



**KUKURBİTASİN D VE I'NİN SORAFENİB İLE
KOMBİNASYONUNUN HEPATOSELÜLER KARSİNOMA HÜCRE
HATTINDA RAS/RAF/MEK/ERK SİNYAL YOLU ARACILI
APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nuray ÜREMİŞ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ**

Doktora Tezi – 2022

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KUKURBİTASİN D VE I'NIN SORAFENİB İLE KOMBİNASYONUNUN
HEPATOSSELÜLER KARSİNOMA HÜCRE HATTINDA RAS/RAF/MEK/ERK
SİNYAL YOLU ARACILI APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nuray ÜREMİŞ

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ**

**Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından
TDK-2021-2671 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

**MALATYA
2022**

KABUL ONAY FORM SAYFASI



ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak “Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ” danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “Kukurbitasin D Ve I'nın Sorafenib İle Kombinasyonunun Hepatoselüler Karsinoma Hücre Hattında Ras/Raf/Mek/Erk Sinyal Yolu Aracılı Apoptotik Etkilerinin Araştırılması” başlıklı Doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Nuray ÜREMİŞ

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Karaciğer Kanseri	4
2.3. Karaciğer Kanserinin Epidemiyolojisi	4
2.4. Karaciğer Kanserinin Patofizyolojisi.....	5
2.5. Karaciğer Kanserinin Moleküler Mekanizması.....	7
2.5.1. Genetik Mutasyonlar	9
2.5.2. Oksidatif Stres	11
2.5.3. Anjiyogenez.....	14
2.5.4. Reseptör Tirozin Kinaz Sinyal Yolları	16
2.5.5. VEGF Reseptörü.....	17
2.5.6. EGF Reseptörü	17
2.5.7. RAS/MAPK Sinyal Yolu.....	18
2.5.8. PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolu	20
2.6. Hepatoselüler Karsinomada (HCC) Tedavi Yaklaşımları	22
2.6.1. Sistemik terapiler.....	24
2.6.2. Sorafenibin etki mekanizmaları.....	27
2.7. Doğal Bileşiklerin Kanser Tedavisinde Kullanımı.....	30
2.7.1. Kukulbitasinlerin biyolojik aktiviteleri	33
3. MATERYAL VE METOT	36
3.1. Bitki Ekstraktının Hazırlanması ve Kukulbitasinlerin İzolasyonu.....	36
3.2. HepG2 hücre kültürü koşulları	36
3.2.1. Hücreleri Dondurma	37
3.2.2. Donmuş Hücreyi Çözdürme İşlemi	37
3.2.3. Hücre Pasajlama	37
3.3. CuD, CuI ve Sorafenib'in Hazırlanması ve Uygulanması	37

3.4.	MTT ile Hücre Canlılığı Testi	38
3.5.	CuD ve CuI ile Sorafenibin Kombine Uygulaması	38
3.6.	Apoptozun Annexin V/PI Boyaması ile Belirlenmesi.....	39
3.7.	Hücre Döngüsü Analizi	40
3.8.	Yara İyileşmesi Analizi	40
3.9.	Mitokondriyal Membran Potansiyeli Analizi	41
3.10.	qRT-PCR ile mRNA Gen Ekspresyon Düzeylerinin Analizi.....	41
3.10.1.	Hücrelerden Total RNA izolasyonu	41
3.10.2.	cDNA Sentez Protokolü	42
3.10.3.	Gerçek Zamanlı PCR Çoğaltım Protokolü	42
3.11.	Western Blot Analizi	43
3.11.1.	Numunenin Hazırlanışı.....	43
3.11.2.	Protein Konsantrasyonun Hesaplanması	44
3.11.3.	SDS-PAGE hazırlanması.....	44
3.11.4.	Elektroforetik Yürütme.....	45
3.11.5.	Proteinlerin Membrana Transferi	45
3.11.6.	Sekonder Antikor ile İnkübasyon	46
3.11.7.	Görüntüleme ve Dansitometrik Analiz.....	46
3.11.8.	İstatistiksel Analiz	47
4.	BULGULAR	48
4.1.	Kukurbitasinlerin İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	48
4.2.	CuD, CuI ve Sorafenibin Sitotoksik Etkileri	49
4.3.	CuD ve Sorafenibin Kombine Uygulamasının Etkileri	49
4.4.	CuI ve Sorafenibin Kombine Uygulamasının Etkileri	53
4.5.	CuD ve Sorafenibin Apoptoz Üzerine Etkileri.....	55
4.6.	CuI ve Sorafenibin Apoptoz Üzerine Etkileri	56
4.7.	CuD ve Sorafenibin Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi	57
4.8.	CuI ve Sorafenibin Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi.....	59
4.9.	CuD, CuI ve Sorafenibin Yara İyileşmesine Etkisi	60
4.10.	Bileşiklerin Mitokondriyal Membran Potansiyeline ($\Delta\Psi_m$) etkisi	62
4.11.	CuD, CuI ve Sorafenibin EGFR ve VEGF Aracılı Raf/MEK/ERK ve PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yollarına Etkisi.....	63
4.12.	Bileşiklerin Kaspaz 9, Bax, Bcl-XL Protein Düzeylerine Etkisi.....	69

4.13.	CuD, CuI ve Sorafenibin AKT, MTOR, MAPK, ERK, STAT3, Kaspaz 3, Bax ve Bcl-XL Gen İfadesine Etkisi.....	70
5.	TARTIŞMA.....	76
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	87
	KAYNAKLAR	89
	EKLER.....	112
	EK-1. Özgeçmiş.....	112
	EK-2. Etik Kurul Bilgisi	113



TEŞEKKÜR

Doktora eğitim hayatım boyunca bilgisini, tecrübesini aktaran ve çalışmamda beni destekleyen danışman hocam Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ'e çok teşekkür ederim.

Bu günlere gelmem için birçok fedakârlık gösteren ve birçok zorluğa katlanan rahmetli canım annem Mesude ÜLTAN'a çok teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Bu zor ve meşakkatli doktora sürecinde evde ve işte desteğini benden esirgemeyen, varlığıyla her daim bana güç veren kıymetli eşim ve iş arkadaşım Muhammed Mehdi ÜREMİŞ'e ve ilk göz ağrım, boncuk gözlü kızım Zeynep Sena ÜREMİŞ'e teşekkür ederim.



ÖZET

Kukurbitasin D ve I'nın Sorafenib İle Kombinasyonunun Hepatoselüler Karsinoma Hücre Hattında Ras/Raf/Mek/Erk Sinyal Yolu Aracılı Apoptotik Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Multi-tirozin kinaz inhibitörü olan sorafenib, HCC tedavisinde birinci basamak tedavi olarak kullanılan sistemik bir ilaçtır. Genel sağkalımı arttırmak için sorafenibin etki gücünü arttıracak ve ilaç direncini engelleyecek kombine ilaç tedavilerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Kukurbitasinler, birçok kanser türünde aşırı aktive olan sinyal yollarını baskılayarak antikanser etki gösteren doğal bileşiklerdir. Bu çalışmada sorafenibin etkinliğini arttırmak ve tedavi dozunu azaltmak amacıyla CuD ve CuI'nın sorafenible kombinasyonunun HepG2 hücre hattı üzerindeki antikarsinojenik etkileri araştırıldı.

Materyal ve Metot: CuD ve CuI HepG2 hücrelerine tek başına veya sorafenible kombine uygulanarak hücre inhibisyonu, göçü, apoptozu, hücre döngüsü dağılımı, mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) incelendi. Ayrıca sorafenibin etki ettiği bilinen sinyal yollarına kukurbitasinlerin nasıl etki ettiğini ortaya koymak amacıyla; VEGF, EGFR, MMP-2, kaspaz kaskatı, PI3K/AKT/mTOR, Raf/MEK/ERK sinyal yollarıyla ilgili proteinler ve genler western blot ve qRT-PCR ile değerlendirildi.

Bulgular: CuD ve CuI'nın düşük konsantrasyonlarda antiproliferatif etkiye sahip olduğu, sorafenib ile kombine edildiğinde sinerjistik etki gösterdiği ortaya konmuştur. Kombine uygulamalar, kaspaz-9, Bax aktivitesini artırıp Bcl-xL aktivasyonunu inhibe ederek, hücre döngüsünü G2/M fazında bloke etti ve $\Delta\Psi_m$ kaybına neden olarak apoptoz indüksiyonunu sağladı. Ayrıca kombinasyonlar, hücre göçünü azaltarak, MMP-2 ve VEGF'i baskıladı. Kombine kukurbitasin-sorafenib uygulamaları EGFR ve PI3K/AKT/mTOR, Raf/MEK/ERK sinyallerinde rol alan proteinlerin ve genlerin ekspresyonunu inhibe etti.

Sonuç: Kukurbitasinlerin sorafenible sinerjetik etki göstermesi ve benzer sinyal yollarını hedeflemesi, kombinasyonlarının HCC'de anjiyojenik, metastatik ve proliferatif aktiviteyi baskılayarak sorafenibin etkinliğini arttırabileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: EGFR, HCC, Kaspaz 9, Kukurbitasin, MMP-2, PI3K/AKT/mTOR, Raf/MEK/ERK, Sorafenib

ABSTRACT

Investigation of Ras/Raf/MEK/ERK Signaling-Mediated Apoptotic Effects of Combination of Cucurbitacin D and I with Sorafenib in Hepatocellular Carcinoma Cell Line

Aim: Sorafenib, a multi-tyrosine kinase inhibitor, is a systemic drug used as first-line therapy in the treatment of HCC. In order to increase overall survival, it is necessary to develop combined drug therapies that will increase the potency of sorafenib and prevent drug resistance. Cucurbitacins are natural compounds that show anticancer effects by suppressing over-activated signaling pathways in many cancer types. In this study, the anticarcinogenic effects of sorafenib-CuD and CuI combination on HepG2 cell line were investigated in order to increase the efficacy of sorafenib and decrease the treatment dose.

Material and Method: Cell inhibition, migration, apoptosis, cell cycle distribution, mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) were investigated by applying CuD and CuI alone or in combination with sorafenib to HepG2 cells. In addition, in order to reveal how cucurbitacins affect the signal pathways known to affect sorafenib; proteins and genes involved in VEGF, EGFR, MMP-2, caspase cascade, PI3K/AKT/mTOR, Raf/MEK/ERK signaling pathways were assessed by western blot and qRT-PCR.

Results: It has been shown that CuD and CuI have an antiproliferative effect at low concentrations and show a synergistic effect when combined with sorafenib. Combined administrations induced apoptosis by increasing caspase-9, Bax activity and inhibiting Bcl-xL activation, blocking the cell cycle in G2/M phase and causing loss of $\Delta\Psi_m$. The combinations also suppressed MMP-2 and VEGF, reduced cell migration. The combined cucurbitacin-sorafenib applications inhibited the expression of proteins and genes involved in EGFR and PI3K/AKT/mTOR, Raf/MEK/ERK signaling pathways.

Conclusion: Due to showing the synergetic effect of cucurbitacins with sorafenib and their targeting of similar signaling pathways reveal that their combination may increase the efficacy of sorafenib by suppressing angiogenic, metastatic and proliferative activity in HCC.

Keywords: EGFR, HCC, Caspase 9, Cucurbitacin, MMP-2, PI3K/AKT/mTOR, Raf/MEK/ERK, Sorafenib

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AKT	: Protein Kinaz B
APS	: Amonyum per sülfat
ATP	: Adenozin trifosfat
Bax	: BCL2 ilişkili X
BCL-2	: B hücreli lenfoma 2
BCL-XL	: B hücreli lenfoma-ekstra büyük
BSA	: Sığır serum albümini
cDNA	: Komplementer DNA
CI	: Kombinasyon indeksi
CuD	: Kukurbitasin D
CuI	: Kukurbitasin I
CYP	: Sitokrom P450
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DRI	: Doz redüksiyon indeksi
ECM	: Ekstraselüler matriks
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
ERK	: Ekstraselüler sinyal regüle kinaz
Fa	: Etkilenen fraksiyon
FBS	: Fetal sığır serumu
HBV	: Hepatit B virüsü
HCC	: Hepatoselüler karsinoma
HCV	: Hepatit C virüsü
HGDN	: Yüksek dereceli displastik nodüller
HIF	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HSC	: Hepatik stellat hücreleri
IC₅₀	: %50 inhibitör konsantrasyonu
IL	: İnterlökin
JAK	: Janus kinaz
LGDN	: Düşük dereceli displastik nodüller
MAP	: Mitojen aktive protein

MAPK	: MAP kinaz
MEK	: Mitojen aktive protein
MMP	: Matriks metalloproteinaz
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
mTOR	: Rapamisin
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NAFLD	: Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı
NASH	: Alkolsüz steatohepatit
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NK	: Doğal öldürücü hücreler
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGF	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PDGFR	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü
PI3K	: Fosfoinositid-3 Kinaz
RAF	: Hızla düzenlenen fibrosarkom
RAS	: Rat sarkom virüsü
RIPA	: Radyoimmünopresipitasyon assay tamponu
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
STAT	: Sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatörleri
TBS	: Tris-tamponlu salin
TBST	: Tris-tamponlu salin, 0.1% Tween 20 deterjan
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamin
TGFβ	: Transforme edici büyüme faktörü beta
TNFα	: Tümör nekroz faktör alfa
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
VEGFR	: Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 1. 2018'de Görülen kanser vaka ve ölümlerin dünya alanına göre dağılımı	3
Şekil 2. Bölge ve cinsiyete göre karaciğer kanseri insidansı.....	5
Şekil 3. HCC'nin fibrozis ve inflamasyon bağımlı gelişimi	6
Şekil 4. Sirotik nodüllerin HCC'ye dönüşümü.....	7
Şekil 5. Hepatoselüler karsinoma sürecine etki eden faktörler ve genler.....	8
Şekil 6. ROS'un karaciğere özgü hücreler üzerindeki fibrojenik etkileri	11
Şekil 7. NOX izoformlarının miyofibroblast aktivasyonundaki rolü	12
Şekil 8. Hepatik anjiyogenez	15
Şekil 9. HCC'de yer alan ana sinyal yollarının şematik gösterimi.....	16
Şekil 10. RAS/MAPK sinyal yolunun şematik olarak gösterimi	19
Şekil 11. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun şematik olarak gösterimi.....	21
Şekil 12. Hepatoselüler karsinomada tedavi yöntemleri	23
Şekil 13. HCC'de sistemik tedavi stratejileri	25
Şekil 14. Sorafenibin tirozin kinaz reseptörleri inhibisyonu ile antitümöral etkisi	29
Şekil 15. Kukurbitasin B, D, E ve I'nın moleküler yapısı (18)	33
Şekil 16. Kukurbitasinlerin etki ettiği hücre içi moleküler mekanizmalar.....	34
Şekil 17. Saflaştırılan CuD ve CuI kromatogramlarının standartlarla karşılaştırılması	48
Şekil 18. CuD, CuI ve sorafenibin HepG2 hücre hattında inhibisyon etkileri	49
Şekil 19. CuD ve CuI'nin sorafenib ile kombine uygulamasına ait CI verilerinin grafiksel gösterimi	50
Şekil 20. CuD ve CuI'nin Sorafenib ile kombinatoryal etkisinin İzobologram grafiksel gösterimi	52
Şekil 21. CuD ve sorafenibin HepG2 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin Annexin V akış sitometrisi analizi ile değerlendirilmesi	56
Şekil 22. CuI ve sorafenibin HepG2 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin Annexin V akış sitometrisi analizi ile değerlendirilmesi	57
Şekil 23. HepG2 hücrelerine uygulanan CuD ve sorafenibin hücre döngüsü analizi	58
Şekil 24. HepG2 hücrelerine uygulanan CuI ve sorafenibin hücre döngüsü analizi.....	60
Şekil 25. CuD, CuI ve sorafenib uygulamasının 0, 24 ve 48 saat sonraki HepG2 hücre göçüne etkisi	61

Şekil 26. HepG2 hücrelerinde CuD, CuI ve sorafenibin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi	63
Şekil 27. HepG2 hücrelerine uygulanan kukurbitasin D, I ve sorafenibin EGFR, p-RGFR, VEGF protein düzeylerine etkisi	64
Şekil 28. HepG2 hücrelerine uygulanan kukurbitasin D, I ve sorafenibin Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR protein düzeylerine etkisi	66
Şekil 29. HepG2 hücrelerine uygulanan kukurbitasin D, I ve sorafenibin c-Raf, p-c-Raf, MEK 1/2, p-MEK 1/2, ERK 1/2, p-ERK 1/2 protein düzeylerine etkisi.....	68
Şekil 30. HepG2 hücrelerine uygulanan kukurbitasin D, I ve sorafenibin Bax, Bcl-XL, Kaspaz 9 ve MMP-2 protein düzeylerine etkisi	70
Şekil 31. CuD, CuI ve sorafenib uygulamasına ait total RNA elektroforegramı	71
Şekil 32. “Hydrolysis Probe” kullanılarak CuD, CuI ve sorafenib uygulamasına ait β -aktin, AKT ve Kaspaz 3 mRNA’larından sentezlenen cDNA’ların gerçek zamanlı PCR ile çoğaltım eğrisi	71
Şekil 33. Hydrolysis Probe” kullanılarak CuD, CuI ve sorafenib uygulamasına ait MAPK, β -aktin, ve mTOR mRNA’larından sentezlenen cDNA’ların gerçek zamanlı PCR ile çoğaltım eğrisi	72
Şekil 34. Hydrolysis Probe” kullanılarak CuD, CuI ve sorafenib uygulamasına ait β -aktin, Bcl-XL ve ERK mRNA’larından sentezlenen cDNA’ların gerçek zamanlı PCR ile çoğaltım eğrisi	72
Şekil 35. Hydrolysis Probe” kullanılarak CuD, CuI ve sorafenib uygulamasına ait STAT3, β -aktin, ve Bax mRNA’larından sentezlenen cDNA’ların gerçek zamanlı PCR ile çoğaltım eğrisi	73
Şekil 36. CuD, CuI ve sorafenib uygulamasına ait hücre örneklerinin HepG2 hücrelerinde ERK, MAPK, STAT3, AKT, mTOR, Kaspas 3, Bax, BCL-XL ve β -aktin cDNA’larının qRT-PCR çoğaltımının elektroforegram görüntüsü.(DNA Marker Bioron, 50 bp).....	73
Şekil 37. CuD, CuI ve sorafenibin farklı dozlarında hesaplanan mRNA düzeyleri	74
Şekil 38. CuD, CuI ve sorafenibin farklı dozlarında hesaplanan mRNA düzeyleri	75

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 1. HCC’de en sık görülen mutasyon, delesyon ve amplifikasyonlar.....	9
Tablo 2. HCC’de moleküler hedefli tedavinin klinik denemeleri.....	26
Tablo 3. Doğal bileşiklerin antikanser aktiviteleriyle birlikte kapsamlı listesi.....	32
Tablo 4. Kukurbitasinler ve küçük moleküllü ilaçların kanser hücre hatlarında sinerjistik etkisi.....	35
Tablo 5. Gen Primerlerinin Dizilimleri.....	43
Tablo 6. Stoklama ve ayırma jelinin bileşenleri ve oranları	44
Tablo 7. Çalışmada kullanılan primer antikorlara ait bilgiler	46
Tablo 8. CuD ve CuI’nın sorafenib ile kombine uygulamasına ait CI verileri	51
Tablo 9. Gerçek deneysel noktalar için hesaplanan CI değerleri.....	51
Tablo 10. CuD ve sorafenibin kombine uygulamasına ait DRI verileri	53
Tablo 11. CuI ve sorafenibin kombine uygulamasına ait DRI verileri.....	54

1. GİRİŞ

Global kanser istatistiklerine göre tüm dünyada karaciğer kanseri, görülme sıklığı açısından erkeklerde 5. kadınlarda ise 9. sıralarda yer almaktadır. Erkeklerde karaciğer kanserinin hem insidansı hem de mortalitesi kadınlara göre daha yüksektir (1).

Hepatosellüler karsinoma (HCC) genellikle kronik karaciğer hastalıklarının uzun süre maruziyetiyle oluşan karaciğerin primer tümörüdür. HCC için temel risk faktörleri Hepatit B (HBV) ve Hepatit C (HCV) virüs enfeksiyonları, yoğun alkol alımı, aflatoksinli gıdaların aşırı tüketilmesi ve diyabettir (2). HCC ile ilgili yapılan çalışmalarda onkogenlerin anormal aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, epigenetik olayların anormal regülasyonu ve PI3K/AKT/mTOR, RAF/MEK/ERK, MAPK, JAK/STAT, NF- κ B, Wnt/ β -catenin gibi çoklu sinyal yollarının anormal aktivasyonu belirtilmiştir (3, 4). Proliferasyon ve tümörogenizde önemli mekanizmalardan biri olan PI3K/AKT/mTOR yolu HCC'nin patogeneğinde yer almaktadır (5). Günümüzde, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunu hedef alan çoklu ajanların karaciğer kanserindeki etkinliğini araştıran birçok araştırma mevcuttur (6-8). Bu bağlamda, mTOR inhibitörlerinin HCC hücrelerinde proliferatif aktiviteyi önemli derecede azaltıp apoptotik etkiyi arttırarak tümör gelişimini engellediği belirtilmiştir (9-11). Ayrıca çok sayıda büyüme faktörüne yanıt olarak aktive olan RAF/MEK/ERK sinyal transdüksiyon yolunun HCC'de aşırı eksprese olduğu ifade edilmiştir (12). Bu sinyal yolunu hedef alan bazı etken maddelerin faz çalışmaları devam etmekle birlikte bazılarının RAF/MEK/ERK sinyal yolunu inhibe ederek sinyal transdüksiyonları bloke ettiği ifade edilmiştir (10, 13).

Ticari ismi Nexavar olan Sorafenib, hepatosellüler karsinomada kullanılan FDA onaylı tek sistemik ilaçtır (14). Sorafenib; proliferasyon, anjiyogenez ve apoptozu düzenleyen vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR), platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) ve c-Kit gibi tirozin kinazları ve reseptör olmayan tirozin kinazları inhibe eder (15). Bu tirozin kinaz reseptörlerinin inhibisyonu ise Ras proteininin aktivasyonuna, RAF/MEK/ERK ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yollarının inhibisyonuna neden olarak antitümöral etkiye aracılık eder (16). Sorafenibin antitümöral özelliğine rağmen HCC hücrelerinde direnç oluşması sorafenibin karaciğer kanserinde kullanımını kısıtlamaktadır. Sorafenibin etki gücünü arttırmak, ilaç direncinin oluşmasını

engellemek ve yan etkilerini azaltmak için kombine ve tekli ilaç tedavilerinin geliştirilmesi hedeflenmektedir.

Doğada bulunan bitkiler veya bitkilerden izole edilen maddeler, koruyucu ve tedavi edici amaçla çeşitli hastalıklarda kullanılmaktadır. Doğal bir tetrasiklik triterpenoid olan kukurbitasinler Çin ve Hindistan gibi Asya ülkelerinde yüzyıllardır geleneksel tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır (17, 18). Özellikle kukurbitasin B, D, E ve I alt türlerinin antiproliferatif (19), antitümör (20, 21), antioksidan (22, 23), antiinflamatuvar (24) ve antidiyabetik (25) etkileri *in vitro* ve *in vivo* olarak incelenmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda kukurbitasinlerin *in vivo* tümör ksenograft modellerinde tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir (26).

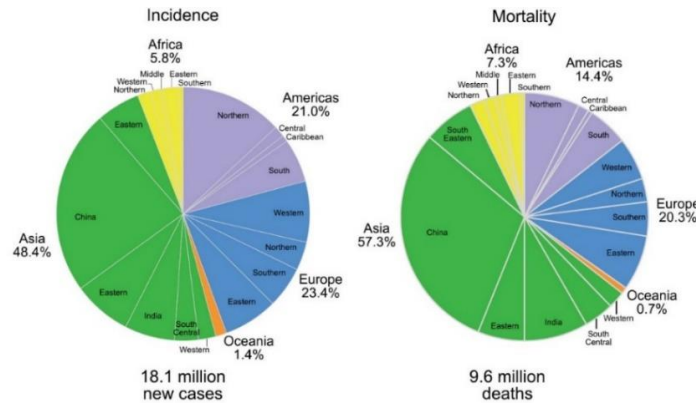
Daha önce kukurbitasinlerle yapılan çalışmalar, bu bileşiklerin geniş spektrumlu malign tümör hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini ortaya çıkarmakla beraber kukurbitasinlerin hepatoselüler karsinoma hücre hattı üzerine antikanser özelliği, moleküler mekanizması ve sinyal yolları aracılı apoptotik etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle çalışmamızda CuD ve CuI'nın tek başına ve sorafenib ile kombine uygulanmasının HepG2 hücre hattı üzerindeki anti tümöral ve apoptotik etki mekanizmalarının ortaya konulması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) küresel düzeyde kanser insidansı ve ölüm oranlarını, cinsiyete göre değişkenlik gösteren kanser türlerini, kanser türlerinin kıtasal dağılımlarını ve risk faktörlerini ifade etmek amacıyla 2002, 2008, 2012 ve 2018 yıllarında küresel kanser istatistiklerini (GLOBOCAN) yayınlamıştır (27-30). GLOBOCAN verilerine göre; 2002 yılında 10.9 milyon yeni kanser vakası, 6.7 milyon ölüm gerçekleşmişken (27), 2008 yılında 12.7 milyon yeni kanser vakası, 7.6 milyon ölüm gerçekleşmiş (28), 2012 yılında 14.1 milyon yeni kanser vakası, 8.2 milyon ölüm gerçekleşmiş (29) ve 2018 yılında 18.1 milyon yeni kanser vakası, 9.6 milyon ölüm gerçekleşmiştir (30). Kanser vakaları ve kanserden kaynaklı ölüm oranlarının yıllara göre artış göstermesi; dünya nüfusunun yaşlanmasıyla, ülkelerin sosyoekonomik durumuyla, gıdalarla vücuda alınan toksikantların artmasıyla, virüslerle, sigara ve alkol kullanımıyla ilişkilendirilmektedir (31, 32).

Dünya nüfusunun yaklaşık %60'ı Asya'da, % 15'i Afrika'da, % 10'u Avrupa'da, % 8'i Amerika'da olduğu göz önünde bulundurulduğunda küresel nüfusla doğru orantılı olarak kanserden ölümlerin % 57.3'ünün Asya kıtasında olduğu görülmektedir (32). Avrupa, nüfus yoğunluğu açısından dünyada 3. sırada yer almasına rağmen toplam kanser ölümlerinin % 20.3'ünü oluşturarak mortalite açısından dünyada 2. sırada yer almaktadır (30). Avrupalı, % 14.4 mortalite oranı ile Amerika takip etmektedir (Şekil 1).



Şekil 1. 2018'de Görülen kanser vaka ve ölümlerin dünya alanına göre dağılımı

Kaynak: Bray ve ark. (30)

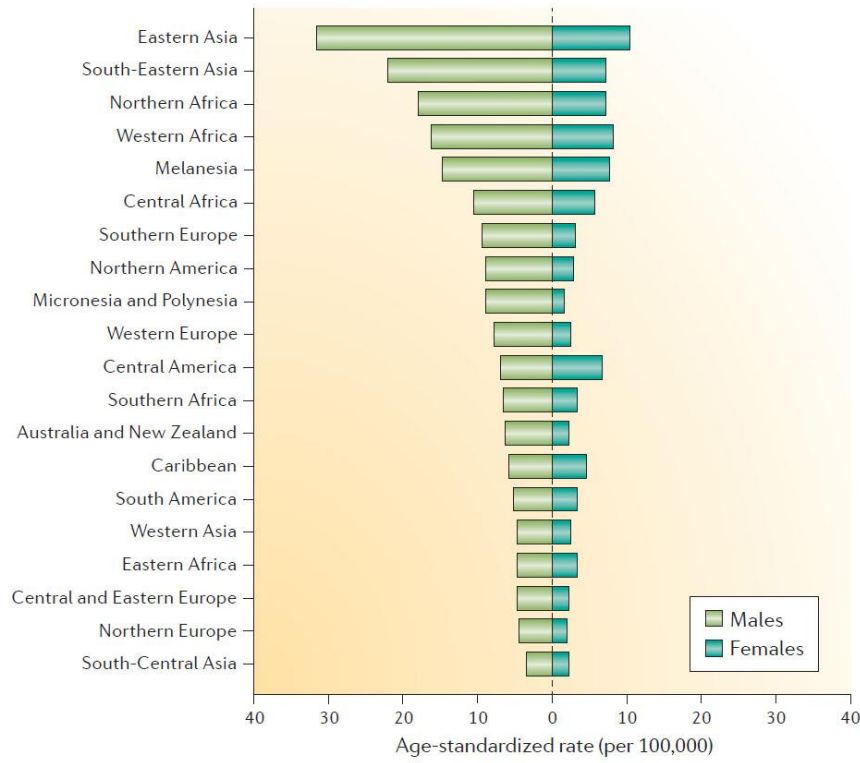
2.2. Karaciğer Kanseri

HCC genellikle kronik karaciğer hastalıklarının uzun süre maruziyetiyle oluşan karaciğerin primer tümörüdür. Diğer kanser türlerinin aksine, HCC için risk faktörleri iyi bilinmektedir. Kronik karaciğer hastalığına bağlı ilerlemiş karaciğer fibrozu veya sirozu, uzun süreli HBV veya HCV enfeksiyonu ve alkol kullanımı karaciğerde hasara neden olan yaygın sebeplerdir. Ayrıca HCC, erkeklerde kadınlara göre üç kat daha yaygın olan güçlü bir cinsiyet eğilimine sahiptir.

2.3. Karaciğer Kanserinin Epidemiyolojisi

HCC'nin dünya çapındaki insidansı, kronik viral hepatit ile paralellik göstermektedir. Hepatit B virüsü (HBV), DNA'ya bir veya daha fazla baz çiftinin eklenmesine (insersiyonel mutajenez) neden olabilen bir DNA virüsüdür. Kronik HBV enfeksiyonuna bağlı olarak oluşan siroz zemininde HCC ortaya çıkmaktadır (33). Ayrıca, bir RNA virüsünün neden olduğu kronik hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonu olan hastalarda, ilerlemiş hepatik fibroz veya siroz varlığında da HCC ortaya çıkmaktadır (34). HCC'nin ortaya çıkmasının diğer sebepleri ise; diyabet ve obeziteye bağlı metabolik sendrom, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) ve alkolsüz steatohepatittir (NASH). NAFLD veya NASH, ilerlemiş hepatik fibroz veya siroz ile birlikte görüldüğü gibi, kronik HBV enfeksiyonu ile de ortaya çıkabilmektedir (35).

HCC'nin en yüksek insidans oranları, HBV enfeksiyonunun yüksek prevalansı nedeniyle Asya ve Sahra Altı Afrika'da görülmektedir (**Şekil 2.**) Afrika'da aflatoksin içeren gıdaların tüketimi, HBV enfeksiyonunun artışıyla ve HCC ile ilişkilendirilmektedir. Aflatoksinli gıdalara ve viral etkileşimlere maruziyetin başlangıç yaşının düşük olması, dünyanın geri kalanına kıyasla Afrika kıtasında HCC'nin daha erken başlamasının muhtemel bir açıklamasıdır (2). Kuzey Amerika, Avrupa ve Japonya'da ise HCV, HCC'nin önde gelen nedenidir. HCC ile ilişkili diğer siroz nedenleri arasında sağlıksız alkol kullanımı, NASH, α 1-antitripsin eksikliği ve hemokromatozis yer alır (36).



Şekil 2. Bölge ve cinsiyete göre karaciğer kanseri insidansı

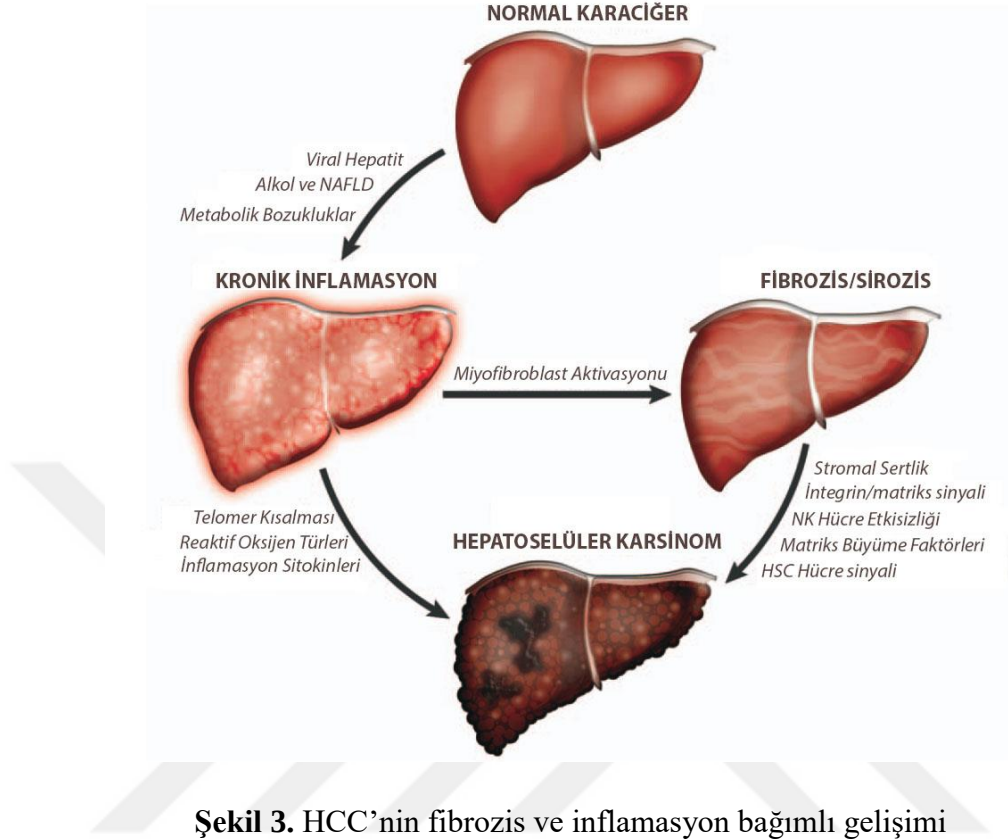
Kaynak: Llovet ve ark. (2)

HCC'nin diğer kanser türlerine göre öne çıkan özelliklerinden bir tanesi de; önlenmesi mümkün olan kanserlerden biri olmasıdır. Yüksek HBV prevalansı olan popülasyonlarda, HBV aşısının HCC insidansını azalttığı görülmektedir (37, 38). HBV için antiviral tedavi, HCC riskini azaltmakla birlikte tamamen ortadan kaldırmamaktadır. Benzer şekilde, interferon ile antiviral tedavi, kronik karaciğer hastalığı ile ilişkili HCV enfeksiyonu olan hastalarda HCC riskini azaltmaktadır (39, 40). Gelecekte karaciğere yönelik güçlü antifibrotik tedavilerin, HCC oluşum riskini azaltabileceği öngörülmektedir.

2.4. Karaciğer Kanserin Patofizyolojisi

HCC; viral hepatit, NAFLD, NASH ve aşırı alkol alımı ile ilişkilendirilen, sirotik ve fibrotik karaciğer zemininde meydana gelen çok aşamalı bir süreçtir (41, 42). Bu durum, kronik iltihabdan kaynaklı immün mikroçevrenin HCC'nin patogeneğinde önemli bir rolünün olduğunu göstermektedir (43). Karaciğerde kronik inflamasyon, fibrosiz ve siroza neden olan bir dizi mekanizmayı aktive eder. Kronik enfeksiyonlar; telomer aktivitesinin bozulmasına, inflamasyonla ilişkili sitokinlerin salınmasına, reaktif oksijen türlerini serbest bırakılmasına ve hücrel mikroçevrede parakrin sinyalleşmesini

değiştirerek hepatik stellat hücrelerin (HSC) miyofibroblastlara aktivasyonuna yol açarak fibroz ve sirozu tetikler (Şekil 3) (44).



Şekil 3. HCC'nin fibrozis ve inflamasyon bağımlı gelişimi

Kaynak: Zhang ve ark. (44)

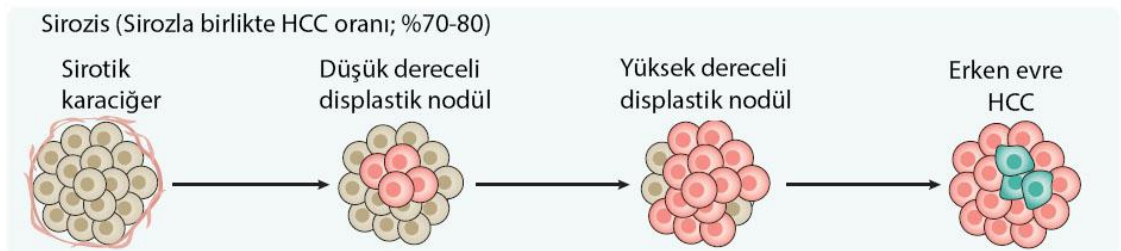
Hepatik stellat hücreler (HSC); A vitamini ve retinoid depolayan, karaciğer rejenerasyonunu sağlayan, immünmodülasyonda ve hepatik homeostazda görev alan karaciğer sinüzoidlerinde yer alan hücrelerdir (43). HSC'ler, kronik karaciğer hasarını takiben ekstraselüler matriks (ECM) oluşumundan sorumlu ana hücrelerdir. HSC'ler karaciğerde inflamasyon durumunda A vitamini depolarını kaybeder ve miyofibroblastlara dönüşerek alfa-düz kas aktinini (α -SMA) eksprese etmeye, kollajen 1 ve 3 sentezi yapmaya başlar. Böylelikle doku onarımı bölgesinde göç ederek büyük miktarda ECM üretimini sağlar (45, 46). ECM üretimi, aşırı bağ dokusu birikimine ve normalde 1:1 oranında olan kollajen tip I/tip III oranının, sirozlu karaciğer dokusunda 4:1'e yükselmesine neden olur (47). İndirgenemeyen çapraz bağlı kollajenin varlığı, ortamın erişilebilirliğini azaltarak protezlara karşı dirençli hale gelmesine, doğal öldürücü hücrelerin (NK) fonksiyonunun inhibisyonuna neden olur. Bunun sonucu olarak NK hücreleri, hasarlı hücreyle temas edemez ve stromada işlevsiz halde kalır (48).

ECM'nin fibrotik karaciğerde birikmesi sadece karaciğerin fizyolojik özelliklerini değiştirmekle kalmaz, aynı zamanda metabolik özelliklerini de etkiler. Fibröz ve ECM sertliğinin artması, hücre membranındaki integrinler (49) ve büyüme faktörü gibi reseptörleri etkileyerek proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına (50), VEGF ve anjiyopoietin-1 gibi anjiyojenik faktörlerin uyarılmasına (51, 52), CXC kemokinlerin salgılanmasına (53) neden olur. Artan ECM sonucu hepatositlerdeki immünmikroçevre baskılanır, anjiyojenik ve büyüme faktörlerinin etkilediği sinyal kaskadları aktive olur (54). Bu durum, kanser öncesi hasarlı hücrelerin büyümesi ve sağ kalımını artırır ve hücrelerin malign dönüşümüne zemin hazırlar.

2.5. Karaciğer Kanserin Moleküler Mekanizması

Karaciğer kanseri morfolojik olarak, önce hücre dışı matrisin (ECM) birikmesi ve fibröz skar oluşumu, ardından, siroz oluşumu, karaciğere kan akışının azalması ve rejenere hepatosit nodüllerinin varlığını seyreden bir tabloda ilerler (55).

Sirotik karaciğerde, fibrozis ile çevrili, büyüklükleri birbirinden farklı çok sayıda rejeneratif nodül vardır. Bu displastik nodüllerin birbirinden ayırt edilebilmeleri için, sitolojik ve yapısal varlığına göre sınıflandırma yapılmıştır (56). Bunlar; düşük dereceli displastik nodülleri (LGDN) ve yüksek dereceli displastik nodülleridir (HGDN). Prekanseroz sirotik nodülünün ardışık gelişimi ile başlayan bir dizi olay sonucunda LGDN'ler oluşur. LGDN'lerin direk maligniteye dönüşme potansiyeli düşüktür ancak HGDN'lere dönüşme potansiyelleri yüksektir. LGDN'ler HGDN'lere dönüştükten sonra HGDN'ler erken evre HCC'ye (evre 0 ve A) ve daha sonra da gelişmiş HCC'ye (evre B ve C) ilerleyebilir (**Şekil 5**) (57).



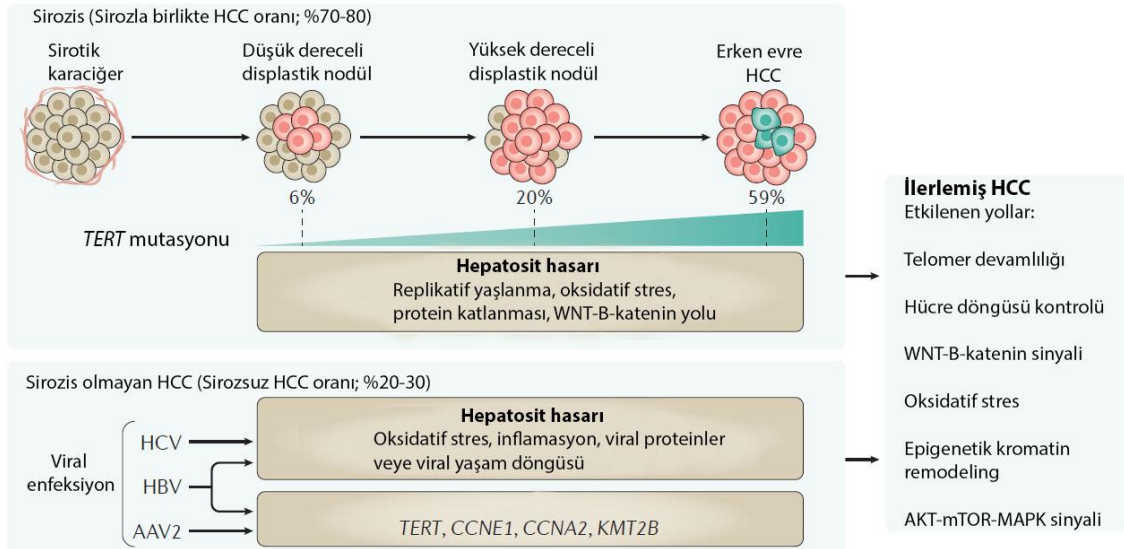
Şekil 4. Sirotik nodüllerin HCC'ye dönüşümü

Kaynak: Llovet ve ark. (2)

Diğer epitelyal katı tümörlere benzer şekilde, HCC'nin oluşumunda da genlerde somatik genomik değişikliklerin birikimi gerçekleşir. Kanser oluşturma potansiyeli olan bir hücre, çoğalma, hayatta kalma, koloni kurma ve bağışıklıktan kaçınma dâhil olmak

üzere çeşitli işlevleri teşvik ederek, kanserin başlangıç, ilerleme, metastaz ve tedaviye direnç aşamalarında tümör gelişimine neden olan bir indükleyici haline gelir. Bu şekilde tümör gelişimine katkıda bulunan bir hücre, otonom ve otonom olmayan değişiklikler geçirmektedir (58). Her HCC nodülünün kodlama bölgesinde ortalama 40 fonksiyonel somatik değişiklik biriktiği bilinmektedir. Bundan dolayı her tümör, epigenetik modifikasyonlarla karıştırılmış benzersiz bir genetik değişiklik kombinasyonunun sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (59, 60). Bu genel gözlem, hepatokarsinogenezin karmaşıklığının ve HCC'nin devasa çeşitliliğinin altını çizmektedir (**Şekil 5**). Bununla birlikte, genomik değişiklikler rastgele birikmemektedir, bu da onkogenezi desteklemek için birkaç yolun işbirliği yapabileceğini ve bu yollardan bazılarının belirli risk faktörleriyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (59).

Siroz bağlamında meydana gelen karsinogenezin erken aşamalarında kanser öncesi nodüllerin (LGDN'ler ve HGDN'ler) erken evre HCC'ye dönüşümü sürecinde hücrelerde moleküler değişiklikler meydana gelmektedir (61). Bu değişiklikler temelde; Telomer ters transkriptaz (TERT) promotör mutasyonlarını, WNT- β -katenin yolunun aktivasyonunu, fetal genlerin yeniden ekspresyonunu, protein katlama mekanizmasının deregülasyonunu ve oksidatif stres yanıt değişkenliğini ifade etmektedir (**Şekil 5**) (2, 62).



Şekil 5. Hepatoselüler karsinoma sürecine etki eden faktörler ve genler

Kaynak: Llovet ve ark. (2)

2.5.1. Genetik Mutasyonlar

HCV ve HBV enfeksiyonları hem kronik inflamasyonun indüklenmesine, hem de viral proteinlerin ekspresyonu ve viral yaşam döngüsü yoluyla malign dönüşümde yer alan moleküler değişikliklere neden olmaktadır (63). Karaciğer karsinogenezinin erken döneminde en sık gözlemlenen majör tekrarlayan mutasyon; telomer ters transkriptaz (TERT) mutasyonudur (**Tablo 1**). TERT mutasyonu sirotik bir karaciğerde gelişen HCC'nin çoğunda tanımlanan erken dönemde görülen moleküler bir değişikliktir (64).

