

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA DİETİLNİTROZAMİN İLE OLUŞTURULAN
KARACİĞER KANSERİNDE THERANEKRON VE
KEMOTERAPİ UYGULAMALARININ; KARSİNOGENEZİS,
APOPTOZİS VE BİYOKİMYASAL PROFİLE ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMALI DEĞERLENDİRİLMESİ**

Serdar VANLI

DOKTORA TEZİ

VETERİNER FAKÜLTESİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Firuze KURTOĞLU

KONYA-2023

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA DİETİLNİTROZAMİN İLE OLUŞTURULAN
KARACİĞER KANSERİNDE THERANEKRON VE
KEMOTERAPİ UYGULAMALARININ; KARSİNOGENEZİS,
APOPTOZİS VE BİYOKİMYASAL PROFİLE ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMALI DEĞERLENDİRİLMESİ**

Serdar VANLI

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Firuze KURTOĞLU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 20212025 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2023

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın yürütülmesi sırasında desteğini, bilgi ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Firuze KURTOĞLU'na, Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi hocalarıma, benimle bilgisini ve tecrübesini paylaşan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Prof Dr. Enver YAZAR ve Doç. Dr. Burak DİK'e, tez çalışmamda ve deneysel süreçte her türlü konuda desteğini sunan Araş. Gör. Beyza SUVARIKLI ALAN'a, Öğr. Gör. Dr. Gökhan AKÇAKAVAK'a ve Dr. Öğr. Üyesi Durmuş HATİPOĞLU'na, yoğun ve zorlu çalışmalarım sırasında bana her zaman destek olan ve sabır gösteren başta sevgili annem ve değerli aile bireylerine, doktora eğitim sürecine başlamamda bana ilham kaynağı olan ve motivasyonları ile bugünlere gelmeme en büyük katkıyı sağlayan rahmetli ceza hukukçusu Prof. Dr. İbrahim DÜLGER hocama, çalışma dönemi boyunca bana her türlü kolaylığı sağlayan ilçe müdürüm Veli UĞUR'a ve desteklerini esirgemeyen İbrahim SOLUK, Ömer KÜÇÜKAPAN, İsmail KEMER ve Abdullah ALTAN'a ve diğer iş arkadaşlarıma, teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR iv

ÖZET..... viii

SUMMARY ix

1. GİRİŞ 1

1.1. Hepatoselüler Karsinoma (HCC) 2

1.2. HCC’de Epidemiyoloji 3

1.3. Etiyolojik Faktörler ve Etiyopatogenez 4

1.3.1. Hepatit B enfeksiyonu 6

1.3.2. Hepatit C enfeksiyonu 8

1.3.3. Alkol tüketimi 13

1.3.4. Aflatoksin intoksikasyonu 14

1.3.5. Alkolik olmayan steatohepatit (NASH) 16

1.4. Apoptoz 19

1.5. Apoptoz Mekanizmaları 20

1.5.1. Ekstrisik yol aracılı apoptoz 20

1.5.2. İntrinsik yol aracılı apoptoz 21

1.5.3. Perforin/Granzim aracılı apoptoz 23

1.6. Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör (p21) Proteini 26

1.7. Sorafenib 26

1.8. Tarantula Cubensis Alkol Ekstresi D6 (TCAE-Therane kron) 27

1.9. Dietilnitrozamin 27

1.10. N-Nitrozomorfolin (NMOR) 28

2. GEREÇ VE YÖNTEM 31

2.1. Hayvan Materyali 31

2.2. Araştırma Prosedürü 31

2.3. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması 35

2.4. Biyokimyasal Analizler 36

2.5. Karaciğer Dokusundan Gerçekleştirilen Analizler 37

2.6. Histopatolojik İnceleme 37

2.7. İstatistiksel Analizler 37

3. BULGULAR 38

3.1. Biyokimyasal Bulgular 38

3.1.1. Serum Alanin aminotransferaz (ALT), Aspartat aminotransferaz (AST) ve Gama glutamiltransferaz (GGT) değişimleri	40
3.2. Ağırlık Değişimi.....	45
3.3. Makroskopik Bulgular	45
3.4. Histopatolojik Bulgular	47
3.4.1. Negatif kontrol, NK+Therane kron ve NK+Sorafenib grupları.....	47
3.4.2. Pozitif kontrol (PK), PK+Therane kron (PKT) ve PK+Sorafenib (PKS) grupları	47
4. TARTIşMA	54
5.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
6. KAYNAKLAR	69
7. EKLER.....	80
EK-A: Etik Kurul Raporu	80
EK-B: Turnitin Raporu	81
8. ÖZGEÇMİř.....	82

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFB ₁	: Aflatoksin-B1
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
ALP	: Alkalen fosfataz
ALT	: Alanin aminotransferaz
AMPK	: Adenozin monofosfat protein kinaz-1
AST	: Aspartat aminotrasferaz
BID	: BH3 etkileşen alanlı ölüm agonisti
CAD	: Kaspazla aktive olan DNaz
CASP	: Kaspaz
CCl ₄	: Karbon tetraklorür
Cdc2	: Hücre bölünme döngüsü protein-2
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
cFLIP protein	: Hücresel FLICE (FADD benzeri IL-1 β -dönüştürücü enzim)-inhibitör
c-mym	: Hücresel myelositomatoz
COX-2	: Siklooksijenaz-2
DC	: Dentritik hücre
DD	: Ölüm alanı
DEN	: dietilnitrozamin
DISC	: Ölüme neden olan sinyal kompleksi
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNMT	: DNA Metil Transferaz
ECM	: Hücre dışı matriks
EMT	: Epitelyal mezenşimal geçiş
Endo-G	: Endonükleaz-G
ER	: Endoplazmik retikulum
ERK	: Hücre dışı sinyal ile düzenlenen kinaz

FADD	: Fas ilişkili ölüm alanı
FAK	: Fokal Adezyon Kinaz
FGFR	: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
FLT-3	: Fms benzeri tirozin kinaz-3
GADD45	: Büyümeyi durdurucu ve DNA hasarıyla uyarılabilir 45
GGT	: Gama glutamil transferaz
GSH	: Glutatyon
GST	: Glutatyon transferaz
grtBID	: Granzim B aracılı kesilmiş BID
HBC	: Hepatit C Virüsü
HBV	: Hepatit B Virüsü
HBx	: Hepatit B X proteini
HCC	: Hepatoselüler karsinoma
HepG2	: Hepatosellüler karsinoma hücre hattı
HSC	: Karaciğer yıldız hücreleri
IAPs	: Apoptozu inhibe eden proteinler
IARC	: Uluslararası kanser araştırmaları ajansı
ICAD	: Kaspaz aktive edici DNaz inhibitörü
IFN- γ	: İnterferon gama
IGF-1	: İnsülin büyüme faktörü
IL	: İnterlökin
IR	: İnsülin direnci
IRF-3	: İnterferon yanıt faktörü-3
IRS-1	: İnsülin reseptörü substratı-1
JAK-STAT	: Janus Kinaz - Sinyal dönüştürücü-transkripsiyon aktivatörü
JNK	: c-jun N-terminal kinaz
LT	: Lenfotoksin

MAPK	: Mitojenle aktive olan kinaz
MMP	: Matrix metalloproteinaz
MOMP	: Mitokondriyal membran bütünlüğünün bozulması
NASH	: Alkolik olmayan karaciğer yağlanması
NF- κ B	: Nükleer Faktör Kappa-Beta
NK	: Doğal katil hücresi
NMOR	: N-Nitrozomorfolin
Omi/TtrA2	: HtrA Serin Peptidaz 2
PCNA	: Çoğalan hücre nükleer antijeni
PDGF	: Trombosit türevi büyüme faktörü
PGE ₂	: Prostaglandin E ₂
PI3K	: Fosfotidil inositol 3-fosfat
PKC	: Protein kinaz-C
PKR	: Protein kinaz
RAS	: Rat Sarcoma Viral Proto-Onkogen
RIP	: Reseptör etkileşimli protein
ROT	: Reaktif oksijen türleri
Smac	: Kaspazların ikinci mitokondri kaynaklı aktivatörü
SMAD	: TGF- β sinyal dönüştürücü proteini
TAK	: Total antioksidan kapasite
TAM	: Tümörle ilişkili makrofajlar
tBID	: Kesilmiş BID
TCAE	: Tarantula cubensis alkol ekstresi D6
TGF	: Dönüştürücü büyüme faktörü
TLR	: Toll benzeri reseptör
TNF	: Tümör nekroz faktör
TOK	: Total oksidan kapasite

TRADD	: TNF reseptörü ilişkili ölüm alanı
TRAIL	: Tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand
Treg	: Düzenleyici T lenfosit
VEGF	: Vasküler endotel büyüme faktörü
VEDFR	: Vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü



ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ratlarda Dietilnitrozamin ile Oluşturulan Karaciğer Kanseriinde Theranekron ve Kemoterapi Uygulamalarının; Karsinogenezis, Apoptozis ve Biyokimyasal Profile Etkilerinin Karşılaştırılmalı Değerlendirilmesi

Serdar VANLI

Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ /KONYA-2023

Hepatoselüler karsinoma (HCC), kanser türleri arasında en sık görülen altıncı ve kansere bağlı ölüm açısından üçüncü sırada olan kanser türüdür. HCC’de; etkili, sistemik ve hedefe yönelik tedavilerin yetersiz kalması nedeniyle prognoz kötüdür. Theranekron veteriner hekimlikte yaygın bir şekilde kullanılan antikanser ve antienflamatuvar özelliklere sahip homeopatik bir ilaçtır. Theranekron’un papilloma, kolon kanseri ve meme adenokarsinoması üzerine yapılan çalışmalarında göstermiş olduğu antikanser özelliğini hangi mekanizmalarca gerçekleştirdiği belirsizdir. Bu çalışmada; Dietilnitrozamin ve N-Nitrozomorfolin ile hepatoselüler karsinomada oluşturulmuş ratlarda tek başına Theranekron ve Sorafenib tedavisi ile Theranekron-Sorafenib kombine tedavisinin biyokimyasal parametrelerle araştırılması, etkinliklerinin karşılaştırılması ve kombine uygulamanın immünoterapi benzeri bir etki oluşturup oluşturamayacağı araştırılmıştır.

Çalışmada Granzim B, kaspaz-3, p21 düzeyleri ile karaciğer fonksiyonu ve metabolizma göstergeleri için ALT, AST, GGT, glikoz, trigliserit ve üre düzeyleri ölçülmüş, karaciğer dokularında histopatolojik incelemeler yapılmıştır. Granzim B, kaspaz-3 ve p21 düzeylerinde; Theranekron, Sorafenib ve Theranekron+Sorafenib tedavi gruplarında kanser grubuna göre yüksek değerler elde edilmiştir. Kanser grubunda; ALT, AST, GGT, trigliserit ve glikoz düzeylerinin yükseldiği, üre değerleri düştüğü, tedavi gruplarında kanser grubuna göre AST, ALT, GGT, trigliserit ve glikoz düzeyleri düşük, üre seviyeleri ise yüksek bulunmuştur. Theranekron+Sorafenib tedavi grubunda ise tüm değerlerde belirgin olarak normal kan sınırları tespit edilmiştir. Karaciğer dokusunda değişimler daha sınırlı ($P<0.05$) düzeyde kalmış; sadece granzim B değerleri önemli değişim göstermiştir ($P<0.05$). Hepatoselüler karsinoma tedavisinde Theranekron’un etkinlik mekanizmasının Doğal Katil Hücreleri ve/veya Sitotoksik CD8⁺T lenfositlerin aktivasyonu sonucu apoptozu uyarması olduğu tespit edilmiştir. Histopatolojik değerlendirmede; kanser grubunda kanserli alanlar sağlam karaciğer dokusundan ayrılmış ve kanser hücrelerinde; çekirdek sitoplazma oranının arttığı, iyi diferensiyasyon, kolonlar, atipi, nükleer polimorfizme sahip olduğu görülmüştür. Tedavi gruplarındaki vakalarda kanser hücreleri ve oluşturduğu yapılar kanserli gruba benzer fakat görülme sıklığı ve büyüklüklerinde azalma görülmüştür. Sonuç olarak, Theranekron’un gelecekteki ilaç tasarımı için bir anti-HCC ajanı olabileceği ve kemoterapi ilaçları ile kombine kullanılabileceği söylenebilir. Daha da önemlisi, elde edilen sonuçlar Sorafenib’i immünoterapi benzeri etki oluşturan Theranekron ile birleştirmenin bilimsel gerekçesini sağlamakta ve Theranekron’un immünregülasyon etkisi ile Sorafenib’in “hedef dışı” bağışıklık sistemi stimülasyonunun etkisini ortaya çıkarmıştır. Sorafenib ve Theranekron kombine tedavisi, HCC’li hastalarda antitümör bağışıklığını yeniden harekete geçirmek ve antitümör yanıtının büyüklüğünü ve dayanıklılığını iyileştirmek için potansiyel olarak sinerji oluşturabilir.

Anahtar Sözcükler: Granzim B, immünoterapi, HCC, Theranekron, DEN

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Comparative Evaluation of the Effects of Theranekron and Chemotherapy Applications on Carcinogenesis, Apoptosis and Biochemical Profile in Diethylnitrosamine-induced Liver Cancer in Rats

Serdar VANLI

Faculty of Veterinary Medicine Department of Biochemistry

PhD THESIS / KONYA-2023

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the sixth most common cancer type and the third most common cancer type in terms of cancer-related death. In HCC; The prognosis is poor due to the inadequacy of effective, systemic and targeted therapies. Theranekron is a homeopathic medicine with anticancer and anti-inflammatory properties that is widely used in veterinary medicine. It is unclear by which mechanisms Theranekron achieves its anticancer properties, which it has shown in studies on cancer cell lines, papilloma, colon cancer and breast adenocarcinoma. In this study; It was investigated whether the combination of Theranekron and Sorafenib treatment alone and the combination of Theranekron-Sorafenib treatment in rats formed in hepatocellular carcinoma with diethylnitrosamine and N-Nitrosomorpholine was investigated with biochemical parameters, their efficacy was compared, and whether the combined application could create an immunotherapy-like effect.

In the study, Granzyme B, caspase-3, p21 levels, liver function and metabolism indicators, ALT, AST, GGT, glucose, triglyceride and urea levels were measured and histopathological examinations were made in liver tissues. Granzyme B, caspase-3 and p21 levels; Higher values were obtained in Theranekron, Sorafenib and Theranekron+Sorafenib treatment groups compared to the cancer group. In the cancer group; It was found that ALT, AST, GGT, triglyceride and glucose levels increased, urea values decreased, AST, ALT, GGT, triglyceride and glucose levels were lower in the treatment groups compared to the cancer group, and urea levels were higher. In the Theranekron+Sorafenib treatment group, all values were clearly normal in blood limits. Changes in liver tissue remained more limited ($P<0.05$); only granzyme B values showed significant changes ($P<0.05$). It has been determined that the mechanism of action of Theranekron in the treatment of hepatocellular carcinoma is to induce apoptosis as a result of the activation of Natural Killer Cells and/or Cytotoxic CD8+T lymphocytes. In histopathological evaluation; In the cancer group, the cancerous areas were separated from the healthy liver tissue and in cancer cells; It was observed that the ratio of nuclei to cytoplasm increased, well differentiated, columnar, atypia, and nuclear polymorphism. In the cases in the treatment groups, the cancer cells and the structures they formed were similar to the cancerous group, but their incidence and size decreased. As a result, it can be said that Theranekron can be an anti-HCC agent for future drug design and can be used in combination with chemotherapy drugs. More importantly, the results provide the scientific rationale for combining Sorafenib with the immunotherapy-like Theranekron, revealing the immunoregulatory effect of Theranekron and the 'off-target' immune system stimulation effect of Sorafenib. Sorafenib and Theranekron combined therapy could potentially synergize to reactivate antitumor immunity in patients with HCC and improve the magnitude and durability of antitumor responses.

Keywords: Granzyme B, immunotherapy, HCC, Theranekron, DEN

1. GİRİŞ

Kanser, dünya genelinde ölüm nedenleri arasında ilk üçte yer aldığı bilinen mortalite oranı yüksek, tedavi süreci güç ve uzun olan bir hastalıktır. Dünya Kanser Örgütü'nün 2020 dünya geneli kanser istatistiklerine göre; her yıl dünyada 18,1 milyon yeni vaka ve 9,6 milyon kansere bağlı ölüm meydana gelmektedir. Dünya genelinde en çok görülen kanser türlerinin başında; akciğer, meme, prostat, kolon ve mide kanserleri gelmektedir. Çevresel ve genetik risk faktörleri kanser oluşumu ve ilerlemesiyle sonuçlanan iki ana risk faktörü olarak kabul edilmektedir (<https://gco.iarc.fr/> 2020).

Kanser; hücre büyümesi, bölünmesi ve farklılaşmasını kontrol eden spesifik genlerde meydana gelen mutasyonların ve epigenetik değişikliklerin aşamalı olarak bir araya gelmesi sonucu oluşur. Karsinogenez basamaklarında kanser hücreleri birçok fenotipik değişikliklere uğrar. Meydana gelen bu değişiklikler sonucu kanser hücreleri hızlı ve sınırsız bir şekilde çoğalarak çevre dokuya invazyon ve immün gözetimden kaçış ile ilerleyen süreçte metastaza neden olur. Malign fenotipe ait bu özelliklerin ortaya çıkmasında hücre büyümesini ve çoğalmasını kontrol eden genlerdeki onkojenik aktivasyon ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen inaktive edici mutasyonlar önemli bir neden olarak gösterilmektedir (Corn ve El-Deiry 2002). Ayrıca hücre sinyal yollarının ve bu yollarda yer alan özel proteinleri hedef alan mutasyonlara ve epigenetik değişikliklere sık rastlanmaktadır. Sinyal iletiminde meydana gelen genetik değişikliklerden dolayı hücre çoğalması ve bölünmesi üzerinde kontrol ortadan kalkar. Bu sinyal yolları üzerinde görevli olan tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen inaktive edici mutasyonlar, sinyal yollarının aşırı uyarılmasına neden olarak kanserin ilerlemesine neden olur (Kopnin 2000).

Kanserin potansiyel risk faktörlerini belirlemek için birçok epidemiyolojik çalışma yapılmaktadır. Kanser multifaktöriyel olup, kalıttan kimyasal ajanlara (nitrozaminli bileşikler, arsenik, kadmiyum, fenobarbital, polisiklik amino hidrokarbonla), çevresel koşullardan fiziksel etkenlere (X ışınları, UV ışınlar), beslenmeden meslek alanlarına ve bağışıklık sistemi bozuklukları veya kronik

inflamatuvar özellikteki enfeksiyonlara (Helicobacter pylori enfeksiyonları, Hepatit enfeksiyonları) kadar birçok etken sorumludur (Ji ve ark 2015).

1.1. Hepatoselüler Karsinoma (HCC)

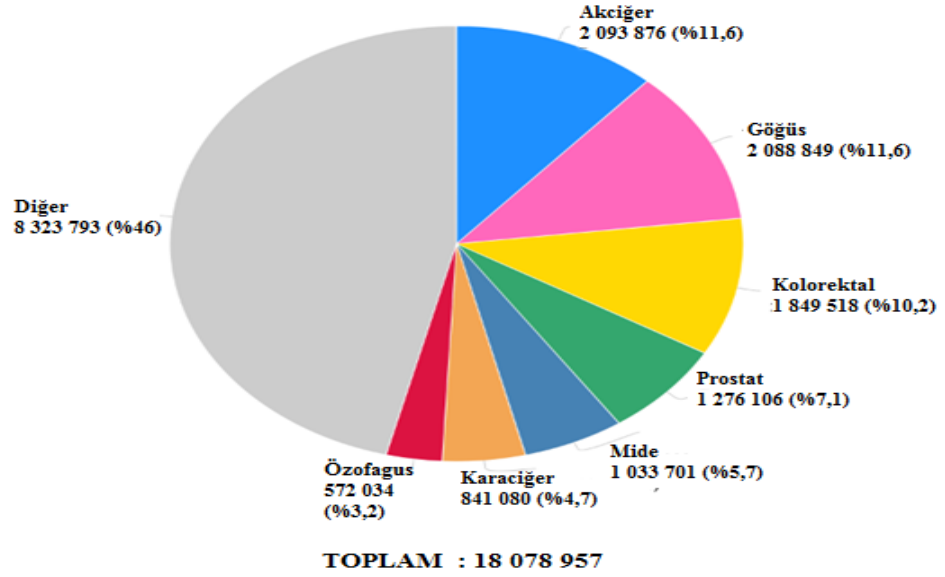
Hepatoselüler karsinoma, dünya çapında kanser türleri arasında %4.7 ile en sık görülen altıncı kanser türüdür. Kansere bağlı ölüm açısından %8.3 ile üçüncü sırada olup yılda ortalama 800.000 binden fazla ölümün sorumlusudur (Anonim 2022)(Şekil 1.1). Risk faktörleri arasında viral enfeksiyonlar (HBV, HCV) alkole bağlı siroz, obezite, tip 2 diyabet, alkolik olmayan karaciğer yağlanması, aflatoksikoz, sigara kullanımı, hemokromatozis, alfa-1-antitripsin eksikliği HCC için potansiyel risk faktörleri arasında yer almaktadır (Hussain ve ark 2007). Karaciğer dokusunun rejenerasyon seviyesinin yüksek olması HCC patogenezinde en önemli etmen olarak karşımıza çıkmaktadır. Primer etken ne olursa olsun HCC, %70-80 oranda karaciğerde inflamasyon ile başlar, fibroz ile ilerler ve sonuçta siroz nedeniyle HCC oluşur (Moeini ve ark 2019).

Karaciğer kanseri için prognoz kötüdür (Anwanwan ve ark 2020). HCC'nin yüksek mortalite oranı çoğu hasta için geç evre tanıya, etkili, sistemik ve hedefe yönelik tedavilerin olmamasına bağlanmaktadır (Ozcan ve ark 2020). Hastaların yalnızca %5 ila %15'i, yalnızca erken evredeki hastalar için uygun olan ve tipik olarak siroz olmaksızın azalmış hepatik rejeneratif kapasite nedeniyle cerrahi olarak çıkarılmaya uygundur. Cerrahi seçeneklerde sağ hepatektomi, sol hepatektomiye kıyasla post-operatif komplikasyon riski daha yüksektir. Daha ileri evreler için tedavi seçenekleri olarak:

1) Orta evre HCC hastalarında konservatif tedaviye kıyasla 2 yıllık sağ kalımda %23'lük bir iyileşmeye yol açan trans-arteriyel kemoembolizasyon.

2) Bir kinaz inhibitörü olan ve ileri evre vakalar için en çok kabul gören seçenek olan sorafenib ile oral dozlama. Bununla birlikte, hastaların üçte birinden daha azı tedaviden fayda görmektedir ve ilaç direnci, rejime başladıktan sonraki altı ay içinde belirgin şekilde ortaya çıkmaktadır (El-Serag ve ark 2008).

2020 Yılı Dünyada Yeni Kansere Vakaları, Her İki Cinsiyet, Tüm Yaş Grupları



Şekil 1.1. 2020 yılı kanser insidansı (Anonim 2020)'den düzenlenmiştir.

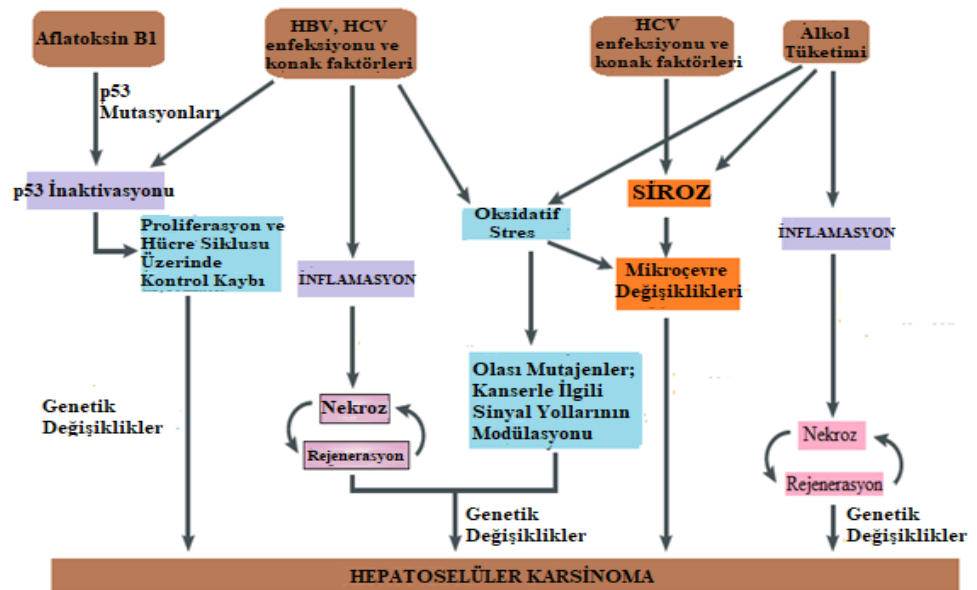
1.2. HCC'de Epidemiyoloji

Hepatoselüler karsinoma, primer karaciğer kanserlerinin yaklaşık %75-85'ini temsil etmekte olup, dünya çapında önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir (Singal ve ark 2020). Karaciğer kanseri, erkeklerde en sık görülen 4. ve kadınlarda 10. en sık görülen kanserdir. 2020 yılında 900.000'den fazla yeni vaka bildirilmiştir. Etiyoloji ve insidansı coğrafi bölgelere göre değişiklik göstermektedir (Anonim 2020). HCC vakalarının büyük bir kısmı kronik karaciğer hasarına ve sirotik zemine bağlı olarak meydana gelmektedir. İncelenen coğrafi bölgeye göre epidemiyolojik farklılıklar olsa da, bu tümörün nedenleri karaciğer sirozu ile örtüşmektedir. Sirotik hastalarda HCC'nin yıllık insidansı %1-6 arasındadır (Sherman 1999). Kronik karaciğer hasarına neden olan faktörlerin başında HBV ve HCV enfeksiyonları gelmektedir. HBV etiyolojisi Çin, Güneydoğu Asya ve Sahra altı Afrika'da yaygındır. HCV etiyolojisi ise Batı ülkeleri ve Japonya'da önemli derecede yaygındır. Kronik alkolik karaciğer hastalıkları için en yüksek prevalans Doğu-Orta Avrupa'da (sırasıyla %53 ve %46), Sahra altı Afrika'da (%40) ve Kuzey Amerika'dadır (%37) (Giannitrapani ve ark 2020). Aflatoksin intoksikasyonu Afrika ve Doğu Asya'da daha fazla görülmektedir. Alkolik olmayan karaciğer yağlanması (NASH), otoimmün ve kolestatik hastalıklar HCC başlangıcına yatkınlık oluşturabilirler. Batı ülkelerinde artan bir şekilde NASH sonrası HCC insidansı vardır (Sagnelli ve ark 2020). Kanada, Avustralya, ABD, Yeni Zelanda ve Avrupa'nın çoğu ülkesinde yapılan araştırmalar HCV ve alkol vakalarında sırasıyla %42 ve %56 oranda artışlar göstermiştir

(Giannitrapani ve ark 2020). 1990-2015 yılları arasında en yüksek HCC insidansına sahip; Çin ve Doğu Sahra Altı Afrika ülkelerinde yeni vaka bildirimlerinde ciddi bir düşüş olmuştur. Bu düşüşün en önemli nedenleri arasında; bu ülkelerde programlı bir şekilde HBV ve HCV aşılama, aflatoksin azaltma programları, HBV ve HCV enfeksiyonlarını tedavi etmek için antivirallerin kullanımı gösterilmektedir (El-Serag 2020). Karaciğer kanseri insidans bakımından orta derecede, mortalite bakımından 8. sırada yer almaktadır. Türkiye'nin Avrupa ülkelerine coğrafi yakınlığı ve HBV taşıyıcılığı açısından komşu ülkelere benzerliği göz önüne alındığında; HCC'nin yaş açısından insidansı diğer ülkeler ile karşılaştırıldığında orta insidans grubunda yer almaktadır. Türkiye yaklaşık %5'lik HBV taşıyıcısı oranları ile HBV açısından endemik bir ülkedir. Ülkemizde HCV pozitiflik oranı ise yaklaşık %0,5 olarak bildirilmiş ve bu oranlar Türkiye'de bölgesel farklılıklar göstermektedir (Tosun 2013).

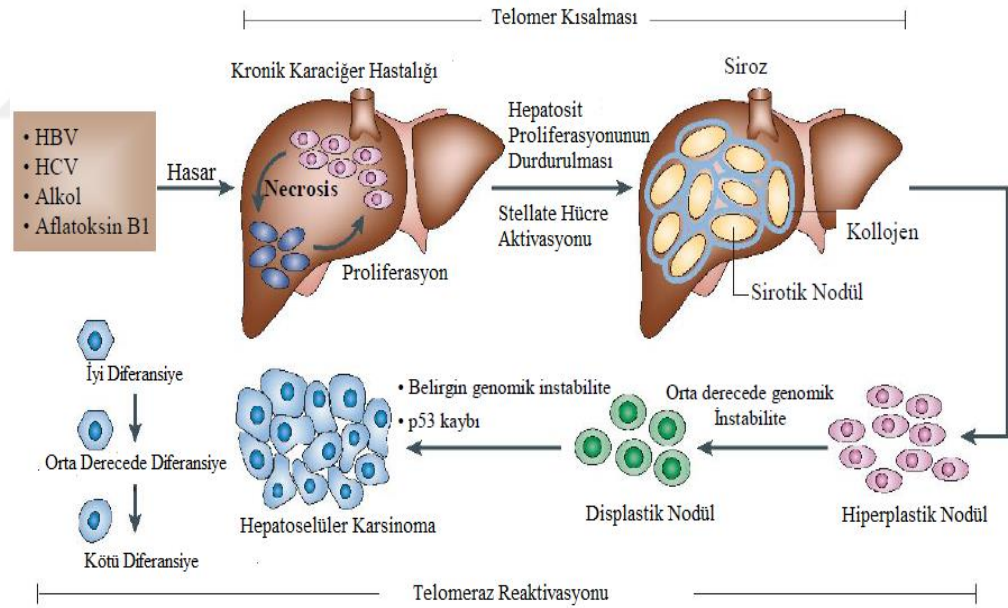
1.3. Etiyolojik Faktörler ve Etiyopatogenez

HCC risk faktörlerini; kronik HBV ve HCV hepatit, aflatoksikozis, alkol ve sigara kullanımı, otoimmün hepatit, hereditör metabolik karaciğer hastalıkları (hemokromatozis, alfa-1 antitripsin eksikliği), tip 2 diyabet, alkolik olmayan karaciğer yağlanması gibi çeşitli faktörler oluşturmaktadır (El-Serag ve Rudolph 2007)(Şekil 1.2).



Şekil 1.2. HCC'de etiyolojik nedenlerin hepatositlerde meydana getirdiği etkiler (Farazi ve DePinho 2006)'den düzenlenmiştir.

HCC etiolojisinde yer alan faktörlerin etkisi ile hepatositlerde kronik inflamasyon meydana gelmektedir. Kronik inflamasyon sonucu hepatosit nekrozu ve sağlam hepatositlerdeki rejeneratif çoğalma döngüler halinde uzun süre devam eder. Kronik inflamasyon ve artan oksidatif stres karaciğerin stromasını ve mikroçevresini değiştirir. Sonuçta diffüz fibroz ile birlikte karaciğer stromasının kaybolmasına bağlı olarak rejeneratif nodüller meydana gelir. Hem etiyolojik faktörlerin hem de kronik inflamasyonun yol açtığı çoğalma zamanla genetik değişimlere yol açmaktadır. Sonuçta sirotik karaciğer dokusu içinde fibrotik stromayla çevrilmiş, sürekli çoğalan hepatositlerden oluşan nodüller oluşmaya başlar. Bu nodüller zamanla hiperplastik nodüllere, daha sonra da büyüme hızı kontrolü kaybı ve genomik instabilite gelişimiyle displastik nodüllere dönüşür. Displastik nodüllerde meydana gelen p53 fonksiyon kaybı ve telomeraz reaktivasyonu ile hepatosellüler karsinoma şekillenir. Telomeraz reaktivasyonu ve p53 kaybı hepatosellüler karsinomanın oluşumunda ilk aşamada meydana gelebileceği gibi ilerleyen dönemlerde de meydana gelebilmektedir (Şekil 1.3) (Farazi ve DePinho 2006).



Şekil 1.3. Hepatosellüler karsinoma oluşum basamakları (Farazi ve DePinho 2006)'den düzenlenmiştir. HCC'ya neden olan etmenlerden herhangi birisinin etkisi sonucu gelişen karaciğer hasarına bağlı hepatositlerde nekroz ve rejenerasyon döngüleri meydana gelir. Artan oksidatif stres ve gelişen kronik inflamasyona bağlı olarak bu nekroz-rejenerasyon döngüleri devam eder. Artan kollajen yükü ve diffüz fibrozis ile birlikte karaciğer stromasının kaybı ve sonuçta karaciğerde siroz meydana gelir. Daha sonra hiperplastik nodüller, displastik nodüller ve p53 kaybı sonucu genomik instabilite meydana gelerek HCC oluşumu başlar. Telomeraz reaktivasyonu ve p53 kaybı HCC'ye ilerleme sırasında meydana geldiği gösterilmektedir. Ancak, p53 kaybı ve mutasyonunun, hepatokarsinogenezin ilk aşamalarında da meydana gelebilmektedir.

1.3.1. Hepatit B enfeksiyonu

Hepatit B (HBV), dünya çapında yaklaşık 2 milyar kişiyi enfekte etmekte ve yılda yaklaşık 320.000 kişinin ölümüne neden olmaktadır. HBV ile ilişkili ölümlerin yaklaşık %30-50'si HCC'den kaynaklanmaktadır (Farazi ve DePinho 2006). HBV enfeksiyonu; kronik karaciğer hasarı, hepatosit ölümü ve rejenerasyonu arasındaki dengesizlik sonucu HCC oluşumuna neden olur. HBV, konakçı genomuna entegre olabilir ve kromozomal dengesizliklere, DNA mikrodelsiyonlarına yol açabilir. HBx geni, hepati B virüsü tarafından HCC'de konakçı genomuna entegre edilen en yaygın açık okuma çerçevesidir. Entegre HBx sıklıkla mutasyona uğrar. Mutant HBx proteinleri, p53'e bağlanma, DNA onarımını ve p53 aracılı apoptozu zayıflatma özelliği gösterir. Özellikle hücrenin hayatta kalması, hücre döngüsünün ilerlemesi ve istilasında yer alan genleri eksprese eder (Hussain ve ark 2007).

