



**HBV İLİŞKİLİ HEPATOSELÜLER KARSİNOMLARDA
AURORA KİNAZ A'NIN ROLÜ, MOLEKÜLER VE
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMA**

Mustafa HÜZ

**TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI
Deneyisel Patoloji Programı**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Neşe KARADAĞ SOYLU**

Doktora Tezi – 2023

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HBV İLİŞKİLİ HEPATOSELÜLER KARSİNOMLARDA AURORA KİNAZ
A'NIN ROLÜ. MOLEKÜLER VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMA**

Mustafa HÜZ

**Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı
Deneyisel Patoloji Programı**

Doktora Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Neşe KARADAĞ SOYLU**

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından 2021/2713.Proje numarası ile desteklenmiştir

MALATYA

2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karaciğer Anatomisi	3
2.1.1. Vasküler Dolaşım ve Venöz Drenaj	8
2.1.2. Biliyer Sistem	9
2.2. Karaciğer Mikroanatomisi	9
2.3. Hepatoselüler Karsinom ve Moleküler Temelleri	13
2.4. Hepatosellüler Karsinomun Histopatolojisi	14
2.5. Prekürsör Lezyonlar	14
2.6. Displastik Oluşumlar	14
2.7. Hepatoselüler Karsinom	15
2.7.1. Fibrolamellar HCC	20
2.7.2. Skiröz HCC	20
2.7.3. Berrak Hücreli HCC	21
2.7.4. Steatohepatitik HCC	22
2.7.5. Makrotrabeküler Masif HCC	23
2.7.6. Kromofob HCC	24
2.7.7. Nötrofilden Zengin HCC	24
2.7.8. Lenfositten Zengin HCC	25
2.8. Hepatoselüler Karsinomun Moleküler Karsinogenezi	25
2.8.1. TERT Promotör Mutasyonları	26
2.8.2. Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı	26
2.8.3. TP53 Geni	26
2.8.4. Myc Protoonkogenler	27
2.8.5. PI3K/PTEN/Akt Sinyal Yolağı	27
2.8.6. Epigenetik Modifikasyonlar ve Tümör Mikroçevresi	28
2.9. Hepatit B ilişkili HCC	29

2.10. Kriptojenik Hepatoselüler Karsinom	31
2.11. Kinazlar ve Aurora Kinaz A	31
2.11.1. Kinazlar.....	31
2.11.2. Aurora Kinaz A.....	32
2.12. TP53.....	34
2.13. PLK-1.....	35
2.14. BRCA1.....	36
3. MATERYAL VE METOT	38
3.1. Çalışma Protokolünün Oluşturulması ve Olguların Seçimi.....	38
3.2. Moleküler Genetik Analizler	40
3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme.....	44
4. BULGULAR.....	46
4.1. Moleküler Parametrelere İlişkin Bulgular	46
4.2. İmmünohistokimyasal Belirteçlere Ait Bulgular	51
5. TARTIŞMA	69
5.1. Çalışmayı Sınırlandıran Faktörler.....	76
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	78
KAYNAKLAR	80
EKLER.....	100
EK-1. Özgeçmiş.....	100
EK-2. Etik Kurul Onayı	101

TEŐEKKÖR

İnönü Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında birlikte çalışma fırsatı bulduğum günden bu güne, mesleğimin icrası ve eğitim hayatımda çok şey öğrendiğim, bilgi, görgü ve tecrübeme değerli katkıları olan, Anabilim Dalı başkanımız, hocam, Prof. Dr. Nusret AKPOLAT'a teşekkürü borç bilirim. Doktora eğitimim süresinde bilgi ve tecrübesini paylaşan bilimsel bakış ve nosyon kazanmama destek olan danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Neşe KARADAĞ SOYLU'ya, yine desteğini esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. Ahmet KOÇ'a, projenin gerçekleşmesine kaynak sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne, eğitimime destek olan ve katkı veren başta Prof Dr. Hasan GÖKÇE olmak üzere Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, laboratuvarında birlikte mesai yaptığım teknik ekipteki değerli arkadaşlarıma, eşim Gülden, sevgili kızlarım Sıdıka Hale ve Gül Bilge'ye, anlayış ve destekleri için ailemin uzak ve yakın üyelerine teşekkür ederim.

ÖZET

HBV İlişkili Hepatoselüler Karsinomlarda Aurora Kinaz A'nin Rolü.

Moleküler ve İmmünohistokimyasal Çalışma

Amaç: Başlıca risk faktörleri arasında Hepatit B virüs'ün (HBV) sayıldığı Hepatoselüler karsinom (HCC), en ölümcül kanserlerden biridir. Kriptojenik Hepatoselüler karsinom (KR-HCC), klinik ve serolojik olarak bir etyoloji ile ilişkilendirilmeyen HCC'yi ifade eder.

Aurora Kinaz A (AURKA) geni birçok kanser türünde aşırı eksprese edilir. Çalışmamızla, HBV ilişkili HCC (HBV-HCC) ve KR-HCC olgularında, AURKA gen amplifikasyonu ve ifade düzeyi yanısıra AURKA'nın, substratları olan P53^{Ser315}, PLK-1^{Thr210} ve BRCA1 de etkinliği araştırıldı.

Materyal ve Metot: Çalışma, her gurubun 17 olguyla temsil edildiği; HBV-HCC (Grup I), KR-HCC (Grup II) ve Kontrol grubu (normal karaciğer dokusu) (Grup III) olarak tasarlandı. Çalışmada, moleküler yöntemlerle, AURKA gen kopya sayısı değişikliği (gen-KSD) ve ekspresyon düzeyi incelendi. Ayrıca immünohistokimyasal yöntemle (İHK) AURKA'nın, substratları P53^{Ser315}, PLK-1^{Thr210} ve BRCA1 üzerinden etkinliği araştırıldı.

Bulgular: Grup I ve Grup II, Kontrol gurubuyla (Grup III) karşılaştırıldığında gen-KSD açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.060$). AURKA düzeyi Grup I-Grup II de yüksek olup Grup III'le aralarındaki fark anlamlıydı ($p<0.001$). P53^{Ser315} her iki HCC grubunda ($p<0.001$), PLK-1^{Thr210} Grup II'de ($p=0.001$), BRCA1 ise Grup I'de ($p=0.006$) yüksekti ve kontrol grubuyla farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı.

Sonuç: HBV-HCC ve KR-HCC olgularında AURKA'nın aşırı ifade edildiğın görüldü. AURKA aracılı fosforilasyonla etkinliği artan PLK-1 KR-HCC olgularında, BRCA1 ise HBV-HCC olgularında yüksek oranda ifade edildiğı saptandı. Sonuçlar, AURKA ile etkin olduğı BRCA1 ve PLK-1'in inhibisyon hedefli tedavilerde HBV-HCC ve KR-HCC için farklı yaklaşım ve strateji geliştirilmesinin önemini ortaya koydu.

Anahtar Kelimeler: Aurora Kinaz A, PLK-1, Hepatoselüler karsinom, HBV ilişkili HCC, Kriptojenik HCC

ABSTRACT

The Role of Aurora Kinase A in HBV-related Hepatocellular Carcinomas. Molecular and Immunohistochemical Study

Aim: Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the deadliest cancers, with Hepatitis B Virus (HBV) among its major risk factors. Cryptogenic hepatocellular carcinoma (KR-HCC) refers to HCC that is clinically and serologically unrelated to an etiology.

The Aurora Kinase A (AURKA) gene is overexpressed in many types of cancer. In our study, in HBV-associated HCC (HBV-HCC) and CR-HCC cases, AURKA gene amplification and expression level, as well as the efficiency of AURKA, its substrates P53^{Ser315}, PLK-1^{Thr210} and BRCA1 were investigated.

Material and Method: In the study, each group was represented by 17 cases; It was designed as HBV-HCC (Group I), KR-HCC (Group II) and Control group (normal liver tissue) (Group III). In the study, AURKA gene copy number change (gene-KSD) and expression level were examined by molecular methods. In addition, the effectiveness of AURKA on its substrates P53^{Ser315}, PLK-1^{Thr210} and BRCA1 was investigated by immunohistochemical method (IHC).

Results: When Group I and Group II were compared with the Control group (Group III), no significant difference was found in terms of gene-KSD ($p=0.060$). AURKA level was high in Group I-Group II and the difference between Group III was significant ($p<0.001$). P53^{Ser315} was higher in both HCC groups ($p<0.001$), PLK-1^{Thr210} was higher in Group II ($p=0.001$), BRCA1 was higher in Group I ($p=0.006$), and the difference between the control group and them was statistically significant.

Conclusion: Overexpression of AURKA was observed in HBV-HCC and CR-HCC cases. PLK-1, whose activity was increased by AURKA-mediated phosphorylation, was found to be highly expressed in CR-HCC cases, and BRCA1 in HBV-HCC cases. The results demonstrated the importance of developing different approaches and strategies for HBV-HCC and KR-HCC in therapies targeting the inhibition of substrates BRCA1 and PLK-1 with AURKA.

Keywords: Aurora Kinase A, PLK-1, Hepatocellular carcinoma, HBV-related HCC, Cryptogenic HCC

SİMGELER VE KISALTMALAR

2^{-ΔΔCt}	: Logaritmik -Delta Delta Ct
ATM	: Ataksi telenjektazi mutant
ATR	: Ataksi telenjektazi ve Rad3 ile ilişkili protein
AURKA	: Aurora kinaz A
AURKB	: Aurora kinaz B
cccDNA	: Kapalı kovalent dairesel DNA
BH-HCC	: Berrak hücreli tip Hepatoselüler karsinom
CCLE	: Kanser Hücre Hattı Ansiklopedisi (Cancer Cell Line Encyclopedia)
CDC25	: Hücre bölünmesi döngüsü 25C (Cell Division Cycle 25C)
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CDKin	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri
CDKN1A	: Siklin bağımlı kinaz inhibitör 1A
cDNA	: Komplementer DNA
Chk1	: Kontrol noktası protein 1
Chk2	: Kontrol noktası protein 2
CT	: Döngü eşiği
CTNNB1	: Beta Katenin 1
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DNMT	: DNA metil transferaz
FFPE	: Formol fikse parafine gömülü doku
FGF19	: Fibroblast büyüme faktörü 19

FGF19	: Fibroblast büyüme faktörü 19 (Fibroblast Growth Factor 19)
F-HCC	: Fibrolamellar Hepatoselüler karsinom
GADD45A	: Büyümenin durması ve DNA hasarı ile indüklenebilir-alfa
gen-KSD	: Gen kopya sayısı değişikliği
H&E	: Hematoksilen & Eozin
HBV	: Hepatit B virüs
HBV-HCC	: HBV ilişkili Hepatoselüler karsinom
HCA	: Hepatoselüler adenom
HCC	: Hepatoselüler karsinom
HCV	: Hepatit C virüs
HNF1A	: Hepatosit nükleer faktör 1
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IHPBA	: Uluslararası Hepato-Pankreato-Biliyer Birliği
IHK	: İmmünohistokimya
K-HCC	: Kromofob Hepatoselüler karsinom
KR-HCC	: Kriptojenik Hepatoselüler karsinom
lncRNA	: Uzun kodlamayan RNA (Long noncoding RNA)
miRNA	: Mikro RNA
MM-HCC	: Makrotrabeküler Masiv Hepatoselüler karsinom
ncRNA	: Non-coding RNA
PD-L1	: Programlanmış ölüm-ligand-1
PI3K	: Fosfoinositid-3 Kinaz

PLK-1	: Polo like kinaz-1
PTEN	: Fosfataz ve tensin homoloğu
RAD50	: Çift zincir kırıkları onarım proteini
RT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time Polymerase chain reaction)
S-HCC	: Skiröz Hepatoselüler karsinom
SH-HCC	: Steatohepatitik Hepatoselüler karsinom
siRNA	: Susturucu RNA (Small interfering RNA)
sncRNA	: Küçük kodlanmayan RNA (short noncoding RNA)
TCF/LEF	: T-hücre faktörü/lenfoid güçlendirici faktör
TERT	: Telomeraz ters transkriptaz (Telomerase reverse transcriptase)
TMA	: Doku mikrodizileri (Tissue microarray)
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü-alfa
VEGFA	: Vasküler endotelial büyüme faktörü-A
WHO	: Dünya sağlık örgütü (World Health Organization)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Karaciğerin yüzey özellikleri, bağları ve peritoneal ekleri .	3
Şekil 2.2. Vena kava inferior ve üç hepatik ven	4
Şekil 2.3. Karaciğerin ligamentleri	4
Şekil 2.4. Karaciğerin morfolojik anatomisi; sağ ve sol lob .	5
Şekil 2.5. Karaciğer viseral yüzü	6
Şekil 2.6. Porta hepatis horizontal kesiti ve porta hepatisi oluşturan yapılar	6
Şekil 2.7. Karaciğer segmentleri.....	7
Şekil 2.8. Karaciğer segmental anatomik görünümü	8
Şekil 2.9. Karaciğer kan dolaşımının şematik gösterimi	9
Şekil 2.10. Klasik altıgen olarak tanımlanan hepatik lobül	10
Şekil 2.11. Karaciğer lobül ve asinus yapısı	11
Şekil 2.12. Karaciğer hücreleri ve organizasyonunun şematik gösterimi	12
Şekil 2.13. Trabeküler morfoloji (H&E, x200)	16
Şekil 2.14. Psödoasinar morfoloji gösteren HCC (H&E, x200)	17
Şekil 2.15. Solid patern gösteren HCC (H&E, x200)	17
Şekil 2.16. Makrotrabeküler patern (H&E, x100)	18
Şekil 2.17. Fibrolamellar HCC varyant (H&E, x100)	20
Şekil 2.18. Skiröz patern HCC (H&E, x100)	21
Şekil 2.19. Berrak hücreli HCC varyantı (H&E, x100)	22
Şekil 2.20. Steatohepatitik Varyant HCC (H&E, x200)	23
Şekil 2.21. Makrotrabeküler-massif tip HCC (H&E, x100)	24
Şekil 2.22. AURKA fonksiyonel bölgeleri.....	33
Şekil 2.23. PLK-1 fonksiyonel birimleri.	36
Şekil 3.1. TMA sektör haritası.....	40
Şekil 4.1. Agaroz jel elektroforez görüntüsü (RNA).....	46
Şekil 4.2. RT-PCR çalışmasında elde edilen amplifikasyon eğrileri	47
Şekil 4.3. Agaroz jel elektroforez görüntüsü (DNA).....	47
Şekil 4.4. AURKA antikor ile boyama, Grup III olguları (Kontrol), (x100)	53
Şekil 4.5. AURKA antikor ile boyanan Grup I olguları (HBV-HCC), (x100).....	54
Şekil 4.6. AURKA antikor ile boyanan Grup II olguları (KR-HCC), (x100)	55

Şekil 4.7. P53 antikor ile boyanan Grup III olguları (kontrol grubu), (x100).....	57
Şekil 4.8. P53 antikor ile boyanan Grup I olguları (HBV-HCC), (x100).....	58
Şekil 4.9. P53 antikor ile boyanan Grup II olguları (KR-HCC), (x100)	59
Şekil 4.10. PLK-1 antikor ile boyanan Grup III olguları (kontrol grubu), (x100)	61
Şekil 4.11. PLK-1 antikor ile boyanan Grup I olguları (HBV-HCC), (x100).....	62
Şekil 4.12. PLK-1 antikor ile boyanan Grup II olguları (KR-HCC), (x100)	63
Şekil 4.13. BRCA-1 antikor ile boyanan Grup III olguları (kontrol grubu), (x100).....	65
Şekil 4.14. BRCA-1 antikor ile boyanan Grup I olguları (HBV-HCC), (x100).....	66
Şekil 4.15. BRCA-1 antikor ile boyanan Grup II olguları (KR-HCC), (x100)	67



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. HCC varyantları, WHO sınıflandırmasına göre özet tablo	19
Tablo 3.1. Çalışma grupları.....	39
Tablo 3.2. RT-PCR’da kullanılan primerler	40
Tablo 3.3. cDNA sentez için hazırlanan karışım	42
Tablo 3.4. RT-PCR çalışmasında kullanılan reaktifler	43
Tablo 3.5. RT-PCR çalışmasında programlanan ısı koşulları.....	44
Tablo 3.6. İHK boyama skor tablosu	45
Tablo 4.1. Gruplara ait örneklerin spektrofotometre ölçüm sonuçları	48
Tablo 4.2. RT-PCR ile yapılan gen-KSD çalışma çıktıları (Tüm gruplar)	49
Tablo 4.3. Grup I ve Grup II arasında karşılaştırılan gen-KSD istatistik sonucu	51
Tablo 4.4. AURKA antikor İHK boyama dereceleri	52
Tablo 4.5. P53 antikor İHK boyama dereceleri	56
Tablo 4.6. PLK-1 antikor İHK boyama dereceleri.....	60
Tablo 4.7. BRCA-1 antikor İHK boyama dereceleri	64
Tablo 4.8. İHK parametreleri ve istatistiki analizi	68

1. GİRİŞ

Dünya genelinde karaciğer kanserlerinin görülme sıklığı, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC)'nın 2020 yılı verilerine göre 905677 kişi sayısı ile (%4.7) altıncı sıradayken, kansere bağlı ölümlerde 830180 vakayla (%8.3) üçüncü sırada yer almaktadır (1). Karaciğerde en sık görülen histolojik tip olan Hepatoselüler karsinom (HCC) ise karaciğer kanserlerinin %90'ını oluşturmaktadır (2, 3).

HCC gelişiminde Alfatoksin B1, alkolik ve nonalkolik yağlı karaciğer hastalıkları yanı sıra en yaygın risk faktörü, hepatit B (HBV) veya hepatit C virüs (HCV) kaynaklı kronik karaciğer enfeksiyonudur. Coğrafi olarak HCV nedeniyle gelişen HCC'ler ABD'de yaygınken, HBV kaynaklı HCC Asya ülkelerinde daha yüksek oranda görülmektedir (4-6). Dünya nüfusunun %30'unda görülebilen HBV, karaciğer sirozuna ve ilerleyen süreçte HCC'ye neden olmaktadır (4, 7).

HCC'nin epidemiyolojisine ve moleküler profiline yönelik çalışmalar gelişim mekanizmalarını sistematik olarak ortaya konmuştur. Ancak bu mekanizmaların aydınlatılmasıyla beklenen, kişiye yönelik tedavi protokollerin oluşturma çalışmaları henüz arzu edilen seviyelere ulaşamamıştır (2).

HCC tedavi protokolleri, tümör özellikleri, karaciğer fonksiyon bozuklukları ve yaş gibi birçok farklı parametre gözetilerek belirlenmektedir. Erken evre HCC'ler lokal ablasyon, cerrahi rezeksiyon veya karaciğer transplantasyonu ile küratif olarak tedavi edilebilirken bazı vakalarda kateter bazlı lokal tedavi bir seçenek olabilmektedir. Bununla birlikte özellikle ileri evre HCC hastalar için kinaz ve immün kontrol noktası inhibitörleri, bugüne kadar pek de başarılı olmayan HCC'nin medikal tedavilerinde, etkili bir seçenek olarak gün geçtikçe daha çok önem kazanmakta, dikkatleri üzerine çekmektedir (8, 9).

Protein kinazlar, hücre biyolojisi içinde etkin düzenleyici ve yön değiştirici rol oynamaktadır. İnsan genomunda kodlanan yaklaşık 538 protein kinaz, proteinden bir fosfat grubu çıkaran fosfotazların aksine, proteine bir fosfat eklerler. Kinaz aracılı protein fosforilasyonu, enzim aktivitesini artırabilir, azaltabilir, transkripsiyon ve translasyon gibi diğer biyolojik aktiviteleri değiştirebilir. Ayrıca, bir protein üzerindeki bazı fosforilasyon bölgeleri için uyarıcıyken diğerleri için inhibe edici olabilmektedir. Protein kinazların birçok kanserin başlaması ve ilerlemesine aracılık ettiği ortaya konduğundan, bu enzim ailesinin üyeleri son yirmi yılda en önemli ilaç hedeflerinden biri haline gelmiştir (10, 11).

Kanser gelişiminde AURKA bir onkogen olarak kabul edilmiş olmakla birlikte, HCC mekanizmalarına katkısı ve HCC metastazındaki rolü bilinmemektedir. Farelerde, mutanat olmasa da aşırı eksprese edilen AURKA'nın sürenin uzunluğuna bağlı olarak düşük hepatik tümör insidansı geliştirdiği ifade edilmiştir. Ek olarak mutant hayvan modellerinde AURKA'nın farklı yolları aktive ederek erken hepatokarsinogeneze neden olabileceği, epitelyal-mezenkimal geçiş ve uzak metastaz ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (12, 13).

AURKA'nın aşırı ekspresyonu p53'ün fonksiyon kaybı, sentrozom amplifikasyonu ve kromozom kararsızlığına neden olduğu; onkojenik transformasyonu indüklediği ifade edilmiştir. Aynı şekilde AURKA'nın inhibisyonu p53'ün daha az fosforilasyonu sonucu p53 stabilizasyonuna neden olduğu, böylece G2-M fazında hücre döngüsünün durmasına yol açtığı bildirilmiştir (14).

Polo like kinaz-1 (PLK-1), hücre bölünme sürecinin farklı yönlerini düzenleyen en temel mitotik kinazlardan biridir. AURKA'nın fosfatlamasıyla, PLK-1'in kontrol noktasına bağlandığı ve mitotik girişi teşvik ettiği gösterilmiştir (15).

DNA hasarına karşı, sentrozomda DNA hasar yanıtı gelişir. Bu yanıt BRCA1 proteini ile ortaya çıkar ve çekirdekte DNA onarımını uyararak sentrozomun gereğinden fazla çoğalmasını engeller. BRCA1'in mutasyonu veya kaybı kanser hücrelerinde sentrozom amplifikasyonuna ve anormal mitotik iğ ipliği bağlanmasına neden olur. BRCA1'in AURKA'ya bağlanarak ve fosforile ederek sentrozom amplifikasyonunun düzenlenmesini artırdığı ifade edilmiştir (16, 17).

AURKA aktivasyonunun başta meme kanseri olmak üzere çok çeşitli kanserlerin gelişiminde etkisi olduğunu gösteren ve hedefe yönelik tedavilerde kullanılabileceğine yönelik çalışmalar mevcuttur. AURKA'nın, AURKA aracılı fosforilasyon ile özellikle mitoz düzenleyiciler, tümör baskılayıcılar veya onkogen substratlarının fonksiyonunun düzenlenmesinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (18, 19).

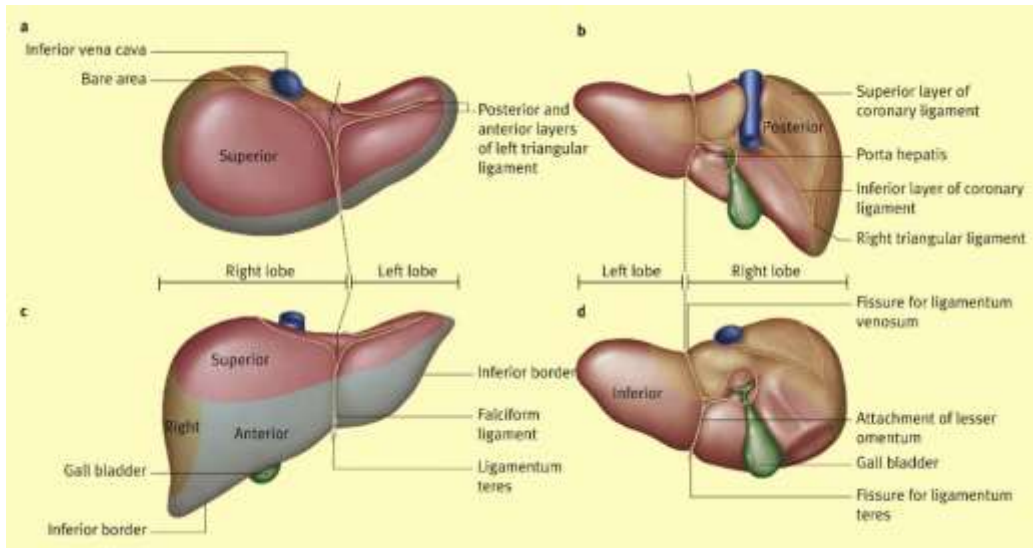
Çalışmamızın amacı; HBV-HCC ve KR-HCC olgularında, onkogen özelliği taşıyan AURKA'nın ifade düzeyi, gen amplifikasyonu ve fosforile ettiği substratlar, P53, PLK-1 ve BRCA1 ile ilişkisini araştırmak, başta KR-HCC ve HBV-HCC olmak üzere HCC tedavisinde AURKA ve substratlarının hedef molekül olma potansiyelini incelemek oldu.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer Anatomisi

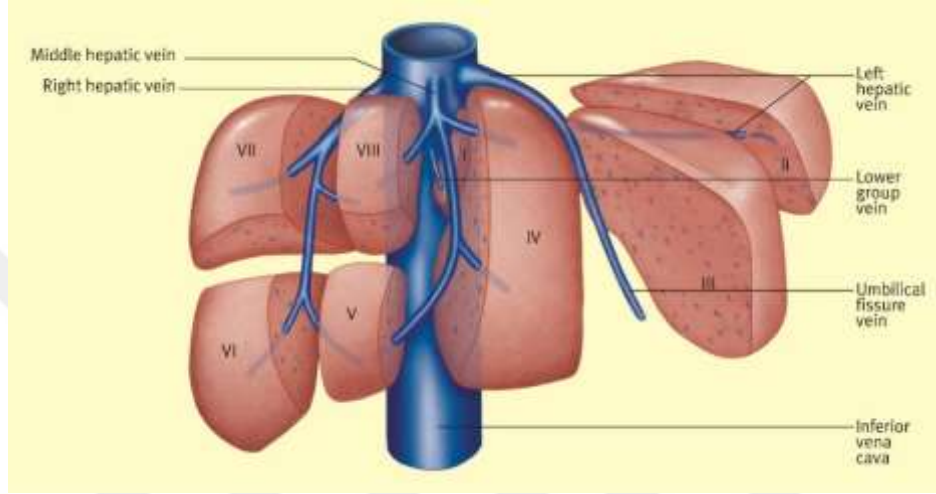
Karaciğer, vücut ağırlığının %2-3'ünü oluşturan ortalama 1500 gram ağırlığında, görece dışbükey kenarları olan üçgen görünümlü en büyük organdır (20). Aynı zamanda çok yönlü bir organ olarak, birçok fizyolojik sürecin merkezidir. Görevleri arasında besin metabolizması, enerji depolaması ve dönüşümü, kan hacminin düzenlenmesi, kimyasal detoksifikasyon, büyüme sinyal yollarının endokrin kontrolü, bağışıklık sisteminin desteklenmesi, lipid ve kolesterol homeostazı ve ksenobiyotik bileşiklerin parçalanması gibi önemli fonksiyonlar bulunur (21). Karaciğer, safra kanalı epiteli ve Kupffer hücreleri gibi birçok farklı hücre tipini de içermesine rağmen, fonksiyonel aktivitenin çoğunda hepatositler (karaciğerin %70'ini oluşturur) rol oynar (22).

Karaciğer abdominopelvik bölgenin üst kısmında bulunur. Sağ hipokondriyal bölgenin büyük bölümünü kaplayan epigastrik bölgeden sol hipokondriumun medial kısmına kadar uzanır. Göğüs kafesinin altındaki konumu ile fiziksel olarak belli ölçüde korunduğu da söylenebilir. Glisson kapsülü olarak adlandırılan ince bağ doku tabakasıyla sarıdır. Kapsül karaciğere giren veya çıkan hepatik arter, portal ven ve biliyer kanal gibi yapıların dallarını çevreler ve organın içine doğru bu yapılarla birlikte uzantılar gösterir. Organın tamamına yakını peritonla kaplıdır. Bunun tek istisnası safra kesesinin periton ile sistik fossanın arasına girdiği bölge ile diyafragmanın altında kalan "*bare area*" (çıplak alan) adı verilen küçük bir bölgedir (Şekil 2.1) (20, 22).



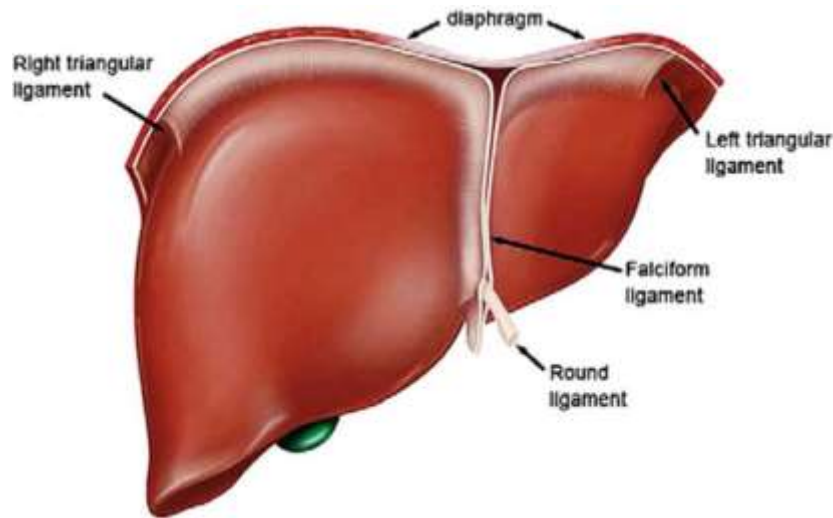
Şekil 2.1. Karaciğerin yüzey özellikleri, bağları ve peritoneal ekleri (23).

Karaciğerin diyafragmayla temas eden yüzeyi diyafragmatik yüzey, karın boşluğunda bakan yüzeyi ise viseral yüzey olarak adlandırılır. Karaciğerin vücutta stabilitesi, vena kava inferiyora boşalan üç ana hepatik ven (Şekil 2.2), karaciğerin diyafragmayla temas eden yüzeyi, peritoneal ligamentler ve karın duvarı kas sistemi ile sağlanır. Söz konusu bu ligamentler peritoneal ligament, koroner ligament, sağ ve sol triangular ligament, falsiform ligamentleridir (Şekil 2.3) (22)



Şekil 2.2. Vena kava inferior ve üç hepatik ven (22).

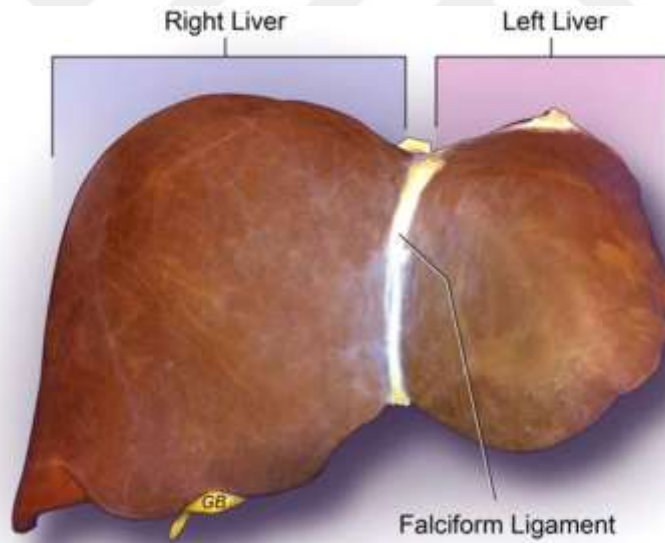
Karaciğer ayrıca tam bir ligament olmayan avasküler, Glisson ve peritonium ile devamlılık gösteren ligamentöz peritoneal refleksiyonlar vasıtasıyla abdominal kaviteye sabitlenmiştir (Şekil 2.3) (20).



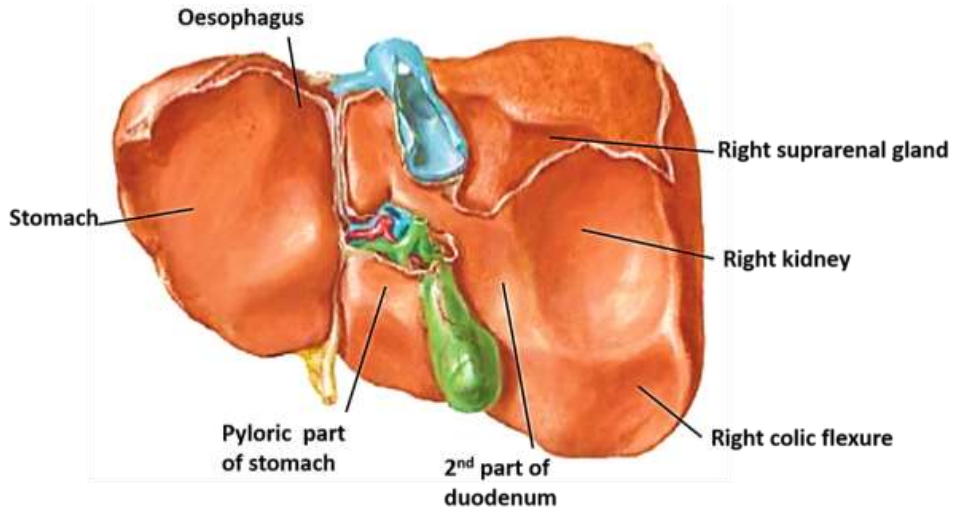
Şekil 2.3. Karaciğerin ligamentleri (20).

Karaciğer anatomisi morfolojik ve fonksiyonel olarak iki farklı şekilde tanımlanmaktadır. Klasik veya morfolojik anatomide falsiform ligamentin diyaframatik yüzeyde anteriora yapışması ve karaciğerin alt yüzeyinde ligamentum teres ve ligamentum venosum fissürü ile birleşmesiyle derin oluklu görünüm oluşur (Şekil 2.3). Bu görünüm, morfolojik olarak doğru görünse de karaciğeri, fonksiyonel olarak yetersiz ve hatta doğru olmayan, basitçe sağ ve sol olmak üzere iki büyük loba ayrılmasında temel teşkil eder. Karaciğerin alt yüzeyinde görünüm olarak büyük yapıdan farklı ve öne çıkan iki adet küçük lop vardır: kuadrat ve kaudat loplar (20, 24).

