

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ ORTAK PROGRAMI

**HEPG2 HÜCRE HATTINDA PİROLOKİNOLİN KİNON (PQQ) VE
KOENZİM Q10'İN MİTOKONDRIYAL GENLER, MİTOMİR'LER VE HÜCRESEL
ÖZELLİKLER ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

MUHAMMED ALİ NALBANT

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ONUR EROĞLU

BİLECİK, 2023

10551037

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ ORTAK PROGRAMI

**HEPG2 HÜCRE HATTINDA PİROLOKİNOLİN KİNON (PQQ) VE
KOENZİM Q10'İN MİTOKONDRIYAL GENLER, MİTOMİR'LER VE HÜCRESEL
ÖZELLİKLER ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

MUHAMMED ALİ NALBANT

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ONUR EROĞLU

BİLECİK, 2023

10551037

BEYAN

“HepG2 Hücre Hattında Pirolokinolin Kinon ve Koenzim Q10’in Gen Ekspresyonlarına, Bazı miRNA Düzeylerine ve Hücresel Özellikler Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” adlı doktora tezinin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bu çalışmanın, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.			
DESTEK ALINMIŞTIR		DESTEK ALINMAMIŞTIR	X
Destek alındı ise;			
Destekleyen kurum;			
Desteğin Türü		Proje Numarası	
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)			
2- TÜBİTAK			
Diğer;.....			
ETİK KURUL onayı var ise;			
ETİK KURUL karar tarih/sayı:		/.....	

Öğrenci Adı ve Soyadı

Muhammed Ali NALBANT

Tarih

İmza

ÖN SÖZ

“HepG2 hücre hattında Pirolokinolin Kinon (PQQ) ve Koenzim Q10’in mitokondriyal genler, MitomiR’ler ve hücresel özellikler üzerine etkilerinin incelenmesi” adlı tez çalışması hepatoselüler karsinom hücre hattı HepG2’de antioksidan metabolizma (Oksidatif Stres), inflamatuvar yanıt, mitokondriyal biyogenez ve mitokondriyal disfonksiyon özelliklerinin araştırmayı hedeflemiş olup elde edilen tüm nicel ve nitel veriler şeffaf bir şekilde paylaşılmıştır.

Öncelikle lisans, ardından yüksek lisans ve nihai olarak doktora eğitimimde üzerimde büyük emeği olan ayrıca tez çalışmalarım süresince yardımını ve desteğini asla esirgemeyen, hoşgörüsü, yardım ve katkıları ile beni cesaretlendirip, bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan değerli tez danışmanım Sayın. Doç. Dr. Onur EROĞLU’na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmaları ve tez izleme komiteleri süresince değerli bilgi ve tecrübelerini aktaran Sayın. Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU ve Prof. Dr. Beyhan DURAK ARAS’a teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamım ve eğitim hayatım boyunca desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen, varlıklarını her zaman yanımda hissettiren annem, babam ve ablalarımın teşekkürü bir borç bilirim.

Lisansüstü eğitimim boyunca, varlığıyla moral bulduğum ve her konuda desteklerini benden esirgemeyen hayat arkadaşım Emel NALBANT’a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmalarımın son aşamalarında kavuştuğum varlığıyla anlam bulduğum sevgili kızım Alya Duru NALBANT’a bana vermiş olduğu moral ve güç için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Muhammed Ali NALBANT

2023

ÖZET

HEPG2 HÜCRE HATTINDA PİROLOKİNOLİN KİNON (PQQ) VE KOENZİM Q10'İN MITOKONDRIYAL GENLER, MITOMİR'LER VE HÜCRESEL ÖZELLİKLER ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Çalışmamız, hepatosellüler karsinom hücre hattı HepG2'de Koenzim Q10 (CoQ10) ve Pirolokinolin Kinon (PQQ)'un antioksidan metabolizma (Oksidatif Stres), inflamatuvar yanıt, mitokondriyal biyogenez ve mitokondriyal disfonksiyon gibi özellikler üzerine etkilerini NRF-1, NRF-2, NFκB ve PGC-1α genlerinde ve miR15-a, miR16-1, miR181-c mitokondriyal miRNA'larda meydana gelen değişimler üzerinden ortaya koymayı amaçlamaktadır.

Pirolokinolin Kinon (PQQ) ve Koenzim Q10 (CoQ10)'in HepG2 hücre hattında göstermiş olduğu etkileri görebilmek amacıyla, ilaçların hücre canlılığı, lateral hücre göçü, gen ekspresyon ve miRNA ekspresyon seviyelerine olan etkileri araştırılmıştır. Elde ettiğimiz verilere göre CoQ10'in anti kanser etkinliği anlamında en etkili kullanımı kombine kullanım yerine yalnız başına kullanımıdır. Lateral hücre göçünü tayin edebilmek amacıyla yapılan yara iyileşmesi deneyinde, Pirolokinolin Kinon (PQQ)'un yalnız başına ve kombine kullanımı kontrol grubuna göre yara kapanma alanını ve hücre proliferasyonunu arttırdığını, yalnızca CoQ10 uygulamasının ise azalttığını belirledik.

HepG2 hücre hattında Pirolokinolin kinon ve Koenzim Q10 maruziyetinin Peroksizom proliferatörü ile aktive edilen reseptör gama koaktivatörü 1-alfa (PGC-1α) ekspresyonunu arttırdığını ancak NRF-1 gen ekspresyonunu artırmadığını bulduk. Pirolokinolin kinon uygulamasında, NRF-2 geninin ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla sadece küçük bir artış bildirdik. Pirolokinolin kinon ve CoQ10 yalnız başına uygulamasının Nükleer Faktör kappa B (NFκB) geninde kombine uygulamaya göre daha fazla ekspresyon artışına neden olduğunu bulduk. Pirolokinolin kinon ve CoQ10 uygulamasının miR16-1, miR15a ve miR181c'nin ekspresyon seviyelerini aşağı doğru regüle ettiğini rapor ettik. Pirolokinolin kinon ve CoQ10 kullanımı genetik epigenetik faktörler üzerinde etkilidir, ayrıca miR-15a, miR-16-1 ve miR181c hepatoselüler karsinom ve mitokondriyal disfonksiyonun eşlik ettiği hastalıklarda önemli aday biyobelirteçlerdir.

Anahtar Kelimeler: Hepatoselüler karsinom, MitomiR, mitokondriyal biyogenez, mitokondriyal disfonksiyon, antioksidan metabolizma

ABSTRACT

EFFECTS OF PYRROLOQUINOLINE QUINONE (PQQ) AND COENZYME Q10 ON MITOCHONDRIAL GENES, MITOMIRS AND CELLULAR PROPERTIES IN HEPG2 CELL LINE

Our study aims to reveal the effects of Coenzyme Q10 (CoQ10) and Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) on features such as antioxidant metabolism (Oxidative Stress), inflammatory response, mitochondrial biogenesis and mitochondrial dysfunction in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. We aim to reveal these features through changes in NRF-1, NRF-2, NF κ B and PGC-1 α genes as well as miR15-a miR16-1 miR181-c mitochondrial miRNAs. To investigate the effects of Pyrroloquinoline quinone (PQQ) and Coenzyme Q10 (CoQ10) in HepG2, and their effects on cell viability, lateral cell migration, gene expression and miRNA expression levels were investigated. If the data we have obtained are evaluated in terms of anti-cancer effectiveness, the most effective use of CoQ10 can be defined as the use alone rather than the combined use. According to the results of the wound healing experiment, we determined that Pyrroloquinoline quinone and combined drug application increased the wound closure area and cell proliferation compared to the control group, while CoQ10 application decreased it. We found that Pyrroloquinoline quinone and Coenzyme Q10 exposure in the HepG2 cell line increased Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) expression but not NRF-1 gene expression. We reported only a small increase in expression of the NRF-2 gene in the Pyrroloquinoline quinone application compared to the control group. We found that only Pyrroloquinoline quinone and CoQ10 application caused more expression increase in the Nuclear Factor kappa B (NF κ B) gene compared to combined application. Pyrroloquinoline quinone and CoQ10 administration down-regulated the expression levels of miR16-1, miR15a and miR181c. The use of Pyrroloquinoline quinone and CoQ10 is effective on epigenetic factors, miR-15a, miR-16-1 and miR181c are important candidate biomarkers in hepatocellular carcinoma and diseases accompanied by mitochondrial dysfunction.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, mitomiR, mitochondrial biogenesis, mitochondrial dysfunction, antioxidant metabolism

İÇİNDEKİLER

ÖN SÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
GRAFİKLER LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	x
GİRİŞ.....	1

BİRİNCİ BÖLÜM

1. KANSER.....	2
----------------	---

İKİNCİ BÖLÜM

1. KARACİĞER KANSERİ	12
1. Hepatoselüler karsinom (HCC).....	12
1.1. HCC Etiyolojisi	13
1.2. Viral Enfeksiyonlar.....	14
1.3. miRNA'lar ve HBV-HCCmikroRNA'lar (miR)	15
1.4. Alkol Tüketimi	15
1.5. Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD)	17
1.6. Aflatoksinler	18
1.7. Predispozan genetik faktörler	19
1.8. HCC ile İlişkili Genetik Risk Faktörleri.....	19
1.8.1. Kromozom Anomalileri.....	19
1.8.2. p53 Gen Mutasyonları.....	19
1.8.3. Wnt Sinyal Yolağı.....	21
1.8.4. TGFβ Sinyal Yolağı.....	22
1.8.5. Ras Sinyal Yolağı	23
1.8.6. Retinoblastoma (Rb) Proteini	24
1.8.7. HCC'de Gen Ekspresyonunun Genom-Ölçekli Analizi.....	25
1.8.8. HCC'de DNA Metilasyonu.....	25
2. Çalışma Kapsamında Araştırılan Genler.....	26
2.1. Nükleer Solunum Faktörleri 1-2 (NRF-1 ve NRF-2)	26

2.2. Peroksizom proliferatörü ile aktive edilen reseptör gama koaktivatörü 1 alfa (PGC-1 α)	27
2.3. Nükleer faktör kappa B (NF κ B)	30
3. Çalışma Kapsamında Araştırılan MitomiR'ler	32
3.2. miR15-a/miR16-1	33
3.3. miR181-c	34
4. Çalışma Kapsamında Araştırılan İlaçlar	35
4.1. Koenzim Q10 (CoQ10)	35
4.2. Pirolokinolin kinon (PQQ)	36
5. HepG2 Hücre Hattı.....	37
6. Çalışmanın Amacı	38

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

1. Gereçler ve Reaksiyon Koşulları.....	40
1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	40
1.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler	42
1.3. Çalışmada Kullanılan MasterMix İçerikleri ve Real-Time qPCR Reaksiyon Koşulları.....	42
2. Yöntemler.....	45
2.2 Pirolokinolin kinon (PQQ) ve Koenzim Q10 (CoQ10)'in Hazırlanması	45
2.3. Hücre Kültürü	46
2.4. Hücre Canlılığının Belirlenmesi	46
2.5. Hücre Sayımı (Cell Count)	47
2.6. Hücre Yara İyileşmesi Deneyi (Cell Wound Healing Assay)	47
2.7. mRNA Ürünleri Gerçek Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (mRNA Real Time PCR)	47
2.7.1. RNA İzolasyonu.....	47
2.7.2. mRNA ürünleri cDNA Sentezi	48
2.7.3. mRNA-cDNA Ürünleri Real-Time qPCR Aşaması	48
2.8. miRNA Ürünleri Gerçek Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (miRNA Real Time PCR).....	49
2.8.1. RNA İzolasyonu.....	49
2.8.2. miRNA-cDNA Sentezi	50
2.8.3. miRNA-cDNA Ürünleri Real-Time qPCR Aşaması	50
3. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz	50

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR

1. Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	52
2. Hücre Yara İyileşmesi Deneyi	53
3. mRNA Ürünleri Gerçek Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (mRNA Real Time PCR).....	57
4. miRNA Ürünleri Gerçek Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (miRNA Real Time PCR).....	59

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE TARTIŞMA

1. Sonuç.....	62
2. Tartışma.....	64
KAYNAKÇA	73

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 3.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	40
Tablo 3.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	41
Tablo 3.3. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler	42
Tablo 3.4. mRNA Ürünlerinden cDNA Sentezi İçin Kullanılan Mastermix İçeriği.....	42
Tablo 3.5. mRNA Ürünlerinden cDNA Sentez Reaksiyonu Koşulları	43
Tablo 3.6. mRNA Ürünleri Real-Time qPCR İçin Kullanılan MasterMix İçeriği.....	43
Tablo 3.7. mRNA Ürünleri Real-Time qPCR Reaksiyonu Koşulları	43
Tablo 3.8. miRNA-cDNA Sentezi İçin Kullanılan MasterMix Bilgileri	44
Tablo 3.9. mRNA Ürünlerinden cDNA Sentez Reaksiyonu Koşulları	44
Tablo 3.10. miRNA Ürünleri Real-Time qPCR İçin Kullanılan MasterMix İçeriği.....	45
Tablo 3.11. miRNA Ürünleri Real-Time qPCR Reaksiyonu Koşulları	45
Tablo 3.12 Gen Ekspresyon Analizi İçin Kullanılan Primer Bilgileri	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Hepatoselüler Karsinom (HCC) Etiyolojisi ve Potansiyel Mekanizmaları	13
Şekil 2.2. PGC-1 α 'nın Ko-Aktivatör Olarak Görev Aldığı Biyolojik Reaksiyonlar	29
Şekil 2.3. miR-181 Ailesi Üyelerinin Mitokondriyal Homeostazda.....	34
Şekil 2.4. Koenzim Q10 (CoQ10) Kimyasal Yapısı.....	36
Şekil 2.5. Pirolokinolin kinon (PQQ) Kimyasal Yapısı.....	37
Şekil 3.1. HepG2 Hücrelerinin Morfolojik Görüntüsü	46
Şekil 4.1. Pirolokinolin kinon (PQQ) Uygulama Dozları ve Lineer Regresyon Eğrisi	52
Şekil 4.2. Koenzim Q10 (CoQ10) Uygulama Dozları ve Lineer Regresyon Eğrisi	53
Şekil 4.3. PQQ+CoQ10 Kombine İlaç Uygulaması Uygulama Dozları ve Lineer Regresyon Eğrisi	53
Şekil 4.4. Pirolokinolin kinon (PQQ), Koenzim Q10 (CoQ10) Hücre Göçü ve Proliferasyonu Üzerine Etkileri	55
Şekil 4.5. Pirolokinolin kinon (PQQ), Koenzim Q10 (CoQ10) Hücre Göçü ve Proliferasyonu Üzerine Etkileri	56
Şekil 4.6. PGC1 α Geni qRt-PCR Δ Ct ve Fold Change Değerleri, Grafiği ve Ortalamaları....	58
Şekil 4.7. NRF1 Geni qRt-PCR Δ Ct ve Fold Change Değerleri, Grafiği ve Ortalamaları.....	58
Şekil 4.8. NRF2 Geni qRt-PCR Δ Ct ve Fold Change Değerleri, Grafiği ve Ortalamaları.....	59
Şekil 4.9. NF κ B Geni qRt-PCR Δ Ct ve Fold Change Değerleri, Grafiği ve Ortalamaları.....	59
Şekil 4.10. hsa miR 16-1 qRt-PCR Δ Ct ve Fold Change Değerleri, Grafiği ve Ortalamaları .	60
Şekil 4.11. hsa miR 15-a qRt-PCR Δ Ct ve Fold Change Değerleri, Grafiği ve Ortalamaları .	60
Şekil 4.12. hsa miR 181-c qRT-PCR Δ Ct ve Fold Change Değerleri, Grafiği ve Ortalamaları	61

GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 1.1. 2020 Yılı Dünyada ve Türkiye’de Kanser Türlerinin İnsidans ve Mortalite Grafiği (Cinsiyet Bağımsız-Tüm Yaş Grupları)	4
Grafik 1.2. 2020 Yılı Dünyada ve Türkiye’de Erkeklerde Görülen Kanser Türlerinin İnsidans ve Mortalite Grafiği (Tüm Yaş Grupları).....	5
Grafik 1.3. 2020 Yılı Dünyada ve Türkiye’de Kadınlarda Görülen Kanser Türlerinin İnsidans ve Mortalite Grafiği (Tüm Yaş Grupları).....	6
Grafik 1.4. 2020 Yılından 2040 Yılına Kadar Dünyada ve Türkiye’de Meydana Gelmesi Tahmin Edilen Kanser Olgularının İnsidans ve Mortalite Grafiği.....	7
Grafik 1.5. 2020 Yılından 2040 Yılına Kadar Dünyada ve Türkiye’de Meydana Gelmesi Tahmin Edilen Karaciğer ve İntrahepatik Safra Kanalı Kanser Olgularının İnsidans ve Mortalite Grafiği (Cinsiyet Bağımsız-Tüm Yaş Grupları).....	8
Grafik 1.6. 2020 Yılında Batı Asya Ülkeleri’nde Meydana Gelen Tüm Kanser Olgularının İnsidans Grafiği (Cinsiyet Bağımsız-Tüm Yaş Grupları)	9
Grafik 1.7. 2020 Yılında Batı Asya Ülkeleri’nde Meydana Gelen Tüm Kanser Olgularının Mortalite Grafiği (Cinsiyet Bağımsız-Tüm Yaş Grupları).....	10
Grafik 1.8. 2020 Yılında Batı Asya Ülkeleri’nde Meydana Gelen Karaciğer Kanser Olgularının İnsidans Grafiği (Cinsiyet Bağımsız-Tüm Yaş Grupları)	10
Grafik 1.9. 2020 Yılında Batı Asya Ülkeleri’nde Meydana Gelen Karaciğer Kanser Olgularının Mortalite Grafiği (Cinsiyet Bağımsız-Tüm Yaş Grupları).....	11

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

% : Yüzde

°C : Santigrat Derece

A : Adenin

ADH : Alkol Dehidrojenaz

AFB1 : Aflatoksin B1

AFBO : Aflatoksin B1–8, 9-Oksit

AFL : Alkolik Karaciğer Yağlanması

AFP : Alfa-Feta Protein

AH : Alkolik Hepatite

AIH : Otoimmün Hepatit

ALD : Alkolik Karaciğer Hastalığı

ALDH : Aldehit Dehidrojenaz

AMPK : Aktive Olan Protein Kinaz

ARE : Antioksidan Yanıt Elemanı

ATCC : Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu

BCL2L10 : BCL2-Like 10

C : Sitozin

cAMP : Siklik Adenozin Monofosfat

CBX7 : Kromobox 7

cHCC-ICC : Kombine HCC İntrahepatik Kolanjiokarsinom

CoQ10 : Koenzim Q10

CREB : cAMP Yanıt Elemanı Bağlayıcı Protein

Ct : Cycle Threshold

dk. : Dakika

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

DNL : De Novo Lipogenez

dNTP : Deoksinükleotid Trifosfat

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

ECM : Ekstraselüler Matriks

ERK : Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinazlar

ERR α : Östrojenle İlişkili Reseptör Alfa

FBS : Fetal Sığır Serum

FFA : Fazla Serbest Yağ Asitleri

G : Guanin

GLUT4 : Glukoz Taşıyıcı 4

GPx : Glutasyon Peroksidaz

GSD : Glikojen Depo Hastalığı

HB : Hepatoblastoma

HBsAg : Hepatit B Yüzey Antijeni

HBV : Hepatit B Virüsü

HCC : Hhepatoselüler Karsinom

HCV : Hepatit C Virüsü

HDAC : Histon Deasetilaz

HH : Herediter Hemokromatosiz

HSC : Hepatik Stellat Hücreler

HT1 : Herediter Tirozinemi Tip-1

IARC : Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı

IC₅₀ : İnhibisyon Konsantrasyonu

ICC : İntrahepatik Kolanjiokarsinom

IFN- γ : İnterferon Gama

IL-6 : İnterlökin 6

IPQ : İmidazol Pirolokinolin

IRF2 : İnterferon Düzenleyici Faktör 2

KEAP1 : Kelch Benzeri ECH İle İlişkili Protein 1

LDH : Laktat Dehidrojenaz

LDL-C : Düşük Yoğunluklu Lipoprotein-Kolesterol

LOH : Heterozigozite Kaybı

LPS : Lipopolisakkarit

MAF : Muskuloaponörotik Fibrosarkoma Onkogen

MAPK : Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz

miRNA : mikroRNA

mtDNA : Mitokondriyal DNA

NAFLD : Alkolsüz Yağlı Karaciğer Hastalığı

NF-κB : Nükleer Faktör Kappa B

NOD : Nükleotit Bağlayıcı Oligomerizasyon Alanı

NRF-1: Nükleer Solunum Faktörü 1

NRF-2 : Nükleer Solunum Faktörü 2

P3H4 : Koenzim Q10/Ubikinon Analogu

PBS : Phosphate Buffered Saline

PGC-1α : Peroksizom Proliferatörü İle Aktive Olan Reseptör 1 Alfa

PKA : Protein Kinaz A

PPARγ : Peroksizom Proliferatörle Aktive Olan Reseptör-Γ

PPAR-α : Peroksizom Proliferatör Aktive Olan Reseptör Alfa

PPP : Pentoz Fosfat Yolu

PQQ : Pirolokinolin Kinon

qRT-PCR : Kantitatif Real-Time PCR

Rb : Retinoblastoma

RIG-I : Retinoik Asitle İndüklenebilir Gen I

ROS : Reaktif Oksijen Türleri

Sn. : Saniye

SOD : Süperoksit Dismutaz

SREBP-1 : Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Protein 1

T : Timin

TFAM : Transkripsiyon Faktörü A Mitokondriyal

TFB1M : Transkripsiyon Faktörü B1 M

TGF : Dönüştürücü Büyüme Faktörü

TGF- β 1 : Dönüştürücü Büyüme Faktörü B1

TLR : Toll Benzeri Reseptör Aktivasyonu

TNF : Tümör Nekroz Faktör

TNF α : Tümör Nekroz Faktör Alfa

TNM : Tümör-Lenf Nodu-Metastaz

XTT : (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)

μ l : Mikrolitre

μ M : Mikromolar

GİRİŞ

Kansere hastalığının oluşumu ve kansere bağlı ölümler, risk faktörlerine maruziyet koşullarındaki değişimlere bağlı olarak meydana gelir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünyada en fazla görülen ölüm nedenidir. Özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde yeni kanser vakalarının sayısının her geçen gün daha fazla artması beklenmektedir.

Karsinogenez, bozulmuş hücre fonksiyonları sonucunda meydana gelir. Bozulmuş hücre fonksiyonlarının sonucu olarak, genetik ve epigenetik kararsızlığa yol açan kromozomal veya moleküler mekanizmalardaki değişimlerin ardından hücre içinde birçok genetik ve epigenetik değişim birikimi karsinogeneze yol açar. Bireyin kendi etiyolojik faktörlerini değerlendirmek zor olsa da, çeşitli risk faktörlerinin bir araya gelmesi kanser gelişimini tetiklediği sonucuna varılabilir.

Hepatoselüler karsinom (HCC) ise, karaciğerde görülen tümörlerin en başında gelmektedir. Karaciğerde görülen tümörlerin %90 gibi çok yüksek bir oranını oluşturmaktadır. HCC dünyada görülen kanser tipleri arasında en sık rastlanan beşinci kanser tipidir.

Yapılan birçok çalışma, NRF1, NRF2, PGC-1 α ve NF κ B gibi çeşitli genlerin ve mikroRNA'ların (özellikler MitomiR'lerin) düzenlenmesi yoluyla karaciğer kanseri hücre büyümesinin desteklenmesinde önemli roller oynadığını göstermektedir.

Çalışmamız, hepatosellüler karsinom hücre hattı HepG2'de antioksidan metabolizma (Oksidatif Stres), inflamatuvar yanıt, mitokondriyal biyogenez ve mitokondriyal disfonksiyon özelliklerinin; ilgili özellikleri kontrol edebilen genlerde (NRF-1, NRF-2, NF κ B ve PGC-1 α) ve miRNA'larda (miR15-a, miR16-1, miR181-c) etkilerini ve meydana gelen değişimleri ortaya koymayı amaçlamaktadır.

BİRİNCİ BÖLÜM

1. KANSER

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı (IARC), 2020 yılında yayınlamış olduğu raporda dünya genelinde yaklaşık olarak 19,29 milyon yeni kanser olgusunun tespit edildiğinin ve 9,96 milyon insanın da kansere bağlı olarak hayatını kaybettiğini raporlamıştır. Kansere bağlı olarak hayatını kaybeden 9,96 milyon kişi dünya genelinde herhangi bir sebeple meydana gelen ölümlerin %51,8'lik bir oranını oluşturmaktadır. Bu istatistiksel oranlar, kanserin dünyada en önemli ölüm nedeni olduğunu açıkça ortaya koymaktadır (Sung vd., 2021: 209).

2000'li yılların başından ortalarına kadar kanser, ilaç araştırmalarındaki eksiklik, maddi yetersizlikler, hasta gruplarındaki çaresizlik algısı dolayısıyla “ölümcül” ve “tedavisi mümkün olmayan hastalık” olarak zihinlerde yer edinmiştir. Bu kabullenmiş düşüncelerin yanında, kanser ve kanser türlerinin epidemiyolojisi, etiyolojisi, yeni ilaçların keşfi, in vitro ve in vivo ilaç uygulamalarının kliniğe uyarlanması gelişmiş ülkelerde kanserle etkin mücadele imkânı sağlamış ve hastalığın insidansında anlamlı düzeyde azaltmış aynı zamanda hastaların tedavi olabileceğine inancı artmış bununla birlikte sağkalımlar ciddi oranda artmıştır. Bu gelişmelerin olmasının altında kanser etiyolojisinin günden güne daha anlamlı olarak anlaşılması ve anti-kanser çalışmalarının artmasıdır. Kansere araştırmalarındaki kırılma noktası, 1971 yılında Amerika Birleşik Devletleri başkanlığı yapan Richard Nixon tarafından imzalanan Ulusal Kansere Yasası'dır. Ulusal Kansere Yasasından sonra kansere araştırmaları farklı bir boyut kazanmış, kansere çalışmaları nükleer enerji ve uzay araştırmaları seviyesine taşınmıştır. İlgili yasanın ardından kanserle mücadele daha verimli hale geldi ve bu yasa bilim insanları birçok keşifle destekledi. Kansere hastalarının sağkalım oranlarını Amerika Birleşik Devletleri örneğinde ele alacak olursak, 5 yıllık sağkalım oranı 50 yıl öncesinde %49 iken günümüzde %70 civarındadır (Schilsky vd., 2020: 897). Karsinogenez ile ilgili elde edilen bilimsel veriler ışığında, temel yaşam değişiklikleri meydana gelmiştir. Bunun en güçlü örneği, sigara kullanımı ve akciğer kanseri arasındaki ilişkinin ortaya konmasının ardından sigara içilebilir alanların yeniden dizaynıdır. Bazı kanser türleri akciğer kanseri ve sigara kullanımı gibi güçlü bir ilişkilendirilebilse de bazı kanser türleri için direk ilişkili bir etiyolojik faktör ortaya konamamaktadır (Liu ve Dong, 2021: 5377).

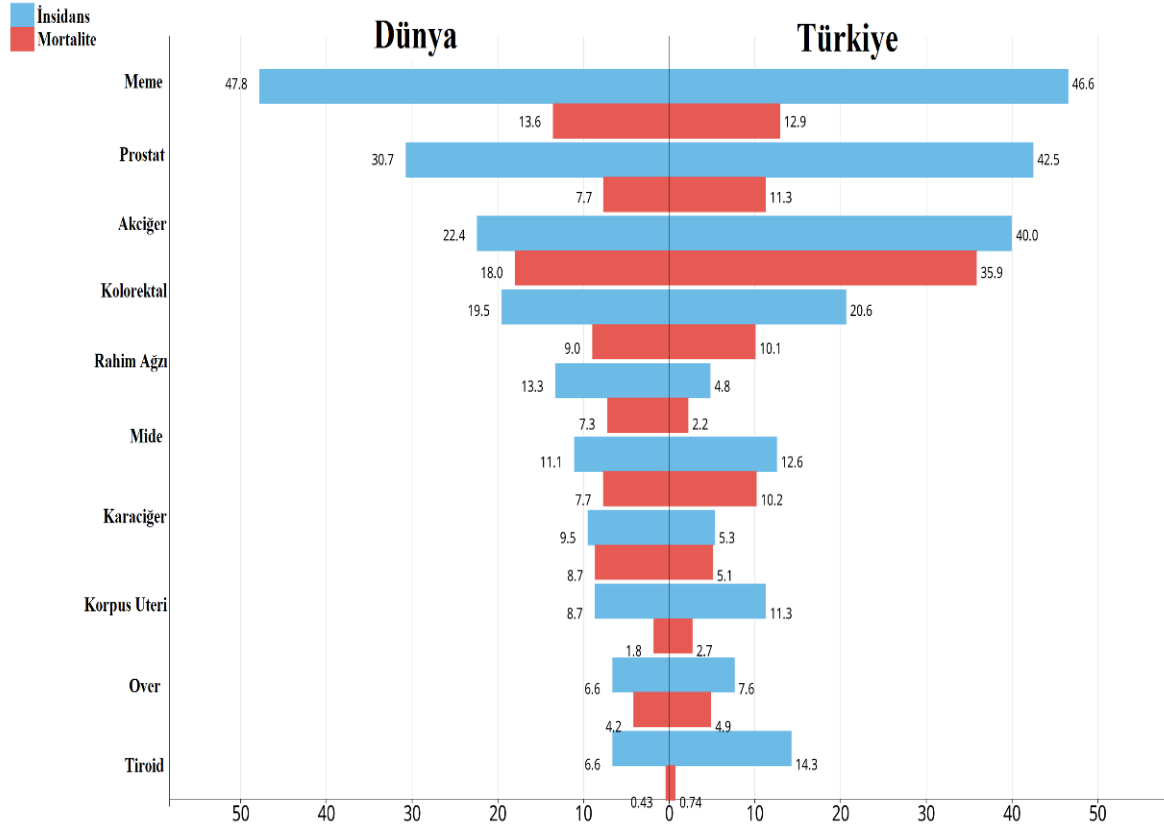
Polonya popülasyonunda yapılmış olan farklı bir kansere epidemiyolojisi araştırmasında, 26-64 yaş arasında ölümlerin ana nedeni olup, bu popülasyon ilgili yaş grubunda kansere bağlı

ölüm nedenleri arasında dünyaya göre en yüksek oranlardan birine sahiptir. Yine 20-64 yaş aralığındaki kadınlarda birincil ölüm nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. 40 yıllık süreçte kansere bağlı olarak ölümler, erkeklerde 3 kat, kadınlarda 2 kat artmıştır.

Kansere bağlı olarak hastalığın oluşumu ve kansere bağlı ölümler, risk faktörlerine maruziyet koşullarındaki değişimlere bağlı olarak meydana gelir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünyada en fazla görülen ölüm nedenidir. Özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde 2025 yılına kadar 20 milyondan fazla yeni kanser vakasının görülmesi beklenmektedir. Kanserin epidemiyolojik olarak iki şekilde kategorize edilebilir; birinci kategori, cinsiyet, yaş, sosyo-ekonomik koşullardaki değişikliklere bağlı olarak, ikinci kategori ise, analitik çalışmalardan elde edilen verilerden ortaya çıkmaktadır.

Karsinogenez, bozulmuş hücre fonksiyonları sonucunda meydana gelir. Bozulmuş hücre fonksiyonlarının sonucu olarak, genetik ve epigenetik kararsızlığa yol açan kromozomal veya moleküler mekanizmalardaki değişimlerin ardından hücre içinde birçok genetik ve epigenetik değişim birikimi karsinogeneze yol açar. Bireyin kendi etiyolojik faktörlerini değerlendirmek zor olsa da, çeşitli risk faktörlerinin bir araya gelmesi kanser gelişimini tetiklediği sonucuna varılabilir. Çevreye bağlı faktörler, endojen ve eksojen faktörlerin yanı sıra genetik yatkınlıkta bireysel risk faktörü olarak kanserin gelişimine önemli derecede katkıda bulunur. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, düşük, orta ve yüksek gelir düzeyine sahip ülkelerde kansere bağlı ölümlerin %35'i, sigara ve alkol tüketimi, enfeksiyonlar, parazitler, ultraviyole ışığa maruz kalma ve ultraviyole radyasyon yayan cihazlar kullanarak bronzlaşma, çevresel tütün kullanıma maruziyet, diyet faktörleri, hormon replasman tedavisi ve ayrıca iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma dolayısıyla meydana gelmektedir (Lewandowska vd., 2018: 1).

