



**SORAFENİB ve LANSOPRAZOL
KOMBİNASYONUNUN HEPATOSELLÜLER
KARSİNOM HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
SİNERJİSTİK ANTİKANSER ETKİLERİNİN
IN VITRO ANALİZLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zekiye HAZAR

Danışman

Doç. Dr. Dilek AKYIL

İkinci Danışman

Doç. Dr. Arzu ÖZKARA

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

Haziran 2025

Bu tez çalışması 23. FEN. BİL. 30 numaralı proje ile BAP tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SORAFENİB ve LANSOPRAZOL KOMBİNASYONUNUN
HEPATOSELLÜLER KARSİNOM HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
SİNERJİSTİK ANTİKANSER ETKİLERİNİN *IN VITRO*
ANALİZLERİ

Zekiye HAZAR

Danışman

Doç. Dr. Dilek AKYIL

İkinci Danışman

Doç. Dr. Arzu ÖZKARA

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

Haziran 2025

TEZ ONAY SAYFASI

Zekiye HAZAR tarafından hazırlanan “Tez Onay Sayfası” 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 **Anabilim Dalı Adı Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Dilek AKYIL

İkinci Danışman : Doç. Dr. Arzu ÖZKARA

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Mürüvvet KURT
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

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

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

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

Üye : Doç. Dr. Arzu ÖZKARA
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

Zekiye HAZAR

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SORAFENİB VE LANSOPRAZOL KOMBİNASYONUNUN HEPATOSELLÜLER KARSİNOM HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİNERJİSTİK ANTİKANSER ETKİLERİNİN *İN VITRO* ANALİZLERİ

Zekiye HAZAR

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Dilek AKYIL

İkinci Danışman: Doç. Dr. Arzu ÖZKARA

Karaciğer tümörünün en sık karşılaşılan türü olan Hepatosellüler Karsinoma (HSK) dünyada kanserin sebebiyet verdiği ölümlerin ilk sırasında yer almaktadır. HSK tedavisinde kullanılan tek kemoterapotik ilaç olan Sorafenib, uygulanan tedavilere kısıtlamalar getirmektedir. Bu sebeple kanser tedavisinde kullanılan halihazırda mevcut ajanla birlikte bitki kökenli maddeler veya ilaç kombinasyonları üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Bu tez çalışmasında HSK tedavisinde hem Sorafenib'in kombinasyonla birlikte etkisini arttırmak hem de yeni tedavi yöntemleri gerçekleştirmek amacıyla HSK olan HepG2 hücrelerinde ilaç kombinasyonlarının sinerjistik antikanser etkileri araştırılmıştır. Bu tez çalışmasında mevcut ajan olan Sorafenib ile proton pompa inhibitör grubundan bir antiülser ilaç olan Lansoprazol'un belirlenmiş doz ve süre zarfında tek ve kombine şeklinde HepG2 hücrelerine maruz bırakılmasının ardından MTT yöntemi ile hücre canlılığı üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla Komet testi yapılmıştır. Böylelikle Sorafenib ve Lansoprazol kombinasyonunun HepG2 hücre DNA'sında bıraktığı hasar incelenmiştir. Ayrıca apoptoz bağlantılı genlerde mRNA düzeyindeki değişimlerin tespiti için PCR testi yapılmıştır. MTT sonucuna bağlı olarak Sorafenib ve Lansoprazol kombinasyon dozunun tekli olarak uygulanan dozlara kıyasla hücre canlılığının azalmasındaki etkisinin daha anlamlı olduğu görülmüştür. PCR sonuçlarına bakıldığında Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 ve Tnf- α protein seviyelerindeki değişimler belirlenmiştir.

Sonuç olarak kombine grupların tekli gruplara kıyasla apoptotik mekanizmayı indüklediği belirlenmiştir. Bu tez çalışması kapsamında sonuç olarak Sorafenib ile Lansoprazol kombinasyonunun HepG2 hücrelerindeki sitotoksik, sinerjistik ve anti-kanser etkileri *in vitro* olarak incelenmiş olup, Sorafenib ile Lansoprazol'un antagonist etki gösterdiği tespit edilmiştir.

2025, ix + 16^(*) sayfa

Anahtar Kelimeler: Genotoksisite, Hepatosellüler Karsinom, Lansoprazol, Sitotoksisite, Sorafenib.



ABSTRACT

M.Sc. Thesis

THE COMBINATION OF SORAFENIB AND LANSOPRAZOLE THE ROLE OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS ON *IN VITRO* ANALYSIS OF SYNERGISTIC ANTICANCER EFFECTS

Zekiye HAZAR

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Dr. Dilek AKYIL

Co-Supervisor: Assoc. Dr. Arzu ÖZKARA

Hepatocellular Carcinoma (HCC), the most common type of liver tumor, ranks first in cancer-related deaths worldwide. Sorafenib, the only chemotherapeutic drug used in the treatment of HCC, imposes restrictions on the applied treatments. For this reason, studies are being carried out on plant-derived substances or drug combinations together with the currently available agent used in cancer treatment. In this thesis, the synergistic anticancer effects of drug combinations were investigated in HepG2 cells, a HCC Line, in order to increase the effect of Sorafenib with the combination and to develop new treatment methods in the treatment of HCC. In this study, the effects of the existing agent Sorafenib and Lansoprazole, an antiulcer drug from a proton pump inhibitor group, on cell viability were investigated by the MTT method after being exposed to HepG2 cells individually and in combination for a specified dose and period of time. In order to determine its genotoxic effects, it was subjected to the Comet test. Thus, the damage left by the combination of Sorafenib and Lansoprazole in HepG2 cell DNA was examined. In addition, a real-time polymerase chain reaction (PCR) test was performed to detect changes in mRNA levels in apoptosis-related genes. Based on the MTT results, it was observed that the combination dose of Sorafenib and Lansoprazole had a more significant effect on reducing cell viability compared to single doses. When PCR results were examined, changes in Bax, Bcl-2, Caspase-3 and Tnf- α protein levels were determined. It was determined that combined groups induced apoptotic mechanism compared to single groups. In line with this

thesis, the cytotoxic, synergistic and anti-cancer effects of the combination of Sorafenib and Lansoprazole on HepG2 cells were investigated *in vitro* and it was determined that Sorafenib and Lansoprazole showed synergistic effects.

2025, ix + 16^(*) pages

Keywords: Cytotoxicity, Genotoxicity, Hepatocellular Carcinoma, Lansoprazol, Sorafenib.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca her türlü bilgi, deneyim ve yardımlarını benden esirgemeyen ve yanımda olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Dilek AKYIL' a tecrübeleriyle bana destek sağlayan sayın Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ ve Doç. Dr. Arzu ÖZKARA hocalarım ile değerli jüri üyelerim Dr. Öğr. Üyesi Mürüvvet KURT ve Dr. Öğr. Üyesi Nilay İŞİTEZ hocalarıma,

Tez çalışmam süresince bilgileriyle ve yardımlarıyla bana destek olan Arş. Gör. Pınar Elife DOĞAN' a ve Kübra AKALIN' a,

Bu tez çalışmasında projesiyle destek sağlayan Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi' ne,

Yüksek lisans boyunca birbirimize destek sağladığımız, birlikte üstesinden geldiğimiz ve motivasyonlarını eksik etmeyen arkadaşlarım Sema DEMİRAYAK, Ayşegül GEDİK, Aleyna ÖZDENİZ, Beyza ARIKAN ve tüm ekip arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Son olarak yüksek lisans eğitimim dahil hayatımın her anında yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini bir an bile benden esirgemeyen, her zaman arkamda dimdik duran ve bugünlere gelmemi sağlayan biricik ailem, her şey için en çok size teşekkür ederim.

Zekiye HAZAR
Afyonkarahisar 2025

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	V
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR.....	ix
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ.....	4
2.1 Kanser.....	4
2.1.1 Apoptoz.....	6
3. MATERYAL VE METOT	30
3.1 Hücre Kültürü.....	30
3.1.1 Hücre Kültürü İçin Medyum Hazırlanması	30
3.1.2 Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekilmesi	30
3.1.3 HepG2 Hücrelerinin Pasajlanması.....	31
3.1.4 Tripan Blue Yöntemi ile Canlı Hücre Sayımı.....	32
3.1.5 HepG2 Hücre Hattının Sıvı Azotta Saklanması.....	32
3.2 Sorafenib, Lansoprazol ve Kombinasyon Gruplarının Sitotoksitesinin Belirlenmesi	33
3.2.1 MTT Yöntemi ile Uygun Dozun Belirlenmesi	33
3.2.2 Sorafenib'in MTT Yöntemi ile IC50 Dozunun Belirlenmesi.....	33
3.2.3 Lansoprazol'ün MTT Yöntemi ile IC50 Dozunun Belirlenmesi.....	34
3.2.4 Lansoprazol/Sorafenib Kombinasyon Dozu İçin MTT Testi	34
3.3 Komet Analizi	34
3.4 RNA İzolasyonu, Saflık Ölçümü ve cDNA Sentezi	37
3.4.1 cDNA Sentezi	39
3.4.2 Primer Tasarımı	39
3.4.3 qRT-PCR	40
3.5 Protein İzolasyonu ve Miktar Analizi	41
3.6 ELISA Analizi	43
3.9 İstatistiksel Analiz	44
4. BULGULAR	45

4.1 MTT Testi Sonuçları.....	45
4.1.1 HepG2 Hücre Hattında Lansoprazol’ün Hücre Canlılık Oranı Üzerine Etkisi.....	45
4.1.2 HepG2 Hücre Hattında Sorafenib’in Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	46
4.1.3 HepG2 Hücre Hattında Sorafenib ve Lansoprazol Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	47
4.2 Genotoksisite Testi Sonuçları.....	48
4.3 RNA İzolasyonu	49
4.4 qPCR ile Gen İfade Düzeyleri	50
4.5 ELISA Protein Düzeyleri.....	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	55
6. KAYNAKLAR.....	63



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

CO ₂	Karbondioksit
dH ₂ O	Distile su
g	Gram
KCL	Potasyum klorid
KH ₂ PO ₄	Potasyum fosfat monohidrit
L	Litre
IC ₅₀	%50 azaltıcı doz
mg	miligram
ml	mililitre
NaCl	Sodyum klorid
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	Sodyum fosfat heptahidrat
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
%	Yüzde
<	Küçüktür
>	Büyüktür
±	Artı ya da eksi

Kısaltmalar

Bax	Bcl-2 ile ilişkili X Proteini
BCL-2	B-Hücreli Lenfoma Geni-2
cDNA	Komplementer DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleikasit
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit

EtBr	Etidyum Bromür
FBS	Fetal Sığır Serumı
HBV	Hepatit B Virüsü
HBC	Hepatit C Virüsü
HCC	Hepatosellüler Karsinom
HepG2	İnsan Hepatosellüler Karsinom Hücresi
Lansor	Lansoprazol
LMA	Düşük Erime Noktalı Agaro
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NMA	Normal Erime Noktalı Agaro
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
RNA	Ribonükleik asit
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute
SOR	Sorafenib
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Normal bir hücre ve apoptoza uğramış bir hücre görüntüsü.....	8
Şekil 2.2 TNF ailesinin apoptoz ve hücre proliferasyon mekanizmasındaki işlevleri ..	10
Şekil 2.3 Kronik hepatit, siroz ve karaciğer kanseri görüntüsü	16
Şekil 2.4 Mide parietal hücresinde mide asit salınımı ve proton pompa inhibitörleri etki mekanizması	22
Şekil 2.5 Lansoprazol'ün kimyasal formülü	24
Şekil 2.6 Lansoprazol'ün yapısı	24
Şekil 2.7 Sorafenib'in kimyasal ve üç boyutlu yapısı	24
Şekil 2.8 Sorafenib'in etki yolları VEGFR (vasküler endotelyal büyüme faktörü), RET (proto-onkogen), KIT (kök hücre faktörü reseptörü), FLT3 (FMS ile ilgili tirozin kinaz 3 reseptörü), PDGFR (büyüme faktörü reseptörü)	25
Şekil 2.9 MTT kimyasal yapısı	27
Şekil 2.10 Komet DNA hasarı dereceleri.....	29
Şekil 3.1 HepG2 hücre görüntüsü	31
Şekil 4.1 HepG2 hücre hattında uygulanan farklı Lansoprazol dozlarının 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki canlılık oranlarına (%) etkisi.	45
Şekil 4.2 HepG2 hücre hattında uygulanan farklı Sorafenib dozlarının 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki canlılık oranlarına (%) etkisi	46
Şekil 4.3 HepG2 hücre hattında uygulanan Sorafenib ve Lansoprazol dozların 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre canlılık oranları (%).	47
Şekil 4.4 Sorafenib ve Lansoprazol dozlarının HepG2 hücre hattı üzerindeki DNA hasar görüntüleri	49
Şekil 4.5 HepG2 hücrelerinde 24 saat doz uygulama sonucu BAX gen ekspresyon seviyesi	50
Şekil 4.6 HepG2 hücrelerinde 24 saat doz uygulama sonucu BCL-2 gen ekspresyon seviyesi grafiği.....	50
Şekil 4.7 HepG2 hücrelerinde 24 saat doz uygulama sonucu KASPAZ-3 gen ekspresyon seviyesi	51
Şekil 4.8 HepG2 hücrelerinde 24 saat doz uygulama sonucu TNF- α gen ekspresyon seviyesi	51
Şekil 4.9 HepG2 hücrelerinde 24 saat uygulama gruplarının Bax protein ekspresyonuna etkisi	52
Şekil 4.10 HepG2 hücrelerinde 24 saat uygulama gruplarının Bcl-2 protein ekspresyonuna etkisi.....	53
Şekil 4.11 HepG2 hücrelerinde 24 saat uygulama gruplarının Kaspaz-3 protein ekspresyonuna etkisi.....	53
Şekil 4.12 HepG2 hücrelerinde 24 saat uygulama gruplarının Tnf- α protein ekspresyonuna etkisi.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Apoptoz mekanizması ile ilişkili genler.....	8
Çizelge 3.1 Hücre medyumunun hazırlanışı	30
Çizelge 3.2 Elektroforez tampon çözeltisinin hazırlanması.....	35
Çizelge 3.3 Nötralizasyon çözeltisinin hazırlanması	35
Çizelge 3.4 Lizis çözeltisinin hazırlanması.....	35
Çizelge 3.5 Etidyum bromür çözeltisinin formülasyonu	36
Çizelge 3.6 Normal erime noktasına sahip agaroz çözeltisinin (NMA) hazırlanması. ...	36
Çizelge 3.7 Düşük erime noktasına sahip agaroz çözeltisinin (LMA) hazırlanması	36
Çizelge 3.8 cDNA sentezinde kullanılan bileşenlerin miktarları.....	39
Çizelge 3.9 Ekspresyon seviyeleri belirlenen genler ile bu genler için kullanılan primer dizileri.....	40
Çizelge 3.10 qRT-PCR çalışmasında kullanılacak reaktif bileşenler ve miktarları.	41
Çizelge 3.11 qRT-PCR protokolü için sıcaklık ve zamanlama bilgileri.	41
Çizelge 4.1 HepG2 hücrelerinde Sorafenib ve Lansoprazol kombinasyonunun oluşturduğu DNA hasarı.....	48

1. GİRİŞ

Geçmiş yıllarda bir vücut hastalığı olarak bilinen kanserin, daha sonra mikroskop ve moleküler teknolojilerin gelişmesiyle birlikte organ veya dokulardaki hücrelerin düzensiz olarak bölünüp çoğalmasıyla ifade edilen bir hastalık olduğu ortaya çıkmıştır (Evirgen 2019, Huriyet 2024). Bir doku veya bir organa ait hücrelerin kontrolsüz bölünüp çoğalması olarak ifade edilen kanser kötü huylu tümörlerden oluşmakta olup yaşamın her döneminde görülebilen, her bireyi etkileyebilen bir durumdur ve vücudumuzun herhangi bir yerinde hücre bölünmesi ve apoptozu düzenleyen noktalardaki işleyişin farklılaşması sonucuyla başlayabilir (Erden 2022).

Kanser dünya genelinde ölüm riski açısından kalp damar hastalığından sonra ikinci sırada yer alan bir sağlık sorunudur ve insan yaşamını oldukça olumsuz etkilemektedir. Kanser tipleri arasında en yaygın olarak görülen ve sıklıkla ölümle karşılaşılacak grup kadınlarda meme kanseri, erkeklerde ise akciğer kanseridir. Gelişmiş ülkelere kıyasla kansere yakalanma ve ölüm oranı gelişmemiş ülkelerde çok daha fazla olmakla beraber erken teşhis ve doğru tedaviyle bu ölüm riski düşürülebilmektedir. Kanserden kaynaklı ölümlerin yaklaşık %40'ı önlenabilir etkenlerden kaynaklanmaktadır. Bu önlenabilir etkenler arasında; kanserojen yapıları maddeler, sigara kullanımı, sağlıksız beslenme, genetik ve çevresel faktörler, stres, obezite, bağışıklık sistemini baskılayan ilaçlar, fazla alkol kullanımı ve iyonize radyasyona maruziyet başta gelmektedir (Özyürek ve Çakır 2004, Özyürek ve Çakır 2023). Son zamanlarda bu çevresel faktörlerin haricinde kanserli hücrelerin mikrobiyota, fenotipik plastisite ve epigenetik mekanizmalarla bağlantılı olduğu da rapor edilmiştir (Hanahan 2022).

Kanser tedavi yöntemleri olarak kemoterapi, hormon tedavisi, kemik iliği nakli, immünoterapi, radyoterapi gibi farklı yöntemler kullanılmakla beraber kanser tedavileri her insanda aynı etkiyi yaratmayabilir (Huriyet 2024). Kanser tedavi yöntemleri zamanla artmış ve gelişmiş olsa da uygulanan tedavilerin genellikle yan etkileri bulunmaktadır (Baran 2018). Bu nedenle, son yıllarda yan etkileri azaltacak yöntemlerin geliştirilmesine çalışılmaktadır (Deisinger vd.1996).

Özellikle kişiye özgü ve hedefe yönelik kanser tedavisi en etkili yöntem olarak kabul edilmektedir. HSK, hepatositlerden köken alan ve karaciğerin en çok karşılaşılan birincil kötü huylu tümörü olup her yıl yaklaşık 600.000 kişinin ölümüne sebep olmakta ve radyoterapi ve kemoterapiye karşı direnç göstermektedir (Okuda 1992). HSK sirozla bağlantılıdır ve sitotoksik ajanlarla tedavisi risk oluşturmaktadır (Yüzügüllü vd. 2010). HSK'nın risk faktörleri arasında siroz başta gelmekte olup sirozun en belirgin sebepleri arasında alkol ve viral hepatitler sayılmaktadır. Kadınlara oranla erkek bireylerde hepatoma riski daha fazla görülmektedir. Karaciğerlerde gerçekleşen rejenerasyon HSK gelişimini önemli derecede etkilemektedir (Taş 2010). Karaciğer kanseri, dünya genelinde kansere bağlı ölümün dördüncü önde gelen sebebiyle dünya çapında en yaygın altıncı kanser türüdür. Türkiye'de HSK için başlıca risk faktörü Hepatit B virüsüdür (Çalışkan 2023).

Hepatokarsinom hastalarında tedavide öncelik olarak tercih edilen Sorafenib oral yol ile alınan antikanser bir ilaçtır (Suo vd. 2012). Sorafenib, trombosit türevli büyüme faktörü (PDGFR), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) ve Serin/Treonin kinaza özgü protein kinaz (RAF) reseptörleri dahilinde tümör anjiyogenezi ve tümör proliferasyonu da olmak üzere birkaç kinazın küçük molekülleriyle oluşmuş bir inhibitördür (Rini 2006). Lansoprazol ise; mide asit salınımını inhibe eden proton pompası inhibitör grubunda bulunan antiülser bir ilaçtır (Çalikoğlu 2011). İmidazol türevi olan Lansoprazol asit salgılanmasını bloke eden proton pompası inhibitörü olarak işlev görmektedir.

Bu çalışmada ilaç materyalleri olarak Sorafenib ve Lansoprazol'un farklı kombinasyonlarının HSK Hücre Hattı olan HepG2 hücrelerinde sinerjistik anti-kanser etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bugüne kadar yapılmış olan kanser çalışmalarında farklı maddelerin hücre döngüsü ve apoptoza olan etkileri araştırılmış ancak Sorafenib ve Lansoprazol'un özellikle HSK hücrelerinde kombine uygulanması ile ilgili literatürde herhangi bir bilgiye rastlanılmamış olup bu iki ilacın kombinasyonlarının olası faydalarının hangi mekanizmalar aracılığı ile olabileceğinin araştırılmasının literatüre katkı sağlayacağı öngörülmektedir. Bu çalışmada Sorafenib ve Lansoprazol'un farklı kombinasyonlarının HepG2 üzerine sinerjistik anti-kanser ve anti-proliferatif etkisinin hücre canlılık testi (MTT), bazı genlerin ifade düzeylerinin (TNF- α , BAX, KASPAZ-3 ve BCL-2)

belirlenmesi, ELISA metodu ile aynı genlerin protein seviyelerinin değerlendirilmesi, bunun yanı sıra Komet testi ile muhtemel DNA hasarının tespit edilmesi amaçlanmakta olup elde edilen verilerin literatüre katkı sağlayacağı düşünölmektedir. Bu bağlamda çeşitli kanser türlerinde bugüne kadar yapılan çalışmalarda farklı maddelerin hücre döngüsü ve apoptoza olan etkileri araştırılmış fakat çalışmamızda kullandığımız Sorafenib ve Lansoprazol'un özellikle HSK hücrelerinde kombine uygulanması ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır.



2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Kanser

Büyüme özellikleri bozulmuş hücrelerin klonal yayılımı olarak tanımlanan kanser ilk kez Hipokrat tarafından ‘karkinos’ olarak isimlendirilmiştir. Bu terim için daha sonra Celsus ‘cancer’, Galen ise tümörleri tanımlamak adına ‘oncos’ terimini kullanmış ve onkoloji teriminin kullanımı o dönemde başlamıştır (Hanahan ve Weinberg 2011, Lodomery 2013). Kanser, bir organ veya dokudaki hücrelerin düzensiz olarak bölünüp çoğalmasıyla ifade edilen bir hastalıktır (Evirgen 2019). Hücre döngüsü sırasında meydana gelen mutasyonlar birçok kanser türünün oluşmasına sebebiyet vermektedir (Park ve Lee 2003). Kanser genetik bir hastalık olmakla birlikte çevresel faktörlerden de etkilenebilmektedir (Şimşek 2023). Doğum kontrol ve tedavi için kullanılan hormonlar kanser oluşumunda etkili olan nedenler arasındadır (Üstündağ 2013). Bunun yanında kanserojen maddeler de genetik değişikliklere sebebiyet vererek kanserin gelişmesinde ve malign yapı oluşumunda rol oynamaktadır (Burrell vd. 2013). Kanser vücut hastalığından ziyade bir doku hastalığı olup (Huriyet 2024) mikroRNA’ları (miRNA) kodlayanlar da dahil olmak üzere birçok gendeki sıralı değişikliklerin birikmesini içeren karmaşık, çok adımlı bir sürecin sonucudur (Visone 2009). Kanser türleri iyi veya kötü huylu olabilmekle beraber, kötü huylu tümörler malign olarak adlandırılmakta (Durmuş 2021) ve tümör hücresinin kontrolsüz çoğalıp malignite göstermesi sessiz ve uzun süren bir süreçten oluşmaktadır (Bagley 2016). Kötü huylu tümörlerin metastaz yapabilme yetenekleri vardır ve bu özellikleri tedaviyi daha güç hale getiren bir durumdur (Eyol 2014). Kanserin karmaşık yapılı bir hastalık olması diğer hastalıklara göre tedaviyi daha zorlu hale getirmektedir (Demirkaya vd. 2019). İyi huylu tümörleri kötü huylu tümörlerden ayıran en önemli özellik ise yakın doku ve organlara yayılım göstermemesidir (Şahin 2023).

Yaşamın her döneminde görülebilen ve her bireyi etkiyebilen kanser, vücudumuzun herhangi bir yerinde hücre bölünmesi ve apoptozu düzenleyen noktalardaki işleyişin farklılaşması sonucuyla başlayabilir (Radhakrishna vd. 2004, Nursal 2012). Kanserlerin önemli kazanılmış yeteneklerinin arasında; apoptozdan kaçma, büyümeyi engelleyici sinyallere karşı direnç, anjiyogenezin artması, sınırsız bölünme kapasitesi, invazyon ve metastazın aktivasyonu ve büyüme sinyallerinin devamlılığı gösterilebilir (Hanahan ve Weinberg 2000). Hücrelerin hayatta kalma ve büyümesini kontrol eden ve düzenleyen

genlerin işlevi artış gösterirken baskılayan genlerin fonksiyonu ise inhibe edilmektedir (Şimşek 2023). Mikroçevre kanserli hücrelerin gelişimi ve metastaz oluşturmaları için oldukça büyük önem taşımaktadır. Çünkü hücrelerin fonksiyonlarını normal bir şekilde gösterebilmesi ve hücre ölümüne karşı direnci için mikroçevre bileşenleri gerekli miktarda ve düzende olmalıdır (Topçu 2022). Biyolojik sinyallerin bozunumu ve farklılık göstermesi, bunlarla birlikte çevresel faktörlerin etkisiyle tümörün oluşumu ve gelişimi kolaylaşmaktadır (Lai 2019). Kanserle sebebiyet veren etkenlere uzun süre maruziyet durumunda hücrelerde mutasyonlar oluşabilmekte (Greaves ve Maley 2012) ve oluşan bu mutasyonların etkisiyle hücredeki mekanizmaların bozulması, ardından da kanser hücre oluşumu ve kontrolsüzce bölünerek yayılım göstermesi gelmektedir (Weinberg 1996). Kanserler vücutta hasara sebebiyet verirken bağışıklık sisteminde ise normal doku gibi göründüklerinden dolayı sistemi içten çökertmeye başlarlar (De Weerd 2017). Teknolojinin gelişmesiyle beraber insanlar kansere sebebiyet veren maddelere, kimyasallara ve gıdalara maruz kaldıklarından dolayı kanser hastalığının ve kanser hastalarının sayısı günden güne artış göstermektedir (Çevik ve Pirinçci 2017).