Konakçı-viral etkileşimler çeşitli yollar ile hepatokarsinogeneze katkıda bulunmaktadır. Viral enfeksiyonla savaşmak için bağışıklık sistemi ortaya sağlam bir T-hücre bağışıklık tepkisi koyar. Ancak bu tepki hepatosit nekrozuna, inflamasyonun genişlemesine ve sonuç olarak rejenerasyonun artmasına yol açar. Kronik aktif yangı; nekroz-inflamasyon-rejenerasyon döngüsünü destekler. Sürekli hepatosit replikasyonları genomik kararsızlıkla sonuçlanarak onkojenik lezyonları ve telomer erozyonlarını artırır (Block ve ark 2003). Bir diğer HBV aracılı HCC mekanizması virüs-endoplazmik retikulum ilişkisidir. Bu ilişki ER stresine neden olarak hepatositlerde oksidatif stresin artmasına neden olur. Virüs-ER etkileşimleri büyüme ve hayatta kalma sinyal yollarını uyarır, serbest radikallerin oluşumunu artırarak mutasyonlara neden olur. Sonuçta karaciğer yıldız hücrelerini (HSCs) aktifleşmesi ile sirotik zemin hazırlanır (Wang ve ark 2006).

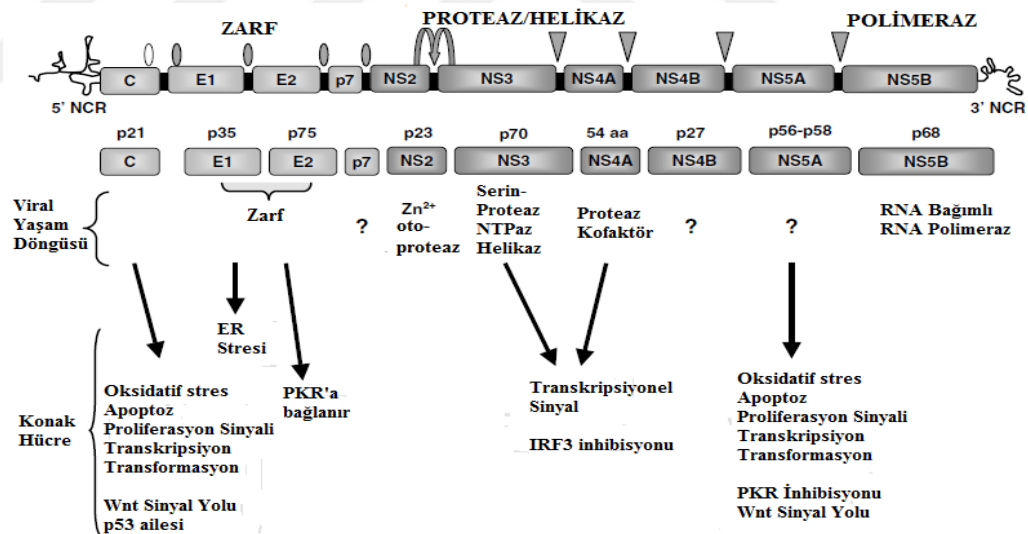
HBx proteini, HBV enfeksiyonu ile ilişkili HCC sürecinde rol almaktadır. HBx proteini; MAPK (mitojenle aktive olan kinaz), NF- κ B (Nükleer Faktör Kappa-Beta), COX-2 (Siklooksijenaz-2), JAK-STAT (Janus Kinaz - Sinyal dönüştürücü-transkripsiyon aktivatörü), FAK (Fokal Adezyon Kinaz) ve PI3K (Fosfotidil inositol 3-fosfat) sinyal yollarının aktivasyonu ile hepatositlerin proliferasyonunu uyararak hücrel sinyal yollarının ve onkogenlerin transaktivasyonuna neden olur. Ayrıca, artan reaktif oksijen türleri (ROT) ve epigenetik değişiklikler sonucu hepatositlerde fren görevi gören tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu HCC'ye önemli bir katkıda bulunur (Kew 2011). Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu veya

kromozomal instabilite ile sonuçlanan epigenetik değişiklikler HBx ilişkili HCC gelişiminde yer almaktadır. HBx proteini, DNMT-1 ve DNMT3 (DNA Metil Transferaz-1,3)'ün transkripsiyonunu etkileyerek epigenetik değişikliklere neden olabilir. HBx ile indüklenen HCC hastalarda tümör baskılayıcı genlerde epigenetik değişiklikler şekillenebilir. HBx proteinin; DNMT1 ve DNMT3A'yı, hem transkripsiyonel hem de translasyonel seviyelerde upregüle eder. Ayrıca HBx proteini ile indüklenen HCC'li hastalarda bazı tümör baskılayıcı genlerdeki epigenetik değişiklikler tanımlanmıştır (Geng ve ark 2015). DNMT1 ve DNMT3A upregülasyonu, p16^{INK4A} promoter metilasyonunun indüksiyonuna ve ardından p16^{INK4A} ekspresyonunun inhibisyonuna yol açar. P16^{INK4A} geni hücre döngüsü ilerlemesinin negatif düzenleyicisidir ve hepatoselüler karsinoma da dahil olmak üzere insan kanserlerinde en sık değiştirilen tümör baskılayıcı gendir (Zhu ve ark 2010). HBx proteini, DNMT1'in transkripsiyonel aktivasyonunu indükleyerek, bir diğer önemli tümör baskılayıcı gen E-kadherin ekspresyonunu da etkisiz hale getirebilir (Lee ve ark 2005). HBx proteini varlığında, apoptoz ile ilişkili p21^{CIP/WAF1}, Bax veya Fas gibi genleri p53'ün upregüle edememesine neden olur. HBx proteini direkt PI3K/AKT yolunun (Lee ve ark 2001) veya HRAS aracılı PI3K/AKT yolunun aşırı aktivasyonu ile Bad ve kaspaz-3'ü inhibe ederek apoptotik ölüme karşı koyar (Kim ve ark 2001).

HCC'de, COX-2 (Siklooksijenaz-2) de yüksek oranda ifade edilir ve p53'e karşı HBx proteininin etkilerine aracılık eder. (Cheng ve ark 2008). HBx gen ekspresyonu, sitoplazmada p53'ü ayırır ve COX-2/PGE2 yolunun aktivasyonu ile p53 ile indüklenen apoptozu ortadan kaldırır. Antiapoptotik Mcl-1 proteini, p53 tarafından baskılanır, ancak HBx proteini tarafından Mcl-1 tekrar etkinleştirilir (Lee ve ark 2001). HBx'in bir diğer ilişkide olduğu sinyal yolu NF-κβ sinyal yoludur. NF-κβ, kanser gelişiminde önemli bir transkripsiyonel faktördür. Tümör başlangıcını, gelişimini, invazyonunu ve metastazı kontrol etmek için birçok sinyal yolu ile çapraz etkileşime katılır (Geng ve ark 2015). HBx'in, NF-κβ sinyali yoluyla HCC hücre istilasını ve metastazı destekleyebileceğini göstermiştir. HBx'in vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), matrix metalloproteinaz 2 (MMP2), MMP9 ve MMP14 dahil olmak üzere NF-κβ hedef genlerinin ekspresyonunu artırdığını göstermiştir (Liu ve ark 2010).

1.3.2. Hepatit C enfeksiyonu

Hepatit-C (HCV) enfeksiyonu; HCC etiyolojisinde yer alan bir diğer önemli viral enfeksiyondur. HCV; flaviviriadae ailesinde yer alan nonsitopatik bir RNA virüsüdür. HCV konak genomuna entegre olmayan, ancak proteinleri birçok konakçı hücre faktörüyle iyi etkileşime giren bir RNA virüsüdür. HCV, HBV'den hepatokarsinogenez ile ilgili üç önemli kliniko-biyolojik ayrıma sahiptir. Birincisi, HCV'nin kronik enfeksiyona yol açma eğilimi (% 60-80), HBV (%10)'ye göre daha yüksektir. İkincisi, HBV'ye kıyasla HCV'nin karaciğer sirozunu teşvik etme eğiliminin daha yüksek olmasıdır. HCV ile enfekte hastaların % 5-10'unda 10 yıllık enfeksiyondan sonra karaciğer sirozu gelişir, bu durum HBV'den yaklaşık 10-20 kat daha yüksektir. Üçüncüsü; HCV, DNA ara formu olmayan bir RNA virüsü olduğundan, konakçı genomlarına entegre olamaz (Rehermann ve Nascimbeni 2005). HCV-RNA genomu; yapısal proteinler, çekirdek proteini ve zarf glikoproteinlerini kodlayarak; hücre sinyalizasyonu, transkripsiyon, proliferasyon, apoptoz, membran yeniden düzenlemeleri, veziküler trafik ve translasyonel düzenlemeyi içeren geniş bir faaliyet yelpazesinde yer alır (Levrero 2006)(Şekil 1.4).

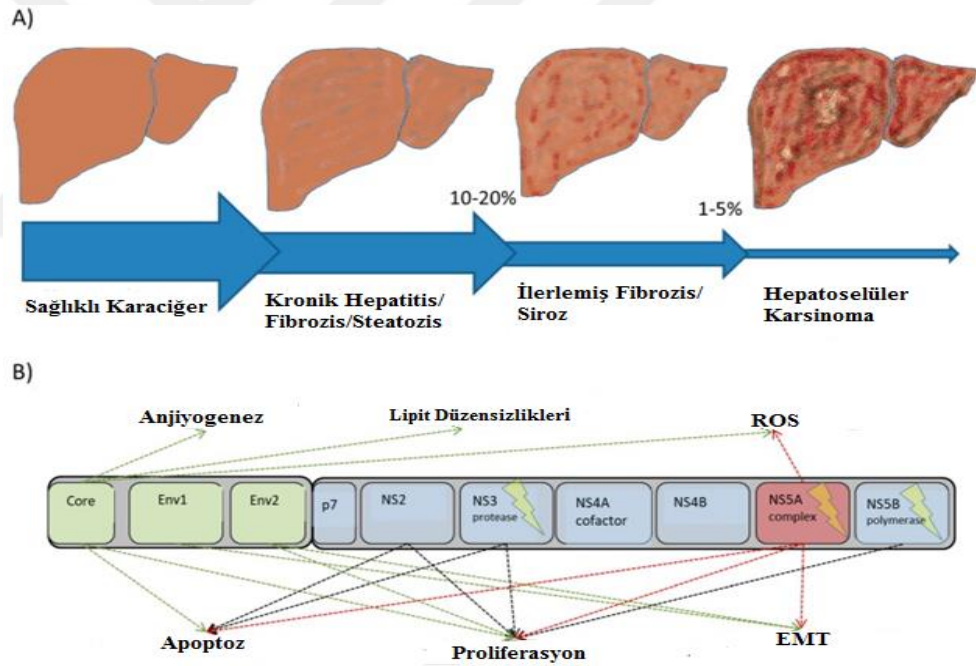


Şekil 1.4. HCV genomunun kısımları ve kodladığı proteinlerin konak hücredeki etkileri (Levrero 2006)’dan düzenlenmiştir. IRF3: İnterferon response factor 3.

HCV proteinlerinin konak hücrelerdeki direkt karsinojenik etkileri

Kronik HCV enfeksiyonu, sıklıkla intrahepatik lipid birikimi, progresif fibroz, siroz ve HCC'ye uzun vadeli ilerleme ile birlikte karaciğerde inflamatuvar lezyonlarla karakterizedir. Hem viral hem de konakçı faktörlerin, HBV'ye benzer şekilde HCC gelişimine katkıda bulunmaktadır. HCV enfeksiyonu, sürekli hepatosit

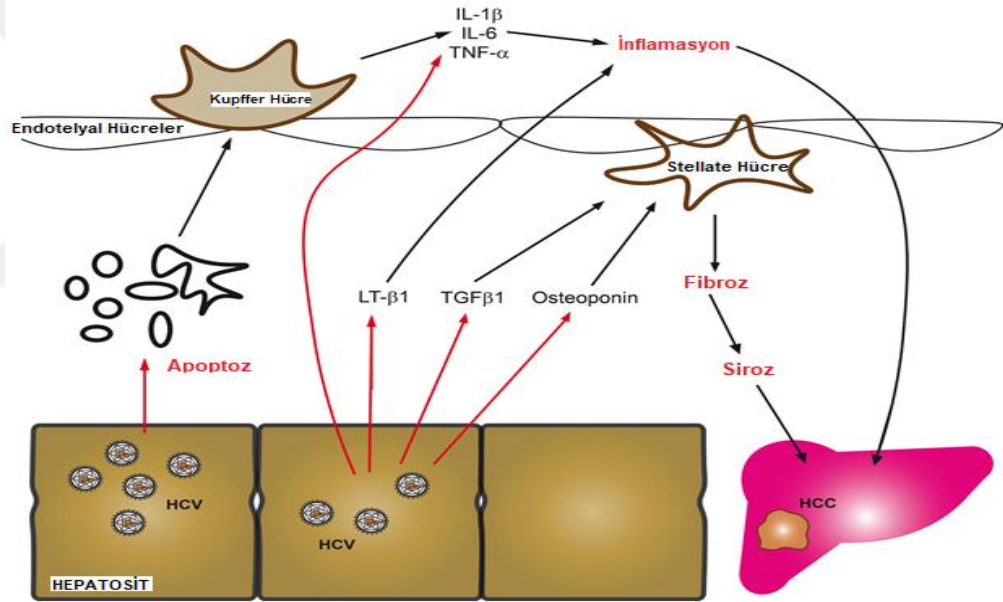
ölümü döngülerinin virüse karşı bağışıklık tepkisinin ardından gerçekleşen doku rejenerasyonu ve bu duruma bağlı mutasyonların birikmesi ve yayılmasına ile HCC gelişimine neden olmaktadır (Farazi ve DePinho 2006)(Şekil 1.5). Kronik HCV hepatositlerde apoptoz mekanizmasının bozulmasına ve hücre siklusunun kontrolden çıkmasına neden olur. Hepatositlerde apoptoz mekanizmasında TNF- α aracılı apoptoz mekanizması önemli bir role sahiptir. HCV, TNF- α aracılı apoptozu bloke eder. HCV çekirdek protein, kaspaz-8 aktivasyonunu inhibe eden c-FLIP ekspresyonunu artırırken (Saito ve ark 2006), HCV ilişkili NS5A proteini ise kaspaz-3 aktivasyonunu bloke eder (Ghosh ve ark 2000). HCV çekirdek proteini Rb aracılı mitotik iğ kontrol noktasına müdahale ederek artan poliploidiyi destekler (Machida ve ark 2009). Ayrıca Wnt sinyal yolunun aşırı aktivasyonu sonucu c-myc ve siklin D artışı apoptozun inhibe olmasına ve proliferasyonun artmasına neden olarak HCC'yi destekler (Higgs ve ark 2013).



Şekil 1.5. Kronik HCV enfeksiyonu sonucu karaciğerde meydana gelen değişiklikler (A) ve HCV genomu üzerinde yer alan önemli bölgelerin konak hücrede neden olduğu etkiler (B)(Hayes ve ark 2018).

HCV çekirdek bölgesi, viral RNA'nın konak genomuna bağlanmasında rol oynar. Çekirdek gen proteini hücre sinyalleme, transkripsiyonel aktivasyon, oksidatif stres, apoptoz, lipid metabolizması ve transformasyonda yer alır (Irshad ve ark 2017). HCV çekirdek proteini; hücre döngüsü kontrolü ve tümör oluşumunda rol oynayan siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü p21^{WAF1/CIP1}'in ekspresyonunu da

modüle eder. p21^{WAF1/CIP1}; p53'ün transkripsiyonel hedefidir ve hücre siklusunda kritik kontrol noktalarında yer alır (Wang ve ark 2000). Ayrıca T lenfositler üzerindeki kompleman reseptörü “C1qR” ile HCV-çekirdek bölgesi etkileşimi immünosupresif etkiye neden olarak kronik enfeksiyona katkıda bulunur (Kittlesen ve ark 2000). Çekirdek proteinleri endoplazmik retikulum (ER) ve/veya mitokondri ile etkileşime girerek, reaktif oksijen türlerinin (ROT) birikimine neden olarak ER stresini indükler. ROS, DNA hasarına neden olarak hepatokarsinogenezi hızlandırıcı etkiye sahiptir. Çekirdek proteinler ayrıca, RAF/MAPK, Wnt/ β -katenin ve TGF- β gibi sinyal yollarının aktivasyonu ile hücrelerin büyümesini ve proliferasyonunu etkiler. Bu bulgular ışığında HCV çekirdek proteini HCC gelişimi sırasında hücre çoğalmasında ve apoptozun azalmasında potansiyel bir role sahip olduğunu göstermektedir (Ivanov ve ark 2017)(Şekil 1.6).



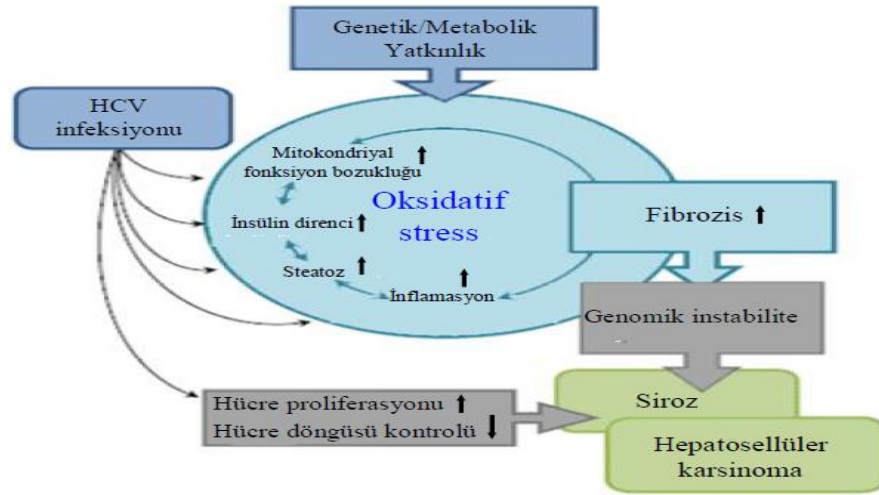
Şekil 1.6. Kronik hepatit C'de fibrozu tetikleyen temel mekanizmalar. Kronik viral hepatitte proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin baskın kaynakları genellikle enfekte olmuş hepatositler, aktive edilmiş Kupffer hücreleri veya dolaşımdaki lökositlerdir. Bu hücreler, hücrel sinyal kaskadlarının aktivasyonuna, virüs kaynaklı oksidatif strese, enfekte hücrelerin apoptozuna veya bağışıklık sistemini aktive etmek için sitokinler üretmek üzere HCV tarafından uyarılır (Ivanov ve ark 2017)'dan düzenlenmiştir.

HCC için yapısal proteinler E1/E2'nin etkisi ile ilgili çalışmalar yapılmış ve bu proteinlerin, dsRNA protein kinazı (PKR) inhibe ederek interferon aktiviteleri üzerine müdahale ettiği ve E2 proteininin sitotoksik T lenfositler ve Natural Killer (NK) hücrelerin aktivasyonunu engellediği gösterilmiştir (Crotta ve ark 2002). NS2 proteini p53 ile etkileşimiyle apoptoz inhibisyonunda rol aldığı, siklin D/CDK4'ü aktive ettiği ve Siklin E'nin ekspresyonunu indüklediği bulunmuştur (Bittar ve ark

2013). NS3 proteini; transformasyon potansiyeline sahip çeşitli sinyal iletim yolların modülasyonu ve immün gözetimden kaçış için interferon yanıt faktörü-3 (IRF-3) aracılı tip-1 interferonun indüksiyonunu inhibe eder (Foy ve ark 2003, Irshad ve ark 2017). NS5A proteini; hücre döngüsü, apoptoz ve lipid metabolizması sinyal yolları ile etkileşime girer. RNA ile aktive edilen protein kinaz (PKR)-p38 sinyal yoluna müdahale ederek anormal mitoz ve kromozomal instabiliteyi indükler (Wu ve ark 2008). Ayrıca tümör baskılayıcı p21^{WAF1/CIP1}'in downregülasyonu, TGF- β sinyal dönüştürücü proteinlerin (SMAD) nükleer translokasyonunu engelleyerek TGF- β sinyalinin inhibe edilmesi (Choi ve Hwang 2006), TNF- α aracılı apoptozun engellenmesine neden olur (Ghosh ve ark 2000). Ayrıca NS5A'nın epitel hücrelerinin mezenkimal kök hücrelere geçiş sürecine yardımcı olduğu da gösterilmiştir (Battaglia ve ark 2009).

HCV ilişkili indirekt hepatokarsinogenez

HCV'nin varlığı; oksidatif stres, değişen sinyal yolları, insülin direnci (IR), karaciğer yağlanması (steatohepatit) ve progresif fibrozu indükleyen bir kronik inflamasyona neden olur. Bağışıklık sistemi aracılı inflamasyon, hepatosit metabolizmasını bozan ve genom bütünlüğüne zarar veren reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini tetikleyerek hücre ölümüne neden olur. Steatohepatit ve IR nedeniyle serbest yağ asitlerinin birikmesi, ER stresine ve mitokondriyal hasara neden olur. Bu durum oksidatif stresi ve kolajen-1 ekspresyonunu artırarak lipid peroksidasyonu ile inflamasyonu destekler. İnflamatuvar sinyaller, büyüme faktörleri ve ROT varlığında devam eden hücresel proliferasyon, apoptozu engelleyen NF- κ B ve TNF- α sinyal yolunun aşırı aktivasyonuna neden olur. Rejenerasyon döngüleri, hücre döngüsünün düzensizliğine ve kromozomal kararsızlığın birikmesine yol açarak neoplastik dönüşümden önce gelen, geri dönüşü olmayan genetik ve epigenetik değişikliklere yol açar. Kötü huylu klonların ilerlemesi; lokal genişleme, portal yol boyunca intrahepatik yayılma ve ekstrahepatik metastaz yoluyla gerçekleşir. İlerleme, kısmen büyüme faktörlerinin yapıcı aktivasyonu ve neoanjiyogenez tarafından yönlendirilir. Bu durum da alışılmadık derecede yüksek mikrodamar yoğunluğuna yol açar (Hayes ve ark 2018)(Şekil 1.7).



Şekil 1.7. HCV aracılı hepatokarsinogenez (Bartosch ve ark 2009).

Karaciğer fibrozu, kronik HCV ile güçlü bir şekilde ilişkili patolojidir. Steatoz, IR ve oksidatif stres arasındaki karşılıklı bağımlılık, NASH’de olduğu kadar HCV enfeksiyonunda da hastalık ilerlemesi için önemlidir. Steatoz, IR ve artan ROT; karaciğer yıldız hücrelerinin (HSCs) aktivasyonu ile doku hasarını ve inflamasyonu artırır. Aktif HSCs hem proliferatif hem de fibrojenik sitokinlere yanıt verir. HSCs; epitelyal, fibröz skarlar veya fibroz oluşturmak için zamanla biriken hücre dışı matriks (ECM) bileşenlerini sentezleyen, miyofibroblast benzeri hücelere epitelyal-mezenkimal farklılaşmaya (EMT) uğrar. Sonuçta, yenilenen hepatositler skar dokusu ile çevrelenir ve sirozu tanımlayan nodüller oluşturur (Ivanov ve ark 2017). Enfekte hepatositlerde TGF- β 1 salgılanması, ROT ve kalsiyuma bağlı mekanizmalar yoluyla çekirdek, NS3/4A, NS4B ve NS5A proteinleri tarafından desteklenir (Presser ve ark 2011).

Kronik HCV enfeksiyonunda; fibrozun ilerlemesi ile seviyesi giderek artan bir fosfoprotein olan osteoponin fibrojenezin bir başka mediatörüdür (Huang ve ark 2010). TGF- β 1 salgılanmasında olduğu gibi, HCV ile enfekte olmuş hepatositlerdeki osteoponin seviyesi, artan ROT üretimi seviyeleri ve değişen kalsiyum homeostazı ile artar (Iqbal ve ark 2013). Osteoponin; HSC’leri aktive etmenin yanı sıra, MMP-13’ün ekspresyonunu baskılar, ekstraselüler matriksin uzaklaştırılmasını durdurur ve fibrozun çözülmesini engeller (Urtasun ve ark 2012). HCV enfeksiyonu karaciğerde kronik inflamasyona bağlı olarak steatozu artırır. HCV; Tip-1 İnterferon üretimini ve CD4⁺T hücresinin; Th2, Th17 ve Treg (düzenleyici T hücresi)’e dönüşümünü inhibe eder. Bu durum sitotoksik özellikteki CD8⁺T ve NK (natural killer) hücrelerinin

işlevlerini bozar. Karaciğer dokusunda artan bir sitotoksik hücre infiltrasyonuna neden olur. Sonuçta doku hemostazını bozan ve hepatokarsinogenezi destekleyen kronik inflamasyonun devamlılığına neden olur. İnflamasyonla eş zamanlı olarak artan ROS, nitrik oksit, sitotoksik sitokinler ve lipid peroksidasyonu şekillenir (Rehermann 2013). HCV enfeksiyonu sırasında inflamasyonu ve HCC'yi destekleyen TNF- α , IL-1 β (interleukin 1 β), IL-23, IL-6 ve lenfotoksinlerin (LT- α ve β) artışı da şekillenir (Haybaeck ve ark 2009, Grivennikov ve ark 2010). LT- α ve β , sitokinlerin ve kemokinlerin üretimini daha da artırarak NF- $\kappa\beta$ sinyal yolunun aşırı aktivasyonuna neden olur. Buna bağlı olarak hücre ölümü ve yeniden doku şekillenmesi döngülerini ve lenfosit infiltrasyonunun artırarak HCC'yi destekler (Haybaeck ve ark 2009).

1.3.3. Alkol tüketimi

Alkol, HCC için önemli bir risk faktörüdür. Kronik alkol alımı veya etanol maruziyeti, hepatosit yıkımı-rejenerasyonu, HSCs aktivasyonu, siroz ve sonuçta HCC'yi düzenleyen hepatosit hücre sinyal yollarını etkiler. Bu sinyal yollarından en önemlileri; fosfolipaz-C, fosfolipaz-D, adenilat siklaz, protein kinaz-C (PKC), c-jun N-terminal kinaz (JNK), sinyal dönüştürücü ve transkripsiyonu aktivatörü (STAT) ve NF- $\kappa\beta$ sinyal yollarıdır. Bu sinyal yollarının karaciğer ve diğer dokularda alkol tüketimi durumlarında aşırı aktif olduğu bulunmuştur. Alkolün karaciğer hücrelerine zarar vermesi fibroz ve siroz gelişimine neden olur. Ayrıca HCC'nin gelişiminde önemli bir etken olan oksidatif stresi indükler (McKillop ve Schrum 2005). Kronik alkol alımının, monosit aktivasyonu yoluyla proinflamatuvar sitokinlerin üretimine neden olduğu ve bağırsaktaki gram-negatif bakterilerin hücre duvarı materyalinden kaynaklanan endotoksinin dolaşımdaki konsantrasyonlarının artmasına neden olduğu gösterilmiştir (Hoek ve Pastorino 2002). Bu durum hepatosit sağkalımı üzerine olumsuz etkiler içeren TNF- α , interleukin-1 β , IL6 ve PG-E₂ gibi kemokin ve sitokin salan Kupffer hücrelerini harekete geçirir (McClain ve ark 2002). Kronik etanol maruziyeti durumunda, hepatositler; kronik hepatosit yıkımı-rejenerasyonu, yıldız hücre aktivasyonu, siroz ve sonuçta HCC için aşamayı belirleyen TNF- α 'nın sitotoksik etkilerine karşı artan hassasiyet gösterir (Hoek ve Pastorino 2002). Alkol ayrıca oksidatif stres mekanizmalar ile karaciğere zarar verir. Alkolik hepatitte, lipid peroksidasyonunun bir belirteci olan dolaşımda artmış izoprostan görülür. Oksidatif stres, çeşitli şekillerde hepatokarsinogeneze katkıda bulunabilir. Birincisi, oksidatif

stres, HCC mikroçevresinin temel özellikleri olan fibroz ve siroz gelişimini teşvik eder (McClain ve ark 2002). Karaciğer yıldız hücreleri, zarar görmüş karaciğerde kollajen birikiminin ana kaynağı olduğundan, izoprostan yoluyla etkilenmiş HSCs'lerin oksidatif stres indüksiyonunun; fibrotik yanıtın özellikleri olan artmış hücre proliferasyonunu ve kollajen sentezini destekleyebileceği tespit edilmiştir (Comporti ve ark 2005). İkincisi, etanolün neden olduğu oksidatif stres, HCC ile ilgili sinyal yolları üzerinde etkiye sahip olabilir. Buna örnek olarak; STAT1'in tirozin fosforilasyonunda tespit edilmiş azalma, IFN- γ sinyalinin STAT1'e yönelik aktivasyonunun azalması ile ortaya çıkan IFN- γ 'nın hepatosit koruyucu etkilerinin kaybı verilebilir (Osna ve ark 2005). Son olarak, oksidatif stres telomer kısalmasını hızlandırabilir ve bu da karaciğer sirozu, kromozomal instabilite ve sonuçta HCC gelişimini tetikler (Kurz ve ark 2004).

1.3.4. Aflatoksin intoksikasyonu

Aflatoksinler, *Aspergillus* cinsinin toksijenik türleri tarafından, özellikle de tarımsal ürünlerde *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından üretilen, akut ve kronik patolojik etkiler gösteren güçlü biyolojik toksinlerdir. AF'lerin AFB₁, B₂, G₁ ve G₂ olmak üzere dört ana formu vardır (McCullough ve Lloyd 2019). Aflatoksinler içerisinde en yüksek toksisiteyi aflatoksin B₁ göstermektedir. AFB₁; kanatlı hayvanlar, alabalık, sığırlar ve ratlar gibi geniş yelpazede birçok hayvan türünde yaş, tür ve cinsiyete bağlı olarak karsinojenik ve immunsupresif etkiye sahiptir (Marchese ve ark 2018). Oral yolla alınan AFB₁ en etkili şekilde ince bağırsaklardan emilmekte, lipid peroksidasyonu ve hücresel zedelenmeye yol açan AFB₁-8,9-epoksit gibi reaktif ara ürünleri şekillendiren hücresel sitokrom P-450 enzim sistemi ve aril hidrokarbon hidroksilaz enzimi etkisiyle karaciğerde metabolize edilmektedir. Bu elektrofilik epoksid DNA, RNA ve protein gibi nükleofilik hücresel makromoleküllere kovalent olarak bağlanabilir. Aflatoksin B₁'in epoksi formunun bu aktifleşme reaksiyonunun sonucunda DNA ile birleşerek AFB₁-N⁷-Guanin kompleksini oluşturduğu bilinmektedir. Bu kompleks organizma veya hücreler için biyolojik bir tehlike oluşturmakta ve karsinojenik ve genotoksik etkilerin sorumlusu olarak değerlendirilmektedir (Chu ve ark 2018).

AF'lerin epoksit türevleri, karaciğerde GSH-S-transferaz (GST) enzimince katalize edilen tepkimeler sonucunda indirgenmiş glutatyon (GSH) ile konjuge edilerek veya epoksit hidrataz enzimince aflatoksikole çevrilerek zararsız hale

getirilmeye çalışılır. GSH, AFB₁'in detoksifikasyonunda önemli bir rol almaktadır. AFB₁ 8,9 ekzo- ve endo-epoksitler, GST tarafından katalize edilen AFB-merkapturik asit oluşması sonucu GSH ile konjuge olabilmektedir (Wild ve Turner 2002). Karaciğerdeki DNA, RNA ve proteinlerin biyosentezlerinin engellenmesi AFB₁'in metabolik aktivasyonuna ve detoksifikasyonuna bağlanmıştır. Özellikle DNA gibi hücresel makromoleküllere kovalent bağlanma affinitesi olan AFB₁-8,9-epoksit, AF'nin biyolojik etkilerini ortaya çıkarmaktadır. Bu oldukça reaktif olan AFB₁-8,9-epoksit substansı DNA bazlarına, özellikle guaninin N⁷ pozisyonuna eklenerek DNA'da konformasyonel değişiklikler yapmaktadır (Benkerroum 2020).

Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC) hem epidemiyolojik hem de laboratuvar çalışmalarını değerlendirmesi sonucu, aflatoksinlerin; kanserojen (Grup 1) ve insanlar için potansiyel olarak kanserojen (Grup 2B) olarak belirlemiştir (Cancer ve Organization 2002). AFB₁'e yüksek konsantrasyonda maruziyet akut hepatite neden olurken, kronik maruziyet karaciğer kanserine neden olur. Oldukça reaktif form olan AFB₁-N⁷-guaninin, DNA'ya bağlanan, karsinojenik ve mutajenik etkide önemli rolü olduğu düşünülmektedir. AFB₁, başta karaciğer olmak üzere insan kanserlerinde mutant bulunan TP53 geninin 249. Kodonunda G→T dönüşümü arjinin-serin mutasyonuna neden olarak fonksiyonel olmayan bir protein ifadesine neden olur (pR249S). Ortaya çıkan değiştirilmiş protein, DNA moleküllerine bağlanamaz. Bu nedenle, hücre döngüsünü kontrol eden, yaşlanma ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli hayati hücresel işlevlerden sorumlu olan çok sayıda gen promoterleri, p53'e karşı transaktivasyon kapasitesini kaybeder. Bu mutasyon, yüksek aflatoksin maruziyetinin olduğu bölgelerde, hepatoselüler karsinom (HCC) hastalarında çok sayıda epidemiyolojik çalışmada yaygın olarak bulunmuştur. Bu durum HCC insidansı ile aflatoksin maruziyeti arasındaki ilişkiyi güçlendirmektedir (Hussain ve ark 2007). Ratlarda, AFB₁ ile indüklenen HCC'de c-KRAS onkojeninde mutasyon tespit edilmiştir (Soman ve Wogan 1993) ve insan HRAS proto-onkojeninin AFB₁ tarafından aktivasyonu in vitro olarak bildirilmiştir. Bu genlerin AFB₁ ile ilişkili tümör oluşumunda rol oynadığını göstermektedir (Riley ve ark 1997). Ayrıca AFB₁ maruziyeti, PI3K/Akt ve ERK1/2 sinyal yolları üzerinden IGF-2 reseptörünün anormal aktivasyonunu indükleyerek hepatokarsinogenez sürecini tetiklemektedir (Lotfollahzadeh ve ark 2012).

