

**SORAFENİB VE PARASETAMOL KOMBİNASYONUNUN
HEPATOSELLÜLER KARSİNOM HÜCRELERİ ÜZERİNE ANTİKANSER
ETKİLERİNİN *IN VITRO* ANALİZLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşegül GEDİK

Danışman

Doç. Dr. Arzu ÖZKARA

İkinci Danışman

Doç. Dr. Dilek AKYIL

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK

ANABİLİM DALI

Haziran 2025

Bu tez çalışması 23. FEN. BİL. 31 numaralı proje ile Afyon Kocatepe Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SORAFENİB VE PARASETAMOL KOMBİNASYONUNUN
HEPATOSELLÜLER KARSİNOM HÜCRELERİ ÜZERİNE
ANTİKANSER ETKİLERİNİN *IN VITRO* ANALİZLERİ**

Ayşegül GEDİK

Danışman

Doç. Dr. Arzu ÖZKARA

İkinci Danışman

Doç. Dr. Dilek AKYIL

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Haziran 2025

TEZ ONAY SAYFASI

Ayşegül GEDİK tarafından hazırlanan “Sorafenib ve Parasetamol Kombinasyonunun Hepatosellüler Karsinom Hücreleri Üzerine Antikanser Etkilerinin *In Vitro* Analizleri” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 25/06/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Arzu ÖZKARA

İkinci Danışman : Doç. Dr. Dilek AKYIL

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Mürüvvet KURT
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Üye : Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Arzu ÖZKARA
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Dilek AKYIL
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Nilay İŞİTEZ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Fakültesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun

..... /..... /..... tarih ve

..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bekir YALÇIN

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

25 / 06 / 2025

Ayşegül GEDİK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SORAFENİB VE PARASETAMOL KOMBİNASYONUNUN HEPATOSELLÜLER KARSİNOM HÜCRELERİ ÜZERİNE ANTİKANSER ETKİLERİNİN *IN VITRO* ANALİZLERİ

Ayşegül GEDİK

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Arzu ÖZKARA

İkinci Danışman: Doç. Dr. Dilek AKYIL

Karaciğer kanseri, dünya genelinde yüksek mortaliteye sahip kanser türleri arasında yer almaktadır. Hepatosellüler karsinom (HCC) en sık görülen primer karaciğer kanseri tipidir. HCC tedavisinde kullanılan Sorafenib'in sınırlı olan etkinliği ve ilaç direnci sorunları nedeniyle yeni kombinasyon türlerinin araştırılması da önem taşımaktadır. Parasetamol ise yaygın kullanılan bir ağrı kesici ve ateş düşürücü olup, yüksek dozlarda hepatotoksik ve olası antikanser etkiler gösterebilmektedir. Bu çalışmada, Sorafenib ve Parasetamol kombinasyonunun HepG2 insan karaciğer kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkileri *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Hücrelere 24 ve 48 saatlik sürelerle farklı dozlarda Sorafenib ve Parasetamol, tek başına ve kombinasyon halinde uygulanmıştır. Hücre canlılığı, MTT testi ile değerlendirilmiş ve Sorafenib için $LD_{50} = 20 \mu M$, Parasetamol için $LD_{50} = 5 mM$ olarak belirlenmiştir. DNA hasarı, Sorafenib 48 saatlik uygulamada Komet testi ile analiz edilmiş; en yüksek DNA hasarı 25.33 ± 4.16 değer ile $20 \mu M$ dozunda tespit edilmiştir. Buna en yakın DNA hasarı ise 23.33 ± 1.15 , $20 \mu M$ Sorafenib + $5 mM$ Parasetamol 48 saatlik kombinasyon uygulamasında gözlenmiştir. Ayrıca, BAX, BCL-2, KASPAZ-3 ve TNF-A gen ekspresyonları qRT-PCR ve protein düzeyleri ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, kombinasyon uygulamasının BAX ve KASPAZ-3 ekspresyonunu artırırken, BCL-2 düzeylerini azalttığını ve TNF-A düzeylerini yükselttiğini göstermektedir. Bu bulgular, Sorafenib ve Parasetamol kombinasyonunun HepG2 hücrelerinde doza ve süreye bağlı olarak güçlü sitotoksik ve genotoksik etkiler oluşturduğunu, apoptotik

yolakları aktive ettiğini ve olası sinerjistik antikanser etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Bu veriler, HCC tedavisinde kombinasyon stratejilerinin potansiyelini vurgulamakta ve ileri prelinik çalışmalar için önemli bir temel oluşturmaktadır.

2025, xii + 71 sayfa

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, ELISA, Genotoksisite, Hepatosellüler karsinom, HepG2, Parasetamol, Sorafenib, Sitotoksisite, qRT-PCR.



ABSTRACT

M.Sc. Thesis

***IN VITRO* ANALYSIS of ANTI-CANCER EFFECTS of SORAFENIB and PARACETAMOL COMBINATION on HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS**

Ayşegül GEDİK

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Arzu ÖZKARA

Co-Supervisor: Assoc. Dilek AKYIL

Liver cancer ranks among the cancer types with the highest mortality rates worldwide, with hepatocellular carcinoma (HCC) being the most common form of primary liver cancer. Due to the limited efficacy of Sorafenib, a drug used in the treatment of HCC, and the development of drug resistance, the investigation of new combination therapies has become essential. Paracetamol, a widely used analgesic and antipyretic agent, is known to exhibit hepatotoxicity at high doses and has been reported to have potential anticancer effects. In this study, the cytotoxic, genotoxic, and apoptotic effects of the combination of Sorafenib and Paracetamol on the human liver cancer cell line HepG2 were evaluated *in vitro*. Cells were treated with various concentrations of Sorafenib and Paracetamol, individually and in combination, for 24 and 48 hours. Cell viability was assessed by MTT assay, and the LD₅₀ values were determined as 20 µM for Sorafenib and 5 mM for Paracetamol. DNA damage was analyzed using the Comet assay after 48-hour Sorafenib treatment, with the highest DNA damage observed at 20 µM Sorafenib (25.33 ± 4.16). A similar level of DNA damage (23.33 ± 1.15) was also detected following the combination of 20 µM Sorafenib and 5 mM Paracetamol for 48 hours. Additionally, gene expressions of BAX, BCL-2, CASPASE-3, and TNF- α were analyzed by qRT-PCR, and protein levels were measured using the ELISA method. Results indicated that the combination

treatment increased the expression of BAX and CASPASE-3, decreased BCL-2 levels, and elevated TNF-A levels.

These findings suggest that the combination of Sorafenib and Paracetamol exerts potent cytotoxic and genotoxic effects on HepG2 cells in a dose- and time-dependent manner, activates apoptotic pathways, and may possess synergistic anticancer potential. These data highlight the potential of combination strategies in HCC treatment and provide a significant foundation for further preclinical studies.

2025, xii + 71 pages

Keywords: Apoptosis, ELISA, Genotoxicity, Hepatocellular carcinoma, HepG2, Paracetamol, Sorafenib, Cytotoxicity, qRT-PCR.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans süresi boyunca hiçbir zaman vazgeçmeden, yılmadan ve benimle bu yolda dimdik yürüten disiplin ve saygı kuralları çerçevesinde bizlerin geleceğe bilimle ışık tutan insanlar olacağımızı hep dile getirerek motive eden sevgili danışmanım saygıdeğer Doç. Dr. Arzu ÖZKARA'ya içten ve minnetle şükranlarımı sunuyorum.

Bu çalışmamda gerek deneysel gerekse bilimsel her açıdan bilgilerini ve imkanlarını esirgemeyen en iyi sonuçlarla yürütülmesi için her türlü fedakarlığı yapan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ ve Doç. Dr. Dilek AKYIL'a minnetlerimi sunarım.

Deney sürecinde yanımda olan tüm laboratuvar ekip arkadaşlarıma ve biricik aileme de her türlü destekleri için çok teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışmasını 23. FEN. BİL.31 nolu proje ile destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Ayşegül GEDİK
Afyonkarahisar 2025

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	3
2.1 Karaciğer ve Karaciğer Kanseri	3
2.1.1 Karaciğer Kanseri	4
2.1.2 Hepatosellüler Karsinom	6
2.1.3 HCC Tedavisinde Hedeflenen Moleküller ve Yolakları	8
2.1.4 HepG2 Hücre Hattı	10
2.2 Apoptoz ve Kanser Gelişiminde Rol Oynayan Moleküler Faktörler	11
2.2.1 TNF- α Ligandı ve İlişkili İnhibitörlerin HCC Üzerindeki Etkileri	12
2.2.2 Bax ve Bcl-2 Apoptoz Düzenleyici Proteinlerin Etkisi.....	13
2.2.3 Kaspaz-3'ün, Apoptotik Süreçteki Fonksiyonu ve HCC'deki Rolü	14
2.3 Sorafenib	15
2.3.1 Sorafenib'in Hücresel Etki Mekanizması.....	17
2.3.2 Sorafenib'in HCC Tedavisindeki Klinik Kullanımı.....	17
2.4 Parasetamol	18
2.4.1 Parasetamol'ün Antikanser Potansiyeli ve Etkinliği	19
2.5 MTT Yöntemi.....	20
2.6 Komet Testi	21
2.7 RNA İzolasyonu, Gen Konsantrasyonu ve Saflık Belirlenmesi.....	23
3. MATERYAL VE METOT.....	24
3.1 Hücre Kültürü Çalışmaları ve MTT Uygulaması.....	24
3.1.1 Hücre Kültürü	24
3.1.2 HepG2 Hücrelerinin Pasajlanması	25

3.1.3 Tripan Blue Yöntemi ile Hücre Sayımı	26
3.1.4 HepG2 Hücrelerinin Sıvı Azotta Dondurulup Muhafaza Edilmesi	26
3.2 Sitotoksiteyi Değerlendirmek İçin MTT Yöntemi	26
3.2.1 MTT Testi ile Sorafenib IC ₅₀ Dozunun Belirlenmesi	27
3.2.2 MTT Testi Kullanılarak Parasetamol IC ₅₀ Dozunun Belirlenmesi	28
3.2.3.MTT Metodu ile Sorafenib ve Parasetamol Kombinasyonu Çalışması	29
3.3 Genotoksitenin Belirlenmesinde Komet Yöntemi	30
3.4 RNA İzolasyonu, Saflık Ölçümü ve cDNA Sentezi	33
3.4.1 cDNA Sentezi	35
3.4.2 Primer Tasarımı	35
3.4.3 qRT-PCR	36
3.5 Protein İzolasyonu ve Miktar Analizi	37
3.6 ELISA Analizi	39
3.7 İstatiksel Analiz	39
4. BULGULAR	40
4.1 MTT Testi Sonuçları	40
4.1.1 HepG2 Hücre Hattında Parasetamol'ün Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	40
4.1.2 HepG2 Hücre Hattında Sorafenib'in Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	41
4.1.3 HepG2 Hücre Hattında Sorafenib ve Parasetamol Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi	42
4.2 Genotoksite Testi Sonuçları	44
4.3 RNA İzolasyonu	45
4.4 Gen İfade Düzeyleri	45
4.5 ELISA Yöntemi ile Protein Düzeyi Sonuçları	50
5. TARTIŞMA	54
6. KAYNAKLAR	61

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dH ₂ O	Distile su
rpm	Dakikada devir sayısı
α	Alfa
mL	Mililitre
°C	Santigrat derece
nm	Nanometre
μ M	Mikromolar
mM	Milimolar
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
%	Yüzde
IC ₅₀	%50 öldürücü doz
CO ₂	Karbondioksit
±	Artı ya da eksi

Kısaltmalar

BCLC	Barselona Klinik Karaciğer Kanseri
BT	Bilgisayarlı Tomografi
cDNA	Komplementer DNA
COX	Siklooksijenaz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EtBr	Etidum Bromür
FADD	Ölüm Alanına Sahip Fas İlişkili Protein
FBS	Fetal Sığır Serum
HBC	Hepatit C Virüsü
HBV	Hepatit B Virüsü
HCC	Hepatosellüler Karsinom
HepG2	İnsan Hepatosellüler Karsinom Hücresi
LMA	Düşük Erime Noktalı Agaroz
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NMA	Normal Erime Noktalı Agaroz
PBS	Fosfat Tamponlu Salın
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RNA	Ribonükleik Asit
RT-qPCR	Ters Transkriptaz Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SCGE	Tek Hücreli Jel Elektroforezi
SHARP	Sorafenib Hepatosellüler Karsinom Değerlendirme Protokolü
SOR	Sorafenib

TACE
VEGFR

Transarteriyel Kemoterapi Embolizasyonu
Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 İnsan karaciğer yapısı.....	4
Şekil 2.2 BCLC evrelemesine göre tedavi seçenekleri	8
Şekil 2.3 Sorafenib'in kimyasal yapısı.....	16
Şekil 2.4 Parasetamol'ün moleküler yapısı	19
Şekil 2.5 MTT yöntemi ile renk değişimi	21
Şekil 2.6 Komet yönteminin basamakları	22
Şekil 2.7 Komet testinde elde edilen normal ve DNA hasarı bulunan iki hücrenin florosan mikroskop görüntüleri.....	23
Şekil 4.1 HepG2 hücreleri üzerinde uygulanan farklı dozların 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında canlılık oranlarına (%) etkisi	40
Şekil 4.2 HepG2 hücreleri üzerinde uygulanan farklı dozların 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında canlılık oranlarına (%) etkisi	41
Şekil 4.3 HepG2 hücrelerine 24 saatlik Sorafenib ve Parasetamol kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkisi	42
Şekil 4.4 HepG2 hücrelerine 48 saatlik Sorafenib ve Parasetamol kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkisi	43
Şekil 4.5 BAX geni ekspresyon seviyesi (a:24 ve b:48 saat).....	46
Şekil 4.6 BCL-2 geni ekspresyon seviyesi (a:24 ve b:48 saat)	47
Şekil 4.7 KASPAZ-3 geni ekspresyon seviyesi (a:24 ve b:48 saat)	48
Şekil 4.8 TNF-A geni ekspresyon seviyesi (a:24 ve b:48 saat).....	49
Şekil 4.9 Bax protein ekspresyonuna düzeyleri (a:24 ve b:48 saat).....	50
Şekil 4.10 Bcl-2 protein ekspresyonuna düzeyleri (a:24 ve b:48 saat)	51
Şekil 4.11 Kaspaz-3 protein ekspresyonuna düzeyleri (a:24 ve b:48 saat)	52
Şekil 4.12 Tnf- α protein ekspresyonuna ekspresyonuna düzeyleri (a:24-b:48 saat).....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 Elektroforez tampon çözeltisinin hazırlanması.....	30
Çizelge 3.2 Lizis çözeltisinin formülasyonu	30
Çizelge 3.3 Nötralizasyon çözeltisinin formülasyonu.....	31
Çizelge 3.4 Düşük erime noktasına sahip agaroz çözeltisinin (LMA) hazırlanması	31
Çizelge 3.5 Normal erime noktasına sahip agaroz çözeltisinin (NMA) hazırlanması ...	31
Çizelge 3.6 Etidyum bromür çözeltisinin hazırlanması	32
Çizelge 3.7 RNA izolasyonunda T75 flasklara uygulanan ilaçlar ve miktarları (24-48 saat).....	34
Çizelge 3.8 cDNA sentezinde kullanılan bileşenlerin miktarları.....	35
Çizelge 3.9 Ekspresyon seviyeleri belirlenen genler ve bu genler için kullanılan primer dizileri.....	36
Çizelge 3.10 qRT-PCR çalışmasında kullanılacak reaktif bileşenler ve miktarları	37
Çizelge 4.1 HepG2 hücrelerinde Sorafenib ve Parasetamol kombinasyonunun oluşturduğu DNA hasarı.....	44

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 2.1 HepG2 hücrelerinin morfolojik görünümü.	11
Resim 3.1 HepG2 hücrelerinin morfolojik görünümü.	25
Resim 3.3 Parasetamol uygulanan HepG2 hücrelerinin MTT görüntüsü.	29
Resim 4.1 Parasetamol ve Sorafenib kombinasyon dozlarının HepG2 hücre hattı üzerindeki etkilerinin Komet görüntüleri.	45



1. GİRİŞ

Kanser tüm dünyada ikinci en yaygın ölüm nedeni olup, diğer yaş gruplarının yanı sıra dünyada 85 yaş altı bireylerin birincil ölüm nedenidir (Zhu vd. 2024). Karaciğer kanseri ise dünya genelinde en yaygın ve ölümcül malignitelerden biri olarak kabul edilmekte ve özellikle HCC, bu kanser türünün en sık görülen şeklidir. HCC'nin patogenezi; genetik değişiklikler, inflamatuvar süreçler, viral enfeksiyonlar ve çevresel faktörlerle yakından ilişkilidir (Bruix ve Sherman 2011, Llovet vd. 2008). Tedavi seçeneklerinin sınırlı olması ve ileri evrelerde tanı konması nedeniyle, karaciğer kanseri tedavisinde yeni ve etkili stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır (Llovet vd. 2003).

Sorafenib, karaciğer kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir multikinaz inhibitörüdür. Bu ilaç, hücre proliferasyonunu baskılayarak, tümör büyümesini ve vaskülarizasyonunu engellemektedir. Klinik çalışmalarda, Sorafenib'in HCC üzerindeki etkinliği kanıtlanmış olmakla birlikte, bazı hastalarda direnç gelişimi gibi zorluklarla karşılaşmaktadır (Llovet vd. 2008, Bruix ve Sherman 2011). Bu sebeple tedavide meydana gelen bu zorlukları aşabilmek için kombine ilaç tedavileri bu zorlukların üstesinden gelinebilmesinde farklı bir yaklaşım sunabilir. Tedavide etkinliği bilinen bir ilaç farklı semptomların giderilmesinde kullanılan diğer ilaçlarla etkileşim halinde olabilir. Kullanılan diğer ilaçlar Sorafenib gibi antikanser ajanların etkinliğini azaltma ya da artırma yönünde bir mekanizma gösterebilir. Dolayısıyla ilaç etkileşimlerinin değerlendirilmesine yönelik çalışmalar tedavi başarısını etkileyebilen sonuçları değerlendirmek açısından önem arz etmektedir.

Parasetamol yaygın kullanım alanına sahip ağrı ve ateş gibi pek çok hastalığa eşlik edebilen semptomların giderilmesinde kullanılan bir ilaçtır. Genellikle güvenli bir ilaç olarak kabul edilse de yüksek dozlarda hepatotoksisiteye yol açtığı bilinmektedir (Hinson vd. 2010). Parasetamol, karaciğerde N-asetil-p-benzoquinon imine (NAPQI) adlı toksik bir metabolit üreterek hücre hasara neden olabilmektedir (McGill ve Jaeschke 2013). Düşük dozlarda güvenli olmasına rağmen, yüksek dozda kullanımı karaciğer hücrelerinde oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon gibi ciddi etkiler oluşturmaktadır (Hinson vd. 2010). Bu durum, hücre ölümüne yol açabilecek mekanizmaları tetikleyebilir. İlginç

bir şekilde, son zamanlarda yapılan çalışmalar, Parasetamol'un yüksek dozlarda kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkiler gösterebileceğini ortaya koymuştur (Kang vd. 2015). Kanser hastaları tedavi sürecinde farklı nedenlerle Parasetamol kullanabilmekte ve iki ilaç yan yana geldiğinde etkileşim durumlarının kanser tedavisini ne yönde etkilediğine dair literatürde herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu çalışma kapsamında, Sorafenib ve Parasetamol kombinasyonunun sinerjistik ya da antagonistik bir etki yaratıp yaratmayacağı ve bu etkinin HCC hücreleri üzerindeki mekanizmalarının aydınlatılması hedeflenmektedir. Parasetamol'un hem hepatotoksik hem de potansiyel antikanser özellikleri dikkate alındığında, bu kombinasyonun kanser tedavisindeki etkinliği önemli bir araştırma konusu olarak karşımıza çıkmaktadır.

İlaçların hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek için kullanılan en yaygın yöntemlerden biri MTT testidir. Bu yöntem, mitokondriyal aktiviteye dayalı olarak hücre canlılığını ölçmekte ve ilaçların hücre proliferasyonunu nasıl etkilediğini gösteren kantitatif veriler sağlamaktadır (Mosmann 1983). Genotoksisite, hücrelerin DNA yapısında oluşan hasarlar sonucu ortaya çıkan bir durumdur ve bu hasar, kanser hücrelerinin ölümü ile sonuçlanabilir (Singh vd. 1988). Komet Yöntemi (Kuyruklu Yıldız Testi) ise DNA hasarını belirlemek için kullanılan bir tekniktir.

Bu tez projesi kapsamında, Sorafenib ve Parasetamol kombinasyonunun HepG2 hücrelerinde oluşturabileceği muhtemel sitotoksik ve genotoksik etkilerin belirlenmesi amacıyla MTT ve Komet testinin uygulanması hedeflendi. Ayrıca kombinasyon uygulaması yapılan HepG2 hücreleri üzerinde TNF-A, BAX, KASPAZ-3 ve BCL-2 gen ifade düzeylerinin belirlenmesi ve ELISA metodu ile aynı genlerin protein seviyelerinin değerlendirilmesi amaçlandı. Bu çalışma, karaciğer kanseri hücre hattı olan HepG2 üzerinde Sorafenib ve Parasetamol kombinasyonunun sitotoksik ve genotoksik etkilerini değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Bu bağlamda bu çalışma ile elde edilecek olan veriler ile hücre ölüm mekanizmalarının ve gen ekspresyon profillerinin anlaşılmasının, kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

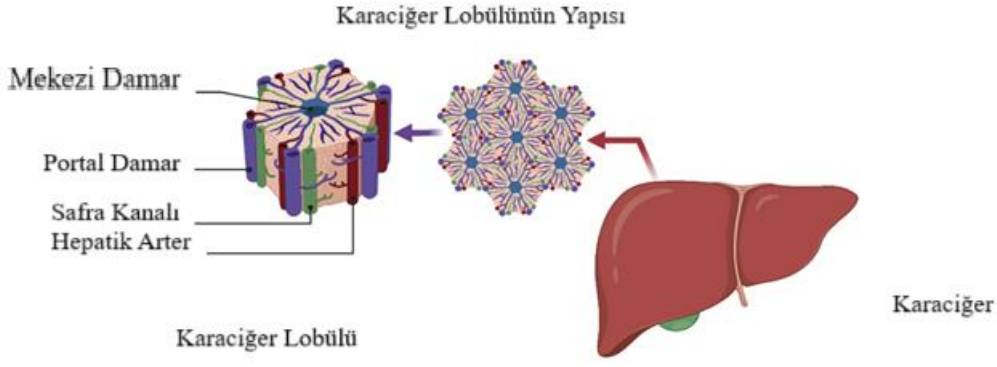
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Karaciğer ve Karaciğer Kanseri

Karaciğer, insan vücudundaki en büyük iç organlardan biri olup yaklaşık 1.5 kilogram ağırlığındadır ve diyaframın hemen altında, sağ üst karın bölgesinde bulunur. Dört adet ana lobdan oluşan bu organ, sağ, sol, kuadrat ve kaudat lobları ile anatomik olarak ayrılır (Guyton ve Hall 2006). Karaciğer, dış yüzeyinde ince bir fibröz kapsül ile kaplanmış olup, bu sayede pürüzsüz bir yapıya sahiptir. Karaciğerin en küçük fonksiyonel birimi lobüller olarak bilinir. Bu lobüller, merkezi ven ve çevresindeki hepatositlerden oluşur. Hepatositler; safra üretimi, detoksifikasyon ve metabolizma gibi birçok önemli işlevi yerine getiren karaciğerin esas hücreleridir (Sherlock ve Dooley 2002). Karaciğere oksijen açısından zengin durumda kanı taşıyan hepatik arter ve besin açısından zengin, ancak oksijen bakımından fakir durumdaki kanı getiren portal ven ile çift yönlü bir kan akışı sağlanır. Bu çift yönlü kanlanma, karaciğerin metabolik faaliyetleri ve toksinleri temizleme görevlerinde önemli bir rol oynar (Kumar ve Abbas 2017).

Karaciğer, yüksek yenilenme kapasitesine sahip bir organ olarak dikkat çeker. Hepatositler, karaciğerin hasarlı dokularını onarabilir ve bu özellik sayesinde organ işlevselliğini koruyabilir (Fausto 2000). Ancak uzun süreli hasar ve kronik hastalıklar, bu yenilenme sürecini olumsuz etkileyerek siroz gibi ciddi hastalıkların gelişmesine neden olabilir (Schuppan ve Afdhal 2008).

Karaciğer, vücuttaki en büyük organlardan biri olup, metabolik süreçlerde, toksinlerin arındırılmasında ve protein sentezi gibi önemli işlevlerde hayati bir rol oynar. Karaciğerin temel işlevsel birimleri, lobüller olarak adlandırılan küçük yapısal bölümlerden oluşur. Bu lobüllerde bulunan hepatositler, karaciğerdeki oksijen ve besin açısından zengin bir ortamda metabolik aktiviteleri gerçekleştirir (Guyton ve Hall 2006). Ancak, sürekli hasar veya kimyasal maddeler gibi çeşitli faktörlerin etkisiyle bu hücrelerde genetik bozulmalar meydana gelebilir. Bu durum, zamanla karaciğer kanseri gibi ciddi patolojik süreçlerin başlamasına neden olabilir. İnsan karaciğer yapısı Şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1 İnsan Karaciğer Yapısı.

2.1.1 Karaciğer Kanseri

Dünyada kanser vakaları arasında karaciğer kanseri ve diğer gastrointestinal maligniteler ilk beş içinde yer almaktadır (Zhu vd. 2024). Karaciğer kanseri genellikle altta yatan bir hastalığın sonucudur; ancak bu hastalığın kaynağı dünya genelinde büyük farklılıklar göstermektedir. Karaciğer kanserinin gelişiminde rol oynayan temel faktörler arasında kronik hepatit B ve C enfeksiyonları, alkol kullanımı, obezite ve tip 2 diyabet bulunmaktadır. Hepatit B ve C virüsleri, karaciğer hücrelerinde sürekli bir iltihap ve doku hasarına neden olarak kanser riskini artırmaktadır (Lee ve Wang 2024). Alkol tüketimi ise, karaciğerin normal işlevini bozar ve iltihaplanma süreçlerini teşvik ederek kanser riskini artırır (Nguyen ve Clark 2021). Obezite ve diyabet, insülin direnci ve yaygın sistemik iltihap ile bağlantılıdır; bu durumlar, karaciğer hücrelerinin kansere dönüşümüne sebep olabilir (Miller ve Zhang 2022). Araştırmacılar, karaciğer kanserinin gelişiminde çeşitli biyolojik faktörlerin etkili olduğunu öne sürmektedir. Ancak, bu faktörlerin nasıl bir etkileşim içinde olduğunu ve hangi biyolojik mekanizmaların kanserin ortaya çıkmasına yol açtığını tam olarak belirlemek zor bir görevdir. Günümüzde yapılan çalışmalar, bu süreçte genetik ve epigenetik değişimlerin yanı sıra, çevresel etmenlerin de rol oynadığını ortaya koymaktadır (Johnson ve Peterson 2023).

