

**T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DİETİLNİTRÖZAMİN İLE OLUŞTURULMUŞ
HEPATOSELÜLER KARSİNOM MODELİNDE CHRYSİN VE
APIGENİN'İN POTANSİYEL TERAPÖTİK ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Fatma TEDİK

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Nevin İLHAN

ELAZIĞ

2022

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Metin Kaya GÜRGÖZE

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur

Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nevin İLHAN

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

.....	_____
.....	_____
.....	_____
.....	_____
.....	_____

TEŞEKKÜR

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda; uzmanlık eğitimim süresince; bilgi, beceri, pratik ve teorik birikimlerini bana aktararak mesleki anlamda yetişmemi sağlayan, tez çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen, her konuda bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren ve destek olan, değerli danışman hocam Prof. Dr. Nevin İLHAN'a, sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim sürecimde bilgi, destek ve tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen; sayın Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ'a ve Anabilim Dalımızın öğretim üyeleri değerli hocalarım Prof. Dr. İhsan HALİFEOĞLU, Prof. Dr. Necip İLHAN, Prof. Dr. Ferit GÜRSU, Prof. Dr. Süleyman AYDIN, Prof. Dr. Dilara KAMAN ve Doç. Dr. Selda TELO'ya saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımı gerçekleştirmemde yardım ve destek sağlayan Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hatice ERÖKSÜZ'e, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Biriminde (FÜDAM) tezimin deneysel çalışmalarında yardımcı olan personele teşekkür ederim. Çalışmalarım esnasında yardım ve desteklerini esirgemeyen kıymetli arkadaşlarım Buket BERK, Oğuzhan TATAR, Sefa MÜLAYİM, Merve Sefa YILMAZ ve bölümümüz asistanlarına teşekkür ederim.

Tüm bu süreçte her anlamda yanımda olan, tez sürecimde de büyük katkıları olup, emeğini, bilgi ve birikimlerini esirgemeyen, değerli kıdemlim, kıymetli dostum Dr. Öğr. Üyesi Solmaz SUSAM' a teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde ve uzmanlık eğitimim boyunca da her zaman yanımda olan, desteklerini esirgemeyen canım kardeşlerime ve üzerimdeki emeklerini kelimelerle ifade edemeyeceğim canım anneme ve babama sonsuz sevgi ve teşekkürlerimle...

Dr. Fatma TEDİK

ÖZET

Hepatoselüler karsinom (HCC) kötü prognozlu, hızlı ilerleyen, yüksek ölüm oranlarına sahip bir kanserdir. HCC ile ilişkili mortalite artışı alternatif tedavilere ihtiyaç duyulmasına yol açmaktadır. Doğal ürünlerin ve bunların yapısal analoglarının, tedavi için yeni yollar sağlamaları beklenmektedir. Deneysel HCC modeli oluşturulan bu çalışmada doğal flavonoidlerden apigenin ve chrysin'in tek tek ve kombine uygulanmasının potansiyel terapötik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada sıçanlar 5 gruba ayrıldı (Kontrol, DEN, DEN+Apigenin, DEN+Chrysin, DEN+Kombin grupları). Kontrol grubuna ilk 2 hafta haftada tek doz 0,5 mL PBS, 2 haftalık aranın ardından DMSO oral gavaj yoluyla 4 hafta boyunca haftada 4 kez, sonraki 8 hafta süresince de haftada 3 kez 0,5 mL uygulandı. Kanser modeli oluşturulan gruplara ise ilk 2 hafta, haftada tek doz DEN 150 mg/kg (PBS içinde) intraperitoneal uygulandı. İki haftalık recovery dönemden sonra 2-AAF 4 hafta boyunca haftada 4 kez oral yolla 20 mg/kg dozunda verildi. Çalışmanın devamında 8 hafta boyunca haftada 3 kez oral gavaj yoluyla; DEN grubuna 0,5 ml DMSO, DEN+Apigenin grubuna 50 mg/kg (DMSO'da çözülerek) apigenin, DEN+Chrysin grubuna 50 mg/kg (DMSO'da çözülerek) chrysin, DEN+Kombin grubuna ise aynı dozlarda apigenin ve chrysin birlikte verildi. Uygulamalar sonunda sıçanlar dekapite edilerek alınan kan ve karaciğer doku örneklerinde, histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapıldı.

Kontrollerle karşılaştırıldığında, DEN uygulanan kanser gruplarında; STAT-3, NF- κ B, CIP2A, survivin, annexin-5, smoothened, sonic hedgehog, jagged1 ve notch1 düzeylerinde artış, tedavi gruplarında ise DEN grubuyla karşılaştırıldığında bu parametrelerin tamamında düşüş saptandı. Kaspaz-3 düzeyinde ise; kontrol grubuna kıyasla kanser gruplarında azalma, tedavi gruplarında ise DEN grubuna kıyasla artma tespit edildi. Bu etkiler DEN+Apigenin grubunda en anlamlıydı. Histopatolojik değerlendirmelerde karaciğer dokularında kontrol grubunda normal histolojik yapı gözlemlendi. DEN grubundaki sıçanlarda %62,5 oranında orta-şiddetli fibrozis olmak üzere değişen derecelerde fibrozis, yangısal lezyonlar, rejeneratif nodül oluşumu ve %87,5 oranında orta-şiddetli inflamasyon izlendi. Tedavi gruplarında ise bu lezyonlarda ve inflamasyonda belirgin azalma gözlemlendi. DEN+Apigenin ve DEN+Kombin gruplarında bu azalma en belirgindi.

Sonuç olarak; apigenin, chrysin ve kombine tedavilerinin HCC’de kemoterapötik etkiye sahip oldukları, bu etkiye en fazla apigenin tedavisi ile ulaşıldığı, histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirme sonuçları ile teyit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hepatoselüler karsinom, DEN, 2-AAF, apigenin, chrysin



ABSTRACT

POTENTIAL THERAPEUTIC EFFECTS OF CHRYSIN AND APIGENIN IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA MODEL INDUCED WITH DIETHYLNITROSAMINE

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a rapidly progressive cancer with a poor prognosis and high mortality rates. The increased mortality associated with HCC leads to the need for alternative treatments. Natural products and their structural analogs are expected to provide new avenues for therapy. In this study, in which an experimental HCC model was created, it was aimed to examine the potential therapeutic effects of the individual and combined application of natural flavonoids apigenin and chrysin.

In the study, rats were divided into 5 groups (Control, DEN, DEN+Apigenin, DEN+Chrysin, DEN+Combin groups). The control group was administered 0.5 mL PBS once a week for the first 2 weeks, after a 2-week break, DMSO was administered via oral gavage 4 times a week for 4 weeks, and 0.5 mL 3 times a week for the next 8 weeks. For the cancer model groups, DEN 150 mg/kg (in PBS) intraperitoneal once a week for the first 2 weeks. Done. After a two-week recovery period, 2-AAF was administered orally at a dose of 20 mg/kg 4 times a week for 4 weeks. In the continuation of the study, by oral gavage 3 times a week for 8 weeks; 0.5 ml DMSO to the DEN group, 50 mg/kg apigenin (dissolved in DMSO) to the DEN+Apigenin group, 50 mg/kg chrysin (dissolved in DMSO) to the DEN+Chrysin group, and apigenin and chrysin to the DEN+Combin group at the same doses given together. At the end of the applications, rats were decapitated and histopathological and biochemical evaluations were made in blood and liver tissue samples.

Compared with the controls, in the cancer groups treated with DEN; There was an increase in STAT-3, NF- κ B, CIP2A, survivin, annexin-5, smoothened, sonic hedgehog, jagged1, and notch1 levels, and a decrease in all of these parameters in the treatment groups compared to the DEN group. At the caspase-3 level; There was a decrease in the cancer groups compared to the control group, and an increase in the treatment groups compared to the DEN group. These effects were most significant in the DEN+Apigenin group. In the histopathological evaluations, the normal histological structure was observed in the liver tissues of the control group. Rats in the DEN group had 62.5% moderate-to-severe fibrosis, varying degrees of fibrosis,

inflammatory lesions, regenerative nodule formation, and 87.5% moderate-to-severe inflammation. Significant reductions in these lesions and inflammation were observed in the treatment groups. This reduction was most pronounced in the DEN+Apigenin and DEN+Combin groups.

As a result; It has been confirmed by the results of a histopathological and biochemical evaluation that apigenin, chrysin, and their combined treatments have chemotherapeutic effects in HCC; and that this effect is mostly achieved with apigenin treatment.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, DEN, 2-AAF, apigenin, chrysin



İÇİNDEKİLER

DEKANLIK ONAYI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO LİSTESİ	xii
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
KISALTMALAR LİSTESİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Karaciğer Kanseri	3
1.1.1. Hepatoselüler Karsinom	3
1.1.1.1. Etiyoloji ve Risk Faktörleri	4
1.1.1.2. Epidemiyoloji	5
1.1.1.3. Semptom ve Bulgular	6
1.1.1.4. Tanı	7
1.1.1.5. Tedavi	8
1.1.1.7. Hepatoselüler Karsinom Biyokimyası	10
1.2. Karaciğer	10
1.2.1. Karaciğer Fonksiyonları	12
1.2.1.1. Glukoz Metabolizması	13
1.2.1.2. Lipid Metabolizması	14
1.2.1.3. Protein ve Amino Asit Metabolizması	15
1.2.1.4. Vitamin ve Mineral Depolanması	16
1.2.1.5. Bilirubin Metabolizması	16
1.2.1.6. Safra Üretimi	17
1.2.1.7. İlaç Metabolizması / Metabolik Detoksifikasyon	18
1.2.1.8. Diğer Fonksiyonlar	18
1.3. Karsinogenez	19
1.3.1. İnisiyasyon	20
1.3.2. Promosyon	20
1.3.3. Progresyon	21

1.4. Hepatokarsinojen Maddeler	21
1.4.1. Dietilnitrozamin	22
1.4.2. 2-Asetilaminofloren	24
1.5. Flavonoidler	24
1.5.1. Chrysin	26
1.5.2. Apigenin	28
1.6. Karsinogenezde Sinyal Yolları	31
1.6.1. İnflamatuar Sinyal Yolları	31
1.6.1.1. Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü-3	31
1.6.1.2. Nükleer Faktör Kappa B	32
1.6.2. Protein Fosfataz 2A'nın Kanserli inhibitörü	33
1.6.3. Apoptoz Yolağı	34
1.6.3.1. Survivin	35
1.6.3.2. Kaspaz -3	36
1.6.3.3. Annexin V	37
1.6.4. Hedgehog Sinyal Yolağı	37
1.6.4.1. Smoothened	37
1.6.4.2. Sonic Hedgehog	38
1.6.5. Notch Sinyal Yolağı	38
1.6.5.1. Jagged1	38
1.6.5.2. Notch1	39
2.GEREÇ VE YÖNTEM	40
2.1. Gereç	40
2.1.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırılması	40
2.1.2. Deneyisel HCC Modelinin Oluşturulması ve Tedavi Protokolü	40
2.1.3. Kimyasalların Ajanların Hazırlanması	43
2.1.4. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması	43
2.1.5. Deneyin Sonlandırılması ve Örneklerin Hazırlanması	46
2.2. Yöntem	46
2.2.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	46
2.2.1.1. Serum ve Doku Süpernatant'ta ELISA Ölçümlerinin Yapılması	48
2.2.1.1.1. Serum ve Doku Süpernatant Survivin Düzeylerinin Ölçümü	48

2.2.1.1.2. Serum ve Doku Süpernatant Kaspaz-3 Düzeylerinin Ölçümü	48
2.2.1.1.3. Serum ve Doku Süpernatant Annexin V Düzeylerinin Ölçümü	48
2.2.1.1.4. Serum ve Doku Süpernatant Smoothened Düzeylerinin Ölçümü	49
2.2.1.1.5. Serum ve Doku Süpernatant Sonic Hedgehog Düzeylerinin Ölçümü	49
2.2.1.1.6. Serum ve Doku Süpernatant Jagged1 Düzeylerinin Ölçümü	49
2.2.1.1.7. Serum ve Doku Süpernatant Notch1 Düzeylerinin Ölçümü	49
2.2.2. Western Blot Analizi	49
2.2.2.1. Western Blot Analizi Çalışma Prosedürü	51
2.2.2.1.1 Doku Numunelerinin Homojenize Edilmesi	51
2.2.2.1.2. Doku Numunelerinde Protein Miktarı Ölçümü	52
2.2.2.1.3. Jele Yüklenecek Olan Protein Numunelerinin Hazırlanması	52
2.2.2.1.4. Protein Karışımlarının Dikey SDS-PAGE'e Yüklmesi ve Yürütülmesi	52
2.2.2.1.5. Blotlama, Bloklama ve Antikorlarla İnkübasyon:	53
2.2.2.1.6. Protein Bantlarının Görüntülenmesi ve Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	53
2.2.3. Histopatolojik Analiz	53
2.2.4. İstatistiksel Analiz	54
3. BULGULAR	55
3.1 Apigenin ve Chrysin Tedavisinin Kilo Alımı ve Büyüme Oranı Üzerine Etkisi	55
3.2. Apigenin ve Chrysin Tedavisinin Total Karaciğer Ağırlığı Üzerindeki Etkisi	55
3.3. Apigenin ve Chrysin Tedavisinin Apoptozis Yolağındaki Serum Survivin, Kaspaz-3 ve Annexin-V Üzerindeki Etkisi	56
3.4. Apigenin ve Chrysin Tedavisinin Hedgehog Yolağındaki Serum Smoothened ve Sonic Hedgehog Düzeyleri Üzerine Etkisi	57
3.5. Apigenin ve Chrysin Tedavisinin Notch Sinyal Yolağındaki Serum Notch1 ve Jagged1 Düzeyleri Üzerine Etkisi	59

3.6. Apigenin ve Chrysin Tedavisinin Süpernatant Survivin, Kaspaz-3 ve Annexin-V Düzeyleri Üzerine Etkisi	60
3.7. Apigenin ve Chrysin Tedavisinin Hedgehog Yolağındaki Süpernatant Smoothened ve Sonic Hedgehog Düzeyleri Üzerine Etkisi	61
3.8. Apigenin ve Chrysin Tedavisinin Notch Yolağındaki Süpernatant Jagged1 ve Notch1 Düzeyleri Üzerine Etkisi	62
3.9. Western Blot Analizlerine Ait Bulgular	63
3.9.1. Apigenin ve Chrysin Tedavisinin Doku CIP2A, NF-κB ve STAT-3 Protein Ekspresyon Düzeylerine Etkisi	63
3.10. Histolojik Bulgular	66
3.10.1. Makroskopik Bulgular:	66
3.10.2. Mikroskopik Bulgular	68
4. TARTIŞMA	75
5. KAYNAKLAR	87

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. ELISA çeşitleri ve kullanımı	47
Tablo 2. Jele yüklenecek protein karışımının hazırlanmasını gösteren örnek hesaplama	52
Tablo 4. Apigenin ve chrysin tedavisinin kilo ağırlığı ve büyüme oranı üzerine etkisi	55
Tablo 5. Apigenin ve chrysin tedavisinin süpernatant survivin, kaspaz-3 ve annexin-V düzeyleri üzerine etkisi	60
Tablo 6. Apigenin ve chrysin tedavisinin süpernatant smoothened ve sonic hedgehog düzeyleri üzerine etkisi	61
Tablo 7. Apigenin ve chrysin tedavisinin süpernatant notch1 ve jagged1 düzeyleri üzerine etkisi	62
Tablo 8. Makroskobik derecelendirme	66

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Karaciğer yapısı	11
Şekil 2.	Hepatik lobül yapısı	12
Şekil 3.	Karaciğer fonksiyonları	13
Şekil 4.	Glukoz metabolizması	14
Şekil 5.	Lipid metabolizması	15
Şekil 6.	Protein metabolizması	16
Şekil 7.	Bilirubin metabolizması	17
Şekil 8.	Karsinogenez evreleri	20
Şekil 9.	‘DEN’ kimyasal yapısı	22
Şekil 10.	‘2-AAF’ kimyasal yapısı	24
Şekil 11.	Chrysin kimyasal yapısı	27
Şekil 12.	Apigenin kimyasal yapısı	29
Şekil 13.	HCC’de STAT-3 aktivasyonu	32
Şekil 14.	NF-κB ve karsinogenez	33
Şekil 15.	Apoptoz ekstrinsik ve intrinsik yol	36
Şekil 16.	Çalışma gruplarının belirlenmesi ve uygulanacak işlemler	45
Şekil 17.	ELISA yönteminin çeşitleri	47
Şekil 18.	Apigenin ve chrysin tedavisinin total karaciğer ağırlığı üzerindeki etkisi	56
Şekil 19.	Apigenin ve chrysin tedavisinin apoptozis yolağındaki serum survivin, kaspaz-3 ve annexin-V Üzerindeki Etkisi	57
Şekil 20.	Apigenin ve chrysin tedavisinin hedgehog yolağındaki serum smoothened ve sonic hedgehog düzeyleri üzerine etkisi	58
Şekil 21.	Apigenin ve chrysin tedavisinin notch yolağındaki serum notch1 ve jagged1 düzeyleri üzerine etkisi	59
Şekil 22.	GAPDH ve CIP2A proteinlerine ait bant görüntüleri	63
Şekil 23.	CIP2A protein ekspresyon düzey değişimleri	63
Şekil 24.	GAPDH ve NF-κB proteinlerine ait bant görüntüleri	64
Şekil 25.	NF-κB protein ekspresyon düzey değişimleri	64
Şekil 26.	GAPDH ve STAT-3 proteinlerine ait bant görüntüleri	65
Şekil 27.	STAT-3 protein ekspresyon düzey değişimleri	65
Şekil 28.	Sakrifikasyon işlemleri	67

Şekil 29. KC boyutlarının ölçümü	67
Şekil 30. Kontrol grubu KC genel görünümü	67
Şekil 31. DEN grubu KC görüntüleri	67
Şekil 32. DEN+Chrysin grubu KC görüntüsü	68
Şekil 33. DEN+Apigenin grubu KC görüntüsü	68
Şekil 34. DEN+Kombin grubu KC görüntüsü	68
Şekil 35. Kanser grubundan bir sıçanda Akciğer görüntüsü	68
Şekil 36. Kontrol Grubu; normal histolojik görünüm	69
Şekil 37. DEN grubu histopatolojik görünüm	70
Şekil 38. DEN grup; Şiddetli perilobuler fibrozis (mavi renkli septalar) +HCC.	70
Şekil 39. DEN grup; Berrak hücreli HCC forma eşlik eden fibrolamellar yapılar	71
Şekil 40. DEN+Chrysin grubu histopatolojik görünüm	71
Şekil 41. DEN+Apigenin grubu histopatolojik görünüm	72
Şekil 42. DEN+Kombin Grubu; Fokal nekrotik odaklar ve minimal fibrotik değişimler	72
Şekil 43. DEN+Kombin grubu; Minimal fibrozis	73
Şekil 44. Gruplarda inflamasyon şiddeti	73
Şekil 45. Gruplarda fibrozis skoru	74

KISALTMALAR LİSTESİ

AAF	: Asetaminofloren
AASLD	: Amerikan Karaciğer Hastalıkları Çalışma Derneği
AAV2	: Adeno-ilışkili virüs 2
AFP	: Alfa fetoprotein
ALP	: Alkalen fosfataz
ALT	: Alanin aminotransferaz
AMR	: Antimikrobiyal direnç
AST	: Aspartat aminotransferaz
BCLC	: Barselona-Klinik-Karaciğer Kanseri
BT	: Bilgisayarlı tomografi
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CDK1	: Sikline bağımlı kinaz 1
CK-19	: Sitokeratin 19
COX2	: Siklooksijenaz 2
CSC	: Kanser kök hücreleri
CYP450	: Sitokrom p450
DEN	: Dietilnitrozamin
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EMT	: Epitelyal-mezenkimal geçiş
FB	: Fenobarbital
GLUT	: Glucose transporter
GP73	: Golgi protein 73
GPC3	: Glypican-3
HBV	: Hepatit B virüsü
HCC	: Hepatoselüler karsinom
HCV	: Hepatit C virüsü
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
HH	: Hedgehog
IAP	: Apoptoz ailesi inhibitörleri
ICC	: İntrahepatik kolanjiokarsinom
IFN-γ	: İnterferon gama

INR	: International Normalized Ratio
JAK	: Janus kinazlar
KC	: Karaciğer
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
miRNA	: mikroRNA
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
NAA	: N-asetillenmiş amino asit
NAFLD	: Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı
NASH	: Non-alkolik steatohepatit
NCCN	: National Comprehensive Cancer Network
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NK	: Natural Killer
PP2A	: Protein fosfataz 2A
Ptch	: Patch reseptör
Raf	: Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	: Rat sarcoma
SHH	: Sonic Hedgehog
SMO	: Smoothened
STAT	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
TACE	: Transarteriyel kemoembolizasyon
TAG	: Triaçilgliserol
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör alfa
TNM	: Tümör-lenf nodu-metastaz
TRAIL	: Tümör Nekroz Faktörü ile İlişkili Apoptoz-İndükleyici Ligand
UGT	: Üridin difosfat glukuroniltransferaz
USG	: Ultrasonografi

1. GİRİŞ

Primer karaciğer kanseri, dünya çapında en sık teşhis edilen altıncı kanser türü olup kanser ölümlerinin dördüncü önde gelen nedenidir. Hepatoselüler karsinom (HCC) ise tüm primer karaciğer kanseri vakalarının %75-95'ini oluşturur (1). Hemen hemen tüm HCC vakaları, karaciğer fibrozu veya kronik karaciğer yaralanmalarından gelişen siroz ile ilişkilidir. Altta yatan her durum farklı kanserojen yollar içerebilmesine rağmen, fibroz ve siroz insan karaciğer dokusunun karsinogenezinde çok önemli kabul edilir (2).

Kanser insidansı ve ölüm oranlarındaki genel düşüş eğilimine rağmen HCC ile ilişkili mortalite artmaya devam etmektedir. Son on yılda yıllık %2'den fazla artmıştır. Terapötik gelişmelere rağmen, uzak metastazlı hastalarda 5 yıllık sağkalım oranı %2,4'tür. HCC hastalık yükü ve kötü prognozu nedeniyle, büyük bir küresel sağlık sorunu olarak kabul edilir (1, 3). Cerrahi, karaciğer transplantasyonu, radyofrekans ablasyon ve kemoterapi HCC'yi tedavi etmek için kullanılabilir. Ancak, çok az erken evre karaciğer kanseri teşhis edilebilir ve başarılı bir şekilde tedavi edilebilir. İleri evre HCC için uygun ilaç veya tedavi hala yoktur. Kullanılan tedavilerin çoğu, ciddi yan etkileri olan aynı zamanda seçici olmayan sitotoksik moleküllerdir (4). Bundan dolayı, tedavi için düşük toksisiteli, yüksek etkili yeni antitümör ilaçlara gereksinim vardır. Doğal kaynaklar ise antitümör ilaçlar geliştirmek için önemli imkan sunarlar (5). Önceki yıllarda, potansiyel antikanser aktivitesi olan doğal bileşikler keşfetmek için birçok araştırma yapıldı. 1940 ile 2002 yılları arasında onaylanan antikanser ilaçların %69'u ya doğal ürünlerdir ya da doğal ürünlerden elde edilen bilgilere dayalı geliştirilmiştir ki bu oran ilaç geliştirmenin diğer yollarından çok daha yüksektir. Modern tıp biliminin temelini oluşturan ve yeni ilaçlar için büyük bir kaynak sağlayan bitkilerin kanser tedavisinde kullanılması kaçınılmaz görünmektedir (6).

HCC'nin patofizyolojik arka planı hala tam olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle, insan HCC'sine benzer siroz özellikleri olan veya olmayan ideal deneysel HCC modellerini belirlemek gereklidir (7). *In vivo* deneysel modeller HCC çalışmasında önemli bir rol oynamaktadır. Genetik, transgenik veya koşullu nakavt deneysel modeller esas olarak HCC geliştirme çalışmalarında kullanılır (7). Farelerde kimyasallar tarafından HCC indüksiyonu, *in vivo* farmakolojik aktiviteyi test etmek için altın standart preklinik model olmaya devam etmektedir. Bu modelin birçok

avantajından biri de, insanlarda HCC gelişimine benzeyen yaralanma-fibrozis-malignite döngüsünü taklit etmesidir (8). Deneysel olarak indüklenen HCC modellerinde, başlatma ve promosyon temel adımlardır. Dietilnitrozamin (DEN) ile başlatmanın ardından bir promotör olarak 2-Asetilaminofloren (2-AAF) kullanılmasının, deneysel olarak indüklenen HCC modelinin başarılı bir şekilde geliştirilmesini sağladığı bildirilmiştir (9). DEN, kanserojen N-nitroso bileşikler ailesinin temsili bir kimyasalıdır, karaciğer hücrelerinde DNA'da tek zincir kırılmalarına neden olur. Ayrıca DNA onarımında yer alan çeşitli enzimlerde değişikliklere neden olur ve genellikle deney hayvanlarında hepatoselüler karsinomu indüklemek için kullanılır (10). 2-AAF, sentetik arilamin yapısındaki 2-amino floranın asetilasyonu sonucu oluşur. 2-AAF, detoksifikasyon reaksiyonlarının ikinci aşamasında etki eder ve DEN'in ilk adımından sonra DNA'da ikinci kez guanin bazına bağlanır ve toksik etki yaratır. Bu toksik etki sırasıyla preneoplastik, neoplastik, benign neoplazm ve malign neoplazm şeklinde meydana gelmekte ve mutasyonlara neden olmaktadır (11).

Flavonoidler, meyve, sebze ve diğer bitkilerde yaygın olarak bulunabilen doğal bir polifenoldür. Aynı zamanda birçok geleneksel Çin ilaçlarının da aktif bileşenidir. Çalışmalarla flavonoidlerin antiinflamatuvar, antioksidan ve antitümör etkiler gibi çeşitli farmakolojik aktiviteler sergilediği gösterilmiştir. Ayrıca, flavonoidler apoptozu indükleyebilir ve HCC, meme kanseri, akciğer kanseri ve diğer kanser hücrelerinin proliferasyonunu doza ve zamana bağlı bir şekilde inhibe edebilir (5). Flavonoidlerin en çok ilgi çeken ve araştırılan özelliklerinden biri, kanser önleme ve tedavisine katkılarıdır (6).

Normal kök hücre homeostazını yöneten moleküler sinyal yolları, sıkı bir şekilde düzenlenir. Bu yolların birçoğu insan kanserlerinde ve deneysel tümörögenез modellerinde anormal şekilde aktive edilir veya bastırılır. Bu tür anormallikler, kanser kök hücrelerinin (CSC) kendini yenileme, çoğalma, hayatta kalma ve farklılaşma özelliklerine katkıda bulunur. Genel olarak bu yollar, iç ve dış moleküler sinyal ve düzenleyici unsurlar ile karmaşık bir şekilde düzenlenir (12).

Çalışmamızda DEN ve 2-AFF uygulayarak deneysel hepatosellüler kanser modeli oluşturmayı ve ardından kemoterapötik rolü bulunan, doğal bileşik flavonoidlerden olan chrysin ve apigenin'in inflamasyon, apoptozis ve Hedgehog-

Notch sinyal yolları ile ilgili seçili parametreler üzerindeki etkilerini araştırmayı hedefledik.

1.1. Karaciğer Kanseri

Karaciğer kanseri dünya genelinde en yaygın beşinci ve en ölümcül üçüncü kanserdir. Karaciğer kanseri ve buna bağlı ölümlerin insidansı Amerika Birleşik Devletleri'nde son 20 yılda artış göstermiştir (13). Karaciğer hastalıkları insidansı gelişmekte olan ülkelerde daha fazla olmakla birlikte risk faktörleri olarak hepatit B virüsü (HBV), hepatit C virüsü (HCV), yağlı karaciğer hastalığı, alkole bağlı siroz, sigara, obezite, diyabet, aşırı demir yüklenmesi ve çeşitli diyet maruziyetleri gösterilebilir. Karaciğer kanserinin prognozu kötüdür. Hastaların yalnızca %5-15'i cerrahiye uygundur, bu da sadece erken evredeki hastalar için geçerlidir (14). Başlıca intrahepatik kolanjiokarsinom (ICC) ve hepatosellüler karsinom (HCC) olmak üzere iki tip primer karaciğer kanseri türü bulunur, diğer türler olan anjiyosarkom, hemanjiyosarkom ve hepatoblastom daha az sıklıkta görülürler. ICC, safra kanalları kaynaklı iken, HCC ise karaciğerin ana parankimal hücreleri hepatositlerden kaynaklanmaktadır (15). Her ne kadar meme, özafagus, mide, pankreas, akciğer, böbrek ve diğer bazı kanserler karaciğere metastaz yapsa da, çoğu sekonder karaciğer kanseri kolorektal kanser kaynaklıdır (15).

1.1.1. Hepatosellüler Karsinom

Hepatosellüler karsinom, fibrozis olarak başlayıp, siroza yol açan ve kanserle sonuçlanan kronik bir karaciğer hastalığıdır. Yüksek malignite, hızlı ilerleme ve kötü prognoz özellikleriyle en agresif klinik durumlardan biridir (7).

HCC, dünya çapındaki primer karaciğer kanserlerinin >%80'inden sorumludur. Ağır bir hastalık yükü doğurur ve dünyanın birçok yerinde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir (16). Hepatokarsinogenez adım adım gelişir, viral enfeksiyonlar veya steatozun neden olduğu kronik karaciğer iltihabı, karaciğer hasarına, fibroz ve siroza ve son olarak da HCC'ye neden olur (13). Moleküler düzeyde önemli onkogenler (örn. MYC) ve tümör baskılayıcı genler (örn. TP53, E cadherin, RASSF1 ve PTEN) yapısal genetik değişiklikler ve birkaç anormal işlev gören sinyal yolu (örneğin; Ras, epitelyal büyüme faktörü reseptörü ve insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü 1 sinyali) nedeniyle mutasyona uğramış veya anormal şekilde

düzenlenmişlerdir. Hücresel düzeyde HCC, olgun hepatositlerin malign transformasyonundan sonra veya intrahepatik kök hücrelerden gelişebilir. Histolojik düzeyde, sirotik nodüller, düşük dereceli displastik nodüller ve yüksek dereceli displastik nodüller dahil fenotipik olarak anormal prekürsör karaciğer lezyonları, başlangıçta erken evre ve sonunda ilerlemiş evre HCC oluşturmak üzere yavaş yavaş gelişir. Bu süreç biyolojik anlamda süreklilik arzeder ve karaciğerin farklı bölümlerinde aynı anda çeşitli oranlarda meydana gelebilir (17).

1.1.1.1. Etiyoloji ve Risk Faktörleri

HCC'nin tümörogenezi, çoklu risk faktörlerini içeren karmaşık bir süreçtir. Hücre döngüsünde bozulma, DNA metilasyon değişikliği, kromozomal instabilite, immünmodülasyon, epitelden mezenkimal'e değişme, HCC kök hücrelerinde artış ve mikroRNA'da (miRNA) düzensizlik gibi çoklu moleküler bozuklukları içerir (15, 18).

Hastalığın mekanizması altta yatan etiyojiye bağlı olarak değişse de olağan karaciğer hasarı dizisi; kronik inflamasyon, fibroz, siroz ve sonunda HCC'dir (15). HCC gelişimi için siroz (fibrozisin neden olduğu kronik karaciğer hasarı), HBV, HCV enfeksiyonu, alkol kullanımı ve metabolik sendrom gibi bir takım risk faktörleri tanımlanmıştır. Tütün soluma ve aflatoksin B1 (tümör baskılayıcı gen TP53'teki mutasyonlarla ilişkili gıda maddelerinde bulunan bir mantar kanserojeni) alımı tanımlanmış diğer risk faktörleridir (19).

Aspergillus mantarı tarafından üretilen mikotoksin olan aflatoksin B1'in diyetle alımı en çok Asya'da ve Afrika'nın tropikal bölgelerinde yaygındır. Aflatoksin B1 genellikle kontamine tahıllarla yutulur ve hepatik sitokrom p450 (CYP450) tarafından metabolize edilir. Tütün içmek HCC'nin başlamasına karaciğer fibrozunu hızlandırarak katkıda bulunur ve uzun süreli tütün kullanımı HCC ile yakından ilişkilidir. Sigara içmek hepatokarsinojenlerin (örneğin, asetilaminoflore ve 4-aminobifenil) vücuda girmesine neden olur, bu da proinflamatuvar sitokinlerin üretimini artırarak ve oksidatif stresi indükleyerek lipid peroksidasyonunu tetikler (20).

Çoğu HCC vakası (yaklaşık %80–90) siroz zemininde gelişir (15). Siroz ile ilişkili HCC nedenleri arasında alkol kullanımı, non-alkolik steatohepatit (NASH), alfa-1 antitripsin eksikliği ve hemokromatoz bulunur. Ancak HCC, otoimmün hepatit,

Wilson hastalığı ve kolestatik karaciğer hastalıklarının neden olduğu sirozda daha az yaygındır (19). Son çalışmalar, özellikle sirozu olmayan bireylerde, hastalığın yeni bir nedeni olarak adeno-ilişkili virüs 2 (AAV2) ile enfeksiyona işaret etmiştir (19).

Risk faktörlerinin prevalansı, HCC'nin dünya çapındaki dağılımına göre değişmektedir. Kronik HBV enfeksiyonu ve aflatoksin B1, Çin ve Hindistan gibi gelişmekte olan bölgelerde başlıca risk faktörleridir. Gelişmiş bölgelerde HCC, öncelikle HCV ve nonalkolik yağlı karaciğer hastalığının (NAFLD) neden olduğu sirozdan gelişir (18).

İnsan HCC'sinin moleküler analizi, TP53, β -katenin, ErbB reseptör ailesi üyeleri, MET ve ligandı hepatosit büyüme faktörü (HGF), p16(INK4a), E-kadherin ve siklooksijenaz 2 (COX2) dahil birçok anahtar onkogen ve tümör baskılayıcının düzensiz çalışmasıyla sonuçlanan genetik ve epigenetik değişiklikleri göstermiştir (21). DNA metilasyonunun kaybı, HCC progresyonunda potansiyel tanısal belirteç olarak işaret edilmiştir. Birkaç klinik öncesi çalışma, kodlanamayan RNA (ncRNA)'ları modüle ederek tümör baskılanmasının sağlanabileceğini göstermiştir (22-24).

1.1.1.2. Epidemiyoloji

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 istatistiklerine göre HCC, insidansla altıncı ve mortalitede dördüncü sırada yer almış ve yılda yaklaşık 840.000 yeni vakaya ve 780.000'den fazla ölüme neden olmuştur (18). Kanserden ölüm oranı 1991 yılından bu yana önemli ölçüde düşmesine rağmen, 2016 kanser istatistiklerine göre karaciğer kanserinden kaynaklanan ölümler hala artmaktadır. HCC insidans oranları da son yıllarda artmaktadır ve 2030'a kadar da benzer eğilimlerin olması beklenmektedir (25, 26).

HCC insidansı coğrafi olarak değişir ve çoğu HCC vakası Doğu Asya (vakaların %54,8'ini oluşturur) ve Güneydoğu Asya (vakaların %10,8'ini oluşturur) gibi daha az gelişmiş bölgelerde görülür (18). HCC'nin en yüksek insidans oranları, HBV enfeksiyonunun yüksek prevalansı nedeniyle Asya ve Sahra altı Afrika'dadır. Kuzey Amerika, Japonya ve Avrupa'da HCV, HCC'nin önde gelen nedenidir (19).

Erkeklerde en çok görülen dördüncü kanser ve kansere bağlı ölümlerin ikinci en sık nedenidir. Erkeklerin, kadınlara oranla karaciğer kanseri geliştirme riski daha

yüksektir. Küresel Erkek: Kadın HCC insidans oranı 2,8:1'dir (15). Çalışmalar, östrojenin HCC'yi önlediğini ancak androjenin HCC'de promotör etkisinin olduğunu göstermektedir. Ayrıca interlekin-6 (IL-6)'nın östrojen aracılı inhibisyonu, östrojenin HCC'ye karşı koruyucu etkisinin bir mekanizması olarak düşünülmüştür (20). Kadınlarda görülen en yaygın dokuzuncu kanserdir, ancak kadınlarda kansere bağlı ölümlerin dördüncü önde gelen nedenidir. Bu da yüksek ölüm oranını göstermektedir (15).

HCC'nin başlangıç yaşı dünyanın farklı yerlerinde değişiklik göstermektedir. HCC, ortalama başlangıç yaşının 60 yaş üzerinde olduğu Japonya, Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinde yaşamın ilerleyen dönemlerinde ortaya çıkma eğilimindedir. Buna karşılık, Asya'nın bazı bölgelerinde ve çoğu Afrika ülkesinde HCC, yaygın olarak 30-60 yaş aralığında teşhis edilir (16).

HCC, önlenmesi mümkün olan kanserlerden biridir. HBV prevalansının yüksek olduğu popülasyonlarda HBV aşısının, HCC insidansını azalttığı gösterilmiştir. Nükleotid ve nükleozid analogları ile HBV için antiviral tedavi, tedavi edilen hasta gruplarında HCC riskini azaltır fakat ortadan kaldırmaz. Benzer şekilde, interferon ile antiviral tedavi, HCV ilişkili kronik karaciğer hastalığı olanlarda HCC riskini azaltabilir. Ayrıca, statin kullanımı ve kahve tüketimi, popülasyon çalışmalarında düşük HCC riski ile ilişkili bulunmuştur. Gelecekte, karaciğere yönelik antifibrotik tedaviler de HCC gelişme riskini azaltabilir (19).

1.1.1.3. Semptom ve Bulgular

Hepatosellüler karsinomun prezantasyonu, tümörün evresine ve arka plandaki siroza bağlıdır. HCC'nin klinik prezentasyonunun medyan yaşı 69'dur. Sirozla ilişkili olmayan HCC, hastalığın erken evresinde asemptomatik olabilir.

Sirotik HCC hastaları, ilerleyen sarılık, kaşıntı, hepatik ensefalopati, asit, üst karında palpe edilebilen kitle, ateş, halsizlik, kilo kaybı, erken doyma, abdominal distansiyon ve kaşeksi dahil olmak üzere dekompanse karaciğer yetmezliği semptomlarıyla başvurabilir. Karın ağrısı HCC için en yaygın başvurudur (27).

HCC hastalarında paraneoplastik sendrom hipoglisemi, eritrositoz, hiperkalsemi, diyare ve *pemfigus foliaceus*, pitriyazis rotunda, dermatomiyozit ve Leser-trelat belirtisi gibi deri bulguları olabilmektedir. Semptomatik hastalar varis

kanaması, intraperitoneal kanama, tıkanma sarılığı, piyojenik karaciğer apsesi ve hepatik ensefalopati ile başvurabilir.

HCC'nin en sık ekstrahepatik metastazı sırasıyla akciğer, intraabdominal lenf nodu, kemik ve adrenaledir (27).

1.1.1.4. Tanı

HCC'nin prognozu, büyük ölçüde tümörün tespit edildiği evreye bağlıdır. Bu nedenle HCC yönetiminde erken tespit ve doğru tiplendirme çok önemlidir (17).

Alfa fetoprotein (AFP), HCC'nin izlenmesi ve teşhisi için en yaygın kullanılan biyobelirteçtir. HCC izleminde mevcut olan tek “faz V” biyobelirteçtir ve ultrason taraması, çok fazlı bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ile birlikte kullanılır. AFP ilk olarak 1960'larda HCC için serolojik bir belirteç olarak tanıtılmış olup şu anda dünya çapında HCC için en yaygın kullanılan biyobelirteçtir. Ancak, HCC'yi saptamak için duyarlılığı zayıftır (%47-64) ve erken HCC'yi doğru bir şekilde saptamada etkisizdir. Düşük seviyeli bir eşik değeri kullanılsa bile (yani, 10–20 ng/mL), HCC'yi teşhis etmek için AFP'nin duyarlılığı az ve özgüllüğü de hala yetersizdir (20, 25). Ayrıca, %15-30 hastada ileri HCC'de serum AFP seviyeleri normal kalır ve yükselmesinin hepatit ve siroz gibi iyi huylu karaciğer hastalıklarında da görülebileceği bildirilmektedir. Bu nedenle, Amerikan Karaciğer Hastalıkları Çalışma Derneği (AASLD) Uygulama Kılavuzları Komitesi, HCC'nin erken tespiti için artık AFP'yi önermemektedir (25).