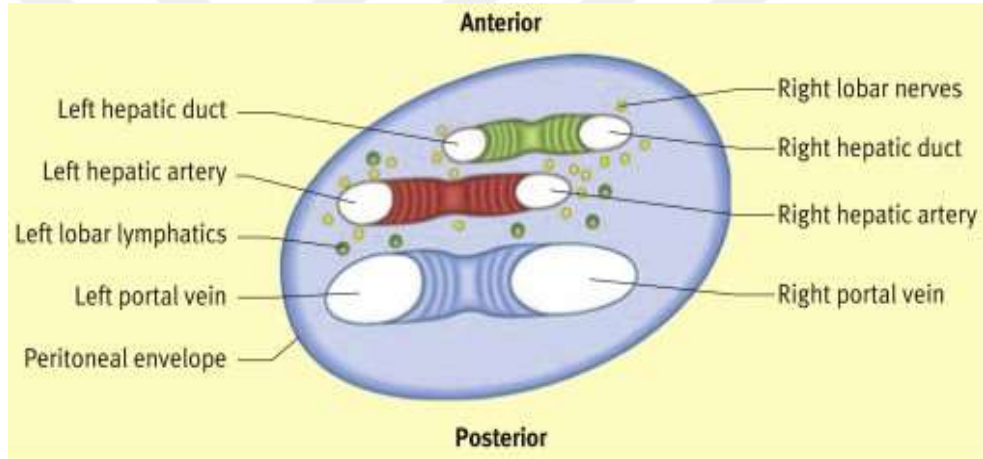
Yine viseral yüzeyde, dışardan bakıldığında morfolojik olarak dikkat çeken yapılar vardır. Bu yapılar; safra kesesini barındıran fossa (sistik fossa); hepatik arter, portal venin sağ ve sol dallarının girdiği ve lenfatik damarların eşlik ettiği 5 cm uzunluğunda transfers fistur, ortak safra kanalının bir arada gözlenebildiği porta hepatis ve yine kuadrat lob ile kaudat lob olarak sayılabilir (Şekil 2.6) (22).



Şekil 2.4. Karaciğerin morfolojik anatomisi; sağ ve sol lob (25).



Şekil 2.5. Karaciğer viseral yüzü (26).

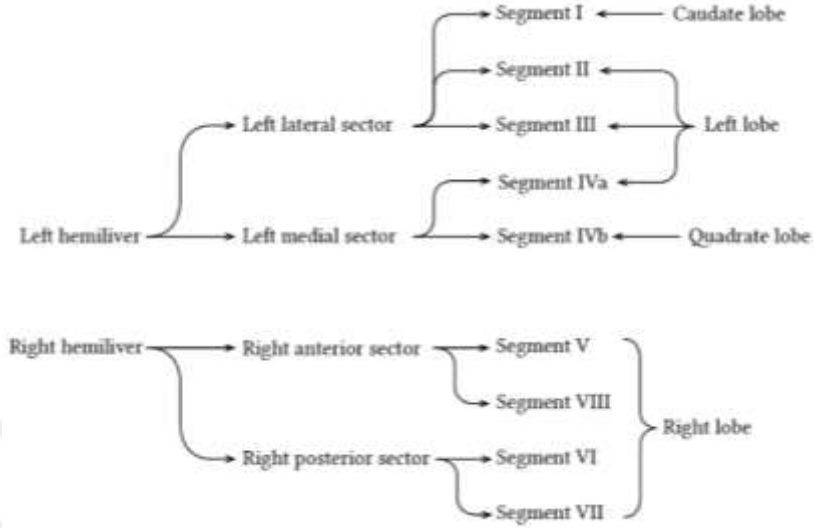


Şekil 2.6. Porta hepatis horizontal kesiti (23).

Son yıllarda karaciğer nakli alanındaki gelişmeler, karaciğerin vasküler ve biliyer yapılanması ve fonksiyonuna bağlı geliştirilen anatomik yaklaşımı ön plana çıkarmıştır (24).

Fonksiyonel bölümlenmenin anatomik temeli, karaciğer içindeki vasküler ve biliyer ilişkilerdir. Couinaud, fonksiyonel anatomik yapılar, segmentler ile yüzeyel anatomik yapı ve özellikler arasındaki korelasyonun oldukça sınırlı olduğunu ortaya koymuştur (22). Özetlemek gerekirse segmental veya fonksiyonel yaklaşımda; karaciğer, ana damarların dallanmaları, kısmen ligamentler, fissürlerin oluşturdukları yüzeysel oluklara karşılık gelen loblar ve son olarak kan beslemesi ve safra drenajı ile tanımlanan fonksiyonel bölümler esas alınmıştır. Buna göre sağ ve sol lob, orta hepatik venden safra

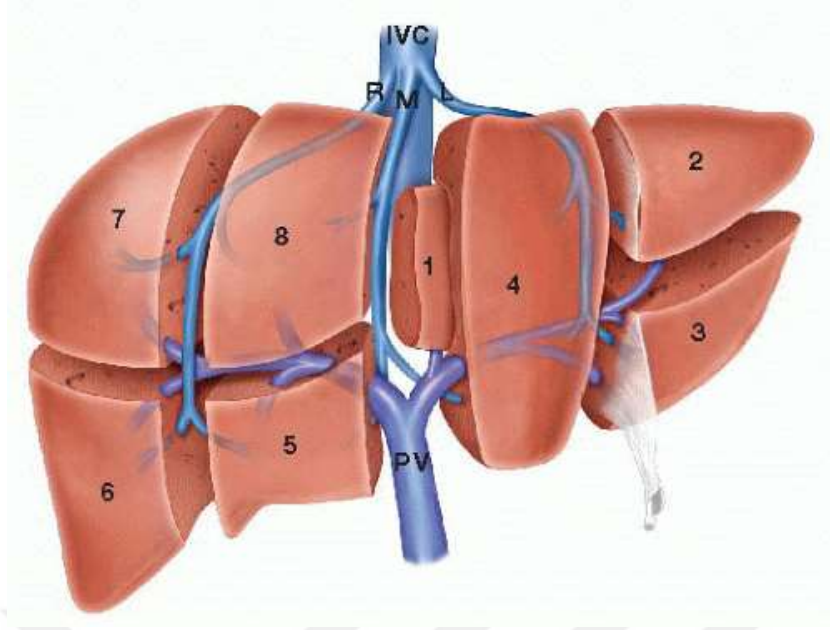
kesesinin ortasına uzanan hayali bir çizgi ile (Cantlie çizgisi) ayrılan dört bölüme (*hemiliver*) ayrılmıştır (Şekil 2.7) (27).



Şekil 2.7. Karaciğer segmentleri (27).

Karaciğer fonksiyonel olarak Couinaud tarafından, Cantlie çizgisi adı verilen bir çizgilenme ile orta hepatik ven hizasından sağ ve sol loba ayrılır. Cantlie çizgisi posteriyorda vena kava inferiyordan, önde sistik fossaya kadar uzanır. Sağ lob, sağ hepatik ven tarafından ön ve arka segmentlere ayrılırken, sol lob ise sol ven tarafından medial ve lateral segmentlere ayrılır (Şekil 2.8). Portal ven ise karaciğeri süperiyor ve anteriör olarak ayırır (24).

Karaciğeri sekiz segmente ayırmak mümkündür. Sağ lob dört segmentten oluşur. Sol lobda; sol medial lob tek bir segment olarak yer alır. Sol lateral lob iki segment ile temsil edilir. Bir no'lu segment olan kaudat segment herhangi bir lobla ilişkilendirilmez (Şekil 2.8). Bu segmentasyonda her segmentin kendi kan beslemesi ve safra drenajı vardır (24).

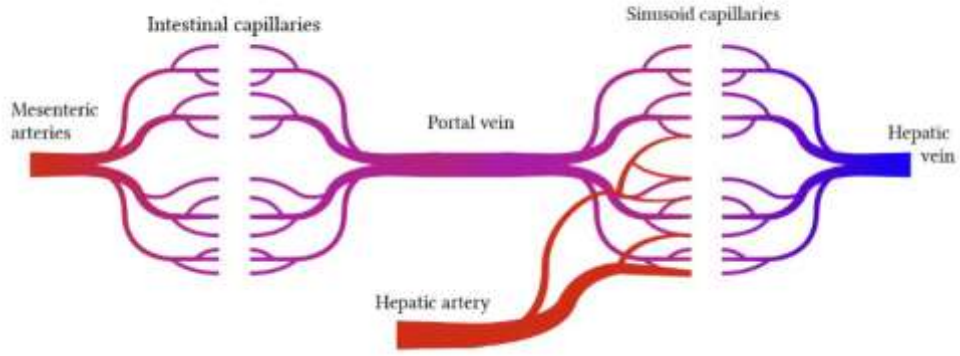


Şekil 2.8. Karaciğer segmental anatomik görünümü (28).

1-Kaudat lob, 2-Sol lateral segment (superior), 3-Sol lateral segment (inferior). 4-Medial segment (sol hemiliver), 5 Sağ anterior segment (inferior), 6-Sağ posteriyör segment (inferior), 7-Sağ posteriyör segment (superior), 8-Sağ anterior segment (superior)

2.1.1. Vasküler Dolaşım ve Venöz Drenaj

Karaciğer dinlenme anında kalp debisinin yaklaşık %25'ine karşılık gelen 1.5 litre kan dolaşımıyla solid organlar arasında en zengin damar ağına sahip organlardan biridir. Bir başka benzersiz yapısı ise birlikte temsil edilen portal ven ve hepatik arterle, hem arteryel hem de venöz kan akışının görülmesidir (Şekil 2.9). Portal ven (%70) ve hepatik arterden (%30) gelen ve sinüzoidlere yönlendirilen kanda bir dizi biyokimyasal reaksiyon gerçekleşir. Bu nedenle kan akış yönünde dereceli olarak oksijen saturasyonunda azalma olur ve hepatik venler aracılığı ile kan, vena kava inferiora döndürülür (22, 29) Portal ven; pankreas boyununun arkasında superior mezenterik ven ile splenik venin birleşmesi ile oluşur ve yaklaşık 10 cm uzunluğundadır. Daha sonra sağ ve sol gastrik venlerin katılması ile portal veni besleyen damarlar tamamlanmış olur (22, 27). Portal ven, sindirim sisteminden emilen besinleri karaciğer sinüzoidlerine taşıırken aynı zamanda sistemik venöz kana kıyasla daha yüksek oksijen düzeyi ile (%40 oksijenli) karaciğerin oksijenlenmesinde önemli rol oynar (22, 24).



Şekil 2.9. Karaciğer kan dolaşımının şematik gösterimi (27).

Portal venöz kan, postero-superior yönde üç ana hepatik damara (sağ, sol ve orta hepatik ven) ve oradan da vena kava inferiyöre döner. Hepatik venlerin dağılımı kısmen farklılık gösterirken yapısı portal tiriyata göre daha geniş ve oldukça büyüktür. Özellikle daha büyük olan sağ hepatik ven kısa bir ekstrahepatik seyir sonrasında doğrudan vena kava inferiyöre döner (20).

2.1.2. Biliyer Sistem

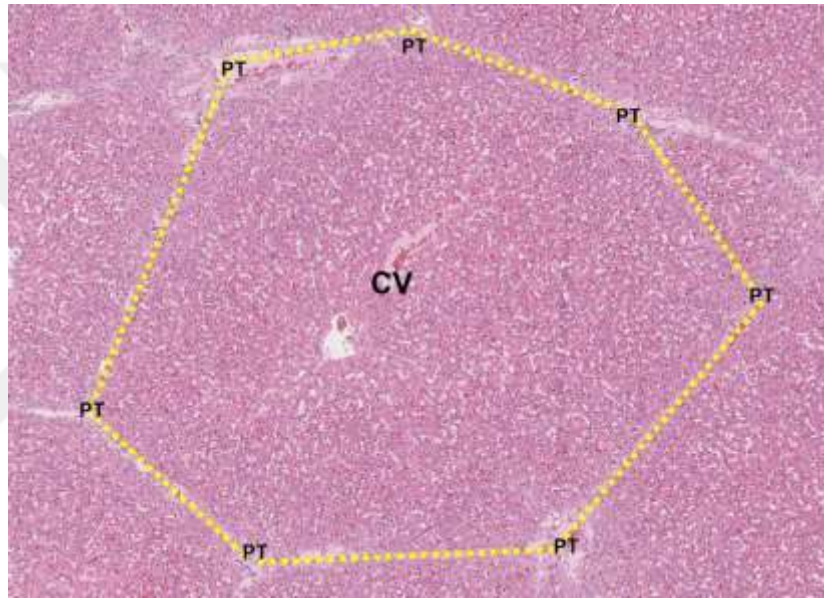
Karaciğerde oluşan safranin duodenuma taşınmasından sorumlu olan, portal venöz sistemi takip eden tipik yapı “safra ağacı” olarak tanımlanır (20). Safra asidi karaciğerin esas hücresel elemanı olan hepatositlerin sıralanarak oluşturduğu duvarın arasındaki ince kanala (kanalikül) yine hepatositler tarafından salgılanır. Kanaliküller birleşerek ağacın daha geniş dallarını oluşturur: Hering kanalı, interlobüler kanal, terminal kolanjiyoller. Devamında, safra ekstrahepatik safra yolunun bir parçası olan hepatik kanallara boşalır (20, 22).

2.2. Karaciğer Mikroanatomisi

Karaciğer fizyolojik homeostazın korunmasında merkezi rol oynar (30). Bir organda temel işlevleri bağımsız olarak yerine getiren ve yapısal bütünlüğü olan en küçük birim (örneğin, böbrekte nefron), işlevsel birim olarak adlandırılır. Karaciğer mikroanatomisi incelendiğinde, ikili damar (portal ven, hepatik arter) ve ikili drenaj sistemi (hepatik venle vasküler ve safrayla biliyer) ile temel işlevlerin çok büyük bir kısmını yerine getiren en küçük fonksiyonel birim lobül olarak tanımlanmıştır (31). Karaciğer mikroanatomik yapısı birbirini tekrarlayan epiteliyal ve mezenkimal (hücresel, yapısal ve vasküler) birimlerin üç boyutlu organizasyonu ile oluşmaktadır.

Mikroanatomik yapının tanımlanmasında farklı birkaç kavramsal yaklaşım olsa da bunların en popüler ikisi farklı embriyonik kökenli, epitelyal ve mezenkimal hücresel elemanların yine üç boyutlu organizasyonunu ifade eden lobül ve asinus kavramlarıdır (32).

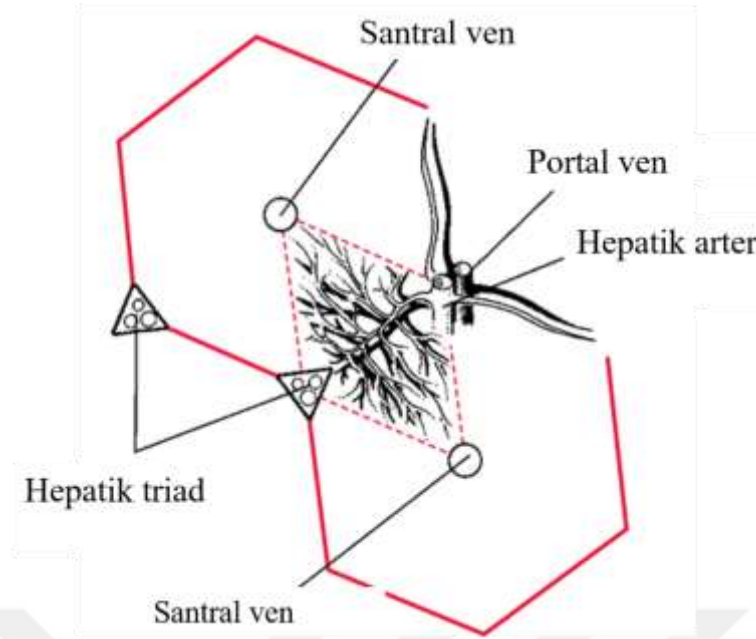
Karaciğerin birincil hücresi, büyük oranda kütesinin oluşturan, karaciğerle ilişkili fonksiyonların birçoğunu yerine getiren hepatositlerdir (21). Geleneksel lobül konseptinde hepatositler, terminal hepatik venin (santral ven) etrafında kordonlar halinde yerleşmiştir. Bu birimi oluşturan lobül; portal triad ile sınırlı, altıgen görünümlü histolojik yapıdır (Şekil 2.10) (21, 32).



Şekil 2.10. Klasik altıgen olarak tanımlanan hepatik lobül (33).

CV: santral ven, PT: portal triad köşeleri, diğer hepatik lobülleriyle komşudur.

Hepatik parankimin klasik lobüllere bölünmesi ile (sentrilobüler, midzonal ve periportal) kullanımı geçerliliğini korusa da hepatik fonksiyonla daha paralel bir birim olan asinus kavramı büyük oranda kabul görmüş ve kullanılmaktadır (Şekil 2.11). Hepatik asinüsler portal traktüsdeki terminal portal ven ve terminal hepatik arteriyol tarafından oluşturulan merkezi eksenden sinüzoidlere doğru uzanan, kan akımı yönünü izleyen üç boyutlu yapılar olarak tanımlanır (34).

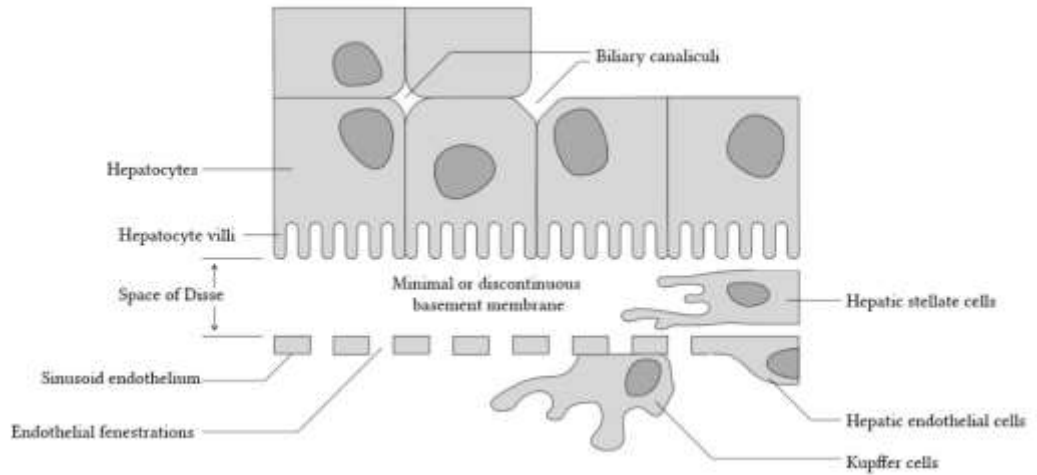


Şekil 2.11. Karaciğer lobül ve asinus yapısı (35).

Karaciğerin en küçük birimini tanımlayan iki kavram; Altıgen düz çizgiler hepatik lobül yapısını temsil ederken kesik çizgilerin oluşturduğu eşkenar dörtgen karaciğer asinusunu temsil etmektedir.

Bir başka ifade ile asinus, portal alanın merkezde ve santral venin periferde olduğu, portal alandan santral vene uzanan küçük bir portal yol ve çevresinin şekillendirdiği yapıdır. Kan portal alandan hepatik vene (santral ven) doğru akarken oksijen ve besin gradyanı azalma eğilimindedir (30, 32). Söz konusu gradyan ve akış, asiner bölgeyi üç zona ayırır. Portal alan çevresi “zon 1”, santral ven çevresi “zon 3”, ikisi arasında kalan bölge ise “zon 2” olarak adlandırılır (32). Bu zonasyonun karaciğerin fizyolojisi, metabolik hastalıkları ve patolojisinde etkili ve anlamlı olduğu artık bilinmektedir (36).

Hepatositler, kolanjiyositler, stellat hücreler, Kupfer hücreleri ve diğer hücresel elemanların farklı seviyelerde iş birliği göstermesi, sayısız fonksiyonların yerine getirilmesi ve düzenlemesini sağlar (Şekil 2.12) (21).



Şekil 2.12. Karaciğer hücreleri ve organizasyonunun şematik gösterimi (27).

Karaciğerin hâkim hücre tipi olan hepatositler, karaciğer lobülünde anastomoz yaparak hücre kordonları oluşturur (37). Geniş ve çok kenarlı stoplazmaları olan, merkezi yerleşimli ve çoğunlukla tetraploid heterokromatin yapıda oval nükleuslu hücrelerdir. Nükleusta çoğu zaman iki ya da daha fazla belirgin nükleolus izlenir. Ortalama beş ay gibi bir yaşam süresi olan hepatositler, sindirim sistemi hücreleri arasında en uzun yaşam süresine ve rejenerasyon yeteneğine sahip hücreler olarak gösterilir (37).

Portal alan ve santral ven ekseninde, sinüzoidler arasında kordonlar halinde dizilmiş hepatositler, gerçekleştirdikleri biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonlara bakıldığında dikkate değer bir heterojenlik görülür (38). Bu farklılık, yani dinamik ve fonksiyonel heterojenite, asinus konsepti içinde yapısal olarak bahsettiğimiz üç farklı zonda tam karşılığını bulmaktadır (36). Zon 1'deki hepatositler protein sentezi ve glikoneogenez benzeri, daha çok enerji gerektiren süreçleri yerine getirirken, zon 2'de konuşlanmış hepatositler diğer görevlerin yanı sıra büyük oranda demir düzenleyici (hepsidin) hormonun sentez ve salgılanmasında görev alırlar. Santral ven çevresinde, zon 3'de yer alan hepatositler, daha düşük oksijen düzeyi ortamında bulunurlar. Bu nedenle oldukça az enerji gerektiren safra asidi sentezi ve salgılanması yanı sıra ksenobiyotik metabolizması (toksinsizleştirme) ve glikoliz benzeri süreçlerde rol alırlar (30, 39). Bununla birlikte mekânsal iş bölümü boyutuyla, hepatositlerde genom çapında portal alan ve santral ven bölgesine göre ekspresyon düzeyi farklılık gösterebilmektedir (38, 39). Örneğin Wnt morfojenleri, oksijen ve besin gradyeni ile ters bir polarizasyon oluşturur. Wnt- β -katenin sinyal yolağı karaciğerin gelişimi, olgunlaşması ve karaciğer patogeneğinde etkisi olan bir mekanizmadır (40-42).

Kupffer hücreleri karaciğerde yerleşik makrofajlar olup sinüzoidlerde bulunan büyük ölçüde hareketsiz hücrelerdir (30). Çoğunlukla portal dolaşım aracılığıyla gelen patojenik uyarınları alır ve bir dizi faktöre bağlı olarak hasar iyileşme sürecinde ve pro/anti-inflamatuar süreçlerde rol oynar (21).

Karaciğerin bir başka önemli hücresi ise sinüzoidal endotel hücreleridir. Hücresel fenestrasyon (pencerelenme) oluşturan bu hücreler, plazma ile karaciğer hücreleri arasında belli bir boyutta protein ve parçacık değişimine izin verir ve yönlendirir (21).

Kolanjiyositler hepatositlerde üretilen safranin safra kesesine, oradan da bağırsağa ileten safra ağacı olarak adlandırılan ve çapı giderek artan kanal sistemini döşeyen hücre tipidir. Bu hücreler hormonal ve nöral uyarınlara tepki olarak safra akışını modifiye etme ve kompozisyonunu değiştirme yeteneğine sahiptir. Az sayıda organelleri olmakla beraber komşu hücrelerle kurdukları sıkı bağlantı noktaları sayesinde kontraktıl özellik kazanmışlardır. Apikal bölgelerindeki villuslardan ötürü görünümüleri hepatositlere benzer (37).

Karaciğer histolojisinde bir başka dikkat çeken yapı ise Hering kanallarıdır. Bu kanallarda izlenen intrahepatik biliyer epitel hücreleri ile hepatositler arasındaki yakın ilişki, multipotent kök hücre rezervini oluşturan ortak endodermal orijine temel teşkil eder (43).

Safra, karaciğerin, kendine özgü, oldukça karmaşık, önemli bir salgısıdır. Safra bitişik dizilimli hepatositlerin apikal zar tarafında sıkı bağlantı noktaları ile çevrelenerek oluşturduğu kanalikül adı verilen ağ benzeri kanala salgılanır. Safra hepatositler tarafından sentezlense de safra kanalı epitel tarafından modifiye edilir. Safranin yaklaşık %5'i organik ve inorganik çözünenlerden oluşur. Safra salgısının akış yönü, portal kan akışının tersi istikametindedir (44).

2.3. Hepatoselüler Karsinom ve Moleküler Temelleri

Primer karaciğer kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturan HCC, dünya çapında önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. HCC'lerin yaklaşık %90'ı altta yatan, bilinen bir etiyoloji ile ilişkilidir (45). HCC etiyolojisinde kronik viral HBV (%33) ve HCV (%21) hepatitleri, aşırı alkol kullanımı (%30) ve aflatoksin maruziyetinin de bulunduğu diğer faktörler (%16) başlıca rol oynar (46). Hastaların pek azında tedavisi mümkün olan erken evrelerde HCC teşhis edilebilmektedir.

HCC'nin moleküler mekanizmaları heterojenite göstermektedir. Çoğunlukla görülen mutasyonlar; gen kopya sayısı değişiklikleri (gen-KSD), HBV insersiyonlarının

etkisiyle ortaya çıkan telomeraz ekspresyonu ve bu ekspresyonuna etki eden Telomeraz ters transkriptaz (TERT) promotör mutasyonları (%60), kromozom 6p21'de görülen Vasküler endotelyal büyüme faktörü-A (VEGFA) mutasyonu, 11q13'teki Fibroblast büyüme faktörü 19 ve Siklin D1'de görülen yüksek düzeyde DNA amplifikasyonları, TP53 ve CTNNB1 mutasyonları (%25) olarak karşımıza çıkar. Süreç içinde bu mutasyonların tanımlanması ve mekanizmaların aydınlatılması, beraberinde hedefe yönelik tedavi protokollerinin belirlenmesine yönelik beklentiyi güçlendirmiştir (47).

2.4. Hepatosellüler Karsinomun Histopatolojisi

HCC genellikle çevresel etmenler, diyet ve yaşam tarzına bağlı-coğrafya, cinsiyet ve ileri yaşla beraber alkol kullanımı olan çok aşamalı risk faktörlerinin bir araya geldiği HBV enfeksiyonu, aşırı alkol tüketimi, Wilson hastalığı, Hemakramatoz veya α -1-antitripsin eksikliği gibi kalıtsal hastalıklarla birlikte ortaya çıkar. Bununla birlikte vakaların yaklaşık %20'si fibrotik olmayan ve septal fibrosiz görülmeyen veya minimal fibrozis içeren karaciğerde gelişirler (48, 49).

2.5. Prekürsör Lezyonlar

HCC karsinogenezinde adenomdan karsinoma geçiş sekansı tipik olmamakla beraber nadiren HCC nin öncül lezyonları olarak görülür. Bu tip lezyonlar daha çok oral kontraseptif kullanan kadınlarda ve androjen tedavisi gören erkeklerde tanımlanmıştır. Bununla beraber HCC için risk faktörü olarak özellikle Hepatosellüler adenomun (HCA) kadınlara kıyasla, erkek hastalarda on kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir (49, 50). Çoklu HCA'lar arasındaki genetik heterojenitenin, Hepatosit nükleer faktör 1 homebox A (HNF1A) mutasyonu, beta-katenin gibi farklı mutasyon ve yollar üzerinden ilerlediği gösterilmiştir (51-53). Bunlarla beraber tüm HCA olgularının sadece %5'inin malign formasyona döndüğü bildirilmiştir (54)

2.6. Displastik Oluşumlar

Morfolojisi, nükleler boyutu ve stoplazmik boyanma özellikleri ile üniform yapıda olan ve çevre karaciğer dokusundan belirgin şekilde ayırt edilebilen, histolojik malignite kriterlerini tam olarak karşılamayan yapılardır. Bir milimetreden daha küçük olanları displastik odak, bir milimetreden büyük olanları ise displastik nodül olarak tanımlanır. Displastik nodüller genellikle siroz zemininde gelişirler. Literatürde gerileme olan olgular bildirilmiş olsa da düşük ve yüksek grade olarak derecelendirilen alt tiplerin her ikisi de HCC için progenitör lezyon olarak tanımlanmaktadır (55).

Özellikle yüksek dereceli nodüllerden HCC gelişme olasılığı daha fazladır (55). Histomorfolojisi; komşu normal karaciğer histolojisi ile karşılaştırıldığında düzensiz trabeküler paterne sahip en az iki kat artmış sellülarite, sitolojik atipi, monomorfik hücresel görünüm, bazofilik sitoplazma, yüksek nükleus/sitoplazma oranı, düşük düzeyde nükleer polimorfizm, nükleer hiperkromazi ve nadiren mitoz görünümü ile tanımlanır (49, 56).

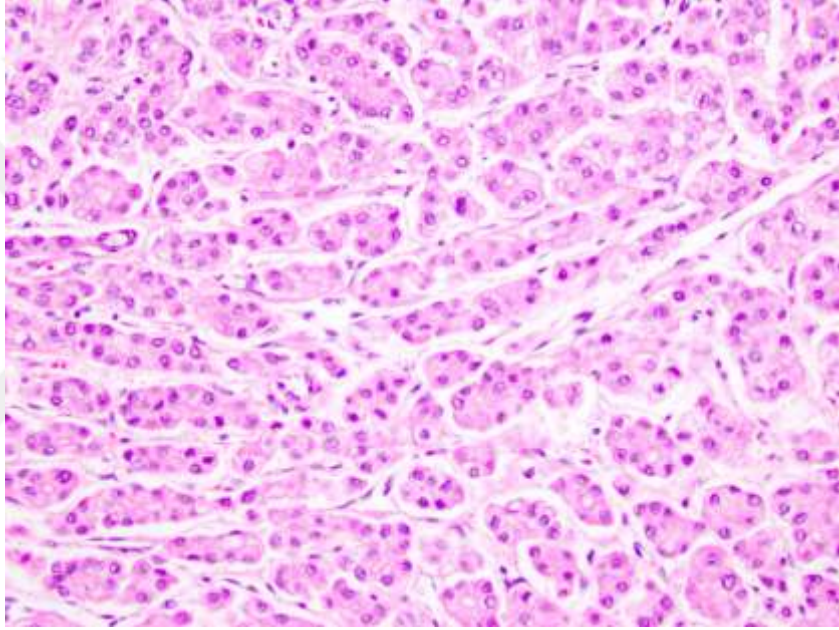
2.7. Hepatoselüler Karsinom

Son yirmi yıla girildiğinde HCC'nin moleküler mekanizmaları henüz yeterince bilinmemektedir. Kronik HBV ve HCV enfeksiyonu olan hastalarda sirotik karaciğerdeki displastik nodüllerin erken dönemde iyi diferansiye HCC olarak karşımıza çıktığı ve devam eden çok aşamalı bir süreçle farklılaştığı ve dediferansiye HCC olarak geliştiği ortaya konmuştu. Bugün ise HCC'nin moleküler mekanizmaları görece aydınlatılmış olmakla beraber, tümör baskılayıcı genlerin etkin olduğu çoklu savunma mekanizması ve karsinogenezdeki kimi noktalar belirsizliğini hala koruyor (57). HCC'nin, büyük oranda spesifik risk faktörleri arasında sayılan HBV veya HCV enfeksiyonu, yoğun alkol kullanımı, alfatoksin maruziyeti, alfa-1-antitripsin eksikliği veya son dönemde oranı artmakta olan alkolsüz steatohepatit risk faktörlerinin de yer aldığı sirozlu veya sirozsuz kronik karaciğer zemininde geliştiği artık net olarak bilinmektedir. HCC'lerin gelişiminde yine bu mekanizmaların da içinde yer aldığı hepatik adenomlar öncü lezyon olarak kabul edilse de vakaların oranını belirlemek oldukça zordur (54, 58). HCC'nin öne çıkan bir başka özelliği de multifokal HCC gelişimidir. Bu durum intrahepatik metastaz olarak yorumlanan tek bir odaktan köken alan, eş zamanlı olarak birçok odağın ortaya çıkması veya intrahepatik metastaza kıyasla daha yüksek oranla, birbirinden bağımsız birden fazla odağın oluşumuyla görülür. Bu iki mekanizma HCC patogenezindeki farklılıkların daha kolay görülmesini sağlamakta önemli fırsatlar sunabilmektedir. (49, 59, 60).

HCC sınıflandırmasında birçok alt tipi olduğu görülür. Bu alt tipler, glikojen birikimine bağlı berrak sitoplazmik değişiklikler, safra üretimi, lipofuskin birikimi ve yağlı değişiklikler gibi morfolojik farklılıklar yanı sıra immünohistokimya (İHK) parametreleri ile tanımlanmaktadır. Hepatositlerde çoğunlukla minimalden daha belirgine doğru giden atipi ve artan proliferasyon, hepatik mimari kaybı, portal traktın kaybı ve normal retiküler çatıda azalma veya tamamen kaybın olduğu morfolojik değişiklikler görülür. Tek bir endotel ile temsil edilen izole arter varlığı ve sinüzoidal

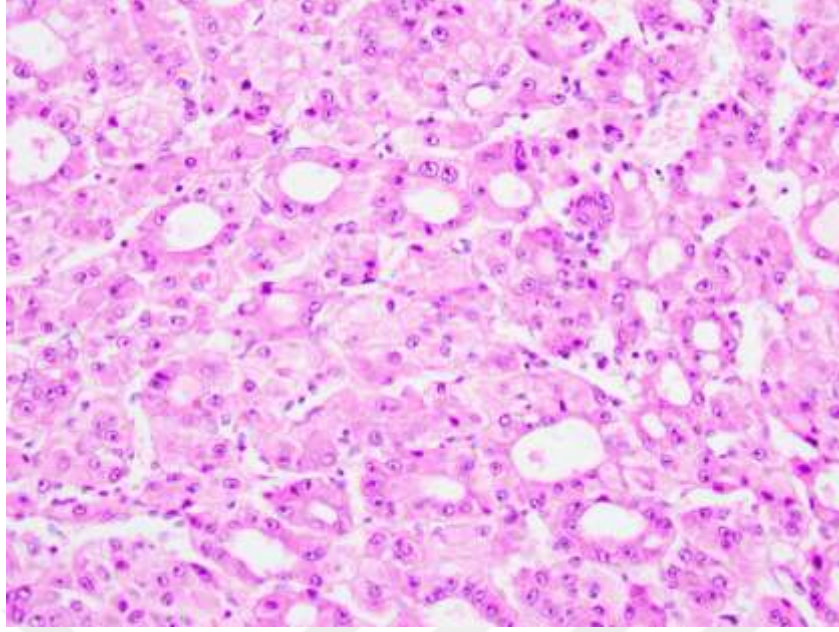
kapillerizasyon displastik ve neoplastik lezyonlarda görülen değişikler içinde bu tabloya eşlik edebilir (61).

HCC gelişimi ve mimari yapısı dikkate alındığında histopatolojik olarak trabeküler patern (Şekil 2.13), pseudoglandular (pseudoasiner) patern (Şekil 2.14), solid (kompakt) patern (Şekil 2.15) ve makrotrabeküler patern (Şekil 2.16) olarak adlandırılan dört temel büyüme modeli tanımlanmıştır (49, 61, 62). HCC'lerin yaklaşık yarısında birden fazla patern görülür. Karışık patern görülen olguların yarısında ise trabeküler patern görülürken, diğer paternlerden en az biri ona eşlik eder. Bir başka özel patern HCC nodülü içinde az diferansiye özellikte farklı nodül gelişimi görülmesidir (61).