2020 yılında yayımlanan verilere göre HCC, yetişkinlerde en sık görülen altıncı kanser türü olup, kansere bağlı ölümler açısından akciğer ve kolorektal kanserden sonra üçüncü sırada yer almaktadır (Sung vd. 2021). Globocan (2022) verilerine göre dünya genelindeki en çok kanser vakası görülen kıta Asya kıtasıdır, ikinci sırada ise Avrupa

kıtası gelmektedir. Yaklaşık 20 milyon vakanın %49.2' si Asya'da, %22.4' üde Avrupa'dadır. Küresel Kanseri Gözlemevi (GCO)'nin Globocan 2022 veritabanına göre 2022 yılında 866.136 kişiye karaciğer kanseri tanısı konulmuş ve 758.725 kişi karaciğer kanseri nedeniyle vefat etmiştir (GLOBOCAN, 2022). Karaciğer kanseri, özellikle HCC, karaciğer dokusunun kötü huylu tümör transformasyonu sonucu oluşan bir tümördür. HCC genellikle siroz veya kronik hepatit gibi arka plandaki karaciğer hastalıkları ile bu bağlamda ilişkilidir. Histolojik olarak, HCC hücreleri anormal, pleomorfik nükleuslara ve yüksek mitotik aktiviteye sahip olarak karakterize edilir. HCC'de, saldırgan büyüme modeli ve kan damarlarının içine sızma sıklıkla gözlemlenir, bu da metastatik potansiyeli artırır (Poon vd. 2021). Histolojik sınıflamalar, HCC'nin farklı alt tiplerini belirlemek için kritik öneme sahiptir ve bu durum tedavi yaklaşımlarını büyük ölçüde etkiler (Forner vd. 2018, Kudo 2020). HCC hastalarının sağ kalım oranları, hastalığın evresi, tedavi yöntemleri ve genel sağlık durumu gibi birçok faktöre bağlıdır. Genel olarak, erken evre HCC hastalarının sağ kalım oranları, ileri evre hastalara göre önemli ölçüde yüksektir. Bu durumda erken tanı ve tedavi ile beş yıllık sağ kalım oranı %50-70 civarında iken, ileri evrede bu oran %5-20'ye kadar düşebilmektedir (Llovet vd. 2021).

Tedavi yöntemleri de hayatta kalım oranlarını etkileyen kritik bir faktördür. Cerrahi rezeksiyon veya karaciğer nakli, erken evre HCC hastalarında en iyi sonuçları vermekte ve sağ kalım oranlarını artırmaktadır (Forner vd. 2018). Bununla birlikte, sistemik tedaviler ve hedefe yönelik tedavi seçenekleri, hastalığın ilerlemesi durumunda yaşam süresini uzatmada önemli bir rol oynamaktadır (Kudo 2020). Ayrıca, hastaların genel sağlık durumu ve kanserle birlikte görülen diğer olumsuzluklar da sağ kalım oranlarını etkileyen önemli etkenler arasındadır (El-Serag vd. 2016). Karaciğer kanseri evrelemesi, hastalığın prognozunu belirlemede ve tedavi stratejilerinin oluşturulmasında kritik bir rol oynamaktadır ve HCC genellikle Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) sistemi kullanılarak evrelenir. Bu sistem, tümör boyutu, karaciğer fonksiyonu ve hastanın genel durumu gibi faktörlere dayanarak hastalığı beş evreye ayırmaktadır (Bruix ve Sherman 2011). BCLC sistemine göre evreler şu şekildedir; A evresi (erken evre), B evresi (ileri evre), C evresi (uzun süreli hastalık) ve D evresi (terminal evre) olarak tanımlanmıştır (Forner vd. 2018). Bu evrelemenin doğru bir şekilde yapılması, hastalığın yönetimi ve tedavi planlaması ve bu sürecin takibi bakımından son derece önemlidir.

Karaciğer kanseri, genellikle ileri evrelerde semptom verdiği için çoğu hastada geç dönemde teşhis edilir. En yaygın belirtiler arasında karında şişlik, ağrı, iştahsızlık, kilo kaybı, sarılık ve sürekli yorgunluk hissi yer alır (Forner vd. 2018). Hastalar genellikle karın sağ üst kısmında ağrı ve karında kitle hissi ile başvururlar. Karaciğerin büyümesi, muayenede fark edilebilirken, bazı hastalarda karında sıvı birikimi görülebilir. İleri evrelerde, karaciğer yetmezliği ve varis kanamaları gibi komplikasyonlar ortaya çıkabilir (El-Serag ve Rudolph 2016). Karaciğer kanserinin tanısında, özellikle risk grubundaki hastaların düzenli taramadan geçirilmesi büyük önem taşır. Hepatit B ve C virüsleri ile enfekte olan ya da siroz tanısı almış hastalar, HCC gelişimi açısından yüksek risk grubundadır. Bu hastalar için 6 aylık periyotlarla ultrasonografi önerilmektedir (Bruix ve Sherman 2011). Tanıda kullanılan görüntüleme yöntemleri arasında bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) bulunmaktadır. Bu teknikler, tümör boyutunu, yayılımını ve karaciğer dışındaki yapılarla olan ilişkisini belirlemek için kullanılır (Forner vd. 2018).

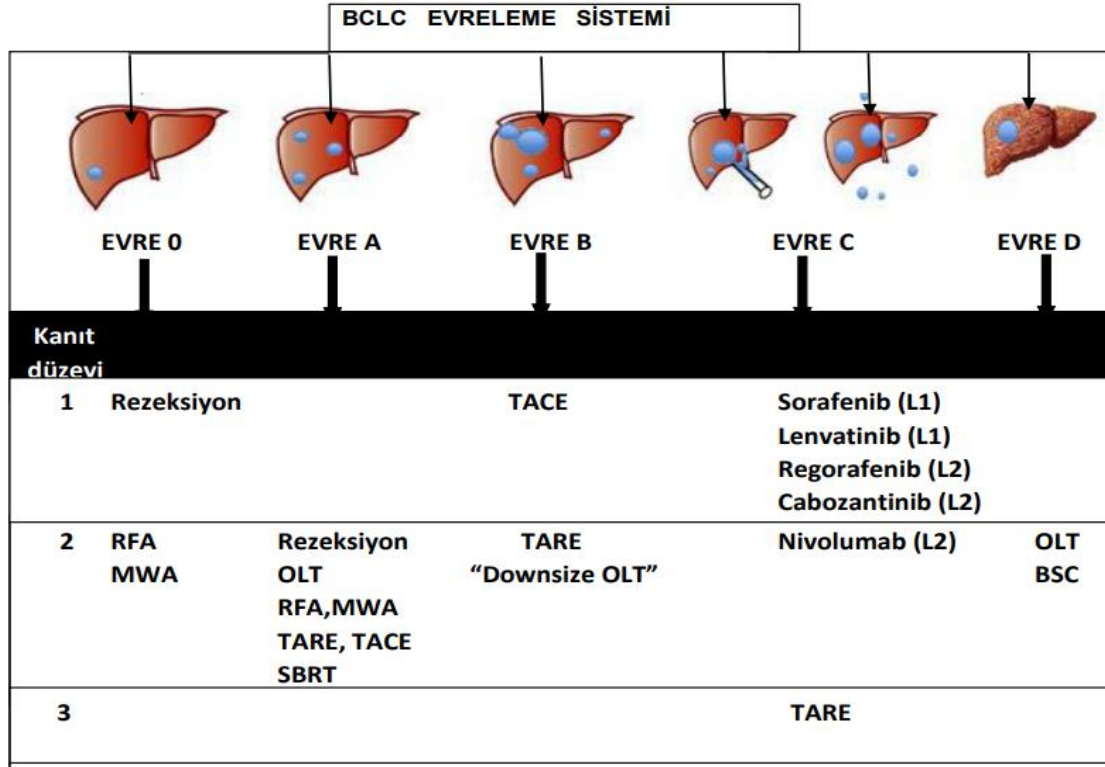
Karaciğer kanseri tedavi seçenekleri, hastalığın evresi ve hastanın genel sağlık durumu dikkate alınarak belirlenir. Erken evre hastalarda, cerrahi rezeksiyon, karaciğer nakli ya da lokal ablasyon tedavileri uygulanabilir. Küçük tümörlerin cerrahi olarak çıkarılması en iyi sonuçları verirken, karaciğer fonksiyonları ciddi şekilde bozulmuş hastalar için nakil daha uygun bir tedavi seçeneğidir (Kudo 2020). Orta evre HCC hastalarında arter yoluyla kemoterapi ve tümör beslenmesinin kesilmesi yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu yöntemle, tümöre doğrudan kemoterapi uygulanırken, tümörün beslenmesi kesilir. İleri evre hastalarda ise sistemik tedavi, özellikle hedefe yönelik tedaviler örneğin Sorafenib gibi ilaçlar, tümör büyümesini kontrol etmek için kullanılır. Sorafenib, tümör hücrelerinin çoğalmasını ve yayılmasını engelleyen bir tirozin kinaz inhibitörüdür ve yaşam süresini uzatmada etkin bir tedavi olarak kabul edilmektedir (Llovet vd. 2021).

2.1.2 Hepatosellüler Karsinom

HCC, primer karaciğer kanserlerinin en sık rastlanan türü olup dünya genelinde kanser sebepli ölümler arasında üçüncü sıradadır. HCC, vakaların %75-85'ini oluştururken, intrahepatik kolanjiyokarsinom ve diğer nadir görülen karaciğer kanserleri bu oranı takip

etmektedir (Nguyen vd. 2009). HCC gelişiminde temel risk faktörleri; hepatit B virüsü (HBV) ve hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonları, aflatoksinle kirlenmiş zararlı gıdaların tüketimi, aşırı derecede alkol kullanımı, obezite ve yağlanma, sigara gibi tütün ürünleri ve tip 2 diyabettir (Chang vd. 1997). Bu risk faktörlerinin dağılımı, coğrafi konuma göre farklılık göstermektedir. Örneğin, Çin ve Doğu Afrika gibi HCC'nin sıklıkla görüldüğü bölgelerde, HBV enfeksiyonu ve aflatoksin maruziyeti bu durumda belirleyici faktörlerdir. Buna karşın, Japonya ve Mısır gibi ülkelerde HCV enfeksiyonu sık görülerek ön plana çıkmaktadır (Balogh vd. 2016). HCC'nin patogeneğinde oksidatif stres, süregelen inflamasyon ve karaciğer hücre hasarı önemli rol oynamaktadır. Bu mekanizmalar, siroz ve hepatositlerin agresif dönüşümüne zemin hazırlayarak tümör gelişimini tetiklemektedir (Gravitz 2014). Özellikle kronik inflamasyon ve karaciğerin sürekli yenilenme yeteneği, kanser hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını kolaylaştırır. Batı ülkelerinde, obezite gibi sağlık sorunlarının da HCC sıklığını artırdığı bilinmektedir (Petrick ve McGlynn 2019).

HCC tedavisinde birçok seçenek mevcut olup, tedavi planı kişinin hastalık sürecindeki evresine, hastanın genel sağlık durumuna ve karaciğer fonksiyonlarına bağlı olarak belirlenir. Erken evre HCC'de cerrahi müdahale en etkili tedavi yöntemidir; yalnızca belirli hastalar bu tedaviye uygun olabilir. Bu durumun yanı sıra karaciğer nakli ise özellikle sirozlu hastalar için önerilen bir seçenektir (Llovet vd. 2021). Daha ileri evrelerde, transarteriyel kemoembolizasyon (TACE) ve radyoembolizasyon gibi lokal tedavi yöntemleri, tümörün büyümesini kontrol etmek ve diğer bölgelere sıçramasını engellemek amacıyla uygulanmaktadır. Ayrıca, Sorafenib gibi hedefe yönelik ilaç tedavileri hastalığın ilerlemesini yavaşlatmada önemli bir yere sahiptir (Forner vd. 2018). HCC tümörlerinin biyolojik özellikleri, kan damarı oluşumunu hızlandırarak büyümlerine zemin hazırlar. Bu nedenle, son yıllarda anti-anjiyogenik tedaviler ve immünoterapiler HCC'de umut verici tedavi stratejileri olarak öne çıkmıştır (Liu vd. 2006). Bu tedaviler, tümör büyümesini baskılayarak ve yeni kan damarlarının oluşumunu engelleyerek HCC hücrelerinin yayılımını önlemeye çalışmaktadır. Ayrıca, bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri bu sürece dahil olup, hastaların hayatta kalma oranlarını artırma potansiyeline sahiptir (Kudo 2020). BCLC evrelemesine göre tedavi seçenekleri Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2 BCLC evrelemesine göre tedavi seçenekleri

2.1.3 HCC Tedavisinde Hedeflenen Moleküller ve Yolakları

HCC, dünya çapında en yaygın karaciğer kanseri türü olup, tedavisinde hedeflenen moleküller ve sinyal yolları üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu yolların inhibisyonu, HCC hücrelerinin proliferasyonunu ve vücuda dağılımını engelleyerek tedavide etkinlik sağlamaktadır. HCC tedavisinde hedeflenmek istenen temel yolaklardan dan biri olan mTOR sinyal yolu, hücre büyümesi, çoğalması ve hayatta kalmasında kritik bir rol oynar. mTOR inhibitörleri, özellikle ilerlemiş evrelerdeki HCC hastalarında tümör büyümesini durdurmak amacıyla kullanılmıştır (Villanueva vd. 2011).

Everolimus gibi mTOR inhibitörleri, bu yolu durdurarak hücre büyümesinin baskılanmasını sağlamaktadır (Zoncu vd. 2011). Hücre dışı sinyalle kontrol edilen kinaz (ERK) ve onunla ilişkili Ras/Raf/MEK/ERK diğer hedef yolaklarından. Bu yol, HCC'de hücre proliferasyonunu tetikleyen önemli bir mekanizmadır. Trametinib gibi MEK inhibitörleri, bu yoldaki hücre sinyalini durdurarak HCC tedavisinde umut vadetmektedir (Yeh vd. 2015). HCC'de sıklıkla mutasyona uğrayan p53 proteini, hücre

döngüsünü düzenleyen ve apoptozu uyaran önemli bir tümör baskılayıcıdır. Bu nedenle, p53 yolağını hedefleyen tedaviler, HCC'nin gelişimini durdurmada akılcı bir yaklaşım olarak görülmektedir (Vousden ve Prives 2009). Nutlin-3 gibi MDM2 inhibitörleri, p53 aktivitesini artırarak HCC hücrelerinde apoptozu başlatabilir. HCC gelişimi, hücre içi sinyal yollarındaki düzensizlikler ve apoptotik sürecin bozulması ile yakından ilişkilidir. Bcl-2, Bax, Kaspaz-3 ve TNF- α gibi proteinler, hücre ölümü ve sağkalımında kritik öneme sahiptir ve bu moleküller, hedeflenen tedavi stratejilerinin anahtar noktalarından biri olarak önümüze çıkar. HCC tedavisinde kullanılan bazı yolaklar, bu proteinlerin üretimini ve işlevlerini düzenleyerek kanser hücrelerinin büyümesini ve metastazını durdurma potansiyeline sahiptir (Vassilev vd. 2004).

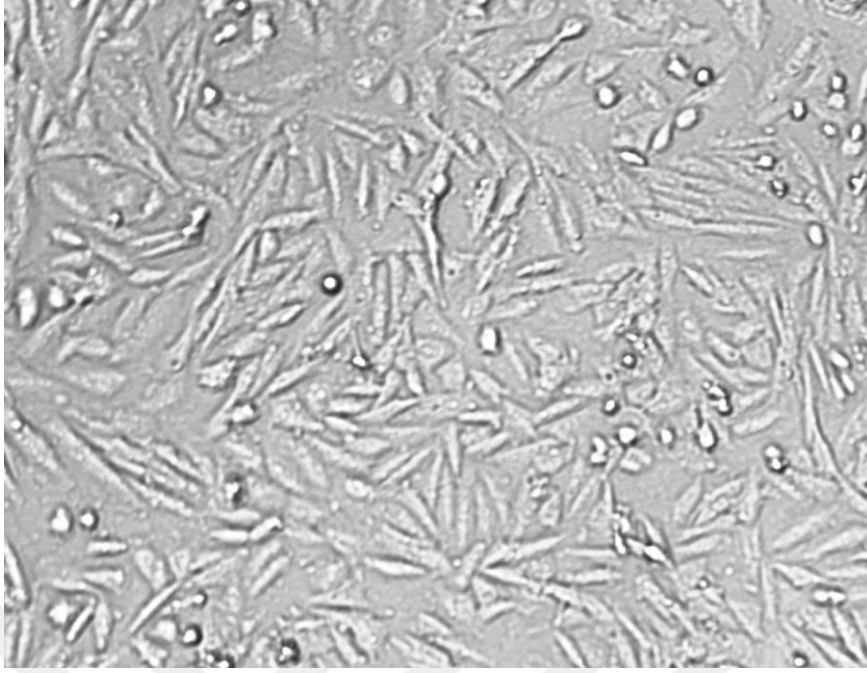
Bcl-2, hücre ölümünü engelleyici bir protein olarak hücrelerin hayatta kalmasını destekler ve kanser hücrelerinde aşırı ekspresyonu, hücre ölümünü baskılayarak tümör büyümesine katkıda bulunur (Yang vd. 1997). Bax ise, bcl-2'nin aksine, pro-apoptotik bir protein olup, mitokondriyal membran geçirgenliğini artırarak hücre ölümünde tetikleyici rol oynar (Oltvai vd. 1993). Bax ve Bcl-2 oranı, hücrenin ölüm sinyallerine yanıtını belirleyen kritik bir göstergedir. Sorafenib gibi hedefe yönelik tedaviler, Bax ekspresyonunu artırıp Bcl-2'yi baskılayarak HCC hücrelerinde apoptotik süreçleri yeniden başlatabilir (Llovet vd. 2008). Kaspaz-3, apoptozun nihai aşamasında görev yapan bir proteaz olup, HCC hücrelerinde hücre ölüm sürecini başlatmada kritik bir rol oynar. Kaspaz-3'ün aktif hale gelmesi, hücrelerin parçalanmasına sebep olarak tümör gelişimini engeller. İlaç kombinasyonlarıyla Kaspaz-3'ün aktivitesinin artırılması, HCC tedavisinde önemli bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (Fan vd. 2005). Tnf- α , hem apoptoz hem de inflamatuvar yanıtları düzenleyen önemli bir sitokin olup, özellikle kronik inflamasyonun baskın olduğu karaciğer hasarı durumlarında, hem tümör baskılayıcı hem de tümör destekleyici etkiler gösterebilir. Tnf- α 'nın aşırı üretimi, karaciğer hücrelerinde inflamasyon ve fibrozis oluşturarak HCC gelişimini tetikleyebilir. Bununla birlikte, Tnf- α yolaklarını hedef alan tedavi yöntemleri, inflamasyonu azaltarak HCC tedavisinde olumlu sonuçlar verebilir (Seki vd. 2012). HCC tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılan Ras/Raf/MEK/ERK sinyal yolu, bu proteinlerin işlevini de etkileyebilir. Örneğin, Sorafenib gibi Raf kinaz inhibitörleri, hem Bcl-2'nin inhibe edilmesine hem de Kaspaz-3'ün aktivasyonuna yol açarak HCC hücrelerinde apoptoz sürecini başlatır (Liu vd. 2006).

Benzer şekilde, mTOR inhibitörleri ve immünoterapiler de Bax ve Kaspaz-3 aracılığıyla hücre ölümünü artırabilir, bu sayede HCC hücrelerinin hayatta kalma mekanizmalarını devre dışı bırakabilir (Villanueva vd. 2011). HCC tedavisinde apoptotik mekanizmaların hedeflenmesi, Bcl-2, Bax, Kaspaz-3 ve Tnf- α gibi proteinlerin düzenlenmesi ile doğrudan ilişki içerisindedir. Bu proteinlerin işlevlerine yönelik akılcı yaklaşımlar, kanser hücrelerinin büyümesini durdurmak ve apoptozu başlatmak için önemli yeni tedavi yaklaşımları ve fırsatlar sunmaktadır.

2.1.4 HepG2 Hücre Hattı

HepG2 hücre hattı, HCC araştırmalarında yaygın bir *in vitro* model olarak kullanılmaktadır. Bu hücreler, 1975 yılında 15 yaşındaki bir erkek hastanın karaciğerinden izole edilmiş olup karaciğer hücrelerinin biyolojik ve moleküler özelliklerini yansıtmaya yeteneğine sahiptir (Aden vd. 2015). HepG2, karaciğer spesifik proteinler ve metabolik enzimlerin yanı sıra lipid sentezi ile ilişkili genlerin ifadesini sürdürebilerek, HCC'nin patogenezi ve tedavi stratejilerinin araştırılması için etkili bir alt yapı sağlamaktadır (Kumar vd. 2017). HepG2 hücreleri, kanser tedavi yöntemlerinin test edilmesinde önemli bir model olup, apoptoz, hücre döngüsü kontrolü ve çeşitli sinyal iletim yolları gibi hayati hücresel süreçlerin araştırılmasında da sıkça kullanılmaktadır (Ryu vd. 2019). Aynı zamanda, araştırmacılara kanser tedavilerinin moleküler mekanizmalarını daha ayrıntılı inceleme imkânı sağlamaktadır (Zhang vd. 2020).

HepG2 hücre hattının morfolojik yapısı, farklı kültür koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. HepG2 hücreleri, genellikle epitelyal karakterde, poligonal şekilli ve sıkıca bağlı koloniler halinde büyüyen, büyük çekirdeğe sahip hücreler olarak morfolojik olarak gözlemlenir. Genellikle bu hücreler, monolayer kültürlerde poligonal ve yassı bir biçimde düzenlenir. Sitoplazmaları geniştir ve organeller açısından zengin bir yapıya sahiptirler, ayrıca belirgin çekirdek yapıları dikkat çekicidir. Bu morfolojik özellikler, karaciğerin çeşitli metabolik işlevlerini taklit etmelerini sağlar (Jiang vd. 2018). Hem morfolojik hem de biyokimyasal nitelikleri, HepG2 hücrelerini HCC çalışmalarında vazgeçilmez bir model haline getirmektedir. HepG2 hücrelerinin morfolojik görünümü Resim 2.1'de görülmektedir.



Resim 2.1 HepG2 hücrelerinin morfolojik görünümü.

2.2 Apoptoz ve Kanser Gelişiminde Rol Oynayan Moleküler Faktörler

Apoptoz, organizmaların doku homeostazını sürdürebilmek ve hasar görmüş ya da işlevini yitirmiş hücreleri temizlemek için başvurduğu düzenlenmiş bir hücre ölümü sürecidir. Kanser gelişimi sürecinde apoptozun önemi, hücre ölüm mekanizmalarındaki bozulmalarla doğrudan bağlantılıdır. Sağlıklı hücreler, DNA hasarı veya anormal hücre çoğalması gibi stres faktörlerine yanıt olarak apoptoz sürecine girerlerken, kanser hücreleri bu süreci baskılayabilir ve kontrolsüz bir şekilde büyümeye devam ederler. Bu kaçış mekanizması, kanserin yayılmasına ve metastaz yapmasına zemin hazırlayan kritik bir faktördür. Kanser hücreleri, apoptoz sinyal yollarındaki bozulmalar nedeniyle ölümsüz hale gelebilirler. Apoptozun baskılanması, tümör hücrelerinin hayatta kalma sürelerini uzatarak kontrolsüz şekilde çoğalmalarına olanak sağlar. Bu durum, birçok kanser türünde yaygın olup, genellikle kaspaz enzimlerinin azalan aktivitesi, Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin aşırı üretimi ve TP53 gibi tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlarla ilişkilendirilir (Reed 2006, Fulda ve Debatin 2006, Elmore 2007, Hotchkiss vd. 2009). DNA hasarına yanıt olarak apoptozu tetikleyen en önemli tümör baskılayıcılardan biri TP53'tür. TP53'ün inaktivasyonu, kanser hücrelerinin apoptozdan kaçmasına ve DNA onarımı yapılmaksızın bölünmelerini sürdürmelerine neden olur. Bcl-

2 ailesine ait proteinler, kanser oluşumunda kritik bir rol oynar. Bcl-2, apoptozu inhibe ederek hücrelerin yaşamını sürdürmesine yardımcı olur ve bu protein pek çok kanser türünde aşırı miktarda üretilir. Özellikle Bcl-2/Bax dengesinin bozulması, kanser hücrelerinin hayatta kalması veya ölmesi arasındaki dengeyi belirleyici bir faktör olarak öne çıkar. Kaspaz-3 aktivitesi, kanser hücrelerinde genellikle düşük seviyelerde bulunur. Kaspazlar, apoptozun son aşamalarında görev alan anahtar enzimlerdir ve kanser hücrelerinde bu enzimlerin baskılanması, hücrelerin ölümden kaçmalarına olanak sağlar. Tnf- α , bağışıklık sistemi tarafından salgılanan bir sitokindir ve çoğunlukla hücre ölümünü başlatarak kanserli hücreleri ortadan kaldırması beklenir. Fakat kanser hücreleri, Tnf- α 'nın etkilerine karşı direnç geliştirerek gelen ölüm sinyalini baskılayabilir (Reed 2006, Fulda ve Debatin 2006, Elmore 2007, Hotchkiss vd. 2009). Kanser tedavisinde apoptozun tekrar aktive edilmesi, etkili bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Apoptotik sinyal yollarını hedefleyen ilaçlar, kanser hücrelerinin ölmesini sağlamak amacıyla tasarlanmıştır. Örneğin, kinaz inhibitörü olan Sorafenib, intrinsik apoptoz yolunda Bax proteinini aktive ederek ve Bcl-2'yi baskılayarak kanser hücrelerini apoptoza yönlendirebilir. Bu tür ilaçlar, kanser hücrelerini yok etme ve tümör büyümesini engelleme konusunda etkili bir mekanizma sunmaktadır (Reed 2006, Fulda ve Debatin 2006, Elmore 2007). Kanser hücrelerinin apoptozdan kaçabilme kapasitesi, kanserin ilerlemesi ve tedaviye karşı direnç geliştirmesinin başlıca sebeplerinden biridir (Hotchkiss vd. 2009). Bu yüzden, apoptoz mekanizmalarındaki aksaklıkların anlaşılması, başarılı kanser tedavilerinin geliştirilmesinde hayati öneme sahiptir (Fulda ve Debatin 2006).

2.2.1 TNF- α Ligandı ve İlişkili İnhibitörlerin HCC Üzerindeki Etkileri

TNF- α , hücrelerin ölüm ve hayatta kalma süreçlerini kontrol eden kritik bir sitokindir. TNF- α , özellikle HCC gibi kanser türlerinde hem tümör baskılayıcı hem de tümör geliştirici etkiler sergilemektedir. HCC, dünya çapında en yaygın görülen karaciğer kanseri türü olup, Tnf- α 'nın bu hastalığın patogeneziindeki rolü yoğun bir şekilde incelenmiştir (Wang ve Lin 2008, Balkwill 2009). Tnf- α , TNF reseptörleri olan TNFR1 ve TNFR2 üzerinden sinyal iletimi yaparak hücresel tepkileri başlatır. TNFR1, genellikle apoptozu indükleyen sinyal yollarını aktive ederken, TNFR2 daha çok hücre hayatta

kalma mekanizmalarını destekleyen süreçlerle ilişkilidir (Wajant ve Pfizenmaier 2003). Bu sinyal iletim yolları, NF- κ B (nükleer faktör-kappa B) ve jnk (c-Jun N-terminal kinaz) gibi çeşitli proteinler aracılığıyla gerçekleşir. NF- κ B'nin aktive edilmesi, anti-apoptotik genlerin transkripsiyonunu artırarak hücre ölümünü engelleyebilir ve bu da HCC'nin ilerlemesine katkıda bulunabilir (Aggarwal 2003, Balkwill 2009). Tnf- α 'nın tümör büyümesini teşvik eden etkilerinin engellenmesi, HCC tedavisinde umut verici bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir. Bu süreçte, Tnf- α inhibitörleri önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle İnflksimab ve Etanercept gibi biyolojik ajanlar, Tnf- α 'nın reseptörlerine bağlanmasını engelleyerek inflamatuvar yanıtı baskılar ve böylece tümör hücrelerinin büyüme hızını düşürür. Bu inhibitörler, HCC üzerine yapılan araştırmalarda Tnf- α tarafından tetiklenen sinyal yollarını bloke ederek hücre çoğalmasını durdurmakta ve apoptoz seviyesini artırarak tümör hücrelerinin ölümüne yol açmaktadır (Tracey vd. 2008, Li ve Zhu 2013). Ayrıca, Tnf- α inhibitörleri sadece inflamasyonun baskılanmasıyla sınırlı kalmayıp, aynı zamanda HCC'nin ilerlemesinde rol oynayan diğer biyokimyasal süreçleri de hedef alarak tedavide çok yönlü bir etki gösterebilir. Tnf- α inhibitörlerinin HCC tedavisinde klinik kullanımları henüz erken aşamadadır. Ancak, yapılan preklinik çalışmalar, bu inhibitörlerin özellikle Sorafenib gibi kinaz inhibitörleriyle birlikte kullanıldığında HCC hücrelerinde ölüm oranını artırabileceğini göstermektedir. Bu kombinasyonlar, hücrede stres ve DNA hasarını tetikleyerek hücre ölüm sürecini hızlandırabilir ve böylece HCC'nin ilerlemesini durdurabilir. Tnf- α , HCC'nin gelişiminde ve ilerleyişinde hem pozitif hem de negatif roller oynayabilir. Tnf- α inhibitörleri, tümör hücrelerinin çoğalmasını ve hayatta kalmasını engelleyerek HCC tedavisinde gelecek vadeden bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (Zhu vd. 2024).

