



**SAĞLIK ALANINDA MAKİNE ÖĞRENMESİ  
YÖNTEMLERİNİN UYGULANMASI: BİR AÇIK VERİ  
SETİ ÜZERİNDE MODELLEMELER VE HASTALIK  
TAHMİNİ İÇİN RİSK FAKTÖRLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

**Umut Serhat AKBULUT**

**BİYOİSTATİSTİK ve TIP BİLİŞİMİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Emek GÜLDOĞAN**

**Yüksek Lisans Tezi- 2025**

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

**SAĞLIK ALANINDA MAKİNE ÖĞRENMESİ YÖNTEMLERİNİN  
UYGULANMASI: BİR AÇIK VERİ SETİ ÜZERİNDE MODELLEMELER VE  
HASTALIK TAHMİNİ İÇİN RİSK FAKTÖRLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Umut Serhat AKBULUT**

**Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Emek GÜLDOĞAN**

**Tez Jüri Üyeleri  
Prof. Dr. Cemil ÇOLAK  
Doç. Dr. Emek GÜLDOĞAN  
Doç. Dr. Mehmet Onur KAYA**

**MALATYA  
2025**

**T.C.**  
**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne**

**ETİK BEYANI**

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak Doç. Dr. Emek GÜLDOĞAN danışmanlığında hazırlayıp sunduğum Sağlık Alanında Makine Öğrenmesi Yöntemlerinin Uygulanması: Bir Açık Veri Seti Üzerinde Modellemeler ve Hastalık Tahmini için Risk Faktörlerinin Belirlenmesi Yüksek Lisans tezim için 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 kabul ettiğimi beyan ederim. 18/11/2025

Umut Serhat AKBULUT

İmza

# İÇİNDEKİLER

|                                                                             |      |
|-----------------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZET .....                                                                  | viii |
| ABSTRACT .....                                                              | ix   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                                        | x    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                        | xi   |
| TABLolar DİZİNİ .....                                                       | xiii |
| 1. GİRİŞ .....                                                              | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                                     | 5    |
| 2.1. Genomik Biliminin Tanımı ve Gelişimi .....                             | 5    |
| 2.2. Genomik Teknolojileri ve Dizileme Yöntemleri .....                     | 5    |
| 2.2.1. İkinci Nesil Dizileme (Next-Generation Sequencing - NGS).....        | 5    |
| 2.2.2. Üçüncü Nesil Dizileme (Third-Generation Sequencing - TGS).....       | 6    |
| 2.2.3. Tek Hücre Dizileme (Single-Cell Sequencing) .....                    | 6    |
| 2.2.4. Metagenomik ve Çevresel Dizileme .....                               | 7    |
| 2.2.5. Kütüphane Hazırlığı ve Dizileme İş Akışı .....                       | 7    |
| 2.3. Fonksiyonel Genomik: Genlerin İşlevlerini Anlamak .....                | 8    |
| 2.4. Genomik ve İnsan Sağlığı: Kişiselleştirilmiş Tıpa Doğru .....          | 8    |
| 2.5. Popülasyon Genomiği ve Evrimsel Perspektif.....                        | 9    |
| 2.6. Kanser Genomiği .....                                                  | 9    |
| 2.7. Genomik Etik ve Veri Güvenliği .....                                   | 10   |
| 2.8. Hepatoselüler Karsinom (HCC).....                                      | 12   |
| 2.8.1. HCC ve Genomik İlişkisi .....                                        | 14   |
| 2.9. Kodlamayan RNA'lar .....                                               | 16   |
| 2.9.1. circRNA (Çembersel RNA) .....                                        | 16   |
| 2.9.2. circRNA'ların Hepatoselüler Karsinomdaki Rolü.....                   | 17   |
| 2.10. Yapay Zekâ ve Makine Öğrenmesi.....                                   | 19   |
| 2.10.1. Açıklanabilir Yapay Zekâ (XAI) .....                                | 20   |
| 2.10.2. SHAP: Şeffaflık için Oyun Teorisi Tabanlı Bir Yaklaşım .....        | 21   |
| 2.11. Kullanılan Makine Öğrenmesi Modelleri ve Açıklanabilirlik Yaklaşımı.. | 21   |
| 2.11.1. Random Forest (RF).....                                             | 22   |
| 2.11.2. XGBoost.....                                                        | 22   |
| 2.11.3. LightGBM.....                                                       | 22   |

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.11.4. CatBoost.....                                                                                 | 22 |
| 2.11.5. Gradient Boosting (GBM) .....                                                                 | 23 |
| 2.11.6. Support Vector Machine (SVM).....                                                             | 23 |
| 2.11.7. Logistic Regression (LR) .....                                                                | 23 |
| 2.11.8. Decision Tree (DT) .....                                                                      | 23 |
| 2.11.9. Naive Bayes (NB) .....                                                                        | 23 |
| 2.11.10. Neural Network (NN) .....                                                                    | 24 |
| 2.11.11. K-Nearest Neighbors (KNN) .....                                                              | 24 |
| 3. MATERYAL VE METOT .....                                                                            | 26 |
| 3.1. Veri Seti .....                                                                                  | 26 |
| 3.2. İstatistik Analiz Aşaması .....                                                                  | 26 |
| 3.3. Modelleme .....                                                                                  | 27 |
| 4. BULGULAR.....                                                                                      | 28 |
| 4.1. Metastatik HCC dokuları ve Normal Doku Karşılaştırmaları .....                                   | 28 |
| 4.1.1. İstatistik Analizler .....                                                                     | 33 |
| 4.1.2. Modelleme Aşaması.....                                                                         | 34 |
| 4.2. Metastaz Yapmamış HCC Dokuları ve Normal Doku Karşılaştırmaları.....                             | 42 |
| 4.2.1. İstatistik Analizler .....                                                                     | 48 |
| 4.2.2. Modelleme Aşaması.....                                                                         | 49 |
| 4.3. Metastatik ve Metastaz Yapmamış HCC Dokuları Karşılaştırmaları.....                              | 58 |
| 5. TARTIŞMA .....                                                                                     | 63 |
| 5.1. Metastatik HCC (MET) ile Normal Karaciğer Dokusu (N) Arasındaki<br>Karşılaştırma .....           | 64 |
| 5.2. Metastaz Yapmamış HCC (nonMET) ile Normal Karaciğer Dokusu (N)<br>Arasındaki Karşılaştırma ..... | 66 |
| 5.3. Metastatik HCC (MET) ile Metastaz Yapmamış HCC (nonMET) Arasındaki<br>Karşılaştırma .....        | 68 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....                                                                            | 74 |
| KAYNAKLAR .....                                                                                       | 75 |
| EKLER.....                                                                                            | 83 |
| EK-1. Özgeçmiş .....                                                                                  | 83 |
| EK-2. Etik Kurul Onayı .....                                                                          | 84 |

## TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Doç. Dr. Emek GÜLDOĞAN hocama, Prof.Dr. Cemil Çolak hocama ve Doç. Dr. Mehmet Onur KAYA katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren ve yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Zeynep KÜÇÜKAKÇALI hocama ve değerli amcam Prof. Dr. Ahmet Sami AKBULUT'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.



## ÖZET

### **Sağlık Alanında Makine Öğrenmesi Yöntemlerinin Uygulanması: Bir Açık Veri Seti Üzerinde Modellemeler Ve Hastalık Tahmini İçin Risk Faktörlerinin Belirlenmesi**

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, hepatoselüler karsinomun (HCC) farklı evreleri arasında circRNA ekspresyon profillerini karşılaştırarak biyobelirteç adaylarını belirlemek ve bu biyobelirteçlerin klinik karar destek sistemlerine entegrasyon potansiyelini açıklanabilir yapay zekâ (XAI) yöntemleri aracılığıyla değerlendirmektir.

**Materyal ve Metot:** Çalışmada, açık erişimli circRNA mikrodizi verileri kullanılarak normal karaciğer dokusu, metastaz yapmamış HCC ve metastatik HCC örnekleri analiz edilmiştir. Diferansiyel ekspresyon analizi, istatistiksel yöntemler ve biyoinformatik yaklaşımlar aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Bulgular, görselleştirme teknikleri (UMAP, volcano, MD plot) ile desteklenmiş ve 11 farklı makine öğrenmesi algoritması üzerinde test edilmiştir. Model kararlarının şeffaf şekilde yorumlanabilmesi için SHAP tabanlı açıklanabilirlik yöntemleri uygulanmıştır.

**Bulgular:** Analizler sonucunda her iki HCC grubuna özgü farklı circRNA imzaları belirlenmiştir. Metastatik olgularda yüksek logFC ve SHAP skorlarıyla tanımlanan circRNA'lar metastatik progresyonla ilişkili biyobelirteç adayları olarak öne çıkarken; non-metastatik grupta erken evre tümör biyolojisini yansıtan özgün moleküller saptanmıştır. Makine öğrenmesi modellerinin doğruluk ve ROC-AUC değerleri yüksek bulunmuş, SHAP analizi ile biyolojik anlamlılığı yüksek transkriptler öne çıkarılmıştır.

**Sonuç:** Bu tez, circRNA'ların HCC'nin farklı evrelerinde moleküler imza olarak kullanılabileceğini ve XAI temelli yaklaşımların biyobelirteç keşfinde güçlü bir araç sunduğunu göstermektedir. Elde edilen bulgular, klinik karar destek sistemlerine bütünleşmiş edilebilecek güvenilir biyobelirteç adaylarının tanımlanmasına katkı sağlamaktadır. Bu yönüyle çalışma, HCC biyoinformatiğinde hem transkriptomik hem de yapay zekâ temelli metodolojileri birleştiren özgün bir çerçeve sunmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Açıklanabilir yapay zekâ, Biyobelirteç, circRNA, Hepatoselüler karsinom, Makine öğrenmesi, SHAP.

## ABSTRACT

### **Application of Machine Learning Methods in Healthcare: Modeling on an Open Dataset and Identification of Risk Factors for Disease Prediction**

**Aim:** This study aimed to compare circRNA expression profiles across different stages of hepatocellular carcinoma (HCC), to identify potential biomarkers, and to evaluate their applicability in clinical decision support through explainable artificial intelligence (XAI) methods.

**Materials and Methods:** Open-access circRNA microarray datasets were analyzed, including normal liver tissue, non-metastatic HCC, and metastatic HCC samples. Differential expression analyses were performed using statistical and bioinformatics approaches, and findings were visualized through UMAP, volcano plots, and MD plots. Eleven distinct machine learning algorithms were applied to classify groups, and SHAP-based explainability techniques were employed to ensure transparent interpretation of model decisions.

**Results:** Distinct circRNA signatures were identified for both metastatic and non-metastatic HCC groups. In metastatic cases, circRNAs with high logFC and SHAP scores emerged as potential biomarkers associated with metastatic progression, whereas non-metastatic cases revealed specific molecular patterns reflecting early-stage tumor biology. Machine learning models demonstrated robust performance with high accuracy and ROC-AUC values, while SHAP analysis highlighted biologically meaningful transcripts contributing to classification.

**Conclusion:** This thesis demonstrates that circRNAs may serve as stage-specific molecular signatures of HCC and highlights the utility of XAI-driven approaches in biomarker discovery. The findings contribute to identifying reliable biomarker candidates that can be integrated into clinical decision support systems, presenting a novel framework that combines transcriptomic analysis with interpretable artificial intelligence in HCC research.

**Keywords:** Explainable artificial intelligence, Biomarker, circRNA, Hepatocellular carcinoma, Machine learning, SHAP.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                 |                                                   |
|-----------------|---------------------------------------------------|
| <b>AI</b>       | : Yapay Zekâ                                      |
| <b>CatBoost</b> | : Kategorik Arttırma                              |
| <b>CV</b>       | : Çapraz Doğrulama                                |
| <b>FC</b>       | : Kat Değişimi                                    |
| <b>FDR</b>      | : Yanlış Keşif Oranları                           |
| <b>ICE</b>      | : Bireysel Koşullu Beklenti                       |
| <b>LC-MS</b>    | : Sıvı kromatografisi-Kütle Spektrometrisi        |
| <b>LIME</b>     | : Yerel Yorumlanabilir Model-Bağımsız Açıklamalar |
| <b>LightGBM</b> | : Light Gradient Boosting Machines                |
| <b>LS-MS</b>    | : Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometrisi        |
| <b>ROC</b>      | : Alıcı İşletim Karakteristiği                    |
| <b>SHAP</b>     | : SHapley Katkı Açıklamaları                      |
| <b>VIP</b>      | : Projeksiyon Değişken Önem                       |
| <b>XAI</b>      | : Açıklanabilir Yapay Zekâ                        |
| <b>XGBoost</b>  | : EXtreme Gradient Boosting                       |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil No                                                                                                                                | Sayfa No |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Şekil 4.1. Metastatik HCC ve Normal Doku Örneklerine Ait Kutu Grafiği .....                                                             | 29       |
| Şekil 4.2. Metastatik HCC ve Normal Doku Örneklerine Ait Gen Ekspresyon Yoğunluk Eğrisi .....                                           | 29       |
| Şekil 4.3. Metastatik HCC ve Normal Doku Örneklerine Ait UMAP Dağılım Grafiği .....                                                     | 30       |
| Şekil 4.4. Metastatik HCC ve Normal Karaciğer Dokuları Arasındaki Gen Ekspresyon .....                                                  | 32       |
| Şekil 4.5. Metastatik HCC ve normal karaciğer dokularındaki transkriptlere ait MD grafiği .....                                         | 33       |
| Şekil 4.6. Neural Network Modeline Ait Confusion Matrix .....                                                                           | 36       |
| Şekil 4.7. Neural Network Modeline Ait ROC Eğrisi .....                                                                                 | 37       |
| Şekil 4.8. Çapraz Doğrulama Sonuçlarına Göre En İyi 5 Modelin Performans Radar Grafiği .....                                            | 38       |
| Şekil 4.9. circRNA Tabanlı Modelde SHAP Değerlerine Göre Özellik Önem Grafiği .                                                         | 39       |
| Şekil 4.10. circRNA Özelliklerine Ait SHAP Özet Grafiği .....                                                                           | 40       |
| Şekil 4.11. circRNA Özelliklerinin SHAP Değerlerine Göre Korelasyon Matrisi .....                                                       | 41       |
| Şekil 4.12. Metastaz Yapmamış HCC ve Normal Karaciğer Doku Örneklerine Ait Kutu Grafiği .....                                           | 43       |
| Şekil 4.13. Metastaz Yapmamış HCC ve Normal Karaciğer Doku Örneklerine Ait Gen Ekspresyon Yoğunluk Eğrisi.....                          | 44       |
| Şekil 4.14. Metastaz Yapmamış HCC ve Normal Karaciğer Doku Örneklerine Ait UMAP Dağılım Grafiği.....                                    | 45       |
| Şekil 4.15. Metastaz Yapmamış HCC ve Normal Karaciğer Dokuları Arasındaki Gen Ekspresyon Farklılıklarını Gösteren Volcano Grafiği ..... | 47       |
| Şekil 4.16. Metastaz Yapmamış HCC ve Normal Karaciğer Dokularındaki Transkriptlere Ait MD Grafiği .....                                 | 48       |
| Şekil 4.17. Neural Network Modeline Ait Karışıklık Matrisi .....                                                                        | 52       |
| Şekil 4.18. Neural Network Modeline Ait ROC Eğrisi .....                                                                                | 52       |
| Şekil 4.19. Çapraz Doğrulama Sonuçlarına Göre En İyi 5 Modelin Performans Radar Grafiği .....                                           | 53       |
| Şekil 4.20. circRNA Tabanlı Modelde SHAP Değerlerine Göre Özellik Önem Grafiği                                                          | 55       |

|                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.21.</b> circRNA Özelliklerine Ait SHAP Özet Grafiği .....                                                                            | 56 |
| <b>Şekil 4.22.</b> circRNA Özelliklerinin SHAP Değerlerine Göre Korelasyon Matrisi .....                                                        | 57 |
| <b>Şekil 4.23.</b> Metastatik HCC ve Metastaz Yapmamış HCC Doku Örneklerine Ait Kutu<br>Grafiği .....                                           | 59 |
| <b>Şekil 4.24.</b> Metastatik HCC ve Metastaz Yapmamış HCC Doku Örneklerine Ait Gen                                                             | 60 |
| <b>Şekil 4.25.</b> Metastatik HCC ve Metastaz Yapmamış HCC Doku Örneklerine Ait UMAP<br>Dağılım Grafiği .....                                   | 61 |
| <b>Şekil 4.26.</b> Metastatik HCC ve Metastaz Yapmamış HCC Dokuları Arasındaki Gen<br>Ekspresyon Farklılıklarını Gösteren Volcano Grafiği ..... | 62 |



## TABLÖLAR DİZİNİ

| <b>Tablo No</b>                                                                                                                                                                         | <b>Sayfa No</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Tablo 4.1.</b> Metastatik HCC doku örneklerinde normal karaciğer dokularına kıyasla yukarı regüle olduğu tespit edilen genler .....                                                  | 30              |
| <b>Tablo 4.2.</b> Metastatik HCC doku örneklerinde normal karaciğer dokularına kıyasla aşağı regüle olduğu tespit edilen genler .....                                                   | 31              |
| <b>Tablo 4.3.</b> MET ve N Grupları Arasında İfade Düzeyi En Fazla Farklılaşan circRNA'lar .....                                                                                        | 33              |
| <b>Tablo 4.4.</b> Ağaç Tabanlı Makine Öğrenmesi Modellerin Performans Ölçütlerine İlişkin Bulgular .....                                                                                | 35              |
| <b>Tablo 4.5.</b> Ağaç Tabanlı Makine Öğrenmesi Modellerin Performans Ölçütlerine İlişkin Bulgular .....                                                                                | 38              |
| <b>Tablo 4.6.</b> Sınıf Bazlı SHAP Analizi: MET ve N Sınıfları İçin En Önemli circRNA'lar .....                                                                                         | 42              |
| <b>Tablo 4.7.</b> Sınıf Bazlı SHAP Analizi: MET ve N Sınıfları İçin En Önemli circRNA'lar .....                                                                                         | 45              |
| <b>Tablo 4.8.</b> Sınıf Bazlı SHAP Analizi: MET ve N Sınıfları İçin En Önemli circRNA'lar .....                                                                                         | 46              |
| <b>Tablo 4.9.</b> Normalize edilmiş SHAP değerlerine göre metabolitlerin PKOS tanısındaki önem düzeyleri .....                                                                          | 49              |
| <b>Tablo 4.10.</b> Farklı Makine Öğrenimi Modellerinin circRNA Temelli Sınıflandırma Performans Karşılaştırması (Metastaz Yapmamış HCC ve Normal Karaciğer Dokularının Ayırımında)..... | 51              |
| <b>Tablo 4.11.</b> SHAP Değerlerine Göre En Yüksek Katkı Sağlayan İlk 10 circRNA Transkripti .....                                                                                      | 54              |
| <b>Tablo 4.12.</b> Sınıf Bazlı SHAP Analizi: nonMET ve N Sınıfları İçin En Önemli circRNA'lar .....                                                                                     | 58              |

# 1. GİRİŞ

Hepatoselüler karsinom (HCC), karaciğerin primer maligniteleri arasında en sık görülenidir ve tüm dünyada kansere bağlı ölümlerde dördüncü sırada yer almaktadır. Son epidemiyolojik projeksiyonlara göre, 2025 yılı itibarıyla küresel düzeyde HCC'ye bağlı yıllık yeni vaka sayısının 1 milyonu aşacağı öngörülmektedir (1). HCC gelişiminin arkasında yatan temel risk faktörleri arasında kronik hepatit B ve C enfeksiyonları, non-alkolik steatohepatit (NASH), siroz, aşırı alkol tüketimi ve aflatoksin B1 gibi hepatotoksik ajanlara maruziyet yer almaktadır (2). Bu faktörlerin yol açtığı kronik inflamasyon, oksidatif stres ve hepatosit ölümü, zamanla fibrozis ve rejeneratif nodüller oluşturarak kanserleşme sürecini başlatmaktadır.

Hücre düzeyinde bu süreç, başta TP53, CTNNB1, TERT, AXIN1 gibi genlerde meydana gelen somatik mutasyonlarla desteklenmekte; DNA hasarı tamir mekanizmalarının bozulması, hücre döngüsünün kontrolsüzleşmesi ve apoptoz baskılanması sonucunda malign transformasyon kaçınılmaz hâle gelmektedir (3). Ayrıca, epigenetik mekanizmalar da HCC patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Özellikle DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kromatin yeniden düzenlenmesi gibi değişiklikler, tümör baskılayıcı genlerin susturulması veya onkogenlerin aktifleşmesine neden olmaktadır (4, 5). HCC'nin heterojen moleküler altyapısı, tümör davranışları açısından hastalar arasında belirgin farklılıklara yol açmakta; bu da hem tanı hem de tedavi yaklaşımlarını zorlaştırmaktadır.

Ne yazık ki HCC hastalarının çoğu, semptomların genellikle geç evrede ortaya çıkması nedeniyle ilerlemiş evrede tanı almakta, bu da prognozu olumsuz etkilemektedir. Erken evrede tanı konulmuş olgularda cerrahi rezeksiyon ve küratif tedavi seçenekleri mümkünken, ileri evrede uygulanan tedaviler çoğunlukla palyatif niteliktedir. Bu nedenle, erken evrede HCC'yi güvenilir ve duyarlı biçimde tanımlayabilecek moleküler biyobelirteçlere duyulan ihtiyaç kritik önemdedir. HCC hastalarının çoğu, semptomların genellikle geç evrede ortaya çıkması nedeniyle ilerlemiş evrede tanı almakta... Erken evrede tanı konulmuş olgularda cerrahi rezeksiyon ve küratif tedavi seçenekleri mümkünken, ileri evrede uygulanan tedaviler çoğunlukla palyatif niteliktedir. Bu nedenle erken evrede HCC'yi güvenilir ve duyarlı biçimde tanımlayabilecek moleküler biyobelirteçlere duyulan ihtiyaç kritik önemdedir. Geleneksel tanı araçları arasında yer alan AFP düzeyleri, abdominal ultrasonografi ve BT/MRG gibi görüntüleme yöntemleri özellikle erken evrede yetersiz duyarlılık ve özgüllük sergilemektedir. (6-9). AFP'nin tek

başına tanı doğruluğu sınırlıdır; bu nedenle non-invaziv, hassas ve evreye özgü moleküler belirteçlerin geliştirilmesi, tanı ve prognozda çığır açıcı potansiyel sunmaktadır.

Bu bağlamda son yıllarda giderek artan sayıda çalışmada, kodlamayan RNA'lar (non-coding RNAs) arasında yer alan sirküler RNA'lar (circRNA'lar) ön plana çıkmaktadır. circRNA'lar, klasik lineer RNA'lardan farklı olarak kovalent bağlarla döngüsel yapılar oluşturan, 5'-3' uçları kapalı ve RNase R gibi ekzonükleazlara karşı dayanıklı moleküllerdir. Bu yapısal kararlılıkları, onları biyolojik sıvılarda tespit edilebilir ve stabil biyobelirteç adayları hâline getirmektedir (10-12). circRNA'ların dokuya ve evreye özgü ekspresyon profilleri, kanser biyolojisiyle olan ilişkilerini daha da güçlendirmektedir. Bu moleküller; miRNA süngerliği, mRNA stabilizasyonu, transkripsiyon regülasyonu ve protein etkileşimleri gibi çok yönlü mekanizmalar aracılığıyla HCC'nin tümör gelişimi, progresyonu, metastazı ve tedavi direnci üzerinde doğrudan etkili olmaktadır (13, 14).

CircRNA'ların bu moleküler karmaşıklık içerisindeki çok işlevli rolleri, onları yalnızca tümör biyolojisinin anlaşılmasında değil, aynı zamanda erken tanı, prognostik sınıflama ve hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde de oldukça değerli kılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, belirli circRNA'ların HCC alt tiplerine, evrelerine veya hastalık progresyonuna özgü ekspresyon profilleri sergilediği gösterilmiştir. Örneğin, circRNA\_100338 yüksek metastatik potansiyel ile ilişkilendirilmiş, circMTO1 ise tümör baskılayıcı rolüyle tanımlanmıştır (15, 16). Bu bulgular, circRNA'ların dokuya ve evreye özgü moleküler imzalar taşıdığını ve dolayısıyla özgün biyobelirteç adayları olarak değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, mevcut literatürde circRNA'ların metastatik evre ile erken evre HCC arasında nasıl farklılaştığına dair sistematik karşılaştırmalar oldukça sınırlıdır. Ayrıca, circRNA'ların ekspresyon desenlerinin yapay zekâ temelli yöntemlerle yorumlanarak klinik karar destek sistemlerine entegre edilmesi hâlâ gelişmekte olan bir araştırma alanıdır.

Bu eksikliklerden yola çıkarak yürütülen bu tez çalışmasında, normal karaciğer dokusu, metastaz yapmamış HCC ve metastatik HCC örnekleri arasında circRNA ekspresyon profilleri karşılaştırılmış, diferansiyel olarak eksprese edilen transkriptler istatistiksel ve biyoinformatik analizlerle belirlenmiştir. Ayrıca bu profiller, açıklanabilir yapay zekâ (XAI) yöntemlerinden SHAP algoritması ile entegre edilerek hem bireysel hem küresel düzeyde model kararlarına en çok katkı sağlayan transkriptler tanımlanmıştır. Böylece yalnızca biyolojik anlamlılık değil, aynı zamanda sınıflandırma

modelleri açısından karar süreçlerine etkisi yüksek circRNA'lar da belirlenmiştir. Çalışmanın özgün katkısı, klinik olarak anlamlı moleküler imzaların sadece ekspresyon düzeyinde değil, aynı zamanda yapay zekâ temelli yorumlanabilirlik açısından da değerlendirilmiş olmasıdır.

Sonuç olarak bu tez, sadece klasik diferansiyel ekspresyon analizleriyle sınırlı kalmayarak, circRNA'ların HCC evrelerine özgü moleküler iz düşümlerini, gelişmiş görselleştirme yöntemleri (UMAP, volcano, MD plot) ve derin öğrenme tabanlı açıklanabilirlik algoritmaları (Neural Network + SHAP) aracılığıyla bütüncül biçimde değerlendirmiştir. Elde edilen bulgular, hem erken evre HCC (nonMET) hem de metastatik HCC (MET) için ayrı ayrı moleküler imzalar ortaya koyarak, bu iki klinik grubun yalnızca histopatolojik olarak değil, aynı zamanda transkriptomik düzeyde de ayrıştırılabileceğini göstermiştir. Özellikle MET grubunda yüksek logFC ve SHAP skorları ile tanımlanan transkriptlerin metastatik progresyona özgü biyobelirteç adayları olarak değerlendirilebileceği ortaya konmuş; buna karşılık nonMET grubunda ise erken evre genetik aktivasyonları temsil eden özgün moleküller belirlenmiştir.

Bu yönüyle çalışmamız, yalnızca istatistiksel anlamlılık temelinde değil, aynı zamanda modelleme ve klinik karar desteği açısından yüksek katkı sağlayan circRNA'ları tanımlamayı başarmış ve böylelikle literatürde eksikliği hissedilen açıklanabilir yapay zekâ (XAI) temelli yaklaşımların HCC biyobelirteç keşfindeki gücünü gözler önüne sermiştir. Yapay zekâ temelli analizlerin SHAP gibi algoritmalarla açıklanabilir hâle getirilmesi, sadece moleküler düzeyde değil, aynı zamanda klinik karar süreçlerinde güvenilirliğin artırılması açısından da önemli bir adımdır. Bu yaklaşım sayesinde, çalışmamızda saptanan biyobelirteç adaylarının gelecekte klinik karar destek sistemlerinde kullanılabilirliği yönünde önemli bir zemin hazırlanmıştır.

Bu tez çalışmasıyla, hepatoselüler karsinomun moleküler heterojenitesini daha iyi anlayabilmek için sistem biyolojisi, yapay zekâ ve transkriptomik veri analitiği disiplinlerini bir araya getiren yenilikçi bir çerçeve sunulmuştur. Literatürde sıklıkla karşılaşılan sınıflandırma ya da tanı modellerinin aksine, bu çalışmada modellerin karar süreçlerine dair şeffaf ve açıklanabilir bir metodoloji benimsenmiş ve bu sayede moleküler biyobelirteçlerin yalnızca varlığı değil, klinikte nasıl ve neden önemli oldukları da ortaya konmuştur.

Netice itibarıyla bu tez, hepatoselüler karsinomun farklı evreleri arasında circRNA düzeyinde özgün biyobelirteçleri yüksek doğrulukla ayırt edebilen ve bu ayrımı klinik olarak yorumlanabilir biçimde destekleyen nadir çalışmalardan biridir. Bu yönüyle, hem

transkriptomik biyobelirteç araştırmalarına hem de XAI destekli kanser biyoinformatiğine önemli ve öncü bir katkı sağlamaktadır. İlerleyen dönemde yapılacak validasyon temelli deneysel çalışmalarla bu biyobelirteç adaylarının kliniğe entegrasyonu hedeflenmekte olup, bu çalışma bu sürecin ilk ve en kapsamlı adımlarından birini oluşturmaktadır.



## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Genomik Biliminin Tanımı ve Gelişimi**

Genomik, bir organizmanın tüm genomunun (DNA dizisinin tamamı) yapısını, işlevini, evrimini ve haritalanmasını inceleyen moleküler biyoloji dalıdır. Klasik genetikten farklı olarak, genomik tek tek genleri değil, genomun bütünsel yapısını anlamaya odaklanır (17). Genomik, insan sağlığı, evrim, tarım ve biyoteknoloji gibi birçok disiplini derinden etkilemiştir. İlk kez 1990 yılında başlatılan İnsan Genomu Projesi (Human Genome Project, HGP), insan genomunun tüm nükleotid dizisinin belirlenmesi ve genetik haritasının çıkarılması amacıyla yürütülen uluslararası, çok disiplinli ve büyük ölçekli bir girişimdir. Bu proje, 13 yıllık bir sürecin ardından 2003 yılında tamamlanmış ve yaklaşık 3 milyar baz çiftinden oluşan insan DNA'sının büyük bir kısmı yüksek doğrulukla dizilenmiştir. HGP'nin başarısı, yalnızca genom dizilimini sağlamakla kalmamış; aynı zamanda biyoinformatik, yüksek verimli dizi analiz teknolojileri, gen anotasyonu ve veri paylaşımı gibi alanlarda da devrim niteliğinde ilerlemelere öncülük etmiştir. Elde edilen veriler, genetik hastalıkların altında yatan nedenlerin daha iyi anlaşılmasına, bireyselleştirilmiş tıp yaklaşımlarının geliştirilmesine ve farmakogenomik gibi yeni alt disiplinlerin ortaya çıkmasına olanak tanımıştır. Ayrıca, proje sürecinde edinilen deneyimler, büyük ölçekli biyolojik projelerin nasıl daha etkili bir şekilde yürütülebileceğine dair önemli yapısal ve organizasyonel dersler de sağlamıştır (18).

### **2.2. Genomik Teknolojileri ve Dizileme Yöntemleri**

Genom dizileme, ilk olarak 1977 yılında Frederick Sanger tarafından geliştirilen Sanger dizileme yöntemi ile başlamıştır. Bu yöntem, dideoksinükleotidlerin (ddNTP) kullanılmasıyla DNA zincirlerinin kontrollü olarak sonlandırılmasını sağlar ve uzun yıllar boyunca "altın standart" olarak kabul edilmiştir (19). Ancak düşük verimliliği ve yüksek maliyeti nedeniyle büyük ölçekli genom projeleri için yetersiz kalmıştır.

#### **2.2.1. İkinci Nesil Dizileme (Next-Generation Sequencing - NGS)**

2005 yılından itibaren geliştirilen ikinci nesil dizileme (NGS) teknolojileri, genetik analizlerde büyük bir dönüşüm yaratmıştır. NGS, milyonlarca DNA fragmentinin

aynı anda paralel olarak dizilenmesine olanak tanır. Bu yüksek verimli yaklaşım sayesinde, bir insan genomu günler içinde düşük maliyetle dizilenebilmektedir.

Öne çıkan platformlar:

- Illumina (en yaygın): Kısa okuma tabanlı, yüksek doğruluk sağlar.
- Ion Torrent: pH değişimlerine dayalı dedeksiyon mekanizması kullanır.
- BGI (MGI teknolojileri): Çin menşeli, Illumina'ya alternatif yüksek kapasiteli sistemler sunar.

NGS teknolojileri, başta kanser genomik, mikrobiyom çalışmaları, kalıtsal hastalık taramaları ve nadir varyant analizleri olmak üzere çok sayıda klinik ve araştırma alanında kullanılmaktadır (20, 21).

### 2.2.2. Üçüncü Nesil Dizileme (Third-Generation Sequencing - TGS)

Üçüncü nesil dizileme teknolojileri, DNA moleküllerini tek okuma döngüsünde, doğrudan ve gerçek zamanlı olarak dizileyebilme yeteneğine sahiptir. Bu teknolojilerin en önemli avantajı, çok daha uzun okuma uzunlukları (long reads) sağlamasıdır. Bu özellik, özellikle tekrarlayan diziler, yapısal varyantlar ve epigenetik modifikasyonlar gibi kompleks genomik yapıların çözülmesinde büyük önem taşır.

Başlıca üçüncü nesil platformlar:

- PacBio (SMRT - Single Molecule Real-Time Sequencing): Yüksek doğruluklu uzun okumalar sağlayabilir (HiFi reads).
- Oxford Nanopore Technologies (ONT): Taşınabilir cihazlarla (ör. MinION) gerçek zamanlı dizileme ve hızlı yanıt sunar.

Bu sistemler, hem araştırma hem de klinik acil durumlarda (ör. salgın analizleri) etkin olarak kullanılmaktadır (22, 23).

### 2.2.3. Tek Hücre Dizileme (Single-Cell Sequencing)

Son yıllarda geliştirilen tek hücreli dizileme (single-cell sequencing) teknolojileri, klasik toplu analiz yöntemlerinin aksine, biyolojik örneklerdeki bireysel hücrelerin transkriptomik profillerini çözümlemeye olanak tanımaktadır. Bu yaklaşım, özellikle doku veya tümör gibi yüksek düzeyde heterojen yapılar içeren biyolojik sistemlerde, hücresel düzeydeki farklılıkların aydınlatılmasını mümkün kılmıştır. Tang ve arkadaşlarının 2009 (24) yılında yayınladıkları öncü çalışma, tek bir hücrenin tüm transkriptomunu mRNA-Seq kullanarak analiz etmiş ve bu teknolojinin genomik araştırmalar için sunduğu potansiyeli gözler önüne sermiştir. Bu gelişme, başta kanser

genomiği, gelişim biyolojisi ve sinirbilim gibi alanlarda olmak üzere, hücresel çeşitliliğin anlaşılması açısından çığır açıcı bir dönüm noktası olmuştur.