Tablo 1. HCC'de en sık görülen mutasyon, delesyon ve amplifikasyonlar
Kaynak: Llovet ve ark. (2)

Yolaklar	Genler	Değişim	HCC'de Görülme Sıklığı
Telomer Devamlılığı	TERT	Mutasyon	54–60%
		Amplifikasyon	5–6%
Hücre Döngüsü Kontrolü	TP53	Mutasyon ve Delesyon	12–48%
	RB1	Mutasyon ve Delesyon	3–8%
	CCND1	Amplifikasyon	7%
	CDKN2A	Mutasyon ve Delesyon	2–12%
WNT-B Katenin Yolu	CTNNB1	Mutasyon	11–37%
	AXIN1	Mutasyon ve Delesyon	5–15%
Oksidatif Stres	NFE2L2	Mutasyon	3–6%
	KEAP1	Mutasyon	2–8%
Epigenetik ve Kromatin Yeniden Düzenlenme	ARID1A	Mutasyon ve Delesyon	4–7%
	ARID2	Mutasyon	3–18%
	KMT2A (MLL1), KMT2B (MLL4), KMT2C (MLL3) KMT2D (MLL2)	Mutasyon	2–6%
AKT-mTOR-MAPK Sinyal Yolu	RPS6KA3	Mutasyon	2–9%
	TSC1 TSC2	Mutasyon ve Delesyon	3–8%
	PTEN	Mutasyon ve Delesyon	1–3%
	FGF3, FGF4 FGF19	Amplifikasyon	4–6%
	PI3KCA	Mutasyon	0–2%
Anjiyogenez	VEGFA	Amplifikasyon	3–7%

TERT aktivitesi somatik hücrelerinde azdır. Normal bir hücrenin her bölünüşünde, telomer boyu yaklaşık 100 baz çifti kadar kısalır. Telomer kısalığına bağlı olarak hücre bölünmesi zamanla azalır ve hücre yaşlanması gerçekleşir. Ancak, kanser hücrelerinde

TERT aktivitesi korunmuştur ve bu yüzden hücreler ölümsüzlük kazanarak sürekli bölünmeye devam eder (65).

İnsanlarda, normal hepatositlerde TERT geni ifade edilmez, ancak LGDN'lerde ve özellikle HGDN'lerde hepatokarsinogenezin erken döneminde tekrarlı ifadenmesi söz konusudur (66). Sirotik hepatositler replikatif yaşlanmayı atlayarak dönüşümün erken aşamasında TERT promotör aktivasyonunu gerçekleştirir. Bu lezyonlarda telomerazın tekrarlı ekspresyonu, TERT promotöründe nokta mutasyonların ortaya çıkmasına neden olur. Bu değişiklikler, LGDN'lerde %6, HGDN'lerde %20, HCC'de %60 oranında görülen en sık tekrarlayan somatik mutasyonlardır (67, 68) (**Şekil 5**). Çeşitli araştırmalar, telomer aktivasyonunun ve kromozomların sonunda tekrarlanan TTAGGG nükleotid dizisini kontrol eden telomeraz kompleksinin sirozda HCC'nin başlatılmasında ve desteklenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir (69). Ayrıca telomeraz ters transkriptazını kodlayan genlerdeki yapıcı inaktive edici mutasyonlar, insanlarda artan siroz riski ile ilişkilendirilmiştir (70).

Sirozlu HCC vakalarında en çok görülen gen mutasyonu TERT promotör mutasyonları olmakla birlikte, sirozun gerçekleşmediği ama adeno ilişkili virüs tip 2 (AAV2) enfeksiyonunun olduğu HCC vakalarında TERT, CCNE1, CCNA2, KMT2B mutasyonlarının olduğu gözlemlenmiştir (**Tablo 1**) (71). AAV2, insan DNA'sına yerleşen tek bir DNA virüsüdür. Daha önce, popülasyonun yarısından fazlasında gözlenen patojenik olmayan bir enfeksiyon olarak kabul edilmekteydi. Ancak yakın dönemde, AAV2'nin tekrarlayan viral eklemeleri nedeniyle normal karaciğerde gelişen ve diğer klasik HCC risk faktörleri olmaksızın gerçekleşen HCC vakaları tanımlandı (71). Viral eklemeler, normal hepatositlerin genomuna rastgele yerleşmiş olarak bulunurken, kanserli hücrelerde, eklemeler normal olarak TERT, siklin A2 (CCNA2), siklin E1 CCNE1, tümör nekroz faktör süper ailesi üyesi 10 (TNFSF10) ve lizin (K)-spesifik metiltransferaz 2B (KMT2B) gibi tipik onkogenler içinde meydana gelir (71, 72).

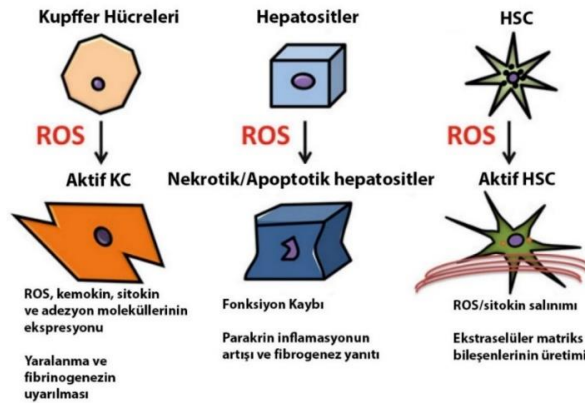
Karaciğer kanserlerinin yaklaşık %12-48'i TP53 mutasyonlarını barındırır (**Tablo 1**) (60, 73). TP53 geni, tümörlerde bir tümör baskılayıcı görevi görür. VEGF-A'nın ekspresyonu dâhil olmak üzere birçok biyolojik süreci düzenler ve fizyolojik olaylara ve hücre tipine bağlı olarak hücre döngüsünün durmasına ve apoptoza neden olur (74, 75). p53 yolundaki genomik bozukluklar, çeşitli kanserlerde en sık görülen anormalliklerdir

ve sıklıkla yüksek dereceli histoloji ile ilişkilidir. Ayrıca HCC'de görülen TP53 mutasyonları daha kötü klinik evre ve prognoz ile ilişkilendirilmiştir (73).

2.5.2. Oksidatif Stres

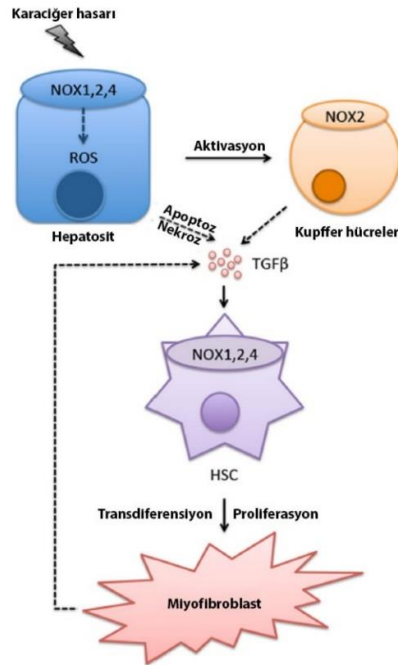
HCC'de Oksidatif stres yolu, HCC vakalarının %5-15'inde nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (NFE2L2) ve Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1'i (KEAP1) ile ilgili mutasyonlar nedeniyle yapısal olarak aktive olmaktadır (**Şekil 6**) (76). Bu mutasyonlara sebep olan oksidatif stres ile ilişkili moleküler değişiklikler, TGF β , NOX ifadenmesinin artmasıyla ve fibrotik karaciğerde demir yüklenmesiyle ilişkilendirilmektedir (77) .

ROS, karaciğere özgü olan Kupffer hücreleri (KC) ve hepatik stellat hücrelerin işlevselliğini etkiler ve bu nedenle fibroz gelişimine katkıda bulunur. Fibrojeniz sırasında hepatositlerde aktive olmuş KC ve HSC'ler bulunur ve hasarlı hepatositlerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi söz konusudur (78). Hepatositler, karaciğerdeki sistemik metabolik talebi, elektrolit homeostazını ve detoksifikasyon süreçlerini kontrol eden merkezi düzenleyicilerdir. Bu parankimal hücrelerde ROS üreten organeller ve enzimler bol miktarda bulunur (79). Hepatositlerin ölümünü takiben, komşu hepatositlerde, KC ve HSC'de inflamatuvar ve fibrotik yanıtı yükseltmek için tümör nekroz faktör alfa (TNF α), interlökin 17 (IL-17), interlökin 22 (IL-22) ve transforme edici büyüme faktörü beta (TGF β) gibi çeşitli araçlar salınır. TGF β bir yandan çeşitli antioksidan enzimlerin ekspresyonunu inhibe ederken, diğer yandan dokuda ROS üretimini ve büyüme faktörlerinin salınımını artırır. Bunun sonucunda TGF β , çeşitli mekanizmalar yoluyla HSC'lerin miyofibroblastlara ve karaciğer fibrozisine aktivasyonunu destekleyerek karsinogeneze zemin hazırlar (80).



Şekil 6. ROS'un karaciğere özgü hücreler üzerindeki fibrojenik etkileri
Kaynak: Luangmonkong ve ark. (78)

Çeşitli hücrel olayların gerçekleştirilmesi sırasında hem organellerde hem de sitoplazmada ROS üretimi gerçekleşir. Mitokondride elektron transport zincirinde, peroksizomda yağların beta oksidasyonunda ve endoplazmik retikulumda disülfid bağı oluşumu esnasında ROS oluşumu gerçekleşirken, sitozol ve plazma zarında da ROS üretimi söz konusudur (78). Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz (NOX), sitokrom P450 (CYP) 2E1, ksantin oksidaz, lipoksijenazlar ve siklooksijenazlar gibi enzimler, yaralanmaya neden olan H_2O_2 üretir (81). Hem fagositik NOX (NOX2) hem de fagositik olmayan NOX (NOX1 ve NOX4) izoformları hepatik stellat hücrelerde ifade edildiğinden hepatik stellat hücrelerin aşırı ROS oluşumundan sorumlu olabileceği öne sürülmüştür (82). Hepatositler, Kupffer hücreleri ve HSC'ler arasındaki etkileşimler miyofibroblast aktivasyonunu teşvik eder. Karaciğerde farklı hücre tiplerinde eksprese edilen çeşitli NOX izoformları bu süreçte çok önemli rol oynar. Viral enfeksiyonlar, aşırı alkol kullanımı, aşırı beslenme ve kolestaz gibi hepatik hasara neden olan faktörlere maruz kaldıktan sonra, hepatositlerde NOX'lar yoluyla ROS üretilir. Artan oksidatif stres aynı zamanda hepatosit apoptozu/nekrozu indükleyerek Kupffer hücrelerini aktive eder. Yaralı hepatositler ve aktive edilmiş Kupffer hücreleri, HSC'lerin miyofibroblastlara farklılaşmasını destekleyen proinflamatuvar ve profibrojenik sitokin $TGF\beta$ salgılar (Şekil 7) (82-84).



Şekil 7. NOX izoformlarının miyofibroblast aktivasyonundaki rolü

Plazma membranına lokalize olan NOX'in çeşitli izoformları tarafından üretilen ROS'un karaciğer için zararlı olduğu başka çalışmalarla da gösterilmiştir. NOX'un oksidatif stresi indükleyerek, fibrojenezi arttırarak ve fibroz ile ilgili yolların uyarılmasına aracılık ederek miyofibroblastların aktivasyonuna ve fibrotik karaciğer oluşumuna katkıda bulunduğu ifade edilmektedir (82, 85). Ayrıca, makrofajlarda NOX1 ekspresyonunun, inflamatuvar sitokinlerin üretimini indükleyerek hepatik tümör oluşumunu teşvik ettiği de bildirilmiştir (86).

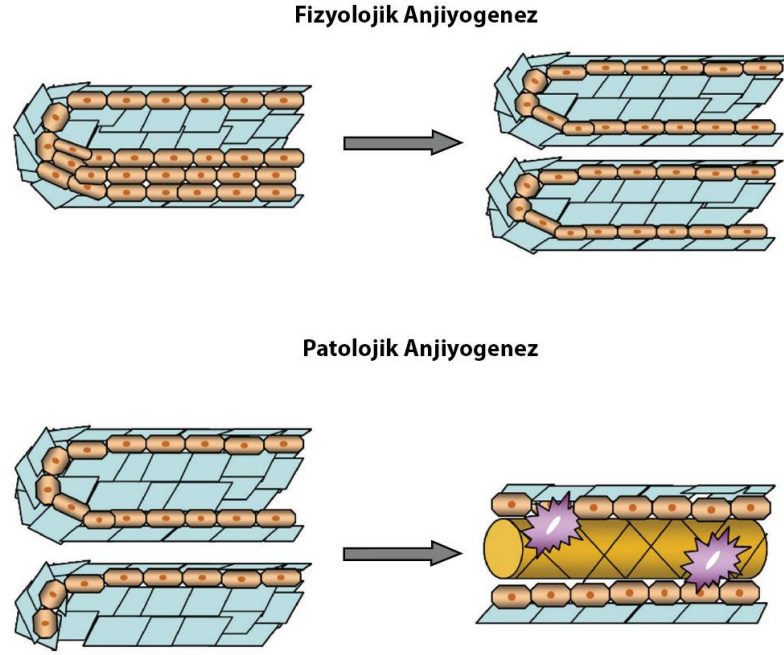
Hepatositlerdeki ROS artışı fenton reaksiyonlarıyla da ilişkilendirilmiştir. Demir, DNA sentezi ve elektron taşıma zinciri dâhil olmak üzere çeşitli enzimatik reaksiyonlar gibi çeşitli süreçlerde kritik bir rol oynadığı için tüm canlı organizmalar için gereklidir (87). Demir eksikliği bir yandan anemiye neden olurken, aşırı demir, ROS ve hidroksil serbest radikalleri üreten fenton reaksiyonunu körükleyerek ciddi oksidatif strese ve hücrel hasara yol açmaktadır. İnsan vücudunda demir öncelikle hemoglobine bağlı olarak bulunur ve karaciğerde aşırı demir yüklenmesinin toksik etkilerine yatkın olan hepatositler veya Kupffer hücreleri tarafından depolanır. Kalıtsal hemokromatozda demirin hepatositler üzerindeki toksik etkisi sonucunda siroz ve HCC'ye yol açabileceği bildirilmiştir(88).

Aşırı demir yüklenmesi bir risk faktörüdür ve tip 2 diyabet, NAFLD, NASH ve fibrozisin gelişiminde ve ilerlemesinde nedensel bir rol oynayabilir (89). Hepatositler tarafından üretilen 25 amino asitlik bir polipeptit hormon olan hepsidin, demir homeostazının merkezi düzenleyicisidir. Hepsidinler ayrıca anti-mikrobiyal özelliklere sahiptir (90). Hepsidin'in hepatositler ve Kupffer hücreleri gibi demir depolayan hücreler tarafından salınıp makrofajlar üzerindeki ferroportine bağlanması, yaşlı eritrositlerden demir eldesini sağlar. Bu durum elde edilen demirin depolanmasına, ferroportin üretiminin baskılanmasına ve depolanan demirin dolaşıma salınmasını önler. Benzer şekilde, bağırsak epitel hücrelerinde hepsidin tarafından ferroportin yıkımı, dolaşıma demir transferinin azalmasına neden olur (91). Bu etkiler birlikte ele alındığında, aşırı demir yüklenmesinin hepatositlerde ve Kupffer hücrelerinde oksidatif stresi indükleyerek HSC aktivasyonunu ve fibrozu indükleyebileceği, böylece inflamasyon ve fibrozise neden olabileceği ortaya çıkmaktadır (77).

2.5.3. Anjiyogenez

Anjiyogenez, önceden varolan damarlar sisteminden yeni kan damarlarının oluşumunu sağlayan vücudun tüm organlarında gelişebilen bir süreçtir (92). Esas olarak hipoksi tarafından uyarılır ve büyüme faktörleri tarafından yönlendirilir. Anjiyogenez ya fizyolojik koşullarda ya da kronik karaciğer hastalığı da dâhil olmak üzere birçok farklı patofizyolojik senaryoda ortaya çıkar (93-95). Kronik karaciğer hasarı boyunca, karaciğer vasküler yapısındaki fonksiyonel değişikliklerden iki farklı yol sorumludur. Bunlardan birincisi; anjiyogenezi destekleyen hipoksiye neden olan inflamasyon ve fibrozisdir. İkincisi, kronik karaciğer hastalığına özgü olan yara iyileşme sürecidir. Bu süreç sonucunda da proanjiyogenik sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salınımı teşvik edilir (96, 97).

Karaciğerin fizyolojisi ile ilişkili olarak fizyolojik hepatik anjiyogenez veya patolojik anjiyogenez olmak üzere iki tür anjiyogenez gelişebilir. Karaciğer rejenerasyonu sırasında gelişen fizyolojik hepatik anjiyogenez, yeni fonksiyonel sinüzoidlerin oluşumunu sağlarken; kronik karaciğer hastalığında ortaya çıkan patolojik anjiyogenez, kapillerize vasküler yapıların oluşumunu gerçekleştirir (**Şekil 8**) (98). Kronik inflamasyon sonucu fizyolojik sinüzoidal kollajenden (tip IV) ziyade fibriler kollajenin (tip I) birikmesiyle değişen fazla hücre dışı matrisin birikmesi gerçekleşir. Daha sonra, hepatik sinüzoidal endotel hücrelerinin karakteristik pencereleri bloke olur ve oksijen ile teması azalır. Fibröz dokunun birikmesi kan akışına direnci artırır ve sonuç olarak parankime oksijen iletimini bozar, ortaya çıkan doku hipoksisi doku hasarını şiddetlendirir. Hipoksik ortam karaciğerde HSC'leri aktive eder ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve anjiyopoietin1 üretimini ve reseptörlerinin (VEGFR ve Tie2) ekspresyonunu artırarak anjiyogenezi destekler (52, 99). Ayrıca, hipoksik ortam dokuda birçok sitokin, kemokin, büyüme faktörü ve metalloproteinazların (MMP'ler) ekspresyonunda bir dengesizliğe yol açar. Bu durumda fizyolojik anjiyogenez yollarındaki kontrol ortadan kalkar ve dolayısıyla yapısal ve fonksiyonel hepatik düzensizlikle birlikte patolojik anjiyogenez ortaya çıkar (98, 100).



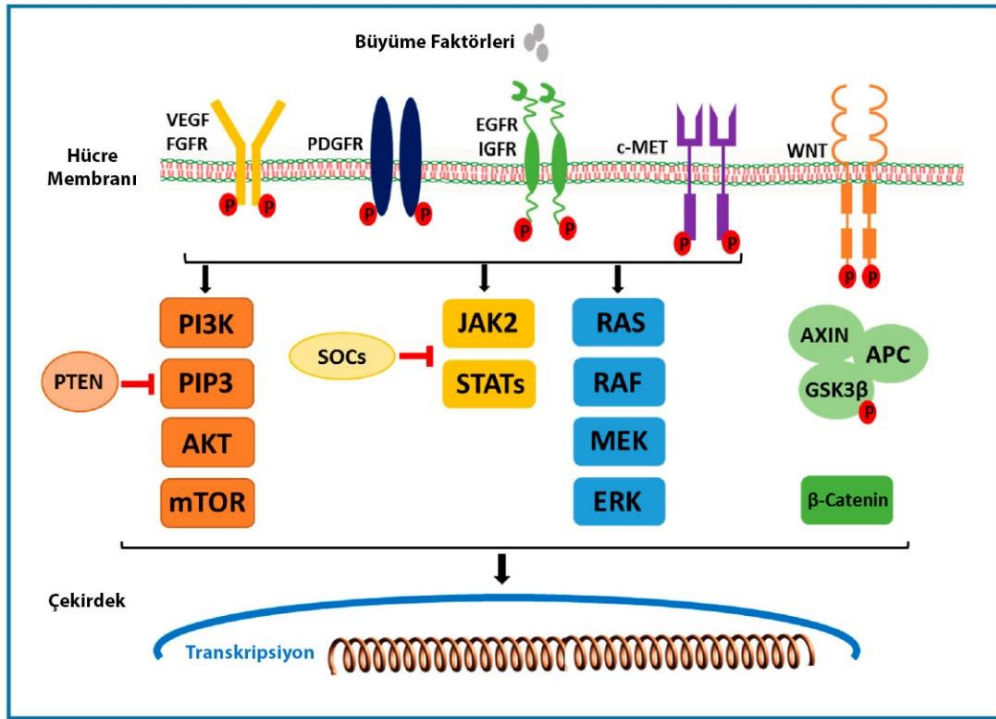
Şekil 8. Hepatik anjiyogenez

Kaynak: Sanz-Cameno ve ark. (98)

Özetle; karaciğerdeki anjiyojenik süreçler kronik karaciğer hastalığı bağlamında açıklanacak olursa iki ana proanjiyogenik stimülasyon kaynağının olduğu söylenebilir. Bunlardan birincisi; anjiyogenez için ana uyarıcı olan hipoksi, kronik karaciğer hastalığında karaciğer parankiminin yapısındaki değişikliklerin gelişimine zemin hazırlar. Bunun sonucunda büyüyen hipoksik doku alanları karaciğerde yeni kan damarlarının oluşumunu sağlar. İkincisi ise; karaciğerdeki patolojiler sonucu yara iyileşmesine ve hipoksiye yanıt olarak, güçlü proanjiyogenik kapasiteye sahip olan PDGF, FGF, VEGF veya TGF- β 1 gibi büyüme faktörlerinin ve kemokinlerin üretiminin artmasıdır (101, 102). Anjiyogenez sürecinde, yeni kan damarlarının oluşumunun ilk aşamasında VEGF, endotel hücrelerin proliferasyonunu ve endotel tübülünün oluşumunu aktive ederken, platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ise endotel tübülünün perisitlerle bağlantı sağlamasını ve yeni oluşan damarın vasküler yapısının stabilizasyonunu ve olgunlaşmasını sağlar (103). Endotel hücrelerinin ve perisitlerin eşzamanlı olarak hedeflenmesinin, her birini tek başına hedeflemekten daha büyük bir vasküler destabilizasyon sağladığından, VEGF ve PDGF sinyal yollarının eşzamanlı olarak hedefleyen VEGF ve PDGF inhibitörleri kullanılarak kombine antianjiyogenik tedaviler ön plana çıkmıştır.

2.5.4. Reseptör Tirozin Kinaz Sinyal Yolları

Hepatokarsinogenezde proliferasyon, farklılaşma, inflamasyon, neoanjiyogenez ve p53 tümör baskılayıcı ile ilgili yollar gibi çeşitli sinyal yolları rol oynar (104). Bu sinyal yolları reseptör tirozin kinazlar aracılığıyla aktive edilir. Reseptör tirozin kinaz yolundaki çoklu sinyal kaskadlarını aktive eden reseptörler arasında epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörü, fibroblast büyüme faktörü (FGF) reseptörü, hepatosit büyüme faktörü (HGF/c-MET), kök hücre büyüme faktörü reseptörü cKIT, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) reseptörü ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) reseptörü yer alır. Bu reseptörlere bağlanan ligand, sitoplazmik kuyruklarda tirozin kalıntılarını fosforile eden sitoplazmik tirozin kinazların (TK'ler) aktivasyonuna yol açar. Bunun sonucunda Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT ve Wnt/ β -Katenin yolları aktive olur (**Şekil 9**). VEGF, HGF/c-MET, EGFR ve IGF reseptörleri dahil birçok büyüme faktörü ile aktive olan reseptör tirozin kinaz sinyal yolları HCC'de tümörlerin başlaması ve ilerlemesi ile doğrudan ilişkilendirilmiştir (12).



Şekil 9. HCC'de yer alan ana sinyal yollarının şematik gösterimi

Kaynak:Dimri ve ark. (12)

Ras: GTPaz aktiviteli stoplazmik sinyal iletim molekülü, Raf: Stoplazmik sinyal ileti molekülü, ERK: Ekstraselüler sinyal regüle edici kinaz MEK: ERK kinaz, PI3K: Fosfoinositid 3- kinaz, AKT : Protein kinaz B, mTOR: Mammalian target of rapamycin, JAK: Janus kinaz, STAT3: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü GSK3B: Glikojen Sentaz Kinaz 3 Beta, VEGF: Vasküler endotelyal büyüme

faktörü, FGFR: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü, PDGFR: Plaketalet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü, EGFR: Epitelial büyüme faktörü reseptörü, IGFR: İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü, PTEN: Fosfataz tensin homoloğu

2.5.5. VEGF Reseptörü

Oldukça vasküler bir organ olan karaciğer, hücresel yenilenme için anjiyogeneze ihtiyaç duyar. Benzer şekilde, HCC'de verimli anjiyogenez, tümör büyümesi, vasküler invazyonu ve metastaz için kritik öneme sahiptir. Bu nedenle VEGF kritik bir anjiyojenik faktördür ve HCC'de önemli bir düzenleyici rol oynar. Zengin vasküler arza rağmen, karaciğer tümörü arteriyogenez ve kapillerizasyon gibi anormal vaskülasyon gösterir. Aşırı derecede sızdıran olgunlaşmamış karaciğer tümör damarları nedeniyle anormal kan akışı ortaya çıkar. Bu durum, HCC'de şiddetli hipoksiyle sonuçlanır ve hipoksi ile indüklenebilir faktörler 1 ve 2 (HIF 1 ve 2) ve insülin benzeri büyüme faktörü 2 (IGF2) gibi büyüme faktörlerinin indüklenmesine neden olur (105). Hem HIF1 hem de IGF2, VEGF ve diğer büyüme faktörlerinin ekspresyonunu uyararak tümör anjiyogenezini teşvik ederek tümörün ilerlemesine ve metastaza zemin hazırlar. HCC hücre hatları ve dokularının yanı sıra HCC'li hastaların serumlarında yapılan çalışmalar, VEGF ve VEGF reseptörlerinin ekspresyonunun arttığını göstermiştir (106, 107). HCC hastalarından alınan karaciğer tümörlerinin çoğunda VEGF mRNA'sının artan ekspresyonunun olduğu ve bu durumun tümör progresyonu ve zayıf sağkalım ile korale olduğu gösterilmiştir (108). Benzer şekilde Hepatit B antijeninin VEGFR upregülasyonu ile ilişkilendirilmiştir (109). Ayrıca, hastalık nüksü, rezeksiyon sonrası kötü prognoz, vasküler invazyon ve portal ven embolisi sıklıkla VEGF'nin yüksek ekspresyonu ile ilişkilidir. Bu nedenle, HCC ilerlemesinde VEGF aracılı anjiyogenezin açık bir düzenleyici rolünün olduğu ifade edilmektedir (12).

2.5.6. EGF Reseptörü

Kronik alkol tüketimine bağlı kalıcı karaciğer hasarı, intrahepatik yağ birikimine yol açan kötü beslenme alışkanlıkları ve kronik karaciğer hasarı ve siroz ile sonuçlanan hepatotropik viral enfeksiyonlar, karaciğer tümörlerinin gelişimi ile güçlü bir şekilde bağlantılıdır (35, 110). İnflamatuar araçlar ve büyüme faktörleri açısından zengin intrahepatik mikroçevre, karaciğerin doğal rejeneratif ve onarıcı yanıtının bir parçasıdır. Ancak bu yanıt kronikleştiğinde ve yaralanma ve inflamasyon devam ettiğinde hücre dışı matriksin (ECM) veya fibrozisin aşırı birikmesi gerçekleşir. Buna bağlı olarak preneoplastik nodüllerin gelişimi gibi organ mimarisindeki değişiklikler, kontrolsüz

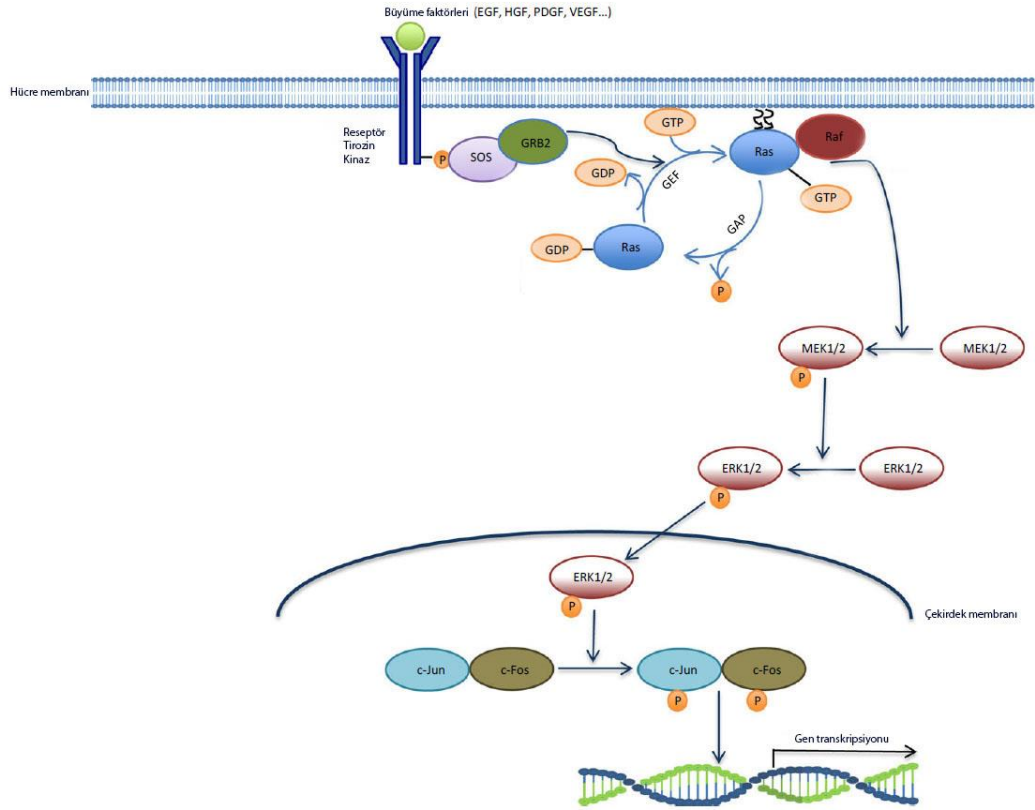
hücre proliferasyonunu, genetik mutasyonlar ve bunlara eşlik eden hepatik fonksiyon kaybı gerçekleşir (32). EGFR ligandlarının, HCS ve karaciğer miyofibroblastları dahil olmak üzere ECM üreten hücrelerin fenotipik aktivasyonuna katkıda bulunduğu bilinmektedir. EGFR sinyal sistemi, erken inflamasyon ve hepatoselüler proliferasyondan fibrogenез ve neoplastik transformasyona kadar karaciğerin yaralanmaya verdiği yanıtın tüm aşamalarında kilit bir oyuncu olarak tanımlanmıştır (111). EGFR sistemi, diğer büyüme faktörleri, sitokinler ve inflamatuvar mediatörler için gerçek bir sinyalleme merkezi görevi görerek, diğer sinyal yollarıyla kapsamlı çapraz etkileşime girmektedir (112). Hem deneysel modellerde hem de sirotik karaciğer doku örneklerinde kronik karaciğer hasarında çeşitli EGFR ligandlarının aşırı eksprese olduğu ve bunların ekspresyonunun akut ve kronik karaciğer hasarında bulunan baskın inflamatuvar sinyalleri tarafından indüklendiği ortaya konmuştur. Bu etmenlerden dolayı EGFR sistemi, hastalığın erken evrelerinden itibaren hepatokarsinogenezin bir parçası olarak ifade edilmektedir (111-113).

2.5.7. RAS/MAPK Sinyal Yolu

RAS/MAPK, hücre proliferasyonu, farklılaşma, anjiyogeneз ve hayatta kalma dahil olmak üzere önemli hücresel süreçleri düzenleyen her hücrede bulunan bir sinyal iletim yoludur. Bu sinyal kaskadı, tümör oluşumunda çok önemli bir rol oynar ve bileşenlerindeki mutasyonlar insan kanserlerinde oldukça yaygın olarak görülmektedir. Tüm insan tümörlerinin yaklaşık %20-30'unda RAS ile ilişkili genlerden birinde mutasyon olduğu ifade edilmektedir (114). Bununla birlikte, HCC vakalarının %5'inden azında RAS ve RAF mutasyonları tespit edilmiştir (115). İnsan HCC'sinde RAS ve RAF'ın düşük mutasyon sıklığına rağmen, RAS/MAPK sinyal yolunun aşırı aktivasyonu tespit edilmiştir (116). MEK/ERK ekspresyonu ve fosforilasyonuna dayalı olarak, RAS/MAPK sinyalinin erken evre HCC hastalarının yaklaşık %50'sinde ve ileri evre HCC'li hastaların hemen hemen tümünde aktif olduğu ifade edilmiştir (117). RAS efektörlerinin yüksek ekspresyon seviyeleri, HCC hastalarında zayıf bir sağkalım oranı ile ilişkilendirilmekte ve MEK1/2 fosforilasyonunun komşu iyi huylu dokulara kıyasla HCC dokularında yedi kat arttığı ifade edilmektedir (117, 118).

RAS/MAPK sinyal yolunun aktivitesi, RTK, RAS, RAF, MEK ve ERK gibi temel sinyal bileşenleri aracılığıyla düzenlenir. Bu sinyal yolu, VEGFR, HGF/c-MET, EGFR ve IGFR gibi hücre yüzeyi reseptörlerinden sinyal iletimi yoluyla aktive edilir (104). RAS/MAPK sinyal yolu, büyüme faktörlerinin reseptörlere bağlanmasıyla aktive

edildikten sonra bir dizi spesifik fosforilasyon olayını tetikler. RTK'ların büyüme faktörleri aracılı aktivasyonu adaptör molekül kompleksi olarak görev alan GRB2/SHC/SOS kompleksini aktive eder. Bu adaptör molekül de daha sonra GDP'ye bağlı RAS'ı, GTP'ye bağlı aktif RAS'a dönüştürür. MAPK/ERK sinyalinin en önemli modülatörlerinden biri, RAS-GTPaz aktive edici protein (RAS-GAP) ve RAS-guanin nükleotid değişim faktörü proteinidir (RAS-GEF) (119, 120) (**Şekil 10**). RAS proteinleri sitozolde GDP'ye bağlı inaktif (RAS-GDP), GTP'ye bağlı aktif durum (RAS-GTP) arasında dengede tutulur. RAS proteinlerinin aktif fonksiyonu için GRB2/SHC/SOS gibi GTP/GDP döngü sürecini düzenleyen faktörlere ihtiyaç duyarlar. RAS-GEF'ler uyarıldıklarında, RAS'ta GDP'nin GTP'ye dönüşümünü aktive edip RAS'ın aktif forma geçmesine izin verirken, RAS-GAP'lar bağlı GTP'nin GDP'ye hidrolizini uyararak aktif RAS'ın inaktif hale geçmesine aracılık eder (117).



Şekil 10. RAS/MAPK sinyal yolunun şematik olarak gösterimi

Kaynak: Delire ve ark. (104)

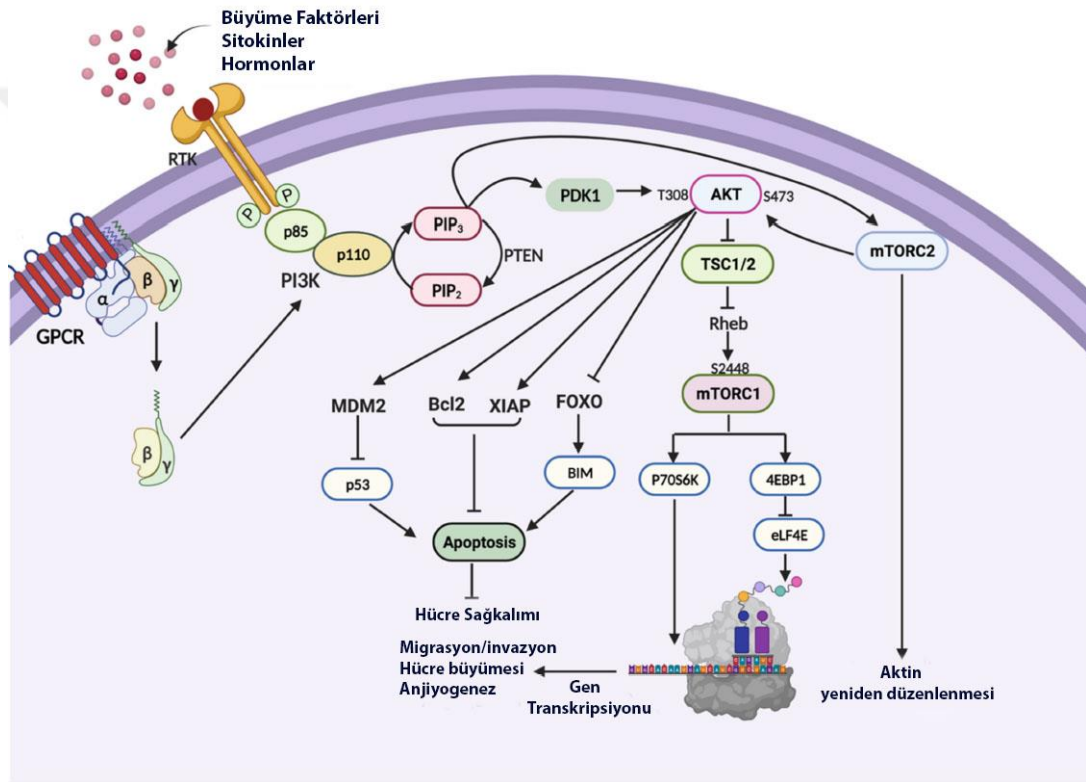
Ras: GTPaz aktiviteli stoplazmik sinyal iletim molekülü, Raf: Stoplazmik sinyal ileti molekülü, MAPK: Mitojen aktive edici protein kinaz, GRB2: Büyüme faktör reseseptörü bağlayıcı protein 2, GDP: Guanozin difosfat, GAP: GTPaz aktive edici protein, GEF: Guanin nükleotid değişim faktörü proteini, MEK: ERK kinaz, ERK : Extracellular signal regulated kinaz

GTP-Ras Aktive edildikten sonra, serin/treonin kinaz RAF (A-RAF, B-RAF ve C-RAF) hücrede fosforilasyon ve dimerizasyon dahil olmak üzere bir dizi işlemle aktive edilir. RAF proteinleri, mitojen/hücre dışı protein kinazı (MEK1 ve MEK2) doğrudan düzenler, bu da hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinazın (ERK1 ve ERK2) fosforilasyonuna yol açar ERK 1/2'yi aktive eder (121). Fosforillenmiş ERK'ler çekirdeğe yer değiştirir ve AP-1 ailesinin iki anahtar transkripsiyon faktörünü, c-Jun ve c-Fos'u aktive eder. Bu iki faktör, promotör bölgelerinin AP-1 bağlanma bölgesine bağlanarak hücre döngüsü ilerlemesinde veya diğer hücresel süreçlerde rol oynayan genlerin transkripsiyonunu indükler (104). Ayrıca, büyüme faktörlerini kodlayan genler, RAS/MAPK sinyal yolu tarafından aktive edilen transkripsiyonel aktivatörler için promotör bölgelerinde bağlanma bölgelerine sahiptir. Bu nedenle, RAS/MAPK sinyal yolunun anormal aktivasyonu, proliferatif sinyallerin kendi kendine yeterli olmasına ve bir otokrin/parakrin döngüsünün kurulması yoluyla hücre büyümesinin sürekli uyarılmasına yol açar (117). RAS/MAPK sinyal yolu, hücrenin hayatta kalması ve proliferasyonu dahil olmak üzere temel hücresel süreçlerin kontrolünde temel bir rol oynadığından, anormal aktivasyonu, hücresel transformasyon ve karsinogenez ile ilişkilidir (114). Ayrıca RAS/MAPK sinyal yolu, BAX ve BIM gibi proapoptotik BCL-2 ailesi proteinlerinin aktivasyonunu inhibe ederek ve BCL-2, BCL-XL ve MCL-1 gibi BCL2 ailesinin anti-apoptotik üyelerinin ekspresyonunu indükleyerek hayatta kalmayı destekler (122). Sinyal yolu ayrıca Rho/Rac-aktin yolu ve matris metalloproteinazın upregülasyonu yoluyla hücre motilitesini ve kanser hücrelerinin istilasını da aktive eder (123). B-RAF, HIF-1 ve VEGF'nin katılımı yoluyla anjiyogenezi indükler ve C-RAF, kanser ve stromal hücreler arasındaki etkileşimde önemli bir rol oynayan endotelial hücre sağkalımını destekler (124).

2.5.8. PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolu

Rapamisin (mTOR) yolunun protein kinaz B (AKT) hedefi, fosfoinositid 3-kinazların (PI3K) aktivasyonu ile başlatılır. Geniş bir lipid ve serin/treonin kinaz ailesinden oluşan bir enzim olan PI3K, normalde lipid sentezinde yer alır ve hücrenin hayatta kalmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenleyen önemli kinazlardır (125). Heterodimerik bir protein olan PI3K, p110 katalitik ve p85 düzenleyici alt birimlerden oluşur. Hormonlar, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi çeşitli hücre dışı uyarılara yanıt olarak aktive olan bir aşağı akış efektörüdür. G protein-bağlı reseptör (GPCR) ve büyüme faktörü/reseptör tirozin kinaz (RTK) dahil olmak üzere büyüme faktörlerinin hücre

yüzeyi reseptörlerine bağlanması, PI3K'nın dimerizasyonunu ve fosforilasyonunu indükleyen reseptör kompleksini aktive eder (126) (**Şekil 11**). Aktive edilmiş PI3K, lipid membran üzerinde inositolleri fosforile ederek fosfatidilinositol 4,5-bifosfattan (PIP₂) ikinci haberci fosfatidilinositol trifosfat (PIP₃) üretir. PIP₃ aktivasyonu fosfoinositide bağımlı kinaz-1'in (PDK1) aktivasyonunu ve AKT'nin aşağı akış hedeflerini indükler. Bu yolun bir diğer kritik bileşeni fosfataz ve tensin homologudur (PTEN). PTEN, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun negatif düzenleyicisi olarak hizmet eden bir tümör baskılayıcı gendir. PIP₃'ün fosforilasyonunu ve dolayısıyla AKT aktivasyonunu baskılayan bir tümör baskılayıcı protein olarak işlev görür (127).