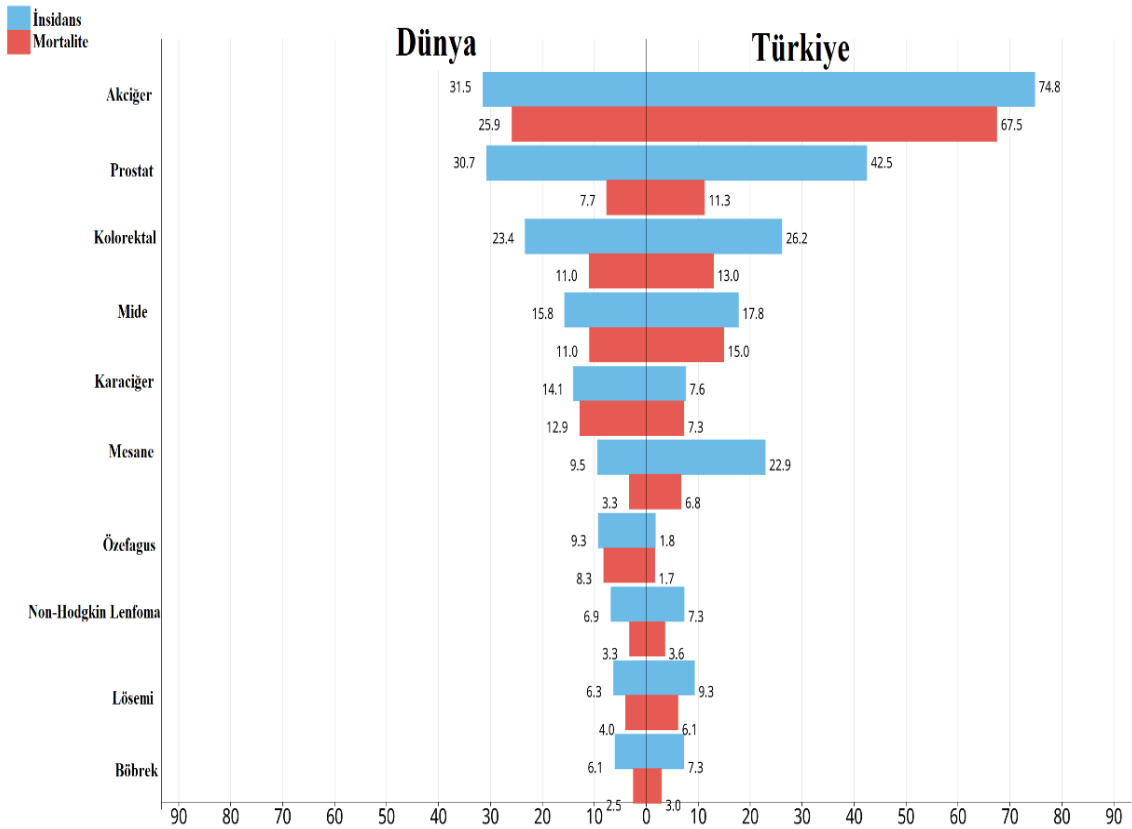
Dünya Sağlık Örgütü'ne bağlı Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (Cancer Today), 2020 yılı için yayınlamış olduğu kanser ve kanser türleri istatistiklerine göre; 2020 yılına dünyada ve ülkemizde en fazla oranda görülen kanser türü meme kanseridir. Kanser türleri cinsiyet bağımsız tüm yaş gruplarında ele alındığında, meme kanserini görülme sıklığı anlamında sırasıyla; prostat, akciğer, kolorektal, serviks, mide ve karaciğer kanseri izlemektedir. Sık görülen kanserler ölüm oranları anlamında incelendiğinde dünyada ve Türkiye'de en fazla ölüm oranı akciğer kanserinde görülmektedir. Ülkemizde kanserlere bağlı mortalite oranları akciğer kanserinden sonra sırasıyla, meme, prostat, mide, kolorektal ve karaciğer kanseri şeklindedir. Dünyadaki sıralamada ise karaciğer kanseri mortalite oranları anlamında daha üst sıralarda bulunmaktadır. (Grafik 1.1)



Grafik 1.1. 2020 Yılı Dünyada ve Türkiye'de Kanser Türlerinin İnsidans ve Mortalite Grafiği (Cinsiyet Bağımsız-Tüm Yaş Grupları)

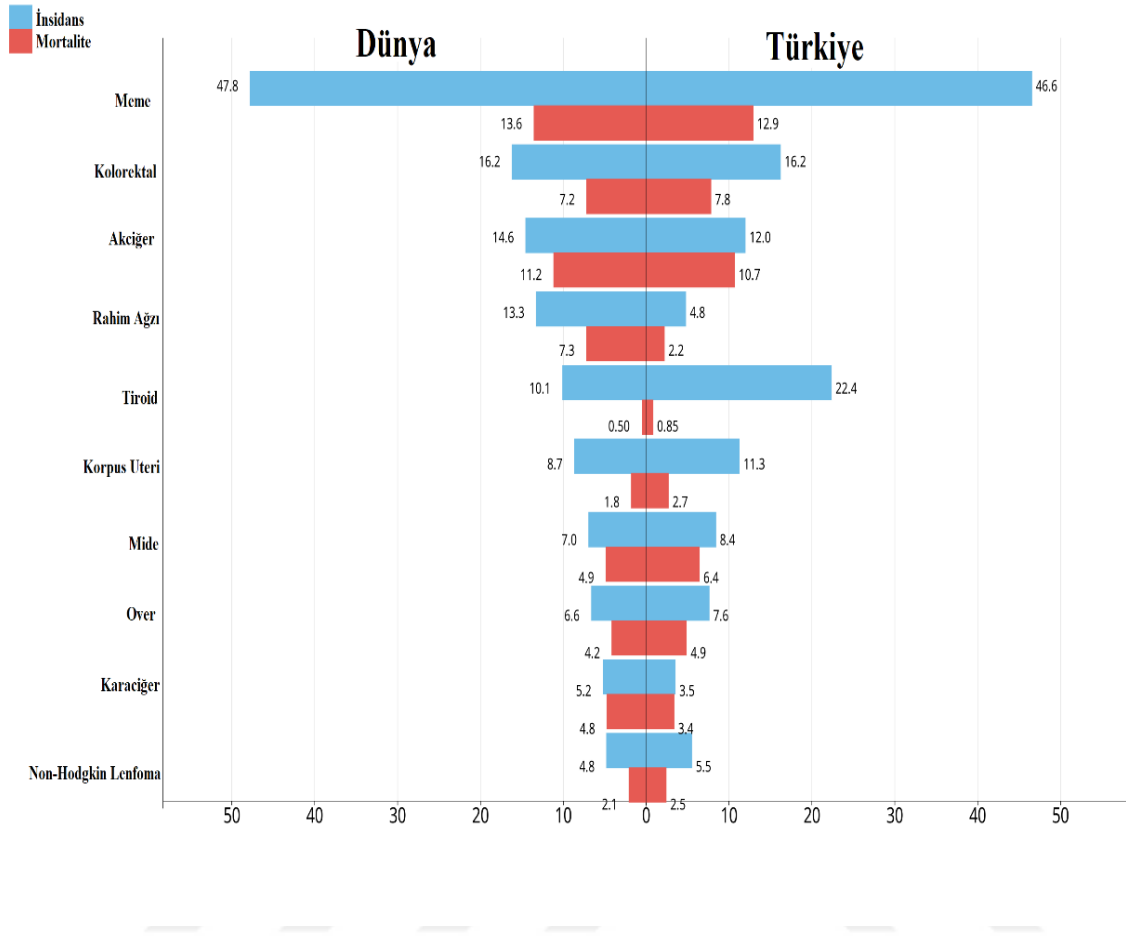
Kaynak: (WHO-World Health Organization-GLOBOCAN (IARC), 2020)

Kanserin görülme sıklığı ve mortalitesi cinsiyet bazlı incelendiğinde, erkeklerde ülkemizde ve dünyada en fazla akciğer kanseri görülmektedir. Dünyada görülme sıklığı anlamında akciğer kanserini, prostat, kolorektal kanser, mide ve karaciğer kanseri izlemektedir. Ülkemizde ise akciğer kanserini, prostat, kolorektal kanser, mesane ve mide kanseri izlemektedir. En fazla mortalite dünyada ve ülkemizde erkekler arasında görülen kanserlerde yine akciğer kanserinde görülmektedir. (Grafik 1.2) Kadınlarda ise dünyada ve ülkemizde en fazla oranda meme kanseri görülmektedir. Dünyada kadınlar arasında meme kanserini, kolorektal, akciğer, serviks ve tiroid kanserleri izlerken; ülkemizde, tiroid, kolorektal ve akciğer kanserleri izlemektedir. (Grafik 1.3)



Grafik 1.2. 2020 Yılı Dünyada ve Türkiye’de Erkeklerde Görülen Kanser Türlerinin İnsidans ve Mortalite Grafiği (Tüm Yaş Grupları)

Kaynak: (WHO-World Health Organization-,”Cancer Tomorrow”, GLOBOCAN (IARC), 2020)

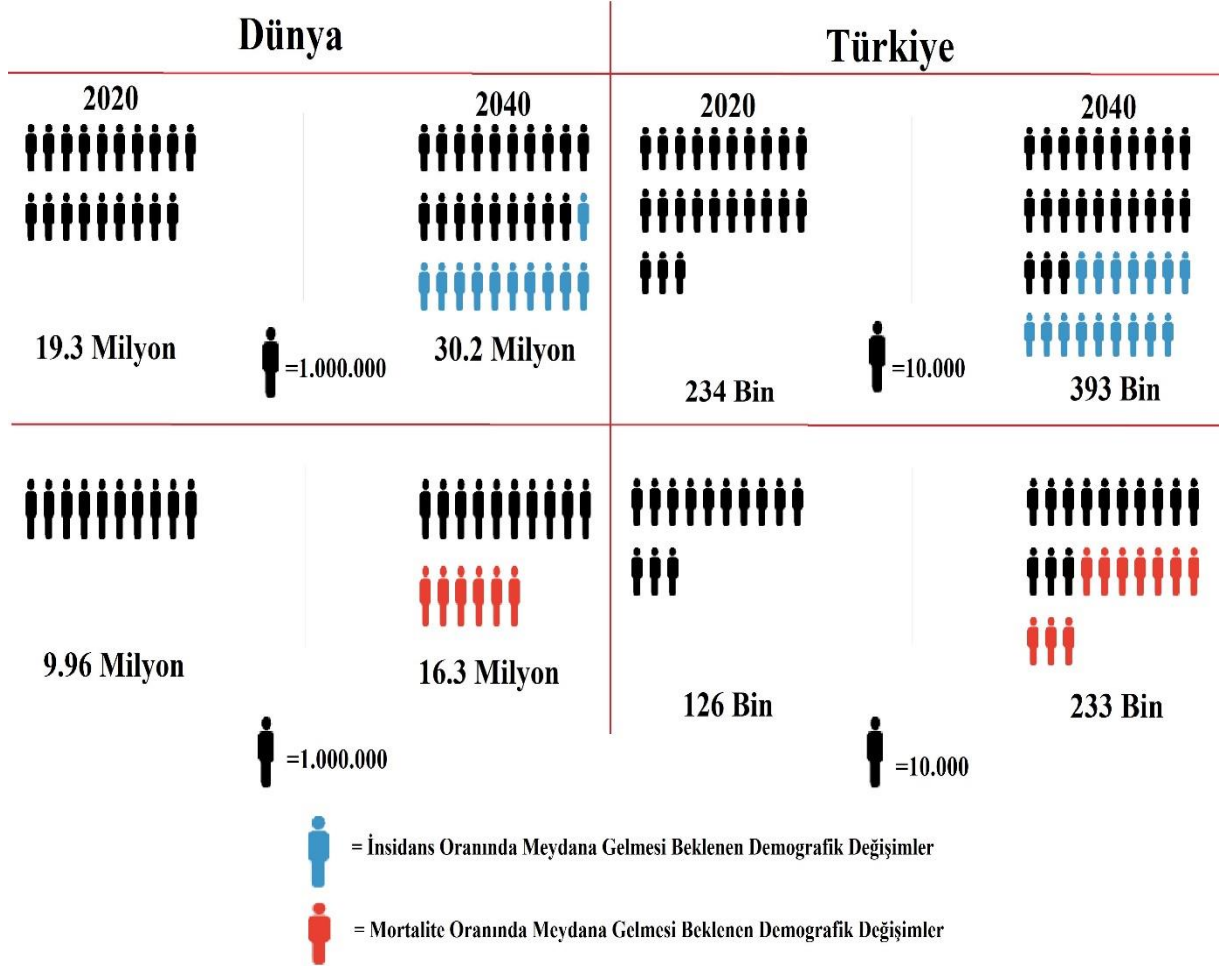


Grafik 1.3. 2020 Yılı Dünyada ve Türkiye’de Kadınlarda Görülen Kanser Türlerinin İnsidans ve Mortalite Grafiği (Tüm Yaş Grupları)

Kaynak: (WHO-World Health Organization-”Cancer Tomorrow”, GLOBOCAN (IARC), 2020)

Dünya Sağlık Örgütü’ne bağlı Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı, geliştirmiş olduğu “Cancer Tomorrow” adlı uygulamada kanserin geleceği hakkında çarpıcı gerçekleri ortaya koymaktadır. Grafik 1.4’te, 2020 yılından 2040 yılına kadar Dünyada ve Türkiye’de meydana gelmesi tüm kanser türleri için önümüzdeki 20 yılda bizi nasıl bir insidans ve mortalite yoğunluğu beklediğini göstermektedir. 2020 yılında tüm Dünyada 19.3 milyon kanser vakası mevcutken, 2040 yılında 30.2 milyon kanser vakasına ulaşılacağı tahmin edilmektedir. Yine Dünyada 2020 yılına kadar 9.96 milyon insan hayatını kaybetmişken 2040 yılında bu sayının 16.3 milyon olması beklenmektedir. Ülkemizde ise, 2020 yılına kadar görülen kanser olgularının sayısı 234 bin iken 2040 yılında bu sayının 393 bin olması beklenmektedir. Ülkemiz

için mortalite sayılarında da 126 binden, 233 bine doğru bir yükseliş beklenmektedir. (Grafik 1.4)

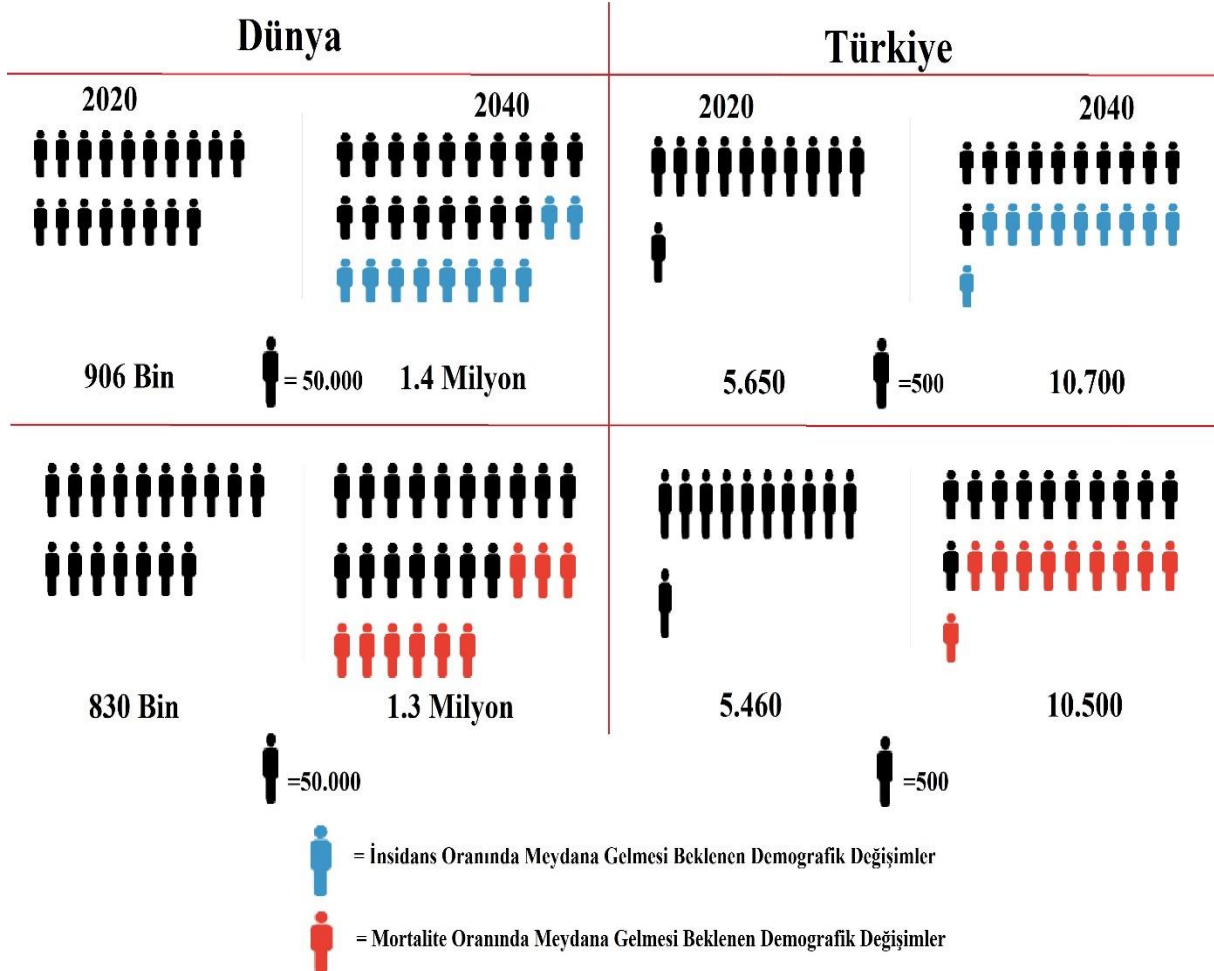


Grafik 1.4. 2020 Yılından 2040 Yılına Kadar Dünyada ve Türkiye’de Meydana Gelmesi Tahmin Edilen Kanser Olgularının İnsidans ve Mortalite Grafiği
(Cinsiyet Bağımsız-Tüm Yaş Grupları)

Kaynak: (WHO-World Health Organization-”Cancer Tomorrow”, GLOBOCAN (IARC), 2020)

“Cancer Tomorrow” uygulamasında karaciğer ve intrahepatik safra kanalı kanseri olguları için önümüzdeki 20 yılda bizleri nelerin beklediğini araştırdığımızda ise, karaciğer kanserinin çok ciddiye alınması gereken bir kanser türü olduğunu görmekteyiz. 2020 yılına kadar Dünyada 906 bin karaciğer ve intrahepatik safra kanalı kanseri olgusu mevcut iken, 2040 yılında bu sayının 1.4 milyon olması beklenmektedir. Mortalitenin ise 2020 yılına kadar 830 iken, 2040 yılında 1.3 milyon olması beklenmektedir. Ülkemizde karaciğer ve intrahepatik

safra kanalı kanseri olgularının 2020 yılına kadar sayısı 5650 iken, 2040 yılında 10.700 olması beklenmektedir. Ülkemizde toplam karaciğer ve intrahepatik safra kanalı kanseri olgularına ait toplam mortalite ise, 5460 iken, 2040 yılında 10.500 olması beklenmektedir. (Grafik 1.5)

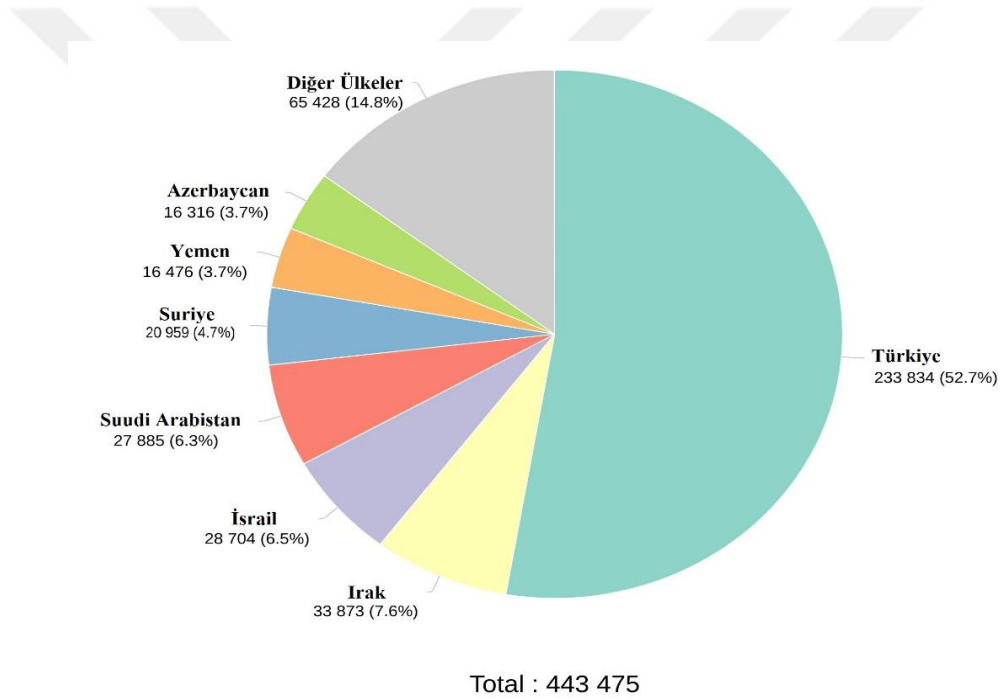


Grafik 1.5. 2020 Yılından 2040 Yılına Kadar Dünyada ve Türkiye’de Meydana Gelmesi Tahmin Edilen Karaciğer ve İntrahepatik Safra Kanalı Kanseri Olgularının İnsidans ve Mortalite Grafiği (Cinsiyet Bağımsız-Tüm Yaş Grupları)

Kaynak: (WHO-World Health Organization-”Cancer Tomorrow”, GLOBOCAN (IARC), 2020)

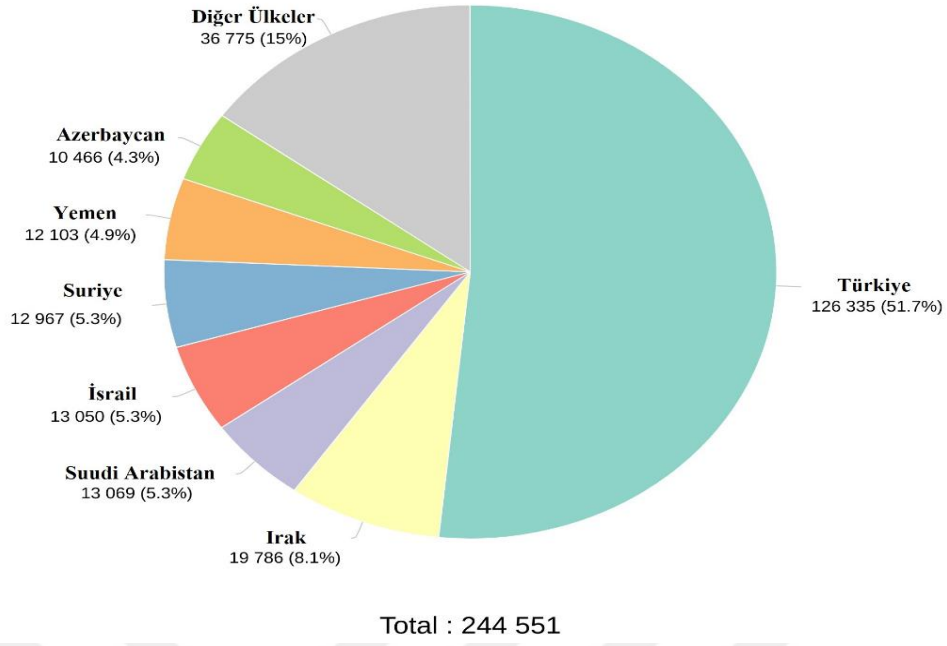
Ülkemizdeki tüm kanser olguları ve karaciğer ve intrahepatik safra kanalı kanseri olgularına ait insidans ve mortalite grafikleri incelendiğinde ülkemizde sağkalımın ciddi oranda dünyaya istatistiklerine göre düşük, mortalite oranlarının ise yüksek olduğu göze çarpmaktadır. İstatistiklere bağlı olarak meydana çıkan bu durum ülkemizde tüm kanser olguları ve karaciğer ve intrahepatik safra kanalı kanseri olguları için bilimsel araştırma ve tedavi olanaklarının yoğunlaştırılması gerektiği gerçeğini ortaya koymaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü'ne bağlı Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı, geliştirmiş olduğu “Cancer Today” adlı uygulamada bölgesel bazlı kanser yoğunluğuna ve ilgili bölgelerde kansere bağlı olarak hayatını kaybedenlerin istatistiklerini oluşturmaktadır. Bölgesel tasnifler yapıldığında “Cancer Today” uygulaması ülkemizi “Batı Asya” ülkelerinin arasında grubuna dahil etmiştir. “Cancer Today” uygulaması “Batı Asya” ülkelerindeki tüm kanser ve karaciğer kanser olgularının sayısı grafikleri ülkemizdeki kanser ve karaciğer kanseri yoğunluğunu ortaya koymaktadır. Ülkemizde hem tüm kanser türleri hem de karaciğer kanser türleri anlamında diğer “Batı Asya” grubu ülkelerdeki toplam kanser yoğunluğunun yarısını oluşturmaktadır. (Grafik 1.6, Grafik 1.8) Yine “Batı Asya” ülkeleri tüm kanser ve karaciğer kanser olgularının mortalitesi anlamında incelendiğinde, ülkemizin toplam sayının yarısını oluşturduğu görülmektedir. (Grafik 1.7, Grafik 1.9)



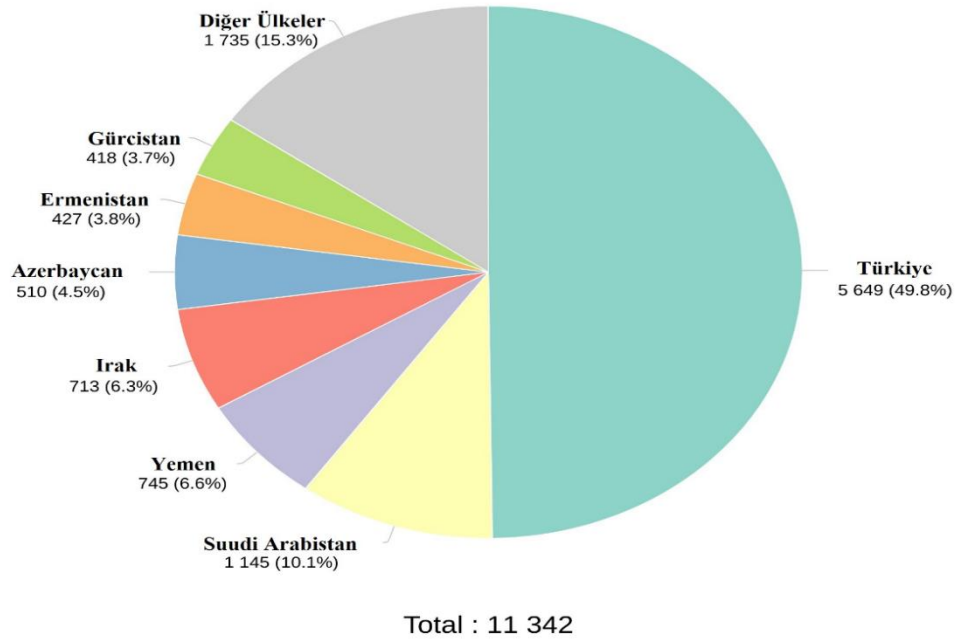
Grafik 1.6. 2020 Yılında Batı Asya Ülkeleri’nde Meydana Gelen Tüm Kanser Olgularının İnsidans Grafiği (Cinsiyet Bağımsız-Tüm Yaş Grupları)

Kaynak: (WHO-World Health Organization-”Cancer Today”, GLOBOCAN (IARC), 2020)



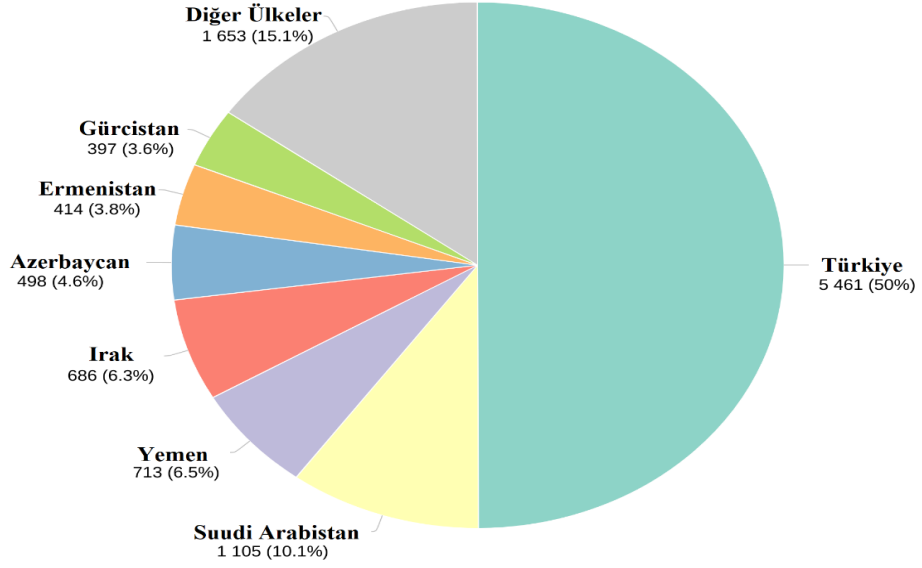
Grafik 1.7. 2020 Yılında Batı Asya Ülkeleri'nde Meydana Gelen Tüm Kansir Olgularının Mortalite Grafiğı (Cinsiyet Bağımsız-Tüm Yaş Grupları)

Kaynak: (WHO-World Health Organization-"Cancer Today", GLOBOCAN (IARC), 2020)



Grafik 1.8. 2020 Yılında Batı Asya Ülkeleri'nde Meydana Gelen Karaciğer Kansir Olgularının İnsidans Grafiğı (Cinsiyet Bağımsız-Tüm Yaş Grupları)

Kaynak: (WHO-World Health Organization-"Cancer Today", GLOBOCAN (IARC), 2020)



Total : 10 927

Grafik 1.9. 2020 Yılında Batı Asya Ülkeleri'nde Meydana Gelen Karaciğer Kanseri Olgularının Mortalite Grafiğı (Cinsiyet Bağımsız-Tüm Yaş Grupları)

Kaynak: (WHO-World Health Organization-"Cancer Today", GLOBOCAN (IARC), 2020)

İKİNCİ BÖLÜM

1. KARACİĞER KANSERİ

Birincil karaciğer kanserleri, dünyada en sık görülen beşinci kanser tipi ve kansere bağlı gerçekleşen ölümlerin üçüncü sıradaki nedenidir. Birincil karaciğer kanserleri, hepatoselüler karsinom (HCC), intrahepatik kolanjiokarsinom (ICC), hepatoblastoma (HB) ve kombine HCC intrahepatik kolanjiokarsinom (cHCC-ICC) olmak üzere 4 grupta temel olarak gruplandırılabilir. Dört grupta sınıflandırdığımız primer karaciğer kanserlerinin orijini ile ilgili soru işaretleri hala mevcuttur. Morfolojik ve patolojik değerlendirmelere göre, hepatoselüler karsinom (HCC) hepatositlerden, intrahepatik kolanjiokarsinom (ICC) ise kolanjiyositlerden köken aldığı düşünülmektedir. Birincil karaciğer kanserleri, hepatositler, kolanjiyositler, hepatoblastlar ve karaciğer kök/progenitor hücreleri olmak üzere dört tip hücreden köken almaktadır (Wang vd., 2020: 313).

İkincil karaciğer kanserleri ise, vücuttaki başka bir kanserin metastaz yapmasıyla meydana gelir. Akciğer, böbrek, yemek borusu, pankreas gibi birçok kanser türü karaciğere metastaz yapıp kansere sebep olsa da ikincil karaciğer kanserlerinin %70'ini kolorektal kanserler oluşturur (Valderrama-Treviño vd., 2017: 166).

1. Hepatoselüler karsinom (HCC)

Hepatoselüler karsinom (HCC) ve intrahepatik kolanjiokarsinom (ICC), en fazla görülen birincil karaciğer kanser tipleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Hem HCC hem de ICC'nin son yıllarda görülme oranı gitgide artmaktadır (Jiang ve Centeno, 2018: 1073274817744658). ICC safra kanallarında bulunan hücrelerden orijinlenirken, HCC karaciğerin ana parankimal hücreleri hepatositlerden orijinlenir (El-Serag ve Rudolph, 2007: 2557).

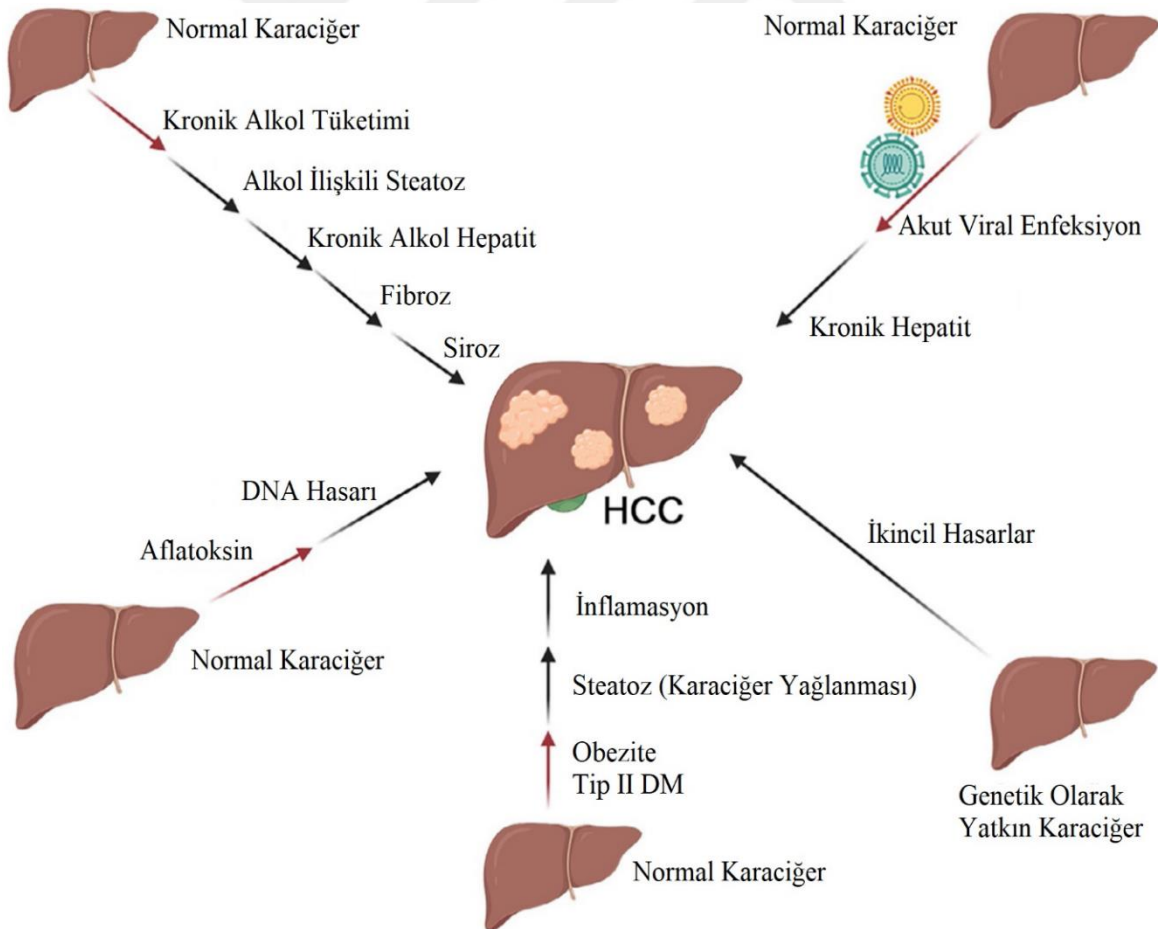
Hepatoselüler karsinom (HCC) ise, karaciğerde görülen tümörlerin en başında gelmektedir. Karaciğerde görülen tümörlerin %90 gibi çok yüksek bir oranını oluşturmaktadır. HCC dünyada görülen kanser tipleri arasında en sık rastlanan beşinci kanser tipidir. Erkeklerde kansere bağlı ölümlerin ilk nedeni akciğer kanseri olurken ikinci nedeni HCC'dir (Asafo-Agyei ve Samant, 2022).

Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü SEER veri tabanına göre, ABD'deki HCC hastalarının ortalama beş yıllık sağkalım oranları %19.6 iken, hastalığın prognozunun daha ileri seviyede olduğu hastalarda ise sağkalım oranı %2.5 gibi ürkütücü

oranlardadır. HCC'nin erkeklerdeki insidans oranı kadınlarla kıyaslandığında 2.8/1 gibi erkeklerde yaklaşık üç katlık bir görülme sıklığı mevcuttur. HCC, kadınlarda görülen kanser türleri arasında 9. sırada yer alırken, kadınlarda kansere bağlı ölümlerin ise 4. nedenidir (Chidambaranathan-Reghupaty vd., 2021: 1). HCC'nin bu denli düşük sağkalım, ileri evrelerde teşhis gibi özellikleri dolayısıyla etkili biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

1.1. HCC Etiyolojisi

HCC patogenezi karaciğerin vücudun birçok reaksiyonunda görevli olması dolayısıyla çok karışıktır. Moleküler mekanizmalarda meydana gelen hatalar HCC'ye adeta davetiye çıkarır. Hücre döngüsünde meydana gelen regülasyon bozuklukları, DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) metilasyon değişiklikleri, kromozomal instabilite, immünomodülasyon, Epitelyal-mezenkimal geçişler, HCC kök hücrelerindeki aşırı sayısal artış, mikroRNA (miRNA) disregülasyonları örnek olarak verilebilir (Ogunwobi vd., 2019: 2279). HCC'nin oluşumu birçok farklı etiyojiye bağlı olabilmekle birlikte, HCC'nin en sık görülme nedenleri sırasıyla, karaciğer hasarı, kronik inflamasyon, fibrozis, siroz şeklindedir.



Şekil 2.1. Hepatoselüler Karsinom (HCC) Etiyolojisi ve Potansiyel Mekanizmaları

Kaynak: (Chidambaranathan Reghupaty vd., 2021: 1)

Hasarlı nekrotik hücrelerden salınan hasarla ilişkili moleküller, virüsler tarafından salınan patojenle ilişkili moleküller; patern tanıma reseptörleri, Toll benzeri reseptör aktivasyonu (TLR), C-tipi lektin Reseptörleri, Nükleotit bağlayıcı Oligomerizasyon Alanı (NOD) benzeri reseptörler ve çeşitli bağışıklık hücrelerinde bulunan retinoik asitle indüklenebilir gen I (RIG-I) benzeri reseptörleri uyararak bir enflamatuvar tepkiye neden olur. Akut bir inflamatuvar yanıt, dış uyaranla bağlantı kesildiğinde sonlanır. Fakat kronik inflamatuvar yanıt, fibroza ve sonrasında siroza neden olur (Villanueva ve Luedde, 2016: 89). HCC meydana gelmeden önce hastaların %80-90'ında sirotik bir olay meydana gelir (Leong ve Leong, 2005: 5).

1.2. Viral Enfeksiyonlar

HCC'nin viral en önemli risk faktörü, Hepatit B Virüsü (HBV) ve Hepatit C Virüsü (HCV) enfeksiyonlarının neden olduğu kronik hepatittir. HBV ve HCV'nin her ikisi kan yoluyla bulaşabilirken HCV diğer vücut sıvılarıyla da bulaşabilir. Enfekte bir kişi ile enjektör paylaşımı, anneden bebeğe perinatal bulaşma, cinsel ilişki ve diğer kan teması hastalığın bulaşı için yeterlidir. Bu enfeksiyonların yoğun olarak görüldüğü bölgelerde, HBV/HCV koenfeksiyonu görülebilir ve bu durum da HCC gelişme riskini daha fazla artırır (Donato vd., 1998: 347)

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, 257 milyon birey veya total dünya nüfusunun %3.3'nün kronik HBV enfeksiyonu ile yaşadığını raporlamaktadır. Yine DSÖ verilerine göre 71 milyon kişi ise kronik HCV enfeksiyonu taşımaktadır. 2018'de görülen HCC vakalarının %54,5'i HBV, %21,2'si ise HCV enfeksiyonu kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Bray vd., 2018: 394)

DSÖ, küresel HBV prevalansını, Hepatit B Yüzey Antijeni (HBsAg) üzerinden tahmin etmektedir. DSÖ HBV dağılımının sınıflandırılması için 6 bölge belirlemiştir. Tespit edilen bu bölgelerde HBV prevalansı, Batı Pasifik Bölgesi (%6,2), Afrika Bölgesi (%6,1), Doğu Akdeniz Bölgesi (%3,3), Güney -Doğu Asya Bölgesi (%2), Avrupa Bölgesi (%1,6) ve Amerika Bölgesi (%0,7) şeklindedir. HBV enfeksiyonu için etkili bir tedavi olmamasına rağmen antiviral tedaviler hastalığın ilerlemesini yavaşlatabilir, hastalıktan %98-100 gibi bir oranda etkili bir korunma sağlayan aşı da günümüzde mevcuttur. Akut olarak meydana gelen bir HBV enfeksiyonunun kronikleşme ihtimali yaşla ters orantılıdır. HBV enfeksiyonu 1 yaşından önce meydana gelirse %80-90 oranında, 1-6 yaşlarında meydana gelirse %30-50 oranında

kronikleşirken yetişkinlerde bu oran %5'in altına düşer (Chidambaranathan Reghupaty vd., 2021: 1).

HCV enfeksiyonu da bireyin kanında HCV'ye karşı antikorlara bağlı olarak teşhis edilir. DSÖ verilerine göre, HCV enfeksiyonu >%3,5 oranla en fazla Orta Asya ve Orta Afrika'da görülmektedir. Akut HCV bulaşı sonrası enfekte kişilerin %30'u virüsü bulaş sonrası 6 ay içerisinde ortadan kaldırır. Geri kalan % 70'lik grup ise kronik HCV enfeksiyonu geliştirir. Kronik HCV bireyler potansiyel HCC adayıdır. HCV ile enfekte olmuş kişiler %95 gibi yüksek bir oranda antiviral ilaçlarla tedavi edilebilir (Petruzziello, A. vd. 2016: 7824).

1.3. miRNA'lar ve HBV-HCC mikroRNA'lar (miR)

miRNA'lar ve HBV-HCC mikroRNA'lar (miRNA), RNA'ların inhibe edilmesiyle gen ekspresyonunu kısıtlayan, küçük, kodlamayan RNA'lardır. Hedeflenen gene bağlı olarak, onkogen veya tümör baskılayıcı gen şeklinde görev yapabilirler. miRNA'ların salınımı, HBV enfeksiyonu sonrası HCC gelişiminin her aşamasında meydana gelir. Geç evre HCC'de tespit edilen miRNA'lar, erken enfeksiyon, inflamatuvar faz ve fibroz aşamasından farklıdır. pI3K/MAPK, WNT/ β -Catenin, TP53 ve JAK/STAT yolları gibi ana yollarla yer alan miRNA'lar HBV-HCC gelişimi sırasında salınır (Sartorius vd., 2019: 1504). HBV-HCC'de en fazla düzeyde yukarı yönde regüle edilen miRNA'lar miR-18a, miR-21, miR-221, miR-222 ve miR-224 şeklinde iken, en fazla düzeyde aşağı yönde regüle edilen miRNA'lar miR-26a, miR-101, miR-122, miR-125b, miR-145, miR-199a, miR-199b, miR-200a ve miR-223 şeklindedir (Xu vd., 2020: 1271).

miR-18a'nın yukarı yönde regüle olması IRF2, CBX7 ve BCL2L10 genlerinin ekspresyonunu aynı zamanda kanserin proliferasyonunu, hücre migrasyonunu ve invazyonu uyarmaktadır (Wang vd., 2018: 7919)

miR-18a'nın ekspresyon düzeyi, alfa-feta protein (AFP) tümör boyutu, intrahepatik vasküler invazyon TNM (Tümör-Lenf Nodu-Metastaz) evrelemesi ile pozitif yönde korelasyon gösterir. İnterferon düzenleyici faktör 2 (IRF2) ve kromobox 7 (CBX7), miR-18a'nın direk hedefleridir ayrıca BCL2-Like 10 (BCL2L10) miR-18a'nın aşağı yönde regüle olmasını sağlar (Yongyu vd., 2018: 1327).

1.4. Alkol Tüketimi

Alkol ürünlerinin kullanımı başta karaciğer kanseri olmak üzere meme, mide ve kolorektal kanserlere de sebebiyet verebilmektedir. Tüketilen alkol miktarı arttıkça kansere yakalanma ihtimali de artar. Karaciğer kanseri riski hiç alkol tüketimi yapmayanlara kıyasla,

günlük 50 gr. etanol alımı yapan kişilerde %46, 100 gr. etanol alımı yapan kişilerde ise %66 artmaktadır (Turati vd., 2014: 1526).

Alkolik karaciğer hastalığı (ALD), obezite, diyabet, hepatit enfeksiyonları gibi diğer risk faktörleri ile birlikte bulunduğu vakalar olsa da HCC vakalarının yaklaşık olarak %30'unu oluşturmaktadır (Ganne-Carrié ve Nahon, 2019: 284).

Alkol tüketimine bağlı olarak oluşan karaciğer hastalıklarının ilk semptomu, genellikle asemptomatik karaciğer yağlanması (steatoz) veya alkolik karaciğer yağlanmasıdır (AFL). Aşırı alkol tüketimi yapanların %90'ından fazlasında AFL gelişmesine rağmen, bu vakaların %30'u şiddetli ALD'ye ilerler. Hepatositlerde başlayan yağ birikimi, sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 1'in (SREBP-1) aktivasyonu ile başlar, artan yağ birikimi peroksizom proliferatör aktive olan reseptör (PPAR)- α 'nın aşağı yönde regüle eder ve yağ asidi β -oksidasyonunda azalmaya neden olur (Gao ve Bataller, 2011: 1572).

Hepatositlerde alkol, alkol dehidrojenaz (ADH) enzimi aracılığıyla toksik asetaldehit çevrilir. Asetaldehit, asetata ardından H_2O ve CO_2 'ye dönüştürülür. İlk iki adım, NAD^+ 'nin $NADH$ 'ye indirgenmesini içerir. Daha fazla alkol yani etanol tüketildikçe hücre içi $NADH/NAD^+$ oranı bozulur ve mitokondriyal yağ β -oksidasyonu artar. Artan $NADH/NAD^+$ reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışına da sebep olur (Donohue, 2007: 4974). Alkol dehidrojenaz (ADH) ve aldehit dehidrojenaz (ALDH) genlerindeki polimorfizmler, endojen fonksiyonları inhibe ederek ve yoğun bir bağışıklık yanıtı meydana getirerek asetaldehit moleküllerinin birikimine yol açar (Brooks ve Theruvathu, 2005: 187).

Yağlı karaciğer, alkolik hepatite (AH) veya karaciğer iltihabına yol açabilecek ikincil hasarlara karşı savunmasızdır. Karaciğerde yerleşik makrofajların aktivasyonu ve sitokin üreten monositlerin, makrofajların ve nötrofil lökositlerin karaciğere alınması ile karakterize edilir. Bağırsak lümeni, bağırsak ve karaciğer arasında bir bariyer görevi gören bir mukoza zarı ile çevrilidir. Gram negatif bakterilerden türetilen az miktarda lipopolisakkarit (LPS), karaciğere portal ven yoluyla girebilir, ancak karaciğer tarafından kolayca temizlenir. Alkolden türetilen metabolitler, sıkı bağlantı proteinlerini, yapışık bağlantı proteinlerini, mikrotübül hücre iskeletini ve epitel hücre-hücre yapışmasını bozarak bağırsak-karaciğer bariyerini oldukça geçirgen hale getirebilir. Sonuç olarak, yüksek seviyelerde LPS karaciğere girer ve kompleman reseptörü 3 (makrofajlarda), CD14/TLR4 (monositlerde, makrofajlarda, B hücrelerinde, karaciğer parankimal hücrelerinde ve bazı fibroblast hücrelerinde) ve miyeloid farklılaşma faktörü (MD) gibi reseptörler tarafından tanınır. 2/TLR4 (miyeloid ve endotel soy

hücrelerinde). Karaciğerde yerleşik makrofajlar dahil olmak üzere birçok hücre tipinde bulunan bu reseptörler, iltihaplanmaya neden olan TNF α , IL-6, IL-1 β ve IL-8 gibi sitokinleri üretmek için aktive edilir. AH ayrıca alkolle ilişkili HCC'de geri dönüşümlü bir aşamadır ve çözüm alkol alımının kesilmesidir. Karaciğerde yerleşik makrofajlar dahil olmak üzere birçok hücre tipinde bulunan bu reseptörler, iltihaplanmaya neden olan TNF α , IL-6, IL-1 β ve IL-8 gibi sitokinleri üretmek için aktive edilir. AH ayrıca alkolle ilişkili HCC'de geri dönüşümlü bir aşamadır ve çözüm alkol alımının kesilmesidir (Szabo ve Bala, 2010: 1321).

Kronik Alkolik hepatit, ekstraselüler matriks (ECM) bileşenlerinin sentezi ve yıkımı arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak, normal karaciğer parankimal dokularının yerine bağ dokularının geçmesiyle fibrozise neden olabilir. Alkol alımının kesilmesi ile erken fibrozun gerilemesi mümkündür ve anti-fibrotik ilaçlarla ilgili araştırmalar ümit vericidir. Bununla birlikte, uzun süreli fibroz siroz ve HCC'ye yol açar (Schuppan vd., 2018: 435).

1.5. Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD)

Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), karaciğer yağlanması ve daha agresif formu olan alkolik olmayan steatohepatite kadar olan çerçeveyi tanımlar. Dünya çapında yaklaşık olarak %25 bir prevalansa sahip yaygın karaciğer bozukluğudur (Maurice ve Manousou, 2018: 245).

NAFLD başlangıcı veya steatozu olan hastaların %20'si alkolik olmayan steatohepatite ve siroza bu grubun %2.6'sı ise HCC'ye ilerler (Ascha vd., 2010: 1972). Vaka sayısı ve diğer etiyolojilere göre düşük olsa da ABD'de 2015-2030 yılları arasında NAFLD vakalarının %21 ve alkolik olmayan steatohepatit ile ilişkili HCC'nin ise %137 artacağı tahmin edilmektedir (Estes vd., 2018: 123). Dünya çapındaki obezite ve diyabet oranlarındaki artış NAFLD için ana risk faktörü olup, NAFLD vakalarının artışı obezite ve diyabet insidansındaki artışa paraleldir (Younossi, 2019: 531).

NAFLD'nin alkolik olmayan steatohepatite ve siroza ilerlemesi için, steatoz olması ve hepatositleri enflamasyona duyarlı hale getirmesi ile ilişkilidir (Buzzetti vd., 2016: 1038).

NAFLD'nin ilk aşaması, hepatositlerde aşırı trigliserit birikimi ile karakterize edilen basit yağlı karaciğerdir. Bu durum, karaciğere taşınan visseral yağ dokusunun artan lipolizi, karaciğerde aşırı de novo lipogenez (DNL) veya yüksek yağlı diyet tüketimi yoluyla meydana gelebilir. Fazla Serbest Yağ Asitleri (FFA), hücrelerdeki lipid dengesini bozar, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi hücresel organellere zarar verir ve hücre hasarına ve hücre ölümüne neden olur. Endoplazmik retikulum stresi, ROS seviyelerini artırarak ve NF- κ B ve c-Jun N-

terminal kinaz (JNK) yollarının aktivasyonunu sağlayarak kronik iltihaplanmaya neden olabilir. Doymuş yağ asitleri, TLR4'ü doğrudan hepatositlerde aktive ederek TNF α üretiminin ve iltihaplanmanın artmasına neden olabilir (Pierantonelli ve Svegliati-Baroni 2019: 1).

Hepatosit hasarına yanıt olarak, lenfositler ve doğal öldürücü T hücreleri karaciğere alınır ve IFN-y ve tümör nekroz faktörü aile üyesi 14'ü (TNFSF14) üretir. Bağırsaktan gelen sinyaller ayrıca Toll benzeri reseptörler (TLR) yoluyla doğuştan gelen bir bağışıklık tepkisini aktive ederek iltihaplanmaya neden olabilir. Bu, enflamatuvar sitokinleri serbest bırakan karaciğerde yerleşik makrofajları aktive eder ve sonuçta ortaya çıkan kronik inflamasyon, HCC ile sonuçlanır (Chidambaranathan-Reghupaty vd., 2021: 1).

1.6. Aflatoksinler

Aflatoksinler, *Aspergillus flavus* ve *A. parasiticus* adı verilen mantar türlerinin meydana getirdiği mikotoksinlerdir. Kumarin ile birleşmiş furan halkası içeriğine sahip olan aflatoksinler, mantarlarda furanokumarin olarak adlandırılan sekonder metabolitlerdir. Aflatoksin bulaşı çoğu zaman bu mantar türlerinin, toplanması, taşınması veya depolanması aşamalarında meydana gelir. Aflatoksin tüketimi yapıldığında, hepatotoksisite, teratojenisite ve immünotoksisite gibi durumlar meydana gelebilir. 20'den fazla aflatoksin bilinmektedir, fakat ancak en önemli hepatokarsinojen olmakla birlikte aflatoksin B1 (AFB1) aflatoksin B1, B2, G1 ve G2'nin de önemi yadsınamaz derecededir (Kumar vd., 2017: 2170).

Aflatoksinler, akut veya kronik olarak zehirlenmelere sebebiyet verebilen hepatotoksinlerdir. Hindistan, Nepal, Bangladeş, Kenya ve Tanzanya gibi ülkelerde aflatoksin zehirlenmelerine bağlı olarak yüzlerce ölüm ve salgınlar meydana gelmiştir (Sarma vd., 2017: 124). Akut zehirlenme sonucunda, sarılık, abdominal ağrı, bulantı gibi basit semptomlar görülebilen ölüm kadar giden tablolar meydana gelebilir. Kronik aflatoksin zehirlenmesi kansere sebebiyet verir ve özellikle HCC ile sıkı bir ilişki içerisinde. Aflatoksin ilişkili HCC meydana gelmiş hastalarda en fazla görülen mutasyon, p53 geninin 249. kodonundaki AGGarg→AGTser missense mutasyonudur (Aguilar vd., 1993: 8586). Bu mutasyonun, farklılaşmayı ve metastazı etkileyerek HCC'yi teşvik ettiği bilinmektedir (Peng vd., 1998: 125). Aflatoksin sitokrom P450 tarafından metabolize edilerek aflatoksin B1-8, 9-oksit (AFBO) gibi hepatositlerde DNA eklentileri oluşturabilen reaktif genotoksik ara ürünler oluşturarak DNA hasarı meydana getirebilir (Hamid vd., 2013: 1087). Aflatoksin maruziyeti tek başına HCC riskini (%0,3-17,4), HBV enfeksiyonu ise tek başına HCC riskini (%4,8-17,4) arttırırken,

Aflatoksin ve HBV enfeksiyonu birlikte sinerjistik olarak HCC riskini %70'e kadar artırabilir (Kew, 2003: 405).

1.7. Predispozan genetik faktörler

Çevresel faktörler kadar genetik bir takım değişiklik ve yatkınlıklar da HCC riskini arttırmaktadır. Erişkin dönemde çoğu meydana gelen HCC vakası, altta yatan genetik durumun ikincil bir sonucudur. Meydana gelen bu genetik değişimler yatkınlığa bağlı olup, genellikle HCC gelişimi için ikincil bir risk faktörü ile etkileşim gereklidir. Genetik yatkınlığa bağlı olarak meydana gelen HCC meydana getirebilecek hastalıklar, Alfa-1 antitripsin (A1AT) eksikliği, Otoimmün hepatit (AIH), Herediter Hemokromatozis (HH), Glikojen depo hastalığı (GSD), Porfiri ve Herediter tirozinemi tip-1 (HT1) şeklindedir (Chidambaranathan-Reghupaty vd., 2021: 1).

1.8. HCC ile İlişkili Genetik Risk Faktörleri

İnsan genom projesinin tamamlanması, modern tıbbın genetik bilgi ve yüksek verimli genomik analiz açısından zengin bir çağa adım atmasına imkân sağladı. Elde edilen bu genetik kaynaklar ve analitik araçlar, birçok hastalıkta olduğu gibi hepatoselüler karsinomun (HCC) moleküler temelini çözülmesinde kilit görev almıştır. Ayrıca, hepatoselüler karsinom için etkili bir tedavi bulunmadığından, HCC'nin genetik altyapısının daha iyi anlaşılması, seçilen hedeflere yönelik yeni tedaviler geliştirmek için çok önemli olacaktır. HCC genetiğinde DNA metilasyonu, kromozomal anormallikler, p53, Wnt sinyali, TGFβ, Ras ve Rb yolları gibi ana sinyal yolları genetiği ve düzenlenmesi özel önem taşımaktadır (Teufel vd., 2007: 2271).

1.8.1. Kromozom Anomalileri

HCC'de kromozomal anormallikler ile sıklıkla karşılaşmaktadır. HCC'de 1q, 8q, 6p ve 17q kromozomlarının amplifikasyonları ve 8p, 16q, 4q, 17p ve 13q delesyonları en fazla karşılaşılan kromozom anomalileridir. Bu kromozomal bölgeler, hepatokarsinogenezde p 53 (kromozom 17p) veya Rb (kromozom 13q) gibi önemli değişimleri de içerir. Bununla birlikte, bu kromozomal anormalliklerin hastalığın klinik seyri ile korelasyonuna ilişkin veriler, büyük kromozomal anormalliklerin sınırlı toplam sayısı ve aynı kromozom anomalisine sahip hastalarda düşük insidansı nedeniyle çok fazla mevcut değildir (Moinzadeh vd., 2005: 935).

1.8.2. p53 Gen Mutasyonları

Son yıllarda yapılan çeşitli çalışmalar, etiyolojiden bağımsız olarak P53 tümör baskılayıcı genin hepatokarsinogenezde önemli bir rol oynadığına dair kanıtlar

sağlamıştır. Bununla birlikte, P 53 mutasyonlarının sıklığı ve %75 yanlış anlamlı mutasyon içeren mutasyon spektrumu, konumları ve yapıları bakımından son derece çeşitlidir ve esas olarak genin merkezi kısmı boyunca dağılmış 200'den fazla kodonu etkiler. HCC'de, P 53 mutasyonları, muhtemelen hem etiyolojik ajanlardaki hem de konak duyarlılık faktörlerindeki farklılıkları yansıtan farklı coğrafi bölgelerde de değişiklik gösterir. Sahra altı Afrika ve Çin gibi bazı coğrafi bölgelerde, Aflatoksin B1 maruziyeti ve kronik viral hepatit, çok yüksek bir HCC insidansından sorumludur (yılda 100/100.000 vakaya kadar). Bu alanlarda, kodon 249'un üçüncü pozisyonunda yüksek oranda bir p 53 nokta mutasyonu vardır ve bu da Guaninden sitozine (G=>C) ve timinden adenine (T=>A)'ya transversiyon ile sonuçlanır. Ayrıca, tümörsüz karaciğerde artan 249^{ser} mutasyon yüküne sahip hücrelerin doza bağlı bir şekilde AFB1 maruziyetini yansıttığı gösterilmiştir, bunun hepatokarsinogenezde erken bir mutasyon olayı olduğunu gösterir. Ek olarak, bu, HCC geliştirme riski daha yüksek olan hastaları tarama şansı da sunabilir. Bir dizi çalışma, 249^{ser} P53 gen mutasyonu ile AFB1 maruziyeti arasındaki pozitif korelasyon bulgularını açıkça desteklemektedir. Bu çalışmalar aynı zamanda, örneğin ABD ve Batı Avrupa gibi neredeyse hiç AFB1 alımının olmadığı bölgelerde HCC analizinin, belirli bir sıcak nokta olmaksızın farklı bir mutasyonel spektrum ortaya koyduğuna işaret etmektedir. Örneğin, kronik hepatit B veya C'de artmış hücre proliferasyonunun arka planında, hepatositlerde AFB1'den promutajenik N7dG (N7-deoksiguanozin) eklenti oluşumu, p 53 kodonu 249'da G=>C'den T=>A'ya transversiyonun sabitlenmesine izin verebilir. Bu, etkilenen hepatositler içinde genişleyen bir hücre klonunun seçilmesine yol açabilir. Bununla birlikte, yüksek AFB1 alımı olan ülkelerde yüksek HCC insidansı mutlaka genomik HBV entegrasyonuna bağlı değildir. Bu, insan karaciğer hücre dizilerinin AFB1'e maruz kalmasının HBV olmasa bile aynı 249^{ser} mutasyonu ile sonuçlandığını göstererek in vitro olarak gösterilmiştir. Muhtemel bir açıklama, kodon 249'daki üçüncü bazın, AFB1 varlığında alışılmadık derecede yüksek bir mutasyon oranına sahip olduğunu gösteren ileri çalışmalardan geldi. Alternatif olarak, 249^{ser} mutant P 53 ile karaciğer hücrelerinin büyüme ve/veya hayatta kalma avantajı olabilir. Bu nedenle, kodon 249^{ser} mutasyonu için serum analizi, AFB1 maruziyeti ve muhtemelen erken HCC aşamaları için bir biyobelirteç olarak faydalı olabilir.

Tersine, P53 mutasyonu düşük AFB1 alımı olan bölgelerde tipik bir mutasyon paterni olmadan karsinogenezde geç bir olay olarak ortaya çıkabilir. Bir dizi çalışmada HCC içinde meydana gelen P53 mutasyonlarından sonra geliştirilen farklılaşmamış hücresel alt popülasyonlar, HCC ilerlemesine yol açan nodül içinde nodül HCC'lerde

farklı P53 mutasyonları bulunmuştur, daha şiddetli hücrel atipi mevcuttur HCC içinde p53 heterozigotluk kaybı (LOH) olan bölgelerde ve son olarak P53 mutasyonları tercihen p53 LOH ile birlikte veya sonrasında orta derecede ila az diferansiye HCC'de meydana gelirken, p53'teki LOH sirotik nodüllerde gösterilmemiştir (Teufel vd., 2007: 2271).

1.8.3. Wnt Sinyal Yolağı

İlk olarak *Drosophila melanogaster*'da tanımlanan ve daha sonra diğer birçok organizmada tanımlanan kanatsız gen ailesinin üyeleri, embriyonik gelişim, hücre/hücre etkileşimi ve proliferasyonun düzenlenmesi sırasında vücut modeli ve eksen oluşumunu oluşturmak için gerekli olan salgılanan morfojenik ligandlardır. Son zamanlarda, Wnt yolunun, tümör gelişimi ve farklılaşmasında anahtar bir düzenleyici olarak işlev gördüğü de gösterilmiştir. Wnt protein ailesinin üyeleri, Frizzled ailesinin hücre yüzeyi reseptörlerine ve bunların yardımcı reseptörleri olan LRP 5/6 proteinlerine bağlanarak sinyal göndermeyi başlatır. Bağlanma sonunda çekirdeğe ulaşan artan miktarda β -katenin ile sonuçlanır. Wnt/kıvrık bağlanma, membranla ilişkili bir Wnt reseptör kompleksinin bir bileşeni olan Disheveled'in aktivasyonuna yol açar ve ardından Axin, GSK-3 ve APC dahil bir protein kompleksini inhibe eder. Bu kompleks normalde β -katenin hücre içi sinyal molekülünün proteolitik bozunmasını destekler. Bununla birlikte, Dsh tarafından inhibe edilirse, β -katenin'in sitoplazmatik bozunması azalır ve artan miktarda β -katenin çekirdeğe girebilir ve spesifik gen ekspresyonunu desteklemek için TCF/LEF familyası transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girebilir. Embriyonik gelişimdeki rolünün yanı sıra, Wnt sinyal yolu, kanser gelişimi ve farklılaşması açısından kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Çeşitli kanıtlar, HCC'de Wnt/ β -katenin teklemeye yolunun önemli bir rolünü desteklemektedir. Bunlar, aktive edilmiş bir Wnt sinyal yolağının bir özelliği olarak artmış ekspresyon ve β -katenin nükleer birikimini içerir. Tüm HCC'nin %62'ye kadarının böyle bir β -katenin düzensizliği gösterdiği gösterildi. Ek olarak, β -katenin nükleer birikimi olan hastalarda daha kötü prognoz ve daha yüksek tümör nüksü oranının arttırır (Luu H. vd., 2004: 653)

Onkogenik β -katenin mutasyonlarının HCC gelişimini de teşvik ettiğinin ortaya konmasının ardından, Wnt-/ β -katenin sinyaline daha fazla dikkat çekilmiştir. Bu mutasyonlar, β -katenin'in fosforile olmasını önler ve böylece bozunmayı önleyerek Wnt-/ β -katenin sinyalleşmesinin aktivasyonuna neden olur. Mutasyonların prevalansının, çeşitli raporlardan %26 ve %41 içinde olduğu tahmin edilmiştir ve bazı raporlar, aflatoxin B1 ve HCV enfeksiyonuna yüksek düzeyde maruz kalma ile mutasyonlar arasında yüksek bir ilişki olduğunu açıklamaktadır. Ek olarak, Wnt sinyal yolağının negatif bir düzenleyicisi olan Axin1

mutasyonlarının da insan HCC'sinde oldukça yaygın olduğu ve yabani tip Axin1'in transfeksiyonunun kanser hücrelerinde Wnt sinyalinin yeniden oluşmasına ve apoptoza yol açtığı bildirilmiştir. Daha düşük bir sıklıkta, Axin2 mutasyonları da HCC'ye katkıda bulunabilir. Kolorektal karsinom gibi diğer tümör varlıklarının aksine, HCC'de Adenoma Polyposis Coli (APC) geninin hiçbir mutasyonu tanımlanmamıştır. Bununla birlikte, farelerde APC geninin karaciğere özgü bir bozulması, Wnt/ β -katenin yolunun aktivasyonuna ve ayrıca HCC'nin gelişmesine yol açmaktadır (Taniguchi vd., 2002: 4863).

Ayrıca, β -katenin mutasyonları taşıyan HCC'li hastaların hastalık seyrinin, β -katenin mutasyonları olmayan hastalara kıyasla ortalama olarak daha az agresif ve daha az invaziv bir tümör ilerlemesi ve daha iyi prognoz gösterdikleri için klinik olarak farklı olduğu gösterilmiştir (Terry vd., 1999: 6583)

Wnt/ β -katenin sinyallemeye ilişkili genlerin mutasyonlarının yanı sıra, Frizzled-reseptörlerinin farklı ekspresyonu ve yolun salgılanan inhibitörlerinin HCC gelişimine katkıda bulunduğu tekrar tekrar gösterilmiştir. Frizzled-7'nin aşırı ekspresyonu çoğu HCC'de baskın ve hepatokarsinogenezde erken bir olay olarak kabul edilmektedir. Dapper'ın (Dpr) insan homologu olan Wnt inhibitörü HDPR1, muhtemelen promotör bölgesindeki bir CpG adasının metilasyonu ve HDPR1 geninin ekson1'i nedeniyle HCC'nin %43'ünde gözlenmiştir. Salgılanan Frizzled ile ilişkili protein 1 promotör geninin (SFRP1) metilasyonu, HCC numunelerinin %75'inde bulundu ve promotörün metilasyonunun, SFRP1 ekspresyonunun aşağı regülasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir, bu da SFRP1 ekspresyonunun, gen promotörünün metilasyonu ile düzenlendiğini düşündürmektedir (Shih H. vd., 2006: 579).

1.8.4. TGF β Sinyal Yolağı

Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) sinyal yolu, hücre büyümesi, hücre farklılaşması ve apoptoz gibi birçok hücresel işlem için esastır. Karaciğerde, normalde parankimal olmayan stellat hücreler tarafından üretilen TGF- β 'nın ana işlevi, DNA sentezini inhibe ederek ve apoptozu indükleyerek yaralanmaya yanıt olarak hepatositlerin rejeneratif büyümesini sınırlamaktır (Romero-Gallo vd., 2005: 3028)

TGF β 'nin aşırı ekspresyonuna ve genel olarak TGF β 'nin büyümeyi sınırlayıcı fonksiyonuna rağmen karaciğer kanserinin neoplastik büyümesinin uyarılması tam olarak anlaşılamamıştır, ancak son zamanlarda kısmen tümörün TGF β fonksiyonuna bir yandan bölge ve bir anahtar üzerindeki direncine dair kanıtlarla açıklanmaktadır. TGF β 'den kaçmanın erken HCC gelişimi sırasında bir rol oynayabileceğine dair önemli kanıtlar, hedefle inaktive edilmiş

bir TGF β 1 aleli veya bir TGF β tip II reseptörü için heterozigot farelerden gelir. Bu hayvanlar, N-dietilnitrokosamin gibi kimyasal karsinojenlere karşı, yabani tiplere kıyasla daha fazla duyarlılık gösterir. TGF β R-II'nin karaciğer dokularında ekspresyonu, kronik hepatit veya karaciğer sirozu olan hastalarla karşılaştırıldığında HCC'li hastalarda önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. TGF β R-II cDNA'nın hepatoma hücre dizisi Huh7'ye transfeksiyonu, hücre arrestini ve apoptozu indüklemektedir (Ueno vd., 2001: 49).