Görüntüleme, HCC yönetiminde önemli bir rol oynar. Günümüzde HCC'nin erken teşhisi için çoğunlukla görüntüleme ve serolojik testler kullanılmaktadır. Bilgisayarlı tomografi ve MRI teknolojisindeki gelişmeler HCC'nin tanısal performansını büyük ölçüde iyileştirmiş olsa da, bu prosedürler günümüzde yaygın tarama için çok pahalıdır (25, 28). Ultrasonografi (USG), HCC taraması için tercih edilen yöntemken, kontrastlı US (CEUS), multiple faz bilgisayarlı tomografi ve çok fazlı MRI HCC teşhisi için önerilir (28).

National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Klinik Uygulama Kılavuzları, HCC'ye dönüşme riski yüksek olan hastaların (yani, herhangi bir etiyolojiye sahip sirozu olan hastalar) sürveyans için yılda iki kez abdominal USG ve AFP ile taranmasını önerir. Mevcut kullanımda birincil radyolojik tarama yöntemi

olan ultrason, operatör bağımlılığı ve küçük sirotik karaciğerde kötü huylu nodülleri iyi huylu nodüllerden ayırt etme yeteneğinin zayıf olmasıyla sınırlıdır (25).

Zaman içinde, HCC için Golgi protein 73 (GP73), Glypican-3 (GPC3), sitokeratin 19 (CK-19) gibi ek tümör belirteçleri önerilmiştir. GP73 HCC'nin potansiyel belirteci olarak kabul edilir ancak karaciğer parankimal tümörü olan hastalarda da serum seviyeleri artabilir. Bu nedenle GP73, HCC ve iyi huylu karaciğer hastalığını ayırt etmede uygun değildir. Liu ve arkadaşları serum GPC3 düzeylerinin HCC hastalarında arttığını bulmuştur. Ancak GPC3, benign hastalıkları erken HCC'den ayırt etmek için duyarlı değildir. Çalışmalar, CK19 ekspresyonunun HCC'deki metastaz ve mikrovasküler invazyon gibi, agresif davranışla ilişkili olduğunu göstermiştir bu da CK-19'un HCC hastalarında sağkalım ve nüksün bir göstergesi olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Fakat bu belirteçlerin HCC teşhisinde klinik uygulamalar için yeterli etkinlikte olmadığı düşünülmektedir (29-31).

HCC sınıflandırması, çoğu neoplazmaların aksine TNM (tümör-lenf nodu-metastaz) sistemine değil, Avrupa ve Amerika klinik uygulama kılavuzları tarafından onaylanan Barselona-Klinik-Karaciğer Kanseri (BCLC) sınıflandırmasına dayanmaktadır. Bu evreleme sistemi, beş prognostik alt sınıf tanımlar ve her evre için özel tedaviler belirler (32).

1.1.1.5. Tedavi

Hepatosellüler karsinomun tedavisi genellikle karmaşıktır, çünkü siroz HCC'li kişilerin %80'i ile ilişkili başlıca klinik risk faktörüdür (7). Yine de, son 10 yılda HCC tedavisinde önemli ilerlemeler olmuştur. HCC cerrahi rezeksiyon, karaciğer transplantasyonu, termal ablasyon gibi ablatif teknikler ile tedavi edilebilir. Diğer bazı tedaviler ise, tümör ilerlemesini yavaşlatmaya çalışır. Bunlar transarteriyel kemoembolizasyon (TACE), transarteriyel radyoembolizasyon (TARE), stereotaktik vücut radyasyon tedavisi (SBRT) ve sistemik kemoterapi'dir (26). Bu seçenekler arasında sadece cerrahi rezeksiyon ve karaciğer transplantasyonu potansiyel küratif yaklaşımlar olarak kabul edilmektedir. Erken evre HCC'yi tedavi etmek için yaklaşık %70-80'lik 5 yıllık bir sağkalım ile en iyi sonuçları veren ilk seçenek cerrahi rezeksiyon veya karaciğer naklidir. Bununla birlikte, hastaların çoğu ilerlemiş hastalık ile başvuracağından, potansiyel olarak sadece %15 hasta iyileştirici tedaviler için

uygundur (26, 33). Ayrıca ameliyat sonrası karaciğer yetmezliğine neden olma riski nedeniyle cerrahi rezeksiyon potansiyeli sınırlıdır. Karaciğer transplantasyonu, uzun süreli sağkalım için en iyisidir, ancak organ yetersizliği nedeniyle tüm hastalara sağlanamaz (7).

HCC'li hastaların yaklaşık %50-60'ı, çoğunlukla ileri evrededir ve sistemik tedaviler kullanılır. Son 5 yılda bu alanda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. 2017 yılına kadar sorafenib, ileri HCC için FDA onaylı tek sistemik tedavi iken 2018'de bir faz II çalışması, birinci basamakda ileri evre HCC için daha sonra onaylanan lenvatinibin etkinliğini de ortaya koymuştur (26, 33). Diğer solid kanserlerin aksine, sistemik kemoterapinin rutin olarak kullanılmamasının nedeni HCC'nin, dihidropirimidin dehidrojenaz, P-glikoprotein gen ürünü ve çoklu ilaç direnç geni MDR-1'in aşırı ekspresyonu ile kemoterapiye dirençli bir tümör olmasıdır. Ayrıca, ilerlemiş HCC'li hastalarda genellikle altta yatan önemli karaciğer hastalığı varlığı, sistemik kemoterapiye karşı zayıf tolere edilebilirliğin nedenidir (33).

Erken evre (0 ve A) hastalarda 36 aylık doğal yaşam beklentisinin aksine, potansiyel olarak iyileştirici tedaviler (rezeksiyon, transplantasyon veya lokal ablasyon), yaklaşık %40 hastada 60 ay ve üzeri medyan sağkalım oranları sağlayabilmektedir. Daha ileri hastalığı olanlarda, randomize kontrollü çalışmalarda sadece iki tedavi sağkalım avantajı göstermiştir. Orta evredeki (evre B) karaciğer fonksiyonu korunmuş hastalar kemoembolizasyondan fayda görür ve tahmini medyan sağkalım 26 aydır. İleri evredeki (evre C) hastalar, sağkalımı yaklaşık 3 ay (8 ila 11 ay arasında) uzatan sistemik sorafenibden fayda sağlar (32).

Son 20 yılda HCC mortalitesi önemli ölçüde artmıştır, ilaç ve ekonominin yükü önümüzdeki yıllar boyunca önemli ölçüde artacaktır (25). Kanserlerin önlenmesi, gelişimi, ilerlemesi ve tedavisi hastaların diyetiyle ilişkilidir. Avrupa'da yapılan bir araştırma, diyetle meyve ve sebze alımının daha yüksek olmasının daha düşük kanser gelişimi riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Meyve, sebze ve baharatlarda bulunan çeşitli doğal bileşikler, kanserlerin gelişiminde yer alan mekanizmaları baskılamada işlev görür ve hastalığın önlenmesi ile ilgili mekanizmaları uyarırlar. Bu bileşikler, yeni tedavi rejimleri için terapötik seçenekler sağlayabilecek antitümör, antiproliferatif, antiinflamatuvar ve antioksidan sistemleri aktive eder. Bazı bileşikler, kanser hücrelerinde sitotoksositeye neden olmada seçici olup kanserli olmayan hücreyi

etkilemezler. Bazıları konak toksisitesini artırmadan mevcut ilaç rejimlerinin etkinliğini artırabilir (14, 34).

1.1.1.7. Hepatoselüler Karsinom Biyokimyası

Bilirubin, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), alkalen fosfataz (ALP) ve albümini içeren karaciğer fonksiyon testleri ilk değerlendirmede yükselebilir. Bu, hastalığın şiddetini gösterebilir. Sentetik karaciğer fonksiyonu veya rezervi azalmış hastalarda kaydedilen diğer anormal laboratuvar bulguları arasında yüksek INR (International Normalized Ratio), protrombin zamanı (PT), trombositopeni, anemi, hiponatremi veya hipoglisemi bulunur. İlerlemiş hastalık, kronik hepatit veya sirozla ilişkili HCC hastalarının bu bulgularla başvurması muhtemeldir. Sirozla ilişkili olmayan erken HCC'li hastalar, ilk karşılaşmada normal karaciğer fonksiyon testleriyle başvurabilir. HCC'nin paraneoplastik semptomları gelişmiş olan hastaları hipoglisemi, hiperkalsemi, eritrositoz ile başvurabilir (27). HCC etiyojisini değerlendirmek için diğer laboratuvar araştırmaları arasında hepatit B yüzey antiijeni, anti-HCV antikoru, alfa antitripsin seviyesi, bakır seviyeleri ve demir satürasyonu bulunur (27).

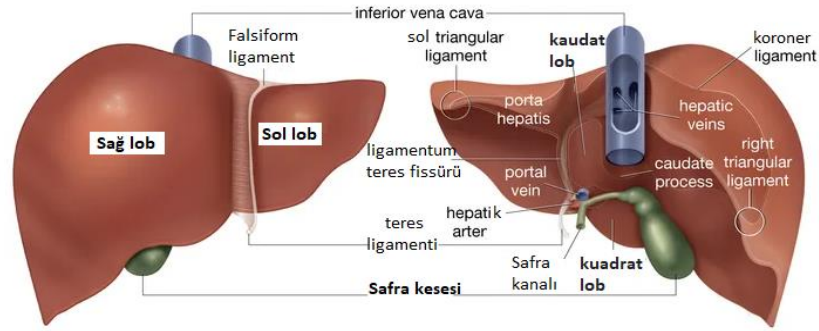
Seruma ek olarak idrar ideal bir metabolit kaynağıdır. Üriner metabolitler HCC deneklerinde farklı şekilde eksprese edilir. Batı Afrika kohortlarında, HCC hastalarında üriner metabolit haritalaması siroz, sirotik olmayan karaciğer hastalığı ve sağlıklı kontrollerden farklı bulunmuştur. HCC'yi sirozdan ayırt etmek için inozin, indol-3-asetat, galaktoz ve ayrıca bir N-asetillenmiş amino asit (NAA) içeren panel, %86,9 duyarlılık ve %90,3 özgüllük ile umut verici bir idrar belirteç paneli olarak önerilmiştir. Benzer şekilde, Çin'deki araştırmalar, HCC biyobelirteçleri olarak üriner karnitin C4:0 ve hidantoin-5-propionik asidin potansiyelini ortaya çıkardı (35, 36).

1.2. Karaciğer

Karaciğer (KC) yetişkin vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturan ve hemen hemen 1,5 kg ağırlığında vücuttaki en büyük solid organdır. Karaciğer sağ, sol, kaudat ve kuadrat lob olarak isimlendirilen 4 loba ayrılmıştır. Sağ ve sol loblar büyük, kaudat ve kuadrat loblar ise daha küçüktür ve arkada bulunurlar. Kraniokaudal uzun aksı erişkin bireylerde yaklaşık 15-17 cm'dir. Sağ üst kadranda, sağ hemidiyafram altında yerleşim gösterir ve kostalar tarafından korunur. Ligamentöz bağları sayesinde

bulunduğu konumu korur (37-39) (Şekil 1). Diyafragma ile komşu olan yüzüne fasya diyafragmatika, iç organlarla komşu olan visseral yüzüne ise fasya ventralis denir. Diyafragmatik yüzü serbest olup büyük kısmı periton ile örtülüdür. Peritonla örtülü olan bu bölüm, falsiform ligament ile diyafragmaya bağlı iken, diyafragmatik yüzün arkaya bakan ve area nuda olarak adlandırılan peritonsuz bölümü gevşek bağ doku aracılığı ile diyafragmaya yapışıktır. KC'in büyük bir kısmı periton ile kaplı iken vena kava sulkusu, safra kesesi fossası, ligamentum teres ve ligamentum venozum fissürleri, area nuda ve porta hepatis peritonsuz bölümleridir (40).

KC diğer organların işlevlerini destekleyen ve tüm fizyolojik sistemleri etkileyen inanılmaz sayıda görevi yerine getirmektedir. Karaciğerin kilit konumu ve benzersiz damar yapısı, karaciğerin görevlerini yerine getirmesinde önemlidir (37). Karaciğer, portal venden (yaklaşık %75) ve hepatik arterden (yaklaşık %25) sağlanan ikili kan perfüzyonu nedeniyle benzersiz bir organdır (41).



Şekil 1. Karaciğer yapısı

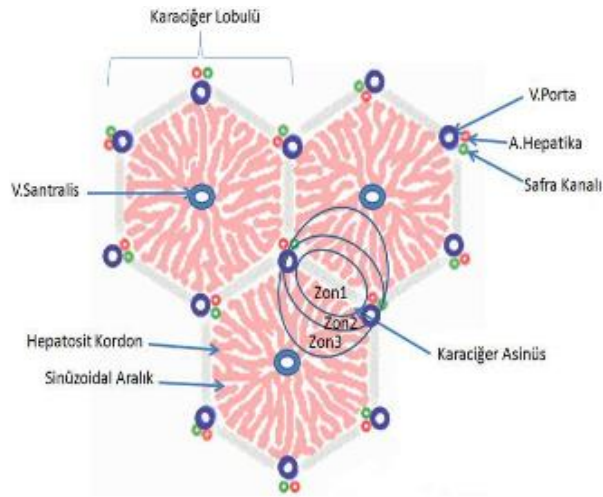
Karaciğer, hepatositler, biliyer epitel hücreleri (kolanjiyositler), stellat hücreler, Kupffer hücreleri ve karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri olmak üzere farklı embriyonik kökenli hücre tiplerinden oluşur. Bu hücre tiplerinin her biri, karaciğer fonksiyonunu işbirliği içinde düzenleyen benzersiz işlevlere sahiptir. Hepatositler, karaciğerin birincil epitel hücre popülasyonudur. Organ hacminin çoğunu oluştururlar ve işlevlerin çoğunu yerine getirirler (42).

Karaciğerin fonksiyonel birimi lobüldür. Her lobül altıgendir ve altıgenin her köşesinde bir portal triad (portal ven, hepatik arter, safra kanalı) bulunur (Şekil 2). Lobülün temeli, fizyolojik olarak farklı apikal ve bazolateral membranlara sahip olan hepatositlerden oluşur. Fonksiyon ve perfüzyona göre hepatositler 3 bölgeye ayrılır (Şekil 2).

Zon I, hepatositlerin periportal bölgesi olarak kabul edilir, oksijenli kan ve besinlere yakınlığı nedeniyle en iyi perfüze edilen ve ilk yenilenen bölgedir. Yüksek perfüzyonu nedeniyle zon I, beta oksidasyon, glukoneogenez, safra oluşumu, kolesterol oluşumu ve amino asit katabolizması gibi oksidatif metabolizmalarda büyük rol oynar (41).

Zon II, hepatositlerin perisantral bölgesi olarak tanımlanır ve bölge I ve III arasında bulunur (41).

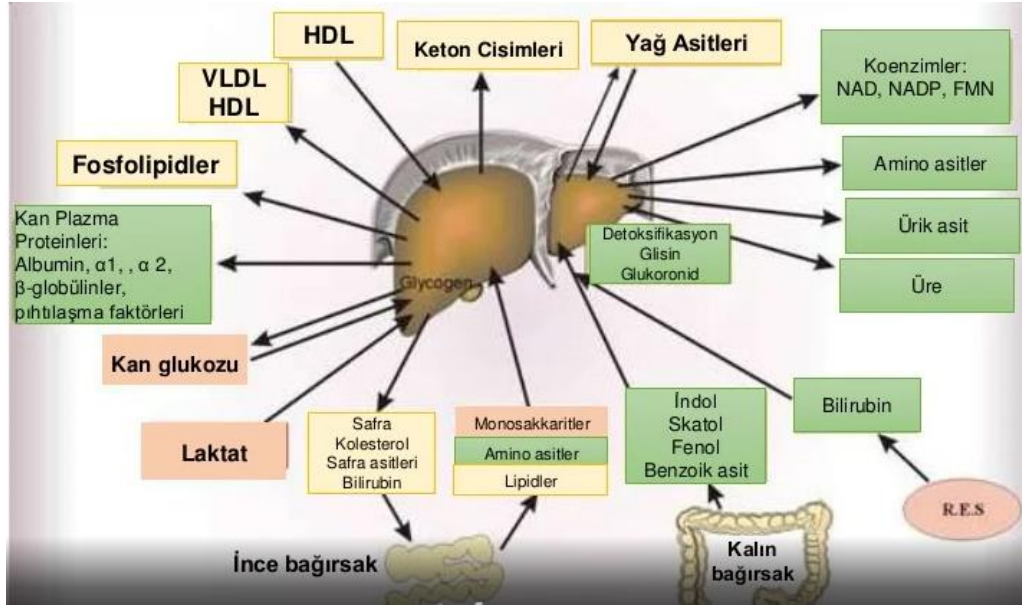
Zon III, portal triaddan uzak olması nedeniyle en düşük perfüzyona sahiptir. Detoksifikasyon, ilaçların biyotransformasyonu, ketogenez, glikoliz, lipogenez, glikojen sentezi ve glutamin oluşumunda en büyük role sahiptir (41).



Şekil 2. Hepatik lobül yapısı (43)

1.2.1. Karaciğer Fonksiyonları

Karaciğer sayısız fizyolojik süreç için kritik bir merkezdir. Makrobesin metabolizması, kan hacmi regülasyonu, immün sistem desteği, büyüme sinyal yollarının endokrin kontrolü, lipid ve kolesterol homeostazı ve birçok güncel ilaç dahil olmak üzere ksenobiyotik bileşiklerin parçalanması görevleri arasındadır (42) (Şekil 3).

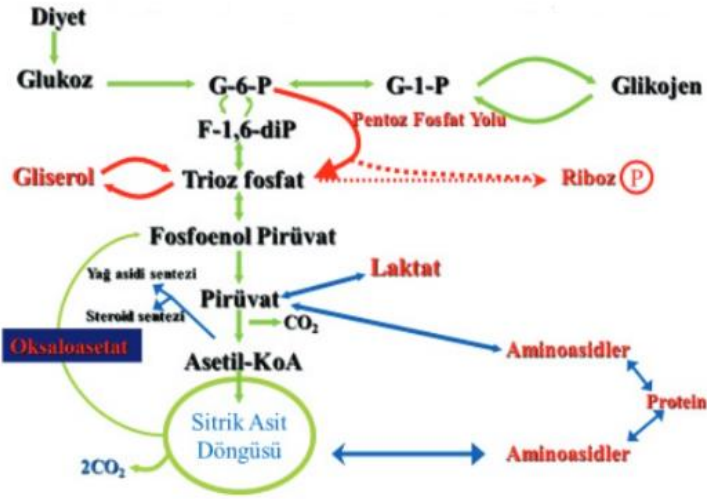


Şekil 3. Karaciğer fonksiyonları

1.2.1.1. Glukoz Metabolizması

Karaciğer, glukoz homeostazının korunmasında merkezi bir rol oynar. Beslenme durumunda fazla miktardaki glukozu alır ve onu karbondioksit oksitlerken glikojen ve yağ asitlerine dönüştürür. Açlık durumunda ise normoglisemiye sağlamak için, glikojenoliz ve glukoneogenezden elde edilen glukozu kan dolaşımına bırakır (44).

Glukoz hepatositlere plazma membranı glukoz taşıyıcısı GLUT2 (Glucose transporter 2) aracılığıyla girer. Glukoz, hepatositlerde glukoz 6-fosfat (G6P) oluşturmak için glukokinaz tarafından fosforile edilir. Glukoz taşıyıcıları tarafından taşınamayan G6P, hepatositler içinde tutulur. Beslenme durumunda G6P, glikojen sentezi için öncü görevi görür. Ayrıca glikoliz yoluyla pirüvat üretmek üzere metabolize edilir (Şekil 4). Pirüvat mitokondriye gönderilir ve trikarboksilik asit döngüsü ve oksidatif fosforilasyon aracılığıyla ATP üretmek için tamamen oksitlenir. Ayrıca, pirüvat lipogenez yoluyla yağ asitleri sentezlemek için kullanılır. Aynı zamanda G6P, pentoz fosfat yolu ile NADPH üretmek için metabolize edilir. NADPH, diğer biyoaktif moleküllerin biyosentezi ve lipogenez için gereklidir. Açlık durumunda, G6P endoplazmik retikulumla taşınır ve glikozu serbest bırakmak için glikoz-6-fosfataz tarafından defosforile edilir (45).



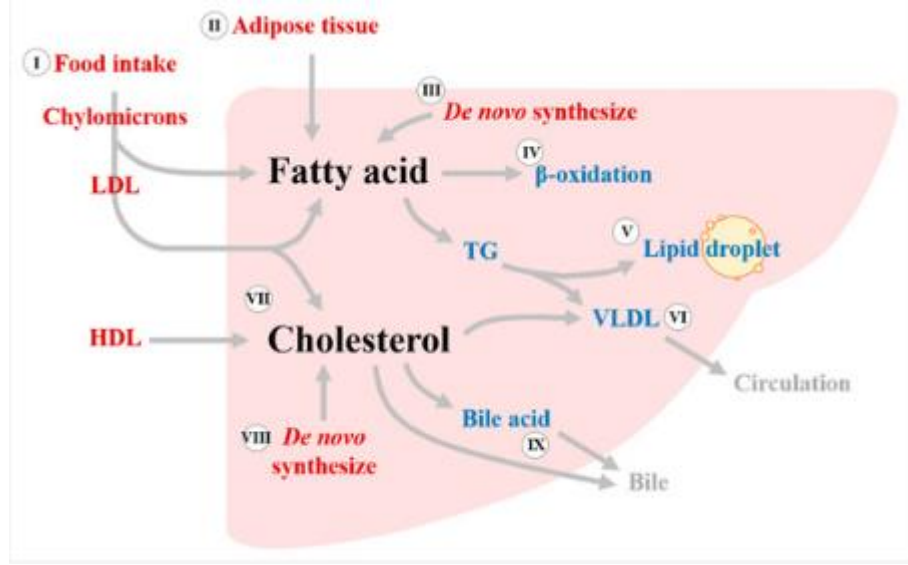
Şekil 4. Glukoz metabolizması

1.2.1.2. Lipid Metabolizması

Karaciğer lipidlerin ve lipoproteinlerin emilimi ve alımının sağlanması, sentez, paketlenme ve salgılama için kritik öneme sahiptir. Karaciğerin safrayı sentezleyip salgılaması, lipidlerin sindirim sisteminden en verimli şekilde absorpsiyonunu sağlar. Şilomikronlar, lenfatik sistemden dolaşıma geçmeden önce lipoproteinlerden ve bağırsakta sindirilmiş lipidlerden elde edilir. Daha sonra yağ asitleri şilomikron kalıntılarından lipoprotein lipaz ile ekstrakte edilir. Bu yağ asitleri daha sonra bir dizi taşıma proteini (örneğin yağ asidi taşıma proteinleri 2, 4 ve 5 ve CD36) yoluyla hepatositlere taşınır. Karaciğer, oksidatif yollar aracılığıyla yağ asitlerini enerji kaynağı olarak kullanabilir, aynı zamanda ketojenik ürünlerden (asetoasetat ve beta hidroksibutirat) diğer organlara da enerji sağlayabilir. Enerjik bir substrat olarak keton sağlama yeteneği, uzun süreli açlıkta veya diyetle aşırı düşük seviyelerde karbonhidrat tüketimi olanlarda gereklidir. Karaciğerin bu lipid işleme yeteneği, bir dizi yağda çözünen vitaminin emilimi için de kritik öneme sahiptir (42).

Karbonhidrat fazlalığında, karaciğer glukozu ana metabolik yakıt olarak kullanmakla kalmaz, glukozu yağ asitlerine de dönüştürür. Hepatositler ayrıca yağ dokusundan salınarak veya gıda sindiriminden sonra emilerek kan dolaşımına katılan yağ asitlerini de kullanır. Yağ asitleri, triaçilgliserol (TAG) oluşturmak için gliserol 3-fosfat ile veya kolesterol esterleri üretmek için kolesterol ile esterleştirilir. TAG ve kolesterol esterleri ya hepatositlerde lipid damlacıklarında depolanır ya da VLDL (Very Low Density Lipoprotein) partikülleri olarak dolaşıma salınır.

Yağ asitleri ayrıca hücre zarlarının temel bir bileşeni olan fosfolipidlere ve lipid damlacıklarının, VLDL'nin ve safra partiküllerinin yüzeyel tabakasına katılır. Açlık durumunda, yağ asitleri, keton cisimlerinin yanı sıra enerji kaynağı oluşturmak için esas olarak mitokondride oksitlenir (45) (Şekil 5).

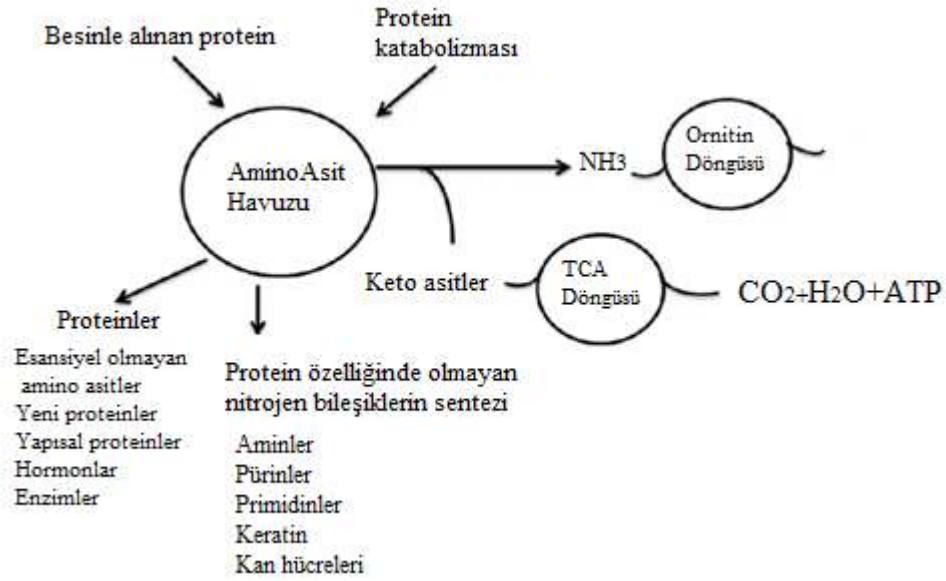


Şekil 5. Lipid metabolizması

1.2.1.3. Protein ve Amino Asit Metabolizması

Proteinlerin sentezi ve yıkımı, hücre ve organ düzeyindeki tüm işlevler için kritik bir öneme sahiptir. Protein sentezleyen bir organ olarak KC, dolaşımdaki protein hacminin %85-90'ının kaynağıdır. Albümin ise toplam plazma proteininin yaklaşık %55'ini oluşturur ve salgılanan bu proteinlerin en fazla olanıdır. Albümin, kan hacminin korunması için gereklidir, ayrıca lipidler ve hormonlar gibi birtakım önemli moleküllerin taşınmasında da görevlidir. KC ayrıca akut faz proteinlerini, büyüme faktörlerini ve sistemik düzenlemelerde görev alan çok sayıda başka peptidi de salgılar. Ayrıca karaciğerin, protein yıkımı ve oluşan amino asitleri metabolize etme kapasitesi de oldukça yüksektir. Amino asit metabolizması hepatosit için enerji sağlayabilir, ancak azotlu atıkların atılmasını gerektirir. Karaciğerde üre döngüsü zararlı reaktif azotlu molekülleri ortadan kaldıran bir mekanizmadır. Belirli amino asitlerin karbon iskeleti, glukoneojenik substratlar olarak hizmet etmek için trikarboksilik asit döngüsüne de dahil edilebilir. Glukoneojenik amino asitlerin bu

kullanımı, glukoz homeostazı ve uzun süreli açlık zamanlarında glukozu bağımlı organlara enerji sağlanması için önemlidir (42) (Şekil 6).



Şekil 6. Protein metabolizması

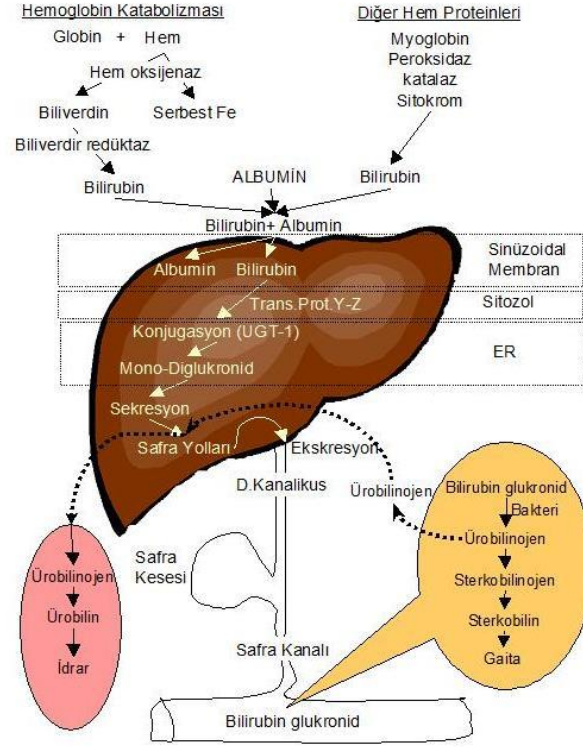
1.2.1.4. Vitamin ve Mineral Depolanması

Karaciğer demir ve bakır dahil bazı vitamin ve mineralleri fazla alındığında depolar, ihtiyaç halinde ise serbest bırakır. B12 ve D vitaminlerini birkaç ay, A vitaminini birkaç yıl süreyle depolayabilir ve ayrıca E ve K vitaminlerini de depolar. Karaciğerde protein kompleksi ferritin olarak depolanan demir, kırmızı kan hücresi üretiminde ihtiyaç olduğunda serbest bırakılır (46).

1.2.1.5. Bilirubin Metabolizması

Hemoliz; KC, dalak ve kemik iliği dahil olmak üzere vücudun çeşitli yerlerinde gerçekleşir ve KC 'hem' molekülünün yıkımında önemli bir rol oynar. Hem, biliverdine parçalanır ve daha sonra unkonjuge bilirubine indirgenir. KC, dolaşımdan albümine bağlı unkonjuge bilirubini alır ve daha sonra hidrofilik hale getirmek için bir faz II prosesi olan üridin difosfat glukuroniltransferaz (UGT) aracılığıyla konjugasyona uğratır. Konjuge bilirubin ise daha sonra safra kanallıkları yoluyla safraya salgılanır veya az miktarda kanda çözünür ve böbrekler tarafından atılmak üzere süzülür. Çoğu konjuge bilirubin safraya katılır ve bağırsak duvarı tarafından emilemediği için safra aracılığıyla dışkı ile atılır. Bir miktarı da, enterohepatik

dolaşıma girmek üzere yeniden emilim için bağırsak bakterileri tarafından ürobilinojene veya unkonjuge bilirubine dönüştürülür (41) (Şekil 7).



Şekil 7. Bilirubin metabolizması

1.2.1.6. Safra Üretimi

Safra, böbrekler tarafından atılamayan maddelerin atılmasına yardımcı olduğu ve safra tuzları ve asitlerinin salgılanması yoluyla lipidlerin emilimine ve sindirimine yardımcı olduğu için önemli bir sıvıdır. Esas olarak su, elektrolit, safra tuzları, safra asitleri, kolesterol, safra pigmenti, bilirubin ve fosfolipitlerden oluşan safra hepatositler tarafından üretilir. Bu sıvı alkali, acı tadı olan, sarımsı yeşil bir sıvıdır. Hepatositlerde oluştuktan sonra kanaliküllere salgılanır. Konjuge safra asitleri olan safra tuzları, yağların emilimi ve intestinal emülsifikasyonu için gereklidir.

Birincil safra asitleri olan kolik asit ve kenodeoksikolik asit hepatositlerde kolesterolden sentezlenir. Deoksikolik asit ve litokolik asit ise ikincil safra asitleridir ve ince bağırsakta bağırsak bakterileri tarafından oluşturulup, sonrasında emilip karaciğere giderler. Konjugasyon safra asitlerininin suda çözünürlüğünü artırır, böylece duodenum ve ileumdan difüzyonları kısıtlanır (41, 46).

1.2.1.7. İlaç Metabolizması / Metabolik Detoksifikasyon

Karaciğerin diğer bir önemli işlevi, ksenobiyotiklerin metabolizması ve/veya detoksifikasyonudur. KC, eksojen ve endojen kimyasalların (örneğin ilaçlar), yabancı moleküllerin ve hormonların toksisitesini azaltmak veya biyolojik olarak aktivitesini değiştirmek için fonksiyon görür. Bu süreç, toksik maddelerin bağırsak ve renal tübüler geri emilimini azaltıp atılımını kolaylaştırır ve metabolik detoksifikasyon olarak adlandırılır. Bu şekilde alkol, barbitüratlar, amfetaminler, steroidler ve hormonlar (aldosteron, östrojenler, antidiüretik hormon ve testosteron dahil) metabolize ve detoksifiye edilerek, aşırı birikim ve olumsuz etkileri önlenir (46, 47). Karaciğer bu maddelerin bazıları için lizozomları kullansa da, metabolizma ve detoksifikasyonun ana yolu biyotransformasyondur. Karaciğer, ksenobiyotikleri faz I ve faz II adı verilen başlıca 2 reaksiyon aracılığıyla lipofilik formdan hidrofilik forma dönüştürerek işlev görür. Bu reaksiyonlar esas olarak hepatositlerin düz endoplazmik retikulumunda gerçekleşir. Faz I reaksiyonlarında, öncelikle CYP450 enzim ailesini kullanarak oksidasyon, indirgeme ve hidroliz yoluyla daha hidrofilik bir bileşik oluşturulur. Faz II reaksiyonlarında ise, faz I'de oluşturulan metabolitler kan veya safraya salgılanmak üzere daha hidrofilik hale getirilmek için konjuge edilir. Faz II'de gerçekleştirilen konjugasyon için üç ana yol glukuronat, glutatyon veya sülfatla konjugasyondur. Glukuronatla konjugasyon düz endoplazmik retikulumda gerçekleşir. Alkol gibi sülfat konjugasyonuna maruz kalan maddeler için işlev gören enzimlerin yeri nedeniyle genellikle sitozolde yapılır. Çoğu glutatyon konjugasyonu sitozolde, çok az kısmı mitokondride meydana gelir. Bazen bu reaksiyonlardan üretilen metabolitlerin transportu faz III olarak tanımlanmaktadır. Böbrek ve bağırsak gibi diğer bazı organlar ilaç metabolizmasına yardımcı olabilir. Yaş, cinsiyet, ilaç-ilaç etkileşimleri, diyabet, hamilelik, karaciğer veya böbrek hastalığı, inflamasyon veya genetik gibi birçok faktör ilaç metabolizmasını etkiler (47).

1.2.1.8. Diğer Fonksiyonlar

Karaciğer, T₄'ten (tiroksin) T₃'e (triiodotironin) deiyodinasyon bölgesidir ve tiroid hormonu metabolizmasında önemli rol oynar. Karaciğer, albümin, bağlayıcı globulinler, protein C, protein S ve faktör VIII'in yanı sıra intrinsik ve ekstrinsik

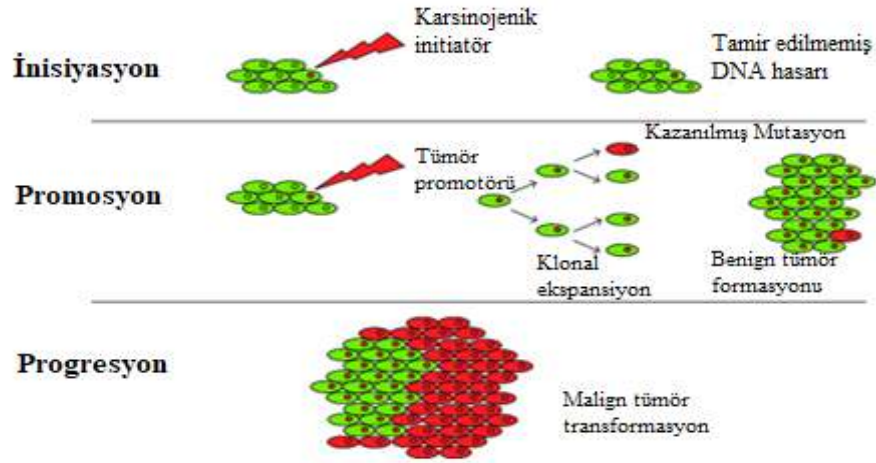
yolların tüm pıhtılaşma faktörleri dahil olmak üzere vücuttaki çoğu plazma proteininin sentezini yönetir (41).

1.3. Karsinogenez

Karsinogenez, normal bir hücrenin kanser hücresi haline gelene kadar geçirdiği süreçtir. Etiyolojisi komplekstir, çok faktörlüdür ve hücresel, moleküler, genetik, epigenetik ve çevresel değişiklikleri içerir. Kanserde hücrenin proliferasyonu ve hayatta kalması için lipidlerin, amino asitlerin, nükleik asitlerin, glukoz ve glutaminin metabolizmaları değiştirilebilir (48).

Kanserin kimyasallarla indüksiyonu da, çok evreli ve aşamalı bir süreçtir. Bu süreç, sağlıklı bir hücreyi malign neoplastik bir hücreye dönüştürmek için çok fazla sayıda moleküler ve hücresel dönüşümü içerir (49). Kimyasal kanserojenlerin sınıflandırması çoğu zaman basitçe genotoksik ve non-genotoksik karsinojenler olarak yapılır. Genotoksik karsinojenler, DNA'ya kovalent olarak bağlanan ya da farklı bir yolla fiziksel olarak etkileşime girerek eklentiler oluşmasını indükleyen ajanlardır. Bu nedenle, kansere dönüşümü başlatan mutasyonları elde etmek için gereken genetik hasarı üretebilen karsinogenezin başlatıcıları (initiatör) olarak kabul edilebilirler. Genotoksik olmayan karsinojenler ise, tümörü indükleyici ajanlar (promotörler) olarak kabul edilirler, yani, zaten kanserojen mutasyona sahip hücrelerin klonal genişlemesini uyarırlar (50).

Son yıllarda, kimyasal karsinogenez sürecinde en az üç adım tanımlanmıştır. Bunlar inisiyasyon (başlangıç), promosyon (gelişim) ve progresyon (ilerleme) olarak adlandırılan üç evredir (49) (Şekil 8).



Şekil 8. Karsinogenez evreleri

1.3.1. İnisiyasyon

Epigenetik modifikasyonlar ve genetik değişiklikler ile karakterize olan başlangıç aşaması kabul edilen bu evrede hücre neoplazik bir hücre değildir, ancak ardışık genotipik ve fenotipik değişiklikler meydana geldikten sonra bu duruma doğru ilk adımını atmış olur (51, 52). Mutasyona uğramış bu hücrenin ortaya çıkması, ultraviyole ışığı ve radyasyonun yanı sıra kimyasal kanserojenler gibi fiziksel kanserojenlerle etkileşim yoluyla da gerçekleşebilir (53). Bu hücrelerin klonal genişlemesi, yeni hücre sayısındaki artışın neden olduğu süreçten ve hücrelerin ölmesini engelleyen apoptoz inhibisyonundan kaynaklanır. Bu aşamada hücreler morfolojik olarak diğer hücrelerden ayırt edilemezler (51, 52).

