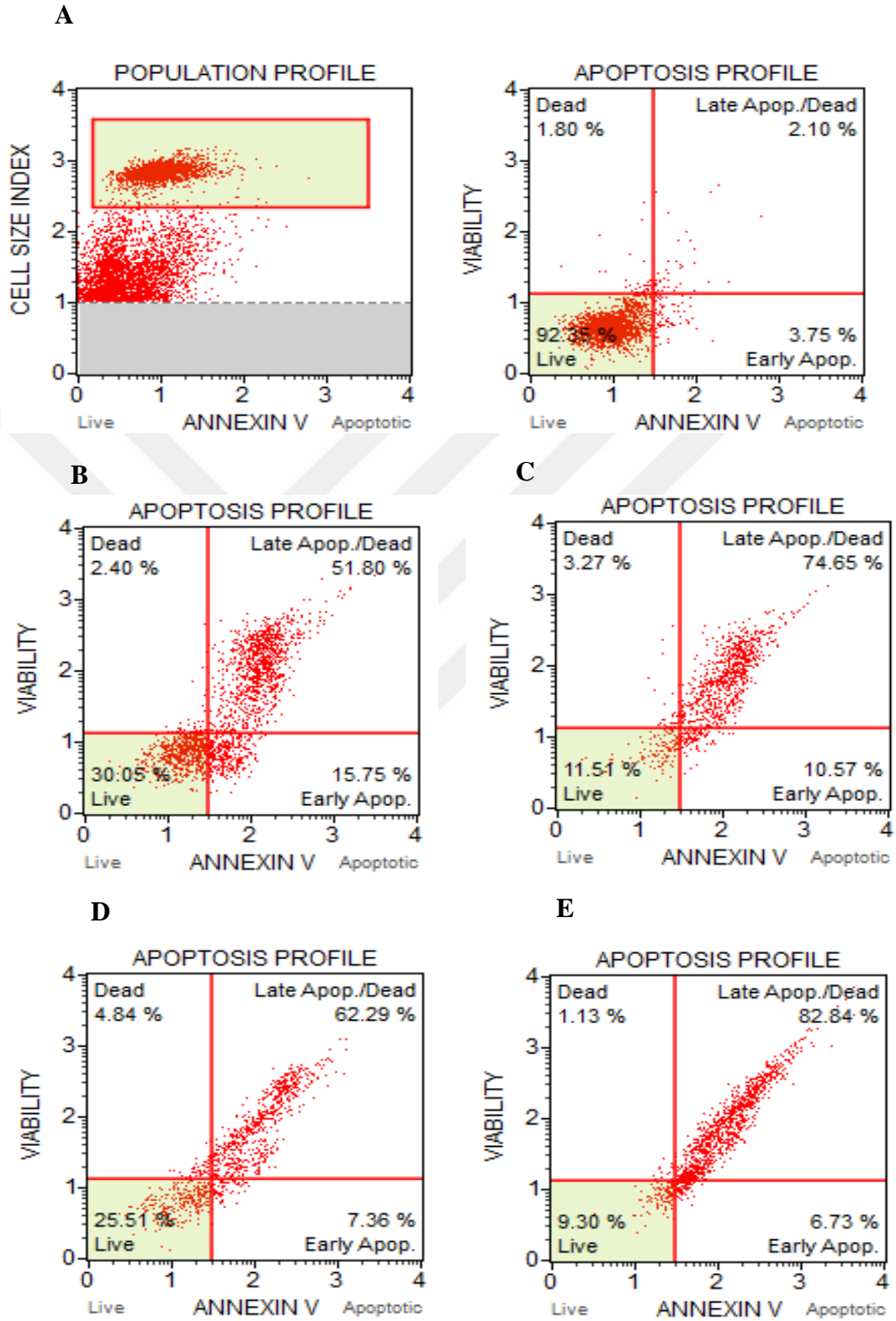
apoptotik ölüm oranları sırasıyla % 0,95 ve % 88,67 olarak belirlendi ve belirlenen konsantrasyonlarda erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik ölüm açısından farklılıklar Şekil 31’de gösterildi.

SNU-449 hücrelerinde UA’ nın apoptotik etkisi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 48. saatte 12,5 µM UA uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptotik ölüm oranları sırasıyla % 3,75 ve % 2,10 olarak belirlenmesine rağmen, 100 µM UA uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptotik ölüm oranları sırasıyla % 6,73 ve % 82,84 olarak analiz edildi ve belirlenen konsantrasyonlarda erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik ölüm açısından farklılıklar Şekil 30’da gösterildi.

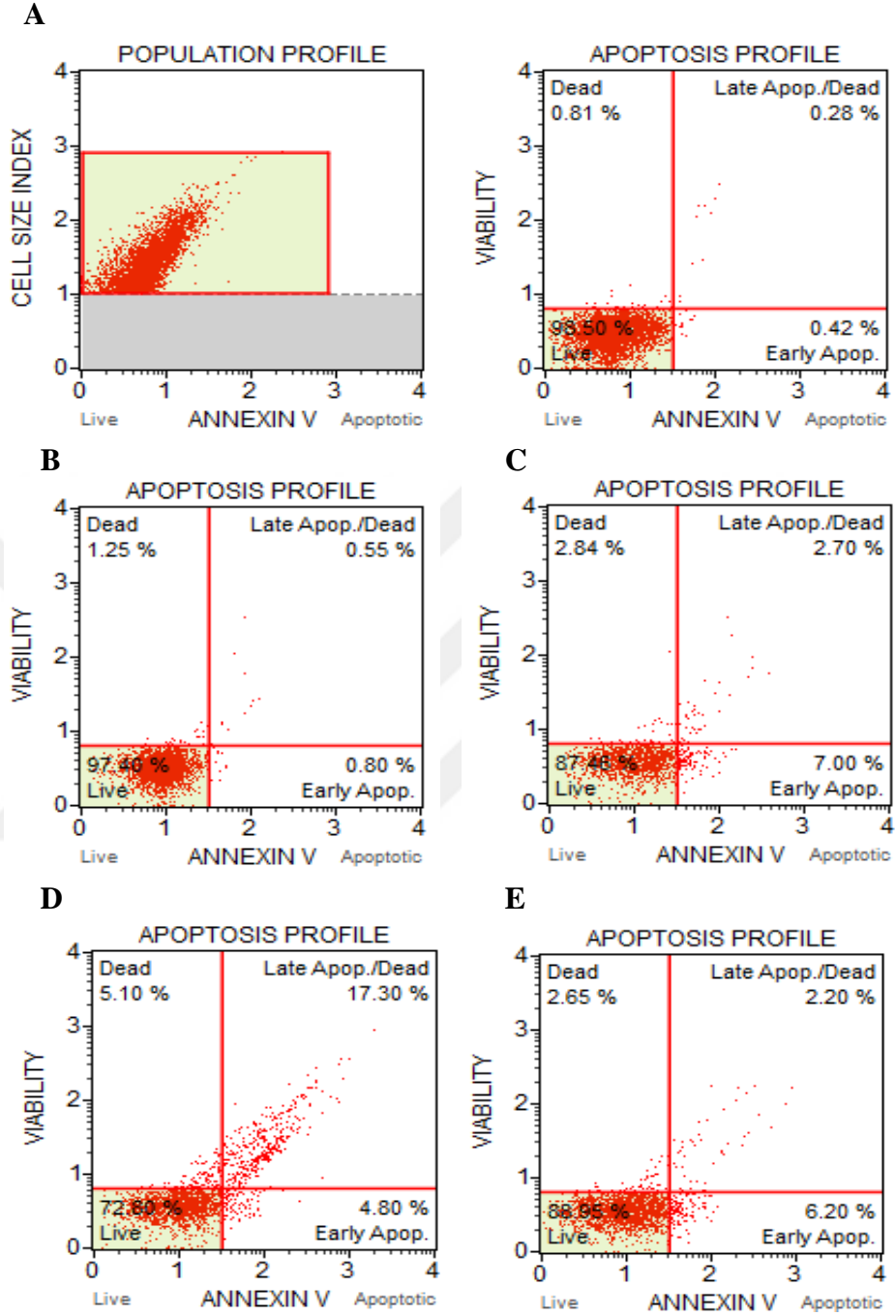
HUVEC hücrelerinde UA’ nın apoptotik etkisi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise, 48. saatte 12,5 µM UA uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptotik ölüm oranları sırasıyla % 0,42 ve % 0,28 iken, 100 µM UA uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptotik ölüm oranları sırasıyla % 6,20 ve % 2,20 olarak belirlendi ve belirlenen konsantrasyonlarda erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik ölüm açısından farklılıklar Şekil 33’de gösterildi.



Şekil 31. UA'nın Hep-G2 hücrelerinde apoptotik etkisinin Annexin V analizi sonuçları (A) Kontrol, (B) 12.5µM, (C) 25 µM, (D) 50µM ve (E) 100µM



Şekil 32. UA'nın SNU449 hücrelerinde apoptotik etkisinin Annexin V analizi sonuçları (A) Kontrol, (B) 12.5µM, (C) 25 µM, (D) 50µM ve (E) 100µM



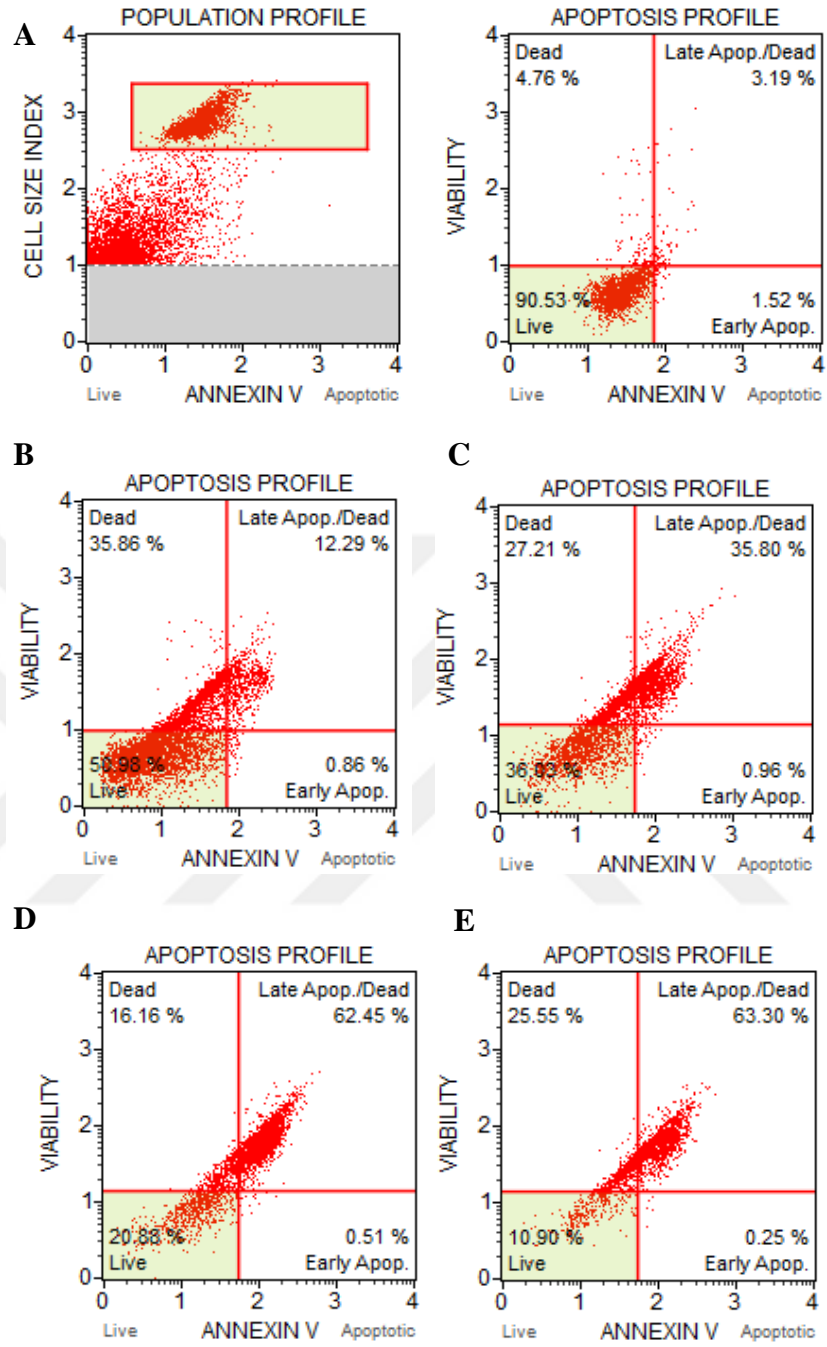
Şekil 33. UA'nın HUVEC hücrelerinde apoptotik etkisinin Annexin V analizi sonuçları (A) Kontrol, (B) 12.5µM, (C) 25 µM, (D) 50µM ve (E) 100µM

Sonuç olarak, UA'nın uygulanan konsantrasyonuna bağlı olarak Hep G2 ve SNU-449 hücrelerinde özellikle geç apoptotik ölüm oranlarında artış belirlenmesine rağmen, HUVEC hücrelerinde Hep G2 ve SNU-449 hücrelerine göre daha az oranda apoptotik ölüm tespit edildi.

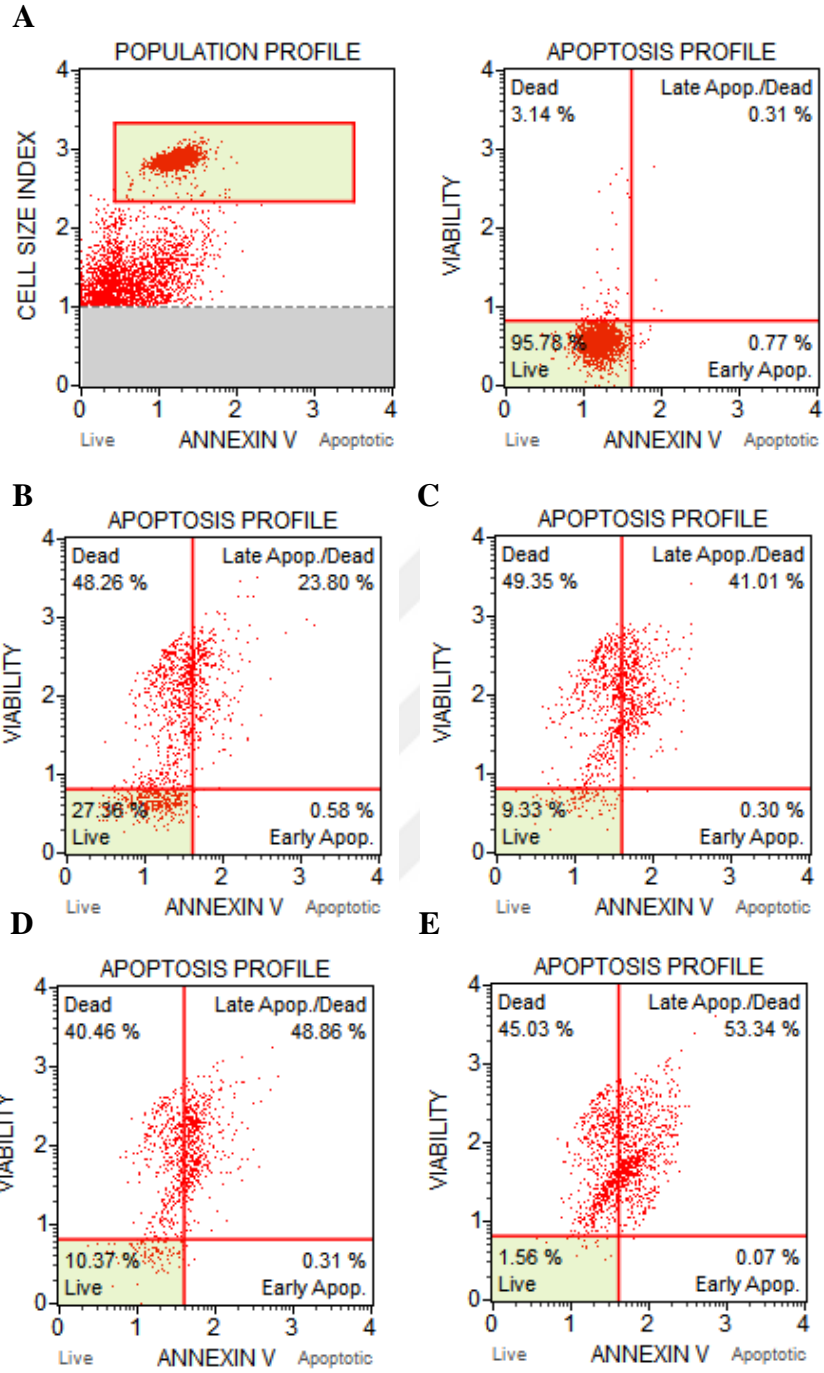
4.2.2. SOR'un Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

Sorafenibin (SOR) Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücrelerinde WST-1 analizi sonuçlarına göre 48. saatte 0,5; 1; 2,5 ve 5 μ M konsantrasyonlarda apoptotik etkisi Annexin V analizi ile değerlendirildi ve elde edilen bulgular Şekil 34-36'de sunuldu. Hep G2 hücrelerinde SOR' un apoptotik etkisi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 48. saatte en düşük konsantrasyon olan 0,5 μ M SOR uygulanan hücrelerde erken ve apoptoz apoptotik ölüm oranları sırasıyla % 0,86 ve % 12,29 iken, en yüksek doz olan 5 μ M SOR uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptotik ölüm oranları sırasıyla % 0,25 ve % 63,30 olarak belirlendi. Ayrıca 0,5; 1; 2,5 ve 5 μ M SOR uygulanan Hep G2 hücrelerinde nekrotik ölüm sırasıyla % 35,86; % 27,21, % 16,6 ve % 25,5 olarak analiz edildi ve belirlenen konsantrasyonlarda erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik ölüm açısından farklılıklar Şekil 32'de gösterildi.