Onkogenler, DNA tamir genleri ve tümör baskılayıcı genler kanser oluşumunu tetikleyen önemli role sahip genlerdir (Akgün vd. 2018). Proto-onkogenler mutasyon sonucu onkogenlere dönüşebilir. Mutasyona uğrayan proto-onkogen kopyaları kansere sebebiyet vermektedir. Onkogene dönüşüm sonrasında hücrelerde büyüme kontrol mekanizmaları bozunum göstermekte ve hücrelerin kontrolsüz büyümesine ve proliferasyona yol açıp kanser oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Tümör baskılayıcı genler hücre bölünmesini kontrol etmekle birlikte tümör gelişimini engellemektedirler. Tümör baskılayıcı genlere ise p53 ve retinoblastoma (Rb) örnek verilebilir. DNA tamir genlerinin en önemli görevi ise hücre döngüsünde oluşabilecek genetik hasarları engellemektir. Ayrıca yapılan tamirin olumsuz sonuçlandığı durumlarda hücreler nekrotik ve apoptotik yollarla yok edilerek kanser hücrelerinin oluşumu engellenmektedir (Şimşek 2023).

Kanser, yaşın ilerlemesine bağlı olarak artan bir hastalıktır (White vd. 2014). Erken teşhis sayesinde kanserden kurtulma oranı artarken, uzun süreli kemoterapi ve radyoterapiye maruz kalınması birincil kanser riski artışına sebep olmaktadır (Copur ve Manapuram 2019). Kanser tedavisinde, tümörün bulunduğu doku/organ ve kanser türüne bağlı olarak farklı yöntemler uygulanmaktadır. Tedavilerden kemoterapi, cerrahi müdahale,

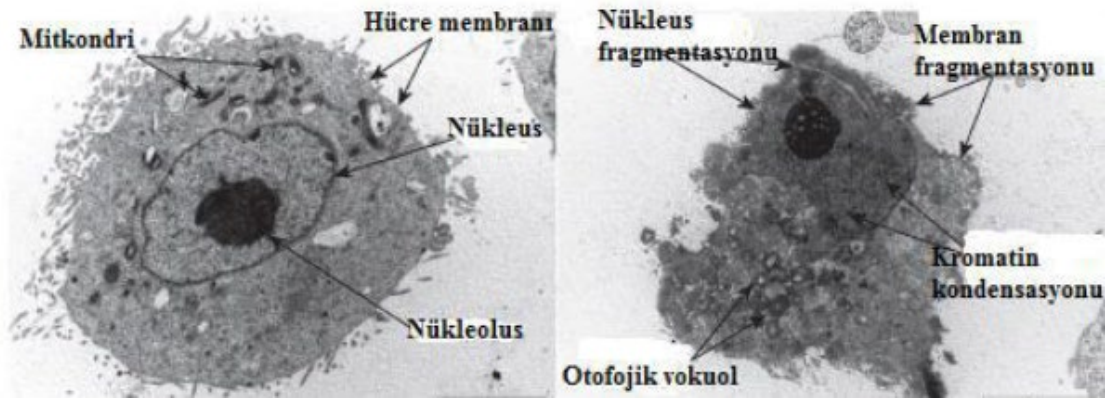
radıyoterapi ve immünoterapi bunlardan birkaçıdır (Demirkaya vd. 2019). Kanserde tedavi uygulanmadığı sürece kanserli dokular büyüyüp metastaz yapmaya devam etmektedir (Roy ve Saikia 2016).

Beslenme ve çevresel faktörlerin de kanser oluşumunu önemli derecede etkilediği, sebze ve meyve ağırlıklı beslenmenin kansere karşı savaşmada bir tedbir olduğu da son yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. Yetersiz uyku, gen ifadesinin bozulmasına sebep olduğundan dolayı uyku dengesini korumak ve yeterli uyku kanser riskini azaltan bir faktör olarak görülmektedir. Bunun yanında egzersiz yapmanın da genleri olumlu yönde etkilediği bilinmekle beraber, egzersizin insülin salgılanmasını, enflamasyon ve enerji metabolizmasıyla alakalı genleri çalıştırdığı bilinmektedir. Yoga ve meditasyon sonrası enflamasyonla alakalı genlerin yapılan çalışmalarda olumsuz ifade düzeyinde düşüş gösterdiği görülmektedir (Hasan vd. 2019). Kısacası düzenli uyku, sağlıklı beslenme, egzersiz ve yürüyüş ile çokça kanser genini susturmamız mümkün olabilmektedir. Epigenetik ile ilgilenen bilim insanlarının çevre ve yaşam faktörlerinin gen ifadeleri ilişkisi üzerinde yaptıkları çalışmalar kanser ve birçok hastalık için günümüzde umut vaat etmektedir (Riley vd. 2019).

2.1.1 Apoptoz

İnsan kanserlerini ayırt eden özelliklerden birinin bu hücrelerin apoptozdan kaçma yetenekleri olduğu düşünülmektedir (Olsson ve Zhivotovsky 2011). Apoptoz programlanmış hücre ölümü anlamına gelen hücresel bir süreçtir ve hasarlı hücreler kontrollü biçimde apoptozis yoluyla ortadan kaldırılmaktadır (Akşit ve Bildik 2008). Apoptozun tümör baskılayıcı mekanizmalardaki rolü oldukça önemli olup (Green 2018) tümörlerin regresyonda ve büyümesinde etkindir (Akşit ve Bildik 2008). Apoptoziste çekirdek yoğunlaşır parçalara ayrılır, hücre büzülür ve sitokrom C'den apoptoz indükleyici faktör salınır (Galle 1997, Roshal vd. 2001). Apoptozda hücre onarımının yapılmamasının sebebi normal hücre ölümüne göre çok daha fazla kırılmaların meydana gelmesidir (Öktem vd. 2001). Apoptoziste; K (potasyum), Cl (klor), Na (sodyum) taşıyıcı iyonlarının durması, hücre iç-dış sıvı hareketinin sonlanmasıyla hücreler büzülerek çevre ve diğer hücrelerle bağlantıyı kesmektedir (Tomatır 2003). Apoptozu karşı gösterilen her direnç hücre homeostazisini bozmakta ve hücrelerde yığılma sağlayarak tümör oluşumu için bir avantaj sağlamaktadır (Rashed ve Ragab 2004).

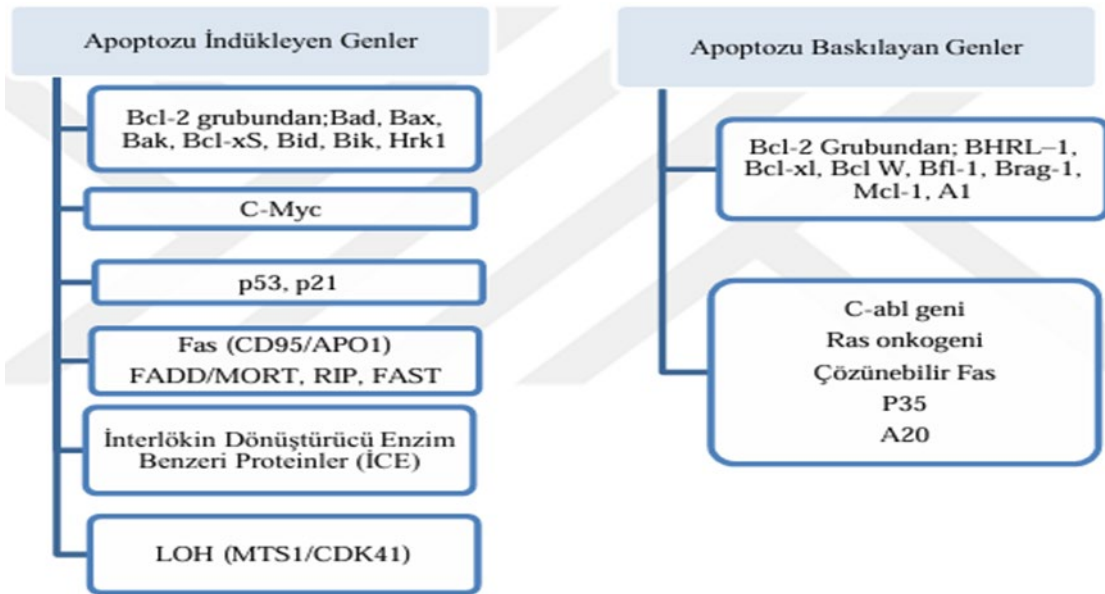
Apoptoziste intrinsik yolak, Kaspaz-2 bağımlı yolak, ekstrinsik yolak, granzim-B yolağı, granzim-A yolağı olmak üzere önemli 5 tane yolak mevcuttur. İntrinsik yolak BCL-2 ile düzenlenmekte ve mitokondriyal zar geçirgenliğini kontrol etmektedir. Bcl-2 proteini sitozolde yer alır ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve sitokrom-C'yi sitozole salarak apoptozu indükler (Babacan 2023). Proapoptotik proteinlerin fazlalığı hücreyi apoptoza sürüklemektedir. Mitokondrinin dış zarı, çekirdek zarı, ve ER'de (Endoplazmik retikulum) bulunmaktadır (Şimşek 2023). DNA hasarı sebebiyle tümör baskılayıcı gen olan p53'ün aktivasyonu apoptozu etkileyen hücresel süreçtir (Öktem vd. 2001). Apoptoz sürecinde BCL-2 ve kaspazlar önemli rol oynar. BCL-2, p53 ve kaspaz aktivasyonu DNA kırılmalarına, kromatin yoğunlaşmasına neden olarak hücrenin apoptoza sürüklenmesini sağlar (Staley vd. 1997). Tümör Nekroz Faktör (TNF), Sinir Büyüme Faktörü (NGF), Koloni Uyarıcı Faktör (CSF), İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF) gibi hücre dışı uyarılar aracılığıyla da hücre apoptoza gidebilir (Gürbilek vd. 2004). İnaktif formda bulunan kaspazlar indüklenen apoptozdan sonra aktif kaspaz aktivasyonuna dönüşmektedir (Şimşek 2023). Hücre içi sinyallerinin etkileşimiyle apoptotik uyarı başlatılmış olur. Apoptotik sinyallerinin alınmasının ardından Bax proteinleri mitokondriyal zarın iyon geçirgenliğini azaltarak apoptozun regülasyonunda görevlidir (Nagata 1997). Proapoptotik proteinin BCL-2'yi aktive etmesiyle Bax proteini aktive edilir. Bax proteininin aktifleşmesiyle mitokondrinin dış membranında porların oluşmasına ve sitokrom-C'nin salınımına sebep olmaktadır (Şimşek 2023). Mitokondriyal zarda oluşan değişiklikler sebebiyle sitokrom C ve AIF sitoplazmaya salınır. AIF yoğunlaşan kromatinden ve çekirdekten sorumluyken, sitokrom-C ise Apaf-1'e bağlanıp Prokaspaz-9'u aktive eder. Aktifleşen Kaspaz-9, efektör kaspazlardan Kaspaz-3'ün aktivasyonunu sağlar. Deoksiribonükleaz inhibitörü inaktifleşerek deoksiribonükleaz serbest salınıp kromatin kondensasyonu gerçekleşir (Tomatır 2003). Apoptozun belirlenmesinde moleküler biyolojik yöntemler, immünohistokimyasal yöntemler, morfolojik görüntüleme ve immünolojik yöntemler kullanılabilir. Antikanser ilaçlar ve radyoterapi sağlıklı hücre ve tümör hücresinde apoptozisi indükler (Akşit ve Bildik 2008). Normal ve apoptoza uğramış hücrelerin görüntüsü Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2. 1 Normal bir hücre ve apoptoza uğramış bir hücre görüntüsü (Durmuş 2021).

2.1.1.1 Apoptozun Moleküler Mekanizmaları

Apoptoz çevreden gelen sinyallerle birlikte önceden hazır olan hücrelerde primer olarak başlatılabileceği gibi bir uyarı sonucu sekonder olarak da gelişebilmektedir. Apoptoz, bazı iyonlar (kalsiyum), genler (c-myc), proteinler (p53), moleküller (seramid), ve hatta organeller (mitokondri) ile birlikte düzenlenen bir programlı hücre ölümü mekanizmasıdır. Düzenleyiciler hücre tipine özgü olabileceği gibi apoptotik uyarının çeşidine göre de farklılık gösterebilmektedir (Balkan ve Menekşe 2012). Hücrede apoptozun düzenlenmesinde görev alan genler Tablo 2.1’de özetlenmiştir.



Çizelge 2.1 Apoptoz mekanizması ile ilişkili genler (Yurdacan 2017)

2.1.1.2 Apoptozun Düzenlenmesinde Görev Alan Genler

2.1.1.2.1 Tümör Nekrozis Faktör (Tnf) Ailesi

Tümör nekroz faktör olarak da bilinen Tnf, tümörde nekrozun oluşumunda, inflamasyon ve apoptozda rol oynayan önemli bir sitokindir. Tnf'nin en genel özelliği bağışıklığın oluşumunda görev almasıdır. Tnf, tümörde büyümeye ve nekroz oluşumuna sebep olmaktadır. Tnf'nin az salınımı durumunda kanser hücrelerinde salınımın arttığı ve fazla salınımında ise nekroz ve apoptoza yol açtığı bilinmekte, buna ek olarak da kanserli hücrelerin yıkımını da sağlamaktadır. Tnf- α genel olarak monosit ve aktif makrofajlar vasıtasıyla salınımı gerçekleşmektedir. Ayrıca Tnf- α 'nın tümör, mast, düz kas hücrelerinden ve fibroblastlardan da sentezi yapılabilmektedir (Demirezen vd. 2008).

İmmün sistemin kanser hücrelerini tanıdığı bilinmektedir. Kanser hücrelerinin normal sağlıklı hücrelerden ayıran özelliği yüzeylerinde bulunan tümörle bağlantılı antijenlerden kaynaklanmaktadır. Bu tanıma olayı bir makrofaj olan dentritik hücre vasıtasıyla sağlanmaktadır. Bu makrofajlar fagosite özelliklerinden dolayı tümör hücrelerini sindirirler ve sindirim sonucu oluşan sindirim ürünlerini ise dışarıya verirler.

Bu sindirim ürünleri, T hücreleri ile immün cevap oluşumunu sağlamaktadır. Tnf'nin en etkin özelliği ise tümör üzerinde kanamalı nekroz oluşturmaktır. Bu nekrozu tümörün beslendiği kan damarlarında tromboz oluşturarak gerçekleştirir (Demirezen vd. 2008).

Tnf, biyolojik fonksiyonlarını tip 1 (TNF-R1) ve tip 2 (TNF-R2) olmak üzere iki farklı reseptör aracılığıyla gerçekleştirmektedir (Aggarwal 2000). Tnf ailesi üyeleri kaspaz aktivasyonuna neden olarak ölüm reseptörleri aracılı apoptoza neden olmaktadır. Bu ailenin üyeleri; Fas (CD95, APO-1), tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR1, p55, CD120a), DR3 (Apo3, WSL-1, TRAMP, LARD), DR4, DR5 (Apo2, TRAILR2, TRICK2, KILLER) ve DR6'dır. Bu reseptörlerden en önemlileri Fas ligandı ve TNFR1 reseptörü aktive olduğunda, hücre sitoplazmasındaki 'adaptör proteinlere' bağlanarak apoptozun başlamasını uyarırlar (Van Horssen vd. 2006). TNF ailesinin apoptoz ve hücre proliferasyon mekanizmasındaki işlevleri Şekil 2.2'de verilmiştir.

Bax, Bcl-2 ile homodimer yapı meydana getirerek BCL-2'yi inaktive ederek hücrede apoptoz gerçekleşmektedir (Tilli vd. 2002).

Bcl-2 grubunun anti-apoptotik proteinleri hücresel zarlara bağlanma yeteneklerinden dolayı mitokondriyal membranın geçirgenliğini regüle ederek apoptozun düzenlenmesinde görev almaktadır (Babacan 2023). Buna ek olarak hücre canlılığını regüle etmekte ve bunu da Ca^{+2} konsantrasyonunu düzenleyerek yapmaktadır (Park vd. 2021). Bundan ayrı olarak ise apoptozun inhibe olmasını sağlayarak tümör hücrelerinin hayatta kalma sürelerini uzatarak malign formunu kazanmalarına sebep olmaktadır (Arbab vd. 2012, Siddiqui vd. 2015). Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w ve Mcl-1 gibi üyeler Grup I antiapoptotik BCL-2 ailesi olarak bilinmekte ve bu üyeler apoptozu inhibe eden proteinler olup hücreyi farklı uyarılara karşı koruyarak hücrenin yaşamı için önem arz etmektedir. Bu grupta yer alan Bcl-xl mitokondri membranı dışında yerleşmiş olan önemli bir apoptoz inhibitörüdür. Bcl-2 ise; mitokondri membran geçirgenliğinin korunmasında proapoptotik proteinleri (Bax ve Bad) inhibe ederek apoptozun engellenmesinde rol almaktadır (Keane vd. 2001). Apoptozu uyarıcı özellik gösteren protein grubu ise Grup II proapoptotik Bcl-2 ailesi olarak bilinmekte olup bu grupta Bak, Bax, Bok/Mtd proteinleri bulunmaktadır. Proapoptotik etki göstererek apoptozun indüklenmesinde görev alan genleri içeren Grup III BH3 only- Bcl-2 ailesi içerisinde ise; Bid, Bad, Bik, Bim, Hrk, Bcl-XS Noxa, Nip3, Bmf, Bcl-G ve PUMA bulunmaktadır (Yurdacan 2017).

Yapılan çalışmalar Bcl-2'nin HSK'nın kemoterapi direnç metabolizmasında rol oynadığını göstermektedir (Craig vd. 2020). Bcl-2 HSK'da apoptoz mekanizmasını engelleyebilir ve Bax ile dimerik yapı oluşturarak tümör oluşumunu indükleyebilmektedir. Bcl-2 normal koşullarda inhibe ederken aşırı salınımı sonucuna bağlı olarak ise tümör oluşumu ve ilaç direncini beraberinde getirmektedir (Lohitesh vd. 2018).

2.1.1.2.3 Bax Ailesi

Bax ve Bcl-2 birbirleriyle etkileşime girerek dimerik yapı oluşturabildikleri gibi birbirlerinden bağımsız ayrı ayrı etki de gösterebilmektedirler. Apoptozun düzenlenmesi bu protein miktarlarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Örneğin Bax arttığında hücredeki

apoptoz mekanizması indüklenirken, Bcl-2 artış gösterdiğinde ise hücredeki apoptoz mekanizması inhibe edilmektedir (Edlich 2018). Bax genel olarak sitoplazmada yer almaktadır ancak apoptoz gerçekleşirken mitokondriyal zara bağlanıp zar geçirgenliği oluşturarak mitokondriyal zar kanalı oluşturmaktadır (Hauseman vd. 2020).

Apoptoz sürecinin regüle olması sırasında, Bax kanallarının aktivitesi inhibisyona uğrarak sitokrom-C'nin salınmasıyla gerçekleşmektedir. Apoptoz sinyallerine karşı hücreler yanıt verdiğinde, Bax mitokondrinin üzerinde yer değiştirmekte ve mitokondriyal membranın bütünlüğünü bozarak etki göstermektedir (Jeng vd. 2018). Bax aktivasyonu, p53 ve Bcl-2'nin sitoplazmadaki miktarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Lee ve Oh 2021).

2.1.1.2.4 Kaspazlar

Kaspazlar bir sistein proteaz ailesi olup apoptoz için merkezi bir konuma sahip olan yapılarıdır. Normal şartlarda prokaspazlar olarak sentezlendikten sonra belirli kısımları kesilip uzaklaştırılarak aktif kaspaz halini almaktadırlar (Chowdhury vd. 2006). Hücrede inaktif halde bulunmakta ve uyarı aldıklarında proteolitik olarak birbirlerini aktive etmekte olan kaspazlar özellikle hücre iskeletini oluşturan ve DNA tamirinden sorumlu proteinlerin kullanıldıktan sonra veya işlevlerini kaybettikten sonra parçalanarak ortadan kaldırılmasından sorumludurlar (Gewies 2003, Serbes 2009; Kandaş 2004; Ekshyyan ve Aw 2004). Toplam 14 üyeye sahip olan bu Kaspaz ailesinin 7 üyesi apoptozda rol alan Kaspaz-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10'dur. Kaspaz -3, -6 ve -7 apoptoz sırasında hücrenin parçalanmasına neden olurken diğer kaspazlar ise apoptozun başlatılması ve apoptozda rol alan kaspazların aktive olmasından sorumludurlar (Earnshaw vd. 1999).

2.1.1.3 Apoptoz Yolakları

Apoptoz yolakları iç yolak ve dış yolak olarak iki kısımdan oluşmaktadır. Dış yolak, hücrenin dışında bulunan bir uyaran vasıtasıyla aktive olmaktadır. Apoptozun başlamasında görev alan sinyal yolaklarının transmembran reseptörlerinin etkileşimleriyle gerçekleşmektedir. Bunlara örnek olarak NGF, CSF, IGF ve IL-2 (interlökin) verilmektedir

(Chinnaiyan 1999). TNF, sistein bakımından zengin hücre dışındaki alana ve yaklaşık olarak 80 aminoasit oluşumlu ölüm bölgesi bulundurmasından dolayı dış yolak için en önemli reseptör ailesi olarak nitelendirilmektedir. Ölüm bölgeleri, ölüm sinyallerinin hücre içine gönderilmesi bakımından oldukça önemlidir. Kaspaz-8, -9 ve -10'un, Kaspaz -3 ve -7'yi aktiveştirmesinin sonucunda DNA'nın apoptotik ölümü gerçekleşmektedir (Yurdacan 2017). Apoptoz iç sinyal yolları ise mitokondriyal temelli olan ve hücre içi hedefleri direkt olarak etkilemek amacıyla hücre içi sinyal üretimi yapan ölüm yolağıdır. İç yolağın aktiveşebilmesi için pozitif veya negatif etkili hücre içi sinyallerin üretilmesi gerekmektedir. Ölüm faktörlerinin yokluğunda üretilen negatif sinyaller apoptozun indüklenmesine sebep olmaktadır. Radyasyon, viral enfeksiyon, toksin ise pozitif sinyallere örnek verilmektedir. Sonuç olarak bütün bu uyarılar iç mitokondriyal membran değişikliğine sebebiyet vermektedir (Festjens vd. 2004).

2.1.2 Apoptoz ve Kanser

DNA'da meydana gelen herhangi bir hasar öncelikle DNA tamir mekanizmaları tarafından taranır ve tamir edilir. Ancak hasarın tamir edilemediği bazı durumlarda hücre genetik kontrol mekanizmalarının gözetimi vasıtasıyla ortadan kaldırılmaktadır (Lozano ve Elledge 2000). Ancak kontrol mekanizmalarında da bir hasar görüldüğü durumlarda hücre ortadan kaldırılamaz ve hasarlı şekilde bölünmesine devam eder. Bu hasarlı hücreler hızla çoğalma göstererek neoplastik oluşumu ve kanseri tetikler (Curtin ve Cotter 2003). Kanserin hücre proliferasyonunda artış ve apoptozda azalmaya bağlı olarak geliştiği bilinmektedir (Meng vd. 2017). Hücre ölümü inhibe olduğunda hasarlı hücreler birikmekte ve dokuda hasara neden olmaktadır. Kemoterapi ile etkin tedavinin sonucunda hücrelerde apoptoz meydana gelmektedir (Kaufmann ve Gores 2000).

Yapılan çalışmalarda C-MYC ve BCL-2 gibi sağkalımı tetikleyen genlerin kanser hücrelerinde oldukça fazla ifade edilerek ölüme sebep olan genleri baskıladığı rapor edilmiştir (Curtin ve Cotter 2003). Yapılan diğer çalışmalarda nöroblastom ve kolon kanserinde survivin ve Bcl-2 proteinlerinin yüksek seviyede ifade edildiği ve bunun kötü prognoz ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (Özçimen 2005). Melanoma hücrelerinde de Apaf-ekspresyonu inhibisyona uğrayarak hücrenin apoptoza girmesi engellenir (Schroter vd.

2000). Kolon ve akciğer ve kanserlerinde ise Fas-liganda bağlanan “decoy” molekülü fazla üretilerek Fas-ligandın, Fas proteinine bağlanması inhibe edilir ve böylece kanser hücreleri sitotoksik T hücreleri tarafından tanınıp öldürülemezler (Özçimen 2005). Bunlara ilave olarak yapılan çalışmalar Bcl-2’nin hücrede aşırı derecede artışının lösemi hücrelerinde sağkalımını arttırdığını ve hastanın kemoterapiye karşı direnç kazanmasına neden olduğunu göstermiştir (Lotem ve Sachs 2002).

Apoptoz sayesinde hasar alan hücreler ortadan kaldırılarak bir sonraki kuşağa aktarılması engellenerek organizma için kanser oluşumunu destekleyen genetik mutasyonların sayısı da en aza indirilmiş olur (Klug ve Cummings 2002). Bu sebeple özellikle son yıllarda kanser tedavisinde apoptozu indükleyecek yeni ajanlar üzerine yoğun araştırmalar gerçekleştirilmektedir (Fesik 2005).

Tümör dokuları artış gösteren genomik kararsızlık sebepli heterojen bir yapıya sahiptir. Bu nedenle kanser hücreleri normal hücrelerle kıyaslandığında apoptoza karşı direnç, yüksek proliferasyon yetenekleri, yüksek metastaz, anjiyogenez ve invazyon yeteneklerine sahip olmalarından dolayı kanserde tedavi başarısı düşüktür. Bu durum ise son zamanlarda kanser tedavisinde tekli tedavilerden çok kombine tedavilerin dikkat çekmesine neden olmaktadır (Frei ve Eder 2003). Son yıllarda HSK tedavisinde de birçok ilaca karşı tedavide başarı sağlanamadığından veya tedavi sürecindeki hastaların ilaca karşı direnç göstermeleri sebebiyle kombine ilaç tedavilerine yoğunlaşmıştır (Şirin 2018).

2.1.3 Kanserde Gen Tedavisi

Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda, moleküler biyoloji alanındaki gelişmelerle birlikte kanserin temelini genetik olduğu ve kanserin gelişip ilerlemesine neden olan genlerin detaylı olarak tanımlanmasıyla birlikte bu hastalıkta gen tedavisi yöntemiyle ilgili çalışmalar büyük önem kazanmıştır. Gen tedavisinin amaçları arasında uygulanacak tedavi etkisinin uzun süreli olması ve hücre veya dokuya özgü olması gerektiği düşünülmektedir (Akbulut 2003). İnsanların DNA’sı birbirinden farklı olduğundan dolayı herkese benzer tedavinin uygulanması durumunda farklı cevaplar ve etkilerin görülmesi kaçınılmazdır. Bu sebepten ötürü kişiye özgü tedavi yöntemlerinin uygulanması ve

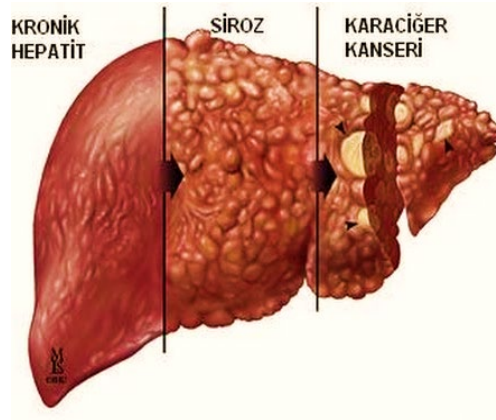
geliştirilmesi gerekmektedir (Baykara 2016). Gen tedavisinde başarılı olmanın temel yolu uygun gen bulunmasıdır. Bu uygun genin hedef hücre veya dokulara uygun koşullarda gönderilmesi ve yeterli miktarda ekspresyonunun sağlanması gerekmektedir. Eğer ki hedef gen ve onkogenin hastaların tamamında bulunuyorsa tedavinin başarılı olma ihtimali çok daha yüksektir (Akbulut 2003).

