



**SORAFENİB VE LİPOİK ASİT KOMBİNASYONUNUN
HEPATOSELLÜLER KARSİNOM HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ SİNERJİSTİK ANTİKANSER
ETKİLERİNİN *IN VITRO* ANALİZLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Beyza Rümeysa ARIKAN

Danışman

Doç. Dr. Arzu ÖZKARA

İkinci Danışman

Doç. Dr. Dilek AKYIL

GENETİK ANABİLİM DALI

Haziran 2025

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SORAFENİB VE LİPOİK ASİT KOMBİNASYONUNUN
HEPATOSELLÜLER KARSİNOM HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
SİNERJİSTİK ANTİKANSER ETKİLERİNİN *IN VITRO*
ANALİZLERİ**

Beyza Rümeysa ARIKAN

Danışman

Doç. Dr. Arzu ÖZKARA

İkinci Danışman

Doç. Dr. Dilek AKYIL

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Haziran 2025

TEZ ONAY SAYFASI

Beyza Rümeysa ARIKAN tarafından hazırlanan ‘‘Sorafenib ve Lipoik Asit Kombinasyonunun Hepatosellüler Karsinom Hücreleri  zerindeki Sinerjistik Antikanser Etkilerinin *In Vitro* Analizleri’’ adlı tez çalışması lisansüstü eēitim ve  ēretim y netmeliēinin ilgili maddeleri uyarınca 25/06/2025 tarihinde aēaēıdaki jüri tarafından **oy birliēi** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK L SANS TEZİ** / olarak kabul edilmiētir.

Danışman : Doç. Dr. Arzu ÖZKARA

 kinci Danışman : Doç. Dr. Dilek AKYIL

Bařkan : Dr.  ēr. Üyesi M r vv t KURT
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

 ye : Dr.  ēr. Üyesi Nilay Iē TEZ
Afyonkarahisar Saēlık Bilimleri Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

 ye : Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİēERCİ
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

 ye : Doç. Dr. Arzu ÖZKARA
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

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

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

.....
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.

9/07/2025

İmza

Beyza Rümeysa ARIKAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SORAFENİB VE LİPOİK ASİT KOMBİNASYONUNUN HEPATOSELLÜLER KARSİNOM HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİNERJİSTİK ANTİKANSER ETKİLERİNİN *IN VITRO* ANALİZLERİ

Beyza Rümeysa ARIKAN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Arzu ÖZKARA

İkinci Danışman: Doç. Dr. Dilek AKYIL

Karaciğer kanserinin en yaygın türü olan hepatosellüler karsinom (HSK), dünya çapında kanserden ölümlerin üçüncü nedenini temsil etmektedir. Karmaşık patogenezi ve moleküler heterojenliği, karaciğer kanseri vakalarında tedaviyi zorlaştırmaktadır. Bu nedenle hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi ihtiyacı artmaktadır. Alfa Lipoik Asit'in (ALA) moleküler çözünürlükte hücrelerle etkileşime girebilmesi ve koruyucu etkileri nedeniyle çeşitli antineoplastik ilaçlarla birlikte kullanılmasının kanser kontrolü ve tedavisi için umut vadedeceği öngörülmektedir. Bu çalışmada ALA'nın farklı kombinasyonlarının HepG2 hücre hattı üzerine sinerjistik, anti-proliferatif ve anti-kanser etkisinin hücre canlılık testi (MTT) ve bazı genlerin ifade düzeylerinin (Tnf- α , Bax, Kaspaz-3 ve Bcl-2) belirlenmesi ve ELISA metodu ile aynı genlerin protein seviyelerinin değerlendirilmesi, bunun yanı sıra Komet testi ile muhtemel DNA hasarının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

MTT testinden elde edilen bulgulara göre, 24 saatlik uygulamada yalnızca Sorafenib uygulanan grup yaklaşık %42 oranında hücre canlılığı göstermiştir ve bu, bileşiğin tek başına anlamlı düzeyde sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, yalnızca 5 μ M ALA uygulanan grupta hücre canlılığı yaklaşık %56 düzeyinde olup, ALA'nın da tek başına hücre canlılığını azalttığı gözlemlenmiştir. ALA + Sorafenib kombinasyonunun uygulanması sonucu %85 hücre canlılığı tespit edilmiştir. 48 saatlik

uygulamada ise Sorafenib uygulanan grupta hücre canlılığı yaklaşık %45 olarak tespit edilirken, (5 μ M ALA) uygulanan grup %47 canlılık oranı göstermiştir. ALA + Sorafenib kombinasyon grubunda ise hücre canlılığı %48'dir. Komet test sonuçlarında ise DNA hasarı Sorafenib 20 μ M dozunda 24 saat için 20.33 ± 2.52 iken ve 48 saatte 25.33 ± 4.16 olarak tespit edilmiştir. Verilerdeki en düşük DNA hasarının 24 saatte 4.67 ± 2.08 ile ALA dozu olduğu tespit edilmiştir. 48 saatlik ALA uygulamasında DNA hasarında bir artış gözlemlenmiş olup bu hasar 15.67 ± 1.15 olarak belirlenmiştir. Hem 24 hem de 48 saatlik uygulamada Sorafenib'in oluşturduğu DNA hasarı kombinasyon uygulamasıyla karşılaştırıldığında düşüş göstermiştir.

HepG2 hücre hattında 24 ve 48 saatlik Sorafenib ve ALA kombinasyonlarının etkileri, apoptotik ve inflamatuvar süreçlerde görev alan Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 ve Tnf- α genlerinin ekspresyon düzeyleri incelenerek değerlendirilmiştir. Elde edilen qRT-PCR verileri doğrultusunda, her iki sürede de gen ekspresyonlarında anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. Yine Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 ve TNF- α gibi apoptoz ve inflamasyonla ilişkili anahtar gen ürünlerinin seviyeleri hem 24 saat hem de 48 saat uygulamalarla belirlenmiş, gen ekspresyon seviyeri ile protein ürünlerinin genellikle uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Tüm bu çalışmalardan elde edilen bulgular, kombinasyon tedavisinin çoğu durumda tekli ajanlara kıyasla daha belirgin etkiler yarattığını ortaya koymaktadır. Özellikle Bax ve Kaspaz-3 gibi pro-apoptotik genlerin ekspresyonundaki artışlar, uygulanan ajanların hücre ölümü mekanizmaları üzerindeki etkilerini ortaya koyarken; Bcl-2 gibi anti-apoptotik genlerdeki değişimler bu sürecin nasıl düzenlendiğini anlamak açısından kritik öneme sahiptir.

2025, xii + 111 sayfa

Anahtar Kelimeler: Alfa-Lipoik Asit; Hepatosellüler Karsinoma; HepG2 Hücre Hattı; Sorafenib; Sitotoksisite, Genotoksisite, BAX, BCL-2, KASPAZ-3, TNF- α .

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

IN VITRO ANALYSIS OF SYNERGISTIC ANTICANCER EFFECTS OF SORAFENIB AND LIPOIC ACID COMBINATION ON HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS

Beyza Rümeysa ARIKAN

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assos. Dr. Arzu ÖZKARA

Co-Supervisor: Assos. Dr. Dilek AKYIL

Hepatocellular carcinoma (HCC), the most common type of liver cancer, represents the third leading cause of cancer death worldwide. Its complex pathogenesis and molecular heterogeneity complicate the treatment of liver cancer cases. Therefore, the need for the development of targeted therapies is increasing. It is anticipated that the use of Alpha Lipoic Acid (ALA) together with various antineoplastic drugs will be promising for cancer control and treatment due to its ability to interact with cells at molecular resolution and its protective effects. This study aimed to determine the synergistic, anti-proliferative and anti-cancer effects of different combinations of ALA on HepG2 cell line by cell viability test (MTT) and expression levels of some genes (Tnf- α , Bax, Caspase-3 and Bcl-2) and to evaluate the protein levels of the same genes by ELISA method, as well as to detect possible DNA damage by Comet test.

According to the findings obtained from MTT test, the group that was administered only Sorafenib showed approximately 42% cell viability after 24 hours of application, indicating that the compound alone showed significant cytotoxic effect. Similarly, the group that was administered only 5 μ M ALA showed approximately 56% cell viability, and it was observed that ALA alone reduced cell viability. As a result of the application of ALA + Sorafenib combination, 85% cell viability was detected. In the 48 hour application, cell viability was approximately 45% in the Sorafenib group, and 47% in the

5 μ M ALA group. In the ALA + Sorafenib combination group, cell viability was 48%. In the comet test results, DNA damage was determined as 20.33 ± 2.52 for 24 hours at the Sorafenib 20 μ M dose and 25.33 ± 4.16 for 48 hours. The lowest DNA damage in the data was determined to be the ALA dose with 4.67 ± 2.08 at 24 hours. An increase in DNA damage was observed in 48 hour ALA application, and this damage was determined as 15.67 ± 1.15 . DNA damage caused by Sorafenib decreased in both 24 and 48 hour applications compared to the combination application.

The effects of Sorafenib and ALA combinations for 24 and 48 hours in HepG2 liver cancer cell line were evaluated by examining the expression levels of Bax, Bcl-2, Caspase-3 and Tnf- α genes involved in apoptotic and inflammatory processes. According to the qRT-PCR data obtained, significant changes were observed in gene expressions in both periods. Again, the levels of key gene products related to apoptosis and inflammation, such as Bax, Bcl-2, Caspase-3 and TNF- α , were determined in both 24 hour and 48 hour applications, and it was found that gene expression levels and protein products were generally consistent. The findings from all these studies suggest that combination therapy produces more pronounced effects compared to single agents in most cases. While increases in the expression of pro-apoptotic genes, especially Bax and Caspase-3, reveal the effects of the applied agents on cell death mechanisms, changes in anti-apoptotic genes, such as Bcl-2, are critical to understanding how this process is regulated.

2025, xii + 111 pages

Keywords: Alpha-Lipoic Acid; Hepatocellular Carcinoma; HepG2 Cell Line; Sorafenib; Cytotoxicity, Genotoxicity, BAX, BCL-2, CASPASE-3, TNF- α .

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca deneyimleri ile bana her zaman yol gösterici olan, desteğini hiç esirgemeyen, sonraki çalışmalarında bilgisine, destek ve fikirlerine her zaman ihtiyaç duyacağım, bana her zaman sabır gösteren değerli hocam Doç. Dr. Arzu ÖZKARA'ya, hücre kültürü çalışmalarının her aşamasında teorik ve pratik destekler veren hocam Doç. Dr. Dilek AKYIL'a, laboratuvar ekipmanlarıyla, bilgi ve tecrübeleriyle destek olan Prof. Dr. Ömer HAZMAN'a, tezim boyunca bana her türlü desteği gösteren, iyi niyet ve sabırla beni çalışmaya teşvik eden değerli hocam Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ'ye ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ahmet SERTESER'e, diğer tüm öğretim üyelerine teşekkürü borç bilirim.

Desteklerini her zaman hissettiğim ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam Arş. Gör. Pınar Elife DOĞAN'a ve çalışmalarında bana her zaman yardımcı olan tüm laboratuvar ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü doktora öğrencisi Kübra AKALIN ve yüksek lisans öğrenci arkadaşlarım Zekiye HAZAR, Ayşegül GEDİK ve Aleyna ÖZDENİZ'e teşekkür ederim.

Her zaman benim için çabalayan ve koşulsuz her şartta yanımda olan sevgili annem Ayşe Dudu ARIKAN'a, tez süresince bana destek olan abim Eyüp Furkan ARIKAN'a teşekkür ederim.

Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarı ekip arkadaşlarıma ve Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü tüm öğretim üyelerine teşekkür ederim.

23.FEN.BİL.32 nolu tez projemin gerçekleşmesi için gerekli kaynağı sağlayan Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü ve Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (AKÜBAP) teşekkür ederim.

Beyza Rümeysa ARIKAN

Afyonkarahisar 2025

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
GRAFİKLER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR TARAMASI.....	3
2.1 Karaciğer ve Karaciğer Kanseri.....	3
2.1.1 Karaciğer Kanseri Evreleme	7
2.1.2 Karaciğer Kanseri Etiyolojisi ve Epigenetik.....	7
2.1.3 Karaciğer Kanseri Epidemiyolojisi	8
2.1.3.1 Karaciğer Kanseri Genetik Yatkınlık	9
2.2 Hepatosellüler Karsinom ve Tirozin-kinazlar.....	10
2.2.1 İnsan Hepatosellüler Karsinomu (HepG2) ve İnflamasyon	10
2.2.1.1 Akut ve Kronik İnflamasyon	11
2.3 Karaciğer Kanserin Tedavisi	12
2.3.1 Karaciğer Transplantasyonu.....	13
2.4 Sorafenib.....	13
2.4.1 Sorafenib'in Genel Özellikleri	14
2.4.2 Sorafenib'in Farmakolojik Özellikleri	15
2.4.3 Sorafenib'in ve Apoptoz Yolağı.....	16
2.5 Alfa Lipoik Asit	19
2.6 TNF- α Ligandı.....	21
2.7 Bax ve Bcl2 Proteinleri.....	23
2.8 Kaspaz Enzimleri	24
2.8.1 Kaspaz-3 Aktivitesi	24
3. MATERYAL VE METOT	26

3.1 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri	26
3.1.1 Kullanılan Cihazlar	26
3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler	27
3.1.3 Kullanılan Kimyasallar	27
3.2 Hücre Kültürü	28
3.2.1 HepG2 Hücrelerinin Çözdürülmesi ve Çoğaltılması	29
3.2.2 Tripan Blue ile Thoma Lamında Hücre Sayımı	29
3.2.3 Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması.....	30
3.3 MTT Yöntemi ile Uygun Dozun Belirlenmesi	31
3.3.1 Alfa Lipoik Asit ve Sorafenib Kombinasyon Doz Uygulaması.....	32
3.4 Komet Yöntemi ile DNA Hasarı	33
3.5 Total RNA ve Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	37
3.5.1 cDNA Sentezi.....	38
3.5.1.1 Primer Dizaynı	39
3.5.2 qRT-PCR (real-time PCR) ile Gen İfade Düzeylerinin Belirlenmesi	39
3.5.3 Total Protein İzolasyonu	40
3.6 ELİSA Analizi	42
3.7 İstatiksel Analiz	42
4. BULGULAR	44
4.1 HepG2 Hücre Hattında ALA ve Sorafenib Uygulamaları.....	44
4.2 HepG2 Hücre Hattında ALA'nın Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	44
4.3 HepG2 Hücre Hattında Sorafenib'in Canlılığına Üzerine Etkisi.....	45
4.3.1 ALA ve Sorafenib Kombinasyonunun HepG2 Hücre Hattı'nda Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi.....	46
4.4 Komet Hasarı Analizi	48
4.5 HepG2 Hücre Hattında ALA, Sorafenib ve Kombinasyon Uygulamasının Gen İfade Düzeylerine Etkisi	49
4.5.1 HepG2 Hücre Hattında Sorafenib, ALA ve Kombinasyon Uygulamasının BAX Gen Ekspresyonuna Etkileri.....	49
4.5.2 HepG2 Hücre Hattında Sorafenib, ALA ve Kombinasyon Uygulamasının BCL-2 Gen Ekspresyonuna Etkileri	50
4.5.3 HepG2 Hücre Hattında Sorafenib, ALA ve Kombinasyon Uygulamasının	

TNF- α Gen Ekspresyonuna Etkileri	51
4.5.4 HepG2 Hücre Hattında Sorafenib, ALA ve Kombinasyon Uygulamasının	
KASPAZ-3 Gen Ekspresyonuna Etkileri	52
4.6 HepG2 Hücre Hattında ALA, Sorafenib ve Kombinasyon Uygulamasının Bax,	
Bcl2, Kaspaz-3 ve TNF- α Protein Düzeyine Etkileri	53
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	57
6. KAYNAKLAR	66



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
CI	: Kombinasyonel Etki Değeri
dk	: Dakika
H₂O	: Su molekülü
ml	: Mililitre
nM	: Nanomolar
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol
RPM	: Dakikada Devir Sayısı
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
°C	: Santigrad derece
ALA	: Alfa Lipoik Asit
AIH	: Otoimmün Hepatit
A1AT	: Alfa 1 antitripsin
APOA1	: Karaciğer kanserinde tanısal biyobelirteç
APOC1	: Karaciğer metastazında biyobelirteç
APOJ	: Karaciğer malignitesini ayıran biyobelirteç
Bax	: Bcl-2 ilişkili X protein
Bcl-2	: B hücreli lenfoma 2 proteini
CLD	: Kronik Karaciğer Hastalığı
DHLA	: Dihidro Lipoik Asit
DMEM Low	: Karaciğer kanseri hücreleri besiyeri
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GSD	: Glikojen Depo Hastalığı
HSK	: Karaciğer Kanseri
HCC-ICC	: Karma tip primer karaciğer tümörü
HH	: Herediter Hemokromatozis
HT1	: Porfiri ve herediter tirozinemi tip 1
HBV	: Hepatit B virüsü
HCV	: Hepatit C virüsü
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IDC	: İnvaziv Duktal Karsinom
IVC	: İnferior vena kava
IC₅₀	: İnhibe edici konsantrasyon 50
iCCA	: İntrahepatik Kolonjiyo Karsinom
KCl	: Potasyum klorür
Kaspaz-3	: Apoptozdan sorumlu efektör protein
MTT	: 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromür
pCEA	: Malign karaciğer kanseri biyobelirteci
PDC	: Pirüvat dehidrogenaz
PPE	: Palmar plantar eritrodisestezi
PARP	: Poli adenzin difosfat riboz
RNA	: Ribo Nükleik Asit

TAM	: Tümör İlişkili Makrofaj
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
tmTNF-α	: Transmembran Tümör Nekroz Faktör Alfa
sTNF-α	: İşlenen Tümör Nekroz Faktör Alfa
TNFR1	: Tümör Nekroz Faktör Reseptör Ailesi, Tip 1
TNFRSF1A	: Tümör Nekroz Faktör Reseptör Ailesi, Tip 1, Üye 1
CD120a	: Tümör Nekroz Faktör Reseptör Ailesi, Tip 1, Üye 2
p55	: Tümör Nekroz Faktör Reseptör Ailesi, Tip 1, Üye 3
TNFR2	: Tümör Nekroz Faktör Reseptör Ailesi, Tip 2
TNFRSF1B	: Tümör Nekroz Faktör Reseptör Ailesi, Tip 2, Üye 1
CD120b	: Tümör Nekroz Faktör Reseptör Ailesi, Tip 2, Üye 2
p75	: Tümör Nekroz Faktör Reseptör Ailesi, Tip 2, Üye 3
TNF-β	: Tümör Nekroz Faktör Beta
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Karaciğer anatomisi (a) arka görünümü ve (b) ve önü	3
Şekil 2.2 Karaciğer kanseri	5
Şekil 2.3 Sorafenib ile tedavide karaciğer kanseri hücrelerin apoptotik ölüm yolları	17
Şekil 2.4 Alfa-Lipoik Asit (6,8-ditiyoktanoik asit) ve ditiyol halkası indirgenen Redükte Alfa-Lipoik Asit	19
Şekil 2.5 Sitokin ve kemokinler gibi proinflamatuvar araçları kodlayan genleri düzenleyen sinyal yolağı	23



ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan HEPG2 Karaciğer Kanseri hücre hattı	29
Çizelge 3.2 HEPG2 hücrelerine uygulanan ALA ve Sorafenib ajanının konsantrasyonları(1)	32
Çizelge 3.3 HEPG2 hücrelerine uygulanan ALA ve Sorafenib ajanının konsantrasyonları(2)	33
Çizelge 3.4 Normal erime noktasına sahip agaroz çözeltisinin (NMA) hazırlanması ..	35
Çizelge 3.5 Düşük erime noktasına sahip agaroz çözeltisinin (LMA) hazırlanması	35
Çizelge 3.6 Lizis çözeltisinin hazırlanması	35
Çizelge 3.7 Nötralizasyon Çözeltisinin hazırlanması.....	36
Çizelge 3.8 Elektroforez tampon çözeltisinin hazırlanması	36
Çizelge 3.9 Etidyum bromür çözeltisinin formülasyonu	36
Çizelge 3.10 cDNA sentezinde kullanılan bileşenlerin miktarları	38
Çizelge 3.11 Ekspresyon seviyeleri belirlenen genler ile bu genler için kullanılan primer dizileri.....	39
Çizelge 3.12 qRT-PCR’da Kullanılacak Reaktifler ve Miktarları	40
Çizelge 3.13 qRT-PCR Protokolü için Sıcaklık ve Zamanlama Bilgileri	40
Çizelge 4.1 Komet Testi DNA Hasarının Belirlenmesi	54

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa

Grafik 4.1 HepG2 hücre hattında 24 ve 48 saatlik ALA uygulamasında % canlılık ...	44
Grafik 4.2 HepG2 hücre hattında 24 saat ve 48 saat Sorafenib ile inkübasyonu sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık.....	45
Grafik 4.3 HepG2 hücre hattında 24 saatlik kombine doz uygulaması sonucu AlfaLipoik Asit'in IC ₅₀ dozunun kontrol grubuna kıyasla etkileşimi ve % canlılık	46
Grafik 4.4 HepG2 hücre hattında 48 saat inkübasyonu sonucu Sorafenib'in IC ₅₀ dozu(20 µM) ile AlfaLipoik Asit'in IC ₅₀ dozu 5 µM konsantrasyonu ve kombinasyon konsantrasyonun kontrol grubuna kıyasla etkileşimi ve % canlılık	47
Grafik 4.5 HepG2 hücre hattında BAX gen ekspresyonunun qRT-PCR ile 24 saatlik (a) ve 48 saatlik gösterimi(b)	49
Grafik 4.6 HepG2 hücre hattında BCL-2 gen ekspresyonunun qRT-PCR ile 24 saatlik (a) ve 48 saatlik gösterimi(b)	50
Grafik 4.7 HepG2 hücre hattında TNF-α gen ekspresyonunun qRT-PCR ile 24 saatlik (a) ve 48 saatlik gösterimi(b)	51
Grafik 4.8 HepG2 hücre hattında KASPAZ-3 gen ekspresyonunun qRT-PCR ile 24 saatlik (a) ve 48 saatlik gösterimi(b)	52
Grafik 4.9 HepG2 hücre hattında Bax protein düzeyinin kontrol grubu ve gruplar arası değişimin sonuçları (a) 24 saat (b) 48 saat	53
Grafik 4.10 HepG2 hücre hattında Bcl-2 protein düzeyinin kontrol grubu ve gruplar arası değişimin sonuçları (a) 24 saat (b) 48 saat	53
Grafik 4.11 HepG2 hücre hattında Tnf-α protein düzeyinin kontrol grubu ve gruplar arası değişimin sonuçları (a) 24 saat (b) 48 saat	54
Grafik 4.12 HepG2 hücre hattında Kaspaz-3 protein düzeyinin kontrol grubu ve gruplar arası değişimin sonuçları (a) 24 saat (b) 48 saat	55

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü'nden (DSÖ) elde edilen verilere göre ölümlerin her altısından birinin kanser nedeniyle olduğu belirtilmektedir. DSÖ ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)'nın kanserin küresel durumuna ilişkin yayınladığı rapora göre 2022'de tahminen 20 milyon yeni kanser vakasının görüldüğü ve kanser nedeniyle 9.7 milyon ölümün yaşandığı bildirilmiştir (GLOBOCAN 2022). Kanser çağımızın en önemli ve acil sorunlarından biri olup kanserin küresel yükü ve kanser insidansı 21. yüzyılda istikrarlı bir şekilde artmaya devam etmektedir. Kanser ikinci sırada en yaygın ölüm nedeni olup, Küresel Kanser İstatistikleri Globacan 2020 Raporu'na göre toplam 19.3 milyon kanser vakası teşhisi ve kanser nedeni 9.9 milyon ölüm olduğu tahmin edilmektedir (Siegel vd. 2021, Baran-Deniz 2022).

Tünel vd. (2012)'ye göre fiziksel olduğu kadar psikolojik ve psikososyal yönleri de olan karmaşık bir hastalık olarak bilinen kanser, günümüzde Türkiye'nin de içinde bulunduğu çoğu ülke arasında kalp hastalıklarından sonra en sık görülen ikinci hastalıktır. Değişen yaşam tarzı ve yaşam süresinin uzaması metabolik komorbidite insidansının artmasına ve kanser prevalansının artışına neden olmaktadır (Hulvat 2020).

Karaciğer kanserinin en yaygın türü olan HepatoSellüler Karsinom HSK'nın, yüksek ölüm oranı ile prevalansı artmaktadır. Dünyada kansere bağlı ölümlerin ise üçüncü nedenini temsil etmektedir. Llovet vd. (2021)'e göre 2025 yılına kadar her yıl 1 milyondan fazla kişinin karaciğer kanserinden etkileneceği tahmin edilmektedir. Dünyada en yüksek karaciğer kanseri insidansı Asya ve Afrika'da görülmektedir. Hepatit C ve B virüsü (HCV ve HBV) olmak üzere farklı etiyolojik ajanların neden olduğu karaciğer hasarı, karaciğer fibrozu ve siroz, HSK gelişimine katkıda bulunmaktadır. Karmaşık patogenez ve moleküler heterojenliği HSK'nın erken teşhisini engelleyerek tedaviyi zorlaştırmaktadır. Yüksek nüks oranı ve 5 yıllık düşük sağkalım oranıyla HSK onlarca yıldır en hızlı artan ölüm oranını göstermektedir (Bai vd. 2019, Fondevila vd. 2019, Siegel vd. 2022).

Karaciğer kanseri ve diğer kanser türlerinin tedavisinde kullanılan ilaçların yan etkileri nedeniyle toksik olmayan, ilaç direncine yol açmayan hedefe yönelik yeni tedavi

protokollerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda alternatif olarak toksik etkileri sınırlı olan doğal etken maddeler kullanılması önerilmektedir. Anti-proliferatif ve anti-anjiyogenik aktiviteye sahip bir multikinaz inhibitörü olan Sorafenib, ileri HSK tanısı olan hastalar için Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan ilk sistemik tedavi ajanıdır. Ancak Sorafenib'in bilinen yan etkileri sebebiyle HSK hastaları, alternatif olarak bazı besin takviyeleri kullanmaya yönelmektedir. Antioksidanlar, kimyasal yapıları nedeniyle zincir yapıyı bozan, serbest radikal temizleyici (serbest radikaller ve metal bağlayıcılar) olarak etki etmektedirler (Liang vd. 2024).

Alfa-Lipoik Asit (tioktik asit, $C_8H_{14}O_2S_2$ - ALA) çeşitli yiyeceklerde bulunan ve vücutta da aerobik metabolizma için sentezlenebilen bir maddedir. ALA ve indirgenmiş formu olan Dihidro-Lipoik Asit (DHHLA) antioksidan özellik göstermektedir. Bu çalışmada oksidatif stres ve glukoz dengesi üzerindeki etkileri nedeniyle de öne çıkan ALA'nın biyolojik etkileri ve klinik öneminin araştırılması hedeflenmektedir. Diyet veya besin takviyelerinden bağımsız olarak ALA, indirgenmiş hali olan DHHLA formuna dönüşür ve karaciğerde bisnorlipoat ve tetranorlipoat gibi farklı metabolitler halinde metabolize edilerek renal olarak atılmakta olup, sodyum, B5 ve B7 vitamini ile birlikte Sodyum Bağımlı Vitamin Taşıyıcı (SMVT) ile taşınmaktadır. SMVT çoğu vitamini taşıdığı için bu vitaminlerin birbiri ile rekabet halinde olmasına neden olmaktadır. ALA'nın fazla alımı B5 ve B7 vitaminlerinin taşınımında sorunlara neden olabilmektedir (Hassan ve Cronan 2011, Najafi vd. 2022).

Mitokondriyal enzimlerde bir kofaktör olarak görev yapan ALA, doğal olarak meydana gelen bir antioksidan olup enerji metabolizmasında kritik rol oynamakta ve burada bulunan enzimleri etkileyerek besinlerin enerjiye dönüşmesine katkıda bulunmaktadır. ALA vücut metabolizması sırasında oluşan bir madde olup, sindirim sistemi ve metabolizma ürünleri grubunda yer almakta ve vücudun metabolik işlevleri üzerinde etkili olmaktadır. Sinir hücrelerinde koruyucu özelliklere (anti-oksidatif) sahip olan ALA ayrıca hücre içi sinyal iletim yollarını etkileyerek anti-inflamatuar özellik göstermektedir. ALA yağda ve suda çözünebilen tek antioksidan olmasından dolayı evrensel antioksidan olarak adlandırılmaktadır (Rimbach vd. 2001, Karaca 2008, Cadenas ve Packer 2010, Milovanovic vd. 2014, Eslampour vd. 2018).

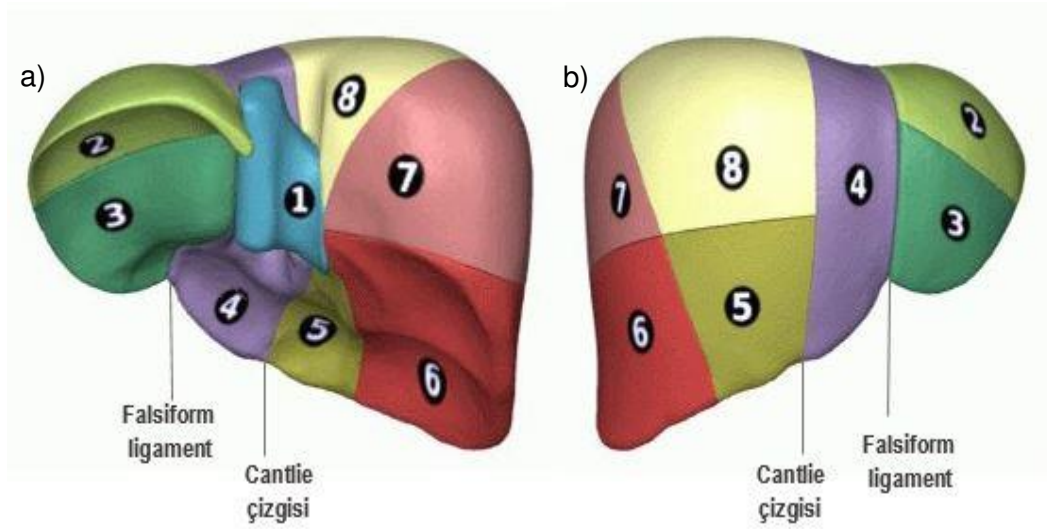
Bu çalışmada ALA'nın farklı kombinasyonlarının HepG2 hücre hattı üzerine sinerjistik, anti-proliferatif ve anti-kanser etkisinin hücre canlılık testi (MTT) ve bazı genlerin ifade düzeylerinin (Tnf- α , Bax, Kaspaz-3 ve Bcl-2) belirlenmesi ve ELISA metodu ile aynı genlerin protein seviyelerinin değerlendirilmesi, bunun yanı sıra Komet testi ile muhtemel DNA hasarının tespit edilmesi amaçlanmakta olup elde edilen verilerin literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Yapılan literatür taramasında HepG2 hücre hattı üzerine Sorafenib ve ALA'nın kombine çalışmasına hiç rastlanılmaması bu tez çalışmasının önemini artırmaktadır. Yapılan çalışma ile elde edilen veriler ilk kez literatüre kazandırılacak olup, kanser tedavi çalışmaları için temel oluşturacağı düşünülmektedir.



2. LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Karaciğer ve Karaciğer Kanseri

Couinaud sistemi, karaciğer anatomisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İsmini hepatobiliyer cerrahi alanında önemli katkıları olan Claude Couinaud'dan almıştır. Karaciğer anatomisinde bulunan sekiz segmentten ilki kaudat lobu oluşturmaktadır ve posteriodur. Burada, doğrudan vücudun en büyük toplardamarı olan inferior vena kava veya posterior vena kavaya ait hepatik venler içermektedir (Jones vd. 2008).



Şekil 2.1 Karaciğer anatomisi (a) arka görünümü ve (b) ve önü (Jones vd. 2008).

Dünya çapında her yıl 19-20 milyon kişiye kanser tanısı konmaktadır. Organı etkileyen orijin, çoğalan hücrelerin türünü tanımlamaktadır. Belirli bir kanser türünün ortaya çıkmasıyla birlikte farklı cinsiyet veya toplumdaki prevalansın arttığı gözlemlenmiştir. DSÖ verilerine göre dünya genelinde her altı ölümden birisi kanser sebebiyle olmakta ve hastalık sebebiyle meydana gelen ölümlerin en yaygın nedenlerinden birinin kanser olduğu rapor edilmiştir (Chhikara ve Parang 2023).

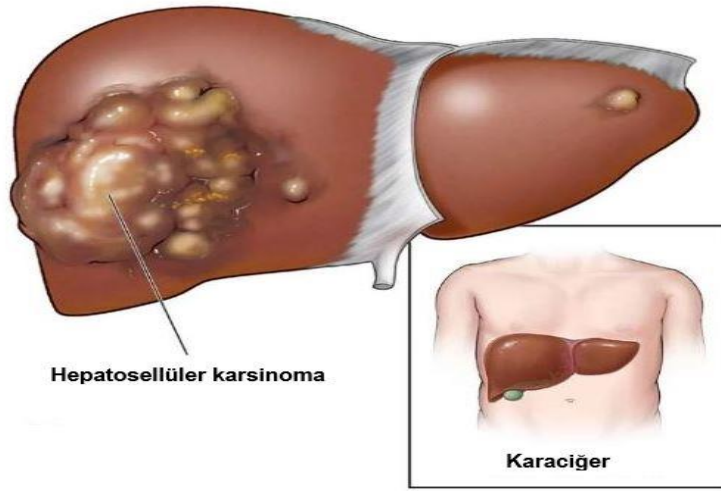
Kanser, hücrelerin anormal ve kontrolsüz çoğalması veya metastazı ile tanınan hastalıkların genel adıdır. Dünya genelindeki en ölümcül hastalıklardan birisidir (Odhav vd. 2003, Barrajon-Catalaan vd. 2017, Singh vd. 2019). DSÖ verilerine göre 2030 yılında 13.1 milyon insanın kanserden öleceği tahmin edilmektedir (Mao ve Xu 2016). HSK, dünya çapında kanser ölümlerinin en yaygın üçüncü nedenini oluşturmaktadır (Hyman

ve Parikh 2007, Asghar ve Meyer 2012). Yaşı veya ırka dayalı önemli bir ayrım olmaksızın dünya çapında kanser ölüm oranlarındaki artış dikkate alındığında, hastalığın insidansını azaltmaya yönelik her türlü çalışma bu konu için sarf edilen çabaya değmektedir (Barrios vd. 2010).

Hücreler bölündükçe, anormal büyüme sağlayabilen ve tümör oluşturabilen mutasyonlar kazanmaktadır. Tümörler ve metastazları, çeşitli hücre gruplarından oluşabilir. Metastatik tümörler, başlangıç kanser hücresinden oldukça farklı fenotip ve genotipe sahip olabilir. Kanser hücreleri vücudumuzun her yerinde oluşabilmektedir ve çok farklı hücre tiplerine sahiptir. Kanser yayıldığı en yaygın yerler kemik, karaciğer ve akciğerdir. İnvaziv Duktal Karsinom (IDC), meme kanseri vakalarının %85'ini oluşturur. İnvaziv duktal meme kanserinin yayılabileceği en yaygın uzak alanlar kemikler, akciğerler, karaciğer ve beyindir (National Breast Cancer Foundation 2024).

Tarih boyunca canlı yaşamını tehdit eden ve ortak olarak en sık görülen problem kanser olmuştur. Kelime olarak ilk defa, Hipokrat tarafından Latince yengeç anlamına gelen “Cancer” kelimesinden türetilmiştir. Tümörün etrafındaki şişmiş damarlar ise yengecin bacaklarına benzetilmiştir. Bugüne kadar denenmiş ve hala devam eden farklı kanser tedavi yöntemlerinin temel sebebi, her insanın farklı bir DNA'ya sahip olmasıdır (Baykara 2016).

Kanser tüm ülkeler açısından halk sağlığını tehdit eden ve ekonomi üzerinde ciddi bir yük oluşturan oldukça önemli bir küresel sorundur. Moleküler düzeyde heterojen bir hastalık olan HSK, hepatositlerde meydana gelen ve karaciğerin ana hücre tipini etkileyen malignitesi yüksek bir kanser tipidir. Dünya çapında kanserler arasında beşinci sırada olan karaciğer kanseri, kanser türleri arasında ise en sık görülen türdür. Genellikle DNA hasarı ve genetik mutasyonların sonucu oluşur. Kemoterapi ilaçları ile tedavinin sonrasında ise hücre yenilenme sürecinde mutasyon birikimine zemin hazırlamaktadır. Kanser öncüsü heterojen lezyonlar komplekstir. Karaciğer karsinogenezi, onlarca yıl süreyle genetik değişiklikleri biriktiren ve nihayetinde malign formasyona dönüşen uzun vadeli bir hastalık olarak kabul edilir (Taheriazam vd. 2023). HSK'a ait şematize edilmiş görsel Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2 Karaciğer kanseri (ESMO Aucejo 2021).

Metastatik hastalık patogenezi ile ilişkili lipit metabolizmasındaki anahtar enzimler söz konusudur. Enzimler çalışmazsa, sindirim işlevini ve dolayısıyla enerji metabolizmasını baştan etkilemektedir. Elektroforezde anot tarafına yürüme sırasına göre LD1 (H4), LD2 (H3M1), LD3 (H2M2), LD4 (HM3) ve LD5 (M4) olarak adlandırılmaktadır (Tatlısöz 2023). Karaciğer hastalıklarında LD değişiklikleri açısından değerlendirildiğinde, karaciğer dokusu en fazla LD5 izoenzimi ihtiva ettiğinden, karaciğer dokusunda hasar meydana getiren hastalıklar en fazla bu enzim aktivitesinde artış meydana getirmektedir. Malign karaciğer hasarı olan kanserlerin %70 kadarında, karaciğer metastazı olmayan kanserlerin ise %20-60 kadarında LD aktivite artışı görülmektedir (Feng vd. 2018, Serrano-Lorenzo 2021).

Karaciğer; primer veya sekonder olarak vasküler, metabolik, enfeksiyöz ve malign süreçlerle sıklıkla etkilenen bir organdır. Benign karaciğer tümörleri genel popülasyonda sık görülen, bireylerin %9 ile %20'sinde rastlanabilen bir hastalıktır. Bu tümörlerden bazıları tamamen iyi huylu bir doğal geçmişe sahiptir ve rezeke edilmeleri gerekmez. Bazıları ise büyüme, kanama veya malign dönüşüm riski taşır ve ameliyatla çıkarılmalıdır. Kalıtsal özellikler malignitelerin %5-10'una neden olurken, çevresel değişkenler veya bunların bir kombinasyonu veya ikisinden biri malignitenin %90-95'ine neden olmaktadır (Kunnumakara vd. 2008, Kartal ve Hamaloğlu 2016).

Kanser hücrelerinin genomik kararsızlığı tümör heterojenitesinin temelini oluşturan genetik çeşitliliğe sebep olmaktadır. Farklı hastalarda gelişen aynı kanser tipleri veya aynı tümörü oluşturan farklı kanser hücresi klonları arasında genetik veya epigenetik değişiklikler gözlenmektedir. Kanser dokusunda, zaman ilerledikçe çeşitli moleküler mekanizmalar sonucu tedavi duyarlılıkları değişkenlik gösterebilmektedir ve farklı hücresel klonlar gelişmektedir. Tümör heterojenitesi tedaviye direnç mekanizmalarının en önemli bileşenlerindendir. Daha heterojen ve daha kararsız bir genoma sahip kanserler daha agresif bir seyir ve daha kısa sağ kalımlarla ilişkilidir (Lawrence vd. 2017).

Kansere bağlı olarak hastalığın oluşumu ve kanser kaynaklı ölümler, risk faktörleri maruziyetine kalmadaki değişimlerine bağlı olarak meydana gelmektedir. DSÖ verilerine göre kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünyada en fazla görülen ölüm nedenidir. Özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde 2030 yılına kadar 20 milyondan fazla yeni kanser vakasının görülmesi beklenmektedir. Kanser; epidemiyolojik olarak iki şekilde kategorize edilebilir. Birinci kategori, cinsiyet, yaş, sosyo-ekonomik koşullardaki değişikliklere bağlı olarak, ikinci kategori ise analitik çalışmalardan elde edilen verilerden ortaya çıkmaktadır (Nalbant 2023).

Primer hedef organı karaciğer olan aflatoksinler, insanlar için bilinen karsinojenler arasında yer alan ve en güçlü doğal karsinojenlerden biri olarak kabul edilen grubu oluşturmaktadır. *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* küflerinin oluşturduğu toksik maddelerdir. İnsanlarda ve hayvanlarda karaciğer kanserine neden olmaktadır. Ayrıca Kronik Hepatit B ve Hepatit C virüsleri tarafından oluşturulan enfeksiyonlarda aflatoksinler sinerjistik etkiler meydana getirebilir. Aflatoksin maruziyeti açısından sağlıklı bir bireyle kronik hepatit hastası bir birey karşılaştırıldığında, kronik hepatit hastasının 30 kat yüksek karsinojenisite riski taşıdığı rapor edilmiştir. Aflatoksin B1, en yüksek toksisiteye sebep olan aflatoksin türüdür. Aflatoksin B1, mikotoksin grubunun en güçlü hepatokarsinojen, teratojen ve mutajeni olarak kabul edilir. Genlerde meydana gelen ve biriken mutasyonlar kanserleşmenin en önemli sebebi olmaktadır. Hücresel savunma mekanizması ise DNA tamir sistemlerine bunu onarması için görev yüklemektedir. Kalıtsal kanserlerde, DNA tamir sistemlerini hedef alan PARP inhibitörleri ile tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır (Jalili ve Scotter 2015, Kuca vd. 2021).

2.1.1 Karaciğer Kanseri Evreleme

Karaciğer tümörleri primer benign, primer malign ve sekonder (metastatik) tümörler olarak üç başlık altında incelenmektedir. Primer malign tümörlerin %70'ten fazlasını HSK, %14'ünü kolanjiokarsinom ve geri kalanını mezenkimal tümörler oluşturur (Demirci vd. 1997).

Primer karaciğer kanseri üç ana histolojik alt tipe ayrılabilir. Bunlar; HSK, İntrahepatik Kolanjiyokarsinom (iCCA) ve Karma Tip (HCC-ICC)'dir. Bu alt tipler epidemiyoloji, klinikopatolojik özellikler, genetik değişiklikler ve klinik yönetim açısından farklılık gösterir. Histopatolojik tip tayini konusunda morfolojik özellikler yanı sıra immünohistokimyasal profil de önemlidir. Prognostik modellemede HSK karmaşıktır, çünkü siroz vakalarının %80'i kadarında rol oynar. Tümör özellikleri ve fonksiyonel hepatik rezervle ilgili faktörler dikkate alınmalıdır. Ana prognostik faktörler kısmen bilinmektedir ve hastalığın farklı evrelerinde değişiklik gösterir (Susilawati vd. 2021, Harputluoglu vd. 2023).

2.1.2 Karaciğer Kanseri Etiyolojisi ve Epigenetik

Epigenetik etkenler; kanser ve kronik metabolik hastalıkları da içeren çeşitli hastalıkların etiyolojisinde rol oynamaktadır. Epigenetik düzenlenmenin önemli bir dalını oluşturan RNA modifikasyonları, RNA'ya çoğunlukla metil grubunun eklenmesi ile oluşan, geri dönüşümlü kimyasal bir değişim olarak tanımlanır. DNA metilasyonu, DNA dizilerinde metil grubu bağlanmış sitozinleri ifade etmekte olup, enzimatik olarak gerçekleştirilmektedir. RNA moleküllerinin birbirine bağlanması ve etkileşimi "Epigenetik Hastalıklar" ve gen ekspresyonunun kontrolünde görevlidir. DNA metilasyonu ise gen ekspresyonu ve kromatin paketlenmesinde önemli rolü olan epigenetik değişiktir. Ancak DNA ile ilgili bu bilgi yine de gen düzenlenmesinin altında yatan mekanizmaları ve buna bağlı olarak hastalığın gelişim sürecini tamamen açıklayamamaktadır (Doğan ve Aktaş 2016, Ayaz vd. 2019, Mongelli vd. 2024).

Kronik Karaciğer Hastalığı, siroz ve HSK'nın etiyolojik eğilimi dünya genelinde zamanla değişmiştir ve yaşlanma ile SIRT1 (Sirtuin-1) ekspresyonunun azalması, karaciğer

hücreleri ve stellat hücrelerde alkolik karaciğer hasarını ve fibrozu şiddetlendirmektedir. SIRT1'in gluko metabolizmi glukoneogenezise doğru yöneltmek amacıyla, hepatosit içindeki FOXO1 faaliyetinin dozunu artırarak hepatik glukoneogenez düzenlenmesinde görev alır. SIRT1, dört adet bilinen FOXO proteinlerinden üçünü Foxo1, Foxo3a ve Foxo4'ü deasetilize eder. SIRT1 apoptoza neden olan stresi düşürerek ve DNA onarımını düzenleyerek, nöronlardaki ve fibroblastlardaki Foxo3a'yı etkilemektedir (Pacher vd. 2017, Kerse-Yeşil 2024).

Literatüre göre, Avrupa ve ABD'de sirozun en sık nedenleri hepatit C virüsü enfeksiyonu, alkol kullanımı ve non-alkolik yağlı karaciğer hastalığıdır. Asya ve Afrika ülkelerinde ise hepatit B enfeksiyonu en yaygın nedendir. Alkol tüketimi Batı toplumunda Kronik Karaciğer Hastalığı'na (CLD) en büyük katkıda bulunanlardan biri olmaya devam etmektedir (Poordad 2015, Gines vd. 2021, Kerse-Yeşil 2024).

2.1.3 Karaciğer Kanseri Epidemiyolojisi

Ülkemizin de arasında bulunduğu Dünya istatistiklerine göre 2022 yılı kanser insidansı projeksiyonunda ölüm verileri %9.6 karaciğer kanseri olarak öngörülmektedir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından elde edilen verilere göre Dünya genelinde 185 ülkede araştırılan 36 çeşit kanserden karaciğer kanserine yakalanma oranı hızla artmıştır ve mortaliteyi büyük ölçüde etkilemiştir. Türkiye coğrafi, kültürel, ekonomik ve sosyal farklılıkların gözlenebildiği ülkelerden biridir. Ülkemiz genelinde karaciğer ve karaciğer kanseri sadece genetik yatkınlıkla açıklanabilen bir hastalık değildir; safra hastalıklarının yanı sıra uzun süre kullanılan toksik ilaçlar ve beslenme (mantar zehirlenmeleri) ile gelişebilen bir hastalık türüdür. Dahası solunan hava, yaşanılan çevre şartları, sedanter yaşam şekli, teknolojik gelişmeler ile ilişkilidir (Koca 2021, Trevisani Stefanini ve Lani 2024, Danpanichkul vd. 2024).

Kanserli hastaların bakımı ve tedavisi, diğer hastalıklar gibi dünyamızdaki eşitsizlikleri yansıtmaktadır. Kapsamlı tedavinin, yüksek gelirli ülkelerin %90'ından fazlasında, düşük gelirli ülkelerin ise %15'inden azında verildiği bildirilmektedir. Kanser teşhisi konan çocukların hayatta kalma oranı, yüksek gelirli ülkelere %80'den fazla, düşük ve orta

gelirli ülkelerde ise %30'dan daha azdır. Yakın tarihli bir DSÖ araştırması, kanser hizmetlerinin devlet tarafından kapsayıcılığının yüksek gelirli ülkelerdeki en az %78'e kıyasla, düşük ve orta gelirli ülkelerde %37 olduğunu göstermiştir. Kanser teşhisinin özellikle düşük gelirli ülkelerde, COVID-19 pandemisinin de arttırdığı etkiyle de katlanarak, aileleri yoksulluğa itme potansiyeline sahip olduğu anlamına gelmektedir (World Health Organization, 2022).

2.1.3.1 Karaciğer Kanseri Genetik Yatkınlık

Çevresel faktörler kadar genetik bir takım değişiklikler de HSK riskini arttırmaktadır. Otoimmün hastalıkların temel sebebi genetik yatkınlık ve artmış toksin temasıdır. Erişkin dönemde meydana gelen HSK vakalarının çoğu, altta yatan genetik durumun ikincil bir sonucudur. Meydana gelen bu genetik değişimler yatkınlığa bağlıdır. Genellikle HSK gelişimi için ikincil bir risk faktörü ile etkileşim gereklidir. Doğuştan gelen karaciğer hastalıklarında bazı çocuklar, doğumdan itibaren karaciğerle ilgili genetik veya metabolik bozukluklar nedeniyle siroz geliştirebilir. Alfa-1 Antitripsin eksikliği, Wilson hastalığı, Otoimmün Hepatit gibi durumlar görülmektedir. Genetik yatkınlığa bağlı olarak meydana gelen HSK meydana getirebilecek hastalıklar, Alfa-1 Antitripsin (A1AT) eksikliği, Otoimmün Hepatit (AIH), Herediter Hemokromatoz (HH), Glikojen Depo Hastalığı (GSD), Porfiri ve Herediter Tirozinemi Tip-1 (HT1) olarak sayılabilir (Chidambaranathan-Reghupaty vd. 2021).

2.2 Hepatosellüler Karsinom ve Tirozin-kinazlar

Antikanser ilaçlar etki mekanizmalarına göre dokuz farklı sınıfa ayrılmıştır. Biyolojik yolakları etkileyerek kanser hücrelerine seçicilik gösteren hedeflenmiş yeni tedavi yöntemleri, terapötik olarak düşük toksisite ile tedavi imkanı sağlamaktadır (Alberts vd. 2008). Tirozin kinaz inhibitörleri, insan hücresinde sinyal iletimine dahil olan enzim ailesi olup, hücre fonksiyonlarının bozulması sonucu anormal hücre aktivitesine neden olmaktadır. Kanser başta olmak üzere immünolojik, nörolojik, metabolik ve enfeksiyon hastalıklarına neden olmaktadır. Son yirmi yılda FDA tarafından 52 adet küçük molekül ağırlıklı tirozin kinaz inhibitörü ilaç onaylanmış ve kanser tedavisinde başarılı sonuçlar

alınmıştır (Roskoski 2020). İmatinib (STI571) ve Sorafenib gibi tip 2 inhibitörler allosterik bölgeye bağlanmaktadır (Thomson vd. 2023).

Sitokinler; büyüme faktörleri ve hormonlar, tirozin kinazlar ile birlikte hücrel cevapta rol almakta ve hücre proliferasyonu, anjiyogenez, hücre büyümesi, doku invazyonu ve stromal büyüme gibi çeşitli mekanizmaları kullanmaktadır. Hormonların, büyüme faktörlerinin veya bunların reseptörlerinin aşırı ifadesi, tirozin kinaz reseptörlerinin yoğun aktivasyonu ile sonuçlanabilir (Posner vd. 1994). Vasküler endotelial büyüme faktörü olarak görev yapan tirozin kinaz inhibitörleri tercih edildiğinde kan damarları anjiyogenez yoluyla kanser hücrelerine göre yeniden şekillenir. Tirozin kinazlar ise anjiyogenez neden olan ve kanser hücreleri tarafından ifade edilen vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF) yönlendirmektedir. Tirozin kinaz inhibitörleri, tirozin kinazların katalizlediği protein fosforilasyonunu engelleyerek hücre döngüsünü durdurmakta ve kanser hücrelerinin apoptozunu sağlamaktadır. Bu bakımdan tirozin kinaz inhibitörleri terapötik tedavi amacıyla kullanılır (Hong vd. 2014, Gurkan-Alp ve Bozca 2019).

2.2.1 İnsan Hepatosellüler Karsinomu (HepG2) ve İnflamasyon

Kronik inflamasyon bağışıklık sisteminin bozulması ve vücudun savunma sisteminin kendisine saldırmasına neden olmaktadır. Çevresel yollardan uzun sürelerle tahriş edicilere maruz kalmak kanser oluşumu ile ilgili inflamasyon sebebi olarak bilinmektedir. Oluşan bu inflamatuvar cevap; tümör ilerlemesinde, anjiyogenez oluşumunda, bölgesel immün yanıtın baskılanmasında ve metastatik yayılımda oldukça etkili olup, tüm bu değişikliklerle birlikte genomik kararsızlık da artış göstermektedir. Gerçekte iç ve dış uyaranlara karşı oluşturulan inflamasyon, organizmanın oluşturduğu tepki olup bu uyaranları elimine ederek dokusal homeostaziyi sağlamaktadır. Bu homeostazi durumu ortadan kalktığında uyaranlar serbest hale gelmekte, lökosit hareketliliği ve sızıntılara neden olmaktadır. Hücre yaşlanması ve DNA hasarının artışı, inflamasyonu kronik hale getirerek kanser oluşumuna neden olduğu yapılan farklı çalışmalarla belirlenmiştir (Yıldırım 2019, Ghalehbandi vd. 2023, Körez vd. 2025).

DNA’da oluşan bu değişikliklerin oksidatif hasarı artırmasıyla 8-OHdG (8-hidroksi-2’-deoksiguanozin) meydana gelmekte ve bu hidroksil radikalleri guanin üzerinde etkileşerek oksidasyon oluşturmaktadır. Yine meydana gelen bu oksidatif stres, DNA üzerinde “DNA-protein” çapraz bağları meydana getirmektedir (Kurland vd. 1995, Jelic vd. 2021).

2.2.1.1 Akut ve Kronik İnflamasyon

Akut inflamasyon genellikle kısa sürede meydana gelen ciddi bir inflamasyon hali olarak tanımlanabilir. Akut iltihaplanmalarda süre 2 haftanın altındadır ve belirtiler oldukça hızlı şekilde gelişmektedir. Yeni başlangıçlı hastalık ve yaralanmalarda oluşan inflamasyon, akut inflamasyondur. İnflamasyon, fizyolojik olarak doğal immün sistemin çeşitli nedenlerle oluşan akut doku hasarına karşı meydana gelen yanıtıdır. Meydana gelen immün yanıt ile karaciğer kanseri baskılanabilmekte ancak bazı durumlarda oluşan bu immün yanıt meydana gelen inflamasyonda artışa da neden olabilmektedir (Mantovani ve Pierotti 2008). Karaciğer kanseri oluşumunda meydana gelen inflamasyonda sitokinler, interlökinler ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) gibi moleküller yer almaktadır (Dranoff 2004).

Karaciğer kanserine neden olan en önemli inflamasyon kronik inflamasyon olup, genellikle hepatit B virüs enfeksiyonu tarafından oluşturulmaktadır. Mevcut terapötikler hepatit B virüs enfeksiyonu ve hastalığın ilerlemesini kontrol etmede etkilidir. Ancak kapalı dairesel DNA olarak bilinen çekirdek içi replikatif ara madde nedeniyle etkili tedavi gerektirmektedir (Yang vd. 2024).

2.3 Karaciğer Kanserinin Tedavisi

Karaciğer kanseri tedavisi için farklı tedavi yaklaşımları ve terapötikler geliştirilmiş olmakla birlikte, bu hastalık maalesef dünya çapında meydana gelen ölümlerin halen önde gelen nedenlerinden biridir. İmmünoterapi, radyasyon terapisi, kemoterapi gibi tedaviler yüksek sitotoksisite, spesifikite eksikliği ve tedavi sürecinde meydana gelen çoklu ilaç direnci gibi sınırlamalar sebebiyle beklenen başarı seviyesine ulaşamamıştır. Bu nedenle

yan etkilerin azaltılarak etkin bir tedavinin gerçekleştirilebilmesi için hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır (Öztürk ve Bozdağ-Pehlivan 2024).

Hedefe yönelik terapi, kanser hücrelerinin nasıl büyüdüğünü, bölündüğünü ve yayıldığını kontrol eden proteinleri hedef alan bir kanser terapisi türü olup hassas tıbbın temelini oluşturmaktadır (Bakay-İlhan 2023).

2.3.1 Cerrahi Rezeksiyon

Cerrahi rezeksiyon, erken evre karaciğer kanseri olan uygun hastalar için potansiyel olarak küratif bir tedavi seçeneğidir. Bununla birlikte, büyüklük, yerleşim ve sayı gibi tümör özellikleri önem taşımaktadır. Siroz varlığı ve eşlik eden altta yatan karaciğer fonksiyon bozukluğunun derecesi ve portal hipertansiyon, rezektabilitenin merkezi belirleyicileridir. Sentetik disfonksiyon yokluğunda genellikle rezeksiyon düşünülmektedir (Yang ve Heimbach 2020).

2.3.2 İleri Evre HSK ve Terminal Evre HSK

Karaciğer kanserinde ilgili semptomlar, vasküler invazyon veya ekstrahepatik yayılım gösteren HSK' nın ileri aşamada olduğu kabul edilmiştir. Bu aşama için tedavi önerisi oral Sorafenib tedavisi kullanılmasıdır. Sorafenib uygulamasından sonra sağkalımdaki iyileşmelere rağmen, HSK' nın bu evresine sahip hastalar için prognoz hala zayıftır. İleri evre karaciğer kanserinde, sistemik tedavi yöntemi ile immün kontrol noktası inhibitörü olan immünoterapiler ve hedefe yönelik tedaviler yetersiz kalmaktadır. Oral Sorafenib ile tedavi medyan genel sağkalım oranı 6.5-10.7 aydır. Aynı zamanda çoklu kinaz inhibitörü olan Regorafenib veya Sorafenib gibi hedefe yönelik tedavilerin, tümörün agresif seyrini hafiflettiği ve tümör progresyonu olan hastalarda plaseboya kıyasla sağkalımı 7.8'den 10.6 aya yükselttiği belirtilmiştir (Yarchoan vd. 2019, Yang ve Heimbach 2020). Terminal evre HSK, fiziksel kapasitede ciddi bozulma ve karaciğer yetmezliği, vasküler invazyon veya ekstrahepatik yayılma ile ilgili semptomları içermektedir. Bu aşamada sadece semptomatik tedaviler mevcuttur ve medyan sağkalım 3 ayın altındadır (Hoffmann vd. 2012).

2.3.3 Karaciğer Transplantasyonu

Ülkemizde ilk karaciğer nakli 1988 yılında Haberal ve ekibi tarafından kadavradan gerçekleştirilmiştir. Canlı donörden ilk karaciğer nakli ise yine Haberal vd. tarafından 1990 yılında 10 aylık bir çocuğa annesinden organ alınarak yapılmıştır. Komplikasyonlar hem nakil sırasında hem de nakilden sonra ortaya çıkabilmektedir. Nakil sonrası erken dönemdeki ana komplikasyonlar greftin işlevi (disfonksiyon ve rejeksiyon), cerrahi teknik, enfeksiyonlar (bakteriyel, fungal veya viral) veya sistemik problemler (pulmoner, renal veya nörolojik) ile ilgilidir. Günümüzde gelişen immün supresif tedaviyle birlikte çoğu nakil merkezinde sağkalımın arttığı görülmektedir. Komplikasyon riski düşük olan hastalarda gereksiz yere yüksek immünosupresyon seviyesinden kaçınmak, rejeksiyonu daha erken saptamak ve sonunda uzun süreli greft sağkalımını sağladığı bulunmuştur (Telatar vd. 1992, Argani 2020).

2.4 Sorafenib

HSK hastalarının tedavisinde kullanılmak üzere Sorafenib terapötik ajanı 2007’de FDA ve Avrupa Komisyonu tarafından onaylanmıştır (Ricci vd. 2008, Manavoğlu ve Avcı 2011, Gadaleta-Caldarola vd. 2015). Strumberg (2005)’e göre Sorafenib, insanlarda HSK ile böbrek, diğer karaciğer kanserleri ve tiroid kanseri olan hastaların tedavisinde endikedir. Yapılan çalışmalar Sorafenib’in, hastalığın ilerlemesini geciktirme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Ladu vd. 2006, Cucchetti vd. 2018).

Oral küçük moleküler bir inhibitör olan Sorafenib (BAY 43-9906, Nexavar®), HSK tedavisi için onaylanmış ilk sistemik tedavidir. Sorafenib uygulaması hem hücrelerde rh123 birikimini hem de P-gp gen ekspresyonunu anlamlı olarak azaltmaktadır. Sorafenib, trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü- β (PDGFR β), Raf ailesi kinazları (c-Raf) ve vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörlerini (VEGFR1, 2, 3) hedef alan multikinaz bir inhibitördür. İleri evre HSK hastaları için klinik olarak desteklenmekte ve Dünya kanser verilerinde kabul gören birinci basamak sistemik tedavi olmaya devam etmektedir (Dönmez-Çakıl vd. 2022, Cai vd. 2023).

Padowski ve Pollack (2010)'a göre, P-gp temel taşıyıcı sınıfında yer almaktadır. P-gp (permeabilite glikoprotein) taşıyıcıları, ABC (ATP-bağımlı kaset proteinleri) süper ailesindeki en iyi karakterize edilen taşıyıcılardır ve çok önemli bir role sahiptir. P-gp taşıyıcıları, ilaçların plazma zarı boyunca akışı düzenleyen zara bağlı proteinlerdir. Hücrelere girişi bloke ederek veya kolaylaştırarak serum ilaç serilerini etkilemekte ve hücre zarında bulunmaktadır. Kolon karsinomu ve hepatik hücreler gibi hücrelerde P-gp aktivitesi belirlenmektedir (Bolla vd. 2018). *In vitro*, membran potansiyelini ölçmek ve taşımanın hızını ve yönünü belirlemek için genellikle su içinde bir izleyici olarak rh 123 (rodamin 123) kullanılır. Membranda, rh 123'ten faydanılarak Sorafenib'in transport protein p-glikoproteini (P-gp) inhibe ettiği gösterilmiştir (Nanayakkara vd. 2019, Szatmari ve Ducza 2023).

2.4.1 Sorafenib'in Genel Özellikleri

Sorafenib, *in vitro* ve *in vivo* anti-proliferatif ve anti-anjiyojenik özellikler sergileyen bir multikinaz inhibitörüdür. Sorafenib'in eliminasyonu için gerekli yarı-ömür 25-48 saat civarındadır. Sorafenib'in plazmada dolaşan esas metaboliti, piridin N-oksit, Sorafenib ajanına benzer bir *in vitro* potens gösterir. Bu metabolit kararlı durumda dolaşımdaki metabolitlerin yaklaşık %9-16'sını oluşturur. İlacın farmakokinetiği incelendiğinde biyoayarlanımı %38-49 aralığındadır. Sorafenib'in insan plazma proteinlerine *in vitro* bağlanması %99.5 düzeyindedir (Lin vd. 2020, Hatip ve Bölükbaşı-Hatip 2021).