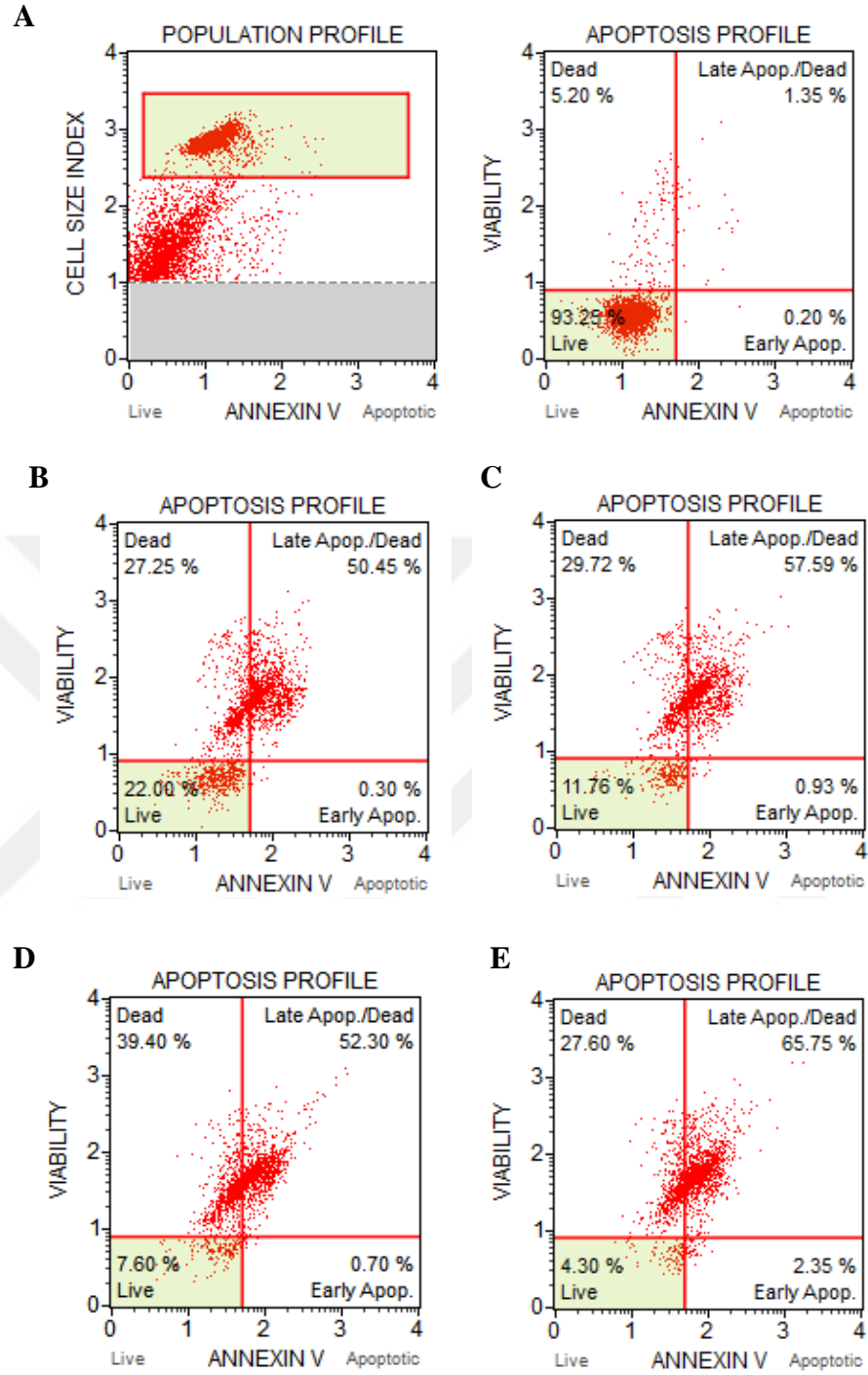
SNU-449 hücrelerinde SOR'un apoptotik etkisi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, en düşük konsantrasyon olan 0,5 μ M SOR uygulanan hücrelerde erken ve apoptoz apoptotik ölüm oranları sırasıyla % 0,58 ve % 23,80 iken, en yüksek doz olan 5 μ M SOR uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptotik ölüm oranları sırasıyla % 0,07 ve % 53,34 olarak belirlendi. Ayrıca 0,5; 1; 2,5 ve 5 μ M SOR uygulanan SNU-449 hücrelerinde nekrotik ölüm sırasıyla % 48,26; % 49,35; % 40,46 ve % 45,03 olarak analiz edildi ve belirlenen konsantrasyonlarda erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik ölüm açısından farklılıklar Şekil 33'de gösterildi. HUVEC hücrelerinde SOR' un apoptotik etkisi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise, 0,5 μ M SOR uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptotik ölüm oranları sırasıyla % 0,30 ve % 50,45 olarak belirlenmesine rağmen, 5 μ M SOR uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptotik ölüm oranları sırasıyla % 2,35 ve % 65,75 olarak belirlendi. Ayrıca 0,5; 1; 2,5 ve 5 μ M SOR uygulanan HUVEC hücrelerinde nekrotik ölüm sırasıyla % 27,25; % 29,72; % 39,40 ve % 27,60 olarak analiz edildi ve belirlenen konsantrasyonlarda erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik ölüm açısından farklılıklar Şekil 36'da gösterildi.



Şekil 34. SOR'un Hep G2 hücrelerinde apoptotik etkisinin Annexin V analizi sonuçları (A) Kontrol, (B) 0.5 μM, (C) 1 μM, (D) 2.5 μM ve (E) 5 μM.



Şekil 35. SOR'un SNU-449 hücrelerinde apoptotik etkisinin Annexin V analizi sonuçları (A) Kontrol, (B) 0.5 μ M, (C) 1 μ M, (D) 2.5 μ M ve (E) 5 μ M.



Şekil 36. SOR'un HUVEC hücrelerinde apoptotik etkisinin Annexin V analizi sonuçları (A) Kontrol, (B) 0.5µM, (C) 1 µM, (D) 2.5 µM ve (E) 5 µM.

Sonuç olarak, SOR'un toksik etkisinden dolayı artan konsantrasyonuna bağlı olarak Hep G2, SNU- 449 ve HUVEC hücrelerinde özellikle geç apoptotik ve nekrotik ölüm oranlarında artış olduğu tespit edildi.

4.2.3. SOR ve UA'nın Kombin Olarak Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

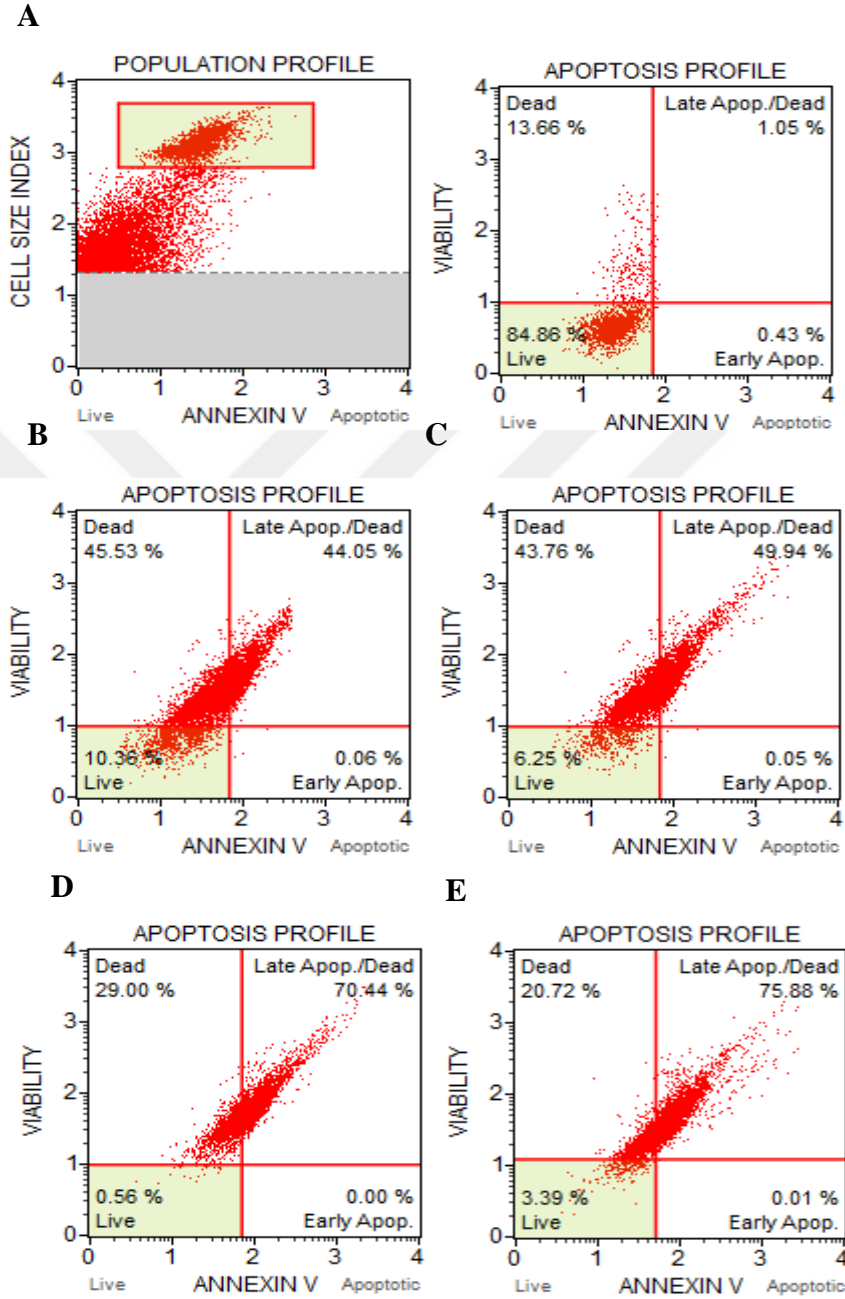
SOR ve UA'nın Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücrelerinde WST-1 analizi sonuçlarına göre, 48. saatte sinerjik etki gösterdiği belirlenen 0,1 μM SOR+ 12,5 μM UA, 0,1 μM SOR+ 25 μM UA, 0,5 μM SOR+12,5 μM UA, 0,5 μM SOR+ 25 μM UA konsantrasyonlarda kombin apoptotik etkisi Annexin V analizi ile değerlendirildi ve elde edilen bulgular Şekil 37-39'de sunuldu.

Hep G2 hücrelerinde SOR ve UA'nın kombin olarak apoptotik etkisi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, en düşük konsantrasyon (0,1 μM SOR+ 12,5 μM UA) uygulanan hücrelerde erken ve apoptoz apoptotik ölüm oranları sırasıyla % 0,06 ve % 44,05 iken, en yüksek konsantrasyonda (0,5 μM SOR+ 25 μM UA) erken ve geç apoptotik ölüm oranları sırasıyla % 0,01 ve % 75,88 olarak belirlendi. 0,1 μM SOR+ 12,5 μM UA ve 0,5 μM SOR+ 25 μM UA uygulanan Hep G2 hücrelerinde nekrotik ölüm sırasıyla % 45,53 ve % 20,72 olarak analiz edildi ve belirlenen konsantrasyonlarda erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik ölüm açısından farklılıklar Şekil 37'de gösterildi.

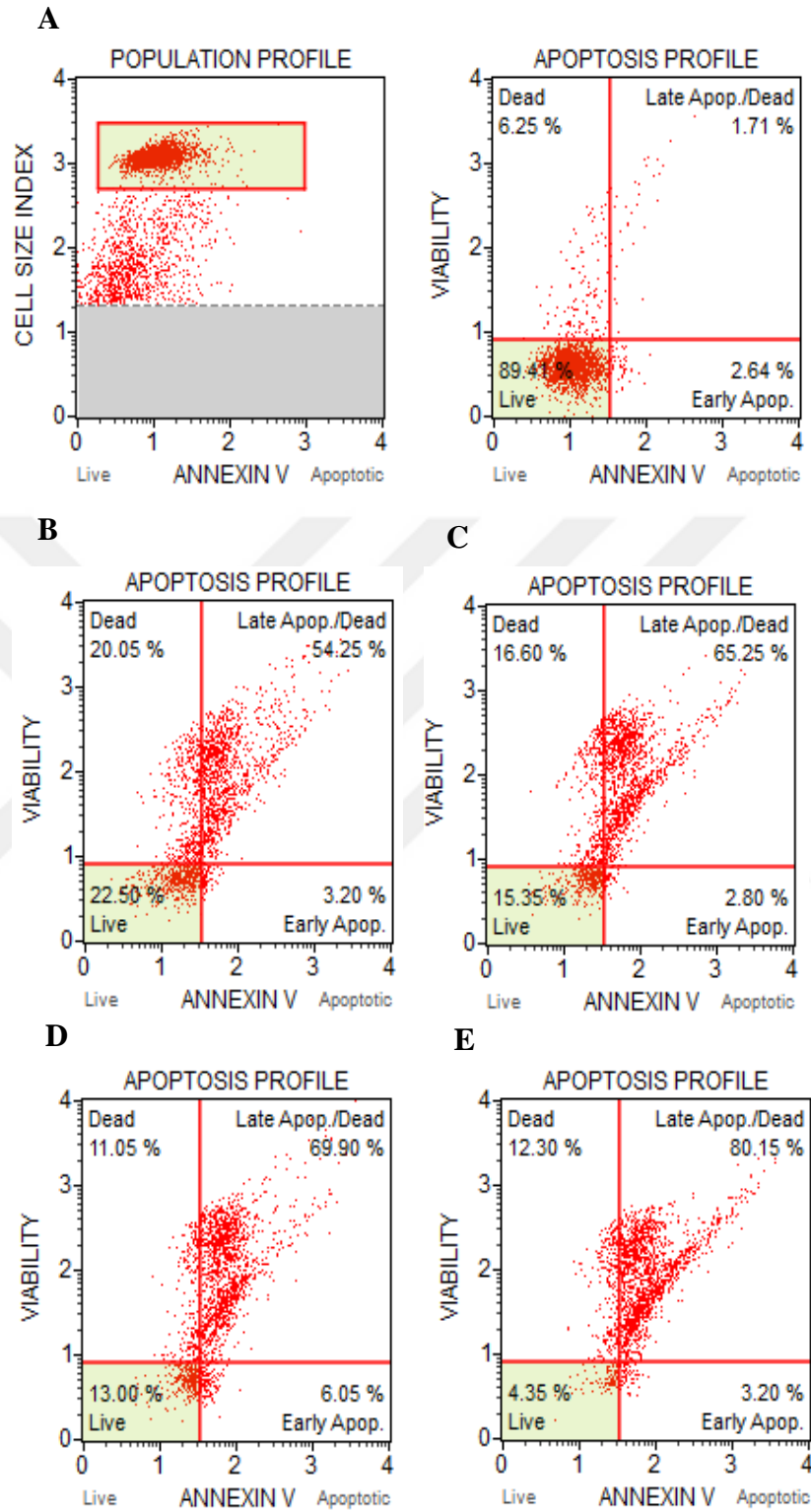
SNU-449 hücrelerinde SOR ve UA'nın kombin olarak apoptotik etkisi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, en düşük konsantrasyon (0,1 μM SOR+ 12,5 μM UA) uygulanan hücrelerde erken ve apoptoz apoptotik ölüm oranları sırasıyla % 3,20 ve % 54,25 iken, en yüksek konsantrasyonda (0,5 μM SOR+ 25 μM UA) erken ve geç apoptotik ölüm oranları sırasıyla % 3,20 ve % 80,15 olarak belirlendi. 0,1 μM SOR+ 12,5 μM UA ve 0,5 μM SOR+ 25 μM UA uygulanan SNU-449 hücrelerinde nekrotik ölüm sırasıyla % 20,05 ve % 12,30 olarak analiz edildi ve belirlenen konsantrasyonlarda erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik ölüm açısından farklılıklar Şekil 38'da gösterildi.

HUVEC hücrelerinde SOR ve UA'nın kombin olarak apoptotik etkisi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise, en düşük konsantrasyon (0,1 μM SOR+ 12,5 μM UA) uygulanan hücrelerde erken ve apoptoz apoptotik ölüm oranları sırasıyla % 3,20 ve % 54,25 iken, en yüksek konsantrasyonda (0,5 μM SOR+ 25 μM UA)) erken ve geç apoptotik ölüm oranları sırasıyla % 3,20 ve % 80,15 olarak tespit edildi. 0,1 μM SOR+ 12,5 μM UA ve 0,5 μM SOR+ 25 μM UA uygulanan HUVEC hücrelerinde nekrotik

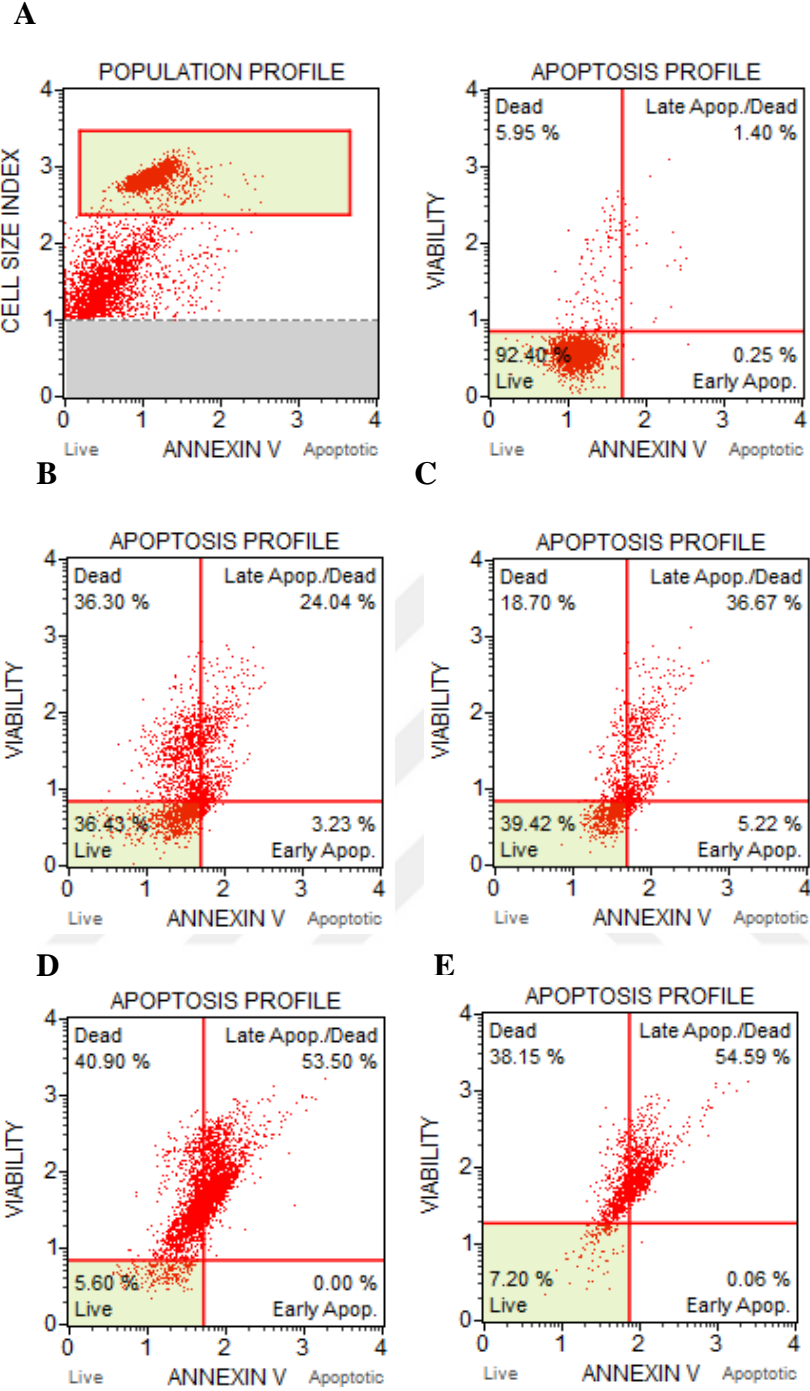
ölüm sırasıyla % 36,30 ve % 38,15 olarak analiz edildi ve belirlenen konsantrasyonlarda erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik ölüm açısından farklılıklar Şekil 39’de gösterildi.



Şekil 37. SOR ve UA'nın Hep G2 hücrelerinde apoptotik etkisinin Annexin V analizi sonuçları (A) Kontrol, (B) 0.1 μ M SOR+ 12.5 μ M UA, (C) 0.1 μ M SOR+ 25 μ M UA, (D) 0.5 μ M SOR+ 12.5 μ M UA, (E) 0.5 μ M SOR+ 25 μ M UA.



Şekil 38. SOR ve UA'nın SNU-449 hücrelerinde apoptotik etkisinin Annexin V analizi sonuçları (A) Kontrol, (B) 0.1 μ M SOR+ 12.5 μ M UA, (C) 0.1 μ M SOR+ 25 μ M UA, (D) 0.5 μ M SOR+ 12.5 μ M UA, (E) 0.5 μ M SOR+ 25 μ M UA.



Şekil 39. SOR ve UA'nın HUVEC hücrelerinde apoptotik etkisinin Annexin V analizi sonuçları (A) Kontrol, (B) 0.1 μ M SOR+ 12.5 μ M UA, (C) 0.1 μ M SOR+ 25 μ M UA, (D) 0.5 μ M SOR+ 12.5 μ M UA, (E) 0.5 μ M SOR+ 25 μ M UA.

Sonuç olarak, Hep G2 ve SNU- 449 hücrelerinde SOR ve UA'nın kombin apoptotik etkisinin tek ajan olarak SOR ve UA'ya göre hücrelerde daha düşük konsantrasyonlarda daha fazla geç apoptotik ve nekrotik ölüme neden olduğu belirlenmiştir. Ancak, HUVEC kontrol hücrelerinde SOR'un toksik etkisinden dolayı kombin SOR ve UA uygulanan hücrelerde geç

apoptotik ve nekrotik ölüme neden olduğu belirlenmesine rağmen, ölüm oranlarının tek ajan olarak SOR uygulanan hücrelere göre daha az oranda olduğu analiz edilmiştir.

