

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

EMODİN'İN HEPATOSSELÜLER KARSİNOMA HÜCRELERİNDE NOTCH
SİNYAL YOLAĞI ARACILIĞILA EPİTELYAL MEZENKİMAL
DÖNÜŞÜME ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Haneen SHAMSHER ALİ

2200000397

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Burcu AYHAN ŞAHİN

EYLÜL 2025

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**EMODİN'İN HEPATOSSELÜLER KARSİNOMA HÜCRELERİNDE NOTCH
SİNYAL YOLAĞI ARACILIĞLA EPİTELYAL MEZENKİMAL
DÖNÜŞÜME ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Haneen SHAMSHER ALİ
2200000397

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik
Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Burcu AYHAN ŞAHİN
Jüri Üyeleri: Dr. Öğr. Üyesi Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ
Dr. Öğr. Üyesi Öykü GÖNÜL GEYİK

EYLÜL 2025

ÖNSÖZ

Bu tez, hem akademik hem de kişisel gelişimimi yansıtan bir çalışma olarak, bu süreçte bana rehberlik eden ve destek olan herkese teşekkür etmek isterim. Öncelikle, tez konusunun belirlenmesinden elde edilen sonuçların değerlendirilmesine kadar geçen tüm aşamalarda sabırla rehberlik eden, bilgisiyle yolumu aydınlatan ve her zaman desteğini hissettiren değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi BURCU AYHAN ŞAHİN'e en içten teşekkürlerimi sunuyorum. Danışmanım olduğunuz için gerçekten çok şanslıyım.

Bu çalışma sürecinde bana her zaman destek olan ve yardımlarını esirgemeyen araştırma görevlisi BUSE ÖZDEN'e çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca ve bugünlere gelmemde bana verdikleri her türlü destek için aileme minnettarım. Varlığıyla bana güç veren, desteği, duaları ve sevgisiyle yolumu aydınlatan canım annem FATİMA ALSAADİ'ye sonsuz teşekkür ederim. Hayatımda her zaman örnek aldığım, kattığı değerlerle bugün hâlâ yolumu aydınlatan, artık aramızda olmasa da kalbimde yaşayan sevgili babam SHAMSHER ALİ'ye sonsuz teşekkür ederim. Bu başarıyı onun anısına ithaf ediyorum. Bana her zaman inanan, destekleriyle yanımda olan ve sevgileriyle bana daima güç veren canım Ablam SARA ve kardeşlerim MOHAMMED ve AREEN gönülden teşekkür ederim. Sizi yanımda hissetmek bana hep güç verdi.

Bu başarıyı görmeyi çok isteyen, ancak aramızdan erken ayrılan sevgili dayım MAHER ALSAADİ'ye gönülden teşekkür ediyorum.

Bu süreçte moral ve destek kaynağım olan sevgili arkadaşlarım NASMA ELABBADY ve HANADİ LABABEDİ'ye içten teşekkür ederim. Zor zamanlarda yanımda oldunuz, paylaşımlarınız ve dostluğunuz bana güç verdi. Birlikte geçirdiğimiz unutulmaz zamanlar, bu yolculuğu çok daha değerli kıldı. Laboratuvar çalışmalarım süresince teknik desteklerini ve iş birliği için tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca, hayatımda özel bir yere sahip olan, bana inanan ve kalbimde hep sevgiyle taşıdığım tüm sevdiklerime en derin ve en samimi teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
KISALTMALAR VE SİMGELER	v
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TÜRKÇE ÖZET	ix
YABANCI DİL ÖZET	xi
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1 Giriş.....	1
1.2 Amaç	2
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Kanser	3
2.2 Karaciğer Kanseri	4
2.2.1 Hepatoselüler Karsinom (HCC).....	6
2.2.2 Hepatoselüler Karsinomun Etiyolojileri ve Risk Faktörleri.....	6
2.2.2.1 Viral enfeksiyonlar	7
2.2.2.2 Alkolik karaciğer hastalığı (ALD)	10
2.2.2.3 Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD)	11
2.2.2.4 Aflatoksin (<i>Aspergillus flavus</i> toksinleri)	11
2.2.2.5 Tütün	12
2.2.3 Hepatoselüler karsinomanın moleküler patogenezi	13
2.2.4 Hepatoselüler karsinomada genetik ve epigenetik olaylar.....	13
2.2.4.1 Wnt/ β -katenin sinyal yolu	16
2.2.4.2 Ras/Raf/MAPK sinyal yolu	17
2.2.4.3 PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu	18
2.2.4.4 Notch sinyal yolu	19
2.2.5 Hepatoselüler Karsinomda (HCC) Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT) .	22
2.2.5.2 Notch sinyalleme ve HCC invazyonu ile metastazı	24
2.2.5.3 Notch sinyalleme ve HCC anjiyogenezi.....	25
2.3 Hepatoselüler Karsinomda Tedavi Stratejileri	26
2.3.1 Rezeksiyon	27
2.3.2 Karaciğer nakli	28
2.3.3 Ablasyon	28
2.3.4 Transarteriyel tedaviler	29
2.3.5 Multi-kinaz inhibitörleri (MKI)	31
2.3.5.1 Sorafenib	32

