



**SORAFENİB VE FAVİPİRAVİR KOMBİNASYONUNUN
HEPATOSELLÜLER KARSİNOM HÜCRELERİ
ÜZERİNE ANTİKANSER ETKİLERİNİN *IN VITRO* ANALİZLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aleyna ÖZDENİZ

Danışman

Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK

ANABİLİM DALI

Haziran 2025

Bu tez çalışması 23. FEN. BİL. 33 numaralı proje ile Afyon Kocatepe Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SORAFENİB VE FAVİPİRAVİR KOMBİNASYONUNUN
HEPATOSELLÜLER KARSİNOM HÜCRELERİ ÜZERİNE
ANTİKANSER ETKİLERİNİN *IN VITRO* ANALİZLERİ**

Aleyna ÖZDENİZ

Danışman

Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Haziran 2025

TEZ ONAY SAYFASI

Aleyna ÖZDENİZ tarafından hazırlanan “sorafenib ve Favipiravir kombinasyonunun hepatosellüler karsinom hücreleri üzerine antikanser etkilerinin *In Vitro* analizleri” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 25/06 /2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

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

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

Üye : Doç. Dr. Dilek AKYIL
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

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

.....
Prof. Dr. Bekir YALÇIN

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

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

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

beyan ederim.

25 /06/2025

Aleyna ÖZDENİZ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SORAFENİB VE FAVİPİRAVİR KOMBİNASYONUNUN HEPATOSELLÜLER KARSİNOM HÜCRELERİ ÜZERİNE ANTİKANSER ETKİLERİNİN *in vitro* ANALİZLERİ

Aleyna ÖZDENİZ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Hepatosellüler karsinom (HSK), karaciğerin en yaygın görülen malign tümörü olup, dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. Genellikle kronik karaciğer hastalıkları, hepatit virüsleri (HBV, HCV), alkol tüketimi ve siroz gibi etkenlerle ilişkilendirilen HSK'nin tedavisinde sistemik kemoterapiler sınırlı başarı sağlamaktadır. HSK tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve hedefe yönelik ilk onaylı ajan olan Sorafenib, hücre proliferasyonunu ve anjiyogenezi baskılayarak tümör büyümesini engellemekte, ancak zamanla tedaviye karşı gelişen direnç mekanizmaları ve yan etkiler nedeniyle tek başına yeterli etkinlik gösterememektedir. Bu nedenle, Sorafenib'in farklı ilaçlarla kombine kullanımı, tedavi etkinliğini artırma ve direnç gelişimini önleme açısından önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir.

Bu tez çalışmasında, antiviral ajan olarak bilinen ve RNA polimeraz inhibitörü etkisiyle ön plana çıkan Favipiravir ile Sorafenib'in birlikte kullanımının HSK üzerindeki antikanser etkileri *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Araştırmada, insan HSK hücre hattı olan HepG2 hücreleri kullanılmış ve ilaçların belirlenen dozlarda tekli ve kombine uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Uygulama sonrasında hücre canlılığı MTT testi ile ölçülmüş, genotoksik etkiler Komet testi ile değerlendirilmiş ve apoptotik genlerdeki değişimler qRT-PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemiyle analiz edilmiştir. Ayrıca, ELISA testi ile protein düzeylerindeki değişimler de incelenmiştir.

Çalışma sonuçları, Sorafenib ve Favipiravir kombinasyonunun hücre canlılığını tek başına uygulanan ilaçlara kıyasla daha anlamlı bir şekilde azalttığını ortaya koymuştur. Apoptozla ilişkili genlerden BAX, BCL-2, KASPAZ-3 ve TNF- α 'nın ekspresyon düzeylerinde anlamlı düzeyde değişiklikler gözlemlenmiş ve bu kombinasyonun apoptoz mekanizmalarını aktive ettiği belirlenmiştir. Komet testi bulguları ise kombinasyon grubunda DNA hasar düzeylerinin arttığını ve bu durumun genotoksik etkiyi işaret ettiğini göstermiştir.

Sonuç olarak, elde edilen veriler doğrultusunda Sorafenib ve Favipiravir kombinasyonunun HepG2 hücreleri üzerinde sinerjistik, sitotoksik ve antikanser etkiler oluşturduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, söz konusu kombinasyonun HSK tedavisinde yeni bir terapötik yaklaşım olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Ayrıca bu çalışma, ileriye dönük prelinik ve klinik araştırmalara temel oluşturabilecek nitelikte önemli veriler sunmaktadır.

2025, xii + 78 sayfa

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Favipiravir, Gen Ekspresyonu, Hepatosellüler Karsinom, Hücre Kültürü, Komet Testi, Sorafenib.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

IN VITRO ANALYSIS OF THE ANTICANCER EFFECTS OF SORAFENIB AND FAVIPIRAVIR COMBINATION ON HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS

Aleyna ÖZDENİZ

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common type of primary liver cancer and remains one of the leading causes of cancer-related deaths worldwide. It is frequently associated with chronic liver diseases, such as hepatitis B and C virus infections, cirrhosis, and excessive alcohol consumption. Although Sorafenib is the first FDA-approved targeted therapy for advanced HCC and has demonstrated significant efficacy in inhibiting tumor growth by targeting angiogenesis and cell proliferation pathways, its clinical effectiveness is often limited due to acquired drug resistance and adverse side effects. Therefore, combination therapies involving Sorafenib and other pharmacological agents have garnered attention as potential strategies to enhance therapeutic outcomes and overcome drug resistance.

In this study, the *in vitro* anticancer effects of the combination of Sorafenib and Favipiravir a broad-spectrum antiviral agent known for its RNA polymerase inhibitory activity were investigated using the HepG2 human HCC cell line. The cells were treated with Sorafenib and Favipiravir both individually and in combination at predetermined doses and durations. Cell viability was evaluated using the MTT assay, while genotoxic effects were assessed through the Comet assay. Furthermore, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed to analyze changes in the expression levels of apoptosis-related genes (BAX, BCL-2, CASPASE-3, TNF- α), and protein-level changes were examined using ELISA.

The results demonstrated that the Sorafenib and Favipiravir combination significantly reduced cell viability compared to monotherapies, indicating a synergistic cytotoxic effect. The combination also induced considerable DNA damage and significantly altered the expression levels of genes involved in apoptotic pathways, promoting programmed cell death. Comet assay findings supported increased genotoxicity in the combination group, aligning with elevated apoptotic responses at both gene and protein levels.

In conclusion, the combination of Sorafenib and Favipiravir exhibited notable synergistic, cytotoxic, and anticancer effects on HepG2 cells in vitro. These findings suggest that this drug combination may serve as a promising therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma and provides a foundation for further preclinical and clinical studies.

2025, xii + 78 pages

Keywords: Apoptosis, Cell Culture, Comet Assay, Favipiravir, Gene Expression, Hepatocellular Carcinoma, Sorafenib.

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, akademik açıdan yetiştirmemi sağlayan, her konuda fikirlerime değer veren, tüm zorluklara rağmen pes etmeden yoluma devam etmemde bana yol gösteren, yardımlarını esirgemeyen kıymetli danışman hocam Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım esnasında şen şakrak güler yüzlü, hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren değerli hocalarım Doç. Dr. Dilek AKYIL'a ve Doç. Dr Arzu ÖZKARA'ya çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecini beraber geçirdiğim ve zorluklara birlikte göğüs gerdiğim, bu süreçte her zaman yanımda olan ve her zaman yardımcı olan meslektaşlarım, arkadaşlarım Ayşegül GEDİK'e, Zekiye HAZAR'a ve Beyza ARIKAN'a çok teşekkür ederim.

Hayatımın her anında beni destekleyen ve bana sonsuz güvenen, aldığım her kararda koşulsuz arkamda duran, beni koşulsuz seven, onlara sahip olduğum için kendimi daima dünyanın en şanslı kişisi olarak atfetmemi sağlayan yol göstericilerim biricik babam Ahmet ÖZDENİZ, annem Filiz ÖZDENİZ'e ve her zaman yanımda olup bana yoldaş olan yüzümü güldüren destekçim, motivasyon kaynağı kardeşim Halil ÖZDENİZ'e çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını 23. FEN. BİL. 33 nolu proje ile destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

Aleyna ÖZDENİZ
Afyonkarahisar 2025

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	4
2.1 Hepatosellüler Karsinoma.....	4
2.1.1 Hepatosellüler Karsinomanın Moleküler Mekanizması	6
2.1.2 Hepatosellüler Karsinomda Genetik ve Epigenetik Değişiklikler.....	7
2.1.3 Hepatosellüler Karsinomun Progresyonu ve Metastazı.....	9
2.1.4 Hepatosellüler Karsinom Tedavisinde Kombinasyon Tedavilerinin Rolü.....	9
2.2 HepG2 Hücre Hattı	10
2.3 Sorafenib	12
2.3.1 Sorafenib'in Kimyasal Yapısı ve Hedefleri.....	13
2.4 Favipiravir.....	13
2.4.1 Antiviral İlaçlar ve HSK.....	14
2.5 Sitotoksosite.....	15
2.5.1 MTT Yöntemi.....	15
2.6 Genotoksosite	16
2.6.1 Komet Yöntemi	18
2.7 RNA İzolasyonu, Gen Konsantrasyonu ve Saflık Belirlenmesi	19
2.8 Apoptozis Mediyatörleri	20
2.8.1 Kaspaz Ailesi.....	20
2.9 Antiapoptotik Proteinler	21
2.9.1 BCL-2 Gen Ailesi.....	22
2.9.2 BAX.....	23

3. MATERYAL VE METOT	24
3.1 Hücre Kültürü	24
3.1.1 Hücre İçin Besiyeri Hazırlanması.....	25
3.1.2 HepG2 Hücrelerinin Çözdürülmesi ve Çoğaltılması.....	25
3.1.3 Hücrelerin Pasajlanması	26
3.1.4 Tripan Blue ile Thoma Lamında Hücre Sayımı	26
3.1.5 Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	27
3.2 MTT Yöntemi ile Uygun Dozun Belirlenmesi	27
3.2.1 Favipiravir'in MTT Yöntemi ile IC ₅₀ Dozunun Belirlenmesi.....	27
3.2.2 Sorafenib'in MTT Yöntemi ile IC ₅₀ Dozunun Belirlenmesi.....	28
3.2.3 MTT Yöntemi ile Kombinasyon Çalışması.....	28
3.3 Komet Analizi.....	29
3.4 Gen Ekspresyon Analizleri	32
3.4.1 Total RNA İzolasyonu.....	32
3.4.2 Gen Konsantrasyonu ve Saflık Ölçümü	33
3.4.3 cDNA Sentezi.....	34
3.4.4 qRT-PCR (Gerçek Zamanlı- PZR).....	35
3.5 Protein Ekstraksiyonu	35
3.6 ELISA Analizi	37
3.7 İstatiksel Analiz	38
4. BULGULAR	39
4.1 MTT Analizi Sonuçları.....	39
4.1.1 MTT Yöntemi ile Favipiravir'in HepG2 Hücre Hattında Sitotoksik Etkileri	39
4.1.2 MTT Yöntemi ile Sorafenib'in HepG2 Hücre Hattında Sitotoksik Etkileri....	40
4.2 Genotoksisite Bulguları	41
4.3 Gen İfade Düzeyi Bulguları.....	42
4.4 Protein Düzeyi Bulguları	51
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	59
6. KAYNAKLAR.....	65

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dH ₂ O	Distile su
rpm	Dakikada devir sayısı
Cr(VI)	Hekzavalent krom
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
OH [•]	Hidroksil radikali
Ma	Miliamper
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
%	Yüzde
IC ₅₀	Yarı maksimal inhibitör konsantrasyonu
CO ₂	Karbondioksit
±	Artı ya da eksi

Kısaltmalar

cDNA	Komplementer DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EtBr	Etidium Bromür
FADD	Ölüm Alanına Sahip Fas İlişkili Protein
FBS	Fetal Sığır Serum
HBC	Hepatit C Virüsü
HBV	Hepatit B Virüsü
HSK	Hepatosellüler Karsinom
HepG2	İnsan Hepatosellüler Karsinom Hücresi
LMA	Düşük Erime Noktalı Agaroz
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NMA	Normal Erime Noktalı Agaroz
PBS	Fosfat Tamponlu Salın
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
RT-qPCR	Ters Transkriptaz Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SCGE	Tek Hücreli Jel Elektroforezi
SHARP	Sorafenib Hepatosellüler Karsinom Değerlendirme Protokolü
SOR	Sorafenib
VEGFR	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
PDGFR	Platelet Türevli Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 4.1 HepG2 hücreleri üzerinde uygulanan Favipiravir'in farklı dozlarının 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında canlılık oranına etkisi	39
Şekil 4.2 HepG2 hücreleri üzerinde uygulanan Sorafenib'in farklı dozlarının (1-100 µM) ve kontrol grubunun 24 saat ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında canlılık oranları (%)	40
Şekil 4.3 HepG2 hücre hattına Sorafenib, Favipiravir ve Sor+Fav doz uygulanmasından 24 saat sonra Bax gen ekspresyon değişimi	43
Şekil 4.4 HepG2 hücre hattına Sorafenib, Favipiravir ve Sor+Fav doz uygulanmasından 48 saat sonra Bax gen ekspresyon değişimi	44
Şekil 4.5 HepG2 hücre hattına Sorafenib, Favipiravir ve Sor+Fav doz uygulanmasından 24 saat sonra BCL-2 gen ekspresyon değişimi	45
Şekil 4.6 HepG2 hücre hattına Sorafenib, Favipiravir ve Sor+Fav doz uygulanmasından 48 saat sonra BCL-2 gen ekspresyon değişimi	46
Şekil 4.7 HepG2 hücre hattına Sorafenib, Favipiravir ve Sor+Fav doz uygulanmasından 24 saat sonra KASPAZ-3 gen ekspresyon değişimi	47
Şekil 4.8 HepG2 hücre hattına Sorafenib, Favipiravir ve Sor+Fav doz uygulanmasından 48 saat sonra KASPAZ-3 gen ekspresyon değişimi.....	48
Şekil 4.9 HepG2 hücre hattına Sorafenib, Favipiravir ve Sor+Fav doz uygulanmasından 24 saat sonra TNF-α gen ekspresyon değişimi	49
Şekil 4.10 HepG2 hücre hattına Sorafenib, Favipiravir ve Sor+Fav doz uygulanmasından 48 saat sonra TNF-α gen ekspresyon değişimi	50
Şekil 4.11 HepG2 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu Bax protein düzeylerinin kontrol grubuna göre değişiminin gösterimi	51
Şekil 4.12 HepG2 hücre hattında 48 saatlik doz uygulama sonucu Bax protein düzeylerinin kontrol grubuna göre değişiminin gösterimi	52
Şekil 4.13 HepG2 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu Bcl-2 protein düzeylerinin kontrol grubuna göre değişiminin gösterimi	53
Şekil 4.14 HepG2 hücre hattında 48 saatlik doz uygulama sonucu Bcl-2 protein düzeylerinin kontrol grubuna göre değişiminin gösterimi	54

Şekil 4.15	HepG2 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu Kaspaz-3 protein düzeylerinin kontrol grubuna göre değişiminin gösterimi	55
Şekil 4.16	HepG2 hücre hattında 48 saatlik doz uygulama sonucu Kaspaz-3 protein düzeylerinin kontrol grubuna göre değişiminin gösterimi.	56
Şekil 4.17	HepG2 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu Tnf- α protein düzeylerinin kontrol grubuna göre değişiminin gösterimi.	57
Şekil 4.18	HepG2 hücre hattında 48 saatlik doz uygulama sonucu Tnf- α protein düzeylerinin kontrol grubuna göre değişiminin gösterimi.	58



ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 Elektroforez tampon çözeltisinin hazırlanması	29
Çizelge 3.2 Nötralizasyon Çözeltisinin hazırlanması.....	29
Çizelge 3.3 Elektroforez tampon çözeltisinin hazırlanması	29
Çizelge 3.4 Etidyum bromür çözeltisinin formülasyonu	30
Çizelge 3.5 Normal erime noktasına sahip agaroz çözeltisinin (NMA) hazırlanması ...	30
Çizelge 3.6 Düşük erime noktasına sahip agaroz çözeltisinin (LMA) hazırlanması	31
Çizelge 3.7 RNA izolasyonu için uygulanan kimyasal maddeler ve derişimleri (24-48 h)	33
Çizelge 3.8 cDNA sentezinde kullanılan kimyasalların miktarları	34
Çizelge 3.9 qRT-PCR çalışmasında kullanılacak reaktif bileşenleri Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Çizelge 4.1 HepG2 hücre hattında Sorafenib ve Favipiravir kombinasyonunun Komet yöntemi ile DNA hasarının düzeyleri..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 2.1 HepG2 Hücre hattı morfolojisi	11
Resim 2.2 Favipiravir'in kimyasal yapısı ve formülü.....	14



1. GİRİŞ

Kanser, dünya genelinde ölüm oranlarını artıran ve sağlık sistemleri üzerinde büyük bir yük oluşturan bir hastalıktır (Sung vd. 2021). Karaciğer kanseri, bu geniş spektrumlu hastalık grubunun önemli bir parçasını oluşturur ve özellikle HSK olarak bilinen formu, yüksek mortalite oranları ile ilişkilidir (Llovet vd. 2021). HSK, genellikle karaciğer sirozu gibi öncül durumlarla tetiklenen bir malignitedir ve tedavisinde karşılaşılan zorluklar, bu hastalığın yönetimini oldukça karmaşık hale getirmektedir.

HSK'nın biyolojisi, hücresel ve moleküler düzeyde karmaşık sinyal yollarının etkileşimiyle şekillenir. Bu tümör, genellikle hücre döngüsünün bozulması, DNA onarım mekanizmalarının zayıflaması ve apoptotik yanıtların baskılanması ile karakterizedir. Wnt/ β -katenin, PI3K/AKT/mTOR ve MAPK/ERK gibi sinyal yolları, HSK oluşumunda ve progresyonunda anahtar roller üstlenmektedir. Bu yolların aşırı aktivasyonu, hücre çoğalmasını artırırken tümör baskılayıcı mekanizmaların baskılanmasına yol açar. Buna ek olarak, HSK'nın heterojen doğası ve farklı genetik mutasyonlar barındırması, hastalığın klinik seyrinde önemli farklılıklara neden olur. Bu durum, kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarını gündeme getirmiştir. Moleküler profillemeye çalışmaları ile HSK hastalarında hangi sinyal yollarının aktif olduğu belirlenerek, hastaya özgü tedavi stratejileri geliştirilmeye başlanmıştır.

HepG2 hücre hattı, HSK'nın *in vitro* modellerinden biri olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir ve bu hücreler, karaciğer kanseri mekanizmalarını anlamak ve yeni tedavi stratejilerini test etmek için değerli bir araç sunar (Wilkening vd. 2003). Hücre kültürü tabanlı çalışmalar sayesinde, kanser hücrelerinin ilaçlara verdiği tepkiler moleküler düzeyde analiz edilebilmekte ve bu da tedaviye yönelik daha etkili stratejilerin geliştirilmesine olanak tanımaktadır. Son yıllarda, HSK tedavisinde önemli ilerlemeler sağlanmış olup, hedefe yönelik tedavi ajanları, tümörlerin büyümesini ve yayılmasını kontrol altına almak için önemli fırsatlar sunmaktadır. Sorafenib, bu tedavi ajanlarının başında gelir ve özellikle vasküler endotel büyüme faktörü reseptörleri (VEGFR) ve platelet türevli büyüme faktörü reseptörleri (PDGFR) gibi moleküler hedefleri inhibe ederek antitümöral etkisini gösterir (Wilhelm vd. 2004). Bu hedeflerin bloke edilmesi, tümör vaskülarizasyonunun ve büyümesinin engellenmesine katkıda bulunur, böylece

HSK'nın tedavisinde belirgin bir iyileşme sağlar (Kane vd. 2006). Ancak Sorafenib tedavisine rağmen birçok hastada direnç gelişmekte ve tedaviye verilen yanıt azalabilmektedir. Bu nedenle, tedaviye alternatif yollar geliştirilmesi ve farklı ajanların araştırılması büyük önem taşımaktadır. Bu noktada, son yıllarda farklı farmakolojik ajanların kombinasyonları gündeme gelmiştir. Bu kombinasyonlar hem ilaçların etkinliğini artırma hem de direnç mekanizmalarını aşma potansiyeli nedeniyle dikkat çekmektedir. Bununla birlikte, antiviral özellikleriyle bilinen Favipiravir gibi ilaçların, kanser tedavisindeki etkileri araştırılmaya başlanmıştır (Furuta vd. 2017). İlk olarak viral enfeksiyonların tedavisinde kullanılan Favipiravir'in, karaciğer kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılan araştırmalar, bu ajanların antikanser özelliklerini ortaya koyabilir (Yamada vd. 2021).

Favipiravir'in antikanser potansiyelini değerlendirmek amacıyla yürütülen çalışmalarda, bu ilacın hücre çoğalmasını baskıladığı, hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptoz mekanizmalarını aktive ettiği bildirilmektedir. Ayrıca, Favipiravir'in Sorafenib ile birlikte kullanıldığında daha güçlü antitümöral yanıtlar oluşturabileceği düşünülmektedir. Bu tür kombinasyon yaklaşımları hem ilaçların etkinliğini artırmakta hem de direnç gelişimini azaltmak açısından önem taşımaktadır (Zhou vd. 2020). Hücre kültürü teknikleri, canlı hücrelerin kontrollü bir ortamda büyütülmesi ve analiz edilmesini sağlayan biyolojik araçlardır (Freshney 2016). Hücre kültürü sistemleri sayesinde hem sitotoksik etkiler hem de genetik ve biyokimyasal yanıtlar detaylı şekilde değerlendirilebilmektedir. Bu bağlamda çeşitli analiz yöntemleri kullanılmaktadır: MTT deneyi, hücre canlılığını ve proliferasyonunu ölçen yaygın bir yöntemdir. Hücrelerin metabolik aktivitesine dayalı olarak çalışan bu test, ilaçların hücre üzerindeki toksik etkilerini değerlendirmede oldukça hassas bir yöntemdir (Mosmann 1983). Komet testi ise DNA hasarını ve onarım süreçlerini incelemek için kullanılan bir yöntemdir. Tek hücre düzeyinde DNA bütünlüğünü değerlendirme olanağı sunan bu test, genotoksik etkilerin belirlenmesi açısından kritik öneme sahiptir (Singh vd. 1988). Moleküler düzeydeki değişikliklerin daha iyi anlaşılması amacıyla RNA izolasyonu, RNA'nın saflık ve konsantrasyon analizi yapılmakta; bu veriler cDNA sentezi ve protein izolasyonu gibi ileri teknikler için temel sağlamaktadır (Chomczynski ve Sacchi 1987). RNA izolasyonu, gen ekspresyon profillemesi ve transkriptom analizi için kritik bir adımdır (Zhao vd. 2014).

cDNA sentezi, bu gen ekspresyonunun detaylı bir şekilde incelenmesine olanak tanır (Bustin vd. 2009). Bu süreçte elde edilen cDNA'lar qRT-PCR gibi tekniklerle gen düzeyinde analiz edilmektedir. Bu analizler sayesinde hücrelerin apoptotik ya da antiapoptotik yanıtları ortaya konabilmektedir. Protein izolasyonu ve analizi, hedef proteinlerin düzeylerinin belirlenmesi için uygulanır (Bradford 1976). Bu analizler, özellikle apoptotik yollarda yer alan Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 gibi proteinlerin aktivasyon durumlarını ortaya koyarak, Sorafenib ve Favipiravir'in apoptotik etkilerini anlamak için önemlidir (Elmore 2007).

Sonuç olarak, güncel tedavi yaklaşımlarının yetersiz kaldığı durumlarda ilaç kombinasyonlarının moleküler düzeyde değerlendirilmesi, HSK gibi zorlayıcı malignitelerin tedavisi için yeni olanaklar sunmaktadır. Hücre kültürü temelli bu tür deneysel çalışmalar, hem mekanistik bilgi sağlayarak temel bilimlere katkıda bulunmakta hem de translasyonel tıbbın gelişmesine zemin hazırlamaktadır (Hanahan ve Weinberg 2011).

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Hepatosellüler Karsinoma

HSK, karaciğer kanserinin en yaygın görülen türü olup, dünya çapında kanser kaynaklı ölümlerin en önde gelen nedenlerinden biridir (El-Serag 2012). HSK genellikle kronik karaciğer hastalıkları, özellikle hepatit B virüsü (HBV) ve hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonları, karaciğer sirozu, alkol tüketimi ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) gibi durumlarla ilişkilidir (Wong ve Hu 2017). Ayrıca metabolik sendrom, diyabet, aflatoksin ve diğer çevresel faktörler gibi çeşitli risk faktörleri de HSK'da rol oynar (Zhou ve Jiang 2018). Kronik hastalık ve hepatositlerin sürekli olarak hasar görmesi, döngüsel onarım mekanizmalarının bozulmasına ve sonunda malign dönüşüme neden olabilir (Kahn ve Wodarz 2016).

HSK'nın patogenezi, birçok karmaşık sinyal yolunun düzenlenmesini içerir. Bunlar arasında Wnt/ β -katenin, Ras/MAPK, PI3K/AKT/mTOR ve Hippo yolları öne çıkar (Xie vd. 2019). Wnt/ β -katenin yolunun aktivasyonu, hücre proliferasyonunu teşvik ederken, Ras/MAPK ve PI3K/AKT/mTOR yolları da hücre büyümesi, hayatta kalma ve metabolizmanın düzenlenmesine katkıda bulunarak tümör hücrelerini destekler (Badr ve Al-Hamoudi 2016). Bu sinyal yollarının aşırı aktivasyonu hem tümör hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasına hem de metastaz potansiyelinin artmasına yol açar. Ayrıca HSK'da hipoksi, anjiyogenez ve tümör mikroçevresinin değişimi, tümör büyüme ve gelişimindeki önemli faktörlerdir (Llovet ve Bruix 2008).

HSK'nın klinik seyri genellikle sessiz ve semptomsuzdur, bu da erken teşhis zorluklarına yol açar (Cheng vd. 2009). Hastaların büyük bir çoğunluğu, tümörler ileri evrelere ulaştığında teşhis edilir, bu durumda tedavi seçenekleri sınırlıdır. Erken evrede teşhis edilen HSK vakalarında cerrahi rezeksiyon, karaciğer nakli veya ablasyon tedavileri uygulanabilirken, ileri evre hastalar için sistemik tedaviler tercih edilmektedir (Kudo ve Matsui 2011). Bu noktada, Sorafenib gibi tirozin kinaz inhibitörleri (TKI'ler), HSK tedavisinde çığır açan ilk hedefe yönelik tedavi ajanlarından biri olmuştur (Wilhelm vd. 2008). Sorafenib, tümörlerde VEGFR ve PDGFR gibi çeşitli sinyal yollarını inhibe ederek tümör büyümesi ve anjiyogenezi baskılar. Ancak, tek başına Sorafenib tedavisi sıklıkla sınırlı etkinlik gösterir ve birçok hastada bu ilaca direnç gelişimi

gözlemlenmektedir (Llovet vd. 2012). Tedaviye direnç kazandırma, HSK'nın sahip olduğu önemli bir sorun olup, bu durum yeni tedavi yöntemlerinin araştırılmasına neden olmaktadır (El-Serag 2012). Son yıllarda, HSK tedavisinde immünoterapiler de büyük bir ilgi görmüştür. Anti-PD-1/PD-L1 ve anti-CTLA-4 gibi immünoterapiler, tedavi sistemi aracılığıyla kanser hücrelerini hedeflemekte ve bazı HSK hastalarında umut verici sonuçlar vermektedir (Wong ve Hu 2017). Bununla birlikte, immünoterapilere yanıt oranları, HSK'nın heterojen yapısı nedeniyle değişkenlik göstermektedir (Zhou ve Jiang 2018). Bağışıklık sistemi ile tümörler arasındaki iletişim, tedavi yanıtlarının belirlenmesi için kritik bilgiler sunar.

İmmünoterapilerin yanı sıra HSK'da yeni tedavi yöntemleri de araştırılmaktadır. Sorafenib ile birlikte diğer hedefe yönelik ajanların veya immünoterapilerin kombinasyonu, tedavi etkinliğini artırma potansiyeline sahiptir (Kudo ve Matsui 2011). Kombinasyon tedavileri, birden fazla tümör yolunu eş zamanlı olarak hedefleyerek, tümörlerin kaçış mekanizmalarını sınırlama olanağı sunar (Badr ve Al-Hamoudi 2016). Ayrıca HSK'da apoptozu indükleyen tedavi yöntemleri önemli bir araştırma alanı olmuştur. Apoptoz, yani programlanmış hücre ölümü, kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasına karşı doğal bir savunma mekanizmasıdır (Xie vd. 2019). HSK'da apoptotik yolların aktivasyonu, kanserin ilerlemesini durdurabilir ve bu nedenle Sorafenib gibi tedavilerin apoptotik etkileri üzerinde durulmaktadır (Wilhelm vd. 2008).

Gen ekspresyon profileme ve biyobelirteç araştırmaları HSK'da önemli bir rol oynamaktadır. HSK'nın biyolojik çeşitliliğinin göz önüne alınması, kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine yardımcı olabilir (Llovet ve Bruix 2008). Örneğin, BCL-2, BAX, KASPAZ-3 ve TNF- α gibi apoptoz ve hücre ölümüne dahil olan genlerin ekspresyon seviyeleri, HSK'da tedavi yanıtını öngörmek için potansiyel biyobelirteçlerdir (Cheng vd. 2009). Ayrıca bu genlerin düzenlenmesi, yeni tedavi hedeflerinin ortaya çıkarılmasına olanak tanır. HSK'nın tedavisinde mevcut zorluklara rağmen, artan bilgi birikimi daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yol açmaktadır (El-Serag 2012). Bu süreçte klinik çalışmalar hem immünoterapilerin hem de hedefe yönelik tedavilerin etkilerini test etmek için kritik öneme sahiptir (Kudo ve Matsui 2011). HSK'nın erken teşhisi, doğru tedavi yöntemlerinin belirlenmesi ve yeni tedavi yaklaşımlarının etkileri, bu hastalığın yönetiminde önemli adımlar olacaktır.