İmmünoterapi, bugüne kadar yapılan gen tedavisinde ağırlıklı kullanılan bir yöntemdir. Hedef genler olarak ise onkogenlere kıyasla tümör baskılayıcı genler daha ön plandadır. Gen dağıtım araçları üç gruba ayrılmakla birlikte bunlar; viral vektörler (retrovirüs, adenovirüs), viral olmayan vektörler (çıplak DNA, paketlenmiş DNA, işlenmiş DNA partikülleri ve lipozomlar) ve hücre tedavileri (mezankimal kök hücre, embriyonik kök hücre, nöronal kök hücre) olarak gruplandırılmaktadır. Gen tedavisi ajanında büyük oranda rekombinant DNA teknolojisinden faydalanılmaktadır (Akbulut 2003). Kanserin türü, agresifliği ve hastanın immün sistemine bağlı olarak kanser tedavileri değişiklik gösterebilmektedir (Siegel vd. 2012). Gen tedavisinde tekniklerin doğru ve uygun kullanılması başarılı olunmasının ön koşulunu oluşturmaktadır (Akbulut 2003).

2.2 Karaciğer Kanseri

Karaciğer kanseri dünyada en yaygın olarak karşılaşılan beşinci kanser tipi olup, kanserden kaynaklanan ölümler arasında ise üçüncü sırada yer almaktadır (Bingöl 2011). Gelişmekte olan ülkelerde karaciğer kanserine yakalanmadaki risk diğer ülkelere oranla daha fazla görülmektedir (Anwanhan vd. 2020). Karaciğer kanseri öncelik olarak karaciğerde oluşmakta veya diğer doku ve organlarda meydana gelen kanser hücrelerinin karaciğerde yayılım göstermesiyle meydana gelmektedir (Shojaei 2016). Karaciğer tümörleri iyi huylu, kötü huylu ve metastazik tümör olarak üç grupta incelenmektedir. Primer karaciğer kanseri genellikle epitel hücre kökenlidir. Coğrafi dağılıma bakılacak olursa karaciğer kanseri diğer kanser türlerine oranla sık değişkenlik göstermektedir (Sankaranarayanan vd. 1998). Karaciğer tümörleri arasında en yaygın karşılaşılanı ise HSK'dır (Arslan, 2012). Metastazik karaciğer kanseri ise vücudun diğer kısımlarındaki kanser hücrelerinin karaciğere yayılımı sonucunda meydana gelen kanserdir (Diril 2022).

Karaciğer kanserlerinin büyük çoğunluğu genellikle altta yatan hastalıklardan kaynaklanmaktadır (Gravitz 2014). İnflamasyon ve hepatosit rejenerasyon sonucunda kronik karaciğer hastalığı ortamında gelişmektedir. Genetik ve epigenetik değişikliklerin uzun yıllar boyunca karaciğerde birikmesi de kanser oluşumunu teşvik etmektedir. En sık rastlanan sebepler arasında Hepatit B enfeksiyonu başta gelmektedir ve Hepatit B, konakçı genomunda genomik instabilite ve mutajenezi indükleyerek karaciğer kanserinin oluşumunu teşvik etmektedir. Hepatit B enfeksiyonu DNA hasarına ve telomer kısalmasına sebep olmakta ve bunun sonucunda ise karaciğer kanserinin oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Yamashita ve Wang 2013). Alkolün kanserojen etkisinden dolayı yüksek oranda kullanımı kanserde risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Alkol, daha önce var olan kronik karaciğer hastalığı, sigara kullanımı, obezite, hareketsiz yaşam, Hepatit B ve C gibi etkenlerden dolayı karaciğer kanseri oluşumunu daha çok tetiklemektedir (Grewal ve Viswanathen 2012). Karaciğer kanserinin gelişmesindeki bir diğer risk faktörü ise aflatoksinlerdir. Aflatoksin, buğday, yer fıstığı, pirinç gibi kuru gıdalarda bulunan ve *Aspergillus* adı verilen küf mantarının sıcaklık ve neme bağlı olarak etkisini göstermesiyle hepatit ve karaciğer yetmezliğine sebep olup karaciğer kanseri oluşumunu etkilemektedir (Barrett 2015). Her ne kadar karaciğer kanseri için farklı sebepler bulunsun da karaciğer kanserinin kaynağında büyük farklılıklar görülmektedir (Gravitz 2014). Kronik hepatit, siroz ve karaciğer kanserinin şematize görüntüsü Şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.3 Kronik hepatit, siroz ve karaciğer kanseri görüntüsü (Int. Kyn. 1)

Karaciğer kanserinin en yaygın tedavi yolları arasında kemoterapi ve immünoterapi başta gelmektedir. Buna ek olarak nanoteknoloji tabanlı tedavi yöntemleri de kullanılmaktadır.

Kemoterapötik bir ilaç olan Sorafenib tedavide iyi bir seçenek olmasına karşın uzun süreli kullanımında ise toksisiteye ve ilacın verimsizleşmesine sebep olması gibi olumsuz yönleri de bulunmaktadır. Karaciğer kanserini tedavi etmek için farklı alternatifler, daha etkili yollar ve tedavi seçenekleri geliştirilmelidir (Anwanhan vd. 2020).

2.2.1 Hepatosellüler Karsinom

HSK en sık rastlanan primer karaciğer malignitesidir ve dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden birini oluşturmaktadır. HSK istatistiği geniş bir coğrafyada yayılım göstermekle beraber (Bruix vd. 2004) etiyolojisi ve dağılımı coğrafi bölgelere bağlı olarak farklılık göstermekte (Mammadli 2023) ve %80'den fazlası Doğu Asya ve Sahra Altı Afrika gibi yeni gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir. Amerika ve Kuzey Avrupa gibi gelişmiş ülkelerde ise görülme sıklığı diğer ülkelere oranla daha azdır. Türkiye'de ise HSK görülme sıklığının %56'sının HBV, %23.2'sinin HCV, %15'inin ise yüksek alkol kullanımı sebebiyle olduğu, İç Anadolu ve Doğu Anadolu bölgelerinde en önemli faktör kronik hepatit B iken, batı bölgelerine doğru yaklaşıldıkça kronik hepatit C ve aşırı alkol kullanımının daha önemli bir sebep olduğu saptanmıştır (Uzunlifoğlu vd. 2001). Bunların dışında HSK için risk faktörleri arasında sigara kullanımı, çeşitli metabolik hastalıklar, aflatoksin, diabetes mellitus, nonalkolik karaciğer yağlanması ve erkek cinsiyet gibi birçok faktör de sayılabilir (El-Serag ve Rudolph 2007). Enfeksiyona sahip olmayan bireylere göre kronik hepatit B virüsü taşıyıcısı olan hastalarda HSK gelişme riskinin aşağı yukarı 100 kat daha fazla olduğu ve bu durumun en yüksek viral etkenli kanser oluşum riski ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Beasley 1988, Arbuthnot ve Kew 2001). HSK, kanser kaynaklı ölümlerde dünya çapında üçüncü sırada yer almaktadır. Kronik hepatit B ve C enfeksiyonları, alkol kullanımı veya aflatoksinler sonucunda oluşan hepatokarsinogeneizde diğer karsinogenezlerde de olduğu gibi apoptozdan kaçabilme, sınırsız bölünebilme yeteneği ve anjiogenez gibi özellikler görülmektedir (Feitelson vd. 2002, Kunter 2007). Karaciğer kanserinin büyük oranını HSK belirlemekte olup bu kanser türünün %75'ini kapsamaktadır (Petrick ve McGlynn 2019). Dünya çapında erkeklerde beşinci ve kadınlarda yedinci sırada yer alan HSK karaciğerin sıklıkla karşılaşılan primer malignite tümörü olup (Mittal ve El-Sarag 2013) görülme sıklığı erkeklerde kadınlara nazaran daha fazla olan bir hastalıktır. Dünya genelinde her yıl ortalama HSK ile ilgili

olarak bir milyondan fazla yeni vaka tanımlanmakta ve bu vakaların sağ kalım oranları 5 yıl için %3'ten daha azdır. Bunlara ek olarak ameliyat sonrası nüks etme ve metastaz oranı da yüksek olan bir kanser türüdür (Tang vd. 1999, Tang 2001).

HSK riski yaşa, cinsiyete, karaciğerde meydana gelen hasara göre farklılık göstermekle birlikte (Bruix vd. 2004) viral hepatit B virüsü taşıyıcıların taşımayanlara kıyasla HSK'ya yaklaşık 100 kat daha fazla yakalanma riski bulunmaktadır (Beasley 1998, Arbuthnot ve Kew 2001). Genellikle 14-33 yaş skalasındaki genç popülasyonda daha çok görülmekte ve sağ kalım oranı diğerlerine kıyasla daha yüksek seyretmektedir (Demirkıran 2022) ve ayrıca kronik hepatit B, kronik hepatit C, alkol ve sigara kullanımı, diyabet, karaciğer yağlanması ve aflatoksin gibi etmenler de HSK için risk oluşturan etmenler arasındadır (El-Serag ve Rudolph 2007).

HSK'nın gelişimi karmaşık bir süreçten oluşmakla beraber (Demirkaya vd. 2019) kronik karaciğer hasarına ve buna bağlı olarak siroza sebebiyet veren herhangi bir etken onkolojik etkenler arasında sayılmaktadır. Buna örnek olarak ise başta Hepatit B, Hepatit C ve alkol gelmektedir. Diğerlerine oranla daha düşük olsa da risk faktörleri arasında primer safra sirozu ve bakır veya demir birikimi de gelmektedir (Bruix vd. 2004). HSK siroz ortamında kendini gösteren ve genellikle ileri evrelerde ortaya çıkan agresif bir kanser tipidir. Siroz, etiyolojiden bağımsız olarak HSK gelişimi için önemli risk oluşturmaktadır. Sirozlu karaciğerde, hepatositlerin çoğalmasından kaynaklanan rejeneratif nodüller görülmektedir (El-Serag 2012). Nodüllerin oluşumuyla birlikte ilk olarak hiperplastik nodüllere daha sonra büyüme hızındaki kontrolün ve hepatositlerin kaybından dolayı displastik nodüllere dönüşerek HSK oluşmaktadır (Thorgeirsson vd. 2006). Bu rejeneratif nodüller ile HSK arasındaki ayrım, nodüllerin boyutuna göre değişebilir (El-Serag 2012). HSK, kromozomal anormallikler, allelik kayıplarda artış, hücresel yolaklarda oluşan anormallikler ve mutasyonlarla ilişkilendirilmekle beraber (Feitelson vd. 2002, Kunter 2007) telomer kısalmasının da sirozlu karaciğerlerde görülen diğer bir anormallik olduğu da geçmiş yıllarda rapor edilmiştir. Farelerle yapılan çalışmalarda telomer kısalmasının karsinogen maruziyeti sonrası deneklerde karaciğer tümörü oluşumunu tetiklediği saptanmış olup insan HSK vakalarında da aynı şekilde telomerlerin kısaldığı tespit edilmiştir. İnsan hepatositlerinde telomer kısalmasının kromozomal instabiliteye neden olabileceği ve bu şekilde HSK gelişimini tetikleyebileceği ileri sürülmüştür (Wiemann vd. 2002).

Yapılan literatür araştırmaları HSK’da sadece genetik değişikliklerin değil epigenetik değişikliklerin de oldukça önemli bir rol oynadığını rapor etmektedir (Bird 2007).

HSK tümörlerinin besin kaynağı kan bakımından zengin kan damarları olduğundan do-
layı son yıllarda yapılan çalışmalar anti-anjiyogenezin HSK hastaları için umut verici bir
tedavi yöntemi olduğunu düşündürmektedir (Liu vd. 2006).

2.2.2 Tanı ve Tedavi

HSK tanısı sıklıkla hastaların semptomatik hale geldiği ve karaciğer yetmezliğinin ilerle-
miş durumunda konmaktadır. Tarama, altı aylık aralıklarla hem ultrason, bilgisayarlı to-
mografi ve manyetik rezonans görüntüleme gibi radyolojik testleri hem de α -fetaprotein
gibi serolojik belirteçleri içermektedir. Çoklu tedavi yöntemleri mevcuttur ancak yalnızca
karaciğer nakli veya cerrahi rezeksiyon küratiftir. Ek tedavi yöntemleri arasında transar-
teriyel kemoembolizasyon, radyofrekans ablasyonu, mikrodalga ablasyonu, peruktan eta-
nol enjeksiyonu, kriyoablasyon, radyasyon terapisi, sistematik kemoterapi ve moleküler
hedefli tedaviler yer almaktadır (Balogh vd. 2016). Lokolejyonel HSK’nın yanı sıra kri-
terleri aşan tümörlerin evrelendirilmesinde en sık kullanılan yöntem TACE (Transarteri-
yel kemoembolizasyon)’dır (Takayasu vd. 2006). TACE ayrıca tümör hacmini azaltmak
ve mikrometastazı hedeflemek için tedavi seçeneği olarak en başlarda gelmektedir
(Schwartz vd. 2007).

Tümörün boyutu arttıa kan akımı arteriyer hale gelir ve bu tümör özelliği HSK’yı tespit
etmek için kullanılan temel yöntemdir. Tedavi yönteminin seçimi tümörün boyutuna, lo-
kasyonuna, ekstrahepatik yayılımına ve altta yatan karaciğer enfeksiyonuna bağlı olarak
değişkenlik göstermektedir. Mevcut organların yetersizliği HSK’lı birçok hasta için bazı
tedavileri engellemektedir (Balogh vd. 2016).

HSK’nın önlenmesi, hepatit B virüsünün aşılanması, kan ürünlerinin evrensel olarak ta-
ranması, güvenli enjeksiyon uygulamalarının yapılması gibi durumlarda gerçekleştirile-
bilir. HSK’da en iyi tedavi sonucunu elde etmek için erken teşhisin önemi büyük olmakla
beraber karaciğer kanser riskini en başından önlemenin yolları ise obezite, diyabet ve aşırı

alkol tüketimi gibi risk faktörlerinin azaltılması şeklinde sayılabilir (McGlynn vd. 2021). HSK, her ne kadar bu risk faktörlerinin azaltılması ile önlenabilir bir kanser tipi olsa da tanının oldukça ileri evrede konulması ve buna bir de karaciğer fonksiyon bozukluklarının eşlik etmesiyle, uygulanan tüm HSK tedavileri başarısız olmaktadır.

Tanı ve tedavide yeni teknolojilerdeki ilerlemelere rağmen insidans ve mortalite artmaya devam etmektedir (Balogh vd. 2016). Tüm bu nedenlerden dolayı, günümüzde yapılan araştırmalarda HSK gelişimi ile ilişkili genetik ve epigenetik değişimlerin rol aldığı moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına odaklanılmaktadır (Balogh vd. 2016).

2.2.3 HSK Tedavisinde Kombin Terapi

Başlangıçta tek kökenli klonal yapıya sahip olan kanser hücreleri, sınırsız bölünme yetenekleri sayesinde neoplazinin başlangıcı ile artan DNA kararsızlığı sonucunda tümör dokusunun heterojen yapı kazanmasına sebep olmaktadır. Sonuçta, kanser hücreleri apoptoza karşı direnç, daha yüksek bir proliferatif kapasiteye, daha yüksek oranda metastatik veya invaziv ve anjiyogenez potansiyeline sahip olduklarından dolayı tedavide başarı oranının düşmesine sebep olmaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı, günümüzde tek ilaç tedavi seçeneği yerine kombinasyonel kemoterapötik tedavi uygulamalarına daha çok odaklanılmaktadır (Frei ve Eder 2003). Günümüzde kullanılan çoğu geleneksel kemoterapötik ilaca karşı duyarlı olmamasından veya tedavinin ilerleyen sürecinde direnç kazanmasından dolayı son yıllarda kombin ilaç tedavilerine HSK tedavisinde de yer verilmektedir. Son yıllarda HSK tedavisinde Sorafenib ile birlikte kombin tedavi olarak MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR, EGFR, histon deasetilaz ve anjiyogenez inhibitörlerin etkisi üzerinde çeşitli araştırmalar gerçekleştirilmektedir (Yurdacan 2017).

2.2.4 Hepatosellüler Karsinoma Hücre Hattı

HepG2 hücresi, HSK'lı hastadan izole edilen ve karaciğer kanseri çalışmalarında sıklıkla tercih edilen bir hücre hattı olup (İsan vd. 2016) diğer hücre hatlarına göre çalışma ve kültürü bakımından daha kolay olduğundan dolayı tercih edilme oranı daha yüksektir. HepG2 hücre hattının avantajları arasında; karaciğere özgü serum ve plazma proteinleri

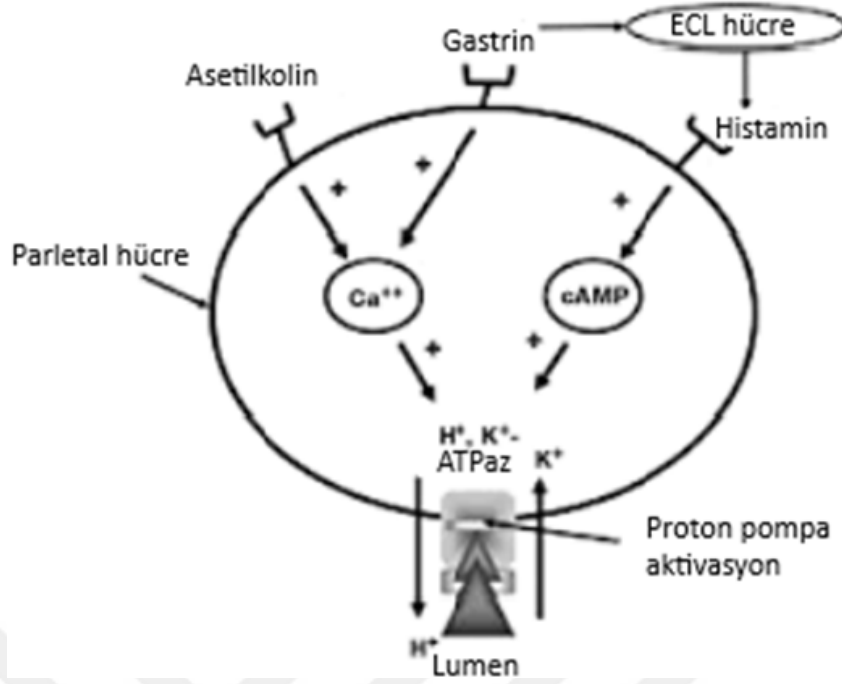
üretimi ve proteinlerin işlenebilmesi başta gelmektedir. HepG2 hücre hatlarında viral enfeksiyon bulunmaması sebebiyle genellikle HSK modeli olarak ve HSK'nın saf hücre hattını temsilen kullanılmaktadır. HepG2 hücre hattının, karaciğer karsinomasında saf hücre çizgisini simgelemesinin nedeni gen ekspresyonunda viral enfeksiyon bulundurmasından kaynaklanmaktadır (Costantini vd. 2013).

HepG2 hücreleri, karakterize edilen insan hepatoma grubunda en iyi hücre hattı olması ve çok yönlü olmasından dolayı oldukça çok tercih edilmektedirler (Burley ve Roth 2007). Aynı zamanda yüksek proliferasyona sahip olup (Danato vd. 2014) ilaç geliştirme çalışmalarında tercih edilen hepatik hücre depolarından biridir (Oshikata-Miyazaki ve Takezawa 2016).

2.3 Proton Pompa İnhibitörleri (PPI)

Tedavi için kullanılmaya ilk defa 1998 yılında başlanmış olan (Uygun 2013) PPI yaygın olarak dünyada 25 yıldır kullanım alanı bulan ve midenin asit üretimini azaltıp, mide asit salgısını baskılayan bir ilaç grubudur. PPI, en sık kullanılan ilaçlar arasında dünyada üçüncü sırada yer almakla beraber WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından düzenlenen reçetede güvenilir ilaç grubunda yer almakta ve asit ile ilişkili hastalıklarda en etkili tedavi yöntemlerinden biri olarak kullanılmaktadır. Karaciğerde metabolize olup metabolitleri idrarla ve feçesle atılmaktadır (Özden 2013).

PPI etki mekanizması histamin, asetilkolin ve gastrin reseptörleri tarafından mide mukozasında bulunan parietal hücrelerindeki asit salınımı ile kontrol edilmektedir. Bu reseptörlere bağlanması sonucuyla protein kinaz aktivasyonu gerçekleşmekte ve protein pompası (H^+/K^+ ATPaz) uyarılmaktadır. Protein pompası K^+ iyonunu hücre içersine geçirirken H^+ iyonunu ise mide lümenine salgılamaktadır (Özden 2013). PPI parietal hücrelerdeki proton pompasında mevcut olan H^+ , K^+ ve ATPaz'a geri dönüşümsüz biçimde bağlanıp mide asit salınımını baskılamaktadır ve buna bağlı olarak ilaç uzun süreli etki sağlamakla birlikte gün içinde tek dozun uygulanması yeterli olmaktadır (Uygun 2013). Mide parietal hücresinde mide asit salınımı ve PPI etki mekanizması Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4 Mide parietal hücresinde mide asit salınımı ve proton pompa inhibitörleri etki mekanizması (Özden 2013)

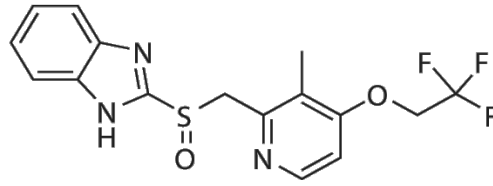
Klinik kullanımdaki proton pompa inhibitörlerine örnek olarak Lansoprazol, Esomeprazol, Rabeprazol, Pantoprazol, Omeprazol ve Dekslansoprazol verilebilir (Uygun 2013). Bu ilaçlar mide asidine karşı dayanıksız olmaları sebebiyle ince bağırsakta açılacak formda üretilmektedir. PPI'ler ince bağırsakta absorbe olup karaciğerde metabolizması gerçekleşmekte ve parietal hücrelerinin lümeninde konsantre olmaktadır. PPI'ler asit ortamında H^+ alarak sülfonamid formuna dönüşümünü sağlayarak aktifleşmekte, aktifleşen PPI'ler H^+ , K^+ ve ATPaz'lar sistein moleküllerine bağlanıp pompa inhibe edilmiş olmakta ve bu inhibasyon sonucu asit sekresyonu bloke edilmektedir. Bu sebeple PPI'lerin etkisi uzun sürmektedir (24-48 saat). Bütün PPI'ler asit uyarılarının asit salınımını bloke ederler. PPI'ler hem yemekle uyarılan asiti hem de uyku sırasında salgılanan asit dahil tüm asit sekresyonunu inhibe etme özelliğine sahiptirler. Standart dozda PPI'ler pH'ı 3-4 üzerinde tutma özelliği göstermekle beraber yüksek dozda PPI kullanılacağı zaman bölünerek belli aralıklarda (kahvaltıda ve akşam yemekten 20-30 dakika önce) alınması daha iyi pH dengesinin kurulmasını sağlamaktadır. PPI'ler her ne kadar günde iki kez verilse de pH gece 12 ve sabah 6 arasında 4'ün altına da düşebilmektedir (Özden 2013).

PPI tedavisi, hastaların yatış aşamasında başlayıp hasta taburcu olduktan sonra uzun süreli kullanımı devam eden bir süreçtir. PPI'ler arasında önemli ölçüde fark olmaksızın yan etkileri %1-3 arasında değişmektedir. Bu tür ilaçların uzun süreli kullanım sonucu yan etkileri artabilmekte olup farmakoepidemiolojik çalışmalarda uzun süreli kullanılmış olması için 6 aydan fazla vücuda alınmış olması gerekmektedir (Çetin Erdem vd. 2021). Klinik çalışmalarda ise uzun dönem kullanım olarak sayılması için 4-8 haftayı geçmesi gerekmektedir (Targownik vd. 2022). Yan etkileri arasında ise neoplaziler, enfeksiyonlar, besin maddesi emiliminde ve sindiriminde bozukluk, kemik kırıkları, ilaç etkileşiminde ve ilaç etkisinde azalmalar sayılabilir (Uygun 2013).

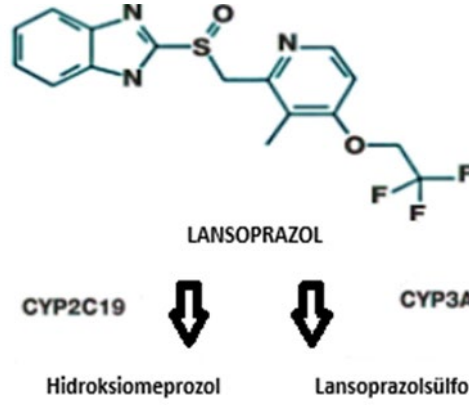
PPI kullanım alanları arasında; peptik ülser, gastroözofageal reflü hastalığı (GÖRH), stres ülseri profilaksisi, Zollinger Ellison sendromu, *Helicobacter pylori*'nin sebep olduğu hastalıklar yer almaktadır (Targownik vd. 2022). Aynı zamanda PPI'ler pH'ı dolaylı olarak değiştirdiğinden dolayı insan mikrobiyotasında bakteri ve funguslar üzerinde doğrudan bir etkiye de sahiptir (Özden 2013).