- scRNA-seq: Hücresel düzeyde gen ekspresyon profili sunar.
- scDNA-seq: Mutasyonları ve genomik çeşitliliği hücresel düzeyde ortaya koyar.

#### **2.2.4. Metagenomik ve Çevresel Dizileme**

Metagenomik, belirli bir ortamdan (örneğin toprak, deniz suyu, insan dışkı gibi) izole edilen tüm mikrobiyal DNA'nın doğrudan dizilenmesine olanak tanıyan bir yaklaşımdır. Bu yöntem, laboratuvar ortamında kültüre edilemeyen mikroorganizmaların da genomik düzeyde incelenmesini mümkün kılarak mikrobiyal çeşitliliğin kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesini sağlar. Özellikle insan mikrobiyomu araştırmaları, çevresel mikrobiyal ekolojiler ve antibiyotik direnç genlerinin yayılımının takibi açısından büyük önem taşır. Metagenomik analizlerde genellikle iki temel yaklaşım tercih edilir: belirli taksonomik grupların (örneğin bakteriler) analizine yönelik 16S rRNA hedefli dizileme ve tüm genomik içeriğin rastgele dizilenmesini sağlayan shotgun metagenomik dizileme. Shotgun metagenomik yöntemi, daha yüksek çözünürlük sunarak işlevsel gen içeriklerinin ve mikrobiyal topluluk dinamiklerinin detaylı analizine olanak tanır (25).

#### **2.2.5. Kütüphane Hazırlığı ve Dizileme İş Akışı**

Bir yeni nesil dizileme (NGS) deneyi genel olarak şu temel adımları içerir: yüksek kaliteli DNA'nın örnekten ekstraksiyonu, DNA'nın belirli boyutlarda fragmente edilmesi, adaptör dizilerinin ligasyonu, gerektiğinde PCR amplifikasyonu, kütüphane kalitesinin değerlendirilmesi ve son olarak dizileme işleminin gerçekleştirilmesiyle veri çıkışı. Bu süreçlerin her biri, elde edilecek dizileme verisinin doğruluğu, kapsamı ve biyolojik anlamlılığı üzerinde doğrudan etkilidir. Özellikle düşük kaliteli DNA örneklerinden hazırlanan kütüphanelerde bias (örnekleme yanlılığı), düşük kapsama oranı ve hata oranlarında artış gibi sorunlarla karşılaşılabilir. Bu nedenle, her aşamada uygulanan kalite kontrol prosedürleri ve istatistiksel değerlendirmeler, güvenilir sonuçlar elde edilmesi açısından kritik rol oynamaktadır (26).

Genomik dizileme teknolojileri, Sanger yönteminden günümüzde uzun okuma ve tek hücre analizlerine kadar çok geniş bir evrim geçirmiştir. Bu teknolojik gelişmeler sayesinde yalnızca genetik hastalıkların tanısı değil, aynı zamanda biyolojik çeşitliliğin anlaşılması, evrimsel biyoloji, çevresel analizler ve kişiselleştirilmiş tıp alanlarında da

önemli katkılar sağlanmıştır. Her bir platformun avantajları ve sınırlamaları bulunmaktadır; bu nedenle uygulama amacına göre uygun teknolojinin seçilmesi hayati önem taşımaktadır.

### **2.3. Fonksiyonel Genomik: Genlerin İşlevlerini Anlamak**

Fonksiyonel genomik, genetik dizilerin yalnızca yapısal özelliklerini değil, aynı zamanda bu genlerin biyolojik işlevlerini, ekspresyon paternlerini ve diğer genetik elementlerle olan etkileşimlerini dinamik bir şekilde inceleyen bir alandır. Bu alanda yaygın olarak kullanılan teknikler arasında RNA-seq (gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi), ChIP-seq (transkripsiyon faktörleri ve histon modifikasyonlarının bağlanma bölgelerinin tespiti), ATAC-seq (kromatin erişilebilirliği analizi) ve CRISPR/Cas9 (hedefli gen düzenleme ile işlevsel analiz) yer almaktadır. ENCODE Projesi kapsamında bu teknikler sistematik olarak uygulanarak insan genomundaki düzenleyici elementler haritalanmış, genlerin ne zaman ve hangi hücre tiplerinde aktif hale geldiği gösterilmiştir (27). Ayrıca, DNA dizileme teknolojilerinin kapsamı genişledikçe, bu yöntemlerin fonksiyonel genomikteki uygulamaları da derinleşmiş ve genomun işlevsel organizasyonunu anlamada kritik araçlar hâline gelmiştir (28).

### **2.4. Genomik ve İnsan Sağlığı: Kişiselleştirilmiş Tıpa Doğru**

Genomik bilimindeki ilerlemeler, modern tıpta bireye özgü tanı, tedavi ve önleme stratejilerinin geliştirilmesine olanak tanımış ve bu yaklaşım 'hassas tıp' (precision medicine) kavramını doğurmuştur. Genomik veriler, artık hastalık risklerinin öngörülmesinden tedavi planlamasına kadar uzanan geniş bir yelpazede kullanılmaktadır. Özellikle kansere özgü somatik ve germline mutasyonların saptanması (örneğin BRCA1, BRCA2, TP53 gibi genlerde), hem tarama hem de tedavi kararlarını doğrudan etkileyebilmekte; hedefe yönelik ilaçların (örneğin PARP inhibitörleri) kullanımını yönlendirmektedir. Farmakogenomik, bireylerin ilaçlara verdikleri yanıtların genetik temellerini anlamayı amaçlar ve bu sayede ilaçların etkinliğini artırırken yan etki risklerini azaltır. Örneğin CYP2C9, VKORC1 gibi genetik varyantlar, warfarin gibi antikoagülan ilaçların dozaj ayarlamasında kritik rol oynayabilir. Bunun yanı sıra, monogenik (tek gen kaynaklı) hastalıklar — örneğin kistik fibrozis, Duchenne musküler distrofi, Tay-Sachs hastalığı gibi — için genomik testler hem tanı koyma hem de taşıyıcı taramaları açısından yüksek hassasiyet sunar. Bu tür testler, özellikle doğum öncesi genetik danışmanlık ve taşıyıcı taramaları gibi alanlarda önemli uygulama alanı

bulmuştur. Günümüzde, genomik veriler Elektronik Sağlık Kayıtları (Electronic Health Records, EHR) sistemlerine entegre edilerek, klinik karar destek sistemlerine doğrudan bağlanmaktadır. Bu sayede bireylere ait poligenik risk skorları (polygenic risk scores, PRS) hesaplanmakta; kalp hastalığı, tip 2 diyabet, meme kanseri gibi kompleks hastalıklar için kişiselleştirilmiş risk değerlendirmeleri yapılabilmektedir. Böylece genomik veriler, sadece tanı ve tedavi değil, aynı zamanda önleyici sağlık hizmetlerinin temel bir bileşeni hâline gelmektedir (29, 30).

## **2.5. Popülasyon Genomiği ve Evrimsel Perspektif**

Popülasyon genomiği, hem türler arası hem de tür içi genetik çeşitliliği araştıran bir bilim dalıdır ve evrimsel süreçlerin moleküler düzeyde anlaşılmasına katkı sağlar. Bu alanda temel olarak, bireyler arasında görülen genetik varyasyonların — özellikle tek nükleotid polimorfizmleri (SNP), kopya sayısı varyasyonları (CNV) ve yapısal değişiklikler — popülasyonlara göre dağılımı analiz edilir. Böylece doğal seçim, genetik sürüklenme, adaptasyon, gen akışı ve genetik izolasyon gibi temel evrimsel mekanizmalar modellenenir.

Özellikle 1000 Genom Projesi, dünya çapında farklı etnik kökenlerden bireylerin genomlarının dizilenmesiyle insan genetik çeşitliliğine dair yüksek çözünürlüklü bir referans oluşturmıştır. Bu proje sayesinde, insan genomundaki yaygın ve nadir varyantların küresel dağılımı haritalanmış ve evrimsel geçmişimize dair önemli ipuçları elde edilmiştir. Bu çabaya ek olarak HapMap, UK Biobank gibi geniş çaplı girişimler de genetik yapı, hastalık ilişkileri ve bireysel sağlık risklerinin anlaşılması açısından önemli veri kaynakları sunmaktadır (31).

## **2.6. Kanser Genomiği**

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına yol açan genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimiyle ortaya çıkan heterojen bir hastalık grubudur. Kanser genomiği, tümör hücrelerinde meydana gelen bu genetik değişimleri kapsamlı şekilde analiz ederek, hastalığın moleküler temellerini anlamayı amaçlar. Sürücü mutasyonlar (driver mutations) olarak adlandırılan bazı genetik değişiklikler, hücresel proliferasyon, apoptozun baskılanması ve invazyon gibi kanserin temel özelliklerini destekleyen biyolojik süreçleri doğrudan etkiler. Bu mutasyonlar genellikle onkogenlerin (ör. KRAS, BRAF) aktivasyonu veya tümör baskılayıcı genlerin (ör. TP53, RB1) inaktivasyonu şeklinde kendini gösterir (32).

Kanser genomu alanında yapılan büyük ölçekli araştırmalar, farklı tümör tiplerinde özgün genetik profillerin bulunduğunu ortaya koymuştur. Özellikle The Cancer Genome Atlas (TCGA) ve International Cancer Genome Consortium (ICGC) gibi projeler, yüzlerce kanser örneğini çok boyutlu omik verilerle analiz ederek mutasyonlar, kopya sayısı değişiklikleri, DNA metilasyonu ve ekspresyon profilleri gibi pek çok değişkeni bütünsel olarak değerlendirmiştir (33, 34). Bu çalışmalar, kanserlerin histopatolojik sınıflandırmalarının ötesine geçilerek moleküler alt tiplerle ayrılmasını sağlamış ve hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunmuştur.

Genomik analizler, günümüzde kanser tedavisinde kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarının merkezinde yer almaktadır. Örneğin, EGFR mutasyonu taşıyan akciğer kanseri hastalarında tirozin kinaz inhibitörleri (erlotinib, gefitinib) etkili olurken, HER2 gen amplifikasyonu pozitif olan meme kanseri hastaları trastuzumab ile tedavi edilmektedir. Benzer şekilde, BRCA1/2 mutasyonuna sahip over ve meme kanseri hastalarında PARP inhibitörleri kullanılmakta, bu da DNA onarım yollarının hedeflenmesini mümkün kılmaktadır (35). Bu genomik temelli tedavi yaklaşımları yalnızca tedavi etkinliğini artırmakla kalmayıp aynı zamanda toksisiteyi de azaltmaktadır.

Son yıllarda gelişen likit biyopsi ve tek hücreli dizileme gibi teknolojiler, kanser genomu alanında tanı ve izleme süreçlerine yeni bir boyut kazandırmıştır. Dolaşımdaki tümör DNA'sının (ctDNA) analiz edilmesi, hastalığın erken teşhisi, nüks riski tahmini ve tedaviye yanıt değerlendirmesi gibi çok sayıda uygulamada kullanılabilmektedir (36). Ayrıca, epigenetik değişikliklerin ve genetik olmayan regölasyon mekanizmalarının da tümör biyolojisine etkisinin anlaşılmasıyla, kanser genomu çok daha kapsamlı bir hale gelmiştir. Tüm bu gelişmeler, bireye özgü kanser tedavisi anlayışının temelini oluşturmakta ve onkolojide moleküler hedeflemeye dayalı yeni nesil tedavilerin önünü açmaktadır.

## **2.7. Genomik Etik ve Veri Güvenliği**

Genomik veriler, bireylerin yalnızca biyolojik kimliklerini değil, aynı zamanda hastalık yatkınlıkları, aile ilişkileri ve hatta davranışsal eğilimleri hakkında son derece hassas bilgiler içermektedir. Bu nedenle, genomik araştırmalar yalnızca bilimsel ilerleme açısından değil, aynı zamanda etik, hukuki ve toplumsal boyutları bakımından da dikkatli biçimde değerlendirilmelidir. Genetik bilgilerin paylaşımı, saklanması ve işlenmesi bireyin mahremiyetini doğrudan etkileyebileceğinden, genomik çalışmaların tasarımı ve uygulanmasında etik kuralların merkezi bir rolü vardır (37).

Özellikle bireyin bilgilendirilmiş onam (informed consent) süreci, genomik araştırmaların etik temelini oluşturur. Ancak genom verileri zamanla farklı analizlere konu olabileceği ve üçüncü taraflarla paylaşılabileceği için, geleneksel onam biçimleri yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle günümüzde “genişletilmiş onam (broad consent)” ve “dinamik onam (dynamic consent)” gibi yaklaşımlar geliştirilmektedir. Bu yaklaşımlar, katılımcıların veri kullanımını belirli aralıklarla güncelleyebilmelerine olanak tanıyarak veri üzerindeki kontrolü artırmaktadır (38-41).

Bununla birlikte, genomik veriler yalnızca bireysel sağlık bilgisi sunmakla kalmaz; aynı zamanda aile üyeleri ve etnik toplumlar üzerinde de doğrudan etkiler oluşturabilir. Örneğin, bir bireyde tespit edilen BRCA1 mutasyonu, yalnızca o kişinin değil, birinci derece kadın akrabalarının da meme ve over kanseri riski taşıdığını gösterir. Bu durum, genetik bilginin bireysel mahremiyet çerçevesinde mi yoksa ailevi/toplumsal sorumluluklar kapsamında mı değerlendirilmesi gerektiği yönünde önemli etik soruları gündeme getirir. Genomik tıbbın uygulanmasında, mahremiyetin korunması ile toplum sağlığının faydaları arasında hassas bir denge gözetilmelidir (37, 42).

Veri güvenliği ise genomik etikte sıkı biçimde iç içe geçmiştir. Genetik veriler, kişisel sağlık kayıtlarından çok daha fazla kimliklendirici bilgi içerdiğinden, bu verilerin anonimleştirilmesi (de-identification) ve şifrelenerek (encryption) saklanması zorunludur. Ancak çalışmalar, gelişmiş biyoinformatik tekniklerle anonimleştirilmiş verilerin bile geri izlenebileceğini göstermektedir (40). Bu durum, veri paylaşımı konusunda araştırmacılar ve kurumlar için ciddi sorumluluklar doğurmaktadır. Ayrıca, veri tabanlarının kötü niyetli kişilerce hedef alınabileceği düşünülerek siber güvenlik önlemleri de artırılmalıdır.

Genomik araştırmalarda şeffaflık, hesap verebilirlik ve katılımcı haklarının gözetilmesi, etik sorumluluğun temel taşlarını oluşturur. Avrupa Birliği Genel Veri Koruma Tüzüğü (GDPR) ve ABD’deki HIPAA gibi düzenlemeler, genetik verilerin korunmasına yönelik yasal çerçeveler sunmaktadır. Ancak uluslararası genomik iş birlikleri, bu düzenlemelerin ötesinde evrensel etik standartlara duyulan ihtiyacı da gündeme getirmiştir (43). Gelecekte, yapay zekâ destekli genom analizlerinin artmasıyla birlikte, algoritmik önyargılar, ticari veri kullanımı ve genetik ayrımcılık gibi yeni etik ikilemlerin ortaya çıkması beklenmektedir. Bu nedenle, genomik veri yönetiminde yalnızca teknik çözümler değil, etik ilkelere dayalı kapsayıcı ve adil bir yaklaşım kaçınılmazdır.

## 2.8. Hepatoselüler Karsinom (HCC)

Hepatoselüler karsinom (HCC), karaciğerin en sık görülen birincil malignitesi olup, dünya genelinde önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır. Özellikle kronik karaciğer hastalıklarının son evresi olan siroz zemininde gelişme eğiliminde olan bu tümör, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde mortalite oranları açısından ön sıralarda yer almaktadır. Küresel kanser istatistiklerine göre, HCC tüm karaciğer kanserlerinin yaklaşık %75'ini oluşturmakta ve her yıl yaklaşık 800.000 yeni vaka ile dünyada en sık görülen altıncı kanser türü olurken, kanser kaynaklı ölümlerde üçüncü sıraya yükselmektedir (44). Bu istatistiksel veriler, hepatoselüler karsinomun tanı ve tedavisinde erken müdahalenin ve etkili sağlık politikalarının ne denli elzem olduğunu gözler önüne sermektedir.

HCC'nin epidemiyolojik dağılımı, coğrafi bölgelere göre değişkenlik göstermektedir. Özellikle Güneydoğu Asya ve Sahra Altı Afrika gibi bölgelerde hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonlarının endemik olması nedeniyle bu bölgelerde HCC insidansı oldukça yüksektir (2). Buna karşılık Batı ülkelerinde HCC vakalarının artan bir oranı, alkol kullanımına bağlı karaciğer hastalıkları ile non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) ve non-alkolik steatohepatit (NASH) gibi metabolik disfonksiyon temelli etkenlere atfedilmektedir (45). Özellikle obezite ve tip 2 diyabetin giderek yaygınlaşması, HCC'nin Batı toplumlarında da alarm verici düzeyde artmasına neden olmuştur. Dolayısıyla, hastalığın etiyojisini anlamak için sadece viral enfeksiyonlar değil, aynı zamanda metabolik sendrom ve çevresel faktörler de kapsamlı biçimde değerlendirilmelidir.

Hepatoselüler karsinomun gelişimi çoğunlukla kronik karaciğer hasarına bağlıdır. Kronik hepatit B ve C virüsleri, hepatositlerde DNA hasarına neden olarak karaciğer hücrelerinin malign dönüşümünü kolaylaştırır. Aynı şekilde, alkol tüketimi ve NASH gibi nedenlerle oluşan uzun süreli inflamasyon ve fibrozis süreci de hücre proliferasyonunun artmasına ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna yol açarak karsinogenez mekanizmasını tetikler (46, 47). Moleküler düzeyde bakıldığında, HCC'de Wnt/ $\beta$ -katenin, PI3K/AKT/mTOR, MAPK ve p53 gibi onkogenik ve tümör baskılayıcı yolların disfonksiyonu sıkça gözlenmektedir. Bu moleküler bozukluklar yalnızca hastalığın patogeneğinde değil, aynı zamanda hastaya özgü hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde de belirleyici rol oynamaktadır.

Klinik olarak HCC çoğu zaman sessiz ilerler. Hastaların önemli bir bölümü, hastalık ileri evreye ulaştığında başvurmaktadır. Belirti verdiğinde ise genellikle karın sağ üst kadranda ağrı, kilo kaybı, iştahsızlık, halsizlik, sarılık, asit ve hepatomegali gibi bulgular ön plandadır. Hastalığın tanısı çoğunlukla radyolojik görüntüleme yöntemleriyle konur. Özellikle dinamik kontrastlı bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yöntemlerinde arteriyel fazda kontrast tutulumu ve geç fazda kontrast kaybı ("washout") varlığı, HCC tanısı için oldukça özgüdür(48). Bununla birlikte, serumda alfa-fetoprotein (AFP) düzeyinin yüksek olması da destekleyici bir biyobelirteçtir. Ancak her HCC olgusunda AFP düzeyleri yüksek olmayabileceğinden, görüntüleme bulguları tanıda belirleyici olmaktadır.

Tedavi seçenekleri, hastalığın evresine, karaciğer rezervine (Child-Pugh skoru) ve hastanın performans durumuna göre değişkenlik gösterir. Erken evrede saptanan HCC olgularında cerrahi rezeksiyon, radyofrekans ablasyon (RFA), mikrodalga ablasyon (MWA) ve karaciğer transplantasyonu gibi küratif tedavi seçenekleri ön plandadır. Ancak hastaların büyük çoğunluğu tanı anında küratif tedaviye uygun olmayan evrededir. Bu durumda transarteriyel kemoembolizasyon (TACE), transarteriyel radyoembolizasyon (TARE), sistemik hedefe yönelik tedaviler (örneğin sorafenib, lenvatinib) veya immünoterapiler (atezolizumab + bevacizumab kombinasyonu gibi) devreye girer (1). Son yıllarda immün kontrol noktası inhibitörlerinin (anti-PD-1, anti-PD-L1) HCC tedavisinde etkili olduğuna dair umut verici veriler elde edilmiştir ve bu ajanlar bazı uluslararası kılavuzlarda ilk basamak tedavi seçenekleri arasında yer almaya başlamıştır (49).

HCC'nin prognozu oldukça değişkendir ve büyük ölçüde tanı anındaki evreyle ilişkilidir. Tümörün boyutu, sayısı, damar invazyonu, uzak metastaz varlığı gibi faktörler, hastalığın seyrini doğrudan etkilerken, karaciğer fonksiyon rezervi de sağkalımı belirlemede önemli bir belirteçtir. Örneğin BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) evreleme sistemi, tümör özellikleri ile karaciğer fonksiyonunu ve hastanın genel durumunu birlikte değerlendiren, yaygın kabul görmüş bir sınıflandırma sistemidir. Bu sistem, aynı zamanda tedavi kararları için de klinik yönlendirme sağlar (50).

Sonuç olarak, hepatoselüler karsinomun küresel ölçekte artan sıklığı ve yüksek mortalite oranları, bu hastalıkla ilgili farkındalığın, erken tanı stratejilerinin ve etkili tedavi yaklaşımlarının önemini artırmaktadır. Viral hepatitlere karşı yürütülen aşılama kampanyaları, alkol tüketiminin azaltılması, NAFLD gibi metabolik hastalıkların yönetimi ve yüksek riskli bireylerde düzenli tarama programlarının uygulanması,

HCC'nin önlenmesi ve erken evrede yakalanması açısından kritik öneme sahiptir. Bu bağlamda, multidisipliner yaklaşımlar ve bireye özgü tedavi algoritmaları, hepatoselüler karsinomun yönetiminde temel taşları oluşturmaktadır.

### **2.8.1. HCC ve Genomik İlişkisi**

Hepatoselüler karsinomun (HCC) oluşumu ve ilerleyişi, yalnızca genetik değişikliklere değil, aynı zamanda bu değişimlerin etkileşim içinde olduğu karmaşık biyolojik süreçlere de bağlıdır. Günümüzde, HCC patogeneğinde hiçbir genetik faktörün tek başına belirleyici olmadığı; bunun yerine, genetik ve epigenetik değişimlerin çevresel etkilerle birlikte kümülatif olarak hastalığın gelişiminde rol oynadığı anlaşılmıştır. Başka bir ifadeyle, HCC oluşum süreci; genetik mutasyonlar, epigenetik modifikasyonlar ve çevresel tetikleyicilerin etkileşimiyle şekillenen çok faktörlü bir yapıya sahiptir. Bu kapsamda, 2000'li yıllarda temelleri atılan tüm genom ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), 2007 yılından itibaren HCC gibi kompleks hastalıklarda genetik yatkınlıkların ortaya çıkarılmasında önemli katkılar sağlamıştır (51). GWAS; binlerce genin aynı anda incelenmesine olanak tanıyan, genetik varyasyonları tanımlamak üzere yürütülen geniş kapsamlı çalışmalardır. Bu çalışmalar sayesinde tüm genom dizilemesi gerçekleştirilerek, hastalıkla ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler değerlendirilebilmektedir. Mikrodizi (microarray) teknolojisi kullanılarak yapılan bu analizlerde, yaklaşık 500.000 ile 2.000.000 arasında tek nükleotid polimorfizmi (SNP) aynı anda incelenebilmektedir. Genellikle vaka-kontrol dizaynında gerçekleştirilen bu çalışmalarda bireylerden izole edilen DNA örnekleri çoğaltılarak genotip analizleri yapılmakta ve iki grup arasındaki alel frekans farkları istatistiksel olarak karşılaştırılmaktadır.

2014 yılında Ngamruengphong ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen GWAS çalışması, HCC ile ilgili bugüne kadar yapılmış en geniş kapsamlı SNP analizlerinden biri olma özelliğini taşımaktadır (52). Bu çalışmada, 53 farklı etnik gruba ait bireyler incelenmiş ve önceki araştırmalarda HCC ile ilişkilendirilen tüm SNP'ler topluca analiz edilmiştir. Sonuç olarak, HCC riskini artıran beş farklı SNP tanımlanmıştır. HBV ile ilişkili HCC olgularında KIF1B genindeki rs17401966 ve CRHR2 genindeki rs2267716 SNP'leri; HCV ile ilişkili olgularda ise MICA geninde yer alan rs2596542 ve HLA-DQ/DR genindeki rs9275572 SNP'leri tespit edilmiştir. Alkol kullanımı ve HCV enfeksiyonunun birlikte görüldüğü HCC olgularında ise HFE genine ait rs1800562 SNP'si saptanmıştır. Özellikle KIF1B genindeki rs17401966 SNP'sinin AA alelinin,

HCC gelişim riskini artırdığı gözlemlenmiştir. Ancak, SNP frekanslarının coğrafi olarak değişkenlik göstermesi bu ilişkiyi daha da karmaşık hale getirmiştir. En belirgin farklılıklar Avustralya, Orta Asya ve Amerika kıtasındaki popülasyonlarda tespit edilmiştir (52).

KIF1B geni, hücre içi taşıma sisteminde görevli olan kinezin protein ailesine ait bir gendir ve 1. kromozomun kısa kolunda (1p36.22) konumlanmıştır. KIF1B proteini, özellikle nöronlarda sinaptik veziküllerin taşınmasında ve tüm hücrelerde mitokondrilerin yer değişiminde görev almaktadır (53, 54). Ayrıca bu genin bir diğer önemli işlevi, apoptoz mekanizmasında bir tümör baskılayıcı (tumor suppressor) olarak yer almasıdır (55). Apoptoz, organizma gelişimi ve doku homeostazı için kritik olan programlı hücre ölüm sürecidir ve bu sürecin bozulması, malignitelerin gelişiminde kilit rol oynamaktadır. Bu nedenle, KIF1B geninde oluşabilecek mutasyonlar veya ekspresyon bozuklukları, çeşitli kanser türlerinin gelişim riskini artırabilir (55). Literatürde HBV veya HCV enfeksiyonuna bağlı gelişen HCC ile KIF1B (rs17401966) ilişkisini değerlendiren 13 çalışma mevcuttur; bu çalışmaların çoğu HBV enfeksiyonu ile ilişkilidir. Ancak, HDV'ye sekonder HCC gelişimi ile KIF1B ya da herhangi bir SNP arasında doğrudan bir ilişki saptanan çalışma bulunmamaktadır. Bu durum, HDV'ye bağlı HCC'nin dünya genelinde nadir görülmesi ve GWAS gibi geniş popülasyon gerektiren çalışmalarda yer bulamaması ile açıklanabilir. Bu nedenle, HDV'ye yönelik SNP analizleri daha çok hastalığın seyrine ve tedaviye yanıt üzerine odaklanmıştır (56-58) .

Zhang ve arkadaşlarının Güney Çin'de gerçekleştirdiği çalışmada, 355 HBV ilişkili HCC hastası ile 360 kronik HBV taşıyıcısı karşılaştırılmış ve 490.794 farklı SNP analiz edilmiştir. Bu analizler sonucunda yalnızca rs17401966 SNP'si ile HCC gelişimi arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (59). Bu bulgu, KIF1B geninin kronik HBV enfeksiyonuna sahip bireylerde HCC gelişiminde potansiyel bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde, Sawai ve arkadaşlarının Japonya, Kore ve Hong Kong'dan üç farklı kohortu dahil ettiği çalışmada rs17401966 SNP'si analiz edilmiş, ancak bu kohortlarda anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (60). Bu farklılıkların, popülasyonlar arası genetik çeşitlilik, çevresel toksinlere maruziyet, yaş, cinsiyet, alkol kullanımı, HBV viral yükü, genotip farklılıkları ve diğer hepatokarsinogenetik faktörlerle açıklanabileceği düşünülmektedir.

KIF1B geninin doku düzeyinde değerlendirilmesini amaçlayan bir çalışmada; HCC dokuları ve çevresindeki karaciğer dokularındaki KIF1B protein ve mRNA düzeyleri analiz edilmiştir. Bu analizlerde rekürrens gelişen tümörlü dokularda KIF1B

proteininin belirgin şekilde azaldığı, ayrıca damar invazyonu görülen tümörlerde de KIF1B düzeyinin düşük olduğu belirlenmiştir. HCC dokularında KIF1B mRNA ekspresyon oranı, genel sağkalım (13,5–20 ay,  $p<0.05$ ) ve hastalıksız sağkalım (11,5–19,5 ay,  $p<0.05$ ) ile anlamlı ilişkili bulunmuştur. Sonuç olarak, KIF1B gen ekspresyonundaki azalma kötü prognoz göstergesi olarak değerlendirilmiş ve bu genin ileriye dönük klinik çalışmalarda prognostik belirteç olarak kullanılabileceği önerilmiştir (61). Devam eden çalışmalarda rs17401966 SNP'sine ek olarak rs1042522 ve rs2279744 gibi farklı polimorfizmler de araştırılmıştır. HBV'ye bağlı HCC hastalarında bu SNP'lerin hem homozigot hem de heterozigot formlarında hastalık riskinin anlamlı şekilde arttığı ve bu riskin 2.68 kata kadar çıkabildiği gösterilmiştir (62).

## **2.9. Kodlamayan RNA'lar**

İnsan genomunun yaklaşık %75'inin transkripsiyona uğradığı bilinmesine rağmen, yalnızca %3'lük bir kısmı protein sentezi için kalıp görevi görmektedir. Bu durum, genomdan türeyen ancak protein kodlamayan çok sayıda RNA molekülünün varlığına işaret etmektedir. Bu moleküller genellikle “kodlamayan RNA (non-coding RNA, ncRNA)” olarak adlandırılmakta ve epigenetik regülasyon mekanizmalarında önemli roller üstlenmektedir (63). Gen ekspresyonunun kontrolü ve genomik stabilitenin korunması gibi temel biyolojik süreçlerde görev alan bu RNA'lar, yapısal ve işlevsel özelliklerine göre kısa ve uzun kodlamayan RNA'lar olarak iki ana gruba ayrılmaktadır (64). Alternatif bir sınıflandırma ise ncRNA'ları miRNA (mikro RNA), lncRNA (uzun kodlamayan RNA), piRNA (piwi ile etkileşen RNA) ve circRNA (sirküler RNA) gibi alt kategorilere ayırmaktadır (65).

Uzun süredir bilinen kısa kodlamayan RNA türleri arasında snRNA'lar (small nuclear RNA), tRNA'lar (transfer RNA), rRNA'lar (ribozomal RNA) ve snoRNA'lar (small nucleolar RNA) yer almaktadır. Bu moleküllerin bir kısmının (örneğin tRNA ve rRNA gibi) işlevleri net olarak ortaya konmuşken, bazılarının biyolojik rolleri henüz tam olarak açıklanamamıştır. Buna karşın miRNA, piRNA, circRNA ve lncRNA gibi kodlamayan RNA'lar, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve hücre proliferasyonunun baskılanması gibi süreçlerde önemli düzenleyici görevler üstlenmektedir (66).

### **2.9.1. circRNA (Çembersel RNA)**

Circular RNA'lar (circRNA'lar), protein kodlamayan RNA'ların (ncRNA) özgün bir alt grubunu oluşturan, uçları olmayan, dairesel yapıda RNA molekülleridir. Bu yapı

sayesinde nükleazlara karşı oldukça dirençlidirler ve bu da onları hücre içinde son derece stabil hâle getirir (67). circRNA'lar ilk olarak 1970'li yıllarda keşfedilmekle birlikte, teknik sınırlılıklar nedeniyle uzun süre “önemsiz” olarak kabul edilmiş, ancak son on yılda gelişen yüksek geçişli RNA dizileme (RNA-seq) ve biyoinformatik algoritmalar sayesinde yeniden ilgi odağı hâline gelmiştir (27).

circRNA'lar, genellikle pre-mRNA'nın back-splicing adı verilen alternatif bir kesilip-birleştirilme (splicing) mekanizması sonucu oluşur. Bu olay sırasında, bir ekzonun 5' ve 3' uçları, normal sıralamanın aksine, birbirine bağlanır ve lineer olmayan, halkasal bir RNA transkripti meydana gelir (68).

circRNA'ların patolojik durumlarla ilişkisi, özellikle kanser biyolojisi çerçevesinde hızla genişlemektedir. circRNA'lar, hücre proliferasyonu, apoptoz, anjiyogenez, invazyon ve metastaz gibi temel onkojenik süreçlere müdahil olabilir. Kanser dokularında ifade düzeyleri değişen birçok circRNA, onkojenik ya da tümör baskılayıcı etki gösterebilir. Örneğin, circHIPK3, farklı kanser türlerinde hem tümör baskılayıcı hem de tümör destekleyici roller gösterebildiği için kontekst bağımlı bir düzenleyici olarak tanımlanmıştır (68).

circRNA'ların bir diğer çarpıcı özelliği, kan, plazma, idrar, tükürük gibi biyolojik sıvılarda da kararlı biçimde bulunabilmeleri ve bu sayede non-invaziv tanı biyobelirteçleri olma potansiyelidir (15). Bu özellik, başta hepatoselüler karsinom olmak üzere birçok kanser türü için erken tanı ve prognostik değerlendirmede circRNA'ların kullanımını mümkün kılar.

Özetle, circRNA'lar hücrel regülasyonun önemli aktörleri hâline gelmiş, özellikle kanser biyolojisinde tanı, prognostik değerlendirme ve hedeflenebilir tedavi yolları açısından büyük umut vaat etmeye başlamıştır. Bu bağlamda, HCC gibi moleküler heterojenitenin yüksek olduğu kanserlerde circRNA ekspresyon profillerinin analizi, biyobelirteç keşfi ve bireyselleştirilmiş tıp açısından önemli bir potansiyel barındırmaktadır.

