

**HEPATOSELLÜLER KANSER HÜCRELERİNDE SORAFENİB, SPIRULINA
PLATENSIS EKTRESİ VE KOMBİNE UYGULAMALARININ ANTİKANSER
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşranur CİVANOĞULLARI AYDOĞDU

Danışman

Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Mayıs 2025

Bu tez çalışması 23. FEN. BİL. 34 numaralı proje ile Afyon Kocatepe Üniversitesi
BAPK tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HEPATOSELLÜLER KANSER HÜCRELERİNDE SORAFENİB,
SPIRULINA PLATENSIS EKTRESİ VE KOMBİNE
UYGULAMALARININ ANTİKANSER ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Büşranur CİVANOĞULLARI AYDOĞDU

Danışman

Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Mayıs 2025

TEZ ONAY SAYFASI

Büşranur CİVANOĞULLARI AYDOĞDU tarafından hazırlanan “Hepatosellüler Kanser Hücrelerinde Sorafenib, Spirulina platensis Ektresi ve Kombine Uygulamalarının Antikanser Etkilerinin Araştırılması” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 23/01/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy çokluğu ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Nilay İŞİTEZ
Afyon Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

Üye : Doc. Dr. Dilek Akyıl
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

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

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
..... /..... /..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Bekir YALÇIN
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

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

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

beyan ederim.

13/ 05 / 2025

Büşranur CİVANOĞULLARI AYDOĞDU

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HEPATOSELLÜLER KANSER HÜCRELERİNDE SORAFENİB, SPIRULINA PLATENSIS EKTRESİ VE KOMBİNE UYGULAMALARININ ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Büşranur CİVANOĞULLARI AYDOĞDU

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Hepatosellüler karsinom, dünya genelinde yüksek ölüm oranlarına sahip olan en yaygın primer karaciğer tümörlerinden biridir. Hastalığın ileri evrelerinde sistemik tedavi seçeneği olarak kullanılan Sorafenib, hücre proliferasyonunu baskılayan, anjiyogenezi engelleyen ve apoptozu indükleyen bir multikinaz inhibitörü olarak bilinmektedir. Ancak Sorafenib'in tek başına kullanımı sınırlı etkinlik göstermekte ve çeşitli advers etkilerle birlikte direnç gelişimi riski taşımaktadır. Bu durum, tamamlayıcı ve sinerjik etki gösterebilecek yeni ajanların araştırılmasını gerekli kılmaktadır. Bu tez çalışmasında, doğal kaynaklı bir mikroalg olan *Spirulina platensis*'in Sorafenib ile kombine olarak hepatosellüler karsinom hücreleri üzerindeki antikanser etkileri ilk kez araştırılmış ve çalışmanın özgünlüğü bu bileşimin deneysel olarak değerlendirilmiş olmasıyla ortaya konmuştur.

Çalışmada, kanser hücresi modeli olarak insan hepatosellüler karsinom hücre hattı (HepG2) ve sağlıklı hücre modeli olarak insan göbek kordonu ven endotel hücre hattı (HUVEC) kullanılmıştır. Hücrelere 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri boyunca farklı konsantrasyonlarda Sorafenib (1–15 μ M) ve *Spirulina platensis* ekstraktı (1–100 μ g/mL) uygulanmıştır. Uygulanan bu tedavi rejimlerinin etkileri hücre canlılığı, gen ve protein ekspresyon düzeyleri ile DNA hasarı yönünden değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı, hücre metabolik aktiviteye duyarlı MTT testi ile belirlenmiş; gen

ekspresyon düzeyleri, apoptozis ve inflamasyonla ilişkili *BAX*, *CASP3*, *BCL-2* ve *TNF- α* genleri üzerinden qRT-PCR yöntemiyle analiz edilmiştir. Bu genlerin translasyon düzeyinde karşılık gelen protein miktarları ise ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. Ek olarak, Komet testi ile uygulanan ajanların hücre DNA'sında oluşturduğu hasar düzeyleri değerlendirilmiştir.

Elde edilen veriler, 5 μ M Sorafenib ile 100 μ g/mL *Spirulina* ekstraktının kombinasyon halinde uygulandığında HepG2 hücre canlılığında anlamlı bir azalma sağladığını, buna karşın HUVEC hücrelerinde hücre hayatta kalım oranlarının görece daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Moleküler düzeyde, *BAX* ve *CASP3* genlerinin yukarı regülasyonu ile apoptozun arttığı, *BCL-2* geninin baskılanması ile antiapoptotik etkinin azaldığı ve *TNF- α* geninde meydana gelen değişikliklerin anti-enflamatuar bir yanıtı desteklediği belirlenmiştir. ELISA sonuçları gen düzeyinde elde edilen bulguları doğrulamış; Komet Test verileri ise özellikle yüksek doz kombinasyonlarında DNA hasarının arttığını göstermiştir.

Bu bulgular doğrultusunda, *Spirulina platensis*'in Sorafenib ile birlikte kullanımının Hepatosellüler karsinom tedavisinde sinerjik bir antikanser etki oluşturabileceği ancak bu etkinin doz ve hücre tipi bağımlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Çalışma, doğada bulunan biyoaktif bileşiklerin modern tıbbi ajanlarla birlikte kullanımının, geleneksel tedavilere katkı sağlayabileceğini göstermesi açısından önemli bir öncü nitelik taşımaktadır.

2025, x + 45 sayfa

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Hepatosellüler karsinom, Kombine tedavi, Sorafenib, *Spirulina platensis*.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INVESTIGATION OF THE ANTICANCER EFFECTS OF SORAFENIB, SPIRULINA PLATENSIS EXTRACT, AND THEIR COMBINED APPLICATIONS IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS

Büşranur CİVANOĞULLARI AYDOĞDU

Afyon Kocatepe University

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most prevalent primary liver tumors worldwide and is associated with a high mortality rate. Sorafenib, a multikinase inhibitor used in the systemic treatment of advanced-stage HCC, is known for its ability to suppress cell proliferation, inhibit angiogenesis, and induce apoptosis. However, its limited efficacy when used alone, alongside its side effect profile and the potential for resistance development, has necessitated the investigation of complementary therapeutic agents. In this context, the present study aimed to explore, for the first time, the anticancer effects of the natural microalga *Spirulina platensis* in combination with Sorafenib on hepatocellular carcinoma cells. The originality of this thesis lies in the experimental assessment of this novel therapeutic combination.

The experimental design involved the use of the human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) as a cancer model and the human umbilical vein endothelial cell line (HUVEC) as a healthy control model. Cells were treated for 24 and 48 hours with varying concentrations of Sorafenib (1–15 μ M) and *Spirulina platensis* extract (1–100 μ g/mL). The cytotoxic, apoptotic, anti-inflammatory, and genotoxic effects of these treatments were evaluated through assessments of cell viability, gene and protein expression, and DNA damage. Cell viability was measured using the MTT assay, while quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was employed to analyze the expression of apoptosis- and inflammation-related genes including *BAX*, *CASP3*, *BCL-2*, and

TNF- α . ELISA assays were used to assess the corresponding protein levels, and the Comet Assay was conducted to determine the extent of DNA damage.

The findings demonstrated that the combination of 5 μ M Sorafenib and 100 μ g/mL *Spirulina* extract significantly reduced the viability of HepG2 cells while maintaining relatively higher survival rates in HUVEC cells. Molecular analyses revealed increased expression of pro-apoptotic genes (*BAX* and *CASP3*), downregulation of the anti-apoptotic gene *BCL-2*, and modulation of *TNF- α* expression consistent with an anti-inflammatory response. Protein expression data supported the gene-level findings, and DNA damage was notably increased in high-dose combination groups.

These results suggest that the co-administration of *Spirulina platensis* with Sorafenib may elicit a synergistic anticancer effect in HCC treatment. However, the observed genotoxicity at higher doses underscores the importance of dose optimization. This study highlights the potential of naturally derived bioactive compounds as supportive agents in modern targeted cancer therapies and contributes valuable preliminary data for future preclinical and clinical investigations.

2025, x + 45 pages

Keywords: Apoptosis, Combined therapy, Hepatocellular carcinoma, Sorafenib, *Spirulina platensis*.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini esirgemeyen, tecrübelerini sürekli paylaşan, öğrettiği bilgilerle bana yol gösteren ve tez sürecinde ve tezin tamamlanmasında yaptığı önemli katkılardan dolayı değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ'ye sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Bu tez çalışmasını 23. FEN. BİL. 34 numaralı proje ile destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (AKÜBAP) Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Her zaman arkamda olduklarını hissettiren aileme tezimi zorlayan oğluma ama ona fırsat vermeyen eşime destekleri için çok teşekkür ederim.

Bu tezi, hayattayken söz verdiğim gibi anneme (Ayşe ÇEKİÇ) ithaf ediyorum. Onun emeği, duası ve sevgisiyle bu noktaya geldim. Mekânı cennet olsun; verdiğim sözü tutmanın huzurunu yaşıyorum teşekkür ederim.

Büşranur CİVANOĞULLARI AYDOĞDU
Afyonkarahisar 2025

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLOLAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	3
2.1 Hepatosellüler Kanser Hücreleri Tanımı Ve Özellikleri	3
2.2 Hepatosellüler Karsinomun Tedavisi	4
2.3 Sorafenib: Kullanımı ve Etki Mekanizması	5
2.4 <i>Spirulina platensis</i> Kanser Tedavisindeki Rolü	7
2.5 HepG2 Hücre Hattı ve Karaciğer Araştırmalarındaki Önemi	8
3. MATERYAL ve METOT	12
3.1 Çalışmada Kullanılan Materyaller	12
3.1.1 Kullanılan Cihazlar	12
3.1.2 Kullanılan Kimyasallar	13
3.2 Hücre Kültürü	15
3.2.1 Hücre İçin Besiyeri Hazırlanması	15
3.2.2 Hücrelerin Çözdürülmesi ve Çoğaltılması	15
3.2.3 Hücrelerin Pasajlanması	16
3.2.4 Tripan Blue ile Thoma Lamında Hücre Sayımı	16
3.2.5 Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	16
3.3 <i>Spirulina platensis</i> Ekstraktının Hazırlanması ve Hücrelere Uygulanması	17
3.3.1 <i>Spirulina platensis</i> Sulu Ekstraktının Hazırlanması	17
3.3.2 Hücre Kültürüne Uygulanması	17
3.4 MTT Yöntemi ile Uygun Dozun Belirlenmesi	17
3.5 Komet Analizi	18
3.5.1 Total RNA İzolasyonu	19

3.5.2 RNA Konsantrasyonun Ölçümü	20
3.5.3 cDNA Sentezi	21
3.5.4 qRT-PCR Analizi	22
3.5.5 ELISA Yöntemi	23
4. BULGULAR	25
4.1 Hücre Canlılığının Metabolik Değerlendirilmesi	25
4.2 DNA Hasarının Değerlendirilmesi	27
4.3 Gen Ekspresyonunun Kantitatif Analizi	27
4.3.1 Bax Gen Ekspresyonu	28
4.3.2 TNF- α Gen Ekspresyonu	29
4.3.3 CASP3 Gen Ekspresyonu	30
4.3.4 BCL-2 Gen Ekspresyonu	31
4.4 Anti-Enflamatuar ve Apoptotik Etkilerin Nicel Analizi: BAX, BCL-2, CAS3, TNF- α ve Ekspresyonu	32
4.4.1 BAX Protein Düzeyi	32
4.4.2 BCL-2 Protein Düzeyi	33
4.4.3 CASP3 Protein Düzeyi	34
4.4.4 TNF- α Protein Düzeyi	35
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	37
5.1 Gelecekteki Çalışmalar için Öneriler	39
5.2 Sonuçlar	39
6. KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	43

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
α	Alfa
β	Beta
μg	Mikrogram
μM	Mikromolar
nm	Nanometre
pH	Asitlik-Bazlık Ölçüsü

Kısaltmalar

BAX	Bcl-2 Associated X Protein
BCL-2	B-cell Lymphoma 2
CASP3	Caspase-3
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Analiz
HSK	Hepatosellüler Karsinom
LMA	Düşük Erime Noktalı Agaroz
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NMA	Normal Erime Noktalı Agaroz
qPCR / qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOR	Sorafenib
SP	Spirulina platensis
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü Alfa