Sonuç olarak, HSK'nın klinik yönetimi, karmaşık patogenezi ile ilerlemektedir. Erken teşhis ve tedavi yöntemlerinin yanı sıra, Sorafenib gibi hedefe yönelik tedaviler ve immünoterapilerin kullanımı, HSK tedavisinin geleceği açısından umut verici alanlar arasında yer almaktadır (Llovet vd. 2012).

2.1.1 Hepatosellüler Karsinomunun Moleküler Mekanizması

HSK, karaciğer kanserinin en yaygın ve en ölümcül formudur ve sıklıkla karaciğer sirozu, hepatit B ve C enfeksiyonları gibi prekanseröz durumlarla ilişkilidir. HSK'nın gelişiminde yer alan moleküler mekanizmalar, genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimleri ile şekillenir (Llovet ve Bruix 2016). Genetik olarak, onkogenlerin (örneğin, MYC, RAS ve HGF) aşırı aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin (örneğin, p53 ve RB1) inaktivasyonu ile birleşerek hücre proliferasyonunu artırır ve apoptozu inhibe eder (El-Serag 2011). Bu genetik değişiklikler, malign transformasyonu destekleyen temel süreçlerdir. Ayrıca, HSK'da görülen TP53 ve CTNNB1 (beta-katenin) gibi genlerdeki mutasyonlar, hücre döngüsünün regülasyonunda bozulmalara yol açarak tümör gelişimini hızlandırır (Galle vd. 2019). Kronik inflamasyon, HSK'nın önemli bir etiyolojik faktörü olarak öne çıkmakta olup, pro-inflamatuar sitokinlerin (örn. TNF- α , IL-6) salınımı yoluyla tümör mikroçevresini değiştirir ve tümör büyümesini teşvik eder (Lee ve Park 2020). Bu inflammatuar ortam, immün hücrelerin tümörle etkileşimini artırarak kanser hücrelerinin hayatta kalmasını ve proliferasyonunu destekler (Lichtenstein ve Cederbaum 2014). Hücre döngüsü regülatörleri üzerindeki anormallikler, özellikle Cyclin D1, CDK4 ve CDK6 gibi proteinlerin aşırı ifadesi, hücre döngüsünün kontrolünü bozar ve malign hücre proliferasyonunu hızlandırır (Grivnickov ve Karin 2010).

MikroRNA'lar, özellikle miR-122 gibi, karaciğer sağlığı için kritik öneme sahip olup, düşük seviyeleri HSK ile ilişkilendirilmiştir (Roderburg ve Luedde 2014). Bu durum, gen ekspresyonunu etkileyerek tümörigenik süreçleri destekleyen önemli bir mekanizma olarak karşımıza çıkar. Ayrıca, metabolik bozukluklar, karaciğer yağlanması ve insülin direnci gibi durumlar HSK gelişimini artıran risk faktörleri arasında yer alır (Sia ve Kwan 2017). Bu tür metabolik değişiklikler, lipid metabolizmasını etkileyerek hücre içindeki oksidatif stres seviyelerini artırabilir, bu da genetik hasara ve tümör gelişimine yol açar (Liu ve Wang 2014). Tümör mikroçevresi, fibroblastlar, immün hücreler ve ekstrasellüler

matriks bileşenleri gibi çeşitli bileşenlerle etkileşim halinde olup, tümör hücrelerinin büyümesini, invazyonunu ve metastazını destekleyen kritik bir rol oynamaktadır (Wang vd. 2016). Bu mikroçevre, tümör hücrelerine besin sağlamakla kalmaz, aynı zamanda immün yanıtları da modüle ederek kanserin ilerlemesini kolaylaştırır (Erler ve Bennewith 2009). HSK tedavisinde, hedefe yönelik tedavi stratejileri, örneğin, Sorafenib, Lenvatinib ve Regorafenib gibi moleküler hedefleri temel alan tedaviler, belirli moleküler yolları etkileyerek etkinlik göstermeye çalışmaktadır (Hanahan ve Weinberg 2011). Bu tedavi yöntemleri, tümörlerin büyümesini inhibe etme ve metastatik yayılmayı engelleme potansiyeline sahiptir (Llovet vd. 2008). Sonuç olarak, HSK'nın karmaşık moleküler mekanizmalarının derinlemesine anlaşılması, hastalığın önlenmesi ve tedavisi için yeni stratejilerin geliştirilmesine olanak tanımaktadır (Kudo 2018). HSK'nın erken teşhisi ve daha etkili tedavi yöntemlerinin bulunması, bu alandaki araştırmaların odak noktası olmalıdır (Lee vd. 2016). Bu tür araştırmalar, HSK ile mücadelede yeni yollar açma potansiyeline sahip olup, hastaların yaşam kalitesini artırma ve hayatta kalma oranlarını yükseltme hedefini taşımaktadır (Yang ve Roberts 2019).

2.1.2 Hepatosellüler Karsinomda Genetik ve Epigenetik Değişiklikler

HSK, genetik değişiklikler açısından zengin ve karmaşık bir hastalıktır (Meyer ve Grone 2002). Bu hastalığın gelişiminde en sık rastlanan gen mutasyonları arasında TP53, CTNNB1 (beta-katenin) ve AXIN1 gibi tümör baskılayıcı genler yer alır (Schemmer ve Haeusler 2003). TP53 genindeki mutasyonlar, hücresel döngü kontrolünü bozarak tümör oluşumuna katkıda bulunurken (Kuo ve Goh 2008), CTNNB1 genindeki mutasyonlar Wnt/ β -katenin yolaklarının aktive olmasına yol açarak hücre proliferasyonunu teşvik eder (Dhanasekaran vd. 2015). HSK'da kromozomal anormallikler de yaygındır; özellikle kromozom 1p, 4q, 8p, 8q, 13q ve 17p bölgelerinde kayıplar ve kazançlar gözlemlenmektedir (Yang ve Hu 2005). Bu kromozomal değişiklikler, onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu etkileyerek tümör gelişimini destekleyebilir (Wong ve Wang 2010). Ayrıca, HSK'lı hücrelerde belirli genlerin aşırı veya yetersiz ifade edilmesi, hastalığın seyrini etkileyen önemli bir faktördür (Calin ve Croce 2011). Örneğin, onkogenler genellikle aşırı ifade edilirken, tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunun azalması dikkat çekmektedir (Kaseb vd. 2011). MikroRNA (miRNA) değişiklikleri de HSK'da önemli bir rol oynamaktadır; bazı miRNA'ların (örneğin, miR-

122 ve miR-199a) seviyelerindeki değişiklikler, tümör oluşumunu ve progresyonunu etkileyebilir (Jiao vd. 2013). HSK tedavisinde genetik değişikliklerin hedeflenmesi, özellikle Sorafenib gibi hedefe yönelik tedavilerin belirli genetik profillere sahip hastalarda daha etkili olmasını sağlamaktadır (Meyer ve Grone 2002). Sonuç olarak, HSK'daki genetik değişiklikler, hastalığın patogenezi ve tedaviye yanıt üzerinde belirleyici bir rol oynamakta ve bu nedenle HSK araştırmalarında genetik değişikliklerin detaylı incelenmesi, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır (Schemmer ve Haeusler 2003). HSK, epigenetik değişikliklerin önemli rol oynadığı bir kanser türüdür. Epigenetik değişiklikler, genlerin ifadesini etkileyen ancak DNA dizisini değiştirmeyen mekanizmalardır. HSK'daki başlıca epigenetik değişiklikler arasında DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, miRNA düzenlemeleri ve RNA modifikasyonları yer almaktadır (Jiang vd. 2015).

HSK'da genellikle tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgelerinde DNA metilasyonu artar, bu da gen ifadesinin inhibe olmasına yol açar; örneğin, p16INK4a ve RASSF1A gibi genlerin metilasyonu, HSK'nın gelişiminde önemli bir faktördür (Klein vd. 2008). Histonlar üzerindeki modifikasyonlar da HSK'daki gen ekspresyon profillerini değiştirebilir; histon deasetilazların aşırı aktivitesi, tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına neden olabilir (Huang vd. 2013). Ayrıca, HSK'daki epigenetik değişiklikler, miRNA'ların ekspresyonunu etkileyebilir ve bu durum onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin kontrolünde rol oynar; örneğin, miR-122 ve miR-199a gibi miRNA'ların ekspresyonundaki değişiklikler HSK gelişiminde etkili olabilir (Liu vd. 2012).

Epitranskriptom alanında yapılan araştırmalar, RNA modifikasyonlarının HSK'da önemli bir rol oynadığını göstermektedir; bu modifikasyonlar RNA'nın stabilitesini ve genel fonksiyonlarını etkileyebilir (He vd. 2020). HSK tedavisinde epigenetik değişikliklerin hedeflenmesi, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak tanır; örneğin, histon deasetilaz inhibitörleri ve DNA metilasyon inhibitörleri gibi epigenetik ajanlar potansiyel olarak kullanılabilir (Deng vd. 2016). Sonuç olarak, HSK'daki epigenetik değişiklikler, hastalığın gelişimi ve seyrinde kritik bir rol oynamakta, dolayısıyla bu değişikliklerin detaylı incelenmesi, yeni tanı ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Yamashita ve Kaneko 2016).

2.1.3 Hepatosellüler Karsinomun Progresyonu ve Metastazı

HSK, genellikle siroz gibi karaciğer hastalıkları sonucunda gelişen, karaciğerin en yaygın malign tümörüdür. HSK'nın progresyonu ve metastazı, çok aşamalı bir süreçtir ve bu süreçte birçok moleküler mekanizma etkilidir.

HSK'nın progresyonu, başlangıç aşamasında genellikle asemptomatiktir, ancak ilerleyen dönemlerde karın ağrısı, kilo kaybı ve sarılık gibi belirtilerle kendini gösterir. Tümör büyüdükçe, hücrel ve moleküler değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler arasında genetik ve epigenetik modifikasyonlar, onkogenlerin aşırı ekspresyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu yer almaktadır. Örneğin, TP53, CTNNB1 ve AXIN1 gibi genlerdeki mutasyonlar, tümör hücrelerinin proliferasyonunu artırarak hastalığın seyrini olumsuz yönde etkileyebilir (Meyer ve Grone 2002, Kuo ve Goh 2008).

HSK'nın metastazı, genellikle lenfatik ve hematolojik yollarla gerçekleşir. Tümör hücreleri, kan damarları veya lenf damarları aracılığıyla uzak organlara yayılabilir. Karaciğerdeki tümör hücreleri, invaziv özelliklerini artıran çeşitli mekanizmalar geliştirir. Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), metastatik sürecin önemli bir parçasıdır; bu süreç, tümör hücrelerinin daha invazif hale gelmesini sağlayarak diğer dokulara geçişini kolaylaştırır (Kalluri ve Weinberg 2009).

Metastaz, genellikle akciğerler, kemikler ve karın içi organlar gibi uzak organlarda gerçekleşir. HSK metastazlarının gelişimi, tümör mikroçevresindeki immün hücrelerin ve sitokinlerin etkileriyle de ilişkilidir. Tümör mikroçevresindeki inflamatuvar yanıt, tümör hücrelerinin invazyonunu teşvik edebilir ve metastatik yayılmayı kolaylaştırabilir (Feng vd. 2018). Sonuç olarak, HSK'nın progresyonu ve metastazı karmaşık ve çok aşamalı bir süreçtir. Bu süreç, moleküler değişiklikler, hücre invazyonu ve tümör mikroçevresinin etkileriyle şekillenir.

2.1.4 Hepatosellüler Karsinom Tedavisinde Kombinasyon Tedavilerinin Rolü

HSK, karaciğer kanserleri arasında en sık görülen malignite olup dünya genelinde önemli bir ölüm sebebidir (El-Serag ve Rudolph 2007). HSK tedavisinde cerrahi rezeksiyon, ablasyon ve karaciğer nakli gibi yöntemler erken evre hastalarda etkili olabilirken, ileri

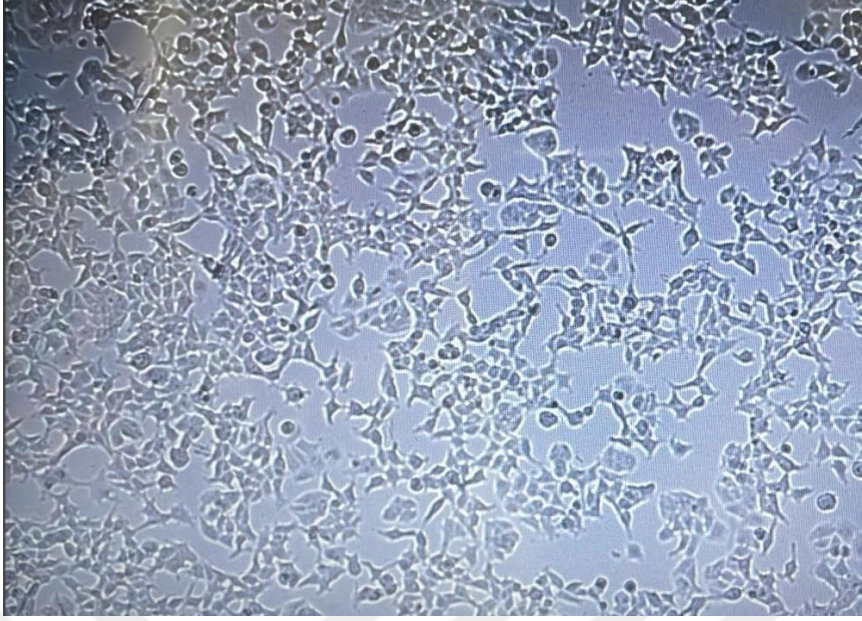
evre hastalarda tedavi seçenekleri sınırlıdır (Ege 2022). Son yıllarda, özellikle hedefe yönelik tedaviler ve immünoterapiler, HSK'nın sistemik tedavisinde önemli bir yer kazanmıştır (Türk Tabipleri Birliği- TTB 2021).

Sorafenib, ileri evre HSK için onaylanan ilk hedefe yönelik tedavi olup, hastaların yaşam süresini uzatma konusunda belirli bir başarı elde etmiştir (Llovet vd. 2008). Ancak Sorafenib'in yan etkileri ve sınırlı etkinliği nedeniyle tedaviye yanıt süreleri genellikle kısa olmaktadır (Aydın 2020). Bu nedenle, HSK tedavisinde kombinasyon tedavileri önem kazanmıştır. Kombinasyon tedavileri, birden fazla biyolojik hedefe yönelerek tümörün direncini kırmayı ve tedavi etkinliğini artırmayı hedefler (Abou-Alfa ve Chan 2021).

Sorafenib ile immünoterapilerin veya diğer kemoterapi ajanlarının kombinasyonu, hem tümör yükünü azaltmada hem de hastaların sağkalımını artırmada etkili olabilmektedir (Kılıç 2019). Bu yaklaşım, HSK'nın moleküler heterojenliği nedeniyle monoterapi ile yeterli yanıt alınamayan hastalar için umut vaat etmektedir (Demirci 2020). Özellikle immünoterapilerle kombinasyon tedavileri, immün sistemin tümör üzerindeki etkisini güçlendirmekte ve tümör mikroçevresini hedef alarak tümör büyümesini engellemektedir (TTB 2021).

2.2 HepG2 Hücre Hattı

HepG2 hücre hattı, HSK hücrelerinden türetilmiş olup, karaciğer kanseri ve diğer karaciğerle ilgili hastalıkların araştırılmasında geniş bir uygulama alanı bulmuştur (Öztürk ve Kaya 2018). İlk kez 1979 yılında 15 yaşındaki bir erkek hastadan izole edilen bu hücre hattı, karaciğer kanserinin biyolojik özelliklerini anlamak ve tedavi stratejilerini geliştirmek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (Aden vd. 1979). HepG2 hücreleri, insan hepatositlerinin birçok biyokimyasal ve metabolik fonksiyonunu koruyarak, karaciğerin temel işlevlerinin laboratuvar ortamında incelenmesini sağlar. Safra asidi üretimi, protein sentezi, lipoprotein metabolizması ve glikoz homeostazı gibi hepatositlere özgü fonksiyonları yerine getirme yeteneğine sahip olan HepG2 hücreleri, bu nedenle ilaç metabolizması ve biyotransformasyon çalışmaları için sıkça tercih edilmektedir (Castell vd. 2006). HepG2 hücrelerine ait morfolojik yapı Resim 2.1'de verilmiştir.



Resim 2.1 HepG2 Hücre hattı morfolojisi

Farmakolojik araştırmalar ve toksisite çalışmaları için ideal bir model olmasının nedeni, HepG2 hücrelerinin ilaç metabolizmasında yer alan çeşitli enzimleri eksprese edebilme yeteneğidir (Scholz 2015). Sitokrom p450 (CYP) ailesi enzimlerini düşük seviyelerde eksprese etmeleri, bu hücre hattının bazı sınırlamaları olmasına yol açsa da, HepG2 hücreleri üzerinde yapılan deneyler genellikle primer hepatositler veya daha gelişmiş *in vitro* modellerle doğrulanmaktadır (Liu vd. 2015). HepG2 hücre hattı, özellikle kanser ilaçlarının sitotoksik etkilerinin araştırılmasında sıkla tercih edilmektedir ve Sorafenib gibi hedefe yönelik tedavi ajanlarının etkinliğini değerlendiren birçok çalışmada kullanılmıştır (Mirza vd. 2020).

Ayrıca, bu hücre hattı, sadece ilaç testleri ve kanser araştırmalarında değil, aynı zamanda karaciğerin oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz gibi patofizyolojik süreçlerinin incelenmesinde de önemli bir araçtır (Demirci 2021). Oksidatif stres altında HepG2 hücrelerinin davranışlarının incelenmesi, karaciğer hasarına neden olabilecek mekanizmaların anlaşılmasına katkıda bulunurken, bu bulgular karaciğer hastalıklarının tedavisinde potansiyel hedeflerin belirlenmesine yardımcı olmaktadır (Grtz ve Elgammal 2015). HepG2 hücre hattı, tümör hücrelerinin biyokimyasal ve proliferatif özelliklerini incelemek için de yaygın olarak kullanılmaktadır (Castell vd. 2006). Bu hücre hattı, genetik modifikasyonlar ve gen ekspresyon analizlerinde de uygun bir model olup, araştırmacıların karaciğer kanserinin moleküler mekanizmalarını incelemelerine

olarak tanınmaktadır (Liu vd. 2015). Ancak HepG2 hücre hattının bazı sınırlamaları da bulunmaktadır. Özellikle, bu hücrelerin tümör hücresi özellikleri taşıması ve bazı enzimleri düşük seviyelerde eksprese etmeleri nedeniyle, karaciğer fonksiyonlarını normal fizyolojik koşullarda tam olarak yansıtamamaktadır (Öztürk ve Kaya 2018). Bu sınırlamalar göz önüne alındığında, ilaç metabolizması ve hepatotoksisite çalışmalarında HepG2 hücre hattının primer hepatositler veya diğer karaciğer hücre hatlarıyla karşılaştırmalı olarak kullanılması önemlidir (Scholz vd. 2015). Sonuç olarak, HepG2 hücre hattı, HSK araştırmalarında ve karaciğer biyolojisinin anlaşılmasında önemli bir model olmaya devam etmektedir. Bu hücre hattı, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi, ilaç testleri ve toksikoloji çalışmalarında yaygın olarak kullanılmakta olup, gelecekte karaciğer hastalıkları ile ilgili araştırmalarda önemli katkılar sağlamaya devam edecektir (Ege 2021).

2.3 Sorafenib

Sorafenib, HSK ve böbrek kanseri gibi bazı solid tümörlerin tedavisinde kullanılan, hedefe yönelik bir tedavi ajanıdır. İlk kez 2005 yılında onaylanan Sorafenib, oral yolla alınan bir ilaç olup, raf kinaz (RAF) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörleri (VEGFR) gibi çok sayıda hedefe karşı etkili bir inhibisyon sağlamaktadır (Wilhelm vd. 2006). Bu ilaç, kanser hücrelerinin proliferasyonunu engelleyerek ve tümör vaskülarizasyonunu azaltarak kanser tedavisinde kritik bir rol oynamaktadır. Sorafenib'in etki mekanizması, mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) yollarını bloke etmesi ve hücre döngüsünü etkileyen sinyal iletim yollarını inhibe etmesine dayanmaktadır (Buchbinder ve Desai 2016). Sorafenib'in, HSK'lı hastaların genel sağ kalım süresini anlamlı bir şekilde uzattığını göstermiştir; bu çalışmada, tedavi grubundaki hastaların sağ kalım süresi 10.7 ay olarak belirlenirken, plasebo grubundakiler için bu süre 7.9 ay olarak rapor edilmiştir. Bu bulgular, Sorafenib'in HSK tedavisinde etkili bir seçenek olduğunu kanıtlamaktadır (Llovet vd. 2008). Sonuç olarak, Sorafenib, HSK tedavisinde etkili bir ajan olarak kabul edilmektedir ve özellikle ileri evre hastalarda sağkalımı uzatma potansiyeli ile dikkat çekmektedir. Ancak, tedavi süresince yan etkilerin dikkatlice yönetilmesi ve hastaların düzenli takibi, bu ilacın etkinliğini artırmak için kritik öneme sahiptir. Gelecekte, Sorafenib'in yan etkilerinin daha iyi yönetilmesine yönelik stratejilerin geliştirilmesi, tedavi süreçlerini optimize etmek açısından büyük önem

taşımaktadır. Ayrıca, Sorafenib'in diğer tedavi seçenekleriyle kombinasyonu, tedaviye direnç geliştiren hastalarda alternatif bir yaklaşım potansiyeli taşımaktadır (Kudo 2016).

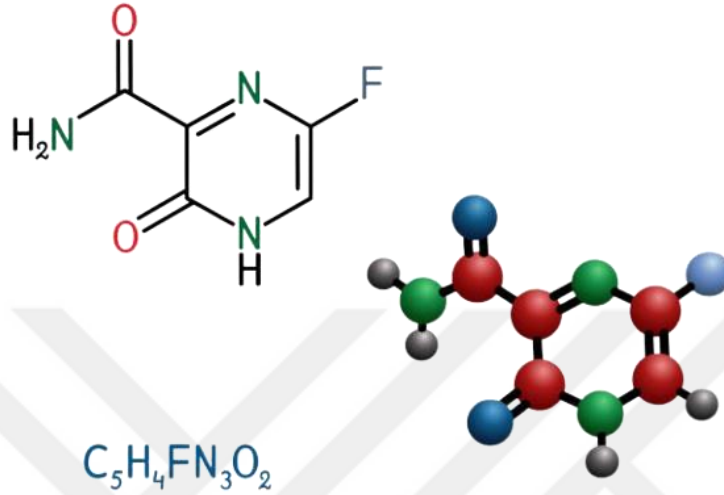
2.3.1 Sorafenib'in Kimyasal Yapısı ve Hedefleri

Sorafenib, karmaşık kimyasal yapısıyla dikkat çeken ve kanser tedavisinde etkili bir hedefe yönelik tedavi ajanı olarak kullanılan bir moleküldür. Kimyasal formülü $C_{18}H_{18}ClF_3N_4O_3S$ olan Sorafenib, 4-(3-(triflorometil) fenil)-2-(4-aminofenil) pirimidin-6-il) benzensülfonamid yapısına sahiptir (Wilhelm vd. 2006). Bu yapı, bir pirimidin halkası ve bir benzen halkasının yanı sıra, bir sülfanilamid grubu içermektedir; bu da Sorafenib'in hedef hücreler üzerindeki etkisini artıran özel bir kimyasal profil oluşturur (Buchbinder ve Desai 2016). Sorafenib'in kimyasal bileşimi, yüksek biyoyararlanım ve hücresel penetrasyon yeteneği ile ilişkilidir; bu özellikler, tedavi edici etkinliğini artıran önemli faktörlerdir (Kudo 2011). Molekül içindeki triflorometil grubu, Sorafenib'in antiproliferatif etkilerini güçlendirmekte ve kanser hücrelerinin büyümesini inhibe etme yeteneğini artırmaktadır (Buchbinder ve Desai 2016). Sorafenib, antitümör etkisini gerçekleştirmek için çeşitli hedef kinazları inhibe etme mekanizmasıyla çalışmaktadır. Başlıca hedefleri arasında raf kinaz (RAF), vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) ve platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) bulunmaktadır (Wilhelm vd. 2006). RAF kinaz inhibisyonu, MAPK yolaklarının bloke edilmesine yol açarak hücre proliferasyonunu engeller; bu durum, tümörlerin büyümesini yavaşlatır ve metastaz riskini azaltır (Llovet vd. 2008). VEGFR üzerindeki etkisi, tümör vaskülarizasyonunu azaltarak tümör hücrelerine oksijen ve besin maddelerinin ulaşımını engeller, bu da tümör hücrelerinin hayatta kalma şansını düşürmektedir (Özdemir vd. 2020). PDGFR inhibisyonu ise, tümör mikroortamındaki fibroblastların aktivasyonunu azaltarak, tümör gelişimini engellemektedir (Buchbinder ve Desai 2016). Sorafenib'in hedef kinazlar üzerindeki etkisi, onun kanser tedavisindeki önemini artırmaktadır. Klinik çalışmalar, HSK ve solid tümörlerde Sorafenib'in sağkalımı artırma potansiyelini göstermektedir.

2.4 Favipiravir

Favipiravir, antiviral bir ajan olup, başlangıçta influenza virüsleri için geliştirilmiş olsa da COVID-19 gibi diğer RNA virüslerinin tedavisinde de kullanıma potansiyeli

göstermiştir. Kimyasal yapısı $C_{18}H_{14}N_4O_3S$ olan Favipiravir, (6-fluoro-3-hidroksi-2-piridinil-4-(2-hidroksipropil)-3-piridinil-2H-1,2,4-triazol-3-karboksamid) yapısındadır (Furuta vd. 2009). Favipiravir'in kimyasal yapısı ve formülü Resim 2.2'de verilmiştir.



Resim 2.2 Favipiravir'in kimyasal yapısı ve formülü

Favipiravir'in mekanizması, viral RNA polimerazın inhibisyonuna dayanarak, virüslerin çoğalmasını durdurur ve viral RNA sentezini engeller (Koh ve Matsuura 2020). Favipiravir, hücre içinde fosforilasyona uğrayarak aktif bir nükleotid analogu haline gelir ve bu sayede viral RNA ile rekabet ederek virüs replikasyonunu engeller (Huang vd. 2015). Favipiravir'in karaciğer üzerindeki etkileri de önemli bir konu olmuştur. Karaciğer kanseri tedavisinde Favipiravir'in potansiyeli de araştırılmaktadır. Özellikle HSK gibi karaciğer kanserleri, RNA virüsleri ile ilişkili hastalıklardır ve Favipiravir'in bu tür kanserlerin tedavisinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (Yoshida vd. 2019).

2.4.1 Antiviral İlaçlar ve HSK

Antiviral ilaçlar, özellikle HSK ile ilişkili viral enfeksiyonların tedavisinde önemli bir role sahiptir. HSK, karaciğerin primer malignitesi olup, dünya genelinde yüksek mortalite oranlarına sahip bir kanser türüdür; bu hastalığın gelişimi, genellikle HBV ve HCV enfeksiyonları ile ilişkilidir (Fattovich vd. 2004). Bu bağlamda, antiviral tedaviler, karaciğer hastalıklarının ve HSK'nın gelişimini engellemeye yardımcı olabilmektedir. Özellikle, HCV enfeksiyonu olan hastalarda antiviral tedavi, HSK riskini önemli ölçüde

azaltma potansiyeline sahiptir (Ahn vd. 2016). Örneğin, direkt etkili antiviral ajanlar (DAAs) ile gerçekleştirilen tedavi, HCV enfeksiyonunun başarılı bir şekilde kontrol altına alınmasını sağlamış ve bunun sonucunda HSK gelişim riskinin azaldığı gösterilmiştir (Yoshida vd. 2019). HBV ile ilişkili HSK'nın tedavisinde de antiviral ilaçlar önemli bir yer tutmaktadır. HBV enfeksiyonunun kronikleşmesi, karaciğer sirozu ve HSK'ya yol açabilir. Bu nedenle, HBV'ye karşı etkili antiviral tedaviler uygulamak, HSK gelişimini önlemede kritik bir strateji olarak öne çıkmaktadır (Yuen vd. 2018). Antiviral tedaviler, HBV replikasyonunu baskılayarak, karaciğer hasarını azaltmakta ve dolayısıyla kanser gelişimini engellemeye yardımcı olmaktadır (Ding vd. 2018)

2.5 Sitotoksosite

Sitotoksosite, hücrelerin zararlı maddelere, ilaçlara veya çevresel stres faktörlerine maruz kaldıklarında gösterdikleri ölüm veya işlev kaybı sürecidir. Bu süreç, hücre canlılığını belirleyen önemli bir biyolojik olaydır ve genellikle hücre ölümüne neden olan mekanizmaları içerir. Sitotoksosite, çeşitli durumlarda incelenmekte olup, özellikle kanser tedavisi, toksikoloji, ilaç geliştirme ve hücre biyolojisi gibi alanlarda kritik bir rol oynamaktadır (Sullivan vd. 2019). Kanser tedavisinde, sitotoksik ilaçlar tümör hücrelerinin büyümesini inhibe etmek amacıyla kullanılırken, bu ilaçların sağlıklı hücrelere de zarar verebileceği göz önünde bulundurulmalıdır (Pérez vd. 2020).