2.2.2 Bax ve Bcl-2 Apoptoz Düzenleyici Proteinlerin Etkisi

Bax ve Bcl-2, hücrelerin apoptoz mekanizmasında kritik öneme sahip iki ana protein grubudur. Bax, pro-apoptotik bir protein olarak bilinir ve mitokondriyal membranda delik açarak hücre ölümünü tetikleyen süreçleri başlatır. Bu durum, Bax'ın mitokondri zarından sitokromC'nin serbest kalmasına yol açmasıyla, apoptoz kaskadının aktive olmasına neden olur (Chao ve Korsmeyer 1998). Öte yandan, Bcl-2 anti-apoptotik bir protein olup, mitokondriyal membranı stabilize ederek Bax gibi pro-apoptotik proteinlerin hücre

ölümünü başlatmasını engeller. Bax ve Bcl-2 arasındaki bu karşılıklı etkileşim, hücrelerin yaşamını sürdürüp sürdürmeyeceği ya da apoptoza uğrayıp uğramayacağı konusunda belirleyici bir faktördür (Reed 1997). Kanser hücrelerinde Bcl-2'nin genellikle yüksek seviyelerde ifade edilmesi, hücrelerin ölümden kaçmasını ve hayatta kalmalarını sağlarken, Bax aktivitesinin artışı apoptozu hızlandırarak tümör hücrelerinin büyümesini baskılayabilir (Cory ve Adams 2002). Bu nedenle, Bax ve Bcl-2'nin dengesi, kanser gelişiminde ve tedavi yanıtında önemli bir rol oynamaktadır.

2.2.3 Kaspaz-3'ün, Apoptotik Süreçteki Fonksiyonu ve HCC'deki Rolü

Kaspazlar, hücrelerin programlanmış ölümü olan apoptoz sürecinin temel düzenleyici enzimleridir ve hücre yapısını kontrollü bir şekilde parçalayan proteazlardır. Bu enzimler, sistein proteazları grubuna ait olup, hücre içindeki proteinleri hedef alarak parçalanmalarını sağlayan aktif katalitik bölgeler içerir. Kaspazlar, inaktif halde bulunan prokaspazlar olarak sentezlenir ve apoptoza neden olan sinyallere yanıt vererek aktif forma geçerler. Genel olarak, kaspazlar başlatıcı ve efektör kaspazlar olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır: başlatıcı kaspazlar ve efektör kaspazlar. Başlatıcı kaspazlar, apoptoz sinyallerini algılar ve efektör kaspazları aktive ederek hücre yapısının yıkımına yol açar (Thornberry ve Lazebnik 1998). Kaspaz-3, apoptoz sürecinin en kritik efektör kaspazlarından biri olarak kabul edilir. Başlatıcı kaspazların etkinleşmesinden sonra Kaspaz-3, hücre içi substratları parçalayarak ve hücre yapısını bozarak apoptozu iletir (Porter ve Jänicke 1999). Aktif hale geçen Kaspaz-3, DNA parçalanması, hücre iskeletinin yıkılması, nükleer proteinlerin parçalanması ve apoptotik cisimciklerin oluşumu gibi hücre ölümüne neden olan önemli süreçleri başlatır (Earnshaw ve Martins 1999). Kaspaz-3, hem mitokondriyal içsel yolda hem de ölüm reseptörü aracılığıyla yürütülen dışsal apoptoz yollarında kilit bir görev üstlenir ve bu iki yolun kesişim noktasında faaliyet gösterir. Apoptozun ileri aşamalarını yöneterek hücre ölümünü geri döndürülemez hale getirir (Li ve Yuan 2008). Mitokondriyal yol, hücre stres faktörleri veya DNA hasarı gibi içsel tetikleyiciler tarafından aktive edilir. Süreç, mitokondri zarındaki proteinlerin serbest kalması ile başlar. Özellikle sitokrom C mitokondriden salınır ve sitozole geçer. Sitokrom C burada Apaf-1 (Apoptotik Proteaz Aktivasyon Faktörü 1) ile birleşerek apoptozom adı verilen büyük bir kompleks meydana getirir.

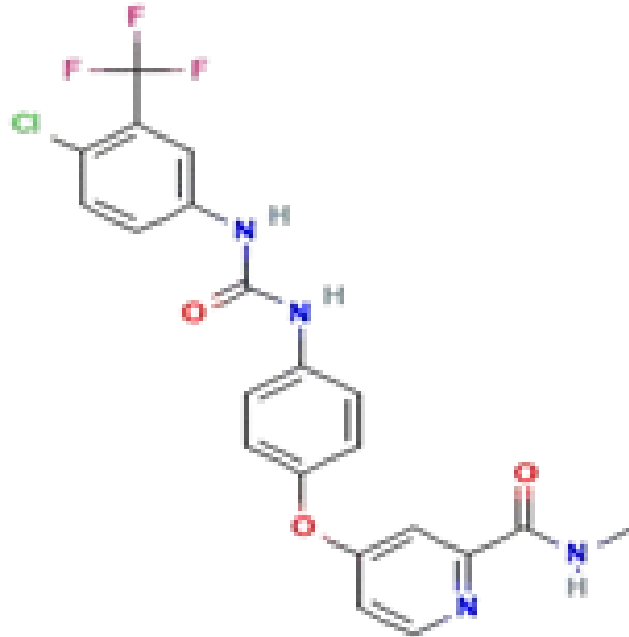
Apoptoz, başlatıcı kaspazlardan biri olan Kaspaz-9'u aktive eder (Li vd. 1997). Kaspaz-9'un aktif hale gelmesiyle efektör kaspazlardan olan Kaspaz-3 etkinleştirilir ve hücre ölüm süreci başlar. Kaspaz-3, hücredeki yapısal proteinleri ve DNA'yı hedef alarak hücre içi yıkım işlemlerini başlatır (Porter ve Jänicke 1999). Ölüm reseptörü aracılığıyla yürütülen dışsal yol, hücre dışından gelen ölüm sinyalleri ile tetiklenir. Bu sinyaller, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri olan Fas ve TNF reseptörleri gibi reseptörler aracılığıyla hücre içine iletilir. Ölüm reseptörlerine bağlanan ligandlar örneğin, FasL veya Tnf- α gibi, bu reseptörlerin trimerik yapı oluşturmaya ve FADD (Fas İlişkili Ölüm Alanı Proteini) gibi adaptör proteinlerin bağlanmasına sebep olur. Bu adaptör proteinler, Kaspaz-8'in aktivasyonunu sağlar. Aktif hale gelen Kaspaz-8, Kaspaz-3 ve diğer yürütücü kaspazları etkinleştirir, böylece apoptoz sürecini başlatır (Ashkenazi ve Dixit 1998).

Normal karaciğer hücrelerinde apoptozun düzenlenmesi, doku homeostazı için yüksek öneme sahiptir. Fakat, HCC'de Kaspaz-3 aktivitesinin azalması veya baskılanması sıkça gözlemlenir, bu da tümör hücrelerinin apoptozdan kaçmasına ve hızla kontrolsüz biçimde çoğalmasına yol açar (Wang vd. 2015). HCC hücrelerinde, Kaspaz-3'ün aktivitesinin azalması, tümörün büyümesi ve tedaviye karşı direnç göstermesiyle ilişkilidir. Özellikle kemoterapi ve radyoterapi gibi kanser tedavileri, Kaspaz-3'ün apoptozu tetikleme yeteneğine bağlıdır; bu sebeple Kaspaz-3'ün baskılanması tedaviye yanıtı olumsuz bir yönde etkileyebilir (Park vd. 2013). HCC'de kaspaz yolundaki işlev bozukluğu, tümör hücrelerinin hayatta kalmasını ve yayılmasını kolaylaştıran temel mekanizmalardan biri olarak kabul edilir. Ancak, Kaspaz-3'ün yeniden aktive edilmesi, HCC tedavisinde kilit bir hedef olarak öne çıkmaktadır. Yapılan çalışmalar, Kaspaz-3'ün yeniden etkinleştirilmesinin, tümör hücrelerini tekrar apoptoz sürecine yönlendirdiğini ve böylece tedaviye olan duyarlılığı artırdığını ortaya koymaktadır (Wang vd. 2015).

2.3 Sorafenib

Sorafenib ticari adı Nexavar olan, kanser tedavisinde kullanılan çoklu kinaz inhibitörü bir ilaçtır. Bu ilaç hem tümör hücrelerinin büyümesini hem de yeni kan damarlarının oluşumunu baskılayarak antikanser özellikler sergiler. Sorafenib'in kimyasal yapısı, birçok kinazın inhibisyonuna olanak tanır, böylece hücre sinyal iletimini kesintiye

uğratarak tümör gelişimini engeller. Sorafenib'in moleküler formülü $C_{21}H_{16}ClF_3N_4O_3$ olup, bu formül ilacın yapısında bulunan karbon (C), hidrojen (H), klor (Cl), flor (F), azot (N) ve oksijen (O) atomlarını temsil eder. İlacın molekül ağırlığı ise 464.83 g/mol'dür. Sorafenib, yapısında piridin halkası, klor-substitüeli triflorometil fenil halkası ve karbamoil grubu barındıran karmaşık bir molekül olarak dikkat çeker. Bu yapısal özellikleri, Sorafenib'in farklı protein kinazlarla etkileşime geçmesine olanak tanır. Molekülün hem hidrofilik hem de hidrofobik kısımları, hedef proteinlerle güçlü bağlar oluşturmasını sağlar (Wilhelm vd. 2004). Sorafenib hem hücre çoğalmasını engelleyen hem de tümör anjiyogenezini durduran bir ilaç olarak etki gösterir. Başlıca etkisi, Ras/Raf/MEK/ERK sinyal yolunda yer alan Raf kinazı inhibe ederek hücre büyümesini durdurmaktadır. Ayrıca, VEGFR ve PDGFR gibi reseptör kinazları bloke ederek tümörlerde yeni damar oluşumunu da engeller (Llovet vd. 2008). Sorafenib, oral yolla alındığında iyi bir biyoyararlanıma sahip olmasa da aslında yağlı gıdalarla birlikte alındığında buna bağlı olarak emilimi artabilir. Karaciğerde sitokrom p450 (CYP3A4) tarafından metabolize edilerek aktif ve inaktif metabolitlere dönüşür. Eliminasyonu ise sıklıkla safra ve idrar yoluyla gerçekleşir (Wilhelm vd. 2006). Sorafenib'in kimyasal yapısı ise Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3 Sorafenib'in kimyasal yapısı.

2.3.1 Sorafenib'in Hücresel Etki Mekanizması

Sorafenib, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir multikinaz inhibitörüdür. Özellikle HCC ve renal hücreli karsinom (RCC) gibi malignitelerde etkinliği onaylanmıştır. Bu ilaç, hücresel düzeyde farklı mekanizmalar aracılığıyla tümör gelişimini engeller. Temel etki mekanizması, hücre proliferasyonu, apoptoz ve anjiyogenez süreçlerini etkileyen çeşitli kinazların inhibisyonuna dayanır (Llovet vd. 2020). Sorafenib, Ras/Raf/MEK/ERK sinyal yolunda kritik bir rol oynayan Raf kinazı inhibe eder. Bu yol, kanser hücrelerinde anormal hücre çoğalmasını ve hayatta kalmayı destekleyen önemli bir sinyal iletim yoludur. Raf kinazın inhibisyonu, mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) kaskadını durdurarak hücre büyümesini baskılar ve aynı zamanda apoptotik süreçleri teşvik eder (Blechacz ve Gores 2008). Özellikle BRAF mutasyonlarına sahip kanser hücrelerinde bu inhibisyon, sinyal iletimini etkili bir şekilde keserek tümör büyümesini yavaşlatır (Wilhelm vd. 2008). Ayrıca, Sorafenib'in hücresel etkileri arasında apoptoz indüksiyonu da yer alır. Bu ilaç, hücre içi sinyal yollarını hedefleyerek programlanmış hücre ölümünü tetikler. Özellikle anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Mcl-1'in ekspresyonunu azaltarak, apoptotik süreçte rol oynayan Bax ve Kaspaz-3 gibi proteinlerin aktivitesini artırır (Eisen vd. 2007). Bu süreç, mitokondriyal permeabilitenin artmasıyla birlikte sitokromC'nin serbest kalmasına neden olarak apoptotik kaskadın tetiklenmesini sağlar (Schwartz vd. 2009). Sorafenib'in bir diğer önemli mekanizması, tümör anjiyogenezini engellemesidir. Tümörlerin büyümesi ve metastaz yapabilmesi için yeni kan damarlarının oluşumu hayati öneme sahiptir. Sorafenib, vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) ve platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) gibi tirozin kinazları hedef alarak bu anjiyogenez sürecini durdurur (Zhu vd. 2011). VEGFR ve PDGFR'nin inhibisyonu, tümörlere kan akışını azaltarak besin ve oksijen kaynağını kısıtlar, bu da tümör büyümesini engeller (Escudier vd. 2017).

2.3.2 Sorafenib'in HCC Tedavisindeki Klinik Kullanımı

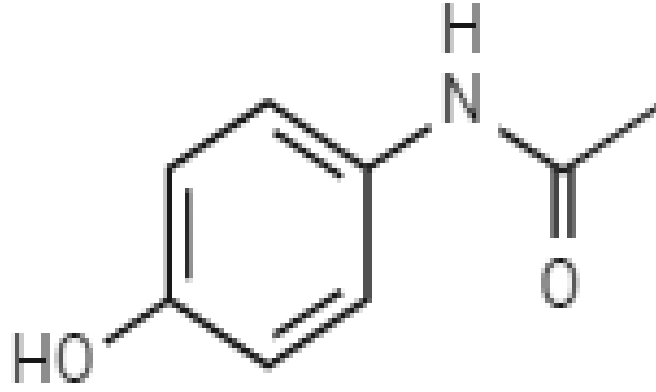
Sorafenib, HCC tedavisinde önemli bir yere sahip olan ilk sistemik tedavi ajanıdır ve klinik çalışmalarda, özellikle ileri evre hastalıklar üzerinde etkinliği ve güvenliği detaylı

olarak incelenmiştir. Sorafenib'in klinik etkinliğinin kanıtı, 2007 yılında gerçekleştirilen SHARP (Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol) çalışmasında ortaya konmuştur. Bu çalışmada, 602 hasta üzerinde yapılan araştırmalarda Sorafenib ile plasebo arasında yapılan karşılaştırmalar, Sorafenib'in medyan sağkalım süresini anlamlı bir şekilde uzattığını göstermiştir. Plasebo grubundaki hastalar için medyan sağkalım süresi 7.9 ay iken, Sorafenib tedavisi alan hastalar için bu süre 10.7 ay olarak belirlenmiştir (Llovet vd. 2008). Bu bulgular, Sorafenib'in HCC tedavisinde önemli bir rol oynadığını ve hastaların yaşam kalitesini artırma potansiyelini vurgulamaktadır. Klinik uygulamada, Sorafenib genellikle sistemik tedavi gerektiren ileri evre HCC hastalarında tercih edilmektedir. Bu tedavi, sıklıkla diğer tedavi yöntemleri ile birlikte uygulanır. Ancak cerrahi rezeksiyon veya karaciğer nakli yapılamayan hastalar için Sorafenib, ilk basamak tedavi seçeneği olarak önerilmektedir. Ayrıca, lokal tedavi yöntemlerinin etkinliğini artırmak için adjuvan tedavi olarak da kullanılabilir (Kudo vd. 2010).

2.4 Parasetamol

Parasetamol, yaygın bir analjezik ve antipiretik ilaç olarak bilinir ve Asetaminofen olarak da adlandırılır. Bu bileşik, genellikle hafif ve orta şiddetteki ağrıların tedavisinde ve ateşin düşürülmesinde kullanılır. Ayrıca, soğuk algınlığı gibi durumlarda semptomatik tedavi amaçlı olarak da tercih edilmektedir (Kearns vd. 2020).

Kimyasal formülü $C_8H_9NO_2$ olan Parasetamol, 4-hidroksi-acetanilid olarak tanımlanabilir ve moleküler ağırlığı 151.16 g/mol'dir. Farklı hasta gruplarına yönelik esneklik sağlamak amacıyla, Parasetamol çeşitli farmasötik formülasyonlar halinde sunulmaktadır; bu formülasyonlar arasında tablet, kapsül, sıvı, süspansiyon ve rektal fitil bulunmaktadır (Roth vd. 2018). Parasetamol, etkili bir ağrı kesici olmasının yanı sıra, vücut sıcaklığını düşürme yeteneği ile de dikkat çeker. Ağrı kesici etkisini, merkezi sinir sistemindeki prostaglandin sentezini inhibe ederek ortaya koyar. Özellikle hipotalamus üzerindeki etkisi sayesinde ateşi düşürürken, periferik dokularda ağrı iletimini azaltarak ağrı hissini hafifletmektedir (Patrignani ve Patrono 2016). Parasetamol'ün moleküler yapısı Şekil 2.5'te verilmiştir.



Şekil 2.4 Parasetamol'ün moleküler yapısı.

2.4.1 Parasetamol'ün Antikanser Potansiyeli ve Etkinliği

Parasetamol, genel olarak ağrı kesici ve ateş düşürücü özellikleriyle tanınmasına rağmen, son yıllarda antikanser potansiyeli üzerine gerçekleştirilen araştırmalar oldukça ilgi çekmektedir. İlk çalışmalar, Parasetamol'ün hücresel düzeyde farklı etkiler yaratabileceğini ve bazı kanser türlerinin tedavisinde destekleyici bir ajan olarak kullanılabileceğini öne sürmüştür (Kearns vd. 2020).

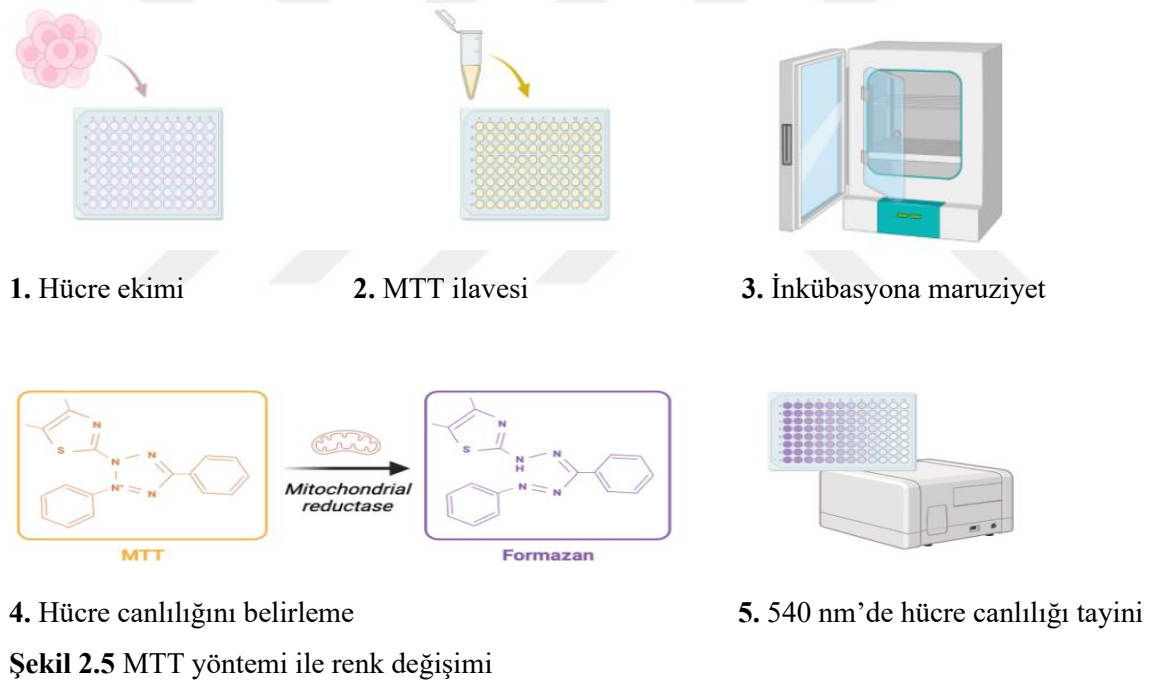
Parasetamol, hücre proliferasyonunu etkileyen birkaç mekanizma aracılığıyla antikanser etkisini ortaya koyabilmektedir. Özellikle, hücre büyümesi ve bölünmesi üzerinde etkili olan çeşitli sinyal yollarını modüle edebilme yeteneği araştırmalarla kanıtlanmıştır. Örneğin, Parasetamol'ün bazı kanser hücrelerinde apoptoz süreçlerini tetiklediği tespit edilmiştir. Bu durum, kanser hücrelerinin hayatta kalma kapasitesini zayıflatırken, tedaviye direnç gösteren kanser türleri üzerinde de olumlu etkiler meydana getirebilir (Fang vd. 2021). Bunun yanı sıra, Parasetamol'ün anti-inflamatuar özellikleri, kanser üzerindeki etkilerini pekiştirmektedir. Kronik inflamasyon, kanser gelişiminde kritik bir rol oynadığından, Parasetamol'ün bu süreci azaltma potansiyeli, antikanser etkileri açısından önemlidir (Buehler vd. 2016). Araştırmalar, Parasetamol'ün farklı kanser türleri üzerinde, özellikle kolorektal ve prostat kanseri hücreleri üzerinde etkili olduğunu ortaya koymuştur (McCarthy vd. 2020). Parasetamol'ün antikanser etkilerinden biri, apoptoz mekanizmasını tetiklemesidir. Apoptoz, kanser tedavisinde istenilen bir olay olan programlanmış hücre ölümü sürecidir. Parasetamol, anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-xL'nin ekspresyonunu baskılayarak, pro-apoptotik proteinler olan Bax ve

Bak'ın seviyelerini artırabilir. Bu etki, mitokondriyal yolların aktive edilmesine ve sitokromC 'nin salınmasına yol açarak apoptotik kaskadın başlamasına neden olur (Ong vd. 2019). Aynı zamanda, Parasetamol DNA hasarına duyarlı p53 proteinini aktive ederek, hücre döngüsünün durdurulmasına katkı sağlar ve kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleyebilir (Michaud vd. 2014). Kronik inflamasyonun kanser gelişiminde oynadığı kritik rol göz önüne alındığında, Parasetamol'ün anti-inflamatuar etkileri de antikanser potansiyelini artıran bir diğer önemli mekanizmadır. Parasetamol, COX-3 enzimini inhibe ederek inflammatuar yanıtları baskılayabilir, böylece kronik inflamasyonu azaltarak tümör gelişimini yavaşlatabilir ve metastatik süreçleri engelleyebilir (Coussens ve Werb 2002). Ayrıca, inflamasyonun azalması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini sınırlayarak hücre hasarını ve kanserojenik süreçleri baskılayabilir (Sakata vd. 2013). Her ne kadar Parasetamol'ün doğrudan bir antikanser ajan olarak klinik kullanımı tam olarak kanıtlanmamış olsa da, mevcut çalışmalar, bu ilacın bazı kanser tedavilerinde destekleyici bir ajan olarak kullanılabileceğini işaret etmektedir. Özellikle kemoterapi ve radyoterapi ile birlikte kullanıldığında, Parasetamol'ün tedaviye katkı sağlayabileceği düşünülmektedir ancak bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Kraft vd. 2015).

2.5 MTT Yöntemi

MTT yöntemi, hücrelerin canlılık ve çoğalma düzeylerini ölçmek için sıklıkla kullanılan bir sitotoksikite testi olarak öne çıkmaktadır. Bu yöntem, özellikle kanser hücrelerinin belirli ilaçlara veya kimyasal maddelere nasıl tepki verdiğini değerlendirmek amacıyla tasarlanmıştır. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid), suda çözünmeyen sarı bir tuz olup, hücre içindeki mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri tarafından indirgenerek çözünür formazan maddesine dönüşür. Aktif hücrelerde bu enzim işlevini sürdürürken, MTT'nin indirgenmesi sonucu mavi veya mor renkte formazan kristalleri oluşur. Ölen ya da işlevlerini kaybeden hücrelerde bu dönüşüm gerçekleşmez ve renk değişimi gözlenmez (Mosmann 1983). MTT testi, hücrelerin metabolik aktivitelerini ölçmesi nedeniyle sitotoksikite analizinde güvenilir bir yöntem olarak kabul görmektedir. Bu test, hücrelerin çoğalma yeteneklerini veya ilaç maruziyeti sonrası hayatta kalma oranlarını değerlendirmek için kullanılır ve test edilen maddenin toksik

etkilerini hızlı ve nicel olarak ölçme imkânı sağlar (Denizot ve Lang 1986). Testin işleyişi, hücre kültürüne belirli konsantrasyonlarda test edilecek maddenin eklenmesi ve belirli bir süre inkübe edilmesi prensibine dayanır. İnkübasyon süresi sonrasında, MTT çözeltisi eklenir ve canlı hücreler tarafından formazan kristallerinin oluşumu sağlanır. Bu kristaller, uygun bir çözücü ile çözülür ve ardından spektrofotometre kullanılarak analiz edilir (Berridge vd. 2005). MTT yöntemi, özellikle kanser araştırmalarında, ilaçların sitotoksik etkilerini belirlemede yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Hücre canlılığı, formazan üretimiyle orantılı olduğundan, sitotoksosite derecesi bu renk değişiminin yoğunluğuna bağlı olarak ölçülür. Testin avantajları arasında, yüksek hassasiyeti ve çok çeşitli hücre hatları ve ilaç türlerinde kullanılabilirliği bulunur (Alley vd. 1988). Oluşan formazan kristalleri ve renk değişimi Şekil 2.6’da gösterilmiştir.