### **2.9.2. circRNA'ların Hepatoselüler Karsinomdaki Rolü**

Son yıllarda, hepatoselüler karsinomun (HCC) moleküler mekanizmalarının anlaşılmasında kodlamayan RNA'lar önemli bir araştırma alanı hâline gelmiştir. Bu kodlamayan RNA'lar arasında, çembersel RNA'lar (circRNA), hücrel süreçlerdeki düzenleyici rolleri ve kanser biyolojisindeki işlevleriyle dikkat çekmektedir. circRNA'lar, lineer RNA'lardan farklı olarak 3' ve 5' uçları olmayan, kapalı halkasal

yapılara sahip, oldukça stabil moleküllerdir ve genellikle RNA splicing süreci sırasında oluşurlar (69). Başta mikroRNA (miRNA) süngerliği olmak üzere, gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel düzeyde düzenleyebildikleri, transkripsiyonu etkileyebildikleri ve hatta bazı durumlarda protein kodlayabildikleri gösterilmiştir (70).

circRNA'ların, HCC patogeneğinde önemli roller oynadığı giderek daha net anlaşılmaktadır. HCC dokularında yapılan yüksek verimli RNA dizileme analizleri (RNA-seq), birçok circRNA'nın diferansiyel olarak ifade edildiğini, özellikle tümör ve normal dokular arasında anlamlı farklılıklar olduğunu göstermektedir (71). Bazı circRNA'ların onkojenik (örneğin circ\_0005075, circMTO1) veya tümör baskılayıcı (örneğin circZKSCAN1) etkiler gösterebildiği belirlenmiştir. Örneğin, circMTO1, miR-9'u hedefleyerek p21 ekspresyonunu arttırmakta ve bu yolla hücre proliferasyonunu baskılamaktadır. Bu durum, circRNA'ların yalnızca biyolojik belirleyici olarak değil, aynı zamanda potansiyel terapötik hedefler olarak da kullanılabileceğini göstermektedir (16).

circRNA'ların bir diğer önemli özelliği, kan, plazma veya dışkı gibi biyolojik sıvılarda da stabil olarak bulunabilmeleri sayesinde, non-invaziv biyobelirteç adayı olmalarıdır. Bu bağlamda, circ\_104075, HCC hastalarının plazmasında yüksek seviyelerde saptanmış ve tanı koydurucu özellik taşıdığı bildirilmiştir (72). Ayrıca, bazı çalışmalarda circRNA profillerinin, HCC'nin klinik alt tiplerini, metastatik potansiyelini veya tedaviye yanıtını öngörmede kullanılabileceği öne sürülmektedir (73).

Bu doğrultuda yapılan birçok yüksek profilli çalışma, circRNA'ların biyolojik işlevleri ve klinik kullanımları arasında doğrudan bağlar kurmayı amaçlamaktadır. Örneğin, Zhang ve arkadaşları (2020), HCC hücre dizilerinde ve hasta dokularında yüksek ifade edilen circ\_0067934'ün miR-1324'ü inhibe ederek, FZD5-Wnt/ $\beta$ -catenin yolunu aktive ettiğini ve bu yolla tümör progresyonunu artırdığını göstermiştir (74). Bu ve benzeri bulgular, circRNA'ların HCC biyolojisindeki yerini moleküler düzeyde tanımlarken, aynı zamanda yeni nesil tanı, prognostik ve hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarına zemin hazırlamaktadır.

Günümüzde geliştirilen explainable AI (XAI) tabanlı biyobelirteç keşif modelleri, circRNA'ların HCC tanı ve ayırıcı tanısındaki rollerini daha detaylı şekilde ortaya koymayı mümkün kılmaktadır. SHAP gibi model açıklama algoritmaları ile birlikte kullanılan makine öğrenmesi modelleri, özellikle sınıf ayrımında en etkili circRNA'ların belirlenmesinde öne çıkmaktadır. Bu yöntemlerle elde edilen bulgular, sadece istatistiksel

anlamlılık değil, aynı zamanda biyolojik anlamlılık açısından da değerlendirilmekte ve hedef doğrulama süreçleriyle desteklenmektedir.

Sonuç olarak, circRNA'lar, hepatoselüler karsinomun moleküler temellerine ışık tutan ve hastalığın erken tanısı, prognoz tahmini ve hedefe yönelik tedavi yaklaşımları açısından umut vadeden moleküler unsurlar arasında yer almaktadır. Bu bağlamda, tez kapsamında yapılacak olan circRNA tabanlı biyoinformatik analizlerin, HCC biyolojisine yönelik özgün katkılar sunması beklenmektedir.

## **2.10. Yapay Zekâ ve Makine Öğrenmesi**

Yapay zekâ (YZ), insan bilişsel süreçlerini taklit ederek, özellikle büyük ve karmaşık veri kümeleri üzerinde analiz, tahmin ve karar verme süreçlerinde insan uzmanlığını destekleyen veya tamamlayan bir teknolojidir. Biyomedikal alanda yapay zekâ uygulamaları, tanı koyma, prognoz belirleme, hastalık sınıflandırması ve bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi gibi çok sayıda kritik süreçte devrim niteliğinde katkılar sağlamaktadır. Günümüzde özellikle görüntü işleme, genomik analizler, biyobelirteç keşfi ve elektronik sağlık kayıtlarının (EHR) analizi gibi alanlarda YZ sistemleri klinik kararlarda doktorlara destek sağlayan araçlar hâline gelmiştir (75, 76)

Makine öğrenmesi (ML), yapay zekâ teknolojileri içerisinde, geçmiş verilerden öğrenerek yeni ve bilinmeyen veriler üzerinde tahmin veya sınıflama yapabilen algoritmalar bütünü olarak tanımlanır. Tıpta ML sistemleri, büyük veri kümeleri içerisinde örüntüleri tanımlayarak klinik karar destek sistemlerinin doğruluğunu artırmakta ve hastalık öngörüsü, tanı, prognoz ve tedavi yanıtı tahminlerinde önemli katkılar sunmaktadır (77). Makine öğrenmesi temel olarak gözetimli öğrenme (supervised learning), gözetimsiz öğrenme (unsupervised learning) ve pekiştirmeli öğrenme (reinforcement learning) olmak üzere üç ana kategoriye ayrılır. Gözetimli öğrenme, etiketlenmiş veri kümeleriyle çalışan ve genellikle sınıflandırma veya regresyon görevlerinde kullanılan bir yaklaşımdır. Bu alanda sık kullanılan algoritmalar arasında Random Forest, Support Vector Machines (SVM), Logistic Regression ve XGBoost yer alır. Öte yandan, gözetimsiz öğrenme yöntemleri —örneğin K-Means veya Principal Component Analysis (PCA)— veri etiketlerine ihtiyaç duymadan, örüntü keşfi ve kümelenme analizi gibi amaçlarla kullanılır (78). Kourou ve arkadaşlarının (2015) (79) çalışması, özellikle kanser prognozu ve hasta sınıflandırmasında gözetimli ML algoritmalarının yüksek doğrulukla kullanılabildiğini göstermiştir. Bu bulgular, klinik

alanda ML temelli yaklaşımların sadece verimliliği değil, aynı zamanda tanısallık hassasiyeti de artırabileceğini ortaya koymaktadır.

Biyomedikal alanda makine öğrenmesi teknikleri, son on yılda hem araştırma hem de klinik pratikte yoğun şekilde uygulanmaktadır. Örneğin, Alzheimer hastalığında görüntü ve nöropsikolojik verilerin entegrasyonu ile erken tanı koymaya yönelik ML modelleri geliştirilmiş ve bu modellerin doğruluk oranları %80'in üzerine çıkmıştır (80). Sepsis gibi akut ve ölümcül klinik tablolar için de ML tabanlı erken uyarı sistemleri, mortaliteyi öngörmede geleneksel skorlama sistemlerinden daha üstün performans göstermiştir (81). Hepatoselüler karsinom (HCC) özelinde yapılan çalışmalarda ise gen ekspresyon profillerine veya radyolojik görüntülere dayalı ML algoritmaları ile hem tanı hem de prognoz tahmini alanında etkili sonuçlar elde edilmiştir (82, 83). Benzer şekilde, otizm spektrum bozukluğu (ASD) gibi nörogelişimsel bozuklukların sınıflandırılmasında da ML modelleri, beyin görüntüleme verileri veya genetik marker'lar üzerinden yüksek ayırt edici güce sahip sistemler üretmiştir (84).

#### **2.10.1. Açıklanabilir Yapay Zekâ (XAI)**

Yapay zekâ (YZ) sistemleri, özellikle makine öğrenmesi (ML) algoritmalarıyla desteklendiğinde yüksek doğrulukla sınıflandırma ve tahminlerde bulunabilir. Ancak bu güçlü performans çoğu zaman modellerin iç işleyişinin belirsiz olması, yani karar alma süreçlerinin insanlar tarafından anlaşılabilir şekilde sunulamamasıyla birlikte gelir. Bu nedenle bu tür modeller genellikle “kara kutu” (black-box) sistemler olarak tanımlanır. Tıp gibi hata payının düşük olduğu ve kararların etik gerekçelerle gerekçelendirilebilir olması gereken alanlarda bu durum, algoritmaların klinik uygulamalara entegrasyonunu ciddi şekilde sınırlamaktadır. Bu noktada devreye giren Açıklanabilir Yapay Zekâ (Explainable Artificial Intelligence – XAI), modellerin kararlarını şeffaf ve yorumlanabilir hale getirerek klinik güveni artırmayı ve doktorlarla yapay zekâ sistemleri arasında etkin iş birliği sağlamayı amaçlamaktadır (85, 86).

XAI, bir modelin neden belirli bir çıktıyı verdiğini kullanıcıya açık ve anlaşılır biçimde sunan yöntemlerin bütünüdür. Bu yöntemler sayesinde klinisyenler, modelin hangi değişkenlere ne düzeyde önem verdiğini görebilir; biyolojik olarak anlamlı olmayan bir karar mekanizması tespit edilirse model yeniden değerlendirilip düzenlenebilir. Açıklanabilirlik ayrıca, yasal düzenlemelere ve etik standartlara uyum sağlanmasında da kritik öneme sahiptir (87).

Son yıllarda XAI'nin biyomedikal veri analizindeki yeri giderek artmıştır. Gen ekspresyon analizleri, görüntüleme verileri ve klinik parametreler gibi çok boyutlu verilerin anlamlı ve güvenilir şekilde yorumlanabilmesi için açıklanabilir yöntemler gereklidir. XAI yöntemleri, yalnızca model çıktısını anlamlandırmakla kalmaz; aynı zamanda biyobelirteç keşfi, hasta alt gruplarının ayrımı ve karar destek sistemlerinin validasyonu gibi konularda da araştırmacılara güçlü araçlar sunar (85).

### **2.10.2. SHAP: Şeffaflık için Oyun Teorisi Tabanlı Bir Yaklaşım**

SHAP (SHapley Additive exPlanations), model-agnostik bir XAI yöntemi olarak oyun teorisine dayanan Shapley değerleri yaklaşımını kullanır. Bu metod, her bir özelliğin tahmine olan katkısını adil ve sayısal biçimde hesaplayarak:

- Bireysel düzeyde, örneğin tek bir hastanın sınıflandırma kararının hangi özellikler tarafından nasıl yönlendirildiğini,
- Küresel düzeyde, modelin genelde hangi özniteliklere ağırlık verdiğini ortaya koyar (88)

Bu özellikleriyle SHAP, makine öğrenmesi modellerinin iç mantığını klinik ve biyomedikal bağlamda anlaşılabilir hale getirir. Özellikle sağlık alanında, modelin karar verme sürecinin şeffaf bir şekilde ortaya konması, hem klinik karar destek sistemlerinin güvenilirliğini artırmakta hem de etik ve regülasyonel gereklilikleri karşılamaktadır. SHAP'ın klinik pratikte kullanım alanları giderek genişlemiştir. Örneğin, sepsis, kardiyovasküler hastalıklar, onkolojik tanılar, COVID-19 prognozu ve genetik biyobelirteç tespiti gibi alanlarda, SHAP sayesinde modellerin hangi klinik veya moleküler değişkenlere dayanarak karar verdiği açıkça gösterilebilmiştir (89-92)

Sonuç olarak SHAP, sadece model performansını değil, aynı zamanda biyolojik içgörü üretimini ve klinik uygulama potansiyelini artıran bir XAI aracı olarak öne çıkmıştır.

### **2.11. Kullanılan Makine Öğrenmesi Modelleri ve Açıklanabilirlik Yaklaşımı**

Bu çalışmada, hepatoselüler karsinom (HCC) tanısına yönelik olarak circRNA ekspresyon verilerinden elde edilen sınıflandırma problemini çözmek amacıyla farklı yapıda ve öğrenme stratejisine sahip 11 farklı makine öğrenmesi (ML) algoritması uygulanmıştır. Her bir algoritma, belirli modelleme gücü, genelleme yeteneği ve karar verme dinamikleriyle literatürde kendine yer bulmuş olup, bu yönleriyle birlikte değerlendirilmiştir. Kullanılan yöntemler şunlardır:

### **2.11.1. Random Forest (RF)**

RF, birçok karar ağacının bir araya gelerek oluşturduğu bir topluluk (ensemble) öğrenme yöntemidir. Her bir ağacın eğitiminde kullanılan örnekler rastgele seçildiğinden, modeldeki varyans azalır ve overfitting riski düşer. Bu yapı, özellikle gürültülü verilerde bile yüksek doğruluk oranları sağlayabilir. RF modelleri aynı zamanda değişken önem sıralaması üretme kabiliyeti sayesinde, sınıflandırma kararlarını etkileyen temel değişkenlerin belirlenmesine de olanak tanır. Bu nedenle, hem öngörü performansı hem de yorumlanabilirlik açısından avantaj sağlar.

### **2.11.2. XGBoost**

Extreme Gradient Boosting olarak bilinen XGBoost, geleneksel boosting algoritmasının geliştirilmiş ve optimize edilmiş bir versiyonudur. Özellikle hız, doğruluk ve model düzenliliği açısından ileri düzey özelliklere sahiptir. L1 ve L2 regularization (cezalandırma) teknikleriyle overfitting riski azaltılmış, paralel işlem desteği ile büyük veri setlerinde kullanım imkânı artırılmıştır. Literatürde çok sayıda biyomedikal, genetik ve klinik veriye dayalı sınıflandırma çalışmalarında tercih edilen güçlü bir yöntemdir.

### **2.11.3. LightGBM**

Light Gradient Boosting Machine, Microsoft tarafından geliştirilmiş ve özellikle büyük ölçekli veri setlerinde yüksek işlem hızı ve hafıza verimliliği sağlamak üzere tasarlanmış bir boosting algoritmasıdır. Veriyi histogramlara ayırarak işlem yaptığı için hesaplama süresi önemli ölçüde azalır. Aynı zamanda kategorik değişkenleri otomatik olarak işleyebilir ve dengesiz veri setlerinde etkili performans sunar. Özellikle yüksek boyutlu biyoinformatik verilerde sıkça kullanılmaktadır.

### **2.11.4. CatBoost**

CatBoost, özellikle kategorik verilerin modelleme sürecinde otomatik olarak kodlanmasına ve işlenmesine olanak tanıyan bir gradient boosting yöntemidir. Modelin overfitting'e karşı daha dirençli hale gelmesini sağlayan özel algoritmik iyileştirmelere sahiptir. Ayrıca, öğrenme sırasındaki ön yargıları azaltmak amacıyla “ordered boosting” yöntemini kullanır. Özellikle tıbbi veri analizlerinde, karmaşık ve çok sayıda kategorik değişken içeren veri setlerinde avantaj sağlamaktadır.

### **2.11.5. Gradient Boosting (GBM)**

GBM, zayıf sınıflandırıcıların (genellikle karar ağaçları) sıralı biçimde birleştirilmesiyle oluşturulan bir ensembledir. Her yeni model, önceki modelin yaptığı hataları minimize etmek amacıyla eğitilir. Bu iteratif yapı sayesinde model doğruluğu artırılır. GBM, yüksek öngörü gücüne sahip olmasına rağmen, parametre seçimi dikkat gerektirir ve aşırı öğrenmeye eğilimlidir. Ancak, uygun optimizasyonla oldukça güçlü sonuçlar elde edilebilir.

### **2.11.6. Support Vector Machine (SVM)**

SVM, veriyi sınıflandırmak için en uygun ayırım düzlemini (hiperdüzlemi) belirlemeye çalışan denetimli bir öğrenme yöntemidir. Özellikle yüksek boyutlu ve doğrusal olmayan sınıflandırma problemlerinde kernel fonksiyonları (örneğin RBF, polinomial) ile etkili performans gösterir. HCC gibi biyolojik verilerde genellikle sınıflar arasındaki ayrımı net olarak ortaya koymak için tercih edilmektedir. Parametre duyarlılığı yüksek olduğu için dikkatli optimizasyon gerektirir.

### **2.11.7. Logistic Regression (LR)**

LR, ikili sınıflandırma problemleri için yaygın olarak kullanılan, açıklanabilirliği yüksek ve lineer temelli bir algoritmadır. Genellikle temel bir referans model olarak kullanılır. Parametre katsayılarının doğrudan yorumlanabilir olması, özellikle klinik karar destek sistemlerinde modelin şeffaflığını ve kabul edilebilirliğini artırmaktadır. Ancak doğrusal varsayımlara dayandığı için karmaşık ilişkilerde sınırlı kalabilir.

### **2.11.8. Decision Tree (DT)**

DT, veriyi dallara ayırarak sınıflandırma yapan, oldukça sezgisel ve açıklanabilir yapay öğrenme modelleridir. Modelin çıktısı, veriye uygulanan ardışık karar kurallarına dayanır. Bu sayede klinik uygulamalarda sıklıkla tercih edilir. Ancak tek bir ağaç kullanımı genellikle düşük genelleme gücü ve yüksek varyansla sonuçlanabilir. Bu nedenle ensemblede kullanımı (örneğin RF, GBM) daha etkilidir.

### **2.11.9. Naive Bayes (NB)**

Bayes teoremi üzerine kurulu olan bu yöntem, değişkenler arasındaki koşulsuz bağımsızlık varsayımı ile çalışır. Basit ve hızlı bir yöntem olması, düşük boyutlu veri setlerinde yüksek doğruluk sağlayabilmesi açısından avantaj sunar. Genellikle metin

madenciliği, genetik varyant sınıflandırması ve hızlı prototipleme gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak varsayım kısıtlamaları nedeniyle korelasyonlu verilerde performansı düşebilir.

#### **2.11.10. Neural Network (NN)**

Yapay sinir ağları, çok katmanlı mimarileri sayesinde doğrusal olmayan ve karmaşık ilişkileri modellemede oldukça etkilidir. Özellikle büyük veri setlerinde, verilerden otomatik olarak özellik öğrenme kapasitesi ile derin öğrenme alanının temel taşlarından biridir. Ancak klasik yapıları “black-box” (kara kutu) olmaları nedeniyle açıklanabilirlik açısından sınırlıdır. Bu nedenle çalışmanızda olduğu gibi SHAP gibi açıklanabilir yapay zekâ yöntemleriyle desteklenmeleri, biyomedikal uygulamalarda daha güvenilir hâle gelmelerini sağlar.

#### **2.11.11. K-Nearest Neighbors (KNN)**

En yakın komşular algoritması, sınıflandırılacak bir örneği, eğitim verisindeki en yakın k komşuya göre etiketler. Basit ve parametre gerektirmeyen yapısıyla dikkat çeker; ancak tüm veri kümesini bellekte tutması gerektiğinden hesaplama maliyeti yüksektir. Özellikle örnekler arasında benzerliğin anlamlı olduğu durumlarda etkili performans gösterebilir. Öklidyen mesafe gibi metriklerle çalışır ve özellikle düşük boyutlu veri setlerinde tercih edilir. Bununla birlikte, yüksek boyutlu ve dengesiz veri kümelerinde performans kaybı yaşanabilir.

Tüm bu modeller üzerinde hiperparametre optimizasyonu ve çapraz doğrulama teknikleri uygulanarak, performansları doğruluk (accuracy), ROC-AUC, F1 skoru ve diğer sınıflandırma metrikleriyle karşılaştırılmıştır. Ancak bu performansın tek başına yeterli olmadığı göz önünde bulundurularak, modelin nasıl karar verdiğini şeffaf şekilde açıklamak için SHAP (SHapley Additive Explanations) yöntemi entegre edilmiştir.

SHAP, yukarıda belirtilen tüm modellerle uyumlu şekilde çalışabilen, modelden bağımsız (model-agnostik) bir açıklanabilir yapay zekâ (XAI) yöntemidir. Her bir özelliğin (örneğin bir circRNA transkriptinin) tahmine olan katkısını hem bireysel hasta düzeyinde hem de model genelinde sayısal olarak hesaplar. Bu yönüyle SHAP:

- Neural Network gibi açıklanması zor modelleri yorumlanabilir kılar,
- Tree-tabanlı modellerde (RF, XGBoost, GBM) değişken önemini daha hassas biçimde gösterir,

- Lojistik regresyon gibi lineer modellerin sonuçlarını doğrular nitelikte, ayrıntılı katkı sunar.

Bu çalışmada, SHAP yardımıyla her modelin en çok önem atfettiği circRNA'lar belirlenmiş; böylece tanı koymadaki biyolojik temelli ayırt edicilik hem sayısal hem de görsel biçimde yorumlanabilir hale getirilmiştir.



### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Veri Seti

Bu tez çalışmasında hepatoselüler karsinomun (HCC) moleküler altyapısının aydınlatılması ve tümör progresyonunda görev alan genetik bileşenlerin tanımlanması amaçlandı. Bu amaçla, açık erişimli bir transkriptomik veri seti analiz edildi. Çalışmada kullanılan veri seti, National Center for Biotechnology Information (NCBI) bünyesindeki Gene Expression Omnibus (GEO) veritabanından elde edildi ve erişim numarasının GSE121714 olduğu belirlendi. Veri setine <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE121714> adresinden erişildi.

GSE121714 veri setinin, HCC cerrahisi uygulanan hastalardan elde edilen karaciğer doku örneklerinde sirküler RNA (circRNA) ekspresyon profillerini içerdiği görüldü. Toplam 30 örnek üç gruba ayrıldı:

- Non-tümör dokular (n=10): HCC hastalarının çevresel, malignite içermeyen karaciğer dokuları
- Metastaz yapmamış HCC dokuları (n=10): Primer HCC lezyonlarından elde edilen ve uzak metastaz göstermeyen tümör dokuları
- Metastatik HCC dokuları (n=10): Uzak metastaz yapmış HCC olgularından alınan tümör dokuları

Bu grup yapısı ile HCC'nin moleküler evrelemesi bağlamında gen ekspresyonundaki değişimler hem tümör/non-tümör karşılaştırmasıyla hem de metastatik progresyon açısından incelendi.

Diferansiyel gen ekspresyon analizleri sonucunda, non-tümör dokuya kıyasla hem metastatik hem de metastaz yapmamış HCC dokularında anlamlı düzeyde farklılaşan circRNA'lar tespit edildi. Ayrıca metastatik HCC ile metastaz yapmamış HCC grupları karşılaştırıldı ve metastatik ilerleme ile ilişkili olabilecek spesifik circRNA'lar belirlendi. Bu farklılıklar biyoinformatik analizlerle değerlendirildi ve tümör progresyonunda rol oynayan moleküler yollar ortaya çıkarıldı.

#### 3.2. İstatistik Analiz Aşaması

Biyoinformatik analizler sonucunda belirlenen ve gruplar arası anlamlı farklılık gösterdiği öngörülen circRNA transkriptlerinin ekspresyon düzeyleri sürekli veri olarak

elde edildi. Veriler, her bir grup (MET, nonMET ve N) için ortalama  $\pm$  standart sapma formatında sunuldu.

Veri setinde yer alan değişkenlerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Normallik varsayımının sağlandığı görüldü. Bu nedenle, MET vs N ve nonMET vs N grupları arasındaki karşılaştırmalarda bağımsız örneklemeler için t-testi uygulandı. Her bir circRNA transkriptinin iki grup arasındaki ortalama ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı ve  $p < 0.05$  değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi. Analizler IBM SPSS 25.0 yazılımı ile yapıldı.

### 3.3. Modelleme

Modelleme aşamasında kapsamlı bir makine öğrenmesi yaklaşımı benimsendi ve 11 farklı algoritma ile karşılaştırmalı analiz yapıldı. Kullanılan algoritmalar; ensemble yöntemler (Random Forest, XGBoost, LightGBM, CatBoost, Gradient Boosting), geleneksel makine öğrenmesi algoritmaları (SVM, Logistic Regression, K-Nearest Neighbors, Decision Tree, Naive Bayes) ve yapay sinir ağları (MLP) olmak üzere üç ana kategoride sınıflandırıldı. Böylece farklı veri yapıları ve örüntüler için en uygun algoritma belirlendi.

Veri ön işleme aşamasında tüm özellikler StandardScaler yöntemi ile normalize edildi. Sınıf dağılımını korumak amacıyla stratified sampling yöntemi kullanıldı ve veriler %70 eğitim, %30 test seti olacak şekilde ayrıldı. Model değerlendirmesi için 5-fold Stratified Cross-Validation uygulandı ve her model için accuracy, precision, recall, F1-score ve ROC-AUC değerleri hesaplandı. Böylece modeller çok boyutlu performans analizi ile değerlendirildi.

Performans analizi sonucunda, her algoritma için hem cross-validation hem de test seti üzerinde ayrıntılı hesaplamalar yapıldı. En iyi performans accuracy metriğine göre belirlendi ve bu model için confusion matrix sunuldu.

Görselleştirme aşamasında ROC eğrileri ve radar grafikleri çizildi. Ayrıca SHAP analizi yapıldı ve model kararlarının arkasındaki faktörler açıklanarak özellik önem sıralamaları grafiklerle gösterildi. Bu yaklaşım ile model performansı değerlendirildi ve karar verme süreci anlaşılır hale getirildi.

Sonuç olarak, bu kapsamlı modelleme yaklaşımı ile en uygun algoritma seçildi, model performansı çok boyutlu olarak değerlendirildi ve sonuçların açıklanabilirliği sağlandı.

## 4. BULGULAR

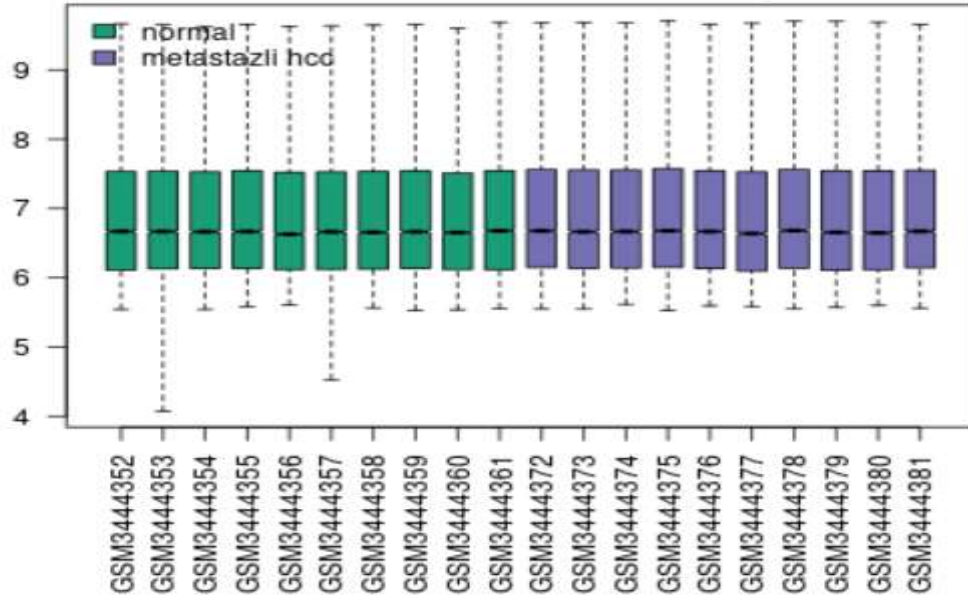
### 4.1. Metastatik HCC dokuları ve Normal Doku Karşılaştırmaları

Hepatoselüler karsinomun (HCC), klinik seyri ve moleküler yapısı bakımından oldukça heterojen bir tümör olduğu görüldü. Metastatik özellik kazanmasının, hastalığın prognozunu belirleyen en önemli faktörlerden biri olduğu belirlendi. Metastatik tümör dokularında, malign transformasyonun erken evrelerinden farklılaşarak kazanılan genetik ve epigenetik değişikliklerin ortaya konmasının; tümör biyolojisinin daha iyi anlaşılması ve yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesi açısından büyük önem taşıdığı saptandı. Bu bağlamda, bu bölümde metastatik HCC dokuları ile non-tümör (normal) karaciğer dokuları arasındaki sirküler RNA (circRNA) ekspresyon farkları analiz edildi. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda, metastatik süreçle ilişkili olabilecek potansiyel biyobelirteçlerin belirlenmesi amaçlandı.

Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de, çalışmada analiz edilen 10 metastatik HCC ve 10 normal karaciğer doku örneğinin gen ekspresyon düzeyleri gösterildi. Şekil 4.1’de örnekler arasındaki gen ekspresyon seviyeleri kutu grafiği (boxplot) ile özetlendi; medyan değerleri, varyasyonları ve aykırı gözlemler ortaya kondu. Şekil 4.2’de ise her iki grup için ekspresyon değerlerinin yoğunluk dağılımı sunuldu. Görselleştirmelerde yeşil renk metastatik HCC dokularını, mor renk ise normal karaciğer dokularını temsil etti.

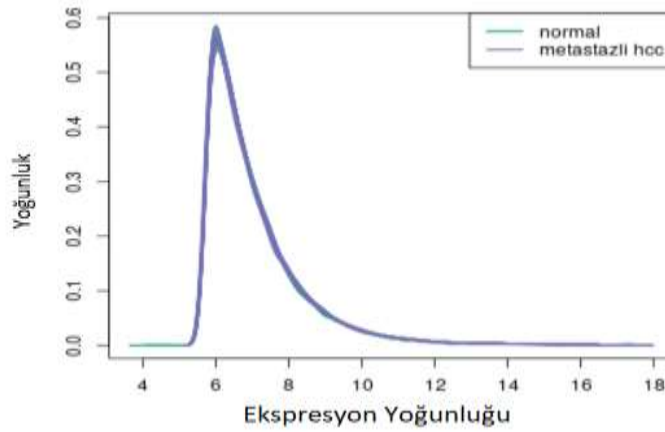
Bu grafikler ile verinin genel dağılım yapısı, normalize edilme durumu ve örnekler arası tutarlılık değerlendirildi. Her iki grup arasında benzer dağılımların gözlemlendiği, farklılıkların teknik değil biyolojik kaynaklı olduğunun desteklendiği ve diferansiyel gen ekspresyon analizine geçmeden önce veri kalitesinin uygun olduğunun doğrulandığı tespit edildi.

Şekil 4.1’e göre gruplar arasında benzer dağılımlar gözlemlendi ve verinin normalize edildiği, karşılaştırmaların biyolojik anlam taşıyabileceği tespit edildi.



**Şekil 4.1.** Metastatik HCC ve Normal Doku Örneklerine Ait Kutu Grafiği

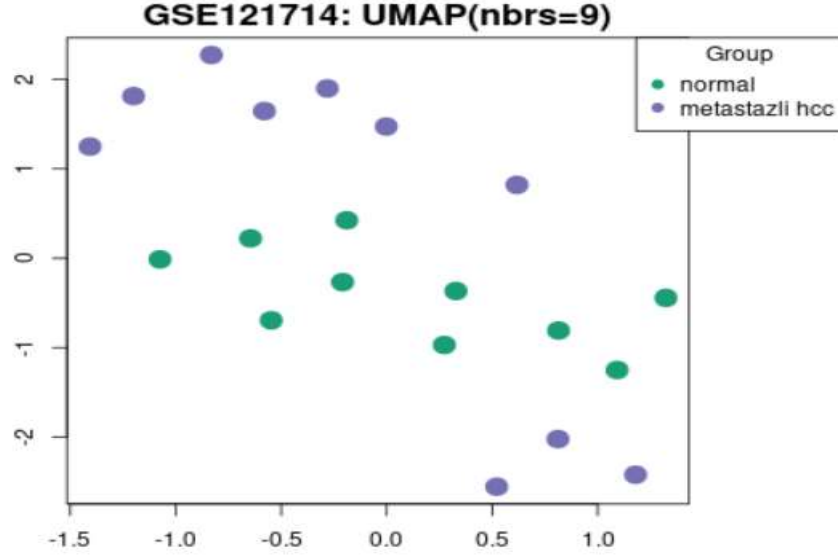
Şekil 4.2’de her iki grubun ekspresyon yoğunluklarının benzer bir dağılım gösterdiği izlendi. Bu bulgunun, verinin normalize edildiğini doğruladığı ve diferansiyel gen ekspresyon analizine geçiş için veri kalitesinin uygun olduğunu ortaya koyduğu belirlendi.



**Şekil 4.2.** Metastatik HCC ve Normal Doku Örneklerine Ait Gen Ekspresyon Yoğunluk Eğrisi

Şekil 4.3’te, GSE121714 veri setindeki metastatik HCC ve normal karaciğer dokusu örneklerinin gen ekspresyon profillerine göre oluşturulan UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) analizi gösterildi. Yeşil noktaların normal (non-tümör) dokuları, mor noktaların ise metastaz yapmış HCC dokularını temsil ettiği görüldü. İki grup arasında belirgin bir ayrışma gözlemlendi ve bu durumun, örneklerin

moleküler açıdan farklı özellikler taşıdığını ve biyolojik anlamlılığın güçlü olduğunu ortaya koyduğu belirlendi. Ayrıca UMAP analizinin yüksek boyutlu veriler arasındaki ilişkileri etkili biçimde yansıttığı ve diferansiyel gen ekspresyon analizleri için veri setinin uygunluğunu teyit ettiği saptandı.



**Şekil 4.3.** Metastatik HCC ve Normal Doku Örneklerine Ait UMAP Dağılım Grafiği

Yapılan gen ekspresyon analizi sonucunda metastatik HCC dokuları ile normal karaciğer dokuları arasında anlamlı düzeyde farklılık gösteren birçok gen tespit edildi. Bu analizde anlamlılık kriteri olarak  $|\log_2FC| > 1$  ve  $\text{adj. } p < 0.05$  eşikleri esas alındı. Elde edilen sonuçlarla metastatik sürece özgü moleküler değişimlerin belirlendiği ve HCC'nin ilerleyici biyolojisine dair önemli ipuçlarının elde edildiği görüldü. Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de, bu karşılaştırma sonucunda en fazla yukarı regüle ve aşağı regüle olan ilk 10 gen özetlendi. Bu genlerin, metastatik HCC'nin biyolojik özelliklerini yansıtan en belirgin ekspresyon değişikliklerine sahip adaylar olduğu ve potansiyel biyobelirteçler veya hedeflenebilir terapötik unsurlar olarak değerlendirilebileceği belirlendi.