1.3.2. Promosyon

Bu aşamada, hücreler klonal olarak büyür ve immün yanıttan kaçış, büyüme kontrolünün kaybı ile karakterize değişmiş hücre klonlarına dönüşürler. Böylece tümörler artık klinik olarak saptanabilir (51). Promatör ajanlar preneoplastik hücrelerin klonal genişlemesini kolaylaştırır, böylece hem tümör gelişimini hem de agresifliğini artırır (54). Bu ajanlar duyarlı dokularda hücre proliferasyonunu artırır, mutasyonların sabitlenmesine katkıda bulunur, genetik ekspresyondaki değişikliklerin artmasına ve hücresel büyümenin kontrolünde değişikliklere neden olur. Bu promotörler ayrıca oksidasyon yoluyla dolaylı olarak DNA'ya zarar verebilir (52).

1.3.3. Progresyon

Premalign lezyonların malign hücre popülasyonlarına veya invaziv kansere dönüştüğü aşamadır (51). Başlangıç ve promosyonda histopatoloji yoluyla tanımlanan lezyonlar, preneoplastik lezyonlar ve/veya iyi huylu neoplaziler olarak adlandırılır. Kötü huylu lezyonlara dönüşmeleri, karsinogenezin son aşamasıdır, en kapsamlı olanıdır ve ilerleme olarak isimlendirilir. Progresyonda, genetik ve epigenetik mekanizmalar yoluyla bir neoplazik fenotip elde edilir. Progresyon sırasında hücre proliferasyonu, uyarının varlığından bağımsızdır (52).

Genetik değişiklikler, temel kanser özelliklerinden biridir ve hasarlı hücrelerin yüksek oranda olması daha fazla genetik değişikliğin oluşmasına yol açar. Sonuç olarak hücreler, invazyon, bağışıklık yanıtından kaçma, metabolizma değişikliği ve ölüme direnç gibi metastaz için çeşitli özellikler geliştirir (51).

1.4. Hepatokarsinojen Maddeler

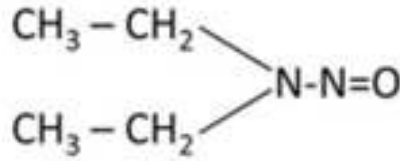
İnsanların doğal kaynaklardan çeşitli kimyasallara maruz kalması kanserogenez üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Karsinojenik maddeler arasında nitrozo bileşikler çok farklı tümörlere sebep olup, bunlar insanlar için potansiyel bir sağlık tehlikesidirler (55). Nitrozo bileşikler; nitrozamidler ve nitrozaminler olmak üzere iki farklı grupta incelenirler. Nitrozamidler; amid, guanidin, karbamat, karboksamid gibi maddelerin türevleri olup, nitrozaminler ise nitrit ve aminlerin sindirim sisteminde birleşmesiyle meydana gelirler. Hepatotoksik, karsinojenik ve alkileyici özelliklere sahip olan bir grup kimyasal bileşiklerdir. Bunlar tükettiğimiz gıda maddelerinde yaygın olarak bulunabilirler ve bazı çevre şartlarında oluşabilen genetik etkili kimyasal kanserojenlerin büyük bir grubunu oluştururlar (56, 57). Bunun yanında nitrozamin bileşikler sitotoksik ve kanserojen aktivitelerini gösterebilmek için metabolik aktivasyona gereksinim duyarlar (58).

Deney hayvanlarına aromatik aminler, azot içeren boyalar, nitrozaminler ve aflatoksinler gibi birtakım kimyasal maddeler uygulanarak deneysel olarak karaciğerde kanser oluşturulabilmektedir (59). İnisiyasyon fazının oluşması için en fazla kullanılan ajanlar dietilnitrozamin (DEN) ve aflatoksindir. İnisiyasyon evresini takiben promosyon evresi oluşturmak amacıyla ise fenobarbital (FB), asetaminoflora

(AAF), 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin, polihalojenli bifenil gibi kimyasallarla indüklemeye yapılmaktadır (59).

1.4.1. Dietilnitrozamin

Dietilnitrozamin, hepatik karsinom oluşumuna neden olan bir nitrozamin bileşiğidir (58). Uluslararası Kansere Enstitüsü tarafından grup I kanserojen olarak rapor edilmiştir (60). Dietilnitrozamin, N-nitrosodietilamin (DEN, DENA, NDEA) olarak da isimlendirilir ve moleküler formülü $C_4H_{10}N_2O$ 'dur (61) (Şekil 9). DEN, tarım kimyasallarında, alkollü içeceklerde, çedar peynirinde, kurutulmuş ve kızartılmış yiyeceklerde ve farmasötik ürünlerde bulunan bir hepatokarsinogen'dir (58). DEN'in, insektisitlerde ve sigara dumanında bulunduğu ve aynı zamanda besinlerde bulunan nitratın sindirim sisteminde sekonder ve tersiyer aminlerle birleşmesi neticesinde de oluşabileceği bildirilmiştir (62).



Şekil 9. 'DEN' kimyasal yapısı

Çok sayıda kimyasal, kemirgenlerde HCC oluşumuna neden olur ve DEN bunlar arasında kanser gelişimi için en çok kullanılan ajandır (7). Kimyasal olarak indüklenen özellikle de DEN tarafından indüklenen HCC fare modelinin avantajı, gen ekspresyon paternlerinin insan HCC kötü prognoz sınıfı ile olan benzerliğidir. DEN kaynaklı tümörler ve kötü prognozlu insan HCC'si yüksek proliferasyon ve kromozomal instabilitenin yanında düşük β -katenin mutasyonu ve apoptoz seviyesi gösterir (7). DEN juvenil farelere enjekte edildiğinde, sentrilobüler hepatositler aracılığıyla mutajenik DNA eklentileri oluşturan alkilleyici ajanlara metabolik olarak aktive edildiği karaciğeri hedefler (63).

DEN'in oksidatif stres ve inflamasyonu uyarmak yollarıyla karaciğerde kansere neden olabileceği bildirilmiştir (58). Kimyasal karsinogeneze önemli olan erken DNA hasarına ve hepatik hücre proliferasyonuna yol açabilir. Hepatokarsinogeneze sürecinde, DEN biyoaktif hale gelmesi için karaciğerde CYP450

sistemi tarafından hidroksillenir (60). CYP450 sistemi, ilaçlar, kanserojenler ve diğer ksenobiyotik kimyasallar dahil olmak üzere çok çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin oksidasyonunu katalize eden enzimler içeren membrana bağlı heme süper ailesidir. CYP450, kanserojenleri, DNA gibi hücresel makromoleküllere bağlanan elektrofilik türevlere aktive eder ve karsinogenezin başlamasına neden olurlar. Özellikle CYP2E1, N -alkilnitrozaminlerin aktivasyonunda birincil öneme sahiptir. Fare modeli kullanılarak, CYP2E1'in nitrozaminler, kloroform, benzen, karbon tetraklorür ve vinil klorür gibi bazı düşük moleküler ağırlıklı toksik madde ve kanserojeni metabolize ettiği gösterilmiştir (64).

Metabolik aktivasyondan sonra DEN'in karaciğerde kanserojen etkilerine neden olan promutajenik ürünler O6-etil deoksi-guanozin ve O4 ve O6-etil deoksi-timidin ürettiği öne sürülmüştür (8). Bunlar da, KC'de karsinogenez başlamasına neden olan DNA zinciri hasarına, pürinasyona veya sıklıkla yanlış bir gen dizisi oluşumuna neden olurlar (65). Ayrıca DEN, DNA ve RNA moleküllerinde oksidasyona yol açan reaktif oksijen türleri üretebilen dolaylı alkilleyici bir ajandır (66). DNA'daki oksidatif hasarın göstergesi 8-hidroksi-2'- deoksiguanozin (8-OHdG) seviyelerinin, DEN tarafından doza bağımlı bir şekilde karaciğer DNA'sında önemli ölçüde yükseldiği bildirilmiştir (58).

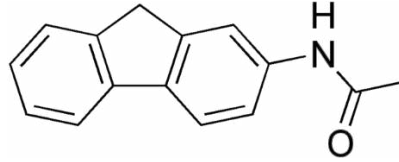
DEN, bir genotoksin olmasının yanında hepatotoksik olup nekrotik hücre ölümüne de sebep olur. Bu da, hayatta kalan hepatositlerin kompensatuar proliferasyonunu destekleyen interlökin-6 gibi mitojenlerin ekspresyonunun artmasıyla sonuçlanan bir inflammatuar yanıtı tetikler (63).

Normal bir karaciğerde hücre replikasyonu ve apoptoz koordinasyonu sağlansa da, prekanseröz ve kanserli dokularda bu dengenin bozulması, kanserin ayırt edici özelliklerinden biridir. DEN tarafından karaciğer kanserinin başlatılması ve ilerlemesinde hücre döngüsünü düzenleyen proteinlerin, kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu anlamda DEN, sıçan hepatositlerinde G1/S fazını düzenleyen proteinlerin aşırı ekspresyonu yoluyla geri dönüşü olmayan hepatoselüler karsinogenezi indükler (67). Ayrıca DEN, sıçan karaciğerinde hücre dışı matriks proteinlerinin (kollajen) aşırı birikimine neden olur ve hepatik fibroz gelişimi ile ilgili olayların incelenmesi için de uygundur (68). DEN uygulaması, klinik HCC göstergeleri GPC3 ve AFP ifadesini indükleyebilir (7).

1.4.2. 2-Asetilaminofloren

Hepatokarsinogenez, ilk aşamada genotoksik hasarı (başlangıç), daha sonra premalign lezyonlardan malign lezyonlara klonal genişlemeyi (promosyon) ve son olarak da klonal genişlemenin artması ile tümörün ilerlemesini içerir (69). DEN tarafından başlatılan ve 2-asetilaminofloren tarafından indüklenen hepatokarsinogenez, deneysel kanser çalışmaları için en uygun ve kullanışlı olanıdır (69).

2-asetilaminofloren, $C_{15}H_{13}NO$ kimyasal formülüne sahiptir (Şekil 10) ve moleküler ağırlığı 223,26 g/mol'dür. Ayrıca N-2 florenil asetamid olarak da adlandırılır (70). Suda çözünmeyen ancak alkoller, glikoller, eter, asetik asit ve yağ çözücülerde çözünebilir sentetik, açık ten rengi kristal bir katıdır (70). 2-AAF için insan maruziyetinin birincil yolları inhalasyon ve dermal temastır. İnsan için kanserojen olduğu tahmin edilmektedir (70).



Şekil 10. '2-AAF' kimyasal yapısı

Aktivasyon mekanizması, arilhidroksamik aside N-hidroksilasyonu ve ardından sülfoksiflorenilasetamid'e enzimatik sülfonasyonu içerir (70).

Bilinen hepatokarsinojenler olan aromatik amin 2-aminofloren (2-AF) ve asetillenmiş türevi 2 asetilaminofloren için kovalent DNA eklentilerinin oluşumu indükledikleri karsinogenezde önemli bir adımdır (71). Metabolik aktivasyonlarından sonra, 2-AAF türevleri oluşur, bunlar çoğunlukla guanin kalıntılarındaki asetillenmiş ve asetillenmemiş ürünlerin bir karışımıdır ve dG-C8-AF, dG-C8-AAF ve dG-N2-AAF başlıca formlardır (72).

1.5. Flavonoidler

Flavonoidler, çok sayıda düşük moleküler ağırlıklı üyeler içeren ikincil bitki metabolitleridir. Genel yapıları, iki fenil halkası arasında heterosiklik (piran) bir halka bulunan 15 karbonlu bir iskeletten oluşur (73). Flavonoidler, meyve ve sebze kaynaklı gıdalarda bulunabilen geniş bir bitki pigmentleri sınıfıdır (74). Kolaylıkla sindirilebilen ve yiyeceklerde yüksek düzeyde bulunan bu bileşikler insan diyetinin

önemli bir bileşeni olarak tanımlanmışlardır. 4.000'den fazla biyolojik olarak aktif flavonoid türü tanımlanmıştır (74).

Fitokimyasallar olan flavonoidler, insanlar ve hayvanlar tarafından sentezlenemez. Son zamanlarda fenolik bileşiklerin, özellikle flavonoidlerden zengin tıbbi bitkilerin terapötik potansiyeline ilgi arttı (75). Flavonoidlerin çoğu yaygın olarak terapötik ajanlar olarak kabul edilmektedir (76). Kimyasal yapılarına, oksidasyon derecelerine, zincir yapılarına göre, izoflavonoidler, flavanonlar, flavanoller, flavonoller, flavonlar ve antosiyanidinler olarak 6 ana gruba ayrılabilirler (77).

Yaygın olarak meyvelerde, bitkilerde, saplarda, tahıllarda, kuruyemişlerde, sebzelerde, çiçeklerde ve tohumlarda bulunurlar (76). Ana flavonoid kaynakları meyve ve sebzelerdir ve ayrıca kakao ürünlerinde (kakao tozu, çikolata), siyah çay, yeşil çay ve kırmızı şarapta bol miktarda bulunurlar. Meyveler arasında çilek, erik, kiraz ve elma flavonoidler açısından en zenginken, tropikal meyveler flavonoidler açısından fakirdir. Sebzeler arasında en yüksek flavonoid bakla, zeytin, soğan, ıspanak ve arpacıkta bulunur (77). Gıdalardaki flavonoidler genellikle renk, tat, yağ oksidasyonunun önlenmesi, vitamin ve enzimlerin korunması gibi özelliklerden sorumludur. Ancak gıdaların hazırlanması ve işlenmesi, kullanılan yöntemlere bağlı olarak flavonoid düzeylerini düşürebilmektedir (75).

Flavonoidler, bitkileri olumsuz çevre koşullarından koruyan güçlü antioksidanlardır. Bu nedenle dikkat çekmiş ve çeşitli akut ve kronik hastalıklarda olası yararlarını değerlendirmek için çok sayıda epidemiyolojik ve deneysel çalışmada kullanılmıştır. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar flavonoidlerin antiinflamatuvar, immünmodülatör ve güçlü antikanser aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (77-81).

Flavonoidler, insanda koruyucu enzim sistemlerini indüklemeye yeteneğine sahiptir. Çalışmalar flavonoidlerin birçok enfeksiyöz (bakteriyel ve viral hastalık) ve kardiyovasküler hastalıklar, kanserler ve yaşa bağlı hastalıklar gibi dejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etkileri olduğunu ileri sürmüştür (75, 82-84).

Flavonoidler birçok biyokimyasal özelliğe sahiptir, ancak hemen hemen her flavonoid grubunun en iyi tanımlanan özelliği, antioksidan olarak hareket etme kapasiteleridir. Antioksidan etki mekanizmaları, enzimlerin inhibisyonu veya serbest radikal oluşumunda rol oynayan eser elementlerin şelatlanması yoluyla reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunun baskılanması, antioksidan savunmaların düzenlenmesi veya

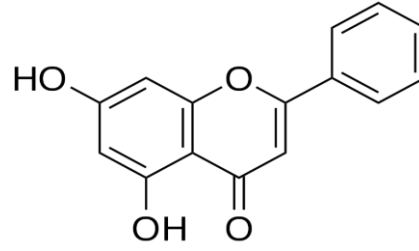
korunmasından kaynaklanabilir (75). Lipid peroksidasyonu, oksidatif stresin yaygın bir sonucudur. Flavonoidler lipidleri oksidatif hasara karşı çeşitli mekanizmalarla korur. Serbest metal iyonları, hidrojen peroksitin indirgenmesiyle son derece reaktif hidroksil radikalini üreterek ROS oluşumunu arttırır. Metal iyonlarını (demir, bakır vb.) şelatlama kapasiteleri nedeniyle flavonoidler ayrıca serbest radikal oluşumu inhibe eder (75).

Flavonoidler, doğal boyalarda, kozmetik ve cilt bakım ürünlerinde ve kırışıklık önleyici cilt ajanlarında kullanılmıştır. Bununla birlikte, bu polifenollerin en belirgin uygulamaları, tıp alanındadır. Flavonoidler açısından zengin elma kabuğu özleri, *in vitro* olarak anjiyotensin converting enzim inhibisyonu yapar ve etkili antihipertansif ajandır. Ayrıca kardiyo-metabolik bozuklukları önler ve yaşlanma ile birlikte bilişsel performansın daha iyi korunmasını sağlar (76).

Çeşitli antikanser ilaçları mevcuttur, ancak yalnızca birkaçı onkogeneze karşı inhibisyon sergiler ve bunların çoğu toksiktir ve olumsuz yan etkileri vardır. Ancak, doğal bileşiklerin insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olduğundan, bunları çeşitli bitkilerden izole etmek için artan bir çaba gösterilmiştir. Sekonder metabolitleri olan doğal biyomoleküller bitkisel içeriklidir ve geniş bir spektrumda biyolojik aktiviteler göstererek kanser önleme ve tedavisi için temel oluştururlar. Flavonoidlerin hücre büyümesini engellediği ve antikanser ajanları olarak hareket ettiği bilinmektedir (76).

1.5.1. Chrysin

Chrysin bir flavondur. Flavonlar, C halkasının 2. pozisyonuna bağlı bir fenil B halkası bulunan kaynaşmış A ve C halkalarından oluşan ortak bir kimyasal yapıya sahiptir (74). Chrysin, A halkasının 5. ve 7. pozisyonlarındaki ek hidroksillerle ortak flavon yapısını gösteren bir dihidroksiflavondur. Moleküler formülü $C_{15}H_{10}O_4$ ve molekül ağırlığı 254,24 g/mol'dür (74, 85). (Şekil 11). Apigenin, baicalein, chrysin ve scutellarein gibi flavonların, nitrojen fiksasyonu ve kimyasal savunmada önemli biyolojik rollere sahip olduğu yakın zamanda tanımlanmıştır (74).



Şekil 11. Chrysin kimyasal yapısı

Chrysin, Çin'de bitki ilacı olarak yaygın kullanılan propolis, bal ve mavi çarkıfelek çiçeği gibi bitki özlerinden elde edilebilen, çeşitli biyolojik özelliklere sahip biyoaktif bir flavondur. Bu doğal ürünler, birtakım antikanser ilaçlarının geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (86, 87). Önceki çalışmalar, chrysin'in antioksidan, antihipertansif, antidiyabetojenik ve anksiyolitik özelliklere sahip olduğunu öne sürmüştür. Ayrıca chrysin, hücre döngüsünün durmasını ve hücre apoptozisini indüklediği için, birçok kanser çeşidinde güçlü bir antikanser etki gösterir. Ancak, chrysin'in HCC'ye karşı yeni bir antitümör ajan olarak kullanılıp kullanılamayacağı kapsamlı bir şekilde araştırılmamıştır (86, 88-91).

Chrysin'in ekstrinsik apoptoz yolu aktivasyonu, siklinlerin ve Siklin bağımlı kinaz (CDK)'ların değiştirilmesi gibi farklı mekanizmalar yoluyla hücre döngüsünün durması ve apoptozu indükleyerek antitümör etkisi oluşturduğu gösterilmiştir (87). Aynı zamanda, rat sarcoma (Ras)- Rapidly accelerated fibrosarcoma (Raf)- mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK)'lar, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT), fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)-Akt, nükleer faktör kappa B (NF-κB), Wnt-β-katenin ve Notch sinyal yolları gibi kanser hücrelerindeki çoklu sinyal yollarının chrysin tarafından hücre proliferasyonu, anjiyogenez, invazyon ve metastazı inhibe etmek amacıyla modüle edildiği de kanıtlanmıştır (87, 92-94). Çalışmalarda chrysin'in etki mekanizmasının bir yolunun da, muhtemelen kaspaz aktivasyonu ve 'Akt' sinyalinin inaktivasyonu olduğu gösterilmiştir. Hem bir kemopreventif hem de bir kemoterapötik ajan olarak antikanser aktivitesi olan bir dizi biyolojik etkiye sahiptir. Chrysin antitümör aktivitesi, hücre apoptozu ve hücre döngüsü durmasını indükleme yoluyla mide, meme, kolorektal ve prostat kanseri dahil olmak üzere çeşitli insan kanser hücre dizilerinde belgelenmiştir. Önceki çalışmalar, p53/Bcl2/kaspaz-9 yolu

aktivasyonu ve heksokinaz-2'yi hedefleme yoluyla HCC'ye karşı antitümör potansiyelini göstermiştir. (73, 74, 86, 95-100).

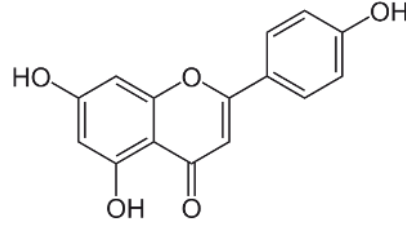
Chrysin sisplatin ile kombinasyon tedavisi olarak kullanıldığında sisplatinin neden olduğu karaciğer ve kolon toksisitesini hafiflettiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, anti-proliferatif etkisinin kesin mekanizması tanımlanmamıştır (95). Son zamanlarda, birtakım çalışmalar, chrysin'in kanserde ilaç direnci, invazyon, proliferasyon ve apoptozda engelleyici rol oynadığını onaylamıştır. Ayrıca, Lirdprapamongkol ve arkadaşları chrysin'in, kanser hücrelerinin Tümör Nekroz Faktörü ile ilişkili Apoptoz-İndükleyici Ligand (TRAIL) direncini STAT-3'ü bloke ederek yendiğini bulmuştur (93, 101-105).

Chrysin tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α)'nın apoptozu tetiklemedeki etkilerini güçlendirir (74). Ayrıca nükleer faktör IL-6'nın (NF-IL6) inhibisyonu yoluyla lipopolisakkarit kaynaklı siklooksijenaz-2 (COX-2) ekspresyonunu da inhibe eder. Böylece chrysin inflamatuvar sitokinlerin sinyal yollarını modüle ederek kanser hücrelerinin ilaca duyarlılığını artırabilir (74).

Tüm bunlarla birlikte, chrysin'in insan kanserleri üzerinde etkilerine ilişkin çalışmalar nadirdir (74). Apoptozun aktivasyonu, chrysin de dahil olmak üzere şu anda çalışılan potansiyel antikanser ajanlarının çoğunun antikanser aktivitelerinden sorumlu olan anahtar moleküler mekanizmadır (74).

1.5.2. Apigenin

Apigenin birçok meyve, sebze ve bitkide bulunan antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyel, antiviral ve antikanser etkileri dahil çeşitli biyolojik etkileri olan doğal olarak oluşan bitki flavonudur (106, 107). '4, 5 ve 7' konumundaki 'OH' fonksiyonel grubu ile bir trihidroksiflavondur. Apigenin veya 4,5,7-trihidroksiflavon, $C_{15}H_{10}O_5$ kimyasal formülüne ve 270,24 g/mol moleküler ağırlığa sahiptir (108, 109) (Şekil 12). Doğada lipofiliktir ve düşük asidik ortamda konakçının gastrointestinal sisteminde hayatta kalır (109). Doğal kaynaklarda, apigenin-7-O-glukozit ve çeşitli açillenmiş türevler olarak bulunur (106).



Şekil 12. Apigenin kimyasal yapısı

Apigenin, papatya (*Matricaria recutita*), bazı yeşil sebzeler, enginar, kereviz, maydanoz ve kurutulmuş kekikte bulunan en yaygın monomerik flavonoidlerden biridir (109). Ayrıca üzüm, elma, portakal gibi çeşitli meyvelerde ve soğanda bol miktarda bulunur (107, 108).

Yüzlerce yıldır apigenin geleneksel bir ilaç olarak kullanılmıştır. Örneğin, yüksek düzeyde apigenin içeren çarkıfelek çiçeği, inatçı astım, uykusuzluk, parkinson hastalığı, nevrojji ve zonayı tedavi etmek için etkili bir şekilde kullanılmıştır. Papatya geleneksel olarak uykusuzluk ve kaygıyı tedavi etmek için de kullanılır (106, 109).

Apigenin kanser de dahil olmak üzere farklı hastalıklarla mücadelede faydalı biyoaktiviteler gösterir. Son yıllarda antitümör aktivitesi nedeniyle artan bir ilgi görmüştür (106, 109). Birkaç çalışma apigenin'in tümör hücresi invazyonu ve metastazını inhibe ettiğini göstermiştir. Örneğin, gen ekspresyon paternlerini değiştirerek ve kanser hücresi apoptozunu indükleyerek hepatik hücre büyümesini inhibe eder (106, 110-114). Ayrıca lösemi hücrelerinde otofajiyi indüklemeye yardımcı olur ve antineoplastik bir ajan görevi görür (109). Birkaç çalışma, antikanser aktivitesinin, apoptozu ve hücre döngüsü durmasını indükleme yeteneğinden kaynaklandığını bildirmiştir (108, 115-117).

Apigenin'in antiinflamatuvar ve antioksidan potansiyeli, konak organizmada hücresel düzeyde apoptozu ve proliferasyonu indükler ve kansere neden olan genlerin aşırı ekspresyonunu durdurur (109).

Ayrıca bu flavonoidin, farklı sinyal kaskadlarını aktive ederek ve NF-κB yolunun aktivitesini inhibe ederek antioksidan potansiyeli indüklediği düşünülmektedir. Antioksidan potansiyelini arttırmak için apigenin eritrosit süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve faz II detoksifikasyon enzimleri dahil olmak üzere antioksidan enzimleri aktive eder. Apigenin sadece TNF-α, IL-6 ve CD40 gibi tümöre neden olan farklı genlerin ekspresyonunu azaltmakla kalmamış, aynı

zamanda interferon gama (IFN- γ) gen inhibisyonu yoluyla tümör baskılayıcı STAT1 geninin aktivitesini artırmıştır. Fareler üzerinde yapılan araştırmalar apigenin'in farelerde kolesterol seviyelerini, yağ asidi üretimini ve obeziteyi azalttığını gösterdi. Ayrıca nikotinamid adenin dinükleotid seviyelerini düzenler ve insan vücudundaki glukoz seviyelerini stabilize eder. Farklı hücresel süreçleri ve proinflamatuvar yolları inhibe ederek inflamasyonu ve ağrıyı azaltır. NF- κ B, JAK2 ve STAT-3 yollarının aktivitesi ve sinyalizasyonunu azaltır. Th2 sitokinler, IL-4, IL-10, IL-1 β ve NLRP3 genleri dahil olmak üzere farklı sitokinlerin ekspresyonunu baskılar(109, 118-124).

Apigenin hipoglisemik etkiler gösterir (109). Biyoaktif bileşikler insülin seviyelerini azaltabilir ve vücuttaki normal glukoz seviyelerinin sürdürülmesine yardımcı olur. Ayrıca yara ve kemik iyileştirici etkiyi artırma potansiyeline sahiptir. Farklı kronik hastalıklar (Alzheimer, felç, diyabet, kanser, anksiyete ve depresyon gibi) üzerinde tedavi edici etkiye sahip olan önemli bir bitkisel bileşiktir (109). Fareler üzerinde yapılan bir araştırma, apigenin'in lipopolisakkarit kaynaklı COX-2 ve NOS aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir ki, bu da vücutlarında antiinflamatuvar yanıtı neden olur (109, 125). Ayrıca, son çalışmalar apigenin tarafından Natural Killer (NK) proliferasyonunda artış yoluyla NK hücrelerinin immünmodülatörü olarak rol oynama potansiyeline sahip olduğunu da göstermiştir (107, 126).

Son zamanlarda, uygunsuz antibiyotik kullanımına bağlı çoklu ilaç dirençli organizmaların sayısı giderek artmaktadır. Antimikrobiyal direnç (AMR) riski ve ilişkili komorbiditeler sürekli artmaktadır. Bu sorunun üstesinden gelmek için tıbbi bitkiler, özellikle apigenin ve biyoaktif bileşikler, farklı metabolik hastalıkları tedavi etmenin alternatif bir yolu olarak kabul edilebilir (109).

Genel olarak, yüksek dozlarda apigenin tüketimi güvenli kabul edilir ve yararları olabilir. Bununla birlikte, bir kişi özellikle siklosporin, varfarin veya bazı kemoterapi ilaçları alıyorsa, apigenin ile önemli bir ilaç etkileşimi olasılığı vardır (109).

Apigenin'in faydalı etkileri nedeniyle yakın gelecekte diyet takviyesi veya yiyecek katkı maddesi olarak kullanılabileceğini belirtmekte fayda var. Bununla birlikte, apigenin'i terapötik bir ilaç olarak geliştirmede bir sonraki adım olarak daha fazla metabolomik, proteomik ve transkriptomik araştırmaya ihtiyaç vardır (109).

1.6. Karsinogeneizde Sinyal Yolları

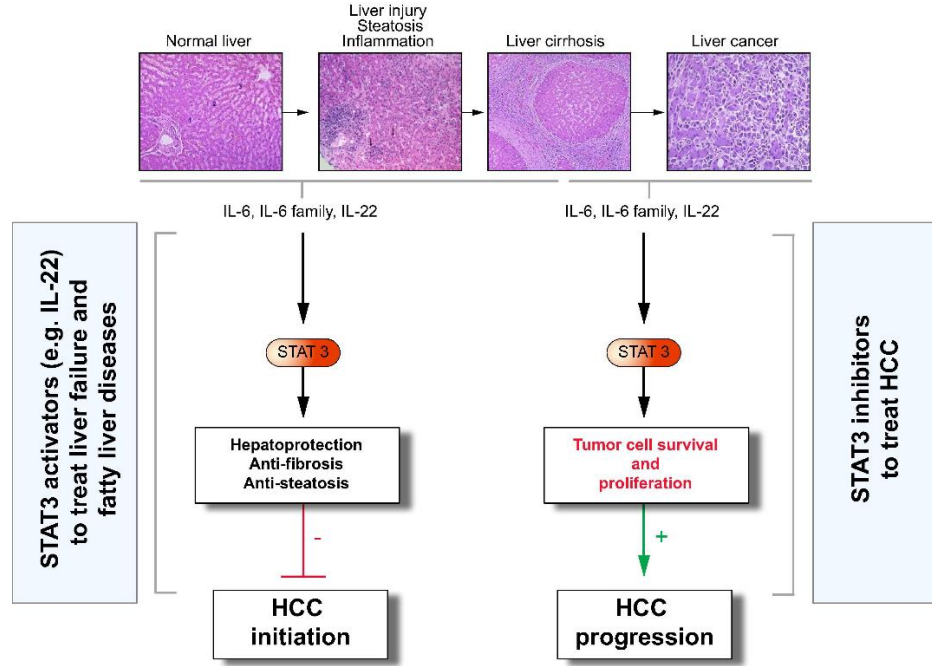
1.6.1. İnflamatuvar Sinyal Yolları

1.6.1.1. Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü-3

Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) proteinleri; birtakım sitokinler, büyüme faktörleri ve diğer peptit ligandlar tarafından aktive edilebilen transkripsiyon faktörü sınıfındırlar. STAT'lar, bazı sitokin sinyallerine yanıt olarak sitoplazmada tirozin fosforilasyonu ile aktivasyona uğrar. STAT-3'ün tirozin fosforilasyonuna en yaygın olarak Janus kinazlar (JAK'ler), özellikle de JAK2 aracılık eder. Aktivitesi aynı zamanda serin fosforilasyonu ve geri dönüşümlü asetilasyon dahil diğer mekanizmalar tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Aktivasyonun ardından, STAT proteinleri çekirdeğe transfer olup, burada spesifik hedeflerine bağlanır ve transkripsiyon faktörleri olarak görev yaparlar (127, 128).

Daha önce yapılan çalışmalar, DNA metilasyonu ve kromatin modülasyonunun epigenetik mekanizmalar aracılığıyla STAT-3 tarafından da düzenlenebileceğini göstermiştir. STAT'ler, apoptoz, hücre proliferasyonu, bölünme ve farklılaşma gibi çok sayıda fizyolojik süreci etkiler. STAT'lerin aktivasyonu sağlıklı bir hücrede, kontrolsüz gen ekspresyonunu önlemek için sıkı şekilde düzenlenir. STAT-3 uyarılmamış hücrelerde inaktiftir, ancak çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri (IL-6, Epidermal büyüme faktörü (EGF) ailesi üyeleri ve ayrıca hepatosit büyüme faktörü (HGF) tarafından hızla aktive edilir. Bununla birlikte, kanser hücrelerinde STAT-3 genellikle yapısal olarak aktive olur. Kanser hücrelerinde uzun süreli STAT aktivasyonu, ilaç direnci ve kötü prognoz gibi olumsuz sonuçlara neden olabilir (127, 129-132).

STAT-3'ü aktive eden başlıca sitokinlerden biri olan IL-6, karaciğer hastalıkları ve HCC'de yükselir. Ayrıca, HCV enfeksiyonu ve hepatosteatoz dahil birçok HCC risk faktörü oksidatif strese neden olur ve STAT-3 de ROS birikimine yanıt olarak aktive edilebilir (133-137). Kalıcı aktivasyonu, HCC hasta dokularının önemli kısmında tespit edilmiştir ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Çalışmalar, HCC hastalarında tümör büyümesi ve metastazında STAT-3'ün kritik roller oynadığını göstermektedir. Bundan dolayı, STAT-3, HCC hastalarının tedavisinde umut verici bir terapötik hedef olabilir (129, 130, 138) (Şekil 13).



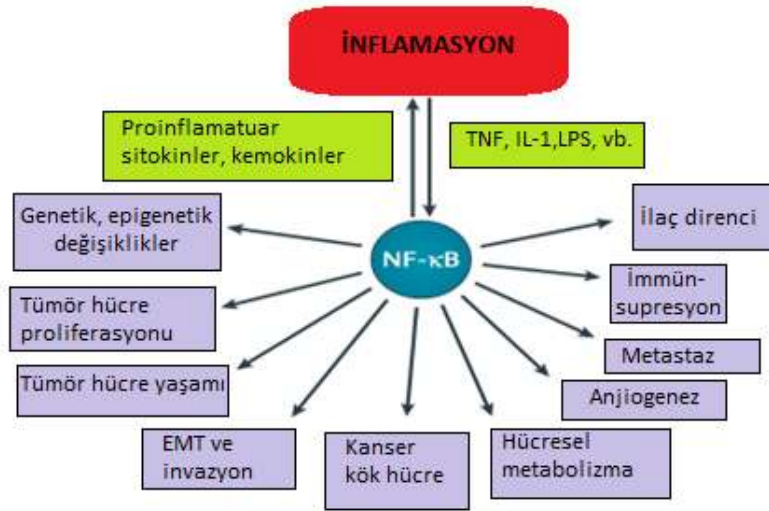
Şekil 13. HCC’de STAT-3 aktivasyonu (139)

1.6.1.2. Nükleer Faktör Kappa B

Nükleer faktör kappa B (NF- κ B), inflamatuvar yanıtları koordine etmede merkezi rol oynayan bir dimerik transkripsiyon faktörleri ailesidir. NF- κ B sistemi sıkı bir şekilde düzenlenir ve yanlış düzenlenmesi, kanserden inflamatuvar ve bağışıklık hastalıklarına kadar çok çeşitli hastalıklarda rol oynar (140). NF- κ B, inflamatuvar yanıtın ve hücre ölümünün temel transkripsiyonel düzenleyicisidir ve karaciğerdeki inflamatuvar sinyal yollarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (141, 142). Son yıllarda NF- κ B’nin hedefleri veya aktivatörleri olan birtakım inflamatuvar aracının kronik karaciğer hastalığının ilerlemesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Alkolik karaciğer hastalığı, non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), viral hepatit ve biliyer karaciğer hastalığı dahil olmak üzere hemen hemen her kronik karaciğer hastalığında aktive edilir. Ayrıca hepatositlerde, Kupffer hücrelerinde ve hepatik stellat hücrelerde (HSC’ler) çok sayıda önemli işlevi düzenler (141). NF- κ B aktivasyonu, farklı etiyojilere sahip insan karaciğer kanserlerinde erken aynı zamanda sık görülen bir olaydır ve bir dizi faktör, hepatokarsinogenez sırasında aktivasyonunu tetikleyebilir. NF- κ B’nin hepatositlerdeki prokarsinojenik rolü ilk olarak kronik biliyer hepatite yanıt olarak HCC geliştirilen Mdr2^{-/-} nakavt farede

gösterilmiştir (141, 143). NF- κ B, hücre proliferasyonunu destekleyerek ve hücre ölümünü baskılayarak tümör oluşumuna katkı sağlar (144).

NF- κ B hücrelerin enfeksiyonlar ve ultraviyole radyasyon dahil olmak üzere stresli uyaranlara nasıl tepki verdiğinde kritik bir rol oynar. NF- κ B sinyalinin aracılık ettiği inflammatuar yanıt yolunun malign durumun sürdürülmesinde rol oynadığı bildirilmiştir. NF- κ B aktivasyonu apoptozu baskılar, EMT'yi aktive eder, maspin'i (bir metastaz baskılayıcı gen) baskılar ve HCC'yi besleyen yeni kan damarlarının oluşumunda gerekli olan VEGF ve diğer anjiyojenik faktörleri hedefler (22, 145-148) (Şekil 14).



Şekil 14. NF- κ B ve karsinogenez

1.6.2. Protein Fosfataz 2A'nın Kanserli inhibitörü

Karsinogenezdeki ana sinyal yolunun düzenlenmesinde tümör baskılayıcı rol oynayan Protein fosfataz 2A (PP2A)'nın endojen inhibitörü ve Myc stabilizatörü olan, PP2A'nın kanserli inhibitörü (CIP2A) onkojenik bir proteindir, malign hücre transformasyonunu ve tümör büyümesini artırır. PP2A, hücredeki serin/treonin fosfataz aktivitesinin çoğundan sorumludur ve birkaç onkojenik sinyal yolunun aktivitesini inhibe ederek tümör baskılayıcı görevi görür. CIP2A, PP2A'ya bağlanır ve fosfataz fonksiyonlarını inhibe ederek hücrelerin tümörojenik transformasyonuna neden olur. CIP2A, Myc'in serin 62'de PP2A aracılı defosforilasyonunu inhibe ederek c- Myc'yi stabilize eder. Normalde CIP2A ekspresyonu sadece embriyonik gelişimde mevcuttur, doğumdan hemen sonra tüm dokularda bastırılır ve genellikle normal

dokularda düşük seviyede eksprese edilir. CIP2A ilk olarak mide ve karaciğer kanserinde tümörle ilişkili bir otoantijen olarak tanımlandı. Kanserli hastaların serumlarında bulunabilen CIP2A'ya karşı yüksek otoantikör sıklığı, onu biyobelirteç geliştirmede umut veren bir aday yapar (149-153).

HCC'de, CIP2A'nın ekspresyon seviyesinin klinik sonuçlarla ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, CIP2A ekspresyonunun erlotinib ve diğer anti-HCC terapiler tarafından da inhibe edildiği düşünülmüştür. Bir çalışmada CIP2A'nın çoğu HCC tümörlerinde aşırı ifade edildiği ve intratümör CIP2A mRNA'sının HCC hastalarının kötü prognozu ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bulunmuştur (154-156).

1.6.3. Apoptoz Yolağı

Apoptoz, DNA hasarı sonrası meydana gelen veya gelişim sırasında oluşanlar gibi hasarlı hücrelerin düzenli ve etkili bir şekilde çıkarılmasıyla sonuçlanan programlanmış hücre ölümünün bir şeklidir. Apoptoz, genotoksik stres gibi hücre içinden gelen sinyaller veya ligandların hücre yüzeyi ölüm reseptörlerine bağlanması gibi dış sinyaller tarafından tetiklenebilir. Apoptoz, birtakım fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde önemli roller oynar. İstenmeyen, yaşlanmış veya hasarlı hücrelerin yok edilmesi için temel bir mekanizmadır. Apoptotik hücre ölümü mekanizmasındaki düzensizlik, kanserin ayırt edici bir özelliğidir. Bu süreçteki bozulma, kontrolsüz hücre çoğalması, kanserin gelişmesi ve ilerlemesi ile ilişkilidir, aynı zamanda tedavilere karşı tümör direncinden de sorumludur. Şu anda klinik onkolojide kullanılan çoğu antikanser ilacı, kanser hücresi ölümünü tetiklemek için bozulmamış apoptotik sinyal yollarından yararlanır. Bu nedenle, apoptotik sinyal yollarının daha iyi anlaşılması, kanser tedavisinin etkinliğini artırabilir (157, 158). Apoptotik dirençle ilgili molekülleri hedef alan terapötik stratejiler kanser hücrelerinin apoptoza duyarlılığını geri kazandırmak ve tedavilerin etkisizliğinin üstesinden gelmek için izlenecek bir yoldur (157). Apoptotik mekanizmalardaki kusurlar, hücresel replikasyon, büyüme, farklılaşma ve apoptoz arasındaki dengenin bozulmasına, karaciğerdeki preneoplastik ve tümöral lezyonların büyümesine neden olur. Biriken kanıtlar, insan hepatoselüler karsinomunda kusurlu bir apoptotik süreci göstermektedir. Bu süreci çeşitli şekillerde indükleyen birçok potansiyel terapötik

strateji, hepatoselüler karsinom yönetimine uygulanabilir (158). Aşağıda apoptoz yolunun çalışmamızda incelediğimiz parametrelerine değinilmiştir.

