



TC

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

İNSAN HEPATOSELLÜLER KANSER HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
TARANTULA CUBENSİS EKSTRESİNİN ANTİTÜMÖR
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

DR. ÖZGÜR KURTKULAĞI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

2022

BOLU



TC

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

İNSAN HEPATOSELLÜLER KANSER HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
TARANTULA CUBENSİS EKSTRESİNİN ANTİTÜMÖR
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

DR. ÖZGÜR KURTKULAĞI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI - DOÇ. DR. OĞUZ ÇATAL

2022

BOLU

ETİK İLKELERE UYULDUĞUNA İLİŞKİN BEYAN

Tıpta uzmanlık tezi olarak sunduğum “**İnsan Hepatosellüler Kanseri Hücresinde Tarantula Cubensis Ekstresinin Antitümör Etkinliğinin Araştırılması**” başlıklı çalışmanın yazılmasında bilimsel ve etik kurallara uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda atıfta bulunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin tamamının ya da bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitede bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

01/08/2022

Dr. Özgür KURTKULAĞI

	BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI	DOKÜMAN KODU: ASS. FR.06
		YAYIN TARİHİ:11.06.2020
		REVİZYON NO 00
		REVİZYON TARİHİ:00
	TEZ ONAY BELGESİ	SAYFA NO:01

Adayın Adı Soyadı : Özgür KURTKULAĞI

Anabilim Dalı/Bilim Dalı : Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Tezin Başlığı : İnsan Hepatosellüler Kansere Hücresel Kültüründe Tarantula
Cubensis Ekstresinin Antitümör Etkinliğinin Araştırılması

Tezin Danışmanı : Doç. Dr. Oğuz ÇATAL

Tezin Savunma Tarihi : 01/08/2022

Jüri Başkanı Prof. Dr. Mehmet Hayri ERKOL

Üye Prof. Dr. Mevlüt PEHLİVAN

(Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı)

Üye Prof. Dr. Mustafa ŞİT

DEKANLIK ONAYI

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Muhammet Güzel KURTOĞLU

DEKAN V

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, cerrahi nosyon edinmemde büyük pay sahibi olan başta Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. M. Hayri ERKOL ve hekim olmaktan önce insan olma duygusunu aşıl原因an Prof. Dr. Nuri Aydın KAMA'ya,

İhtisas sürem boyunca bilgi ve becerilerimin gelişmesinde her türlü gayreti gösteren, sabırla destek veren ve gece gündüz ayrımı olmaksızın bilgi ve tecrübelerini paylaşan, bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan Prof. Dr. Mustafa ŞİT'e,

Uzmanlık eğitimimde ve tezimin hazırlanmasından bitimine kadar yardımlarını esirgemeyen, asistanlık eğitimim boyunca çok şey öğrendiğim başta tez danışmanım Doç. Dr. Oğuz ÇATAL olmak üzere Doç. Dr. Bahri ÖZER ve Prof. Dr. Neriman ŞENGÜL'e çok teşekkür ederim.

2022.08.11.1539 no'lu projemize finansal destek sağlayan B.A.İ.B.Ü. BAP koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, gece gündüz mesai paylaşımı yaptığım ve bu noktaya gelmemde hocalarımdan sonra büyük pay sahibi olan şu an uzman olarak görev yapmakta olan Ferdi BOLAT olmak üzere tüm kıdemlilerime ve asistan arkadaşlarıma,

Asistanlık eğitimimin başından bu yana Genel Cerrahi Kliniği'nde birlikte çalışma imkânı bulduğum tüm hemşire ve personellere, hastanemiz poliklinik ve ameliyathane ekibine,

En önemlisi bu günlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, iyi günde kötü günde yanımda olan, beni bu tezi yazabilecek sonsuz desteğini, sevgi ve saygısını kalbim ve ruhumda hissettiğim sevgili eşim, okyanus gözlüm Dr. Öğr. Üyesi Özge KURTKULAĞI'na ve bu günlere yetiştiren anne ve babama,

En içten dileklerimi ve sonsuz şükranlarımı sunar, teşekkür ederim.

Dr. Özgür KURTKULAĞI

İÇİNDEKİLER

ETİK İLKELERE UYULDUĞUNA İLİŞKİN BEYAN	i
TEZ ONAY BELGESİ.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLO DİZİNİ	vi
ŞEKİL DİZİNİ	vii
KISALTMALAR	viii
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Karaciğer Embriyolojisi	2
2.2. Karaciğer Histolojisi.....	3
2.3. Karaciğer Anatomisi	3
2.3.1.Temel Anatomi	3
2.3.2.Fonksiyonel Anatomi.....	4
2.4. Hepatosellüler Kanser Epidemiyolojisi	7
2.4.1.Global İnsidans.....	7
2.4.2.Hepatosellüler Kanser Etyolojisi ve Risk Faktörleri.....	8
2.4.3.Tümör Biyolojisi.....	11
2.4.4.Hepatosellüler Kanser'in Oluşum ve Genetiği.....	22
2.4.5. HSK'nın Tanı, Tarama ve Tedavisi	24

2.4.5.1. Alfa FetoProtein	24
2.4.5.2. Tanıda Görüntülemenin Rolü.....	25
2.4.5.3. Tanıda Biyopsinin Rolü.....	27
2.4.5.4. Tanıda Amerikan Karaciğer Hastalıkları Çalışma Grubu Kılavuzu...	28
2.4.5.5. Tanıda Avrupa Birliği Karaciğer Çalışma Grubu (EASL) Kılavuzu...	28
2.4.5.6. HSK'nın Evrelemesi.....	29
2.4.5.7. TNM Evreleme Sistemi.....	30
2.4.5.8. HSK'nın Tedavisi.....	32
2.4.5.8.1.Küratif Tedavi Yöntemleri.....	33
2.4.5.8.2.Non-Küratif Tedavi Yöntemleri.....	37
2.6. Tarantula Cubensis	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM	46
4. BULGULAR.....	50
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
7. KAYNAKLAR	66

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Hepatoselüler Kanser TNM evreleme sistemi.....	31
Tablo 2. Child –Turcotte -Pugh sınıflandırması.....	33
Tablo 3. HepG2 hücre hattında TCE’nin doz ve zamana göre absorbans değerleri.....	50
Tablo 4. HepG2 hücre hattında 24-48-72. saat TCE’nin uygulaması sonrası % hücre canlılığı	51
Tablo 5. 24 saat için 5 µg/ml, 48 ve 72 saat için 1 µg/ml TCE ile inkübe edilmiş HepG2 hücrelerinde Ki-67 H-SKOR değerleri	54
Tablo 6. 24. saatte 5 µg/ml doz TCE uygulanan HepG2 hücre hattı ile Kontrol grubunun Ki-67 immunhistokimya boyanma verilerinin değerlendirilmesi	55
Tablo 7. 48. saatte 1 µg/ml doz TCE uygulanan HepG2 hücre hattı ile Kontrol grubunun Ki 67 immunboyanma verilerinin değerlendirilmesi	55
Tablo 8. 72. saatte Tarantula Cubensis 1 µg/ml dozu ile Kontrol grubunun hayatta kalma verilerinin değerlendirilmesi	56
Tablo 9 Verilen ilaç gruplarına göre farklı zamanlarda ki-67 ile boyanan hücre sayıları	56

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Karaciğerin ligamentleri .	4
Şekil 2. Karaciğerin segmental anatomisi .	5
Şekil 3. Apoptozun iç ve dış yolak tarafından aktivasyonu.	17
Şekil 4.. Hepatokarsinogenezin çok aşamalı sürecinin şematik temsili	22
Şekil 5.. LIRADS sınıflaması şematik gösterimi	26
Şekil 6. EASL kılavuzundaki tanı algoritması.	29
Şekil 7. Barcelona Klinik Karaciğer Kanseri Evreleme ve Tedavi Algoritması.	30
Şekil 8.HepG2 hücresi için farklı doz ve saatlerdeki TCE uygulamasının MTT sonuçları	52
Şekil 9. HepG2 hücre hattında TCE'nin etkin dozları 1 ve 5 µg/ml olarak belirlendikten sonra bu dozlar ile 24. saat MTT canlılık-doz oranı logaritmik grafik immunhistokimya çalışması.	52
Şekil 10. HepG2 hücre hattında TCE'nin etkin dozları 1 ve 5 µg/ml olarak belirlendikten sonra bu dozlar ile 48. saat MTT canlılık-doz oranı logaritmik grafik immunhistokimya çalışması	53
Şekil 11. HepG2 hücre hattında TCE'nin etkin dozları 1 ve 5 µg/ml olarak belirlendikten sonra bu dozlar ile 72. saat MTT canlılık-doz oranı logaritmik grafik immunhistokimya çalışması.	53
Şekil 12. Ki-67 immunoreaktiviteleri.	57

KISALTMALAR

HSK	: Hepatoselüler kanser
HBV	: Kronik Hepatit B
HCV	:Kronik Hepatit C
TC / TCE	: Tarantula Cubensis / Tarantula Cubensis Ekstresi
VCI	: Vena Kava İnferior
APC	: Yıllık Yüzde Değişim
NAYKH	: Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı
NASH	: Non Alkolik Steatohepatiti
AFB 1	: Aflatoksin B1
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
AIDS	: Edinsel Bağışıklık Yetmezliği Sendromu
AIF	: Apoptoz İndükleyici Faktör
ASP	: Substratlarının Aspartik Asit
IHC	: İmmünohistokimyası
AML	: Lösemik blastik hücreler
P53	: Tümör Proteini P53
PTEN	: Fosfataz Ve Tensin Homologu
AXIN	: Axin 1
RB1	: Retinoblastoma Transkripsiyonel Çekirdek Baskılayıcı
FNH	: Fokal Nodüler Hiperplazi
DKP	: Des-Gama-Karboksi Protrombin

AFU	: Alfa-1 Fukosidaz
TGF – B1	: Transforming büyüme faktörü-B1
GP73	: Golgi Protein 73
PIVKA II	: Vitamin K İle İndüklenen Protrombin
USG	: Ultrasonografi
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
AFP	: Alfa Fetoprotein
AASLD	: Amerikan Karaciğer Hastalıkları Araştırma Derneği
EASL	: Avrupa Karaciğer Hastalıkları Araştırma Derneği
LI-RADS	: Karaciğerin Radyolojik Görüntüleme ve Raporlama Sistemi
ECOG	: Kansere Bağlı Semptom Varlığı
CUPI, CNLC	: Çin Karaciğer Kanseri Evreleme Sistemi
CLIP	: İtalyan Karaciğer Programı
BCLC	: Barcelona Klinik Karaciğer Kanseri Evreleme Ve Tedavi Algoritması
AHPBA	: Amerika Hepato Pankreato Biliyer Derneği
AJCC	: Amerikan Ortak Kanseri Komitesi
TAE	: Transarterial Embolizasyon
TACE	: Transarterial Kemoembolizasyon
TARE	: Transarterial Radyoembolizasyon
UICC	: Uluslararası Kanseri Kontrolü Birliği
RF / RFA	: Radyo Frekans / Radyo Frekans Ablasyon

ÖZET

Amaç: İnsan Hepatoseller Kanseri Hücresi Hattı(HepG2) üzerinde Tarantula Cubensis Ekstresinin Ki-67 ekspresyonunu supresyon etkisi üzerinden antitümöral etkinliğinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada HepG2 hücreleri kullanıldı.Kontrol grubunda HepG2 hücre hattı ve Tarantula Cubensis Ekstresinin(TCE) uygulandığı HepG2 hücre hattı olarak iki grup oluşturuldu. Öncelikle HepG2 hücre hattı üzerine etkin TCE sitotoksik ve IC50 dozu MTT yöntemi ile belirlendi. Daha sonra MTT yöntemi ile belirlenen IC50 dozlarında TCE'nin HepG2 hücre hattında immunboyama ile Ki-67 ekspresyonunu supresyon etkinliği ölçüldü.

Bulgular: HepG2 hücre hattında MTT testi ile TCE'ni IC50 dozları 24 saat bekleme sonrası 5µg/ml ,48 saat ve 72 saat bekleme sonrası ise 1µg/ml olarak saptanmıştır. İmmunboyama neticesinde 24. saatde kontrol grubunda HepG2 hücrelerinde Ki-67 %75 saptanırken , 5µg/ml doz TCE'nin Ki-67 ekspresyonunu supresyon oranı %48olduğu görülmüştür.48. saat kontrol grubunda immunboyama ile Ki-67 %90 saptanırken , 1µg/ml TCE uygulanan grupta Ki-67 ekspresyon supresyonu %35 olduğu saptanmıştır.72. saat kontrol grubunda immunboyama ile Ki-67 %92 saptanırken , 1µg/ml TCE uygulanan grupta Ki-67 ekspresyon supresyonu %42 olduğu saptanmıştır

Sonuç: Tarantula Cubensis Ekstresinin HepG2 hücre hattında Ki-67 ekspresyonunu 24. saatde 5µg/ml dozda, 48 ve 72. saatlerde ise 1µg/ml dozda HepG2 hücre hattında Ki-67 ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı derecede baskıladığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Tarantula Cubensis Ekstresi, Hepatosellüler Kanseri,Ki-67,HepG2 Hücre Hattı, İmmunboyama, MTT testi,IC50.

ABSTRACT

Background: It is aimed to find out the antitumoral activity of Tarantula Cubensis Extract by suppressing Ki-67 expression on Human Hepatocellular Cancer Cell Line (HepG2).

Material and Methods: HepG2 cells were used in this study. Two groups were formed as HepG2 cell line in the control group and HepG2 cell line to which Tarantula Cubensis Extract (TCE) was administered. First of all, effective TCE cytotoxic and IC50 dose on HepG2 cell line were determined by MTT method. Then, the suppressive efficiency of Ki-67 expression was measured by immunostaining of TCE in HepG2 cell line at IC50 doses determined by MTT method.

Results: With the MTT test in HepG2 cell line, the IC50 doses of TCE were determined as 5µg/ml after waiting 24 hours, 1µg/ml after waiting 48 hours and 72 hours. As a result of immunostaining, Ki-67 was detected 75% in HepG2 cells in the control group at the 24th hour, while the suppression rate of Ki-67 expression of 5µg/ml dose TCE was 48%. In the 48th hour control group, 90% of Ki-67 was detected by immunostaining, while the suppression of Ki-67 expression was 35% in the group treated with 1µg/ml TCE. While Ki-67 was detected 92% in the 72th hour control group, the Ki-67 expression suppression was found to be 42% in the 1µg/ml TCE applied group.

Conclusion: It was observed that Tarantula Cubensis Extract has statistically suppressed Ki-67 expression in HEPG2 cell line in 24 hours at a dose of 5µg/ml and in 48-72 hours at a dose of 1µg/ml.

Keywords: Tarantula Cubensis Extract, Hepatocellular Cancer, Ki-67, HepG2 Cell Line, Immunostaining, MTT test, IC50.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hepatoselüler kanser (HSK) karaciğerin yetişkinlerde görülen en sık primer malign tümörüdür. HSK, kansere bağlı morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenidir. Erkeklerin kadınlara küresel HSK insidans oranı 2,8:1'dir (1). Kadınları etkileyen en yaygın dokuzuncu kanser olmasına rağmen, yüksek ölüm oranını vurgulayarak kadınlarda kansere bağlı ölümlerin dördüncü önde gelen nedeni olduğu tespit edilmiştir (2).

HSK için risk faktörü olarak kronik hepatit B (HBV) ve hepatit C (HCV), alkol bağımlılığı, metabolik karaciğer hastalığı (özellikle alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı) aflatoksinler ve aristoloşik asit gibi diyet toksinlerine maruziyet sayılabilir (3).

HSK tanılı hastalarda küratif tedavi, sadece erken evre ve karaciğer sentez fonksiyonları iyi olanlarda mümkündür. Primer tedavi cerrahi rezeksiyon olmasına rağmen, çoğu hastada, tümör yaygınlığı veya altta yatan karaciğer fonksiyon bozukluğu nedeniyle küratif tedavi yapılamamaktadır. HSK tedavi yöntemi seçiminde, tümör evresi ve altta yatan karaciğer hastalığının derecesi belirlenerek hareket edilir (4).

Tarantula örümceği ismini İtalya'daki Taranto şehrinden alır. Tarantula Cubensis (TC) örümceğinin farklı isimleri bulunmaktadır. Mygale cubensis, Küba tarantula, Aranea pedula, tüylü örümcek ve kahverengi örümcek bu isimlerindendir. Güney Karolina, Teksas ve Küba'da bulunan büyük, koyu kahverengi ve zehirli bir örümcektir (5). TC zehrinin antiinflamatuvar, antitümöral, nekrotizan ve yara iyileşmesi gibi çok fazla tedavi edici etkisi klinik çalışmalarda gösterilmiştir. Bu zehir sık olarak klinik veterinerlikte kutanöz papillomatoz, endometrit, ayak ve ağız lezyonları, köpek tümörlerinin büyümesini engellemede, enflamasyonu ve tarsal bursit boyutunu azaltmada ve bunlardan başka kutanöz yaralarda epitelizasyonu uyarmada etkili olduğu litataturde yayınlanmıştır (6).

Biz de insan hepatosellüler kanser hücreleri üzerine TC ekstresinin antitümör etkinliğini araştırmayı planladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Karaciğer Embriyolojisi

İnsan embriyolojik döneminin dördüncü haftasının başında, ön barsağın endoderminde hepatik divertikül vasıtasıyla tomurcuklanma oluşturularak karaciğer, safra kesesi ve safra kanallarının oluşumu başlar. Bu alanda vitellin ve umbilikal venler ile bağlantılı bir kapiller damar ağı oluşturur. Parankim hücreleri hepatik divertikülden çoğalarak septum transversum'un mezenkimine ulaşır (7).

Mesenterium ventralinden karaciğerin viseral peritonu oluşmaktadır. Mezenterium ventrale'nin iki yaprağı arasında büyüyen karaciğer tomurcuğu ikiye bölünür. Tomurcuğun üst bölümünden primordium hepatikum (ilkel karaciğer), alt bölümünden safra kesesi ve sap şeklindeki bölümünden de duktus sistikus gelişir (8).

Karaciğerin hepatik hücre kordonları ve intrahepatik safra kanalları, endodermden gelişen ve çoğalan hücreler tarafından oluşturulur. Karaciğerin fibröz ve hematopoetik dokusu ile Kupffer hücreleri septum transversum'un mezenşimal bölümünden olgunlaşır (7). Embriyolojik hayatın 5.-10. haftaları arasında gelişen karaciğer, özellikle karın boşluğunun büyük kısmını kaplar. Karaciğeri besleyen oksijenden zengin kan, anneden gelen vena umbilikalıs yolu ile temin edilir. Oksijenden zengin kanın miktarı, karaciğerin gelişiminde ve fonksiyonel segmentasyonunun oluşmasında önemlidir.

Karaciğer fonksiyonlarından biri olan hematopoez, embriyolojik hayatın 6. haftasında başlar. Karaciğer hücrelerinden safra üretimi, embriyolojik hayatın 12. haftasında başlar (7). 13. haftadan itibaren koledok vasıtası ile duodenum'un 2. bölümü olan, inen bölümüne boşaltılır (7, 9).

2.2 Karaciğer Histolojisi

Karaciğerin fonksiyonel hücrelerine hepatosit denir. Hepatositler karaciğerde, endokrin ve ekzokrin fonksiyonları sağlarlar. Safrayı üreten ve salgılayan hepatositler Disse aralığı (perisinüzoidal boşluk) sayesinde karaciğer sinüzoidlerinin endotelial hücrelerinden ayrılır. Disse mesafesinde yağ depolayan yıldız şeklinde tanımlanan İto hücreleri (hepatik stellat hücreler) vardır. Karaciğer parankimindeki perisinüzoidal boşlukta bulunan stromal hücreler olan hepatik stellat hücreler, kronik hepatit, karaciğer fibrozu ve sirozun karaciğer kanserine ilerlemesinde rol oynayan ana hücrelerdir. İto hücreleri ve HSK hücreleri arasındaki etkileşim, tümör büyümesine, metastaza, anjiyogeneze ve sitokinler tarafından immünosupresyona katkıda bulunur (10). Kupfer hücreleri, sinüzoidlerin lümene bakan yüzünde bulunan ve fagositik özelliği olan makrofaj hücreleridir (11).

Karaciğerin 6 köşeli fonksiyonel ünitlerine hepatik lobül denir. Her bir lobülün ortasında vena centralis denilen bir ven bulunur. Üç lobülün komşu köşelerinde kalan alana portal alan (capsula fibrosa perivascularis) denir ve portal alanda; vena porta hepatis ile arteria hepatica propria'nın bir dalı, safra kanalı, lenf damarı ve sinir bulunur (12).

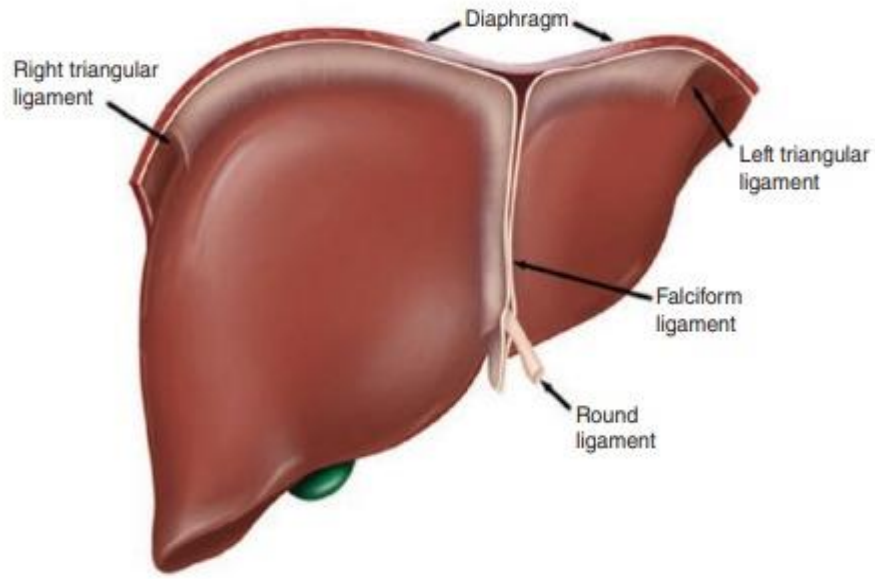
2.3 Karaciğer Anatomisi

2.3.1 Temel Anatomi

Karaciğer, abdomende sağ üst kadranda yerleşir. Dördüncü ve altıncı interkostal aralıklar arasına yerleşiktir. Midklaviküler hattın arcus kostaya uzanır. İnférieur komşuluğunda duodenum, transvers kolon, böbrek ve sürrenal bez bulunur. Medial komşuluğunda ise özofagus ve mide vardır. Diyafragma karaciğeri üstten sınırlar. İnsan vücudunun deriden sonra en büyük organı karaciğerdir.

Karaciğerin posterior yüzeyi vena kava inferiorun üzerine oturmuştur. Karaciğer yüzeyindeki peritoneal duplikasyonlar, ligamanlar olarak bilinir. Diyaframatik taraftaki koroner ligaman, bunun her iki kenardaki sınırlarının sağ ve sol triangüler ligamanlar oluşturur. Koroner ligamanın tam ortasından falciform ligaman çıkar ve anteriora doğru karaciğer

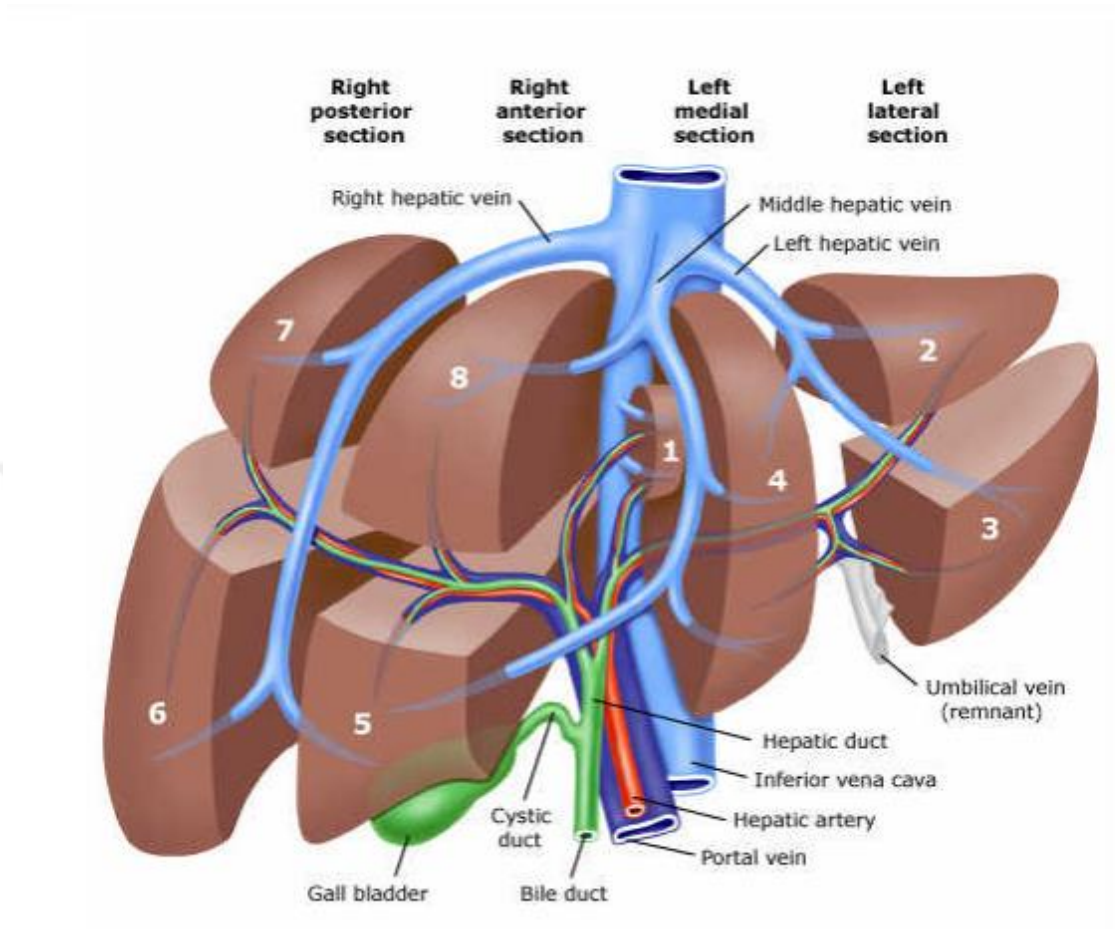
yüzeyini diyafragma, karın duvarı ve umblikusa bağlayan ince bir membran olarak uzanmaktadır (Şekil 1) (13).



Şekil 1: Karaciğerin ligamentleri

2.3.2 Fonksiyonel Anatomi

Karaciğer falsiform ligament sayesinde sol ve sağ loblara bölünmüştür. Bu tanımlama, kolay olmasının yanında karaciğer kanlanmasına göre anatomik olarak yanlıştır Karaciğerin fonksiyonel anatomisi 8 segmentten oluşmaktadır (Şekil 2) (14). Bu segmentlerden her biri bir portal ven, hepatik arter ve safra kanalından oluşan tek bir portal triaddan (pedikül) beslenir.



Şekil: 2: Karaciğerin segmental anatomisi

Bu segmentler kendi içlerinde üç ana hepatik veni içeren sulkuslar tarafından bölünerek dört sektör halinde daha ileri seviyede ortaya konulur. Bu dört sektör sağ ve sol karaciğer içinde daha da organize olur. Bu sistem 1957 yılında ilk haliyle Goldsmith ve Woodburne ve eş zamanlı olarak Couinaud tarafından tanımlanmıştır (15).

Karaciğerin gerçek sağ ve sol lobu kabaca eşit boyutlarda olup yanlış bilinenin aksine falciform ligament tarafından değil de safra kesesi yatağı ile inferior vena cava oluğu arasında uzanım gösterdiği varsayılan bir sulkus tarafınca birbirinden ayrılır ve bu sulkus Cantlie hattı olarak isimlendirilir. Ortak hepatik ven bu hattın medialindedir (12, 16).

Sağ karaciğer, sağ hepatik veni içeren sağ sulkus tarafından anterior (segment 5 ve 8) ve posterior (segment 6 ve 7) sektörlerine bölünür. Sağ portal pedikül sağ hepatik arter, portal ven ve safra kanalından oluşur. Sağ portal pedikül daha sonra sağ anterior ve sağ posterior pediküllerine ayrılarak anterior ve posterior sektörlerin segmentlerini kanlandırır (17).

Sol karaciğer, alt yüzeyi boyunca umblikal fissür adı verilen bir oluğa sahiptir. Umblikal ven artığı içeren ligamentum teres bu oluğa doğru uzanır. Falsiform ligament umblikal fissür ve ligamentum teres ile devamlılık halindedir. Umblikal fissür bir sulkus değildir ve bir hepatik ven içermez; sol portal ven, hepatik arter ve safra kanalından oluşan sol portal pedikülü içerir. Bu pedikül bu fissür içinde uzanır ve sol karaciğeri beslemek üzere dallanır. Sol karaciğer, sol sulkus tarafından anterior (segment 3 ve 4) ve posterior (segment 2, tek bir segment içeren tek sektör) sektörlerine ayrılır. Sol sulkus ligamentum teresin posteriorunda seyrederek ve sol hepatik veni içerir. Karaciğer hilusunda sağ portal triad karaciğer dokusuna girmeden ve anterior ve posterior sektör dallarını vermeden önce yaklaşık 1 - 1,5 cm ekstrahepatik kısa bir seyir göstermektedir. Sol portal triad ise 3-4 cm'lik uzun bir ekstrahepatik seyir göstermekte olup segment 4'ün tabanı boyunca küçük omentumun üst sınırı olan peritoneal bir kılıf içinde transvers olarak uzanır. Bu bağ dokusu hiler plaka olarak bilinir. Sol portal triadın devamı umblikal fissür içinde anterior ve kaudal yönde ilerleyerek segment 2 ve 3'e doğrudan segment 4'e ise rekürren dallar verir.

Kaudat lob (segment 1) karaciğerin dorsal kısmıdır. Kaudat lob inferior vena cava oluğu, porta hepatis ve ligamentum venozum fissürü ile belirteçleri ile anatomik olarak lokalize edilir (16). Kaudat lob posterior yüzeyi ile Vena Cava Inferioru (VCI) sarmaktadır ve aşağıda sol portal triada yukarıda sol ve ortak hepatik venlere posterior olarak yerleşim gösterir.

Portal ven karaciğer kan akımının %75'ini sağlamaktadır (18). Pankreas boynunun arkasında süperior mezenterik ven ve splenik venin birleşmesi ile oluşur. Karaciğer hilusunda sağ ve sol ana dallara ayrılır. Sol dalı segment 4 tabanı boyunca umblikal fissüre doğru uzanır ve burada segment 2 ve 3'e doğrudan, segment 4'e ise geriye doğru dallarını verir. Sağ portal venin kısa bir ekstrahepatik kısmı vardır. Genellikle anterior ve posterior sektörel dallarına ayrıldığı noktada karaciğere girer.

Portal ven karaciğere gelen kan akımının yaklaşık %70'ini ve oksijenin %40'ını sağlarken hepatik arter bu kan akışının %30'unu ve oksijenin %60'ını sağlar (18). Hepatik arter diyafragmatik hilusun hemen altında aorttan çıkan çölyak truncusun 3 dalından biridir.