Şekil 11. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun şematik olarak gösterimi

Kaynak: Iksen ve ark. (126)

GPCR: G protein bağlı reseptör, PI3K: Fosfoinositid 3- kinaz, PIP₂: Fosfatidil inozitol bifosfat, PIP₃ : Fosfatidil inozitol trifosfat, PTEN: Fosfataz ve tensin homologu, AKT : Protein kinaz B, TSC1/2: Tuberozskleroz kompleksi, mTOR: Mammalian target of rapamycin, Rheb: Ras homologu küçük G proteini, XIAP: X bağlı apoptoz protein inhibitörü

Akt etkinleştirildiğinde, hücrenin hayatta kalmasını, çoğalmasını, hücre döngüsü ilerlemesini, göçü ve anjiyogenezi düzenlemek için aşağı akış sinyal efektörlerini aktive

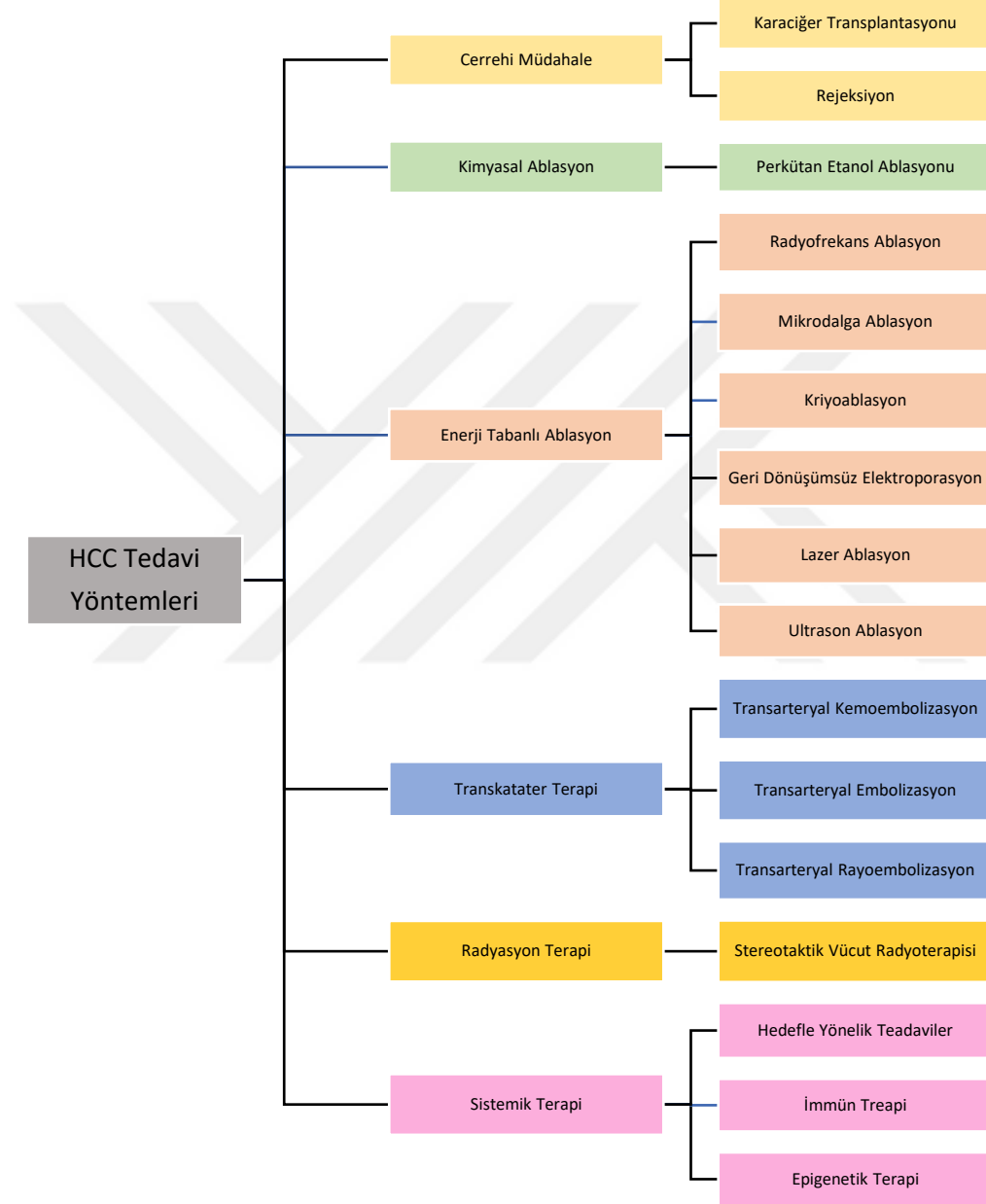
eder. Akt'nin en önemli aşağı akış etkilerinden biri, mTOR ailesinin alt birimlerini aktifleştirmektedir. AKT, bir treonin kalıntısı (T308) ile serin kalıntısından (S473) oluşur. AKT'nin treonin 308 kalıntısı (PDK1) tarafından fosforile edilebilir. Bunun yanı sıra AKT'nin Serin 473'ün fosforilasyonu mTOR kompleksi 2'yi (mTORC2) hedefler. mTORC2, aktin hücre iskeletinin yeniden şekillenmesine ve hücre motilitesine aracılık eder. Maksimal AKT aktivitesi, hem Thr308 hem de Ser473 kalıntılarının fosforilasyon durumuna bağlıdır (128). AKT'nin Ser473 ve Thr308 kalıntılarının fosforilasyonu tuberoskleroz kompleksi 1/2'nin (TSC1/2) fosforilasyonunu indükler ve inaktif forma getirir (129). TSC1/2 kompleksinin inaktivasyonu, Ras homologu küçük G proteininin (Rheb) GTP'ye bağlı durumda birikmesine izin verir. Rheb, GTP'ye bağlı durumunda mTORC1'i etkinleştirir. Aktive edilmiş mTORC1, hücre döngüsü ilerlemesini ve proliferasyonunu düzenleyen transkripsiyonel baskılayıcı proteinler p70S6 ve 4EBP1 fosforilasyonu aracılığıyla kanserle ilişkili genlerin transkripsiyonu düzenler (126). Ayrıca, Akt etkinleştirildiğinde FOXO ve Bad gibi çeşitli proapoptotik proteinleri downregüle ederek apoptozu inhibe eder, Bcl2 ve X-bağlı apoptoz proteini inhibitörü (XIAP) gibi hücre sağkalımını destekleyen proteinleri upregüle ederek hücre ölümü direncini uyarır (125, 126).

PI3K yolunda yer alan genlerin mutasyonu veya amplifikasyonu, tümör baskılayıcı PTEN'in kaybı veya RTK'ların aşırı aktivasyonu ile PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun aşırı aktivasyonu, HCC'de gözlenmiş ve tümörün ilerlemesine ve metastazına katkıda bulunduğu ifade edilmiştir (2, 125). PTEN işlevindeki anomalilerin HCC'de PI3K/AKT/mTOR yolunun hiperaktivasyonuna yol açabileceği bildirilmiştir. Önemli olarak, PTEN geninin mutasyonu veya azalmış PTEN ekspresyonu, tüm HCC tümörlerinin yaklaşık yarısında gözlenir, bu da PTEN inaktivasyonunun HCC patogenezinde rol oynadığını düşündürür (130). Genel olarak HCC'de gözlemlenen PI3K/Akt/mTOR düzensizliği; p110 katalitik alt birimi olan PIK3CA'nın fonksiyon mutasyonu veya amplifikasyonu ve PTEN'in işlev kaybı ile ilişkilendirilmiştir (125).

2.6. Hepatoselüler Karsinomada (HCC) Tedavi Yaklaşımları

Hepatoselüler karsinoma; hepatit, alkol tüketimi, aflatoksinli gıda tüketimi, karaciğer yağlanması gibi farklı etmenlerin etkisiyle ortaya çıksa da bu etmenlerin sonucunda karaciğerde görülen patofizyolojik durumlar inflamasyon, fibroz ve anormal rejenerasyondur. Rejenerasyon nodüllerinden sırayla düşük dereceli displastik nodül, yüksek dereceli displastik nodül ve erken evre HCC nodülü gelişir. Bu nodülleri ve

agresif maligniteyi tedavi etmek amacıyla çeşitli tedaviler geliştirilmiştir. Genel olarak bu tedavi yöntemleri; transplantasyon, rejeksiyon, kimyasal ve enerji tabanlı ablasyon, transkatater terapi, radyasyon terapi ve sistemik tedaviler olarak sınıflandırılmıştır (131) (Şekil 12). HCC’de bu tedaviler genellikle tek başına veya kombine halde kullanılarak kitle azaltma, evre düşürme, sağ kalımı artırma ve iyileştirme hedeflenmektedir.



Şekil 12. Hepatosellüler karsinomada tedavi yöntemleri

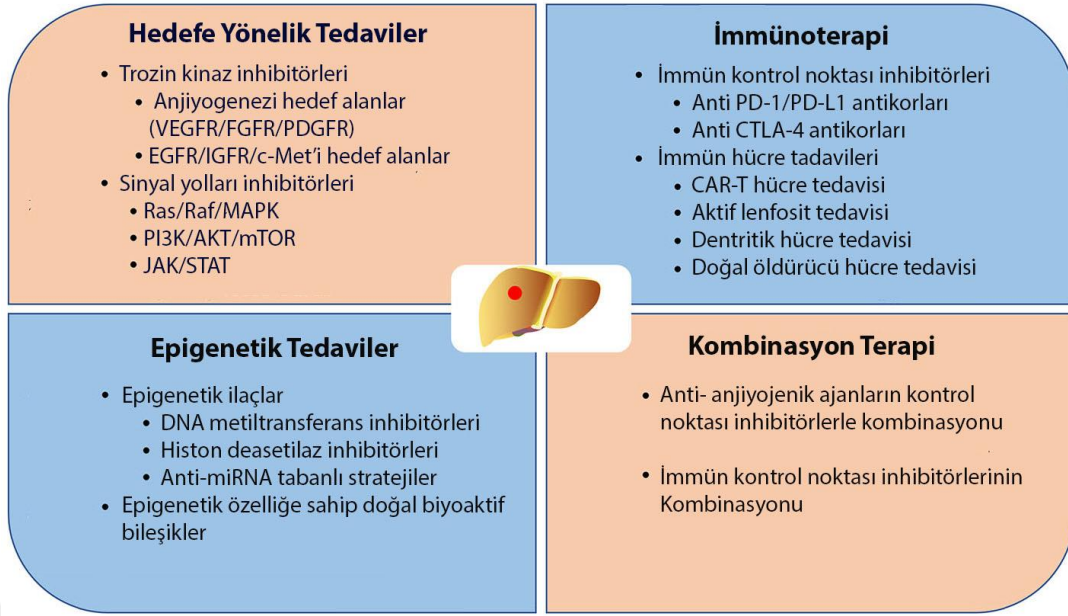
Kaynak: Voizard ve ark. (131)

2.6.1. Sistemik terapiler

Son yıllarda moleküler hücre biyolojisindeki gelişmeler, tümör başlangıcı ve ilerlemesinin altında yatan ayrıntılı moleküler mekanizmalar hakkındaki yeni anlayışların ortaya konulmasına yol açtı. Bu da, kanser için umut verici terapötik müdahaleler olarak yeni moleküler hedefli ajanların geliştirilmesi için fırsatlar sağladı. Kanserde büyüme faktörü reseptörlerinin ve hücre içi sinyal yollarının aşırı aktive olduğu bilinmekle birlikte çeşitli kanser türünde hangi reseptörlerin ve moleküler yolların aşırı aktive olduğu belirlenerek bu yollar üzerinde etkili olan moleküler hedefli ajanları bulmak için birçok klinik çalışma yürütülmektedir (132).

HCC’de kullanılan hepatektomi, karaciğer transplantasyonu ve ablasyon gibi tedavi yöntemleri erken evre HCC tanısı konan hastalar için iyileştirme potansiyeline sahiptir. Ancak, konvansiyonel sistemik kemoterapi özellikle hastalığın iyi yönetilmesi ve sağkalımı arttırmak için kullanılan faydalı bir tedavi yöntemidir (133). Son zamanlarda HCC’de etkili olan çoklu sinyal yollarının anlaşılmasıyla birlikte bu yolların aktivitesini bloke eden ilaçların geliştirilmesi sağlanarak kesin tedaviler geliştirme hedeflenmiştir. HCC’de Ras/Raf/MAPK, PI3K/AKT/mTOR, Wnt/ β -katenin ve JAK/STAT yollarının aktivasyonu ön plana çıktığı için bu yolları hedef alan ilaçların faz çalışmaları klinik olarak denenmiş ve bu ilaçların cesaret verici sağkalım yararları gösterdiği kaydedilmiştir (12).

Hepatokarsinogenez, tirozin kinaz proteinlerinin hem reseptör hem de reseptör olmayan etkilerini içeren çeşitli sinyal yollarının anormal aktivasyonu ile ilişkilendirilen çok elementli ve çok aşamalı bir süreçtir. Bu nedenle HCC için sistemik tedavi protokollerini belirlemek amacıyla bu sinyal yollarını merkezine alan hedefe yönelik tedaviler, immünoterapi, epigenetik terapi ve kombinasyon tedaviler geliştirilmiştir (**Şekil 13**) (133).



Şekil 13. HCC’de sistemik tedavi stratejileri

Kaynak: Qing ve ark. (133)

Büyüme promotörleri olarak bilinen protein tirozin kinaz ailesinin üyeleri, sinyal yollarının aktivasyonu başlatıcı bir role sahiptir. Bu nedenle tirozin kinaz inhibitörleri hedef tedavinin ana amacı haline gelmiştir (134). HCC için anjiyogenez, her adımda önemli bir rol oynadığı için moleküler hedefli terapötik stratejinin merkezi haline gelmiştir. HCC’de hedefe yönelik tedaviler geliştirmek için özellikle VEGFR, FGFR, PDGFR ve EGFR’i hedefleyen güçlü anti-anjiyojenik ajanlara yönelilmiştir (32). Anjiyojenik yolları hedef alan inhibitörlerin yanısıra HCC’de aşırı aktivasyonu gerçekleşen Ras/Raf/MAPK, PI3K/AKT/mTOR ve JAK/STAT yollarını hedef alan inhibitörler de araştırılmıştır. Günümüzde, hem antianjiyojenik özelliğe sahip olan hem de Ras/Raf/MEK/ERK yolu inhibitörü olan Sorafenib, HCC’de kullanılan temel sistemik kemoterapötiktir (135). Son yıllarda, Sorafenib’in yanısıra lenvatinib, regorafenib, cabozantinib ve ramucirumab gibi birkaç yeni tedavi bileşiği geliştirilmiş ve bunların klinik uygulamaları birinci ve ikinci basamak rejimler olarak faydalar göstermiştir (**Tablo 2**) (32, 136).

Tablo 2. HCC’de moleküler hedefli tedavinin klinik denemeleri

Kaynak: Alqahtani ve ark. (32)

Tedavi	Hedef	Faz çalışması clinicaltrial.gov numarası	Ortalama Genel Sağkalım
Sorafenib	Multi-kinase inhibitor	Phase III vs. placebo (SHARP; NCT00105443)	10.7 months vs. 7.9 months ($p < 0.001$)
		Phase III vs. placebo (Asia-Pacific; NCT00492752)	6.5 months vs. 4.2 months ($p = 0.014$)
Sunitinib	VEGFR, PDGFR inhibitor	Phase III vs. sorafenib (SUN 1170; NCT00699374)	8.1 months vs. 10.2 months (two-sided $p = 0.019$)
Linifanib	VEGFR, PDGFR inhibitor	Phase III vs. sorafenib (LIGHT; NCT01009593)	9.1 months vs. 9.8 months ($p = \text{NS}$)
Brivanib	VEGFR, PDGFR, FGFR inhibitor	Phase III vs. sorafenib (BRISK-FL; NCT00858871)	9.5 months vs. 9.9 months ($p = 0.3116$)
Lenvatinib	Multi-kinase inhibitor	Phase III vs. sorafenib (REFLECT; NCT01761266)	13.6 months vs. 12.3 months
Regorafenib	Multi-kinase inhibitor	Phase III vs. placebo (RESORCE; NCT01774344)	10.6 months vs. 7.8 months ($p < 0.0001$)
Cabozantinib	Multi-kinase inhibitor	Phase III vs. placebo (CELESTIAL; NCT01908426)	10.2 months vs. 8.0 months ($p = 0.005$)
Erlotinib	EGFR inhibitor	Phase III vs. sorafenib (SEARCH; NCT00901901)	9.5 months vs. 8.5 months ($p > 0.05$)
Everolimus	mTOR inhibitor	Phase III vs. placebo (EVOLVE-1; NCT01035229)	7.6 months vs. 7.3 months
Trivantinib	c-Met inhibitor	Phase III vs. placebo (NCT01755767)	8.4 months vs. 9.1 months ($p = 0.81$)
Selumetinib	MEK inhibitor	Phase II vs. placebo (NCT00604721)	-
		Phase Ib vs. sorafenib	14.4 months with selumetinib
Pembrolizumab	Anti-PD-1 monoclonal antibody	Phase II (KEYNOTE-224; NCT02702414)	12.9 months
		Phase III vs. placebo (KEYNOTE-240; NCT02702401)	-
Bevacizumab	Anti-VEGF antibody	Phase II vs. placebo	53% (1 year) 28% (2 years) 23% (3 years)
Bevacizumab + Gemcitabine + Oxaliplatin		Phase II	9.6 months
Nivolumab	Anti-PD-1 monoclonal antibody	Phase I/II (CheckMate-040; NCT01658878)	15.0 months
Ramucirumab	Human IgG1 monoclonal antibody	Phase III vs. placebo (REACH-2; NCT02435433)	8.5 months vs. 7.3 months ($p = 0.0199$)

HCC tedavisi için dünya çapında kabul gören en etkili sistemik tedavilerden biri trozin kinaz inhibitörlerinin kullanımıdır. HCC'de bölgesel tedavide olumsuz sonuç alındıysa ve karaciğer nakli yapılamıyorsa karsinogenezin çoklu aktivasyon mekanizmasına yönelik temel tedavi ajanı olarak multi kinaz inhibitörleri kullanılır (133). Hedefe yönelik tedaviler önemli klinik etkiler gösteren ilaçlar olmakla birlikte düzenli kullanımında ilaç direnci oluşumu hala aşılamayan bir sorundur. Bu nedenle sistemik tedaviye, immünoterapi ve epigenetik tedavilerdeki atılımlarla alternatif antikarsinojenik ajanlar dahil edilmiştir. İmmünoterapide tümör hücrelerine doğrudan müdahale etmek yerine, hastaların bağışıklık sistemi ve tümör mikro-ortamı hedeflenmektedir (137). Tümörler, anti-tümör immün tepkilerini inhibe etmek için bağışıklık kontrol noktalarını kullanır. Birçok kanserli hastada immün baskılanmasında, programlanmış ölüm-1 (PD-1) ve sitotoksik T-lenfosit-ilişkili antijen-4 (CTLA-4) reseptörlerinin görev aldığı

bildirilmiştir. Bu nedenle immünoterapide PD-1 ve CTLA-4 gibi kontrol noktalarını hedefleyen monoklonal antikorlar kullanılmaktadır. Bunlar bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri olarak adlandırılır (138). HCC ile ilişkili olarak, HBV enfeksiyonu olan hastalarda PD1 ekspresyonunun arttığı, artmış viral yük ile PD1/PDL1 ve CTLA-4 bağışıklık kontrol noktalarının doğrusal ilişkide olduğu ifade edilmiştir (139). HCC’de immünoterapinin klinikte kullanım için çeşitli monoklonal antikorlar bulunmaktadır. Anti-PD1 için; nivolumab, pembrolizumab ve kamrelizumab, anti-PD-L1 için; atezolizumab, aveluma ve durvalumab ve anti-CTLA-4 için; ipilimumab ve tremelimumab klinikte kullanım için FDA onayı almış monoklonal antikorlardır (140-144). Günümüzde karaciğer kanseri tedavisi için anti-CTLA-4 ve anti-PD/anti-PD-L1 antikorları tek başına veya kombinasyon halinde kullanılmaktadır. İmmünoterapinin bu faydalarıyla birlikte bazı tümör hastalarında, bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri tümöre özgü T hücre aktivitesini ortaya çıkaramadığından ve PD-1/PD-L1’den başka ek bağışıklık kontrol noktalarının araştırılması gerektiğinden immünoterapi sınırlı sayıda kanser hastası için kullanılmaktadır (133, 145).

Hedefe yönelik ve immünoterapinin yanısıra epigenetik tedaviler de kanser tedavisi için öne çıkan sistemik tedavi yaklaşımlarındandır. Epigenetik düzensizlikler karaciğer fibrozu ve siroz ile ilişkilendirilmekte ve DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmaların ana unsurlarını değiştirerek HCC’nin arka planında rol aldığı ifade edilmektedir (146). Spesifik olarak epigenetik değişikliklere neden olan faktörleri hedef alan çok sayıda ilaç geliştirilmiş, çoklu tümör modellerinde denenmiş ve bunların birçoğunun klinikte kullanıma uygun olduğu bildirilmiştir (147, 148).

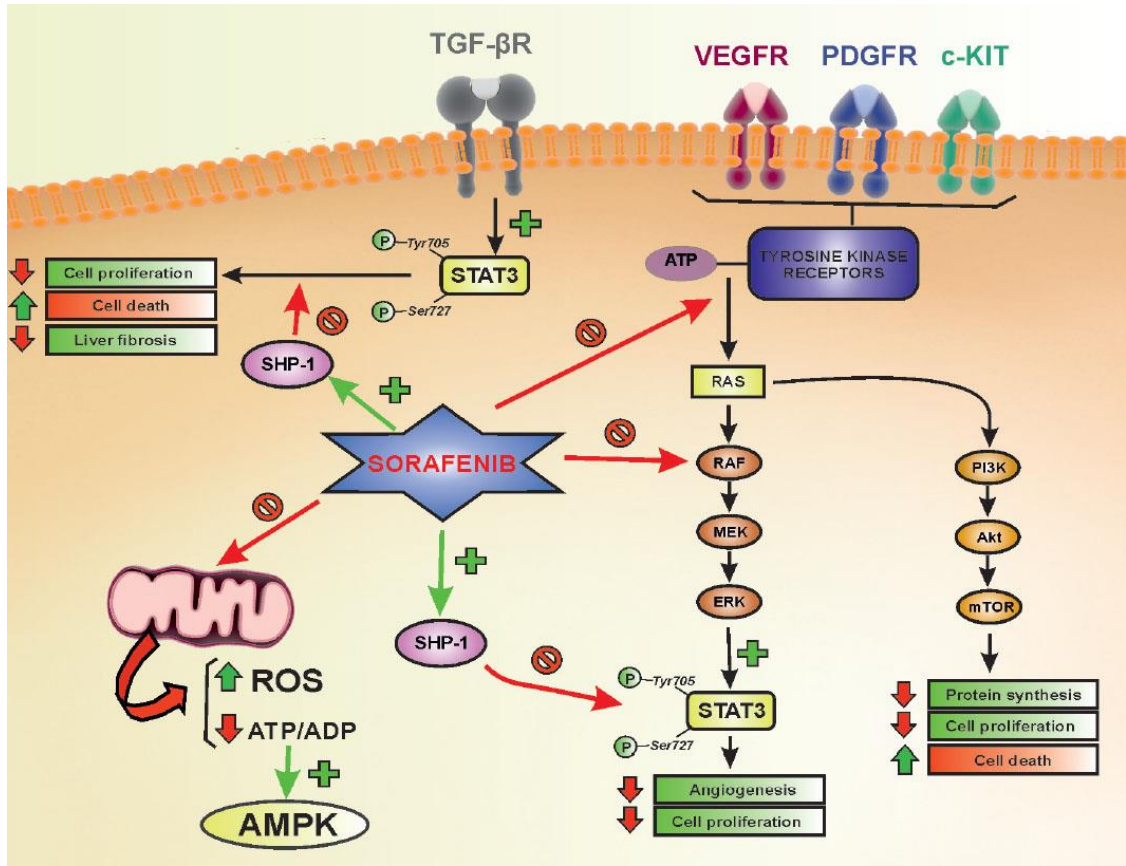
2.6.2. Sorafenibin etki mekanizmaları

Anti-anjiyojenik ve multi-tirozin kinaz inhibitörü olma özelliğiyle ortaya çıkan Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar) 2007 yılında Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından klinikte HCC tedavisinde uygulanmak üzere onaylanan ilk hedefe yönelik kemoterapötik ajandır (149). Sorafenib, VEGFR, PDGFR ve c-Kit gibi çeşitli hücre reseptörlerini bloke ederek RAF/MEK/ERK ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yollarının inhibisyonuna neden olur ve bu yolla antitümöral etkiye aracılık eder (32). Çeşitli kemoterapötiklerin faz çalışmalarının küresel çapta verilerinin sunulduğu SHARP ve Asya-Pasifik klinik deneylerinin sonuçlarına göre; sorafenib, ileri HCC’li hastaların sağkalımında önemli bir artış göstermiştir (32, 150). Bu iki küresel faz III randomize çalışmada, rezeksiyon

yapılamayan, ilerlemiş HCC'si olan ve daha önce herhangi bir sistemik tedavi almamış hastalarda sorafenibin genel sağkalım üzerine etkisi incelenmiştir (**Tablo 2**) (150, 151). SHARP çalışmasında sorafenib grubunun ortalama sağkalım süresinin 10.7 ay arttığı, Asya-Pasifik çalışmasında ise sorafenib grubunda ortalama sağkalım süresinin 6.5 ay arttığı ifade edilmiştir. Sorafenib ile tedavinin HCC'de genel sağkalımı uzatmada etkili olduğu kanıtlanmış olmakla birlikte, ilacın böbrek karsinomu, tiroid kanseri, prostat kanseri ve akut miyeloid lösemi gibi diğer kanser türlerinin klinik uygulamalarında da fayda sağladığı bildirilmiştir (152-155).

Sorafenibin hücrel etkisi VEGFR, PDGFR, c-Kit gibi hücre proliferasyonu, anjiyogenezi, apoptozu düzenleyen ve tümör progresyonuna aracılık eden tirozin kinaz reseptörlerini inhibe ederek başlar (**Şekil 14**) (14). Karsinogenezde; VEGF, PDGF, IGF, HGF, EGF gibi büyüme faktörleri reseptörlerine bağlanıp adaptör molekülleri aktive etme yoluyla GTP-Ras'ı aktive eder. Sorafenib sistemik etkisinin çoklu tirozin kinaz reseptörü inhibitörü olma özelliğiyle gösterir. Bu reseptörlerin inhibisyonu, Ras proteininin yapısal olarak inaktif olduğu GDP'ye bağlı formunda tutar. Ras'ın inaktivasyonu, hücre büyümesini ve RAF/MEK/ERK ve PI3K/AKT/mTOR gibi malign transformasyonun temel düzenleyicileri olan sinyal yollarını baskılar.

Tümör baskılayıcı protein olarak görev yapan PTEN, PIP3'ün fosforilasyonunu baskılayarak PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunu negatif yönlü düzenler. PTEN kaybı veya sitokin ve büyüme faktörlerinin tirozin kinaz reseptörlerine bağlanması AKT'nin Ser473 ve Thr308 kalıntılarının fosforilasyonuna aracılık ederek FOXO, mTOR, NF-kB gibi daha fazla malign dönüşüme yol açabilen çok sayıda yolun düzenlenmesine neden olur (156). Aktif Akt, mitokondriden kalsiyum salınımını baskılar ve dolayısıyla apoptozu önler. Aktif Akt tarafından apoptozun önlenmesi FOXO ve Bad gibi çeşitli proapoptotik proteinleri inhibe eder, Bcl2 ve XIAP gibi anti-apoptotik proteinleri aktive eder. Bunun sonucu olarak hücre proliferasyonu artarken hücre ölümü baskılanır (125). Sorafenibin renal ve hepatoselüler karsinomda, Akt ve mTOR sinyal inhibisyonu yoluyla hücrelerin hayatta kalım mekanizmalarını baskıladığı bildirilmiştir (157-159).



Şekil 14. Sorafenibin tirozin kinaz reseptörleri inhibisyonu ile antitümöral etkisi

Kaynak: Molina-Ruiz ve Ark. (14)

TGF- β , IL-6, EGF, PDGF, VEGF ve HGF gibi sitokinler ve bazı büyüme faktörleri, hücrel proliferasyon, anjiyogenez, hayatta kalma, metabolizma ve immün modülasyon ile ilgili genlerin transkripsiyonunu düzenlemek için çekirdeğe STAT3 translokasyonuna neden olurlar (160). STAT3'ün transkripsiyonel aktivasyonu, sitokin uyarımı ile Ser727 aracılığıyla ya da Tirozin705'in fosforilasyonu ile meydana gelebilir (161). STAT3 sinyali bu sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından aktive edilme özelliğine sahipken, tirozin fosfataz ailesinin bir üyesi olan SHP-1 ve SHP-2 (Src homoloji alanı içeren protein tirozin fosfataz) tarafından da inhibe olma özelliğine sahiptir. Bu fosfatazlar, Tirozin705'in defosforilasyonuna aracılık ederek STAT3 aktivasyonunu azaltırlar (162, 163). Tyr705 ve Ser727'nin fosforilasyonu, sorafenib tarafından farklı yollar aracılığıyla SHP-1 ile downregüle edilebilir. Reseptör tirozin kinaz aktivasyonu ile başlayan Ras ve Raf/MEK/ERK aktivasyonu ile devam eden aşağı akış yolunda nihai aktive edilen modülatörlerden biri STAT3'tür. Sorafenib, bu nihai

kaskat düzenleyicisinin fosforilasyonunu inhibe ederek HCC’de hücrel proliferasyon, anjiyogenez ve fibrozisi baskılamaktadır (14).

Mitokondri, apoptotik hücre ölümü, ATP arzı, ROS üretimi ve homeostazında kritik roller oynar. HCC’nin ilerlemesi sırasında HSC’lerin aktive olması, ECM üretiminin artması ve fibrinogenez oluşumu bol miktarda hücre içi ATP arzı gerektirir (164). Hepatositler artan bu enerji ihtiyacını karşılamak için, büyüme faktörlerinin başlattığı sinyal yollarını, hücre içi glukoz alımı ve metabolizmasını aktive ederek hücre sağkalımı için yakıt sağlar (165). Sorafenibin mitokondri fonksiyonları üzerindeki etkisini ortaya koymayı hedefleyen bir grup çalışmada, sorafenibin hücre metabolizması, glikoliz üzerindeki rolü, antiglikolitik ilaç olan 2-deoksiglukoz ile birlikte etkisi incelenmiştir. Bu çalışmalarda; Sorafenibin mitokondriyal fonksiyonu bozarak hücre içi ROS üretimini arttırdığı (166) ve oksidatif fosforilasyonu bloke ettiği, insan HCC hücre dizilerinde aerobik glikolizi arttırdığı gösterilmiştir (167). Ayrıca antiglikolitik ilaç olarak kullanılan 2-deoksiglukoz ile sorafenibin kombine uygulamasının sorafenibe dirençli HCC hücrelerinde ATP tükenmesine, hücrel enerji homeostazını düzenleyen adenozin monofosfat kinazın aktive olmasına (AMPK) ve hücre döngüsünün G0/G1 fazında durmasına aracılık ettiği ifade edilmiştir (168).

Sorafenibin antineoplastik aktivitesi genel olarak özetlenecek olursa; Bu anti-anjiyojenik, multi-tirozin kinaz inhibitörü, antitümöral etkisini VEGF, PDGF ve c-Kit gibi büyüme faktörü reseptörlerini bloke ederek ve Ras/Raf/MAPK ve PI3K/AKT/mTOR sinyal iletimini inhibe ederek gösterir. Bunun sonucunda hücrenin büyüme ve çoğalması için temel olan transkripsiyon, translasyon gibi fonksiyonları düzenleyerek karsinogenezi baskılar (32).

2.7. Doğal Bileşiklerin Kansere Tedavisinde Kullanımı

Kanser hücrelerinin farklılaşması, proliferasyonu ve yaşlanması normal hücrelerden daha farklı moleküler mekanizmayla ilerler. Hızlı bölünen kanser hücreleri artan biyokütlelerinin ihtiyacı olan protein, lipid ve nükleik asitler gibi makromoleküllerin sentezini sağlamak için onkogenik mutasyonları artırır (169). Hücreler, farklı tümörlerde çeşitli büyüme faktörü reseptörlerinden bilgi alır ve bu bilgiyi hücrelerin biyolojik aktivitelerini düzenleyen sinyal yollarını aktive etmek için kullanır. Bu aktivasyonun hücrel yanıtı olarak hücre proliferasyonu, protein sentezi, hücre ölümü, gen transkripsiyonu, hücre farklılaşması, hücre mimarisi ve polarite gibi çeşitli hücrel

süreçler düzenlenir (170). Kanseri başlangıcı, ilerlemesi ve metastazı sırasında kullanılan sinyal yolları çok çeşitlidir ve bunlar birbiriyle etkileşen karmaşık bir iletişim ağına sahiptir (171). Bu nedenle karsinojenik hücreler bir sinyal yolu inhibitör tarafından bloke edildiğinde, başka büyüme faktörleri ve reseptörleriyle aktive olabilen alternatif bir sinyal yolu aracılığıyla çoğalabilir. Bu nedenle, kanserde hedefe yönelik tedavi için, çeşitli reseptörler ve sinyal yolları inhibitörleri, tümör mikroortamını hedefleyen immünoterapi veya DNA hasarı oluşturabilen kemoterapötik ajanların tek başına veya kombine olarak uygulanması gerekir (170, 171). Tümör hücrelerinin belirli kanserlerdeki davranışı ve aktif olan sinyal yollarının moleküler mekanizması geniş çapta incelenmesine rağmen, bu belirteçleri hedef alan kemoterapötik yaklaşımlar sınırlıdır. Birçok doğal bileşiğin çeşitli sinyal yollarını hedefleyerek kanser hücrelerinin moleküler aktivitesini değiştirdiği gösterilmiştir (172). Yapılan çalışmalar, doğal bileşiklerin farklı tümör tiplerinde aktive olan karmaşık sinyal yollarının reseptörlerini, proteinlerini, enzimlerini, genlerini hedef alarak hücre proliferasyonunu baskılayabildiği, anjiyogenezi ve metastazı inhibe ettiği, tümör hacmini küçülttüğünü göstermiştir (172). Doğada bulunan bitkilerden saflaştırılan bileşiklerin düşük maliyetleri, kolay bulunabilirlikleri, düşük toksisiteleri, yüksek seçicilikleri ve belirli kanser türlerindeki spesifitesinden dolayı kanserde iyi bir tedavi seçeneği olabilir (173). Potansiyel antikanser etkisiyle öne çıkan bazı doğal bileşiklerin etkili olduğu kanser türleri ve etki ettikleri moleküler mekanizmalar **Tablo 3**'de gösterilmiştir.

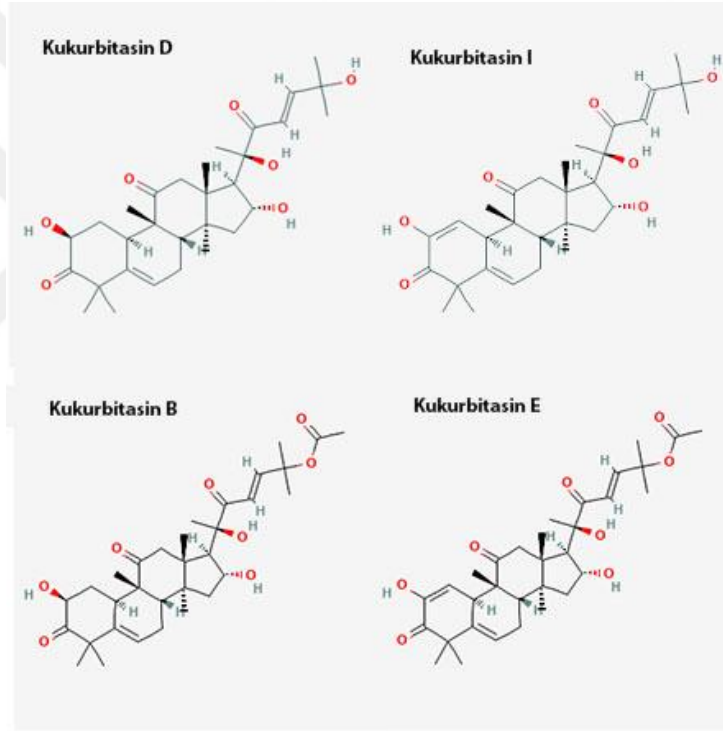
Tablo 3. Doğal bileşiklerin antikanser aktiviteleriyle birlikte kapsamlı listesi

Kaynak: Hashem ve ark.(172)

Doğal Bileşik	Kaynak	Kanser türü	Etki ettiği moleküler mekanizma
Formononetin	Red clover	Gastric cancer	- Inhibition of cell proliferation in MGC803 cells - Inhibition of the migration in SGC7901 tumor cells via Wnt/β-Catenin and Akt/ mTOR pathway
Honokiol	<i>Magnolia officinalis</i> [Magnoliaceae]	Colon cancer, Oral cancer, Thyroid cancer	- Recruitment of Jagged-1 and Hes-1 towards downstream gene target - Downregulation of CSC marker DCLK1 - Downregulation of CD44 and Wnt / β-catenin (SP) receptor inhibitor
Curcumin	Turmeric	Colon cancer, Gastric cancer, AML, Breast cancer, Head and neck cancer, Lung cancer	- Reduction of CD44 and CD166 expression in chemoresistant colon cancer - Inhibition of tumor growth of ALDH+ /CD133 + cells - Downregulation of Gli-1, Notch-1, and cyclin D1 - Downregulation of the mRNA and the protein expression of cyclin D1
Urololic acid and Koetjapic acid	Apples, pears, and prunes	Colon cancer	Inhibition of STAT3 phosphorylation and induction of caspase-3 cleavage in ALDH(+)/CD133(+) colon cancer-initiating cells
Hesperidin	Citrus fruits	Non-small-cell lung carcinoma	Modulation of NF-κB signal transduction thereby mediating growth inhibition through apoptosis
Isobutyropheneone and Amicolid	<i>Centipeda minima</i> (L.) A. Braun & Asch. [Compositae]	Colon cancer	- Promotion of intracellular ROS production - Downregulation of NF-κB protein
Epigallocatechin gallate	Green tea	Skin cancer	Inhibition of PI3K1 activation
Gossypol	Cotton plants	Prostate cancer	- DNA damage induction, activation of p53, and induction of apoptosis - Inhibition of estrogen-induced cell proliferation
Ethoxy Mansonone G	<i>Manzonis gagei</i> J.R.Drumm. [Malvaceae]	Breast cancer	
Genistein	Soybeans and Soy products	Prostate cancer, Cervical cancer, Colorectal cancer, Non-small-cell lung carcinoma	- Inhibition of Hedgehog-Gli signaling and expression of CSC markers CD44 - p53 stabilization through APE1 pathway - Inhibition of Akt pathway
Sulforaphane	Cruciferous vegetables	Prostate and Pancreatic cancer	- Induction of apoptosis and inhibition of self-renewing potential, ALDH1 activity, clonogenicity, xenograft growth in pancreatic CSCs. Enhanced drug cytotoxicity when combined with other conventional drugs in prostate CSCs. - Inhibited relapse of gemcitabine-treated tumor cells in nude mice
Proanthocyanidins	Grape seeds	Pancreatic adenocarcinoma	Reduction of NF-κB expression and reversal of the epithelial-mesenchymal transition process
Methyl antcinatate A	Antrodia camphorate	Breast cancer	- Downregulation of heat shock protein 27 - Upregulation of IL6 and p53 expression
Oridonin	<i>Roblosia rubescens</i> [Lamiaceae]	Breast cancer	- Downregulation of Jagged2 expression and Notch1 activity - Activation of the PI3K/PTEN/ Akt/mTORC1 and WNT/ β-catenin pathways
Resveratrol	Grapes	Head and neck cancer, Gastric cancer, Thyroid cancer, Lung cancer	Downregulation of ALDH1 and CD44 in HNC-TICs in a dose-dependent manner
Ouggulsterone	<i>Commiphora mukul</i> (Hook. Ex Stocla) Engl. [Burseraceae]	Colon cancer, Prostate cancer, Head and neck cancer	- Activation of caspase-9, caspase-8, and caspase-3 - Induction of cell death in PC-3 cells - Induction of apoptosis in HT-29 cells by activating caspase-3 and - 8 - Downregulation of cIAP1, cIAP2, and Bcl-2 levels and upregulation of truncated Bid, Fas, p-JNK, and p-c-Jun
Emodin	Rhubarb	Prostate cancer	Activation of Notch signaling pathway
Artesunate	<i>Artemisia annua</i> [Compositae]	Chronic myeloid leukemia	Inhibition of VEGF expression
Allicin	Garlic	Ovarian cancer	Activation of JNK pathway
Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)	Propolis of honeybee hives	Prostate cancer	Induction of cell G1 or G2/M cell cycle arrest
Brinacine A (diterpenoid)	<i>Hericum erinaceum</i>	Gastrointestinal cancer, Colorectal cancer	- ROS-mediated cell cycle arrest - Attenuation of NF-κB activity in cancer stem cells
Morusin	<i>Morus alba</i> L. [Moraceae]	Cervical cancer	Downregulation of the PI3K/Akt/mTOR pathway
Deoxyshikonin	<i>Arnebia euchroma</i> [Boraginaceae]	Colorectal cancer, Glioma	Growth inhibition and apoptosis induction by modulating Bcl-2, Bax, and STAT3 proteins
Apigenin	<i>Scutellaria spp</i>	Colorectal cancer, Lung Cancer, Osteocarcinoma, Liver Cancer, Melanoma, Prostate cancer	- Induction of cell cycle arrest at G2/M phase - Promotion of different anti-inflammatory pathways, including p38/MAPK and PI3K/Akt - Alteration of Raf-1 kinase mediating apoptosis
Paclitaxel	Pacific yew tree	Endometrial cancer, Sarcoma, Cervical cancer, Gastroesophageal cancer, Prostate cancer, Head and neck cancer	Activation of MEK-independent signaling pathway
Tannins/ Tannic acid	<i>Syrigium guineense</i> , Gall nuts	Triple-negative Breast cancer, Colon cancer, Lung cancer, Liver cancer, Ovarian cancer, Prostate cancer, Pancreatic cancer, Embryonic carcinoma	- Inhibits cell proliferation via Wnt3a-induced β-catenin - Downregulate JAK/STAT pathway - Inhibit cell cycle progression by G1/S phase arrest - Decrease TGF-β induced EMT and NF-κB activation - Act synergistic with cisplatin and oxaliplatin - Promotes TRAIL-induced extrinsic apoptosis
Calotropin	Asclepiadoideae family	Colon cancer	Inhibits β-catenin
Quercetin	Nuts, tea, onions, apple and in plant sources	Colorectal cancer, Triple-negative Breast cancer	- Inhibits phosphorylation of GSK-3β - Upregulate E-cadherin
Lycopene	Red fruits and vegetables	Prostate cancer	- Decrease cyclin E expression - Inhibits β-catenin - Inhibits phosphorylation of GSK-3β

2.7.1. Kukurbitasinlerin biyolojik aktiviteleri

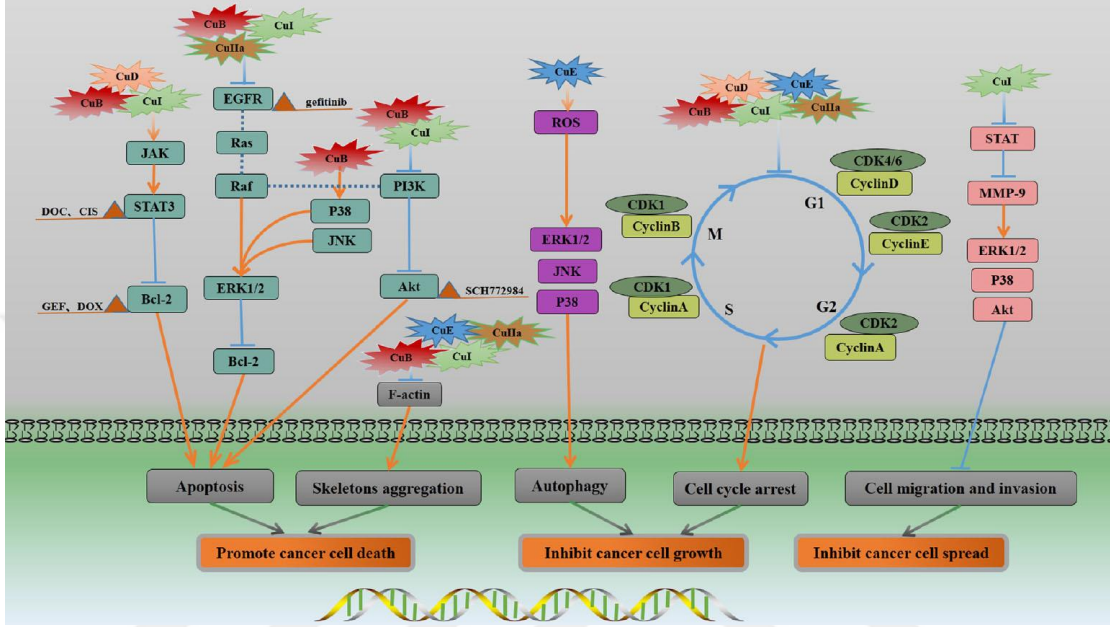
Cucurbitaceae bitki familyasında yaygın olarak bulunan kukurbitasin türleri; antikanser, anti-inflamatuar, antiviral ve hepatoprotektif etki gibi geniş spektrumlu biyolojik etkilere sahip olan doğal tetrasiklik triterpenoidlerdir (174). Biyolojik aktivitelerinin keşfedilmesiyle birlikte yaklaşık 30 farklı bitki türünden izole edilen kukurbitasinler, tetrasiklik iskeletindeki yan grupların varlığına göre A'dan T'ye 12 alt katagoride sınıflandırılmıştır. *Cucurbitaceae* familyasındaki bitkilerde en yüksek içeriğe sahip kukurbitasin türleri B ve D olmakla birlikte biyolojik aktiviteleri en çok çalışılan kukurbitasin türleri B, D, E ve I'dır (Şekil 15) (18).



Şekil 15. Kukurbitasin B, D, E ve I'nın moleküler yapısı (18)

Kukurbitasinlerin bitkilerden izole edilmesi, saflaştırılması gibi metodolojik bilgiler ve antioksidan, anti-inflamatuar, immün modölatör, antikanser gibi biyolojik aktivitesine ait özellikler birçok araştırmada raporlanmıştır (175, 176). Bunlardan antikanser ve anti-inflamatuar etki, kukurbitasinlerin ana biyolojik aktivitesi olma özelliğiyle ön plana çıkmaktadır. Kukurbitasinlerin antikanser aktivitesi, karaciğer kanseri, meme kanseri, kolon kanseri, pankreas kanseri, yumurtalık kanseri, kolon

kanseri, osteosarkom, skuamöz hücreli karsinom ve akciğer kanserinde *in vitro* ve *in vivo* olarak araştırılmıştır (177-184). Kukurbitasinler antikanser etkilerini, kanser hücre proliferasyonunun inhisiyonu, hücre döngüsü durması, apoptoz indüksiyonu, anjiyogenez ve metastaz inhibisiyonu, protein iskeletini yok etme ve otofaji dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar aracılığıyla gösterir (Şekil 16) (185).