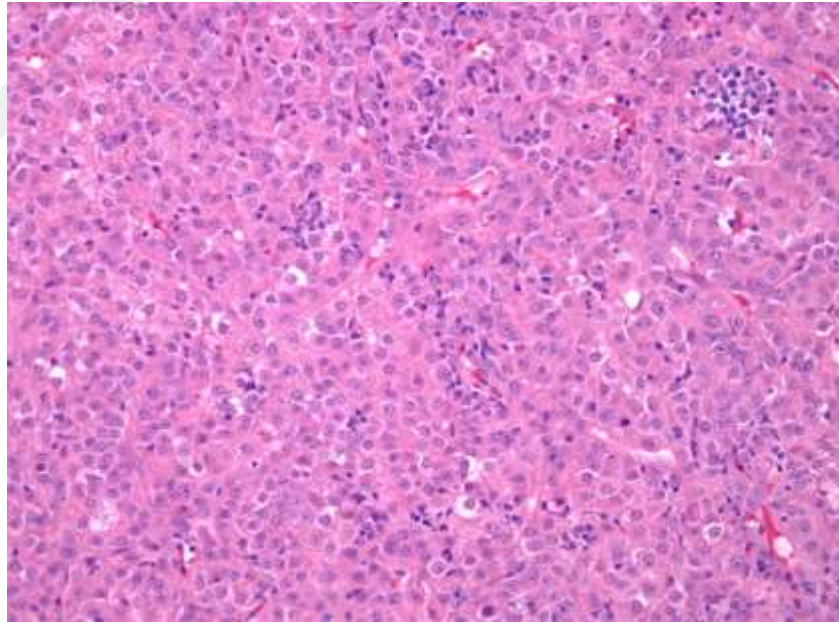


Şekil 2.13. Trabeküler morfoloji (H&E, x200) (63).

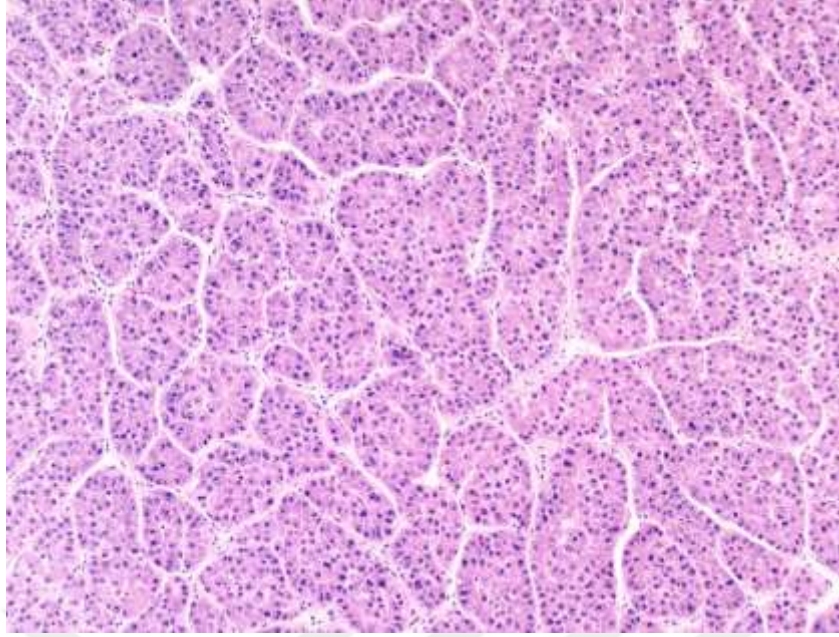
Trabeküler morfoloji ve sitolojik atipi gösteren hepatosellüler karsinom



Şekil 2.14. Psödoasinar morfoloji gösteren HCC (H&E, x200) (63).



Şekil 2.15. Solid patern gösteren HCC (H&E, x200) (64).



Şekil 2.16. Makrotrabeküler patern (H&E, x100) (65).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) histolojik derecelendirme sistemi; iyi diferansiye (Grade 1), orta derece diferansiye (Grade 2) ve az diferansiye (Grade 3) olmak üzere üç aşamalı bir derecelendirme sistemidir. Hepatoselüler veya biliyer oldukları ayırt edilemeyen dediferansiye tümörler bu derecelendirmenin dışında tutulmuştur (61, 66).

Hepatoblastom ve kombine hepatoselüler-kolanjiokarsinomun ayrı olarak sınıflandırıldığı WHO 2019 sınıflandırmasında HCC'nin çeşitli varyantlarını tanımlanmıştır (54, 67). Bunlar; fibrolamellar HCC (F-HCC), skiröz HCC (S-HCC), berrak hücreli HCC (BH-HCC), steatohepatitik HCC (SH-HCC), makrotrabeküler masiv HCC (MM-HCC), kromofob HCC (K-HCC), nötrofil zengin HCC ve lenfosit zengin HCC olarak sayılmaktadır (Tablo 2.1) (58, 67).

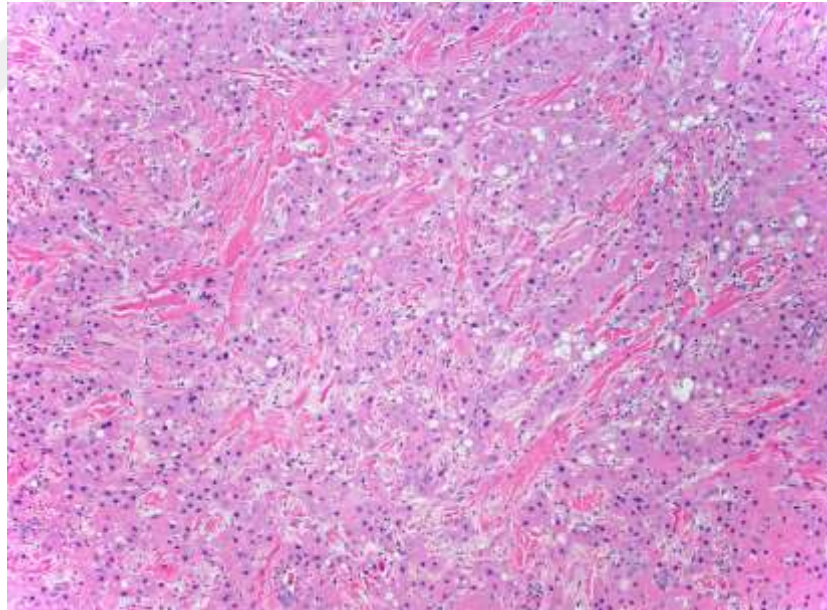
Tablo 2.1. HCC varyantları, WHO sınıflandırmasına göre özet tablo (67)

Variant	Histopatolojik özellikler	Moleküler özellikler	Klinik özellikler ve prognoz
		IL-6/JAK/STAT aktivasyonu	NAFLD mevcut olabilir
SH-HCC	Tümör hücreleri steatohepatitin histolojik özelliklerini gösterir	CTNNB1, TERT ve TP53 mutasyonları az sıklıkla görülür	Konvansiyonel HCC'ye benzer prognoz
BH-HCC	Tümör hücreleri, glikojen birikimi nedeniyle berrak sitoplazma gösterir.	Bilinmiyor	Konvansiyonel HCC'ye göre daha iyi prognoz
MM-HCC	Belirgin kalın trabeküller (6-10 hücre kalınlığında), sık damar invazyonu	Sık TP53 mutasyonu FGF19 amplifikasyonu	Kötü prognoz, yüksek serum AFP seviyeleri
S-HCC	Bol intratümöral fibröz stroma (tümörün %30-50'si)	Sık TSC1/TSC2 mutasyonları, TGF- β sinyal aktivasyonu	Değişken Daha büyük tümörler Konvansiyonel HCC'ye kıyasla agresif sonuçla ilişkili Görüntüleme bulguları sıklıkla kolanjiokarsinom ile örtüşür
K-HCC	Berrak sitoplazma, Arada belirgin atipik çekirdekli odaklar	ALT fenotipi	Konvansiyonel HCC'ye benzer prognoz
F-HCC	Yoğun fibröz stroma; belirgin nükleollü eozinofilik iri tümör hücreleri	DNAJB1-PRKACA gen füzyonu	Çocuk ve genç yetişkinlerde; altta yatan kronik karaciğer hastalığı yok; Batı ülkelerinde daha sık Sirotik olmayan karaciğerlerdeki HCC'lere benzer prognoz
Nötrofil zengin	Diffüz intratümöral nötrofilik infiltrasyon	Tümör tarafından G-CSF üretimi	Yüksek kan lökosit sayıları, C-reaktif protein ve IL-6 Geleneksel HCC ile kıyasla kötü prognoz
Lenfosit zengin	Masif intratümöral lenfositik infiltrasyon, sık PD-L1 ekspresyonu	Bilinmiyor, EBV ile ilişkisiz	Geleneksel HCC'ye kıyasla daha iyi prognoz

2.7.1. Fibrolamellar HCC

Daha çok Batı ülkelerinde görülen nadir varyanttır ve tüm HCC'lerin yaklaşık %1 kadarını oluşturur. F-HCC daha çok gençlerde ve kırk yaş altı gruplarda görülür. Karakteristik olarak yaygın görülen varyantların aksine altta yatan kronik karaciğer hastalığı bulunmaz. Vakaların %95'i kadarı 19. kromozomda, intrakromozomal delesyonla oluşan, onkojenik DNAJB1-PRKACA füzyon genini barındırır. Bu grup klinik, histolojik ve moleküler biyolojik özellikler nedeniyle diğerlerinden farklılık gösterir (67).

Ayırt edici histomorfolojik özellikler; belirgin nükleolusu olan büyük veziküler çekirdek ve yine yoğun mitokondri içeriği nedeniyle eozinofilik, granüler görünümde, belirgin sınırları olan çokgen sitoplazmaya sahip tümör hücreleridir. Tümör hücre gruplarının çoğunun, birbirine paralel intratümöral fibrozisin oluşturduğu septumlarla ayrıldığı görülür (Şekil 2.17). İntratümöral stromanın bu yoğun görünümü S-HCC'leri anımsatır. Ancak S-HCC'lerin makrofajlardaki markör ekspresyonu ve bunun tümörle ilişkisi dikkate alındığında bu gruptan farklı olduğu görülür (67, 68).



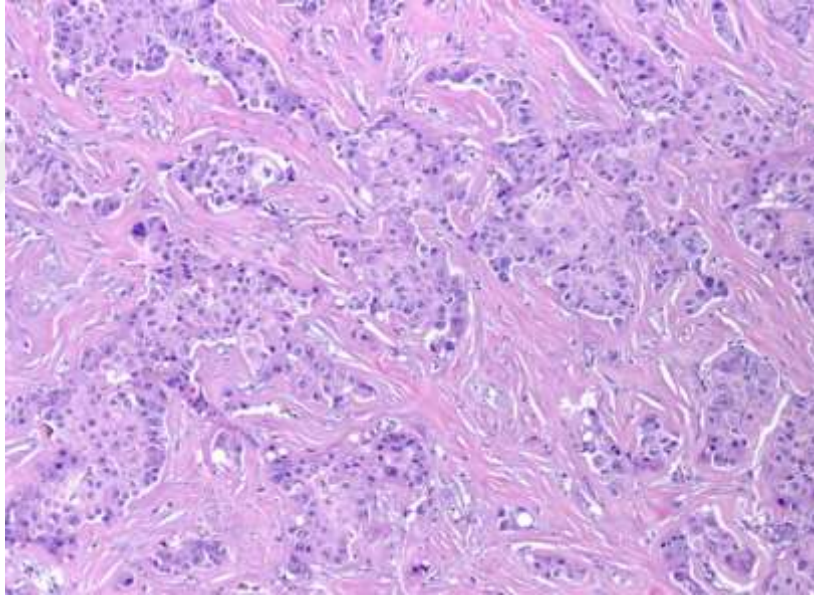
Şekil 2.17. Fibrolamellar HCC (H&E, x100) (68).

2.7.2. Skiröz HCC

Histomorfolojik görünümü; tümör hücre yuvalarını ve trabekülleri ayıran bol miktarda (%50'den fazla) intratümöral fibröz stroma ile karakterizedir ve sklerozan varyant olarak da adlandırılır (67, 69, 70). S-HCC'lerde, tedavilerden sonra ve ender

olarak da tedavi edilmeyen tümörlerde karşılaşılan yaygın fibrotik değişiklikler, trabeküler atrofiye yol açan sinüzoidal kapillerizasyonla karşımıza çıkar. Bu nedenle tipik sinüzoidler yerine arka planda tümör hücrelerinden oluşan yoğun fibröz stroma ile karakterize görünüme sahiptir. HCC nedeniyle kemoterapi veya radyoterapi alan kişilerde tümör, bu alt tipi taklit edebilir (49, 61, 69).

Bu varyasyonun makroskopik ayrıcı özelliği; genellikle subkapsüler yerleşimli ve kapsüle olmayan kimi zaman da uydu lezyonlarla birlikte görülen gri-beyaz, bazen de tırtıklı kenarı olan, lobüle kitle görünümüdür. Tümör hücre yuvalarının ve trabekülünün arka planda kaldığı, bu alt tipin karakteristik özelliği olan bol ve daha yaygın fibröz stromadan oluşması, merkezi skar olmayışı ve yayılan fibröz bantlar içermemesi ile F-HCC'den ayrılır (Şekil 2.18). Tümör hücre yuva ve trabekülü matür hepatosit benzeri hücrelerden oluşsa da daha küçük hepatik kök/progenitör hücrelere benzeyen tümör hücreleri tarafından çevrelenir (58, 61, 67, 69).

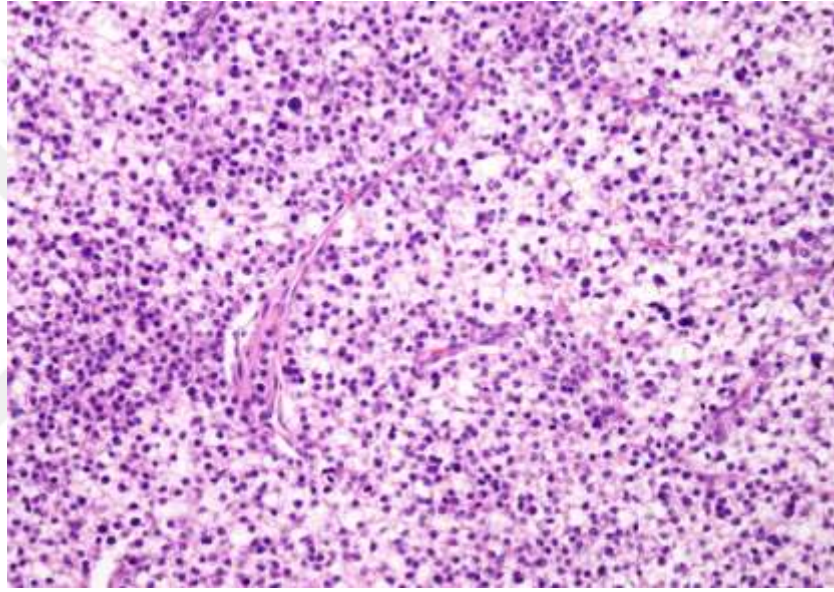


Şekil 2.18. Skiröz patern HCC (H&E, x100) (71).

2.7.3. Berrak Hücreli HCC

HCC'ler arasında %3-7 oranında görülen bu varyantın moleküler özellikleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Berrak hücreli Hepatoselüler karsinom (BH-HCC) varyantın histomorfolojisi, baskın karakterde daha çok glikojen kaynaklı olduğu düşünülen berrak sitoplazmik görünümündedir. Bu görünüm steatoz bulgusu olan sitoplazmik lipid damlacıklarından belirgin bir şekilde farklılık gösterse de bazen ayırt etmekte

zorlanılabilir. Bu nedenle BH-HCC tanısında bir dereceye kadar steatoz değerlendirilmesi yapılabilir (67). BH-HCC'lerde berrak sitoplazmalı neoplastik hepatositlerce baskın pater oluştursa da, seyrek (%20-40 orana kadar) berrak hücreler görülebilir. Özellikle baskın şeffaf sitoplazmalı hücre paterni izlenen olgularda metastatik lezyonları ekarte etmek için klasik HCC morfolojisini aramak gerekebilir. Büyük oranda glikojenin, kısmen lipid kaynaklı bol berrak sitoplazmalı yuvarlak çekirdekli neoplastik hepatositleri, psödoasinar, solid ve trabeküler desenlerin olduğu karışık mimariyi veya farklı hücresel formları da görmek mümkündür (Şekil 2.19). Bu morfolojiye ek olarak; kanama, nekroz alanları ve intrasitoplazmik safra eşlik edebilir (72).



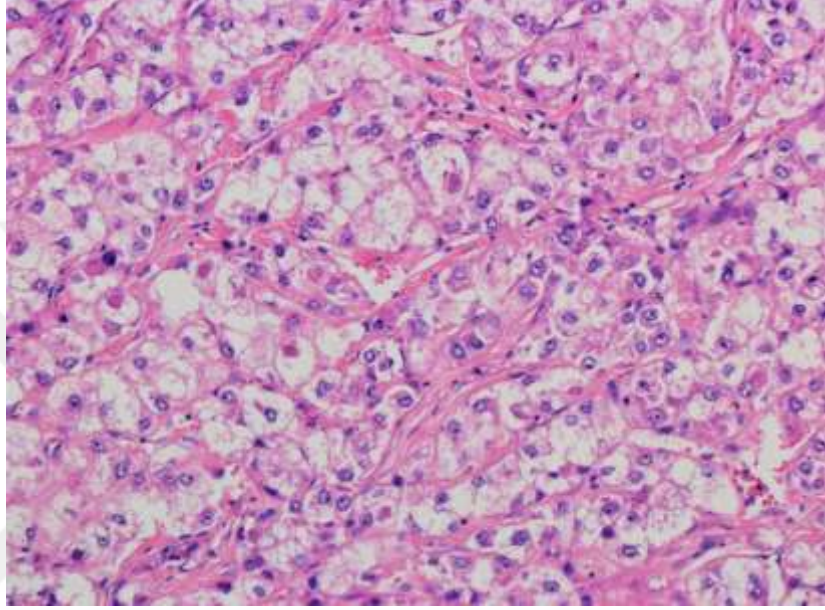
Şekil 2.19. Berrak hücreli HCC (H&E, x100) (73).

2.7.4. Steatohepatitik HCC

HCC'ler arasında %5-20 görülme sıklığı ile en yaygın olan alt tiptir (61). İntratümöral inflamasyon etkisi ve yağ içeriği ile birlikte görülen kalın fibröz bantlardan oluşan fibrozis görüntüsü, yağlı karaciğer hastalığı olan steatohepatitis görüntüsüne oldukça çok benzer. Bu benzerlik nedeniyle HCC'nin bu alttipi SH-HCC olarak adlandırılır. (58). Bu olgularda görülen fibrozis derecesinin yüksek oluşu, steatoz ve yoğun fibrozis nedeniyle daha sıkı yapı ve altın sarısı görünümüyle diğer HCC'lerden ayırt bir makroskobik özelliği vardır. Tümör nodülleri iyi sınırlı, çapı 0.5 ila 11 cm arasında değişen ölçülerdedir. Siroz ve bazı metabolik hastalıklarla ilişkili olduğu ifade edilen HCC'nin bu varyantında; tümör hücrelerinde yağlı değişiklikle görülen

balonlaşma, steatotik yağ vakuolleri, reaktif intratümöral stroma, Mallory-Denk cisimcikleri (Şekil 2.20) ve inflamatuvar hücreler görülür. Ayrıca "kümes teli paterni" olarak adlandırılan tipik periselüler fibrozis eşlik eder (61, 67, 74).

SH-HCC varyantının vasküler invazyon veya satellit nodüllerle ilişkisi daha azdır; prognozu klasik HHC prognozuyla benzerlik gösterir. IL-6/JAK/STAT aktivasyonu düşüktür ve yine CTNNB1, TERT ve TP53 mutasyonları daha az oranla görülür (67)



Şekil 2.20. Steatohepatitik HCC (H&E, x200) (75).

Belirgin eosinofilik Mallory-Denk cisimcikleri ve periselüler fibrozis görülmektedir.

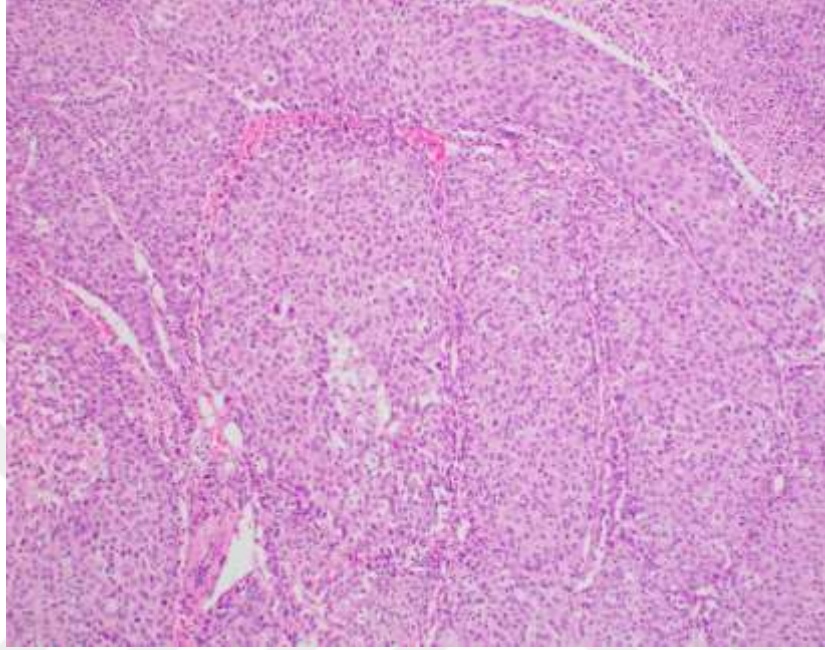
2.7.5. Makrotrabeküler Masif HCC

Bu alt tip malign hepatositlerden oluşan belirgin kalın trabekül yapılarıyla dikkati çeker. Genel HCC mimarisine göre yapılan sınıflamadaki trabeküler morfoloji <6 hücreden oluşurken bu varyantta 6-10 ve kimi kaynaklara göre 20 hücreye varan kalınlıkta trabeküller izlenir (Şekil 2.21) (67). Tüm HCC'ler içinde görülme sıklığı %5 olarak belirtilse de histomorfolojik kriterlerdeki farklılıklar nedeniyle %12'ye varan oranda görüldüğü de bildirilmiştir (76).

Makroskopik olarak sirotik veya sirotik olmayan her iki durumda da karşılaşılabilen satellit nodüller ve makrovasküler invazyon gözlenen, yarıdan fazla oranla 5 cm'den büyük nodüllerin izlenir.

Mikroskopik olarak genel görünüm makrotrabeküler-masif morfolojidir. Trabeküller enine kesitlerde CD34 pozitif endotel hücreleriyle kesintisiz olarak çevrelenir

(77). MM-HCC varyantta gen ekspresyon profilinde anjiyogenez aktivasyonu, başlıca karsinogenez yolu olduğu bildirilmiştir. Ayrıca MM-HCC varyantın önemli karsinogenez yolları arasında TGF- β , RAS/MAPK, PI3K/AKT, TP53 mutasyonu ve FGF19 amplifikasyonu saymak mümkündür (67, 76, 78).



Şekil 2.21. Makrotrabeküler-massif tip HCC (H&E, x100) (65).

2.7.6. Kromofob HCC

HCC'nin bu alt tipi WHO sınıflandırmasının 5. baskısında sınıflandırmaya dâhil edilmiştir (79). K-HCC, kromofob renal hücreli karsinomu ile morfolojik benzerlikler gösterebilen alt tiptir. Histomorfolojik olarak hücre sınırları genel hatları ile belirgin, çekirdekler üniform görünümündedir. Fokal alanlarda belirgin nükleer atipi bulunması karakteristik bir özelliğidir (58). Hücre sınırları genel hatları ile belirgin, yoğun olmayan sitoplazmik içeriği ile kromofobik görüntü verir (61). Moleküler mekanizması henüz aydınlatılmış olmamakla beraber FISH testi ile yapılan analizde telomer uzaması gösterilmiştir (67, 79).

2.7.7. Nötrofilden Zengin HCC

Tüm HCC'ler arasında insidansı %1'den az olan bu varyant daha çok ileri yaştaki kişilerde görülür. Histomorfolojisinde zengin intratümöral nötrofil ile sarkomatoid alanlar dikati çeker. Klinik olarak da yüksek lökosit sayısı ile dikkat çeken bu varyantta nötrofillerce yoğun, infiltrat alanlarının granülosit koloni uyarıcı faktör (Granulocyte

Colony Stimulating Factor; G-CSF) ekspresyon artışı önemli moleküler bulgudur (61, 67).

2.7.8. Lenfosit Zengin HCC

Tüm HCC'ler arasında görülme insidansı %1'den daha azdır. Histomorfolojik olarak tümör alanlarında, tümör hücresinden daha çok lenfosit varlığı dikkat çeker. Geçmişte lenfoepitelyoma benzeri HCC olarak da adlandırılmıştır. Lenfositik infiltrantın baskın olduğu morfolojide makrofaj, dev hücre, plazma hücresi ve nötrofil de görülebilir. Bu alt tipin Epstein-Barr Virüsü enfeksiyonu ile ilişkili olduğu ifade edilse de son çalışmalar bunun aksini göstermektedir (61). Klinik olarak önemli ve olumlu sonuçları olan programlanmış ölüm-ligand-1 (PD L-1) ekspresyonuyla ilişkisi net olarak ortaya konmuştur (67).

2.8. Hepatoselüler Karsinomun Moleküler Karsinogenezi

HCC'nin moleküler patogenezi, etiyoloji ve coğrafyaya bağlı olarak değişiklikler gösterse de vakaların %80'inde görülen kronik inflamasyonun karaciğer mikroçevresini değiştirmesiyle genotoksik hareketlerin karsinogeneze kritik rol oynadığı söylenebilir (2, 80). İnflamatuar hücrelerin sitokinleri, serbest oksijen türevleri, nitrik oksit ve benzeri ürünler rejeneratif yanıtı indüklerken, transkripsiyonel düzeyde organizmayı genetik değişkenliklere yatkın ve duyarlı hale getirir (80, 81). Bununla beraber karaciğer karsinogenezi söz konusu olduğunda iki modelden bahsetmek mümkündür. Bunlardan ilki klonal evrim modeli iken bir diğeri ise kanser kök hücre modelidir. Klonal evrim modeli, doku ekosisteminin adaptif mekanizmaları içinde tekrarlayan klonal genişleme ve seçim süreci ile ortaya çıkar. Karaciğer söz konusu olduğunda özellikle kronik inflamatuvar zeminde gelişen prekansöröz lezyonlardan, metastatik lezyona varıncaya dek tümör gelişimini çok aşamalı genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesinin bir sonucudur (80, 82).

Kanser kök hücre modelinde, doku onarımında rol alan, dokuları yenileme potansiyeline sahip progenitör (öncül) hücreler dikkati çeker (83). Tek bir kök hücreden çimlenen kanser hücresine rağmen HCC'lerde tümör heterojenitesi görmek mümkündür. Hepatositlerin rejeneratif potansiyeli, somatik mutasyonlar, sürücü mutasyonların farklı birikimi ve tümör mikroçevre varyasyonları tümör heterojenitesini açıklamakta kullanılan argümanlardır (80, 83).

HCC'de sürücü gen mutasyonlarında, sıklıkla tekrarlayan ve değişen onkogen etkiye veya tümör süpresör etkiye sahip kanser sürücü genleri tanımlanmıştır (84). Bu

sınıflandırma büyük oranda genomik, epigenomik, histopatolojik ve immünolojik analizler sonucu elde edilen verilere dayanan, moleküler ve İHK sınıflandırması ile oluşturmuştur. Son dönemde ise HCC’de kullanılan moleküler sınıflandırma ve ilişkiler, temel moleküler sürücüler ve ana yollar üzerinden yapılmaktadır (2).

2.8.1. TERT Promotör Mutasyonları

Farklı etiyolojilerde (HBV, HCV, aşırı alkol tüketimi ve non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı vb) ve %80 kadar sıklıkta, en erken görülen olgu, uzayan telomeraz aktivasyonudur. Yaklaşık %60 oranda görülen TERT promotör mutasyonları, sirotik karaciğerlerden gelişen HCC’lerde erken dönemde gözlenirken, bunun tekrarlayan ve yaygın somatik değişiklik olduğu söylenebilir. Ek olarak %5-6 düzeyde TERT amplifikasyonu ve %1-2 düzeyinde görülen TERT translokasyonundan da bahsedilebilir. TERT amplifikasyonu HBx proteinin, TERT promotör bölgesine entegrasyonu ile görülmesi, HBV-HCC vakalarında dikkat çekici bir olgudur (2, 84, 85). Bu aktivasyonu teşvik eden mekanizmalar TERT promotör mutasyonları, viral eklemeler (insersiyon), translokasyon veya amplifikasyonlar olabilmektedir (2, 47).

2.8.2. Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı

Wnt/ β -katenin sinyal yolağının HCC’lerde de aktif rol oynadığı gösterilmiştir. HCC’lerin yaklaşık %30 kadarı ise Wnt sinyal yolağındaki inhibitörlerin (APC, AXIN1) mutasyonuya ilişkilendirilmiştir. Bu inhibitörlerden özellikle APC’nin (adenomatöz polipozis koli) β -katenin yıkım kompleksi olarak görev yapmaması ve CTNNB1 geni tarafından β -katenin farklı seviyelerde eksprese edilmesiyle, sitosolde ve farklı lokalizasyonlarda birikmesiyle kendini gösterir (86). Bilhassa β -katenin, transkripsiyon faktörleri ailesinden T-hücre faktörü/lenfoid güçlendirici faktör (TCF/LEF) proteinlerine bağlanarak çekirdekte belirli transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girer (2, 80, 87).

2.8.3. TP53 Geni

HCC karsinogenezinde yaygın olarak karşılaşılan bir başka mekanizma ise P53 tümör süpresör gende görülen somatik mutasyonlarıdır. HCC’de görülen TP53 mutasyonu kötü prognoza sahiptir ve Fibroblast Büyüme Faktörü 19 (FGF19) veya Siklin D1 amplifikasyonları ile birlikte HBV-HCC’lerde daha sık karşılaşırlar (2). Hücre döngüsünü durdurmakta, apoptozda, yaşlanma ve hücre hasar yanıtında önemli bir protein olan P53’ü kodlayan TP53 geni, dış faktörlerle tetiklenen karsinogenezi önlemede önemli bir mekanizmadır (80).

HBV ve HCV kaynaklı kronik infeksiyon, reaktif oksijen radikallerinin açığa çıktığı hemokromatozis hastalığı gibi etmenler TP53 mutasyonlarının görüldüğü DNA hasarına neden olur (88). Tümör süpresör mekanizmasındaki bozukluklar, hücre döngüsünün işleyişinde düzensizliğe neden olan birçok sürecin aktive olmasına yol açar. Özellikle HBV'nin HBx olarak bilinen viral proteini kodladığı ve bu proteinin p53'e spesifik olarak bağlandığı ve bu yolla p53 ile indüklenen apoptozu baskıladığı bilinmektedir (80).

2.8.4. Myc Protoonkogenler

Genel olarak HCC'lerde c-Myc'nin aşırı eksprese edildiği görülür. c-Myc, proto onkogen ailesinin bir üyesi ve transkripsiyon faktörlerini kodlayan, düzenleyici bir gendir. Kronik karaciğer hastalıklarında c-Myc ekspresyon seviyelerinin yüksek seyretmesi ve HCC'lerde sıklıkla c-Myc amplifikasyonu tanımlanması HCC karsinogenezindeki rolünün ortaya konmasında önemli olmuştur (89). Bu olgular Wnt/ β -katenin etkinliğinde, Myc'nin yukarı yönlü regüle edilmesi arasında ilişki kurulmuştur. Myc'nin HCC karsinogenezinde artan ekspresyon düzeyi ile TERT'in indüklediği ve bu yolla hücre yaşlanması atlanarak kanserleşmeye katkıda bulunduğu bildirilmiştir (80, 89). Anjiyogenezde rol alan VEGFA'nın ekspresyon düzeyi artacak şekilde, özellikle hipoksi sırasında c-Myc ve HIF-1 α ile etkileşime girerek anjiyogenezi indüklediği de ortaya konmuştur (89, 90)

2.8.5. PI3K/PTEN/Akt Sinyal Yolağı

Hücre proliferasyonu, hücre metabolizması ve apoptoz gibi süreçlerin kontrolünde yer alan bir diğer mekanizmadan, PTEN/PI3K/AKT sinyalleşmesini düzenleyen önemli bir yolağın varlığından da bahsetmek gerekir (91, 92). PI3K-Akt yolu, kanserde aktive olan hayatta kalma yolu olması, tümör oluşumuna önemli ölçüde etki eden PI3K ve PKB/Akt aktivasyonunun keşfedilmesi, bu yolun düzenlenmesine yönelik araştırmaların artmasına ve nihayetinde, negatif düzenleyici olarak görev yapan fosfataz ve tensin homologunun (PTEN) keşfedilmesiyle sonuçlanmıştır (93, 94). Bu özeliğiyle PTEN tümör baskılayıcı, somatik kanserlerde inaktivasyon için ortak hedef molekül seçilmiştir. Akt'nin (protein kinaz B) aktivasyonu veya inaktifliği, hücrenin hayatta kalması, büyümesi ve proliferasyonu gibi hücrel süreçlerin ilerlemesinde etkili olur. Bu işlevi yerine getirmede çok sayıda Akt, fosforilasyon hedefi aracılığıyla sinyalleşmeyi tetikler ve fosfoinositid-3-kinaz'ın (PI3K) rol aldığı çok aşamalı bir mekanizma ile kontrol edilir.

PTEN tarafından ifade edilen PTEN protein Akt için negatif düzenleyici rolündedir. (92, 93).

2.8.6. Epigenetik Modifikasyonlar ve Tümör Mikroçevresi

Epigenetik modifikasyonlar, mutasyonlar gibi nükleotit dizi değişikliklerinden farklı olarak gen ekspresyon düzeyine etki eden DNA metilasyonu, miRNA düzeyi gibi çeşitli mekanizmalarla kendisini gösteren değişikliklerdir. Özellikle oldukça iyi araştırılan DNA metilasyonu ve miRNA etkinliği gibi epigenetik modifikasyonlar HCC'lerin %25-50'sinde karsinogeneze katkı verdiği ve süreci güçlendirdiği çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur (85, 95). Bir transkripsiyon düzenleyicisi rolüyle, hücrel sinyallere yanıt olarak gelişen DNA metil transferaz (DNMT) aktivitesi, histonların lizin ve arginin spesifik metilasyonunu gerçekleştirerek gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde etkin görev yapar (96, 97). Genellikle somatik hücrelerde, CpG dinükleotitlerinde gerçekleşen bu olay, DNMT aktivitesiyle S-adenosil metyoinin gen promotör bölgeleri ve düzenleyici bölgelere metil gruplarının sitozin bazlarına aktarılma sürecidir (98). Gen ifadesinde önemli işlevi yerine getiren CpG adaları, kısa tekrar dizileri ve yaklaşık 2 kb'lık bir bölümü de içine alan daha düşük CpG içeren bölgeyi tanımlar. Tüm promotörlerin %50'si bu adacıklardan oluşur. Promotör bölgede bulunan CpG adacıklarında sitozin bazlarının hipermetilasyonu veya hipometilasyonu ile genin uzun süreli susturulması veya aşırı ifade edilmesi indüklenir. Birçok kanser türünde DNA üzerindeki metilasyon düzensizlikleri görülmektedir. Hipometilasyon genom yapısında kararsızlığa, mutasyonların görülme sıklığının artışına ve translokasyonlara neden olabilmekte, transkripsiyon faktörlerini indükleyebilmektedir. HCC'lerde ise tümör süpresör genlerin hipermetilasyonu ile gen ifadesinin susturulması ya da azalması karsinogeneze önemli yer tutar (95, 98-100).