Sorafenib 7.4 pH değerinde çözünmektedir. Ancak 5 gibi bir pH aralığında daha hızlı salım sergilemektedir. HSK'nın, genetik heterojenliği nedeniyle başlangıçta Sorafenib'e birincil düzeyde dirençli olduğu kabul edilmektedir (Zhu vd. 2017).

2.4.2 Sorafenib'in Farmakolojik Özellikleri

Sorafenib (NEXAVAR®, 200 mg) terapötik ilacı etken maddesi 274 mg Sorafenib tosilat içermektedir (Gökmen ve Hacıoğlu 2022, Kalyuzhnyy vd. 2022). Sorafenib temel olarak tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Ancak organ fonksiyon bozukluğu varlığında dozlama ve toksisite yapılan araştırmaların zayıf yönlerini göstermektedir. Sorafenib'in antiproliferatif aktivitesi farklı tümör tiplerinde değişkendir. Sorafenib, büyük ölçüde

tümör proliferasyonuna aracılık eden onkogenik sinyal yollarına bağlıdır. Sorafenib'in ayrıca çeşitli tümör hücre hatlarında apoptozu indüklediği ve doğrudan etkilediği bilinmektedir. *In vitro* çalışmalar aynı zamanda bağışıklık hücrelerini de doğrudan etkilemektedir (Li vd. 2024).

Sorafenib'in yan etkileri arasında hipertansiyon, renal toksisite, arteriel tromboembolizm, kanama, kardiyak toksisite, tiroid disfonksiyonu, el-ayak sendromu, döküntü, kaşıntı, alopesi, yara iyileşmesinde gecikme, hepatotoksisite, toksik-metabolik ensefalopati ve kas kaybı sayılabilmektedir. Sorafenib ile terapötik tedavi sürecine başlamadan önce hipertansiyon öyküsü gibi risk faktörleri olan hastalarda kullanımına dikkat edilmektedir (Şahin-Tırnova 2017).

Kemoterapi ilaçları arasında tirozin kinaz inhibitörleri kullanılarak tedavi edilen hastalarda yaygın bir şekilde Palmar-Plantar Eritrodizestezi (PPE) ile karşılaştıkları bildirilmiştir. PPE sendromu olarak bilinen el-ayak deri reaksiyonu (%35 oranında) ve döküntü Sorafenib'e bağlı en yaygın yan etkileri oluşturmaktadır. Genel olarak Sorafenib ile tedavinin ilk altı haftası içinde ortaya çıkmakta ve doza bağlı olarak da parmak izi kaybına da neden olabilmektedir (Zhao vd. 2020). Demirkan ve diğerleri, (2017) Sorafenib ile ilişkili el ayak sendromu olan hastalarda nemlendiriciler, topikal veya sistemik steroidler, % 0.1 tazaroten krem, nikotin bandı, E vitamini, piridoksin ve şiddetli reaksiyonlar için siklooksijenaz inhibitör tedavileri önerilmektedir (Demirkan vd. 2017). Kadın cinsiyet ve doz seviyeleri sendromun gelişmesinde risk faktörü olarak belirlenmektedir. Çoklu kinaz inhibitör tedavilerinde kemoterapötik ajan kullanımı ile el-ayak deri reaksiyonu açısından risk faktörü kadın cinsiyet, tedavi öncesi normal sınırlarda beyaz kan hücresi sayısı, karaciğer metastazı ve etkilenen organ sayısıdır (Miller vd. 2014, Cisar vd. 2018, Oral-Öğretici ve Dere 2023). Özellikle kanser tedavisi gören kadınlarda oluşan PPE'nin yaşam kalitesini, kadının imajını, cinselliğini ve özellikle zihinsel sağlığını ciddi bir şekilde etkilediği ileri sürülmüştür (Ferreira, Ramseier ve Leventhal 2019, Barrui vd. 2023).

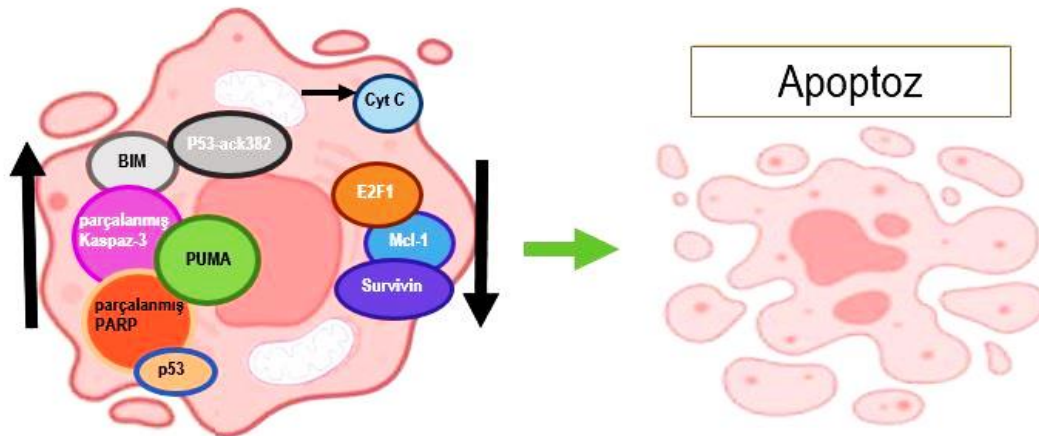
Klein vd. (2008)'e göre, Sorafenib'in kanser hastaların tedavi sürecinin ötesinde, pulmoner hipertansiyonun bazı temel patolojik özelliklerini geri kazandırabildiğini

göstermektedir. Semptoma sahip hastalar ve karaciğer transplantasyon adaylarında portopulmoner hipertansiyona dikkat edilmesi gerekmektedir (Schäfer vd. 2008, Goh ve Chang 2024).

Karaciğer kanserinde Sorafenib ileri evre kanser hastalarında kullanılmaktadır. Karaciğer kanseri hücrelerin çoğalmasını kontrol altına almak amacıyla Sorafenib'in sitotoksik etkisinden yararlanılır. İleri evre karaciğer kanseri hastalarının sağkalım oranı ile ilgili olarak tedavide kesin bir yanıt olmamasına rağmen, tümör boyutunda azalma belirtilmiştir (Abdel-Rahman 2013). Bu nedenle, erken evre tanı alan hastalarda cerrahi uygulamaların yanında Sorafenib uygulanması karaciğer kanseri hastalarında sağkalım süresinin 19-20 ay, orta evrede tanı alan ve rezeksiyon yapılamayacak hastalarda Sorafenib sağkalım süresini 1 yıla kadar uzattığı belirtilmektedir. Son evredeki hastalarda ise Sorafenib tek tedavi yolu olup hastaların sağkalımını 3-4 ay uzatabilmektedir (El-Serag vd. 2008, Di-Bisceglie vd. 2008, Ghasoub vd. 2015, Forner vd. 2018, Rashed vd. 2020).

2.4.3 Sorafenib ve Apoptoz Yolağı

İnsan HSK hücre hattında Sorafenib ajanının etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, antikanserojen aktivite sergilediği bilinen Sorafenib'in *in vitro* uygulamalarda doz ve zamana bağlı artan bir sitotoksik etkiye sahip olduğu ve hücrel apoptozu uyardığı belirtilmektedir (Chen vd. 2010). Şekil 2.3'de Sorafenib'in indüklediği apoptoz yolları gösterilmektedir.



Şekil 2.3 Sorafenib ile tedavide karaciğer kanseri hücrelerin apoptotik ölüm yolları

Sorafenib ajanının; apoptoz, otofaji ve demir bağımlı programlanmış hücre ölümü ferroptoz ile litik bir programlanmış hücre ölümü olan piroptozu indüklediği gösterilmiştir. İnsan karaciğer kanserinde Sorafenib ajanı, kemoterapide Bcl-2'nin proapoptik üyeleri olan BIM, PUMA ve P53-ack382, parçalanmış Kaspaz-3, poli-ADP riboz olan PARP ve tümör oluşumunda koruyucu olan p53 aktivitesini upregüle yapabiliyorken, Bcl-2'nin anti-apoptik üyesi MCL-1 (Miyeloid hücreli lösemi 1), apoptoz inhibitör protein ailesinin (IAP) bir üyesi Survivin ve E2F1 mRNA'ların downregüle olabildiği gösterilmiştir (Franco-Juarez vd. 2024).

Enzimatik komplekslerin monomerik alt birimi olan sitokrom C (Cyt C) hemoprotein, apoptotik proteaz olan CED-4'ün memeli homologu APAF-1 proteini ve ATP'nin katılımıyla apoptozom kompleksi oluşmaktadır. Apoptozom kompleksi pro-Kaspaz-9'un aktifleşmesi ile başka efektör kaspazların aktivasyonu gerçekleşmektedir. Aynı zamanda WD-40 tekrar alanında Cyt C, apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1 olan APAF-1'i konformasyonel olarak değiştirmektedir. Ancak dATP ve sitokrom C'nin APAF-1'e bağlanması inhibitör etkiyi ortadan kaldırması olarak görülmektedir. Abusaliya vd. (2024), karaciğer kanserinde apoptozis için sinyal alındıktan sonra DNA parçalanması, fosfotidil serin pozitif moleküllerin hücre membranının dış yüzeyine çıkması önemli bir biyobelirtecken, poli-ADP riboz polimeraz 1 (PARP) kesilmesi kaspazlardan bağımsız olarak TNFR ve Fas ligandın aktivasyonu ile başlayan morfolojik anlamda nekroz biyobelirteci olarak görülmektedir (Haroun vd. 2024).

Apoptozisin indüklenmesinde iki majör sinyal yolunun rol aldığı bilinmektedir. Bunlar "ekstrinsik" hücre dışı ve "intrinsik" hücre içi sinyal yollarıdır. Apoptoz, biyolojik görevini tamamlamış ya da hasarlı hücrelerin ve organizmanın ihtiyaç duymadığı tüm hücreleri ortadan kaldıran bir programlı hücre ölüm biçimidir. Apoptozis süreci ya genotoksik stres gibi hücre içi yollardan gelen sinyaller ya da dışarıdan farklı ligandların hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanması sonucunda oluşan dışsal sinyaller tarafından başlatılabilmekte olup bu mekanizma farklı molekül ve proteinleri kapsamaktadır. Kanser de ise bu mekanizmanın bozulması ayırt edici bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır (Okuyan 2023).

Hücrenin apoptoza girip girmediğini belirlemek için karar mekanizması pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki denge ile belirlenmektedir. Pek çok kanser öncüsü hücre daha kanserleşme mekanizması başlamadan DNA hasarının tespit edilmesi yoluyla indüklenen apoptoz ile ortadan kaldırılarak kanser hücresinin çoğalarak tümör haline gelmesini engellemektedir. Tümör tedavisinde karşılaşılan apoptoz direncinin kırılması için ilgili moleküllerin terapötik olarak hedeflenmesi ve bu yolla tümör hücrelerinin apoptoz duyarlılığının geri kazandırılması tedavide önem taşımaktadır. Mitokondri, endoplazmik retikulum, lizozom, golgi aygıtı, çekirdek gibi kompleks yapılar birlikte çalışarak bu süreci tamamlar. Kaspaz mekanizmaları, farklı apoptoz indükleyici sistemler ile birlikte çalışır (D'Arcy 2019, Xie vd. 2020).

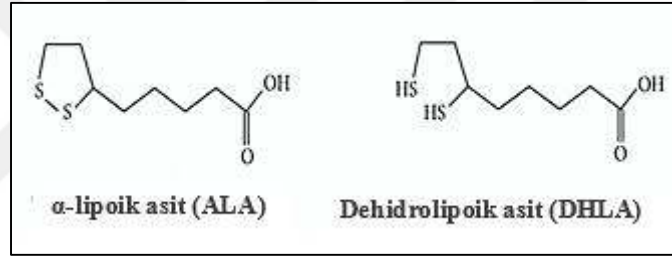
Sorafenib ajanı ile ilgili ekstrinsik apoptotik sinyal yolağında, TNF ailesinin hücre yüzeyi ölüm reseptör üyeleri ve bunların ligandlarının etkileşimleriyle aktive olmaktadır. Sinyaller, pro-Kaspaz-8 ve oto-katalitik kompleks Fas ile ilgili ölüm bölgesi FADD veya TNFR-1 ile ilgili ölüm bölgesi TRADD adaptör proteinleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Ayrıca proteinler kendi bölünmelerine aracılık etmenin yanı sıra Kaspaz-8 ile birlikte, efektör Kaspaz-3 ve Kaspaz-7 aktifliğini gerçekleştirmektedir. Ek olarak Sorafenib ajanı ile ilgili intrinsik apoptotik sinyal yolağında ise, Bcl-2 ailesi üyesi pro-apoptik protein X düzenleyicisi BAX, Bcl-2 ile ilgili ölüm agonisti BAD, p53 proteinin regülasyonunu düzenleyen apoptoz regülatörü PUMA, BH3 etkileşimli ölüm agonisti BID, Bcl-2 benzeri-11 olan BIM ile anti-apoptotik özelliğe sahip Bcl-2 apoptoz regülatörleri, Bcl-2 benzeri-2 olan Bcl-w, Bcl-2 benzeri-1 olan Bcl-xL, Mcl-1 apoptoz regülatörü, Bcl-2 ile ilgili protein-A1 olan Bcl-2A1 arasında oluşan denge apoptoz belirleyicisi olmaktadır (Güleş ve Eren 2008, Atagün vd. 2011, Aktug 2014, Tryndyak vd. 2020, Abusaliya vd. 2024).

2.5 Alfa Lipoik Asit

1950'li yıllarda karaciğerden izole edilen Lipoik Asit (LA) ilk defa 1930'lu yıllarda tanımlanmış olup, moleküler yapısı sebebiyle 1,2 ditiyolen-3 pentanoik asit olarak isimlendirilmiştir (Morris vd. 1995). LA esansiyel bir kofaktör olup pekçok hücrel redoks reaksiyonlarında rol alır (Ciğerci vd. 2017). Alfa-Lipoik Asit (ALA), 6,8-

ditiyoktanoik asit olarak da bilinir. Ayrıca, Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından (R)-5- (1,2-ditiyolan-3-il) pentanoik asit olarak da isimlendirilmiştir (Fisunoğlu ve Fırat 2021).

İlk kez 1959’da Almanya’da yaşanan bir mantar zehirlenmesinde semptomatik olarak ortaya çıkan nöropatik etkileri tedavi etmek amacıyla kullanılan ALA bir yağ asidi türevi olduğu için suda az miktarda çözünmekle beraber hem su hem de yağda çözünebilen ender bir antioksidan etki potansiyaline sahiptir. ALA 206.328 g/mol ağırlığında olup, moleküler formülü $C_8H_{14}O_2S_2$ ’dür (Gomes ve Negrato 2014). ALA’nın redükte ve okside olmak üzere iki farklı formu bulunmakta olup, bu formlar canlılarda aktivite gösterirler (Altuner ve Aldemir 2024). ALA ve redükte ALA’ya ait kimyasal formül Şekil 2.4’de verilmiştir.



Şekil 2.4 Alfa-Lipoik Asit (6,8-ditiyoktanoik asit) ve ditiyol halkası indirgenen Redükte Alfa-Lipoik Asit (Hossain vd. 2021).

ALA, karaciğer, kalp, böbrekler ve kan-beyin bariyeri de dahil olmak üzere vücudun birçok bölgesinde bulunan “Sodyum bağımlı multivitamin taşıyıcı” olarak isimlendirilen transmembran bir protein tarafından taşınır. ALA bu taşıyıcı sistem sayesinde kan beyin bariyerini bile geçebilmektedir (Park ve Sinko 2005). ALA emiliminde, karaciğerde belirgin bir ilk geçiş etkisine maruz kalır. ALA’nın sistemik biyoyararlanımı açısından, kişisel olarak önemli değişkenler vardır. Dokulara hızlı dağılımından dolayı, ALA’nın insanlarda plazma yarılanma zamanı yaklaşık 25 dakikadır ve toplam plazma klerensi 10-15 ml/dak/kg’dır. *In vitro* olarak, ALA metal iyon kompleksleri ile (sisplatin) reaksiyona girmektedir (Keith vd. 2012, Brufani ve Figliola 2014).

ALA serbest radikal yakalama, metallerle şelat oluşturma, vücutta enerji metabolizmasında özellikle kofaktör olarak rol alma ve farklı antioksidanları rejenere

etme fonksiyonlarına sahiptir. ALA'nın geleneksel ve tamamlayıcı tıpta terapötik ajan ve takviye edici gıda olarak kullanılması son yıllarda gittikçe artmaktadır. ALA'nın faydaları ve önemi üzerinde çalışmalar ve araştırmalar devam etmektedir (Odabaşı-Bükün vd. 2024).

ALA ağız yoluyla alındıktan sonra gastrointestinal sistem tarafından emilerek kan-beyin bariyerini kolayca geçme potansiyeline sahiptir. Besin takviyesi ve diyet gibi orijinal kaynaklardan bağımsız olarak ALA indirgenmiş hali olan DHLA formuna dönüşür ve karaciğerde bisnorlipoat ve tetranorlipoat gibi farklı metabolitlerde metabolize edilerek renal olarak atılır (Hassan ve Cronan 2011). ALA, B5, B7 vitamini ve Na ile Sodyum Bağımlı Vitamin Taşıyıcı (SMVT) sisteminde birlikte taşınmaktadır. Bu durum ise çoğu vitaminin SMVT aracılığıyla taşınması sebebiyle bu vitaminler arasında bir rekabet oluşturmaktadır. Bu durumda ALA'nın fazla alımı B5 ve B7 vitaminlerinin taşınımında sorunlara yol açabilmektedir (Najafi vd. 2022). Yapılan bir çalışmada ALA'nın glukoz taşıyıcılarının translokasyonu ve aktivitelerine etki ederek glukoz alımını uyardığı rapor edilmiştir (Najafi vd. 2022, Dalmış ve Ekici 2024).

ALA, hücre için enerji üretiminde rol oynayan bazı enzimatik kompleksler için kofaktör görevi yapmakta, glikoz ve lipid metabolizmasında rol almakta ve gen transkripsiyonunu yönetmektedir. Şelatör özelliği sayesinde, oksidatif strese sorumlu olan ağır metalleri etkin bir şekilde kan dolaşımından uzaklaştırır. Hücre içi sinyal iletim yollarını etkileyerek anti-inflamatuar özellik göstermektedir. Kalp rahatsızlıkları, şeker hastalığı ya da kanser gibi kronik hastalıklarla da ilgilidir. İnflamasyon aracısı Prostaglandin E2 olan PGE2, sağlam hücrelerde prostaglandin inhibitörü olan COX-2, nitrik oksit sentazın indüklenebilir izoformu olan iNOS, bağışıklık sisteminin tetiklediği inflamasyonun ilk belirtisi olan TNF- α , lökosit endojen medyatörü ve mononükleer hücre faktörü olan IL-1 β ve IL-6 başta olmak üzere çoğu inflamasyon belirtecinin yapımında ve salınımında ALA'nın etkisi olduğu bilinmektedir. Yeni nesil immünoterapi ilaçları, T hücrelerinin kanser hücrelerine körlüğünü engellemek amacıyla geliştirilmiş antikör yapısında ilaçlardır. Abdulhamid vd. (2022)'ye göre ALA takviyesi metabolik rahatsızlığı olan hastalarda incelendiğinde takviye sonrası inflamasyona yanıt olarak kan plazmasında konsantrasyonu artan pentamerik C-Reaktif protein CRP, IL-6 ve TNF- α seviyelerinde azalmalar olduğu bildirilmiştir (Dalmış ve Ekici 2024).

2.6 TNF- α Ligandı

Tnf- α , esas olarak monosit ve makrofajlar tarafından sentezlenen ve 212 aminoasitten oluşan üç monomerli glikoprotein yapısında bir sitokindir. Sitokinler immün sistemin ve inflamasyonun düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır. TNF- α 'nın direkt antiviral etki, immünomodülatör aktivite, virüsle enfekte hücrelere sitotoksik etki ile apoptoz, multiple biyolojik fonksiyonlarla birlikte inflamasyon ve hücrel immün cevapta önemli role sahip olduğu bildirilmiştir. (Balasar vd. 2023). Tnf- α 'nın primer kaynağı makrofajlar ve monositlerdir. Diğer kaynakları T ve B lenfositler, Naturel Killer (NK) hücreleri, nötrofiller, astrositler, Kupffer hücreleri, fibroblastlar, mast hücreleri, bazofiller, düz kas hücreleri, epidermal hücreler ve endotelyal hücreler oluşturur. DR1, p55, p60, CD120a'ya bağlanarak Tnf- α aktivasyonu sağlanmaktadır. Bu hücrelerden salınan Tnf- α , hem otokrin hem de parakrin etki göstermektedir (Çavusoğlu vd. 2020).

Tümör Nekroz Faktör ailesinin diğer üyesi Tnf- β , lenfotoksin- α (LT- α) olarak da adlandırılırken, insanlarda, Tnf- β , Tnf- α ile %56 nükleotid özdeşliği ve %36 aminoasit özdeşliği paylaşır ve her iki Tnf'nin, özellikle işlevsel alanları benzer üçüncül ve dördüncül yapılar sergiler. Tnf- β ifadesi lenfositler ve makrofajlar gibi bağışıklık hücreleriyle sınırlı olmakla birlikte çözünür bir forma dönüşmede oldukça etkilidir. Ek olarak hücre yüzeyinde asla ifade edilmemektedir (Constanze vd. 2020, Wang vd. 2020)

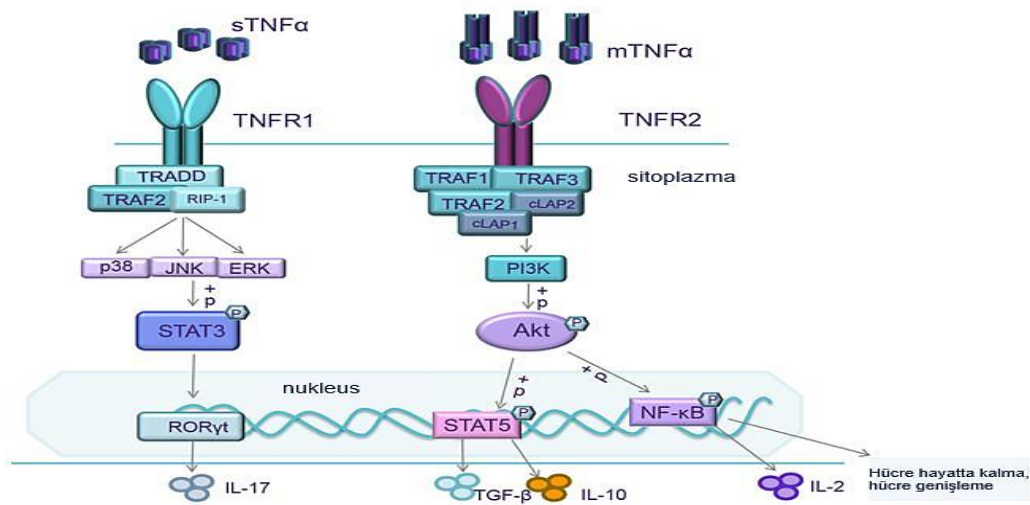
Bazı dokularda birbirleriyle sinerjistik etkili olabilen sitokinler, başka dokularda antagonist etki de gösterebilmekte ve birbirlerini inhibe edebilmektedirler. Sitokinler, hücrelerin çevresel koşullarına göre farklı etkiler gösterebilmektedir. Bir sitokin değişik tip hücreler tarafından yapılabilir. Değişik tip hücreler üzerine etki gösterebilmektedir ve başka sitokinlerin sentezlenmesini uyarabilir veya engelleyebilir. Bir sitokinin aynı hedef hücre üzerinde farklı etkileri olabilir. Birden fazla sitokin aynı etkiyi gösterebilir (Kan vd. 2025).

İmmün ve inflamatuvar olaylara katılan hücrelerin etkinliklerinin artırılması uyarılmış lenfositler, monositler ve makrofajlar ile diğer bazı hücrelerde sentezlenen ve organizmada sistemik (endokrin), salgılandıkları hücre çevresindeki hücrelere (parakrin)

veya doğrudan salgılandıkları hücreler üzerine (otokrin) etkili sitokinler aracılığı ile olmaktadır (Vaghjani vd. 2025). Sitokinlerin ise sentez ve salgılanmaları geçici ve kısa sürelidir, depolanmazlar. Çok düşük konsantrasyonlarda hormonlara benzer biçimde reseptörlere bağlanarak etkilerini göstermektedir. Hücreler arası sinyal proteini olan sitokinler, immün ve inflamatuvar yanıt oluşumu, hematopoez ve yara iyileşmesi gibi birçok biyolojik olayın düzenlenmesinde rol alır (Abbas vd. 2025).

Tnf- α , özellikle HSK gibi kanser türlerinde hem tümör baskılayıcı hem de tümör geliştirici etkiler sergilemektedir. HSK, dünya çapında en yaygın görülen karaciğer kanseri türü olup, Tnf- α 'nın bu hastalığın patogenezindeki rolü yoğun bir şekilde incelenmiştir (Wang ve Lin 2008, Balkwill 2009). Genel olarak Tnf- α , başta TNFR1 ve TNFR2 olmak üzere kendi reseptörlerine bağlanır ve ardından iltihaplanma ve hücre ölümü gibi biyolojik işlevler için moleküler sinyaller iletir (Shin vd. 2021). TNFR1, genellikle apoptozu indükleyen sinyal yollarını aktive ederken, TNFR2 daha çok hücre hayatta kalma mekanizmalarını destekleyen süreçlerle ilişkilidir (Scheurich vd. 2003).

En iyi karakterize edilmiş ölüm reseptör ve ligand sinyalleri; FAS (CD95, APO-1)/FasL, TNFR1/TNF- α , TRAILR2(DR5)/TRAIL, TRAILR1(DR4)/TRAIL'dir. Ligand ile ölüm reseptörü birleştikten sonra reseptörün sitoplazmik kısmında konformasyonel bir değişiklik meydana gelmektedir (Guicciardi ve Gores 2009). TNFR1 ve TNFR2 üzerinden oluşan sinyal yolları Şekil 2.5'de gösterilmiştir.



Şekil 2.5 Sitokin ve kemokinler gibi proinflamatuvar araçları kodlayan genleri düzenleyen sinyal yolağı (Yang vd. 2018).

Tnf'nin TNF reseptör 1'e (TNFR1) bağlanması, toplu olarak transkripsiyonel yol açan Nükleer Faktör-κB (NF-κB) ve mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyal yollarını aktive ederek doğrudan inflamasyonu desteklemektedir. IL1 ile birlikte, sitokinler ve kemokinler gibi proinflamatuvar araçları kodlayan genlerin düzenlenmesinde ve immün cevabın başlaması ve sürdürülmesinde görevlidir (Emamalipour vd. 2025).

Bu etkileşimden sonra başlatıcı pro-Kaspaz-8 ve -10'u aktive ederek ölüme neden olan sinyal kompleksinin (DISC) oluşumuna ve sonrasında diğer prokaspazların aktive olmasına sebep olmaktadır. Ekstrinsik yolun en önemli bileşenlerinden TNF reseptör ailesi, sistenden zengin hücre dışı domainleri ve hücrenin dışından içeriye doğru uzanan ölüm sinyaline sahip apoptotik en önemli moleküllerden birisi olarak rol almaktadır (Papenfuss vd. 2008).

2.7 Bax ve Bcl-2 Proteinleri

Apoptozun regülasyonu Bcl-2/Bax gen ailesi ile sağlanır. Bcl-2'nin Bax'a oranı apoptotik uyarının yaşamsal devam edip edemeyeceğini belirler. Ayrıca p53'ün Bax/Bax, Bax/Bcl-2, Bcl2/Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlediği düşünülmektedir (Schultz ve Harrington 2003, Choi vd. 2004, Ugwu ve Suru 2021, Siddiqui vd. 2024). Bax, pro-apoptotik bir protein olup mitokondriyal yoldan ölümü tetikleyen süreçleri başlatır. Bu durum mitokondri zarından Cyt C'nin serbest kalmasına ve apoptoz kaskadının aktive olmasına neden olur (Chao ve Korsmeyer 1998). Diğer taraftan, Bcl-2 anti-apoptotik bir protein olup, mitokondriyal membranı stabilize ederek Bax gibi pro-apoptotik proteinlerin hücre ölümünü başlatmasını durdurur. Bax ve Bcl-2 arasındaki bu denge, hücrelerin yaşamını devam ettirip ettirmeyeceği veya apoptoza sürükleyip sürüklemeyeceği konusunda belirleyici bir parametredir (Reed 1998). Monomerik BAX proteini, oligomerizasyon yoluyla aktive edildiği mitokondriyal dışı zara hedeflenir. Bilinen diğer tüm gözenek oluşturan proteinlerin aksine, aktive olmuş BAX oligomerleri zarı geçirgenleştirme yeteneğine sahip olup çok farklı boyut ve şekilleri; yaylar, çizgiler, halkalar, gözeneklerdir. Bax'ın aktivitesinin artışı apoptozu hızlandırarak tümör hücrelerinin büyümesini engellerken, Bcl-2'nin yüksek seviyelerde ifade edilmesi ise hücrelerin ölümden kaçmasına neden olarak tümör gelişimini teşvik eder (Cory ve Adams 2002).

2.8 Kaspaz Enzimleri

Kaspaz enzimleri, aspartik asit kalıntılarından sonra substratlarını ayıran sistein-proteazlarıdır. İnsanlarda katalitik aktiviteye sahip 11 farklı kaspaz vardır. Kaspaz genlerin filogenetik analizi kaspazları üç sınıf olarak gruplandırmıştır: (I) kaspaz-1, -2, -4, -5, -9 ve -14, (II) kaspaz-3, -6 ve -7 ile (III) kaspaz-8 ve -10 (Vakili vd. 2022, Eckhart ve Fischer 2024).

2.8.1 Kaspaz-3 Aktivitesi

Kaspaz-3 hücre apoptozunda zimojendir ve başlatıcı kaspazlar tarafından parçalanana kadar aktive olmaz. Kaspaz-3 ve Kaspaz-7 geniş bir protein yelpazesini kesmesi dolayısıyla tipik olarak apoptozis olarak bilinen hücre ölüm sebebidir. Kaspaz-3, -6 ve -7 uzun bir prodomain'den yoksundur ve diğer kaspazlar aracılığıyla proteolitik bölünme yoluyla aktive edilir. Kaspaz-3, -6 ve -7 aktivitesi toplam proteolitik aktiviteyi güçlendirir. Kaspazlar, dokuların gelişimi ve yenilenmesi ile enfeksiyonlara karşı savunmada önemli hücresel süreçlerin kritik düzenleyicileridir (Eckhart ve Fischer 2024). Kaspaz-3 etkileşimi sonunda nükleer DNA'nın bozulmasına neden olan kaspaz ile birlikte aktive olan DNase (CAD) aktive olmaktadır (Svandova vd. 2024). Aktif hale geçen Kaspaz-3, DNA parçalanması, hücre iskeletinin yıkılması, nükleer proteinlerin parçalanması ve apoptotik cisimciklerin oluşumu gibi hücre ölümüne neden olan önemli süreçleri başlatır (Earnshaw ve Martins 1999). Alternatif eklemeye üretilen daha kısa bir izoform olan Kaspaz-3s, apoptozu olumsuz yönde düzenlemektedir (Svandova vd. 2024). HSK'da kaspaz yolundaki işlev bozukluğu, tümör hücrelerinin hayatta kalmasını ve yayılmasını kolaylaştıran temel mekanizmalardan biri olarak kabul edilir. Ancak, Kaspaz-3'ün yeniden aktive edilmesi, HKS tedavisinde kilit bir hedef olarak öne çıkmaktadır. Yapılan çalışmalar, Kaspaz-3'ün yeniden etkinleştirilmesinin, tümör hücrelerini tekrar apoptoz sürecine yönlendirdiğini ve böylece tedaviye olan duyarlılığı artırdığını ortaya koymaktadır (Wang vd. 2015).