4.3. Hücrelerde Hücre Döngüsü Üzerindeki Değişimlerin Belirlenmesi

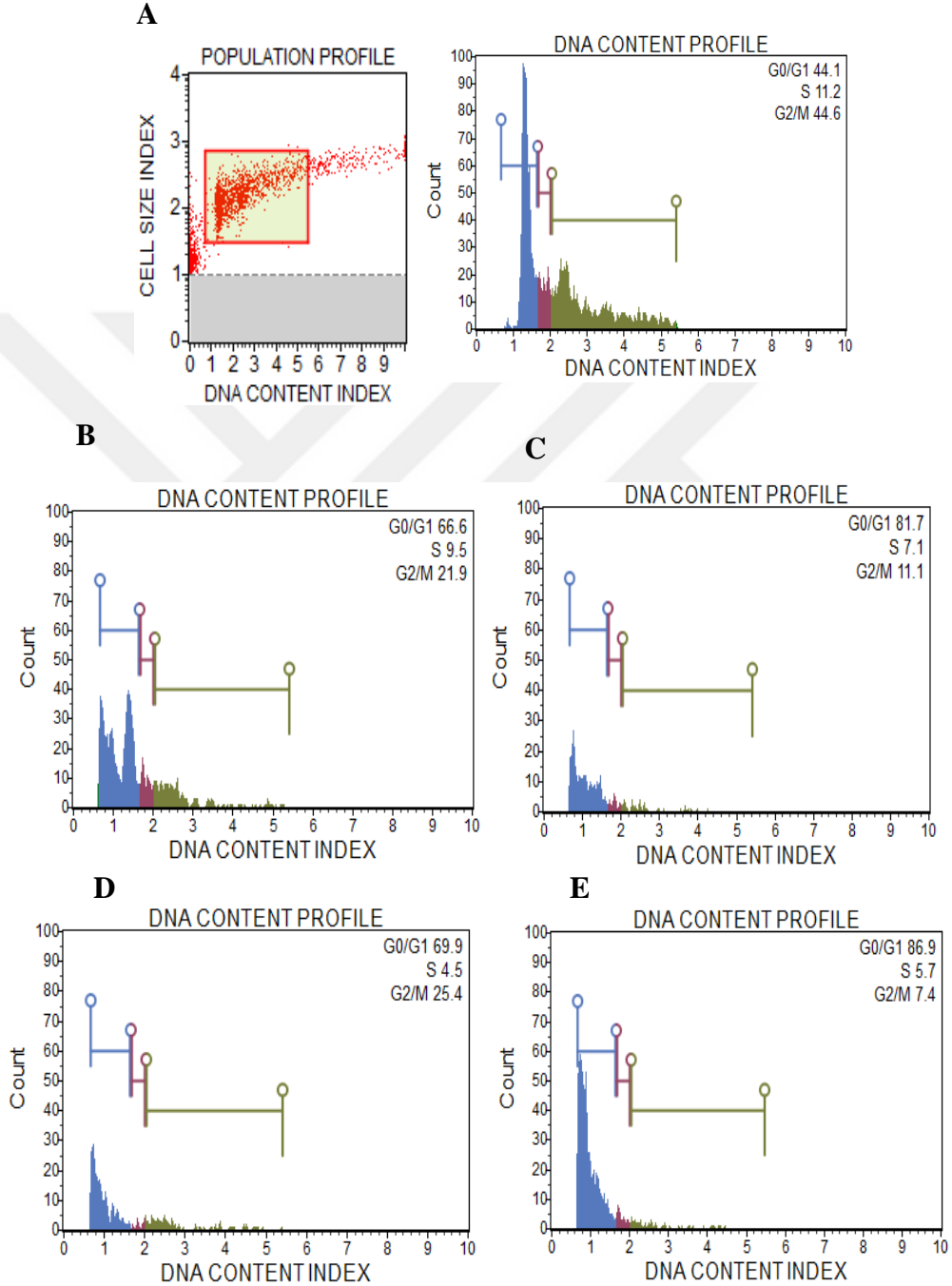
UA Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücrelerinde WST-1 analizi sonuçlarına göre 48. saatte 12,5; 25; 50; 100 μ M konsantrasyonlarda hücre döngüsü üzerindeki etkisi değerlendirilerek elde edilen bulgular Şekil 40-42’da sunuldu.

Hep G2 hücrelerinde UA’ nın hücre döngüsü evrelerindeki etkisi incelendiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (% 44,2), en düşük konsantrasyon olan 12,5 μ M UA uygulanan hücrelerde G0/G1 evresinde hücre miktarının % 66,6’ya arttığı analiz edilmesine rağmen, en yüksek konsantrasyon olan 100 μ M UA uygulanan hücrelerde G0/G1 evresinde hücre miktarı % 86,9 olarak belirlendi. G2/M evresinde ise kontrol grubuna göre 12,5 μ M UA uygulanan hücrelerde hücre miktarının % 44,6’dan % 21,9’a düştüğü belirlenmesine rağmen, 100 μ M UA uygulanan hücrelerde bu oran % 7,4 olarak tespit edildi (Şekil 40).

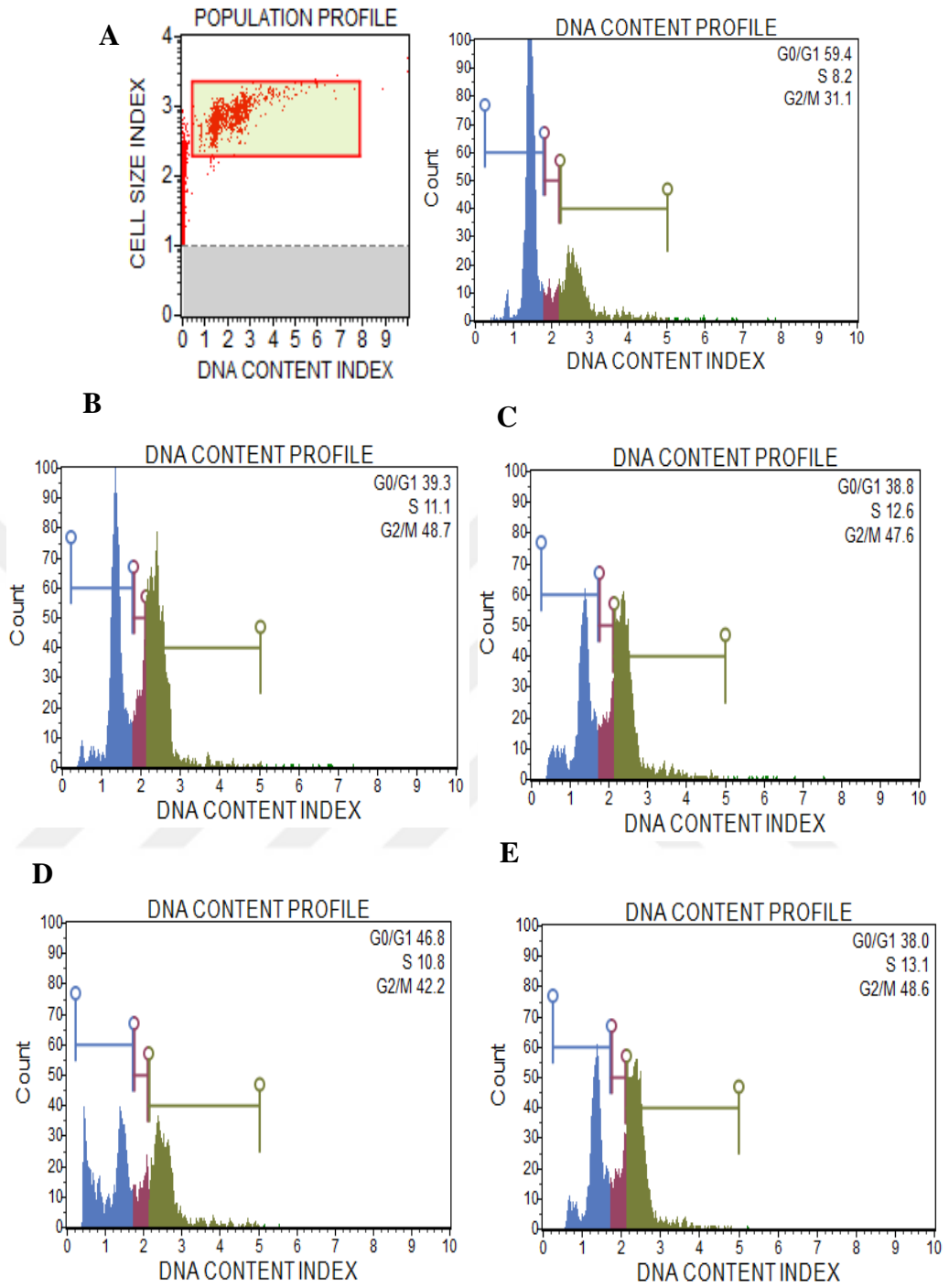
SNU-449 hücrelerinde UA’ nın hücre döngüsü evrelerindeki etkisi değerlendirildiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (% 59,4); 12,5 μ M UA uygulanan hücrelerde G0/G1 evresinde hücre miktarının % 39,3’ e azaldığı belirlenmesine rağmen, 100 μ M UA uygulanan hücrelerde G0/G1 evresinde hücre miktarı % 38,0 olarak analiz edildi. G2/M evresinde ise kontrol grubuna göre 12,5 μ M UA uygulanan hücrelerde hücre miktarının kontrol grubuna kıyasla % 31,1’den % 48,7’ye arttığı analiz edilmesine rağmen, 100 μ M UA uygulanan hücrelerde bu oran % 48,6 olarak belirlendi (Şekil 41).

HUVEC hücrelerinde UA’ nın hücre döngüsü evrelerindeki etkisi incelendiğinde ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (% 44,2) 12,5 μ M UA uygulanan hücrelerde G0/G1 evresinde hücre miktarının % 66,6’ ya arttığı analiz edilmesine rağmen, 100 μ M UA uygulanan hücrelerde G0/G1 evresinde hücre miktarı % 86,9 olarak belirlendi. G2/M evresinde ise kontrol grubuna göre 12,5 μ M UA uygulanan hücrelerde hücre miktarının kontrol grubuna kıyasla % 44,6’dan % 21,9’a azaldığı tespit edilmesine rağmen, 100 μ M UA uygulanan hücrelerde bu oran % 7,4 olarak belirlendi (Şekil 42).

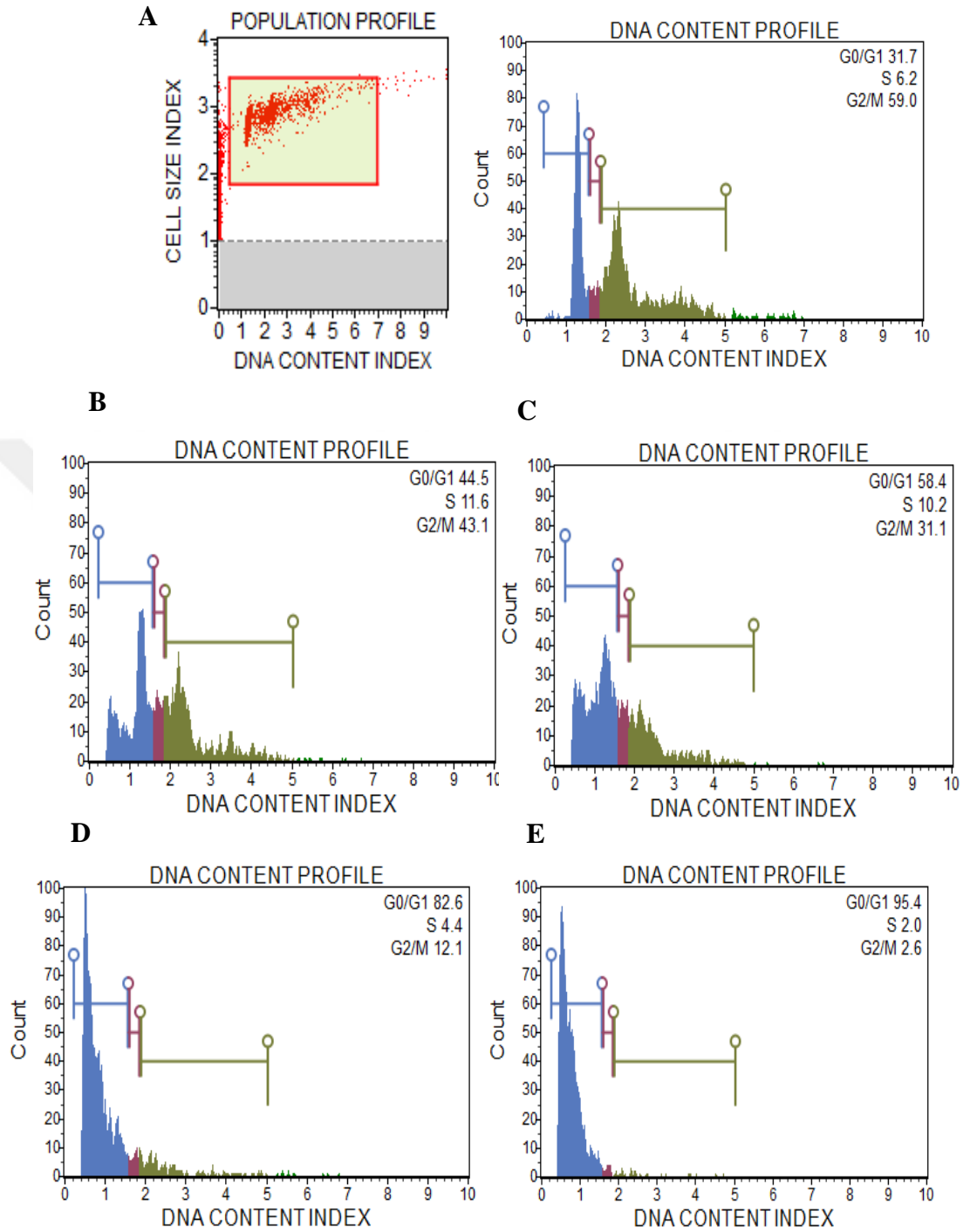
Sonuç olarak, UA' nın Hep G2 ve HUVEC hücrelerinde artan konsantrasyonuna bağlı olarak G0/G1 evresinde hücre miktarında artışa neden olurken, SNU-449 hücrelerinde G2/M evresinde hücre miktarında artışa neden olduğu analiz edilmiştir.



Şekil 40. Hep-G2 hücrelerinde UA'nın hücre siklusunda etkisi (A) Kontrol, (B) 12.5 μ M, (C) 25 μ M, (D) 50 μ M ve (E) 100 μ M.



Şekil 41. SNU449 hücrelerinde UA'nın hücre siklusunda etkisi (A) Kontrol, (B) 12.5 μ M, (C) 25 μ M, (D) 50 μ M ve (E) 100 μ M.



Şekil 42. HUVEC hücrelerinde UA'nın hücre siklusunda etkisi (A) Kontrol, (B) 12.5µM, (C) 25µM, (D) 50µM ve (E) 100µM.

4.3.2. SOR'un Hücre Döngüsü Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi

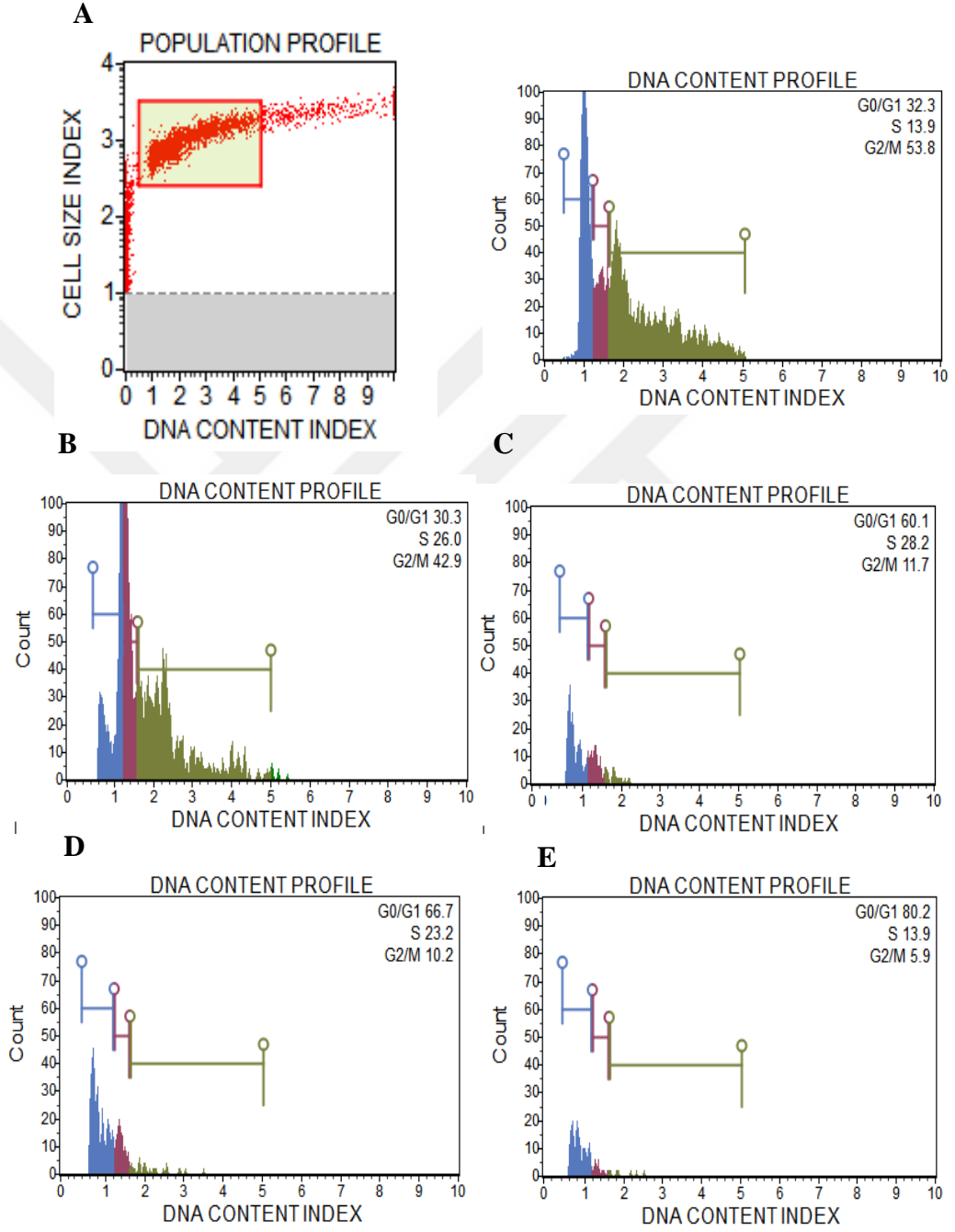
SOR'un Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücrelerinde WST-1 analizi sonuçlarına göre 48. saatte 0,5; 1; 2,5 ve 5 μ M konsantrasyonlarda hücre döngüsü üzerindeki etkisi değerlendirilerek elde edilen bulgular Şekil 43-45'de sunuldu.

Hep G2 hücrelerinde SOR' un hücre döngüsü evrelerindeki etkisi incelendiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (% 32,3), en düşük konsantrasyon olan 0,5 μ M SOR uygulanan hücrelerde G0/G1 evresinde hücre miktarının % 30,3'e azaldığı analiz edilmesine rağmen, en yüksek konsantrasyon olan 5 μ M SOR uygulanan hücrelerde G0/G1 evresinde hücre miktarı % 80,2 olarak belirlendi. G2/M evresinde ise kontrol grubuna göre 0,5 μ M SOR uygulanan hücrelerde hücre miktarının % 53,8' den % 42,9' a düştüğü belirlenmesine rağmen, 5 μ M SOR uygulanan hücrelerde bu oran % 5,9 olarak tespit edildi (Şekil 43).