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Sorafenib kimyasal yapısı (Rini 2006).....	6
Şekil 4.1 HepG2 hücrelerinde Spirulina Platensis'e bağlı hücre canlılığı.....	26
Şekil 4.2 HepG2 hücrelerinde Sorafenib dozlarına bağlı hücre canlılığı	26
Şekil 4.3 24 saatlik uygulamalarda BAX gen ekspresyon düzeyi.....	28
Şekil 4.4 48 saatlik uygulamalarda BAX gen ekspresyon düzeyi.....	28
Şekil 4.5 24 saatlik uygulamalarda TNF- α gen ekspresyonu.....	29
Şekil 4.6 48 saatlik uygulamalarda TNF- α gen ekspresyonu.....	29
Şekil 4.7 24 saatlik uygulamalarda CASP3 Gen Ekspresyonu.....	30
Şekil 4.8 48 saatlik uygulamalarda CASP3 Gen Ekspresyonu	30
Şekil 4.9 24 saatlik uygulamalarda BCL-2 Gen Ekspresyonu.....	31
Şekil 4.10 48 saatlik uygulamalarda BCL-2 Gen Ekspresyonu.....	31
Şekil 4.11 24 saatlik uygulamalarında BAX Protein Düzeyi.....	32
Şekil 4.12 48 saatlik uygulamalarında BAX Protein Düzeyi.....	33
Şekil 4.13 24 saatlik uygulamada BCL-2 protein düzeyi	33
Şekil 4.14 24 saatlik uygulamada BCL-2 protein düzeyi	34
Şekil 4.15 24 saatlik uygulamada CASP3 protein düzeyi	34
Şekil 4.16 48 saatlik uygulamada CASP3 protein düzeyi	35
Şekil 4.17 24 saatlik uygulamalarda TNF- α protein düzeyi	35
Şekil 4.18 48 saatlik uygulamalarda TNF- α protein düzeyi	36

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1 Gen Primer Dizileri	23
Tablo 4.1 Kombine ilaç uygulamaları ve kontrol örneklerinin 24h ve 48h karşılaştırılmaları verilmiştir.....	27



1. GİRİŞ

Kanser, dünya genelinde milyonlarca insanı etkileyen, karmaşık biyolojik mekanizmalarla seyreden ve yüksek ölüm oranlarına neden olan bir hastalık grubudur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, kanser türleri arasında karaciğer kanseri, özellikle hepatosellüler karsinom (HSK), en yaygın görülen ve ölümcül seyreden türlerden biridir (Kıyıcı 2023). HSK, genellikle kronik karaciğer hastalıkları ve siroz gibi temel sağlık sorunlarına bağlı olarak gelişmekte ve hastaların yaşam sürelerini ciddi şekilde kısaltmaktadır. Bununla birlikte, mevcut tedavi yöntemlerinin etkinliği sınırlı olup, bu tedavilerin sağlıklı dokular üzerinde oluşturduğu yan etkiler tedaviyi daha da zorlaştırmaktadır (Drozdogan 2024).

Günümüzde, hedefe yönelik tedavi yaklaşımları, kanser araştırmalarında giderek daha fazla ön plana çıkmaktadır. Bu yaklaşımlar, kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını baskılamakla birlikte sağlıklı hücrelerin korunmasını hedeflemektedir. Bu doğrultuda, doğal bileşiklerin antikanser potansiyelleri dikkat çekmekte, özellikle mikroalglerden elde edilen biyoaktif maddeler bu alanda umut vaat etmektedir. *Spirulina platensis*, içerdiği fenolik bileşikler, karotenoidler ve polisakkaritler gibi biyolojik aktif bileşenler sayesinde antioksidan, antiinflamatuvar ve immünomodülatör özellikleriyle tanınmaktadır (Çelekli ve Kahraman 2021). Son yıllarda yapılan çalışmalar, *Spirulina platensis*'in antikanser etkilerinin de dikkate değer olduğunu göstermektedir (Çelekli ve Kahraman 2021).

HSK tedavisinde kullanılan temel ilaçlardan biri olan Sorafenib (SOR), hücre proliferasyonunu ve anjiyogenezi baskılayan bir tirozin kinaz inhibitörüdür (Kıyıcı 2023). SOR, HSK tedavisinde yaygın olarak kullanılsa da, hastalarda önemli yan etkiler yaratması ve uzun vadede tümör hücrelerinde direnç gelişmesine yol açması, bu ilacın etkinliğini sınırlandırmaktadır. Bu nedenle, SOR'in etkisini artıracak ve yan etkilerini azaltacak destekleyici kombinasyon stratejileri üzerinde çalışmalar yapılması büyük bir önem taşımaktadır (Kıyıcı 2023, Drozdogan 2024).

HepG2 hücre hattı kullanılarak *Spirulina platensis* ve SOR kombinasyonunun antikanser etkilerini değerlendirilmiş, araştırma kapsamında, bu kombinasyonun hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri hücre canlılık testi, gen ekspresyon analizleri (qRT-PCR) ve DNA hasar testi (KOMET testi) ile incelenmiştir. Özellikle apoptoz mekanizmasında yer alan *TNF- α* , *BAX*, *CASP3* ve *BCL-2* gibi genlerin ifade seviyelerindeki değişiklikler detaylı olarak analiz edilecektir. Bu analizler, kombinasyonun apoptoz indüksiyon potansiyelini ve kanser hücrelerini hedef almadaki etkinliğini ortaya koyacaktır (Çelekli ve Kahraman 2021, Drozdogan 2024).

Araştırmanın temel hipotezi, *Spirulina platensis* ekstralarının antikanser etkilerinin SOR ile kombine edildiğinde sinerjik bir şekilde artabileceği ve bu kombinasyonun kanser hücrelerinin ölüm oranını yükseltirken, sağlıklı hücrelerin korunmasına katkı sağlayabileceğidir. Bu kapsamda, çalışmada elde edilen bulgular, daha etkili ve yan etkileri minimize edilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi için değerli bilgiler sunabilir. Ayrıca, *Spirulina platensis* gibi doğal ürünlerin biyoteknolojik ve farmakolojik potansiyelini de aydınlatmayı hedeflemektedir (Çelekli ve Kahraman 2021, Kıyıcı 2023, Drozdogan, 2024).

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Hepatosellüler Kanser Hücreleri Tanımı Ve Özellikleri

HSK, karaciğerin birincil malign tümörlerinden biri olup, genellikle hepatositlerden (karaciğerin ana hücreleri) kaynaklanmaktadır. HSK, karaciğer kanserlerinin %75–85’ini oluşturmakta ve dünya genelinde önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir (Llovet 2021, Sung 2021).

Bu kanser tipi genellikle siroz, hepatit B virüsü (HBV) ve hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonları gibi kronik karaciğer hastalıkları ile ilişkilidir (El-Serag 2012). Histopatolojik olarak, HSK mikroskop altında farklı alt türlere ayrılabilen heterojen bir yapıya sahiptir (Marrero 2018).

Histolojik çeşitlilik açısından HSK, genellikle trabeküler, pseudoglandüler veya solid hücresel düzenlemeler gösterir. Bu yapılar, hepatositlerin malign değişimlerine işaret eder. Moleküler heterojenlik açısından HSK, genetik ve epigenetik değişikliklerin bir sonucu olarak farklı moleküler alt tiplere ayrılabilir. Örneğin, Wnt/ β -katenin sinyal yolunda mutasyonlar sıkça gözlemlenir. Klinik seyir açısından semptomlar genellikle ileri evrede ortaya çıkar ve bu durum, hastalığın geç teşhisine neden olur. Karaciğer fonksiyon kaybı, karın ağrısı, asit ve sarılık sık görülen belirtilerdir. Risk Faktörleri kronik hepatit B (HBV) ve C (HCV) enfeksiyonları, alkolik karaciğer hastalığı ve aflatoksin maruziyeti önemli risk faktörleridir (Boyault 2007).

Hücre tiplerine bağlı kanser alt tipleri’ne baktığımızda fibrolamellar HSK daha genç yaş gruplarında görülür ve genellikle kronik karaciğer hastalığı öyküsü olmayan bireylerde ortaya çıkar (Craig 1980). Histolojik olarak yoğun kollajen bantları ve büyük eozinofilik hücreler içerir. Kolloid (Mukoid) Tip nadir görülen bir alt tiptir ve müsin üreten hücrelerden oluşur (Ishak 2001). Daha agresif bir seyir gösterebilir. Klar Hücreli Tip Hücrelerin sitoplazmasında bol glikojen veya lipid birikimi nedeniyle şeffaf bir görünüme sahiptir (Lauwers Misdraji 2007). Genellikle daha iyi prognoz ile ilişkilidir. Makrotrabeküler Masif Alt Tip özellikle p53 mutasyonları ile ilişkilidir ve daha kötü bir prognoz taşır (Kakar 2009). Büyük trabeküler düzenlemeler ile karakterizedir.

Anjiyomiyolipom Benzeri Alt Tip HSK'nin yağ ve damar benzeri yapı gösteren nadir bir varyantıdır. Karışık mezodermal ve epitelyal farklılaşma izlenir (Banerjee 2012).

2.2 Hepatosellüler Karsinomun Tedavisi

HSK, hem lokal hem de sistemik tedavi yaklaşımlarını gerektiren kompleks bir malignitedir. Tedavi stratejileri; tümör evresi, karaciğer fonksiyon rezervi (Child-Pugh sınıflaması), hastanın performans durumu (Eastern Cooperative Oncology Group [ECOG] skoru) ve genel klinik durumu gibi çeşitli faktörlere göre bireyselleştirilir (Marrero 2018). Bu kapsamda, Barcelona Klinik Karaciğer Kanseri (BCLC) evreleme sistemi, HSK için uluslararası düzeyde kabul gören bir tedavi planlama algoritması olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Llovet 1999, Reig 2022).

Moleküler hedefli tedaviler arasında en yaygın kullanılan ajanlardan biri SOR olup, bu ajan bir multikinaz inhibitörüdür. Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörleri (VEGFR) ve Raf kinaz yollarını inhibe ederek tümör proliferasyonu ve anjiyogenezini baskılar. İleri evre HSK'da birinci basamak sistemik tedavi olarak kabul edilen SOR, diyare, el-ayak sendromu ve hipertansiyon gibi yan etkiler oluşturabilir (Llovet 2008). Alternatif bir multikinaz inhibitörü olan Lenvatinib, ileri evre hastalarda SOR benzer etkinlik göstermiştir. Ancak hipertansiyon, proteinüri ve iştahsızlık gibi advers etkileri mevcuttur (Kudo 2018).

İmmünoterapilerde Atezolizumab (anti-PD-L1) ile Bevacizumab (VEGF inhibitörü) kombinasyonu öne çıkmaktadır. Bu tedavi protokolü, birinci basamakta progresyonsuz sağkalımı anlamlı düzeyde artırmıştır. Ancak kanama riski, yorgunluk ve hipertansiyon gibi yan etkiler gözlenebilmektedir (Finn 2020).

SOR tedavisine rağmen hastalık progresyonu gösteren olgularda ikinci basamak ajan olarak Regorafenib kullanılmaktadır. Regorafenib'in başlıca yan etkileri arasında hepatotoksisite, hipertansiyon ve dermatolojik reaksiyonlar yer almaktadır (Bruix 2017). Üçüncü basamak tedavi seçeneği olarak Cabozantinib, MET, AXL ve VEGFR-2 kinazlarını hedef alarak etkinlik gösterir. Ancak gastrointestinal bozukluklar, hipertansiyon ve tromboz gibi advers etkiler söz konusudur (Abou-Alfa 2018).

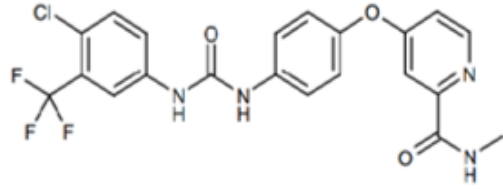
Lokal tedavi yaklaşımları arasında cerrahi rezeksiyon, özellikle Child-Pugh A sınıfı ve yeterli karaciğer rezervine sahip hastalarda uygulanabilir. Karaciğer nakli ise Milan kriterlerine uygun hastalar için küratif bir seçenektir (Mazzaferro 1996).

Cerrahiye uygun olmayan olgularda, küçük ve sınırlı tümörler için Radyofrekans Ablasyon (RFA) etkili bir yöntemdir (Livraghi 1999). Transarteriyel Kemoembolizasyon (TACE), ara evre HSK'da standart tedavi olarak kullanılmakta ve tümöral damarların kemoterapötik ve embolik ajanlarla tıkanmasını içermektedir (Lo 2002). Transarteriyel Radyoembolizasyon (TARE) ise Yttrium-90 (Y-90) partikülleri ile hedefe yönelik lokal radyoterapi sağlar (Sangro 2011). Stereotaktik Beden Radyoterapisi (SBRT), lokalize ancak cerrahiye uygun olmayan hastalarda tercih edilebilirken, Proton Terapisi daha az çevre doku hasarı ile hassas tümör hedeflemesi sunar, ancak yüksek maliyeti nedeniyle sınırlı uygulanmaktadır (Klein 2015).

Son yıllarda lokal ve sistemik tedavilerin kombinasyonu, daha iyi klinik sonuçlar elde etmek amacıyla önerilmektedir. Örneğin, TACE sonrası immünoterapi uygulaması hastalığın kontrolünde olumlu katkılar sağlayabilir (Park 2021).