3.MATERYAL VE METOT

Çalışmada kullanılan HepG2 karaciğer karsinom hücreleri Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarındaki stoklardan temin edildi. Laminar kabin her kullanımda önce mutlaka UV ile steril hale getirilerek, çalışma öncesinde ve sonrasında %70' lik etanol ile dezenfekte edilerek çalışmalar yürütüldü.

3.1 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Vakum pompası, Aspirasyon	: Sartorius, Germany
Buzdolabı	: Arçelik, Türkiye
Santrifüj	: Hettich, Germany
Vortex	: IKA, USA
Hassas Terazı	: Sartorius, Germany
Sirkülasyonlu Su Banyosu	: Memmert, WNB10, Germany
CO ₂ Girişli İnkübatör	: Panasonic, Japan
Laminar Flow Kabin	: JSR, Korea
Floresan Mikroskop	: Olympus, Japan
İnverted Mikroskop	: JULI Br, Korea
Otoklav	: Jeico Tech, Korea
Saf Su	: GFL 2102, Germany
Dondurucu (-80)	: New Brunswick Scientific, England
Mikroplak Okuyucu Spektrofotometre	: µ- Quant, BioTech Instruments, USA
Prime Thermal Cycler (qRT-PCR)	: Bibby Scientific, UK
pH metre	: Hanna instruments, Romania
Etüv	: Panasonic, Japan
Soğutmalı Santrifüj	: ThermoFisher Scientific, Germany

3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler

- 96'lik Well Plate
- Şırınga
- Criyo Tüp
- 75 cm²' lik Flask
- Pess Membran Filtre (0.22 µm)
- Petri (SPL Life Sciences, Korea)
- Hepa Filtre (High Efficiency Particulate Arresting)
- Falkon Tüp (15 ve 50 mL)(İsoLab, Germany)
- Pipet Uçları (Sartorius, Germany)
- Eldiven (Erk, Turkey)
- Ependorf Tüp (Tarsons, India)
- Hücre Kazıyıcı (Scraper)(Costar, Mexico)
- Otomatik Pipetler (Eppendorf Research[®] plus)

3.1.3 Kullanılan Kimyasallar

- Sorafenib (Nexavar 200mg, Bayer)
- Alfa Lipoik Asit, ALA (Orzax Ocean, Türkiye)
- Aquaguard (Aquabator-Clean[™], 100X, AppliChem)
- DMEM Low Glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
(Sigma-Aldrich, UK)
- %96' lık Etil Alkol (Riedel-de Haen, Germany)
- Tripsin-EDTA (Gibco[™], Canada)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma, USA)
- L-Glutamin (Sigma-Aldrich, Germany)
- MTT (Metiltiazol Difenil Tetrazolium) (Sigma, USA)
- DMSO (Dimetil Sülfoksit (Sigma, China)
- Etidiyum Bromür (Vivantis, USA)
- Tripan Blue Solüsyonu (Sigma, USA)
- PBS (Fosfat Tamponlu Salin) (Sigma, Germany)

3.2 Hücre Kültürü

Hücre kültürü deneyinde, kontaminasyon riski yüksek olduğu için sterilizasyon işlemlerine önem verildi ve çalışmalar steril akış kabini içinde yapıldı. Hücre kültürü ortamı hücrelerin *in vitro* olarak kontrollü koşullar altında morfoloji kazanmalarını gerektiren süreçtir. Primer hücre kültüründe dikkat edilmesi gereken en önemli ölçüt manipülasyonlarda kullanılacak alet ve ekipmanların steril olması, dikkatli, titiz ve steril bir şekilde çalışılmasıdır. Kabin her kullanımdan önce ve sonra mutlaka UV ile steril hale getirilerek tüm yüzey %70'lik etanol ile temizlendi. Çalışmada kullanılan HepG2 hücre hattı için besiyeri olarak Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM Low) kullanıldı. Besiyeri hazırlamak için, 500 ml DMEM Low içerisine besiyeri içeriğinin, amonyak ve piroglutamat ihtiyacının karşılanması ve stabil hale getirilmesi için pH, sıcaklık ve anyonların göz önüne alınarak zamanla parçalanmak üzere 6 mL L-glutamin, besiyerinin bakteriyel ve fungal kontaminasyonu önlemek amacıyla 10 ml/L penisilin-streptomisin ve hücrelerin çoğalmasını sağlamak için hücre büyüme, çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri ve hücrelerin yüzeye tutunmasını sağlayan hücreler arası matriks proteinleri, enzim ve hormonların bulunduğu protein çözeltisi Fetal Sığır Serumundan (FBS) 50 mL ilave edildi. 500 mL'lik DMEM Low Glucose (Biological Industries, #01-050-1A) besiyeri pss membran filtre içerisine alınarak filtre edildi. Steril edilen besiyeri, 50 mL'lik (İsoLab, #CTPPA22500007) steril falkonlara aktarıldı. Besiyerinin rengi, içerisindeki fenol kırmızı nedeniyle kırmızıya yakın parlak ve canlı renktedir. pH'ın asiditeye kayması ile rengin sararması ve besiyerinde bulanıklaşma bozulduğu anlamına gelmektedir.

Çalışmalardan önce medyum 37°C'deki sıcak su banyosunda 30 dakika bekletilerek kullanıma hazır hale getirildi. Çalışmada kullanılan karbondioksit inkübatörü, hücrelerin büyüme koşullarının korunması amacıyla 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ seviyesinde çalıştırıldı ve inkübatörün alt haznesindeki suya %1 oranında Aquaguard-1 (AppliChem, #4N017928) eklenerek %95 nem oranı sabit tutuldu. Deneyler sırasında kullanılan kimyasal, çözelti ve uygulanan tüm dozlar; 37°C'de sıcak su banyosunda bekletilerek hücrelerin strese maruz kalması önlendi. Ayrıca, tüm santrifüj işlemleri 5 dakika boyunca 800 rpm'de gerçekleştirildi.

3.2.1 HepG2 Hücrelerinin Çözdürülmesi ve Çoğaltılması

Sıvı azot tankında saklanan hücreler, uygun sterilizasyon koşullarında çözdürüldü. Hücreler, strese girmemesi için -20°C’de yaklaşık 10-15 dakika bekletildi ve sıcak su banyosunda 1-2 dakika süreyle hafifçe dairesel hareketlerle çözülmesi sağlandı. Daha sonra hücreler laminar akış kabinine alınarak, 1 mL besiyeri içerisinde homojenizasyon için pipetajlandı. Eş zamanlı olarak 15’lik falkon (İsoLab, #CTPPA22015008) içerisine 4 mL besiyeri eklendi. Falkon içerisine medyumlu hücre aktarıldı. Hücre ve besiyerinin homojen bir şekilde karışması için pipetaj yapıldı ve 5 dakika süreyle 800 rpm’de santrifüj edilerek işlem sonrasında süpernatant atıldı. Dipteki pelet üzerine yeni besiyeri eklenip yeniden santrifüj edilerek DMSO uzaklaştırıldı. T75’lik flask alınarak içerisine 7-11 mL DMEM Low Glucose eklendi. T75’lik flaskta 500 µL ve petri kabına 500 µL olmak üzere hücreler homojen bir şekilde yayıldı. T75’lik flask ve petriye ekilen hücreler inverted mikroskopta (JULI Br, Korea) canlılıkları ve hücre yoğunlukları kontrol edilerek 37 °C ve 5 CO₂’da inkübasyona bırakıldı. T75’lik flask ve petri üzerine pasaj sayısı, hücre hattı ve tarih not edildi.

Hücreler T75’lik flaskın %70-80’ini kapladıktan sonra Tripsin-EDTA (Gibco™, #25200-056) eklenerek inkübatöre kaldırıldı. 3-4 dakika sonunda hücreler santrifüj tüpüne alındı. T75’lik flask tabandan tamamı ayrılan hücrelerin üzerine daha fazla tripsine maruz kalmaması için 3 mL medyum eklendi ve steril 15 ml’lik bir falkona alındı. Böylelikle T75’lik flasktaki tripsin dilüe edilerek falkona alınan hücre-medyum süspansiyonu 800 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. T75’lik flaskta tekrar ekim yapıldıktan üzerine pasaj sayısı, tarih not edildi ve 37 °C ve 5 CO₂’da inkübatöre alındı.

3.2.2 Tripkan Blue ile Thoma Lamında Hücre Sayımı

Yapılan analizlerde kullanılmak için 96 kuyucuklu plaklara hücre ekilirken birbirine yakın sayıda hücre ekimi yapılmasına dikkat edildi. Bu nedenle yapılan çalışmada dozlar belirlenirken 96 kuyucuklu plaklara hücreler ekilmeden önce konfluent olmuş flaskın 1 ml’inde ne kadar hücre olduğu hesaplandı.

Hücrelerin üreme oranı %80-90'a ulaştığında, flasklardaki medyum atılarak, üzerine 3 mL Tripsin-EDTA eklendi ve inkübatörde 5 dakika bekletilerek hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Daha sonra 3 mL besiyeri eklenerek hücrelerin steril falkonlara aktarılması gerçekleştirildi ve 5 dakika 800 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atılarak 1 mL medyum eklenip pipetaj yapıldı. İkinci bir santrifüj işleminden sonra, süpernatant tekrar atıldı ve pellet üzerine 1 mL medyum eklenip tekrar pipetaj yapıldı. Canlı hücre sayısını belirlemek için, ependorfa 10 µL hücreli medyum, 90 µL besiyeri ve 10 µL Tripan Blue (Gibco, #15250-061) boya solüsyonundan 1:1 oranında alınarak 2 ml'lik ependorf tüpe alındı. Homojen hale gelen boyanmış hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak thoma lamina (İsoLab Laborgerate, #075.03.002) aktarıldı. Görüntüleme cihazında canlı hücrelerin parlak renkte, ölü hücrelerin ise mavi renkte görünmesi presinbine dayanarak; toplam canlı hücre sayısını bulmak için, aşağıdaki formül uygulandı:

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

3.2.3 Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

HepG2 hücreleri, %80-90 konfluens seviyesine ulaştığında, 100'lük petriye (SPL, #70175) ekimi yapılan $1.5-2 \times 10^6$ hücrenin ardından kalan hücreler daha sonraki çalışmalar için 1 ml dondurma besiyeri hazırlamak için T75'lik flaskın içindeki medyum atılarak, hücrelerin tabandan ayrılması amacıyla 3 mL Tripsin-EDTA eklendi ve 5 dakika inkübatörde bekletildi. Ardından, flask içerisine 3 mL medyum eklendi ve bu süspansiyon steril bir falkona alındı. 15 ml'lik falkon, 5 dakika 800 rpm'de santrifüj edildi ve ardından süpernatant atılarak ve pellet üzerine 1 mL medyum eklenip tekrar santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve 1 ml dondurma besiyeri (%7 Dimetil Sulfoksit (DMSO; Sigma Aldrich, #D8418), %93 FBS) falkon içerisinde resüspanse edildi. Hücreli kriyotüp (İsoLab, #091.11.102), önce -20°C'de 15-20 dakika bekletildi ve daha sonra sıvı azot (-80°C) tankına alındı.

3.3 MTT Yöntemi ile Uygun Dozun Belirlenmesi

Yapacağımız sitotoksikite çalışmalarının ilk denemelerinde, ALA'nın farklı konsantrasyonlarının hücre canlılık testi MTT- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (%98, Sigma, # MKBX0151V) analizi HepG2 hücre hattı üzerinde yapıldı. IC₅₀ değerinin belirlenmesinin ardından Sorafenib'in kombinasyon için hazırlanan 10 µM IC (İnhibisyon Konsantrasyonu) ile antioksidan aktiviteye sahip Alfa Lipoik Asit' in IC₅₀, IC₁₀ ve IC₀ konsantrasyonları olan upper ve lower konsantrasyonları (95% Fiducial CI) kombinasyonlu uygulamaları da yapıldı. IC₅₀ değeri 253 µM, IC₁₀ konsantrasyonu 100 µM ve IC₀ konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde kontrol grubuna kıyasla uygulandı. Gerçekleştirilen MTT tahlilinde, MTT solüsyonu kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde hazırlanarak falkon içerisinde mikropipet yardımıyla homojenizasyonu sağlandı. Rezervuar kullanılarak multi-kanal pipet yardımıyla pipet ucuna hassasiyet göstererek kuyucuklara 100'er µl MTT eklemesi tamamlandı ve 3 sa 30 dk 37 °C 5CO₂ etüvde inkübasyona konuldu. Sonrasında tüm kuyucuklardaki hücrelerin medyumunu alınıp 100'er µl DMSO eklendi. 30 dk süre ile karanlıkta bekletilerek gerçekleştirildi.

Kuyucuklarda oluşan formazan kristallerini çözmek amacıyla her bir kuyucuğa her bir kuyucuğa 200 µL MTT (Sigma Aldrich, #M2128) solüsyonu eklenip 2-3 saat inkübe edildi ve 200 µL DMSO eklendi ve plak karanlık bir ortamda 15 dakika inkübe edildi ve formazan kristalleri inverted mikroskop ile görüntülendi.

Yapılan çalışmada, sitotoksik tedavi seçeneği kapsamında ALA'nın bir oksidasyon önleyicisi olması dolayısıyla Sorafenib ile kombinasyonunda olası yan etkilerinin azaltılması istenmiştir. Bunun yanı sıra tedavide hem iyileşme sürecine etkilerinin hem de antiinflamatuvar, antioksidan ve antiapoptotik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yarı maksimum inhibisyon dozu saptanmak istenmiştir. Ek olarak fizyolojik süreçte serbest radikaller, oksidan antioksidan denge içerisinde hassas bir çizgide tanımlanmaktadır. Oksidanlar lehine bozulan bir denge; membran lipidleri, proteinler ve DNA gibi yaşamsal yapıların bütünlüğünün bozulmasına sebebiyet verir. ALA radikal etki alanını temizleme, radikal üreten kimyasal reaksiyonları durdurma, moleküler hasarı onarma, reaksiyon hızını baskılama, hücresel enzim kinaz kayıplarını önleme gibi hücre yaşamındaki moleküler mekanizmalar ile dengeyi sağlamaktadır. Oysaki oksidan antioksidan

dengeinin bozulması zar lipidleri başta olmak üzere biyomoleküller için bir risk faktördür. Bununla birlikte karaciğer bir immün sistem organı olarak kabul edilmektedir. Hepatositler ve kolanjiyositler gibi parankimal hücreler immünolojik işlevlere sahiptir. İlaçların, karaciğerde toksik etkileri nedeniyle karaciğer hücre yapılarına zarar vermektedir. HepG2 hücre hattında tedavi sürecinde hem moleküler düzeyde yangıyı azaltmak hem de ALA'nın sitotoksik tedavide olası faydalı etkilerini ortaya koyabilmek amaçlanmıştır. Bununla birlikte ALA'nın kofaktör olarak hücresel süreçte glikoz ve lipid metabolizmalarında düzenleyici rol almaları da hasarı iyileştirmek için fayda sağlayacağı düşünülmektedir. Doz uygulamalarında ALA'nın 0.01-100 mM aralığında hücre canlılığı 24 saatte %39 seviyelerine inmiş ve 48 saatte %15-16 seviyelerine gerilemiştir. Bu sebeple artan doz aralığından, 10 µM ve daha az konsantrasyonları uygulanarak IC₅₀ dozu belirlenmiştir (Öztürk ve Kara 2022).

ALA'nın uygulanan dozları 1 mL DMSO ile çözülüp 1, 5 ve 10 µM dozları ve kontrol grubu 4 tekrarlı olacak şekilde her kuyucuğa 100 µl uygulandı. Sorafenib için 4 kontrol grubu olmak üzere 1, 2, 5, 10, 12.5, 15, 20, 30, 40, 50 ve 100 µM konsantrasyonları 4 tekrarlı olacak şekilde her kuyucuğa 100 µl uygulanarak çalışmalara devam edildi ve yapılan ölçümlerde, hücrelerin canlılık ve ölüm oranları karşılaştırılarak IC₅₀ dozları ALA ve Sorafenib için hesaplandı. 96 kuyucuklu plakanın her kuyucuğunda 5x10³ hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı ve 37°C, %5 CO₂ etüvde 24-48 saat süre ile inkübe edildi ve çalışmalara devam edildi.

MTT analizinde bütün işlemler spektrofotometre cihazında (µ- Quant, BioTech Instruments, USA) 540 nm dalga boyunda absorban ölçümü ile gerçekleştirildi.

3.3.1 Alfa Lipoik Asit ve Sorafenib Kombinasyon Doz Uygulaması

T75'lik flasklara ekilen kombinasyon uygulaması için hücreler %80-90'a konfülsan oranına ulaştığında, sayım yapılarak plaktaki her kuyucuğa sayısına 5x10³ hücre olacak şekilde hesaplandı ve 37°C'de, %5 CO₂ etüvde inkübasyona bırakıldı. HepG2 hücrelerinde Sorafenib ile ALA'nın'ın kontrol grubuna göre kombinasyon uygulamaları kıyaslandı.

Çizelge 3.2 HepG2 hücrelerine uygulanan ALA ve Sorafenib konsantrasyonları

Alfa Lipoik Asit (μM)	Sorafenib (μM)	Sorafenib (μM) + Alfa Lipoik Asit (μM)
1	15	1 + 15
5	15	5 + 15
10	15	10 + 15
Kontrol	Kontrol	Kontrol

Spektrofotometre cihazında (μ - Quant, BioTech Instruments, USA) 540 nm dalga boyunda absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Sorafenib'in IC_{50} konsantrasyonu 20 μM olacak şekilde ve ALA'nın IC_{50} konsantrasyonu ve $\text{IC}_{50\pm}$ konsantrasyonları olacak şekilde belirlendi ve her bir kuyucuğa 1, 5 ve 10 μM konsantrasyonlarında ALA 6 tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara uygulandı ve plak 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

Çizelge 3.3 HepG2 hücrelerine uygulanan ALA ve Sorafenib konsantrasyonları

Alfa Lipoik Asit ($\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2\text{S}_2$) (μM)	Sorafenib (μM)	Sorafenib IC_{50} (μM) + ALA(Alfa Lipoik Asit) IC_{50} (5 μM)
1	20	1 + 20
5	20	5 + 20
10	20	10 + 20
Kontrol	Kontrol	Kontrol

Aynı işlem 48 saatlik uygulama için de 6 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi ve kontrol grubuna göre kıyaslandı. Belirlenen konsantrasyonlarda ilaç uygulamaları (Çizelge 3.2 ve 3.3)'te gösterilmiştir.

3.4 Komet Yöntemi ile DNA Hasarı

HepG2 hücre hattında bağışıklık sistemini güçlendiren ve DNA hasarını önlemeye yardımcı antioksidan etki ALA'nın ve Sorafenib ajanının etkileşimi sonucunda tek bir hücre düzeyinde DNA hasarını ve tamirini ölçmek amacıyla DNA hasar analizi olarak Komet analizi yapıldı. Kontrol, IC_{50} değeri olarak ALA 5 μM konsantrasyonu, Sorafenib IC_{50} için ise 20 μM konsantrasyonu ve kombinasyon konsantrasyonu gözlemlendi. %1 oranında hazırlanacak olan NMA'yı hassas terazide tarttıktan sonra cam bir tüpe konuldu.

Üzerine 10 kat seyreltilmiş PBS'den pH'ı 7.4 olacak şekilde 3 mL eklenerek karıştırıldı. Cam tüp, bek alevi üzerinde tutuldu ve şeffaf bir NMA çözeltisi elde edilmesi sağlandı. Hazırlanan lamalar, ısıtıcı tabla üzerinde el yakmayacak bir sıcaklığa kadar ısıtıldıktan sonra üzerine 110 µL NMA döküldü ve pipetin ucu ile ince bir tabaka halinde yayıldı. Son olarak, hazırlanan lamalar oda sıcaklığında kuruması için bekletildi.

Deney günü %8 oranında hazırlanacak olan LMA'nın (Sigma, #9012-36-6;A9414), hassas terazide tartılmasının ardından cam bir tüpe konuldu. Üzerine 10 kat seyreltilmiş PBS'den 2 mL eklenerek karıştırıldı ve pH'ı 7.4 olacak şekilde hazırlandı. Cam tüp, bek alevi üzerinde tutuldu ve homojen bir LMA çözeltisi elde edildi. Çalışma sırasında, jel haline gelmesini önlemek için sıcak su içerisinde bekletildi. İnkübatörde bekletilerek uygun yoğunluğa ulaşan hücrelere, MTT yöntemi ile belirlenen Sorafenib ve ALA'nın IC₅₀ dozları, iki flaska kombinasyon halinde uygulandı ve hücreler 24 saat boyunca inkübatörde bekletildi. Aynı işlem, 48 saatlik gözlem için de tekrarlandı.

Uygulanan dozlarla uygun yoğunluğa ulaşan, plakadaki kuyucuk sayısına 5×10^3 hücre olacak şekilde hazırlanan hücreler, inkübatörden alınarak her bir kuyucuktan, hücrelerin yüzeye zarar vermeden pipet yardımıyla medyum alındı. Her bir kuyucuğa 250 µL PBS ilave edildi. Hücreler, hücre kazıyıcı (scraper) kullanılarak dikkatlice kaldırıldı. Kodlanmış steril ependorflara, aynı gruptaki hücreler aktararak hücreler, 3 dakika boyunca 1000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında, süpernatantın bir kısmı pipetle uzaklaştırıldı. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak, 15-20 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 kapatılarak 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 pH:10 olacak şekilde +4°C'de bekletilmek üzere bırakıldı. Bu işlemden sonra, soğuk dH₂O ile yıkandı. Nükleer materyal dışındaki hücre bileşenlerin parçalanmasından sonra preparatlar elektroforez tankına yerleştirilerek 30 dakika süre ile elektroforez tamponunda +4°C'de bekletildi (pH:13). Süre sonunda 25 V (1 V cm⁻¹) ve 300 mA'de elektroforez işlemi başlatıldı. Daha sonra preparatlar, jel hasar görmeyecek şekilde nötralizasyon tamponu ile yıkandı. Boyama işlemi için her bir preparat üzerine 70 µL EtBr damlatıldı ve lamel ile kapatılarak floresans mikroskobunda her uygulama grubu

için 100 hücre olacak şekilde sayım yapıldı. Komet testinde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

Çizelge 3.4 Normal erime noktasına sahip agaroz çözeltisinin (NMA) hazırlanması

Kimyasal	Miktar
PBS	3 mL
NMA	0.03 g

NMA'nın %1 oranında hazırlanması için, NMA hassas terazide tartıldıktan sonra cam bir tüpe alındı. Üzerine 10 kat seyreltilmiş PBS'den 3 mL eklendi. Cam tüp, bek alevi üzerinde tutulularak şeffaf bir NMA çözeltisi elde edildi. Isıtıcı tabla üzerine alınan lamalar el yakmayacak bir sıcaklıkta ısıtıldıktan sonra üzerine 110 µL NMA döküldü ve ince bir tabaka halinde yayıldı. Son olarak, hazırlanan lamalar oda sıcaklığında kuruması için bekletildi.

Çizelge 3.5 Düşük erime noktasına sahip agaroz çözeltisinin (LMA) hazırlanması

Kimyasal	Miktar
PBS	2 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.

Çizelge 3.6 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'ye tamamlandı ve buzdolabına kaldırıldı. Çalışmadan yaklaşık bir saat önce, bu karışıma Triton-X ve DMSO eklenerek pH 10 seviyesine getirildi.

Çizelge 3.7 Nötralizasyon Çözeltisinin Hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
dH ₂ O	300 mL
Trizma Base	14.55 g

Trizma Base, hassas terazide tartılarak cam bir şişeye alınıp üzerine 300 mL dH₂O eklenerek homojen hale getirildi ve pH değeri 7.4 olarak ayarlandı.

Çizelge 3.8 Elektroforez tampon çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktarı
NaOH	6 g
EDTA	0.18 g
dH ₂ O	500 mL

NaOH ve EDTA hassas terazide tartılarak behere alındı ve üzerine 500 mL dH₂O eklenerek homojen hale getirildi ve bu pH değeri 13 olacak şekilde ayarlandı. Çalışma süresine kadar +4°C'de saklandı.

Çizelge 3.9 Etidyum bromür çözeltisinin formülasyonu.

Kimyasal	Miktar
Etidyum bromür	0.01 g
dH ₂ O	50 mL

Etidyum bromür, hassas terazide tartılı steril bir falkona konularak üzerine 50 mL dH₂O eklendi. Falkon, +4°C'de bekletildi ve çalışma sırasında 10 kat seyreltme işlemi gerçekleştirildi.

3.5 Total RNA ve Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

qRT-PCR için HepG2 karaciğer kanseri hücre hattında Ribospin™ RNA İzolasyon Kit (GeneAII®, #304-150) protokolü uygulanarak total RNA izolasyonu yapıldı. qRT-PCR için 2 kontrol ve 2 doz uygulama grubu olarak T75 flasklara 8.5×10^5 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. 37°C, %5 CO₂ ortamlı etüvde 24 saat 48 saat süreyle inkübe edildi. Sürenin sonunda eski besiyerleri uzaklaştırıldı. Kontrol ve Sorafenib ile ALA gruplarına besiyeri eklendi. 24 ve 48 saat olacak şekilde belirlenen doz uygulama gruplarına ise MTT testi ile belirlenen IC₅₀ değeri olan Sorafenib 20 µM(a), ALA 5 µM(b) ve kombinasyon uygulama grubu Sorafenib 20 µM + ALA 5 µM (c) konsantrasyonu uygulandı ve 37°C’de, %5 CO₂ ortamlı etüvde inkübe edildi. Uygulama grup sürelerinin inkübasyonu sonunda hücreler kendi besiyerinde hücre kazıyıcı ile kaldırılarak santrifüj tüpüne aktarılıp 800 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra PBS ile yıkama yapılarak 15 ml falkona aktarılan hücreler 3000 rpm’de qRT-PCR santrifüj cihazı Mikro 22 R santrifüj edildi. Elde edilen hücre peletlerine 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’de 30 saniye boyunca santrifüj edildi (25°C). Böylelikle RNA kolon membranına tutundu. Kolona 500 µL GW1 çözeltisi eklendi ve RNA’dan protein, tuz ve diğer kontaminantların uzaklaştırılması için 10.000 G’de 1 dk santrifüj işlemi uygulandı ve sonrasında kolon 700 µl RNW Buffer ile 10.000 G’de 1.5 dakika santrifüj edilerek RNA’nın saflaştırılması amaçlandı. Mini spin kolon, yeni bir santrifüj tüpüne transfer edildi. Kolonun merkezine 50 µL Nuclease-Free Water eklenerek 1 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından RNA’nın elüsyonu, 10.000 G’de 1 dakika santrifüj edilerek tamamlandı. Elde edilen RNA, uzun süreli muhafaza için ise -80°C’de saklandı.

İzole edilen RNA’ların konsantrasyon (ng/µl) ve saflık (OD260/280) ölçümü yapıldı. 1.8 - 2 konsantrasyon aralığına göre bakılarak RNA’lar arasından iki ve ikiye yakın olanlar saf kabul edildi. İlk olarak RNA ölçümü için hazır protokol girildi. Nanodrop plate’ine blank için 1µl NFW ve 1µl RNA örneklerinden yüklendi. RNA’ların konsantrasyon ve saflığı ölçüldü.

3.5.1 cDNA Sentezi

RNA saflaştırma işlemi tamamlandıktan sonra, FIREScript® RT cDNA Sentez Kiti protokolüne göre cDNA sentezi gerçekleştirildi. 24 ve 48 saatlik hücre inkübasyonlarının ardından, her bir RNA örneği için 20 µl'lik reaksiyon karışımları hazırlandı.

Çizelge 3.10 cDNA sentezinde kullanılan bileşenlerin miktarları.

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

Kit protokolüne göre RNA konsantrasyonları NFW ile 1 µg'a eşitlendi ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. Kit içerisinde bulunan bileşenlerin tümü buz üzerine alındı. Birer µl Oligo dT primer ve Random primer alınarak tüpe konuldu ve mini spin yapıldı. Tüm RNA örnekleri için ayrı ayrı olacak miktarda her tüpe 2 µl primer mix eklendi. Tüpler Thermal Cycler'da 65 °C'de 5 dk 1 döngü olacak şekilde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler buz üzerine alındı ve örnek sayısına göre ayrı bir eppendorf tüpün içinde hazırlandı. Bu kit içerisindeki bileşenlerden, titizlikle 10X RT Reaction Buffer (2 µl), dNTP Mix (0.5 µl), RNase İnhibitor (0.5 µl) ve FIREScript Reverse Transcriptase (1 µl) olmak üzere sırasıyla reaksiyon tüplerine eklendi. Ardından, her bir örnekte kullanılacak RNA'lar için son hacim Nuclease-Free Water (NFW) ile 20 µl'ye 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 saklandı.

3.5.1.1 Primer Dizaynı

β -Actin, Bcl-2, Tnf- α , Bax ve Kaspaz-3 genlerine spesifik primerler Primer-Blast programı ile tasarlanarak BİLİMED firmasından sipariş verildi. Tüm primerlerin stokları 100 μ M olarak geldi. Tüm primerler, 100 μ M 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 3.11 Ekspresyon seviyeleri belirlenen genler ile bu genler için kullanılan primer dizileri.

Gen	Primerler
β -Aktin	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'

3.5.2 qRT-PCR (real-time PCR) ile Gen İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

HepG2 insan karaciğer kanseri hücre hattında ALA, Sorafenib ve kombinasyon uygulamasından sonra hedef genlerin ekspresyon seviye farklılıklarının tespit edilmesi amacıyla bu analizde, Bioneer Exicycler™ 96 (Ver.4) Real-Time Quantitative Thermal Block cihazı kullanıldı. Deneylerde HOT FIREPol® SolisGreen® qPCR Mix reaktifi (#08-46-00001, 5x) tercih edildi ve tüm genler için 2 tekrar olacak şekilde çalışıldı.

Hedef genlerin amplifikasyonuna yönelik reaksiyon karışımı, Çizelge 3.12'de yer alan konsantrasyonlara ve örnek sayılarına göre dikkatlice hazırlandı. Karışım, her bir hedef gen için özel olarak tasarlanmış primer çiftleri ve HOT FIREPol® SolisGreen® qPCR Mix içerecek şekilde optimize edildi. Hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 7 μ l eklendi, ardından 2 μ l cDNA örneği dikkatlice ilave edildi.

Tüm pipetleme işlemleri hassasiyetle yapıldı ve 24 ile 48 saatlik inkübasyon sürelerine göre elde edilen örneklerin her biri için aynı protokol uygulandı. qRT-PCR işlemi, her bir

döngü için önceden belirlenen sıcaklık ve süreler doğrultusunda programlandı. Enzim aktivasyonu, denatürasyon, bağlanma ve uzama aşamaları, protokole uygun şekilde optimize edilen sıcaklık ve zaman aralıklarında gerçekleştirildi. Deneyin verimliliğini artırmak amacıyla her bir adım özenle planlandı ve uygulandı. qRT-PCR’da kullanılacak reaktifler ve miktarları Çizelge 3.12’de verilmiştir.