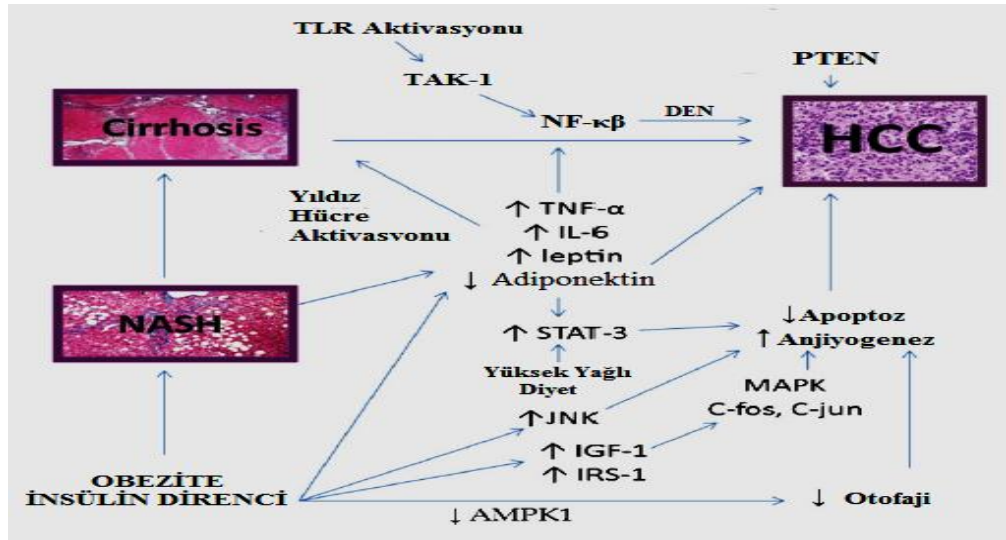
AFB₁'in ROT ve oksidatif stresi indüklediği ve mitokondriyal ROS-bağımlı apoptozu indükleyen sinyal yollarını aktive ettiği tespit edilmiştir (Liu ve Wang 2016). AFB₁ maruziyeti, alkol ve HCV enfeksiyonu dahil siroz için önemli risk faktörleri olan katılımcılarda HCC'nin gelişmesine katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (Chu ve ark 2018). Ayrıca kronik HBV taşıyıcıları arasında bir doz-yanıt şeklinde siroz ve HCC riskini artırabileceği sonucuna varılmıştır (Chu ve ark 2017). Karaciğer bozukluğu olan hastaların diyet aflatoksinlerine maruz kaldığını ve karaciğerdeki rezidüel AFB₁ alımı; HCC'deki p53 ve Rb (retinoblastoma proteini) yollarını olumsuz etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca sirotik karaciğerlerde AFB₁'in varlığı, diyetle alınan aflatoksinin viral siroz ve alkolik siroz sırasında hastalığın ilerlemesine potansiyel katkısı olduğu görülmüştür (Ramalho ve ark 2018). Aflatoksinlerin, sitokinlerin ve kemokinlerin canlılığını, işlevini veya genetik ifadesini kısıtlamak için monositler, makrofajlar, dendritik hücreler (DC) ve NK hücreleri gibi doğuştan gelen bağışıklıkta anahtar rol oynayan bağışıklık hücreleri üzerindeki etkileri tespit edilmiştir. İmmün sistemi uyarıcı etkilerle ilgili olarak, kısa süreler için düşük aflatoksin dozlarına maruz kalma bağışıklık sistemini uyarırken, daha uzun süreler boyunca yüksek dozlara maruz kalmak bağışıklık sistemini baskılayıcı etkiler yaratır (Wang ve ark 2018).

1.3.5. Alkolik olmayan steatohepatit (NASH)

Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NASH) alkol kullanmayan kişilerde alkole bağlı yağlı karaciğer hastalığının histopatolojik bulgularının olduğu bir karaciğer hastalığıdır. NASH basit steatozdan steatohepatite, ilerlemiş fibroza ve siroza kadar geniş bir karaciğer hasarını tanımlar. NASH'ın önemi; toplumda sık görülmesi, siroza ve hepatoselüler karsinomaya ilerleme potansiyelinden kaynaklanmaktadır. Basit yağlanmada iyi bir gidişat olmasına karşılık, alkolik olmayan steatohepatitte daha çok ilerleyici fibroz ve siroz riski vardır (Hashimoto ve Tokushige 2012). NASH'da, kronik besin fazlalığı endoplazmik retikulum stresine neden olarak artmış steatoz ve insülin direncine (IR) yol açar. Bu etmenler birbirleriyle bağlantılıdır ve birbirini güçlendirir. Karaciğerde doğal olmayan yüksek seviyelerde yağ birikiminin, inflamatuvar hücrelerin toplanmasını tetiklediği ve prooksidan seviyelerini arttırdığı bilinmektedir. ROT doğrudan temel biyomoleküllere etki ederek hepatotoksisiteye neden olur. ROT ayrıca dolaylı olarak sitotoksik, proinflamatuvar ve fibrojenik mediyatörlerin üretimini tetikleyen redoksa

duyarlı transkripsiyonel basamakları aktive eder (Bartosch ve ark 2009). NASH patogenezinde karaciğerde yağ depolanmasına neden olan insülin direncine ilave olarak mitokondri kaynaklı reaktif oksijen türlerinin bileşiminden oluşan çift vuruş teorisi kabul görmektedir. Bu teoride birinci vuruş olan steatoz oluşumunda tip-2 diabetes melitus ve obezitede sıklıkla bulunan insülin direnci anahtar rol oynamaktadır. Steatoz oluşuktan sonra karaciğer, proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına yol açan ikinci bir vuruş olarak adlandırılan oksidatif strese duyarlı hale gelir. Ayrıca oksidatif strese ek olarak endoplazmik retikulum stresi de hepatositlerde oksidatif stres yükünü artırmaktadır. Oksidatif stres, NASH'de steatozun steatohepatite ilerlemesinin ana nedenlerinden birisidir (Hashimoto ve Tokushige 2012). NASH patogenezinde yer alan IR nedeniyle; TNF- α , IL-6 ve leptin düzeylerinin artması ve adiponektinin azalması meydana gelir (Tilg ve Moschen 2010) (Şekil 2.17).

Karsinojen dietilnitrozamin (DEN) ile oluşturulan NASH'ın fare modelinde; NF- κ B'nin aktivasyonuna yol açan yüksek TNF- α seviyeleri hepatokarsinogeneze yol açtığı tespit edilmiştir (Wang ve ark 2009). IL-6 ekspresyonunun ve TNF- α reseptörünün ortadan kaldırılması ile yapılan çalışmalarda, DEN'e maruz kalmış obez farelerde HCC'nin azaldığı tespit edilmiştir (Park ve ark 2010, Roderburg ve Trautwein 2010). Obezitede, IL-6 seviyeleri yükseldiği bulunmuş ve kilo kaybının IL-6 ve TNF- α seviyelerini düşürdüğü tespit edilmiştir. Açıkça, IR'de bulunan yüksek seviyelerde TNF- α ve IL-6, inflamasyonu ve fibrozu teşvik eder. Bu durum hem NASH şiddetine hem de hepatik karsinogeneze katkıda bulunabilir (Bougoulia ve ark 2006). IR durumunda görülen azalmış adiponektin ve yüksek vücut kitle indeksinin, NASH ile bağlantısı ve hepatik fibrozda rol oynar. Farelerde hipoadiponektinemi tablosunda, hepatik tümör oluşumunu hızlandırdığını gösteren bulgular elde edilmiştir (Kamada ve ark 2007). Adiponektin antianjiyogenezi ve apoptozu destekler ve hipoadiponektineminin tümör oluşumu ve progresyonunda önemli bir rolü vardır (Bråkenhielm ve ark 2004). HCC gelişimi tartışması açısından daha önemli olan leptinin, hepatik fibrozisin temel bir aracısı olduğu ve yüksek TNF- α seviyelerine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Ikejima ve ark 2001, Marra 2002) (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. Alkolsüz steatohepatit ve obezite durumunda hepatosellüler karsinomun patogenezi (Torres ve Harrison 2012)’den düzenlenmiştir. AMPK-1: Adenozin monofosfat protein kinaz-1. DEN: dietilnitrosamin. IGF-1, insülin büyüme faktörü 1. IL-6: interlökin-6. IRS-1: insülin reseptörü substratı-1; JNK: c-JUN amino asit terminal kinaz. MAPK: mitojenle aktive edilmiş protein kinaz. NF-κβ: nükleer faktör- κβ. STAT-3: sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon-3 aktivatörleri. TAK1: dönüştürücü büyüme faktörü-beta ile aktive olan kinaz 1. TLR: toll benzeri reseptör. TNF-α: tümör nekroz faktörü alfa.

Hiperinsülinemili insülin direnci, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) ve insülin reseptörü substratı-1 (IRS-1) üretimini upregüle eder. IGF-1, hücre proliferasyonu ve hepatik apoptozun inhibisyonu ile büyümeyi uyaran bir peptid hormonudur. IGF-1'in hepatokarsinogenez sürecine katkıda bulunan c-fos ve c-jun protoonkogenlerinin artan ekspresyonunun yanı sıra MAPK'ı aşırı aktive ettiği gösterilmiştir (Price ve ark 2002). Oksidatif stres ve IR koordineli bir şekilde; hepatik inflamasyonu, fibrozu ve ileri aşamada hepatokarsinogenez NF-κβ, c-Jun amino asit terminal kinazları (JNK'ler) ve STAT3 sinyal yolları ile tetiklemektedir. NF-κβ; NASH, karaciğer hasarı, fibroz ve HCC arasında önemli bir rol üstlenir (Tilg ve Moschen 2010). NASH patogenezinde yer alan yüksek yağlı diyet, NF-κβ'nın aşırı aktivasyonuna neden olmaktadır. DEN ile başlatılan ve yüksek yağ içeren bir diyetle devam edilen fare modeli çalışmasında NF-κβ ekspresyonunun, HCC ilerlemesi için önemli olduğu bulunmuştur (Chiang ve ark 2009). JNK, aşırı alınan doymuş serbest yağ asitlerine cevap olarak apoptozun intrinsik yolunu aktive etmek için gereklidir. Hepatositlerde lipid birikimi ve ardından apoptozun bu süreci lipoapoptoz olarak adlandırılmıştır ve NASH'nin temel bir bileşeni olduğu düşünülmektedir (Wree ve ark 2011). JNK; IR ve obezite tarafından aktive edilir ve kilo kaybı üzerinde azalmış aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Solinas ve Karin 2010). JNK'nin iki ana izoformu olan JNK1 ve JNK2 arasındaki belirgin farklılıklar

hepatositlerde deneysel çalışmalarda tespit edilmiştir. JNK1'in hepatik steatoz ve inflamasyonu teşvik ettiği görülürken, JNK2 hepatosit ölümünü inhibe ettiği görülmüştür (Singh ve ark 2009). JNK yollarının inhibisyonunun sıçanlarda steatohepatiti iyileştirdiği gösterilmiştir (Aghazadeh ve Yazdanparast 2010). Hem steatohepatit hem de hepatokarsinogenezde önemli olduğu gösterilen bir başka farklı yol, adenosin monofosfat-aktif protein kinazı (AMPK) içerir. AMPK, yağ asidi ve kolesterol biyosentezi gibi metabolik süreçleri düzenler (Fumarola ve ark 2014). Obezite ve aşırı kalori alımı durumunda, AMPK inhibe edilir ve otofaji azalır. AMPK'nın inhibisyonu, hepatositlerden lipid uzaklaştırılmasında bir azalmaya neden olduğu için hepatosteatoz gelişimini, tümör oluşumu ve tümör büyüme hızının artmasına neden olur (Takamura ve ark 2011). Ayrıca, AMPK sinyal yolunda önemli tümör baskılayıcı Beclin1 otofaji geninden yoksun farelerde HCC geliştiği gösterilmiş olup, insan HCC'sinde sıklıkla Beclin1 kaybının daha kötü prognoz ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Qu ve ark 2003, Ding ve ark 2008).

1.4. Apoptoz

Apoptoz; canlılarda hücre yapımı ve yıkımı arasındaki dengeyi sağlayan programlı hücre ölümüdür. Fizyolojik bir olay olan apoptoz ekstrinsik ve intrinsik özel sinyal mekanizmalarına bağlı olarak gerçekleşir. Apoptoza giden hücrelerde biyokimyasal ve morfolojik olarak farklı değişiklikler meydana gelmektedir. Apoptoz, özel bir sistein aspartil proteaz ailesi olan kaspaz enzim aktivasyonu sonucu gerçekleştirilir. Kaspaz aktivasyonu neticesinde DNA yıkımlanması, hücre iskeletinin yıkımlanması ve hücre parçalanması gerçekleşir (Norbury ve Hickson 2001). Radyo aktif ışınlar, sitokinler, oksidatif stres, büyüme faktörlerinin ortadan kalkması, toksinler, kemoterapötik ilaçlar ve viral enfeksiyonlar apoptozisi tetikleyen başlıca etmenlerdir. Apoptoz; normal doku gelişiminin sağlanması, kan hücrelerinin yenilenmesi, barsak epitel hücrelerinin yenilenmesi, gelişme ve yaşlanma gibi normal fizyolojik süreçlerde görülmektedir. Patolojik olarak apoptoz; nörodejeneratif hastalıklar, AIDS, otoimmün hastalıklar, viral enfeksiyonlar ve kanser gibi patolojik durumlarda da ortaya çıkmaktadır (Thompson 1995).

Apoptoz mekanizması incelendiği zaman, çok çeşitli ve birçok aracı proteinin katıldığı kompleks mekanizmalarla kontrol edildiği görülür. Apoptoz mekanizmasında etkili faktörlerin başında Bcl-2 ailesi proteinleri gelir. Antiapoptotik ve proapoptotik proteinler olarak ikiye ayrılan Bcl- 2 ailesi intrinsik apoptoz

metabolizmasının düzenlenmesi ve yürütülmesinde önemli role sahiptir. Proapoptotik Bcl-2 proteinleri apoptozun başlatılmasında, antiapoptotik Bcl-2 proteinleri ise apoptozun inhibe edilmesi ve hücrenin hayatta kalmasında görev alır (Solano-Gálvez ve ark 2018). Apoptoz mekanizmasında, hücrede DNA parçalanması ve hücrenin ölüme götürülmesi noktasında rol alan enzim ailesi kaspazlardır. Kaspazlar bu özellikleri nedeniyle intinsik ve ekstrinsik apoptoz mekanizmasında kritik noktada yer alırlar. Hücrenin hayatta kalmasına ya da ölmesine karar verilmesi genetik mekanizmalar ile düzenlenmektedir. Genetik mekanizmada c-myc ve p53 genleri önemli görevler alır. Hücrede meydana gelen DNA hasarında p53, p21i GADD45 ve c-myc geni tamir mekanizmasında yer alan proteinlerin transkripsiyonel gen düzenlenmesini gerçekleştirirler (Hunter ve ark 2007). Apoptozun negatif düzenlenmesi IAP (Apoptozu inhibe eden proteinler) ailesi üyelerince gerçekleştirilir. IAP ailesi aktif kaspaz inhibisyonu sağlayarak apoptozu inhibe ederler. Apoptozu negatif olarak düzenleyen IAP proteinleri de Smac/DIABLO ve Omi/HtrA2 gibi negatif düzenleyiciler tarafından kontrol edilmektedir (Oberoi-Khanuja ve ark 2013).

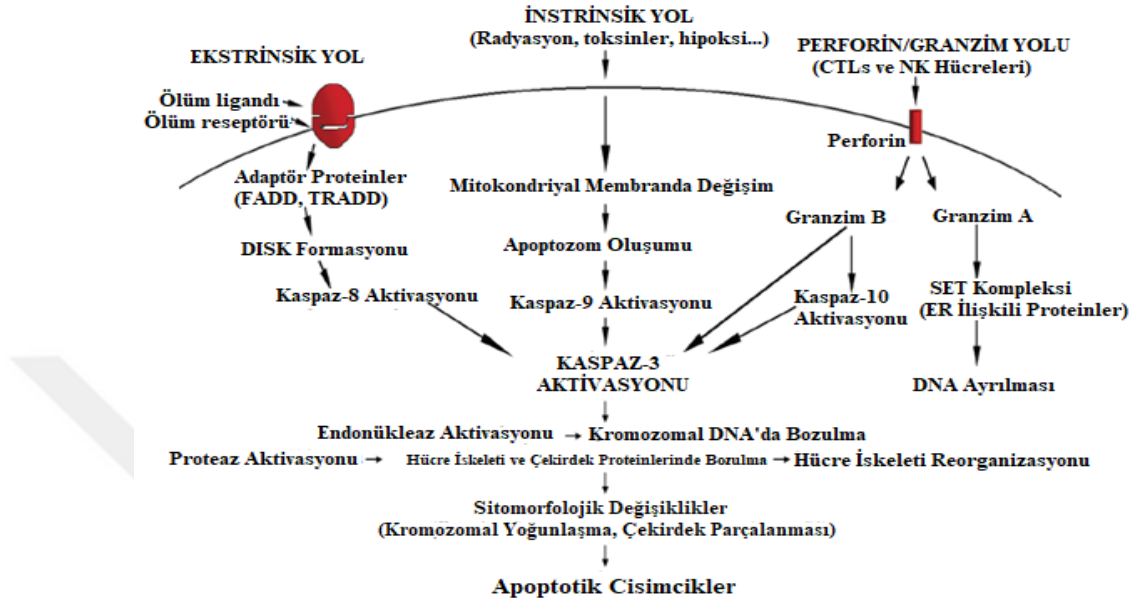
1.5. Apoptoz Mekanizmaları

Apoptozdan sorumlu iki ana yol vardır: ölüm reseptörlerinin ligasyonu ile aktifleşen ve kaspaz-8/10'u içeren ekstrinsik yol ve kaspaz-9'u içeren intrinsik yol. Apoptozun hem başlatması hem de yürütülmesi için kaspazlar olarak adlandırılan aspartata özgü sistein proteaz ailesinin üyeleri gerekmektedir. Hücre ölüm yollarındaki yapılarına ve sıralarına göre kaspazlar, başlatıcı (kaspaz-8,-9 ve -10) ve efektör (kaspaz-3,-6, -7) kaspazlara ayrılabilir. Bir ölüm sinyali apoptotik yolu tetiklediğinde, başlatıcı kaspazlar aktif hale gelerek proteolitik bölünme ile efektör kaspazları ve hücre ölümüne yol açan birçok proteini aktifleştirir (Fischer ve ark 2006).

1.5.1. Ekstrisik yol aracılı apoptoz

Apoptozu başlatan dış sinyal yolları, transmembran reseptör aracılı etkileşimleri içerir. Bunlar, TNF (tumor necrosis factor) reseptör gen süper ailesinin üyesi olan ölüm reseptörlerini içerir. TNF reseptör ailesinin üyeleri sisteinden zengin benzer hücre dışı alanları paylaşır. Bu aile üyeleri ölüm alanı (DD) olarak adlandırılan yaklaşık 80 amino asitlik sitoplazmik alana sahiptir. Bu ölüm alanı, ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yollarına iletilmesinde kritik bir

rol alır. FasL/FasR (CD95 yolu) yolu, FADD (Fas ilişkili ölüm alanı) ölüm alanı ve RIP (Reseptör ilişkili protein) proteini ile etkileşim içerisinde. TNF α /TNFR1 yolunun ölüm alanı ise TRADD (TNF Reseptörü İlişkili Ölüm Alanı) olarak adlandırılır (Elmore 2007)(Şekil 1.10).



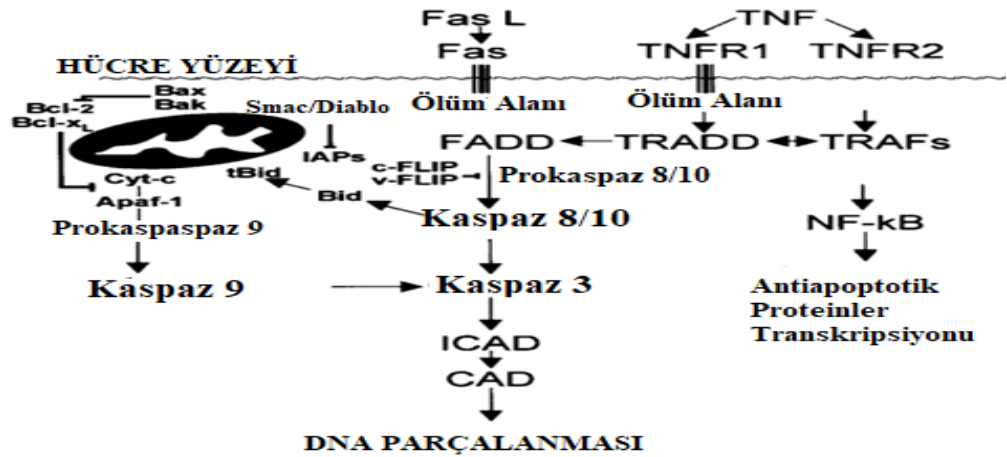
Şekil 1.10. Apoptotik yollarda kaspaz aktivasyonu (Elmore 2007).

Hücre ekstrinsik apoptotik sinyaller ile uyarıldığında, hücre yüzeyinde ölüm reseptör-ligand etkileşimi sonucu reseptör trimerik yapı kazanır. Trimerik yapı kazanan reseptör; adaptör molekülleri ve prokaspazla birleşerek apoptoza neden olan DISC (Ölüme neden olan sinyal kompleksi) adı verilen yapıyı oluşturur (Kischkel ve ark 1995). DISC formasyonu şekillendikten sonra inaktif durumdaki prokaspaz-8'in uzun ve kısa kolları kesilerek aktif kaspaz-8'in oluşması sağlanır. Aktif kaspaz-8; iki yolla kaspaz-3'ü aktive eder. Birincisi, direkt kaspaz-8 kaspaz-3'ü aktive eder. İkincisi ise, Bid'i keserek dolaylı yoldan intrinsik mekanizmada kaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive eder. Her iki yolla da aktive olan kaspaz-3, yine CAD (Kaspazla aktive olan DNaz) aktivasyonu ile DNA fragmentasyonuna neden olur. Ölüm reseptörü aracılı apoptoz FADD ve kaspaz-8'e bağlanarak, bunları etkisiz hale getiren bir protein olan c-FLIP ile inhibe edilebilmektedir (Schulze-Osthoff ve ark 1998)(Şekil 3.2).

1.5.2. İntrinsik yol aracılı apoptoz

Apoptozu tetikleyen hücre dışı sinyaller ya da DNA hasarı, hücre içi kalsiyum düzeyi artışı, hücre siklus bozuklukları, hipoksi gibi hücre içi sinyaller

sonucu instrinsik yolu uyarır. Mitokondri üzerinden gerçekleşen bu yolda, hücre ölüm sinyalini alması sonucu aktif hale gelen kaspaz-8 ile BID (BH3 etkileşen alanlı ölüm agonisti) proteini mitokondri dış membranına bağlanır. Mitokondri dış membranında kaspaz-8; BID molekülünü keserek, aktif BID olan tBID (Truncated BID) haline dönüştürür. Aktif BID, antiapoptotik protein Bcl-2'yi inaktive eder, Bax ve Bak'ı aktifleştirir. Aktifleşen Bax ve Bak mitokondriyum membranında por oluşumunu indükleyip zar potansiyelini değiştirir. Böylelikle mitokondriyum membranındaki porlardan sitokrom-c, Smac/DIABLO, Endo-G (Endonükleaz-G), kalsiyum ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımını uyarır (Lucken-Ardjomande ve Martinou 2005). SMAC, IAF proteinini inhibe ederek apoptozu hızlandırır. IAP'nin ortamda bulunması ise kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonunu engeller. AIF, çekirdeğe transloke olur ve parçalara ayırır. Endo-G de DNA'yı parçalar. Mitokondriyal porlardan salınan sitokrom-c, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve ATP'nin katılmasıyla sitozolde apoptozom denen bir kompleks oluşturur. Apoptozom kaspaz-9'u keserek aktifleştirir. Kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir. Aktif kaspaz-3 de ICAD (kaspaz aktive edici DNaz inhibitörü)'ı inaktifleştirerek CAD (Kaspaz aktive edici DNaz)'ı serbestleştirir. CAD ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde parçalanmasına neden olur (Schultz ve Harrington Jr 2003)(Şekil 1.11).



Şekil 1.11. Apoptotik yolların aktive edilmesi, ekstrinsik apoptoz ile instrinsik apoptozun ilişkisi. Ölüm sinyalleri ölüm reseptörü ile bağlandığı zaman, adaptör proteinler tarafından ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC (death-inducing signaling complex)) oluşturmak için kaspaz 8'i toplar. Kaspaz 8 ise DISC'te dimerizasyonla aktif hale getirilir. Hücre stresine cevap olarak da, mitokondri hücre içi boşluktan sitozole sitokrom C (cyto C) salgılar. Bu; kaspaz-9'u dimerizasyonla aktive eden apoptozom oluşumunu tetikler. Aktif kaspaz 8 ve 9, infazcı kaspazlar 3 ve 7'yi proteolitik olarak aktive eder (Schultz ve Harrington Jr 2003).

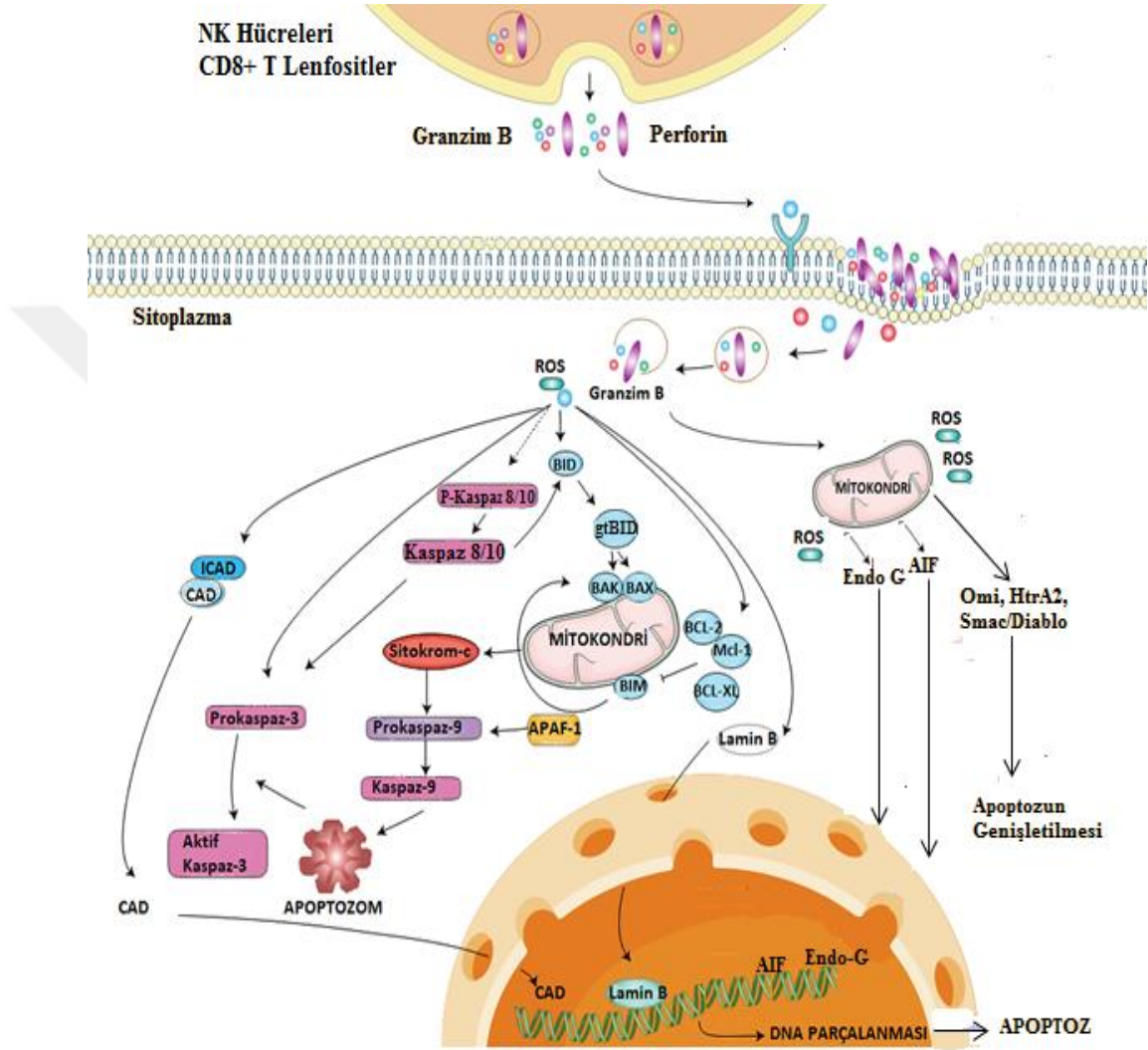
1.5.3. Perforin/Granzim aracılı apoptoz

Kanser hücrelerinin yok edilmesinde; granül aracılı sitotoksositeye dahil olan Perforin/Granzim B sistemi hayati öneme sahiptir. Granzim B, kaspaz zimojenlerinin aktifleştirmesi ile kaspaz sistein proteaz ailesinin üyelerini aktive edebilen majör bir sitotoksik T lenfosit/doğal öldürücü (CTL/NK) granül proteazdır (Adrain ve ark 2005). Apoptoz mekanizmasında; sitotoksik T lenfositler (CTLs) ve doğal öldürücü (NKs) hücreler, çeşitli mekanizmalar kullanarak tümör ya da enfekte olmuş hücreleri doğrudan parçalayabilir. Bunu; litik granüllerin salınmasını içeren “granül aracılı sitotoksosite (Perforin/granzim)” ve hedefin yüzeyindeki ölüm reseptörlerini bağlayan tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) veya Fas ligandını (FasL) kullanarak (ölüm reseptörü aracılı sitotoksosite) gerçekleştirir (Tuomela ve ark 2022).

Granül aracılı sitotoksosite iki mekanizma ile hücre ölümüne neden olur. Birincisi, yüksek perforin konsantrasyonlarına maruz kalındığında gözlemlenebilen, perforin gözenekleri boyunca hızlı ozmotik akışın ve membran yırtılmasının neden olduğu nekrotik hücre ölümüdür (Masson ve Tschopp 1985, Backes ve ark 2018). İkincisi, Granzim B'nin hedef hücreye perforin aracılı alımıyla indüklenen apoptotik hücre ölümüdür. Yapılan çalışmalarda Granzim B'nin hedef hücrelere girişinin: hücre zarındaki perforin gözeneklerinden doğrudan difüzyon (Law ve ark 2010) ya da granzimlerin perforin kaynaklı endozomal alımı şeklinde olduğu tespit edilmiştir (Froelich ve ark 1996, Veugelers ve ark 2004).

Granzim B, perforinler aracılığı ile hedef bir hücreye girdikten sonra prokaspazların doğrudan bölünerek aktifleştirilmesi ve/veya mitokondriyal membran bütünlüğünün bozulmasına (MOMP) neden olarak apoptozu uyarır. Granzim B'nin apoptozu tetiklediğine inanılan ana mekanizma, sadece BH3 içeren protein BID'in Granzim B aracılı kesilmesidir (gtBID). gtBID daha sonra mitokondriye yer değiştirir ve proapoptotik proteinler Bax ve/veya Bak ile etkileşerek mitokondriyal membran bütünlüğünü bozar (Keskin ve Hatipoğlu 2018). Mitokondriyal membran bütünlüğünün bozulması, membran geçirgenliğini artırarak sitokrom C, smac/DIABLO, Omi/HtrA2 ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) gibi apoptojenik faktörlerin salınmasına yol açar (Bots ve Medema 2006). Sitokrom C salınımı, apoptozom olarak bilinen; sitokrom C, dATP, Apaf-1, prokaspaz-9'dan oluşur ve makromoleküler bir kompleks olan Apoptozom oluşumunu uyarır. Apoptozomda

kaspaz-9 aktivasyonu ile kaspaz-3 ve 7'nin aktivasyonu uyarılır. Granzim B ayrıca Mcl-1 ve Bim kompleksinden anti-apoptotik protein Mcl-1'i ayırarak, proapoptotik Bim'in serbest kalmasına ve ardından Bax ve/veya Bak artışına neden olur. Bax/Bak artışı; MOMP'a neden olarak proapoptojenik moleküllerin salınmasına neden olan sitokrom-c salımına neden olur (Boivin ve ark 2009) (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. Perforin/Granzim B aracılı apoptoz (Anonim 2022)'düzenlenmiştir. CTLs/NKs hücrelerinin sitotoksik granülleri perforin ve granzim B, çeşitli kaspazların doğrudan aktivasyonunu tetikleyebilir. Apoptozu indüklemek veya mitokondriyal geçirgenliği bozmak için apoptoz kaskadı, Cyt C'nin salınmasına neden olur ve apoptotik cisimlerin oluşumunu tetikler. Ayrıca Granzim B çeşitli ölüm substratlarının doğrudan bölünmesini indükleyerek apoptozu genişletir. Granzim B apoptozu indüklemek için mitokondriyal ROS üretimini de artırabilir.

Granzim B aracılı ikincil apoptoz mekanizması; kaspaz-3 gibi efektör kaspazların doğrudan bölünmesiyle başlatılır. Kaspaz-3, DNA hasarına yol açan DNaz'ı inhibitöründen ayırır ve hücre iskeleti yapısını da gelsolini parçalayarak bozar (Lord ve ark 2003). Son zamanlarda, granzim B'nin gözenek oluşturucu

protein gasdermin E'yi parçaladığı ve aktive ettiği, hücre zarında gasdermin gözeneklerinin oluşumu yoluyla alternatif bir hücre ölümü formu olan piroptozu açtığı bulunmuştur. Piroptoz, apoptozu kıyasla daha enflamatuar bir hücre ölümü şeklindedir ve gasdermin ailesinin üyeleri tarafından hücre zarında gözeneklerin oluşumuna dayanır. Gasdermin E'nin granzim B tarafından bölünmesi, sitotoksik lenfositlerin kanser hücrelerini öldürebildiği ve tümör büyümesini kontrol edebildiği güçlü bir mekanizmadır (Zhang ve ark 2020).

Granzim B; kaspaz-3,7,8 ve 10'u doğrudan hedefleyerek apoptozu başlatabilir. Ekstrinsik yolda aktifleşen kaspaz-8/10'un Granzim B tarafından hedeflenmesi; mitokondriyal mekanizmada gerçekleşebilecek bir sorunda apoptozun devam ettirilmesini ya da apoptozun güçlendirilmesini sağlar. Granzim B aracılı BID bölünme oranı ve hızı, Granzim B aracılı kaspaz-3 aktivasyonundan daha hızlıdır. Bu yüzden Granzim B aracılı apoptozda BID bölünmesi ile mitokondriyal yolun aktifleştirilmesi daha avantajlıdır (Adrain ve ark 2005). Kaspaz-3'ün aktivasyonu, genellikle tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilen apoptoz proteini (IAP) ailesi üyelerinin inhibitörü tarafından kontrol edilir. Kaspaz-3 aktivasyonu iki aşamalı bir sürece dahil edilebilir. Kaspaz-3'ün serbest kalması için, IAP'lerin bozulan mitokondrilere salınan Smac/Diablo veya HtrA2/Omi tarafından tutulması gerekir. Bu nedenle, bu doğrudan yol için de mitokondriyal bozulma gerekebilir; bu kavram, granzim-B/perforinle edilmiş Bcl-2-aşırı eksprese eden hücrelerde aktif kaspaz 3'ün olmamasıyla desteklenmektedir (Goping ve ark 2003).

CTLs/NKs aracılı sitotoksistide, ölüm reseptörü yolu aracılı apoptoz başlatılabilir. Ölüm reseptörü yolunda, FasL (CD95L) ve TRAIL (APO-2L) gibi bir ölüm ligandının spesifik bir transmembran ölüm reseptörü olan Fas'a (APO-1/CD95) ve ölüm reseptörü 4 ve/veya 5 (DR4, DR5) bağlanmasıyla tetiklenir. Sitolitik Fas ile ilişkili ölüm alanı adaptör proteininin (FADD) ligandlı ölüm reseptörlerine bağlanmasından sonra, başlatıcı prokaspaz-8 ve/veya -10, bağlantılı FADD'ye bağlanarak apoptozu neden olan DISC oluşumunu tamamlar. DISC'ler içinde prokaspaz-8/10; homodimerizasyon yoluyla aktive edilir. Aktif kaspaz-8/10, DISC'lerden prokaspaz-3 ve 7'yi parçalayıp aktif kaspaz-3 ve 7'ye dönüştürür. Kaspaz 8/10, Granzim B'ye benzer şekilde apoptozun mitokondriyal yolunu aktive etmek için BID'ı böler (tBID). Oluşan tBID, mitokondriye bağlanarak mitokondriyal

sitokrom-c ve diğer pro-apoptotik mitokondriyal proteinlerin sitoplazmaya akışını indükleyerek apoptotik sinyali daha da güçlendirir (Tuomela ve ark 2022). CTLs/NKs'lerin, hem Perforin/Granzim B sistemi hem de hücre ölüm reseptörü aracılı apoptozu uyarması; prokaspaz-3,6 ve 7'nin aktivasyonunda birleşir ve sonuçta tBID oluşumunu sağlayarak MOMP'a yol açar (Rousalova ve Krepela 2010).