1.6.3.1. Survivin

17. kromozomda (17q25.3) lokalize BIRC5 geni, normalde insanlarda fetal gelişim sırasında ve erişkinlerde eksprese edilen apoptoz ailesinin inhibitör (IAP)'lerinin bir üyesi olan survivin proteinini kodlar. Survivin, birçoğu apoptozun inhibisyonu ve hücre proliferasyonunun desteklenmesine katkıda bulunan farklı izoformlara sahip küçük bir proteindir. İnsanlarda kromozom 17'deki survivin gen ekspresyonunun kontrolü karmaşıktır ve çok sayıda pozitif ve negatif düzenleyiciyi içerir. Birkaç onkojenik transkripsiyon faktörü, survivin geninin ekspresyonunu uyarırken, çoklu tümör baskılayıcılar survivin genini aktif olarak bastırır. Son 20 yıldaki araştırmalar göstermiştir ki, survivin çoğu kanser hücresinde yüksek oranda eksprese edilmektedir. Mesane kanseri, akciğer kanseri, meme kanseri, mide, yemek borusu, karaciğer, yumurtalık kanserleri ve hematolojik kanserler de dahil olmak üzere neredeyse tüm insan malignitelerinde survivin'in aşırı ekspresyonu rapor edilmiştir (159-163). Aberran ekspresyonu, tümör hücresi proliferasyonu, invazyonu, anjiyogenez, terapötik direnç ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Bu nedenle survivin tanısal ve prognostik bir belirteç olarak kabul edilmiştir. Ayrıca kanser tedavisi için mükemmel bir moleküler hedef olarak tanımlanmıştır (164). Survivin'i hedefleyen moleküller geliştirmek için girişimlerde bulunulmasına rağmen, şu anda terapötik kullanımda olan bir tedavi yoktur (159).

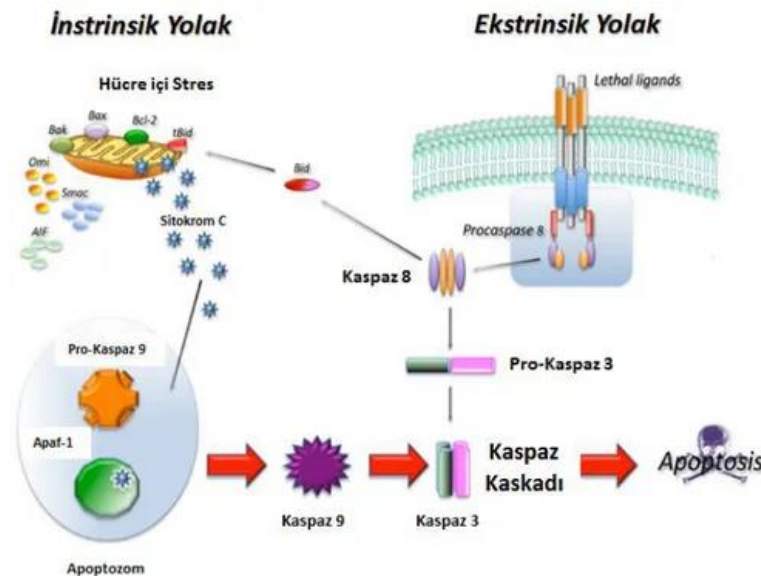
Survivin geninin transkripsiyonu hücre döngüsü tarafından düzenlenir ve mitozda zirve yapar. Survivin, G2/M fazında yüksek oranda eksprese edilir ve hücre döngüsünün G1 fazında hızla azalır. Bununla birlikte, özellikle büyüme faktörü veya sitokin stimülasyonuna yanıt olarak hücre döngüsünden bağımsız hayatta kalan gen ekspresyonunun örnekleri de tanımlanmıştır (160, 161).

HCC dokularında survivin ekspresyonu incelenmiş ve sonuçlar pozitif oranın %70'e ulaştığını göstermiştir. Bununla birlikte, survivin parakanseröz dokularda ve sirotik karaciğer dokularında eksprese edilmez. Survivin, tümör gelişimini ve ilerlemesini teşvik eden diğer faktörlerle sinerji içinde hareket edebilir, böylece HCC hücrelerinin biyolojik davranışlarını daha fazla etkileyip HCC'nin malign ilerlemesini

kolaylaştırabilir. Survivin ekspresyonu, HCC hücrelerinin proliferatif aktivitesini destekler, apoptozu inhibe eder, stromal anjiyogenezi indükler ve radyasyon tedavisine ve kemoterapiye direnci artırır. Pozitif survivin oranı, tümör boyutu, kapsüler invazyon, portal ven tümör trombozu, lenf nodu metastazı ve tümörlerin klinik evresi ile yakından ilişkilidir (165, 166).

1.6.3.2. Kaspaz -3

Apoptoz, inflamatuvar bir yanıt ortaya çıkarmadan hücrel parçalanmaya yol açan programlanmış hücre ölümünün aktif bir şeklidir. Kaspazlar, apoptozun temel itici güçleri olarak, apoptozun karmaşık biyolojik sürecini düzenleyen bir sistein proteaz ailesidir. Ayrıca doku farklılaşması, hücre çoğalması ve nörodejenerasyon gibi apoptotik olmayan biyolojik süreçlere de katılırlar. Kaspazlar, inaktif zimojenler olarak ifade edilir, ancak aktivasyon üzerine (örneğin bölünme), başlatıcı kaspazlar, kaspaz-2 ve -9 (intrinsik yol) ve kaspaz-8 ve -10 (ekstrinsik yol) yoluyla ölüm uyarıları çoğaltılır ve hücrede kaspaz-3 ve -7 yoluyla parçalanmaya yol açar. Kaspaz-3 ve -7'nin her ikisi de uygulayıcı kaspaz olsa da, apoptoz sırasında kaspaz-3'ün esas uygulayıcı kaspaz olduğu kabul edilir. Geleneksel olarak, kaspaz-3'ün aktivasyonu hücre ölümünün habercisi olmuştur. Kaspaz-3, aktive edildikten sonra hücre içinde fonksiyonel olarak kritik birçok proteini parçalayarak apoptoza yol açar (167-169) (Şekil 15).



Şekil 15. Apoptoz ekstrinsik ve intrinsik yol

1.6.3.3. Annexin V

Annexin V, aneksin ailesine ait ve 32-35 kDa moleküler kütleye sahip, kalsiyum tarafından düzenlenen, fosfolipid bağlayıcı bir proteindir. İlk olarak antikoagülan ve antitrombotik bir protein olarak keşfedilmiştir. Annexin V hücresel çoğalma ve sinyal iletimi dahil olmak üzere birçok hücresel işlevde yer almıştır. Temel biyokimyasal özelliği, anyonik fosfolipidleri Ca^{2+} bağımlı olarak bağlamasıdır (170, 171). Annexin V apoptoz için bir belirteçtir, aynı zamanda kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve tehlikeli virüslere karşı terapötik potansiyele sahiptir (172). Esas olarak sitoplazmada bulunur, hücre dışına salgılanabilir. Anormal ekspresyona edilen Annexin V, birçok hastalıkla ilişkilidir (173).

1.6.4. Hedgehog Sinyal Yolu

Hedgehog (HH) sinyal yolu hücre zarından çekirdeğe sinyal iletiminin bir yoludur. Doku homeostazını ve kök hücre davranışlarını, normal hücre büyümesini ve farklılaşmasını düzenler. Embriyonik gelişimde önemli bir rol oynar. Ancak yetişkin dokularda çoğunlukla inaktif veya zayıf aktivitededir. Gerektiğinde, örneğin yara iyileşmesinde aktive edilebilir.

Bu yoldaki yanlış düzenlenme sonucu, anormal HH sinyali, tümör oluşumuna neden olur ve neoplastik dönüşüm, tümör ilerlemesi, metastaz ve ilaç direnci gibi insan kanserlerinin agresif fenotiplerine sebebiyet verir. Bu yoldaki anormal sinyal cilt, beyin, karaciğer, prostat ve meme kanserinde bulunabilir. HH sinyal yolu, HCC hastalarında oldukça aktiftir. Aktivasyonu, siklin B1 ve sikline bağımlı kinaz 1'in (CDK1) aşırı ekspresyonunu takiben hücre proliferasyonunu kolaylaştıran G2-M geçişini artırır. HH sinyal aktivasyonunda hedgehog (Hh) ligandı, patch reseptör (Ptch) ve smoothened (SMO) olmak üzere üç protein yer alır (174, 175).

1.6.4.1. Smoothened

SMO proteini, HH sinyal yolunda bir yardımcı reseptördür, yani reseptör kompleksinin bir sinyal bileşenini temsil eder. Yapısal olarak G-protein-bağılı reseptörlere benzer, yedi geçişli bir transmembran proteindir ve işlevi için vazgeçilmez olan hücre dışı sistein açısından zengin bir alana sahiptir. SMO, farklı malignitelerin tedavisinde HH sinyalinin inhibisyonu yoluyla umut vadeden bir terapötik hedeftir.

SMO erken hepatokarsinogenez sırasında epitelyal-mezenkimal geçişin desteklenmesinde önemli rol oynar. SMO'nun aşırı ekspresyonu, hepatokarsinogenezde önemli bir rol oynayan c-Myc (hücreyel myc geni) ekspresyonunu indükler ve yüksek ekspresyonu tümör boyutları ile de ilişkilidir (174-176).

1.6.4.2. Sonic Hedgehog

Hedgehog sinyali; Sonic Hedgehog (SHH), Indian hedgehog ve Desert hedgehog olmak üzere üç ligand tarafından başlatılabilir. Bununla birlikte, SHH bu ligandların en sık ifade edilen ve aynı zamanda en güçlü olanıdır (177). Sonic hedgehog sinyali, yetişkin dokularında sessiz kalır. Ancak, birçok yetişkin dokusunda, diferansiyasyon, proliferasyon ve onarım sırasında aktif hale gelir. SHH sinyalinin anormal aktivasyonu, cilt, beyin, karaciğer, safra kesesi, pankreas, mide, kolon, meme, akciğer, prostat kanserlerinde ve hematolojik malignitelerde meydana gelir. Hayvan çalışmalarında, kronik karaciğer hasarının SHH yolunu aktive ettiği gösterilmiştir. Yine bir çalışmada hepatokarsinogenez sırasında SHH sinyal yolunun aktive olduğu bulunmuştur. Aktive edilmiş SHH sinyali, siklin B1 ve sikline bağımlı kinaz 1'de artış yoluyla G2/M geçişini güçlendirdikten sonra hücre proliferasyonunu kolaylaştırır. Başka bir çalışmada ise SHH sinyalinin yüksek ekspresyonunun HCC de rezeksiyon sonrası nüks riskini etkilediği bildirilmiştir (178-181).

1.6.5. Notch Sinyal Yolağı

Notch sinyal yolu, hücre farklılaşmasının kontrolü, hayatta kalma, çoğalma ve anjiyogenez gibi normal gelişim için gerekli olan birçok temel süreci düzenler. Memelilerde dört Notch reseptörü (Notch1- Notch4) ve iki ligand ailesi; Jagged (JAG1, 2) ve Delta benzeri ligandlar (DLL 1, 3, 4) vardır (182).

1.6.5.1. Jagged1

Notch sinyal yolunun önemli bir bileşeni olan Jagged1 (JAG1), embriyonik gelişim ve kanser gibi hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerde önemli rol oynar. Farelerde JAG1 gen nakavtı erken embriyogenezde ölümcül olan ciddi vasküler bozukluklara neden olur ve insanlarda JAG1 mutasyonları kalıtsal çoklu gelişimsel organ bozukluğu olan Alagille sendromundan sorumludur. Notch sinyal yolundaki

rolünün yanı sıra, JAG1'in tümör anjiyogenezi, neoplastik hücre büyümesi, kanser kök hücreleri (CSC), epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), metastatik süreç ve çeşitli kanser türlerinde tedaviye direnç dahil kanserin birçok sürecinde rol oynadığı kanıtlanmıştır. JAG1 ekspresyonu, TGF- β , WNT/ β -katenin, IL-6 ve NF- κ B gibi kanserde önemli olan sinyal yollarının yanı sıra Notch yolunun kendisi tarafından indüklenebilir (183).

1.6.5.2. Notch1

Notch1, tüm çok hücreli organizmalarda doğuştan gelen bir sinyal yolunun parçası olan, embriyogenez ve doku homeostazında çok önemli rol oynayan Notch reseptör ailesine (Notch1-4) aittir. Notch reseptörleri, çoğalma, farklılaşma, apoptoz ve kök hücre onarımı dahil temel hücre fonksiyonları düzenlerler. Notch1, en kapsamlı şekilde çalışılan ve karakterize edilen Notch ailesi üyesidir, çünkü insan kanserlerindeki mutasyon prevalansı diğer üyelere göre daha yüksektir. Anormal Notch1 sinyali, meme kanseri, lösemiler, deri, yemek borusu, serviks ve akciğerin skuamöz kanserleri dahil çeşitli kanser türlerinin ilerlemesinde rol oynar (184). Bir çalışmada, neoplastik hepatositlerde çevreleyen sirotik dokuya kıyasla Notch1'in anormal nükleer ekspresyonu bildirilmiştir (185, 186).

DEN ve 2-AAF kullanarak HCC modeli oluşturulan ratlarda apigenin ve chrysin'in tek tek ve kombine kullanımının antiinflamatuvar, antiproliferatif, apoptotik etkinliklerini değerlendirmek istediğimiz çalışmamızda DEN uygulamasının inflamatuvar sinyal yollarının düzenlenmesinde önemli rol oynayan STAT-3 ve NF- κ B ekspresyonu ve karsinogenezdeki ana sinyal yolunun düzenlenmesinde tümör baskılayıcı rol oynayan Protein fosfataz 2A'nın endojen inhibitörü ve kötü prognoz ile ilişkili CIP2A ekspresyonu ile apoptoz ailesinin inhibitörü survivin, hücre ölümünün habercisi kaspaz-3, apoptotik hücrelerin tanımlanması ve değerlendirilmesi için seçici bir probu temsil eden annexin V seviyelerini, aynı zamanda doku homeostazını ve kök hücre davranışlarını, normal hücre büyümesini ve farklılaşmasını düzenleyen HH yolunda bir yardımcı reseptör ve kanser terapisinde HH sinyalinin inhibisyonu yoluyla umut vadeden bir terapötik hedef olan SMO ve SHH ile tümör anjiyogenezi, neoplastik hücre büyümesi, metastatik süreç ve tedaviye direnç gibi birçok süreçte rol oynayan Notch sinyal yolu moleküllerinden Notch1 ve Jagged1 seviyelerini değerlendirmek amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırılması

Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM)'nde yürütülen bu çalışma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 14/07/2020 tarih ve 2020/10 sayılı onayı ile standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapılmıştır.

Uyguladığımız deney protokolü süresince tüm sıçanlar 12 saat ışık, 12 saat karanlık fotoperiyodunda, otomatik olarak klimatize edilen odalarda, $21\pm1^{\circ}\text{C}$ sabit ısıda özel dizayn edilmiş kafeslerde 4 ya da 5'li olacak şekilde barındırılmış olup, standart pellet yemi ve çeşme suyu ad-libitum beslenmelerinde kullanılmıştır. Bu süreçte günlük bakımları yapılmıştır.

Çalışmaya, 8-10 haftalık, 250 ± 25 gr, toplam 48 adet Wistar Albino cins erkek sıçan kullanılarak başlanmıştır. 5 farklı grupta yürütülen çalışmada kontrol grubu (n=8), DEN grubu (n=10), chrysin tedavi grubu (n=10), apigenin tedavi grubu (n=10), apigenin+chrysin tedavi grubu (n=10) şekilde belirlendi (gruplar için sayı belirleme mortalite oranları düşünülerek yapıldı). Tüm gruptaki sıçanların vücut kütleleri başlangıçta, çalışma süresi boyunca haftada bir kez ve çalışma sonunda sakrifiye edilmeden önce ölçüldü. Çalışma tamamlandığında ise deney süresince meydana gelen ölümlerden dolayı 40 sıçan ile deney tamamlanmıştır. Deney süresince anesteziklerin muhtemel interferansını bertaraf etmek amacıyla uygulamalar esnasında anestezik ajan kullanılmamıştır.

2.1.2. Deneysel HCC Modelinin Oluşturulması ve Tedavi Protokolü

Hayvan modelleri, hepatik karsinogenez çalışmasında çok önemli araçlar olarak görülmektedir. Kemirgenler ve insanlar arasındaki fizyolojik ve genetik benzerlikler, kısa ömür, üreme kapasitesi ve manipüle etme yöntemlerinin çeşitliliği nedeniyle, hayvan modelleri kanser araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Sıçanlarda karaciğer kanseri indüksiyonu üzerine yapılan çalışmalarda DEN, 2-AAF, fenobarbital ve aflatoksin B1 gibi kimyasal ajanlar kullanılmaktadır (11).

Kurma ve ark. DEN ile indüklenen HCC sıçan modelinde, hepatokarsinogenez sürecinin, insan HCC'sinde gözlenen temel olayları gösteren karaciğer hasarı, hepatosit proliferasyonu, karaciğer fibrozu/sirozu, düzensiz damarlanma, kronik inflamasyon ve karaciğerin immün mikro ortamının modülasyonlarını içerdiğini göstermişlerdir. Bulgularının DEN kaynaklı HCC rat modelini kapsamlı bir şekilde karakterize ettiğini ve bu modelin tümör mikro ortamının özellikleri dahil insan HCC'sinin patolojik sürecini büyük ölçüde taklit ettiğini söylemişlerdir (2). Mohammed El-Magd ve ark. HCC'yi indüklemek için, sıçanlara 1 ml PBS içinde çözölmüş olarak tek doz 200 mg/kg DEN intraperitoneal yolla enjekte etmiş ve 2. haftanın başında, DEN ile indüklenen hepatik odakların gelişimini desteklemek için 2 hafta süresince 2-asetilaminofloren (2-AAF; 150 mg/kg) oral yoldan verilmiştir. Benzer bir intraperitoneal DEN dozu ve ardından tekrarlanan 2-AAF dozlarının sıçanlarda HCC'yi başarıyla indüklediğini söylemişlerdir (187). Malik ve ark. erkek Wistar sıçanlarına tek seferlik DEN (200 mg/kg) dozunda vermiş ve 1 haftalık aradan sonra, DEN uygulanan hayvanlara, destekleyici madde olarak hizmet eden %1 karboksimetil selüloz içinde oral olarak tekrarlanan dozlarda 2-asetaminoflorin (150 mg/kg) uygulamışlardır. DEN uygulamasından otuz gün sonra, histopatolojik analiz ile belirgin olarak hepatoselöler hasar gözleendiğini söylemişlerdir (10). Amereh ve ark. sıçanlara hepatokarsinogenezi başlatmak (inisiasyon) için tek doz DEN intraperitoneal (200 mg/kg) dozunda enjekte etmişlerdir. İki hafta sonra, karaciğer kanseri gelişiminin desteklenmesi için iki hafta boyunca günde bir kez 2-AAF (30 mg/kg) oral yolla uygulamışlardır. HCC oluşumunu, histopatolojik değerlendirmeler ve AFP, gama glutamil transpeptidaz (GGT), alanin transaminaz ve aspartat transaminaz dahil karaciğer hasarı ve kanser belirteçlerinin ölçümü ile doğrulamışlardır (188). Ahmed ve ark. Wistar cins erkek sıçanlarda hepatokarsinogenezi indüklemek için; iki hafta boyunca haftada iki kez DEN (150 mg/kg) intraperitoneal olarak, ardından 3 hafta boyunca haftada 4 kez 2-AAF (20 mg/kg) oral yolla uygulamışlardır (189).

Literatürde yaptığımız taramalar göz önüne alınarak, deneysel hepatoselöler karsinom modeli oluşturmak istediğimiz çalışmamızda deneyin başladığı birinci ve ikinci hafta inisiyasyon başlangıcı için kanser gruplarına 150 mg/kg DEN tek doz intraperitoneal (i.p.) uygulandı. Bu işlemten sonra sıçanlara 2 hafta boyunca herhangi

bir uygulama yapılmadı (Recovery dönem). Promosyon basamağı için 4 hafta boyunca haftada 4 gün 20 mg/kg dozajında 2-AAF oral gavaj yoluyla uygulandı.

Dong Xu ve ark. chrysin'in, tümör glikolizini inhibe ederek ve hücre apoptozunu indükleyerek HCC'ye karşı antitümör aktiviteye sahip olduğunu gösterdikleri *in vivo* testlerinde chrysin'i, 30 mg/kg dozajında intraperitoneal enjeksiyon yoluyla haftada üç kez uyguladılar (87). Cornel Balta ve ark. chrysin'in antifibrotik etkisini kanıtladıkları çalışmada 14 gün boyunca günde 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda oral yolla tedavi yaptılar (190). Bir çalışmada Wistar sıçanları, sisplatinin intraperitoneal uygulanmasının neden olduğu hepatotoksisiteye karşı chrysin'in eşzamanlı profilaktik oral tedavisine (25 ve 50 mg/kg vücut ağırlığı) tabi tutulmuştur. Sonuçta, chrysin, muhtemelen oksidatif stresi ve inflamatuvar yanıtı hafifleterek sisplatin kaynaklı hepatotoksisiteye karşı koruyucu etkinlik göstermiştir (191). Khan ve ark. sıçanlarda DEN kaynaklı preneoplastik nodüllerde chrysin'in apoptozu indüklediğini söyledikleri çalışmalarında oral gavaj yoluyla haftada üç kez chrysin ile (250 mg/kg) 4 hafta boyunca tedavi uygulamışlardır (192).

Bir çalışmada apigenin ve diğer birtakım maddeler fare modelinde melanom hücrelerinin büyümesinin ve metastatik potansiyelinin inhibitör ajanları olarak araştırıldı. 25 mg/kg ve 50 mg/kg apigenin'in tümör büyümesini önemli ölçüde geciktirdiğini ve ayrıca 50 mg/kg dozunda apigenin'in en etkili olduğunu buldular (193). Chen ve ark. kolon kanseri fare modelinde apigenin'in tümörlerin büyümesini önemli ölçüde bastırdığını göstermişler ve apigenin'i normal salin ile seyreltilen dimetilsülfoksitte çözmüşler; 35 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak (haftada üç kez 6 hafta süresince) uygulamışlardır (194). He ve ark. overyan tümör modelinde apigenin oral uygulamasının karaciğer, akciğer, ince bağırsak ve midede tümör mikrometastazını farklı derecelerde inhibe ettiğini buldular. %0,2 jelatin içinde çözülen apigenin'i, 75 mg/kg ve 150 mg/kg dozlarında intragastrik uygulama ile günlük olarak beş hafta uyguladılar (195).

Doğal flavonoid apigenin ve chrysin'in HCC'deki terapötik potansiyelini araştırmak istediğimiz çalışmamızda tedavi grupları için uygulayacağımız doz ve süreyi önceki çalışmalara dayanarak belirledik. Chrysin ve apigenin, her ikisini de oral gavaj yoluyla 50 mg/kg dozunda ve 8 hafta boyunca haftada 3 gün uyguladık.

Böylelikle toplam deney süremiz olan 16. haftanın bitiminde deney hayvanları sakrifiye edildi.

2.1.3. Kimyasalların Ajanların Hazırlanması

Uygulanacak kimyasalların hazırlanmasında çözücü ve seyreltici maddeler olarak Phosphate Buffered Saline (PBS) ve Dimetilsülfoksit (DMSO) kullanıldı. Ajanlar DMSO içinde çözüldükten sonra '2:1' oranında distile su ile dilüe edildi (su:DMSO; 2:1; v:v) (DMSO; Tekkim Kimya Sanayi Tic., Bursa /TÜRKİYE). Tüm kimyasallar uygulama yapılan günlerde taze olarak hazırlandı.

DEN (J&K Scientific Ltd, Beijing China), 0,01 M PBS ile sulandırılarak, intraperitoneal enjeksiyon yoluyla uygulandı. 2-AAF (Tokyo Chemical Industry Co., Toshiima, Kita-Ku, Tokyo, JAPAN) DMSO (su:DMSO; 2:1; v:v) içinde çözündürülmüş olarak hazırlandı.

Chrysin (BLDpharm, Shanghai, China) ve apigenin (Biosynth Carbosynth, Old Station Business Park GB-Compton) DMSO (su:DMSO; 2:1; v:v) içinde çözündürülerek hazırlandı.

2.1.4. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması

Kontrol Grubu (n=8): Bu gruba deneyin başladığı birinci ve ikinci hafta 0,5 mL PBS tek doz intraperitoneal (ip) uygulandı. Daha sonra sıçanlara 2 hafta boyunca herhangi bir uygulama yapılmadı. Ardından 0,5 mL DMSO, 4 hafta boyunca haftada 4 gün, deneyin 9. haftasından itibaren 8 hafta boyunca haftada 3 gün oral gavaj yoluyla uygulandı.

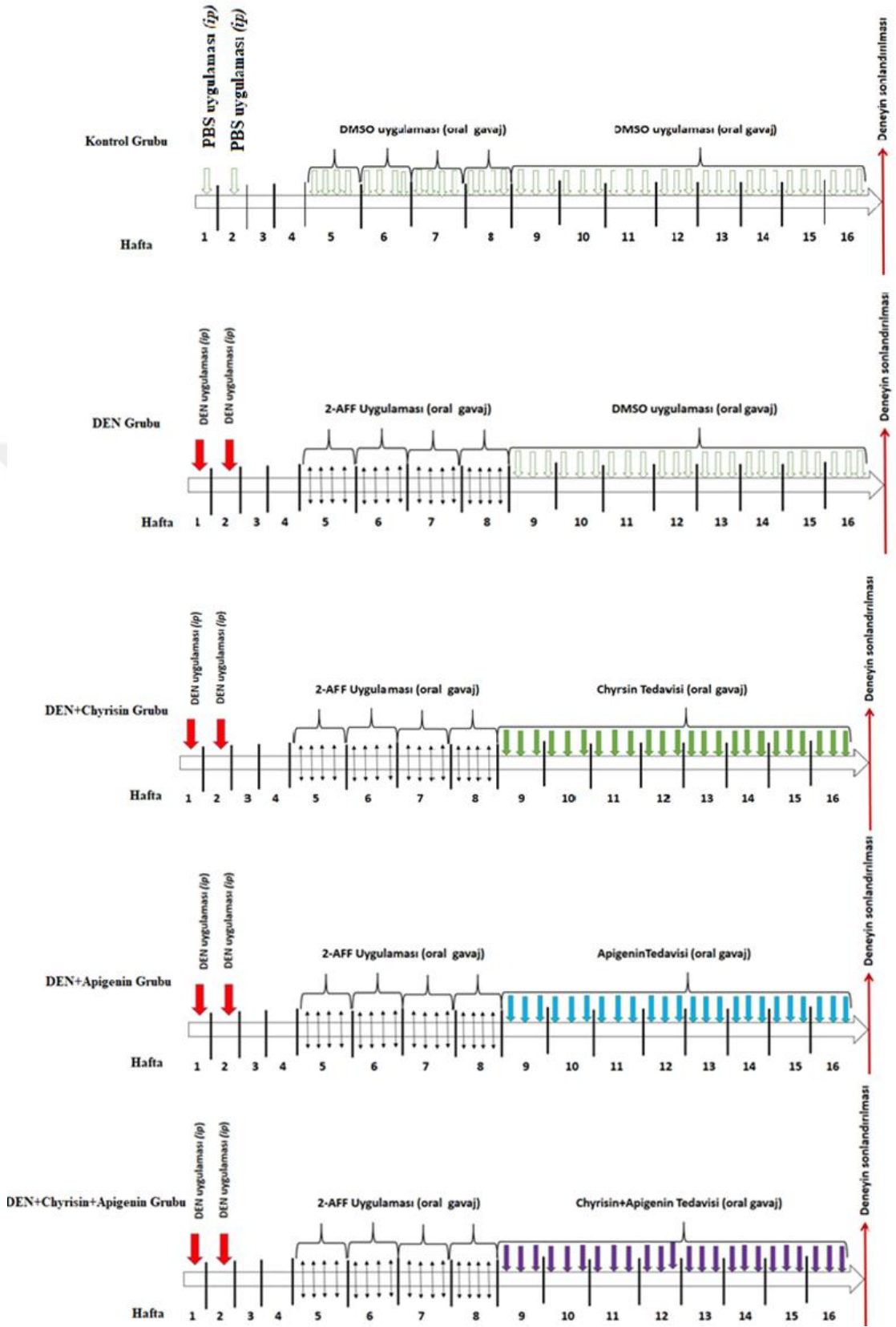
DEN grubu (n=10): Birinci ve ikinci hafta inisiyasyon başlangıcı için 150 mg/kg olacak şekilde DEN tek doz ip uygulandı. Sonrasında 2 hafta boyunca herhangi bir uygulama yapılmayan sıçanlara (Recovery dönem) promosyon basamağı için 4 hafta boyunca haftada 4 gün 20 mg/kg dozajında 2-AAF oral gavaj yoluyla uygulandı. Deneyin 9. haftasından itibaren ise 8 hafta boyunca 0,5 mL DMSO haftada 3 gün oral gavaj olarak uygulandı.

DEN + Chrysin grubu (n=10): Deneyin başladığı birinci ve ikinci hafta 150 mg/kg DEN tek doz ip uygulandı. Bu işlemten sonra 2 hafta boyunca herhangi bir uygulama yapılmayan sıçanlara (Recovery dönem) 4 hafta boyunca haftada 4 gün 20 mg/kg dozajında 2-AAF oral gavaj yoluyla uygulandı. Deneyin 9. haftasında 50 mg/kg

dozajındaki chrysin tedavisi haftada 3 kez oral gavaj yoluyla 8 hafta boyunca uygulanmak üzere başlatıldı.

DEN + Apigenin grubu (n=10): Deneyin başladığı birinci ve ikinci hafta inisiyasyon başlangıcı için 150 mg/kg DEN tek doz ip uygulandı ve bu işlemten sonra sıçanlara 2 hafta boyunca herhangi bir uygulama yapılmadı (Recovery dönem). Promosyon basamağı için 4 hafta boyunca haftada 4 gün 20 mg/kg dozajında 2-AAF oral gavaj olarak uygulandı. Apigenin tedavisi, 50 mg/kg dozajında deneyin 9. haftasında başlatıldı ve apigenin haftada 3 kez oral gavaj yoluyla 8 hafta boyunca uygulanmaya devam edildi.

DEN + Kombin (Chrysin+Apigenin) grubu (n=10): DEN ve 2-AAF uygulaması yukarıda tüm kanser gruplarında belirtilen dozlarda ve uygulama sıklıklarında yapıldı. Deneyin 9. haftasında apigenin ve chrysin tedavisi birlikte 50 mg/kg dozunda başlatıldı. Haftada 3 kez oral gavaj yoluyla 8 hafta boyunca uygulanmaya devam edildi (Şekil 16).



Şekil 16. Çalışma gruplarının belirlenmesi ve uygulanacak işlemler

2.1.5. Deneyin Sonlandırılması ve Örneklerin Hazırlanması

16 haftalık deney periyodunun sonunda, sıçanlar gece boyunca aç bırakılarak ve vücut ağırlıkları ölçülerek dekapite edildiler. Elde edilen kan örnekleri toplanarak 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip (Heraeus Biofuge Stratos; Kendo Laboratory Products, Osterode-Germany) serum/plazmaları ayrıldı. Bu örnekler, eppendorf tüplere porsiyonlar halinde bölündü ve analiz yapılacak güne kadar -80°C'de muhafaza edildi. Tüm karaciğer dokusu eksize edilerek çıkartıldıktan sonra bir kısmı histopatolojik incelemeler için, %10'luk formaldehit içinde tespit edildi. Diğer bir kısmı %0,9'luk sodyum klorür (NaCl) ile yıkanıp kurutma kâğıdı ile kurutuldu. Porsiyonlar halinde, analizler yapılincaya kadar -80°C de saklanan dokuların bir kısmı çalışma zamanı homojenizatörle 0,01M'lık PBS (1/10) çözeltisi içinde, 16000 rpm'de 3 dakika gerekli şartlar sağlanıp homojenize edildi. Homojenat 5000xg'de 1 saat (+4°C'de) santrifüj yapıp süpernatantları ayrıldı ve süpernatantlar ELISA çalışmaları için kullanıldı.

2.2. Yöntem

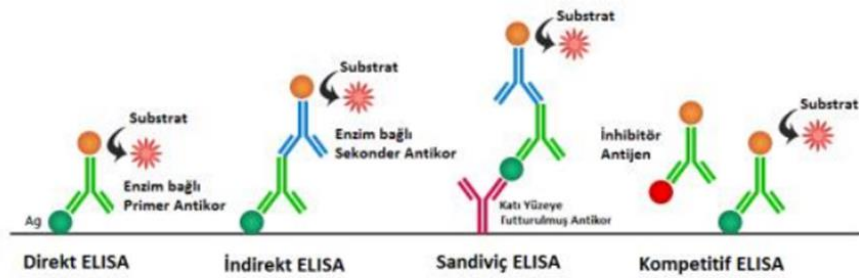
2.2.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Teknik prensibi antijenle antikor arasındaki reaksiyona dayanan ELISA'da işaretli antijenle işaretli antijen antikorla reaksiyona girmek için yarışır. Tayin etmek istediğimiz madde işaretli antijendir. İşaretleyici olarak enzim kullanılan yöntemde alkalen fosfataz ve horseradish peroksidaz en çok kullanılan enzimlerdir. Reaksiyonun tamamlanmasından sonra seperasyon (ayırma) işlemi yapılır ve ortama bir substrat ilave edilerek spektrofotometrik olarak enzim aktivitesi ölçülür. Ölçülen enzim aktivitesi ile tayin edilmek istenen madde arasındaki ilişkiden analit konsantrasyonu tayin edilir.

Zamanla ELISA'nın farklı çeşitleri ortaya çıkmıştır (Şekil 17) (Tablo1). Tüm ELISA çeşitlerinde, katı faza bağlanmamış konjugatlar yıkanarak uzaklaştırılır. Ortama kromojenik substratlar (yani antikora ya da antijene bağlı olan enzimin reaksiyonunda renk değişikliği oluşturabilecek maddeler) eklenir ve bu substratlar, bağlanmış enzim konjugatı ile hidroliz olduğunda renkli ürünler ortaya çıkar. Bu enzim reaksiyonunun ürünündeki renk değişikliği mikrotitrasyon pleyt okuyucusunda (spektrofotometre) tayin edilir (196, 197).

Tablo 1. ELISA çeşitleri ve kullanımı

	Elisa Çeşidi	Kullanımı
1	Direkt ELISA	Antijen tarama, çözünebilir antijen belirleme
2	İndirekt ELISA	Antikor tarama, epitop haritalama
3	Yarışmalı (kompetitif) ELISA	Antijen tarama. Çözünebilir antijen belirleme
4	Sandwich ELISA	Antikor tarama, epitop haritalama
5	Direkt Hücresel ELISA	Antijenlerin ekspresyonu hücreler perdelenerek ölçülür.
6	İndirekt Hücresel ELISA	Hücresel antijenlere karşı antikorlar perdelendir.



Şekil 17. ELISA yönteminin çeşitleri

ELISA yönteminin basamak ve bileşenleri

Katı faz (Matriks): Manuel ELISA yöntemlerinde, çukurlarına analitlerin (antijen veya antikor) bağlandığı genellikle 96 çukurlu mikroplyetlerdir.

Konjugat: Enzim ile işaretli antikorlar

Substrat: Antijen-antikor komplekslerinin oluşumunu konjugatın yapısındaki enzim ile reaksiyona girme yoluyla ortaya koyan maddedir.

Enzim: İşaretlemede en sık kullanılan enzimler alkalen fosfat (substrat BCIP/NBT ‘5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium’), horseradish peroksidaz (substrat TMB ‘tetramethylbenzidine’).

Yıkama: Özgül bağlanmaları etkilemezken özgül olmayan bağlanmaları gidermek için yöntemde her bir safha arasında fosfatlı tampon solusyonu (PBS, wash buffer) ile yıkama işlemi yapılmaktadır.

Sonlandırma: Asidik veya bazik çözeltiler (H_2SO_4 , HCl , $NaOH$) reaksiyonun durdurulması için kullanılır.

Okuma: Spektrofotometrik olarak reaksiyon sonucunda meydana gelen rengin şiddeti ölçülür.

2.2.1.1. Serum ve Doku Süpernatant'ta ELISA Ölçümlerinin Yapılması

- **Kullanılan Cihazlar**

Plate yıkama işleminde Bio-tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) otomatik cihazı kullanılmış olup, absorbanslar ve konsantrasyonlar EPOCH 2 (BioTek Instrument, Inc, USA) mikropleyt okuyucusunda 450 nanometre (nm) dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlendi.

- **Lowry Yöntemi ile Protein Tayini**

Doku süpernatantlarındaki protein düzeyi Lowry metodu (198) ile çalışılıp belirlendi. Yöntem, proteinlerin alkali ortamda Folin-Fenol ayırıcı ile renk (mavi) oluşturması prensibine dayanmaktadır. Hesaplanan protein değerleri doku ELISA çalışmalarında kullanıldı. Sonuçlar mg protein başına değerler olarak verildi.

2.2.1.1.1. Serum ve Doku Süpernatant Survivin Düzeylerinin Ölçümü

Survivin düzeyleri, rat survivin ELISA kiti (SUNRED, katalog no: 201-11-0192) kullanılarak kit prosedürüne uygun olacak şekilde çalışıldı. Kullandığımız kit için sensitivite 2,747 pg/mL, ölçüm aralığı 3-600 pg/mL idi.

2.2.1.1.2. Serum ve Doku Süpernatant Kaspaz-3 Düzeylerinin Ölçümü

Kaspaz-3 düzeyleri, rat kaspaz-3 ELISA kiti (BT LAB, katalog no: E0280Ra) kullanılarak kit prosedürüne uygun olacak şekilde çalışıldı. Kullandığımız kit için sensitivite 0,022 ng/mL, ölçüm aralığı 0,05-10 ng/mL, intra assay: CV<8%, inter assay: CV<10% idi.

2.2.1.1.3. Serum ve Doku Süpernatant Annexin V Düzeylerinin Ölçümü

Annexin V düzeyleri, rat annexin V ELISA kiti (BT LAB, katalog no: E0457Ra) kullanılarak kit prosedürüne uygun olacak şekilde çalışıldı. Kullandığımız kit için sensitivite 0,29 ng/mL, ölçüm aralığı 0,5-100 ng/mL, intra assay: CV<8%, inter assay: CV<10% idi.

2.2.1.1.4. Serum ve Doku Süpernatant Smoothened Düzeylerinin Ölçümü

SMO düzeyleri, rat SMO ELISA kiti (BT LAB, katalog no: E2644Ra) kullanılarak kit prosedürüne uygun olacak şekilde çalışıldı. Kullandığımız kit için sensitivite 9,19 ng/L, ölçüm aralığı 20-3500 ng/L, intra assay: CV<8%, inter assay: CV<10% idi.