DNA metilasyonları kadar histon modifikasyonları da epigenetik mekanizmalar içinde önemli ağırlığa sahiptir. Bu mekanizmaları histon metilasyonu, histon asetilasyonu ve histon fosforilasyonu olarak özetlemek mümkündür. Histon olarak adlandırılan bu protein bileşim, ökaryotik kromatin mimarisinde önemli yer tutar. DNA, bu dört *domain* 'den oluşan protein yapının etrafına sarılarak histonu, nükleozomu ve kromatini oluşturur. Özellikle histon kuyruğunun modifikasyonu, transkripsiyon sonrası yüksek dereceli kromatin mimarisinin düzenlenmesindeki mekanizma olarak karşımıza çıkar (101, 102). Histon metilasyonu ve asetilasyonu dışında histon fosforilasyonu bilhassa aktif gen transkripsiyonu ile karakterize edilen, özellikle Aurora kinazların H3 histon'un

serin/treoninin fosforilasyonundan sorumlu olduğu ve yüksek dereceli tümörlerle korelasyonu bildirilmiştir (97, 102).

Kodlamayan RNA parçaları-Non-coding RNA (ncRNA), promoter bölgeye bağlanarak genlerin ifadesinin düzenlenmesine aracılık eden RNA parçalarıdır. Bu kodlamayan RNA parçalarının 200 bazdan uzun olanları *long noncoding RNA* (lncRNA), 200 bazdan kısa olanlar, *short noncoding RNA* (sncRNA) olarak sınıflandırılır. Yine 200 bazdan kısa olan sncRNA'lar *small interfering RNA* (siRNA) ve *micro RNA* (miRNA) olarak iki alt grupta yer alır. Özellikle miRNA'lar son dönemde yoğun şekilde incelenmiş, tanı ve prognoz açısından önemli bir biyobelirteç olabileceği ifade edilmiş ve bu niteliği ile öne çıkmıştır (103, 104). HCC karsinogenezi ile ilişkilendirilen bir başka moleküler yapı, gen ifadesinin düzenlenmesinde transkripsiyon sonrası, translasyon düzeyindeki ifadeyi modüle eden ve düzenleyici etkileri olan, tek sarmal, kodlamayan küçük endojen moleküllerin anormal ekspresyonudur (105). Karsinogenezde rol alan miRNA'lar onkojenik ve tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak gruplandırılmıştır. Tümör baskılayıcı miRNA'lar onkojen ekspresyonunu inhibe ederken kanser hücrelerinde rastlanmaz. Onkojen miRNA ise, hücrelerde tümör baskılayıcıları inhibe eder ve karsinogenezi indüklerler. Bu özellikleri, miRNA'ların HCC'lerde de bir biyobelirteç ve tedavide hedef molekül olarak seçilmesi araştırmalarında etkili olmuştur (106-108).

Tümör mikroçevresini oluşturan immün sistem hücreleri ile HCC hücreleri arasındaki ilişki, gün geçtikçe daha çok ilgi gören ve çalışılan bir konudur. Tümör mikroçevresi hücrel ve hücrel olmayan unsurların bir arada bulunmasıyla oluşur. İmmün sistem hücreleri ve medyatörleri ile HCC arasındaki ilişki, HCC yi teşvik veya inhibe edici yönde olabilmektedir (109, 110). HCC'lerde de tümör ve mikroçevresi arasında karşılıklı ve devam eden bir etkileşim görülür. Tümör mikroçevresini oluşturan hücrel olmayan unsurları ekstraselüler matriks barındırır. Hücrel unsurlar ise HCC hücreleri ve hepatik stellat hücreleri ile bu hücrelerin etkileştiği anjiyogenik endotel hücreler, fibroblastlar, adipositler ve immün sistem hücreleridir. Tümör mikroçevresinin karsinogenezi tetiklediği, tümörün ilerlemesini ve ilaç direncini büyük ölçüde etkilediği belirtilmiştir (110, 111).

2.9. Hepatit B İlişkili HCC

Hepadnaviridea ailesinin bir üyesi olan HBV kısmen çift sarmallı, dairesel DNA virüsüdür. İlk olarak kan ve plazma transfüzyonu sonrası geçici veya kronik hepatite neden olan viral infeksiyonların olabileceği düşünülmüş, 1950'lerden sonra ise HCC ile

ilişkisi değerlendirilmiştir. Serumda HBV zarf proteinleri L, S ve M (Hepatit B yüzey antijenleri - HBsAg) 1960'ların sonunda keşfedildi. Ardından 1990'larda HBV ile HCC arasındaki ilişki açık bir şekilde ortaya kondu (112). Hepatit B virüslerin neden olduğu bu enfeksiyonlar birkaç ay gibi kısa süreli ve geçici olabildiği gibi, bireyin yaşamı süresince devam eden, siroz, karaciğer yetmezliği ve HCC ile sonuçlanabilen kronik enfeksiyon tablosu da görülebilmektedir (112, 113).

Çalışmalar, viral proteinlerin konakçı genomunu etkileyebildiği, gen ekspresyonunu değiştirebilecek şekilde konakçı proteinlerle etkileşime girdikleri gösterilmiştir (88). Kısmen çift sarmal, dairesel üst üste binen ve dört okuma çerçevesinden oluşan (core, yüzey, x ve polimeraz bölgesi) virüs DNA'sı yedi protein yapıyı sentezler (57). Bunlar “core” protein, “precore” protein, pol ve HBx protein ile küçükten büyüğe sırasıyla S, M, L olarak adlandırılan üç zarf proteinden ibarettir (112). HBV DNA'sı, ipliklerin 5' uçları arasında yapışkan, kısa bir örtüşme bölgesinin yer aldığı kısmen çift sarmal, halkasal bir formasyon gösterir. DNA'nın replikasyonu, revers transkripsiyon ile bir pregenom RNA'nın 5' kopyasına bağlanmasıyla başlar. Viral RNA'ların sentezlenmesinde kapalı, oldukça küçük kovalent dairesel bir kromozom (cccDNA)¹ kalıp olarak kullanılır. Bundan hareketle 1980'lerde, rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesiyle beraber, revers transkriptaz inhibitörleri geliştirilmiş ve HBV enfeksiyon tedavisinde etkili yollar aranmıştır (112). HBV enfeksiyon tedavisinde öncü gelişme 1990'ların ortalarında virüse spesifik sitotoksik T hücrelerce sentezlenen ve HBV gen ekspresyonuna ket vuran interferon-gama ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α)'nın aracılık ettiğinin ortaya konulmasıyla olmuştur (114). Virüs nükleik asit ve yapısal protomer biriminin oluşturduğu, nükleokapsitin alt birimi olan “core” ve “pol”, konakçı hücre sitoplazmasında yer alan viral DNA'nın sentezi için gerekli revers transkriptaz, RNaz H gibi enzimleri ve primeri kodlar (112).

Viral RNA'ların sentezinde, cccDNA'nın tam ve etkin transkripsiyon için yapısal HBx protein gereklidir (112). Bu noktada HBx'in hepatositte ekspresyon düzeyine bağlı olarak hücre ölümü veya HCC gelişiminde rol oynayan transaktivatör görevi gördüğü, c-Myc ile etkileşimini güçlendirdiği, sitoplazmada P53 proteini ayırarak hepatosit patogenezi ve HCC'yi indüklediği ifade edilmektedir (115, 116).

¹ cccDNA (kovalent olarak kapalı dairesel DNA), virüslerin çoğalma sürecinde ortaya çıkan, kalıcı, özel DNA parçasıdır. Kronik HBV'nin temel nedeni olduğu bildirilmiştir. (214)

2.10. Kriptojenik Hepatoselüler Karsinom

KR-HCC, klinik ve serolojik olarak HBV, HCV ve alkolizimin görülmediği, otoimmün, genetik, toksinle ilişkili karaciğer hastalıkları, biliyer siroz, hemokromatoz ve Wilson hastalığı gibi bilinen başka bir etiyolojisi olmayan hastalarda gelişen HCC'yi tanımlamak için kullanılır. Kriptojenik sirozlu hastalarda da KR-HCC gelişebileceği bildirilmiştir. Kriptojenik sirozda, benzer şekilde, belirli bir hastalık için kesin klinik ve histopatolojik kriterlerin uygulanamadığı, etiyolojisi belirsiz sirozu tanımlamada kullanılır (117, 118).

Çoğu zaman geç evrede ve genel durumu kötü olduğu halde tanı konmasına rağmen, viral ve alkolik ilişkili HCC'lerle karşılaştırıldığında benzer prognostik öngörü ve uzun süreli sağ kalıma sahiptir. Ancak sürveyans eksikliği nedeniyle ileriki aşamalarda teşhis edilmesi, sağ kalım sürelerini olumsuz etkilemektedir (117, 119).

2.11. Kinazlar ve Aurora Kinaz A

2.11.1. Kinazlar

İnsan genomunun kodladığı yaklaşık 538 protein kinaz tanımlanmıştır. Kinazlar, hücrenin biyokimyasal faaliyetler için ihtiyaç duyduğu enerjiyi taşıyan, depolayan, çok yönlü nükleozit trifosfat olan ATP'yi substrat olarak kullanarak bir γ -fosfat grubunu, serin, tirozin ve treonin birimlerine aktaran enzimlerdir (11, 120).

Hücre döngüsünün kontrolü ve düzenlenmesine bakıldığında, siklin bağımlı kinazlar, DNA hasar ve iğ düzeneği kontrol noktası düzenleyicileri, Aurora kinazlar ve Polo-like kinaz gibi, kinaz ailesinin birkaçının öne çıktığı görülür (121). İlk protein kinaz inhibitörünün geliştirilmesi ile 1980'lerden itibaren ilaç tedavisinde G-protein bağlı reseptörlerden sonra en çok hedeflenen moleküller bu grupta yer alır (11, 122). Gen ekspresyonunu düzenlemeye yönelik yöntemler arasında, transkripsiyon sonrası mRNA'nın işlenmesini inhibe edecek antisens oligonükleotitler de tasarlanmıştır. Kinaz aktivitesini inhibe eden ve doğal olarak oluşan ürünlerin sentetik türevleri ile reseptöre bağlı kinazları inhibe etmek için monoklonal antikolar, hedef kinazları baskılamasına yönelik araştırmaların odak noktasını oluşturur (122).

İlk çalışmalar hücre bölünmesindeki merkezi rolleri, mitojenik sinyalleşmede sensör görevleri nedeniyle siklinler, siklin bağımlı kinaz (CDK) ailesi üzerinde yoğunlaştığı görünüyor. CDK inhibitörlerinin inaktivasyonu veya siklin partner moleküllerin aşırı ekspresyonu nedeniyle bu kinazlar karsinogenezde çoğunlukla yukarı regüle edilir. Bu yönde yapılan çalışmalar netice vermiş ve CDK'lara karşı tanımlanmış

çok sayıda küçük CDK inhibitör molekülü belirlenmiştir. Yakın zamanda ise AURKA, Aurora kinaz B (AURKB) ve PLK-1 gibi diğer serin-treonin protein kinazlar başkaca hedefler olarak ilgi görmektedir (121).

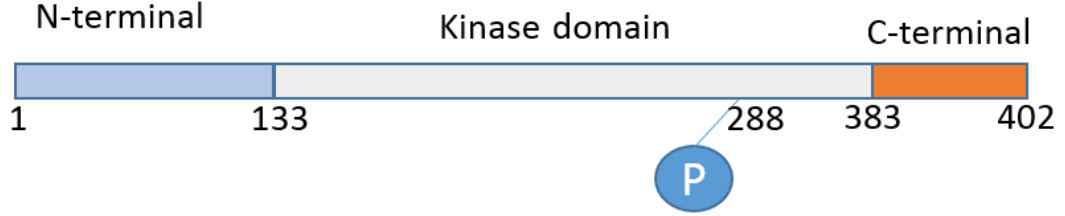
2.11.2. Aurora Kinaz A

Hücre bölünmesi, büyümesi, yaşlanması, apoptoz süreçleri içinde yer alan genler ve ürünleri, hücre transformasyonu ve karsinogenezde öne çıkmaktadırlar. Hücre bölünmesi sürecinde yer alan; CDK gibi hücre döngüsünü düzenleyen genler ve aşağı yönlü substratları, siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKin) çok çalışılmış ve irdelenmiştir. Hücre bölünme döngüsünde önemli görevler üstlenen serin/treonin kinaz ailesinin bir başka üyesi ise Aurora kinazlardır (123, 124). AURKA geni, birçok kanser türünde sıklıkla amplifiye olduğu gözlenen kromozom 20q13 bölgesiyle eşleşir ve ekspresyon insidansı kötü prognozla ilişkilendirilir (124, 125). Bir kısım kinazları veya fosfatazları fosforile ederek birçok sürece etki eder. Ayrıca hücre bölünmesi sürecinde sentrozom fonksiyonunu düzenlenmekte, bipolar iğ ipliğın bağlanması ve kromozom ayrışmasında rol oynar (123, 124).

Hücre döngüsünde, işlevsel molekülerin fosforilasyonu, döngüde mitoz giriş, defosforilasyon ise çıkışa işaret eder (126). Siklinler, CDK, CDKin, p53 ve Retinablastom tümör süpresör proteinleri G1 ve S fazında etkinlik gösterir ve bu fazı regüle eder. AURKA'nın da olduğu bir dizi gen ve ürünleri başta kromozom ayrılma kusurlarının görüldüğü çeşitli tümör gen transformasyonunun gerçekleştiği G2 ve M fazının düzenlenmesi, yürütülmesi ve korunmasında etkin görev alırlar (124). AURKA'nın da içinde bulunduğu mitotik kinazlar, çoğunlukla G2-M fazında aktive olur ve bunların mitozun çeşitli kritik süreçlerinde önemli roller oynadıkları düşünülür (123). AURKA ifade düzeyi G1 ve S fazında düşüktür. Ancak G2/M evresinde en yüksek seviyede eksprese edilen AURKA ve PLK-1 benzer bir şekilde pozitif geri besleme ile CDC-2'nin (cell division control 2 protein) aktivasyonunu indükleyebildiği ve sinerjistik bir ilişki içinde olduğu belirtilmiştir. Hücre döngüsünün devamında, mitotik çıkış sırasında, yani G1 fazında ise en düşük seviyede gözlenir (123, 124).

AURKA'nın yapısı incelendiğinde; protein lokalizasyonunu belirlediği düşünülen yaklaşık 133 amino asitten (aa) oluşan bir N-terminal alanı olduğu görülür. Ortada 250 aa'dan oluşan korunmuş bir katalitik alan ve birde kinaz alanı vardır. C-terminal alanı (yıkım kutusu) ise 19 aa'dan oluşur ve başta APC/C aracılı bozunum olmak üzere, protein konformasyonuna, kinaz aktivitesinden sorumlu ortak faktörler ile etkileşime aracılık

eder (Şekil 2.22. AURKA fonksiyonel bölgeleri). AURKA'nın katalitik olmayan N ve C-terminal alanları boyut ve dizilim açısından insan AURKA proteini içinde minör farklılık gösterebilmektedir (127).



Şekil 2.22. AURKA fonksiyonel bölgeleri

Başta ökaryotik canlılar olmak üzere protein fosforilasyonu, çoğunlukla serin, treonin ve tirozin kalıntılarında olur (128). Yapısında bulunan, kinaz alanının C-terminal lobunda yer alan Thr288 kalıntısının fosforilasyonu, AURKA'nın kinaz aktivitesi kazanmasıyla sonuçlanan bir konformasyona neden olur. Bu özelliklerden de yola çıkılarak AURKA'nın aktif bölgesinin özel yapısının aktivasyon döngüsü içinde özel konformasyona sahip olduğu, böylece Aurora kinazların seçici, ATP-rekabetçi inhibitör tasarlanmasına imkân sağlayabileceği düşünülmüştür (127, 129, 130).

Hücrede DNA hasarı oluşması durumunda, hasar üç kontrol noktasında ve farklı mekanizmalarla denetlenir. Bu kontrol noktaları Gap 1 (G1) fazı, Sentez (S) ve Gap 2 (G2) fazlarıdır. Kontrol noktalarında hasar özel mekanizmalarla tamir edilir, hücre döngüsü duraklatılır ve/veya programlanmış hücre ölümü gerçekleştirilir (127, 131).

Mitotik faza giriş öncesinde G2 fazında başta kromatin kopma kusurları tesbitinde bir dizi sensör protein görev yapar. Bunlardan bazıları; çift zincir kırıkları onarım proteini (RAD50), 3' ila 5' eksonükleaz aktivitesi ile DNA çift sarmal kopmalarına karşı onarım yapan MRE11 homologu ve yine DNA hasarı kontrol noktası aktivasyonunda yer alan Nibrin (Nbs1) molekülleridir. Bu süreçte görev yapan mekanizmalar, mitozu ve dolayısıyla replikasyonu inhibe edebilen, DNA onarımını veya apoptozu indükleyen birden fazla proteini fosforile ve aktive eden, Ataksi telenjipektazi ve Rad3 ile ilişkili protein (ATR) ve Ataksi telenjipektazi mutant (ATM) kinazlarını uyarır (127, 132-135).

Siklin, CDK ve CDKin'den farklı olarak G2 *arrest*'in kurulmasında; TP53 aracılı mekanizma da görev alır. ATM ve ATR, Hücre bölünmesi döngüsü 25C (CDC25) proteinini (M fazı indükleyici fosfat 3) ekspre eden, bir serin/treonin spesifik protein kinaz olan, kontrol noktası protein 1 ve 2 (Chk1/Chk2)'yi fosforile eder ve aktive eder.

Bu arada CDC25C'nin ekspresyonu, Siklin B1 alımını önleyerek hücre döngüsünün G2 fazından mitotik geçişine blokaj yapar. Diğer yandan CDK1 ile indüklenen mitotik girişi engelleyen p21, büyüme durması ve DNA hasarı ile indüklenabilir protein, büyümenin durması-DNA hasarıyla indüklenebilir-alfa (GADD45A)'nın p53'e bağlı transkripsiyonu indüklenir. P53, GADD45A ve Stratifin'nin (SFN) transkripsiyonunu indükleyerek, CDC25C'nin transkripsiyonunu inhibe eder. Böylece döngüde G2 arrest'i kurulur. Devamında. GADD45A, AURKA'yı bağlar, katalitik aktivitesini inhibe eder ve AURKA aracılı G2/M geçişini önler (127, 136, 137). Başka bir yolla Chk1, mitotik giriş öncesinde DNA hasar yanıtı olarak AURKA'yı baskılar. DNA onarımıyla döngünün mitotik ilerlemesi için kontrol noktasını geçmesi gerekecektir. Bu aşamada kontrol noktası kurtarma-çıkış mekanizmaları, AURKA'nın etkin olması için Chk1'in inhibisyonunun önünü açacaktır. AURKA'nın aktive olmasıyla birlikte PLK-1 ve M-Faz İndükleyici Fosfat 2 uyarılır. Dahası sentrozomal p53 proteinleri, ubiquitinasyon ve Ser215 fosforilasyonu yoluyla protein yıkımı mekanizmalarını çalıştırır ve AURKA'yı inhibe eder (127).

G2/M kontrol noktasında AURKA aşırı ifade edildiğinde hücre G2 hasar kontrol noktasından kurtulur. Farklı birçok kanser türünde AURKA'nın aşırı ifadesi veya inhibe edilmesi gereken noktada, inhibisyonundan kaçarak kontrol dışına çıkması, sentrozom amplifikasyonu ve neden olduğu genomik kararsızlık, bu gen ve ürününün onkogen olarak önemli bir molekül olabileceği yönündeki yaklaşımı güçlendirmektedir (123, 138). Bu hipotez ile korale olarak AURKA'nın birçok kanser türünde aşırı eksprese edildiği çalışmalarla da ortaya konmuştur (123, 139, 140).

2.12. TP53

TP53 geni, insan kanseri ile ilişkili en popüler genlerden biridir. On yedinci kromozom üzerinde bulunan gen, hücre proliferasyonunun negatif düzenleyicisi olarak tanımlayabileceğimiz p53 proteinini kodlar (141). Bu bağlamda P53 proteini, DNA hasar yanıtı olarak tümör oluşumunun durdurulmasında ve apoptozun pozitif yönde düzenlenmesinde rol oynar. TP53 geninde transkripsiyonel aktivasyon bölgesi, DNA bağlanma bölgesi ve bir protein sentezinin kodlanmasına kaynaklık eden oligomerizasyon alanlarını içeren bölgeler bulunur (142). TP53 geni ile karsinogenez arasında sıkı ilişki vardır. *Li-Fraumeni* sendromu olarak bilinen ve nadir görülen bir hastalıkta; ailesel olarak P53 geninin tek kopya olarak kalıtıldığı durumda, bu bireylerin

kansere çok daha yatkın olduğu ve birbirinden bağımsız birçok kanserle karşılaştıkları bilinmektedir (143).

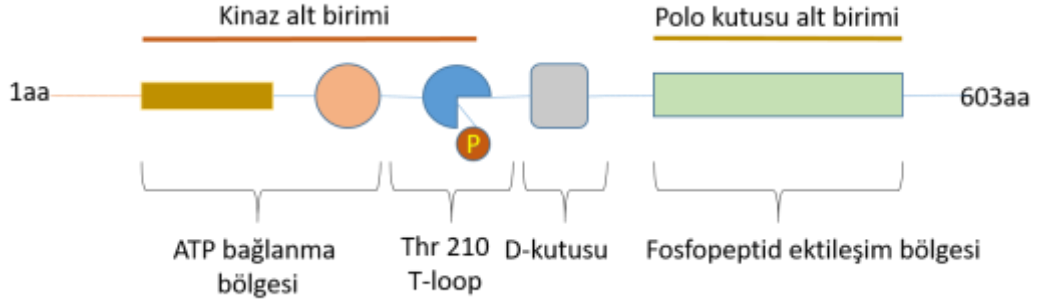
TP53 gen mutasyonları birçok tümör tipinde bulunurken, tümör baskılayıcı görevinin fizyolojik koşullara ve hücre tipine bağlı olarak büyümeyi, bölünmeyi durdurduğu, apoptozu indüklediği bilinmektedir. Bu süreçlerde hücre bölünmesine negatif yönde etki eden transaktivatör etkinliği için birçok geni kontrol eder. Apoptoz, BAX ve FAS antijen ekspresyonu uyarılarak veya Bcl-2 ekspresyonunun baskılanması indüklenerek gerçekleşirken, hücrede DNA hasarı ile gelişen yanıtla p53 proteini DNA'ya bağlanarak, hücre bölünmesini aktive eden cdk2 ile etkileşime girer ve Siklin bağımlı kinaz inhibitör (CDKN1A), diğer adıyla p21'in ekspresyonunu sağlar. P53 tarafından indüklenen p21, Cdk4/siklin D ve Cdk2/siklin E komplekslerine bağlanarak bu iki molekülün kinaz aktivitesini inhibe etmesi sonucu hücre döngüsü bir sonraki aşamaya geçemez (141, 144-147). TP53 geninin kodladığı ürünlerde alternatif promotörlerin kullanımıyla, alternatif translasyon başlatma kodlarının kullanımıyla ortaya çıkan transkript varyantları ve izoformları vardır (142).

HCC karsinogenezinde çoklu mekanizmaların olduğundan bahsedilmiştir. Ayrıca p53 geninin insan kanserlerinin yaklaşık %50'sinde mutasyona uğradığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Temel olarak p53, etki ettiği genleri aktive ederek çeşitli hücresel yanıtları düzenler ve etkinleştirir. Bununla beraber p53 aktivasyonu, dinamikleri ve diğer hücresel proteinlerle etkileşimi translasyon sonrası modifikasyonlar tarafından kontrol edilir (148). HBV-HCC gelişiminde HBx'in p53 ile etkileşime girerek onu bağladığı ve p53 üzerinden ilerleyen çeşitli tümör baskılayıcı mekanizmaların bloke olduğu bildirilmiştir (88). Benzer bir dinamikle HCC'de, AURKA'nın da içinde bulunduğu çoklu mekanizmaların p53 aktivitesini negatif yönde etkilediği yönünde sınırlı çalışmalar da bulunmaktadır (149).

2.13. PLK-1

PLK-1, protein kinazların polo subfamilyasının bir üyesidir ve yalnızca bu ailede bulunan yüksek oranda korunmuş POLO kutusu alanına sahiptir (150). Bu yönüyle PLK-1 enzimi belli bir motifle POLO kutularınca tanınan serin veya treonin aminoasitinin “-OH” grubunu fosforilleyen veya fosforile edilmiş proteinleri bağlayan bir kinaz enzimidir (Şekil 2.23. PLK-1 fonksiyonel birimleri.). Bu enzim özellikle hücre döngüsü M fazı boyunca iğ iplikleri dahil sentrozomların olgunlaşması ve düzenlenmesi, mitotik çıkış ve sitokinezin düzenlenmesi, DNA hasar adaptasyonu, sentrozom olgunlaşmasının

düzenlenmesi, anafaz-*promoting* kompleks/siklozom (APC/C)'nin aktivasyonu veya inhibisyonu gibi M fazının farklı aşamalarında çeşitli hücrel ve biyokimyasal olayların düzenlenmesinde etkili olduğu bilinmektedir (151, 152).



Şekil 2.23. PLK-1 fonksiyonel birimleri.

Hücre proliferasyonu ve mitotik ilerleme için PLK-1 aktivitesinin dengeli yürütülmesi gerektiği yönünde ve özellikle aşağı yönlü regülasyonlarda karsinogenezi teşvik ettiği yönünde ilk dönem çalışmalar mevcuttur (150).

Birçok çalışmada, mitotik giriş öncesi, temel mitotik kinazlardan biri olan PLK-1'in forforilasyona ihtiyaç duyduğu ifade edilmiştir. Özellikle AURKA ve kofaktörü ve aktivatörü Bora üzerinden AURKA'nın PLK-1 üzerinde kinaz *domain* motifinde yer alan Thr210'u doğrudan fosforilleyerek aktivite kazandırdığı ve bu yolla mitotik girişi teşvik ettiği gösterilmiştir (15, 151, 153). Mitoz sürecinde Bora, PLK-1 aktivitesi ve E3 ubiquitin ligaz etkinliği üzerinden parçalanır ve geç anafaz devresinde AURKA'nın inaktivasyon ve yıkım sürecini başlatır (153). AURKA'nın PLK-1'in denetimiyle Bora üzerinden yıkımın APC/C substratı bir adaptör protein olan Cdh1 tarafından kontrol edilir. Böylece PLK-1'in fosforilasyonla aktivitesi teşvik edilir (153, 154). Hücre döngüsünün mitoz giriş ve mitoz boyunca sağlıklı ilerleyişi, AURKA ve PLK-1'in komplike ve çoklu kofaktörlerle etkileşim halinde olmasına ve bunu dengeli bir şekilde sürdürmesine bağlıdır. Yüksek dereceli lenfomalar gibi agresif lenfoproliferatif bozukluklarda AURKA/PLK-1 ekseninin doğru çalışmadığı gösterilmiştir (155, 156).

2.14. BRCA1

BRCA1, insanda meme kanser tip 1 duyarlılık proteini (Breast cancer type 1 susceptibility protein) kodlayan gendir. Hücrede genomik stabilitenin korunmasında rol oynayan çok alt birimli protein kompleksinin oluşturulmasında, DNA hasar sensörleri ve

diğer sinyal dönüştürücüleri ile birlikte çalışır. BRCA1'in büyük oranda kalıtsal meme ve yumurtalık kanserlerinden sorumlu olduğu anlaşılmıştır (157). Bununla birlikte mutant BRCA1'in G2/M fazında AURKA ile protein kompleksi oluşturduğu ve bu iki molekül yapısının birleşerek AURKA'nın BRCA1'i fosforile ettiği bildirilmiştir (158, 159). Yapılan çalışmalar BRCA1'in de AURKA ile benzer şekilde sentrozomda lokalize olduğu ve BRCA1'in aktivasyonu sonrasında G/M kontrol noktasının kayba uğradığı ortaya konmuştur (159). Bununla beraber AURKA birçok kanser tipinde yüksek düzeyde eksprese edilirken, meme kanserleri için AURKA'nın yüksek frekansı ile bozulmuş tümör baskılayıcılar arasındaki sinerjistik etkileşime dikkat çekilmiştir (160, 161).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışma Protokolünün Oluşturulması ve Olguların Seçimi

Çalışma kapsamında Malatya Klinik Araştırmalar Etik Kurul başvurusu yapıldı ve 2021/171 numaralı kararla onay alındı. Çalışmamız, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından TDK-2021-2713 proje koduyla desteklendi.

Projenin amaç ve kapsamına uygun olarak üç grup oluşturuldu. Her grup için olgular belirlendi. Birinci grup (Grup I); HBV-HCC tanısı alan olgulardan, ikinci grup (Grup II); serolojik ve klinik olarak herhangi bir etiyoloji ile ilişkilendirilmeyen KR-HCC olgularından ve üçüncü grup (Grup III); histopatolojik değerlendirmede normal olarak raporlanan sağlıklı karaciğer biyopsi materyallerinden oluşturuldu. Yapılan *power* analizine göre olgu sayıları her grupta 17 ve toplamda 51 olacak şekilde belirlendi (162). Olgular, 2021 yılından başlayarak herhangi bir yaş ve cinsiyet sınırlaması olmaksızın geriye doğru rapor arşivi taranarak rastgele yöntemle seçildi. Olgulardan bir ve ikinci grup, hepatektomi materyalleri arasından, üçüncü grup ise sağlıklı donör bireylerden alınan normal karaciğer kama biyopsilerden seçildi (Tablo 3.1).

Arşiv çalışması sonrası tüm olguların Hematoksilen-Eozin (H&E) boyalı preparatları yeniden değerlendirildi ve tümörü temsil eden alanlar, parafine gömülü doku mikrodizileri (TMA) tekniğiyle yeni doku mikrodizileri oluşturmak üzere lam üzerinde işaretlendi. Seçili alanlar parafin blok üzerinde bulundu ve TMA tekniği ile yeni doku mikrodizilerinden oluşan parafin blok elde edildi.

Tablo 3.1. Çalışma grupları

Gruplar		Histopatolojik özellik
Grup I:	HBV-HCC olguları	Hepatektomi materyali. Parafin bloktan yeni doku mikrodizileri üretilen TMA parafin blok
Grup II:	Klinik ve serolojik olarak herhangi bir etiyoloji ile ilişkilendirilemeyen KR-HCC olguları	Hepatektomi materyali. Parafin bloktan yeni doku mikrodizileri üretilen TMA parafin blok
Grup III:	Kontrol grubu. Normal donör karaciğer dokuları	Karaciğer kama biyopsi materyali. Parafin bloktan yeni doku mikrodizileri üretilen TMA parafin blok

Çalışmada İHK parametrelerinin değerlendirilmesinde TMA doku kesitleri kullanıldı. TMA yöntemi, boyama derecelerinin puanlamasında ve diğer moleküler testlerin değerlendirilmesinde her olgu için aynı donör doku kullanılmasına imkân verdiği için tercih edildi (163-165). TMA bloklarının oluşturulmasında Harris Uni-core Size:3.0 (Electron Microscopy Sciences Cat: 69036-30) *punch* kullanıldı.

Araştırma konusu olan İHK parametreleri, gen-KSD ve gen ekspresyon düzeyi çalışmasının tamamında, TMA parafin bloklardan üretilen seri kesitler kullanıldı. Gruplar ve grupları oluşturan her olgunun TMA parafin blok üzerinde bulunduğu konum (sektör) kayıt altına alındı (Şekil 3.1).

Grup:

Adres	Biyopsi No:	Değerlendirme				Not
1A						
1B						
1C						
2A						
2B						
2C						
3A						
3B						
3C						
4A						
4B						
4C						

Grup:

	A	B	C
1	☐	☐	☐
2	☐	☐	☐
3	☐	☐	☐
4	☐	☐	☐
5	☐	☐	☐

Şekil 3.1. TMA sektör haritası

Çalışmaya kaynaklık eden olguları temsil eden, donör doku ile hazırlanan TMA'ların çalışma ve değerlendirme sürecinde kullanılan sektör haritası ve formu.

3.2. Moleküler Genetik Analizler

Moleküler testle yapılan analizler, AURKA gen ifade düzeyi ve gen-KSD olmak üzere iki ayrı parametrede gerçekleştirildi. AURKA kopya sayısı değişikliği ve gen ifade düzeyi SYBR Green boya kullanılarak, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemiyle analiz edildi.

Her iki parametre için hedef gen AURKA'nın yanı sıra kontrol gen (housekeeping) olarak, insan 36b4 geni seçildi. Primerler, gen ifadesi ve gen-KSD araştırmasının her ikisinde ortak kullanılmak üzere tasarlandı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. RT-PCR'da kullanılan primerler

Primer	Primer dizilimi
AURKA-F	GCAACCAGTGTACCTCATCCTG
AURKA-R	AAGTCTTCCAAAGCCCACTGCC
36B4-F	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC
36B4-R	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA

AURKA gen ifade analizi için tüm gruplardan her olgu için formol fikse parafine gömülü dokulardan (FFPE) hazırlanan TMA doku örneklerinden 8-10 µ kalınlığında yapılan kesitler 1.5 ml tüplere alındı. RNA izolasyon işlemi Monarch Total RNA Miniprep Kit (New England Biolabs Ipswich, MA, USA) kullanılarak ve aşağıdaki

adımlar takip edilerek yapıldı. 1.5 ml tüplere iki kez 1 ml ksilen eklenip 1 dak. 16.000 x g'de santrifüj yapılarak parafin doku kesitlerinden uzaklaştırıldı. 1 ml absolü etanol eklendi, 30 saniye vortekslendi ve 1 dakika 16.000 x g'de santrifüj yapılarak, etanol doku kesitlerinden uzaklaştırıldı. Numuneler 37°C'da 40 dakika kadar inkübe edildi ve kurutuldu. Kuruyan örnekler Tissue Lysis Buffer- Proteinaz K karışımı ile 55°C'de 15 dakika inkübe edildi. İkinci aşamada 65°C'de 15 dakika inkübe edildi. RNA Binding Buffer ve eşit miktarda etanol eklenerek pipetaj yapıldı. Tüm lizat, *collection* tüp içine yerleştirilen filtreli tüplere aktarıldı ve 6000 g' de 30 saniye santrifüj sonrası, filtre yeni *collection* tüpe kondu. Yeni tüpler 16.000 x g 2 dakika santrifüj edilerek kuruması sağlandı. *DNase* miks eklendi ve 15 dakika oda ısısında inkübe edildi. 500 µ *wash buffer* I ve ardından 500 µ *wash buffer* II eklenerek 6000 x g 30 saniye santrifüj işlemi tekrar edildi. *Wash buffer* II işlemi bir kez daha tekrarlandı ve 6000 x g' de 30 saniye santrifüj yapıldı. Maksimum hızda (16.000 g) 2 dakika santrifüj yapılarak filtrenin kuruması sağlandı. Kuruyan filtre temiz ve etiketlenmiş yeni bir 1,5 ml tüpe alınarak her birine 50 µl *RNA elution buffer* eklendi. Bir dakika oda ısısında inkübasyon sonrası 6000 x g'de 60 saniye santrifüj edildi ve elde edilen RNA örneklerinde ölçüm yapıldı

RNA kalite tayini için jel elektroforezinde, numuneler, % 1' lik (ağırlık/hacim) jel hazırlanarak ve 80V'da 50 dakika yürütüldü. *Marker* olarak 1kb *ladder* kullanıldı. Jel elektroforez sonrası, örneklerin tamamında, UV ışık altında bant oluşumu gözlenmedi.