2.3 Sorafenib: Kullanımı ve Etki Mekanizması

SOR, ileri evre HSK tedavisinde kullanılan, oral yolla uygulanan çoklu kinaz inhibitörüdür. Özellikle tümör hücrelerinin proliferasyonu ve anjiyogenezinden sorumlu olan *VEGF* reseptörleri gibi çeşitli tirozin kinazları hedef alır. SOR kimyasal adı N-(3-triflorometil-4-klorofenil)-N'-(4-[2-metilkarbamoylpiridin-4-il]oksifenil) olan bir bi-aril üre türevidir (Gauthier & Ho 2013). Sorafenib'e kimyasal yapı Şekil 2.1'de sunulmaktadır (Rini 2006).



Şeki 2.1: Sorafenib kimyasal yapısı (Rini 2006).

SOR'in önerilen günlük dozu, günde iki kez 400 mg olmak üzere toplam 800 mg'dır. Bu doz, yemeklerden en az bir saat önce veya iki saat sonra uygulanmalıdır. Tedavi süresi, hastalığın seyrine ve hastanın ilaca toleransına göre değişmektedir. İlacın tolere edilemediği durumlarda dozaj azaltılabilir; örneğin diyare, el-ayak sendromu veya hipertansiyon gibi advers etkiler gözlemlendiğinde doz günde iki kez 200 mg'a indirilebilir. Hafif ve orta dereceli karaciğer yetmezliği olan hastalarda doz ayarlaması genellikle gerekmezken, ciddi karaciğer yetmezliği durumunda dikkatli kullanım önerilmektedir. SOR, ciddi kardiyak bozuklukları olan, kontrolsüz hipertansiyon veya ilaca karşı aşırı duyarlılık öyküsü bulunan hastalarda kontrendikedir (Llovet 2008).

SOR'in antitümör etkisi, üç temel biyolojik sürecin inhibisyonu ile ilişkilidir. İlk olarak, serin-treonin kinaz ailesinden olan CRAF ve BRAF kinazlarını inhibe ederek RAF/MEK/ERK sinyal yolunu baskılar. Bu mekanizma, hücre proliferasyonunun önlenmesini sağlar ve tümör büyümesini yavaşlatır (Wilhelm 2004). İkinci olarak, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 ve platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü PDGFR- β gibi anjiyogeneze katılan reseptörlerin inhibisyonu yoluyla tümör dokusunun damarlaşması azaltılır ve oksijenlenme sınırlanır (Llovet 2008). Üçüncü olarak, BCL-2 protein ailesi üzerinden etki ederek apoptoz mekanizmasını aktive eder ve tümör hücrelerinin kontrollü hücre ölümünü teşvik eder (Wilhelm 2006). Ayrıca, c-KIT ve RET gibi diğer tirozin kinazları da inhibe ettiği gösterilmiştir; bu sayede tümör mikroçevresi ve metastatik potansiyel üzerinde de düzenleyici etki sağlamaktadır (Wilhelm 2006).

Klinik çalışmalar, SOR'in ileri evre HSK hastalarında plasebo ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde sağkalım avantajı sağladığını ortaya koymuştur. (Llovet 2008) yürüttüğü çok merkezli, çift kör, randomize kontrollü SHARP çalışmasında (Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol), SOR tedavisi uygulanan hastalarda ortalama

sağkalım süresi 10.7 ay olarak saptanmış, bu süre plasebo grubunda 7.9 ay olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada SOR tedavisine bağlı olarak en sık karşılaşılan advers etkiler diyare, el-ayak sendromu, hipertansiyon ve yorgunluk şeklinde raporlanmış; nadiren karaciğer toksisitesi, miyokard enfarktüsü ve gastrointestinal perforasyon gibi ciddi yan etkiler de gözlenmiştir (Llovet 2008).

2.4 *Spirulina platensis* Kanseri Tedavisindeki Rolü

Spirulina platensis, mikroskobik mavi-yeşil algler (siyanobakteriler) sınıfına ait olup, içerdiği yüksek düzeyde biyolojik aktif bileşenler nedeniyle fonksiyonel bir süper gıda olarak tanımlanmaktadır. Antioksidan, antiinflamatuvar ve immünomodülatör özellikleri sayesinde özellikle kanser alanında destekleyici tedavi ajanı olarak kullanılmasına yönelik ilgi giderek artmaktadır (Agarwal 2014, Dasgupta 2014).

Antioksidan etkisi, özellikle fikosiyenin, karotenoidler ve tokoferoller (E vitamini) gibi bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Bu maddeler, reaktif oksijen türlerini (ROS) nötralize ederek oksidatif stres düzeyini azaltır ve DNA hasarını önleyerek hücresel mutasyonlara bağlı kanserleşme riskini azaltabilir (Agarwal 2014).

İmmünomodülatör etkileri bağlamında *Spirulina*; makrofajlar, doğal öldürücü (NK) hücreler ve T lenfositler gibi immün sistem bileşenlerini aktive ederek bağışıklık yanıtını güçlendirmektedir (Dasgupta 2014). Bu durum özellikle kemoterapi ve radyoterapi gibi bağışıklığı baskılayan tedaviler sırasında koruyucu fayda sağlayabilir.

Antiinflamatuvar etkisini siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimini inhibe ederek gerçekleştiren *Spirulina*, prostaglandin sentezini baskılamakta ve böylece kronik inflamasyonu azaltmaktadır (Agarwal 2014). Kronik inflamasyonun kansere yol açabilecek moleküler değişiklikleri tetiklediği göz önüne alındığında bu etki oldukça kritiktir.

Deneysel çalışmalar, *Spirulina platensis*'in kemoterapiye bağlı yan etkileri (örneğin, yorgunluk, iştahsızlık, mide bulantısı) azaltabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda iştah artışı ve enerji düzeylerinde iyileşme sağlayarak hastaların genel yaşam kalitesine

olumlu katkı sunduğu bildirilmiştir (Agarwal 2014). Bu etkinin özellikle fikosiyanin bileşiğinin hücre döngüsünü durdurma ve apoptoz indüksiyonu yoluyla ortaya çıktığı belirtilmiştir (Dasgupta 2014).

Ayrıca *Spirulina*'nın tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu artırabileceği ve proto-onkogenlerin baskılanmasına aracılık edebileceği ifade edilmektedir. Bu durum epigenetik mekanizmalar aracılığıyla hücre çoğalmasını düzenleyerek tümör oluşumunu sınırlandırabilir (Dasgupta 2014). Preklinik modellerde *Spirulina*'nın HSK başta olmak üzere meme ve kolorektal kanserlerde tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Agarwal 2014). İnsan çalışmalarında, meme kanserli kadınlarda yapılan bir araştırmada *Spirulina* takviyesi alan bireylerde yorgunluk düzeylerinin azaldığı ve yaşam kalitesinde belirgin iyileşme sağlandığı rapor edilmiştir (Dasgupta 2014).

Spirulina genellikle toz, tablet veya kapsül formunda kullanılmaktadır. Günlük dozaj, genellikle 1–3 gram arasında önerilmekte olup, bireyin genel sağlık durumuna ve tedavi protokolüne göre hekim kontrolünde belirlenmelidir (Agarwal 2014). Kemoterapi ya da radyoterapi sürecine entegre edildiğinde bağışıklık sistemini destekleyici rol üstlenebilir (Dasgupta 2014).

Genellikle güvenli bir ürün olarak kabul edilse de bazı bireylerde mide rahatsızlıkları, baş ağrısı veya alerjik reaksiyonlar gibi hafif yan etkiler oluşturabileceği için, özellikle immün sistemi baskılanmış bireylerde dikkatli kullanılması önerilmektedir (Agarwal 2014).

2.5 HepG2 Hücre Hattı ve Karaciğer Araştırmalarındaki Önemi

HepG2 hücre hattı, insan HSK hücrelerinden türetilmiş olup, karaciğer kanseri araştırmalarında yaygın olarak kullanılan bir *in vitro* modeldir (Aden 1979). Çalışmanızda, SOR ve *Spirulina platensis* kombinasyonunun HepG2 hücre hattı üzerindeki antikanser etkileri değerlendirilmiştir. Bu hücre hattı, karaciğerin biyokimyasal ve metabolik işlevlerini taklit etme kapasitesine sahip olup, özellikle ilaç

metabolizması, gen ekspresyon değişiklikleri ve apoptoz mekanizmalarının incelenmesi açısından önemli bir model sunmaktadır (Castellb2006).

HepG2 hücre hattı üzerinde yapılan çalışmamızda SOR ve *Spirulina platensis* kombinasyonlarının hücre canlılığı, gen ekspresyonu ve DNA hasarı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. MTT testi sonuçları, kombinasyon tedavisinin HepG2 hücrelerinde belirgin bir sitotoksik etkiye neden olduğunu göstermiştir. Hücre canlılığının azalması, özellikle apoptotik mekanizmaların aktive olmasına bağlı olarak *BAX* ve *CASP3* gen ekspresyonlarında artış, *BCL-2* gen ekspresyonunda ise azalma ile doğrulanmıştır (Demirci 2021). Bu bulgular, kombinasyon tedavisinin HepG2 hücrelerinde apoptoz indükleyici etkisini desteklemektedir (Mirza 2020).

Bununla birlikte, çalışmamızda Komet testi yöntemi kullanılarak, SOR ve *Spirulina platensis* kombinasyonlarının DNA hasarına neden olup olmadığı araştırılmıştır. Sonuçlar, yüksek doz kombinasyon uygulamalarında genotoksisite düzeyinin arttığını, ancak düşük doz kombinasyonlarda DNA hasarının daha sınırlı olduğunu göstermiştir. Bu durum, kombinasyon tedavisinin doza bağımlı etkiler gösterebileceğini ve optimum dozun belirlenmesinin önemini ortaya koymuştur (Scholz, Görtz ve Elgammal 2015).

HepG2 hücre hattı, aynı zamanda kanser tedavisinde yeni ilaç kombinasyonlarının etkinliğini test etmek için sıkça tercih edilmektedir. SOR ve *Spirulina platensis* kombinasyonunun tek başına uygulanan SOR e kıyasla daha güçlü apoptotik ve sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgular, *Spirulina platensis*'in HSK tedavisinde kemoterapötik ajanlarla kombine kullanımının potansiyel olarak faydalı olabileceğini düşündürmektedir (Liu 2015).

HepG2 hücre hattının bazı sınırlamaları da bulunmaktadır. Bu hücreler tümör hücresi özellikleri taşıdığı için normal hepatosit fonksiyonlarını tam olarak yansıtamamaktadır (Öztürk ve Kaya 2018). Özellikle, Sitokrom P450 (CYP) ailesi enzimlerinin düşük seviyelerde eksprese edilmesi, ilaç metabolizmasını değerlendirme açısından bazı kısıtlamalar yaratmaktadır. Bu nedenle, elde edilen verilerin daha kapsamlı bir şekilde

değerlendirilmesi için primer hepatositler veya farklı karaciğer hücre hatlarıyla doğrulama yapılması önerilmektedir (Ege 2021).

Kullanılan HepG2 hücre hattı, HSK tedavisinde SOR ve *Spirulina platensis* kombinasyonunun potansiyel terapötik etkilerini değerlendirmek açısından güçlü bir model oluşturmuştur. Elde edilen bulgular, bu kombinasyonun apoptozu teşvik ettiğini, DNA hasarını artırdığını ve gen ekspresyon düzeylerinde belirgin değişikliklere neden olduğunu ortaya koymuştur. Bu veriler, kombinasyon tedavilerinin karaciğer kanseri için umut vadeden bir yaklaşım olabileceğini göstermektedir.

2.6 HUVEC Hücre Hattı ve Damar Endoteli Araştırmalarındaki Rolü

HUVEC damar biyolojisi, inflamasyon, vasküler geçirgenlik, pıhtılaşma ve anjiyogenez gibi endotelial fonksiyonların *in vitro* modellenmesinde yaygın olarak kullanılan bir sistemdir. Bu hücre hattı, sağlıklı insan endotel hücrelerini temsil etmesi nedeniyle özellikle ilaç toksisitesi, inflamatuvar yanıtlar ve hücre koruma mekanizmalarının araştırılmasında önemlidir (Jaffe 1973, Baudin 2007). Bu çalışmada, HUVEC hücre hattı, SOR ve *Spirulina platensis* kombinasyonunun sağlıklı damar hücreleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır. Kombinasyon tedavisinin HUVEC hücreleri üzerindeki etkileri, oksidatif stres ve inflamatuvar yanıt parametreleri üzerinden analiz edilmiştir.

Ayrıca HUVEC hücre hattı, anjiyogenezin *in vitro* incelenmesinde de önemli bir model sistemdir. Anjiyogenez, yalnızca tümör büyümesinde değil, aynı zamanda yara iyileşmesi ve çeşitli vasküler hastalıkların progresyonunda da kritik rol oynar (Folkman 2007). Çalışmada, kombinasyon tedavisinin HUVEC hücreleri üzerindeki etkileri, sağlıklı hücre bütünlüğünün korunması ve tedaviye bağlı toksik etkilerin sınırlandırılması perspektifinden değerlendirilmiştir. Bulgular, bu tedavi protokolünün sağlıklı hücreler üzerinde minimal sitotoksik etki oluşturduğunu ortaya koymuştur.