2.2.1.1.5. Serum ve Doku Süpernatant Sonic Hedgehog Düzeylerinin Ölçümü

SHH düzeyleri, rat SHH ELISA kiti (BT LAB, katalog no: E2647Ra) kullanılarak kit prosedürüne uygun olacak şekilde çalışıldı. Kullandığımız kit için sensitivite 4,48 ng/L, ölçüm aralığı 10-2000 ng/L, intra assay: CV<8%, inter assay: CV<10% idi.

2.2.1.1.6. Serum ve Doku Süpernatant Jagged1 Düzeylerinin Ölçümü

JAG1 düzeyleri, rat JAG1 ELISA kiti (BT LAB, katalog no: E2643Ra) kullanılarak kit prosedürüne uygun olacak şekilde çalışıldı. Kullandığımız kit için sensitivite 0,021 ng/mL, ölçüm aralığı 0,05-30 ng/mL, intra assay: CV<8%, inter assay: CV<10% idi.

2.2.1.1.7. Serum ve Doku Süpernatant Notch1 Düzeylerinin Ölçümü

Notch1 düzeyleri, rat Notch1 ELISA kiti (BT LAB, katalog no: E1020Ra) kullanılarak kit prosedürüne uygun olacak şekilde çalışıldı. Kullandığımız kit için sensitivite 0,27 ng/mL, ölçüm aralığı 0,5-100 ng/mL, intra assay: CV<8%, inter assay: CV<10% idi

2.2.2. Western Blot Analizi

Western blot, araştırmalarda proteinleri ayırmak ve tanımlamak için sıklıkla kullanılır. Bu teknikte bir protein karışımı, jel elektroforezi yoluyla moleküler ağırlığına ve dolayısıyla türüne göre ayrılır. Daha sonra her protein için bir bant üreten membrana aktarılır ve membran ilgili proteine özgü işaretli antikorlar ile inkübe edilir. Bağlı olmayan antikor yıkanıp ayrılarak, yalnızca ilgili proteine bağlı antikor bırakılır. Daha sonra bağlı antikorlar film geliştirilerek tespit edilir. Antikorlar yalnızca ölçülecek proteine bağlandığından, sadece bir bant görünür olmalıdır. Bandın

kalınlığı, mevcut protein miktarına karşılık gelir, bu nedenle bir standart kullanmak, mevcut protein miktarını gösterebilir (199). Aşağıda yöntemin temel aşamalarına kısaca değinilmiştir.

1. Örneklerin hazırlanması: Hücre lizatları veya dokulardan protein ekstraksiyonu yapılır. Doku numunelerinde bu işlem için homojenizasyon veya sonikasyon gibi çalışmalar gereklidir. Proteini ekstrakte ettikten sonra, konsantrasyonunu ölçmek gerekir çünkü bu ölçüm örneklerin eşdeğer bir temelde karşılaştırıldığından emin olmanızı sağlar ve konsantrasyon, kütle, hacim arasındaki ilişki ile her bir kuyuya yüklenen proteinin kütlesinin ölçülmesini sağlar. Numune daha sonra yüksek dereceli yapıyı denatüre etmek için ısıtılır. Yüksek yapının denatüre edilmesi, amino asitlerin nötralize olmasını önleyerek proteinin elektrik alanında hareket etmesini sağlar.

2. Jel elektroforezi: Western blot'ta yükleme ve ayırma jeli olarak iki farklı tipte agaroz jel kullanır. Yükleme jeli hafif asidiktir (pH 6,8) ve daha düşük akrilamid konsantrasyonuna sahip olduğundan gözenekli bir jel vardır, bu da proteini zayıf bir şekilde ayırır ancak ince, keskin tanımlanmış bantlar oluşmasına izin verir. Ayırma veya çözme jeli olarak adlandırılan alt jel baziktir (pH 8,8) ve daha yüksek poliakrilamid içeriğine sahiptir, bu da jelin gözeneklerini daraltır. Küçük proteinler büyük proteinlerden daha kolay ve dolayısıyla daha hızlı hareket ettiğinden, protein bu jelde boyutlarına göre daha fazla ayrılır. Proteinler, jel üzerine yüklendiğinde ısıtma ile denatüre edildikleri için negatif bir yüke sahiptir ve bir voltaj uygulandığında pozitif elektrota doğru ilerleyecektir. Numuneler ve bir işaretleyici kuyucuklara yüklenir ve boş kuyucuklar numune tamponu ile yüklenir. Jel daha sonra güç kaynağına bağlanıp çalıştırılır. Voltaj çok önemlidir, çünkü yüksek voltaj bantları aşırı ısıtılabilir ve bozabilir.

3. Blotlama: Protein karışımı ayrıldıktan sonra bir membrana transfer edilir. Membran, bir sandviçte jel yüzeyi ile pozitif elektrot arasına yerleştirilir. Sandviç, her iki uçta bir fiber ped (sünger), jel ve blot membranını korumak için filtre kâğıtları içerir. Net bir görüntü sağlamak için jel ve membranın yakın teması ve membranın jel ile pozitif elektrot arasına yerleştirilmesi çok önemli iki faktördür. Negatif yüklü proteinlerin jelden membrana geçebilmesi için bu şekilde yerleştirilmelidir. Bu tür transfere “elektroforetik transfer” denir ve yarı kuru veya ıslak koşullarda yapılabilir.

Jeli kurutma olasılığı daha düşük olduğundan ıslak koşullar genellikle daha güvenilirdir ve daha büyük proteinler için tercih edilir.

Katı destek olan membran, bu sürecin önemli bir parçasıdır ve nitroselüloz ve polividin florür (PVDF) olmak üzere iki tür membran vardır. Nitroselüloz, proteine yüksek afinitesi ve tutma yetenekleri nedeniyle kullanılır. Ancak kırılmandır ve membranın yeniden kullanılmasına izin vermez. Bu bağlamda, PVDF membranları daha iyi mekanik destek sağlar.

4.Yıkama, bloke etme ve antikor inkübasyonu: Antikorların membrana nonspesifik olarak bağlanmasını önlediğinden, bloklama western blotlamanın çok önemli bir adımıdır. Antikoru konsantrasyonu, üreticinin talimatına bağlıdır. Antikor, PBS veya TBST gibi bir yıkama tamponu içinde seyreltilebilir. Yıkama bağlanmamış antikoru ortadan kaldırdığı için yapılır. Bununla birlikte, sinyali de azaltabileceğinden, membran çok uzun süre yıkanmaya bırakılmamalıdır. Membran daha sonra, hedef proteinin pozisyonuna karşılık gelen ürettiği sinyal tarafından tespit edilen, genellikle horseradish peroxidase (HRP) gibi bir enzim ile işaretli antikor kullanılarak tespit edilir.

5.Analiz: Western blot ile elde edilen veriler yarı nicel olarak kabul edilir. Bunun nedeni, protein seviyelerinin göreceli bir karşılaştırmasını sağlaması, ancak mutlak bir miktar ölçüsü olmamasıdır (199).

2.2.2.1. Western Blot Analizi Çalışma Prosedürü

2.2.2.1.1 Doku Numunelerinin Homojenize Edilmesi

Rat KC dokuları muhafaza edildiği dondurucudan (-80 °C) çıkarılıp bistüri ile 100 mg olacak şekilde (hassas terazide -SARTORIUS GMBH, Germany- tartılarak) parçalara ayrıldı. Bu parçalar RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz® Biotechnology, Inc. USA) çözeltisi (1;9, w; v) içerisine alındı ve homojenizasyon işlemine tabi tutuldu (homojenizatör - Ultra TurraxType T25-B, IKA Labortechnik, Germany). Bu işlem 16.000 rpm de 3 dk boyunca olacak şekilde gerçekleştirildi. İşlem boyunca soğuk ortam sağlamak adına buz kalıpları kullanıldı. Daha sonra santrifüjlenen numunelerden elde edilen süpernatantlar etiketleme yapılmış eppendorf tüplere alındı. Süpernatant total protein tayini western blot çalışmalarında kullanıldı.

2.2.2.1.2. Doku Numunelerinde Protein Miktarı Ölçümü

Homojenizasyon sonrası elde edilen süpernatant örneklerinde protein konsantrasyonu Qubit protein ölçüm kiti (Qubit Protein Assay Kit, Invitrogen, USA) ile Qubit Fluorometer cihazı (Invitrogen, USA) kullanılarak tayin edildi. Sonuçların birimi mg/mL olan çalışma kit prosedürüne uygun olarak yürütüldü.

2.2.2.1.3. Jele Yüklenecek Olan Protein Numunelerinin Hazırlanması

Jellere yükleme, jelin her kuyucuğuna eşit miktarda protein (30 µg) yükleme yapılacağı şekilde kit prosedürlerine uygun olarak gerçekleştirildi. Total hacim 20 µL olmak üzere, tabloda (Tablo 2) belirtilen hesaplama tüm örnekler için uygulanarak (LDS sample buffer ve sample reducing agent volümleri toplamda 7 µL ve sabittir, total hacmin 20 µL ye tamamlanması için de distile su kullanıldı), NuPAGE Sample Reducing Agent (10X), NuPAGE LDS Sample Buffer (4X), distile su ve örnekten oluşan karışım hazırlandı. Karışım 200 µL'lik eppendorf tüplerde hazırlandı ve denatürasyon işlemi (Thermal Cycler-Bio-Rad Laboratories, USA cihazında) gerçekleştirildi (10 dk, 70 °C de). Daha sonrasında karışım 3-5 dk -20 °C'ye bırakıldı.

Tablo 2. Jele Yüklenecek Protein Karışımının Hazırlanmasını Gösteren Örnek Hesaplama

Ölçülen Protein Düzeyi (mg/mL)	Jele yüklenecek Örnek miktarı (µL)	LDS Sample Buffer (4X) (µL)	Sample Reducing Agent (10X) (µL)	Distile su (µL)
4,34	6,91	5	2	6,09

2.2.2.1.4. Protein Karışımlarının Dikey SDS-PAGE'e Yükleneceği ve Yürütülmesi

Yükleme jeli olarak 15 kuyucuklu %4-12 Bis-Tris Protein jel kasetleri (Invitrogen, Novex) kullanıldı. Yürütme solüsyonu olarak MES SDS Running Buffer 20X'in (NuPAGE® MES BIS-TRIS Running Buffer Kit COMBO, Invitrogen™, USA) distile su ile seyreltilmesiyle 1x MES SDS Running Buffer elde edildi ve tanka yerleştirilen kasetlerin orta kısmına boşaltıldı. Daha sonra 500 µL antioksidant (NuPAGE® Invitrogen™, USA) yine jel kasetlerinin orta kısmına pipetlendi. Kasetin ilk kuyucuğuna protein markerden (SeeBlue Plus2 Pre-stained Standart, Invitrogen™,

USA), diğer kuyucuklara da örnekler eklenip 200 V sabit akımda elektroforez (Bio-Rad Laboratories, USA) işlemi başlatıldı. Elektroforez işlemi sonrası jeli kasetten ayırma işlemi tamamlandı.

2.2.2.1.5. Blotlama, Bloklama ve Antikorlarla İnkübasyon:

Elektroforezden sonra blotlama için iBlot Dry Blotting System cihazı, (iBlot® Gel Transfer Device and Apparatus, Invitrogen™, USA), iBlot® Transfer Stack, PVDF membran kit (Invitrogen™, USA) kullanıldı. Transfer işlemi tamamlandıktan sonra membran steril bir bistüri yardımıyla bloklamaya hazır hale getirildi.

Transfer sonrasında membran, blotlama sırasında özgül olmayan bağlanmaların engellenmesi için bloklama işlemine tabi tutuldu (Bloklama solüsyonu (WesternBreeze® Chromogenic Kit–Anti- Mouse, Invitrogen™, USA). Daha sonra primer (Tablo 3) ve sekonder antikorlarla inkübasyon ve yıkama işlemleri gerçekleştirilip bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılmış oldu.

Tablo 3. Western blot analizinde kullanılan primer antikorlar

Mouse Monoclonal Anti- STAT-3 primer antikoru (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA)
Mouse Monoclonal Anti- CIP2A primer antikoru (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA)
Mouse Monoclonal Anti- NF-κB primer antikoru (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA)

2.2.2.1.6. Protein Bantlarının Görüntülenmesi ve Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Membranlar kromojenik substrat ile bant gelişimi oluncaya kadar inkübe edildi ve devamında yıkama yapıldı. Son olarak membranlar uygun bir tarayıcıda (Hewlett Packard Company, Photosmart C3100, California, ABD) 600 dpi ile taranarak bant görüntüleri bilgisayar ortamına aktarılıp protein bant yoğunlukları IMAGE-J (National Institute of Health, Bethesda, ABD) Analysis Software programında değerlendirildi ve veriler GAPDH housekeeping proteinine karşı normalize edildi.

2.2.3. Histopatolojik Analiz

Deney süresinin sonunda kurbanı edilen ratlara ait karaciğer dokusu örnekleri; %10'luk nötral formalin solüsyonunda tespit edilerek rutin işlemlerden geçirilerek,

rotary mikrotomda (Leica RM2125, Wetzlar, Almanya) 3-5 μ kalınlığında kesitler alındı. Rutin Hematoksilen-Eozin (Leica Autostainer XL, Wetzlar, Almanya) ve kollejen spesifik Masson boyama yöntemiye boyanarak, ışık mikrosbunda (Trinokuler Olympus BX43, Tokyo, Japonya) incelendi ve resimlendi. Fibrozis ve yangısal inflamasyon aktivite METAVIR skorlama sistemine göre yapıldı. Nekroz ve inflamasyon A0 ve A3 arasında değerler kullanılarak A ile belirtildi (A0: yangısal lezyon yok, A1: hafif aktivite, A2: orta şiddetli aktivite A3: şiddetli aktivite). Fibrozis ise F0 ve F4 arasında değerler kullanılarak F ile belirtildi (F0: fibrosiz yok, F1: portal fibrozis, septumları yok F2: birkaç septumu olan portal fibrozis, F3: çok sayıda septumu olan portal fibrozis, F4: sirozis)

2.2.4. İstatistiksel Analiz

Araştırma sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows 22.0 paket programı kullanıldı. Analiz aşamasında kullanılacak yöntemin belirlenebilmesi için veri setinde ilgilenilen değişkenlerin normal dağılımdan gelip gelmediğinin tespit edilmesi için Shapiro-Wilk testi uygulandı. Shapiro-Wilk testinin yanı sıra çarpıklık (skewness), basıklık (kurtosis) katsayıları, kutu grafiği (boxplot) ve Q-Q plot da incelenerek veri setinin normalliğine ilişkin karar verildi. İki den fazla grubun sürekli ölçümlerinin genel karşılaştırılmasında varsayımların sağlanması durumunda Tek Yönlü Varyans Analizi ve ardından çoklu karşılaştırma yöntemlerinden LSD testi kullanıldı. Elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiş olup, $p < 0,05$ değerleri istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1 Apigenin ve Chrysin Tedavisinin Kilo Alımı ve Büyüme Oranı Üzerine Etkisi

Çalışmanın başladığı ilk hafta deney grubunu oluşturan sıçanların kiloları tartılmış ve birbirlerine yakın olduğu, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Çalışmanın bitiminde ise kanser gruplarındaki tüm sıçanların son ağırlıklarında kontrol grubuna kıyasla bir azalma olduğu gözlenmiştir (sadece DEN grubunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$; DEN grubu için). Total kilo kazanımları incelendiğinde ise en çok kilo alan grubun kontrol grubu olduğu, kanser gruplarındaki sıçanların ise kontrol grubuna göre daha az kilo aldığı tespit edilmiştir ($p<0,001$; DEN grubu için, $p<0,05$; DEN+Chrysin grubu için). Tedavi ajanları uygulanan kanser grupları DEN grubu ile kıyaslandığında, en çok kilo kazanımının olduğu grubun apigenin ve kombin tedavi uygulanan grup olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$; DEN+Apigenin grubu, $p<0,05$; DEN+Kombin tedavi grubu). Chrysin tedavisi uygulanan grupta da DEN grubuna göre kilo alımında daha fazla artış olduğu tespit edilse de bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$) (Tablo 4).

Tablo 4. Apigenin ve chrysin tedavisinin kilo ağırlığı ve büyüme oranı üzerine etkisi

	İlk ağırlık (gr)	Son ağırlık (gr)	Toplam kilo kazanımı (gr)	Büyüme oranı
Kontrol	286,714 ±13,437	401,142±10,838	114,428±4,825	0,953±0,402
DEN	264,250 ±13,593	365,875±15,198*	101,625±5,396**	0,846±0,185**
DEN+ Chrysin	277,000 ±18,371	382,777±19,298	105,777±2,223*	0,881±0,520*
DEN+Apigenin	285,625 ± 17,369	398,500±19,026+	112,875±6,243++	0,940±0,449++
DEN+Kombin	270,750 ±9,617	380,125±10,439	109,375±1,060+	0,911±0,008+

* $p<0,05$ kontrol grubuna kıyasla

* $p<0,05$ DEN grubuna kıyasla

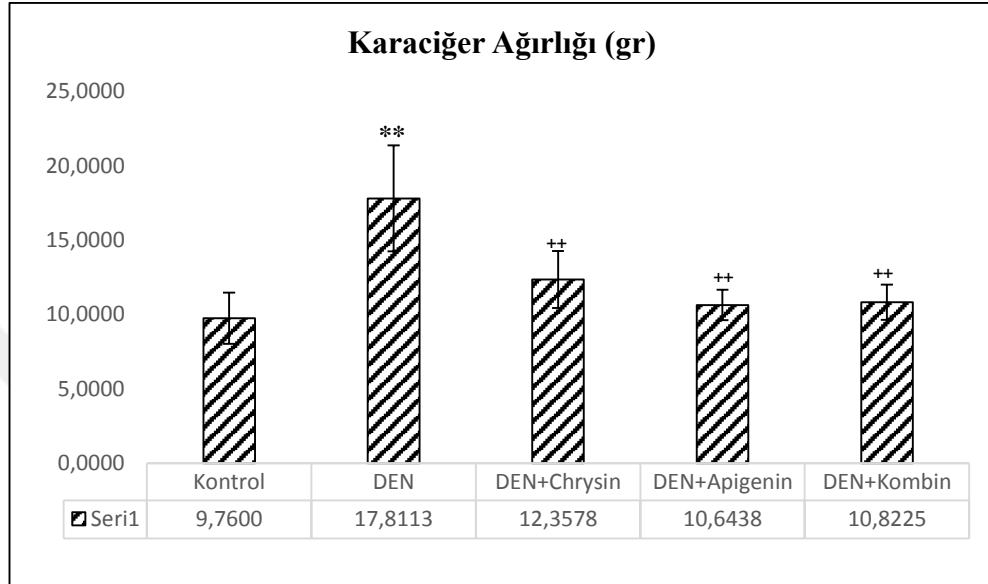
** $p<0,001$ kontrol grubuna kıyasla

++ $p<0,001$ DEN grubuna kıyasla

3.2. Apigenin ve Chrysin Tedavisinin Total Karaciğer Ağırlığı Üzerindeki Etkisi

Deney grubundaki sıçanlar kurban edildikten sonra karaciğer dokuları bütün olarak çıkarılmış ve tartılmıştır. Elde edilen bulgulara göre kontrol grubuna kıyasla kanser gruplarındaki karaciğer dokusu ağırlıkları artmıştı ancak bu artış sadece DEN

grubunda istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,001$). Tedavi ajanları uygulanan gruplardaki karaciğer ağırlıkları DEN grubu ile kıyaslandığında ise tedavi uygulanan üç grupta da daha az olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$; tüm tedavi grupları için) (Şekil 18).



Şekil 18. Apigenin ve chrysin tedavisinin total karaciğer ağırlığı üzerindeki etkisi

** $p<0,001$ kontrol grubuna kıyasla

++ $p<0,001$ DEN grubuna kıyasla

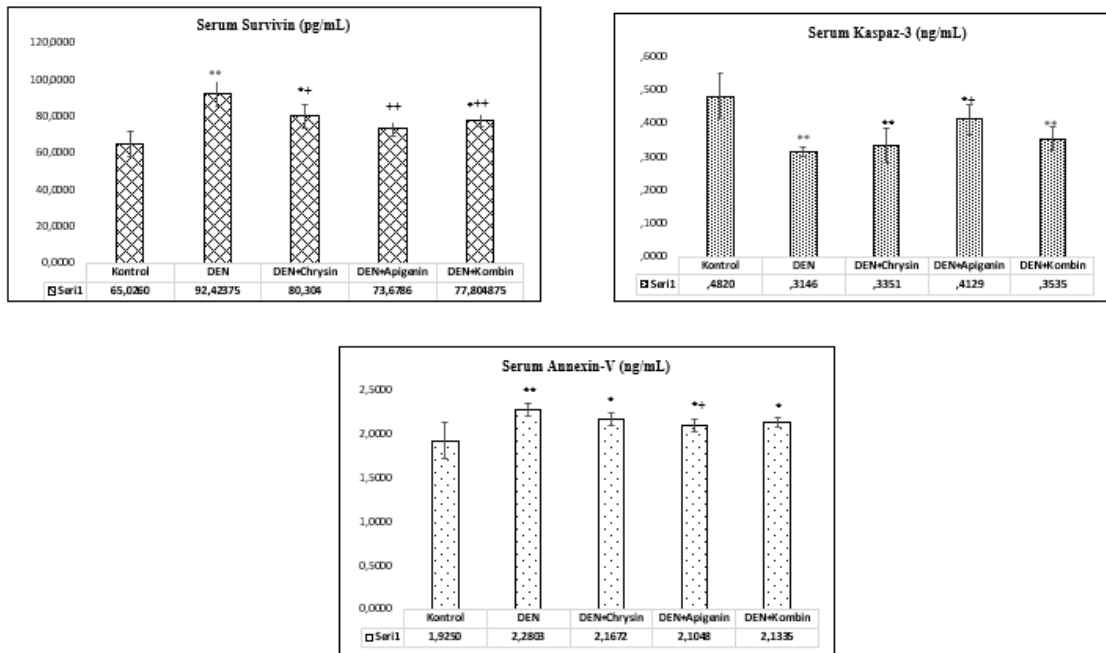
3.3. Apigenin ve Chrysin Tedavisinin Apoptozis Yolağındaki Serum Survivin, Kaspaz-3 ve Annexin-V Üzerindeki Etkisi

Apigenin ve chrysin tedavisinin apoptozis yolağında önemli parametrelerden olan survivin, kaspaz-3 ve annexin-V düzeyleri üzerindeki etkisi Şekil 19'da sunulmuştur. Kontrol grubuna kıyasla serum survivin düzeylerindeki en etkili artış DEN grubunda gözlenirken ($p<0,001$) en az artışın apigenin uygulanan grupta olduğu tespit edilmiştir ($p>0,05$). Tedavi ajanı uygulanan gruplardaki serum survivin düzeyleri DEN grubuna göre kıyaslandığında ise tüm gruplarda bir azalışın olduğu, en fazla azalmanın DEN+Apigenin grubunda olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$; DEN+Apigenin ve DEN+Kombin grupları için, $p<0,05$; DEN+Chrysin grubu için).

Serum kaspaz-3 düzeylerinin ise kontrol grubuna kıyasla kanser gruplarında azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,001$; DEN, DEN+Chrysin ve DEN+Kombin grupları için, $p<0,05$; DEN+ Apigenin grubu için). DEN grubuna göre kıyaslandığında ise tedavi ajanı uygulanan gruplardaki kaspaz-3 düzeylerinde bir artışın gözlemlendiği ve en

fazla artışın apigenin tedavisi uygulanan grupta olduğu saptanmıştır ($p<0,05$; DEN+Apigenin grubu için).

Serum annexin-V düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla kanser gruplarında arttığı, en etkili artışın ise DEN grubunda olduğu saptandı ($p<0,001$; DEN grubu için, $p<0,05$; tedavi ajanı uygulanan tüm gruplar için). Tedavi ajanı uygulanan gruplardaki annexin-V düzeyleri DEN grubuna göre kıyaslandığında ise her üç grupta da bir azalışın olduğu, bu azalmanın ise DEN+Apigenin grubunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$; DEN+Apigenin grubu için).



Şekil 19. Apigenin ve chrysin tedavisinin apoptozis yolağındaki serum survivin, kaspaz-3 ve annexin-V Üzerindeki Etkisi

* $p<0,05$ kontrol grubuna kıyasla
** $p<0,001$ kontrol grubuna kıyasla

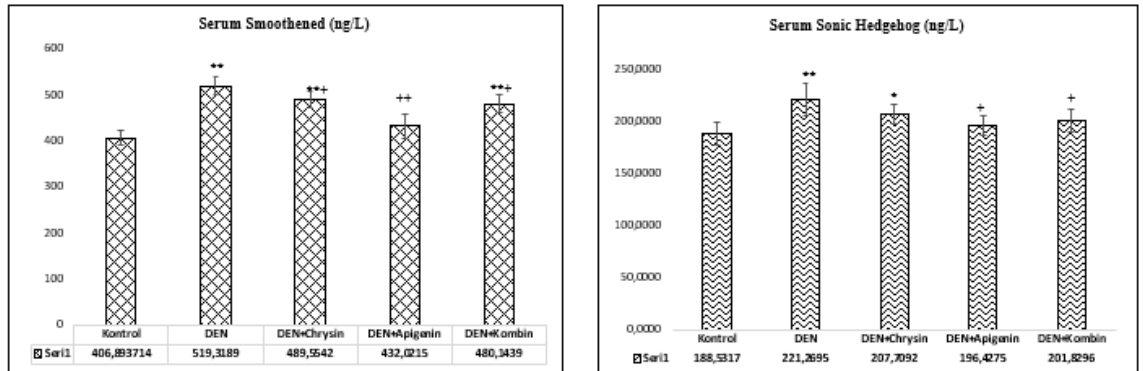
* $p<0,05$ DEN grubuna kıyasla
** $p<0,001$ DEN grubuna kıyasla

3.4. Apigenin ve Chrysin Tedavisinin Hedgehog Yolağındaki Serum Smoothened ve Sonic Hedgehog Düzeyleri Üzerine Etkisi

Apigenin ve chrysin tedavisinin Hedgehog sinyal yolağındaki serum smoothened ve sonic hedgehog düzeyleri üzerine etkisi Şekil 20’de sunulmuştur. Serum smoothened düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla diğer tüm gruplarda arttığı ve bu artışın apigenin tedavisi uygulanan hariç DEN’e maruz kalan diğer tüm

gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,001$; DEN, DEN+Chrysin ve DEN+Kombin grubu için). Tedavi ajanı uygulanan gruplardaki smoothened düzeyleri DEN grubuna göre kıyaslandığında ise her üç grupta da istatistiksel olarak bir azalışın olduğu, en etkili azalmanın ise apigenin tedavisinin uygulandığı grupta olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$; DEN+Apigenin grubu için, $p<0,05$; DEN+Chrysin ve DEN+Kombin grupları için).

Serum sonic hedgehog düzeyleri kontrol grubuna kıyasla DEN ve DEN+Chrysin grubunda istatistiksel olarak yüksekti ($p<0,001$; DEN grubu için, $p<0,05$; DEN+Chrysin grubu için). DEN+Apigenin ve DEN+Kombin gruplarında da serum sonic hedgehog düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksekti ancak bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Tedavi ajanı uygulanan gruplar DEN grubu ile karşılaştırıldığında apigenin ve kombin tedavi uygulanan gruplardaki serum sonic hedgehog düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$; DEN+Apigenin ve DEN+Kombin grupları için).



Şekil 20. Apigenin ve chrysin tedavisinin hedgehog yolağındaki serum smoothened ve sonic hedgehog düzeyleri üzerine etkisi

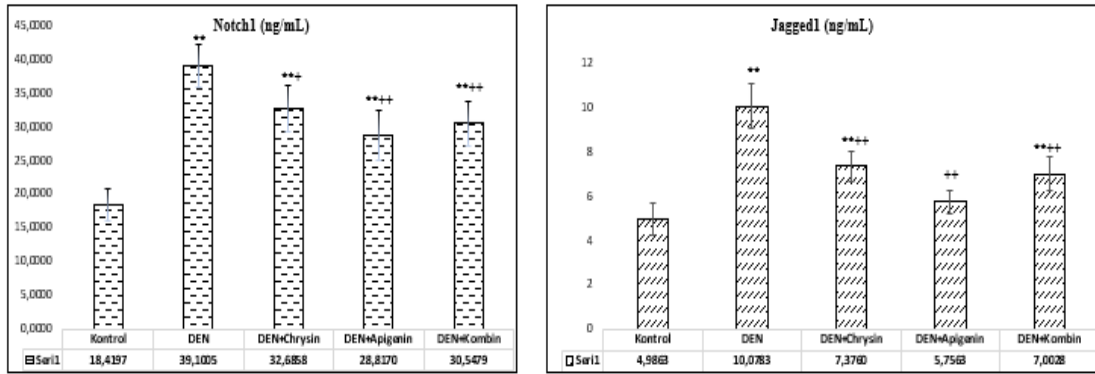
* $p<0,05$ kontrol grubuna kıyasla
** $p<0,001$ kontrol grubuna kıyasla

* $p<0,05$ DEN grubuna kıyasla
** $p<0,001$ DEN grubuna kıyasla

3.5. Apigenin ve Chrysin Tedavisinin Notch Sinyal Yolağındaki Serum Notch1 ve Jagged1 Düzeyleri Üzerine Etkisi

Apigenin ve chrysin tedavisinin Notch sinyal yolağındaki serum notch1 ve jagged1 düzeyleri üzerine etkisine ait bulgular Şekil 21’de sunulmuştur. Bu sinyal yolağındaki önemli proteinlerden biri olan serum jagged1 düzeyleri kontrol grubuna kıyasla DEN+Apigenin grubu hariç tüm kanser gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksekti ($p<0,001$; DEN, DEN+Chrysin ve DEN+Kombin grupları için). Tedavi ajanı uygulanan gruplardaki jagged1 düzeylerinin DEN grubuna kıyasla istatistiksel olarak tüm gruplarda azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,001$; tüm tedavi ajanı uygulanan gruplar için) (Şekil 21).

Bu sinyal yolağındaki diğer önemli proteinlerden biri olan notch1 düzeyleri kontrol grubuna kıyasla kanser gruplarının tümünde istatistiksel olarak daha yüksekti ($p<0,001$; DEN uygulanan tüm gruplar için). Tedavi ajanı uygulanan gruplardaki notch1 düzeylerinin DEN grubuna kıyasla istatistiksel olarak azaldığı, en etkili azalışın apigenin ve kombin tedavinin uygulandığı gruplarda olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$; DEN+Apigenin ve DEN+Kombin grubu için, $p<0,05$; DEN+Chrysin grubu için) (Şekil 21).



Şekil 21. Apigenin ve chrysin tedavisinin notch yolağındaki serum notch1 ve jagged1 düzeyleri üzerine etkisi

* $p<0,05$ kontrol grubuna kıyasla

** $p<0,001$ kontrol grubuna kıyasla

* $p<0,05$ DEN grubuna kıyasla

** $p<0,001$ DEN grubuna kıyasla

3.6. Apigenin ve Chrysin Tedavisinin Süpernatant Survivin, Kaspaz-3 ve Annexin-V Düzeyleri Üzerine Etkisi

Apigenin ve chrysin tedavisinin süpernatant survivin, kaspaz-3 ve annexin-V düzeyleri üzerine etkisi parametre bazında incelendiğinde, karaciğer doku süpernatant survivin düzeylerinin kanser gruplarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek olduğu tespit edildi ($p<0,001$; tüm kanser grupları için). Tedavi ajanı uygulanan gruplarda ise süpernatant survivin düzeylerinin DEN grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı ve bu azalışın tüm tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p<0,001$; DEN+Apigenin ve DEN+Kombin grubu için, $p<0,05$; DEN+Chrysin grubu).

Süpernatant kaspaz-3 düzeylerinin ise kontrol grubuna kıyasla kanser gruplarında DEN+Apigenin grubu hariç diğer tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,001$; DEN, DEN+Chrysin ve DEN+Kombin grupları için). Tedavi ajanı uygulanan gruplardaki süpernatant kaspaz-3 düzeyleri DEN grubuna göre kıyaslandığında; tüm tedavi ajanı uygulanan gruplarda kaspaz-3 düzeylerinde bir artışın gözlemlendiği ve en fazla artışın apigenin tedavisi uygulanan grupta olduğu saptanmıştır ($p<0,001$; DEN+Apigenin grubu için, $p<0,05$; DEN+Kombin grubu).

Süpernatant annexin-V düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla tüm kanser gruplarında arttığı ($p<0,001$; DEN+Apigenin hariç tüm kanser grupları için), tedavi ajanı uygulanan gruplarda ise DEN grubuna göre kıyaslandığında her üç grupta da azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,001$; tüm tedavi uygulanan gruplar için).

Tablo 5. Apigenin ve chrysin tedavisinin süpernatant survivin, kaspaz-3 ve annexin-V düzeyleri üzerine etkisi

	Survivin (pg/mg protein)	Kaspaz-3 (ng/mg protein)	Annexin-V (ng/mg protein)
Kontrol	38,180 ±1,74	0,33±0,025	4,65±0,58
DEN	66,437±4,93**	0,21±0,033**	10,88±0,82**
DEN+ Chrysin	57,573±2,40***	0,23±0,029**	8,24±0,77****
DEN+Apigenin	51,605±5,33****	0,30±0,013**	5,10±0,71**
DEN+Kombin	53,133±4,67****	0,25±0,019***	7,20±0,91****

* $p<0,05$ kontrol grubuna kıyasla

** $p<0,001$ kontrol grubuna kıyasla

* $p<0,05$ DEN grubuna kıyasla

** $p<0,001$ DEN grubuna kıyasla

3.7. Apigenin ve Chrysin Tedavisinin Hedgehog Yolağındaki Süpernatant Smoothened ve Sonic Hedgehog Düzeyleri Üzerine Etkisi

Apigenin ve chrysin tedavisinin Hedgehog sinyal yolağındaki süpernatant smoothened ve sonic hedgehog düzeyleri üzerine etkisi Tablo 6’te sunulmuştur. Süpernatant smoothened düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla kanser gruplarında arttığı ve bu artış apigenin ve kombin tedavi uygulanan hariç diğer kanser gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,001$; DEN grubu, $p<0,05$; DEN+Chrysin grubu için). Tedavi ajanı uygulanan gruplardaki smoothened düzeyleri DEN grubuna göre kıyaslandığında ise her üç grupta da azalışın olduğu, en etkili azalmanın ise apigenin tedavisinin uygulandığı grupta olduğu tespit edilmiştir. Diğer gruplardaki azalışlar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

Süpernatant sonic hedgehog düzeyleri kanser gruplarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak daha yüksekti ($p<0,001$; DEN, DEN+ Chrysin ve DEN+Kombin grupları için, $p<0,05$; DEN+Apigenin grubu için,). Tedavi ajanı uygulanan gruplardaki süpernatant sonic hedgehog düzeyleri değerlendirildiğinde, apigenin ve kombin tedavi uygulanan gruplarda istatistiksel olarak azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$; apigenin ve kombin tedavi uygulanan gruplarda) (Tablo 6).

Tablo 6. Apigenin ve chrysin tedavisinin süpernatant smoothened ve sonic hedgehog düzeyleri üzerine etkisi

	Smoothened (ng/mg protein)	Sonic hedgehog (ng/mg protein)
Kontrol	288,577 $\pm$ 20,31	86,106 $\pm$ 6,49
DEN	325,014 $\pm$ 13,54**	123,36 $\pm$ 10,40**
DEN+ Chrysin	313,479 $\pm$ 13,67*	113,103 $\pm$ 10,20**
DEN+Apigenin	305,824 $\pm$ 16,71 ⁺	103,508 $\pm$ 10,29* ⁺
DEN+Kombin	309,096 $\pm$ 14,15	109,376 $\pm$ 8,53** ⁺
* $p<0,05$ kontrol grubuna kıyasla		* $p<0,05$ DEN grubuna kıyasla
** $p<0,001$ kontrol grubuna kıyasla		** $p<0,001$ DEN grubuna kıyasla

3.8. Apigenin ve Chrysin Tedavisinin Notch Yolağındaki Süpernatant Jagged1 ve Notch1 Düzeyleri Üzerine Etkisi

Apigenin ve chrysin tedavisinin Notch yolağındaki süpernatant notch1 ve jagged1 düzeyleri üzerine etkisine ait bulgular Tablo 7’de sunulmuştur. Süpernatant jagged1 düzeyleri kontrol grubuna kıyasla tüm kanser gruplarında istatistiksel açıdan anlamlı olacak şekilde daha yüksek bulundu ($p<0,001$; DEN ve DEN+Chrysin grupları için, $p<0,05$; DEN+Apigenin ve DEN+Kombin grupları için). Tedavi ajanı uygulanan gruplardaki jagged1 düzeylerinin ise DEN grubuna kıyasla istatistiksel olarak tüm gruplarda azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,001$; DEN+Apigenin grubu için, $p<0,05$; DEN+ Chrysin ve DEN+Kombin grupları için) (Tablo 7).

Bu sinyal yolağındaki diğer önemli parametrelerden biri olan Notch1 düzeyleri kontrol grubuna kıyasla DEN uygulanan tüm gruplarda (apigenin uygulanan grup hariç) istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksekti ($p<0,001$; DEN ve DEN+Chrysin grupları için, $p<0,05$; DEN+Kombin grubu için). Tedavi ajanı uygulanan gruplardaki Notch1 düzeylerinin DEN grubuna kıyasla azaldığı, en etkili azalışın apigenin ve kombin tedavinin uygulandığı gruplarda olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$; DEN+Apigenin ve DEN+Kombin grubu için) (Tablo 7).

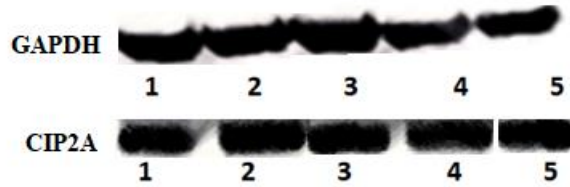
Tablo 7. Apigenin ve chrysin tedavisinin süpernatant notch1 ve jagged1 düzeyleri üzerine etkisi

	Jagged1 (ng/mg protein)	Notch1 (ng/mg protein)
Kontrol	1,417 ± 0,14	31,666 ± 0,74
DEN	2,033±0,16**	46,466±5,71**
DEN+ Chrysin	1,807 ± 0,19**+	43,341 ± 2,68**
DEN+Apigenin	1,664±0,15**++	36,137 ± 2,13**
DEN+Kombin	1,746±0,067**+	37,544 ± 3,44**++
* $p<0,05$ kontrol grubuna kıyasla		* $p<0,05$ DEN grubuna kıyasla
** $p<0,001$ kontrol grubuna kıyasla		** $p<0,001$ DEN grubuna kıyasla

3.9. Western Blot Analizlerine Ait Bulgular

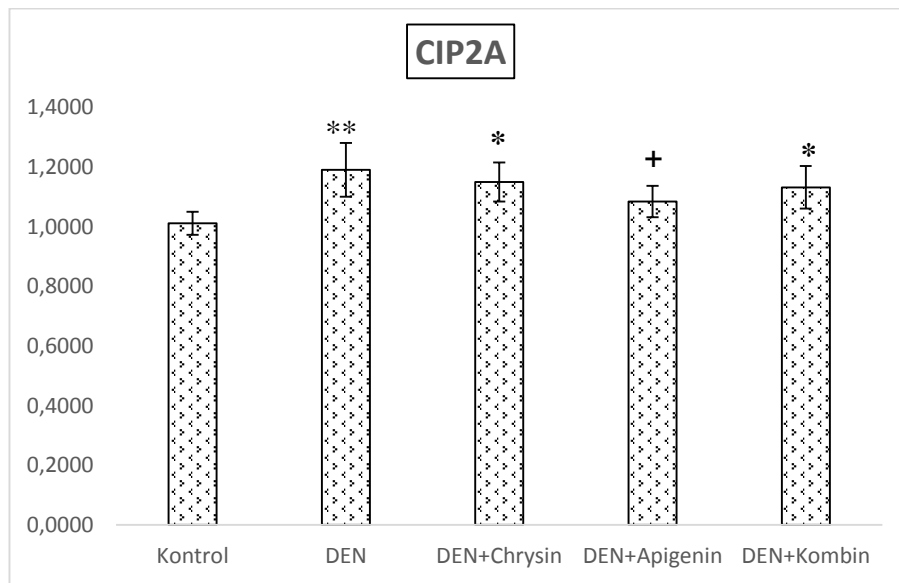
3.9.1. Apigenin ve Chrysin Tedavisinin Doku CIP2A, NF- κ B ve STAT-3 Protein Ekspresyon Düzeylerine Etkisi

Karaciğer doku CIP2A ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna kıyasla DEN, DEN+Chrysin ve DEN+Kombin gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksek bulundu ($p<0,001$; DEN grubu için, $p<0,05$; DEN+Chrysin ve DEN+Kombin grupları için). Apigenin uygulanan grupta da doku CIP2A ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Tedavi ajanı uygulanan gruplardaki CIP2A ekspresyon düzeyleri DEN grubuyla kıyaslandığında ise sadece apigenin tedavisi uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0,05$). Diğer tedavi ajanı uygulanan gruplarda bir azalma söz konusu olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 23).