**Tablo 4.1.** Metastatik HCC doku örneklerinde normal karaciğer dokularına kıyasla yukarı regüle olduğu tespit edilen genler

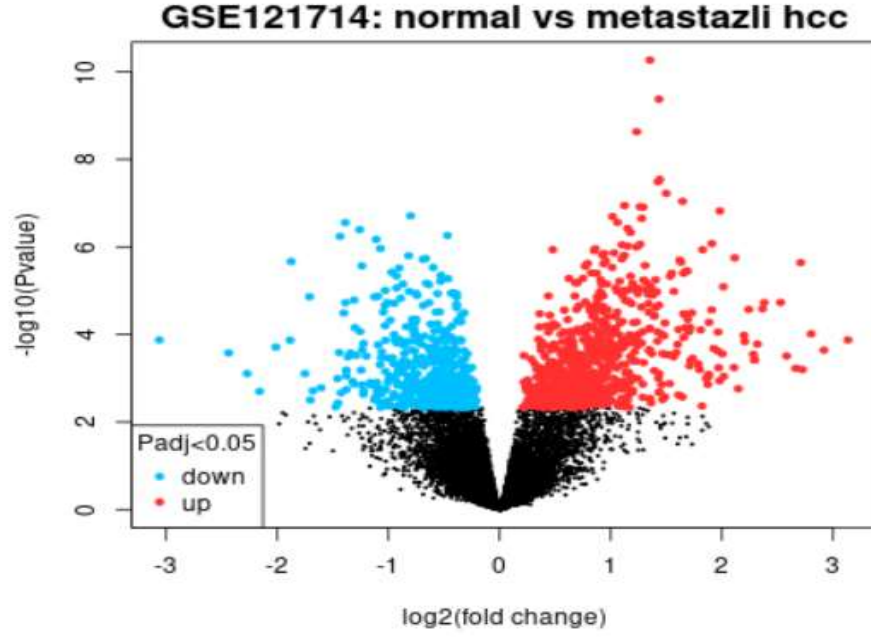
| ID           | adj.P.Val | P.Value  | t        | B        | logFC    | circRNA                      |
|--------------|-----------|----------|----------|----------|----------|------------------------------|
| ASCRP3006784 | 0.00620   | 1.34E-04 | 4.700525 | 1.12263  | 3.134601 | hsa_circRNA_405463<br>ZNF423 |
| ASCRP3007069 | 0.00819   | 2.28E-04 | 4.473061 | 0.61502  | 2.917522 | hsa_circRNA_404974<br>SOX5   |
| ASCRP3013015 | 0.00517   | 9.70E-05 | 4.839276 | 1.43112  | 2.801888 | hsa_circRNA_023016<br>RBM4   |
| ASCRP3006567 | 0.01510   | 6.33E-04 | 4.038273 | -0.35734 | 2.723481 | hsa_circRNA_103809<br>ZFR    |
| ASCRP3007627 | 0.00066   | 2.27E-06 | 6.513499 | 5.00763  | 2.707302 | hsa_circRNA_100246<br>FGGY   |

|              |         |          |          |          |          |                                       |
|--------------|---------|----------|----------|----------|----------|---------------------------------------|
| ASCRP3011969 | 0.01440 | 5.95E-04 | 4.064189 | -0.29945 | 2.664275 | hsa_circRNA_101491<br>MAPKPB1         |
| ASCRP3002845 | 0.00951 | 3.10E-04 | 4.342362 | 0.32272  | 2.581835 | hsa_circRNA_405814<br>ZNF470          |
| ASCRP3007536 | 0.00194 | 1.85E-05 | 5.56104  | 3.01191  | 2.527694 | hsa_circRNA_406698<br>ENSG00000293830 |
| ASCRP3013116 | 0.00194 | 1.86E-05 | 5.559544 | 3.00869  | 2.380569 | hsa_circRNA_400248<br>FGGY            |
| ASCRP3010445 | 0.00238 | 2.59E-05 | 5.41366  | 2.69312  | 2.36595  | hsa_circRNA_000881<br>MS12            |

**Tablo 4.2.** Metastatik HCC doku örneklerinde normal karaciğer dokularına kıyasla aşağı regüle olduğu tespit edilen genler

| ID           | adj.P.Val | P.Value  | t        | B        | logFC    | circRNA                      |
|--------------|-----------|----------|----------|----------|----------|------------------------------|
| ASCRP3003243 | 0.00620   | 1.34E-04 | -4.7019  | 1.1257   | -3.06166 | hsa_circRNA_091581<br>GPC3   |
| ASCRP3007299 | 0.00883   | 2.64E-04 | -4.4111  | 0.47649  | -2.43958 | hsa_circRNA_001387<br>NSD2   |
| ASCRP3001122 | 0.01740   | 7.80E-04 | -3.94911 | -0.55631 | -2.27226 | hsa_circRNA_402458<br>CCNYL1 |
| ASCRP3011550 | 0.02980   | 2.00E-03 | -3.54729 | -1.44629 | -2.15954 | hsa_circRNA_082319<br>ZC3HC1 |
| ASCRP3013608 | 0.00757   | 1.94E-04 | -4.54129 | 0.76746  | -2.01175 | hsa_circRNA_103587<br>NSD2   |
| ASCRP3000434 | 0.08200   | 1.09E-02 | -2.80225 | -3.03218 | -1.98448 | hsa_circRNA_022382<br>FADS2  |
| ASCRP3005569 | 0.05920   | 6.14E-03 | -3.05906 | -2.49918 | -1.95268 | hsa_circRNA_050900<br>ACTN4  |
| ASCRP3007568 | 0.06280   | 6.81E-03 | -3.01345 | -2.5951  | -1.92493 | hsa_circRNA_087631<br>HABP4  |
| ASCRP3007511 | 0.00623   | 1.36E-04 | -4.69447 | 1.10913  | -1.88529 | hsa_circRNA_100832<br>FADS1  |
| ASCRP3001547 | 0.00066   | 2.16E-06 | -6.53847 | 5.0583   | -1.87648 | hsa_circRNA_066568<br>ROBO1  |

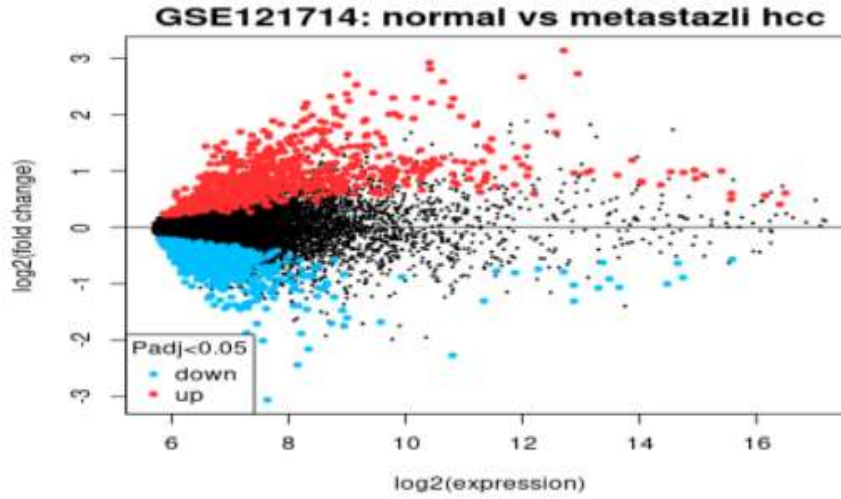
Şekil 4.4'te, metastatik HCC dokuları ile normal karaciğer dokuları arasındaki anlamlı gen ekspresyon farklılıklarını gösteren volkan grafiği sunuldu. Her bir noktanın bir geni temsil ettiği, x ekseninde log<sub>2</sub> kat değişiminin (log<sub>2</sub> fold change), y ekseninde ise -log<sub>10</sub>(p-değeri) değerinin gösterildiği belirtildi. Bu iki eksen aracılığıyla genlerin hem ekspresyon düzeyindeki değişim miktarının hem de istatistiksel anlamlılığının görselleştirildiği görüldü. Analizde |log<sub>2</sub>FC| > 1.0 ve p < 0.05 eşiklerini karşılayan genlerin vurgulanarak gösterildiği kaydedildi. Bu grafik ile metastatik progresyonla ilişkili olabilecek aday genlerin belirlendiği ve potansiyel terapötik hedeflerin ön plana çıkarıldığı tespit edildi.



**Şekil 4.4.** Metastatik HCC ve Normal Karaciğer Dokuları Arasındaki Gen Ekspresyonu

Volcano grafiğinde kırmızı noktaların ekspresyonu artan transkriptleri, mavi noktaların ekspresyonu azalan transkriptleri ve siyah noktaların ekspresyon düzeyi anlamlı şekilde değişmeyen transkriptleri temsil ettiği görüldü.

Şekil 4.5'te, log2 kat değişimi (y eksen) ile ortalama log2 gen ekspresyonu (x eksen) arasındaki ilişkiyi gösteren MD (Mean-Difference) grafiği sunuldu. Bu grafiğin, genlerin genel ekspresyon seviyelerine göre farklılaşma derecesini görselleştirmek amacıyla kullanıldığı belirtildi. Grafikte merkezden uzaklaşan noktaların, metastatik HCC ile normal karaciğer dokuları arasında anlamlı ekspresyon farkı gösteren genleri temsil ettiği gözlemlendi. Böylece diferansiyel olarak ifade edilen genlerin açık biçimde öne çıkarıldığı ve biyolojik olarak anlamlı adayların vurgulandığı tespit edildi.



**Şekil 4.5.** Metastatik HCC ve normal karaciğer dokularındaki transkriptlere ait MD grafiği

#### 4.1.1. İstatistik Analizler

Biyoinformatik analizler sonucunda MET (metastatik HCC) ve N (normal karaciğer dokusu) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık gösteren circRNA transkriptleri belirlendi. Bu transkriptler arasından ifade düzeyine göre en belirgin şekilde artmış (upregulated) ve azalmış (downregulated) olan ilk 10’ar transkript seçildi ve her birinin gruplar arası farkı bağımsız örneklemeler için t-testi ile değerlendirildi. Bu analize ilişkin bulgular Tablo 4.3’te sunuldu.

Tablo 4.3’de sunulan veriler incelendiğinde, MET ve N grupları arasında belirli circRNA transkriptlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunduğu görüldü ( $p < 0.05$ ). Özellikle ASCRP3006784, ASCRP3007069, ASCRP3013015 ve ASCRP3001547 transkriptlerinin normal karaciğer dokusunda daha yüksek ekspresyon gösterdiği; ASCRP3003243, ASCRP3007299, ASCRP3001122, ASCRP3005569 ve ASCRP3000434 transkriptlerinin ise MET grubunda anlamlı olarak artmış düzeyde bulunduğu tespit edildi. Bu sonuçların, belirli circRNA’ların hem tanı hem de potansiyel prognostik biyobelirteç adayları olarak değerlendirilebileceğine işaret ettiği belirlendi.

**Tablo 4.3.** MET ve N Grupları Arasında İfade Düzeyi En Fazla Farklılaşan circRNA’lar

| Değişkenler  | Grup                    |              | p     |
|--------------|-------------------------|--------------|-------|
|              | N                       | MET          |       |
|              | Ortalama±Standart sapma |              |       |
| ASCRP3006784 | 14.27±0.997             | 11.135±1.993 | 0.001 |
| ASCRP3007069 | 11.866±0.682            | 8.946±2.072  | 0.001 |

|              |              |              |       |
|--------------|--------------|--------------|-------|
| ASCRP3013015 | 11.822±0.8   | 9.02±1.759   | 0.001 |
| ASCRP3006567 | 14.308±0.825 | 11.582±2.098 | 0.003 |
| ASCRP3007627 | 10.357±0.902 | 7.647±1.052  | 0.001 |
| ASCRP3011969 | 13.327±0.652 | 10.663±2.093 | 0.003 |
| ASCRP3002845 | 11.926±0.879 | 9.346±1.783  | 0.001 |
| ASCRP3007536 | 10.422±0.897 | 7.892±1.223  | 0.001 |
| ASCRP3013116 | 10.633±0.939 | 8.252±1.077  | 0.001 |
| ASCRP3010445 | 10.172±0.935 | 7.806±1.117  | 0.001 |
| ASCRP3003243 | 6.109±0.139  | 9.168±2.173  | 0.002 |
| ASCRP3007299 | 6.931±0.342  | 9.371±1.817  | 0.002 |
| ASCRP3001122 | 9.664±1.091  | 11.936±1.582 | 0.002 |
| ASCRP3011550 | 7.262±0.922  | 9.422±1.814  | 0.005 |
| ASCRP3013608 | 6.552±0.361  | 8.564±1.432  | 0.001 |
| ASCRP3000434 | 8.78±1.187   | 10.764±2.049 | 0.019 |
| ASCRP3005569 | 9.372±0.987  | 11.326±1.891 | 0.012 |
| ASCRP3007568 | 7.672±0.919  | 9.596±1.927  | 0.014 |
| ASCRP3007511 | 7.271±0.661  | 9.156±1.162  | 0.001 |
| ASCRP3001547 | 6.339±0.183  | 8.218±0.933  | 0.001 |

#### 4.1.2. Modelleme Aşaması

Metastatik hepatoselüler karsinom (HCC) ve normal karaciğer dokuları arasında anlamlı düzeyde farklılık gösteren en yüksek 10 yukarı ve 10 aşağı regüle circRNA transkripti kullanılarak sınıflandırma modelleri oluşturuldu. Bu 20 biyobelirteç, metastatik biyolojiyi yansıtacak şekilde seçildi ve makine öğrenmesi algoritmalarına girdi olarak kullanıldı. Modelleme sürecinde Random Forest, XGBoost, LightGBM, CatBoost, Gradient Boosting, Support Vector Machine (SVM), Logistic Regression, K-Nearest Neighbors (KNN), Decision Tree, Naive Bayes ve Neural Network modelleri uygulandı.

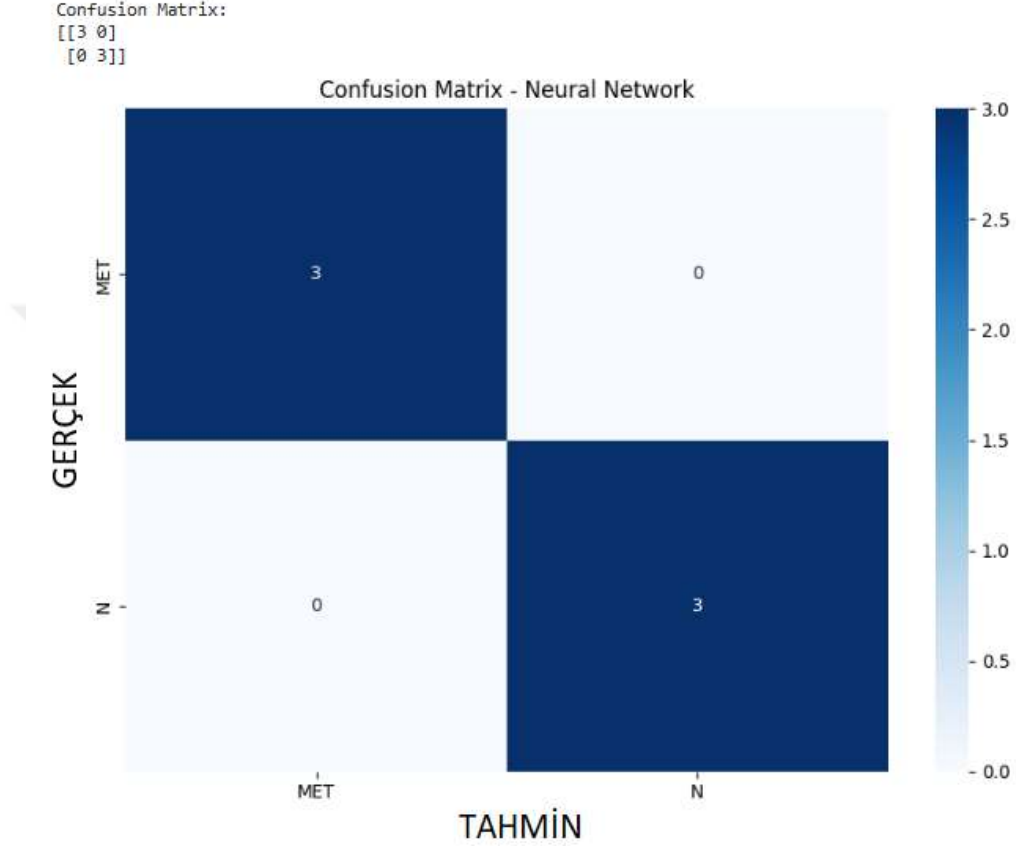
Modellemeden elde edilen metrikler Tablo 4.4'te verildi.

Tablo 4.4'de, metastatik hepatoselüler karsinom (HCC) ve normal karaciğer dokularının sınıflandırılmasında kullanılan farklı makine öğrenmesi modellerinin performans karşılaştırması özetlendi. Modeller, diferansiyel olarak ifade edilen 20 circRNA transkriptine dayalı olarak eğitildi ve hem 5 katlı çapraz doğrulama (CV) hem de test verisi üzerinden Accuracy, Precision, Recall, F1-score ve ROC AUC metrikleri ile değerlendirildi.

**Tablo 4.4.** Ağaç Tabanlı Makine Öğrenmesi Modellerin Performans Ölçütlerine İlişkin Bulgular

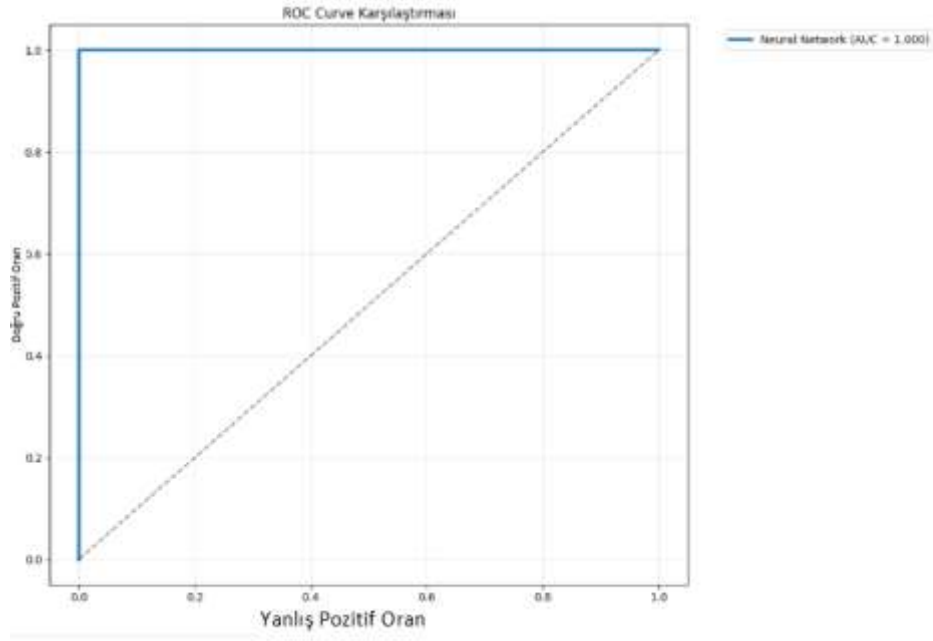
| Model               | CV Accuracy (Mean) | CV Accuracy (Std) | CV Precision (Mean) | CV Precision (Std) | CV Recall (Mean) | CV Recall (Std) | CV F1 (Mean) | CV F1 (Std) | CV ROC AUC (Mean) | CV ROC AUC (Std) | Test Accuracy | Test Precision | Test Recall | Test F1   | Test ROC AUC |
|---------------------|--------------------|-------------------|---------------------|--------------------|------------------|-----------------|--------------|-------------|-------------------|------------------|---------------|----------------|-------------|-----------|--------------|
| Random Forest       | 0.933333           | 0.133333          | 0.933333            | 0.133333           | 1.0              | 0.000000        | 0.960000     | 0.080000    | 1.00              | 0.0              | 1.000.000     | 1.000.000      | 1.000.000   | 1.000.000 | 1.000.000    |
| XGBoost             | 0.866667           | 0.163299          | 0.933333            | 0.133333           | 0.9              | 0.200000        | 0.893333     | 0.137275    | 0.85              | 0.2              | 0.666667      | 0.666667       | 0.666667    | 0.666667  | 0.666667     |
| LightGBM            | 0.366667           | 0.066667          | 0.133333            | 0.163299           | 0.4              | 0.489898        | 0.200000     | 0.244949    | 0.50              | 0.0              | 0.500000      | 0.000000       | 0.000000    | 0.000000  | 0.500000     |
| CatBoost            | 1.000.000          | 0.000000          | 1.000.000           | 0.000000           | 1.0              | 0.000000        | 1.000.000    | 0.000000    | 1.00              | 0.0              | 1.000.000     | 1.000.000      | 1.000.000   | 1.000.000 | 1.000.000    |
| Gradient Boosting   | 0.933333           | 0.133333          | 0.933333            | 0.133333           | 1.0              | 0.000000        | 0.960000     | 0.080000    | 1.00              | 0.0              | 0.666667      | 0.666667       | 0.666667    | 0.666667  | 0.888889     |
| SVM                 | 1.000.000          | 0.000000          | 1.000.000           | 0.000000           | 1.0              | 0.000000        | 1.000.000    | 0.000000    | 1.00              | 0.0              | 1.000.000     | 1.000.000      | 1.000.000   | 1.000.000 | 1.000.000    |
| Logistic Regression | 1.000.000          | 0.000000          | 1.000.000           | 0.000000           | 1.0              | 0.000000        | 1.000.000    | 0.000000    | 1.00              | 0.0              | 1.000.000     | 1.000.000      | 1.000.000   | 1.000.000 | 1.000.000    |
| KNN                 | 0.933333           | 0.133333          | 0.933333            | 0.133333           | 1.0              | 0.000000        | 0.960000     | 0.080000    | 1.00              | 0.0              | 0.833333      | 0.750000       | 1.000.000   | 0.857143  | 1.000.000    |
| Decision Tree       | 0.866667           | 0.163299          | 0.933333            | 0.133333           | 0.9              | 0.200000        | 0.893333     | 0.137275    | 0.85              | 0.2              | 0.666667      | 0.666667       | 0.666667    | 0.666667  | 0.666667     |
| Naive Bayes         | 1.000.000          | 0.000000          | 1.000.000           | 0.000000           | 1.0              | 0.000000        | 1.000.000    | 0.000000    | 1.00              | 0.0              | 1.000.000     | 1.000.000      | 1.000.000   | 1.000.000 | 1.000.000    |
| Neural Network      | 1.000.000          | 0.000000          | 1.000.000           | 0.000000           | 1.0              | 0.000000        | 1.000.000    | 0.000000    | 1.00              | 0.0              | 1.000.000     | 1.000.000      | 1.000.000   | 1.000.000 | 1.000.000    |

Elde edilen sonuçlara göre Neural Network, Naive Bayes ve CatBoost modellerinin tüm metriklerde %100 başarı sağladığı ve en yüksek performansı gösterdiği belirlendi. En iyi sonuçları veren modellerden biri olan Neural Network ile analizlere devam edildi ve bu modele ait confusion matrisi Şekil 4.6’da sunuldu.



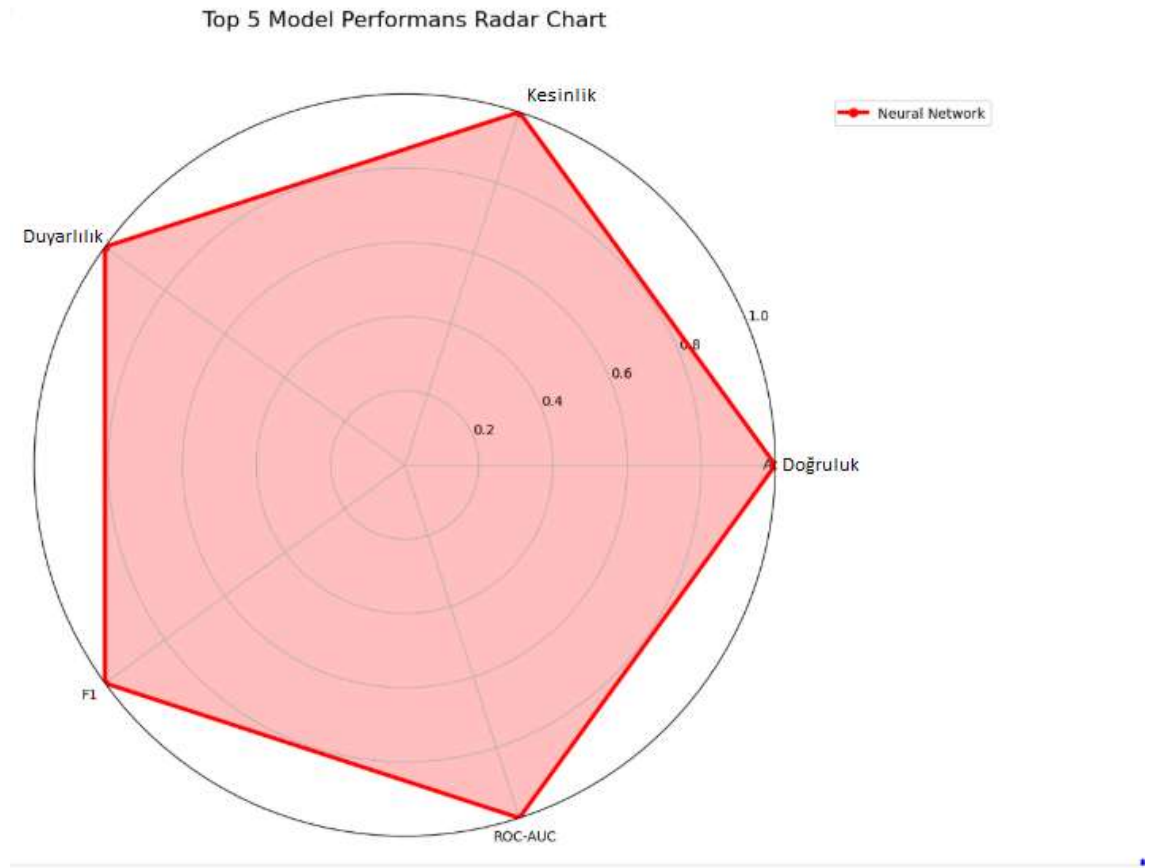
**Şekil 4.6.** Neural Network Modeline Ait Confusion Matrix

Neural Network modeline ait ROC grafiği Şekil 4.7’de sunuldu.



**Şekil 4.7.** Neural Network Modeline Ait ROC Eğrisi

Şekil 4.8’de, `cv_accuracy_mean`, `cv_precision_mean`, `cv_recall_mean`, `cv_f1_mean` ve `cv_roc_auc_mean` değerleri kullanılarak çapraz doğrulama ortalamalarına göre en iyi 5 makine öğrenmesi modelinin performans karşılaştırması sunuldu. Grafikte, modellerin beş temel metrik (Accuracy, Precision, Recall, F1-score ve ROC-AUC) açısından genel başarı düzeylerinin görsel olarak ortaya konduğu görüldü.



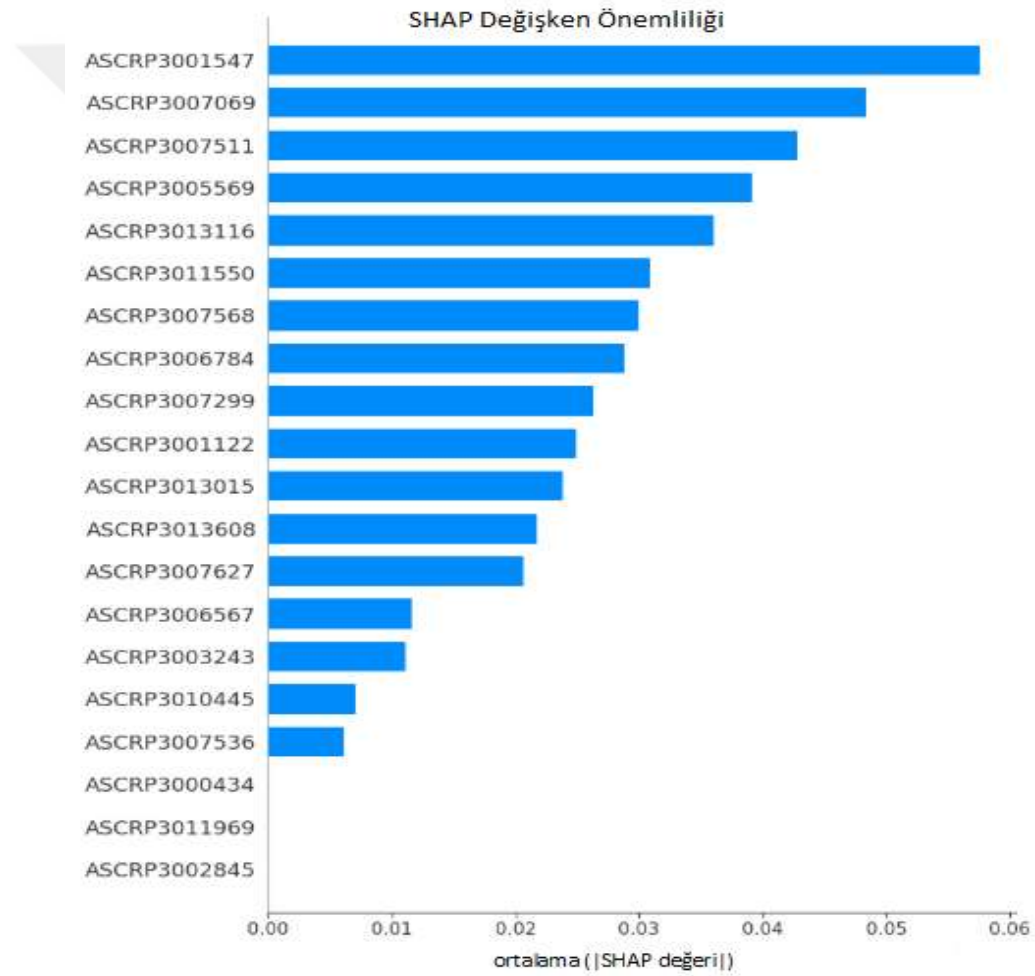
circRNA transkriptlerinin model üzerindeki etkilerini daha iyi anlamak amacıyla Neural Network modeline SHAP (SHapley Additive exPlanations) analizi uygulandı. Bu analiz ile modelin karar süreçlerine hangi özelliklerin ne ölçüde katkı sağladığı nicel olarak değerlendirildi. Tablo 4.5'te, model çıktısı üzerinde en fazla etkiye sahip olan ilk 10 circRNA transkriptinin ortalama SHAP değerlerine göre sıralandığı gösterildi.

**Tablo 4.5.** Ağaç Tabanlı Makine Öğrenmesi Modellerin Performans Ölçütlerine İlişkin Bulgular

| Sıra | Özellik Kodu | Önem Skoru |
|------|--------------|------------|
| 1    | ASCAP3001547 | 0.057629   |
| 2    | ASCAP3007869 | 0.054580   |
| 3    | ASCAP3007511 | 0.042814   |
| 4    | ASCAP3005569 | 0.039115   |
| 5    | ASCAP3011116 | 0.036016   |
| 6    | ASCAP3011550 | 0.030887   |
| 7    | ASCAP3007568 | 0.029968   |
| 8    | ASCAP3006784 | 0.028786   |
| 9    | ASCAP3007299 | 0.026301   |
| 10   | ASCAP3001122 | 0.024934   |

Şekil 4.9’da sınıflandırma modelinde kullanılan circRNA transkriptlerinin SHAP (SHapley Additive exPlanations) analizine göre ortalama katkı düzeyleri sunuldu. Yatay ekseninde her bir özelliğin model çıktısına olan ortalama etkisinin (mean |SHAP value|) temsil edildiği gösterildi.