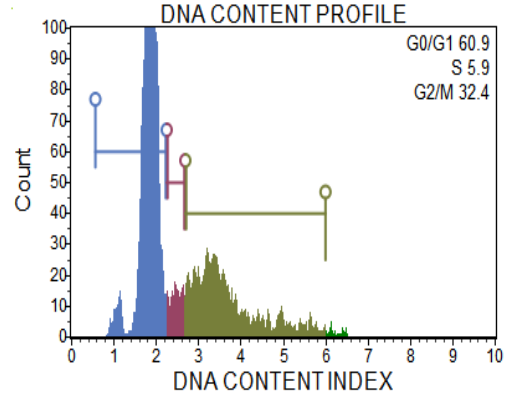
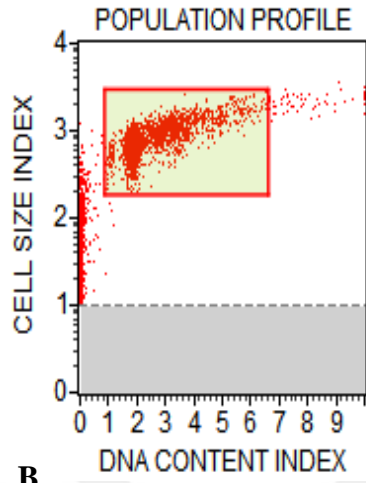
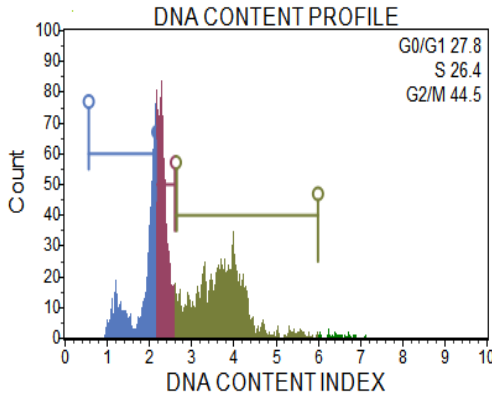
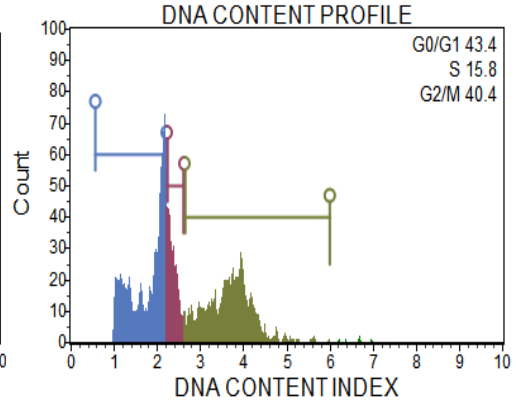
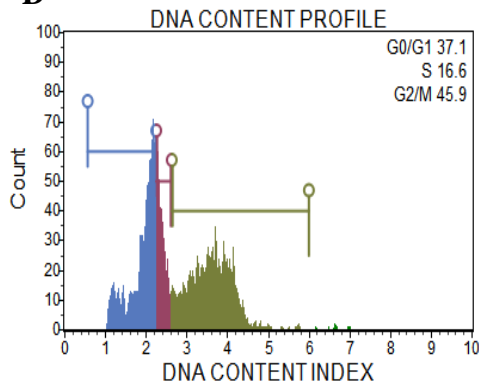
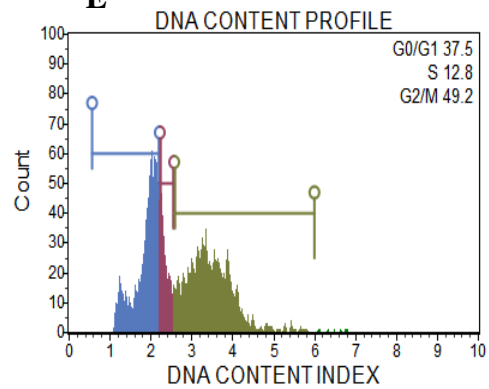
SNU-449 hücrelerinde SOR' un hücre döngüsü evrelerindeki etkisi incelendiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (% 60,9) 0,5 μ M SOR uygulanan hücrelerde G0/G1 evresinde hücre miktarının % 27,8'e düştüğü belirlenmesine rağmen, 5 μ M SOR uygulanan hücrelerde G0/G1 evresinde hücre miktarı % 37,5 olarak analiz edildi. G2/M evresinde ise kontrol grubuna göre 0,5 μ M SOR uygulanan hücrelerde hücre miktarının % 32,4'den % 44,5'e arttığı belirlenmesine rağmen, 5 μ M SOR uygulanan hücrelerde bu oran % 49,2 olarak tespit edildi (Şekil 44).

HUVEC hücrelerinde SOR' un hücre döngüsü evrelerindeki etkisi değerlendirildiğinde ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (% 28,9) 0,5 μ M SOR uygulanan hücrelerde G0/G1 evresinde hücre miktarının % 36,1' e arttığı tespit edilmesine rağmen, 5 μ M SOR uygulanan hücrelerde G0/G1 evresinde hücre miktarı % 39,7 olarak analiz edildi. G2/M evresinde ise kontrol grubuna göre 0,5 μ M SOR uygulanan hücrelerde, hücre miktarının % 63,7' den % 53,0' a azaldığı belirlenmesine rağmen, 5 μ M SOR uygulanan hücrelerde bu oran % 49,0 olarak analiz edildi (Şekil 45).

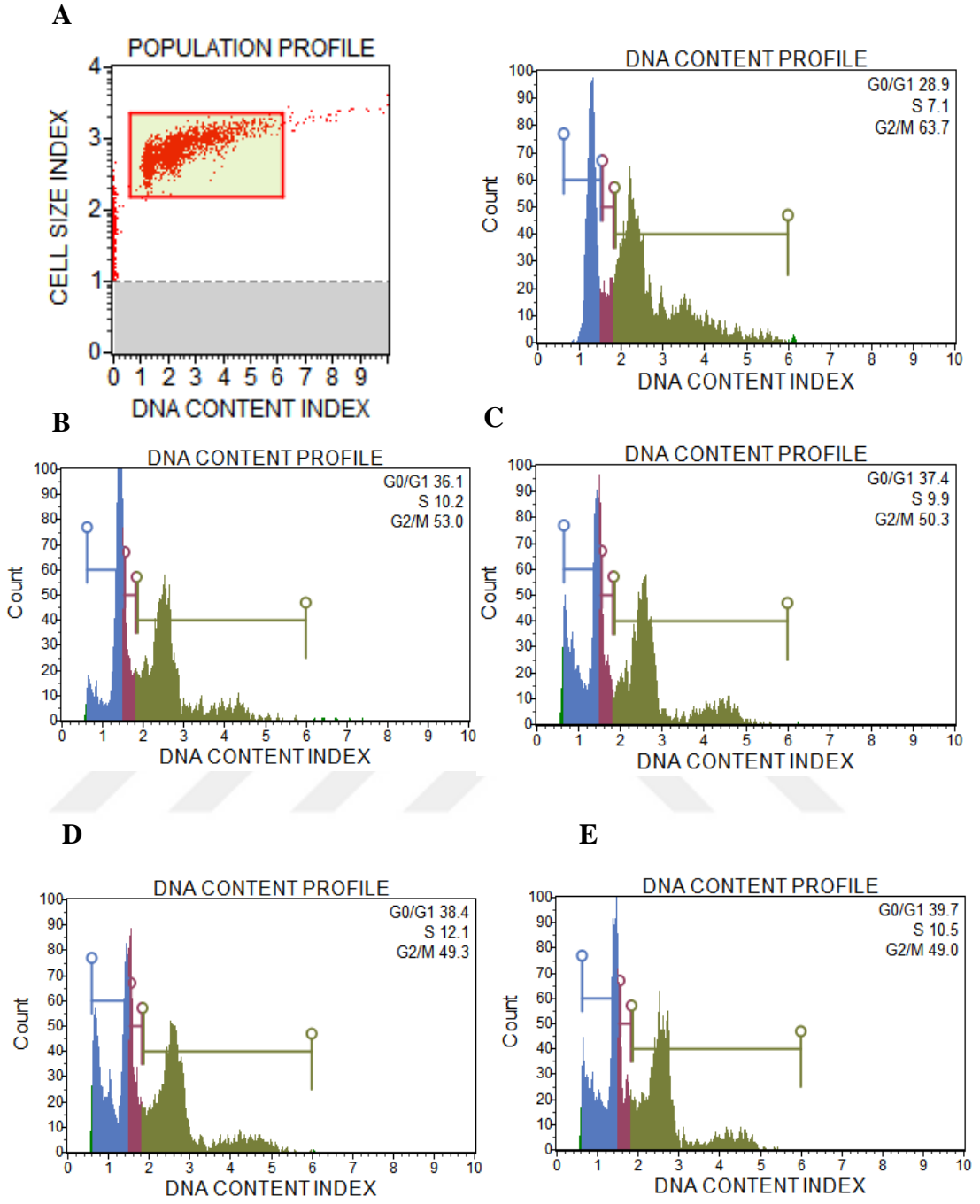
Sonuç olarak, SOR'un Hep G2 ve HUVEC hücrelerinde artan konsantrasyonuna bağlı olarak G0/G1 evresinde hücre miktarında artışa neden olurken, SNU-449 hücrelerinde G2/M evresinde hücre miktarında artışa neden olduğu belirlendi.



Şekil 43. HepG2 hücrelerinde SOR'un hücre siklusunda etkisi (A) Kontrol, (B) 0.5 μ M, (C) 1 μ M, (D) 2.5 μ M ve (E) 5 μ M.

A**B****C****D****E**

Şekil 44. SNU449 hücrelerinde SOR'un hücre siklusunda etkisi (A) Kontrol, (B) 0.5 μ M, (C) 1 μ M, (D) 2.5 μ M ve (E) 5 μ M.



Şekil 45. HUVEC hücrelerinde SOR'un hücre siklusunda etkisi (A) Kontrol, (B) 0.5 μ M, (C) 1 μ M, (D) 2.5 μ M ve (E) 5 μ M.

4.3.3. SOR ve UA'nın Kombin Olarak Hücre Döngüsü Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi

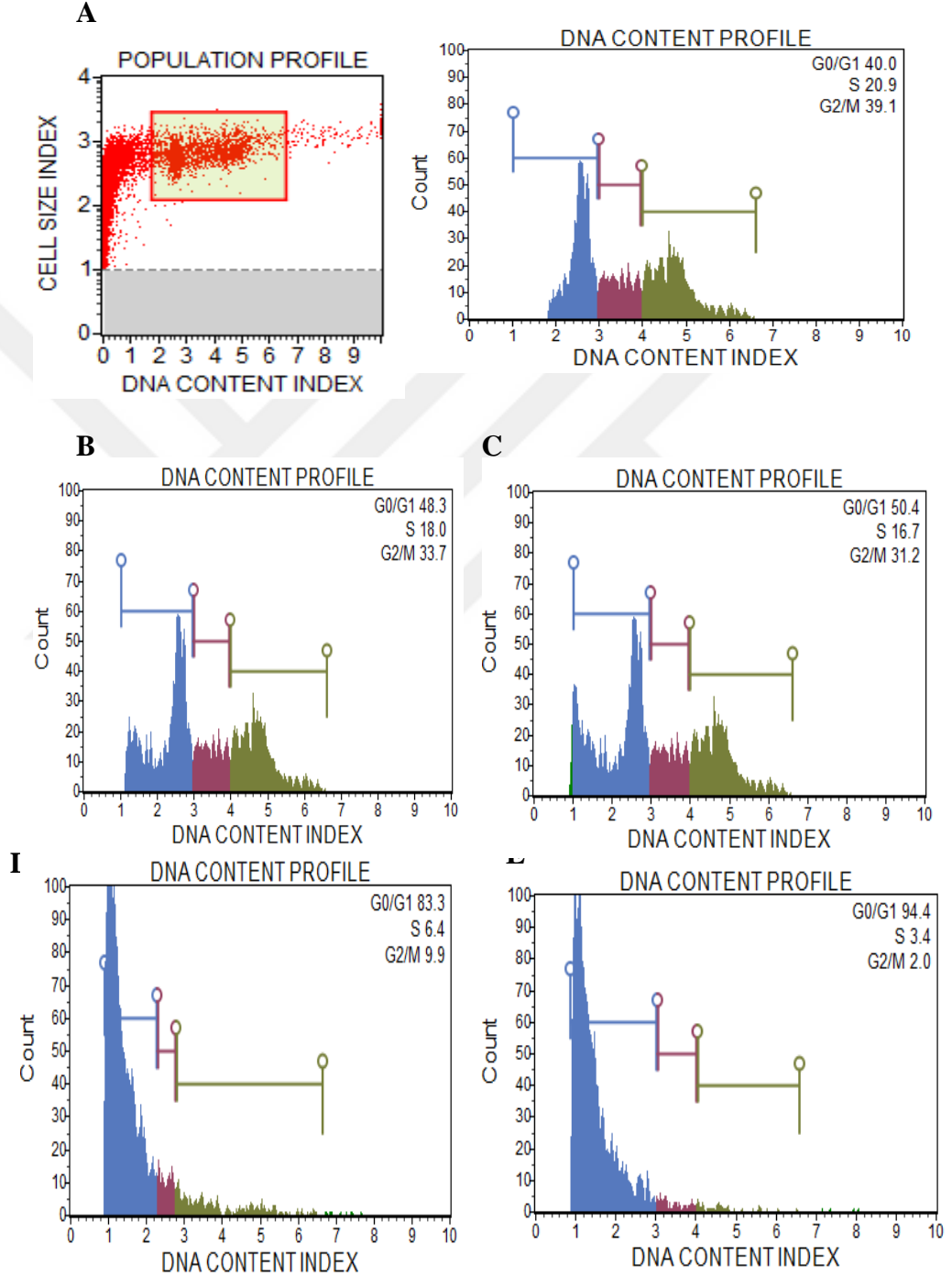
SOR ve UA'nın kombin olarak Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücrelerinde WST-1 analizi sonuçlarına göre 48. saatte sinerjik etki gösterdiği belirlenen 0,1 μ M SOR+ 12,5 μ M UA, 0,1 μ M SOR+ 25 μ M UA, 0,5 μ M SOR+12,5 μ M UA, 0,5 μ M SOR+ 25 μ M UA konsantrasyonlarda hücre döngüsü üzerindeki etkisi değerlendirilerek elde edilen bulgular Şekil 46-48'da sunuldu.

Hep G2 hücrelerinde SOR ve UA'nın kombin olarak hücre döngüsü evrelerindeki etkisi incelendiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (% 40,0), en düşük konsantrasyon olan 0,1 μ M SOR+ 12,5 μ M UA uygulanan hücrelerde G0/G1 evresinde hücre miktarının % 48,3'e arttığı analiz edilmesine rağmen, en yüksek konsantrasyon olan 0,5 μ M SOR+ 25 μ M UA uygulanan hücrelerde G0/G1 evresinde hücre miktarı % 94,4 olarak belirlendi. G2/M evresinde ise kontrol grubuna göre 0,1 μ M SOR+ 12,5 μ M UA uygulanan hücrelerde hücre miktarının % 39,1'den % 33,1'e düştüğü belirlenmesine rağmen, 0,5 μ M SOR+ 25 μ M UA uygulanan hücrelerde bu oran % 2,0 olarak tespit edildi (Şekil 46).

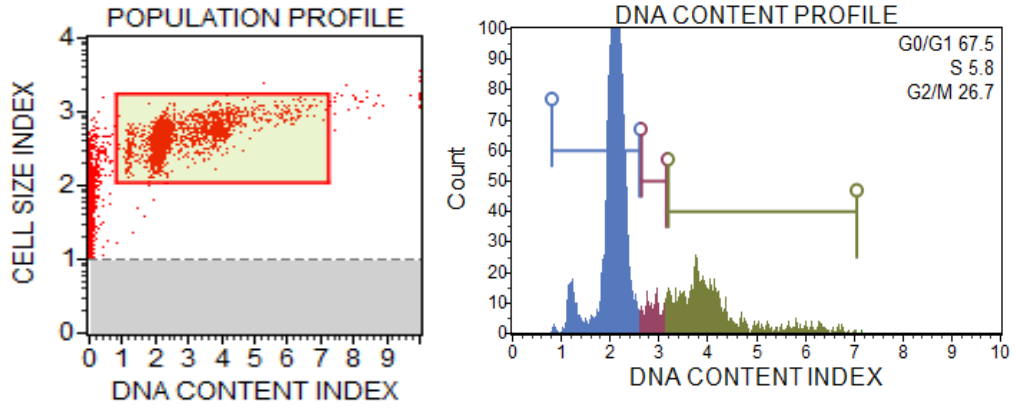
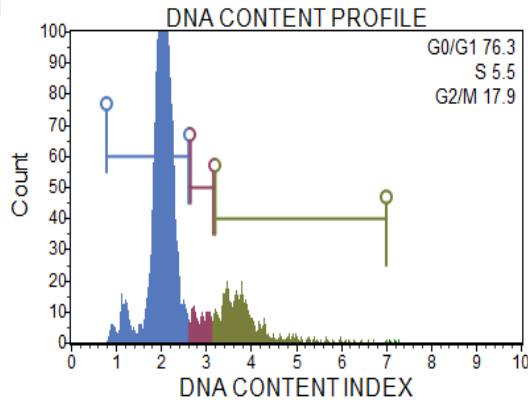
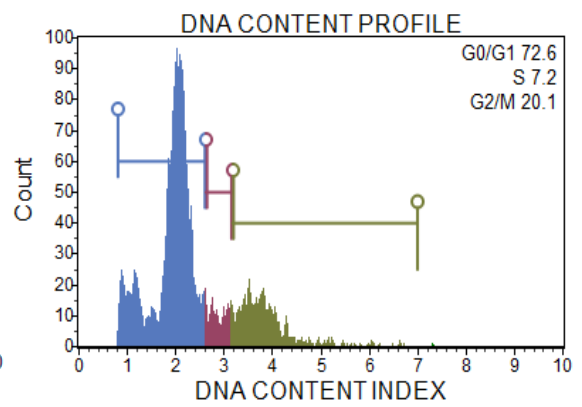
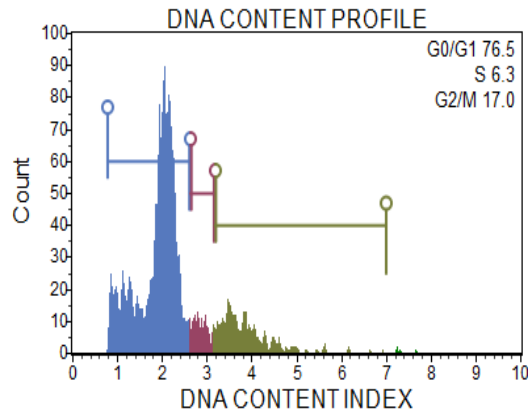
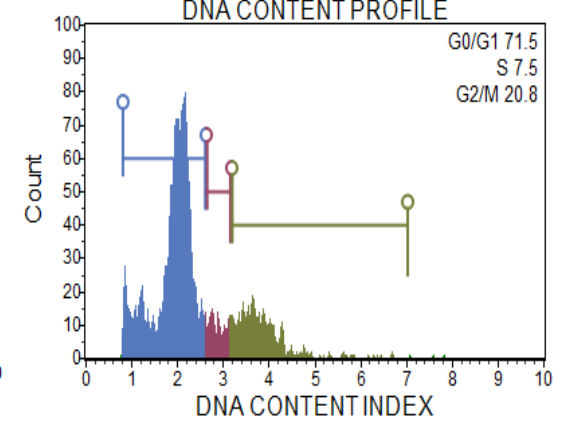
SNU-449 hücrelerinde SOR ve UA'nın kombin olarak hücre döngüsü evrelerindeki etkisi değerlendirildiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (% 67,5), 0,1 μ M SOR+ 12,5 μ M UA uygulanan hücrelerde G0/G1 evresinde hücre miktarının % 76,3'e arttığı belirlenmesine rağmen, 0,5 μ M SOR+ 25 μ M UA uygulanan hücrelerde G0/G1 evresinde hücre miktarı % 71,5 olarak tespit edildi. G2/M evresinde ise kontrol grubuna göre 0,1 μ M SOR+ 12,5 μ M UA uygulanan hücrelerde hücre miktarının % 26,7'den % 17,9'a düştüğü analiz edilmesine rağmen, 0,5 μ M SOR+ 25 μ M UA uygulanan hücrelerde bu oran % 20,8 olarak tespit edildi (Şekil 47).