İzole edilen RNA, sentez işlemine kadar geçireceği sürede -80°C'da saklandı. Tüm örnekler fragmente yapıda görünmesine rağmen cDNA sentezi için numuneler işleme alındı.

cDNA sentezinde ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs Ipswich, MA, USA) kullanıldı. Kit bileşenleri buz ortamına alındı. RNA numunesini ve primer d(T), 1.5 ml'lik steril tüpte karıştırıldı. RNA başlangıç 2.5 mikrogram olacak şekilde miks hazırlandı (Tablo 3.3) ve 75°C'da 5 dakika denatüre edildi.

Tablo 3.3. cDNA sentez için hazırlanan karışım

Bileşen	Miktar
Toplam RNA	1–6 ul
d(T)	2 ul
H ₂ O	Değişken
Toplam miktar	8 ul

Süre sonunda hızlıca buza alınan örneklere 10 µl M-MuLV Reaction Mix ve 2 µl M-MuLV Enzyme Mix eklendi. Toplam 20 µl olan karışım 1 saat 42°C’da inkübe edildi. İnkübasyon sonunda elde edilen cDNA, PCR çalışması için 30 µl *PCR grade* su ile seyreltildi. Numunelerden nicel gen ifade araştırmasında Gotaq Qpcr Master Mix kiti (PROMEGA Madison, WI 53711 USA) kullanıldı. PCR ısı ve döngü koşulları 95°C’da 10 dakika ve 15 saniye, 60°C’da 30 saniye ve 95°C’da 15 sn, 60°C’da 1 dakika, 95 °C 15 saniye, 40 döngü şeklinde kılavuza uygun olarak programlandı. Sonuçların rölatif kuantifikasyon ile değerlendirilmesi planlansa da değerlendirmeye uygun veri elde edilemedi.

AURKA gen-KSD analizi için üç çalışma gurubuna ait FFPE dokulardan hazırlanan TMA örneklerinden 1.5 ml tüpe 4-6 µ kalınlığında kesitler alındı. DNA izolasyonu, Quick-DNA FFPE Miniprep Kit (Zymo Research 17062 Murphy Ave. Irvine USA) kit kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapıldı.

Tüp içindeki numuneleri parafinden uzaklaştırmak için 500 µl ksilen eklendi ve 10 saniye vorteks işleminden sonra oda ısısında 5 dakika tutuldu. Devamında 500 µl absolü etanol ilave edildi ve 5 dakika oda ısısında bekletildi. 16000 x g’ de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Bir önceki işlem basamakları bir kez daha tekrar edildi. Pelet’e 1000 µl absolut alkol ilave edilerek vortekslendi. 16000 x g’ de 3 dakika santrifüj edilmesini takiben 20 dakika 56° C’ de kurutuldu ve ardından 180 µl Tissue Lysis Buffer, 70 µl Proteinaz K eklendi. Süspansiyon halindeki karışım önce 56° C’ de 1 saat, devamında 90° C’ de 1 saat bekletildi. Oda sıcaklığına soğutulan örnekler 200 µl DNA Binding Buffer eklenerek 10 dakika inkübe edildi. 100 µl izopropanol ilave edildikten sonra lizatın tamamı collection tüp içindeki, filtre tüpe aktarıldı ardından 800 x g’de santrifüj yapıldı. Sırasıyla; Wash Buffer I ve II den 500 ml eklenerek, yine 800 x g de santrifüj edildi. Boş olduğu halde 16000 x g de çevrilen ve kurutulan tüplere 100 µl DNA *Elution Buffer* ilave edilerek 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 8000 x g’de 1 dakika santrifüj yapıldı ve izole DNA örnekleri elde edildi. Genomik DNA’ların miktarı ve saflığı spektrofotometre ile ölçülerek

OD260/OD280 değerleri belirlendi. DNA'ların miktar ve kalite tayini için % 1' lik (ağırlık/hacim) jel hazırlandı. 80V'da 50 dakika yürütüldü. *Marker* olarak 1kb *ladder* kullanıldı. Elektroforez sonrasında UV ışık altında bantlar gözlemlendi. Elde edilen DNA'lar PCR analizi öncesinde -20°C'de muhafaza edildi.

Real Time-PCR her olguda üç tekrar çalışıldı. DNA örnekleri, plate kuyucuklarına her olgu için 200 ng olacak şekilde dağıtıldı. Yine örnek başına 10µl Master Mix, nükleaz free PCR grade su, 0.5 µl primer ve 0.1 µl boya her bir kuyucuğa dağıtıldı (Tablo3.4). İşlem sonunda *plate* optik filmle kapatıldı. Numunelerde AURKA'nın gen-KSD araştırması, yine Gotaq Qpcr Master Mix kiti (PROMEGA Madison, WI 53711 USA) kullanılarak yapıldı. Miksler kit içeriğinde yer alan kılavuza göre hazırlandı.

Tablo 3.4. RT-PCR çalışmasında kullanılan reaktifler

Total hacim	DNA	Su	Master mix	Boya	Primer
20 µl	Değişken	Değişken	10	0.1	0.5 F + 0.5 R

Kuyucuklardaki reaktif ve DNA örnek karışımını dipte toplamak ve olası kabarcıkları gidermek için *plate*, *spin* cihazında düşük hızda, 1 dakika santrifüje edildi. PCR ısı ve döngü koşulları kit içeriğinde bulunan kılavuza göre 40 döngü olarak düzenlendi (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. RT-PCR çalışmasında programlanan ısı koşulları

	1. Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım	5. Adım	6. Adım
Sıcaklık	95 °C	95 °C	60 °C	95 °C	60 °C	95 °C
Zaman	10 dk	15 sn	30 sn	15 sn	1 dk	15 sn

Kontrol gen (housekeeping) olarak yine tek kopya olduğu bilinen insan 36b4 geni kullanıldı. Çalışmada gen-KSD değişikliği analizi, Step One Plus Applied Biosystems RT-PCR sistemi ile ölçülerek yapıldı. Elde edilen çıktılar rölatif kuantifikasyon yöntemi ile değerlendirildi.

3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Her üç grup için hazırlanan TMA'dan İHK tekniğiyle boyama yapmak için İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında mikrotom cihazı (Leica RM 2255) kullanılarak 4µ kalınlığında kesitler alındı.

İHK prametreleri sırasıyla; Aurora A (Katolog No: GTX104620) antikor ve fosfospesifik P53 (Ser315) (katolog no GTX50164) Rabbit, Polyclonal antikorlar (GeneTex International Corporation 6F-2, No.89, Dongmei Rd. East Dist. Hsinchu City 300 Taiwan, R.O.C.) seçildi. Her iki antikorun seyreltme oranı 1/100 (Antibody Diluent, katolog No: S3022 Dako, 5301 Stevens Creek Blvd Santa Clara, CA 95051 United States), inkübasyon süresi 30 dakika olarak optimize edildi. Yüksek pH antijen *retrieval* (Target Retrieval Solution Envision Flex, Dako Omnis) kullanıldı. Fosfospesifik PLK-1 (Thr210) (katolohg no: AF2385) rabbit poliklonal antikor (Affinity Biosciences Biotechnology Research. Cincinnati U.S) seyreltme oranı 1/100, inkübasyon süresi 60 dakika ve antijen *retrieval* düşük pH reaktifte 30 dakika süreleriyle uygulandı. BRCA-1 (katolog no: E-AB-10188) polyclonal antikor (Elabscience 14780 Memorial Drive, Suite 216, Houston, Texas 77079) 1/200 seyreltme oranı, 30 dakika primer antikor inkübasyon süresi ve antijen *retrieval* yüksek pH reaktifi 30 dakika süreyle uygulandı.

Tüm İHK parametreler, İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarı altyapısında bulunan, tam otomatik İHK cihazında (Dako Omnis–Agilent, Santa Clara, CA, United States) çalışıldı. Adeziv lama (IHC Microscope Slides, FLEX, Dako) alınan TMA kesitler 60°C etüvde bir saat inkübe edildikten sonra tam otomatik İHK cihazında deparafinizasyon işlemi Clearify (American MasterTech) ile yapıldı. Görüntüleme kiti olarak EnVision FLEX System (Agilent Dako 5301 Stevens Creek Blvd. Santa Clara, CA 95051 United States) standart uygulama süreleri ile çalışıldı. İkincil reaktif (linker) kullanılmadı. Tüm parametreler için DAB

kromojen kullanıldı ve standart sürede inkübe edildi. Zıt boyama için hematoksilinle boyandı ve 10 dakika süreyle uygulandı.

İHK teknikle boyanan tüm parametreler (AURKA, P53, PLK 1, BRCA1), ışık mikroskopunda (Olympus BX53) değerlendirildi. İHK parametreleri boyama yoğunluğu ve boyama yaygınlığı olmak üzere iki boyutta değerlendirildi. Boyama yaygınlığının belirlenmesinde TMA'nın kesit alanı yüzdelik dilime göre oranlandı ve semikantitatif olarak 0 ile 4 arasında bir değer verildi. Boyama yoğunluğu ise boyamanın şiddetine göre 0 ile 3 arasında derecelendirildi (Tablo 3.6). İki boyutta yapılan değerlendirme sonucu verilen puanlar çarpıldı ve 0-12 arasında final skor elde edildi (166).

Tablo 3.6. İHK boyama skor tablosu

Yaygınlık		Yoğunluk	
Boyama Dağılım	Derece	Boyama Yoğunluğu	Derece
Hücrelerin boyanma oranı %0	0	Negatif	0
Hücrelerin boyanma oranı %1-10	1	Zayıf	1
Hücrelerin boyanma oranı %11-50	2	Orta	2
Hücrelerin boyanma oranı %51-80	3	Güçlü	3
Hücrelerin boyanma oranı %81-100	4		

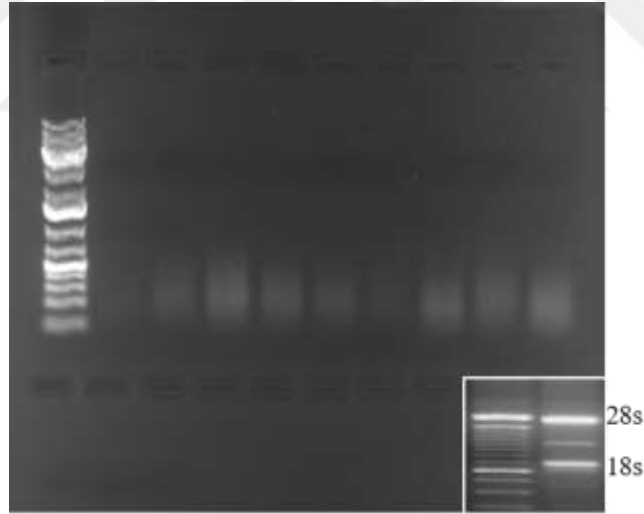
İmmünohistokimyasal derecelendirme iki bağımsız gözlemci tarafından değerlendirildi. Farklı derecelendirilen olgular tekrar değerlendirildi, tartışıldı ve uzlaşılan dereceler verildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya ait bulgular RNA ve DNA temelinde yapılan moleküler testler ve protein düzeyinde İHK boyamaları olmak üzere iki başlıkta derlendi.

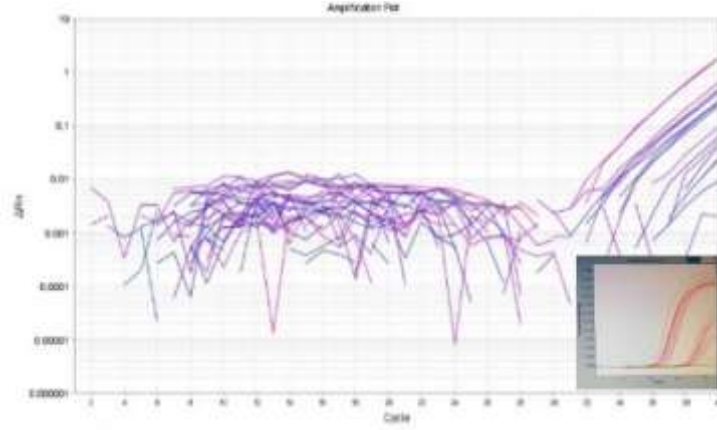
4.1. Moleküler Parametrelere İlişkin Bulgular

AURKA gen ifade düzeyi araştırmasında, gruplara ait örneklerin RNA izolasyonu sonrası yapılan ölçümlerde, sonuçlarının referans değerlerin dışında olduğu görüldü. Aynı RNA örneklerinin jel elektroforez görüntüsünün fragmente paternle uyumlu olduğu tesbit edildi (Şekil 4.1). İlk değerlendirmedeki olumsuz bulgulara rağmen örnekler çalışma planına uygun olarak, FFPE doku örneklerinde izole edilen düşük kalitedeki RNA ile cDNA sentezi ve RT-PCR çalışması yapıldı. Çalışma sonucunda RNA ölçüm ve jel elektroforezi görüntüsünü teyit eder şekilde, başta Grup I ve Grup II numunleri olmak üzere tüm gruplarda numunler amplifiye olmadı ve döngü eşiği (CT) değeri okunamadı (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Agaroz jel elektroforez görüntüsü (RNA)

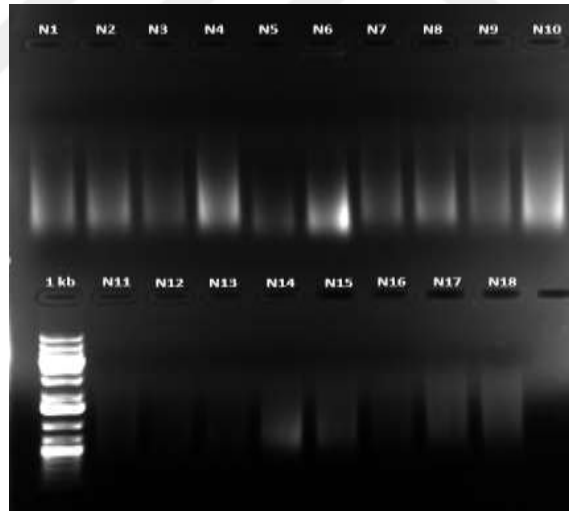
Normal karaciğer grubuna ait doku örneklerinden izole edilen jel elektroforezi görüntüsü (Grup III). Küçük resim: Örnek jel elektroforez görüntüsü, ideal koşullarda izole edilen RNA ürünü.



Şekil 4.2. RT-PCR çalışmasında elde edilen amplifikasyon eğrileri

AURKA gen ifadesi analizi. cDNA ile başlatılan RT-PCR çalışmasında DNA'nın amplifiye olmadığı görülüyor (Grup III). Küçük resim: Örnek RT-PCR görüntüsü, ideal koşullarda izole edilen RNA ürünü

Çalışma kapsamında planlanan gen-KSD değişiklik araştırması için izole edilen ve -20°C 'da saklanan DNA örnekleri jel elektroforezinde yürütüldü. DNA örnekleri jel elektroforez görüntüsünün oldukça fragmente olduğu tesbit edildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Agaroz jel elektroforez görüntüsü (DNA)

Normal karaciğer grubuna ait doku örnekleri jel elektroforezinde bantlaşmanın olmadığı fragmente görünüm (Grup III).

İzolasyon sonrası elde edilen DNA örneklerinin RT-PCR çalışması öncesi yapılan spektrofotometrik ölçümlerde yeterlilik ve nitelik bakımından sınırda olduğu görüldü (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Gruplara ait örneklerin spektrofotometre ölçüm sonuçları

Örnek No	Grup I			Grup II			Grup III		
	ng/uL	260/230	260/280	ng/uL	260/230	260/280	ng/uL	260/230	260/280
1	112	2.2	1.9	54	1.7	1.7	65	1.1	1.7
2	47	1.8	1.8	56	1.7	1.8	68	1.2	1.7
3	55	1.8	2.8	93	1.8	1.8	55	1	1.8
4	82	2.5	1.8	60	1.6	1.8	95	1.5	1.7
5	40	1.9	1.7	85	1.2	1.7	66	1.5	1.9
6	45	2	1.8	47	1.6	1.8	108	1.5	1.8
7	45	1.8	1.8	108	1.7	1.8	58	1.1	1.8
8	39	1.7	1.8	50	1.1	1.8	62	1.1	1.8
9	50	1.7	1.7	71	1.1	1.8	48	1.2	1.8
10	104	2	1.8	85	1.5	1.8	63	1.2	1.7
11	50	1.8	1.8	74	1.3	1.7	63	1.2	1.8
12	80	1.7	1.7	59	1.4	1.9	63	1.4	1.7
13	128	2	1.8	60	1.2	1.7	60	1.4	1.8
14	100	1.9	1.8	122	1.6	1.8	130	1.6	1.8
15	100	1.9	1.8	83	1.5	1.6	88	1.9	1.9
16	86	1.8	1.8	68	1.3	1.7	50	1.4	1.8
17	155	2	1.7	60	1.4	1.8	60	1.9	1.9

Gruplara ait DNA örneklerinin gen-KSD'ye yönelik RT-PCR çalışması sonrasında üç tekrar çalışılan örneklerle ait çıktılar elde edilerek yorumlandı (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. RT-PCR ile yapılan gen-KSD çalışma çıktıları (Tüm gruplar)

Grup I								
Örnek No	36b4 gen				AURKA gen			
	Ct1	Ct2	Ct3	Ortalama Ct	Ct1	Ct2	Ct3	Ortalama Ct
1	20.973	22.916	22.855	22.248	28.553	28.491	29.247	28.763
2	21.817	21.497	22.007	21.774	29.378	30.559	30.109	30.015
3	21.441	21.431	22.499	21.790	28.016	27.853	29.431	28.433
4	21.916	20.892	22.076	21.628	25.824	25.996	26.426	26.082
5	22.969	24.279	23.524	23.590	33.999	33.906	32.815	33.573
6	21.652	20.075	21.545	21.091	30.587	30.397	31.502	30.829
7	19.409	20.541	20.207	20.052	25.327	24.046	24.327	24.567
8	22.671	21.675	22.097	22.148	29.965	29.408	29.630	29.668
9	20.768	22.845	21.151	21.588	26.834	28.188	27.644	27.555
10	21.476	20.900	21.872	21.416	28.752	28.672	28.861	28.762
11	21.140	21.095	21.697	21.310	27.651	26.861	27.131	27.215
12	22.011	22.839	23.035	22.628	29.007	28.907	29.235	29.050
13	22.267	22.934	21.084	22.095	29.402	29.626	29.286	29.438
14	22.812	22.763	23.291	22.956	30.691	30.777	29.342	30.270
15	21.872	22.902	22.572	22.449	27.871	28.674	27.895	28.147
16	22.514	23.704	22.889	23.036	29.600	30.370	31.037	30.336
17	21.514	21.704	21.889	21.702	30.190	31.460	30.821	30.824
Grup II								
Örnek No	36b4 gen				AURKA gen			
	Ct1	Ct2	Ct3	Ortalama Ct	Ct1	Ct2	Ct3	Ortalama Ct
1	21.824	21.975	21.502	21.767	25.292	25.836	25.434	25.521
2	22.008	21.907	21.502	21.806	27.738	27.408	27.939	27.695
3	21.107	21.677	22.246	21.677	27.467	27.987	28.118	27.857
4	22.544	22.183	21.592	22.106	27.283	27.695	26.969	27.316
5	20.912	21.435	20.748	21.032	27.827	27.897	27.875	27.866
6	22.668	22.513	22.087	22.422	29.683	28.896	28.985	29.188
7	21.694	20.503	20.602	20.933	26.348	26.379	26.959	26.562
8	20.524	20.307	20.067	20.299	28.921	27.024	28.979	28.308
9	21.389	21.669	20.563	21.207	27.273	26.807	27.174	27.085
10	20.880	20.327	20.125	20.444	26.742	27.014	26.527	26.761
11	20.752	20.856	21.795	21.134	25.383	25.936	26.084	25.801
12	22.520	22.176	24.943	23.213	27.683	27.896	27.985	27.855
13	23.329	23.607	23.257	23.398	31.663	31.480	31.379	31.507
14	21.668	21.513	22.087	21.756	28.117	27.651	27.514	27.761
15	21.258	21.574	21.502	21.445	26.447	26.786	27.020	26.751
16	22.052	21.468	21.556	21.692	29.109	29.302	29.091	29.167
17	20.102	20.476	21.178	20.585	26.516	27.084	27.228	26.943

Grup III								
Örnek No	36b4 gen				AURKA gen			
	Ct1	Ct2	Ct3	Ortalama Ct	Ct1	Ct2	Ct3	Ortalama Ct
1	19.567	21.631	21.057	20.751	25.484	25.391	25.842	25.573
2	19.494	20.679	21.242	20.472	24.004	24.275	24.821	24.366
3	19.062	21.181	20.868	20.371	24.117	24.935	23.839	24.297
4	21.334	20.962	20.981	21.092	27.946	27.311	27.702	27.653
5	21.111	20.621	20.460	20.731	23.960	22.862	24.001	23.608
6	20.301	20.714	21.101	20.705	24.533	24.161	24.932	24.542
7	20.496	21.435	21.879	21.270	25.170	25.696	24.631	25.166
8	20.416	21.032	21.296	20.915	24.562	24.256	23.918	24.246
9	21.626	21.241	21.827	21.565	25.658	25.988	25.581	25.742
10	20.989	20.493	21.155	20.879	24.263	24.687	24.687	24.546
11	18.277	19.614	21.407	19.766	24.754	25.149	25.404	25.102
12	20.152	20.896	19.639	20.229	24.481	24.129	24.039	24.216
13	20.301	21.580	20.690	20.857	25.273	23.813	24.188	24.425
14	21.363	21.788	22.105	21.752	23.362	23.889	24.869	24.040
15	20.828	21.849	18.928	20.535	24.022	24.282	24.855	24.387
16	21.011	20.916	20.570	20.832	23.273	23.473	24.626	23.791
17	21.123	21.771	21.458	21.451	22.892	22.864	23.871	23.209

Çalışmadaki iki test grubu (Grup I ve II) ve kontrol grubu verileri rölatif olarak değerlendirildiğinde; delta-delta Ct metodu ile yapılan hesaplamada, elde edilen logaritmik değerin; $2^{-\Delta\Delta Ct} < 2$ olduğu görüldü. DNA başlangıç konsantrasyonu 200 ng olduğu halde kontrol gen CT çıktıları üzerinden yapılan değerlendirmede; Grup III'ün, Grup I ve II'den ayrıştığı dikkati çekti. Bunun üzerine benzer preanalitik ve analitik süreçler geçirmiş olan Grup I ve II, kendi arasında kopya sayısı değişikliği, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplandı. İki test grubu (Grup II / Grup I) arasında yapılan hesaplamada değer $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2.11$ bulunması üzerine bu iki gruba ait çıktılar istatistiksel analize tabi tutuldu (Tablo 4.3).

Veriler medyan (minimum-maksimum) ile özetlendi. Normal dağılıma uygunluk için Shapiro Wilk testi kullanıldı. Elde edilen sayısal değerlerin istatistik analizlerinde, Mann Whitney U testi kullanıldı. İki grup arasındaki analizlerde $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Analizlerde IBM SPSS Statistics 26.0 programı kullanıldı.

Tablo 4.3. Grup I ve Grup II arasında karşılaştırılan gen-KSD istatistik sonucu

Değişkenler	Grup II (KR-HCC)	GRUP I (HBV-CC)	p
	Medyan (Minimum-Maksimum)		
$\Delta\Delta Ct$	6.181(3.753-8.11)	6.981(4.454-9.983)	0.060
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	0.174(0.046-0.938)	0.1(0.012-0.577)	0.060

4.2. İmmünohistokimyasal Belirteçlere Ait Bulgular

Tüm grupların TMA kesitleri İHK yöntemle yapılan boyamayla AURKA, P53, PLK-1 ve BRCA1 boyama yaygınlığı ve yoğunluğu değerlendirildi. İki boyutta yapılan derecelendirme ile elde edilen sayıların çarpılması ile final skor bulundu.

Nükleer (sentrozom, iç iplikleri) ve sitoplazmik olarak boyanan AURKA değerlendirme sonuçları tablo halinde sunuldu (Tablo 4.4).

Kontrol grubunun (Grup III) 1, 4, 6, 9, 11, 12 ve 13 numaralı olguları AURKA boyama sonucu derece 1 olarak bulundu. Yine 9, 11, 12 ve 13 numaralı olgularda, perisantral hepatositler zayıf nükleer ve sitoplazmik boyama paterni gösterdi. Grubun diğer olguları negatif olarak değerlendirildi (Şekil 4.4. *AURKA antikor ile boyanan Grup III olguları (Kontrol)*). HBV-HCC grubunda (Grup I) olguların hemen hemen tamamında nükleer ve sitoplazmik diffüz boyama görülürken 1, 12 ve 17 numaralı olgularda tümör heterojenitesine bağlı olarak iki farklı boyama paterninin varlığı dikkati çekti (Şekil 4.5. *AURKA antikor ile boyanan Grup I olguları (HBV-HCC)*,). KR-HCC olgularında (Grup

II) boyama yaygınlığı ve yoğunluğu bakımından grup içi olgular heterojen görünümdeydi (Şekil 4.6).

Tablo 4.4. AURKA antikor İHK boyama dereceleri

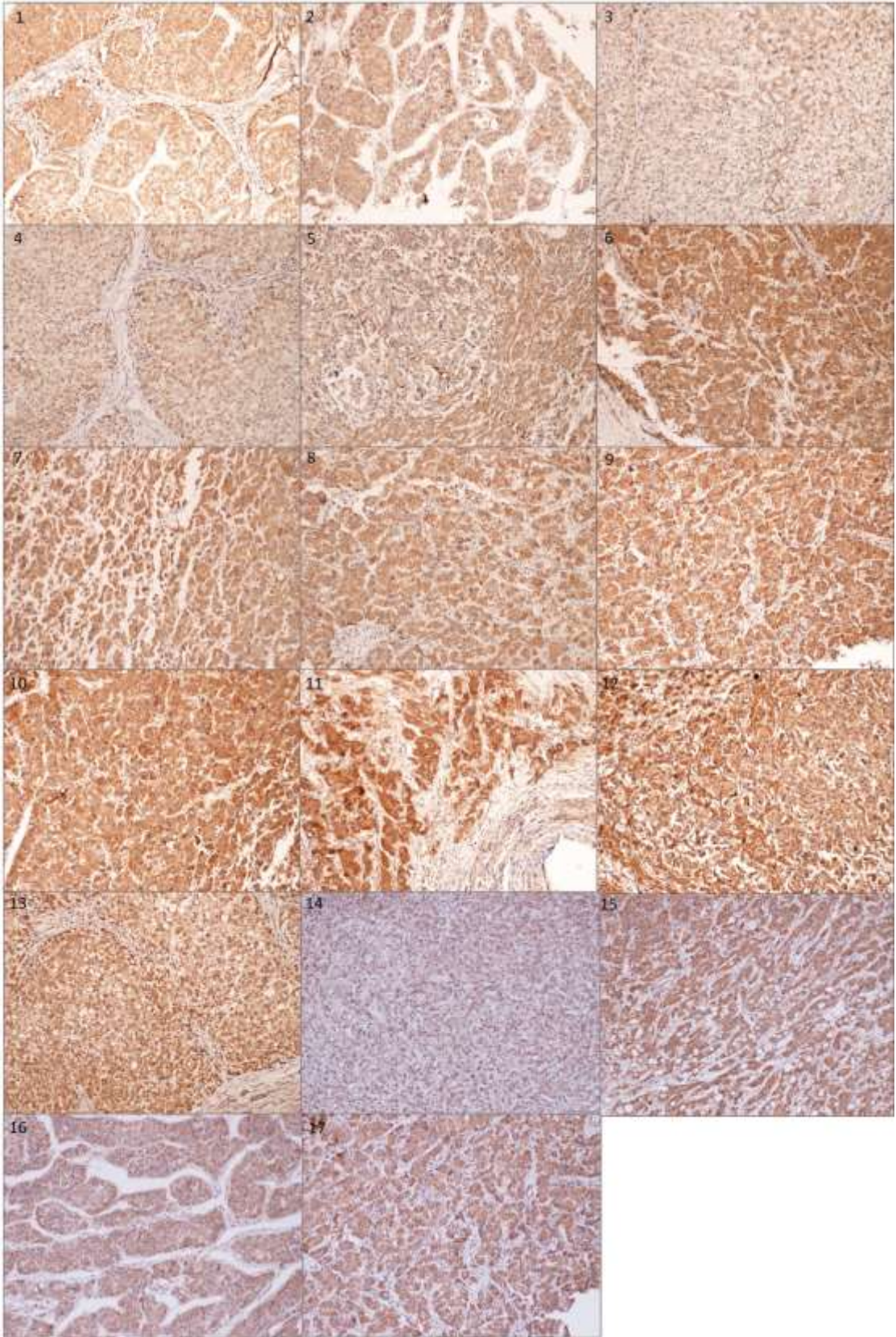
Olgu No	Grup I (HBV-HCC)			Grup II (KR-HCC)			Grup III (Kontrol)		
	Yaygınlık	Yoğunluk	Final Skor	Yaygınlık	Yoğunluk	Final Skor	Yaygınlık	Yoğunluk	Final Skor
1	3	3	9	3	2	6	1	1	1
2	3	2	6	3	1	3	0	0	0
3	3	3	9	3	1	3	0	0	0
4	3	2	6	2	2	4	1	1	1
5	3	4	12	3	1	3	0	0	0
6	3	3	9	4	3	12	1	1	1
7	4	3	12	4	2	8	0	0	0
8	3	2	6	4	2	8	0	0	0
9	4	2	8	4	3	12	1	1	1
10	4	1	4	4	3	12	0	0	0
11	4	2	8	4	3	12	1	1	1
12	3	3	9	3	3	9	1	1	1
13	4	2	8	4	2	8	1	1	1
14	4	3	12	4	1	4	0	0	0
15	4	2	8	4	2	8	0	0	0
16	4	3	12	4	2	8	0	0	0
17	3	3	9	4	2	8	0	0	0



Şekil 4.4. AURKA antikor ile boyanan Grup III olguları (Kontrol), x100



Şekil 4.5. AURKA antikor ile boyanan Grup I olguları (HBV-HCC), x100



Şekil 4.6. AURKA antikor ile boyanan Grup II olguları (KR-HCC), x100

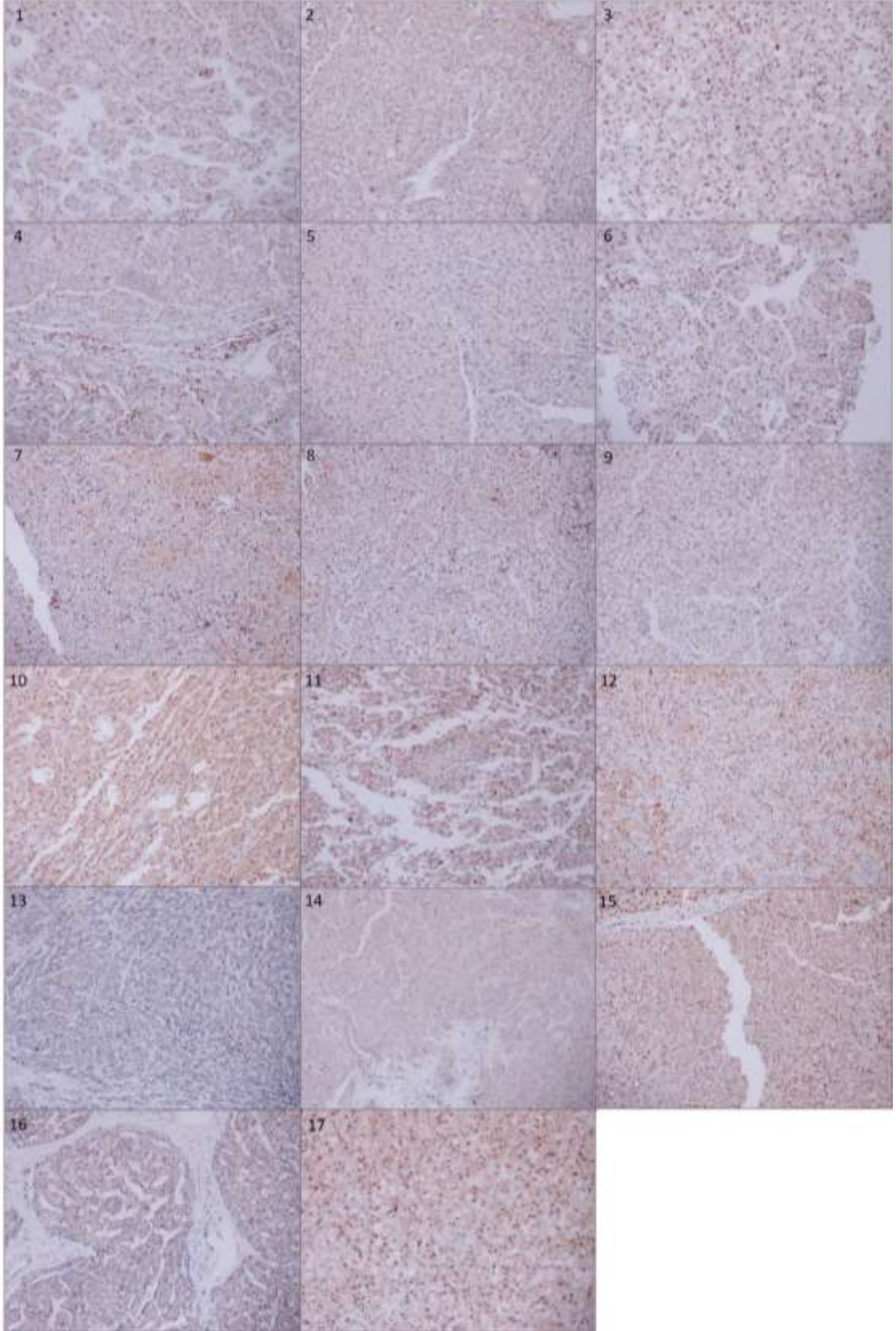
Nükleer, sitoplazmik ve mitokondrial matrikste boyama özelliği gösteren P53 antikor ile yapılan İHK çalışma sonuçları, değerlendirildi ve tablo halinde sunuldu (Tablo 4.5). Buna göre; Grup III'e ait 4, 5, 6, 9 ve 13 numaralı olgular seyrek ve zayıf nükleer boyanırken 14 ve 15 numaralı olguların boyama yaygınlık ve yoğunluğu, finalde, derece 2 olarak değerlendirildi. Diğer dokuz olguda boyama görülmedi (Şekil 4.7). Grup I olguları; 5, 13, 14'de boyanma olmazken diğer olgular orta-zayıf şiddette boyanma özelliği gösterdi (Şekil 4.8). Grup II'de ise 4, 12, 17 ve kısmen de 8 numaralı olgular kuvvetli boyanırken diğerleri orta ve zayıf derecede boyandı (Şekil 4.9).