Bununla birlikte, HUVEC hücre hattının bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Primer hücre kökenli olmaları nedeniyle sınırlı bölünme kapasitesine sahiptirler ve uzun süreli

kültürlerde yaşlanma (senesens)  zellikleri gösterebilirler. Ayrıca, farklı donörlerden izole edilen HUVEC hücreleri arasında genetik ve fenotipik farklılıklar bulunabilir. Bu nedenle, çalışmada kullanılan hücrelerin donör özellikleri ve kültür koşulları, sonuçların biyolojik güvenilirliğini artırmak amacıyla titizlikle standardize edilmiştir (Zhou 2020).

Sonuç olarak, HUVEC hücre hattı bu çalışmada, SOR ve *Spirulina platensis* kombinasyonunun sağlıklı damar hücreleri üzerindeki etkilerini analiz etmede uygun ve güvenilir bir model sistem olarak kullanılmıştır. Bulgular, bu kombinasyon tedavisinin inflamatuvar yanıtları baskıladığını, oksidatif stresi azalttığını ve sağlıklı hücre bütünlüğünü koruyarak daha güvenli tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sunabileceğini göstermiştir.

3. MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada, HepG2 ve HUVEC kullanılarak SOR ve *Spirulina platensis* kombinasyonunun hücresel etkileri incelenmiştir. HepG2 hücreleri, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarı stoklarından temin edilmiştir. Çalışma kapsamında, HepG2 ve HUVEC üzerinde, farklı ilaç kombinasyonlarının sitotoksik ve genotoksik etkileri değerlendirilmiştir (Castell 2006, Scholz 2015).

HepG2 hücre hattı, karaciğer kanseri araştırmalarında yaygın olarak kullanılan bir modeldir ve özellikle ilaç metabolizması, apoptoz ve gen ekspresyon analizleri için önemli bir sistem sunmaktadır (Aden 1979).

Bu araştırma, SOR ve *Spirulina platensis* kombinasyonunun, karaciğer kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptoz indükleyici etkilerini değerlendirirken, sağlıklı hücreler üzerindeki olası koruyucu etkilerini de analiz etmeyi amaçlamaktadır.

3.1 Çalışmada Kullanılan Materyaller

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada, hücre kültürü, sitotoksisite, gen ekspresyon analizi ve biyokimyasal testler için aşağıda belirtilen cihazlar kullanılmıştır:

CO₂ İnkübatörü: Hücrelerin optimal büyüme koşullarında (%5 CO₂, 37°C, %95 nem) kültüre edilmesini sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

Laminat Akış Kabini (Flow Kabin): Hücre kültürü işlemlerinin steril ortamda yürütülmesini sağlayarak kontaminasyon riskini azaltmak için kullanılmıştır.

Ters Mikroskop (Inverted Microscope): Hücrelerin morfolojik yapılarının ve büyüme durumlarının gözlemlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

Santrifüj (4°C ve oda sıcaklığında çalışabilen): Hücre süspansiyonlarının ayrıştırılması, süpernatantların toplanması ve numunelerin yoğunlaştırılması için kullanılmıştır.

ELISA Okuyucu (Mikroplaka Spektrofotometresi): MTT testi ve ELISA analizlerinin absorbans ölçümleri için kullanılmıştır.

qPCR Cihazı (Bio-Rad CFX96): Gen ekspresyon analizlerinde, hedef genlerin relatif ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

Derin Dondurucular (-20°C ve -80°C): Hücre kültürü, RNA/DNA örnekleri ve çeşitli kimyasalların uzun süreli saklanması için kullanılmıştır.

Elektroforez Sistemi: PCR ürünlerinin analiz edilmesi ve DNA hasar testleri için kullanılmıştır.

3.1.2 Kullanılan Kimyasallar

Deneylerin doğru ve güvenilir şekilde yürütülmesi için aşağıdaki kimyasallar kullanılmıştır:

Hücre Kültürü İçin Kullanılan Kimyasallar:

HepG2 Hücre Besiyeri: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + %10 Fetal Bovine Serum (FBS) + %1 Penicillin/Streptomycin

HUVEC Hücre Besiyeri: Endotel hücre büyüme ortamı (ECM) + %10 FBS + %1 Penicillin/Streptomycin

Trypsin-EDTA Çözeltisi: Yapışkan hücreleri kültür yüzeyinden ayırmak için kullanılmıştır.

Fetal Bovine Serum (FBS): Hücrelerin büyüme ve gelişimini destekleyen temel bileşenlerden biridir.

Phosphate Buffered Saline (PBS): Hücre yıkama işlemlerinde ve çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.

DMSO (Dimetil Sülfoksit): Hücre dondurma çözeltisi olarak kullanılmıştır.

MTT Testi İçin Kullanılan Kimyasallar:

MTT Çözeltisi (Metil Tiazolil Tetrazolyum): Hücre canlılığını belirlemek için kullanılmıştır.

DMSO (Dimetil Sülfoksit): Formazan kristallerini çözmek ve absorbans ölçümü yapmak için kullanılmıştır.

Gen Ekspresyon Analizi İçin Kullanılan Kimyasallar:

RNA İzolasyon Kiti (GeneAll® Ribospin™ RNA Kit #304-150): Hücrelerden RNA ekstraksiyonu için kullanılmıştır.

cDNA Sentez Kiti (FIREScript® RT cDNA Synthesis Kit, Solis BioDyne): İzole edilen RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesi için kullanılmıştır.

qPCR Master Mix (Solis BioDyne 5X HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus): Gen ekspresyon analizleri için kullanılmıştır.

Primerler: Hedef genler ve referans gen (GAPDH) için tasarlanmış spesifik primerler kullanılmıştır.

Komet Analizi İçin Kullanılan Kimyasallar:

Düşük Erime Noktalı Agaroz (LMA): DNA hasar analizi için kullanılmıştır.

Lizis Tamponları: Hücre membranını parçalayarak DNA'nın serbest hale getirilmesini sağlamak için kullanılmıştır.

Elektroforez Tamponu: DNA göçünü sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

ELISA Analizi İçin Kullanılan Kimyasallar:

ELISA Kitleri: TNF- α , IL-6 ve VEGF proteinlerinin kantitatif ölçümleri için kullanılmıştır.

Standart Çözelti: Konsantrasyon hesaplamaları için referans noktaları oluşturulmuştur.

Substrat Çözeltisi (TMB): Renk değişimi sağlayarak absorbans ölçümü yapılmasına olanak tanımıştır.

Durdurma Solüsyonu (%1 H₂SO₄): Renk reaksiyonunu sonlandırmak için kullanılmıştır.

Yıkama Tamponu: ELISA kuyucuklarının temizlenmesi için kullanılmıştır.

Hücre Tedavisi İçin Kullanılan Bileşikler:

SOR: HSK hücrelerinde kullanılan kemoterapötik ajan.

Spirulina platensis Ekstresi: Doğal bileşik olarak çalışmaya dahil edilen ve anti-kanser etkileri araştırılan madde.

3.2 Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan HepG2 ve HUVEC hücre kültürü işlemleri gerçekleştirildi. Deneylerde *Spirulina platensis* sulu ekstraktı kullanılarak hücrelere farklı dozlarda uygulanmıştır.

3.2.1 Hücre İçin Besiyeri Hazırlanması

Hücrelerin büyümesi ve canlılığını sürdürebilmesi için gerekli olan besiyeri steril koşullarda hazırlandı.

HepG2 hücre hattı için besiyeri olarak Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kullanıldı. Bu besiyeri, 500 mL DMEM içerisine;

%10 (v/v) Fetal Sığır Serum (FBS),

%1 (v/v) Penisilin/Streptomisin,

%1 (v/v) L-Glutamin eklenerek hazırlandı.

HUVEC hücre hattı için, Endotelyal Hücre Büyüme Ortamı (EGM-2) kullanıldı ve içerisine heparin ve büyüme faktörleri eklendi.

Besiyerinin sterilizasyonu için 0.22 µm gözenekli membran filtreden geçirildi ve 4°C'de saklandı. Çalışmalardan önce 37°C'de su banyosunda 30 dakika bekletildi.

3.2.2 Hücrelerin Çözdürülmesi ve Çoğaltılması

HepG2 ve HUVEC hücreleri, sıvı azot tankında -80°C'de saklanmıştır. Hücreler steril koşullar altında çözdürülerek kültür ortamına adapte edildi.

Hücreler -20°C'de 10-15 dakika bekletildi, ardından 37°C'de sıcak su banyosunda 1-2 dakika süreyle çözdürüldü.

Çözülen hücreler laminar akış kabinine alındı ve 1 mL besiyeri eklenmiş steril 15 mL'lik falkon tüpüne aktarıldı.

Homojen dağılım sağlamak için pipetleme yapıldı, ardından 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve taze besiyeri ile tekrar santrifüj edildi.

Flasklara uygun besiyeri miktarı eklenerek %5 CO₂ içeren, 37°C'de inkübasyona alındı.

3.2.3 Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin sağlıklı çoğalmasını sağlamak için %80-90 konfluens seviyesine ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

Flask içindeki eski besiyeri uzaklaştırıldı ve 37°C’de 3 mL Tripsin-EDTA eklendi.

Hücrelerin yüzeyden ayrılması için 5 dakika inkübatörde bekletildi ve ardından besiyeri eklenerek hücreler falkona alındı.

Santrifüj (800 rpm, 5 dk) sonrası süpernatant uzaklaştırıldı, hücreler besiyeri ile yeniden süspansiyon haline getirildi.

Ekim için 25 cm² ve 75 cm² boyutundaki flasklara uygun miktarda besiyeri eklendi; ardından hücre-besiyeri karışımından alınan 500 µL, flaskların yüzeyine homojen bir şekilde dağıtıldı.

Pasajlanan flasklar daha sonra %5 CO₂ ve 37°C sıcaklıkta inkübasyona alındı.

3.2.4 Tripan Blue ile Thoma Lamında Hücre Sayımı

Hücrelerin üreme oranı %80-90 olduğunda, flasklardaki medyum atık kabına atıldı ve üzerine 3 mL Tripsin-EDTA eklenerek hücrelerin yüzeyden ayrılması için inkübatörde 5 dakika bekletildi.

Mikroskop altında canlı hücreler parlak, ölü hücreler mavi renkte gözlemlendi.

Canlı hücre sayısı aşağıdaki formül ile hesaplandı:

Toplam hücre sayısı (mL) = Ortalama hücre sayısı $\times 10^4 \times$ Dilüsyon faktörü

3.2.5 Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Uzun süreli saklama için HepG2 ve HUVEC hücreleri kriyoprezervasyona tabi tutuldu.

Hücre süspansiyonu hazırlandı ve 800 rpm’de santrifüj edildi.

Pellete zarar vermeden 750 µL besiyeri eklendi.

675 µL Fetal Bovine Serum (FBS) ve 75 µL DMSO damla damla eklendi.

-20°C’de 15-20 dakika bekletildi, ardından -80°C sıvı azot tankında saklandı.

3.3 *Spirulina platensis* Ekstraktının Hazırlanması ve Hücrelere Uygulanması

Bu çalışmada *Spirulina platensis* kuru toz formunda (SOLGAR markası) temin edilerek, sulu ekstrakt formunda hazırlanmıştır. Hazırlanan ekstrakt, HepG2 ve HUVEC hücrelerine farklı dozlarda uygulanarak sitotoksosite ve biyolojik etkiler değerlendirilmiştir.

3.3.1 *Spirulina platensis* Sulu Ekstraktının Hazırlanması

1, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 µg/mL *Spirulina* tozu, steril distile su içinde çözündürüldü. Manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırılarak homojenize edildi. Santrifüj (10.000 rpm, 10 dk) sonrası süpernatant alındı. 0.2 µm membran filtreden geçirilerek sterilize edildi.

3.3.2 Hücre Kültürüne Uygulanması

Hücreler %80-90 konfluens seviyesine ulaştığında, *Spirulina platensis* ekstraktı besiyerine eklendi.

1 µg/mL ve 100 µg/mL dozları hücre ortamına eklenerek 24 ve 48 saat inkübasyon yapıldı.

Kontrol grubu olarak hücre kültürü ortamı (*Spirulina* içermeyen) kullanıldı.

3.4 MTT Yöntemi ile Uygun Dozun Belirlenmesi

Bu çalışmada, HepG2 ve HUVEC hücrelerinin MTT yöntemi ile hücre canlılığı belirlenmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri boyunca uygulanan dozların etkileri gözlemlenmiş ve LD50 değerleri hesaplanmıştır. Hücrelerin canlılık ve ölüm oranları karşılaştırılarak, hem tekil hem de kombinasyon halinde uygulanan maddelerin etkileri detaylı şekilde analiz edilmiştir.

Hücreler 96 kuyucuklu plaklara 10.000 hücre/well olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından, SOR 1, 2, 5, 10, 12.5, 15, 20 ve 30 µM dozları

Spirulina platensis için ise 1–100 µg/mL aralığında dozlar uygulanmıştır. Kombinasyon uygulamaları LD50'ye yakın dozlardan oluşturulmuş, örneğin 10 µM SOR + 2 µg/mL *Spirulina* gibi kombinasyonlar denenmiştir. 24 ve 48 saat sonunda 20 µL MTT çözeltisi (5 mg/mL) eklenmiş, 4 saat inkübe edilmiştir. Medyum uzaklaştırılarak 200 µL DMSO eklenmiş ve 30 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir. Absorbans değerleri 540 nm'de BioTek ELx800 cihazıyla ölçülmüştür.