3 ana hepatik ven karaciğerin üst arka yüzeyinden VCI'ya doğrudan drene olur. Sağ hepatik ven sağ olukta sağ karaciğerin anterior ve posterior sektörleri arasında ilerler ve sağ karaciğerin büyük kısmını drene ettikten sonra kısa bir ekstrahepatik seyri takiben VCI'ya sağdan drene olur. Sol ve orta hepatik venler sıklıkla intrahepatik birleşirler ve ayrı da drene olabilmelerine rağmen tek bir damar olarak VCI'nın sol tarafına drene olurlar (12, 19, 20).

2.4.Hepatosellüler Karsinomanın Epidemiyolojisi

HSK, karaciğer kanserinin birincil en sık sebebidir ve tüm vakaların ~%90'ını oluşturur (21, 22). Dünya genelinde beşinci sıklıkta görülen kanserdir ve kanser sebebiyle ölümden üçüncü sırayı alarak, yılda 500.000'den fazla kişinin ölümüne yol açar. HSK insidansı coğrafik bölgeler, etnik gruplar ve cinsiyetler arasında değişiklik gösterir (23, 24).

2.4.1. Global İnsidans

HSK görülme sıklığı dünyada artmaya devam etmektedir (25). 2012 yılında dünya çapında 782.000 vaka olduğu ve bunların %83'ünün dünyanın daha az gelişmiş ülkelerinde tanı aldığı görülmektedir. HSK vakalarının %72'sinin Asya'da, %10'unun Avrupa'da, %8'inin Afrika'da, %5'inin Kuzey Amerika'da ve %5'inin Latin Amerika'da meydana geldiği tahmin edilmektedir (26, 27). Moğolistan en yüksek karaciğer kanseri insidansına sahiptir (100.000'de 93.7), ancak Çin yüksek insidansı (18.3) ve geniş nüfusu nedeniyle en fazla vaka sayısına sahiptir (28).

2000 ile 2018 yılları arasında primer karaciğer kanserli hastalardan oluşan geniş bir veri tabanı çalışmasında, ölüm oranları 2000 ile 2007 yılları arasında (yıllık yüzde değişim [APC] yüzde 1,9) ve 2007 ile 2013 yılları arasında (APC yüzde 2,7) sabit kaldığı görülmüştür. 2013 ile 2016 arasında (APC yüzde 0.1) ve ardından 2016'dan 2018'e düşmeye başladığı görülmüştür (APC -1.5, %95 GA -3.2 ila 0.2) (29). HSK'nın insidans ve mortalite oranları kabaca eşdeğerdir. 2018 yılında, 100.000 kişi yıl bazına oranlarında küresel karaciğer kanseri insidans hızı 9,3 iken, buna karşılık gelen ölüm oranı 8,5'dir (30).

HSK, 2020'de tüm kanserlerin %8,3'ünü oluşturan 905.677 yeni vaka ve 800.000'den fazla ölümle küresel olarak en yaygın beşinci kanser ve üçüncü önde gelen kanser ölüm nedenidir (26).

Bu veriler, coğrafi heterojenliğin öncelikle genetik yatkınlıktan ziyade risk faktörlerine maruz kalma oranındaki ve edinme süresindeki farklılıklarla ilgili olduğunu göstermektedir. Göçmen popülasyonları üzerinde yapılan araştırmalar, birinci nesil göçmenlerin, kendi ülkelerinde bulunan yüksek HSK insidansını yanlarında taşıdıklarını, fakat sonraki nesillerde insidansın azaldığını göstermiştir (31).

2.4.2.Hepatosellüler Kansere Etyolojisi ve Risk Faktörleri

HSK etyolojisinde rol oynadığı bilinen temel risk faktörleri arasında viral nedenler (kronik hepatit B ve hepatit C), alkol ve aflatoksin gibi toksik maddeler, diyabet, yağlı karaciğer hastalığı ve herediter hemokromatozis gibi metabolik durumlar ile primer biliyer siroz ve otoimmün hepatit gibi immünite ile ilişkili durumlar sıralanabilir (32).

HSK prevalansındaki farklılıklar muhtemelen hepatit virüslerine ve çevresel patojenlere maruz kalmadaki bölgesel farklılıklardan kaynaklanmaktadır (26). HSK insidansının, Hepatit B ve C virus enfeksiyonunun yüksek olduğu bölgeler ile yakın ilişkili olduğu belirtilmiştir (33). Hepatit B virüsü taşıyıcılarının sıklığı, HSK insidansının daha yüksek olduğu bölgelerde, insidansı düşük olan bölgelere göre nispeten yüksektir.

Kronik HBV enfeksiyonu, artan HSK riski ile ilişkilendirilmiştir (34). HSK gelişen hastaların çoğunda siroz bulunmaktadır. Ancak kronik HBV olup siroz olmayan hastalarda da HSK gelişebilmektedir (35). Benzer şekilde, HBV enfeksiyonu olanlarda yıllık HSK insidansı, sirozu olmayanlara kıyasla sirozu olan hastalarda daha yüksektir (100 kişi-yılı başına 0.1 vakaya karşılık 3.2) (36).

Siroza ek olarak HBV ilişkili HSK riskini artıran diğer faktörler;

- Yüksek viral yük (yani, HBV DNA seviyeleri $>10^6$ kopya /mL) (37)
- HBeAg pozitifliği (uzamış bir replikasyon fazının göstergesi) (38)
- HBeAg negatif kronik HBV'si olan ve viral yükü düşük olan hastalarda HBsAg düzeyleri >1000 IU/mL (yani, inaktif kronik HBV) (39, 40)
- HBV genotip c (41)
- Erkek cinsiyet (HBsAg pozitif olan hastalar için) (40, 42)
- Viral koenfeksiyon (HCV veya hepatit D virüsü) (43, 44)
- B kan grubu (sadece erkeklerde) (45)
- Ailede HSK öyküsü (46)

HCV enfeksiyonu, HSK riski ile ilişkilendirilmiştir ve kanser, neredeyse yalnızca ileri evre hepatik fibroz veya sirozlu HCV ile enfekte hastalarda gelişir (42, 47). Siroz geliştikten sonra HSK gelişme riskine ilişkin tahminler yılda yüzde 1 ile 4 arasında değişmektedir (48). Amerika Birleşik Devlet’inde HCV, HSK vakalarının yaklaşık üçte birini oluştururken, başarılı tedavi HSK riskini azaltır ancak ortadan kaldırmaz (26).

Siroza ek olarak HCV ilişkili HSK riskini artıran faktörler;

- Genotip 1b (49)
- Viral koenfeksiyon (HBV veya HIV) (50, 51)
- Alkol veya tütün kullanımı (52, 53)
- Metabolik faktörler; Obezite ve diyabetes mellitus (54, 55)

Tayvan'da ulusal bir viral hepatit programı gözetimi altında kronik hepatit B ve C tedavisinin HSK insidansında ve HSK'ye bağlı ölümlerde azalma sağladığı görülmüştür (56).

Metabolik faktörler; HSK riski obez hastalarda ve nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) ve nonalkolik steatohepatiti (NASH) olanlarda çokça artış olduğu kanıtlanmıştır (57). NAYKH'den NASH'a ilerleyip sirozu olan hastalarda tahmini yıllık HSK insidans oranı yaklaşık yüzde 1-2'dir (27). Batı dünyasında obezite ve obeziteye ait komplikasyonların epidemik oranda artıyor olması obeziteyi HSK'nin bir nedeni olarak değerli hale getirmektedir. 11 kohort çalışmanın bir meta-analizinde, obezitesi olan hastalarda karaciğer kanseri riski, normal kilolu hastalarla karşılaştırıldığında obez hastalarda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. NAYKH olan hastalarda obezite ve diyabetes mellitus sıklıkla bir arada bulunur (55). Son veriler çevresel faktörlerin belirlenmesi ile HSK insidansında azalma olacağını göstermektedir.

HSK düşük ve yüksek insidans olan yerlerde erkeklerde kadınlara göre 2-8 kat daha sıktır (58). HSK gelişiminde erkek cinsiyet hakimiyetinin sebebi olarak, seks hormonları küçük bir etkiye sahiptir, erkeklerde ki bu yüksek insidansın esas sebebi olarak HBV enfeksiyonu, siroz, sigara, alkol tüketimi ve sirozda yüksek hepatik DNA sentezi gibi daha fazla risk faktörlerinin erkeklerde daha fazla olması ile ilişkilidir (59). Bununla birlikte erkek cinsiyette HSK riskini arttıran çevresel olmayan risk faktörleri arasında artmış vücut kitle indeksi ve androjenik hormon seviyeleri söylenebilir. Nitekim bu konu ile ilgili Tayvan'dan yapılan

çalışmalarda, HBV ile enfekte erkeklerde artmış testosteron seviyeleriyle HSK arasında doğru orantılı ilişki saptandığı bildirilmiştir (52, 60).

Genel olarak HSK insidansı yaşla beraber artar fakat HSK gelişiminin ylıksek insidans olduğu b6lgelerde daha erken olma eğiliminde olduğu dikkat çekmiştir. 6rneğin bir doğu Afrika 6lkesinde HSK olan hastaların %50'sinin 30 yaşından daha genç olduğu g6r6lm6ştir. Bu durum enfeksiyon yaşı ve hepatit B ile C'nin doğal seyri ile ilişkili olabilir (22).

Sonuç olarak; hepatik viral enfeksiyonlar, çevresel etkenler, alkol kullanımı, sigara içme, genetik metabolik hastalıklar, siroz ve oral kontraseptif kullanımı ile HSK gelişimi yakın ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. HSK vakalarının %44'6nde HBV bulunurken, %21'inde HCV bulunmaktadır. HSK vakalarının %26'sında alkol t6knetimi olduğu g6r6lm6ştir. Sigara içmek HSK oranını %13 artırırken, obezite %9 artırdığı g6zlenmiştir. Diyabetes mellitus bağımsız olarak bir HSK risk fakt6r6 olarak g6r6lmektedir (61). Aflatoksinin HSK vakalarının %4.6-28.2'sinin etyolojisinde rol aldığı g6sterilmiştir ve vakaların çoğu Çin ve G6neydoğu Asya'da g6r6lmektedir (62).

Temel gıda 6r6nlerini (6rneğin mısır) kontamine eden bir mikotoksin olan aflatoksin B1 (AFB 1)'in diyetle alınması, 6zellikle Afrika ve Asya'nın bazı b6lgelerinde (tahıl aflatoksin testinin daha az yapıldığı yerlerde) HSK ile ilişkilendirilmiştir (63). Kronik olarak AFB1'e maruz kalmış HSK hastalarında p53 t6m6r baskılayıcı gen mutasyonları g6sterilmiştir. HBV ve aflatoksinlere maruz kalan laboratuvar hayvanlarında, p53 mutasyonlarının g6zlendiği hepatokarsinogenez modellerinde de benzer bulgular g6sterilmiştir (64). Yapılan bir metanalizde tek başına AFB 1'in HSK riskini 6 kat arttırdığı tespit edilmişken, AFB 1'in HBV enfeksiyonu olanlarda maruziyeti HSK riskini 11 kat arttırdığı g6zlemlenmiştir (62).

Aristol6şik asit, Aristolochia ve Asarum gibi Çin bitkisel ilaçlarında etkili bir bileşen olan bir nitrofenantren organik asit bileşiğidir. Aristol6şik asit içeren bu bitkiler G6ney Brezilya ve Hindistan'da yaygındır ve bunların yaprak veya sap içeren m6stahzarları geleneksel olarak anti-inflamatuar, idrar s6kt6r6c6 ve anti-toksik panzehir olarak kullanıldığı bildirilmiştir (65). Aristol6şik asitin, t6t6n, ultraviyole ışığı ve diğer kanserojenlerden daha fazla mutasyona neden olduğu ve aristol6şik asit ile karaciğer kanseri arasındaki korelasyonu g6sterilmiştir (66).

2.4.3. Tümör Biyolojisi

Hücre döngüsü, genetik materyalin kopyalanarak bölünme sonucu oluşturulan yeni hücrelere eşit olarak dağıtıldığı hücresel ve moleküler bir dizi olaydan oluşan döngüdür. Bu döngü birbiriyle bağlantılı dört süreçten meydana gelir;

- 1- Hücre büyümesi
- 2- DNA replikasyonu
- 3- Kromozomların yeni hücrelere dağılması
- 4- Hücre bölünmesi

Genel olarak döngüsü interfaz (G1, S, G2) ve mitoz (M) olarak iki bölüme ayrılır. Hücre bölünme sinyali aldığında bir hazırlık evresine girer ve hücre büyümeye başlar. Bu evreye interfaz evresi denir ve kendi içinde G1, S, G2 olmak üzere   e ayrılır.

G0 fazı; herhangi bir büyüme faktörü ile uyarılmadığı sürece ya da bölünme için yeteri kadar büyümemiş ise hücreler bu aşamada bekler. Hücre metabolik olarak aktiftir fakat hücre dışı faktörler tarafından uyarılmadı  a  oğalmazlar. Hücrenin dinlenme evresidir. Normal hepatosellüler hücreler bu haldedir (67).

G1 fazı; hücre bu aşamada DNA sentezi için gerekli hazırlıklarını bitirir. ATP sentezi, organel sayısı ve metabolizma hızı artar. Hücre için gerekli RNA ve proteinlerin sentezi gerçekleşir, büyüme faktörleri aktive olur. Sentez evresi için hazırlık yapılır.

S fazı: Sentez fazıdır. RNA sentezi devam ederken protein sentezi en yüksek seviyeye ulaşmış olur. DNA replikasyonu gerçekleşir ve DNA miktarı iki katına çıkarılır. Sentrozom kendini eşlemeye başlar.

G2 fazı: Hücre bu aşamada mitoz için hazırlanır. DNA sentezi tamamlanmıştır fakat RNA ve protein sentezi devam eder. Sentrozom kendini eşlemiş olur.

M fazı: Mitoz bölünmenin gerçekleştiği evredir. Kromozomlar meydana gelir. Kendi içinde profaz, prometafaz, metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinden oluşmaktadır. Son olarak sitoplazma bölünmesinin ardından aynı genetik materyale sahip iki yeni hücre meydana gelir. Sürekli bölünen hücrelerde döngü tekrar G1, S, G2, M olarak devam eder (68, 69).

Hücre döngüsü birçok gen ve gen ürünü tarafından kontrol edilmektedir. Sağlıklı hücrelerde, hücre döngüsü sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Döngü süresince bir aşamanın bitişi ve diğer aşamaya geçiş farklı mekanizmalar tarafından kontrol altına alınmıştır. Hücre döngüsünün kontrolünün sağlandığı 3 temel kontrol noktası vardır. Bu kontrol noktaları; G1-S, G2-M ve M kontrol noktalarıdır (68, 69).

G1-S Kontrol Noktası

Bu noktada DNA'da bir hasar olup olmadığı ve hücrenin bölünme için uygun boyuta ulaşmış ulaşmadığı kontrol edilir. S evresine girmeden önce oluşmuş veya bir önceki evre olan mitoz evresinde meydana gelmiş DNA hasarının varlığı hücre döngüsünün S evresine girmeden durdurulmasını sağlar. Eğer DNA'da bir hasar tespit edilirse veya hücre bölünme için uygun boyutta değilse döngü bu aşamada durdurulur. Böylece S fazından hasarlı DNA'nın bir sonraki aşamaya geçmesi engellenmiş olur. Böylece hücre hasarı tamir etmek için zaman kazanır ve hasarlı DNA'nın kopyalanması önlenir.

G1, S ve G2 evrelerinde hücre döngüsünün durması, hasar görmüş ya da replike olmamış DNA'ya bağlanan protein kompleksleri ile tetiklenir. Bu proteinler DNA hasarını algılar ve ardından sadece hücre döngüsünü durdurmakla kalmaz DNA tamirini ve eğer tamir gerçekleştirilemezse programlı hücre ölümünü de aktive ederler.

Memeli hücrelerinde G1-S kontrol noktasında hücre döngüsünün duraklatılması Chk2 ve ATM tarafından fosforillenen, p53 olarak bilinen tümör baskılayıcı gen tarafından gerçekleştirilir. Fosforillenme p53'ü kararlı hale getirir ve DNA hasarı p53 miktarında hızlı bir artışa neden olur. p53 aynı zamanda bir transkripsiyon faktörüdür ve miktarındaki hızlı artış, hücre döngüsünü durduracak olan hedef genlerin uyarılmasını tetikler. p53 döngüsünü durdurduktan sonra p21'i aktive ederek DNA'nın transkripsiyonel olarak tamirini başlatır. DNA'daki hasar tamir edilmezse p53 hücrenin apoptoza gitmesini sağlar (70).

Farklı kanser türlerine bakıldığında genellikle p53'ü kodlayan genin iki kopyasında da mutasyon görülmektedir. p53'te meydana gelen fonksiyonu kaybı hasarlı DNA'ya sahip hücrenin G1-S kontrol noktasında hasarın tespit edilip döngünün durdurulamamasına neden olur. Böylece hasarlı DNA tamir edilemeden yeni oluşan hücrelere aktarılmış olur. Böylece mutasyonlar artar ve genom kararsızlaşır.

G1-S kontrol noktasında p53'ün yanısıra siklin/CDK (Siklin Bağımlı Kinaz) kompleksleri (siklin A/CDK2, siklin E/CDK2, siklinD/CDK4 ve siklin D/CDK6) gibi bazı

protein kompleksleri de görev almaktadır. Siklin/CDK komplekslerinin fazla ekspresyonu hücrenin G1-S noktasındaki duraklama süresini kısaltırken, az ekspresyonu hücrelerin G1 evresinde kalmasına neden olur. Bu yüzden siklinler ve CDK'lar önemli onkogenlerdir (71).

G2 - M Kontrol Noktası

G2-M kontrol noktasında DNA replikasyonunun tamamlanıp tamamlanmadığı ve hücrenin fizyolojik olarak mitozu hazır olup olmadığı kontrol edilir. DNA replikasyonu tamamlanmamış hücrede döngüyü durduran bir sinyal oluşturulur ve böylece hücrenin M evresine geçmesi engellenir. Böylece hücre tüm genomun replikasyonu tamamlanıncaya kadar G2'de bekler. G2-M kontrol noktasında meydana gelebilecek hatalar kromozomal anomalilere yol açmaktadır. DNA replikasyonunun ardından her bir kromozomun iki kopyasının da ayrılması gerekir, bu ayrılmayı ise Siklin/CDK kompleksleri düzenler. G2-M kontrol noktasında BRCA1'in yanı sıra G1'de olduğu gibi p53'ün de rol aldığı bilinmektedir. Bu durum p53'ün genomun kararlılığında önemli bir rol oynadığını göstermektedir (68, 69, 72, 73).

M Kontrol Noktası

M kontrol noktası en önemli kontrol noktalarındandır. Kromozomların mitotik iğ üzerinde düzenli bir şekilde yer almalarını sağlar. Bu sayede yeni oluşacak hücrelere kromozomların doğru şekilde dağılması sağlanır. Eğer bu aşamada iğ ipliklerinin oluşması ve kromozomların bağlanmasında bir sorun meydana gelirse hücre döngüsü metafaz aşamasında durdurularak hatalı kromozomların yeni hücrelere gitmesi engellenmiş olur (74). Bu kontrol noktaları sayesinde DNA replikasyonunda, hasarlı DNA'nın tamirinde, kromozomların biçimlendirilmesi veya düzenlenmesinde bir hata meydana gelirse, hücre döngüsü hata düzeltilene kadar durdurulur. Böylece tespit edilememiş veya tamir edilememiş mutasyonların artması ve bunun sonucu olarak hücrelerde biriken kromozomal anormallikler engellenmiş olur. Fakat tüm kontrol noktalarına rağmen hasarlı olan DNA tamir edilemez veya kromozomal hasar giderilemezse hücre programlanmış hücre ölümü yani apoptoz ile ölüme gider (75).

Hücre Döngüsü ve Kanser

Kanser, proto-onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen birçok mutasyon sonucu hücre döngüsünün düzenlenmesinde ortaya çıkan hatalar sonucu hücrenin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile ortaya çıkmaktadır (76). Yapılan çalışmalarda DNA hasarını tespit eden ve ardından tamir için p21 proteinini aktifleştiren ve hücre döngüsünün durdurulmasını sağlayan p53 geninin tümörlerin %50'sinden fazlasında mutasyona uğramış olduğu tespit edilmiştir. Yine yapılan çalışmalarda çeşitli kanser türlerinde tümör baskılayıcı proteinler düşük seviyede eksprese edilirken CDK' lar ise yüksek seviyede eksprese edilmektedir (70). Normal hücreler ile karşılaştırıldığında protein seviyesindeki bu değişiklikler kanser hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde bölünüp çoğalmasının sebebidir. Tüm insan tümörlerinin yaklaşık %20'sinde bir proto-onkogen olan ve siklin D-CDK4 kompleksini aktifleştirerek hücre döngüsünün ilerlemesinin sağlayan RAS proteininin aktif olduğu görülmektedir (77). Kanser hücrelerinde hücre döngüsü kontrol noktaları işlevsel değildir veya kanser hücreleri bu noktaları duraklamadan geçebilirler. Bu durum da hasarlı DNA'nın sürekli çoğalarak yeni hücrelere aktarılmasına yani mutasyonun giderek artmasına neden olur. Örneğin G2 kontrol noktasından kaçan hasarlar kromozomal kırıklara ve dolayısıyla genomik kararsızlığa neden olmaktadır (78). Yine radyasyon gibi çevresel mutajenlere maruz kalmış bir hücrede hücre döngüsü kontrolünde hatalar meydana gelebilmektedir. Yapılan çalışmalara göre gamma radyasyonuna maruz kalmış hücrelerin hücre döngüsünün G evresinde kalmadan S evresine geçtiği ve bu sebeple hasarlı DNA'nın kopyalanarak mutasyonlara ve yanlış kromozom dizilimlerine neden olduğu gösterilmiştir (78).

Apoptoz

Yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, düzensiz gelişmiş veya hasarlı, çeşitli nedenlerle artık ihtiyaç duyulmayan hücrelerin genler tarafından kontrol edilerek programlı bir şekilde ortadan kaldırıldığı mekanizmaya apoptoz denir (79). Bir organizmada hücrelerin çoğalması ve ölümleri arasındaki dinamik denge homeostazinin korunması için önemlidir. İnsan vücudunda hergün milyarlarca hücre homeostazın korunabilmesi için ölmektedir. Hücre ölümü, organizmanın gelişiminde ve doku homeostazında da hücre çoğalması kadar önemlidir (79). Fakat plansız şekilde gerçekleşen apoptoz, apoptoz sürecinin hızlanması veya yavaşlaması gibi bozukluklar organizma için hayati sonuçlar doğurabilmektedir. Örneğin; bazı nörodejeneratif hastalıklar, AIDS, arteriosklerozis gibi hastalıklarda apoptoz sürecinin hızlandığı görülürken, bazı otoimmün hastalıklar ve kanserde apoptoz sürecinin yavaşladığı bu sebeple de apoptoz mekanizmasında bozukluklar görülmektedir (80). Apoptoz sürecine girmiş hücreler geçirdikleri

morfolojik değişimler ile diğer hücrelerden ve nekroz gibi diğer ölüm mekanizmalarından ayrılırlar. Apoptoza giren bir hücrede özetle;

- hücre şekli yuvarlaklaşır ve bunun sonucu olarak komşu hücrelerle olan bağlantı kaybolur,
- hücre hacminde azalma ve büzülme meydana gelirken sitoplazma yoğunluğunda artış görülür,
- kromatin yoğunlaşır,
- apoptotik cisimler oluşarak hücre parçalara ayrılmaya başlar,
- daha sonra bu cisimler komşu hücreler tarafından fagositler tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılır.

Ölen hücrelerin artıkları ve kalan apoptotik cisimlerin fagositler ve komşu hücreler tarafından fagosite edilmesi dokuda bir inflamatuvar yanıt oluşmasını engellenmektedir (79). Eğer bu apoptotik süreçte bir hata meydana gelirse bu organizma için kötü sonuçlar meydana getirebilmektedir. Örneğin; ölmesi gereken mutasyonlu bir hücrenin meydana gelen bir hata sonucu yaşamaya devam etmesi o mutasyonlu hücrenin çoğalmasına ve bunun sonucunda organizmada genetik bozukluklara sebep olmaktadır.

Apoptozun Mekanizması

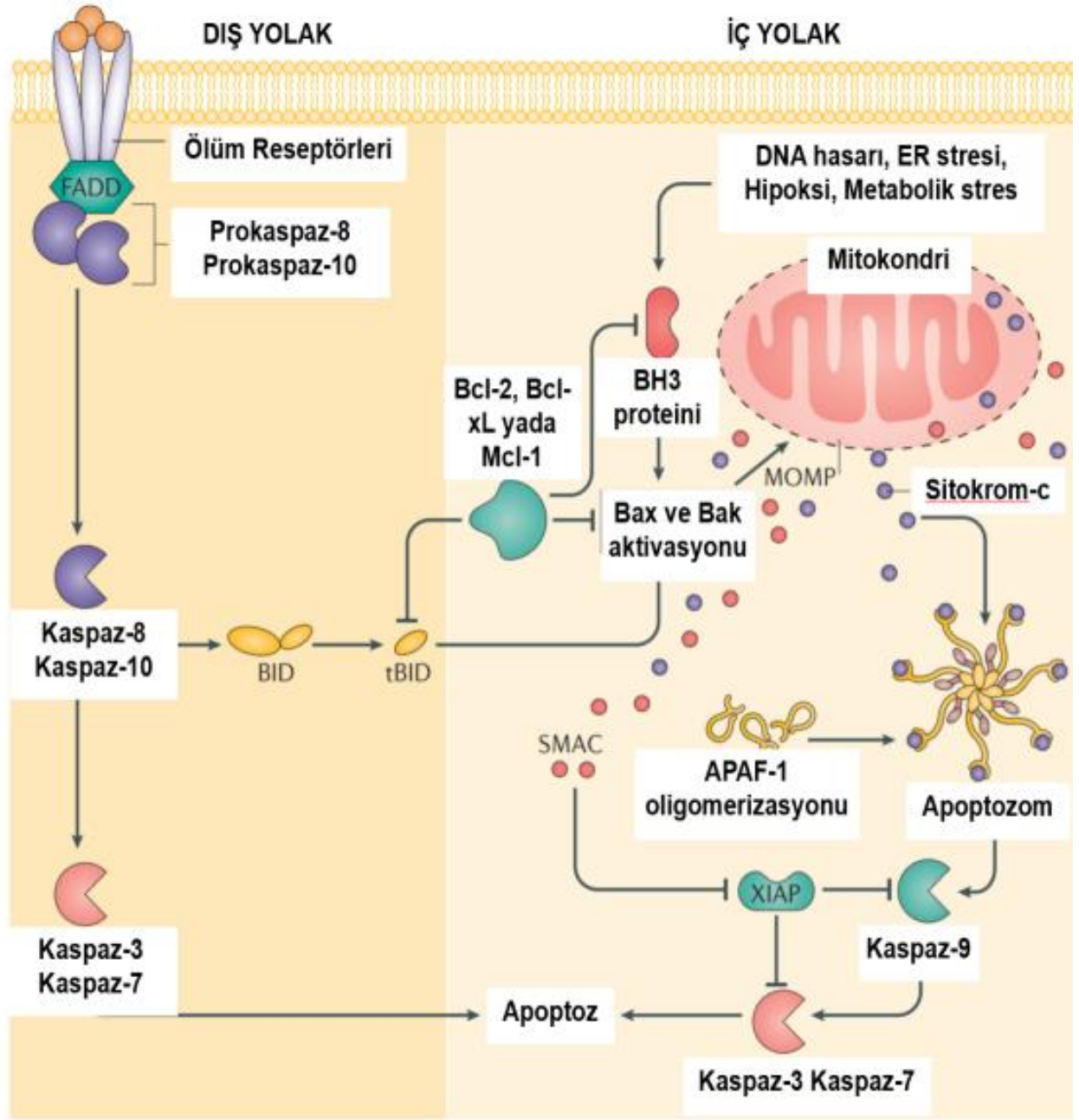
Hücrede büyüme faktörleri ve sitokinler gibi hücrenin yaşaması için gerekli olan pozitif sinyallerin yanı sıra, Fas-ligand ve TNF gibi hücrede ölümü tetikleyen negatif sinyaller bulunmaktadır. Bu iki zıt sinyal arasındaki dengenin bozulması hücreyi apoptoza sürüklemektedir (81). Bcl-2 gen ailesi apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan önemli faktörlerin başındadır. Bir kısmı pro-apoptotik olarak görev yaparken bir kısmı anti-apoptotik olarak görev yapar. Bunlardan pro-apoptotik olanlar; Bax, BclXs, Bad, Bak, Bid, Bim, Puma ve Noxa'dır. Bu proteinler mitokondriden Sitokrom- C salınımını ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) salınımını artırır ve bu sayede apoptozu tetikler. Anti-apoptotik olanlar; Bcl-2, Mcl-1 ve Bcl-Xl'dir. Hücrede kalsiyum oranının korunmasını düzenlerler. Pro-apoptotiklerin tersine Sitokrom-C ve AIF salınımını inhibe ederek apoptozu engellerler. Hücrenin apoptoza girip girmeyeceğini hücredeki Bax-Bcl-2 dengesi belirler. Eğer hücre apoptoza girecekse hücredeki Bax oranı Bcl-2 oranından yüksektir (82). Apoptoz iki şekilde aktive olur:

Apoptozun hücre içi sinyaller tarafından uyarılması (İç Yolak)

Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör) molekülüne bağlanan Bcl-2 proteinini hücrede mitokondrinin dış zarında eksprese edilmektedir. Hücrede hasar meydana geldiğinde Bcl-2, Apaf-1 molekülünü serbest bırakır. Bcl-2 ile ilişkili diğer bir protein olan Bax, mitokondri membranından girerek Sitokrom C' nin salınımını başlatır. Diğer yandan serbest kalan Apaf-1, Kaspaz-9 molekülüne bağlanır. Böylece ATP enerjisi harcanarak sitoplazmada "Apoptozom Kompleksi" oluşmuş olur. Kaspaz-9 proteinleri keserek diğer kaspazların da aktive olmasını sağlar. Böylece proteolitik yolaklar aktive olarak sitoplazmik proteinler ve DNA yıkılır. Kalan hücre artıkları ve apoptotik cisimler fagositozla ortadan kaldırılır (82).

Apoptozun hücre dışı sinyaller tarafından uyarılması (Dış Yolak)

Fas-Ligand ve TNF gibi ölüm aktivatörlerinin hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerine bağlanmasıyla reseptörlerin sitoplazmik tarafına bağlanan kaspaz 8 kendini kırparak aktifleşir. Aktive olan kaspaz-8 de pro-kaspaz 3'ü kırparak aktifleştirir. Böylece kaspaz kaskadı oluşur ve hücrenin fagositozu sağlanır (82). Ölüm reseptör yolağındaki bir diğer faktör ise mitokondri lümeninde bulunan apoptoz indükleyici faktör (AIF) dır. Hücre ölüm sinyalleri tarafından uyarılan AIF serbest kalarak çekirdeğe geçer. Çekirdekte DNA'ya bağlanan AIF DNA'nın yıkılmasını ve bunun sonucunda hücrenin parçalanmasını sağlar (Şekil 3) (83). Kısaca; Proapoptotik proteinler, sitozolde mitokondriyal bağımlı ölümün aktive edilmesinde anahtar rol oynayan sitokrom C'nin mitokondri salınımını teşvik ederek apoptozu düzenler ve ayrıca anti-apoptotik proteinler bu salınımı bloke ederek hareket ederler (84). Sitokrom C aktive edildikten sonra hücre apoptotik sinyal yolu güçlendirilecek ve hücre ölümünün geri döndürülemez olacağı taahhüt edilir (85). Kaspaz 9, içsel apoptotik yolun apoptotik promotör proteazıdır. Aktive edildiğinde, aşağı akış yürütücü kaspaz 3 karşılığında tetiklenir ve daha sonra hücre apoptozuyla birlikte hücrel substratları parçalar (86).