Sitotoksosite, hücre canlılığını değerlendirmek için çeşitli yöntemlerle ölçülmektedir. Bu yöntemler arasında MTT, XTT ve resazurin gibi biyokimyasal testler yer almaktadır. MTT testi, hücrelerin canlılığını ölçmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir ve hücrelerin metabolik aktivitesine dayanmaktadır (Mosmann 1983). Sitotoksik etki, genellikle hücrelerin metabolizma oranlarının düşmesi, hücre büyümesinin inhibe olması ve en nihayetinde hücre ölümünün gerçekleşmesi ile ilişkilidir (Kato vd. 2015)

2.5.1 MTT Yöntemi

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yöntemi, hücre canlılığını belirlemek için kullanılan klasik ve yaygın bir sitotoksosite testidir. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan MTT testi, hücrelerin metabolik aktivitesine dayalı olarak çalışır ve özellikle mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinin aktivitesini ölçer. Bu

enzimler, sadece canlı hücrelerde aktif olarak çalışır ve MTT çözeltisini formazan adı verilen çözünmeyen mor kristallere dönüştürür. Formazan kristalleri, çözülerek spektrofotometrik ölçümlerle hücre canlılığı hakkında bilgi verir. Canlı hücrelerde meydana gelen bu reaksiyon sonucunda, hücrelerin ne kadar metabolik olarak aktif oldukları ölçülebilir (Mosmann 1983).

MTT yöntemi, sitotoksosite çalışmalarında oldukça önemli bir yer tutar çünkü ilaçların veya diğer kimyasalların hücre kültürleri üzerindeki etkisini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle kanser araştırmalarında, HepG2 gibi HSK hücre hatları üzerindeki çalışmaların değerlendirilmesinde önemli bir araçtır. Testin amacı, hücrelerin ilaçlara verdiği yanıtı ölçerek, hangi ilaçların daha fazla toksik etki gösterdiğini veya hücre canlılığını artırdığını belirlemektir (Deniz ve Kaya 2020). Böylece, ilaç geliştirme çalışmalarında MTT testi önemli bir rol oynamaktadır. MTT testi, hız, pratiklik ve hassasiyet açısından büyük avantajlar sunar. Örneğin, hücrelerin farklı dozlarda ilaçlara nasıl tepki verdiğini birkaç saat içinde gözlemlemek mümkündür. Hücrelerin maruz kaldığı ilaçların etkilerini hızlı bir şekilde ölçerek, geniş ölçekli tarama çalışmaları için uygun bir yöntem sunar (Riss vd. 2016). Bunun yanı sıra, MTT testi ekonomik bir yöntemdir ve çoğu laboratuvar da rahatça uygulanabilir. MTT testi sırasında hücreler ölürse, MTT çözeltisi tarafından indirgemenin gerçekleşmediği gözlemlenir ve dolayısıyla formazan oluşumu görülmez. Canlı hücrelerin sayısı arttıkça, formazan üretimi de artar ve absorbans değerlerinde bir yükselme kaydedilir. Ölçülen bu absorbans değeri, hücrelerin hayatta kalma yüzdesiyle doğru orantılıdır (Alley vd. 1988). Dolayısıyla, MTT testi sadece hücre canlılığını değerlendirmekle kalmaz, aynı zamanda hücrelerin ne kadar sağlıklı olduğunu ve metabolik aktivitelerini de gösterir. Bu nedenle, özellikle farmakolojik araştırmalarda ve toksisite değerlendirmelerinde tercih edilen bir yöntemdir (Scholz vd. 2015).

2.6 Genotoksosite

Genotoksosite, bir hücrenin genetik materyali olan DNA üzerinde doğrudan ya da dolaylı yollarla meydana gelen hasarları tanımlayan bir terimdir. Genotoksik ajanlar, DNA'nın yapısında mutasyonlara, kırılmalara, yanlış eşleşmelere ya da diğer genetik anormalliklere yol açarak hücresel fonksiyonları bozabilir ve bu durum hücre ölümü, kanser, mutasyonlar veya diğer genetik bozukluklara neden olabilir (Tucker ve Preston

2020). Genotoksisite hem endojen hem de eksojen kaynaklardan kaynaklanabilir. Endojen kaynaklar arasında hücre içi metabolik süreçlerden kaynaklanan serbest radikaller ve oksidatif stres bulunurken, eksojen kaynaklar arasında radyasyon, kimyasal maddeler, çevresel toksinler ve bazı ilaçlar yer almaktadır (Klaunig 2022).

Genotoksisite, çeşitli biyolojik testlerle değerlendirilebilir. Bu testler arasında Ames testi, mikronükleus testi, Komet testi ve Kromozom Anormallik testleri gibi yöntemler bulunmaktadır. Bu testler, bir maddenin potansiyel genotoksik etkilerini ölçmek amacıyla kullanılır. Komet testi, özellikle DNA kırıklarını tespit etmek için sıkça kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle tek hücrelerin DNA hasarını belirlemek mümkündür ve özellikle kanser araştırmalarında, genetik toksisiteyi incelemek için yaygın olarak kullanılır (Olive ve Banáth 2006). Genotoksik maddeler, hücrelerin genetik yapısını değiştirerek kanser oluşumuna katkıda bulunabilir ve bu nedenle kanserojen maddeler genotoksik etki gösteren maddelerle yakından ilişkilidir (Klaunig 2022). Genotoksisite, özellikle kanserojenite çalışmalarında büyük bir öneme sahiptir çünkü DNA'da meydana gelen hasarlar hücresel proliferasyon mekanizmalarını bozarak kontrolsüz hücre büyümesine ve tümör oluşumuna yol açabilir (Marchetti ve Wyrobek 2020). Bu yüzden genotoksik maddeler, kanser tedavisi ve önleme stratejilerinde de araştırmaların merkezinde yer almaktadır. Örneğin, birçok kemoterapi ilacı genotoksik etki göstererek kanser hücrelerinin DNA'sına zarar verir ve bu hücrelerin ölümüne yol açar (Jackson ve Bartek 2009). Ancak, bu ilaçların genotoksik etkileri normal hücreler üzerinde de zararlı etkiler yaratabilir, bu da yan etkilerin ortaya çıkmasına neden olur. Genotoksisite çalışmalarında kullanılan *in vitro* ve *in vivo* testler, potansiyel genotoksik ajanların tanımlanmasında kritik rol oynamaktadır. *In vitro* testler, hücre kültürlerinde genetik hasarın ölçülmesine olanak tanırken, *in vivo* testler, canlı organizmalar üzerindeki genetik etkileri incelemek için kullanılır. Bu testler, çevresel faktörlerin ve kimyasalların insan sağlığı üzerindeki potansiyel risklerini değerlendirmek için de kullanılmaktadır (Eastmond vd. 2009). Son yıllarda genotoksisite testlerinin sonuçlarının, çevresel koruma ve halk sağlığı politikalarının oluşturulmasında önemli bir yere sahip olduğu vurgulanmaktadır (OECD 2021). Genotoksisite ile ilgili araştırmaların bir diğer önemli alanı ise DNA onarım mekanizmalarıdır. DNA, sürekli olarak çeşitli hasarlara maruz kalmasına rağmen, hücreler bu hasarları onarabilen çeşitli mekanizmalara sahiptir. Bu onarım mekanizmaları, hücrelerin genetik bütünlüğünü korur ve genotoksik etkenlere karşı bir

savunma sağlar. Ancak, bu onarım mekanizmalarının yetersiz kaldığı durumlarda, genetik hasar birikir ve bu da hücrelerde genetik dengesizliklere ve hastalıkların gelişmesine yol açabilir (Jackson ve Bartek 2009). Bu nedenle, genotoksisite ve DNA onarım mekanizmaları arasındaki etkileşimler, genetik hasarın hücresel sonuçlarını anlamak için büyük bir öneme sahiptir.

2.6.1 Komet Yöntemi

Komet yöntemi, DNA hasarını tespit etmek için geliştirilmiş, oldukça duyarlı ve kolay uygulanabilir bir yöntemdir. Bu yöntem, hücrelerin genetik bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır ve özellikle kanser araştırmaları, toksikoloji, genetik mutasyonlar ve çevresel etmenlerin DNA üzerindeki etkilerinin incelenmesinde yaygın olarak tercih edilmektedir (Olive ve Banáth 2006, Singh vd. 2020). Komet yöntemi, hücrelerin elektromanyetik alan altında agaroz jeli içinde yerleştirilmesi ve ardından DNA'nın hasar seviyesine bağlı olarak hareket etmesine dayanır. Uygulama sırasında, hücreler belirli bir kimyasal ya da fiziksel ajanla maruz bırakılır ve ardından lize edilir. Lizis işlemi sonrasında, DNA'nın serbest kalması sağlanır ve bu aşamada DNA parçacıkları, bir elektrik alanı altında jel üzerinde hareket eder. DNA'nın hasar seviyesi, DNA'nın jel üzerindeki göç mesafesi ile orantılıdır; hasarlı DNA daha uzak mesafelere göç ederken, sağlam DNA daha kısa mesafelerde kalır (Tice vd 2000, Singh vd. 2009). Komet yönteminin en önemli avantajlarından biri, hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda DNA hasarını değerlendirebilmesidir. Bu özellik, yöntemi genotoksik etki testlerinde vazgeçilmez kılmaktadır. Komet yöntemi ile elde edilen sonuçlar, DNA onarım mekanizmaları, hücresel yanıtlar ve genotoksik etkilerin derecesini belirlemek için kullanılabilir (Huang vd. 2019). Yöntemin uygulama esnekliği, farklı hücre tipleri ve organizmalarda kullanılması nedeniyle geniş bir araştırma yelpazesi sunmaktadır. Ayrıca, Komet yöntemi, düşük maliyetli olması ve laboratuvarlarda kolay uygulanabilirliği ile dikkat çekmektedir (Al-Mahroos vd. 2021). Komet yöntemi ile elde edilen veriler, genotoksik maddelerin insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkilerini değerlendirmek için de önem taşımaktadır. Özellikle kimyasal toksinlerin, çevresel kirleticilerin ve ilaçların DNA üzerindeki etkileri incelenirken, bu yöntem sayesinde hücre bazında detaylı analizler yapılabilmektedir (Speit ve Burkhardt 2005). Ayrıca Komet yöntemi, yeni ilaçların genotoksik potansiyelinin değerlendirilmesi ve kanser tedavisi süreçlerinde

kullanılan kemoterapötik ajanların etkilerinin araştırılması gibi önemli alanlarda da kullanılmaktadır (Fenech 2000, Sinha vd. 2021).

2.7 RNA İzolasyonu, Gen Konsantrasyonu ve Saflık Belirlenmesi

RNA izolasyonu, genetik materyalin saf bir şekilde elde edilmesi ve analizi için kritik bir süreçtir. Bu işlem, hücrelerden veya dokulardan RNA'nın ayrılması ve saflaştırılmasını içerir. RNA'nın kalitesi ve saflığı, genellikle çeşitli moleküler biyoloji tekniklerinin başarısını doğrudan etkiler. RNA izolasyonu, genellikle fenol-kloroform ekstraksiyonu veya silikon bazlı kolon teknolojileri gibi çeşitli metotlar kullanılarak gerçekleştirilir (Chomczynski ve Sacchi 1987, Peltoketo vd. 2021). Bu yöntemler, hücre yapılarının parçalanması, RNA'nın serbest bırakılması ve daha sonra DNA ve protein gibi diğer hücresel bileşenlerin ayrılması aşamalarını içerir. Bu süreç, RNA'nın saflaştırılmasını sağlamak için dikkatli bir şekilde yürütülmelidir, çünkü RNA'nın hücre içindeki stabilitesi, RNA'nın enzimatik aktiviteye karşı duyarlılığı ve çevresel faktörlerden etkilenme oranı oldukça yüksektir (Zhou vd. 2016).

RNA izolasyonunun ardından, gen konsantrasyonu ve saflık belirlemesi gerçekleştirilir. Bu aşama, genellikle UV spektrofotometrisi veya floresan bazlı yöntemler kullanılarak yapılmaktadır. UV spektrofotometrisi, RNA'nın 260 nm dalga boyunda maksimum absorbans gösterdiği için RNA konsantrasyonunu belirlemede yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Saflık, 260/280 ve 260/230 oranları ile değerlendirilir; ideal olarak, 1.8-2.0 aralığında bir 260/280 oranı, yüksek saflıkta RNA olduğunu gösterir (Wilfinger vd. 1997, Liu vd. 2019). Bununla birlikte, RNA'nın kalitesini belirlemenin başka bir yolu da agaroz jel elektroforezidir. Bu yöntem sayesinde RNA örneklerinin bütünlüğü, degradasyona uğrayıp uğramadığı ve moleküler ağırlıklarına göre bant desenleri analiz edilebilir; böylece RNA'nın deneysel uygulamalarda, özellikle RT-PCR, Northern blot veya RNA-sekans gibi hassas tekniklerde kullanıma uygun olup olmadığı hakkında güvenilir bilgiler elde edilebilir (Sambrook ve Russell, 2001). RNA izolasyonu ve analizi, gen ekspresyon profillemesi, RNA dizileme ve gen terapisi gibi birçok biyomedikal araştırma ve uygulama için temel bir adımdır. Özellikle kanser araştırmaları ve genetik hastalıkların incelenmesinde, yüksek kaliteli ve saf RNA'nın elde edilmesi, sonuçların güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini artırır (Baker 2018, Benes vd. 2020).

2.8 Apoptozis Mediyatörleri

Apoptozis, hücrelerin programlı bir şekilde ölmesini sağlayan karmaşık bir biyolojik süreçtir ve bu süreçte birçok mediyatör önemli bir rol oynamaktadır. Apoptozis mediyatörleri, hücre içindeki ve dışındaki sinyalleri algılayarak hücrenin hayatta kalma veya ölüm kararını vermesine yardımcı olan moleküllerdir. Bu mediyatörler arasında Kaspaz adı verilen enzimler, Bcl-2 ailesi proteinleri, mitokondriyal faktörler ve çeşitli sitokinler bulunmaktadır (Elmore 2007, Galluzzi vd. 2012). Kaspazlar, apoptozisi başlatan ve yürüten temel enzimlerdir; özellikle Kaspaz-3, hücre ölüm sürecinin son aşamasında kritik bir rol oynamaktadır (Tait ve Harris 2016). Apoptozis mediyatörlerinin gen ekspresyonu üzerindeki etkileri de dikkat çekicidir; örneğin, Bcl-2 ailesi üyelerinin ekspresyon düzeyleri, hücrelerin apoptozise yanıtını etkileyebilir ve bu durum, kanser gibi hastalıklarda önemli sonuçlar doğurabilir (Strasser vd. 2011). İki ana apoptozis yolu bulunmaktadır: içsel ve dışsal yollar. İçsel yol, mitokondriyal stres veya DNA hasarı gibi hücrel uyarılara yanıt olarak aktive olur; bu yolun başlatılması sırasında Bcl-2 ailesi proteinleri, hücre ölüm sinyallerini düzenleyerek apoptozisi etkiler (Czabotar vd. 2014). Dışsal yol ise, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin (örneğin, Fas) aktive edilmesi ile başlar ve bu süreçte de Kaspazların aktivasyonu gerçekleşir (Krammer 2000). Her iki yol da gen ekspresyonunu etkileyebilir; örneğin, apoptozis ile ilgili genlerin ekspresyonu, hücrel stres koşullarına göre değişiklik gösterebilir ve bu durum, kanser hücrelerinin hayatta kalma yeteneğini artırabilir (Hanahan ve Weinberg 2011). Apoptozis mediyatörleri, tedavi stratejilerinde de hedef alınmaktadır. Kanser tedavisinde, apoptozisi teşvik eden ilaçlar geliştirilmektedir; bu ilaçlar, apoptozis mediyatörlerinin aktivasyonunu artırarak kanser hücrelerinin ölümüne yol açabilir (Keenan vd. 2016). Ayrıca, apoptozisi inhibe eden mekanizmaların anlaşılması, kanserin ilerlemesini durdurmak için yeni stratejilerin geliştirilmesine olanak tanımaktadır (Fuchs ve Steller 2011).

2.8.1 Kaspaz Ailesi

Kaspaz ailesi, apoptozis sürecinde kritik bir rol oynayan ve çeşitli hücrel yanıtları düzenleyen enzimlerden oluşan bir grup proteolitik enzimdir. Kaspazlar, hücrelerin hayatta kalma ve ölüm kararını vermesine yardımcı olan karmaşık sinyal yollarını düzenler. Kaspazlar, iki ana gruba ayrılır: başlatıcı kaspazlar ve efektör kaspazlar.

Başlatıcı kaspazlar, apoptoz sinyallerini alır ve bu sinyallere yanıt olarak efektör kaspazları aktive eder. Kaspaz-8 ve Kaspaz-9, bu başlangıç aşamasında kritik rol oynar (Salvesen ve Riedl 2008). Efektör kaspazlar ise, özellikle Kaspaz-3, hücre ölümünün final aşamasında işlev görerek hücre parçalanması ve DNA fragmentasyonu gibi olayları başlatır (Tait ve Green 2013).

Gen ekspresyonu, kaspazların işlevi açısından büyük bir öneme sahiptir. Çeşitli çevresel ve hücrel stres faktörleri, kaspaz genlerinin ekspresyonunu etkileyebilir ve bu da hücrelerin apoptozis sürecindeki rolünü şekillendirir. Örneğin, DNA hasarı, p53 gibi tümör baskılayıcı proteinlerin aktivasyonunu tetikleyebilir ve bu süreç kaspaz genlerinin ekspresyonunu artırarak hücrelerin apoptozise girmesine yol açar (El-Deiry 1998, Gozuacik ve Kimchi 2004). Bu durum, kanser tedavisinde kaspaz aktivitesinin artırılmasını hedefleyen stratejilerin geliştirilmesine olanak tanır. Bununla birlikte, aşırı apoptozis, dokularda hasara neden olabileceğinden, kaspaz inhibisyonu bazı klinik durumlarda faydalı olabilir (Kroemer ve Reed 2000). Kaspaz ailesinin önemli bir özelliği, sadece apoptozisle sınırlı kalmayıp, inflamasyon ve hücrel farklılaşma gibi diğer biyolojik süreçlerde de rol oynamasıdır. Örneğin, Kaspaz-1, inflamatuvar kaspaz olarak bilinir ve pro-inflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β gibi) aktivasyonunu sağlar. Bu durum, bağışıklık sisteminin yanıtını düzenler ve bu süreçte kaspazların rolü oldukça kritik hale gelir (Boucher vd. 2009). Sonuç olarak, kaspaz ailesi, temel biyolojik işlevlerin düzenlenmesinde ve kanser gibi hastalıkların tedavisinde önemli bir hedef oluşturur, bu da araştırmaların bu proteinlerin mekanizmaları ve potansiyel tedavi hedefleri üzerine yoğunlaşmasına yol açmaktadır (Friedlander vd. 1997, Strasser vd. 2000).

2.9 Antiapoptotik Proteinler

Antiapoptotik proteinler, hücrelerin programlı ölüm sürecinden kaçınmasını sağlayan önemli moleküllerdir ve genellikle hücre hayatta kalmasının anahtarı olarak kabul edilir. Bu proteinler, Bcl-2 ailesinin üyeleri arasında yer almakta olup, özellikle Bcl-2, bcl-xl ve Mcl-1 gibi üyeler, hücrelerin ölüm sinyallerine karşı direncini artırarak hayatta kalmalarını sağlar (Adams ve Cory 1998, Chipuk vd. 2010). Bcl-2, mitokondriyal membran permeabilizasyonunu engelleyerek, apoptoz için gerekli olan sitokrom C gibi faktörlerin salınımını önler; bu durum, hücrenin hayatta kalma süresini uzatır (Huang vd. 2020). Bu proteinlerin gen ekspresyonu, birçok kanser türünde anormal bir şekilde artar,

bu da tümör hücrelerinin tedaviye karşı direnç geliştirmesine yol açar (Cory ve Adams 2002). Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu, lenfoma ve diğer hematopoetik malignitelerde sıkça görülür ve bu durum, tedavi edici yaklaşımlar üzerinde büyük etkiler yaratır (Hockenbery vd. 1993). Ayrıca, Bcl-2 ailesinin antiapoptotik üyeleri, çeşitli hücrel stres koşullarında (örneğin, oksidatif stres veya büyüme faktörleri eksikliği) hücrelerin hayatta kalmasını teşvik eder (Leber vd. 2007).

Antiapoptotik proteinlerin, tümörlerin büyümesini desteklemesi ve tedaviye karşı direnç göstermesi, onları kanser tedavisinin önemli hedefleri haline getirir. Özellikle Bcl-2 inhibitörleri, kanser hücrelerini apoptoz sürecine zorlamak için geliştirilmiş olan yeni tedavi yöntemlerindendir (Kuwana vd. 2005). Bu bağlamda, antiapoptotik proteinlerin işlevselliği ve gen ekspresyonunun kontrolü, kanser araştırmalarında yoğun bir şekilde incelenmekte ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak tanımaktadır (Weston vd. 2021).

2.9.1 BCL-2 Gen Ailesi

BCL-2 gen ailesi, hücre hayatta kalma ve apoptoz süreçlerini düzenleyen kritik proteinlerin bulunduğu bir aile olarak önemli bir rol oynamaktadır. Bu gen ailesi, Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 gibi anti-apoptotik proteinlerin yanı sıra Bax ve Bak gibi pro-apoptotik proteinleri de içerir (Liu vd. 2023). BCL-2 gen ailesinin temel işlevi, mitokondriyal membran permeabilizasyonunu düzenleyerek hücre ölümünü kontrol etmektir. Bu mekanizma, hücrel stres, DNA hasarı ve diğer apoptotik uyarıcılara yanıt olarak hayati öneme sahiptir (Kraus vd. 2023). BCL-2 ve onun homologlarının aşırı ekspresyonu, birçok kanser türünde yaygın olarak gözlemlenmekte ve bu durum tümör hücrelerinin apoptozdan kaçınmasına olanak tanımaktadır (Wang vd. 2023). BCL-2 gen ailesinin gen ekspresyonu, onkogenik sinyaller ve hücrel stres koşullarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Örneğin, BCL-2'nin yüksek seviyeleri, kanser hücrelerinin tedaviye yanıt vermede zorluk yaşamasına neden olabilir (Amaral vd. 2024). Bu bağlamda, BCL-2 ailesinin proteinleri, kanser tedavisinde hedeflenmesi gereken önemli moleküller olarak öne çıkmaktadır. Yeni nesil BCL-2 inhibitörleri, kanser tedavisinde etkinliği artırmak için kullanılan stratejiler arasında yer almaktadır (Cairo vd. 2024). Ayrıca, BCL-2 ailesinin gen ekspresyonundaki değişiklikler, tedavi süreçlerinin iyileştirilmesi ve kişiselleştirilmiş onkoloji uygulamaları için önemli bilgiler sağlamaktadır (Deng vd. 2023).

2.9.2 BAX

BAX, BCL-2 gen ailesinin önemli bir üyesi olarak, hücrelerin apoptoz mekanizmalarında kritik bir rol oynamaktadır. Normal hücre koşullarında sitoplazmada inaktif bir formda bulunan BAX, apoptotik uyarıların gerçekleşmesiyle birlikte mitokondri membranına lokalize olur ve burada pro-apoptotik işlevlerini üstlenir. Bu yerleşim, mitokondriyal dış membranın geçirgenliğini artırarak, sitokrom C gibi önemli apoptotik faktörlerin sitozole salınmasına yol açar. Bu süreç, hücrel homeostazın bozulmasına ve nihayetinde apoptozun tetiklenmesine neden olur (Korkmaz vd. 2022, Zhang vd. 2023). BAX'ın ekspresyon düzeyleri, kanser gelişiminde ve tedaviye yanıtında önemli bir belirleyici faktör olarak kabul edilmektedir. Özellikle, birçok kanser türünde BAX seviyelerinin düşüklüğü, hücrelerin apoptozdan kaçınmasına ve tümörlerin büyümesine katkıda bulunabilir (Gonzalez vd. 2024). Bunun yanı sıra, BAX gen ekspresyonunun artırılması, kanser tedavisinde umut verici bir strateji olarak ortaya çıkmakta ve çeşitli tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde hedef olarak belirlenmektedir. Araştırmalar, BAX'ın hedeflenmesiyle birlikte, kanser hücrelerinin apoptoz yoluyla etkili bir şekilde yok edilmesi mümkün olduğunu göstermektedir (Singh vd. 2024).

3. MATERYAL VE METOT

HepG2 insan karaciğer kanseri hücre hattı üzerinde yürütülen bu çalışmada, hücreler Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarı stoklarından temin edilmiştir. Bu tez kapsamında, Sorafenib ve Favipiravir ilaç kombinasyonlarının HepG2 hücre hattı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Farklı kombinasyon dozları uygulanarak hücreler üzerinde sitotoksikite ve genotoksikite testleri gerçekleştirilerek, yapılan çalışma moleküler düzeyde analiz edilmiştir. Deneyler, Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirilmiş olup, araştırmanın her aşamasında güvenilir ve bilimsel standartlara uygun yöntemler kullanılmıştır.

3.1 Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan HepG2 hücre hattı için besiyeri olarak Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kullanılmıştır. Bu besiyeri, hücrelerin optimal büyüme koşullarını sağlamak için 500 ml DMEM içerisine 10 ml/L penisilin-streptomisin, 5 ml L-glutamin ve 50 ml Fetal Sığır Serum (FBS) eklenerek hazırlanmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında, sterilizasyon büyük önem taşımaktadır; bu nedenle tüm işlemler laminar akış kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. Kabin her kullanımdan önce ve sonra mutlaka ultraviyole ışık (UV) ile steril hale getirilmiş ve iç yüzeyler %70'lik etanol ile silinmiştir. Çalışmada kullanılan karbondioksit inkübatörü, hücrelerin büyüme koşullarının korunması amacıyla 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ seviyesinde çalıştırılmış, inkübatörün alt haznesindeki suya %1 oranında Aquaguard-1 eklenerek %95 nem oranı sabit tutulmuştur. Deneyler sırasında kullanılan kimyasallar, çözeltiler ve uygulanan dozlar, hücrelerin strese maruz kalmaması için 37°C'de sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Ayrıca, tüm santrifüj işlemleri 800 rpm'de 5 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin kültür ortamında büyümesi ve çoğalması için sterilizasyon ve optimum koşulların korunması hayati önem taşır. Çalışma boyunca kontaminasyon riski yüksek olduğundan cihaz ve kimyasalların sterilizasyonu ekstra özen gösterilerek sağlanmıştır. Bu süreçte HepG2 hücre hattı kullanılarak, hücrelerin uygun ortamda sağlıklı bir şekilde büyümesi ve deneysel çalışmaların başarıyla sürdürülmesi gerçekleştirilmiştir.

3.1.1 Hücre İçin Besiyeri Hazırlanması

Hücrelerin büyümesi ve canlılığını sürdürebilmesi için gerekli olan medyum, 0.22 µm gözenek boyutuna sahip vakum pess membran filtre ile steril edilerek hazırlanmıştır. Besiyerinin hazırlanması aşamasında, Fetal Bovine Serum (FBS) %10 (v/v) oranında, penisilin/streptomisin %1 (v/v) oranında ve L-glutamin %1 (v/v) oranında eklenmiştir. 500 mL'lik DMEM Low Glucose (Düşük Glikoz) besiyer pess membran filtre içerisine alınmıştır. Filtrasyon işlemi, besiyerinin vakum pompasına bağlanarak süzülmesi ile tamamlanmıştır. Steril edilen besiyeri, 50 mL'lik steril falkonlara aktarılmış ve hücrelerin çözündürülmesi, pasajlanması ve yıkanması için +4°C'de saklanmıştır. Çalışmalardan önce medyum 37°C'deki sıcak su banyosunda 30 dakika bekletilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.1.2 HepG2 Hücrelerinin Çözdürülmesi ve Çoğaltılması

Sıvı azot tankında donmuş halde saklanan hücreler, kontaminasyonu önlemek için uygun sterilizasyon adımları izlenerek çözündürüldü. Hücreler önce strese girmemesi adına -20°C'de yaklaşık 10-15 dakika bekletildi, ardından çözümleri için sıcak su banyosunda 1-2 dakika süreyle hafifçe dairesel hareketlerle bekletildi. Çözülen hücreler laminar akış kabine alınarak, 1 mL besiyeri eklenmiş steril 15 mL'lik falkon tüpüne aktarıldı. Hücre ve besiyerinin homojen bir şekilde karışması için pipetaj yapıldıktan sonra, falkon 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Bu işlem sonrasında üstteki süpernatant dikkatlice çekilerek atıldı. Dipteki hücrelerin üzerine yeni besiyeri eklenerek yeniden santrifüj edildi. Bu adım sayesinde DMSO gibi koruyucu maddeler uzaklaştırıldı ve hücreler ekime hazır hale getirildi. Ekim yapılacak flasklara, boyutlarına göre belirlenen miktarda besiyeri (25 cm² flask için 4-7 mL, 75 cm² flask için 7-10 mL) eklenerek hücreler flask içine damla damla homojen bir şekilde yayıldı. Hücrelerin eşit dağılımını sağlamak için flask hafifçe sallandıktan sonra hücrelerin büyümesi için %5 CO₂ ve 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan tüm malzemeler ve ortam %70'lik etanol ile steril edilip ultraviyole ışınları ile dezenfekte edilerek kontaminasyon riski minimuma indirildi. Hücrelerin uygun şekilde korunması ve çoğaltılması adına her aşamada sterilizasyon adımlarına özen gösterildi.

3.1.3 Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin pasajlama aşamasında, flask tabanında %80-90 oranında üreme/yapışma sağlandığında, ilk olarak görüntüleme cihazı aracılığıyla kontrol edilerek dikkatlice laminar akış kabineye alındı. Flasktaki eski medyum atıldıktan sonra, 37°C sıcaklıktaki 3 mL Tripsin-EDTA, hücrelerin tabandan ayrılmasını sağlamak üzere flask tabanına eklendi ve inkübatörde 5 dakika bekletildi. Bu süre sonunda hücrelerin hala yapışık olup olmadığı kontrol edildi ve gerekirse, flaskın kenarına hafifçe vurularak hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Ayrılan hücreler, Tripsin-EDTA ile karıştırıldıktan sonra 3 mL besiyeri eklenerek falkona alındı. Bu karışım 5 dakika süreyle 800 rpm’de santrifüj edildi, böylece hücrelerin strese girmemesi ve kimyasal maruziyetin azaltılması amaçlandı. Santrifüj işlemi sonrasında, süpernatant kısmı atıldı ve dipteki hücrelerin üzerine 1 mL besiyeri eklenerek homojen dağılımları için pipetaj yapıldı. İkinci santrifüjden sonra, yeniden 1 mL medyum eklenip homojen dağılım sağlandı. Ekim için 25 cm² ve 75 cm² boyutundaki flasklara uygun miktarda besiyeri eklendi; ardından hücre-besiyeri karışımından alınan 500 µL, flaskların yüzeyine homojen bir şekilde dağıtıldı. Pasajlanan flasklar daha sonra %5 CO₂ ve 37°C sıcaklıkta inkübasyona alındı.