3.5 Komet Analizi

Bu analizde, HepG2 ve HUVEC hücre hatları, belirlenen SOR ve *Spirulina platensis* dozları ile 24 ve 48 saat boyunca inkübe edilerek DNA hasarı yönünden değerlendirilmiştir. Deney öncesinde gerekli tüm kimyasal çözeltiler hazırlanmış; elektroforez tankı, buz kasetleri ve preparatların yerleştirileceği ekipmanlar analiz süresine kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Elektroforez tamponunda NaOH (6.0 g) ve EDTA (0.18 g), 500 mL distile su içinde çözülerek homojen hale getirilmiş; pH değeri 13.2'ye ayarlanarak +4°C'de saklanmıştır. Nötralizasyon tamponunda Trizma Base (14.55 g), 300 mL distile su içerisinde çözülmüş; çözeltinin pH'ı 7.5'e ayarlanmış ve analiz gününe kadar soğuk ortamda saklanmıştır.

Lizis Tamponunda NaCl (29.4 g), EDTA (7.44 g), Trizma Base (0.24 g), Triton-X (2.0 mL) ve DMSO (20.0 mL) bileşenleri kullanılarak hazırlanmıştır. Triton-X ve DMSO, analizden bir saat önce ilave edilerek çözeltinin pH'ı 10'a getirilmiş ve +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Etidyum Bromür çözeltisi 0.01 g etidyum bromür, 50 mL distile su içerisinde çözülerek 10 kat seyreltilmiş halde kullanılmış ve çözeltinin saklama koşulları +4°C olarak belirlenmiştir.

Normal erime noktalı agaroz (NMA) 0.03 g NMA, 3 mL PBS içinde çözülerek ısıtıcı tabla üzerinde eritilmiş ve lamalar üzerine ince tabaka halinde yayılmıştır.

Düşük erime noktalı agaroz (LMA) hazırlanışında 0.016 g LMA, 2 mL PBS içerisinde çözölmüş ve çözeltinin jel haline geçmesini önlemek amacıyla sıcak su banyosunda bekletilmiştir.

Komet Assay uygulamasında, MTT testi sonucunda belirlenen dozlara maruz bırakılan HepG2 ve HUVEC hücreleri, %0.5 oranında LMA ile karıştırılarak pre-coated lamalar üzerine yayılmış ve oda sıcaklığında katılaştırılmıştır. Hazırlanan lamalar lizis tamponu içinde 4°C’de bir gece bekletilmiş, ardından alkali elektroforez tamponu içerisinde 20 dakika denatürasyona bırakılmıştır. Elektroforez işlemi, 25 V gerilim altında 30 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir.

Deney sonunda lamalar nötralizasyon tamponu ile dengelenmiş ve 10 kat seyreltilmiş Etidyum Bromür ile boyanmıştır. Boyama sonrası lamalar kurutulmuş ve floresan mikroskop (Leica DMI8) ile görüntölenmiştir. Her gruptan rastgele seçilen 100 hücrede DNA hasarı değerlendirmesi yapılmış ve sonuçlar Komet Assay IV yazılımı kullanılarak “tail length”, “% tail DNA” ve “tail moment” parametreleri üzerinden analiz edilmiştir.

3.5.1 Total RNA İzolasyonu

Bu çalışmada, HepG2 ve HUVEC hücrelerinden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve gen ekspresyon analizleri için örnekler hazırlanmıştır. RNA izolasyonu için Ribospin™ RNA İzolasyon Kiti (GeneAll®) protokolü takip edilmiştir. Çalışma kapsamında bir kontrol grubu ve deneysel uygulama grupları oluşturulmuş, hücreler 24 ve 48 saat boyunca belirlenen koşullarda inkübe edilmiştir.

Her deney grubu için 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri boyunca toplamda 8 adet T75 flask'a 5 x 10⁶ hücre ekildi ve hücrelerin tutunması için 37°C, %5 CO₂ ortamında 24 saat inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda, kontrol gruplarına taze besiyeri, deney gruplarına ise belirlenen SOR ve *Spirulina platensis* dozları içeren besiyeri eklendi.

Uygulama süresi tamamlandığında, RNA izolasyonu için hücreler toplandı ve işlem basamakları gerçekleştirildi. 24 saat ve 48 saat aralıklarında incelendi. İnkübasyon süresi

tamamlandıktan sonra, hücreler hücre kazıyıcı kullanılarak toplanmış ve santrifüj tüplerine alınmıştır.

Hücre pelletleri oluşturmak için 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

Hücrelerin zarlarını parçalamak ve RNA izolasyonunu sağlamak amacıyla pelletlerin üzerine 400 µL lizis tamponu eklendi ve hücreler pipetleme işlemiyle homojen hale getirildi.

Lizis edilen hücre süspansiyonu mini spin kolona aktarıldı ve RNA'nın membran yüzeyine tutunması için 10.000 G'de 30 saniye santrifüj edildi. 500 µL GW1 tampon çözeltisi eklenerek, RNA saflığını artırmak için 10.000 G'de 1 dakika 30 saniye santrifüjleme işlemi gerçekleştirildi. RNA'yı saflaştırmak amacıyla mini spin kolon yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 50 µL Nuclease-Free Water (NFW) eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi. Son aşamada, RNA örnekleri 10.000 G'de 1 dakika santrifüj edilerek elüsyonu tamamlandı. Elde edilen RNA örnekleri kısa süreli kullanım için -20°C'de, uzun süreli saklama amacıyla ise -80°C'de muhafaza edildi.

3.5.2 RNA Konsantrasyonun Ölçümü

RNA izolasyonunun ardından, izole edilen RNA'nın yoğunluğu ve saflık oranı Thermo Scientific™ Multiskan™ GO spektrofotometresi kullanılarak değerlendirildi. Analiz öncesinde cihaz, RNA özelliklerine uygun protokolle kalibre edildi.

Nanodrop plaka üzerine referans çözeltisi olarak 5 µL Nükleazsız Su eklendi.

Her RNA numunesinden 5 µL alınarak aynı plaka içerisine yüklendi.

Cihaz, 260 nm ve 280 nm dalga boylarında absorbans ölçümü yaparak RNA saflık oranlarını belirledi.

OD260/OD280 oranı kullanılarak RNA'nın protein veya diğer kirleticiler ile kontaminasyon durumu analiz edildi.

Ölçüm sonuçları kaydedilerek, RNA saflığı ve bütünlüğü değerlendirilmiştir.

3.5.3 cDNA Sentezi

RNA izolasyonunun ardından, FIREScript® RT cDNA Sentez Kiti (Solis BioDyne) protokolü doğrultusunda cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bu aşamada, HepG2 ve HUVEC hücre hatlarından izole edilen RNA örnekleri kullanılarak gen ekspresyon analizleri için uygun cDNA'lar oluşturuldu. Deney kapsamında, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreçlerine tabi tutulan örneklerin her biri için toplam hacmi 20 µL olan reaksiyon karışımları hazırlandı. Tüm bileşenler dikkatlice eklenerek homojen bir karışım oluşturuldu:

10X RT Reaction Buffer (2 µL)

dNTP Mix (0.5 µL)

Oligo(dT) Primer (1 µL)

Random Primer (1 µL)

RNase Inhibitor (0.5 µL)

FIREScript Reverse Transcriptase (1 µL)

Nükleaz-Free Water (NFW) ile 20 µL'ye tamamlandı

cDNA sentez reaksiyonu toplam 20 µL hacminde olacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımında; 5 µg total RNA, 1 µL Oligo(dT) primer, 0.5 µL dNTP karışımı, 2 µL 10X reaksiyon tamponu, 1 µL FIREScript Reverse Transcriptase, 0.5 µL RiboGrip RNase inhibitörü ve nükleaz içermeyen su kullanılmıştır. Tüm bileşenler üretici firma protokolüne uygun şekilde birleştirilerek cDNA sentez işlemi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan reaksiyon tüpleri, RNA'dan cDNA sentezini sağlamak amacıyla Prime Thermal Cycler cihazına yerleştirildi. Belirlenen program kapsamında enzimatik dönüşüm gerçekleştirildi ve elde edilen cDNA örnekleri gen ekspresyon analizlerinde kullanılmak üzere -80°C'de azot tankında saklandı.

cDNA sentez sürecinde yüksek kalite ve saflık düzeyi sağlanarak, RNA'dan cDNA'ya dönüşümün verimli olması için tüm aşamalar özenle yürütüldü. Hücrelerin SOR ve *Spirulina platensis* uygulamalarına verdiği tepkileri belirlemek amacıyla sentezlenen cDNA'lar, gen ekspresyon analizlerinde temel materyal olarak kullanıldı. Bu aşama, genetik profillemenin doğruluğunu artırmak için optimize edilmiş ve kontaminasyon riski en aza indirilecek şekilde tasarlanmıştır.

3.5.4 qRT-PCR Analizi

Gen ekspresyon seviyelerini belirlemek amacıyla, HepG2 ve HUVEC hücrelerinden izole edilen RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar kullanılarak kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qPCR) analizi gerçekleştirildi. Çalışmada, hedef genlerin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi için SYBR Green yöntemi kullanıldı.

qPCR analizi için Solis BioDyne 5X HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus reaktifi kullanılarak toplam 20 µL'lik reaksiyon karışımları hazırlandı. Çalışmada, referans gen olarak GAPDH seçildi ve hedef genlerin ekspresyon seviyeleri $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile analiz edildi.

Her bir qPCR reaksiyonu 20 µL toplam hacme ulaşacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 4.0 µL 5X HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus, 0.5 µL Forward primer (10 µM), 0.5 µL Reverse primer (10 µM), 2.0 µL cDNA şablonu ve 13.0 µL nükleaz içermeyen su (Nuclease-Free Water) içerecek şekilde oluşturulmuştur. Hazırlanan reaksiyon karışımları, qPCR cihazına (Bio-Rad CFX96) yüklenerek aşağıdaki termal döngü programı kullanıldı:

Başlangıç denatürasyonu: 95°C'de 3 dakika

Denatürasyon: 95°C'de 15 saniye (40 döngü)

Primer bağlanma: 60°C'de 30 saniye (40 döngü)

Uzama aşaması: 72°C'de 30 saniye (40 döngü)

Melt Curve Analizi: 65°C'den 95°C'ye kadar her 0.5°C artışla

qRT-PCR Uygulaması:

qRT-PCR analizi için SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak, gen ekspresyon düzeyleri Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR System cihazı ile ölçülmüştür. Reaksiyon hacmi 20 µL olarak belirlenmiş olup, her örnek üçlü teknik tekrarlar halinde çalışılmıştır. Kullanılan primer dizileri aşağıda sunulmuştur:

Tablo 3.1 Gen Primer Dizileri

Gen	Primer Dizileri (5'→3')
BAX	F: TTTGCTTCAGGGTTTCATCC / R: GACACTCGCTCAGCTTCTTG
BCL-2	F:AGTACCTGAACCGGCATCTG/ R: GAGAAATCAAACAGAGGCCG
CASP3	F: AGAACTGGACTGTGGCATTG/ R: CGTACCAGAGCGAGATGACA
TNF- α	F: CCCAGGCAGTCAGATCATCTT / R: AGCTGCCCCTCAGCTTGAG
GAPDH (Referans)	F:AGGTCGGAGTCAACGGATTTG/R: GTGATGGCATGGACTGTGGT

Her bir genin ekspresyon düzeyi, referans gen olarak kullanılan GAPDH'ye normalize edilerek, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi ile hesaplanmıştır. C_t (threshold cycle) değerleri cihaz yazılımı aracılığıyla otomatik olarak analiz edilmiştir.

Kontrol grubu ile karşılaştırmalı analiz yapılarak, SOR ve *Spirulina platensis* uygulamalarının gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri değerlendirildi. İstatistiksel analizler GraphPad Prism 9 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi ve verilerin anlamlılığı $p < 0.05$ olacak şekilde belirlendi.

3.5.5 ELISA Yöntemi

Bu çalışmada, hücrelerden elde edilen süpernatant örneklerinde TNF- α protein düzeyini kantitatif olarak belirlemek amacıyla, Wuhan Fine Biotech Co., Ltd. tarafından üretilen ticari ELISA kiti (FineTest®) kullanılmıştır. Analizler, kitin üretici talimatlarına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, kit protokolü doğrultusunda, protein konsantrasyonlarının hesaplanmasında kullanılacak standart eğri hazırlanmıştır. Bunun için, standart çözeltiden belirli oranlarda seri dilüsyonlar yapılmış ve her bir dilüsyon 96 kuyucuklu ELISA plakasının kuyucuklarına 100 μ L olacak şekilde pipetlenmiştir. Standartların yüklenmesinin ardından, deney gruplarından elde edilen süpernatant örnekleri de aynı hacimde ilgili kuyucuklara eklenmiştir. Bu işlemler sırasında, pipetleme işlemlerinin doğru ve hassas bir şekilde gerçekleştirilmesine dikkat edilmiştir.