2.3.1 Lansoprazol

Lansoprazol, mide asit salınımını inhibe eden PPI grubundaki antiülser ilaçlar arasında en yaygın kullanılanlardan biridir. Mide parietal hücrelerinin H^+/K^+ -ATPaz enziminin aktivasyonunu inhibe ederek gastrik asit oluşumunun son basamağını engellemektedir. Lansoprazol diğer bir PPI grubundaki Omeprazol ile benzerlik göstermesine rağmen Lansoprazol'ün molekül formunda, benzol halkasındaki imidazolden dolayı farklılık görülmektedir. Lansoprazol karaciğerde sitokrom p450 enzim sistemi ile metabolize olmakta ve oral uygulamadan sonra hızla emilim göstererek 1-7 saatte maksimum seviyeye ulaşmaktadır. Lansoprazol yüksek oranla plazma proteinlerine bağlanmaktadır. Mide asit salınımını ilk doz alımında %80 oranında baskılayarak ülserde semptomatik dozlarda düzeltilmeler görüldüğü rapor edilmiş olup yan etkileri yok denecek kadar azdır (Çalikoğlu 2011). Bu yan etkileri arasında saçta döküntü, deride kuruma, kulakta çınlama, kalpte çarpıntı, deride kaşıntı ve inflamasyon, kas ve eklem ağrıları sayılabilir (İnt Kyn. 2). Lansoprazol'ün kimyasal formülü ve yapısı Şekil 2.5 ve 2.6'da verilmiştir.



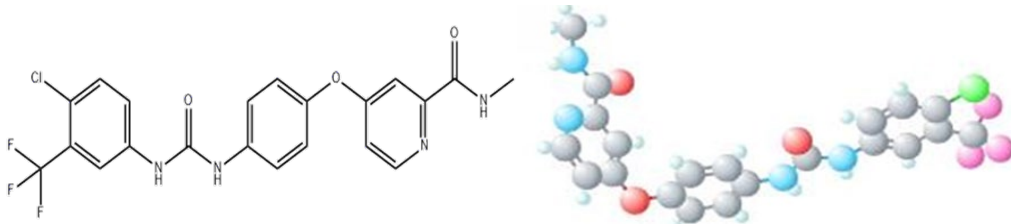
Şekil 2.5 Lansoprazol'ün kimyasal formülü (Çalikoğlu 2011).



Şekil 2.6 Lansoprazol'ün yapısı (Özden 2013).

2.4 Sorafenib

Sorafenib, $C_{21}H_{16}ClF_3N_4O_3$ kimyasal formülüne sahip, Avrupa Birliği tarafından HSK tedavisi için onaylanan ve birçok kanser türünde etki gösteren çoklu kinaz inhibitör grubu bir ilaçtır (Yurdacan 2017). Sorafenib'in kimyasal ve üç boyutlu yapısı Şekil 2.7'de verilmiştir.



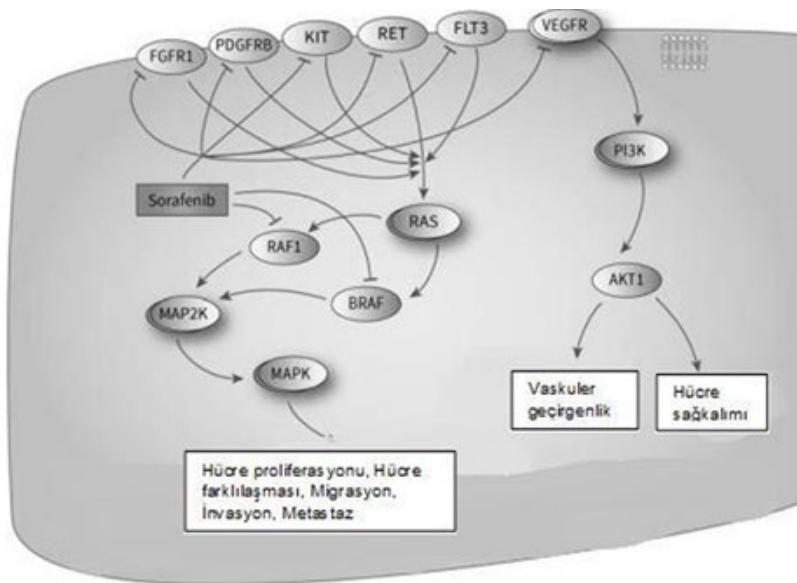
Şekil 2.7 Sorafenib'in kimyasal ve üç boyutlu yapısı (Yurdacan 2017)

Sorafenib HSK'nın cerrahi müdahale yapılamayacak kadar ileri seviyedeki hastalarında yaşam süresini uzatmak ve HSK'nın ilerlemesinin önüne geçmek için kullanılmaktadır. HSK hastalarında oral yolla alınan ilk tedavi yöntemi olarak kullanılmakta (Suo vd. 2012) ve erken evre HSK hastalarında sağkalım sürecini 19-20 ay, orta evredeki hastaların

sağkalım sürecini ortalama bir yıl ve son evredeki HSK hastaları için uygulanan tek tedavi yöntemi olarak hastaların sağkalımını 3-4 ay kadar uzatmaktadır (El-Serag vd. 2008).

Sorafenib'in; kanser gelişiminde önemli rol oynayan VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, FLT3, PDGFR, Ret ve c-kit gibi hücre yüzey kinazlarını inhibe ederek ve yeni damar oluşumunu ve tümör hücrelerinin bölünmelerini engelleyerek tümör boyutlarında azalmaya sebebiyet verdiği rapor edilmiştir (Wilhelm vd. 2004, Carlomagno vd. 2006, Rini, 2006, Durmuş 2023). Aynı zamanda *in vitro* koşullarda anti-tümör etkinliği gösteren güçlü bir ilaç olduğu da bilinmektedir (Ali vd. 2021).

HSK oldukça yoğun vaskülarizasyon içermekte ve bu durum HSK gelişimindeki önemli basamaklardan birini oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda HSK tümör dokularında, komşu tümör içermeyen dokulara göre çok daha fazla Ras/Raf/MAPK yolağında rol alan protein ekspresyonları olduğu tespit edilmiş olup Sorafenib ile HSK tedavisinde hücre proliferasyonu ve anjiogenezin engellenmesi hedeflenmektedir. Sorafenib serin/treonin kinazlar olan c-RAF ve BRAF'ı da inhibe ederek RAF/ MEK/ ERK sinyal yollarını dolayısıyla farklı onkogenetik yolları bloke ederek tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve anjiyogenezini de bloke etmektedir (Gong vd. 2017). Sorafenib'in etki yolları Şekil 2.8'de verilmiştir.



Şekil 2.8 Sorafenib'in etki yolları VEGFR (vasküler endotelyal büyüme faktörü), RET (proto-onkogen), KIT (kök hücre faktörü reseptörü), FLT3 (FMS ile ilgili tirozin kinaz 3 reseptörü), PDGFR (büyüme faktörü reseptörü) (Şirin 2018)

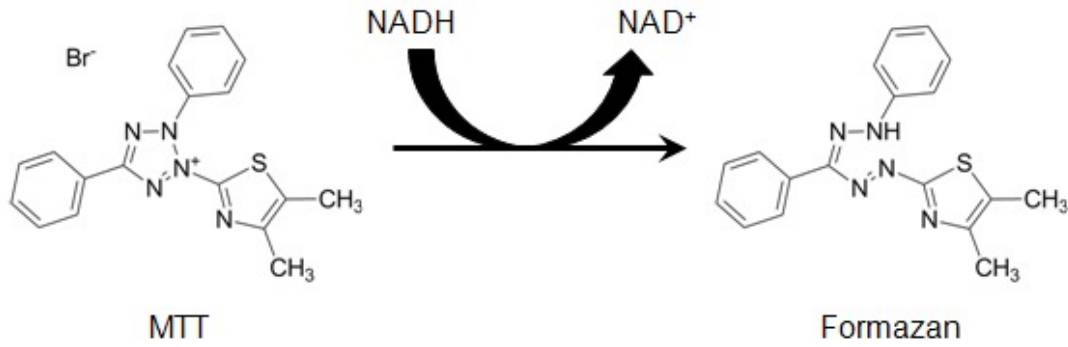
2.5 Sitotoksosite

Sitotoksosite günümüzde sayıları giderek artan çevresel kimyasallar, kozmetik ürünler, ağır metaller, biyolojik ya da fiziksel ajanlar ve bunların yanı sıra ilaç etken maddelerinin çeşitli dozlardaki kullanımında hücre canlılığına olan etkisidir ve birçok farklı güncel yöntemle belirlenerek değerlendirilebilmektedir. Bu yöntemlerin hangisinin en uygun olduğunu değerlendirirken test maddesinin kimyasal ve fiziksel özellikleri, maddenin hangi mekanizma aracılığı ile apoptoza yol açtığı ve yöntemin hassasiyetine dikkat edilmesi gerekmektedir (Erkekoğlu ve Baydar 2021).

Sitotoksosite testi tıbbi cihazların hücre büyümesini, üremesini ve morfolojik etkilerini gözlemlemek için *in vitro* doku hücrelerini kullanan biyolojik değerlendirme ve tarama testi olmakla birlikte basit, hızlı, yüksek hassasiyete sahip olmasıyla ön plandadır. Sitotoksosite testlerinin devamlı olarak gelişmesiyle birlikte, morfolojik değişikliklerle hücre hasarının tespiti ve belirlenmesi, hücre büyümesi ve metabolik özelliklerinin ölçülmesi bakımından niteliksel değerlendirmeden kantitatif değerlendirmeye yönelik kademeli olarak geliştirilmektedir. Sitotoksosite testinde ekstrakt testi tıbbi cihazların çözünabilir maddelerinin toksisitesini tespit etmek için uygundur ve genel olarak hayvan toksisitesinin sonuçlarıyla tutarlılık göstermektedir. Doğrudan temas testi ise tıbbi cihazların sitotoksitesini test etmek için duyarlıdır ve tıbbi cihazlar zayıf sitotoksositeyle ölçülebilmektedir. Sitotoksosite bir dizi avantajının yanı sıra tercih edilen zorunlu olan öğelerle birlikte biyolojik değerlendirme için en önemli yöntemlerden biridir (Weyermann vd. 2005, Li vd. 2015). Canlı hücre varlığı tespiti için tetrazolyum bileşikleri kullanımı tercih edilmektedir. Sıklıkla kullanılan yöntemler arasında MTT, XTT, MTS ve WST-1 gelmektedir. Sitotoksosite deneyleri, ilaçların ve bazı bileşiklerin sitotoksosite profilini belirlemek için kullanılan ve hücre kültürü bazlı ölçüm tekniklerinden biri olup günümüzde sıklıkla kullanımı tercih edilen yöntemdir (Tokur ve Aksoy 2017). Modern hücre biyolojisinin ilerlemesiyle birlikte, sitotoksositeyi değerlendirmek için birçok numunenin aynı anda ve hızlı analiz edilmesi gibi deneysel yöntemlerin devamlı olarak geliştirilmesi ve iyileştirilmesinden dolayı son zamanlarda sitotoksosite bakımından önemli bir potansiyel gösterdiği görülmektedir (Weyermann vd. 2005, Li vd. 2015).

2.5.1 Sitotoksosite Testi Olarak MTT

MTT yöntemi hücrelerin canlılığını ve sitotoksitesini belirlemek için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. MTT bir tetrazolyum tuzudur ve proliferasyona uğrayan hücreler MTT'yi mor renkli formazan kristallerine dönüştürür ve bu kristaller suda çözünmezler. Kristaller DMSO'ya (dimetil sülfoksit) maruz bırakılarak çözündürülür. Daha sonra hücrelerin canlılığı ELISA cihazında okunur. MTT yönteminin avantajları; diğer tekniklere göre daha hızlı ve güvenilir olmasıdır, istenildiği kadar tekrarlanabilir ve hücrelerin hem canlı hem ölü oranını belirler (Erkekoğlu ve Baydar 2021). MTT kimyasal yapısı Şekil 2.9'da verilmiştir.



Şekil 2.9 MTT kimyasal yapısı (Riss vd. 2004)

2.6 Genotoksosite

Genotoksosite, genotoksinler vasıtasıyla DNA'nın, çekirdeğin ve kromozomun yapısında oluşan hasarları kapsamaktadır. Bu hasarlar sıklıkla kromozom anomalileri, gen mutasyonları, DNA zincirindeki kırıklar ve fazla DNA eklentilerinden oluşmaktadır. Oluşan hasarlar genetik hastalıklara, kansere, yaşlanmaya, kısırlaşmaya ve birçok sorunlara yol açmaktadır. Bu sebeple halk sağlığını korumak için mutajen ve karsinojen riski en alt düzeye indirebilmek büyük önem taşımaktadır. Genotoksosite testleri *in vivo* veya *in vitro* olarak uygulanabilmektedir (Zeiger 2004).

DNA’da mutasyona sebebiyet veren ajanlara mutajen denir. Genotoksisite testlerinin amacı, mutajenitesi belirlenen fiziksel ve kimyasal ajanların karsinojenik potansiyel eğilimini tahmin etmede kullanılmalarıdır. Genotoksinler, mitotik iğ ipliklerinde, DNA’da ve hücre döngüsü kontrol noktalarında hasar oluştururlar. Bu hasarlar, DNA onarım hatlarına, mutasyonlara ve apoptoza sebebiyet verir. Bu durum ise genetik kararsızlığa yol açacağından yaşlanma, kısırılık, kanser ve genetik hastalıkların meydana gelmesi muhtemeldir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).

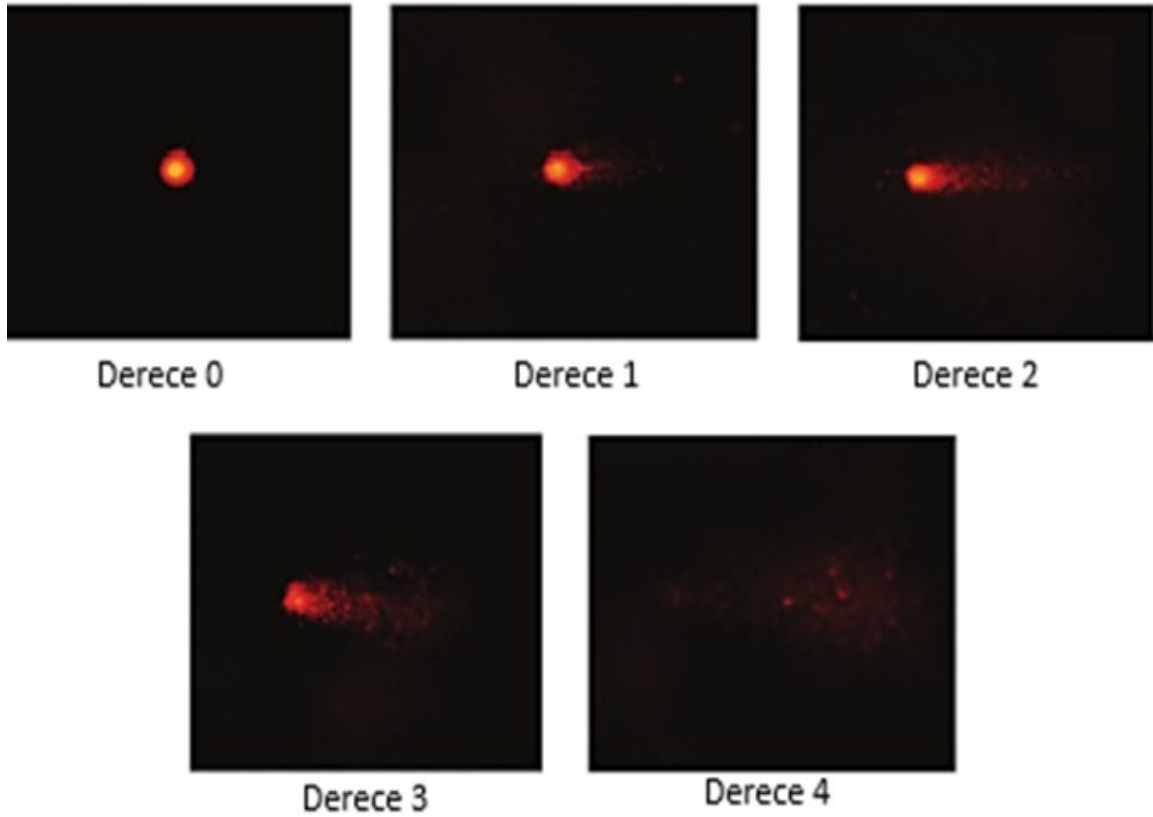
2.6.1 Genotoksisite Testi Olarak Komet

Komet ya da kuyruklu yıldız testi, çeşitli ajanların sebep olduğu DNA’daki tek ve çift sarmallı kırıkları ölçmek için kullanılan çok yönlü ve hassas bir yöntemdir (Collins vd. 2008, Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2021). Kuyruklu yıldızların oluşum mekanizması DNA’nın yapısal halkası içinde bulunan DNA süper sarmalının tek bir DNA’nın kopmasıyla gevşemesinin bu halkanın kuyruklu yıldız testinde olduğu gibi elektroforetik alan altında (Collins vd. 2008) elektrik alanına yanıt olarak bir agaroz jelden negatif yüklü döngülerin DNA parçalarının çizilme yeteneğine ve bununla birlikte farklı molekül ağırlığına ve elektrik yüküne sahip olan DNA moleküllerinin farklı alanlara göç etmesi temeline dayanmaktadır. DNA göçünün kapsamı hücrelerde bulunan hasara göre değişkenlik göstermektedir (Kumaravel vd. 2009, Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011). Komet, DNA hasarının tek bir hücre düzeyinde mikroskopik olarak tespitinin yapılması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Oluşan hasarın belirlenmesi, hücrelerin kuyruk uzunluğu ve şekline göre sınıflandırılmasından sonra görsel olarak derecelendirilmesi temeline dayanmaktadır. Bu derecelendirme hasar seviyesinin tespitinde oldukça önemlidir (Kumaravel vd. 2009).

Komet, kanser hastalarının DNA hasarı derecesinin belirlenmesi ve tamirinin tespit edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Komet testinin avantajları diğer testlere göre maliyetinin daha ucuz olması, hızlı ve güvenilir olmasından kaynaklanmaktadır. Komet yönteminde hücreler ya da çekirdekçikler ilk olarak agaroz jeline yerleştirildikten sonra lizisin ardından elektroforez tamponunda yürütülmekte ve nötralizasyona tabii tutulduktan sonra DNA bağlayıcı floresan boya ile boyanmaktadır. Komet okuma işlemi floresan

mikroskopta gerçekleşmekte olup hasar gören hücreler kuyruklu yıldız görünümü alırken hasar görmeyen hücreler ise kuyruk oluşturmazlar. Bu sebepten dolayı bu tekniğe Komet adı verilmiştir (şekeroğlu ve şekeroğlu 2011).

Komet piyasaya yeni sürülen ilaçların genotoksisite testinde sıklıkla kullanılmaktadır (Speit ve Hartman 2006). Kometin varyantları, DNA apraz bağları, tek ve çift iplik kopmaları gibi DNA hasarlarının derecelendirilmesi için tercih edilir (Gyori vd. 2014). Komet testinin apoptozis çalışmaların kullanılmasına yönelik argümanlar bulunmaktadır (Collins vd. 2008). Komet DNA hasarı dereceleri şekil 2.10’da verilmiştir.



şekil 2.10 Komet DNA hasarı dereceleri (Gunasekeran vd. 2019).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Hücre Kültürü

3.1.1 Hücre Kültürü İçin Medyum Hazırlanması

Hücrelerin çoğalabilmesi ve yaşam faaliyetlerini sürdürebilmesinde kullanılacak olan medyum için gerekli olan kimyasallar ilk olarak çalışmaya başlanmadan yarım saat önce hücrelerin strese girmeyeceği optimal ısıya ulaşması için sıcak su banyosuna koyuldu. Daha sonra bu kimyasallar ve 0.22 µm gözenekli pess membran filtre (WVR) steril kabin içerisine koyularak medyumun son hacmi 1L olacak şekilde pess membran filtreye öncelikle DMEM Low glucose (Sigma-Aldrich, UK), %10 oranında FBS (Fetal Bovine Serum) (Sigma, USA), %1 oranında penisilin (Sigma, USA) ve yine %1 oranında L-Glutamin (Sigma-Aldrich, USA) eklendi. Bütün bu gerekli olan kimyasallar pess membran filtreden geçirildi. Filtreden geçirilen stok medyum 50'lik falkonlara bölündü, kodlandı ve kullanılmak üzere +4 °C'ye kaldırıldı. Hücre medyumunun hazırlanışı Çizelge 3.1'de verilmiştir.

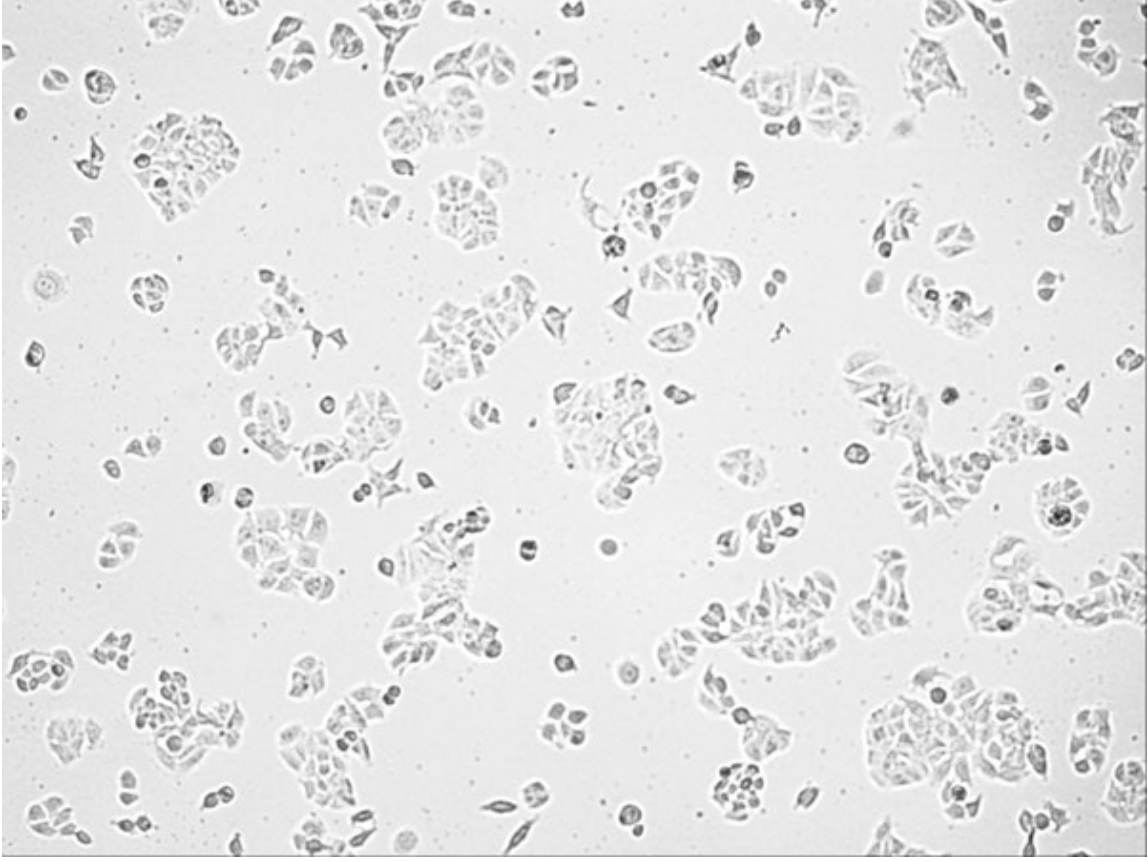
Çizelge 3.1 Hücre medyumunun hazırlanışı

Kimyasallar	Miktar	Oran
DMEM Low Glucose	880 ml	%88
FBS	100 ml	%10
Penisilin	10 ml	%1
L-Glutamin	10 ml	%1
Son hacim	1000 ml	%100

3.1.2 Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekilmesi

Hücreleri çözmeye başlamadan önce gerekli olan kimyasallar sıcak su banyosuna koyuldu. Kabinin UV'si belli bir miktar açık tutuldu ve UV'yi kapattıktan sonra kabin ve kullanılacak olan kimyasallar %70 alkolle steril edildi. Kriotüp içinde -80°C'de donmuş halde bulunan HepG2 hücreler strese girmeyecek şekilde çözdürüldü. Hazırlanmış olan 1 ml medyum 15'lik falkona alındı ve çözünmüş olan hücre de aynı falkonun içine aktarılıp

eşit miktarda homojen olması adına pipetaj yapılarak, hücre dondurulurken koyulan DMSO'nun uzaklaştırılması için 5 dakika 800 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işlemi bittikten sonra pellete zarar vermeden süpernatant kısmı çekilip atığa aktarıldı. Daha sonra pelletin üzerine 1 ml medyum ilave edilip pipetaj yapılarak homojen hale getirildi. 75'lik flasklara 7 ml medyum eklendi ve hücreli medyum hafifçe pipetaj yapılarak flaskın her yerine ekimi sağlandı. Hücrelerin üremesi için gerekli uygun koşulları bulunan 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı. HepG2 hücreleri Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1 HepG2 hücre görüntüsü

3.1.3 HepG2 Hücrelerinin Pasajlanması

Gerekli olan kimyasallar pasajdan yarım saat kadar önce sıcak su banyosuna koyuldu. Flasktaki medyumlar çekilip atığa aktarıldı ve hücreleri kaldırmak adına flaskların her birine eşit bir biçimde 3'er ml tripsin-EDTA eklendi ve 1-2 dk boyunca %5 CO₂'li 37°C inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin kalkıp kalkmadığını gözlemlemek için flasktaki hücrelerin her biri görüntülendi. Hücrelerin kalktığı görüldükten

sonra alkollenip kabine geçerek 1/1 oranında olacak şekilde 3 ml medyum eklendi ve hücrelerdeki Tripsin-EDTA'yı uzaklaştırmak için yıkama işlemine geçildi. Flasktaki hücreler 15'lik falkona kodlanıp aktarıldı ve 5 dk 800 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra falkondaki hücrelerin süpernatantı pellete zarar verilmeden çekilip atığa aktarıldı. Flasklara 7 ml medyum eklendi ve falkondaki hücrelere 1'er ml medyum eklenip pipetajla çözdürüldü ve flasklara ekimi yapıp inkübatöre kaldırıldı.

3.1.4 Tripan Blue Yöntemi ile Canlı Hücre Sayımı

HepG2 hücreleri bulunan flasklara tek tek görüntüleme cihazında bakıldı ve belirli konfluent oranına ulaştığında hücre sayımını gerçekleştirmek için kabine alındı. Flasklardaki medyum atığa aktarıldı ve flaskların her birine 3 ml tripsin-EDTA eklenerek 1-2 dk inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyon süresi sonunda 1/1 oranı olması adına 3 ml medyum eklendi ve flasklardaki tripsin-EDTA'lı medyum 15'lik falkonlara alınarak 5 dk 800 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işlemi bittikten sonra süpernatant kısmı hücreye zarar verilmeden çekildi ve 1 ml medyum eklenip homojen dağılımları için pipetaj yapıldı. Hücre sayımı için endorflara 10 µl hücreli medyum, 90 µl medyum, 10 µl tripan blue eklenerek pipetaj yapıldı. Hazırlanan karışımdan thoma laminının iki kenarına 10'ar µl çekilerek eklendi. Görüntüleme canlı hücrelerin parlak, ölü hücrelerinse mavi boyalı olduğu görüldü ve aşağıdaki formüle göre canlı hücre sayımı yapıldı.