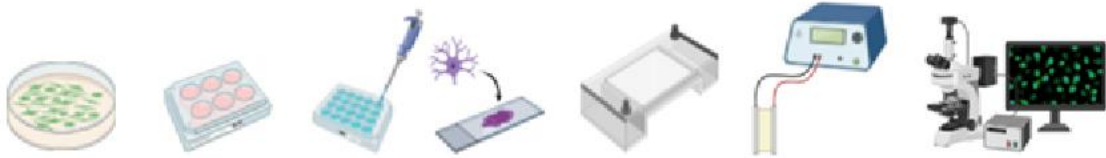


Şekil 2.5 MTT yöntemi ile renk değişimi

2.6 Komet Testi

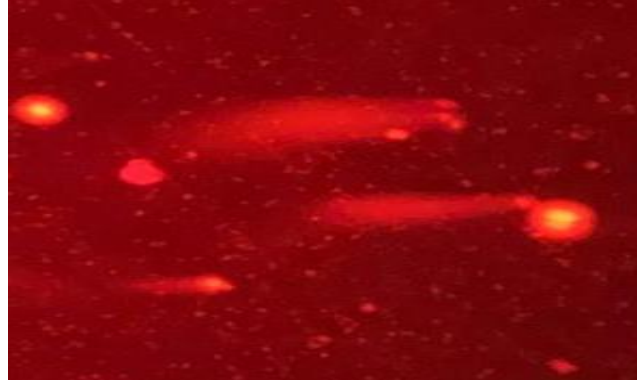
Komet testi, genotoksisite analizinde DNA hasarını görselleştirmek ve sayısal olarak değerlendirmek amacıyla geliştirilmiş etkili bir tekniktir. Bu yöntem, özellikle bireysel hücrelerde DNA bütünlüğündeki değişiklikleri hassas bir şekilde tespit etme yeteneği sunar. Komet testinin temel prensibi, hasar görmüş DNA'nın elektrik alanı altında hareket etme kabiliyetine dayanır; bu hareket, DNA parçalarının boyutuna ve hasar derecesine

bağlı olarak değişiklik gösterir. Komet testi uygulandığında, hücreler agaroz jel üzerinde yerleştirilir ve daha sonra elektrik alanına maruz bırakılır. DNA hasarı olan hücreler, hasarsız hücrelere oranla daha uzun mesafeler kat eder ve bu hareket, "kuyruk" şeklini alır. Kometin kuyruk uzunluğu, hasar görmüş DNA miktarını gösterirken, kuyruk uzunluğundaki artış, hücredeki DNA hasarının da arttığını belirtir. Kometin baş kısmı, sağlıklı DNA'nın bulunduğu bölgeyi temsil ederken, kuyruk kısmı hasar görmüş DNA parçalarını göstermektedir. Bu sayede, bir hücredeki DNA hasar derecesi, kuyrukların boyutu ve şekliyle değerlendirilebilir. Genotoksisite analizi açısından Komet testi, birçok alanda geniş bir uygulama yelpazesi sunmaktadır. Özellikle kanserojen maddelerin tespitinde, çevresel toksinlerin etkilerinin değerlendirilmesinde ve kimyasalların genotoksik potansiyelinin incelenmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Komet testinin avantajları arasında düşük maliyet, hızlı sonuç alma süresi ve karmaşık laboratuvar ekipmanlarına ihtiyaç duymaması yer almaktadır. Kuyruk uzunluğu ve kuyruk başı oranı gibi parametreler, DNA hasar derecelerinin sayısal olarak belirlenmesine olanak tanır. Bu ölçümler, DNA kırıklarının varlığını ve DNA onarım süreçlerinin etkinliğini değerlendirmek amacıyla kullanılabilir (Singh vd. 1988, Olive ve Banáth 2006, Hughes vd. 2016, Nair vd. 2018). Komet testi basamakları Şekil 2.7’de gösterilmiştir.



Şekil 2.6 Komet yönteminin basamakları

Örneğin, uzun kuyruklar daha fazla DNA hasarını temsil ederken, kısa kuyruklar hücredeki hasarın az olduğunu göstermektedir. Bu durum, genotoksik etkilerin zaman içindeki değişimini anlamak açısından önemlidir (Singh vd. 1988, Olive ve Banáth 2006, Hughes vd. 2016, Nair vd. 2018). Floresan mikroskop incelemeleriyle elde edilen normal ve hasar görmüş DNA moleküllerinin örnek görüntüleri Şekil 2.8'de yer almaktadır.



Şekil 2.7 Komet testinde elde edilen normal ve DNA hasarı bulunan iki hücrenin floresan mikroskop görüntüleri.

2.7 RNA İzolasyonu, Gen Konsantrasyonu ve Saflık Belirlenmesi

RNA izolasyonu, hücre veya doku örneklerinden nükleik asitlerin saf ve etkin bir biçimde elde edilmesi için önemli bir adımdır. RNA izolasyonunun tarihçesi, 1970'lere kadar uzanmakta olup, bu dönemde nükleik asitlerin ayrıştırılmasına yönelik ilk yöntemler geliştirilmiştir. İlk başlarda RNA'nın saflaştırılması için fiziksel ve kimyasal yöntemler bir arada kullanılırken, zamanla fenol-kloroform ekstraksiyonu gibi daha etkili yöntemler ortaya çıkmıştır. Günümüzde, ticari RNA izolasyon kitleri ve lityum klorür çözeltileri gibi çeşitli yöntemler yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu aşamalar sırasında RNA'nın enzimatik olarak bozulmasını önlemek için RNAza (RNase) aktivitesine dikkat etmek oldukça önemlidir; çünkü RNazlar RNA'yı hızla parçalayarak analiz süreçlerini olumsuz etkileyebilir. RNA konsantrasyonlarının belirlenmesi genellikle spektrofotometrik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilir. Bu yöntemde, RNA örneği 260 nm dalga boyunda ölçülerek, RNA'nın absorbans değeri kaydedilir. Elde edilen RNA konsantrasyonunun yanı sıra, RNA'nın saf olup olmadığını belirlemek için 260/280 oranı da değerlendirilir. Genellikle, RNA için ideal bir 260/280 oranı 1.8-2.1 arasında olmalıdır. Bu oran, RNA'nın protein veya fenol gibi safsızlıklar içermediğini gösterir; düşük oranlar ise kontaminasyon olabileceğini işaret eder (Chomczynski ve Sacchi 1987, Sambrook ve Russell 2001).

3. MATERYAL VE METOT

Tez çalışmasında, HepG2 hücre hattı üzerinde Sorafenib ve Parasetamol kombinasyonunun etkileri araştırılmıştır. Farklı kombinasyon dozları uygulanarak hücrelerin canlılık ve ölüm oranları incelenmiş, sinerjistik veya antagonist etkileşimler değerlendirilmiştir. HepG2 hücre hattı, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir ve deneyler, Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarlarında yürütülmüştür.

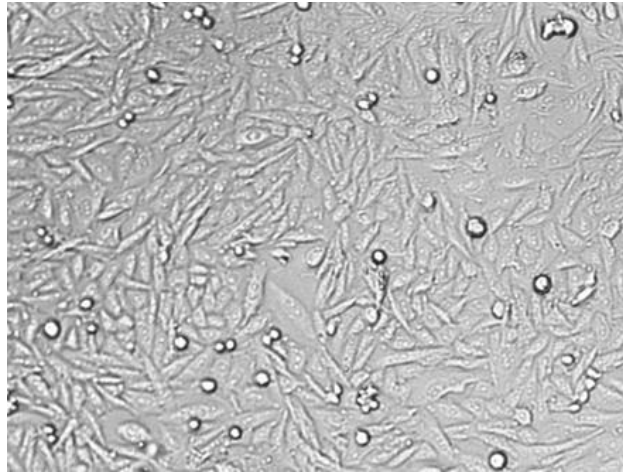
3.1 Hücre Kültürü Çalışmaları ve MTT Uygulaması

3.1.1 Hücre Kültürü

Çalışma kapsamında, deney ortamı ve kullanılan tüm malzemeler steril koşullarda hazırlandı. Hücre kültürü çalışmalarında ortamda oluşabilecek kontaminasyon riski yüksek olduğundan, cihazların ve kimyasalların sterilizasyonu büyük bir titizlikle gerçekleştirildi. Deneylerde insan HCC olan HepG2 kullanıldı. Tüm işlemler boyunca inkübatör, hücrelerin optimal çoğalması için 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ konsantrasyonunda sabit tutuldu. Sıvı azot tankında dondurularak muhafaza edilen hücreler, öncelikle -20°C'de 15 dakika süreyle bekletildi. Çalışma kabini ve kullanılacak tüm kimyasallar %70 etanol ile sterilize edildi. Kryotüp içindeki dondurulmuş HepG2 hücreleri dikkatlice çözüldü. 1 ml hazır besi ortamı 15 ml'lik falkon tüpüne alındı ve çözülen hücreler bu tüpe aktarıldı. Hücrelerin eşit ve homojen şekilde dağılması için pipetaj işlemi yapıldı, ardından hücrelerin dondurulma sırasında kullanılan DMSO'yu uzaklaştırmak amacıyla 5 dakika boyunca 800 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra, falkon tüpü steril koşullarda kabine alınarak pellet zarar görmeden süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine 1 ml taze besi ortamı eklenerek pipetaj ile homojen bir karışım elde edildi. 75 cm²'lik flasklara 7 ml besi ortamı ilave edilerek, hücreli besi ortamı nazikçe flasklara dağıtıldı. Ardından, hücrelerin büyümesi için uygun koşullar sağlayan 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilerek kültürleme süreci başlatıldı. Yapılan tüm işlemler steril koşullar altında titizlikle gerçekleştirildi.

3.1.2 HepG2 Hücrelerinin Pasajlanması

HepG2 hücreleri inkübatörden alındıktan sonra, flask tabanındaki yapışma ve üreme oranı görüntüleme cihazıyla kontrol edildi. Hücrelerin yapışma oranı %80-90'a ulaştığında pasajlama işlemine geçildi. İnkübatörde bulunan hücre hattının besiyeri, önce bir gün, ardından ise iki ya da üç gün aralıklarla yenilendi. Besiyerinin değiştirilme süreci şu şekilde uygulandı: İlk olarak, flask içerisindeki eski besiyeri çekilip, ardından hücreler yaklaşık 5 ml steril fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra PBS dikkatlice çekilerek uzaklaştırıldı ve ardından 8 ml taze besiyeri eklendi. Bu besiyeri değiştirme prosedürü, hücrelerin flask yüzeyinin yaklaşık %90'ını kaplayana kadar sürdürüldü. Görüntüleme cihazı (JULI Br, Korea) ile yapılan kontrollerde, HepG2 hücre hattının yaklaşık bir hafta içerisinde 75'lik flask yüzeyinin %90'ını kapladığı gözlemlendiğinde, pasajlama işlemine geçildi. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra, hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması amacıyla 3 ml Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek yaklaşık 2 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda flask inkübatörden çıkarılıp görüntüleme cihazında hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edildi. Hücreler tamamen yüzeyden ayrıldığında, tripsinin hücrelere zarar vermesini önlemek ve çözeltiden uzaklaştırmak amacıyla 9 ml taze besiyeri eklenerek toplamda 12 ml'lik bir hacim elde edildi. Bu 12 ml'lik hücre süspansiyonu, tripsinden arındırılmak üzere 15 ml'lik falkon tüpüne aktarıldı ve santrifüj edildi. Pelet, 1 ml besiyerinde homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra T75 flaska aktarıldı. HepG2 hücrelerinin morfolojik görünümü Resim 3.1'de verilmiştir.



Resim 3.1 HepG2 hücrelerinin morfolojik görünümü.

3.1.3 Tripan Blue Yöntemi ile Hücre Sayımı

Hücre peleti, 1 ml besiyeri içinde çözündürülüp thoma lamı kullanılarak hücre sayımı gerçekleştirildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu, Tripan Blue boya solüsyonu ile 1:1 oranında karıştırıldı ve bu karışım 0.2 ml'lik bir ependorf tüpüne aktarıldı. Pipetleme işlemi yapılarak süspansiyonun homojen şekilde karışması sağlandı. Boyanmış hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak thoma lamına yerleştirildi. Ölü hücreler mavi boya tarafından boyandığı için göz ardı edilirken, boyanmayan canlı hücreler görüntüleme cihazıyla sayılarak değerlendirildi. Canlı, ölü ve toplam hücre sayısı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı. Toplam hücre sayısı (mL) = ortalama hücre sayısı $\times 10^4 \times$ dilüsyon faktörü.

3.1.4 HepG2 Hücrelerinin Sıvı Azotta Dondurulup Muhafaza Edilmesi

Ekim işleminden sonra ilk olarak, flaskta büyütülen HepG2 hücrelerinin üreme ve yapışma oranları görüntüleme cihazıyla gözlemlendi. Hücreler %80-90 konfluens seviyesine ulaştığında, hücre dondurma işlemi için kullanılacak kriyotüpler -20°C'de soğutulmak üzere hazırlığa alındı. Flasktaki hücreler mikroskopla görüntülenip, hücre yoğunluğu istenen orana ulaştığında besiyeri uzaklaştırıldı. Her bir flaskta hücrelerin yüzeyden ayrılması için 3 ml tripsin-EDTA eklenip, flasklar 1-2 dakika boyunca inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyon süresi sonunda, hücre süspansiyonunu dondurmak için 1:1 oranında 3 ml besiyeri eklendi (HepG2 hücre hattı için düşük glukozlu DMEM kullanıldı) ve santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, süpernatant dikkatlice uzaklaştırılıp pelete zarar vermeden atıldı. Hücreler gelecekteki deneylerde kullanılmak üzere %7 DMSO ve %93 FBS içeren 1 mL dondurma medyumunu ile yeniden süspansiyon haline getirildi ve kriyotüplere aktarılıp ani sıcaklık değişiminden korunması için önce -20°C'ye, sonra -80°C'ye yerleştirildi.

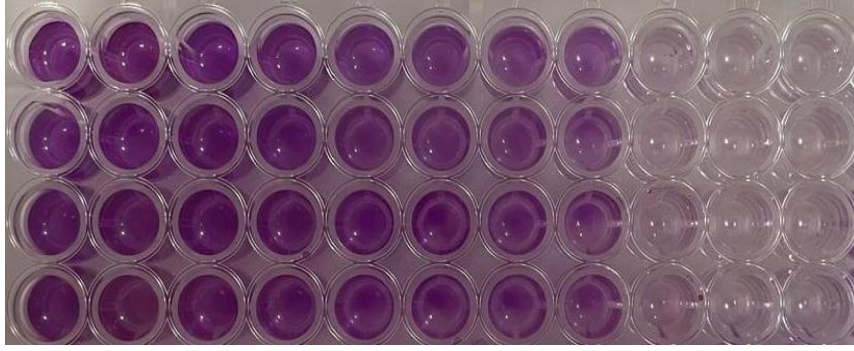
3.2 Sitotoksiteyi Değerlendirmek İçin MTT Yöntemi

Bu çalışmada, Sorafenib ve Parasetamol ilaçlarının IC₅₀ dozları, MTT yöntemi kullanılarak belirlendi. Ayrıca, bu ilaçların kombinasyonunun HepG2 hücreleri

üzerindeki etkisini değerlendirmek için Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) testi uygulandı. HepG2 hücrelerinin canlılık oranları, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri boyunca ölçüldü. Her iki süre zarfında uygulanan yöntemler ve kullanılan kimyasalların miktarları standart şekilde korundu. Elde edilen veriler yardımıyla, hücrelerin canlılık ve ölüm oranlarını karşılaştırarak IC₅₀ dozları hesaplandı.

3.2.1 MTT Testi ile Sorafenib IC₅₀ Dozunun Belirlenmesi

Thoma lamında yapılan canlı hücre sayımı sonucunda, her mililitrede 5×10^4 hücre içeren bir hücre süspansiyonu hazırlandı. Sorafenib'in IC₅₀ değerini belirlemek amacıyla, 96 kuyucuklu mikropalakların her bir kuyucuğuna 100 µl hücre süspansiyonu eklendi ve plaklar 24 ve 48 saat süreyle inkübe edildi. 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücreler belirli bir yoğunluğa ulaştığında, Sorafenib için IC₅₀ değerini belirlemek amacıyla doz uygulamaları yapıldı. Bu deneyde, Sorafenib için dört tekrar oluşturularak (hücrelere sadece 100 µl DMEM Low Glucose besiyeri eklendi), kullanılırken, iki grup da kuyucuklardaki besiyerine %10 oranında DMSO eklenerek test edildi. Sorafenib uygulaması öncesinde taze olarak hazırlanan 1, 2, 5, 10, 12.5, 15, 20, 30, 40, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarındaki dozlar, her bir kuyucuğa 4 tekrarlı olacak şekilde 100 µL hacminde uygulandı. 24-48 saatlik deney süresince hücrelerin davranışları ve Sorafenib'in sitotoksik etkileri doz-bağımlı olarak takip edilerek, IC₅₀ değerini belirlemek amacıyla inkübatöre kaldırıldı. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, her bir kuyucuğa %10 oranında olacak şekilde 10 µL MTT solüsyonu eklendi ve ardından kuyucuklar 4 saat boyunca inkübe edildi. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, her bir kuyucuğa %10 oranında olacak şekilde 10 µL MTT solüsyonu eklendi. 48 saatlik Süre sonunda, hücre içeren medyum ve MTT karışımı, mikropipet yardımıyla plaktan uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 200 µL DMSO eklendi. Hücreler, DMSO ile uzun süre temas etmeyecek şekilde karanlık ortam koşullarında 15 dakika boyunca bekletildi. 5-10 dakika boyunca çalkalayıcıda hafifçe karıştırıldı. Çözünen formazan kristallerinin ölçümü, mikropalak okuyucu spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Hücrelerin absorbans değerleri ve buna göre hücre canlılık yüzdeleri hesaplandı. Sorafenib uygulanan HepG2 hücrelerinin MTT görüntüsü Resim 3.2'de verilmiştir.



Resim 3.2 Sorafenib uygulanan HepG2 hücrelerinin MTT görüntüsü.

3.2.2 MTT Testi Kullanılarak Parasetamol IC₅₀ Dozunun Belirlenmesi

Thoma lamında gerçekleştirilen canlı hücre sayımı sonucunda, mililitresinde 5×10^4 hücre içeren hücre süspansiyonu elde edildi. Parasetamol'ün IC₅₀ değerini tespit etmek için, 96 kuyucuklu mikrop lakın her kuyucuğuna 100 µl hücre süspansiyonu eklendi ve plaklar 24 ile 48 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinin 24 ve 48 saati tamamlamasıyla birlikte hücreler belirli bir yoğunluğa ulaştığında, Parasetamol'ün IC₅₀ değerini belirlemek amacıyla doz uygulamaları yapıldı. Bu deneyde, Parasetamol için dört tekrar oluşturularak (hücrelere sadece 100 µl DMEM Low Glucose besiyeri eklendi), iki grup da kuyucuklardaki besiyerine %10 oranında DMSO eklenerek test edildi.

Parasetamol uygulamasından önce taze olarak hazırlanan 1, 5 ve 10 mM konsantrasyonlarındaki Parasetamol dozları, her kuyucuğa 100 µL hacminde ve dört tekrar halinde uygulandı. Hücrelerin 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresince gösterdiği davranışlar ve Parasetamol'ün sitotoksik etkileri doz-bağımlı olarak izlenip, bu gözlemler ışığında IC₅₀ değerini tespit etmek amacıyla deneysel süreç sürdürüldü. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, her kuyucuğa %10 oranında 10 µL MTT solüsyonu eklendi ve kuyucuklar 4 saat boyunca inkübe edildi. 48 saatlik gözlem süresi için de aynı prosedür tekrarlandı. Süre dolduğunda, hücre içeren medyum ve MTT karışımı plaktan uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 200 µL DMSO eklendi ve hücreler, DMSO ile uzun süre temas etmeyecek şekilde karanlık ortamda bekletildi. Plaklar 5-10 dakika boyunca çalkalayıcıda nazikçe karıştırıldı. Formazan kristallerinin ölçümü, 540 nm dalga boyunda mikrop lak okuyucu spektrofotometrede gerçekleştirildi ve hücre canlılık oranları optik yoğunluk değerlerine göre hesaplandı. Parasetamol uygulanan HepG2 hücrelerinin MTT görüntüsü Resim 3.3'de verilmiştir.



Resim 3.3 Parasetamol uygulanan HepG2 hücrelerinin MTT görüntüsü.

3.2.3.MTT Metodu ile Sorafenib ve Parasetamol Kombinasyonu Çalışması

Bu çalışma kapsamında, genel bir doz taraması yapmak amacıyla Sorafenib'in 1, 2, 5, 10, 12.5, 15, 20, 30, 40, 50 ve 100 μM 'lık konsantrasyonları ile Parasetamol'ün 1, 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonları, DMSO çözeltisi içerisinde hazırlandı ve HepG2 hücrelerine uygulandı. Deneyler, her bir etken maddenin farklı konsantrasyonlarıyla 6 tekrar olacak şekilde yapıldı ve en az 3 bağımsız çalışma olarak gerçekleştirildi. Kontrol olarak hücrelere sadece 100 μl DMEM Low Glucose besiyeri eklendi. Sorafenib'in genel doz taramasından elde edilen sonuçlara göre IC_{50} konsantrasyonu belirlendi, Parasetamol için de aynı şekilde IC_{50} değeri hesaplandı. Bu doğrultuda, HepG2 hücrelerinde Sorafenib ve Parasetamol'ün farklı kombinasyonlarındaki IC_{50} değerleri esas alınarak uygulama yapıldı ve hücreler 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakıldı. Her kuyucuğa 100 μL MTT solüsyonu ve besiyeri eklendi. Plak, 37°C, %5 CO_2 'li inkübatörde 4 saat daha inkübe edildi. Süre sonunda, MTT solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra, formazan kristallerini çözmek amacıyla her kuyucuğa 200 μL DMSO eklendi ve plak 30 dakika boyunca karanlık bir ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, 96 kuyucuklu plaktaki absorban değerleri, spektrofotometre cihazında 540 nm dalga boyunda ölçülerek analiz edildi.

3.3 Genotoksisitenin Belirlenmesinde Komet Yöntemi

Komet Yöntemi ya da diğer adıyla tek hücre jel elektroforezi (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE), DNA hasarını değerlendiren basit, hassas, çok yönlü, hızlı ve maliyet açısından uygun bir testtir. Bu yöntem, DNA'daki kırıkların elektrik alanı altında hareket etmesine dayanır. Periferik lenfositler veya kültürlenmiş hücreler, bir mikroskop lamında agaroz içerisine gömülerek, deterjan ve yüksek tuz çözeltisi ile denatüre edilir; bu işlem DNA'nın süper sarmal yapısının açılmasını sağlar. Sonrasında, elektroforez uygulanarak kırık DNA parçalarının anoda doğru göç etmesi sağlanır. Kırık DNA'lar, hareket ettikleri için kuyruklu yıldız (Komet) şeklinde bir görünüm oluşturduğu için bu yönteme "Komet Yöntemi" adı verilmiştir (Akmehmet 2020). Çalışmamızda hücrelere, Sorafenib ve Parasetamol'ün IC₅₀ dozu birlikte uygulandı. Buna bağlı olarak olası DNA hasarları izlendi ve 24-48 saatlik periyotlarda elde edilen sonuçlar kaydedildi. NaOH ve EDTA, hassas terazi ile tartılarak bir cam kapta karıştırıldı ve üzerine 500 mL dH₂O eklendi. Elde edilen çözelti, homojenizasyonun ardından pH değeri 13.2 olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan çözelti, +4°C'de deney öncesinde muhafaza edildi. Çalışma öncesinde, deneyde kullanılacak çözelti ve kimyasallar, Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2' de gibi titizlikle hazırlandı.

Çizelge 3.1 Elektroforez tampon çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktarı
NaOH	6.0 g
EDTA	0.18 g
dH ₂ O	500 mL

Çizelge 3.2 Lizis çözeltisinin formülasyonu.

Kimyasal	Miktar
NaCl	29.4 g
EDTA	7.44 g
Trizma Base	0.24 g
Triton-X	2 mL
DMSO	20 mL

NaCl, EDTA ve Trizma Base, deiyonize su eklenerek toplam hacim 200 mL'ye tamamlanacak şekilde tartıldı ve +4°C'de muhafaza edildi. Deney gününde, çalışmaya başlamadan önce Triton-X ve DMSO eklenerek karıştırıldı. Çözelti, pH değeri 10 olacak şekilde ayarlandı. Trizma Base, hassas terazide tartılarak ardından cam bir şişeye konuldu ve üzerine 300 mL dH₂O eklendi. Homojen olarak hazırlanan çözeltinin pH değeri 7.5 olacak şekilde ayarlanarak optimize edildi (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 Nötralizasyon Çözeltisinin Formülasyonu.

Kimyasal	Miktar
dH ₂ O	300 mL
Trizma Base	14.55 g

%8'lik olan LMA çözeltisi, hassas terazi kullanılarak 0.0016 g olarak tartıldı ve cam bir tüpe alındı. Üzerine 10 kat seyreltilmiş 2 mL PBS eklendi. Karışım, saydam bir LMA elde edilene kadar bek alevinde ısıtıldı. Çözeltinin berraklaşması sağlandıktan sonra, jel haline gelmesini önlemek için çalışma sırasında yaklaşık 40°C'de sıcak suda bekletilerek jel formuna geçmesi engellendi (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 Düşük erime noktasına sahip agaroz çözeltisinin (LMA) hazırlanması

Kimyasal	Miktar
PBS	2.0 mL
LMA	0.016 g

NMA çözeltisini %1 hazırlamak için, hassas terazi ile 0.03 g NMA tartıldı ve temiz cam bir tüpe alındı. Üzerine 10 kat seyreltilmiş 3 mL PBS eklendi ve karışım, şeffaf bir NMA elde edilene kadar bek alevi üzerinde ısıtıldı. Kullanıma hazır hale getirilen lamalar, ısıtıcı tabla üzerinde ısıtıldıktan sonra her birine 115 µL homojen NMA çözeltisi döküldü. Pipet ucu yardımıyla ince bir tabaka halinde yayılan çözeltinin kuruması için lamalar laboratuvar ortamında oda sıcaklığında bırakıldı (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 Normal erime noktasına sahip agaroz çözeltisinin (NMA) hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
PBS	3.0 mL
NMA	0.03 g

NMA çözeltisini %1 hazırlamak için, hassas terazi ile 0.03 g NMA tartıldı ve temiz cam bir tüpe alındı. Üzerine 10 kat seyreltilmiş 3 mL PBS eklendi ve karışım, şeffaf bir NMA elde edilene kadar bek alevi üzerinde ısıtıldı. Kullanıma hazır hale getirilen lamalar, ısıtıcı tabla üzerinde ısıtıldıktan sonra her birine 115 µL homojen NMA çözeltisi döküldü. Pipet ucu yardımıyla ince bir tabaka halinde yayılan çözeltinin kuruması için lamalar laboratuvar ortamında oda sıcaklığında bırakıldı (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6 Etidyum bromür çözeltisinin hazırlanması

Kimyasal	Miktar
Etidyum bromür	0.01 g
dH ₂ O	50 mL

Etidyum bromür, hassas terazi ile tartılarak steril bir falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine 50 mL dH₂O eklenerek tamamen çözülmesi sağlandı. Çözelti +4°C’de saklandı ve çalışma sırasında kullanılmak üzere 10 kat seyreltilerek hazırlandı. Komet testi çalışmalarında, T75 flask kullanılmak üzere iki flask hazırlandı. Hücreler inkübatörde inkübe edilerek yapışmaları sağlandı. Hücre yoğunluğu uygun seviyeye ulaşmış flasklara MTT yöntemi ile belirlenen Sorafenib ve Parasetamol’ün IC₅₀ dozları, iki flaska kombine edilerek uygulandı ve hücreler 24 saat boyunca inkübatörde inkübe edildi. Aynı prosedür, 48 saatlik gözlemler için yapılan çalışmada da tekrarlandı. İnkübasyon süresi sonunda hücreler ilaçlardan arındırıldı. Flasklardaki ilaçlı besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Hücreleri flask yüzeyinden ayırmak için uygun miktarda Tripsin-EDTA eklendi ve hücreler inkübatörde 3-5 dakika bekletilerek yüzeyden ayrılması sağlandı. Daha sonra tripsin etkisini durdurmak ve hücrelere zarar vermesini engellemek için %10 FBS içeren DMEM eklendi ve hücreler aynı doz grupları bir arada olacak biçimde pipetleme yoluyla toplandı. Homojen hücre süspansiyonu steril falkona aktarıldı. 1000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu işlem sonucunda süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve hücre peleti elde edildi. Hücreler, belirli bir hacimde besiyerinde tekrar süspanse edildi. Thoma lamı kullanılarak hücre sayısı 10.000-20.000 hücre-mL yoğunluğunda olacak şekilde hazırlandı. Hücre süspansiyonundan 10-15 µL alınarak 90-100 µL LMA ile karıştırıldı. NMA’lı preparatlara, LMA+hücre karışımı damlatıldı ve lamel ile kapatıldı ve ardından buz kasetleri üzerinde 5-7 dakika bekletilerek agarozun donup sabitlenmesi sağlandı. Sürenin sonunda, lameller dikkatlice kaydırılarak çıkarıldı

ve hücre + LMA karışımı sabitlenmiş oldu. Lamalar, hücre zarlarının parçalanması ve DNA'nın serbest hale getirilmesi için lizis tamponuna yerleştirilerek +4°C'de 1 saat süreyle inkübe edildi. Lizis işleminden sonra, preparatlar elektroforez tankına yerleştirildi ve elektroforez tamponunda 30 dakika boyunca +4°C'de bekletildi. 30 dakikalık sürenin ardından, 25 V ve 300 mA'de elektroforez işlemi başlatıldı. Elektroforez işlemi tamamlanan preparatlar, soğuk su veya nötralizasyon tamponu ile jel hasar görmeyecek şekilde yıkandı. Yıkama işlemi tamamlanan lamaların üzerine 70 µL etidyum bromür çözeltisi damlatıldı ve lamel ile kapatıldı. Son olarak, her bir preparat, karanlık bir ortamda floresans mikroskobunda 100 hücre olacak şekilde sayım için incelendi. Komet kuyruğunun uzunluğu ve DNA'nın kuyruktaki yüzdesi gibi parametreler analiz edilerek DNA hasarı değerlendirildi.