Birkaç dokuda, TGF β 'nin tümör ilerlemesinde ve metastazında aktif bir rol oynadığı öne sürülmüştür. Örneğin, TGF β -1'i aşırı eksprese eden prostat kanseri hücreleri ile aşılınmış fareler, kontrollerden %50 daha büyük tümörlere sahiptir ve metastaz geliştirme olasılığı önemli ölçüde daha yüksektir. Bu bulguların bir sonucu olarak, birkaç kanserde karsinogenez sırasında TGF β etkisinin bir tümör baskılayıcı etkiden tümörü teşvik edici bir işleve geçiş yaptığı hipotezi öne sürülmüştür. Bununla birlikte, HCC'de böyle bir tümör teşvik edici etki henüz gösterilmemiştir (Steiner M. ve Barrack E., 1992: 15).

1.8.5. Ras Sinyal Yolağı

Aktive edilmiş Ras, sinyallerini bir sitoplazmik protein dizisi aracılığıyla aşağı doğru iletir. Önemli biyolojik, biyokimyasal ve genetik kanıtlar, Raf-1 serin/treonin kinazın Ras fonksiyonunun kritik bir efektörü olduğunu göstermiştir. Ras-Raf birliği, sitoplazmik Raf proteininin, sonraki olayların kinaz fonksiyonunun aktivasyonuna yol açtığı plazma zarına translokasyonunu teşvik eder. Bu olaylar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır keşfedilmeyi beklemektedir. Aktivasyon üzerine Raf, MAPK kinazları (MKK'ler) MEK1 ve MEK2'yi fosforile eder ve aktive eder. MEK1 ve 2, çekirdeğe translokasyondan sonra hem tirozin hem de treonin kalıntıları üzerinde ERK1 ve 2'nin fosforilasyonunu katalize eden ikili özgüllük kinazlardır. Bu aşağı akış hedefleri daha sonra büyüme, farklılaşma ve apoptoz dahil olmak üzere hücrel tepkileri kontrol eder.

Ras'ın ve P21 gibi sinyal yolunun üyelerinin aşırı ekspresyonu, HCC'nin araştırıldığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Ras yolunun inhibitörlerinin HCC'de aşağı regüle edilmektedir. Ras'ın HCC'de aşırı ekspresyonunun yanı sıra, Ras'ı aktif durumda kilitleyen Ras proto-onkogenlerinin mutasyonları da tanımlanmıştır. En sık araştırılan mutasyonlar, N-Ras kodonu 61, H-Ras kodonu 12 ve K-Ras kodonu 12 mutasyonudur. Sıçanlarda çeşitli kimyasal ajanların neden olduğu HCC'de sürekli olarak Ras mutasyonları gözlenmektedir. HCC'yi indükleyen bu kimyasallar, bleomisin ve 1-nitropiren, metil (asetoksimetil) nitrozamin, asetilaminofloren, 3-metil-(dimetilamino)'nun bir kombinasyonu olan N-nitrozomorfolin azobenzen ve

nitrogliserindir. Murin HCC modellerinden kaynaklanan bu verilere göre, vinil klorüre maruz kalan işçilerin tümör dokularının önemli düzeyde Ras mutasyonları içerdiği gösterildi ve bu da Ras mutasyonlarının HCC'deki rolüne dair kanıtları desteklemektedir.

HCC'de Ras yolunun aşırı ekspresyonunun bir sonucu olarak ve HCC'nin tedavisi için yeni terapötik hedefleri belirlemek amacıyla, çeşitli gruplar son zamanlarda yolun antisens RNA tarafından düzenlenmesi araştırılmaktadır. H-Ras için antisens tedavinin hepatokarsinogenezi önemli ölçüde inhibe ettiği ve ilgili hücrelerde/dokularda apoptozu yeniden oluşturabildiği defalarca bildirilmiştir (Teufel vd., 2007: 2271).

1.8.6. Retinoblastoma (Rb) Proteini

Tümör baskılayıcı protein retinoblastoma proteini (Rb), çeşitli kanser türlerinin gelişimi için kritik öneme sahiptir. Rb, birkaç kinaz tarafından fosforilasyonun hedefidir. Normal hücre sinyalleşmesinde Rb, hücre bölünmesini ve hücre döngüsü ilerlemesini önler. Özellikle Rb, hücre döngüsü boyunca S fazına ilerlemesini veya G1 boyunca ilerlemesini engelleyerek, hücrenin hasarlı DNA'yı kopyalamasını önler. E2F transkripsiyon faktörüne bağlı olan Rb, bir büyüme baskılayıcı görevi görür ve hücre döngüsü boyunca ilerlemeyi önler. Rb, hücre döngüsü ilerlemesini yalnızca fosforillenmemiş bir durumda inhibe eder. S fazına girmeden önce, sikline bağımlı kinazlar (CDK) ve siklinler Rb'i fosforile eder. Defosforile edilmiş Rb, transkripsiyon faktörü E2F'e bağlanır. Daha sonra, Rb'nin fosforilasyonu, E2F-DP'nin Rb'den ayrışmasıyla sonuçlanır. Serbest E2F daha sonra siklinler (Siklin E ve A) gibi hücre döngüsünü etkinleştiren faktörleri aktive ederek hücre döngüsünün ilerlemesine yol açabilir. Bu nedenle, mutasyona uğramış Rb'ye sahip hücreler, daha sonra kanserin gelişmesiyle sonuçlanan hücre döngüsü ilerlemesinde azaltılmış kontrole tabi tutulur. Ek olarak, Rb-E2F/DP kompleksi, kromatin ile ilişkilendirildiğinde DNA sentezini daha da baskılayan histon deasetilaz (HDAC) adı verilen bir proteini de bağlar. HDAC inhibitörleri son zamanlarda terapötik ajanlar olarak artan ilgi görmektedir. Ayrıca, birkaç virüsün onkoproteinleri Rb'yi bağlayabilir ve etkisiz hale getirebilir, bu da muhtemelen kanser gelişimine yol açar (Münger K. ve Howley P., 2002: 213)

Çeşitli kanser varlıkları için kanser farklılaşmasında Rb'nin rolü hakkında çok miktarda veri birikmiş olsa da Rb'nin HCC farklılaşmasındaki rolü hakkında yalnızca sınırlı veri mevcuttur. Rb'nin insan HCC hücre hatlarında ve HCC'lerin %28'inde inaktive olduğu gösterilmiştir. Eşzamanlı olarak, Rb ağındaki diğer üyeler de HCC'de önemli ölçüde anormal ekspresyon seviyelerine sahip olduğu bilinmektedir. Örneğin, fosforile edici ve inaktive edici Rb olan siklin D1/Cdk4, HCC'lerin %58'inde aşırı eksprese edilir. Ayrıca, Cdk4'e karşı

inhibisyon yoluyla Rb aktivitesinin düzenleyicisi olan p 16 proteini, HCC'lerin %34'ünde mevcut değildir. Tüm bu veriler, Rb düzenleyici ağının bozulmasının HCC karsinogenezinde yaygın ve önem sahibi olduğunu göstermektedir (Suh S. vd., 2000: 81).

1.8.7. HCC'de Gen Ekspresyonunun Genom-Ölçekli Analizi

Son yıllarda, HCC'nin genom çapında ekspresyon analizinden elde edilen çok sayıda mikrodizi veri seti yayınlanmıştır. Bu çalışmalar, HCC'nin farklılaşmasında veya gelişiminde bireysel genlerin yeni katılımlarını bildirmiştir. Genel olarak HCC gelişimi için çok önemli olan gen kümelerini, bireysel genleri ve yolları tanımlamak için, solid veya multinodüler gelişim, metastaz ve cerrahi rezeksiyondan sonra tümör nüksü çoklu mikrodizi deneyleri ile araştırılmaktadır. Bu deneyler, HCC farklılaşmasında temel rolleri yerine getirmek için birkaç gen kümesini ve çoklu genleri ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte, bu farklı mikrodizi deneyleri arasındaki karşılaştırma, bu deneylerin tümü, tümör gelişimi, metastaz veya nüksetme için gerekli olan çeşitli gen kümelerini tanımladığından, zor ve zaman alan çalışmalar olmaktadır. Bu nedenle, tümör gelişimine müdahale eden yeni düzenleyici hedefler olarak değerlendirilmek üzere seçilebilecek küçük bir anahtar düzenleyici gen alt kümeleri tanımlamaya yönelik çalışmalar hala devam etmektedir (Nam S. vd., 2006: 239).

1.8.8. HCC'de DNA Metilasyonu

Somatik mutasyonların aksine, metilasyondaki, özellikle tek tek genlerin promotör bölgelerindeki değişiklikler, DNA sekansında değişiklik olmaksızın gen ekspresyonunu düzenleyebilir. Metilasyon, ağırlıklı olarak CpG nükleotitlerinde olmak üzere sitozin nükleotitlerinde meydana gelebilir ve metil grubu, üç metiltransferazdan (DNMT 1, DNMT3a ve DNMT3b) biri tarafından pirimidin halkasına eklenebilir. Bu metilasyonlar hücre bölünmesinden geçer. Promotörlerin metilasyonu, transkripsiyon faktörlerinin ve diğer düzenleyici mekanizmaların bağlanmasına müdahale edebilir. Daha sonra promotör bölgelerin ilerleyici metilasyonu, karşılık gelen genin ekspresyonunun azalmasına neden olabilir. Kanserde, genom çapında bir hipometilasyona lokalize hipermetilasyon ve DNA metiltransferaz ekspresyonunda bir artışın eşlik ettiği bir "metilasyon dengesizliği" sıklıkla gözlenmektedir.

HCC'nin patogenezinde değiştirilmiş metilasyonun araştırılması, metilasyon analizi için yüksek verimli tekniklerin bulunmaması nedeniyle araştırılan tek tek genlerle sınırlı kalmaktadır. HCC'deki metilasyondaki değişiklikler için araştırılan 133 gen üzerinde yapılan bir çalışmada, 32'si çoğunlukla hipermetile olduğu, sadece birkaçı hipometile olduğu tespit

edilmiştir. Bu değiştirilmiş metilasyon profillerinin, ekspresyon profillerinde ve genetik ağların işlevinde önemli değişikliklere yol açıp açmadığı veya bu değişikliklerin sadece ciddi epigenetik rahatsızlıklara işaret edip etmediği araştırılmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, bu genler, HCC'deki diferansiyel ekspresyona göre analizden önce seçildiğinden, değiştirilmiş metilasyonun, HCC'nin farklılaşmasına önemli ölçüde katkıda bulunduğu önerilmektedir. Bu nispeten büyük gen setinin yanı sıra, sadece birkaç gen tekrar tekrar bireysel olarak araştırılmış ve HCC'de hipermetile olduğu bildirilmiştir. Böylece, SFRP1, RUNX3, RASSF1, OCT6, AR, P73, MYOD1 ve P16INK4a geninin tüm HCC'lerin yarısından fazlasında hipermetile olduğu rapor edilmiştir (Yu J. vd., 2003: 319).

2. Çalışma Kapsamında Araştırılan Genler

2.1. Nükleer Solunum Faktörleri 1-2 (NRF-1 ve NRF-2)

Çoklu mitokondriyal fonksiyonların ifadesinde rol oynayan ilk omurgalı düzenleyici faktörler, nükleer solunum faktörleri, NRF-1 ve NRF-2'dir. NRF-1, sitokrom c promotöründe bir palindromik diziye bağlanması yoluyla tanımlanmıştır ve daha sonra solunum zincirinin ekspresyonu ve işlevi için gerekli birçok genin ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir. NRF-1, nükleer kodlanmış mitokondriyal genleri düzenlemek için peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör gama, koaktivatör 1 alfa (PGC-1 α) dahil olmak üzere koaktivatörlerle etkileşime giren bir transkripsiyon faktörüdür (Klinge, 2020: 101435).

Nükleer solunum faktörü 1 (NRF1), birden fazla nükleer kodlu elektron taşıma zinciri proteinini bir transkripsiyon faktörüdür. Ek olarak NRF1, peroksizom proliferatörü ile aktive edilen reseptör gama koaktivatörü 1 α (PGC-1 α) ile koaktivasyon yoluyla mtDNA transkripsiyonunun ekspresyonunun düzenlenmesinde dolaylı olarak yer alır. Bu nedenle, NRF1 mitokondriyal biyogenezde önemli bir rol oynar. NRF1 hedef genlerinin, DNA hasar onarımı, protein translasyon başlangıcı ve ubiquitin aracılı protein degradasyonu dahil olmak üzere ektramitokondriyal biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynadığını tanımlamıştır (Satoh vd., 2013: 139). NRF1 ayrıca meme kanseri teşhisi ve prognozu için değerli bir biyobelirteç olarak tanımlanmıştır (Ramos vd., 2018: 469).

NF-E2 ile ilişkili faktör 2 (NRF2) transkripsiyon faktörü, oksidatif strese bağlı olarak aktive edilir, NRF-2 karaciğeri oksidatif stresten korumak için hareket ettiği aynı zamanda, anormal şekilde aktive olması hepatomegali ve HCC gelişimini indüklediği ileri sürülmektedir. RF2 transkripsiyonel aktivitesinin, çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyerek karaciğer kanseri gelişimini desteklediği öne sürülmüştür. Oksidatif stres sırasında hücreler, geniş bir

sitoprotektif gen dizisinin ekspresyonunu yukarı regüle eden adaptif bir yanıt başlatır (He vd., 2020: 1182). NRF2 ve Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1'in (KEAP1) protein etkileşiminin, karaciğer homeostazını korumak için NRF2'ye bağlı oksidatif stres tepkisini düzenlediği bilinmektedir. Oksidatif stres varlığında KEAP1 sitoplazmada parçalanır ve bozunma nedeniyle KEAP1'den NRF2 salınır (McMahon vd., 2003: 21592).

Daha sonra, NRF2 fosforile edilir ve çekirdeğe yer değiştirir ve küçük muskuloaponevrotik fibrosarkoma onkogen homolog (Maf) proteinleri ile heterodimerizasyondan sonra antioksidan yanıt elemanına (ARE) bağlanarak bir dizi sitoprotektif geni indükler (Huang vd., 2002: 42769). Daha da önemlisi, birkaç çalışma, somatik mutasyonların NRF2'nin kodlama bölgesinde meydana geldiğini ve çeşitli kanserlerde kötü prognozlarla ve genel olarak düşük hayatta kalma oranlarıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (Kerins ve Ooi, 2018: 12846). Mutasyonlar çoğunlukla NRF2'nin DLG veya ETGE motiflerinde bulunur ve NRF2'nin KEAP1'e bağlanma yeteneğini bozduğu ve bunun da NRF2'nin anormal nükleer birikimine yol açtığı bildirilmiştir (Guichard vd., 2012: 694).

HepG2 HCC hücreleri, MAPK-JNK yolunun aktivasyonuna bağlı olarak apoptoz indüksiyonu ile birlikte azalmış Glutasyon-SH ve Bcl2 seviyeleri ve artan NRF2 ekspresyonu sergiler. Bu çalışmalar, çoklu hücre içi sinyal yollarının oksidatif stres tarafından aktive edildiğini ve özellikle kanserojen veya antikanserojenik yolların bağlama bağlı bir şekilde tetiklendiğini göstermektedir (Nguyen vd., 2013: 114).

Kanser hücrelerinde, NRF2'nin anormal aktivasyonu, glikoz metabolizma yollarında yer alan anahtar genleri düzenleyerek metabolik adaptasyonlarına yardımcı olur. NRF2'nin glikoz metabolizmasının düzenlenmesi üzerindeki etkisinin kısmen miR-1 ve miR-206'nın transkripsiyonunu baskılamak yoluyla olduğu bildirilmiştir. miR-1 ve miR-206, PPP'nin (pentoz fosfat yolu) hedef genlerini düzenler (Sing vd., 2013: 2921). NRF2 anormal aktivasyonunun neden olduğu bu miRNA ekspresyonunun baskılanmasının, glikoz metabolizması eksikliği yoluyla tümör gelişimini artırabileceğini öne sürülmektedir. Ek olarak, miR-1'in bastırılmış ifadesinin de karaciğer kanseri hücre büyümesinde önemli olduğu ileri sürülmüştür (Datta vd., 2008: 5049).

2.2. Peroksizom proliferatörü ile aktive edilen reseptör gama koaktivatörü 1 alfa (PGC-1 α)

Peroksizom proliferatörü ile aktive edilen reseptör gama koaktivatörü 1 alfa (PGC-1 α), mitokondriyal biyogenez ve solunum fonksiyonunun transkripsiyonel kontrolünü yöneten düzenleyici bir ağda merkezi bir rol oynayan önemli bir koaktivatördür (Scarpulla, 2011: 1269).

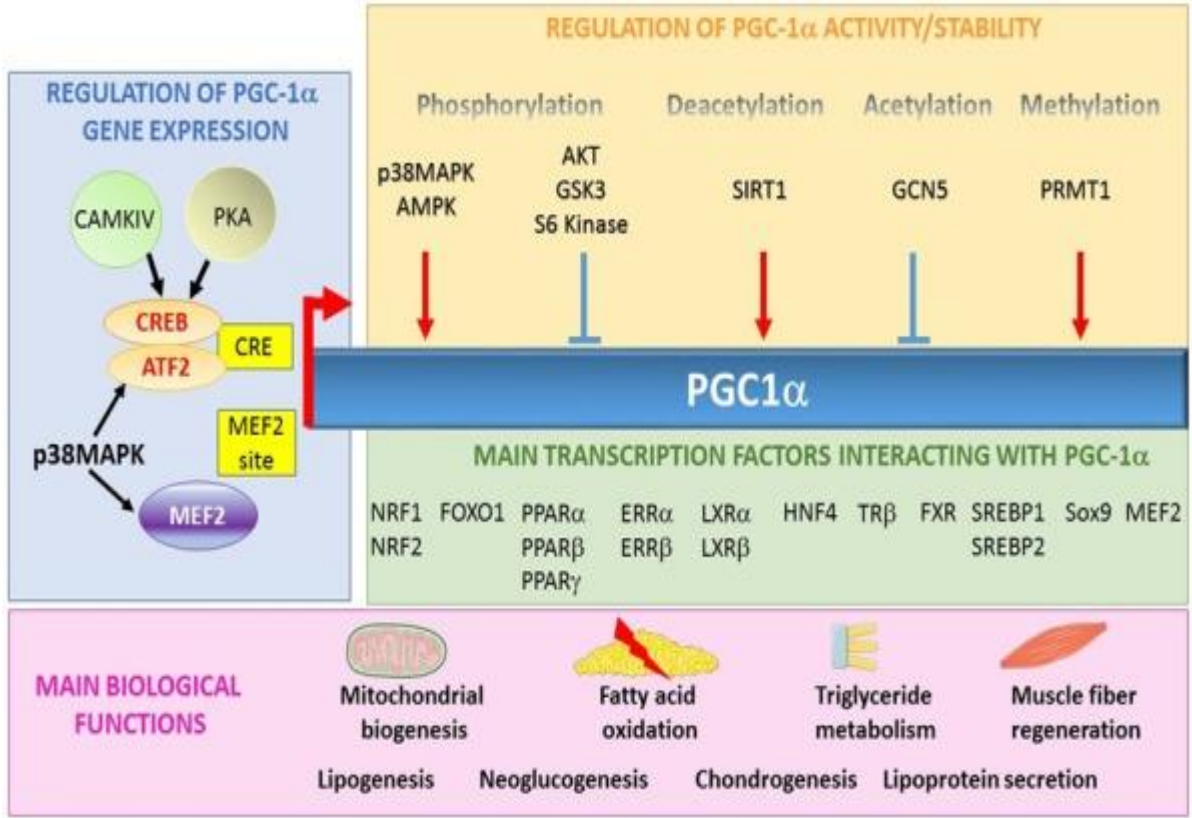
PGC-1 α , hücre metabolizmasının merkezi bir modölatörüdür. Mitokondriyal biyogenezi ve oksidatif metabolizmayı düzenler. Hücresel metabolizmadaki modifikasyonlar ve adaptasyonlar, kanser hücrelerinin ayırt edici özellikleridir, dolayısıyla PGC-1 α 'nın kanserde rol oynaması şaşırtıcı değildir. PGC-1 α 'nın diyabet, nörodejenerasyon ve kardiyovasküler hastalıkta rol oynadığı iyi bilinmektedir (Bost ve Kaminski, 2019: 198).

PGC-1 ailesinin ilk üyesi olan PGC-1 α , 1990'ların sonunda tanımlanmıştır ve mitokondri açısından zengin ve özelleşmiş bir doku olan kahverengi yağ dokusunda, termojenezde peroksizom proliferatörle aktive olan reseptör- γ (PPAR γ) transkripsiyon faktörü ile etkileşime girdiği bulundu (Puigserver vd., 1998: 829). PGC-1 α , ekspresyonu, kahverengi adipoz dokuda ve iskelet kasında soğuğa maruz kalmaya tepki olarak indüklenen, dekuplaj eden mitokondriyal proteinlerin ekspresyonu ile bağlantılı olarak indüklenen bir transkripsiyonel koaktivatördür (Lin vd., 2002: 1645).

PGC-1 α 'nın ifadesi ve aktivitesi, çevresel ve fizyolojik uyarılar tarafından kontrol edilir. Sıcaklık, daha spesifik olarak soğuğa tepki, cAMP sinyal yolu ve protein kinaz A (PKA) aktivasyonu yoluyla kahverengi adipoz doku ve kasta PGC-1 α ekspresyonunun ana indükleyicisidir (Puigserver vd., 1998: 829).

PGC-1 α , hücrenin enerji durumuna çok duyarlıdır. Hücresel AMP seviyelerinin bir sensörü olan AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) tarafından ince bir şekilde düzenlenir. AMPK, egzersiz sırasında kas dokusunda aktive olur ve mitokondriyal biyogenezi ve metabolizmayı artırır. AMPK'nin aracılık ettiği mitokondriyal aktivasyon, PGC-1 α aktivitesi gerektirir (Knutti vd., 2001: 9713). Benzer şekilde, açlık, PGC-1 α 'nın ifadesini düzenlediği bilinen başka bir çevresel sinyaldir. Karaciğerde, cAMP ve CREB aktivasyonunu indükleyen bir pankreatik hormon olan glukagona yanıt olarak PGC-1 α 'nın ekspresyonu artar (Herzig vd., 2001: 179).

PGC-1 α 'nın transkripsiyonel aktivitesi ayrıca, kromatini yeniden şekillendirebilen ve gen transkripsiyonunu aktive edebilen kompleksleri toplama kabiliyetini olumlu veya olumsuz etkileyen translasyon sonrası modifikasyonlarla da modüle edilebilir. Bu translasyon sonrası modifikasyonlar, fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon ve her yerde bulunmayı içerir ve yalnızca PGC-1 α 'nın aracılık ettiği yanıtın yoğunluğunu modüle etmekle kalmaz, aynı zamanda hangi transkripsiyon faktörünün PGC-1 α ile etkileşime gireceğini de belirler (Bost ve Kaminski, 2019: 198).



Şekil 2.2. PGC-1 α 'nın Ko-Aktivatör Olarak Görev Aldığı Biyolojik Reaksiyonlar

Kaynak: (Bost ve Kaminski, 2019: 198)

PGC-1 α 'nın uyarılması, soğuk algınlığı, uzun süreli egzersiz veya açlık gibi fizyolojik durumlarla ilişkilidir. Bu koşullarda, yağ asitleri hücreler için tercih edilen enerji substratı haline gelir. Bu nedenle, PGC-1 α , PPAR α yoluyla yağ asidi oksidasyonunda yer alan genlerin ekspresyonunu kontrol eder (Leone vd., 2005: 101). PGC-1 α , yağ asitlerinin hücreye (CD36 aracılığı ile) ve ardından nihai olarak oksitlendikleri mitokondriye (CPT1 aracılığı ile) girmesine izin veren yağ asidi taşıyıcıları CD36 ve karnitin palmitoiltransferaz I'nin (CPT1) ekspresyonunu indükler. β -oksidasyonun düzenlenmesi için PGC-1 α 'nın ortakları olarak PPAR α ve östrojenle ilişkili reseptör alfa (ERR α) adında iki transkripsiyon faktörü tanımlanmıştır (Bost ve Kaminski, 2019: 198).

Mitokondriyal biyogenez ve oksidatif fosforilasyondaki rollerine ek olarak, PGC-1 α ayrıca glikoz metabolizmasının düzenlenmesinde de yer alır. İskelet kasında PGC-1 α 'nın indüklenmesi, bu hücrelerde glukoz alımını artıran MEF2 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu yoluyla glukoz taşıyıcı 4'ün (GLUT4) ekspresyonunu aktive eder (Michael vd., 2001: 3820). Hücre içi glikoz konsantrasyonundaki bu artış, glikolizde bir azalma ve glikojen depolanmasında bir artış ile birleşir (Wende vd., 2007: 36642).

Mitokondriyal solunum zinciri yoluyla oksidasyondaki herhangi bir artış, bunun sonucunda ROS üretimi ile ilişkilidir. Artan ROS seviyeleri, genotoksik strese ve hücre ölümüne yol açabilir. Sonuç olarak, hücreler bu potansiyel olarak toksik türlere karşı savunma mekanizmaları geliştirmiştir. PGC-la, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi, ROS'un detoksifikasyonunda yer alan çeşitli enzimlerin ekspresyonunu indükleyerek ROS seviyelerinin düzenlenmesinde yer alır (Chen vd., 2011: 7199). PGC-la'nın bu antioksidan enzimleri indükleme yeteneği, ROS'un neden olduğu hücre hasarına ve hücre ölümüne karşı koruma için gereklidir (St-Pierre vd., 2006: 397).

2.3. Nükleer faktör kappa B (NFκB)

Nükleer faktör kappa B (NFκB), hücrel farklılaşması, proliferasyon, sağkalım ve bağışıklık yanıtı gibi inflamatuvar yanıtların koordinasyonunu sağlayan dimerik transkripsiyon faktörleri ailesidir. NFκB'nin yanlış düzenlenmesi, kanserden inflamatuvar ve immün bozukluklara kadar çok çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak, NFκB düzenleyici ağı ve dinamikleri, keşfedilmeyi ve klinik kullanıma çevrilmeyi bekleyen çok sayıda umut verici terapötik hedef sunmaktadır (Mitchell vd., 2016: 227).

NF-κB, inflamatuvar yanıtın anahtar transkripsiyon düzenleyicisidir ve karaciğerde inflamatuvar sinyal yollarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Karin ve Been-Nariah, 2000: 621). İlk olarak NF-κB, alkolik karaciğer hastalığı, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), viral hepatit ve biliyer karaciğer hastalığı dahil olmak üzere hemen hemen her kronik karaciğer hastalığında aktive olur (Kosters ve Karpen, 2010: 186). NF-κB, hepatositler, Kupffer hücreleri ve hepatik stellat hücrelerde (HSC'ler) çoklu temel fonksiyonları düzenler. Farklı NFκB sinyal bileşenlerinin genetik inaktivasyonu, spontan yaralanma, fibroz ve karsinogenezi içeren karaciğer fenotipleriyle sonuçlanır; bu, NF-κB'nin karaciğer homeostazına ve yara iyileşme süreçlerine önemli bir katkı yaptığını düşündürür (Luedde vd., 2007: 119).

NF-κB kronik inflamasyon ve fibroz üzerinde etkileri olan ve HCC gelişimine zemin hazırlayan bir transkripsiyon faktörüdür. NF-κB'nin hepatokarsinogenez üzerindeki etkilerinin, hücre tipine ve NF-κB aktivasyon veya inhibisyon derecesine güçlü bir şekilde bağlıdır. NF-κB'nin parankimal olmayan hücrelerde aktivasyonu genellikle inflamasyonu, fibrozisi ve hepatokarsinogenezi teşvik ederken, parankimal hücrelerde NF-κB aktivasyonunun baskılanması bazı ortamlarda hepatokarsinogenezi teşvik ederken diğerlerinde hepatokarsinogenezi inhibe eder (Luedde ve Schwabe, 2011: 108).

HCC'nin gelişiminde çoklu genetik ve epigenetik değişiklikler yer alır. Birçok çalışma, oksidatif stresin, normal hücrel redoks homeostazını bozarak tümörün başlaması ve ilerlemesiyle bağlantılı nedenlerden biri olduğunu ortaya koymuştur (Sakurai vd., 2008: 156).

Oksidatif stres ayrıca mitokondriyal disfonksiyonu indükler, telomer kısalmasını hızlandırır, DNA hasarına neden olur ve HCC'de apoptoza özgü genlerin mutasyonları ile ilişkilidir (Wiemann vd., 2002: 935). Hepatik inflamasyon sırasında Kupffer hücreleri tarafından üretilen artan reaktif oksijen türleri (ROS), karaciğer patolojilerinin ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (Vrba ve Modrianský, 2002: 15). Benzer şekilde, oksidatif stres, hücre içi sinyal yollarını bozar ve HCC'ye katkıda bulunur. Nükleer faktör-kappa beta (NF- κ B), peroksizom proliferatörle aktive olan reseptör alfa (PPAR α), mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (ERK) ve dönüştürücü büyüme faktörü β 1 (TGF- β 1)'deki değişiklikler) oksidatif strese bağlı yollar, genel olarak HCC ile ilişkilidir, çünkü tüm bu yollar, hücrel proliferasyon ve hayatta kalma aktivasyonunda yer alır (Mahmoudvand vd., 2019: 42). Ayrıca, HCV enfeksiyonu, ROS üretimi ve p38-MAPK, ERK ve JNK aktivasyonu yoluyla NF- κ B ve TGF- β 1 ekspresyonunu artırır ve böylece hepatik fibrozisin gelişimini destekler (Lin vd., 2010: 2509). DEN/CC14 ile indüklenen hepatokarsinogenezin kemirgen modelleri, karaciğere özgü NF- κ B ve TGF- β 1/Smad3 sinyallemesinde önemli bir artış gösterir (Mahmoud vd., 2017: 146).

Anatomik konumu nedeniyle karaciğer, bağırsak kaynaklı patojenlerin ve ürünlerinin birincil hedefidir ve sıklıkla sistemik enfeksiyonlara karışır (Schwabe vd., 2006: 1886). Bu bakteriyel ürünlerin çoğu ve Tümör Nekroz Faktör (TNF) gibi sitokinler hepatositler için toksiktir, bu da karaciğer hasarını önlemek için bu inflamatuvar mediatörlere hepatik tepkinin sıkı bir şekilde düzenlenmesi gerektiği anlamına gelir (Luedde ve Trautwein, 2006: 1163). İlginç bir şekilde NF- κ B, bu araçlara hem proinflamatuvar hem de antiapoptotik yanıtlara aracılık ederek, uygun inflamatuvar ve immün yanıtlar başlatılırken hepatositlerin hücre ölümünden korunmasını sağlar. NF- κ B yolunun ikili işlevi, hassas bir denge gerektirir, çünkü çok az veya çok fazla NF- κ B aktivasyonu, artan iltihaplanma veya hücre ölümüne karşı yetersiz koruma nedeniyle karaciğer üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabilir. Buna göre NF- κ B yolu, hepatit ve hepatokarsinogenez gibi kronik karaciğer hastalığının birçok yönüne nedensel olarak dahil olur (Luedde ve Schwabe, 2011: 108).

3. Çalışma Kapsamında Araştırılan MitomiR'ler

MikroRNA'lar (miRNA'lar), kök döngü yapılarına sahip endojen öncü RNA'lardan işlenen, 21-23 nükleotit uzunluğunda, kodlama yapmayan, tek sarmallı RNA'lardır. MiRNA'lar, translasyonu inhibe etmek veya mRNA'yı destabilize etmek ve hedef genlerin ekspresyonunu sıklıkla ve negatif olarak düzenlemek için haberci RNA'nın (mRNA) 3'-çevrilmemiş bölgesi (3'-UTR) ile baz çifti oluşturabilir. MiRNA'ların, tüm insan genlerinin %10 ila %30'u kadar protein ekspresyonunu düzenleyebileceği tahmin edilmektedir. Normalde miRNA'lar organ gelişimi, hücre farklılaşması ve proliferasyonu, apoptoz ve kanser hücresi istilası gibi çok önemli biyolojik süreçlerde önemli roller oynar. Son birkaç yılda, miRNA'ların düzensiz ifadesi, kanser dahil birçok hastalıkta geniş çapta rapor edilmiştir. MiRNA'ların, tümör oluşumunu düzenlemede yeni ve önemli bir role sahip olduğu kanıtlanmıştır ve bunların, tümör metastazı da dahil olmak üzere kanserin ilerlemesinin çeşitli yönlerinde önemli roller oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmalar, HCC ilerlemesi sırasında anormal şekilde eksprese edilen miRNA'lar, özellikle HCC metastazı ile ilişkili miRNA'lar hakkında kapsamlı araştırmalar yapmanın önemini göstermektedir (Liu vd., 2017: 520).

Son zamanlarda MitomiR olarak adlandırılan bazı miRNA türlerinin, spesifik olarak mitokondride mevcut olduğu tanımlanmıştır. Bu MitomiR'lerin çoğu çekirdek orjinlidir, fakat bazıları mitokondriyal genomdan türetilen mRNA moleküllerinden kaynaklanır. MitomiR'lerin mitokondri ile ilişkisi türe ve hücre tipine göre değişiklik gösterir. MitomiR'ler çeşitli doku ve hücrelerde mitokondride bulunmaktadır ve miRNA'lardan farklı termodinamik özelliklere sahip oldukları düşünülmektedir. Mitokondri, çeşitli deneylerle gösterilen ayrı ve benzersiz bir MitomiR havuzuna sahiptir. Mitokondride, MitomiR'lerin anormal ekspresyonunun kanser özelliklerinin ortaya çıkmasıyla ilişkili olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca MitomiR'ler, mRNA ekspresyonunu düzenleyerek kanser hücresi metabolizmasının kontrolünde önemli bir rol oynar. Birkaç onkogenik sinyal yolunu düzenlerler ve hücresel metabolizmadaki anahtar taşıyıcıları veya enzimleri hedeflerler (Renceli vd., 2021: 379).