1.6. Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör (p21) Proteini

Siklin bağımlı kinaz inhibitör (p21) proteini; p53'ün aşağı akışında yer alan, G1 fazından S fazına geçiş için gerekli olan siklin/Cdk ailesinin her bir üyesinin aktivitesini inhibe eden bir proteindir. p21 proteini; siklin-CDK2, siklin-CDK1 ve siklin-CDK4,6 komplekslerini inhibe ederek hücre siklusunun ilerlemesini durdurur. p21 proteini, hem normal hem de kanser hücrelerinde güçlü bir hücre döngüsü ilerlemesi inhibitörü olarak işlev görür. p21 ayrıca hücrel farklılaşmayı ve yaşlanmayı da indükler (Xiong ve ark 1993). p21, ana tümör baskılayıcılardan biri olmasına rağmen, onkogenezi de teşvik edebilir. p21'in moleküler davranışı, hücre altı lokalizasyonuna bağlıdır. Nükleer p21 hücre proliferasyonunu inhibe ederek proapoptotik olabilirken, sitoplazmik p21 onkojenik ve anti-apoptotik fonksiyonlara sahip olabilmektedir (Ohkoshi ve ark 2015).

1.7. Sorafenib

Orijinal bir Raf kinaz inhibitörü olarak geliştirilen multikinaz inhibitörü sorafenib; Ras/Raf/Mitojenle aktive olan kinaz ve hücre dışı sinyal ile düzenlenen kinaz (ERK) sinyal yolunu hedefler. Aynı zamanda VEGFR-1,2,3, PDGF-R, FGFR, c-kit, Flt3 gibi kinaz aktiviteye sahip molekülleri de hedefleyerek antiproliferatif ve antianjiyogenik etkileri tetikler (Cervello ve ark 2012). Sorafenib, ilerlemiş HCC'nin klinik sonucunu önemli ölçüde artıran ilk ilaç olmasına rağmen, pivotal faz III çalışmasında plasebo ile 7.9 aya karşılık ortalama 10.7 aylık bir ortalama genel sağkalım ile etkinliği orta düzeydedir (Llovet ve ark 2008). Sorafenib ile indüklenen apoptoz; endoplazmik retikulum (ER) stresi, JNK ve AMPK'ye bağlı sinyalleme düzenlenmesi ve otofajinin indüklenmesi ile ilgilidir. Sorafenib'in apoptozu indüklemesi ile ilgili yapılan bir çalışmada; erken dönemde sürekli ilaç tedavisi, HepG2 hücrelerinde otofajiden apoptozla geçişle ilişkili olan, ER stresinde ilerleyici bir artışa ve PERK-CHOP (C/EBP homolog protein)'a bağlı BimEL artışı ile gerçekleştiği tespit edilmiştir (Rodríguez-Hernández ve ark 2019). Sorafenibe uzun süreli maruz kalma, sıklıkla tümör hücrelerinin duyarlılığının azalmasına neden

olarak, kazanılmış dirence yol açar. Bu nedenle, HCC'nin daha iyi etkinliğe sahip yeni terapötik tedavilerine acilen ihtiyaç duyulmaktadır (Xia ve ark 2020).

1.8. Tarantula Cubensis Alkol Ekstresi D6 (TCAE-Therane kron)

Therane kron (Tarantula cubensis alkol ekstresi D6 (TCAE)), örümcek Tarantula cubensis'ten hazırlanan homeopatik bir ilaçtır (Anonim). TCAE'nin demarkatif, rejeneratif, antienflamatuvar ve rezorptif gibi olumlu etkileri vardır. Veteriner hekimlikte birçok travmatik olguda, nekrotik bozukluklarda, kutanöz yaralarda epitelizasyonu uyarmada, birçok bulaşıcı hastalıkta, sistemik ve lokal enfeksiyonlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Karabacak ve ark 2015). Ayrıca panarsiyum, laminitis, ülseratif olgularda (Karabacak ve ark 2015) ve papillomaların tedavisinde de etkinliği kanıtlanmıştır (Icen ve ark 2011). Viral enfeksiyonlarda da geniş kullanım alanı bulan TCAE; foot-and-mouth hastalığı (Lotfollahzadeh ve ark 2012) ve mavi dil hastalığı olan sığırlarda (Albay ve ark 2010) oral lezyonların tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Azoksimetan ile indüklenen deneysel kolorektal kanseri çalışmasında Therane kron uygulamasının ACF (Aberrant kript foci) oluşturan kript sayılarını anlamlı düzeyde azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca Therane kron uygulamasının kriptlerde displazi varlığı ve derecelendirilme skorlarını da azalttığı tespit edilmiştir (Akçakavak ve Özdemir 2023). Köpeklerde, Therane kron preoperatif uygulamalarının benign meme tümörlerinde regresyon ve sertleşme, malign meme tümörlerde ise sadece sertleşme oluşturduğu, ayrıca ilacın postoperatif dönemde kullanımının yeni tümör oluşumlarını önleyebileceği görülmüştür (Gültiken ve Vural 2007). Köpeklerde meme adenokarsinoması üzerine yapılan çalışmada Therane kron ve immünmodülatör bir ilaç olan Baypamun uygulamalarının primer ikincil tümör oluşumları üzerine etkinliği araştırılmış ve Therane kron'un, Baypamuna göre belirgin bir şekilde üstün olduğu gözlenmiştir (Gültiken 2003). Therane kron'un antitümöral etkileri veteriner hekimlik tıbbında kanıtlanmış olmasına rağmen, TCAE'nin antitümöral etkisinin mekanizmasını ele almak için daha fazla in vivo ve in vitro araştırmalara ihtiyaç vardır.

1.9. Dietilnitrozamin

Karsinojen bir madde olan dietilnitrozamin (DEN); sigara dumanı, tarımda kullanılan kimyasallar ile kurutulmuş ve kızartılmış besinlerde, kozmetik ve farmosötik ürünlerinde bulunur. Çevresel bir karsinojen ve hepatotoksin olan DEN deneysel hayvan modellerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Karaciğerde

dejeneratif, proliferatif ve neoplastik lezyonlara sebep olmaktadır (Arboatti ve ark 2018). DEN biyotransformasyonu karaciğer loblarında pericentral hepatositlerde en yüksek metabolik aktiviteye sahip sitokrom P450 (CYP) sistemi (CYP2A6 alt ailesi ve esas olarak CYP2E1) tarafından bir dizi reaksiyonla katalize edilir. CYP'ler, çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin oksidasyonunu katalize eden zara bağlı “hem” içeren enzimlerdir. DEN; P450 izoenzimleri tarafından hidroksile edilmekte ve alkilasyon mekanizması ile biyoaktif hale gelmektedir. İlk biyoaktivasyon basamağı P450 kaynaklı α -hidroksilasyon ve α -hidroksilnitrozamin oluşumudur. Daha sonra DNA eklentilerinin oluşumu, asetaldehitin bölünmesiyle devam eder ve elektrofilik bir etildiazonyum iyonunun üretilmesiyle sonuçlanır. Bu elektrofilik iyonlar DNA bazları gibi nükleofilik özellikteki moleküllerle reaksiyona girerek DNA hasarını tetikler. O6-etil-guanin, DEN karsinojenliği ile ilişkili ana maddelerinden biridir. Etil DNA eklentileri baz çiftlerini kesebilir, iplikler arası çapraz bağlanmalara neden olabilir, mutasyonlara, H-ras, K-ras, Raf gibi proto-onkogenlerin aktivasyonuna ve DNA tamir mekanizmasında ve apoptozda önemli tümör baskılayıcı gen olan p53'te hasara neden olabilir. Enzimatik onarım mekanizmaları DNA eklentilerini tamir edemezse, hepatokarsinogenezin başlangıç aşaması meydana gelebilir (Verna ve ark 1996). DNA alkilasyonuna ek olarak, P450'ye bağlı enzimatik sistemden kaynaklanan, ROT ve serbest radikallerin hidrojen peroksit ve süperoksit anyonlarının oluşumu ile oksidatif stresi indükleyebilir. Artan ROT yükü; hücrel protein, lipidler ve DNA hasarını artırarak hücrel işlev bozukluğuna neden olur. Bu nedenle, DEN aracılı artan oksidatif stres, hem başlangıç hem de ilerleme aşamalarında hepatokarsinogenezde önemli bir faktör olarak rol almaktadır (Santos ve ark 2017).

1.10. N-Nitrozomorfolin (NMOR)

Sıçan karaciğerinde iyi bilinen bir kanserojen olan N-nitrosomorfolin (NMOR) genotoksik model karsinojen olarak seçilmiştir. Çünkü NMOR, hepatoselüler karsinomayı indüklemek için ilave bir karsinojen yüklemesi gerektirmeyen ve bu kimyasala maruziyet belli bir süre sonra sonlandırılrsa bile kanser oluşumunu indükleyen tam bir karsinojendir (Yoshino ve ark 2005). NMOR, deney hayvanlarında yeterli karsinojenlik kanıtına dayalı olarak IARC grup 2B kanserojen olarak listelenmiştir (Lijinsky ve ark 1988). Deneysel hayvan kanser modellerinde kullanılan DEN ve NMOR uygulaması, insan hepatokarsinogenezine

en uygun karsinojenler olarak kullanılmaktadır. Oldukça fazla sayıda rat çalışması, bu madde ve türler için mevcut güvenilir bir bilgi kaynağını temsil eden, kimyasal olarak indüklenen hepatokarsinogenezi incelemek için NMOR'u bir model karsinojen olarak kullanmıştır (Volm ve ark 1990, Weber ve Bannasch 1994, Futakuchi ve ark 1999, Yoshino ve ark 2005, Wang ve ark 2009, Mohamed 2013, Mohamed ve ark 2015, Hai-feng ve ark 2018, Jing ve ark 2019, Ram ve ark 2020, Song ve ark 2020, Sun ve ark 2021, Shunxi ve ark 2022, Wang ve ark 2022).

N-MOR, karsinogeneizde hem başlatıcı hem de hızlandırıcı olarak kabul edilebilir. Karsinogenezin başlamasından sonra gelişen preneoplastik lezyonlar ve malignant tümörler iyi karakterize edilir ve indüklenmiş lezyonların akciğerlere metastazı bildirilmektedir (Masui ve ark 1997). DEN ile indüklenmiş ve NMOR ile devam ettirilen karaciğer hasarında gelişen HCC lezyonlarının; NMOR'un kimyasal yapısı ve metastaz oluşturan tümörler arasındaki ilişkiyi açıklayan Lijinsky ve ark. NMOR ile insan HCC'sine en yakın modeli oluşturmuşlardır (Lijinsky ve ark 1988). N-MOR, sıçanlarda hepatotoksitesitesi ve genotoksik hepatokarsinojenitesi ile iyi bilinmektedir (Jeong ve ark 2003). NMOR da diğer nitrozaminler gibi P450 sistemi tarafından DNA bazlarına ve diğer biyomoleküllere bir eklenti oluşturan reaktif ara maddelere dönüştürülür (Hecht ve Hoffmann 1991). Yükseltme aşamasında, başlatılan hücre popülasyonu klonal genişlemeye tabi tutulur, bu da değiştirilmiş hepatositlerin (FAH) lokusları olarak adlandırılan preneoplastik lezyonlarla sonuçlanır. Berrak veya asidofilik, karışık ve bazofilik hücre odaklarından, tümör lezyonuna giden fenotipik olarak farklı lezyonların sıralı bir dizisi olduğu tespit edilmiştir (Bannasch 1996).

Sunulan tez çalışmasında, Theranekron'un iyi huylu tümörler ve kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarında göstermiş olduğu antikanser ve antiproliferatif etkilerinden hareket ile bu etkilerin bağışıklık sistemi kaynaklı olup olamayacağının; CTLs/NKs hücre aktivitesinin stimülasyonu ile Perforin/Granzim sistemi üzerinden kanser hücrelerinde apoptozun uyarılmasının tespiti hedeflenmiştir. Ayrıca çalışmada; Theranekron ya da Sorafenib monoterapisinin ve Theranekron-Sorafenib kombine tedavisinin, hepatosellüler karsinomada etkinliklerinin karşılaştırılması, yan etkilerin biyokimyasal parametrelerle araştırılması ve kombine uygulamanın immünoterapi benzeri bir etki oluşturup oluşturamayacağının ortaya konması

hedeflenmiştir. Hepatoselüler karsinomada insan hepatokarsinogenez sürecine en yakın deneysel modelleme araştırması yapılmış olup, gerek gelişim süreci açısından gerekse akciğer metastazı modellemeleri için temel alınan Dietilnitrozamin ve N-Nitrozomorfolin (DEN+NMOR) protokolü kullanılmıştır.

Çalışmada, apoptotik mekanizmanın belirteci olan kaspaz-3 ve kaspaz-10 enzim aktiviteleri, hücre proliferasyonunda ve hücre siklusunda önemli görevleri olan siklin bağımlı kinaz inhibitörü (p21) ile bağışıklık sisteminin sitotoksik proteini olan Granzim B düzeyleri araştırılmıştır. Ayrıca antioksidan kapasiteyi belirlemek amacı ile total antioksidan kapasite (TAK), karaciğer fonksiyonu ve metabolizma göstergeleri için alaninaminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), gama glutamil transferaz (GGT), glikoz, trigliserit ve üre düzeylerinin tespiti gerçekleştirilmiştir. HCC'nin rat modellerinde kemoterapi ile Theranekron uygulamasının etkisini araştıran bir çalışma olmaması, Theranekron'un antikanser özelliğinin sinyal mekanizmasının araştırılmamış olması, çalışma konusunun belirlenmesinde etkili olmuştur.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Çalışmada, Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırmalar Merkezinden temin edilmiş 6 haftalık yaşta, 140-210 gr ağırlığında, toplam 58 adet, Wistar-Albino ırkı erkek rat kullanılmıştır. Deneysel uygulamalar laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımı şartlarına (12 saat aydınlık: 12 saat karanlık ve 24±3 °C) uygun olarak yürütülmüştür. 25 haftalık uygulama süresince ratlara standart ticari rat yemi (pellet yem) ve içme suyu ad libitum sağlanmıştır.

Araştırma, Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Çalışma protokolü Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Yerel Etik Kurulu tarafından (No:2020/33) onaylanmıştır.

2.2. Araştırma Prosedürü

Çalışma grupları oluşturulurken hayvanlar rastgele seçilerek 7 gruba ayrılmıştır (Tablo 2.1). Araştırma başlangıcında Pozitif Kontrol (PK), Pozitif Kontrol+Therane kron (PKT), Pozitif Kontrol+Sorafenib (PKS) ve Pozitif Kontrol+Therane kron+Sorafenib (PKTS) gruplarına, Dimetilsülfoksitte (DMSO) çözdürülmüş Dietilnitrozamin (N0258-1G-Sigma Aldrich) intraperitoneal (i.p 120 mg/kg) yolla enjekte edilmiştir. Dietilnitrozamin uygulamasından 3 gün sonra N-nitrozomorfolin (N0258-1G-Sigma Aldrich) 21 hafta boyunca içme suyuna katılarak (50 ppm) verilmiştir. Negatif Kontrol (NK), Negatif Kontrol+Therane kron (NKT) ve Negatif Kontrol+Sorafenib (NKS) gruplarına ise tek doz DMSO intraperitoneal yolla uygulanmıştır (Tablo 2.1).

Gruplandırma ve gruplara uygulanan işlemler şu şekildedir:

1.Grup: (n=6) Negatif Kontrol (NK) grubu. Sağlıklı grup. Bu gruptaki ratlara araştırmanın ilk günü 0,1 ml DMSO i.p yolla uygulanmıştır (DMSO'nun herhangi bir etki oluşturup oluşturmayacağını araştırmak için). Araştırmanın 22. haftasından itibaren 3 hafta süre ile araştırmanın bitimine kadar; 0,3 ml/rat/subkutan günde 2 uygulama olacak şekilde haftada 3 gün serum fizyolojik uygulanmıştır. Bu gruptaki hayvanlar araştırma süresince (25 hafta) standart sıçan yemi ve içme suyu verilmiştir.

2.Grup: (n=6) Theranekron Kontrol (NKT) grubu. Bu gruptaki ratlara araştırmanın ilk günü 0,1 ml DMSO i.p yolla uygulanmıştır. Theranekron (Richter Pharma)'un sağlıklı ratlarda etkisini araştırmak için: araştırmanın 22. haftasından araştırmanın bitimine kadar 3 hafta, 0,3 ml/rat/subkutan günde 2 uygulama olacak şekilde haftada 3 gün Theranekron uygulanmıştır. Bu gruptaki hayvanlara araştırma süresince (25 hafta) standart sıçan yemi ve içme suyu verilmiştir.

3.Grup: (n=6) Sorafenib Kontrol (NKS) grubu. Bu gruptaki ratlara araştırmanın ilk günü 0,1 ml DMSO i.p yolla uygulanmıştır. Sorafenib (MyBioSource, 109-MBS655375)'in sağlıklı ratlarda etkisini araştırmak için: araştırmanın 22. haftasından araştırmanın bitimine kadar 3 hafta 5 mg/kg/gavaj haftada 5 gün Sorafenib uygulanmıştır. Bu gruptaki hayvanlar araştırma süresince (25 hafta) standart sıçan yemi ve içme suyu verilmiştir.

4.Grup: (n=10) Pozitif Kontrol (PK) grubu. Kanseri oluşturulan grup. Bu gruptaki ratlara araştırmanın ilk günü 0,1 ml DMSO içerisinde çözödürölen DEN 120 mg/kg/i.p tek doz uygulanmıştır. DEN uygulamasından 3 gün sonra, NMOR; 50 ppm/gönlük içme suyu ile birlikte 22. haftaya kadar ratlara verilmiştir. Bu gruptaki hayvanlar araştırma süresince (25 hafta) standart sıçan yemi ile beslenmiş ve son 3 hafta normal içme suyu verilmiştir.

5.Grup: (n=10) Pozitif Kontrol+Theranekron (PKT) grubu. Bu gruptaki ratlara araştırmanın ilk günü DEN: 0,1 ml DMSO içerisinde çözödürölerek 120 mg/kg/i.p tek doz uygulandı. DEN uygulamasından 3 gün sonra, NMOR; 50 ppm/gönlük içme suyu ile birlikte 22. haftaya kadar ratlara verilmiştir. Bu gruptaki hayvanlar araştırma süresince (25 hafta) standart sıçan yemi ile beslendi ve son 3 hafta normal içme suyu verilmiştir. Araştırmanın 22. haftasından araştırmanın bitimine kadar 3 hafta, 0,3 ml/rat/subkutan günde 2 uygulama olacak şekilde haftada 3 gün Theranekron uygulanmıştır.

6.Grup: (n=10) Pozitif Kontrol+Sorafenib (PKS) uygulanan grup. Bu gruptaki ratlara araştırmanın ilk günü DEN, 0,1 ml DMSO içerisinde çözödürölerek 120 mg/kg, i.p tek doz uygulanmıştır. DEN uygulamasından 3 gün sonra, NMOR; 50 ppm/gönlük içme suyu ile birlikte 22. haftaya kadar ratlara verilmiştir. Bu gruptaki hayvanlar araştırma süresince (25 hafta) standart sıçan yemi ile beslenmiş ve son 3

hafta normal içme suyu verilmiştir. DEN + NMOR uygulanan gruba araştırmanın 22. haftasından araştırmanın bitimine kadar 3 hafta, 5 mg/kg/gavaj haftada 5 gün Sorafenib uygulanmıştır.

7.Grup: (n=10) Pozitif Kontrol Grubu+Therane kron+Sorafenib (PKTS) uygulanan grup. Bu gruptaki ratlara araştırmanın ilk günü DEN, 0,1 ml DMSO içerisinde çözülürölerek 120 mg/kg, i.p tek doz uygulanmıştır. DEN uygulamasından 3 gün sonra, NMOR; 50 ppm/günlük içme suyu ile birlikte 22. haftaya kadar ratlara verilmiştir. Bu gruptaki hayvanlar araştırma süresince (25 hafta) standart sıçan yemi ile beslenmiş ve son 3 hafta normal içme suyu verilmiştir. Araştırmanın 22. haftasından araştırmanın bitimine kadar 3 hafta, 0,3 ml/rat/subkutan günde 2 uygulama olacak şekilde haftada 3 gün Therane kron ve haftada 5 gün, 5 mg/kg/gavaj Sorafenib tedavileri uygulanmıştır.

Araştırma amaçlı yapılan uygulamalar laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımı şartlarına (12 saat aydınlık: 12 saat karanlık ve 24±3 C°) uygun olarak yürütüldü. Çalışmanın başlangıcından itibaren, özellikle PK grubundaki hayvanların kansorejen madde uygulanmasından olumsuz etkilenip etkilenmedikleri, vücut ağırlıkları, yem ve içme suyu alımı dahil olmak üzere, gün aşırı kontrolleri gerçekleştirilmiştir. Araştırma prosedürü tamamlandıktan sonraki tedavi döneminde de Therane kron ve Sorafenib uygulanan tüm ratlar ilaç yan etkileri, anafilaksi gibi ani ölüme neden olabilecek ciddi yan etkiler, sekonder enfeksiyon kontrolü, dozajlamanın etki düzeyi bakımından düzenli olarak kontrol edilmiştir. Tüm gruplardaki hayvanlar her hafta düzenli olarak tartılmıştır.

Tablo 2.1. Araştırma gruplarının oluşturulması ve araştırma döneminde yapılan uygulamalar.

Grup No	Beslenme	Araştırma Dönemi Uygulamalar	Tedavi Dönemi Uygulamalar
1.Grup (NK)	Standart yem Normal içme suyu	i.p DMSO	s.c DMSO
2.Grup (NKT)	Standart yem Normal içme suyu	i.p DMSO	s.c Theranekron 0,3 ml/rat dozu, günde 2 kez / haftada 3 gün
3.Grup (NKS)	Standart yem Normal içme suyu	i.p DMSO	Sorafenib (hafta 5 gün, 5 mg/kg/gavaj)
4.Grup (PK)	Standart yem Araştırmanın 3. gününden 22. Haftaya kadar 50 ppm NMOR içme suyu ile verildi.	Tek doz i.p 120 mg/kg DEN	Tedavi yapılmadı
5.Grup (PKT)	Standart yem Araştırmanın 3. gününden 22. Haftaya kadar 50 ppm NMOR içme suyu ile verildi.	Tek doz i.p 120 mg/kg DEN	Subkutan Theranekron (0,3 ml/rat dozu, günde 2 kez/haftada 3 gün)
6.Grup (PKS)	Standart yem Araştırmanın 3. gününden 22. Haftaya kadar 50 ppm NMOR içme suyu ile verildi.	Tek doz i.p 120 mg/kg DEN	Sorafenib (hafta 5 gün 5 mg/kg/gavaj)
7.Grup (PKTS)	Standart yem Araştırmanın 3. gününden 22. Haftaya kadar 50 ppm NMOR içme suyu ile verildi.	Tek doz i.p 120 mg/kg DEN	Subkutan Theranekron (haftada 3 gün 0,3 ml/rat, günde 2 kez) Sorafenib (hafta 5 gün 5 mg/kg/gavaj)

NK: negatif kontrol, NKT: negatif kontrol+Theranekron, NKS: negatif kontrol+Sorafenib, PK: pozitif kontrol, PKT: pozitif kontrol+Theranekron, PKS: pozitif kontrol+Sorafenib, PKTS: pozitif kontrol+Theranekron+Sorafenib, i.p: intraperitoneal, s.c: subkutan, DMSO: Dimetilsülfoksit, DEN: Dietilnitrozamin, NMOR: N-nitrozomorfolin

Araştırma döneminde PK, PKT, PKS ve PKTS gruplarındaki ratlarda kılların düzensiz ve kirli görünümü, durgunluk, iştah kaybı ve bazı haftalarda kilo kayıpları dikkati çekmiştir. Kemoterapi alan (Sorafenib verilen) PKS, PKTS ve NKS gruplarındaki hayvanlarda alopesi görülmüştür. Theranekron ile tedavi edilen NKT, PKT ve PKTS gruplarında uygulama sıklığı ile birlikte ilacın içeriğinde bulunan alkolden kaynaklanan deride kızarıklık ve hayvanların bu bölgeleri kaşımaya bağlı yara oluşumu görülmüş ve antibiyotikli kremle tedavileri yapılmıştır. Araştırma sürecinde bu durumlar harici ciddi bir yan etki ya da ölüme götürebilecek anafilaksi durumları şekillenmemiştir. Araştırma sürecinde DEN+NMOR verilen gruplarda 2. hafta 1 adet, 5. hafta 1 adet, 9. hafta 2 adet, 21. hafta 1 adet ve 24. hafta 1 adet olmak üzere toplamda 6 adet rat, ilaç toksisitesine bağlı olarak ölmüştür.

2.3. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Çalışmanın 25. haftasında tüm ratlara ketamine-ksilazine (5 mg/kg) ile anestezi uygulanmış, intrakardiyak yolla kanları alındıktan sonra servikal dislokasyonla ötenazi yapılmıştır. Alınan kanlar, 3000 g'de +4'de 15 dakika santrifüj edilerek (Hettich Universal 320R/1406) serumlar elde edilmiş ve analizlere kadar -80°C'de saklanmıştır. Karaciğerler, akciğerler ve diğer organlar tüm hayvanlardan mümkün olduğunca homojen bir şekilde ve bağ-yağ dokudan arınmış örnekler halinde çıkartılmıştır (Şekil 2.1). Tüm ratların karaciğerleri nekropsilerinden sonra çıkarılarak, belirgin tümörün/tümörlerin boyutları ölçülmüş; ortalama büyüklükte alınan örnekler fosfat tamponu içerisine konularak hızla -80°C de depolanmaya bırakılmıştır.



Şekil 2.1. Rat iç organlarının çıkarılması.

2.4. Biyokimyasal Analizler

Serum örnekleri -80°C 'den oda sıcaklığına alınarak, bu örneklerde kaspaz-3, Granzim B, p21 (Siklin bağımlı kinaz inhibitörü) (BT-LAB, sırasıyla E1648Ra, E0403Ra, E1082Ra), total antioksidan kapasite (TAK) değerleri (Elabscience, E-BC-K136-M), serum glikoz, üre, trigliserit ve gama glutamil transferaz değerleri EIA (Enzim Linked İmmunoassay) yöntemi ile, AST, ALT değerleri ise spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Tüm parametreler Biotek ELx800 ELISA okuyucuda yapılan okumalarla değerlendirilmiştir.

Hepatoselüler kanser belirteçleri olarak değerlendirilen Kaspaz-3, Granzim B ve p21 ölçümleri rat spesifik BT-LAB kitleri ölçüm protokülüne göre yapılmıştır. Gruplardan rastgele seçilen numune örnekleri eşit sayıda ($n=6$) olacak şekilde analizlerde kullanılmıştır.

Test Prosedürü:

Serumlar -80°C 'den -20°C 'ye ve daha sonra oda sıcaklığına alınarak 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Belirtilen parametreler (Kaspaz-3, Granzim B ve p21) için ortak olan aşağıdaki prosedürler uygulanmıştır.

1. Tüm reaktifler ve standart çözeltiler belirtilen şekilde hazırlandı. Ayrıca stok standart, spesifik dilue edici ile 5 farklı konsantrasyonda hazırlanarak standart grafiği oluşturulmuştur. Plaklara ilgili bölümlere standart, numune ve Streptavidin-HRP konulmuştur.
2. Yapılacak analizle ilişkili antikorlar (Rat CASP3, GZMB ve CDKN1A/P21) eklendi. Otomatik olarak çalkalanan plaklar kapatılmış ve 37°C 'de 1 saat inkübe edilmiştir.
3. Plaklar yıkama solüsyonu ile 5 kez otomatik yıkayıcıda yıkanmıştır.
4. Substrat solüsyonu A ve B eklenerek, 37°C 'de 10 dakika tekrar inkübe edilmiştir.
5. Stop solüsyonu eklenerek reaksiyonlar durdurulmuştur.
6. Takiben 10 dakika içerisinde okuyucuda (Biotek ELx800) 450 nm dalga boyunda, standart eğriye karşı absorbanslar elde edilmiştir.

2.5. Karaciğer Dokusundan Gerçekleştirilen Analizler

Karaciğer doku örnekleri analize kadar -80 °C’de saklanmıştır. Analiz aşaması öncesinde ise dokular, homojenizasyon için -80 °C’den +4 °C’ye alınmıştır.

Homojenizasyon amaçlı 1 g karaciğer dokusu tartılarak distile suda yıkanmış; hafif kurutma işleminin ardından üzerine 5 ml tampon (pH 7.4) eklenerek homojenizatörde (Heidolph, SilentCrucher M) 2000 devir ve 1 dk süreyle homojenizasyonu yapılmıştır. Homojenatlar 4°C’de 12.000 rpm’de 15 dakika santrifüjlenerek (Hettich Universal 320R/1406) süpernatantlar elde edilmiştir. Karaciğer dokuları Kaspaz-3, Granzim B ve p21 düzeyleri “3.5. Biyokimyasal Analizler” bölümünde açıklanan şekilde rat spesifik ELISA kitleri ile ölçümler sonucu belirlenmiştir.

2.6. Histopatolojik İnceleme

Hayvanların nekropsileri sonrası karaciğerden alınan örnekler %10’luk formaldehit solüsyonunda 24 saat süreyle tespit edilmiştir. Trimleme işlemlerinin ardından bir gece çeşme suyunda yıkanmıştır. Daha sonra doku takip cihazına yerleştirilen dokular bu cihazda sırasıyla alkol ve ksilol serilerinden tutulduktan sonra sırasıyla ksilol-parafin, yumuşak parafin ve sert parafinde tutularak, cihazdan çıkarılan örnekler parafin bloklar içerisine gömülmüştür. Soğutma ve dondurma işleminin ardından bu kesitlerden 4-6 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak, Hematoksilen-Eozin (HxE) boyasıyla boyanmış (Luna 1968) ve ışık mikroskopunda (Olympus BX51) incelenerek hepatoselüler karsinom oluşumuna göre değerlendirmeler yapılmıştır.

Bu çalışmada projenin amacı doğrultusunda histopatolojik olarak kanser deneme gruplarında sadece kanserin gelişip gelişmediğine yönelik inceleme yapılmış olup; kanserin alt tipleri, yaygınlık, invazyon, görülme sıklığı gibi bulgulara yönelik inceleme ve skoreleme yapılmamıştır.

2.7. İstatistiksel Analizler

İstatistikler SPSS 22 paket programında “One Way ANOVA Post-hoc DUNCAN MULTİPLE RANGE” testi uygulanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Biyokimyasal Bulgular

Ratlarda 25 haftalık araştırma sürecinde Dietilnitrozamin (DEN) ve N-Nitrozomorfolin (NMOR) etkisi ile hepatoselüler karsinoma (HCC) oluşturarak Sorafenib ve Theranekron ile bu olguların tedavi süreçlerinin takibinin amaçlandığı çalışmada; yapılan uygulamaların tüm gruplarda serum biyokimyasal değerlere ve tümör belirteçlerine belirgin etkileri dikkat çekici bulunmuştur (Tablo 3.1).

PK, PKT, PKS ve PKTS gruplarında, DEN+NMOR etkisi ile patolojik olarak da tespit edilen karaciğer tümörleri kan biyokimyasında ve tümör gelişimi için anlamlı olan; kaspaz 3, granzim B ve p21 değerlerinde büyük değişimlere neden olmuştur. Özellikle Sorafenib ve Theranekron kombine tedavisinin uygulandığı PKTS grubunda ise tüm değerlerde normal değerlerin belirgin bir şekilde elde edilmiş olması önemli bir gelişme olarak değerlendirilmiştir.