Şekil 3: Apoptozun iç ve dış yolak tarafından aktivasyonu

Apoptozun Düzenlenmesi

Apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi, p53, kaspazlar, sitokrom-C ve mitokondriyonlar gibi birçok eleman görev almaktadır. Hücrenin apoptoza girdiği andan itibaren hücre içerisine sürekli bir kalsiyum girişi olmakta ve bu kalsiyum iyonları, endonükleaz, proteaz ve transglutaminaz aktivasyonunda, gen regulasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda düzenleyici olarak görev yapmaktadır. Yapılan çalışmalar, bazı onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin de apoptozun düzenlenmesinde rol aldığını göstermektedir. Bu genlerden bazıları; c-myc, p53, bcl-2 ve kaspaz ailesidir (82).

c-myc: Bir transkripsiyon faktörü olmasının yanı sıra protoonkogen olarak da görev yapar. Ortamda bulunan moleküllere bağlı olarak hücrenin çoğalmasını ve proliferasyonu yada apoptoza girmesini düzenler. Hücrede yeterli miktarda c-myc ve uygun büyüme faktörleri yoksa hücre büyümesi durur, her ikisinin de yeterli miktarda bulunması halinde ise çoğalma gerçekleşir. Fakat c-myc var ama ortamda uygun büyüme faktörleri yoksa hücre apoptoza girer (87).

p53: Tümör baskılayıcı olan p53, radyasyon, kemoterapi gibi etkenler sonucu oluşmuş DNA hasarını tanır ve hücre döngüsünü G1 evresinde durdurarak DNA'nın tamir edilmesini sağlar. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek seviyede ise hücrenin apoptoza girmesini indükler. Bunu takiben Bax ekspresyonu artar ve hücredeki bcl-2 / Bax dengesi değişir. Ayrıca Fas, DR4 ve DR5 gibi hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri aracılığı ile de apoptozu indükleyebilir (88). Ayrıca p53, doğrudan protein-protein etkileşimi yoluyla Bax oligomerizasyonunu teşvik edebilir ve mitokondriyal zarı geçirgen hale getirmek için Bcl-2 ve Bcl-XL ile inhibitör kompleksler oluşturabilir. Sitokrom c salınımı ile birlikte ve son olarak hücre apoptozunu indükler (89, 90).

Bcl-2 ailesi: Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs gibi bazı üyeleri apoptozu indüklerken, Bcl-2, Bcl-XL gibi bazı üyeleri de apoptozu inhibe etmektedir. Bu apoptotik ve antiapoptotik üyelerin hücredeki oranları hücrenin sağkalımını düzenlemektedir. Örneğin; hücredeki Bcl-2 / Bax oranının değişmesi hücrede apoptozun indüklenmesine veya inhibe edilmesine yol açar (82). Proapoptotik üyelerden olan Bax ve Bak heterodimerizasyon ile kaspazların ve mitokondriden salınan sitokrom-C'nin serbestleşmesini ve böylece kaspazların aktive olmasını sağlarlar. B hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) protein ailesinin üyeleri apoptozun düzenlenmesinden sorumludur (84). Bcl-2, kanser hücrelerinin hayatta kalması ve ölümü arasındaki dinamik dengenin korunmasında ikili bir rol oynayan önemli bir antiapoptotik gendir (91).

Bcl-2 protein ailesi, mitokondriyal dış zar geçirgenliğinin değişimini kontrol eden, intrinsek apoptotik yolları kontrol eder. Bu durum Bcl-2 proteinlerinin mitokondriyal membranın permeabilizasyonuna aracılık ederek apoptozisde anahtar rolü almasına sebep olur. Bcl-2 ailesi üyeleri arasındaki denge ve protein-protein etkileşimleri, bir hücrenin hücre sağkalımı mı yoksa apoptozu mı uğrayacağını saptamak için gereklidir (82). Bcl-2'nin daha düşük seviyelerde ATP ve reaktif oksijen türleri üretmek için mitokondriyal metabolik yolları düzenleyerek G0/G1'den S fazına girişini geciktirdiği gösterilmiştir (92). Bcl-2 programlanmış hücre ölümünü durdurarak apoptozda rol oynayan bir onkoproteindir.

Memeli hücrelerinde 25 veya daha fazla üye içeren Bcl-2 ailesi, stres apoptoz yolunun gerekip gerekmediğini belirlemek için farklı hücreler arası ve hücre içi işaretleri birleştiren bir 'yaşam/ölüm anahtarı' olarak işlev görür (93). Bcl-2'nin in vitro ve in vivo tümör göçü, invazyon, otofaji ve anjiyogenezi modüle ettiğini göstermiştir (94). Apoptoz regülasyonu açısından zıt fonksiyonlara sahip iki Bcl-X cDNA izoformu, Bcl-xL ve Bcl-xS tanımlanmıştır. Bcl-xL, Bcl-2 ile benzer yapısal alanları paylaşan bir anti-apoptotik protein iken, Bcl-2'ye en yüksek homolojiye sahip bölgeden yoksun olan Bcl-xS, apoptozu teşvik eder (95).

Hücre kaderi, proapoptotik ve anti-apoptotik Bcl - 2 aile üyelerinin aktiviteleri arasındaki balans ile saptanır. Tümör oluşumu ve kanserin ilerlemesi sırasında kanser hücreleri, anti-apoptotik Bcl - 2 protein ailesinin yukarı regülasyonuna dayanır ve bu hayatta kalma mekanizmalarına bağımlı olma eğilimindedir (93). Bcl-2 proteinlerinin iki ana grubu vardır, bunlar proapoptotik proteinler (örn. Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim ve Hrk) ve anti-apoptotik proteinler (örn. Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Bfl-1 ve Mcl-1)'dir. Anti-apoptotik proteinler sitokrom-C'nin mitokondriyal salınımını engelleyerek apoptozu düzenlerken, pro-apoptotik proteinler bu salınımı teşvik ederek etki ederler. Apoptozun başlayıp başlamayacağını belirleyen şey mutlak miktar değil, pro ve anti-apoptotik proteinler arasındaki dengedir (96). Bcl-2 protein ailesini hedeflemede kullanılan bazı potansiyel tedavi stratejileri, Bcl-2 anti-apoptotik protein ailesini inhibe etmek için terapötik ajanların kullanımını, ilgili yukarı regüle edilmiş anti-apoptotik proteinlerin ya da genlerin bastırılmasını içerir.

Bu mekanizma ile tekli veya çoklu anti-apoptotik Bcl - 2 ailesi üyelerini hedef alan birkaç ilaç, prelinik çalışmalarda ve faz I/II/III klinik deneylerinde katı ve hematopoietik tümörler için tek ajan ya da kombinasyon tedavilerinde umut verici yanıtlar göstermiştir (97, 98).

Kaspazlar: Apoptoz için merkezi bir konuma sahip olan kaspazlar bir sistein proteaz ailesidir. Substratlarının aspartik asit (ASP) bölgelerindeki karboksil gruplarındaki peptit bağlarını keserler. Normal şartlarda hücrede inaktif halde bulunurlar ve uyarı aldıklarında proteolitik olarak birbirlerini aktive ederler (99). Hücrede özellikle hücre iskeletini oluşturan ve DNA tamirinden sorumlu proteinlerin kullanıldıktan sonra veya işlevlerini kaybettikten sonra parçalanarak ortadan kaldırılmasından sorumludurlar (99). 14 üyesi olan bu kaspaz ailesinin 7 üyesi apoptozda rol alan kaspaz 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10'dur. Kaspaz 3, 6 ve 7 apoptoz sırasında hücrenin parçalanmasına neden olurken diğer kaspazlar ise apoptozun başlatılması ve apoptozda rol alan kaspazların aktive olmasından sorumludurlar (100).

Ki-67: Ki-67, G0 dışındaki proliferasyon evrelerinde eksprese edilen nükleer antijenlere bağlanan bir nükleer proteindir ve immünohistokimya da değerlendirilebilen tümör proliferasyonu ile ilgili ana faktörlerden biri olarak hizmet eder (100). Ki-67 ekspresyonunun malign tümörlerde malign olmayan tümörlere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ki-67, tüm çoğalan omurgalı hücrelerinde eksprese edilen bir nükleer proteindir ve tümör evrelemesinde bölünen hücrelerin oranını tahmin etmek için yaygın olarak kullanılan bir biyobelirteçtir. Bugüne kadar incelenen tüm tümör antitelerinde, Ki-67 ile belirlenen büyüme fraksiyonunun ortalama değerleri ile malignitenin histopatolojik değerlendirmesi arasında oldukça anlamlı bir korelasyon bildirilmiştir (101). Çekirdekteki Ki-67 proteini, tümörlerin saldırganlığını gösterebilen hücre proliferasyonu ile ilgilidir. G0 hariç hücre döngüsünün tüm aşamalarında eksprese edilir, özellikle G2/M fazında en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşır (101). Ki-67 marker indeksini elde etmek için parafine gömülü kesitlerin immünohistokimyası (IHC) kullanılır ve pozitif oran hastaların prognozu için bir gösterge olarak kullanılabilir. Anti-apoptozis faktörleri gibi bazı belirteçler, bir tümörün kendine özgü tedavilere duyarlı olup olmadığını belirlemek ya da Ki-67 gibi bir tümörün proliferatif evresini takip etmek için kullanılır.

HSK lezyonlarının Ki-67 immün boyamasının daha yüksek mitotik aktivite ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (102). HSK dokusunda daha yüksek Ki-67 ekspresyon seviyelerinin daha agresif bir tümör derecesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Daha yüksek Ki-67 ekspresyon seviyelerinin erken hastalık nüksü ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Yüksek Ki-67 ekspresyonu, zayıf farklılaşma, büyük tümör boyutu, çoklu tümör nodülleri, metastaz, siroz ve venöz invazyon gibi özellikler ileri HSK ile önemli ölçüde ilişkili olduğu gösterilmiştir (100). Proliferasyon ve apoptoz, HSK patogenezinin arkasındaki iki temel itici güçtür. HSK, Ki-67 ve Bcl-2 aşırı ekspresyonu, hücresel proliferasyon ve apoptoz arasındaki dengenin bozulmasına

neden olan Bax ekspresyonunun azalması ve PPAR- γ ve FOXO-1'in azalmış ekspresyonun şiddetlenmesi ile ilişkilidir (103).

Apoptoz ve Kanser

DNA'da meydana gelen hasar, tamir mekanizmaları tarafından tespit edildikten sonra tamir edilir. Hasarın tamir edilemediği durumlarda ise hücre genetik kontrol mekanizmalarının gözetimi ile ortadan kaldırılır (79). Eğer bu kontrol mekanizmalarında bir hasar meydana gelirse hücre ortadan kaldırılamaz ve hasarlı bir şekilde bölünmeye devam eder. Bu hasarlı hücreler hızla çoğalarak neoplastik bir oluşumu dolayısıyla kanseri tetikler.

Yapılan çalışmalarda Bcl-2 ve c-myc gibi sağkalımı tetikleyen genlerin kanser hücrelerinde oldukça fazla eksprese edilerek ölüme neden olan genleri baskıladığı görülmüştür (87, 91). Yine yapılan çalışmalarda hepatoselüler, nöroblastom ve kolon kanserinde survinin ve Bcl-2 proteinlerinin yüksek seviyede eksprese edildiği ve bunun kötü prognoz ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (104). Melanoma hücrelerinde de Apaf-ekspresyonu inhibe edilerek hücrenin apoptoza girmesi engellenir (105). Akciğer ve kolon kanserlerinde ise Fas-liganda bağlanan “decoy” molekülü fazla miktarda üretilerek Fas ligandın Fas proteinine bağlanması engellenir ve bu sayede kanser hücreleri sitotoksik T hücreleri tarafından tanınıp öldürülemezler (106). Bcl-2 ve c-myc proteinlerinin aşırı ekspresyonu AML hücrelerinde apoptozu engelleyerek hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına neden olur. Ayrıca yapılan çalışmalar Bcl-2'nin hücrede aşırı derecede artışı lösemi hücrelerinin sağkalımını arttırdığı ve hastanın kemoterapiye karşı direnç oluşturmaya neden olduğu görülmüştür (107).

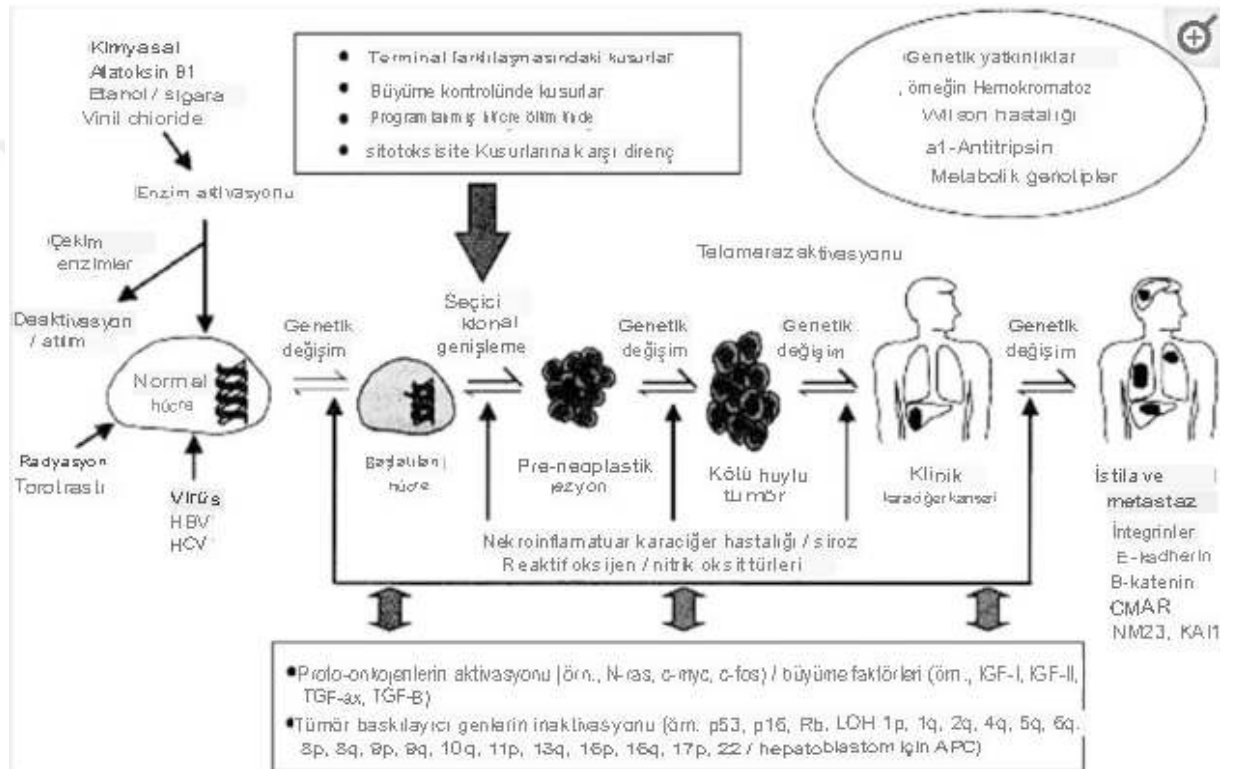
Apoptoz sayesinde hasarlı hücreler ortadan kaldırılarak bir sonraki kuşağa aktarılması engellenir. Böylece organizma için kanser oluşumunu tetikleyen genetik mutasyonların sayısı da en aza indirilir (79). Bu yüzden son yıllarda kanser tedavisi için apoptozu indükleyecek yeni ajanlar üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır (108). Apoptoz, hem Bcl-2 ailesini hem de kaspaz ailelerini düzenleyerek mitokondri tarafından düzenlenen intrinsik yol tarafından tetiklenebilir. Bcl-2 ailesi üyeleri arasındaki denge ve protein-protein etkileşimleri, bir hücrenin hayatta kalmasına mı yoksa apoptoza mı uğrayacağını belirler. Bu nedenle Bax/Bcl-2 oranı, apoptozun oluşumu ve derecesi için büyük önem taşır (90).

Çeşitli kanser türlerinde bugüne kadar yapılan çalışmalarda farklı maddelerin hücre döngüsü ve apoptoza olan etkileri araştırılmış fakat çalışmamızda kullandığımız TC ekstresinin

özellikle insan hepatoselüler kanser hücrelerinde uygulanmasına dair çalışmaya rastlanmamıştır.

2.4.4. Hepatoselüler Kanser'in Oluşumu ve Genetiği

Hepatokarsinogenez, hücrede dizi mutasyonel genetik değişikliğin olduğu çok aşamalı bir süreçtir (Şekil 4) (109).



Şekil 4: Hepatokarsinogenezin çok aşamalı sürecinin şematik temsili

HSK'nın etyolojisi ve karinsinogenezi diğer kanser türlerinde olduğu gibi çok yönlü ve çok basamaklıdır. HSK'nın çok basamaklı oluşum süreci inflamasyona sebep olan hepatosit tahribatı, hücre ölümü, siroz ve rejenerasyon, displazi ve karsinom olarak söylenebilir (110). HSK gelişiminin ilk safhasına, karaciğer kök hücrelerindeki değişiklikler neden olur. Protoonkogenlerin (N-ras, c-myc, c-fos) aktive olması, growth faktörlerin (IGF1, IGF2, TGF-

α , TGF- β aktivasyonu) aktive olması ve tümör supresör genlerin (p53, Rb, p16, APC) baskılanması şeklinde üç temel faktörde değişim görülür (38, 111, 112).

HSK oluşumundaki bu genetik değişiklikler sonrası, hepatositlerin fenotipi değişime uğrar. Uzun preneoplastik zaman boyunca mitojenik yolların değişmesi ile hepatosit döngüsü hızlanır. Bu kronik rejenerasyon süreci displazik hepatositlerin oluşmasına neden olur. Bu hepatositlerin özelliği, genlerinde ve kromozomlarında yapısal değişikliklerinin olmasıdır. Displazik nodüllerin ve HSK'nın ortaya çıkışı, genlerde ve kromozomlarda geri dönüşsüz yapısal değişikliklerin birikimi ile oluşur. Malign hepatosit fenotipi, farklı düzenleyici yollarda görev yapan genlerin fonksiyonlarını engellemesi ile gelişebilir (113).

Hepatosit tahribatı, en fazla kronik HBV ve HCV enfeksiyonlarında meydana gelmektedir. Bu enfeksiyonlar fibrozla sonuçlanan inflamasyona sebep olurlar. Hepatik fibroz, inflamatuvar hücrelerin de dahil olduğu, stellat hücrelerin aktivasyonu ve sitokinlerin salınımı ile meydana gelen, karaciğer tahribatına karşı verilen bir cevaptır. Hepatik fibrozun önemli bir özelliği ekstraselüler matriksin birikiminin geri dönüşlü olması ve nodüllerin yeterince gelişmediği bir durum olmasıdır. Oysa siroz, rejenere nodüllerin olduğu, parankimanın etrafının kalın koyu bir şerit ile çevrildiği, geri dönüşsüz bir durumdur. Siroz, HSK oluşumu için önemli bir risk artışına neden olmaktadır. Ama siroz olmadan da HSK gelişebilmektedir (114).

HSK gelişiminin moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, onu tedavi etmek için yeni etkili terapötik stratejiler geliştirmede için kritik öneme sahiptir (115). HSK'nın başlaması ve ilerlemesi, proto-onkogenlerin aktivasyonu ve spesifik tümör baskılayıcı genlerin işlevlerinin bozulması gibi çoklu genetik olayları içerir. Onkogenler tarafından kodlanan onkoproteinler, hücrelerin bölünmesini ve canlılığını uyarır veya arttırırlar (116).

Buna karşılık, tümör baskılayıcı genler, hücre çoğalmasını doğrudan veya dolaylı olarak önleyebilir veya hücre ölümü ile sonuçlanabilir. Tümör proteini p53 (*P53*), fosfataz ve tensin homologu (*PTEN*), axin 1 (*AXIN 1*) ve retinoblastoma transkripsiyonel çekirdek baskılayıcı 1 (*RBI*), HSK'da iyi bilinen tümör baskılayıcı genlerdir. Örneğin *P53*, HSK'nın %30-60'ında mutasyona uğrar veya susturulurken, PTE HSK'nın %40'ından fazlasında kaybolur (117, 118). HSK ile ilgili güncel olarak 30 onkogen ve 12 tümör baskılayıcı gen tanımlanmıştır (119).

2.4.5. HSK'nın Tanı, Tarama ve Tedavisi

HSK'nın özel belirti ve bulgular vermemesi, karaciğerin geniş fonksiyonel kabiliyeti tanı konulmasında gecikmeye neden olmaktadır. Bu nedenle tanı esnasında hastaların çoğu metastatiktir ve uygun tedavi için şansını kaybetmiştir (120). Tanı esnasında vasküler invazyonun olup olması, karaciğer hastalığı nedeniyle fonksiyonel kapasitenin kötü olması, tümör büyüklüğünün fazla olması, lenf nodu metastazları ve uzak metastazlarının olması kötü prognoz belirteçleridir (121, 122). Kronik karaciğer hastalığı olanlarda karaciğerde tespit edilen herhangi bir kitle aksi ispat edilene kadar HSK olduğu düşünülmelidir. Hiçbir karaciğer hastalığı olmayan hastalarda hipervasküler özelliği varsa fokal nodüler hiperplazi (FNH) ve hemanjiom dışlandıktan sonra HSK ön planda akla gelmelidir. Takipli olmayan hastalarda yeni saptanan AFP yüksekliği tanı koydurucu olabilmektedir.

HSK tanısında serolojik belirteçler olarak AFP, des-gama-karboksi protrombin (DKP), AFP-L3, Alfa-1fukosidaz (AFU), Transforming büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1), mikroRNA miR-21, golgi protein 73 (GP73), vitamin K ile indüklenen protrombin (PIVKA II) yer almaktadır. Bunlar dışında biyopsi, tüm batın ultrasonografisi (USG), trifazik multinodal bilgisayarlı tomografi (BT), trifazik manyetik rezonans görüntüleme MRG, laparoskopik yöntemler kullanılmaktadır (123, 124).

2.4.5.1. Alfa Fetoprotein

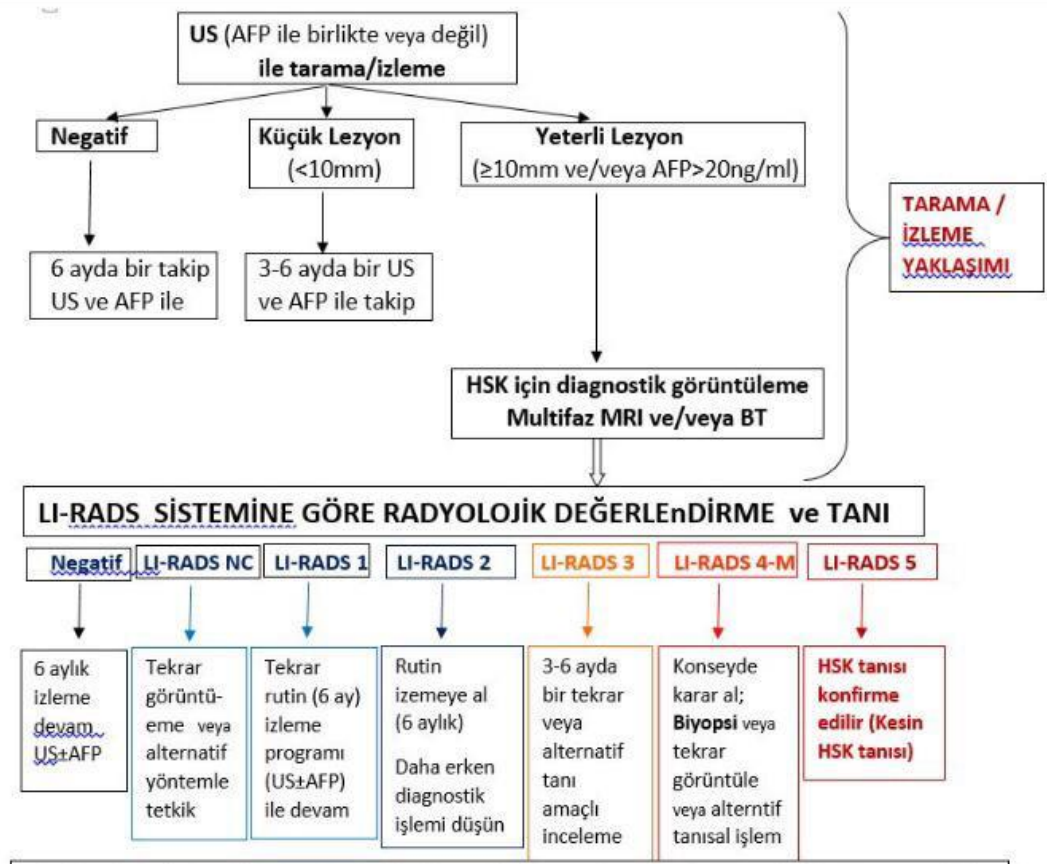
Taramada kullanılan serolojik bir belirteç olduğu gibi önceden HSK hastalarının tanısında da kullanılmıştır. Tek başına olmasa da diğer testler ile beraber kullanıldığında tanısal doğruluğu arttırmaktadır. Takiplerde tam yeterli performansı göstermemesinin nedeni olarak sirozlu hastalarda dalgalı seyir göstermesi, akut hepatit alevlenmeleri, karaciğer hastalığının alevlenmesi ve erken evrede yükselmesi gösterilmiştir. Alfa fetoprotein (AFP)'nin normal serum düzeyi 10 - 20 ng/mL'dir. AFP'nin 20-400 ng/mL olması aktif hepatit, siroz ve yeni geçirilen karaciğer cerrahisi gibi hepatosit rejenerasyonunu göstermektedir.

HSK tanısı için 400 ng/mL üstü değerler anlamlı kabul edilebilir. Kronik karaciğer hastalığı olan kritik hastalarda AFP >500 ng/ml olması kesin HSK olarak değerlendirilmektedir. Ancak AFP değeri düşük kişilerde yapılan taramalar sonucu çok sayıda HSK hastası saptanmıştır (125). Bunun yanında Fibrolamellar tip HSK ve küçük boyutlu HSK'ların %40'ının AFP sekrete etmedikleri görülmüştür. Bu gibi nedenlerle 2005 yılında Avrupa ve Amerika çalışma cemiyetleri (EASL, AASLD) HSK tanısında arteriyal fazda hipervaskülerite ve geç washout'u tanı kriteri olarak kabul etmiş ve AFP'yi tanısal algorithmadan çıkarmışlardır (126, 127).

AFP düzeyi tanıda kullanıldığı gibi özellikle cerrahi olarak rezeke edilen ve karaciğer transplantasyonu yapılan hastaların prognozunda ve takibinde kullanılmaktadır. Transplantasyon yapılan hastalarda AFP düzeyinin >1000 mcg/L üzerinde ise hastalığın nüks etme riskinin yüksek olduğunu göstermektedir (128). AFP ayrıca germ hücreli tümörlerde (over ve testis), mide kolon akciğer kanserlerinde, lenfoma hastalarında ve meme kanserinde yüksek bulunabilmektedir (129).

2.4.5.2. Tanıda Görüntülemenin Rolü

Görüntüleme, HSK tanısında en önemli yöntemdir. Birçok solid kanserlerin aksine, HSK tanısı, biyopsi ile histolojik konfirmasyona gerek olmadan doğrudan görüntüleme ile konabilir ve tedavi düzenlenir. Biyopsi gerektiği zaman, görüntüleme yardımı gerekir. AFP ve diğer serum belirteçlerinin tanıdaki rolü daha geri plandadır. HSK'ya tanısal yaklaşım algoritması Şekil-5'de verilmiştir. Riskli grupta yer alan ve tarama testleri pozitif olan hastalarda HSK tanısı için ilk başvurulacak tanı aracı multifaz MRI veya BT dinamik incelemeleri olmalıdır. “*American College of Radiology*” nin hazırladığı ve 2011 yılından beri bilinen “*CT/MRI Liver Reporting and Data System*” (LI-RADS) kılavuzu BT/MRI incelemesinin nasıl yapılacağı, değerlendirmesi ve nasıl rapor edileceğini belirtmektedir (Şekil 5) (130).



Şekil 5: LIRADS sınıflaması şematik gösterimi

Ultrasonografi (USG)

USG genelde kronik hepatit ve sirozu olanlarda tarama amaçlı kullanılır. USG tanı için duyarlılığı %78, özgüllüğü %89'dur. Heterojen parankimde lezyonları saptamada yetersiz kalmaktadır. Kontrastlı USG yapılırsa duyarlılık artmaktadır (131). Yapılan çalışmalar sonucu tümör boyutu arttıkça USG'nin duyarlılığının arttığı gösterilmiştir. Çapı 1 cm'den küçük tümörlerde duyarlılığı %42 iken tümör büyüklüğü arttıkça duyarlılığı %95'e kadar çıkmaktadır (132). USG görüntülemenin sınırlamaları, teorik olarak, her ikisinin de HSK tanısı için yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olduğu gösterilen MRG ve BT'nin teknik üstünlüğü ile ele alınabilir (133).

Bilgisayarlı Tomografi (BT)

Genelde daha önce USG’de tespit edilen bir anormalliğin netleştirmek için kullanılır. Duyarlılık %65-98, özgüllük %92’dir. Standart olarak kontrastsız, arterial, portal venöz ve denge fazlarından oluşan multifazik değerlendirme yapılır. Tümör boyutu küçüldükçe doğru teşhis koyma oranı azalır, bu durumlarda helikal BT ve kontrast olarak lipiodol kullanılarak duyarlılık arttırılmaya çalışılır (130, 134).

Manyetik Rezonans Görüntüleme

Manyetik Rezonans (MR)’da nefrotoksik kontrastlar ve radyasyon kullanılmadan daha net görüntüler elde edilebilmektedir. T2’de yüksek yoğunluk ve T1’de düşük yoğunluklu görüntüler ile ayırım yapılır. Duyarlılığı %86 özgüllüğü %89’dur. Fakat gadoksetin asit ve diffüzyon görüntüleri ile duyarlılığı arttırılabilir (135). Tümör çapı arttıkça sensitivitesi artmaktadır. 2cm’den küçük kitlelerde %30 sensitivitesi varken büyük kitlelerde %95’e kadar çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda MRG’nin BT’ye göre daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu gösterilmiştir (136).

2.4.5.3. Tanıda Biyopsinin Rolü

Karaciğerdeki premalign nodüllere perkütan biyopsiler görüntüleme ile tipik bulgu vermeyen, hipovasküler olan ve biyopsi sonucu hastanın tedavi ve yönetimini değiştirecek ise düşünülmelidir (137, 138). Biyopsi yaparken kanama riski, tümörün yeri ve biyopsi traktı boyunca tümör ekimi gibi komplikasyonlar göz önünde bulundurulmalı ve bu riskin %1,6-5 arasında olduğu unutulmamalıdır. Yapılan çalışmalarda doğru tanı konulup küratif cerrahi yapılabilen HSK hastalarında, ince iğne aspirasyon biyopsisinin komplikasyonsuz yapılabileceği gösterilmiştir (139).