Tablo 4.5. P53 antikor İHK boyama dereceleri

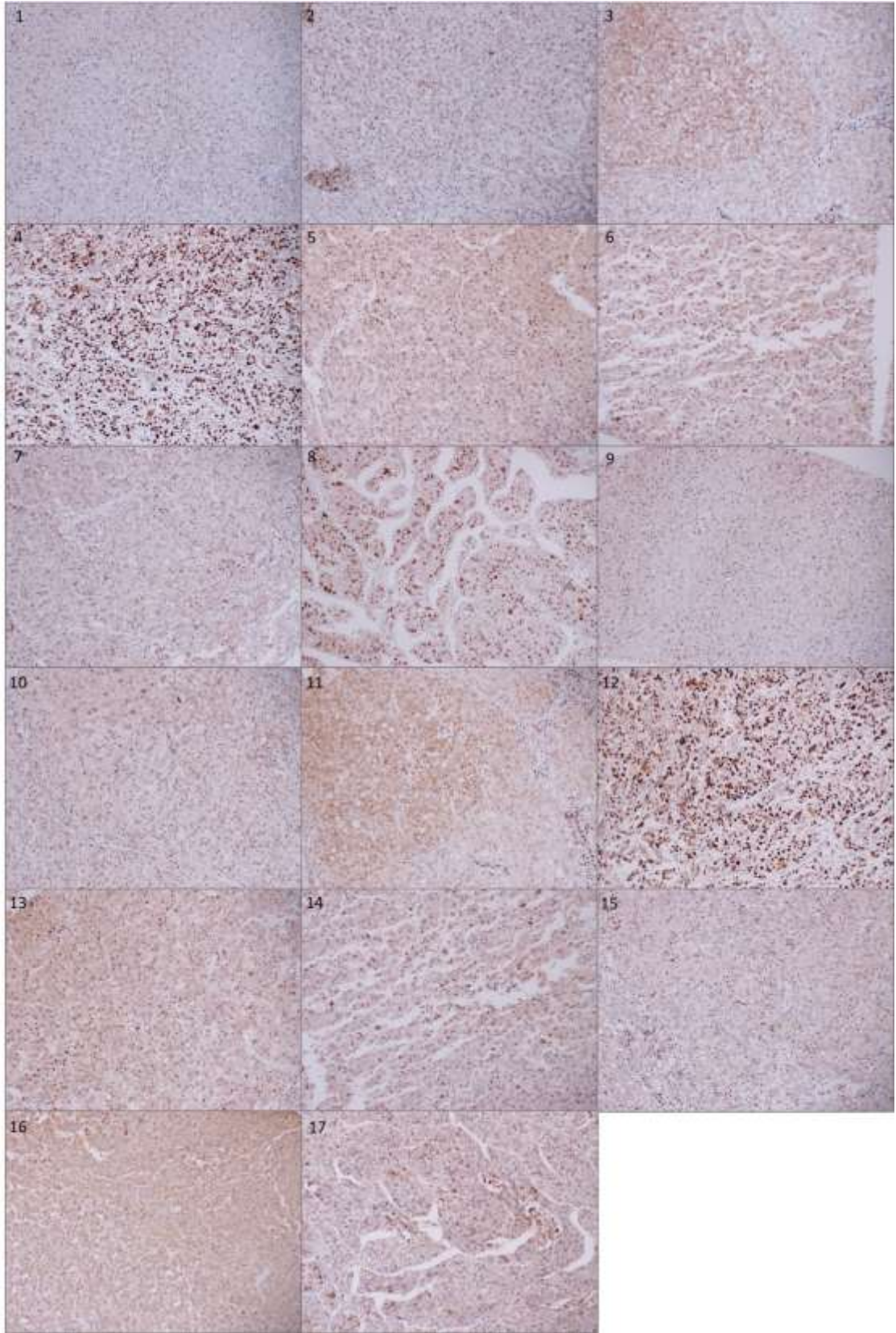
Olgu No	Grup I (HBV-HCC)			Grup II (KR-HCC)			Grup III (Kontrol)		
	Yaygınlık	Yoğunluk	Final Skor	Yaygınlık	Yoğunluk	Final Skor	Yaygınlık	Yoğunluk	Final Skor
1	2	1	2	0	0	0	0	0	0
2	2	1	2	3	1	3	0	0	0
3	3	2	6	2	1	2	0	0	0
4	1	1	1	2	3	6	1	1	1
5	0	0	0	3	2	6	1	1	1
6	1	1	1	3	2	6	1	1	1
7	1	2	2	2	2	4	1	1	1
8	1	2	2	3	3	9	0	0	0
9	1	2	2	3	1	3	1	1	1
10	2	1	2	3	1	3	1	1	1
11	2	2	4	3	1	3	0	0	0
12	1	2	2	3	3	9	0	0	0
13	0	0	0	3	2	6	1	1	1
14	0	0	0	2	2	4	2	1	2
15	2	3	6	2	2	4	2	2	4
16	1	1	1	1	1	1	0	0	0
17	3	2	6	1	1	1	1	1	1



Şekil 4.7. P53 antikor ile boyanan Grup III olguları (Kontrol), x100



Şekil 4.8. P53 antikor ile boyama, Grup I (HBV-HCC) olguları, x100.

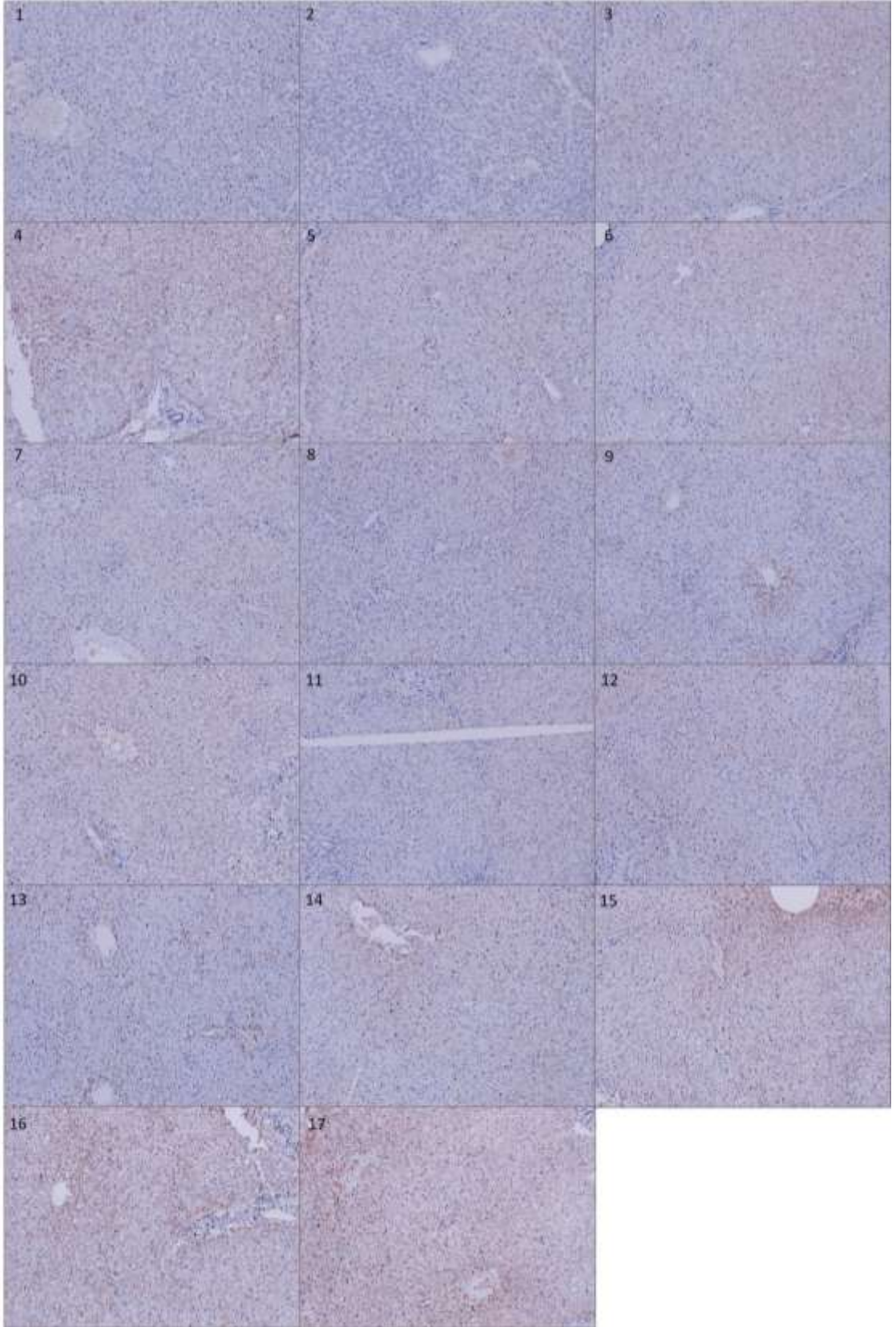


Şekil 4.9. P53 antikor ile boyama, Grup II olguları (KR-HCC), x100

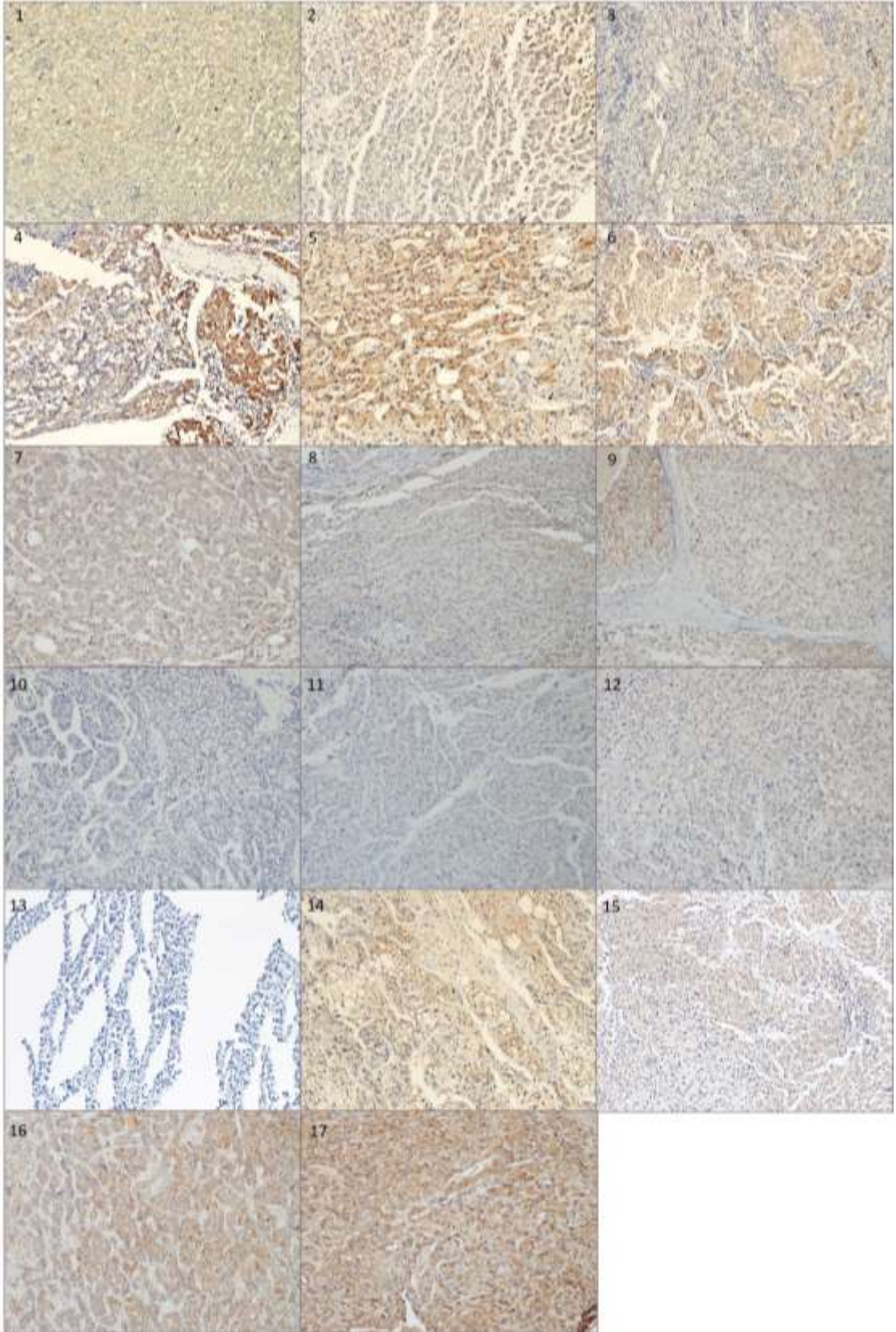
PLK-1 belirteci çekirdekte sentrozom, sentromer ve kinetokor, sitoplazmada ise hücre iskeletini boyamaktadır. PLK-1 antikoru ile yapılan boyama sonrası değerlendirme tablo halinde sunuldu (Tablo 4.6). Kontrol grubunda (Grup III) 4, 15, 16 ve 17. olgular kısmen diffüz ve hafif şiddette boyanırken 5, 7, 9 ve 12 numaralı olgularda, perisantral hepatositler zayıf-orta şiddette boyandı (Şekil 4.10). Grup I olgularından 1, 10, 11, 13 de boyama olmazken grubun genel görünümü ise orta ve zayıf düzeyde boyanma şeklinde değerlendirildi (Şekil 4.11). Grup II’de, diğer iki grubun aksine 1, 7, 9 ve 10 numaralı olgularda şiddetli ve genel olarak orta-yüksek yoğunlukta boyama görüldü. Bir olguda (örnek 8) tümör heterojenitesine bağlı iki farklı boyama paterni izlendi (Şekil 4.12)

Tablo 4.6. PLK-1 antikor İHK boyama dereceleri

Olgu No	Grup I (HBV-HCC)			Grup II (KR-HCC)			Grup III (Kontrol)		
	Yaygınlık	Yoğunluk	Final Skor	Yaygınlık	Yoğunluk	Final Skor	Yaygınlık	Yoğunluk	Final Skor
1	0	0	0	3	3	9	0	0	0
2	0	0	0	2	2	4	0	0	0
3	1	1	1	3	2	6	1	1	1
4	2	2	4	4	2	8	2	1	2
5	2	1	2	3	2	6	0	0	0
6	3	1	3	2	2	4	1	1	1
7	3	1	3	4	3	12	0	0	0
8	2	1	2	1	1	1	0	0	0
9	2	2	4	4	3	12	1	1	1
10	0	0	0	4	3	12	1	1	1
11	0	0	0	3	2	6	0	0	0
12	0	0	0	3	2	6	1	1	1
13	0	0	0	2	2	4	2	1	2
14	2	2	4	2	2	4	1	1	1
15	2	1	2	3	2	6	2	1	2
16	3	2	6	0	0	0	2	2	4
17	4	2	8	2	2	4	3	2	6



Şekil 4.10. PLK-1 antikor ile boyama, Grup III olguları (Kontrol), x100



Şekil 4.11. PLK-1 antikor ile boyama, Grup I olguları (HBV-HCC), x100

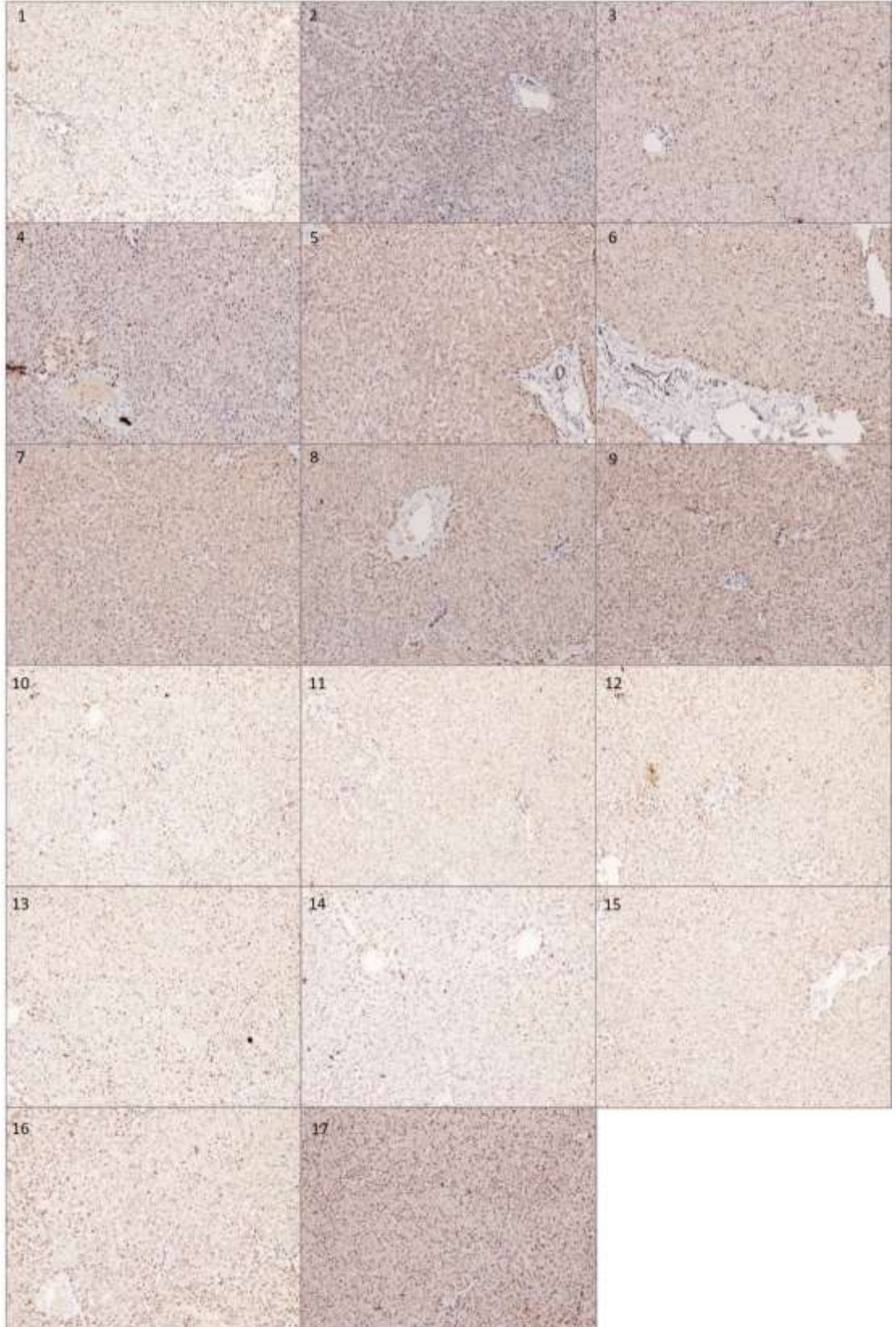


Şekil 4.12. PLK-1 antikor ile boyama, Grup II olguları (KR-HCC), x100

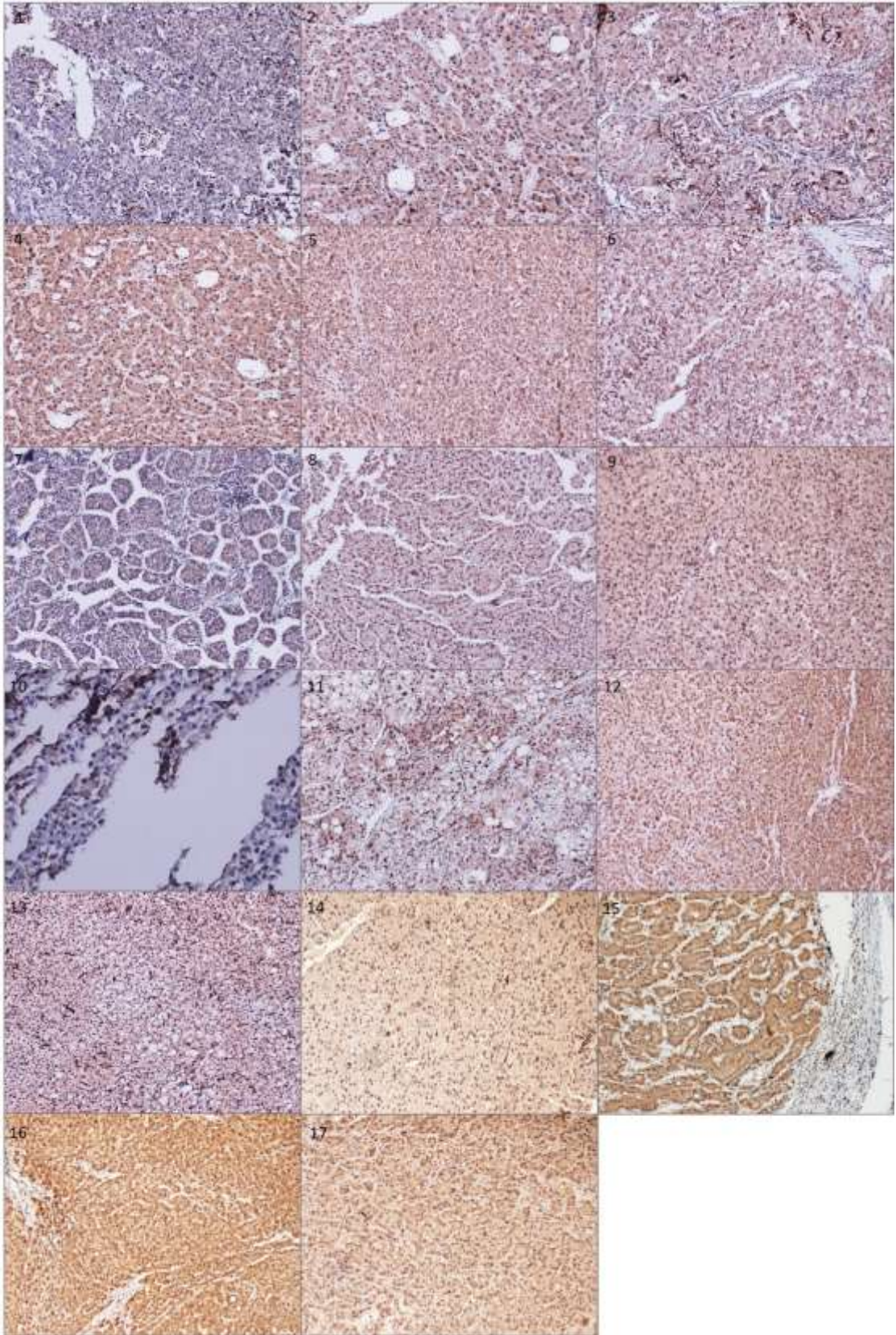
Nükleer boyama paterni gösteren BRCA-1 antikorunun değerlendirmesi tablo halinde sunuldu (Tablo 4.7). Grup III (kontrol grubu) boyamasında 1, 3, 4, 10 13 ve 16 numaralı olgularda zayıf ve seyrek nükleer boyama görülürken diğer olgular negatif olarak yorumlandı (Şekil 4.13). Grup I olguları, belirgin nükleer boyamanın yaygın görünümü ile diğer iki gruptan farklıydı (Şekil 4.14). Grup II olgularının kontrol grubu ile benzer özelliklerde olduğu görüldü (Şekil 4.15).

Tablo 4.7. BRCA-1 antikor İHK boyama dereceleri.

Olgu No	Grup I (HBV-HCC)			Grup II (KR-HCC)			Grup III (Kontrol)		
	Yaygınlık	Yoğunluk	Final Skor	Yaygınlık	Yoğunluk	Final Skor	Yaygınlık	Yoğunluk	Final Skor
1	0	0	0	4	1	4	2	1	2
2	4	1	4	0	0	0	0	0	0
3	4	1	4	4	1	4	2	1	2
4	4	1	4	0	0	0	0	0	0
5	3	1	3	4	1	4	0	0	0
6	4	1	4	4	1	4	0	0	0
7	0	0	0	1	1	1	0	0	0
8	0	0	0	2	1	2	1	1	1
9	4	1	4	0	0	0	1	1	1
10	0	0	0	0	0	0	1	1	1
11	2	1	2	0	0	0	0	0	0
12	4	2	8	2	1	2	0	0	0
13	4	1	4	0	0	0	1	1	1
14	0	0	0	0	0	0	1	1	1
15	2	1	2	4	1	4	1	1	1
16	3	2	6	2	1	2	1	1	1
17	4	1	4	0	0	0	0	0	0



Şekil 4.13. BRCA-1 antikor ile boyama, Grup III olguları (Kontrol), x100



Şekil 4.14. BRCA-1 antikor ile boyama, Grup I olguları (HBV-HCC), x100



Şekil 4.15. BRCA-1 antikor ile boyama, Grup II olguları (KR-HCC), x100

Elde edilen bulgular medyan (minimum-maksimum) ile özetlendi. Normal dağılıma uygunluk için Shapiro Wilk testi kullanıldı. İstatistik analizlerde, Mann Whitney U testi kullanıldı. İlgili analizlerde $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Analizlerde IBM SPSS Statistics 26.0 programı kullanıldı. İstatistiki bulgular tablo olarak sunuldu (Tablo 4.8)

Tablo 4.8. İHK parametreleri ve istatistiki analizi

Medyan (Minimum-Maksimum)			
	Grup I (HBV-HCC)	Grup III (Kontrol)	p
AURKA	9(4-12)	0(0-1)	<0.001
P53	2(0-6)	1(0-2)	0.002
PLK-1	2(0-8)	1(0-6)	0.296
BRCA1	4(0-8)	1(0-2)	0.006
	Grup II (KR-HCC)	Grup III (Kontrol)	p
AURKA	8(3-12)	0(0-1)	<0.001
P53	4(0-9)	1(0-2)	<0.001
PLK-1	6(0-12)	1(0-6)	<0.001
BRCA1	1(0-4)	1(0-2)	0.239
	Grup I (HBV-HCC)	Grup II (KR-HCC)	p
AURKA	9(4-12)	8(3-12)	0.224
P53	2(0-6)	4(0-9)	0.025
PLK-1	2(0-8)	6(0-12)	0.001
BRCA1	4(0-8)	1(0-4)	0.11

5. TARTIŞMA

Fosfotazlar ve protein kinazlar, hücre metabolizması ve fonksiyonunun düzenlenmesinde görev yapan moleküllerdir. Bu nitelikleriyle çok sayıda sinyal yollarında yer aldıkları için özellikle son yıllarda terapötik ilaçların geliştirilmesinde hedef molekül olarak öne çıktıkları görülüyor (122, 167). Son yirmi yılda yapılan çalışmalarla, protein kinazlar üzerinden (inhibitörlerinin potensi ve özgüllüğündeki iyileştirmelerle) kanser tedavi stratejilerinde önemli kazanımlar elde edilmiştir (168).

Serin/treonin kinaz ailesi içinde yer alan Aurora Kinazlar (Aurora A, B ve C) mitotik hücre bölünme sürecinin yönetilmesinde anahtar role sahiptir. Mitozun düzenlenmesi ve hücre bölünmesi için gereken aktivasyonu sağlayan AURKA, bu ailenin önemli bir üyesidir. Bugüne dek tanımlanmış G1/S fazında etkili olan birçok onkogenden farklı olarak bu kinaz ailesinin üyeleri, G2/M fazında en yüksek seviyede ifade edildiği gösterilmiştir (124). Çok sayıda substratı tanımlanan AURKA'nın birçok kanser türünde normal dokulara nazaran daha fazla ifade edildiği çalışmalarla ortaya konmuştur (124, 169). Çalışmamızda; HBV-HCC ve KR-HCC olgularında, AURKA'nın ekspresyon düzeyi, AURKA gen amplifikasyonu (gen-KSD) ve AURKA substratı olan P53, PLK-1 ve BRCA-1 protein düzeyleri rölatif olarak incelendi.

Karsinogeneizde, gen-KSD, nokta mutasyonlardan farklı olarak genomun büyük kısmını etkileyen genetik bir varyasyondur. Gen amplifikasyonun gen ekspresyonuna etkisi birçok kanser türünde araştırılmıştır (170, 171). MYCN, AKT2 ve ERBB2 gibi somatik gen amplifikasyonlarının kilit role sahip oldukları artık bilinmektedir. Ayrıca bu gen-KSD'lerinin, over, meme, mide ve kolorektal kanserlerde bir belirteç olabileceği, kötü prognozla ilişkilendirilebileceği yönünde çalışmalar bulunmaktadır (172-174). HCC lerde gen amplifikasyonunun en sık neden olduğu sürücü mutasyonlar, telomeraz aktivasyonudur. HBV ile ilişkili HCC'ler için, gen-KSD'nin karsinogenez potansiyeline sahip olabileceği gösterilmiştir (175). Özellikle Siklin D1, CDKN1A, KRAS ve MDM2 gibi onkogenlerin HCC'de kopya sayısının 2-10 kat arasında arttığı gösterilmiştir (176, 177). AURKA'nın ise kolorektal ve meme kanserinde amplifiye olduğu ortaya konmuş olmasına rağmen HBV ile ilişkili olmayan 224 HCC olgusunun yer aldığı bir çalışmanın sonuçlarına göre üç olguda AURKA gen amplifikasyonu varlığı tesbit edilmiştir (171, 178, 179). Yaptığımız güncel literatür taramasında HBV ilişkili HCC olgularında AURKA'nın gen-KSD'sine ilişkin bir araştırma görülmedi. Çalışmamızda, DNA örneği

ile yaptığımız AURKA gen-KSD, gen amplifikasyonu araştırmasında, gruplara ait referans gen Ct ortalaması Grup I ve Grup II’de birbirine yakın değerleri verirken (sırasıyla 21.99- 21.56) kontrol grubu daha erken bir Ct değeri (20.98) verdi. Bu durum; TMA parafin blok doku serilerine, Grup I ve II’de hepatektomi materyalinin kaynaklık etmesi ile ilişkilendirilirken, Grup I ve Grup II örneklerinden izole edilen DNA’daki fragmanite görünümü de açıklamaktaydı. Kontrol grubu (Grup III) numunelerinde, izole edilen DNA materyalinin jel elektorforez görüntüsü ve ölçüm sonuçları dikkate alındığında, görece daha iyi korunmuş olmasını donör karaciğeri kama biyopsi örneklerinin kullanılmış olmasıyla açıklamak mümkündür. Çalışmada Grup I ve Grup II’nin kontrol grubu ile yapılan Delta Delta Ct logaritmik analizinde ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) anlamlı sonuç bulunmadı ($2^{-\Delta\Delta Ct} < 2$). Ek olarak aynı preanalitik süreçlerden geçen ve her ikisi de hepatektomi materyalinden örneklenen Grup I ve Grup II olguları gen-KSD, kendi aralarında rölatif olarak karşılaştırıldı. Söz konusu iki grup arasında; $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2.11$ sınırda bir değer bulundu. Ancak yapılan istatistik çalışmasıyla iki grup arasında, $\Delta\Delta Ct$ ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri dikkate alındığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p=0.060$) görüldü. Çalışmanın gen-KSD araştırmasında Grup I ve II verileri ile yapılan $\Delta\Delta Ct$ analiz sonucunun eşik değerde olması ve istatistiki olarak anlamlı çıkmamasında; çalışmanın doğası gereği, deneysel hatalar ve özellikle numune varyasyonu kaynaklı unsurların (preanalitik süreç soğuk iskemisi, numune büyüklüğü ve numune işleme koşulları) sonuç üzerine etkili olduğu değerlendirildi (180).

AURKA geninin başta mide, kolon, meme ve over kanserinde aşırı eksprese edildiği ve bu durumun kötü prognozla ilişkili olduğu ifade edilmiştir (178, 181, 182). Çalışma planına göre FFPE olgularından hazırlanan TMA doku serilerinden RNA izolasyonu yapıldı. Ancak RNA ile gen ekspresyon düzeyi çalışmasında elde edilen RNA çalışmayı sonuçlandırmaya uygun nitelikte değildi. Buna rağmen izolasyonu yapılan RNA materyaliyle cDNA sentezi yapıldı. cDNA örnekleriyle başlatılan RT-PCR çalışması sonucunda örneklerin amplifiye olmadığı görüldü. Çalışmaya kaynaklık eden olguların soğuk iskemisi süresiyle ilişkilendirilen bu durum “Çalışmayı Sınırlandıran Faktörler” başlığı altında detaylı incelendi. AURKA’nın protein düzeyinde ifadesi, İHK yöntemi kullanılarak analiz edildi.

AURKA’nın karsinogenezdeki rolü ve tedavi stratejilerindeki yerine ilişkin ilginç son birkaç yılda daha da arttığı görülüyor. Özellikle kolorektal adenokarsinom, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, over kanseri gibi kanser türlerinde AURKA gen ifadesinin arttığı bildirilmiş ve bu durum, olgunun kötü prognoz ve ilaç direnci ile ilişkilendirilmiştir

(171, 181, 183, 184). Aurora kinaz (AURKA, AURKB) inhibitörleri ile 2014-2020 yılları arasında yapılan bir araştırma, henüz klinik kullanım için onay almamış olsa da, tek veya kombine kullanım için bu çok hedefli inhibitörlerin önemini ve gelişme eğiliminde olduğunu ortaya koymuştur (185). Kanseri Genomu Atlası, Kanseri Hücre Hattı Ansiklopedisi (CCLE) ve Gene Expression Omnibus (GEO) verileri kullanılarak yapılan bir başka çalışmada ise JQ1, Aktinomis D1 ve Kamptotesinin AURKA ekspresyon düzeyini azaltabildiği bildirilmiştir (183). Yakın zamanda MLN8237 (Alesertib)'e AURKA inhibitörü olarak klinik çalışmalarda yer verilmiş, bir makalede ise Sorafenib ile birlikte MLN8237'nin HCC'de güçlü bir sinerjistik etki yarattığı deneysel çalışmayla ortaya konmuştur (186, 187). Bununla birlikte yapılan literatür taramasında, AURKA etkisinin sınırlı sayıda makalede ve özellikle HCC gelişimi ve etiyolojisi dikkate alınmadan deneysel modellerle yorumlandığı görüldü.