Şekil 16. Kukurbitasinlerin etki ettiği hücre içi moleküler mekanizmalar

Kaynak: Jing ve ark.(174)

Kukurbitasinlerin belirli bir hücre veya dokuya spesifik proliferasyonu inhibe etme özelliği bildirilmemiştir. Kukurbitasinlerin hücre ve doku spesifikliği olmadan birçok karsinojenik hücrede antiproliferatif aktivite gösterdiği ifade edilmiştir (174). Ayrıca kukurbitasinlerin kanserde aşırı aktive olan spesifik bir sinyal yolundan ziyade JAK/STAT3, Ras/Raf/MEK/ERK, MAPK, PI3K/AKT/mTOR ve otofaji gibi çoklu sinyal yollarına etki ederek antikanser özellik gösterdiği ifade edilmiştir (20). Kukurbitasinlerin çeşitliliği, belirli doku spesifitesi olmayışı ve çoklu sinyal yollarına etki etme özelliği onların birçok kanser türünde sitotoksikite göstermelerine olanak sağlamaktadır. Ayrıca kukurbitasinler, polifenoller gibi antikanser özellik gösteren başka doğal bileşiklerle karşılaştırıldığında daha güçlü sitotoksik özellik gösterdiği ortaya konmuştur. Birçok araştırmada kukurbitasinlerin, kanserli hücre proliferasyonunu inhibe etme gücünün bir göstergesi olan maksimum inhibisyon konsantrasyonunun (IC_{50}) diğer bileşiklerden daha düşük olduğu ifade edilmiştir. Bazı kukurbitasinlerin mikromolar ve

hatta nanomolar konsantrasyonda bile hücre büyümesini engellediği bildirilmiştir (182, 186-188).

Klinikte kullanılmak üzere birçok antikanser ilacı geliştirilmesine rağmen bu ilaçların uzun süreli kullanımı antikanser ilaçlara karşı direnç gelişmesine neden olmaktadır (189). Kukurbitasinler, çeşitli sinyal yollarını baskılayarak antikanser etkiler gösterir ve kukurbitasinlerin hedeflediği sinyal yollarının bazıları antikanser ilaçlarıinkiyle benzerlik gösterir. Bu nedenle, ilaca dirençli kanser hücrelerinde antikanser ilaçların antiproliferatif etkinliğini arttırmak için kukurbitasinlerin kombinasyon halinde kullanılabilirliği denenmiştir (19, 190-192). Kukurbitasinlerin düşük konsantrasyonlarda antikanser aktiviteye sahip olmaları, yüksek konsantrasyonlarda kullanılan diğer kemoterapi ilaçları ile kombine edildiğinde kemoterapötiklerin uygulama dozunu azaltılabilir. Ayrıca, kukurbitasinlerin küçük molekül antineoplastik ilaçlarla kombinasyonunun hücre direncini azaltarak ilaçların etkinliğini arttırdığı bildirilmiştir (Tablo 4) (174).

Tablo 4. Kukurbitasinler ve küçük molekül ilaçların kanser hücre hatlarında sinerjistik etkisi

Kaynak: Jing ve ark.(174)

Kukurbitasin	Küçük molekül yapıları ilaçlar	Kanser hücre hatları	Sinerjistik etki mekanizması
Cucurbitacin B	Gemcitabine	Breast cancer cell: MDA-MB-231	Induce apoptosis
	Docetaxel	Breast cancer cell: MDA-MB-231	Induce apoptosis
	Ionizing radiation	Breast cancer cell: aggressive 4 T1	Induce apoptosis and arrest cell cycle in G2/M phase
	Imatinib mesylate	Breast cancer cell: MCF-7	Inhibit cell proliferation and induce apoptosis
	SCH772984	Pancreatic cancer cells: BxPC-3, MiaPaCa-2, HPAC, CFPAC, ASPC-1	Induce apoptosis
	Gemcitabine	Pancreatic cancer cells: MiaPaCa-2 and PANC-1	Inhibit cell proliferation
	Gefitinib	Colon cancer cells: HT-29 and HCT-116	Inhibit cell growth and arrest cell cycle
	Imatinib mesylate	Colon cancer cell: SW480	Inhibit cell proliferation and induce apoptosis
	Cisplatin	Ovarian cancer cell: A2780CP	Increase the sensitivity of cisplatin
	Cerulenin	Osteosarcoma cell: U2-OS	Induce apoptosis and inhibition of SENP5 expression
	Methotrexate	Osteosarcoma cells: MG-63 and SAOS-2	Induce apoptosis and arrest cell cycle
	Docetaxel	Squamous cell carcinoma cell: Hep-2	Induce apoptosis and arrest cell cycle
	Cisplatin	Squamous cell carcinoma cell: cutaneous squamous cell carcinoma	Inhibit cell proliferation
	Cisplatin	Squamous cell carcinoma cell: Hep-2	Inhibit cell growth, arrest cell cycle and induce apoptosis
Cucurbitacin E	Doxorubicin	Hepatocellular carcinoma cell: H22	Inhibit cell proliferation
	Curcumin	Hepatocellular carcinoma cell: BEL7402/5-Fu	Induce apoptosis
	PS-341	Glioblastoma multiforme	Induce apoptosis
	ATO	Lymphoma cell: Ramos	Induce apoptosis
	Cisplatin	Breast cancer cells: Bcap-37 and MDA-MB-231	Inhibit cell growth
DACE ^a	Doxorubicin	Ovarian sarcoma: M5076	Inhibit DOX efflux and increase the DOX concentration in the tumor
	Paclitaxel	Gastric cancer cell: NCI-N87	Enhance the cytotoxicity of DOX in cells
Cucurbitacin D	Doxorubicin	Lung cancer cell: A549	Reduce tumor volume and inhibit cell proliferation
	Docetaxel	Breast cancer cell: MCF-7/ADR	Inhibit cell proliferation and induce apoptosis
Cucurbitacin I	Irinotecan	Prostate cancer stem cell	Inhibit cell growth and cloning potential
	5-Fu	Colon cancer cells: SW620 and LS174T	Inhibit cell proliferation
	Doxorubicin	Colon cancer cell: COLO205	Enhance anti-migration and invasion effects and increase the sensitivity of cells to chemical drugs
		Ovarian sarcoma: M5076	Enhance cytotoxicity and reduce tumor volume and weight

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Bitki Ekstraktının Hazırlanması ve Kukurbitasinlerin İzolasyonu

Bitki ekstraktının hazırlanması ve kukurbitasinlerin izolasyonu daha önce Tosun ve Baysar tarafından gerçekleştirilen metot esas alınarak ve modifiye edilerek hazırlandı (176). Bitki ekstraksiyonu ve saflaştırma ile ilgili olan çalışmalar genel olarak 3 aşamada gerçekleştirildi. İlk olarak Osmaniye bölgesinde yetişen acı kavun bitkisi mevsiminde toplandı. Olgun *Ecballium elaterium* meyveleri sıkılarak meyve suyu elde edildi. Daha sonra bu meyve suyunun, önce hekzan daha sonra kloroform ile ekstraksiyonu gerçekleştirildi ve kloroform faza geçen etken madde evaporatörde kloroform uzaklaştırılması ile konsantre hale getirildi. İkinci aşamada, ham özütün analizi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile gerçekleştirildi. Tosun ve Baysar'ın daha önce ifade ettiği kukurbitasin saflaştırma metodu daha efektif bir hale getirilerek, izokratik elüsyonla 1 ml/dk akış hızı, 40°C'de C18 kolon, %45-55 Asetonitril-su mobil fazı uygulanarak CuD ve CuI'nın daha kısa sürede ayrılma işlemi gerçekleştirildi. Kromatogramdaki CuD ve CuI fraksiyonları, kendi standartları ile karşılaştırılarak belirlendi ve fraksiyonlar bir fraksiyon toplayıcı ile ayrıldı. Üçüncü aşamada ise kukurbitasinlerin HPLC fraksiyonları liyofilize edildi. Hücre kültürü için kullanıma hazır olan liyofilize edilmiş kukurbitasin D ve I'nın bir kısmı daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere dondurularak -80 °C'de muhafaza edildi.

3.2. HepG2 hücre kültürü koşulları

İnsan hepatoselüler karsinom hattı HepG2, %1 penisilin-streptomisin (Pen-Strep) ve %10 fetal sığır serumu (FBS) içeren düşük glukozlu Minimum Essential Medium- α (Biological Industries, MEM- α , Ref: 01-042-1A, Lot: 2112252) ile kültürlendi. HepG2 hücre hattı, 37°C'de ve %5 CO₂ ortamda, su ceketli bir inkübatörde (Sanyo, MCO-19AIC (UV)) inkübe edildi. Tüm hücre kültürü deneyleri için laminar flow kabini (Esco Class II BSC, Sentinel Gold) kullanıldı. Hücre büyümesinin durumu düzenli olarak gözlemlendi, hücre büyüme durumuna göre medium değiştirildi ve hücre yoğunluğu %90'a ulaştığında hücre pasajı yapıldı.

3.2.1. Hücreleri Dondurma

Öncelikle hücrenin kültüre edildiği flask içinden medium atıldı. Flaska yapışık olan hücreler PBS ile yıkanıp atıldı. Flaska 2-3 ml kadar Tripsin ilave edilip flask aşağı yukarı, sağ sol hareket ettirilip 5-10 dk inkübatörde bekletildi. Flaska 10 ml medium ilave edildi ve hafifçe karıştırıldı ve pipetaj yapıldı. Hücreler 15 ml'lik falkon tüpe alındı. Falkon tüp 300 RPM'de 4 dk santrifüj edildi. Tüpten pipet ile dikkatlice medium alınıp atıldı. Freezing medium pellete alındı ve 1 ml olacak şekilde viallere ayrılarak dondurulacak olan hücrelerin herbir vial'deki hücre sayısı dikkate alınmak suretiyle pellete ne kadar hacimde freezing medium konulacağı belirlendi. Önce -20°C'de donduruldu, daha sonrasında -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.2. Donmuş Hücreyi Çözdürme İşlemi

Cryo vialdeki hücreler 37 °C su banyosunda yavaşça çalkalayarak çözdürüldü. Hücreler çözünür çözünmez hemen su banyosundan çıkarılıp (2-3 dk içinde çözünme tamamlanır) içinde 9 ml medyum (%10 fetal bovin serum içeren medyum) bulunan bir santrifüj tüpüne vial içeriği boşaltılıp 125 x g'de 5-7 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılıp pelet kısmının üzerine bir miktar medyum konuldu. Dikkatlice pipetaj yapıldı. 75 cm²'lik flaska toplam hacim 15-20 ml olacak şekilde ekim yapıldı. %5 CO₂ sağlayan karbondioksit inkübatöründe hücreler inkübe edildi.

3.2.3. Hücre Pasajlama

Pasajlama işlemi 75 cm²'lik flaska yapıldı. Inkübatörden çıkartılan flaskın medyumunu atıldı. 5-6 ml PBS ilave edilip yıkandı. Üzerine 2-3 ml %0.25 lik (w/v) Tripsin-EDTA eklendi. Flask nazikçe aşağı yukarı hareket ettirildi. 5 dk kadar inkübatörde bekletildikten sonra hücreler 6-8 ml medyum içine alındı (15 ml'lik falkon tüpe alınır ve hafifçe pipetaj yapılır). Medyum eklendikten sonra flask kuzey, güney, doğu batı hareketiyle homojen dağılması sağlandı. Daha sonra flask karbondioksit inkübatörüne konulup inkübe edildi.

3.3. CuD, CuI ve Sorafenib'in Hazırlanması ve Uygulanması

Çalışmada *E. elaterium* olgun meyvelerinden izole edilip liyofilize hale getirilen Kukurbitasin D, I ve Bayer firmasından temin edilen Sorafenib kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin D, I ve Sorafenib uygulama gruplarını hazırlamak için öncelikle liyofilize kukurbitasinler ve Sorafenib DMSO kullanılarak çözme işlemi gerçekleştirilerek ana stoklar elde edildi. Uygulama konsantrasyonları uygulanacağına ise MEM- α besiyer kullanılarak önce 100 μ M ara stok, daha sonrasında ise besiyer ile

nihai uygulanacak dozlar (0.5, 1, 5 ve 10 μ M) hazırlanmıştır. Plakalara veya flasklara ekilen hücreler 24 saat süreyle inkübe edildikten sonra uygulama yapılmayan (kontrol grubu) dışındaki hücrelerin üzerine hazırlanan Kukurbitasin D, I ve Sorafenib uygulandı. Hazırlanan CuD, CuI ve Sorafenib konsantrasyonlarında %0.1'in altında kullanılan çözücünün (DMSO) sitotoksik etki gösterip göstermediğini belirlemek için kontrol gruplarında da eşit miktarda çözücü içeren besiyer kullanılarak uygulama grupları ile aynı sürede inkübe edildi.

3.4. MTT ile Hücre Canlılığı Testi

MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) uygulaması; MTT tetrazolyum tuzlarının bir elektron bağlama reaktifi içinde formazan'a dönüşmesi esasına dayanır. Tetrazolyum tuzları mitokondride solunum zincirinde oluşan süksinat-tetrazolyum redüktaz enzim sistemi ile formazana dönüşür. Bu nedenle bu reaksiyon sadece canlı hücrelerde gerçekleşebilir. Bunun vasıtasıyla MTT testi canlı hücre oranını yansıtmaktadır. Araştırmamızda 96'lık kültür plakasına her kuyucukta 2×10^3 hücre olacak şekilde standart hücre ekimi yapıldı. Hücreler konfluent olduktan sonra farklı dozlarda etken madde içeren kültür medyumundan kuyucuklara 100 μ l konuldu. 1-4 gün aralığında +37°C %5'lik karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyondan sonra ekilen hücrelere 10 μ l MTT solüsyonu (son konsantrasyonu 0.5 mg/ml) her kuyucuğa ekildi ve yaklaşık 4 saat inkübe edildi. Bu inkübasyon aşamasından sonra suda çözünmeyen formazan boyası oluşur. İlave bir aşamayla çözünebilir bir hale getirilmesi gereklidir. Bunun için oluşan formazan kristalleri DMSO ile çözüldü. Her kuyucuğa 100 μ l DMSO eklendi ve tamamen çözünen kristaller 570-650 nm dalga boyunda mikropilok okuyucu ile okundu. Ölçülen absorbans direk olarak canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Tüm MTT analizleri 10 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. İstatistiksel analizlerde bu 10 tekrarın sonuçları değerlendirildi MTT verileri ile elde edilen absorbanslar normalleştirildi ve %50 inhibitör konsantrasyonları (IC₅₀), Prism 5.0 yazılımı (GraphPad) kullanılarak hesaplandı. Bunun için, değişken eğimli sigmoidal doz-yanıt formülüne doğrusal olmayan regresyon ile hesaplama yapıldı.

3.5. CuD ve CuI ile Sorafenibin Kombine Uygulaması

MTT testinde uygulanan dozlar kombine uygulamalarda da değerlendirildi. Bunun için, her bir bileşik 0.1, 0.5, 1, 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarda hazırlanıp HepG2 hücrelerine kombine olarak uygulandı. 24 saatlik inkübasyondan sonra MTT testi daha önce açıklandığı gibi yapıldı. Kombine ilaç etkisi Chou ve Talalay'ın (193, 194) kombinasyon

indeks yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Sinerjizm, daha önce tarif edilmiş olan Compusyn (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ, ABD) yazılımı ile (195), Chou ve Talalay'ın (196) medyan etki ilkesinden türetilen işlemler aracılığıyla analiz edildi. Araştırmada elde edilen MTT verileri, bu istatistiksel analizi gerçekleştirmek için kullanıldı. Kombinasyon indeksi (CI), aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanan sayısal bir indekstir (197): $CI = D_1 / (D_x)_1 + D_2 / (D_x)_2$, burada D_1 ve D_2 , kombinasyon halinde uygulanan reaktif 1 ve 2'nin konsantrasyonlarıdır. Toplam ilaç etkisinin %x'ini elde etmek için, $(D_x)_1$ ve $(D_x)_2$ ise aynı etkinliği elde etmek için ayrı ajanların konsantrasyonlarını temsil eder. CI değeri, iki ilacın ($CI > 1$, antagonizma; $CI = 1$, additif; $CI < 1$, sinerjizm) farmakolojik etkileşiminin matematiksel ve nicel bir temsidir. Büyüme inhibisyonu testinden ve bilgisayarlı yazılımdan elde edilen verilere dayanarak, 0.05–0.9 (%5–90 büyüme baskılaması) aralığında, etkilenen fraksiyon (Fa) düzeylerinden CI değerleri üretildi. Fa-CI grafiği ve Fa-log (CI) grafiği, çeşitli baskılayıcı seviyelerde gerçek CI değerlerini gösterir. Doz reduksiyon indeksi (DRI) değeri, eşdeğer bir etkiyi sürdürmek için başka bir bileşikle birlikte kullanıldığında bir bileşiğin konsantrasyonunun azaltılabileceği dereceyi temsil eder. 1'den büyük bir DRI değeri, kombinatorial ilaçların herhangi bir spesifik bileşeninin dozunun, sitotoksitenin normal hücrelerde neden olduğu yan etkileri iyileştirmek için azaltıldığı koşullar altında terapötik önemi ifade ettiği için pratik öneme sahiptir. Fa-DRI grafiği ve Fa-log (DRI) grafiği, bilgisayar simülasyonlarına dayalı olarak her ilacın farklı seviyelerdeki DRI değerlerini gösterir. Fa ise, hücre ölümünün 0 (hücre ölümü yok) ile 1 (hücrelerin %100'ünün ölümü) arasında değişen fraksiyonudur. Klasik izoblogramlar, %50, %75 ve %90 canlılığı inhibe eden ilaç konsantrasyonlarının (tek başına ve kombinasyon halinde) çizilmesiyle de elde edilmiştir. Bu çizimde, kombinasyon veri noktaları hipotenüs, sol alt veya sağ üstte yer alıyorsa, sırasıyla bir additif, sinerjizm veya antagonizm etkisi önermektedir.

3.6. Apoptozun Annexin V/PI Boyaması ile Belirlenmesi

Kukurbitasinlerin ve Sorafenibin HepG2 hücre hattı üzerindeki doz bağımlı apoptotik etkisini ortaya çıkarmak için Annexin V Apotoz testi ile flow sitometri analizleri yapıldı. Bunun için ticari Annexin V Apotoz kiti kullanıldı (BD Pharmingen, FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, Cat: 556547). Apoptotik etkinin tespiti için 6'lı plakalara ekilen hücreler 0, 0.5, 1, 5 ve 10 μ M konsantrasyonda Kukurbitasin D, I ve Sorafenib uygulamasından 24 saat sonra hücreler tripsinize edildi. 130xg'de 6 dk santrifüj edildikten sonra hücre peletleri elde edildi. Elde edile peletlere medyum ilave edilip

hücreler sayıldı. 1 milyon hücre tüpe alınıp PBS ile yıkandı ve santrifüj işlemi tekrarlandı. 1 ml 1X Binding Buffer ilave edilip resüspense edildi. 100 µL Binding Buffer karışımına 5 µL FITC Annexin V ve 5 µL PI boya ilave edildi. Hafifçe vortekslendi ve oda sıcaklığında 15 dk karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 400 µL 1X Binding Buffer ilave edildi. 1 saat içerisinde analiz yapıldı. Apoptoz/nekroz durumu, flow sitometre (Navios EX, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, ABD) kullanılarak belirlendi. Verilerin analizi için ise Kaluza Analysis yazılımı (Beckman Coulter, ABD) kullanıldı.

3.7. Hücre Döngüsü Analizi

HepG2 hücre hattında Kukurbitasin D, I ve sorafenibin hücre döngüsündeki rolünü incelemek amacıyla, Propidium Iodide Cell Cycle Analysis Kit (Abcam, ab139418, Lot: GR3258937-1) ile hücre döngüsü analizi gerçekleştirildi. Analiz için öncelikle 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş HepG2 hücrelerine Kukurbitasin D, I ve Sorafenib'in farklı dozları 24 saat süreyle uygulandı. Hücreler tripsinize edilip 500xg'de 5 dk santrifüj edildi. 1 ml 1X PBS ile pellet resüspense edilip yıkandı. 500 xg'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pellete 400 µL ice cold PBS ve 800 µL ice cold %100 etanol ilave edildi. Hücrelerin fiks olması için +4°C'de en az 2 saat bekletildi. Fiks edilmiş hücreler 500 xg'de 5 dk santrifüj edildi. Pelletin üzerine 1 ml PBS eklendi ve 500 xg'de 5 dk santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. 200 µL 1X PI + RNase çözeltisi dikkatle eklenip resüspense edildi. Karışım, 37°C'de, karanlıkta 20-30 dk inkübe edildi. Tüp buza alınıp karanlıkta muhafaza edilerek analizi gerçekleştirildi. Hücre döngüsü durumu, flow sitometre (Navios EX, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, ABD) kullanılarak belirlendi. Verilerin analizi için ise Kaluza Analysis yazılımı (Beckman Coulter, ABD) kullanıldı.

3.8. Yara İyileşmesi Analizi

24 kuyucuklu plakanın kuyucuklarına Ibidi marka 2 kuyucuklu kültür aparatı steril pens ile aktarıldı. Hücre süspansiyonunu 7×10^5 konsantrasyonda %10 FBS'li MEM alpha ile hazırlanarak insertin her bölümüne 70 µL ilave edildi. Kuyucukların konfluent olması için plaka 37 °C'de ve %5 CO₂'de 24 saat inkübatörde bekletildi. İnkübasyondan sonra kültür aparatları steril pens ile nazikçe çıkarıldı. Yapışmayan hücreleri uzaklaştırmak için, kuyucuklar 1 mL MEM alpha ile yıkandı. insertler tarafından oluşturulan boşluklar invert mikroskopta (Leica DMIL LED) görüntülenip sıfır zaman (T0) olarak kaydedildi. Kukurbitasinler ve sorafenib belirli konsantrasyonlarda büyüme medyumuyla hazırlanıp kuyucuklara ilave edildi. Kontrol kuyucukları için sadece 1 mL MEM alpha kullanıldı. Plaka test bileşikleri ile inkübatörde bekletilip sırasıyla 24 saat

(T24) ve 48 saat(T48) görüntüleri kaydedildi. İlk boşluk genişliğiyle son boşluk genişliği karşılaştırılarak yara yüzdesi Image J yazılım versiyonu 1.53e ile hesaplandı.

3.9. Mitokondriyal Membran Potansiyeli Analizi

HepG2 hücrelerini 96'lı plakaya kuyucuk başına 10.000 hücre olacak şekilde ekildi. Kuyucukların konfluent olması için 24 saat inkübatörde bekletildi. CuD ve CuI'nın 1-5 μ M dozu ve sorafenibin 5-10 μ M dozu büyüme medyumuyla hazırlanıp kuyucuklara ilave edildi. Deney grupları 48 saat inkübe edildikten sonra pozitif kontrol için ayrılan gruplara FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone) ve mitokondriyal membran potansiyeli ölçülecek hücre gruplara JC-1 katyonik karboksiyanin boyası ilave edildi. FCCP içeren kuyucuklar 4 saat JC-1 boyası içeren gruplar 15 dk inkübatörde bekletildi. Plaka, floresan mikropilaka okuyucuda excitation: 535 ± 17.5 nm ve 475 ± 20 nm, emisyon: 590 ± 17.5 nm ve 530 ± 15 dalga boyunda okutuldu. Ayrıca plakalar Texas Red ve Rhodamine Green filtresi kullanılarak invert floresan mikroskopunda (Zeiss Axio vert) görüntülendi. Tüm florometrik ölçümler üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. İstatistiksel analizlerde bu üç tekrarın sonuçları değerlendirildi

3.10. qRT-PCR ile mRNA Gen Ekspresyon Düzeylerinin Analizi

Gen ekspresyon analizleri, İnönü Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. HepG2 hücrelerine Kukurbitasin D, I ve Sorafenib'in ayrı ayrı ve kombine uygulanmasından sonra β -aktin, Caspase-3, Bax, Bcl-xL, Erk, MAPK, Akt, mTOR ve Stat3 genlerinin ifade düzeylerinin karşılaştırmalı değerlendirmeleri yapıldı. Bu genlerin mRNA ifade düzeylerini belirlemek için kantitatif Real-time PCR yöntemi kullanılmıştır. Tüm qRT-PCR analizleri üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. İstatistiksel analizde bu üç tekrarın sonuçları değerlendirildi.

3.10.1. Hücrelerden Total RNA izolasyonu

Hücrelerden total RNA saflaştırılmasında GeneAll firmasından alınan "Hybrid-R Total RNA Isolation Kit" (Cat no: 305-101) izolasyon kiti kullanıldı. İlgili firmanın test protokolüne uygun şekilde tüm basamaklar gerçekleştirilmiştir. Hücrelerden elde edilen RNA numunelerinin %1 agaroz jelde, 1X TBE tamponu ile 100 mV'de elektroforezde yürütülmesi ile RNA'nın saf olup olmadığı kontrol edilmiştir. Saflaştırılan RNA'larda 28S ve 18S ribozomal bantlarının varlığı ve herhangi bir yıkılım olup olmadığı kontrol edildi. Ek olarak, hücre örneklerinden izole edilen toplam RNA'ların saflığı ve niceliği

spektrofotometre ile kontrol edildi. Spektrofotometrik analizin sonuçları, numunelerin saf RNA içerdiğini gösterdi. Numunedeki RNA miktarını belirlemek için "Biotek" marka bir mikropilaya okuyucuda "Gen5" programını kullanarak numunenin 260 ve 280 nm'de absorbansı ölçüldü ve 260/280 absorbans oranı değerlendirildi. 260/280 oranı yaklaşık 2 olan numuneler cDNA sentezi için kullanıldı.

3.10.2. cDNA Sentez Protokolü

cDNA sentezinde Roche firmasından temin edilen "EvoScript Universal cDNA Master" kiti (Ref No: 07912374001, Lot: 55173700) kullanıldı. 100 µl'lik PCR tüpüne Kukurbitasin D, I ve Sorafenib'in tüm doz grupları için 4500 ng/µl toplam RNA, 1 µl OligodT18 (50 pmol/µl), 1 µl Random Hexamer Primer (600 pmol/µl) ve toplam hacim 13 µl olacak şekilde bidistile su eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra 65°C'de 10 dakika PCR cihazında ısıtıldı. Bu karışımın üzerine 4 µl "Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer", 0.5 µl "Protector RNase Inhibitor", 2 µl Deoxynucleotide Mix (her nükleotid için 10 mM konsantrasyonda), 0.5 µl "Transcriptor Reverse Transcriptase" enzimi eklendi ve böylece toplam hacim 20 µl oldu. Karıştırılan numuneler PCR cihazında 25 °C'de 10 dakika, 55 °C'de 60 dakika ve 85 °C'de 5 dakika ısıtıldı daha sonra -20 °C'de analize kadar saklandı.

3.10.3. Gerçek Zamanlı PCR Çoğaltım Protokolü

Caspase-3, Bax, Bcl-xL, Erk, MAPK, Akt, mTOR, Stat3 ve β-Aktin cDNA'larının çoğaltılması işlemi, Roche Light Cycler 96 RT-PCR cihazında, Roche firmasından temin edilen "LightCycler 480 Probes Master (Ref No: 04707494001)", Erk (TIB MOLBIOL reference no: 021123041, Product Description No: 2145427-8), MAPK (Roche Catalog Assay Id: 100597, Config No: 100150227), Akt (Roche Catalog Assay Id: 100816, Config No: 100150218), mTOR (Roche Catalog Assay Id: 110014, Config No: 100150209), Stat3 (Roche Catalog Assay Id: 110694, Config No: 100150236), Caspase-3 (TIB MOLBIOL reference no: 021123041, Product Description No: 2145425-6), Bax (TIB MOLBIOL reference no:021123041, Product Description No:2145421), Bcl-xL (TIB MOLBIOL reference no: 021123041, Product Description No:2145423-4) ve β-Actin (Roche Catalog Assay Id: 143636, Config No: 100150254) genlerine spesifik hidroliz problu primerler kullanılarak yapıldı. qRT-PCR işleminin her aşaması ilgili firmaların direktiflerine uyularak gerçekleştirildi. Caspase-3, Bax, Bcl-xL, Erk, MAPK, Akt, mTOR, Stat3 ve β-Aktin genlerine spesifik hidroliz problu primerlerinin dizilimleri **Tablo 5'**de verilmiştir.

Tablo 5. Gen Primerlerinin Dizilimleri

Gen	Primer dizisi (Forward ve Reverse)
<i>β-Aktin</i>	F: 5' TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA R: 5' CGTGGATGCCACAGGACT
<i>Erk</i>	F: 5' CTACACCAACCTCTCGTACATC R: 5' CAGTAGGTCTGGTGCTCAAA
<i>MAPK</i>	F: 5' CACACAGGGTTCCTGACAGA R: 5' ATATCAATGGACTTGGTGTAGCC
<i>Akt</i>	F: 5' GCAGCACGTGTACGAGAAGA R: 5' GGTGTCAGTCTCCGACGTG
<i>mTOR</i>	F: 5' GCACCATCAACCTCCAAAA R: 5' CCATTCCAGCCAGTCATCTT
<i>Stat3</i>	F: 5' TCCTGAAGCTGACCCAGGTA R: 5' GGTCGTTGGTGTACACAGAT
<i>Caspase-3</i>	F: 5' TGGATTATCCTGAGATGGGTTTAT R: 5' CTGAATGTTTCCCTGAGGTTTG
<i>Bax</i>	F: 5' CTCTGAGCAGATCATGAAGACA R: 5' GACACTCGCTCAGCTTCTT
<i>Bcl-xL</i>	F: 5' AGCTTGGATGGCCACTTAC R: 5' TGCTGCATTGTTCCCATAGA

3.11. Western Blot Analizi

Western Blot analizleri, Tıbbi Biyokimya araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Kanserli hücrelerin gelişmesi ve çoğalmasında birçok sinyal yolu rol almaktadır. Araştırmamızda ise kritik öneme sahip olan Akt/mTOR, Raf/Mek/Erk ve EGFR/VEGF sinyal yollarının yanı sıra apoptotik düzenlenmenin göstergesi olan Bax, Bcl-xL, Caspase-9 ve MMP-2 proteinleri incelenmiştir. Çalışmamızda HepG2 hücrelerinde CuD, CuI ve Sorafenib'in etkilediği bu proteinlerin düzeylerini değerlendirmek için Western-Blot ile analizi yapıldı. Tüm Western-Blot analizleri üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. İstatistiksel analizde bu üç tekrarın dansitometrik analizleri değerlendirildi.

3.11.1. Numunenin Hazırlanışı

Western blot ile analizi yapılacak olan HepG2 hücreleri 6 kuyucuklu plakaya ekilerek 24 saat sonra, etken maddelerin belirlenen dozları uygulandı. 48 saat

inkübasyondan sonra kuyucuklar PBS ile yıkandı. Kuyucuklara 200 µL RIPA Buffer (50 mM tris HCl, 150 mM NaCl, % 1 NP-40, % 0.5 Sodyum Deoksikolat, 1 mM EDTA, % 0.1 SDS; pH: 7.4) konulup buz üzerinde 5-10 dk bekletildi. Hücreler tamamen kalktıktan sonra 4°C'de 20.000 g'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant toplandı, protein lizatı - 86°C'de muhafaza edildi.

3.11.2. Protein Konsantrasyonun Hesaplanması

Elde edilen lizatlardaki protein tayini, Lowry metoduna göre (198) ticari kit (BIO-RAD DC Protein Assay, U.S) kullanılarak gerçekleştirildi. Protein standartı olarak bidistile su içerisinde 0, 0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 7.5 ve 10 mg/ml konsantrasyonlarında sıgır serum albümini (BSA, Sigma) standartları hazırlandı. Kör olarak distile su kullanıldı. 96 kuyucuklu plakaya 5 µL örnek 25 µL assay reaktifi ve 200 µL boya reaktifinden konularak 15 dk karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, mikrolaka okuyucuda 750 nm'de absorbanları ölçüldü. Örneklerden elde edilen absorban değerleri, BSA standart absorbanlarıyla çizilen standart eğriye göre hesaplanarak protein örneklerinin konsantrasyonları µg/µl olarak belirlendi.

3.11.3. SDS-PAGE hazırlanması

SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi) jelinin hazırlanmasında Bio-Rad marka dikey elektroforez sistemi (Mini-PROTEAN Tetra System, Bio-Rad) ve güç kaynağı (Power Pac 3000, Bio-Rad) kullanıldı. SDS-Poliakrilamid jelin hazırlanması için aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulandı. Jel elektroforezi için jeller uygulama yapılmadan bir gün önce %5 stoklama, %10 ayırma jeli içerecek şekilde hazırlandı (**Tablo 6**). Jeller Running Buffer içinde +4°C bir gece bekletildi.

Tablo 6. Stoklama ve ayırma jelinin bileşenleri ve oranları

Bileşenler	%10 ayırma jeli karışımı	%5 stoklama jeli karışımı
Distile su	4.02 mL	3 mL
%30 Akrilamid stoğu	3.33 mL	660 µL
Tris tamponu	2.5 mL	1.26 mL
%10 SDS	100 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL
%10 APS	50 µL	25 µL

3.11.4. Elektroforetik Yürütme

Jeller Jel elektroforezi tankına yerleştirildi. Son konsantrasyonları 15 µg olacak şekilde protein miktarları hesaplandı ve örnekler 2X Sample Loading Buffer (Boster, AR0131-20) ile hazırlandı. Denatürasyon için, 95°C’de 6 dakika inkübe edildikten sonra, örnekler jel kuyucuklarına yüklendi. Örnekler, önce 80 V’ta 45 dakika daha sonra 100 V’ta 2 saat yürütüldü (Güç kaynağı: BIO-RAD, POWER PAC 3000).

3.11.5. Proteinlerin Membrana Transferi

Transfer işlemi için, semi-dry cihazının (BIO-RAD, Trans-Blot Turbo Transfer System) içine sırasıyla filtre, jel, PVDF membran ve filtre olacak şekilde yerleştirilerek transfer işlemi gerçekleştirildi. Semi-Dry transfer cihazı, 25 V’da 7 dakika ayarlanıp transfer yapıldı.

Bloklama

Transfer işlemi tamamlandıktan sonra proteinleri içeren membran 1 saat %5’lik süt tozu ve 1X TBST (10X TBS, Tween-20, ddH₂O) içeren tamponda çalkalamaya bırakıldı. Bloklama sonrasında ise membran 3 kez 1X TBST içerisinde 10 dakika boyunca yıkandı.

Primer Antikor ile İnkübasyon

Primer antikorlar 1X TBST çözeltisinde hazırlanmış %5’lik süt tozu içerisinde antikor ürecisinin western blot için önerdiği oranda dilüe edildi. Membran, analizi yapılacak primer antikoru ile +4°C’de gece boyunca çalkalanarak inkübe edildi. Ertesi sabah membran alınarak 3 kez 1X TBST ile 10 dakika boyunca yıkandı ve bağlanmayan antikorların uzaklaşması sağlandı. Araştırmamızda kullanılan primer antikorlara ait bilgiler **Tablo 7**’de verilmiştir.

Tablo 7. Çalışmada kullanılan primer antikorlara ait bilgiler

Antikor	Marka ve ürün kodu	Antikor kaynağı	Dilüsyon oranı
Akt	Cell Signaling Technology, 4691	Tavşan	1:1000
p-Akt	Cell Signaling Technology, 4060	Tavşan	1:2000
mTOR	Cell Signaling Technology, 2983	Tavşan	1:1000
p-mTOR	Cell Signaling Technology, 5536	Tavşan	1:1000
c-Raf	Cell Signaling Technology, 53745	Tavşan	1:1000
p-c-Raf	Cell Signaling Technology, 9427	Tavşan	1:1000
MEK1/2	Cell Signaling Technology, 8727	Tavşan	1:1000
p-MEK1/2	Cell Signaling Technology, 9154	Tavşan	1:1000
Erk1/2	Cell Signaling Technology, 4695	Tavşan	1:1000
p-Erk1/2	Cell Signaling Technology, 4370	Tavşan	1:2000
EGFR	Cell Signaling Technology, 4267	Tavşan	1:1000
p-EGFR	Cell Signaling Technology, 3777	Tavşan	1:1000
VEGF	Santa Cruz Biotechnology, sc-7269	Fare	1:200
Bax	Cell Signaling Technology, 2772	Tavşan	1:1000
Bcl-xL	Cell Signaling Technology, 2764	Tavşan	1:1000
Caspase-9	Cell Signaling Technology, 9508	Fare	1:1000
MMP-2	Santa Cruz Biotechnology, sc-13594	Fare	1:200
β-actin	Cell Signaling Technology, 4970	Tavşan	1:1000

3.11.6. Sekonder Antikor ile İnkübasyon

Primer antikor ile 1 gecelik inkübasyondan sonra membran 1:2000 oranında 1X TBST içerisinde hazırlanmış %5'lik süt tozu karışımında Anti-rabbit (Cell Signaling Technology, 7074) veya Anti-mouse sekonder antikorlar (Cell Signaling Technology, 7076) ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca yavaş çalkalama ile inkübe edildi. Membran 3 kez 1X TBST ile 10 dakika boyunca yıkandı.

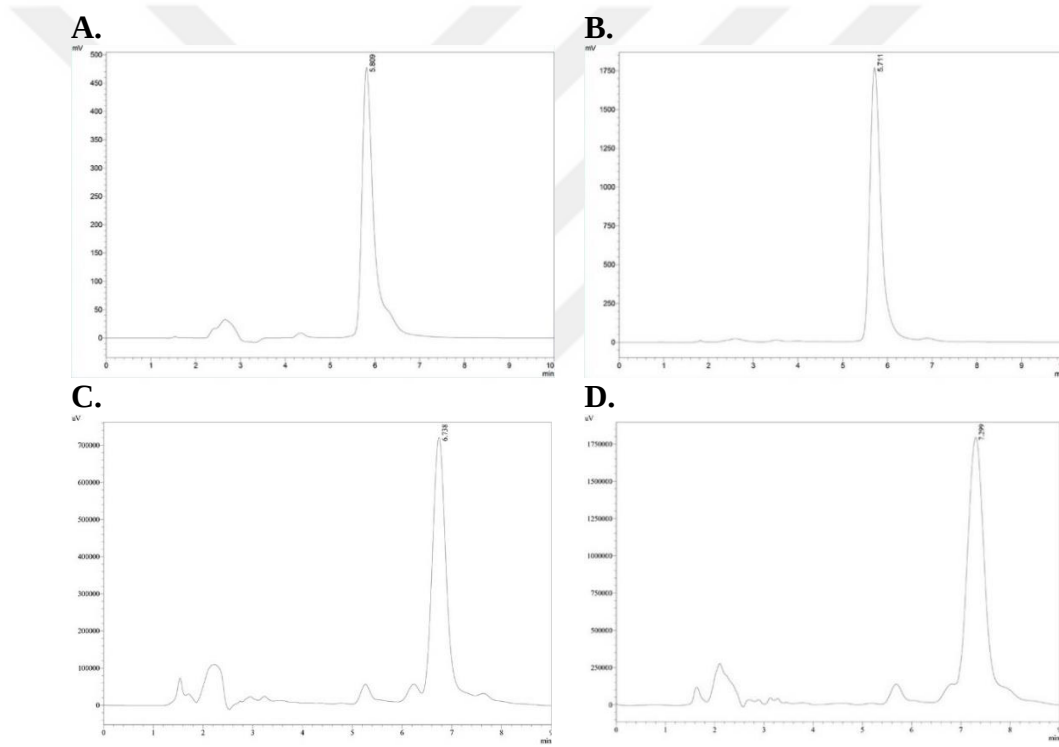
3.11.7. Görüntüleme ve Dansitometrik Analiz

Elektrokemilüminesans ışına yaparak western blot bantlarını görünür hale getirmek için ticari olarak temin edilen ECL substrat (Thermo Scientific, ECL Plus Western Blotting Substrate, REF32132, USA) kullanılarak görüntüler kaydedildi. Bu aşamada sekonder antikora bağlı bulunan HRP (horse radish peroksidaz) enzimi, ECL

4. BULGULAR

4.1. Kukurbitasinlerin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Ecballium Elaterium bitkisi birçok kukurbitasin alt türünü barındırmakla birlikte bu bitkinin meyve suyundan başlıca kukurbitasin B, D, I ve E izole edilmektedir (199). Çalışmamızda toplanan bitki meyve sularından Tosun ve Baysar'ın ifade ettiği metod kullanılarak CuD ve CuI saflaştırıldı (176). Bu bileşiklerin aynı şartlarda HPLC'ye uygulanılan ticari standartlarla kromatogramları ve alıkonma süreleri karşılaştırıldı. Saflık doğrulaması yapıldı. CuD ve CuI'nın alıkonma sürelerinin standartlarındaki ile aynı olduğu görüldü (Şekil 17).

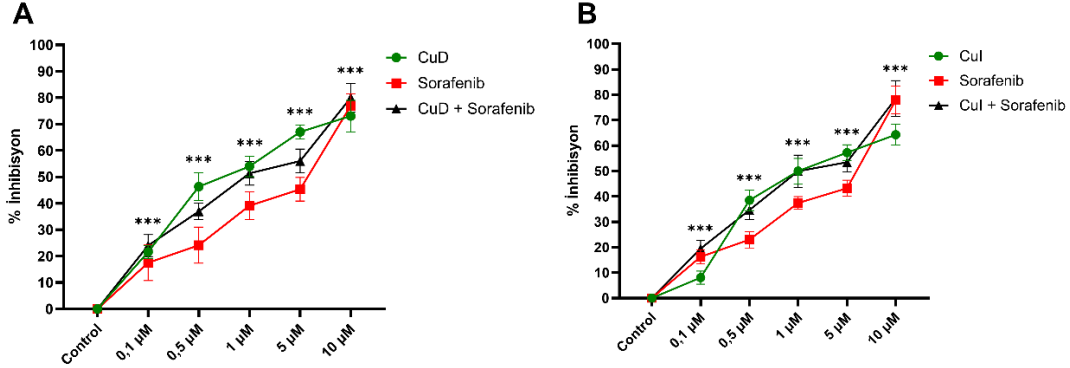


Şekil 17. Saflaştırılan CuD ve CuI kromatogramlarının standartlarla karşılaştırılması

CuD (**A**), CuD standardı (**B**), CuI (**C**) ve CuI standardının (**D**) HPLC kromatogramları. Kolon özellikleri: Nükleosil RP-C18 sütunu (250 mm × 4.6 mm id, 5 µm gözenek boyutu, 100Å), solvent %45-55 asetonitril-su. Akış hızı 1 mL/dk.

4.2. CuD, CuI ve Sorafenibin Sitotoksik Etkileri

CuD, CuI ve Sorafenib'in hepatoselüler karsinoma hücreleri üzerindeki etkinliğini incelemek için, herbir bileşiğin %50 inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerleri MTT testi ile belirlenip değerlendirildi. Hücre canlılığı testlerinden elde edilen veriler **Şekil 18**'de sunulmaktadır. Tüm bileşikler, HepG2 hücrelerinin proliferasyonunda doza bağlı azalma gösterdi. Bununla birlikte, hem CuD hem de CuI bileşikler klinikte kullanılmakta olan Sorafenib ilacına kıyasla daha düşük IC_{50} değerleri sergilediği gözlemlendi. CuD ve Sorafenib'in tek başına ayrı ayrı HepG2 hücrelerine uygulanmasıyla elde edilen IC_{50} değerleri sırasıyla 0.2751 μM ve 1.341 μM . CuD ve Sorafenib'in kombine uygulamasıyla ise elde edilen IC_{50} değeri 0.6065 μM 'a kadar önemli ölçüde düşürülmüştür. Öte yandan, CuI ve Sorafenib'in ayrı ayrı uygulanmasıyla elde edilen IC_{50} değerleri sırasıyla 0.4057 μM ve 1.541 μM olarak belirlenmiştir. CuD ve Sorafenib'in kombine uygulamasıyla benzer şekilde CuI ve Sorafenib'in kombine uygulandığı canlılık testinden elde edilen IC_{50} değeri 0.9479 μM olarak tespit edilmiştir. Bu da klinikte uygulanmakta olan Sorafenib'in tek başına uygulandığı doza kıyasla önemli miktarda azalmayı göstermektedir.



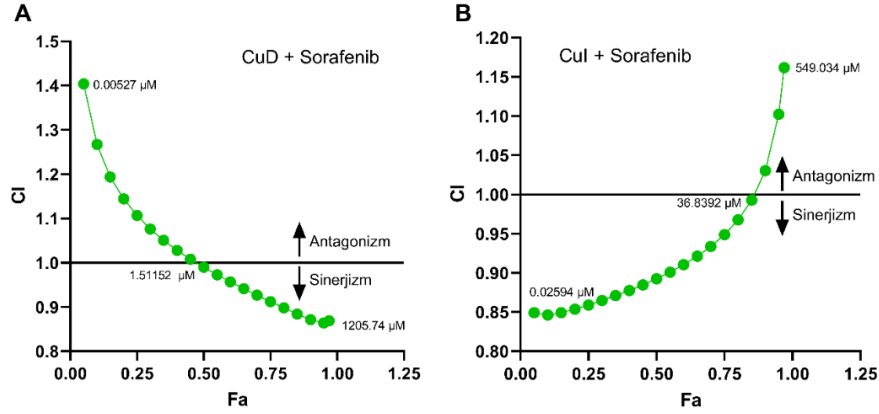
Şekil 18. CuD, CuI ve sorafenibin HepG2 hücre hattında inhibisyon etkileri

Kontrol gruplarında herhangi bir ilaç uygulaması bulunmadığından %0 inhibisyon olarak değerlendirme yapılmıştır. **A.** CuD ve Sorafenib'in tek başına ve CuD+Sorafenib kombinasyonunun % inhibisyon oranları. **B.** CuI ve Sorafenib'in tek başına ve CuI+Sorafenib kombinasyonunun % inhibisyon oranları. Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık *** $p < 0.001$.