2.3.5.2 Lenvatinib	32
2.3.5.3 Regorafenib	33
2.3.5.4 Cabozantinib	34
2.3.6 İmmünoterapi	34
2.3.6.1 Atezolizumab-Bevacizumab (Atezo-Bev)	35
2.3.6.2 Nivolumab	36
2.3.6.3 Pembrolizumab	36
2.3.6.4 Ramucirumab	37
2.4. Emodin	37
2.4.1 Emodin ve kanserin yayılması (metastaz ve anjiyogenezi)	41
2.5 MicroRNA	42
2.5.1 MiR- 32	45
3 MATERYAL VE METOD.....	47
3.1 Materyaller	47
3.1.1 Kullanılan Hücre Hattı	47
3.1.2 Kullanılan cihazlar	48
3.1.3 Kullanılan malzemeler	48
3.1.3.1 Hücre Kültürü Ekipmanları	48
3.1.3.2 Kullanılan Kimyasallar	48
3.1.4 Çalışma Süresince Kullanılan Antikor, miRNA ve primerler	48
3.2 Metodlar	48
3.2.1 Hücre Kültürü	48
3.2.2 Hücrelerin Açılması	48
3.2.3 Hücrelerin Dondurulması	49
3.2.4 miRNA Transfeksiyonu	49
3.2.5 MTT Hücre Canlılığı Testi	50
3.2.6 HepG2 Hücrelerin koloni oluşturma verimliliğinin ölçülmesi	50
3.2.7 Protein İzolasyonu	51
3.2.8 Bradford Protein Miktar Tayini	51
3.2.9 Western Blot	52
3.2.10 Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	53
3.2.11 Kantitatif-Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	53
3.2.12 Floresan Boyamalar	54
3.2.12 Hücre Sağkalım Deneyi	54
3.2.14 İstatiksel Analizler	55
4 SONUÇLAR	56

4.1. Emodin'in HepG2 Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	56
4.2. Emodin'in HepG2 Hücre Sağkalımı Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi.....	56
4.3. Emodin ile Muamele Edilen HepG2 Hücrelerinde Hücre Canlılığı ve Hücre Ölümünün Floresan Boyama ile Gösterilmesi	57
4.4. Emodinin, HepG2 Hücrelerinin Koloni Oluşturma Potansiyeline Etkisinin Araştırılması.....	59
4.5. HepG Hücrelerinde Emodin'in <i>Notch1</i> Gen Ekspresyonu Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi	60
4. 6. HepG2 Hücrelerinde miR-32-5p'nin <i>Notch1</i> Gen Ekspresyonu Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi	60
4.7. HepG2 Kanser Hücrelerinde miR-32-5p'nin EMT Proteinleri Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	61
4. 8. HepG2 Kanser Hücrelerinde miR-32-5p'nin, EMT ile İlişkili Genlerin Ekspresyonu Üzerindeki Etkisinin qRT-PCR ile Gösterilmesi	63
5 TARTIŞMA	65
KAYNAKLAR	71
6 EKLER.....	105