Çizelge 3.12 qRT-PCR’da Kullanılacak Reaktifler ve Miktarları

Deney Bileşeni	Miktar
Solis Green HOT FIREPol qPCR Mix(5X)	4 µl
Forward Primer	0.5 µl
Revers Primer	0.5 µl
cDNA	2 µl
dH ₂ O	Toplam hacim 20 µl olacak şekilde eklenir.
Toplam Hacim	20 µl

Çizelge 3.13’de qRT-PCR protokolü için sıcaklık ve zamanlama bilgileri verilmiştir.

Çizelge 3.13 qRT-PCR Protokolü için Sıcaklık ve Zamanlama Bilgileri.

Döngü	Sıcaklık	Zaman
Denatürasyon	95 °C	10 dk
40	95 °C	10 sn
Bağlanma	50-55 °C	20sn
40	Primer bağlanma sıcaklığında	
Uzama	72 °C	20 sn
40		

3.5.3 Total Protein İzolasyonu

Protein izolasyonunu sağlayabilmek için hücre lizatı hazırlamak amacıyla HepG2 hücre hattından 2 kontrol ve 2 doz uygulama grubu olarak T75 flasklara 8.5×10^5 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. 37°C, %5 CO₂ ortamlı etüvde 24 saat inkübe edildi. Sürenin

sonunda eski besiyerleri uzaklaştırıldı. Kontrol gruplarına besiyeri eklendi. 24 ve 48 saat olarak belirlenen doz uygulama gruplarına ise MTT testi ile belirlenen IC₅₀ değeri olan Sorafenib 20 µM (a), ALA 5 µM (b) ve kombinasyon uygulama grubu Sorafenib 20 µM + ALA 5 µM (c) konsantrasyonları uygulandı ve 37°C, %5 CO₂ ortamlı etüvde inkübe edildi.

HepG2 hücre hattında Sorafenib ve ALA kombinasyonunun uygulanmasını takiben, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri tamamlandıktan sonra hücre toplama aşamasına geçildi. Aynı uygulama gruplarındaki hücreler dikkatlice falkon tüplerine aktararak santrifüjleme işlemi gerçekleştirildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kalan hücre pelletleri, soğuk PBS ile iki kez yıkanarak tamamen çöktürüldü. Tüm işlemler, protein yapılarının zarar görmemesi için buzlu ortamda gerçekleştirildi. Yıkama tamamlandıktan sonra, her bir hücre peletinin üzerine 200 µl hacminde soğuk RIPA tamponu ile 10 µl proteaz inhibitör kokteyli karışıma eklendi. Bu çözelti homojen hâle getirildi ve tüpler 30 dakika boyunca buz içerisinde bekletildi. İnkübasyonun ardından tüpler, 4 °C’de, 10 dakika süreyle 10.000 G’de santrifüj edilerek protein bulunan süpernatant elde edildi. Elde edilen örnekler önce -20 °C’de, ardından uzun süreli saklama için -80 °C’de muhafaza edildi.

Protein konsantrasyonunu belirlemek amacıyla kolorimetrik analiz yöntemi olan Bradford testi kullanıldı. Bu yöntem Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlerle bağlanarak renk değiştirmesi prensibine dayanır. Oluşan boya-protein kompleksi, asidik ortamda 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans gösterdi. Renk değişimi, örneklerdeki toplam protein miktarı ile doğru orantılı şekilde ölçüldü (Bradford 1976). Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılarak çeşitli konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı ve bu çözeltilerle bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Bilinmeyen örneklerin protein miktarları, bu eğri üzerinden hesaplandı (Compton ve Jones 1985).

Protein standart çözeltileri, Brilliant Blue reaktifi ve örnekler, deney süresince düşük sıcaklıkta muhafaza edildi. Bradford reaktifi, distile su ile 1:10 oranında seyreltilerek kullanıma hazır hâle getirildi. BSA, farklı hacimlerde (25, 50, 100, 150, 300 µl) distile su ile karıştırılarak standart çözeltiler elde edildi. Kontrol grubu için 900 µl boya çözeltisi ve 100 µl distile su, ependorf tüplerine eklendikten sonra pipetaj yapılarak optik cam küvetlere aktarıldı ve absorbans ölçümleri 595 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Aynı

prosedür, diğer BSA konsantrasyonları için de uygulandı. Denek örnekleri için 900 µl RIPA çözeltisi, 10 µl protein örneği ve 900 µl Brilliant Blue reaktifi karıştırılarak homojen bir çözelti elde edildi. Ardından bu karışım küvetlere aktarılıp Jenway 6305 UV/Vis spektrofotometre cihazı kullanılarak absorbans ölçümleri yapıldı ve elde edilen veriler ayrıntılı şekilde kaydedildi.

3.6 ELISA Analizi

Bu çalışmada, HepG2 hücre hattında Sorafenib ajanı ve ALA'da Bax, Bcl-2, Tnf- α ve Kaspaz-3 protein düzeylerinin kantitatif olarak ölçülmesi amacıyla, human Bax ELISA kiti 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 mikropilaka okuyucu ile ölçüldü. Her protein için oluşturulan standart eğriler kullanılarak konsantrasyon değerleri hesaplandı.

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

Mikrotitre plağındaki işlemler şu sırayla yürütülmüştür:

Her kuyucuğa 100 µL standart veya örnek numune eklenerek, 90 dakika inkübasyon gerçekleştirildi ve yıkama adımı uygulandı. Daha sonra 100 µL biotinli antikor eklendi, 60 dakika inkübe edilerek tekrar yıkama yapıldı. 100 µL HRP-konjugat eklendi, 30 dakika inkübe edildi ve üçüncü yıkama uygulandı. Ardından 90 µL TMB substrat

eklenerek 15-20 dakika renk gelişimi beklendi. Son olarak 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 belirlendi; kontrol ve tüm uygulama grupları karşılaştırıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek protein düzeylerindeki değişiklikler optik yoğunluk değerleri temel alınarak analiz edildi.

3.7 İstatiksel Analiz

MTT deneyi sonucunda elde edilen spektrofotometrik veriler yüzde (%) cinsinden ifade edildi ve LD₅₀ dozunun tespiti için probit analiz yöntemi kullanıldı. Komet analizi ile elde edilen veriler, grupların ortalamaları arasında karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla Duncan testi ile analiz edildi ($p < 0.05$). Gen ekspresyon analizinde, referans gen olarak β -Aktin kullanılmış ve analiz bu gen temel alınarak standartlaştırılmıştır.

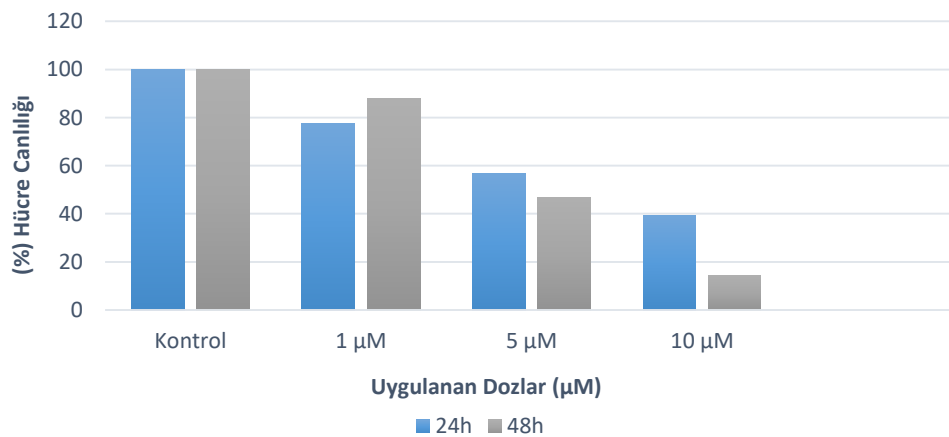
4. BULGULAR

4.1 HepG2 Hücre Hattında ALA ve Sorafenib Uygulamaları

HepG2 hücre hattında ALA ve Sorafenib ajanının kombinasyonunun hücre proliferasyonuna etkisini gözlemlemek amacıyla hücre canlılık analizi olarak MTT yapıldı. 540 nm dalga boyunda ölçülen absorbansların ortalamaları alındı. ALA ve Sorafenib ajanı uygulanmış hücrelerin ortalama absorbans değerleri ile doz uygulanmayan kontrol grubu hücrelerin ortalama absorbans değerleri oranlanarak canlılık yüzdeleri hesaplandı ve % canlılık grafikleri verildi. 24 ve 48 saat sonunda doz uygulanmamış kontrol grubuna göre, farklı konsantrasyonlarda doz uygulanan hücrelere göre canlılığın anlamlı ölçüde azaldığı tespit edildi.

4.2 HepG2 Hücre Hattında ALA'nın Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

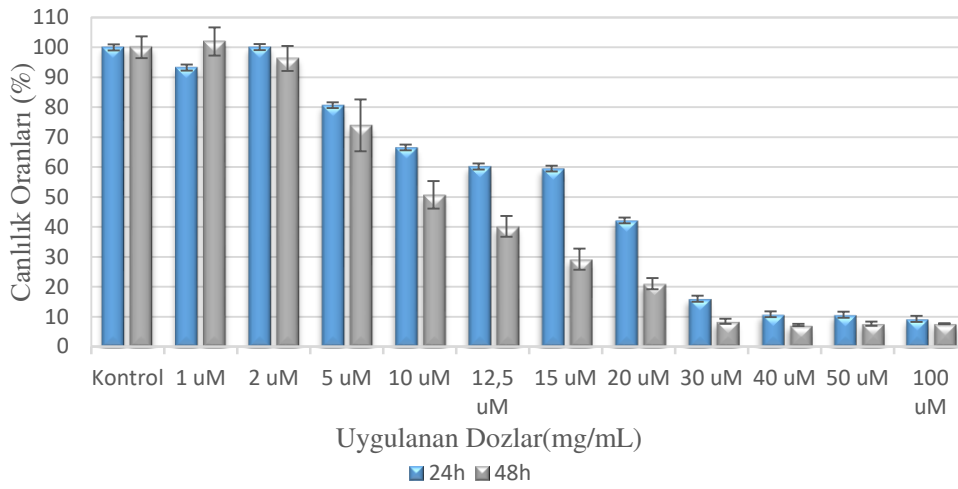
HepG2 hücre hattında ALA için (1-10 μ M) her kuyucuğa 4 tekrarlı olacak şekilde artan konsantrasyonlardaki dozlar uygulandı. Bu uygulamaya ait sonuçlar Grafik 4.1'de verilmiştir. ALA uygulamasından 24 saat sonra kontrol grubuna göre HepG2 hücre hattında hücre canlılık yüzdesinin 1 μ M'da %77.68, 5 μ M'da %56.70, 10 μ M'da %39.06'a düştüğü gözlemlendi. 48 saatlik ALA uygulamasında ise kontrol grubuna göre HepG2 hücre hattında hücre canlılık yüzdesinin 1 μ M'da %87.96, 5 μ M'da %46.83, 10 μ M'da %14.41'e düştüğü gözlemlendi.



Grafik 4.1 HepG2 hücre hattında 24 ve 48 saatlik ALA uygulamasında % hücre canlılık oranları

4.3 HepG2 Hücre Hattında Sorafenib'in Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Sorafenib'in HepG2 hücre hattı üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla, 1-100 μM aralığında 11 farklı konsantrasyon kullanılarak MTT canlılık testi gerçekleştirildi. Her doz, dört tekrarlı olacak şekilde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde hücrelere uygulandı. Hücre canlılık yüzdeleri, 540 nm dalga boyunda elde edilen absorpsiyon verilerine dayanarak hesaplandı. Bu hesaplamalar sonucunda elde edilen bulgular, Grafik 4.2'de gösterilmiştir.



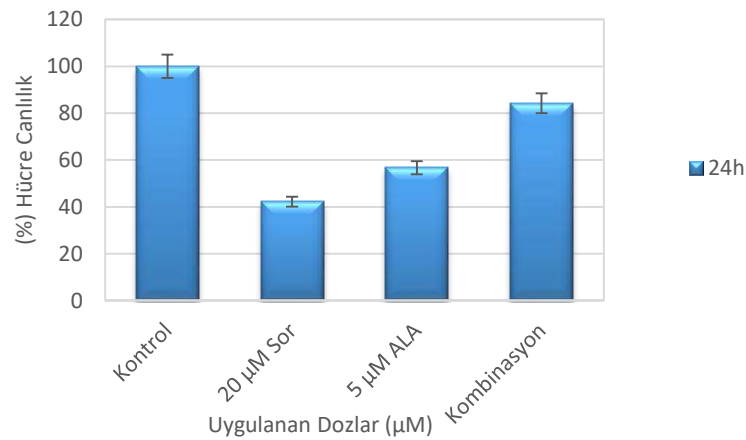
Grafik 4.2 HepG2 hücre hattında Sorafenib uygulaması sonucu % canlılık oranları

Her iki inkübasyon süresinde de artan Sorafenib konsantrasyonuyla birlikte hücre canlılık oranlarının azaldığı gözlemlenmiştir. 1 μM ve 2 μM gibi düşük konsantrasyonlarda, hücre canlılık oranının kontrol grubuna yakın seviyelerde olduğu belirlenmiştir. 5 μM ve üzerindeki dozlarda hücre canlılığında belirgin bir azalma meydana geldiği gözlemlenmiş, özellikle 10 μM ve 15 μM dozlarında canlılık oranı %50'nin altına düşmüş ve 48 saatlik inkübasyonda bu azalma daha belirgin bir şekilde ortaya çıkmıştır. Bu bağlamda Sorafenib'in, doza ve inkübasyon süresine bağlı olarak toksik etkisinin arttığı belirlenmiştir. 30 μM ve üzeri dozlarda canlılık oranları oldukça düşük seviyelere inmiş ve yaklaşık %10-20 civarında kalmıştır. Elde edilen verilere dayanarak, 24-48 saatlik inkübasyonda IC_{50} değeri 20 μM olarak tespit edilmiştir. Bu bağlamda çalışmada uygulanacak kombinasyonlar için Sorafenib konsantrasyonu 20 μM olarak kabul edilmiştir.

4.3.1 ALA ve Sorafenib Kombinasyonunun HepG2 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi

Çalışmamızda, HepG2 hücre hattına uygulanan 5 μ M ALA, 20 μ M Sorafenib ve bu iki bileşiğin kombinasyonlarının sitotoksik etkileri, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda MTT yöntemi kullanılarak değerlendirildi. MTT analizi sonucunda, her bir deney grubuna ait hücre canlılığı değerleri 540 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu cihaz ile ölçülüp optik yoğunluk (OD) verilerine göre yüzde (%) canlılık oranları hesaplandı. Kontrol grubu, %100 canlılık değeri olarak referans alındı. Elde edilen veriler Grafik 4.3 ve 4.4’de verilmiştir.

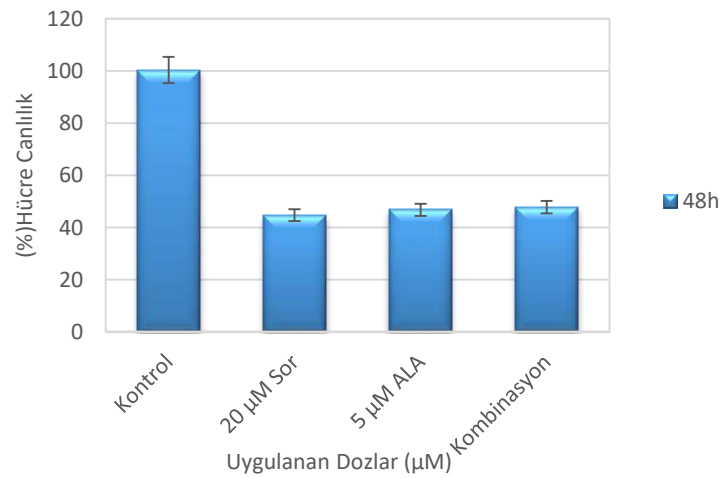
Elde edilen bulgulara göre, 24 saatlik uygulamada yalnızca Sorafenib uygulanan grup (20 μ M) yaklaşık %42 oranında hücre canlılığı göstermiştir ve bu, bileşiğin tek başına anlamlı düzeyde sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, yalnızca 5 μ M ALA uygulanan grupta hücre canlılığı yaklaşık %56 düzeyinde olup, ALA’nın da tek başına hücre canlılığını azalttığı gözlemlenmiştir. Ancak dikkat çeken en önemli bulgu, ALA + Sorafenib kombinasyonunun uygulanması sonucu elde edilen %85 düzeyindeki hücre canlılığıdır. Bu oran, her iki maddenin tek başına oluşturduğu sitotoksik etkiye kıyasla daha az hücre ölümünü ifade etmektedir. Bu sonuç, iki ajanın birlikte uygulanmasının hücrelerde beklenenin aksine antagonistik bir etki yaratmış olabileceğini düşündürmektedir (Grafik 4.3).



Grafik 4.3 HepG2 hücre hattında 24 saatlik ALA ve Sorafenib kombinasyon uygulamasının hücre canlılık oranına etkisi

Dolayısıyla, 24 saatlik tedavi süresinde ALA-Sorafenib kombinasyonunun, ayrı ayrı uygulanan dozlara kıyasla hücre canlılığını daha az azaltması, kombinasyonun sinerjistik değil, aksine koruyucu ya da etkiyi azaltıcı bir rol üstlendiğini göstermektedir. Bu durum, kombinasyon tedavilerinde ajanlar arası olası biyokimyasal etkileşimlerin ve hücre içi sinyal yollarının dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

48 saatlik süre ile HepG2 hücre hattına uygulanan 5 μ M ALA, 20 μ M Sorafenib ve bu iki ajanın kombinasyonunun sitotoksik etkileri MTT hücre canlılığı testi ile analiz edilmiştir. 48 saat sonunda, yalnızca 20 μ M Sorafenib uygulanan grupta hücre canlılığı yaklaşık %45 düzeyinde olup, benzer şekilde, 5 μ M ALA uygulanan grup da yaklaşık %47 canlılık oranı ile, ALA'nın tek başına orta düzeyde sitotoksik etki gösterdiğini teyit etmektedir. En dikkat çekici bulgu ise, ALA + Sorafenib kombinasyon grubunda gözlenen yaklaşık %48'lik hücre canlılığıdır. Bu oran, her iki ajanın tek başına oluşturduğu etkiye oldukça benzer seviyededir. Bu durum, kombinasyon uygulamasının sinerjistik bir toksisite oluşturmaktan ziyade, additif ya da nötr bir etki gösterdiğini düşündürmektedir. Yani, ALA ve Sorafenib'in birlikte uygulanması sonucu, hücre canlılığında belirgin bir artış ya da azalış gözlenmemiştir. Ayrıca, bu sonuçlar 24 saatlik verilerle kıyaslandığında, 48 saatlik inkübasyonda hücre canlılık oranlarında önemli bir değişiklik olmadığını ortaya koymakta ve bu da test edilen bileşiklerin sitotoksik etkisinin zamana bağımlı olarak sınırlı kalabileceğine işaret etmektedir (Grafik 4.4).



Grafik 4.4 HepG2 hücre hattında 48 saatlik ALA ve Sorafenib kombinasyon uygulamasının hücre canlılık oranına etkisi

4.4 Komet Hasarı Analizi

HepG2 hücrelerinde DNA hasar analizi, 20 µM Sorafenib ve 5 µM ALA dozu ayrı ayrı ve kombine edilerek uygulanmıştır. DNA hasar düzeyinin tespitinde, Komet testi kullanılmış olup, her uygulama grubundan hazırlanan preparatlar üzerinden toplamda 100 hücre incelenerek skorelama yapılmış ve kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Komet Testi DNA Hasarının Belirlenmesi

Uygulama	DNA Hasarı (Arbitrary Unit)	
	Konsantrasyon Ortalama ± Standart sapma	
	24 saat	48 saat
Pozitif Kontrol	49.55±7.87 ^e	50.44±8.62 ^e
Kontrol	3.67±1.15 ^a	4.33±1.15 ^a
Sorafenib	20.33±2.52 ^b	25.33±4.16 ^b
ALA	4.67±2.08 ^a	15.67±1.15 ^c
Sorafenib + ALA	16.67±2.89 ^d	22.67±1.15 ^d

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

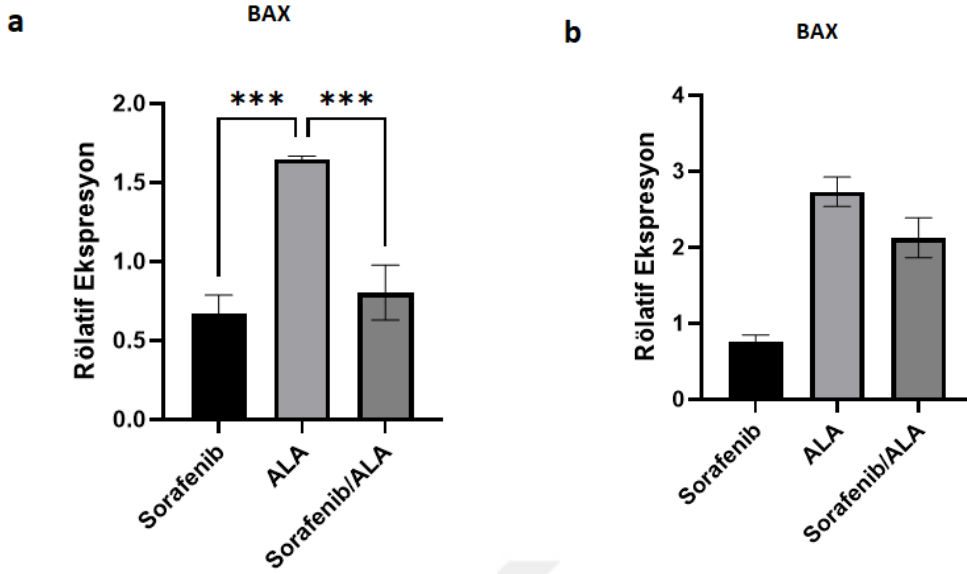
Elde edilen bulgulara göre en yüksek DNA hasarı 48 saatlik uygulamada pozitif kontrol grubunda (50.44±8.62) görülmüş ve bunu 24 saatlik pozitif kontrol uygulama grubu (49.55±7.87) takip etmiştir. DNA hasarı Sorafenib 20 µM dozunda 24 saat için 20.33±2.52 iken ve 48 saatte 25.33±4.16 olarak tespit edilmiştir. Verilerdeki en düşük DNA hasarının 24 saatte 4.67±2.08 ile ALA dozu olduğu tespit edilmiştir. 48 saatlik ALA uygulamasında DNA hasarında bir artış gözlemlenmiş olup bu hasar 15.67±1.15 olarak belirlenmiştir. Hem 24 hem de 48 saatlik uygulamada Sorafenib’in oluşturduğu DNA hasarı kombinasyon uygulamasıyla karşılaştırıldığında düşüş göstermiştir. Yapılan tüm uygulama gruplarındaki DNA hasar seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış göstermiştir.

4.5 HepG2 Hücre Hattında ALA, Sorafenib ve Kombinasyon Uygulamasının Gen İfade Düzeylerine Etkisi

HepG2 hücre hattında 24 ve 48 saatlik kombinasyon çalışmaları sonucunda kontrol grubu ve buna bağlı olarak değişkenlik gösteren kombinasyon grupları çalışılmış ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda, Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 ve Tnf- α genlerinin ekspresyon seviyeleri, β -Aktin referans geni kullanılarak çift tekrarlı olacak şekilde qRT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir.

4.5.1 HepG2 Hücre Hattında Sorafenib, ALA ve Kombinasyon Uygulamasının Bax Gen Ekspresyonuna Etkileri

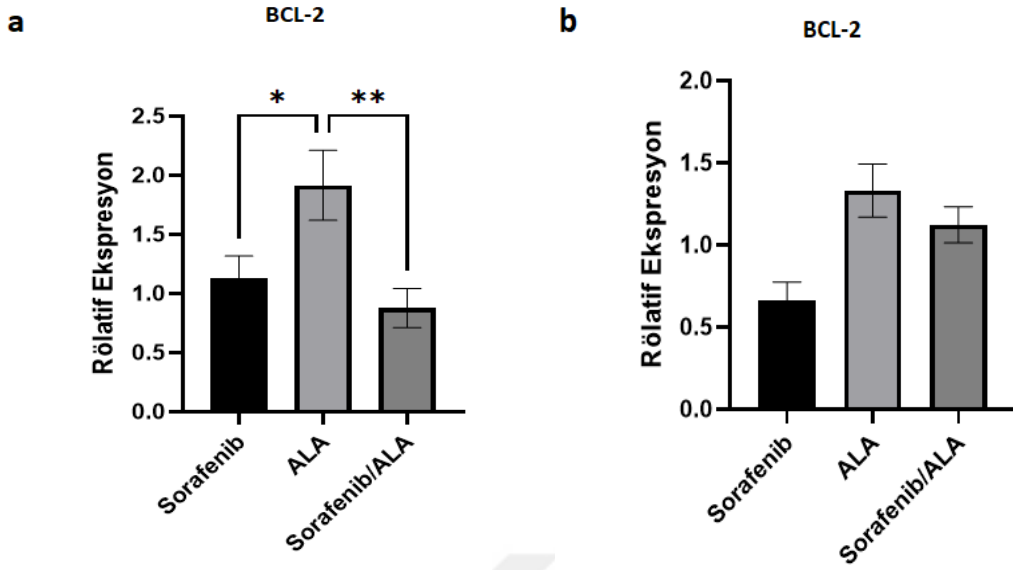
24 ve 48 saatlik uygulama sonucunda Bax gen ekspresyonuna yönelik veriler değerlendirildiğinde her iki saat uygulamasında da ALA'nın tek başına uygulamasının tek başına Sorafenib uygulamasına kıyasla gen ifade düzeyinde önemli bir artışa sebep olduğu ve bu artışın 24 saatlik uygulamada istatistiksel olarak da anlamlı olduğu gözlemlenmiştir. 24 saatlik uygulamada ALA'nın tek başına uygulaması Sorafenib uygulamasından daha fazla bir ifade düzeyine sebep olmuştur. Aynı durum 48 saatlik uygulama için de geçerli olmuştur. Sorafenib ve ALA'nın birlikte uygulanması, her iki uygulama süresi için tek başına ALA uygulamasına oranla Bax gen ifade düzeylerini azaltmıştır. Bununla birlikte tek başına ALA uygulamasında inflamasyon ve apoptoz süreçlerini başlattığı, hücre büyüme inhibisyonunun da Bax geninin ifadesinin artması ile birlikte artış gösterdiği düşünülmektedir. Elde edilen veriler göz önünde bulundurulduğunda her iki uygulama süresinde de ALA'nın tek başına uygulamasının daha güçlü bir apoptotik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Kombine uygulamalar yine Sorafenib'in tek başına uygulanmasına göre sinerjistik bir etki göstererek Bax gen ifadesinde artışa neden olmuştur. Sorafenib'e göre kombinasyon uygulamasında zamana bağlı sinerjistik etkinin artmasının, ALA uygulamasının Sorafenib'in inflamasyon ve apoptotik etkilerini artırması ile tedavide prognozun iyileşmesine moleküler düzeyde yarar sağlayacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte ALA'nın terapötik dozlarının inflamasyonda anormal hücrelerin büyüme ve çoğalmasının durdurulmasının yanı sıra hücre yenilenmeye de yarar sağlayacağı, oksidatif stres kaynaklı apoptoz üzerinde ise koruyucu etkileri olduğu öngörülmektedir. Elde edilen veriler Grafik 4.5'de verilmiştir.



Grafik 4.5 HepG2 hücre hattında BAX gen ekspresyonunun qRT-PCR ile 24 saatlik gösterimi(a) ve 48 saatlik sonuçları (b)

4.5.2 HepG2 Hücre Hattında Sorafenib, ALA ve Kombinasyon Uygulamasının Bcl-2 Gen Ekspresyonuna Etkileri

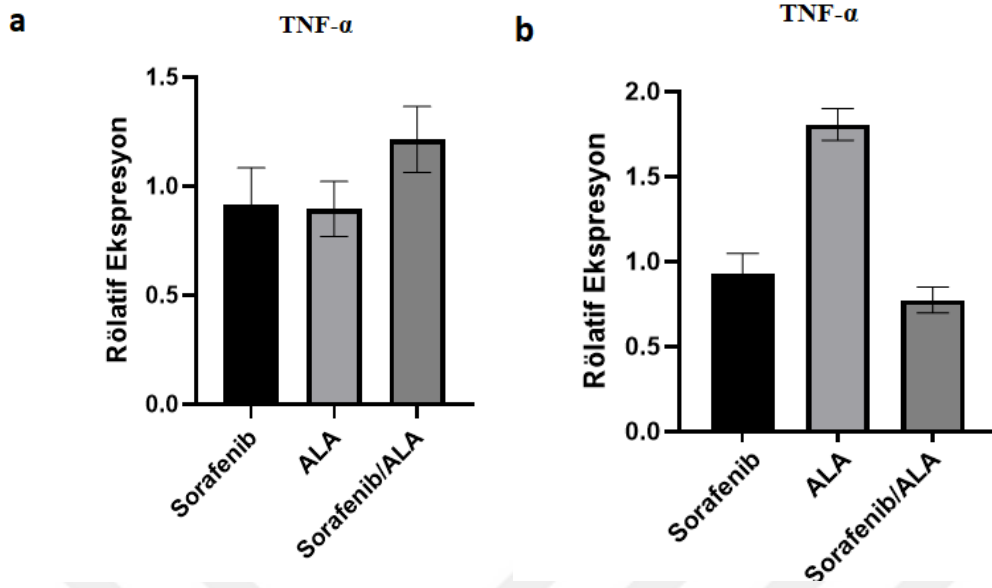
Hem 24 saatlik hem de 48 saatlik uygulama sonucunda Bcl-2 gen ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde ALA'nın tek başına uygulamasının Sorafenib'in tek başına uygulamasından daha yüksek düzeyde olduğu görülmektedir. 24 saatlik uygulamada ALA/Sorafenib kombinasyonunun her iki maddenin de tek başına uygulamasından daha düşük bir Bcl-2 gen ekspresyonu oluşturduğu gözlemlenmiştir. Ancak 48 saatlik uygulama sonucunda tek başına Sorafenib uygulamasına göre hem ALA'nın tek olarak hem de kombinasyon uygulamasının gen ifade düzeyini artırdığı tespit edilmiştir. Bu durum zaman içerisinde ALA ve Sorafenib uygulamasının zamana bağlı olarak etkinliği azalırken birlikte uygulanmasının sinerjistik etki yarattığını göstermektedir. Bununla birlikte tedavi süresi uzadıkça Bcl-2 gen ifade düzeyinin azalmasının inflamasyon ve apoptoz süreçlerinde belirleyici olduğunu göstermektedir. Bu özelliğinden dolayı Bcl-2 geninin hücresel gelişim, doku homeostazi ve immün sistemde önemli rolleri olduğu düşünülmektedir. ALA ve Sorafenib uygulamasının tedavi süresinin uzamasıyla birlikte sinerjistik etkiyi artırdığı ve çeşitli sitotoksik sinyallerin iletiminde Bax ile etkileştiği düşünülmektedir. Bcl-2 gen ifadelerine ait veriler Grafik 4.6'da verilmiştir.