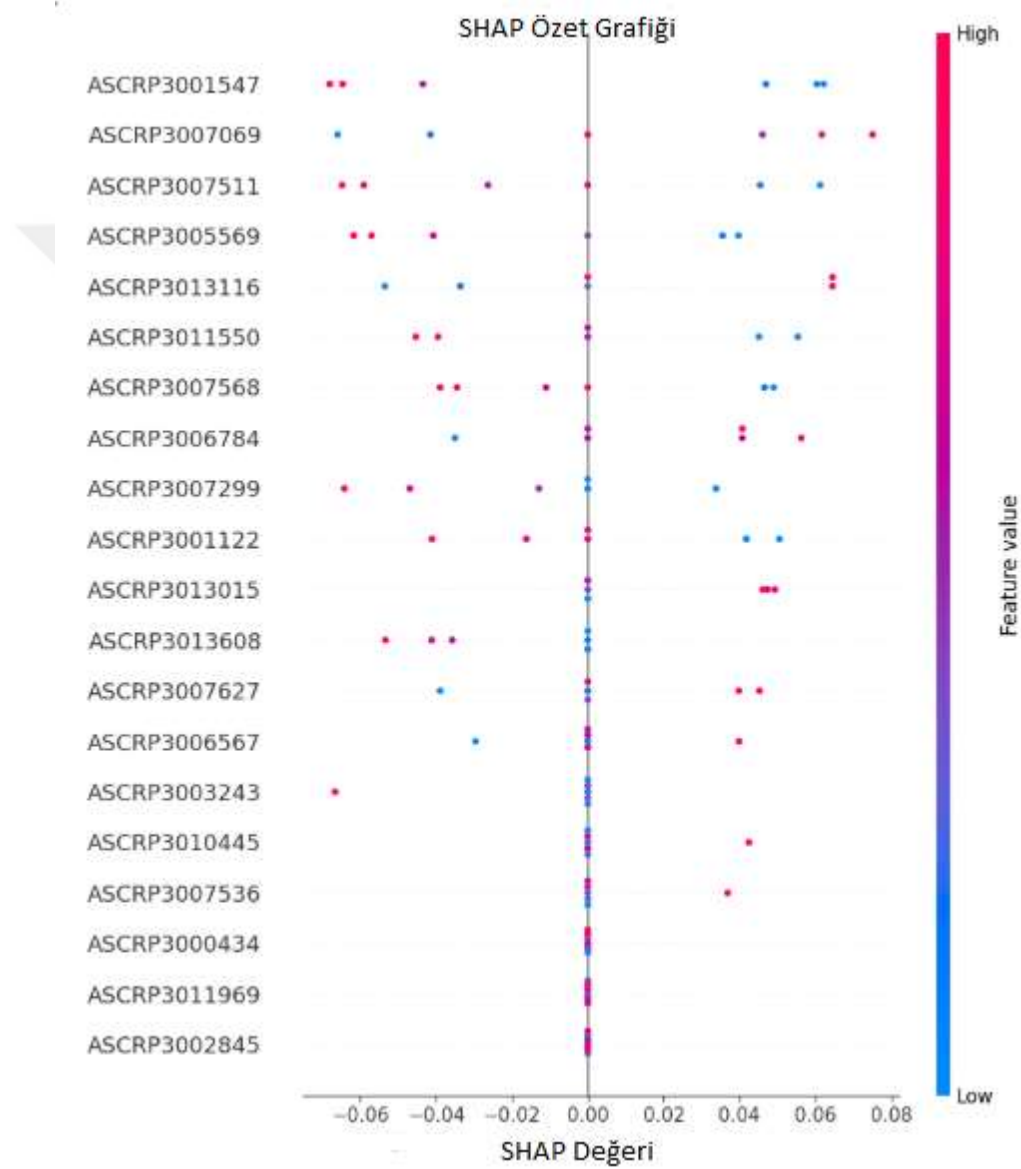
ASCRP3001547, ASCRP3007069 ve ASCRP3007511 transkriptlerinin en yüksek SHAP değerlerine sahip olduğu ve modelin tahminleri üzerinde en belirleyici circRNA’lar olarak öne çıktığı belirlendi. Bu transkriptlerin, metastatik HCC ve normal doku ayırımında biyolojik olarak anlamlı aday biyobelirteçler olabileceği değerlendirildi. Grafikte, özneliliklerin görece öneminin görsel olarak sunulduğu ve modelin karar sürecine katkı sağlayan unsurların daha iyi anlaşılmasına yardımcı olduğu görüldü.



**Şekil 4.9.** circRNA Tabanlı Modelde SHAP Değerlerine Göre Özellik Önem Grafiği

Şekil 4.10’da, sınıflandırma modelinde yer alan circRNA transkriptlerinin bireysel örnekler üzerindeki etkileri ve bu etkilerin yönü gösterildi. Yatay ekseninde SHAP değerlerinin (model çıktısına olan katkının) ifade edildiği, renk skalasında ise ilgili circRNA’nın ifade düzeyinin gösterildiği belirtildi (kırmızı = yüksek, mavi = düşük).

Grafikte öne çıkan ASCRP3001547, ASCRP3007069 ve ASCRP3007511 transkriptlerinin hem yüksek SHAP değerleri hem de tutarlı etki yönleriyle dikkat çektiği görüldü. Örneğin ASCRP3001547'nin yüksek ifade düzeylerinin genellikle modelin pozitif sınıf (metastatik HCC) yönünde tahmin yapmasına katkı sağladığı belirlendi. Bu analiz ile yalnızca hangi özelliklerin önemli olduğu değil, aynı zamanda nasıl ve ne yönde etkili oldukları da ortaya kondu. Böylece modelin karar verme mantığının daha derinlemesine anlaşıldığı tespit edildi.



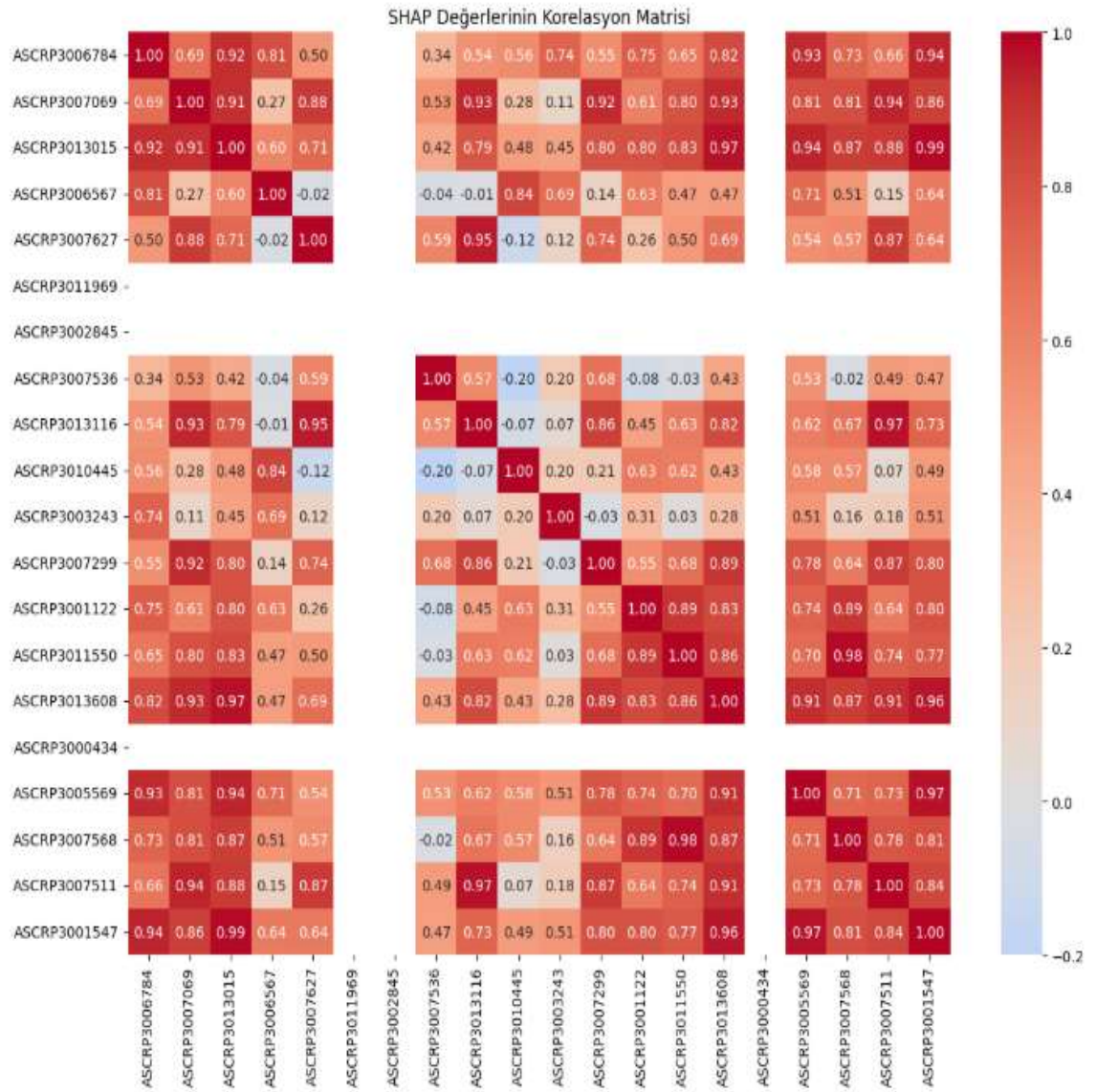
**Şekil 4.10.** circRNA Özelliklerine Ait SHAP Özet Grafiği

Şekil 4.11'de sınıflandırma modelinde yer alan circRNA transkriptlerine ait SHAP değerleri arasındaki çift yönlü korelasyonlar görselleştirildi. Renk skalasının korelasyon katsayısının büyüklüğünü ve yönünü yansıttığı (kırmızı: pozitif korelasyon; mavi: negatif

korelasyon), kareler içerisindeki sayısal değerlerin ise Pearson korelasyon katsayılarını temsil ettiği gösterildi.

Bu grafiğe göre özellikle ASCRP3013608, ASCRP3011550 ve ASCRP3001547 transkriptlerinin birçok diğer özelliğin SHAP değeriyle yüksek pozitif korelasyon gösterdiği belirlendi ( $r > 0.9$ ). Bu durumun, söz konusu circRNA'ların model çıktısı üzerinde benzer yönde ve birlikte etkili olabileceğini düşündürdüğü görüldü. Diğer yandan ASCRP3010445 ve ASCRP3006567 transkriptlerinin daha bağımsız etkiler taşıdığı gözlemlendi.

Bu korelasyon analizi ile özneliliklerin birbirleriyle olan ilişkilerinin ortaya konduğu, modeldeki bilgi fazlalığının (redundancy) veya birlikte değişim gösteren biyolojik yapıların (co-expression) tespit edildiği anlaşıldı.



**Şekil 4.11.** circRNA Özelliklerinin SHAP Değerlerine Göre Korelasyon Matrisi

Tablo 4.6’da MET (metastatik HCC) ve N (normal doku) sınıfları için SHAP analizine göre en yüksek etkiye sahip ilk 5 circRNA transkripti yan yana sunuldu. Bu yapı ile her iki sınıfta farklılaşan biyobelirteçlerin karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği gösterildi.

Tablo 4.6’ya göre SHAP analizine dayalı olarak MET (metastatik HCC) ve N (normal karaciğer dokusu) sınıfları için modele en fazla katkı sağlayan ilk 5 circRNA transkriptinin karşılaştırmalı olarak sunulduğu görüldü.

ASCRP3001547’nin her iki sınıf için de yüksek SHAP skoruna sahip olduğu ve bu nedenle her iki sınıfı ayırt etmede önemli bir biyobelirteç adayı olduğu belirlendi. MET sınıfında ayrıca ASCRP3005569, ASCRP3007511 ve ASCRP3013608 transkriptlerinin öne çıktığı; N sınıfında ise ASCRP3007069, ASCRP3013015 ve ASCRP3006784 circRNA’larının belirgin katkı sağladığı tespit edildi.

Bu analiz ile sınıflar arası özgün biyobelirteçlerin ortaya konduğu ve modelin sınıf bazlı karar süreçlerine ışık tutulduğu anlaşıldı. Özellikle biyolojik validasyon çalışmaları için bu farklılaşan transkriptlerin öncelikli olarak değerlendirilebileceği belirlendi.

**Tablo 4.6.** Sınıf Bazlı SHAP Analizi: MET ve N Sınıfları İçin En Önemli circRNA'lar

| Sıra | MET Sınıfı Özellik Kodu | MET Sınıfı Önem Skoru | N Sınıfı Özellik Kodu | N Sınıfı Önem Skoru |
|------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| 1    | ASCRP3001547            | 0.058748              | ASCRP3007069          | 0.060924            |
| 2    | ASCRP3005569            | 0.053173              | ASCRP3001547          | 0.056651            |
| 3    | ASCRP3007511            | 0.050055              | ASCRP3013015          | 0.047064            |
| 4    | ASCRP3013608            | 0.043445              | ASCRP3006784          | 0.045885            |
| 5    | ASCRP3007299            | 0.041337              | ASCRP3013116          | 0.042988            |

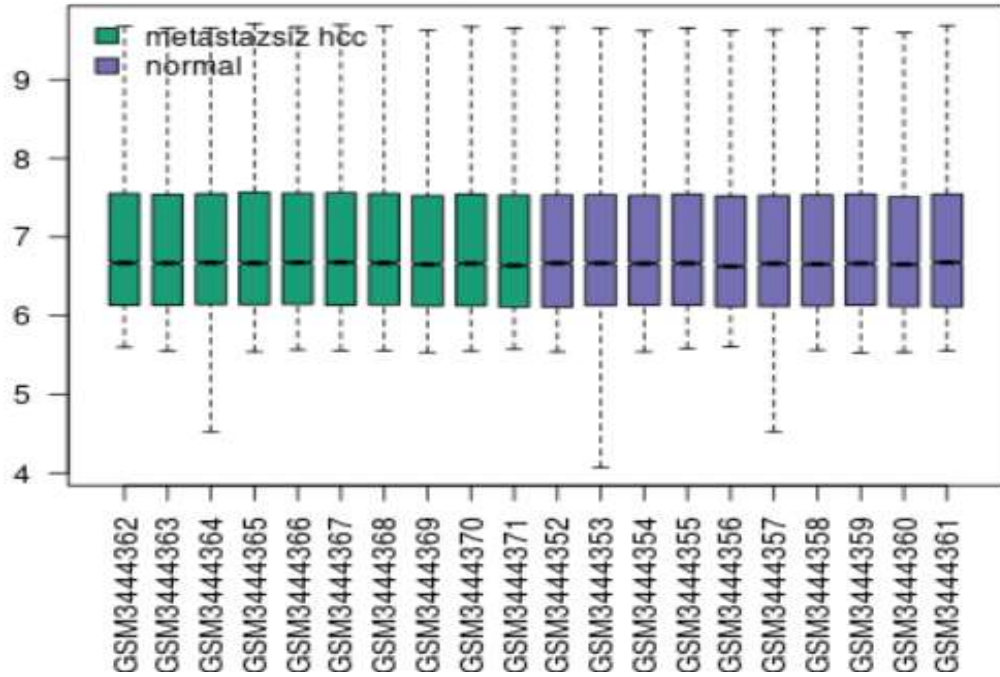
#### 4.2. Metastaz Yapmamış HCC Dokuları ve Normal Doku Karşılaştırmaları

Metastaz yapmamış hepatoselüler karsinom (HCC) olgularının tümörün erken evresini temsil ettiği ve hastalığın başlangıç biyolojisine dair önemli bilgiler sunduğu kabul edildi. Bu evredeki moleküler değişimlerin tespit edilmesinin, HCC’nin tanı ve tedavi süreçlerinde erken müdahaleyi mümkün kılacak biyobelirteçlerin belirlenmesi açısından klinik önem taşıdığı belirlendi. Bu bölümde metastaz yapmamış HCC dokuları ile normal karaciğer dokuları arasındaki sirküler RNA (circRNA) ekspresyon profilleri karşılaştırıldı. Elde edilen verilerin tümöral transformasyonun erken evresine özgü genetik değişimleri ortaya koyarak HCC gelişiminin moleküler temellerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağladığı görüldü.

Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te, çalışmada analiz edilen 10 metastaz yapmamış HCC ve 10 normal karaciğer doku örneğinin gen ekspresyon düzeyleri gösterildi. Şekil 4.12'de örnekler arasındaki gen ekspresyon seviyelerinin kutu grafiği (boxplot) ile özetlendiği, medyan değerlerinin, varyasyonlarının ve aykırı gözlemlerin ortaya konduğu görüldü. Şekil 4.13'te ise her iki grup için ekspresyon değerlerinin yoğunluk dağılımı sunuldu. Görselleştirmelerde yeşil rengin metastaz yapmamış HCC dokularını, mor rengin ise normal karaciğer dokularını temsil ettiği belirtildi.

Bu grafikler aracılığıyla verinin genel dağılım yapısı, normalize edilme durumu ve örnekler arası tutarlılık değerlendirildi. Her iki grup arasında benzer dağılımların gözlemlendiği, farklılıkların teknik değil biyolojik kaynaklı olduğunun desteklendiği ve diferansiyel gen ekspresyon analizine geçmeden önce veri kalitesinin uygun olduğunun doğrulandığı tespit edildi.

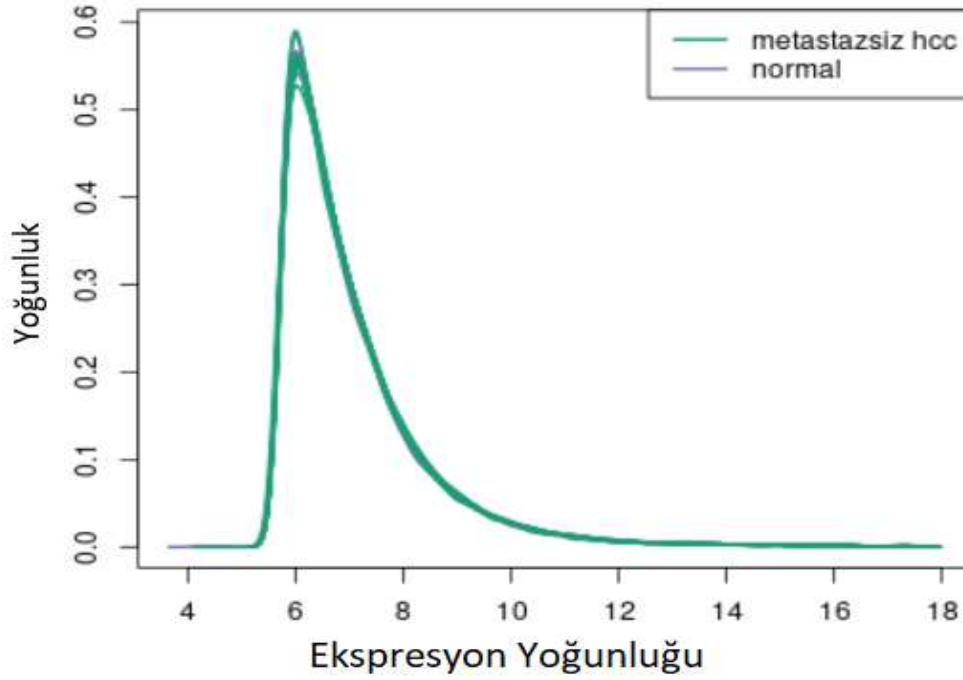
Şekil 4.12'ye göre gruplar arasında benzer dağılımlar gözlemlendi. Bu durumun verinin normalize edildiğini ve karşılaştırmaların biyolojik anlam taşıyabileceğini gösterdiği belirlendi.



**Şekil 4.12.** Metastaz Yapmamış HCC ve Normal Karaciğer Doku Örneklerine Ait Kutu Grafiği

Şekil 4.13'e göre metastazsız HCC dokuları ile normal karaciğer dokuları arasında genel gen ekspresyon yoğunluklarının dağılımının oldukça benzer olduğu gözlemlendi. Her iki grubun yoğunluk eğrilerinin neredeyse çakıştığı ve verilerin başarılı bir şekilde

normalize edildiği, ayrıca örnekler arası sistematik bir sapmanın bulunmadığı belirlendi. Bu durumun, teknik değişkenlikten kaynaklanan etkilerin minimal olduğunu ve gözlemlenecek gen ekspresyon farklılıklarının büyük ölçüde biyolojik kökenli olduğunu desteklediği tespit edildi. Böylece diferansiyel ekspresyon analizine geçmeden önce veri kalitesinin uygun olduğu doğrulandı.

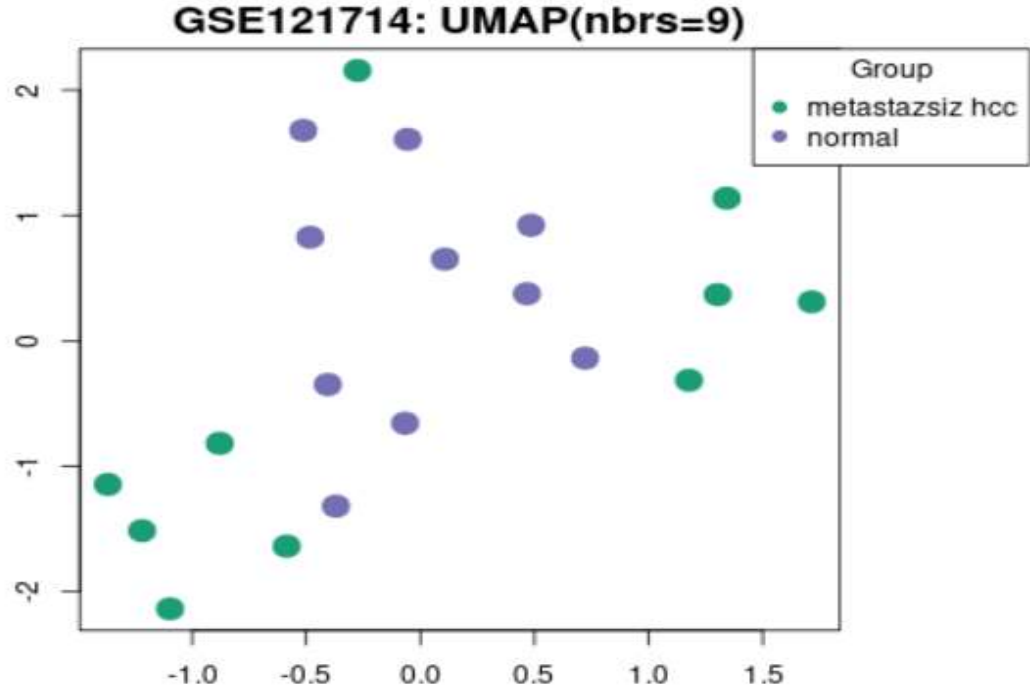


**Şekil 4.13.** Metastaz Yapmamış HCC ve Normal Karaciğer Doku Örneklerine Ait Gen Ekspresyon Yoğunluk Eğrisi

Şekil 4.14'te GSE121714 veri setindeki metastaz yapmamış HCC ve normal karaciğer dokusu örneklerinin gen ekspresyon profillerine göre oluşturulan UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) analizi gösterildi. Yeşil noktaların metastaz yapmamış HCC dokularını, mor noktaların ise normal karaciğer dokularını temsil ettiği belirtildi. Grafik incelendiğinde gruplar arasında kısmi bir ayrışmanın gözlemlendiği görüldü. Örneklerin bazı bölgelerde kümелendiği ve bu iki doku tipi arasında belirli moleküler farklılıkların bulunduğu tespit edildi. Ancak tam bir ayrışmanın görülmemesinin, bu evredeki tümör dokularının normal dokulara göre daha sınırlı bir moleküler farklılaşma gösterdiğini düşündürdüğü belirlendi. UMAP analizinin yüksek boyutlu gen ekspresyon verisini iki boyutlu düzlemde özetleyerek örnekler arası benzerlikleri ve ayrımları görselleştirmeye olanak sağladığı kaydedildi.

Yapılan gen ekspresyon analizi sonucunda metastaz yapmamış HCC dokuları ile normal karaciğer dokuları arasında anlamlı düzeyde farklılık gösteren çok sayıda gen

tespit edildi. Bu analizde anlamlılık kriteri olarak  $|\log_2FC| > 1$  ve  $\text{adj. } p < 0.05$  eşikleri esas alındı. Elde edilen sonuçlarla tümöral transformasyonun erken evresine özgü moleküler değişimlerin belirlendiği ve HCC'nin başlangıç biyolojisine dair önemli ipuçlarının elde edildiği görüldü.



**Şekil 4.14.** Metastaz Yapmamış HCC ve Normal Karaciğer Doku Örneklerine Ait UMAP Dağılım Grafiği

Tablo 4.7 ve Tablo 4.8’de bu karşılaştırma sonucunda en fazla yukarı regüle ve aşağı regüle olan ilk 10 gen özetlendi. Bu genlerin, metastaz yapmamış HCC’nin moleküler özelliklerini yansıtan belirgin ekspresyon değişikliklerine sahip adaylar olduğu ve olası erken dönem biyobelirteçler veya tedaviye yönelik hedefler olarak değerlendirilebileceği belirlendi.

**Tablo 4.7.** Sınıf Bazlı SHAP Analizi: MET ve N Sınıfları İçin En Önemli circRNA'lar

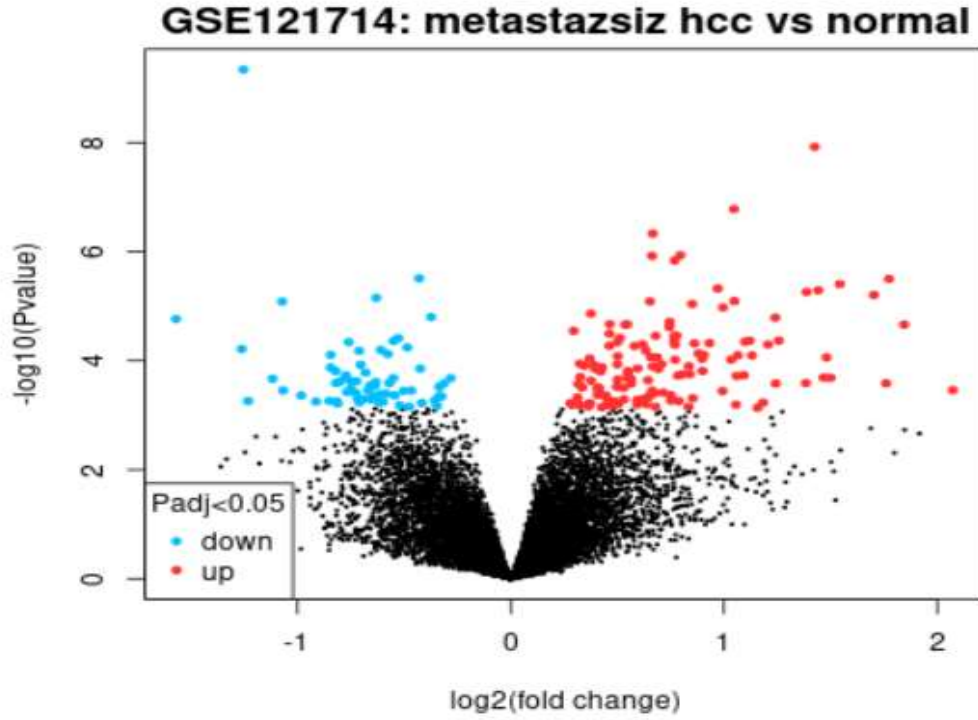
| ID           | adj.P.Val | P.Value  | t        | B       | logFC    | circRNA                        |
|--------------|-----------|----------|----------|---------|----------|--------------------------------|
| ASCRP3003243 | 0.03523   | 3.46E-04 | 4.293641 | 0.3008  | 2.073631 | hsa_circRNA_091581<br>GPC3     |
| ASCRP3001523 | 0.080219  | 2.18E-03 | 3.509978 | -1.3907 | 1.916261 | hsa_circRNA_103415<br>FOXP1    |
| ASCRP3007600 | 0.075447  | 1.87E-03 | 3.57607  | -1.2495 | 1.846502 | hsa_circRNA_103414<br>FOXP1    |
| ASCRP3007524 | 0.010197  | 2.19E-05 | 5.485675 | 2.8433  | 1.845105 | hsa_circRNA_103584<br>NSD2     |
| ASCRP3006741 | 0.111212  | 4.92E-03 | 3.15667  | -2.1351 | 1.799287 | hsa_circRNA_100583<br>ARHGAP12 |
| ASCRP3007299 | 0.004744  | 3.18E-06 | 6.355474 | 4.5998  | 1.774326 | hsa_circRNA_001387<br>NSD2     |

|              |          |          |          |         |          |                             |
|--------------|----------|----------|----------|---------|----------|-----------------------------|
| ASCRP3001547 | 0.029905 | 2.60E-04 | 4.416335 | 0.5666  | 1.760948 | hsa_circRNA_066568<br>ROBO1 |
| ASCRP3012096 | 0.005983 | 6.23E-06 | 6.047122 | 3.9892  | 1.702629 | hsa_circRNA_103586<br>NSD2  |
| ASCRP3005569 | 0.073971 | 1.74E-03 | 3.606162 | -1.1851 | 1.688316 | hsa_circRNA_050900<br>ACTN4 |
| ASCRP3009147 | 0.106509 | 4.40E-03 | 3.205034 | -2.0344 | 1.5468   | hsa_circRNA_101099<br>CPSF6 |

**Tablo 4.8.** Sınıf Bazlı SHAP Analizi: MET ve N Sınıfları İçin En Önemli circRNA'lar

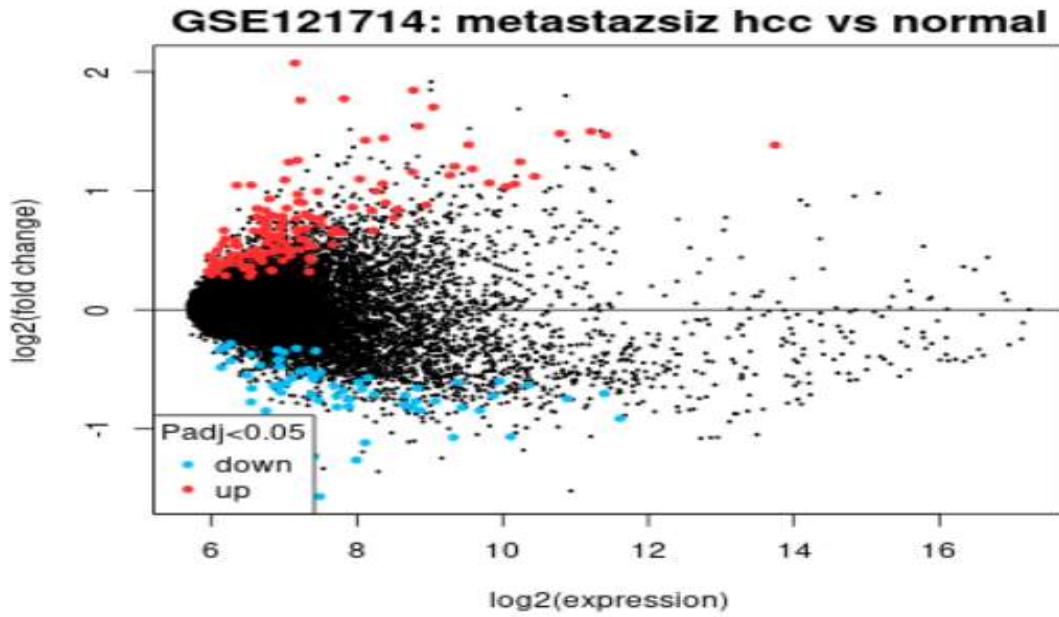
| ID           | adj.P.Val | P.Value  | t        | B       | logFC    | circRNA                        |
|--------------|-----------|----------|----------|---------|----------|--------------------------------|
| ASCRP3009894 | 0.009611  | 1.72E-05 | -5.59315 | 3.0658  | -1.5689  | hsa_circRNA_002141<br>ZDBF2    |
| ASCRP3000640 | 0.213268  | 2.68E-02 | -2.3886  | -3.6529 | -1.52048 | hsa_circRNA_044097<br>EFTUD2   |
| ASCRP3002750 | 0.13717   | 8.81E-03 | -2.89896 | -2.6633 | -1.35916 | hsa_circRNA_400670<br>FGFR2    |
| ASCRP3013548 | 0.12597   | 6.40E-03 | -3.0409  | -2.3742 | -1.33254 | hsa_circRNA_405468<br>MT2A     |
| ASCRP3005258 | 0.015476  | 6.10E-05 | -5.03786 | 1.9018  | -1.26172 | hsa_circRNA_406145<br>RCAN1    |
| ASCRP3001458 | 6.14E-06  | 4.57E-10 | -11.1162 | 12.1416 | -1.25352 | hsa_circRNA_089372<br>ADAMTS13 |
| ASCRP3000566 | 0.109739  | 4.79E-03 | -3.16773 | -2.1121 | -1.24551 | hsa_circRNA_062557<br>CHCHD10  |
| ASCRP3001565 | 0.043752  | 5.50E-04 | -4.09709 | -0.1254 | -1.23117 | hsa_circRNA_071106<br>ARHGAP10 |
| ASCRP3005903 | 0.084984  | 2.47E-03 | -3.45593 | -1.5057 | -1.19466 | hsa_circRNA_103820<br>LIFR     |
| ASCRP3000537 | 0.132227  | 7.73E-03 | -2.95695 | -2.5458 | -1.1786  | hsa_circRNA_001937<br>CHD9     |

Şekil 4.15'te metastaz yapmamış HCC dokuları ile normal karaciğer dokuları arasındaki anlamlı gen ekspresyon farklılıklarını gösteren volkan grafiği sunuldu. Her bir noktanın bir geni temsil ettiği, x ekseninde log2 kat değişiminin (log2 fold change), y ekseninde ise  $-\log_{10}(p\text{-değeri})$  değerinin gösterildiği belirtildi. Bu iki eksen aracılığıyla genlerin hem ekspresyon düzeyindeki değişim miktarının hem de istatistiksel anlamlılığının görselleştirildiği görüldü. Analizde  $|\log_2FC| > 1.0$  ve  $p < 0.05$  eşiklerini karşılayan genlerin vurgulanarak gösterildiği kaydedildi. Bu grafik ile erken evre HCC oluşumu ile ilişkili olabilecek aday genlerin belirlendiği ve potansiyel biyobelirteç ya da terapötik hedeflerin ön plana çıkarıldığı tespit edildi.



**Şekil 4.15.** Metastaz Yapmamış HCC ve Normal Karaciğer Dokuları Arasındaki Gen Ekspresyon Farklılıklarını Gösteren Volcano Grafiği

Şekil 4.16’da log2 kat değişimi (y eksen) ile ortalama log2 gen ekspresyonu (x eksen) arasındaki ilişkiyi gösteren MD (Mean-Difference) grafiği sunuldu. Bu grafiğin, genlerin genel ekspresyon seviyelerine göre ne ölçüde farklılaştığını görselleştirmek amacıyla kullanıldığı belirtildi. Grafikte merkezden uzaklaşan noktaların, metastaz yapmamış HCC ile normal karaciğer dokuları arasında anlamlı ekspresyon farkı gösteren genleri temsil ettiği gözlemlendi. Böylece diferansiyel olarak ifade edilen genlerin açık biçimde öne çıkarıldığı ve erken evre tümöral değişimlerle ilişkili biyolojik olarak anlamlı adayların vurgulandığı tespit edildi.



**Şekil 4.16.** Metastaz Yapmamış HCC ve Normal Karaciğer Dokularındaki Transkriptlere Ait MD Grafiği

#### 4.2.1. İstatistik Analizler

Biyoinformatik analizler sonucunda N (normal karaciğer dokusu) ve nonMET (non-metastatik HCC) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren circRNA transkriptleri belirlendi. İfade düzeyine göre en belirgin şekilde artmış (upregulated) ve azalmış (downregulated) olan ilk 10'ar transkript seçildi ve bu transkriptlerin iki grup arasındaki farklılıkları bağımsız örneklem için t-testi ile analiz edildi. Bu analize ilişkin bulgular Tablo 4.9'da sunuldu.