- Toplam hücre sayısı (mL) = ortalama hücre sayısı $\times 10^4 \times$ dilüsyon faktörü.

3.1.5 HepG2 Hücre Hattının Sıvı Azotta Saklanması

Flasktaki HepG2 hücreleri görüntüleme cihazında görüntülenip konfluenti belirli orana ulaştığında medyumlar uzaklaştırıldı. Her bir flaska hücrelerin kalkması için 3'er ml tripsin-EDTA eklenip 1-2 dk inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyon süresi sonunda 1/1 oranı olması adına 3 ml medyum eklendi (HepG2 için DMEM Low glucose) ve flasktaki tripsin-EDTA'lı hücreler 15'lik falkonlara aktararak 5 dk 800 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra falkondaki süpernatantlar pellete zarar verilmeden çekilip atığa aktarıldı. Pelletlere 750 µl medyum eklenerek pipetajla homojen olarak dağılımı sağlandı. Medyumlu hücreler soğuk kriotüpe alındı ve üzerlerine 675 µl FBS ve 75 µl DMSO damla

damla olacak şekilde eklendi. Hücrelerin ani şoklanmaması adına kriotüpler önce -20°C'ye daha sonra -80°C'e kaldırıldı.

3.2 Sorafenib, Lansoprazol ve Kombinasyon Gruplarının Sitotoksitesinin Belirlenmesi

3.2.1 MTT Yöntemi ile Uygun Dozun Belirlenmesi

Bu çalışmada HepG2 hücrelerinin MTT yöntemi ile hücre canlılığı belirlenirken, Lansoprazol için 24 ve Sorafenib için 48 saatlik gözlemler yapıldı ve her iki süre için uygulanan işlemlerin sırası ile kullanılan kimyasalların miktarları standart olarak korundu. Sorafenib ve Lansoprazol 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

3.2.2 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 konfluent oranı %80-90'a ulaştığında, her bir kuyucuğa 1, 2, 5, 10, 12.5, 15, 20, 30, 40, 50 ve 100 µM dozlarında Sorafenib uygulandı ve kontrol grubu olarak 1 mL DMSO eklendi. Plak tekrar inkübatöre kaldırılarak 24 saat boyunca inkübasyonda bekletildi. Ertesi gün hücreler aynı dozlarda Sorafenib ile muamele edilerek 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, her bir kuyucuğa 200 µL MTT solüsyonu pipet yardımıyla eklenip 2-3 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlandığında, kuyucukların içerisindeki medyum pipet yardımıyla çıkarılarak uzaklaştırıldı. 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 Lansoprazol'ün MTT Yöntemi ile IC₅₀ Dozunun Belirlenmesi

75'lik flaskta belli yoğunluğa ve morfolojiye ulaşan HepG2 hücrelerine toma lamında sayım yapılarak kuyu başına 10.000 hücre olacak biçimde 96'lık plaklara HepG2 hücreleri ekildi ve %5 CO₂'li 37°C inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda HepG2 hücrelerine çalışmadan önce taze hazırlanan 125, 250 ve 500 µM Lansoprazol dozları uygulandı ve 24 saatlik sonuçlar için 1 gün inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon süresi sonunda Lansoprazol'den arınmak için 100 µl PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemi sonunda PBS'li medyum çekilerek her kuyucuk başına 100 µl besiyeri + 10 µl MTT solüsyonu eklendi ve 3 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuk başına 200 µl DMSO eklendi ve karanlık ortamda 15 dakika bekletildi. Son olarak çözünen formazanlar, 540 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometre cihazında ölçülerek analiz edildi.

3.2.4 Lansoprazol/Sorafenib Kombinasyon Dozu İçin MTT Testi

Bu çalışmada 24 saatlik doz uygulaması yapıldı. Doz uygulaması sonucundaki kombinasyon IC₅₀ değerleri belirlendi. HepG-2 hücrelerinde Sorafenib ve Lansoprazol'ün farklı kombinasyonlarındaki IC₅₀ ± ve 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 saatlik inkübasyon süreleri sonunda uygulanan dozlar kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 100 µL MTT solüsyonu ve besiyeri eklendi. Plak, 37°C, %5 CO₂'li inkübatörde 4 saat daha 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.

3.3 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. Elektroforez tankı, buz kasetleri ve preparatların yerleştirileceği kutular buzdolabında bekletilerek çalışma süresine kadar soğutuldu.

Çizelge 3.2 Elektroforez tampon çözeltisinin hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
NaOH	6.0 g
EDTA	0.18 g
dH ₂ O	500.0 mL

NaOH ve EDTA hassas terazide tartılarak cam bir behere alındı ve üzerine 500 mL saf su (dH₂O) eklendi. Homojen hale getirilen bu çözeltinin pH değeri 13.2'ye ayarlandı ve +4°C'de çalışma süresine kadar saklandı.

Çizelge 3.3 Nötralizasyon çözeltisinin hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
dH ₂ O	300 mL
Trizma Base	14.55 g

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.

Çizelge 3.4 Lizis çözeltisinin hazırlanması

Kimyasal	Miktar
NaCl	29.4 g
EDTA	7.44 g
Trizma Base	0.24 g
Triton-X	2 mL
DMSO	20 mL

NaCl, EDTA ve Trizma Base tartılarak bir cam şişeye konuldu ve toplam hacim 200 mL'e 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.

Çizelge 3.5 Etidyum bromür çözeltisinin formülasyonu

Kimyasal	Miktar
Etidyum bromür	0.01 g
dH ₂ O	50.0 mL

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 3.6 Normal erime noktasına sahip agaroz çözeltisinin (NMA) hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
PBS	3.0 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 lam-lar, 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 lam-lar oda sıcaklığında kuruması için bekletildi.

Çizelge 3.7 Düşük erime noktasına sahip agaroz çözeltisinin (LMA) hazırlanması

Kimyasal	Miktar
PBS	2.0 mL
LMA	0.016 g

%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.

Hücreler, inkübatörde inkübe edilerek yapışma süreci tamamlandı. Uygun yoğunluğa ulaşan hücrelere, MTT yöntemi ile belirlenen Sorafenib ve Lansoprazol’ün 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 ependorflara, 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 lamalar, 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 mikroskopunda 100 hücre olacak şekilde sayım için incelendi.

3.4 RNA İzolasyonu, Saflık Ölçümü ve cDNA Sentezi

HepG2 karaciğer kanseri hücre hattında, qRT-PCR çalışması için lizis tamponu kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Çalışmamız için temin edilen Ribospin™ RNA İzolasyon Kit (GeneAll®, #304-150) protokolü uygulandı. Deney için bir tane kontrol ve üç tane de doz uygulama grubu oluşturuldu, hücreler 24 saatleri boyunca yeniden inkübe edildi. Bu aşamadan sonra RNA izolasyonu ve saflaştırma işlemleri gerçekleştirildi ve RNA örnekleri daha sonra qRT-PCR analizinde kullanılmak üzere muhafaza edildi.

T75 flasklara 5×10^6 olacak biçimde 24 saatlik deney grupları için toplamda 4 adet flaska hücre ekimi yapıldı ve flasklar 37°C, %5 CO₂ ortamında 24 saat inkübe edildi.

İnkübasyon süresi sonunda hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında, eski besiyeri dikkatlice uzaklaştırıldı ve kontrol gruplarına taze besiyeri ilave edildi. Deney gruplarına ise belirlenen dozlar uygulandı. Doz uygulama grupları, MTT testiyle belirlenen IC₅₀ değerlerine göre uygulandı. Hücreler bu dozlarla 24 saat daha inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında hücreler, kendi besiyerlerinde hücre kazıyıcı yardımıyla flasklardan kazınarak santrifüj tüplerine aktarıldı. Hücreler, 3000 devirde 5 dakika süreyle santrifüj edilerek hücre pelletleri elde edildi. Elde edilen hücre pelletlerine 400 µL lizis tamponu eklenerek hücre zarlarının parçalanması sağlandı. Pipetleme yapılarak homojenize edilen karışım, 25°C’de 5 dakika inkübe edildi. Hücre lizatı, RNA’nın bağlanması için mini spin kolonuna transfer edildi ve 10.000 G kuvvetinde 30 saniye boyunca santrifüj edildi. Bu işlem, RNA’nın kolonun membranına tutunmasını sağladı. Kolona 500 µL GW1 çözeltisi eklendi ve RNA’dan protein, tuz ve diğer kontaminantların uzaklaştırılması için 10.000 G kuvvetinde 1 dakika 30 saniyelik bir santrifüj işlemi uygulandı. Bu yıkama aşaması ile RNA’nın saflaştırılması amaçlandı. Mini spin kolon, yeni bir santrifüj tüpüne transfer edildi. Kolonun merkezine 50 µL Nuclease-Free Water (NFW) eklenerek 1 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından RNA’nın elüsyonu, 10.000 G kuvvetinde 1 dakika santrifüj edilerek tamamlandı. Elde edilen RNA, kısa süreli depolama için -20°C’de, uzun vadeli muhafaza amacıyla ise -80°C’de saklandı.

İzole edilen RNA’ların konsantrasyonu (ng/µl) ve saflık oranı (OD₂₆₀/OD₂₈₀) Thermo Scientific™ Multiskan™ GO cihazı kullanılarak, Scanlt Software 6.1.1 programı aracılığıyla ölçüldü. Ölçüm sürecine başlamadan önce, RNA konsantrasyonunun doğru bir şekilde belirlenebilmesi için cihazda RNA ölçümüne uygun olan hazır protokol aktif hale getirildi. Ölçümde kullanılacak olan Nanodrop plate (Thermo Scientific™ µDrop™ Plate, #N12391, ABD) üzerine, referans (blank) olarak 5 µl Nuclease-Free Water (NFW) eklendi. Ardından her bir RNA numunesinden 5 µl alınarak aynı plate üzerine yüklendi. Multiskan GO cihazı, ışık absorbansını belirli dalga boylarında ölçerek RNA konsantrasyon ve saflığı hesaplandı; bu sayede RNA’nın protein veya diğer safsızlıklarla kontamine olup olmadığını belirlemek amacıyla OD₂₆₀/OD₂₈₀ kullanıldı. Sonuçlar, RNA’nın saflık derecesi ve deneysel çalışmalar için uygunluğu değerlendirilmek üzere kaydedildi.

3.4.1 cDNA Sentezi

RNA saflaştırma işlemi tamamlandıktan sonra, FIREScript® RT cDNA Sentez Kiti (Solis BioDyne) protokolüne göre cDNA sentezi gerçekleştirildi. 24 saatlik hücre inküasyonlarının ardından, her bir RNA örneği için 20 µl'lik reaksiyon karışımları hazırlandı. Bu karışımın hazırlanması sırasında, kit içerisindeki bileşenler titizlikle eklenerek sırasıyla 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) reaksiyon tüplerine ilave edildi. Ardından, her bir örnekte kullanılacak RNA'lar ve Nuclease-Free Water (NFW) eklenerek reaksiyon hacmi toplamda 20 µl'e tamamlandı. İşlemin devamında, tüpler RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesi amacıyla Prime Thermal Cycler marka cihaz kullanılarak elde edilen cDNA'lar, gen ekspresyon analizlerinde kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi. Bu süreç, elde edilen cDNA'nın saflığı ve kalitesini garanti altına almak ve gen ifadesi analizlerinin doğruluğunu sağlamak adına oldukça kritik bir aşama olduğu için titizlikle çalışıldı. cDNA sentezinde kullanılan bileşenlerin miktarları Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.8 cDNA sentezinde kullanılan bileşenlerin miktarları

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

3.4.2 Primer Tasarımı

HepG2 hücreleri üzerinde β-AKTİN, BCL-2, BAX, KASPAZ-3 ve TNF-α genlerinin ekspresyonunu incelemek amacıyla genlere uygun spesifik primerler, Primer-BLAST

programı kullanılarak tasarlandı ve Bilim Med firmasından temin edildi. Tüm primerler, 100 µM stok çözeltiler halinde temin edildi. Kullanılan primerlerin dizilimleri ve PCR ürünlerini belirtilen sekanslara göre (5' → 3') uzunlukları detaylı olarak Çizelge 3.11'de sunulmuştur.

Çizelge 3.9 Ekspresyon seviyeleri belirlenen genler ile bu genler için kullanılan primer dizileri.

Gen	Primerler
β-AKTİN	F: 5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3' R: 5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'
BCL-2	F: 5'TATCTGGGCCACAAGTGAAG-3' R: 5'-ATTCGACGTTTTGCCTGAAG-3'
KASPAZ-3	F: 5'-GCGCTCTGGTTTTTCGTTAAT-3' R: 5'-ACCCATCTCAGGATAATCCATTT-3'
BAX	F: 5'-AGCAGATCATGAAGACAGGG-3' R: 5'-GAAGTTGCCGTCAGAAAACA-3'
TNF-α	F: 5'-GACTATCTCGACTTTGCCGA-3' R: 5'-GTTTCGAAGTGGTGGTCTTG-3'

3.4.3 qRT-PCR

Sorafenib ve Lansoprazol kombinasyonu uygulanan HepG2 hücre hattında, hedef genlerin ekspresyon seviyelerindeki farklılıkları belirlemek amacıyla bu analizde, Bioneer Exicycler™ 96 (Ver.4) Real-Time Quantitative Thermal Block (Thermo, ABD) cihazı kullanıldı. Bu analizde, HOT FIREPol® SolisGreen® qPCR Mix reaktifi kullanıldı ve tüm genler için her koşulda iki teknik tekrar yapıldı.

Hedef genlerin ekspresyon seviyelerinin amplifikasyonu için gerekli karışım, Çizelge 3.10'de belirtilen konsantrasyonlara ve numune sayısına göre dikkatlice hesaplanarak hazırlandı. Bu karışım, her bir hedef gen için spesifik primerler ve HOT FIREPol® SolisGreen® qPCR Mix içerecek şekilde optimize edildi. Hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 7 µl dikkatlice dağıtıldı, ardından her kuyucuğa 2 µl cDNA örneği eklenerek pipetleme işlemi hassas bir şekilde gerçekleştirildi. Protokol, 24 saatlik inkübasyon süreleri sonucunda elde edilen tüm örnekler için, her koşulda iki tekrar olacak şekilde aynı titizlikle uygulandı.

Çizelge 3.10 qRT-PCR çalışmasında kullanılacak reaktif bileşenler ve miktarları.

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

qRT-PCR işlemi, her bir döngü için uygun ısının ve sürelerin ayarlandığı bir program doğrultusunda gerçekleştirildi. Yapılan deneyin her aşamasında, enzim aktivasyonu, denatürasyon, bağlanma ve uzatma basamakları, belirlenen protokole uygun olarak optimize edilmiş sıcaklık ve zaman dilimleri ile uygulandı. Bu basamakların sıcaklık ve süre ile ilgili detayları, deneyin verimliliğini sağlamak için dikkatle düzenlendi (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.11 qRT-PCR protokolü için sıcaklık ve zamanlama bilgileri.

Döngü	Sıcaklık	Zaman
Denatürasyon	95 °C	7 dk
Bağlanma	60 °C	14 dk
Uzama	72 °C	14 dk

3.5 Protein İzolasyonu ve Miktar Analizi

HepG2 hücre hattında, Sorafenib ve Lansoprazol kombinasyonunun uygulanmasının ardından, 24 saatlik inkübasyon süreleri tamamlandıktan sonra hücre toplama aşamasına geçildi. Inkübasyon süresi sona erdikten sonra, doz uygulanan hücreler falkonlara toplandıktan sonra santrifüj edildi. Santrifüjleme işlemi sonrasında hücrelerin süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırıldı. Elde edilen hücre peleti, soğuk PBS ile iki kez yıkanarak hücrelerin tam anlamıyla çökeltilmesi sağlandı. Bu yıkama işlemi, hücre dışı bileşenlerin ve gereksiz maddelerin ortadan kaldırılmasına yardımcı oldu. Bu süreçte, proteinlerin stabilitesini korumak amacıyla tüm işlemlerin buz içerisinde gerçekleştirilmesine özen gösterildi.

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra, hücre peleti üzerine soğuk RIPA tamponu eklenecek, 200 µl hacminde bir çözelti oluşturuldu. Bunun yanı sıra, 10 µl proteaz inhibitör kokteyli ilave edildi. Bu karışımı, homojen biçimde elde etmek amacıyla dikkatlice pipetaj yapıldıktan sonra, tüpler buz içerisine gömülerek 30 dakika bekletildi. Bu aşama, proteinlerin çözünmesi ve bozulmalarının önlenmesi için kritik bir öneme sahiptir.

Ardından, buz içerisinde bulunan tüpler 4°C’de 10.000 rpm hızında 10 dakika santrifüje tabi tutuldu. Bu işlem sonucunda, ependorf tüplerinin üst kısmında istenilen çözünmüş protein süpernatantı elde edildi. Elde edilen süpernatant, santrifüj işleminden çıkınca protein yapısının zarar görmemesi için tekrar buzda tutuldu ve uygun etiketleme işlemleri yapılarak -20 °C’de saklanmak üzere hazırlandı. Sonrasında, uzun süreli depolama için -80 °C’de muhafaza edilmek üzere kaldırıldı. Böylece, protein izolasyonu işlemi tamamlanmış oldu.

Bradford testi, protein konsantrasyonunu belirlemek için sıklıkla tercih edilen bir kolorimetrik yöntemdir. Bu analiz, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlerle etkileşim göstermesi prensibine dayanır. Boya, protein ile bağlandığında renk değişimi meydana gelir ve bu değişim, protein miktarı ile orantılı olarak ölçülebilir. Boya-protein kompleksinin oluşumu, asidik bir ortamda 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans gösteren mavi bir yapı oluşturur. Bradford testi, özellikle yüksek doğruluk ve hızlı sonuç elde etme kapasitesi nedeniyle diğer protein ölçüm tekniklerine göre belirgin avantajlar sunar (Bradford 1976).

Testin doğruluğu, proteinlerin Coomassie Brilliant Blue ile olan etkileşimlerine dayanmaktadır; bu nedenle, proteinlerin yapısal farklılıkları ölçümlerde belli bir sapma yaratabilir. Genel olarak, Bovin Serum Albümini (BSA) gibi standart bir proteinin farklı konsantrasyonları kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturulur ve bilinmeyen örneklerin protein miktarları bu eğriye dayanarak belirlenir. Bu yöntemin hassasiyeti, özellikle düşük protein konsantrasyonlarını ölçebilme yeteneği sayesinde tercih edilmektedir. (Compton ve Jones 1985).

Deney öncesinde, tüm kullanılan malzemelerin ve çalışma ortamının sterilizasyonu titizlikle sağlandı. Protein standardı, Brilliant Blue Reagent ve örnekler, deney süresince düşük sıcaklıkta tutuldu. Protein miktarının belirlenmesi amacıyla ilk adımda, Brilliant Blue

Protein Reagent 1:10 oranında distile su ile seyreltilerek hazırlandı. Protein standardı olarak BSA farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100, 150, 300 µl) distile su ile seyreltilerek çözeltiler oluşturuldu. Kontrol grubu (blank) için 900 µl boya çözeltisi ve 100 µl distile su, ependorf tüplere eklenip pipetaj işlemi ile optik cam küvetlere aktarıldı. 595 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi. Aynı protokol, diğer BSA konsantrasyonları için de takip edildi. Örnekler için ise 900 µl RIPA solüsyonu, 10 µl protein ve 900 µl Brilliant Blue Reagent karıştırılarak homojen bir çözelti oluşturuldu ve pipetajın ardından küvetlere aktarılıp, Jenway6305 UV/Vis Spektrofotometre cihazı ile 595 nm'de ölçümler yapıldı; sonuçlar detaylı şekilde kaydedildi.

3.6 ELISA Analizi

Bu çalışmada, HepG2 hücre hattında Sorafenib ve Lansoprazol'de Bax, Bcl-2, Tnf- α ve Kaspaz-3 protein düzeylerinin kantitatif olarak ölçülmesi amacıyla, human ELISA kiti (Kod: EH0669, 96T, FineTest) kullanıldı. 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 aktarıldı ve ELISA protokolü doğrultusunda işleme alındı. Numuneler önce inkübasyona bırakıldı, ardından biotin etiketli sekonder antikor ve HRP-konjugat (horseradish peroxidase) ilave edilerek renk reaksiyonu başlatıldı. TMB substratının eklenmesiyle oluşan renk değişimi, reaksiyonun sülfürik asit ile durdurulmasının ardından 450 nm dalga boyunda mikroparka okuyucu ile ölçüldü. Her protein için oluşturulan standart eğriler kullanılarak konsantrasyon değerleri hesaplandı.

Deneyde kullanılan çözelti ve reaktifler, kit protokolüne sadık kalınarak özenle hazırlandı. Yıkama tamponu, stok çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle oluşturuldu ve standart protein çözeltileri santrifüjlenip seri dilüsyon yöntemiyle analizde kullanılacak hale getirildi. Biotinli antikor ve HRP-konjugat çözeltileri, analizden kısa süre önce hazırlanarak, her biri 1:99 oranında seyreltme ile 1X konsantrasyonuna getirildi.

Mikrotitre plakasındaki işlemler şu sırayla yürütüldü:

Her kuyucuğa 100 µL standart veya örnek numune eklenerek 90 dakika inkübasyon

yapıldı ve süre sonunda yıkama adımı uygulandı. Daha sonra 100 µL biotinli antikor eklendi ve 60 dakika inkübe edilerek tekrar yıkama yapıldı. Ardından 100 µL HRP-konjugat eklendi, 30 dakika inkübe edildi ve üçüncü yıkama uygulandı. Son olarak 90 µL TMB substrat eklenip 15–20 dakika süreyle renk gelişimi beklendi ve 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 belirlenip; kontrol ve ilaç uygulanmış gruplar karşılaştırıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi ve protein düzeylerindeki değişiklikler optik yoğunluk değerleri temel alınarak analiz edildi.

3.9 İstatistiksel Analiz

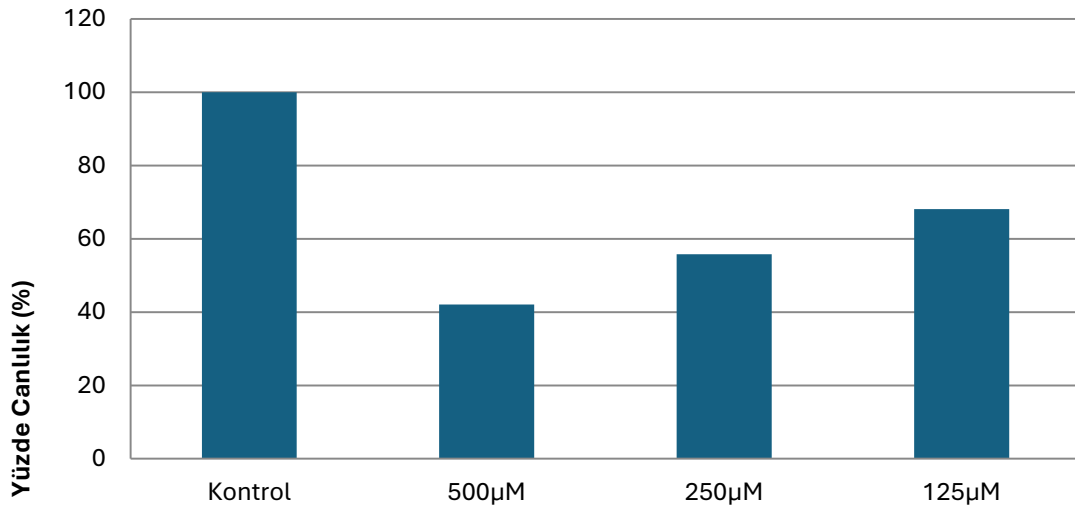
MTT deneyi sonucunda elde edilen spektrofotometrik veriler yüzde (%) cinsinden ifade edilmiştir. IC₅₀ dozunun tespiti için probit analizi yöntemi kullanılmıştır. Komet analizi ile elde edilen veriler, grupların ortalamaları arasında karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla Duncan testi ile analiz edilmiştir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

4. BULGULAR

4.1 MTT Testi Sonuçları

4.1.1 HepG2 Hücre Hattında Lansoprazol'ün Hücre Canlılık Oranı Üzerine Etkisi

HepG2 hücre hattında Lansoprazol'ün IC₅₀ dozunu belirlemek amacıyla, her bir kuyu-
cuğa dört tekrar olacak şekilde artan konsantrasyonlarda doz uygulamaları yapıldı. Lan-
soprazol için 125-500 µm aralığında üç farklı doz konsantrasyonu seçilerek, 24 saatlik
süreyle hücreler bu dozlara maruz bırakıldı. MTT canlılık testi kullanılarak ELISA cihazı
mikroplak okuyucusunda 540 nm'de elde edilen absorbans verileri ile hücre canlılık yüz-
deleri hesaplandı. Bu hesaplamalar doğrultusunda elde edilen bulgular Şekil 4.1'de gös-
terilmiştir.



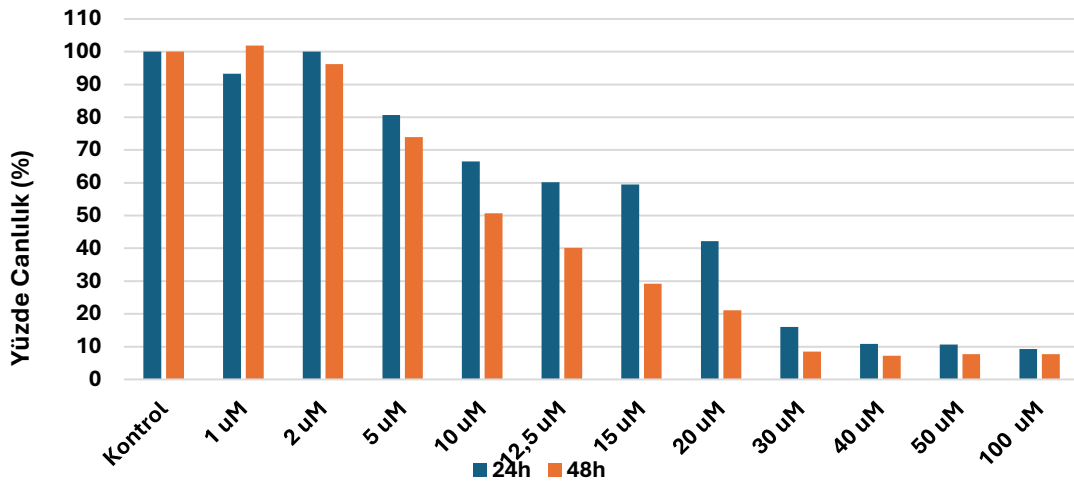
Şekil 4.1 HepG2 hücre hattında uygulanan farklı Lansoprazol dozlarının 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki canlılık oranlarına (%) etkisi.