Grafik 4.6 HepG2 hücre hattında BCL-2 gen ekspresyonunun qRT-PCR ile 24 saatlik gösterimi(a) ve 48 saatlik sonuçları (b)

4.5.3 HepG2 Hücre Hattında Sorafenib, ALA ve Kombinasyon Uygulamasının Tnf- α Gen Ekspresyonuna Etkileri

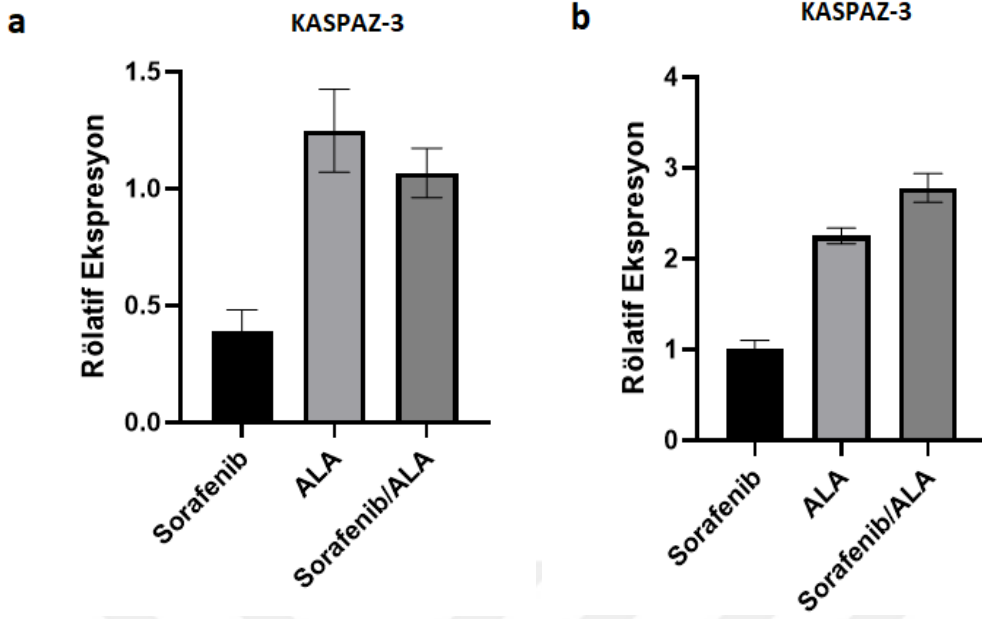
24 saatlik uygulama sonucunda kombinasyon uygulamasının Sorafenib'in ve ALA'nın tek başına uygulanmasına göre Tnf- α gen ekspresyonunu artırdığı gözlemlenmiştir. Bu durum ALA ve Sorafenib uygulamasının birlikte gerçekleştirilmesinde sinerjistik bir etki yaratabileceğini göstermiştir. Ancak 48 saatlik uygulamaya bakıldığında zamana bağlı olarak sinerjistik etkinin azaldığı aksine ALA uygulamasının tek başına Tnf- α gen ekspresyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir. 48 saatlik uygulamada Sorafenib/ALA kombinasyon uygulaması tek başına Sorafenib ya da ALA'nın etkinliğinin altında kalmış ve Tnf- α gen ekspresyonunu düşürdüğü gözlemlenmiştir. Dolayısıyla belli bir süreye kadar sinerjistik etki görülürken sürenin uzamasıyla bu etkinliğin azaldığı tespit edilmiştir. İnflamasyonun başlangıcında salınan Tnf- α anjiyogenez, invazyon ve metastazla ilgili süreçlerin, ek olarak hücre proliferasyonu ve apoptoz süreçlerinin ve yakın ve uzaktaki hücrelerin davranışlarının belirlenmesi ile de immünolojik sistemin düzenleyicisidir. Proinflamatuvar sitokinlerin yüksek düzeydeki ifadesi hemodinamik düzenlemede ve metabolik kontrol süreçlerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Sorafenib, ALA ve kombinasyon uygulamasının Tnf- α gen ekspresyon seviyelerine etkileri Grafik 4.7'de verilmiştir.



Grafik 4.7 HepG2 hücre hattında TNF- α gen ekspresyonunun qRT-PCR ile 24 saatlik gösterimi (a) ve 48 saatlik sonuçları (b)

4.5.4 HepG2 Hücre Hattında Sorafenib, ALA ve Kombinasyon Uygulamasının Kaspaz-3 Gen Ekspresyonuna Etkileri

24 ve 48 saatlik uygulama grupları değerlendirildiğinde gerek ALA'nın tek başına gerekse kombinasyonunun Sorafenib'e kıyasla Kaspaz-3 gen ifadesinde bir artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. 24 saatlik uygulamada ALA tek başına daha fazla gen ifadesi oluştururken 48 saatlik uygulamada kombinasyon halinde daha fazla gen ifadesi oluşturduğu tespit edilmiştir. Sorafenib her iki uygulama süresinde de en az Kaspaz-3 ekspresyonu göstermiştir. Bu bağlamda gerek ALA'nın tek başına gerekse kombinasyon uygulamasının hem 24 hem de 48 saatlik sürelerde Kaspaz-3 gen ifadesini upregüle ettiği sonucuna ulaşılmıştır. Ek olarak gerek ALA'nın tek başına gerekse kombinasyon uygulamasının Kaspaz-3 gen ifadesinin artışı ile apoptotik süreçte etkinliği artırmasının, hücre membranında blebler oluşturan morfolojik değişikliklere sebep olduğunun ve hem patolojik hem de fizyolojik süreçte hücre ölümünü teşvik etmesi ile doğrudan DNA fragmetasyonuna yol açtığına göstergesidir. Dahası tümör regresyonunda ve tümörün büyüme ve gelişmesinde önemli etkiler sergilediği, tedavi sürecinde ise inflamatuvar yanıt olmaksızın gereksiz, hasarlı ve zararlı hücrelerin ölümü açısından apoptotik dengenin korunduğu düşünülmektedir. Elde edilen tüm veriler Grafik 4.8'de gösterilmiştir.

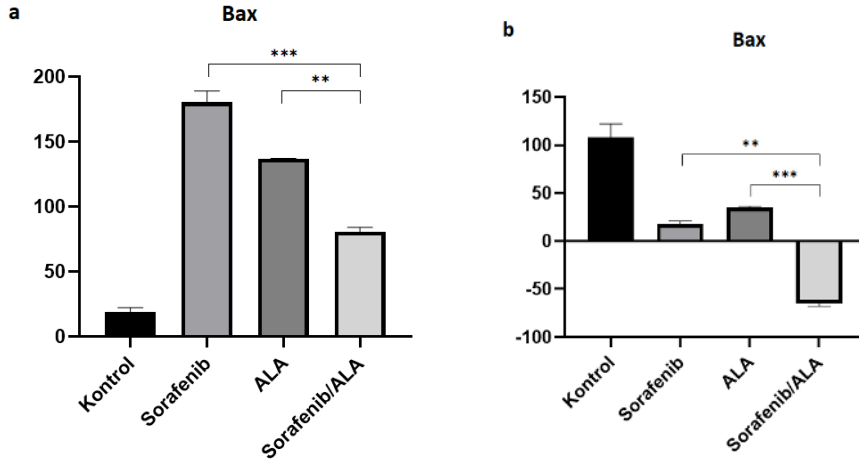


Grafik 4.8 HepG2 hücre hattında KASP3 gen ekspresyonunun qRT-PCR ile 24 saatlik gösterimi (a) ve 48 saatlik sonuçları (b)

4.6 HepG2 Hücre Hattında ALA, Sorafenib ve Kombinasyon Uygulamasının Bax, Bcl-2, Tnf- α ve Kaspaz-3 Protein Düzeyine Etkileri

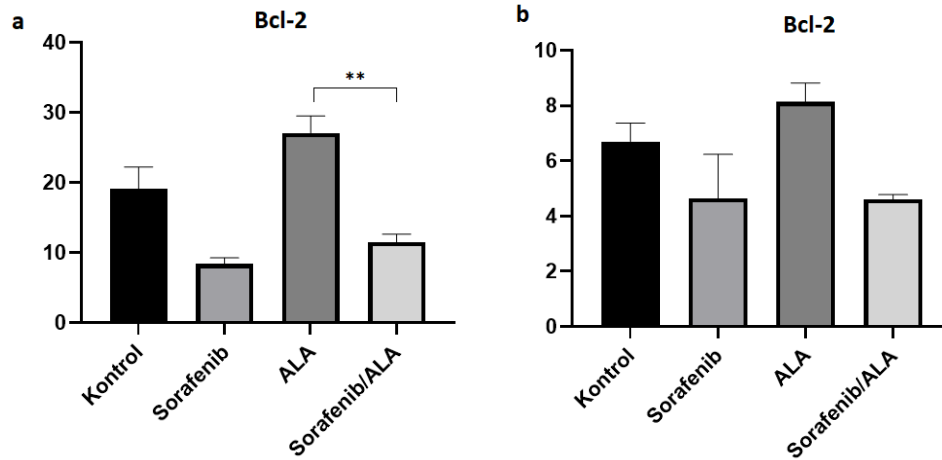
24 ve 48 saatlik ALA, Sorafenib ve kombinasyon uygulamaları ile HepG-2 hücre hattında terapi amaçlı Bax, Bcl-2, Tnf- α ve Kaspaz-3 protein seviyeleri kontrole kıyasla analiz edilerek hücrenin inflamatuvar ve özellikle apoptoz cevabı tespit edilmiştir.

24-48 saatlik uygulama sonucunda Bax protein düzeyine etkileri değerlendirildiğinde her bir uygulama grubunda da anlamlı değişiklikler gözlemlenmiştir. 24 saatlik uygulama grupları arasında en yüksek ekspresyon seviyesi Sorafenib grubunda gözlenmektedir. Yine 24 saatlik uygulamada ALA'nın tek başına uygulanmasında da Bax ifadesinin yüksek olduğu görülmektedir, kombinasyon uygulamasında ise kontrol grubundan yüksek bir ifade görülse de tek başına Sorafenib ve ALA uygulamasındaki ifade düzeyi yakalanmamıştır. 48 saatlik Bax ifade düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla genel olarak bir düşüş gözlemlenmiş, tek başına uygulamalarda görülen ifade düzeyinin kombinasyon uygulamasında oldukça gerilediği dikkat çekmiştir. Tedavi süresinin uzamasına bağlı olarak hem tek tek hem de kombinasyon uygulamasında apoptotik etkinin azaldığı görülmektedir. Elde edilen veriler Grafik 4.9'da verilmiştir.



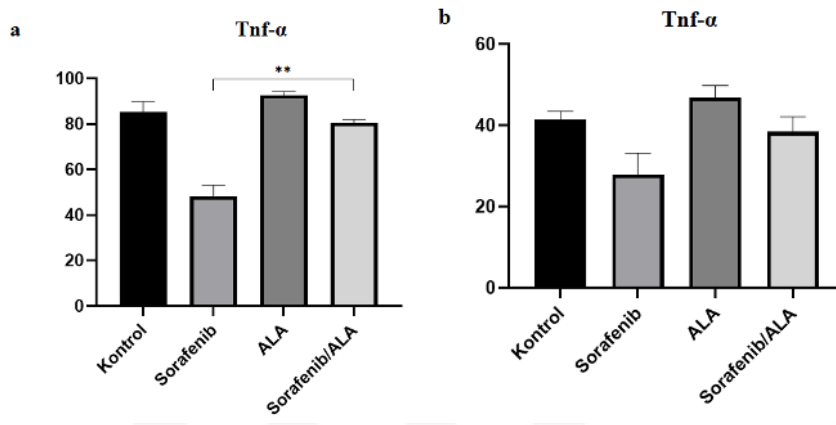
Grafik 4.9 HepG2 hücre hattında Bax protein düzeyinin kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin sonuçları (a) 24 saat (b) 48 saat

24-48 saatlik uygulama sonucunda Bcl-2 protein düzeyi verileri değerlendirildiğinde her bir uygulama grubunda da anlamlı değişiklikler gözlemlenmiştir. Özellikle 24 saatlik uygulamada kontrol grubuna göre ALA uygulamasının ve yine Sorafenib/ALA kombinasyon uygulamasının anlamlı ölçüde Bcl-2 protein ifadesini arttırdığı gözlemlenmiştir. 48 saatlik uygulamada ise ALA'nın tek başına en yüksek Bcl-2 protein seviyesi artışına neden olduğu tespit edilmiştir. Her iki saat uygulamasında da ALA'nın tek başına Bcl-2 protein artışına sebep olduğu açıkça gözlenmektedir. Ancak bu protein ifade düzeyleri zamana bağlı olarak azalış göstermektedir. Elde edilen veriler Grafik 4.10'da verilmiştir.



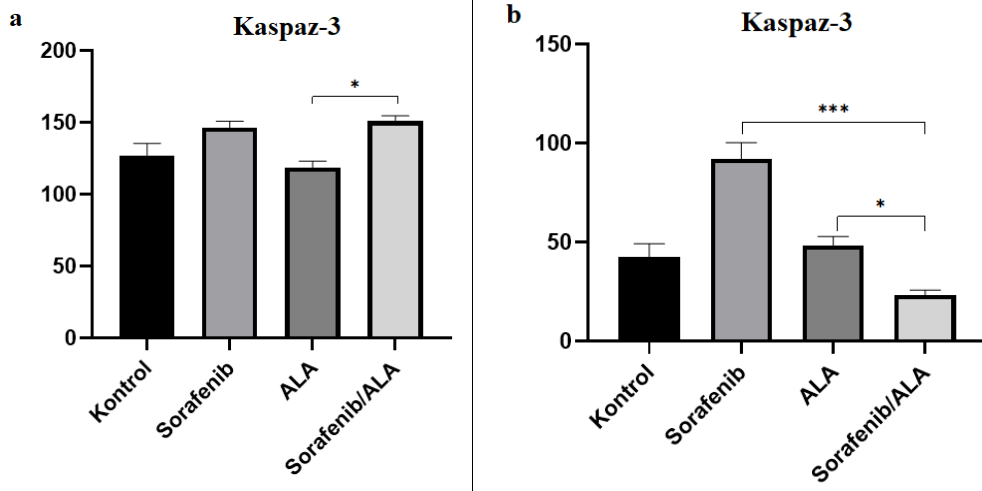
Grafik 4.10 HepG2 hücre hattında Bcl-2 protein düzeyinin kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin sonuçları (a) 24 saat (b) 48 saat

24 ve 48 saatlik uygulama sonuçlarında $Tnf-\alpha$ protein ifade düzeyleri değerlendirildiğinde özellikle tek başına ALA uygulamasının kontrol grubundan daha yüksek ifade düzeyine sahip olduğu tespit edilmiştir. Sorafenib'in tek başına uygulamasına kıyasla hem 24 saat hem de 48 saatlik uygulama gruplarında ALA ve Sorafenib/ALA kombinasyonlarının daha yüksek $Tnf-\alpha$ ifade düzeyine ulaştığı saptanmıştır. $Tnf-\alpha$ 'nın kontrole göre ve gruplar arasında protein ifade düzeyleri yüksek seviyededir. Ayrıca iki farklı uygulama süresi değerlendirildiğinde zamana bağlı olarak tüm uygulamalarda $Tnf-\alpha$ düzeyinin azaldığı ortaya konulmuştur. $Tnf-\alpha$ ifadesindeki uygulama gruplarına ve zamana bağlı değişimler Grafik 4.11'de verilmiştir.



Grafik 4.11 HepG2 hücre hattında $Tnf-\alpha$ protein düzeyinin kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin sonuçları (a) 24 saat (b) 48 saat

24-48 saatlik uygulama sonucunda Kaspaz-3 protein ifade düzeyleri değerlendirildiğinde her bir uygulama grubunda da anlamlı değişiklikler gözlemlenmiştir. 24 saatlik uygulamada ALA tek başına kontrol grubuna yakın bir değer gösterirken Sorafenib'in tek uygulaması ve kombinasyon uygulaması kontrol grubundan daha yüksek bir Kaspaz-3 protein ifadesi oluşturmuştur. 48 saatlik uygulama sonuçları değerlendirildiğinde ise zamana bağlı olarak tüm gruplarda Kaspaz-3 protein ifadesinde bir azalma meydana gelmiş ancak kontrol grubuna göre Sorafenib uygulama grubu başta olmak üzere ALA uygulama grubu da kontrol grubuna kıyasla daha yüksek protein ifadesi sergilemiştir. Ancak kombinasyon grubu 48 saatlik uygulamada bu protein ifadesi açısından düşük bir sentez sergilemektedir.



Grafik 4.12 HepG2 hücre hattında Kaspaz-3 protein düzeyinin kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin sonuçları (a) 24 saat (b) 48 saat

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser dünya genelinde insan ölümlerinin ikinci nedeni olarak önemini korumaya devam eden bir hastalık olup, bu hastalıkla savaşmak için yeni tedavi prosedürlerinin oluşturulmasına yönelik araştırmalar güncelliğini korumaya devam etmektedir. Karaciğer kanseri dünya genelinde en yaygın ve ölümcül malignitelerden biri olarak kabul edilmekte ve özellikle HSK, bu kanser türünün en sık görülen şeklini oluşturmaktadır. Sorafenib, karaciğer kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir multikinaz inhibitörüdür. Sorafenib'in HSK üzerindeki etkinliği kanıtlanmış olmakla birlikte, bazı hastalarda direnç gelişimi gibi zorluklarla karşılaşmaktadır (Bruix ve Sherman 2011). Bu nedenle etkinliği kanıtlanmış olan ilaçlarda sıklıkla karşılaşılan ilaç direncinin önüne geçilmesi ve pek çok kanser türünde bu problemi bertaraf etmek için kombine terapiler tercih edilmektedir. Dolayısıyla Sorafenib'in farklı maddelerle kombinasyonları bu ilaç direncinin önüne geçilmesinde ve HSK tedavisinde yeni bir umut ışığı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bağlamda çalışmamızda Sorafenib'in çeşitli yiyeceklerde bulunan ve vücutta da aerobik metabolizma için sentezlenebilen ve antioksidan bir madde olan ALA ile kombinasyonunun HepG2 hücre hattındaki etkileri araştırıldı.

Bu çalışmada, HepG2 hücre hattında ALA ve Sorafenib'in tekli ve kombine uygulamalarının sitotoksik etkileri MTT hücre canlılık testi aracılığıyla 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri boyunca değerlendirilmiştir. Yine genotoksik etkilerini belirlemek için Komet analizi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca uygulama gruplarının tümünde Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 ve TNF- α gen ekspresyon seviyeleri tespit edilerek uygulama gruplarının apoptoz açısından değerlendirilmesi yapılmıştır. Gen ifade düzeylerinin yanısıra aynı genlerin protein ürünleri de tespit edilerek, gen ifadeleri ile bunların ürünlerinin uyumlulukları da gözden geçirilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, her iki ajan için de doz ve zamana bağlı olarak hücre canlılığında anlamlı düzeyde azalma gözlemlendiğini ortaya koymuştur. ALA'nın 1-10 μ M aralığındaki dozlarında hem 24 hem de 48 saat sonunda hücre canlılık oranlarında düşüş olduğu, bu etkinin doz arttıkça belirginleştiği görülmüştür. Özellikle 10 μ M ALA dozunda canlılık oranı 24 saatte %39.06 ve 48 saatte %14.41 düzeylerine düşerek bu

ajanın hepatokarsinom hücrelerinde güçlü bir antiproliferatif etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, Sorafenib'in 1-100 μM aralığında uygulandığı çalışmalarda, 5 μM ve üzeri dozlarda hücre canlılığında anlamlı düşüşler gözlemlenmiş, özellikle 10 ve 15 μM dozlarında canlılık %50'nin altına inmiş ve 30 μM dozdan itibaren canlılık oranları %10-20 seviyelerine kadar gerilemiştir. Bu bulgular, literatürde daha önce yapılan çalışmalarla da örtüşmektedir. Örneğin, Wilhelm vd. (2004), Sorafenib'in hepatokarsinom hücrelerinde hücre proliferasyonunu baskıladığını ve doz artırımla birlikte bu etkinin arttığını göstermiştir. Çalışmada en dikkat çekici bulgu ise ALA ve Sorafenib'in kombinasyon halinde uygulanmasıyla elde edilen canlılık oranları olmuştur. 24 saatlik inkübasyon sonunda ALA (5 μM) ve Sorafenib (20 μM) tekli uygulamalarında sırasıyla %56 ve %42 oranlarında hücre canlılığı saptanırken, bu iki ajanın birlikte uygulanması sonucu hücre canlılık oranı %85'e çıkmıştır.

Kombinasyonun, her iki ajanın tekli uygulamalarına kıyasla daha yüksek canlılık oranı oluşturması, sinerjistik ya da additif bir etki yerine antagonistik bir etkileşimin varlığını işaret etmektedir. 48 saatlik inkübasyonda da benzer bir durum gözlemlenmiş ve kombinasyon grubundaki canlılık oranı yaklaşık %48 ile, tekli uygulamaların oluşturduğu hücre canlılık oranlarıyla benzer düzeyde seyretmiştir. Bu durum, iki ajanın birlikte uygulandığında toksisitenin azalabileceğini ve bunun da hücre düzeyinde olası antagonistik etkileşmeye işaret ettiğini düşündürmektedir. Aittokallio vd. (2015) ile Pemovska vd. (2018) tarafından yapılan çalışmalarda da vurgulandığı üzere, ilaçların kombinasyon etkileri farmakodinamik olarak sinerjistik, additif veya antagonistik olarak sınıflandırılmakta ve özellikle sinerjistik olmayan kombinasyonlar tedavi stratejileri açısından daha dikkatli analizler gerektirmektedir.

ALA-Sorafenib kombinasyonunda gözlenen bu antagonistik etki, ALA'nın antioksidan özellikleri ile Sorafenib'in oksidatif stres yoluyla oluşturduğu apoptoz arasında potansiyel bir etkileşime işaret etmektedir. Literatürde, ALA'nın reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleyici ve mitokondriyi koruyucu etkileri sayesinde bazı kemoterapötik ajanların etkinliğini azaltabileceği bildirilmiştir (Shay vd. 2009). Bu açıdan bakıldığında, Sorafenib'in mitokondriyal disfonksiyon üzerinden apoptoz indükleyici etkisi, ALA'nın antioksidan kapasitesiyle nötralize edilmiş olabileceği öngörülmektedir. Bu etki,

sitotoksik etkinin azalmasıyla sonuçlanarak hücre canlılığının beklenenden daha yüksek kalmasıyla sonuçlanmış olabilir. Bu durum, ilaç kombinasyonlarının terapötik başarısını etkileyebilecek önemli bir faktör olup, hedeflenen sinerjistik etkinin sağlanabilmesi için etkileşen moleküllerin biyokimyasal yolları üzerinde detaylı analizlerin yapılmasını gerekli kılmaktadır. Çalışmamızın sonuçları, literatürde benzer şekilde kombinasyon tedavilerinin her zaman sinerjistik sonuçlar doğurmadığını vurgulayan çalışmalarla da örtüşmektedir. Örneğin, Oğuz-Ozer (2023), bazı kombinasyonların hücre düzeyinde koruyucu veya antagonistik etki gösterebileceğini ve bu etkinin çoğunlukla ilaçların hücre içi hedeflerinin çakışmaması veya birbirini engellemesi durumunda meydana geldiğini belirtmiştir. Bu nedenle, özellikle antioksidan özellik taşıyan bileşiklerin kemoterapötik ilaçlarla birlikte kullanılmadan önce potansiyel antagonistik etkilerinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Ayrıca, kontak inhibisyon mekanizmasının ve hücre-hücre etkileşimlerinin *in vitro* ortamlarda hücre yanıtlarını etkileyebileceği de unutulmamalıdır.

Özet olarak, bu çalışmada MTT analizinden elde edilen veriler, ALA ve Sorafenib'in tekli uygulamalarında HepG2 hücre hattında anlamlı düzeyde hücre canlılığı azalmasına yol açtığını, ancak kombinasyon uygulamalarında beklenen sinerjistik etki yerine antagonistik ya da nötr bir etkinin gözlemlendiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, kemoterapiye destek amaçlı kullanılacak ajanların dikkatli seçilmesi gerektiğini ve antioksidanların kullanılan anti kanser ajanın etkinliğini değiştirebileceğini göstermektedir.

HepG2 hücre hattında Sorafenib ve ALA'nın tek başlarına ve kombinasyon halinde uygulanmasıyla meydana gelen DNA hasarları, Komet testi ile değerlendirilmiştir. Komet testi sonuçlarına göre, Sorafenib uygulamasının hem 24 saat hem de 48 saatlik inkübasyon sürelerinde DNA hasarını anlamlı düzeyde artırdığı görülmüştür. Bu sonuç, daha önce HSK modellerinde Sorafenib'in DNA bütünlüğünü bozarak hücre ölümünü tetiklediğini bildiren çalışmalarla uyumludur (Zhang ve ark., 2018). Yine elde edilen bu sonuçlar, Sorafenib'in genotoksik bir bileşik olduğunu rapor eden literatürdeki diğer pek çok çalışmayla paralellik göstermektedir. Örneğin, Zhang ve diğerleri (2020), Sorafenib'in doz artışına bağlı olarak DNA bütünlüğünü bozduğunu ve ROS türevlerini

artırarak oksidatif strese yol açtığını ifade etmiştir. Yine Abdel-Rahman ve diğerleri (2022), Sorafenib'in HepG2 hücrelerinde DNA iplikçiklerinin kopmasına neden olduğunu ve genotoksik potansiyel taşıdığını belirtmiştir. Bu bağlamda, mevcut çalışmamızda elde edilen veriler, Sorafenib'in genetik materyal üzerinde ciddi düzeyde hasara neden olabileceğini göstermektedir. ALA uygulama gruplarında ise özellikle 24 saatlik uygulamada (4.67 ± 2.08) DNA hasar düzeyinin kontrol grubuna yakın bir değer sergilediği tespit edilmiştir. Bu sonuç ALA'nın tek başına uygulandığında DNA hasarını anlamlı düzeyde düşük tuttuğunu göstermektedir. Benzer şekilde, Şahin (2021) tarafından yapılan bir çalışmada ALA'nın Caco-2 hücre hattında oksidatif stres kaynaklı DNA hasarını azalttığı gösterilmiştir. 48 saatlik uygulamada hasar seviyesinde artış olsa da Sorafenib uygulama grubunun hasar seviyesinden aşağıda kalmıştır. ALA ve Sorafenib'in kombinasyon halinde uygulandığı grupta DNA hasarı yalnızca Sorafenib grubuna göre daha düşük, fakat kontrol grubuna kıyasla hâlâ yüksek bulunmuştur. Bu bulgu, ALA'nın Sorafenib'e bağlı oluşan genotoksisiteyi tamamen ortadan kaldırmasa da belirli oranda baskıladığını göstermektedir. Liu ve diğerleri (2020), ALA'nın kemoterapiye bağlı DNA hasarını mitokondriyal düzeyde azalttığını ve hücre sağkalımını artırdığını bildirmiştir. Bu durum, çalışmamızdaki bulgularla örtüşmektedir. Dahası kombinasyon uygulama sonuçları değerlendirildiğinde ise ALA ve Sorafenib'in tek başına oluşturduğu DNA hasar düzeyinde bir koruyucu etkisinin olduğu görülmektedir. ALA özellikle ROS oluşumunu engelleyerek DNA hasarının oluşmasında koruyucu bir rol üstlenmektedir. Çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde literatürdeki farklı çalışmalar ALA'nın DNA hasarı açısından koruyucu etkisini göstermektedir (Dadhania vd. 2010, Koşar vd. 2017, Attiya 2022, Luo vd. 2022, Espíndola vd. 2022, Abd-Alaty vd. 2025).

HepG2 hücre hattında 24 ve 48 saatlik Sorafenib ve ALA kombinasyonlarının etkileri, apoptotik ve inflamatuvar süreçlerde görev alan Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 ve TNF- α genlerinin ekspresyon düzeyleri incelenerek değerlendirilmiştir. Elde edilen qRT-PCR verileri doğrultusunda, her iki sürede de gen ekspresyonlarında anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. Elde edilen bulgular, kombinasyon tedavisinin çoğu durumda tekli ajanlara kıyasla daha belirgin etkiler yarattığını ortaya koymaktadır. Özellikle Bax ve Kaspaz-3 gibi pro-apoptotik genlerin ekspresyonundaki artışlar, uygulanan ajanların hücre ölümü

mekanizmaları üzerindeki etkilerini ortaya koyarken; Bcl-2 gibi anti-apoptotik genlerdeki değişimler bu sürecin nasıl düzenlendiğini anlamak açısından kritik öneme sahiptir.

Bax gen ekspresyonu açısından değerlendirildiğinde, her iki sürede de ALA'nın tek başına Sorafenib uygulamasından daha yüksek ekspresyon düzeyine neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kombinasyon uygulaması Bax ifadesi açısından değerlendirildiğinde tek başına Sorafenib uygulamasından daha yüksek bir ifade düzeyi sergilemiş 48 saatlik uygulamada Sorafenib'in etkisi azalırken hem ALA'nın tek başına uygulanması hem de kombinasyonu Bax ifadesinde artışa neden olmuştur. Bu bulgu, tedavi süresi uzadıkça ALA'nın apoptotik süreçlerde Sorafenib ile sinerjistik bir etkileşim içine girdiğini göstermektedir. Literatürde yapılan benzer bir çalışmada, Yang ve diğerleri (2021), HepG2 hücrelerinde Sorafenib uygulamasının mitokondriyal yolda yer alan Bax gen ekspresyonunu artırarak hücreleri apoptoza sürüklediğini, bu etkinin ise tedavi süresiyle birlikte daha belirgin hale geldiğini bildirmiştir. Yine Ahmadi vd. (2025) yapmış oldukları çalışmada Osteosarkom MG-63 hücrelerinde ALA'nın etkinliğini değerlendirmiş ALA'nın hücre göçünü önemli ölçüde engellediğini, hücre döngüsü durmasını indüklediğini ve P53 ve Bax ekspresyonunu yukarı düzenlerken Bcl-2 seviyelerini aşağı düzenleyerek apoptozu desteklediğini göstermiştir. Bu çalışma sonuçları elde ettiğimiz Bax ifadesindeki artış ile uyumlu sonuçlar göstermektedir.

Apoptozun başlatılmasında görev alan proapoptotik Bax geni, mitokondriyal membran bütünlüğünün bozulmasına neden olarak hücre ölümünü tetiklemektedir. Çalışmamızda, ALA uygulamasının Bax gen ekspresyonunu tek başına ve kombinasyon grubunda anlamlı biçimde artırdığı tespit edilmiştir. Bu bulgu, ALA'nın apoptozu destekleyici etkisini göstermektedir. Literatürde de benzer şekilde, ALA'nın proapoptotik genleri aktive ederek çeşitli kanser hücrelerinde apoptotik yanıtı artırdığı rapor edilmiştir (Demir vd. 2021; Kaya vd. 2022). Ayrıca, Sorafenib'in tek başına uygulandığında Bax genini anlamlı biçimde upregüle edemediği görülmüştür. Bu durum, Sorafenib'in daha çok anti-proliferatif etkiyle sınırlı kaldığını, ancak ALA ile kombinasyonunun sinerjik bir apoptotik etki oluşturduğunu düşündürmektedir. Aynı yönde sonuçlara ulaşan bir başka çalışmada da, ALA'nın Sorafenib ile birlikte kullanıldığında HepG2 hücrelerinde mitokondriyal yıkımı tetiklediği bildirilmiştir (Yılmaz vd. 2023). Literatürde benzer

şekilde, ALA'nın kanser hücrelerinde oksidatif stres oluşturarak Bax ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (Wang vd. 2021). Sorafenib'in de mitokondriyal disfonksiyonu artırarak Bax üzerinden apoptozisi başlattığı gösterilmiştir (Park vd. 2020). Kombinasyon tedavisi, bu etkilerin sinerjistik olarak birleşmesiyle Bax düzeyinde belirgin bir upregülasyon yaratmıştır.