3.1.4 Tripan Blue ile Thoma Lamında Hücre Sayımı

Hücrelerin üreme oranı %80-90 olduğunda, flasklardaki medyum atık kabına atıldı ve üzerine 3 mL Tripsin-EDTA eklenerek hücrelerin yüzeyden ayrılması için inkübatörde 5 dakika bekletildi. Bu süre sonunda, hücreler yüzeyden kalktığında, 3 mL besiyeri eklenerek hücrelerin steril falkonlara aktarılması sağlandı. Ardından, falkonlar 800 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atılarak 1 mL medyum eklenip hafif pipetaj yapıldı. İkinci bir santrifüj işleminden sonra, süpernatant tekrar atıldı ve dipteki hücrelere 1 mL medyum eklenerek tekrar hafifçe pipetaj yapıldı. Canlı hücre sayısını belirlemek için, steril endorf tüpüne 90 µL besiyeri, 10 µL hücreli medyum ve 10 µL Tripan Blue eklendi, ardından karışım homojen hale getirilerek thoma laminin iki kenarına 10’ar µL konuldu. Görüntüleme cihazında incelenen lamda, canlı hücrelerin parlak görünmesi ve ölü hücrelerin mavi renkte görünmesi sağlandı. Son olarak, toplam canlı hücre sayısını bulmak için, aşağıdaki formül uygulandı: Toplam hücre sayısı (mL) = ortalama hücre sayısı $\times 10^4 \times$ dilüsyon faktörü.

3.1.5 Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

HepG2 hücreleri, %80-90 konfluens seviyesine ulaştığında kriyotüplere aktarılmak üzere hazırlandı. Flaskın içindeki medyum atık kabına dökülerek, hücrelerin tabandan ayrılması amacıyla flask tabanına 3 mL Tripsin-EDTA eklendi ve 5 dakika inkübatörde bekletildi. Ardından, hücrelerin yüzeyden kalkması sağlandığında, flask içerisine 3 mL medyum eklendi ve bu süspansiyon steril bir falkona aktarıldı. Falkon, 800 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi; ardından üstteki süpernatant dikkatlice atıldı ve pellete zarar vermeden 1 mL medyum eklenerek tekrar santrifüj işlemi yapıldı. Santrifüj sonrası, 1 mL süpernatant uzaklaştırıldı ve falkona 750 µL medyum eklenerek kriyotüpe aktarıldı. İlk olarak 675 µL Fetal Bovine Serum (FBS) ve ardından 75 µL DMSO damla damla eklendi. Kriyotüp, -20°C’de 15-20 dakika bekletildikten sonra, hücrelerin korunması amacıyla sıvı azot (-80°C) tankına alındı. Bu süreç, hücrelerin canlılığını ve işlevselliğini korumak için titizlikle gerçekleştirildi ve gelecekteki deneylerde kullanılabilirliğini artırdı.

3.2 MTT Yöntemi ile Uygun Dozun Belirlenmesi

Bu çalışmada HepG2 hücrelerinin MTT yöntemi ile hücre canlılığı belirlenirken, 24 ve 48 saatlik gözlemler yapıldı ve her iki süre için uygulanan işlemlerin sırası ile kullanılan kimyasalların miktarları standart olarak korundu. Sorafenib ve Favipiravir ilaçlarının IC₅₀ dozları bu süreçte belirlendi. Yapılan ölçümlerde, hücrelerin canlılık ve ölüm oranları karşılaştırılarak IC₅₀ dozları hesaplandı, böylece hem tekil hem de kombinasyon halinde uygulanan ilaçların etkileri detaylı bir şekilde değerlendirildi.

3.2.1 Favipiravir’in MTT Yöntemi ile IC₅₀ Dozunun Belirlenmesi

Öncelikle bir well planı yapıldı ve hücre sayısı hesaplanmış süspansiyondan yararlanarak, 96 kuyucuklu plakta her bir kuyucuğa eşit sayıda olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi. Plak, 37°C ve %5 CO₂ oranındaki inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin konfluens oranı %80-90’a ulaştığında, her bir kuyucuğa 100, 500 ve 1000 µM dozlarında Favipiravir uygulandı. Dozlar 4 tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara uygulandı. Kontrol grubu olarak 1 mL DMSO eklendi. Plak tekrar inkübatöre kaldırılarak 24 saat boyunca inkübasyonda bekletildi. Ertesi gün hücreler aynı dozlarda Favipiravir ile

muamele edilerek 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, her bir kuyucuğa 10 µL MTT solüsyonu pipet yardımıyla eklenip 2-3 saat inkübe edildi. Plak içindeki kuyucuklarda oluşan formazan kristallerini çözmek amacıyla her bir kuyucuğa 200 µL DMSO eklendi ve hücrelerin etkilenmemesi için plak karanlık bir ortamda 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Son olarak çözünen formazanlar, 540 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometre cihazında ölçülerek analiz edildi.

3.2.2 Sorafenib'in MTT Yöntemi ile IC₅₀ Dozunun Belirlenmesi

Öncelikle bir well planı yapıldı ve hücre sayısı hesaplanmış süspansiyondan yararlanarak, 96 kuyucuklu plakta her bir kuyucuğa eşit sayıda olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi. Plak, 37°C ve %5 CO₂ oranındaki inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin konfluens oranı %80-90'a ulaştığında, her bir kuyucuğa 1- 100 µM dozlarında sorafenib uygulandı ve kontrol grubu olarak 1 mL DMSO eklendi. Plak tekrar inkübatöre kaldırılarak 24 saat boyunca inkübasyonda bekletildi. Hücreler aynı dozlarda Sorafenib ilacı ile muamele edilerek 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, her bir kuyucuğa 10 µL MTT solüsyonu pipet yardımıyla eklenip 2-3 saat inkübe edildi. Plak içindeki kuyucuklarda oluşan formazan kristallerini çözmek amacıyla her bir kuyucuğa 200 µL DMSO eklendi ve hücrelerin etkilenmemesi için plak karanlık bir ortamda 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Son olarak çözünen formazanlar, 540 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometre cihazında ölçülerek analiz edildi.

3.2.3 MTT Yöntemi ile Kombinasyon Çalışması

Bu tez çalışmasında 24 ve 48 saatlik doz uygulaması yapıldı. 24 saat için uygulanan aynı işlemler 48 saat içinde uygulandı. Doz uygulaması sonucundaki kombinasyon IC₅₀ değerleri belirlendi. HepG2 hücrelerinde, Sorafenib ve Favipiravir kombinasyonlarındaki IC₅₀ değerleri esas alınarak her bir kuyucukta eşit sayıda hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakta hücre ekimi gerçekleştirildi ve plak 37°C, %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakıldı. 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda uygulanan dozlar kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 1,0 µL MTT solüsyonu ve besiyeri eklendi. Plak, 37°C, %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Süre sonunda, MTT solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra, formazan kristallerini çözmek amacıyla her kuyucuğa 200 µL

DMSO eklendi ve plak 30 dakika boyunca karanlık bir ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, 96 kuyucuklu well plaktaki absorbans değerleri, spektrofotometre cihazında 540 nm dalga boyunda ölçülerek analiz edildi.

3.4 Komet Analizi

Bu analiz yönteminde, 24 ve 48 saatlik uygulamalar için belirlenen aynı dozlar ve kombinasyonlarla hücrelere uygulama yapıldı. Komet analizi öncesinde kullanılacak kimyasallar ve çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan kiyasallar Çizelge 3.1, Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'te verilmiştir. Elektroforez tankı, buz kasetleri ve preparatların yerleştirileceği kutular buzdolabında bekletilerek çalışma süresine kadar soğutuldu. NaOH ve EDTA hassas terazide tartılarak cam bir behere alındı ve üzerine 500 mL distile su (dH₂O) eklendi. Homojen hale getirilen bu çözeltinin pH değeri 13.2'ye ayarlandı ve +4°C'de çalışma süresine kadar saklandı.

Çizelge 3.1 Elektroforez tampon çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktarı
NaOH	6.0 g
EDTA	0.18 g
dH ₂ O	500 mL

Çizelge 3.2 Nötralizasyon Çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
dH ₂ O	300 mL
Trizma Base	14.55 g

Çizelge 3.3 Lizis çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
NaCl	29.4 g
EDTA	7.44 g
Trizma Base	0.24 g
Triton-X	2 mL
DMSO	2 mL

Trizma Base, hassas terazide tartılarak ardından cam bir şişeye konuldu ve üzerine 300 mL dH₂O eklendi. Homojen bir şekilde çözümün pH değeri 7.5 olarak ayarlandı. NaCl, EDTA ve Trizma Base tartılarak bir cam şişeye konuldu ve toplam hacim 200 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan kimyasal, buzdolabına kaldırılarak çalışma günü için soğuk tutuldu. Çalışmaya başlamadan bir saat önce, bu karışıma Triton-X ve DMSO eklenerek pH 10 seviyesine getirildi ve çözünmesi için bekletildi.

Etidyum bromür, hassas terazide tartıldıktan sonra steril bir falkona konuldu. Üzerine 50 mL dH₂O eklenerek çözünmesi sağlandı. Falkon, +4°C'de bekletildi ve çalışma için 10 kat seyreltme işlemi gerçekleştirildi (Çizelge 3.4). %1 oranında hazırlanacak olan NMA, hassas terazide tartıldıktan sonra cam bir tüpe konuldu. Üzerine 10 kat seyreltilmiş PBS'den 3 mL eklenerek karıştırıldı. Cam tüp, bek alevi üzerinde tutuldu ve şeffaf bir NMA çözeltisi elde edilmesi sağlandı. Hazırlanan lamalar, ısıtıcı tabla üzerinde el yakmayacak bir sıcaklığa kadar ısıtıldıktan sonra üzerine 110 µL NMA döküldü ve pipetin ucu ile ince bir tabaka halinde yayıldı. Son olarak, hazırlanan lamalar oda sıcaklığında kuruması için bekletildi (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.4 Etidyum bromür çözeltisinin formülasyonu.

Kimyasal	Miktar
Etidyum bromür	0.01 g
dH ₂ O	50 mL

Çizelge 3.5 Normal erime noktasına sahip agaroz çözeltisinin (NMA) hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
PBS	3 mL
NMA	0.03 g

%1 oranında hazırlanacak olan NMA, hassas terazide tartıldıktan sonra cam bir tüpe konuldu. Üzerine 10 kat seyreltilmiş PBS'den 3 mL eklenerek karıştırıldı. Cam tüp, bek alevi üzerinde tutuldu ve şeffaf bir NMA çözeltisi elde edilmesi sağlandı. Hazırlanan lamalar, ısıtıcı tabla üzerinde el yakmayacak bir sıcaklığa kadar ısıtıldıktan sonra üzerine 110 µL NMA döküldü ve pipetin ucu ile ince bir tabaka halinde yayıldı. Son olarak, hazırlanan lamalar oda sıcaklığında kuruması için bekletildi.

%8 oranında hazırlanacak olan LMA, hassas terazide tartıldıktan sonra cam bir tüpe konuldu. Üzerine 10 kat seyreltilmiş PBS'den 2 mL eklenerek karıştırıldı. Cam tüp, bek alevi üzerinde tutuldu ve saydam bir LMA çözeltisi elde edildi. Çalışma sırasında, jel haline gelmesini önlemek için sıcak su içerisinde bekletildi (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6 Düşük erime noktasına sahip agaroz çözeltisinin (LMA) hazırlanması

Kimyasal	Miktar
PBS	2.0 mL
LMA	0.016 g

Hücreler, inkübatörde inkübe edilerek yapışma süreci tamamlandı. Uygun yoğunluğa ulaşan hücrelere, MTT yöntemi ile belirlenen Sorafenib ve Favipiravir'in IC₅₀ dozları, iki flaska kombinasyon halinde uygulandı ve hücreler 24 saat boyunca inkübatörde bekletildi. Aynı işlem, 48 saatlik gözlem için tekrarlanarak uygulandı. Uygulanan dozlarla uygun yoğunluğa ulaşan hücreler, inkübatörden alındı ve Komet analizine geçilmek üzere hazırlık yapıldı. Plaktaki her bir kuyucuktan, hücrelerin yüzeye zarar vermeden pipet yardımıyla medyum alındı. Her bir kuyucuğa 250 µL PBS ilave edildi. Hücreler, hücre kazıyıcı (scraper) kullanılarak plak yüzeyinden dikkatlice kaldırıldı. Kodlanmış steril endorflara, aynı gruptaki hücreler aktarıldı. Hücreler, 1000 rpm hızda 3 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında, süpernatantın bir kısmı pipetle uzaklaştırıldı. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak, 10-12 µL hücre alınarak 100-120 µL LMA ile karıştırıldı ve LMA+hücre karışımı oluşturuldu. NMA'lı preparatlara, LMA+hücre karışımı üç kez damlatıldı ve lamel ile kapatıldı. Kapatılan lamlar, donma işlemi için buz kaseti üzerinde yaklaşık 5 dakika bekletildi. Süre sonunda, lameller dikkatlice çıkarıldı. Preparatlar, düz bir tepsiye dizilerek minimum 60 dakika süreyle lizis tamponunda +4°C'de bekletilmek üzere bırakıldı. Lizis işleminden sonra, preparatlar elektroforez tankına yerleştirildi ve elektroforez tamponunda 30 dakika boyunca +4°C'de bekletildi. 30 dakikalık sürenin ardından, 25 V ve 300 mA'de elektroforez işlemi başlatıldı. Elektroforez işlemi tamamlanan preparatlar, soğuk su veya nötralizasyon tamponu ile jel hasar görmeyecek şekilde yıkandı. Her bir preparat üzerine boyama işlemi için 70 µL EtBr damlatıldı ve lamel ile kapatıldı. Son olarak, her bir preparat, karanlık bir ortamda floresans mikroskobunda 100 hücre olacak şekilde sayım yapıldı.

3.5 Gen Ekspresyon Analizleri

Gen ekspresyonu analizi, hücrelerdeki genlerin ifade seviyelerinin belirlenmesi için kritik bir yöntemdir ve genellikle mRNA düzeylerinin ölçülmesi yoluyla gerçekleştirilir. En yaygın kullanılan tekniklerden biri, ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) olup, belirli bir genin mRNA'sını ters transkripte ederek cDNA'ya dönüştürür ve ardından bu cDNA'nın miktarını nicel olarak belirler (Bustin vd. 2009). Diğer bir yöntem olan RNA dizileme (RNA-Seq), hücrelerdeki tüm RNA'nın dizilenmesi ile gen ekspresyonunu detaylı bir şekilde inceleme imkânı sunar ve farklı RNA türlerinin (örneğin, mRNA ve miRNA) analizine olanak tanır (Wang vd. 2009). Ek olarak, mikrodizi analizi, binlerce genin aynı anda izlenmesine olanak sağlayarak, gen ekspresyon profillemesi yapmayı mümkün kılar (Schena vd. 1995). Western blot gibi protein düzeyindeki analizler, gen ifadesinin dolaylı bir göstergesi olarak proteinlerin varlığı ve miktarını belirlemekte kullanılır (Burnette 1981).

3.5.1 Total RNA İzolasyonu

Bu işlemde Ribospin™ RNA İzolasyon Kiti (GeneAll®, #304-150) protokolü takip edildi. Deney kapsamında bir kontrol grubu ve üç doz uygulama grubu oluşturuldu; hücreler bu gruplarda 24 ve 48 saat süreyle yeniden inkübe edildi. RNA izolasyonu ve saflaştırma işlemleri bu aşamadan sonra yapıldı ve elde edilen RNA örnekleri daha sonraki qRT-PCR analizleri için saklandı. Deney grupları için 24 ve 48 saat süreyle toplamda 8 adet T75 flask'a 5×10^6 hücre ekimi yapıldı ve flasklar 37°C, %5 CO₂ ortamında 24 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında besiyeri dikkatlice çıkarıldı.

Kontrol gruplarına taze besiyeri eklenirken, deney gruplarına belirlenen dozlar uygulandı. Doz uygulama gruplarında, MTT testi ile belirlenen IC₅₀ değerlerine göre dozlar kullanıldı. Hücreler bu dozlarla 24 saat daha inkübe edildi ve benzer işlemler 48 saatlik süre için de tekrarlandı. Uygulanan kimyasal maddeler ve derişimleri Çizelge 3.7 'de verilmiştir.

Çizelge 3.7 RNA izolasyonu için uygulanan kimyasal maddeler ve derişimleri (24h-48h)

	Favipiravir	Sorafenib
Kontrol	Yok	Yok
Favipiravir	250 µM	Yok
Sorafenib	Yok	20 µM
Sorafenib+Favipiravir	250 µM	20 µM

İnkübasyonun ardından hücreler, besiyerleri içinde hücre kazıyıcı kullanılarak şişelerden sıyrıldı ve santrifüj tüplerine alındı. Hücre pelletlerini oluşturmak için hücreler, 3000 rpm hızında 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Oluşturulan hücre pelletlerine 400 µL lizis tamponu eklendi ve bu sayede hücre zarlarının parçalanması sağlandı. Homojen bir karışım elde etmek için pipetleme işlemi yapıldı ve ardından karışım 25°C’de 5 dakika bekletildi. Hücre lizati, RNA’nın bağlanmasını sağlamak amacıyla mini spin kolona aktarıldı ve 10.000 G kuvvetinde 30 saniye süreyle santrifüj edildi. Bu işlem, RNA’nın kolonun membran yüzeyine tutunmasına olanak sağladı. Kolona 500 µL GW1 çözeltisi ilave edildi ve RNA’dan protein, tuz ve diğer kirleticileri temizlemek amacıyla 10.000 G kuvvetinde 1.5 dakika 30 saniye boyunca santrifüj edildi. Bu saflaştırma aşaması, RNA’nın saflığını artırmak için uygulandı. Kolona 700 µL RNW çözeltisi ilave edildi ve 30 saniye boyunca santrifüj edildi. Mini spin kolon, temiz bir santrifüj tüpüne taşındı ve kolona 50 µL Nuclease-Free Water (NFW) eklendi. Kolon, oda sıcaklığında 1 dakika bekletildikten sonra 10.000 G kuvvetinde 1 dakika santrifüj edilerek RNA’nın elüsyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA, kısa süreli saklama amacıyla -20°C’de, uzun süreli depolama için ise -80°C’de muhafaza edildi.

3.5.2 Gen Konsantrasyonu ve Saflık Ölçümü

RNA izolasyonundan sonra izole edilen RNA'ların yoğunluğu (ng/µL) ve saflık oranı (OD260/OD280), Thermo Scientific™ Multiskan™ GO cihazı ve Scanlt Software 6.1.1 programı kullanılarak analiz edildi. Ölçümlere başlamadan önce cihazda RNA özelliklerine uygun bir hazır protokol etkinleştirildi. Analiz için kullanılan Nanodrop plak (Thermo Scientific™ µDrop™ Plate, #N12391, ABD) referans (boş) üzerine 5 µL Nükleazsız Su (NFW) eklendi. Daha sonra her bir RNA numunesinden 5 µL alınarak aynı plaka yüklendi. Multiskan GO cihazı, belirli dalga boylarındaki ışık absorbansını ölçerek

RNA'nın miktarını ve saflık durumunu hesapladı. Bu ölçüm, RNA'nın proteini veya diğer safsızlıklarla kontamine olup olmaması için OD260/OD280 değerlerine bakılarak saf RNA elde edildi. Elde edilen sonuçlar, RNA'nın saflıklarının ve taramaların uygunluğunun belirlenmesi amacıyla kaydedildi.

3.5.3 cDNA Sentezi

RNA izolasyonu aşamasının ardından, FIREScript® RT cDNA Sentez Kiti (Solis BioDyne) protokolü kullanılarak cDNA sentezine geçildi. 24 ve 48 saatlik hücre inkübasyon süreçlerini takiben, her bir RNA örneği için toplam hacmi 20 µL olan reaksiyon karışımları hazırlandı. Karışım hazırlanırken kit içeriğindeki bileşenler sırasıyla titizlikle eklendi: 10X RT Reaction Buffer (2 µL), dNTP Mix (0.5 µL), Oligo (dT) Primer (1 µL), Random Primer (1 µL), RNase Inhibitor (0.5 µL) ve FIREScript Reverse Transcriptase (1 µL). Daha sonra, her bir tüpe örnekler için RNA ve Nuclease-Free Water (NFW) eklenerek karışımın hacmi 20 µL'ye tamamlandı. cDNA sentezinde kullanılan kimyasalların miktarları Çizelge 3.8' de verilmiştir.

Çizelge 3.8 cDNA sentezinde kullanılan kimyasalların miktarları

Deney Bileşeni	Miktar
RNA	5 µg
Oligo (dT) primer	1 µl
dNTP MIX	0.5 µl
10x Reaction Buffer	2 µl
Firescript RT	1 µl
RiboGrip RNase İnhibitor	0.5 µl
Nükleaz Free Water	Toplam hacim 20 µl
Toplam Hacim	20 µl

Reaksiyon tüpleri, RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesi amacıyla Prime Thermal Cycler cihazına yerleştirildi. Bu işlem sonucunda elde edilen cDNA, gen ekspresyon analizleri için -80°C'de azot tankında saklandı. Süreç boyunca, cDNA'nın yüksek kalitede ve saf olarak elde edilmesi, gen ifadelerinin doğru şekilde analiz edilmesi açısından hayati bir öneme sahip olduğundan, tüm adımlar dikkatle uygulandı.

3.5.4 qRT-PCR (Gerçek Zamanlı- PZR)

Favipiravir ve Sorafenib kombinasyonunun HepG2 insan karaciğer kanseri hücre hattındaki hedef genler (B-ACTİN, BCL2, KASPAZ-3, BAX, TNF- α) ekspresyon etkisini belirlemek amacıyla kantitatif gerçek zamanlı PCR analizi gerçekleştirildi. Bu analizde, Bioneer Exicycler™ 96 (Ver.4) Real-Time Quantitative Thermal Block (Thermo, ABD) cihazı kullanıldı. Deneylerde HOT FIREPol® SolisGreen® qPCR Mix reaktifi tercih edildi ve her bir gen için tüm deneysel koşullarda iki teknik tekrar yapıldı. Hedef genlerin amplifikasyonuna yönelik reaksiyon karışımı, Çizelge 3.10'de yer alan konsantrasyonlara ve örnek sayılarına göre dikkatlice hazırlandı. Karışım, her bir hedef gen için özel olarak tasarlanmış primer çiftleri ve HOT FIREPol® SolisGreen® qPCR Mix içerecek şekilde optimize edildi. Hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 5 μ l eklendi, ardından 2 μ l cDNA örneği dikkatlice ilave edildi. qRT-PCR çalışmasında kullanılacak reaktif bileşenleri Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9 qRT-PCR çalışmasında kullanılacak reaktif bileşenleri

Reaktif Bileşen	Miktar
Solis Green qPCR Mix	4 μ l
Forward Primer	0.5 μ l
Reverse Primer	0.5 μ l
dH₂O	13 μ l
cDNA	2 μ l

Tüm pipetleme işlemleri hassasiyetle yapıldı ve 24 ile 48 saatlik inkübasyon sürelerine göre elde edilen örneklerin her biri için aynı protokol uygulandı. qRT-PCR işlemi, her bir döngü için önceden belirlenen sıcaklık ve süreler doğrultusunda programlandı. Enzim aktivasyonu, denatürasyon, bağlanma ve uzama aşamaları, protokole uygun şekilde optimize edilen sıcaklık ve zaman aralıklarında gerçekleştirildi. Deneyin verimliliğini artırmak amacıyla her bir adım özenle planlandı ve uygulandı.

3.6 Protein Ekstraksiyonu

HepG2 hücre hattında Sorafenib ve Favipiravir kombinasyonunun uygulanmasını takiben, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri tamamlandıktan sonra hücre toplama

aşamasına geçildi. İnkübasyonun sona ermesiyle birlikte, benzer dozlar uygulanan hücreler dikkatlice falcon tüplerine aktarıldı ve ardından santrifüjleme işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonucunda elde edilen hücre süspansiyonlarının üst fazı (süpernatant) özenle uzaklaştırıldı. Kalan hücre pelletleri, soğuk PBS ile iki kez yıkanarak tamamen çöktürüldü. Bu yıkama basamağı, hücre dışı artık maddelerin ve kontaminantların ortamdaki temizlenmesine yardımcı oldu. Tüm işlemler, protein yapılarının zarar görmemesi için buz ortamında sürdürüldü. Yıkama tamamlandıktan sonra, her bir hücre pelletinin üzerine 200 µl hacminde soğuk RIPA tamponu ilave edildi. Ek olarak, 10 µl proteaz inhibitör kokteyli de karışıma katıldı. Bu çözelti pipetaj yardımıyla homojen hâle getirildi ve tüpler 30 dakika boyunca buz içerisinde bekletildi. Bu inkübasyon süreci, hücre içerisindeki proteinlerin etkin bir şekilde çözülmesini ve proteolitik yıkıma uğramadan korunmasını sağladı. İnkübasyonun ardından tüpler, 4 °C’de, 10.000 rpm hızında 10 dakika süreyle santrifüje edildi. Bu adım sonucunda tüplerin üst kısmında yer alan protein açısından zengin süpernatant elde edildi. Süpernatant, santrifüj sonrası protein yapılarının bozulmasını engellemek amacıyla tekrar buz üzerinde tutuldu. Etiketleme işlemi tamamlandıktan sonra örnekler önce -20 °C’de, ardından uzun süreli saklama için -80 °C’de muhafaza edildi. Böylece, protein izolasyon süreci başarıyla tamamlandı.

Protein konsantrasyonunu belirlemek amacıyla Bradford testi kullanıldı. Bu kolorimetrik analiz yöntemi, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlerle bağlanarak renk değiştirmesi prensibine dayandı. Oluşan boya-protein kompleksi, asidik ortamda 595 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon gösterdi. Renk değişimi, örneklerdeki toplam protein miktarı ile doğru orantılı şekilde ölçüldü (Bradford 1976). Testin güvenilirliği, boya ile proteinler arasındaki bağlanma derecesine bağlı olarak değişiklik gösterebildi. Farklı protein yapıları ölçüm değerlerinde bazı farklılıklara neden olabildi. Genellikle Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılarak çeşitli konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı ve bu çözeltilerle bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Bilinmeyen örneklerin protein miktarları, bu eğri üzerinden hesaplandı (Compton ve Jones 1985). Deneysel çalışmalarda, öncelikle kullanılan tüm malzemelerin ve çalışma yüzeylerinin sterilizasyonu sağlandı. Protein standart çözeltileri, Brilliant Blue reaktifi ve örnekler, deney süresince düşük sıcaklıkta muhafaza edildi. Bradford reaktifi, distile su ile 1:10 oranında seyreltilerek kullanıma hazır hâle getirildi. BSA, farklı hacimlerde (25, 50, 100,

150, 300 µl) distile su ile karıştırılarak standart çözeltiler elde edildi. Kontrol grubu için 900 µl boya çözeltisi ve 100 µl distile su, ependorf tüplerine eklendikten sonra pipetaj yapılarak optik cam küvetlere aktarıldı ve absorbans ölçümleri 595 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Aynı prosedür, diğer BSA konsantrasyonları için de uygulandı. Denek örnekleri için 900 µl RIPA çözeltisi, 10 µl protein örneği ve 900 µl Brilliant Blue reaktifi karıştırılarak homojen bir çözelti elde edildi. Ardından bu karışım küvetlere aktarılıp Jenway 6305 UV/Vis spektrofotometre cihazı kullanılarak absorbans ölçümleri yapıldı ve elde edilen veriler ayrıntılı şekilde kaydedildi.

3.7 ELISA Analizi

Bu çalışmada, HepG2 hücre hattında Sorafenib ve Favipiravir'de Bax, Bcl-2, TNF- α ve Kaspaz-3 protein düzeylerinin kantitatif olarak ölçülmesi amacıyla, human BAX ELISA kiti (Kod: EH0669, 96T, FineTest) kullanılmıştır. ELISA yöntemi, antijen-antikor etkileşimi esasına dayanmakta olup, yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü sayesinde protein analizlerinde yaygın olarak tercih edilmektedir (Crowther 2009). Deneysel işlemler kapsamında, hücre kültür süpernatantlarından elde edilen örnekler, bu proteinlere özgü antikorlarla kaplı mikrotitre plakalarına aktarılmış ve ELISA protokolü doğrultusunda işleme alınmıştır. Numuneler önce inkübasyona bırakılmış, ardından biotin etiketli sekonder antikor ve HRP-konjugat (horseradish peroxidase) ilave edilerek renk reaksiyonu başlatılmıştır. TMB substratının eklenmesiyle oluşan renk değişimi, reaksiyonun sülfürik asit ile durdurulmasının ardından 450 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu ile ölçülmüştür. Her protein için oluşturulan standart eğriler kullanılarak konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. Deneyde kullanılan çözelti ve reaktifler, kit protokolüne sadık kalınarak özenle hazırlanmıştır. Yıkama tamponu, stok çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle oluşturulmuş; standart protein çözeltileri santrifüjlenip seri dilüsyon yöntemiyle analizde kullanılacak hale getirilmiştir. Biotinli antikor ve HRP-konjugat çözeltileri, analizden kısa süre önce hazırlanmış, her biri 1:99 oranında seyreltme ile 1X konsantrasyona getirilmiştir. Mikrotitre plakındaki işlemler şu sırayla yürütülmüştür: Her kuyucuğa 100 µL standart veya örnek numune eklendi. 90 dakika inkübasyon yapıldı. Yıkama adımı uygulandı. 100 µL biotinli antikor eklendi, 60 dakika inkübe edildi. Tekrar yıkama yapıldı. 100 µL HRP-konjugat eklendi, 30 dakika inkübe edildi. Üçüncü yıkama uygulandı. 90 µL TMB substrat eklendi, 15–20 dakika renk

gelişimi beklendi. 50 µL durdurma solüsyonu eklendi ve optik yoğunluk ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak Bax, Bcl-2, Tnf- α ve Kaspaz-3 protein düzeyleri belirlenmiş; kontrol ve ilaç uygulanmış gruplar karşılaştırılmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve protein düzeylerindeki değişiklikler optik yoğunluk değerleri temel alınarak analiz edilmiştir.