Kontrol grubunda 24 saat inkübasyon süresi sonunda hücre canlılık oranları oldukça yük-
sek olup %100 olarak gözlemlenmiştir. Lansoprazol'ün 125 µM dozunda %68.11 oranla
hücre canlılığında gözle görülür bir düşüş yaşanırken, bu düşüşü takip eden 250 µM do-
zunda ise yüzde canlılık değeri 24 saatlik süre sonunda %55.74 olarak belirlenmiştir. 500
µM dozunda ise diğer dozlara kıyasla hücre canlılığında çok daha fazla düşüşün olduğu
saptanmış olup oranı %42.05 olarak bulunmuştur. Bu veriler doğrultusunda artan doz
konsantrasyonları ile HepG2 hücrelerinin canlılık oranlarında kademeli olarak bir düşüş

gözlemlenmiştir. Özellikle 250 ve 500 μM gibi yüksek dozlarda hücre canlılığında belirgin düzeyde bir düşüşün yaşandığı görülmektedir. Bu bağlamda ise HepG2 hücreleri üzerinde değişken doza bağlı olarak sitotoksik etkinin görüldüğünü göstermektedir.

4.1.2 HepG2 Hücre Hattında Sorafenib'in Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

HepG2 hücre hattında uygulanan Sorafenib'in hücre canlılığı üzerindeki etkilerini gözlemek amacıyla 1-100 μM aralığında artan farklı konsantrasyon dozları kullanılarak MTT canlılık testi uygulandı. Her bir kuyucuğa dört tekrar olacak şekilde hücreler 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresine maruz bırakıldı. ELISA cihazı mikropalak okuyucusunda 540 nm dalga boyunda elde edilen absorbans verileri ile hücre canlılık yüzdeleri hesaplandı. Bu hesaplamalar doğrultusunda elde edilen bulgular Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



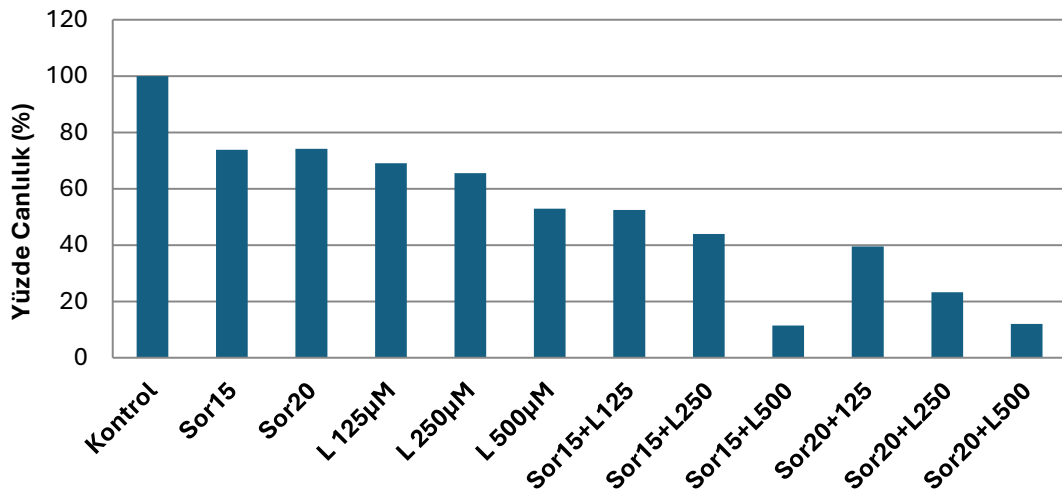
Şekil 4.2 HepG2 hücre hattında uygulanan farklı Sorafenib dozlarının 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki canlılık oranlarına (%) etkisi

HepG2 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresinde artan Sorafenib konsantrasyon dozlarının hücre canlılık oranlarında bir azalma gösterdiği görülmüştür. Uygulanan 1-2 μM gibi düşük konsantrasyon dozlarının hücre canlılık oranlarında kontrol grubuna yakın düzeyde seyrettiği gözlemlenmiştir. 5-100 μM aralığındaki dozlarda ise hücre canlılık oranlarında kontrol grubuna kıyasla gözle görülür bir azalma olduğu görülmüş olup, özellikle 20-100 μM konsantrasyon dozlarında canlılık oranı %50'nin altına düşmüş olduğu ve Sorafenib 15, 20 ve 30 μM dozlu uygulama gruplarındaki hücre

canlılığındaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Tüm bu veriler kapsamında Sorafenib'in HepG2 hücreleri üzerinde değişken doza bağlı olarak sitotoksik bir etki gösterdiği saptanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucunda Sorafenib'in IC₅₀ değerinin 20 µM olduğu ve uygulanacak olan kombinasyon çalışmalarında da Sorafenib konsantrasyon dozu 20 µM olarak belirlenmiştir.

4.1.3 HepG2 Hücre Hattında Sorafenib ve Lansoprazol Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Kombinasyon çalışması için daha önce yaklaşık olarak belirlenen 20 µM IC₅₀ dozu ve bu değere yakın olan 15 µM Sorafenib dozu ve Lansoprazol'un yaklaşık IC₅₀ dozu ile bu değere yakın olan 125, 250 ve 500 µM konsantrasyon dozları kombine edilerek HepG2 hücre hattı üzerindeki 24 saatlik sitotoksik etkisine bakılmıştır. ELISA cihazı mikropalak okuyucusunda 540 nm dalga boyunda elde edilen absorbans verileri ile hücre canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar doğrultusunda elde edilen bulgular, Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



* Sor:Sorafenib; L: Lansoprazol

Şekil 4.3 HepG2 hücre hattında uygulanan Sorafenib ve Lansoprazol dozların 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre canlılık oranları (%).

HepG2 hücrelerinde kontrol grubunda hücre canlılık oranı %100 seyrederken uygulanan Sorafenib ile Lansoprazol kombinasyon dozlarına maruziyeti sonucunda kontrol grubuna oranla azalmalar gözlemlenmiştir. Sorafenib 15 ve 20 µM dozu sabit tutularak

Lansoprazol 125, 250 ve 500 μM doz kombinasyonlarında HepG2 hücre hattındaki etkileri incelendi. Sorafenib IC_{50} 20 μM dozu ile Lansoprazol 125 μM kombinasyonunun canlılık oranı %39.46 seviyesinde iken, Sorafenib IC_{50} 20 μM dozu ile Lansoprazol 250 μM kombinasyonunun canlılık oranı %23.25 olup, Sorafenib IC_{50} 20 μM ile Lansoprazol 500 μM kombinasyonunun canlılık oranı %11.99 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Sorafenib 15 μM ile Lansoprazol 125 μM kombinasyonunun canlılık oranı %52.41 seviyesinde iken, Sorafenib 15 μM ile Lansoprazol 250 μM kombinasyonunun canlılık oranı %43.88 ve Sorafenib 15 μM ile Lansoprazol 500 μM kombinasyonunun canlılık oranı %11.38 olarak tespit edilmiştir. Kombinasyon uygulamalarında artan doza bağlı olarak hücre canlılığında bir düşüş yaşandığı görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda Sorafenib IC_{50} 20 μM dozunun sabit tutularak Lansoprazol doz kombinasyonlarının, Sorafenib 15 μM doz kombinasyonuna göre daha anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Tüm bu verilere bakılarak bu kombinasyonun tek başına uygulanan Sorafenib'e kıyasla daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

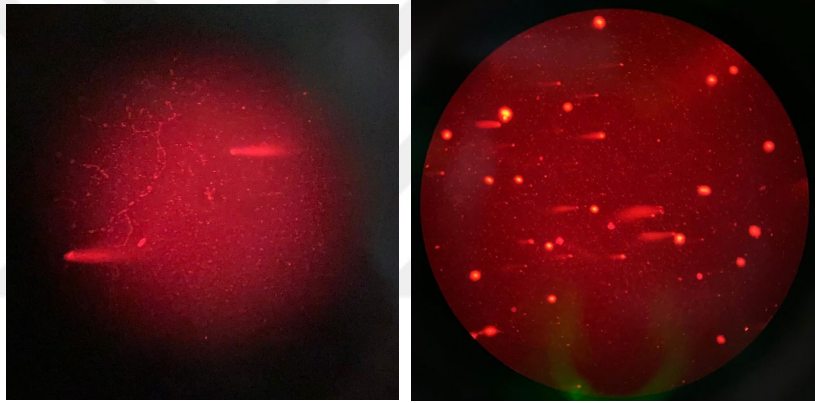
4.2 Genotoksisite Testi Sonuçları

Sorafenib 20 μM , Lansoprazol 250 μM ve kombinasyonlarının HepG2 hücre hattında DNA hasar tespiti Komet yöntemiyle belirlendi. Bu kombinasyonların DNA hasar düzeylerini belirlemek için deney üç tekrarlı yapılmış olup her bir tekrar için 100 hücre olacak şekilde değerlendirilme ve kontrol grubuyla karşılaştırılma yapılmıştır. Grupların 24 ve 48 saatlik uygulama sonucu elde edilen DNA hasar verileri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 HepG2 hücrelerinde Sorafenib ve Lansoprazol kombinasyonunun oluşturduğu DNA hasarı

Uygulama	DNA Hasarı (Arbitrary Unit)	
	Konsantrasyon Ortalama $\pm$ Standart sapma	
	24 saat	48 saat
Kontrol	3.67 $\pm$ 1.15 ^a	4.33 $\pm$ 1.15 ^a
Pozitif Kontrol	49.55 $\pm$ 7.87 ^d	50.44 $\pm$ 8.62 ^d
Sorafenib (20μM)	20.33 $\pm$ 2.52 ^b	25.33 $\pm$ 4.16 ^b
Lansoprazol (250 μM)	21,00 $\pm$ 4,36 ^b	26,67 $\pm$ 2,89 ^b
Sorafenib + Lansoprazol	28,67 $\pm$ 4,16 ^c	32,67 $\pm$ 3,21 ^c

HepG2 hücre hattına uygulanan dozların DNA hasar verilerine bakılarak en yüksek DNA hasarı 48 saatte 32.67 ± 3.21 ile Sorafenib 20 μM ve Lansoprazol 250 μM kombinasyon dozu olup bu sonuca en yakın diğer bir DNA hasarı ise 24 saatte 28.67 ± 4.16 ile Sorafenib 20 μM ve Lansoprazol 250 μM kombinasyon dozu olduğu belirlenmiştir. Verilerdeki en düşük DNA hasarı ise 24 saatte 20.33 ± 2.52 ile Sorafenib 20 μM dozu olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada tek başına uygulanan dozlara kıyasla Sorafenib ve Lansoprazol kombinasyonunun HepG2 hücre hattı üzerinde çok daha fazla DNA hasarına sebep olduğu ve ayrıca 48 saatlik DNA hasar verilerinin 24 saatlik verilere oranla DNA hasar seviyesini arttırdığı saptanmıştır. Bu veriler doğrultusunda inkübasyon süresinin artmasına bağlı olarak DNA hasarında artış yaşandığı gözlemlenmiştir. Uygulama yapılan HepG2 hücrelerine ait hasar görüntüleri Şekil 4.4'te verilmiştir.



* Farklı sütunlardaki farklı şekilde belirtilen harfler $p < 0,05$ düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi. Pozitif kontrol: sispilatin.

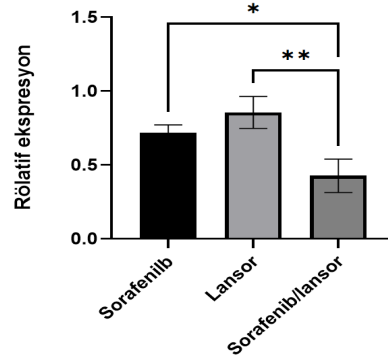
Şekil 4.4 Sorafenib ve Lansoprazol dozlarının HepG2 hücre hattı üzerindeki DNA hasar görüntüleri

4.3 RNA İzolasyonu

24 saat inkübasyona tabii tutulmuş HepG2 hücre kültürlerinden elde edilen RNA izolasyonu, lizis tamponu, çalışma için temin edilen Ribospin™ RNA İzolasyon Kit (Gene-All®, #304-150) ve kit protokolü uygulanarak çalışma yapılmıştır. İzolasyon sonrasında RNA saflık ve konsantrasyon spektrofotometrik analiz (NanoDrop) ile değerlendirme yapılmış ve bu ölçümler sonucunda, A260/A280 oranı ortalama 1.8-2.0 arasında olduğu belirlenmiştir. Bu değerlere bakılarak RNA'nın saf olarak izole edildiği görülmüştür.

4.4 qPCR ile Gen İfade Düzeyleri

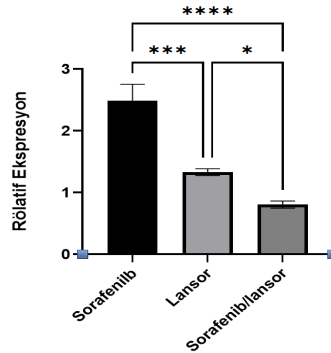
HepG2 hücre hattında 24 saatlik doz kombinasyon çalışması uygulama sonucunda kontrol grubu ve kombinasyon grubuyla çalışılmış olup elde edilen sonuçlar bağlamında KASPAZ-3, BCL-2, TNF- α ve BAX genlerinin ekspresyon seviyeleri, β -AKTİN referans geni kullanılarak çift tekrarlı olacak şekilde qPCR kullanılarak belirlenmiştir.



* Lansor: Lansoprazol

Şekil 4.5 HepG2 hücrelerinde 24 saat doz uygulama sonucu BAX gen ekspresyon seviyesi

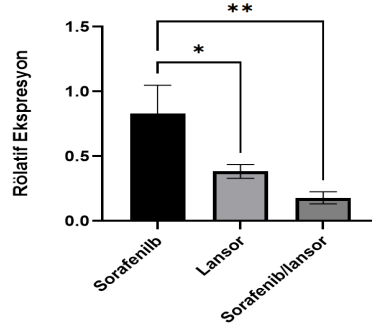
24 saatlik uygulama gruplarına bakılarak en yüksek BAX ekspresyon seviyesine ait grubun Lansoprazol olduğu ve Sorafenib'e göre anlamlı derecede daha yüksek ekspresyon seviye gösterdiği görülmüştür. Lansoprazol'ün tek başına BAX gen ifade düzeyini arttırmamasından dolayı sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir. Kombinasyon uygulamasının ise hem Lansoprazol hem de Sorafenib'e kıyasla anlamlı olarak çok daha düşük ekspresyon gösterdiği ve kombinasyon olarak uygulamanın Sorafenib'e antagonistik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



* Lansor: Lansoprazol

Şekil 4. 6 HepG2 hücrelerinde 24 saat doz uygulama sonucu BCL-2 gen ekspresyon seviyesi grafiği

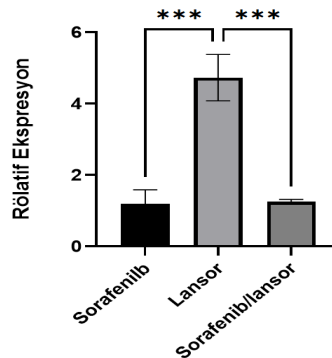
24 saatlik doz uygulama sonucu BCL-2 gen ekspresyon verileri değerlendirildiğinde her bir uygulama grubunda istatistiksel olarak anlamlı değişikliklerin ve kademeli bir şekilde azalmanın olduğu görülmektedir ($p<0.0001$). 24 saatlik uygulama gruplarına bakılarak en yüksek ekspresyon seviyesi Sorafenib grubunda gözlemlenmiş olup kombinasyon grubunun ekspresyon seviyesinde olağan azalma görüldüğünden dolayı antagonistik bir etkileşim olabileceği öngörülmektedir (Şekil 4.6).



* Lansor: Lansoprazol

Şekil 4.7 HepG2 hücrelerinde 24 saat doz uygulama sonucu KASP AZ-3 gen ekspresyon seviyesi

24 saatlik uygulamada KASP AZ-3 ekspresyon düzeyi bakımından istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler ve kademi olarak bir azalma gözlemlenmiştir. En yüksek ekspresyon seviyesi Sorafenib grubunda gözlemlenmiş ve Lansoprazol grubunun Sorafenib grubuna kıyasla gen ekspresyonunda bir düşüşe sebep olduğu belirlenmiştir. Kombinasyon grubunun ise ekspresyon seviyesinde kademeli olarak bir azalma göstermesinden dolayı antagonistik bir etkileşime neden olacağı öngörülmektedir (Şekil 4.7).

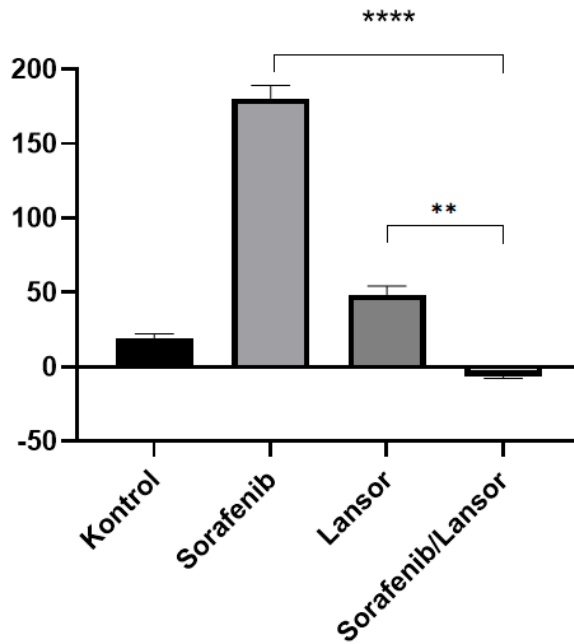


* Lansor: Lansoprazol

Şekil 4.8 HepG2 hücrelerinde 24 saat doz uygulama sonucu TNF-α gen ekspresyon seviyesi

24 saatlik uygulama grupları arasında en yüksek TNF- α ekspresyon düzeyine sahip grup Lansoprazol grubu olup, Sorafenib'e oranla çok daha yüksek düzeyde ekspresyon gösterdiği gözlemlenmiştir. Lansoprazol tek başına ekspresyon düzeyini arttırdığından dolayı sinerjistik etki gösterirken, kombinasyon ve Sorafenib grubunun ise TNF- α ekspresyon düzeyinde artışı baskılayıp önemli derecede azalmaya sebep olduğundan dolayı antagonist bir etkileşim yarattığı görülmektedir (Şekil 4.8).

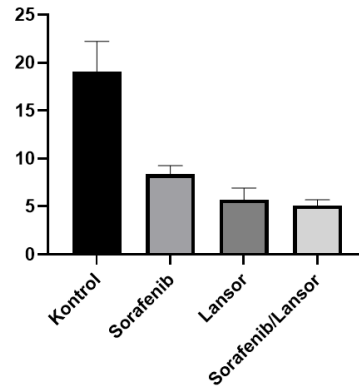
4.5 ELISA Protein Düzeyleri



* Lansor: Lansoprazol

Şekil 4.9 HepG2 hücrelerinde 24 saat uygulama gruplarının Bax protein ekspresyonuna etkisi

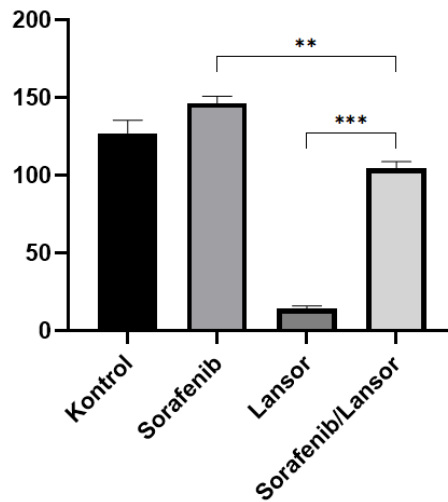
24 saatlik uygulama sonuçlarına bakıldığında Sorafenib uygulanan grupta Bax protein ekspresyon seviyesinde önemli ölçüde bir artışın olduğu görülmektedir. Aksine kombinasyon grubunun düzeyinde ise belirgin bir azalmanın olduğu gözlemlenmiştir. Kombinasyon grubu, Sorafenib ve Lansoprazol'e kıyasla çok daha düşük ekspresyon düzeyine sahipken, Lansoprazol grubunun ise Bax düzeyini kombinasyon grubuna göre anlamlı bir şekilde arttırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.9).



* Lansor: Lansoprazol

Şekil 4.10 HepG2 hücrelerinde 24 saat uygulama gruplarının Bcl-2 protein ekspresyonuna etkisi

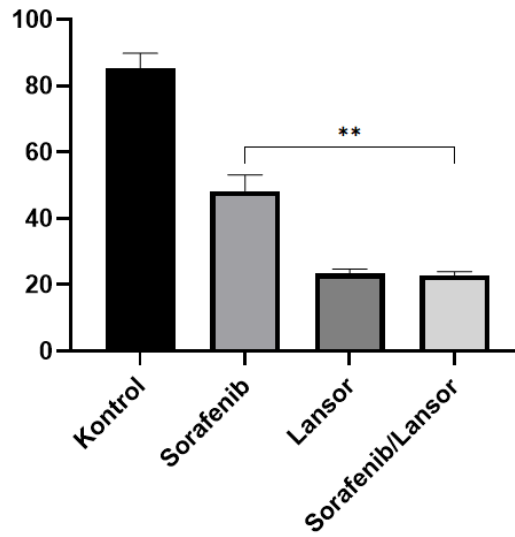
24 saatlik uygulama sonuçlarına bakıldığında Bcl-2 protein ekspresyon düzeylerinde kademeli olarak bir düşüşün yaşandığı görülmektedir. Tüm uygulama gruplarının Bcl-2 protein ekspresyon düzeylerinin kontrol grubunun oldukça altında olduğu belirgin olarak görülmektedir. Lansoprazol grubunun kontrol grubuna kıyasla Bcl-2 ekspresyon düzeyinde düşüşe sebep olduğu görülürken, Sorafenib grubunun ise Bcl-2 düzeyini kombinasyon grubuna göre anlamlı olarak arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu bağlamda kombinasyon uygulamasının kontrol grubuna kıyasla Bcl-2 protein ekspresyonu açısından antagonistik etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.10).



* Lansor: Lansoprazol

Şekil 4.11 HepG2 hücrelerinde 24 saat uygulama gruplarının Kaspaz-3 protein ekspresyonuna etkisi

24 saatlik uygulama sonuçlarına bakıldığında kontrol grubuna oranla Sorafenib uygulamasının Kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyinde bir artışının olduğu görülürken, Lansoprazol ve kombinasyon gruplarında ise bu seviyenin daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Lansoprazol grubunun Sorafenib uygulamasına oranla daha düşük Kaspaz-3 protein ekspresyonuna sahipken, kombinasyon uygulamasının Lansoprazol grubuna oranla ifade düzeyinde artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu kapsamda kombinasyon uygulamasının Sorafenib uygulamasına göre Kaspaz-3 ekspresyon düzeyinde antagonistik bir etkiye sahip olduğu ve Lansoprazol uygulamasının da kombinasyon uygulamasına kıyasla ekspresyon düzeyinde antagonistik bir etki gösterdiği doğrultusundadır (Şekil 4.11).



* Lansor: Lansoprazol

Şekil 4.12 HepG2 hücrelerinde 24 saat uygulama gruplarının Tnf- α protein ekspresyonuna etkisi

24 saatlik uygulama sonucunda tüm grupların Tnf- α protein ekspresyon düzeyini kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde düşürmüş olup istatistiksel olarak anlamlıdır. En yüksek ekspresyon düzeyine sahip grup kontrol grubu iken, en düşük ekspresyon seviyesine ait grup ise kombinasyon ve Lansoprazol grupları olduğu görülmektedir. Sorafenib grubunun Tnf- α protein ekspresyon düzeyini birbirleriyle aynı seyreden Lansoprazol ve kombinasyon gruplarına göre anlamlı bir şekilde arttırdığı gözlemlenmektedir. Lansoprazol'ün tek başına ve kombinasyon halinde uygulanmasının Tnf- α düzeyini baskıladığı görülmektedir (Şekil 4.12).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, dünya çapında ölüm nedenleri arasında ikinci sırada olup altı ölümden birinin sebebidir ve geçmişten günümüze insanlık için ciddi sorun oluşturmaya devam etmektedir. Bu sebeple de etkili yöntemlerle tedavi mecburi hale gelmektedir ve özgün tedavi yöntemleri tercih edilmektedir. Tümörü ortadan kaldırmak için radyoterapi ve lokal tedavi her ne kadar etkili olsa da metastaz sebebiyle hastalık tekrardan nüksedebilmektedir. Bu nedenle de tedavide son zamanlarda etkili olan kemoterapi ilaç kombinasyonları daha çok tercih edilmektedir. Kemoterapi yalnız kanserli hücrelere değil sağlıklı hücrelere de zarar verebilmektedir. Bu sebeple tümöre ve kişiye özgü tedavi yöntemleri daha etkili olmaktadır (Barbaros ve Dikmen 2015, Ada vd. 2021).

HSK büyük çoğunlukla yetişkin bireylerde görülen bir malignitedir ve siroz ile bu riskin artma olasılığı yükselmektedir (Hamilton ve Altonen 2000). Sorafenib bir kemoterapi ilacı olmakla birlikte cerrahi müdahalenin yapılamayacak durumundaki ileri seviyeli HSK hastalarında kullanılan gıda ve ilaç idaresince onaylı bir inhibitör grubu ilaç olup, hastalığın ilerlemesini önlemek ve hasta ömrünü uzatmak adına kullanılmaktadır (Keating ve Santoro 2009). Sorafenib'in, kanser oluşum mekanizmasında etkisi olan VEGFR gibi hücre yüzey kinazlarını etkisiz hale getirerek HSK malignitesinin gelişimini, büyümesini ve ilerleyip metastaz yapmasını önlediği tespit edilmiştir. Ayrıca anjiyogenez oluşumunu da önlediği yapılan çalışmalarca saptanmıştır (Gong vd. 2017). Yapılan araştırmalar doğrultusunda Sorafenib kullanımına bağlı olarak HSK hastalarındaki tümör boyutlarında belirgin bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Abdel-Rahman 2013). Ayrıca Sorafenib kullanımının hastalarda yaşama olasılığının artırılmasında ve bu durumun özellikle erken evrede etkili olduğu görülmüştür (El-Serag vd. 2008, Llovet vd. 2008).