3.5 RNA İzolasyonu, Saflık Ölçümü ve cDNA Sentezi

HepG2 karaciğer kanseri hücre hattında, qRT-PCR çalışması için lizis tamponu kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Çalışmamız için temin edilen Ribospin™ RNA İzolasyon Kit (GeneAll®, #304-150) protokolü uygulandı. Deney için bir tane kontrol ve üç tane de doz uygulama grubu oluşturuldu, hücreler 24 saat ardından 48 saat boyunca yeniden inkübe edildi. Bu aşamadan sonra RNA izolasyonu ve saflaştırma işlemleri gerçekleştirildi. Elde edilen RNA örneklerinin saflık tayini nanodrop cihazında gerçekleştirildi. Uygun konsantrasyonda çıkan RNA örnekleri daha sonra cDNA'ya çevrildi. Çalıştığımız gen bölgeleri özel primer dizaynı ile reaksiyon karışımı hazırlanıp qRT-PCR analizinde kullanılmak üzere muhafaza edildi. T75 flasklara 5×10^6 hücre olacak biçimde 24 ve 48 saatlik deney grupları için toplamda 8 adet flaska hücre ekimi yapıldı ve flasklar 37°C, %5 CO₂ ortamında 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında, eski besiyeri dikkatlice uzaklaştırıldı ve kontrol gruplarına taze besiyeri ilave edildi. Deney gruplarına ise belirlenen dozlar uygulandı. Doz uygulama grupları, MTT testiyle belirlenen IC₅₀ değerlerine göre uygulandı. Sorafenib için 20 µM, Parasetamol için ise 5Mm dozları kullanıldı. Hücreler bu dozlarla 24 saat daha inkübe edildi ve aynı işlemler 48 saat için de gerçekleştirildi. 24 ve 48 saatlik RNA izolasyonunda T75 flasklara uygulanan ilaçlar ve miktarları Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7 RNA izolasyonunda T75 flasklara uygulanan ilaçlar ve miktarları (24-48 saat)

	Parasetamol	Sorafenib
Kontrol	Yok	Yok
Parasetamol	5 mM	Yok
Sorafenib	Yok	20 µM
Sorafenib+Parasetamol	5 mM	20 µM

İnkübasyon sonrasında hücreler, kendi besiyerlerinde hücre kazıyıcı yardımıyla flasklardan kazınarak santrifüj tüplerine aktarıldı. Hücreler, 3000 devirde 5 dakika süreyle santrifüj edilerek hücre peletleri elde edildi. Elde edilen hücre peletlerine 400 µL lizis tamponu eklenerek hücre zarlarının parçalanması sağlandı. Pipetleme yapılarak homojenize edilen karışım, 25°C’de 5 dakika inkübe edildi. Hücre lizatı, RNA’nın bağlanması için mini spin kolonuna transfer edildi ve 10.000 G kuvvetinde 30 saniye boyunca santrifüj edildi. Bu işlem, RNA’nın kolon membranına tutunmasını sağladı. Kolona 500 µL GW1 çözeltisi eklendi ve RNA’dan protein, tuz ve diğer kontaminantların uzaklaştırılması için 10.000 G kuvvetinde 1 dakika 30 saniyelik bir santrifüj işlemi uygulandı. Bu yıkama aşaması ile RNA’nın saflaştırılması amaçlandı. Mini spin kolon, yeni bir santrifüj tüpüne transfer edildi. Kolonun merkezine 50 µL Nuclease-Free Water (NFW) eklenerek 1 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından RNA’nın elüsyonu, 10.000 G kuvvetinde 1 dakika santrifüj edilerek tamamlandı. Elde edilen RNA, kısa süreli depolama için -20°C’de, uzun vadeli muhafaza amacıyla ise -80°C’de saklandı. İzole edilen RNA’ların konsantrasyonu (ng/µl) ve saflık oranı (OD260/OD280) Thermo Scientific™ Multiskan™ GO cihazı kullanılarak, ScanIt Software 6.1.1 programı aracılığıyla ölçüldü. Ölçüm sürecine başlamadan önce, RNA konsantrasyonunun doğru bir şekilde belirlenebilmesi için cihazda RNA ölçümüne uygun olan hazır protokol aktif hale getirildi. Ölçümde kullanılacak olan Nanodrop plate (Thermo Scientific™ µDrop™ Plate, #N12391, ABD) üzerine, referans (blank) olarak 5 µl Nuclease-Free Water (NFW) eklendi. Ardından her bir RNA numunesinden 5 µl alınarak aynı plate üzerine yüklendi. Multiskan GO cihazı, ışık absorbansını belirli dalga boylarında ölçerek RNA konsantrasyon ve saflığı hesaplandı; bu sayede RNA’nın protein veya diğer safsızlıklarla kontamine olup olmadığını belirlemek amacıyla OD260/OD280 kullanıldı. Sonuçlar, RNA’nın saflık derecesi ve deneysel çalışmalar için uygunluğu değerlendirilmek üzere kaydedildi.

3.5.1 cDNA Sentezi

RNA saflaştırma işlemi tamamlandıktan sonra, FIREScript® RT cDNA Sentez Kiti (Solis BioDyne) protokolüne göre cDNA sentezi gerçekleştirildi. 24 ve 48 saatlik hücre inkübasyonlarının ardından, her bir RNA örneği için 20 µl'lik reaksiyon karışımları hazırlandı. Bu karışımın hazırlanması sırasında, kit içerisindeki bileşenler titizlikle eklenerek sırasıyla 10X RT Reaction Buffer (2 µl), dNTP Mix (0.5 µl), Oligo(dT) Primer (1 µl), Random Primer (1 µl), RNase Inhibitor (0.5 µl) ve FIREScript Reverse Transcriptase (1 µl) reaksiyon tüplerine ilave edildi. Ardından, her bir örnekte kullanılacak RNA'lar ve Nuclease-Free Water (NFW) eklenerek reaksiyon hacmi toplamda 20 µl'ye tamamlandı. İşlemin devamında, tüpler RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesi amacıyla Prime Thermal Cycler marka cihaz kullanılarak elde edilen cDNA'lar, gen ekspresyon analizlerinde kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi. Bu süreç, elde edilen cDNA'nın saflığı ve kalitesini garanti altına almak ve gen ifadesi analizlerinin doğruluğunu sağlamak adına oldukça kritik bir aşama olduğu için titizlikle çalışıldı. cDNA sentezinde kullanılan bileşenlerin miktarları Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.8 cDNA sentezinde kullanılan bileşenlerin miktarları.

Deney Bileşeni	Miktar
RNA	5 µg
Oligo(dT) primer	1 µl
dNTP MIX	0.5 µl
10x Reaction Buffer	2 µl
Firescrip RT	1 µl
RiboGrip RNase İnhibitor	0.5 µl
Nükleaz Free Water	Toplam hacim 20 µl
Toplam Hacim	20 µl

3.5.2 Primer Tasarımı

HepG2 hücreleri üzerinde β -ACTİN, BCL2, BAX, CASPASE-3 ve TNF- α genlerinin ekspresyonunu incelemek amacıyla genlere uygun spesifik primerler, Primer-BLAST programı kullanılarak tasarlandı. Kullanılan primerlerin dizilimleri ve PCR ürünlerini belirtilen sekanslara göre (5'→3') uzunlukları detaylı olarak Çizelge 3.9'da sunulmuştur.

Çizelge 3.9 Ekspresyon seviyeleri belirlenen genler ve bu genler için kullanılan primer dizileri.

Gen	Primerler
β-AKTİN	F: 5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3' R: 5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'
BCL-2	F: 5'TATCTGGGCCACAAGTGAAG-3' R: 5'-ATTCGACGTTTTGCCTGAAG-3'
KASPAZ-3	F: 5'-GCGCTCTGGTTTTTCGTTAAT-3 R: 5'-ACCCATCTCAGGATAATCCATTT-3'
BAX	F: 5'-AGCAGATCATGAAGACAGGG-3' R: 5'-GAAGTTGCCGTCAGAAAACA-3'
TNF-α	F: 5'-GACTATCTCGACTTTGCCGA-3' R: 5'-GTTTCGAAGTGGTGGTCTTG-3'

3.5.3 qRT-PCR

Sorafenib ve Parasetamol kombinasyonu uygulanan HepG2 insan karaciğer kanseri hücre hattında, hedef genlerin ekspresyon seviyelerindeki farklılıkları belirlemek amacıyla bu analizde, Bioneer Exicycler™ 96 (Ver.4) Real-Time Quantitative Thermal Block (Thermo, ABD) cihazı kullanıldı. Bu analizde, HOT FIREPol® SolisGreen® qPCR Mix reaktifi kullanıldı ve tüm genler için her koşulda iki teknik tekrar yapıldı. Hedef genlerin ekspresyon seviyelerinin amplifikasyonu için gerekli karışım, Çizelge 3.10'da belirtilen konsantrasyonlara ve numune sayısına göre dikkatlice hesaplanarak hazırlandı. Bu karışım, her bir hedef gen için spesifik primerler ve HOT FIREPol® SolisGreen® qPCR Mix içerecek şekilde optimize edildi. Hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 5 μ l dikkatlice dağıtıldı, ardından her kuyucuğa 2 μ l cDNA örneği eklenerek pipetleme işlemi hassas bir şekilde gerçekleştirildi. Protokol, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonucunda elde edilen tüm örnekler için, her koşulda iki tekrar olacak şekilde aynı titizlikle uygulandı.

Çizelge 3.10 qRT-PCR çalışmasında kullanılacak reaktif bileşenler ve miktarları.

Reaktif Bileşen	Miktar
Solis Green qPCR Mix	4 µl
Forward Primer	0.5 µl
Reverse Primer	0.5 µl
dH₂O	13 µl
cDNA	2 µl

qRT-PCR işlemi, her bir döngü için uygun ısının ve sürelerin ayarlandığı bir program doğrultusunda gerçekleştirildi. Deneyin her aşamasında, enzim aktivasyonu, denatürasyon, bağlanma ve uzama basamakları için belirlenen protokole uygun olarak optimize edilmiş sıcaklık ve zaman dilimleri ile uygulandı.

3.6 Protein İzolasyonu ve Miktar Analizi

HepG2 hücre hattında, Sorafenib ve Parasetamol kombinasyonunun uygulanmasının ardından, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri tamamlandıktan sonra hücre toplama aşamasına geçildi. İnkübasyon süresi sona erdikten sonra, her iki grup için benzer dozlar uygulanan hücreler falkonlara toplandıktan sonra santrifüj edildi. Santrifüjleme işlemi sonrasında hücrelerin süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırıldı. Elde edilen hücre peleti, soğuk PBS ile iki kez yıkanarak hücrelerin tam anlamıyla çökeltilmesi sağlandı. Bu yıkama işlemi, hücre dışı bileşenlerin ve gereksiz maddelerin ortadan kaldırılmasına yardımcı oldu. Bu süreçte, proteinlerin stabilitesini korumak amacıyla tüm işlemlerin buz içerisinde gerçekleştirilmesine özen gösterildi. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra, hücre peleti üzerine soğuk RIPA tamponu eklenerek, 200 µl hacminde bir çözelti oluşturuldu. Bunun yanı sıra, 10 µl proteaz inhibitör kokteyli ilave edildi. Bu karışımı, homojen biçimde elde etmek amacıyla dikkatlice pipetaj yapıldıktan sonra, tüpler buz içerisine gömülerek 30 dakika bekletildi. Bu aşama, proteinlerin çözünmesi ve bozulmalarının önlenmesi için kritik bir öneme sahiptir. Ardından, buz içerisinde bulunan tüpler 4 °C’de 10.000 rpm hızında 10 dakika santrifüje tabi tutuldu. Bu işlem sonucunda, ependorf tüplerinin üst kısmında istenilen çözünmüş protein süpernatantı elde edildi. Elde edilen süpernatant, santrifüj işleminden çıkınca protein yapısının zarar görmemesi için

tekrar buzda tutuldu ve uygun etiketleme işlemleri yapılarak -20 °C’de saklanmak üzere hazırlandı. Sonrasında, uzun süreli depolama için -80 °C’de muhafaza edilmek üzere kaldırıldı. Böylece, protein izolasyonu işlemi tamamlanmış oldu.

Bradford testi, protein konsantrasyonunu belirlemek için sıklıkla tercih edilen bir kolorimetrik yöntemdir. Bu analiz, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlerle etkileşim göstermesi prensibine dayanır. Boya, protein ile bağlandığında renk değişimi meydana gelir ve bu değişim, protein miktarı ile orantılı olarak ölçülebilir. Boya-protein kompleksinin oluşumu, asidik bir ortamda 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans gösteren mavi bir yapı oluşturur. Bradford testi, özellikle yüksek doğruluk ve hızlı sonuç elde etme kapasitesi nedeniyle diğer protein ölçüm tekniklerine göre belirgin avantajlar sunar (Bradford 1976). Testin doğruluğu, proteinlerin Coomassie Brilliant Blue ile olan etkileşimlerine dayanmaktadır; bu nedenle, proteinlerin yapısal farklılıkları ölçümlerde belli bir sapma yaratabilir.

Genel olarak, bovin serum albümini (BSA) gibi standart bir proteinin farklı konsantrasyonları kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturulur ve bilinmeyen örneklerin protein miktarları bu eğriye dayanarak belirlenir. Bu yöntemin hassasiyeti, özellikle düşük protein konsantrasyonlarını ölçebilme yeteneği sayesinde tercih edilmektedir. (Compton ve Jones 1985). Deney öncesinde, tüm kullanılan malzemelerin ve çalışma ortamının sterilizasyonu titizlikle sağlandı. Protein standardı, Brilliant Blue Reagent ve örnekler, deney süresince düşük sıcaklıkta tutuldu. Protein miktarının belirlenmesi amacıyla ilk adımda, Brilliant Blue Protein Reagent 1:10 oranında distile su ile seyreltilerek hazırlandı. Protein standardı olarak BSA (Bovine Serum Albumin) farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100, 150, 300 µl) distile su ile seyreltilerek çözeltiler oluşturuldu. Kontrol grubu (blank) için 900 µl boya çözeltisi ve 100 µl distile su, ependorf tüplere eklenip pipetaj işlemi ile optik cam küvetlere aktarıldı. 595 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi. Aynı protokol, diğer BSA konsantrasyonları için de takip edildi. Örnekler için ise 900 µl RIPA solüsyonu, 10 µl protein ve 900 µl Brilliant Blue Reagent karıştırılarak homojen bir çözelti oluşturuldu ve pipetajın ardından küvetlere aktarılıp, Jenway6305 UV/Vis Spectrophotometer cihazı ile 595 nm’de ölçümler yapıldı; sonuçlar detaylı şekilde kaydedildi.

3.7 ELISA Analizi

Bu çalışmada, HepG2 hücre hattında Sorafenib ve Parasetamol'de Bax, Bcl-2, Tnf- α ve Kaspaz-3 protein düzeylerinin kantitatif olarak ölçülmesi amacıyla, human ELISA kiti kullanıldı. ELISA yöntemi, antijen-antikor etkileşimi esasına dayanmakta olup, yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü sayesinde protein analizlerinde yaygın olarak tercih edilmektedir (Crowther 2009). Deneysel işlemler kapsamında, hücre kültür süpernatanlarından elde edilen örnekler, bu proteinlere özgü antikorlarla kaplı mikrotitre plaklarına aktarıldı ve ELISA protokolü doğrultusunda işleme alındı. Numuneler önce inkübasyona bırakıldı, ardından biotin etiketli sekonder antikor ve HRP-konjugat (horseradish peroxidase) ilave edilerek renk reaksiyonu başlatıldı. TMB substratının eklenmesiyle oluşan renk değişimi, reaksiyonun sülfürik asit ile durdurulmasının ardından 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu ile ölçüldü. Her protein için oluşturulan standart eğriler kullanılarak konsantrasyon değerleri hesaplandı. Yıkama tamponu, stok çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle oluşturuldu. Her kuyucuğa 100 μ L standart veya örnek numune eklenerek 90 dakika inkübasyon yapıldı ve süre sonunda yıkama adımı uygulandı. Daha sonra 100 μ L biotinli antikor eklendi ve 60 dakika inkübe edilerek tekrar yıkama yapıldı. Ardından 100 μ L HRP-konjugat eklendi, 30 dakika inkübe edildi ve üçüncü yıkama uygulandı. Son olarak 90 μ L TMB substrat eklenip 15–20 dakika süreyle renk gelişimi beklendi ve 50 μ L durdurma solüsyonu eklendi ve optik yoğunluk ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak Bax, Bcl-2, Tnf- α ve Kaspaz-3 protein düzeyleri belirlenerek kontrol ve ilaç uygulanmış gruplar karşılaştırıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi ve protein düzeylerindeki değişiklikler optik yoğunluk değerleri temel alınarak analiz edildi.

3.8 İstatiksel Analiz

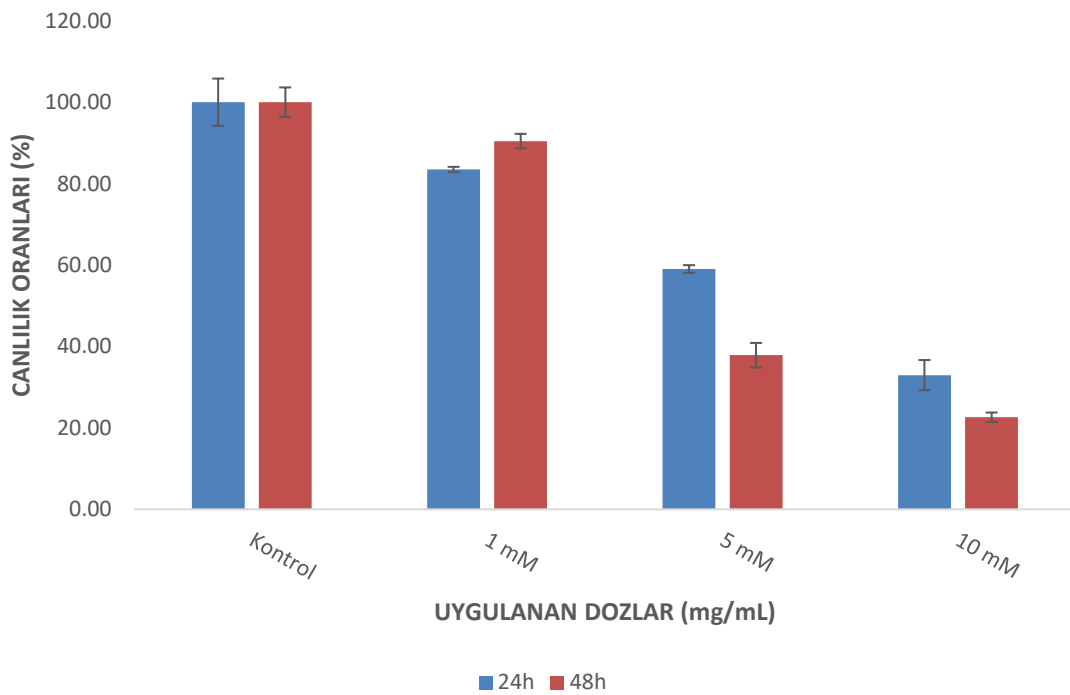
MTT deneyi sonucunda elde edilen spektrofotometrik veriler yüzde (%) cinsinden ifade edilmiştir. IC₅₀ dozunun tespiti için probit analizi yöntemi kullanılmıştır. Komet analizi ile elde edilen veriler, grupların ortalamaları arasında karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla Duncan testi ile analiz edilmiştir ($p < 0.05$). Gen ekspresyon analizinde, referans gen olarak β -AKTİN kullanılmış ve analiz bu gen temel alınarak standartlaştırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 MTT Testi Sonuçları

4.1.1 HepG2 Hücre Hattında Parasetamol'ün Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

HepG2 hücre hattında Parasetamol'ün IC₅₀ dozunu belirlemek amacıyla, her kuyucuğa dört kez tekrarlanacak şekilde artan konsantrasyonlarda dozlar uygulandı. Parasetamol için 1-10 mM arasında üç farklı doz seçilerek, 24 ve 48 saatlik süreyle hücreler bu dozlara maruz bırakıldı. MTT canlılık testi ile 540 nm'de elde edilen absorbans verileri kullanılarak hücre canlılık yüzdeleri hesaplandı. Bu hesaplamalar sonucunda elde edilen bulgular Şekil 4.1'de sunulmuştur.



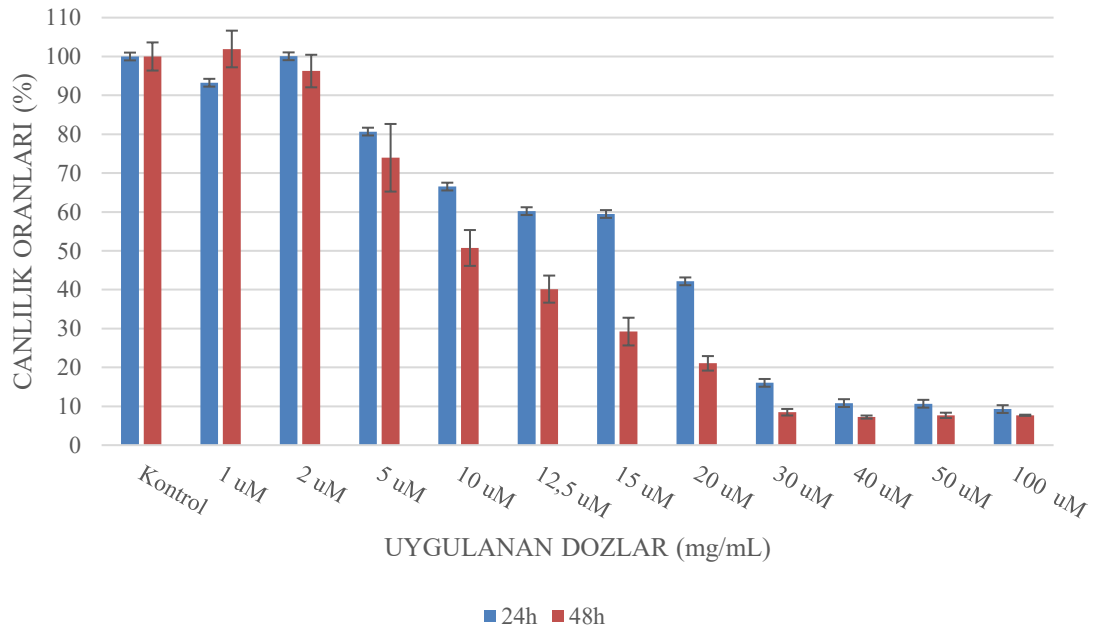
Şekil 4.1 HepG2 hücreleri üzerinde uygulanan farklı dozların 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında canlılık oranlarına (%) etkisi.

Kontrol grubunda 24 saat ve 48 saat sonrasında hücre canlılık oranları oldukça yüksek (%100) gözlenmiştir. 1 mM konsantrasyonda 24 saat sonra hücre canlılık oranı hafif bir düşüş gösterirken, 48 saatlik inkübasyon sonrasında bu oranda bir düşüş gözlemlenmemiştir. 5 mM dozda, hem 24 saat hem de 48 saat inkübasyon sürelerinde canlılık oranlarında belirgin bir azalma görülmüştür ve yüzde canlılık değeri 24 saatlik

süre sonunda %59.03 olarak belirlenip, 48 saatlik süre sonunda ise % 37.85 olarak bulunmuştur. 48 saatlik uygulamada canlılık oranı, 24 saate kıyasla daha düşük olarak saptanmıştır. En yüksek konsantrasyon olan 10 mM’de, hem 24 saat hem de 48 saatlik sürelerde canlılık oranı önemli ölçüde azalmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda canlılık oranı neredeyse %20’ye düşmüştür. Bu bağlamda artan doz ve inkübasyon süresi ile HepG2 hücrelerinin canlılık oranlarında kademeli bir azalma gözlemlenmiştir. Özellikle yüksek dozlarda 5 mM ve 10 mM olduğu gibi uzun süreli inkübasyonlarda, hücre canlılığı belirgin şekilde düşmektedir. Bu da, uygulanan maddenin HepG2 hücreleri üzerinde doza ve zamana bağlı sitotoksik etkisi olduğunu göstermektedir.

4.1.2 HepG2 Hücre Hattında Sorafenib’in Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Sorafenib’in HepG2 hücre hattı üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla, 1-100 µM aralığında 11 farklı artan konsantrasyon kullanılarak MTT canlılık testi gerçekleştirildi. Her doz, dört tekrarlı olacak şekilde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde hücrelere uygulandı. Hücre canlılık yüzdeleri, 540 nm dalga boyunda elde edilen absorpsiyon verilerine dayanarak hesaplandı. Bu hesaplamalar sonucunda elde edilen bulgular Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

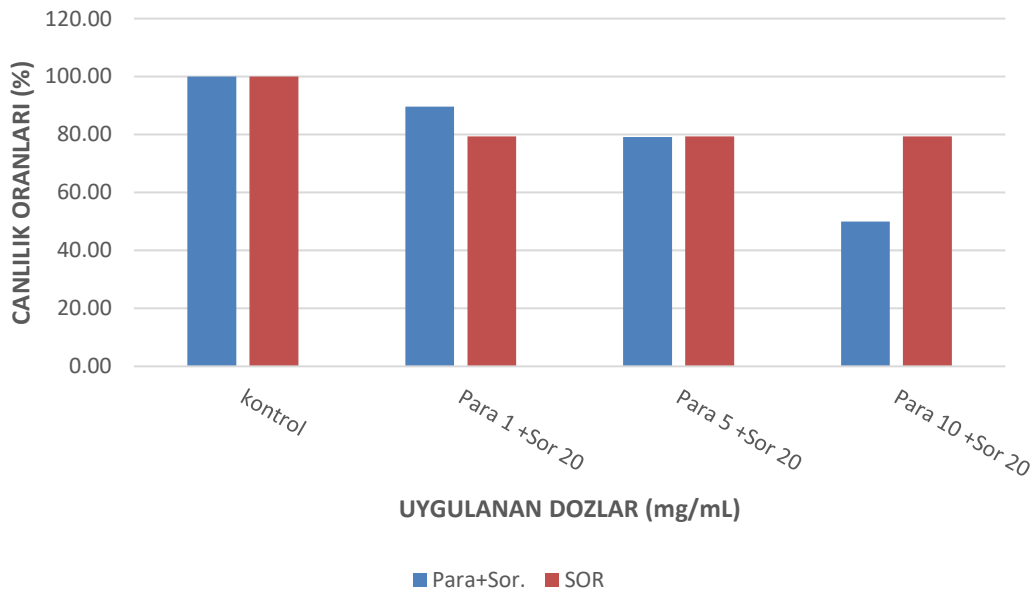


Şekil 4.2 HepG2 hücreleri üzerinde uygulanan farklı dozların 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında canlılık oranlarına (%) etkisi

Her iki inkübasyon süresinde de artan Sorafenib konsantrasyonu ile birlikte hücre canlılık oranlarının azaldığı gözlemlenmiştir. 5 μ M ve üzerindeki dozlarda hücre canlılığında belirgin bir azalma meydana geldiği gözlemlenmiş olup özellikle 10 μ M ve 15 μ M dozlarında canlılık oranı %50 ve altına düşmüş ve 48 saatlik inkübasyonda bu azalma daha belirgin bir şekilde ortaya çıkmıştır. Bu bağlamda Sorafenib'in, doza ve inkübasyon süresine bağlı olarak toksik etkisinin arttığı belirlenmiştir. 30 μ M ve üzeri dozlarda canlılık oranları oldukça düşük seviyelere inmiş ve yaklaşık %10-20 civarında kalmıştır. Elde edilen verilere dayanarak, 24-48 saatlik inkübasyonda IC₅₀ değeri 20 μ M olarak tespit edilmiştir.