Yükleme işleminin ardından plaka, proteinlerin kuyucuklardaki antikorlarla bağlanması için 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandığında, serbest

proteinleri ve bağlanmamış bileşenleri uzaklaştırmak amacıyla plaka, yıkama tamponu kullanılarak üç kez yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrası, her kuyucuğa 1:100 oranında seyreltilmiş biyotin ile işaretlenmiş ikincil antikor çözeltisi eklenmiş ve plaka tekrar 37°C’de 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Bu aşamada bağlanma tamamlandığında, plaka yeniden yıkama işlemine tabi tutulmuştur.

Sonraki adımda, kuyucuklara renk reaksiyonunu başlatmak amacıyla TMB (Tetrametilbenzidin) substrat çözeltisi eklenmiş ve plaka karanlık bir ortamda 20 dakika süreyle bekletilmiştir. Renk değişiminin meydana gelmesinin ardından, reaksiyonu durdurmak amacıyla kuyucuklara stop solüsyonu (%1 H₂SO₄) eklenmiştir. Stop solüsyonu eklenmesiyle birlikte oluşan renk yoğunluğu, 450 nm dalga boyunda çalışan bir mikropilaka okuyucu ile ölçülmüştür.

Elde edilen absorbans değerleri, kit ile birlikte sağlanan standart eğri kullanılarak değerlendirilmiş ve her bir örneğin TNF- α , IL-6 ve VEGF protein düzeyleri hesaplanmıştır. Bu yöntem, hücre grupları arasında protein seviyelerindeki değişiklikleri analiz etmek ve SOR ile *Spirulina platensis* uygulamalarının biyokimyasal etkilerini belirlemek için kullanılmıştır. Analiz sonuçları, bu uygulamaların hücrelerde oluşturduğu inflamatuvar ve anjiyojenik yanıtların detaylı şekilde ortaya konulmasını sağlamıştır.

4. BULGULAR

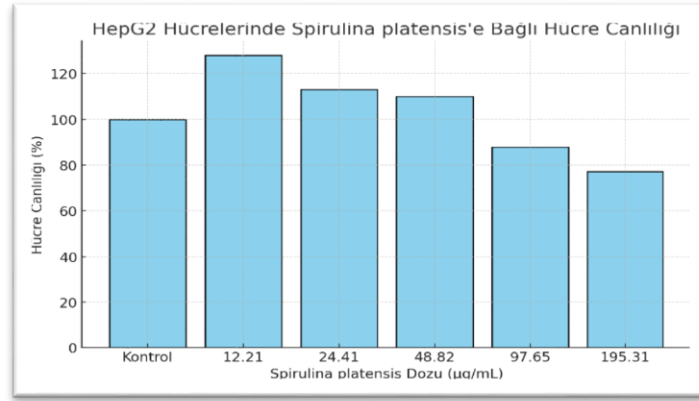
4.1 Hücre Canlılığının Metabolik Değerlendirilmesi

HepG2 hücreleri, 96 kuyucuklu plakalara ekildikten sonra; *Spirulina platensis* ekstraktı: 1, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 µg/mL ve SOR: 1, 2, 5, 10, 12.5, 15 µM (ve 48 saatlik uygulamalarda ek olarak 20 ve 30 µM) konsantrasyonlarında hücrelere uygulanmıştır. MTT testi ile hücre canlılık seviyeleri belirlenmiş olup, farklı uygulamalara göre sonuçlar şu şekilde gözlemlenmiştir:

SOR tek başına uygulandığında: SOR tek başına uygulandığında, HepG2 hücre canlılığında doza bağlı olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Özellikle 5 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarda, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş; 10 µM, 15 µM ve 30 µM gibi yüksek dozlarda sitotoksik etkinin en belirgin düzeye ulaştığı tespit edilmiştir.

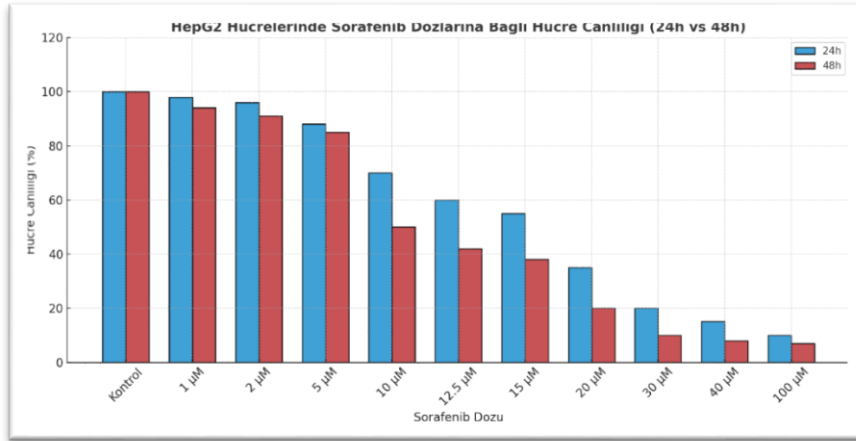
Spirulina platensis ekstraktı ise benzer şekilde doza bağımlı sitotoksik etki göstermiş, özellikle 50–100 µg/mL aralığında hücre canlılığını anlamlı düzeyde azaltmıştır. Her iki ajan da tek başına uygulandığında antikanser potansiyele sahip olduğunu ortaya koyarken, kombinasyon gruplarında bu etki sinerjistik biçimde daha güçlü şekilde gözlemlenmiştir.

Bu sonuçlar, SOR ve *Spirulina platensis* kombinasyonunun sinerjik bir etki yarattığını ve HSK (HepG2) üzerinde toksik etkiyi artırabileceğini göstermektedir. HepG2 hücreleri *Spirulina Platensis* ekstraktı farklı konsantrasyonlarda kuyulara uygulanmıştır. Uygulama ardından hücrelerin canlılık seviyelerini gösteren MTT testinin sonuçları da gösterilmiştir.



Şekil 4.1 HepG2 hücrelerinde Spirulina Platensis'e bağlı hücre canlılığı

Ön çalışmadan elde ettiğimiz doz olarak *Spirulina platensis* nin 1 µg/mL (Low) ve 100 µg/mL (High) dozlarını kombinasyon çalışmalarında kullandık. Düşük doz *Spirulina platensis* (1 µg/mL) uygulandığında, hücre canlılığında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Yüksek doz *Spirulina platensis* (100 µg/mL) ise hafif düzeyde sitotoksik etki göstermiştir. Hücre canlılığı verileri aşağıdaki grafikte gösterildiği gibi dozlara bağlı olarak dalgalanma göstermektedir.



Şekil4.2 HepG2 hücrelerinde Sorafenib dozlarına bağlı hücre canlılığı

96 kuyuya ekilen hücrelerin SOR uygulandıktan sonra gerçekleştirilen MTT sonuçları SOR uygulanan HepG2 hücrelerinde, doz arttıkça canlılık düzeylerinde belirgin bir düşüş tespit edilmiştir. Özellikle 10 µM ve üzeri konsantrasyonlarda hücre ölüm oranları anlamlı düzeyde artmıştır.

24 saatlik inkübasyonda canlılık yüzdesi 15 µM dozda %50'nin altına düşerken, 48 saatlik inkübasyonda aynı dozda bu oran daha da belirgin bir şekilde azalmıştır.

4.2 DNA Hasarının Değerlendirilmesi

Bu tez kapsamında, SOR ve *Spirulina platensis*'in tekli ve kombine uygulamalarının HepG2 hücrelerinde DNA üzerindeki etkileri, Komet Assay ile belirlenmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda elde edilen veriler, özellikle yüksek doz kombinasyonlarında DNA hasarının anlamlı biçimde arttığını, buna karşın düşük doz kombinasyonlarındagenotoksisite düzeyinin daha sınırlı kaldığını göstermiştir. Bu bulgular, kombinasyon tedavisinin doz bağımlı bir genotoksik potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Tablo 4.1 Kombine ilaç uygulamaları ve kontrol örneklerinin 24h ve 48h karşılaştırılmaları verilmiştir.

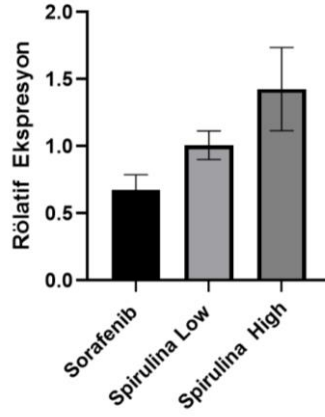
	24 saat	48 saat
Kontrol	3,67±1,15a	4,33±1,15a
Sor	20,33±2,52b	25,33±4,16b
Spirolow	3,33±,58a	4,67±,58a
Spirohigh	5,33±1,15a	6,00±1,00a
sor+spirolow	17,33±2,31c	20,67±1,15c
sor+spirohigh	15,67±1,53c	16,67±1,53d

4.3 Gen Ekspresyonunun Kantitatif Analizi

Tüm örnekler arasından yapılan analizlere göre *Spirulina platensis* 1µg, *Spirulina platensis* 100µg ve SOR +Spirolow 1µg örneklerinden Dna izolasyonu gerçekleştirilmiş ve örnekler PCR ile çoğaltılmıştır. Daha sonra bu örneklerden RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA'lar ile qPCR yöntemi gerçekleştirilmiş ve BAX, BCL-2, CAS3, TNFα genlerinin gerçek zamanlı artışları analiz edilmiştir. Anlamlılık vermeyen grafikler paylaşılmamıştır.

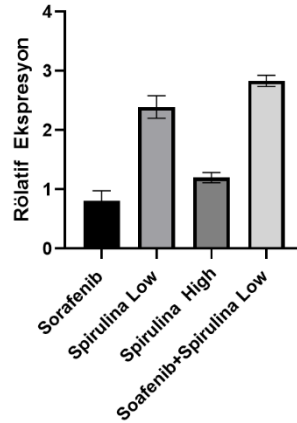
4.3.1 Bax Gen Ekspresyonu

HepG2 hücre hattında 24 saatlik uygulamalarda *Bax* gen ekspresyon düzeyleri, SOR grubuna kıyasla *Spirulina* High grubunda anlamlı düzeyde artmıştır ($p=0.0088$). *Spirulina* Low grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p=0.1822$).



Şekil 2.3 24 saatlik uygulamalarda BAX gen ekspresyon düzeyi

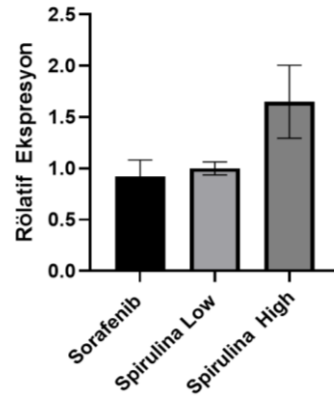
48 saatlik uygulamalarda *Bax* gen ekspresyonu tüm uygulama gruplarında belirgin şekilde upregüle olmuştur. SOR grubuna kıyasla *Spirulina* High ($p=0.0400$), *Spirulina* Low ($p<0.0001$) ve SOR + *Spirulina* Low ($p<0.0001$) gruplarında anlamlı artış gözlenmiştir.



Şekil 4.4 48 saatlik uygulamalarda BAX gen ekspresyon düzeyi

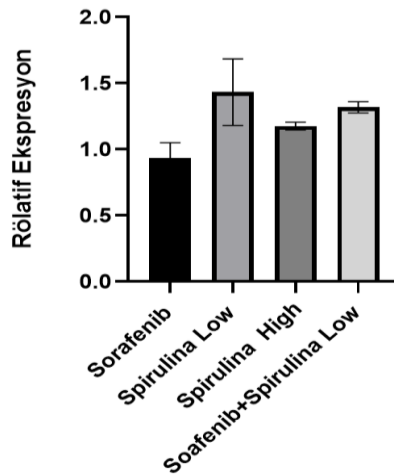
4.3.2 *TNF- α* Gen Ekspresyonu

24 saatlik uygulamalarda *TNF- α* gen ekspresyonu en düşük seviyede SOR grubunda ölçülmüştür. *Spirulina* Low uygulamasında bu ekspresyon anlamlı şekilde artış göstermiştir ($p=0.0108$).



Şekil 4.5 24 saatlik uygulamalarda *TNF- α* gen ekspresyonu

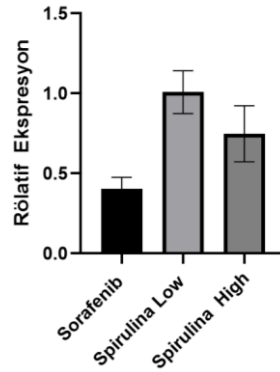
48 saatlik uygulamalarda SOR grubuna kıyasla *Spirulina* Low ($p=0.0108$) ve SOR + *Spirulina* Low ($p=0.0412$) gruplarında *TNF- α* ekspresyon düzeylerinde anlamlı artış gözlenmiştir. *Spirulina* High grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel fark bulunmamıştır.