3.8 İstatiksel Analiz

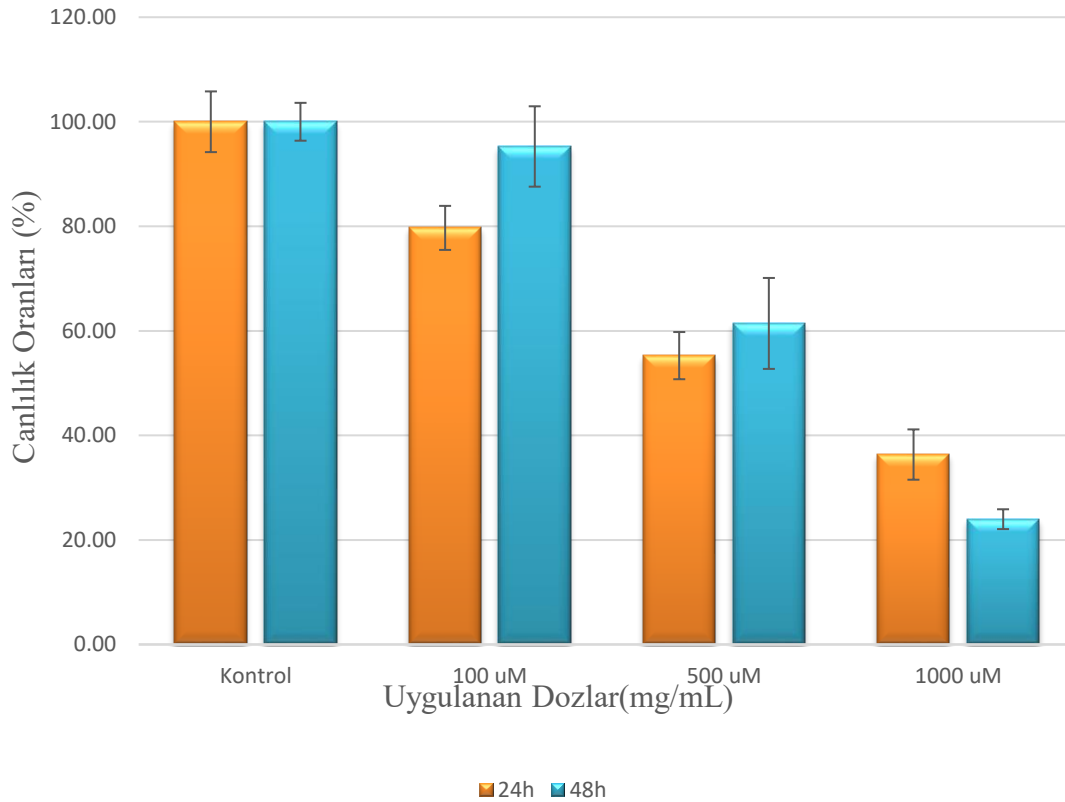
MTT deneyi sonucunda elde edilen spektrofotometrik veriler yüzde (%) cinsinden ifade edilmiştir. IC₅₀ dozunun tespiti için probit analizi yöntemi kullanılmıştır. Komet analizi ile elde edilen veriler, grupların ortalamaları arasında karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla Duncan testi ile analiz edilmiştir ($p < 0.05$). Gen ekspresyon analizinde, referans gen olarak β -aktin kullanılmış ve analiz bu gen temel alınarak standartlaştırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 MTT Analizi Sonuçları

4.1.1 MTT Yöntemi ile Favipiravir'in HepG2 Hücre Hattında Sitotoksik Etkileri

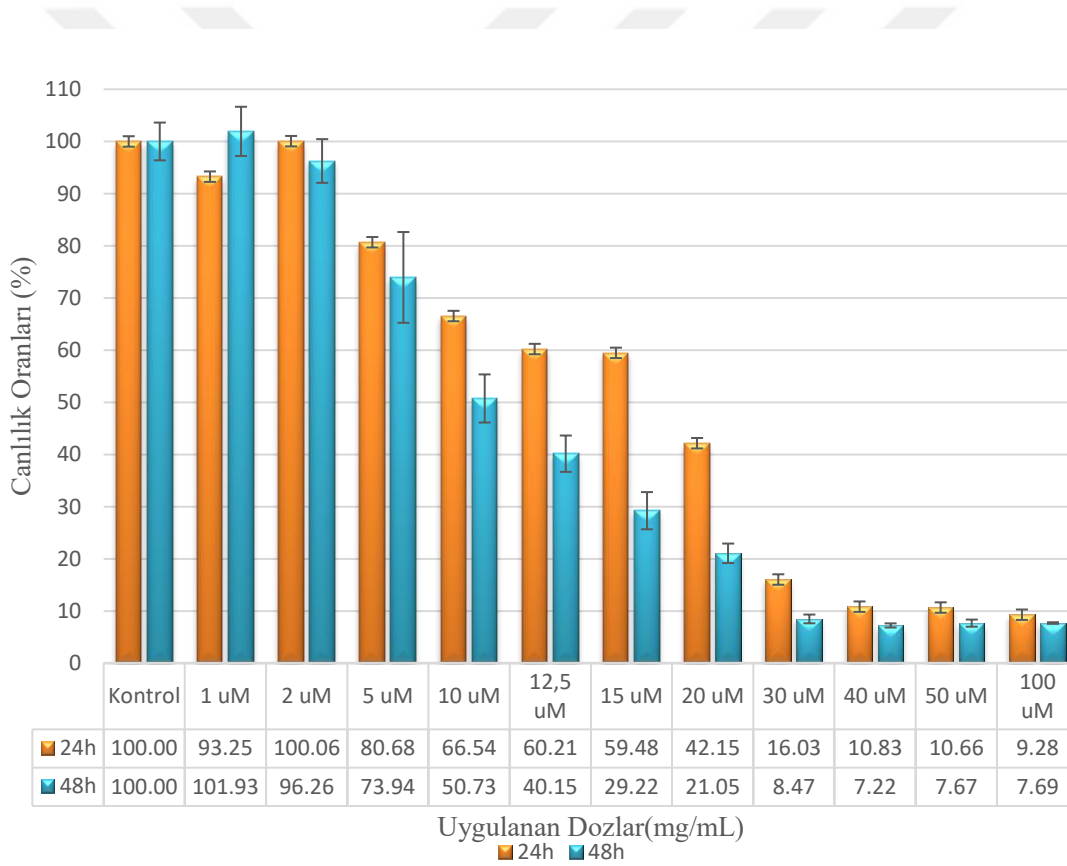
Çalışmamızda HepG2 hücre hattında 24. ve 48. saatlerde Favipiravir'in etkin dozunu belirlemek için MTT yöntemiyle hücre yoğunluğu belirlendi. Favipiravir hücrelere 3 farklı konsantrasyonda (100, 500 ve 1000 µM) uygulandı. MTT analizi, ELISA mikropalak okuyucusu kullanılarak 540 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiş ve her bir dozun HepG2 hücrelerinin canlılık oranı üzerindeki etkisi belirlendi. Elde edilen verilere dayanarak, 24-48 saatlik inkübasyonda IC₅₀ değeri 250 µM olarak tespit edilmiştir. Hücre canlılığı sonuçları yüzde (%) olarak ifade edildi. Kontrol grubu %100 canlılık değeri olarak kabul edilerek, test edilen bileşiklerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri bu referansa göre hesaplandı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 HepG2 hücreleri üzerinde uygulanan Favipiravir'in farklı dozlarının 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında canlılık oranına etkisi.

4.1.2 MTT Yöntemi ile Sorafenibin HepG2 Hücre Hattında Sitotoksik Etkileri

Çalışmamızda HepG2 hücre hattında 24. Ve 48. Saatlerde Sorafenibin etkin dozunu belirlemek için MTT yöntemiyle hücre yoğunluğu belirlendi. Sorafenibin hücrelere 11 farklı konsantrasyonda (1-100 μ M) uygulandı. MTT analizi, ELISA mikropalak okuyucusu kullanılarak 540 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiş ve her bir dozun HepG2 hücrelerinin canlılık oranı üzerindeki etkisi belirlendi. Elde edilen verilere dayanarak, 24-48 saatlik inkübasyonda IC₅₀ değeri 20 μ M olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubu %100 canlılık değeri olarak kabul edilerek, test edilen bileşiklerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri bu referansa göre hesaplandı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 HepG2 hücreleri üzerinde uygulanan Sorafenib'in farklı dozlarının (1-100 μ M) ve kontrol grubunun 24 saat ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında canlılık oranları (%).

Çalışmamızda, HepG2 hücre hattında 24. ve 48. saatlerde hem Sorafenib hem de Favipiravir'in etkin dozlarını belirlemek amacıyla MTT yöntemi kullanarak hücre canlılığı değerlendirildi. Sorafenib hücrelere 1 μ M ile 100 μ M arasında değişen 11 farklı konsantrasyonda, Favipiravir ise 100, 500 ve 1000 μ M olmak üzere üç farklı

konsantrasyonda uygulandı. Her iki ilaç için de uygulamaların ardından 24. ve 48. saatlerde MTT analizini gerçekleştirildi ve absorbans değerlerini ELISA mikropalak okuyucusu ile 540 nm dalga boyunda ölçüldü. Elde ettiğimiz hücre canlılığı sonuçları yüzde (%) olarak ifade edildi; kontrol grubunu %100 canlılık değeri olarak kabul ederek, test edilen bileşiklerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri bu referansa göre hesaplandı. Her iki ilacın da tek başına uygulandığı deneylerde IC₅₀ değerleri belirlendi. Favipiravir IC₅₀ değeri 250 µM, Sorafenib IC₅₀ değeri 20 µM olup ve bu değerleri sabit kabul ederek ilaç kombinasyonları oluşturuldu; kombinasyon şeklinde gerçekleştirdiğimiz MTT analizlerinde ve diğer tüm deney aşamalarda bu IC₅₀ değerleri temel alındı.

4.2 Genotoksisite Bulguları

Favipiravir ve Sorafenib'in HepG2 hücre hattında belirlenen konsantrasyonlarda DNA hasarı düzeyleri 24. ve 48. saatlerde Komet yöntemi ile belirlendi. Her bir doz konsantrasyonu için, preparatlar üzerinde toplamda 100 hücre floresan mikroskop kullanılarak sayılmıştır (çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 HepG2 hücre hattında Sorafenib ve Favipiravir kombinasyonunun Komet yöntemi ile DNA hasarının düzeyleri.

Uygulama	DNA Hasarı (Arbitrary Unit)	
	Konsantrasyon Ortalama ± Standart sapma 24 saat	48 saat
Kontrol	3.67±1,15 ^a	4.33±1,15 ^a
Pozitif Kontrol	49.55±7.87 ^d	50.44±8.62 ^d
Sor20	20.33±2,52 ^b	25.33±4,16 ^b
Fav250	10.33±2,08 ^c	15.67±2,08 ^c
Sor20 + Fav250	23.67±1,53 ^b	32.00±4 ^d

* Farklı sütunlardaki farklı şekilde belirtilen harfler p<0,05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi).

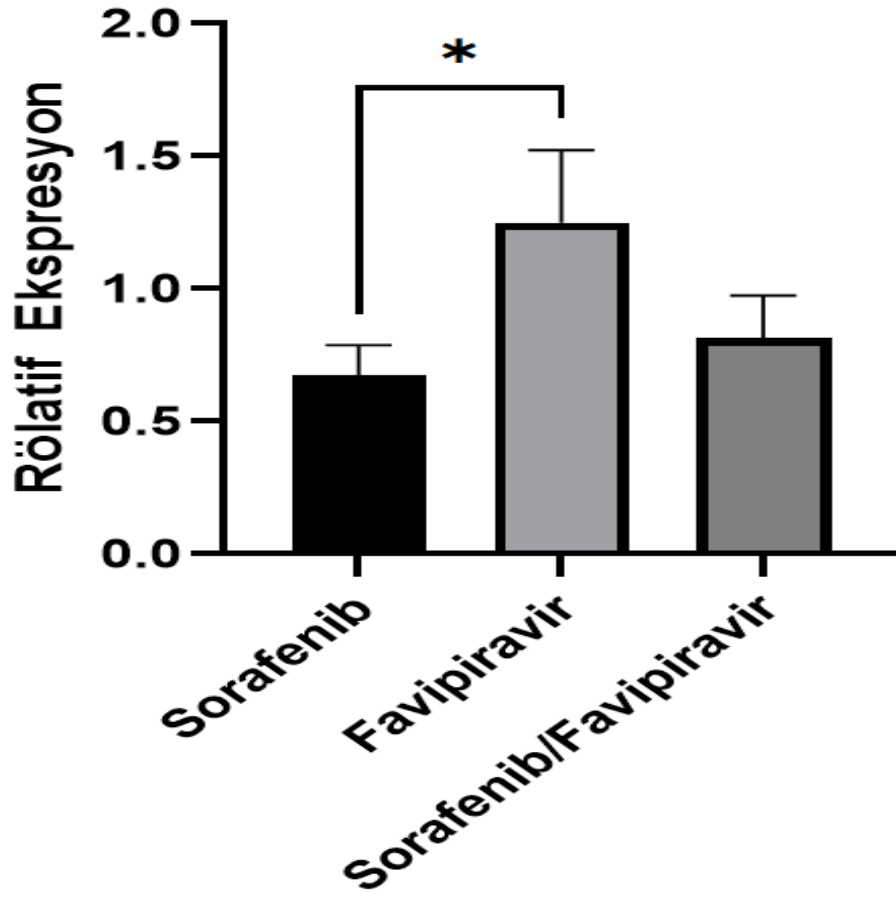
* Sor:Sorafenib; Fav:Favipiravir , pozitif kontrol: cisplatin.

HepG2 hücre hattı üzerine uygulanan ilaç, ilaç-ilaç dozlarının yarattığı en yüksek DNA hasarı değeri Sor20+Fav250 kombinasyon grubunda (32.00±4^d), en düşük DNA hasarı ise Fav250 dozunda görüldü. 24. saatteki DNA hasar seviyeleri: kontrol grubunda 3.67±1.15^a; Sor20 dozunda 20.33±2.52^b; Fav250 dozunda 10.33±2.08^c; kombinasyon grubunda ise 23.67±1.53^b bulundu. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise DNA hasar

seviyelerindeki artış istatistiksel olarak anlamlıdır. 48. saatteki DNA hasar seviyeleri: kontrol grubunda 4.33 ± 1.15^a ; Sor20 dozunda 25.33 ± 4.16^b ; Fav250 dozunda 15.67 ± 2.08^c ; kombinasyon grubunda ise 32.00 ± 4^d bulundu. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise DNA hasar seviyelerindeki artış istatistiksel olarak anlamlıdır.

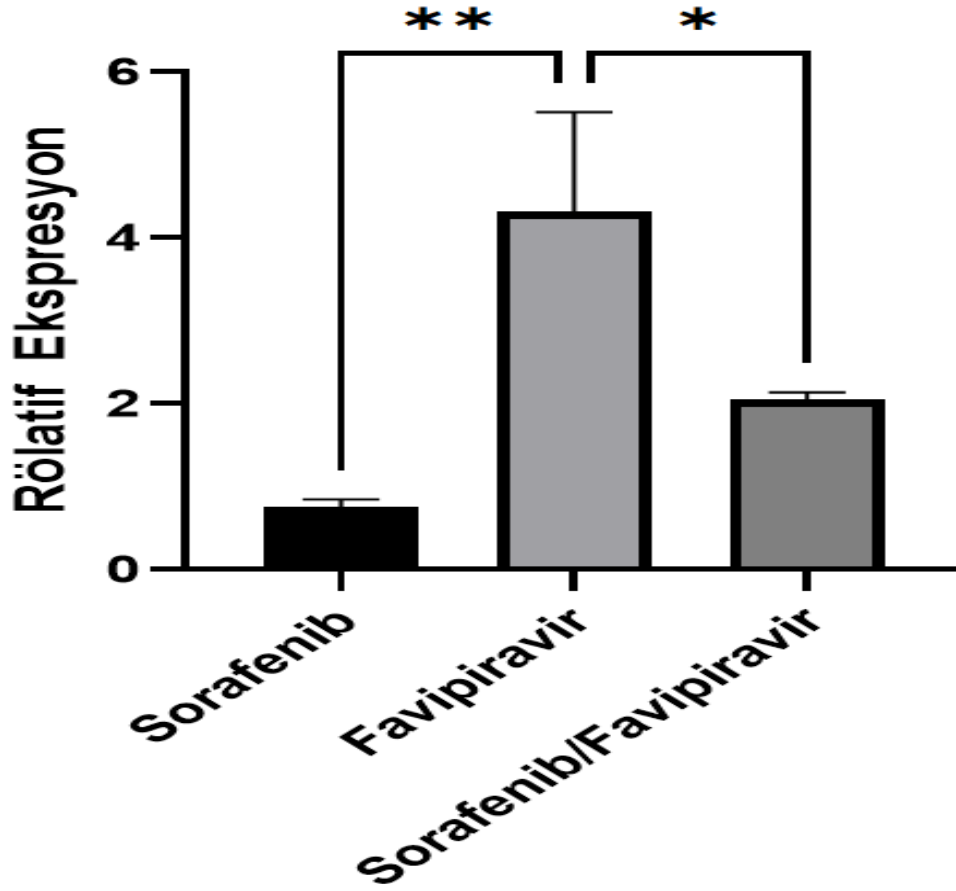
4.3 Gen İfade Düzeyi Bulguları

Çalışmamızda, HepG2 hücre hattında IC_{50} değerleri belirlenmiş olan Favipiravir ve Sorafenib'in tek başına ve kombine doz uygulamaları gerçekleştirildi. Uygulamaların ardından hücreler 1 gün süreyle etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda izole edilen RNA'lar kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Elde edilen cDNA örnekleri ile qRT-PCR analizleri gerçekleştirildi ve doz uygulamalarının BAX, BCL-2, KASPAZ-3 ve TNF- α gibi hedef genlerin ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkileri incelendi. qRT-PCR analizlerinden 24 ve 48 saatleri sonucunda elde edilen Ct değerleri doğrultusunda, kontrol grubu ve doz uygulaması yapılan gruplar için çift tekrarlı analizler yapıldı. Gen ekspresyon analizlerinde referans gen olarak β -ACTİN housekeeping geni kullanıldı. 24 ve 48 saatlik uygulama süreleri göz önünde bulundurulduğunda, Favipiravir'in gen ekspresyonu üzerindeki etkisi, özellikle 48 saatin sonunda daha belirgin hale gelmiştir. 24 saatlik süre zarfında BAX, KASPAZ-3 ve BCL-2 gen ekspresyonlarındaki değişiklikler, Favipiravir'in apoptotik süreçleri başlattığını ancak etkisinin daha sınırlı olduğunu göstermektedir. Ancak, 48 saatlik süre sonrasında Favipiravir, BAX VE KASPAZ-3 genlerinde önemli artışlar sağlarken, BCL-2 gen ekspresyonunda belirgin bir azalma meydana gelmiştir, bu da ilacın hücre ölümünü teşvik ettiğini ve apoptoz süreçlerini aktive ettiğini düşündürmektedir. TNF- α genindeki artış, Favipiravir'in inflamatuvar yanıtları da etkileyebileceğini göstermektedir. Kombinasyon uygulaması ise 48 saatin sonunda daha ılımlı etkiler göstermiştir; özellikle BAX ve KASPAZ-3 gen ekspresyonlarında daha az artış ve BCL-2 ekspresyonunda daha az azalma gözlemlenmiştir. Bu durum, Sorafenib ve Favipiravir'in birlikte uygulandığında, Favipiravir'in tek başına uygulandığı kadar güçlü bir apoptotik yanıt yaratmadığını, kombinasyonun bazı mekanizmaları dengelediğini düşündürmektedir. 24 saatlik uygulamada daha sınırlı değişiklikler gözlenirken, 48 saat sonunda Favipiravir ve kombinasyonun apoptotik ve inflamatuvar yanıtları daha belirgin hale gelmiştir



Şekil 4.3. HepG2 hücre hattına Sorafenib, Favipiravir ve Sor+Fav doz uygulanmasından 24 saat sonra Bax gen ekspresyon değişimi.

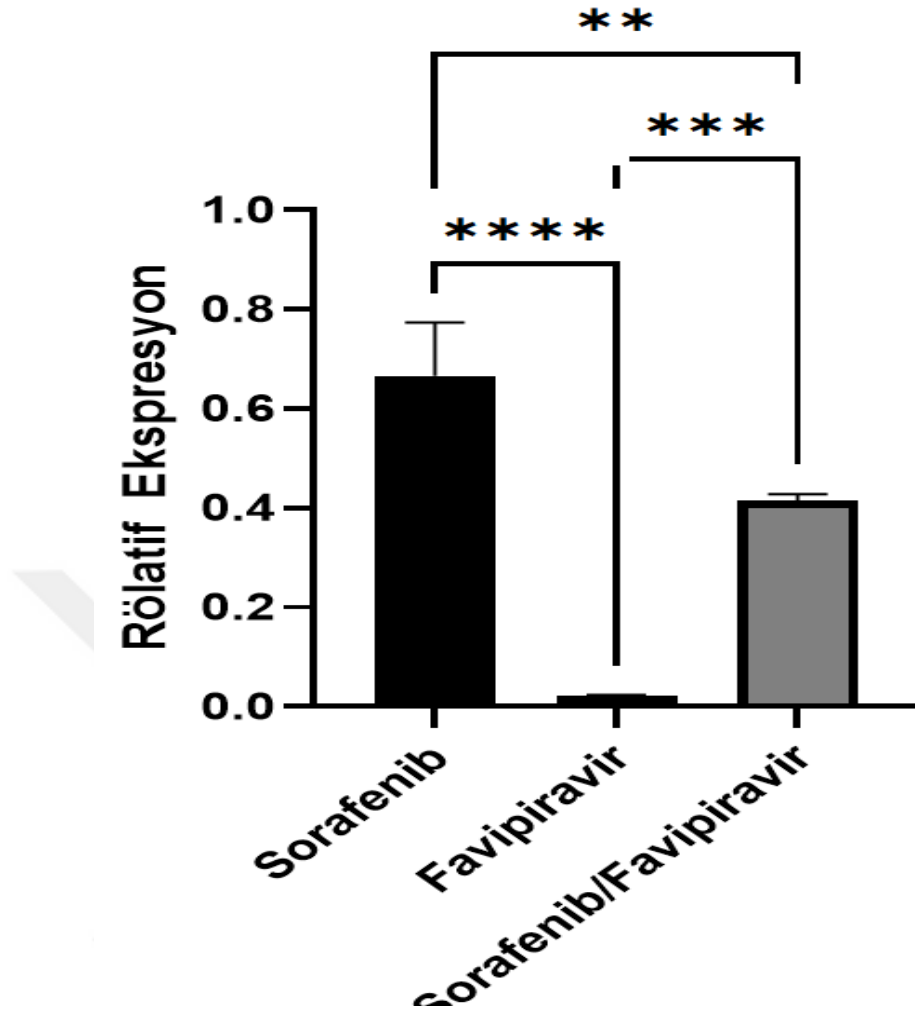
HepG2 hücre hattında gerçekleştirilen qRT-PCR analizleri sonucunda, BAX geninin mRNA düzeyindeki ekspresyonunda tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edilmiştir. Sorafenib, Favipiravir ve Sorafenib + Favipiravir uygulamaları 24 saat süreyle uygulanmış ve ardından elde edilen RNA’lardan sentezlenen cDNA’lar kullanılarak Bax gen ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. Favipiravir uygulamasının, Sorafenib grubuna kıyasla BAX gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde artırdığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Kombinasyon grubunda (Sorafenib + Favipiravir) da ekspresyon düzeyinde artış gözlenmiş olmakla birlikte, bu artış Favipiravir’in tek başına oluşturduğu artıştan daha düşük düzeyde kalmıştır. Elde edilen bu bulgular doğrultusunda, Favipiravir’in BAX genini upregüle ederek apoptoz mekanizmasını aktive edebileceği; ancak Sorafenib ile birlikte uygulandığında bu etkinin kısmen azaldığı ve kombinasyonun olası bir antagonistik etki yaratabileceği düşünülmektedir. Bu durum, ilaçların birlikte kullanımında dikkatli olunması gerektiğini ve etkileşimlerinin hücresel düzeyde farklı biyolojik yanıtlar doğurabileceğini göstermektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.4. HepG2 hücre hattına Sorafenib, Favipiravir ve Sor+Fav doz uygulanmasından 48 saat sonra Bax gen ekspresyon değişimi.

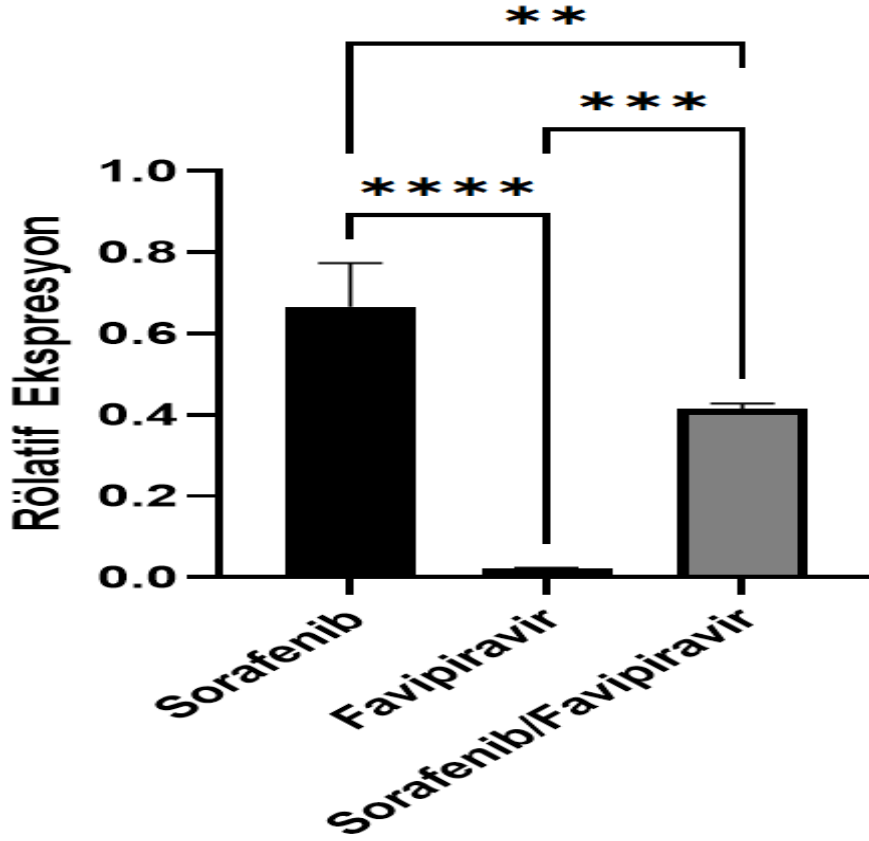
48 saatlik uygulamalar sonrasında Bax gen ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemiyle değerlendirildi. Elde edilen veriler doğrultusunda, Favipiravir grubunda BAX gen ekspresyonunun anlamlı düzeyde arttığı belirlendi ($p<0.01$). Bu artış, hem Sorafenib grubuna hem de Sorafenib ve Favipiravir kombinasyon grubuna kıyasla daha yüksek düzeyde gerçekleştiği tespit edildi.

Kombinasyon grubunda, BAX gen ekspresyonunun Favipiravir grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$). Sorafenib grubunda ise Bax gen ekspresyon seviyesinin düşük düzeyde seyrettiği ve gruplar arasında anlamlı bir fark oluşturmadığı saptandı. Bu bulgular doğrultusunda, Favipiravir'in tek başına uygulandığında BAX gen ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı, dolayısıyla apoptozu tetikleyici bir etki oluşturduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.4).



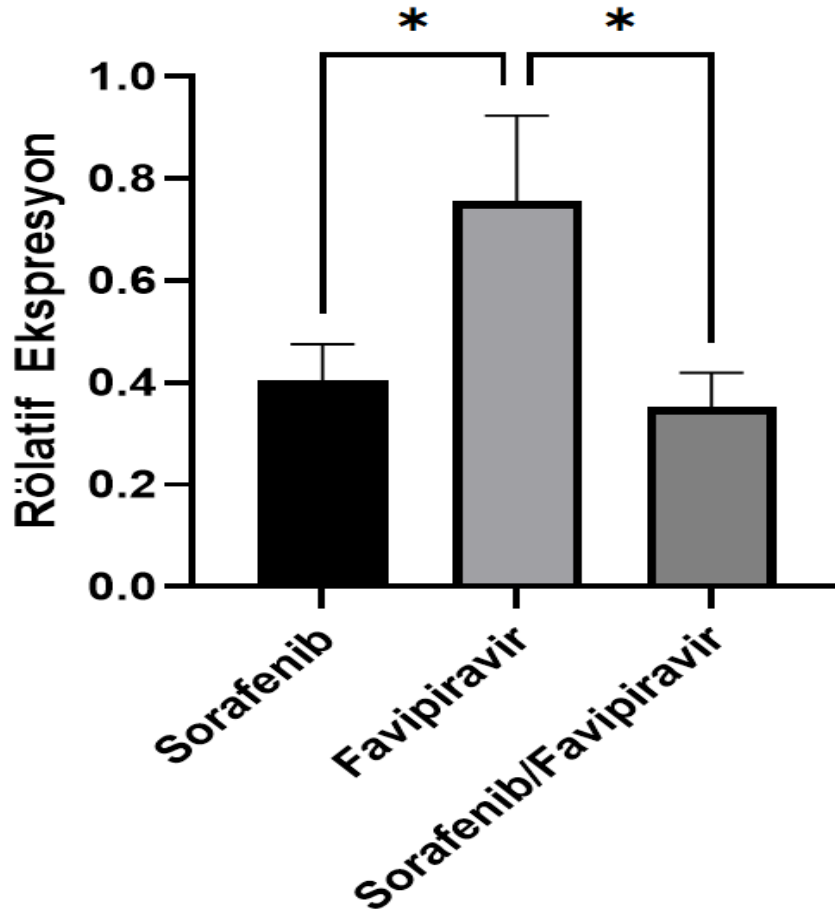
Şekil 4.5. HepG2 hücre hattına Sorafenib, Favipiravir ve Sor+Fav doz uygulanmasından 24 saat sonra BCL-2 gen ekspresyon değişimi.