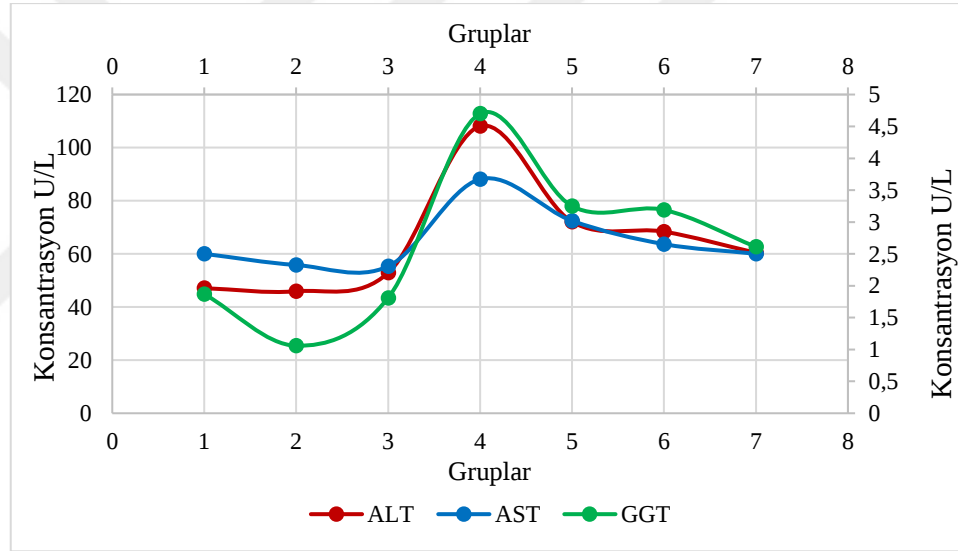
Tablo 3.1. Negatif kontrol ve pozitif kontrol gruplarında serum ALT, AST, GGT, glikoz, TAK, trigliserit ve üre ortalama değerleri

Grup	n	ALT U/L	AST U/L	GGT U/L	Glikoz mg/dl	Trigliserit mg/dl	TAK nmol/L	Üre mg/dl
		Ort ± St.Hata	Ort ± St.Hata	Ort ± St.Hata	Ort ± St.Hata	Ort ± St.Hata	Ort ± St.Hata	Ort ± St.Hata
1 (NK)	6	47,09 ± 7,09 ^e	60,03 ± 5,08 ^b	1,87 ± 0,58 ^{cd}	106,40 ± 11,38 ^e	104,18 ± 6,02 ^d	1,43 ± 0,08 ^b	39,33 ± 2,21 ^a
2 (NKT)	6	45,94 ± 5,66 ^e	55,83 ± 9,10 ^b	1,06 ± 0,24 ^d	116,64 ± 11,68 ^{cde}	106,11 ± 13,77 ^d	1,46 ± 0,27 ^b	38,50 ± 4,40 ^a
3 (NKS)	6	52,86 ± 6,00 ^{de}	55,34 ± 3,72 ^b	1,81 ± 0,49 ^{cd}	133,37 ± 8,93 ^{ab}	130,50 ± 17,41 ^{cd}	1,31 ± 0,46 ^b	30,40 ± 1,91 ^c
4 (PK)	6	108,09 ± 11,62 ^a	88,12 ± 6,47 ^a	4,70 ± 0,77 ^a	138,99 ± 8,24 ^a	289,55 ± 65,87 ^a	2,45 ± 0,37 ^a	22,84 ± 1,97 ^e
5 (PKT)	6	72,11 ± 12,70 ^b	72,46 ± 13,30 ^b	3,25 ± 0,68 ^b	123,99 ± 4,59 ^{bc}	195,08 ± 37,44 ^b	2,51 ± 0,55 ^a	26,66 ± 3,01 ^d
6 (PKS)	6	68,39 ± 5,38 ^{bc}	63,68 ± 4,16 ^{ab}	3,19 ± 0,98 ^b	118,88 ± 9,92 ^{cd}	206,67 ± 20,88 ^b	2,62 ± 0,40 ^a	28,45 ± 2,48 ^{cd}
7 (PKTS)	6	60,42 ± 2,91 ^{cd}	60,05 ± 2,56 ^b	2,61 ± 0,51 ^{bc}	107,53 ± 7,53 ^{de}	153,53 ± 16,10 ^c	1,38 ± 0,36 ^b	34,46 ± 2,44 ^b
P		P<0.001	P<0.001	P<0.001	P<0.001	P<0.001	P<0.001	P<0.001

Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık önemlidir (P<0.001). NK: Negatif Kontrol, NKT: Negatif Kontrol+Theranekron, NKS: Negatif Kontrol+Sorafenib, PK: Pozitif Kontrol, PKT: Pozitif Kontrol+Theranekron, PKS: Pozitif Kontrol+Sorafenib, PKTS: Pozitif Kontrol+Theranekron+Sorafenib grupları. ALT: Alanin aminotransferaz, AST: Aspartat aminotransferaz, GGT: Gama glutamil transferaz, TAK: Total antioksidan kapasite

3.1.1. Serum Alanin aminotransferaz (ALT), Aspartat aminotransferaz (AST) ve Gama glutamiltransferaz (GGT) değışimleri

Karaciğer enzimleri olan ALT, AST ve GGT; en yüksek aktiviteye hücre yıkımlanmasının doğal olarak yüksek olduğu PK grubunda ulaşılmış olup, diğer gruplara göre yüksek derecede anlamlılık tespit edilmiştir ($P<0.001$). PKT, PKS ve PKTS tedavi gruplarında Theranekron ve Sorafenib uygulamaları sonucu ALT, AST ve GGT değęerlerinin PK grubuna göre anlamlı şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir ($P<0.001$). NK, NKT ve NKS gruplarında ise serum ALT, AST ve GGT değęerleri birbirine oldukça yakın seyretmiş olup; bu sonuçlar Theranekron ve Sorafenib uygulamalarının karaciğerde hasar ya da toksikasyon oluşturmadığı şeklinde yorumlanmıştır (Grafik 3.1).

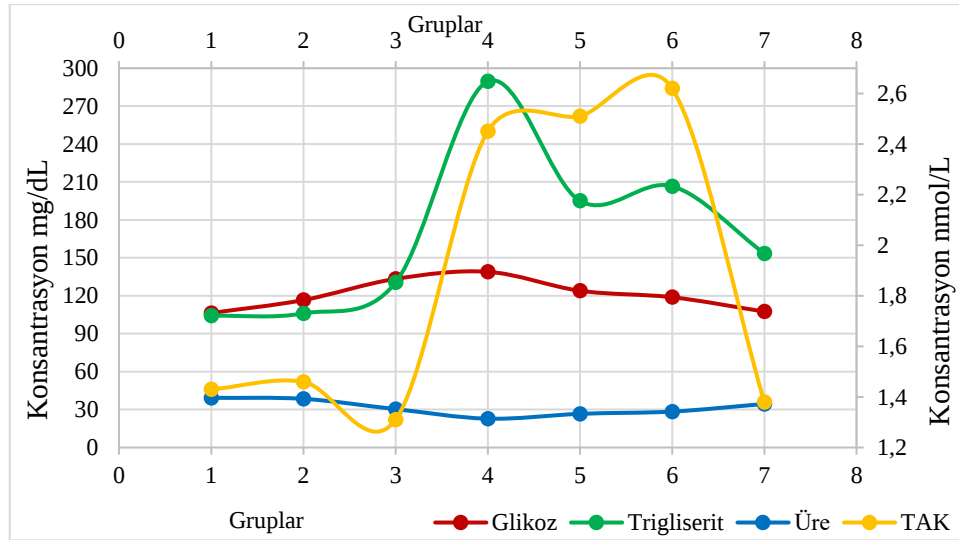


Grafik 3.1. Gruplara göre kan serum ALT, AST (grafik sol y eksen) ve GGT (grafik sağ y eksen) seviyelerinin değışimi.

PK grubunda ALT aktivitesi tüm gruplara göre en yüksek artışı göstermiştir ($P<0.001$). Theranekron ve Sorafenib uygulamalarının PK grubuna (4.grup) göre; PKT (5.grup), PKS (6.grup) ve PKTS (7.grup) gruplarında ALT enzim seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü tespit edilmiştir ($P<0.001$). PKTS grubunda (7.grup) belirgin olarak ALT kan değęerlerinde düşüşler gözlenmiştir ($P<0.001$). PKT, PKS ve PKTS tedavi gruplarında AST seviyelerinin, PK grubuna göre rakamsal olarak daha düşük seviyelerde olduğu ($P<0.001$) tespit edilmiştir. Kan serumu GGT değęerlerinin gruplar arası değışimleri de AST ve ALT bulgularına paralellik göstermektedir. PK grubunda, tüm gruplara göre en yüksek ($P<0.001$)

artışı göstermiş ve PKT, PKS ve PKTS tedavi gruplarında GGT seviyeleri PK grubuna göre daha düşük seviyelerde tespit edilmiştir ($P<0.001$). Ancak PKT ve PKS grupları ile PKTS grubu arasında istatistiksel fark bulunmuştur ($P<0.001$).

Kan trigliserit ve glikoz seviyelerinin PK grubunda diğer gruplara göre istatistiksel anlamda arttığı ($P<0.001$) tespit edilirken, PKT ve PKS tedavi gruplarında kan trigliserit ve glikoz düzeylerinin PK grubuna göre önemli oranda düştüğü tespit edilmiştir ($P<0.001$). PKTS kombine tedavi grubunda ise düşüşlerin daha da belirgin olduğu tespit edilmiştir ($P<0.001$, Grafik 3.2). Artan reaktif oksijen türlerine (ROT) karşı doku ve organları koruma, ROT aktivitesini engelleme ve hücrel tamir için en önemli aktivite antioksidan kapasite ile sağlanmaktadır. Antioksidanların serum konsantrasyonları ayrı ayrı ölçüldüğünde daha fazla zaman ve maliyet gerektirmesi ve antioksidan moleküllerin toplam ölçümünün daha kolay ve net bir sonuç verebilir (Naito ve ark 2010). Bu nedenle çalışmamızda TAK'ın ölçülmesi tercih edilmiştir. PK, PKT ve PKS gruplarında total antioksidan kapasite (TAK) değerlerindeki artış ($P<0.001$), DEN+NMOR'a bağlı artan karaciğer hasarının sonucu antioksidan savunmanın arttığı; PKTS grubunda TAK değerlerinin sağlıklı gruplara yakın olması ise kombine tedavideki etkinlikle bağlantılı olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Karaciğerde üre biyosentezinin azalmasına bağlı olarak, en düşük kan üre düzeyleri PK grubunda elde edilmiş olup ($P<0.001$) PKT ve PKS tedavi gruplarında kan üre düzeyleri tedrici olarak yükselirken ($P<0.001$), PKTS grubunda istatistiksel anlam olmakla birlikte NK grubuna en yakın değere ulaştığı gözlenmiştir ($P<0.001$). Monoterapi uygulamalarının (Theranekron ya da Sorafenib) karaciğer üzerindeki tedavi edici etkisi ile üre biyosentezinin arttığı, kombine tedavinin (Theranekron ve Sorafenib) ise daha etkin sonuçlar elde edilmesini sağladığı görülmüştür.



Grafik 3.2. Gruplara göre kan serum glikoz, trigliserit ve üre seviyelerinin değişimi. Glikoz, trigliserit ve üre düzeyleri mg/dl (grafik sol y eksen), TAK değerleri nmol/L (grafik sağ y eksen) şeklinde verilmiştir.

3.1.2. Kaspaz 3, Granzim B ve p21 değişimleri

Çalışmada deneme gruplarına ait kan (Tablo 3.2) ve karaciğer dokusu (Tablo 3.3) kaspaz-3 (Casp3), Siklin bağımlı kinaz inhibitörü (p21) ve Granzim B (GrzB) belirteçlerinin ortalamaları ve istatistiksel değişimleri aşağıda sunulmuştur. Tüm gruplarda belirtilen tümör belirteçlerinin tamamının yüksek önem ($P < 0.001$) düzeyinde değişkenlik gösterdiği gözlenmiştir.

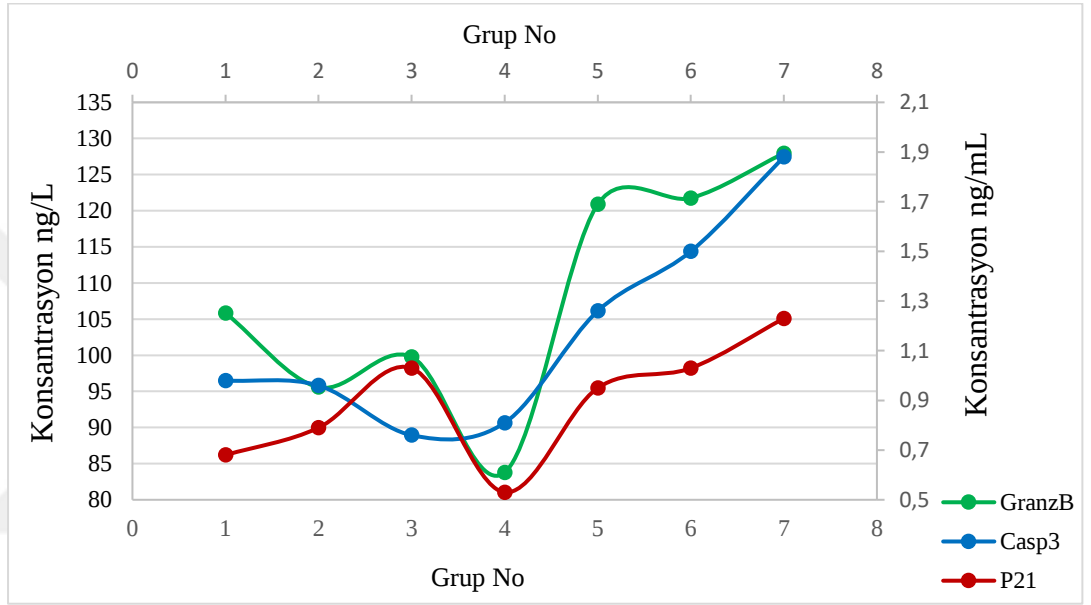
Tablo 3.2. Kan Kaspaz-3, Siklin bağımlı Kinaz İnhi (p21) ve Granzim B değerleri.

Grup No	Sayı	Casp3 ng/ml	P21 ng/ml	GrzB ng/L
		Ort± St. Hata	Ort± St. Hata	Ort± St Hata
1. (NK)	6	0,98 ± 0,07 ^c	0,68 ± 0,15 ^{bc}	105,84 ± 16,25 ^{bc}
2. (NKT)	6	0,96 ± 0,23 ^c	0,79 ± 0,15 ^{bc}	95,58 ± 12,71 ^{cd}
3. (NKS)	6	0,76 ± 0,22 ^c	1,03 ± 0,30 ^{ab}	99,77 ± 14,28 ^{cd}
4. (PK)	6	0,81 ± 0,13 ^c	0,53 ± 0,08 ^c	83,78 ± 14,24 ^d
5. (PKT)	6	1,26 ± 0,20 ^b	0,95 ± 0,40 ^{ab}	120,89 ± 17,68 ^{ab}
6. (PKS)	6	1,50 ± 0,30 ^b	1,03 ± 0,12 ^{ab}	121,75 ± 10,44 ^{ab}
7. (PKTS)	6	1,88 ± 0,15 ^a	1,23 ± 0,33 ^a	127,95 ± 11,82 ^a
Önem (P)		$P < 0.001$	$P < 0.05$	$P < 0.001$

Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık önemlidir ($P < 0.001$). NK: Negatif Kontrol, NKT: Negatif Kontrol+Theranekron, NKS: Negatif Kontrol+Sorafenib, PK: Pozitif

Kontrol, PKT: Pozitif Kontrol+Theranekron, PKS: Pozitif Kontrol+Sorafenib, PKTS: Pozitif Kontrol+Theranekron+Sorafenib grupları.

PKT, PKS ve PKTS tedavi gruplarında kan kaspaz-3, p21 ve Granzim B parametreleri PK grubuna göre en yüksek düzeylerde tespit edilmiştir ($P<0.001$, Grafik 3.3). Apoptoz belirteci olan kaspaz-3'ün istatistiksel olarak yüksek önem düzeyinde artışı PKTS grubunda elde edilmiştir ($P<0.001$). PKT ve PKS tedavi gruplarında elde edilen kaspaz-3 seviyeleri ise birbirine yakın seviyelerde tespit edilmiştir.



Grafik 3.3. Deneme gruplarının kan serumunda belirlenen Kaspaz-3 ve p21 (ng/ml) (grafiğin sağ y eksenini) ve GrzB (ng/L) (grafiğin sol y eksenini) değerleri.

Siklin bağımlı kinaz inhibitörü (p21) seviyeleri PKT, PKS ve PKTS gruplarında, PK grubuna göre istatistiksel anlamda artmış düzeyde tespit edilmiştir ($P<0.05$).

PKT, PKS ve PKTS tedavi gruplarında Granzim B seviyelerinde PK grubuna göre istatistiksel anlamda yüksek önem düzeyinde artış olduğu gözlenmiştir ($P<0.001$). PKT ve PKS tedavi gruplarında elde edilen Granzim B seviyeleri birbirine yakın tespit edilmiştir. PKTS grubunda elde edilen seviyelerde PKT ve PKS gruplarına göre farklılıklar dikkat çekmiştir. Bu durum; kombine tedavinin monoterapiye göre daha iyi olduğuna yorumlanmıştır. PKT grubunda, PK grubuna göre anlamlı oranda yüksek Granzim B seviyelerinin elde edilmesi Theranekronun CTLs/NKs hücrelerini aktive ettiğinin bir göstergesi olarak değerlendirilmiş ve PKTS grubundaki yüksek

Granzim B seviyeleri de göz önünde bulundurulduğunda ise sonuç, Theranekron'un immünoterapi benzeri etkiyi oluşturmuş olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

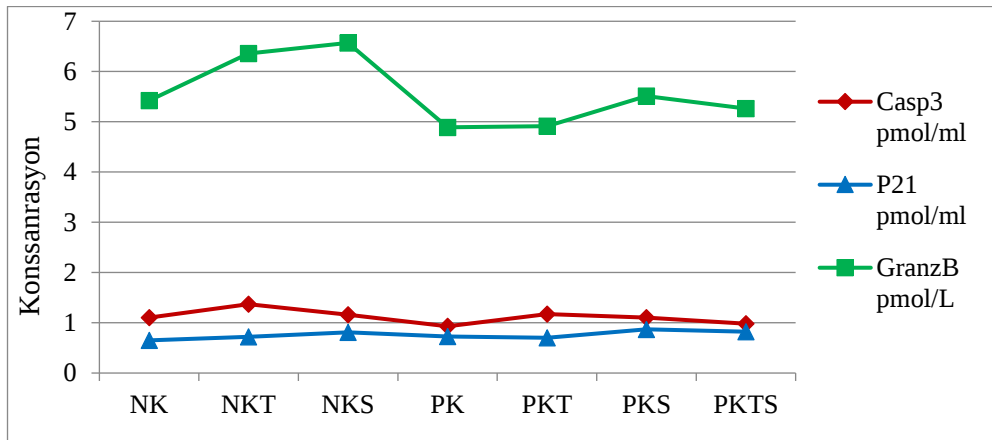
3.1.3. Karaciğer Dokusu Kaspaz-3, Granzim B ve p21 değişimleri

Karaciğer dokusunda ise değişimler daha sınırlı ($P < 0.05$) düzeyde kalmış; sadece Granzim B değerlerinde önemli değişim gözlenmiştir (Tablo 3.3, Grafik 3.4).

Tablo 3.3. Karaciğer dokusu Kaspaz-3, p21 ve Granzim B değerleri.

Grup No	n	Casp3 pmol/ml	P21 pmol/ml	GrzB pmol/L
		Ort± St. Hata	Ort± St. Hata	Ort± St Hata
1 (NK)	6	1,10 ± 0,70	0,65 ± 0,11	5,42 ± 2,22 ^{ab}
2 (NKT)	6	1,37 ± 0,74	0,72 ± 0,06	6,36 ± 1,33 ^{ab}
3 (NKS)	6	1,16 ± 0,44	0,81 ± 0,13	6,57 ± 0,65 ^a
4 (PK)	6	0,93 ± 0,15	0,73 ± 0,15	4,89 ± 0,58 ^b
5 (PKT)	6	1,17 ± 0,28	0,70 ± 0,11	4,91 ± 0,91 ^b
6 (PKS)	6	1,10 ± 0,08	0,87 ± 0,13	5,51 ± 1,15 ^{ab}
7 (PKTS)	6	0,98 ± 0,15	0,82 ± 0,08	5,26 ± 0,67 ^{ab}
Önem (P)		$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P < 0.05$

Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir ($P < 0.05$); $P > 0.05$ Önemli). NK: Negatif Kontrol, NKT: Negatif Kontrol+Theranekron, NKS: Negatif Kontrol+Sorafenib, PK: Pozitif Kontrol, PKT: Pozitif Kontrol+Theranekron, PKS: Pozitif Kontrol+Sorafenib, PKTS: Pozitif Kontrol+Theranekron+Sorafenib grupları.

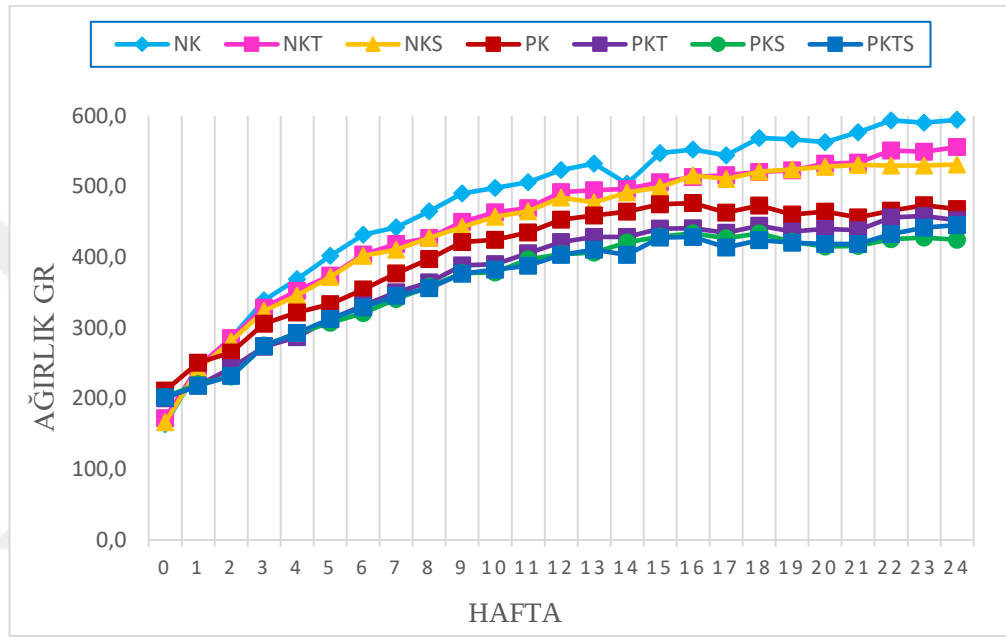


Grafik 3.4. Araştırma gruplarının karaciğer dokusundan ölçülen Kaspaz-3, GrzB ve p21 değerleri.

3.2. Ağırlık Değişimi

Araştırma başlangıcında: NK grubu (285,3 gr), NKT grubu (285,5 gr), NKS grubu (281,0 gr) ve DEN+NMOR verilen PK (265,3 gr), PKT (243 gr), PKS (231,3 gr), PKTS (232,3 gr) ortalama ağırlıkta ölçülmüştür.

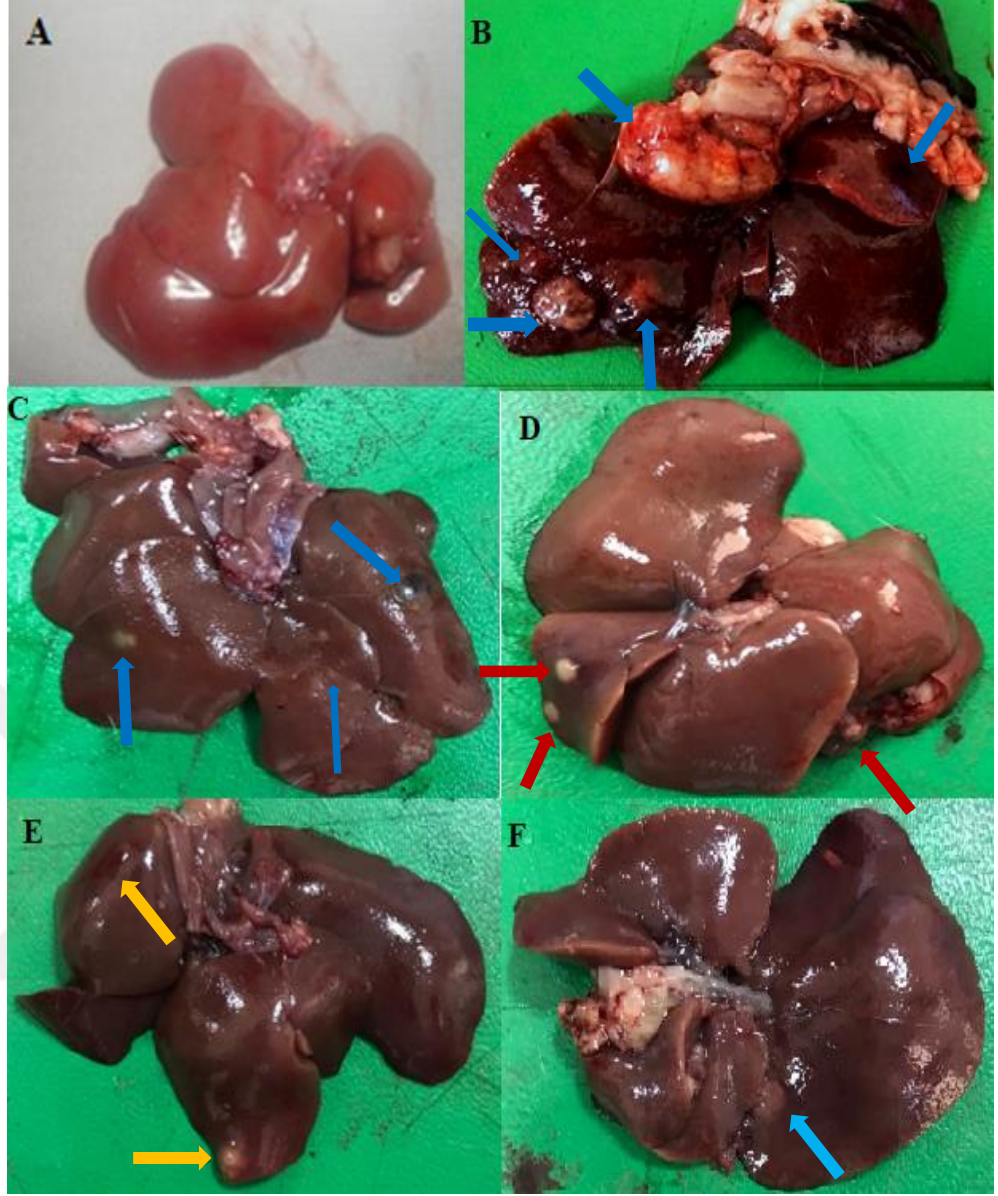
Araştırma bitiminde: NK grubu (594,2 gr), NKT grubu (555,7 gr), NKS grubu (531,0 gr) ve DEN+NMOR verilen PK (468 gr), PKT (452 gr), PKS (424,7 gr), PKTS (445,4 gr) ortalama ağırlıkta ölçülmüştür (Grafik 3.5).



Grafik 3.5. Araştırma başlangıç ve sonunda gruplardaki haftalık ağırlık ortalaması değişimi. Tüm gruplarda ortalama vücut ağırlığında bir artış oldu, ancak bu durum Negatif Kontrol gruplarına göre DEN+NMOR verilen PK, PKT, PKS ve PKTS gruplarında daha az bir ortalama ile şekilde gerçekleşmiştir.

3.3. Makroskopik Bulgular

Pozitif kontrol (PK) gruplarındaki ratların karaciğerlerinin soluk ve koyu kırmızı-kahverengi renkli ve daha büyük hacimde olduğu görülmüştür. PK gruplarındaki karaciğerler, heterojen yüzeye sahip olup, çok sayıda soluk renkte nodül görülmüştür (Şekil 3.1 B ve C).



Şekil 3.1. NK (A), PK (B ve C), PKT (D), PKS (E) ve PKTS (F) gruplarındaki hayvanlara ait karaciğerin makroskobik görüntüsü ve oluşan hepatosellüler karsinom nodülleri. Oklar nodülleri göstermektedir.

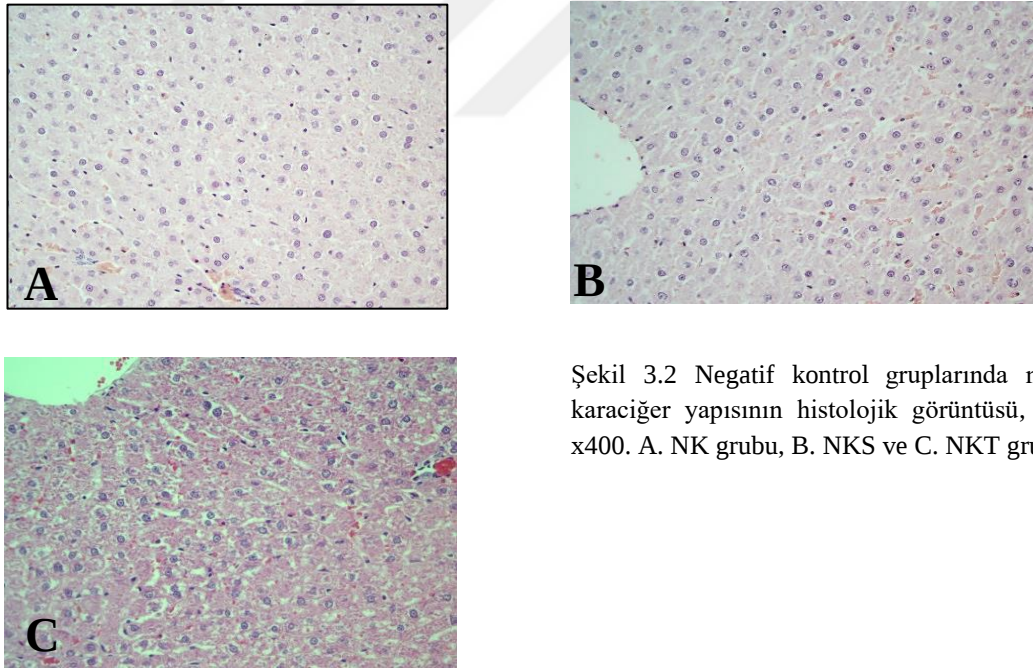
PKT grubunda karaciğerlerin makroskobik görünümü PK grubuna benzer, karaciğer dokusu koyu kırmızı-kahverengiye yakın renkte, PK grubuna göre dış yüzeyleri daha pürüzsüz ve PKT grubunda kanser nodülleri daha küçük (ortalama 1x1x1 cm) ölçülmüştür (Şekil 3.1D). PKS tedavi grubunda nodüllerin PK ve PKT grubuna göre daha küçük ve az sayıda olduğu görülmüştür (Şekil 3.1E). PKTS grubundaki ratlarda kanser odakları belirgin olmamakla birlikte karaciğer dokusu soluk ve hafif kırmızı-kahverengi renkte görülmüştür. PK, PKT ve PKS grubundaki hayvanlara göre büyüklükleri ve sayıları daha az sayıda ya da nodül varlığı dikkat çekmemiştir (Şekil 3.1F).

3.4. Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik incelemelerde PK grubundan 9 hayvandan 7'sinde tümöral alanlara rastlanmış, 2 vakada dejeneratif ve rejeneratif lezyonlar görülmekle birlikte alınan kesitlerde tümöre rastlanmamıştır. PKS grubunda 2 vakada belirgin 3 vakada minimal düzeyde tümöral lezyonlarla 3 vakada tümör görülmemiştir. PKT grubunda PK grubuna göre daha küçük olmakla birlikte bir tanesi hariç vakaların hepsinde (7) tümöral lezyonlar tespit edilmiştir. Kombine tedavi grubunda (PKST) sadece bir vakada belirgin, 2 vakada sınırlı tümöral lezyonlarla görülmüş 4 vakada ise alınan karaciğer kesitlerinde tümöre rastlanmamıştır.

3.4.1. Negatif kontrol, NK+Theranekron ve NK+Sorafenib grupları

Araştırma bitiminde ratlara yapılan nekropsilerde, karaciğerlerde makroskopik bir lezyona rastlanmamıştır. Karaciğer doku örneklerinin histolojisinde normal yapıda oldukları görülmüştür (Şekil 3.2). Ratlardan alınan diğer dokuların makroskopik-histolojik değerlendirmesinde herhangi patolojik lezyon olmadığı ve normal yapıda oldukları görülmüştür.

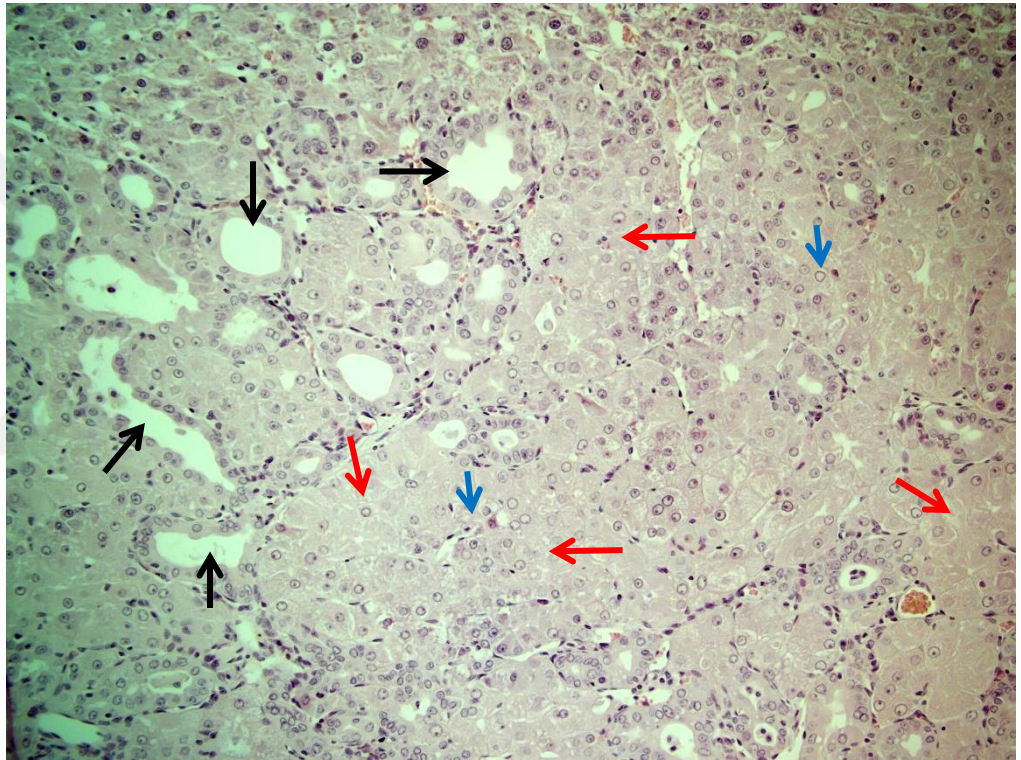


Şekil 3.2 Negatif kontrol gruplarında normal karaciğer yapısının histolojik görüntüsü, HXE, x400. A. NK grubu, B. NKS ve C. NKT grubu

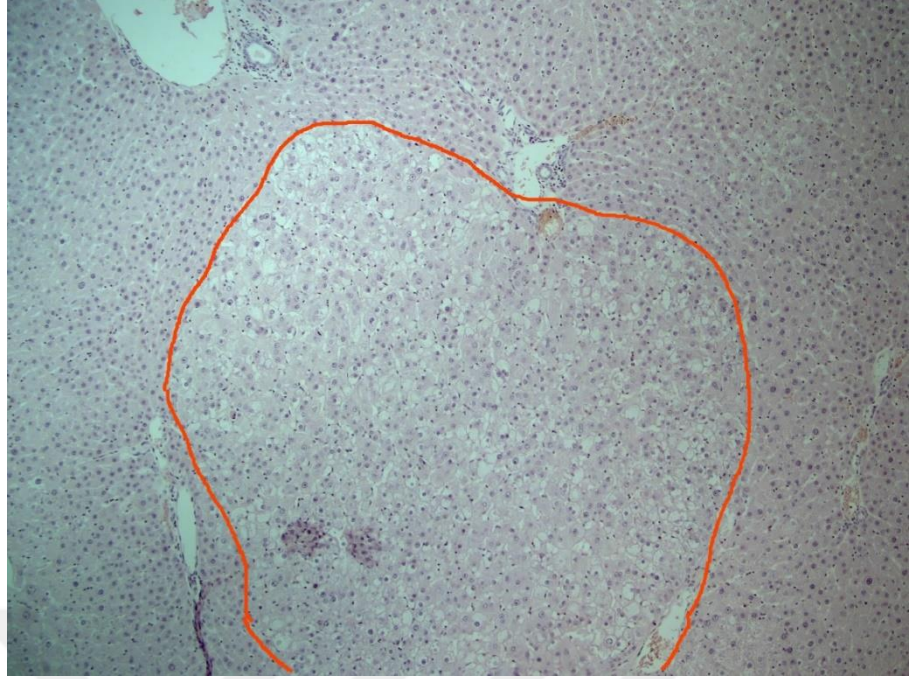
3.4.2. Pozitif kontrol (PK), PK+Theranekron (PKT) ve PK+Sorafenib (PKS) grupları

PK grubunda kanserli alanlar sağlam karaciğer dokusundan ayrılmış görünmekle birlikte kapsül yapısı görülmemiştir. Kanserli alanlarda trabeküler ve psödoglandüler yapıların (Şekil 3.3) genellikle birlikte olduğu görülmüştür. Kanser

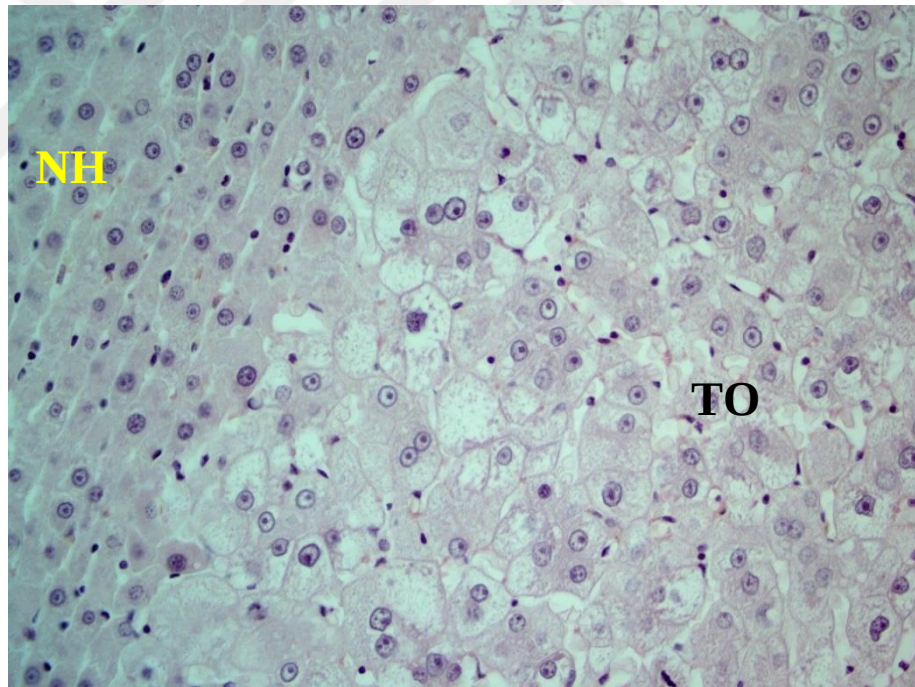
hücrelerinin oval-yuvarlak ve kolumnar yapıda olup iyi diferansiye olarak hepatositlere benzediği, bazı alanlarda belirgin atipi (Şekil 3.6 ve 3.9) ile birlikte mitotik figürlere (Şekil 3.10) rastlandığı, bazı odaklarda yer yer steatozla (Şekil 3.10 ve 3.11) birlikte iri şeffaf hücrelerin (clear cell) (Şekil 3.4 ve 3.5) varlığı dikkati çekmiştir. Ayrıca kanser hücrelerinde çekirdek sitoplazma oranı artmış, nükleer polimorfizm belirgin ve bazı çekirdeklerde glikojen birikimi (Şekil 3.3) ile ilgili değişiklikler gözlenmiştir. Sitoplazmalarda eozinofilik renkte inklüzyonlara (Mallory cisimcikleri) rastlanmıştır (Şekil 3.10); iki vakada ise içleri eritrositlerle dolu genişlemiş sinuzoidler (peliozis) tespit edilmiştir (Şekil 3.7 ve 3.8).