ALA uygulamasında ise bu genlerin ekspresyon düzeylerinde dengeleyici bir etki gözlenmiş; Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 ve TNF- α gen ekspresyonları genel olarak artış göstermiştir. Benzer şekilde, Kaya (2020) tarafından yapılan bir çalışmada ALA'nın, 5-FU ile tedavi edilen kolorektal kanser hücrelerinde apoptoz belirteçlerinin ekspresyonunu baskıladığı ve hücre sağkalımını artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, Baran vd. (2019), ALA'nın TNF- α ekspresyonunu azalttığını ve iltihabi yanıtı bastırdığını göstermiştir, ancak çalışmamızda gözlemlenen TNF- α 'daki artış bu çalışma ile farklılık göstermektedir. TNF- α düzeyindeki bu artış inflamatuvar bir yanıtın tetiklendiğini düşündürmektedir. Ayrıca TNF- α gen ekspresyonunun artışı, ilacın inflamatuvar yanıtı da aktive ettiğini göstermektedir. Bu sonuçlar, Sorafenib'in hem mitokondriyal hem de ekstrinsik apoptoz yollarını etkileyerek hücre ölümünü tetiklediğini bildiren literatür çalışmalarıyla paralellik göstermektedir (Kim vd. 2017; Yılmaz 2022).

Özet olarak, bu çalışma Sorafenib'in HepG2 hücre hattında hem DNA hasarına hem de apoptoz/inflamasyon süreçlerine neden olduğunu; ALA'nın ise DNA hasarını azaltıcı yönde etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. ALA, antioksidan özelliği sayesinde kemoterapiye bağlı hücresel toksisiteyi azaltma potansiyeline sahiptir. Ancak gen ifade düzeyleri göz önünde bulundurulduğunda ALA'nın Bax, Kaspaz-3 ve TNF- α gen ekspresyonlarını artırarak özellikle apoptoz sürecine katkı sağladığı ve bunun literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu olduğu dikkat çekmektedir.

TNF- α gen ekspresyonu, çalışmada tüm uygulama gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artmıştır. Bu artış, inflamatuvar yanıtın aktivasyonu ve hücre içi ölüm sinyallerinin arttığını göstermektedir. Özellikle ALA'nın TNF- α genini güçlü bir şekilde upregüle ettiği görülmüştür. Literatürde, ALA'nın NF- κ B yollarını inhibe etmesiyle TNF- α salınımını düzenlediği belirtilmiştir (Doğan vd. 2021). Bununla birlikte, Sorafenib

uygulamasında TNF- α düzeyleri kombinasyon uygulaması ya da yalnızca ALA uygulamasına yakın değerler göstermiştir. Kombinasyon grubunda bu iki etkinin bir arada bulunması nedeniyle özellikle 24 saatlik uygulamada TNF- α ekspresyonunda yüksek düzeyde bir artış gözlemlenmiştir. Bu durum, ALA ve Sorafenib'in inflamasyon ve apoptoz yollarında birbirine sinerjistik etkiler yaratabileceğini ve bunun da terapötik açısından önemli olduğunu düşündürmektedir.

Apoptozun yürütücü kaskadında görev alan Kaspaz-3 gen ekspresyonunun özellikle ALA ve kombinasyon gruplarında belirgin şekilde arttığı saptanmıştır. Bu bulgu, apoptotik sürecin ilerletildiğini göstermektedir. Önceki çalışmalar, ALA'nın mitokondriyal yolla apoptozu tetiklediğini ve Kaspaz-3 aktivitesini artırarak hücre ölümüne neden olduğunu ortaya koymuştur (Türkmen vd. 2022). Sorafenib'in ise tek başına uygulandığında Kaspaz-3 ekspresyonunu daha düşük düzeyde etkilediği, ancak ALA ile kombinasyonunun bu etkiyi sinerjik şekilde artırdığı görülmüştür. Bu da ALA'nın Sorafenib'in apoptotik etkilerini güçlendirebileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada, HepG2 insan karaciğer kanseri hücre hattında Sorafenib ve ALA'nın tek tek ve kombinasyon halinde uygulanmasının apoptotik ve inflamatuvar yanıt üzerine etkileri, hem gen hem de protein düzeyinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde değerlendirilmiştir. Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 ve TNF- α gibi apoptoz ve inflamasyonla ilişkili anahtar gen ürünlerinin seviyeleri qRT-PCR ile analiz edilip, ELISA metodu ile de protein ifade düzeyleri belirlenmiştir.

Bax protein ekspresyonları açısından değerlendirildiğinde, 24 saatlik uygulamada Sorafenib'in tek başına uygulandığı grupta belirgin bir artış gözlenmiş, bu durum önceki çalışmalarla paralellik göstermiştir. Zhang vd. (2017), özellikle, Sorafenib'in apoptotik mekanizmaları Bax üzerinden aktive ettiğini vurgulamıştır. Ancak 48 saatlik uygulama sonuçlarında tüm gruplarda protein düzeylerinin kontrol grubunun altında kalması, uzun süreli etkileşimlerde kompanzatuvar mekanizmaların devreye girebileceğini düşündürmektedir. Yine 24 saatlik uygulamada ALA'nın tek başına ve kombinasyon halindeki uygulama gruplarında Bax protein ifadesi açısından kontrol grubundan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Bcl-2 protein seviyeleri açısından uygulama grupları değerlendirildiğinde Sorafenib uygulamasında kontrol grubuna göre Bcl-2 protein ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir. Liu vd. (2018), Bcl-2 ekspresyonları hem gen hem protein düzeyinde incelendiğinde, Sorafenib'in anti-apoptotik bir gen olan Bcl-2'yi baskıladığı net olarak ortaya konmuştur. Sorafenib'in intrinsik apoptoz yolunu aktive ederek Bcl-2'yi inhibe ettiği literatürde daha önce de rapor edilmiştir. Yine Mittal vd. (2024) yaptıkları çalışmada Sorafenib'in Bcl-2 protein seviyelerinde bir azalışa sebep olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamız Bcl-2 protein seviyeleri bakımından literatürdeki benzer çalışmalara paralellik göstermektedir. Ancak gerek tek başına ALA uygulaması gerekse kombinasyon halinde uygulanması Bcl-2 protein seviyelerinde Sorafenib grubuna göre bir artış göstermiş olup bu değerler her ne kadar kontrol grubuna yaklaşımasa da Bcl-2 protein seviyelerindeki bu artış bir antagonist etkiyi düşündürmektedir.

Kaspaz-3 protein ifadeleri bakımından 24 saatlik uygulama verileri değerlendirildiğinde gerek Sorafenib gerekse kombinasyon grubunun kontrol grubundan daha yüksek bir Kaspaz-3 protein seviyesi oluşturduğu tespit edilmiş ve bu protein açısından sinerjistik bir ilişki oluşturduğu düşünülmüştür. Kaspaz-3 aktivitesinin artışı, apoptotik yolağın başarıyla çalıştığının göstergesi olarak kabul edilir (Zhang vd. 2022). Ayrıca, bu bulgu kombinasyon tedavisinin apoptotik hücre ölümünü artırmadaki başarısını desteklemektedir. Ancak 48 saatlik uygulama süresinde Sorafenib etkisi halen devam ederken kombinasyonun etkisinin azaldığı gözlemlenmiştir. Vanli vd. (2024) yaptıkları çalışmada, Sorafenib uygulamasının bizim çalışmamıza benzer şekilde Kaspaz-3 protein seviyelerinde bir artışa neden olduğunu tespit etmişlerdir. Literatürde daha önce yapılmış olan pek çok çalışma Kaspaz-3 protein seviyelerindeki artışa dikkat çekmektedir (Persad vd. 2004, Ding vd. 2010, Youssef vd. 2016, Yao vd. 2020).

TNF- α protein düzeylerinde ise özellikle Sorafenib'in baskılayıcı etkisi açıkça görülmüştür. TNF- α , hem inflamatuvar hem de apoptozla ilişkili ikili fonksiyona sahip olup, hücre tipine ve uyarana göre farklı yolları aktive edebilmektedir. Çalışmamızda Sorafenib tekli uygulamalarda Tnf- α protein ifadesinde düşüşe sebep olmuştur. Tnf- α düzeylerinde gözlenen azalmalar, potansiyel antiinflamatuvar etkiyi düşündürmektedir. Çalışmamıza benzer şekilde Hasan vd. (2024) yaptığı çalışmada HSK hücre hattında

Sorafenib uygulamasının Tnf- α düzeylerinde azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir. Literatürde farklı çalışmalar tüm bu sonuçları destekler niteliktedir (Yoshizaki vd. 2011, Liu vd. 2022, Demirtas vd. 2023). Bu durum, özellikle hepatokarsinom gibi inflamatuvar mikroçevreye sahip tümörlerde, tedavinin inflamasyonu azaltıcı etkisine işaret etmektedir. Tnf- α 'nın downregülasyonu, tümör progresyonunun baskılanması açısından önemlidir (Chen vd. 2021). Çalışmamızda ALA'nın gerek tek başına gerekse Sorafenib ile kombine halde uygulanmasında Tnf- α düzeyleri kontrol grubuna yakın değerler sergilemektedir bu durum ALA'nın Sorafenib'in etkinliğini azalttığını ve antagonizm sergilediğini düşündürmüştür. Bu sonuçlar literatürdeki bazı çalışmalarda (Albadrani vd. 2024, Abdelkader vd. 2025) kullanılan ALA'nın Tnf- α düzeylerini düşürücü etkisi açısından bizim çalışmamızla zıtlık göstermekte olup bu durumun antiinflamatuvar etkisinin doz bağımlı olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışma, özellikle HSK tedavisinde Sorafenib ve ALA kombinasyonunun olası etkilerini hem moleküler düzeyde ortaya koyarak, gelecekteki tedavi stratejileri için önemli veriler sunmaktadır. Ancak, bu sonuçların daha ileri *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi, farmakokinetik etkilerin kapsamlı bir şekilde analiz edilmesi gerekmektedir. Ayrıca toksikolojik etkilerin değerlendirilmesinde farklı test sistemleri de kullanılarak sonuçların güvenilirliğinin artırılması da gerek ALA'nın tek başına uygulanması gerekse kombinasyon etkileri açısından daha güvenli veriler sunabilir. Çalışmamızda elde edilen tüm bu sonuçlar, gelecekte yapılacak *in vivo* çalışmalar ve klinik denemeler için temel oluşturması bakımından önem arz etmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abbas, A. M., Faisal, A. N. and Mohsein, O. A. (2025). Histological and Cytokine-Based Biomarkers in the Early Diagnosis of Cancer. *Indonesian Journal on Health Science and Medicine*, 2(2), 10-21070. <https://doi.org/10.21070/ijhsm.v2i2.93>
- Abd-Alaty, H. E. S., Abu Almaaty, A. H., Elsayed, M., and Hassan, M. K. (2025). Medemia Argun Seed Extract Ameliorates the Lipopolysaccharide-Induced Acute Inflammation. *Alfarama Journal of Basic & Applied Sciences*, 6(1), 9-22. <https://doi.org/10.21608/ajbas.2024.340108.1240>
- Abdelkader, N. F., El-Batal, A. I., Amin, Y. M., Hawas, A. M., Hassan, S. H. and Eid, N. I. (2025). Possible Mechanisms Underlying the Neuroprotective Effects of Gold Nanoparticles and Alpha-Lipoic Acid Mixture on Brain Damage Induced by Radiation: A Subacute Study in Rats. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 106977. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2025.106977>
- 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>
- Abusaliya, A., Bhosale, P. B., Kim, H. H., Park, M. Y., Jeong, S. H., Lee, S., and Kim, G. S. (2024). Investigation of Prunetrin Induced G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis Via Akt/mTOR/MAPK Pathways in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 174, 116483. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116483>
- Acar, F., Kara, E., Tunç, E. (2020). Sorafenib'in Hepatokarsinom Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkileri. *Onkoloji Bülteni*, 15(2), 101-110.
- Adams, J. M. and Cory, S. (2002). Apoptosomes: Engines for Caspase Activation. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(6), 715-720.
- Ahmadi, A., Hosseini, F., Rostami, M. and Soukhtanloo, M. (2025). Anticancer Effects of Alpha-Lipoic Acid, A Potent Organosulfur Compound by Modulating Matrix

- Metalloproteinases and Apoptotic Markers in Osteosarcoma MG-63 Cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 247, 106664. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2024.106664>
- Aittokallio, T., Lin, K., & Wennerberg, K. (2015). Drug Combination Prediction And Design In Cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(6), 427–440. <https://doi.org/10.1038/nrd4572>
- Aktuğ, H. (2014). Apoptozis ve Hücre Döngüsü. *Ege Journal of Medicine*, 53(1), 60-64.
- Albadrani, G. M., Altyar, A. E., Kensara, O. A., Haridy, M. A., Zaazouee, M. S., Elshanbary, A. A., ... Abdel-Daim, M. M. (2024). Effects of Alfa Lipoic Acid and Coenzyme Q10 Treatment on AFB1-Induced Oxidative, Inflammatory, and DNA Damages in Rats. *Toxicon*, 249, 108083. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2024.108083>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2008). The Molecular Biology of The Cell. In J. Boyle (Eds.), 316-321. New York, Garland Science.
- Altuner, E. E. ve Aldemir, O. (2024). Sağlık Bilimlerinde Uluslararası Çalışmalar. Prof. Dr. Engin Şahna, Serüven Yayınevi, 41-48.
- Ana-Maija, T., Maja, L. (2024). Normalization Strategies for qPCR Gene Expression Analysis İn Cancer Research. *Journal of Molecular Biology Reports*, 13(1), 25-34.
- Argani, H. (2020). New Markers for Transplant Rejection. *Experimental and Clinical Transplantation*, 18(Ek 1):1-9. <https://doi.org/10.6002/ect.TOND-TDTD2019.L6>
- Asghar, U. and Meyer, T. (2012). Are There Opportunities for Chemotherapy in The Treatment of Hepatocellular Cancer? *Journal of Hepatology*, 56(3), 686-695. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.07.031>

- Atagün, G., Eren, Z. ve Gürkanlı, İ. (2011). Role of Mitochondria in Apoptosis. *Turkish Journal of Scientific Reviews*, 4(2), 49-53.
- Attiya, H. (2022). Protective Effect of Spirulina Against Aspartame induced Oxidative Stress And Molecular Gene Brain Damage. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 73(1), 3689-3698. <https://doi.org/10.12681/jhvms.25509>
- Ayaz, G. B., Şahin, O., Ayaz, U. ve Özdemir, S. M. (2019). Epigenetik ve Kanser. *Madde, Diyalektik ve Toplum*, 2(1), 94-103.
- Bai, J., Duan, B., Huang, C., Zhang, Y. L., Wang, X., Yang, J. and Li, J. (2019). Multidrug Resistance In Hepatocellular Carcinoma. Janina E. E. Tirnitz-Parker (çeviri editörü), Codon Publications, 141-158. <https://doi.org/10.15586/hepatocellularcarcinoma.2019.ch8>
- Bakay-İlhan, D. (2023). Mide Kanseri Hücrelerine Sonodinamik Terapi Uygulamasında Hsp 70 İnhibisyonu ve Klorin E6 Yüklü Mikrokabarcıkların Rolü. Doktora Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik (Tıp) Doktora Programı, Aydın, 123.
- Balasar, B., Erayman, İ. ve Türk-Arıbaş, E. (2023). Naif Kronik Hepatit C Hastalarında Serum TNF-Alpha, TGF-Beta, IL-10 ve ALT Düzeyleri ile Karaciğer Histolojik Aktivitesi Arasındaki Bağlantının Değerlendirilmesi. *Klinik Dergisi*, 36(1), 65-69. <https://doi.org/10.36519/kd202.3.3588>
- Balkwill, F. (2009). Tumour Necrosis Factor and Cancer. *Nature Reviews Cancer*, 9(5), 361-371. <https://doi.org/10.1038/nrc2628>
- Baran, E. (2022). Kanser Epidemiyolojisi. *Turkish Journal of Health Literacy*, 3(2); 102-111. <https://doi.org/10.54247/SOYD.2022.49>
- Baran, N., Yıldız, G., & Karakaya, A. (2019). Alfa Lipoik Asidin İnflamasyon ve Oksidatif Stres Üzerindeki Etkileri. *Türk Biyokimya Dergisi*, 44(3), 287–294.
- Barrajon-Catalaan, E., Encinar, J. A., Herranz-Lopez, M., ... Micol, V. (2017). An Updated Review on Marine Anticancer Compounds: The Use of Virtual Screening for The Discovery of Small-Molecule Cancer Drugs. *Molecules*, 22(7), 1037. <https://doi.org/10.3390/molecules22071037>

- Barrios, J., Cordero, C. P., Aristizabal, F., Heredia, F. J., Morales, A. L. and Osorio, C. (2010). Chemical Analysis and Screening as Anticancer Agent of Anthocyanin-rich Extract from Uva caimarona (*Pourouma cecropiifolia* Mart.) Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2100-2110. <https://doi.org/10.1021/jf90414 97>
- Barrui, V., Nardi, A., E., Sancassiani, F., Barru, V., Kalcev, G., ... Uras, V. (2023). The Effects of Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs) in Monotherapy and With Addon Treatments on Health-Related Quality of Life of People with Chronic Myeloid Leukemia: A Systematic Review of Randomized-Controlled Trials. *Clinical Practice Epidemiology in Mental Health*, 19 (1,M2), e1745017921112200. <https://doi.org/10. 2174/17450179-v17-e211118-2021-HT2-1910-12>
- Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165. <https://doi.org/10.5505/bsbd.2016.93823>
- Bolla, L., Paul, D. and Nanjappan, S. (2018). Assessing Herb-Drug Interactions of Herbal Products With Therapeutic Agents for Metabolic Diseases: Analytical and Regulatory Perspectives. *Studies in Natural Products Chemistry*, 59, 283-322. <https://doi.org/10. 1016/B97 8-0-444-64179-3.00009-8>
- Brufani, M. and Figliola, R. (2014). (R)- α -Lipoic Acid Oral Liquid Formulation: Pharmacokinetic Parameters And Therapeutic Efficacy. *Acta Bio-Medica: Atenei Parmensis*, 85(2), 108-115. PMID: 25245645.
- Cadenas, E. and Packer, L. (2010). Lipoic Acid: Energy Metabolism and Redox Regulation of Transcription and Cell Signaling. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 48(1), 26-32. <https://doi.org/10.3164/jcbtn.11-005FR>
- Cai, J., Ruan, Y., Chen, T., Zheng, L., Ji, L., ... Cai, X. (2023). cDCBLD2 Mediates Sorafenib Resistance In Hepatocellular Carcinoma By Sponging Mir-345-5p Binding To The TOP2A Coding Sequence. *International Journal of Biological Sciences*, 19(14), 4608-4626. <https://doi.org/10.7150/ijbs.86227>
- Chao, D. T. and Korsmeyer, S. J. (1998). BCL-2 Family: Regulators of Cell Death. *Annual Review of Immunology*, 16(1), 395-419. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.395>

- Chen, X., Wei, H., Li, Z., Hu, S. and Cong, X. (2010). Apoptosis of Mesenchymal Stem Cells Induced by Hydrogen Peroxide Concerns Both Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondrial Death Pathway Through Regulation of Caspases, p38 and JNK. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(4), 967-978. <https://doi.org/10.1002/jcb.22785>
- Chen, X., Zhao, C., Zhang, Y. vd. (2021). Tumor Necrosis Factor- α Signaling and Liver Cancer: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Cancer Letters*, 499, 234–244.
- Chhikara, B. S. and Parang, K. (2023). Global Cancer Statistics 2022: The Trends Projection Analysis. *Chemical Biology Letters*, 10(1), 451.
- Chidambaranathan-Reghupaty, S., Fisher, P. R. and Sarkar, D. (2021). Hepatocellular Carcinoma (HCC): Epidemiology, Etiology and Molecular Classification. *Advances in Cancer Research*, 149, 1-61. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2020.10.001>
- Choi, D., Hwang, S., Lee, E., Yoon, S., Yoon, B. K. and Bae, D. (2004) Expression of Mitochondria-Dependent Apoptosis Genes (P53, Bax, And Bcl-2) In Rat Granulosa Cells During Follicular Development. *J. Soc. Gynecol Investig*, 11 (5); 311-317. <https://doi.org/10.1016/j.jsigi.2004.01.015>
- Cisar, L., Srinivas, S., Stein, D., ... Teltsch, D. Y. (2018). Real-World Chart Review Study of Adverse Events Management in Patients Taking Tyrosine Kinase Inhibitors to Treat Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 24(8), 574-583. <https://doi.org/10.1177/1078155217719583>
- Compton, S. J. and Jones, C. G. (1985). Mechanism of Dye Response and Interference in The Bradford Protein Assay. *Analytical Biochemistry*, 151(2), 369-374. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90190-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3)
- Constanze, B., Popper, B., Aggarwal, B. B. and Shakibaei, M. (2020). Evidence That TNF- β Suppresses Osteoblast Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and Resveratrol Reverses It Through Modulation of NF- κ B, Sirt1 and Runx2. *Cell and Tissue Research*, 381, 83-98. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03188-8>

- Crowther, J. R. (2009). Stages in ELISA. *The ELISA Guidebook*, 43-78. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-254-4_3
- Cucchetti, A., Marisi, G., Canale, M., Cabibbo, G., ... Scartozzi, M. (2018). Ten Years of Sorafenib In Hepatocellular Carcinoma: Are There Any Predictive And/OR Prognostic Markers? *World J Gastroenterol*, 28;24(36), 4152-4163. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i36.4152>.
- Çavuşoğlu, T., Gökhan, A., Kılıç, K. D., Gülle, K. ve Uyanıkgil, Y. (2020). Apoptotik Yolaklar ve Hedefe Yönelik Tedaviler. *Medical Journal of Suleyman Demirel University*, 27(4). <https://doi.org/10.17343/sdutfd.619417>
- Dadhania, V. P., Tripathi, D. N., Vikram, A., Ramarao, P. and Jena, G. B. (2010). Intervention of α -Lipoic Acid Ameliorates Methotrexate-Induced Oxidative Stress and Genotoxicity: A Study in Rat Intestine. *Chemico-Biological Interactions*, 183(1), 85-97. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.10.020>
- Dalmış, U. ve Ekici, E. M. (2024). Diyabet Tedavisinde Antioksidan Etki: Alfa Lipoik Asit. *Avrasya Sağlık Bilimleri Dergisi*, 7(1), 68-74. https://doi.org/10.53493/avrasya_sbd.1344385
- Danpanichkul, P., Aboona, M. B., Sukphutanan, B., ... Karn, W. (2024). Incidence of Liver Cancer In Young Adults According to The Global Burden of Disease Database 2019. *American Association For The Study of Liver Diseases*. <https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000872>
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell Death: A Review of The Major Forms of Apoptosis, Necrosis And Autophagy. *Cell Biology International*, 43, 582-592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Demir, B., Arslan, Y., Güneş, Z. (2021). Alfa Lipoik Asit'in MCF-7 Hücre Hattında Apoptotik Genler Üzerine Etkisi. *Türk Biyokimya Dergisi*, 46(3), 301-308.
- Demirci, S., İnan, A., Kaptanoğlu, E. ve Varolgüneş, H. (1997). Primer ve Metastatik Karaciğer Tümörlerinde Tedavi Yöntemleri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 50(4), 209-230.
- Demirkan, S., Gündüz, Ö. ve Devrim, T. (2017). Sorafenib-Associated Hand-Foot

Syndrome Treated With Topical Calcipotriol. *JAAD Case Reports*, 3(4): 354-357. <https://doi.org/10.1016/j.jdc.2017.03.017>

Demirtas, L., Gürbüz, M., Tahirler, H., Akbas, E. M., Karatas, O., Arslan, Y. K. (2023) The Effects of Sorafenib in Healthy and Cisplatin-Treated Rats. *Advances in Clinical and Experimental Medicine: Official Organ. Wroclaw Med Univ* 32(4):449–456. <https://doi.org/10.17219/acem/155216>

Di-Bisceglie, A. M., Llovet, J. M., Schwartz, M., ... Lencioni, R. (2008). Design and Endpoints of Clinical Trials in Hepatocellular Carcinoma. *JNCI:Journal of the National Cancer Institute*, 100(10), 698-711. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn134>

Ding W, Hu W, Wang X, Dong X. 2010. Expressions of Survivin and Caspase-3 in Human Hepatocellular Carcinoma and The Relationship with Prognosis. *Chin - Ger J Clin Oncol*. 9(11):628–632. <https://doi.org/10.1007/s10330-010-0689-z>.

Doğan, N., Şahin, M., Karaca, E. (2021). Oksidatif Stresin Düzenlenmesinde ALA'nın Rolü. *Türk Farmakoloji Dergisi*, 12(1), 44-52.

Doğan, P. E. (2023). Yeşil Sentezlenen Altın Nanopartikülün Akciğer Kanseri Hücre Hattında Boyut Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 153

Doğan, R. (2023). Hedef Genlerin qRT-PCR ile Analizi ve Verilerin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Doğan, R. ve Aktaş, R. G. (2016). Epigenetic Mechanisms and Hepatocellular Carcinoma. *Maltepe Medical Journal*, 8(3); 29-35.

Dönmez-Cakıl, Y., Altun, İ., Tekin-İslerel, E. ve Ozunal, Z. (2022). Sertralin ve Sorafenibin Karaciğer Kanseri Hücrelerinde P-Glikoprotein Gen Ekspresyonuna ve Rodamin 123 Birikimine Etkileri. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 15(1), 56-65. <https://doi.org/10.26559/mersinsbd.1001821>

- Dranoff, G. (2004). Cytokines In Cancer Pathogenesis And Cancer Therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(1), 11-22.
- Eckhart, L. and Fischer, H. (2024). Caspase-5: Structure, Pro-Inflammatory Activity and Evolution. *Biomolecules*, 14(5), 520. <https://doi.org/10.3390/biom14050520>
- El-Serag, H. B., Marrero, J. A., Rudolph, L. and Reddy, K. R. (2008). Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, 134(6), 1752-1763. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.02.090>
- Emamalipour, M., Shamdani, S., Mansoori, B., Uzan, G. and Naserian, S. (2025). The Implications of The TNF α -TNFR2 Immune Checkpoint Signaling Pathway in Cancer Treatment: From Immunoregulation to Angiogenesis. *International Journal of Cancer*, 156(1), 7-19. <https://doi.org/10.1002/ijc.35130>
- Eslampour, E., Saboori, S., Falahi, E., Zeinali-Khosroshahi, M., Yousefi-Rad, E. (2018). Effects of Alpha-lipoic Acid Supplementation on C-reactive Protein Level: A Systematic Review And Meta-analysis of Randomized Controlled Clinical Trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 28(8), 779-786. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2018.04.003>
- Espíndola, K. M. M., Varela, E. L. P., de Albuquerque, R. D. F. V., Figueiredo, R. A., Dos Santos, S. M., Malcher, N. S., ... Monteiro, M. C. (2022). Alpha-Lipoic Acid and Its Enantiomers Prevent Methemoglobin Formation and DNA Damage Induced by Dapsone Hydroxylamine: Molecular Mechanism and Antioxidant Action. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 57. <https://doi.org/10.3390/ijms24010057>
- Feng, Y., Xiong, Y., Qiao, T., Li, X., Jia, L. and Han, Y. (2018). Lactate Dehydrogenase A: A Key Player in Carcinogenesis and Potential Target in Cancer Therapy. *Cancer Med*, 7(12), 6124-6136. <https://doi.org/10.1002/cam4.1820>
- Ferreira, M. N., Ramseier, J. Y. and Leventhal, J. S. (2019). Dermatologic Conditions in Women Receiving Systemic Cancer Therapy. *International Journal of Womens Dermatology*, 5(5), 285-307. <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2019.10.003>
- Fisunoglu, M. ve Fırat, S. (2021). Polikistik Over Sendromunda Güncel Terapötik

- Ajanlardan İnositol ve Alfa Lipoik Asit Takviyesi Üzerine Bir Derleme. *Akdeniz Medical Journal*, 7(2):184-196.
- Fondevila, F., Tunon, M. J., Fernandez-Palanca, P., Mendez-Blanco, C., Gonzalez-Gallego, J. and Mauriz, J. L. (2019). Antitumor Effects of Quercetin in Hepatocarcinoma *In Vitro* and *In Vivo* Models: A Systematic Review. *Nutrients*, 11(12), 2875. <https://doi.org/10.3390/nu11122875>
- Forner, A., Reig, M. and Bruix J. (2018). Hepatocellular Carcinoma. *Lancet*, 391(10127); 1301-1314. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30010-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30010-2)
- Franco-Juarez, E. X., Gonzalez-Villasana, V., Camacho-Moll, M. E., ... Bermudez de Leon, M. (2024). Mechanistic Insights about Sorafenib-, Valproic Acid- and Metformin-Induced Cell Death in Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(3), 1760. <https://doi.org/10.3390/ijms25031760>
- Gadaleta-Caldarola, G., Infusino, S., Divella, R., De Rose, F., ... Brandi, M. (2015). Sorafenib: 10 Years After The First Pivotal Trial. *Future Oncology*, 11(13), 1863-1880. <https://doi.org/10.2217/fon.15.85>
- Gao, W., Zhang, Y., Li, M. vd. (2023). Synergistic Antitumor Effects of Sorafenib Combined With Antioxidants In Hepatocellular Carcinoma Models. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 42(1), 56.
- Ghalehbandi, S., Yuzugulen, J., Pranjol, M. Z. I. and Pourgholami, M. H. (2023). The Role of VEGF in Cancer-Induced Angiogenesis And Research Progress of Drugs Targeting VEGF. *European Journal of Pharmacology*, 949, 175586. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175586>
- Ghasoub, R., Rasul, K., Issameldin, A., Elazzazi, S. and Gulied, A. (2015). Can We Use Sorafenib For Advanced Hepatocellular Carcinoma (HCC) Child Pugh B? *The Gulf Journal of Oncolog*, 1(17); 82-84. PMID: 25682457
- Gines, P., Krag, A., Abraldes, J. G., Sola, E., Fabrellas, N. and Kamath, P. S. (2021). Liver Cirrhosis. *Journal of The Lancet*, 398(10308), 1359-1376. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01374-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01374-X)