Lansoprazol ise mide asit salınımının inhibe edilmesi adına kullanılan proton pompası inhibitör grubundaki antiülser bir ilaçtır ve gastrik asit oluşumunu engellemek için kullanılmaktadır (Çalıkoglu 2011). Son yıllarda özellikle kanser tedavisinde ilaç kombinasyon çalışmaları çok denenmekte olup pek çok çalışmada olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu bağlamda bu çalışmada daha önce denenmemiş olan Sorafenib ve Lansoprazol ilaç kombinasyonlarının HepG2 hücre hattındaki, sitotoksik, genotoksik, sinerjistik ve antagonistik

etkilerinin *in vitro* ortamda ilaç etkileşimleri değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada, Lansoprazol, Sorafenib ve her iki ajanın kombinasyonunun HepG2 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri MTT canlılık analizi ile değerlendirilmiş ve Lansoprazol'ün 125, 250 ve 500 μM dozlarında 24 saatlik inkübasyon sonucunda sırasıyla %68.11, %55.74 ve %42.05 hücre canlılık oranları elde edilmiştir. Bu sonuçlar, doz artışına paralel şekilde hücre canlılığının azaldığını ve Lansoprazol'ün HepG2 hücreleri üzerinde doza bağlı bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, Sorafenib'in 1–100 μM aralığında test edilen dozlarında özellikle 20 μM ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü gözlemlenmiş, bu da Sorafenib'in IC_{50} değerinin yaklaşık 20 μM olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmada elde edilen bulgular daha önce yapılan çalışmalarla da uyum göstermektedir. Cervello vd. (2012) yaptıkları çalışmada Sorafenib'in HepG2 hücre hattı üzerinde hücre canlılığına olan etkisinin LD_{50} değerinin 19.5 μM olduğunu saptamışlardır (Cervello vd. 2012). Abdelrahman vd. (2021) çalışmalarında, Sorafenib'in HepG2 hücrelerinde mitokondriyal yolağı hedefleyerek apoptozisi tetiklediğini ve IC_{50} değerinin çalışmamıza benzer şekilde yaklaşık 20 μM olduğunu belirtmişlerdir. Farklı bir çalışmada ise Karaoğlu (2019) Sorafenib'in 10–30 μM aralığında belirgin sitotoksik etki gösterdiğini ve LD_{50} değerinin 20 μM civarında olduğunu raporlamıştır.

Lansoprazol özelinde ise literatürde sitotoksik etkilerine ilişkin sınırlı sayıda çalışma bulunmakla birlikte, bazı araştırmalar Lansoprazol'ün proton pompa inhibitörü olmanın ötesinde anti-kanser potansiyeli taşıdığını göstermektedir. Örneğin, Omata vd. (2020), Lansoprazol'ün belirli gastrointestinal kanser hücrelerinde pH regülasyonu ve hücre içi asidoz mekanizmaları yoluyla hücre ölümünü artırdığını belirtmiştir. Bizim çalışmamızda da Lansoprazol'ün özellikle 250 ve 500 μM gibi yüksek dozlarda anlamlı düzeyde kanser hücre ölümüne neden olduğu saptanmış olup bu sonuç da onun olası kemoterapotik destekleyici rolüne işaret etmektedir.

Kombinasyon çalışmaları kapsamında, sabit 20 μM ve 15 μM Sorafenib dozları ile değişken Lansoprazol dozları kombine edilerek hücre canlılık oranları değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, kombine uygulamaların tek başına uygulanan dozlara kıyasla çok daha güçlü sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle 20 μM Sorafenib ile

500 µM Lansoprazol kombinasyonunda hücre canlılık oranı %11.99'a kadar düşmüştür. Bu düşüş, antagonistik bir etkinin varlığını düşündürmektedir. Bu bulgu, Lansoprazol gibi tek başına zayıf apoptotik etki gösteren ajanların (Gürlek 2021), Sorafenib ile combine edildiğinde etkilerinin anlamlı şekilde arttığını gösteren çalışmalara paralellik arz etmektedir. Ayrıca kombinasyon uygulamalarında özellikle yüksek doz Lansoprazol'ün Sorafenib ile birlikte uygulanmasının, düşük doz kombinasyonlara göre daha anlamlı sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Bu durum, Lansoprazol'ün hücre içi pH dengesini bozarak sitotoksik ajanların etkinliğini artırabileceğini destekleyen teorilerle de örtüşmektedir (Karaoğlu 2019, Omata vd. 2020, Gürlek 2021, Abdelrahman vd. 2021). Ayrıca, elde edilen veriler ilerleyen aşamalarda yapılacak gen ekspresyonu analizleri ve ELISA çalışmaları için uygun dozların belirlenmesi açısından önemli bir temel oluşturmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada hem Lansoprazol hem de Sorafenib'in tek başına ve kombinasyon halinde HepG2 hücre hattı üzerinde doza bağlı anlamlı sitotoksik etkiler oluşturduğu gösterilmiştir. Özellikle kombinasyon uygulamalarında elde edilen veriler, bu iki ajanın birlikte kullanımının karaciğer kanseri tedavisinde potansiyel bir terapötik strateji olabileceğini düşündürmektedir. Elde edilen bulgular, daha önce yapılmış farklı birçok çalışmayla da paralellik göstermektedir (Karaoğlu 2019, Omata vd. 2020, Gürlek 2021, Abdelrahman vd. 2021). Bu nedenle, elde edilen doz aralıklarının sonraki moleküler düzeyde yapılacak çalışmalar için uygun ve güvenilir bir temel oluşturacağı kanaatindeyiz.

Komet testi, çeşitli ajanların DNA hasarı derecesinin belirlenmesi amacıyla sıklıkla kullanılan çok yönlü ve hassas bir yöntem olduğundan dolayı bu çalışmada ayrıca (Collins vd. 2008, Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011) Sorafenib (20 µM), Lansoprazol (250 µM) ve bu ajanların kombinasyonlarının HepG2 hücre hattında oluşturduğu DNA hasarı bu yöntem ile de değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, her iki maddenin tek başına genotoksik etki oluşturabildiğini, ancak birlikte kullanıldıklarında bu etkinin anlamlı düzeyde arttığını ortaya koymuştur. Özellikle kombinasyon grubunda 24 ve 48 saatlik uygulama süreleri sonunda tespit edilen DNA hasar seviyeleri hem kontrol grubu hem de ajanların tek başına uygulandığı gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Bu durum, Sorafenib ve Lansoprazol'ün birlikte uygulanmasının sinerjik veya en azından additif bir genotoksik etki oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Sorafenib'in genotoksik etkileri daha önce yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir. Özellikle hücre döngüsünü durdurması, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini artırması ve mitokondriyal disfonksiyona neden olması, DNA hasarının başlıca nedenleri arasında sayılmaktadır (Yeh vd. 2011). Aynı şekilde, Lansoprazol gibi proton pompası inhibitörlerinin de özellikle yüksek konsantrasyonlarda ve uzun süreli maruziyetlerde ROS üretimini artırarak oksidatif DNA hasarına neden olabileceği belirtilmiştir (Fukami vd. 2015). Bu çalışmadaki bulgular, Lansoprazol'un tek başına dahi DNA zincirlerinde anlamlı düzeyde hasar oluşturabileceğini göstermektedir. Erbaş vd. (2021) yaptığı çalışmada benzer şekilde, Lansoprazol'un farklı kanser hücre hatlarında apoptotik etki yarattığını, oksidatif stres belirteçlerini değiştirdiğini ve genotoksositeye yol açabildiğini tespit etmiştir (Erbaş vd. 2021).

Bu çalışmada gözlemlenen en düşük DNA hasarı kontrol grubunda belirlenmiş olup, pozitif kontrol olarak kullanılan sisplatin uygulaması ise beklenildiği üzere en yüksek DNA hasarına yol açmıştır. Ancak ilginç olan, Sorafenib ve Lansoprazol kombinasyonunun oluşturduğu DNA hasar düzeyinin, pozitif kontrole oldukça yakın değerler göstermesidir. Bu durum, kombinasyonun HepG2 hücre hattında DNA bütünlüğünü ciddi şekilde bozduğunu ve potansiyel olarak yüksek düzeyde genotoksik etki yarattığını göstermektedir. Bu bulgular, özellikle hedeflenmiş tedavi yaklaşımlarında kullanılan ajanların başka ilaçlarla kombinasyonlarının dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Yine yaptığımız bu çalışma ile inkübasyon süresinin genotoksosite üzerindeki etkisi de açıkça ortaya konmuş olup 48 saatlik uygulamaların 24 saate kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek DNA hasarı oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu da, ajanların hücre içinde birikimi, ROS düzeyindeki artış ve DNA tamir mekanizmalarının yetersizliği gibi faktörlerle açıklanabilir. Bu doğrultuda inkübasyon süresinin tedavi etkinliği kadar genotoksik güvenlik açısından da önemli bir faktör olduğu vurgulanmalıdır (Aydoğan ve Gürler 2020).

Çalışmanın genel sonuçları değerlendirildiğinde, Sorafenib ve Lansoprazol'un birlikte kullanımı, HepG2 hücrelerinde DNA hasarını tek başlarına uygulamalarına kıyasla anlamlı ölçüde artırmıştır. Bu durum, söz konusu ajanların kombinasyon halinde kullanımının sitotoksik ve genotoksik etkileri artırabileceğini göstermektedir. Ancak bu bulguların terapötik açıdan nasıl değerlendirileceği, yani bu hasarın programlanmış hücre ölümü

yoluyla kanser hücrelerinin eliminasyonuna mı yoksa istenmeyen mutasyonlara mı yol açtığı, gelecekte yapılacak detaylı moleküler çalışmalarla açıklığa kavuşturulmalıdır. Bununla birlikte, bu tür kombinasyon tedavilerinin normal hücrelerdeki etkilerinin de incelenmesi, toksisite profillerinin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Sonuç olarak, bu çalışma Sorafenib ve Lansoprazol kombinasyonunun HepG2 hücre hattında genotoksik etkiyi artırdığını göstermiştir. Elde edilen veriler, bu iki ajanın birlikte kullanımının karaciğer kanseri tedavisinde potansiyel bir strateji olabileceğini ancak genotoksik güvenlik açısından dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, *in vitro* ortamda elde edilen bu bulguların *in vivo* deneylerle ve klinik düzeyde desteklenmesi hem tedavi etkinliği hem de olası uzun vadeli genetik toksisite etkilerinin anlaşılması açısından gereklidir.

Gen ifadesi üzerine yapılan araştırmalar, belirli bir zaman noktasında bir hücrenin veya hücre grubunun fizyolojisine dair içgörüler sunar. Bu nedenle bu çalışmada HepG2 hücre hattında 24 saatlik inkübasyon süresi boyunca Sorafenib ve Lansoprazol'un ayrı ayrı ve birlikte uygulamalarının, apoptoz ve inflamasyonla ilişkili BAX, BCL-2, KASPAZ-3 ve TNF- α genlerinin ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkileri, qRT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir.

BAX geni, hücrel apoptozu indükleyen pro-apoptotik genlerden biridir ve genellikle kemoterapötik ajanlara maruz kalma sonucu ekspresyonu artmaktadır. Çalışmamızda, BAX geninin en yüksek ekspresyon düzeyinin Lansoprazol grubunda gözlemlenmiş olması, bu ilacın pro-apoptotik yolları tek başına aktive edebildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, kombinasyon grubunda BAX gen ekspresyonunun hem Lansoprazol hem de Sorafenib grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmış olması, bu iki ajanın birlikte kullanımının BAX geni üzerinden apoptozu indükleyici etkisini baskılayabileceğini ve olası bir antagonistik etkileşime neden olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgu, proton pompası inhibitörlerinin bazı koşullarda apoptotik yanıtı arttırabileceğini, ancak kombinasyonlarda etkileşimin karmaşık olabileceğini ortaya koymaktadır (Özdemir 2020, Erbaş vd. 2021).

BCL-2 geni ise anti-apoptotik bir gendir ve hücrelerin programlı ölümünü engelleyici bir rol oynar. Çalışmamızda, 24 saatlik uygulama sonrası her üç grupta da BCL-2

ekspresyonunda kademeli ve anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ($p < 0.0001$). Özellikle kombinasyon grubundaki ekspresyon düzeyindeki azalma, Sorafenib'in tek başına uygulandığı gruba kıyasla belirgin düzeydedir. Bu bulgu, kombinasyonun anti-apoptotik BCL-2 üzerinden hücre ölümünü artırıcı yönde etkili olabileceğini göstermektedir. Ancak bu etkinin BAX gibi pro-apoptotik bir genle birlikte değerlendirildiğinde, gen ekspresyonlarının zıt yönlü etkiler sergilemesi, hücre içi apoptotik dengenin hassas bir düzenlemeye tabi olduğunu ortaya koymaktadır (Kowalczyk vd. 2020).

KASPAZ-3 geni apoptotik sürecin son yürütücü moleküllerinden biridir ve birçok hücrel stres durumunda aktifleşerek hücre ölümünü gerçekleştirir. Çalışmamızda KASPAZ-3 ekspresyonunun Sorafenib grubunda en yüksek düzeyde olduğu, Lansoprazol grubunda bu ekspresyonun azaldığı, kombinasyon grubunda ise daha da düştüğü görülmüştür. Bu durum, Sorafenib'in apoptozu aktive etme kapasitesinin, Lansoprazol ile birlikte uygulandığında azaldığını ve bu bağlamda potansiyel bir antagonistik etkileşim meydana geldiğini göstermektedir. Apoptotik sinyalleşme zincirinde KASPAZ-3'ün aktivasyonu, tedaviye duyarlılığın önemli bir göstergesi olduğundan, bu düşüş terapötik etkinlik açısından dikkatle değerlendirilmelidir (Chien vd. 2019, Türkmen 2021).

TNF- α geni, hem inflamasyon hem de programlı hücre ölüm sürecinde kritik rol oynayan bir sitokindir. Lansoprazol grubunda TNF- α ekspresyon düzeyinin en yüksek seviyede gözlemlenmesi, bu ajanın inflamatuvar yanıtı neden olabileceğini ve aynı zamanda apoptozu tetikleyebileceğini göstermektedir. Buna karşın, Sorafenib ve kombinasyon gruplarında TNF- α ekspresyonunun anlamlı derecede azalmış olması, bu ajanların inflamatuvar yanıtı baskılayıcı yönde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu etkileşim, kombinasyon uygulamasının TNF- α üzerinden oluşan apoptotik sinyalleşmeyi zayıflattığını ve bu bağlamda sinerjiden ziyade antagonist bir etki oluşturduğunu göstermektedir (Chen vd. 2010).

Genel olarak değerlendirildiğinde, elde edilen qRT-PCR sonuçları, özellikle Lansoprazol'ün tek başına pro-apoptotik genlerin (BAX, TNF- α) ekspresyonunu artırıcı, anti-apoptotik genlerin (BCL-2) ekspresyonunu ise baskılayıcı yönde etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak, bu etkinin Sorafenib ile kombinasyon halinde çoğunlukla azaldığı, bazı genlerde ise antagonistik bir etkileşimle sonuçlandığı görülmüştür. Bu bulgular, her

iki ajanın birlikte kullanımının moleküler düzeyde beklenen terapötik etkiyi her zaman göstermeyebileceğini ve bu tür kombinasyonların moleküler mekanizmalar göz önünde bulundurularak dikkatle planlanması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında elde edilen gen ekspresyon bulguları, Sorafenib ve Lansoprazol'un HSK hücrelerinde tek başına veya kombinasyon halinde farklı genetik yolları etkileyerek apoptotik ve inflamatuvar süreçlerde rol oynadığını göstermiştir. Ancak bu etkileşimlerin her zaman sinerjik olmadığı, aksine çoğu durumda antagonistik etkileşimlerle sonuçlanabileceği görülmektedir. Bu nedenle, bu kombinasyonun klinik düzeyde uygulanabilirliğini değerlendirmek üzere daha fazla *in vitro* ve *in vivo* moleküler düzeyde çalışmalar yapılması önerilmektedir.

Ayrıca bu tez çalışması kapsamında Sorafenib ve Lansoprazol'un tek başına ve kombinasyon halinde HepG2 hücre hattında uygulandığı 24 saatlik inkübasyon süresinin ardından Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 ve Tnf- α proteinlerinin düzeylerinde meydana gelen değişimler ELISA yöntemiyle değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, bu bileşiklerin hücresel yanıtlar üzerindeki etkilerini daha derinlemesine ortaya koymaktadır.

Bax protein düzeyleri incelendiğinde, Sorafenib grubunda anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Bax, mitokondriyal yolakla ilişkili pro-apoptotik bir protein olup, hücre içi apoptotik sinyallerin başlatılmasında rol oynar. Bu nedenle, Sorafenib'in Bax protein seviyesini yükseltmesi, apoptoz mekanizmalarını aktive ettiğini göstermektedir (Elmore 2007). Buna karşılık kombinasyon grubunda belirgin bir düşüş tespit edilmiştir ki bu durum, Sorafenib'in apoptotik etkisinin Lansoprazol tarafından baskılanabileceğini düşündürmektedir. Lansoprazol'un tek başına uygulandığı grupta ise Bax protein düzeyinin kombinasyon grubuna kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu bulgu, Lansoprazol'un tek başına uygulandığında apoptotik bir yanıt oluşturabileceğini, ancak Sorafenib ile kombinasyonunda bu etkinin zayıfladığını göstermektedir. Bu durum antagonistik bir etkileşimi düşündürmektedir (Wang vd. 2018).

Bcl-2 protein düzeylerinde ise tüm uygulama gruplarında kademeli bir azalma gözlemlenmiştir. Bcl-2, hücre yaşamını destekleyen anti-apoptotik bir proteindir. Bu bağlamda, Bcl-2 düzeyindeki düşüş hücrelerin apoptotik sürece yöneldiğinin bir göstergesi olabilir. Kombinasyon grubunun Bcl-2 düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla daha düşük olması,

bu grupta apoptotik sürecin baskın olduğu şeklinde yorumlanabilir. Ancak Sorafenib'in kombinasyon grubuna göre Bcl-2 düzeyini daha yüksek tutması, yine Lansoprazol ile birlikte kullanıldığında Sorafenib'in etkisinin antagonize edildiğini göstermektedir (Yang vd. 2020).

Kaspaz-3 protein düzeyleri bakımından elde edilen sonuçlar, Sorafenib'in kontrol grubuna kıyasla bu proteini arttırdığını, dolayısıyla apoptotik yanıtı tetiklediğini göstermektedir. Ancak Lansoprazol grubunda Kaspaz-3 düzeyinin daha düşük olması, bu ilacın apoptozu baskıladığını ortaya koymaktadır. Kombinasyon grubunda ise Lansoprazol grubuna göre artış gözlenmiş olsa da Sorafenib grubuna kıyasla daha düşük düzeyler tespit edilmiştir. Bu durum da kombinasyonun, Sorafenib'in apoptozu tetikleyici etkisini kısmen baskıladığı ve aralarında zayıf düzeyde antagonistik bir etkileşim olabileceğini düşündürmektedir (Fulda ve Debatin 2006).

Tnf- α protein düzeyleri açısından değerlendirildiğinde, kontrol grubunun en yüksek ekspresyon seviyesine sahip olduğu, buna karşın Lansoprazol ve kombinasyon gruplarının bu düzeyleri önemli ölçüde düşürdüğü gözlemlenmiştir. Tnf- α , hücre dışı sinyal molekülü olarak immün yanıtları düzenler ve bazı durumlarda apoptoz süreçlerini başlatabilir. Sorafenib grubunun Tnf- α düzeyini, kombinasyon ve Lansoprazol gruplarına kıyasla anlamlı şekilde artırması, bu ajanların inflamatuvar yanıtı etkilerinde farklı mekanizmalar izlediğini düşündürmektedir. Lansoprazol'un Tnf- α düzeyini düşürücü etkisi ise bu bileşiğin anti-inflamatuvar etkilerini ön plana çıkarmaktadır (Kojima vd. 2010). Bu bağlamda, kombinasyon uygulamasının Tnf- α düzeyinde baskılayıcı (antagonistik) bir etki yarattığı ve Lansoprazol'un bu süreçte belirleyici rol oynadığı öne sürülebilir.

Sonuç olarak, elde edilen ELISA bulguları, Sorafenib'in pro-apoptotik etkisinin Lansoprazol tarafından baskılanabileceğini göstermektedir. Özellikle Bax ve Kaspaz-3 düzeyleri dikkate alındığında kombinasyonun apoptotik süreçleri zayıflattığı gözlemlenmiştir. Tnf- α ve Bcl-2 düzeylerinde görülen düşüşler ise hücrede apoptoz ve inflamatuvar yanıtların farklı yollarla etkilendiğini ortaya koymaktadır. Bu durum, ilaç kombinasyonlarının hücresel düzeyde beklenenin aksine antagonistik etkileşimler doğurabileceğini, dolayısıyla kombinasyon tedavilerinde farmakodinamik etkilerin dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Abdel-Rahman O, 2013, Systemic therapy for hepatocellular carcinoma (HCC): from bench to bedside, *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 25(4): 165-171, <https://doi.org/10.1016/j.jnci.2013.08.002>.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00280-021-04266-0>
- Ada S, Ertürk C, Uçar A, Akyüz S, Doğan F ve Yücel B, 2021, Kanser Hücre Metabolizması, *Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı Dergisi*, 4(3): 66.75.
- Aggarwal B B, 2000, Tumor necrosis factor receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-κB, *Ann Rheum Dis*, 59; 6-16.
- Akbulut H, 2003, Kanserde Gen Tedavisi, 5. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi.
- Akgün Ş, Küçüksayan H, Akça H, 2018, Tümör Baskılayıcı Genler, Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Denizli.
- Akşit H, Bildik A, 2008, Apoptosis, *YYÜ Vet Fak Derg*, 19(1): 55-63.
- Ali D J, He C, Xu H, Kumaravel S, Sun B, Zhou Y, Liu R, Xiao Z, 2021, Microvesicles
- Anwanhan D, Singh S K, Singh S, Saikam V, Singh R, 2020, Challenges in liver cancer and possible treatment approaches, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1873(1): 17. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.188314>.
- Arbab I A, Looi C Y, Abdul, A B, Cheah F K, Wong, W F, Sukari M A, ... & Ibrahim Abdelwahab, S, 2012, Dentatin Induces Apoptosis in Prostate Cancer Cells via Bcl-2, Bcl-xL, Survivin Downregulation, Caspase-9, -37 Activation and NF-κB Inhibition, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 856029, <https://doi.org/10.1155/2012/856029>.
- Arbuthnot P ve Kew M, 2001, Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Int J Exp*

- Arslan A, 2012, Karaciğer Primer ve Metastaz Kanserli Hastalarda Katalaz ve Karbonik Anhidraz Enzim Aktiviteleri ve Bazı Mineral, Eser Element ve Ağır Metal Düzeylerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Van.
- Aydoğan N ve Gürler H, 2020, Komet testi ile DNA hasarının değerlendirilmesi: Kansere araştırmalarında uygulama alanları, *Moleküler Kansere Araştırmaları Dergisi*, 3(2), 55–62.
- Babacan D, 2023, Bcl-2 Protein Ailesi ve Kansere, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 28(3): 1218-1232.
- Bagley R G, 2016, Commentary of Folkman: ‘Tumore Angiogenesis Factor’, *Cancer Research*, 76(7): 1673-1674, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0675>.
- Balkan A, Menekşe B, 2012, HepG2 hücrelerinde selenyum ve vitamin C'nin apoptozis üzerine etkileri, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, 106s. Ankara.
- Balogh J, Victor D, Asham E H, Burroughs S G, Boktour M, Saharia A, 2016, Hepatocellular carcinoma: a review, *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, 3, 41-53.
- Baran Y (Ed.), 2018, Kansere Moleküler Biyolojisi, *Kısayol Yayıncılık*, 536s, Ankara.
- Barbaros M B, Dikmen M, 2015, Kansere İmmünoterapisi, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 31(4): 177-182.
- Barett J R, 2015, Liver Cancer and Aflatoxin: New Information from the Kenyan Outbreak, *Environmental Health Perspectives*, 113(12): 837-838.
- Baykara O, 2016, Kansere Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar, *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3): 154-165.
- Beasley R P, 1998, Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma, *Cancer*, 61, 1942-1956.
- Bingöl İ, 2011, Deneysel Karaciğer Kanserinde Bazı Antioksidan Bileşiklerin Etkisinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü İstanbul.
- Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature*, 2007; 447:396-398.

- Bruix J, Boix L, Sala M, Llovet J M, 2004, Focus on hepatocellular carcinoma, *Cancer Cell*, 5(3): 215-219.
- Burley M R, Roth C M, 2007, Effects of Retinoic Acid on Proliferation and Differentiation of HepG2 Cells, *The Open Biotechnology Journal*, 4(2):23.
- Burrell R A, Mc Gahan N, Bartek J, Swanton C, 2013, The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution, *Nature*, 501, 338-345.
- Carlomango F, Anaganti S, Guida T et al, 2006, BAY 43-9006 inhibition of oncogenic RET mutants. *J Natl Cancer Insts*, 98: 326-34.
- Cervello M, Bachvarov D, Lampiasi N, Cusimano A, Azzolina A, McCubrey J.A, Montalto G, 2012, Molecular Mechanisms of Sorafenib Action in Liver Cancer Cells, *Cell Cycle*, 11, 2843–2855.
- Chen K F, Yeh P Y, Yeh K H, Lu Y S, & Cheng A L, 2010, Down-regulation of Bcl-2 expression by sorafenib enhances TRAIL-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma cells, *Cancer Letters*, 290(2), 180–190.
- Chien M H, Lin Y W, Wen Y C, Yang S F, & Hsiao M, 2019, Molecular mechanisms of caspase-3 gene expression regulation during cancer progression, *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0563-5>.
- Chinnaiyan A M, 1999, The Apoptosome: Heart and Soul of the Cell Death Machine, *Neoplasia*, 1(1):5-15.
- Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK, 2006, Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett*. 11(4): 506-25.
- Collins R A, Oscoz A A, Brunborg G et al. 2008, The comet assay; topical issues, *Journal Article*, 23(3): 143-151.
- Compton S J, Jones C G, 1985, Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay, *Analytical Biochemistry*, 151(2):369-374.
- Copur MS, Manapuram S, 2019, Multiple Primary Tumors Over a Lifetime, *Oncology (Williston Park)*, 33(7): 629384.