KISALTMALAR VE SİMGELER

aCGH:	Dizi Karşılaştırmalı Genom Hibridizasyonu
ALC1:	Karaciğer Kanserinde Amplifikasyon 1
ALD:	Alkolle İlişkili Karaciğer Hastalığı
ASIR:	Yaşa Göre Standartlaştırılmış İnsidans Oranları
ASMR:	Yaşa Göre Standartlaştırılmış Ölüm Oranları
CHB:	Kronik Hepatit B
CHD1L:	Kromodomain Helikaz DNA Bağlanma Proteini 1-Benzeri
DAA:	Doğrudan Etkili Antiviral Ajanlar
EGF:	Epidermal Büyüme Faktörü
ER:	Endoplazmik Retikulum
FGF:	Fibroblast Büyüme Faktörü
HBF:	(HBV X Proteini satırında bir düzeltme olacak, HBx olarak geçiyor, altta yer alıyor)
HBV:	Hepatit B Virüsü
HBx:	HBV X Proteini
HCC:	Hepatosellüler Karsinom
HCV:	Hepatit C Virüsü
HGF:	Hepatosit Büyüme Faktörü
HGDN:	Yüksek Dereceli Displastik Nodüller
HH:	HedgeHog
HIV:	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
ICC:	İntrahepatik Kolanjiyokarsinom
IGF:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
JAK:	Janus Kinaz
LGDN:	Düşük Dereceli Displastik Nodüller
LncRNA:	Uzun Kodlamayan RNA
MASLD:	Metabolik Fonksiyon Bozukluğuyla İlişkili Steatotik Karaciğer Hastalığı
MDM2:	Murine Double Minute 2
miRNA:	mikroRNA

MYC:	Miyelosito-Matoz Viral Onkogen
NAFLD:	Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı
NASH:	Non-Alkolik Steatohepatit
NID:	Non Enfeksiyöz Hastalık (Non Infectious Disease)
PBC:	Primer Biliyer Siroz
PDGF:	Trombosit Türevli Büyüme Faktörü
SNP:	Tek Nükleotid Polimorfizmi
STAT:	Transkripsiyon Faktörünün Sinyal Transdüktör Aktivatörü
UV:	Ultraviyole
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Emodinin fiziksel ve kimyasal özellikleri (<i>Emodin CAS#: 518-82-1</i> , n.d.)	38
Tablo 2. qRT-PCR reaksiyonunda kullanılan primerler.	54
Tablo 3. Kullanılan Cihazların Listesi	105
Tablo 4. Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemeler	106
Tablo 5. Kullanılan Kimyasalların Listesi.	106
Tablo 6. %12'lik Alt Jel (Seperating Gel) hazırlama prosedürü (2Jel)	107
Tablo 7. % 4'lük Üst Jel (Stacking Gel) hazırlama prosedürü	107
Tablo 8. qRT-PCR 'da Kullanılan Protokol	108
Tablo 9. Çalışma süresince kullanılan çözeltiler.....	108