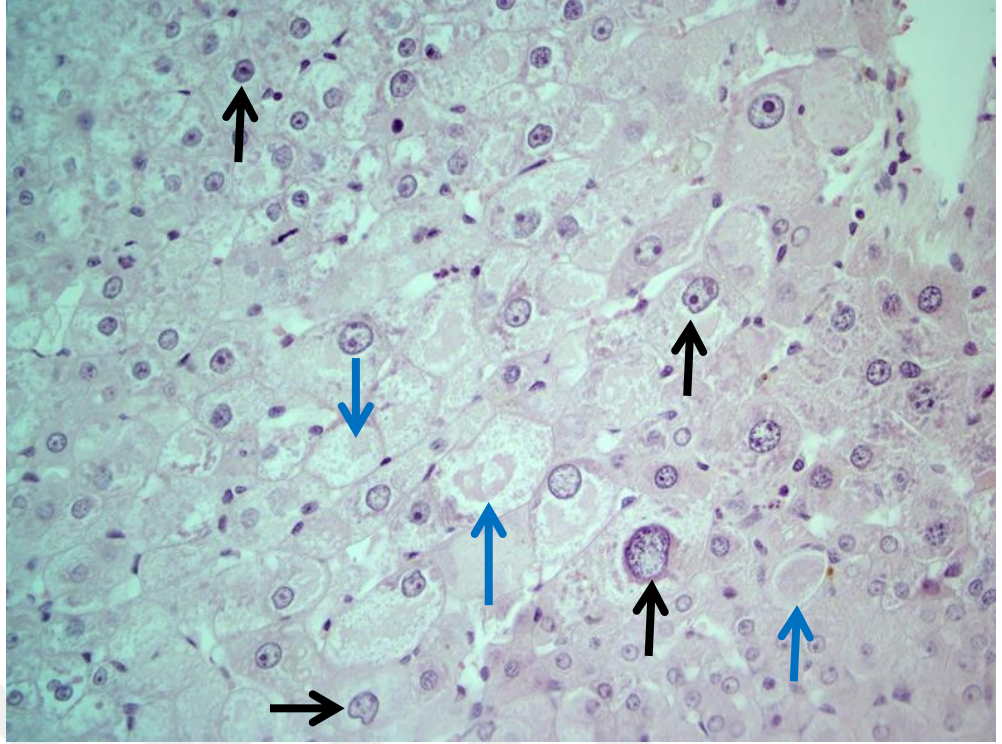
Şekil 3.3 HCC’de trabeküler (siyah oklar) ve psöydoglandüler yapılar (kırmızı oklar), glikojen içeren çekirdekler (mavi ok). PK grubu, Hx&E, x200.



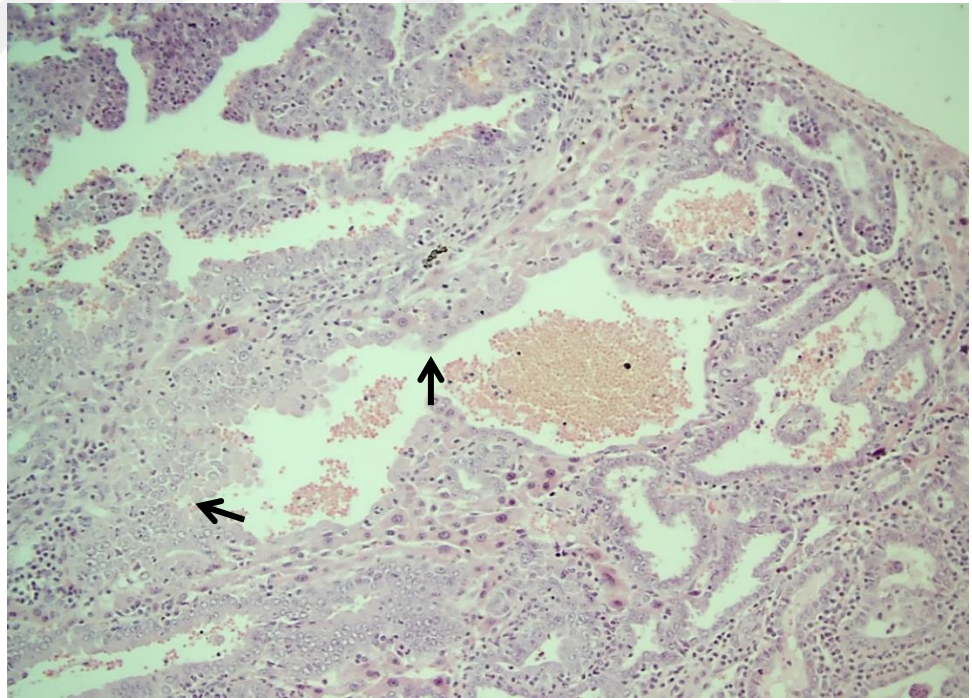
Şekil 3.4. Şeffaf görünüme sahip (clear cell tip) hücrelerinden oluşan tümöral odak. PK grubu, HxE, x100.



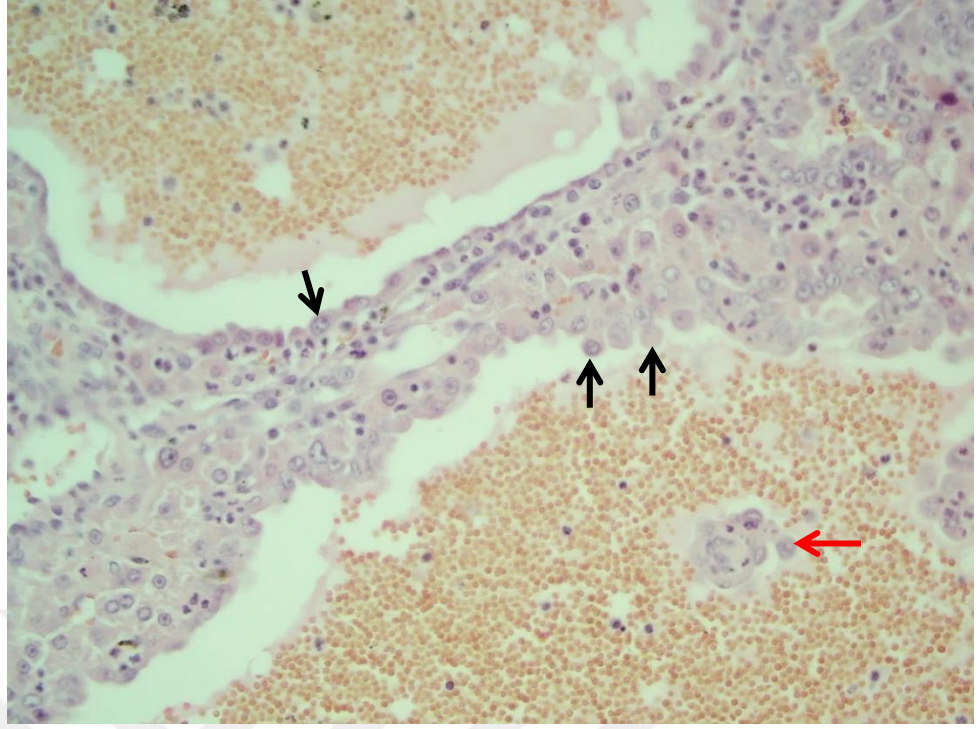
Şekil 3.5. Şeffaf görünüme sahip (clear cell tip) hücrelerinden oluşan tümöral odak. PK grubu, HxE, x400. NH: normal hepatositler, TO: Tümöral odak



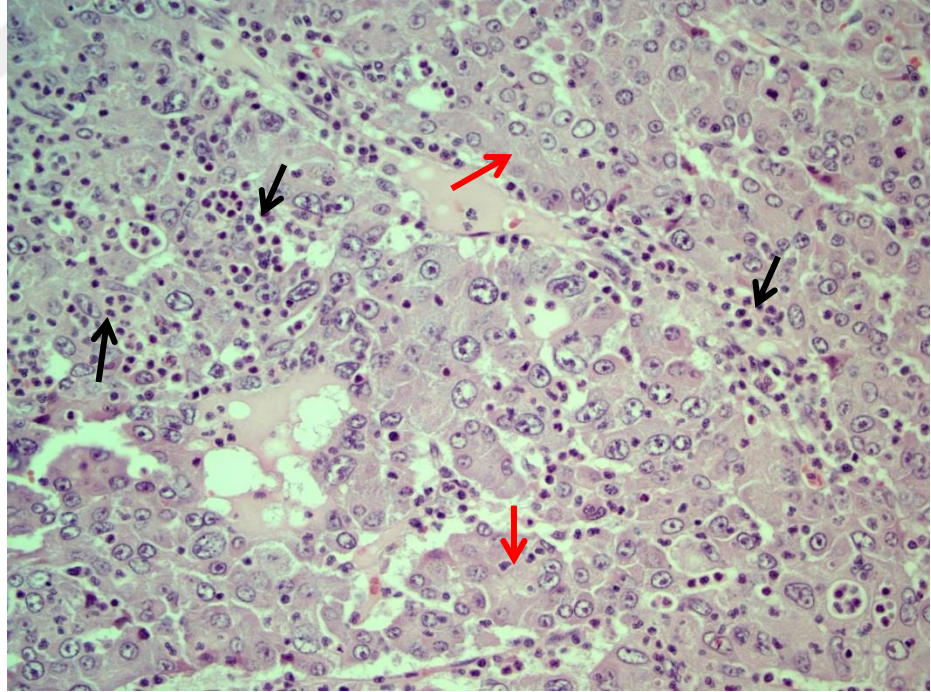
Şekil 3.6. Şeffaf görünüme sahip (clear cell) hücrelerinden oluşan tümöral odak. Kanserli hücrelerde belirgin pleomorfizm ve anizonükleozis, sitoplazmada solgun eozinofilik inklüzyonlar (Mallory cisimcikleri), PK grubu, HxE, x400. NH: normal hepatositler, TO: Tümöral odak



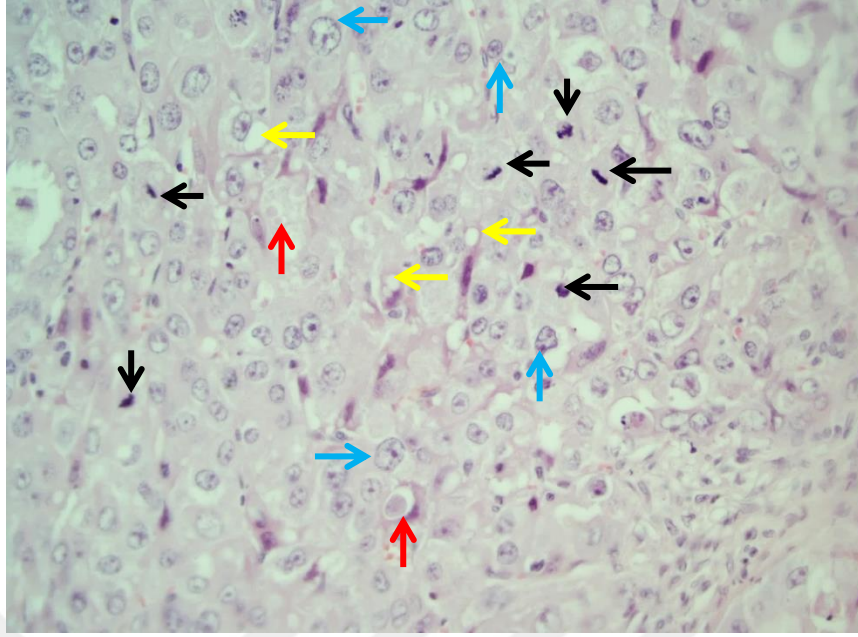
Şekil 3.7. Atipik Oval ve kolumnar hücrelerden oluşan psöydoglandüler yapılar ve peliozis görünümü. PK grubu, HxE, x200.



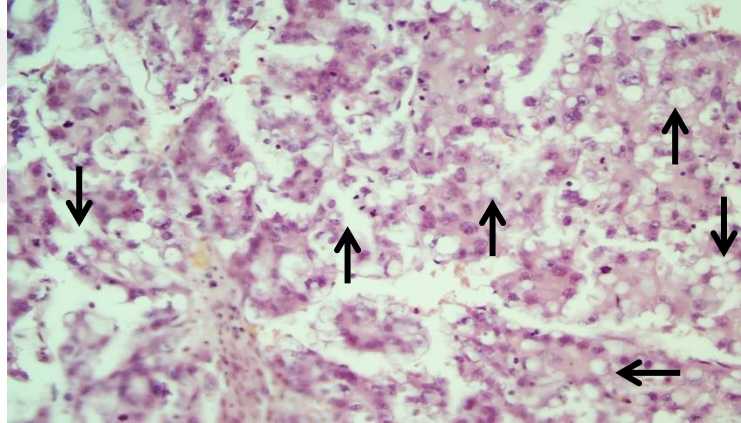
Şekil 3.8. Atipik Oval ve kolumnar hücrelerden (siyah oklar) oluşan psöydoglandüler yapılar ve peliozis görünümü. Sinuzoid lümeninde tümöral hücreler (kırmızı ok) PK grubu, HxE, x400.



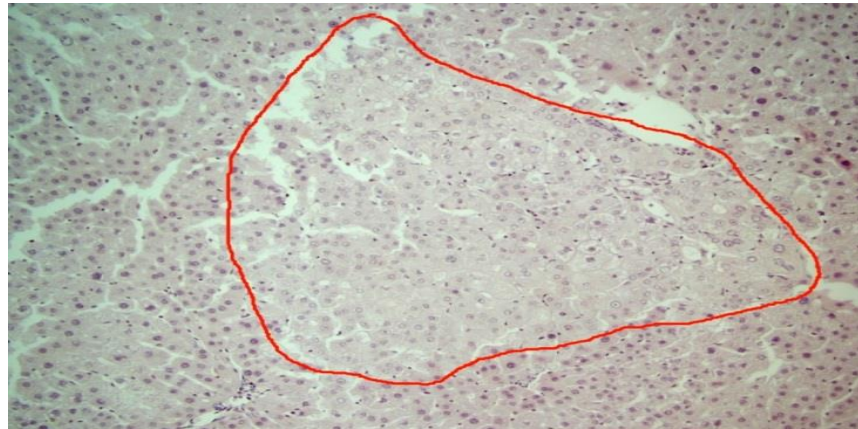
Şekil 3.9. Atipik oval ve kolumnar hücrelerde belirgin atipik özellikler, trabeküler yapılar (kırmızı oklar) ve tümöral alanlarda nötrofil infiltrasyonu (siyah oklar) (nötrofil zengin tip) PK grubu, HxE, x400.



Şekil 3.10. Atipik oval ve kolumnar hücrelerde belirgin atipik özellikler (mavi oklar) ve çok sayıda mitotik figür (siyah oklar), sitoplazmada eozinofilik inklüzyonlar (kırmızı oklar)(Mallory cisimcikleri) ve yağ vakuolleri (sarı oklar) PK grubu, HxE, x400.



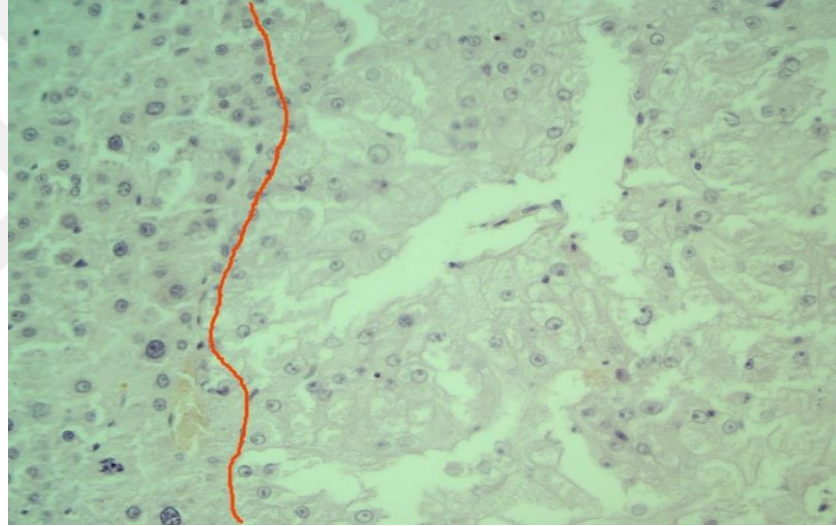
Şekil 3.11. Atipik tümöral hücrelerin sitoplazmasında yağ vakuolleri (steatohepatik tip)(siyah oklar), PK grubu, HxE, x400.



Şekil 3.12. Atipik özelliklere sahip şeffaf hücreler (Clear cell tip) ve trabeküler yapıların görüldüğü tümöral odak, PKS, HxE, x200.



Şekil 3.13. tümöral odak Atipik özelliklere sahip tümöral hücrelerin oluşturduğu trabeküler yapılar ve intrasitoplazmik inklüzyonlar (kırmızı oklar), PKT, HxE, x100.



Şekil 3.14. Tümöral odak. Atipik özelliklere sahip şeffaf hücreler (Clear cell tip) PKST, HxE, x400.

Tedavi gruplarındaki karaciğerlerde tümör tespit edilen vakalarda kanserli hücreler ve bunların oluşturduğu yapılar pozitif kontrole benzer olmakla birlikte kullanılan tedavilerin etkisiyle; tümör görülme sıklığı ve büyüklüklerinde azalma meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 3.12, Şekil 3.13 ve 3.14).

4. TARTIŞMA

Hepatoselüler karsinoma (HCC) tedavisinde kullanılan kemoterapotik ilaçlara tüm kanser türlerinde olduğu gibi direnç gelişimi söz konusudur. Tedaviye karşı oluşan direnç nedeniyle kanser hücrelerinin anjiyogenez ve metastaz yeteneği artmakta ve kemoterapotik ajanların ağır yan etkileri de tedavinin başarısını olumsuz etkilemektedir. Bu sebeple HCC tedavisinde araştırmalar son yıllarda kemoterapik ajanlar ile kombine kullanılmak üzere bitkisel ürünler ya da etken maddeler ve homeopatik ajanlar üzerine yoğunlaşmıştır.

Sunulan tez çalışmasında, antikanser, antiproliferatif ve apoptotik etkileri olduğu bilinen Theranekron'un HCC tedavisinde kullanımı ve kanser hücreleri üzerine olan etkileri araştırılmak istenmiş olup, ayrıca Theranekron'un antikanser özelliklerinin hangi mekanizma ve/veya mekanizmalar üzerinden gerçekleştiğinin tespiti amaçlanmıştır. Ayrıca HCC tedavisinde Theranekron'un immünoterapi benzeri etkisi sayesinde Sorafenib'in, terapötik etkisini ne oranda arttırılabileceği ve kemoterapinin yan etkilerinin azaltılması için alternatif tedavi amaçlı kullanılabileceği düşünülen Theranekron'un etkinliğinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Karaciğer fonksiyonunu temsil eden ALT, AST ve GGT enzimlerinin artan konsantrasyonları hepatik hasarın hassas göstergeleri olarak değerlendirilmektedir (Song ve ark 2020). Lijinsky ve ark. (1988) DEN ve NMOR ile HCC modeli oluşturma çalışmalarında; DEN ve NMOR verilen hayvanlarda serum ALT, AST ve GGT seviyelerindeki artış, hepatotoksisite ve hepatokarsinogenezde preneoplastik hepatik odakların gelişimi ve HCC'nin ilerleyen evreleri ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir (Lijinsky ve ark 1988). Hatipoglu ve Keskin (2022) AFB1 ile karaciğer toksisitesinde kurkuminin koruyucu rolünü araştırdıkları çalışmada; AFB1 grubunda ALT, AST ve GGT değerlerinin arttığı ve AFB1+kurkumin grubunda kurkumin ile tedavi sonucunda ALT, AST ve GGT enzimlerinin seviyelerinde anlamlı düşüş elde etmişlerdir (Hatipoglu ve Keskin 2022). Tez çalışmasında PK grubunda; tüm gruplara göre serum ALT, AST ve GGT en yüksek seviyeye ulaşması ($P<0.001$) ve histopatolojik değerlendirmede PKT, PKS ve PKTS gruplarına göre neoplastik odakların çok fazla sayıda ve büyüklükte olması yapılan hepatik hasar ve HCC ilerlemesi üzerine çalışmalarla uyum göstermektedir. Song ve ark. (2020), 10 hafta süreyle hafta tek doz DEN (70 mg/kg) uygulaması ile ratlarda serum ALT ve AST

seviyelerinin artışı göstermişlerdir (Jian ve ark 2020). Alsahli ve ark. (2021), ratlarda 8 hafta boyunca hafta 3 kez DEN (50 mg/kg) uygulaması ile serum ALT ve AST düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yükseldiğini tespit etmişlerdir (Alsahli ve ark 2021). Assar ve ark. (2021), tek doz DEN uygulamasının (200 mg/kg i.p) ratlarda serum ALT, AST ve GGT seviyelerinin arttığını göstermişlerdir (Assar ve ark 2021). Yapılan bu çalışmalarda sonuçlar, tez çalışmasındaki PK grubunda serum ALT, AST ve GGT seviyelerinin; NK, NKT ve NKS gruplarına göre istatistiksel anlamda elde edilen artışlarla ($P < 0.001$) uyum göstermektedir. Ram ve ark (2020) DEN ve NMOR ile ratlarda oluşturdukları HCC modelinde antienflamatuvar bir ilaç olan Nimbolid'in; sağlıklı+Nimbolid kontrol grubunda serum ALT ve AST değerlerinin sağlıklı kontrol gruba yakın olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer şekilde tez çalışmasında NK ve Theranekron uygulanan NKT gruplarında serum ALT ve AST değerlerinde birbirine yakın sonuçlar elde edilmiş ve istatistiksel fark bulunamamıştır. Bu durum Theranekron uygulamasının karaciğerde hasar ya da toksikasyon oluşturmadığına yorumlanmıştır. Mohamed ve ark. (2012), DEN ve NMOR kullanarak oluşturdukları HCC modelinde; sağlıklı kontrol grubuna göre kanserli grupta yüksek serum ALT ve AST aktiviteleri tespit etmişler ve Norflaxacin tedavisi alan HCC grubunda serum ALT ve AST seviyelerinde anlamlı düşüşler elde etmişlerdir (Mohamed ve ark 2012). Mecut tez çalışmasında HCC tedavisi için kullanılan Theranekron, Sorafenib ve Theranekron+Sorafenib kombine tedavilerinin; PKT, PKS ve PKTS gruplarında serum ALT, AST ve GGT değerlerini anlamlı şekilde düşürdüğü tespit edilmiştir. Ram ve ark (2020) ratlarda DEN+NMOR ile oluşturdukları HCC çalışmasında; antienflamatuvar ilaç Nimbolid'in antikanser özelliklerini araştırmışlar ve Nimbolid'in tek başına kemoterapi ilacı Doksorubisin kadar serum ALT ve AST seviyelerini düşürdüğü ve HCC tümör boyutunun azalmasını sağladığını tespit etmişlerdir (Ram ve ark 2020). Kurma ve ark. (2022) HCC tedavisinde Sorafenib ve AKT inhibitörü Vevorisertib uygulamaları ile yaptıkları çalışmada Sorafenib monoterapisinin serum ALT, AST ve GGT seviyelerinde anlamlı düşüşler sağladığını tespit etmişlerdir (Kurma ve ark 2022). Çalışmada PKS grubunda serum ALT, AST ve GGT seviyelerinin PK grubuna göre daha düşük olması, Sorafenib tedavisinin etkili olduğunu göstermektedir. Tüzün ve ark. (2022) ratlarda iskemi-reperfüzyon hasarı sonrası Theranekron tedavisinin serum ALT, AST ve GGT seviyelerinde anlamlı düşüşlere neden olduğu ve Theranekron tedavisinin karaciğer

üzerinde koyucu etkisi olduğunu tespit etmişlerdir (Tüzün ve ark 2022). Karabacak ve ark (2015) ratlarda aflatoksin-B1 ile karaciğer hasarında Theranekron tedavisinin ALT ve AST seviyelerini kısmen düşürdüğü ve karaciğerde koruyucu etkiler oluşturabileceği şeklinde değerlendirmişlerdir (Karabacak ve ark 2015). Bu çalışmalarla uyumlu olarak; çalışmada PKT grubunda Theranekron tedavisinin PK grubuna göre serum ALT, AST ve GGT seviyelerinde anlamlı düşüşler sağladığını ve karaciğer üzerindeki koruyucu/tedavi edici etkisini göstermektedir. Ayrıca HCC'de Theranekron'un tek başına kullanımında serum ALT, AST ve GGT seviyelerini düşürmede Sorafenib'e yakın etki oluşturması olumlu bir gelişme olarak değerlendirilmiştir.

Hepatokarsinogenez sürecinde trigliserit düzeylerinde artışlar meydana gelebilir. Huang ve ark. (2016), HCC'li hastalarda yaptıkları çalışmada hiperlipidemi tablosunun tümör büyümesini tetiklediğini tespit etmişlerdir. Tez çalışmasında PK grubunda tüm gruplara göre yüksek serum trigliserit seviyelerinin elde edilmiş olması ve histopatolojik değerlendirmede PK grubundaki kanser alanlarının diğer PKT, PKS ve PKTS gruplarına göre çok geniş olması hipertrigliserideminin HCC'de tümör büyümesini destekleyebileceğine yorumlanmıştır. Karabacak ve ark (2015) ratlarda aflatoksikozun metabolik profile etkisinin Aflatoksin+Theranekron grubunda trigliserit seviyelerini düşürdüğü tespit etmişlerdi. Tez çalışmasında PKT grubunda elde edilen trigliserit düzeylerinin PK grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunması ($P<0.001$) ve PKS grubu ile istatistiksel anlamda fark olmaması; Theranekron'un trigliserit seviyelerinin kontrol altına alınmasında Sorafenib kadar etkili olduğu göstermekte ve yapılan çalışmalardaki sonuçlarla uyum göstermektedir. Iqbal ve ark. (2022) kanserli hastalarda metabolik sendrom üzerine Sorafenib'in etkinliğini araştırdıkları çalışmada; Sorafenib tedavisinin dislipidemi ve hiperlipidemi tablosunu düzelttiği ve trigliserit seviyelerini düşürdüğünü tespit etmişlerdir. HCC'nin erken evresinde düşük doz Sorafenib tedavisinin uygulandığı NASH ilişkili HCC fare ve maymun modelinde Sorafenib tedavisinin hiperlipidemi tablosunu baskıladığı, karaciğer yağlanmasını iyileştirdiği ve kan trigliserit seviyelerini anlamlı şekilde düşürdüğü saptanmıştır (Jian ve ark 2020). Tez çalışmasında PKS grubunda kan trigliserit düzeylerini PK grubuna göre anlamlı derecede düşürmesi ($P<0.001$) yapılan çalışmalarla uyum göstermektedir. Ayrıca PKTS tedavi grubunda serum trigliserit düzeylerinin PKT ve PKS gruplarından

düşük olması; Theranekron ve Sorafenib kombinasyonunun HCC’de hipertrigliseridemi kontrol altına almada daha etkili olduğunu göstermektedir.

Chen ve ark. (2019) DEN ile indüklenmiş HCC’de enerji metabolizması üzerine yaptıkları çalışmada; DEN grubunda, kontrol grubuna göre zamanla azalan kan glikoz düzeyi tespit etmişlerdir. Bu çalışmanın aksine tez çalışmasında kanser kontrol grubu (PK) kan glikoz seviyelerinde hiperglisemi tablosu dikkat çekmiştir. PK grubunda elde edilen hiperglisemi durumunu destekler nitelikte; HCC ile ilgili metabolik yolun ve profilin incelendiği kapsamlı analizde, ileri evre HCC’li hastalarda erken evre HCC’li hastalara göre daha yüksek serum glikoz seviyeleri elde edilmiştir (Casadei-Gardini ve ark 2020). Ratlarda aflatoksin ile karaciğer hasarı üzerine yapılan başka bir çalışmada Aflatoksin+Theranekron grubunda, Theranekron tedavisinin glikoz seviyelerini düşürmediği ve Aflatoksin grubunda glikoz seviyelerinde azalmanın gerçekleştiği tespit edilmiştir (Karabacak ve ark 2015). Sunulan tez çalışmasında ise, kan glikoz düzeylerinin PK grubunda NKS grubu harici tüm gruplarda istatistiksel olarak yüksek seviyelerde olduğu ($P<0.001$) tespit edilmiş ve Theranekron tedavisinin (PKT), PK grubuna göre kan glikoz seviyelerinde anlamlı düşüşler sağladığı görülmüştür. Iqbal ve ark. (2022) kanserli hastalarda metabolik sendrom tablosunda Sorafenib tedavisinin kan glikoz seviyelerinin kontrol altına alınmasını sağladığını tespit etmişlerdir. PKS grubunda kan glikoz seviyeleri PK grubuna istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük tespit edilmiştir ($P<0.001$). Kurma ve ark. (2022) nın, HCC’nin ratlarda DEN ile oluşturdukları siroz ilişkili HCC modelinde; Sorafenib monoterapisinin kan glikoz seviyelerinde herhangi bir değişiklik oluşturmadığı bildirilmiştir (Kurma ve ark 2022). Mevcut tez çalışmasında PK grubuna göre kan glikoz düzeylerinde istatistiksel anlamda en fazla düşüş PKTS grubunda ($P<0.001$) gerçekleşmiş olup, HCC’de; Theranekron ve Sorafenib kombine tedavisinin monoterapi uygulamalarına göre kan glikoz seviyelerini daha etkili bir şekilde düşürdüğü tespit edilmiştir.

Hepatokarsinogenez sürecinde hepatik hasara bağlı olarak üre biyosentezi azalmaktadır. Lin ve ark. (2022) yaptıkları kapsamlı analizde sirozlu, kronik karaciğer hastalığı olan ya da hepatoselüler karsinomlu hastalarda üre sentezi kapasitesinin azaldığını tespit etmişlerdir. De Chiara ve ark. (2020) alkolik olmayan karaciğer hastalığında azalmış üre sentezinin, hepatik stellat hücreleri aktive eden ve

fibrozun ilerlemesini destekleyen amonyak birikimi ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Üre seviyesinin PK grubunda tüm gruplara göre düşük olması yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlarla uyum göstermektedir. Ratlarda DEN+Fenobarbital ile oluşturulmuş HCC modelinde; kanser grubunda üre sentezinin azaldığı ve kanser+cisplatin grubunda kemoterapi ilacı “cisplatin” ile tedavinin kan üre düzeylerini artırdığı tespit edilmiştir (El Miniawy ve ark 2017). Mobasher ve ark. (2021), diyabetik ratlarda haftada tek doz DEN ile indüklenen HCC modelinde; diyabetik-DEN grubunda ALT, AST ve total bilirubin seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığını tespit etmişler, DEN enjeksiyonundan önce ve sonra Metformin ile tedavinin en düşük ALT, AST, üre, kreatinin ve arginaz seviyelerinin elde edilmesini ve maksimum iyileşmeyi sağladığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise, PKT ve PKS tedavi gruplarında kan üre düzeyleri PK grubuna oranla yükselirken, PKTS grubunda NK grubuna yakın değerlere ulaştığı gözlenmiştir. Theranekron ya da Sorafenib monoterapilerinin karaciğer üzerindeki tedavi edici etkisi ile üre biyosentezinin arttığı, kombine tedavinin ise daha etkin sonuçlar elde edilmesini ($P<0.001$) sağladığı görülmüştür. Üre sentezi ile yakından ilişkili kan amonyak düzeylerinin ölçümleri ile tez çalışma gruplarında elde edilen üre sonuçlarının daha net olarak ortaya konabileceği de ayrıca belirtilmelidir.