Mitokondriyal reaktif oksijen türleri (mROS), metabolik yol sinyalleşmesine aracılık eder; bu yollardaki değişiklikler, kronik karaciğer hastalıklarının ve tümörlerin gelişimini ve ilerlemesini etkiler (Mansouri vd., 2018: 629). Mitokondriyal metabolizma, kanser metastazı ve tedavi direnci için hem avantajlı hem de zararlı olabilir (Valcarcel-Jimenez vd., 2017: 748). Son zamanlarda ortaya çıkan çalışmalar, fonksiyonel mitokondrilerin kanser hücreleri için gerekli olduğunu göstermiştir (Vyas vd., 2016: 555). Kanser hücrelerindeki mitokondri, yapı ve işlev bakımından normal mitokondriden farklıdır (Gogyadze vd., 2008: 165). Enerji ve

metabolik mekanizmalardaki klasik rolün ötesinde, birçok kanserde hem mitokondriyal DNA (mtDNA) kusurları hem de artmış mitokondriyal fizyon bildirilmiştir (Srinivasan vd., 2017: 602). Daha da önemlisi, mitokondriyal biyogenez ve kalite kontrol kanserlerde sıklıkla yukarı regüle edilir ve onkojenik sinyal yollarında kritik bir rol oynar (Zong vd., 2016: 667).

3.2. miR15-a/miR16-1

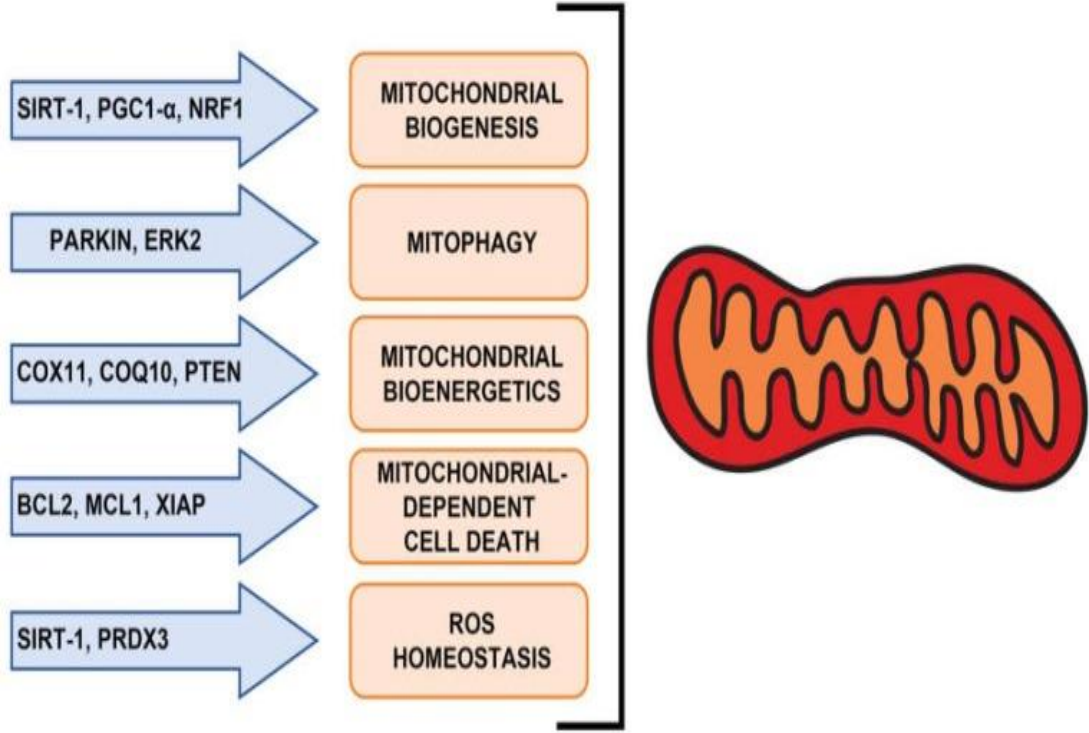
MitomiR ailesinden; miR-15a ve miR-16-1 (miR-15a/16-1), mitokondriyal fonksiyonun düzenlenmesi yoluyla apoptozu indükler. 13q14 kromozomal bölgesinde bir küme olarak bulunurlar ve kronik lenfositik lösemide sıklıkla silinirler veya aşağı yönde regüle edilirler. miR-15a ve 16-1, Bcl-2 ve Mcl1 dahil olmak üzere çoklu onkojenik aktiviteleri düzenler. Ayrıca miR-15a, sitozole sitokrom c salınımı ve mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması ile gösterilen mitokondriyal disfonksiyonu teşvik eder (Li vd., 2012: 1104).

miR-15a, HCC hücrelerinde ve dokularında, özellikle metastatik karaciğer kanseri hücrelerinde önemli ölçüde azalır; artan FOS ve Met ifadesi ile sonuçlanır. Ayrıca, miR-15a'nın ifadesi, HCC dokularında önemli ölçüde azaldığı ve bu ifade, tümörün TNM evresi ile negatif korelasyon gösterdiği raporlanmıştır. Ayrıca, bu aşağı regülasyon, hastalarda düşük metastazsız sağkalım ile lenf düğümü metastazına neden olur (Liu vd., 2017: 520).

Son zamanlarda birçok çalışma, miR-16 ve miR-122'nin ekspresyon düzeylerinin HCC'de önemli ölçüde farklı olduğunu bildirmiştir, ancak bulgular genellikle tartışmalıdır. miR-16'nın bir tümör baskılayıcı olarak hareket ettiği ve HCC dahil olmak üzere çeşitli insan kanserlerinde aşağı regüle edildiği düşünülmektedir. Serum miR-16'nın HCC hastalarında siroz ve sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede düşük olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte, başka bir çalışmada araştırmacılar, HCC grubunun serumundaki miR-16'nın kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bulmuşlardır (Fang vd., 2022: 24541).

3.3. miR181-c

MitoMir ailesinden; miR181-c mitokondriyal oksidatif metabolizmada görev alan ve mitokondriyal enerji metabolizmasını düzenleyen önemli bir miRNA'dır. miR181-c nükleer genomdan kaynaklanır, sitozolde işlenir ve mitokondriye çevrilir. miR181c'nin aşırı ekspresyonu mitokondriyal birimler arasında bir dengesizliğe neden olarak ROS oluşumunu teşvik eder (Das vd., 2012: 1596).



Şekil 2.3. miR-181 Ailesi Üyelerinin Mitokondriyal Homeostazda Kontrol Ettiği Yollar

Kaynak: (Indrieri vd., 2020: 2092)

Hepatik kanser kök hücreleriyle ilişkili mikroRNA'ları tanımlamak için genom çapında yapılan bir taramada, dört olgun miR-181 aile üyesinin (miR-181a, miR-181b, miR-181c, miR-181d) yirmi Hepatoselüler karsinom (HCC) vakasının yanı sıra HCC kök hücrelerinde ve progenitörlerinde önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. Dört miR-181 aile üyesinin hepsinin, iki hepatik transkripsiyon düzenleyiciyi, yani CDX2 ve GATA6 ve Wnt sinyal inhibitörü NLK'yı aşağı regüle ederek HCC kök hücrelerinin korunmasında önemli roller oynadığını raporlanmıştır. Ayrıca miR-181 üyeleri ile Wnt yolu arasındaki ilişki, Wnt/beta-katenin sinyalinin HCC'de miR-181 ekspresyonunun ana transkripsiyon düzenleyicisi olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmanın in vivo fare fare modelinde tümörjenik in vitro tahliller kullanarak miR-181b ve miR-181d'nin hepatokarsinogenez ile anlamlı bir ilişkisini bildirilmiştir. Özellikle, TGFβ yolağının miR-181b'nin transkripsiyonunu modüle ettiği ve

bunun da tümör baskılayıcı TIMP3'ü hedefleyerek HCC hücrelerinin anti-kanser ilacı doksorubisine direncini ve tümörijenisitesini artırabildiğini gösterilmiştir (Wang vd., 2010: 1787).

Bu bulgular, NRF1, NRF2, PGC-1 α ve NF κ B gibi çeşitli genlerin ve mikroRNA'ların düzenlenmesi yoluyla karaciğer kanseri hücre büyümesinin desteklenmesinde önemli roller oynadığını göstermektedir.

4. Çalışma Kapsamında Araştırılan İlaçlar

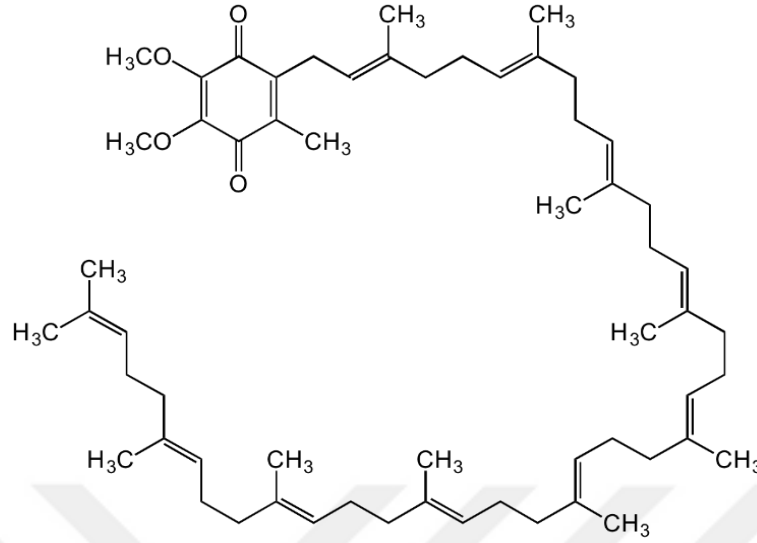
4.1. Koenzim Q10 (CoQ10)

Sağlıklı yaşam trendi ve artan günlük aktivitelerin sonucu olarak bireyler takviye ve destek gıdalara daha fazla ihtiyaç duymaktadır. Bu trendin sonucunda rağbet edilen bu gıda takviyeleri, etkinlikleri konusunda bilimsel olarak araştırılma ihtiyacı duymaktadır. Koenzim Q10 (CoQ10), en çok kullanılan üçüncü takviye olarak ve çeşitli bulaşıcı olmayan hastalıkların tedavisinde tercih edilen önemli bir suplemanttir (Arenas-Jal vd., 2020: 574).

Koenzim Q10 (CoQ10) veya ubiquinone, elektron ve proton taşıyıcısı olarak mitokondriyal biyoenerjetteki anahtar rolüyle biliniyordu; fakat daha sonraki çalışmalar, diğer hücre zarlarında ve kan plazmasında varlığını gösterdi ve antioksidan rolünün kapsamlı bir şekilde araştırılmasının önünü açtı. Bu iki işlev, CoQ10'un klinik endikasyonunu desteklemenin temelini oluşturmaktadır. Ayrıca, son veriler CoQ10'ın insan hücre sinyalizasyonu, metabolizması ve taşınmasında yer alan genlerin ekspresyonunu etkilediğini ve CoQ10 takviyesinin bazı etkilerinin bu özellikten kaynaklanabileceğini göstermektedir. CoQ10 eksiklikleri otozomal çekinik mutasyonlar, mitokondriyal hastalıklar, yaşlanmaya bağlı oksidatif stres ve karsinogenez süreçlerinden ve ayrıca statin tedavisinin ikincil etkisinden kaynaklanmaktadır. Birçok nörodejeneratif bozukluk, diyabet, kanser, fibromiyalji, kas ve kardiyovasküler hastalıklar düşük CoQ10 seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir (Garrido-Maraver vd., 2014: 619).

Koenzim Q10 (CoQ10), yan zincirinde 10 izoprenil birimi bulunan ve adenosin trifosfat sentezi için mitokondriyal solunum zincirinin anahtar bileşeni olan, lipidde çözünen bir benzokinondur. Ek olarak koenzim Q10, membran fosfolipidlerini, mitokondriyal membran proteinini ve LDL-C'yi (düşük yoğunluklu lipoprotein-kolesterol) serbest radikal kaynaklı oksidatif hasardan koruyan hücre içi bir antioksidandır. İn vivo çalışmalar, koenzim Q10'un sıçanların karaciğer dokusunda hepPar-1, alfa-fetoprotein, indüklenabilir nitrik oksit sentaz,

siklooksijenaz-2 ve nükleer faktör- κ B (NF- κ B) ekspresyonunu modüle ederek terapötik ve kemoterapötik etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Liu vd., 2016: 85).



Şekil 2.4. Koenzim Q10 (CoQ10) Kimyasal Yapısı

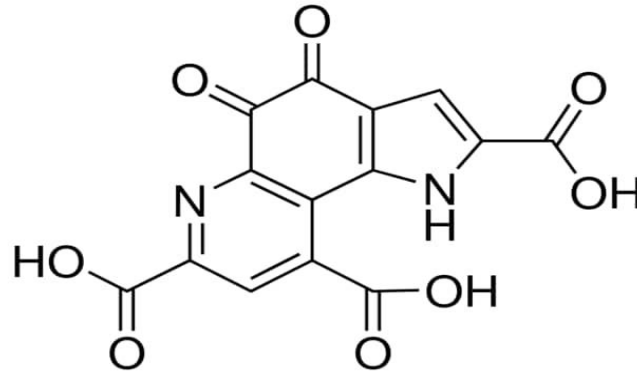
Kaynak: (Chemodex.com, 2023)

4.2. Pirolokinolin kinon (PQQ)

Pirolokinolin kinon (PQQ) 1979'da gram-negatif bakterilerden keşfedilmiştir ve kivi ve yeşil biber gibi meyve ve sebzelerde ve anne sütünde bulunduğu bilinmektedir. 2016'da PQQ'nun yeni bir memeli laktat dehidrojenaz (LDH) koenzimi olduğu bildirilmiştir. PQQ'nun bir antioksidan etki, hücre büyümesini teşvik edici bir etki ve mitokondriyogenez üzerinde uyarıcı bir etki dahil olmak üzere çeşitli etkileri vardır. PQQNa₂, PQQ'nun en yaygın kaynağıdır ve fonksiyonel bir gıda olarak kullanılır. PQQ'nun antioksidan etkisinin kinon parçasının indirgeyiciliğine bağlı olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, PQQNa₂ (oksitlenmiş PQQ) ve indirgenmiş PQQ'nun (PQQH₂) diğer etkilerinin mekanizmaları hala belirsizdir. PQQ çok yüksek bir reaktiviteye sahiptir ve amino grubu içeren maddelerle kolayca reaksiyona girer ve bir imidazol iskeleti oluşturarak imidazol pirolokinoline (IPQ) dönüştüğü rapor edilmiştir. Glisin varlığında, PQQ'nun %100'ü IPQ'ya dönüştürülür. İn vivo olarak IPQ oluşturmak için amino grubu içeren bir madde ile reaksiyona girebilir. IPQ'nun bazı biyolojik aktiviteleri hücre büyümesini destekleyici aktivite ve serbest radikal süpürme aktivitesi gibi özelliklere sahip bir bileşin olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, IPQ'nun biyolojik aktiviteleri hala ayrıntılı olarak araştırılmamıştır. PQQ içermeyen bir diyetle beslenen farelerin ve sıçanların mitokondri miktarının azaldığı gösterilmiştir. Fare Hepa1-6 hücreleri kullanılarak, PQQ'nun, CREB'nin (cAMP'ye yanıt veren element bağlayıcı protein) fosforilasyonu ve

PGC1 α 'nın (peroksizom proliferatör aktive edilen reseptör γ ko-aktivatör-1 α) mRNA ve protein ekspresyon seviyelerini artırarak mitokondriyal biyogenezi uyarmaktadır (Yamada vd., 2020: 03240).

Pirolokinolin kinon (PQQ) , çevresel maruziyetler ve diyet yoluyla, temel biyolojik süreçleri, mitokondriogenezi, üremeyi, büyümeyi ve yaşlanmayı etkiler. PQQ özellikle yağ asidi metabolizması ve mitokondriyal fonksiyon için gerekli olan genler tarafından hedeflenir. PQQ, PGC-1 α ve nükleer solunum faktörleri (NRF-1 ve NRF-2) gibi diğer transkripsiyonel arttırıcıların bir araya getirilmesini sağlayarak bir transkripsiyonel koaktivatör olarak görev yapar. Bu tür faktörler, enerji homeostazını sürdürmek ve antioksidan yanıt genlerini bağlamak için gerekli için olan gerekli elementlerdir (Jonscher vd., 2021: 1441). Mitokondriyal biyogenezi uyardığı bildirilen biyoaktif bileşikler, sağlıklı yaşam süresi, etkin enerji kullanımı ve reaktif oksijen türlerinden korunma gibi birçok faydayı içeriğinde barındırır (Chowanadisai vd., 2010: 142).



Şekil 2.5. Pirolokinolin kinon (PQQ) Kimyasal Yapısı

Kaynak: (Sigmaaldrich.com, 2023)

5. HepG2 Hücre Hattı

Hepatik hücre hatları arasında HepG2 hücreleri, hepatositlerin temel özelliklerini sergileyen ilk hücrelerdir. HepG2 hücre hattı, 1975'te izole edilmiştir ve hepatoselüler karsinom olarak tanımlanmıştır. Wistar Enstitüsü, "insan hepatomundan türetilmiş hücre dizisi" gibi HepG2 hücre dizisi için patent başvurusunda bulunmuştur. O zamandan beri, HepG2 hücreleri ATCC (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu, Rockville, MD, ABD) deposuna bir insan hücre dizisi (HB 8065) olarak tanımlanmaktadır. 15 yaşındaki beyaz bir erkeğin karaciğer dokusundan elde edilmiş iyi bir şekilde ayrıştırılmış hepatoselüler karsinom hücreleridir (López-Terrada vd., 2009: 1512).

HepG2 hücresinin ortalama çapı yaklaşık 10–20 µm'dir. Hücreler büyük çekirdeklere sahip olup ve 3-7 adet nükleol içerir. HepG2, düşük mitokondriyal içeriğe sahip olup ve az gelişmiş pürüzsüz endoplazmik retikulum barındırır. Hücre çizgisi, kromozom 1 ve 21'in kısa kolları arasındaki translokasyonları , kromozom 2, 16 ve 17'nin trizomilerini ve kromozom 20'nin tetrazomisini içerir (Simon vd., 1982: 27). t(1; 4) translokasyonu ile ilişkili kromozom 4q3 bölgesinde kayıplara sahiptir (Tomlinson vd., 2005: 177). Kromozom sayısı, hiperdiploid karyotipe karşılık gelen 50 ila 60 arasında değişir. Bazı durumlarda tetraploid genişleme ile karakterize 100'den fazla kromozom gözlenebilir. HepG2 hücresi, normal bir somatik hücreden %15 daha fazla, yaklaşık olarak 7.5 pg DNA içerir (Wiśniewski vd., 2016: 234).

HepG2 hücre hattı, TERT promotörü C228T'de bir mutasyon taşır. TERT promotöründeki mutasyon hem HCC hem de Hepablastoma (HB)'da meydana gelir. Bu mutasyon, kanser hücrelerinde telomerleri koruyarak ölümsüzleşmeye katkıda bulunur (Cevik vd., 2015: 311).

Yabani tip TP53, HCC ve HB'de olduğu gibi HepG2 hücre hattında da gözlenir . TP53 geni , hücre döngüsü durması, apoptoz ve yaşlanmada rol oynadığı için insanlarda kanseri baskılamada kritik öneme sahiptir. Böylece, gendeki bu mutasyon hücre proliferasyonunu destekleyebilir (Cagatay ve Ozturk, 2002: 7971).

HepG2, Wnt/β-katenin, hücre büyümesinin düzensizliği ve fetal ve embriyonal HB gibi hayatta kalma yolları dahil olmak üzere çeşitli yolların parametrelerini içerir. Hücre çizgisi , epitel tipi HB'de tarif edilenle aynı olan, CTNNB1 geninin üçüncü ekzonunun karakteristik bir delesyonunu barındırır (Ding vd., 2017: 1144526).

6. Çalışmanın Amacı

Çalışmamız, hepatosellüler karsinom hücre hattı HepG2'de Koenzim Q10 (CoQ10) ve Pirolokinolin Kinon (PQQ)'un antioksidan metabolizma (Oksidatif Stres), inflamatuvar yanıt, mitokondriyal biyogenez ve mitokondriyal disfonksiyon gibi özellikler üzerine etkilerini NRF-1, NRF-2, NFκB ve PGC-1α genlerinde ve miR15-a, miR16-1, miR181-c mitokondriyal miRNA'larda meydana gelen değişimler üzerinden ortaya koymayı amaçlamaktadır.

Çalışmamız kapsamında mitokondriyal fonksiyonun en yoğun bulunduğu hepatosellüler hücreler tercih edilerek seçilmiş olan genlerin, miRNA'ların ve hücresel özelliklerin en net şekilde çalışmanın hipotezine uygun olarak ortaya konulması hedeflenmiştir.

Çalışmamızda antioksidan ilaçlar PQQ ve CoQ10'in hepatosellüler karsinom hücre hattı HepG2'de hücresel, mitokondriyal, moleküler genetik ve epigenetik etkileri kapsamlı bir şekilde ortaya konmaktadır.



ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

1.Gereçler ve Reaksiyon Koşulları

1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı	Cihaz Markası
Buz makinası	Empero
Buzdolabı (+4)	Bosch
Deep- freze (-20)	Bosch
Distile Su Cihazı	ISOLAB
Etüv	ISOLAB
Hassas Terazı	Ohaus, PA214C
Hücre sayım cihazı	RWD C100
Isıticılı Manyetik Karıştırıcı IKA Plate	RCT Digital
Laminar Flow (Steril Kabin)	Esco, Air Stream
Otoklav	Nüve Steam Art, OT-90L
-80°C Dondurucu	İnFrico Medcare
Karbondioksitli İnkübatör	Esco CelCulture CO2
Pastör Fırını	Lab Companion, ON-12
pH Metre	Mettler Toledo
Pipet takımı	Thermo Scientific
Real Time PCR cihazı	Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR
Santrifüj	Thermo Scientific, MicroCL 21R
Shaker	Bioer
Termal Çalkalamalı İnkübatör	ALLSHENG TMS-300
Vorteks	JEIO TECH, Lab Companion

Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal Adı	Kimyasal Markası
%100' lük etil alkol	Merck
%70' lik etil alkol (Merck)	Merck
cDNA Synthesis Kit with Rnase inh. (High Capacity) (C03-01-05 katalog no)	A.B.T. TM
A.B.T. TM , 2X qPCR SYBR-Green Mastermix (Without Rox) (Q03-01-05 katalog no)	A.B.T. TM
A.B.T. TM , cDNA Synthesis Kit (High Capacity) (C03-01-05 katalog no)	A.B.T. TM
DNase/RNase Free Water	Gibco
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Besiyeri	Sigma
EDTA	Carlo Erba Reagents
RiboEx (301-001 katalog no) Hybrid-R izolasyon kiti miRNA (325-150 katalog no)	GeneAll
RiboEx (301-001 katalog no) ve Hybrid-R (305-101 katalog no)	GeneAll
HepG2 hücreleri	ATCC® HB-8065 TM)
Koenzim Q10 (CoQ10)	Sigma-Aldrich
mRNA ve miRNA Primerleri	Oligomer
Pirolokinolin kinon (PQQ)	Sigma-Aldrich
Penisilin	Biological Industries
Streptomisin	Biological Industries
XTT kit (30007 katalog no)	Biotium

1.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

Tablo 3.3. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

Sarf Malzeme Adı	Sarf Malzeme Markası
T75 cm ² - T25 Flask	Thermo Fisher
1,5 ml Toplama Tüpü	ISOLAB
2 ml Toplama Tüpü	ISOLAB
Cryo Tüp (2 ml)	ISOLAB
6 well Plate	Thermo Fisher
Enjektör (5-10 ml)	Beybi
5 ml -10 ml Serolojik Pipet	LP Italiana
15 ml Falkon	ISOLAB
50 ml Falkon	ISOLAB

1.3. Çalışmada Kullanılan MasterMix İçerikleri ve Real-Time qPCR Reaksiyon Koşulları

Tablo 3.4. mRNA Ürünlerinden cDNA Sentezi İçin Kullanılan Mastermix İçeriği

MasterMix Bileşeni	Miktar
RNA örneği	2 µl
10X RTase Reaksiyon Buffer	2 µl
dNTP mix	1 µl
RNase-Free Distilled Water	3.5 µl
Reverse Transcriptase	1 µl
RNase Inhibitor	0.5 µl
Random Hexamer	2 µl

Tablo 3.5. mRNA Ürünlerinden cDNA Sentez Reaksiyonu Koşulları

	Adım 1	Adım 2	Adım 3	Adım 4
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre	10 dk.	120 dk.	5 dk.	∞

Tablo 3.6. mRNA Ürünleri Real-Time qPCR İçin Kullanılan MasterMix İçeriği

MasterMix Bileşeni	Miktar	Final Konsantrasyon
2X MasterMix (with SYBR-Green)	10 µl	1X
Forward Primer (10 µM)	1 µl	0.5 µM
Reverse Primer (10 µM)	1 µl	0.5 µM
cDNA Template	4 µl	-
RNase-Free Distilled Water	4 µl	-
Toplam	20 µl	-

Tablo 3.7. mRNA Ürünleri Real-Time qPCR Reaksiyonu Koşulları

qPCR Adımı	Sıcaklık (°C)	Süre (sn.)	Döngü
Initial Denaturation	95	300	1
Denature	95	15	40
Anneal	60	60	

Tablo 3.8. miRNA-cDNA Sentezi İçin Kullanılan MasterMix Bilgileri

MasterMix Bileşeni	Miktar
10X Reaksiyon tamponu	2 µl
Stem-loop primer (miRNA spesifik)	2 µl
20X dNTP mix	1 µl
Reverse transkriptaz	1 µl
RNase Inhibitor	0.5 µl
RNase free Water	3.5 µl
miRNA örneği	10 µl
Toplam	20 µl

Tablo 3.9. mRNA Ürünlerinden cDNA Sentez Reaksiyonu Koşulları

	Adım 1	Adım 2	Adım 3	Adım 4
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre	10 dk.	120 dk.	5 dk.	∞

Tablo 3.10. miRNA Ürünleri Real-Time qPCR İçin Kullanılan MasterMix İçeriği

MasterMix Bileşeni	Miktar
A.B.T. TM 2X miRqGreen MasterMix (with ROX)	10 µl
ROX Dye (20X)	1 µl
miRNA Specific Forward Primer (5 µM)*	1 µl
miRNA Universal Reverse Primer (5 µM)*	1 µl
miRNA-cDNA Template	2 µl
RNase-Free Distilled Water	5 µl
Toplam	20 µl

Tablo 3.11. miRNA Ürünleri Real-Time qPCR Reaksiyonu Koşulları

qPCR Adımı	Sıcaklık (°C)	Süre (sn.)	Döngü
Initial Denaturation	95	300	1
Denature	95	10-30	25-40
Anneal	55-68	10-60	
Melting Curve	65-98	2-5 sn./adım	1

2. Yöntemler

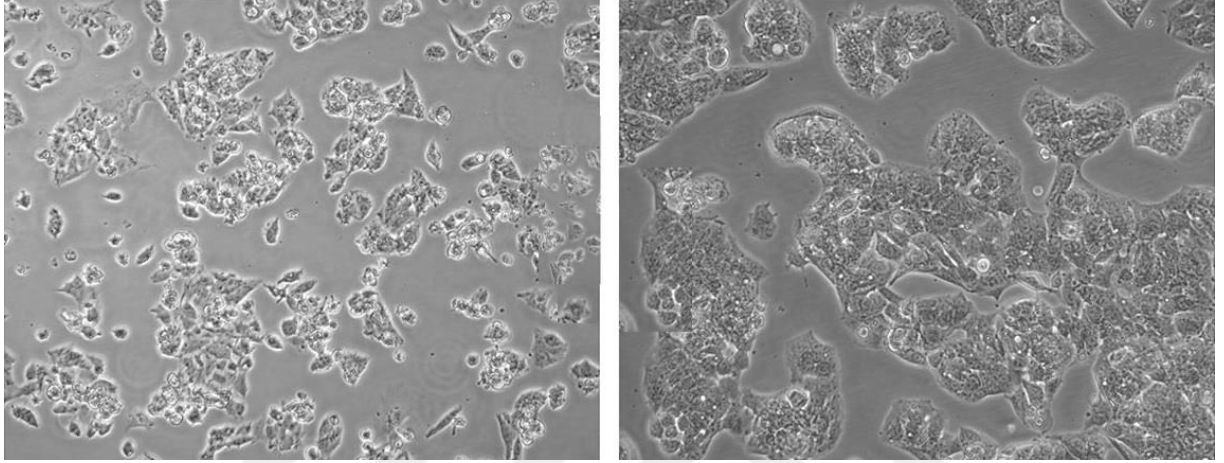
2.2 Pirolokinolin kinon (PQQ) ve Koenzim Q10 (CoQ10)'in Hazırlanması

Toz halde temin edilen Pirolokinolin kinon (PQQ) (Sigma-Aldrich) ve Koenzim Q10 (CoQ10) (Sigma-Aldrich) 10 µM Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) hücre kültür solüsyonunda hazırlanmıştır ve hazırlanan çözeltiler -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Pirolokinolin kinon (PQQ) 200 µM – 100 µM – 50 µM – 25 µM – 12,5 µM – 6,25 µM şeklinde seri dilue edilmiş konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Koenzim Q10 (CoQ10) 100 µM – 50 µM – 25 µM – 12,5 µM – 6,25 µM – 3,125 µM seri dilue edilmiş konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. PQQ+CoQ10 kombine ilaç uygulaması yapılmış hücre grubunun konsantrasyonu 100 µM – 50

μM – 25 μM – 12,5 μM – 6,25 μM – 3,125 μM seri dilue edilmiş şekildedir. İlaç uygulaması yapılmayan hücreler kontrol grubunu oluşturmaktadır.

2.3. Hücre Kültürü

HepG2 hücreleri (ATCC® HB-8065™), %10 fetal sığır serumu (FBS), 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penisilin, 100 U/ml streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyerinde 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda (Esco CelCulture CO₂), 75 cm²'lik flasklarda kültüre edilmiştir.



Şekil 3.1. HepG2 Hücrelerinin Morfolojik Görüntüsü

Kaynak: (Atcc.org, 2023)

2.4. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

PQQ, CoQ10 ve kombine ilaç uygulamasının HepG2 hücre hattında hücrelerin canlılığı üzerine olan etkileri XTT testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışmamızda Biotium marka 30007 katalog nolu XTT kit kullanılmıştır. Deney aşamaları kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. HepG2 hücreleri 96'lık well platelere kuyucuk başına 10.000 hücre yoğunluğunda olacak şekilde ekilmiştir. Ekimi gerçekleştirilen hücrelerin yapışıp, confluency hale gelmesi beklenmesinin ardından 3 gün sonra confluency halde ilaç dozlarının hesaplaması yapılarak ilaç uygulaması gerçekleştirilmiştir. PQQ ve Q10 stok solüsyonu, 10mM DMEM ortamında hazırlanmıştır. Toz halinde temin edilmiş olan PQQ ve Q10 10mL'de çözdürüldü. Dozlar seri dilüsyon ile Bölüm 2.1'de belirtilen şekilde hazırlanmıştır. Absorbans değerlerinin okumaları elisa okuyucuda 475 nm alınmıştır. IC₅₀ konsantrasyonları lineer regresyon eğrisi çizilerek belirlenmiştir. Hücre büyümesi inhibisyonunun yüzdesi;

Relatif inhibisyon oranı (%) = $(OD_{\text{kontrol}} - OD_{\text{ilaç uygulaması}}) / OD_{\text{kontrol}} \times \%100$ şeklinde hesaplanmıştır. Relatif inhibisyon oranları ve lineer regresyon eğrileri Microsoft Excel programı yardımıyla hesaplanmış ve grafik haline getirilmiştir.

2.5. Hücre Sayımı

Çözdürülen hücreler RWD markalı ürün kodu Automated Cell Counter (C100) olan hücre sayım cihazı ile sayılarak hesaplamalar yapılmıştır. Cihaz 1 ml'sinde 40.000 adet hücre saydığından dolayı 96'lık well platelerde uygun şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Sayımı yapılan hücrelerin yapılacak deneye göre yapılacak hücre kültürü deneyine özgü petri kaplarına ya da tekrardan T75 petri kaplarına ekimi yapılarak pasaj işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.6. Hücre Yara İyileşmesi Deneyi

Uygulanan ilaçların lateral hücre göçü ve hücre hücre etkileşimi üzerine etkisini ortaya koyabilmek için hücre yara iyileşmesi deneyi yapılmıştır. HepG2 (1×10^5) hücreleri medium içeren kültür ortamında, 6'lı well-platelerde ekilmiştir. 1. kuyucuk ilaçsız kontrol, 2. kuyucuk CoQ10, 4. kuyucuk PQQ ve 5. kuyucukta ise PQQ+Q10 ilaç uygulaması yapılmış hücrelerin ekimi yapılmıştır. 3. ve 6. kuyucuklar boş bırakılmıştır. Hücreler %75 confluency hale geldiğinde her bir kuyucuğun tam ortasına 200 µL mikro pipet ucu ile bir çizik oluşturulmuştur. Hücre artıklarının temizlenmesi için 1xPBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkama işleminin ardından, ilaç uygulaması olmayan (kontrol grubu) ve ilaç uygulaması olan tüm kuyucuklara 2 ml taze medium ilave edilmiştir. 24, 48 ve 72. saatlerde hücrelerin hareketleri inverted mikroskop altında izlenmiştir ve görüntüleri kaydedilmiştir. Kuyuculardan elde edilen görüntüler yara pipet ucu ile açılmış yara boşluğunun kapanma oranına göre değerlendirilmiştir. Elde edilen resimlerin boşlukların kapanma oranının değerlendirilmesi için, Image-Pro Premier 9.2.22 programına aktarılmıştır. Yara iyileşmesine ait boşlukların karşılaştırılabilmesi için gerekli ölçüm ve işaretlemeler bu program yardımı ile yapılmıştır.