BCL-2 gen ekspresyon düzeyi, 24 saatlik uygulamalar sonrasında RT-PCR yöntemiyle değerlendirildi. Bulgulara göre, en yüksek ekspresyon düzeyi Sorafenib uygulanan grupta gözlemlendi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.0001$). Bu durum, Sorafenib'in anti-apoptotik yanıtı artırdığını düşündürdü. Favipiravir uygulamasıyla birlikte BCL-2 düzeylerinde anlamlı bir azalma meydana geldi ($p < 0.0001$). Bu azalma, Favipiravir'in apoptotik süreci desteklediğini gösterdi. Aynı şekilde, Sorafenib ve Favipiravir birlikte uygulandığında da BCL-2 ekspresyonunun azaldığı ve sadece Sorafenib grubuna göre anlamlı farklılık gösterdiği tespit edildi ($p < 0.001$). Kombinasyon grubundaki bu azalma, Favipiravir'in etkisinin baskın olduğunu düşündürdü. Elde edilen veriler 24 saatlik sürede Favipiravir'in BCL-2 gen ekspresyonunu azaltarak apoptozu teşvik ettiğini, Sorafenib'in ise bu süreci baskıladığını ortaya koydu (Şekil 4.5).



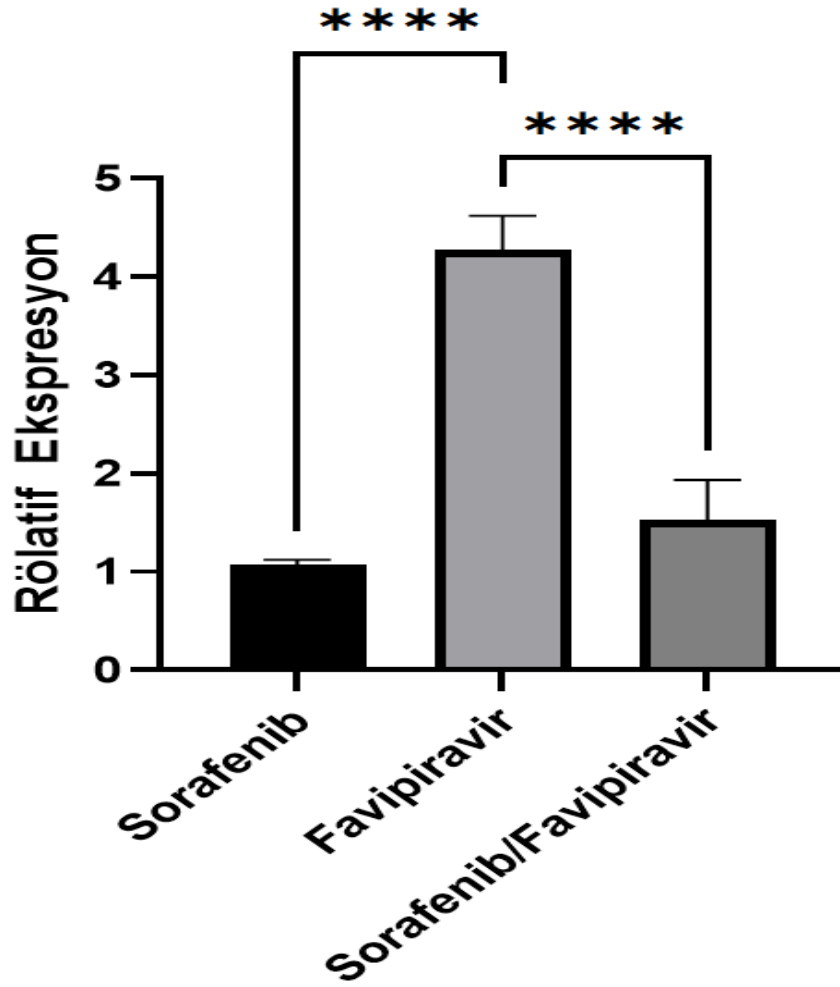
Şekil 4.6. HepG2 hücre hattına Sorafenib, Favipiravir ve Sor+Fav doz uygulanmasından 48 saat sonra BCL-2 gen ekspresyon değişimi.

BCL-2 gen ekspresyon düzeyinde; Sorafenib ($p<0.0001$), Favipiravir ($p=0.0013$) ve Sorafenib/Favipiravir kombinasyonunun ($p=0.0024$) 48 saatlik uygulaması sonrasında, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Sorafenib uygulamasının BCL-2 gen ekspresyonunu anlamlı derecede downregüle ettiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, Favipiravir uygulamasının da BCL-2 ekspresyon düzeyini belirgin şekilde düşürdüğü saptanmıştır. Kombine tedavi grubunda ise, Sorafenib ve Favipiravir'in birlikte uygulanmasının BCL-2 ekspresyon düzeyini, tek başına uygulanan Sorafenib'e kıyasla daha düşük düzeyde bastırmadığı, ancak Favipiravir uygulamasına kıyasla daha yüksek downregülasyon sağladığı görülmüştür. Elde edilen bu veriler doğrultusunda, Sorafenib ve Favipiravir'in kombinasyon halinde uygulanmasının BCL-2 ekspresyonu üzerindeki etkileşimlerinin antagonistik özellik gösterebileceği düşünülmektedir. Bu bulgu, apoptozun negatif düzenleyicilerinden biri olan BCL-2'nin baskılanmasında, Sorafenib'in Favipiravir'e kıyasla daha baskın ve etkili bir role sahip olabileceğini de ortaya koymaktadır (Şekil 4.6).



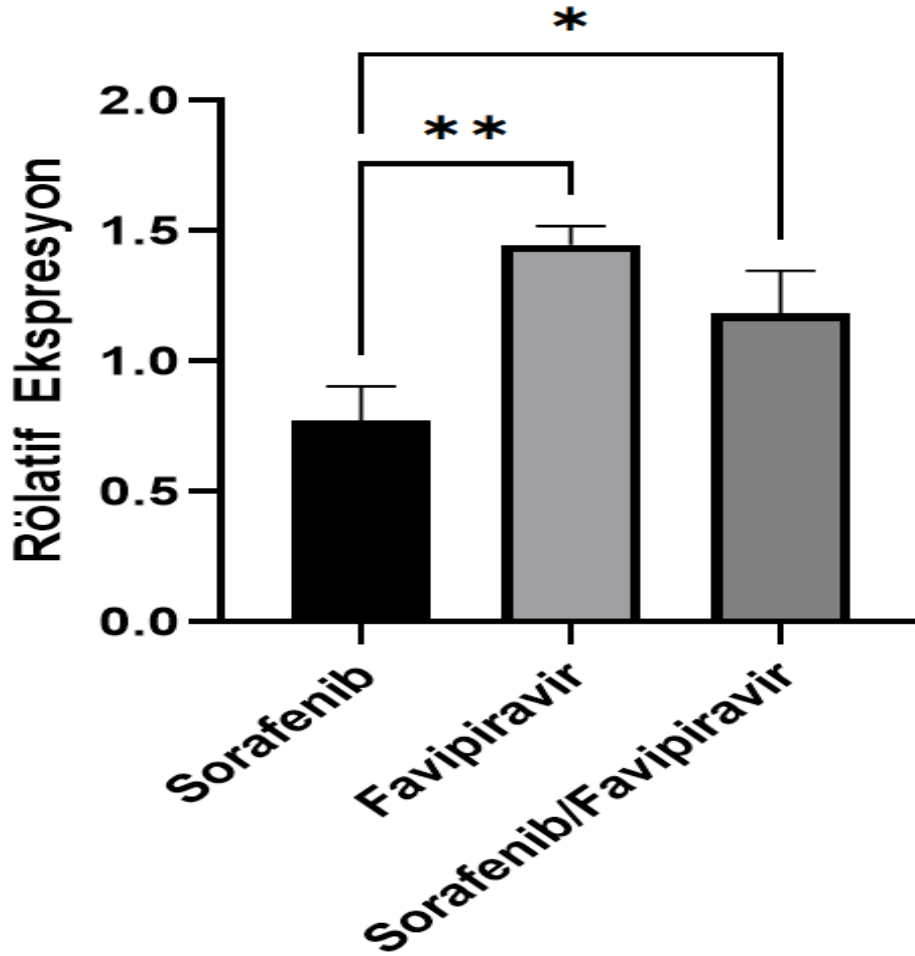
Şekil 4.7. HepG2 hücre hattına Sorafenib, Favipiravir ve Sor+Fav doz uygulanmasından 24 saat sonra KASPAZ-3 gen ekspresyon değişimi.

HepG2 hücre hattında KASPAZ-3 gen ekspresyon düzeyinde, Sorafenib, Favipiravir ve Sorafenib/Favipiravir kombinasyonunun 24 saatlik uygulaması sonucunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Yapılan analizler neticesinde, Favipiravir uygulamasının KASPAZ-3 gen ekspresyonunu Sorafenib uygulamasına kıyasla daha yüksek düzeyde artırdığı belirlenmiştir. Bununla birlikte Sorafenib ve Favipiravir'in kombinasyon halinde uygulanması, tek başına Favipiravir uygulamasına kıyasla KASPAZ-3 ekspresyon düzeyinde daha düşük bir artışa neden olmuştur. Bu bulgular, Sorafenib ve Favipiravir'in apoptotik yolaktaki etkilerinin kombinasyon halinde uygulandığında olası bir antagonistik etkileşim gösterebileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla, bu kombinasyonun apoptoz mekanizmasını aktive etme potansiyelinin sınırlı olabileceği ve tedavi stratejilerinde dikkatle değerlendirilmesi gerektiği ileri sürülebilir (Şekil 4.7).



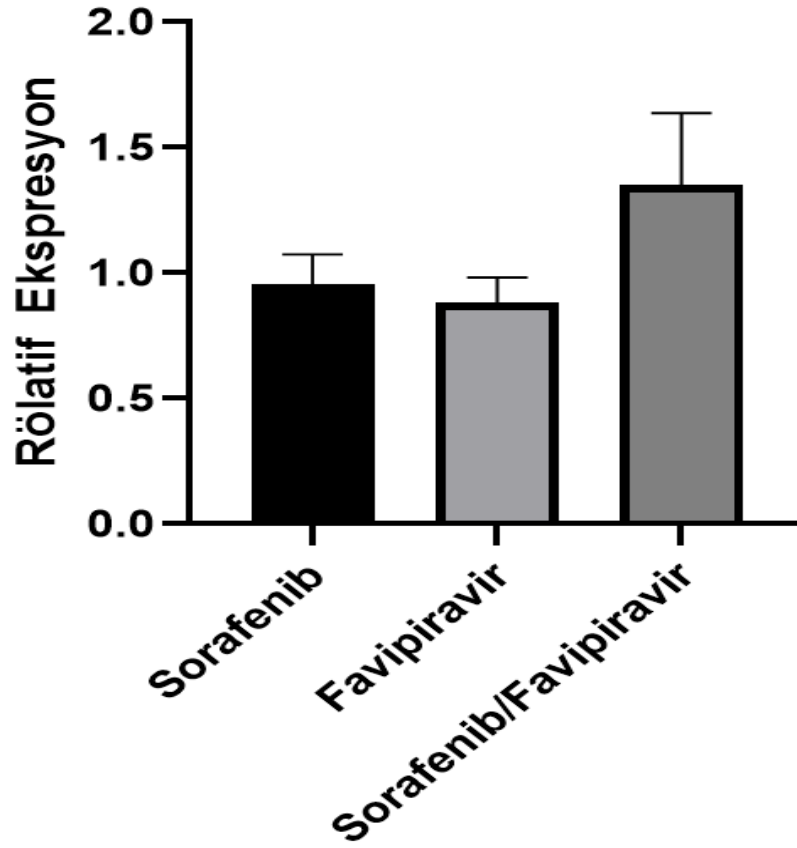
Şekil 4.8. HepG2 hücre hattına Sorafenib, Favipiravir ve Sor+Fav doz uygulanmasından 48 saat sonra KASPAZ-3 gen ekspresyon değişimi.

HepG2 hücre hattında KASPAZ-3 gen ekspresyon düzeyinde, Sorafenib ($p<0.0001$), Favipiravir ($p<0.0001$) ve Sorafenib/Favipiravir kombinasyonunun ($p<0.0001$) 48 saatlik uygulaması sonucunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Favipiravir uygulamasının, Sorafenib uygulamasına kıyasla KASPAZ-3 gen ekspresyonunu çok daha yüksek düzeyde upregüle ettiği tespit edilmiştir. Kombine tedavi grubunda ise, Sorafenib ve Favipiravir'in birlikte uygulanmasının, Favipiravir'in tek başına sağladığı yüksek ekspresyon seviyesini düşürdüğü ve Sorafenib uygulamasına yakın bir düzeyde ekspresyon sağladığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, Favipiravir'in apoptotik yanıtı belirgin şekilde tetiklediğini, ancak kombinasyon tedavisinin bu etkiyi baskıladığını ve iki ilacın birlikte kullanımının antagonistik etkileşim gösterebileceğini desteklemektedir (Şekil 4.8).



Şekil 4.9. HepG2 hücre hattına Sorafenib, Favipiravir ve Sor+Fav doz uygulanmasından 24 saat sonra TNF-a gen ekspresyon değişimi.

HepG2 hücre hattında TNF- α gen ekspresyonu düzeyinde Sorafenib ($p < 0.01$), Favipiravir ($p < 0.05$) ve Sorafenib/Favipiravir etken maddelerinin 24 saatlik uygulaması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir. Sorafenib uygulaması tek başına uygulandığında 24 saatte Favipiravir dozu uygulamasına kıyasla daha düşük düzeyde ekspresyon seviyesi göstermiştir. Kombinasyon grubu çalışmasına kıyasla ise daha düşük düzeyde ekspresyon artışı sağladığı gözlenmiştir. Favipiravir uygulamasının TNF- α gen ekspresyonunu anlamlı derecede upregüle ettiği, Sorafenib/Favipiravir kombinasyonunun ise tekli uygulamalara kıyasla daha düşük düzeyde ekspresyon artışı sağladığı gözlenmiştir. Bu durum, kombinasyon uygulamasının antagonistik bir etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Bu bulgu, inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde Favipiravir'in tek başına daha güçlü bir etki oluşturabildiğini, ancak Sorafenib ile birlikte uygulandığında bu etkinin baskılanabileceğini ortaya koymaktadır (Şekil 4.9).

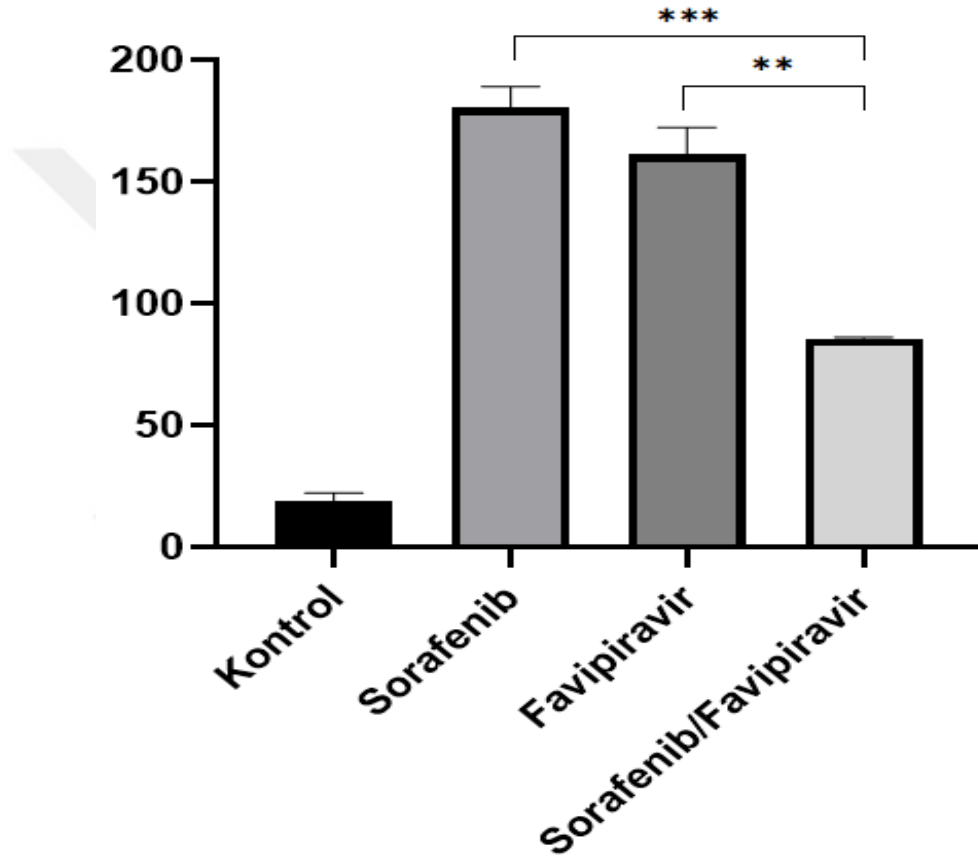


Şekil 4.10. HepG2 hücre hattına Sorafenib, Favipiravir ve Sor+Fav doz uygulanmasından 48 saat sonra TNF-a gen ekspresyon değişimi.

48 saatlik uygulamada ise TNF- α gen düzeylerinde artış eğilimi devam etse de, bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu, tedavi süresinin uzamasıyla birlikte hücrelerin tedaviye karşı bir adaptasyon geliştirmiş olabileceğini ya da ilk 24 saatte gözlenen inflamatuvar yanıtın zamanla azaldığını düşündürmektedir. Özellikle kombinasyon grubunda gözlenen yüksek ancak anlamsız artış, geç dönem etkiler açısından dikkatle değerlendirilmelidir. Sonuç olarak, TNF- α gen ekspresyonu açısından Favipiravir'in güçlü bir uyarıcı etkisi olduğu, ancak bu etkinin Sorafenib ile birlikte verildiğinde baskılandığı anlaşılmaktadır. Bu çalışmada, özellikle kombinasyon tedavisinin hücreler üzerinde daha belirgin bir düzeyde yanıt oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Bu artış, apoptoza veya inflamasyona aracılık eden bir gen olan TNF- α 'nın ekspresyonunun kombinasyon tedavisinin hücre ölümünü tetikleyici etkisini desteklemektedir. Ancak bu etkinin tekli uygulamalara kıyasla daha düşük seviyede gerçekleşmesi, kombinasyon tedavisinin bazı gen ekspresyon düzeylerinde sınırlayıcı veya modülatör bir rol oynayabileceğine işaret etmektedir (Şekil 4.10).

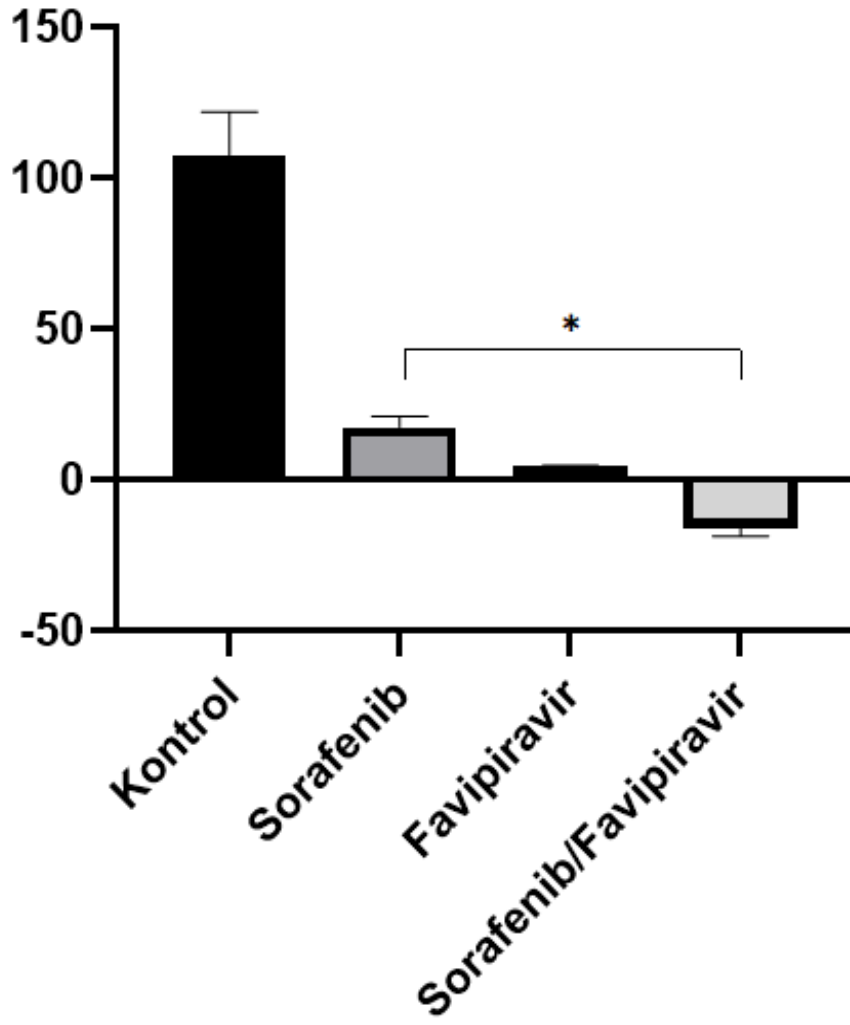
4.4 Protein Düzeyi Bulguları

Çalışmamızda, HepG2 hücre hattında IC₅₀ değerleri belirlenmiş olan Favipiravir ve Sorafenib'in tek başına ve kombine doz uygulamaları gerçekleştirildi. Uygulamaların ardından hücreler 1 gün süreyle etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda izole edilen proteinler kullanılarak ELISA analizi ile Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 ve Tnf- α protein ekspresyon düzeyleri analiz edildi.



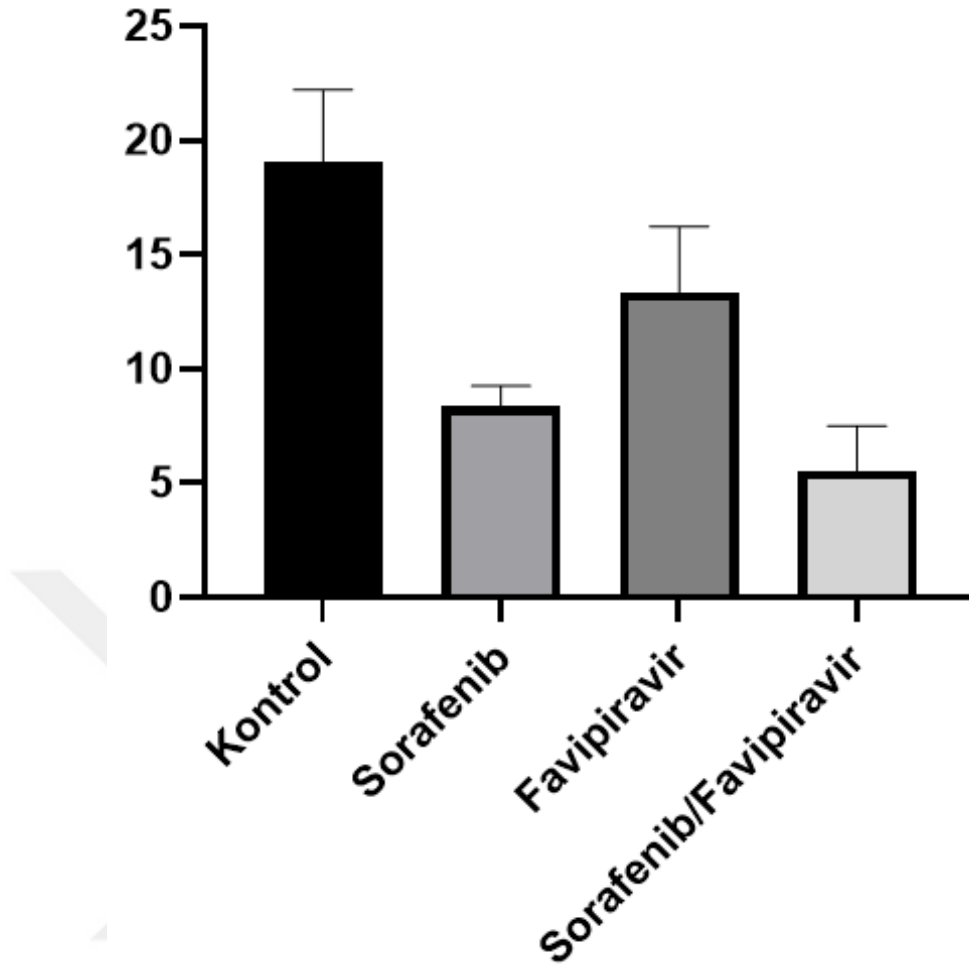
Şekil 4.11. HepG2 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu Bax protein düzeylerinin kontrol grubuna göre değişiminin gösterimi.

HepG2 hücre hattında Bax protein düzeyinde Sorafenib ($p < 0.0001$), Favipiravir ($p = 0.0002$) ve Sorafenib/Favipiravir ($p = 0.0028$) etken maddelerinin 24 saat uygulaması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir. Sorafenib ve Favipiravir uygulamasının Bax protein ekspresyonunu upregüle ettiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte Sorafenib/Favipiravir etken maddelerinin kombine uygulanması Bax protein ekspresyonunu daha az düzeyde upregüle etmiştir. (Şekil 4.11).



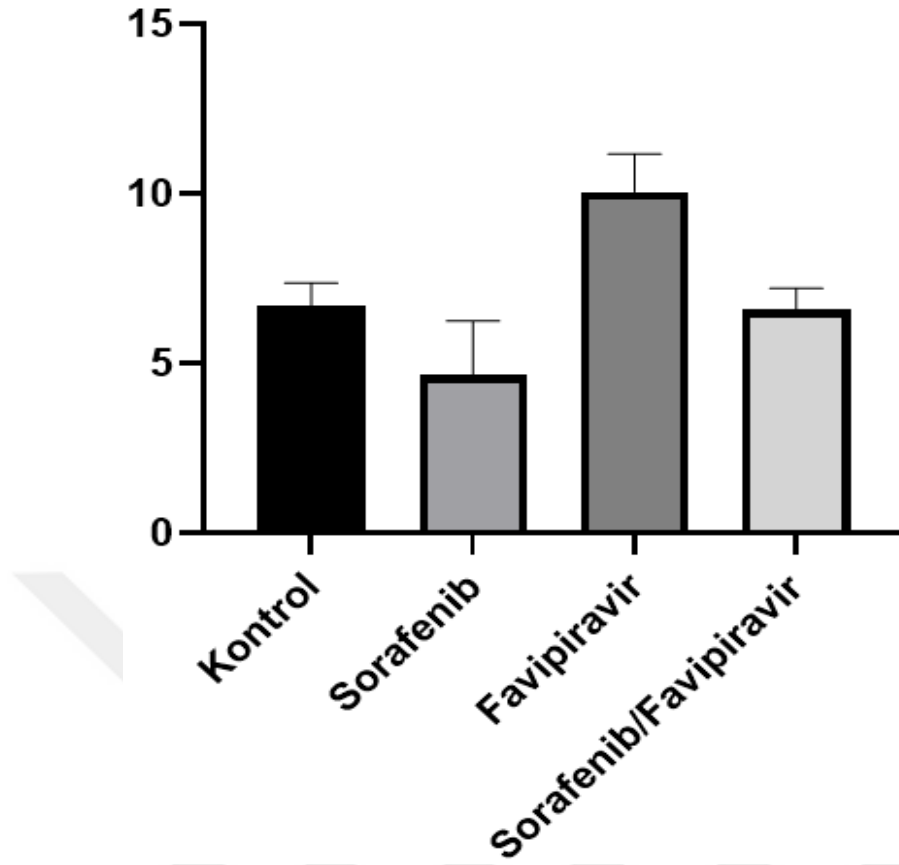
Şekil 4.12. HepG2 hücre hattında 48 saatlik doz uygulama sonucu Bax protein düzeylerinin kontrol grubuna göre değişiminin gösterimi.

HepG2 hücre hattında Bax protein düzeyinde Sorafenib ($p<0.0001$), Favipiravir ($p=0.0002$) ve Sorafenib/Favipiravir ($p=0.0028$) etken maddelerinin 48 saatlik uygulamaları sonucunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlenmiştir. Sorafenib ve Favipiravir tedavilerinin her biri, Bax protein ekspresyonunu anlamlı derecede artırarak upregülasyon sağlamıştır. Ancak bu iki ilaç birlikte uygulandığında, Bax protein düzeyinde düşüş gözlemlenmiş ve bu kombinasyon, her iki ilacın tek başına oluşturduğu etkiye kıyasla daha düşük bir ekspresyon düzeyi ile sonuçlanmıştır. Bu durum, Sorafenib ve Favipiravir'in kombinasyonunun antagonistik bir etkileşim yarattığını ve birlikte kullanımın, Bax protein ekspresyonunu baskılayıcı bir etki oluşturduğunu düşündürmektedir. Dolayısıyla, apoptozun önemli bir düzenleyicisi olan Bax proteininin baskılayıcı bir etki oluşturduğunu düşündürmektedir (Şekil 4.12).