DEN+NMOR metabolizması sırasında birçok reaktif oksijen türünün oluşması ve bunların artışı; DEN+NMOR aracılı hepatokarsinogenez sırasında başlatıcı, genişletici ve ilerletici rol alır (Mohamed 2013). Theranekron’un oksidan etkinliği azalttığı ve total antioksidan kapasite değerlerini (TAK) artırdığı polimikrobiyal sepsis modeli çalışmada tespit edilmiştir (Tanyeli ve ark 2019). Tez çalışmasında PK, PKT ve PKS gruplarında TAK değerlerindeki artış, DEN ve NMOR’a bağlı artan karaciğer hasarının sonucu antioksidan savunmanın arttığı; PKTS grubunda TAK değerlerinin sağlıklı gruplara yakın olması ise kombine tedavideki etkinlikle bağlantılı olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Ancak TAK seviyelerinin tam olarak değerlendirilebilmesi için TAK değerleri ile birlikte total oksidan ve diğer antioksidan parametrelerin araştırılması ve değerlendirilmesinin gerekli olduğu söylenebilir.

Siklin bağımlı kinaz inhibitör (p21) proteini sitoplazmik (onkojenik) ve nükleer (tümör baskılayıcı) lokalizasyonuna bağlı olarak kanser türlerinde tartışmalı

role sahiptir. Aynı şekilde p21 proteini hepatoselüler karsinomada da ikili role sahiptir. p21'in kronik karaciğer hastalıklarında inflamasyon ve fibroz ile upregüle edildiği ve yüksek p21 gen ekspresyonunun sirotik hastalarda hepatokarsinogenez ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Wagayama ve ark 2002). Kronik hepatit ve siroz vakalarında p21 kontrol noktası aktivasyonunun artmış HCC riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Plentz ve ark 2007). p21 artışının HCC ile ilişkili olduğunu belirten bu çalışmalardan farklı olarak çalışmada gruplar arasında en düşük p21 düzeyleri PK grubunda ve istatistiksel anlamda fark ($P<0.05$) tespit edilmesi; p21 protein seviyelerinin azalmasının HCC gelişiminde önemli olduğunu göstermektedir. Elde edilen bu bulgu; tümör rezeksiyonundan sonra HCC hastalarda, p53'ten bağımsız bir şekilde karaciğer dokularının %37'sinde p21 ekspresyonunun gözlemlendiği ve p21'in bağımsız bir hayatta kalma prognostik faktörü olduğunu tespit etmeleri ile desteklenmektedir (Kao ve ark 2007).

p21 aracılı proliferasyonun inhibisyonu PCNA ve siklin inhibe edici alanların birbirinden bağımsız bir şekilde aktivasyonu ile gerçekleşir (Abbas ve Dutta 2009). Özdemir ve ark (2022), ratlarda Azoksimetan ile indükledikleri deneysel kolorektal kanserde, Theranekron uygulamasının PCNA (çoğalan hücre nükleer antijeni) hücre proliferasyon belirtecini inhibe ettiğini ve kolorektal kanser hücrelerinde proliferasyonun baskılandığını tespit etmişlerdir. "Macrothela raveni" zehrinin, HepG2 hücrelerinde yapılan çalışmada p21 birikimini arttırdığı ve hücre döngüsünde siklin B1/cdc2 inhibisyonu ile G2/M fazını durdurarak antiproliferatif etki gösterdiği bulunmuştur (Gao ve ark 2007). Çalışmada Theranekron'un etkisiyle PKT grubunda PK grubuna göre p21 seviyelerindeki artış kanser hücrelerinde proliferasyonun baskılandığına ve kanser hücrelerinde apoptozun arttığına yorumlanmıştır. Theranekron bu etkisini yapılan çalışma sonuçlarına benzer şekilde p21'in PCNA inhibisyonuna neden olarak ya da siklin ve siklin bağımlı kinaz inhibisyonu aracılığıyla gerçekleştirmiş olabilir. Qu ve ark (2013) kemoterapötik ajan Cisplatin ile HepG2 (HCC hücre hattı) kanser hücrelerinde yaptıkları çalışmada, P53 ve p21 ekspresyonunu artırarak hücre siklusunun durmasını ve HepG2 hücrelerinde apoptozun indüklendiğini göstermişlerdir. Jindal ve ark (2021) insan HCC'sinin ortotopik fare modelinde Sorafenib ve Milsiklib ile yaptıkları çalışmada; her iki ajanın tek başına kullanımında p21 ekspresyon seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı artırarak antiproliferatif etki gösterdiğini ve Sorafenib ile Milsiklib

kombinasyonunun tek başına tedaviden daha yüksek bir şekilde p21 ekspresyon seviyelerini artırarak HCC hücrelerinde apoptozu artırdığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmalarla uyumlu olarak PKS grubunda elde edilen p21 seviyelerinin PK grubundan daha yüksek olması Sorafenib'in kanser hücrelerinde apoptozun artmasını göstermektedir.

İnsan primer hepatoselüler karsinomasında kaspaz-3 gen ekspresyonunu saptamak ve bunun p21 gen ekspresyonu ve apoptoz ile ilişkisini araştırmak amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların birinde (Sun ve ark 2000), p21'in HCC hücrelerinde kaspaz-3 aracılı apoptozu azaltabilen inhibitörlerden birisi olduğu belirtilmiştir. Tez çalışmasındaki sonuçlar, PKT, PKS ve özellikle PKTS gruplarındaki p21 seviyelerinin yüksekliğinin apoptozu inhibe etmediğini, aksine bu gruplarda Kaspaz-3 artışıyla korelasyon gösterdiği ve apoptozun artışıyla gruplarda uygulanan tedavilerin etkinliğini yansıtmaktadır. Şirin ve ark (2020), apigeninin HepG2 hücre hattında p21 ekspresyonunda oldukça anlamlı bir artışa neden olduğu ve kemoduyarlılığı artırdığını, HepG2 hücrelerinde hücre siklusunu durdurarak HepG2 hücrelerinde proliferasyonun baskılanmasına neden olduğunu ve Kaspaz-3,8,10 artışıyla apoptozun arttığını tespit etmişlerdir. Tez çalışmasında PKTS grubunda p21 seviyelerinin PK grubuna göre yüksek olması; Theranekron'un, p21 ekspresyonu artışına bağlı antiproliferatif özelliği ile apoptozu indükleyebileceği ihtimalini düşündürmektedir. Diğer taraftan, p21'in hücre döngüsünü durdurmasına bağlı olarak HCC hücrelerinin Sorafenib'e karşı duyarlaşmasına neden olarak tedavide başarı sağladığı sonucuna varılabilir. Ancak p21 aracılı hücre siklusu ve proliferasyonun inhibe edilmesinin iyi bir şekilde anlaşılması ve bu yoldaki hedeflerinin tam olarak tespit edilebilmesi için (p53, PCNA) ek araştırmalara ihtiyaç vardır.

Hepatoselüler karsinomada CD8⁺T ve NK hücreleri birincil basamak hücresel sitotoksiteden sorumludur ve bu hücrelerin hedeflerini öldürme yeteneği için önemlidir. Ayrıca bu hücrelerin tümör mikroçevresinde yüksek oranda olması HCC'li hastalarda daha iyi bir prognozla ilişkilendirilmiştir (Flecken ve ark 2014, Hong ve ark 2022). NK hücreleri hepatoselüler karsinomada özel bir yere sahiptir ve önceden duyarlılaşma olmaksızın tümör hücreleri üzerine doğrudan hücresel sitotoksite uygulayabilir. Mantovani ve ark (2020) yaptıkları çalışmada NK

hücrelerinin intrahepatik lenfosit popülasyonunun önemli bir bölümünü oluşturduğunu ve HCC hastalarının hayatta kalması ve kanser prognozu ile pozitif ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Fathy ve ark (2009), periferik NK hücreleri tarafından sitoplazmik granüllerin (perforin/granzim B) üretiminin daha kötü prognozlu ilerlemiş HCC hastalarında önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmalarla uyumlu olarak, PK grubunda en düşük Granzim B seviyelerinin elde edilmesi ($P<0.001$); immunsupresif bir mikroçevrenin geliştiğini ve HCC’de Granzim B seviyelerinin prognozda önemli olduğunu göstermektedir.

İmmunsupresif hücre alt gruplarının HCC mikroçevresinde oluşmasında VEGFR ve ERK sinyal yolları önemli role sahiptir ve Sorafenib tarafından bu yolların inhibisyonu HCC kanser hücrelerinin sitotoksik immun sistem hücrelerine duyarlılığını artırır (Yang ve ark 2018). PKS grubunda Granzim B seviyeleri PK grubuna göre daha yüksek elde edilmesi; Sorafenib tedavisinin immunsupresif hücre alt gruplarının baskılayarak fonksiyonel sitotoksik immun sistem hücrelerinin aktive edildiğine yorumlanmıştır. Sorafenib tedavisinin, yalnızca anjiyogenezi inhibe ederek değil, aynı zamanda IFN- γ ve Granzim B üreten fonksiyonel sitotoksik immun hücrelerin eşzamanlı aktivasyonu ile immünosupresif hücre alt gruplarını baskılayarak HCC’li hastalarda tümör büyümesini ve metastazları geciktirebileceği bildirilmektedir (Kalathil ve ark 2019). Sunulan çalışmada, PKT ve PKS tedavi gruplarında Granzim B seviyelerinin birbirine yakın olduğu tespit edilmiş ve bu durum Theranekron’un bağışıklık sistemi üzerindeki immünosupresif etkileri ortadan kaldırmasında Sorafenib kadar etkili olduğunu göstermektedir. HCC’nin tümör immün mikroçevresi, immünoterapiye yanıt etkileyebilecek önemli immünosupresif unsurlara sahiptir. Chung ve ark (2021) Metformin tedavisinin HCC tümör mikroçevresinde NK/CD8⁺T hücrelerini devreye sokarak IFN- γ ve Granzim B artışını sağlayarak kanserli dokuyu immünoterapiye yanıt verecek şekilde önemli ölçüde duyarlı hale getirdiğini tespit etmişlerdir . Tez çalışmasında, Theranekron’un immünoterapi benzeri etki gösterip gösteremeyeceği araştırılmıştır. PKT grubunda, pozitif kontrol grubuna göre yüksek ($P<0.001$) Granzim B seviyelerinin elde edilmesi Theranekronun CTLs/NKs hücrelerini aktive ettiğinin bir göstergesi olarak kabul edilmiş ve PKTS grubundaki yüksek Granzim B seviyeleri de göz önünde bulundurulduğunda Theranekron’un immünoterapi benzeri etkiyi oluşturmaya yorumlanmıştır. PKTS grubunda en yüksek Granzim B değerlerinin elde edilmesi ise

bu kombinasyonun HCC tedavisinde etkinliğin artırıldığının göstergesidir. PKTS grubunda elde edilen Granzim B seviyelerinde PKT ve PKS gruplarına göre farklılıklar dikkat çekmiştir. Bu durum; kombine tedavinin monoterapiye göre daha iyi olduğuna yorumlanmıştır.

Apoptotik sinyal yolunda kaspaz-3 parametresi sıklıkla apoptotik aktiviteyi belirlemede kullanılır (Huang ve ark 2010). Azalmış kaspaz-3 ekspresyonunun HCC’de apoptoza ve dolayısıyla tedaviye karşı direnç neden olur (Fujikawa ve ark 2000). Kaspaz-3 eksik farelere DEN uygulamasının, p38/MAP kinaz aktivasyonunu artırdığı ve DEN kaynaklı karaciğerde telafi edici hepatosit proliferasyonuna bağlı olarak HCC geliştiğini bildirilmiştir (Shang ve ark 2018). Sunulan çalışmada kaspaz-3 seviyelerinin, PK grubunda düşük olması HCC’de azalmış kaspaz-3 seviyelerinin kanser ilerlemesi ile ilişkili olduğu ve uygulanan tedavilere bağlı olarak da PKT, PKS ve PKTS gruplarında kaspaz-3 seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir. Abouzeid ve ark (2015), ratlarda DEN ile oluşturdukları HCC modeli çalışmasında anjiyojenik ve antiapoptotik faktörler TGF- β ve Akt seviyeleri ile kaspaz-3 seviyelerini araştırmışlar ve zerdeçal tedavisinin, TGF- β ve Akt’ın aşırı ekspresyonunu azalttığı ve kaspaz-3 ekspresyonunu ve HCC hücrelerinde apoptozu kısmen artırdığını tespit etmişlerdir. Zhang ve ark (2012), ratlarda DEN ile oluşturdukları HCC’de sarımsak yağı kullanımının etkisini araştırmışlar ve DEN+sarımsak yağı tedavi grubunda antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL protein ekspresyonunun azaldığı ve buna karşılık Bax ve kaspaz-3 seviyelerinin arttığını, dolayısıyla apoptozun HCC hücrelerinde arttığını tespit etmişlerdir. Jiang ve ark (2022), in vivo ve in vitro “Marsdenia Tenacissima” bitkisinin içerdiği saponinler, artan mitokondriyal hasara bağlı kaspaz-3 artışını tetikleyerek HCC hücrelerinde apoptozun tetiklendiğini tespit etmişlerdir. Ratlarda DEN ile indüklenmiş HCC’de resveratrolün; antiapoptotik β -arrestin-2, Bcl-xL ve Bcl-2 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı, HCC hücrelerinde kaspaz-3 ve Bax ekspresyonu artışına bağlı apoptozu artırdığı, ayrıca resveratrolün HCC’li gruplarda serum ALT ve AST seviyelerini düşürdüğü de tespit edilmiştir (Su ve ark 2019). Karbon tetraklorür (CCl₄) ile karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda CCl₄+deve dikenli ekstresi grubunda, CCl₄ grubuna göre antiapoptotik Bcl-2 ekspresyon seviyesinin azaldığı ve kaspaz-3 seviyelerinin ise arttığı tespit edilmiştir (Aslan ve Can 2014). Mevcut tez çalışmasında PKT, PKS ve PKTS gruplarında artan kaspaz-3 seviyeleri HCC tedavisi

için farklı terapötik hedefli çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile uyum göstermiş ve Theranekron ve Sorafenib tedavilerinin HCC hücrelerinde apoptozun artmasına ve tedavideki etkinliğe yorumlanmıştır.

Salimi ve ark (2020), DEN ile başlatılan HCC rat modelinde Ellagik asit ve Sorafenib tedavilerinin Kaspaz-3 artışına neden olduğu ve HCC hücre canlılığında azalma meydana geldiğini ve her ikisinin kombine kullanımında bu etkinin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Piguet ve ark (2011), farelere HCC hücre nakli ile oluşturdukları HCC modelinde Evorlismus ve Sorafenib tedavilerinin apoptoza olan etkilerini incelemişler ve kaspaz-3 seviyelerinin her iki kullanımda da arttığı ve kombine kullanımda ise bu artışın daha fazla olduğunu ve sonuçta apoptozun artışıyla sonuçlandığını tespit etmişlerdir. Sunulan tez çalışmasında, PKS grubunda PK grubuna göre daha yüksek kaspaz-3 seviyeleri elde edilmiş ve bu durum HCC hücrelerinde artan apoptozun ve tedavinin yapılan çalışma sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür. Sorafenib'in antianjiyogenik özelliği ile immünsupresyonu azaltarak HCC'de apoptozu artırdığı ve metastazı yavaşlattığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Cao ve ark 2011, Prieto-Domínguez ve ark 2016, Kalathil ve ark 2019). El-Ashmawy ve ark (2017) ratlarda DEN ile oluşturdukları HCC modelinde Sorafenib'in antianjiyogenik etkilerinden farklı olarak antineoplastik etkilerini araştırmışlar ve Sorafenib'in antineoplastik etkisini reaktif oksijen türlerinin oluşumunu, Bax, Kaspaz-9 ve Kaspaz-3'ün aktivasyonunu artırarak farklı bir yol üzerinden de gerçekleştirdiğini tespit etmişlerdir. Tez çalışmasında PKS grubunda Kaspaz-3 yüksekliği ve artan apoptoz Sorafenib'in hangi özelliğine bağlı olarak gerçekleştirdiğinin tespiti için ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Sonuç olarak PKS grubunda Kaspaz-3 seviyelerinde elde edilen sonuçlar yapılan çalışmalarla sonuçlar uyum göstermektedir.

Theranekron'un bağışıklık sistemini modüle edici özelliği ve antienflamatuvar özellikleri yapılan çalışmalarda araştırılmış olup (Gültiken ve Vural 2007, Tanyeli ve ark 2019, Dik ve ark 2022, Savran ve ark 2022), HCC'de Theranekron'un antikanser özelliklerinin hangi mekanizma üzerinden gerçekleştiği ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır. Çalışmada PKT grubunda kaspaz-3, PK grubundan daha yüksek seviyelerde elde edilmiştir. Ayrıca Theranekron'un, Sorafenib'e yakın bir şekilde kaspaz-3 seviyelerini artırması son derece başarılı bir

sonuç olarak değerlendirilmiştir. PKT grubunda Granzim B seviyelerindeki artışla Kaspaz-3 seviyelerindeki korelasyon; Theranekronun CD8⁺T ve/veya NKs'leri aktive etmesine bağlı olarak apoptozu uyardığının göstergesi olarak kabul edilmiştir. Mevcut tez çalışmasında Theranekron-Sorafenib kombine tedavisi sonucu tedavi etkinliğinde artış olup olmayacağını incelenmiştir. Kaspaz-3 seviyeleri, tüm gruplarda en yüksek PKTS grubunda elde edilmiş ve istatistiksel anlamda yüksek ($P<0.001$) fark bulunmuştur. Bu sonuç; Theranekron-Sorafenib kombinasyonunun monoterapi gruplarına göre daha etkili ve farklı mekanizmaları uyararak kanser hücrelerinde apoptozu uyaraabilecek avantaja sahip olduğunu göstermektedir.

Ekstrinsik ve sitotoksik granül aracılı apoptozda önemli bir role sahip kaspaz-8 ile kaspaz-10 homolog özellik gösterir ve DISC sinyalleşmesi ile ilişkili olarak apoptozun uyarılmasında görev alır. Kaspaz-10 üzerine yapılan deneysel araştırmalarda ve insan hücre kültürlerinin kullanıldığı in vitro çalışmalarda ekstrinsik apoptozda önemli bir bileşen olduğu ve kaspaz-8 varlığında ya da kaspaz-8 aracılı apoptozu artırdığı tespit edilmiştir (Fernandes-Alnemri ve ark 1996). Hepatoselüler karsinomada kaspaz-10 üzerine yapılan çalışma sayısı sınırlıdır. Bunun nedenleri olarak ekstrinsik mekanizmada apoptozun genellikle kaspaz-8 üzerinden ilerlemesi ve kaspaz-8 ile kaspaz-10'un homolog olması gerekçe sunulmaktadır. İnsan genomunda, kaspaz-8 ve kaspaz-10 geni kromozom 2'nin aynı bölgesinde kümelenmiş, fonksiyon olarak da yüksek düzeyde benzerliğe sahip ve bunlarla etkileşen proteinlerin aynı alan yapısına sahip olduğu tespit edilmiştir (Fernandes-Alnemri ve ark 1996).

Kaspaz-10 nun, birçok türde korunmuş olmasına karşın, ratlarda bu genin fonksiyonel fazlalık açısından evrimsel süreçte kaybolduğu belirtilmektedir (Eckhart ve ark 2008). Farede ve ratta kaspaz-10 ile yapılan çalışmalarda (Giampietri ve ark 2003, Reed ve ark 2003, Green ve ark 2004, Stupack ve ark 2006), kaspaz-10'un çeşitli hücre kültürlerinde ve Western Blot analiziyle yapılan gösterimlerinde elde edilen raporlar dikkate alınarak, kaspaz-10'un varlığının varsayıldığı görülmüştür. Bu konuyla ilgili birkaç durum söz konusudur. Bir açıklama, kaspaz-10'un işlenmesini ve aktivasyonunu incelemek için antikolar ve kaspaza özgü inhibitör peptidler olarak adlandırılan yetersiz araçların kullanılması olabilir. Gerçekten de, yukarıdaki çalışmaların tümünde, ya belirtilmemiş kaspaz-10 antikoları ya da insan,

fare ve rat kaynaklı hücresel ekstraktlarla reaksiyona girdiği ilgili şirketlerin veri sayfalarında onaylanan antikörler kullanılmıştır. Ticari olarak temin edilebilen kaspaz-10 antikörleri için yapılan bir araştırmada, 24 şirket tarafından dağıtılan 44 kaspaz-10 antiköründen 19'unun veri sayfalarında fare veya sıçan dokularıyla reaksiyona girdiğinin belirtildiği bulunmuştur. Bunun nedeni olarak; fare ve sıçan dokularıyla çapraz reaksiyona giren antikörlerle aynı immünojenik peptit ile üretildikleri için olabilir. Ayrıca, birçok grup farede kaspaz-10'un varlığına ilişkin sonuçlar, kaspaz-10'a özgü olduğu iddia edilen AEVD peptidinin kullanımına dayandırılmaktadır (Garcia-Calvo ve ark 1998, Jänicke ve ark 2006). Mevcut tez çalışması ile ilgili olarak yapılan son değerlendirmelerde ise, ratlarda ve farelerde yapılmış olan çalışmaların referans alınması ve çalışmada ticari olarak temin edilen rat spesifik kaspaz-10 test kiti kullanılsa da sistematik bir şekilde firmalardan yapılan incelemelerde bu kitlerin çoğunlukla insan kaspaz-10 gen ve proteinlerinden elde edilen ürünlerle yapıldığı görülmüştür. Bu durum karşısında NCBI veritabanında BLAST çalışması yapılmıştır. Yapılan filogenetik analizler ışığında kaspaz-8 ve kaspaz-10 genlerinin kümelenmesi ve bunlarla etkileşen proteinlerin aynı alan yapısına sahip olması gerçeğiyle birlikte (Eckhart ve ark 2008, Sakamaki ve ark 2015) insan kaspaz-10 proteinine ratlarda en yakın özelliğe sahip proteinler aranmıştır. Bu amaçla ELISA kitlerinde referans insan kaspaz-10 geni nükleotit NCBI referans sırasının NM_001206524.2 olduğu, referans proteini “kaspaz-10 izoformu 6 preproprotein [Homo sapiens] ve NCBI Referans Sırası: NP_001193453.1” olduğu tespit edilmiştir. BLAST raporunda ratlarda; kaspaz-10 izoformu 6 preproprotein [Homo sapiens]'e en yakın protein “rattus (taxid:10114)” araması yapılmış ve sonuçta ratlarda % 94 oranla kaspaz-8 proteini olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca düşük seviye yakınlıkla kaspaz-1,2,3,6,7 ve 9 tespit edilmiştir.

Mevcut tez çalışmasında kaspaz-10 (BT-LAB, E1456Ra) rat spesifik ELISA kitiyle serum ve karaciğer doku örneklerinde tespit edilmiş, PKT, PKS ve PKTS gruplarında kaspaz-3 ve granzim B seviyeleri ile kaspaz-10 seviyelerinin artışı korelasyon gösterip PK grubundan daha yüksek elde edilmiştir ($P < 0.001$). BLAST raporundaki güçlü kanıtlarla birlikte, ratlarda kaspaz-10 geni silinmesine rağmen en yakın proteinin kaspaz-8 olduğunun kabul edilebileceği, ancak BLAST raporunda ratlarda insan kaspaz-10 proteinine en yakın aramada kaspaz-1,2,3,6,7 ve 9 da tespit edilmesi nedeniyle; tez çalışmasında serumda ölçümü yapılan kaspaz 10, belirtilen

ve netlik kazanmamış olan genetik tespitler nedeni ile veri olarak sunulmamıştır; çalışma örneklerinde yapılacak kaspaz-8 geni analizlerini takiben bilimsel verilerin değerlendirilmesinin uygun olacağına karar verilmiştir.



5.SONUÇ VE ÖNERİLER

HCC üzerine geliştirilen birçok sistemik tedavi; hayatta kalma sinyallerinin inhibe edilmesi, immün sistemin modülasyonu ve aktive edilmesi ile apoptozun uyarılması temeline dayanmaktadır. HCC için tedavisinde kullanılmak üzere denenmiş birçok immün kontrol noktası inhibitörlerinin ve Sorafenib ile kombine immünoterapi seçeneklerinin yan etkilerinin çok ciddi olması ya da tedavide başarısızlıkla sonuçlanması nedeniyle, HCC tedavisinde immünoterapi seçenekleri sınırlı düzeyde kalmaktadır. Sorafenib sonrası kullanım amacıyla FDA tarafından hızlandırılmış bir şekilde onay alan İpilumab ve Nivolumab kombine immünoterapi seçeneği haricinde kullanılan immünoterapi ajanlarının diğer kanser türlerinde kullanımına göre sınırlı sayıda ve klinik deneme aşamasında olması HCC tedavisinde immünoterapi araştırmalarının önemini göstermektedir. Mevcut tez çalışmasında HCC hücrelerinde apoptozun artırılması ve bağışıklığın uyarılması için bir tedavi protokolü geliştirilmesi amaçlanmıştır. HCC’de birinci basamak kemoterapi ajanı Sorafenib’in ve immün sistemi aktive etmek için Theranekron’un ayrı ayrı ve kombine kullanımında kanser hücrelerinde apoptoza olan etkileri incelenmiştir. Mevcut HCC terapötik durumunun ışığında, Theranekron’u moleküler etki şekliyle birlikte ilk kez bir anti-HCC ajanı olarak denendi. Theranekron’nun HCC tedavisindeki önemi, bu araştırmanın bulgularına göre NK ve/veya CD8⁺T lenfositlerin aktivasyonuna bağlı kaspaz aracılı apoptozun uyarılması şeklinde açıklanabilir. Kanser hücrelerinde bağışıklık sistemi aracılı apoptozda Granzim B aracılı apoptoz önemli bir sinyal yoludur. Theranekron’un elde edilen klinik, biyokimyasal ve ELISA test sonuçlarına göre; Granzim B/kaspaz-3 sinyal yolu üzerinden kanser hücrelerinde apoptozun uyarılmasını sağlamıştır. Perforin/Granzim B aracılı apoptozda apoptozun ana yolunun tespiti amacıyla ara yolda apoptozu güçlendirici olan BID, Kaspaz-7 gibi proteinlerin dahil olup olmadığının tam tespiti için ileri düzeyde ve kapsamlı bir şekilde yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, Theranekron’un gelecekteki ilaç tasarımı için bir anti-HCC ajanı olabileceği ve kemoterapi ilaçları ile kombine kullanılabileceği söylenebilir. Daha da önemlisi, elde edilen sonuçlar Sorafenib’i immünoterapi benzeri etki oluşturan Theranekron ile birleştirmenin bilimsel gerekçesini sağlamaktadır. HCC’de böyle bir rejim, hem tümör anjiyogenezini hedefleyebilmeli hem de Sorafenib’in bağışıklık sistemi üzerindeki "hedef dışı" bir etkisi olan baskılayıcı hücre

fenotiplerini azaltabilmelidir. Ayrıca sonuçlar Theranekron'un bağışıklık sistemi üzerindeki düzenleyici etkisi ile Sorafenib'in "hedef dışı" bağışıklık sistemi stimülasyonunun etkisini ortaya çıkarmıştır. Farklı doz ve kombinasyonlarla yürütülecek deneysel araştırmalar elde edilen sonuçlara farklı katkılar sağlayacaktır. Sorafenib+Theranekron kombinasyonunun yararları tahmin etmeye ve toksik etkilere maruz kalmayı azaltmaya yardımcı olan biyobelirteçler, maliyet, yaşam kalitesi ve hasta sağkalımı üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilecektir. Sorafenib ve Theranekron kombine tedavisi, HCC'li hastalarda antitümör bağışıklığını yeniden harekete geçirmek ve antitümör yanıtlarının büyüklüğünü ve dayanıklılığını iyileştirmek için potansiyel olarak sinerji oluşturabilir ve uygun biyobelirteçler, tedavi sırası seçimlerine yardımcı olabilir ve bu hastalık için paradigma değiştirici olabilir.

6. KAYNAKLAR

- Abbas T, Dutta A, 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer*, 9, 6, 400-14.
- Abouzied MM, Eltahir HM, Abdel Aziz MA, Ahmed NS, Abd El-Ghany AA, Abd El-Aziz EA, Abd El-Aziz HO, 2015. Curcumin ameliorate DENA-induced HCC via modulating TGF- β , AKT, and caspase-3 expression in experimental rat model. *Tumor biology*, 36, 1763-71.
- Aghazadeh S, Yazdanparast R, 2010. Inhibition of JNK along with activation of ERK1/2 MAPK pathways improve steatohepatitis among the rats. *Clinical nutrition*, 29, 3, 381-5.
- Akcakavak G, Ozdemir O, 2023. Effect of Tarantula cubensis alcoholic extract on tumour pathways in azoxymethane-induced colorectal cancer in rats. *Acta Veterinaria Brno*, 92, 1, 79-88.
- Albay MK, Şahinduran Ş, Kale M, Karakurum MÇ, Sezer K, 2010. Influence of Tarantula cubensis extract on the treatment of the oral lesions in cattle with bluetongue disease.
- Alsahli MA, Almatroodi SA, Almatroudi A, Khan AA, Anwar S, Almutary AG, Alrumaihi F, Rahmani AH, 2021. 6-Gingerol, a major ingredient of ginger attenuates diethylnitrosamine-induced liver injury in rats through the modulation of oxidative stress and anti-inflammatory activity. *Mediators of inflammation*, 2021.
- Anonim, Theranekron D6.
- Cancer Today, 2020. Estimated number of new cases, worldwide, both sex, all ages. Erişim. Erişim adresi, https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id=.
- Liver cancer statistics, 2020. Erişim. Erişim adresi, <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/liver-cancer-statistics>.
2022. Erişim. Erişim adresi, https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id=.
- Perforin/Granzyme Apoptosis Pathway, 2022. Erişim. Erişim adresi, <https://www.creative-diagnostics.com/perforin-granzyme-apoptosis-pathway.htm>.
- Anwanwan D, Singh SK, Singh S, Saikam V, Singh R, 2020. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1873, 1, 188314.
- Arboatti A, Lambertucci F, Sedlmeier M, Pisani G, Monti J, Álvarez MdL, Francés D, Ronco M, Carnovale C, 2018. Diethylnitrosamine increases proliferation in early stages of hepatic carcinogenesis in insulin-treated type 1 diabetic mice. *BioMed research international*, 2018.
- Aslan A, Can Mİ, 2014. Milk thistle impedes the development of carbontetrachloride-induced liver damage in rats through suppression of bcl-2 and regulating caspase pathway. *Life Sciences*, 117, 1, 13-8.
- Assar DH, Mokhbatly A-AA, Ghazy EW, Ragab AE, Abou Asa S, Abdo W, Elbially ZI, Mohamed NE, El-Far AH, 2021. Ameliorative effects of Aspergillus awamori against the initiation of hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine in a rat model: regulation of Cyp19 and p53 gene expression. *Antioxidants*, 10, 6, 922.
- Bannasch P, 1996. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma: sequential cellular, molecular, and metabolic changes. *Progress in liver diseases*, 14, 161-97.

- Bartosch B, Thimme R, Blum HE, Zoulim F, 2009. Hepatitis C virus-induced hepatocarcinogenesis. *Journal of hepatology*, 51, 4, 810-20.
- Battaglia S, Benzoubir N, Nobilet S, Charneau P, Samuel D, Zignego AL, Atfi A, Bréchet C, Bourgeade M-F, 2009. Liver cancer-derived hepatitis C virus core proteins shift TGF-beta responses from tumor suppression to epithelial-mesenchymal transition. *PloS one*, 4, 2, e4355.
- Benkerroum N, 2020. Chronic and acute toxicities of aflatoxins: mechanisms of action. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17, 2, 423.
- Bittar C, Shrivastava S, Chowdhury JB, Rahal P, Ray RB, 2013. Hepatitis C virus NS2 protein inhibits DNA damage pathway by sequestering p53 to the cytoplasm. *PloS one*, 8, 4, e62581.
- Block TM, Mehta AS, Fimmel CJ, Jordan R, 2003. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 22, 33, 5093-107.
- Bougoulia M, Triantos A, Koliakos G, 2006. Effect of weight loss with or without orlistat treatment on adipocytokines, inflammation, and oxidative markers in obese women. *HORMONES-ATHENS-*, 5, 4, 259.
- Bråkenhielm E, Veitonmäki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhivotovsky B, Funahashi T, Cao Y, 2004. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 8, 2476-81.
- Cancer IAFRo, Organization WH, 2002. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which Met in Lyon, 12-19 February 2002, IARC, p.
- Cao M, Xu Y, Youn J-i, Cabrera R, Zhang X, Gabrilovich D, Nelson DR, Liu C, 2011. Kinase inhibitor Sorafenib modulates immunosuppressive cell populations in a murine liver cancer model. *Laboratory investigation*, 91, 4, 598-608.
- Casadei-Gardini A, Del Coco L, Marisi G, Conti F, Rovesti G, Ulivi P, Canale M, Frassinetti GL, Foschi FG, Longo S, 2020. 1H-NMR based serum metabolomics highlights different specific biomarkers between early and advanced hepatocellular carcinoma stages. *Cancers*, 12, 1, 241.
- Cervello M, Bachvarov D, Lampiasi N, Cusimano A, Azzolina A, McCubrey JA, Montalto G, 2012. Molecular mechanisms of sorafenib action in liver cancer cells. *Cell cycle*, 11, 15, 2843-55.
- Chen M, Lu S, Zheng H, Xu M, Song J, Yang W, Weng Q, Zheng L, Fan X, Cheng X, 2019. Identification of the Potential Metabolic Pathways Involved in the Hepatic Tumorigenesis of Rat Diethylnitrosamine-Induced Hepatocellular Carcinoma via 1H NMR-Based Metabolomic Analysis. *BioMed Research International*, 2019.
- Chiang S-H, Bazuine M, Lumeng CN, Geletka LM, Mowers J, White NM, Ma J-T, Zhou J, Qi N, Westcott D, 2009. The protein kinase IKK ϵ regulates energy balance in obese mice. *Cell*, 138, 5, 961-75.
- Choi S-H, Hwang SB, 2006. Modulation of the transforming growth factor- β signal transduction pathway by hepatitis C virus nonstructural 5A protein. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 11, 7468-78.
- Chu Y-J, Yang H-I, Wu H-C, Lee M-H, Liu J, Wang L-Y, Lu S-N, Jen C-L, You S-L, Santella RM, 2018. Aflatoxin B1 exposure increases the risk of hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection or alcohol consumption. *European Journal of Cancer*, 94, 37-46.
- Chu YJ, Yang HI, Wu HC, Liu J, Wang LY, Lu SN, Lee MH, Jen CL, You SL, Santella RM, 2017. Aflatoxin B1 exposure increases the risk of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers. *International journal of cancer*, 141, 4, 711-20.
- Chung YM, Khan PP, Wang H, Tsai WB, Qiao Y, Yu B, Larrick JW, Hu MC, 2021. Sensitizing tumors to anti-PD-1 therapy by promoting NK and CD8 $^{+}$ T cells via pharmacological activation of FOXO3. *Journal for immunotherapy of cancer*, 9, 12.