4.3. CuD ve Sorafenibin Kombine Uygulamasının Etkileri

CuD ve Sorafenib'in HepG2 hücre hatları üzerindeki kombinasyon etkilerini incelemek için MTT verileri kullanıldı. Bileşiklerin ilaç kombinasyonu kullanılarak

büyümenin inhibisyonunu değerlendirmek için aynı dozlarda CuD ve Sorafenib'in (0.1, 0.5, 1, 5 ve 10 μM) uygulamaları yapıldı. CompuSyn programının simülasyonu ile sabit oran kombinasyonu kullanılarak, $m_{1,2}$ ve $(Dm)_{1,2}$ değerlerine dayalı olarak doz-etki eğrileri, Fa-CI etkisi ve izobologram verileri elde edildi. CI değerinin 1'in altında olduğu kombine dozlar sinerjizm, 1'in üstünde olduğu dozlar antagonizmi işaret etmektedir (Şekil 19).



Şekil 19. CuD ve Cul'nin sorafenib ile kombine uygulamasına ait CI verilerinin grafiksel gösterimi

Elde edilen Fa-CI tablosu (Tablo 8), sinerjik etkinin % kaçlık inhibisyona karşılık geldiğini göstermektedir. CuD ve Sorafenib'in kombine uygulamasıyla elde edilen veriler değerlendirildiğinde 1'in altında bulunan 0.98972'lik CI değeri 0.5'lik Fa değerine (%50 inhibisyon) karşılık gelmektedir. Buda kombine uygulamada toplam olarak 1.51152 μM konsantrasyonda ilaç uygulaması gerektiğini göstermektedir. Simülasyon ile elde edilen verilere göre en düşük CI değeri 0.86868 olarak bulunurken Fa değeri 0.97'ye (% 97 inhibisyon) karşılık gelmektedir. Ancak bu simülasyon senaryosunda %97'lik inhibisyonu, 1205 μM 'lık uygulanabilir olmayan kombine ilaç dozuna karşılık gelmektedir (Tablo 8). CI değerinin 1'in altında olduğu bulunan ilaç kombinasyonunun belirli konsantrasyonlarda hepatoselüler karsinoma hücresinin büyümesini sinerjistik olarak engelleyebileceğini göstermektedir.

Tablo 8. CuD ve CuI'nın sorafenib ile kombine uygulamasına ait CI verileri

CuD+Sorafenib			CuI+Sorafenib		
Fa	CI Değeri	Total Doz	Fa	CI Değeri	Total Doz
0.05	1.40394	0.00527	0.05	0.84906	0.02594
0.1	1.26704	0.02214	0.1	0.84634	0.08267
0.15	1.19385	0.05387	0.15	0.84918	0.16944
0.2	1.14422	0.10523	0.2	0.85366	0.29086
0.25	1.10662	0.18293	0.25	0.85891	0.45447
0.3	1.07622	0.29655	0.3	0.86467	0.67116
0.35	1.05052	0.45988	0.35	0.87086	0.95633
0.4	1.02810	0.69332	0.4	0.87751	1.33198
0.45	1.00803	1.02777	0.45	0.88466	1.83009
0.5	0.98972	1.51152	0.5	0.89242	2.49844
0.55	0.97271	2.22298	0.55	0.90093	3.41087
0.6	0.95668	3.29531	0.6	0.91043	4.68641
0.65	0.94138	4.96807	0.65	0.92120	6.52724
0.7	0.92659	7.70438	0.7	0.93372	9.30065
0.75	0.91216	12.4892	0.75	0.94873	13.7350
0.8	0.89799	21.7115	0.8	0.96755	21.4609
0.85	0.88415	42.4088	0.85	0.99272	36.8392
0.9	0.87133	103.194	0.9	1.03037	75.5077
0.95	0.86393	433.937	0.95	1.10198	240.662
0.97	0.86868	1205.74	0.97	1.16163	549.034

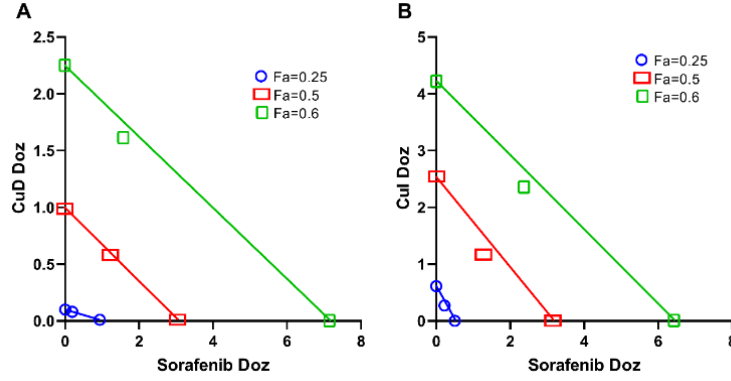
Ayrıca CI değerleri, CuD ve CuI'nın sorafenib ile kombinasyonunda uygulanan dozlara ait gerçek deneysel noktalar için hesaplanmıştır. Bu verilerde ise simülasyon yapılmaksızın elde edilen CI ve Fa değerleri tespit edilmiştir (**Tablo 9**).

Tablo 9. Gerçek deneysel noktalar için hesaplanan CI değerleri

CuD+Sorafenib			CuI+Sorafenib		
Total Doz	Fa	CI Değeri	Total Doz	Fa	CI Değeri
0.1	0.20284	1.04892	0.1	0.1	1.02376
0.5	0.33885	1.26243	0.5	0.26997	0.80647
1.0	0.48952	0.71241	1.0	0.44	0.51388
5.0	0.53891	2.39317	5.0	0.47998	2.01510
10.0	0.79004	0.46663	10.0	0.76	0.63744

CuD ve Sorafenibin kombinatoryal etkisinin grafiksel gösterimi, Compusyn yazılımı kullanılarak oluşturulan izobologramlar (**Şekil 20**) aracılığıyla da gösterilmiştir. İki ilaç arasındaki etkileşimin doğası, izobologram analizi ile de iki koordinatlı bir grafikte değerlendirilebilir. Bir izobologramdaki x ve y koordinatları, tanımlanmış bir etki üretmek için gereken tek tek ilaç konsantrasyonlarını temsil eder. İki farklı eksen de iki veri noktasını birbirine bağlayan ilgili çizgi, toplamsallık çizgisidir. İzobologramda eşdeğerlik çizgisinin veya aditiflik çizgisinin altında kalan noktalar, iki ilaç arasındaki

sinerjistik etkiyi gösterir ve eşdeğerlik çizgisinin üzerindeki noktalar, antagonistik etkiyi temsil eder (197). Çalışmamızda elde edilen izobologramlar, CuD ve Sorafenib'in düşük konsantrasyonlarında sinerjetik, yüksek dozlarda ise antagonist olarak etki ettiğini göstermektedir. 0.25'lik Fa değerinde kombine uygulama antagonistik etki gösterirken, 0.5 ve 0.6'lık Fa değerleri için sırasıyla additif ve sinerjetik etki görüldüğü belirlenmiştir.



Şekil 20. CuD ve Cul'nın Sorafenib ile kombinatoryal etkisinin İzobologram grafiksel gösterimi

Compusyn programı ile elde edilen DRI değerleri incelendiğinde, %50 inhibisyonun öngörüldüğü kombinasyon konsantrasyonları CuD için 1.00483 μM , Sorafenib için 3.18099 μM 'dır. 1'in üzerindeki DRI değeri kombinasyonda doz redüksiyonu için elverişlidir. 1'in altında ise doz redüksiyonu mümkün değildir. %50 inhibisyon için eşdeğer etkiyi elde edebilmek için CuD'nin 1.32955, Sorafenib'in ise 4.20899 oranında daha az konsantrasyonda alınması gerekmektedir. Yani azaltılan dozlar karşılaştırıldığında; CuD 1.00483 μM 'dan, 0.75576 μM 'a, Sorafenib ise 3.18099 μM 'dan, 0.75576 μM 'a düşürülmesi ile %50 inhibisyon elde edilebilir. CuD ve Sorafenib'in bu yeni dozlarının toplamı ise Fa-CI verilerinde elde edilen 0.5'lik Fa'nın toplam dozu olan 1.51152 μM 'a denk gelmektedir (**Tablo 10**).

Tablo 10. CuD ve sorafenibin kombine uygulamasına ait DRI verileri

Fa	CuD Doz	Sor Doz	DRI CuD	DRI Sor
0.05	0.00207	0.01950	0.78806	7.40720
0.1	0.00996	0.07104	0.89992	6.41740
0.15	0.02632	0.15817	0.97699	5.87206
0.2	0.05469	0.28898	1.03935	5.49227
0.25	0.10005	0.47537	1.09384	5.19719
0.3	0.16959	0.73431	1.14378	4.95241
0.35	0.27388	1.08993	1.19111	4.74009
0.4	0.42887	1.57719	1.23716	4.54968
0.45	0.65931	2.24788	1.28300	4.37429
0.5	1.00483	3.18099	1.32955	4.20899
0.55	1.53141	4.50145	1.37780	4.04993
0.6	2.35425	6.41565	1.42885	3.89380
0.65	3.68654	9.28381	1.48409	3.73739
0.7	5.95357	13.7799	1.54550	3.57716
0.75	10.0916	21.2858	1.61606	3.40868
0.8	18.4634	35.0157	1.70079	3.22554
0.85	38.3660	63.9721	1.80934	3.01692
0.9	101.352	142.436	1.96431	2.76055
0.95	486.686	518.916	2.24312	2.39167
0.97	1486.25	1301.97	2.46529	2.15961

DRI, CompuSyn programı kullanılarak hesaplanmıştır. $DRI > 1$, doz redüksiyonunun elverişli olduğunu, $DRI < 1$ ise doz redüksiyonunun elverişli olmadığını ifade etmektedir. DRI:Doz redüksiyon indeksi.

4.4. CuI ve Sorafenibin Kombine Uygulamasının Etkileri

CuI ve Sorafenib'in bileşiklerinin ilaç kombinasyonu kullanılarak hücre çoğalmasının inhibisyonunu değerlendirmek için aynı dozlarda CuI ve Sorafenib'in (0.1, 0.5, 1, 5 ve 10 μM) kombine uygulamaları yapıldı. CuI ve Sorafenib'in kombine uygulamasıyla elde edilen veriler değerlendirildiğinde 1'in altında bulunan 0.99272'lik CI değeri 0.85'lik Fa değerine (%85 inhibisyon) karşılık gelmektedir. Buda kombine uygulamada toplam olarak 36.8392 μM konsantrasyonda ilaç uygulaması gerektiğini göstermektedir. Simülasyon ile elde edilen verilere göre 0.45 Fa değeri (%45 inhibisyon) için ise toplam olarak 1.83009 μM kombine ilaç uygulanması gerekmektedir (**Tablo 8**). CI değerinin 1'in altında olduğu bulunan ilaç kombinasyonunun belirli konsantrasyonlarda hepatoselüler karsinoma hücresinin çoğalmasını sinerjistik olarak engelleyebileceğini göstermektedir (**Şekil 19**).

Kombinatoryal etkinin grafiksel gösterimi, Compusyn yazılımı kullanılarak oluşturulan izoblogramlar aracılığıyla da gösterilmiştir (**Şekil 20**). Çalışmamızda elde

edilen izobologramlar, CuI ve Sorafenib'in 0.25, 0.5 ve 0.6 Fa değerlerinin tümünde sinerjetik etki göstereceği hesaplanmıştır.

Hesaplanan DRI değerleri incelendiğinde, %35 inhibisyonun öngörüldüğü kombinasyon konsantrasyonları CuI için 1.02076 μM , Sorafenib için 1.18820 μM 'dır. %35 inhibisyon için eşdeğer etkiyi elde edebilmek için CuI'nin 2.13476, Sorafenib'in ise 2.48493 oranında daha az konsantrasyonda alınması gerekmektedir. Yani azaltılan dozlar karşılaştırıldığında; CuI 1.02076 μM 'dan, 0.47816 μM 'a, Sorafenib ise 1.18820 μM 'dan, 0.47816 μM 'a düşürülmesi ile %35 inhibisyon elde edilebilir. CuI ve Sorafenib'in bu yeni dozlarının toplamı ise Fa-CI verilerinde elde edilen 0.35'lik Fa'nın toplam dozu olan 0.95633 μM 'a denk gelmektedir (**Tablo 11**).

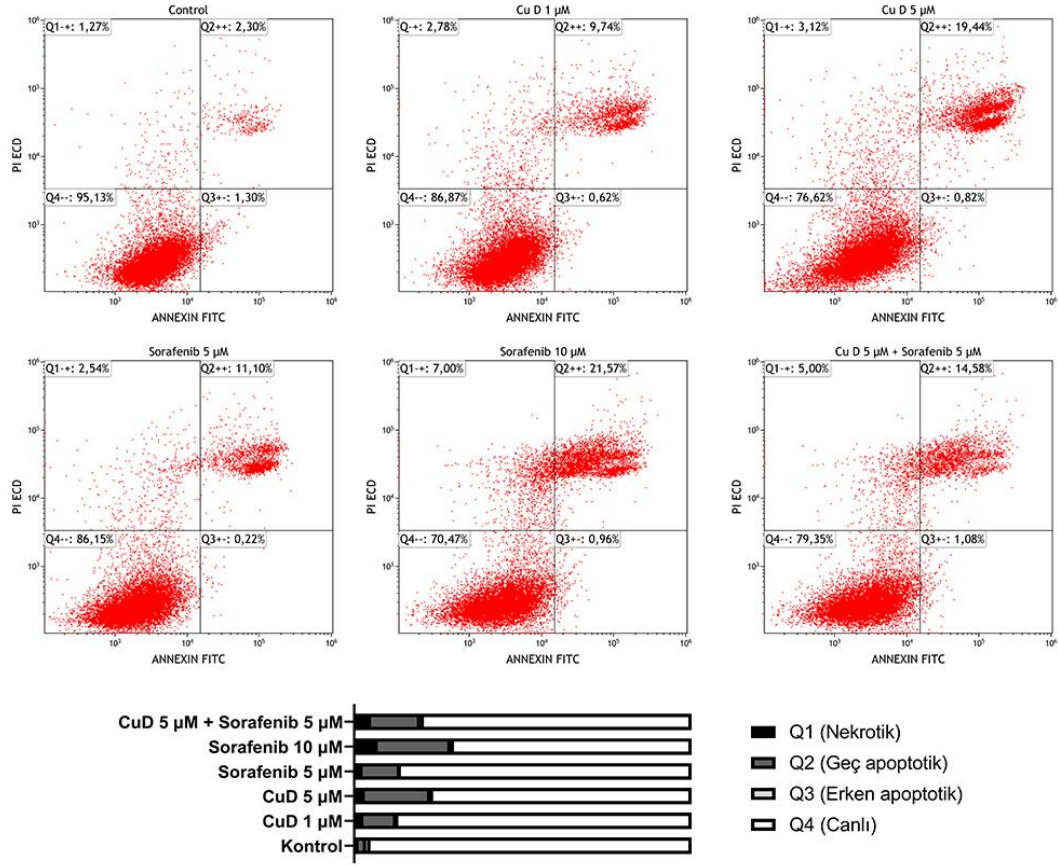
Tablo 11. CuI ve sorafenibin kombine uygulamasına ait DRI verileri

Fa	CuI Doz	Sor Doz	DRI CuI	DRI Sor
0.05	0.04043	0.02455	3.11716	1.89301
0.1	0.11409	0.08540	2.76013	2.06596
0.15	0.21688	0.18477	2.55989	2.18086
0.2	0.35177	0.33036	2.41877	2.27158
0.25	0.52448	0.53385	2.30810	2.34934
0.3	0.74350	0.81191	2.21558	2.41944
0.35	1.02076	1.18820	2.13476	2.48493
0.4	1.37314	1.69681	2.06181	2.54781
0.45	1.82478	2.38789	1.99420	2.60959
0.5	2.41112	3.33740	1.93011	2.67159
0.55	3.18587	4.66446	1.86807	2.73506
0.6	4.23374	6.56422	1.80682	2.80139
0.65	5.69526	9.37401	1.74507	2.87227
0.7	7.81913	13.7185	1.68142	2.95001
0.75	11.0843	20.8638	1.61401	3.03805
0.8	16.5267	33.7156	1.54016	3.14205
0.85	26.8054	60.2826	1.45526	3.27274
0.9	50.9558	130.431	1.34969	3.45477
0.95	143.807	453.696	1.19510	3.77040
0.97	300.873	1101.47	1.09601	4.01239

DRI, CompuSyn programı kullanılarak hesaplanmıştır. $\text{DRI} > 1$, doz redüksiyonunun elverişli olduğunu, $\text{DRI} < 1$ ise doz redüksiyonunun elverişli olmadığını ifade etmektedir. DRI: Doz redüksiyon indeksi.

4.5. CuD ve Sorafenibin Apoptoz Üzerine Etkileri

CuD'nin 1, 5 μ M ve sorafenibin 5, 10 μ M konsantrasyonları tek başına ve kombine olarak HepG2 hücrelerine 24 saat uygulanarak bileşiklerin apoptotik etkisi Annexin V-FITC ile değerlendirildi. Apoptotik etkiyi incelemek için, sitotoksikite testinde CuD ve sorafenibin en iyi sitotoksik etki gösterdiği dozlar hücrelere uygulanarak elde edilen apoptotik yüzdelere kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Kontrol grubundaki apoptotik hücre oranı %2.30 iken, CuD'nin 24h 1 μ M konsantrasyon uygulamasındaki apoptotik hücre oranı %9.74 ve 5 μ M uygulamasındaki apoptotik hücre oranı %19.44'tür (**Şekil 21**). 5 μ M CuD uygulamasındaki apoptotik hücre sayısı, 1 μ M CuD uygulamasındakinden daha yüksektir. Bu artan apoptotik etkinin CuD'nin sitotoksitesi ile doğru orantılı olduğu ortaya çıkmaktadır. Benzer şekilde, sorafenibin 5 μ M konsantrasyon uygulamasındaki apoptotik hücre oranı %11.10 iken, 10 μ M uygulamasındaki apoptotik hücre oranı %21.57 ile apoptotik hücre sayısında artış göstermiştir. Ayrıca CuD ve sorafenibin 5 μ M konsantrasyondaki kombine uygulamasında %14.58 apoptotik hücre sayısı elde edilmiştir. Sorafenibin CuD ile kombine uygulamasından elde edilen apoptotik hücre sayısı (%14.58), aynı dozdaki sorafenib uygulamasından elde edilen apoptotik hücre sayısından (%11.10) daha yüksek olduğu için, CuD'nin sorafenibin apoptotik etkisini arttırdığı ortaya çıkmaktadır.



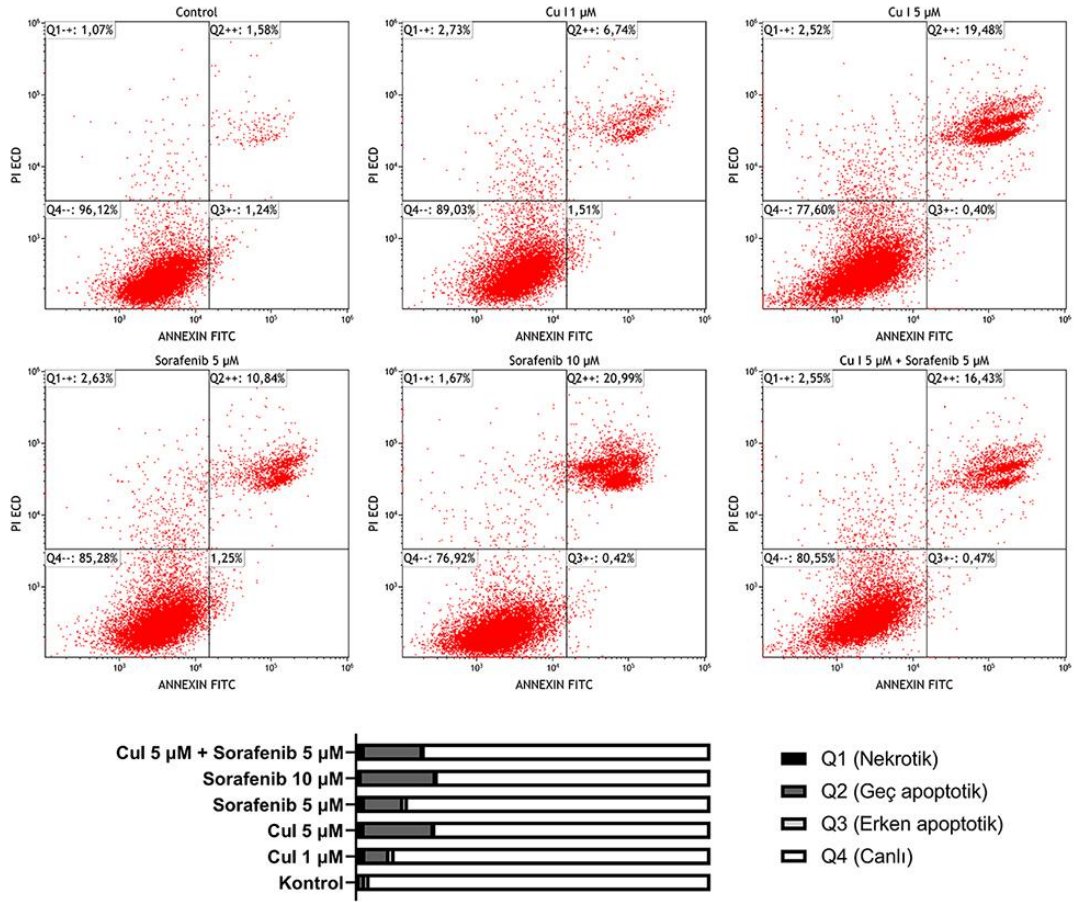
Şekil 21. CuD ve sorafenibin HepG2 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin Annexin V akış sitometrisi analizi ile değerlendirilmesi

CuD ve sorafenib farklı konsantrasyonlarda HepG2 hücrelerinde apoptozu indüklemiştir. Apoptoz, fosfatidilserin translokasyonu FITC-Annexin V ile boyanarak analiz edildi. Sağ üst (Annexin V+/PI+) kadrantlarının toplam oranı apoptozu temsil eder.

4.6. CuI ve Sorafenibin Apoptoz Üzerine Etkileri

CuI'nin ve sorafenibin farklı konsantrasyonları tek başına ve kombine olarak HepG2 hücrelerine uygulanarak bileşiklerin apoptotik etkisi değerlendirildi. Bunun için hücrelere 1 ve 5 µM konsantrasyondaki CuI ve 5, 10 µM konsantrasyondaki sorafenib, 24 h uygulanarak Annexin V-FITC analizi yapıldı. Kontrol grubundaki apoptotik hücre oranı %1.58 iken, CuI'nın 1 µM konsantrasyon uygulamasındaki apoptotik hücre oranı %6.74 ve 5 µM uygulamasındaki apoptotik hücre oranı %19.48'dir (**Şekil 22**). sorafenibin 5 µM konsantrasyon uygulamasındaki apoptotik hücre oranı %10.84 iken, 10 µM uygulamasındaki apoptotik hücre oranı % 20.99'dur. Hem CuI'nın hem de sorafenibin yüksek konsantrasyondaki uygulaması apoptotik hücre sayısındaki artışa eşlik etmiştir. Ayrıca CuI ve sorafenibin 5 µM konsantrasyondaki kombine

uygulamasında %16.43 apoptotik hücre sayısı elde edilmiştir ve bu apoptotik oran sorafenibin 5 μ M konsantrasyondaki tekli uygulamasından daha yüksektir.



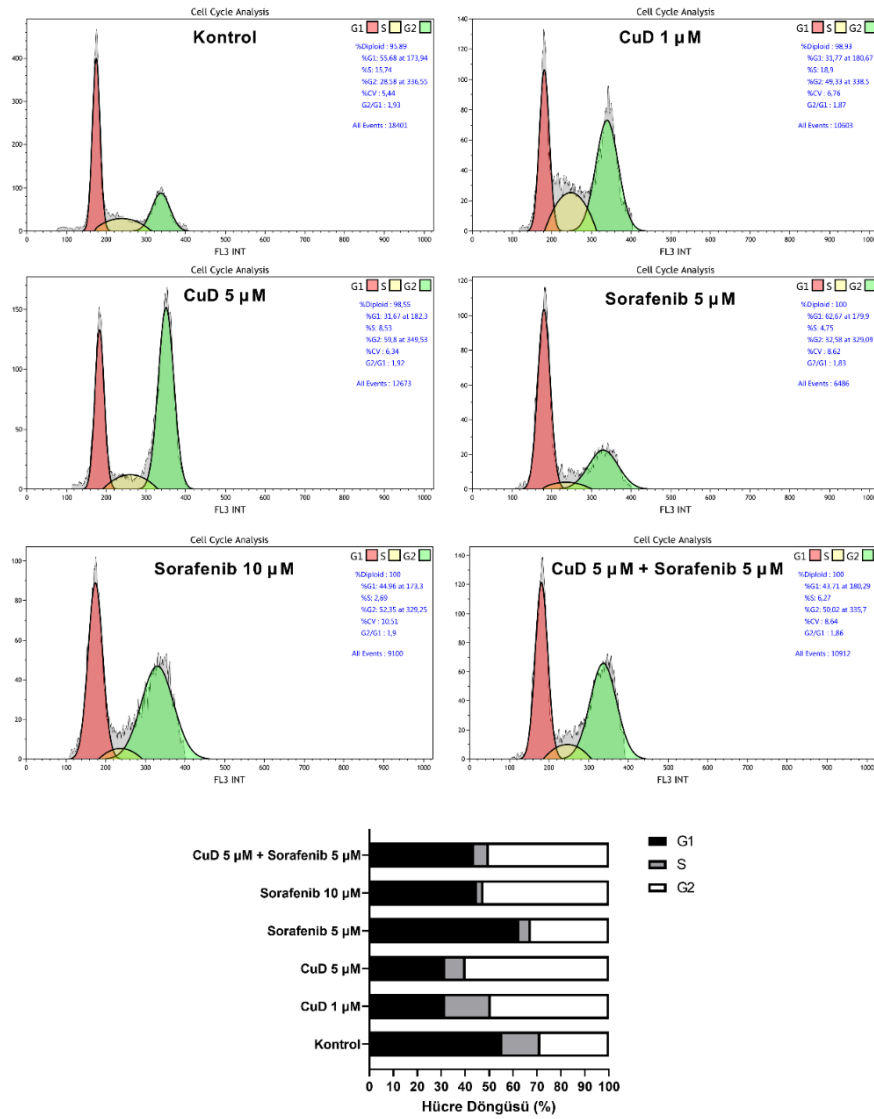
Şekil 22. CuI ve sorafenibin HepG2 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin Annexin V akış sitometrisi analizi ile değerlendirilmesi

CuI ve sorafenib farklı konsantrasyonlarda HepG2 hücrelerinde apoptozu indüklemiştir. Apoptoz, fosfatidilserin translokasyonu FITC-Annexin V ile boyanarak analiz edildi. Sağ üst (Annexin V+/PI+) kadrantlarının toplam oranı apoptozu temsil eder.

4.7. CuD ve Sorafenibin Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi

HepG2 hücresinde CuD ve sorafenib aracılı inhibisyon ile meydana gelen antiproliferatif etkinin hangi mekanizma ile gerçekleştiğini ortaya çıkarmak için, PI işaretli hücrelerin hücre döngüsü fazlarının dağılımı incelendi. 1 ve 5 μ M konsantrasyonlarındaki CuD ve 5 ve 10 μ M sorafenib ile muamele edilen hücrelerin hücre döngüsü evreleri **Şekil 23**'de gösterilmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında, CuD ve sorafenib uygulanan hücrelerin önemli bir kısmının G2/M fazında olduğu görüldü. HepG2 hücrelerinin 24h CuD ve sorafenib uygulaması sonucu G2 evresindeki hücre

popülasyonu yüzdesi kontrol grubunda %28.58 iken, 1 ve 5 μ M CuD uygulanan gruplarda sırasıyla %49.33, %59.8 ve 5 ve 10 μ M sorafenib uygulanan gruplarda ise sırasıyla %32.58, %52.35 olarak saptandı. 5 μ M Sorafenib ile CuD kombine uygulamasında görülen G2/M fazındaki hücre yoğunluğu (%50.02), 5 μ M sorafenib uygulamasından (%32.58) daha yüksektir. Bu durum kombine uygulamanın tek başına sorafenib uygulamasına göre hücre döngüsünü duraklatma etkisinin daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır.

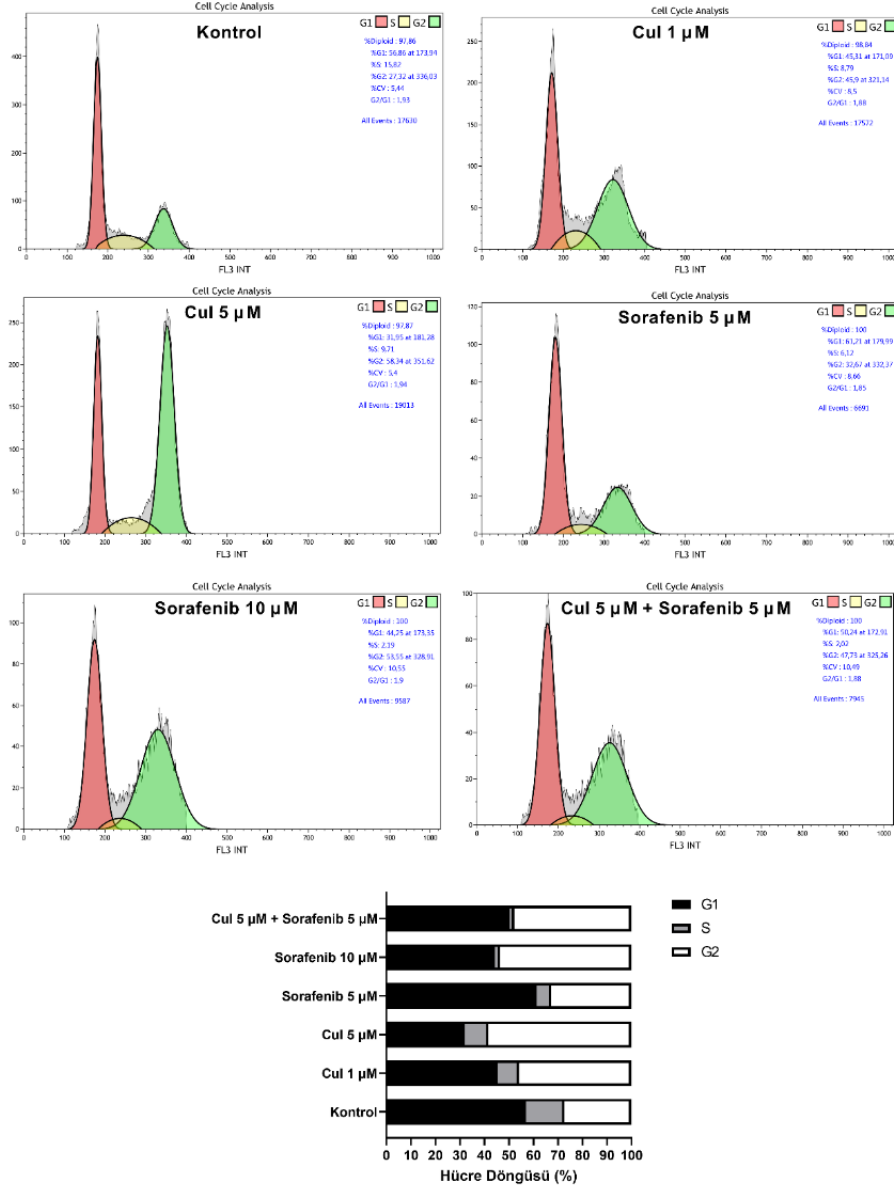


Şekil 23. HepG2 hücrelerine uygulanan CuD ve sorafenibin hücre döngüsü analizi

24 saat CuD ve sorafenibe maruz bırakılan HepG2 hücreleri propidyum iyodür (PI) ile boyandı ve akış sitometresi yapıldı. Uygulanan grupların G2/M oranları grafikte gösterilmektedir.

4.8. CuI ve Sorafenibin Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi

HepG2 hücresinde CuI ve sorafenibin hücre döngüsüne etki mekanizmasını incelemek için, PI işaretli hücrelerin hücre döngüsü fazlarının dağılımı incelendi. 1 ve 5 μ M konsantrasyonlarındaki CuI ve 5 ve 10 μ M sorafenib ile muamele edilen hücrelerin hücre döngüsü evreleri **Şekil 24**'de gösterilmiştir. CuI ve sorafenib uygulanan hücrelerin önemli bir kısmının G2/M fazında yoğunlaştığı görüldü. HepG2 hücrelerinin 24h CuI ve sorafenib uygulaması sonucu G2 evresindeki hücre popülasyonu yüzdesi kontrol grubunda %27.32 iken, 1 ve 5 μ M CuI uygulanan gruplarda sırasıyla %45.9, %58.34 ve 5 ve 10 μ M sorafenib uygulanan gruplarda ise sırasıyla %32.67, %53.55 olarak saptandı. 5 μ M Sorafenib ile CuI kombine uygulamasında görülen G2/M fazındaki hücre yoğunluğu (%47.73), 5 μ M sorafenib uygulamasından daha yüksektir (%32.67). Bu durum kombine uygulamanın tek başına sorafenib uygulamasına göre hücre döngüsünü duraklatma etkisinin daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır.



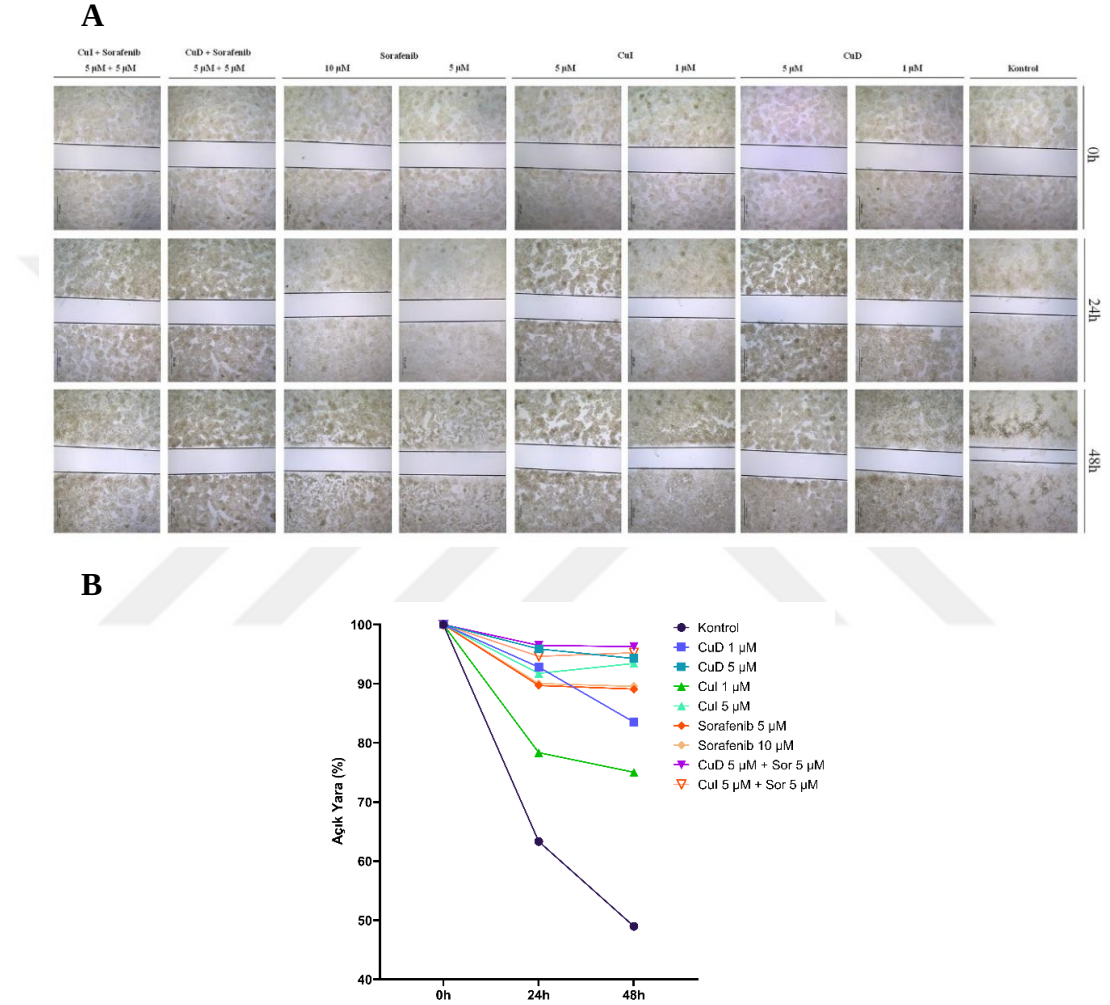
Şekil 24. HepG2 hücrelerine uygulanan CuI ve sorafenibin hücre döngüsü analizi

24 saat CuI ve sorafenibe maruz bırakılan HepG2 hücreleri propidyum iyodür (PI) ile boyandı ve akış sitometresi yapıldı. Uygulanan grupların G2/M oranları grafikte gösterilmektedir.

4.9. CuD, CuI ve Sorafenibin Yara İyileşmesine Etkisi

Daha önce yapılan çalışmalarda VEGF ve EGFR sinyal aktivasyonunun hepatoselüler karsinomada hücre proliferasyonu ve migrasyonu arttırdığı bildirilmiştir (200). CuD, CuI ve sorafenibin tekli ve kombine uygulamalarının HCC de hücre göçü üzerindeki etkisini saptamak için yara iyileşmesi testi yapıldı. Kontrol grubunda yara

genişliği 48 saatte %51.01 oranında azaldı. CuD, CuI ve sorafenibin 5µM uygulamalarının ise yara genişliğini sırasıyla %5.72, %6.55, %10.90 oranında azalttığı bulunmuştur. CuD ve CuI'nın sorafenible kombine uygulamasının hücre göçü oranını sırasıyla %3.71 ve %4.75 oranında azalttığı ortaya kondu. Bu bulgular ilaç gruplarının hücre göçünü baskıladığını, CuD ve CuI ile muamele edilen hücrelerin sorafenibe göre daha az motilite gösterdiğini ortaya koymuştur (Şekil 25).



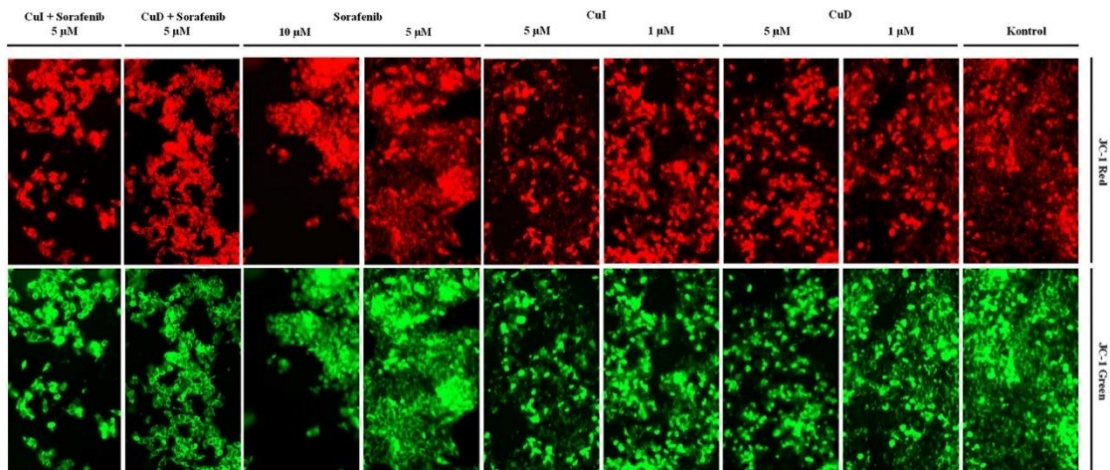
Şekil 25. CuD, CuI ve sorafenib uygulamasının 0, 24 ve 48 saat sonraki HepG2 hücre göçüne etkisi

CuD, CuI ve sorafenibin tek başına ve kombine uygulaması HepG2 hücre göçünü baskıladı. **A.** HepG2 hücrelerine 1, 5 µM uygulanan CuD, CuI ve 5, 10 µM uygulanan sorafenibin 0, 24 ve 48 saat sonra kaydedilen yara iyileşme deneyi görüntüleri **B.** Kukurbitasine ve sorafenibe maruz bırakılan hücrelerin 0, 24 ve 48 saate sonraki yara genişliğindeki yüzdesel değişim

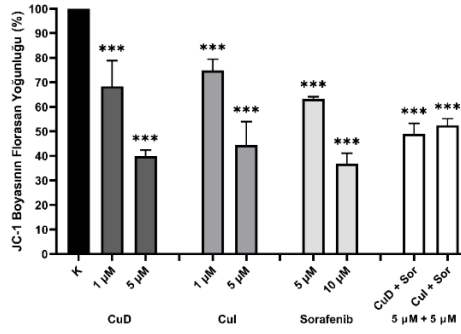
4.10. Bileşiklerin Mitokondrial Membran Potansiyeline ($\Delta\Psi_m$) etkisi

Mitokondriyal membran potansiyeli JC-1 katyonik boya kullanarak hem floresan mikroskopu ile nitel olarak, hem de floresan spektrofotometresi ile nicel olarak değerlendirildi. Oksidatif fosforilasyonun gerçekleştiği temel organel mitokondri olduğu için mitokondri membranının durumu apoptozla ilişkilendirilir. Oksijenli solunumun aktif olarak gerçekleştiği mitokondride $\Delta\Psi_m$ 'e bağlı belirgin kırmızı floresan boya gözlemlenir. $\Delta\Psi_m$ derecesine bağlı olarak sitozolik yeşil floresan da gözlemlenir. Floresan eksikliği ise, apoptotik veya nekrotik hücrelerin göstergesidir. Çalışmamızda CuD, CuI ve sorafenib uygulamasının mitokondriyal membran potansiyeli üzerindeki etkisi JC-1 boyaması yapılarak değerlendirildi. HepG2 hücreleri kontrol grubunda, JC-1 boyasının mitokondride agreste olduğunu gösteren yoğun kırmızı floresan sergiledi (**Şekil 26**). CuD, CuI'nın 5 μ M uygulamasında gözlemlenen JC-1 boyasının kırmızı floresans yoğunluğundaki azalma, Sorafenibin 5 μ M uygulamasına kıyasla daha belirgindi. Bununla birlikte sorafenibin kukurbitasinlerle kombine uygulamasında oluşan kırmızı floresans yoğunluğundaki azalma, tek başına uygulamasından elde edilenden daha belirgindi. Bu veriler; CuD, CuI ve sorafenib kaynaklı mitokondriyal membran potansiyeli kaybının gerçekleştiğini, sorafenible kukurbitasinlerin kombine uygulamasının aynı dozdaki sorafenib uygulamasına göre daha belirgin mitokondriyal membran potansiyeli kaybına neden olarak apoptozu indüklediğini ifade etmektedir.