HUVEC hücrelerinde SOR ve UA'nın kombin olarak hücre döngüsü evrelerindeki etkisi değerlendirildiğinde ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (% 29,7), 0,1 μ M SOR+ 12,5 μ M UA uygulanan hücrelerde G0/G1 evresinde hücre miktarının % 24,8'e azaldığı tespit edilmesine rağmen, 0,5 μ M SOR+ 25 μ M UA uygulanan hücrelerde G0/G1 evresinde hücre miktarı % 61,1 olarak belirlendi. G2/M evresinde ise kontrol

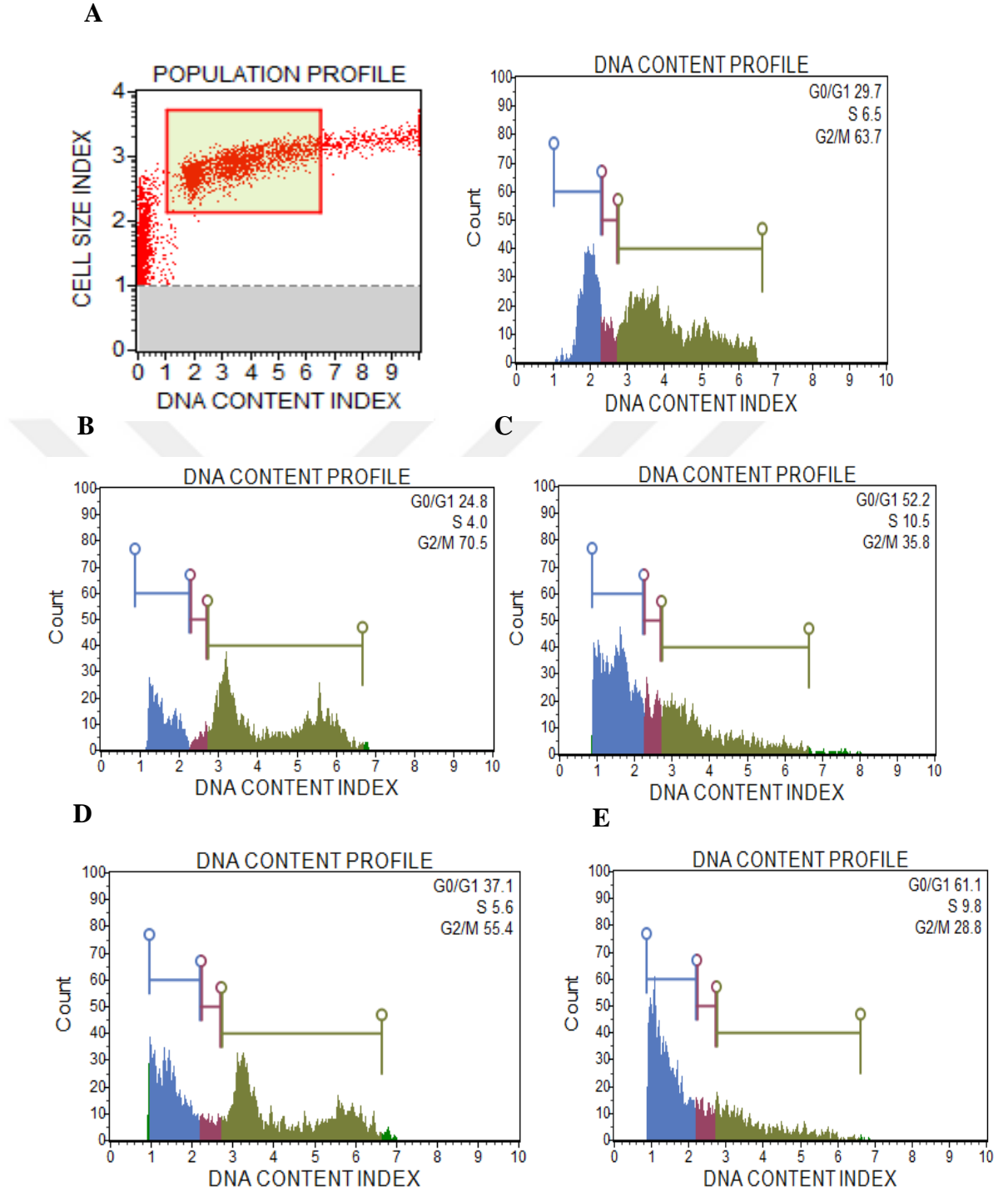
grubuna göre 0,1 μM SOR+ 12,5 μM UA uygulanan hücrelerde hücre miktarının % 63,7'den % 72,5' e arttığı analiz edilmesine rağmen, 0,5 μM SOR+ 25 μM UA uygulanan hücrelerde bu oran % 28,8 olarak belirlendi (Şekil 48).



Şekil 46. Hep G2 hücrelerinde SOR ve UA'nın hücre siklusunda kombin etkisi (A) Kontrol, (B) 0.1 μM SOR+ 12.5 μM UA, (C) 0.1 μM SOR+ 25 μM UA, (D) 0.5 μM SOR+ 12.5 μM UA, (E) 0.5 μM SOR+ 25 μM UA.

A**B****C****D****E**

Şekil 47. SNU-449 hücrelerinde SOR ve UA'nın hücre siklusunda kombin etkisi (A) Kontrol, (B) 0.1 μ M SOR+ 12.5 μ M UA, (C) 0.1 μ M SOR+ 25 μ M UA, (D) 0.5 μ M SOR+ 12.5 μ M UA, (E) 0.5 μ M SOR+ 25 μ M UA.



Şekil 48. HUVEC hücrelerinde SOR ve UA'nın hücre siklusunda kombin etkisi (A) Kontrol, (B) 0.1 μM SOR+ 12.5 μM UA, (C) 0.1 μM SOR+ 25 μM UA, (D) 0.5 μM SOR+ 12.5 μM UA, (E) 0.5 μM SOR+ 25 μM UA.

Sonuç olarak, Hep G2 hücrelerinde kombin SOR ve UA'nın G0/G1 evresinde hücre miktarında tek ajan olarak SOR ve UA'ya göre daha düşük konsantrasyonlarda daha fazla hücre miktarının artmasına neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, tek ajan

olarak SOR ve UA uygulanan SNU-449 hücrelerinde G2/M evresinde hücre miktarında artış belirlenmesine rağmen, kombin SOR ve UA uygulanan hücrelerde G0/G1 evresinde hücre miktarında artış analiz edilmiştir. HUVEC hücrelerinde ise, tek ajan olarak SOR' un uygulandığı hücrelere göre daha fazla miktarda G0/G1 evresinde hücre miktarında artış tespit edilmiştir.

4.4. Hücrelerde Meydana Gelen Morfolojik Değişimlerin Belirlenmesi

4.4.1. UA'nın Hücre Morfolojileri Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

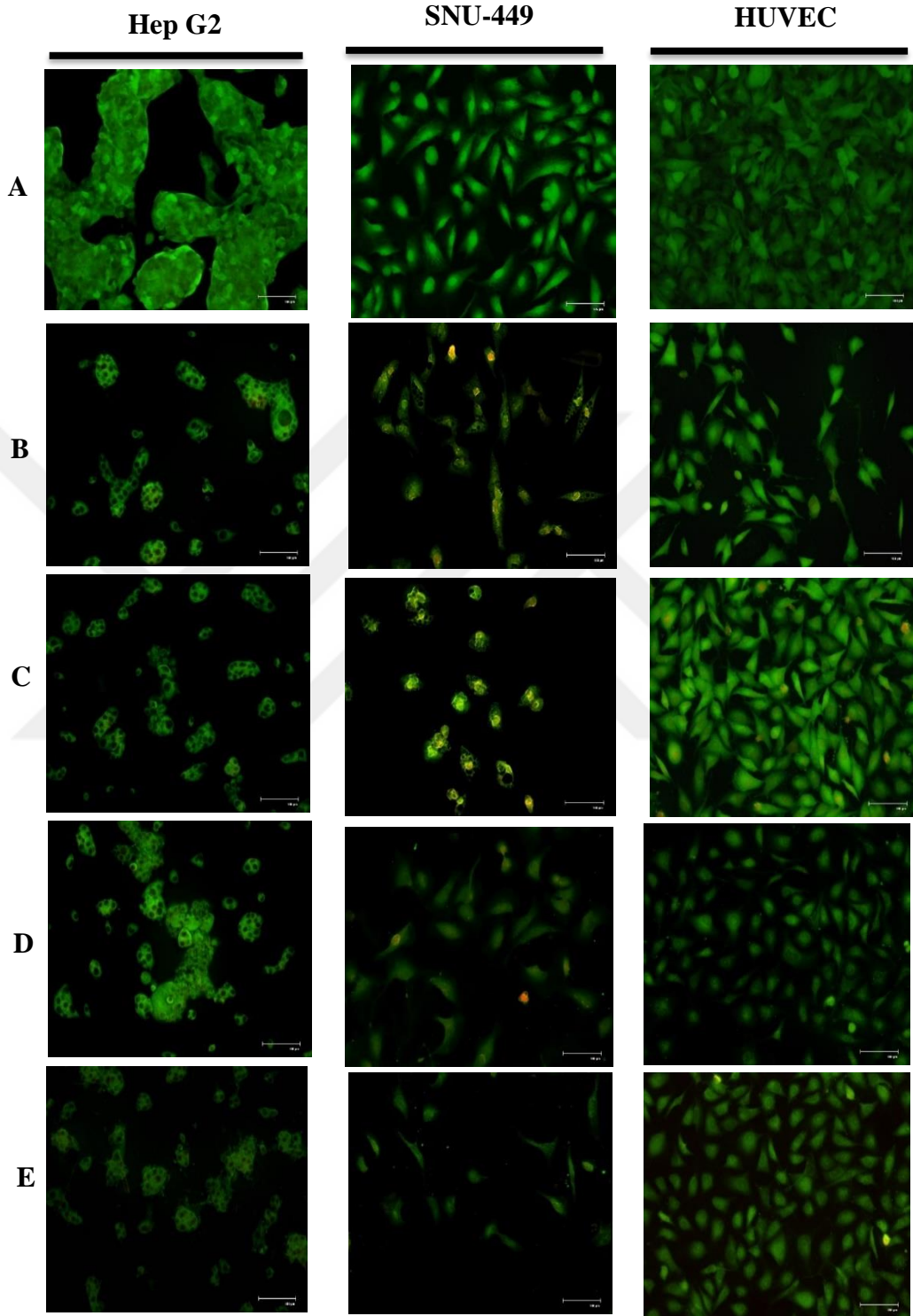
UA'nın Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücrelerinde WST-1 analizi sonuçlarına göre 48. saatte 12,5; 25; 50, 100 μ M konsantrasyonlarda neden olduğu yapısal değişimler AO/EB boyaması ile belirlenerek elde edilen görüntüler Şekil 49'da sunuldu.

Hep G2 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 12,5 μ M UA uygulanan hücrelerin genel morfolojik yapıların değiştiği (daha oval bir yapı) ve hücrelerde hasar meydana geldiği gözlemlendi. UA'nın uygulanan konsantrasyonu arttıkça hücrelerin membran bütünlüğünün bozulma hem AO hemde EB boyaları ile boyanan hücre sayısında artış görüntülenmesine rağmen hücrelerde çok sayıda vakuol oluşumu da gözlemlendi. Ayrıca, geç apoptozun karakteristik özelliklerinden olan apoptotik cisimcikler görüntülendi.

SNU-449 hücrelerinin genel morfolojik yapıları Hep G2 hücrelerinde göre daha iğsi veya mekik şeklinde hücreler olmasına rağmen, 12,5 ve 25 μ M UA uygulanan hücrelerde çok sayıda vakuol oluşumunun meydana geldiği, yoğunlaşmış ve asimetrik şekle sahip AO ve EB ile boyanmış turuncu nükleusa sahip olan geç evre apoptotik hücreler ve nükleuslarda kromatin yoğunlaşması ve hücre membran bütünlüğünün bozulduğu belirlendi. Ancak, 50 ve 100 μ M UA uygulanan hücrelerin genel morfolojik yapılarının kontrol grubuna daha çok benzediği belirlenmesine rağmen, nükleusta kromatin yoğunlaşması, apoptotik cisimcikler ve daha oval morfolojik yapıda hücreler görüntülendi.

HUVEC hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, UA'nın uygulanan konsantrasyonu arttıkça hücrelerde kromatin yoğunlaşması ile birlikte bazı kırmızı

nükleusa sahip sadece EB ile boyanmış nekrotik hücreler ve erken apoptotik hücreler görüntülendi.



Şekil 49. UA'nın Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişimler. (A) Kontrol, (B) 12.5 μ M, (C) 25 μ M, (D) 50 μ M, (E) 100 μ M.

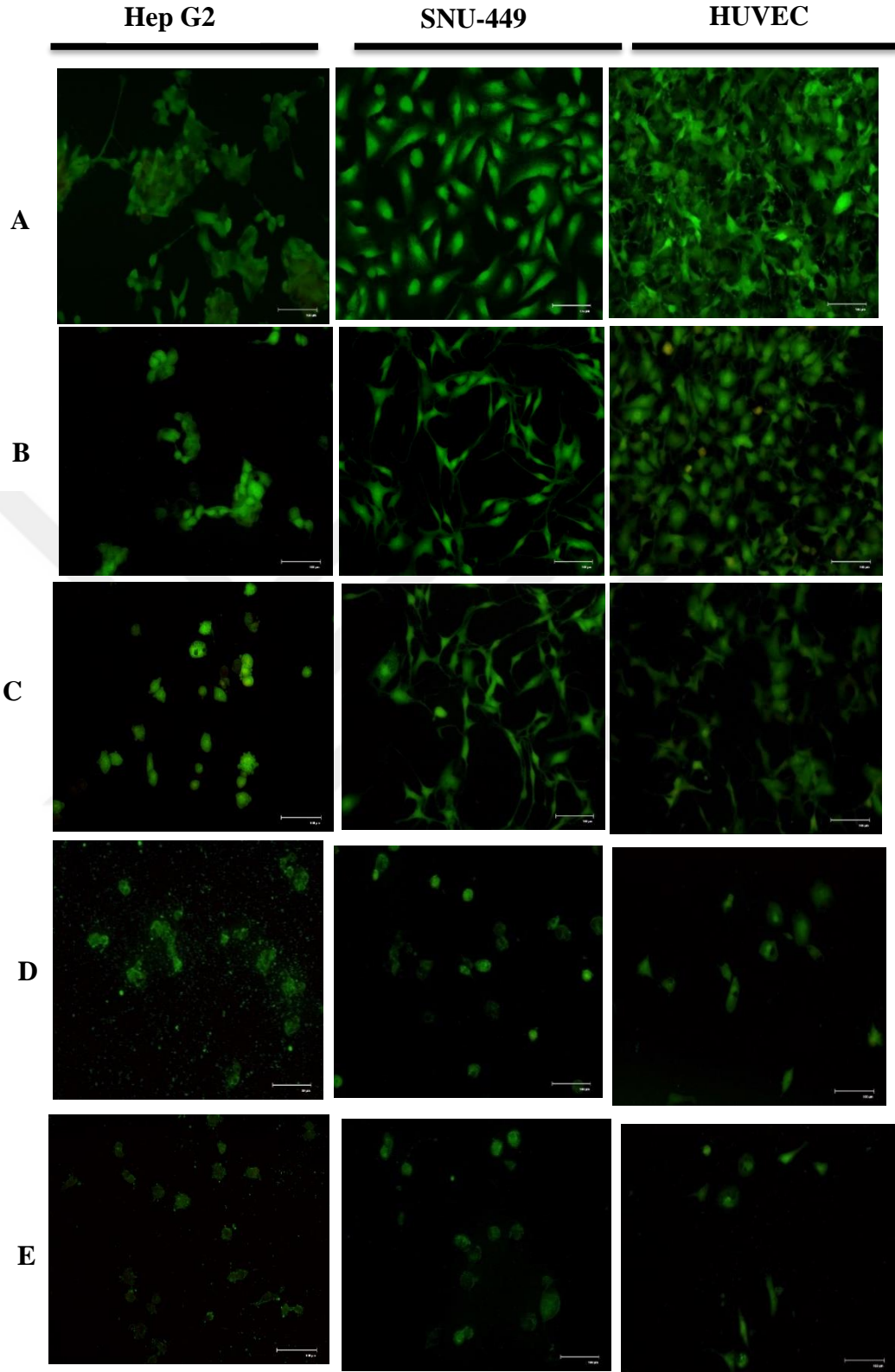
4.4.2. SOR'un Hücre Morfolojileri Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

Sorafenibin (SOR) Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücrelerinde WST-1 analizi sonuçlarına göre 48. saatte 0.5, 1, 2.5, 5 μ M konsantrasyonlarda neden olduğu yapısal değişimler AO/EB boyaması ile belirlenerek elde edilen görüntüler Şekil 50'de sunuldu.

Hep G2 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, SOR'un uygulanan konsantrasyonu arttıkça özellikle 2.5 ve 5 μ M SOR uygulanan hücrelerde, hücre membran bütünlüğünün bozulduğu, nükleusta kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimcikler görüntüledi. Ayrıca, geç evre apoptotik hücrelerin yanı sıra nekrotik hücrelerde gözlemlendi.

SNU-449 hücrelerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, SOR'un uygulanan konsantrasyonu arttıkça nükleuslarda kromatin yoğunlaşması, apoptotik cisimcikler ve hücre membran bütünlüğü tamamen bozulmuş oval morfolojik yapıda hücreler görüntüledi. Ayrıca geç evre apoptotik hücrelerin yanı sıra bazı nekrotik hücrelerde gözlemlendi.

HUVEC hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, SOR'un uygulanan konsantrasyonu arttıkça hücrelerde kromatin yoğunlaşması ile birlikte bazı kırmızı nükleusa sahip sadece EB ile boyanmış nekrotik hücreler ve erken apoptotik hücreler görüntüledi. Ayrıca, SOR'un toksik etkisinden dolayı nüklear fragmentasyon, membran tomurcuklanma ve apoptotik cisimciklerin meydana geldiği görüntüledi.



Şekil 50. SOR'un Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişimler. (A) Kontrol, (B) 0.5 μ M, (C) 1 μ M, (D) 2.5 μ M, (E) 5 μ M.