- Comporti M, Arezzini B, Signorini C, Sgherri C, Monaco B, Gardi C, 2005. F 2-isoprostanes stimulate collagen synthesis in activated hepatic stellate cells: a link with liver fibrosis? *Laboratory investigation*, 85, 11, 1381-91.
- Corn PG, El-Deiry WS, 2002. Derangement of growth and differentiation control in oncogenesis. *Bioessays*, 24, 1, 83-90.
- Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, Mosca M, Filliponi F, Brunetto RM, Bonino F, 2002. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *The Journal of experimental medicine*, 195, 1, 35-42.
- De Chiara F, Thomsen KL, Habtesion A, Jones H, Davies N, Gracia-Sancho J, Manicardi N, Hall A, Andreola F, Paish HL, 2020. Ammonia scavenging prevents progression of fibrosis in experimental nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 71, 3, 874-92.
- Dik B, Coskun D, Er A, 2022. Protective Effect of Nerium oleander Distillate and Tarantula cubensis Alcoholic Extract on Cancer Biomarkers in Colon and Liver Tissues of Rats with Experimental Colon Cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 22, 10, 1962-9.
- Ding Z-B, Shi Y-H, Zhou J, Qiu S-J, Xu Y, Dai Z, Shi G-M, Wang X-Y, Ke A-W, Wu B, 2008. Association of autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer research*, 68, 22, 9167-75.
- Eckhart L, Ballaun C, Hermann M, VandeBerg JL, Sipos W, Uthman A, Fischer H, Tschachler E, 2008. Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. *Molecular biology and evolution*, 25, 5, 831-41.
- El-Ashmawy NE, Khedr EG, El-Bahrawy HA, Abd El-Fattah EE, 2017. Sorafenib effect on liver neoplastic changes in rats: more than a kinase inhibitor. *Clinical and experimental medicine*, 17, 185-91.
- El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, Reddy KR, 2008. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 134, 6, 1752-63.
- El-Serag HB, 2020. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *The Liver: Biology and Pathobiology*, 758-72.
- El-Serag HB, Rudolph KL, 2007. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132, 7, 2557-76.
- El Miniawy HM, Ahmed KA, Mansour SA, Khattab MMS, 2017. In vivo antitumour potential of camel's milk against hepatocellular carcinoma in rats and its improvement of cisplatin renal side effects. *Pharmaceutical biology*, 55, 1, 1513-20.
- Elmore S, 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35, 4, 495-516.
- Farazi PA, DePinho RA, 2006. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature Reviews Cancer*, 6, 9, 674-87.
- Fathy A, Eldin MM, Metwally L, Eida M, Abdel-Rehim M, 2009. Diminished absolute counts of CD56dim and CD56bright natural killer cells in peripheral blood from Egyptian patients with hepatocellular carcinoma. *The Egyptian Journal of Immunology*, 16, 2, 17-25.
- Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, 1996. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 15, 7464-9.
- Flecken T, Schmidt N, Hild S, Gostick E, Drognitz O, Zeiser R, Schemmer P, Bruns H, Eiermann T, Price DA, 2014. Immunodominance and functional alterations of tumor-associated antigen-specific CD8+ T-cell responses in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 59, 4, 1415-26.
- Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R, Ikeda M, Lemon SM, Gale M, 2003. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science*, 300, 5622, 1145-8.

- Fujikawa K, Shiraki K, Sugimoto K, Ito T, Yamanaka T, Takase K, Nakano T, 2000. Reduced expression of ICE/caspase1 and CPP32/caspase3 in human hepatocellular carcinoma. *Anticancer research*, 20, 3b, 1927-32.
- Fumarola C, Bonelli MA, Petronini PG, Alfieri RR, 2014. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. *Biochemical pharmacology*, 90, 3, 197-207.
- Futakuchi M, Hirose M, Ogiso T, Kato K, Sano M, Ogawa K, Shirai T, 1999. Establishment of an in vivo highly metastatic rat hepatocellular carcinoma model. *Japanese journal of cancer research*, 90, 11, 1196-202.
- Gao L, Shen J-B, Sun J, Shan B-E, 2007. Effect of the venom of the spider *Macrothele raveni* on the expression of p21 gene in HepG2 cells. *Sheng li xue bao: [Acta Physiologica Sinica]*, 59, 1, 58-62.
- Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA, 1998. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 49, 32608-13.
- Geng M, Xin X, Bi L-Q, Zhou L-T, Liu X-H, 2015. Molecular mechanism of hepatitis B virus X protein function in hepatocarcinogenesis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 21, 38, 10732.
- Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB, 2000. Hepatitis C virus NS5A protein protects against TNF- α mediated apoptotic cell death. *Virus research*, 67, 2, 173-8.
- Giampietri C, Petrungaro S, Coluccia P, D'Alessio A, Starace D, Riccioli A, Padula F, Srinivasula S, Alnemri E, Palombi F, 2003. FLIP is expressed in mouse testis and protects germ cells from apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 10, 2, 175-84.
- Giannitrapani L, Zerbo M, Amodeo S, Pipitone E, Galia M, Li Cavoli TV, Minissale MG, Licata A, Schiavone C, Brancatelli G, 2020. The Changing Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma: Experience of a Single Center. *BioMed Research International*, 2020.
- Green KA, Naylor MJ, Lowe ET, Wang P, Marshman E, Streuli CH, 2004. Caspase-mediated cleavage of insulin receptor substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 24, 25149-56.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M, 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140, 6, 883-99.
- Gültiken N, 2003. Malign meme tümörlü köpeklerde operatif girişime ek olarak uygulanan immunoterapi ve homeopatinin etkisi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum ve
- Gültiken N, Vural MR, 2007. The effect of *Tarantula cubensis* extract applied in pre and postoperative period of canine mammary tumours. *Journal of Istanbul Veterinary Sciences*, 2, 13-23.
- Hai-feng S, Xing-yu Z, Li J, Ya-huan G, Bao-xia L, Wen-juan C, Zheng Z, Ke-jun N, Guang-ning Y, 2018. The expression of SERPINB5 in the process of hepatocellular carcinoma induced by DEN and NMOR in F344 rats/DEN 和 NMOR 联合诱导 F344 大鼠肝癌形成过程中 SERPINB5 的表达变化. *Xi'an jiao tong da xue xue bao. Yi xue ban*, 6, 816.
- Hashimoto E, Tokushige K, 2012. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis: Growing evidence of an epidemic? *Hepatology research*, 42, 1, 1-14.
- Hatipoglu D, Keskin E, 2022. The effect of curcumin on some cytokines, antioxidants and liver function tests in rats induced by Aflatoxin B1. *Heliyon*, 8, 7, e09890.
- Haybaeck J, Zeller N, Wolf MJ, Weber A, Wagner U, Kurrer MO, Bremer J, Iezzi G, Graf R, Clavien P-A, 2009. A lymphotoxin-driven pathway to hepatocellular carcinoma. *Cancer cell*, 16, 4, 295-308.
- Hayes CN, Zhang P, Zhang Y, Chayama K, 2018. Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis following sustained virological response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Viruses*, 10, 10, 531.

- Hecht S, Hoffmann D, 1991. 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a nicotine-derived tobacco-specific nitrosamine, and cancer of the lung and pancreas in humans. *Origins of human cancer: A comprehensive review*, 745-55.
- Higgs M, Lerat H, Pawlowsky J, 2013. Hepatitis C virus-induced activation of β -catenin promotes c-Myc expression and a cascade of pro-carcinogenic events. *Oncogene*, 32, 39, 4683-93.
- Hoek JB, Pastorino JG, 2002. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol*, 27, 1, 63-8.
- Hong G, Xie S, Guo Z, Zhang D, Ge S, Zhang S, Gao W, 2022. Progression-Free Survival of a Patient with Advanced Hepatocellular Carcinoma Treated with Adoptive Cell Therapy Using Natural Killer Cells: A Case Report. *OncoTargets and therapy*, 15, 255.
- <https://gco.iarc.fr/>, (2020).
- Huang H, Zhang XF, Zhou HJ, Xue YH, Dong QZ, Ye QH, Qin LX, 2010. Expression and prognostic significance of osteopontin and caspase-3 in hepatocellular carcinoma patients after curative resection. *Cancer science*, 101, 5, 1314-9.
- Huang J, Li L, Lian J, Schauer S, Vesely PW, Kratky D, Hoefler G, Lehner R, 2016. Tumor-induced hyperlipidemia contributes to tumor growth. *Cell reports*, 15, 2, 336-48.
- Huang W, Zhu G, Huang M, Lou G, Liu Y, Wang S, 2010. Plasma osteopontin concentration correlates with the severity of hepatic fibrosis and inflammation in HCV-infected subjects. *Clinica chimica acta*, 411, 9-10, 675-8.
- Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG, 2007. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis*, 12, 9, 1543-68.
- Hussain S, Schwank J, Staib F, Wang X, Harris C, 2007. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene*, 26, 15, 2166-76.
- Icen H, Sekin S, Simsek A, Kochan A, Tunik S, 2011. The efficacy of *Tarantula cubensis* extract (Theranekron) in treatment of canine oral papillomatosis. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6, 7, 744-9.
- Ikejima K, Honda H, Yoshikawa M, Hirose M, Kitamura T, Takei Y, Sato N, 2001. Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. *Hepatology*, 34, 2, 288-97.
- Iqbal A, Najam R, Simjee S, Khan SS, Ishaqui AA, Ahmed SA, Ahmed Z, Ahmed S, Ahmed S, Osama M, 2022. The Potential of Sorafenib in Preventing Metabolic Syndrome in Rats Fed a High-Fat High-Sucrose Diet. *Journal of Hunan University Natural Sciences*, 49, 8.
- Iqbal J, McRae S, Banaudha K, Mai T, Waris G, 2013. Mechanism of hepatitis C virus (HCV)-induced osteopontin and its role in epithelial to mesenchymal transition of hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 52, 36994-7009.
- Irshad M, Gupta P, Irshad K, 2017. Molecular basis of hepatocellular carcinoma induced by hepatitis C virus infection. *World journal of hepatology*, 9, 36, 1305.
- Ivanov AV, Valuev-Elliston VT, Tyurina DA, Ivanova ON, Kochetkov SN, Bartosch B, Isagulants MG, 2017. Oxidative stress, a trigger of hepatitis C and B virus-induced liver carcinogenesis. *Oncotarget*, 8, 3, 3895.
- Jänicke RU, Sohn D, Totzke G, Schulze-Osthoff K, 2006. Caspase-10 in mouse or not? *Science*, 312, 5782, 1874-.
- Jeong JS, Lee SH, Jung KJ, Choi YC, Park WY, Kim IH, Kim SS, 2003. Hepatotoxin N-nitrosomorpholine-induced carcinogenesis in rat liver: ex vivo exploration of preneoplastic and neoplastic hepatocytes. *Experimental and molecular pathology*, 74, 1, 74-83.
- Ji J, Eggert T, Budhu A, Forgues M, Takai A, Dang H, Ye Q, Lee JS, Kim JH, Greten TF, Wang XW, 2015. Hepatic stellate cell and monocyte interaction contributes to poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 62, 2, 481-95.

- Jian C, Fu J, Cheng X, Shen L-J, Ji Y-X, Wang X, Pan S, Tian H, Tian S, Liao R, 2020. Low-dose sorafenib acts as a mitochondrial uncoupler and ameliorates nonalcoholic steatohepatitis. *Cell metabolism*, 31, 5, 892-908. e11.
- Jiang XP, Jin S, Shao W, Zhu L, Yan S, Lu J, 2022. Saponins of *Marsdenia Tenacissima* promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through damaging mitochondria then activating cytochrome C/Caspase-9/Caspase-3 pathway. *Journal of Cancer*, 13, 9, 2855-62.
- Jindal A, Palejwala V, Ciomei M, Degrassi A, Texido G, Shailubhai K, 2021. Milciclib and sorafenib synergistically downregulate c-Myc to suppress tumor growth in an orthotopic murine model of human hepatocellular carcinoma. *Journal of Translational Science*, 7.
- Jing L, Ruan Z, Sun H, Li Q, Han L, Huang L, Yu S, Wang Y, Guo H, Jiao M, 2019. Epithelial–mesenchymal transition induced cancer-stem-cell-like characteristics in hepatocellular carcinoma. *Journal of Cellular Physiology*, 234, 10, 18448-58.
- Kalathil SG, Hutson A, Barbi J, Iyer R, Thanavala Y, 2019. Augmentation of IFN- γ + CD8+ T cell responses correlates with survival of HCC patients on sorafenib therapy. *JCI insight*, 4, 15.
- Kamada Y, Matsumoto H, Tamura S, Fukushima J, Kiso S, Fukui K, Igura T, Maeda N, Kihara S, Funahashi T, 2007. Hypoadiponectinemia accelerates hepatic tumor formation in a nonalcoholic steatohepatitis mouse model. *Journal of hepatology*, 47, 4, 556-64.
- Kao JT, Chuah SK, Huang CC, Chen CL, Wang CC, Hung CH, Chen CH, Wang JH, Lu SN, Lee CM, 2007. P21/WAF1 is an independent survival prognostic factor for patients with hepatocellular carcinoma after resection. *Liver International*, 27, 6, 772-81.
- Karabacak M, Eraslan G, Kanbur M, Sarıca ZS, 2015. Effects of *Tarantula cubensis* D6 on aflatoxin-induced injury in biochemical parameters in rats. *Homeopathy*, 104, 03, 205-10.
- Keskin E, Hatipoğlu D, 2018. Granzimlerin Apoptotik ve Non-Apoptotik Etkileri. *Kocatepe Veterinary Journal*, 11, 1, 96-103.
- Kew MC, 2011. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 26, 144-52.
- Kim YC, Song K-S, Yoon G, Nam M-J, Ryu W-S, 2001. Activated ras oncogene collaborates with HBx gene of hepatitis B virus to transform cells by suppressing HBx-mediated apoptosis. *Oncogene*, 20, 1, 16-23.
- Kischkel F, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter M, 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal*, 14, 22, 5579-88.
- Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS, 2000. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *The Journal of clinical investigation*, 106, 10, 1239-49.
- Kopnin B, 2000. Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *BIOCHEMISTRY C/C OF BIOKHEMIIA*, 65, 1, 2-27.
- Kurma K, Zeybek Kuyucu A, Roth GS, Sturm N, Mercey-Ressejac M, Abbadessa G, Yu Y, Lerat H, Marche PN, Decaens T, 2022. Effect of Novel AKT Inhibitor Vevorisertib as Single Agent and in Combination with Sorafenib on Hepatocellular Carcinoma in a Cirrhotic Rat Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 24, 16206.
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Trivier E, Akhmedov A, Erusalimsky JD, 2004. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *Journal of cell science*, 117, 11, 2417-26.
- Lee J-O, Kwun HJ, Jung JK, Choi KH, Jang KL, 2005. Hepatitis B virus X protein represses E-cadherin expression via activation of DNA methyltransferase 1. *Oncogene*, 24, 44, 6617-25.

- Lee YI, Kang-Park S, Do S-I, Lee YI, 2001. The hepatitis B virus-X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 20, 16969-77.
- Levrero M, 2006. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene*, 25, 27, 3834-47.
- Lijinsky W, Kovatch RM, Riggs CW, Walters PT, 1988. Dose response study with N-nitrosomorpholine in drinking water of F-344 rats. *Cancer research*, 48, 8, 2089-95.
- Lin H, Wong GL-H, Zhang X, Yip TC-F, Liu K, Tse YK, Hui VW-K, Lai JC-T, Chan HL-Y, Wong VW-S, 2022. U-shaped relationship between urea level and hepatic decompensation in chronic liver diseases. *Clinical and molecular hepatology*, 28, 1, 77.
- Liu Y, Wang W, 2016. Aflatoxin B1 impairs mitochondrial functions, activates ROS generation, induces apoptosis and involves Nrf2 signal pathway in primary broiler hepatocytes. *Animal Science Journal*, 87, 12, 1490-500.
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F, De Oliveira AC, Santoro A, Raoul J-L, Forner A, 2008. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New England journal of medicine*, 359, 4, 378-90.
- Lotfollahzadeh S, Alizadeh MR, Mohri M, Dezfouli MRM, 2012. The therapeutic effect of *Tarentula cubensis* extract (Theranekron®) in foot-and-mouth disease in cattle: a randomised trial in an endemic setting. *Homeopathy*, 101, 03, 159-64.
- Lucken-Ardjomande S, Martinou J-C, 2005. Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane. *Comptes rendus biologiques*, 328, 7, 616-31.
- Machida K, Liu J-C, McNamara G, Levine A, Duan L, Lai MM, 2009. Hepatitis C virus causes uncoupling of mitotic checkpoint and chromosomal polyploidy through the Rb pathway. *Journal of virology*, 83, 23, 12590-600.
- Mantovani S, Oliviero B, Varchetta S, Mele D, Mondelli MU, 2020. Natural Killer Cell Responses in Hepatocellular Carcinoma: Implications for Novel Immunotherapeutic Approaches. *Cancers*, 12, 4.
- Marchese S, Polo A, Ariano A, Velotto S, Costantini S, Severino L, 2018. Aflatoxin B1 and M1: Biological properties and their involvement in cancer development. *Toxins*, 10, 6, 214.
- Marra F, 2002. Leptin and liver fibrosis: a matter of fat. *Gastroenterology*, 122, 5, 1529-32.
- Masui T, Nakanishi H, Inada K-i, Imai T, Mizoguchi Y, Yada H, Futakuchi M, Shirai T, Tatematsu M, 1997. Highly metastatic hepatocellular carcinomas induced in male F344 rats treated with N-nitrosomorpholine in combination with other hepatocarcinogens show a high incidence of p53 gene mutations along with altered mRNA expression of tumor-related genes. *Cancer letters*, 112, 1, 33-45.
- McClain CJ, Hill DB, Song Z, Deaciuc I, Barve S, 2002. Monocyte activation in alcoholic liver disease. *Alcohol*, 27, 1, 53-61.
- McCullough AK, Lloyd RS, 2019. Mechanisms underlying aflatoxin-associated mutagenesis—Implications in carcinogenesis. *DNA repair*, 77, 76-86.
- McKillop IH, Schrum LW, 2005. Alcohol and liver cancer. *Alcohol*, 35, 3, 195-203.
- Mobasher MA, Germoush MO, Galal El-Tantawi H, Samy El-Said K, 2021. Metformin improves biochemical and pathophysiological changes in hepatocellular carcinoma with pre-existed diabetes mellitus rats. *Pathogens*, 10, 1, 59.
- Moeini A, Torrecilla S, Tovar V, Montironi C, Andreu-Oller C, Peix J, Higuera M, Pfister D, Ramadori P, Pinyol R, 2019. An immune gene expression signature associated with development of human hepatocellular carcinoma identifies mice that respond to chemopreventive agents. *Gastroenterology*, 157, 5, 1383-97. e11.
- Mohamed F, 2013. Molecular and cellular study of liver diseases: focusing on the biology of toll-like receptors in liver tumours, UCL (University College London).
- Mohamed F, Dhar D, Shah N, Davies N, Habtesion A, Luong T, Winstanley A, Dhillon A, Oldedamink S, Mookerjee R, 2012. PTU-030 Selective gut decontamination reduces hepatic expression of toll-like receptor (TLR) 4 and development of

- cirrhosis but does not prevent development of hepatocellular carcinoma (HCC). *Gut*, 61, A196.
- Mohamed FE, Al-Jehani RM, Minogue SS, Andreola F, Winstanley A, Olde Damink SW, Habtesion A, Malagó M, Davies N, Luong TV, 2015. Effect of toll-like receptor 7 and 9 targeted therapy to prevent the development of hepatocellular carcinoma. *Liver International*, 35, 3, 1063-76.
- Naito Y, Masaichi C-iL, Kato Y, Nagai R, Yonei Y, 2010. Oxidative stress markers. *Anti-Aging Medicine*, 7, 5, 36-44.
- Norbury CJ, Hickson ID, 2001. Cellular responses to DNA damage. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 41, 1, 367-401.
- Oberoi-Khanuja TK, Murali A, Rajalingam K, 2013. IAPs on the move: role of inhibitors of apoptosis proteins in cell migration. *Cell death & disease*, 4, 9, e784-e.
- Ohkoshi S, Yano M, Matsuda Y, 2015. Oncogenic role of p21 in hepatocarcinogenesis suggests a new treatment strategy. *World journal of gastroenterology*, 21, 42, 12150.
- Osna NA, Clemens DL, Donohue Jr TM, 2005. Ethanol metabolism alters interferon gamma signaling in recombinant HepG2 cells. *Hepatology*, 42, 5, 1109-17.
- Ozcan M, Altay O, Lam S, Turkez H, Aksoy Y, Nielsen J, Uhlen M, Boren J, Mardinoglu A, 2020. Improvement in the current therapies for hepatocellular carcinoma using a systems medicine approach. *Advanced Biosystems*, 2000030.
- Özdemir Ö, Akçakavak G, Tuzcu M, 2022. Effect of *Tarantula cubensis* alcoholic extract and *Nerium oleander* distillate on cell proliferation markers in colon carcinogenesis. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 32, 1.
- Park EJ, Lee JH, Yu G-Y, He G, Ali SR, Holzer RG, Österreicher CH, Takahashi H, Karin M, 2010. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*, 140, 2, 197-208.
- Piguet A-C, Saar B, Hlushchuk R, St-Pierre MV, McSheehy PM, Radojevic V, Afthinos M, Terracciano L, Djonov V, Dufour J-F, 2011. Everolimus Augments the Effects of Sorafenib in a Syngeneic Orthotopic Model of Hepatocellular Carcinoma Sorafenib and Everolimus in HCC. *Molecular cancer therapeutics*, 10, 6, 1007-17.
- Plentz RR, Park YN, Lechel A, Kim H, Nellessen F, Langkopf BHE, Wilkens L, Destro A, Fiamengo B, Manns MP, 2007. Telomere shortening and inactivation of cell cycle checkpoints characterize human hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 45, 4, 968-76.
- Presser LD, Haskett A, Waris G, 2011. Hepatitis C virus-induced furin and thrombospondin-1 activate TGF- β 1: role of TGF- β 1 in HCV replication. *Virology*, 412, 2, 284-96.
- Price JA, Kovach SJ, Johnson T, Koniaris LG, Cahill PA, Sitzmann JV, McKillop IH, 2002. Insulin-like growth factor I is a comitogen for hepatocyte growth factor in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 36, 5, 1089-97.
- Prieto-Domínguez N, Ordóñez R, Fernández A, García-Palomo A, Muntané J, González-Gallego J, Mauriz JL, 2016. Modulation of autophagy by sorafenib: effects on treatment response. *Frontiers in pharmacology*, 7, 151.
- Qu K, Lin T, Wei J, Meng F, Wang Z, Huang Z, Wan Y, Song S, Liu S, Chang H, 2013. Cisplatin induces cell cycle arrest and senescence via upregulating P53 and P21 expression in HepG2 cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 33, 9, 1253-9.
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen E-L, Mizushima N, Ohsumi Y, 2003. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *The Journal of clinical investigation*, 112, 12, 1809-20.
- Ram AK, Vairappan B, Srinivas B, 2020. Nimbolide inhibits tumor growth by restoring hepatic tight junction protein expression and reduced inflammation in an experimental hepatocarcinogenesis. *World journal of gastroenterology*, 26, 45, 7131.
- Ramvalho LN, Porta LD, Rosim RE, Petta T, Augusto MJ, Silva DM, Ramvalho FS, Oliveira CA, 2018. Aflatoxin B1 residues in human livers and their relationship with markers of hepatic carcinogenesis in São Paulo, Brazil. *Toxicology reports*, 5, 777-84.

- Reed JC, Doctor K, Rojas A, Zapata JM, Stehlik C, Fiorentino L, Damiano J, Roth W, Matsuzawa S-i, Newman R, 2003. Comparative analysis of apoptosis and inflammation genes of mice and humans. *Genome research*, 13, 6b, 1376-88.
- Rehermann B, 2013. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells. *Nature medicine*, 19, 7, 859-68.
- Rehermann B, Nascimbeni M, 2005. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Immunology*, 5, 3, 215-29.
- Riley J, Mandel HG, Sinha S, Judah DJ, Neal GE, 1997. In vitro activation of the human Harvey-ras proto-oncogene by aflatoxin B1. *Carcinogenesis*, 18, 5, 905-10.
- Roderburg C, Trautwein C, 2010. Obesity and liver cancer: a key role for interleukin-6 and signal transducer and activator of transcription 3? *Hepatology*, 51, 5, 1850-2.
- Rodríguez-Hernández MA, González R, de la Rosa AJ, Gallego P, Ordóñez R, Navarro-Villarán E, Contreras L, Rodríguez-Arribas M, González-Gallego J, Álamo-Martínez JM, 2019. Molecular characterization of autophagic and apoptotic signaling induced by sorafenib in liver cancer cells. *Journal of cellular physiology*, 234, 1, 692-708.
- Sagnelli E, Macera M, Russo A, Coppola N, Sagnelli C, 2020. Epidemiological and etiological variations in hepatocellular carcinoma. *Infection*, 1-11.
- Saito K, Meyer K, Warner R, Basu A, Ray RB, Ray R, 2006. Hepatitis C virus core protein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by a protective effect involving cellular FLICE inhibitory protein. *Journal of virology*, 80, 9, 4372-9.
- Sakamaki K, Imai K, Tomii K, Miller DJ, 2015. Evolutionary analyses of caspase-8 and its paralogs: deep origins of the apoptotic signaling pathways. *Bioessays*, 37, 7, 767-76.
- Salimi A, Saboji M, Seydi E, 2021. Synergistic effects of Ellagic acid and Sorafenib on hepatocytes and mitochondria isolated from a hepatocellular carcinoma rat model. *Nutrition and Cancer*, 73, 11-12, 2460-8.
- Santos NP, Colaco AA, Oliveira PA, 2017. Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research: A Review. *Tumor Biology*, 39, 3, 1010428317695923.
- Savran M, Asci H, Erzurumlu Y, Ozmen O, Ilhan I, Sırın MC, Karakuyu NF, Karaibrahimoglu A, 2022. Theranekron: A Novel Anti-inflammatory Candidate for Acetic Acid-Induced Colonic Inflammation in Rats. *Molecular Biology Reports*, 49, 9, 8753-60.
- Schultz DR, Harrington Jr WJ. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 345-69.
- Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME, 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *European journal of biochemistry*, 254, 3, 439-59.
- Sherman M, 1999. Screening for hepatocellular carcinoma. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 13, 4, 623-35.
- Shunxi W, Long C, Wanqian L, 2022. Ferroptosis-related genes coordinated with PD-L2 shapes matrix stiffness-driven tumor environment and predict hepatocellular carcinoma development.
- Singal AG, Lampertico P, Nahon P, 2020. Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: New trends. *Journal of Hepatology*, 72, 2, 250-61.
- Singh R, Wang Y, Xiang Y, Tanaka KE, Gaarde WA, Czaja MJ, 2009. Differential effects of JNK1 and JNK2 inhibition on murine steatohepatitis and insulin resistance. *Hepatology*, 49, 1, 87-96.
- Solano-Gálvez SG, Abadi-Chirriti J, Gutiérrez-Velez L, Rodríguez-Puente E, Konstat-Korzenny E, Álvarez-Hernández D-A, Franyuti-Kelly G, Gutiérrez-Kobeh L, Vázquez-López R, 2018. Apoptosis: activation and inhibition in health and disease. *Medical Sciences*, 6, 3, 54.
- Solinas G, Karin M, 2010. JNK1 and IKK β : molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *The FASEB Journal*, 24, 8, 2596-611.
- Soman NR, Wogan GN, 1993. Activation of the c-Ki-ras oncogene in aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma and adenoma in the rat: detection by denaturing gradient

- gel electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 5, 2045-9.
- Song J, Ding W, Liu B, Liu D, Xia Z, Zhang L, Cui L, Luo Y, Jia X, Feng L, 2020. Anticancer effect of caudatin in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Molecular medicine reports*, 22, 2, 697-706.
- Song L, Zhang J-g, Zheng L, Feng X, Hou J, Zhang H-l, Liu S-f, 2020. Establishment of rat liver cancer cell lines with different metastatic potential. *Scientific reports*, 10, 1, 1-11.
- Stupack DG, Teitz T, Potter MD, Mikolon D, Houghton PJ, Kidd VJ, Lahti JM, Cheresch DA, 2006. Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. *Nature*, 439, 7072, 95-9.
- Su X, Zhao J, Li N, Mukesh K, Yang A, 2019. Chemoprotective effects of resveratrol against diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in Wistar rats. *International Journal of Pharmacology*, 15, 5, 549-59.
- Sun B-H, Zhang J, Wang B-J, Zhao X-P, Wang Y-K, Yu Z-Q, Hao L-J, Yang D-L, 2000. Analysis of in vivo patterns of caspase 3 gene expression in primary hepatocellular carcinoma and its relationship to p21WAF1 expression and hepatic apoptosis. *World journal of gastroenterology*, 6, 3, 356.
- Sun Y, Li H, Chen Q, Luo Q, Song G, 2021. The distribution of liver cancer stem cells correlates with the mechanical heterogeneity of liver cancer tissue. *Histochemistry and Cell Biology*, 156, 1, 47-58.
- Şirin N, Elmas L, Seçme M, Dodurga Y, 2020. Investigation of possible effects of apigenin, sorafenib and combined applications on apoptosis and cell cycle in hepatocellular cancer cells. *Gene*, 737, 144428.
- Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, Eishi Y, Hino O, Tanaka K, Mizushima N, 2011. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes & development*, 25, 8, 795-800.
- Tanyeli A, Eraslan E, Guler MC, Sebin SO, Celebi D, Ozgeris FB, Toktay E, 2019. Investigation of biochemical and histopathological effects of tarantula cubensis D6 on lung tissue in cecal ligation and puncture-induced polymicrobial sepsis model in rats. *Medicine Science International Medical Journal*, 8, 3, 644-50.
- Thompson CB, 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 5203, 1456-62.
- Tilg H, Moschen AR, 2010. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*, 52, 5, 1836-46.
- Torres DM, Harrison SA. Nonalcoholic steatohepatitis and noncirrhotic hepatocellular carcinoma: fertile soil. *Seminars in liver disease*, 030-8.
- Tosun S, 2013. Viral hepatitlerin ülkemizdeki değişen epidemiyolojisi. *Ankem Derg*, 27, Supl 2, 128-34.
- Tüzün A, Dalbaşı E, Berrin Arserim N, Karahan S, Çetin A, 2022. Protective Effects of Tarantula Cubensis Extract

(Theranecron) and N-acetylcysteine on the Liver in an

- Experimental Model of Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Lokman Hekim Health Sciences*, 2, 2, 43-9.
- Urtasun R, Lopategi A, George J, Leung TM, Lu Y, Wang X, Ge X, Fiel MI, Nieto N, 2012. Osteopontin, an oxidant stress sensitive cytokine, up-regulates collagen-I via integrin $\alpha V\beta 3$ engagement and PI3K/pAkt/NF κ B signaling. *Hepatology*, 55, 2, 594-608.
- Verna L, Whysner J, Williams GM, 1996. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacology & therapeutics*, 71, 1-2, 57-81.
- Volm M, Zerban H, Mattern J, Efferth T, 1990. Overexpression of P-glycoprotein rat hepatocellular carcinomas induced with N-nitrosomorpholine. *Carcinogenesis*, 11, 1, 169-72.

- Wagayama H, Shiraki K, Sugimoto K, Ito T, Fujikawa K, Yamanaka T, Takase K, Nakano T, 2002. High expression of p21WAF1/CIP1 is correlated with human hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus–associated chronic liver diseases. *Human pathology*, 33, 4, 429-34.
- Wang F, Yoshida I, Takamatsu M, Ishido S, Fujita T, Oka K, Hotta H, 2000. Complex formation between hepatitis C virus core protein and p21Waf1/Cip1/Sdi1. *Biochemical and biophysical research communications*, 273, 2, 479-84.
- Wang F, Zuo Z, Chen K, Gao C, Yang Z, Zhao S, Li J, Song H, Peng X, Fang J, 2018. Histopathological injuries, ultrastructural changes, and depressed TLR expression in the small intestine of broiler chickens with aflatoxin B1. *Toxins*, 10, 4, 131.
- Wang HC, Huang W, Lai MD, Su IJ, 2006. Hepatitis B virus pre-S mutants, endoplasmic reticulum stress and hepatocarcinogenesis. *Cancer science*, 97, 8, 683-8.
- Wang S, Chen L, Liu W, 2022. Matrix stiffness-dependent STEAP3 coordinated with PD-L2 identify tumor responding to sorafenib treatment in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell International*, 22, 1, 1-18.
- Wang W, Jia W-D, Xu G-L, Wang Z-H, Li J-S, Ma J-L, Ge Y-S, Xie S-X, Yu J-H, 2009. Antitumoral activity of rapamycin mediated through inhibition of HIF-1 α and VEGF in hepatocellular carcinoma. *Digestive diseases and sciences*, 54, 10, 2128-36.
- Weber E, Bannasch P, 1994. Dose and time dependence of the cellular phenotype in rat hepatic preneoplasia and neoplasia induced by continuous oral exposure to N-nitrosomorpholine. *Carcinogenesis*, 15, 6, 1235-42.
- Wild C, Turner P, 2002. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*, 17, 6, 471-81.
- Wree A, Kahraman A, Gerken G, Canbay A, 2011. Obesity affects the liver—the link between adipocytes and hepatocytes. *Digestion*, 83, 1-2, 124-33.
- Wu S-C, Chang SC, Wu H-Y, Liao P-J, Chang M-F, 2008. Hepatitis C virus NS5A protein down-regulates the expression of spindle gene Aspm through PKR-p38 signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 43, 29396-404.
- Xia S, Pan Y, Liang Y, Xu J, Cai X, 2020. The microenvironmental and metabolic aspects of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *EBioMedicine*, 51, 102610.
- Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D, 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, 366, 6456, 701-4.
- Yang J, Yan J, Liu B, 2018. Targeting VEGF/VEGFR to modulate antitumor immunity. *Frontiers in Immunology*, 9, 978.
- Yoshino H, Futakuchi M, Cho Y-M, Ogawa K, Takeshita F, Imai N, Tamano S, Shirai T, 2005. Modification of an in vivo lung metastasis model of hepatocellular carcinoma by low dose N-nitrosomorpholine and diethylnitrosamine. *Clinical & experimental metastasis*, 22, 5, 441-7.
- Zhang CL, Zeng T, Zhao XL, Yu LH, Zhu ZP, Xie KQ, 2012. Protective effects of garlic oil on hepatocarcinoma induced by N-nitrosodiethylamine in rats. *International journal of biological sciences*, 8, 3, 363-74.
- Zhu YZ, Zhu R, Fan J, Pan Q, Li H, Chen Q, Zhu HG, 2010. Hepatitis B virus X protein induces hypermethylation of p16INK4A promoter via DNA methyltransferases in the early stage of HBV-associated hepatocarcinogenesis. *Journal of viral hepatitis*, 17, 2, 98-107.

RATLARDA DİETİLNİTROZAMİN İLE OLUŞTURULAN KARACİĞER
KANSERİNDE THERANEKRON VE KEMOTERAPİ
UYGULAMALARININ KARSİNOGENEZİS, APOPTOZİS VE
BİYOKİMYASAL PROFİLE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMALI
DEĞERLENDİRİLME

ORJİNALLİK RAPORU

% 9	% 9	% 2	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	iksadyayinevi.com İnternet Kaynağı	% 1
3	openaccess.firat.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	openaccess.ogu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
5	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
7	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	