A



B

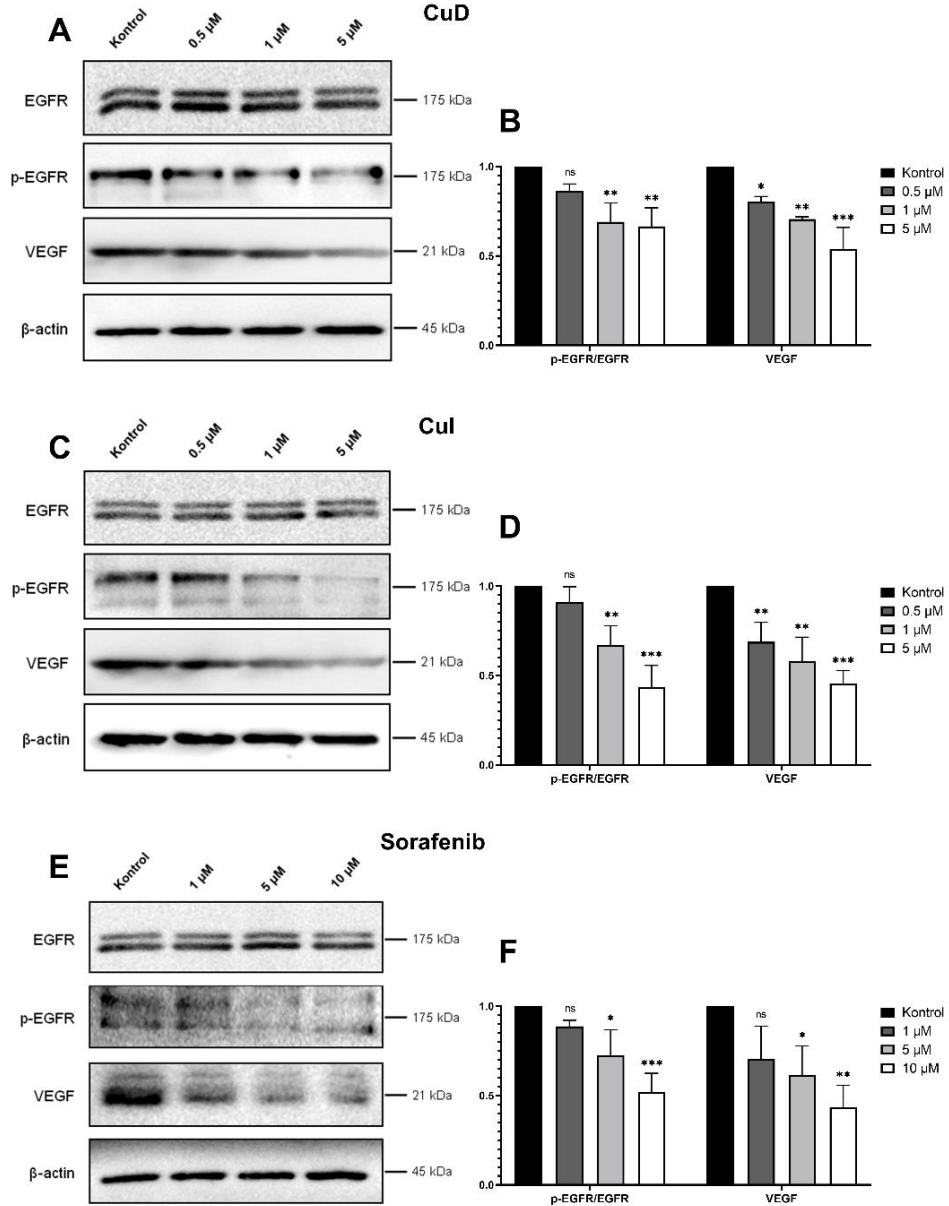


Şekil 26. HepG2 hücrelerinde CuD, CuI ve sorafenibin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi

Mitokondriyal membran potansiyelindeki azalma apoptozla ilişkilendirilir. **A.** Farklı konsantrasyonlarda CuD, CuI ve sorafenib uygulandıktan sonra JC-1 ile boyanan HepG2 hücrelerinin kırmızı ve yeşil floresan görüntüsü. **B.** Kukurbitasinler ve sorafenib JC-1 kırmızı floresan yoğunluğunu doz bağımlı azalttı. Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık *** $p < 0.001$.

4.11. CuD, CuI ve Sorafenibin EGFR ve VEGF Aracılı Raf/MEK/ERK ve PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yollarına Etkisi

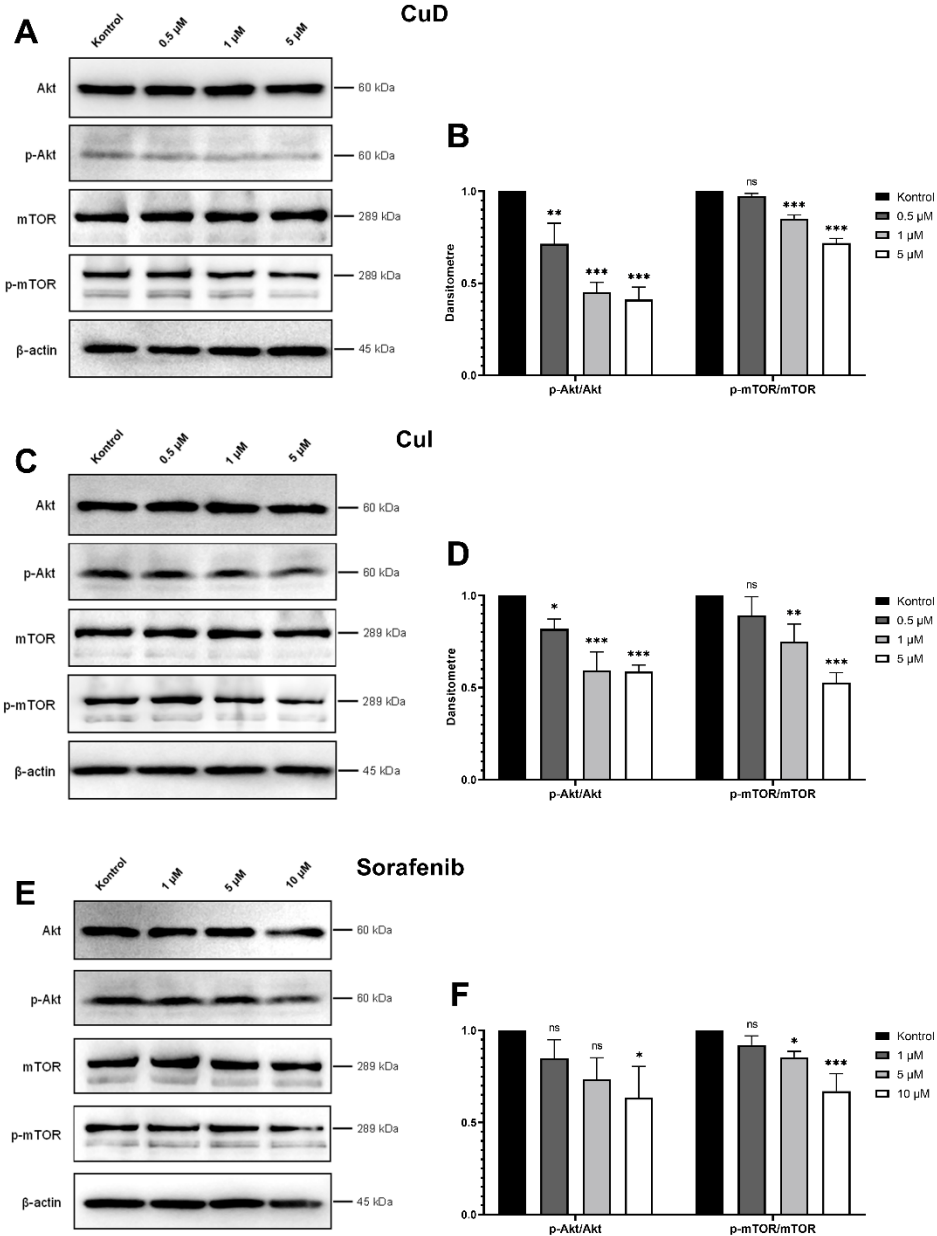
VEGF'ün reseptörüne bağlanmasıyla ve EGFR'nin aktive olmasıyla etkin hale gelen temel iki sinyal yolu Raf/MEK/ERK ve PI3/AKT/mTOR yollarıdır (201, 202). Sorafenibin bir multi reseptör tirozin kinaz inhibitörü ve Raf inhibitörü olma özelliğine dayanarak, sorafenibin HCC'de inhibe ettiği bu sinyal yollarına kukurbitasin D ve I'nın etkisini ortaya koymaya çalıştık. Bunun için; bu sinyal yollarının başlatıcısı konumundaki reseptör ve büyüme faktörü EGFR (4267), p-EGFR (3777) ve VEGF (sc-7269)'nin, sinyal yolunda modülatör görev olan c-Raf (53745), p-c-Raf (9427), MEK (8727), p-MEK (9154), ERK (4695), p-ERK (4370), Akt (4691), p-Akt (4060), mTOR (2983), p-mTOR (5536) proteinlerinin ekspresyon düzeyleri western blot ile değerlendirildi. CuD ve CuI'nın 0.5, 1, 5 µM, sorafenibin 1, 5, 10 µM uygulaması sonrası EGFR ekspresyon seviyelerinde ciddi bir değişiklik gözlenmezken fosforile formunda doz bağımlı bir azalış gözlemlenmiştir. Bileşiklerin büyüme faktörü üzerindeki etkisini değerlendirmek için VEGF protein düzeyi incelendi. Kukurbitasinler ve sorafenible muamele edilen hücrelerde VEGF protein ifadesinin downregüle olduğu görüldü (Şekil 1Şekil 27).



Şekil 27. HepG2 hücrelerine uygulanan kukurbitasin D, I ve sorafenibin EGFR, p-RGFR, VEGF protein düzeylerine etkisi

HepG2 hücrelerine uygulanan kukurbitasin D, I ve sorafenibin EGFR, p-RGFR, VEGF protein düzeylerine etkisi. **A.** Farklı dozlarda uygulanan kukurbitasin D'nin EGFR, p-RGFR, VEGF western blot bantları. **B.** Kukurbitasin D'nin p-RGFR/EGFR düzeylerinin dansitometrik analiz oranı ve VEGF protein düzeyinin dansitometrik analizi. **C.** Farklı dozlarda uygulanan kukurbitasin I'nın EGFR, p-RGFR, VEGF western blot bantları. **D.** Kukurbitasin I'nın p-RGFR/EGFR düzeylerinin dansitometrik analiz oranı ve VEGF protein düzeyinin dansitometrik analizi. **E.** Farklı dozlarda uygulanan sorafenibin EGFR, p-RGFR, VEGF western blot bantları. **F.** Sorafenibin p-RGFR/EGFR düzeylerinin dansitometrik analiz oranı ve VEGF protein düzeyinin dansitometrik analizi. Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil

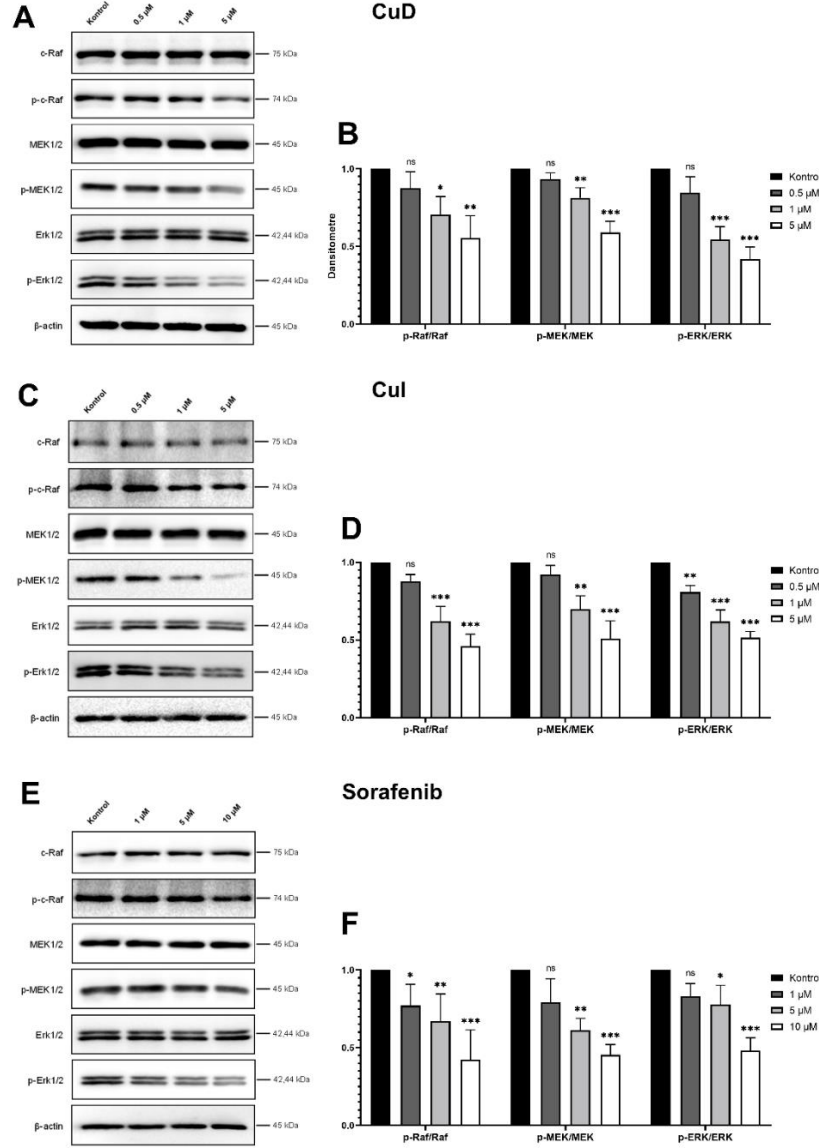
Akt etkinleştğinde, hücrenin hayatta kalmasını, hücre döngüsü ilerlemesini ve anjiyogenezi düzenlemek için mTOR ailesinin alt birimlerini aktifleştirmektedir. Buna bağlı olarak Akt aktivasyonu, PI3K/Akt/mTOR yolunda yer alan aşağı akış sinyal efektörlerinin ekspresyonunu düzenler. CuD, CuI ve sorafenibin PI3K/Akt/mTOR yoluna etkisini değerlendirmek için Akt, p-Akt, mTOR ve p-mTOR protein düzeyleri incelendi. Yapılan çalışmada farklı dozlarda uygulanan kukurbitasin ve sorafenibin Akt protein düzeyinde doz bağımlı ciddi bir değişikliğe neden olmadığı, ancak p-Akt düzeylerinde kontrole göre ciddi bir azalmaya aracılık ettiği gözlemlenmiştir (**Şekil 28**). Ayrıca, HepG2 hücrelerinde 5 μ M CuD ve 5 μ M CuI uygulamasının p-mTOR/mTOR oranını kontrole göre önemli derecede azalttığı ve 10 μ M sorafenib uygulamasında da benzer etkinin olduğu ortaya konmuştur. Bu sonuçlar CuD ve CuI'nın, EGF reseptörünün inhibisyonundan başlayarak aşağı akış sinyali olarak Akt/mTOR yolunu inhibe ettiğini ve bunun sonucu olarak hücrel sağ kalımı baskıladığını göstermektedir. Ayrıca Sorafenibin HepG2 hücrelerine uygulanan 1, 5, 10 μ M dozlarına karşılık daha düşük dozlarda uygulanan kukurbitasinlerinin (0.5, 1, 5 μ M) PI3K/Akt/mTOR yolundaki modulator proteinlerinin düzeylerini azalttığı ortaya konmuştur.



Şekil 28. HepG2 hücrelerine uygulanan kukurbitasin D, I ve sorafenibin Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR protein düzeylerine etkisi

HepG2 hücrelerine uygulanan kukurbitasin D, I ve sorafenib PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunu modüle ediyor **A**. Farklı dozlarda uygulanan kukurbitasin D'nin Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR western blot bantları. **B**. Kukurbitasin D'nin p-Akt/Akt ve p-mTOR/mTOR düzeylerinin dansitometrik analiz oranı. **C**. Farklı dozlarda uygulanan kukurbitasin I'nın Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR western blot bantları **D**. Kukurbitasin I'nın p-Akt/Akt ve p-mTOR/mTOR düzeylerinin dansitometrik analiz oranı. **E**. Farklı dozlarda uygulanan sorafenibin Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR western blot bantları. **F**. Sorafenibin p-Akt/Akt ve p-mTOR/mTOR düzeylerinin dansitometrik analiz oranı. Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil

Büyüme ve hayatta kalmayı sağlayan faktörleri kodlayan genler, RAS/MAPK sinyal yolu tarafından aktive edilmektedir. Bu sinyal yolunun aktivitesi, VEGF gibi büyüme faktörleri, EGFR gibi hücre yüzeyi reseptörü ve RAS, RAF, MEK ve ERK gibi temel sinyal bileşenleri aracılığıyla düzenlenir. Biz de CuD, CuI ve sorafenibin bu sinyal yolundaki etkisini c-Raf, p-c-Raf, MEK, p-MEK, ERK, p-ERK protein düzeyleri ile inceledik. Kukurbitasinlerin ve sorafenibin üç farklı dozu uygulanan HepG2 hücrelerinde c-Raf'ın protein düzeyinde kontrole göre belirgin bir azalma gözlenmezken, p-c-Raf'ın protein düzeyinde ciddi bir azalma gözlenmiştir (**Şekil 29**). MEK ve p-MEK protein düzeyleri incelendiğinde MEK'in protein düzeylerinde doz bağımlı bir etki gözlenmezken, fosforile formunun protein düzeylerinde doz bağımlı bir azalma gözlenmiştir. Bu sinyal yolunun aşağı akış efektörlerinden biri olan ERK protein düzeylerinde ise uygulanan dozlarda kontrole göre belirgin bir azalma gözlenmemiştir. Ancak p-ERK protein düzeyinin doz bağımlı azalmasından dolayı p-ERK/ERK oranının azaldığı ve 5µM CuD, 5 µM CuI ve 10 µM sorafenib uygulamasındaki azalmanın kontrole göre önemli derecede olduğu ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlar HepG2 hücrelerinde 5 µM konsatrasyonda CuD ve CuI, 10 µM konsantrasyonda sorafenib uygulamasının EGFR hücre yüzeyi reseptörü ve VEGF büyüme faktörünün protein düzeylerini önemli derecede inhibe ettiğini, bu hücre reseptörünün ve büyüme faktörünün aktive ettiği RAS/MAPK sinyal yolu modülatörlerinin fosforilasyonunu baskılayarak kaskatın ilerleyişini engellediği ortaya konmuştur.

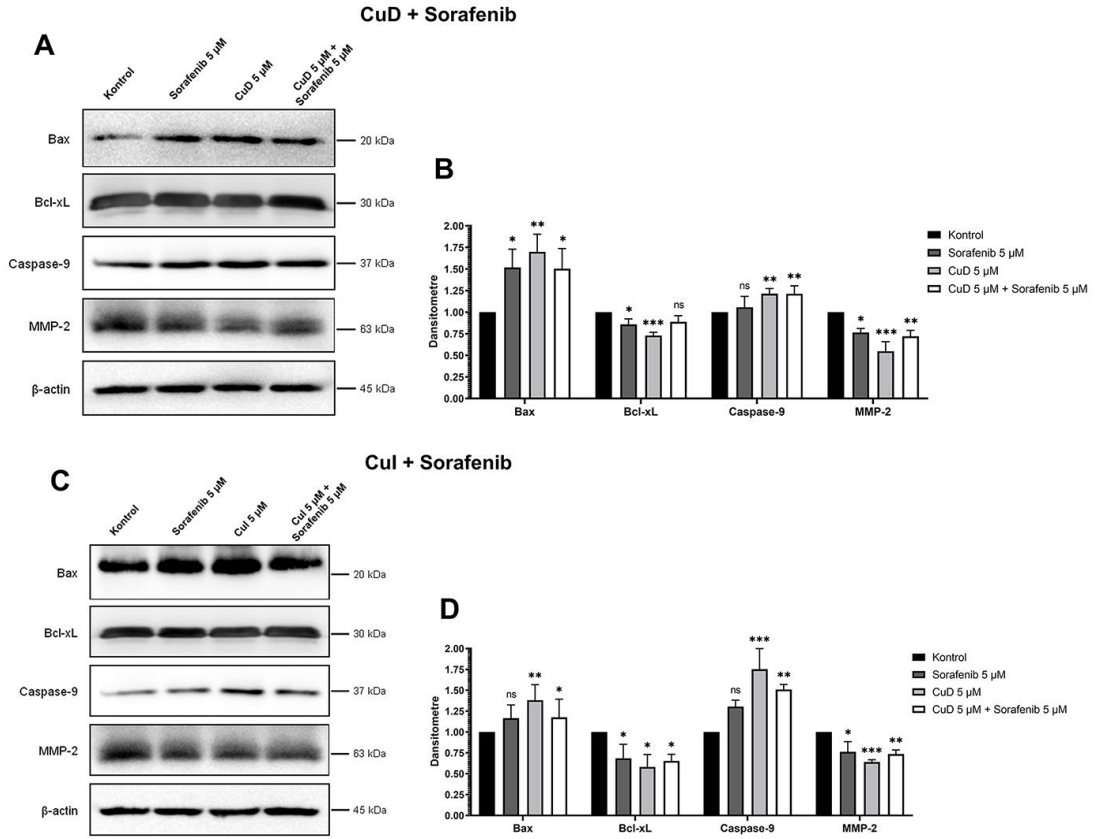


Şekil 29. HepG2 hücrelerine uygulanan kukurbitasin D, I ve sorafenibin c-Raf, p-c-Raf, MEK 1/2, p-MEK 1/2, ERK 1/2, p-ERK 1/2 protein düzeylerine etkisi

HepG2 hücrelerine uygulanan kukurbitasin D, I ve sorafenib Raf/MEK/ERK sinyal yolunu modüle ediyor. **A.** Farklı dozlarda uygulanan kukurbitasin D'nin c-Raf, p-c-Raf, MEK 1/2, p-MEK 1/2, ERK 1/2, p-ERK 1/2 western blot bantları. **B.** Kukurbitasin D'nin p-Raf/Raf, p-mEK/MEK ve p-ERK/ERK düzeylerinin dansitometrik analiz oranı. **C.** Farklı dozlarda uygulanan kukurbitasin I'nın c-Raf, p-c-Raf, MEK 1/2, p-MEK 1/2, ERK 1/2, p-ERK 1/2 western blot bantları. **D.** Kukurbitasin I'nın p-Raf/Raf, p-mEK/MEK ve p-ERK/ERK düzeylerinin dansitometrik analiz oranı. **E.** Farklı dozlarda uygulanan sorafenibin c-Raf, p-c-Raf, MEK 1/2, p-MEK 1/2, ERK 1/2, p-ERK 1/2 western blot bantları. **F.** Sorafenibin p-Raf/Raf, p-mEK/MEK ve p-ERK/ERK düzeylerinin dansitometrik analiz oranı. Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil

4.12. Bileşiklerin Kaspaz 9, Bax, Bcl-XL Protein Düzeylerine Etkisi

Hücre içi ve hücre dışı mekanizmalarla başlatılabilen apoptotik sürecin nihai hedefi kaspazlardır. İnaktif formdan aktif forma geçen tüm kaspazlar geri dönüşümsüz olarak apoptozu indükler. Kukurbitasin D, I ve sorafenibin tek başına ve kombine uygulamasının apoptozla ilişkisini ortaya koymak için apoptotik proteinlerden Bax, antiapoptotik proteinlerden Bcl-XL, kaskat aktivasyonu başlatıcı özellikteki kaspaz 9'un ve proteolitik bir enzim olan matriks metelloproteinaz-2'nin (MMP-2) protein düzeylerini inceledik. Bunun için kukurbitasinlerin HepG2 hücrelerinde en iyi inhibisyon gösterdiği 5 µM dozu ile aynı dozdaki sorafenib tek başına ve kombine olarak uygulandı. Yapılan çalışmada CuD, CuI ve sorafenibin Bax apoptotik protein düzeylerini arttırdığı ancak, CuD ve CuI'daki artışın aynı dozdaki sorafenibe göre istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu ortaya konmuştur (**Şekil 30**). HepG2 hücrelerine 48 saat uygulanan CuD, CuI ve sorafenibin, antiapoptotik özellikteki Bcl-XL protein düzeyini azalttığı ve CuD uygulamasından elde edilen protein düzeyindeki azalmanın sorafenibe kıyasla istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu ortaya konmuştur. Kaspaz kaskadı başlatıcı özelliğiyle apoptozda kritik rolü olan kaspaz 9 protein seviyeleri CuD, CuI ve sorafenib uygulamaları için değerlendirildi. CuD ve CuI'nın Kaspaz 9 protein düzeyinin sorafenibe göre daha yüksek oranda arttırdığı ve CuI'daki artışın istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu bulunmuştur. Hem CuD+Sor hem de CuI+Sor uygulamasının, sorafenibin tek başına uygulamasına göre Kaspaz 9 protein düzeyini daha yüksek oranda arttırdığı ortaya konmuştur. Ekstraselüler matriksin yıkılmasını sağlayarak kanserin metastazına zemin hazırlayan enzimlerden biri MMP-2'dir. Bu nedenle kanserde MMP-2 artması invazyon ve metastasla ilişkilendirilir (203). HepG2 hücrelerinde CuD ve CuI'nın 5 µM uygulamasının MMP-2 protein düzeylerini, sorafenibin 5 µM uygulamasına göre daha çok düşürdüğü görülmüştür. Sorafenibin kukurbitasilerle kombine uygulaması ile elde edilen MMP-2 protein düzeylerinin, tek başın uygulamasından elde edilene göre daha düşük ve istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu ortaya konmuştur. Tüm bu sonuçlar, CuD, CuI ve sorafenibin HepG2 hücrelerinde apoptozla ilişkili Bax ve Kaspaz 9 proteini düzeylerini arttırarak ve antiapoptotik Bcl-XL protein düzeyini azaltarak apoptozu indüklediğini ortaya koymaktadır. Yine bu sonuçlar değerlendirildiğinde, CuD ve CuI'nın apoptotik etkisinin aynı dozdaki sorafenib uygulamasına göre daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca CuD ve CuI, MMP-2 protein düzeyini sorafenibe kıyasla daha yüksek oranda azaltması nedeniyle invazyonun baskılanmasında daha etkili olabileceği ortaya çıkmaktadır.



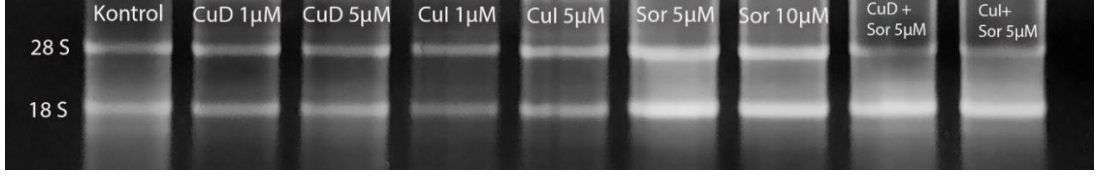
Şekil 30. HepG2 hücrelerine uygulanan kukurbitasin D, I ve sorafenibin Bax, Bcl-XL, Kaspaz 9 ve MMP-2 protein düzeylerine etkisi

HepG2 hücrelerine uygulanan kukurbitasin D, I ve sorafenib apoptozu ve invazyonun baskılanmasını modüle ediyor **A**. Farklı dozlarda uygulanan kukurbitasin D'nin Bax, Bcl-XL, Kaspaz 9 ve MMP-2 western blot bantları. **B**. Kukurbitasin D'nin Bax, Bcl-XL, Kaspaz 9 ve MMP-2 düzeylerinin densitometrik analizi. **C**. Farklı dozlarda uygulanan kukurbitasin I'nın Bax, Bcl-XL, Kaspaz 9 ve MMP-2 western blot bantları **D**. Kukurbitasin I'nın Bax, Bcl-XL, Kaspaz 9 ve MMP-2 düzeylerinin densitometrik analizi. **E**. Farklı dozlarda uygulanan sorafenibin Bax, Bcl-XL, Kaspaz 9 ve MMP-2 western blot bantları. **F**. Sorafenibin Bax, Bcl-XL, Kaspaz 9 ve MMP-2 düzeylerinin densitometrik analizi. Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık $*p<0.05$, $**p<0.01$ ve $***p<0.001$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil

4.13. CuD, CuI ve Sorafenibin AKT, MTOR, MAPK, ERK, STAT3, Kaspaz 3, Bax ve Bcl-XL Gen İfadesine Etkisi

CuD, CuI ve sorafenibin, büyüme faktörlerinin EGFR'ye bağlanmasıyla aktive olan Ras/MAPK, STAT3 ve PI3/AKT/mTOR sinyal kaskatlarına etkisini ifade etmek için bu sinyallerde kritik rol oynayan ERK, MAPK, STAT3, AKT ve mTOR genlerinin ifade düzeyleri incelendi. Ayrıca apoptozu modüle etme özellikleriyle ortaya çıkan Kaspaz 3, Bax, BCL-XL genlerinin ifade düzeyleri de incelendi. qRT-PCR analizinin yapılması

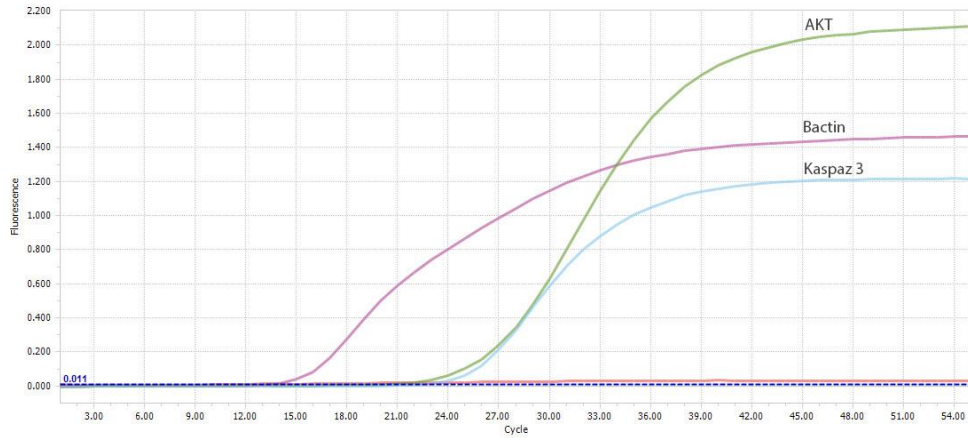
için öncelikle HepG2 hücrelerine uygulanan her grubun RNA'ları saflaştırıldı ve bu grupların 28S ve 18S ribozomal bantları agaroz jel elektroforezi yapılarak görüntülendi (Şekil 31).



Şekil 31. CuD, CuI ve sorafenib uygulamasına ait total RNA elektroforegramı

HepG2 hücrelerine tüm ilaç grupları uygulandıktan sonra izole edilen total RNA'ların saflığı %0.5'lik agaroz jelde elektroforezinde yürütülerek 28S ve 18S rRNA bantları ile kontrol edilmiştir.

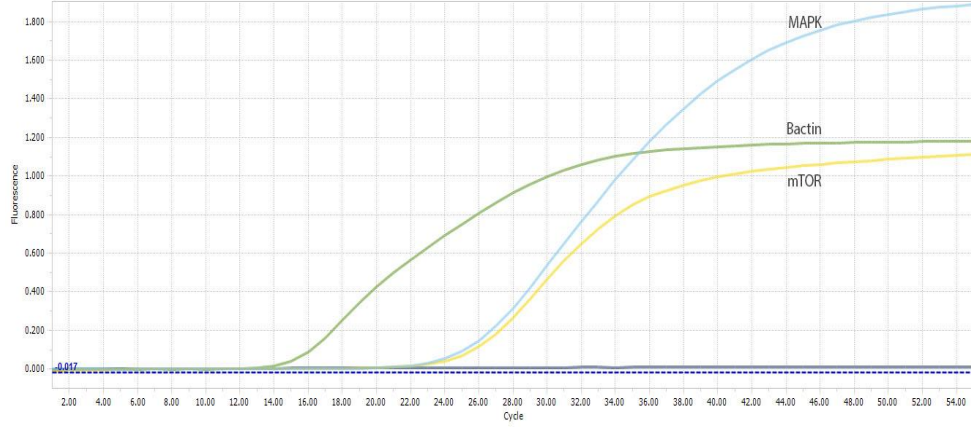
Moleküler analizde “Hydrolysis Probe” kullanılarak β -aktin ve ERK, MAPK, STAT3, AKT, mTOR, Kaspas 3, Bax, BCL-XL mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların qRT-PCR ile çoğaltımı gerçekleştirilmiştir. AKT, Kaspas 3 ve β -aktin mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların qRT-PCR ile çoğaltım eğrisi gösterilmiştir (Şekil 32).



Şekil 32. “Hydrolysis Probe” kullanılarak CuD, CuI ve sorafenib uygulamasına ait β -aktin, AKT ve Kaspaz 3 mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların gerçek zamanlı PCR ile çoğaltım eğrisi

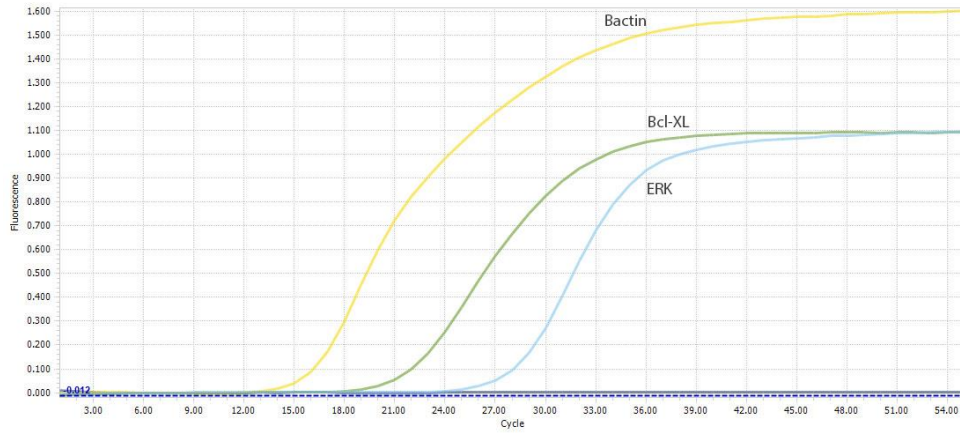
Total RNA'dan sentezlenen AKT, Kaspas 3, β -aktin amplifikasyonlarının RT-PCR eğrileri. Hesaplanan döngü eşiği (Cycle threshold, Ct) ile her numune için bir Ct değerinin belirlenmesini sağlar.

MAPK, β -aktin, ve mTOR mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların qRT-PCR ile çoğaltım eğrisi **Şekil 33**'de gösterilmiştir.



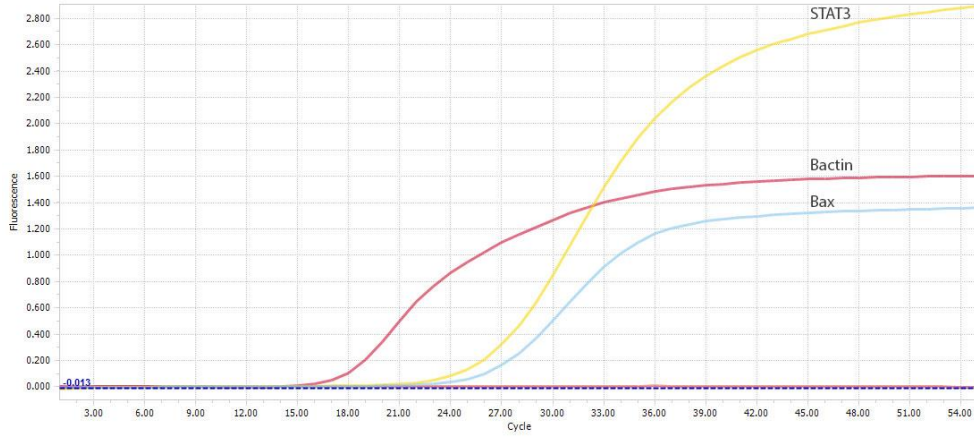
Şekil 33. Hydrolysis Probe” kullanılarak CuD, CuI ve sorafenib uygulamasına ait MAPK, β -aktin, ve mTOR mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların gerçek zamanlı PCR ile çoğaltım eğrisi

β -aktin, Bcl-XL ve ERK mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların qRT-PCR ile çoğaltım eğrisi **Şekil 34**'de gösterilmiştir.



Şekil 34. Hydrolysis Probe” kullanılarak CuD, CuI ve sorafenib uygulamasına ait β -aktin, Bcl-XL ve ERK mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların gerçek zamanlı PCR ile çoğaltım eğrisi

STAT3, β -aktin, ve Bax mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların qRT-PCR ile çoğaltım eğrisi **Şekil 35**'de gösterilmiştir.



Şekil 35. Hydrolysis Probe” kullanılarak CuD, CuI ve sorafenib uygulamasına ait STAT3, β -aktin, ve Bax mRNA’larından sentezlenen cDNA’ların gerçek zamanlı PCR ile çoğaltım eğrisi

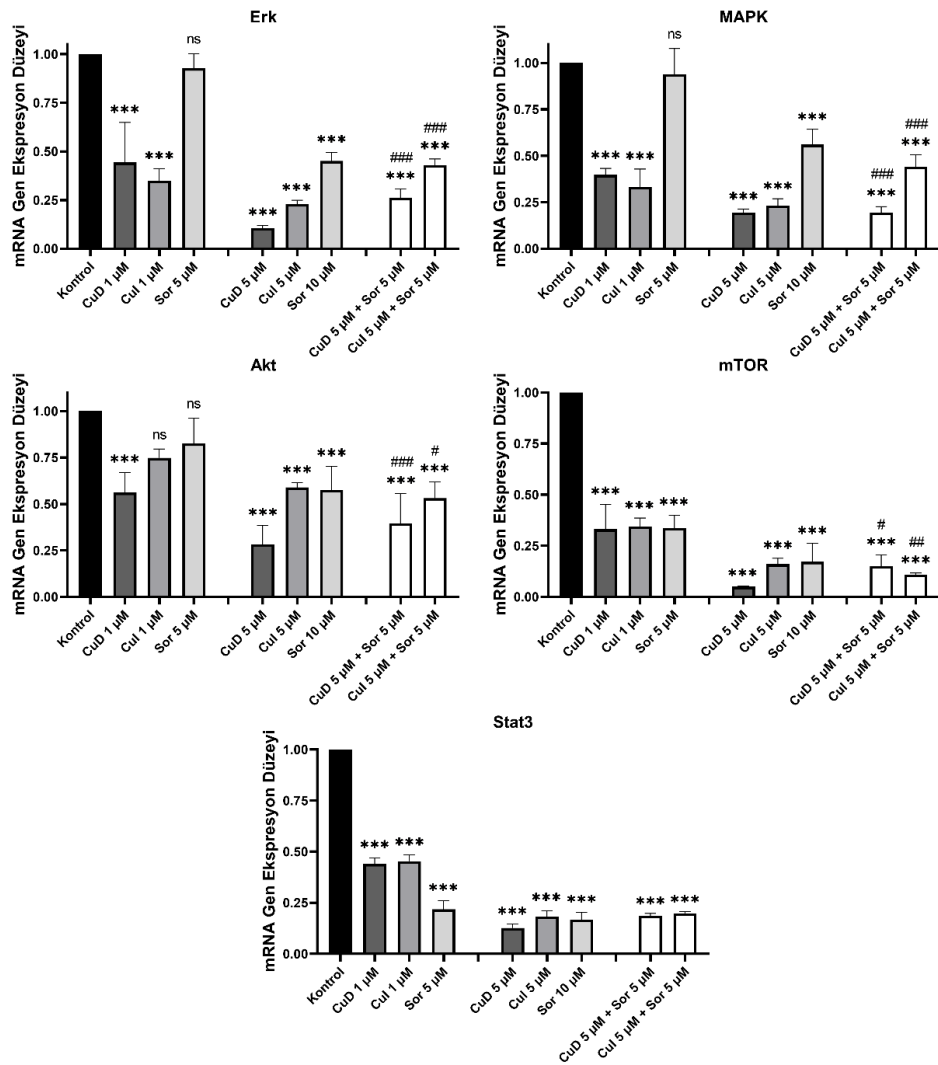
qRT-PCR ile ERK, MAPK, STAT3, AKT, mTOR, Kaspas 3, Bax, BCL-XL ve β -aktin cDNA’larının sentezi sonrası, primer bağlanmasının özgüllüğünü kontrol etmek için örnekler agaroz jel yürütüldü. Elektroforez jeline ERK, MAPK, STAT3, AKT, mTOR, Kaspas 3, Bax, BCL-XL ve β -aktin genleri için tek ve kompakt DNA bantlarının oluştuğu görüldü. DNA marker kullanılarak genlerin karşılık geldikleri baz çifti sayısı da incelenmiştir (**Şekil 36.** CuD, CuI ve sorafenib uygulamasına ait hücre örneklerinin HepG2 hücrelerinde ERK, MAPK, STAT3, AKT, mTOR, Kaspas 3, Bax, BCL-XL ve β -aktin cDNA’larının qRT-PCR çoğaltımının elektroforegram görüntüsü.(DNA Marker Bioron, 50 bp)



Şekil 36. CuD, CuI ve sorafenib uygulamasına ait hücre örneklerinin HepG2 hücrelerinde ERK, MAPK, STAT3, AKT, mTOR, Kaspas 3, Bax, BCL-XL ve β -aktin cDNA’larının qRT-PCR çoğaltımının elektroforegram görüntüsü.(DNA Marker Bioron, 50 bp)

Kukurbitasinlerin ve sorafenibin HepG2 hücrelerine kombine ve tek başına uygulamasıyla elde edilen gen ifade düzeyleri karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Çalışmada, deney gruplarına ait ERK, MAPK, STAT3, AKT ve mTOR mRNA gen ifade düzeyleri β -aktin ifade düzeyine göre normalize edilerek kantitatif Real-time PCR yapıldı (**Şekil 37**). HepG2 hücrelerine 48h süreyle uygulanan CuD, CuI ve sorafenibin ERK, MAPK, STAT3, AKT ve mTOR gen ekspresyon seviyelerini doz artışıyla orantılı olarak

aşağı yönde regüle ettiğini göstermektedir. Ayrıca sorafenib ile kukurbitasinlerin 5 μ M kombine uygulamasının, sorafenibin tek başına 5 μ M uygulandığı gruba göre gen ekspresyonunu önemli derecede azalttığı görülmüştür. qRT-PCR sonuçları, CuD, CuI ve sorafenibin, kanserde aşırı aktive olan Ras/MAPK, STAT3 ve PI3/AKT/mTOR sinyal yollarında kavşak rolü olan genlerin ekspresyon düzeylerini azaltarak bu yolların baskılanmasında rol aldığını göstermektedir. Kukurbitasinlerin sorafenibden daha düşük dozlarda bu sinyal yollarını regüle etmesi ve kombine uygulamalarının sorafenibin etkinliğini artırması, onların antikanser potansiyelinin yüksek olduğunu ve sorafenible kombinasyonunun HCC’de etkili olduğunu göstermektedir.

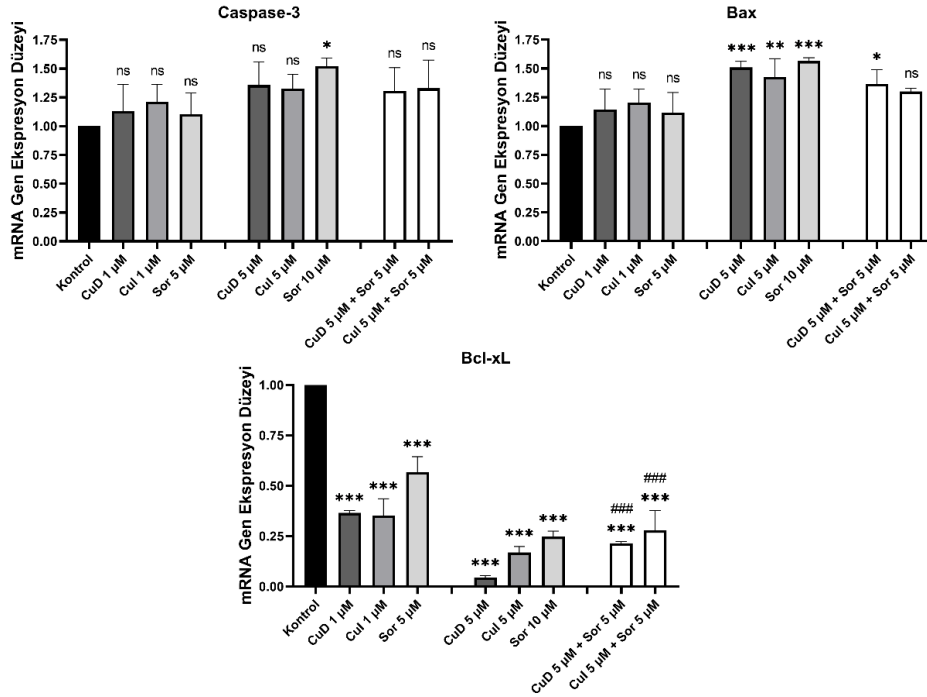


Şekil 37. CuD, CuI ve sorafenibin farklı dozlarında hesaplanan mRNA düzeyleri

HepG2 hücrelerinde tüm gruplar için ERK, MAPK, STAT3, AKT ve mTOR mRNA gen ekspresyonlarının β -aktin’e göre normalize edilen histogram grafikleri. Kontrol grubuna göre

istatistiksel anlamlılık *** $p < 0.001$. 5 μM Sorafenib grubuna göre istatistiksel anlamlılık # $p < 0.05$ ve ### $p < 0.001$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil

Çalışmamızda ayrıca CuD, CuI ve Sorafenibin apoptotik etkisini değerlendirmek için Kaspaz 3, Bax ve Bcl-XL genlerinin mRNA düzeyleri kantitatif Real-time PCR ile incelendi. Reaksiyon sonucu β -aktin ifade düzeyine göre normalize edilen Kaspaz 3 ve Bax genlerinin ifade düzeylerinin doz artışına bağlı olarak arttığı, ancak bu artışın Bax'ın 5 μM konsantrasyonu için istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlenmiştir. Antiapoptotik özellikli Bcl-XL gen ifade düzeylerinin ise doz artışıyla paralel olarak önemli derecede azaldığı ortaya konmuştur (**Şekil 38**). 5 μM konsantrasyonlarda kombine uygulanan sorafenib ve kukurbitasinlerin, Bcl-XL gen ekspresyon düzeyini çok daha yüksek oranda düşürerek, tek başına uygulanan 5 μM sorafenibden daha etkili apoptotik etki gösterdiği ortaya konmuştur. qRT-PCR sonuçları, CuD, CuI ve sorafenibin apoptozla ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerine etki ettiği, Bcl-XL'deki etkinin daha belirgin olduğu ve bu genlere etki ederek apoptozu düzenlediğini ortaya konmuştur.