Karaciğerdeki küçük lezyonlardan alınan biyopsiler deneyim seviyesi yüksek patologlar tarafından değerlendirilmelidir. HSK tanısı için karaciğer biyopsisinin sensitivitesi %70-90’dır. 1-2 cm aralığındaki nodüllerde stromal invazyon görünmesi gibi engellerden dolayı erken HSK ile yüksek dereceli displastik nodül ayırımı yapılamayabilir. Biyopside ≤ 2 cm lezyonlar için görüntü kılavuzluğunda perkütan karaciğer biyopsisinin tanısal verimi yüzde 70 kadar düşük olabilir (140). Yapılan çalışmalarda küçük tümörlerde ilk biyopsiler ile tanı şansı %60 civarındadır. Bu yüzden negatif biyopsiler tanıyı ekarte ettirmez. Radyolojik görüntüleme ile beraber yapılan biyopsilerde sensitivitesi ve spesifitesi daha yüksektir. HSK negatif çıkması durumunda 3-6 ay ara ile hastalar yakından USG ve/veya BT ile değerlendirilerek nodül

kaybolması, büyümesi, HSK dönüşmesi, göz önünde bulundurularak takip edilmelidir. Nodülde değişiklikler saptanması durumundan tekrar biyopsi planlanmalıdır (141).

Histolojik olarak HSK iyi diferansiye tipten anaplastik kötü diferansiye lezyonlara kadar değişkenlik gösterebilir.

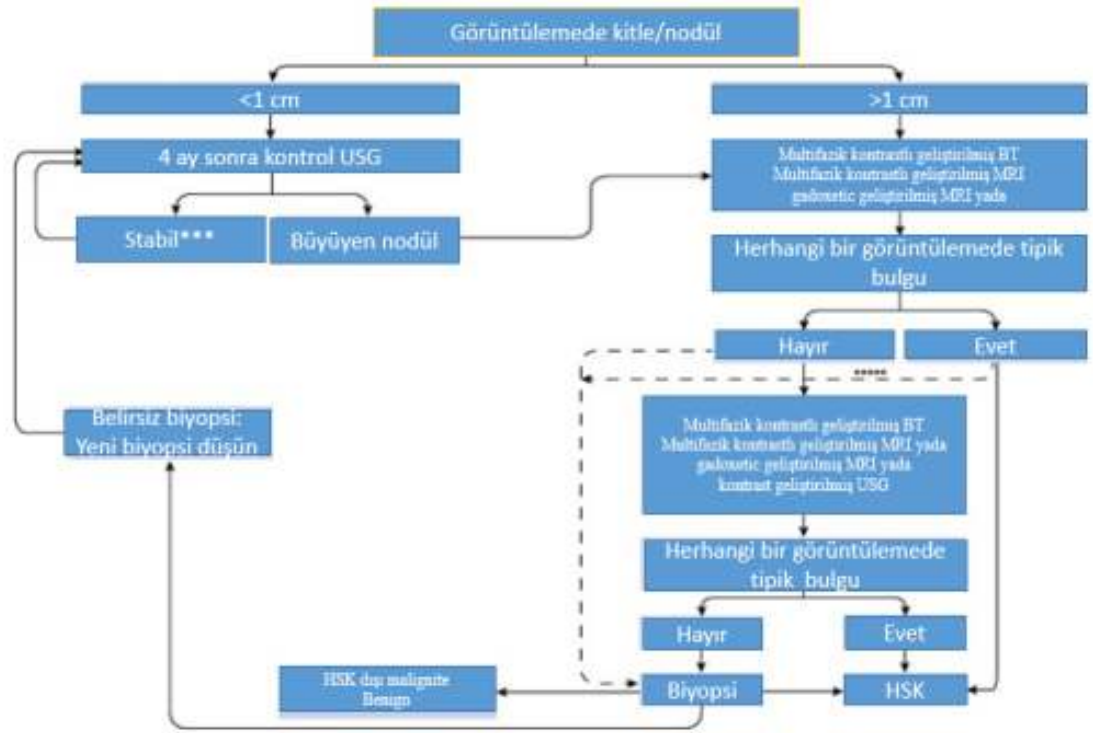
2.4.5.4. Tanıda Amerikan Karaciğer Hastalıkları Çalışma Grubu (AASLD) Kılavuzu

Taramalarda veya rastgele saptanan 1 cm'den küçük nodülleri 3-6 ay aralıklı USG ile izlenmesi, 2 yılda nodülde büyüme yok ise rutin taramaya geçilebilir. Sirotik karaciğerde tespit edilen 1 cm'den büyük nodüllerden BT ve/veya MRG ile yapılan radyolojik görüntüleme de lezyonun hipervasküler olması, portal venöz fazda washout paterninde görünüm saptanması HSK lehine değerlendirilir. Görüntü tipik değilse yapılmayan diğer radyolojik görüntüleme yapılmalıdır (121, 142).

Görüntüleme sonucunda tipik görüntü varsa HSK tanısı kesindir. Yine beraberinde yüksek AFP >200 ng/ml varsa biyopsi yapmaya gerek yoktur. Karakteristik radyolojik bulgu yoksa ve karaciğer sirotik değilse biyopsi önerilmektedir (121, 142).

2.4.5.5. Tanıda Avrupa Birliği Karaciğer Çalışma Grubu (EASL) Kılavuzu

2018'deki yapılan yayına göre 1cm'den küçük nodüller 4 ayda bir USG ile izlenmeli, nodülde büyüme olması durumunda nodülün büyüklüğüne göre ek inceleme yapılmalıdır. Nodül boyutu 1 cm'den büyük ise radyolojik görüntüleme yapılmalı ve patognomonik görünüm yoksa biyopsi önerilmelidir. Biyopsi sonucu negatif gelirse hasta 4 aylık periyotlar ile tekrar USG ile izlenmeli nodülde değişiklik olması durumunda tekrardan biyopsi planlanmalıdır (Şekil 6) (126). İlk radyolojik görüntüleme tekniğinde tanı alamayan hasta alternatif diğer görüntüleme yöntemi ile değerlendirilir veya takip programına alınır. Displastik nodüller genelde sabit olarak kalırlar, fakat büyüyen ve kapsül oluşturan lezyonlar HSK olarak değerlendirilebilir. Büyümeyen nodüller bile yakın takip programına alınmalı bu nodüllerin premalign olduğu unutulmamalıdır (126).



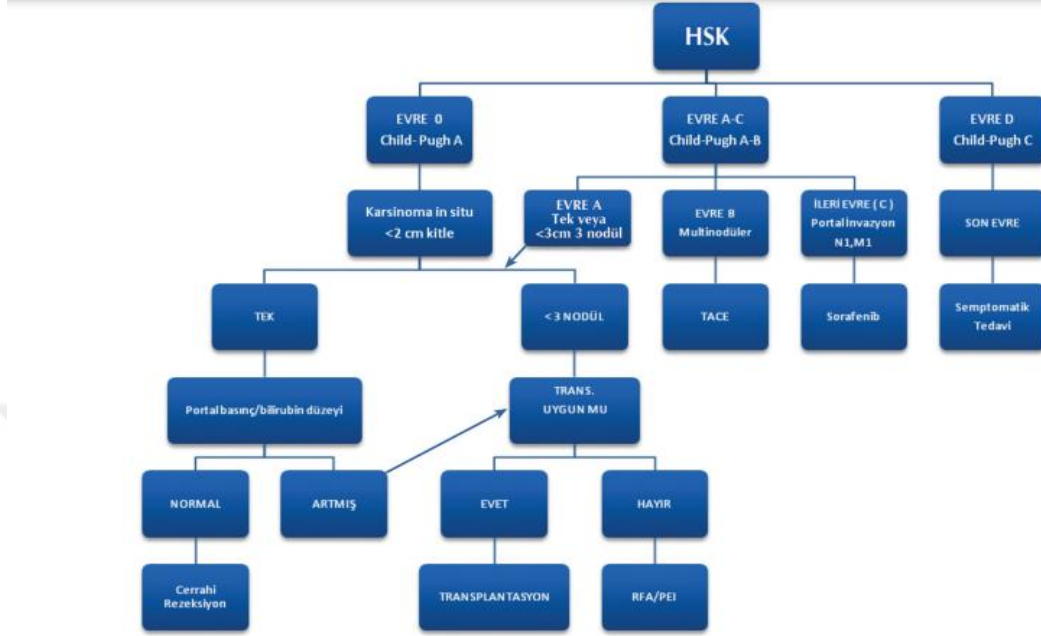
Şekil 6: EASL kılavuzundaki tanı algoritması: ***; aynı boyut ya da küçülme

2.4.5.6. HSK'nın Evrelemesi

HSK'lı hastalarda evreleme tedavinin ve prognozun belirlenmesi açısından önemlidir. Diğer tümörlerden farklı olarak HSK' da prognoz değerlendirmesi yapabilmesi kronik karaciğer hastalığının eşlik etmesinden dolayı komplike olmaktadır. Evreleme yapılabilmesi için tümörün büyüklüğü, nodüllerin sayısı, damar invazyonunun varlığı, karaciğer dışına yayılımının olması, siroz hastalığının evresi (Child Pugh evrelemesi) ve kansere bağlı semptom varlığı (ECOG) gibi prognostik faktörler göz önünde bulundurulmalıdır (134, 143).

HSK için birkaç adet evreleme sistemi yapılmıştır. Evreleme sistemlerinden hangisinin prognozu belirlemede en iyi olduğu konusunda görüş birliği yoktur (134, 144, 145). Bunlar; TNM, Chinese Universty Prognostic Index (CUPI,CNLC), Canser of the Liver Italian Program (CLIP) skoru, Fransız Klasifikasyonu, The Barcelona Clinic Liver Canser (BCLC), Okuda, The Japan İntegrated Staging (JIS)'dir. En sık olarak kullanılanları BLCL, CLIP, Okuda ve TNM'dir. TNM cerrahi sonuçları değerlendirmek için, Okuda, BCLC ve CLIP ise karaciğer fonksiyonu kötü vakalarda prognoz açısından daha yararlıdır (146). Amerika Hepato Pankreato Biliyer Derneği (AHPBA) her hastaya göre evreleme sistemi seçilmesini önermektedir. Cerrahi

uygulanacak hastalarda TNM, cerrahi düşünülmeyen hastalarda BLCL kullanılmasını önermiştir (Şekil 7) (147).



Şekil 7: Barcelona Klinik Karaciğer Kanseri Evreleme ve Tedavi Algoritması

2.4.5.7. TNM Evreleme Sistemi

Bu evreleme sistemi The American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından 2010 yılında yeniden yazılmıştır (Tablo 1) (148). Bu sistem tümör sayısı, büyüklüğü, damar invazyonu ve uzak metastazları dikkate almaktadır. Altta yatan karaciğer hastalığının durumu dikkate alınmaz. TNM sistemi karaciğer rezeksiyonu yapılan ve transplantasyon uygulanan hastalarda prognostik değerleri doğrulanmış tek evreleme sistemidir (149).

Tümör Büyüklüğü (T)			
Tx	Tümör değerlendirilemiyor		
T0	Tümör kanıtı yok		
T1	Soliter tümör vasküler invazyon yok		
T2	Soliter tümör vasküler invazyon var veya <5 cm multipl tümörler		
T3a	>5 cm multipl tümörler		
T3b	Portal veya Hepatik venin dallarını tutan soliter veya multipl tümör		
T4	Komşu organ veya visseral peritonun doğrudan invazyonu		
Lenf Nodu (N)			
Nx	Lenf nodu metastazı değerlendirilemiyor		
N0	Lenf nodu metastazı yok		
N1	Lenf nodu metastazı var		
Uzak Metastaz			
M0	Uzak metastaz yok		
M1	Uzak metastaz var		
Anatomik Evreleme			
Evre 1	T1	N0	M0
Evre 2	T2	N0	M0
Evre 3A	T3a	N0	M0
Evre 3B	T3b	N0	M0
Evre 3C	T4	N0	M0
Evre 4A	Herhangi bir T	N1	M0
Evre 4B	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

Tablo 1: Hepatoselüler Kanser TNM evreleme sistemi

2.4.5.8. HSK'nın Tedavisi

HSK olağan yapısı gereği geç teşhis edilir ve teşhisten sonraki medyan sağkalım yaklaşık 6 ila 20 aydır. Tedavinin temeli cerrahi rezeksiyon olmasına rağmen, hastaların çoğu tümör boyutu veya altta yatan karaciğer fonksiyon bozukluğu nedeniyle uygun değildir (4). Kansere ilişkin semptomların ortaya çıkmasından sonra hastaların sadece %0-10'u, 5 yıl yaşayabilmektedir. Semptomlar oluşmadan önce tümör boyutları küçükken tanı konulursa; cerrahi rezeksiyon ve transplantasyon gibi küratif tedavi seçeneklerinin uygulanması durumunda 5 yıllık yaşam şansının yüksek olması, HSK'da erken tanı ve tedavinin önemini ortaya koymaktadır (150-157).

Amerikan Karaciğer Hastalıkları Araştırma Derneği'nin (AASLD) 2010 yılında güncellenen tedavi kılavuzu verilerine göre tam yanıt ve kür şansının olduğu bilinen tedaviler cerrahi rezeksiyon, transplantasyon ve perkütan ablasyondur (151, 158). Bununla beraber non-küratif tedaviler transarterial embolizasyon (TAE), transarterial kemoembolizasyon (TAKE) ve sorafenib'i kapsamaktadır (158). Tamoksifen, anti-androjenler ve oktreotid gibi ajanların tamamıyla etkisiz olduğu kabul edilmektedir (159, 160).

Sistemik kemoterapinin etkisi ise sınırlıdır. Sık toksisite yapar ve sağkalım süresini arttırdığı gösterilememiştir (161). Seçenekler, hem hastalığın boyutuna hem de herhangi bir tedaviye (tıbbi, girişimsel veya cerrahi) toleransı sınırlayan altta yatan karaciğer hastalığının ciddiyetine göre belirlenir (162). Sirozlu hastaları sınıflandırmak kullanılan Child–Turcotte–Pugh sınıflandırması operasyon kararında ve diğer tedavilerde yol göstericidir (Tablo 2) (162).

Sirozun şiddetinin Child-Pugh sınıflandırması

Parametre	Atanan puanlar		
	1	2	3
asit	Mevcut olmayan	Hafif	İlman
bilirubin	<2 mg/dL (<34,2 mikromol/L)	2 ila 3 mg/dL (34.2 ila 51,3 mikromol/L)	>3 mg/dL (>51,3 mikromol/L)
Albümin	>3,5 g/dL (35 g/L)	2,8 ila 3,5 g/dL (28 ila 35 g/L)	<2.8 g/dL (<28 g/L)
Protrombin zamanı (kontrol üzerinde saniye) veya INR	<4 <1.7	4 ila 6 1,7 ila 2,3	>6 >2.3
ensefalopati	Hiçbiri	1'den 2'ye kadar	3'ten 4'e kadar

Asit derecesine, serum bilirubin ve albümin konsantrasyonlarına, protrombin süresine ve ensefalopatinin derecesine göre karaciğer hastalığının ciddiyetinin modifiye edilmiş Child-Pugh sınıflandırması. Toplam Child-Turcotte-Pugh puanı 5 ila 6, Child-Pugh sınıf A (iyi kompanse edilmiş hastalık), 7 ila 9 sınıf B (önemli fonksiyonel bozulma) ve 10 ila 15 sınıf C (dekompanse hastalık) olarak kabul edilir. Bu sınıflar bir ve iki yıllık hasta sağkalımı ile ilişkilidir: sınıf A: %100 ve %85; B sınıfı: %80 ve %60; ve C sınıfı: %45 ve %35.

Tablo 2: Child –Turcotte -Pugh sınıflandırması

2.4.5.8.1. Küratif Tedavi Yöntemleri

Cerrahi Rezeksiyon

HSK'da cerrahi tedaviyi seçmek için birçok evreleme sistemi kullanılmaktadır. Amerika Birleşik Devlet'inde HSK tanısı almış hastalara cerrahi uygulaması nüfusunun sadece yaklaşık % 5'ine karşılık gelmektedir (163).

HSK için tercih edilen tedavi cerrahi rezeksiyondur ancak hastaların çoğu tümör boyutu veya altta yatan karaciğer fonksiyon bozukluğu nedeniyle cerrahiye uygun değildir. HSK'nın cerrahi tedavisi için hasta seçimi çok önemlidir. Uygun hastaların seçilmesi için preoperatif olarak karaciğer fonksiyonlarının değerlendirilmesi şarttır. Rezeksiyonlardan sonra karaciğer yetmezliği meydana getirecek kadar büyük tümörlerin varlığı, her iki karaciğer lobunu tutmuş

yaygın ve mutlifokal tümör odakları, karaciğer dışı metastaz, tümörün ana portal ven, hepatik ven ve vena kava inferior'u tutması anrezekeabilite kriterlerini oluşturmaktadır. Kısacası; HSK için rezeksiyon sonrası sonuçlarda hem tümörle ilişkili faktörlere hem de altta yatan karaciğer hastalığına atfedilebilen geniş bir değişkenlik vardır (163, 164).

Child-Pugh sınıf A sirozu olan hastalarda küçük tümörler (<5 cm) için sınırlı karaciğer rezeksiyonları ile yüzde 40'ın üzerinde uzun vadeli genel sağkalım oranları elde edilebilir (165). En iyi sonuçlar, intrahepatik metastaz veya vasküler invazyonu (portal veya hepatik ven dallarının yaygın veya mikroskobik invazyonu) olmayan, tümör çapı ≤ 5 cm ve >1 cm negatif cerrahi sınırı olan soliter tümörlü seçilmiş hastalarda rapor edilmiştir. Beş yıllık sağkalım oranları % 78 kadar yüksektir (166). Son seriler, majör hepatektomiye rağmen uygun hasta seçimi ile daha ileri HSK için uzamış sağkalımı göstermektedir (167).

Portal veya hepatik venlerin dallarının makroskopik veya mikroskobik invazyonu, rezeksiyon sonrasında daha düşük bir sağkalım olasılığı ile ilişkilidir. Bir raporda, vasküler invazyonu olan hastalarda beş yıllık sağkalım oranı % 32 iken, vasküler invazyonu olan hastalarda üç yıllık sağkalım yoktu (168).

Tümör boyutu önemli bir prognostik faktördür. HSK'nın hem intrahepatik hem de ekstrahepatik yayılımı özellikle venöz invazyonu olan >5 cm'lik tümörlerde daha yaygındır. Hepsi aynı dönemde hepatektomi uygulanan ≤ 5 cm tümörlü 1000 hasta ile >5 cm tümörlü 1366 hastayı karşılaştıran bir çalışmada, küçük tümörlü hastalarda beş yıllık sağkalım oranları önemli ölçüde daha iyi olduğu görülmüştür (% 63'e karşı % 37). Bununla birlikte, birkaç çalışmada, tek bir HSK için rezeksiyon uygulanan seçilmiş hastalarda % 19 ila 27 arasında değişen beş yıllık sağkalım oranlarını göstermektedir (169-171).

Geniş rezeksiyon sınırlarının önemi tartışılmaktadır. HSK için rezeksiyon uygulanan 225 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada >1 cm tümörsüz sınır elde edildiğinde üç yıllık sağkalım anlamlı olarak daha iyiydi (sırasıyla % 77'ye karşı % 21). Bununla birlikte, daha büyük seriler <1 cm'lik bir negatif marjın kabul edilebilir olduğunu göstermektedir (172, 173).

Karaciğer Transplantasyonu

Hepatosellüler karsinomda karaciğer transplantasyonu için aday gösterilen hasta grubu belirlenmiş olup bugün için erken evre vakalarda transplantasyon sonrası 5 yıllık sağkalım oranı %74'e kadar çıkmıştır (174). Milan kriterleri olarak da bilinen; 5 cm altında tek tümör veya 3 cm altında en fazla 3 tümör olması ve ekstra hepatik yayılım olmaması durumunda hastalar karaciğer transplantasyon listesine alınmaktadır. Bu kriterlerin genişletilmesi için birçok çalışma yapılmış olsa da, bugün için Milan kriterlerinden başka etkinliği ispatlanmış ve kesin olarak önerilmiş bir şema yoktur.

Bağışlanan organ yetersizliği nedeniyle bir hastanın nakil listesine alınması ve transplantasyon işleminin gerçekleştirilmesi arasında süre geçmektedir. Bu sürenin 12 aya kadar uzaması durumunda hastaların %25'lik bir kısmı yayılım ve hastalığın ilerlemesi sonucu artık transplantasyon için uygun kriterleri sağlayamadığından nakil listesinden çıkarılmaktadır (175). Bundan dolayı hastaların transplantasyon için bekledikleri aşamada diğer tedavi seçeneklerinin uygulanması gündeme gelmiştir. Buna göre; 6 aydan uzun süreyle nakil sırası bekleyeceği öngörülen hastaların mevcut tümörlerinin büyüklüğüne göre radyofrekans ablasyon (RFA), perkütan etanol injeksiyonu veya seçilecek başka bir uygun yöntemle tedavilerine başlanması gerekmektedir (176). Aynı zamanda bekleme süresinin 7 ayı aşacağı düşünülen vakalarda canlı donörden nakil yapılması önerilmiş ve bunun sonucunda 5 yıllık yaşam beklentisinin %50-70'lere kadar artabileceği bildirilmiştir. Ancak donörde meydana gelebilecek komplikasyon riskinin %20-40, mortalitenin %0,3-0,5 olması bu işlemin deneyimli merkezlerde yapılmasını zorunlu kılmaktadır (177). Ancak karaciğer transplantasyonu sonrası %8-17 oranında HSK nüksü gelişebildiği gösterilmiştir (178).

Çeşitli çalışmalarda karaciğer transplantasyonu sonrası HSK nüksünün farklı lokalizasyonlarda ve farklı zamanlamada ortaya çıktığını ileri sürmektedirler. HSK için nüks tipik olarak çoğunlukla karaciğer dışı lokasyonlarda ortaya çıkmaktadır ve ortalama nüks gelişme zamanı postop 1 ve 2. yıllar arasında olmaktadır (178, 179).

BCLC B için uygun tedavi olan karaciğer transplantasyonu eğer uygun hasta seçimi ile uygulanırsa genel sağkalım % 65 – 70'leri bulabilmektedir (164).

Perkütan Ablasyon Tedavileri

Perkütan ablasyon, cerrahi rezeksiyon ve transplantasyon için uygun olmayan erken evredeki hastalar ve transplantasyon listesinde bekleyen HSK vakaları için iyi bir tedavi seçeneğidir. Hedeflenen tümör dokusu içine etanol, asetik asit gibi kimyasal ajanlar verilmesi veya RFA, laser ve kriyoterapi gibi işlemlerle, sıcaklık uygulanması esaslarına dayanan prosedürlerdir. Bu grup tedaviler içinde RFA yöntemi ilk seçenek olmalıdır. RFA başarısı, 1 ay sonra yapılacak olan dinamik bilgisayarlı tomografi yöntemiyle değerlendirilebilir (180). Etanol injeksiyonu bugüne kadar en iyi tecrübe edilmiş perkütan ablasyon yöntemidir ve 2 cm'den küçük tümörlerde %90 oranında nekroz sağlayabilmektedir (181). Bu oran 2-3 cm büyüklüğündeki tümörler için %70, 3-5 cm büyüklüğündeki tümörler için %50'ye gerilemektedir. Uzun dönem çalışmalar etanol injeksiyonu yöntemiyle erken evre HSK vakalarında ortalama %50 sağkalımın mümkün olabileceğini göstermiştir (182, 183).

Alkolün tümör içi septalar olması nedeni ile 3 cm'den büyük tümörlerin içine tam olarak yayılamaması nedeni ile ilerleyen günlerde tekrarlanması gerekebilir. Bazı otoriteler bu gibi büyük kitlelerde etanol injeksiyonu yönteminin etkinliğini arttırmak için arteriyel embolizasyonla desteklenmesini önerse de asıl kabul edilen görüş bu tip tümörlerde RFA yönteminin tercih edilmesidir (184). RFA yönteminin etkinliği 2 cm altındaki tümörlerde etanol injeksiyonu yöntemiyle benzer olsa da; daha geniş tümörlerde etkinlik belirgin olarak daha fazladır ve daha az seansla işlemin yapılabilmesi de ayrı bir avantajdır (182, 185). Dezavantajları ise maliyetinin daha fazla olması ve %10 oranında komplikasyon riskinin (plevral effüzyon, karaciğer enfarktı, peritoneal kanama, hepatik abse, tümör lizis sendromu ve %0,3 oranında RFA'a bağlı mortalite) olmasıdır (186-188). Subkapsüler yerleşimli ve/veya kötü diferansiye tümörlerde peritoneal yan etki riski yüksek olduğu için bu tip kitlelerde RFA yöntemi uygulanmamalıdır (189).

Her iki yöntem göz önüne alındığında 5 yıllık yaşam beklentisi RFA için daha fazladır. RFA < 2 cm tümörlerde 5 yıllık yaşam şansının %70 kadar yüksek olabilmesi nedeniyle cerrahi rezeksiyon yöntemiyle bile kıyaslanmıştır (190). Ancak cerrahi yöntemde tümörün bütününün ortadan kaldırılmasının mümkün olması sebebiyle RFA yöntemi HSK'de ilk sıra tedavisi olarak kabul görmemektedir (190). Japonya'da yapılan bir çalışmada RFA ve cerrahi rezeksiyon yöntemiyle tedavi edilmiş < 2 cm tümöre sahip erken evre HSK tanıli hastalar takip edilmiş ve sonuçları karşılaştırılmıştır. Hastalıksız yaşam süresinin cerrahi rezeksiyon yapılan hastalarda

kısa ve uzun dönem takiplerinde daha fazla olduğu belirlenmiş olup, total sağkalım süresi bakımından iki grup arasında belirgin fark saptanmamıştır (191).

2.4.5.8.2. Non-Küratif (Palyatif) Tedavi Yöntemleri

Trans-Arteriyel Embolizasyon-Kemoembolizasyon

Hepatosellüler karsinom, progresyonu sırasında neo-anjiogenez yapan bir tümördür. Erken evrelerde portal venden beslenmekteyken, ileri evrelerde kan akımı hepatik arterden sağlanır. Besleyen arterin tıkanması suretiyle tümör içinde nekroz yaratılması işlemi transarteriyel embolizasyon (TAE) adını almaktadır. Bu işlem sırasında arter içine kemoterapötik ilaç (en sık adriamisin ve sisplatin) ile birlikte bu ilacın emiliminin ve tümör hücrelerine olan etkinliğinin artmasını sağlayan lipiodol gibi bir yardımcı maddenin verilmesi halinde, uygulanan prosedür transarteriyel kemoembolizasyon (TAKE) adını alır (192). TAE/TAKE, 5 cm'den büyük, multifokal, ekstra hepatik yayılım göstermeyen ve küratif tedavilerin mümkün olmadığı kitleler için en uygun tedavidir.

Vakaların yarısından fazlasında tümör nekrozu hedefine ulaşılır (193). İşlemden bir ay sonra bakılan tümör markerları sonuçları ve bilgisayarlı tomografi, magnetik rezonans gibi görüntüleme yöntemleri ile tedavi başarısı değerlendirilebilir. Hastaların %2'den daha düşük bir kesiminde tedaviye tam cevap alınır, büyük bir kısmında ise beslenmesi azaltılan tümör dokusu zaman içinde kan akımını tekrar kazanır ve büyümeye devam eder. Ancak işlem sonrası büyüme daha yavaş olur ve beklenen yaşam süresi hastaların %20-60'lık bir kesiminde kesin olarak uzar (192, 193).

TAE/TAKE, biliyer obstrüksiyon, ensefalopati ve portal ven trombozu gibi durumlarda kontrendikedir. Semptomatik, ileri karaciğer yetmezlikli olgularda işlem sonrası mortalite riski artmış olduğundan bu hasta grubuna da TAE/TAKE uygulanmamalıdır. TAKE komplikasyonları RFA ile benzerdir, yan etkileri kullanılan kemoterapötik ajanın yan etkilerinden oluşmaktadır (bulantı, kusma, kemik iliği depresyonu, alopesi, renal yetmezlik vb). Hepatik arterin akut iskemisi sonucu ise, hastaların yaklaşık yarısında post-embolizasyon sendromu adı verilen, kendini ileus, ateş ve karın ağrısıyla gösteren bir klinik tablo meydana gelir. Ateş, çoğunlukla vücut tarafından tümör nekrozuna verilen bir cevap olsa da; bazı hastalarda kolesistit ve hepatik abse gibi enfeksiyöz bir sebebe bağlı da gelişmiş olabilir. Post-

embolizasyon sendromu hastaların büyük bir kısmında 48 saat içinde kendi kendini sınırlar ve düzelir.

Portal ven trombozu gibi kontrendikasyonlar varlığında TAE/TAKE tedavisinin uygulanamaması durumunda bu grup hastalarda iyi tolere edilebilen transarteriyel radyoembolizasyon yöntemi uygulanabilir. Diğer iki yönteme benzer şekilde radyoembolizasyonda da yttrium-90 veya iodine-131 içeren partiküller hepatik arterde emboli oluşturmak amacıyla kullanılır. Transarteriyel radyoembolizasyon hakkında yapılmış çok sayıda çalışma olmamakla beraber, portal ven trombozlu ve sirozu olmayan hastalarda ortalama yaşam süresini uzattığı belirtilmektedir (194).

Sorafenib

VGEFR 1-2-3, B-Raf, PDGFR- β c-Kit ve Raf-1 reseptörleri üzerinde etki göstererek antianjiogenezi ve proapoptozu artıran bir kinaz inhibitörüdür. Rezeke edilemeyen HSK tedavisi için onaylanmış tek birinci basamak sistemik tedavidir (158, 195, 196).

TAKE tedavisinden fayda görmemiş ileri evre hepatosellüler karsinom vakarında kullanılan FDA onaylı multikinaz inhibitörü ilaçtır. Yukarıda bahsedilen efektif prosedürlerle daha fazla fayda görmeyeceği düşünülen ve karaciğer fonksiyonları korunmuş hastalarda palyasyon amacıyla endikedir. Hastaların %5'inde parsiyel cevap oluşturabilir, sağkalım ve hastalığın progresyon süresini plasebo grubuna göre yaklaşık 3-4 ay uzattığı belirlenmiştir. Alt grup analizleri, hastalık etiyojisi, başlangıç tümör yükü, performans durumu, tümör evresi ve önceki tedavi gibi temel koşullardan bağımsız olarak sorafenib'in plaseboya kıyasla sürekli olarak sağkalım yararı sağladığını göstermiştir (195, 197).

Hiçbir çalışma sorafenib ve sitotoksik kemoterapinin kombine uygulanmasını, tek başına birinci basamak sorafenibe göre sağkalım avantajını gösterememiştir.

Sorafenib gibi antianjiyogenik tirozin kinaz inhibitörlerinin yan etkileri arasında hipertansiyon, renal toksisite, arteriyel tromboembolizm, kanama, kardiyotoksisite, tiroid disfonksiyonu, el-ayak deri reaksiyonu, döküntü, kaşıntı, alopesi, yara iyileşmesi ile ilgili sorunlar, potansiyel olarak ölümcül hepatotoksisite, toksik/metabolik ensefalopati ve kas kaybı bulunmaktadır (198, 199).