Yara kapanma yüzdeleri $(W_{t0} - W_{t72}) / W_{t0} \times 100$ formülüne göre hesaplanmıştır. (W_{t0} : 0. Saat Boşluk Mesafesi, W_{t72} : 72. Saat Boşluk Mesafesi)

2.7. mRNA Ürünleri Gerçek Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (mRNA Real Time PCR)

2.7.1. RNA İzolasyonu

mRNA ürünlerinden RNA izolasyonu için GeneAll marka, RiboEx (301-001 katalog no) adlı ve Hybrid-R (305-101 katalog no) adlı kitler kullanılmıştır. Hücre örneklerinin santrifüj

edilmesinin ardından elde edilen hücre pelletleri ($\sim 1 \times 10^7$) kit protokölüne uygun olarak kitin içeriğindeki tamponlarla muamele edilmiştir. Son aşamada kolonların $10.000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edilmesinin ardından elde edilen RNA örnekleri $-80^\circ C$ 'de muhafaza edilmiştir.

2.7.2. mRNA ürünleri cDNA Sentezi

RNA izolasyonunun ardından cDNA sentezi aşamasına geçilmiştir. cDNA eldesi için A.B.T marka, cDNA Synthesis Kit (High Capacity) (C03-01-05 katalog no) adlı kit kullanılmıştır. cDNA sentezi için mastermix hazırlanmıştır. Hazırlanan mastermixin içeriğini; RNA örneği, 10X RTase Reaksiyon Buffer, dNTP mix, RNase-Free Distilled Water, Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor, Random Hexamer oluşturmaktadır. cDNA sentezi için mastermix hazırlandıktan sonra reverse transkripsiyon reaksiyon aşamasına geçilmiştir. Reverse transkripsiyonun ardından, elde edilen cDNA örnekleri $-80^\circ C$ 'de muhafaza edilmiştir.

2.7.3. mRNA-cDNA Ürünleri Real-Time qPCR Aşaması

cDNA elde edildikten sonra Real-Time qPCR aşamasına geçilmiştir. Real-Time qPCR için A.B.T marka, 2X qPCR SYBR-Green Mastermix (Without Rox) (Q03-01-05 katalog no) adlı kit kullanılmıştır. Ekspresyon analizi için kullanılan primer bilgileri tabloda gösterildiği gibi sentezlenmiştir. (Tablo 3.12)

Tablo 3.12. Gen Ekspresyon Analizi İçin Kullanılan Primer Bilgileri

Gen Adı	Primer Bilgisi	Marka
NRF1-F	ATCGTCTTGTCTGGGGAAAC	Oligomer
NRF1-R	TGTTCCAATGTCACCACCTC	Oligomer
NRF2-F	ATGCCCTCACCTGCTACTTT	Oligomer
NRF2-R	GATGCCACACTGGGACTTG	Oligomer
NFKB-F	GAAGCACGAATGACAGAGGC	Oligomer
NFKB-R	GCTTGGCGGATTAGCTCTTTT	Oligomer
PGC-1 α -F	CGAGAGTTTCCGTTCCCTTT	Oligomer
PGC-1 α -R	CCAGGAGGAGCCGTAGTTGT	Oligomer
B-ACTIN-F	AAACTGGAACGGTGAAGGTG	Oligomer
B-ACTIN-R	AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT	Oligomer

Real-Time qPCR için mastermix hazırlanmıştır. Hazırlanan mastermixin içeriğini; 2X MasterMix (with SYBR-Green) (1X), Forward Primer (10 μ M), Reverse Primer (10 μ M), cDNA Template, RNase-Free Distilled Water oluşturmaktadır. Tüm primerler için aynı MasterMix koşulları kullanılmıştır. Mastermix hazırlandıktan sonra Real-Time qPCR reaksiyonuna geçilmiştir. Real-Time qPCR reaksiyonu Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. mRNA ürünlerinin qRT-PCR aşamasında çalışmamız kapsamında β -ACTIN (ACTB) geni referans gen olarak kullanılmıştır.

2.8. miRNA Ürünleri Gerçek Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (miRNA Real Time PCR)

2.8.1. RNA İzolasyonu

miRNA izolasyonu için GeneAll marka, RiboEx (301-001 katalog no) adlı ve Hybrid-R miRNA (325-150 katalog no) adlı kitler kullanılmıştır. Hücre örneklerinin santrifüj edilmesinin ardından elde edilen hücre pelletleri ($\sim 1 \times 10^7$) kit protokölüne uygun olarak kitin içeriğindeki tamponlarla muamele edilmiştir. Son aşamada kolonların 11.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmesinin ardından elde edilen RNA örnekleri -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.8.2. miRNA-cDNA Sentezi

miRNA izolasyonunun ardından elde edilen miRNA'lardan cDNA sentezi aşamasına geçilmiştir. Araştırılacak her bir miRNA için spesifik "stem-loop primer" dizayn edilerek cDNA sentezinde bu primerler kullanılmıştır. Stem-loop primerler miRNA'dan cDNA sentezi yaparken miRNA dizisi ile spesifik bağlandığı için oldukça güvenilir bir yöntem olarak kabul edilmektedir. miRNA'lardan cDNA eldesi için A.B.T.TM marka, cDNA Synthesis Kit with Rnase inh. (High Capacity) (C03-01-05 katalog no) adlı kit kullanılmıştır. cDNA sentezi için mastermix hazırlanmıştır. Hazırlanan mastermixin içeriğini; miRNA örneği, 10X RTase Reaksiyon Buffer, 20X dNTP mix, Stem-loop primer (miRNA spesifik), Rnase-Free Distilled Water, Reverse Transcriptase, Rnase Inhibitor, oluşturmaktadır. miRNA-cDNA sentezi için mastermix hazırlandıktan sonra reverse transkripsiyon reaksiyon aşamasına geçilmiştir. Reverse transkripsiyonun ardından, elde edilen miRNA-cDNA örnekleri -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.8.3. miRNA-cDNA Ürünleri Real-Time qPCR Aşaması

miRNA-cDNA elde edildikten sonra Real-Time qPCR aşamasına geçilmiştir. Real-Time qPCR için A.B.T.TM marka, A.B.T.TM 2X miRqGreen MasterMix (with ROX) (Q04-02-01 katalog no) adlı kit kullanılmıştır. Real-Time qPCR için mastermix hazırlanmıştır. Hazırlanan mastermixin içeriğini; A.B.T.TM 2X miRqGreen MasterMix (with ROX), ROX Dye (20X), miRNA Specific Forward Primer (5 µM), miRNA Universal Reverse Primer (5 µM), miRNA-cDNA Template, RNase-Free Distilled Water oluşturmaktadır. Tüm primerler için aynı MasterMix koşulları kullanılmıştır. Mastermix hazırlandıktan sonra Real-Time qPCR reaksiyonuna geçilmiştir. Real-Time qPCR reaksiyonu Applied BiosystemsTM 7500 Fast Real-Time PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. miRNA ürünlerinin qRT-PCR aşamasında çalışmamız kapsamında RNU6 geni referans gen olarak kullanılmıştır.

3. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Çalışmamız kapsamında yapılan tüm deneyler 3 teknik tekrarlar yapılmıştır. Çalışmamızın istatistiksel analizi GraphPad Prism 9.3.1 kullanılarak yapılmıştır.

Hücre canlılığının değerlendirilmesi amacıyla yapılan XTT deneyinin verileri ilk olarak PQQ, CoQ10, PQQ+CoQ10 XTT okuma değerlerinin Normallik testi Shapiro-Wilk test ve Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak kullanılmıştır. Ardından ilgili verilerin "Normallik Grafiği" hazırlanmıştır. PQQ, CoQ10, PQQ+CoQ10 XTT okuma değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını grup içinde "One Sample t-test" yapılarak araştırılmıştır.

Ardından gruplar arasındaki istatistiksel analiz “One-Way Anova” kullanılarak yapılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

Hücre proliferasyon ve migrasyon yeteneğinin ilaç uygulamasına bağlı olarak değişiminin ölçüldüğü yara iyileşmesi deneyi verileri, ilk aşamada Normallik testi Shapiro-Wilk test kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar 4X ve 10X görüntülere ait ölçüm değerleri ayrı ayrı olmak üzere istatistiksel olarak analiz edilmiştir. 4X görüntülere ait ölçüm değerleri her grup içinde (Kontrol-PQQ-CoQ10-PQQ+CoQ10) olacak şekilde istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını grup içinde “One Sample t-test” yapılarak araştırılmıştır. Ardından gruplar arasındaki istatistiksel analiz “One-Way Anova” kullanılarak yapılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

qRT-Pcr sonuçlarının analizi için; threshold cycle (eşik değeri döngüsü): Ct değeri, ΔCt değeri, $\Delta\Delta Ct$ ve Fold Change (örneklerin karşılaştırılması sonrasındaki katsayı değişimi) değerleri hesaplanmıştır. ΔCt değerinin hesaplaması yapılırken, ($Ct_{\text{hedef miRNA}} - Ct_{\text{referans miRNA}}$) formülü kullanılmıştır. $\Delta\Delta Ct$ değerinin hesaplaması yapılırken, ($\Delta Ct_{\text{hedef miRNA}} - \text{Ortalama } \Delta Ct_{\text{kontrol miRNA}}$) formülü kullanılmıştır. Fold Change değerinin hesaplaması yapılırken, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılmıştır (Dülgeroğlu ve Eroğlu, 2019: 417). Fold Change değerlerinin 0 ila 1 aralığında olması, aşağı yönde regülasyonu tanımlayacak şekilde değerlendirilmiştir. Elde edilen ΔCt değeri ve Fold Change değerlerinin öncelikli olarak normallik testi yapılmıştır. Normallik testi yapılırken Shapiro-Wilk test kullanılmıştır. Ardından ilgili verilerin “Normallik Grafiği” hazırlanmıştır. ΔCt değeri ve Fold Change değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını grup içinde “One Sample t-test” kullanılarak araştırılmıştır. Grupların yani mRNA ürünleri olan genleri (PGC-1 α , NRF-1, NRF-2 ve Nükleer faktör kappa B (NF κ B) ve miRNA ürünlerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması “One-Way Anova” kullanılarak yapılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir. Standart sapma hesaplaması popülasyon standart sapması hesaplanarak yapılmıştır. Popülasyon standart sapması SD: $\sqrt{\sum (xi-M)^2 / n}$ formülüne göre hesaplanmıştır. (Xi: Serideki değerler, M: Medyan değer, n: değer sayısı)

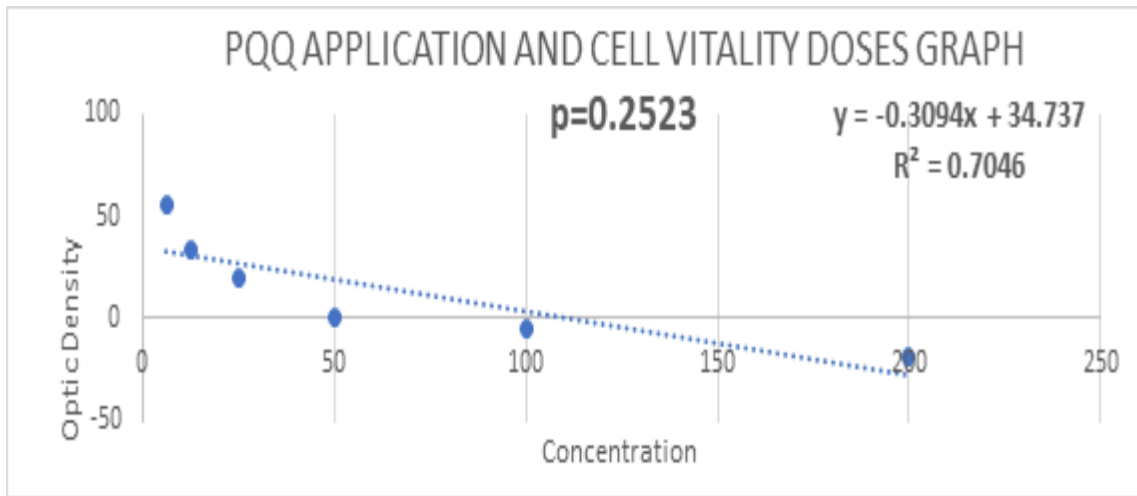
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR

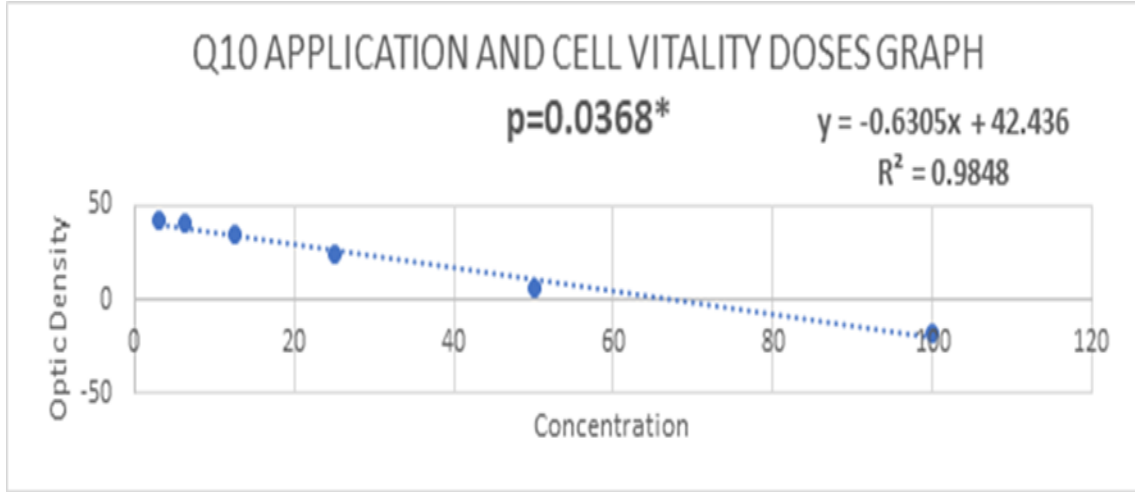
1. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Pirolokinolin kinon PQQ ve Koenzim Q10 CoQ10'in hücre canlılığı üzerine olan etkilerini ortaya koymak için XTT testi uygulaması yapılmıştır. Pirolokinolin kinon (PQQ) 200 μ M – 100 μ M – 50 μ M – 25 μ M – 12,5 μ M – 6,25 μ M şeklinde seri dilue edilmiş konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. PQQ için IC₅₀ konsantrasyonu 46,331 μ M olarak belirlenmiştir. (Şekil 4.1.) Koenzim Q10 (CoQ10) 100 μ M – 50 μ M – 25 μ M – 12,5 μ M – 6,25 μ M – 3,125 μ M seri dilue edilmiş konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. (Şekil 4.2.) CoQ10 için IC₅₀ konsantrasyonu 23,99 μ M olarak belirlenmiştir. PQQ+CoQ10 kombine ilaç uygulaması yapılmış hücre grubunun konsantrasyonu 100 μ M – 50 μ M – 25 μ M – 12,5 μ M – 6,25 μ M – 3,125 μ M seri dilue edilmiş şekildedir. PQQ+CoQ10 kombine ilaç uygulaması için IC₅₀ konsantrasyonu 32,1992 μ M olarak belirlenmiştir. (Şekil 4.3.)

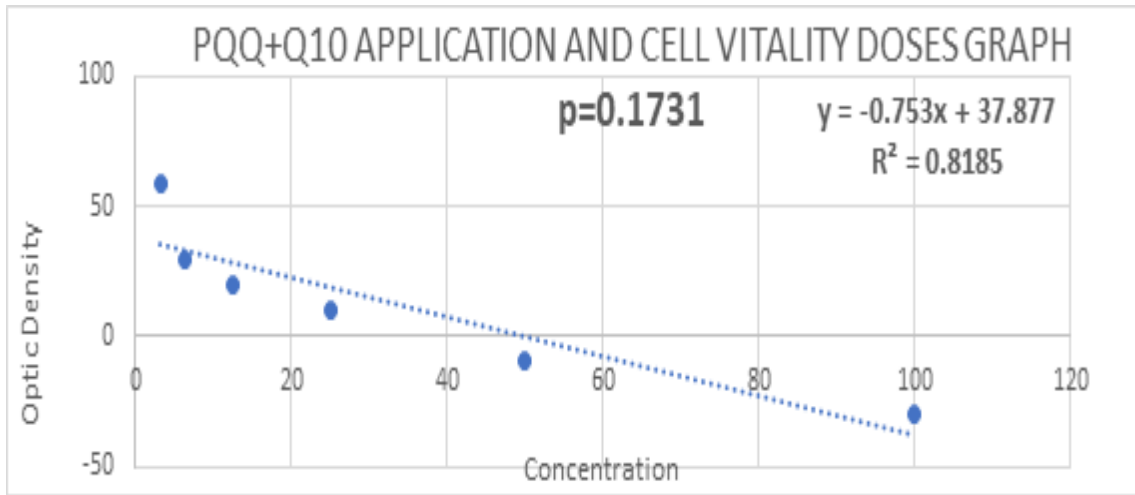
XTT sonuçlarının gruplar içinde istatistiksel olarak değerlendirme yapmak amacıyla yapılan One-Sample t Test sonuçlarına göre, $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde PQQ uygulamasına ait p değeri 0,2523, CoQ10 uygulamasına ait p değeri 0,0368*, PQQ+CoQ10 uygulamasına ait p değeri 0,1731 olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel analiz $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde “One-Way Anova” kullanılarak yapılmıştır. Yapılan analiz neticesinde p değeri 0,8888 olarak tespit edilmiş olup istatistiksel olarak anlamsızdır, gruplar birbirinden bağımsızdır.



Şekil 4.1. Pirolokinolin kinon (PQQ) Uygulama Dozları ve Lineer Regresyon Eğrisi



Şekil 4.2. Koenzim Q10 (CoQ10) Uygulama Dozları ve Lineer Regresyon Eğrisi



Şekil 4.3. PQQ+CoQ10 Kombine İlaç Uygulaması Uygulama Dozları ve Lineer Regresyon Eğrisi

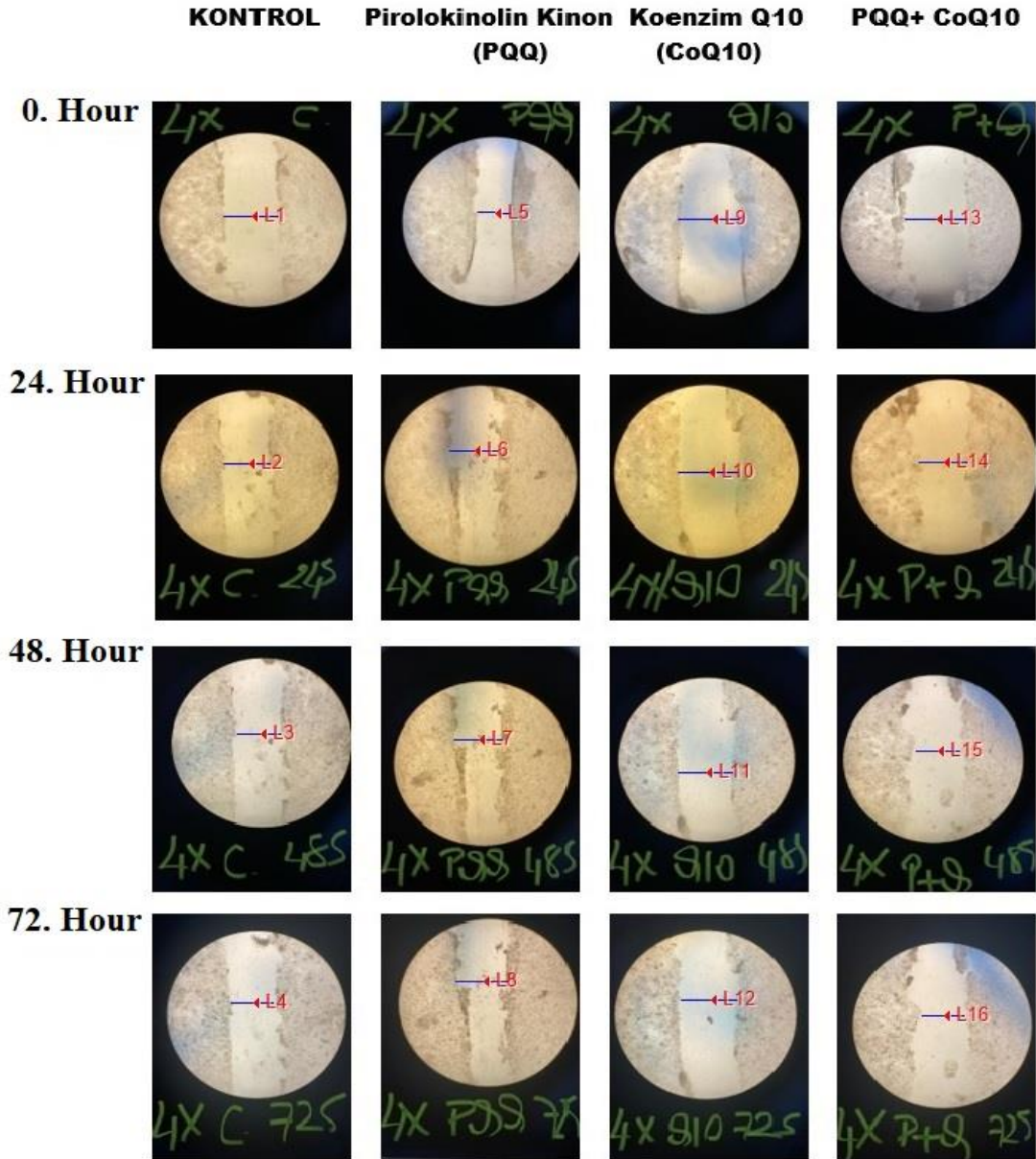
2. Hücre Yara İyileşmesi Deneyi

Hepatosellüler karsinom hücre hattı HepG2’de gerçekleştirmiş olduğumuz yara iyileşmesi deneyinde kontrol, Pirolokinolin kinon (PQQ), Koenzim Q10 (CoQ10) ve PQQ+CoQ10 kombine ilaç uygulaması yapılmış olan kuyucuklarda 0.,24.,48.,72., saatlerde yara kapanma mesafeleri ışık mikroskobu altında 4X ve 10X büyütmelerde incelenmiş olup elde edilen görüntüler kaydedilmiştir. (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5) Çalışmamızın yara iyileşmesi deney sonuçlarından elde etmiş olduğumuz görseller, kapanma oranının değerlendirilmesi için, Image-Pro Premier 9.2.22 programına aktarılmıştır. Boşlukların ölçümü 4X ve 10X görüntülerin her ikisinde de yapılmıştır. 10X görüntülerden ölçülen mesafelerin kontrol grubu ve ilaç uygulama gruplarında yara kapanma yüzdeleri; Kontrol:%33,01, PQQ:% 36,79, CoQ10:%18,09, PQQ+CoQ10: %38,77 şeklinde hesaplanmıştır. PQQ uygulaması kontrol

grubuna kıyasla yara kapanma alanını ve hücre proliferasyonunu arttırmaktadır. CoQ10 uygulaması ise kontrol grubuna kıyasla; yara alanının kapanmasını ve hücre proliferasyonunu engellediği tespit edilmiştir. Kombine uygulamada diğer uygulamalara kıyasla yara kapanmasını daha fazla arttırmış ve hücre proliferasyonunu daha fazla oranda desteklemiştir. 72. Saat sonunda yapılan ölçüm sonuçlarının kontrol grubuna göre değerlendirilmesinde, en fazla hücre çoğalması ve yara kapanması PQQ+CoQ10 kombine ilaç uygulamasında olmuştur. Bu durum ilaçların ayrı ayrı uygulamasından daha fazla bir proliferasyon uyarımını ortaya koymaktadır.

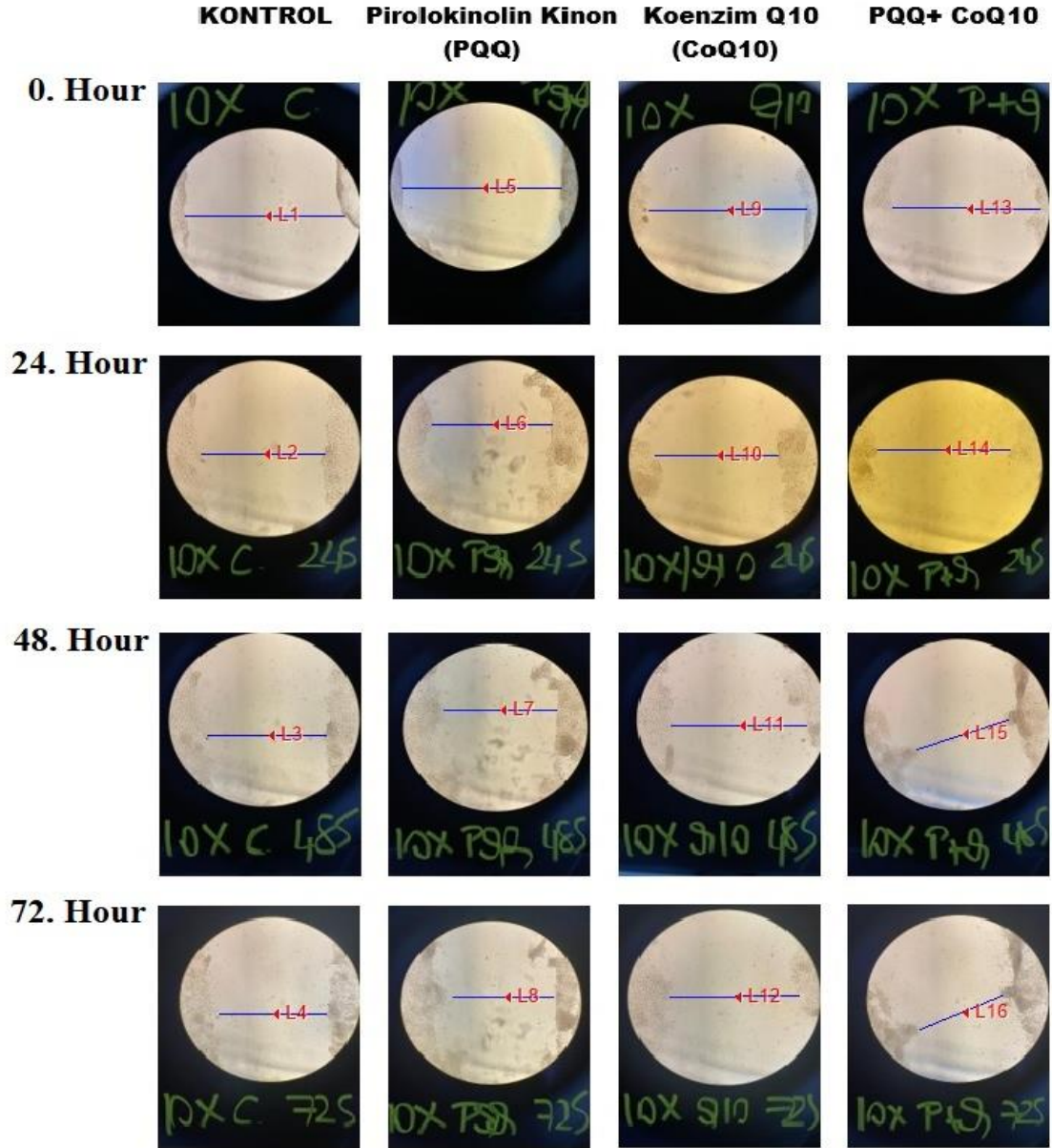
4X ve 10X görüntülere ait boşluk kapanma verilerinin istatistiksel olarak incelediğimizde ise her iki grup verilerinin normal dağılıma sahip olduğunu tespit ettik. (Resim 1.4 ve Resim 1.5) Ardından grup içinde istatistiksel olarak değerlendirme yapmak amacıyla yapılan One-Sample t Test sonuçlarına göre, 4X görüntülere ait veriler $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde Kontrol grubu p değeri 0,0004***, PQQ p değeri 0,0018**, CoQ10 için p değeri 0,0002*** ve PQQ+CoQ10** için ise p değeri 0,0016 olarak tespit edilmiş olup elde edilen tüm veriler istatistiksel olarak anlamlıdır. Gruplar arasında istatistiksel analiz $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde “One-Way Anova” kullanılarak yapılmıştır. Yapılan analiz neticesinde p değeri 0,0781 olarak tespit edilmiş olup istatistiksel olarak anlamsızdır, gruplar birbirinden bağımsızdır. 10X görüntülere ait veriler $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde Kontrol grubu p değeri 0,0015**, PQQ p değeri 0,0023**, CoQ10 için p değeri 0,0004*** ve PQQ+CoQ10 için ise p değeri 0,0034** olarak tespit edilmiş olup elde edilen tüm veriler istatistiksel olarak anlamlıdır. Gruplar arasında istatistiksel analiz $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde “One-Way Anova”

kullanılarak yapılmıştır. Yapılan analiz neticesinde p değeri 0,6848 olarak tespit edilmiş olup istatistiksel olarak anlamsızdır, gruplar birbirinden bağımsızdır.



Şekil 4.4. Pirolokinolin kinon (PQQ), Koenzim Q10 (CoQ10) Hücre Göçü ve Proliferasyonu Üzerine Etkileri

(Yara Alanı Işık Mikroskobu Altında İncelenmiştir-4X).



Şekil 4.5. Pirolokinolin kinon (PQQ), Koenzim Q10 (CoQ10) Hücre Göçü ve Proliferasyonu Üzerine Etkileri

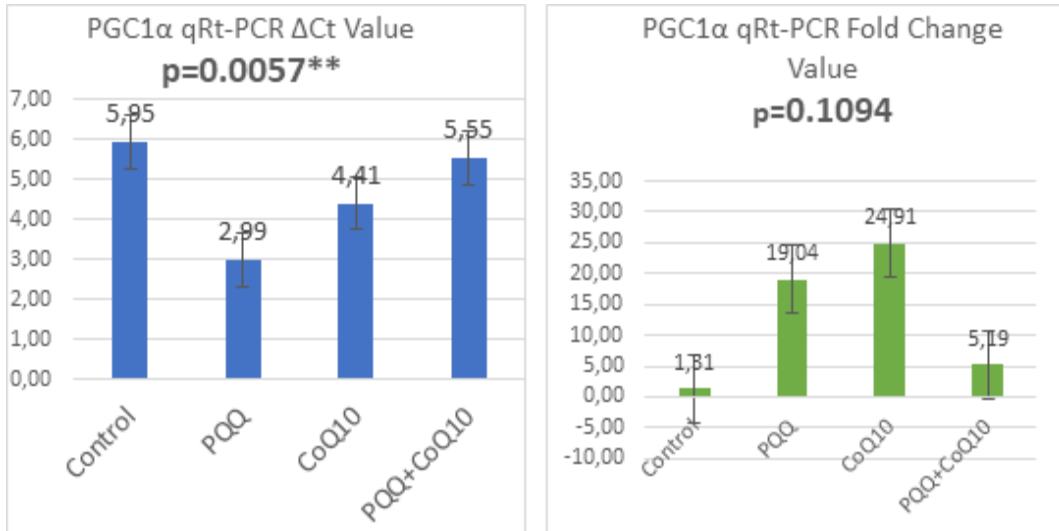
(Yara Alanı Işık Mikroskobu Altında İncelenmiştir-10X).

3. mRNA Ürünleri Gerçek Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (mRNA Real-Time PCR)

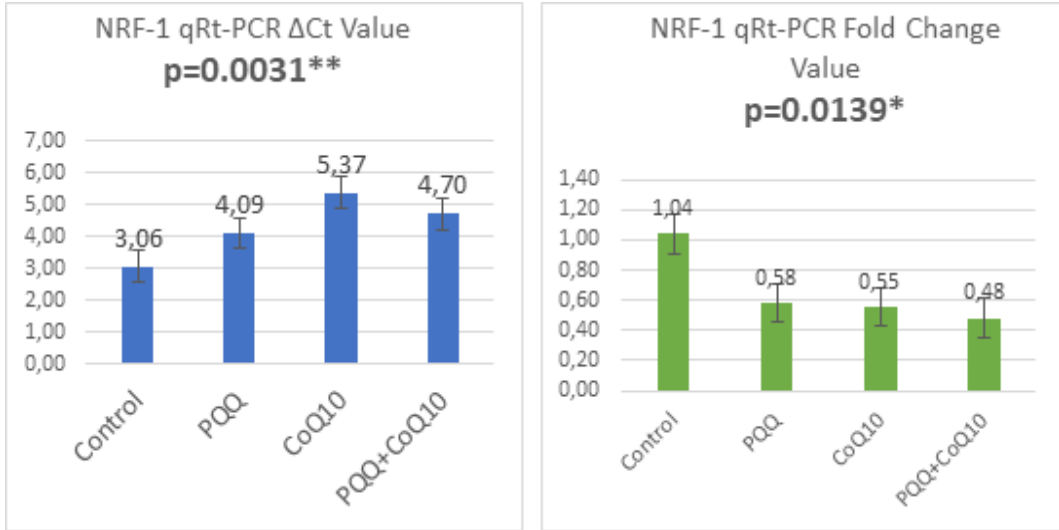
Çalışmamızın qRT-PCR aşamasında ilk olarak belirlemiş olduğumuz genlerin (PGC-1 α , NRF-1, NRF-2 ve Nükleer faktör kappa B (NF κ B)) ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Uygulamış olduğumuz qRT-PCR neticesinde ilgili genlere ait Ct değeri, Δ Ct değeri, $\Delta\Delta$ Ct ve Fold Change (örneklerin karşılaştırılması sonrasındaki katsayı değişimi) değerleri hesaplanmıştır.

mRNA ürünleri qRT-PCR deney sonuçları normal dağılıma sahip olduğunun tespitinin ardından; qRT-PCR Δ Ct değerlerinin gruplar içinde istatistiksel olarak değerlendirme yapmak amacıyla yapılan One-Sample t Test sonuçlarına göre, $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde PGC1- α için p değeri 0,0057**, NRF-1 için p değeri 0,0031**, NRF-2 için p değeri 0,0066**, NF κ B için p değeri 0,0036** olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel analiz $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde “One-Way Anova” kullanılarak yapılmıştır. Yapılan analiz neticesinde p değeri 0,0002*** olarak tespit edilmiş olup istatistiksel olarak anlamlıdır.