- Goh, C. H. and Chang, A. J. (2024). Resolution of Severe Portopulmonary Hypertension with Inhaled Treprostinil and Liver Transplantation. *The Texas Heart Institute Journal*, 51(1): e238209. <https://doi.org/10.14503/THIJ-23-8209>
- Gomes, M. B. and Negrato, C. A. (2014). Alpha-Lipoic Acid As A Pleiotropic Compound With Potential Therapeutic Use In Diabetes And Other Chronic Diseases. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 6(80), 1-18. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-6-80>
- Gökmen, I. ve Hacıoglu, M. B. (2022). Böbrek ve Karaciğer Yetmezliğinde İmmünoterapi; İmmünoterapilerin Yan Etki Yönetimi. Şendur Man (editör), Türkiye Klinikleri, 82-90.
- Guicciardi, M. E. and Gores, G. J. (2009). Life and Death by Death Receptors. *The FASEB Journal*, 23(6), 1625-1637. <https://doi.org/10.1096/fj.08-111005>
- Gurkan-Alp, A. S. ve Bozca, F. (2019). Tirozin Kinaz Enzim İnhibitörü Yeni Bileşikler ve Yapı Aktivite İlişkilerinin Değerlendirilmesi. *Fabad J. Pharm. Sci.*, 44(1), 65-78.
- Güleş, Ö. ve Eren, Ü. (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2), 73-78.
- Haroun, A. M., El-Sayed, W. M. and Hassan, R. E. (2024). Quercetin and L-Arginine Ameliorated the Deleterious effects of Copper Oxide Nanoparticles on The Liver of Mice Through Anti-Inflammatory and Anti-Apoptotic Pathways. *Biological Trace Element Research*, 202(7), 3128-3140. <https://doi.org/10.1007/s12011-023-03884-w>
- Harputluoglu, M. M. M., Caliskan A. R. ve Ataman, E. (2023). Karaciğer Kanseri. M. F. Genç (çeviri editörü), Public Health Perspective on Cancers, Kansere Halk Sağlığı Bakışı. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri, 58-63.
- Hasan, A. M., Cavalu, S., Saber, S., Doghish, A. S., Hamad, R. S., Abdel-Reheim, M. A., ... Mohammed, O. A. (2024). Hedgehog Signaling Mastery: R51211's Promise in Augmenting the Therapeutic Efficacy of Sorafenib. *Life Sciences*, 351, 122791. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122791>

- Hassan, B. H. and Cronan, J. E. (2011). Protein-Protein Interactions in Assembly of Lipoic Acid on the 2-Oxoacid Dehydrogenases of Aerobic Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 286(10), 8263-8276. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.194191>
- Hatip, İ. ve Bölükbaşı-Hatip, F. (2021). Tıbbi Farmakokinetik; Şematik-Temel-Uygulamalı-Klinik. Prof. Dr. İzzettin Hatip (editör). Pamukkale Üniversitesi Yayınları, 42-226.
- Hoffmann, K., Lin, S. and Schemmer, P. (2012). Treatment of Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review. *Liver Cancer*, 1(3-4), 144-158. <https://doi.org/10.1159/000343828>
- Hong, S., Fang, W., Liang, W., Yan, Y., Qin, T., ... Xue, C. (2014). Risk of Treatment-Related Deaths With Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors: A Meta-Analysis of 41 Randomized Controlled Trials. *Onco Targets and Therapy*, 7, 1851-1867. <https://doi.org/10.2147/OTT.S68386>
- Hossain, K. F. B., Akter, M., Rahman, Kurasaki, M., ... Saito, T. (2021). Amelioration of Metal-Induced Cellular Stress by α -Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid through Antioxidative Effects in PC12 Cells and Caco-2 Cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(4):2126. <https://doi.org/10.3390/ijerph18042126>
- Hulvat, M. C. (2020). Cancer Incidence and Trends. *Surgical Clinics*, 100(3); 469-481. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2020.01.002>
- Hyman, D. and Parikh, S. (2007). Hepatocellular Cancer: A Guide for The Internist. *The American Journal of Medicine*, 120(3), 194-202. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.11.020>
- Jalili, M. and Scotter, M. (2015). A Review of Aflatoxin M1 in Liquid Milk. *Iranian Journal of Health, Safety and Environment*, 2(2), 283-295.
- Jelic, M. D., Mandic, A., Maricic, S. M. and Srdjenovic, B. (2021). Oxidative Stress And Its Role In Cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 17(1), 22-28. https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_862_16

- Jones, J., Campos, A., Daniel, J. B., ... Hirano, Y. (2008). Couinaud Classification of Hepatic Segments. Radiopaedia Article, 4474. <https://doi.org/10.53347/rID-4474>
- Kalyuzhnyy, A., Johnson, P. J., Pinato, D. J. and Toyoda, H. (2022). Breaking The Child-Pugh Dogma In Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 40(19), 2078-2082. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02373>
- Kan, X., Sun, B., Liu, J., Liu, X., Li, J., ... Sun, T., (2025). Oncolytic Peptide LTX-315 Plus An Anti-CTLA-4 Antibody Induces A Synergistic Anti-Cancer Immune Response In Residual Tumors After Radiofrequency Ablation of Hepatocellular Carcinoma. *Cell Death & Disease*, 16(1), 288. <https://doi.org/10.1038/s41419-025-07622-z>.
- Karaca, E. G. (2008). Lipoik Asit: Evrensel Antioksidan. *Afyon Kocatepe University Journal of Science* 8(1); 231-245.
- Kartal, K. ve Hamaloğlu, E. (2016). Benign Tumors of The Liver. *International Journal of Clinical And Experimental Medicine*, 9(2), 596-605.
- Kaya, M. (2020). 5-FU Uygulanan Kolorektal Kanseri Hücrelerinde ALA'nın Apoptoz Üzerine Etkisi (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Üniversitesi.
- Kaya, M., Yıldız, D., Öztürk, N. (2022). Karaciğer Kanseri Apoptotik Yolakların Düzenlenmesinde Antioksidanların Etkisi. *Hücre Biyolojisi Araştırmaları*, 8(2), 75-83.
- Keith, D. J., Butler, J. A., Bemer, B., Dixon, B., ... Hagen, T. M. (2012). Age And Gender Dependent Bioavailability of R-And R, S-A-Lipoic Acid: A Pilot Study. *Pharmacological Research*, 66(3), 199-206. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.05.002>
- Kerse-Yesil, H. (2024). Siroz Hastalığının Retrospektif Olarak Etiyolojik Dağılımının İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Konya, 65.

- Kim, H. J., Park, K. H., & Park, J. W. (2017). Sorafenib-Induced Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells Via Mitochondrial Dysfunction. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 435(1-2), 123–132.
- Koca, F. (2021). T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü; Türkiye Kanser Kontrol Programı. Dr. Murat Türkyılmaz (HSGM Kanser Dairesi Başkanı) (çeviri editörü), Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Yayın Komisyonu, Ankara, 9-19.
- Koşar, P. A., Aşcı, H., Ciğerci, I. H., Saygın, M., Calapoğlu, M., Yüksek, Ş., & Cankara, F. N. (2017). The Effect of Alpha-Lipoic Acid on Preventing Amikacin-Induced DNA Damage in Rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 87, 1489-1495. <https://doi.org/10.1007/s40011-016-0728-9>
- Körez, M. K., Duymus, F., Kocak, N., Özdemir, E. M., Esin, D. and Cora, T. (2025). Influence of the IDOL Gene Variants on Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels in Turkish Patients with Familial Hypercholesterolemia. *Molecular Syndromology*, 16(2), 128-137. <https://doi.org/10.1159/000540898>
- Kuca, K., Wu, W., Guan, Y., Chen, J., Nepovimova, E. and Long, M. (2021). Aflatoxin Detoxification Using Microorganisms and Enzymes. *Toxins*, 13(1), 46. <https://doi.org/10.3390/toxins13010046>
- Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Aggarwal, B. B., Anand, P. and Sung, B. (2008). Cancer is A Preventable Disease That Requires Major Lifestyle Change. *Pharmaceutical Research*, 25(9), 2097-2116. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9661-9>
- Kurland, D., Hu, J. J., Dubin, N., Ma, B. L. and Roush, G. C. (1995). The Effects of Hydrogen Peroxide on DNA Repair Activities. *Mutation Research/DNA Repair*, 336(2), 193-201. [https://doi.org/10.1016/0921-8777\(94\)00054-A](https://doi.org/10.1016/0921-8777(94)00054-A)
- Ladu, S., Calvisi, D. F., Gorden, A., Farina, M., ... Thorgeirsson, S. S. (2006). Ubiquitous Activation of Ras and Jak/Stat Pathways in Human HCC. *Gastroenterology*, 130(4), 1117-1128. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.01.006>

- Lawrence, D., Hayward, M., Kolvekar, S., Panagiotopoulos, N., Thakrar, R., Jamal-Hanjani, M., Wilson, G. A., ... McGranahan, N. (2017). Tracking The Evolution of Non-Small Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 376(22), 2109-2121. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1616288>
- Li, J., Zhang, L., Ge, T., Liu, J., Wang, C. and Yu, Q. (2024). Understanding Sorafenib-Induced Cardiovascular Toxicity: Mechanisms and Treatment Implications. *Drug Design, Development and Therapy*, Dove Medical Press 18, 829-843. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S443107>
- Liang, P., Hu, Y., Zheng, Z., Zhai, D., Wang, Z., Jiang, C., ... Liu, Q., (2024). A Mini-Review: Exploring The Application Prospects of The Three Major Rules in The Field of Antioxidants. *Journal of Molecular Structure*, 1304, 137746. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.137746>
- Lin, Z., Niu, Y., Wan, A., Chen, D., Liang, H., Chen, X., ... Wan, G. (2020). RNA m⁶A Methylation Regulates Sorafenib Resistance In Liver Cancer Through FOXO3-Mediated Autophagy. *The Embo Journal*, 39: e103181. <https://doi.org/10.15252/emb.j.2019103181>
- Liu, H., Zang, C., Wang, H. vd. (2019). Sorafenib Induces Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis In Hepatocellular Carcinoma Cells. *Oncology Reports*, 41(2), 1107–1116.
- Liu, W., Wang, L., Liu, C., Dai, Z., Li, T., Tang, B. (2022) Edaravone Ameliorates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Downregulating Ferroptosis via The Nrf2/FPN Pathway in Rats. *Biol Pharm Bull* 45(9):1269–1275. <https://doi.org/10.1248/bpb.b22-00186>
- Liu, X., Zhang, W., & Chen, Y. (2020). Protective Role of Alpha-Lipoic Acid Against Chemotherapy-Induced Mitochondrial Dysfunction. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 16(2), 310–316.
- Luo, X., Xie, D., Wu, T., Xu, W., Meng, Q., Cao, K., & Hu, J. (2022). Evaluation of The Protective Roles of Alpha-Lipoic Acid Supplementation on Nanomaterial-

- Induced Toxicity: A Meta-Analysis of *In Vitro* And *In Vivo* Studies. *Frontiers in Nutrition*, 9, 991524. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.991524>
- Manavoğlu, O. ve Avcı, N. (2011). Metastatik Renal Hücreli Kanserde Hedefe Yönelik İlaçları Nasıl Kullanalım? *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 37(3), 165-168.
- Mantovani, A. and Pierotti, M. A. (2008). Cancer And Inflammation: A Complex Relationship. *Cancer Letters*, 267(2), 180-181. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.05.003>
- Mao, W. and Xu, J. (2016). Overview of Research and Development for Anticancer Drugs. *Journal of Cancer Therapy*, 7(10), 762-772. <https://doi.org/10.4236/jct.2016.710077>
- McHenry, R. N., Li, J., Davis, B. D. vd. (2024). Regulation of BAX and Its Role In Cancer Apoptosis. *Journal of Molecular Oncology*, 16(3), 145–157.
- Miller, K. K., Gorcey, L. and McLellan, B. N. (2014). Chemotherapy-Induced Hand-Foot Syndrome and Nail Changes: A Review of Clinical Presentation, Etiology, Pathogenesis, and Management. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 71(4);787-794. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.03.019>
- Milovanovic, S., Dordevic, B., Kotur-Stevuljevic, J., Stefanovic, A., Ivanisevic, J., Pantovic, M, ... Spasic, S. (2014). Effect of Alpha-Lipoic Acid Supplementation on Oxidative Stress Markers And Antioxidative Defense in Patients with Schizophrenia. *Psychiatria Danubina*, 26(3), 205-213.
- Mittal, A., Mahala, N., Dhanawade, N. H., Dubey, S. K., & Dubey, U. S. (2024). Evaluation of The Cytotoxic Activity of Sorafenib-loaded Camel Milk Casein Nanoparticles Against Hepatocarcinoma Cells. *Biotechnology Journal*, 19(3), 2300449. <https://doi.org/10.1002/biot.202300449>
- Mongelli, A., Geiger, M., Gorica, E., Mohammed, S. A., Delfine, V., ... Paneni, F. (2024). Epigenetic Network In Immunometabolic Disease. *Advanced Biology*, 8(1), 2300211. <https://doi.org/10.1002/adbi.202300211>
- Morris, T. W., Reed, K. E. and Cronan, J. E. (1995). Lipoic Acid Metabolism In

- Escherichia Coli: The Lpla And Lipb Genes Define Redundant Pathways For Ligation of Lipoyl Groups to Apoprotein. *Journal of Bacteriology*, 177(1), 1-10. <https://doi.org/10.1128/jb.177.1.1-10.1995>
- Najafi, N., Mehri, S., Ghasemzadeh-Rahbardar, M. and Hosseinzadeh, H. (2022). Effects of Alpha-Lipoic Acid on Metabolic Syndrome: A Comprehensive Review. *Phytotherapy Research*, 36(6), 2300-2323. <https://doi.org/10.1002/ptr.7406>
- Nalbant, M. A. (2023). HepG2 Hücre Hattında Pirolokinolin Kinon (Pqq) Ve Koenzim Q10'in Mitokondriyal Genler, Mitomir'ler Ve Hücresel Özellikler Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Bilecik, 83.
- Nanayakkara, A. K., Vogel, P. D. and Wise, J. G. (2019). Prolonged Inhibition of P-Glycoprotein After Exposure to Chemotherapeutics Increases Cell Mortality In Multidrug Resistant Cultured Cancer Cells. *PLoS ONE*, 14(6): e0217940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217940>
- Odabaşı-Bükün, H., Açar, F., P., Konca-Karabuğa, E., ... Kuzu, Ö. F. (2024). Kanser Hastalarının Başvurduğu Geleneksel ve Tamamlayıcı Tedaviler. Dr. Abdullah Sakin, Akademisyen Yayınevi, 317-445. <https://doi.org/10.37609/akya.2380>
- Odhav, B., Bhoola, K. D. and Reddy, L. (2003). Natural Products for Cancer Prevention: A Global Perspective. *Pharmacology and Therapeutics*, 99(1), 1-13. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(03\)00042-1](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(03)00042-1)
- Oğuz-Ozer, B. (2023). İlaç Kombinasyonlarının Antikanser Etkileri: Sinerjizm, Antagonizm ve Farmakodinamik Değerlendirmeler. *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 10(2), 87–95. https://doi.org/10.1501/sbfd_0000000045
- Okuyan, D. (2023). Apoptozis. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 49(1), 1-10. <https://doi.org/10.35238/sufefd.1210651>
- Oral-Öğretici, S. ve Dere, E. (2023). Parmak İzi Kaybına Neden Olan Kanser İlaçlarına Genel Bakış. *East Black Sea Journal of Health Sciences*, 2(3), 127-140. <https://doi.org/10.59312/ebshealth.1376750>

- Özdemir, A., Karakuş, R., Uğur, H. (2019). BCL2 Gen Ekspresyonunun Kanser Hücrelerinde Modülasyonu. *Genetik ve Moleküler Biyoloji Dergisi*, 4(1), 19-27.
- Öztürk, M. ve Bozdag-Pehlivan, S. (2024). Kanser Tedavisinde Bakteri Destekli İlaç Taşıyıcı Sistemler 2024. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 44(1), 75-91. <https://doi.org/10.52794/hujpharm.1392635>
- Öztürk, Y. ve Kara, Ö. (2022). Alfa Lipoik Asit, Selenyum. *Türkiye Klinikleri Geriatrics-Special Topics*, 8(2), 54-60.
- Pacher, P., Ramirez, T., Mukhopadhyay, P., ... Yin, S. (2017). Aging Aggravates Alcoholic Liver Injury and Fibrosis in Mice By Downregulating Sirtuin 1 Expression. *Journal of Hepatology*, 66(3), 601-609. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.11.004>
- Papenfuss, K., Cordier, S. M. and Walczak, H. (2008). Death Receptors As Targets for Anti-Cancer Therapy. *Journal of Cellular And Molecular Medicine*, 12(6b), 2566-2585. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00514.x>
- Park, J. H., Kim, H. G., Lee, K. S. vd. (2020). Sorafenib Promotes Apoptosis By Modulating Mitochondrial Pathways In Liver Cancer. *Biochemical Pharmacology*, 177, 113954.
- Park, S. and Sinko, P. J. (2005). The Blood-Brain Barrier Sodium-Dependent Multivitamin Transporter: A Molecular Functional In Vitro-In Situ Correlation. *Drug Metabolism And Disposition*, 33(10), 1547-1554. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.005231>
- Pemovska, T., Bigenzahn, J. W., & Furga, J. (2018). Targeted Therapy: Combining Insights From Genomics And Chemical Biology. *Current Opinion in Systems Biology*, 8, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.11.003>
- Persad, R., Liu, C., Wu, T-T., Houlihan, P. S., Hamilton, S. R., Diehl, A. M., Rashid, A. (2004). Overexpression of Caspase-3 in Hepatocellular Carcinomas. *Mod Pathol*. 17(7):861–867. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800146>.

- Poordad, F. F. (2015). Presentation and Complications Associated With Cirrhosis of The Liver. *Current Medical Research and Opinion*, 31(5), 925-937. <https://doi.org/10.1185/03007995.2015.1021905>
- Posner, I., Engel, M., Gazit, A. and Levitzki, A. (1994). Kinetics of Inhibition By Tyrphostins of The Tyrosine Kinase Activity of The Epidermal Growth Factor Receptor And Analysis By A New Computer Program. *Molecular Pharmacology*, 45(4), 673-683.
- Rashed, W. M., Kandeil, M. A. M., Mahmoud, M. O. and Ezzat, S. (2020). Hepatocellular Carcinoma (HCC) In Egypt: A Comprehensive Overview. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 32; 5. <https://doi.org/10.1186/s43046-020-0016-x>
- Reed, J. (1998). Bcl-2 Family Proteins. *Oncogene* 17, 3225-3236. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202591>
- Ricci, S., Llovet, J. M., Mazzaferro, V., ... Bruix, J. (2008). Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 359(4), 378-390. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0708857>
- Rimbach, G., Packer, L. and Kraemer, K. (2001). Molecular Aspects of Lipoic Acid in The Prevention of Diabetes Complications: Beyond Deficiency: New Roles For Vitamins. *Nutrition*, 17(10), 888-895. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(01\)00658-X](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(01)00658-X)
- Roskoski, R. (2020). Properties Of FDA-Approved Small Molecule Protein Kinase Inhibitors: A 2020 Update. *Pharmacological Research*, 152, 104609. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104609>
- Rzayev, N. (2020). Apoptosis Regülasyonunda Bcl-2 Ailesi Proteinlerinin Rolü. *Türk Biyokimya Dergisi*, 45(1), 12-20.
- Schäfer, S., Klein, M., Riedl, B., Schermuly, R. T., ... Ellinghaus, P. (2008). Combined Tyrosine and Serine/Threonine Kinase Inhibition By Sorafenib Prevents Progression of Experimental Pulmonary Hypertension And Myocardial Remodeling. *AHA-ASA Journals, Circulation*, 118(20); 2081-2090.

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATION.AHA.108.77975>

- Schultz, D. R., Harrington Jr, W. J. (2003). Apoptosis: Programmed Cell Death at A Molecular Level. *In Seminars in Arthritis and Rheumatism* 32(6). 345-369. <https://doi.org/10.1053/sarh.2003.50005>
- Shay, K. P., Moreau, R. F., Smith, E. J., Smith, A. R., & Hagen, T. M. (2009). Alpha-Lipoic Acid As A Dietary Supplement: Molecular Mechanisms And Therapeutic Potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1790(10), 1149–1160. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.026>
- Shin, H. Y., Jang, D. I., Lee, A. H., Song, H. R., Park, J. H., ... Yang, S. H. (2021). The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (*TNF-α*) in Autoimmune Disease and Current *TNF-α* Inhibitors in Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2719. <https://doi.org/10.3390/ijms22052719>
- Siddiqui, M. A., Farshori, N. N., Al-Oqail, M. M., Alblwi, F., Ahmad, J., Al-Khedhairi, A. A. and Al-Sheddi, E. S., (2024). Hepatoprotective Effect of Date Fruit Extract Against Ethanol-Induced Apoptosis in Human Hepatoma (HepG2) Cells. *Tissue and Cell*, 90, 102519. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2024.102519>
- Siegel, R. L., Sung, H., Ferlay, J., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. & GLOBOCAN 2022. *CA Cancer J Clin*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Siegel, R., L., Miller, K., D., Fuchs, H., E., Jemal, A., 2022. Kanser İstatistikleri. *CA Cancer J. Clin.* 72 (1); 7-33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
- Singh, A., Venkatesh, S., Sharma, M. vd. (2018). Dual Roles of Alpha-Lipoic Acid In Cancer: Antioxidant And Cytotoxic Agent. *Nutrition and Cancer*, 70(7), 1080–1092.
- Singh, P. K., Rawat, P. and Tewari, D. (2019). Adverse Drug Reactions of Anticancer Drugs Derived from Natural Sources. *Food and Chemical Toxicology*, 123, 522-535. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.041>

- Sonmez, A., Yüce, M., Erdem, A. (2021). Alfa Lipoik Asit'in Antioksidan Kapasitesi ve Karaciğer Koruyucu Etkisi. *Farmasötik Bilimler Dergisi*, 7(3), 114-120.
- Susilawati, T. N., Rahayuningtyas, W. and Pramana, T. Y. (2021). Proinflammatory Cytokines and Its Correlation with Liver Injury. *The Indonesian Journal of Gastroenterology Hepatology and Digestive Endoscopy*, 22(3), 210-216. <https://doi.org/10.24871/2232021210-216>
- Svandova, E., Vesela, B., Janeckova, E., Chai, Y. and Matalova, E. (2024). Exploring Caspase Functions in Mouse Models. *Apoptosis* 29, 938-966. <https://doi.org/10.1007/s10495-024-01976-z>
- Szatmari, P. and Ducza, E. (2023). Changes In Expression And Function of Placental And Intestinal P-Gp And BCRP Transporters During Pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17), 13089. <https://doi.org/10.3390/ijms241713089>
- Şahin, E. (2021). Caco-2 Hücre Hattında Alfa Lipoik Asid'in Oksidatif DNA Hasarına Etkisi (Yüksek Lisans Tezi). Ege Üniversitesi.
- Şahin-Tırnova, S. Z. (2017). Hepatoselüler Karsinomlu Hastalarda Sorafenib Etkilerinin Retrospektif Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa, 66.
- Taheriazam, A., Rashidi, M., Paskeh, M. D. A., ... Sethi, G. (2023). Biological Impact and Therapeutic Perspective of Targeting PI3K/Akt Signaling in Hepatocellular Carcinoma: Promises and Challenges. *Pharmacological Research*, 187, 106553. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106553>
- Tatlısöz, M. M. (2023). Spora Çok Yönlü Yaklaşım. Öğr. Gör. Mert Uysal (çeviri editörü), Özgür Yayınları, 73-81. <https://doi.org/10.58830/ozgur.pub329>
- Telatar, H., Ekici, E., Haberal, M., Buyukpamukcu, N., Bilgin, N., Arslan, G., Simsek, H. ve Karamemetoğlu, M. (1992). Segmental Living Liver Transplantation In Children And Adults. *Transplant Proceedings*, 24(6): 2687-2689.

- Thomson, R. J., Moshirfar, M. and Ronquillo, Y. (2023). Tyrosine Kinase Inhibitors. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- Trevisani, F., Stefanini, B. and Lani, L. (2024). Surveillance for Hepatocellular Carcinoma in Patients with Successfully Treated Viral Disease of the Liver: A Systematic Review. *Liver Cancer*, 13(4);376-388. <https://doi.org/10.1159/000535497>
- Tryndyak, V., de Conti, A., Heidor, R., Jimenez, L., ... Pogribny, I. P. (2020). Butyrate-Containing Structured Lipids Inhibit RAC1 and Epithelial-to-Mesenchymal Transition Markers: A Chemopreventive Mechanism Against Hepatocarcinogenesis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 86, 108496. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108496>
- Türkmen, D., Demirtaş, Y., Altun, H. (2022). Kaspaz-3 Aktivitesinin Kanser Hücre Hatlarında Değerlendirilmesi. *Apoptoz ve Kanser Dergisi*, 9(1), 27-33.
- Ugwu, C. E. and Suru, S. M. (2021). Medicinal Plants with Hepatoprotective Potentials Against Carbon Tetrachloride-Induced Toxicity: A Review. *Egyptian Liver Journal*, 11(88), 1-26. <https://doi.org/10.1186/s43066-021-00161-0>
- Vaghjiani, R., Ishikawa, T., Wu, R., Tung, K. H. and Takabe K. (2025). Angiogenesis Is Associated With Aggressive Biology That Counterbalances With Tumor Immunogenicity in Hepatocellular Carcinoma. *World J Oncol*, 16(2):173-181. <https://doi.org/10.14740/wjon2009>
- Vakili, O., Asadi, M., Taghizadeh, S., Kaviani, E., ... Savardashtaki, A. (2022). Caspase-3: Structure, Function, and Biotechnological Aspects. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(4), 1633-1645. <https://doi.org/10.1002/bab.2233>
- Vanli, S., Kurtoglu, F., Alan, B. S., Akcakavak, G., & Ozdemir, O. (2024). Investigation of The Effects of Theranekron and Sorafenib Treatments on Carcinogenesis, Apoptosis and Biochemical Profile in Hepatocellular Carcinoma in Rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 34(7), 750-760. <https://doi.org/10.1080/15376516.2024.2332909>

- Vogel, A., Martinelli, E. vd. (2021). Updated Treatment Recommendations for Hepatocellular Carcinoma (HCC) from The ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology*, 32(6), 801-805. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.02.014>
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. (2003). Tumor Necrosis Factor Signaling. *Cell Death and Differentiation*, 10(1), 45-65. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401189>
- Wang, X. and Lin, Y. (2008). Tumor Necrosis Factor and Cancer, Buddies or Foes? 1. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(11), 1275-1288. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00889.x>
- Wang, Y., Che, M., Xin, J., Zheng, Z., Li, J. and Zhang, S. (2020). The Role of IL-1 β and TNF- α In Intervertebral Disc Degeneration. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 131, 110660. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110660>
- Wang, Y., Kang, S., Fernandes-Alnemri, T., Rogers, C., Mayes, L., Dillon, C., ... Alnemri, E. S. (2015). Caspase-8 Scaffolding Function and MLKL Regulate NLRP3 Inflammasome Activation Downstream of TLR3. *Nature communications*, 6(1), 7515. <https://doi.org/10.1038/ncomms8515>
- Wang, Y., Nakajima, T., Gonzalez, F. J. and Tanaka, N., (2020). PPARs as Metabolic Regulators in the Liver: Lessons from Liver-Specific PPAR-Null Mice. *Int J Mol Sci.*, 17;21(6):2061. <https://doi.org/10.3390/ijms21062061>.
- Wang, Z., Liu, X., Yang, Y. vd. (2021). Alpha-Lipoic Acid Suppresses Proliferation And Induces Apoptosis In Liver Cancer Cells. *International Journal of Oncology*, 59(3), 72.
- Wilhelm, S. M., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., Chen, C., Zhang, X., Vincent, P., McHugh, M., Cao, Y., Shujath, J., Gawlak, S., Eveleigh, D., Rowley, B., Liu, L., Adnane, L., Lynch, M., Auclair, D., ... Lynch, M. (2004). BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity And Targets The RAF/MEK/ERK Pathway And Receptor Tyrosine Kinases

- Involved In Tumor Progression And Angiogenesis. *Cancer Research*, 64(19), 7099–7109. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1443>
- Xie, Q., Liu, Y. and Li, X. (2020). The Interaction Mechanism Between Autophagy And Apoptosis In Colon Cancer. *Transkaional Oncology*, 13(12), 100871. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100871>
- Yang, J. D. and Heimbach, J. K. (2020). New Advances in The Diagnosis and Management of Hepatocellular Carcinoma. *The BMJ*, 371, m3544. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3544>
- Yang, J., Wei, H., Yi, K., Li, F., Li, D., Shi, R., ... Li, M. (2024). Multimodal Tetrahedral DNA Nanoplatfrom for Surprisingly Rapid and Significant Treatment of Acute Liver Failure. *Advanced Materials*, 36(30), 2305826. <https://doi.org/10.1002/adma.202305826>
- Yang, S., Wang, J. H., Zheng, S. G. and Brand, D. D. (2018). Role of TNF–TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications. *Frontiers in Immunology*, 9:784. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00784>
- Yao, X., Zhao, C-R., Yin, H., Wang, K., Gao, J-J. (2020). Synergistic Antitumor Activity of Sorafenib and Artesunate in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Acta Pharmacol Sin.* 41(12):1609–1620. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0395-5>.
- Yarchoan, M., Agarwal, P., Villanueva, A., Rao, S., Dawson, L. A., Karasic, T., ... Ahmed, M. M. (2019). Recent Developments and Therapeutic Strategies Against Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research*, 79(17), 4326-4330. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0803>
- Yıldırım, I. (2019). Kanser Gelişiminde İnflamasyonun Rolü. *Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 8(1), 121-40. <https://doi.org/10.18036/auubtdc.412520>
- Yılmaz, B., Ekinçi, Ö., Tunç, E. (2023). Sorafenib ve ALA Kombinasyonunun Hepatokarsinom Hücrelerinde Apoptotik Genler Üzerindeki Etkileri. *Kanser Araştırmaları Dergisi*, 18(4), 211-219.

- Yılmaz, Z. (2022). Sorafenib Uygulamasının Apoptotik Gen Ekspresyonlarına Etkisi (Doktora Tezi). Hacettepe Üniversitesi.
- Yoshizaki, A., Yanaba, K., Ogawa, A., Iwata, Y., Ogawa, F., Takenaka, M., Shimizu, K., Asano, Y., Kadono, T., Sato, S. (2011) The Specific Free Radical Scavenger Edaravone Suppresses Fibrosis in The Bleomycin-Induced and Tight Skin Mouse Models of Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum* 63(10):3086–3097. <https://doi.org/10.1002/art.30470>
- Youssef, M. M., Tolba, M. F., Badawy, NN, Liu AW, El-Ahwany, E., Khalifa, AE, Zada, S., Abdel-Naim, AB. (2016). Novel Combination of Sorafenib and Biochanin-A Synergistically Enhances the Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic Effects on Hepatocellular Carcinoma cells. *Sci Rep.* 6(1):30717. <https://doi.org/10.1038/srep30717>.
- Zhang, Y., Huang, L., Wang, J. vd. (2022). Caspase-3 as A Key Mediator of Apoptosis In Targeted Cancer Therapy. *Cell Death Discovery*, 8, 313.
- Zhang, Y., Liu, Q., & Wang, Y. (2018). DNA Damage And Apoptosis Induced By Sorafenib In Human Liver Cancer Cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 82(5), 821–828.
- Zhao, J., Zhang, X., Cui, X., Wang, D., Zhang, B. and Ban, L. (2020). Loss of Fingerprints As A Side Effect of Capecitabine Therapy: Case Report and Literature Review. *Oncology Research*, 25(1), 103-106. <https://doi.org/10.3727/096504019X156050788731913>
- Zhu, Y., Zheng, B., Wang, H. and Chen, L. (2017). New Knowledge of The Mechanisms of Sorafenib Resistance in Liver Cancer. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(5), 614-22. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.5>