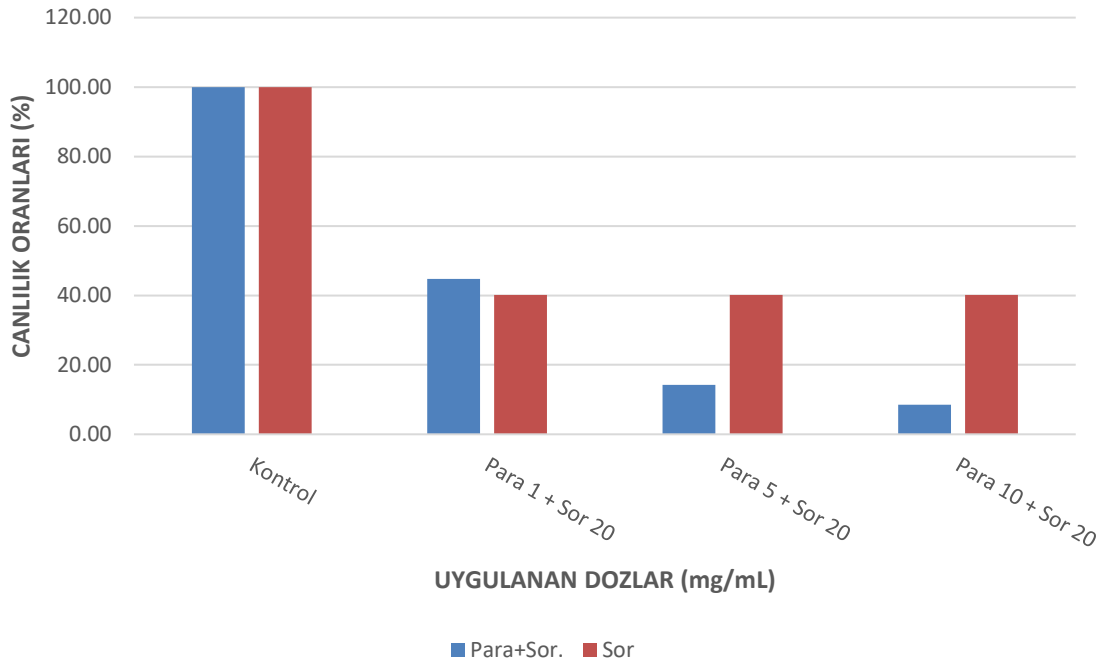
4.1.3 HepG2 Hücre Hattında Sorafenib ve Parasetamol Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi

Sorafenib için IC₅₀ dozu olarak belirlenen 20 μ M konsantrasyon dozu, Parasetamol ile kombine edilerek HepG2 hücre hattında incelenmiştir. Parasetamol için IC₅₀ dozu ve buna yakın konsantrasyonlar olan 1, 5 ve 10 mM seviyelerindeki konsantrasyonlar Sorafenib ile kombinasyonlar hazırlanarak, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresince hücrelere uygulanmıştır. Kombinasyonların hücre canlılığı üzerindeki etkilerine ilişkin veriler Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te sunulmuştur.



Şekil 4.3 HepG2 hücrelerine 24 saatlik Sorafenib ve Parasetamol kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkisi.

Sorafenib IC₅₀ dozunda 20 µM sabit tutulurken, Parasetamol üç farklı konsantrasyonda (1, 5 ve 10 mM) uygulanmıştır. Kontrol grubunda hücre -canlılık oranı %100 seviyesinde iken, uygulanan Para 1 + Sor 20 (1 mM Parasetamol + 20 µM Sorafenib)'luk kombinasyonda, hücre canlılık oranı yaklaşık %70 seviyesine gerilemiştir. Para 5 + Sor 20 (5 mM Parasetamol + 20 µM Sorafenib)'lik uygulamada hücre canlılığına etkide belirgin bir azalma gözlenmiştir. Canlılık oranı, %50-60 seviyelerinde kalmış olup, bu kombinasyonun hücrelerde orta derecede bir toksik etki oluşturduğu ve bu bağlamda tek başına Sorafenib uygulamasına herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Para 10 + Sor 20 (10 mM Parasetamol + 20 µM Sorafenib) uygulamasında ise hücre canlılık oranının yaklaşık %40 seviyesine kadar gerilediği ve bu kombinasyonun tek başına Sorafenib uygulamasından daha etkili olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.4 HepG2 hücrelerine 48 saatlik Sorafenib ve Parasetamol kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkisi.

48 saatlik kombinasyon uygulamasında, kontrol grubunda hücre canlılık oranı %100 seviyesinde iken, uygulanan Para 1 + Sor 20, Para 5 + Sor 20 ve Para 10 + Sor 20 uygulamalarında, hücre canlılık oranları sırasıyla; yaklaşık %45, %15 ve %9 olarak belirlenmiştir. 24 ve 48 saatlik uygulamaların sonuçları değerlendirildiğinde uygulama süresi arttıkça ve konsantrasyon artışı ile hücre canlılık oranlarının düştüğü gözlenmiştir. Özellikle Para 10 + Sor 20 uygulamasında 48 saatte hücre canlılığı %9 civarına kadar gerilemiştir. Bu durum, yüksek Parasetamol ve Sorafenib kombinasyonunun ve uygulama

süresinin artışının hücreler üzerinde güçlü bir sitotoksik etki yarattığını ve hücre ölüm oranını artırdığını göstermektedir. Artan Parasetamol konsantrasyonu ile birlikte, sabit tutulan Sorafenib dozunun hücre canlılığı üzerindeki toksik etkisi daha belirgin hale gelmiştir. Bu kombinasyon dozlarının etkisi, doza bağımlı bir şekilde artış göstererek hücre ölüm oranını yükseltmiştir. Özellikle yüksek Parasetamol dozları ile Sorafenib'in birlikte kullanımı, HepG2 hücre hattında belirgin bir sitotoksik etki yaratmaktadır.

4.2 Genotoksisite Testi Sonuçları

HepG2 hücrelerinde DNA hasar analizi, 20 µM Sorafenib ve Parasetamol dozları kombine edilerek uygulanmıştır. DNA hasar düzeyinin tespitinde, komet testi kullanılmış olup, her uygulama grubundan hazırlanan preparatlar üzerinden toplamda 100 hücre incelenerek skora yapılmış ve kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.1 HepG2 hücrelerinde Sorafenib ve Parasetamol kombinasyonunun oluşturduğu DNA Hasarı

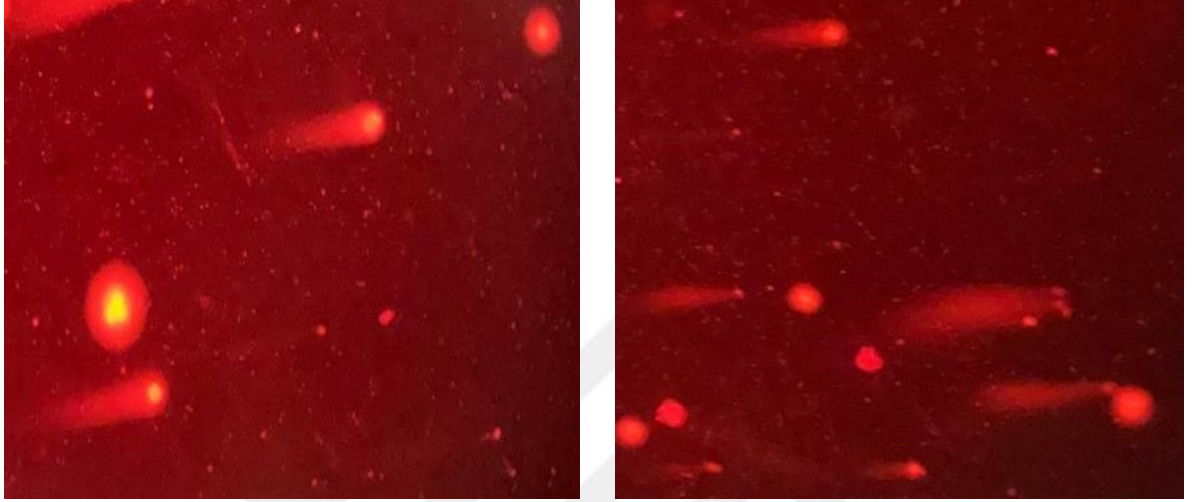
Uygulama	DNA Hasarı (Arbitrary Unit)	
	Konsantrasyon Ortalama ± Standart sapma	
	24 saat (Parasetamol 2.5 mM)	48 saat (Parasetamol 5 mM)
Kontrol	3.67±1.15 ^a	4.33±1.15 ^a
Pozitif Kontrol	49.55±7.87 ^d	50.44±8.62 ^d
Sorafenib (20µM)	20.33±2.52 ^b	25.33±4.16 ^b
Parasetamol	6.00±2.65 ^a	12.00±6.24 ^c
Sor + Para	18.33±3.51 ^b	23.33±1.15 ^b

* Sor: Sorafenib; Para: Parasetamol, pozitif kontrol: cisplatin

* Farklı sütunlardaki farklı şekilde belirtilen harfler p<0,05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi).

Uygulanan dozların HepG2 hücreleri üzerindeki DNA hasarının en yüksek değeri (25.33±4,16^b), 48 saatlik sonuçlarda Sorafenib (20 µM) doz uygulamasında görülmüştür. Bu sonuca en yakın bir diğer DNA hasarı (23.33±1.15^b), 48 saatlik Sor20+Para2.5 (20 µM Sorafenib + 2.5 mg/ml Parasetamol) kombinasyon doz uygulamasında tespit edilmiştir. En az DNA hasarının görüldüğü değer (6.00±2.65^a), 24 saatlik sonuçlarda 5 mg/ml Parasetamol doz uygulamasında belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan Sorafenib ve Parasetamol kombinasyonu, tek başına uygulanan ilaç dozlarına kıyasla HepG2

hücreleri üzerinde daha fazla DNA hasarı göstermekle birlikte tek başına Sorafenib uygulamasındaki hasar seviyesini hem 24 hem de 48 saatlik uygulamada azaltmıştır. Yapılan uygulama sonucunda elde edilen hasar görüntülerinden bazıları Resim 4.1’de verilmiştir.



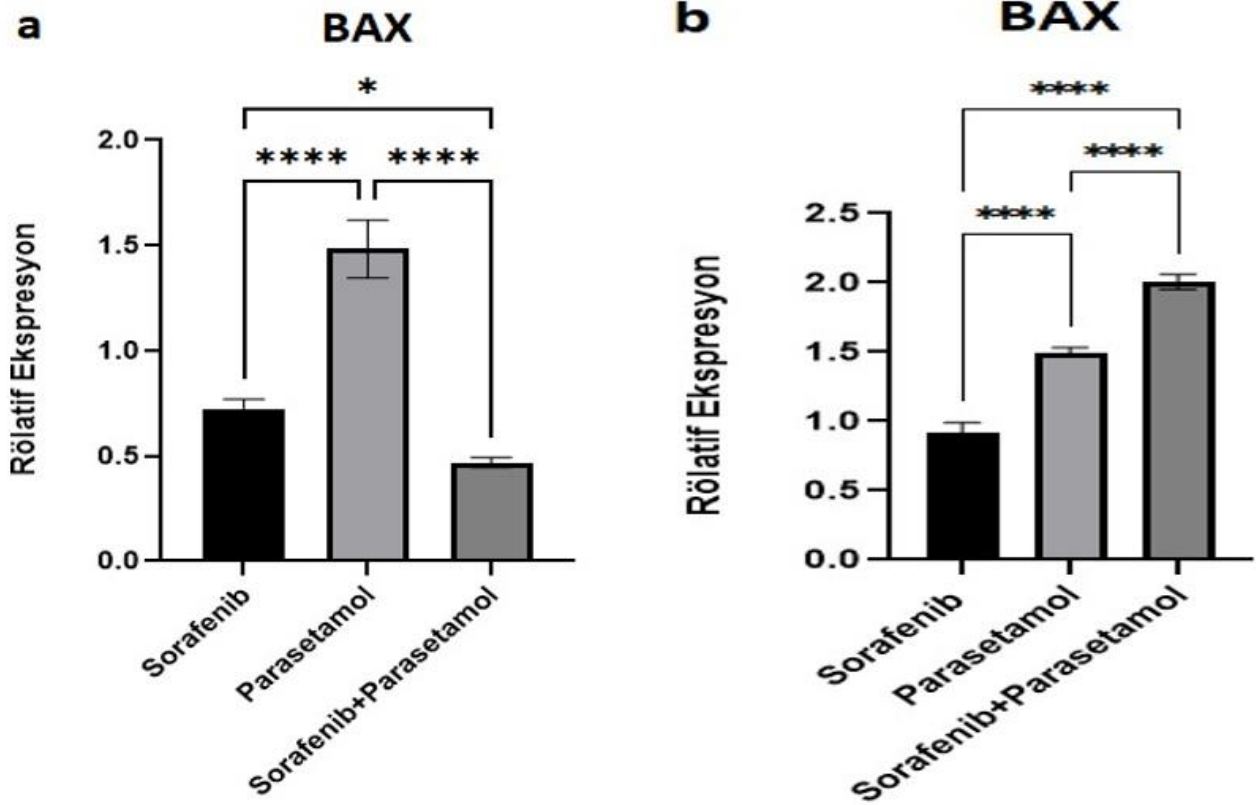
Resim 4.1 Parasetamol ve Sorafenib kombinasyon dozlarının HepG2 hücre hattı üzerindeki etkilerinin Komet görüntüleri.

4.3 RNA İzolasyonu

24 ve 48 saat inkübe edilmiş hücre kültürlerinden toplam RNA izolasyonu, lizis tamponu kullanılarak ve çalışma için temin edilen Ribospin™ RNA İzolasyon Kit protokolü uygulanarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrası RNA saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometrik analiz (NanoDrop) ile değerlendirilmiş ve ölçümler sonucunda, A260/A280 oranı ortalama 1.8-2.0 arasında bulunmuş ve bu değer RNA'nın saf olarak izole edildiğini göstermiştir.

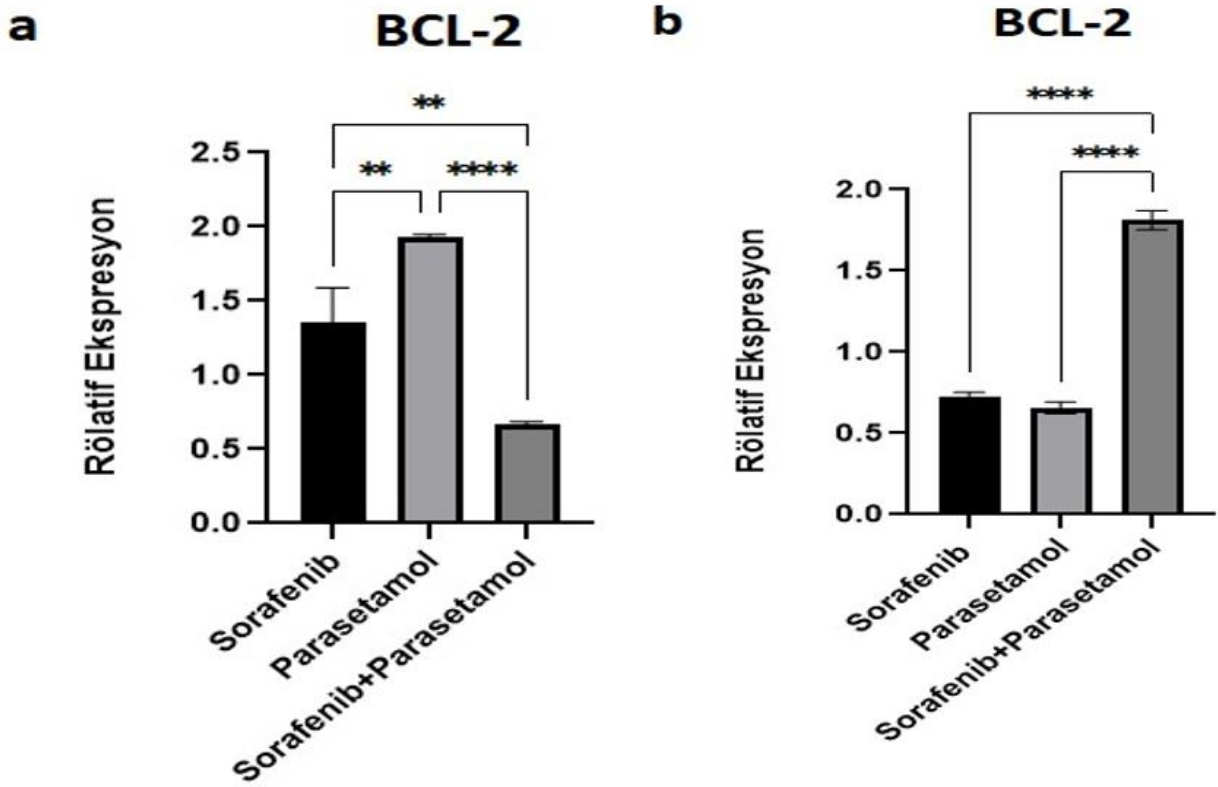
4.4 Gen İfade Düzeyleri

HepG2 hücre hattında 24 ve 48 saatlik kombinasyon çalışmaları sonucunda kontrol grubu ve buna bağlı olarak değişkenlik gösteren kombinasyon grupları çalışılmış ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda, BAX, BCL-2, KASPAZ-3 ve TNF- α genlerinin ekspresyon seviyeleri, β -Actin referans geni kullanılarak qPCR yöntemi ile belirlenmiştir.



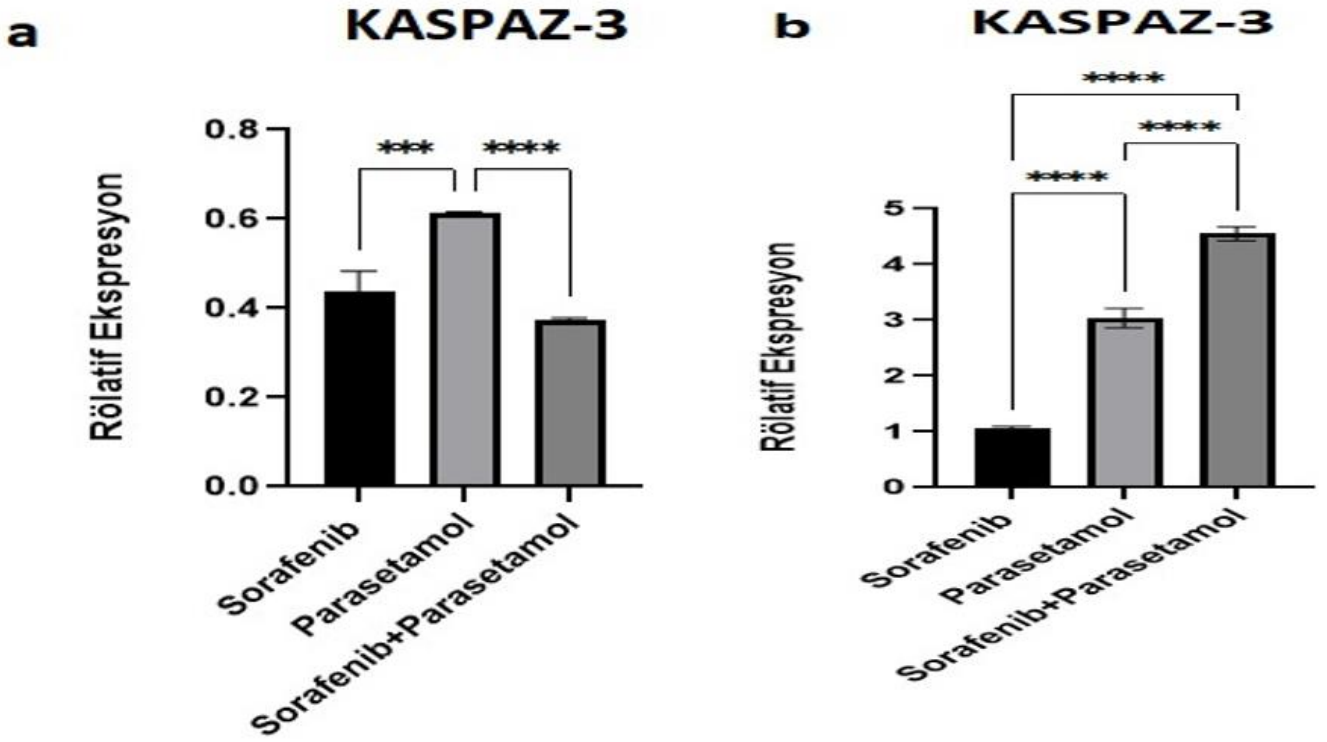
Şekil 4.5 Bax geni ekspresyon seviyesi (a:24 ve b:48 saat).

Yapılan çalışmada 24-48 saatlik uygulama sonucunda BAX gen ekspresyonu verileri değerlendirildiğinde her bir uygulama grubunda da anlamlı değişiklikler gözlemlenmiştir ($p < 0.0001$). 24 saatlik uygulama grupları arasında en yüksek ekspresyon seviyesi Parasetamol grubunda gözlenmekte olup Sorafenib'ten daha yüksek bir gen ekspresyon seviyesi göstermiştir. Kombine halde kullanımında Parasetamol-Sorafenib kombinasyon dozunun Sorafenib'e kıyasla BAX ekspresyonun da antagonistik bir etki sergilediği görülmektedir. Ancak 48 saatlik uygulama verilerine bakıldığında, Parasetamol'ün tek başına uygulamasında anlamlı derecede ekspresyon düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. Kombinasyon uygulamasında ise Sorafenib'den daha fazla Bax ekspresyonu gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar 48 saatlik uygulama süresiyle birlikte Parasetamol'ün Sorafenib uygulamasına sinerjistik etkisi olduğunu göstermiş olup bu durum tedavi süresi uzadıkça kombinasyonun apoptotik etkisini artırdığını ifade etmektedir. Bu veriler, tedavi süresine bağlı olarak BAX geninin farklı düzeylerde regüle olduğunu ve özellikle kombinasyon tedavisinin zamanla daha güçlü bir apoptotik etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 4.5).



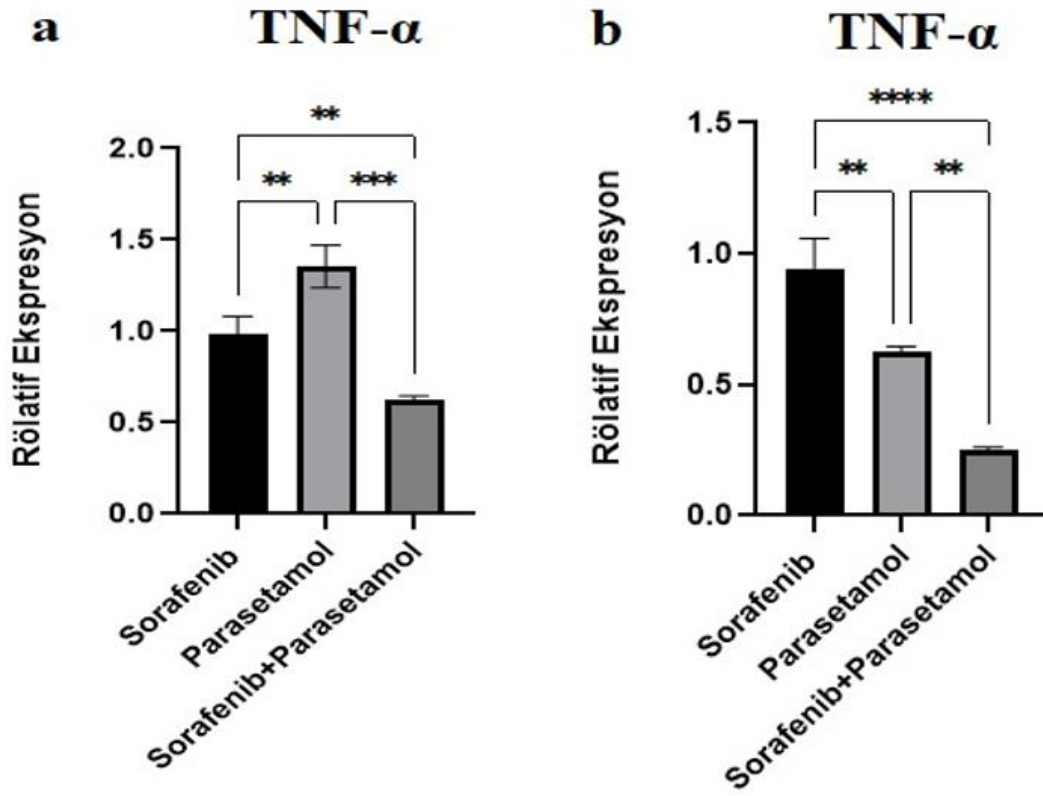
Şekil 4.6 Bcl-2 geni ekspresyon seviyesi (a:24 ve b:48 saat).

24 saatlik uygulamada Sorafenib+Parasetamol kombinasyon grubunun ekspresyon seviyesinin hem Sorafenib'e hem de Parasetamol'e kıyasla BCL-2 ekspresyon seviyesini önemli derecede azalttığı görülmüştür. Parasetamol tek başına ekspresyonu artırırken, Sorafenib ile birlikte uygulandığında bu artışı baskılamış ve ekspresyon seviyesinde ciddi bir düşüşe neden olarak antagonist bir etkileşim yaratmıştır. Ancak zaman faktörü göz önüne alındığında, 48 saatlik uygulama sonrası elde edilen verilerde farklı bir eğilim ortaya çıkmıştır. Bu daha uzun sürede, hem Sorafenib hem de Parasetamol tek başlarına düşük BCL-2 ekspresyonu seviyeleri sergilerken, kombine tedavi grubunda ekspresyonun anlamlı şekilde arttığı tespit edilmiştir. Bu artış, iki ilacın uzun süreli bir arada uygulanmasında sinerjistik bir etkileşime işaret etmektedir. Bu da, kombinasyon tedavisinin zamanla hücrelerde farklı moleküler adaptasyonlar veya kompensatuar mekanizmalar tetikleyebileceğini göstermektedir. Uzun süreli maruz kalmada, hücrelerin ilaç etkilerine karşı direnç geliştirmek amacıyla BCL-2 proteinini artırdığı ve böylece hücre yaşamsallığını korumaya çalıştığı varsayılabilir (Şekil 4.6).