Şekil 38. CuD, CuI ve sorafenibin farklı dozlarında hesaplanan mRNA düzeyleri

HepG2 hücrelerinde tüm gruplar için Kaspaz 3, Bax ve Bcl-XL mRNA gen ekspresyonlarının β -aktin'e göre normalize edilen histogram grafikleri. Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık * $p < 0.05$ ve *** $p < 0.001$. 5 μM Sorafenib grubuna göre istatistiksel anlamlılık ### $p < 0.001$. ns: İstatistiksel olarak anlamlı değil

5. TARTIŞMA

HCC genellikle bozulmuş karaciğer fonksiyonlarıyla ve kronik karaciğer hastalıklarıyla ilişkilendirilen karaciğerin primer tümörüdür (30). Karaciğer nakli, rejeksiyon, kimyasal ve enerji tabanlı ablasyon, transkatater terapi, radyasyon terapi ve sistemik tedaviler tek başına veya kombine halde uygulanarak HCC’de kitle azaltma, evre düşürme, sağ kalımı artırma ve iyileştirme hedeflenmektedir (204). Bunların yanısıra rezeke edilemeyen ve ilerlemiş HCC’li hastalarda hedefe yönelik kemoterapi ve immünoterapi gibi sistemik tedavilerin kullanımı hastalarda sağkalımı arttırmaktadır (133). Son zamanlarda, hepatokarsinogenezde anormal aktive olan çoklu sinyal yollarının, büyüme faktörlerinin ve trozin kinaz reseptörlerinin anlaşılmasıyla birlikte HCC’de etkili yeni tedavi yöntemleri geliştirilmiştir (205). Hepatokarsinogenezin patogenezinde rol alan VEGF, EGFR, HGF/c-Met, Ras/Raf/MAPK, PI3K/AKT/mTOR, STAT3 ve Wnt/ β -catenin sinyalleşme basamaklarını bloke eden ilaçlar hedefe yönelik tedavi geliştirmeyi sağlamaktadır (12). Bu kemoterapötiklerden sorafenib, HCC tedavisinde kullanımı FDA tarafından onaylanan ve 2007 yılından beri birinci basamak tedavi olarak kullanılan en önemli sistemik ilaçtır (149). Sorafenib hem anormal doku damarlanmasında etkili olan VEGFR/PDGFR’yi hedefleyen hem de tümör hücrelerinde RAF/MEK/ERK yolunu hedefleyen çift etkili bir inhibitördür (206). Sorafenib’in etki mekanizmaları arasında A-RAF, B-RAF ve C-RAF aktivasyonunu baskılayarak mitojenik ve onkojenik sinyalleri bloke etmesi yer alır (207). HCC tümörlerinin zengin kan kaynağı ihtiyacı ve yüksek MAPK aktivitesi göz önünde bulundurulduğunda; sorafenibin RAF/MEK/ERK yolu ve VEGFR/PDGFR’nin etki ettiği anjiyogenez yolunu baskılaması HCC’de kullanılan sistemik tedavide öne çıkmasına neden olmaktadır (14, 208). Faz III klinik çalışmalarına göre; sorafenib, ilerlemiş HCC’si olan hastaların genel sağkalım süresini ortalama 10.7 ve 6.5 ay arttırmıştır (150, 151). Sorafenib ile tedavinin HCC’de genel sağkalımı iyileştirmede etkili olduğu kanıtlanmış olsa da bu sürenin arttırılması daha iyi HCC yönetimi için gerekmektedir. Sorafenib, HCC’de birinci basamak tedavi olmasına rağmen yüksek doz kullanımı, ilaç direnci ve oluşan yan etkiler tedavinin sürekliliğini engeller (209). Ayrıca sorafenib antianjiyojenik özellikte olmasına rağmen karaciğerde anjiyojenik mekanizmaların fazlalığı ve tümör mikrodamarlarının tamamen engellenememesi tedaviyi kısıtlamaktadır (210). Bu nedenle, sorafenibi çoklu sinyal yollarını hedefleyen antianjiyojenik ajanlarla birleştirmek, sorafenibin etkinliğini

artırıp, ilaç direncini azaltacaktır. Ayrıca alternatif ilaç kombinasyonları, sorafenibin etkisini arttırarak uygulanan dozların azaltılmasına olanak sağlayacaktır (211). Bu nedenle son araştırmalarda, sorfenibin ilaç direncinin üstesinden gelecek ve etkinliğini arttıracak yeni terapötik stratejiler sunulmaktadır (136). CuD ve CuI, geniş yelpazede etki gösteren, antioksidan, anti-inflammatuar, immün modülatör ve antikanser aktivitelere sahip doğal bileşiklerdir. CuD ve CuI'nın antikanser aktivitesi, karaciğer kanseri, meme kanseri, kolon kanseri, yumurtalık kanseri, osteosarkom, skuamöz hücreli karsinom ve akciğer kanserinde *in vitro* ve *in vivo* olarak araştırılmıştır (178, 186, 212-216). Ayrıca CuD ve CuI düşük konsantrasyonlarda çoklu sinyal yollarını baskılayarak antikanser etki gösterdiklerinden, antineoplastik ilaçların antiproliferatif etkinliğini arttırmak amacıyla çeşitli kanser türlerinde kombinasyon etkileri araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada CuD'nin, EGFR ve trozin kinaz inhibitörü olan gefitinib ile kombine uygulaması akciğer kanseri hücrelerinde denenmiştir. CuD'nin gefitinib dirençli akciğer kanseri hücrelerinde EGFR, ERK ve AKT fosforilasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği, hücre döngüsünü G2/M fazında bloke ettiği ve apoptozu indüklediği bildirilmiştir. CuD'nin gefitinib direncinin üstesinden gelmek için etkili bir alternatif olabileceği bildirilmiştir (192). Yapılan başka bir çalışmada, CuD tek başına veya dosetaksel ile kombinasyon halinde prostat kanseri kök hücrelerine uygulanmış ve CuD'nin kombinasyon etkisi araştırılmıştır. CuD'nin SOX2 ve Oct 4 gibi embriyojenik faktörlerin ekspresyonunu inhibe ederek prostat kanseri kök hücrelerini modüle ettiği ve dosetakselin terapötik etkinliğini artırdığı ifade edilmiştir (217). CuI'nın da çeşitli kemoterapötiklerle kombinasyon etkileri araştırılmıştır. CuI ve irinotekan kombinasyonunun insan kolorektal kanser hücre hatlarındaki etkisi araştırılmış ve CuI'nın tek başına ve irinotekan ile uygulamasının hücre göçü ve proliferasyonu azalttığı, apoptozu indüklediği ifade edilmiştir (218). Yapılan başka bir çalışmada, CuI'nın yumurtalık kanserinde doksorubisinin antitümör aktivitesini arttırdığı, antioksidatif özelliği ile doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisiteyi azaltabileceği ifade edilmiştir (219). CuD ve CuI'nın hedeflediği bazı sinyal yollarının antikanser ilaçları ile benzerlik göstermesi, bu bileşiklerin kombine tedavi rejimlerinde kullanılma potansiyelini arttırmaktadır. Literatürde CuD ve CuI'nın farklı kanser hücrelerinde, farklı sistemik ilaçlarla kombinasyon etkisinin araştırıldığı çalışmalar olmasına rağmen, hepatoselüler karsinomada sorafenible kombinasyon etkisinin araştırıldığı çalışma bulunmamaktadır. HCC'de birinci basamak tedavi olarak kullanılan sorafenibin oluşturduğu ilaç direncini aşabilmek için yeni kombinasyon alternatiflerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu

nedenle çalışmamızda CuD ve CuI'nın sorafenible kombinasyonu HepG2 hücrelerine uygulanarak, HCC'de anormal aktive olan çoklu sinyal yollarına etkisi ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Mevcut çalışmada, CuD ve CuI'nın sorafenible kombinasyonlarının doz bağımlı antiproliferatif etkileri HepG2 hücre hattı üzerindeki inhibisyon etkileri karşılaştırılarak değerlendirildi. Hücre büyümesi inhibisyonu değerlendirilirken, konsantrasyonun artışıyla birlikte CuD, CuI ve sorafenibin tek başına HepG2 hücrelerine karşı doza bağımlı olarak sitotoksikite sergilediği, ayrıca kukurbitasinlerin daha düşük dozlarda daha yüksek inhibisyonlara neden olduğu gözlemlendi. 5 μ M CuD ve CuI uygulamasının sırasıyla %67.02 ve % 57.23 büyüme inhibisyonu sergilediği, sorafenibin ise yaklaşık %44 büyüme inhibisyonu sergilediği gözlenmiştir. CuD ve CuI'nın sorafenibden daha yüksek oranda büyüme inhibisyonu sergilemesi, bu bileşiklerin HepG2 hücrelerinde düşük konsantrasyonlarda daha etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca CuD, CuI ve sorafenibin hepatoselüler karsinoma hücreleri üzerindeki etkinliğini incelemek için, bileşiklerin tek başına ve kombine uygulamasının %50 inhibitör konsantrasyonları (IC_{50}) değerlendirildi. Hem CuD'nin hem de CuI'nın klinikte kullanılmakta olan sorafenibe kıyasla daha düşük IC_{50} değerleri sergilediği gözlemlendi. CuD ve sorafenibin tek başına ve kombine olarak HepG2 hücrelerine uygulanmasından elde edilen IC_{50} değerleri sırasıyla 0.2751 μ M, 1.341 μ M ve 0.6065 μ M olarak belirlendi. Öte yandan, CuI ve sorafenibin tek başına ve kombine uygulanmasıyla elde edilen IC_{50} değerleri sırasıyla 0.4057 μ M, 1.541 μ M ve 0.9479 μ M olarak tespit edilmiştir. Kombinasyon uygulamasının, sorafenibin tek başına uygulandığı IC_{50} değerlerini düşürmesi, klinikte uygulanmakta olan sorafenibin dozunda ve sağlıklı doku hücreleri üzerindeki toksik yan etkilerinde önemli oranda azalmaya eşlik edeceğini göstermektedir.

Çalışmamızda ayrıca HepG2 hücreleri, 1:1 oranlarında sorafenib ve CuD, sorafenib ve CuI kombinasyonları ile tedavi edildiğinde elde edilen kombinasyon indeksleri değerlendirildi. Hem CuD'nin hem de CuI'nın sorafenib ile kombinasyonunun belirli dozlarında sinerjistik etkilerin olduğu görüldü. CuD ve sorafenib kombinasyonunun 1'in altındaki CI verileri değerlendirildiğinde 1.5-10 μ M arasındaki dozlarda sinerjistik etki sergilediği görülmüştür. Aynı şekilde CuI ve sorafenib kombinasyonunun 1'in altındaki CI verileri değerlendirildiğinde 0.5-10 μ M arasındaki dozlarda sinerjistik etki sergilediği görülmüştür. DRI verileri, her bir ilacın dozunun, tek başına kullanılmasına kıyasla kombinasyon halinde kullanıldığında kaç kat

azaltılabileceğinin ölçüm derecesini belirtir. CuD ile sorafenibin kombinasyonunun DRI değerlerinden çoğu, CuI ile sorafenibin kombinasyonunun DRI değerlerinin tamamı ise 1'den yüksekti. Bu nedenle sonuçlar, CuD ve CuI'nın sorafenib ile kombinasyon halinde kullanılması durumunda sorafenib dozunun 2-7 kat aralığında azaltılabileceğini göstermektedir. Veriler, kukurbitasinlerin sorafenib ile kombinasyonunun daha fazla değerlendirmeyi hak ettiğini göstermektedir. Daha da önemlisi, kombinasyon ile uygulanan sorafenib dozu azaltılarak sağlıklı hücreler için sitotoksik etkinin azaltılabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle CuD ve CuI'nın kombinasyon uygulamasının, olası terapötik uygulamalar için kritik bir faktör olarak ön plana çıkması muhtemeldir.

Kanserli hücrelerde hücre döngüsünün deregülasyonu söz konusudur. Bu nedenle CuD, CuI, sorafenib ve kombinasyon uygulamalarının hücre döngüsü duraklatma etkileri araştırıldı. Tek başına ve kombine kukurbitasin-sorafenib uygulamasının HepG2 hücrelerinde hücre döngüsünü G2/M fazında duraklattığı kaydedildi. Elde edilen bulgular daha önce sorafenib ve kukurbitasinlerle yapılan çalışmalardan elde edilen hücre döngüsü duraklatma etkileriyle uyumludur (183, 220). CuD, CuI ve sorafenib konsantrasyon artışına bağlı olarak HepG2 hücrelerinde G2/M fazındaki hücre yüzdesinde artış olmuştur. CuD'nin 1 ve 5 μ M uygulamasında G2/M fazındaki hücre yüzdesi %49.33'den %59.8'e artmıştır. CuI'nın 1 ve 5 μ M uygulamasında G2/M fazındaki hücre yüzdesi %45.9'den %58.34'e artmıştır. Sorafenibin 5 ve 10 μ M uygulamasında G2/M fazındaki hücre yüzdesi %32.67'den %53.55'e çıkarak önemli bir artış göstermiştir. 5 μ M CuD+Sorafenib ve 5 μ M CuI+Sorafenib uygulamasında ise G2/M fazındaki hücre yüzdesi sırasıyla %43.71 ve %47.73 olarak elde edilmiştir. Kukurbitasin ve sorafenib kombinasyonlarını takiben hücre döngüsünde G2/M fazında artmış hücre birikimi, hücre döngüsünde daha iyi bir blokajı ifade etmektedir.

Apoptoz hem normal sağlıklı hücreler için hem de kanser hücreleri için büyük öneme sahiptir. Sağlıklı hücrelerin zarar görmesi, enfekte olması, hücre içi toksikantların artması hücrenin işlevsiz hale gelmesine ve hücre ölümünü gerçekleştirecek faktörlerin salınmasına neden olur (221). Ancak kanserde, hasar görmüş bu hücreler genetik mutasyonlarla hasarlı DNA ile hücre siklusunun devamlılığını, apoptoz inhibitör proteinlerin salınımını ve Bcl-2 ailesinden anti-apoptotik proteinlerin ifadenmesini arttırarak hücrenin uzun süre hayatta kalmasına neden olur. Bu nedenle kanserde apoptoz indüksiyonunu sağlayan kemoterapötiklerin kullanımı esastır (222). Bunun yanı sıra

kombinasyon tedavi yöntemleri apoptoz indüklemeye kapasitesini arttırarak tümör inhibisyonunu sağlayabilmektedir. Biz de çalışmamızda CuD ve CuI'yı sorafenib ile kombine uygulayarak sorafenibin apoptoz indüklemeye kapasitesini arttırmayı hedefledik. HepG2 hücrelerinde CuD ve CuI ve sorafenibin monoterapi olarak uygulaması doz artışıyla birlikte apoptotik hücre sayısında artış göstermiştir. Bu sonuç, CuD, CuI ve sorafenibin kanser hücrelerinde belirgin apoptotik etki gösterdiğini ifade eden önceki çalışmalarla uyumludur (21, 207, 216). Bununla birlikte 5 µM tekli sorafenib tedavisine kıyasla, CuD ile kombinasyonunda 1.3 kat ve CuI ile kombinasyonunda 1.5 kat geç apoptozda artış gözlemlendi. Kukurbitasin B ve sorafenibin kombinasyon etkisinin araştırıldığı bir çalışmada sorafenib ve kukurbitasin B ile tedavinin, tekli sorafenib tedavisine kıyasla apoptotik hücre yüzdesini hem HepG2 hem de Huh7 hücrelerinde arttırdığı ifade edilmiştir (223). Bizim sonuçlarımız bu araştırmanın sonuçları ile uyum göstermiştir. CuD, CuI ve sorafenibin potansiyel sinerjistik etkisini değerlendirmek için apoptotik sürecin hücre içi ve hücre dışı mekanizmalarında etkin rolü olan kaspaz-9, kaspase-3, Bax ve Bcl-xL'nin protein ve gen ekspresyon seviyelerini inceledik. Apoptotik sürecin ana yürütücülerinden biri olan kaspaz-9 aktive olduktan sonra kaspaz-3, 6 ve 7 efektör kaspazlarını aktive ederek hücre yıkımını katalizler. Biz de çalışmamızda, kaspaz kaskadı başlatıcı özelliğiyle apoptozda kritik rolü olan kaspaz-9 protein seviyelerini CuD, CuI ve sorafenib uygulamaları için değerlendirdik. CuD ve CuI'nın kaspaz-9 protein düzeyini sorafenibe göre daha çok arttırdığı ve CuI'daki artışın istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu bulunmuştur. Hem CuD+sorafenib hem de CuI+sorafenib uygulamasının, sorafenibin tek başına uygulamasına göre kaspaz-9 protein düzeyini daha yüksek oranda arttırdığı ortaya konmuştur. Monoterapi ile karşılaştırıldığında, sorafenib ve kukurbitasin kombinasyonunun kaspaz-3 gen ekspresyon seviyelerini yukarı regüle ettiği ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Ayrıca, yaptığımız çalışmada Bcl-2 ailesinin apoptotik üyelerinden Bax ve antiapoptotik üyelerinden biri olan Bcl-xL'nin protein ve gen ekspresyon düzeyleri de incelendi. Yapılan western blot analizinde; CuD, CuI ve sorafenibin Bax apoptotik protein düzeylerini arttırdığı ancak, CuD ve CuI'daki artışın aynı dozdaki sorafenibe göre istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu ortaya konmuştur. Bax geninin ifade düzeyleri araştırıldığında, doz artışına bağlı olarak CuD, CuI ve sorafenibin Bax'ın ekspresyon düzeyini arttırdığı ve CuD+sorafenib kombinasyonundaki artışın, CuI+sorafenib kombinasyonuna göre daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, CuD, CuI ve sorafenibin, antiapoptotik özellikteki Bcl-xL protein düzeyini azalttığı ve CuD uygulamasından elde edilen protein düzeyindeki

azalmanın sorafenibe kıyasla istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu ortaya konmuştur. Bcl-xL gen ifade düzeylerinin ise doz artışıyla paralel olarak önemli derecede azaldığı, 5 μ M konsantrasyonlarda kombine uygulanan sorafenib ve kukurbitasinlerin, Bcl-xL gen ekspresyon düzeyini daha çok düşürerek, tek başına uygulanan 5 μ M sorafenibden daha etkili apoptotik etki gösterdiği ortaya konmuştur. Daha önce sorafenibin apoptoz üzerine etkisi iki farklı hepatosellüler karsinom kanser hücresinde araştırılmış ve sorafenibin kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9 protein ekspresyonunu artırarak kaspaz bağımlı hücre ölümünü indüklediği belirtilmiştir (224). Literatürde CuD'nin ve CuI'nın apoptotik proteinler aracılığıyla hepatosellüler karsinomu indüklediğine dair bir çalışma olmamakla birlikte farklı kanser türlerinde apoptozu indüklediği bildirilmiştir. CuD'nin pankreatik kanser hücre hatlarında kaspaz-7 ve kaspaz-8 ve PARP protein ekspresyonunu artırarak kaspaz bağımlı hücre ölümünü indüklediği belirtilmiştir (225). CuI'nın da yumurtalık kanseri hücrelerinde kaspaz-3 ve Bax protein ekspresyonunu artırıp, Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak apoptozu indüklediği bildirilmiştir (21). Biz de çalışmamızda sorafenib, CuD ve CuI'nın HepG2 hücrelerinde kaspaz-3, kaspaz-9, Bax artışına ve Bcl-xL azalışına yol açarak apoptozu indüklediğini ortaya koyduk. Ayrıca CuD ve CuI'nın sorafenib ile kombine edilmesinin, HepG2 hücrelerinde sinerjistik olarak kaspaz bağımlı apoptoz indüksiyonuna yol açtığını gösterdik.

Oksidatif fosforilasyon sırasında elektron transport zinciri üzerinde bulunan kompleks I, III ve IV (proton pompaları) tarafından mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) oluşturulur. ATP üretimi için gerekli olan hidrojen iyonlarının transmembran potansiyelini, proton gradyanı (ΔpH) ve $\Delta\Psi_m$ oluşturur. Sağlıklı hücrelerin mitokondriyal fonksiyonu bu şekilde ilerlerken, mitokondriyal homeostazı bozulmuş hücrelerde ise apoptozun indüklenmesini takiben mitokondriyal membranı boyunca elektrokimyasal gradyan bozulur (226). Bu nedenle mitokondri membranının durumu apoptozla ilişkilendirilir. Mitokondri fonksiyonu normal olan hücrelerde, JC-1 reaktifi mitokondride agregre olarak kırmızı floresan oluşturur. Apoptotik hücrelerde, boya mitokondriye giremediği için floresan kaybına neden olur. Bizim çalışmamızda da, ilaç grubu uygulanmayan HepG2 hücreleri, JC-1 boyasının mitokondride agregre olduğunu gösteren yoğun kırmızı floresan sergiledi. Ancak, CuD, CuI ve sorafenibin artan dozlarda uygulanmasıyla hücrelerde gözlemlenen kırmızı floresans yoğunluğunda azalma gözlemlendi. Ayrıca elde ettiğimiz veriler; sorafenible kukurbitasinlerin kombine uygulamasının aynı dozdaki sorafenib uygulamasına göre daha belirgin mitokondriyal

membran potansiyeli kaybına neden olarak apoptozu indüklediğini göstermektedir. CuD'nin endometrial ve yumurtalık kanser hücrelerindeki apoptotik etkisini araştıran bir çalışmada CuD uygulamasının mitokondrial membran potansiyel kaybına neden olduğu ifade edilmiştir (216). Benzer şekilde sorafenibin mitokondrial hasara neden olduğu araştırılan bir çalışmada sorafenibin elektron taşıma zincirinde kompleks II/III ve ATP sentazın aktivitesini inhibe ettiği, ayrıca mitokondrial dış zar üzerinde hasara neden olduğu ifade edilmiştir (227). Bizim çalışmamızın sonuçları da literatürdeki çalışmalara benzer şekilde CuD, CuI ve sorafenibin mitokondrial membran potansiyeli kaybına neden olarak apoptozu indüklediğini göstermektedir.

Matriks metalloproteinazlar (MMP), HCC'nin metastazı sırasında hücre dışı matriks proteinlerini parçalayarak kanserli hücre göçüne neden olmaktadır. Bu nedenle potansiyel antikanser bileşiklerin MMP'lerin ekspresyonunun düzenleyerek metastazı baskılaması beklenir. HCC'de MMP-2'nin artması invazyon ve metastazla ilişkilendirildiği için çalışmamızda; CuD, CuI, sorafenib ve kombinasyonunun MMP-2 protein ekspresyonu üzerine etkisini inceledik. HepG2 hücrelerinde CuD ve CuI'nın 5 μ M uygulamasının MMP-2 protein düzeylerini, sorafenibin 5 μ M uygulamasına göre daha yüksek oranda düşürdüğü görüldü. Bu da monoterapi ile karşılaştırıldığında, sorafenibin CuD ve CuI ile kombinasyonunun, MMP-2 ekspresyon seviyelerini belirgin şekilde aşağı regüle ederek metastazı baskılayabileceğini ortaya koymuştur. Literatürde CuD ve CuI'nın MMP'ler üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamakla birlikte sorafenibin MMP-2 ve MMP-9 baskılanması yoluyla HepG2 hücrelerinin göçünü ve istilasını inhibe ettiği ifade edilmiştir (228). Yaptığımız çalışma, CuD ve CuI'nın monoterapi ve sorafenible kombine tedavi uygulamalarının MMP-2 aracılığıyla hücre göçünü baskıladığını gösteren ilk çalışmadır. Ayrıca sorafenibin MMP'leri baskılayarak hücrelerinin göçünü engellediğini gösteren diğer çalışmalarla uyum içindedir (228, 229).

Hepatosellüler karsinomanın invaziv özellikte bir kanser türü olduğu bilinmektedir. Bu sebeple çalışmamızda uygulanan ilaç gruplarının farklı dozları ile yara iyileştirme deneyi yapıldı. Çalışmada ilaç uygulanmayan HepG2 hücrelerinde boşluk genişliğinin zamana bağlı bir şekilde azaldığı gözlemlenirken, 5 μ M CuD, CuI ve 10 μ M sorafenib konsantrasyonları ile tedaviden sonra, hücre göçünün önemli derecede azaldığı görülmüştür. Ayrıca yara iyileşme deneyi sonuçları CuD+sorafenib, CuI+sorafenib kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinin göç kabiliyetini azalttığını göstermiştir. Hücrelerin invazyon yeteneğini gösteren yara iyileşme deneyi ve hücrelerin metastaz

yeteneğini gösteren MMP-2 western blot analizi birlikte değerlendirildiğinde; sorafenibin CuD ve CuI ile kombinasyonunun HepG2 hücrelerinin göçünü ve istilasını inhibe ettiğini göstermektedir.

Karaciğer hasarı ile karaciğer parankiminin yapısının değişmesi sonucunda hipoksi oluşur. Hipoksiye hücrel yanıt olarak VEGF gibi proanjiyogenik faktörlerin, EGFR gibi büyüme faktörlerinin ve metalloproteinazların üretimi artar (100). Anjiyogenez sürecinde, yeni kan damarlarının oluşumu VEGF ile aktive edilirken, EGFR ile hücrelerin proliferasyonu aktive edilir. Anjiyogenezi ve proliferasyonu eş zamanlı hedeflemek ayrı ayrı hedeflemekten daha az yan etkili tedavi olanakları sağlayacağı için, VEGF ve EGFR sinyal yollarını eşzamanlı olarak hedefleyen inhibitörleri kullanmak kombine antianjiyogenik tedavileri ön plana çıkarmaktadır (230). Çalışmamızda CuD, CuI ve sorafenib HepG2 hücrelerine monoterapi olarak uygulanarak VEGF ve EGFR üzerindeki inhibitör aktivitesi incelenmiştir. İlaç gruplarının MMP-2 üzerindeki inhibitör aktivitesi, VEGF ve EGFR protein düzeyindeki azalmayla da desteklenmiştir. Uygulanan tekli tedaviler, EGFR'nin fosforilasyonunu doz bağımlı olarak azaltmış, VEGF aktivasyonunu baskılamıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar, CuD, CuI ve sorafenibin HepG2 hücrelerinde büyüme faktörünün ve anjiyogenik faktörün inhibisyonuna aracılık ettiğini göstermektedir. Bu inhibitör etki, CuD'nin gefitinib dirençli akciğer kanserinde EGF'nin EGFR'ye bağlanmasını engelleyerek hücre ölümünü indüklediğini gösteren önceki çalışmayla uyumludur (192).

Hem VEGF hem de EGF reseptörlerine bağlanarak, Ras aktivasyonu, Raf/MAPK aktivasyonu ve PI3K/Akt/mTOR gibi ortak aşağı akış sinyal yollarını aktive eder. HCC'de reseptör trozin kinazların aşırı aktivasyonu, PI3K yolunda yer alan genlerin mutasyonu veya amplifikasyonu, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun aşırı aktivasyonuna neden olarak tümörün ilerlemesine ve metastazına katkıda bulunur (125). Bu sinyal yolunda yer alan Akt, mTOR gibi aşağı akış efektörlerini modüle eden inhibitörlerin araştırılması antikanser çalışmalarının ilgi çeken konusu olmuştur (127). Bu nedenle biz de araştırmamızda CuD, CuI ve sorafenibin PI3K/Akt/mTOR yoluna etkisini değerlendirmek için Akt ve mTOR'un protein ve gen düzeylerini inceledik. Yapılan western blot çalışmasında farklı dozlarda uygulanan kukurbitasin ve sorafenibin Akt fosforilasyonunu doz bağımlı olarak azalttığı gözlemlenmiştir. Benzer şekilde 5 μ M CuD, 5 μ M CuI ve 10 μ M sorafenib uygulamasının p-mTOR/mTOR oranını azalttığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar CuD ve CuI'nın, EGF reseptörünün inhibisyonundan

başlayarak aşağı akış sinyali olarak Akt/mTOR yolunu inhibe ettiğini ve bunun sonucu olarak hücresel sağ kalımı baskıladığını göstermektedir. Yaptığımız çalışma, sorafenibin HepG2 hücrelerine uygulanan yüksek dozlarına karşılık, daha düşük dozlarda uygulanan CuD ve CuI'nın PI3K/Akt/mTOR yolundaki modülatör proteinlerinin düzeylerini azalttığını göstermiştir. Ayrıca sorafenib ile kukurbitasinlerin 5 µM kombinasyonlarının, sorafenibin monoterapi olarak uygulandığı gruba göre Akt ve mTOR gen ekspresyonlarını daha çarpıcı şekilde azalttığı görülmüştür. CuD ve CuI'nın sorafenibden daha düşük dozlarda bu sinyal yolunu regüle etmesi ve kombine uygulamalarının sorafenibin etkinliğini arttırması, onların antikanser potansiyelinin yüksek olduğunu ve sorafenible kombinasyonunun HCC'de etkili olabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, daha önce hepatosellüler karsinoma ve renal kanser hücrelerinde PI3K/Akt/mTOR inhibitörleri ile sorafenib kombinasyonlarının sinerjistik etki gösterdiğini vurgulayan önceki çalışmalarla uyumludur (231-234).

Ras/MAPK, hücre proliferasyonu, farklılaşma, anjiyogenez ve hayatta kalma dahil olmak üzere önemli hücresel süreçleri düzenleyen ve çeşitli kanser türlerinde aşırı aktive olan bir sinyal yoludur (114). MEK/ERK ekspresyonu ve fosforilasyonuna dayalı olarak, erken evre HCC hastalarının yaklaşık %50'sinde ve ileri evre HCC'li hastaların hemen hemen tümünde aktif olduğu ifade edilmiştir (117). RAS/MAPK sinyal yolu VEGFR, EGFR gibi hücre yüzeyi reseptörleri ile aktive edilirken, RTK, RAS, RAF, MEK ve ERK gibi temel sinyal bileşenleri aracılığıyla modüle edilir (104). Bu yolak, büyüme faktörlerinin reseptörlere bağlanmasıyla aktive edildikten sonra bir dizi spesifik fosforilasyon olayını tetikler (119). Kukurbitasinlerin ve sorafenibin üç farklı dozu uygulanan HepG2 hücrelerinde c-Raf, MEK ve ERK proteinlerinin fosforile formlarının ekspresyon seviyelerinde doz bağımlı bir azalma gözlenmiştir. Ayrıca sorafenibe kıyasla, CuD ve CuI'nın daha düşük konsantrasyonlarda p-c-Raf, p-MEK, p-ERK düzeylerine etki ettiği gözlenmiştir. Bu bulgular CuD, CuI ve sorafenibin, RAS/MAPK sinyal yolundaki efektörlerin fosforilasyonunu baskılayarak bu kaskatın ilerleyişini engellediğini ve kukurbitasinlerin daha düşük dozlarda bu modülasyona aracılık ettiğini göstermektedir. Ayrıca çalışmamızda CuD ve CuI'nın hem monoterapi hem de sorafenible kombine tedavisinin etkisini değerlendirmek için ERK ve MAPK gen düzeyleri incelendi. Kukurbitasin ve sorafenib kombinasyonlarının, sorafenibin tek doz uygulandığı (5 µM) gruba göre ERK ve MAPK gen ekspresyonlarını daha çarpıcı şekilde azalttığı görülmüştür. CuD ve CuI'nın sorafenibden daha düşük dozlarda bu sinyal yolunu

regüle etmesi ve kombine uygulamalarının sorafenibin etkinliğini arttırması, Raf inhibitörü olan sorafenibin kombine uygulamayla daha düşük konsantrasyonlarda HCC’de etkili olabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, daha önce hepatosellüler karsinomada reseptör tirozin kinaz inhibitörleri ve Src homolog-2 domain içeren protein tirozin fosfataz inhibitörleri ile sorafenib kombinasyonlarının Raf/MEK/ERK yolunun aktivasyonunu baskılayarak sinerjistik etki gösterdiğini vurgulayan önceki çalışmalarla uyum içindedir (232, 235). Bunun yanı sıra daha öne CuD ve CuI’nın Raf/MEK/ERK yolunu baskıladığını gösteren bir araştırma bulunmamaktadır. Bu nedenle yaptığımız çalışma CuD ve CuI’nın hücre yüzeyinden başlayarak EGFR hücre yüzeyi reseptörü ve VEGF büyüme faktörünün protein düzeylerini inhibe ederek, bu hücre reseptörünün ve büyüme faktörünün aktive ettiği Raf/MEK/ERK sinyal yolu modülatörlerinin fosforilasyonunu baskılayarak kaskatın ilerleyişini engellediğini ortaya koyan ilk çalışmadır.

Yapılan çalışmada CuD, CuI ve sorafenibin HCC’de anormal aktivasyonu olan sinyal yollarına etkisi *in vitro* olarak değerlendirildi. Hem CuD’nin hem de CuI’nın hücre canlılığını azaltarak bu sinyal yollarını baskıladığı ortaya konmuştur. CuD’nin IC₅₀ değerinin CuI’dan daha düşük olduğu belirlenmekle birlikte her iki bileşiğin de HepG2 hücrelerinde güçlü büyüme inhibisyonuna aracılık ettiği gözlemlenmiştir. CuD ve CuI’nın sorafenible kombinasyon indeksleri değerlendirildiğinde, CuI’nın daha geniş konsantrasyon aralığında sorafenible sinerjistik etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra Ras/MAPK, PI3K/Akt/mTOR ve kaspas kaskatı ile ilgili protein ve gen ekspresyonları değerlendirildiğinde hem CuD’nin hem de CuI’nın bu protein ve genlerin ekspresyonunu 1 ve 5 µM konsantrasyonlarda belirgin şekilde regüle ettiği ortaya konmuştur. Bu iki bileşiğin aynı konsantrasyon aralıklarında HepG2 hücre inhibisyonuna aracılık etmesi, muhtemelen benzer moleküler yapıya sahip olmalarından kaynaklanmaktadır.

Genel olarak değerlendirildiğinde; yapılan çalışma CuD ve sorafenib, CuI ve sorafenib kombinasyonlarının hücresel proliferasyonunu baskılayarak, apoptozu indükleyerek ve hücre döngüsünü G2/M fazında duraklatarak hepatosellüler karsinomaya karşı güçlü bir antikanser etki gösterebileceğini ortaya koymuştur. Bu kombinasyon uygulamalarının HCC’de, kaspaz bağımlı apoptozu aktive ederek ve MMP-2, EGFR, VEGF protein düzeylerini azaltarak tümör invazyonu ve anjiyogenezde rol oynayabileceği ortaya konmuştur. Ayrıca kukurbitasinlerin farklı kanser türlerinde, farklı

kemoterapötiklerle kombinasyon etkisini araştıran çalışmalar olmasına rağmen, yapılan alışma CuD ve CuI'nın sorafenible kombinasyonunun HepG2 hücrelerinde PI3K/Akt/mTOR ve Raf/MEK/ERK sinyal yolunu baskıladığını gösteren ilk çalışmadır. Sorafenib ile CuD ve CuI kombine uygulaması, uygulanan sorafenib dozlarını azaltarak toksik yan etkilerinin azaltılabileceğini ortaya koymuştur. Hepatoselüler karsinoma üzerinde hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak yapılacak ileri çalışmalar, kukurbitesinlerin yararlılığını doğrulayacak ve klinikte sorafenible birlikte uygulanabileceğini ortaya koyacaktır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Anti-anjiyojenik ve multi-tirozin kinaz inhibitörü olma özelliğiyle ortaya çıkan sorafenib, HCC tedavisinde 2007 yılından beri birinci basamak tedavi olarak kullanılan en önemli sistemik ilaçtır. Sorafenib ile tedavinin HCC’de genel sağkalımı iyileştirmede etkili olduğu bilinmekle birlikte bu sürenin arttırılması daha iyi HCC yönetimi için gerekmektedir. Hepatosellüler karsinoma hücrelerinde sorafenibe karşı direnç oluşması sorafenibin karaciğer kanserinde uzun süreli kullanımını kısıtlamakta ve tedavinin sürekliliğini engellemektedir. Sorafenibin etki gücünü arttırmak ve uygulanabilir dozunu azaltmak için kombine ve tekli ilaç tedavilerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle HCC tedavisine yönelik, sorafenibe alternatif kemoterapötiklere ve sorafenib ile kombine yeni terapötik stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. CuD ve CuI, geniş yelpazede etki gösteren, antioksidan, anti-inflammatuar, antikanser aktivitelere sahip doğal bileşiklerdir. Bu bileşiklerin çeşitli sinyal yollarını baskılayarak antikanser etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmamızda CuD ve CuI ve sorafenibin hepatosellüler karsinoma hücrelerinde uyardığı ve baskıladığı sinyal yolları birlikte araştırılarak antikanser etkinliği ortaya konmuş ve kükurbitasinlerin sorafenible kombinasyon halinde kullanılabilirliği tartışılmıştır. CuD ve CuI’nın düşük konsantrasyonlarda antiproliferatif etkiye sahip olduğu, daha yüksek konsantrasyonlarda antiproliferatif etki gösteren sorafenib ile kombine edildiğinde sinerjistik etki gösterdiği ortaya konmuştur. Bu durum HCC’de antineoplastik ilaç olarak kullanılan sorafenibin kükurbitasinlerle kombine edildiğinde kemoterapötik dozunun azaltılabileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca çalışmamızda; sorafenibin hedeflediği RAF/MEK/ERK ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yollarını ve EGFR, VEGF ve MMP-2 gibi efektörlerini, CuD ve CuI’nın da hedef alarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu sonuç; CuD ve CuI’nın hedeflediği sinyal yollarının sorafenib ile benzerlik gösterdiğini, sorafenib ile kombinasyonunun HCC’de anjiyojenik, metastatik ve proliferatif aktiviteyi baskılayarak tümör mikroçevresine etki edebileceğini, sorafenibe direnci azaltarak ilacın etkinliğini arttırabileceğini ortaya koymaktadır.

Yapılan çalışmanın literatüre katkısını arttırmak için öne çıkan öneriler aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır;

- Kukurbitasinlerin saflaştırılması ve izolasyonu için ekibimiz tarafından geliştirilen HPLC metodu, preparatif HPLC sistemine uyarlanarak kukurbitasinlerin daha kısa sürede daha yüksek verimle elde edilmesi sağlanabilir.
- Kültür ortamında çoğaltılan hücrelerin maruz kaldığı mikroçevre ile organizmada ait oldukları dokuda maruz kaldıkları mikroçevre farklılık göstermektedir. Kültür ortamında sadece kanserli hücre çoğalırken, kanserli dokuda sağlıklı hücreler ve farklı hücre tipleri kanserli hücrelerle temas halindedir. Organizmada bu mikroçevreyle etkileşimde olan kanserli hücrelerin kemoterapötiklere verdiği yanıt ile kültür ortamında çoğalan kanserli hücrelerin verdiği yanıt farklılık gösterebilmektedir. CuD ve CuI'nın hepatoselüler karsinomadaki etkilerinin daha net ortaya konması için hücrelerde uygulanan doz aralıkları hayvan modelleri üzerinde denenmeli ve farmakokinetik çalışmalarla diğer doku ve sistemlere etkisi araştırılmalıdır.
- CuD ve CuI'nın antikanser etkisinin ortaya konulması için hepatosellüler hücre hatlarında uyardığı kaspaz aracılı apoptotik kaskatlar ve baskıladığı PI3K/AKT/mTOR ve RAF/MEK/ERK gibi kanserde aşırı aktive olan yollar *in vivo* karaciğer kanseri modellerinde araştırılmalıdır. HCC hücre kültürlerinde etkili olan sitotoksik, anti-metastatik ve anti-anjiyojenik etkileri *in vivo* çalışmalarla da desteklenmelidir.
- Kanser hücrelerinde sinerjistik etki gösterdiği doz aralıkları göz önünde bulundurularak CuD ve CuI'nın monoterapi ve sorafenib ile kombine tedavi uygulamaları *in vivo* kanser modellerinde çalışılmalı, kukurbitasin yararlılığı doğrulanarak, klinikte sorafenible birlikte uygulanabilirliği ortaya konulmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015, 136(5):E359-86.
2. Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, Gores G. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016, 2:16018.
3. Jiang Y, Han QJ, Zhang J. Hepatocellular carcinoma: Mechanisms of progression and immunotherapy. *World J Gastroenterol* 2019, 25(25):3151-67.
4. Aravalli RN, Cressman EN, Steer CJ. Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update. *Arch Toxicol* 2013, 87(2):227-47.
5. Whittaker S, Marais R, Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2010, 29(36):4989-5005.
6. Xu Z, Hu J, Cao H, Pilo MG, Cigliano A, Shao Z, Xu M, Ribback S, Dombrowski F, Calvisi DF, Chen X. Loss of Pten synergizes with c-Met to promote hepatocellular carcinoma development via mTORC2 pathway. *Exp Mol Med* 2018, 50(1):e417.
7. Sun R, Zhai R, Ma C, Miao W. Combination of aloin and metformin enhances the antitumor effect by inhibiting the growth and invasion and inducing apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma through PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer Med* 2020, 9(3):1141-51.
8. Song XZ, Ren XN, Xu XJ, Ruan XX, Wang YL, Yao TT. LncRNA RHPN1-AS1 Promotes Cell Proliferation, Migration and Invasion Through Targeting miR-7-5p and Activating PI3K/AKT/mTOR Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Technol Cancer Res Treat* 2020, 19:1533033820957023.
9. Semela D, Piguet AC, Kolev M, Schmitter K, Hlushchuk R, Djonov V, Stoupis C, Dufour JF. Vascular remodeling and antitumoral effects of mTOR inhibition in a rat model of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2007, 46(5):840-8.
10. Akula SM, Abrams SL, Steelman LS, Emma MR, Augello G, Cusimano A, Azzolina A, Montalto G, Cervello M, McCubrey JA. RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/PTEN/AKT/mTORC1 and TP53 pathways and regulatory miRs as

- therapeutic targets in hepatocellular carcinoma. *Expert Opin Ther Targets* 2019, 23(11):915-29.
11. Ye L, Mayerle J, Ziesch A, Reiter FP, Gerbes AL, De Toni EN. The PI3K inhibitor copanlisib synergizes with sorafenib to induce cell death in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Discov* 2019, 5:86.
 12. Dimri M, Satyanarayana A. Molecular Signaling Pathways and Therapeutic Targets in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)* 2020, 12(2).
 13. Galuppo R, Maynard E, Shah M, Daily MF, Chen C, Spear BT, Gedaly R. Synergistic inhibition of HCC and liver cancer stem cell proliferation by targeting RAS/RAF/MAPK and WNT/beta-catenin pathways. *Anticancer Res* 2014, 34(4):1709-13.
 14. Molina-Ruiz FJ, Gonzalez R, Rodriguez-Hernandez MA, Navarro-Villaran E, Padillo FJ, Muntane J. Antitumoral Activity of Sorafenib in Hepatocellular Carcinoma: Effects on Cell Survival and Death Pathways, Cell Metabolism Reprogramming, and Nitrosative and Oxidative Stress. *Crit Rev Oncog* 2016, 21(5-6):413-32.
 15. Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 2008, 7(10):3129-40.
 16. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004, 64(19):7099-109.
 17. Lee DH, Iwanski GB, Thoennissen NH. Cucurbitacin: ancient compound shedding new light on cancer treatment. *ScientificWorldJournal* 2010, 10:413-8.
 18. Chen X, Bao J, Guo J, Ding Q, Lu J, Huang M, Wang Y. Biological activities and potential molecular targets of cucurbitacins: a focus on cancer. *Anticancer Drugs* 2012, 23(8):777-87.

19. Marostica LL, Silva IT, Kratz JM, Persich L, Geller FC, Lang KL, Caro MS, Duran FJ, Schenkel EP, Simoes CM. Synergistic Antiproliferative Effects of a New Cucurbitacin B Derivative and Chemotherapy Drugs on Lung Cancer Cell Line A549. *Chem Res Toxicol* 2015, 28(10):1949-60.
20. Lin X, Farooqi AA. Cucurbitacin mediated regulation of deregulated oncogenic signaling cascades and non-coding RNAs in different cancers: Spotlight on JAK/STAT, Wnt/beta-catenin, mTOR, TRAIL-mediated pathways. *Semin Cancer Biol* 2021, 73:302-9.
21. Li R, Xiao J, Tang S, Lin X, Xu H, Han B, Yang M, Liu F. Cucurbitacin I induces apoptosis in ovarian cancer cells through oxidative stress and the p190B^{Rac1} signaling axis. *Mol Med Rep* 2020, 22(3):2545-50.
22. Hussein MA, El-Gizawy HA, Gobba N, Mosaad YO. Synthesis of Cinnamyl and Caffeoyle Derivatives of Cucurbitacin-Eglycoside Isolated from Citrullus colocynthis Fruits and their Structures Antioxidant and Anti-inflammatory Activities Relationship. *Curr Pharm Biotechnol* 2017, 18(8):677-93.
23. Tannin-Spitz T, Bergman M, Grossman S. Cucurbitacin glucosides: antioxidant and free-radical scavenging activities. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 364(1):181-6.
24. Oridupa OA, Saba AB, Adesanwo JK, Oyebanji BO. Anti-inflammatory and analgesic activity of a cucurbitacin isolated from Lagenaria breviflora Roberty fruit. *Afr J Med Med Sci* 2013, 42(3):223-30.
25. Kim KH, Lee IS, Park JY, Kim Y, An EJ, Jang HJ. Cucurbitacin B Induces Hypoglycemic Effect in Diabetic Mice by Regulation of AMP-Activated Protein Kinase Alpha and Glucagon-Like Peptide-1 via Bitter Taste Receptor Signaling. *Front Pharmacol* 2018, 9:1071.
26. Wang X, Bai Y, Yan X, Li J, Lin B, Dai L, Xu C, Li H, Li D, Yang T, Zhang T. Cucurbitacin B exhibits antitumor effects on CD133⁺ HepG2 liver cancer stem cells by inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway. *Anticancer Drugs* 2021, 32(5):548-57.
27. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005, 55(2):74-108.
28. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011, 61(2):69-90.

29. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015, 65(2):87-108.
30. 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 Cancer J Clin* 2018, 68(6):394-424.
31. Frager SZ, Schwartz JM. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, screening, and assessment of hepatic reserve. *Curr Oncol* 2020, 27(Suppl 3):S138-S43.
32. Alqahtani A, Khan Z, Alloghbi A, Said Ahmed TS, Ashraf M, Hammouda DM. Hepatocellular Carcinoma: Molecular Mechanisms and Targeted Therapies. *Medicina (Kaunas)* 2019, 55(9).
33. Yang JD, Kim WR, Coelho R, Mettler TA, Benson JT, Sanderson SO, Therneau TM, Kim B, Roberts LR. Cirrhosis is present in most patients with hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011, 9(1):64-70.
34. Chang SS, Hu HY, Chen YC, Yen YF, Huang N. Late hepatitis C virus diagnosis among patients with newly diagnosed hepatocellular carcinoma: a case-control study. *BMC Gastroenterol* 2022, 22(1):425.
35. Ahmad MI, Khan MU, Kodali S, Shetty A, Bell SM, Victor D. Hepatocellular Carcinoma Due to Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Current Concepts and Future Challenges. *J Hepatocell Carcinoma* 2022, 9:477-96.
36. Bruix J, Sherman M, Practice Guidelines Committee AAftSoLD. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005, 42(5):1208-36.
37. Wen X, Li X, Xie H, Chen N, Zeng W, Ru H, Cui X, Tang Z. Observation on the therapeutic effect of Lamivudin on chronic hepatitis B. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2002, 16(4):395-7.
38. Wong GL, Chan HL, Mak CW, Lee SK, Ip ZM, Lam AT, Iu HW, Leung JM, Lai JW, Lo AO, Chan HY, Wong VW. Entecavir treatment reduces hepatic events and deaths in chronic hepatitis B patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 2013, 58(5):1537-47.
39. Mori Y, Matsuda S, Sato M, Muraoka M, Suzuki Y, Tatsumi A, Nakayama Y, Inoue T, Maekawa S, Enomoto N. The Impact of Antiviral Therapy for Hepatitis C Virus on the Survival of Patients after Hepatocellular Carcinoma Treatment. *Intern Med* 2022, 61(18):2721-9.
40. Singal AG, Volk ML, Jensen D, Di Bisceglie AM, Schoenfeld PS. A sustained viral response is associated with reduced liver-related morbidity and mortality

- in patients with hepatitis C virus. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010, 8(3):280-8, 8 e1.
41. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004, 127(5 Suppl 1):S35-50.
 42. O'Rourke JM, Sagar VM, Shah T, Shetty S. Carcinogenesis on the background of liver fibrosis: Implications for the management of hepatocellular cancer. *World J Gastroenterol* 2018, 24(39):4436-47.
 43. Hernandez-Gea V, Toffanin S, Friedman SL, Llovet JM. Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2013, 144(3):512-27.
 44. Zhang DY, Friedman SL. Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2012, 56(2):769-75.
 45. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2011, 6:425-56.
 46. Gabele E, Brenner DA, Rippe RA. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Front Biosci* 2003, 8:d69-77.
 47. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000, 275(4):2247-50.
 48. Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Goldfarb RH, Nagelkerke JF, Nannmark U, Kuppen PJ. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends Immunol* 2003, 24(11):603-9.
 49. Wu Y, Qiao X, Qiao S, Yu L. Targeting integrins in hepatocellular carcinoma. *Expert Opin Ther Targets* 2011, 15(4):421-37.
 50. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin DJ, Wu Y, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujinoue H, Imazu H, Masaki T, Fukui H. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut* 2003, 52(9):1347-54.
 51. Kukla M. Angiogenesis: a phenomenon which aggravates chronic liver disease progression. *Hepatol Int* 2013, 7(1):4-12.
 52. Wang YQ, Luk JM, Ikeda K, Man K, Chu AC, Kaneda K, Fan ST. Regulatory role of vHL/HIF-1alpha in hypoxia-induced VEGF production in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 317(2):358-62.

53. Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN, Belperio JA, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005, 16(6):593-609.
54. Oura K, Morishita A, Tani J, Masaki T. Tumor Immune Microenvironment and Immunosuppressive Therapy in Hepatocellular Carcinoma: A Review. *Int J Mol Sci* 2021, 22(11).
55. Konyn P, Ahmed A, Kim D. Current epidemiology in hepatocellular carcinoma. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2021, 15(11):1295-307.
56. International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia The International Consensus Group for Hepatocellular N. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology* 2009, 49(2):658-64.
57. Marquardt JU, Andersen JB, Thorgeirsson SS. Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer. *Nat Rev Cancer* 2015, 15(11):653-67.
58. Alizadeh AA, Aranda V, Bardelli A, Blanpain C, Bock C, Borowski C, Caldas C, Califano A, Doherty M, Elsner M, Esteller M, Fitzgerald R, Korbel JO, Lichter P, Mason CE, Navin N, Pe'er D, Polyak K, Roberts CW, Siu L, Snyder A, Stower H, Swanton C, Verhaak RG, Zenklusen JC, Zuber J, Zucman-Rossi J. Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. *Nat Med* 2015, 21(8):846-53.
59. Schulze K, Imbeaud S, Letouze E, Alexandrov LB, Calderaro J, Rebouissou S, Couchy G, Meiller C, Shinde J, Soysouvanh F, Calatayud AL, Pinyol R, Pelletier L, Balabaud C, Laurent A, Blanc JF, Mazzaferro V, Calvo F, Villanueva A, Nault JC, Bioulac-Sage P, Stratton MR, Llovet JM, Zucman-Rossi J. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet* 2015, 47(5):505-11.
60. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad IB, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Letexier M, Degos F, Clement B, Balabaud C, Chevet E, Laurent A, Couchy G, Letouze E, Calvo F, Zucman-Rossi J. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2012, 44(6):694-8.
61. Llovet JM, Chen Y, Wurmbach E, Roayaie S, Fiel MI, Schwartz M, Thung SN, Khitrov G, Zhang W, Villanueva A, Battiston C, Mazzaferro V, Bruix J, Waxman S, Friedman SL. A molecular signature to discriminate dysplastic

- nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis. *Gastroenterology* 2006, 131(6):1758-67.
62. Wurmbach E, Chen YB, Khitrov G, Zhang W, Roayaie S, Schwartz M, Fiel I, Thung S, Mazzaferro V, Bruix J, Bottinger E, Friedman S, Waxman S, Llovet JM. Genome-wide molecular profiles of HCV-induced dysplasia and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007, 45(4):938-47.
63. Datfar T, Doulberis M, Papaefthymiou A, Hines IN, Manzini G. Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma: State of the Art. *Pathogens* 2021, 10(11).
64. Pezzuto F, Buonaguro L, Buonaguro FM, Tornesello ML. Frequency and geographic distribution of TERT promoter mutations in primary hepatocellular carcinoma. *Infect Agent Cancer* 2017, 12:27.
65. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2015, 149(5):1226-39 e4.
66. Kotoula V, Hytioglou P, Pyrpasopoulou A, Saxena R, Thung SN, Papadimitriou CS. Expression of human telomerase reverse transcriptase in regenerative and precancerous lesions of cirrhotic livers. *Liver* 2002, 22(1):57-69.
67. Nault JC, Calderaro J, Di Tommaso L, Balabaud C, Zafrani ES, Bioulac-Sage P, Roncalli M, Zucman-Rossi J. Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis. *Hepatology* 2014, 60(6):1983-92.
68. Nault JC, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Laurent C, Laurent A, Cherqui D, Balabaud C, Zucman-Rossi J. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun* 2013, 4:2218.
69. Nault JC, Ningarhari M, Rebouissou S, Zucman-Rossi J. The role of telomeres and telomerase in cirrhosis and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019, 16(9):544-58.
70. Rebouissou S, Nault JC. Advances in molecular classification and precision oncology in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2020, 72(2):215-29.
71. Nault JC, Datta S, Imbeaud S, Franconi A, Mallet M, Couchy G, Letouze E, Pilati C, Verret B, Blanc JF, Balabaud C, Calderaro J, Laurent A, Letexier M, Bioulac-Sage P, Calvo F, Zucman-Rossi J. Recurrent AAV2-related insertional

- mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 2015, 47(10):1187-93.
72. Nault JC, Datta S, Imbeaud S, Franconi A, Mallet M, Couchy G, Letouze E, Pilati C, Verret B, Blanc JF, Balabaud C, Calderaro J, Laurent A, Letexier M, Bioulac-Sage P, Calvo F, Zucman-Rossi J. AAV2 and Hepatocellular Carcinoma. *Hum Gene Ther* 2016, 27(3):211-3.
 73. Takai A, Dang HT, Wang XW. Identification of drivers from cancer genome diversity in hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Sci* 2014, 15(6):11142-60.
 74. Schwaederle M, Lazar V, Validire P, Hansson J, Lacroix L, Soria JC, Pawitan Y, Kurzrock R. VEGF-A Expression Correlates with TP53 Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer: Implications for Antiangiogenesis Therapy. *Cancer Res* 2015, 75(7):1187-90.
 75. Khemlina G, Ikeda S, Kurzrock R. The biology of Hepatocellular carcinoma: implications for genomic and immune therapies. *Mol Cancer* 2017, 16(1):149.
 76. Taguchi K, Yamamoto M. The KEAP1-NRF2 System in Cancer. *Front Oncol* 2017, 7:85.
 77. Dhar D, Baglieri J, Kisseleva T, Brenner DA. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer. *Exp Biol Med (Maywood)* 2020, 245(2):96-108.
 78. Luangmonkong T, Suriguga S, Mutsaers HAM, Groothuis GMM, Olinga P, Boersema M. Targeting Oxidative Stress for the Treatment of Liver Fibrosis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2018, 175:71-102.
 79. Sanchez-Valle V, Chavez-Tapia NC, Uribe M, Mendez-Sanchez N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Curr Med Chem* 2012, 19(28):4850-60.
 80. Fabre T, Molina MF, Soucy G, Goulet JP, Willems B, Villeneuve JP, Bilodeau M, Shoukry NH. Type 3 cytokines IL-17A and IL-22 drive TGF-beta-dependent liver fibrosis. *Sci Immunol* 2018, 3(28).
 81. Zuo L, Zhou T, Pannell BK, Ziegler AC, Best TM. Biological and physiological role of reactive oxygen species--the good, the bad and the ugly. *Acta Physiol (Oxf)* 2015, 214(3):329-48.
 82. Liang S, Kisseleva T, Brenner DA. The Role of NADPH Oxidases (NOXs) in Liver Fibrosis and the Activation of Myofibroblasts. *Front Physiol* 2016, 7:17.
 83. Sancho P, Mainez J, Crosas-Molist E, Roncero C, Fernandez-Rodriguez CM, Pinedo F, Huber H, Eferl R, Mikulits W, Fabregat I. NADPH oxidase NOX4

- mediates stellate cell activation and hepatocyte cell death during liver fibrosis development. *PLoS One* 2012, 7(9):e45285.
84. Sampson N, Koziel R, Zenzmaier C, Bubendorf L, Plas E, Jansen-Durr P, Berger P. ROS signaling by NOX4 drives fibroblast-to-myofibroblast differentiation in the diseased prostatic stroma. *Mol Endocrinol* 2011, 25(3):503-15.
 85. Lan T, Kisseleva T, Brenner DA. Deficiency of NOX1 or NOX4 Prevents Liver Inflammation and Fibrosis in Mice through Inhibition of Hepatic Stellate Cell Activation. *PLoS One* 2015, 10(7):e0129743.
 86. Liang S, Ma HY, Zhong Z, Dhar D, Liu X, Xu J, Koyama Y, Nishio T, Karin D, Karin G, McCubbin R, Zhang C, Hu R, Yang G, Chen L, Ganguly S, Lan T, Karin M, Kisseleva T, Brenner DA. NADPH Oxidase 1 in Liver Macrophages Promotes Inflammation and Tumor Development in Mice. *Gastroenterology* 2019, 156(4):1156-72 e6.
 87. Philippe MA, Ruddell RG, Ramm GA. Role of iron in hepatic fibrosis: one piece in the puzzle. *World J Gastroenterol* 2007, 13(35):4746-54.
 88. Mehta KJ, Farnaud SJ, Sharp PA. Iron and liver fibrosis: Mechanistic and clinical aspects. *World J Gastroenterol* 2019, 25(5):521-38.
 89. Dongiovanni P, Fracanzani AL, Fargion S, Valenti L. Iron in fatty liver and in the metabolic syndrome: a promising therapeutic target. *J Hepatol* 2011, 55(4):920-32.
 90. Lee PL, Beutler E. Regulation of hepcidin and iron-overload disease. *Annu Rev Pathol* 2009, 4:489-515.
 91. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004, 306(5704):2090-3.
 92. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997, 386(6626):671-4.
 93. Chaparro M, Sanz-Cameno P, Trapero-Marugan M, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R. Mechanisms of angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Ann Hepatol* 2007, 6(4):208-13.
 94. Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, Van Steenkiste C, Colle I, Van Vlierberghe H. Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver Int* 2011, 31(2):146-62.

95. Medina J, Sanz-Cameno P, Garcia-Buey L, Martin-Vilchez S, Lopez-Cabrera M, Moreno-Otero R. Evidence of angiogenesis in primary biliary cirrhosis: an immunohistochemical descriptive study. *J Hepatol* 2005, 42(1):124-31.
96. Bocca C, Novo E, Miglietta A, Parola M. Angiogenesis and Fibrogenesis in Chronic Liver Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2015, 1(5):477-88.
97. Rosmorduc O, Housset C. Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease. *Semin Liver Dis* 2010, 30(3):258-70.
98. Sanz-Cameno P, Trapero-Marugan M, Chaparro M, Jones EA, Moreno-Otero R. Angiogenesis: from chronic liver inflammation to hepatocellular carcinoma. *J Oncol* 2010, 2010:272170.
99. Elpek GO. Angiogenesis and liver fibrosis. *World J Hepatol* 2015, 7(3):377-91.
100. Meng W, Li X, Bai Z, Li Y, Yuan J, Liu T, Yan J, Zhou W, Zhu K, Zhang H, Li Y. Silencing alpha-fetoprotein inhibits VEGF and MMP-2/9 production in human hepatocellular carcinoma cell. *PLoS One* 2014, 9(2):e90660.
101. Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, Housset C, Rosmorduc O. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 2002, 35(5):1010-21.
102. DeLeve LD. Hepatic microvasculature in liver injury. *Semin Liver Dis* 2007, 27(4):390-400.
103. Fernandez M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009, 50(3):604-20.
104. Delire B, Starkel P. The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications. *Eur J Clin Invest* 2015, 45(6):609-23.
105. Muto J, Shirabe K, Sugimachi K, Maehara Y. Review of angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2015, 45(1):1-9.
106. Shimamura T, Saito S, Morita K, Kitamura T, Morimoto M, Kiba T, Numata K, Tanaka K, Sekihara H. Detection of vascular endothelial growth factor and its receptor expression in human hepatocellular carcinoma biopsy specimens. *J Gastroenterol Hepatol* 2000, 15(6):640-6.
107. Poon RT, Ho JW, Tong CS, Lau C, Ng IO, Fan ST. Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2004, 91(10):1354-60.

108. Yamaguchi R, Yano H, Iemura A, Ogasawara S, Haramaki M, Kojiro M. Expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998, 28(1):68-77.
109. Lian Z, Liu J, Wu M, Wang HY, Arbuthnot P, Kew M, Feitelson MA. Hepatitis B x antigen up-regulates vascular endothelial growth factor receptor 3 in hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2007, 45(6):1390-9.
110. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2011, 365(12):1118-27.
111. Berasain C, Avila MA. The EGFR signalling system in the liver: from hepatoprotection to hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol* 2014, 49(1):9-23.
112. Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, Xu L, Eng F, Afdhal N, Kalluri R. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 2003, 124(1):147-59.
113. Perugorria MJ, Latasa MU, Nicou A, Cartagena-Lirola H, Castillo J, Goni S, Vespasiani-Gentilucci U, Zagami MG, Lotersztajn S, Prieto J, Berasain C, Avila MA. The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin participates in the development of mouse liver fibrosis. *Hepatology* 2008, 48(4):1251-61.
114. Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, Hu LL. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med* 2020, 19(3):1997-2007.
115. Taketomi A, Shirabe K, Muto J, Yoshiya S, Motomura T, Mano Y, Ikegami T, Yoshizumi T, Sugio K, Maehara Y. A rare point mutation in the Ras oncogene in hepatocellular carcinoma. *Surg Today* 2013, 43(3):289-92.
116. Li L, Zhao GD, Shi Z, Qi LL, Zhou LY, Fu ZX. The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC. *Oncol Lett* 2016, 12(5):3045-50.
117. Moon H, Ro SW. MAPK/ERK Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)* 2021, 13(12).
118. Chen L, Shi Y, Jiang CY, Wei LX, Wang YL, Dai GH. Expression and prognostic role of pan-Ras, Raf-1, pMEK1 and pERK1/2 in patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2011, 37(6):513-20.
119. Hennig A, Markwart R, Esparza-Franco MA, Ladds G, Rubio I. Ras activation revisited: role of GEF and GAP systems. *Biol Chem* 2015, 396(8):831-48.
120. Harrell Stewart DR, Clark GJ. Pumping the brakes on RAS - negative regulators and death effectors of RAS. *J Cell Sci* 2020, 133(3).

121. Lavoie H, Gagnon J, Therrien M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020, 21(10):607-32.
122. Yue J, Lopez JM. Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis. *Int J Mol Sci* 2020, 21(7).
123. Tanimura S, Takeda K. ERK signalling as a regulator of cell motility. *J Biochem* 2017, 162(3):145-54.
124. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, de Mestier L, Cros J, Faivre S, Raymond E. MEK in cancer and cancer therapy. *Pharmacol Ther* 2014, 141(2):160-71.
125. Sun EJ, Wankell M, Palamuthusingam P, McFarlane C, Hebbard L. Targeting the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines* 2021, 9(11).
126. Iksen, Pothongsrisit S, Pongrakhananon V. Targeting the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Lung Cancer: An Update Regarding Potential Drugs and Natural Products. *Molecules* 2021, 26(13).
127. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol* 2009, 4:127-50.
128. Yung HW, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Regulation of AKT phosphorylation at Ser473 and Thr308 by endoplasmic reticulum stress modulates substrate specificity in a severity dependent manner. *PLoS One* 2011, 6(3):e17894.
129. Tee AR, Anjum R, Blenis J. Inactivation of the tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products occurs by phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent and -independent phosphorylation of tuberlin. *J Biol Chem* 2003, 278(39):37288-96.
130. Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, Sasaki T, Hamada K, Sasaki J, Mizuno K, Hasegawa G, Kishimoto H, Iizuka M, Naito M, Enomoto K, Watanabe S, Mak TW, Nakano T. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest* 2004, 113(12):1774-83.
131. Voizard N, Cerny M, Assad A, Billiard JS, Olivie D, Perreault P, Kielar A, Do RKG, Yokoo T, Sirlin CB, Tang A. Assessment of hepatocellular carcinoma treatment response with LI-RADS: a pictorial review. *Insights Imaging* 2019, 10(1):121.
132. Stotz M, Gerger A, Haybaeck J, Kiesslich T, Bullock MD, Pichler M. Molecular Targeted Therapies in Hepatocellular Carcinoma: Past, Present and Future. *Anticancer Res* 2015, 35(11):5737-44.

133. Qing X, Xu W, Zong J, Du X, Peng H, Zhang Y. Emerging treatment modalities for systemic therapy in hepatocellular carcinoma. *Biomark Res* 2021, 9(1):64.
134. Du Z, Lovly CM. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer* 2018, 17(1):58.
135. Ramakrishnan V, Timm M, Haug JL, Kimlinger TK, Wellik LE, Witzig TE, Rajkumar SV, Adjei AA, Kumar S. Sorafenib, a dual Raf kinase/vascular endothelial growth factor receptor inhibitor has significant anti-myeloma activity and synergizes with common anti-myeloma drugs. *Oncogene* 2010, 29(8):1190-202.
136. Dong Y, Liu TH, Yau T, Hsu C. Novel systemic therapy for hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int* 2020, 14(5):638-51.
137. Zongyi Y, Xiaowu L. Immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2020, 470:8-17.
138. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* 2018, 359(6382):1350-5.
139. Cheng HY, Kang PJ, Chuang YH, Wang YH, Jan MC, Wu CF, Lin CL, Liu CJ, Liaw YF, Lin SM, Chen PJ, Lee SD, Yu MW. Circulating programmed death-1 as a marker for sustained high hepatitis B viral load and risk of hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2014, 9(11):e95870.
140. El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, Crocenzi TS, Kudo M, Hsu C, Kim TY, Choo SP, Trojan J, Welling THR, Meyer T, Kang YK, Yeo W, Chopra A, Anderson J, Dela Cruz C, Lang L, Neely J, Tang H, Dastani HB, Melero I. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet* 2017, 389(10088):2492-502.
141. Zhu AX, Finn RS, Edeline J, Cattani S, Ogasawara S, Palmer D, Verslype C, Zagonel V, Fartoux L, Vogel A, Sarker D, Verset G, Chan SL, Knox J, Daniele B, Webber AL, Ebbinghaus SW, Ma J, Siegel AB, Cheng AL, Kudo M, investigators K-. Pembrolizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma previously treated with sorafenib (KEYNOTE-224): a non-randomised, open-label phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2018, 19(7):940-52.
142. Qin S, Ren Z, Meng Z, Chen Z, Chai X, Xiong J, Bai Y, Yang L, Zhu H, Fang W, Lin X, Chen X, Li E, Wang L, Chen C, Zou J. Camrelizumab in patients with

- previously treated advanced hepatocellular carcinoma: a multicentre, open-label, parallel-group, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2020, 21(4):571-80.
143. Llovet JM, Montal R, Sia D, Finn RS. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol* 2018, 15(10):599-616.
 144. Sangro B, Gomez-Martin C, de la Mata M, Inarrairaegui M, Garralda E, Barrera P, Riezu-Boj JI, Larrea E, Alfaro C, Sarobe P, Lasarte JJ, Perez-Gracia JL, Melero I, Prieto J. A clinical trial of CTLA-4 blockade with tremelimumab in patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2013, 59(1):81-8.
 145. Hahn AW, Gill DM, Pal SK, Agarwal N. The future of immune checkpoint cancer therapy after PD-1 and CTLA-4. *Immunotherapy* 2017, 9(8):681-92.
 146. Kanda M, Sugimoto H, Kodera Y. Genetic and epigenetic aspects of initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2015, 21(37):10584-97.
 147. Bayo J, Fiore EJ, Dominguez LM, Real A, Malvicini M, Rizzo M, Atorrasagasti C, Garcia MG, Argemi J, Martinez ED, Mazzolini GD. A comprehensive study of epigenetic alterations in hepatocellular carcinoma identifies potential therapeutic targets. *J Hepatol* 2019, 71(1):78-90.
 148. Khan FS, Ali I, Afridi UK, Ishtiaq M, Mehmood R. Epigenetic mechanisms regulating the development of hepatocellular carcinoma and their promise for therapeutics. *Hepatol Int* 2017, 11(1):45-53.
 149. Shen YC, Lin ZZ, Hsu CH, Hsu C, Shao YY, Cheng AL. Clinical trials in hepatocellular carcinoma: an update. *Liver Cancer* 2013, 2(3-4):345-64.
 150. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, Luo R, Feng J, Ye S, Yang TS, Xu J, Sun Y, Liang H, Liu J, Wang J, Tak WY, Pan H, Burock K, Zou J, Voliotis D, Guan Z. 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. *Lancet Oncol* 2009, 10(1):25-34.
 151. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Haussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J, Group SIS. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008, 359(4):378-90.

152. Gollob JA, Rathmell WK, Richmond TM, Marino CB, Miller EK, Grigson G, Watkins C, Gu L, Peterson BL, Wright JJ. Phase II trial of sorafenib plus interferon alfa-2b as first- or second-line therapy in patients with metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol* 2007, 25(22):3288-95.
153. Chi KN, Ellard SL, Hotte SJ, Czaykowski P, Moore M, Ruether JD, Schell AJ, Taylor S, Hansen C, Gauthier I, Walsh W, Seymour L. A phase II study of sorafenib in patients with chemo-naïve castration-resistant prostate cancer. *Ann Oncol* 2008, 19(4):746-51.
154. Antar A, Kharfan-Dabaja MA, Mahfouz R, Bazarbachi A. Sorafenib Maintenance Appears Safe and Improves Clinical Outcomes in FLT3-ITD Acute Myeloid Leukemia After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2015, 15(5):298-302.
155. Luo Y, Shi Y, Xing P, Wang L, Feng Y, Han X, He X. Sorafenib in metastatic radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer: A pilot study. *Mol Clin Oncol* 2014, 2(1):87-92.
156. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2003, 17(3):590-603.
157. Serova M, de Gramont A, Tijeras-Raballand A, Dos Santos C, Riveiro ME, Slimane K, Faivre S, Raymond E. Benchmarking effects of mTOR, PI3K, and dual PI3K/mTOR inhibitors in hepatocellular and renal cell carcinoma models developing resistance to sunitinib and sorafenib. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013, 71(5):1297-307.
158. Zhang CZ, Wang XD, Wang HW, Cai Y, Chao LQ. Sorafenib inhibits liver cancer growth by decreasing mTOR, AKT, and PI3K expression. *J BUON* 2015, 20(1):218-22.
159. Gulhati P, Zaytseva YY, Valentino JD, Stevens PD, Kim JT, Sasazuki T, Shirasawa S, Lee EY, Weiss HL, Dong J, Gao T, Evers BM. Sorafenib enhances the therapeutic efficacy of rapamycin in colorectal cancers harboring oncogenic KRAS and PIK3CA. *Carcinogenesis* 2012, 33(9):1782-90.
160. Akira S. Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* 2000, 19(21):2607-11.

161. Yamada S, Shiono S, Joo A, Yoshimura A. Control mechanism of JAK/STAT signal transduction pathway. *FEBS Lett* 2003, 534(1-3):190-6.
162. Zhao R, Fu X, Teng L, Li Q, Zhao ZJ. Blocking the function of tyrosine phosphatase SHP-2 by targeting its Src homology 2 domains. *J Biol Chem* 2003, 278(44):42893-8.
163. Wu C, Guan Q, Wang Y, Zhao ZJ, Zhou GW. SHP-1 suppresses cancer cell growth by promoting degradation of JAK kinases. *J Cell Biochem* 2003, 90(5):1026-37.
164. Grattagliano I, Russmann S, Diogo C, Bonfrate L, Oliveira PJ, Wang DQ, Portincasa P. Mitochondria in chronic liver disease. *Curr Drug Targets* 2011, 12(6):879-93.
165. Gajendiran P, Vega LI, Itoh K, Sesaki H, Vakili MR, Lavasanifar A, Hong K, Mezey E, Ganapathy-Kanniappan S. Elevated mitochondrial activity distinguishes fibrogenic hepatic stellate cells and sensitizes for selective inhibition by mitotropic doxorubicin. *J Cell Mol Med* 2018, 22(4):2210-9.
166. Tesori V, Piscaglia AC, Samengo D, Barba M, Bernardini C, Scatena R, Pontoglio A, Castellini L, Spelbrink JN, Maulucci G, Puglisi MA, Pani G, Gasbarrini A. The multikinase inhibitor Sorafenib enhances glycolysis and synergizes with glycolysis blockade for cancer cell killing. *Sci Rep* 2015, 5:9149.
167. Fiume L, Manerba M, Vettraino M, Di Stefano G. Effect of sorafenib on the energy metabolism of hepatocellular carcinoma cells. *Eur J Pharmacol* 2011, 670(1):39-43.
168. Reyes R, Wani NA, Ghoshal K, Jacob ST, Motiwala T. Sorafenib and 2-Deoxyglucose Synergistically Inhibit Proliferation of Both Sorafenib-Sensitive and -Resistant HCC Cells by Inhibiting ATP Production. *Gene Expr* 2017, 17(2):129-40.
169. Ackerman D, Simon MC. Hypoxia, lipids, and cancer: surviving the harsh tumor microenvironment. *Trends Cell Biol* 2014, 24(8):472-8.
170. Sever R, Brugge JS. Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015, 5(4).
171. Martin GS. Cell signaling and cancer. *Cancer Cell* 2003, 4(3):167-74.
172. Hashem S, Ali TA, Akhtar S, Nisar S, Sageena G, Ali S, Al-Mannai S, Therachiyil L, Mir R, Elfaki I, Mir MM, Jamal F, Masoodi T, Uddin S, Singh M, Haris M, Macha M, Bhat AA. Targeting cancer signaling pathways by natural

- products: Exploring promising anti-cancer agents. *Biomed Pharmacother* 2022, 150:113054.
173. Davison EK, Brimble MA. Natural product derived privileged scaffolds in drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* 2019, 52:1-8.
 174. Jing S, Zou H, Wu Z, Ren L, Zhang T, Zhang J, We Z. Cucurbitacins: Bioactivities and synergistic effect with small-molecule drugs. *Journal of Functional Foods* 2020, 72:104042.
 175. Silvestre GFG, de Lucena RP, da Silva Alves H. Cucurbitacins and the Immune System: Update in Research on Anti- inflammatory, Antioxidant, and Immunomodulatory Mechanisms. *Curr Med Chem* 2022, 29(21):3774-89.
 176. Tosun E, Baysar A. Isolation And Purification Of Cucurbitacin D And I From *Ecballium Elaterium* (L.) A. Rich Fruit Juice. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 2019, 38:171–82.
 177. Uremis N, Uremis MM, Cigremis Y, Tosun E, Baysar A, Turkoz Y. Cucurbitacin I exhibits anticancer efficacy through induction of apoptosis and modulation of JAK/STAT3, MAPK/ERK, and AKT/mTOR signaling pathways in HepG2 cell line. *J Food Biochem* 2022, 46(10):e14333.
 178. Chen YW, Chen KH, Huang PI, Chen YC, Chiou GY, Lo WL, Tseng LM, Hsu HS, Chang KW, Chiou SH. Cucurbitacin I suppressed stem-like property and enhanced radiation-induced apoptosis in head and neck squamous carcinoma--derived CD44(+)ALDH1(+) cells. *Mol Cancer Ther* 2010, 9(11):2879-92.
 179. Iwanski GB, Lee DH, En-Gal S, Doan NB, Castor B, Vogt M, Toh M, Bokemeyer C, Said JW, Thoennissen NH, Koeffler HP. Cucurbitacin B, a novel in vivo potentiator of gemcitabine with low toxicity in the treatment of pancreatic cancer. *Br J Pharmacol* 2010, 160(4):998-1007.
 180. Lan T, Wang L, Xu Q, Liu W, Jin H, Mao W, Wang X, Wang X. Growth inhibitory effect of Cucurbitacin E on breast cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol* 2013, 6(9):1799-805.
 181. Lee DH, Thoennissen NH, Goff C, Iwanski GB, Forscher C, Doan NB, Said JW, Koeffler HP. Synergistic effect of low-dose cucurbitacin B and low-dose methotrexate for treatment of human osteosarcoma. *Cancer Lett* 2011, 306(2):161-70.
 182. Liu P, Xiang Y, Liu X, Zhang T, Yang R, Chen S, Xu L, Yu Q, Zhao H, Zhang L, Liu Y, Si Y. Cucurbitacin B Induces the Lysosomal Degradation of EGFR

- and Suppresses the CIP2A/PP2A/Akt Signaling Axis in Gefitinib-Resistant Non-Small Cell Lung Cancer. *Molecules* 2019, 24(3).
183. Dandawate P, Subramaniam D, Panovich P, Standing D, Krishnamachary B, Kaushik G, Thomas SM, Dhar A, Weir SJ, Jensen RA, Anant S. Cucurbitacin B and I inhibits colon cancer growth by targeting the Notch signaling pathway. *Sci Rep* 2020, 10(1):1290.
 184. Liu J, Liu X, Ma W, Kou W, Li C, Zhao J. Anticancer activity of cucurbitacin-A in ovarian cancer cell line SKOV3 involves cell cycle arrest, apoptosis and inhibition of mTOR/PI3K/Akt signaling pathway. *J BUON* 2018, 23(1):124-8.
 185. Boykin C, Zhang G, Chen YH, Zhang RW, Fan XE, Yang WM, Lu Q. Cucurbitacin Ila: a novel class of anti-cancer drug inducing non-reversible actin aggregation and inhibiting survivin independent of JAK2/STAT3 phosphorylation. *Br J Cancer* 2011, 104(5):781-9.
 186. Mehdi Uremis M, Uremis N, Tosun E, Durhan M, Cigremis Y, Baysar A, Turkoz Y. Cucurbitacin D Inhibits the Proliferation of HepG2 Cells and Induces Apoptosis by Modulating JAK/STAT3, PI3K/Akt/mTOR and MAPK Signaling Pathways. *Curr Cancer Drug Targets* 2022, 22(11):931-44.
 187. Wu D, Wang Z, Lin M, Shang Y, Wang F, Zhou J, Wang F, Zhang X, Luo X, Huang W. In Vitro and In Vivo Antitumor Activity of Cucurbitacin C, a Novel Natural Product From Cucumber. *Front Pharmacol* 2019, 10:1287.
 188. Touihri-Barakati I, Kallech-Ziri O, Ayadi W, Kovacic H, Hanchi B, Hosni K, Luis J. Cucurbitacin B purified from Ecballium elaterium (L.) A. Rich from Tunisia inhibits alpha5beta1 integrin-mediated adhesion, migration, proliferation of human glioblastoma cell line and angiogenesis. *Eur J Pharmacol* 2017, 797:153-61.
 189. Sauter ER. Cancer prevention and treatment using combination therapy with natural compounds. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2020, 13(3):265-85.
 190. Bakar F. Cucurbitacin B Enhances the Anticancer Effect of Imatinib Mesylate Through Inhibition of MMP-2 Expression in MCF-7 and SW480 Tumor Cell Lines. *Anticancer Agents Med Chem* 2016, 16(6):747-54.
 191. Pang L, Zhang L, Zhou H, Cao L, Shao Y, Li T. Reactive Oxygen Species-Responsive Nanococktail With Self-Amplificated Drug Release for Efficient Co-Delivery of Paclitaxel/Cucurbitacin B and Synergistic Treatment of Gastric Cancer. *Front Chem* 2022, 10:844426.

192. Hong SH, Ku JM, Lim YS, Lee SY, Kim JH, Cheon C, Ko SG. Cucurbitacin D Overcomes Gefitinib Resistance by Blocking EGF Binding to EGFR and Inducing Cell Death in NSCLCs. *Front Oncol* 2020, 10:62.
193. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 2006, 58(3):621-81.
194. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res* 2010, 70(2):440-6.
195. Chou TC. Preclinical versus clinical drug combination studies. *Leuk Lymphoma* 2008, 49(11):2059-80.
196. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984, 22:27-55.
197. Zhao L, Wientjes MG, Au JL. Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses. *Clin Cancer Res* 2004, 10(23):7994-8004.
198. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 193(1):265-75.
199. Hu S, Wang YH, Avula B, Wang M, Khan IA. Separation of cucurbitane triterpenoids from bitter melon drinks and determination of partition coefficients using vortex-assisted dispersive liquid-phase microextraction followed by UHPLC analysis. *J Sep Sci* 2017, 40(10):2238-45.
200. Okamoto K, Neureiter D, Alinger B, Meissnitzer M, Sass G, Schmitz V, Di Fazio P, Wissniowski T, Gahr S, Hohenstein B, Kaufmann B, Schlosser A, Haus U, Hahn EG, Herold C, Ocker M. The dual EGF/VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor AEE788 inhibits growth of human hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *Int J Oncol* 2008, 33(4):733-42.
201. Xu WC, Dong X, Ding JL, Liu JC, Xu JJ, Tang YH, Yi YP, Lu C, Yang W, Yang JS, Gong Y, Zhou JL. Nanotubular TiO₂ regulates macrophage M2 polarization and increases macrophage secretion of VEGF to accelerate endothelialization via the ERK1/2 and PI3K/AKT pathways. *Int J Nanomedicine* 2019, 14:441-55.

202. Oprita A, Baloi SC, Staicu GA, Alexandru O, Tache DE, Danoiu S, Micu ES, Sevastre AS. Updated Insights on EGFR Signaling Pathways in Glioma. *Int J Mol Sci* 2021, 22(2).
203. Scheau C, Badarau IA, Costache R, Caruntu C, Mihai GL, Didilescu AC, Constantin C, Neagu M. The Role of Matrix Metalloproteinases in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2019, 2019:9423907.
204. Vitale A, Peck-Radosavljevic M, Giannini EG, Vibert E, Sieghart W, Van Poucke S, Pawlik TM. Personalized treatment of patients with very early hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2017, 66(2):412-23.
205. Kudo M. Management of Hepatocellular Carcinoma in Japan as a World-Leading Model. *Liver Cancer* 2018, 7(2):134-47.
206. Adnane L, Trail PA, Taylor I, Wilhelm SM. Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature. *Methods Enzymol* 2006, 407:597-612.
207. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res* 2006, 66(24):11851-8.
208. Schmidt CM, McKillop IH, Cahill PA, Sitzmann JV. Increased MAPK expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 236(1):54-8.
209. Roderburg C, Ozdirik B, Wree A, Demir M, Tacke F. Systemic treatment of hepatocellular carcinoma: from sorafenib to combination therapies. *Hepat Oncol* 2020, 7(2):HEP20.
210. Gao JJ, Shi ZY, Xia JF, Inagaki Y, Tang W. Sorafenib-based combined molecule targeting in treatment of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2015, 21(42):12059-70.
211. Tang W, Chen Z, Zhang W, Cheng Y, Zhang B, Wu F, Wang Q, Wang S, Rong D, Reiter FP, De Toni EN, Wang X. The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects. *Signal Transduct Target Ther* 2020, 5(1):87.

212. Qi J, Xia G, Huang CR, Wang JX, Zhang J. JSI-124 (Cucurbitacin I) inhibits tumor angiogenesis of human breast cancer through reduction of STAT3 phosphorylation. *Am J Chin Med* 2015, 43(2):337-47.
213. Zhu X, Huang H, Zhang J, Liu H, Ao R, Xiao M, Wu Y. The anticancer effects of Cucurbitacin I inhibited cell growth of human nonsmall cell lung cancer through PI3K/AKT/p70S6K pathway. *Mol Med Rep* 2018, 17(2):2750-6.
214. Song J, Liu H, Li Z, Yang C, Wang C. Cucurbitacin I inhibits cell migration and invasion and enhances chemosensitivity in colon cancer. *Oncol Rep* 2015, 33(4):1867-71.
215. Oi T, Asanuma K, Matsumine A, Matsubara T, Nakamura T, Iino T, Asanuma Y, Goto M, Okuno K, Kakimoto T, Yada Y, Sudo A. STAT3 inhibitor, cucurbitacin I, is a novel therapeutic agent for osteosarcoma. *Int J Oncol* 2016, 49(6):2275-84.
216. Ishii T, Kira N, Yoshida T, Narahara H. Cucurbitacin D induces growth inhibition, cell cycle arrest, and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells. *Tumour Biol* 2013, 34(1):285-91.
217. Sikander M, Malik S, Hafeez B, Mandi H, Halaweish F, Jaggi M, Chauhan S. Cucurbitacin D enhances the therapeutic efficacy of docetaxel via targeting cancer stem cells and miR-145. 2018, 78:2934.
218. E. Eyol, Z. Tanrıverdi, F. Karakuş, K. Yılmaz, S. Ünsar. Synergistic Anti-proliferative Effects of Cucurbitacin I and Irinotecan on Human Colorectal Cancer Cell Lines. *Journal of Clinical & Experimental Pharmacology* 2016, 6:5.
219. Sadzuka Y, Fujiki S, Itai S. Enhancement of doxorubicin-induced antitumor activity and reduction of adverse reactions by cucurbitacin I. *Food Res Int* 2012, 47(1):64-9.
220. Youssef MM, Tolba MF, Badawy NN, Liu AW, El-Ahwany E, Khalifa AE, Zada S, Abdel-Naim AB. Novel combination of sorafenib and biochanin-A synergistically enhances the anti-proliferative and pro-apoptotic effects on hepatocellular carcinoma cells. *Sci Rep* 2016, 6:30717.
221. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int* 2014, 2014:150845.
222. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci* 2018, 19(2).

223. Wang X, Li H, Li D, Bai Y, Zhang Y, Yan X, Li J, Zhao R, Liu J, Liu W, Shi M, Xu C, Yang T, Zhang T. Sorafenib and CuB exert synergistic antitumor effects against hepatocellular carcinoma cells via inhibition of STAT3 phosphorylation. *FEBS Open Bio* 2021, 11(1):133-45.
224. Jiang C, Xu R, Li XX, Zhou YF, Xu XY, Yang Y, Wang HY, Zheng XFS. Sorafenib and Carfilzomib Synergistically Inhibit the Proliferation, Survival, and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma. *Mol Cancer Ther* 2018, 17(12):2610-21.
225. Kim MS, Lee K, Ku JM, Choi YJ, Mok K, Kim D, Cheon C, Ko SG. Cucurbitacin D Induces G2/M Phase Arrest and Apoptosis via the ROS/p38 Pathway in Capan-1 Pancreatic Cancer Cell Line. *Evid Based Complement Alternat Med* 2020, 2020:6571674.
226. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, Babenko VA, Zorov SD, Balakireva AV, Juhaszova M, Sollott SJ, Zorov DB. Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem* 2018, 552:50-9.
227. Zhang C, Liu Z, Bunker E, Ramirez A, Lee S, Peng Y, Tan AC, Eckhardt SG, Chapnick DA, Liu X. Sorafenib targets the mitochondrial electron transport chain complexes and ATP synthase to activate the PINK1-Parkin pathway and modulate cellular drug response. *J Biol Chem* 2017, 292(36):15105-20.
228. Ha TY, Hwang S, Moon KM, Won YJ, Song GW, Kim N, Tak E, Ryoo BY, Hong HN. Sorafenib inhibits migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells through suppression of matrix metalloproteinase expression. *Anticancer Res* 2015, 35(4):1967-76.
229. Tan W, Zhu S, Cao J, Zhang L, Li W, Liu K, Zhong J, Shang C, Chen Y. Inhibition of MMP-2 Expression Enhances the Antitumor Effect of Sorafenib in Hepatocellular Carcinoma by Suppressing the PI3K/AKT/mTOR Pathway. *Oncol Res* 2017, 25(9):1543-53.
230. Cao S, Zhu S, Yin W, Xu H, Wu J, Wang Q. Relevance of EGFR Between Serum VEGF and MMP-9 in Primary Hepatocellular Carcinoma Patients with Transarterial Chemoembolization. *Onco Targets Ther* 2020, 13:9407-17.
231. Dai N, Ye R, He Q, Guo P, Chen H, Zhang Q. Capsaicin and sorafenib combination treatment exerts synergistic antihepatocellular carcinoma activity by suppressing EGFR and PI3K/Akt/mTOR signaling. *Oncol Rep* 2018, 40(6):3235-48.

232. Gedaly R, Angulo P, Hundley J, Daily MF, Chen C, Evers BM. PKI-587 and sorafenib targeting PI3K/AKT/mTOR and Ras/Raf/MAPK pathways synergistically inhibit HCC cell proliferation. *J Surg Res* 2012, 176(2):542-8.
233. Roulin D, Waselle L, Dormond-Meuwly A, Dufour M, Demartines N, Dormond O. Targeting renal cell carcinoma with NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, in combination with sorafenib. *Mol Cancer* 2011, 10:90.
234. Gedaly R, Angulo P, Hundley J, Daily MF, Chen C, Koch A, Evers BM. PI-103 and sorafenib inhibit hepatocellular carcinoma cell proliferation by blocking Ras/Raf/MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways. *Anticancer Res* 2010, 30(12):4951-8.
235. Liu M, Gao S, Elhassan RM, Hou X, Fang H. Strategies to overcome drug resistance using SHP2 inhibitors. *Acta Pharm Sin B* 2021, 11(12):3908-24.

EKLER

EK-1. Özgeçmiş



EK-2. Etik Kurul Bilgisi