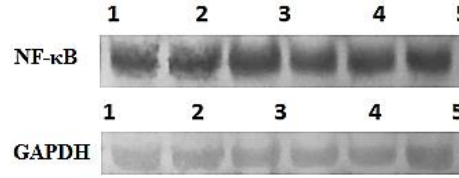
Şekil 22. GAPDH ve CIP2A proteinlerine ait bant görüntüleri

1: Kontrol; 2: DEN; 3: DEN+Chrysin; 4: DEN+Apigenin; 5: DEN+Kombin



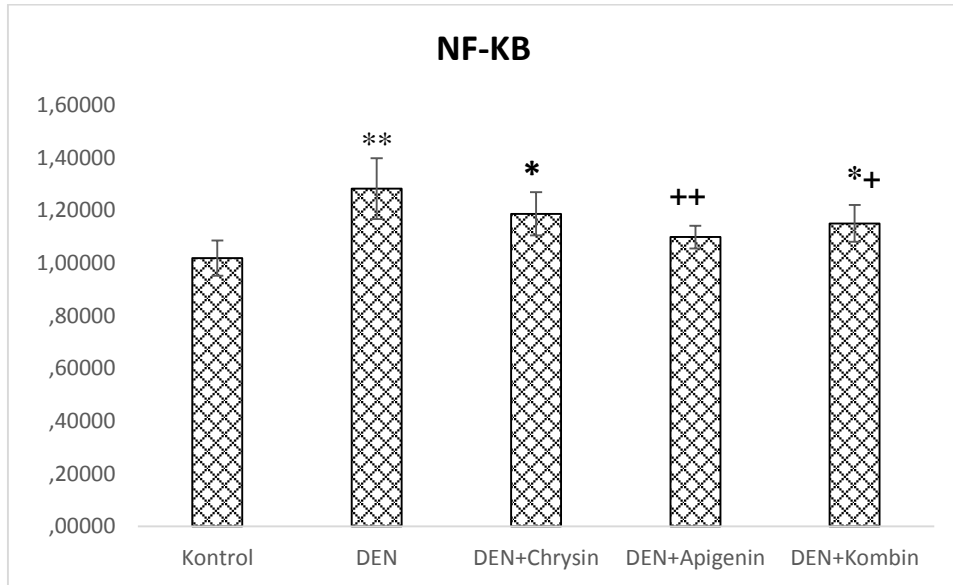
Şekil 23. CIP2A protein ekspresyon düzey değişimleri

Karaciğer doku NF- κ B ekspresyon düzeyleri DEN grubu ve chrysin ve kombin tedavilerinin uygulandığı gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksek bulundu ($p<0,001$; DEN grubu için, $p<0,05$; DEN+Chrysin ve DEN+Kombin grupları için). Apigenin uygulanan grupta da doku NF- κ B ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Tedavi ajanı uygulanan gruplardaki NF- κ B ekspresyon düzeyleri DEN grubuyla kıyaslandığında ise, apigenin ve kombin tedavi uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0,001$; DEN+Apigenin grubu için, $p<0,05$; DEN+Kombin grubu için). Chrysin tedavisi uygulanan grupta da NF- κ B ekspresyon düzeyinde bir azalma gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 25).



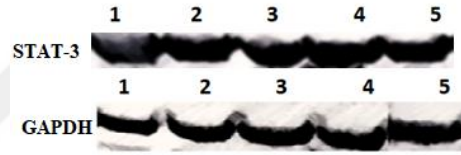
Şekil 24. GAPDH ve NF- κ B proteinlerine ait bant görüntüleri

1:Kontrol; 2: DEN; 3: DEN+Chrysin; 4: DEN+Apigenin; 5: DEN+Kombin



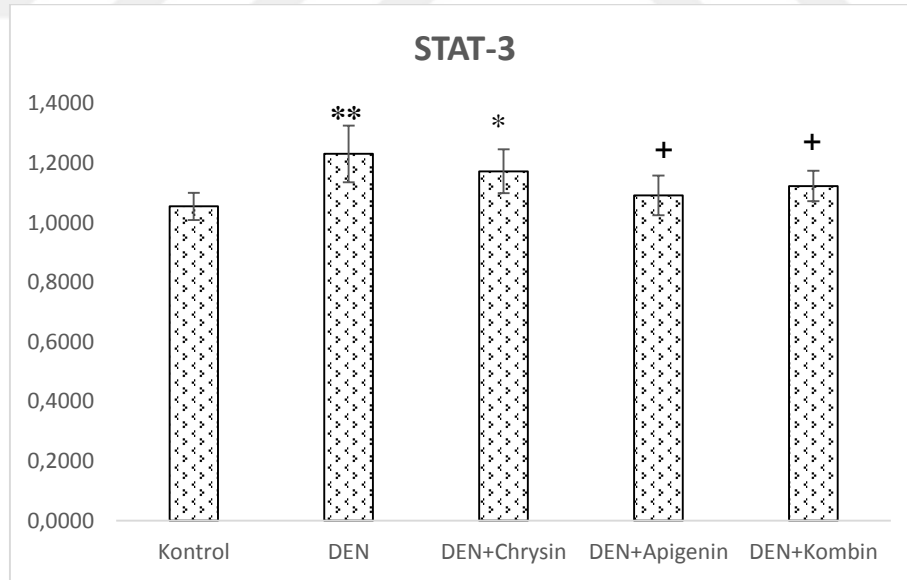
Şekil 25. NF- κ B protein ekspresyon düzey değişimleri

Karaciğer doku STAT-3 ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna kıyasla DEN grubu ve chrysin uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksek bulundu ($p<0,001$; DEN grubu için, $p<0,05$; DEN+Chrysin). Apigenin ve kombin tedavi uygulanan grupta da doku STAT-3 ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Tedavi ajanı uygulanan gruplardaki STAT-3 ekspresyon düzeyleri DEN grubuyla kıyaslandığında ise, apigenin ve kombin tedavi uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0,05$; DEN+Apigenin ve DEN+Kombin grubu için). Chrysin uygulanan grupta da STAT-3 ekspresyon düzeyinde bir azalma gözlenmesine rağmen bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 27).



Şekil 26. GAPDH ve STAT-3 proteinlerine ait bant görüntüleri

1: Kontrol; 2: DEN; 3: DEN+Chrysin; 4: DEN+Apigenin; 5: DEN+Kombin



Şekil 27. STAT-3 protein ekspresyon düzey değişimleri

3.10. Histolojik Bulgular

3.10.1. Makroskopik Bulgular:

Makroskopik olarak subkapsular milier beyaz odaklar karaciğerde dikkati çeken en önemli değişim olarak değerlendirildi. Makroskopik lezyonlar nodül oluşumu ve dağılımı dikkate alınarak tüm gruplarda 0 ve 3 arasında değerler kullanılarak derecelendirildi (Tablo 8).

Çalışmaya toplam 48 adet erkek Wistar Albino türü sıçan ile başlandı. Çalışmamızın 5. ve 9. haftaları arasında Kontrol ve DEN+Chrysin gruplarından 1; DEN, DEN+Apigenin, DEN+ Kombin gruplarından 2'şer adet olmak üzere toplamda 8 sıçan kaybedildi ve çalışmaya 40 adet sıçanla devam edildi. Sakrifikasyon (Şekil 28) esnasında ve sonrasında çıkardığımız organ ve dokuların makroskopik incelemesi, kilo ve boyut ölçümleri (Şekil 29) sonucu; özellikle DEN grubundaki hayvanların büyük bir çoğunluğunda kontrol grubu KC'i (Şekil 30) ile karşılaştırıldığında belirgin büyüme ve tümöral oluşumlar (Şekil 31) gözlemlendi. Diğer kanser gruplarında da tümöral görünüm mevcuttu (Şekil 32, 33, 34). Ancak DEN grubu ile karşılaştırıldığında tedavi gruplarında tümöral oluşumlar daha az, görünüm normal KC dokusuna daha yakındı. Ayrıca kanser gruplarında bazı sıçanların akciğerleri de kontrollerden çıkardığımız normal akciğerlerden farklı görünümdeydi (Şekil 35).

Tablo 8. Makroskopik derecelendirme

	<u>Adet</u>	<u>Siddet</u>
Kontrol (n=7)	7	0
DEN (n=8)	1	0
	7	3
	3	0
DEN+Chrysin (n=9)	3	1
	1	2
	2	3
DEN+Apigenin (n=8)	2	0
	6	1
	4	0
DEN+Kombin (n=8)	1	1
	3	2



Şekil 28. Sakrifikasyon işlemleri



Şekil 29. KC boyutlarının ölçümü



Şekil 30. Kontrol grubu KC genel görünümü



Şekil 31. DEN grubu KC görüntüleri



Şekil 32. DEN+Chrysin grubu KC Görüntüsü



Şekil 33. DEN+Apigenin grubu KC görüntüsü



Şekil 34. DEN+Kombin grubu KC görüntüsü



Şekil 35. Kanser grubundan bir sıçanda Akciğer görüntüsü

3.10.2. Mikroskopik Bulgular

Kontrol Grup: Kontrol grubunda karaciğer dokuları normal histolojik yapıyı göstermekte idi (Şekil 36).

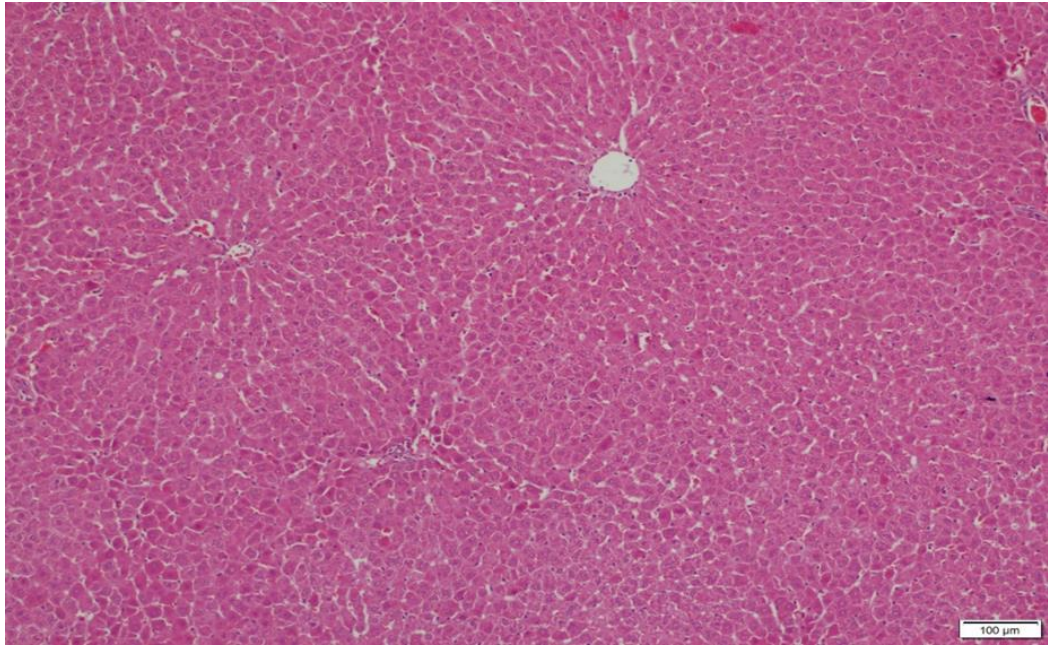
DEN Grup: 16 haftanın sonunda bu gruptaki ratların tamamında değişen derecelerde fibrozis ve yangısal lezyonlar izlendi. METAVIR skorum sistemine uygun olarak skorum yapılan lezyonlar Şekil 44, 45’de gösterildi. Şiddetli fibrotik değişiklikler yangısal hücre infiltrasyonları ve rejeneratif nodül oluşumu gözlemlendi (Şekil 37). Karaciğer dokusunda perilobüler fibrozis, kollajenin lokalizasyonu Masson

boyama ile ortaya kondu (Şekil 38). Nekrotik bölgeler fibröz dokuların etrafında mononükleer hücre infiltrasyonları dikkati çekti. Makroskopik olarak yaklaşık 1-2 mm büyüklüğündeki diffuz dağılımlı nodüllerin berrak hücreli HCC olduğu tespit edildi. Bu hücreler fibrolamellar bir yapı ile desteklenmekte idi (Şekil 39). Tümör hücreleri berrak, eozinofilik, ya da bazofilik olup çekirdekleri hiperkromatik idi.

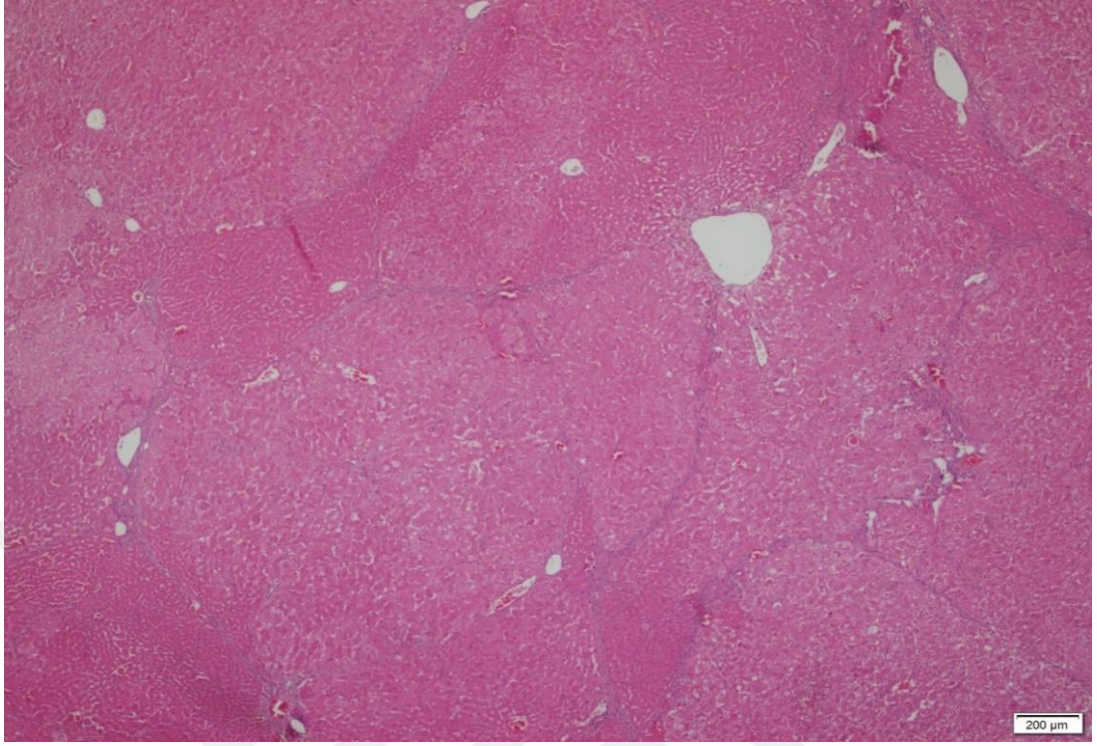
DEN+Chrysin Grubu: Bu grup karaciğerlerde; nekro inflamatuvar lezyonlar, fibrozis ve HCC ile karakterize lezyonlar dikkati çekti. Bazı karaciğerlerde fibrozisin eşlik etmediği berrak hücreli tümör hücre kümeleri stromada gözlemlendi (Şekil 40).

DEN+Apigenin Grubu: Lezyonlar Chrysin grup ile benzerlik göstermekle birlikte, fibrozis şiddeti en düşük hayvanlar bu grupta yer almakta idi (Şekil 41) (Şekil 45).

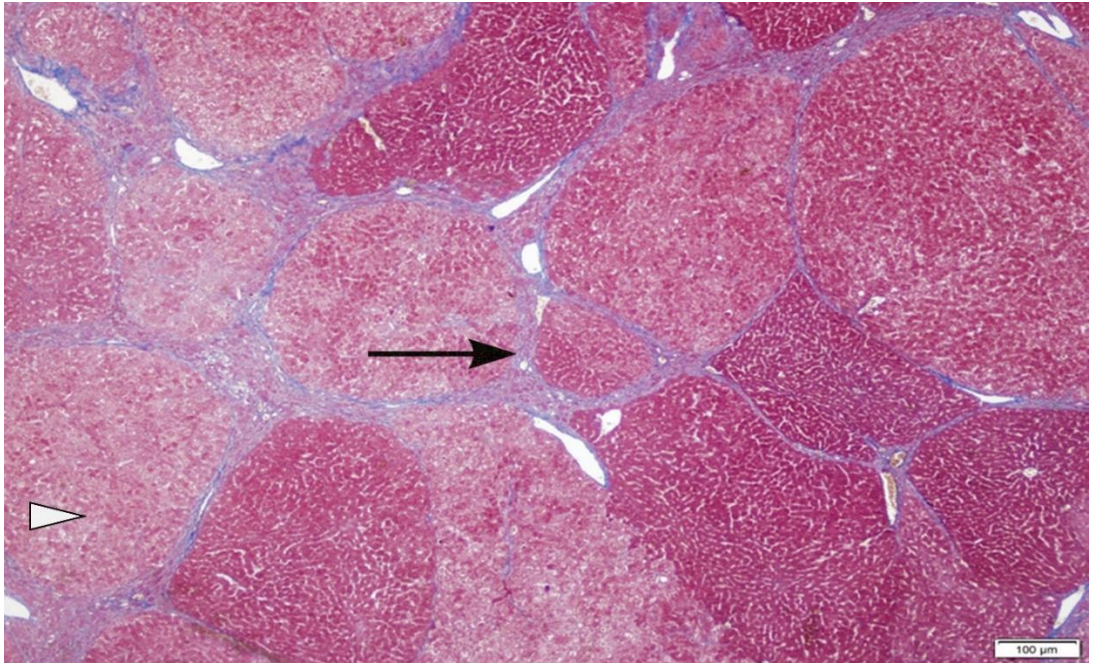
DEN+Kombin Grubu: Fibrozis ve inflamasyona yönelik değişimler Şekil 44, 45’ de skorlandı. Aynı grubun, bireyler arasında farklılıklar gözlemlendi. Bazı hayvanlarda lezyonlar gözlenmezken bazılarında minimal bazılarında ise şiddetli lezyonlar tespit edildi (Şekil 42, 43). HCC oluşumu F4 fibrozis gösteren hayvanlarda belirlendi.



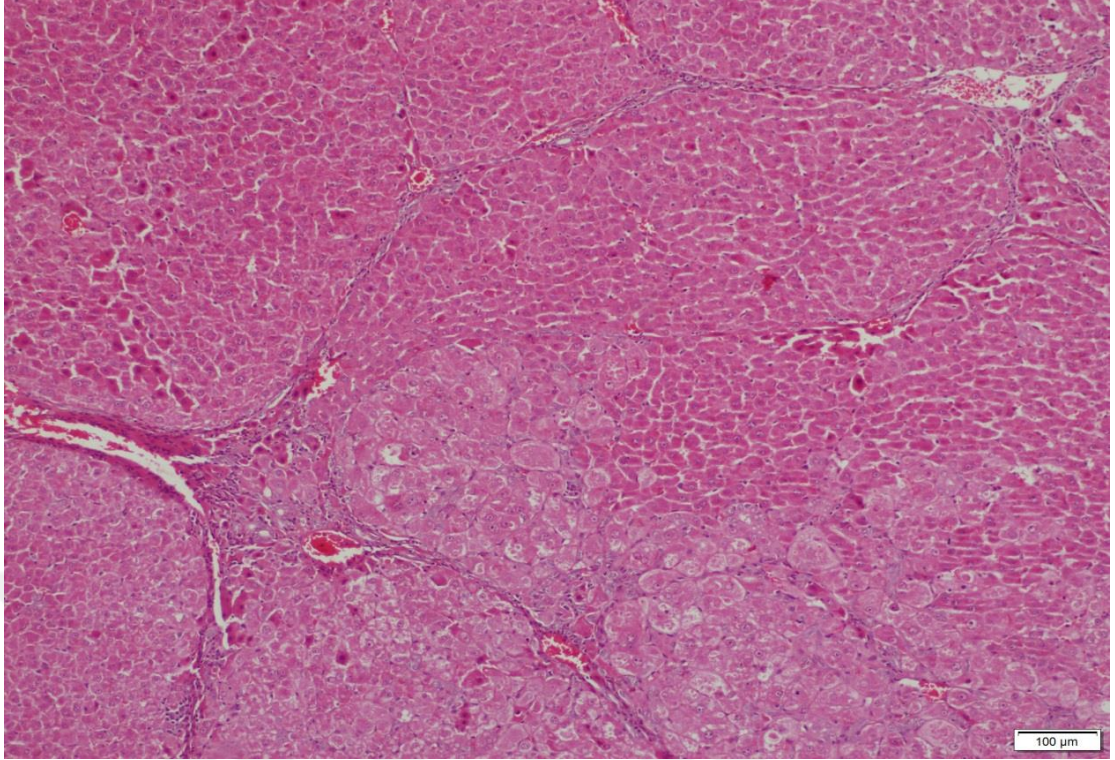
Şekil 36. Kontrol Grubu; normal histolojik görünüm: H.E x10



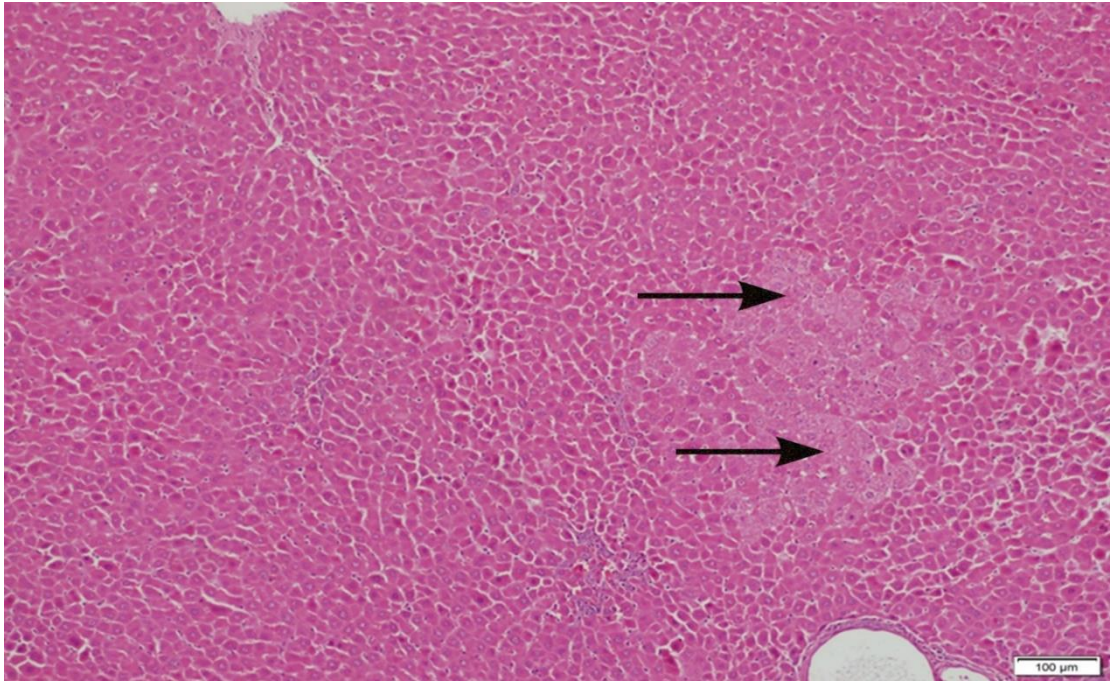
Şekil 37. DEN grubu; şiddetli perilobuler fibrozis (siroz) + HCC rejeneratif nodüller ve tümöral dokunun birlikte görünümü. H.E x 4



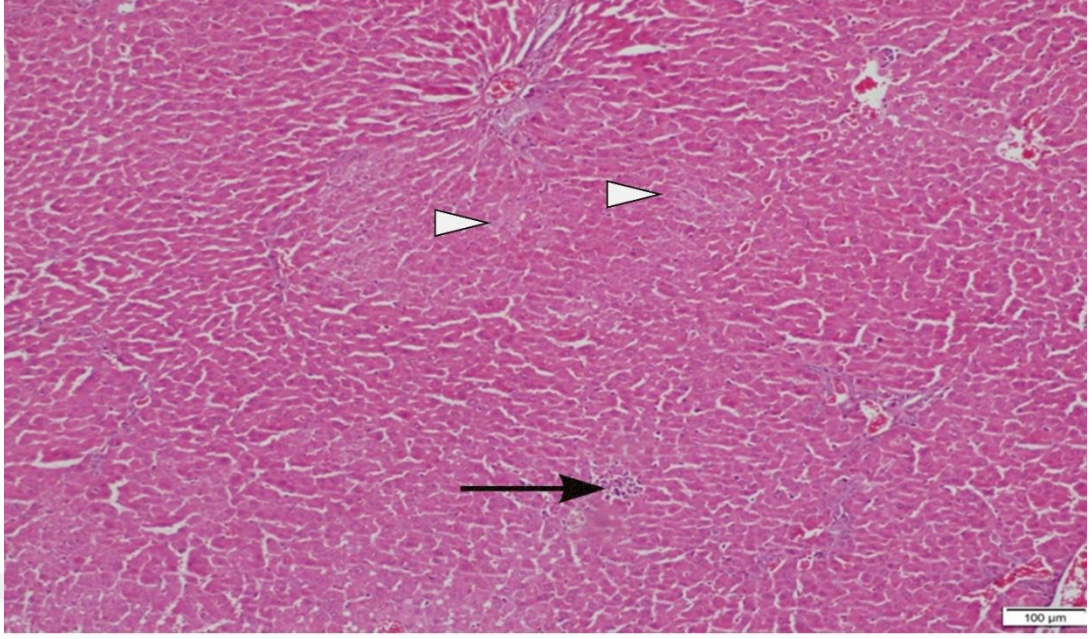
Şekil 38. DEN grup; Şiddetli perilobuler fibrozis (mavi renkli septalar) +HCC. Açık renkli lobüller berrak hücreli HCC alanları (ok başı) Koyu renkli lobüller ise rejeneratif nodüler karaciğer dokusu. Masson x 10



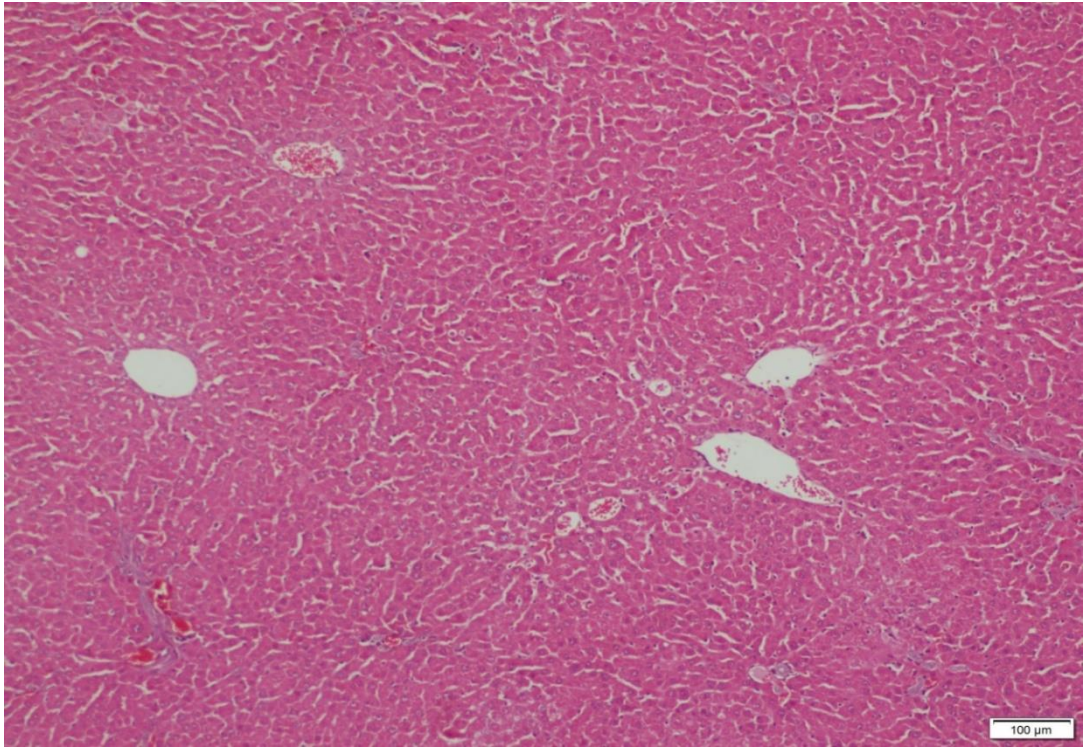
Şekil 39. DEN grup; Berrak hücreli HCC forma eşlik eden fibrolamellar yapılar
H.Ex10



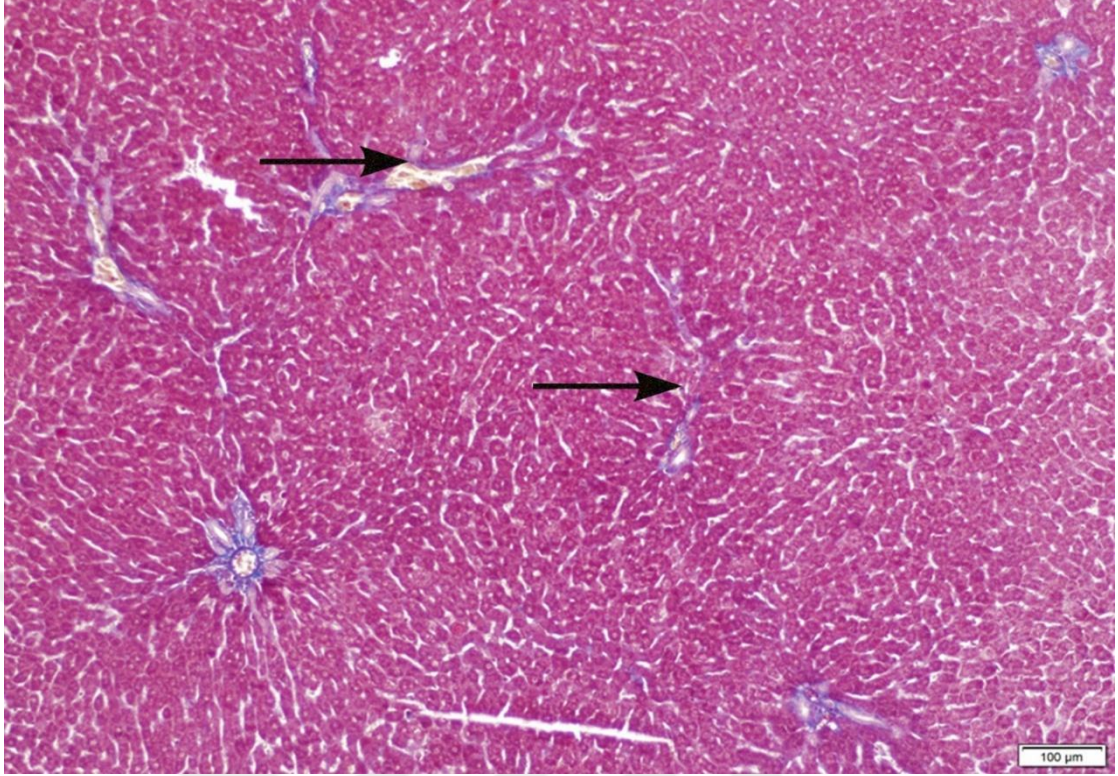
Şekil 40. DEN+Chrysin grubu; berrak hücrelerin parankimdeki lokalizasyonu (oklar) ve fibrozis yok ancak yangısal mononükleer hücre infiltrasyonu (ok başları) olaya eşlik etmektedir. H.Ex10



Şekil 41. DEN+Apigenin Grubu; Fokal mononükleer hücre infiltrasyonu (ok) ile portal bölgede berrak hücreler (ok başları) H.Ex10

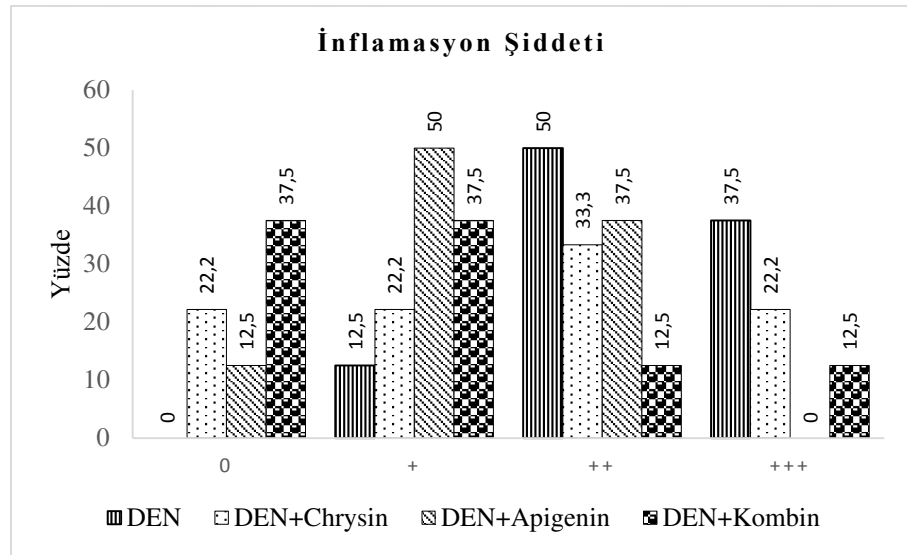


Şekil 42. DEN+Kombin Grubu; Fokal nekrotik odaklar ve minimal fibrotik değişimler H.E x10

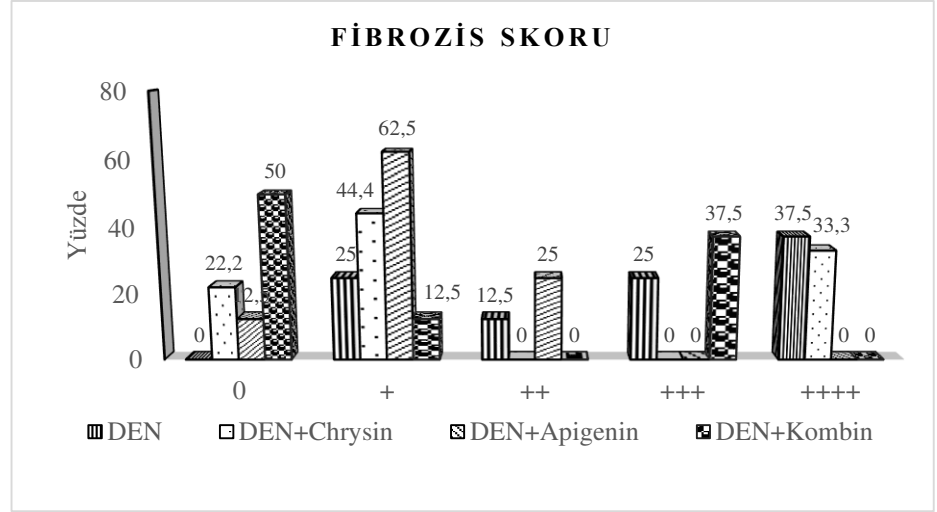


Şekil 43. DEN+Kombin grubu; Minimal fibrozis (oklar) Masson x10

- Mikroskopik Bulgular:**



Şekil 44. Gruplarda inflamasyon şiddeti



Şekil 45. Gruplarda fibrozis skoru

4. TARTIŞMA

Son yıllarda moleküler hücre biyolojisindeki ilerleme, tümör başlangıcı ve ilerlemesinin altında yatan moleküler mekanizmalar hakkındaki anlayışımızı geliştirdi. Bu da, kanserde moleküler anormallikleri sınırlayan umut verici terapötik müdahaleler için yeni moleküler hedefli ajanlar geliştirme fırsatları sağladı. Sinyal yolları ve moleküler ağlar, hayatta kalma ve büyümede önemli hücresel süreçlerin yürütülmesinde ve kontrol edilmesinde kritik rolleri ile tanınmaktadır. Bu nedenle esas olarak kanserin başlangıcında ve ayrıca potansiyel tedavisinde rol oynamaktadırlar. HCC, ileri evrede çoğunlukla kötü prognozlu, komplike bir hastalıktır. Hastalık patogeneze çok sayıda sinyal yolağı katkıda bulunur. Yeni yollara yönelik moleküler hedefli ajanları tespit etmek için araştırmalar devam etmektedir (142, 200).

Hepatoselüler karsinomun mevcut konvansiyonel tedavi yöntemi halen cerrahi rezeksiyondur, ilaç tedavisi yöntemi hala gerekli yeterlilikte olmayıp halihazırda kullanılan ilaçların yan etkileri oldukça fazladır. Araştırmaların ilerlemesiyle birlikte, doğal ürünlerin ve bunların yapısal analoglarının, kanserin tedavisine önemli katkılarda bulunmaları ve yeni bir yol sağlamaları beklenmektedir. Son kırk yılda yeni ilaçların kaynağı olarak kullanılan doğal ürünlerin geriye dönük analizinde, doğal ürünlerin hala yeni ilaçlar bulmak için en iyi seçim olduğu ve birçok hastalığın tedavisinde etkili ilaçlar olabileceği gösterilmiştir. Genellikle karaciğer kanseri teşhisi konan hastalar ameliyat fırsatını kaçırdıkları için HCC'e alternatif tedavi aramak acildir (201).

Bu amaçla bizde çalışmamızda kanserde terapötik aday olarak umut vaat eden, doğal flavonoidlerden olan apigenin ve chrysin'in, HCC üzerindeki kemoterapötik etkilerini tanımlamak adına çeşitli sinyal yollarında meydana gelen değişiklikleri biyokimyasal olarak değerlendirdik. Ayrıca karaciğer doku örnekleri, histopatolojik olarak incelendi.

STAT-3 ve NF- κ B, inflamatuvar mediatörlere yanıt olarak aktive olan transkripsiyon faktörleri ailesine ait önemli sinyal yollarıdır. Proinflamatuvar sitokinlerin hem STAT-3 hem de NF- κ B'yi aktive ettiği ve aynı zamanda bir geri besleme döngüsü oluşturarak onların transkripsiyonel hedefleri olduğu gösterilmiştir. Bu yollardaki benzerlik, dış uyaranlardan gelen sitozolik sinyaller için gerekli olmaları

ve çoğalma, hayatta kalma, anjiyogenez, invazyon ve inflamasyon ile ilgili genleri düzenlemek için gerekli transkripsiyon faktörleri olarak işlev görmeleridir (202).