Tablo 4.9'da sunulan veriler incelendiğinde normal ve nonMET grupları arasında circRNA ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklılaştığı görüldü. Özellikle ASCRP3007299, ASCRP3001547 ve ASCRP3005569 transkriptlerinin nonMET grubunda belirgin şekilde artış gösterdiği; ASCRP3009894, ASCRP3002750 ve ASCRP3001458 transkriptlerinin ise nonMET grubunda azaldığı tespit edildi. Bu farklılıkların, ilgili transkriptlerin non-metastatik süreçlerde biyolojik anlam taşıyabileceğini ve tanı ya da prognoz amacıyla değerlendirilebilecek potansiyel adaylar olduğunu gösterdiği belirlendi.

**Tablo 4.9.** Normalize edilmiş SHAP değerlerine göre metabolitlerin PKOS tanısındaki önem düzeyleri

| Değişkenler  | Grup         |              | p     |
|--------------|--------------|--------------|-------|
|              | N            | nonMET       |       |
|              | Ortalama     |              |       |
| ASCRP3003243 | 6.109±0.139  | 8.182±1.608  | 0.007 |
| ASCRP3001523 | 8.057±0.573  | 9.974±1.732  | 0.003 |
| ASCRP3007600 | 8.086±0.507  | 9.932±1.651  | 0.006 |
| ASCRP3007524 | 7.848±0.615  | 9.694±0.937  | 0.001 |
| ASCRP3006741 | 9.962±0.992  | 11.762±1.63  | 0.009 |
| ASCRP3007299 | 6.931±0.342  | 8.706±0.863  | 0.001 |
| ASCRP3001547 | 6.339±0.183  | 8.101±1.317  | 0.002 |
| ASCRP3012096 | 8.193±0.45   | 9.898±0.821  | 0.001 |
| ASCRP3005569 | 9.372±0.987  | 11.062±1.212 | 0.003 |
| ASCRP3009147 | 7.998±0.891  | 9.544±1.344  | 0.008 |
| ASCRP3009894 | 8.269±0.621  | 6.701±0.696  | 0.001 |
| ASCRP3000640 | 11.695±1.044 | 10.175±1.857 | 0.04  |
| ASCRP3002750 | 8.966±0.622  | 7.61±1.438   | 0.018 |
| ASCRP3013548 | 8.198±0.91   | 6.868±1.148  | 0.011 |
| ASCRP3005258 | 8.62±0.696   | 7.358±0.458  | 0.001 |
| ASCRP3001458 | 7.498±0.277  | 6.244±0.229  | 0.001 |
| ASCRP3000566 | 9.784±0.884  | 8.538±0.97   | 0.008 |
| ASCRP3001565 | 8.018±0.877  | 6.786±0.48   | 0.002 |
| ASCRP3005903 | 8.673±0.825  | 7.477±0.806  | 0.004 |
| ASCRP3000537 | 10.872±0.621 | 9.694±1.177  | 0.014 |

#### 4.2.2. Modelleme Aşaması

Metastaz yapmamış hepatoselüler karsinom (HCC) dokuları ile normal karaciğer dokuları arasında anlamlı düzeyde farklılık gösteren en yüksek 10 yukarı ve 10 aşağı regüle circRNA transkripti kullanılarak sınıflandırma modelleri oluşturuldu. Bu 20 biyobelirteç, non-metastatik HCC'nin moleküler özelliklerini yansıtacak şekilde seçildi ve makine öğrenmesi algoritmalarına girdi olarak dahil edildi.

Modelleme sürecinde sınıflandırma performansını değerlendirmek amacıyla farklı algoritmalar uygulandı. Bu kapsamda Random Forest, XGBoost, LightGBM, CatBoost, Gradient Boosting, Support Vector Machine (SVM), Logistic Regression, K-Nearest Neighbors (KNN), Decision Tree, Naive Bayes ve Neural Network modelleri kullanıldı.

Her bir model, belirtilen biyobelirteçlere dayalı olarak eğitildi ve hem çapraz doğrulama hem de test verisi üzerinden performansları karşılaştırıldı.

Tablo 4.10’da modellemelere ait performans metrikleri sunuldu.

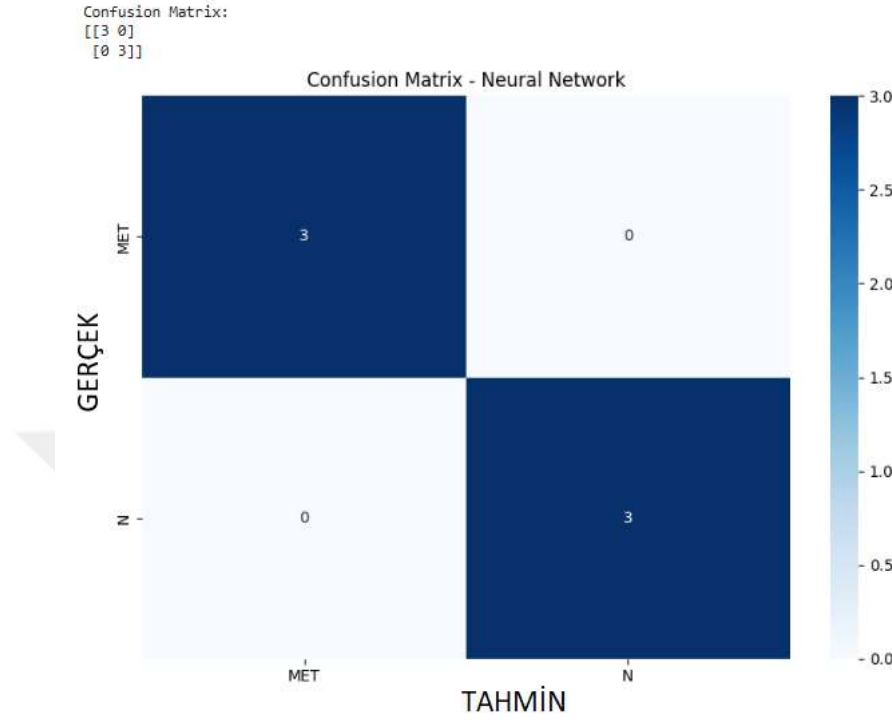
Tablo 4.10’da metastaz yapmamış hepatoselüler karsinom (HCC) ve normal karaciğer dokularının sınıflandırılmasında kullanılan farklı makine öğrenmesi modellerinin performans karşılaştırması özetlendi. Modeller, bu iki grup arasında diferansiyel olarak ifade edilen 20 circRNA transkriptine dayalı olarak eğitildi ve hem 5 katlı çapraz doğrulama (CV) hem de test verisi üzerinden Accuracy, Precision, Recall, F1-score ve ROC AUC metrikleri ile değerlendirildi.

Bu kapsamlı karşılaştırma ile hangi modellerin non-metastatik HCC dokularını sağlıklı dokulardan daha etkili şekilde ayırt edebildiği ortaya kondu ve potansiyel klinik uygulamalar açısından en güçlü sınıflandırıcıların belirlendiği görüldü. Elde edilen sonuçlara göre Neural Network, Naive Bayes ve CatBoost modellerinin tüm metriklerde %100 başarı sağladığı ve en yüksek performansı gösterdiği tespit edildi.

**Tablo 4.10.** Farklı Makine Öğrenimi Modellerinin circRNA Temelli Sınıflandırma Performans Karşılaştırması (Metastaz Yapmamış HCC ve Normal Karaciğer Dokularının Ayrımında)

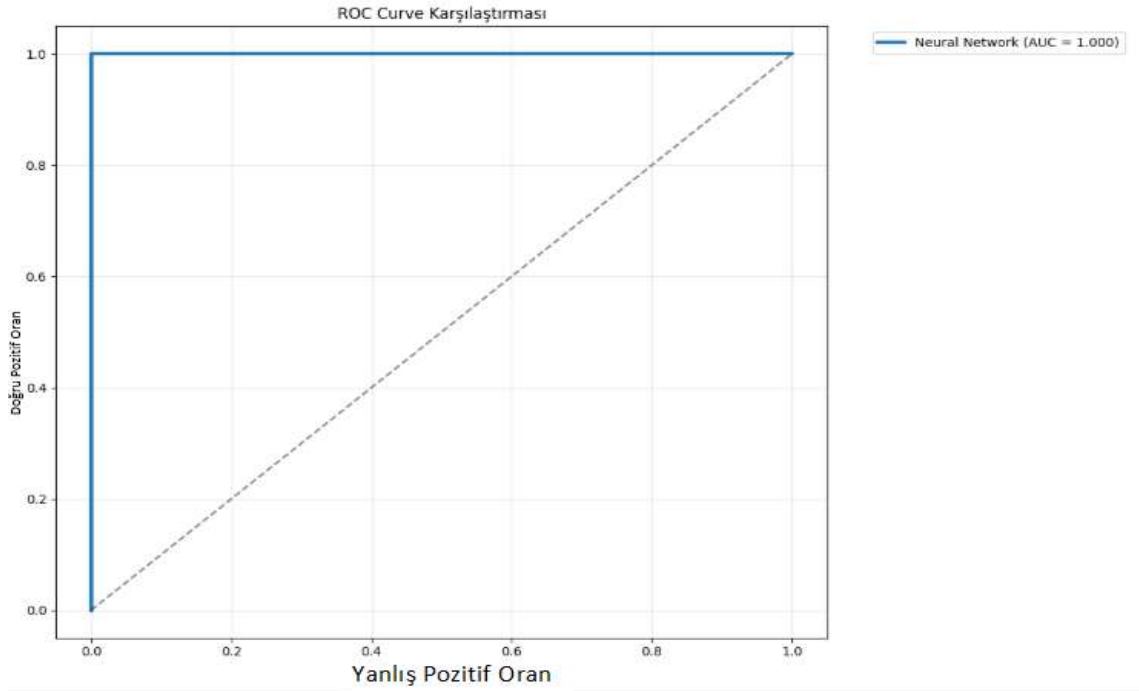
| Model               | CV Accuracy (Mean) | CV Accuracy (Std) | CV Precision (Mean) | CV Precision (Std) | CV Recall (Mean) | CV Recall (Std) | CV F1 (Mean) | CV F1 (Std) | CV ROC AUC (Mean) | CV ROC AUC (Std) | Test Accuracy | Test Precision | Test Recall | Test F1 | Test ROC AUC |
|---------------------|--------------------|-------------------|---------------------|--------------------|------------------|-----------------|--------------|-------------|-------------------|------------------|---------------|----------------|-------------|---------|--------------|
| Random Forest       | 0.933333           | 0.133333          | 0.800000            | 0.400000           | 0.800000         | 0.400000        | 0.800000     | 0.400000    | 1.00              | 0.0              | 1.0           | 1.0            | 1.0         | 1.0     | 1.0          |
| XGBoost             | 0.866667           | 0.163299          | 0.800000            | 0.400000           | 0.733333         | 0.400000        | 0.733333     | 0.388730    | 0.85              | 0.2              | 1.0           | 1.0            | 1.0         | 1.0     | 1.0          |
| LightGBM            | 0.366667           | 0.066667          | 0.133333            | 0.163299           | 0.200000         | 0.489898        | 0.200000     | 0.244949    | 0.50              | 0.0              | 0.5           | 0.0            | 0.0         | 0.0     | 0.5          |
| CatBoost            | 0.933333           | 0.133333          | 0.800000            | 0.400000           | 0.800000         | 0.400000        | 0.800000     | 0.400000    | 1.00              | 0.0              | 1.0           | 1.0            | 1.0         | 1.0     | 1.0          |
| Gradient Boosting   | 0.933333           | 0.133333          | 0.800000            | 0.400000           | 0.800000         | 0.400000        | 0.800000     | 0.400000    | 1.00              | 0.0              | 1.0           | 1.0            | 1.0         | 1.0     | 1.0          |
| SVM                 | 1.000.000          | 0.000000          | 1.000.000           | 0.000000           | 1.000.000        | 0.000000        | 1.000.000    | 0.000000    | 1.00              | 0.0              | 1.0           | 1.0            | 1.0         | 1.0     | 1.0          |
| Logistic Regression | 1.000.000          | 0.000000          | 1.000.000           | 0.000000           | 1.000.000        | 0.000000        | 1.000.000    | 0.000000    | 1.00              | 0.0              | 1.0           | 1.0            | 1.0         | 1.0     | 1.0          |
| KNN                 | 0.933333           | 0.133333          | 0.800000            | 0.400000           | 0.800000         | 0.400000        | 0.800000     | 0.400000    | 1.00              | 0.0              | 1.0           | 1.0            | 1.0         | 1.0     | 1.0          |
| Decision Tree       | 0.866667           | 0.163299          | 0.800000            | 0.400000           | 0.733333         | 0.400000        | 0.733333     | 0.388730    | 0.85              | 0.2              | 1.0           | 1.0            | 1.0         | 1.0     | 1.0          |
| Naive Bayes         | 1.000.000          | 0.000000          | 1.000.000           | 0.000000           | 1.000.000        | 0.000000        | 1.000.000    | 0.000000    | 1.00              | 0.0              | 1.0           | 1.0            | 1.0         | 1.0     | 1.0          |
| Neural Network      | 1.000.000          | 0.000000          | 1.000.000           | 0.000000           | 1.000.000        | 0.000000        | 1.000.000    | 0.000000    | 1.00              | 0.0              | 1.0           | 1.0            | 1.0         | 1.0     | 1.0          |

En iyi sonuçları veren modellerden biri olan Neural Network ile analizlere devam edildi ve bu modele ait confusion matrisi Şekil 4.17’de sunuldu.



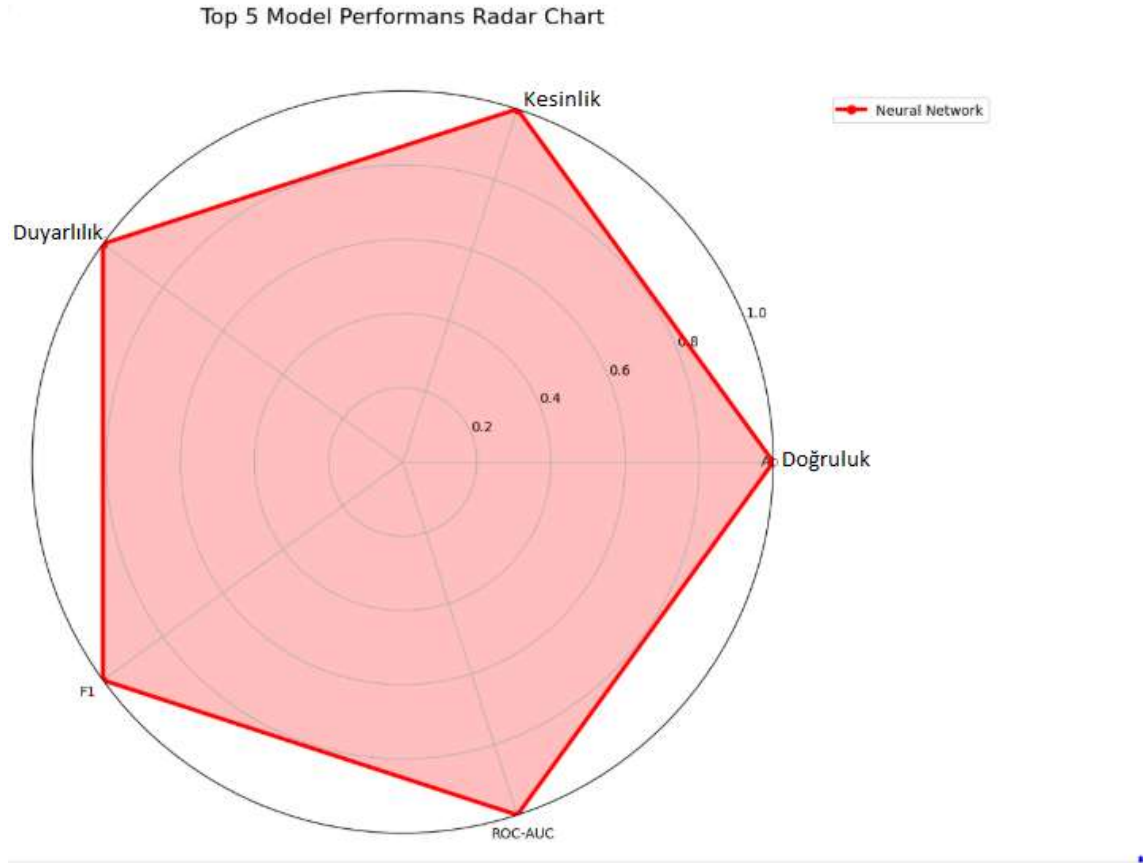
Şekil 4.17. Neural Network Modeline Ait Karışıklık Matrisi

Neural Network modeline ait ROC grafiği Şekil 4.18’de sunuldu.



Şekil 4.18. Neural Network Modeline Ait ROC Eğrisi

Şekil 4.19’da `cv_accuracy_mean`, `cv_precision_mean`, `cv_recall_mean`, `cv_f1_mean` ve `cv_roc_auc_mean` değerleri kullanılarak çapraz doğrulama ortalamalarına göre en iyi 5 makine öğrenmesi modelinin performans karşılaştırması sunuldu. Grafikte, modellerin beş temel metrik (Accuracy, Precision, Recall, F1-score ve ROC-AUC) açısından genel başarı düzeylerinin görsel olarak ortaya konduğu görüldü.



**Şekil 4.19.** Çapraz Doğrulama Sonuçlarına Göre En İyi 5 Modelin Performans Radar Grafiği

circRNA transkriptlerinin model üzerindeki etkilerini daha iyi anlamak amacıyla Neural Network modeline SHAP (SHapley Additive exPlanations) analizi uygulandı. Bu analiz ile modelin karar süreçlerine hangi özelliklerin ne ölçüde katkı sağladığı nicel olarak değerlendirildi. Tablo 4.11’de model çıktısı üzerinde en fazla etkiye sahip olan ilk 10 circRNA transkriptinin ortalama SHAP değerlerine göre sıralandığı gösterildi.

Tablo 4.11’de modelin karar süreçlerine en fazla etki eden ilk 10 circRNA transkriptinin, önem skorlarına (feature importance) göre azalan şekilde sıralandığı gösterildi. En yüksek katkı sağlayan transkriptler arasında ASCRP3001458, ASCRP3005903 ve ASCRP3003243’ün yer aldığı ve bu özelliklerin modelin tahmin

başarısını yönlendirdiği görüldü. Bu transkriptlerin, non-metastatik HCC ile normal doku arasındaki ayırt edici biyobelirteçler olarak değerlendirilebileceği belirlendi.

Bu analiz ile biyolojik anlamlılık taşıyabilecek circRNA adaylarının ön plana çıkarıldığı ve gelecekteki fonksiyonel validasyon çalışmalarına temel oluşturabilecek bir ön seçim stratejisi sağlandığı tespit edildi.

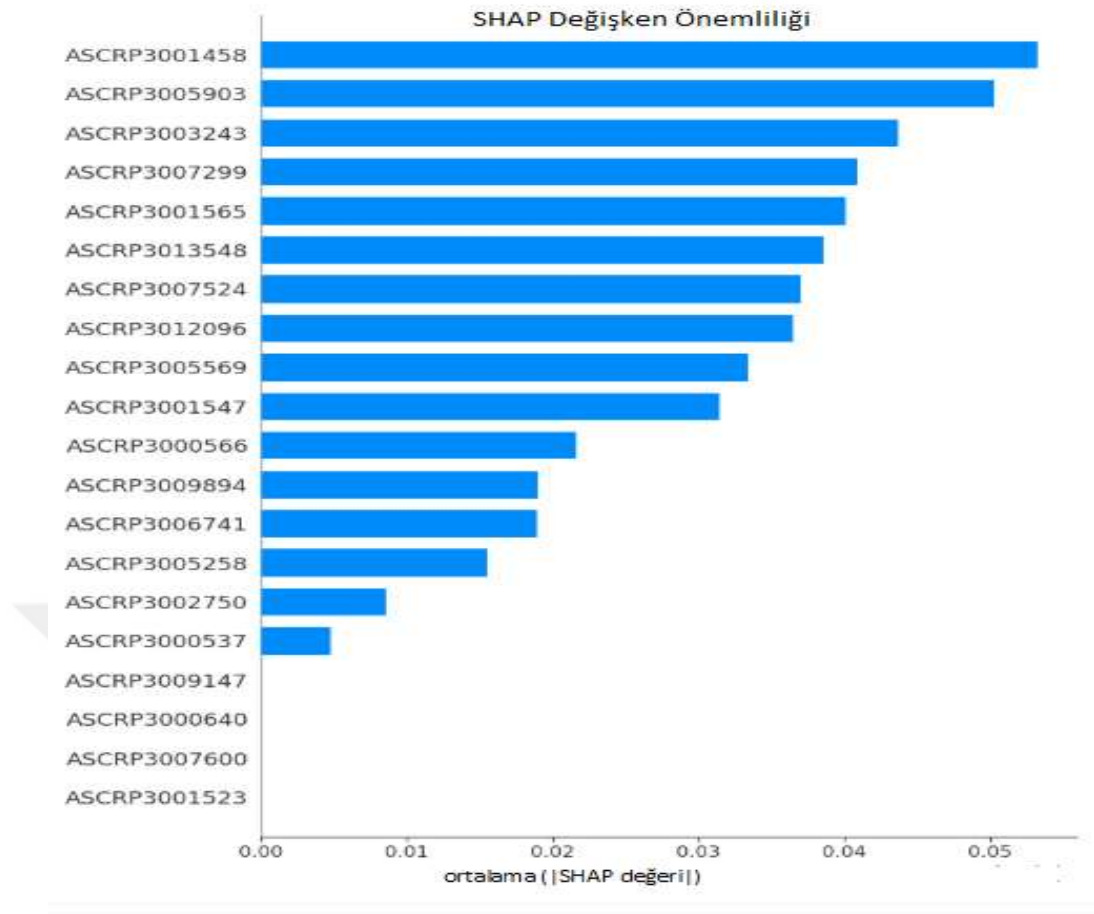
**Tablo 4.11.** SHAP Değerlerine Göre En Yüksek Katkı Sağlayan İlk 10 circRNA Transkripti

| Sıra | Özellik Kodu | Önem Skoru |
|------|--------------|------------|
| 1    | ASCRP3001458 | 0.051270   |
| 2    | ASCRP3005903 | 0.050242   |
| 3    | ASCRP3003243 | 0.043697   |
| 4    | ASCRP3007299 | 0.040927   |
| 5    | ASCRP3001565 | 0.040079   |
| 6    | ASCRP3013548 | 0.038580   |
| 7    | ASCRP3007524 | 0.037089   |
| 8    | ASCRP3018096 | 0.036442   |
| 9    | ASCRP3005569 | 0.033624   |
| 10   | ASCRP3001547 | 0.033395   |

Şekil 4.20’de sınıflandırma modelinde kullanılan circRNA transkriptlerinin SHAP (SHapley Additive exPlanations) analizine göre ortalama katkı düzeyleri sunuldu. Yatay ekseninde her bir özelliğin model çıktısına olan ortalama etkisinin (mean |SHAP value|) temsil edildiği belirtildi.

Grafiğe göre en yüksek SHAP değerlerine sahip olan ASCRP3001458, ASCRP3005903 ve ASCRP3003243 transkriptlerinin modelin tahminleri üzerinde en belirleyici circRNA’lar olarak öne çıktığı belirlendi. Bu transkriptlerin, metastaz yapmamış HCC ile normal doku ayrımında biyolojik olarak anlamlı aday biyobelirteçler olabileceği değerlendirildi.

Grafikte özniteliklerin göreceli öneminin görsel olarak sunulduğu ve modelin karar sürecine katkı sağlayan unsurların daha iyi anlaşılmasına olanak tanındığı görüldü. Bu sayede hem modelin açıklanabilirliğinin arttığı hem de biyolojik olarak öncelikli araştırma hedeflerinin belirlendiği tespit edildi.

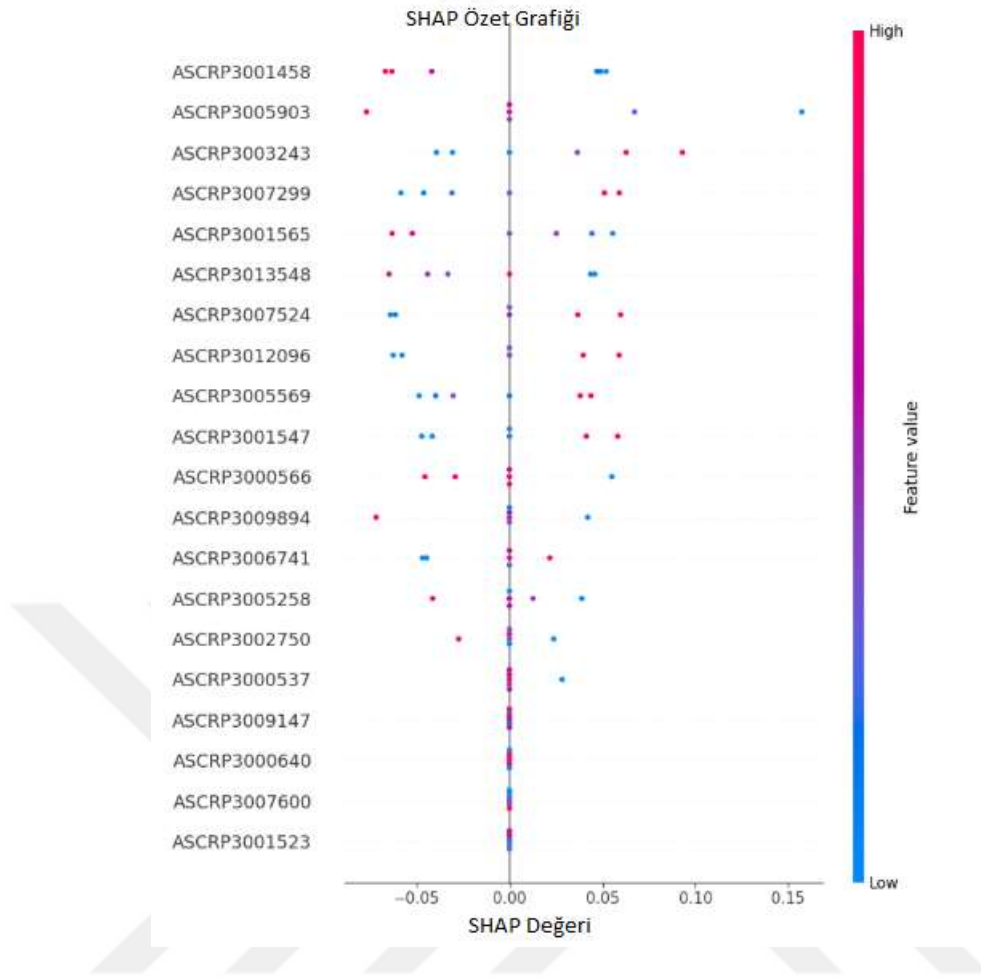


**Şekil 4.20.** circRNA Tabanlı Modelde SHAP Değerlerine Göre Özellik Önem Grafiği

Şekil 4.21’de sınıflandırma modelinde yer alan circRNA transkriptlerinin bireysel örnekler üzerindeki etkileri ve bu etkilerin yönü gösterildi. Yatay ekseninde SHAP değerlerinin (model çıktısına olan katkının) ifade edildiği, renk skalasında ise ilgili circRNA’nın ifade düzeyinin gösterildiği belirtildi (kırmızı = yüksek, mavi = düşük).

Grafiğe göre öne çıkan ASCRP3001547, ASCRP3007069 ve ASCRP3007511 transkriptlerinin hem yüksek SHAP değerleri hem de tutarlı etki yönleriyle dikkat çektiği belirlendi. Örneğin ASCRP3001547’nin yüksek ifade düzeylerinin genellikle modelin pozitif sınıf (metastaz yapmamış HCC) yönünde tahmin yapmasına katkı sağladığı görüldü.

Bu analiz ile yalnızca hangi özelliklerin önemli olduğu değil, aynı zamanda nasıl ve ne yönde etkili olduklarının da ortaya konduğu tespit edildi. Böylece modelin karar verme mantığının daha derinlemesine anlaşıldığı ve biyolojik yorumlarla desteklendiği belirlendi.

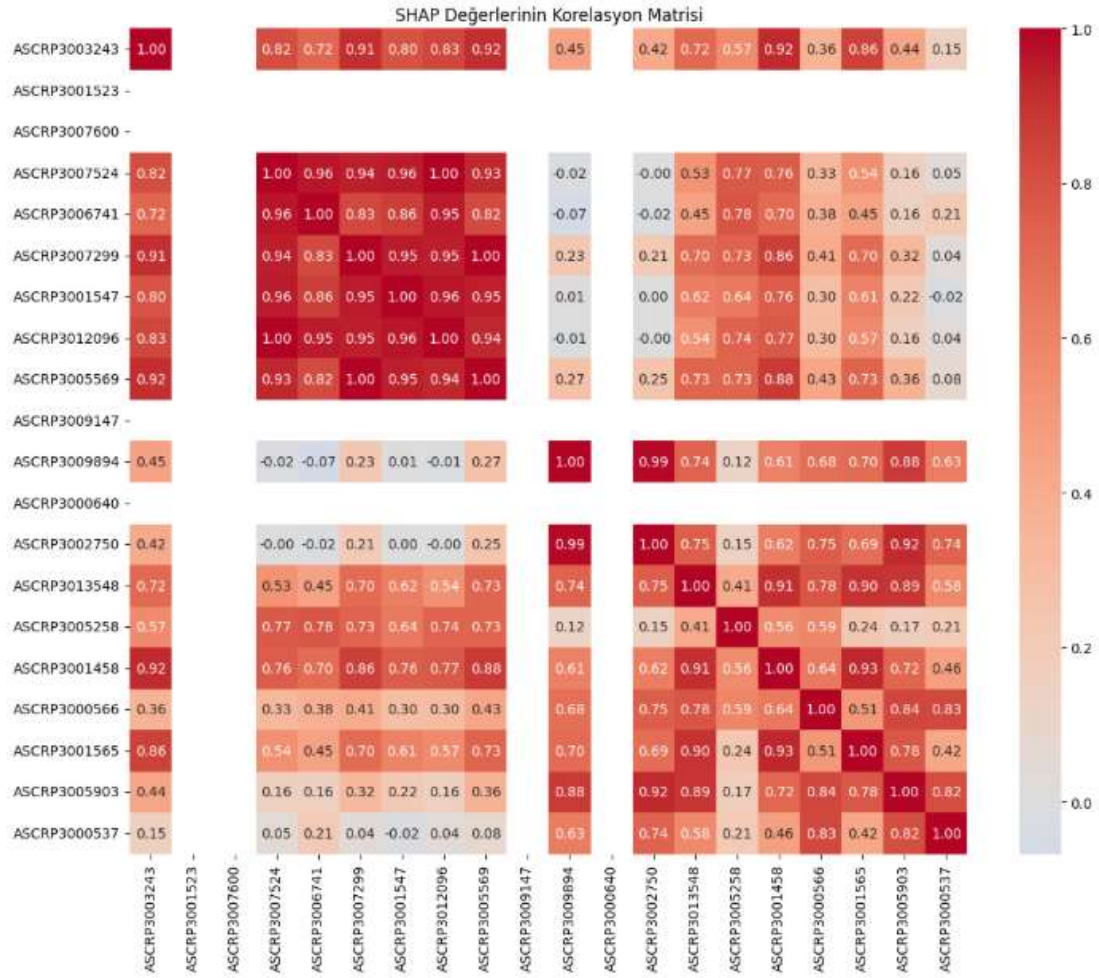


**Şekil 4.21.** circRNA Özelliklerine Ait SHAP Özet Grafiği

Şekil 4.22’de sınıflandırma modelinde yer alan circRNA transkriptlerine ait SHAP değerleri arasındaki çift yönlü korelasyonlar görselleştirildi. Renk skalasının korelasyon katsayısının büyüklüğünü ve yönünü yansıttığı (kırmızı: pozitif korelasyon; mavi: negatif korelasyon), kareler içerisindeki sayısal değerlerin ise Pearson korelasyon katsayılarını temsil ettiği gösterildi.

Bu grafiğe göre özellikle ASCRP3013608, ASCRP3011550 ve ASCRP3001547 transkriptlerinin birçok diğer özelliğin SHAP değeriyle yüksek pozitif korelasyon gösterdiği belirlendi ( $r > 0.9$ ). Bu durumun, söz konusu circRNA’ların model çıktısı üzerinde benzer yönde ve birlikte etkili olabileceğini düşündürdüğü görüldü.

Diğer yandan ASCRP3010445 ve ASCRP3006567 transkriptlerinin daha bağımsız etkiler taşıdığı gözlemlendi. Bu korelasyon analizi ile özneliliklerin birbirleriyle olan ilişkilerinin ortaya konduğu, modeldeki bilgi fazlalığının (redundancy) veya birlikte değişim gösteren biyolojik yapıların (co-expression) tespit edildiği anlaşıldı.



**Şekil 4.22.** circRNA Özelliklerinin SHAP Değerlerine Göre Korelasyon Matrisi

Tablo 4.12’de non-metastatik HCC (nonMET) ve normal karaciğer dokusu (N) sınıfları için SHAP analizine göre en yüksek etkiye sahip ilk 5 circRNA transkriptinin karşılaştırmalı olarak sunulduğu görüldü. Bu yapı ile her iki sınıfta öne çıkan biyobelirteçlerin karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği ve sınıfa özgü moleküler imzaların belirlendiği tespit edildi.

Tablo 4.12’ye göre SHAP analizine dayalı olarak nonMET (metastaz yapmamış HCC) ve N (normal karaciğer dokusu) sınıfları için modele en fazla katkı sağlayan ilk 5 circRNA transkriptinin karşılaştırmalı olarak sunulduğu görüldü.

ASCRP3001458’in her iki sınıfta da yüksek SHAP skorlarına sahip olduğu ve bu nedenle nonMET ile normal doku ayırımında ortak belirleyici bir biyobelirteç adayı olarak öne çıktığı belirlendi. nonMET sınıfında özellikle ASCRP3005903, ASCRP3003243 ve ASCRP3013565 transkriptlerinin modelin karar sürecine anlamlı katkı sağladığı; N sınıfında ise ASCRP3013548, ASCRP3007299 ve ASCRP3007524 circRNA’larının daha belirgin bir rol oynadığı tespit edildi.