Farklı birçok çalışmada, AURKA ekspresyon düzeyinin çeşitli kanser tiplerinde kantitatif olarak artmış olduğu RT-PCR yöntemi kullanılarak gösterilmiştir (171, 181, 183, 184). Çalışmamızda RT-PCR tekniğiyle sonuç alınamadığı için AURKA ifadesi protein düzeyi İHK yöntemi kullanılarak araştırıldı. AURKA spesifik antikoru, Grup I ve Grup II olgularını orta-şiddetli düzeyde nükleer boyarken, sitoplazmada oldukça zayıf, diffüz boyama görüldü. Grup III (kontrol) olgularının yarısında hiçbir şekilde boyama izlenmezken sekiz olguda, zayıf sitoplazmik, perisantral (zon 3) boyama vardı. AURKA nükleer olarak sentrozom ve iğ iplikleri yanı sıra kısmen bozulan mikrotübül organizasyonunda veya hücre döngüsünün ilerlemesiyle normal mikrotübül düzenlenmesinde de rol almaktadır (188, 189). Bu durum; AURKA antikor ile Grup I ve Grup II olgularında HCC hepatositlerin sitoplazmik diffüz boyanması ile kontrol grubunda perisantral hepatositlerin sitoplazmik boyanmasını açıklamaktadır. Ayrıca karaciğer mikroadatomisi dikkate alındığında; mekânsal iş bölümü boyutuyla (portal alan ve santral ven bölgesine göre) hepatositlerde, genom çapında birçok gen açısından ekspresyon düzeyinin farklılık gösterdiğini açıklayan literatürle, sitoplazmik boyama paterni uyumluydu (38, 39).

AURKA protein düzeyindeki analizde; Grup I (HBV-HCC) olguları Grup III (kontrol) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi ($p < 0.001$). Grup II (KR-HCC) ile Grup III (kontrol) karşılaştırıldığında yine farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$). İki HCC grubu arasında ise AURKA ifadesinin protein düzeyinde yapılan değerlendirmesinde, istatistiki açıdan anlamlı fark yoktu ($p = 0.224$). Veriler yorumlandığında her iki grup HCC olgularında (HBV-HCC ve KR-

HCC) AURKA ifadesinin artığı net olarak ortaya konmaktadır. HCC grupları arasında ise AURKA ifade yüksekliği açısından bir farklılık olmadığı, her iki araştırma grubunda da yüksek düzeyde ifade edildiği rahatlıkla söylenebilir. Grup I ve II bulgularımız, AURKA'nın çeşitli kanser türlerinde artış gösterdiği yönündeki literatür ile uyumluydu.

AURKA'nın aktivite gösterdiği çok sayıda substrat tanımlanmıştır. Mitotik süreçte görev yapanlar, tümör baskılayıcılar ve onkogenlerden oluşan bu substratların işlevleri AURKA aracılı fosforilasyonla düzenlenir (18, 127). Çalışmamızda bu substratlardan üçüne (P53, PLK-1 ve BRCA-1) yer verildi. AURKA'nın substratları üzerindeki aktivite ve etkinliği, HCC ve kontrol grupları arasında rölatif olarak incelendi.

P53 çoğunlukla translasyon sonrası fosfatazlar ve protein kinazlar tarafından iki ayrı alanda kümelenen fosforilasyon alanlarının değiştirilmesiyle modifiye edilir. Bu modifikasyon zaman zaman DNA tümör virüslerinin transformasyon yapan proteinlerin, P53 fosforilasyonu üzerine etkisiyle olduğu ifade edilmiştir (190, 191).

P53 fonksiyon kaybı mutasyonlarının fenotip özelliği; onkojenik transformasyonu, sentrozomun aşırı ifade edilmesi ve kromozom kararsızlığıdır. AURKA'nın ektopik aşırı ifadesinin, ortaya çıkan bu fenotiplerle ilişkili olduğu ve bunları indüklediği biliniyor. Son yıllarda, stokiyometrik fosforilasyon yöntemine göre yapılan bir çalışmada, P53^{Ser315}'in fosforilasyonu ile P53'ün DNA bağlanma aktivasyonunu ve transkripsiyonu artırdığı bildirilmiş olsa da, daha sonra yayınlanan başka bir makalede P53 MDM2 ilişkisi üzerinden AURKA aracılı P53^{Ser315} fosforilasyonunun destabilizasyona neden olduğu bildirilmiştir (14, 192, 193). Sonuçta AURKA'nın P53'ü Ser315 üzerinden fosforile ettiği, böylece MDM2 ve proteoliz aracılığı ile P53'ün ubiquitinasyonun yol açtığı gösterilmiştir. P53, MDM2 varlığında veya aktif olmayan düzeyde AURKA varlığında bozulmazken, mutant-MDM2 varlığında veya çalışmamızda olduğu gibi AURKA'nın yüksek ifade edildiği durumda; özellikle P53^{Ser315} ve diğer P53 protein ailesi sinyal eksenlerinin fosforilasyonu P53'ü stabilize etmektedir. P53'ün bu destabilizasyonu, kontrol noktası-tepki yollarını aşağı regüle ederken, hücrelerde onkojenik dönüşüme doğrudan katkı verdiği ortaya konulmuştur (14, 149).

Fosfospesifik P53^{Ser315} antikoruyla yapılan İHK boyamasında; kontrol grubu (Grup III) olgularında, beklendiği gibi oldukça seyrek, zayıf nükleer boyama gösteren birkaç olgu dışında boyanma olmadı. Grup I ve Grup II olguları kontrol grubuna kıyaslandığında P53^{Ser315} antikoruyla belirgin boyandı. Bu iki grup istatistiksel olarak kontrol grubundan anlamlı bir şekilde farklılık gösterdi (sırasıyla; p=0.002 ve p<0.001). Grup I olgularının üçünde boyama gerçekleşmezken kalan on dört olgu seyrek-orta şiddette nükleer

boyanma gösterdi. Grup II olgularının ise daha yaygın ve yoğun boyanmasıyla kontrol grubundan ve Grup I olgularından bariz şekilde ayrıştığı görüldü ($p=0.025$). AURKA aracılı fosforile P53^{Ser315} proteini varlığı ve yoğunluğu deney tasarımımda öngördüğümüz gibi çıkarken, KR-HCC olgularında HBV-HCC olgularına kıyasla daha yoğun ve şiddette olması dikkat çekiciydi. Bir protein kinaz olarak AURKA'nın substratı P53^{Ser315} fosforilasyonu, P53-MDM2 arasındaki ilişki, modifikasyonu ve konformasyonu, P53'ün destabilizasyonuna bağlı karsinogenez mekanizmasının, etyolojik olarak farklı, iki HCC grubu arasında farklı düzey ve etkinlikte olduğunu düşündürmektedir. Sonuçlar, özellikle aşırı eksprese edilen AURKA olgularının inhibisyonunu hedefleyen tedavi stratejilerinde KR-HCC ve HBV-HCC olguları özelinde tedavi başarısında farklılık gösterebileceğini düşündürmektedir.

AURKA substratları arasında yer alan ve genellikle tümör hücrelerinde aşırı ekspresyonu görülen bir diğer molekül PLK-1'dir. PLK-1, AURKA aracılığıyla, kinaz domain'i üzerinde bulunan T lopunda korunmuş Thr210 fosforilasyonu gerçekleşir ve hedef proteinlerle birleşerek aktivite kazanır. PLK-1^{Thr210} fosforilasyonu gerçekleşmediğinde bu moleküllerle birleşse dahi aktivite göstermez (15, 194, 195). PLK-1'in aktivasyonu, AURKA için bir kofaktör olan Bora-AURKA fosforilasyonu, kontrol noktasının geçilerek hücrenin M fazına girişi için ön koşuldur (15). Ayrıca mitotik çıkışta, hücre döngüsünün ilerlemesinde ve S fazı replikasyon sürecinde ikincil rolü olduğu biliniyor (152). Bu mekanizma üzerinden PLK-1'in inhibisyonu ve fosforilasyonun engellenmesiyle mitoz sürecinin birden çok noktasına müdahale edilerek kanser hücrelerinin ölümünün sağlandığı bildirilmiştir. Aynı zamanda PLK-1 ekspresyonu birçok farklı kanser tipinde yüksek ifade edildiği bildirilmiş ve bu durum çoğunlukla kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (152, 195).

Çalışmamızda PLK-1, AURKA ilişkisini daha net ortaya koyabilmek için fosfospesifik PLK-1^{Thr210} antikor kullanıldı. PLK-1^{Thr210} antikoru, Grup I ve II olgularında, orta ve yüksek derecede nükleer boyama gösterdi. Kontrol grubu olan Grup III de ise nükleer boyanma olmadı. Ancak birkaç olguda, orta-zayıf düzeyde sitoplazmik perisantral boyanma vardı. Kontrol doku kesitlerinde perisantral alanda AURKA'da olduğu gibi PLK-1'de de görülen perisantral sitoplazmik boyama paterni, karaciğerdeki kan akımı nedeni ile toksik maddeye en çok maruz kalan bölge olması ve buna bağlı hasarla ilişkilendirildi (196). Gruplar arasında PLK-1^{Thr210} düzeyi, karşılaştırıldığında; Grup II ile Grup III arasında değişiklik istatistiksel olarak Grup II lehine anlamlıyken ($p<0.001$), Grup I ve Grup III arasında ise istatistiki bir fark görülmedi ($p=0.296$). Grup

II ve Grup I arasında yine Grup II lehine görülen artış istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0.001).

PLK-1 ifadesinin normal hücrelere oranla, kanser hücrelerinde 20 kata kadar, HCC'lerde ise 11.7 kat arttığı bildirilmiştir (195). İnsan karaciğer hücre dizisi *HuH-7* hücre kültürü ile yapılan başka bir çalışmada yine PLK-1'in aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada, aşırı eksprese edilen PLK-1 yıkımının endonükleaz-G yolağıyla olduğu, apoptoza yol açtığı ve terapötik amaçlı iyi bir hedef olabileceği bildirilmiştir (197). Bizim elde ettiğimiz sonuçlar AURKA'nın fosforile ettiği PLK-1^{Thr210} düzeyinin sadece KR-HCC grubunda artmış olduğunu gösterdi. AURKA düzeyi benzer olsa da P53^{Ser315} ve PLK-1^{Thr210} düzeylerindeki bu ayrışma, Grup I ve Grup II olguları arasında, karsinogenez mekanizmasının farklı ilerlediğini göstermektedir. PLK-1 inhibitörlerinin hedef proteinle birleşmiş olsa dahi ancak fosforile PLK-1'in aktivite gösterdiği gerçeği dikkate alındığında, fosforile olmayan ve PLK-1 aktivitesi sınırlı olan HBV-HCC'lerde, PLK-1 yıkımı ile hedeflenen ve beklenen başarıyı gösteremeyeceğini düşündürmektedir. Yine başka bir çalışmada PLK-1'in aşırı ekspresyonunun kötü prognoz ve tümörigenez arasındaki güçlü ilişkiye vurgu yapılmış ve bu sürece doğrudan veya dolaylı birçok katkı verdiği ortaya konmuştur. Bu katkılardan birinin de P53 ve pRB'nin inhibisyonu olduğu bildirilmiştir (152). Benzer bir şekilde çalışmamızda fosforilasyonu ile destabilize olduğu bildirilen P53^{Ser315}'in yüksek oranda fosforile PLK-1'le aynı grupta (Grup II) kümелendiğini ve KR-HCC gurubu için literatür ile uyumlu olduğunu göstermiştir. Ancak HBV-HCC (Grup I) olguları fosforile PLK-1 ile ilerleyen karsinogenez mekanizması açısından diğer KR-HCC grubuyla önemli ölçüde ayrılmaktadır.

BRCA1 genomik stabilizasyonun korunması görevi ve tümör baskılayıcı işlevleri olan fosfoproteindir. İlk olarak 1994 yılında meme ve yumurtalık kanserine neden olan gen olarak tanımlanmıştır (198). BRCA1 çift zincir kırıklarının onarımında ve rekombinasyonunda görev yapar. Kalıtsal meme kanserlerinin %40'ından sorumlu olduğu bildirilen BRCA1 geninin alternatif *splicing* (uç birleştirme) ile subselüler lokalizasyonu ve fizyolojik fonksiyonu modüle edilir. Bu nedenle bazıları hastalıklarla ilişkilendirilmiş birçok alternatif uç birleştirme varyantı tanımlanmıştır (199, 200). BRCA1, başta P53 olmak üzere, tümör baskılayıcılar, c-Myc gibi onkojenler, RAD50 ve RAD51 gibi DNA onarım porteinleriyle doğrudan veya dolaylı ilişki içindedir. Fiziksel ilişkilerle hücre döngüsü ilerlemesinin, sentrozom duplikasyonunun, DNA hasar onarımının ve apoptoz gibi süreçlerin merkezi kavşak noktasında yer alır (201, 202).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada; metafazdan anafaza geçişte, mutant BRCA1 varlığı veya benzer bir nedenle BRCA1'in aşağı yönlü regülasyonunda, mikrotübül-kinetokor bağlantısının kontrol edilemez şekilde gerçekleşmesine ve mitotik kontrol noktasının aşılmasına neden olduğu bildirilmiştir. Böylece mutant BRCA1'in bulunduğu kanserlere özgü, azalan BRCA1 ekspresyonuna eşlik eden poliploidi, yüksek anöploidi ve nihayetinde malign transformasyonu açıklanmıştır (202, 203). BRCA1 sitoplazmada, çekirdek çift iplik DNA hasarında, hasar bölgelerinde lokalize olmaktadır (204).

Kanser Genom Atlas verileri kullanılarak 2021 yılında karaciğer Hepatoselüler karsinom kohortları kullanılarak yapılan çalışmada; BRCA1'in çoklu HCC dokularında önemli ölçüde yukarı regüle edildiği, yüksek BRCA1 ekspresyonunun ise kötü prognoz, ileri T evresi, mikrosatellit instabilite gibi parametrelerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (205).

Çalışmamızda BRCA1 antikorla yapılan boyamalarda Grup II ve Grup III olguları benzer patern gösteriyordu. Özellikle Grup II'de sitoplazmik boyamanın da eşlik ettiği birkaç olguda zayıf seyrek nükleer boyanma özellikleri görüldü. Grup I'de yer alan olgularda sitoplazmik boyanmanın da eşlik ettiği, orta yoğunlukta nükleer boyamanın varlığı dikkat çekti. BRCA1 boyaması; istatistiki değerlendirme sonucu Grup I ve Grup III arasında fark anlamlıydı ($p=0.006$). Grup II ile Grup III arasında anlamlı fark görülmedi ($p=0.239$). Grup I ve Grup II arasında da yine istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmadı ($p=0.110$). Sentrozomda lokalize olan AURKA'nın kinaz aktivitesi ile hücre döngüsünün G2 fazından M fazına geçmesini sağladığı bilinmektedir. Benzer şekilde sentrozomda lokalize BRCA1'in inaktivasyonu durumunda G2/M kontrol noktası kaybıyla AURKA'nın fosforilasyonu arasında fiziki ve biyokimyasal ilişki ortaya konmuştur (159). Çalışmamız, AURKA ifadesinin benzer düzeyde yüksek olduğu iki deneysel grubumuz (HBV-HCC, KR-HCC) arasında, BRCA1 sonuçları ve karsinogeneze katkısı bakımından ayrışma olduğunu göstermektedir. Grup I olgularına ait bulgular, AURKA'nın yüksek ifade edildiği DNA hasarı durumunda, BRCA1 varlığında dahi hücre döngüsünün ilerlemesine katkıda bulunduğu ve M fazına geçişe olanak sağladığı yönündeki literatür bilgisini desteklemiştir (159).

Grup I olgularında yüksek AURKA ekspresyonu olduğu halde, daha düşük seviyede ifade edilen BRCA1'in, HCC dinamiği açısından diğer HCC grubundan (Grup II) farklılık gösterdiği rahatlıkla söylenebilir. BRCA1 temelde N-terminali *ring* motifine sahiptir ve BARD1 proteinle oluşturdukları kompleks Poli (ADP-riboz) (PAR), bölgelerine bağlanarak protein fonksiyonunda değişikliklere aracılık eden sinyal

molekölü E3 ubikuitin ligaz olarak işlev görür. (206, 207). BRCA ring alanı mutasyonları ve dolayısıyla BARD1 ile kompleks oluşturmaması, önceki çalışmalarda gösterilmiş olan E3 ligaz aktivitesini azaltan ve BRCA1'in kanserle ilişkisini açıklayan mekanizmanın Grup I olguları için de geçerli olduğunu düşünüyoruz (202).

5.1. Çalışmayı Sınırlandıran Faktörler

Çalışma sürecinde, moleküler testlerin tamamlanmasında çeşitli olumsuzluklarla karşıldı. Özellikle planlanan AURKA gen ifade düzeyinin RNA temelinde, kantitatif analizi numune kaynaklı olumsuzluklar nedeniyle gerçekleştirilemedi. AURKA gen kopya sayısı değişikliği analizinde hepatektomi materyalinden alınan numunelerden elde edilen DNA örneği ile kontrol grubu için kullanılan karaciğer kama biyopsilerinden üretilen örneklerin, preanalitik ve analitik süreçlerinin farklı olmasının, DNA ekstraksiyon sonuçlarına yansıdığı görüldü.

Modern teknik ve teknolojik gelişmelerle FFPE doku numunelerinden moleküler düzeyde analizler başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. FFPE numuneleri, moleküler analizler için esneklik ve özgünlük sağlamaları nedeniyle oldukça değerli kaynaklardır (208, 209). Bununla beraber FFPE doku örneklerinin işleme süreçleri ve seçilen moleküler analiz yöntemleri, uygulamanın başarısını etkilemektedir.

Optimal olmayan preanalitik ve analitik süreçler, FFPE numunelerde yapılan moleküler analizin sonuçlarını etkileyebilmektedir. Etkinin yönü ve büyüklüğü analit ve analitik platforma bağlıdır. Analit yani çalışılan örneğin DNA veya RNA temelinde olması testin başarısını doğrudan etkileyebilmekte, olumsuz şartların sonuca etkisini değiştirebilmektedir. Patoloji laboratuvarlarında FFPE doku örneklerinin üretilmesi çok aşamalı bir süreçtir. Örnek çeşitliliği, örneği saklama ve işleme süresi, uygulama farklılıkları ve çeşitliliği, standardizasyonu güçleştiren unsurlardır (210). RNA temelinde FFPE doku numunesi ile yapılan çalışmalarda numunenin büyük veya küçük olması, soğuk iskemi süresi, dekalsifikasyona tabi tutulup tutulmaması ve FFPE dokunun arşiv süresi, majör etmenler olarak sıralanırken, doku takip süresi ve reaktiflerinin niteliği çalışmaya uygun RNA eldesini olumsuz etkileyebilmektedir (208, 210-212). Ayrıca uzun süreli formol fiksasyonu RNA molekölü ile protein içerik arasında kurulan metil köprüleri, reverse transkriptaz ile cDNA elde edilmesini güçleştirebilmektedir (208, 213). Benzer şartlarda total RNA elde sürecinde 21-23 nükleotitten oluşan miRNA'ların daha avantajlı olduğu, izolasyon ve amplifikasyon başarısının daha yüksek olduğu ifade

edilmiştir. Uzun formol fiksasyonu durumunda proteinaz süresinin uzun tutulması önerilmektedir (212).

Çalışmamızda AURKA gen ifadesi araştırmasında, RNA elde etme başarısını artırmak için doku kesiti sayıca fazla tutuldu. İzolasyon işlemi sonunda örnekler jel elektroforezinde yürütüldüğünde tüm gruplarda fragmente patern görüldü (Şekil 4.1). Tüm gruplar RT-PCR işlemine tabi tutulduysa da amplifikasyon gerçekleşmedi. Ayrıca çalışmamızdaki olgularımıza benzer büyük organların, dilimlenmeden önce altı saati aşan sürelerde fiksasyona tabi tutulduğu takdirde RNA eldesinin dramatik şekilde düştüğü bildirilmiştir (209). Grup III olguları intra-operatif konsültasyon amacıyla gönderilen sağlıklı donör karaciğer örneklerinden hazırlandı. Grup III olgularında RNA elde edilememesi; fikse edilmeyen, taze karaciğer numunelerinin, transfer süresi ve işlem sürecinde soğuk iskemiye uzun süre maruz kalmasıyla, literatürde yer verildiği gibi, elde edilen RNA kalitesini kalıcı olarak düştüğünü değerlendiriyoruz. Test başarısını etkileyen bu faktörlere ek olarak, total RNA eldesinin neredeyse başarısız kılan etmenlerden birinin FFPE numunelerin saklama sıcaklığı, diğerininse uzun süre formol fiksasyonuna tutulması ve metil çapraz bağlarının enzimatik olarak kırılmaması olduğunu değerlendiriyoruz. Jel elektroforez görüntüsü bu olasılığı destekler nitelikteydi (Şekil 4.1). Bu görüntü, metil bağının kırılmadığı veya güç olduğu uzun nükleotid zincirlerinden yoksun (izolasyon başarısızlığı), bağların daha kolay kırıldığı kısa veya fragmente RNA dizilerinin varlığı ile uyumlu görünümündedir. Diğer etmen olarak FFPE doku numunelerinin saklama ve maruz kaldığı sıcaklık değeridir. Uzun süre oda sıcaklığı veya 37 °C da saklanan örneklerin RNA kalitesinin bozulduğu bildirilmiştir (208). Ayrıca RNA izolasyon kit kılavuzlarında örneklerin 53°C üzerine çıkılmaması gerektiği hususu özellikle belirtilmiştir. Patoloji laboratuvarlarında kullanılan doku takip işleminde, parafinin 60-62°C de kullanılması ve 3-4 saat işlem süresi neredeyse standart bir uygulamadır. Çalışmamızda kullanılan numunelerin standart doku takip işleminde 60-62°C de 3-4 saat işlenmiş olmasının, RNA elde edilme sürecinin olumsuz sonuçlanmasına ek katkı verdiğini düşünüyoruz. Ancak literatür taramamızda doku takip işlemi ve yüksek sıcaklığın etkisi üzerine bir çalışmaya rastlamadık. Preanalitik ve teknik uygunsuzluklar nedeniyle gruplarda AURKA gen ifade düzeyi kantitatif olarak ölçülemedi. Ek bir çalışma yapılarak AURKA'nın protein düzeyi

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız, birçok kanser türünde olduğu gibi HBV-HCC ve KR-HCC olgularında AURKA'nın yüksek düzeyde ifade edildiğini ortaya koymuştur. Bu iki HCC grubunda yüksek ifade edilen AURKA'nın çalışmamızda yer verdiğimiz substratlar üzerine farklı düzeyde etki ettiğini gösterdik. Yüksek düzeyde ifade edilen AURKA'nın katkı verdiği karsinogenezin başlamasında ve ilerlemesinde HBV-HCC ve KR-HCC gruplarında, mekanizmanın farklı olabileceğini ortaya koyduk. AURKA tarafından P53^{Ser315} fosforilasyonu, P53'ün MDM2 ile ilişkisinde, modifikasyona, konformasyon değişikliğine ve destabilizasyona neden olmakta, karsinogeneze katkı vermektedir. Bu mekanizma HBV-HCC ve KR-HCC gurplarının her ikisinde de gösterilmiş olmakla birlikte, KR-HCC'de fosforilasyon yoluyla etkisinin ve yoğunluğun daha yüksek olduğu gösterildi.

KR-HCC olgularının HBV-HCC olgularından ayrıştığı bir başka yolak ise PLK-1^{Thr210}'un AURKA üzerinden fosforilasyonudur. HBV-HCC olgularının aksine AURKA aracılı PLK-1^{Thr210} fosforilasyonunun KR-HCC olgularında yüksek oranda gerçekleştiğini ortaya koyduk.

PLK-1'in antitümör ilaç hedefi olarak belirlendiği, on ikiden fazla inhibitör deneysel olarak çalışılmış ve etkinliği kanıtlanmıştır. PLK-1'in antisens oligonükleotit aracılı inhibisyonu, HCC tedavisinde özellikle sitotoksik ajanların kısıtlı kullanımına karşın çözüm olarak sunulmuştur (152, 195). Çalışma sonuçlarımız, HBV-HCC olgularına nazaran, KR-HCC olgularında AURKA'nın fosfat bağladığı aktif PLK-1 molekülünün hedef olarak seçilmesinin tedavi stratejilerinde daha anlamlı olacağını ortaya koydu.

Çalışmamızla ortaya çıkan sonuçlar PLK-1'in ekspresyon düzeyinin aşırı yüksekliği ile P53 ve pRB'nin inhibisyonu arasında ilişki olduğu ve fosforile P53^{Ser315} stabilize olduğu yönündeki literatür çalışmaları ile paralellik arz ediyordu. Bu iki parametrenin bilhassa KR-HCC olgularında yüksek düzeyde olması dikkat çekici bir sonuçtu.

KR-HCC olgularıyla HBV-HCC olgularındaki bu farklılık dikkate alındığında PLK-1^{Thr210} fosfospesifik antikorun yoğun nükleer boyama özelliğinde bir patern göstermesi, KR-HCC olguları için PLK-1^{Thr210} antikorunun bir biyobelirteç olabileceğini düşündürdü.

BRCA1, AURKA substratları arasında yer alan bir diğer parametremizdi. KR-HCC olgularında yüksek AURKA ekspresyonu olduğu halde BRCA1 protein ifade düzeyi düşüktü. Oysa benzer oranda yüksek AURKA ekspresyonu gösteren HBV-HCC olgularında, BRCA1 protein düzeyinin yüksek olduğu görüldü. Diğer iki parametreden (P53 ve PLK-1) farklı olarak HBV-HCC olgularındaki bulgularımız, AURKA'nın yüksek ifade edildiği BRCA1 varlığında, DNA hasarı durumunda dahi hücre döngüsün durmamasına ve ilerlemesine katkı verdiği, M fazına geçişe olanak sağladığı yönündeki literatürle uyum gösterdi (159). İki HCC grubu arasında AURKA'nın substratları özelinde farklılık olduğu, AURKA'nın farklı etkinlik gösterdiği ve farklı mekanizma üzerinden HCC gelişimine ve ilerlemesine katkı verdiği çalışmamız sonuçlarıyla birkez daha ortaya kondu.

HCC'lerde farklı onkogenlerin 2-10 kat amplifiye olduğu literatürde yer almaktadır. Bir çalışmada HCC olgularının bazılarında AURKA gen amplifikasyonu olduğunu bildirilmiştir. Gen kopya sayısı değişikliğinin de incelendiği çalışmamızda; HBV-HCC ve KR-HCC olgularında AURKA'nın gen kopya sayısı değişikliği saptamadık. Bu yönüyle sonuçlarımız literatürü desteklememektedir. Sonuçlar ışığında; AURKA gen kopya sayısındaki artışın AURKA'nın yüksek düzeyde ifade edilmesine katkı vermediğini, muhtemel transkripsiyonel ve epigenetik faktörlerin rol oynadığını söylemek mümkündür.

HCC olgularında AURKA'nın etkinliği ve mekanizmasının aydınlatılması açısından yeni çalışmalarla bulgularımız desteklenmelidir. HBV-HCC olguları yanı sıra KR-HCC lerde AURKA ve onun substratı konumunda olan PLK-1'in gelecek dönemde yeni araştırmalarla HCC tedavisi için hedef olarak ortaya konabileceğini düşünüyoruz.

Çalışmamızla ortaya çıkan sonuçlardan biri de oldukça zengin doku arşivine sahip patoloji laboratuvarlarında, gen ifadesi çalışmaları için parafine gömülü doku örneklerinin kullanımıyla ilgili olmuştur. Preanalitik süreçlerdeki olumsuzluklar, soğuk iskemi süresi, fiksasyon süresinin uzunluğu ve doku takip işleminde, dokuların uzun süre yüksek ısıya maruz kalması gibi olumsuzlukların, parafine gömülü formol fikse doku örnekleriyle yaptığımız gen ifadesi moleküler çalışmalarını olumsuz etkilediği görüldü.

Özellikle patoloji laboratuvarlarında, çalışmalara kaynaklık eden doku örnekleri için, süreçlerin standardizasyonu, başta doku takip işleminde süre ve sıcaklık parametreleri olmak üzere, tekniğin yeniden gözden geçirilmesi ve iyileştirmesi gerektiğini düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. International Agency for Research on Cancer (IARC). <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf>. Son Erişim Tarihi 05 Ağustos 2022.
2. Llovet JM, Zucman RJ, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, Gores G. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2016, 2:16018.
3. McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*. 2021, 73:4-13
4. Trépo C, Chan HL, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet*. 2014, 384:2053-63.
5. Kulik L, El-Serag HB. Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2019, 156:477-91.
6. Hoshida Y, Toffanin S, Lachenmayer A, Villanueva A, Minguez B, Llovet JM. Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Semin Liver Dis*. 2010, 30:35-51.
7. Xie Y. Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma. *Adv Exp Med Biol*. 2017, 1018:11-21.
8. Abbasoğlu O. Hepatosellüler Karsinom, *J Surg Med Sci*. 2006, 2:5-10.
9. Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, Amadou A, Plymoth A, Roberts LR. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019, 16:589-604.
10. Roskoski RJ. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol Res*. 2015, 100:1-23.
11. Bhullar KS, Lagarón NO, McGowan EM, Parmar I, Jha A, Hubbard BP. Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Mol Cancer*. 2018, 17:48.
12. Chen C, Song G, Xiang J, Zhang H, Zhao S, Zhan Y. AURKA promotes cancer metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017, 486:514-20.

13. Su ZL, Su CW, Huang YL, Yang WY, Sampurna BP, Ouchi T, Lee KL, Wu CS, Wang HD, Yuh CH. A Novel AURKA Mutant-Induced Early-Onset Severe Hepatocarcinogenesis Greater than Wild-Type via Activating Different Pathways in Zebrafish. *Cancers*. 2019, 11:927.
14. Katayama H, Sasai K, Kawai H, Yuan ZM, Bondaruk J, Suzuki F, Fujii S, Arlinghaus RB., Czerniak BA, Sen S. Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet*. 2004, 36:55-62.
15. Macurek L, Lindqvist A, Lim D, Lampson MA, Klompmaker R, Freire R, Clouin C, Taylor SS, Yaffe MB, Medema RH. Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature*. 2008, 455:119-23.
16. Yoshino Y, Fang Z, Qi H, Kobayashi A, Chiba N. Dysregulation of the centrosome induced by BRCA1 deficiency contributes to tissue-specific carcinogenesis. *Cancer Sci*. 2021, 112:1679-87.
17. Brodie KM, Henderson BR. Characterization of BRCA1 protein targeting, dynamics, and function at the centrosome: a role for the nuclear export signal, CRM1, and Aurora A kinase. *J Biol Chem*. 2012, 287:7701-16.
18. Du R, Huang C, Liu K, Li X, Dong Z. Targeting AURKA in Cancer: molecular mechanisms and opportunities for Cancer therapy. *Mol Cancer*. 2021, 20:15.
19. Xie Y, Zhu S, Zhong M, Yang M, Sun X, Liu J, Kroemer G, Lotze M, Zeh HJ 3rd, Kang R, Tang D. Inhibition of Aurora Kinase A Induces Necroptosis in Pancreatic Carcinoma. *Gastroenterology*. 2017, 153:1429-43
20. Abdel-Misih SR, Bloomston M. Liver anatomy. *Surg Clin North Am*. 2010, 90:643-53.
21. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol*. 2017, 27:1147-51.
22. Mahadevan V. Anatomy of the liver. *Surgery (Oxford)* 2020, 427-31.
23. Ellis H. Anatomy of the liver. *Surgery (Oxford)*, 2011, 12:589-92
24. Mitra V, Metcalf J. Functional anatomy and blood supply of the liver. *Anaesthesia & intensive care medicine* 2009, 7:332-3.
25. Sibulesky L. Normal liver anatomy. *Clin Liver Dis*. 2013, 1:1-3
26. AnotomyQE. <https://anatomyqa.com/liver-anatomy/>. Son Erişim Tarihi 01 Kasım 2022.

27. Yartsev A. Functional anatomy of the liver, <https://derangedphysiology.com/main/cicm-primary-exam/required-reading/liver-physiology/Chapter%20101/functional-anatomy-liver>. Son Erişim Tarihi 01 Nisan 2022.
28. Smadja C, Blumgart LH. The biliary tract and the anatomy of biliary exposure. In: L.H Beditor. *Surgery of the liver and biliary tract* 2th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994:11-24
29. Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev.* 2009, 89:1269-339.
30. Manco R, Itzkovitz S. Liver zonation. *J Hepatol.* 2021, 74:466-8.
31. Saxena R, Theise ND, Crawford JM. Microanatomy of the human liver-exploring the hidden interfaces. *Hepatology.* 1999, 30:1339-46.
32. Krishna M. Microscopic anatomy of the liver, *Clin Liver Dis.* 2013, 147:4-7.
33. The Ohio State University Pressbooks. Open Course Materials from Ohio State Instructors. <https://ohiostate.pressbooks.pub/app/uploads/sites/36/h5p/content/6/images/file-5991f56f44bae.jpg> Son Erişim Tarihi 01 Nisan 2022.
34. Mills, Stacey E. *Histology for Pathologists.* 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2012:735-50.
35. TheFreeDictionary. <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/liver+acinus>. Son Erişim Tarihi: 15 Nisan 2022.
36. Gebhardt R, Matz-Soja M. Liver zonation: Novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis. *World J Gastroenterol.* 2014, 20:8491-504.
37. Özoğul C. Sindirim Sistemi: Karaciger,Safra Kesesi ve Pankreas, içinde: *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*, . B. Baykal (Çeviri editörü) Ross, MH, Pavlina W. 6. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık. 2014:628-36
38. Ben-Moshe S, Itzkovitz S. Spatial heterogeneity in the mammalian liver. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019, 16:395-410.
39. Halpern KB, Shenhav R, Matcovitch-Natan O, Toth B, Lemze D, Golan M, Massasa EE, Baydatch S, Landen S, Moor AE, Brandis A, Giladi A, Avihail AS, David E, Amit I, Itzkovitz S. Single-cell spatial reconstruction reveals global division of labour in the mammalian liver. *Nature.* 2017, 542:352-6.