Regorafenib

Antiproliferatif ve antianjiyogenez etkileri olan multikinaz inhibitörüdür. Sorafenibe tolerans gösteremeyen veya alerjik durumlardan dolayı kullanamayan ECOG 0-1 ve Child Pugh A olan hastaların sağkalımını %37 oranında uzattığı gösterilmiştir. Faz 3 RESORCE çalışmasında sorafenib ile progrese olan HSK'lı hastalara regorafenib verilmiş ve ortalama sağkalım 10,6 aya karşılık 7,8 ay olarak anlamlı bulunmuştur (200). Sorafenib intoleransı olan hastalar için regorafenib uygun bir seçenek olarak kullanılmaktadır. Regorafenib, birinci basamak immünoterapiden sonra remisyona girmeyen hastalar için de bir seçenektir (200).

Lenvatinib

Lenvatinib, VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3'ün yanı sıra fibroblast büyüme faktörü reseptörleri (FGFR) 1-4, trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) alfa, RET ve KIT inhibitörüdür. Yakın zamanda yapılan çalışma sonucunda sağkalım ve ilaç yan etkileri bakımında lenvatinib ile sorafenib karşılaştırılmış benzer etkiler görülmüştür (201). REFLECT çalışmasında lenvatinibin, sağkalımı iyileştiren birinci basamak tedavide etkinliğinin sorafenib'den daha düşük olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca REFLECT çalışmasında sorafenib ile karşılaştırıldığında lenvatinib daha iyi tolere edilmiş, daha yüksek bir objektif yanıt oranı elde edilmiş ve tümör progresyon süresini geciktirdiği görülmüştür (202).

Cabozantinib

VEGFR 2, Ret ve Met inhibisyonu yapan oral bir multikinazdır. Faz 3 CELESTIAL çalışmasında plaseboya göre genel sağkalım cabozantinib alanlarda 10,8 ay, plaseboda 8 ay olarak tespit edilmiştir (203). Daha önce sorafenib ile tedavi edilen hastalarda, cabozantinibin tek başına destekleyici tedaviye kıyasla genel sağkalımı iyileştirdiği gösterilmiştir. Sorafenib'de progresyondan sonra ikinci basamak tedavi için cabozantinibin nivolumab/ipilimumab veya pembrolizumab monoterapisine bir alternatif olduğu düşünülmektedir. Ancak çoğu hasta için immünoterapi tercih edilir. Cabozantinib, birinci basamak immünoterapiden sonra ilerleyen hastalar için de iyi bir seçenektir (203, 204).

Ramucirumab

Ramucirumab, VEGFR-2'ye bağlanan ve reseptör aktivasyonunu bloke eden immünoglobulin G alt sınıf 1 (IgG1) sınıfının bir rekombinant monoklonal antikorudur. Ramucirumab, sorafenib veya birinci basamak immünoterapinin başarısızlığından sonra uygun

bir ikinci basamak seçeneğidir, ancak yarar başlangıçta yüksek AFP düzeyleri ve ileri evre HSK olan hastalarda sınırlı görünmektedir (205, 206).

Apatinib

Apatinib, Çin'de ilerlemiş mide kanserinin ikinci basamak tedavisi için onaylanmış, oral olarak kullanılan aktif bir VEGFR-2 inhibitörüdür. Amerika Birleşik Devletleri veya Avrupa'da mevcut değildir. Sorafenib ve oksaliptatin bazlı kemoterapinin başarısızlığından sonra ilerlemiş HSK'nın ikinci basamak tedavisi için kullanılır. Child-Pugh sınıf A veya B'den (≤ 7) daha kötü olmayan 393 hastada yapılan bir faz III randomize plasebo kontrollü çalışmada etkinliği gösterilmiştir (207).

Bevacizumab ve Atezolizumab

Bevacizumab ve atezolizumab ile kombine tedavinin, birinci basamak sorafenib monoterapisine kıyasla sağkalımı iyileştirdiği gösterilmiştir. Child-Pugh sınıf A sirozundan daha kötü olmayan, mükemmel performans durumu olan, bevacizumab için herhangi bir kontrendikasyonu olmayan ve karaciğer transplantasyonunu takiben nüksetmeyen sağlıklı hastalar için sorafenib monoterapisi yerine atezolizumab ile bevacizumab kombine tedavisi önerilmektedir (208, 209).

Sintilimab/bevacizumab

Başka bir anti-PD-1 monoklonal antikoru olan sintilimab ile biyobenzer bir bevacizumab kombinasyonu da Çin ORIENT-32 çalışmasında tek başına sorafenib'den daha iyi performans göstermiştir (210).

Tremelimumab/durvalumab

Durvalumab/tremelimumab ile kombine tedavinin, birinci basamak sorafenib monoterapisine göre sağkalımı iyileştirdiği gösterilmiştir. Child-Pugh sınıf A sirozundan daha kötü olmayan, mükemmel bir performans durumu olan, karaciğer transplantasyonunu takiben nüks etmeyen ve bevacizumab alamayan sağlıklı hastalar için tremelimumab ile durvalumab, bevacizumab ve atezolizumab'a bir alternatiftir (211).

Donafenib

Donafenib, büyük ölçüde ilaç metabolize edici hepatik enzimlere duyarlılığın azalması nedeniyle daha uygun bir farmakokinetik profile sahip bir sorafenib türevidir (212). İlerlemiş HSK'nın birinci basamak tedavisi için her iki ilacı (donafenib-sorafenib) doğrudan karşılaştıran bir Çin çalışmasında, donafenib ile orta düzeyde üstün etkinlik ve tolere edilebilirlik

gösterilmiştir (207). Donafenib, daha önce sistemik tedavi almamış, rezeke edilemeyen HSK hastalarının tedavisi için Çin'de onaylanmıştır (213) ancak, başka bir yerde mevcut değildir.

Sistemik Kemoterapi

Tedavi rejimine hastanın performansına ve karaciğer rezervine bakılarak karar verilmektedir. HSK'lı hastalarda sitotoksik kemoterapinin etkinliği orta düzeydedir ve genel olarak fayda süresi sınırlıdır. Birkaç randomize çalışma yapılmış olmasına rağmen, hiçbir rejim diğerinden üstün değildir. Çalışmalarda medyan sağkalım kısa olmuştur (tüm vakalarda <12 ay).

Sorafenib intoleransı olmayan, nivolumab için aday olmayan, kombinasyon kemoterapisini tolere edebilen hastalara Gempitabin-oxaliplatin ile kemoterapi önerilmektedir. Oral kapesitabin veya lökovorin ile modüle edilmiş fluorourasil tedavi seçeneklerindendir. Moleküler hedefli tedavi ve immün kontrol noktası inhibitörleri kullanılarak immünoterapinin ortaya çıkmasıyla birlikte, sistemik konvansiyonel kemoterapinin ilerlemiş HSK'deki rolü belirsiz hale gelmiştir. Bununla birlikte, moleküler olarak hedeflenen ajanlar ve immün kontrol noktası inhibitörleri pahalıdır, çoğunluğu Child-Pugh A sirozundan daha kötü olmayan hastalar için araştırılmış ve onaylanmıştır. Diğer tedavileri alamayan veya karaciğer fonksiyonu daha az korunmuş hastalar için sistemik kemoterapi bir seçenek olmaya devam etmektedir (214).

Neoadjuvan tedavi

Neoadjuvan tedaviler, ilerlemiş hastalığın evresini düşürmek, uygun hasta seçimini sağlamak ve rezeksiyon öncesi tedaviye tümör yanıtını değerlendirmek için diğer solid organ maligniteleri olan hastalarda yaygın olarak kullanılırken, HSK yönetimindeki rolüleri daha az bilinir. Öte yandan agresif biyolojisi, genellikle ileri evrede teşhisinin sık olması ve altta yatan kronik karaciğer hastalığı nedeniyle verilen cerrahi sırasında normal karaciğer fonksiyonunu koruma ihtiyacında gerekliliği, HSK için neoadjuvan yaklaşımının uygun olabileceğini düşündürmektedir (215).

Neoadjuvan tedavide TAKE'nin rolü gelişmeye devam etmektedir. Bazı çalışmalar, radyografik yanıt gelişen hastalar arasında uzun vadeli sonuçların iyileştirilmesinin yanı sıra bazı hastaların rezeksiyona indirgenmesi için bir fırsat önerse de, bu tedaviler şu anda HSK'lı hastaların azınlığında uygulanmaktadır. TAKE yaygın olarak karaciğer transplantından önce köprüleme tedavisi olarak kullanılsa da, rezeksiyon öncesi neoadjuvan düzenlemedeki rolü belirsizliğini korumakta ve rutin olarak önerilmemektedir (216).

Transarterial Radyoembolizasyonun (TARE) avantajı portal ven trombozu olan hastalarda uygulanmasıdır. Malign lobar portal ven trombozu olan hastalar tipik olarak TAKE için aday olarak kabul edilmez. Bu nedenle TARE, bu tür hastaların neoadjuvan yönetiminde alternatif ve tercih edilen bir yaklaşım sunmaktadır (215). TARE ile TAKE'yi karşılaştıran daha önce bildirilmiş, randomize olmayan bir çalışmada, TARE, TAKE'den daha iyi bir yanıtla sonuçlandırılmış görülmüştür (%61'e karşı %37 kısmi yanıt). Bu çalışmanın diğer bir sonucunda daha fazla hastanın evresinin T3'ten T2'ye indirilmesiyle sonuçlanmıştır. Bu sonuç özellikle transplant bekleyen hastalar için kritik olabilir (217).

Mevcut kemoterapotik ajanların neoadjuvan sebebiyle kullanımı kısıtlıdır. Bunun sebebi etkinlik düzeyinin düşük olması ve komplikasyonlarının fazlalığıdır (215). Örneğin kombine faz III çalışmasında sorafenib ve doksorubisin verilen ileri evre hasta grubunda tümör hücrelerinde regresyon görülmemiş olup, bu tedaviye ikincil yaygın komplikasyonlar görülmüştür. Bunlar; sepsis, disfaji, pnömoni, kardiyak, karaciğer yetmezliği ve ikincil bir malignite olduğu görülmüştür (218).

İmmünoterapiler

HSK inflamasyona bağlı bir tümör olduğu için hasta sonuçları ve tümöre karşı immün yanıt arasında bir bağlantı olduğu görülmüştür. İnsan monoklonal antikoru Nivolumab programlanmış hücre ölümü reseptörleri üzerinde etki göstererek T hücrelerin tümör üzerinde immün aktivitesini aktiflediği görülmüştür. Faz II ve faz III çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (219).

Nivolumab

Tirozin kinaz inhibitörlerinin ve antianjiyojenik ilaçların kontrendike olduğu veya mevcut olmadığı ileri evre HSK'lı hastalarda birinci basamak tedavi olarak nivolumab düşünülebilir, ancak nivolumab monoterapisi Amerika Birleşik Devletleri'nde veya Avrupa'da ön basamak tedavisi için onaylanmamıştır (220).

Durvalumab

Durvalumab, bir anti-PD-L1 monoklonal antikordur. İlerlemiş HSK'nın birinci basamak tedavisi için durvalumab monoterapisinin sorafenib'den aşağı olmadığı, sorafenib ile tek başına durvalumabı veya tremelimumab'ı karşılaştıran üç kollu HIMALAYA çalışmasının bir ön raporunda gösterilmiştir (221). Hastalar bevacizumab/atezolizumab veya

durvalumab/tremelimumab ile kombine tedavi için uygun değilse, durvalumab monoterapisinin sorafenibe makul bir alternatif oluşturduğu düşünülmektedir (211).

Son raporlar, normal karaciğer fonksiyonu korunduğu sürece, ilerlemiş hastalığı veya portal hipertansiyonu olan birçok hasta için hepatik rezeksiyonun uygun bir tedavi olduğunu göstermiştir. Karaciğer transplantasyonu (n = 1218) veya hepatik rezeksiyon (n = 2068) ile tedavi edilen 3286 HSK hastasından elde edilen veriler, hastalıksız sağkalım dikkate alındığında, tedavi oranı karaciğer transplantasyonundan sonra %74.1 ve hepatik rezeksiyondan sonra %24,1'dir (222).

Sonuç olarak, HSK'nın optimal multidisipliner yönetimi hızla gelişmeye devam etmektedir. Cerrahi rezeksiyon HSK'lı hastalar için önemli bir tedavi seçeneği olmaya devam ederken, neoadjuvan ve/veya adjuvan tedavi stratejilerinin eklenmesi, cerrahi adayı olan hastaların oranını artırabilir ve cerrahi geçirenlerin uzun vadeli sonuçlarını iyileştirebilir. İmmünoterapideki gelişmeler de dahil olmak üzere bölgesel ve sistemik tedavilerdeki heyecan verici gelişmelerle birlikte, multimodalite tedavisinin optimal bileşenlerini belirlemek için gelecekteki araştırmalara ihtiyaç duyulacaktır (215).

HSK günümüzde halen %80-90 oranında efektif tedavi uygulanamayacak aşamada tanı koyulan ve bu sebeple vakalarının büyük bir kısmı 2 yıl içinde kaybedilen agresif bir tümördür. Ultrasonografi ve tümör belirteçleri ile düzenli aralıklarla taramaları yapılan kronik hepatitli hastalara erken evrede tanı konabilmektedir. Bu hastalar küratif yöntemlerle tedavi edilmekte ve 5 yıllık sağkalım oranları %70 ve üzerinde olabilmektedir. Ancak diğer bir problem de küratif yöntem sonrası vakalara uygulanacak nüks önleyici tedavilerin yetersizliğidir. Bu amaçla denenmiş tüm tedavilerin efektif olmadığı bildirilmiştir. Hastaların büyük bir bölümünde 5 yıl içinde nüks görülmektedir. Küratif tedavi uygulanamayan vakalara palyasyon amaçlı tedaviler denenmekte olup sağkalım süresinin uzatılması amaçlanmaktadır. Tirozin kinaz inhibitörleri ve büyüme faktörleri reseptör blokerleriyle yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlar alınmıştır ancak bunların başarısı da beklenen yaşam süresini en fazla 6 ay uzatmakla sınırlı kalmıştır. Yeni tedavilere duyulan ihtiyaç günümüzde de devam etmektedir (164).

2.6. Tarantula Cubensis

Örümceklerin çoğu, polipeptitler, poliamin nörotoksinler, nükleik asitler, serbest asitler, biyojenik aminler ve inorganik iyonlar içeren karmaşık bir kokteyl zehirler kullanır. Bu bileşikler hem omurgalılarda hem de omurgasızlarda çok çeşitli patolojik etkilere neden olabilir. Peptitler, antimikrobiyal, antifungal, antiparazitik, antiaritmik, analjezik, sitolitik, hemolitik ve antitümör aktiviteleri daha önce tanımlanmış geniş bir biyoaktivite yelpazesine sahip örümcek zehirlerinin ana bileşiğidir (223). Küba tarantulası olarak da bilinen *Tarantula cubensis*, Theraphosidae örümcek ailesine ait büyük bir arakniddir (224).

Bu zehrin memeliye enjekte edilmesi anjiyonörodem, şişme, iltihaplanma, şiddetli alerjik reaksiyonlara, hatta nekroz ve kalıcı doku ölümüne neden olabilir. Theranekron® veteriner tıbbında homeopatik tedavi olarak kullanılan tarantula cubensis'in ticari olarak temin edilebilen alkollü ekstresidir (225).

Tarantula cubensis zehiri, hayvan yaraları ve tümörleri gibi çok çeşitli durumların tedavisinde yararlı homeopatik ilaç şeklinde farmakolojik olarak karakterize edilmiştir. Theranekron®'un antitümör etkileri klinik veterinerlik tıbbında kanıtlanmıştır (226, 227).

Bunun yanında insan meme gland kanser hücre hattında ve insan baş boyun kanser hücre hatlarında Theranekron®'un antitümör etkisi gösterilmiştir (6).

Ayrıca deri altı yolla enjekte edilen TCE'nin hücre proliferasyonunu azalttığı ve kanser hücrelerinde apoptozisi artırdığı tespit edilmiştir (228).

TCE'nin insan hücre kültürlerindeki antitümör aktivitesini caspaz-3 proteinini aktive ederek apoptozis üzerinden gerçekleştirildiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda Ki-67 (mitotik aktiviteyi temsil eder) ve Bcl-2'nin (bir anti-apoptotik protein) ekspresyonunun Theranekron®'un tedavi öncesi dokulara kıyasla tedavi sonrası dokularda önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur.

Ayrıca, Bcl-2 pozitif tümörleri olan hastaların, tümörleri uygun TCE ekstresi verilen meme kanseri olgusunda Bcl-2 ekspresyonu olmayan kişilere göre üç kat daha düşük relapssız sağkalım oranlarına sahip oldukları bulunmuştur (226, 229). Tedavi öncesi dokularda gözlenen yüksek Bcl-2 ve Ki-67 ekspresyonu seviyeleri ve tedavi sonrası dokularda düşük seviyeler, TCE uygulamasının T2N0M0 olarak sınıflandırılan köpek meme adenokarsinomlarında tümör büyümesinin kontrolüne yardımcı olabileceğini göstermiştir (226).

Hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda Tarantula Cubensis Ekstresinin antitümöral aktivitesini Ki-67 ve Bcl-2 ekspresyonunda önemli bir azalmaya yol açarak gösterdiği bulunmuştur.

Bu bilgiler ışığında Tarantula Cubensis alkol ekstresinin tümör hücrelerinde apoptozisi uyardığını gösteren çalışmalar olması nedeni ile bizde Tarantula Cubensis Ekstresinin insan hepatosellüler kanser hücreleri üzerinde antitümör etkisinin olacağını düşünöyoruz. Bu konu ile ilgi yaptığımız literatür incelemesinde benzer bir çalışmaya rastlayamadık. Bu nedenle çalışmamızın özgün bir çalışma olduğunu düşünöyoruz.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı akademik kurul kararı ile 13/10/2021 tarihinde onay almış, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada *Tarantula Cubensis* ekstresinin insan karaciğer kanseri hücre hattı üzerindeki antitumor etkisi araştırıldı. *Tarantula Cubensis* ekstresinin Ki-67 ekspresyonunu azaltma etkisi ile insan karaciğer kanseri hücre kültürlerindeki antitumor etkileri araştırılmıştır. *Tarantula Cubensis* ekstresi ve insan hücre kültürleri üzerinde antitumor etki ile ilgili çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmamız özgün bir çalışmadır.

Projede uygulanacak yöntem ve araştırma teknikleri (veri toplama araçları ve analiz yöntemleri dahil) ilgili literatüre atıf yapılarak açıklandı. Yöntem ve tekniklerin projede öngörülen amaç ve hedeflere ulaşmaya elverişli olduğu ortaya konuldu. Kullanılacak yöntemin işleyişini, takibini ve anlaşılmasını kolaylaştıracak şekil, şema, grafiklerden faydalanıldı.

Hücre hattının elde edilmesi ve pasajlanması

Bu çalışmada HepG2 (ATCC: HB-8065) hücreleri kullanıldı. Azot tankındaki hücreler uygun koşullarda çözdürülerek hücre yoğunluğu ve canlılığı tripan mavisiyle thoma lamında sayıldı. Daha sonra 25 cm² hücre kültürü flasklarında 2.0 x 10⁵ - 3.0 x 10⁵ olacak şekilde hücreler, %10 ısı ile inaktive (heat-inactivated) edilmiş fetal sığır serumu (FBS) ve 1% penicillin-streptomycin (P/S) takviye edilmiş, 5 mL EMEM ortamında ekildi. Hücreler 37°C'de %5 CO₂ inkübatöründe kültüre edildi. %50-%80 konflent olan hücreler 0.25 % trypsin EDTA kullanılarak 75 cm² lik polistren flasklara pasajlandı.

TCE Ekstresinin Elde Edilmesi

Tarantula Cubensis venomunun etanol ekstresini içeren, literatürde de adı geçen Theranekron® D6 yerel bir veteriner kliniğinden veteriner izni ile elde edilmiş ve kullanıma hazır olan ekstresi uygulandı.

Hücre canlılığı ve etkin TCE dozunun belirlenmesi

TCE'nin anti-sitotoksitesi, MTT testi ile kullanılarak değerlendirildi. Sarı bir tetrazol olan MTT, canlı hücrelerde mor formazana indirgenir. Canlı hücreler tarafından MTT'nin (3-(4,5-di-metiltiazol-2-il)-2,5 Difeniltetrazolyum Bromür) indirgenmesinin kolorimetrik

ölçümüne dayanır. HepG2 hücreleri toplanarak, kullanılan medium içinde süspanse edildi. 100 µl kültür ortamı ile her bir kuyucuğa 5x10⁴ ml hücre yoğunluğunda 96 kuyucuklu kültür flasklarına ekildi. Kontrol grubunda sadece saf HepG2 hücreleri mevcuttu. 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml ve 500 µg/ml TCE konsantrasyonları üzer kuyucuk halinde ekilip ve tüm dozlar için 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra 10 µl MTT solüsyonu her kuyucuğa eklenip, 4 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra formazan tuzlarını çözmek için 200 µl DMSO (dimetilsülfoksit) ilave edildi. Absorbans değeri nanodrop spektrofotometre (Biotech ELx50) kullanılarak ile 570 nm'de ölçüldü. Deney setlerinde hücreler her ilaç dozu için 3 paralel halinde ekilerek ve deneyler birbirinden bağımsız olarak 3 kez tekrarlandı. Kontrol amaçlı olarak TCE eklenmeyen hücreler ve TCE'nin çözücüsü kullanıldı.

Doz-Yanıt Eğrilerinin ve IC50 Değerlerinin Türetilmesi

Verileri normalleştirmek için GraphPad Prism 5.0 kullanıldı. Log-dönüştürülmüş ilaç konsantrasyonları daha sonra konsantrasyon-yanıtı karşı çizildi ve yarı maksimum inhibitör konsantrasyon (IC50) değerleri, doğrusal olmayan regresyon logu ile normalleştirilmiş tepki değişken eğimi (GraphPad Software, ABD) kullanılarak belirlenildi.

Deney Gruplarının Oluşturulması

Karaciğer hücre hattı kontrol: HepG2 (HB-8065) hücre hattı

Karaciğer hücre hattı+TCE ekstresi : HepG2 hücre hattına TCE (1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml ve 500 µg/ml) verilmesi

MTT sitotoksosite testinden sonra etkin (IC50) dozu belirlenerek immünohistokimya aşamasına geçildi.

İmmünohistokimyasal Yöntemler İçin Hücrelerin Hazırlanması

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyinde %70 konflent olduklarında tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırıldı. Tripin mavisi boyası ile boyanan hücreler, thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak ve besi ortalamalarına

alındı. Hücreler daha önce hazırlanan besiyerinde süspansiyon haline getirildi. 24 kuyucuklu kültür plakalarına yuvarlak 10 mm' lik lameller plate içine yerleştirildi. Sterilizasyon için önceden en az 4 saat UV'de bekletildi. Cam lamellere hücrelerin yapışmasını sağlamak amacıyla kuyucuklara 50 µl FBS eklenerek 37°C'de etüvde 30 dk bekletildi. FBS mikropipet yardımıyla çekilip atılarak üzerine her kuyucuğa toplam hacim 0,5 ml olacak şekilde 4x10⁴ hücre medium karışımı ekildi. 24-48 saat boyunca hücrelerin yapışması sağlandı. MTT yöntemi ile belirlenen en etkin olan TCE dozu olan 1 µg/ml ile 5µg/ml, hücreler üzerine uygulandı. Aynı ayrı kuyucuk olacak şekilde 24-48-72 saat süre ile etüvde bekletilen hücreler daha sonra içerikleri atılarak %4'lük paraformaldehit ile 30 dk fikse edildi.

İmmünotokimya Yöntemi ile Ki-67 Sinyal Yolu Etkinliğinin Araştırılması

İmmünotokimyasal çalışmalarda streptavidin biotin kompleks (Strept-ABC) immunoperoksidaz tekniği uygulandı. Bu sayede hücrelerde var olan bu antijenlere kullandığımız adı geçen antikorların spesifik bağlanması sağlanarak hücrelerdeki miktarları ile ilgili bilgi edinilmiş olundu. Yuvarlak lameller üzerinde çoğaltılarak tespit edilmiş hücrelerdeki fiksasyon solüsyonu hücre yüzeyinden uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 2x5 dk PBS ile yıkandı. Hücrelere %1'lik Triton X-100 içeren PBS solüsyonu eklendi ve plakalar 5 dk +4°C'de inkübe edilerek permeabilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Permeabilizasyon solüsyonu hücre yüzeyinden uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile 2x5 dk yıkama yapıldı. Endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için PBS içinde hazırlanmış %4'lük H₂O₂ eklendi ve hücreler 5 dk oda sıcaklığında tutuldu. 2x5 dk PBS ile yıkanan lamellere oda sıcaklığında 1 saat bloking solüsyonu uygulanarak özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemten sonra yıkama yapılmadan tüm dozlar ve ekstrakt uygulamaları için ayrı ayrı Ki-67 (anti-human monoclonal primer antibody) primer antikor aşamasına geçildi. Bu işlem için PBS ile 1/200 oranında dilüe edilen primer antikor uygulanacak hücreler 1 gece +4°C'de bekletildi. Süre sonunda hücreler 3x3 dk PBS ile yıkandı ve 30 dk uygun biyotinli sekonder antikor (rabbit polyclonal sekonder antibody) uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı. 3x3 dk PBS ile yıkamanın ardından hücreler 30 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine maruz bırakıldı, böylece enzimin biyotine bağlanması sağlandı. Lameller yeniden 3x3 dk PBS ile yıkandıktan sonra DAB uygulanarak gözle görülebilen immün tepkimenin açığa çıkması sağlandı. Zemin (zıt) boyamasında Mayers'in Hematoksileni kullanıldı. Mounting medium ile lameller lamalar üzerine kapatıldı. Boyanmış hücre örnekleri, Binoküler Mikroskop (Carl Zeiss AX10) ışık mikroskobu ile incelendi. Uygulanan immün boyama göz önünde bulundurularak yapılan değerlendirmeler sonucunda, Ki-67 pozitif hücreler saptanarak ve bu hücreler 1 merkez,

5 perifer toplam 6 bölge için tüm preparatlarda incelenip, immünreaktivite açısından 100 hücre sayılarak istatistik uygulaması için veriler oluşturuldu. “0 = Hiç Yok, 1 = Zayıf, 2 = Orta, 3 Ortadan Yoğuna, 4 = Yoğun ” sayısal veriler ile H-Score Analizi yapıldı (230).

İstatistik Analizlerin Yapılması

Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak değerlendirildi. Sitotoksosite deneyleri farklı zamanlarda 3 seri halinde yapıldı ve veri analizi için GraphPad Prism 5.0 yazılımı (GraphPad Software, San Diego, ABD) kullanıldı. Hücrelerin hayatta kalma verileri sayı ve yüzdelerle, saatlere göre ayrı ayrı incelendi. Her bir saat diliminde ilaç grubu ile hücre canlılığı arasındaki ilişkiler Pearson’ın ki-kare testi ile değerlendirildi. Analizler R (versiyon 4.2.1) istatistiksel yazılım programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Etkin tarantula Cubensis Ekstresinin Dozunun belirlenmesi

İnsan hepatocellüler kanser hücre hattı(HepG2) üzerine, en etkin dozu belirleyebilmek amacı ile 1-5-10-20-50-100-250-500 mikrogram/ml olarak 8 farklı doz Tarantula Cubensis Ekstresi uygulandı.

HepG2 hücreleri üzerine Tarantula Cubensis Ekstresinin sitotoksik etkisi uygulanan 24, 48 ve 72 saat bekleme süreleri ardından MTT yöntemi ile araştırıldı. MTT testi sonucunda sitotoksitesi ve baskılayıcı konsantrasyon (IC50) değeri belirlendi. MTT testi kapsamında TCE'nin absorbans değerleri tespit edildi (Tablo 3).

MTT sonuçlar (MTT Results)										
İlaç konsantrasyon (µg/ml) (Drug con.)		0/kontrol	1	5	10	20	50	100	250	500
Absorbans/optik yoğunluk (Absorbance)	24 saat	1,2248	1,0562	1,0199	0,7351	0,5195	0,4806	0,5096	0,423	0,3489
	24 saat	1,338	1,0842	1,2284	0,8047	0,6246	0,5038	0,3568	0,5142	0,3291
	48 saat	1,1992	1,15349	1,5346	1,2693	1,1415	0,9027	0,30193	0,3942	0,21471
	48 saat	1,273	1,5039	1,4754	1,1295	0,96	0,9077	0,453877	0,45753	0,26178
	72 saat	1,8433	1,4472	1,3133	1,3558	1,0561	0,80399	0,56237	0,2612	0,11349
	72 saat	1,3088	1,2917	1,224	1,0366	0,6365	0,4889	0,6615	0,2863	0,1245
Ortalama (Average)		1,364517	1,256115	1,299267	1,055167	0,823033	0,681282	0,474346	0,389405	0,23208
		1,39246	1,296098	1,35514	1,11918	0,88374	0,721418	0,467295	0,382686	0,208716
		1,397763	1,330481	1,369313	1,169273	0,923427	0,756914	0,490805	0,357727	0,189312

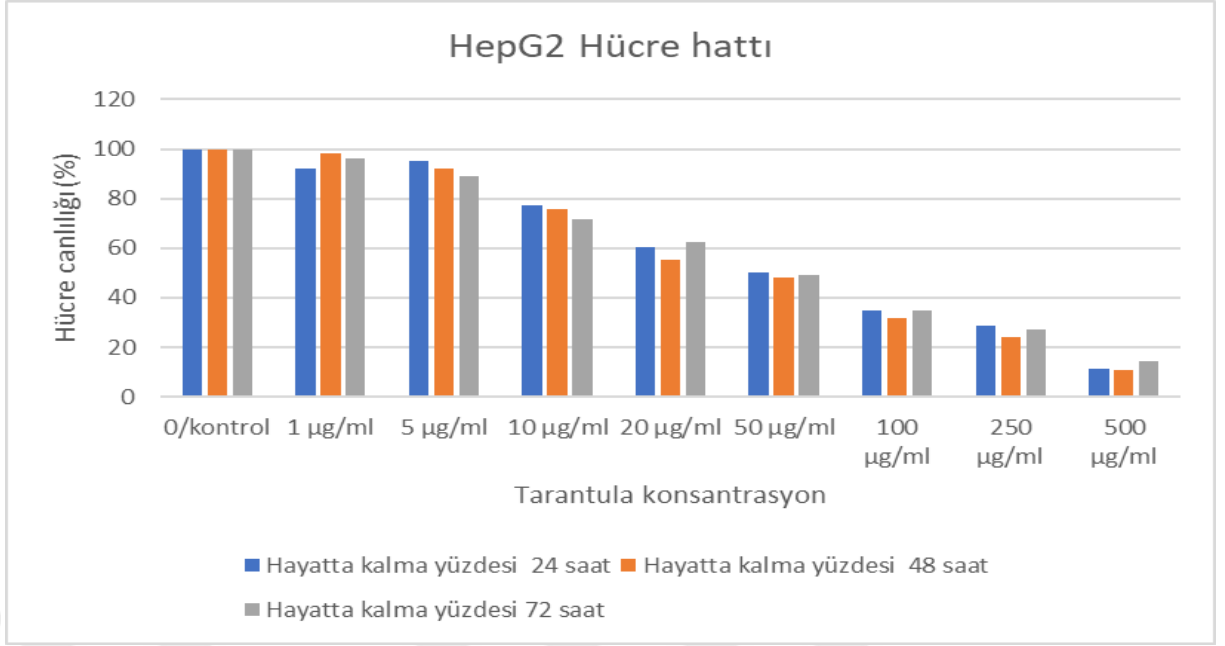
Tablo 3: HepG2 hücre hattında TCE'nin doz ve zamana göre absorbans değerleri

Daha sonra HepG2 hücre hattına 1-5-10-20-50-100-250-500 mikrogram/ml olarak 8 doz uygulanan TCE'nin 24, 48 ve 72. saatlerdeki IC50 etkin doz değerleri tespit edildi (Tablo 4).