Bu analiz ile sınıflara özgü circRNA profillerinin ayırt edici gücünün ortaya konduğu ve sınıf bazlı biyobelirteçlerin belirlendiği görüldü. Ayrıca modelin karar mekanizmasının daha iyi anlaşıldığı ve bu transkriptlerin biyolojik validasyon çalışmaları açısından öncelikli olarak değerlendirilmesi gerektiğine işaret edildi.

**Tablo 4.12.** Sınıf Bazlı SHAP Analizi: nonMET ve N Sınıfları İçin En Önemli circRNA'lar

| Sıra | N Sınıfı Özellik Kodu | N Sınıfı Önem Skoru | nonMET Sınıfı Özellik Kodu | nonMET Sınıfı Önem Skoru |
|------|-----------------------|---------------------|----------------------------|--------------------------|
| 1    | ASCRP3001458          | 0.057242            | ASCRP3005903               | 0.074557                 |
| 2    | ASCRP3013548          | 0.047391            | ASCRP3003243               | 0.064126                 |
| 3    | ASCRP3007299          | 0.045158            | ASCRP3001458               | 0.049310                 |
| 4    | ASCRP3007524          | 0.041824            | ASCRP3013565               | 0.041604                 |
| 5    | ASCRP3012096          | 0.040105            | ASCRP3007299               | 0.036696                 |

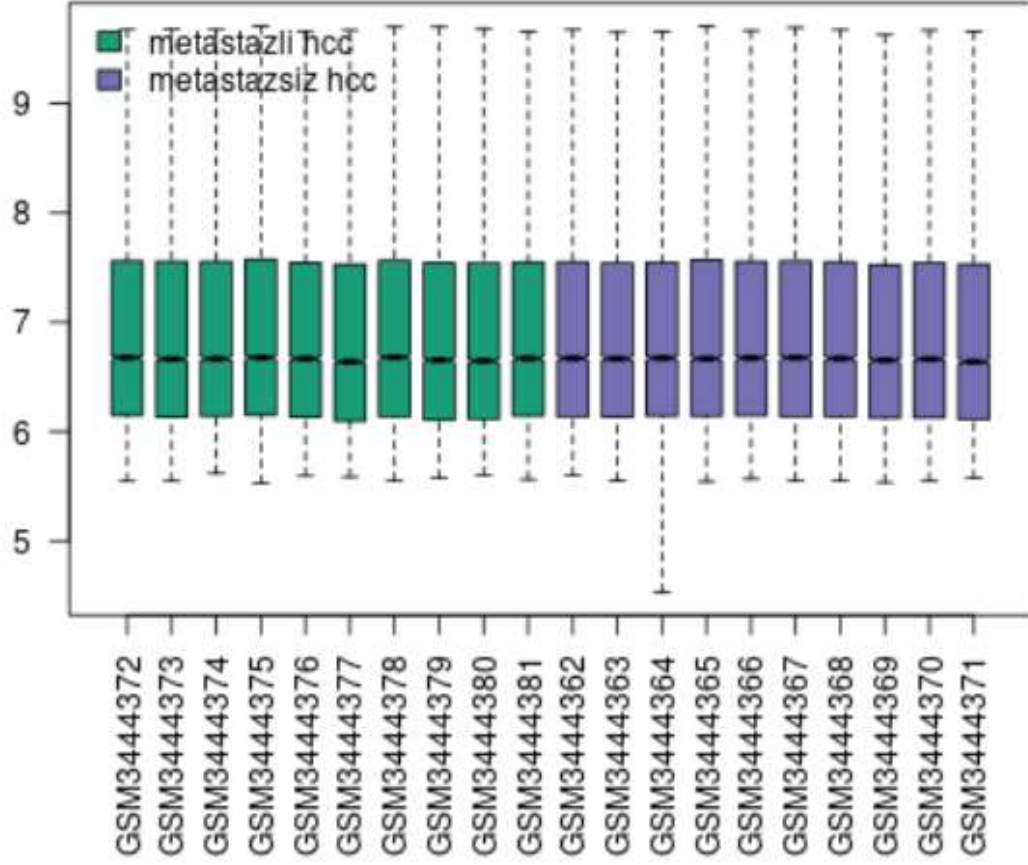
### 4.3. Metastatik ve Metastaz Yapmamış HCC Dokuları Karşılaştırmaları

Metastatik ve metastaz yapmamış hepatoselüler karsinom (HCC) olgularının tümörün farklı evrelerini temsil ettiği ve hastalığın ilerleyici biyolojisinin anlaşılması açısından önemli bir karşılaştırma sunduğu kabul edildi. Metastatik potansiyelin kazanılmasının, tümör hücrelerinde önemli moleküler yeniden programlamaları beraberinde getirdiği bilindi. Bu nedenle metastaz ile ilişkili gen ekspresyon değişikliklerinin belirlenmesinin, HCC'nin invazyon ve yayılım süreçlerini anlamada kritik rol oynadığı belirlendi. Bu bölümde metastatik HCC dokuları ile metastaz yapmamış HCC dokuları arasındaki sirküler RNA (circRNA) ekspresyon profilleri karşılaştırıldı. Elde edilen bulguların, metastatik geçişin altında yatan potansiyel düzenleyici RNA'ları ve biyobelirteç adaylarını ortaya koyarak HCC'nin progresif moleküler dinamiklerine dair önemli bilgiler sunduğu görüldü.

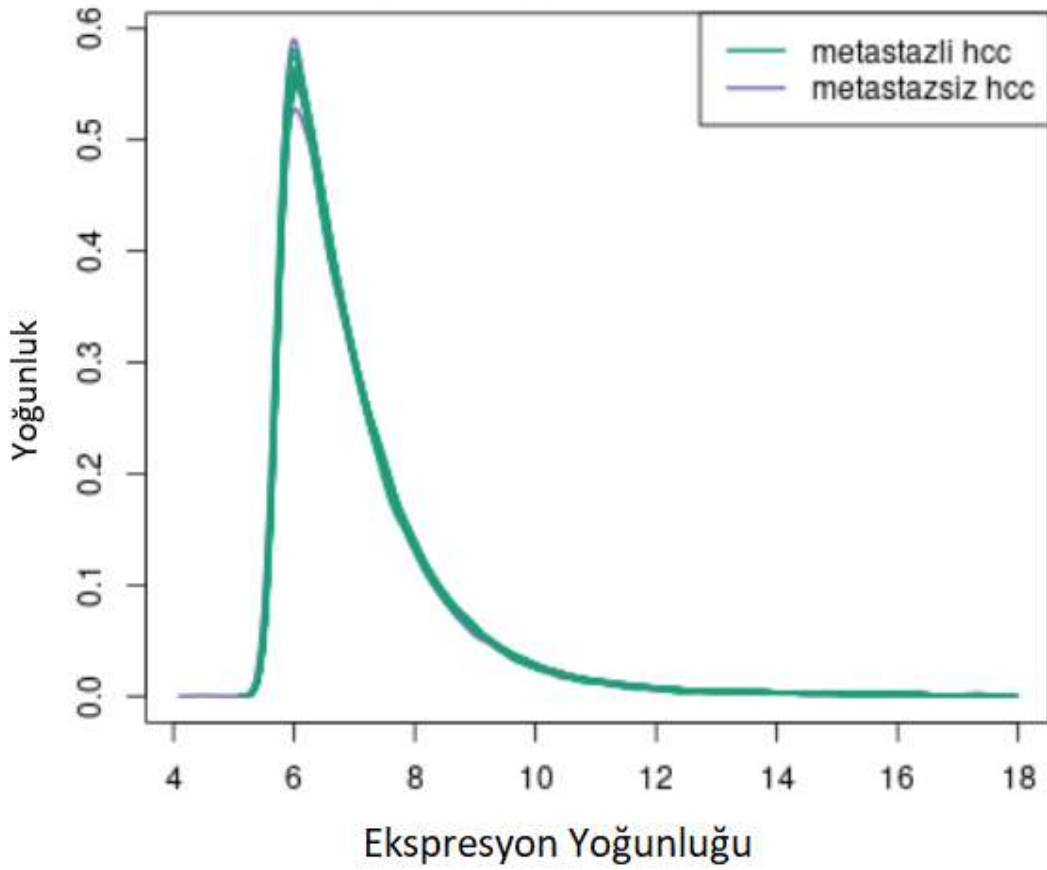
Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'te çalışmada analiz edilen 10 metastatik HCC ve 10 metastaz yapmamış HCC doku örneğinin gen ekspresyon düzeyleri gösterildi. Şekil 4.23'te örnekler arasındaki gen ekspresyon seviyelerinin kutu grafiği (boxplot) ile özetlendiği, medyan değerlerinin, varyasyonlarının ve aykırı gözlemlerin ortaya konduğu görüldü. Şekil 4.24'te ise her iki grup için ekspresyon değerlerinin yoğunluk dağılımı sunuldu. Görselleştirmelerde yeşil rengin metastaz yapmamış HCC dokularını, mor rengin ise metastatik HCC dokularını temsil ettiği belirtildi.

Bu grafikler aracılığıyla verinin genel dağılım yapısı, normalize edilme durumu ve örnekler arası tutarlılık değerlendirildi. Her iki grup arasında benzer dağılımların

gözlendiği, farklılıkların teknik değil biyolojik kaynaklı olduğunun desteklendiği ve diferansiyel gen ekspresyon analizine geçmeden önce veri kalitesinin uygun olduğunun doğrulandığı tespit edildi.



**Şekil 4.23.** Metastatik HCC ve Metastaz Yapmamış HCC Doku Örneklerine Ait Kutu Grafiği



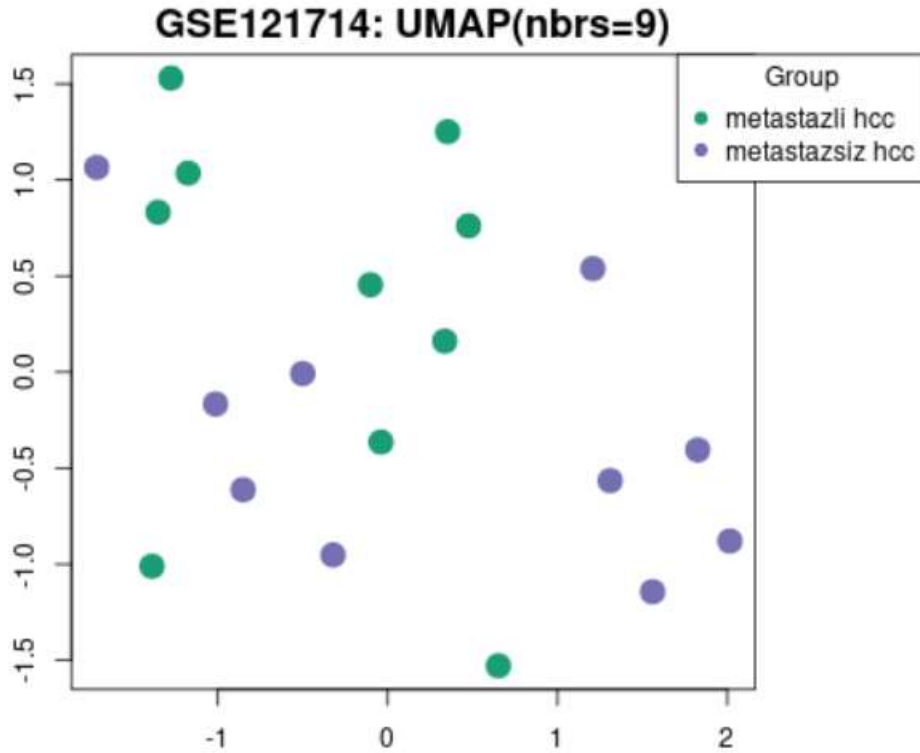
**Şekil 4.24.** Metastatik HCC ve Metastaz Yapmamış HCC Doku Örneklerine Ait Gen

Şekil 4.25'te GSE121714 veri setindeki metastatik HCC ve metastaz yapmamış HCC dokusu örneklerinin gen ekspresyon profillerine göre oluşturulan UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) analizi gösterildi. Yeşil noktaların metastatik HCC dokularını, mor noktaların ise metastaz yapmamış HCC dokularını temsil ettiği belirtildi. Grafik incelendiğinde iki grup arasında kısmi bir ayrışmanın gözlemlendiği görüldü. Bu durumun, metastatik kapasiteye sahip tümörlerin genetik profillerinde belirli farklılıkların oluştuğunu gösterdiği belirlendi. Ancak tam bir kümelenmenin olmamasının, bazı moleküler özelliklerin her iki tümör tipinde ortak olabileceğini düşündürdüğü anlaşıldı. UMAP analizinin yüksek boyutlu gen ekspresyon verisinin örnekler arası ilişkilerini iki boyutlu düzlemde başarılı bir şekilde görselleştirerek metastatik progresyona dair biyolojik sinyallerin değerlendirilmesine katkı sağladığı tespit edildi.

Yapılan diferansiyel gen ekspresyon analizi sonucunda metastatik HCC dokuları ile metastaz yapmamış HCC dokuları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık gösteren herhangi bir genin tespit edilemediği ortaya kondu. Analiz sürecinde

gen ekspresyon değişimlerini değerlendirmek amacıyla yaygın olarak kabul gören  $|\log_2FC| > 1$  ve  $\text{adj. } p < 0.05$  eşik değerleri esas alındı. Ancak bu kriterleri karşılayan hiçbir gen bulunmadı.

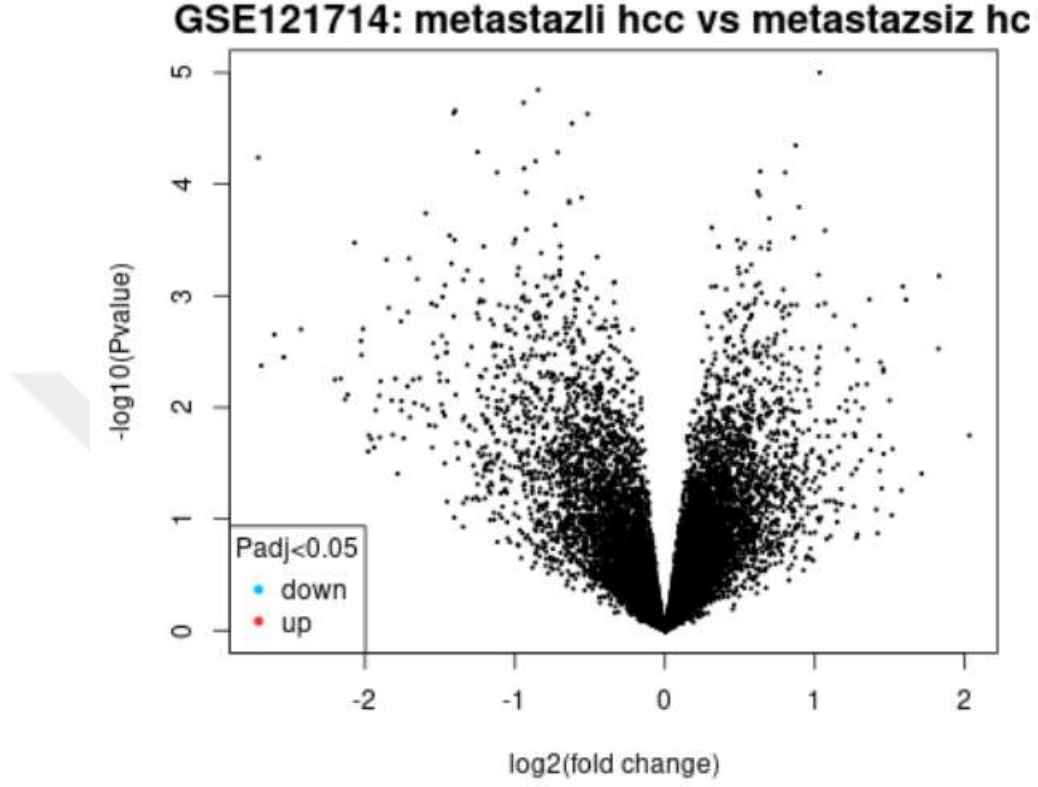
Bu sonucun, iki tümör alt tipi arasında gen ekspresyon düzeyinde açık ve belirgin bir moleküler ayrışmanın olmadığını düşündürdüğü görüldü. Bununla birlikte metastatik kapasitenin kazanımıyla ilişkili biyolojik değişikliklerin yalnızca transkripsiyonel düzeyde değil, aynı zamanda epigenetik modifikasyonlar, post-transkripsiyonel düzenlemeler, protein düzeyindeki değişiklikler ya da tümör mikroçevresine bağlı etkileşimler yoluyla gerçekleşebileceği göz önünde bulunduruldu. Ayrıca çalışmada kullanılan örnek sayısının sınırlı olmasının mevcut biyolojik farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ortaya konmasını güçleştirmiş olabileceği belirlendi.



**Şekil 4.25.** Metastatik HCC ve Metastaz Yapmamış HCC Doku Örneklerine Ait UMAP Dağılım Grafiği

Şekil 4.26’da sunulan volcano grafiğinde açık biçimde görüldüğü tespit edildi. Grafikte her bir noktanın bir geni temsil ettiği, genlerin  $\log_2$  kat değişimleri ve  $-\log_{10}(p\text{-değeri})$  ekseninde dağılımlarının gösterildiği belirtildi. Ancak belirlenen anlamlılık eşiklerini ( $|\log_2FC| > 1$  ve  $p < 0.05$ ) karşılayan hiçbir gen bulunmadığı için grafikte istatistiksel olarak anlamlı yukarı (kırmızı) veya aşağı (mavi) regüle genlere ait belirgin

bir dağılımın gözlenmediği saptandı. Tüm genlerin merkezde kümelenmiş olarak siyah noktalar şeklinde yer aldığı ve bu durumun analizde anlamlı diferansiyel ekspresyon tespit edilemediğini doğruladığı görüldü. Bu bağlamda Şekil 4.26'nın çalışmanın bu yönüne görsel bir destek sağladığı belirlendi.



**Şekil 4.26.** Metastatik HCC ve Metastaz Yapmamış HCC Dokuları Arasındaki Gen Ekspresyon Farklılıklarını Gösteren Volcano Grafiği

## 5. TARTIŞMA

PKOS'un Hepatoselüler karsinom (HCC), dünya genelinde en sık görülen primer karaciğer tümörü olup, tüm karaciğer kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. 2020 yılı verilerine göre HCC, kanser ilişkili ölümler arasında üçüncü sırada yer almakta ve dünya genelinde yıllık yaklaşık 830.000 ölüme neden olmaktadır. Bu durum HCC'yi hem yüksek insidans hem de mortalite oranları ile dikkat çeken, küresel sağlık açısından ciddi bir tehdit haline getirmektedir. Ayrıca HCC, sıklıkla kronik karaciğer hastalığı ve siroz zemininde gelişmekte; bu da erken tanıyı ve etkili tedavi yaklaşımlarını daha da zorlaştırmaktadır. Erken evrede tanı konabilen olgulara küratif tedavi seçenekleri sunulabilse de, hastaların büyük bir kısmı ileri evrede başvurduğu için prognoz genellikle kötüdür (1). HCC'nin yüksek mortalite oranı, çoğunlukla hastalığın ileri evrede tanı alması, tedaviye geç yanıt verilmesi ve yüksek nüks oranlarıyla ilişkilidir. HCC biyolojik olarak oldukça heterojen bir yapıya sahip olup; genetik, epigenetik, metabolik ve immünolojik düzeylerde karmaşık değişimlerle karakterize edilir (49). Klinik pratikte yaygın olarak kullanılan tanı yöntemleri arasında yer alan alfa-fetoprotein (AFP) düzeyleri, görüntüleme teknikleri (örneğin ultrasonografi, BT, MRG) ve biyopsi temelli yaklaşımlar, özellikle erken evre hepatoselüler karsinom (HCC) olgularında sınırlı duyarlılık göstermektedir. AFP, tüm HCC hastalarının yalnızca yaklaşık %60'ında yükselmiş düzeylerde saptanabilmekte olup, erken evrede tanısal değeri oldukça düşüktür. Görüntüleme yöntemleri ise lezyon boyutu küçükse ya da siroz zemininde maskeleniyorsa tanı koymada yetersiz kalabilmektedir. Biyopsi ise invazif bir yöntem olması ve örneklem yanlılığı riski taşıması nedeniyle her zaman tercih edilmemektedir. Tüm bu sınırlılıklar, erken tanı konulmasını zorlaştırmakta ve tedavi başarısını olumsuz etkilemektedir (93). Bu durum, hastaların küratif tedavi şansını azaltmakta ve prognozu olumsuz etkilemektedir.

Bu bağlamda, hepatoselüler karsinomun (HCC) erken evrede tanınmasına katkı sağlayabilecek, invaziv olmayan ve moleküler düzeyde duyarlılığı yüksek biyobelirteçlerin geliştirilmesi, karaciğer kanseri araştırmalarının temel hedeflerinden biri haline gelmiştir. Özellikle son yıllarda, kodlamayan RNA sınıfına ait sirküler RNA'lar (circRNA'lar), kanser biyolojisinde üstlendikleri işlevsel roller nedeniyle yoğun ilgi görmektedir. CircRNA'lar, geleneksel lineer RNA'ların aksine, back-splicing adı verilen alternatif bir süreçle oluşan kovalent kapalı halka yapısına sahiptir. Bu yapı, ribonükleaz aracılı degradasyona karşı doğal bir direnç sağlayarak, hücre içi ortamda

yüksek stabilite kazanmalarına neden olur. Bu özellikleri, onları potansiyel tanı ve prognostik biyobelirteçler olarak ön plana çıkarmaktadır (94). Ayrıca mikroRNA süngerliği, transkripsiyonel regülasyon ve protein etkileşimlerine aracılık gibi işlevsel mekanizmalar aracılığıyla gen ekspresyonunu dolaylı yoldan etkileyebilmektedirler. CircRNA'ların plazma, doku ve vücut sıvılarında stabil biçimde bulunabilmesi, onları non-invaziv tanı araçları için ideal adaylar haline getirmektedir (95).

Literatürde HCC'ye özgü circRNA imzalarının tanımlanmasına yönelik çalışmalar artmakla birlikte, bu moleküllerin metastatik evre ile ilişkili değişimlerinin sistematik olarak analiz edildiği çalışmalar hâlen sınırlıdır. Ayrıca HCC'nin heterojen yapısı göz önünde bulundurulduğunda, tümör progresyonunun evrelere özgü moleküler belirteçlerle detaylandırılması, hastalığın erken teşhisi ve evre bazlı tedavi planlaması açısından kritik öneme sahiptir. Bu çalışmada, HCC'nin ilerleyici doğasını daha iyi anlayabilmek amacıyla üç grup –normal karaciğer dokusu (N), metastaz yapmamış HCC (nonMET) ve metastatik HCC (MET)– karşılaştırılmıştır. Her bir grup, HCC progresyonunun farklı biyolojik evrelerini temsil etmektedir. Çalışmada diferansiyel ekspresyon analizleri, biyoinformatik görselleştirme yöntemleri ve sınıflandırma algoritmalarına dayalı açıklanabilir yapay zekâ (SHAP) teknikleri bir arada kullanılmıştır. Böylece hem istatistiksel anlamlılık hem de model tabanlı karar süreçleri açısından evreye özgü circRNA profilleri ayrıntılı biçimde değerlendirilmiştir.

Bu çok boyutlu yaklaşım, HCC tanı ve prognozunda kullanılabilecek potansiyel biyobelirteçlerin tespit edilmesine katkı sağlamayı, ayrıca açıklanabilir yapay zekâ yaklaşımlarıyla bu biyobelirteçlerin klinik uygulanabilirliğini artırmayı hedeflemektedir.

### **5.1. Metastatik HCC (MET) ile Normal Karaciğer Dokusu (N) Arasındaki Karşılaştırma**

Bu karşılaştırma, hepatoselüler karsinomun ileri evresini temsil eden metastatik tümör dokularıyla normal karaciğer dokusu arasında ortaya çıkan moleküler farklılıkları ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın bu bölümü, HCC'nin yalnızca klinik ya da histopatolojik olarak değil, aynı zamanda transkriptomik düzeyde de metastatik progresyona özgü bir moleküler imza taşıyıp taşımadığını değerlendirmeye yöneliktir. Bu amaç doğrultusunda, circRNA ekspresyon profilleri hem biyoinformatik analizlerle küresel düzeyde görselleştirilmiş hem de istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren transkriptler detaylı şekilde tanımlanmıştır.

İlk olarak, verilerin boyutsal indirgenmesi amacıyla kullanılan UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) algoritması, MET ve N grupları arasında net bir ayrışma olduğunu ortaya koymuştur. Elde edilen UMAP dağılımı, her iki grubun kendi içinde homojen ve birbirinden uzak kümeler oluşturduğunu göstermiştir. Bu durum, global ekspresyon profillerinin gruplar arasında anlamlı düzeyde farklılaştığını ve metastatik HCC'nin moleküler düzeyde normal karaciğer dokusundan belirgin biçimde ayrıştığını göstermektedir. Ayrıca bu ayrım, örnek bazında sınıf ayrımını mümkün kılacak kadar güçlüdür ve ileri evre HCC'ye ait biyolojik heterojenliğin ekspresyon profiline yansındığını göstermesi açısından dikkat çekicidir.

Volcano grafiği ile yapılan diferansiyel ekspresyon analizlerinde, hem yukarı regülasyon ( $\log FC > +1$ ) hem de aşağı regülasyon ( $\log FC < -1$ ) gösteren çok sayıda transkript saptanmıştır. Özellikle  $-\log_{10}(p\text{-değeri})$  düzeyinde anlamlılık gösteren genler, MET grubunun genetik profilinin normal dokudan ciddi biçimde ayrıştığını ortaya koymuştur. Bu bulgu, MD (mean-difference) grafiklerinde de desteklenmiş ve MET grubunun hem pozitif hem negatif yöne kaymış ekspresyon örüntülerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Görsel olarak belirginleşen bu dengesizlik, moleküler düzeyde HCC'nin ilerleyen evresinde aktif olan yeni biyolojik yolların ortaya çıktığına işaret etmektedir.

Biyoinformatik analizler sonucunda belirlenen yukarı ve aşağı regülasyon gösteren circRNA lardan MET grubu ile normal doku arasında anlamlı diferansiyel ekspresyon gösteren ve en çok eksprese olan toplam 20 (10 yukarı, 10 aşağı) transkript belirlenmiştir. Bunların ilk 10'u yukarı regüle edilmiş, geri kalan 10'u ise aşağı regülasyona uğramıştır. Özellikle ASCRP3006784 ( $\log FC = +3.13$ ), ASCRP3007069 ( $+2.91$ ) ve ASCRP3013015 ( $+2.80$ ) gibi transkriptler, MET grubunda yüksek düzeyde ifade edilmiş ve t-testi sonuçlarına göre istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.001$ ). Bu genlerin yukarı regülasyonu, metastatik tümör dokularında aktif hale gelen yeni sinyal yollarını, proliferatif kapasitenin artışı ve hücrel plastisitenin yükselişini yansıtır olabilir. Buna karşın, ASCRP3001547 ( $\log FC = -1.87$ ), ASCRP3007511 ( $-1.88$ ) ve ASCRP3013608 ( $-2.01$ ) gibi transkriptler, MET grubunda anlamlı derecede baskılanmıştır. Bu transkriptlerin ekspresyon düzeylerindeki belirgin azalma, tümör hücrelerinde sessizleşen ya da tümör baskılayıcı işlev gören yolların devre dışı bırakıldığını düşündürülebilir. Bu bağlamda özellikle ASCRP3001547 transkripti dikkat çekicidir; zira bu transkript, yalnızca MET grubunda değil, diğer karşılaştırmalarda da anlamlı düzeyde farklılaşmış ve potansiyel bir tümör baskılayıcı circRNA adayı olarak öne çıkmıştır.

Çalışmanın en önemli katkılarından biri, elde edilen diferansiyel ekspresyon verilerinin sadece istatistiksel olarak değil, aynı zamanda açıklanabilir makine öğrenmesi yaklaşımları ile desteklenmiş olmasıdır. Neural network modeli kullanılarak yapılan sınıflandırma işlemlerinde, SHAP (SHapley Additive exPlanations) algoritması ile her bir transkriptin modele olan katkısı sayısal olarak hesaplanmıştır. Bu analiz, modelin karar sürecinde hangi transkriptlerin ne derece etkili olduğunu açıkça göstermiştir. ASCRP3007069, ASCRP3006784 ve ASCRP3013015 gibi transkriptler, yüksek pozitif SHAP skorları ile MET sınıfının tanımlanmasında belirleyici olmuştur. Bu transkriptlerin ekspresyon düzeyleri arttıkça, modelin MET grubunu tahmin etme olasılığı da artmıştır. Öte yandan, ASCRP3001547 transkripti yüksek negatif SHAP skoru ile MET grubunun sınıflandırılmasında baskılayıcı bir rol oynamış, bu da transkriptin düşük ekspresyon düzeyinin MET grubuna ait örneklerde daha belirgin olduğunu göstermiştir.

Model tabanlı bu açıklanabilirlik, yalnızca genlerin ekspresyon düzeyine bakmakla kalmayıp, bu genlerin sınıflandırma algoritmaları içinde nasıl bir karar katkısı sunduğunu da anlamaya imkân tanımaktadır. Neural network gibi çok boyutlu ilişkileri algılayabilen algoritmaların, SHAP ile birlikte kullanılması, istatistiksel olarak anlamlı ancak biyolojik olarak yorumlanması zor transkriptlerin de potansiyel biyobelirteç adayı olarak değerlendirilmesini kolaylaştırmaktadır. Dolayısıyla, MET grubuna özgü ekspresyon farklılıklarının SHAP ile bütüncül olarak değerlendirilmesi, hem moleküler tanı hem de evreye özgü terapi planlaması açısından değerli bilgiler sunmaktadır.

Bu bütüncül değerlendirme sonucunda, metastatik HCC'nin yalnızca klinik açıdan değil, aynı zamanda moleküler biyobelirteç düzeyinde de özgün bir alt tip oluşturduğu ortaya konmuştur. MET grubunda saptanan yukarı ve aşağı regüle transkriptlerin hem tanı hem de potansiyel prognostik kullanım açısından ileri çalışmalarla biyolojik olarak doğrulanması gerekmektedir. Bu yönüyle çalışmamız, metastatik evreyi moleküler düzeyde anlamlandırmaya yönelik bütüncül bir model önererek literatüre özgün bir katkı sunmaktadır.

## **5.2. Metastaz Yapmamış HCC (nonMET) ile Normal Karaciğer Dokusu (N) Arasındaki Karşılaştırma**

Metastaz yapmamış hepatoselüler karsinom (nonMET) ile normal karaciğer dokusu (N) arasındaki karşılaştırma, tümöral progresyonun erken evresinde ortaya çıkan moleküler yeniden yapılanmayı ortaya koymak açısından büyük önem taşımaktadır. Biyoinformatik değerlendirmeler sonucunda elde edilen UMAP analizi, nonMET

grubunun normal dokudan belirli ölçüde ayrıştığını, ancak bu ayrışmanın metastatik evredeki kadar net olmadığını göstermiştir. Bu bulgu, HCC'nin erken evresinde circRNA düzeyinde farklılaşmanın başladığını ancak henüz belirgin bir moleküler fenotipe dönüşmediğini düşündürmektedir. Volcano ve mean-difference (MD) grafikleri, özellikle yukarı regülasyon yönünde farklılaşma gösteren birçok transkriptin varlığına işaret etmiş, bu da hücresel proliferasyon, RNA stabilizasyonu ve epigenetik yeniden programlama gibi mekanizmaların erken evrede aktive olduğunu düşündürmüştür.

Biyoinformatik analizler sonucunda, metastaz yapmamış HCC (nonMET) doku örneklerinde normal karaciğer dokularına kıyasla anlamlı düzeyde diferansiyel ekspresyon gösteren toplam 20 circRNA transkripti (10 yukarı regüle, 10 aşağı regüle) belirlenmiştir. Bu transkriptler, logFC (log fold change) değerlerine ve istatistiksel anlamlılık düzeylerine göre seçilmiş olup, HCC'nin erken evresine özgü moleküler değişimlerin anlaşılmasında önemli ipuçları sunmaktadır.

Özellikle ASCRP3003243, ASCRP3001523, ASCRP3007600, ASCRP3007524 ve ASCRP3007299 gibi transkriptler; hem yüksek ortalama ekspresyon seviyeleri hem de  $p < 0.05$  düzeyindeki anlamlılıkları ile dikkat çekmektedir. Bu genlerin logFC değerleri genellikle +1.5 ile +2.5 aralığında olup, nonMET grubunda yukarı regülasyona uğradıklarını göstermektedir. Bu durum, nonMET örneklerinde baskılanmadan ziyade belirgin bir genetik aktivasyonun söz konusu olduğunu ve tümör hücrelerinin erken evrede daha çok transkripsiyonel yeniden yapılanma ve biyolojik mobilizasyon eğiliminde olduğunu ortaya koymaktadır.

Diğer yandan, aşağı regülasyona uğrayan transkriptler arasında ASCRP3001458, ASCRP3009894 ve ASCRP3005258 gibi moleküller ön plana çıkmakta; bu transkriptlerin negatif yönlü yüksek logFC değerleri, normal karaciğer dokusuna kıyasla nonMET grubunda belirgin ekspresyon kaybı yaşandığını göstermektedir. Bu aşağı regüle transkriptlerin bazıları, potansiyel tümör baskılayıcı özellikler taşıyor olabilir ve bu yönleriyle HCC patogenezinin erken evresinde susturulan yolları temsil ediyor olabilir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, nonMET grubunda gözlenen bu ekspresyonel farklılıklar, erken evre hepatoselüler karsinomda circRNA düzeyinde gerçekleşen özgün transkripsiyonel yeniden yapılanmanın bir göstergesi olarak yorumlanabilir. Bu farklılıklar aynı zamanda hem tanısal biyobelirteç keşfi açısından hem de HCC'nin progresyon dinamiklerinin anlaşılması açısından önemli bir temel oluşturmaktadır.