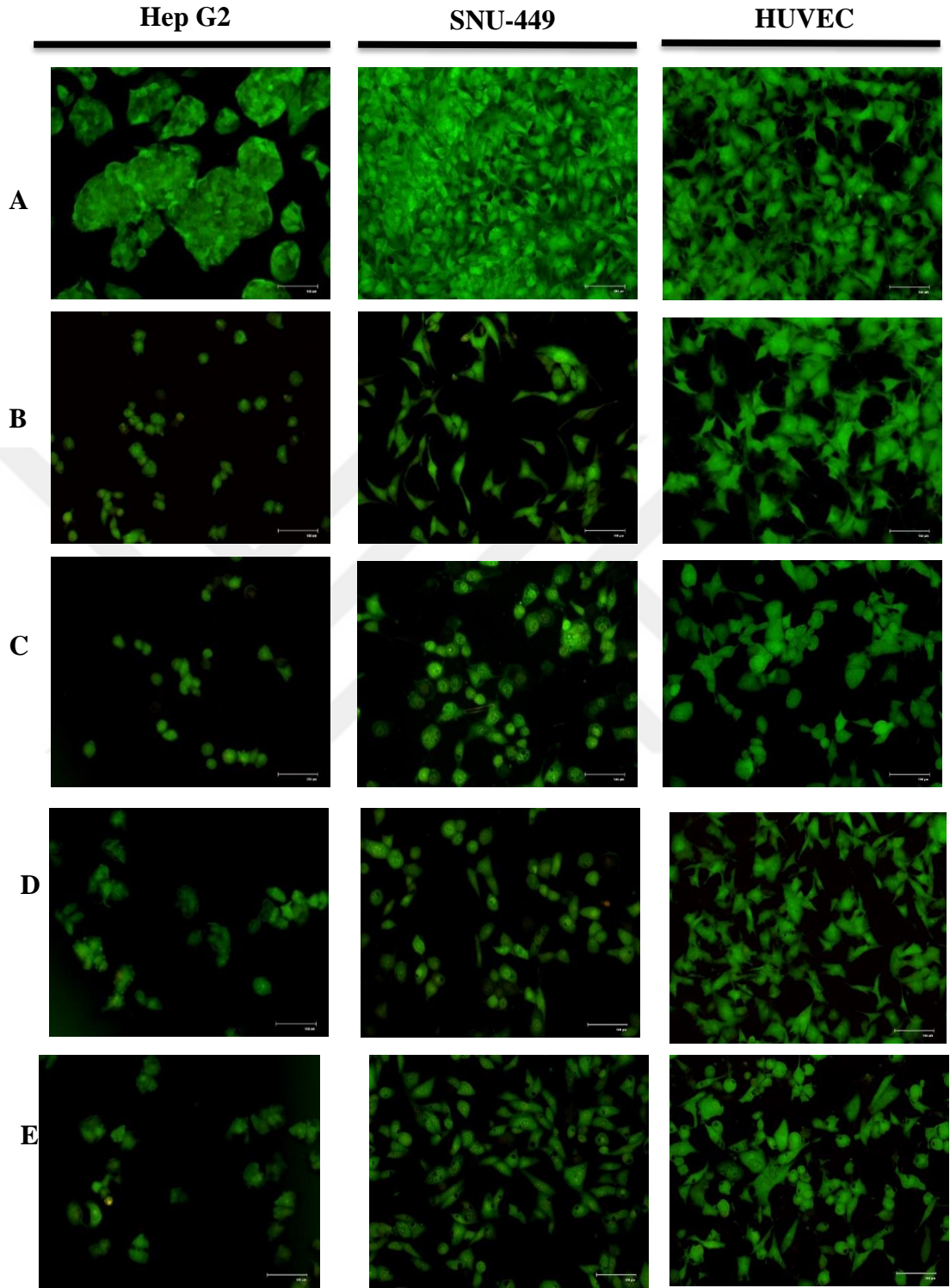
4.3.3. SOR ve UA'nın Kombin Olarak Hücre Morfolojileri Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

SOR ve UA Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücrelerinde kombin olarak WST-1 analizi sonuçlarına göre 48. saatte sinerjik etki gösterdikleri 0,1 μ M SOR+ 12,5 μ M UA, 0,1 μ M SOR+ 25 μ M UA, 0,5 μ M SOR+ 12,5 μ M UA, 0,5 μ M SOR+ 25 μ M UA konsantrasyonlarında neden olduğu yapısal değişimler AO/EB boyaması ile belirlenerek elde edilen görüntüler Şekil 51' de sunuldu.

Hep G2 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 0,1 μ M SOR+ 12,5 μ M UA ve 0,1 μ M SOR+ 25 μ M UA uygulanan hücrelerin daha oval bir yapıya sahip olduğu ve hem AO ve EB ile boyanmış turuncu geç evre apoptotik hem de kırmızı nükleusa sahip sadece EB ile boyanmış nekrotik hücrelerin olduğu gözlemlendi. Ayrıca, nükleusta kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimcikler görüntüldü. Ancak, 0,5 μ M SOR+ 12,5 μ M UA ve 0,5 μ M SOR+ 25 μ M UA SOR uygulanan hücrelerde diğer kombin doz uygulamalarına göre hücrelerde daha fazla apoptotik hücre morfolojisi (kromatin yoğunlaşması, membran tomurcuklanması, apoptotik cisimcikler ve membran bütünlüğünde bozulma) gözlemlendi.

SNU-449 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 0,1 μ M SOR+ 12,5 μ M UA ve 0,1 μ M SOR+ 25 μ M UA uygulanan hücrelerde AO ile boyanmış erken evre apoptotik, AO ve EB ile boyanmış turuncu nükleusa sahip geç apoptotik hücrelerin yanı sıra EB ile boyanmış nekrotik hücreler de gözlemlendi. Ancak, 0,5 μ M SOR+ 12,5 μ M UA ve 0,5 μ M SOR+ 25 μ M UA SOR uygulanan hücrelerde tek UA uygulanan hücrelerdeki gibi çok sayıda vakuol oluşumu, nükleusta belirgin kromatin yoğunlaşması görüntüldü. 0,1 μ M SOR+ 12,5 μ M UA ve 0,1 μ M SOR+ 25 μ M UA uygulanan hücelere göre daha az miktarda nekrotik hücre gözlemlendi.

HUVEC hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 0,1 μ M SOR+ 12,5 μ M UA ve 0,1 μ M SOR+ 25 μ M UA uygulanan hücrelerde belirgin kromatin yoğunlaşması gözlemlenmemesine rağmen, hücrelerin kontrol grubuna göre genel morfolojik yapılarının daha oval olduğu görüntüldü. Ancak, 0,5 μ M SOR+ 12,5 μ M UA ve 0,5 μ M SOR+ 25 μ M UA SOR uygulanan hücrelerde nükleusta kromatin yoğunlaşması, belirgin hasar, bazı hücrelerde vakuol oluşumları ve nekrotik hücreler de gözlemlendi.



Şekil 51. SOR ve UA'nın Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişimler. (A) Kontrol, (B) 0.1 μM SOR+ 12.5 μM UA, (C) 0.1 μM SOR+ 25 μM UA, (D) 0.5 μM SOR+ 12.5 μM UA, (E) 0.5 μM SOR+ 25 μM UA.

Sonuç olarak, kombin olarak SOR ve UA'nın tek ajan olarak SOR ve UA'ya göre Hep G2 ve SNU-449 hücrelerinde daha fazla geç apoptotik ölüme neden olduğu görülmüştür. Ayrıca, kombin olarak SOR ve UA'nın tek ajan olarak uygulanan SOR'a göre HUVEC hücrelerinde daha az hasara neden olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen veriler, WST-1 ve Annexin V sonuçlarını destekler niteliktedir.



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mevcut tez çalışmasında, HSK tedavisinde günümüzde tek kemoterapik ajan olarak kullanılan SOR'un daha düşük konsantrasyonlarda terapötik etkisini arttırmak ve normal hücrelerde neden olduğu hasarı azaltmak amacıyla literatürde potansiyel apoptotik ve otofajik etkileri bilinen UA ile SOR'un ilk kez kombin terapötik etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Günümüzde mevcut tedavi yöntemlerine karşı kanser hücrelerinde gelişen ilaç direnci, tümörün metastaz ve anjiyogenez potansiyeli, tümörün heterojen yapısı ve kemoterapik ajanların neden olduğu yan etkiler HSK tedavisinde başarının elde edilmesinde güncel sorunları oluşturmaktadır (Frei and Eder, 2003, Zhang ve ark. 2012). Bu nedenle, son yıllarda kanser ve HSK tedavisinde güncel yaklaşım olarak kemoterapik ajanlar ile birlikte çeşitli kemoterapik ilaç kombinasyonlarının, bitkisel özütlerin veya etken maddelerinin etkilerinin araştırıldığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar dikkat çekmektedir.

Günümüzde bitkisel özütlerinin, mantar ve liken metabolitlerinin ve etken maddelerinin kanser tedavisinde potansiyel terapötik etkilerinden dolayı özellikle içerdikleri etken maddeler yeni nesil kemoterapik ajanların geliştirilmesinde önem kazanmaktadır. Bazı kemoterapik ajanların bitkisel kaynaklı olduğu literatürde belirtilmiştir. Örneğin, kurkumin (*Curcuma longa*), paklitaksel (*Pacific yew*), kampoateksin (*Camptotheca acuminata*) ve vinkristinin (*Catharanthus roseus*) çeşitli kanser türlerinde etkinliği belirlenen kemoterapik ajanlardır. Ancak, likenlerin özellikle büyüme hızlarının yavaş olması ve metabolitlerin sentezlenmesinin zor olmasından dolayı ilaç endüstrisindeki kullanım alanları kısıtlıdır (Miao ve ark. 2001; Solowey ve ark. 2014). Bu nedenle, bitkisel özütlerinin, mantar ve liken metabolitlerinin ve etken maddelerinin kanser hücrelerinde neden olduğu ölüm mekanizmalarının, içerdiği etken madde tiplerinin ve oranlarının, kombin etkide kullanılan ajanlar ile etkileşimlerinin ve özellikle normal hücrelerde neden olduğu toksik etkilerin belirlendiği detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir (Lee ve ark. 2005; Norwood ve ark. 2007; Morris ve ark. 2008, Ferlay ve ark. 2012).

Bir liken metaboliti olarak UA'nın, son yıllarda anti-kanserojen potansiyel terapötik etkisinden dolayı kanser hücrelerinde sitotoksik, apoptotik ve otofajik etkisinin belirlendiği çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar literatürde mevcuttur (Ahmadjian ve Hale, 1973; Manojlovic ve ark, 2002, Shrestha and St Clair, 2013). Ancak, UA'nın herhangi bir kemoterapik ajanla kombin etkisinin araştırıldığı bir çalışma literatürde yer almamaktadır.

Literatürde UA'nın HSK hücrelerinde sitotoksik etkisinin belirlendiği sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Chen ve ark. (2014) Hep G2 HSK hücre hattında 2, 6, 12, 24 ve 48 saatte, 1.562, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 37.5 ve 50 μ M konsantrasyonlarda UA'nın sitotoksik etkisini araştırdıkları çalışmalarında UA'nın artan konsantrasyonuna bağlı olarak özellikle 24 ve 48 saatte hücrelerde canlılık oranının anlamlı bir şekilde azaldığını belirtmişlerdir ($p < 0.05$). Ayrıca, 25 μ M UA uygulanan hücrelerde otofajik ve apoptotik ölüm gözlemlenmiştir (Chen ve ark. 2014). Mevcut tez çalışmasında, UA'nın Hep G2 ve SNU-449 HSK hücrelerinde sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen WST-1 analizi sonucunda hücrelerin UA'nın artan zamanına bağlı olarak canlılık oranının anlamlı bir şekilde azalışa yol açtığı ve SNU-449 hücrelerinde canlılık oranında Hep G2 hücrelerine göre daha fazla oranda azalış olduğu analiz edilmiştir ($p < 0.01$). Ancak 50 ve 75 μ M UA uygulanan özellikle Hep G2 hücrelerinin canlılık oranında anlamlı bir artış belirlenmiştir ($p < 0.01$) ve bu artışın HepG2 hücrelerinin agresif heterojen yapısından veya hücrelerde UA'ya karşı gelişen çoklu ilaç direnci (MDR)'den kaynaklanabileceği öngörülmektedir. Bu nedenle literatürde UA'nın 50 μ M konsantrasyona kadar apoptotik ve otofajik etkisinin araştırıldığı görülmektedir (Chen ve ark. 2014). Ayrıca UA'nın HUVEC kontrol hücrelerinde de toksik etkiye sahip olmadığı analiz edilmesine rağmen, 50 ve 75 μ M UA uygulanan HUVEC hücrelerinde canlılık oranında anlamlı derecede azalış belirlenmiştir. Ancak UA'nın kontrol hücrelerinde sitotoksik, apoptotik ve otofajik etkisinin araştırıldığı detaylı bir çalışma mevcut olmadığından dolayı, özellikle 50 ve 75 μ M konsantrasyonda UA'nın HUVEC kontrol hücrelerinde neden olduğu toksik etkinin ve kanser hücrelerinde neden olduğu proliferatif etkinin nedenlerinin araştırılacağı detaylı çalışmaların gerçekleştirilmesine gerek duyulmaktadır (Rabelo ve ark. 2012). UA'nın apoptotik etkisinin belirlenmesi amacıyla literatürde gerçekleştirilen analizler sonucunda UA uygulanan kanser hücrelerinde geç apoptotik

ölümün arttığı belirlenmiştir (Bessadottir ve ark. 2012; Sing ve ark. 2013). Yu ve ark.. (2016) yaptıkları çalışmalarında, Hep G2 hücrelerinde özellikle geç evre apoptotik ölümün arttığını belirtmişlerdir (Yu ve ark. 2016). Mevcut tez çalışmasında, Hep G2 ve SNU-449 hücrelerinde UA'nın artan konsantrasyonuna (12.5-100 µM UA) bağlı olarak 48. saatte hücrelerde geç apoptotik ölümün arttığı ve SNU-449 hücrelerinde Hep G2 hücrelerine göre geç apoptotik ölüm oranının daha fazla olduğu belirlenmiştir. HUVEC hücrelerinde ise WST-1 sonuçlarında belirlendiği gibi hücrelerde UA'nın artan konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerde erken ve geç apoptotik ölüm yüzdesinde az bir oranda artış tespit edilmiştir (100 µM UA erken ve geç apoptoz oranları sırasıyla %6.20 ve %2.65).

Ayrıca, UA'nın hücre siklusunda G0/G1 evresinde hücre miktarında artışa neden olduğu bilinmektedir (Singh ve ark. 2013; Chen ve ark. 2014). Mevcut tez kapsamında UA'nın artan konsantrasyonuna bağlı olarak Hep Ge ve HUVEC hücrelerinde G0/G1 evresinde hücre miktarının arttığı belirlenmesine rağmen, SNU 449 hücrelerinde G2/M evresinde hücre miktarında artış tespit edilmiştir. G0/G1 evresinde hücre miktarında artış hücre siklusunda gecikmeye neden olarak kanser hücrelerinin proliferatif etkilerinin azalmasında etkilidir. UA uygulanan SNU-449 hücrelerinde G2/M evresinde hücre miktarında artışın ise, hücrelerin G0/G1 evresinde tutulmasında rol alan CDK2A geninde taşıdıkları mutasyondan kaynaklanabileceği ve bu nedenle UA'nın hücrelerde farklı evrede hücre miktarında artışa neden olarak hücrelerin mitozaya girmesini engelleme sureti ile proliferatif etkilerinin azalmasında rol aldığı öngörülmektedir. (Anonim. 2017, Anonim A. 2017)

UA'nın hücrelerde neden olduğu morfolojik değişimlerin görüntülediği çalışmalarda son yıllarda apoptozun yanı sıra UA'nın kanser hücrelerinde (Hep G2, CAPAN-2, MCF-7, T47D) otofajik ölüme neden olduğu belirtilmektedir (Kroemer ve ark. , 2010; Bessadottir ve ark. 2012, Chen ve ark. 2014). Mevcut tez çalışmasında, UA'nın artan konsantrasyonuna bağlı olarak Hep G2 ve SNU-449 hücrelerinde hem geç apoptotik hücreler hem de çok sayıda vakuol içeren otofajik ölüme gittiği öngörülen hücrelerin olduğu görüntülenmiştir. Bu nedenle, mevcut tez kapsamında UA'nın HSK hücre hatlarında otofajik ölüme neden olduğunun belirlenebilmesi için LC3-II ve Beklin-1 gibi otofaji belirteçlerinin analiz edildiği detaylı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

SOR' un, FDA tarafından onaylanan ve günümüzde HSK tedavisinde kullanılan bir multi kinaz inhibitörü olmasına rağmen, hastalarda sağ kalım süresinin kısa olması ve istenmeyen yan etkileri SOR'un tedavide kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle son yıllarda yapılan çalışmalarda SOR ile birlikte kemoterapik ajanların, bitkisel etken maddelerin ve anti-oksidan bileşiklerin kombin terapötik tedavi stratejilerinin geliştirilmesine odaklanılmaktadır (Bluanchet ve ark. 2010, Mishra ve ark.2013).

HSK tedavisinde SOR ile birlikte kombin tedavi olarak MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR, EGFR, histon deasetilaz ve anjiyogenez inhibitörlerin etkisi ile ilgili çeşitli *in vitro*, *in vivo* ve klinik faz denemeleri mevcuttur (Frei and Eder, 2003; Schmieder ve ark. 2013; Huynh ve ark. 2009; Piguet ve ark. 2011, Ezzoukhry ve ark. 2012, Minguet ve ark. 2015; McNamara ve ark. 2015, Bolden ve ark. 2006; Yeo ve ark. 2012; Zhao ve ark. 2015). Ayrıca, SOR ile birlikte bazı bitkisel etken maddelerin (resveratrol, kuarsetin, kurkumin ve kaempferol) kombin etkilerin araştırıldığı çalışmalarda, HSK hücre hatlarında SOR ile sinerjik etki göstererek hücrelerde apoptotik ölüme neden olduğu belirlenmiştir (Abaza ve ark 2017). Rouleau ve ark. (2016) Hep G2, SNU-449 ve HuH-7 hücrelerinde SOR'un askorbat kombinlerinde sitotoksik ve apoptotik etkisini araştırdıkları çalışmalarında, askorbat ve SOR'un sinerjik etki göstererek hücrelerde apoptotik ölüme neden olduğu belirlenmiştir (Rouleau ve ark. 2016). Yan ve ark. (2017) ise, antiviral, antiproliferatif ve immünomodülatör tip III interferon IFN- λ 3 ile SOR'un HepG2 ve SMMC7721 HSK hücrelerinde SOR'un terapötik etkisini arttırarak sinerjik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Yan ve ark. 2017).

SOR'un sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda, HSK hücre hatlarında (HepG2, HuH-7, SNU-449, PLC-PRF-5, SK-Hep1, Hep3B) 0-20 μ M konsantrasyon aralığında SOR'un sitotoksik etkisinin doza ve zamana bağlı olarak arttığı ve SOR'un 48 saatte etkili olduğu belirtilmiştir. Ancak, hücrelerin özelliklerine göre SOR'un IC₅₀ (HuH-7: 4.5 μ M, Hep G2: 3.4 μ M, SNU-449: 0.5 μ M) konsantrasyonları değişmektedir (Fiume ve ark. 2011, Fernando ve ark. 2012, Wei ve ark 2015, Chen ve ark. 2017). Mevcut tez çalışmasında SOR'un Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen WST-1 analizi sonucunda IC₅₀ konsantrasyonları 48 saatte sırasıyla 1.2 μ M, 0.08 μ M ve 0.4 μ M olarak belirlenmiştir. Ayrıca, SOR'un sitotoksik etkisinin kontrol

hücrelerinde araştırıldığı herhangi bir çalışma literatürde mevcut olmadığından dolayı mevcut tez kapsamında SOR'un sitotoksik etkisi ilk kez HUVEC kontrol hücreleri ile karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir.

SOR'un HSK hücrelerinde (Bel7402 ve SMMC-7721) geç apoptotik ve nekrotik ölümü tetiklediği ve G0/G1 evresinde hücre miktarında artışa neden olduğu literatürde belirtilmiştir (Chang ve ark. 2007, Fernando ve ark. 2012, Zhang ve ark. 2012, Godin ve ark. 2015, Preuss ve ark. 2015, Long ve ark. 2017). Mevcut tez çalışmasında, SOR'un uygulanan konsantrasyonu arttıkça hücrelerde geç apoptotik ve nekrotik ölümün arttığı Annexin V analizi ile gösterilmiştir. HUVEC hücrelerinde ise, SOR'un toksik etkisinden dolayı artan konsantrasyonuna bağlı olarak geç apoptotik ve nekrotik ölüm önemli derece de artmıştır. Ayrıca, Hep G2 ve HUVEC hücrelerinde 48. saatte SOR'un artan konsantrasyonuna bağlı olarak G0/G1 evresinde hücre miktarında artış belirlenmesine rağmen, UA uygulanan SNU-449 hücrelerinde belirlendiği gibi SOR uygulanan hücrelerde de G2/M evresinde hücre miktarında artış tespit edilmiştir. Ancak, Fernando ve ark. (2012) tarafından, 48 saat boyunca 6 µM SOR uygulanan Hep3B, HepG2, SK-Hep1 ve PLC/PRF/5 HSK hücre hatlarında G2/M evresinde hücre miktarında artış olduğu belirtilmiştir (Fernando ve ark. 2012).

SOR'un hücrelerde neden olduğu morfolojik değişimler ve nükleusta etkisi AO/EB, DAPI ve Hoechst 33352 boyaması ile görüntülenmiştir (Li ve ark. 2012, Sonntag ve ark. 2014, Xiao ve ark. 2016). Xiao ve ark. (2016) SOR uygulanan (8 µM, 48 saat) BEL-7402 ve Hep G2 hücrelerinde AO/EB boyaması sonucunda SOR'un hücrelerde geç apoptotik ve nekrotik ölüme neden olduğunu belirtmişlerdir (Xiao ve ark. 2016). Mevcut tez kapsamında Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücrelerinde SOR'un artan konsantrasyonuna bağlı olarak geç apoptotik ve nekrotik ölüm gözlemlenmiştir.