He ve ark. çok sayıda insan HCC örneğini incelemiş ve bunların yaklaşık %60'ında fosforile edilmiş (yani aktive edilmiş) STAT-3 tespit ettiklerini, STAT-3 pozitif tümörlerin daha agresif davranış sergilediğini belirtmişlerdir. Kötü prognozlu HCC'lerin çoğunda STAT-3'ün aktive olduğunu, çevreleyen tümörsüz dokuda veya normal karaciğerde olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca büyük olasılıkla kanser hücrelerinde STAT-3'ün, tümör mikroçevresinde üretilen sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından aktive edildiğini söylemişlerdir (130). Saraswati ve ark. Phloretin'in (PH) HCC'de STAT-3 yolağı üzerindeki etkilerini çalışmış, PH'nin STAT-3 ekspresyonunu azaltarak ve diğer birtakım mekanizmalar yoluyla tüm HCC hücrelerinde hücre büyümesini inhibe ettiğini ve apoptozu indüklediğini göstermişlerdir (203). Brantley ve ark. Glioblastoma Multiforme tümörlerinde STAT-3 aktivasyonu ve gen ekspresyonu üzerine yaptıkları çalışmada; STAT-3 aktivasyonunun, kontrol dokusuna kıyasla Glioblastoma multiforme dokusunda yükseldiğini belirtmişlerdir (204). Nagpal ve ark. çalışmalarında, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom (HNSCC) tümörlerinin %58,9'unun çok yüksek STAT-3 protein birikimi, %23,3'ünün orta düzeyde birikim gösterdiğini, HNSCC tümörlerinin %17,8'inin ise STAT-3 için negatif olduğunu bulmuşlardır. Normal örneklerde ise STAT-3 saptamamışlardır. STAT-3 aktivasyonunun, baş ve boyun karsinogenezinde erken bir olay olduğu sonucuna varmışlardır (205).

Deneyisel HCC sıçan modeli oluşturduğumuz çalışmamızda karaciğer doku STAT-3 ekspresyon düzeyleri DEN uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre yüksek bulundu. Tedavi ajanlarımızı uyguladığımız gruplarda ise STAT-3 ekspresyon düzeylerinde DEN grubuyla karşılaştırdığımızda anlamlı bir azalma tespit ettik (özellikle apigenin ve kombin tedavi gruplarında).

Jing Li ve ark. kimyasal olarak N-metil-N-nitrozüre (MNU) ile indüklenen sıçan mesane kanserinde fisetin'in mesane kanserine karşı inhibe edici etkilerini, NF- κ B sinyal yolunun modülasyonu ile ilişkilendirmişlerdir. MNU verilen hayvanlarda NF- κ B ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla önemli bir artış gösterdiğini bununla birlikte, fisetin uygulanmasının ise MNU verilen hayvanlara kıyasla NF- κ B ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığını bulmuşlardır. Fisetin'in mesane kanserine

karşı inhibitör etkisinin bir yolunun da, NF-κB aktivasyonunu inhibe etme özelliğinden kaynaklandığını söylemişlerdir (206). Bakshi ve ark. insan kolon karsinomunun tedavisinde crocin'in etkili bir kemoproventif ajan olabileceğini öne sürdükleri çalışmalarında, NF-κB ekspresyonun crocin gruplarında konsantrasyona bağlı bir şekilde kontrol grubuna oranla önemli düşüş gözlemişlerdir (207). Yuan Qin ve ark. HCC hücrelerinde apigenin tedavisini takiben NF-κB ekspresyonunun ve aktivitesinin azaldığını söylemişler ve apigenin'in, karsinom için etkili bir alternatif tedavi olmasının yanında yeni bir anti-metastaz ilacı adayı olabileceğini öne sürmüşlerdir (106).

Bizim çalışmamızda karaciğer doku NF-κB ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna kıyasla kanser gruplarında yüksek bulundu. Ancak sadece DEN+Apigenin grubunda bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildi. Tedavi ajanı uygulanan gruplardaki NF-κB ekspresyon düzeyleri ise DEN grubuyla kıyaslandığında tüm gruplarda azalma mevcuttu. Fakat bu azalma istatistiksel olarak chrysin tedavisi uygulanan grupta anlamlı değil, apigenin ve kombin tedavi gruplarında anlamlıydı.

HCC'lerin %90'ından fazlası karaciğer hasarı ve inflamasyon zemininde ortaya çıktığı için, inflamasyonla ilişkili kanserin bir örneğidir. Kronik inflamasyon, kalıcı karaciğer hasarı ve eşzamanlı rejenerasyon ile ilişkilidir ve ardışık fibroz, siroz ve sonunda HCC gelişimine yol açar. Bu nedenle, kronik karaciğer hasarından displaziye ve HCC'ye geçişe neden olan temel inflamatuvar sinyal yollarının tanımlanması, kronik karaciğer inflamasyonu olan hastaları tanımlamak ve tedavi etmek için yeni biyobelirteçleri ve hedefleri gösterebilir (208). Bu nedenle inflamasyon yolağı parametreleri olan STAT-3 ve NF-κB ölçümlerinden elde ettiğimiz verileri birlikte değerlendirdiğimizde apigenin ve apigenin + chrysin tedavisinin HCC' de inflamasyonun ilerlemesini engellemek yoluyla alternatif terapötik uygulamalar olabileceğini düşündük.

CIP2A, protein fosfataz 2 aktivitesinin inhibisyonu yoluyla c-Myc defosforilasyonunu önleyebilen yeni bir insan onkoproteinidir. Kanser hücrelerinde PP2A aracılığıyla, c-Myc'in bozulmasını önleyerek stabilize eder. Buna ek olarak, CIP2A ve c-Myc pozitif geri beslemeyle birbirlerinin ifadesini teşvik ederler (209).

Mide, meme ve kolon adenokarsinomlarında, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlarda artmış bir CIP2A ekspresyonu tespit edilmiştir (151). Lin ve ark.

çalışmalarında, HCC'de miR-548b-3p ekspresyonunu ve miR-548b-3p'nin CIP2A ifadesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. CIP2A protein ekspresyonunu miR-548b-3p'nin önemli ölçüde azalttığını ve doğrudan CIP2A'yı hedefleyerek bir tümör baskılayıcı olarak hareket ettiğini göstermişlerdir (150). Vaarala ve ark. prostat kanserinde CIP2A ekspresyonunu inceledikleri çalışmalarında iyi huylu hiperplastik epitel ile karşılaştırıldığında prostat kanseri epitelinde CIP2A ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Bu ekspresyon artışının kötü diferansiye ve yüksek riskli tümörlerle ilişkili olduğunu söylemişlerdir (151).

Çalışmamızda tespit ettiğimiz karaciğer doku CIP2A ekspresyon düzeyleri kanserojen ajan verdiğimiz gruplarda kontrol grubuna göre daha yüksekti. Bu önceki çalışmalarla uyumlu bir sonuçu (209-212). Sadece DEN uygulanan gruba göre natural tedavi ajanlarını uyguladığımız gruplarda ise CIP2A ekspresyon düzeylerinde azalma gözlemlendi (özellikle apigenin uygulanan grupta). Kötü prognoz parametresi kabul edilen CIP2A'nın DEN+apigenin grubunda anlamlı azalış göstermesi HCC'de terapötik bir etkisinin olabileceğini ve bu etkiyi, anormal büyüme ile ilişkili onkogen 'myc' geninin CIP2A aracılı stabilizasyonunun inhibisyonu yoluyla gösterebileceğini düşündürdü.

Apoptoz, yani programlanmış hücre ölümü, DNA hasarını takiben veya gelişim sırasında oluşabilen hasarlı hücrelerin düzenli ve etkili bir şekilde çıkarılmasıyla sonuçlanan gen seviyesinde düzenlenen bir süreçtir. Apoptoz mekanizması karmaşıktır ve birçok sinyal yolunu içerir (157).

Bir çalışmada survivin'in HCC'de tümör hücre proliferasyonunu desteklediği gösterildi (213). Oparina ve ark. BIRC5 geninin ürünü olan survivin protein seviyelerinin yüksek ifadesinin meme kanserinin spesifik moleküler alt tipleri ile ilişkili olduğunu gözlemlemiş ve ayrıca yüksek BIRC5 ekspresyonunun meme kanseri hastalarında kötü prognoz ile ilgili olduğunu göstermişlerdir (214). Ioannis Kapiris ve ark. HCC'de apoptoz inhibitörü survivin'in pozitif ifadesinin vasküler infiltrasyonlu, kötü diferansiye HCC'de anlamlı olarak daha yüksek olduğunu ve aynı zamanda survivin pozitif HCC hastalarının negatif HCC hastaları ile karşılaştırıldığında daha kötü sağkalıma sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Survivin'in HCC prognozunu değerlendirmek adına biyobelirteç olarak kullanılabileceğini önermişlerdir (215). Liu ve ark. paeonolün, survivin'i hedefleyerek HCC hücreleri üzerinde antitümör etkileri

gösterebileceğini ve terapötik bir aday olabileceğini söyledikleri çalışmalarında survivin ekspresyonunun paeonol tarafından bloke edildiğini gösterdiler (216).

Survivin ilk kez tanımlandığında, kanserde yeni hedefler arayan onkologlar ve hücre biyologları için bugün de devam eden büyük bir ilgi uyandırdı. Survivin, hem proliferatif hem de antiapoptotik bir protein olarak umut verici bir hedeftir. Ayrıca, kanser söz konusu olduğunda en ilgi çekici hedefler kanserde normal hücrelere göre farklı şekilde eksprese edilenlerdir ve survivin de kanserde çoğu normal somatik hücreye göre oldukça fazladır (217). Ayrıca, survivin karaciğer kanserinde nüks ve terapötik direnç ile yakından ilişkilidir (218). Survivin inhibitörlerinin veya diğer moleküllerin geliştirilmesi HCC hücrelerine pro-apoptotik etki kazandırmayı sağlar ve hedefe yönelik tedavi seçenekleri sunar (215).

HCC sıçan modeli oluşturduğumuz çalışmamızda karaciğer doku süpernatant ve serum survivin düzeyleri DEN uygulanan tüm gruplarda kontrol grubuna göre önceki çalışmalarla uyumlu olarak artış göstermiştir. Yine tedavi ajanı uygulanan gruplardaki survivin düzeyleri hem doku süpernatantı hem serumda incelendiğinde DEN grubuna göre tüm gruplarda bir azalışın olduğunu gözlemledik (En fazla azalma DEN+Apigenin grubundaydı).

Son çalışmalar, kaspaz-3'ün karsinogenezdeki rolünü ortaya koymaya çalıştı. Kaspaz-3, meme kanseri, kolorektal kanser ve hepatoselüler karsinom gibi malignitelerde yer alan süreçler olan hücre ölümü ve apoptozu düzenleyebilir. Tümörlerde kaspaz-3 down-regülasyonu genellikle kanser tedavisine dirençle sonuçlanır (219).

Yasser Mohamed ve ark. DEN ile indükledikleri sıçan HCC modelinde kanser grubu sıçanlarının karaciğerlerinin, kontrol grubu sıçanlarına göre proapoptotik kaspaz-3 ekspresyonunda azalma sergilediğini göstermişlerdir. Bu azalmış ekspresyon, terapötik ajanların uygulanmasının ardından önemli ölçüde artmıştır (220). Hui Liang ve ark. patolojik kanama ve nekroz ile komplike primer HCC'li hastalarda kaspaz-3 ekspresyonunun azaldığını ve bunun klinikopatolojik özellikler ve prognoz ile ilgili olduğunu vurgulamışlardır (221). Acar ve ark. prostat karsinomlu hastalarda yaptıkları incelemede kötü prognozlu hastaların, iyi prognozlu hasta grubuna göre daha düşük seviyelerde kaspaz-3 ekspresyonu gösterdiğini ortaya çıkarmışlardır (222). Shati ve ark. Saussurea costus'un antikanser aktivitesini

inceledikleri çalışmada kanser hücrelerinin *Saussurea costus* özü ile tedavisinin güçlü kaspaz-3'ün aktivasyonu sergilediğini göstermişlerdir. Elde ettikleri bulgularla birlikte *Saussurea costus* özütünün, çeşitli meme, kolon ve karaciğer kanserlerini tedavi etmek için antikanser ajan olarak kullanılabilecek ikincil metabolitlerin potansiyel kaynağı olduğunu söylemişlerdir (223).

Apoptotik moleküler sinyal yollarının bozulması karsinogenezde önemli rol oynar. Kaspaz ailesi aktivasyonunun, apoptoz sürecinde bildiğimiz en eski adımlardan birini temsil ettiği bilinmektedir. Sitotoksik ilaçlar, radyoterapi veya immünoterapi gibi birçok antikanser tedavi, kaspazı aktive ederek tümör hücresi ölümüne neden olabilir. Bu nedenle, kaspaz-3 aktivasyonu, birçok araştırmacı tarafından kanser tedavisinin etkinliğinde bir belirteç olarak kullanılmaktadır (168, 223). DEN ile indüklenen sıçan HCC modeli çalışmamızda, doku ve serum kaspaz-3 düzeylerini kontrol grubuna kıyasla DEN uygulanan tüm gruplarda azalmış olarak tespit ettik. DEN uygulanan grupla kıyaslandığında tüm tedavi ajanı uygulanan gruplarda doku ve serum kaspaz-3 düzeylerinde bir artış ve en fazla artışın apigenin tedavisi uygulanan grupta olduğu saptandı. Bu sonuçlar yukarda verilen tüm literatür çalışmalarının sonuçları ile uyumluydu.

Sun ve ark. kolon kanserli hastaların serum annexin A5'in seviyesini önemli ölçüde artmış ve lenf nodu metastazı olan hastalarda lenf nodu metastazı olmayan hastalara göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Ayrıca, evre III-IV hastalığı olanlardaki ekspresyonun, evre I-II hastalığı olanlardan anlamlı düzeyde daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (224). Zhuang ve ark. çalışmalarında normal karaciğer dokularına kıyasla karaciğer kanserinde annexin V'in arttığını ve yüksek ekspresyon seviyelerinin, düşük genel sağkalım oranı ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu söylemişlerdir (225). Li ve ark. uterin servikal skuamöz hücreli karsinomda (UCSCC) tüm displastik dokuların, normal epitelde gözlenen zayıf sinyalle kıyaslandığında önemli ölçüde artmış annexin V ekspresyonu gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca orta ve iyi diferansiye tümörlerle karşılaştırıldığında, kötü diferansiye tümörlerde annexin V ekspresyonunda önemli bir artış olduğunu ve hastaların serum annexin V konsantrasyonlarının da önemli ölçüde arttığını bulmuşlardır (226). Sun ve ark. annexin V'in HCC hastalarından alınan tümörlü dokularda aşırı eksprese edildiğini bu durumun HCC'nin klinik ilerlemesini ve lenfatik metastazını potansiyel olarak

arttırdığını gösterdiler. Annexin V kararlı yıkımının ise migrasyon ve invazyon kapasitelerinin azalmasına yol açmanın yanı sıra tümörojenite hızı, malignite, metastaz oranını azalttığını gösterdiler (227).

Yukarıdaki çalışmalarla uyumlu olarak biz de hem doku hem serum annexin-V düzeylerini kanser gruplarımızda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek tespit ettik. Tedavi gruplarımızda ise DEN grubuyla kıyaslandığında tüm gruplarda azalma saptadık. Serum annexin-V seviyelerinde en anlamlı azalma DEN+ apigenin grubunda gözlemlendi.

Apoptoz yolağındaki ekspresyonunu incelediğimiz tüm parametre sonuçları (Survivin, annexin V, kaspaz-3) birlikte değerlendirildiğinde apigenin ve chrysin tek tek ve kombin uygulamalarının apoptozu destekler özellikte davranış sergilediği görüldü ve bu etki en fazla apigenin'in uygulandığı gruplar için geçerliydi. Böylece bu flavonların sıçanların karaciğerinde apoptozu tetikleme kabiliyeti nedeniyle anti-HCC etkiler gösterebileceği söylenebilir.

Liu ve ark. invaziv meme kanserinde SMO ekspresyonunun tümör dokularında normal meme dokularına kıyasla daha fazla eksprese edildiği bulmuşlardır (228). Yin-Lu Ding ve ark. kolon kanseri dokularında yüksek SMO ekspresyonu tespit ettiklerini ve SMO ekspresyon seviyesinin lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Bu da onlara SMO'nun daha agresif seyreden kolon kanseri ile korelasyona sahip olduğunu düşündürmüştür (229). Sicklick ve ark. insan hepatokarsinogenezinde Hedgehog yolunun disregülasyonunu 14 HCC hastasının tümör dokusunda incelemişlerdir. Gen ekspresyon paternlerini analiz ettiklerinde 14 tümör dokusu, SMO proto-onkogen ekspresyonunda ortalama 2.5 kat artış göstermiştir. 14 HCC'den 6'sında (%42,9) SMO ekspresyonu 3 kattan fazla artmıştır. Ayrıca hiçbir tümör dokusu SMO ekspresyonunda azalma göstermemiştir. Bunun yanında HCC boyutunun SMO ekspresyonu ile pozitif korelasyon gösterdiğini ve büyük tümörlerin (≥ 5 cm) küçük tümörlerden (< 5 cm) daha yüksek ekspresyon oranlarına sahip olduğunu göstermişlerdir (230). Jing-Song Chen ve ark. SHH sinyal yolunun karaciğer kanserinin invazyon ve metastazına katkıda bulunduğunu gösterdiklerini çalışmalarında HCC dokularının %63,5'i, komşu kanserli olmayan karaciğer dokularının %11,1'inde SMO'nun pozitif ifadesini bulmuşlardır. Ayrıca yüksek SMO ekspresyonunu, HCC'de daha yüksek TNM evresi, vasküler invazyon ve intrahepatik metastaz ile ilişkilendirmişlerdir (231).

SMO, kanserlerin tedavisinde önemli bir hedeftir. SMO inhibitörlerinin meme, karaciğer, pankreas ve kolon kanseri malignitelerinin tedavisi için etkinliği kanıtlanmıştır veya klinik deneyler altındadır. Bu tür tedaviler, tek bir kullanımla veya geleneksel kemoterapiye adjuvan veya ek olarak hastalara faydalı olabilir (175). Bizim çalışmamızda ise önceki çalışmalara benzer smoothened sonuçları elde edilmiştir. Şöyle ki HCC oluşturduğumuz gruplarda serum ve süpernatant SMO düzeyleri kontrol

grubuna kıyasla artmıştır. Tedavi uyguladığımız her üç grupta da DEN grubuna kıyasla azalmış SMO düzeyi tespit ettik (en anlamlı azalma DEN+Apigenin grubunda).

Wei-Ting Cheng ve ark. hedgehog sinyal yolunun hepatosellüler karsinom hücrelerinin çoğalması ve invazyonundaki rolü üzerinde çalışmışlardır. HCC hastalarında HH yolu bileşenlerinin (Sonic HH, Ptch1 ve Gli2) seviyelerini incelemişler ve kanserli olmayan dokulara kıyasla kanser dokularında aşırı eksprese edildiğini bulmuşlardır. Bu ekspresyonun histolojik farklılaşma ve portal ven invazyonu ile yakın korelasyon gösterdiğini söylemişlerdir (232). Che ve ark. SHH proteininin insan HCC dokularında önemli derecede pozitif ifade edildiğini, ancak komşu normal karaciğer dokularında negatif veya zayıf şekilde ifade edildiğini bulmuşlardır (233). Chen ve ark. 200 hastada yaptıkları incelemede tümörlü ve komşu kanserli olmayan karaciğer dokusunda yaptıkları çeşitli analizler sonucu SHH proteinini, HCC'nin %66'sında saptarken, kanserli olmayan karaciğer dokularının %18,5'inde saptamışlardır. SHH aşırı ekspresyonunu, HCC'de kapsüler invazyon, daha yüksek tümör evresi, vasküler invazyon ve intrahepatik metastaz ile ilişkili bulmuşlardır (231). Li ve ark. SHH sinyalinin ve histon deasetilazın (HDAC) kombine inhibisyonunun karaciğer kanseri tedavisinde daha etkili olabileceğini öngörmüşlerdir. SHH inhibitörü vismodegib'in etkisi, tek ajan olarak ve histon deasetilaz inhibitörü entinostat ile kombinasyon halinde çeşitli yöntemlerle incelenmiştir. Sonuçlar, SHH inhibitörünün tek başına etkili olduğunu ancak HDAC inhibitörüyle ikili kullanımının, karaciğer kanseri hücrelerinde proliferasyonu inhibe etmek ve apoptozu teşvik etmek için daha etkili olduğunu ortaya koydu (234).

Yukarıdaki çalışmalarla benzer şekilde çalışmamızda SHH düzeyleri serum ve süpernatantta kontrol grubuna kıyasla DEN uygulanan gruplarda yüksekti (Serum SHH düzeyleri apigenin ve kombin tedavi gruplarında anlamlı değildi). Tedavi ajanı uygulanan gruplardaki süpernatant ve serum SHH düzeylerine baktığımızda DEN grubuna göre; apigenin ve kombin tedavi uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir.

HH sinyalinin aktivasyonu, kronik karaciğer yaralanmaları ve sirozdan HCC'ye kadar olan lezyonlarda bulunur. Çalışmalar, HH sinyalinin, HCC hücrelerinin çoğalmasını, yaşayabilirliğini, migrasyon ve invazyonunu teşvik etmek için anormal şekilde aktive olduğunu göstermektedir (235). Bu bilgiler ışığında ve yukardaki

alışmalar da göz önüne alınıp bizim çalışmamızdaki hedgehog sinyal yolundaki parametre sonuçları değerlendirilmiştir. Tedavi ajanlarımızın bu yolaktaki parametreler üzerinde inhibe edici etkisi ile apoptozu indkleyeceği, hücre proliferasyonunu inhibe edip (muhtemelen G2/M hücre döngüsünü durdurarak) karaciğer kanseri hücrelerinin büyümesini engelleyeceği ve böylece HCC için terapötik aday olabilecekleri dşnlmştir.

Notch sinyali, apoptoz, migrasyon, invazyon ve anjiyogenez de dahil olmak üzere birçok hücresel süreci düzenleyen bir çekirdek sinyalleme sistemidir (236). Che ve ark. insan intrahepatik kolanjiokarsinom (ICC) rneklerinde JAG1 seviyelerini belirlemişlerdir. 90 ICC örneğinin 81'inde (%90) JAG1 seviyelerinin, tümörlü olmayan evre dokuyla karşılaştırıldığında arttığını bulmuşlardır. İmmünohistokimyasal bu bulguyu daha da doğrulamak için JAG1 mRNA seviyeleri, gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR kullanılarak aynı koleksiyondan 36 tümörsüz karaciğer dokusu ve ICC numunesinde analiz edilmiş ve tümörsüz çevreleyen karaciğerle karşılaştırıldığında 36 ICC örneğinden 31'inde daha yüksek JAG1 seviyeleri tespit etmişlerdir (237). Areerat Kunanopparat ve ark. HCC dokularında JAG1 ekspresyonunu, bitişik tümör olmayan dokulardan anlamlı derecede daha yüksek buldular. Bunun JAG1'in onkogen olarak rolünü desteklediğini belirtmişlerdir (238). Dai ve ark. insan kolon kanseri dokularının çoğunluğunun (%83), kontrollere göre daha yüksek Jagged1 ekspresyonu sergilediğini göstermişlerdir. Ayrıca JAG1'i hedeflemenin (down-regülasyonunun) kolon kanseri hücrelerinin çoğalmasını, migrasyonunu ve invazyonunu engellediğini göstermişlerdi (239). Li ve ark. miR-199b'nin HCC'de JAG1'i doğrudan hedefleyerek hepatoseller karsinomda tümör baskılayıcı işlev gördüğünü gösterdiler (240).

JAG1'in hedeflenmesinin şu anda kanser tedavisi için umut vaat ettiği düşünülmektedir ve güçlü JAG1 ekspresyon profilleri ile ilişkili yolları hedeflemek için çalışmalar devam etmektedir (241). Çalışmamızda Jagged sinyal yolağı düzeylerine bakıldığında kontrol grubuna kıyasla DEN uygulanan tüm gruplarda istatistiksel açıdan anlamlı olacak şekilde daha yüksek bulundu (serum DEN+Apigenin grubu yüksekliliği anlamlı değildi.). Tedavi ajanı uygulanan gruplardaki düzeylerin ise DEN grubuna kıyasla tüm gruplarda anlamlı ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Sonuçlar nceki çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

H Zhang ve ark. Notch1 aktivasyonunun mide kanseri ilerlemesi ile ilişkili olduğunu ve hasta sonuçları için yeni bir prognostik faktör olarak kullanılabileceğini belirlediler (242). Fang Wang ve ark. abelson tirozin-protein kinaz 1'in (ABL1) inhibisyonunun, c-MYC'nin düzenlenmesi aracılığıyla Notch1 ekspresyonunu azaltarak HCC hücre büyümesini baskıladığını buldular (243). Xiang ve ark. tıbbi bitki ekstraktı olan Anemoside B4'ün (AB4) karaciğer kanserinde Notch sinyal yolunun temel bileşenlerinin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisini değerlendirdiler. Notch1'in AB4'ün ana moleküler hedefi olabileceğini, ekspresyonunun AB4 ile tedaviyi takiben kolaylıkla baskılandığını buldular. AB4 tedavisi ile Notch sinyalinin inhibisyonun, karaciğer kanseri hücre proliferasyonunu baskıladığını ve kanser hücresi apoptozunu indüklediğini söylediler (244). Zhou ve ark. ICC'de Notch1'in, aynı hastadan alınan bitişik normal dokuya kıyasla tümör örneklerinin tümünde hem mRNA hem de protein seviyelerinin aşırı eksprese edildiği buldular. Artan Notch1 ekspresyonunun tümör progresyonu ile ilişkili olabileceğini düşündüler (245).

Sonuçlarımızda serum ve süpernatant Notch1 düzeyleri kontrol grubuna kıyasla DEN uygulanan gruplarda (süpernatant apigenin uygulanan grup hariç) anlamlı olacak şekilde daha yüksekti. Tedavi ajanı uygulanan gruplardaki Notch1 düzeylerinin ise DEN grubuna kıyasla azaldığı, en etkili azalışın apigenin ve kombin tedavi uygulanan gruplarda olduğu gözlenmiştir.

HCC'de Notch sinyal yolağının rolünde mevcut veriler tartışmalıdır. Ancak, daha fazla sayıda kanıt, Notch'in HCC gelişimindeki kanserojen rolünü desteklemektedir. Notch sinyalinin HCC proliferasyonu, invazyon ve metastazına dahil olması nedeniyle, çok sayıda çalışma, Notch'in bir HCC terapötik hedefi olarak potansiyelini göstermiştir (246). Bu bilgiler ve daha önceki çalışmalar değerlendirildiğinde bu sinyal yolunun tümör anjiyogenezi, neoplastik hücre büyümesi, epitelyal-mezenkimal geçiş, metastatik süreç ve tedaviye direnç dahil kanserin birçok sürecinde rol oynaması ve tedavi ajanlarımızın Notch sinyal yolağındaki inhibe edici etkisi nedeniyle HCC için terapötik aday olabileceği bu sinyal yolağıyla da desteklenmiştir.

Histopatolojik incelemede makroskobik görünüm nodül oluşum ve dağılımına göre değerlendirildiğinde kontrol grubu hariç tüm gruplarda nodül oluşumu mevcuttu. Bu görünüm en şiddetli DEN grubunda izlendi. DEN grubu ile kıyaslandığında ise

tedavi gruplarında nodül oluşum şiddetinde gerileme mevcuttu. Sağlıklı kontrollere en yakın görünüm DEN+Apigenin grubunda izlendi. Bu en fazla apigenin etkisiyle olmak üzere tedavi ajanlarımızın tümör gelişimini baskıladığını ve hatta gerilettiğini düşündürdü.

DEN grubunda 16 haftanın sonunda ratların tamamında değişen derecelerde fibrozis ve yangısal lezyonlar, rejeneratif nodül oluşumu izlendi. DEN grubundaki sıçanlarda %62,5 oranında orta-şiddetli fibrozis izlendi. DEN+Chrysin grubunda %33,3 şiddetli fibrozis; %44,4 hafif lezyonlar ve kalan hayvanlarda normal görünüm tespit edildi. DEN+Apigenin grubunda ise %75 oranında hafif fibrozis vardı ve %25 sıçanda patolojik görünüm tespit edilmedi. Kombin tedavi uygulanan grupta %37,5 şiddetli fibrozis, %12,5 hafif fibrozis ve %50 kadarında normal görünüm izlendi. Kontrol grubu KC dokuları ise normal histolojik yapıyı göstermekteydi. Önceki çalışmalarla uyumlu sonuçlar elde edildi (198, 247).

Karaciğer kanserinin benzersiz bir özelliği, karaciğer fibrozu ile yakın ilişkisidir. Hepatosellüler karsinomların %80'den fazlası fibrotik veya sirotik karaciğerlerde gelişir, bu da karaciğerin premalign ortamında karaciğer fibrozunun önemli bir rolü olduğunu düşündürür (248). Bizim çalışmamızda KC'deki fibrozis gelişimi göz önüne alındığında kanser gruplarında değişen derecelerde fibrozis mevcuttu. HCC oluşumu şiddetli fibrozis gösteren hayvanlarda belirgindi. Tedavi gruplarında ise DEN grubu ile kıyaslandığında fibrozis ve inflamasyonda gerileme mevcuttu. Sağlıklı kontrol grubuna en yakın görünüm apigenin ve kombin tedavi uygulanan grupta tespit edildi. Tüm bunlar tedavi ajanlarının HCC'nin temel basamaklarından biri olan fibrozisi iyileştirerek etkili olabileceklerini düşündürdü.

Sonuç olarak; HCC sıçan modelinde apigenin ve chrysin uygulamasının antiinflamatuvar, antiproliferatif, apoptotik etkinliklerini değerlendirdiğimiz çalışmamızda, DEN uygulamasının karsinogenez sinyal yollarındaki STAT-3, NF- κ B ve CIP2A ekspresyonunun artmasına, doku ve serum Notch1, Jagged1, SMO, SHH, survivin, annexin V seviyelerinde artışına ve kaspaz-3 azalışına yol açarak tümör oluşumuna katkı sağladığı, apigenin ve chrysin'in ise tümör oluşumuna yatkın bu mikroçevrede kanser sinyal yollarında görevli bu moleküllerin ekspresyonlarını düzenleyerek koruyucu bir etki gösterebileceği kanısına varılmıştır. Aynı zamanda, seçili doğal flavonoidlerin HCC üzerinde sağladığı terapötik etkinlik (özellikle en

fazla antineoplastik etkiyi gösteren apigenin), etkin bir kemoterapötik ajan olabileceklerini göstermektedir. Çalışmamızın özgünlüğünü oluşturan kısım ise hepatoselüler karsinomda her iki ajanının (chrysin ve apigenin) birlikte kullanılmasının chrysin grubuna göre daha fazla yarar sağlaması olmuştur. Farklı kanser modellerinde yapılacak çalışmalarla ve bu verileri destekler nitelikte alınacak sonuçlarla kemoterapötik ajan olarak kullanılabilecekleri, yeni bir terapötik ilaç geliştirme imkanı sunabileceği ön görülmektedir. Bu iki ajanın birlikte kullanılmasıyla ilgili ise daha fazla araştırmaya gerek vardır.



5. KAYNAKLAR

1. Chang Y, Jeong SW, Young Jang J, Jae Kim Y. Recent Updates of Transarterial Chemoembolization in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci* 2020; 21(21): 8165.
2. Kurma K, Manches O, Chuffart F. DEN-Induced Rat Model Reproduces Key Features of Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2021; 13(19): 4981.
3. El-Khoueiry AB, Hanna DL, Llovet J, Kelley RK. Cabozantinib: An evolving therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Treat Rev* 2021; 98: 102221.
4. Cao Z, Zhang H, Cai X. Luteolin Promotes Cell Apoptosis by Inducing Autophagy in Hepatocellular Carcinoma. *Cell Physiol Biochem* 2017; 43(5): 1803-1812.
5. Jialin Wei ZS, Li Shi, Shaodan Hu, Da Liu, and Hong Wei. Molecular Mechanism of Chrysin in Hepatocellular Carcinoma Treatment Based on Network Pharmacology and in Vitro Experiments 2021; 16(12): 1–10.
6. Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacogn Rev*. 2014; 8(16): 122-146.
7. Memon A, Pyao Y, Jung Y, Lee JI, and Lee WK. A Modified Protocol of Diethylnitrosamine Administration in Mice to Model Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(15): 5461.
8. Gani SA, Muhammad SA, Kura AU. Effect of protocatechuic acid-layered double hydroxide nanoparticles on diethylnitrosamine/phenobarbital-induced hepatocellular carcinoma in mice. *PLoS One*. 2019; 14(5): e0217009.
9. Abdallah HMI, El Awdan SA, Abdel-Rahman RF, Farrag ARH, Allam RM. 1,8 Cineole and Ellagic acid inhibit hepatocarcinogenesis via upregulation of MiR-122 and suppression of TGF- β 1, FSCN1, Vimentin, VEGF, and MMP-9. *PLoS One*. 2022; 17(1): e0258998.

10. Malik S, Bhatnagar S, Chaudhary N, Katare DP, Jain SK. DEN+2-AAF-induced multistep hepatotumorigenesis in Wistar rats: supportive evidence and insights. *Protoplasma*. 2013; 250(1): 175-83.
11. Unsal V and Belge-Kurutaş E. Experimental Hepatic Carcinogenesis: Oxidative Stress and Natural Antioxidants. *Open Access Maced J Med Sci* 2017; 5(5): 686-691.
12. Matsui WH. Cancer stem cell signaling pathways. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95(1): 8-19.
13. Yuen VW and Wong CC. Hypoxia-inducible factors and innate immunity in liver cancer. *J Clin Invest* 2020; 130(10): 5052-5062.
14. Anwanwan D, Singh SK, Singh S, Saikam V, Singh R. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2020; 1873(1): 188314.
15. Chidambaranathan-Reghupaty S, Fisher PB, and Sarkar D. Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification. *Adv Cancer Res* 2021; 149: 1-61.
16. Yang JD, Hainaut P, Gores GJ. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019; 16(10): 589-604.
17. Jiang HY, Chen J, Xia CC. Noninvasive imaging of hepatocellular carcinoma: From diagnosis to prognosis. *World J Gastroenterol*. 2018; 24(22): 2348-2362.
18. Chen Z, Xie H, Hu M, et al. Recent progress in treatment of hepatocellular carcinoma. *Am J Cancer Res*. 2020; 10(9): 2993-3036.
19. Forner A, Reig M, and Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2018; 391(10127): 1301-1314.

20. Kim E and Viatour P. Hepatocellular carcinoma: old friends and new tricks. *Exp Mol Med* 2020; 52(12): 1898-1907.
21. Farazi PA and DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(9): 674-87.
22. Ogunwobi OO HT, Huaman J, Galuza A, Odumuwagun O, Tan Y, Ma GX, Nguyen MT. Mechanisms of hepatocellular carcinoma progression *World Journal of Gastroenterology* 2019; 25(19): 2279-2293.
23. Xiao Z, Shen J, Zhang L, et al. Therapeutic targeting of noncoding RNAs in hepatocellular carcinoma: Recent progress and future prospects. *Oncol Lett* 2018; 15(3): 3395-3402.
24. Peng L, Yuan XQ, Zhang CY, et al. The emergence of long non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma: an update. *J Cancer* 2018; 9(14): 2549-2558.
25. Luo P, Wu S, Yu Y. Current Status and Perspective Biomarkers in AFP Negative HCC: Towards Screening for and Diagnosing Hepatocellular Carcinoma at an Earlier Stage. *Pathol Oncol Res.* 2020; 26(2): 599-603.
26. Renne SL, Sarcognato S, Sacchi D. Hepatocellular carcinoma: a clinical and pathological overview. *Pathologica.* 2021; 113(3): 203-217.
27. Asafo-Agyei KO, Samant H. Hepatocellular Carcinoma In: E. H (Editor).StatPearls. Treasure Island (FL):StatPearls Publishing 2022: 257-285.
28. Cunha GM, Sirlin CB, Fowler KJ. Imaging diagnosis of hepatocellular carcinoma: LI-RADS. *Chin Clin Oncol.* 2021; 10(1): 3-4.
29. Feng H, Li B, Li Z, Wei Q, and Ren L. PIVKA-II serves as a potential biomarker that complements AFP for the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer.* 2021; 21(1): 401-402.

30. Xu C YZ, Zhou L, Wang Y. A comparison of glypican-3 with alphafetoprotein as a serum marker for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013; 139(8): 1417–1424.
31. Kawai YK, Ishii T, Katayama H, Yoshitoshi EY, Ogiso S, et al. Keratin 19, a Cancer stem cell marker in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2015; 21(13) 3081–3091.
32. Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 2: 16018.
33. Kim DW, Talati C, and Kim R. Hepatocellular carcinoma (HCC): beyond sorafenib-chemotherapy. *J Gastrointest Oncol*. 2017; 8(2): 256-265.
34. Isabelle Soerjomataram DO, Valery Lemmens, Anke Oenema, Vassiliki Benetou, Antoni Trichopoulou, Jan Willem Coebergh, Jan Barendregt, Estherde Vries. Increased consumption of fruit and vegetables and future cancer incidence in selected European countries. *European Journal of Cancer* 2010; 46: 2563-2580.
35. Wang W and Wei C. Advances in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Genes Dis*. 2020; 7(3): 308-319.
36. Ladep NG, Dona AC, Lewis MR. Discovery and validation of urinary metabotypes for the diagnosis of hepatocellular carcinoma in West Africans. *Hepatology* 2014; 60(4): 1291-301.
37. Bogdanos DP, Gao B, and Gershwin ME. Liver immunology. *Compr Physiol* 2013; 3(2): 567-598.
38. Abdel-Misih SR and Bloomston M. Liver anatomy. *Surg Clin North Am*. 2010; 90(4): 643-653.
39. Robert J.Washabau. Liver. *Canine and Feline Gastroenterology* 2013: 849-957.

40. Arinci K EA. Anatomi. 1.Baskı, Ankara: GüneşKitabevi, 1995: 281-449.
41. Kalra A, Yetiskul E, Wehrle CJ, and Tuma F. Physiology, Liver. In: E. H (Editor). StatPearls. Treasure Island (FL):StatPearls Publishing 2022: 422-437.
42. Trefts E, Gannon M, and Wasserman DH. The liver. Curr Biol 2017; 27(21): 1147-1151.
43. Yilmaz S. Nonalkolik Steatohepatit“li Ratlarda Metformin, Rosiglitazon, N-Asetilsistein ve Etodolak“ın Tedavi Edici Etkilerinin Değerlendirilmesi. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 2010.
44. Hijmans BS, Grefhorst A, Oosterveer MH, and Groen AK. Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: mechanism and metabolic consequences. Biochimie. 2014; 96: 121-9.
45. Rui L. Energy metabolism in the liver. Compr Physiol 2014; 4(1): 177-97.
46. Ozougwu JC. Physiology of the liver. International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences 2017; 4(8): 13-24.
47. Almazroo OA, Miah MK, and Venkataramanan R. Drug Metabolism in the Liver. Clin Liver Dis 2017; 21(1): 1-20.
48. Moindjie H, Rodrigues-Ferreira S, Nahmias C. Mitochondrial Metabolism in Carcinogenesis and Cancer Therapy. Cancers (Basel) 2021; 13(13): 3311.
49. Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. Toxicol Appl Pharmacol 2011; 254(2): 86-99.
50. Radford R, Frain H, Ryan MP, Slattery C, McMorrow T. Mechanisms of chemical carcinogenesis in the kidneys. Int J Mol Sci 2013; 14(10): 19416-33.
51. Bouyahya A, Mechchate H, Oumeslakht L. The Role of Epigenetic Modifications in Human Cancers and the Use of Natural Compounds as

Epidrugs: Mechanistic Pathways and Pharmacodynamic Actions. *Biomolecules* 2022; 12(3): 367

52. Oliveira PA, Colaço A, Chaves R. Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc.* 2007; 79(4): 593-616.
53. Klaunig JE, Kamendulis LM, and Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 2010; 38(1): 96-109.
54. De Minicis S, Kisseleva T, Francis H, et al. Liver carcinogenesis: rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. *Dig Liver Dis* 2013; 45(6): 450-9.
55. Jahan MS, Vani G, and Shyamaladevi CS. Effect of *Solanum trilobatum* on hepatic drug metabolising enzymes during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis promoted by Phenobarbital in rat. *Hepatol Res* 2007; 37(1): 35-49.
56. Bartsch H and Spiegelhalter B. Environmental exposure to N-nitroso compounds (NNOC) and precursors: an overview. *Eur J Cancer Prev* 1996; 5(1): 11-17.
57. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some N-nitroso compounds 1978: 365.
58. Yamada K, Yamamiya I, Utsumi H. In vivo detection of free radicals induced by diethylnitrosamine in rat liver tissue. *Free Radic Biol Med* 2006; 40(11): 2040-6.
59. Glauert HP C-MK, Stemm DN, Tharappel JC, Spear BT. Dietary antioxidants in the prevention of hepatocarcinogenesis: A review. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54: 875 -896.
60. Wang G, Xiao K, Gao J. Inhibitory effect of chlormethiazole on the toxicokinetics of diethylnitrosamine in normal and hepatofibrotic rats. *Drug Chem Toxicol.* 2019; 42(6): 600-607.