40. Perugorria, M.J., Olaizola, P., Labiano, I. Esparza-Baquer A, Marzioni M, Marin JJG, Bujanda L, Banales JM. Wnt- β -catenin signalling in liver development, health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019, 16: 121–36.
41. Torre C, Perret C, Colnot S. Transcription dynamics in a physiological process: β -catenin signaling directs liver metabolic zonation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011, 43:271-8.
42. Doumpas N, Lampart F, Robinson MD, Lentini A, Nestor CE, Cantù C, Basler K. TCF/LEF dependent and independent transcriptional regulation of Wnt/ β -catenin target genes. *EMBO J.* 2019, 38:98873.
43. Gill RM, Theise ND. Rappaport, Glisson, Hering, and Mall-Champions of Liver Microanatomy: Microscopic and Ultramicroscopic Anatomy of the Liver Into the Modern Age. *Clin Liver Dis.* 2021, 18:76-92
44. Boyer JL. Bile formation and secretion. *Compr Physiol* 2013; 3:1035-78
45. European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology* 2018, 69.: 182-236.
46. Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Alam N, Alemayohu MA, Allen C, Al-Raddadi R, Alvis-Guzman N, Amoako Y, Artaman A, Ayele TA, Barac A, Bensenor I, Berhane A, Bhutta Z, Castillo-Rivas J, Chittheer A, Choi JY, Cowie B, Dandona L, Dandona R, Dey S, Dicker D, Phuc H, Ekwueme DU, Zaki MS, Fischer F, Fürst T, Hancock J, Hay SI, Hotez P, Jee SH, Kasaeian A, Khader Y, Khang YH, Kumar A, Kutz M, Larson H, Lopez A, Lunevicius R, Malekzadeh R, McAlinden C, Meier T, Mendoza W, Mokdad A, Moradi-Lakeh M, Nagel G, Nguyen Q, Nguyen G, Ogbo F, Patton G, Pereira DM, Pourmalek F, Qorbani M, Radfar A, Roshandel G, Salomon JA, Sanabria J, Sartorius B, Satpathy M, Sawhney M, Sepanlou S, Shackelford K, Shore H, Sun J, Mengistu DT, Topór-Mądry R, Tran B, Ukwaja KN, Vlassov V, Vollset SE, Vos T, Wakayo T, Weiderpass E, Werdecker A, Yonemoto N, Younis M, Yu C, Zaidi Z, Zhu L, Murray CJL, Naghavi M, Fitzmaurice C. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level:. Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol.* 2017, 3:1683-91.

47. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2015, 149:1226-39.
48. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*. 2004, 127:35-50.
49. Schlageter M, Terracciano LM, D'Angelo S, Sorrentino P. Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014, 20:15955-64.
50. Farges O, Ferreira N, Dokmak S, Belghiti J, Bedossa P, Paradis V. Changing trends in malignant transformation of hepatocellular adenoma. *Gut*. 2011, 60:85-9.
51. Nault JC, Couchy G, Balabaud C, Morcrette G, Caruso S, Blanc JF, Bacq Y, Calderaro J, Paradis V, Ramos J, Scoazec JY, Gnemmi V, Sturm N, Guettier C, Fabre M, Savier E, Chiche L, Labrune P, Selves J, Wendum D, Pilati C, Laurent A, De Muret A, Le Bail B, Rebouissou S, Imbeaud S; GENTHEP Investigators, Bioulac-Sage P, Letouzé E, Zucman-Rossi J. Molecular Classification of Hepatocellular Adenoma Associates With Risk Factors, Bleeding, and Malignant Transformation. *Gastroenterology*. 2017, 152:880-94.
52. Kim H, Park YN. Hepatocellular adenomas: recent updates. *J Pathol Transl Med*. 2021, 55:171-80.
53. Abdelmalak M, Pendse A. Hepatocellular adenoma PathologyOutlines, <https://www.pathologyoutlines.com/topic/livertumorhepatocellularadenoma.html>. Son Erişim Tarihi 05 Şubat 2022.
54. Sempoux C, Balabaud C, Bioulac-Sage P. Malignant transformation of hepatocellular adenoma. *Hepat Oncol*. 2014;1:421-31.
55. Assarzadegan N, Gonzalez RS, High grade dysplastic nodule [pathologyoutlines https://www.pathologyoutlines.com/topic/livertumorhighgradedysplasticnod.html](https://www.pathologyoutlines.com/topic/livertumorhighgradedysplasticnod.html). Son Erişim Tarihi 05 Mayıs 2022.
56. Chang O, Yano Y, Masuzawa A, Fukushima N, Teramura K, Hayashi Y. The cytological characteristics of small cell change of dysplasia in small hepatic nodules. *Oncol Rep*. 2010, 23:1229-32.
57. Link T, Iwakuma T. Roles of p53 in extrinsic factor-induced liver carcinogenesis. *Hepatoma Res*. 2017, 3:95-104.

58. Suriawinata AA, Thung SN. Malignant liver tumors. *Clin Liver Dis*. 2002, 6:527
59. Feo F, Pascale RM. Multifocal hepatocellular carcinoma: intrahepatic metastasis or multicentric carcinogenesis?. *Ann Transl Med*. 2015, 3:4.
60. Utsunomiya, Itaru. "Pathological study on multicentric occurrence of hepatocellular carcinoma." *The Kurume Medical Journal*. 2005, 52:133-8.
61. Schlageter M, Terracciano LM, D'Angelo S, Sorrentino P. Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014;20:15955-64..
62. Brunt EM. Histopathologic features of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis (Hoboken)*, 2013, 1: 194-9.
63. Chen IY, Agostini-Vulaj D. Hepatocellular carcinoma overview pathologyoutlines. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/livertumorHCC.html>. Son Erişim Tarihi 05 Mayıs 2022.
64. WebPathology, Hepatocellular Carcinoma-Solid Pattern in Hepatitis B, <https://www.webpathology.com/image.asp?case=238&n=37>. Son Erişim Tarihi 11 Ekim 2022.
65. Xia R, Zhang X. HCC-macrotrabecular massive pathologyoutlines. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/macrotrabecularhepatocellularcarcinoma.html>. Son Erişim Tarihi 05 Mayıs 2022.
66. Martins-Filho SN, Paiva C, Azevedo RS, Alves VAF. Histological Grading of Hepatocellular Carcinoma-A Systematic Review of Literature. *Front Med (Lausanne)*. 2017, 4:193
67. Kim H, Jang M., Park YN. Histopathological Variants of Hepatocellular Carcinomas: an Update According to the 5th Edition of the WHO Classification of Digestive System Tumors. *J Liver Cancer*. 2020 20:17-24.
68. Gonzalez RS, Graham RP, HCC-fibrolamellar variant pathologyoutlines. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/livertumorfibrolamellar.html>. Son Erişim Tarihi 05 05 2022.
69. DRF Elliott, Gill RM, HCC-scirrhous type. pathologyoutlines. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/livertumorscirrhousHCC.html>. Son Erişim Tarihi 05 05 2022.

70. Murtha-Lemekhova A, Fuchs J, Schulz E, Sterkenburg AS, Mayer P, Pfeiffenberger J, Hoffmann K. Scirrhous Hepatocellular Carcinoma: Systematic Review and Pooled Data Analysis of Clinical, Radiological, and Histopathological Features. *J Hepatocell Carcinoma*. 2021, 8:1269-79.
71. WebPathology. Hepatocellular Carcinoma-Schirrous Pattern. <https://www.webpathology.com/image.asp?n=48&Case=238>. Son Erişim Tarihi 05 Mayıs 2022.
72. Jain D. HCC-clear cell variant. [pathologyoutlines.com](https://www.pathologyoutlines.com). Son Erişim Tarihi 05 Mayıs 2022. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/livertumorcLEARCELLHCC.html>
73. WebPathology. Hepatocellular Carcinoma-Clear Cell Pattern. <https://www.webpathology.com/image.asp?n=46&Case=238>. Son Erişim Tarihi 05 Mayıs 2022.
74. Olofson AM, Gonzalo DH, Chang M, Liu X. Steatohepatic Variant of Hepatocellular Carcinoma: A Focused Review. *Gastroenterology Res*. 2018, 11:391-6.
75. Stephen C. HCC-steatohepatic. [pathologyoutlines](https://www.pathologyoutlines.com). <https://www.pathologyoutlines.com/topic/liversteatohepaticHCC.html>. Son Erişim Tarihi 05 Ekim 2022.
76. Ziol M, Poté N, Amaddeo G, Laurent A, Nault JC, Oberti F, Costentin C, Michalak S, Bouattour M, Francoz C, Pageaux GP, Ramos J, Decaens T, Luciani A, Guiu B, Vilgrain V, Aubé C, Derman J, Charpy C, Zucman-Rossi J, Barget N, Seror O, Ganne-Carrié N, Paradis V, Calderaro J. Macrotrabecular-massive hepatocellular carcinoma: A distinctive histological subtype with clinical relevance. *Hepatology*. 2018, 68:103-12.
77. Xia R, Zhang X. [pathologyoutlines https://www.pathologyoutlines.com/topic/macrotrabecularhepatocellularcarcinoma.html](https://www.pathologyoutlines.com/topic/macrotrabecularhepatocellularcarcinoma.html). Son Erişim Tarihi 05 Mayıs 2022.
78. Li X, Yao Q, Liu C, Wang J, Zhang H, Li S, Cai P. Macrotrabecular-Massive Hepatocellular Carcinoma: What Should We Know?. *J Hepatocell Carcinoma*. 2022, 9:379-87.
79. Kang HJ, Oh JH, Kim YW, Kim W, An J, Sung CO, Kim J, Shim JH, Hwang S, Yu E, Heaphy CM, Hong SM. Clinicopathological and molecular characterization of chromophobe hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2021, 41:2499-510.

80. Kumar, M., Zhao, X. & Wang, X.W. Molecular carcinogenesis of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: one step closer to personalized medicine?. *Cell Biosci* 2011, 1:5.
81. Rossetto A, De Re V, Steffan A, Ravaioli M, Miolo G, Leone P, Racanelli V, Uzzau A, Baccarani U, Cescon M. Carcinogenesis and Metastasis in Liver: Cell Physiological Basis. *Cancers (Basel)*. 2019, 11:1731.
82. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012, 481:306-13.
83. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med*. 2007, 58:267-84.
84. Couri, T., Pillai, A. Goals and targets for personalized therapy for HCC. *Hepatol Int*, 2019, 13:125–37.
85. Rebouissou S, Nault JC. Advances in molecular classification and precision oncology in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2020, 72:215-29.
86. Moon RT. Wnt/beta-catenin pathway. *Sci STKE*. 2005, 2005(271):cm1
87. Khalaf AM, Fuentes D, Morshid AI, Burke MR, Kaseb AO, Hassan M, Hazle JD, Elsayes KM. Role of Wnt/ β -catenin signaling in hepatocellular carcinoma, pathogenesis, and clinical significance. *J Hepatocell Carcinoma*. 2018, 5:61-73.
88. Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene*. 2007, 26:2166-76.
89. Lin CP, Liu CR, Lee CN, Chan TS, Liu HE. Targeting c-Myc as a novel approach for hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*. 2010, 2:16-20.
90. Ghouri YA, Mian I, Rowe JH. Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *J Carcinog*. 2017, 16:1
91. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008, 8:187-98.
92. Georgescu MM. PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer*. 2010, 1:1170-7.

93. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012, 4:a011189.
94. Georgescu MM. PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer.* 2010,12:1170-7
95. Fan G, Tu Y, Chen C, Sun H, Wan C, Cai X. DNA methylation biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell Int.* 2018, 18:140.
96. Stallcup MR. Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation. *Oncogene.* 2001, 20:3014-20.
97. An W. Histone acetylation and methylation: combinatorial players for transcriptional regulation. *Subcell Biochem.* 2007, 41:351-69.
98. Toh TB, Lim JJ, Chow EK. Epigenetics of hepatocellular carcinoma. *Clin Transl Med.* 2019, 8:13.
99. Hlady RA, Sathyanarayan A, Thompson JJ, Zhou D, Wu Q, Pham K, Lee JH, Liu C, Robertson KD. Integrating the Epigenome to Identify Drivers of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology.* 2019, 69:639-52.
100. Nagaraju GP, Dariya B, Kasa P, Peela S, El-Rayes BF. Epigenetics in hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol.* 2022, 86:622-32
101. Iwasaki W, Miya Y, Horikoshi N, Osakabe A, Taguchi H, Tachiwana H, Shibata T, Kagawa W, Kurumizaka H. Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes. *FEBS Open Bio.* 2013, 3:363-9.
102. Braghini MR, Lo Re O, Romito I, Fernandez-Barrena MG, Barbaro B, Pomella S, Rota R, Vinciguerra M, Avila MA, Alisi A. Epigenetic remodelling in human hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2022, 41:107.
103. Yang J, Sheng YY, Wei JW, Gao XM, Zhu Y, Jia HL, Dong QZ, Qin LX. MicroRNA-219-5p Promotes Tumor Growth and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma by Regulating Cadherin 1. *Biomed Res Int.* 2018, 4793971.

104. Lin XJ, Chong Y, Guo ZW, Xie C, Yang XJ, Zhang Q, Li SP, Xiong Y, Yuan Y, Min J, Jia WH, Jie Y, Chen MS, Chen MX, Fang JH, Zeng C, Zhang Y, Guo RP, Wu Y, Lin G, Zheng L, Zhuang SM. A serum microRNA classifier for early detection of hepatocellular carcinoma: a multicentre, retrospective, longitudinal biomarker identification study with a nested case-control study. *Lancet Oncol.* 2015, 16:804-15.
105. Morishita A, Oura K, Tadokoro T, Fujita K, Tani J, Masaki T. MicroRNAs in the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma: A Review. *Cancers (Basel).* 2021, 13:514
106. Sui CJ, Xu F, Shen WF, Dai BH, Lu JJ, Zhang MF, Yang JM. MicroRNA-147 suppresses human hepatocellular carcinoma proliferation migration and chemosensitivity by inhibiting HOXC6. *Am J Cancer Res.* 2016, 6:2787-98.
107. Yerukala Sathipati S, Ho SY. Novel miRNA signature for predicting the stage of hepatocellular carcinoma. *Sci Rep.* 2020, 10:14452.
108. Xu X, Tao Y, Shan L, Chen R, Jiang H, Qian Z, Cai F, Ma L, Yu Y. The Role of MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma. *J Cancer.* 2018, 9:3557-69.
109. Hao X, Sun G, Zhang Y, Kong X, Rong D, Song J, Tang W, Wang X Targeting Immune Cells in the Tumor Microenvironment of HCC: New Opportunities and Challenges. *Front Cell Dev Biol.* 2021, 9:775462
110. Sevic I, Spinelli FM, Cantero MJ, Reszegi A, Kovalszky I, García MG, Alaniz L. The Role of the Tumor Microenvironment in the Development and Progression of Hepatocellular Carcinoma. In: Tirnitz-Parker JEE (eds). *Hepatocellular Carcinoma.* Brisbane (AU), Codon Publications. 2019:29-45.
111. Polidoro MA, Mikulak J, Cazzetta V, Lleo A, Mavilio D, Torzilli G, Donadon M. Tumor microenvironment in primary liver tumors: A challenging role of natural killer cells. *World J Gastroenterol.* 2020, 26:4900-18.
112. Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology.* 2015, 480:672-86.
113. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000, 64:51-68.

114. Guidotti LG, Chisari FV. To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Curr Opin Immunol*. 1996, 8:478-83
115. Terradillos O, Pollicino T, Lecoeur H, Tripodi M, Gougeon ML, Tiollais P, Buendia MA. p53-independent apoptotic effects of the hepatitis B virus HBx protein in vivo and in vitro. *Oncogene*. 1998, 17:2115-23.
116. Schuster R, Gerlich WH, Schaefer S. Induction of apoptosis by the transactivating domains of the hepatitis B virus X gene leads to suppression of oncogenic transformation of primary rat embryo fibroblasts. *Oncogene*. 2000, 19:1173-80.
117. Giannini EG, Marabotto E, Savarino V, Trevisani F, di Nolfo MA, Del Poggio P, Benvegnù L, Farinati F, Zoli M, Borzio F, Caturelli E, Chiamonte M. Hepatocellular carcinoma in patients with cryptogenic cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7:580-5
118. Caldwell S. Cryptogenic cirrhosis: what are we missing?. *Curr Gastroenterol Rep*. 2010, 12:40-48.
119. Hsu CY, Lee YH, Liu PH, Hsia CY, Huang YH, Lin HC, Chiou YY, Lee FY, Huo TI. Decrypting cryptogenic hepatocellular carcinoma: clinical manifestations, prognostic factors and long-term survival by propensity score model. *PLoS One*. 2014, 9:e89373.
120. Dunn J, Grider MH. Physiology, Adenosine Triphosphate. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; February 17, 2022.
121. de Cárcer G, Pérez de Castro I, Malumbres M. Targeting cell cycle kinases for cancer therapy. *Curr Med Chem*. 2007, 14:969-85.
122. Sridhar R, Hanson-Painton O, Cooper DR. Protein kinases as therapeutic targets. *Pharm Res*. 2000, 17:1345-53..
123. Marumoto T, Hirota T, Morisaki T, Kunitoku N, Zhang D, Ichikawa Y, Sasayama T, Kuninaka S, Mimori T, Tamaki N, Kimura M, Okano Y, Saya H. Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. *Genes Cells*. 2002, 7:1173-82.
124. Katayama H, Brinkley WR, Sen S. The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev*. 2003, 22:451-64.

125. National Library of Medicine. AURKA aurora kinase A [Homo sapiens (human)]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6790>. Son Erişim Tarihi 01 08 2022.
126. Magnaghi-Jaulin L, Eot-Houllier G, Gallaud E, Giet R. Aurora A Protein Kinase: To the Centrosome and Beyond. *Biomolecules*. 2019, 9:28.
127. Willems E, Dedobbeleer M, Digregorio M, Lombard A, Lumapat PN, Rogister B. The functional diversity of Aurora kinases: a comprehensive review. *Cell Div*. 2018, 13:7-19.
128. Wikipedi. https://tr.wikipedia.org/wiki/Protein_fosforilasyonu. Son Erişim Tarihi 05 Ağustos 2022.
129. Cheetham GM, Knegt RM, Coll JT, Renwick SB, Swenson L, Weber P, Lippke JA. Crystal structure of aurora-2, an oncogenic serine/threonine kinase. *J Biol Chem*. 2002, 277:42419-22.
130. Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2017, 17:93-115.
131. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES National Institutes of Health National Institute of General Medical Science. Inside the Cell. <https://www.nigms.nih.gov/education/Booklets/Inside-the-Cell/Documents/Booklet-Inside-the-Cell.pdf>. Son Erişim Tarihi 01 Ağustos 2022.
132. National Library of Medicine. RAD50 double strand break repair protein. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10111>. Son Erişim Tarihi 01 Ağustos 2022.
133. MRE11 homolog, double strand break repair nuclease. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4361> Son Erişim Tarihi 01 Ağustos 2022.
134. Rotman G, Shiloh Y. ATM: from gene to function. *Hum Mol Genet*. 1998, 7:1555-63.
135. The GeneCards human gene database. ATR Serin/Treonin Kinaz. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ATR>. Son Erişim Tarihi 01 Ağustos 2022
136. National Library of Medicine. GADD45A growth arrest and DNA damage inducible alpha. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1647>. Son Erişim Tarihi 01 Ağustos 2022.
137. The GeneCards human gene database. CDC25C. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CDC25C> . Son Erişim Tarihi 01 Ağustos 2022.

138. Çakır FB, Kebudi R. Çocukluk çağında karşılaşılan santral sinir sistemi yüksek dereceli glial tümörlerinde tedavi. *Turkish Journal of Oncology/Türk Onkoloji Dergisi*. 2013, 28:1.
139. Katsha A, Soutto M, Sehdev V, Peng D, Washington MK, Piazzuelo MB, Tantawy MN, Manning HC, Lu P, Shyr Y, Ecsedy J, Belkhiri A, El-Rifai W. Aurora kinase A promotes inflammation and tumorigenesis in mice and human gastric neoplasia. *Gastroenterology*. 2013, 145:1312-22.
140. Mehra R, Serebriiskii IG, Burtneß B, Astsaturov I, Golemis EA. Aurora kinases in head and neck cancer. *Lancet Oncol*. 2013, 14:e425-35.
141. 141 National Center for Biotechnology Information. Genes and Disease. The p53 tumor suppressor protein. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22268/> Son Erişim Tarihi 25 Temmuz 2022
142. National Library of Medicine. TP53 tumor protein p53. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157/>. Son Erişim Tarihi 01 Ağustos 2022.
143. Guha T, Malkin D. Inherited TP53 Mutations and the Li-Fraumeni Syndrome. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017, 7:a026187.
144. He G, Siddik ZH, Huang Z, Wang R, Koomen J, Kobayashi R, Khokhar AR, Kuang J. Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene*. 2005, 24:2929-43.
145. Basu A, Haldar S. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod*. 1998, 4:1099-109.
146. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*. 1994, 9:1799-805.
147. The GeneCards human gene database. TP53 Gene - Tumor Protein P53. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TP53>. Son Erişim Tarihi 01 Ağustos 2022.
148. Liebl MC, Hofmann TG. The Role of p53 Signaling in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021, 13:2125.

149. Sasai K, Treekitkarnmongkol W, Kai K, Katayama H, Sen S. Functional Significance of Aurora Kinases-p53 Protein Family Interactions in Cancer. *Front Oncol.* 2016, 6:247.
150. Cheng KY, Lowe ED, Sinclair J, Nigg EA, Johnson LN. The crystal structure of the human polo-like kinase-1 polo box domain and its phospho-peptide complex. *EMBO J.* 2003, 21:5757-68.
151. Park JE, Soung NK, Johmura Y, Kang YH, Liao C, Lee KH, Park CH, Nicklaus MC, Lee KS. Polo-box domain: a versatile mediator of polo-like kinase function. *Cell Mol Life Sci.* 2010, 67:1957-70.
152. Kumar S, Sharma AR, Sharma G, Chakraborty C, Kim J. PLK-1: Angel or devil for cell cycle progression. *Biochim Biophys Acta.* 2016, 1865:190-203.
153. Hutterer A, Berdnik D, Wirtz-Peitz F, Zigman M, Schleiffer A, Knoblich JA. Mitotic activation of the kinase Aurora-A requires its binding partner Bora. *Dev Cell.* 2006, 11:147-57.
154. van Leuken R, Clijsters L, van Zon W, Lim D, Yao X, Wolthuis RM, Yaffe MB, Medema RH, van Vugt MA. Polo-like kinase-1 controls Aurora A destruction by activating APC/C-Cdh1. *PLoS One.* 2009, 4:e5282.
155. Murga-Zamalloa C, Inamdar KV, Wilcox RA. The role of aurora A and polo-like kinases in high-risk lymphomas. *Blood Adv.* 2019, 3:1778-87.
156. Li J, Hong MJ, Chow JP, Man WY, Mak JP, Ma HT, Poon RY. Co-inhibition of polo-like kinase 1 and Aurora kinases promotes mitotic catastrophe. *Oncotarget.* 2015, 6:9327-40.
157. National Library of Medicine. BRCA1 DNA repair associated. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/672#gene-expression>. Son Erişim Tarihi 02 Ağustos 2022.
158. Tiwari S, Pandey VP, Yadav K, Dwivedi UN. Modulation of interaction of BRCA1-RAD51 and BRCA1-AURKA protein complexes by natural metabolites using as possible therapeutic intervention toward cardiotoxic effects of cancer drugs: an in-silico approach. *J Biomol Struct Dyn.* 2021, 1-17.
159. Ouchi M, Fujiuchi N, Sasai K, Katayama H, Minamishima YA, Ongusaha PP, Deng C, Sen S, Lee SW, Ouchi T. BRCA1 phosphorylation by Aurora-A in the regulation of G2 to M transition. *J Biol Chem.* 2015, 279:19643-48.

160. Couch FJ, Sinilnikova O, Vierkant RA, Pankratz VS, Fredericksen ZS, Stoppa-Lyonnet D, Coupier I, Hughes D, Hardouin A, Berthet P, Peock S, Cook M, Baynes C, Hodgson S, Morrison PJ, Porteous ME, Jakubowska A, Lubinski J, Gronwald J, Spurdle AB; kConFab, Schmutzler R, Versmold B, Engel C, Meindl A, Sutter C, Horst J, Schaefer D, Offit K, Kirchhoff T, Andrulis IL, Ilyushik E, Glendon G, Devilee P, Vreeswijk MP, Vasen HF, Borg A, Backenhorn K, Struewing JP, Greene MH, Neuhausen SL, Rebbeck TR, Nathanson K, Domchek S, Wagner T, Garber JE, Szabo C, Zikan M, Foretova L, Olson JE, Sellers TA, Lindor N, Nevanlinna H, Tommiska J, Aittomaki K, Hamann U, Rashid MU, Torres D, Simard J, Durocher F, Guenard F, Lynch HT, Isaacs C, Weitzel J, Olopade OI, Narod S, Daly MB, Godwin AK, Tomlinson G, Easton DF, Chenevix-Trench G, Antoniou AC. AURKA F31I polymorphism and breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a consortium of investigators of modifiers of BRCA1/2 study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007, 16:1416-21.
161. Zhang D, Hirota T, Marumoto T, Shimizu M, Kunitoku N, Sasayama T, Arima Y, Feng L, Suzuki M, Takeya M, Saya H. Cre-loxP-controlled periodic Aurora-A overexpression induces mitotic abnormalities and hyperplasia in mammary glands of mouse models. *Oncogene.* 2004, 23:8720-30.
162. Buchner A, Erdfelder E, Faul F, Lang A. *G* Power 3.1 manual*. Düsseldorf, Germany: Heinrich-Heine-Universität Dusseldorf. 2017.
163. KS Suvarna, C Layton, JD Bancroft. *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. E-Book : Elsevier, 2018. 0-7020-6864-0.
164. Voduc D, Kenney C, Nielsen TO. Tissue microarrays in clinical oncology. *Semin Radiat Oncol.* 2008, 18:89-97.
165. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet.* 2001, 10:657-62.
166. Huang CI, Wang CC, Tai TS, Hwang TZ, Yang CC, Hsu CM, Su YC. eIF4E and 4EBP1 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma recurrence after definitive surgery and adjuvant radiotherapy. *PLoS One.* 2019, 11:e0225537.
167. Faivre S, Djelloul S, Raymond E. New paradigms in anticancer therapy: targeting multiple signaling pathways with kinase inhibitors. *Semin Oncol.* 2006, 33:407-20.

168. Cohen P, Cross D, Jänne PA. Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress and future directions. *Nat Rev Drug Discov*. 2021, 20:551-69.
169. Katsha A, Belkhiri A, Goff L, El-Rifai W. Aurora kinase A in gastrointestinal cancers: time to target. *Mol Cancer*. 2015, 14:106.
170. Gonçalves E, Fragoulis A, Garcia-Alonso L, Cramer T, Saez-Rodriguez J, Beltrao P. Widespread Post-transcriptional Attenuation of Genomic Copy-Number Variation in Cancer. *Cell Syst*. 2017, 5:386-98.
171. Koh HM, Jang BG, Hyun CL, Kim YS, Hyun JW, Chang WY, Maeng YH. Aurora Kinase A Is a Prognostic Marker in Colorectal Adenocarcinoma. *J Pathol Transl Med*. 2017, 51:32-39.
172. Shlien A, Malkin D. Copy number variations and cancer. *Genome Med*. 2009, 1:62.
173. Graf RP, Eskander R, Brueggeman L, Stupack DG. Association of Copy Number Variation Signature and Survival in Patients With Serous Ovarian Cancer. *JAMA Netw Open*. 2021, 4:e2114162.
174. Liang L, Fang JY, Xu J. Gastric cancer and gene copy number variation: emerging cancer drivers for targeted therapy. *Oncogene*. 2016, 35:1475-82.
175. Zhou C, Zhang W, Chen W, Yin Y, Atyah M, Liu S, Guo L, Shi Y, Ye Q, Dong Q, Ren N. Integrated Analysis of Copy Number Variations and Gene Expression Profiling in Hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*. 2017, 7:10570.
176. Lee JY, Hong M, Lee J, Lee S, Kim KM, Park C, Lim HY. An investigation of the role of gene copy number variations in sorafenib sensitivity in metastatic hepatocellular carcinoma patients. *J Cancer*. 2017, 8:730-6
177. Nishida N, Fukuda Y, Komeda T, Kita R, Sando T, Furukawa M, Amenomori M, Shibagaki I, Nakao K, Ikenaga M, Ishizaki K. Amplification and overexpression of the cyclin D1 gene in aggressive human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 1994, 54:3107-10.
178. Staff S, Isola J, Jumppanen M, Tanner M. Aurora-A gene is frequently amplified in basal-like breast cancer. *Oncol Rep*. 2010, 23:307-12.
179. Jeng YM, Peng SY, Lin CY, Hsu HC. Overexpression and amplification of Aurora-A in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004, 10:2065-71.

180. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013, 3:71-85.
181. Pérez-Fidalgo JA, Gambardella V, Pineda B, Burgues O, Piñero O, Cervantes A. Aurora kinases in ovarian cancer. *ESMO Open*. 2020, 5:e000718.
182. Goos JA, Coupe VM, Diosdado B, Delis-Van Diemen PM, Karga C, Beliën JA, Carvalho B, van den Tol MP, Verheul HM, Geldof AA, Meijer GA, Hoekstra OS, Fijneman RJ ve group., DeCoDe PET. Aurora kinase A (AURKA) expression in colorectal cancer liver metastasis is associated with poor prognosis. *Br J Cancer*. 2013, 109:2445-52.
183. Miralaei N, Majd A, Ghaedi K, Peymani M, Safaei M. Integrated pan-cancer of AURKA expression and drug sensitivity analysis reveals increased expression of AURKA is responsible for drug resistance. *Cancer Med*. 2021, 10:6428-41.
184. Al-Khafaji ASK, Marcus MW, Davies MPA, Risk JM, Shaw RJ, Field JK, Liloglou T. AURKA mRNA expression is an independent predictor of poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2017, 13:4463-8
185. Jing XL, Chen SW. Aurora kinase inhibitors: a patent review (2014-2020). *Expert Opin Ther Pat*. 2021, 31:625-44.
186. National Library of Medicine A Study of MLN8237, A Novel Aurora A Kinase Inhibitor, in Participants With Advanced Solid Tumors. ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00500903>. Son Erişim Tarihi: 11 Ağustos 2022.
187. Zhang K, Wang T, Zhou H, Feng B, Chen Y, Zhi Y, Wang R. A Novel Aurora-A Inhibitor (MLN8237) Synergistically Enhances the Antitumor Activity of Sorafenib in Hepatocellular Carcinoma. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018, 13:176-88.
188. Yao LJ, Zhong ZS, Zhang LS, Chen DY, Schatten H, Sun QY. Aurora-A is a critical regulator of microtubule assembly and nuclear activity in mouse oocytes, fertilized eggs, and early embryos. *Biol Reprod*. 2004, 70:1392-9.
189. Tsai MY, Zheng Y. Aurora A kinase-coated beads function as microtubule-organizing centers and enhance RanGTP-induced spindle assembly. *Curr Biol*. 2005, 15:2156-63.

190. Jun, Meek DW. Post-translational modification of p53. *Semin Cancer Biol.* 1994, 5:203-10.
191. Cai Q, Xiao B, Si H, Cervini A, Gao J, Lu J, Upadhyay SK, Verma SC, Robertson ES. Kaposi's sarcoma herpesvirus upregulates Aurora A expression to promote p53 phosphorylation and ubiquitylation. *PLoS Pathog.* 2012, 8:e1002566.
192. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 1997, 91:325-34.
193. Blaydes JP, Luciani MG, Pospisilova S, Ball HM, Wojtesek B, Hupp TR. Stoichiometric phosphorylation of human p53 at Ser315 stimulates p53-dependent transcription. *J Biol Chem.* 2001, 276:4699-708.
194. García-Alvarez B, de Cárcer G, Ibañez S, Bragado-Nilsson E, Montoya G. Molecular and structural basis of polo-like kinase 1 substrate recognition: Implications in centrosomal localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007, 104:3107-12.
195. Liu Z, Sun Q, Wang X. PLK1, A Potential Target for Cancer Therapy. *Transl Oncol.* 2017, 10:22-32.
196. Crawford J, Burt A. Anatomy, pathophysiology and basic mechanisms of disease. In: Portmann B, Ferrel L, Burt A. *MacSween's Pathology of the Liver.* 6thed. Edinburgh, Churchill Livingstone, Elsevier 2012: 1-73.
197. Mok WC, Wasser S, Tan T, Lim SG. Polo-like kinase 1, a new therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2012, 18:3527-36.
198. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science.* 1994, 266:66-71.
199. National Library of Medicine. BRCA1 DNA repair associated. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/672/ortholog/?scope=7742>. Son Erişim Tarihi 06 Ekim 2022.
200. Petrucelli N, Daly MB, Pal T. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews* Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1998.

201. Deng CX, Brodie SG. Roles of BRCA1 and its interacting proteins. *Bioessays*. 2000, 22:728-37
202. Takaoka M, Miki Y. BRCA1 gene: function and deficiency. *Int J Clin Oncol*. 2018, 23:36-44.
203. Austria T, Marion C, Yu V, Widschwendter M, Hinton DR, Dubeau L. Mechanism of cytokinesis failure in ovarian cystadenomas with defective BRCA1 and P53 pathways. *Int J Cancer*. 2018, 143:2932-42.
204. Elabscience. BRCA1 Polyclonal Antibody. https://www.elabscience.com/p-brca1_polyclonal_antibody-30243.html. Son Erişim Tarihi 06 10 2022.
205. Mei J, Wang R, Xia D, Yang X, Zhou W, Wang H, Liu C. BRCA1 Is a Novel Prognostic Indicator and Associates with Immune Cell Infiltration in Hepatocellular Carcinoma. *DNA Cell Biol*. 2020, 39:1838-49.
206. Kang HC, Lee YI, Shin JH, Andrabi SA, Chi Z, Gagné JP, Lee Y, Ko HS, Lee BD, Poirier GG, Dawson VL, Dawson TM. Iduna is a poly(ADP-ribose) (PAR)-dependent E3 ubiquitin ligase that regulates DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011, 108:14103-8
207. Ardley HC, Robinson PA. E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem*. 2005, 41:15-30.
208. von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlumpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS One*. 2007, 2:e1261
209. Choi Y, Kim A, Kim J, Lee J, Lee SY, Kim C. Optimization of RNA Extraction from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Blocks for Targeted Next-Generation Sequencing. *J Breast Cancer*. 2017, 20:393-9
210. Bass BP, Engel KB, Greytak SR, Moore HM. A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue: how well do you know your FFPE specimen? *Arch Pathol Lab Med*. 2014, 138:1520-30.
211. Barcelos D, Franco MF, Leão SC. Effects of tissue handling and processing steps on PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008, 50:321-6.

212. Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, Guenther SM, O'Leary JJ, Sheils O. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnol.* 2007, 7:36.
213. McKinney MD, Moon SJ, Kulesh DA, Larsen T, Schoepp RJ. Detection of viral RNA from paraffin-embedded tissues after prolonged formalin fixation. *J Clin Virol.* 2009, 44:39-42.
214. Wei L, Ploss A. Hepatitis B virus cccDNA is formed through distinct repair processes of each strand. *Nat Commun.* 2021, 12:1591.



EKLER

EK-1. Özgeçmiş



EK-2. Etik Kurul Onayı