- Costantini S, Bernardo D G, Cammarota M, Catello G, Colonna G, 2013, Gene expression signature of human HepG2 cell line, *Gene*, 518(2): 335-345, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.106>.
- Craig A J, Johan von Felden, Lezena T G, Sarcognato S, Villanueva A, 2020, Tumor evolution in hepatocellular carcinoma, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17, 139-152, <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0229-4>.
- Curtin J F ve Cotter T G, 2003, Apoptosis: Historical Perspectives, *Assay Biochem*, 39, 1-10.
- Çalıkoğlu M, 2011, Lansoprazol Etken Maddesine Ait Safsızlıkların Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi Tekniği ile Tayini ve Tayin Yönteminin Analitik Validasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Çalışkan B, 2023, Hepatosellüler karsinom (HepG2 hücre hattı) üzerinde borik asit uygulamasının glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Çalışkan B, 2023, Hepatosellüler Karsinom (HepG2 Hücre Hattı) Üzerinde Borik Asit Uygulamasının Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı/ Kanser Biyolojisi Bilim Dalı, Ankara.
- Çetin Erdem M, Pamuk G, Erden B, Koç E M, 2021, Bir Eğitim Aile Sağlığı Merkezine Başvuran ve Herhangi Bir Nedenle Proton Pompa İnhibitörü Kullanan Hastalık Tedavi Farkındalık Düzeyi, *Forbest J Medicine*, 2(3): 166-170, DOI: 10.4274/forbes.galenos.2021.41736 .
- Çevik A B, Pirinççi E, 2017, Beslenme ve Kanser, *Fırat Tıp Derg/ Fırat Med J*, 22(1): 1-7.
- De Weerd S, 2017, Calling cancer's bluff with neoantigen vaccines, *Nature*, 552(7683): 76-77.
- Deisinger P J, Hill T S, English J C, 1996, Human exposure to naturally occurring hydroquinone, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 47, 31-46.

- Demirezen Ş, Işık G, Beksaç M S, 2008, The Relationship Between Tumor Necrosis Factor and Cervical Carcinoma, *Turkish Journal of Scientific Reviews*, 2, 55-61.
- Demirkaya A K, Gündoğdu G, Dodurga Y, Seçme M, 2019, Parietinin HepG2 Hepatosellüler Karsinom Hücrelerinde Sitotoksik ve Genotoksik Etkisinin Belirlenmesi, *Atatürk University Journal of Veterinary Sciences*, 14(1): 29-37.
- Demirkıran Ö, 2022, Karaciğer Tümörlerinde Termal Ablasyon Uygulanan Hastaların Değerlendirilmesi: Onkolojik Cerrahide Ablasyon Ek Tedavi (Adjunct) Yöntemi Olarak Etkindir, Uzmanlık Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Kocaeli.
- Diril M, 2022, Karaciğer Kanseri Tedavisine Yönelik Aktif Hedefli Nanopartikül İlaç Taşıyıcı Sistemin Hazırlanması, İn Vitro-İn Vivo Değerlendirilmesi Üzerine Çalışmalar, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Donato M T, Tolosa L, Gómez-Lechón M J, 2014, Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG 2 Cells, *Protocols in İn Vitro Hepatocyte Research*, 1250, 77-93.
- Durmuş U, 2021, Sorafenib ve *Cynara Scolymus L.* Yaprak Ekstraktının Hepatosellüler Karsinom Üzerindeki Sinerjistik Antikanser Etkilerinin İn Vitro Analizi, Yüksek Lisans Tezi, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Erzincan.
- Durmuş U, 2023, Synergistic Effects of *Cynara scolymus Leaf* Extract and Sorafenib on Polyamine Metabolism in HepG2 Hepatocellular Carcinoma Cells, 5th Eurasia Biochemical Approaches & Technologies (EBAT) Congress, Antalya, Türkiye, 2 - 05 Kasım, ss.112.
- Earnshaw a FNK, Kumiko Samejima a vd., 1999, Capase-Mediated Cleavage of DNA Topoisomerase I at Unconventional Sites during Apoptosis, *Journal of Biological Chemistry*, 274(7): 4335-4340.
- Edlich F, 2018, Bcl-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 500(1): 26-34,
- Ekshyyan O, Aw T K, 2004, Apoptosis: A Key in Neurodegenerative Disorders, *Current Neurovascular Research*, 1(4): 355-371.

- Elmore S, 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- El-Sarag H B, 2012, Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma, *Gastroenterology*, 142(6): 1264-1273,
- El-Serag B H, Marreo A J, Rudolph L, Reddy R K, 2008, Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma, *Gastroenterology*, 134(6): 1752-1763.
- El-Serag H B, Rudolph K L, 2007, Hepatocellular carcinoms: epidemiology and molecular carcinogenesis, *Gastroenterology*, 132, 2557-2276.
- Erden K, 2022, Kurkumin ve Piperinin HepG2 Karaciğer Karsinom Hücrelerinde Anti-kanser Etkilerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.
- Erkekoğlu P, Baydar T, 2021, Güncel *İn Vitro* Sitotoksikite Testleri, *Hacettepe University Journal of the Faculty Pharmacy*, 41(1): 45-63.
- Evirgen M, 2019, Hepatosellüler Karsinoma Hücre Hatlarında m TOR (Mammalian Target of Rapamycin) Gen Ekspresyonunun Plazmit Bazlı mikroRNA-7 Kitozan Kompleksleri ile Baskılanmasına İlişkin *İn Vitro* Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 71.
- Eyol E, 2014, Sık Rastlanan Karaciğer Metastazları ve Modelleri, *Çağdaş Tıp Dergisi*, 4, 44-52.
- Feitelson M A, Sun B, Tufan N L S, Liu J, Pan J, Lian Z, 2002, Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis, *Oncogene*, 21, 2593-2604.
- Fesik SW, 2005, Progmotig apoptosis as a strategy for cancer drug discovery, *Nat Rev Cancer*, 5, 876-885.
- Festjens N, van Grup M, van Loo G et a, 2004, Bcl- family members as sentinels of cellular integrity and role of mitochondrial intermembrane space proteind in apoptotic cell death, *Acta Haematologica*, 111(1-2), 7-27.
- Frei E, Eder J P, 2003, Combination Chemotherapy, *Holland-Frei Cancer Medicine*, 10(2):23-27.
- Fukami T, Nakajima M, Higashi E, Yamanaka H, & Yokoi T, 2015, Involvement of

- oxidative stress in lansoprazole-induced cytotoxicity in human hepatoma cells *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 38(1), 58–64.
- Fulda S ve Debatin K M, 2006, Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), 4798–4811.
- Galle R P, 1997, Apoptosis in liver disease, *Journal of Hepatology*, 27(2): 405-412, [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(97\)80189-4](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(97)80189-4).
- Gewies A, 2003, UBP41 is a proapoptotic ubiquitin-specific protease, *Cancer Research*, 63(3): 682-688.
- Gong L, Giacomini Marilyn M, Giacomini Craig, Maitlant Michael L, Altman Russ B, Klein Teri E, 2017, PharmGKB summary sorafenib pathways, *Pharmacogenetics and Genomics*, 27(6): 240-246, DOI: 10.1097/FPC.0000000000000279 .
- Gong W F, Zhong J H, Lu S D et al, 2017, Effects of antiviral therapy on post-hepatectomy HBV reactivation and liver function in HBV DNA-negative patients with HBV-related hepatocellular carcinoma, *Oncotarget*, Feb 28; 8(9): 15047-15056.
- Gravitz L, 2014, Liver cancer, *Nature*, 516,1.
- Greaves M, Maley C C, 2012, Clonal evolution in cancer, *Nature*, 481, 306-313.
- Green D R, 2018, Cell Death Apoptosis and Other Means to an End, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Gunasekaran G, Damanhuri H A, Chan F L, Tan J C A, 2019, Oxidative Status in Bipolar Disorder (BD) and Its Correlation with Age, Gender and Body Mass Index (MBI), *Sains Malaysiana*, 48(5): 1083, 1095, <http://dx.doi.org/10.17576/jsm-2019-4805-17>.
- Gürbilek M, Dağlar C, Aköz M, Topçu C, 2004, Diabetes mellituslu hastalarda hastalık süresinin eritrosit membranı Na^+/K^+ ATPaz enzim aktivitesi, lipid peroksidasyonu ve DHEA(S), glukoz, lipid düzeylerine etkisi, *Turkish Journal of Biochemistry*, 29(3): 237-242.
- Gürlek B, 2021, Favipiravir'in meme kanseri hücre hatlarında sitotoksik etkilerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, YÖK Tez Merkezi.

- Gyory B M, Venkatachalam G, Thiagarajan P S, Hsu D, Clement M V, 2014, OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis, *Redox Biol*, 2, 457-465.
- Hamilton S R, Aaltonen L A, 2000, Pathology and Genetics of Tumors of the Digestive System, *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, 14(2): 473-485.
- Hanahan D and Weinberg R A, 2011, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, 144(5): 646-674.
- Hanahan D, 2022, Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46.
- Hanahan D, Weinberg R A, 2000, The Hallmarks of Cancer, *Cell*, 100(1): 57-70.
- Hasan T, Arora R, Bansal A K, Bhattacharya R, Sharma G S, Singh L R, 2019, Disturbed homocysteine metabolism is associated with cancer, *Experimental & Molecular Medicine*, 51, 1-13.
- Hauseman Z J, Harwey E P, Newman C E, Gygi S P, Engen J R, Walensky L D, 2020, Homogeneous Oligomers of Pro-apoptotic Reveal Structural Determinants of Mitochondrial Membrane Permeabilization, *Molecular Cell*, 79(1):68-83, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.029>.
- Huriyet H, 2024, Sodyum Pentaboratın Kanser ve Sağlıklı İnsan Akciğer Hücreleri Üzerindeki *İn Vitro* Sitotoksik Genotoksik ve Radyobiyojik Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Bursa.
- İsan H, Tombuş A C, Doğru H A, Şanlı G, Aktaş R G, 2016, Karaciğer Kanseri Hücrelerinin Sitoplazmik Özellikleri İle Kültür Süreci İlişkisi: Konfokal Mikroskopik Karşılaştırmalı Kantitatif Bir Çalışma, *Maltepe Tıp Dergisi*, 8(3): 18-23.
- Jeng P, Inoue-Yamauchi A, Hsieh J J, Cheng E H, 2018, BH3-dependent and independent activation of BAX and BAK in mitochondrial apoptosis, *Current Opinion in Physiology*, 3, 71-81.
- Kandaş N Ö, 2004, Apoptosis. Programlı Hücre Ölümü, *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 5(1): 0-0.
- Karaoğlu E, 2019, Sorafenib'in HepG2 hücrelerinde apoptotik ve anti-proliferatif

etkilerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, YÖK Tez Merkezi.

Kaufmann S H ve Gores G J, 2000, Apoptosis in cancer: cause and cure, *BioEssays*, 22(11):1007-1017

Keane R W, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea J R et al, 2001, Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury, *J Neuropathol Exp Neurol*, 60, 422-429.

Keating G M, Santoro A, 2009, Sorafenib: A Review of its Use in Advanced Hepatocellular Carcinoma, *Drugs*, 69, 223-240.

Klug WS, Cummings MR, 2002, Genetik, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 28, 635-651.

Kojima T, Takahashi H K, Liu K, Kawai Y, Iwagaki H, & Tanaka N, 2010, Anti-inflammatory effects of lansoprazole on cytokine production from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 47(3), 248–255.

Kowalczyk, A., Kucia, M., & Madej, J. A. (2020). Bcl-2 and Bax in the prognosis of cancer: molecular indicators of apoptosis. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 23(4), 761–768.

Kummaravel T S, Vilhar B, Faux S P, Jha A N, 2009, Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, 25, 53-64.

Kunter İ, 2007, Hepatosellüler karsinomada IP3 kinaz sinyal yolağının önemi, Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Ladomery M, 2013, Aberrant Alternative Splicing Is Another Hallmarks of Cancer, *International Journal of Cell Biology*, 1, 1-6, <https://doi.org/10.1155/2013/463786>.

Lai S, 2019, Cancer related fatigue and cancer cachexia are the consequence of endocrine failure caused by persistent stress, *Medical Hypotheses*, 123, 60-62, <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2018.12.018>.

Lee Y H, Oh S H, 2021, Autophagy- mediated cytoplasmic accumulation of p53 leads to apoptosis through DRAM-BAX in cadmium-exposed human proximal tubular

- cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 534, 128-133, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.12.019>.
- Li W, Zhou J, Xu Y, 2015, Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices (Review), *Biomedical Reports*, 3, 617-620.
- Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C, 2006, Sorafenib Blocks the RAF/MEK/ERK Pathway, Inhibits Tumor Angiogenesis, and Induces Tumor Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Model PLC/PRF/5, *Cancer Research*, 66(24): 11851-11858.
- Llovet J M, Ricci S, Muzafferro et al, 2008, Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma, *The New England Journal of Medicine*, 359, 378-390.
- Lohitesh K, Chowdhury R, Mukherjee S, 2018, Resistance a major hindrance to chemotherapy in hepatocellular carcinoma: an insight, *Cancer Cell International*, 18(1): 1-15, <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0538-7>.
- Lotem J ve Sachs L, 2002, Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia, *Oncogene*, 21(21), 3284-3254.
- Lozano G ve Elledge S J, 2000, p53 sends nucleotides to repair DNA, *Nature*, 404, 24-25.
- Mammadli R, 2023, İnsan HCC Hücre Hattında (HepG2) WNT Sinyal Yolunun Aktivasyonu ve Farmakolojik Regülasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Anabilim Dalı.
- McGlynn K A, Petrick J L, El-Sarag H B, 2021, Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma, *Hepatology*, 73, 1.
- MD Grewal P, MD Viswanathan V A, 2012, Liver Cancer and Alcohol, *Clinics in Liver Disease*, 16(4): 839-850, <https://doi.org/10.1016/j.cld.2012.08.011>.
- Meng S, Zhu Y, Li JF, Wang X, Liang Z, Li SQ, Xu X, Chen H, Liu B, Zheng XY, Xie LP, 2017, Apigenin inhibits renal cell carcinoma cell proliferation, *Oncotarget*, 8, 19834-42.
- Mittal S, El-Sarag H B, 2013, Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma Consider the Population, *Journal of Clinical Gastroenterology*, 47, 2-6.

- Nagata S, 1997, Apoptosis by death factor, *Cell*, 88:355-365.
- Nursal A F, 2012, Meme Kanseri Her2 ve Top2a Gen Düzensizlikleri ve Kanseri İlişkili Diğer Genlerin Epigenetik Durumu ile İlişkilendirilmesi, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Okuda K, 1992, Hepatocellular Carcinoma: Recent Progress, *Special Article*, Department of Medicine, Chiba University Hospital, Chiba, Japan, 15(5): 280.
- Olsson M, Zhivotovsky B, 2011, Caspases and cancer, *Cell Death & Differentiation*, 18, 1441-1449.
- Omata M, Kato N, Tanaka J, & Ueno Y, 2020, Proton pump inhibitors as novel antineoplastic agents in gastrointestinal cancers, *Gastroenterology and Hepatology Reports*, 12(2), 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.ghr.2020.03.004>.
- Oshikata-Miyazaki, Takezawa T, 2016, Development of an oxygenation culture method for activating the liver-specific functions of HepG2 cells utilizing a collagen vitrigel membrane chamber, *Cytotechnology*, 68, 1801-1811.
- Öktem S, Özhan M H, Özöl D, 2001, Apoptozisin Önemi, *Toraks Dergisi*, 2(1): 91-95.
- Özçimen A, 2005, Steroid'in HL-60 (İnsan Akut Miyeloid Lösemi) Hücre Hattında, Apoptoz ve Farklılaşma Üzerine Etkisi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Özdemir H, 2020, Hücre ölümü mekanizmaları: apoptotik genlerin kanser tedavisindeki önemi, *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*, 83(1), 17–26.
- Özden A, 2013, Proton Pompa İnhibitörleri ve Kullanım Güvenirliği, *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*, 17, 112-9.
- Özyürek U D, Çakır B, 2023-2024, Dünya Kanser Günü, HÜTF Halk Sağlığı AD Toplum İçin Bilgilendirme Serisi, 29.
- Park M, Lee S, 2003, Cell Cycle and Cancer, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36, 60-65, <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2003.36.1.060>.
- Park, H A, Broman, Katheryn, Jonas, Elizabeth A, 2021, Oxidative stress battles neuronal Bcl-xL in a fight to the death, *Neural Regeneration Research*, 16(1): 12-15, DOI: 10.4103/1673-5374.286946.

- Petrick J L, McGlynn K A, 2019, The Changing Epidemiology of Primary Liver Cancer, *Current Epidemiology Reports*, 6, 104-111.
- Radhakrishna Pillai G, Srivastava A S, Hassanein T I, Chauhan D P, Carrier E, 2004, Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin, *Cancer Letters*, 208(2):163-170, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.01.008>.
- Rashed M M, Ragab N M, 2004, The pattern of expression of the apoptotic inducer Fas and apoptotic inhibitor bcl-2 oncogenes immunohistochemically in bone-marrow invaded by the non-Hodgkin lymphomas, *Turk J Haematol*, 21(3): 141-147.
- Riley RS, June C H, Langer R, Mitchell M J, 2019, Delivery technologies for cancer immunotherapy, *Nature Reviews Drug Discovery*, 18, 175-196.
- Rini B I, 2006, Sorafenib, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 7(4): 453-461, <https://doi.org/10.1517/14656566.7.4.453>.
- Riss T, Niles A L, Minor L et al, 2004, Cell Viability Assays Assay Guidance Manual, *U.S National Library of Medicine*, 2.
- Roshal M, Zhu Y, Planelles V, 2001, Apoptosis in AIDS, *Apoptosis*, 6, 103-116.
- Roy P S, Saikia B J, 2016, 'Cancer and Cure: A Critical Analysis', *Indian Journal of Cancer*, 53(3): 441-442, DOI: 10.4103/0019-509X.200658.
- Sankaranarayanan R, Masuyer E, Swaminathan R, Ferlay J, Whelan S, 1998, Head and Neck Cancer: a global Perspective on Epidemiology and Prognosis, *Anticancer Research*, 18(6B): 4779-4786.
- Schroter M, Peli J, Hane M, Tschop J ve Reichmann E, 2000, Fasdependet tissue turnover is implicated in tumor cell cleanance, *Oncogene*, 19(14), 1794-1800.
- Schwartz M, Roayaie S, Konstadoulakis M, 2007, Strategies for the management of hepatocellular carcinoma, *Nature Clinical Practice Oncology*, 4, 424-432.
- Serbes U, 2009, Evulation of Apaptotic Effects of Single and Combined use of Current Antifibrotic Agents on Human Endothelial Cells, *IOVS an ARVO Journal*, 50(13): 469.
- Shojaei M, 2016, Identication of gene mutations involved in drug resistance in liver cancer using RNA-SEQ data analysis, A Thesis Submitted to The Graduate School

of Informatics of Middle East Technical University, In Partial Fulfillment Of The Requirements For The Degree Of Master Of Science In Bioinformatics.

Siddiqui, W A, Ahad, A, & Ahsan, H, 2015, The mystery of Bcl-2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update, *Archives of Toxicology*, 89(3): 289-317.

Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, vd., 2012, Cancer treatment and survivorship statistics, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62(4): 220–241, <https://doi.org/10.3322/caac.21149>.

Speit G, Hartmann A, 2006, The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair, *Methods in Molecular Biology*, 314, 275-286.

Staley K, Blaschke A J, Chun J, 1997, Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semiquantitative ligation-mediated PCR of blunt DNA ends, *Cell Death and Differentiation*, 4, 66-75.

Suo A, Zhang M, Yao Y, Zhang L, Huang C, Nan K, Zhang W, 2012, Proteome analysis of the effects of sorafenib on human hepatocellular carcinoma cell line HepG2, *Medical Oncology*, 29, 1827-1836.

Şahin T, 2023, Karaciğer Karsinomu Hücre Hattında Sorafenib, Sertralin ve Piperin Uygulamalarının Oksidatif Durum Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Afyonkarahisar.

Şekeroğlu Z A, Şekeroğlu V, 2011, Genetik Toksikite Testleri, *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4(3): 221-229.

Şimşek B, 2023, Amiodaron ve Trastuzumab Kombinasyonunun Meme Kanseri Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik ve Antianjiyogenik Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

Şirin N, 2018, Hepatosellüler Kansere Hücrelerinde Apigenin, Sorafenib ve Kombine Uygulamalarının Apoptoz ve Hücre Döngüsü Üzerine Olası Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

- Takayasu K, Arii S, Ikai I, Omata M, Okita K, Ichida T, Matsuyama M, Nakanuma Y, Kojiro M, Makuuchi M, Yamaoka Y, Liver Cancer Study Group of Japan, 2006, Prospective Cohort Study of Transarterial Chemoembolization for Unresectable Hepatocellular Carcinoma n 8510 Patients, *Gastroenterology*, 131(2): 461-469, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.05.021>.
- Tang Z Y, 2001, "Hepatocellular carcinoma-cause, treatment and metastasis," *World Journal of Gastroenterology*, 7(4): 445-454.
- Tang Z, Zhou X, Lin Z et al, 1999, Surgical treatment of hepatocellular carcinoma and related basic research with special reference to recurrence and metastasis, *Chinese Medical Journal*, 112(10): 887-891.
- Targownik L E, Fisher D A, Saini S D, 2022, AGA Clinical Practice Update on Deprescribing of Proton Pump Inhibitors: Expert Review, *Gastroenterology*, 162(4): 1334-1342, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.12.247>.
- Taş A, 2010, Hepatosellüler Karsinom Tanı ve Tedavisi, *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*, 13-6.
- Thorgeirsson SS, Lee J, Grisham JW, 2006, Functional genomics of hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, 43, 145-150.
- Tilli CMLJ, Stavast-Kooy AJW, Ramaekers FCS et al, 2002, Bax expression and growth behavior of basal cell carcinomas, *J Cutan Pathol*, 29, 79-87.
- Tokur O, Aksoy A, 2017, *In Vitro* Cytotoxicity Assay, *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 112-118, <https://doi.org/10.31196/huvfd.325794>.
- Tomatır A G, 2003, Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü, *T. Klin. J. Med. Sci.*, 23, 499-508.
- Topçu B K S, 2022, Tümör İlerlemesinde Tümör Mikroçevrebin Rolü, *Türk Nöroşir Derg*, 32(1): 98-104.
- Türkmen M, 2021, Kaspaz gen ailesinin kanserdeki rolü, *Türkiye Klinikleri Biyokimya Özel Dergisi*, 14(2), 45-53.
- Uygun A, 2013, Uzun Süre Proton Pompa İnhibitörleri (PPI) Kullanılacaksa Hangi PPI Tercih Edilmelidir? Nelere Dikkat Edilmelidir? *Güncel Gastroenteroloji*, 17/1.

- Uzunalioglu O et al, 2001, Risk factors for hepatocellular carcinoma in Turkey, *Dig Dis Sci*, 46(5): 1022-8.
- Üstündağ S, 2013, Kemoterapi Alan Kanser Hastalarının Semptom Yönetiminde Kullandıkları Tamamlayıcı Tedavi Yaklaşımlarının Yaşam Kalitesine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Van Horssen R, ten Hagen TL, Eggermont, AM, 2006, TNF- α in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects and clinical utility, *The Oncologist*, 11(4), 397-408.
- Visone R, Croce C M, 2009, miRNAs and Cancer, 2009, *The American Journal of Pathology*, 17(4): 1131-1138, <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080794>.
- Wang S, Wang X, & Cheng H, 2018, Apoptosis induction of sorafenib via the mitochondrial pathway in human hepatoma cells, *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 33(8), 327-334.
- Weinberg R A, 1996, How Cancer Arises, *Scientific American*, 275(3): 62-70.
- Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A, 2005, A practical note on the use of cytotoxicity assay, *International Journal of Pharmaceutics*, 288(2): 369-376.
- White M C, Holman D M, Boehm J E, Peipins L A, Grossman M, Henley S J, 2014, Age and Cancer Risk: A Potentially Modifiable Relationship, *American Journal of Preventive Medicine*, 46, 7-15, <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2013.10.029>.
- Wiemann SU, Satyanarayana A, Tsahuridu M, Tillmann HL, Zender L, Klempnaller J, Flemming P, Franco S, Blasco MA, Manns MP, Rudolph KL, 2002, Hepatocyte telomere shortenning and senescence are general markers of human liver cirrhosis, *FASEB J*, 16, 935-942.
- Wilhelm SM, Carter C, Tang L et al, 2004, BAY43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis, *Cancer Res*, 64, 7099-109.
- Yalçın E, Erbaş D, & Tetik S, 2021, Lansoprazol'un MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması, *Türk Biyokimya*

Dergisi, 46(3), 345–352. <https://doi.org/10.5505/tbd.2021.58741>.

Yamashita T, Yang X W, 2013, Cancer stem cells in the development of liver cancer, *The Journal of Clinical Investigation*, 2-7.

Yang J, Liu Y, & Zhang Y, 2020, Sorafenib inhibits Bcl-2 expression and promotes apoptosis in hepatocellular carcinoma cells, *International Journal of Molecular Medicine*, 45(5), 1311–1320.

Yeh P Y, Chen K F, Tsai M F, Hsu C H, Ke C C, & Cheng A L, 2011, Biological mechanisms of Sorafenib in suppressing hepatocellular carcinoma. *Hepatology International*, 6(3), 337–350. <https://doi.org/10.1007/s12072-011-9279-0>.

Yurdacan B, 2017, Hepatosellüler Karsinomada Üsrik Asit ve Sorafenib'in Kombin Tedavi Olarak Anti-Tümöral Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

Yüzügüllü H, Mumcuoğlu M, Alotaibi H, Sentürk S, Telkoparan P, Gur-Dedeoğlu B, Cingöz B, Bozkurt B, Tazebay U H, Yulug I G, Akcalı K C, Ozturk M, Bagislar S, 2010, The Ability to Generate Senescent Progeny as a Mechanism Underlying Breast Cancer Cell Heterogeneity, *Journal Plos One*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011288>.

Zeiger E, 2004, History and rationale of genetic toxicity testing: An impersonal, and sometimes personal, view, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44(5): 363-371, <https://doi.org/10.1002/em.20062>.

İnternet Kaynakları

Int. Kyn.1 <https://www.drugs.com/sfx/lansoprazole-side-effects.html>

Int. Kyn. 2 <https://www.sakaryakuzey.com/siroz-nedir/>