61. Atakisi E MO. Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide Involvement in Different Toxicities. In: Nitric Oxide Synthase-Simple Enzyme-Complex Roles. Saravi SSS (ed). 2017: 525-542.
62. Akyuz F IM, Baycu C, Kanbak G. Changes in antioxidant status and lipid peroxidation at liver and kidney tissues of the rats that were given diethylnitrosamine. *Ann Med Sci* 2001; 10: 2: 50-54.
63. Connor F, Rayner TF, Aitken SJ, et al. Mutational landscape of a chemically-induced mouse model of liver cancer. *J Hepatol*. 2018; 69(4): 840-850.
64. Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K, Gonzalez FJ, and Fukushima S. Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in vivo. *Cancer Res* 2007; 67(23): 11141-6.
65. Janani P, Sivakumari K, Geetha A, Ravisankar B, and Parthasarathy C. Chemopreventive effect of bacoside A on N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010; 136(5): 759-70.
66. Adebayo OA, Akinloye O, Adaramoye OA. Cerium Oxide Nanoparticles Attenuate Oxidative Stress and Inflammation in the Liver of Diethylnitrosamine-Treated Mice. *Biol Trace Elem Res* 2020; 193(1): 214-225.
67. Arboatti AS, Lambertucci F, Sedlmeier MG. Diethylnitrosamine Increases Proliferation in Early Stages of Hepatic Carcinogenesis in Insulin-Treated Type 1 Diabetic Mice. *Biomed Res Int*. 2018; 2018: 9472939.
68. Rodríguez MJ, Herrera F, Donoso W. Pro-Resolving Lipid Mediator Resolvin E1 Mitigates the Progress of Diethylnitrosamine-Induced Liver Fibrosis in Sprague-Dawley Rats by Attenuating Fibrogenesis and Restricting Proliferation. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(22): 8827.
69. Taha MM, Abdul AB, Abdullah R. Potential chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated and 2-acetylaminofluorene-promoted

hepatocarcinogenesis by zerumbone from the rhizomes of the subtropical ginger (*Zingiber zerumbet*). *Chem Biol Interact.* 2010; 186(3): 295-305.

70. 2-Acetylaminofluorene, 2022, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Acetylaminofluorene>. Erişim Tarihi: 12.06.2022
71. Kroese ED vdPM, Mulder GJ, Meerman JH. The role of N-sulfation in the N-hydroxy-2-acetylaminofluorene-mediated outgrowth of diethylnitrosamine-initiated hepatocytes to gammaglutamyltranspeptidase-positive foci in male rat liver. *Carcinogenesis.* Medline 1988; 9: 1953-1958.
72. Heflich RH NR. Genetic toxicity of 2-acetylaminofluorene, 2-aminofluorene and some of their metabolites and model metabolites. *Mutat Res* Medline 1994; 318: 73-114.
73. Mayer S, Keglevich P, Ábrányi-Balogh P, Szigetvári Á, Dékány M, Szántay C, Hazai L. et al. Synthesis and In Vitro Anticancer Evaluation of Novel Chrysin and 7-Aminochrysin Derivatives. *Molecules* 2020; 25(4): 888-889.
74. Khoo BY, Chua SL, Balaram P. Apoptotic effects of chrysin in human cancer cell lines. *Int J Mol Sci* 2010; 11(5): 2188-2199.
75. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal.* 2013; 2013: 162750.
76. Ullah A, Munir S, Badshah SL, Khan N, Ghani L, Poulson BG. et al. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules.* 2020; 25(22):5243-5244.
77. Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients.* 2020; 12(2):457.
78. Rodríguez-García C, Sánchez-Quesada C. Dietary Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents: An Updated Review of Human Studies. *Antioxidants (Basel).* 2019; 8(5):137-139.

79. Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients* 2018; 10(11):137.
80. Abotaleb M, Samuel SM, Varghese E, Varghese S, Kubatka P, Liskova A, Büsselberg D, et al. Flavonoids in Cancer and Apoptosis. *Cancers (Basel)*. 2018; 11(1):28-29.
81. Chirumbolo S, Bjørklund G, Lysiuk R, Vella A, Lenchyk L, Upyr T. Targeting Cancer with Phytochemicals via Their Fine Tuning of the Cell Survival Signaling Pathways. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(11). 3568-3570.
82. Ak P. Anti-staphylococcal activity of a pan-tropical aggressive and obnoxious weed *Parthenium hysterophorus*: an in vitro study. . *National Academy Science Letters*. 2007; 30(11-12): 383–386.
83. Cook NC SS. Review: flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 1996; 7(2): 66–76.
84. Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res*. 1995; 22(4): 375-383.
85. Chrysin, 2022, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chrysin>. Erişim Tarihi: 12.06.2022
86. Zhang Q, Ma S, Liu B, Liu J, Zhu R, Li M. Chrysin induces cell apoptosis via activation of the p53/Bcl-2/caspase-9 pathway in hepatocellular carcinoma cells. *Exp Ther Med*. 2016; 12(1): 469-474.
87. Xu D, Jin J, Yu H, Zhao Z, Ma D, Zhang C, Jiang H. Chrysin inhibited tumor glycolysis and induced apoptosis in hepatocellular carcinoma by targeting hexokinase-2. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017; 36(1): 44.
88. Khan R, Khan AQ, Qamar W, Lateef A, Tahir M, Rehman MU, Ali F, Sultana S. Chrysin protects against cisplatin-induced colon. toxicity via amelioration

of oxidative stress and apoptosis: probable role of p38MAPK and p53. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012; 258(3): 315-29.

89. Cherkaoui-Tangi K, Lachkar M, Wibó M, Morel N, Gilani AH, Lyoussi B. Pharmacological studies on hypotensive, diuretic and vasodilator activities of chrysin glucoside from *Calycotome villosa* in rats. *Phytother Res.* 2008; 22(3): 356-61.
90. Song MY, Jeong GS, Kwon KB, Ka SO, Jang HY, Park JW, et al. Sulfuretin protects against cytokine-induced beta-cell damage and prevents streptozotocin-induced diabetes. *Exp Mol Med.* 2010; 42(9): 628-38.
91. Yang F, Jin H, Pi J, Jiang JH, Liu L, Bai HH, et al. Anti-tumor activity evaluation of novel chrysin-organogermanium(IV) complex in MCF-7 cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2013; 23(20): 5544-51.
92. Lee SJ, Yoon JH, Song KS. Chrysin inhibited stem cell factor (SCF)/c-Kit complex-induced cell proliferation in human myeloid leukemia cells. *Biochem Pharmacol.* 2007; 74(2): 215-25.
93. Xia Y, Lian S, Khoi PN. Chrysin inhibits cell invasion by inhibition of Recepteur d'origine Nantaïs via suppressing early growth response-1 and NF- κ B transcription factor activities in gastric cancer cells. *Int J Oncol* 2015; 46(4): 1835-43.
94. Gao AM, Ke ZP, Shi F, Sun GC, Chen H. Chrysin enhances sensitivity of BEL-7402/ADM cells to doxorubicin by suppressing PI3K/Akt/Nrf2 and ERK/Nrf2 pathway. *Chem Biol Interact.* 2013; 206(1): 100-108.
95. Sherif IO, Al-Mutabagani LA, Sabry D, Elsherbiny NM. Antineoplastic Activity of Chrysin against Human Hepatocellular Carcinoma: New Insight on GPC3/SULF2 Axis and lncRNA-AF085935 Expression. *Int J Mol Sci* 2020; 21(20): 7642.

96. Xu D, Jin J, Yu H, Zhao Z, Ma D, Zhang C, Jiang H. Chrysin inhibited tumor glycolysis and induced apoptosis in hepatocellular carcinoma by targeting hexokinase-2. *J. Exp Clin Cancer Res* 2017; 36:44.
97. Mohammadian F, Pilehvar-Soltanahmadi Y, Alipour S, Dadashpour M, Zarghami N. Chrysin Alters microRNAs Expression Levels in Gastric Cancer Cells: Possible Molecular Mechanism. *Drug Res (Stuttg)* 2017; 67(9): 509-514.
98. Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Borji A. Inhibitory and Cytotoxic Activities of Chrysin on Human Breast Adenocarcinoma Cells by Induction of Apoptosis. *Pharmacogn Mag.* 2016; 12(4): 436-440.
99. Lin YM, Chen CI, Hsiang YP, Hsu YC, Cheng KC, Chien PH, et al. Chrysin Attenuates Cell Viability of Human Colorectal Cancer Cells through Autophagy Induction Unlike 5-Fluorouracil/Oxaliplatin. *Int J Mol Sci* 2018; 19(6):1763-1765.
100. Kasala ER, Bodduluru LN, Madana RM, V AK, Gogoi R, Barua CC, et al. Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives. *Toxicol Lett.* 2015; 233(2): 214-225.
101. Zhang Y, Chen F, Xiao X, Pan W, Yuan Q, Cao J, et al. Chrysin inhibits sphere formation in SMMC-7721 cells via modulation of SHP-1/STAT3 signaling pathway. *Cancer Manag Res* 2019; 11: 2977-2985.
102. Kasala ER, Bodduluru LN, Barua CC, Gogoi R. Chrysin and its emerging role in cancer drug resistance. *Chem Biol Interact.* 2015; 236: 7-8.
103. Jia WZ, Zhao JC, Sun XL, Yao ZG, Wu HL, Xi ZQ. Additive anticancer effects of chrysin and low dose cisplatin in human malignant glioma cell (U87) proliferation and evaluation of the mechanistic pathway. *J Buon* 2015; 20(5): 1327-1336.

- 104.** Li X, Huang JM, Wang JN, Xiong XK, Yang XF, Zou F. Combination of chrysin and cisplatin promotes the apoptosis of Hep G2 cells by up-regulating p53. *Chem Biol Interact.* 2015; 232: 12-20.
- 105.** Lirdprapamongkol K, Sakurai H, Abdelhamed S, Yokoyama S, Athikomkulchai S, Viriyaroj A, et al. Chrysin overcomes TRAIL resistance of cancer cells through Mcl-1 downregulation by inhibiting STAT3 phosphorylation. *Int J Oncol.* 2013; 43(1): 329-337.
- 106.** Qin Y, Zhao D, Zhou HG, Wang XH, Zhong WL, Chen S, et al. Apigenin inhibits NF- κ B and snail signaling, EMT and metastasis in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2016; 7(27): 41421-41431.
- 107.** Lee HH, Cho H. Apigenin Increases Natural Killer Cytotoxicity to Human Hepatocellular Carcinoma Expressing HIF-1 α through High Interaction of CD95/CD95L. *J Microbiol Biotechnol* 2022; 32(4): 397-404.
- 108.** Mabrouk Zayed MM, Sahyon HA, Hanafy NAN, El-Kemary MA. The Effect of Encapsulated Apigenin Nanoparticles on HePG-2 Cells through Regulation of P53. *Pharmaceutics.* 2022; 14(6):1160-1161.
- 109.** Abid R, Ghazanfar S, Farid A, Sulaman SM, Idrees M, Amen RA, et al. Pharmacological Properties of 4', 5, 7-Trihydroxyflavone (Apigenin) and Its Impact on Cell Signaling Pathways. *Molecules.* 2022; 27(13):4304-4305.
- 110.** Zhu Y, Wu J, Li S, Wang X, Liang Z, Xu X, et al. Apigenin inhibits migration and invasion via modulation of epithelial mesenchymal transition in prostate cancer. *Mol Med Rep* 2015; 11(2): 1004-1008.
- 111.** Liu X, Li L, Lv L, Chen D, Shen L, Xie Z. . Apigenin inhibits the proliferation and invasion of osteosarcoma cells by suppressing the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncol Rep.* 2015; 34(2): 1035-1041.
- 112.** Chunhua L, Donglan L, Xiuqiong F, Lihua Z, Qin F, Yawei L, et al. Apigenin up-regulates transgelin and inhibits invasion and migration of colorectal cancer

through decreased phosphorylation of AKT. *J Nutr Biochem* 2013; 24(10): 1766-1775.

- 113.** Zhu Y, Mao Y, Chen H, Lin Y, Hu Z, Wu J, et al. Apigenin promotes apoptosis, inhibits invasion and induces cell cycle arrest of T24 human bladder cancer cells. *Cancer Cell Int.* 2013; 13(1): 54.
- 114.** Cai J, Zhao XL, Liu AW, Nian H, Zhang SH. Apigenin inhibits hepatoma cell growth through alteration of gene expression patterns. *Phytomedicine.* 2011; 18(5): 366-373.
- 115.** Yang J, Pi C, Wang G. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells. *Biomed Pharmacother.* 2018; 103: 699-707.
- 116.** Madunić J, Madunić IV, Gajski G, Popić J, Garaj-Vrhovac V. Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties. *Cancer Lett.* 2018; 413: 11-22.
- 117.** Ashrafizadeh M, Bakhoda MR, Bahmanpour Z, Ilkhani K, Zarrabi A, Makvandi P, et al. Apigenin as Tumor Suppressor in Cancers: Biotherapeutic Activity, Nanodelivery, and Mechanisms With Emphasis on Pancreatic Cancer. *Front Chem* 2020; 8: 829-832.
- 118.** Huang CS, Lii CK, Lin AH, Yeh YW, Yao HT, Li CC, et al. Protection by chrysin, apigenin, and luteolin against oxidative stress is mediated by the Nrf2-dependent up-regulation of heme oxygenase 1 and glutamate cysteine ligase in rat primary hepatocytes. *Arch Toxicol.* 2013; 87(1): 167-178.
- 119.** Farid A, Javed R, Hayat M. Screening of *Strobilanthes urticifolia* wall. ex kuntze for Antitermite and insecticidal activities. *Abasyn J. life Sci.* 2021; 4: 40-45.
- 120.** Rezai-Zadeh K, Ehrhart J, Bai Y. Apigenin and luteolin modulate microglial activation via inhibition of STAT1-induced CD40 expression. *J Neuroinflammation.* 2008; 5: 41.

121. Jung UJ, Cho YY, Choi MS. Apigenin Ameliorates Dyslipidemia, Hepatic Steatosis and Insulin Resistance by Modulating Metabolic and Transcriptional Profiles in the Liver of High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients*. 2016; 8(5):305.
122. Escande C, Nin V, Price NL, Capellini V, Gomes AP, et al. Flavonoid apigenin is an inhibitor of the NAD⁺ ase CD38: implications for cellular NAD⁺ metabolism, protein acetylation, and treatment of metabolic syndrome. *Diabetes* 2013; 62(4): 1084-1093.
123. Cardenas H, Arango D, Nicholas C, Duarte S, Nuovo GJ, He W, et al. Dietary Apigenin Exerts Immune-Regulatory Activity in Vivo by Reducing NF- κ B Activity, Halting Leukocyte Infiltration and Restoring Normal Metabolic Function. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(3): 323.
124. Seo HS, Jo JK, Ku JM, Choi HS, Choi YK, Woo JK, et al. Induction of caspase-dependent extrinsic apoptosis by apigenin through inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signalling in HER2-overexpressing BT-474 breast cancer cells. *Biosci Rep*. 2015; 35(6): e00276
125. Nayaka HB, Londonkar RL, Umesh MK, Tukappa A. Antibacterial Attributes of Apigenin, Isolated from *Portulaca oleracea* L. *Int J Bacteriol* 2014; 2014: 175851.
126. Aung MNN, Mohd Adnan LH, Ahmad NZ, Septama AW, Nik Nurul Najihah NNN, et al. . Effects of apigenin, luteolin, and quercetin on the Natural Killer (NK-92) cells proliferation: A potential role as immunomodulator. *Sains Malaysiana*. 2021; 50: 821-828.
127. Gu Y, Mohammad IS, Liu Z. Overview of the STAT-3 signaling pathway in cancer and the development of specific inhibitors. *Oncol Lett* 2020; 19(4): 2585-2594.
128. Guobin He MK. NF- κ B and STAT3 – key players in liver inflammation and cancer. *Cell Research* 2011; 21: 159-168.

- 129.** Hong M, Lee S, Clayton J, Yake W, Li J. Genipin suppression of growth and metastasis in hepatocellular carcinoma through blocking activation of STAT-3. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020; 39(1): 146.
- 130.** He G, Karin M. NF- κ B and STAT3-key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res.* 2011; 21(1): 159-68.
- 131.** Nowak EM, Poczęta M, Bieg D, Bednarek I. DNA methyltransferase inhibitors influence on the DIRAS3 and STAT3 expression and in vitro migration of ovarian and breast cancer cells. *Ginekol Pol.* 2017; 88(10): 543-551.
- 132.** Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(11): 736-746.
- 133.** Tilg H WA, Vogel W. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1992; 103: 264-274.
- 134.** Trikha CR, Klein B, Rossi JF. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4653-4665.
- 135.** He G, Yu GY, Temkin V, Ogata H, Kuntzen C, Sakurai T, et al. . Hepatocyte IKK β /NF- κ B inhibits tumor promotion and progression by preventing oxidative stress-driven STAT3 activation *Cancer Cell* 2010; 17: 286-297.
- 136.** El-Serag RK. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2007; 132: 2557-2576.
- 137.** Wang T WS. Causes and consequences of mitochondrial reactive oxygen species generation in hepatitis. *C. J Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 34-37.
- 138.** Lee C, Cheung ST. STAT3: An Emerging Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2019; 11(11): 1646-1647.

139. Bin Gao HW, Fouad Lafdil, Dechun Feng. STAT proteins – Key regulators of anti-viral responses, inflammation, and tumorigenesis in the liver. *Journal of Hepatology*. 2012; 57: 430-441.
140. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF κ B system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2016; 8(3): 227-41.
141. Luedde T, Schwabe RF. NF- κ B in the liver-linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8(2): 108-118.
142. Alqahtani A, Khan Z, Alloghbi A, Said Ahmed TS, Ashraf M, Hammouda DM. Hepatocellular Carcinoma: Molecular Mechanisms and Targeted Therapies. *Medicina (Kaunas)*. 2019; 55(9):526.
143. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004; 431(7007): 461-466.
144. Fan Y, Mao R, Yang J. NF- κ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein Cell* 2013; 4(3): 176-185.
145. Naugler WE, Karin M. NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev*. 2008; 18(1): 19-26.
146. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 1996; 274(5288): 787-9.
147. Bassères DS and Baldwin AS. Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 2006; 25(51): 6817-6830.
148. Luo JL, Tan W, Ricono JM, et al. Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. *Nature*. 2007; 446(7136): 690-694.

- 149.** Lei N, Peng B, Zhang JY. CIP2A regulates cell proliferation via the AKT signaling pathway in human lung cancer. *Oncol Rep* 2014; 32(4): 1689-94.
- 150.** Lin L, Wang Y. miR-548b-3p Regulates Proliferation, Apoptosis, and Mitochondrial Function by Targeting CIP2A in Hepatocellular Carcinoma. *Biomed Res Int* 2018; 2018: 7385426.
- 151.** Vaarala MH, Väisänen MR, and Ristimäki A. CIP2A expression is increased in prostate cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29(1): 136.
- 152.** Tawab Osman N, Khalaf M, and Ibraheem S. Assessment of CIP2A and ROCK-I expression and their prognostic value in breast cancer. *Pol J Pathol* 2020; 71(2): 87-98.
- 153.** Soo Hoo L, Zhang JY, Chan EK. Cloning and characterization of a novel 90 kDa 'companion' auto-antigen of p62 overexpressed in cancer. *Oncogene* 2002; 21(32): 5006-5015.
- 154.** Xue Yang KQ, Jie Tao, Guozhi Yin, Shaoshan Han, Qingguang Liu, Hao Sun. Inhibition of CIP2A attenuates tumor progression by inducing cell cycle arrest and promoting cellular senescence in hepatocellular carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2018; 495: 1807-1814.
- 155.** Pinzhu Huang JQ, Jinghong Y, Jian H, Binkui L, Kai Z, Guihua C, et al. Expression and prognostic significance of CIP2A mRNA in hepatocellular carcinoma and nontumoral liver tissues. *Biomarkers* 2012; 17: 422-429.
- 156.** Yu HC, Hung MH, Chen YL, Chu PY, Wang CY, Chao TT, et al. Erlotinib derivative inhibits hepatocellular carcinoma by targeting CIP2A to reactivate protein phosphatase 2A. *Cell Death & Disease*. 2014; 5: 1359
- 157.** Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*. 2016; 8(4): 603-619.

- 158.** Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. Apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2003; 50(49): 242-249.
- 159.** Fäldt Beding A, Larsson P, Helou K, Einbeigi Z, and Parris TZ. Pan-cancer analysis identifies BIRC5 as a prognostic biomarker. *BMC Cancer* 2022; 22(1): 322-324.
- 160.** Altieri DC. Targeting survivin in cancer. *Cancer Lett* 2013; 332(2): 225-228.
- 161.** Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J Med Res* 2015; 141(4): 389-397.
- 162.** Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3(8): 917-921.
- 163.** Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(5): 1087-98.
- 164.** Lyu H, Huang J, He Z, Liu B. Epigenetic mechanism of survivin dysregulation in human cancer. *Sci China Life Sci.* 2018; 61(7): 808-814.
- 165.** Su C. Survivin in survival of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2016; 379(2): 184-190.
- 166.** Ito T, Shiraki K, Sugimoto K. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2000; 31(5): 1080-1085.
- 167.** Suresh K, Carino K, Johnston L. A nonapoptotic endothelial barrier-protective role for caspase-3. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2019; 316(6): 1118-1126.
- 168.** Zhou M, Liu X, Li Z, Huang Q, Li F, Li CY. Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *Int J Cancer.* 2018; 143(4): 921-930.

- 169.** Araya LE, Soni IV, Hardy JA, Julien O. Deorphanizing Caspase-3 and Caspase-9 Substrates In and Out of Apoptosis with Deep Substrate Profiling. *ACS Chem Biol.* 2021; 16(11): 2280-2296.
- 170.** Zhang X, Huo L, Jin H, Han Y, Wang J, Zhang Y, et al. Anti-cancer activity of Annexin V in murine melanoma model by suppressing tumor angiogenesis. *Oncotarget.* 2017; 8(26): 42602-42612.
- 171.** Jeong JJ, Park N, Kwon YJ, Ye DJ, Moon A, Chun YJ. Role of annexin A5 in cisplatin-induced toxicity in renal cells: molecular mechanism of apoptosis. *J Biol Chem* 2014; 289(4): 2469-2481.
- 172.** Haeckel A, Ascher L, Beindorff N, Prasad S, Garczyńska K, Guo J, et al. Long-circulating XTEN864-annexin A5 fusion protein for phosphatidylserine-related therapeutic applications. *Apoptosis.* 2021; 26(9-10): 534-547.
- 173.** Ding XM, Li JX, Wang K, Wu ZS, Yao AH, Jiao CY, et al. Effects of silencing annexin A5 on proliferation and invasion of human cholangiocarcinoma cell line. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21(7): 1477-1488.
- 174.** Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci.* 2018; 18(1): 8-20.
- 175.** Jeng KS, Sheen IS, Leu CM, Tseng PH, Chang CF. The Role of Smoothened in Cancer. *Int J Mol Sci* 2020; 21(18): 6863.
- 176.** Doheny D, Manore SG, Wong GL, Lo HW. Hedgehog Signaling and Truncated GLI1 in Cancer. *Cells.* 2020; 9(9): 2114.
- 177.** Carpenter RL, Ray H. Safety and Tolerability of Sonic Hedgehog Pathway Inhibitors in Cancer. *Drug Saf.* 2019; 42(2): 263-279.
- 178.** Jeng KS, Chang CF, Lin SS. Sonic Hedgehog Signaling in Organogenesis, Tumors, and Tumor Microenvironments. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(3):758.

- 179.** Montagnani V, Stecca B. Role of Protein Kinases in Hedgehog Pathway Control and Implications for Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(4):449.
- 180.** Cai H, Li H, Li J. Sonic hedgehog signaling pathway mediates development of hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol*. 2016; 2: 277-286.
- 181.** Jeng KS, Sheen IS, Jeng WJ. High expression of patched homolog-1 messenger RNA and glioma-associated oncogene-1 messenger RNA of sonic hedgehog signaling pathway indicates a risk of postresection recurrence of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2013; 20(2): 464-473.
- 182.** Kikuchi H, Sakakibara-Konishi J, Furuta M,. Expression of Notch1 and Numb in small cell lung cancer. *Oncotarget* 2017; 8(6): 10348-10358.
- 183.** Li D, Masiero M, Banham AH, and Harris AL. The notch ligand JAGGED1 as a target for anti-tumor therapy. *Front Oncol*. 2014; 4: 254-256.
- 184.** Shah PA, Huang C, Li Q. Kazi SA, Byers LA, Wang J, et al. NOTCH1 Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cells*. 2020; 9(12):2677.
- 185.** Qian Sun RW, Yan Wang, Jing Luo, Peng Wang, Bin Cheng. Notch1 is a potential therapeutic target for the treatment of human hepatitis B virus X protein-associated hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*. 2013; 31: 933-939.
- 186.** Giovannini C, Gramantieri L, Chieco P, Minguzzi M, Lago F, Pianetti S, et al. Selective ablation of Notch3 in HCC enhances doxorubicin's death promoting effect by a p53 dependent mechanism. *J Hepatol* 2009; 50(5): 969-979.
- 187.** El-Magd MA, Mohamed Y, El-Shetry ES, Elsayed SA, Abo Gazia M, Abdel-Aleem GA, et al. Melatonin maximizes the therapeutic potential of non-preconditioned MSCs in a DEN-induced rat model of HCC. *Biomed Pharmacother* 2019; 114: 108732.

- 188.** Amereh Z, Hatami N, Shirazi FH, Gholami S, Hosseini SH, Noubarani M, et al. Cancer chemoprevention by oleaster (*Elaeagnus angustifoli* L.) fruit extract in a model of hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine in rats. *Excli J.* 2017; 16: 1046-1056.
- 189.** Ahmed OM, Ahmed AA, Fahim HI, and Zaky MY. Quercetin and naringenin abate diethylnitrosamine/acetylaminofluorene-induced hepatocarcinogenesis in Wistar rats: the roles of oxidative stress, inflammation and cell apoptosis. *Drug Chem Toxicol* 2022; 45(1): 262-273.
- 190.** Balta C, Herman H, Boldura OM, Gasca I, Rosu M, Ardelean A, et al. Chrysin attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation through TGF- β /Smad signaling pathway. *Chem Biol Interact.* 2015; 240: 94-101.
- 191.** Pingili RB, Pawar AK, Challa SR, Kodali T, Koppula S, Toleti V.. A comprehensive review on hepatoprotective and nephroprotective activities of chrysin against various drugs and toxic agents. *Chem Biol Interact.* 2019; 308: 51-60.
- 192.** Khan MS, Devaraj H, Devaraj N. Chrysin abrogates early hepatocarcinogenesis and induces apoptosis in N-nitrosodiethylamine-induced preneoplastic nodules in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011; 251(1): 85-94.
- 193.** Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, Kręgiel D, Sharifi-Rad J, Durazzo A, et al. The Therapeutic Potential of Apigenin. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(6): 1305.
- 194.** Chen X, Xu H, Yu X. Apigenin inhibits in vitro and in vivo tumorigenesis in cisplatin-resistant colon cancer cells by inducing autophagy, programmed cell death and targeting m-TOR/PI3K/Akt signalling pathway. *J Buon.* 2019; 24(2): 488-493.
- 195.** He J, Xu Q, Wang M, Li C, Qian X, Shi Z, et al. Oral administration of apigenin inhibits metastasis through AKT/P70S6K1/MMP-9 pathway in orthotopic ovarian tumor model. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(6): 7271-82.

- 196.** Mehmetoğlu I. Klinik Biyokimya El Kitabı. 2.Basım, Ankara:Atlas Kitabevi, 2019: 32-33.
- 197.** Görmüş U. Laboratuvar Dünyası 2.Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2018: 141-154.
- 198.** Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193(1): 265-275.
- 199.** Yang MC. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. North American Journal of Medical Sciences. 2012; 4(9): 429-434.
- 200.** Yip HYK, Papa A. Signaling Pathways in Cancer: Therapeutic Targets, Combinatorial Treatments, and New Developments. Cells 2021; 10(3):659-660.
- 201.** Huang L, Xu H, Wu T, Li G. Hedyotis diffusa Willd. Suppresses Hepatocellular Carcinoma via Downregulating AKT/mTOR Pathways. Evid Based Complement Alternat Med 2021; 2021: 5210152.
- 202.** Shankar E, Vykhovanets EV, Vykhovanets OV. High-fat diet activates pro-inflammatory response in the prostate through association of Stat-3 and NF- κ B. Prostate. 2012; 72(3): 233-243.
- 203.** Saraswati S, Alhaider A, Abdelgadir AM, Tanwer P, Korashy HM. Phloretin attenuates STAT-3 activity and overcomes sorafenib resistance targeting SHP-1-mediated inhibition of STAT3 and Akt/VEGFR2 pathway in hepatocellular carcinoma. Cell Commun Signal 2019; 17(1): 127.
- 204.** Brantley EC, Nabors LB, Gillespie GY. Loss of protein inhibitors of activated STAT-3 expression in glioblastoma multiforme tumors: implications for STAT-3 activation and gene expression. Clin Cancer Res 2008; 14(15): 4694-704.

- 205.** Nagpal JK, Mishra R, Das BR. Activation of Stat-3 as one of the early events in tobacco chewing-mediated oral carcinogenesis. *Cancer* 2002; 94(9): 2393-400.
- 206.** Li J, Qu W, Cheng Y, Sun Y, Jiang Y, Zou T, et al. The inhibitory effect of intravesical fisetin against bladder cancer by induction of p53 and down-regulation of NF-kappa B pathways in a rat bladder carcinogenesis model. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2014; 115(4): 321-329.
- 207.** Bakshi HA, Quinn GA, Nasef MM, Mishra V, Aljabali AAA, El-Tanani M, et al. Crocin Inhibits Angiogenesis and Metastasis in Colon Cancer via TNF- α /NF-kB/VEGF Pathways. *Cells*. 2022; 11(9):1502.
- 208.** Bishayee A. The role of inflammation and liver cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2014; 816: 401-435.
- 209.** Ahmet ML and Sheren ME. CIP2A expression in Bortezomib-treated multiple myeloma. *J buon*. 2020; 25(1): 395-400.
- 210.** Cristóbal I, Zazo S, Torrejón B. CIP2A confirms its prognostic value in triple-negative breast cancer. *Oncogene* 2017; 36(23): 3357-3358.
- 211.** Liu X, Chai Y, Li J, et al. Autoantibody response to a novel tumor-associated antigen p90/CIP2A in breast cancer immunodiagnosis. *Tumour Biol* 2014; 35(3): 2661-2667.
- 212.** He H, Wu G, Li W, Cao Y, Liu Y. CIP2A is highly expressed in hepatocellular carcinoma and predicts poor prognosis. *Diagn Mol Pathol*. 2012; 21(3): 143-149.
- 213.** Akpınar MY, Simsek GG, Aksoy EK. Survivin expression starts before hepatocellular cancer development in the liver of chronic hepatitis B patients: a pilot, cross-sectional study. *Prz Gastroenterol* 2020; 15(2): 138-143.

- 214.** Oparina N, Erlandsson MC, Fäldt Beding A, Parris T, Helou K, Karlsson P. Prognostic Significance of BIRC5/Survivin in Breast Cancer: Results from Three Independent Cohorts. *Cancers (Basel)*. 2021; 13(9):2209.
- 215.** Kapisir I, Nastos K, Karakatsanis A, Theodosopoulos T, Karandrea D, Kondi Pafiti A, et al. Survivin expression in hepatocellular carcinoma. Correlation with clinicopathological characteristics and overall survival. *J Buon* 2019; 24(5): 1934-1942.
- 216.** Liu H, Zhang C. Paeonol induces antitumor effects in hepatocellular carcinoma cells through survivin via the cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 signaling pathway. *Transl Cancer Res* 2020; 9(11): 7183-7195.
- 217.** Wheatley SP, Altieri DC. Survivin at a glance. *J Cell Sci*. 2019; 132(7): jcs223826
- 218.** Hu G, Cao C, Deng Z. Effects of matrine in combination with cisplatin on liver cancer. *Oncol Lett* 2021; 21(1): 66-70.
- 219.** Huang KH, Fang WL, Li AF. Caspase-3, a key apoptotic protein, as a prognostic marker in gastric cancer after curative surgery. *Int J Surg* 2018; 52: 258-263.
- 220.** Mohamed Y, Basyony MA, El-Desouki NI, Abdo WS, El-Magd MA. The potential therapeutic effect for melatonin and mesenchymal stem cells on hepatocellular carcinoma. *Biomedicine (Taipei)* 2019; 9(4): 24-27.
- 221.** Liang H, Wu JG, Wang F, et al. Expression of caspase-3 and hypoxia inducible factor 1 α in hepatocellular carcinoma complicated by hemorrhage and necrosis. *World J Clin Cases* 2021; 9(23): 6725-6733.
- 222.** Acar V, Couto Fernandez FL, Buscariolo FF. Immunohistochemical Evaluation of PARP and Caspase-3 as Prognostic Markers in Prostate Carcinomas. *Clin Med Res*. 2021; 19(4): 183-191.

223. Shati AA, Alkahtani MA, Alfaifi MY. Secondary Metabolites of *Saussurea costus* Leaf Extract Induce Apoptosis in Breast, Liver, and Colon Cancer Cells by Caspase-3-Dependent Intrinsic Pathway. *Biomed Res Int* 2020; 2020: 1608942.
224. Sun CB, Zhao AY, Ji S. Expression of annexin A5 in serum and tumor tissue of patients with colon cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2017; 23(39): 7168-7173.
225. Zhuang C, Wang P, Sun T, Zheng L, Ming L. Expression levels and prognostic values of annexins in liver cancer. *Oncol Lett.* 2019; 18(6): 6657-6669.
226. Li X, Chen L, Liang XJ. Annexin A5 protein expression is associated with the histological differentiation of uterine cervical squamous cell carcinoma in patients with an increased serum concentration. *Mol Med Rep.* 2012; 6(6): 1249-1254.
227. Sun X, Liu S, Wang J, et al. Annexin A5 regulates hepatocarcinoma malignancy via CRKI/II-DOCK180-RAC1 integrin and MEK-ERK pathways. *Cell Death Dis* 2018; 9(6): 637-640.
228. Liu P, Zeng J, Yang G. Expression of yes-associated protein, β -catenin and smoothened, and their clinical significance in invasive breast cancer. *Exp Ther Med* 2022; 23(6): 429-432.
229. Ding YL, Wang QS, Zhao WM, Xiang L. Expression of smoothened protein in colon cancer and its prognostic value for postoperative liver metastasis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13(8): 4001-4005.
230. Sicklick JK, Li YX, Jayaraman A. Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2006; 27(4): 748-757.
231. Chen JS, Huang XH, Wang Q, Huang JQ, Zhang LJ, Chen XL, et al. Sonic hedgehog signaling pathway induces cell migration and invasion through focal adhesion kinase/AKT signaling-mediated activation of matrix

- metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in liver cancer. *Carcinogenesis*. 2013; 34(1):10-19.
232. Cheng WT, Xu K, Tian DY. Role of Hedgehog signaling pathway in proliferation and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol*. 2009; 34(3): 829-836.
 233. Che L, Yuan YH, Jia J, Ren J. Activation of sonic hedgehog signaling pathway is an independent potential prognosis predictor in human hepatocellular carcinoma patients. *Chin J Cancer Res* 2012; 24(4): 323-331.
 234. Li J, Cai H, Li H. Combined inhibition of sonic Hedgehog signaling and histone deacetylase is an effective treatment for liver cancer. *Oncol Rep* 2019; 41(3): 1991-1997.
 235. Zheng X, Zeng W, Gai X. Role of the Hedgehog pathway in hepatocellular carcinoma (review). *Oncol Rep*. 2013; 30(5): 2020-2026.
 236. Liu X, Yun F, Shi L. Roles of Signaling Pathways in the Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16(15): 6201-6206.
 237. Che L, Fan B, Pilo MG. Jagged 1 is a major Notch ligand along cholangiocarcinoma development in mice and humans. *Oncogenesis*. 2016; 5(12): 274.
 238. Kunanopparat A, Hirankarn N, Issara-Amphorn J, Tangkijvanich P, Sanpavat A. The expression profile of Jagged1 and Delta-like 4 in hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2021; 39(1): 44-52.
 239. Dai Y, Wilson G, Huang B. Silencing of Jagged1 inhibits cell growth and invasion in colorectal cancer. *Cell Death Dis*. 2014; 5(4): e1170.
 240. Li GL, Yuan JH, Zhuang GD, Wu DQ. miR-199b exerts tumor suppressive functions in hepatocellular carcinoma by directly targeting JAG1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018; 22(22): 7679-7687.

- 241.** Grochowski CM, Loomes KM, Spinner NB. Jagged1 (JAG1): Structure, expression, and disease associations. *Gene* 2016; 576: 381-384.
- 242.** Zhang H, Wang X, Xu J, Sun Y. Notch1 activation is a poor prognostic factor in patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 2014; 110(9): 2283-2290.
- 243.** Wang F, Hou W, Chitsike L. ABL1, Overexpressed in Hepatocellular Carcinomas, Regulates Expression of NOTCH1 and Promotes Development of Liver Tumors in Mice. *Gastroenterology*. 2020; 159(1): 289-305.
- 244.** Xiang Z, Miao Q, Zhang J, Liu G, Xue S, Liu X, et al. AB4 inhibits Notch signaling and promotes cancer cell apoptosis in liver cancer. *Oncol Rep*. 2021; 45(6):112.
- 245.** Zhou Q, Wang Y, Peng B, Liang L, Li J. The roles of Notch1 expression in the migration of intrahepatic cholangiocarcinoma. *BMC Cancer*. 2013; 13: 244.
- 246.** Huang Q, Li J, Zheng J, Wei A. The Carcinogenic Role of the Notch Signaling Pathway in the Development of Hepatocellular Carcinoma. *J Cancer* 2019; 10(6): 1570-1579.
- 247.** Afaloniati H, Angelopoulou K, Giakoustidis A. HDAC1/2 Inhibitor Romidepsin Suppresses DEN-Induced Hepatocellular Carcinogenesis in Mice. *Onco Targets Ther*. 2020; 13: 5575-5588.
- 248.** Affo S, Yu LX, and Schwabe RF. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts and Fibrosis in Liver Cancer. *Annu Rev Pathol* 2017; 12: 153-186.