Yapay zekâ temelli sınıflandırma modelinde SHAP (SHapley Additive exPlanations) analizi kullanılarak modelin nonMET sınıfını tanımlarken hangi transkriptlere dayandığı anlaşılır hâle getirilmiştir. Neural network modeli ile yapılan bu analizde, ASCRP3001458, ASCRP3005903, ASCRP3003243, ASCRP3007299 ve ASCRP3007524 gibi transkriptler yüksek SHAP önem skorları ile modelin karar sürecine en fazla katkı sağlayan değişkenler olarak belirlenmiştir. Özellikle ASCRP3001458 ve ASCRP3005903, sınıflandırma sürecinde en yüksek SHAP katkılarına sahip olup, erken evre tümöral dokuların ayırt edilmesinde öne çıkan moleküller arasında yer almıştır. ASCRP3003243 ise hem istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş hem de model kararlarında ilk sıralarda yer alarak, çok yönlü bir biyobelirteç potansiyeli taşımıştır. Ayrıca ASCRP3001547 transkripti, hem MET hem de nonMET gruplarında önemli roller üstlenerek modelin karar dinamiklerine çift yönlü katkı sağlamış ve sınıflandırma algoritmalarında güçlü bir ayırt edici olarak karşımıza çıkmıştır.

Bu bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, nonMET grubuna ait yukarı regüle edilmiş transkriptlerin hem biyoinformatik hem istatistiksel hem de yapay zekâ temelli analizlerle uyumlu şekilde öne çıktığı görülmektedir. Bu durum, HCC'nin erken evresinde devreye giren moleküler ağların tanımlanmasında circRNA'ların güçlü adaylar olabileceğini göstermekte; özellikle ASCRP3001458, ASCRP3003243 ve ASCRP3007524 gibi transkriptlerin, erken tanıya yönelik biyobelirteç araştırmalarında öncelikli olarak değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

### **5.3. Metastatik HCC (MET) ile Metastaz Yapmamış HCC (nonMET) Arasındaki Karşılaştırma**

Bu karşılaştırma, hepatoselüler karsinomun metastatik evreye geçişinde circRNA ekspresyon düzeyinde anlamlı bir moleküler değişim olup olmadığını değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Ancak elde edilen sonuçlar, MET ve nonMET grupları arasında beklenenin aksine belirgin bir farklılaşma olmadığını ortaya koymuştur.

Biyoinformatik analizler kapsamında gerçekleştirilen UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) görselleştirmesi, bu iki grup arasında net bir ayrım sunmamıştır. MET ve nonMET örnekleri gen ekspresyon uzayında birbirine oldukça yakın ve karışık biçimde dağılmış, bu da her iki grubun global ekspresyon profilleri açısından benzer olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, volcano grafiğinde log2 fold değişim (logFC) ve  $-\log_{10}(\text{p-değeri})$  değerlerine göre anlamlı düzeyde yukarı veya aşağı regüle edilen herhangi bir circRNA transkripti saptanmamıştır. MD (mean-difference)

grafisinde de benzer şekilde dikkat çeken bir yönelim ya da diferansiyasyon bulunmamıştır. Bu durum, metastatik progresyonun genel circRNA profili üzerinde belirgin bir iz bırakmadığını düşündürmektedir.

İstatistiksel değerlendirme sonuçları da bu bulguları destekler niteliktedir. MET ile nonMET grupları arasında yapılan diferansiyel ekspresyon analizinde, hem istatistiksel anlamlılık ( $p < 0.05$ ) hem de biyolojik anlamlılık kriteri ( $|\log_2FC| > 1$ ) ile değerlendirildiğinde herhangi bir transkriptin anlamlı şekilde yukarı veya aşağı regülasyona uğradığı gösterilememiştir. Bu nedenle, bu karşılaştırma için 10 yukarı ve 10 aşağı regüle edilen gen listesi oluşturulamamıştır. Veriler, MET ve nonMET grupları arasında circRNA düzeyinde belirgin ekspresyon farklarının bulunmadığını, dolayısıyla metastatik ilerlemenin bu seviyede saptanabilir bir biyobelirteç imzası üretmediğini göstermektedir.

Bu sonuçlar, metastatik progresyonun daha çok genetik mutasyonlar, epigenetik düzenleyiciler, mikroRNA etkileşimleri veya proteom düzeyinde ortaya çıkan değişikliklerle şekillendiğini düşündürmektedir. Ayrıca, circRNA'ların metastazla ilişkili rollerinin dokuya özel, lokalize veya geçici olabileceği; bu nedenle toplu RNA profillemeye çalışmalarında yeterince ayırtılabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Dolayısıyla, bu çalışmada elde edilen bulgular, HCC'nin metastatik evresine geçişinin circRNA ekspresyon düzeyinde anlamlı bir imza üretmediğini; ancak bu durumun, farklı moleküler mekanizmalarla desteklenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Sirküler RNA'lar (circRNA'lar), hepatoselüler karsinom (HCC) biyolojisinde önemli düzenleyici moleküller olarak tanımlanmış ve son yıllarda birçok çalışmada gen ekspresyonunun regülasyonu, tümör progresyonu, metastaz ve kemoterapi direnci gibi süreçlerde rol aldıkları gösterilmiştir.

Huang ve arkadaşları (2017) (96), hepatit B virüsü (HBV) ile ilişkili HCC hastalarından elde ettikleri doku örneklerinde gerçekleştirdikleri kapsamlı bir mikroarray analizi ile, circRNA\_100338'in hem tümör dokularında anlamlı şekilde yukarı regüle olduğunu hem de bu yüksek ekspresyonun artmış metastatik potansiyel ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) analizleri ile doğrulanan bu bulgular, hastalık progresyonunda circRNA\_100338'in potansiyel bir regülatör olduğunu ortaya koymaktadır. Moleküler düzeyde yapılan işlevsel analizler, circRNA\_100338'in miR-141-3p adlı mikroRNA'yı "süngerleyerek" hedef aldığını göstermiştir. Bu etkileşim, hücre içi sinyal yolağında tümörle ilişkili genlerin (örneğin EMT ile ilgili genlerin) baskılanmadan aktif kalmasını sağlamakta ve bu da invazyon ve migrasyon kapasitesinin

artmasına neden olmaktadır. Diğer bir ifadeyle, circRNA\_100338, HCC hücrelerinde miR-141-3p'nin baskılayıcı etkisini azaltarak tümör hücrelerinin daha agresif bir fenotipe geçmesine aracılık etmektedir. Dikkat çeken bir diğer bulgu ise, bu molekülün yüksek düzeyde eksprese olduğu hastaların daha düşük genel sağkalım sürelerine sahip olmasıdır. Bu durum, circRNA\_100338'in yalnızca biyolojik bir aktör değil, aynı zamanda prognostik bir biyobelirteç olarak da değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır. Hem tanı hem de hasta takibi açısından değerlendirildiğinde, bu molekülün HCC'ye özel bir moleküler imza sunabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak, circRNA\_100338, hepatoselüler karsinomda tümör progresyonunun ve metastazının moleküler mekanizmalarını anlamada anahtar bir rol oynamakta olup, aynı zamanda yeni nesil tanı ve tedavi yaklaşımları için hedeflenebilir bir aday olarak öne çıkmaktadır.

Hepatoselüler karsinom (HCC) gibi malignitelerde, hücresel proliferasyonun ve tümör progresyonunun arkasında yatan moleküler mekanizmalar son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Bu bağlamda, circMTO1 adlı sirküler RNA, hepatoselüler karsinom biyolojisinde tümör baskılayıcı bir molekül olarak tanımlanmıştır. Han ve arkadaşları (2017) (16) tarafından gerçekleştirilen kapsamlı bir çalışmada, circMTO1'in HCC dokularında anlamlı şekilde düşük ekspresyon düzeyine sahip olduğu gösterilmiş ve bu molekülün hücresel düzeyde tümör gelişimini baskılayıcı yönde işlev gördüğü ortaya konmuştur. Moleküler mekanizma düzeyinde, circMTO1'in miR-9 adlı mikroRNA'yı "sünger" gibi bağladığı, yani bu miRNA'nın hedef genleri susturmasını engellediği gösterilmiştir. miR-9'un bilinen hedeflerinden biri olan p21 (CDKN1A), hücre döngüsünün negatif düzenleyicisidir. Dolayısıyla, circMTO1'in miR-9'u baskılaması sonucunda p21'in ekspresyonu artmakta; bu da hücre döngüsünün G1/S geçişinde blokaj oluşturarak proliferasyonu baskılamaktadır. Yapılan in vitro analizlerde, circMTO1 ekspresyonunun artırılmasının HCC hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve invazyon kapasitesini anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca in vivo fare modellerinde yapılan çalışmalar, circMTO1'in tümör oluşumunu baskılayıcı etkisinin sadece hücre kültürüyle sınırlı kalmadığını, canlı organizmalarda da benzer etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Klinik örnekler üzerinde yapılan korelasyon analizlerinde, düşük circMTO1 ekspresyonuna sahip HCC hastalarının genel sağkalım süresinin daha kısa olduğu ve bu molekülün seviyesinin hastalık progresyonu ile ters orantılı olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, circMTO1'in hem biyolojik hem de klinik düzeyde HCC gelişimini baskılayan güçlü bir moleküler düzenleyici olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, circMTO1; miRNA süngerliği, tümör baskılayıcı gen aktivasyonu ve proliferasyon kontrolü gibi

mekanizmalar üzerinden HCC'nin gelişimini sınırlayan önemli bir moleküldür. Bu özellikleri sayesinde, tanı, prognostik değerlendirme ve terapötik hedefleme açısından değerlendirilebilecek yeni nesil biyobelirteç adaylarından biri olarak kabul edilmektedir.

Zhang ve arkadaşları (2018) (97) tarafından yayımlanan çalışmada, HCC hastalarından elde edilen doku ve serum örneklerinde circRNA\_104075'in anlamlı düzeyde yukarı regüle olduğu gösterilmiştir. Hem HCC hücre hatlarında hem de klinik hasta örneklerinde yapılan kantitatif RT-PCR analizleri ile doğrulanan bu bulgu, bu molekülün HCC'ye özgü ekspresyon paternine sahip olabileceğini düşündürmektedir. Aynı çalışmada yapılan ROC analizleri, circRNA\_104075'in ayırt edici tanısal gücünün yüksek olduğunu (AUC = 0.973) göstermiştir. Bu da onu, potansiyel bir non-invaziv tanı biyobelirteci haline getirmektedir. Moleküler düzeyde ise, circRNA\_104075'in HNF4 $\alpha$  (Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha) tarafından transkripsiyonel olarak regüle edildiği ve bu molekülün, YAP (Yes-associated protein) mRNA'sının stabilitesini artırarak Hippo yolaklarını bypass ettiği gösterilmiştir. YAP, hücre proliferasyonu, anti-apoptoz mekanizmaları ve tümör büyümesiyle ilişkili bir transkripsiyonel ko-aktivator olup, normal koşullarda Hippo sinyal yolağı tarafından baskılanmaktadır. Ancak circRNA\_104075'in YAP mRNA'yı stabilize etmesi, bu baskılayıcı mekanizmanın devre dışı kalmasına ve YAP aracılığıyla onkogenik süreçlerin aktifleşmesine yol açmaktadır. Bu, literatürde circRNA'ların yalnızca miRNA süngerliği yoluyla değil, aynı zamanda mRNA stabilizasyonu gibi alternatif moleküler mekanizmalarla da tümör progresyonuna katkı sağladığını gösteren güçlü bir kanıttır. In vitro deneylerde circRNA\_104075'in susturulması, HCC hücrelerinde proliferasyonun ve invazyonun anlamlı şekilde azaldığını göstermiştir. Ayrıca nude farelerde yapılan in vivo tümör modellemesi deneylerinde, bu molekülün aşırı ekspresyonunun tümör hacmini ve metastatik potansiyeli anlamlı ölçüde artırdığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular, yalnızca biyolojik etkiyi doğrulamakla kalmamış, aynı zamanda molekülün fonksiyonel olarak tümör gelişiminde kritik bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Klinik anlamda bakıldığında, circRNA\_104075'in hem HCC tanısında non-invaziv biyobelirteç olarak kullanılabilmesi hem de tedavi hedefi olarak değerlendirilebilecek moleküler bir giriş kapısı sunması, bu molekülün translasyonel potansiyelini artırmaktadır. Hippo-YAP eksenine bağlı kanserlerde, özellikle de YAP'ın baskılanmasının güç olduğu durumlarda, circRNA\_104075'e yönelik hedefli tedaviler geliştirmek, gelecekte umut vadeden bir strateji olabilir.

Gong ve arkadaşları (2018) (98) tarafından yayımlanan çalışmada, circZEB1.33'ün hem HCC doku örneklerinde hem de hasta serumlarında anlamlı şekilde yukarı regüle olduğu gösterilmiştir. Kontrollere kıyasla bu molekülün ekspresyon düzeyindeki artış, HCC patogenezi ile ilişkilendirilmiş ve klinik olarak ileri evre hastalarda daha belirgin bulunmuştur. Ayrıca, yüksek circZEB1.33 düzeyleri, daha büyük tümör hacmi, kötü diferansiyasyon ve daha kısa sağkalım süreleri ile pozitif korelasyon göstermiştir. Bu durum, bu molekülün yalnızca biyolojik bir aktör değil, aynı zamanda tanısal ve prognostik bir biyobelirteç adayı olduğunu göstermektedir. Mekanik olarak, circZEB1.33'ün miR-200a-3p'yi süngerlediği, yani bu mikroRNA ile bağlanarak onu fonksiyonel olarak etkisiz hale getirdiği gösterilmiştir. Normal koşullarda, miR-200a-3p CDK6 (Cyclin-dependent kinase 6) mRNA'sını hedefleyerek ekspresyonunu baskılar. Ancak circZEB1.33'ün miR-200a-3p'yi absorbe etmesi, CDK6 mRNA'nın translasyonunu artırmakta ve sonuç olarak hücre döngüsünün G1/S faz geçişini hızlandırmaktadır. Bu durum, tümör hücrelerinin daha hızlı bölünmesine, daha yüksek proliferasyon oranlarına ve dolayısıyla daha agresif tümör davranışlarına yol açmaktadır. In vitro düzeyde yapılan işlevsel analizlerde, circZEB1.33'ün ekspresyonunun artırılmasının HCC hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu artırdığı; buna karşın susturulmasının bu süreçleri anlamlı şekilde inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, CDK6 protein düzeyinin doğrudan bu molekül üzerinden regüle edildiği Western blot ve qPCR analizleriyle doğrulanmıştır. In vivo fare modellerinde yapılan tümör nakli deneylerinde ise, circZEB1.33 ekspresyonunun yükseltilmesinin tümör büyüklüğünü ve hücre çoğalmasını artırdığı saptanmıştır. Bu sonuçlar, circZEB1.33'ün miRNA süngerliği aracılığıyla tümör hücre döngüsünü ve proliferasyonunu yönettiğini, dolayısıyla hem moleküler tanı hem de hedeflenebilir tedavi stratejileri için güçlü bir aday olduğunu göstermektedir. Ayrıca CDK6 gibi hücre döngüsüyle ilişkili hedeflerin circRNA'lar üzerinden kontrol edilebiliyor olması, kanser biyolojisinde yeni düzenleyici katmanların tanımlanmasına da önemli katkılar sunmaktadır.

Bu tez kapsamında da yapılan analizler, hepatoselüler karsinomun farklı evrelerini temsil eden doku grupları (normal, metastaz yapmamış ve metastatik) arasında circRNA ekspresyon düzeyinde meydana gelen değişimleri ortaya koymayı amaçlamıştır. Biyoinformatik yöntemler, istatistiksel değerlendirmeler ve açıklanabilir yapay zekâ yaklaşımları bir arada kullanılarak, hem erken evre hem de ileri evre HCC'ye özgü potansiyel moleküler imzalar tanımlanmıştır.

Normal doku ile HCC dokuları arasındaki karşılaştırmalarda anlamlı düzeyde yukarı ve aşağı regüle edilen çok sayıda transkript saptanmış; özellikle bazı circRNA'lar, hem istatistiksel hem de model tabanlı analizlerde öne çıkarak biyobelirteç adayı olarak değerlendirilmiştir. Öte yandan, metastatik HCC ile metastaz yapmamış HCC grubu arasında belirgin bir ekspresyon farklılığı gözlenmemiştir. Bu durum, metastatik progresyonun circRNA düzeyinde iz bırakmadığını; buna karşın erken evrede başlayan transkripsiyonel yeniden yapılanmanın, HCC'nin karakteristiğini belirlemede daha önemli olduğunu göstermektedir.

Genel olarak, elde edilen bulgular circRNA'ların HCC'nin erken tanısı ve moleküler alt tiplenmesi açısından değerli bilgiler sunduğunu; açıklanabilir makine öğrenmesi modellerinin ise bu biyobelirteçlerin işlevsel önemini anlamada güçlü bir destek aracı olduğunu ortaya koymuştur.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, hepatoselüler karsinomun normal karaciğer dokusu, metastaz yapmamış (nonMET) ve metastatik (MET) evreleri arasında circRNA ekspresyon düzeyindeki değişiklikler kapsamlı biçimde analiz edilmiştir. Normal dokuya kıyasla hem nonMET hem de MET gruplarında anlamlı düzeyde yukarı ve aşağı regülasyona uğrayan circRNA'lar belirlenmiş; bu transkriptlerden bazıları potansiyel biyobelirteç adayı olarak öne çıkmıştır. Hem MET hem de nonMET gruplarında yüksek logFC ve SHAP katkı skorlarına sahip bazı transkriptler, ilgili evreye özgü moleküler imzaların varlığını ortaya koymuştur. Buna karşın, MET ile nonMET grupları arasında anlamlı bir ekspresyon farkı saptanmamış, bu da metastatik geçişin circRNA düzeyinde sınırlı bir etki yarattığını düşündürmüştür. Sonuç olarak, circRNA'lar özellikle HCC'nin erken evresinde tanı ve sınıflandırma açısından önemli biyobelirteç adayları sunmakta; açıklanabilir yapay zekâ yaklaşımları ise bu biyobelirteçlerin klinik değerini anlamada güçlü destek sağlamaktadır. Çalışma ile ilgili önerilerimiz ise şu şekildedir:

- Biyolojik doğrulama gereklidir: Bu çalışmada saptanan potansiyel biyobelirteç adayı circRNA'ların klinik geçerliliğinin sağlanabilmesi için, fonksiyonel deneylerle (in vitro/in vivo) biyolojik doğrulama yapılması önerilir.
- Daha büyük ve çeşitli hasta gruplarıyla çalışma yapılmalı: Bulguların genellenebilirliğini artırmak adına, farklı etiyolojik alt tipleri ve evreleri içeren geniş örneklemli çalışmalara ihtiyaç vardır.
- Longitudinal takip verileri entegre edilmelidir: Hastalık progresyonunun zamana yayılı etkilerini anlayabilmek için, circRNA ekspresyonunun seri biyopsilerle izlenmesi faydalı olabilir.
- Multimodal analizler yapılmalı: circRNA'lar ile birlikte miRNA, mRNA, lncRNA, proteom ve epigenetik verilerin entegre edildiği çok katmanlı sistem biyolojisi analizleri, daha kapsamlı biyobelirteç panellerinin ortaya konmasına olanak sağlayabilir.
- Klinik karar destek sistemlerinde kullanımı araştırılmalıdır: SHAP gibi açıklanabilirlik algoritmaları ile desteklenen bu tür modellerin, tanı ve evreleme süreçlerinde hekim destekli karar sistemlerinde uygulanabilirliği test edilmelidir.

## KAYNAKLAR

1. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):6.
2. McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2021;73 Suppl 1(Suppl 1):4-13.
3. Valiante M, Grammatico P. Molecular and Genetic Mechanisms of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatocellular Carcinoma: Springer*; 2022. p. 11-7.
4. Lin H-Y, Jeon A-J, Chen K, Lee CJM, Wu L, Chong S-L, et al. The epigenetic basis of hepatocellular carcinoma – mechanisms and potential directions for biomarkers and therapeutics. *Br J Cancer*. 2025;132(10):869-87.
5. Bueloni B, de Barrena MGF, Avila MA, Bayo J, Mazzolini G. Epigenetic mechanisms involved in hepatocellular carcinoma development and progression. *eGastroenterology*. 2025;3(2).
6. Lee DH. Recent advances and issues in imaging modalities for hepatocellular carcinoma surveillance. *J Liver Cancer*. 2025;25(1):31-40.
7. Maung ST, Tanpowpong N, Satja M, Treeprasertsuk S, Chaiteerakij R. MRI for hepatocellular carcinoma and the role of abbreviated MRI for surveillance of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2024;39(10):1969-81.
8. Singal A. Emerging Strategies for Hepatocellular Carcinoma Surveillance. *Gastroenterology & Hepatology*. 2024;20(9):560.
9. Haj Ali S, Alqato SI, Almansi AM, Haj Ali NS, Amaireh MA. Hepatocellular Carcinoma: The Search for an Optimal Screening Test. *Middle East J Dig Dis*. 2025;17(1):31-9.
10. Pisignano G, Michael DC, Visal TH, Pirlog R, Lodomery M, Calin GA. Going circular: history, present, and future of circRNAs in cancer. *Oncogene*. 2023;42(38):2783-800.
11. Chen LL. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(8):475-90.
12. Hwang HJ, Kim YK. Molecular mechanisms of circular RNA translation. *Experimental & Molecular Medicine*. 2024;56(6):1272-80.
13. Liu Z, Yang F, Xiao Z, Liu Y. Review of novel functions and implications of circular RNAs in hepatocellular carcinoma. *Front Oncol*. 2023;13:1093063.

14. Zhang Y, Wang Y. Circular RNAs in hepatocellular carcinoma: emerging functions to clinical significances. *Front Oncol.* 2021; 11: 667428. 2021.
15. Li Y, Zheng Q, Bao C, Li S, Guo W, Zhao J, et al. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis. *Cell Research.* 2015;25(8):981-4.
16. Han D, Li J, Wang H, Su X, Hou J, Gu Y, et al. Circular RNA circMTO1 acts as the sponge of microRNA-9 to suppress hepatocellular carcinoma progression. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2017;66(4):1151-64.
17. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409(6822):860-921.
18. Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science (New York, NY).* 2003;300(5617):286-90.
19. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS.* 1977;74(12):5463-7.
20. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9:387-402.
21. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016;17(6):333-51.
22. van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, Thermes C. The Third Revolution in Sequencing Technology. *TIG.* 2018;34(9):666-81.
23. Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE. Long-read human genome sequencing and its applications. *Nat Rev Genet.* 2020;21(10):597-614.
24. Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods.* 2009;6(5):377-82.
25. Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat Biotechnol.* 2017;35(9):833-44.
26. Head SR, Komori HK, LaMere SA, Whisenant T, Van Nieuwerburgh F, Salomon DR, et al. Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. *BioTechniques.* 2014;56(2):61-4, 6, 8, passim.
27. Salzman J, Gawad C, Wang PL, Lacayo N, Brown PO. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PloS one.* 2012;7(2):e30733.
28. Shendure J, Aiden EL. The expanding scope of DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 2012;30(11):1084-94.

29. Ashley EA. Towards precision medicine. *Nat Rev Genet.* 2016;17(9):507-22.
30. Manolio TA, Chisholm RL, Ozenberger B, Roden DM, Williams MS, Wilson R, et al. Implementing genomic medicine in the clinic: the future is here. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics.* 2013;15(4):258-67.
31. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526(7571):68-74.
32. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science (New York, NY).* 2013;339(6127):1546-58.
33. Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KR, Ozenberger BA, Ellrott K, et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet.* 2013;45(10):1113-20.
34. Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature.* 2020;578(7793):82-93.
35. Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science (New York, NY).* 2017;355(6330):1152-8.
36. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(4):223-38.
37. Knoppers BM. Framework for responsible sharing of genomic and health-related data. *The HUGO journal.* 2014;8(1):3.
38. Kaye J, Whitley EA, Lund D, Morrison M, Teare H, Melham K. Dynamic consent: a patient interface for twenty-first century research networks. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(2):141-6.
39. Knoppers BM. Framework for responsible sharing of genomic and health-related data. *The HUGO journal.* 2014;8(1):3.
40. Gymrek M, McGuire AL, Golan D, Halperin E, Erlich Y. Identifying personal genomes by surname inference. *Science (New York, NY).* 2013;339(6117):321-4.
41. Platt J, Bollinger J, Dvoskin R, Kardia SL, Kaufman D. Public preferences regarding informed consent models for participation in population-based genomic research. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics.* 2014;16(1):11-8.
42. Green RC, Berg JS, Grody WW, Kalia SS, Korf BR, Martin CL, et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med.* 2013;15(7):565-74.

43. Kaye J, Whitley EA, Lund D, Morrison M, Teare H, Melham K. Dynamic consent: a patient interface for twenty-first century research networks. *European journal of human genetics : EJHG*. 2015;23(2):141-6.
44. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.
45. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2016;64(1).
46. El-Serag HB. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2012;142(6):1264-73.e1.
47. Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, Alexandrov LB, Calderaro J, Rebouissou S, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet*. 2015;47(5):505-11.
48. Galle PR, Forner A, Llovet JM, Mazzaferro V, Piscaglia F, Raoul J-L, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2018;69(1):182-236.
49. Villanueva A. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2019;380(15):1450-62.
50. Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*. 2018;391(10127):1301-14.
51. Visscher PM, Montgomery GW. Genome-wide association studies and human disease: from trickle to flood. *Jama*. 2009;302(18):2028-9.
52. Ngamruengphong S, Patel T. Molecular evolution of genetic susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci*. 2014;59(5):986-91.
53. Munirajan AK, Ando K, Mukai A, Takahashi M, Suenaga Y, Ohira M, et al. KIF1Bbeta functions as a haploinsufficient tumor suppressor gene mapped to chromosome 1p36.2 by inducing apoptotic cell death. *J Biol Chem*. 2008;283(36):24426-34.
54. Yeh IT, Lenci RE, Qin Y, Buddavarapu K, Ligon AH, Leteurtre E, et al. A germline mutation of the KIF1B beta gene on 1p36 in a family with neural and nonneural tumors. *Hum Genet*. 2008;124(3):279-85.
55. Schlisio S, Kenchappa RS, Vredeveld LC, George RE, Stewart R, Greulich H, et al. The kinesin KIF1Bbeta acts downstream from EglN3 to induce apoptosis and is a potential 1p36 tumor suppressor. *Genes & development*. 2008;22(7):884-93.

56. Abbas Z, Yakoob J, Umer MA, Abbas M, Hamid S. Interferon lambda-3 polymorphism and response to pegylated interferon in patients with hepatitis D. *Antivir Ther.* 2015;20(5):529-33.
57. Karatayli SC, Ulger ZE, Ergul AA, Keskin O, Karatayli E, Albayrak R, et al. Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-10, interferon-gamma and vitamin D receptor gene polymorphisms in patients with chronic hepatitis delta. *J Viral Hepat.* 2014;21(4):297-304.
58. Yilmaz E, Baran B, Soyer OM, Onel M, Onel D, Ormeci AC, et al. Effects of polymorphisms in interferon  $\lambda$  3 (interleukin 28B) on sustained virologic response to therapy in patients with chronic hepatitis D virus infection. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association.* 2014;12(10):1753-8.
59. Zhang H, Zhai Y, Hu Z, Wu C, Qian J, Jia W, et al. Genome-wide association study identifies 1p36.22 as a new susceptibility locus for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers. *Nat Gen.* 2010;42(9):755-8.
60. Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, et al. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. *BMC medical genetics.* 2012;13:47.
61. Yang SZ, Wang JT, Yu WW, Liu Q, Wu YF, Chen SG. Downregulation of KIF1B mRNA in hepatocellular carcinoma tissues correlates with poor prognosis. *World J Gastroenterol.* 2015;21(27):8418-24.
62. Su C, Lin Y, Niu J, Cai L. Association between polymorphisms in tumor suppressor genes and oncogenes and risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in an HCC epidemic area within the Han Chinese population. *Medical oncology (Northwood, London, England).* 2014;31(12):356.
63. Yan H, Bu P. Non-coding RNA in cancer. *Essays Biochem.* 2021;65(4):625-39.
64. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell.* 2003;115(7):787-98.
65. Vos PD, Leedman PJ, Filipovska A, Rackham O. Modulation of miRNA function by natural and synthetic RNA-binding proteins in cancer. *CMLS.* 2019;76(19):3745-52.
66. Kwek KY, Murphy S, Furger A, Thomas B, O'Gorman W, Kimura H, et al. U1 snRNA associates with TFIIF and regulates transcriptional initiation. *Nat Struct Mol Biol.* 2002;9(11):800-5.

67. Jeck WR, Sharpless NE. Detecting and characterizing circular RNAs. *Nat Biotechnol.* 2014;32(5):453-61.
68. Zheng Q, Bao C, Guo W, Li S, Chen J, Chen B, et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs. *Nat Commun.* 2016;7(1):11215.
69. Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu J, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA (New York, NY).* 2013;19(2):141-57.
70. Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature.* 2013;495(7441):333-8.
71. Qin M, Liu G, Huo X, Tao X, Sun X, Ge Z, et al. Hsa\_circ\_0001649: A circular RNA and potential novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers.* 2016;16(1):161-9.
72. Yu J, Xu QG, Wang ZG, Yang Y, Zhang L, Ma JZ, et al. Circular RNA cSMARCA5 inhibits growth and metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2018;68(6):1214-27.
73. Vo JN, Cieslik M, Zhang Y, Shukla S, Xiao L, Zhang Y, et al. The Landscape of Circular RNA in Cancer. *Cell.* 2019;176(4):869-81.e13.
74. Zhang Z, Gao X, Zhang Q, Li W. Constitutive activity of a spermine receptor is maintained by a single site in the C-terminal. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;526(2):389-95.
75. Topol E. Deep medicine: how artificial intelligence can make healthcare human again: Hachette UK; 2019.
76. Rajkomar A, Dean J, Kohane I. Machine learning in medicine. *N Engl J Med.* 2019;380(14):1347-58.
77. Obermeyer Z, Emanuel EJ. Predicting the future—big data, machine learning, and clinical medicine. *N Engl J Med.* 2016;375(13):1216.
78. Shickel B, Tighe PJ, Bihorac A, Rashidi P. Deep EHR: a survey of recent advances in deep learning techniques for electronic health record (EHR) analysis. *IEEE J Biomed Health.* 2017;22(5):1589-604.
79. Kourou K, Exarchos TP, Exarchos KP, Karamouzis MV, Fotiadis DI. Machine learning applications in cancer prognosis and prediction. *Comput Struct Biotechnol J.* 2015;13:8-17.

80. Jo T, Nho K, Saykin AJ. Deep learning in Alzheimer's disease: diagnostic classification and prognostic prediction using neuroimaging data. *Front Aging Neurosci.* 2019;11:220.
81. Nemati S, Holder A, Razmi F, Stanley MD, Clifford GD, Buchman TG. An Interpretable Machine Learning Model for Accurate Prediction of Sepsis in the ICU. *Crit Care Med.* 2018;46(4).
82. Pan J, Zhang C, Huang H, Zhu Y, Zhang Y, Wu S, et al. Deciphering the Prognostic and Therapeutic Value of a Gene Model Associated with Two Aggressive Hepatocellular Carcinoma Phenotypes Using Machine Learning. *J Hepatocell Carcinoma.* 2024;11:2373-90.
83. Zhang X, Yang L, Liu C, Yuan X, Zhang Y. An Artificial Intelligence Pipeline for Hepatocellular Carcinoma: From Data to Treatment Recommendations. *Int J Gen Med.* 2025;18:3581-95.
84. Duda M, Ma R, Haber N, Wall DP. Use of machine learning for behavioral distinction of autism and ADHD. *Transl Psychiatry.* 2016;6(2):e732.
85. Tjoa E, Guan C. A survey on explainable artificial intelligence (xai): Toward medical xai. *IEEE Trans Neural Netw.* 2020;32(11):4793-813.
86. Holzinger A, Langs G, Denk H, Zatloukal K, Müller H. Causability and explainability of artificial intelligence in medicine. *Wiley Interdiscip Rev: Data Min Knowl Discov* 2019;9(4):e1312.
87. Samek W, Montavon G, Lapuschkin S, Anders CJ, Müller K-R. Explaining deep neural networks and beyond: A review of methods and applications. *Proceedings of the IEEE.* 2021;109(3):247-78.
88. Wang Y, Gao Z, Zhang Y, Lu Z, Sun F. Early sepsis mortality prediction model based on interpretable machine learning approach: development and validation study. *Intern Emerg Med.* 2024:1-10.
89. Lundberg SM, Nair B, Vavilala MS, Horibe M, Eisses MJ, Adams T, et al. Explainable machine-learning predictions for the prevention of hypoxaemia during surgery. *Nat Biomed Eng.* 2018;2(10):749-60.
90. Hu C, Li L, Huang W, Wu T, Xu Q, Liu J, et al. Interpretable machine learning for early prediction of prognosis in sepsis: a discovery and validation study. *Infectious diseases and therapy.* 2022;11(3):1117-32.

91. Luo H, Xiang C, Zeng L, Li S, Mei X, Xiong L, et al. SHAP based predictive modeling for 1 year all-cause readmission risk in elderly heart failure patients: feature selection and model interpretation. *Sci Rep.* 2024;14(1):17728.
92. Laatifi M, Douzi S, Ezzine H, Asry CE, Naya A, Bouklouze A, et al. Explanatory predictive model for COVID-19 severity risk employing machine learning, shapley addition, and LIME. *Sci Rep.* 2023;13(1):5481.
93. Yang JD, Heimbach JK. New advances in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. *BMJ (Clinical research ed).* 2020;371:m3544.
94. Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted LVW, Ebbesen KK, Hansen TB, Kjems J. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nat Rev Gen.* 2019;20(11):675-91.
95. Chen L-L. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2020;21(8):475-90.
96. Huang X-Y, Huang Z-L, Xu Y-H, Zheng Q, Chen Z, Song W, et al. Comprehensive circular RNA profiling reveals the regulatory role of the circRNA-100338/miR-141-3p pathway in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *Sci Rep.* 2017;7(1):5428.
97. Zhang X, Xu Y, Qian Z, Zheng W, Wu Q, Chen Y, et al. circRNA\_104075 stimulates YAP-dependent tumorigenesis through the regulation of HNF4a and may serve as a diagnostic marker in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis.* 2018;9(11):1091.
98. Gong Y, Mao J, Wu D, Wang X, Li L, Zhu L, et al. Circ-ZEB1.33 promotes the proliferation of human HCC by sponging miR-200a-3p and upregulating CDK6. *Cancer Cell Int.* 2018;18:116.

## **EKLER**

### **EK-1. Özgeçmiş**



## **EK-2. Etik Kurul Onayı**