Şekil 4.6 48 saatlik uygulamalarda *TNF- α* gen ekspresyonu

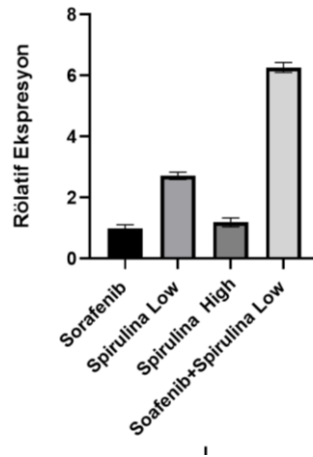
4.3.3 CASP3 Gen Ekspresyonu

24 saatlik inkübasyonda CASP 3 gen ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna göre yükselmiştir. *Spirulina* Low ve kombinasyon gruplarında anlamlı artış tespit edilmiştir ($p<0.001$). *Spirulina* High ve SOR grupları arasında fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.7 24 saatlik uygulamalarda CASP3 Gen Ekspresyonu

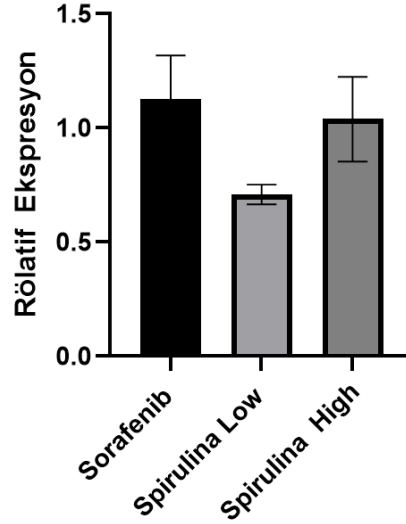
48 saat sonunda *Spirulina* Low ve SOR + *Spirulina* Low gruplarında CASP3 ekspresyonu belirgin düzeyde artmış olup ($p<0.001$), apoptotik mekanizmaların aktive edildiğini göstermektedir.



Şekil 4.8 48 saatlik uygulamalarda CASP3 Gen Ekspresyonu

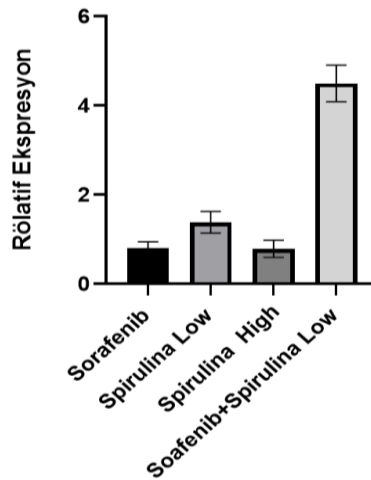
4.3.4 BCL-2 Gen Ekspresyonu

SOR grubu dışındaki gruplarda *BCL-2* ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna benzer bulunmuştur. SOR grubunda ise ekspresyon azalmıştır.



Şekil 4.9 24 saatlik uygulamalarda BCL-2 Gen Ekspresyonu

48 saatlik uygulamalarda SOR ($p<0.01$) ve SOR + *Spirulina* Low ($p<0.01$) gruplarında *BCL-2* ekspresyonu anlamlı derecede azalmıştır. Bu durum, anti-apoptotik gen olan *BCL-2*'nin baskılandığını ve apoptoz sürecinin desteklendiğini göstermektedir.



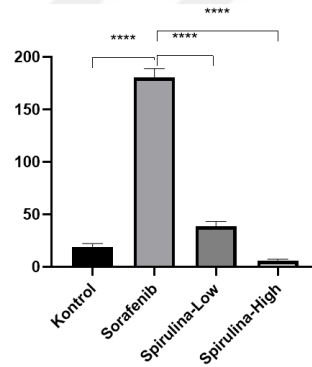
Şekil 4.10 48 saatlik uygulamalarda BCL-2 Gen Ekspresyonu

4.4 Anti-Enflamatuar ve Apoptotik Etkilerin Nicel Analizi: *BAX*, *BCL-2*, *CAS3*, *TNF-α* ve *Ekspresyonu*

Bu çalışmada, HepG2 hücre hattı üzerinde SOR, *Spirulina platensis* ve bu ajanların kombinasyonlarının anti-enflamatuar ve apoptotik etkileri, *TNF-α*, *BCL-2*, *CASPASE-3* ve *BAX* genlerine ait protein ekspresyon düzeyleri üzerinden, ELISA yöntemi ile hem 24 saat hem de 48 saat inkübasyon süreleri sonunda değerlendirilmiştir.

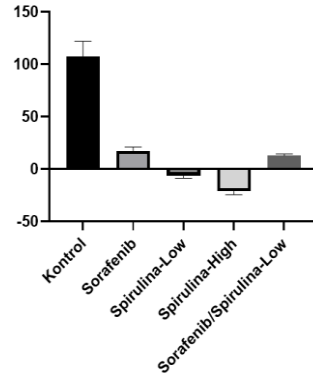
4.4.1 *BAX* Protein Düzeyi

BAX 24 Saat HepG2 hücrelerinde 24 saatlik uygulamada *BAX* protein düzeyi, SOR ($p<0.0001$), *Spirulina* ($p=0.0002$) ve SOR + *Spirulina* ($p=0.0028$) uygulamaları ile anlamlı derecede artmıştır. En yüksek artış bireysel SOR ve *Spirulina* uygulamalarında görülürken, kombinasyon grubunda bu artış daha sınırlı kalmıştır. Bu durum, kombinasyonun olası antagonistik etki göstermiş olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 4.11 24 saatlik uygulamalarında *BAX* Protein Düzeyi

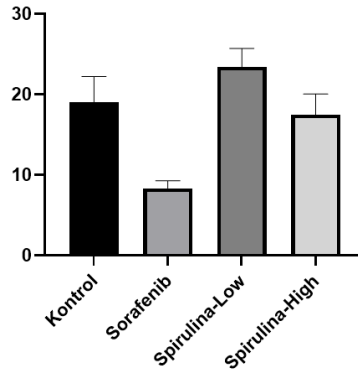
BAX 48 saatlik uygulamaya ilişkin veriler sayısal olarak sunulmamış olmakla birlikte, grafiksel eğilim *BAX* protein düzeylerinde genel bir artışı göstermektedir. Ancak istatistiksel anlamlılık değerlendirmesi yapılmamıştır.



Şekil 4.12 48 saatlik uygulamalarında BAX Protein Düzeyi

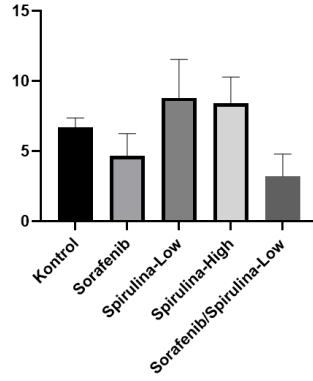
4.4.2 BCL-2 Protein Düzeyi

24 saatlik uygulamada *BCL-2* protein düzeyine ilişkin doğrudan istatistiksel veriler sunulmamıştır. Ancak grafiksel olarak değerlendirildiğinde SOR uygulamasında *BCL-2* düzeyinde belirgin azalma gözlemlenmiştir. *Spirulina* ve kombinasyon gruplarında *BCL-2* düzeylerinin kontrol grubuna daha yakın seyrettiği izlenmiştir.



Şekil3.13 24 saatlik uygulamada BCL-2 protein düzeyi

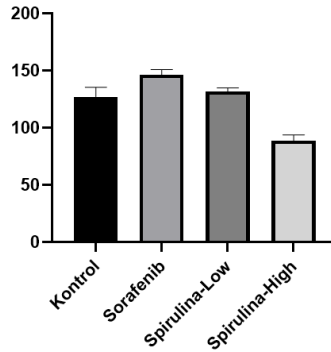
48 saat sonunda özellikle SOR ve SOR + *Spirulina* gruplarında *BCL-2* düzeyinde düşüş devam etmiş; bu da anti-apoptotik etkinin baskılandığını ve apoptotik sürecin desteklendiğini göstermektedir.



Şekil 4.14 24 saatlik uygulamada BCL-2 protein düzeyi

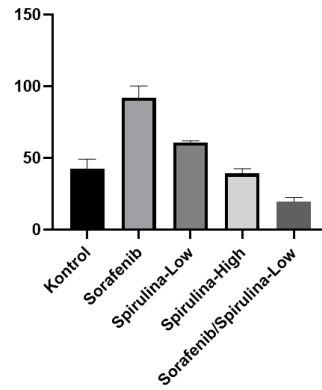
4.4.3 CASP3 Protein Düzeyi

CASP3 protein düzeyinde 24 saat sonunda *Spirulina* ve kombinasyon gruplarında artış eğilimi gözlenmiş, SOR grubunda ise daha sınırlı bir değişiklik oluşmuştur. Bu artış apoptotik mekanizmaların erken aktivasyonunu işaret edebilir.



Şekil 4.15 24 saatlik uygulamada CASP3 protein düzeyi

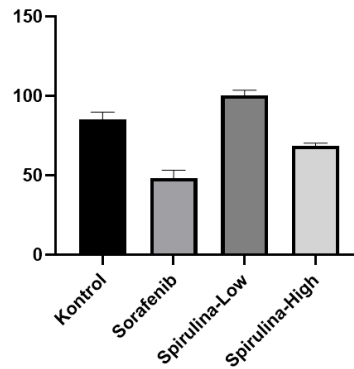
48 saatlik süreçte CASP3 düzeyinde artış daha belirgin hale gelmiştir. Özellikle kombinasyon grubunda yüksek düzeyde ekspresyon tespit edilmiştir. Bu durum, kombinasyonun geç dönemde apoptoz aktivasyonunu güçlendirdiğini düşündürmektedir.



Şekil 4.16 48 saatlik uygulamada CASP3 protein düzeyi

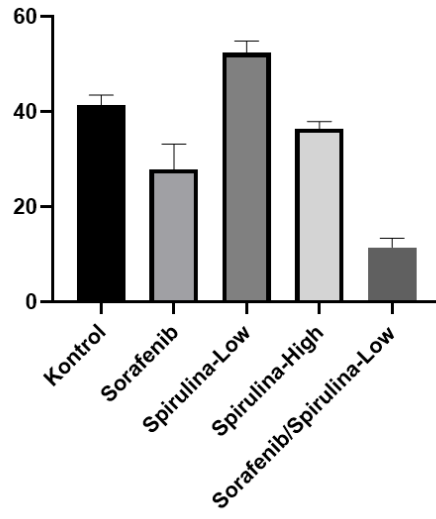
4.3.4 *TNF-α* Protein Düzeyi

24 saatlik uygulamalarda *TNF-α* protein düzeyi *Spirulina* grubunda SOR'e göre anlamlı şekilde artmış; bu da *Spirulina*'nın proinflatuar yanıtı tetiklediğini göstermektedir. Kombinasyon grubunda da *TNF-α* düzeyleri yüksektir.



Şekil 4.17 24 saatlik uygulamalarda *TNF-α* protein düzeyi

48 saat sonunda *TNF-α* düzeyleri genel olarak artış eğilimindedir. *Spirulina* ve kombinasyon uygulamaları SOR'in inflamasyonu baskılayıcı etkisini dengelemiş görünmektedir. Bu sonuçlar *Spirulina*'nın bağışıklık sistemini uyarıcı etkisini desteklemektedir.



Şekil 4.18 48 saatlik uygulamalarda TNF- α protein düzeyi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

HSK, yüksek mortalite oranları, geç teşhis edilme eğilimi ve mevcut tedavilere karşı gelişen direnç mekanizmaları nedeniyle global düzeyde önemli bir sağlık problemi oluşturmaktadır. Bu bağlamda, özellikle hedefe yönelik ajanlar ve doğal ürünlerin kombinasyonları, daha etkili ve toksikitesi azaltılmış tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından dikkat çekmektedir (Llovet 2008, Wilhelm 2004).

Bu çalışmada, SOR ve *Spirulina platensis* ekstraktının HepG2 hücreleri üzerindeki sitotoksik, genotoksik ve gen ekspresyon düzeyinde oluşturduğu etkiler detaylı olarak değerlendirilmiştir. Bulgular, kombinasyon tedavisinin hem hücre canlılığı hem de apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonu üzerinde anlamlı etkiler oluşturduğunu göstermiştir.

MTT testi bulgularına göre, *Spirulina platensis*'in doza bağlı olarak sitotoksik etkiler oluşturduğu ve hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. Özellikle yüksek konsantrasyonlarda bu etkinin belirginleştiği görülmüştür. SOR de benzer şekilde doza bağlı olarak hücre canlılığını anlamlı ölçüde azaltmış, bu etkinin 48 saatlik inkübasyon süresinde daha da belirginleştiği gözlemlenmiştir. Kombinasyon gruplarında bu azalma daha da ileri düzeyde gerçekleşmiş, özellikle düşük doz *Spirulina* ile kombine edilen SOR grubunda hücre canlılığı üzerinde sinerjistik bir azalma meydana gelmiştir (Wilhelm 2006).