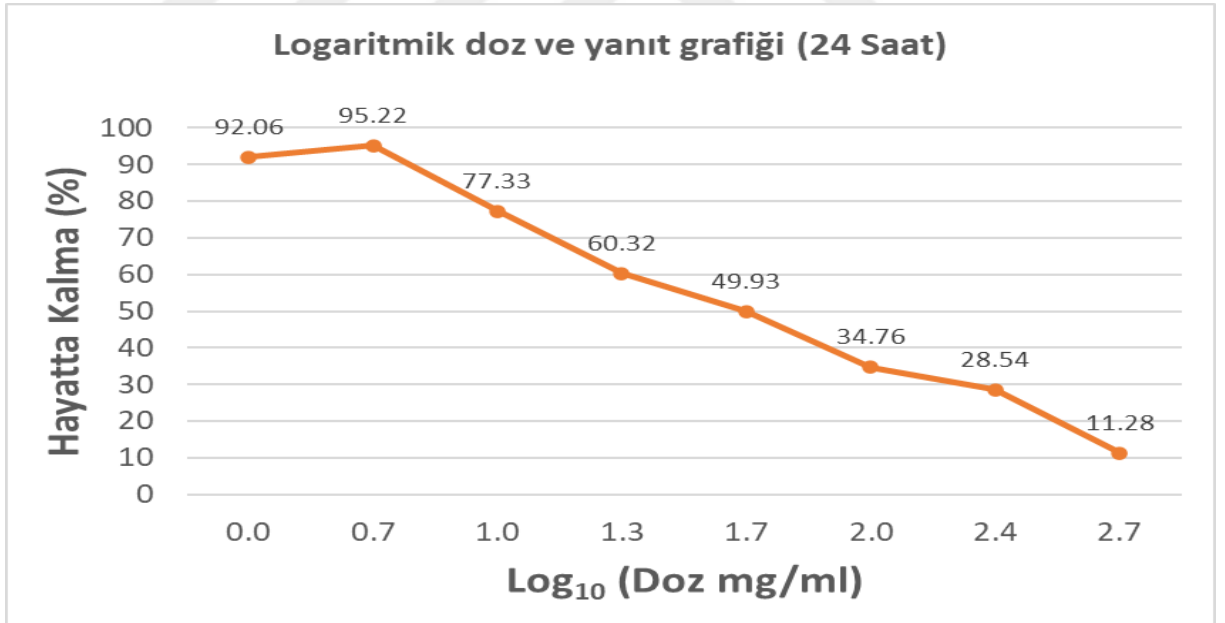
HepG2 hücre hattında TCE ‘nin uygulamasında en uygun dozun 24. saatte 5µg/ml doz, 48 ve 72 saatte 1µg/ml doz , IC50 etkin değeri olarak belirlendi (Tablo 4). 24. saat sonunda 5µg/ml doz %95.2181 canlılık değeri ile etkin doz olarak karşımıza çıkmıştır. HepG2 hücre hattında 48. Saat sonunda 1µg/ml doz %98.4539 canlılık değeri ile etkin doz olarak karşımıza çıkmaktadır. HepG2 hücrelerinde 72. saat sonunda yine 1µg/ml doz %96.0557 canlılık değeri ile etkin dozun olduğu bulunmuştur. HepG2 hücre hattı üzerine TCE’nin 10µg/ml ve üzerindeki dozlarda ise etkinlik göstermediği ve toksik etki gösterdiği görülmüştür (Şekil 8,9,10,11).

ilaç konsantrasyon (µg/ml)	0/kontrol	1	5	10	20	50	100	250	500
Canlılık (%Survival) 24 saat	100	92,05 57	95,21 81	77,32 90	60,31 68	49,92 84	34,76 29	28,53 79	11,27 89
Canlılık (%Survival) 48 saat	100	98,45 39	91,93 13	75,50 39	55,42 16	47,92 84	31,54 89	24,11 59	10,55 48
Canlılık (%Survival) 72 saat	100	96,05 57	89,21 81	71,66 35	62,46 58	49,39 84	34,76 29	27,27 99	14,25 48
Std sapma (Stdv)	0,240 111	0,189 33	0,187 262	0,247 903	0,261 076	0,211 723	0,132 651	0,098 421	0,099 881
Canlılık yüzdesine göre Stdv	17,59 67	13,87 52	13,72 36	18,16 78	19,13 32	15,51 63	9,721 44	7,212 89	7,319 85

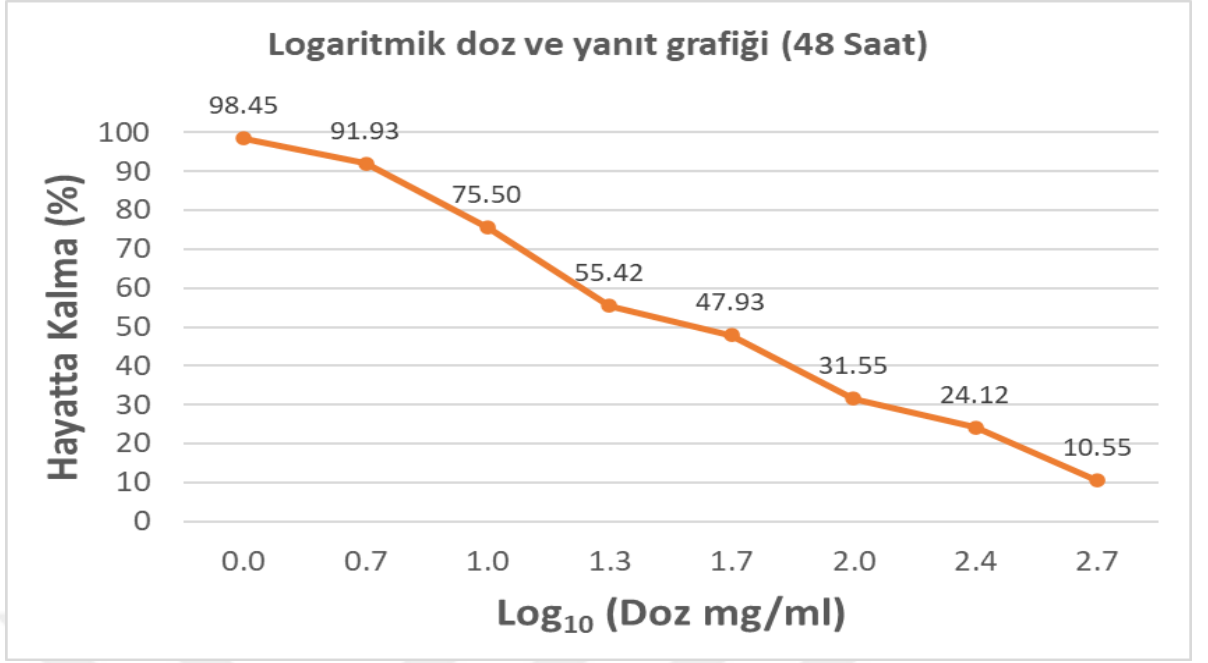
Tablo 4: HepG2 hücre hattında 24-48-72. saat TCE’nin uygulaması sonrası % hücre canlılığı



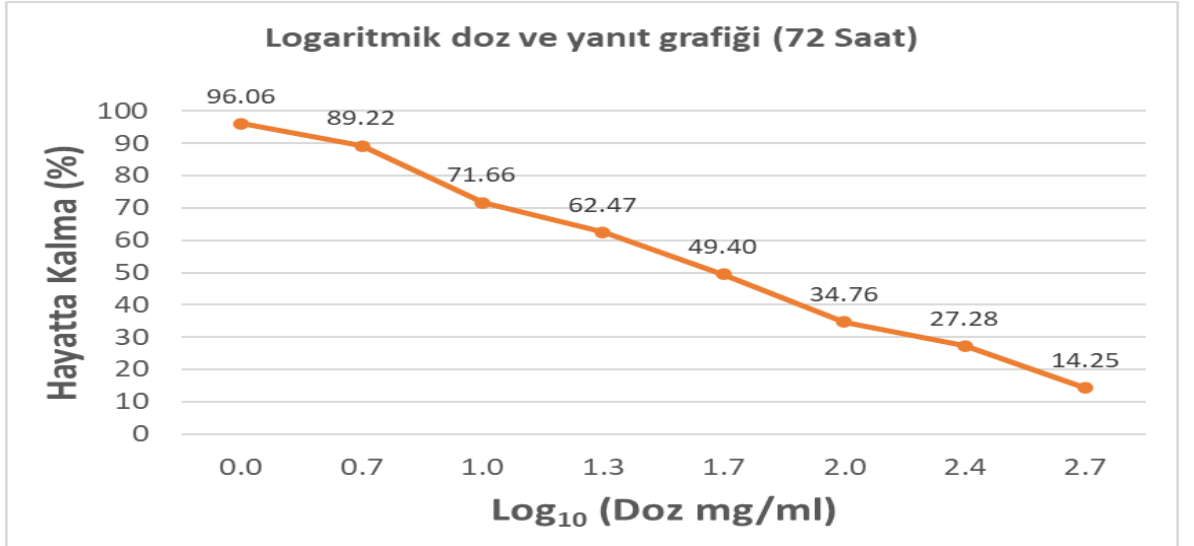
Şekil 8: HepG2 hücresi için farklı doz ve saatlerdeki üzerine TCE uygulamasının MTT sonuç grafiği



Şekil 9: HepG2 hücre hattında TCE'nin etkin dozları 1 ve 5 µg/ml olarak belirlendikten sonra bu dozlar ile 24. saat MTT canlılık-doz oranı logaritmik grafik immunhistokimya çalışması



Şekil 10: HepG2 hücre hattında TCE'nin etkin dozları 1 ve 5 µg/ml olarak belirlendikten sonra bu dozlar ile 48. saat MTT canlılık-doz oranı logaritmik grafik immunhistokimya çalışması



Şekil 11: HepG2 hücre hattında TCE'nin etkin dozları 1 ve 5 µg/ml olarak belirlendikten sonra bu dozlar ile 72. saat MTT canlılık-doz oranı logaritmik grafik immunhistokimya çalışması

İmmunositokimyasal Değerlendirme

TCE, uygulanan HepG2 hücrelerinde Ki-67 immünoboyamasının yoğunluğunun tespiti için 5 farklı alanda 100 adet hücre sayılarak, immün pozitiflik güçlü-orta-zayıf derece olarak gösterilmiştir. TCE 24. saat için 5µg/ml dozu uygulanan HepG2 hücre hattı grubu ile kontrol grubuna Ki-67 immunhistokimya boyası uygulanırken; 48 ve 72. saatte 1µg/ml TCE uygulanmış HepG2 hücre hattı ile kontrol grubu HepG2 hücre hattına Ki-67 immunhistokimya uygulanmıştır. TCE uygulanan HepG2 hücrelerinde Ki-67 immünoboyaması tüm saatler için zayıf dereceli olarak bulunmuştur. Kontrol grubunun immünoboyaması ise 24 saat için orta 48 ve 72 saatler için güçlü olarak belirlenmiştir. TCE uygulanan HepG2 hücrelerinde Ki-67 H-SKOR'u kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0.001$, Tablo 5).

	24 saat (χ^2 : 15.39) (p :<0.001)	48 saat(χ^2 : 64.53) (p :<0.001)	72 saat(χ^2 :56.54) (p :<0.001)
HepG2 +TC Ki-67	+	+/-	+
HepG2 Ki-67	++	+++	+++

Tablo 5: 24 saat için 5 µg/ml, 48 ve 72 saat için 1 µg/ml TCE ile inkübe edilmiş HepG2 hücrelerinde Ki-67 H-SKOR değerleri ((+): zayıf, (++) : orta, (+++): güçlü)

Araştırmada, 24. saatte incelenen toplam 100 hücrede kontrol grubunda Ki-67 ile immunboyamasının hücre sayısı 75, Ki-67 immunboyanmayan hücre sayısı 25'tir. TCE 5 µg/ml doz verildiğinde ise, Ki-67 immunboyanan hücre oranları değişiklik göstermektedir ve Ki-67 immunboyanan hücre sayısı 48'e düşmektedir (Tablo 6).

24 SAAT	Canlılık (n=100)	χ^2 değeri	p
---------	------------------	-----------------	---

TC HEPG2 Ki-67 ICC SONUÇLARI	(+)	(-)		
Kontrol	75 (%75)	25 (%25)	15.39	<0.001
TC 5 µg/ml Doz	48 (%48)	52 (%52)		

Tablo 6: 24. saatte 5 µg/ml doz TCE uygulanan HepG2 hücre hattı ile Kontrol grubunun Ki-67 immunhistokimya boyanma verilerinin değerlendirilmesi.

24 Saatlik sürede verilen TCE dozu ile Ki-67 immunboyanan arasındaki ilişki incelendiğinde, canlılık (Ki-67 ile immunboyanan) ile TCE uygulaması arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($\chi^2 = 15.39$, $p < 0.001$) (Tablo 7).

48 SAAT TC HEPG2 Ki-67 ICC SONUÇLARI	Canlılık (n=100)		χ^2 değeri	p
	(+)	(-)		
Kontrol	90 (%90)	10 (%10)	64.53	<0.001
TC 1 µg/ml Doz	35 (%35)	65 (%65)		

Tablo 7: 48. saatte 1 µg/ml doz TCE uygulanan HepG2 hücre hattı ile Kontrol grubunun Ki-67 immunboyanma verilerinin değerlendirilmesi.

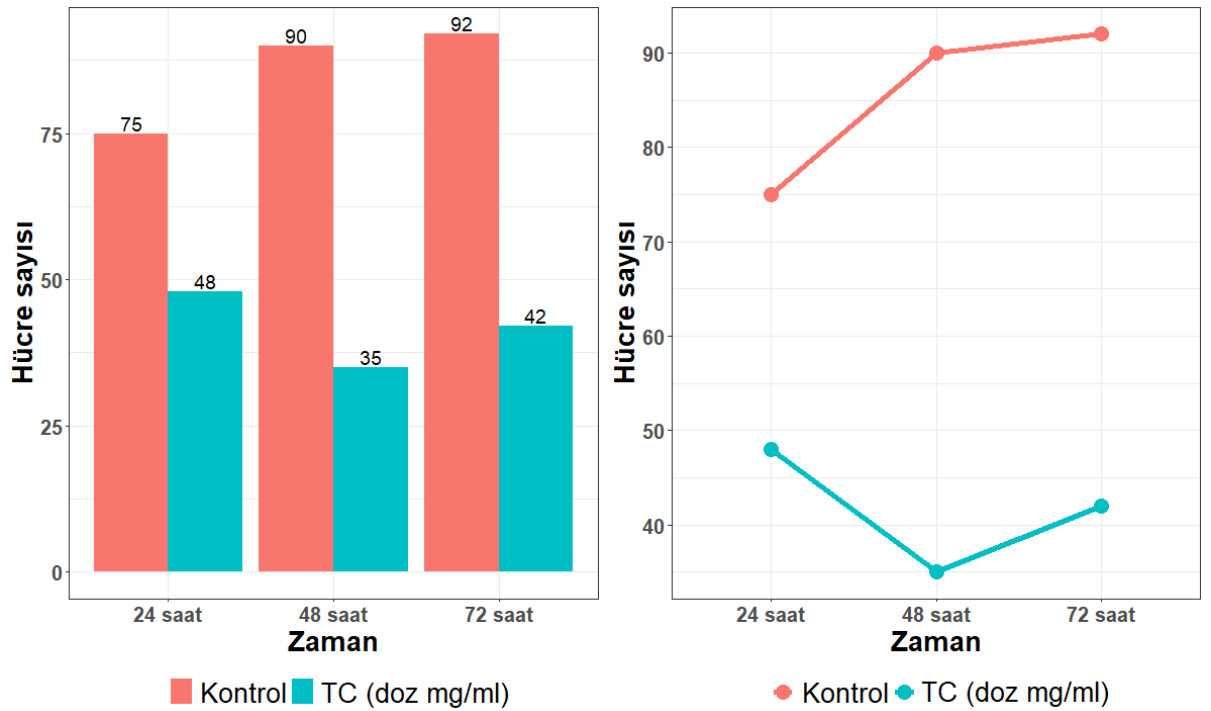
48. saatte incelenen toplam 100 hücrede kontrol grubunda Ki-67 immun boyanan hücre sayısı 90 olarak saptanmıştır. TCE 1 µg/ml doz ilaç verildiğinde ise, bu değerler değişiklik göstermektedir ve Ki-67 immunboyanan hücre sayısı 35'e düşerken, canlılık aktivitesi göstermeyen hücre sayısı 65'e yükselmektedir. 48 saatlik sürede verilen ilaç dozu ile hücre sayısı arasındaki ilişki incelendiğinde, 48 saatlik sürede verilen TCE ile canlı hücre sayısı (Ki-67 ile immunboyanan) arasındaki istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($\chi^2 = 64.53$, $p < 0.001$) (Tablo 8).

72 SAAT TC HEPG2 Ki-67 ICC SONUÇLARI	Canlılık (n=100)		χ^2 değeri	p
	(+)	(-)		
Kontrol	92 (%92)	8 (%8)	56.54	<0.001
TC 1 µg/ml Doz	42 (%42)	58 (%58)		

Tablo 8: 72. saatte Tarantula Cubensis 1 µg/ml dozu ile Kontrol grubunun hayatta kalma verilerinin değerlendirilmesi.

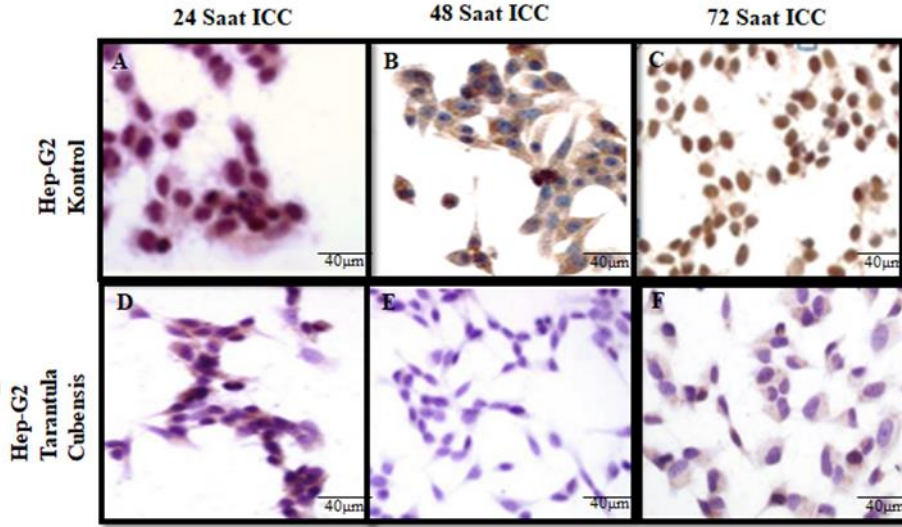
72. saatte incelenen toplam 100 hücrede kontrol grubunda 92 hücre Ki-67 ile immunoboyanmıştır. TCE 1 µg/ml dozda uygulandığında ise Ki-67 ile immunoboyanan hücre sayısı 42'ye düşmüş, canlılık aktivitesi kaybolan hücre sayısı 58'e yükselmiştir. Yapılan istatistiksel test sonucunda, 72. saatte verilen ilaç ile canlı hücre sayısı arasındaki istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($\chi^2 = 56.54$, $p < 0.001$) (Tablo 8).

Tablo 9'da 24, 48 ve 72. saatlerde verilen ilaç dozlarının gruplarına göre Ki-67 sütun ve çizgi grafiğinde gösterilmiştir.



Tablo 9: Verilen ilaç gruplarına göre farklı zamanlarda Ki-67 ile boyanan(canlılık) hücre sayıları

TCE 24. saat için 5µg/ml dozu uygulanan HepG2 hücre hattı grubu ile kontrol grubuna Ki-67 immunhistokimya boyası uyguladığımız; 48 ve 72. saatte 1µg/ml TCE uyguladığımız HepG2 hücre hattındaki kademeli renk değişimi (ilaç etkinliği) mikroskop altında görülmüştür (Şekil 12).



Şekil 12: Standart kültür şartlarında kontrol ve 24 saat için 5 µg/ml, 48 ve 72 saat için 1 µg/ml Tarantula Cubensis ile inkübe edilmiş HepG2 hücrelerinde Ki-67 immunoreaktiviteleri (A-F, Ölçek: 40 µm).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada insan hepatoselüler kanser hücrelerine (HepG2) belirli dozlarda Tarantula Cubensis Ekstresi uygulanması vasıtasıyla elde edilen verilerin ve bazı laboratuvar parametrelerinin etkinlikleri değerlendirilmiştir.

Hepatoselüler kanser tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de en sık görülen primer karaciğer kanser tipi olmakla birlikte insidansı giderek artmaktadır (26). HSK, vakaların yaklaşık %70'inin değiştirilebilir risk faktörlerine (örneğin alkol kullanımı, kronik viral hepatit enfeksiyonları, obezite ve sigara) sekonder gelişmesi gerçeğine rağmen, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki hem erkek hem de kadınlar için diğer kanserlerden daha hızlı artmaktadır (231).

HSK patogenezi karmaşıktır ve hücre döngüsü düzensizliği, DNA metilasyon değişikliği, kromozomal kararsızlık, immünomodülasyon, epitelden mezenkimal geçiş (bazal memrana yapışma özelliklerini kaybeden normal epitel hücrelerin tümör tarafından ele geçirilmesi), tümör yayılımı olması, HSK kök hücrelerinde artış ve mikroRNA düzensizliği gibi çoklu moleküler başarısızlıkları içerir (232). HSK hastalık mekanizması altta yatan etiyolojiye göre değişse de olağan sıra karaciğer hasarı, kronik inflamasyon, fibrozis, siroz ve kanserdir.

HSK tedavisinde önemli bir zorluk, potansiyel sistemik terapötik yaklaşımları doğal olarak sınırlayan altta yatan karaciğer hastalığının büyük çoğunluğunda birlikte ortaya çıkmasıdır. Son yıllarda HSK'nın yönetimi, tedavi seçeneklerindeki ilerlemeye rağmen sıkıntılı olmaya devam etmektedir. HSK'da beş yıllık hayatta kalma oranı %5'ten azdır (233).

Nispeten korunmuş karaciğer fonksiyonuna sahip hastalarda cerrahi rezeksiyon temel tedavi olmakla birlikte genellikle hastalığın boyutu ve anatomisi ile sınırlıdır (190, 234).

Son dönem karaciğer hastalığı (ESLD) olan hastalarda karaciğer transplantasyonu (LT), hem maligniteyi hem de altta yatan sirozu ele aldığı için optimal tedavi seçeneği olarak kabul edilir (235). Lokalize kitlesi olan HSK'lı hastalarda transplantasyon yapıldıktan sonra 5 yıllık sağkalım oranları %65-80 arasında ve tümör rekürrens oranı %8-15 arasındadır (236). Ne yazık ki, HSK'lı hastaların çoğu, Milan Kriterleri'ne göre transplantasyon için uygun değildir ve organ alımı, başlangıçta transplant adayı olanlar için bile bir zorluk olmaya devam etmektedir (235, 237).

HSK'deki cerrahi tedavi sonrası yüksek nüks oranları ve tanı anında ileri evre olması nedeni ile HSK'de mevcut tedavilerin yetersiz olduğu gerçeği ortaya çıkmaktadır. HSK hastalarında yaşam süresini ve hastalıksız sağkalım süresini uzatacak yeni tedavi modalitelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yönde çalışmalar yapılmaktadır (238). HSK de rekürrense etki eden faktörler ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Hepatektomi sonrası rekürrens ile ilgili bir çalışmada tümör boyutu, sayısı, kapsüler invazyon ve portal ven tutulumunun rekürrensi arttırdığı görülmüşken başka bir çalışmada milan kriterlerine kıyasla mikrovasküler invazyonun rekürrensi öngörmede daha duyarlı olduğunu belirtmiştir.

Tümör dokuları artan genomik kararsızlık sebebiyle heterojen bir yapıya sahiptir. Bu sebeple kanser hücreleri normal hücrelerle karşılaştırıldığında yüksek proliferasyon, apoptoza karşı direnç, yüksek metastaz, invazyon ve anjiyogenez yetenekleri sebebiyle tedavi başarısı düşük olmaktadır. Bu durum, kanser tedavisinde son zamanlarda tekli tedavilerden çoklu kombine tedavilere yönelmesine neden olmaktadır. Son zamanlarda HSK tedavisinde de birçok ilaca karşı tedavi başarısı sağlanamadığından veya tedavi sürecinde hastaların ilaca karşı direnç geliştirmesi sebebiyle kombine ilaç tedavilerine odaklanılmıştır (239).

TCE, enjeksiyon için bir çözelti olarak kullanılan *Tarantula cubensis*'in alkolü bir özüdür (bileşim: *Tarantula cubensis* D6) (1 ml etanol içinde 286 mg) ve hayvan hastalıklarını tedavi etmek için yaygın olarak kullanılır. TCE antiinflamatuvar ve epitalizan bir ajan olduğu hayvan epitel yaralarında yapılan çalışmalarında etkinliği gösterilmiştir (240).

Tarantula Cubensis ilaç formunda kullanıldığında inflamatuvar süreçlerde sınır çizgisinin oluşmasını sağlar, epitelizasyonu artırır. Sınır çizgisi oluşturma etkisinin, katabolik enzimlerin mevcut nekrotik dokudan çevre dokuya yayılmasını önleyerek ve antiinflamatuvar etkisi ile elde edildiği düşünülmektedir. TCE vücut sıvılarının emilimini artırarak ödemin gerilemesine katkıda bulunur. Ayrıca TCE'nin anti-inflamatuvar, immünomodülatör, antitümör ve neovaskülarizasyonu artırıcı etkileri vardır (241).

TCE veterinerlikte çevre dokulardan ayrılmayı teşvik ederek köpek meme tümörlerinin büyümesini durdurduğu bulunmuştur. Yine hayvanlarda TCE cilt, bağ dokusu ve sinir sistemindeki iltihaplanmayı tedavi etmek için homeopatik bir ilaç olarak kullanılır. Hayvanlarda ağrılı apseleri, inflamatuvar ülserleri ve şiddetli dermatiti iyileştirmede kullanılmaktadır. Köpek meme kanserleri üzerinde yapılan çalışmada TCE'nin tedavi öncesi ile tedavi sonrası karşılaştırmalarında Ki-67 ekspresyonunu azalttığı ve apoptozu arttırdığı görülmüştür (223).

Sıçanlarda yapılan deneysel bir çalışmada siyatik sinir hasarı modelinde TCE periferik sinir aksonal ve miyelin hasarını azalttığını görülmüştür. TCE'nin bu nöroprotektif etkisinin, proinflatuar sitokin seviyeleri üzerindeki anti-inflatuar etkisinden kaynaklandığı ve sinir üzerinde daha az hasar bıraktığı gösterilmiştir (242).

2017'de yapılan insan embriyonik böbrek, meme bezi ve baş-boyun kanseri hücre dizisine TCE uygulanması sonucunda kaspaz-3'ü aktivite ederek bu kanser hücrelerinde güçlü sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür (6).

Ratlarda 2022 yılında kolon ve karaciğer dokularındaki kanser belirteçleri üzerine yapılan bir çalışmada, TCE'nin TGF- β , VEGF, AFP ve kaspaz-3 düzeylerindeki artışları önlediği görülmüştür (243).

2015 yılında yapılan çalışmada 32 adet aflatoxin maruziyeti yapılmış dişi sıçanlara TCE uygulanması sonrasında hayvan kanında bakılan bazı oksidatif stres belirteçleri ve bazı bozulmuş biyokimya parametrelerinde düzelme olduğu görülmüştür (244). HSK etyolojisinde güncel yerini koruyan aflatoxinle maruziyetin yaygın olduğu ve TCE'nin aflatoxine bağlı HSK gelişen hastaların tedavisinde kullanılabileceğini vaat etmektedir.

CopA3 (Kore scarab extract) ile yapılan bir çalışmada; AFB1'e maruz bırakılan ve CopA3 ile tedavi edilen grupta Ki-67 pozitif hücre sayısının önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. CopA3 tedavisi, farelerde AFB1'in neden olduğu kolon iltihabı ve hepatotoksitenin erken dönemde gelişimini baskıladığı, hasarlı enflatuar hücrelerin DNA sentezini inhibe ettiği ve temizlenmesi için apoptozu etkin bir şekilde indüklediği gösterilmiştir (245). Bizim çalışmamızda da TCE'nin HSK hücre kültüründe Ki-67 üzerine etkisi görüldüğü üzere mevcut kanser için bir tedavi parametresi olarak ışıık olmaktadır.

Yapılan çalışmalarda HSK lezyonlarının Ki-67 immün boyamasının daha yüksek mitotik aktivite ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (102). HSK dokusunda daha yüksek Ki-67 ekspresyon seviyelerinin daha agresif bir tümör derecesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ki-67 ekspresyon seviyelerinin yüksek olması erken hastalık nüksü ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Yüksek Ki-67 ekspresyonu, kötü diferansiasyon, büyük tümör boyutu, çoklu tümör nodülleri, metastaz, siroz ve venöz invazyon gibi özellikler dahil olmak üzere ileri HSK ile önemli ölçüde ilişkili olduğu gösterilmiştir (100). Proliferasyon ve apoptoz, HSK patogenezinin arkasındaki iki temel itici güçtür. HSK, Ki-67 ve Bcl-2 aşırı ekspresyonu, hücrel proliferasyon ve apoptoz arasındaki dengenin bozulmasına neden olan Bax ekspresyonunun azalması ve PPAR-y ve FOXO-1'in azalmış ekspresyonun şiddetlenmesi ile ilişkilidir (103).

Yüksek HSK skorunda (ileri evre/CLIP skoru 4-6) Ki-67 ekspresyonu; büyük tümör boyutu, vasküler invazyon, yaşlı hasta ve antiviral ajanlarla HCV tedavisi olan hastalar ile ilişkilendirilmiştir (246). Bu sebeple Ki-67 seviyelerinde anlamlı düşüşler sağlayan ajanların yüksek HSK skoru olan hastaların tedavisinde uygulanabileceğini düşündürmektedir. İleri basamak çalışmalarla desteklenmek üzere çalışmamız neticesinde HepG2 hücre hattında Ki-67 supresyonu yapan TCE'nin, HSK tedavisinde tek başına ya da kombine tedavi olarak kullanıldığında başarı elde edilebileceğini düşünmekteyiz.

Ki-67 ekspresyon seviyesi, karaciğer kanseri dokularında ve bir HepG2 hücre hattında TGFB1 ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir. HBV ile ilişkili HSK'lı hastalarda daha yüksek Ki-67 ekspresyonu seviyeleri ve daha kötü bir ortalama sağkalım bulunmuş; bunun yanında siroz ve BCLC evreleriyle birlikte Ki-67 ekspresyonunun, HBV ile ilişkili HSK'lı hastaların klinik sonuçlarını öngörebileceği belirtilmiştir (247).