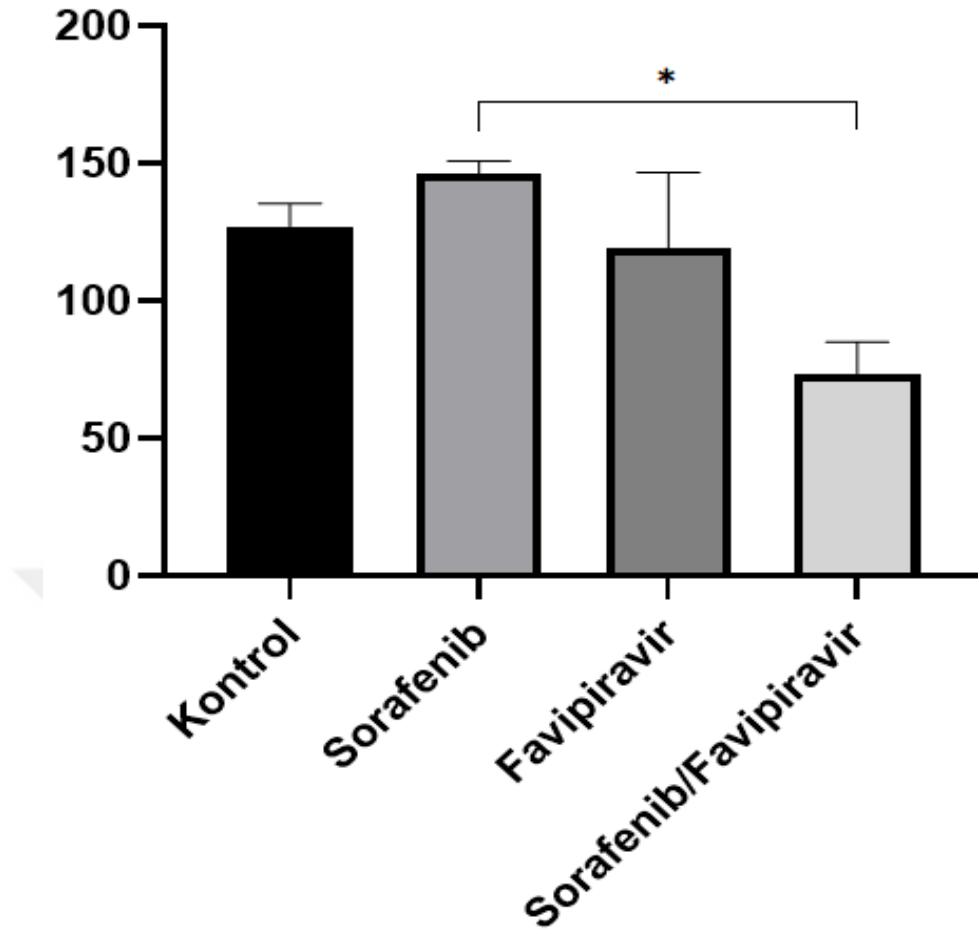
Şekil 4.13. HepG2 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu Bcl-2 protein düzeylerinin kontrol grubuna göre değişiminin gösterimi.

HepG2 hücre hattında 24 saatlik uygulama sonucunda, Bcl-2 protein düzeyinde Sorafenib, Favipiravir ve Sorafenib/Favipiravir gruplarında kontrol grubuna göre azalma gözlemlenmiştir. Sorafenib ilacı Bcl-2 düzeyini düşürürken, Favipiravir tek başına uygulandığında daha az etkili olmuştur. Sorafenib ve Favipiravir'in birlikte uygulanması ise Bcl-2 düzeyinde en belirgin düşüşü sağlamış, bu da kombinasyon tedavisinin anti-apoptotik Bcl-2 proteinini baskılayıcı etkisini göstermektedir. Bu çalışma, kombinasyon tedavisinin 24 saatlik sürede Bcl-2 üzerinden antagonistik bir şekilde etki gösterdiğine işaret etmektedir. Bcl-2 proteininin apoptozun negatif düzenleyicisi olduğu göz önünde bulundurulduğunda, bu düşüş hücre ölümü süreçlerinin aktivasyonu açısından önemli olabilir. Dolayısıyla, Sorafenib/Favipiravir kombinasyonunun 24 saat sonunda Bcl-2 proteinini baskılayarak apoptozu teşvik ettiği sonucuna varılabilir (Şekil 4.13).



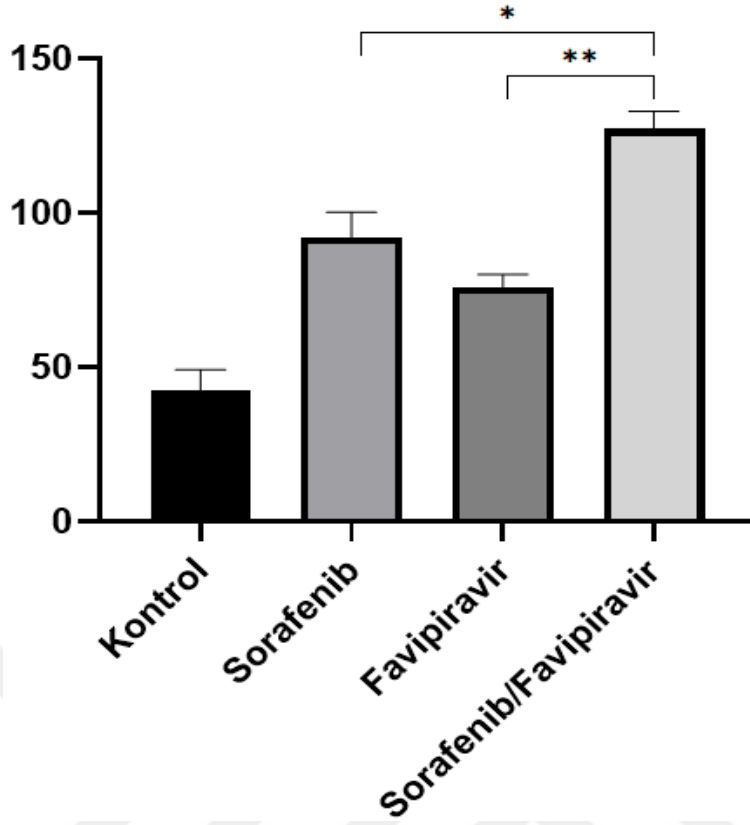
Şekil 4.14. HepG2 hücre hattında 48 saatlik doz uygulama sonucu Bcl-2 protein düzeylerinin kontrol grubuna göre değişiminin gösterimi.

48 saatlik uygulama sonucunda HepG2 hücre hattında Bcl-2 protein düzeyinde anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla Sorafenib uygulaması Bcl-2 ekspresyonunu azaltmış olup bu da ilacın anti-apoptotik mekanizmaları baskıladığını göstermektedir. Favipiravir tedavisi ise 24 saatlik verilere göre daha belirgin bir etki göstermiş ve Bcl-2 düzeyini daha fazla arttırmıştır. Bu durum, Favipiravir'in etkisinin zamanla artabileceğini ve 48 saat sonunda Bcl-2 üzerinden daha güçlü bir pro-apoptotik etki oluşturabileceğini düşündürmektedir. Sorafenib ve Favipiravir'in birlikte uygulanması ise Bcl-2 protein düzeyini orta seviyede artmıştır ve tek başına uygulanan Favipiravir'e göre daha güçlü bir baskılayıcı etki oluşturmuştur. Bu bulgu, kombinasyon tedavisinin 48 saatlik sürede Bcl-2 üzerinden sinerjik bir şekilde etki gösterdiğine işaret etmektedir. Bcl-2 proteininin apoptozun negatif düzenleyicisi olduğu göz önünde bulundurulduğunda, bu düşüş hücre ölümü süreçlerinin aktivasyonu açısından önemli olabilir. Dolayısıyla, Sorafenib/Favipiravir kombinasyonunun 48 saat sonunda anti-apoptotik Bcl-2 proteinini güçlü şekilde baskılayarak apoptozu teşvik ettiği sonucuna varılabilir (Şekil 4.14).



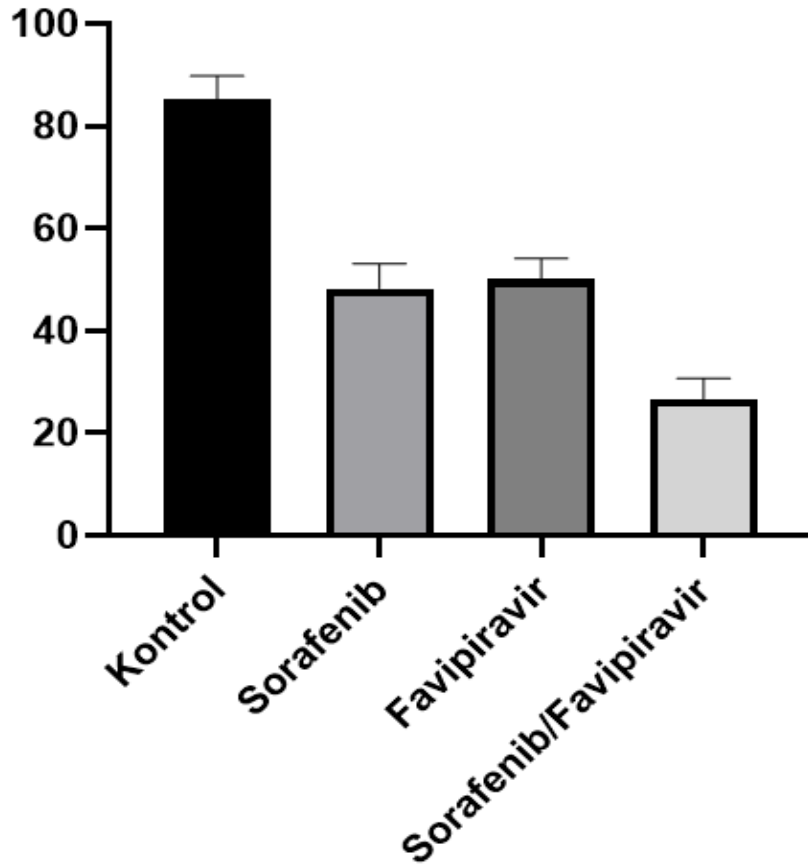
Şekil 4.15. HepG2 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu Kaspas-3 protein düzeylerinin kontrol grubuna göre değişiminin gösterimi.

HepG2 hücre hattında Kaspaz-3 protein düzeyi incelendiğinde, Sorafenib, Favipiravir ve bu iki etken maddenin kombinasyonunun 24 saatlik uygulaması sonucunda anlamlı düzeyde değişiklikler gözlemlenmiştir. Sorafenib ve Favipiravir'in tek başlarına uygulanması, Kaspaz-3 protein ekspresyonunu anlamlı şekilde artırmış, bu durum upregülasyon olarak değerlendirilmiştir. Sorafenib uygulamasındaki gen ekspresyon artışı Favipiravir ilacı uygulamasına kıyasla daha yüksek düzeyde ekspresyon gösterdiği gözlemlenmiştir. Sorafenib ve Favipiravir'in birlikte uygulanması durumunda, bu artışın tekli tedavilere kıyasla Kaspaz-3 düzeyini daha az upregüle ettiği belirlenmiştir. Benzer şekilde, Kaspaz-3 protein düzeyi üzerindeki etkiler de zamanla değişkenlik göstermiştir. 24 saatlik uygulama sonucunda, iki ilacın birlikte kullanımının 24 saatlik sürede antagonistik bir etki oluşturduğunu göstermiştir. Bu nedenle, kombinasyon tedavisinin apoptoz mekanizmasını destekleyici etkisinin, tekli tedavilere kıyasla daha sınırlı kaldığı söylenebilir (Şekil 4.15).



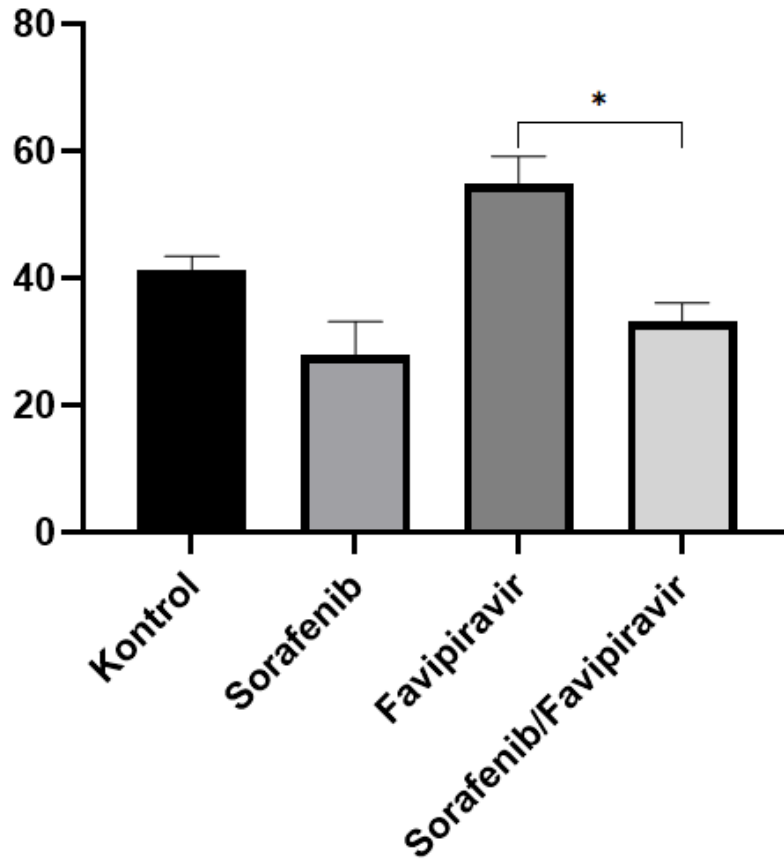
Şekil 4.16. HepG2 hücre hattında 48 saatlik doz uygulama sonucu Kaspaz-3 protein düzeylerinin kontrol grubuna göre değişiminin gösterimi.

48 saatlik uygulama sonucunda ise bu durumun değiştiği görülmektedir. Sorafenib ve Favipiravir'in kombinasyonu hem tekli tedavilere hem de kontrol grubuna kıyasla daha yüksek Kaspaz-3 protein düzeyi oluşturmuş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu durum, iki etken maddenin birlikte kullanımının zamanla etkisini artırdığını ve 48 saatlik sürede sinerjik bir etki gösterebildiğini düşündürmektedir. Kaspaz-3 protein düzeyi üzerindeki etkiler de zamanla değişkenlik göstermiştir. 24 saatlik uygulama sonucunda, Sorafenib ve Favipiravir tedavileri Kaspaz-3 ekspresyonunu artırmışken, kombinasyon tedavisi bu artışı baskılamış ve daha düşük düzeyde Kaspaz-3 ekspresyonuna neden olmuştur. Bu da, tıpkı Bax proteininde olduğu gibi, kısa vadede antagonistik bir etkiyi düşündürmektedir. Ancak 48 saatlik uygulama sonrasında Kaspaz-3 protein düzeyinin en yüksek şekilde Sorafenib/Favipiravir kombinasyonunda ortaya çıktığı gözlenmiş ve bu artış hem Sorafenib hem de Favipiravir'e göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlar, iki ilacın birlikte uygulandığında zamanla etkilerini pekiştirdiğini ve apoptotik belirteçler üzerinde daha güçlü bir yanıt oluşturduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.16).



Şekil 4.17. HepG2 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu Tnf- α protein düzeylerinin kontrol grubuna göre değişiminin gösterimi.

HepG2 hücrelerinde yapılan uygulamalar sonucunda Sorafenib, Favipiravir ve bu iki ilacın kombinasyonu, Tnf- α düzeyinde istatistiksel düzeyde anlamlı değişiklikler meydana getirmiştir. Grafikte, kontrol grubunda Tnf- α protein düzeyinin en yüksek seviyede olduğu gözlemlenmiştir. Sorafenib ilacının tek başına uygulanmasıyla protein ekspresyon seviyesi önemli ölçüde downregüle olduğu görülmektedir. Favipiravir ilacının tek başına uygulanmasıyla bu Tnf- α protein düzeyinin önemli ölçüde azaltıp downregüle olduğu görülmektedir. Özellikle favipiravir ve Sorafenib ilacının birlikte uygulanması, Tnf- α düzeyinde çok daha belirgin bir düşüşe yol açmış ve en düşük seviyeye ulaşmıştır. Dolayısıyla, Sorafenib ve Favipiravir'in kombine uygulanmasının Tnf- α protein düzeyi üzerinde antagonistik bir etki yarattığı düşünülmektedir. Bu veriler doğrultusunda, Sorafenib ve Favipiravir'in birlikte kullanımının terapötik potansiyelinin yüksek olduğu söylenebilir (Şekil 4.17).



Şekil 4.18. HepG2 hücre hattında 48 saatlik doz uygulama sonucu TNF- α protein düzeylerinin kontrol grubuna göre değişiminin gösterimi.

HepG2 hücre hattında 48 saatlik uygulama sonucunda Tnf- α protein düzeyinde anlamlı değişiklikler gözlemlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Favipiravir uygulaması Tnf- α düzeyini belirgin şekilde artırmıştır. Buna karşın, Favipiravir ile birlikte uygulanan Sorafenib kombinasyonu, Favipiravir'in tek başına oluşturduğu Tnf- α artışını anlamlı düzeyde düşürmüştür ($p < 0.05$). Sorafenib'in tek başına uygulandığı grupta ise Tnf- α düzeyi kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Bu bulgular, Favipiravir'in Tnf- α ekspresyonunu upregüle ettiğini, ancak Sorafenib ile kombinlendiğinde bu etkinin azaldığını göstermektedir. Dolayısıyla, Sorafenib ve Favipiravir'in kombine uygulanmasının Tnf- α protein düzeyi üzerinde antagonistik bir etki yarattığı düşünülmektedir (Şekil 4.18).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda, Favipiravir ve Sorafenib'in HepG2 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri MTT analizi ile değerlendirilmiş ve her iki ilacın da hücre canlılığını doz bağımlı olarak azalttığı gözlemlenmiştir. Yapılan deneylerde, Favipiravir için IC_{50} değeri 250 μ M, Sorafenib için ise 20 μ M olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu değerler, daha önce yapılmış benzer çalışmalarla paralellik göstermektedir. Örneğin, Çetin (2020)'nin yaptığı bir çalışmada, Favipiravir'in çeşitli kanser hücre hatlarında sitotoksik etki gösterdiği, özellikle 250–500 μ M aralığında belirgin hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde Karaoğlu (2019) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, Sorafenib'in HepG2 hücrelerinde 10–30 μ M aralığında sitotoksikite oluşturduğu ve IC_{50} değerinin 20 μ M civarında olduğu rapor edilmiştir. Uluslararası literatürde de benzer bulgular mevcuttur; Wang vd. (2012) çalışmalarında, Sorafenib'in HepG2 hücrelerinde güçlü antiproliferatif etki gösterdiği ve IC_{50} değerinin 15–22 μ M aralığında olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, Favipiravir'in sitotoksik etkileri konusunda yapılan çalışmalarda Gürlek (2021), ilacın tek başına sınırlı apoptotik aktivite gösterdiği, ancak diğer kemoterapötik ajanlarla birlikte uygulandığında bu etkinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu bağlamda, çalışmamızda elde edilen IC_{50} değerlerine dayanarak seçilen dozlarla yapılan kombinasyon uygulamaları, her iki ajanın birlikte kullanımının sinerjik ya da katkılایıcı etki potansiyelini değerlendirme açısından önemli bir temel oluşturmuştur. Sonuç olarak hem ulusal tezler hem de uluslararası çalışmalar ışığında değerlendirdiğimizde, bu çalışmada belirlenen IC_{50} değerlerinin literatürle uyumlu olduğu ve doğru doz aralıklarının tercih edildiği söylenebilir. Bu da, ilerleyen deney aşamalarında elde edilecek moleküler ve biyokimyasal verilerin güvenilirliği açısından önemli bir dayanak oluşturmaktadır.

Komet çalışmamızda ise HSK model hücresi olan HepG2 hücre hattında Sorafenib ve Favipiravir'in hem tekil hem de kombinasyon halinde uygulanmasının DNA hasarı üzerine etkileri, Komet Analizi yöntemiyle 24 ve 48 saatlik sürelerde değerlendirilmiştir. DNA hasar düzeyleri, "Arbitrary Unit (AU)" cinsinden sayısal olarak belirlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar ortaya koyulmuştur. Bulgular, özellikle Sorafenib ve Favipiravir kombinasyonunun, her iki zaman diliminde de tekil uygulamalara göre daha yüksek DNA hasarına yol açtığını göstermektedir.

24 saatlik sonuçlara göre, Sorafenib tek başına uygulandığında DNA hasar düzeyi 20.33 ± 2.52 AU ile önemli bir artış göstermiştir. Favipiravir ise, 10.33 ± 2.08 AU değeriyle daha düşük bir DNA hasarı oluşturmuş, fakat kontrol grubuna kıyasla bu artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. En yüksek DNA hasarı ise Sorafenib + Favipiravir kombinasyon grubunda (23.67 ± 1.53 AU) tespit edilmiştir. Bu durum, Favipiravir'in tek başına uygulandığında düşük düzeyde DNA hasarına neden olduğunu, ancak Sorafenib ile birlikte uygulandığında sinerjistik ya da en azından aditif bir etkide bulunduğunu düşündürmektedir. Bu sonuçlar, literatürde yer alan benzer çalışmalarla uyumludur. Örneğin, Abdelrahman vd. (2021), Sorafenib'in HepG2 hücrelerinde ROS artışı yoluyla ciddi DNA hasarına neden olduğunu ve bu hasarın doz ve süreye bağlı olarak arttığını raporlamıştır. 48 saatlik uygulamada, DNA hasar düzeyleri tüm gruplarda artmış olup, bu artışın en belirgin olduğu grup 32.00 ± 4 AU ile yine kombinasyon grubu olmuştur. Bu sonuç, zaman bağımlı olarak hücre içi oksidatif stresin ve apoptozun arttığını ve dolayısıyla DNA'ya verilen zararın da birikerek çoğaldığını göstermektedir. Özellikle Favipiravir'in 48 saatlik uygulamasında (15.67 ± 2.08 AU) gözlenen DNA hasarındaki artış, bu ajanla ilgili daha önceki bazı çalışmalarla paralellik göstermektedir. Literatürde Favipiravir'in viral RNA polimeraz inhibitörü olmasının yanında, hücre metabolizmasına dolaylı olarak etki ederek oksidatif stresi artırabileceği ve bu yolla DNA'ya zarar verebileceği belirtilmiştir (Smee vd. 2009, Gürbüz ve Çelik 2022).

Yılmaz (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, Sorafenib'in HepG2 hücrelerinde doza ve süreye bağlı DNA hasarını artırdığı ve bu hasarın mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada, antioksidan savunma sisteminin çökmesiyle birlikte DNA tamir mekanizmalarının da baskılandığına dikkat çekilmiştir. Bizim çalışmamızda da 48 saat sonunda en yüksek hasarın kombinasyon grubunda oluşması, bu mekanizmalara işaret edebilir.

Sorafenib'in bir tirozin kinaz inhibitörü olarak özellikle RAF/MEK/ERK yolunu inhibe ederek hücre proliferasyonunu engellediği ve apoptoz mekanizmalarını devreye soktuğu bilinmektedir (Llovet vd. 2008). Favipiravir ise esas olarak antiviral etkinliğiyle bilinse de, bazı çalışmalar hücre metabolizması ve genetik stabilite üzerinde beklenmedik etkiler gösterebileceğini ortaya koymuştur (Madurga vd. 2021). Bu nedenle, kombinasyon uygulamalarında toksikolojik değerlendirme büyük önem arz etmektedir.

Bu bulgular ışığında, Sorafenib ve Favipiravir'in birlikte kullanımı, HSK tedavisinde potansiyel bir etkileşim göstermekte ve DNA hasarı üzerinden güçlü apoptotik sinyalleri tetikleyebilmektedir. Ancak bu etkinin klinik kullanımda güvenlik profilini zorlayabilecek toksikolojik sonuçlar doğurabileceği de unutulmamalıdır. Bu nedenle, bu kombinasyonun daha kapsamlı *in vivo* çalışmalarla değerlendirilmesi ve özellikle DNA tamir mekanizmaları, oksidatif stres belirteçleri ve mitokondriyal fonksiyonlar üzerinden incelenmesi önerilmektedir.

qRT-PCR çalışmamızda, hepatoselüler karsinom model hücre hattı olan HepG2 üzerine uygulanan Sorafenib ve Favipiravir'in tek başına ve kombinasyon şeklinde uygulanmasının gen ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkileri qRT-PCR yöntemiyle değerlendirildi. BAX, BCL-2, KASPAZ-3 ve TNF- α genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişim, apoptotik ve inflamatuvar süreçler bağlamında yorumlandı. Elde edilen bulgular, bu ilaçların özellikle apoptotik yollara etkisi konusunda çarpıcı sonuçlar ortaya koymuştur. Apoptoz göstergesi olan BAX geninin 24 ve 48 saatlik uygulamalar sonucunda Favipiravir ile anlamlı şekilde arttığı ve bu artışın Sorafenib ile kombine edildiğinde baskılandığı gözlemlenmiştir. Bu bulgu, Favipiravir'in apoptotik süreci aktif olarak uyardığını, ancak Sorafenib ile kombinasyonunda bu etkinin azaldığını göstermektedir. Bu sonuç, Güzel (2021) tarafından yapılan bir çalışmayla uyumludur. Benzer şekilde, Zhang vd. (2020) tarafından Sorafenib üzerine yapılan bir çalışmada ise, bu ajanın bazı apoptotik genleri baskılayarak direnç mekanizmaları geliştirebileceği ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızda da, kombinasyon grubunda BAX ekspresyonunun düşmesi, Sorafenib'in Favipiravir'in pro-apoptotik etkisini antagonize ettiğini düşündürmektedir.

Anti-apoptotik bir belirteç olan BCL-2 gen ekspresyon düzeylerinin özellikle 24 saatlik süreçte Sorafenib grubunda anlamlı şekilde arttığı ve Favipiravir uygulamasında ise baskılandığı gözlemlenmiştir. Bu durum, Favipiravir'in apoptotik süreci desteklediğini, Sorafenib'in ise aksine anti-apoptotik bir yanıt oluşturduğunu düşündürmektedir. Sorafenib'in tek başına uygulandığı bazı çalışmalarda, ilaca karşı gelişen dirençle birlikte BCL-2 ekspresyon düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (Li vd. 2019). Bu bulgularla birlikte değerlendirildiğinde, Sorafenib'in belirli koşullarda apoptotik yanıtı baskılayabileceği, Favipiravir'in ise bu süreci tersine çevirebileceği görülmektedir.

Kaspaz-3, apoptozun yürütücü fazında görev alan temel bir proteazdır. Yapılan analizlerde, Favipiravir'in hem 24 hem de 48 saatlik uygulamalarda Kaspaz-3 ekspresyonunu anlamlı düzeyde artırdığı tespit edilmiştir. Bu artış, Sorafenib'e kıyasla daha belirgin olup, kombine uygulamada ise etkisi kısmen baskılanmıştır. Bu sonuç, Favipiravir'in apoptoz mekanizmasını doğrudan aktive eden bir etkiye sahip olduğunu ve bu etkinin Sorafenib ile birlikte verildiğinde antagonistik bir etkileşimle zayıfladığını ortaya koymaktadır Gholami vd. (2018), Sorafenib'in uzun süreli uygulamalarla birlikte apoptoz yanıtında zayıflama ve Kaspaz-3 aktivitesinde azalma meydana getirdiğini bildirmiştir.

TNF- α gen ekspresyonu açısından elde edilen sonuçlar, Favipiravir'in erken dönemde (24 saat) inflamatuvar yanıtı belirgin şekilde artırdığını, ancak bu etkinin 48 saat sonunda anlamlı bir farklılık oluşturmadığını göstermiştir. Bu durum, ilk uygulamada Favipiravir'in hücreyi strese sokarak proinflamatuvar yanıtı tetiklediğini, ancak zamanla bu etkinin azaldığını düşündürmektedir. Ayrıca kombinasyon grubunda TNF- α gen ekspresyonunun baskılanması da Sorafenib'in bu yanıtı baskıladığına işaret etmektedir. Bu bulgu, Kumar vd. (2020) yaptığı *in vitro* çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Kumar'ın çalışmasında, Favipiravir'in viral enfeksiyonlara karşı erken dönemde TNF- α ekspresyonunu artırdığı ancak bu etkinin geç dönemde azaldığı gösterilmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde, bu çalışma Favipiravir'in özellikle apoptotik genler (BAX VE KASPAZ-3) üzerinde upregülasyon etkisi gösterdiğini, anti-apoptotik BCL-2 genini ise baskıladığını ortaya koymaktadır. Buna karşılık Sorafenib'in apoptotik süreci desteklemediği, hatta bazı gen ekspresyonları üzerinden bu süreci baskıladığı gözlemlenmiştir. Kombine uygulamalarda ise Favipiravir'in etkisinin Sorafenib tarafından zayıflatıldığı ve bu durumun olası bir antagonistik etkileşime işaret ettiği düşünülmektedir. Elde edilen bulgular, Favipiravir'in HSK tedavisinde potansiyel bir apoptoz indükleyici ajan olabileceğini; ancak Sorafenib ile birlikte uygulandığında etkinliğinin azalabileceğini göstermektedir. Bu durum, klinik uygulamalarda ilaç kombinasyonlarının dikkatle değerlendirilmesi gerektiğine işaret etmektedir.