Son yıllarda HSK tedavisinde kombin tedavi stratejilerine odaklanılmasından ve mevcut tez kapsamında UA'nın potansiyel terapötik etkisinin belirlenmesinden dolayı, HSK hücre hatlarında ilk kez UA ve SOR'un kombin sitotoksik ve apoptotik etkisi belirlenmiştir.

Gerçekleştirilen WST-1 analizleri sonuçlarına göre, UA ve SOR'un 48 saatte Hep G2 ve SNU-449 hücrelerinde tek UA ve SOR'a göre canlılık oranının daha fazla azalışa neden olarak sinerjik etki gösterdikleri analiz edilmiştir. Ayrıca, tek SOR'a göre UA ile birlikte daha düşük konsantrasyonlarda SOR uygulanması ile Hep G2 ve SNU-449

hücrelerinde canlılık düzeyinde anlamlı bir azalış analiz edilmiştir ($p < 0.01$). HUVEC hücrelerinde ise, tek SOR ve UA'ya göre SOR ve UA kombinlerinin daha az toksik etkiye neden olduğu gösterilmiştir.

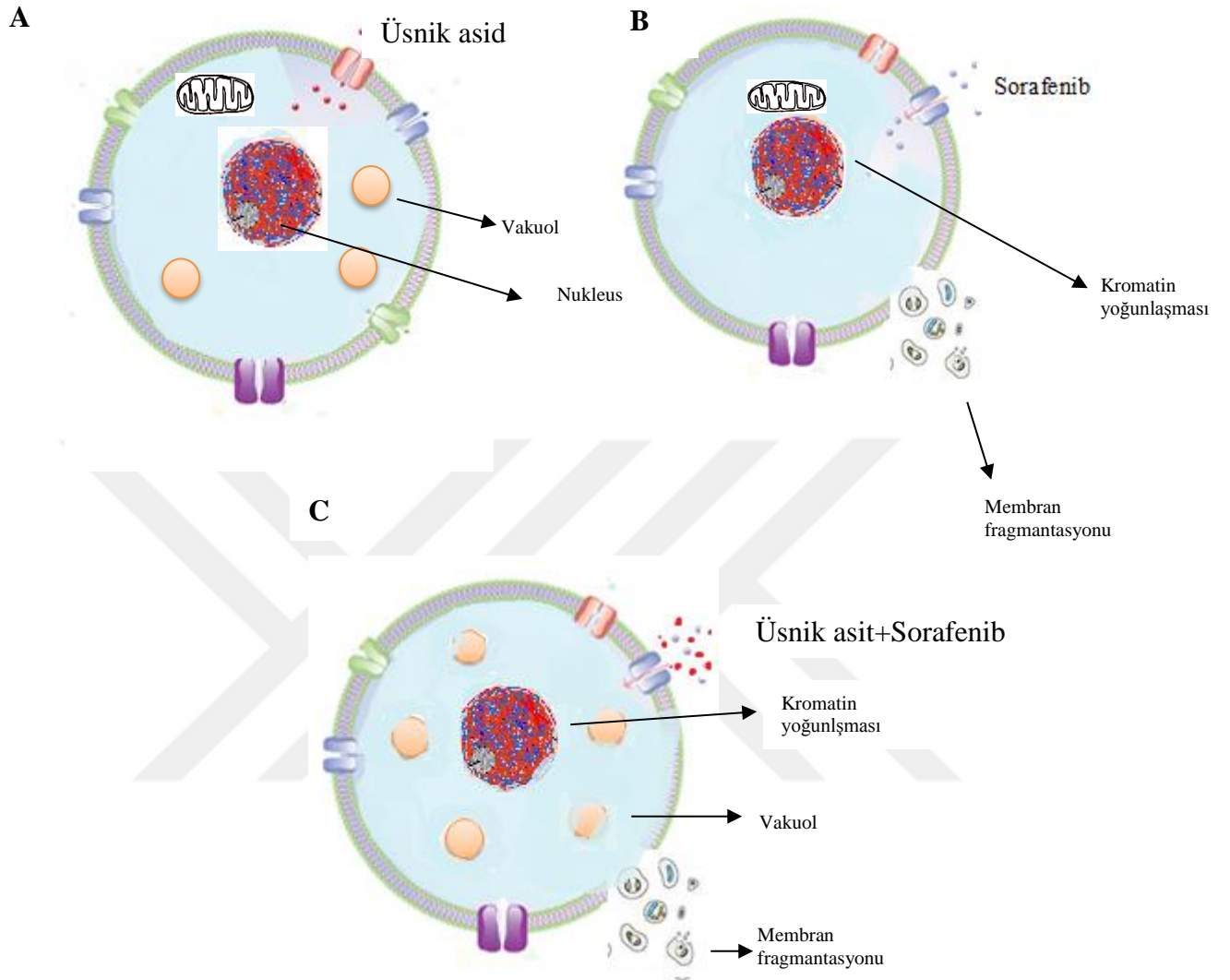
SOR ve UA'nın Hep G2, SNU-449 ve HUVEC hücrelerinde neden olduğu kombin apoptotik etki incelendiğinde, hücrelerde geç apoptotik ve nekrotik ölüm oranında artış tespit edilmiştir. Tek UA uygulanan hücrelerde sadece geç apoptotik ölüm oranında belirgin artış analiz edilmesine rağmen, tek SOR uygulanan hücrelerde hem geç apoptoz hem de nekrotik ölümden artış belirlenmiştir. Ancak, SOR ve UA uygulanan Hep G2 ve SNU-449 hücrelerinde tek SOR ve UA'ya göre geç apoptotik ölüm oranında daha fazla artış belirlenmesine rağmen, SNU-449 hücrelerinde daha az oranda nekrotik ölüm analiz edilmiştir.

SOR ve UA'nın hücre siklusunda kombin etkisi değerlendirildiğinde ise, Hep G2 hücrelerinde tek SOR ve UA uygulanan hücelere göre G0/G1 evresinde daha fazla miktarda hücre belirlenmesine rağmen, HUVEC hücrelerinde, tek SOR uygulanan hücelere göre daha az ve tek UA uygulanan hücelere göre daha fazla miktarda G0/G1 evresinde hücre analiz edilmiştir. SNU-449 hücrelerinde SOR ve UA kombin uygulandığında ise, tek SOR ve UA uygulanan hücrelerin aksine G0/G1 evresinde hücre miktarında artış tespit edilmiştir. Bu nedenle, hücre siklusunun evrelerinde ve kontrol noktalarında rol alan genlerin (retinoblastoma (Rb), p16, p21 ve p27) ve bu genleri hedef alan ve aktivitesinin düzenlenmesinde rol alan düzenleyicilerin (siklin bağımlı kinazlar, miRNA'lar vb) ekspresyon seviyesinde değişimlerin belirleneceği detaylı çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir (Bistreau ve ark. 2014).

Son olarak, SOR ve UA'nın hücrelerde neden olduğu değişimlerin belirlenebilmesi amacıyla gerçekleştirilen AO/EB boyaması sonucunda, HepG2 hücrelerinde tek UA ve SOR uygulanan hücelere göre geç apoptotik ve nekrotik ölümün arttığı görüntülenmiştir. Ancak, tek UA uygulanan hücrelerde gözlemlenen çok sayıda vakuol, SOR ve UA kombin uygulamalarında Hep G2 hücrelerinde belirlenmemiştir. SNU-449 hücrelerinde ise, özellikle 0.1 ve 0.5 μM SOR ile 25 μM UA kombin uygulanan hücrelerde geç apoptotik ölümün yanı sıra, nekrotik ve muhtemel otofajik ölüm görüntülenmiştir. Ancak tek 12.5 μM UA uygulanan hücrelerde belirlenen çok sayıda vakuol oluşumu 12.5 μM UA ile 0.1 ve 0.5 μM SOR uygulanan hücrelerde gözlemlenmemiştir. Hep G2 ve SNU-449 hücrelerinde tek SOR ve UA uygulanan

hücrelere göre değişen ölüm tiplerinin hücrelerin farklı gen profillerinden, hücrelerin SOR ve UA'ya karşı gösterdikleri yanıt ve/veya direnç farklılıklarından, MDR mekanizmasının aktivitesinden ve HBV enfeksiyonunun hücrelerde neden olduğu genomik instabiliteden kaynaklanabileceği öngörülmektedir. Bu konuda detaylı kantitatif ve kalitatif analizlerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. HUVEC hücrelerinde ise tek SOR uygulanan hücrelere göre daha az oranda geç apoptotik ve nekrotik hücre gözlemlenmesine rağmen, tek UA uygulanan hücrelere göre hasarın arttığı belirlenmiştir. Elde edilen bulgular WST-1 ve Annexin V analiz sonuçlarını destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, mevcut tez çalışmasında ilk kez HSK hücre hatlarında UA ve SOR'un kombin sitotoksik ve apoptotik etkileri *in vitro* olarak değerlendirilerek sinerjik etkiye sahip oldukları gösterilmiştir. HSK tedavisinde FDA onayı alan SOR'un hücrelerde geç apoptotik ve nekrotik etkisi belirlenmesine rağmen, normal hücrelerde sitotoksik etki göstererek, apoptotik ve nekrotik ölüme neden olduğu analiz edilmiştir. Bununla birlikte, son yıllarda HSK tedavisinde kombin tedavi stratejileri önem kazandığından dolayı, mevcut tez çalışmasında farklı kanser türlerinde potansiyel terapötik etkisi bilinen UA ile SOR'un Hep G2 ve SNU-449 hücrelerinde kombin terapötik etkisi değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, UA ve SOR'un sinerjik etkiye sahip olduğu ve SOR'un HSK hücrelerinde daha düşük konsantrasyonlarda daha fazla terapötik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, UA ve SOR'un HUVEC kontrol hücrelerinde tek SOR uygulanan hücrelere göre daha az oranda apoptotik ve nekrotik ölüme neden olduğu analiz edilmiştir. Bu yüzden, mevcut tez çalışmasında elde edilen veriler HSK tedavisinde kombin terapötik tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir niteliktedir. Ancak, kontrol hücrelerinde SOR ve SOR+UA'nın kombin sitotoksik etkilerinin azaltılması ve HSK tedavisinde güncel sorunlardan olan MDR'nin aşılması amacıyla, nanopartikül formülasyonlarının üretilmesi ve *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların gerçekleştirilmesi ile HSK tedavisinde yeni terapötik tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlanabilir. Ayrıca, UA ve SOR kombin uygulanan hücrelerde, hücre ölüm tiplerinde değişikliğe neden olan moleküler mekanizmaların aydınlatılması ve bu mekanizmalarda rol alan genlerin ekspresyon seviyesinde değişimlerin belirlenmesi ile mevcut tez çalışması geliştirilebilir.



Şekil 50. UA ve SOR'un hücrelerde neden olduğu apoptotik ve nekrotik etkiler sonucu meydana gelen morfolojik değişimler. (A) UA'nın HSK hücrelerinde (Hep G2 ve SNU-449) neden olduğu vakuol oluşumu ve apoptotik etkisi (Hep G2, SNU-449, HUVEC), (B) SOR'un hücrelerde (Hep G2, SNU-449 ve HUVEC) neden olduğu nekrotik ve apoptotik etkisi, (C) UA+SOR'un hücrelerde neden olduğu vakuol oluşumu (SNU-449) ve apoptotik ve nekrotik etkisi (Hep G2, SNU-449, HUVEC)

6. KAYNAKLAR

Abdel-Rahman O (2013) Systemic therapy for hepatocellular carcinoma (HCC): from bench to bedside. J Egypt Natl Canc Inst; 25:165-171

Abou-Alfa GK (2004) Current and novel therapeutics for hepatocellular carcinoma. In: American Society of Clinical Oncology Educational Book. Perry MC (ed). Alexandria, VA ; 192-197

Aggarwal BB (2000) Tumor necrosis factor receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF- κ B. Ann Rheum Dis., 59;6-16

Ahmadjian V, Hale ME (1973) The Lichens. London: Academic Pres, 1973.

Aiyar E, Park H, Aldo B et al (2010) TMS, a chemically modified herbal derivative of Resveratrol, induces cell death by targeting Bax. Breast Cancer Res Treat. ;124:265–77.

Akşit H, Bildik A (2008) Apoptozis. Yyü Vet Fak Derg 19(1): 55-63.

Akyıldız Ü, Yalçın KS, Türkay FC (2011) Hepatosellüler Karsinom Tedavisi güncel gastroenteroloji 18415/3.

Amaravadi RK, Thompson CB (2007) The Roles of Therapy-Induced Autophagy and Necrosis in Cancer Treatment. Clinical Cancer Research December13; 24

Anonim a, 2017. Liver Cancer (Hepatocellular Carcinoma) http://www.hopkinsmedicine.org/liver_tumor_center/conditions/cancerous_liver_tumors/hepatocellular_carcinoma.html, (05.2017)

Anonim b, 2017 <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=13587>. (05.2017)

Anonim c, 2017 <https://www.lgcstandardsatcc.org/~media/7B9555D462954A469E92894CA83024F8.ashx>. (05.2017)

<http://www.dojindo.eu.com/store/p/833-Annexin-V-FITC-Apoptosis-Detection-Kit.aspx> (05.2017)

Antar V (2005) Bir Genel Kaspaz İnhibitörü Olan Qvd-Oph'nin Nöroprotektif Etkilerinin Deneysel spinal Kord Travması Modelinde İncelenmesi. Uzmanlık Tezi. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği.

Arhan M, Akdoğan M, İbiş M et al (2009) Tek merkeze ait hepatosellüler karsinom verileri; retrospektif çalışma Akademik Gastroenteroloji Dergisi, 8 (1): 18-23

Avila MA, Berasain C, Sangro B et al (2006) New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. ;25:3866–84

Baehrecke EH (2005). Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Jun;6(6):505-10.

Bačkorová M, Jendželovský R, Kello M et al (2012) Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines, *Toxicology in Vitro* 26; 3, 462–468

Balkan A, Menekşe B (2012) HepG2 hücrelerinde selenyum ve vitamin C'nin apoptozis üzerine etkileri. *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı*. 106s. Ankara

Balogh J, Victor D, Asham EH et al (2016) Hepatocellular carcinoma: a review, *J Hepatocell Carcinoma*; 3: 41–53.

Bernstam EV, Hersh WR, Johnson SB et al (2009) Synergies and distinctions between computational disciplines in biomedical research: perspective from the Clinical and Translational Science Award programs. *Acad Med*.;84(7):964-70.

Blanchet B. et al. (2010) Toxicity of sorafenib: clinical and molecular aspects, *Journal Expert Opinion on Drug Safety* 9, 2

Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW (2006) Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*.;5:769–784

Bozdayı M ve Karataylı E (2009) Hepatit B Virüs Enfeksiyonlarında Anti-Viral İlaç Direnci-Mikrobiyolojik Yaklaşım

Bravi F, Bosetti C, Tavani A et al (2007) Coffee drinking and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis. *Hepatology*. ;46:430–435.

Brown KS (2006) Chemotherapy and Other Systemic Therapies for Hepatocellular Carcinoma and Liver Metastases *Semin Intervent Radiol*.; 23(1): 99–108.

Byam J, Renz J, Millis JM (2013) Liver transplantation for hepatocellular carcinoma, *Hepatobiliary Surg Nutr* ; 2(1): 22–30.

Cervello M, Bachvarov D, Lampiasi N et al (2012) Molecular mechanisms of sorafenib action in liver cancer cells *Cell Cycle* 11:15, 2843-2855;

Chang MH, Chen CJ, Lai MS (1997) Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med*; 336:1855–1859.

Chang SY. (2017) Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models, Article · Cancer Chemotherapy and Pharmacology

Chen J, Siddiqui A (2007) Hepatitis B virus X protein stimulates the mitochondrial translocation of Raf-1 via oxidative stress. *J Virol.*;81 (12):6757-60.

Chen KF, Tai WT, Liu TH et al (2010) Sorafenib, STAT3 inhibisyonu yoluyla hepatoselüler karsinom hücrelerinin TRAIL direncini yener. *Clin Cancer Res.* ; 16 (21): 5189-5199

Chen Z, Zheng S, Li L et al (2014) Metabolism of flavonoids in human:a comprehensive review. *Curr. Drug Metab.* 15:48–61.

Chen Y et all, (2017) Overcoming sorafenib evasion in hepatocellular carcinoma using CXCR4-targeted nanoparticles to co-deliver MEK-inhibitors, Digital Access to Scholarship at Harvard.

Chinnaiyan AM (1999). The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia.*;1:5–15.

Chok KS, Cheung TT, Lo RC et al (2014) Pilot study of high-intensity focused ultrasound ablation as a bridging therapy for hepatocellular carcinoma patients wait-listed for liver transplantation. *Liver Transpl.*;20:912–921.

Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK (2006) Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett.*;11(4):506-25.

Chuang SC, Lee YCA, Hashibe M et al (2010) Interaction between Cigarette Smoking and HBV or HCV Infection on the Risk of Liver Cancer: A Meta-Analysis *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*; 19(5): 1261–1268.

Coşkun, G, Özgür, H (2011). Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3).

Culberson WL (1970) Chemosystematics and ecology of lichens-forming fungi. *Ann Rev Ecol Sys.*; 1: 153-70.

Çefle, K. (2003). P53 Tümör Süpresör Geni. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*, 66(2).

Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G (2005) Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* ;1(2):66-74.

Deniz MN (2017), Karaciğer Fizyolojisi <http://www.jcam.com.tr/files/JCAM-3913.pdf>, (05.2017).

Desai AG (2014) Medicinal Plants and Cancer Chemoprevention, *Curr Drug Metab.* Author manuscript; available in PMC

Edinger AL, Craig B (2004) Thompson Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy *Current Opinion in Cell Biology* 16; 6,663–66

Egger G, Liang G, Aparicio A et al (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. ;429:457–463.

Einarsdóttir E, Groeneweg J, Björnsdóttir GG et al (2010) Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. *Planta medica*. 76(10), 969-974.

El-Serag HB (2002) Hepatocellular carcinoma: an epidemiologic view. *J Clin Gastroenterol*. 35(5 Suppl 2): 72-78, 2002.

El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, et al (2008) Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008 May; 134(6): 1752–63

Encalada MA, Hoyos KM, Rehecho S et al (2011) Anti-proliferative Effect of *Melissa officinalis* on Human Colon Cancer Cell Line. *Plant Foods Hum Nutr*. ;66(4):328–34

Ezzoukhry Z, Louandre C, Trécherel E et al (2012) EGFR activation is a potential determinant of primary resistance of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib. *Int J Cancer*. 2012 Dec 15;131(12):2961-9

Fernando J, Sancho P, Fernández-Rodríguez CM et al (2012) Sorafenib sensitizes hepatocellular carcinoma cells to physiological apoptotic stimuli, *J Cell Physiol*. Author manuscript; available in PMC.

Festjens N, van Gurp M, van Loo G et al (2004). Bcl-2 family members as sentinels of cellular integrity and role of mitochondrial intermembrane space proteins in apoptotic cell death. *Acta haematologica*, 111(1-2), 7-27.

Frei E, Eder JP (2003) *Combination Chemotherapy Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition.

Gao Y, Ruan B, Liu W et al (2015) Knockdown of CD44 inhibits the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma both in vitro and in vivo by reversing epithelial-mesenchymal transition.; 6(10): 7828–7837.

Ge P, Cui Y, Liu F et al (2015) L-carnitine affects osteoblast differentiation in NIH3T3 fibroblasts by the IGF-1/PI3K/Akt signalling pathway. *Biosci Trends*. ;9:42–48.

Gillian MK, Armando S (2009) Sorafenib *Drugs*, 69; 2, 223–240

Godin C. Et all, Biomarkers of Apoptosis and Necrosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma Treated with Sorafenib, *Anticancer Research* March 2015 vol. 35 no. 3 1803-1808.

Gong WF, Zhong JH, Lu SD et al (2017) Effects of antiviral therapy on post-hepatectomy HBV reactivation and liver function in HBV DNA-negative patients with HBV-related hepatocellular carcinoma. Feb 28; 8(9): 15047–15056.

Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S et al (2012) Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma Nature Genetics, 44 (2012), pp. 694–698

Güleş Ö, Eren Ü (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. YY Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 2, 73-78.

Hanağası F, Hanağası HA (2013) Wilson Hastalığı Türk Nöroloji Dergisi 2013; 19:122-127

Hui H, Dotta F, Di Mario U et al (2004) Role of Caspases in the Regulation of Apoptotic Pancreatic Islet Beta-Cells Death. J Cell Physiol ;200(2):177-200.

Huynh H, Ngo VC, Koong HN et al (2009) Sorafenib and rapamycin induce growth suppression in mouse models of hepatocellular carcinoma. J Cell Mol Med. ;13:2673–2683

Huynh H, Ngo VC, Koong HN et al (2010) AZD6244 enhances the anti-tumor activity of sorafenib in ectopic and orthotopic models of human hepatocellular carcinoma (HCC) J Hepatol ;52:79–87.

Gözüaçık D. (2017) http://research.sabanciuniv.edu/17530/1/Otofaji_ve_Sinyal_Yolaklar_%C4%B1-_GOZUACIK.pdf

Ichim G, Tait SWG (2016) A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. Nature Reviews Cancer 16, 539–548 doi:10.1038/nrc.2016.58

İç Hastalıkları - Romatoloji Bilim Dalı Ders notları.

Jones SA, Hu J (2013) Hepatitis B virus reverse transcriptase: Diverse functions as classical and emerging targets for antiviral intervention. Emerging Microbes and Infections 2,e56;

Kaya C, Çalışkan Y, Yönden Z (2012) Apoptozis. Mustafa Kemal Üniv.Tıp Derg, Cilt 3, Sayı 11, 2012

Keane RW, Kraydieh S. Lotocki G, Bethea JR et al (2001) Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. J Neuropathol Exp Neurol 60: 422- 429,

Kerr SG, Anderson KS (1997) RNA dependent DNA replication fidelity of HIV-1 reverse transcriptase: evidence of discrimination between DNA and RNA substrates. Biochemistry 36.46 ;14056-14063.

Kinloch RA, Treherne JM, Furness LM et al (1999). The pharmacology of apoptosis. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(1), 35-42.

Knop W (1944) Chemisch-physiologische Untersuchung u"ber die Flechten. *Ann Chem Pharm*,49:103–24.

Koçer S (2012) Liken Metaboliti Usnik Asitin Bazı Aril-Aminofenoller İle Schiff Bazları Türevleri Ve Metal Komplekslerinin Sentezi, Antimutajenik Ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması Yüksek Lisans Tezi Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Kroemer G, Mariño G, Levine B. (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 40:280–293.

Liaw YF, Sung JJ, Chow WC et al (2004) Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease *N Engl J Med*. 7;351(15):1521-31.

Liu L, Cao Y, Chen C et al (2006) Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res*; 66(24): 11851–8

Liu Y, Wu F (2010) Global Burden of Aflatoxin-Induced Hepatocellular Carcinoma: A Risk Assessment, *Environ Health Perspect.*; 118(6): 818–824

Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J, et al (2008) Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*; 100(10): 698–711

Long F, Dong C, Jiang K, et al (2017) Melatonin enhances the anti-tumor effect of sorafenib via AKT/p27-mediated cell cycle arrest in hepatocarcinoma cell lines. *RSC Adv.*, 7, 21342-21351

Lozano R, Patt Y, Hassan M et al (2000) Oral capecitabine (Xeloda) for the treatment of hepatobiliary cancers (hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and gallbladder cancer) (abstract 1025). Paper presented at Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology. New Orleans, LA: May 20–23,

Mahmood S, Niiyama G, Kamei A et al (2005) Influence of viral load and genotype in the progression of Hepatitis B associated liver cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Liver Int.*; 25:220-225.

Manojlovic NT, Solujic S, Sukdolak S (2002) Antimicrobial activity of an extract and anthraquinones from *Caloplaca schaeerica*. *The British Lichen Society.*; 34:83–5.

Mayer M, O'Neill MA, Murray KE (2005) Usnic acid: a non-genotoxic compound with anti-cancer properties *Anti-Cancer Drugs Issue: Sayı 16(8)*, 2005,805-809

McGlynn KA ve London WT (2011) The Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma, Present and Future, *Clin Liver Dis.*; 15(2): 223–43

McNamara MG, Le LW, Horgan AM et al (2015) A phase II trial of second-line axitinib following prior antiangiogenic therapy in advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer*. ;121:1620–1627.

Mıstık R (2007). Ülkemizde Kronik Viral Hepatitlerin Epidemiyolojisi. XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi. *Klinik Dergisi*. 20 (özel sayı 1): 61-63.

Miao V, Legal MFC, Brown D et al (2001) Genetic approaches to harvesting lichen products. *Trends in Biotechnol.*; 19: 349-355.

Mishra A, Otgonsuren M, Venkatesan C (2013) The inpatient economic and mortality impact of hepatocellular carcinoma from 2005 to 2009: analysis of the US nationwide inpatient sample *Liver Int.*, 33 (8). 1281–1286

Minguet J, Smith KH, Bramlage CP et al (2015) Targeted therapies for treatment of renal cell carcinoma: recent advances and future perspectives. *Cancer Chemother Pharmacol.* ;76:219–233.

Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V et al. (2011) Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 5428-48.

Mittal S, El-Serag HB (2013) Epidemiology of HCC: Consider the Population, *J Clin Gastroenterol.*; 47(0): S2–S6.

Miura H, Miyazaki T, Kuroda M et al (1997) Increased expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. Nov; 27(5):854-61.

Molassiotis A, Fernandez-Ortega P, Pud D et al (2005). Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey. *Annals of oncology*, 16(4), 655-663.

Monden M, Sakon M, Gotoh M, et al (1992) Selection of therapeutic modalities for hepatocellular carcinoma in patients with multiple hepatic lesions. *Cancer Chemother Pharmacol* 31: 38- 44, 1992.

Nguyen VTT, Law MG, Dore GJ (2009) Hepatitis B-related hepatocellular carcinoma: epidemiological characteristics and disease burden *J. Viral Hepat.*, 16. 453–463

Nicotera P, Leist M, Manzo L (1999) Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends Pharmacol. Sci.*, 20, 46–51.

Nissen NN, Martin P (2002) Hepatocellular carcinoma: the high-risk patient. *J.Clin. Gastroenterol.*; 35:79-85.

Oran S. (2006) Liken Maddeleri (I). Liken maddelerinin liken yaşamındaki önemi. TLT Bülteni; 3: 8-11.

Özen Ç, Yıldız G, Dağcan AT et al (2013) Genetics and epigenetics of liver cancer New Biotechnology 30, 4, 25,381–384.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J et al (2000) Estimating the world cancer burden Globocan 2000. Int. J. Cancer; 94:153-156.

Pascual S, Herrera I, Irurzun J (2016) New advances in hepatocellular carcinoma World J Hepatol. 2016 Mar 28; 8(9): 421–438.

Paterlini-Bréchet P, Saigo K, Murakami Y et al (2003) Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene Oncogene, 22 , pp. 3911–3916

Piguet AC, Saar B, Hlushchuk R et al (2011) Everolimus augments the effects of sorafenib in a syngeneic orthotopic model of hepatocellular carcinoma. Mol Cancer Ther. ;10:1007–1017.

Pogribny IP, Rusyn I (2012) Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma Cancer Letters

Proskuryakov SY, Gabai VL (2010) Mechanisms of Tumor Cell Necrosis. Current Pharmaceutical Design, , 16, 56-68

https://www.researchgate.net/figure/6640086_fig5_Figure-5-Sorafenib-induces-tumor-apoptosis-and-necrosis-in-the-786-O-xenograft-model

Rees RW, Feigel I, Vickers A et al (2000) Prevalence of complementary therapy use by women with breast cancer:a population based survey. Eur J Cancer.;36:1354–64.

Renehan AG, Booth C, Potten CS (2001) What is apoptosis, and why is it important ? 23; 322(7301):1536-8

Rouleau C, Fernando ATP, Hwang JH et al (2016) Transformation by Polyomavirus Middle T Antigen Involves a Unique Bimodal Interaction With the Hippo Effector YAP. Virol 90 (16), 7032-7045.

Sahu SC, Amankwa-Sakyi M, O'Donnell MW Jr et al (2011). Effects of usnic acid exposure on human hepatoblastoma HepG2 cells in culture, Journal of Applied Toxicology 32, 9 722–730

Schady DA, Roy A, Finegold MJ Liver tumors in children with metabolic disorders Translation pediatrics 4,4.

Schmieder R, Puehler F, Neuhaus R et al (2013) Allosteric MEK1/2 inhibitor refametinib (BAY 86-9766) in combination with sorafenib exhibits antitumor activity

in preclinical murine and rat models of hepatocellular carcinoma. *Neoplasia*. ;15:1161–1171

Schütte K, Schulz C, Malfertheiner P (2016) Nutrition and Hepatocellular Cancer, *Gastrointest Tumors*.; 2(4): 188–194.

Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D et al (2012) Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*.; 16(1): 15–31.

Sharp GB. At all. Relationship of hepatocellular carcinoma to soya food consumption: a cohort-based, case-control study in Japan. *Int J Cancer*. 10;115(2):290-5.

Sherman M (2005) Hepatocellular carcinoma, epidemiology, risk factor, and screening. *Semin. Liver Dis*; 25:143-154.

Sherman M, Takayama Y (2004) Screening and treatment for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Clin North Am*. 33(3): 671-691.

Shimizu S, Takehara T, Hikita H et al (2011) Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *International Journal Of Cancer*.

Shounan Y, Feng X, O'Connell PJ (1998). Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity. *Journal of immunological methods*, 217(1), 61-70.

Sunar A (2011) Hepatosellüler Karsinomada Prognostik Faktörler, Yapılan Tedavi Yöntemleri ve Bu Tedavilerin Sağ Kalım Süresine Etkisinin Araştırılması Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi. Ankara.

Sümbül AT (2008) Hepatosellüler Karsinomalı Hastalarda P53 Kodon72 ve Mdm2 Snp309 Gen Polimorfizimlerinin Sıklığı ve Tümöre Ait Karakteristiklerle Karşılaştırılması, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, Adana.

Sonntag R et al, Pro-apoptotic Sorafenib signaling in murine hepatocytes depends on malignancy and is associated with PUMA expression in vitro and in vivo, *Citation: Cell Death and Disease* (2014)

Tabak F, Tosun S, Balık İ et al (2012) Ülkemizde HBV ve HCV Seroprevalansı Değişiyor mu? XI. Ulusal Viral Hepatit Kongresi, s.69, P01- 29, Antalya.

Terzioglu M, Ruzzenente B, Harmel J et al (2013). MTERF1 binds mtDNA to prevent transcriptional interference at the light-strand promoter but is dispensable for rRNA gene transcription regulation. *Cell metabolism*, 17(4), 618-626.

Tilli CMLJ, Stavast-Kooy AJW, Ramaekers FCS et al (2002) Bax expression and growth behavior of basal cell carcinomas. *J Cutan Pathol*; 29: 79-87

Toh DF, Patel DN, Chan EC et al (2011) Anti-proliferative effects of raw and steamed extracts of *Panax notoginseng* and its ginsenoside constituents on human liver cancer cells. *Chinese Medicine* 2011, 6:4

Tözün AN, (2012) Türkiye’de viral hepatitler ve hepatosellüler kanser. IV. Hepatoloji Okulu Konuşma Özetleri Kitabı. Bodrum.

Türkçapar N (2012) Hücre Ölüm Mekanizmaları Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Ulukaya E (2001) Hücre siklusu ve apoptozis. Akciğer Kanseri: Tanı ve tedavide temel ilkeler ve uygulamalar. Engin K ve Özyardımcı N. Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Şti. İstanbul, Türkiye. 26-38,

Q Wang, G Shi, , L Wang, X Liu, Early prediction of response of sorafenib on hepatocellular carcinoma by CT perfusion imaging: an animal study, *Br J Radiol.* March 2014; 87(1035): 20130695.

Van Horssen R, ten Hagen TL, Eggermont, AM (2006). TNF- α in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *The oncologist*, 11(4), 397-408.

Vorster C, Joubert A (2010) In vitro effects of 2-methoxyestradiol-bis-sulphamate on cell growth, morphology and cell cycle dynamics in the MCF-7 breast adenocarcinoma cell line, *Biocell.*;34(2):71-9.

Walker NI, Harmon BV, Gobé GC et al (1998) Patterns of cell death. *Methods Achiev. Exp. Pathol.*, 13, 18–54

Wallace DF, Subramaniam VN (2009) Karaciğer hastalığında yardımcı faktörler: HFE ile ilişkili kalıtsal hemokromatoz ve demirin rolü. *Biochim Biophys Acta*; 1790: 663-70.

Wang TL, Wang BE, Zhang HH et al (1998) Pathological study of the therapeutic effect on HBV-related liver fibrosis with herbal compound 861. *Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology.*;7:148–153.

Wang Z, Zhao Z, Wu T et al (2015) Sorafenib-irinotecan sequential therapy augmented the anti-tumor efficacy of monotherapy in hepatocellular carcinoma cells HepG2. *Neoplasma* Vol.62, No.2, p.172-179,

Wei JC, Meng FD, Qu K et al (2015) Sorafenib inhibits proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells via up-regulation of p53 and suppressing FoxM1. *Acta Pharmacol Sin* ;36(2):241-51.

Wilhelm SM, Adnane L, Newell P et al (2008) Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(10):3129–3140.

Xiao Y, Yan W, Guo L et al (2016) Digitoxin Synergizes With Sorafenib to Inhibit Hepatocellular Carcinoma Cell Growth Without Inhibiting Cell Migration. *Mol Med Rep* 15 (2), 941-947.

Yan M, Mi D, Sun X et al (2017) Cloning and Sequence Analysis of Variable Region Genes of Mouse Anti-Human S100A9 Monoclonal Antibody.;33(2):252-255.

Yang HI, Lu SN, Liaw YF et al (2002) Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 347(3): 168-174.

Yau T, Chan P, Epstein R et al (2009) Management of advanced hepatocellular carcinoma in the era of targeted therapy. *Liver Int;* 29: 10-7.

Yeo W, Chung HC, Chan SL et al (2012) Epigenetic therapy using belinostat for patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a multicenter phase I/II study with biomarker and pharmacokinetic analysis of tumors from patients in the Mayo Phase II Consortium and the Cancer Therapeutics Research Group. *J Clin Oncol.*;30:3361–3367.

Yeo W, Mok TS, Zee B et al (2005) A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/ fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst.*;97:1532–8.

Yıldırım Y (2007) Hepatoselüler Karsinomada Cox-2 İfadesi ve Hastalığın Klinik Özellikleri ile İlişkisi. Tıbbi Onkoloji Uzmanlık Tezi. Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi. Ankara

Yin, LM, Wei Y, Wang Y et al (2013). Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells. *Int J Med Sci,* 10(1), 68-72.

Yonekawa T, Thorburn A (2013) Autophagy and Cell Death *Essays Biochem;* 55: 105–117.

Zdenko H, Paliwala A (2011) Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: How environmental factors influence the epigenome, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research,* 727,3, 55–61

Zhang W, Xiang YB, Li HL et al (2013) Vegetable-based dietary pattern and liver cancer risk: results from the Shanghai women's and men's health studies. *Cancer Sci.*;104:1353–1361.

Zhang X, Guo S, Fan R et al (2012) Dual-functional liposome for tumor targeting and overcoming multidrug resistance in hepatocellular carcinoma cells. *Biomaterials,* 33 (29), pp. 7103–7114

Zhang, Y., Zhang, B., Zhang, A et al (2012). Synergistic growth inhibition by sorafenib and vitamin K2 in human hepatocellular carcinoma cells. *Clinics*, 67(9), 1093-1099.

Zhao J, Lawless MW (2015) Resminostat: Opening the door on epigenetic treatments for liver cancer. *Hepatology*:Epub ahead of print.

Zhu L, Li L, Li Y et al (2016) Chinese Herbal Medicine as an Adjunctive Therapy for Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Evid Based Complement Alternat Med*. 9469276.



7. SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC: American Type Culture Collection
c-Met: Mezenkimal Epitelyal Geçiş Faktörü
CSF: Koloni Uyarıcı Faktörler
DMEM:Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA: Deoksiribo Nükleik asit
EGFR: Epidermal Büyüme Faktörleri
FAH: Fumalilasetoasetat Hidrolaz
FBS: Fetal Bovine Serum
FDA: Food and Drug Administration
HBV: Hepatit B Virüsü
HCV: Hepatit C Virüsü
HDAC: Histon Deasetilazlar
HSK: Hepatosellüler Karsinoma
HT1: Tirozinemi Tip 1
HUVEC: Human Umbilical Vein Endotelial Cells
IGF: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
MPT: Mitokondriyal Geçirgenliğin
NGF: Nöron Büyüme Faktörü
PDGF: Trombosit Türevli Büyüme Faktörü
PI: Propidium İyodür
RFA: Radyofrekans Ablasyon
RIP: Receptor İnteracting Proteinler
RNA: Ribo Nükleik asit
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
SHARP: Assesment Randomized Protocol
SOR: Sorafenibin
TACE: Transarteriyel Kemoembolizasyon
TERT: Telomeraz Reverse Transkriptaz
TK: Tirozin Kinazların
TNF: Tümör Nekrozis Faktör
UA: Üsnik Asidin
VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WH: Wilson Hastalığı

8. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilime olan sevgisi, karakteri ve hoşgörüsü ile bana çok şey öğreten, sabrını, desteğini ve bilimsel katkılarını esirgemeyen değerli danışmanım ve aynı zamanda Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Ünal EGELİ' ye, bilgi ve tecrübelerini hoşgörü ile aktaran kıymetli hocalarım Prof. Dr. Berrin TUNCA ve Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER' e, tez çalışmasında kullanılan hücre hatlarını hediye eden Prof. Dr. Mehmet ÖZTÜRK' e ve bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Yrd. Doç. Dr. Tolga ACUN' a teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve tecrübesiyle yetişmemi sağlayan ve her türlü hatalarımda güzel kalbiyle yanımda olan, tez sürecinde ve hayatıma kattıklarıyla emeklerini ödeyemeyeceğim Araş. Gör. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER'e ve destekleri için ailesine, moral, motivasyon ve yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Işıl Ezgi Eryılmaz'a, tez çalışmamda desteklerini ve hoşgörülerini hep hissettiğim yüksek lisans öğrencisi Hilal DEMİRCİ ve ailesine, Biyolog Ayten HACİEFENDİ'ye, ayrıca birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum Tıbbi Biyoloji A.D asistan, öğrenci ve tüm çalışanlarına, eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Av. Kemaleddin ÖNÜR ve Av. Oya ÇANKAYA'ya, her zaman yanımda olan ve kahrımı çeken Enis AKAY ve ailesine,

Hayatta tüm zorlukları beraber aştığımız anneme kardeşlerime ve kıymetli dedeme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Beste YURDACAN

Bursa, 2017

9. ÖZGEÇMİŞ

1993 yılı Bursa doğumluyum. İlköğretimimi Bursa Ahmet Hamdi Tanpınar İlköğretim Okulu' da tamamladım. Yıldırım Beyazıt Lisesinde 2011 yılında mezun olduktan sonra Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümünde eğitimimi tamamlayarak 2015 yılında mezuniyetimin ardından Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D'da yüksek lisans eğitimime başladım. Halen Uludağ Üniversitesi Tıbbi Biyoloji A.D yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.



ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	Beste YURDACAN
Tez Adı	Hepatosellüler Karsinomada Üsnik Asit ve Sorafenibin Kombin Tedavi Olarak Anti-Tümöral Etkilerinin Araştırılması
Enstitü	Sağlık Bilimleri
Anabilim Dalı	Tıbbi Biyoloji
Tez Türü	Yüksek Lisans
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Ünal EGELİ
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) izni	<input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimin sadece içindikiler, özet, kaynakça ve içeriğinin % 10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input checked="" type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum
Yayımlama izni	<input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin Veriyorum

Hazırlamış olduğum tezimin belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih : 05.06.2014

İmza :