HSK'nın farklı agresif alt tiplere sınıflandırılmasında p53, β -katenin, CD133 ve Ki-67'nin rolünü ve bu belirteçler ile HSK hastalarının klinikopatolojik özellikleri arasındaki korelasyonun araştırıldığı bir çalışma, yüksek Ki-67 ekspresyon yüzdesinin (≥ 50) kötü sağkalım ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Ki-67 ekspresyonu ne kadar yüksekse, HSK prognozunun o kadar kötü olduğu bildirilmiştir (248). Yukarıda bahsedilen literatür bilgileri ışığında çalışmamızda da HepG2 hücrelerinde Ki-67 ekspresyonunu baskılaması nedeniyle TCE'nin HSK tedavisinde önemli fayda sağlayacağını düşündürmektedir.

HSK'nın agresif doğası göz önüne alındığında, birçok çalışma, rekürrens potansiyel klinik ve moleküler belirleyicilerini araştırmıştır. Küratif parsiyel hepatektomi uygulanan 112 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada, tümör boyutu, sayısı, kapsüler invazyon ve portal ven tutulumu nüksün bir göstergesi olarak tanımlanmıştır (249). CD34'ün immünohistokimyasal analizi ile ölçülen tümör mikrodamar yoğunluğu, HSK'lı hastalarda nüksün bir göstergesi olarak tanımlanmıştır, ancak bu korelasyon sadece 5 cm'den küçük tümörlerde bulunmuştur (250, 251). İnflamatuvar belirteçler, HSK hastalarında nüksün vekilleri olarak da araştırılmıştır. HSK'nın tümör mikroçevresinde CD68+ tümör infiltrate edici makrofajlar kaydedilmiştir ve cerrahi olarak rezeke edilmiş 137 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada, daha yüksek intratümöral ve tümör makrofaj infiltrasyonu, daha kısa hastalıklı sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (252). Bu inflamatuvar belirteçlerdeki yükselmenin, altta yatan sistemik inflamatuvar yanıtları yansıtabileceği, bunun da anjiyogenezi ve kanser büyümesini arttırdığı varsayılmaktadır (253). Daha öncede bahsettiğimiz gibi TCE'nin hayvan çalışmalarında

inflamasyona verdiği güçlü yanıttan dolayı HSK rekürrensini önlemede başarılı sonuçlar elde edilebileceğini düşünmekteyiz.

Sorafenib, apoptozu kolaylaştırabilen, anjiyogenezi hafifletebilen ve tümör hücresi proliferasyonunu baskılayabilen bir multikinaz inhibitörüdür. Geç evre hepatoselüler karsinomda, sorafenib şu anda etkili bir birinci basamak tedavidir. Ne yazık ki, sorafenib'e karşı ilaç direnci gelişimi giderek yaygınlaşmaktadır (254, 255).

Hastaların sadece yaklaşık %30'u sorafenibden yararlanabilir ve bu popülasyon genellikle 6 ay içinde ilaç direnci kazanır (256). Sorafenib uygulanan hastalarda tespit edilen advers olaylar, başlıca gastrointestinal, fiziksel veya cilt hastalıklarını (örneğin, el ve ayak deri reaksiyonları, kilo kaybı ve diyare) içerdiği görülmüştür. Ciddi vakalarda sorafenib, yüksek kan basıncına ve karın ağrısına neden olarak tedavinin kesilmesine neden olabilir (257).

Sorafenib direnci, ilaçları kanser hücrelerinden çekerek kemoterapinin etkinliğini azaltan ve antikanser tedavilerinin sonuçlarını olumsuz etkileyen ATP bağlayıcı kutu (ABC) taşıyıcılarını içerir (258, 259). Eksozomlar hücreler arası bilginin taşıyıcılarıdır ve tümör mikro-ortamının düzenleyicileridir. Normal hücrelerde, eksozomlar olumsuz biyomolekülleri ortadan kaldırır, ancak bu mekanizma kanser hücrelerinde kaçırılabilir. Örneğin, ilaca dirençli kanser hücreleri, terapötik ilaçları eksozomlarda kapsülleyebilir ve bunları tümör hücrelerinin dışına taşıyabilir (260, 261). Bu veriler gözetiminde ve yapılan çalışmalarda sorafenip ve başka HSK'ya özgü antitümöral ajanlar ile kombinasyon tedavileri denenmiş ve olumlu yanıtlar alınmıştır (254).

Sorafenib ve diğer ajanlarla köprüleme tedavisinde kullanılan diğer ajanların Ki-67 üzerinde antitümör etkinliği ile başarılı sonuçlar alınmıştır (103). Görüldüğü gibi HSK tedavisinde sık kullanılan ajanlara karşı tedavi direnci gelişmiş olup HSK tedavisinde yeni ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle TCE uygulaması sonrası HepG2 hücre hattında Ki-67 ekspresyonunu etkin dozlarda anlamlı olarak baskıladığı gösterildiğinden ileri basamak çalışmalarla desteklenerek HSK tedavisi için umut olabilir.

Regorafenib, anjiyojenik ve tümör büyümesini teşvik eden yolaklarda yer alan çeşitli kinazları hedefleyen, yapısal olarak sorafenib ile karşılaştırılabilir bir difenilüre oral multikinaz inhibitörüdür (262). Regorafenib, daha önce sorafenib ile birinci basamak tedavide başarısız olmuş, rezeke edilemeyen HSK'lı hastalarda ikinci basamak tedavi olarak anlamlı sağkalım

avantajı gösteren ilk ajandı. Son kanıtlar, antitümör etkinliğinin, tümör gelişiminde çok önemli bir rol oynayan tümör mikroçevresi üzerindeki kapsamlı bir tümör neo-anjiyogenezi, proliferasyon inhibisyonu ve immünomodülatör etkileri spektrumundan kaynaklandığını göstermiştir (263).

2016 yılından bu yana yapılan çalışmalar sonrası plaseboya göre, sorafenib dirençli ileri HSK hastalarına regorafenibin sağkalım üzerine kombine tedavide etkinliği gösterilmiştir (264, 265). Regorafenib tedavisi ile ilgili yapılan çalışmalarda toplam genel sağ kalıma etkisi 24.2 ay (21.1-27.3) saptanmıştır (266). Regorafenib ile görülen el-ayak deri reaksiyonunun özellikleri, diğer hedeflenen ajanlar için bildirilenlere benzerdir ve ciddi cilt toksisitesine ikincil tedavisi oldukça zor olan enfeksiyonlar gelişebilir (267, 268). HSK tedavisinde kullanılan yukarıda bahsedilen kinaz inhibitörlerinin yan etkisiyle oluşan HFRS reaksiyonuna, daha önce yukarıda bahsettiğimiz üzere hayvan çalışmalarında yara yeri iyileşmesinde, tırnak ve eklem hastalıklarında başarılı sonuçlar elde edilen TCE'nin bu yan etkiler olmadan HSK tedavisinde daha başarılı olabileceğini düşünmekteyiz.

Oral bir multikinaz inhibitörü olan lenvatinib, HSK'lı hastalarda genel sağkalım (OS), daha yüksek bir objektif yanıt oranı (ORR) ve daha iyi progresyonsuz sağkalım (PFS) açısından sorafenib kadar başarılı olduğu gösterilmiştir (201). Cabozantinib, VEGFR ve reseptör kinaz ailesi dahil olmak üzere tümör büyümesi, anjiyogenez ve immün regülasyonda yer alan reseptör kinazları hedefleyen küçük molekülü bir tirozin kinaz inhibitörüdür (269, 270). Ancak HSK'da kullanılan tirozin kinazların yorgunluk, iştah kaybı, el-ayak deri reaksiyonu (HFSR), diyare, hipertansiyon, üst gastrointestinal kanama, beyin kanaması, hipotiroidizm ve proteinüri gibi ciddi yan etkileri olmaktadır. Bu advers olaylardan dolayı kinaz inhibitörleri tedavilerinde tedavi bırakma oranı 43,5'a kadar çıkmaktadır (202, 271). Bu ajanların yüksek tedavi bırakma oranı nedeni ile HSK tedavisinde yeni ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bizim TCE ile HepG2 hücre hattında çalışma yapmamızın amaçlarından biri de HSK'daki bu çıkmaza alternatif oluşturabilmektir.

Hepatosellüler Kanser insidansı dünya çapında giderek artmakta ve tedavisinde yeni modaliteler geliştirilmesine rağmen tanı anında ileri evre olması ya da cerrahi tedavi uygulansa bile yüksek rekürrens oranları kötü prognoza sahip olmasına neden olmaktadır (272). HSK'da cerrahi rezeksiyon ile her zaman kür sağlanamaz, 5 yıllık nüks oranı %70 üzerinde olduğu tespit edilmiştir (273). Bunun yanında uygulanan tedavilerin yüksek yan etki insidanslarının olması,

kemoterapötik ajanların kanser hücresi yanında normal hücreler üzerinde yüksek toksisite gösterdiği görülmüştür. Üstelik ileri evre hastalılarda mevcut kemotrapötik ajanlar sadece hastalığın sürecini yavaşlatabilmekte ve kür sağlanamamaktadır. HSK’da uygulanan adjuvan ve neoadjuvan protokollerinden herhangi birinin etkinliğine dair net bir kanıt olmadığı saptanmıştır (274). Bu nedenlerle hepatosellüler kanser tedavisinde yeni tedavi ajanlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla biz *Theranechron*[®] adı altında ticari olarak temin edilebilen TCE’nin hepatosellüler kanser hücre dizilerinde (HepG2) Ki-67’yi inhibe ederek antitümöral etkisini olduğu sonucuna vardık. Bulgularımıza göre, TCE kayda değer bir hepatosellüler antikanser aktivitesine sahip olduğunu ve kanser tedavisinde bir antitümör hücre ölüm indükleyici biyoterapötik olarak kullanılabileceğini öneriyoruz. Bu sonuca dayanarak, TCE biyokimyasal olarak analizine yönelik, fonksiyonel bileşiklerini tanımlayan ve kanser hücreleri üzerindeki etki mekanizmasını ele alan gelecekteki çalışmaları öneriyoruz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Sitotoksosite analizleri yapılarak en etkili Tarantula Cubansis Ekstresi dozu belirlendi. Tarantula Cubansis baskılayıcı konsantrasyonun (IC50) değerinin 1 µg/ml olduğu tespit edildi.

2. HepG2 insan hepatosellüler kanser hücre hattına uygulanan Tarantula Cubensis Ekstresinin kontrol HepG2 hücre hattına göre inhibitör etkisi belirlendi.
3. TCE inhibitör etkisinin Ki-67 ekspresyonunu baskılayarak gerçekleştirdiği ortaya konuldu.
4. Çalışmadan elde edilen bulguların değerlendirilmesi; kanser tedavisinde yeni açılımların, yeni ilaçların ve tedavi ajanlarının geliştirilmesine katkıda bulunabilecektir. Kanserli hastaların tedavi sürecinde yaşadığı olumsuzluklar ve ilaçların yarattığı güçlü yan etkiler düşünüldüğünde, antioksidan-antikanserojen etisi olan yeni maddelerin araştırılması ve kullanılması önem arz etmektedir.
5. HSK'da tedavi çıkmazı günümüzde hala bir ciddi sorun oluşturmaktadır. Gerek cerrahi tedavi sonrası, gerekse adjuvan ve neoadjuvan tedavilerle HSK tedavisinde tam bir başarı elde edilememiştir.
6. Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler ışığında, Tarantula Cubensis Ekstresinin bir ön çalışma olarak hepatosellüler kanser hücrelerine etkin olduğu, ileri basamak çalışmalar yapılarak ve bu çalışmalar ile desteklenerek hepatosellüler kanser tedavisinde yer alabileceği kanısına varıldı.

7. KAYNAKLAR

1. Kulik L, El-Serag HB. Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. Gastroenterology. 2019;156(2):477-91.e1.

2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
3. Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, Amadou A, Plymoth A, Roberts LR. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2019;16(10):589-604.
4. Investigators CotLIP. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients. *Hepatology*. 1998;28(3):751-5.
5. Richardson-Boedler C. The brown spider *Loxosceles laeta*: source of the remedy *Tarentula cubensis*? *Homeopathy*. 2002;91(03):166-70.
6. Ghasemi-Dizgah A, Nami B, Amirmozafari N. *Tarantula cubensis* venom (Theranekron®) selectively destroys human cancer cells via activating caspase-3-mediated apoptosis. *Acta Medica International*. 2017;4(1):74.
7. Sadler T. Langman's medical embryology. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1988;81(1):131.
8. Cascio S, Zaret KS. Hepatocyte differentiation initiates during endodermal-mesenchymal interactions prior to liver formation. *Development*. 1991;113(1):217-25.
9. KARA A, MALKOÇ İ. DOĞU ANADOLU BÖLGESİNDEKİ CANLI KARACİĞER VERİCİLERİNDE HEPATİK ARTERİN ANATOMİK VARYASYONLARI. 2013.
10. Thompson AI, Conroy KP, Henderson NC. Hepatic stellate cells: central modulators of hepatic carcinogenesis. *BMC gastroenterology*. 2015;15(1):1-13.
11. AKTAN T, CANBİLEN A, KEKLİKOĞLU N. Kupffer hücresi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*. 2003;34(2).
12. Skandalakis JE, Skandalakis LJ, Skandalakis PN, Mirilas P. Hepatic surgical anatomy. *Surgical Clinics*. 2004;84(2):413-35.
13. ACAR E, BİLGİÇ T. FONKSİYONEL ANATOMİSİ.
14. Fong Y, Blumgart LH. *Surgery of the liver and biliary tract*: WB Saunders; 2000.
15. COUINAUD C. Lobes et segments hépatiques. *Notes sur l'architecture anatomique et chirurgicale du foie*. *Presse méd*. 1954;62:709-12.
16. Rutkauskas S, Gedrimas LV, Pundzius J, Barauskas G, Basevičius A. Clinical and anatomical basis for the classification of the structural parts of liver. *Medicina*. 2006;42(2):98-106.
17. Moore KL, Dalley AF. *Clinically oriented anatomy*: Wolters kluwer india Pvt Ltd; 2018.
18. Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR. New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicologic pathology*. 2005;33(1):27-34.
19. Abdel-Misih SR, Bloomston M. Liver anatomy. *Surgical Clinics*. 2010;90(4):643-53.
20. Deshpande R, Heaton N, Rela M. Surgical anatomy of segmental liver transplantation. *British journal of surgery*. 2002;89(9):1078-88.
21. Carcinoma H. Villanueva A. *N Engl J Med*. 2019;380:1450-62.
22. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *The lancet oncology*. 2001;2(9):533-43.

23. Kuetting F, Lang S, Schramm C, Kasper P, Goeser T, Steffen H-M, et al. FIB-4 Is a Potential Tool for Hepatocellular Carcinoma Risk Stratification in Ethnically Diverse Chronic Hepatitis B Patients When Using Specific Cutoff Values. *Hepatitis Monthly*. 2019;19(12).
24. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *International journal of cancer*. 2001;94(2):153-6.
25. Marrero JA, Kulik LM, Sirlin CB, Zhu AX, Finn RS, Abecassis MM, et al. Diagnosis, staging, and management of hepatocellular carcinoma: 2018 practice guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Clinical Liver Disease*. 2019;13(1):1.
26. World Health Organization 2020. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/home>.
27. Singal AG, Lampertico P, Nahon P. Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: New trends. *Journal of hepatology*. 2020;72(2):250-61.
28. McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2021;73:4-13.
29. Lee Y-T, Wang JJ, Luu M, Nouredin M, Kosari K, Agopian VG, et al. The mortality and overall survival trends of primary liver cancer in the United States. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2021;113(11):1531-41.
30. Park JW, Chen M, Colombo M, Roberts LR, Schwartz M, Chen PJ, et al. Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: the BRIDGE Study. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2015;35(9):2155-66.
31. McCredie M, Williams S, Coates M. Cancer mortality in east and southeast Asian migrants to New South Wales, Australia, 1975–1995. *British journal of cancer*. 1999;79(7):1277-82.
32. Parikh S, Hyman D. Hepatocellular cancer: a guide for the internist. *The American journal of medicine*. 2007;120(3):194-202.
33. Curry GW, Beattie AD. Pathogenesis of primary hepatocellular carcinoma. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 1996;8(9):850-5.
34. Chen JD, Yang HI, Iloeje UH, You SL, Lu SN, Wang LY, et al. Carriers of inactive hepatitis B virus are still at risk for hepatocellular carcinoma and liver-related death. *Gastroenterology*. 2010;138(5):1747-54. e1.
35. Beasley RP. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 1988;61(10):1942-56.
36. Thiele M, Gluud LL, Fialla AD, Dahl EK, Krag A. Large variations in risk of hepatocellular carcinoma and mortality in treatment naïve hepatitis B patients: systematic review with meta-analyses. *PloS one*. 2014;9(9):e107177.
37. Chen C-J, Yang H-I, Su J, Jen C-L, You S-L, Lu S-N, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *Jama*. 2006;295(1):65-73.
38. Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, et al. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2002;347(3):168-74.
39. Tseng TC, Liu CJ, Yang HC, Su TH, Wang CC, Chen CL, et al. Serum hepatitis B surface antigen levels help predict disease progression in patients with low hepatitis B virus loads. *Hepatology*. 2013;57(2):441-50.

40. Tseng TC, Liu CJ, Yang HC, Su TH, Wang CC, Chen CL, et al. High levels of hepatitis B surface antigen increase risk of hepatocellular carcinoma in patients with low HBV load. *Gastroenterology*. 2012;142(5):1140-9. e3.
41. Yu M-W, Yeh S-H, Chen P-J, Liaw Y-F, Lin C-L, Liu C-J, et al. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(4):265-72.
42. Huang Y-T, Jen C-L, Yang H-I, Lee M-H, Su J, Lu S-N, et al. Lifetime risk and sex difference of hepatocellular carcinoma among patients with chronic hepatitis B and C. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(27):3643.
43. Benvegnù L, Fattovich G, Noventa F, Tremolada F, Chemello L, Cecchetto A, et al. Concurrent hepatitis B and C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. A prospective study. *Cancer*. 1994;74(9):2442-8.
44. Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, et al. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. *Gut*. 2000;46(3):420-6.
45. Li Q, Yu C-H, Yu J-H, Liu L, Xie S-S, Li W-W, et al. ABO blood group and the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in patients with chronic hepatitis B. *PloS one*. 2012;7(1):e29928.
46. Loomba R, Liu J, Yang HI, Lee MH, Lu SN, Wang LY, et al. Synergistic effects of family history of hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus infection on risk for incident hepatocellular carcinoma. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2013;11(12):1636-45. e3.
47. Lok AS, Seeff LB, Morgan TR, Di Bisceglie AM, Sterling RK, Curto TM, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology*. 2009;136(1):138-48.
48. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2012;142(6):1264-73. e1.
49. Raimondi S, Bruno S, Mondelli MU, Maisonneuve P. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *Journal of hepatology*. 2009;50(6):1142-54.
50. Lok AS, Everhart JE, Di Bisceglie AM, Kim HY, Hussain M, Morgan TR, et al. Occult and previous hepatitis B virus infection are not associated with hepatocellular carcinoma in United States patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2011;54(2):434-42.
51. Sun J, Althoff KN, Jing Y, Horberg MA, Buchacz K, Gill MJ, et al. Trends in hepatocellular carcinoma incidence and risk among persons with HIV in the US and Canada, 1996-2015. *JAMA network open*. 2021;4(2):e2037512-e.
52. Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *American journal of epidemiology*. 2002;155(4):323-31.
53. Trichopoulos D, Bamia C, Lagiou P, Fedirko V, Trepo E, Jenab M, et al. Hepatocellular carcinoma risk factors and disease burden in a European cohort: a nested case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(22):1686-95.

54. Dyson J, Jaques B, Chattopadhyay D, Lochan R, Graham J, Das D, et al. Hepatocellular cancer: the impact of obesity, type 2 diabetes and a multidisciplinary team. *J Hepatol*. 2014;60(1):110-7.
55. Larsson SC, Wolk A. Overweight, obesity and risk of liver cancer: a meta-analysis of cohort studies. *Br J Cancer*. 2007;97(7):1005-8.
56. Chiang CJ, Yang YW, Chen JD, You SL, Yang HI, Lee MH, et al. Significant reduction in end-stage liver diseases burden through the national viral hepatitis therapy program in Taiwan. *Hepatology*. 2015;61(4):1154-62.
57. Corey KE, Kaplan LM. Obesity and liver disease: the epidemic of the twenty-first century. *Clinics in liver disease*. 2014;18(1):1-18.
58. Petrick JL, Florio AA, Znaor A, Ruggieri D, Laversanne M, Alvarez CS, et al. International trends in hepatocellular carcinoma incidence, 1978-2012. *Int J Cancer*. 2020;147(2):317-30.
59. Ikeda K, Saitoh S, Arase Y, Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, et al. Effect of interferon therapy on hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic hepatitis type C: A long-term observation study of 1,643 patients using statistical bias correction with proportional hazard analysis. *Hepatology*. 1999;29(4):1124-30.
60. Bruno S, Battezzati PM, Bellati G, Manzin A, Maggioni M, Crosignani A, et al. Long-term beneficial effects in sustained responders to interferon-alfa therapy for chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2001;34(5):748-55.
61. Baecker A, Liu X, La Vecchia C, Zhang ZF. Worldwide incidence of hepatocellular carcinoma cases attributable to major risk factors. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*. 2018;27(3):205-12.
62. Liu Y, Chang CC, Marsh GM, Wu F. Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: systematic review and meta-analysis. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2012;48(14):2125-36.
63. Chen J, Zhu J, Wang G, Groopman JD, Kensler TW. Qidong: a crucible for studies on liver cancer etiology and prevention. *Cancer biology & medicine*. 2019;16(1):24-37.
64. Chu YJ, Yang HI, Wu HC, Liu J, Wang LY, Lu SN, et al. Aflatoxin B(1) exposure increases the risk of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers. *Int J Cancer*. 2017;141(4):711-20.
65. Dey A, Hazra AK, Mukherjee A, Nandy S, Pandey DK. Chemotaxonomy of the ethnic antidote *Aristolochia indica* for aristolochic acid content: Implications of anti-phospholipase activity and genotoxicity study. *Journal of ethnopharmacology*. 2021;266:113416.
66. Schwabe RF, Luedde T. Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2018;15(12):738-52.
67. Giaginis C, Gatzidou E, Theocharis S. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*. 2006;213(3):282-90.
68. Burdon T, Smith A, Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends in cell biology*. 2002;12(9):432-8.
69. White J, Dalton S. Cell cycle control of embryonic stem cells. *Stem cell reviews*. 2005;1(2):131-8.
70. Shamloo B, Usluer S. p21 in Cancer Research. *Cancers*. 2019;11(8).

71. Yang HW, Cappell SD, Jaimovich A, Liu C, Chung M, Daigh LH, et al. Stress-mediated exit to quiescence restricted by increasing persistence in CDK4/6 activation. *eLife*. 2020;9.
72. Orford KW, Scadden DT. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nature reviews Genetics*. 2008;9(2):115-28.
73. Zhao R, Deibler RW, Lerou PH, Ballabeni A, Heffner GC, Cahan P, et al. A nontranscriptional role for Oct4 in the regulation of mitotic entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(44):15768-73.
74. Bancroft J, Holder J, Geraghty Z, Alfonso-Pérez T, Murphy D, Barr FA, et al. PP1 promotes cyclin B destruction and the metaphase-anaphase transition by dephosphorylating CDC20. *Molecular biology of the cell*. 2020;31(21):2315-30.
75. Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology*. 2020;17(7):395-417.
76. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer research*. 1989;49(17):4682-9.
77. Parker MI, Meyer JE, Golemis EA, Dunbrack RL. Delineating the RAS Conformational Landscape. *Cancer research*. 2022;82(13):2485-98.
78. Bonora M, Missiroli S, Perrone M, Fiorica F, Pinton P, Giorgi C. Mitochondrial Control of Genomic Instability in Cancer. *Cancers*. 2021;13(8):1914.
79. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Brazilian journal of biology = Revista brasileira de biologia*. 2021;81(4):1133-43.
80. Mehrbod P, Ande SR, Alizadeh J, Rahimizadeh S, Shariati A, Malek H, et al. The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections. *Virulence*. 2019;10(1):376-413.
81. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*. 2019;43(6):582-92.
82. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience reports*. 2019;39(1).
83. Ichim G, Tait SW. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature reviews Cancer*. 2016;16(8):539-48.
84. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC cell biology*. 2013;14:32.
85. Fu J, Zhang H, Zhang Y, Zhang T. AG1031 induces apoptosis through suppressing SIRT1/p53 pathway in human neuroblastoma cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2019;454(1-2):165-75.
86. Kim B, Srivastava SK, Kim SH. Caspase-9 as a therapeutic target for treating cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2015;19(1):113-27.
87. Moon H, Park H, Ro SW. c-Myc-driven Hepatocarcinogenesis. *Anticancer research*. 2021;41(10):4937-46.
88. Wang S, Yadav AK, Han JY, Ahn KS, Jang BC. Anti-Growth, Anti-Angiogenic, and Pro-Apoptotic Effects by CX-4945, an Inhibitor of Casein Kinase 2, on HuCCT-1 Human Cholangiocarcinoma Cells via Control of Caspase-9/3, DR-4, STAT-3/STAT-5, Mcl-1, eIF-2 α , and HIF-1 α . *International journal of molecular sciences*. 2022;23(11).

89. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, et al. Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis. *Science*. 2004;303(5660):1010-4.
90. Ye G, Kan S, Chen J, Lu X. Puerarin in inducing apoptosis of bladder cancer cells through inhibiting SIRT1/p53 pathway. *Oncol Lett*. 2019;17(1):195-200.
91. Du X, Xiao J, Fu X, Xu B, Han H, Wang Y, et al. A proteomic analysis of Bcl-2 regulation of cell cycle arrest: insight into the mechanisms. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2021;22(10):839-55.
92. Du X, Fu X, Yao K, Lan Z, Xu H, Cui Q, et al. Bcl-2 delays cell cycle through mitochondrial ATP and ROS. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2017;16(7):707-13.
93. Roberts AW. Therapeutic development and current uses of BCL-2 inhibition. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2020;2020(1):1-9.
94. D'Aguzzo S, Del Bufalo D. Inhibition of Anti-Apoptotic Bcl-2 Proteins in Preclinical and Clinical Studies: Current Overview in Cancer. *Cells*. 2020;9(5).
95. Stevens M, Oltean S. Modulation of the Apoptosis Gene Bcl-x Function Through Alternative Splicing. *Frontiers in genetics*. 2019;10:804.
96. Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell death & disease*. 2019;10(3):177.
97. Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Levenson JD, Souers AJ. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nature reviews Drug discovery*. 2017;16(4):273-84.
98. Delbridge AR, Grabow S, Strasser A, Vaux DL. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nature reviews Cancer*. 2016;16(2):99-109.
99. Nagata S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annual review of immunology*. 2018;36:489-517.
100. Luo Y, Ren F, Liu Y, Shi Z, Tan Z, Xiong H, et al. Clinicopathological and prognostic significance of high Ki-67 labeling index in hepatocellular carcinoma patients: a meta-analysis. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015;8(7):10235-47.
101. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1984;133(4):1710-5.
102. Watanabe J, Kushihata F, Honda K, Sugita A, Tateishi N, Mominoki K, et al. Prognostic significance of Bcl-xL in human hepatocellular carcinoma. *Surgery*. 2004;135(6):604-12.
103. Abd-Elbaset M, Mansour AM, Ahmed OM, Abo-Youssef AM. The potential chemotherapeutic effect of β -ionone and/or sorafenib against hepatocellular carcinoma via its antioxidant effect, PPAR- γ , FOXO-1, Ki-67, Bax, and Bcl-2 signaling pathways. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2020;393(9):1611-24.
104. Miao C, Zhang W, Feng L, Gu X, Shen Q, Lu S, et al. Cancer-derived exosome miRNAs induce skeletal muscle wasting by Bcl-2-mediated apoptosis in colon cancer cachexia. *Molecular therapy Nucleic acids*. 2021;24:923-38.
105. Ohta E, Itoh M, Ueda M, Hida Y, Wang MX, Hayakawa-Ogura M, et al. Cullin-4B E3 ubiquitin ligase mediates Apaf-1 ubiquitination to regulate caspase-9 activity. *PLoS One*. 2019;14(7):e0219782.

106. Rossin A, Lounnas N, Durivault J, Miloro G, Gagnoux-Palacios L, Hueber AO. The Btk-dependent PIP5K1 γ lipid kinase activation by Fas counteracts FasL-induced cell death. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2017;22(11):1344-52.
107. Zhu R, Li L, Nguyen B, Seo J, Wu M, Seale T, et al. FLT3 tyrosine kinase inhibitors synergize with BCL-2 inhibition to eliminate FLT3/ITD acute leukemia cells through BIM activation. *Signal transduction and targeted therapy*. 2021;6(1):186.
108. Mortezaee K, Salehi E, Mirtavoos-Mahyari H, Motevaseli E, Najafi M, Farhood B, et al. Mechanisms of apoptosis modulation by curcumin: Implications for cancer therapy. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(8):12537-50.
109. Wang XW, Hussain SP, Huo TI, Wu CG, Forgues M, Hofseth LJ, et al. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology*. 2002;181-182:43-7.
110. Tannapfel A, Wittekind C. Genes involved in hepatocellular carcinoma: deregulation in cell cycling and apoptosis. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2002;440(4):345-52.
111. Severi T, van Malenstein H, Verslype C, van Pelt JF. Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets. *Acta pharmacologica Sinica*. 2010;31(11):1409-20.
112. Tsilidis KK, Kasimis JC, Lopez DS, Ntzani EE, Ioannidis JP. Type 2 diabetes and cancer: umbrella review of meta-analyses of observational studies. *BMJ (Clinical research ed)*. 2015;350:g7607.
113. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature genetics*. 2002;31(4):339-46.
114. Khanam A, Saleeb PG, Kottilil S. Pathophysiology and Treatment Options for Hepatic Fibrosis: Can It Be Completely Cured? *Cells*. 2021;10(5).
115. Shang N, Arteaga M, Zaidi A, Stauffer J, Cotler SJ, Zeleznik-Le NJ, et al. FAK is required for c-Met/ β -catenin-driven hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. 2015;61(1):214-26.
116. Lee EY, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010;2(10):a003236.
117. Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene*. 2007;26(15):2166-76.
118. Wan XW, Jiang M, Cao HF, He YQ, Liu SQ, Qiu XH, et al. The alteration of PTEN tumor suppressor expression and its association with the histopathological features of human primary hepatocellular carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2003;129(2):100-6.
119. Wang F, Breslin SJP, Qiu W. Novel oncogenes and tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Liver research*. 2021;5(4):195-203.
120. Kew MC, Dos Santos HA, Sherlock S. Diagnosis of primary cancer of the liver. *British medical journal*. 1971;4(5784):408-11.
121. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*. 2011;53(3):1020-2.
122. Llovet JM, Bustamante J, Castells A, Vilana R, Ayuso Mdel C, Sala M, et al. Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology*. 1999;29(1):62-7.