Şekil 4.7 Kaspaz-3 geni ekspresyon seviyesi (a:24 ve b:48 saat).

24 saatlik uygulamada Parasetamol'ün, Sorafenib'e göre anlamlı derecede daha yüksek KASP AZ-3 ekspresyonuna neden olduğu belirlenmiştir, ancak kombinasyon grubu uygulamasının hem Parasetamol hem de Sorafenib'e göre anlamlı olarak daha düşük ekspresyon gösterdiği belirlenmiştir. 48 saatlik uygulama sonuçları incelendiğinde Sorafenib grubu ekspresyonu en düşük iken Parasetamol tedavisiyle ekspresyon belirgin şekilde artmıştır. İlk 24 saatlik süreçte hücrelerin bu ilaç kombinasyonuna karşı adaptif yanıtlar geliştirerek KASP AZ-3 aktivasyonunu sınırladığı düşünülebilir. Bununla birlikte, 48 saatlik uygulama süresi incelendiğinde, KASP AZ-3 ekspresyonunda önemli değişiklikler gözlenmiştir. Sorafenib grubunda ekspresyon seviyesi en düşük düzeyde seyretmiş olup, bu durum Sorafenib'in uzun süreli kullanımında hücrelerde apoptotik aktivasyonun sınırlı kalabileceğine işaret etmektedir. Buna karşın, Parasetamol tedavisi 48 saatte KASP AZ-3 ekspresyonunu belirgin şekilde artırmış, apoptotik süreçlerin devam ettiğini göstermiştir. En dikkat çekici sonuç ise kombinasyon grubundan elde edilmiştir; burada KASP AZ-3 ekspresyonu çok yüksek düzeylere ulaşmış ve bu durum, Sorafenib ve Parasetamol'ün birlikte uygulandığında gen ekspresyonunu sinerjistik biçimde artırarak apoptotik hücre ölümünü güçlendirdiğini ortaya koymuştur (Şekil 4.7).

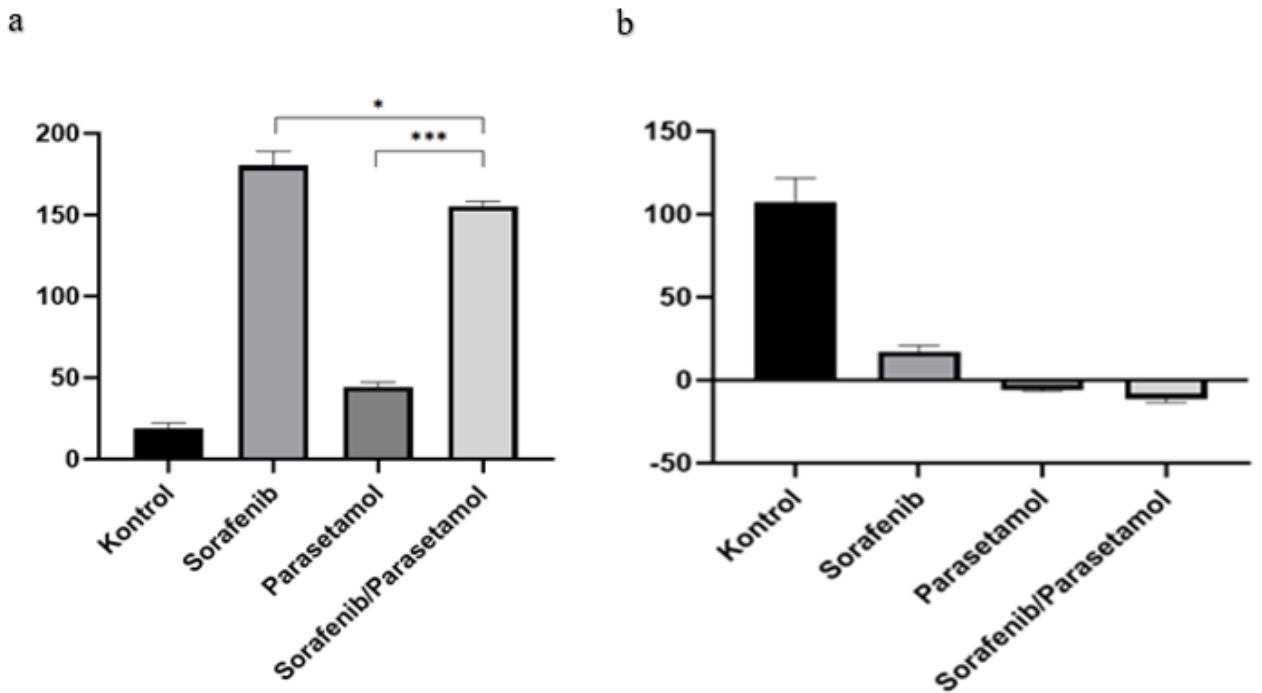


Şekil 4.8 TNF-A geni ekspresyon seviyesi (a:24 ve b:48 saat).

Her iki süre uygulamasında da TNF- α ekspresyon düzeyi bakımından, istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler saptanmıştır. 24 saatlik uygulamada Parasetamol grubunda gen ekspresyon düzeyi hem Sorafenib hem de kombinasyon grubundan daha yüksek bir değer göstermiştir. 48 saatlik uygulamada ise en yüksek ekspresyon seviyesi Sorafenib uygulamasında görülmüş kombinasyon uygulamasının ekspresyon seviyesi çok azaldığı için antagonistik bir etkileşim olabileceği öngörülmektedir. Bu düşüş, iki ilacın birlikte kullanıldığında TNF- α üretimi üzerinde birbirini engelleyen, yani antagonistik bir etkileşim içerisinde olduklarını düşündürmektedir. Böyle bir antagonizm, hücrelerin cytokine bağlı sinyal yollarındaki karmaşık düzenlemeler nedeniyle ortaya çıkabilir; bu da kombinasyon tedavisinin tek başına uygulamalardan farklı ve beklenmedik moleküler sonuçlar doğurabileceğini göstermektedir. Erken dönemde Parasetamol'un pro-inflamatuar etkisi baskınken, uzun dönemde Sorafenib'in TNF- α düzeylerini yükselttiği; ancak kombinasyonun bu etkileri azaltarak hücrelerin TNF- α kaynaklı sinyalizasyon yollarında bir çeşit denge veya baskılama mekanizması oluşturduğu sonucuna varılabilir (Şekil 4.8).

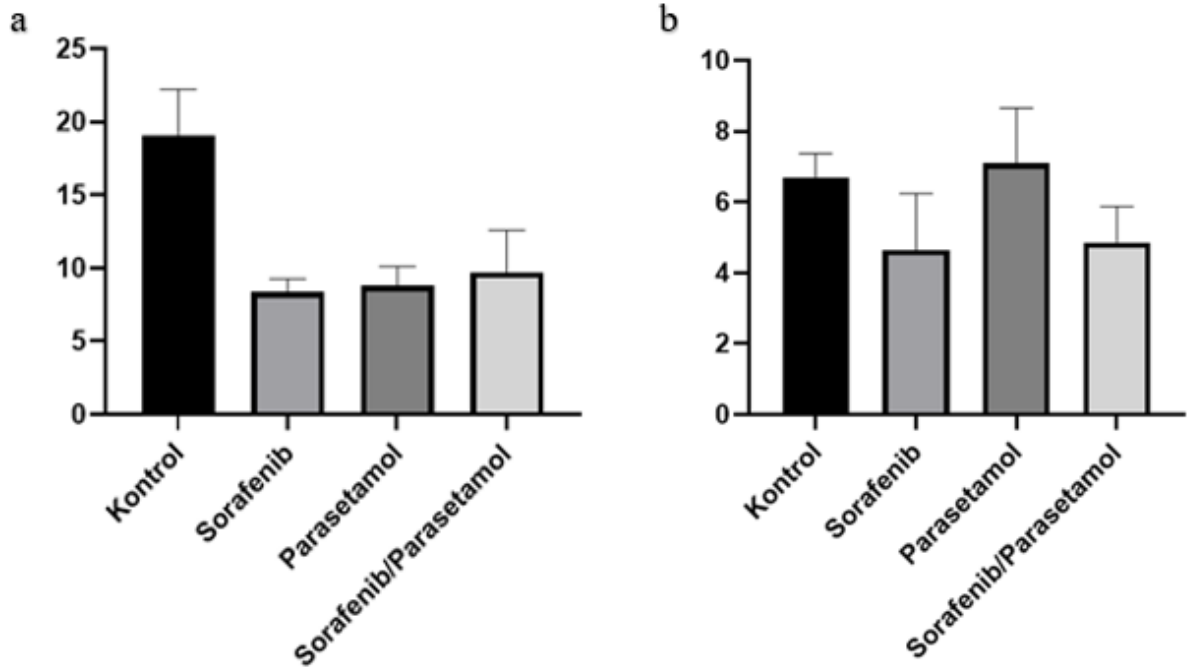
4.5 ELISA Yöntemi ile Protein Düzeyi Sonuçları

24 saatlik uygulama sonuçları değerlendirildiğinde Sorafenib uygulanan grupta, bax protein ekspresyon düzeyinde belirgin bir artış görülmüştür. Parasetamol grubu, Sorafenib'e kıyasla daha düşük düzeyde Bax ekspresyonuna sahipken, kombinasyon sonuçlarının Bax ekspresyon düzeylerini Parasetamol grubuna göre anlamlı bir şekilde artırdığı tespit edilmiştir. Parasetamol tek başına uygulandığında görülen Bax düzeylerinin üzerine çıkarak, bu proteinin ekspresyonunu anlamlı biçimde yükseltmesi, iki ilacın erken dönemde Bax aracılı apoptotik süreçler üzerinde sinerjistik veya en azından destekleyici bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. 48 saatlik uygulama sonuçlarına göre ise tüm uygulama gruplarının Bax protein ifade düzeyleri kontrol grubunun oldukça altında kalmıştır. Bu düşüş, uzun süreli uygulamalarda hücrelerin Bax ekspresyonunu baskılayarak apoptotik sinyal yolağı aktivasyonunu azaltabileceğini veya alternatif hücre yaşamsallığı mekanizmalarını devreye soktuğunu düşündürmektedir. Yani, zaman ilerledikçe hücrelerde Bax proteininin düzenlenmesi üzerinde farklı mekanizmalar etkili olmaya başlamış olabilir. Bu azalma, hücrelerin tedaviye adaptasyonunu veya direnç geliştirme süreçlerini yansıtabilir ve tedavinin uzun vadeli etkinliğini sınırlayabilir. (Şekil 4.9).



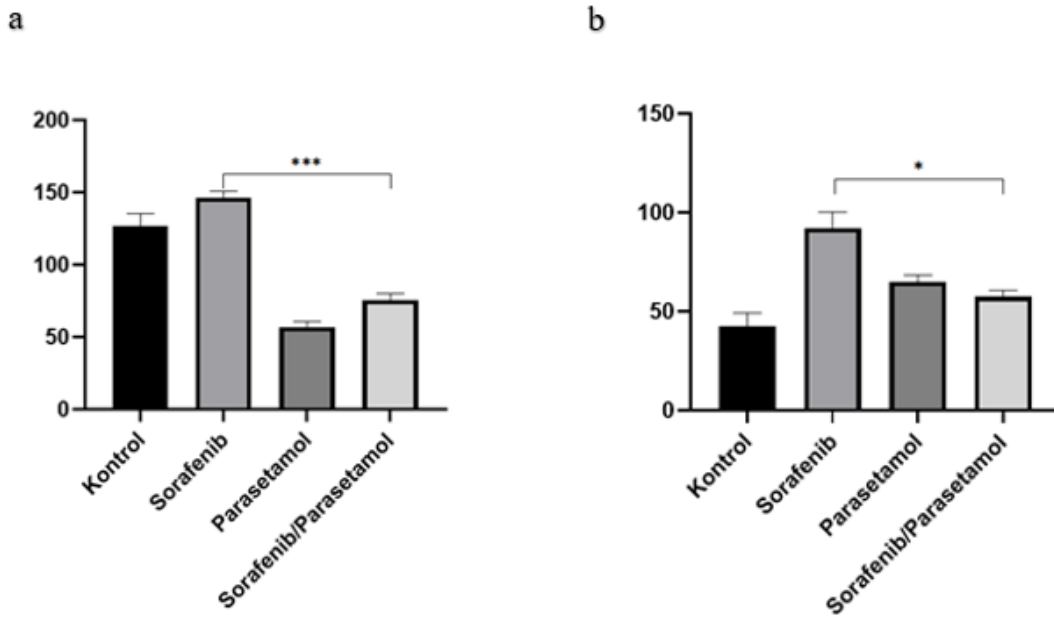
Şekil 4.9 Bax protein ekspresyonu düzeyleri (a:24 b:48 saatlik).

24 saatlik uygulama sonuçları incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla diğer uygulamalarda Bcl-2 seviyesinde düşüş görülürken en belirgin düşüş Sorafenib'te tespit edilmiştir. Bcl-2 proteini, hücrelerde apoptozu engelleyen anti-apoptotik bir molekül olması nedeniyle, bu proteindeki düşüş hücrelerin apoptotik sürece daha yatkın hale geldiğini ve tedaviye olumlu yanıt verdiğini göstermektedir. Sorafenib'in özellikle bu proteinin seviyesini düşürmesi, ilacın kanser hücrelerinde hücre ölümünü teşvik eden etkilerinden biri olarak değerlendirilebilir. 48 saatlik çalışma sonuçları incelendiğinde ise kontrol grubuna kıyasla Sorafenib ve kombinasyon uygulamalarında düşüş görülmüş olup bu durum Parasetamol'un uzun süreli uygulamasında Bcl-2 seviyesinde kısmi bir artışa sebep olsa da bu artış, hücrelerin apoptotik baskıya karşı direnç mekanizmalarını harekete geçirdiği ve böylece hayatta kalma sinyallerinin güçlendiği şeklinde yorumlanabilir. Ancak hem Sorafenib'in hem de Parasetamol ile birlikte uygulandığında bu proteindeki baskılayıcı etkinin devam etmesi, bu tedavi stratejilerinin uzun süreli uygulamalarda da hücrelerin yaşamsallığını olumsuz etkilediğini göstermektedir (Şekil 4.10).



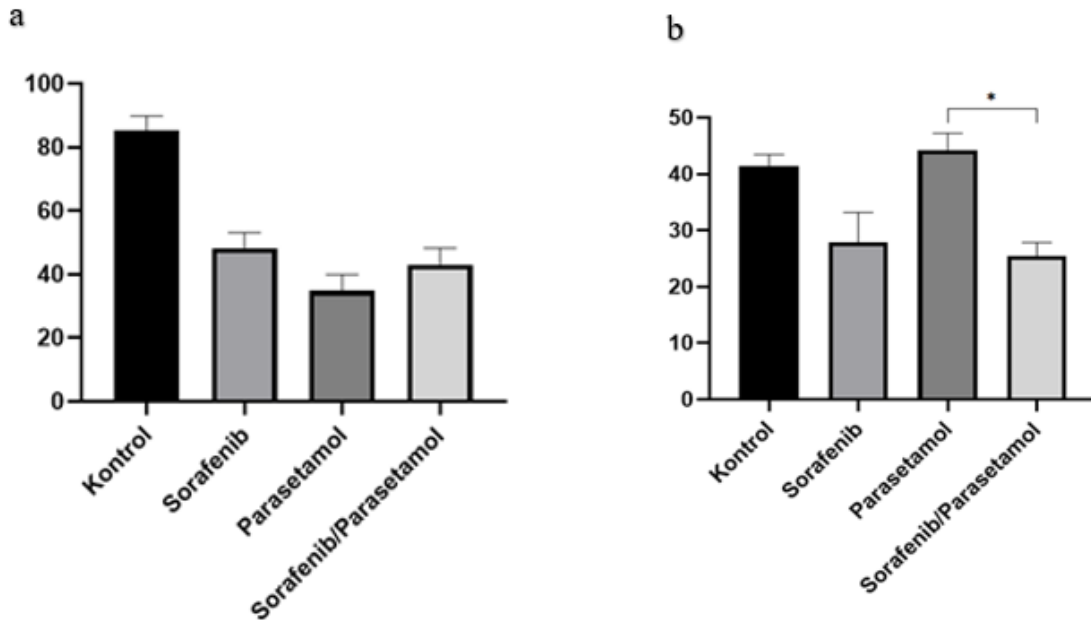
Şekil 4.10 Bcl-2 protein ekspresyon düzeyleri (a:24 b:48 saatlik).

24 saatlik uygulama verilerinde kontrol grubuna kıyasla Sorafenib uygulamasında Kaspaz-3 ekspresyon düzeyinde belirgin bir artış görülürken, Parasetamol ve kombinasyon gruplarında bu seviyenin daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda kombinasyon uygulamasının Sorafenib uygulamasına kıyasla Kaspaz-3 protein ekspresyonu açısından antagonistik etki yarattığı söylenebilir. Kaspaz-3, hücrelerde apoptozun anahtar enzimlerinden biri olup, ekspresyon seviyesindeki yükseliş apoptotik süreçlerin aktive olduğunu ve hücre ölümünün tetiklendiğini göstermektedir. Ancak, Parasetamol ve özellikle Parasetamol ile Sorafenib kombinasyonunun uygulandığı gruplarda, Kaspaz-3 ekspresyon düzeylerinin Sorafenib grubuna göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durum, kombinasyon tedavisinin kısa süreli uygulamasında Sorafenib'in pro-apoptotik etkisini kısmen baskılayarak antagonistik bir etkileşim oluşturduğunu düşündürmektedir. 48 saatlik uygulama verilerine göre Kaspaz-3 protein ekspresyonu Sorafenib uygulamasında kontrol grubuna kıyasla artış göstermiş diğer uygulama grupları ise kontrol grubundan fazla olsa da Sorafenib uygulaması kadar yüksek bulunmamıştır. Parasetamol ve kombinasyon gruplarındaki Kaspaz-3 ekspresyonları kontrol grubundan yüksek olmakla birlikte, Sorafenib grubundaki kadar güçlü bir artış göstermemiştir. Bu durum, zaman ilerledikçe Parasetamol ve kombinasyon tedavisinin apoptotik süreçler üzerindeki etkisinin artabileceğini, ancak tek başına Sorafenib'in bu alandaki etkisinin daha baskın kaldığını göstermektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 Kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyleri (a:24 b:48 saat).

24 saatlik uygulamada, tüm gruplar Tnf- α düzeyini kontrol grubuna göre belirgin şekilde düşürmüş olup istatistiksel olarak bu düşüşler herhangi bir anlam ifade etmemiştir. 24 saatlik kısa süre zarfında tedavi gruplarının TNF- α üzerindeki etkisinin net ve keskin bir farklılık yaratmadığı söylenebilir. Bu durum, erken dönemde hücrelerin TNF- α üretiminde büyük değişikliklere gitmediği ya da tedaviye yanıtın henüz tam olarak gelişmediği şeklinde yorumlanabilir. 48 saatlik uygulamada ise kontrol grubuna kıyasla benzer şekilde Sorafenib ve kombinasyon grupları, Tnf- α düzeyini belirgin şekilde düşürmüş ancak tek başına Parasetamol uygulaması kontrol grubundan daha yüksek protein seviyesine ulaşmıştır. Bu da 48 saatlik sürede sorafenibin Tnf- α üzerindeki baskılayıcı etkisinin sürdüğünü göstermektedir. Bu sonuçlar, Sorafenib'in tek başına ve Parasetamol ile birlikte uygulandığında TNF- α ekspresyonunu etkili biçimde baskılayabildiğini göstermektedir. TNF- α , hücrelerin inflamatuvar yanıt ve apoptoz süreçlerinde merkezi bir rol oynayan bir sitokindir ve bu proteinin baskılanması, ilacın inflamasyon ve hücre ölümü mekanizmalarını düzenleyerek tedavi etkinliğine katkı sağlayabilir. Özellikle Sorafenib'in bu baskılayıcı etkisi, kanser hücrelerinde inflamasyon kaynaklı hücre yaşaması sinyallerini azaltarak hücre ölümünü destekleyici bir etki yaratmaktadır. (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 TNF- α protein ekspresyonu düzeyleri (a:24 b:48 saat)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada HCC olarak kullanılan HepG2 hücre hattı üzerinde, yaygın bir analjezik olan Parasetamol ile standart antikanser ajanlardan biri olan Sorafenib'in hem tek başlarına hem de kombinasyon şeklinde uygulandıklarında hücre canlılığı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Hücre canlılık analizleri 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi boyunca MTT testi kullanılarak gerçekleştirilmiş hem zamana hem de doza bağlı olarak hücre canlılık oranlarındaki değişiklikler analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular, her iki bileşiğin de belirli konsantrasyonlarda sitotoksik etki oluşturduğunu ve kombinasyon halinde uygulandıklarında bu etkinin daha da güçlendiğini göstermektedir.

Parasetamol, terapötik dozlarda güvenli kabul edilmekle birlikte yüksek dozlarda ciddi hepatotoksisiteye neden olabilmektedir. Bu toksik etki özellikle karaciğer hücreleri üzerinde belirginleşmekte olup oksidatif stres, glutatyon tükenmesi ve mitokondriyal disfonksiyon gibi mekanizmalar üzerinden etkisini göstermektedir. Tez çalışmamızda da, düşük doz olan 1 mM'lık Parasetamol'ün 24 saatlik uygulama sonrası canlılık oranında hafif bir düşüş gözlenmişken, 5 ve 10 mM dozlarında canlılık oranlarında anlamlı azalmalar tespit edilmiştir. Bu çalışmadaki sonuçlar, McGill vd. (2012) ve James vd. (2003) gibi araştırmacıların yürüttüğü çalışmalarda bildirilen Parasetamol'e bağlı mitokondriyal hasar ve oksidatif stres mekanizmalarını desteklemektedir. Özellikle 10 mM dozda 48 saat sonunda canlılık oranının %20'nin altına düşmesi, bu molekülün yüksek konsantrasyonlarda belirgin sitotoksisiteye yol açtığını göstermektedir.

Sorafenib ise, HCC tedavisinde FDA onaylı bir multikinaz inhibitörü olup, özellikle RAF/MEK/ERK yolakları üzerinden antiproliferatif etki göstermektedir. Bu çalışmada, 1-100 µM arasında uygulanan dozlar sonrası özellikle 10-15 µM konsantrasyonları ile canlılık oranlarının %50'nin altına düştüğü gözlemlenmiş ve IC₅₀ değerinin 20 µM olarak belirlenmiştir. Bu bulgu ise Llovet vd. (2008) tarafından bildirilen Sorafenib'in HCC üzerindeki antitümöral etkileriyle tutarlıdır. Ayrıca, Wilhelm vd. (2004) çalışması da Sorafenib'in *in vitro* ortamlarda doza bağlı sitotoksik etki gösterdiğini doğrulamaktadır. Kombinasyon uygulamalarında ise Parasetamol ve Sorafenib'in birlikte kullanımı sonucunda, özellikle yüksek Parasetamol dozlarında (10 mM), hücre canlılık oranının azaldığı görülmüştür. 48 saatlik inkübasyon sonunda bu kombinasyonda hücre canlılığı

%9 seviyesine kadar gerilemiş olup bunun da sinerjistik bir etki oluşturduğu düşünülmektedir. Bu durum, Parasetamol'ün karaciğer hücrelerinde mitokondriyal fonksiyonları zayıflatması ve glutatyon depolarını tüketmesiyle ilişkili olabileceğini ve bu etkilerin, Sorafenib'in mitokondriyal membran potansiyelini hedef almasıyla birleşerek hücrelerde daha fazla hasar yaratmış olabileceğini düşündürmüştür. Du vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada da, hücre içi glutatyon düzeylerinin düşürülmesinin kemoterapötik ilaçların toksisitesini artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, Wang vd. (2019) tarafından yapılan bir *in vitro* çalışmada, kanser dışı ajanları ile antikanser ilaçların kombinasyonunun hücre stresini artırarak hücre ölüm oranını yükselttiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada benzer yönde bulgular sunmaktadır.

Bu tez kapsamında yürütülen MTT analizleri, Parasetamol'ün yüksek dozlarda HepG2 hücrelerinde belirgin sitotoksikite oluşturduğunu ve Sorafenib ile birlikte kullanıldığında bu etkinin daha da arttığını ortaya koymuştur. Hücre canlılığındaki düşüşler, hem doza hem de inkübasyon süresine bağlı olarak artmış, özellikle 48 saatlik sürelerde belirginleşmiştir. Bu bulgular, bizlere Parasetamol gibi yaygın kullanılan farmasötik ajanların kemoterapötik ilaçlarla birlikte kullanımında dikkatli olunması gerektiğini vurgulamakta; kombinasyon tedavilerinin sinerjistik ya da toksik etkilerinin önceden değerlendirilmesinin önemini ortaya koymaktadır. Elde edilen veriler, ileride yapılacak olan moleküler analizler, farklı gen ekspresyon çalışmaları ve oksidatif stres belirteçlerinin incelenmesi ile daha ayrıntılı olarak değerlendirilebilir. Bu yönüyle yapılan tez çalışmamızda, antikanser tedavi yaklaşımlarında ilaç etkileşimlerinin göz önünde bulundurulması gerektiğine dikkat çekmekte ve farmakolojik kombinasyonların hücre düzeyindeki etkilerinin detaylı biçimde incelenmesine katkı sağlamaktadır.

Komet çalışmasında ise HepG2 hücre hattında Sorafenib ve Parasetamol'ün tek başlarına ve kombinasyon halinde uygulanmasıyla meydana gelen DNA hasarları, Komet testi ile değerlendirilmiştir. Komet test sonuçları, genotoksik etkilerin zamana ve kullanılan dozlara bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini açıkça ortaya koymuştur. Elde edilen bulgulara göre en yüksek DNA hasarı, 48 saatlik uygulamada yalnızca Sorafenib (20 μ M) uygulanmış hücrelerde (25.33 ± 4.16) gözlenmiş, bu değere en yakın hasar ise aynı süre boyunca Sorafenib ve Parasetamol kombinasyonu (23.33 ± 1.15) uygulanan hücrelerde tespit edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonda ise genotoksikite en düşük seviyede (6.00 ± 2.65)

yalnızca 5 mg/mL Parasetamol uygulanmış hücrelerde saptanmıştır. Bu sonuçlar, Sorafenib'in genotoksik bir bileşik olduğunu desteklemekte olup, literatürdeki pek çok çalışmayla paralellik göstermektedir. Örneğin, Abdel-Rahman vd (2022), Sorafenibin HepG2 hücrelerinde DNA iplikçiklerinin kopmasına neden olarak apoptoz mekanizmasını aktive ettiğini ve genotoksik potansiyel taşıdığını belirtmiştir. Benzer şekilde Zhang vd (2020), Sorafenib'in doza bağımlı olarak DNA bütünlüğünü bozduğunu ve reaktif oksijen türlerini (ROS) artırarak oksidatif strese yol açtığını ifade etmiştir. Bu bağlamda, mevcut çalışmamızda elde edilen veriler, Sorafenib'in genetik materyal üzerinde ciddi düzeyde hasara neden olabileceğini göstermektedir.

Parasetamol'un genotoksik etkilerine dair literatürdeki bazı veriler ise daha çelişkilidir. Bazı çalışmalar, yüksek dozlarda Parasetamol'un DNA hasarına yol açabileceğini, ancak bu etkinin çoğunlukla metabolitlerine bağlı olarak ortaya çıktığını öne sürmektedir (James vd 2003). Nitekim, çalışmamızda da Parasetamol tek başına uygulandığında özellikle 24 saatlik sürede DNA hasarının oldukça düşük olduğu (6.00 ± 2.65) gözlemlenmiştir. Ancak 48 saatlik uygulamada hasarın (12.00 ± 6.24) arttığı saptanmış, bu da ilacın süresi ve dozuyla ilişkili olarak genotoksik etkiler oluşturabileceğine ve süre uzadıkça etkinin değiştiğine işaret etmektedir.