ELISA çalışmasında, Sorafenib ve Favipiravir'in tek başlarına ve kombinasyon halinde HepG2 insan karaciğer kanseri hücre hattı üzerinde Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 ve Tnf- α protein düzeylerine etkileri 24 ve 48 saatlik süreler boyunca değerlendirilmiştir. Bulgular

genel olarak, apoptoz ve inflamasyonla ilişkili bu belirteçlerin zaman ve tedavi türüne göre değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle apoptozu teşvik eden Bax ve Kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin tekli uygulamalarda arttığı, kombinasyon uygulamalarında ise zamana bağlı olarak farklı eğilimler sergilediği gözlenmiştir. Aynı zamanda anti-apoptotik Bcl-2 proteini ve proinflamatuvar Tnf- α protein düzeylerinde de anlamlı değişiklikler tespit edilmiştir. Bu bulgular, daha önce yapılmış benzer çalışmalarla hem paralellik göstermekte hem de yeni bakış açıları sunmaktadır.

Sorafenib'in karaciğer kanseri hücrelerinde apoptotik mekanizmaları aktive ettiğine dair literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Örneğin, Liu vd. (2021), Sorafenib'in BAX gen ekspresyonunu artırırken BCL-2 seviyesini düşürdüğünü ve bu durumun hücre içi apoptotik süreci başlattığını göstermiştir. Bu çalışma ile paralel olarak, bizim çalışmamızda da Sorafenib uygulaması 24 ve 48 saatlik sürelerde Bax protein düzeyini anlamlı şekilde artırmış, Bcl-2 seviyesini ise düşürmüştür. Özellikle 48 saatlik sürede bu etkilerin daha belirgin hale gelmesi, Sorafenib'in zamanla hücre içi ölüm mekanizmalarını daha aktif hale getirdiğini göstermektedir. Kaspaz-3 düzeyinin de artması, hücre ölümünün yürütücü fazının aktive olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, Sorafenib'in apoptotik yolları zamanla kuvvetlendirerek etkisini sürdürdüğünü doğrulamaktadır.

Favipiravir esasen bir antiviral ajan olup, kanser biyolojisi üzerine etkileri daha az araştırılmıştır. Ancak son yıllarda yapılan bazı çalışmalar, Favipiravir'in yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik ve apoptotik etki gösterebileceğini ileri sürmektedir. Favipiravir uygulaması sonucu Bax ve Kaspaz-3 protein düzeylerinin artış gösterdiği, Bcl-2 ekspresyonunun ise azaldığı görülmüştür. Ayrıca Tnf- α düzeylerinde gözlenen değişiklikler, Favipiravir'in inflamatuvar yanıtları modüle edebileceğini göstermektedir. İlginç bir şekilde, 48 saatlik uygulamada Favipiravir'in Tnf- α ekspresyonunu artırdığı gözlenmiştir. Kombinasyon tedavisine dair elde edilen bulgular ise oldukça dikkat çekicidir. 24 saatlik uygulamalarda Sorafenib ve Favipiravir'in birlikte kullanımı, apoptoz belirteçleri üzerinde antagonistik etki yaratmış; özellikle Bax ve Kaspaz-3 protein düzeylerinde tekli tedavilere göre daha düşük artışlar gözlenmiştir. Bu durum, iki ajanın kısa sürede birbirinin etkisini baskılayabileceğini düşündürmektedir. Ancak 48

saatlik uygulama sonunda bu durumun tersine döndüğü ve kombinasyonun sinerjik etki gösterdiği görülmüştür. Hem Bax hem de Kaspaz-3 düzeyleri, bu sürede tekli tedavilere kıyasla daha fazla artmış; Bcl-2 düzeyinde ise anlamlı düşüş gözlenmiştir. Bu, apoptozun hem başlatıcı hem yürütücü mekanizmalarının aktivasyonunu göstererek kombinasyonun zamanla daha etkili hale geldiğini ortaya koymaktadır. Zhang vd. (2022), farklı ilaçların kombinasyonlarının zamanla sinerjik veya antagonistik etki gösterebileceğini ve bu etkinin hücre döngüsüne bağımlı olabileceğini belirtmiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde, zaman faktörünün ilaçların etki mekanizmalarında belirleyici olduğu görülmüştür.

Tnf- α düzeylerine bakıldığında ise kombinasyon uygulamasının bu proinflamatuar sitokinin düzeyini baskıladığı, özellikle 48 saatlik sürede Favipiravir'in oluşturduğu TNF- α artışının Sorafenib tarafından anlamlı şekilde azaltıldığı tespit edilmiştir. Bu durum, Sorafenib'in anti-inflamatuar özellikleri ile ilişkili olabilir. Literatürde, Sorafenib'in NF- κ B sinyal yollarını inhibe ederek Tnf- α üretimini baskıladığı bildirilmektedir. Bu da kombinasyonun inflammatuar mikroçevreyi baskılayarak apoptotik süreci desteklediğini düşündürmektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, bu çalışma Sorafenib ve Favipiravir'in tekli ve kombine kullanımda farklı zaman noktalarında apoptoz ve inflamasyon belirteçleri üzerinde anlamlı etkiler oluşturduğunu göstermektedir. 24 saatlik sürede kombinasyonun antagonistik bir etki gösterdiği, ancak 48 saat sonunda sinerjistik bir etkiye dönüştüğü görülmüştür. Bu bulgular, zaman ve doz faktörlerinin ilaç kombinasyonlarında belirleyici olduğunu ve tedavi planlamasında bu parametrelerin dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, Favipiravir'in Sorafenib ile birlikte kullanımının özellikle uzun süreli uygulamalarda apoptozun pro-apoptotik belirteçleri olan Bax ve Kaspaz-3'ü artırdığı, anti-apoptotik Bcl-2'yi ise düşürdüğü gösterilmiştir. TNF- α düzeylerindeki değişimler ise bu ilaçların inflammatuar yanıtları modüle edebileceğini göstermektedir. Bu çalışma, karaciğer kanseri tedavisinde yeni kombinasyon stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemli bir katkı sunmakta ve ileride yapılacak olan *in vivo* ya da klinik çalışmalara temel oluşturabilecek niteliktedir.

6. KAYNAKLAR

- Abdelrahman R. S, Elsherbiny, N. M, & Ali D. A, 2021. Sorafenib induces DNA damage and apoptosis in HepG2 liver cancer cells through oxidative stress and mitochondrial pathways. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 87(5), 587–595.
- Abou-Alfa, G. K. & Chan, S. L, 2021. Combination systemic therapies in advanced hepatocellular carcinoma: Advances, challenges, and unmet needs. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 41, 372-381.
- Adams, J. M & Cory S, 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281(5381), 1322-1326.
- Aden, D P, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I & Knowles B B, 1979. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282(5739),615-616.
- Ahn, S. H, Kim Y. J & Hwang S G, 2016. Antiviral Therapy for Hepatitis C Virus Infection Reduces the Risk of Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Hepatology*, 64(4), 1232-1244.
- Alley, M. C. et al, 1988. "Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay." *Cancer Research*, 48(3), 589–601.
- Al-Mahroos F, Barash S. H, & Kaur, M, 2021. Assessment of genotoxic effects of heavy metals using comet assay. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(1), 1-10.
- Amaral, F A, Silva M D R, & Lima M A, 2024. The role of Bcl-2 family proteins in cancer and potential therapeutic strategies. *Cancer Letters*, 560, 54-68.
- Aydın, İ. 2020. Karaciğer kanseri tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Türk Gastroenteroloji Dergisi*, 31(3), 150-162.
- Badr, M, & Al-Hamoudi, W, 2016. The role of hypoxia in the progression of liver cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 12(2), 1019-1026.
- Baker, M, 2018. RNA isolation: A review of current methods and their applications. *Nature Reviews Genetics*, 19(8), 537-552.
- Benes, V, Koc A, & Pospisil T, 2020. Methods for RNA quality assessment. *Molecular Biotechnology*, 62(6), 777-785.

- Boucher, D, et al, 2009. The role of caspases in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 9(10), 738-749.
- Bradford, M. M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Buchbinder, E I, & Desai A, 2016. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Journal of Immunotherapy*, 39(1), 1-10.
- Bustin, S A, Benes V, Garson J A, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, & Wittwer, C T, 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622.
- Bustin, S A, Benes V, Nolan T, & Pfaffl M W, 2009. Quantitative RT-PCR—A perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 42(5), 1-8.
- Cairo, A M, Fragale M A, & De Maria R, 2024. Bcl-2 inhibitors in cancer therapy: from the bench to the bedside. *Clinical Cancer Research*, 30(5), 1422-1430.
- Calin, G A, & Croce C M, 2011. Role of miRNA in hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 8(8), 471-479.
- Castell, J V, Gómez-Lechón M J, López P, & Bort R, 2006. Hepatocyte cell lines: Their use, heterogeneity and applicability in drug testing. *Chemico-Biological Interactions*, 168(1), 66-73.
- Cheng, A L, et al, 2009. Sorafenib for the treatment of hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 359(4), 378-390.
- Chipuk, J E, et al, 2010. Pharmacological modulation of Bcl-2 family proteins in cancer: lessons learned and future directions. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(12), 861-877.
- Chomczynski, P, & Sacchi N, 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159.
- Cory, S, & Adams J. M, 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2(9), 647-656.

- Czabotar, P E, Lessene G, Strasser A, & Adams J M, 2014. Control of apoptosis by the Bcl-2 protein family: implications for physiology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 49-63.
- Çetin, B. 2020. Favipiravir'in çeşitli kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Demirci, M. 2020. Hepatosellüler karsinom tedavisinde immünoterapinin yeri. *Onkoloji Dergisi*, 35(4), 180-192.
- Demirci, M. 2021. HepG2 hücre hattında sitotoksisite ve apoptotik mekanizmaların değerlendirilmesi. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*, 35(3), 198-210.
- Deng, X, Wu Y, & Wang K, 2016. Epigenetic therapies for hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, 380(1), 55-62.
- Deng, Z, Wang Y, & Zhang W, 2023. The role of Bcl-2 family proteins in the regulation of apoptosis and their implications in cancer therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 42(1), 57-73.
- Deniz, F. & Kaya, D. 2020. "Hücre Kültürleri Üzerine MTT Sitotoksisite Testi: Temel İlkeler ve Uygulama Alanları." *Journal of Molecular Biology and Genetics*, 10(2), 45-52.
- Dhanasekaran, R, & M. R, 2015. Oncogenes and tumor suppressors in liver cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(4), 204-218.
- Ding, X, Liu M, & Jin X, 2018. The role of antiviral therapy in the prevention of hepatocellular carcinoma. *Hepatology International*, 12(1), 1-10.
- Eastmond, D. A, Hartwig A, Anderson D, Anwar W. A, Cimino M C, Dobrev I, & Vickers C, 2009. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: Update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 678(2), 112-118.
- Ege, M. 2021. Hepatosellüler karsinom araştırmalarında kullanılan in vitro modeller: HepG2 hücre hattı ve diğer seçenekler. *Onkoloji Bülteni*, 37(1), 102-110.
- Ege, M. 2022. Karaciğer kanseri tedavisinde güncel gelişmeler. *Ankara Tıp Dergisi*, 64(2), 215-225.
- El-Deiry, W S, 1998. The p53 gene family and its role in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), 727-735.

- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.
- El-Serag, H. B. 2011. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 140(8), 2046-2052.
- El-Serag, H B, & Rudolph K L, 2007. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7), 2557-2576.
- El-Serag, H B, 2012. Hepatocellular Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 365(12), 1118-1127.
- Erdem, N. 2022. *Favipiravir'in in vitro kanser hücre hatlarında gen ekspresyon profiline etkisi*. Tez, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Erler, J T, & Bennewith K L, 2009. Hypoxia-induced changes in the extracellular matrix of solid tumors. *Cancer Research*, 69(8), 3683-3691.
- Fattovich, G, Giustina G, & Lazzarin A, 2004. Hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection: A review. *Journal of Hepatology*, 40(5), 826-831.
- Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Nature Genetics*, 24, 30-33.
- Feng, S. H, Liu L Z, & Xu W. 2018. The role of tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma progression. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 350.
- Forner, A, Llovet J M, & Bruix J, 2012. Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*, 379(9822), 1244-1254.
- Freshney, R I 2016. *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications* (7th ed.). Wiley-Blackwell.
- Friedlander, R M, et al, 1997. Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme reduces amyloid plaque pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*, 388(6639), 610-614.
- Fuchs, Y, & Steller H, 2011. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 147(4), 742-758.
- Furuta, Y, Komeno T, & Nakamura T, (2017). Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proceedings of the Japan Academy, Series B, Physical and Biological Sciences*, 93(7), 449–463.
- Furuta, Y, Kuno T, & Nishikawa K, 2009. The anti-influenza viral drug favipiravir (T-705) inhibits the replication of various RNA viruses. *Antiviral Research*, 82(1),

66-76.

- Galle, P R, Forner A, Llovet J. M, et al, 2019. EASL Clinical Practice Guidelines: Liver cancer. *Journal of Hepatology*, 70(1), 1-20.
- Galluzzi, L, Kepp O, & Kroemer G, 2012. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Cell*, 147(7), 1323-1335.
- Gholami, M H, et al, 2018. Resistance to Sorafenib: Molecular Mechanisms and Strategies to Overcome. *Current Cancer Drug Targets*, 18(6), 566–576.
- Gonzalez, M A, Silva P A, & Mendez M, 2024. Bax ekspresyonu ve kanser: Potansiyel bir terapötik hedef. *Oncology Reports* , 41(4), 215-223
- Gozuacik, D, & Kimchi, A. 2004. Autophagy and cell death. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 286, 187-199.
- Grivennikov, S I, & Karin M, 2010. Inflammation and cancer: Back to the future. *Cell*, 140(6), 883-899.
- Gürbüz, M, & Çelik M, 2022. Favipiravir'in hücre kültürü sistemlerinde genotoksik ve sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi. *Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 51(3), 1021–1030.
- Gürlek, B. 2021. *Favipiravir'in meme kanseri hücre hatlarında sitotoksik etkilerinin araştırılması*, Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Güzel, Z. 2021. *Favipiravir'in kolorektal kanser hücrelerinde apoptotik etkileri*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Hanahan, D, & Weinberg R. A, 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hasan, M. J, et al, 2021. Favipiravir-induced cytokine modulation in infected liver cells. *Cytokine*, 141, 155467.
- He, C, & Zhu D, 2020. RNA modifications in hepatocellular carcinoma: Insights and therapeutic implications. *Frontiers in Genetics*, 11, 614152.
- Hockenbery, D M, et al, 1993. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 348(6299), 334-336.
- Huang, C, Zhang X, & Wu Y, 2019. Applications of the comet assay for assessing DNA damage in human studies. *Molecular and Cellular Toxicology*, 15(1), 23-31.

- Huang, D. C S, et al, 2020. Bcl-2 family proteins: The Achilles' heel of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 20(11), 686-705.
- Huang, X, Liu Y, & Zhang M, 2013. Histone deacetylase inhibitors in liver cancer. *Oncology Letters*, 5(6), 1631-1636.
- Huang, Y, Yang C, Xu F et al, 2015. Structural basis for inhibition of the influenza virus RNA polymerase by favipiravir. *Nature Communications*, 6, 6531.
- Jackson, S P, & Bartek J, 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071-1078.
- Jiang, Z, Xu Y, & Hu Z, 2015. Epigenetic regulation in hepatocellular carcinoma: An overview. *Cancer Letters*, 363(1), 105-112.
- Jiao, Y, & D, 2013. The role of genetic alterations in hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*, 73(6), 1766-1771.
- Kahn, S. A, & Wodarz D, 2016. The role of Ras in the development of hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 13(6), 353-366.
- Kalluri, R & Weinberg R. A, 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420-1428.
- Kane, R. C, Farrell A T, Madabushi R, Booth B P, Chattopadhyay S, Sridhara R, & Pazdur R, 2006. Sorafenib for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *The Oncologist*, 11(8), 908-913.
- Karaoğlu, E. 2019. Sorafenib'in HepG2 hücrelerinde apoptotik ve anti-proliferatif etkilerinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Kaseb, A, & M J, 2011. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma: a new standard of care. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8(8), 498-503.
- Kato, Y, Tsuji K, & Saito K. 2015. A simple and sensitive assay for cell viability and proliferation using MTT. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 459(1), 166-170.
- Kayaalp, C, Kutluturk K, & Yilmaz S. 2020. Primary liver cancer in Turkey: Epidemiology, diagnosis and current management. *Hepatoma Research*, 6, 30.
- Keenan, S. J, et al, 2016. The role of apoptosis in cancer therapy: Is targeting apoptosis a new strategy? *Cancers*, 8(8), 74.

- Kılıç, R. 2019. Hepatosellüler karsinomda sistemik tedavi stratejileri. *Tıp Bilimleri Dergisi*, 39(4), 342-355.
- Kim, D. H, et al, 2019. Sorafenib suppresses TNF- α -mediated inflammation via inhibition of the NF- κ B pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2203.
- Klaunig, J. E, 2022. Chemical Carcinogenesis. *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 10th edition.
- Klein, K, Göke M, & Lutz M. P, 2008. The role of methylation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research*, 38(7), 730-737.
- Koh, W. J, & Matsuura Y, 2020. The Role of Favipiravir in Influenza Virus Infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(1), 13-22.
- Korkmaz, E, Yıldız H, & Ceylan M, 2022. Bax'ın apoptozisdeki rolü ve kanser tedavisindeki etkileri. *Uluslararası Moleküler Bilimler Dergisi*, 23(11), 6007.
- Krammer, P. H, 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 407(6805), 789-795.
- Kraus, S, Eberle C, & Hennel R, 2023. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins in apoptosis: implications for cancer therapy. *Cell Death & Disease*, 14(1), 48-66.
- Kroemer, G, & Reed J. C, 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nature*, 411(6835), 850-856.
- Kudo, M. 2011. Sorafenib for liver cancer: Current status and future directions. *Journal of Gastroenterology*, 46(1), 44-55.
- Kudo, M. 2018. Lenvatinib for hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research*, 48(5), 360-365. <https://doi.org/10.1111/hepr.13144>
- Kudo, M, & Matsui O, 2011. Sorafenib: a new standard for advanced hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 55(2), 487-495.
- Kumar, P, et al, 2020. Favipiravir induces TNF-alpha and interleukin responses in human lung epithelial cells. *Virology Journal*, 17, 123.
- Kuo, T. H, & Goh H, 2008. Chromosomal instability in liver cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 181(1), 1-8.
- Kuo, Y. C, & Goh K L, 2008. The role of genetic alterations in hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*, 68(18), 7453-7461.

- Kuwana, T, et al, 2005. Bcl-2 family proteins and their roles in apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(8), 632-641.
- Leber, B, et al, 2007. Bcl-2 family members in the maintenance of mitochondrial integrity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(1), 54-65.
- Lee, J. H, & Park Y. N, 2020. Molecular genetics of hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 26(6), 1237-1245.
- Lee, Y. R, et al, 2016. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Hepatology*, 8(11), 555-563.
- Li, J., et al. 2019. Mechanisms of Bcl-2 expression contributing to sorafenib resistance in liver cancer. *Molecular Oncology*, 13(5), 1047–1058.
- Lichtenstein, L, & Cederbaum, A I, (2014). Inflammation and cancer: A review. *Biochemical Society Transactions*, 42(4), 974-979.
- Liu Y, Zheng X, Yu Q, et al, 2021. Sorafenib induces apoptosis in hepatocellular carcinoma through mitochondrial pathway. *Oncology Reports*, 45(4), 52.
- Liu, P, & Wang Z, 2014. Metabolic disorders and the risk of liver cancer. *Hepatology*, 58(2), 643-650.
- Liu, X, Zhang Y, & Wang D, (2012). MicroRNA-122 and hepatocellular carcinoma: A review. *Cell Death & Disease*, 3(5), e457.
- Liu, Y, Wu H, & Wang X, 2019. Comparison of RNA isolation methods for analyzing mRNA and miRNA in rice. *Frontiers in Plant Science*, 10, 962.
- Liu, Y, Zhang Y, & Chen X, 2023. Bcl-2 family proteins in cancer: mechanistic insights and therapeutic targeting. *Nature Reviews Cancer*, 23(4), 230-246.
- Liu, Z, Ma L, Tian X, & Gao L, 2015. The role of HepG2 cell line in the study of hepatocellular carcinoma. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 11(3), 643-649.
- Llovet, J. M, & Bruix J, 2016. Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16018.
- Llovet, J. M, et al, 2008. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 359(4), 378-390.
- Llovet, J. M, Kelley R K, Villanueva A, Singal A G, Pikarsky E, Roayaie S, & Finn, R. S, 2021. Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 7, 6.
- Llovet, J. M, Ricci S, Mazzaferro V, et al, 2008. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 359(4), 378-390.

- Llovet, J. M, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J F, & Bruix J, 2008. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 359(4), 378-390.
- Llovet, J.M, & Bruix J. 2008. Novel approaches for staging and treatment of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 48(1), 1-9.
- Madurga, S, Delgado A, & Pineda B. 2021. Unexpected cytotoxicity of Favipiravir in non-viral cellular models: Implications for drug repositioning. *Journal of Cellular Biochemistry*, 122(7), 773–782.
- Marchetti, F, & Wyrobek A J, 2020. Mechanisms and consequences of paternally-transmitted chromosomal abnormalities and aberrations. *Frontiers in Genetics*, 11, 764.
- Meyer, L. T, & Grone M S W, 2002. Beta-catenin mutations and Wnt signaling in liver cancer. *Cancer Research*, 62(12), 3525-3530.
- Mirza, A. Z, Siddiqui F A, Ashraf M, & Ahmad S, 2020. Hepatocellular carcinoma: A review of HepG2 and Hep3B cell lines in research. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 9(8), 223-241.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Olive, P. L, & Banáth J P, 2006. The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1(1), 23-29.
- Özdemir, N. İ, Fırat P, & Akyüz F, 2020. Hepatosellüler karsinom tedavisinde sorafenibin yeri ve yan etkileri. *Turkish Journal of Oncology*, 35(2), 114-122.
- Öztürk, A, & Kaya F, 2018. Hepatosellüler karsinom hücre hatlarının özellikleri ve kullanım lanları. *Türkiye Biyokimya Dergisi*, 43(2), 123-130.
- Peltoketo, H, Rinta-Koski M, & Koivunen J, 2021. Isolation and characterization of RNA from plant tissues. *Plants*, 10(2), 350.
- Pérez, M. A, Palacios J, & García J, 2020. Toxicity of anticancer agents: overview of sitotoxicity. *Journal of Pharmacological Sciences*, 144(1), 1-12.
- Riss, T. L, et al, 2016. "Cell Viability Assays." *Assay Guidance Manual* (Internet).
- Roderburg, C, & Luedde T, 2014. The role of inflammation in hepatocellular carcinoma. *Cellular Oncology*, 37(6), 395-402.

- Salvador, J. M, Gatto S, & Reddy K. B, 2024. Targeting Bcl-2 proteins in cancer therapy: challenges and opportunities. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 21(2), 76-90.
- Salvesen, G. S, & Riedl S. J, 2008. Caspase mechanisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 615, 13-23.
- Sambrook, J, & Russell D W, 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schemmer, P, & Haeusler M, 2003. Chromosomal aberrations in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer*, 107(6), 955-961.
- Schena, M, Shalon D, Davis R W, & Brown P. O, 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235), 467-470.
- Scholz, R, Görtz S, & Elgammal M, 2015. Morphological and functional differentiation of human HepG2 hepatoma cells grown in culture and their use in pharmacological and toxicological studies. *Toxicology In Vitro*, 29(1), 51-61.
- Sia, D, & Kwan K, 2017. Hepatocellular carcinoma: A review of molecular and cellular mechanisms. *World Journal of Gastroenterology*, 23(29), 5488-5498.
- Singh, N. P, & Tice R. R, 2020. The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 15(3), 865-876.
- Singh, N. P, McCoy M T, Tice R R, & Schneider E L, 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191.
- Singh, R. Sharma K ve Kumar M, 2024. Kanser tedavisinde Bax'ı hedeflemenin terapötik potansiyeli. *Kanser Mektupları*, 527, 100-110
- Sinha, A, Vats P, & Sharma V, 2021. Recent advances in comet assay: Applications and challenges. *Molecular and Cellular Toxicology*, 17(4), 409-421.
- Smee, D. F, Hurst B L. & Day C W, 2009. Comparative efficacy of favipiravir and oseltamivir against influenza virus infections in mice. *Antiviral Research*, 82(2), 165–172.
- Speit, G, & Burkhardt S, 2005. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 577(1-2), 157-167.
- Strasser, A, et al, 2000. Bcl-2 proteins and cell death. *Nature*, 406(6791), 94-101.

- Strasser, A, et al, 2011. Apoptosis signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(9), a002598.
- Sullivan, R. J, et al, 2019. Assessing cytotoxicity: a review of cell viability assays. *Cancer Biology & Therapy*, 20(5), 600-610.
- Sun, D, et al, 2021. Apoptosis induction by favipiravir in cancer cells through caspase-3 activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 534, 247–253.
- Sung, H, Ferlay J, Siegel R L, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, & Bray F, 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249.
- Tait, S. W, & Green D. R, 2013. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29, 5-26.
- Tait, S. W, & Harris A. L, 2016. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 13(5), 283-298.
- Tang, Y, et al, 2020. Mitochondrial dysfunction in antiviral therapy: Implications for hepatotoxicity and apoptosis. *Cell Death & Disease*, 11(4), 302.
- Tice, R. R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Dobrzyńska M, & Dürand R E, 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206-221.
- Tucker, J. D, & Preston R J, 2020. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 61(7), 570-580.
- Türk Tabipleri Birliği [TTB], 2021. Karaciğer kanseri tedavisinde immünoterapi ve hedefe yönelik tedavi yaklaşımları. *TTB Onkoloji Bülteni*, 42(1), 10-18.
- Villanueva, A, 2019. Hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 380(15), 1450–1462.
- Wang, H, Liu T, Li L, Cheng Y, Zhang Y, & Xue Y, 2012. Role of Sorafenib in suppressing proliferation and inducing apoptosis of HepG2 cells. *Oncology Reports*, 27(2), 451–457.
- Wang, J, et al, 2016. Oxidative stress and liver cancer. *Cancer Letters*, 381(1), 6-12.

- Wang, X, Liu H, & Zhang J, 2023. Bcl-2 family proteins and cancer: the fine line between life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24(3), 205-221.
- Wang, Z, Gerstein M, & Snyder M, 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57-63.
- Weston, C. R, et al, 2021. Targeting Bcl-2 family proteins in cancer: therapeutic opportunities and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(1), 27-48.
- Wilfinger, W W, Mackey K, & chomczynski P. 1997. A quick and efficient method for the quantitation of RNA. *BioTechniques*, 22(3), 474-481.
- Wilhelm, S. M, Carter C, Tang L, et al, 2006. Discovery and development of sorafenib: A multitargeted inhibitor that treats cancer by inducing apoptosis. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(10), 829-844.
- Wilhelm, S. M, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, & Lynch M, 2004. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Research*, 64(19), 7099–7109.
- Wilkening, S, Stahl F, & Bader A. 2003. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metabolism and Disposition*, 31(8), 1035–1042.
- Wong, R. W, & Wang D R, 2010. Overexpression of oncogenes in liver cancer. *Cancer Research*, 70(8), 3166-3176.
- Wong, R. J, & Hu C, 2017. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, 65(1), 267-276.
- Xie, D, et al, 2019. Activation of the PI3K/AKT pathway in hepatocellular carcinoma. *Hepatology International*, 13(6), 726-740.
- Yamada, K, Ogawa S, Furusawa Y, & Tanaka H, 2021. Potential anticancer effect of favipiravir in liver cancer: Preliminary findings. *Biomedical Reports*, 14(6), 57.
- Yamashita, T, & Kaneko S, 2016. The role of epigenetics in hepatocellular carcinoma: A review. *Hepatology Research*, 46(5), 477-484.
- Yang, J. D, & Roberts L. R, 2019. The importance of early detection in liver cancer. *Gastroenterology*, 156(2), 362-378.
- Yang, X, & Hu Z, 2005. Gene expression profiling in hepatocellular carcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(11), 1746-1753.

- Yılmaz, H. 2020. HepG2 hücre hattında Sorafenib'in neden olduğu genotoksik etkinin değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Erciyes.
- Yoshida, H, & Aikata H, 2019. Direct-acting antiviral agents for hepatitis C virus infection: A real-world evidence perspective. *Journal of Viral Hepatitis*, 26(10), 1191-1200.
- Yoshida, H, Tazawa H, & Hara K, 2019. Antitumor effects of favipiravir on hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Science*, 110(3), 1178-1185.
- Zhang, L, Chen Y ve Liu Qi, 2023. Bax'ın apoptozdaki rolü: Genel bir bakış ve kanser tedavisindeki etkileri. *Hücrel Onkoloji*, 46(3), 321-335.
- Zhang, W, Li W, Song J, et al, 2022. Time-dependent effects of drug combinations on cancer cell apoptosis. *Cancer Cell International*, 22, 45.
- Zhang, Y, et al, 2020. Sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: mechanisms and therapeutic strategies. *Cancer Letters*, 470, 15-25.
- Zhao, W, He X, Hoadley K A, Parker J S, Hayes D N, & Perou C. M, 2014. Comparison of RNA-Seq by poly(A) capture, ribosomal RNA depletion, and DNA microarray for expression profiling. *BMC Genomics*, 15, 419.
- Zhou, J, & Jiang W, 2018. Molecular Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma: The Wnt/ β -Catenin Pathway. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 23(2), 107-120.
- Zhou, Q, Jiang J, & Wang Y, 2016. Comparison of RNA isolation methods for quantitative real-time PCR analysis. *Scientific Reports*, 6(1), 34862.
- Zhou, Y, Hou Y, Shen J, Huang Y, Martin W, & Cheng F, 2020. Network-based drug repurposing for novel coronavirus 2019-nCoV/SARS-CoV-2. *Cell Discovery*, 6(1), 14.

İnternet Kaynakları

1. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Favipiravir>, 13.10.2024