123. Lok AS, Seeff LB, Morgan TR, di Bisceglie AM, Sterling RK, Curto TM, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology*. 2009;136(1):138-48.
124. Marrero JA, Su GL, Wei W, Emick D, Conjeevaram HS, Fontana RJ, et al. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in american patients. *Hepatology*. 2003;37(5):1114-21.
125. Collier J, Sherman M. Screening for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1998;27(1):273-8.
126. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2018;69(1):182-236.
127. Heimbach JK, Kulik LM, Finn RS, Sirlin CB, Abecassis MM, Roberts LR, et al. AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2018;67(1):358-80.
128. Ioannou GN, Perkins JD, Carithers RL, Jr. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: impact of the MELD allocation system and predictors of survival. *Gastroenterology*. 2008;134(5):1342-51.
129. Bialecki ES, Di Bisceglie AM. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2005;7(1):26-34.
130. Tang A, Bashir MR, Corwin MT, Cruite I, Dietrich CF, Do RKG, et al. Evidence Supporting LI-RADS Major Features for CT- and MR Imaging-based Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review. *Radiology*. 2018;286(1):29-48.
131. Singal AG, Mittal S, Yerokun OA, Ahn C, Marrero JA, Yopp AC, et al. Hepatocellular Carcinoma Screening Associated with Early Tumor Detection and Improved Survival Among Patients with Cirrhosis in the US. *Am J Med*. 2017;130(9):1099-106.e1.
132. Tzartzeva K, Obi J, Rich NE, Parikh ND, Marrero JA, Yopp A, et al. Surveillance Imaging and Alpha Fetoprotein for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis: A Meta-analysis. *Gastroenterology*. 2018;154(6):1706-18.e1.
133. Liang Y, Xu F, Guo Y, Lai L, Jiang X, Wei X, et al. Diagnostic performance of LI-RADS for MRI and CT detection of HCC: A systematic review and diagnostic meta-analysis. *European journal of radiology*. 2021;134:109404.
134. van der Pol CB, Lim CS, Sirlin CB, McGrath TA, Salameh JP, Bashir MR, et al. Accuracy of the Liver Imaging Reporting and Data System in Computed Tomography and Magnetic Resonance Image Analysis of Hepatocellular Carcinoma or Overall Malignancy-A Systematic Review. *Gastroenterology*. 2019;156(4):976-86.
135. Chou R, Cuevas C, Fu R, Devine B, Wasson N, Ginsburg A, et al. Imaging Techniques for the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *Annals of internal medicine*. 2015;162(10):697-711.
136. Aubé C, Oberti F, Lonjon J, Pageaux G, Seror O, N'Kontchou G, et al. EASL and AASLD recommendations for the diagnosis of HCC to the test of daily practice. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2017;37(10):1515-25.
137. Bialecki ES, Ezenekwe AM, Brunt EM, Collins BT, Ponder TB, Bieneman BK, et al. Comparison of liver biopsy and noninvasive methods for diagnosis of hepatocellular

carcinoma. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2006;4(3):361-8.

138. Crippin JS. Biopsy of suspicious liver nodules: does it change management? *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2006;4(3):296-8.

139. Liu YW, Chen CL, Chen YS, Wang CC, Wang SH, Lin CC. Needle tract implantation of hepatocellular carcinoma after fine needle biopsy. *Digestive diseases and sciences*. 2007;52(1):228-31.

140. Forner A, Vilana R, Ayuso C, Bianchi L, Solé M, Ayuso JR, et al. Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008;47(1):97-104.

141. Durand F, Regimbeau JM, Belghiti J, Sauvanet A, Vilgrain V, Terris B, et al. Assessment of the benefits and risks of percutaneous biopsy before surgical resection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2001;35(2):254-8.

142. Lindor KD, Bowlus CL, Boyer J, Levy C, Mayo M. Primary Biliary Cholangitis: 2018 Practice Guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2019;69(1):394-419.

143. Cabibbo G, Enea M, Attanasio M, Bruix J, Craxì A, Cammà C. A meta-analysis of survival rates of untreated patients in randomized clinical trials of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2010;51(4):1274-83.

144. Marrero JA, Fontana RJ, Barrat A, Askari F, Conjeevaram HS, Su GL, et al. Prognosis of hepatocellular carcinoma: comparison of 7 staging systems in an American cohort. *Hepatology*. 2005;41(4):707-16.

145. Sherman M. Staging for hepatocellular carcinoma: complex and confusing. *Gastroenterology*. 2014;146(7):1599-602.

146. Cho YK, Chung JW, Kim JK, Ahn YS, Kim MY, Park YO, et al. Comparison of 7 staging systems for patients with hepatocellular carcinoma undergoing transarterial chemoembolization. *Cancer*. 2008;112(2):352-61.

147. Vauthey JN, Dixon E, Abdalla EK, Helton WS, Pawlik TM, Taouli B, et al. Pretreatment assessment of hepatocellular carcinoma: expert consensus statement. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2010;12(5):289-99.

148. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(6):1471-4.

149. Vauthey JN, Ribero D, Abdalla EK, Jonas S, Bharat A, Schumacher G, et al. Outcomes of liver transplantation in 490 patients with hepatocellular carcinoma: validation of a uniform staging after surgical treatment. *Journal of the American College of Surgeons*. 2007;204(5):1016-27; discussion 27-8.

150. Aii S, Yamaoka Y, Futagawa S, Inoue K, Kobayashi K, Kojiro M, et al. Results of surgical and nonsurgical treatment for small-sized hepatocellular carcinomas: a retrospective and nationwide survey in Japan. The Liver Cancer Study Group of Japan. *Hepatology*. 2000;32(6):1224-9.

151. Forner A, Reig ME, de Lope CR, Bruix J. Current strategy for staging and treatment: the BCLC update and future prospects. *Seminars in liver disease*. 2010;30(1):61-74.

152. Jonas S, Bechstein WO, Steinmüller T, Herrmann M, Radke C, Berg T, et al. Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Hepatology*. 2001;33(5):1080-6.
153. Llovet JM, Bruix J, Gores GJ. Surgical resection versus transplantation for early hepatocellular carcinoma: clues for the best strategy. *Hepatology*. 2000;31(4):1019-21.
154. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* (London, England). 2003;362(9399):1907-17.
155. Llovet JM, Fuster J, Bruix J. Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology*. 1999;30(6):1434-40.
156. Poon RT, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Wong J. Long-term survival and pattern of recurrence after resection of small hepatocellular carcinoma in patients with preserved liver function: implications for a strategy of salvage transplantation. *Annals of surgery*. 2002;235(3):373-82.
157. Yao FY, Ferrell L, Bass NM, Watson JJ, Bacchetti P, Venook A, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology*. 2001;33(6):1394-403.
158. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2009;10(1):25-34.
159. Randomized trial of leuporelin and flutamide in male patients with hepatocellular carcinoma treated with tamoxifen. *Hepatology*. 2004;40(6):1361-9.
160. Barbare JC, Bouché O, Bonnetain F, Dahan L, Lombard-Bohas C, Faroux R, et al. Treatment of advanced hepatocellular carcinoma with long-acting octreotide: a phase III multicentre, randomised, double blind placebo-controlled study. *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990). 2009;45(10):1788-97.
161. Okada S, Okazaki N, Nose H, Yoshimori M, Aoki K. Prognostic factors in patients with hepatocellular carcinoma receiving systemic chemotherapy. *Hepatology*. 1992;16(1):112-7.
162. Sun HC, Zhou J, Wang Z, Liu X, Xie Q, Jia W, et al. Chinese expert consensus on conversion therapy for hepatocellular carcinoma (2021 edition). *Hepatobiliary surgery and nutrition*. 2022;11(2):227-52.
163. Chen Z, Xie H, Hu M, Huang T, Hu Y, Sang N, et al. Recent progress in treatment of hepatocellular carcinoma. *American journal of cancer research*. 2020;10(9):2993.
164. Reig M, Forner A, Rimola J, Ferrer-Fàbrega J, Burrel M, Garcia-Criado Á, et al. BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *J Hepatol*. 2022;76(3):681-93.
165. Roayaie S, Obeidat K, Sposito C, Mariani L, Bhoori S, Pellegrinelli A, et al. Resection of hepatocellular cancer ≤ 2 cm: results from two Western centers. *Hepatology*. 2013;57(4):1426-35.
166. Shi M, Guo RP, Lin XJ, Zhang YQ, Chen MS, Zhang CQ, et al. Partial hepatectomy with wide versus narrow resection margin for solitary hepatocellular carcinoma: a prospective randomized trial. *Annals of surgery*. 2007;245(1):36-43.

167. Palavecino M, Chun YS, Madoff DC, Zorzi D, Kishi Y, Kaseb AO, et al. Major hepatic resection for hepatocellular carcinoma with or without portal vein embolization: Perioperative outcome and survival. *Surgery*. 2009;145(4):399-405.
168. Parker GA, Lawrence W, Jr., Horsley JS, 3rd, Neifeld JP, Cook D, Walsh J, et al. Intraoperative ultrasound of the liver affects operative decision making. *Annals of surgery*. 1989;209(5):569-76; discussion 76-7.
169. Pawlik TM, Poon RT, Abdalla EK, Zorzi D, Ikai I, Curley SA, et al. Critical appraisal of the clinical and pathologic predictors of survival after resection of large hepatocellular carcinoma. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*. 2005;140(5):450-7; discussion 7-8.
170. Shrager B, Jibara GA, Tabrizian P, Schwartz ME, Labow DM, Hiotis S. Resection of large hepatocellular carcinoma (≥ 10 cm): a unique western perspective. *Journal of surgical oncology*. 2013;107(2):111-7.
171. Zhou XD, Tang ZY, Yang BH, Lin ZY, Ma ZC, Ye SL, et al. Experience of 1000 patients who underwent hepatectomy for small hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2001;91(8):1479-86.
172. Ozawa K, Takayasu T, Kumada K, Yamaoka Y, Tanaka K, Kobayashi N, et al. Experience with 225 hepatic resections for hepatocellular carcinoma over a 4-year period. *American journal of surgery*. 1991;161(6):677-82.
173. Poon RT, Fan ST, Ng IO, Wong J. Significance of resection margin in hepatectomy for hepatocellular carcinoma: A critical reappraisal. *Annals of surgery*. 2000;231(4):544-51.
174. Bruix J, Llovet JM. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2002;35(3):519-24.
175. Freeman RB, Mithoefer A, Ruthazer R, Nguyen K, Schore A, Harper A, et al. Optimizing staging for hepatocellular carcinoma before liver transplantation: A retrospective analysis of the UNOS/OPTN database. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2006;12(10):1504-11.
176. Llovet JM, Mas X, Aponte JJ, Fuster J, Navasa M, Christensen E, et al. Cost effectiveness of adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma during the waiting list for liver transplantation. *Gut*. 2002;50(1):123-8.
177. Trotter JF, Wachs M, Everson GT, Kam I. Adult-to-adult transplantation of the right hepatic lobe from a living donor. *N Engl J Med*. 2002;346(14):1074-82.
178. Chan KM, Chou HS, Wu TJ, Lee CF, Yu MC, Lee WC. Characterization of hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation: perioperative prognostic factors, patterns, and outcome. *Asian journal of surgery*. 2011;34(3):128-34.
179. Roayaie S, Schwartz JD, Sung MW, Emre SH, Miller CM, Gondolesi GE, et al. Recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplant: patterns and prognosis. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2004;10(4):534-40.
180. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol*. 2001;35(3):421-30.

181. Livraghi T, Goldberg SN, Lazzaroni S, Meloni F, Solbiati L, Gazelle GS. Small hepatocellular carcinoma: treatment with radio-frequency ablation versus ethanol injection. *Radiology*. 1999;210(3):655-61.
182. Livraghi T, Giorgio A, Marin G, Salmi A, de Sio I, Bolondi L, et al. Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long-term results of percutaneous ethanol injection. *Radiology*. 1995;197(1):101-8.
183. Okada S. Local ablation therapy for hepatocellular carcinoma. *Seminars in liver disease*. 1999;19(3):323-8.
184. Lencioni R, Vignali C, Caramella D, Cioni R, Mazzeo S, Bartolozzi C. Transcatheter arterial embolization followed by percutaneous ethanol injection in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 1994;17(2):70-5.
185. Lencioni RA, Allgaier HP, Cioni D, Olschewski M, Deibert P, Crocetti L, et al. Small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: randomized comparison of radio-frequency thermal ablation versus percutaneous ethanol injection. *Radiology*. 2003;228(1):235-40.
186. Giorgio A, Tarantino L, de Stefano G, Coppola C, Ferraioli G. Complications after percutaneous saline-enhanced radiofrequency ablation of liver tumors: 3-year experience with 336 patients at a single center. *AJR American journal of roentgenology*. 2005;184(1):207-11.
187. Lin SM, Lin CJ, Lin CC, Hsu CW, Chen YC. Radiofrequency ablation improves prognosis compared with ethanol injection for hepatocellular carcinoma ≤ 4 cm. *Gastroenterology*. 2004;127(6):1714-23.
188. Shiina S, Teratani T, Obi S, Sato S, Tateishi R, Fujishima T, et al. A randomized controlled trial of radiofrequency ablation with ethanol injection for small hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2005;129(1):122-30.
189. Livraghi T, Solbiati L, Meloni MF, Gazelle GS, Halpern EF, Goldberg SN. Treatment of focal liver tumors with percutaneous radio-frequency ablation: complications encountered in a multicenter study. *Radiology*. 2003;226(2):441-51.
190. Livraghi T, Meloni F, Di Stasi M, Rolle E, Solbiati L, Tinelli C, et al. Sustained complete response and complications rates after radiofrequency ablation of very early hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Is resection still the treatment of choice? *Hepatology*. 2008;47(1):82-9.
191. Takayama T, Makuuchi M, Kojiro M, Lauwers GY, Adams RB, Wilson SR, et al. Early hepatocellular carcinoma: pathology, imaging, and therapy. *Annals of surgical oncology*. 2008;15(4):972-8.
192. Bruix J, Sala M, Llovet JM. Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S179-88.
193. Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*. 2003;37(2):429-42.
194. Jia Z, Jiang G, Tian F, Zhu C, Qin X. A systematic review on the safety and effectiveness of yttrium-90 radioembolization for hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombosis. *Saudi journal of gastroenterology : official journal of the Saudi Gastroenterology Association*. 2016;22(5):353-9.

195. Bruix J, Cheng A-L, Meinhardt G, Nakajima K, De Sanctis Y, Llovet J. Prognostic factors and predictors of sorafenib benefit in patients with hepatocellular carcinoma: Analysis of two phase III studies. *Journal of Hepatology*. 2017;67(5):999-1008.
196. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008;359(4):378-90.
197. Lee DW, Cho EJ, Lee JH, Yu SJ, Kim YJ, Yoon JH, et al. Phase II Study of Avelumab in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma Previously Treated with Sorafenib. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2021;27(3):713-8.
198. Bettinger D, Schultheiss M, Knüppel E, Thimme R, Blum HE, Spangenberg HC. Diarrhea predicts a positive response to sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2012;56(2):789-90.
199. Estfan B, Byrne M, Kim R. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma: hypertension as a potential surrogate marker for efficacy. *American journal of clinical oncology*. 2013;36(4):319-24.
200. Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang YH, Bodoky G, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*. 2017;389(10064):56-66.
201. Kudo M, Finn RS, Qin S, Han KH, Ikeda K, Piscaglia F, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet (London, England)*. 2018;391(10126):1163-73.
202. Maruta S, Ogasawara S, Ooka Y, Obu M, Inoue M, Itokawa N, et al. Potential of Lenvatinib for an Expanded Indication from the REFLECT Trial in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Liver cancer*. 2020;9(4):382-96.
203. Abou-Alfa GK, Meyer T, Cheng AL, El-Khoueiry AB, Rimassa L, Ryoo BY, et al. Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2018;379(1):54-63.
204. Kelley RK, Verslype C, Cohn AL, Yang TS, Su WC, Burris H, et al. Cabozantinib in hepatocellular carcinoma: results of a phase 2 placebo-controlled randomized discontinuation study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017;28(3):528-34.
205. Zhu AX, Finn RS, Mulcahy M, Gurtler J, Sun W, Schwartz JD, et al. A phase II and biomarker study of ramucirumab, a human monoclonal antibody targeting the VEGF receptor-2, as first-line monotherapy in patients with advanced hepatocellular cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(23):6614-23.
206. Zhu AX, Park JO, Ryoo BY, Yen CJ, Poon R, Pastorelli D, et al. Ramucirumab versus placebo as second-line treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma following first-line therapy with sorafenib (REACH): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2015;16(7):859-70.
207. Qin S, Bi F, Gu S, Bai Y, Chen Z, Wang Z, et al. Donafenib Versus Sorafenib in First-Line Treatment of Unresectable or Metastatic Hepatocellular Carcinoma: A Randomized,

- Open-Label, Parallel-Controlled Phase II-III Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2021;39(27):3002-11.
208. Bruix J, Chan SL, Galle PR, Rimassa L, Sangro B. Systemic treatment of hepatocellular carcinoma: An EASL position paper. *J Hepatol*. 2021;75(4):960-74.
209. Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim TY, et al. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2020;382(20):1894-905.
210. Ren Z, Xu J, Bai Y, Xu A, Cang S, Du C, et al. Sintilimab plus a bevacizumab biosimilar (IBI305) versus sorafenib in unresectable hepatocellular carcinoma (ORIENT-32): a randomised, open-label, phase 2-3 study. *The Lancet Oncology*. 2021;22(7):977-90.
211. Kelley RK, Sangro B, Harris W, Ikeda M, Okusaka T, Kang YK, et al. Safety, Efficacy, and Pharmacodynamics of Tremelimumab Plus Durvalumab for Patients With Unresectable Hepatocellular Carcinoma: Randomized Expansion of a Phase I/II Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2021;39(27):2991-3001.
212. Qin S, Bi F, Xu J, Du C, Fan Q, Zhang L, et al. P-86 Comparison of the pharmacokinetics of donafenib and sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: An open-label, randomized, parallel-controlled, multicentre phase II/III trial. *annals of oncology*. 2020;31(3):117-8.
213. Keam SJ, Duggan S. Donafenib: First Approval. *Drugs*. 2021;81(16):1915-20.
214. Keith E Stuart M. Systemic treatment for advanced hepatocellular carcinoma 2022. Available from: https://www.uptodate.com/contents/systemic-treatment-for-advanced-hepatocellular-carcinoma?search=hepatosel%C3%BCler%20kanser%20kemoterapi%20tedavi&source=search_result&selectedTitle=4~150&usage_type=default&display_rank=4#.
215. Akateh C, Black SM, Conteh L, Miller ED, Noonan A, Elliott E, et al. Neoadjuvant and adjuvant treatment strategies for hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology*. 2019;25(28):3704-21.
216. Pompili M, Francica G, Ponziani FR, Iezzi R, Avolio AW. Bridging and downstaging treatments for hepatocellular carcinoma in patients on the waiting list for liver transplantation. *World journal of gastroenterology*. 2013;19(43):7515-30.
217. Lewandowski RJ, Kulik LM, Riaz A, Senthilnathan S, Mulcahy MF, Ryu RK, et al. A comparative analysis of transarterial downstaging for hepatocellular carcinoma: chemoembolization versus radioembolization. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009;9(8):1920-8.
218. Abou-Alfa GK, Niedzwieski D, Knox JJ, Kaubisch A, Posey J, Tan BR, et al. Phase III randomized study of sorafenib plus doxorubicin versus sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC): CALGB 80802 (Alliance). *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(4_suppl):192-.
219. Greten TF, Manns MP, Korangy F. Immunotherapy of HCC. *Reviews on recent clinical trials*. 2008;3(1):31-9.

220. Yau T, Park JW, Finn RS, Cheng AL, Mathurin P, Edeline J, et al. Nivolumab versus sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 459): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2022;23(1):77-90.
221. Abou-Alfa GK, Chan SL, Kudo M, Lau G, Kelley RK, Furuse J, et al. Phase 3 randomized, open-label, multicenter study of tremelimumab (T) and durvalumab (D) as first-line therapy in patients (pts) with unresectable hepatocellular carcinoma (uHCC): HIMALAYA. *Journal of Clinical Oncology*. 2022;40(4_suppl):379-.
222. Pinna AD, Yang T, Mazzaferro V, De Carlis L, Zhou J, Roayaie S, et al. Liver Transplantation and Hepatic Resection can Achieve Cure for Hepatocellular Carcinoma. *Annals of surgery*. 2018;268(5):868-75.
223. Saez NJ, Senff S, Jensen JE, Er SY, Herzig V, Rash LD, et al. Spider-venom peptides as therapeutics. *Toxins*. 2010;2(12):2851-71.
224. Wheeler WC, Coddington JA, Crowley LM, Dimitrov D, Goloboff PA, Griswold CE, et al. The spider tree of life: phylogeny of Araneae based on target-gene analyses from an extensive taxon sampling. *Cladistics : the international journal of the Willi Hennig Society*. 2017;33(6):574-616.
225. Vildan Betul Yenigun AAA, Mustafa Said Acar, Muhammed Burak Kaplan, Vasfiye Betul Ucar, DidemTastekin4 Hasan Acar. Alcoholic extract of *Tarantula cubensis* (Theranekron®) induce autophagy on gastric cancer cells. *Experimental Biomedical Research*. 2021;4(2):89-09.
226. Gultiken N, Guvenc T, Kaya D, Agaoglu AR, Ay SS, Kucukaslan I, et al. *Tarantula cubensis* extract alters the degree of apoptosis and mitosis in canine mammary adenocarcinomas. *Journal of veterinary science*. 2015;16(2):213-9.
227. Koch H, Stein M. Conservative and surgical treatment of panaritium (bovine interdigital necrobacillosis) of cattle in combination with Theranekron (spider venom preparation). *Praktische Tierarzt*. 1980;61:116-9.
228. Amin Bigham–Sadegh D, DVSc; Iraj Karimi, DVM, DVSc; Farzaneh Hoseini, DVM, DVSc; Hamid, Moradi D. Concurrent Use of Theranekron with Hydroxyapatite on Bone Healing in Rabbit Model: Radiographic and Histologic Evaluation *Iranian Journal of Orthopaedic Surgery*. 2017;15(2):56-64.
229. Daidone MG, Luisi A, Veneroni S, Benini E, Silvestrini R. Clinical studies of Bcl-2 and treatment benefit in breast cancer patients. *Endocrine-related cancer*. 1999;6(1):61-8.
230. Becer E, Yiğit Hanoğlu D, Soykut G, Hanoğlu A, Vatansever H, Yavuz D, et al. Colchicum pusillum Extract Induced Apoptosis in Colo-741 Metastatic Colon Cancer Cells via Extrinsic Pathway. *Proceedings*. 2018;2:1543.
231. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2019;69(1):7-34.
232. Ogunwobi OO, Harricharran T, Huaman J, Galuza A, Odumuwaogun O, Tan Y, et al. Mechanisms of hepatocellular carcinoma progression. *World journal of gastroenterology*. 2019;25(19):2279-93.
233. Desai A, Sandhu S, Lai JP, Sandhu DS. Hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: A comprehensive review. *World journal of hepatology*. 2019;11(1):1-18.
234. Kow AWC. Transplantation versus liver resection in patients with hepatocellular carcinoma. *Translational gastroenterology and hepatology*. 2019;4:33.

235. Saidi RF, Hejazi Kenari SK. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: past, present and future. *Middle East journal of digestive diseases*. 2013;5(4):181-92.
236. Duvoux C, Kiuchi T, Pestalozzi B, Busuttil R, Miksad R. What is the role of adjuvant therapy after liver transplantation for hepatocellular carcinoma? *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2011;17 Suppl 2(Suppl 2):S147-58.
237. Rubin J, Ayoub N, Kaldas F, Saab S. Management of recurrent hepatocellular carcinoma in liver transplant recipients: a systematic review. *Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*. 2012;10(6):531-43.
238. Sahin IH, Khalil L, Millett R, Kaseb A. Neoadjuvant and adjuvant treatment approaches for hepatocellular carcinoma: future outlook. *Chinese clinical oncology*. 2021;10(1):7.
239. Anwanwan D, Singh SK, Singh S, Saikam V, Singh R. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches. *Biochimica et biophysica acta Reviews on cancer*. 2020;1873(1):188314.
240. Akhtar B, Muhammad F, Sharif A, Anwar MI. Mechanistic insights of snake venom disintegrins in cancer treatment. *European journal of pharmacology*. 2021;899:174022.
241. Gul Satar NY, Cangul IT, Topal A, Kurt H, Ipek V, Onel GI. The effects of *Tarantula cubensis* venom on open wound healing in rats. *Journal of wound care*. 2017;26(2):66-71.
242. Karabacak M, Eraslan G, Kanbur M, Sarica ZS. Effects of *Tarantula cubensis* D6 on aflatoxin-induced injury in biochemical parameters in rats. *Homeopathy*. 2015;104(3):205-10.
243. Kizilay Z, Aktas S, Cetin NK, Kilic MA, Ozturk H. Effect of *Tarantula Cubensis* Extract (Theranechron) on Peripheral Nerve Healing in an Experimental Sciatic Nerve Injury Model in Rats. *Turkish neurosurgery*. 2019;29(5):743-9.
244. Dik B, Coskun D, Er A. Protective Effect of *Nerium oleander* Distillate and *Tarantula cubensis* Alcoholic Extract on Cancer Biomarkers in Colon and Liver Tissues of Rats with Experimental Colon Cancer. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2022;22(10):1962-9.
245. Dey DK, Chang SN, Kang SC. The inflammation response and risk associated with aflatoxin B1 contamination was minimized by insect peptide CopA3 treatment and act towards the beneficial health outcomes. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*. 2021;268(Pt B):115713.
246. Abdou AG, Holah NS, Elazab DS, El-Gendy WG, Badr MT, Al-Sharakly DR. Hepatocellular Carcinoma Score and Subclassification Into Aggressive Subtypes Using Immunohistochemical Expression of p53, β -Catenin, CD133, and Ki-67. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*. 2021;29(1):20-33.
247. Yang C, Su H, Liao X, Han C, Yu T, Zhu G, et al. Marker of proliferation Ki-67 expression is associated with transforming growth factor beta 1 and can predict the prognosis of patients with hepatic B virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer management and research*. 2018;10:679-96.
248. Bai K, Cao Y, Huang Q, Jiang Y, Lv L. Prognostic Value of Ki67 Expression for Patients with Surgically Resected Hepatocellular Carcinoma: Perspectives from a High Incidence Area. *Clinical laboratory*. 2017;63(2):355-64.

249. Arii S, Tanaka J, Yamazoe Y, Minematsu S, Morino T, Fujita K, et al. Predictive factors for intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy. *Cancer*. 1992;69(4):913-9.
250. Lim KC, Chow PK, Allen JC, Chia GS, Lim M, Cheow PC, et al. Microvascular invasion is a better predictor of tumor recurrence and overall survival following surgical resection for hepatocellular carcinoma compared to the Milan criteria. *Annals of surgery*. 2011;254(1):108-13.
251. Poon RT, Ng IO, Lau C, Yu WC, Yang ZF, Fan ST, et al. Tumor microvessel density as a predictor of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(7):1775-85.
252. Ding T, Xu J, Wang F, Shi M, Zhang Y, Li SP, et al. High tumor-infiltrating macrophage density predicts poor prognosis in patients with primary hepatocellular carcinoma after resection. *Human pathology*. 2009;40(3):381-9.
253. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.
254. Tang W, Chen Z, Zhang W, Cheng Y, Zhang B, Wu F, et al. The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects. *Signal transduction and targeted therapy*. 2020;5(1):87.
255. Xu J, Ji L, Liang Y, Wan Z, Zheng W, Song X, et al. CircRNA-SORE mediates sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma by stabilizing YBX1. *Signal transduction and targeted therapy*. 2020;5(1):1-14.
256. Trevisani F, Brandi G, Garuti F, Barbera MA, Tortora R, Casadei Gardini A, et al. Metronomic capecitabine as second-line treatment for hepatocellular carcinoma after sorafenib discontinuation. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2018;144(2):403-14.
257. Colagrande S, Regini F, Taliani GG, Nardi C, Inghilesi AL. Advanced hepatocellular carcinoma and sorafenib: Diagnosis, indications, clinical and radiological follow-up. *World journal of hepatology*. 2015;7(8):1041-53.
258. Beretta GL, Cassinelli G, Pennati M, Zuco V, Gatti L. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: The dual role of tyrosine kinase inhibitors as multitargeting agents. *European journal of medicinal chemistry*. 2017;142:271-89.
259. Durmus S, Hendriks JJ, Schinkel AH. Apical ABC transporters and cancer chemotherapeutic drug disposition. *Advances in cancer research*. 2015;125:1-41.
260. Arrighetti N, Corbo C, Evangelopoulos M, Pastò A, Zuco V, Tasciotti E. Exosome-like Nanovectors for Drug Delivery in Cancer. *Current medicinal chemistry*. 2019;26(33):6132-48.
261. Gowda R, Robertson BM, Iyer S, Barry J, Dinavahi SS, Robertson GP. The role of exosomes in metastasis and progression of melanoma. *Cancer treatment reviews*. 2020;85:101975.
262. Heo Y-A, Syed YY. Regorafenib: a review in hepatocellular carcinoma. *Drugs*. 2018;78(9):951-8.
263. Granito A, Forgione A, Marinelli S, Renzulli M, Ielasi L, Sansone V, et al. Experience with regorafenib in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Therapeutic advances in gastroenterology*. 2021;14:17562848211016959.

264. Fondevila F, Méndez-Blanco C, Fernández-Palanca P, González-Gallego J, Mauriz JL. Anti-tumoral activity of single and combined regorafenib treatments in preclinical models of liver and gastrointestinal cancers. *Experimental & molecular medicine*. 2019;51(9):1-15.
265. Ettrich TJ, Seufferlein T. Regorafenib. *Small Molecules in Oncology*. 2018:45-56.
266. Wu H, Han X, Wang Z, Mo L, Liu W, Guo Y, et al. Prediction of the Ki-67 marker index in hepatocellular carcinoma based on CT radiomics features. *Physics in medicine and biology*. 2020;65(23):235048.
267. McCredie M, Williams S, Coates M. Cancer mortality in East and Southeast Asian migrants to New South Wales, Australia, 1975-1995. *Br J Cancer*. 1999;79(7-8):1277-82.
268. Maeda A, Irie K, Ando H, Hasegawa A, Taniguchi H, Kadowaki S, et al. Associations among regorafenib concentrations, severe adverse reactions, and ABCG2 and OATP1B1 polymorphisms. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2019;83(1):107-13.
269. El-Khoueiry AB, Hanna DL, Llovet J, Kelley RK. Cabozantinib: An evolving therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer treatment reviews*. 2021;98:102221.
270. Deeks ED. Cabozantinib: a review in advanced hepatocellular carcinoma. *Targeted oncology*. 2019;14(1):107-13.
271. Shimose S, Iwamoto H, Niizeki T, Shirono T, Noda Y, Kamachi N, et al. Clinical Significance of Adverse Events for Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma Treated with Lenvatinib: A Multicenter Retrospective Study. *Cancers*. 2020;12(7).
272. Zeair S, Rajchert J, Stasiuk R, Cyprys S, Miğtkiewski J, Zasada-Cedro K, et al. Recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: a single-center experience. *Annals of Transplantation*. 2019;24:499.
273. Hartke J, Johnson M, Ghabril M. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Seminars in diagnostic pathology*. 2017;34(2):153-9.
274. Samuel M, Chow PK, Chan Shih-Yen E, Machin D, Soo KC. Neoadjuvant and adjuvant therapy for surgical resection of hepatocellular carcinoma. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2009;2009(1):Cd001199.