İlginç bir bulgu ise, Sorafenib ve Parasetamol kombinasyonlarının, her ne kadar hasarı artırsa da, tek başına Sorafenib uygulamasına kıyasla DNA hasarını kısmen azaltmasıdır. Bu durum, Parasetamol'un antioksidan özellikleri sayesinde ROS oluşumunu azaltarak Sorafenib kaynaklı oksidatif DNA hasarını hafiflettiğini düşündürmektedir. Bu yönde, Ho vd. (2010), düşük dozlarda Parasetamol'un hücre içi glutatyon seviyelerini artırarak bazı kemoterapötik ajanların neden olduğu oksidatif stresi sınırlandırabileceğini bildirmiştir. Dolayısıyla bu sonuçlar, Parasetamol'un potansiyel bir koruyucu ajan olarak Sorafenib'in genotoksik etkilerini modüle edebileceğini göstermektedir. Ancak bu durumun doğruluğu, doz-zaman etkileşimi ve mekanistik düzeyde yapılacak ileri araştırmalarla netlik kazanabilir. Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen Komet testi bulguları, Sorafenib'in HepG2 hücrelerinde belirgin genotoksik etkiler oluşturduğunu, Parasetamol'un ise süre ve doza bağlı olarak bu etkiyi hafifletme potansiyeline sahip olabileceğini göstermiştir. Kombinasyonların oluşturduğu DNA hasarı, klinik tedavi yaklaşımlarında bu iki ilacın birlikte kullanımının genetik stabilite üzerindeki potansiyel

etkileri açısından dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, özellikle karaciğer kanseri tedavisinde farmakolojik kombinasyon stratejilerinin hem terapötik etkinlik hem de genotoksosite açısından dikkatli bir şekilde planlanması gerektiğini göstermektedir. HepG2 hücre hattında 24 ve 48 saatlik Sorafenib ve Parasetamol kombinasyonlarının etkileri, apoptotik ve inflamatuvar süreçlerde görev alan BAX, BCL-2, CASPASE-3 VE TNF-A genlerinin ekspresyon düzeyleri incelenerek değerlendirilmiştir. Elde edilen qRT-PCR verileri doğrultusunda, her iki sürede de gen ekspresyonlarında anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. Özellikle BAX ve CASPASE-3 gibi pro-apoptotik genlerin ekspresyonundaki artışlar, uygulanan ajanların hücre ölümü mekanizmaları üzerindeki etkilerini ortaya koyarken; BCL-2 gibi anti-apoptotik genlerdeki değişimler bu sürecin nasıl düzenlendiğini anlamak açısından kritik öneme sahiptir. BAX gen ekspresyonu açısından değerlendirildiğinde, her iki sürede de Parasetamol'un tek başına Sorafenib'den daha yüksek ekspresyon düzeyine neden olduğu, özellikle 48 saatlik uygulamada kombinasyon grubunun daha da yüksek ekspresyon sergilediği tespit edilmiştir. Bu bulgu, tedavi süresi uzadıkça Parasetamol'un apoptotik süreçlerde Sorafenib ile sinerjistik bir etkileşim içine girdiğini göstermektedir. Literatürde yapılan benzer bir çalışmada, Yang vd. (2021), HepG2 hücrelerinde Sorafenib uygulamasının mitokondriyal yolda yer alan BAX gen ekspresyonunu artırarak hücreleri apoptoza sürüklediğini, bu etkinin ise tedavi süresiyle birlikte daha belirgin hale geldiğini bildirmiştir. Bununla birlikte Parasetamol'un yüksek dozda mitokondriyal disfonksiyona yol açarak sitokrom C salınımı üzerinden BAX aktivasyonunu artırabildiği de James vd. (2003) tarafından gösterilmiştir. Çalışmamızın sonuçları da, özellikle uzun süreli kombinasyon tedavisinin BAX ekspresyonu üzerinde sinerjistik bir artışa yol açtığını desteklemektedir.

BCL-2 genine ait bulgular, kombinasyon tedavisinin özellikle 24 saatlik uygulamada ekspresyon düzeyini baskılayarak anti-apoptotik yanıtı zayıflattığını göstermiştir. Bu durum, apoptozis lehine dengenin kaydığını ortaya koymaktadır. Ancak 48 saatlik sürede kombinasyon grubunda BCL-2 ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Bu bulgu, uzun süreli uygulamalarda hücrelerin apoptotik baskıyı dengelemek amacıyla anti-apoptotik yanıt geliştirme eğiliminde olabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde El-Serag vd. (2020), HCC BCL-2 ekspresyonunun, kemoterapötik ajanlara karşı geliştirilen direnç mekanizmalarında önemli bir rol oynadığını ve zamanla bu genin dengeleyici şekilde

aktive olabileceğini belirtmiştir. Dolayısıyla, bu çalışmada 48 saatlik kombinasyon tedavisinde artan BCL-2 ekspresyonu, apoptotik sürece karşı gelişen hücre adaptasyonunun bir yansıması olarak öngörülmektedir. KASPAZ-3, apoptotik hücre ölümünün en önemli efektör enzimlerinden biridir ve bu çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda, 24 saatlik sürede Parasetamol uygulamasının en yüksek KASPAZ-3 ekspresyonuna neden olduğu, kombinasyonun ise bu etkinin altında kaldığı görülmüştür. Buna karşın 48 saatlik sürede kombinasyon grubunun KASPAZ-3 ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı, bu durumun apoptotik sürecin ilerlemesiyle ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir. Chen vd. (2019), kaspaz 3'ün özellikle uzun süreli stres yanıtlarında daha belirgin şekilde aktive olduğunu ve bu durumun apoptotik sürecin terminal aşamasını temsil ettiğini belirtmiştir. Bu bağlamda, 48 saatlik tedaviyle birlikte kombine uygulamanın KASPAZ-3 aktivitesini artırması, terapötik etkinliğin zamanla güçlendiğini ve apoptotik yıkımın hızlandığını ve bu durumun zamana bağlı olduğunu göstermektedir.

TNF- α gen ekspresyonuna dair bulgular ise daha karmaşık bir çizelge sunmaktadır. 24 saatlik uygulamalarda Parasetamol grubunun gen ekspresyonunun daha yüksek olduğu, kombinasyon grubunun ise daha düşük ekspresyon sergilediği görülmüştür. 48 saatlik sonuçlarda ise Sorafenib'in tek başına TNF- α ekspresyonunu en yüksek düzeyde artırdığı, kombinasyon uygulamasında ise bu ekspresyonun düştüğü tespit edilmiştir. Bu durum, TNF- α ekspresyonunun tedavi süresi ve ilaç etkileşimine oldukça duyarlı olduğunu göstermektedir. Wang vd. (2017), TNF- α 'nın hem apoptotik hem de inflamatuvar süreçlerde rol aldığını, özellikle Sorafenib gibi kinaz inhibitörlerinin bu genin ekspresyonunu farklı şekillerde etkileyebileceğini ifade etmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada Sorafenib ve Parasetamol kombinasyonunun apoptotik ve inflamatuvar genlerin ekspresyonu üzerinde zamana bağlı olarak değişen, bazen sinerjistik bazen ise antagonistik etkileşimler gösterdiği ortaya konmuştur. Özellikle 48 saatlik inkübasyonda kombine uygulamanın BAX ve KASPAZ-3 genlerinde belirgin artışlara yol açması, bu tedavi stratejisinin apoptotik hücre ölümü üzerindeki potansiyel etkinliğini artırabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, karaciğer kanseri tedavisinde ilaç kombinasyonlarının sadece sitotoksik değil, aynı zamanda moleküler düzeyde hedeflenmiş etkiler oluşturabileceğini ortaya koymaktadır. Gelecekte yapılacak daha detaylı çalışmalarla, bu genetik yanıtların mekanistik temellerinin açığa çıkarılması, daha

etkili ve güvenli kemoterapötik protokollerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Bu çalışmada, HepG2 hücre hattında Sorafenib ve Parasetamol'ün tekil ve kombinasyon halinde uygulanmasının apoptotik ve inflamatuvar yanıt üzerine etkileri, hem gen hem de protein düzeyinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde değerlendirilmiştir. BAX, BCL-2, KASPAZ-3 VE TNF- α gibi apoptoz ve inflamasyonla ilişkili anahtar genlerin ekspresyon seviyeleri qPCR ile analiz edilerek gen ifade düzeyleri belirlenmiştir.

BAX gen ve Bax protein ekspresyonları açısından değerlendirildiğinde, 24 saatlik uygulamada Sorafenib'in tek başına uygulandığı grupta belirgin bir artış gözlenmiş, bu durum önceki çalışmalarla paralellik göstermiştir. Zhang vd. (2017), özellikle, Sorafenib'in apoptotik mekanizmaları BAX üzerinden aktive ettiği pek çok çalışmada vurgulanmıştır. Ancak 48 saatlik uygulama sonuçlarında tüm gruplarda protein düzeylerinin kontrol grubunun altında kalması, uzun süreli etkileşimlerde kompanzatuvar mekanizmaların devreye girebileceğini düşündürmektedir. İlginç biçimde, qPCR verileri gen düzeyinde özellikle kombinasyon grubunda BAX ekspresyonunun arttığını göstermiştir.

Liu vd. (2018), Bcl-2 ekspresyonları hem gen hem protein düzeyinde incelendiğinde, Sorafenib'in anti-apoptotik bir gen olan BCL-2'Yİ baskıladığı net olarak ortaya konmuştur. Bu sonuçlar, Sorafenib'in intrinsik apoptoz yolunu aktive ederek BCL-2'yi inhibe ettiği literatürde daha önce de rapor edilmiştir. Bununla birlikte, Parasetamol'ün 48 saatlik uygulamasında BCL-2 gen ekspresyon seviyesinde kısmi bir artış gözlenmiştir. Kombinasyon grubunda 24 saatlik sürede baskılama etkisinin daha güçlü olması, ilaçlar arası kısa süreli sinerjistik veya antagonistik etkileşimleri olabileceği durumunu gündeme getirmektedir. Kaspaz-3, hücrelerin apoptoza girmesinde önemli rol oynayan yürütücü kaspazlardan biridir. Bulgular, 24 saatlik süreçte Sorafenib'in bu proteinin ekspresyonunu artırdığını, ancak Parasetamol'ün bu etkiyi baskıladığını göstermektedir. Bu durum, Parasetamol'ün kısa sürede Sorafenib'in apoptotik etkisini antagonize edebileceğini düşündürmektedir. Ancak 48 saatlik kombinasyon uygulamasında gen ekspresyonunun artması, sinerjistik bir yanıtı destekler niteliktedir. TNF- α gen ve protein düzeylerinde ise özellikle Sorafenib'in baskılayıcı etkisi açıkça görülmüştür. TNF- α , hem inflamatuvar hem de apoptozla ilişkili ikili fonksiyona sahip olup, hücre tipine ve uyarana göre farklı yolları aktive edebilmektedir. Bu çalışmada, özellikle 48 saatlik süreçte

Sorafenib'in TNF- α ekspresyonunu hem gen hem protein düzeyinde düşürmesi, Sun vd. (2017) TNF- α anti-inflamatuvar potansiyelini ve NF- κ B sinyal yolları üzerindeki etkisini göstermişlerdir. Genel olarak değerlendirildiğinde, Parasetamol ve Sorafenib'in kombinasyon halinde kullanımının, özellikle 48 saatlik inkübasyon süresinden sonra apoptotik yanıtı artırmakta olduğu görülmüştür. Bu çalışma, özellikle HCC tedavisinde Sorafenib ve Parasetamol kombinasyonunun olası etkilerini hem moleküler hem de protein düzeyinde ortaya koyarak, gelecekteki tedavi stratejileri için önemli veriler sunmaktadır. Ancak, bu sonuçların daha ileri *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi, farmakokinetik ve toksikolojik etkilerin kapsamlı bir şekilde analiz edilmesi gerekmektedir. Özellikle Parasetamol'un uzun süreli kullanımda olası hepatotoksik etkileri zamana bağlı şekilde göz önünde bulundurularak, bu kombinasyonun klinik öncesi değerlendirmesi titizlikle yapılmalıdır.

6. KAYNAKLAR

- Abdel-Rahman O, 2022, *Sorafenib-induced genotoxicity and its modulation in hepatocellular carcinoma models*, Journal of Oncology Research, 16(3), 145–153.
- Adams J M, Cory S, 2007, *The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy*, Oncogene, 26(9), 1324–1337.
- Aden T J, et al., 2015, *The HepG2 cell line: A model for human liver cancer*, Cellular Oncology, 38(3), 169–175.
- Aggarwal B B, 2003, Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword, Nature Reviews Immunology, 3(9), 745–756.
- Akmehmet A, 2020, *Bipolar bozukluk tedavisinde kullanılan lityumun Comet Assay ile genotoksisite açısından in vivo ve in vitro değerlendirilmesi*, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 9s, Rize.
- Alley M C, et al, 1988, Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, Cancer Research, 48(3), 589–601.
- Ashkenazi A, 2002, *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily*, Nature Reviews Cancer, 2(6), 420–430.
- Ashkenazi A, Dixit V M, 1998, *Death receptors: Signaling and modulation*, Science, 281(5381), 1305–1308.
- Balkwill F, 2009, Tumour necrosis factor and cancer, Nature Reviews Cancer, 9(5), 361–371.
- Balogh J, et al, 2016, *Hepatocellular carcinoma: A review*, Journal of Hepatocellular Carcinoma, 3, 41–53.
- Berridge M V, Herst P M, Tan A S, 2005, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction, Biotechnology Annual Review, 11, 127–152.
- Bradford M M, 1976, *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Analytical Biochemistry, 72(1–2), 248–254.

- Bruix J, Reig M, Sherman M, 2016, *Evidence-based diagnosis, staging, and treatment of patients with hepatocellular carcinoma*, *Gastroenterology*, 150(4), 835–853. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.12.041>
- Bruix J, Sherman M, 2011, *Management of hepatocellular carcinoma: An update*, *Hepatology*, 53(3), 1020–1022.
- Buehler C, Rossmann C, Wölfling J, 2016, Acetaminophen and Cancer: From Epidemiology to Experimental Evidence, *Frontiers in Pharmacology*, 7, 372.
- Chao D T, Korsmeyer S J, 1998, BCL-2 family: Regulators of cell death, *Annual Review of Immunology*, 16, 395–419.
- Chen X, Guo C, Kong J, 2019, Oxidative stress in neurodegenerative diseases and the role of antioxidant therapy, *Frontiers in Neuroscience*, 13, 1024.
- Cheng A L, et al, 2009, *Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: A phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial*, *The Lancet Oncology*, 10(1), 25–34.
- Chomczynski P, Sacchi N, 1987, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*, *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159.
- Cory S, Adams J M, 2002, *The Bcl2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch*, *Nature Reviews Cancer*, 2(9), 647–656.
- Coussens L M, Werb Z, 2002, Inflammation and cancer, *Nature*, 420(6917), 860–867.
- Crowther J R, 2009, *The ELISA Guidebook* (2nd ed.), Humana Press.
- Denizot F, Lang R, 1986, *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*, *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271–277.
- Donato M T, et al, 2008, *Cell lines: A tool for in vitro drug metabolism studies*, *Current Drug Metabolism*, 9(1), 1–11.
- Du K, Ramachandran A, Jaeschke H, 2014, Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential, *Redox Biology*, 3, 127–143.

- Earnshaw W C, Martins L M, Kaufmann S H, 1999, Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis, *Annual Review of Biochemistry*, 68(1), 383–424.
- Elmore S, 2007, *Apoptosis: A review of programmed cell death*, *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- El-Serag H B, et al., 2020, Resistance to apoptosis in hepatocellular carcinoma: Role of Bcl-2 family proteins, *Liver International*, 40(5), 1093–1104.
- El-Serag H B, Rudolph L, 2016, *Epidemiology of hepatocellular carcinoma*, *Gastroenterology*, 150(1), 150–165.
- Escudier B, et al, 2017, Renal cell carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, *Annals of Oncology*, 28(4), 29–44.
- Fan W, Tang Z Y, Yu Y Q, Wu Z Q, 2005, *Apoptosis and apoptosis-related gene expression in carcinogenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma*, *World Journal of Gastroenterology*, 11(5), 711–717.
- Fang C, Wu X, Wang Y, 2021, *Mechanisms of acetaminophen-induced apoptosis in cancer cells*, *Pharmaceuticals*, 14(3), 236.
- Fausto N, 2000, *Liver regeneration*, *Journal of Hepatology*, 32(1), 19–31.
- Forner A, Reig M, Bruix J, 2018, *Hepatocellular carcinoma*, *The Lancet*, 391(10127), 1301–1314.
- Fulda S, Debatin K M, 2006, *Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy*, *Oncogene*, 25(34), 4798–4811.
- Gasimzade N, 2024, *Çip üzerinde karaciğer kanseri platformunda ilaca bağlı karaciğer endotel hasarının incelenmesi*, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Gravitz L, 2014, *Liver cancer*, *Nature*, 516(7529), 1-3.
- Guyton A C, Hall J E, 2006, *Textbook of Medical Physiology*, Elsevier, 1-11
- Ho Y S, et al, 2010, Protective effects of acetaminophen on ROS-induced DNA damage, *Free Radical Biology & Medicine*, 49(2), 271–278.

- Ho Y S, Yang X, Yeung S C, Chiu T H, Chow B K, 2010, Protective effects of acetaminophen on ROS-induced DNA damage, *Free Radical Biology & Medicine*, 49(2), 271–278.
- Hotchkiss R S, Strasser A, McDunn J E, Swanson P E, 2009, Cell death, *New England Journal of Medicine*, 361(16), 1570–1583.
- Hughes B, Heddle J A, Huber W, 2016, The Comet Assay: A Comprehensive Review of DNA Damage Assessment Techniques, *Nature Protocols*, 11(10), 1711–1732.
- Jaeschke H, McGill M R, Ramachandran A, 2012, Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity, *Drug Metabolism Reviews*, 44(1), 88–106.
- James L P, Mayeux P R, Hinson J A, 2003, *Acetaminophen-induced hepatotoxicity*, *Drug Metabolism and Disposition*, 31(12), 1499–1506.
- Jiang Y, et al, 2018, Limitations of the HepG2 cell line as a model for hepatocellular carcinoma, *Scientific Reports*, 8, 17323.
- Johnson M, Peterson A, 2023, *Genetic and epigenetic factors in liver cancer development*, *Cancer Research*, 83(1), 45–59.
- Kearns G L, et al, 2020, Developmental pharmacology of acetaminophen: Implications for therapy, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 107(2), 425–435.
- Kraft V, Cossais F, Monnoyer R, Schmutzler A, 2015, Investigating the potentiating effects of paracetamol in conjunction with anticancer agents, *Journal of Oncology Research*, 10(1), 123–128.
- Kudo M, 2020, *Hepatocellular carcinoma: Current management and future directions*, *Hepatology Research*, 50(3), 1–16.
- Kumar V, et al., 2017, *Characterization of HepG2 cells for liver cancer research*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 616–622.
- Lee S, Wang Y, 2024, *Chronic viral hepatitis and liver cancer: A review*, *Hepatology Reviews*, 42(4), 345–360.
- Li J, Yuan J, 2008, Caspases in apoptosis and beyond, *Oncogene*, 27(48), 6194–6206.

- Li P, et al., 1997, Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell*, 91(4), 479–489.
- Li Y, Zhu W G, 2013, TNF- α signaling in cancer: The importance of context, *Journal of Hematology & Oncology*, 6, 133.
- Liu L, et al, 2006, Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma models, *Cancer Research*, 66(24), 11851–11858.
- Liu L, et al, 2018, Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma, *Journal of Clinical Oncology*, 24(26), 3781–3789.
- Llovet J M, et al, 2008, *Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma*, *New England Journal of Medicine*, 359(4), 378–390.
- Llovet J M, Montal R, Sia D, Finn R S, 2018, *Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma*, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(10), 599–616.
- Llovet J M, Ricci S, Mazzaferro V, et al, 2008, Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma, *New England Journal of Medicine*, 359(4), 378–390.
- Llovet J M, Villanueva A, Finn R S, 2021, *Recent developments in hepatocellular carcinoma*, *New England Journal of Medicine*, 384(12), 1138–1150.
- McCarthy A L, Jago R, Van de Ven C, 2020, Paracetamol and Cancer: A Review of Clinical Evidence, *Australian Journal of General Practice*, 49(9), 545–550.
- McGill M R, et al, 2012, Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: Comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 264(3), 387–394.
- McGill M R, Jaeschke H, 2013, *Metabolism and disposition of acetaminophen: Recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis*, *Pharmaceutical Research*, 30(9), 2174–2187.
- McGill M R, Williams C D, Xie Y, Ramachandran A, Jaeschke H, 2012, Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: Comparison of protein adducts,

- mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 264(3), 387–394.
- Michaud D S, Platz E A, Giovannucci E, 2014, Acetaminophen use and the risk of prostate cancer, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 23(5), 875–884.
- Miller R, Zhang Y, 2022, *Obesity, diabetes, and liver cancer risk*, *Metabolism*, 71(5), 456–470.
- Mosmann T, 1983, *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*, *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63.
- Nair A, Hande M P, Mani U V, 2018, Standardization of the Comet Assay for Assessment of Genotoxicity in Plant Samples, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 59(8), 635–642.
- Nguyen M H, Keeffe E B, 2009, Screening for hepatocellular carcinoma, *Journal of Clinical Gastroenterology*, 43(5), 395–403.
- Nguyen T, Clark J, 2021, *Alcohol consumption and liver cancer risk*, *Alcohol and Health*, 39(2), 89–102.
- Olive P L, Banáth J P, 2006, The Comet Assay: A Method to Measure DNA Damage in Individual Cells, *Nature Protocols*, 1(1), 23–29.
- Oltvai Z N, Milliman C L, Korsmeyer S J, 1993, *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death*, *Cell*, 74(4), 609–619.
- Ong S B, et al, 2019, Paracetamol to reduce oxidative stress in ischemia-reperfusion injury: A new therapeutic target for cardiovascular disease, *Journal of Clinical Medicine*, 8(12), 2005.
- Patrignani P, Patrono C, 2016, Aspirin and Cancer, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 13(6), 325–339.
- Petrack J L, McGlynn K A, 2019, The changing epidemiology of primary liver cancer, *Current Epidemiology Reports*, 6(2), 104–111.

- Poon R T P, et al, 2021, The histological spectrum of hepatocellular carcinoma: A comprehensive review, *Journal of Clinical Pathology*, 74(2), 105–112.
- Porter A G, Jänicke R U, 1999, *Emerging roles of caspase-3 in apoptosis*, *Cell Death and Differentiation*, 6(2), 99–104.
- Reed J C, 1997, Double identity for proteins of the Bcl-2 family, *Nature*, 387(6635), 773–776.
- Reed J C, 1998, Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: History and future prospects, *Blood*, 111(12), 5436–5446.
- Reed J C, 2006, *Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer*, *Current Opinion in Oncology*, 18(6), 637–642.
- Ryu S H, et al, 2019, *HepG2 cells as a model for studying hepatocellular carcinoma*, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 145(4), 911–922.
- Sakata T, Ishibashi N, Yoshida M, 2013, Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and novel insights for biotherapy, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 14(8), 1373–1378.
- Sambrook J, Russell D W, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schuppan D, Afdhal N H, 2008, *Liver cirrhosis*, *The Lancet*, 371(9615), 838–851.
- Schwartz G K, Shah M A, 2009, Targeting the cell cycle: A new approach to cancer therapy, *Journal of Clinical Oncology*, 23(36), 9408–9421.
- Sherlock S, Dooley J, 2002, *Diseases of the Liver and Biliary System*, Wiley-Blackwell, 5-11.
- Sibulesky L M, 2013, *Normal liver anatomy*, *Clinical Liver Disease*, 2, 1–3.
- Singh N P, McCoy M T, Tice R R, Schneider E L, 1988, *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*, *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191.
- Sun B, Karin M, Jin J, 2017, NF- κ B signaling in liver disease, *Cell Research*, 27(2), 31–45.

- Thornberry N A, Lazebnik Y, 1998, Caspases: Enemies within, *Science*, 281(5381), 1312–1316.
- Tracey D, et al, 2008, Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review, *Pharmacology & Therapeutics*, 117(2), 244–279.
- Vassilev L T, et al, 2004, In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2, *Science*, 303(5659), 844–848.
- Villanueva A, Chiang D Y, Newell P, et al, 2011, Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma, *Gastroenterology*, 140(4), 1417–1426.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P, 2003, Tumor necrosis factor signaling, *Cell Death and Differentiation*, 10(1), 45–65.
- Wang C, Youle R J, Yang Z, 2017, TNF signaling in cell death and inflammation, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(8), a028316.
- Wang W, et al, 2015, Caspase-3 reactivation through caspase-8 restores apoptosis in resistant hepatocellular carcinoma cells, *Oncology Reports*, 34(6), 2840–2846.
- Wang X, Lin Y, 2008, Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes, *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(11), 1275–1288.
- Wang Z, Zhang Y, Gao F, 2019, *Synergistic cytotoxic effects of acetaminophen and chemotherapy drugs in liver cancer cells*, *Toxicology in Vitro*, 54, 215–223.
- Wilhelm S M, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet J M, Lynch M, 2006, *Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis*, *Cancer Research*, 66(24), 11851–11858.
- Wilhelm S M, et al, 2004, BAY 43-9006 exhibits broad-spectrum antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway, *Cancer Research*, 64(19), 7099–7109.
- Wilhelm S M, et al, 2006, Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases, *Cancer Research*, 66(24), 11851–11858.
- Xu W, Wang Y, Li Y, Xu X, 2020, Regulation of Bax gene expression and translocation in cancer: Therapeutic targeting, *Frontiers in Oncology*, 10, 282.

- Yang E, et al, 1997, Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death, *Cell*, 80(2), 285–291.
- Yang L, He S, Zhang Y, Liu J, 2021, Sorafenib induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells by activating the mitochondrial pathway, *Oncology Reports*, 45(1), 234–243.
- Zhang J, et al, 2020, *Targeted therapy in hepatocellular carcinoma: The role of HepG2 cells*, *Frontiers in Oncology*, 10, 212.
- Zhang X, Liu L, Wang Y, 2020, The genotoxic potential of sorafenib through oxidative DNA damage in human hepatoma cells, *Toxicology in Vitro*, 65, 104788.
- Zhang Y, et al, 2020, Targeted therapy in hepatocellular carcinoma: The role of HepG2 cells, *Frontiers in Oncology*, 10, 212.
- Zhang Y, Zhang Q, Xu W, 2017, The apoptosis pathway of liver cancer cells induced by sorafenib, *International Journal of Oncology*, 51(3), 1055–1063.
- Zhu A X, et al, 2011, Effect of everolimus on survival in advanced hepatocellular carcinoma, *Journal of Clinical Oncology*, 29(1), 125–132.
- Zhu X, Trehan R, Xie C, 2024, *Primary liver cancer organoids and their application to research and therapy*, *Journal of the National Cancer Center*, 4(3), 121–128.
- Zhu Y, Zhou Y, Zhu Y, 2024, Exploring TNF- α inhibitors in combination therapies for HCC, *Journal of Hepatology*, 81(3), 480–491.
- Zoncu R, Efeyan A, Sabatini D M, 2011, *mTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing*, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), 21–35.

İnternet Kaynakları

- 1- <http://dergi.tkcvt.org/?view=article&id=22:17-hsk-tani-evreleme-tedavi-2018-aasld&catid=8>, 10.09.2024
- 2- <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1213448/full>,10.09.2024
- 3- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/406563>,10.09.2024
- 4- <https://www.istockphoto.com/tr/vekt%C3%B6r/parasetamol-asetaminofen-form%C3%BCl-ve-molek%C3%BCler-yap%C4%B1-gm1217428984-355373310>, 10.09.2024