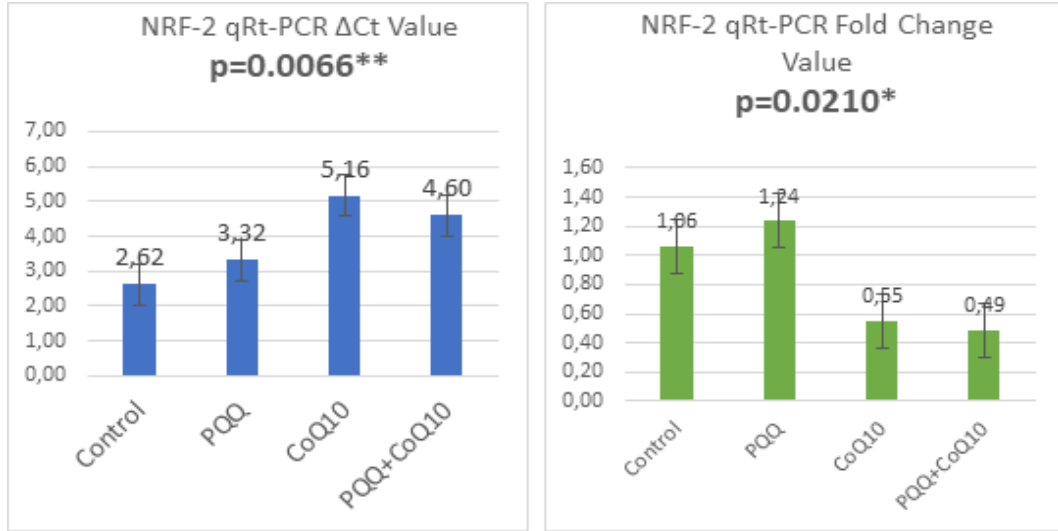
qRT-PCR Fold Change değerlerinin gruplar içinde istatistiksel olarak değerlendirme yapmak amacıyla yapılan One-Sample t Test sonuçlarına göre, $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde PGC1- α için p değeri 0,1094, NRF-1 için p değeri 0,0139*, NRF-2 için p değeri 0,0210*, NF κ B için p değeri 0,1766 olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel analiz $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde “One-Way Anova” kullanılarak yapılmıştır. Yapılan analiz neticesinde p değeri 0,1038 olarak tespit edilmiş olup istatistiksel olarak anlamsızdır, gruplar birbirinden bağımsızdır.



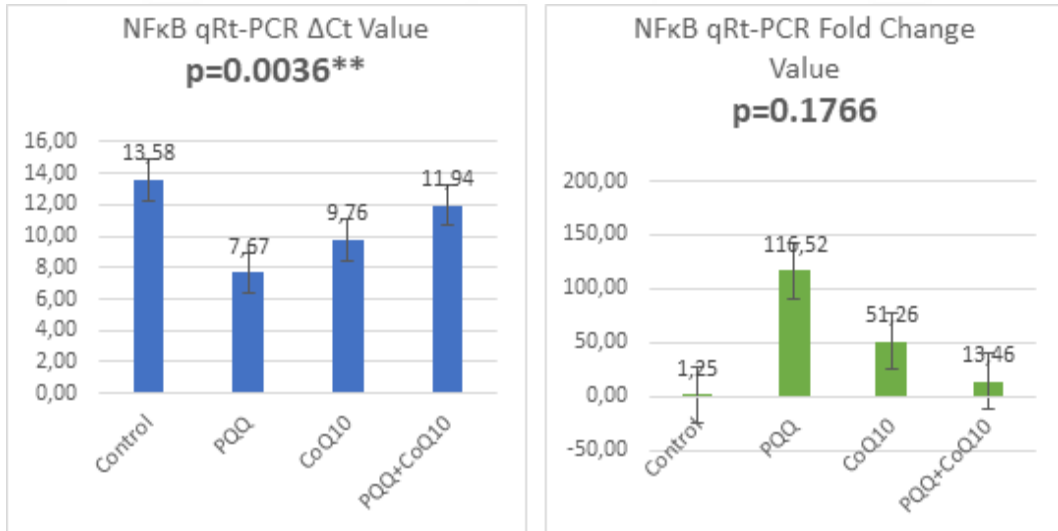
Şekil 4.6. PGC1α Geni qRt-PCR Δ Ct ve Fold Change Değerleri, Grafiği ve Ortalamaları



Şekil 4.7. NRF1 Geni qRt-PCR Δ Ct ve Fold Change Değerleri, Grafiği ve Ortalamaları



Şekil 4.8. NRF2 Geni qRt-PCR Δ Ct ve Fold Change Değerleri, Grafiği ve Ortalamaları



Şekil 4.9. NFκB Geni qRt-PCR Δ Ct ve Fold Change Değerleri, Grafiği ve Ortalamaları

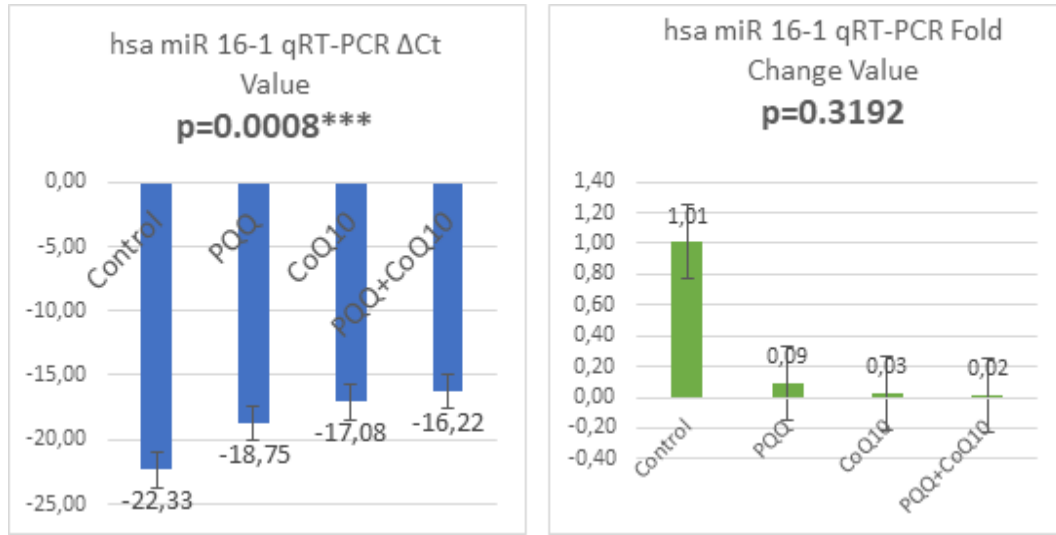
4. miRNA Ürünleri Gerçek Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (miRNA Real Time PCR)

Çalışmamızın qRT-PCR aşamasında ikinci olarak belirlemiş olduğumuz MitomiR ailesinin üyeleri miRNA'ların (miR15-a/miR16-1/miR181-c) ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Uygulamış olduğumuz qRT-PCR neticesinde ilgili miRNA'lara ait Ct değeri, Δ Ct değeri, $\Delta\Delta$ Ct ve Fold Change (örneklerin karşılaştırılması sonrasındaki katsayı değişimi) değerleri hesaplanmıştır.

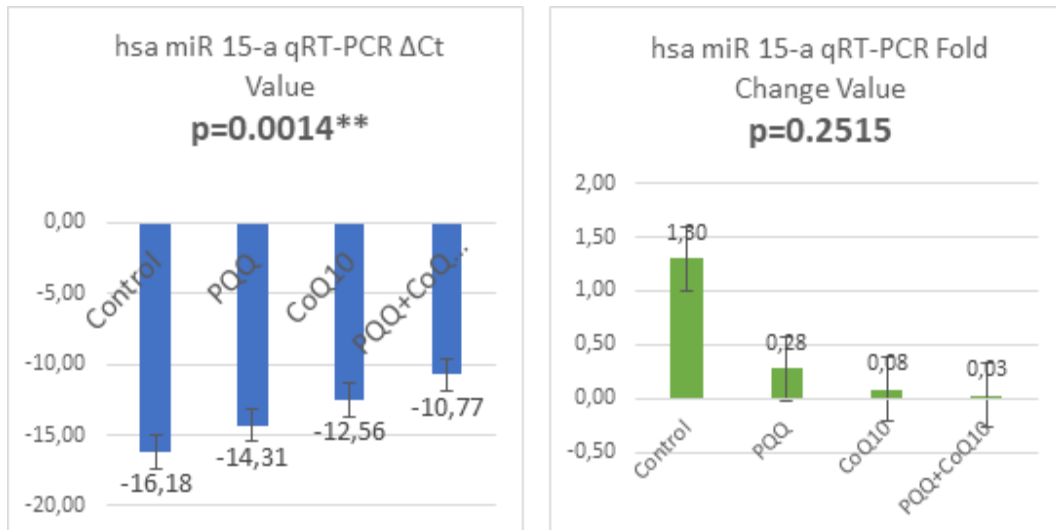
miRNA ürünleri qRT-PCR deney sonuçları normal dağılıma sahip olduğunun tespitinin ardından; qRT-PCR Δ Ct değerlerinin gruplar içinde istatistiksel olarak değerlendirme yapmak amacıyla yapılan One-Sample t Test sonuçlarına göre, $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde hsa miR 16-1 için p değeri 0,0008***, hsa miR 15a için p değeri 0,0014**, hsa miR 181-c için p değeri

<0,0001**** olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel analiz $p<0,05$ anlamlılık düzeyinde “One-Way Anova” kullanılarak yapılmıştır. Yapılan analiz neticesinde p değeri 0,0118* olarak tespit edilmiş olup istatistiksel olarak anlamlıdır.

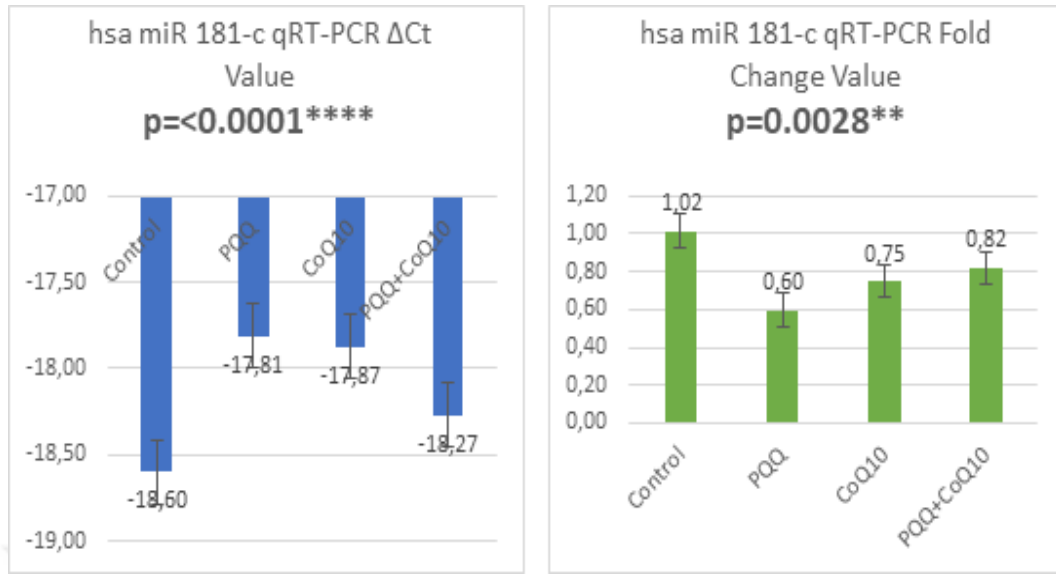
qRT-PCR Fold Change değerlerinin gruplar içinde istatistiksel olarak değerlendirme yapmak amacıyla yapılan One-Sample t Test sonuçlarına göre, $p<0,05$ anlamlılık düzeyinde hsa miR 16-1 için p değeri 0,3192, hsa miR 15a için p değeri 0,2515, hsa miR 181-c için p değeri 0,0028** olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel analiz $p<0,05$ anlamlılık düzeyinde “One-Way Anova” kullanılarak yapılmıştır. Yapılan analiz neticesinde p değeri 0,3075 olarak tespit edilmiş olup istatistiksel olarak anlamsızdır, gruplar birbirinden bağımsızdır.



Şekil 4.10. hsa miR 16-1 qRt-PCR ΔCt ve Fold Change Değerleri, Grafiği ve Ortalamaları



Şekil 4.11. hsa miR 15-a qRt-PCR ΔCt ve Fold Change Değerleri, Grafiği ve Ortalamaları



Şekil 4.12. hsa miR 181-c qRT-PCR ΔCt ve Fold Change Değerleri, Grafiği ve Ortalamaları

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE TARTIŞMA

1. Sonuç

Çalışmamız kapsamında günümüzde antioksidan ve enerji metabolizmasındaki rolleri dolayısıyla yaygın olarak kullanılan PQQ ve CoQ10 maddelerinin mitokondriyal faaliyetlerin yoğun olarak bulunduğu Hepatosellüler hücre hattı olan HepG2’de hücrelerin sağkalımı, proliferasyonu, anti-kanser etkinliği, hücrelerin migrasyonu üzerine etkileri, mitokondri için hayati önem taşıyan (PGC1- α , NRF-1 ve NRF-2 genlerinin ekspresyon seviyelerine olan etkisini), antioksidan metabolizma ve önemli apoptoz belirteci olan NF κ B geninin ekspresyon seviyesine etkisini ve son olarak kanser için önemleri ve MitomiR olmaları dolayısıyla seçmiş olduğumuz 3 önemli miRNA’da (miR-16-1, miR-15a ve miR181c) ekspresyon seviyelerindeki değişimi raporladık. PQQ ve CoQ10’i hücresel özellikler olan etkisini ayrıca önemli ve ilişkili mRNA ve miRNA ekspresyon seviyelerine etkisini ortaya koyduk.

Sonuç olarak, elde ettiğimiz veriler anti kanser etkinliği anlamında değerlendirilecek olursa CoQ10 ve PQQ ayrı ve bir arada kullanımda çok farklı etkiler ortaya koyabilen iki farklı takviye olduğunu ve CoQ10’in en etkin kullanımı kombine kullanıma kıyasla; yalnız ve tek başına yapılan kullanımda ortaya koyduğunu rapor ettik. CoQ10 ve PQQ içeriğine sahip ürün ve supplementler geliştirildiğinde mutlaka bu etkileşimler göz önünde bulundurulmalıdır ve CoQ10 anti kanser özelliği dolayısıyla kullandığında mutlaka etkileşimlere bağlı olarak etkinin değişimi göz önünde bulundurulmalıdır. Hedef kitlenin endikasyonları da yine göz önünde bulundurulması gereken bir diğer kavramdır. PQQ ve CoQ10 anti-kanser etki yönünden sinerji ortaya koymamaktadır.

PQQ kanser hücre proliferasyonunu desteklemekte olduğunu rapor ettik bu özelliği dolayısıyla; kanser hastalarında kullanımı konusunda daha dikkatli hareket edilmelidir. Ayrıca birçok farklı kanser türünde ve bunların hücre hattında detaylı etkileri de araştırılmalıdır. Çalışmamız bu yönüyle yeni çalışmalara ışık tutmaktadır. CoQ10 kanserli hücre proliferasyonunu yine yalnız kullanımda etkin olarak azaltmakta olup eşlikçi supplement ve ilaçlar bu özelliği göz önünde bulundurularak kullanılmalıdır.

PQQ ve CoQ10 uygulaması PGC1- α geni ve dolayısıyla mitokondriyal biyogenez için önemli etkiler oluşturmaktadır. PQQ ve CoQ10 uygulaması NRF-1 ve NRF-2 için literatürle uyuşmayan verileri rapor ettik. PQQ ve CoQ10 uygulamasının NRF-1 ve NRF-2 gen ekspresyonu üzerindeki etkileri farklı hücre hatları üzerinde araştırılmalıdır. PQQ ve CoQ10

NFκB gen ekspresyon seviyelerinin HepG2 hücre hattında araştırılması sonuçlarına göre; özellikle PQQ'nun kanser hastalarında klinik olarak dikkatli kullanılmalıdır. Ayrıca bu etkinlik in vivo olarakta araştırılabilir yeni çalışmalara kapı açılabilir. Çalışmamız, mitokondriyal fonksiyon, mitokondriyal biyogenezin $ERR\alpha$, β , γ ve $PPAR\gamma$, SIRT1 ve SIRT3'ün kombine olarak bu çalışmamızdaki genler üzerinden araştırılabileceği yeni çalışmalara kapı aralamıştır.

Çalışmamızda PQQ ve CoQ10 maruziyeti sonucu ekspresyon seviyelerindeki değişimleri, miR-15a için beklenen şekilde ilk kez, miR-16-1 ve miR181c için ise literatürde ilk kez raporlamış olduk. PQQ ve CoQ10 kullanımı epigenetik faktörler üzerinde etkili olup, ilgili miRNA'lar hepatosellüler karsinomda ve mitokondriyal disfonksiyonun eşlik ettiği hastalıklarda önemli aday biyobelirteçlerdir.



2. Tartışma

Çalışmamız kapsamında; günümüzde yaygın olarak kullanılan ve güçlü destek, takviye ve suplemental olarak önerilen iki antioksidan ajanın etkilerini hepatosellüler hücre hattı HepG2’de araştırdık. PQQ ve CoQ10’in mitokondriyal biyogenez, mitokondriyal disfonksiyon, anti-kanser etkinlik, hücre proliferasyonu ve göçü, gen ekspresyon düzeylerine olan etkisini ve son olarakta MitomiR ailesinin üyeleri olan miRNA’ların ekspresyon sevipleri üzerindeki etkilerini ortaya koyduk. İlaç uygulamalarımızın denemelerini ayrı ayrı ve kombine olarak gerçekleştirdik. Çalışmamız kapsamında yapmış olduğumuz tüm deneylerimizi 3 teknik tekrarlar gerçekleştirdik.

Çalışmamız kapsamında yapmış olduğumuz deneysel araştırmalar neticesinde ilk olarak elde etmiş olduğumuz veriler hücre canlılığına olan etki ve ilaçların IC₅₀ dozları olmuştur. Elde edilen bu dozlara göre uygulaması yapılan ilacın deney grubunda etkinliğinin olabilmesi için PQQ CoQ10’e göre daha yüksek miktarda kullanılması gerekmektedir. Yine kombine ilaç uygulamasında elde edilen verilere göre; yalnızca CoQ10 uygulaması daha az miktarda ilaçla daha etkili olabilmektedir. Anti kanser etkinliğin araştırıldığı çalışmalarda minimum ilaç kullanımı maksimum etki hedeflenmektedir. Çalışmamız bu kapsamda değerlendirildiğinde, yalnızca CoQ10 daha etkili bir kullanım ortaya koymaktadır. İlaç üreticileri tarafından PQQ ve CoQ10’e bir arada veya çeşitli ilaveler eklenip piyasaya sürülmektedir. Elde ettiğimiz veriler anti kanser etkinliği anlamında değerlendirilecek olursa CoQ10’in en etkin kullanımı kombine kullanıma kıyasla; yalnız ve tek başına yapılan kullanım olarak ortaya çıkmaktadır.

Hücre kültür çalışmalarında ilaç uygulamaları yapıldığında ilaç etkisi tek başına veya kombine olarak araştırılır. Kombine ilaç uygulaması yapıldığında daha az ilaç kullanımı ile maksimum terapötik etkinlik elde edilmeye çalışılır. Bu etkinin meydana gelebilmesi için ilaçların sinerjistik olarak etki etmesi gerekir. Kombinasyon kemoterapisinin kullanımı, ilaç etkinliğini artırma ve koruma sağlamanın yanında, doz azaltma şansı, azaltılmış toksisite ve ilaç direnci gelişiminin azalması veya geciktirilmesi gibi potansiyel olarak avantajlar da sağlar. Fakat aksi durum olduğunda daha yüksek konsantrasyonlarda ilaç kullanımı ile aynı etki meydana gelebilir (Palmer ve Sorger, 2017: 1678).

PQQ, CoQ10, PQQ+CoQ10 XTT relatif inhibisyon oranlarına ait okuma değerlerinin istatistiksel değerlendirilme sonuçları; PQQ için p değeri 0,2523, CoQ10 için p değeri 0,0368, PQQ+CoQ10 için p değeri 0,1731 olarak bulunmuştur. XTT okuma değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmasına göre yalnızca CoQ10 uygulaması istatistiksel olarak anlamlı

bulunmuştur. CoQ10 tespit edilen IC₅₀ konsantrasyonunda ve uygulama aralıklarında etkin kullanım olanağı sağlayacaktır. PQQ ve CoQ10 için ise daha geniş bir kullanım aralığında farklı konsantrasyonlarda denemeler yapılarak etkinliği araştırılabilir. PQQ, CoQ10, PQQ+CoQ10 XTT deneyi relatif inhibisyon oranlarının istatistiksel olarak gruplar arasında değerlendirildiğinde ($p<0,05$ anlamlılık düzeyinde) gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunamamıştır, bu sonuca göre uygulamalarda ilaçlar bağımsız olarak etkinlik gösterirler. Bu veri yine IC₅₀ dozlarımızda görüldüğü gibi yalnız başına CoQ10 kullanımı kombine kullanımdan daha az miktarda ilaçla daha yüksek etkinlik ortaya koymaktadır. Bu şekilde ilaç uygulama gruplarının bağımsızlığı desteklenmektedir.

Zhihui Min vd. üç farklı tümör hücre hattı ile yapmış oldukları çalışmada PQQ maddesinin anti-kanser etkinliğini araştırmışlardır. Yapmış oldukları çalışmada PQQ için IC₅₀ konsantrasyonunu 24 saatte sırasıyla 50.16 uM ve 56.21 uM olarak tespit etmişlerdir. PQQ, düşük konsantrasyonlarda (30-75 µM) apoptotik süreci tetiklediği ve daha yüksek konsantrasyonlarda ise (120-300 µM) apoptotik etkilerin önemli hale geldiği raporlanmıştır (Min vd., 2014: 609). Bizim çalışmamızda da tespit etmiş olduğumuz IC₅₀ (46,331 µM) bu çalışma ile uyumludur. (Şekil 4.1) Tespit etmiş olduğumuz konsantrasyon aralığında apoptotik süreç indüklenmiş ve kanser hücrelerinin sağ kalımı olumsuz yönde etkilenmiştir.

CoQ10'in kanser için faydaları, bağışıklık sisteminin geliştirilmesi ve antioksidan aktivite ile meydana gelir. Supplemental CoQ10 (günde 100-200 mg.) kemoterapötik ilaçların kardiyak hasarını, gastrointestinal sistemdeki olumsuz etkilerini önleyebilir. Sistematik bir derlemede, kanser hastalarında yapılan kontrollü çalışmalarda doxorubicin gibi kemoterapötik ilaçları alan hastalarda CoQ10'in kardiyotoksisite ve karaciğer toksisitesine karşı koruma sağladığı raporlanmıştır (Garrido-Maraver vd., 2014: 619). Bu özellik dolayısıyla, bizim çalışmamız kapsamında CoQ10 ve PQQ anti-kanser etkinliğinin araştırılması HepG2 hepatosellüler hücre hattında gerçekleştirilmiştir. Mitokondriyal özellikler ve biyogenezdeki değişimleri bu şekilde net olarak gözlemlemiş olduk.

Camptothecin, etoposide, doxorubicin ve methotrexate gibi kemoterapötik ilaçlar kanser hücre hatlarında COQ7, COQ4 ve COQ8 gen ekspresyonlarını yukarı yönde regülasyonu ile serbest radikal oluşumuna karşı antioksidan tepki olarak CoQ10 seviyelerinde artış meydana gelir. Bir çalışmada, meme kanserli kadınlarda ve kanserli meme dokularında, azalmış CoQ10 seviyeleri tespit edilmiş, azalmış CoQ10 seviyeleri kötü prognoz ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir. Bazı vaka raporları, günlük 390 mg. CoQ10 alımının daha önce metastaz tespit edilmiş hastalarda tümörün gerilemesi ve kaybolması ile sonuçlandığını rapor etmiştir.

Metastazı olmayan 117 melanom hastasında kontrol grubuna göre, plazma CoQ10 seviyeleri önemli derecede düşük bulunmuştur. Ayrıca metastaz gelişen hastalarda gelişmeyenlere göre daha düşük CoQ10 seviyeleri tespit edilmiştir. CoQ10'in düşük plazma seviyeleri servikal intraepitelyal neoplazia ve rahim ağzı kanserinde gösterilmiştir (Garrido-Maraver vd., 2014: 619). Çalışmamız kapsamında CoQ10 için hücre canlılığına olan etkisi araştırılarak kanser etkinliği olan hücrelere (HepG2 Hücre Hattı) dışarıdan verilen takviye dozların anti kanser etkinliği ortaya konmuştur. Çalışmalarımız kapsamında tespit etmiş olduğumuz IC₅₀ konsantrasyonu ve hücre canlılığının tayin edildiği deneylerin sonuçları CoQ10 uygulaması için hem uygulamada hem de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup ilgili çalışmalar desteklemektedir. (Şekil 4.2.) CoQ10 doğru kullanım dozu ile; anti kanser etkinlik göstermekte, kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve sağkalımını olumsuz yönde etkilemektedir.

Literatürde PQQ ve CoQ10'in kombine uygulama olarak hücre canlılığına etkisi daha önce araştırılmamıştır. HepG2 hücre hattında ise PQQ ve CoQ10'in etkinliği ve anti-kanser özellikleri daha önce ortaya konmamıştır. PQQ ve CoQ10 redoks faktörü olmaları, mitokondriyal disfonksiyonun önlenmesi ve mitokondriyal biyogeneze aktif rol almaları dolayısıyla mitokondriyal faaliyetlerin en yoğun olduğu karaciğer karsinomu hücre hattı HepG2'de hücre özelliklerini ilk kez ortaya koyduk. Elde ettiğimiz veriler neticesinde PQQ ve CoQ10 kombine kullanımda; kanser hücrelerinin sağkalımı üzerinde antagonist etki gösterdiklerini tespit ettik.

Hepatosellüler karsinom hücre hattı HepG2'de gerçekleştirmiş olduğumuz yara iyileşmesi deneyinde; deney sonuçlarına göre, PQQ uygulaması kontrol grubuna kıyasla yara kapanma alanını daraltmakta ve hücre proliferasyonunu arttırmaktadır. CoQ10 uygulaması ise kontrol grubuna kıyasla; yara alanının kapanmasını genişletmekte ve hücre proliferasyonunu engellediği tespit edilmiştir. Kombine uygulamada ise ilaçlar yara kapanmasını en fazla miktarda uyardığı ve hücre proliferasyonunu en yüksek oranda arttırdığını tespit ettik.

Nagwan Shanan vd., yapmış oldukları çalışmada PQQ ve resveratrolün serebellar granüler nöronların hayatta kalması ve rejenerasyonu üzerine etkisini araştırırken apoptoz ve hücre proliferasyonunun araştırıldığı aşamada, serebellar granüler nöron kültüründe yara iyileşmesi deneyi yapmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre; PQQ (0,5 µM) ve resveratrol (5 µM), yara bölgesinde nörit yeniden büyümesini destekleme eğilimi gösterdiğini; ancak bu etkinin istatistiksel olarak önemsiz olduğunu rapor etmişlerdir. Her iki ilacın kombinasyon uygulaması, tek başına resveratrol ile gözlenen etkiye benzer nörit yeniden büyüme dereceleri gösterdi ve iki ilaç arasında hiçbir sinerjistik etki gözlenmediğini raporlamışlardır (Shanan vd.,

2019: 192). Çalışma bu yönüyle bizim yapmış olduğumuz çalışma ile paralellik göstermektedir. Bizim çalışmamızda da PQQ yara iyileşmesini ve hücre proliferasyonunu arttırdığını rapor ettik.

B. Wan vd., bir tür kinon bileşiği olan P3H4 (Koenzim Q10/ubikinon analogu) ile yapmış oldukları bir çalışmada CoQ10'in renal kanser hücreleri (Renca) üzerinde proliferasyon ve migrasyon üzerine etkileri araştırmak amacıyla yara iyileşmesi deneyi yapmışlardır. Yara iyileştirme deneyinde, hücre göç yeteneğinin, kontrol grubuna kıyasla test grubunda belirgin şekilde engellendiğini raporlamışlardır (Wan vd., 2018: 5180). Bu sonuçlar bizim çalışmamızda yara iyileşmesi deneyinde elde etmiş olduğumuz sonuçlar ile uyumlu olup; hücre göç yeteneği kontrol grubuna kıyasla, CoQ10 uygulamasında engellendiği yönündeki bulgularımızla uyumludur.

Mitokondriyal sayılar, hücrenin enerji ihtiyaçlarına cevap vermek ve hücre hasarı telafi etmek için düzenlenir. Artan mitokondriyal sayılar, mitokondriyal biyogenezin ana düzenleyicisi olan PGC1- α tarafından desteklenir. Mart Dela Cruz vd., yapmış oldukları çalışmada pre-kanseröz lezyonları bulunduran hastaların PGC1- α ve mitokondriyal sayılarında artış tespit etmişlerdir. Oksidatif stresin mitokondriyal kütleyi arttırdığı bilindiğinden, mitokondriyal kütledeki artışın, karsinogenezin erken evrelerinde oksidatif stres tarafından yönlendirilmiş olabileceğini öne sürmektedirler (Cruz vd., 2017: 20543).

Hücredeki besin kaynağı ve enerji dengesi, hem transkripsiyonel hem de translasyon sonrası seviyede PGC-1 α aktivitesini modüle eder. Hücreler mitokondriyal hasara, mitokondriyal biyogenezi artırarak yanıt verir ve bu aynı zamanda yukarı regüle edilmiş PGC-1 α ekspresyonuna da bağlıdır. PGC-1 α , PPAR'lar, mTOR (YY1 üzerinde etkili) ve CREB (PKA sinyalinin aşağı akışı) tarafından transkripsiyonel olarak aktive edilir ve bu da mitokondriyal biyogenezin artmasına neden olur. PGC-1 α 'nın NAD⁺ bağımlı SIRT1 tarafından deasetilasyonu, mitokondriyal biyogenezi destekler ve PGC-1 α 'nın aktivitesinin hücredeki hem enerjiye hem de redoks dengesine duyarlı olmasını sağlar ERR α 'nın (Östrojen ilişkili reseptör α) PGC-1 α birlikte aktivasyonu, diğer mitokondriyal sirtuin hedefleri arasında mitokondriyal süperoksit dismutazın aktivasyonu yoluyla mitokondride ROS'un etkin bir şekilde temizlenmesini sağlayan mitokondriyal SIRT3 ekspresyonunu destekler. Son çalışmalar, PGC-1 α 'nın telomer disfonksiyonuna yanıt olarak p53 tarafından transkripsiyonel olarak baskılandığını göstermiştir. Bu durum yaşlanma süreci sırasında mitokondriyal biyogenezin azalmasını ve p53 mutasyona uğradığı kanserlerde mitokondriyal disfonksiyonun ve ROS'un artması ile ilişkilidir (Boland vd., 2013: 292).

PGC-1 α 'nın ana işlevlerinden biri hem mitokondriyal biyogenez hem de oksidatif fosforilasyon üzerinde hareket ederek elde edilen enerji metabolizmasının kontrolüdür. Bu , PGC-1 α 'nın mitokondriyal biyogenezde yer aldığını gösteren çok sayıda *in vitro* ve *in vivo* çalışma ile doğrulanmıştır. Aslında adipositlerde, kas hücrelerinde, kardiyak miyositlerde ve osteoblastlarda PGC-1 α 'nın aşırı ekspresyonu, mitokondriyal DNA miktarında bir artışa yol açar. PGC-1 α , nükleer DNA tarafından kodlanan mitokondriyal proteinlerin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörlerini aktive ederek mitokondriyal biyogenezi başlatır. Mitokondriyal DNA, mitokondriyal solunum zincirinin bazı protein alt birimlerini ve mitokondriyal protein sentezi için gerekli olan proteinleri kodlar. Diğer tüm mitokondriyal proteinler nükleer DNA tarafından kodlanır ve bu nedenle mitokondriyal biyogenez, bu iki genom arasında koordinasyon gerektirir. Bu koordinasyon, çekirdek tarafından kodlanan mitokondriyal genlerin ekspresyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörlerini aktive eden PGC-1 α tarafından düzenlenir. Örneğin, PGC-1 α , NRF1 ve NRF2'yi aktive ederek birkaç proteinin ekspresyonunu tetikler: β -ATP sentaz, sitokrom c, sitokrom c oksidaz alt birimleri, transkripsiyon faktörü A mitokondriyal (TFAM) ve transkripsiyon faktörü B1 M ve B2 M (TFB1M, TFB2M). İlginç bir şekilde, NRF'ler, mitokondriye translokasyon yapan ve mitokondriyal DNA'nın replikasyonu, transkripsiyonu ve korunmasında önemli bir rol oynayan bir transkripsiyonel aktivatör olan TFAM'yi indükler. PGC-1 α , TFAM'nin ekspresyon seviyesini düzenleyerek, mitokondriyal DNA tarafından kodlanan proteinlerin ekspresyonunu kontrol eder (Bost ve Kaminski, 2019: 198).