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 2022'de Dünya Çapında Karaciğer Kanseri Epidemiyolojisi.	5
Şekil 2. HCC karsinogenezini teşvik eden etyoloji ve risk faktörleri.	7
Şekil 3. Alkolik karaciğer hastalığının (ALD) risk faktörleri ve komorbiditesi	10
Şekil 4. NOTCH sinyal yolunun kısa tarihçesi	19
Şekil 5. Notch reseptör ailesi ve ligandlarının yapısı.....	20
Şekil 6. Notch sinyal yolu ve sinyal aktivasyonu	22
Şekil 7. Barcelona Klinik Karaciğer Kanseri (BCLC) HCC evreleme 2022	27
Şekil 8. Hepatoselüler karsinom (HCC) için sistemik tedavilerin zaman çizelgesi ve elde edilen sağkalım	31
Şekil 9. Emodinin kimyasal yapısı.....	38
Şekil 10. Emodin'in Antikanser Etkinliğine Genel Bir Bakış	41
Şekil 11. mikroRNA (miRNA) biyogenezisi	43
Şekil 12. miR-32'nin Konumu ve Dizisi	46
Şekil 13. Hep G2 hücre hattının mikroskop altında görüntülenmesi	47
Şekil 14. Emodinin HepG2 hücre canlılığına etkisinin MTT yöntemi ile gösterilmesi	56
Şekil 15. Emodinin doza ve zamana bağlı olarak hücre sağkalıma etkisinin değerlendirilmesi	57
Şekil 16. HepG2 hücrelerinde, Emodinin mitokondri membran potansiyeli ve hücre ölümüne etkisinin gösterilmesi.....	58
Şekil 17. Emodinin HepG2 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğine etkisinin incelenmesi.....	59
Şekil 18. Emodinin Notch1 protein seviyesine etkisinin incelenmesi	60
Şekil 19. miR-32-5p'nin Notch1 protein seviyesine etkisinin incelenmesi.....	61
Şekil 20. miR32-5p ve Emodinin Vimentin ve Snail1 protein seviyesine etkisinin incelenmesi.....	63
Şekil 21. Emodin ve miR-32-5p'nin EMT belirteçlerinin mRNA seviyelerine etkilerinin araştırılması.....	64

TÜRKÇE ÖZET

Enstitü : Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Program : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Burcu AYHAN ŞAHİN
Tez Türü ve Tarih : Yüksek Lisans – Eylül 2025

KISA ÖZET

EMODİN'İN HEPATOSELÜLER KARSİNOMA HÜCRELERİNDE NOTCH SİNYAL YOLU ARACILIĞILA EPİTELYAL MEZENKİMAL DÖNÜŞÜME ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Haneen SHAMSHER ALI

Hepatoselüler karsinom (HCC), geç teşhis, yüksek metastatik potansiyel ve konvansiyonel tedavilere karşı direnç nedeniyle dünya genelinde en yaygın ve ölümcül malignitelerden biri olmaya devam etmektedir. HCC progresyonuna katkıda bulunan temel süreçlerden biri, epitel hücrelerinin mezenkimal özellikler kazanarak hareketlilik ve invazivlik yeteneklerini artırdığı epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) sürecidir. Doğal bir antrakinin türevi olan emodin, önemli antikanser özellikleriyle dikkat çekmekte olup, çeşitli kanser türlerinde proliferasyonu inhibe ettiği, apoptozu indüklediği ve invazyonu baskıladığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, emodinin HepG2 karaciğer kanseri hücrelerinde EMT üzerindeki etkileri, özellikle Notch sinyal yolu ile etkileşimi ve miR-32-5p'nin düzenleyici rolü dikkate alınarak araştırılmıştır. Bulgularımız, emodinin doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını ve koloni oluşumunu anlamlı şekilde inhibe ettiğini; ayrıca mitokondriyal disfonksiyon ve hücre ölümünü indüklediğini göstermiştir. Biyoinformatik analizler, Notch1 mRNA'sının 3' UTR bölgesinde miR-32-5p için potansiyel bağlanma bölgeleri olduğunu ortaya koymuş ve olası düzenleyici etkileşimlere işaret etmiştir. Ön bulgular, emodinin Notch1 ekspresyonunu baskılayarak ve muhtemelen miR-32-5p aracılığıyla EMT'yi azaltabileceğini düşündürmektedir. Bu etkiler, miR-32-5p mimikleri ve inhibitörleri varlığında EMT belirteçleri ve Notch yolu bileşenlerinin ekspresyonu analiz edilerek daha ileri düzeyde doğrulanmaktadır. Genel olarak, elde edilen veriler emodinin

HCC'deki antikanser potansiyelini desteklemekte ve EMT'yi Notch/miR-32-5p eksenini aracılığıyla modüle etmedeki rolünü ortaya koyarak hedefe yönelik tedavi stratejileri için umut verici bilgiler sunmaktadır.



Anahtar kelimeler: Hepatoselüler karsinom, HepG2, Emodin, Notch1, EMT, miR-32-5p.