Bu bulgular, literatürde daha önce EGCG (Epigallocatechin gallate) gibi doğal bileşiklerle yapılan SOR kombinasyonlarının VEGF ve mikrodamar yoğunluğunu azalttığını ortaya koyan çalışmalarla da uyumludur (Irawan 2020).

Komet Test sonuçları, özellikle SOR grubunda anlamlı DNA hasarı oluştuğunu ve bu etkinin zamanla arttığını göstermiştir. *Spirulina*'nın yüksek dozu da DNA hasarını artırmış olsa da, bu hasar SOR grubuna göre daha sınırlı düzeyde kalmıştır. Kombinasyon gruplarında DNA hasar düzeylerinin SOR'e kıyasla azaldığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular, *Spirulina*'nın reaktif oksijen türlerini nötralize ederek hücre içi oksidatif stresi

azaltılabileceğini ve böylece DNA'nın korunmasına katkı sağlayabileceğini destekleyen çalışmalarla paralellik göstermektedir (Lu 2010, Abdel-Daim 2013, Agarwal 2014).

Gen ekspresyon analizlerinde, apoptozla ilişkili *BAX* ve *CASP3* genlerinin düşük doz *Spirulina* grubunda anlamlı şekilde arttığı görülmüştür. Bu artışlar, mitokondriyal apoptotik yolun aktive edildiğini göstermekte; *Spirulina*'nın *BAX* üzerinden mitokondri zar geçirgenliğini artırarak sitokrom C salınımını başlattığını ifade eden çalışmalarla örtüşmektedir (Dasgupta 2014). *CASP3* ekspresyonunun kombinasyon grubunda en yüksek düzeye ulaşması, *Spirulina*'nın SOR ile birlikte apoptozu sinerjik biçimde artırabileceğini göstermektedir.

İlginç şekilde, *BCL-2* gen ekspresyonunun kombinasyon grubunda artış göstermesi, bazı hücrelerde hayatta kalma sinyallerinin aktive edildiğini ve apoptoza karşı bir tür hücresel dengeleme (kompansasyon) mekanizmasının devreye girmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Öte yandan, *TNF-α* ekspresyonu düşük doz *Spirulina* grubunda anlamlı şekilde artarken, kombinasyon gruplarında bu artışın baskılandığı gözlemlenmiştir. Bu durum, *Spirulina*'nın proinflatuar yanıtı artırmasına karşın, kombinasyon tedavisinin bu etkiyi dengelediğini göstermektedir. Bu durum, *Spirulina*'nın anti-inflatuar etkisinin gen düzeyinde de kendini gösterdiğini ve SOR'in olası inflamatuvar yan etkilerini baskılayabileceğini göstermektedir (Abdel-Daim 2013).

ELISA analizleri de qRT-PCR bulgularını desteklemiş; *TNF-α* protein düzeylerinin özellikle SOR + düşük doz *Spirulina platensis* grubunda anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiştir. *BAX* ve *CASP3* protein düzeylerindeki artışlar, apoptotik sürecin caspaz bağımlı olarak aktive edildiğini; *BCL-2* düzeylerindeki azalma ise anti-apoptotik sinyallerin baskılandığını ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, kombinasyonun hem apoptozu indükleyici hem inflamasyonu baskılayıcı çift yönlü etkisini vurgulamaktadır.

Genel olarak bu çalışma, *Spirulina platensis*'in SOR ile birlikte kullanıldığında terapötik etkileri artırabileceğini göstermektedir. *Spirulina*'nın antioksidan, anti-inflatuar ve

apoptoz indükleyici özellikleri; SOR'in toksik etkilerini azaltırken antikanser etkinliğini artırıcı yönde tamamlayıcı bir rol üstlenmektedir. Ayrıca bu kombinasyonun, sağlıklı hücrelerde daha düşük toksisite profili oluşturabileceği de önemli bir avantajdır.

Ancak, çalışmanın yalnızca *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmiş olması, bulguların doğrudan klinik uygulamalara aktarılmasını sınırlamaktadır. Bu nedenle, elde edilen sonuçların geçerliliği ve klinik anlamı, ileri *in vivo* çalışmalarla desteklenmeli; doz-zaman optimizasyonları, farklı hücre hatlarında testler ve uzun dönem etkiler üzerine yeni araştırmalar yapılmalıdır.

5.1 Gelecekteki Çalışmalar için Öneriler

In vivo modellerde SOR ve *Spirulina* kombinasyonlarının etkinliğini ve güvenliğini araştırmak, klinik uygulamalara geçişte önemli bir adımdır.

Bu kombinasyonun farklı kanser türlerindeki etkileri, genel tedavi yaklaşımlarını geliştirmek için değerlendirilebilir.

Spirulina'nın bireysel bileşenlerinin (örneğin fikosiyanın veya klorofil) SOR ile kombine etkileri, terapötik etkinlik açısından ayrıntılı şekilde incelenmelidir. Bulguların daha ileri düzeyde doğrulanabilmesi için *in vivo* modellerde ve klinik çalışmalarda bu kombinasyonların etkilerinin araştırılması önerilmektedir. Ayrıca, bu kombinasyonların farklı kanser türlerindeki etkilerinin incelenmesi, elde edilen sonuçların genellenebilirliği açısından değerli bilgiler sağlayabilir.

5.2 Sonuçlar

Bu çalışmada, HSK tedavisinde yaygın olarak kullanılan SOR'in, mikroalg kökenli doğal bir bileşik olan *Spirulina platensis* ile birlikte kullanımının HepG2 hücre hattı üzerindeki antikanser etkileri detaylı şekilde incelenmiştir. Deneysel analizler, hem tekli hem de kombinasyon tedavilerinin hücre canlılığı, gen ekspresyonu ve DNA hasarı üzerindeki etkilerini kapsamlı biçimde ortaya koymuştur.

MTT testi bulguları, SOR ve *Spirulina*'nın ayrı ayrı ve özellikle birlikte uygulandığında, doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını anlamlı şekilde azalttığını göstermiştir. Düşük doz *Spirulina*'nın bile belirgin bir sitotoksik etki göstermesi, bu mikroalg bileşiğinin sahip olduğu biyoaktif içeriğin güçlü antiproliferatif potansiyel taşıdığını ortaya koymaktadır.

Komet test analizleri, SOR'in tek başına uygulandığında DNA hasarını artırdığını göstermiştir. *Spirulina*'nın yüksek doz uygulamaları genotoksisiteyi artırsa da, düşük doz *Spirulina* + SOR kombinasyonu, DNA hasar düzeyini anlamlı şekilde düşürmüştür. Bu sonuçlar, *Spirulina*'nın antioksidan kapasitesinin SOR'in neden olduğu DNA hasarını baskılayabileceğini düşündürmektedir.

Gen ekspresyon analizleri, apoptotik süreçte görev alan *BAX* ve *CASP3* genlerinin, düşük doz *Spirulina* ile SOR'in birlikte uygulandığı grupta anlamlı düzeyde arttığını ortaya koymuştur. Bu bulgular, kombinasyon tedavisinin apoptoz mekanizmalarını aktif hale getirerek kanser hücrelerini hedef aldığını göstermektedir. *BCL-2* geninde yalnızca kombinasyon grubunda gözlenen artış, hayatta kalma sinyallerinin bir kısmının devam ettiğine işaret edebilirken, *TNF- α* ekspresyonundaki artış, inflamatuvar sürecin de eşzamanlı aktive olduğunu ortaya koymaktadır.

ELISA analizleriyle desteklenen bu bulgular, SOR + düşük doz *Spirulina* kombinasyonunun *TNF- α* düzeylerini baskılayarak inflamasyonu azalttığını ve *CASP3* protein düzeylerini artırarak kontrollü apoptoz sürecini desteklediğini göstermiştir.

Elde edilen veriler ışığında, SOR ve *Spirulina platensis* kombinasyonunun HSK hücrelerinde:

Hücre proliferasyonunu baskıladığı,

DNA hasarını doza bağlı olarak artırabildiği veya azaltabildiği,

Apoptotik gen ve proteinleri aktive ettiği,

İnflamatuvar yanıtları düzenleyebildiği bulgularına ulaşılmıştır.

Sonuçlar, düşük doz *Spirulina*'nın SOR'in etkinliğini artırırken toksisiteyi azaltabileceğini göstermekte; bu da *Spirulina platensis*'in doğal bir ajan olarak kemoterapötik ilaçlarla sinerjik etki oluşturma potansiyelini ortaya koymaktadır.

Bununla birlikte, bu verilerin klinik uygulamalara aktarılabilmesi için, ileri düzey *in vivo* çalışmalarla ve geniş ölçekli klinik deneylerle doğrulanması gerekmektedir. Elde edilen bulgular, doğal biyoaktif bileşiklerin hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarında tamamlayıcı ajanlar olarak kullanılabileceğine dair önemli bilimsel kanıtlar sunmaktadır.



6.KAYNAKLAR

- Abou-Alfa G K, Meyer T, Cheng A L, 2018, Cabozantinib in patients with advanced and progressing hepatocellular carcinoma, *The New England Journal of Medicine*, 379(1), 54–63.
- Agarwal R, Tandon A, Malhotra P, 2014, The antioxidant properties of *Spirulina platensis* in experimental models, *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 5(2), 345–350.
- Bruix J, Reig M, Sherman M, 2017, Evidence-based diagnosis, staging, and treatment of patients with hepatocellular carcinoma, *Gastroenterology*, 150(4), 835–853.
- Dasgupta T, Banerjee S, Yadav P K, 2014, Immunomodulatory and antineoplastic properties of *Spirulina platensis*, *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 63(12), 1491–1503.
- Finn R S, Qin S, Ikeda M, 2020, Atezolizumab plus bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma, *The New England Journal of Medicine*, 382, 1894–1905.
- Gauthier A, Ho M, 2013, Targeted therapy for hepatocellular carcinoma: Beyond sorafenib, *World Journal of Hepatology*, 5(4), 421–430.
- Koničková R, Vaňková K, 2014, Anti-cancer effects of blue-green alga *Spirulina platensis*, *Annals of Hepatology*, 13(2), 273–283.
- Kudo M, Finn R S, Qin S, 2018, Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of unresectable hepatocellular carcinoma: A randomized phase 3 non-inferiority trial, *Lancet*, 391(10126), 1163–1173.
- Lee J H, Chung I K, 2016, Anti-cancer effects of marine algae-derived compounds, *Marine Drugs*, 14(1), 20.
- Llovet J M, Ricci S, Mazzaferro V, 2008, Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma, *The New England Journal of Medicine*, 359(4), 378–390.
- Park J W, Chen M, Colombo M, 2021, Integration of systemic therapy with locoregional treatment in hepatocellular carcinoma, *Journal of Hepatology*, 74(1), 101–110.
- Rini B I, 2006, Sorafenib in advanced renal cell carcinoma, *Clinical Cancer Research*, 12(24), 7271–7278.
- Wang Z, Xu D, Liu C, 2019, Synergistic effects of K and natural compounds in hepatocellular carcinoma therapy, *Cancer Letters*, 446, 12–21.

- Wilhelm S M, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet J M, Lynch M, 2004, Preclinical models of hepatocellular carcinoma and the application of sorafenib, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 1, 106–117.
- Özlü T, Bayram B, 2022, Spirulina mikroalginin besinsel özellikleri ve sağlık üzerine potansiyel etkileri, *Akademik Gıda*, 20(3), 296–304.
- Irawan A, Prabowo E, Atmodjo W L, 2022, Anti-angiogenic effect of the combination of low-dose sorafenib and EGCG in HCC-induced Wistar rats, *F1000Research*, 11, 289, 10.12688/f1000research.109142.2.
- Drozdogan H, 2024, HCC tedavisinde yenilikler, *Kanser Araştırma Vakfı*.
- Gauthier A, Ho M, 2013, Targeted therapy for hepatocellular carcinoma: Beyond sorafenib, *World Journal of Hepatology*.
- Kıyıcı M, 2023, Karaciğer kanseri ve tedavi yaklaşımları, *Onkoloji Derneği*.
- Çelekli A, Kahraman S, 2021, Spirulina platensis'in antikanser etkileri, *Biyoteknoloji ve Mikrobiyoloji*.
- Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, 1996, Liver transplantation criteria, *WHO Karaciğer Kanseri Raporu*.

İnternet Kaynakları

- 1- <https://www.kansarastirma.org/hcc-yenilikler>, 12.03.2025
- 2- <https://www.wjgnet.com>, 15.02.2025
- 3- <https://www.onkolojidernegi.org.tr/karaciger-kanseri>, 18.03.2025
- 4- <https://biyoteknoloji.org/spirulina-etkiler>, 08.01.2025
- 5- <https://www.who.org/transplantation-liver>, 05.02.2025