Çalışmamızın qRT-PCR aşamasının verilerine göre; PQQ ve CoQ10 uygulaması PGC1- α gen ekspresyonunu yukarı yönde regüle etmektedir. Yalnızca CoQ10 uygulaması 24,91 katlık bir ekspresyon artışına sebep olmuşken yalnızca PQQ uygulaması 19,04 katlık bir ekspresyon artışına sebep olmuştur. Fakat ilaçların kombine uygulaması, ayrı ayrı uygulamalarına göre; PGC1- α geninin ekspresyonu çok daha az miktarda arttırmıştır. PQQ+CoQ10 kombine uygulaması PGC1- α gen ekspresyonunu 5,19 kat arttırmıştır. (Şekil 4.6.) İlaçların kombine uygulaması ayrı ayrı uygulamaya göre antagonist etki meydana getirerek PGC1- α geni için ekspresyon sevisinde azalmaya sebep olmuştur. PGC1- α geni için fold change değerleri; gen ekspresyonu kontrol grubuna göre her üç uygulamada da artmış olmuştur. (p=0,1094)

Uygulamasını yaptığımız hücre hattında PQQ ve CoQ10 maruziyeti, PGC-1 α ekspresyonunu yukarı yönde regüle etmektedir. Artan PGC-1 α ekspresyonu artan mitokondriyal biyogenez, mitokondriyal fonksiyon ve düşük ROS seviyeleri ile ilişkilidir. Her

iki antioksidan ajana maruziyet mitokondriyal fonksiyon üzerine aktive etmektedir. Kombine kullanımın ise bu etkiyi azalttığını rapor ettik.

Nükleer solunum faktörleri, mitokondriyal fonksiyonun sürdürülebilirliği için hayati önem taşırlar. Mitokondriyal biyogenez, peroksizom çoğaltıcı aktivatör reseptör-alfa (PPAR α), PPAR- γ , nükleer solunum faktörü 1 (NRF-1), nükleer solunum faktörü 2 (NRF-2) ve östrojen ile ilgili olan reseptörler (ERR) α , β , γ gibi nükleer transkripsiyon faktörlerinin bir hiyerarşisinin aktivitesine bağlıdır. NRF-1 ve NRF-2, antioksidan genlere ek olarak sitokrom c ve CO alt birimleri gibi solunum zinciri bileşenlerinin ekspresyonunu modüle ederken, ERR faktörleri yağ asidi oksidasyonu, Krebs döngüsü ve oksidatif fosforilasyon ile ilgili genlerin ekspresyonunu düzenler. Bu transkripsiyon faktörlerinin tümü, ilk olarak kahverengi adipositlerde PPAR γ 'nin bir ko-aktivatörü olarak tanımlanan PPAR- γ yardımcı aktivatörü 1-alfa (PGC-1 α) üzerindeki aktiviteleri için kritik derecede bağımlıdır. Yapısal ve işlevsel olarak ilişkili proteinler ile birlikte, PGC-1 β ve PRC (PGC ile ilgili ortak aktivatör), NRF-2, ERR α ve PPAR γ dahil olmak üzere yukarıda belirtilen transkripsiyon faktörlerinin koordineli aktivasyonu yoluyla mitokondriyal biyogenezi, hücrel metabolizmayı ve antioksidan tepkileri teşvik eder. Artan mitokondriyal biyogenez yoluyla besin stresine yanıt olarak mitokondriyal kütle artar. Peroksizom çoğaltıcı aktivatör reseptör-gama ortak aktivatör 1-alfa (PGC-1 α), NRF-1, NRF-2, ERR α , β , γ ve PPAR γ 'nin birlikte aktivasyonu yoluyla besin mevcudiyetine ve biyogenezin indüklenmesine verilen tepkileri koordine etmek için önemli aşamadır (Boland vd., 2013: 292). Çalışmamızda bu bağlamda; NRF-1 ve NRF-2 genlerinin etkilerini araştırdık. PQQ ve CoQ10 uygulamasının NRF-1 gen ekspresyonu üzerine etkilerini incelediğimizde; her üç uygulamada da (PQQ-CoQ10-PQQ+CoQ10) kontrol grubuna kıyasla gen ekspresyonunu arttırmadığını aksine kontrol grubundan daha az ekspresyona neden olduğunu tespit ettik. (Şekil 4.7.) Elde ettiğimiz sayısal verileri grup içinde istatistiksel olarak değerlendirdiğimizde; $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde p değerini 0,0139 olarak tespit ederek istatistiksel olarak anlamlı bulduk. NRF-2 geni için ise sadece PQQ uygulamasında kontrol grubuna kıyasla çok az miktarda bir ekspresyon artışı tespit ettik. CoQ10 ve kombine ilaç uygulamamızda kontrol grubuna kıyasla ekspresyonda azalma tespit ettik. (Şekil 4.8.) NRF-2 genine ait verileri grup içinde istatistiksel olarak değerlendirdiğimizde; $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde, p değerini 0,0210 olarak tespit ederek istatistiksel olarak anlamlı bulduk.

Winyoo Chohanadisai vd., yapmış oldukları çalışmada, Hepa1-6 hücrelerinde PQQ'nun mitokondriyal biyogenez üzerindeki etkisini araştırmışlardır. PQQ'nun PGC-1 α mRNA ve protein ekspresyonu üzerindeki etkileri ve NRF-1, NRF-2, CREB ve PGC-1 α

promotör aktivasyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hücreler, NRF-1 veya NRF-2 için yanıt elemanları içeren bir raportör plazmit ile transfekte edilmesinin ardından, PQQ'a maruz bırakılmışlardır. Çalışmada PQQ maruziyetinin, NRF-1 ve NRF-2 promotörlerinde aktivasyon artışı ve PGC-1 α mRNA, protein ve promotör aktivasyonunda artış meydana getirdiğini rapor etmişlerdir (Chowanadisai vd., 2010: 142).

Düşük NRF-1 ve NRF-2 ekspresyonu; oksidatif fosforilasyon kapasitesinde azalma, zayıf antioksidan kapasite, düşük hücrel metabolizma gibi durumlara sebebiyet verir. PQQ ve CoQ10 gibi antioksidan ajanların maruziyeti sonucu, nükleer solunum faktörlerinin ekspresyon seviyelerinde artış beklenir. Bizim çalışmamızda, PQQ maruziyeti Winyoo Chowanadisai vd.,'nin yapmış oldukları çalışma ile PGC-1 α geninin ekspresyon seviyelerindeki artış dolayısıyla paralellik gösterse de NRF-1 ve NRF-2 genlerinin ekspresyon seviyeleri bakımından benzer sonuçlar mevcut değildir. NRF-1 ve NRF-2 genleri için farklı sonuçların rapor edilmesinde gen ekspresyonunu ölçme tekniklerinin farklılığından kaynaklanabilir.

Xing Li vd., yapmış oldukları çalışmada CoQ10'in Nrf-2/ARE sinyal yolunun oksidatif stres ve apoptoza karşı koruyuculuğuna etkisini araştırmak için Western Blot tekniği ile Nrf-2 ve NQO-1 proteinlerinin seviyeleri ölçülmüştür. CoQ10 muamelesinin Nrf-2 ve NQO-1 protein seviyelerini arttırdığını rapor etmişlerdir (Liv d., 2019: 6493081). Çalışmamızda PQQ ve CoQ10 uygulamasına bağlı olarak, NRF-1 ve NRF-2 gen ekspresyon seviyelerinde tespit etmiş olduğumuz azalma gen düzeyinde olup protein seviyelerinde farklı etkileşimler meydana gelebilir.

PQQ ve CoQ10 güçlü antioksidan özellikleri ile bilinen iki önemli bileşendir. Bu özellikleri dolayısıyla çalışmamızda NF κ B gen ekspresyon seviyelerine olan etkisini araştırdık. NF- κ B sitoplazmada bulunur ve normal hücrelerde I κ B ile kompleks oluşturur. Stres, serbest radikaller ve ROS tarafından uyarıldığında, NF- κ B aktive olur, bu da p65'in fosforilasyonuna yol açar. Fosforile edilmiş p65, sitozolden çekirdeğe yer değiştirir ve ROS'u aktive ederek sonunda oksidatif stres meydana gelir (Li vd., 2019: 6544). Elde ettiğimiz verilere göre; NF κ B gen ekspresyon seviyesinde, PQQ uygulaması 116,52 katlık bir artış, CoQ10 uygulaması 51,26 katlık bir artış, PQQ+CoQ10 kombine uygulaması ise 13,46 katlık bir artış meydana getirmiştir. (Şekil 4.9.) Uygulaması yapılan ilaçlardan NF κ B gen ekspresyon seviyesine en fazla miktarda PQQ olurken, PQQ+CoQ10 kombine uygulamasında ilaçlar birbirinin etkisini düşürecek yönde antagonist olarak etki meydana getirmiştir. Elde edilen verileri istatistiksel olarak

değerlendirdiğimizde; $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde, p değerini 0,1766 istatistiksel olarak anlamlı olmayacak şekilde tespit ettik.

Elde ettiğimiz verilere göre; NF κ B gen ekspresyon seviyesinde, en fazla PQQ, ardından CoQ10 uygulaması son olarak ise PQQ+CoQ10 kombine uygulaması ekspresyon artışı meydana getirmektedir. (Şekil 4.9.) Uygulaması yapılan ilaçlardan NF κ B gen ekspresyon seviyesine en fazla miktarda artışa PQQ olurken, PQQ+CoQ10 kombine uygulaması en düşük ekspresyon artışını meydana getirmiştir. Elde edilen verileri istatistiksel olarak değerlendirdiğimizde; istatistiksel olarak anlamlı bulmadık.

Lixia Liu vd., C2C12 fare iskelet miyoblast hücre hattında yapmış oldukları çalışmada PQQ'nun ROS birikimini önemli ölçüde aşağı yönde regüle ettiği, önemli antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırdığını ve NF κ B fosforilasyonunda azalma meydana getirdiğini rapor etmişlerdir. Kanser hücre hattında antioksidan ajana maruziyet, hücrelerin oksidatif stresini azaltması beklenir, dolayısıyla NF- κ B geninin ekspresyonu da yine azalması beklenir. Çalışmalarımız bu yönüyle paralellik göstermemektedir, kullanmış oldukları hücrelerin kanser hücreleri olmaması dolayısıyla hücreler hepatosellüler karsinom hücre hattı HepG2 hücreleri ile antioksidan özellikler bakımından farklı ekspresyon seviyeleri ortaya koyabilir (Liu vd., 2021: 21934). Çalışmamız kapsamında PQQ ve CoQ10 uygulamasının NF κ B ve antioksidan özellikler üzerindeki etkileri istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte bu durum farklı hücre hatlarında da araştırılmalıdır.

Çalışmamız kapsamında qRT-PCR aşamasında uygulaması yapılarak gen ekspresyon seviyelerine etkisi araştırılan ilaç grupları arasında istatistiksel olarak değerlendirdiğimizde anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. PGC1- α , NRF-1, NRF-2, NF κ B genlerin ekspresyon seviyelerine etkisi bakımından PQQ, CoQ10 ve PQQ+CoQ10 uygulaması gruplar aralarında bağımsızdır. İlgili genler ve ilaçlar uygulamaları dolayısıyla birbirleri ile ilişkili olmadığı tespit edilmiştir.

MitomiR ailesinden; miR-16-1, miR-15a ve miR181c çalışmamız kapsamında ekspresyon düzeylerini araştırdığımız miRNA'lardır. miR-15a ve miR-16-1, mitokondriyal fonksiyonun düzenlenmesi yoluyla apoptozu indükler. miR-15a, sitozole sitokrom c salınımı ve mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması ile gösterilen mitokondriyal disfonksiyonu teşvik eder (Li vd., 2012: 1104). miR181-c mitokondriyal oksidatif metabolizmada görev alan ve mitokondriyal enerji metabolizmasını düzenleyen önemli bir miRNA'dır. miR181c'nin aşırı ekspresyonu mitokondriyal birimler arasında bir dengesizliğe

neden olarak ROS oluşumunu teşvik eder (Das vd., 2012: 1596). miRNA'lar bu özellikleri dolayısıyla mitokondriyal hasar, karsinogenez ve bozulan membran potansiyelleri olması durumunda normal hücre fonksiyonlarına göre daha fazla aktive olmaları beklenir. Çalışmamız kapsamında hepatosellüler hücre hattı HepG2'de uygulaması yapılan PQQ ve CoQ10'e bağlı olarak MitomiR ekspresyonunun kontrol grubuna göre daha fazla ifade edilmesi, mitokondriyal fonksiyon ve antioksidan metabolizma için avantaj kabul edilmiştir. Çalışmamızın qRT-PCR sonuçlarına göre, miR16-1 kontrol grubuna kıyasla üç ilaç uygulama grubunda da (PQQ,CoQ10, PQQ+CoQ10) daha fazla ifade edilmiştir. (Şekil 4.10.) Kombine uygulama ilaçların etkinliğini arttırmış olup sinerjistik etki meydana getirmiştir. miR15a'da da, yine benzer sonuçlar elde edilmiş olup her üç uygulama grubu da (PQQ,CoQ10, PQQ+CoQ10) kontrol grubuna kıyasla aşağı yönde regüle olmuştur. (Şekil 4.11.) Kombine uygulama ilaçların etkinliğini arttırmış olup sinerjistik etki meydana getirmiştir. miR181c ise; her üç uygulama grubunun (PQQ,CoQ10, PQQ+CoQ10) aşağı yönde regüle olması dolayısıyla benzer sonuçlar ortaya koysa da en fazla etki PQQ uygulamasında olmuştur. (Şekil 4.12.) Kombine uygulama ise miR181c'nin ifade düzeyini olumsuz yönde etkilemiştir. Elde edilen veriler $p<0,05$ anlamlılık düzeyinde her grup içinde karşılaştırıldığında yalnızca miR181-c ($p=0,0028$) için elde edilen değerler anlamlı bulunmuştur. İlaç uygulamaları gruplar aralarında istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. İlgili ilaç uygulamaları çalışmada araştırılan miRNA'lar için ortak bir etki göstermediği tespit edilmiştir.

Bazı miRNA'ların (miR-192, miR-146a, miR-148a, miR-15a ve miR-21) ilaca bağlı karaciğer hasarında yukarı yönde regüle edildiği bildirilmiştir. Sharon Lt vd., yapmış oldukları çalışmada CoQ10'in farklı biyokimyasal biyobelirteçler ve miRNA ekspresyon düzeylerine etkisini araştırmışlardır. Elde etmiş oldukları sonuçlara göre miR-15a ekspresyon seviyelerini aşağı yönde beklerken yüksek ekspresyon seviyeleri ile karşılaşmışlardır, hastalarda dolaşan miR-15a kaynağının başka organlardan olabileceğini öne sürmüşlerdir (Pek vd., 2016: 317). Fakat bizim çalışmamızda beklendiği üzere miR15-a için her üç uygulamada aşağı yönde regülasyon tespit edilmiştir.

PQQ ve CoQ10 uygulamasının miR-16-1 ve miR181c ekspresyon seviyelerine olan etkisinin araştırılması üzerine literatürde mevcut yayın olmadığından bu etkiler çalışmamız kapsamında ilk kez ortaya konmuştur.

KAYNAKÇA

Aguilar, F., Hussain, S. P., & Cerutti, P. (1993). Aflatoxin B1 induces the transversion of G->T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(18), 8586–8590.

Arenas-Jal, M., Suñé-Negre, J. M., & García-Montoya, E. (2020). Coenzyme Q10 supplementation: Efficacy, safety, and formulation challenges. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 19(2), 574-594.

Asafo-Agyei, K. O., & Samant, H. (2022). Hepatocellular Carcinoma [M]. *StatPearls*. Treasure Island (FL).

Ascha, M. S. vd. (2010). The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51(6), 1972–1978.

Atcc.org (2023). [Erişim: 03.05.2023, <https://www.atcc.org/products/hb-8065#detailed-product-images>]

Boland, M. L., Chourasia, A. H., & Macleod, K. F. (2013). Mitochondrial dysfunction in cancer. *Frontiers in oncology*, 3, 292.

Bost, F., & Kaminski, L. (2019). The metabolic modulator PGC-1 α in cancer. *American journal of cancer research*, 9(2), 198–211.

Bray, F. vd. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.

Brooks, P. J., & Theruvathu, J. A. (2005). DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 35(3), 187–193.

Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: clinical and experimental*, 65(8), 1038–1048.

Cagatay, T., & Ozturk, M. (2002). P53 mutation as a source of aberrant beta-catenin accumulation in cancer cells. *Oncogene*, 21(52), 7971–7980.

Cevik, D., Yildiz, G., & Ozturk, M. (2015). Common telomerase reverse transcriptase promoter mutations in hepatocellular carcinomas from different geographical locations. *World journal of gastroenterology*, 21(1), 311–317.

Chemodex.com (2023). [Erişim: 03.05.2023,<https://www.chemodex.com/products/coenzyme-q10/>]

Chen, S. D. vd. (2011). Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1 α and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. *International journal of molecular sciences*, 12(10), 7199–7215.

Chidambaranathan-Reghupaty, S., Fisher, P. B., & Sarkar, D. (2021). Chapter One-Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification. *Advances in Cancer Research. Vol 149. Mechanisms and Therapy of Liver Cancer*, 1-61.

Chowanadisai, W. vd. (2010). Pyrroloquinoline quinone stimulates mitochondrial biogenesis through cAMP response element-binding protein phosphorylation and increased PGC-1 α expression. *Journal of Biological Chemistry*, 285(1), 142-152.

Cruz, M. D. vd. (2017). Metabolic reprogramming of the premalignant colonic mucosa is an early event in carcinogenesis. *Oncotarget*, 8(13), 20543–20557.

Das, S. vd. (2012). Nuclear miRNA regulates the mitochondrial genome in the heart. *Circulation research*, 110(12), 1596–1603.

Datta, J. vd. (2008). Methylation mediated silencing of MicroRNA-1 gene and its role in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer research*, 68(13), 5049–5058.

Ding, Z. vd. (2017). Oncogenic dependency on β -catenin in liver cancer cell lines correlates with pathway activation. *Oncotarget*, 8(70), 114526–114539.

Donato, F., Boffetta, P., & Puoti, M. (1998). A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *International journal of cancer*, 75(3), 347-354.

Donohue T. M., Jr (2007). Alcohol-induced steatosis in liver cells. *World journal of gastroenterology*, 13(37), 4974–4978.

Dülgeroğlu, Y. & Eroğlu, O. (2019). Diagnostic performance of microRNAs in the circulation in differential diagnosis of BPH, chronic prostatitis and prostate cancer. *Turkish Journal of Biochemistry*, 44(4), 417-425.

El-Serag, H. B., & Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7), 2557–2576.

- Estes, C. vd.** (2018). Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 67(1), 123–133.
- Fang, Y. vd.** (2022). Circulating microRNAs (miR-16, miR-22, miR-122) expression and early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Journal of clinical laboratory analysis*, 36(7), e24541.
- Ganne-Carrié, N., & Nahon, P.** (2019). Hepatocellular carcinoma in the setting of alcohol-related liver disease. *Journal of hepatology*, 70(2), 284–293.
- Gao, B., & Bataller, R.** (2011). Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology*, 141(5), 1572–1585.
- Garrido-Maraver, J. vd.** (2014). Clinical applications of coenzyme Q10. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 19(4), 619-633.
- Globacan** (2020). [Erişim: 02.05.2023, [https //gco.iarc.fr/](https://gco.iarc.fr/)]
- Globacan** (2020). [Erişim:02.05.2023, <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>]
- Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B.** (2008). Mitochondria in cancer cells: what is so special about them?. *Trends in cell biology*, 18(4), 165–173.
- Guichard, C. vd.** (2012). Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nature genetics*, 44(6), 694–698.
- Hamid, A. S. vd.** (2013). Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention. *Oncology letters*, 5(4), 1087–1092.
- He, F. vd.** (2020). NRF2 activates growth factor genes and downstream AKT signaling to induce mouse and human hepatomegaly. *Journal of hepatology*, 72(6), 1182–1195.
- Herzig, S. vd.** (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*, 413(6852), 179–183.
- Huang, H. C., Nguyen, T., & Pickett, C. B.** (2002). Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *The Journal of biological chemistry*, 277(45), 42769–42774.
- Indrieri, A. vd.** (2020). The Pervasive Role of the miR-181 Family in Development, Neurodegeneration, and Cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 2092.

- Jiang, K., & Centeno, B. A.** (2018). Primary liver cancers, part 2: progression pathways and carcinogenesis. *Cancer Control*, 25(1), 1073274817744658.
- Jonscher, K. R., Chohanadisai, W., & Rucker, R. B.** (2021). Pyrroloquinoline-quinone is more than an antioxidant: a vitamin-like accessory factor important in health and disease prevention. *Biomolecules*, 11(10), 1441.
- Karin, M., & Ben-Neriah, Y.** (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annual review of immunology*, 18, 621–663.
- Kerins, M. J., & Ooi, A.** (2018). A catalogue of somatic NRF2 gain-of-function mutations in cancer. *Scientific reports*, 8(1), 12846.
- Kew M. C.** (2003). Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 23(6), 405–409.
- Klinge, C. M.** (2020). Estrogenic control of mitochondrial function. *Redox biology*, 31, 101435.
- Knutti, D., Kressler, D., & Kralli, A.** (2001). Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17), 9713–9718.
- Kosters, A., & Karpen, S. J.** (2010). The role of inflammation in cholestasis: clinical and basic aspects. *Seminars in liver disease*, 30(2), 186–194.
- Kumar, P. vd.** (2017). Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. *Frontiers in microbiology*, 7, 2170.
- Leone, T. C. vd.** (2005). PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS biology*, 3(4), e101.
- Leong, T. Y. M., & Leong, A. S. Y.** (2005). Epidemiology and carcinogenesis of hepatocellular carcinoma. *Hpb*, 7(1), 5-15.
- Lewandowska, A. M. vd.** (2018). Environmental risk factors for cancer-review paper. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 26(1), 1-7.
- Li, P. vd.** (2012). Control of mitochondrial activity by miRNAs. *Journal of cellular biochemistry*, 113(4), 1104-1110.

- Li, X. vd.** (2019). Coenzyme Q10 Regulation of Apoptosis and Oxidative Stress in H₂O₂ Induced BMSC Death by Modulating the Nrf-2/NQO-1 Signaling Pathway and Its Application in a Model of Spinal Cord Injury. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 6493081.
- Li, X. vd.** (2019). Coenzyme Q10 suppresses oxidative stress and apoptosis via activating the Nrf-2/NQO-1 and NF-κB signaling pathway after spinal cord injury in rats. *American journal of translational research*, 11(10), 6544–6552.
- Lin, J. vd.** (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *The Journal of biological chemistry*, 277(3), 1645–1648.
- Lin, W. vd.** (2010). Hepatitis C virus regulates transforming growth factor beta1 production through the generation of reactive oxygen species in a nuclear factor kappaB-dependent manner. *Gastroenterology*, 138(7), 2509–2518.e1.
- Liu, B. vd.** (2017). MiR-15a suppresses hepatocarcinoma cell migration and invasion by directly targeting *cMyb*. *American journal of translational research*, 9(2), 520–532.
- Liu, H. T. vd.** (2016). Effects of coenzyme Q10 supplementation on antioxidant capacity and inflammation in hepatocellular carcinoma patients after surgery: a randomized, placebo-controlled trial. *Nutrition journal*, 15(1), 85.
- Liu, H., & Dong, Z.** (2021). Cancer Etiology and Prevention Principle:“1+ X” Cancer Etiology and Prevention Principle:“1+ X”. *Cancer Research*, 81(21), 5377-5395.
- Liu, L. vd.** (2021). Pyrroloquinoline quinone protects against exercise-induced fatigue and oxidative damage via improving mitochondrial function in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 35(4), e21394.
- López-Terrada, D. vd.** (2009). Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Human pathology*, 40(10), 1512–1515.
- Luedde, T. vd.** (2007). Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer cell*, 11(2), 119–132.
- Luedde, T., & Schwabe, R. F.** (2011). NF-κB in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 8(2), 108–118.

- Luedde, T., & Trautwein, C.** (2006). Intracellular survival pathways in the liver. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 26(10), 1163–1174.
- Luu, H. H. vd.** (2004). Wnt/beta-catenin signaling pathway as a novel cancer drug target. *Current cancer drug targets*, 4(8), 653–671.
- Mahmoud, A. M. vd.** (2017). Hesperidin protects against chemically induced hepatocarcinogenesis via modulation of Nrf2/ARE/HO-1, PPAR γ and TGF- β 1/Smad3 signaling, and amelioration of oxidative stress and inflammation. *Chemico-biological interactions*, 277, 146–158.
- Mahmoudvand, S. vd.** (2019). Hepatitis C virus core protein modulates several signaling pathways involved in hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology*, 25(1), 42–58.
- Mansouri, A., Gattolliat, C. H., & Asselah, T.** (2018). Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases. *Gastroenterology*, 155(3), 629–647.
- Maurice, J., & Manousou, P.** (2018). Non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical medicine (London, England)*, 18(3), 245–250.
- McMahon, M. vd.** (2003). Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *The Journal of biological chemistry*, 278(24), 21592–21600.
- Michael, L. F. vd.** (2001). Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), 3820–3825.
- Min, Z. vd.** (2014). Pyrroloquinoline Quinone Induces Cancer Cell Apoptosis via Mitochondrial-Dependent Pathway and Down-Regulating Cellular Bcl-2 Protein Expression. *Journal of Cancer*, 5(7), 609–624.
- Mitchell, S., Vargas, J., & Hoffmann, A.** (2016). Signaling via the NF κ B system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 8(3), 227–241.
- Moinzadeh, P. vd.** (2005). Chromosome alterations in human hepatocellular carcinomas correlate with aetiology and histological grade--results of an explorative CGH meta-analysis. *British journal of cancer*, 92(5), 935–941.

Münger, K., & Howley, P. M. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus research*, 89(2), 213–228.

Nam, S. W. vd. (2006). Comparative analysis of expression profiling of early-stage carcinogenesis using nodule-in-nodule-type hepatocellular carcinoma. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 18(3), 239–247.

Nguyen, K. C., Willmore, W. G., & Tayabali, A. F. (2013). Cadmium telluride quantum dots cause oxidative stress leading to extrinsic and intrinsic apoptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Toxicology*, 306, 114–123.

Ogunwobi, O. vd. (2019). Mechanisms of hepatocellular carcinoma progression. *World journal of gastroenterology*, 25(19), 2279–2293.

Palmer, A. C., & Sorger, P. K. (2017). Combination Cancer Therapy Can Confer Benefit via Patient-to-Patient Variability without Drug Additivity or Synergy. *Cell*, 171(7), 1678–1691.e13.

Pek, S. L. vd. (2016). MicroRNAs as biomarkers of hepatotoxicity in a randomized placebo-controlled study of simvastatin and ubiquinol supplementation. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 241(3), 317–330.

Peng, X. M., Peng, W. W., & Yao, J. L. (1998). Codon 249 mutations of p53 gene in development of hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology*, 4(2), 125–127.

Petruzziello, A. vd. (2016). Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World journal of gastroenterology*, 22(34), 7824.

Pierantonelli, I., & Svegliati-Baroni, G. (2019). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Basic Pathogenetic Mechanisms in the Progression From NAFLD to NASH. *Transplantation*, 103(1), e1–e13.

Puigserver, P. vd. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92(6), 829–839.

Ramos, J. vd. (2018). NRF1 motif sequence-enriched genes involved in ER/PR -ve HER2 +ve breast cancer signaling pathways. *Breast cancer research and treatment*, 172(2), 469–485.

Rencelj, A., Gvozdenovic, N., & Cemazar, M. (2021). MitomiRs: their roles in mitochondria and importance in cancer cell metabolism. *Radiology and Oncology*, 55(4), 379–392.

Romero-Gallo, J. vd. (2005). Inactivation of TGF-beta signaling in hepatocytes results in an increased proliferative response after partial hepatectomy. *Oncogene*, 24(18), 3028–3041.

Sakurai, T. vd. (2008). Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis. *Cancer cell*, 14(2), 156–165.

Sarma, U. P. vd. (2017). Aflatoxins: Implications on Health. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 32(2), 124–133.

Sartorius, K. vd. (2019). The regulatory role of microRNA in hepatitis-B virus-associated hepatocellular carcinoma (HBV-HCC) pathogenesis. *Cells*, 8(12), 1504.

Satoh, J., Kawana, N., & Yamamoto, Y. (2013). Pathway Analysis of ChIP-Seq-Based NRF1 Target Genes Suggests a Logical Hypothesis of their Involvement in the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Gene regulation and systems biology*, 7, 139–152.

Scarpulla, R. C. (2011). Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular cell research*, 1813(7), 1269-1278.

Schilsky, R. vd. (2020) Progress in cancer research, prevention, and care. *The New England journal of medicine*, 383(10), 897-900.

Schuppan, D. vd. (2018). Liver fibrosis: Direct antifibrotic agents and targeted therapies. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 68-69, 435–451.

Schwabe, R. F., Seki, E., & Brenner, D. A. (2006). Toll-like receptor signaling in the liver. *Gastroenterology*, 130(6), 1886–1900.

Shanan, N. vd. (2019). The effect of Pyrroloquinoline quinone and Resveratrol on the Survival and Regeneration of Cerebellar Granular Neurons. *Neuroscience letters*, 694, 192–197.

Shih, Y. vd. (2006). Promoter methylation of the secreted frizzled-related protein 1 gene SFRP1 is frequent in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 107(3), 579–590.

Sigmaaldrich.com (2023). [Erişim: 03.05.2023, <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/d7783>]

Simon, Daniela & Aden, David & Knowles, Barbara. (1982). Chromosomes of human hepatoma cell line. *International Journal of Cancer*. 30. 27 - 33.

Singh, A. vd. (2013). Transcription factor NRF2 regulates miR-1 and miR-206 to drive tumorigenesis. *The Journal of clinical investigation*, 123(7), 2921–2934.

Srinivasan, S. vd. (2017). Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection. *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics*, 1858(8), 602–614.

Steiner, M. S., & Barrack, E. R. (1992). Transforming growth factor-beta 1 overproduction in prostate cancer: effects on growth in vivo and in vitro. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 6(1), 15–25.

St-Pierre, J. vd. (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*, 127(2), 397–408.

Suh, S. I. vd. (2000). 5-Aza-2'-deoxycytidine leads to down-regulation of aberrant p16INK4A RNA transcripts and restores the functional retinoblastoma protein pathway in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer letters*, 160(1), 81–88.

Sung, H. vd. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249

Szabo, G., & Bala, S. (2010). Alcoholic liver disease and the gut-liver axis. *World journal of gastroenterology*, 16(11), 1321–1329.

Taniguchi, K. vd. (2002). Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene*, 21(31), 4863–4871

Terris, B. vd. (1999). Close correlation between beta-catenin gene alterations and nuclear accumulation of the protein in human hepatocellular carcinomas. *Oncogene*, 18(47), 6583–6588.

Teufel, A. vd. (2007). Genetics of hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology*, 13(16), 2271–2282.

Tomlinson, G. E. vd. (2005). Cytogenetic evaluation of a large series of hepatoblastomas: numerical abnormalities with recurring aberrations involving 1q12-q21. *Genes, chromosomes & cancer*, 44(2), 177–184.

Turati, F. vd. (2014). Alcohol and liver cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 25(8), 1526–1535.

- Ueno, T. vd.** (2001). Relation of type II transforming growth factor-beta receptor to hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma. *International journal of oncology*, 18(1), 49–55.
- Valcarcel-Jimenez, L. vd.** (2017). Mitochondrial Metabolism: Yin and Yang for Tumor Progression. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 28(10), 748–757.
- Valderrama-Treviño, A. I. vd.** (2017). Hepatic metastasis from colorectal cancer. *Euroasian journal of hepato-gastroenterology*, 7(2), 166.
- Villanueva, A., & Luedde, T.** (2016). The transition from inflammation to cancer in the liver. *Clinical liver disease*, 8(4), 89-93.
- Vrba, J., & Modrianský, M.** (2002). Oxidative burst of Kupffer cells: target for liver injury treatment. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 146(2), 15–20.
- Vyas, S., Zaganjor, E., & Haigis, M. C.** (2016). Mitochondria and Cancer. *Cell*, 166(3), 555–566.
- Wan, B. vd.** (2018). P3H4 affects renal carcinoma through up-regulating miR-1/133a. *European review for medical and pharmacological sciences*, 22(16), 5180–5186.
- Wang, B. vd.** (2010). TGFbeta-mediated upregulation of hepatic miR-181b promotes hepatocarcinogenesis by targeting TIMP3. *Oncogene*, 29(12), 1787–1797.
- Wang, G. vd.** (2020). Oncogenic driver genes and tumor microenvironment determine the type of liver cancer. *Cell death & disease*, 11(5), 313.
- Wang, X. vd.** (2018). MicroRNA-18a promotes hepatocellular carcinoma proliferation, migration, and invasion by targeting Bcl2L10. *OncoTargets and therapy*, 7919-7934.
- Wende, A. R. vd.** (2007). A role for the transcriptional coactivator PGC-1alpha in muscle refueling. *The Journal of biological chemistry*, 282(50), 36642–36651.
- Wiemann, S. U. vd.** (2002). Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(9), 935–942.
- Wiśniewski, J. R. vd.** (2016). In-depth quantitative analysis and comparison of the human hepatocyte and hepatoma cell line HepG2 proteomes. *Journal of proteomics*, 136, 234–247.
- Xu, J. vd.** (2020). Dysregulated microRNAs in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: potential as biomarkers and therapeutic targets. *Frontiers in oncology*, 10, 1271.

Yamada, Y. vd. (2020). Effects of pyrroloquinoline quinone and imidazole pyrroloquinoline on biological activities and neural functions. *Heliyon*, 6(1), e03240.

Yongyu, Z. vd. (2018). MicroRNA-18a Targets IRF2 and CBX7 to Promote Cell Proliferation in Hepatocellular Carcinoma. *Oncology research*, 26(9), 1327–1334.

Younossi Z. M. (2019). Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective. *Journal of hepatology*, 70(3), 531–544.

Yu, J. vd. (2003). Methylation profiling of twenty four genes and the concordant methylation behaviours of nineteen genes that may contribute to hepatocellular carcinogenesis. *Cell research*, 13(5), 319–333.

Zong, W. X., Rabinowitz, J. D., & White, E. (2016). Mitochondria and Cancer. *Molecular cell*, 61(5), 667–676.