Bilim Dalı Sayısal Kodu: 20610

YABANCI DİL ÖZET

Institute : Institute of Graduate Studies
Department : Molecular Biology and Genetics
Program : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Assist. Prof. Burcu Ayhan ŞAHİN
Degree Awarded and Date : MASTER – September 2025

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF EMODIN ON EPITHELIAL- MESENCHYMAL TRANSITION IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS VIA THE NOTCH SIGNALING PATHWAY

Haneen SHAMSHER ALI

Hepatocellular carcinoma (HCC) remains one of the most prevalent and lethal malignancies worldwide due to late diagnosis, high metastatic potential, and resistance to conventional therapies. A key contributor to HCC progression is epithelial-mesenchymal transition (EMT), a process wherein epithelial cells acquire mesenchymal traits, enhancing motility and invasiveness. Emodin, a natural anthraquinone derivative with well-documented anti-cancer properties, has been shown to inhibit proliferation, induce apoptosis, and suppress invasion in various cancer types. In this study, we investigated the effects of emodin on EMT in HepG2 liver cancer cells, focusing on its interaction with the Notch signaling pathway and the regulatory role of miR-32-5p. Our findings demonstrated that emodin significantly inhibited cell viability and colony formation in a dose- and time-dependent manner and induced mitochondrial dysfunction and cell death. Bioinformatic analyses identified potential binding sites for miR-32-5p in the 3' UTR of Notch1 mRNA, suggesting regulatory interactions. Preliminary results indicate that emodin may attenuate EMT by downregulating Notch1, potentially mediated by miR-32-5p. These effects are being further validated by evaluating the expression of EMT markers and Notch pathway components in the presence of miR-32-5p mimics and inhibitors. Collectively, our data support the anti-cancer potential of emodin in HCC and

highlight its role in modulating EMT through the Notch/miR-32-5p axis, offering promising insights for targeted therapeutic strategies.



Key words: Hepatocellular carcinoma, HepG2, Emodin, Notch1, EMT, miR-32-5p.

Science Code: 20610

1 GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 Giriş

Hepatoselüler karsinom (HCC), karaciğer kanserinin en yaygın türü olup, geç tanı, yüksek metastatik potansiyel ve konvansiyonel tedavilere karşı direnç nedeniyle dünya genelinde kanserden ölümlerde dördüncü sırada yer almaktadır. HCC progresyonuna katkıda bulunan en önemli süreçlerden biri, epitel hücrelerinin polarite ve hücre-hücre adezyon özelliklerini kaybederek artmış hareketlilik ve invazivlik kazandığı epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) adlı biyolojik süreçtir. EMT, metastaz, tedaviye direnç gelişimi ve tümör hücrelerinin kök hücre benzeri özellikler kazanmasında kilit bir rol oynamaktadır.

Emodin, doğal bir antrakinon türevidir ve antiinflamatuvar, antioksidan, antibakteriyel ve özellikle antikanser aktiviteleri dâhil olmak üzere geniş bir farmakolojik etki yelpazesine sahiptir. Önceki çalışmalar, emodinin çeşitli kanser hücre hatlarında proliferasyonu inhibe ettiğini, apoptozu indüklediğini ve invazyon ile metastazı baskıladığını göstermiştir. Karaciğer kanseri bağlamında ise emodinin, HCC progresyonu ve EMT sürecine dahil olan PI3K/Akt ve β -katenin gibi temel sinyal yollarını modüle ederek terapötik fayda sağlayabileceği bildirilmektedir. Özellikle, emodin suksinil esterinin HCC hücrelerinde androjen reseptörü (AR) ve EZH2 etkileşimini hedefleyerek proliferasyon ve migrasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir.

Notch sinyal yolu, embriyonik gelişim, doku homeostazı ve tümör oluşumunda temel roller oynayan, oldukça korunmuş bir hücresel iletişim sistemidir. Bu yolun EMT düzenlenmesi ve karaciğer kanseri progresyonunda önemli rol oynadığına dair kanıtlar giderek artmaktadır. Ancak Notch sinyal yolunun işlevi, hücresel ve moleküler bağlama bağlı olarak tümör baskılayıcı ya da onkogenik şekilde değişiklik gösterebilir.

Gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel düzeyde düzenleyen küçük, kodlamayan RNA molekülleri olan mikroRNA'lar (miRNA'lar), kanser biyolojisinde de önemli düzenleyici roller üstlenmektedir. Özellikle miR-32-5p'nin, bağlamına bağlı olarak tümör baskılayıcı ya da onkogenik roller oynayabildiği gösterilmiştir. Biyoinformatik

analizler, Notch1 mRNA'sının 3' UTR bölgesinde miR-32-5p'ye ait olası bağlanma bölgeleri olduğunu ortaya koyarak bu iki molekül arasında düzenleyici bir etkileşim olabileceğini düşündürmektedir.

1.2 Amaç

Bu çalışmanın amacı, emodinın HepG2 hepatoselüler karsinom hücrelerinde epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) üzerindeki etkilerini araştırmak; özellikle Notch sinyal yolunun ve miR-32-5p'nin bu süreçteki düzenleyici rollerine odaklanmaktır. Çalışmamızda, Emodin uygulamasının HepG2 hepatoselüler karsinoma hücrelerinde Notch sinyal yolu aracılığıyla epitelyal mezenkimal dönüşüme etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, miR-32-5p mimik ve inhibitörü kullanılarak Notch1 reseptörünün hedeflenmesi ve hepatoselüler karsinoma hücrelerinde emodinın epitelyal mezenkimal dönüşüme etkisinde Notch1 reseptörünün rolünün araştırılması amaçlanmaktadır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Kanser, transforme olan hücrelerin doğal seçim yoluyla evrimleşmesi ve kontrolsüz çoğalmasıyla ortaya çıkan multifaktöriyel bir hastalıktır (Brown et al., 2023). Kanseri hücrelerinin büyümesi, yayılması, vücut kaynaklarını kullanması, metabolit üretimi ve doku tahribatı normal vücut fonksiyonlarını bozar ve nihayetinde ağrı, organ yetmezlikleri ve kanserle ilişkili sendromlara yol açar. Kanseri, fiziksel hasarlarının yanı sıra, aynı zamanda kişinin ruh sağlığını olumsuz etkiler. Kanseri, bir hastalık olarak her yıl dünya genelinde 10 milyon insanın ölümüne neden olmakta ve bu, kanserin ne kadar yaygın ve öldürücü bir hastalık olduğunu göstermektedir (S. Chen et al., 2023).

Her biri kendine özgü nedenleri, semptomları ve risk faktörleri olan birçok farklı kanser türü vardır. Ancak, erken teşhis ve önlemenin önemi de dahil olmak üzere farklı kanser türleri arasında birçok ortak nokta da bulunmaktadır. Kanseri, hücrelerin DNA'sındaki mutasyonlar veya değişikliklerden kaynaklanır (Asad et al., 2018). Bu mutasyonlar, genetik yatkınlık, çevresel toksinlere maruz kalma, tütün kullanımı, alkol tüketimi, obezite, UV ışınları, sağlıksız yaşam tarzı seçimleri ve viral enfeksiyonlar dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir (Ali et al., 2023)(Egbuna & Hassan, 2021)(Friedenreich et al., 2021). Bazı bireylerde kalıtsal genetik mutasyonlar nedeniyle belirli kanser türleri geliştirme olasılığı daha yüksek olabilir. Örneğin, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonlar meme ve yumurtalık kanseri riskinin artmasıyla ilişkilidir (Pourmasoumi et al., 2024). Tütün dumanı, asbest ve radyasyon gibi belirli çevresel toksinlere maruz kalmak DNA'ya hasar verebilir ve kanseri geliştirme riskini artırabilir. Sağlıksız yaşam tarzı seçimleri, kötü beslenme, fiziksel aktivite eksikliği ve alkol tüketimi gibi yaşam tarzı faktörleri kanseri geliştirme riskini artırabilir. Öte yandan, insan papilloma virüsü (HPV) ve hepatit B ve C gibi bazı virüsler, belirli kanser türlerinin gelişme riskini artırabilir (Ali et al., 2023).

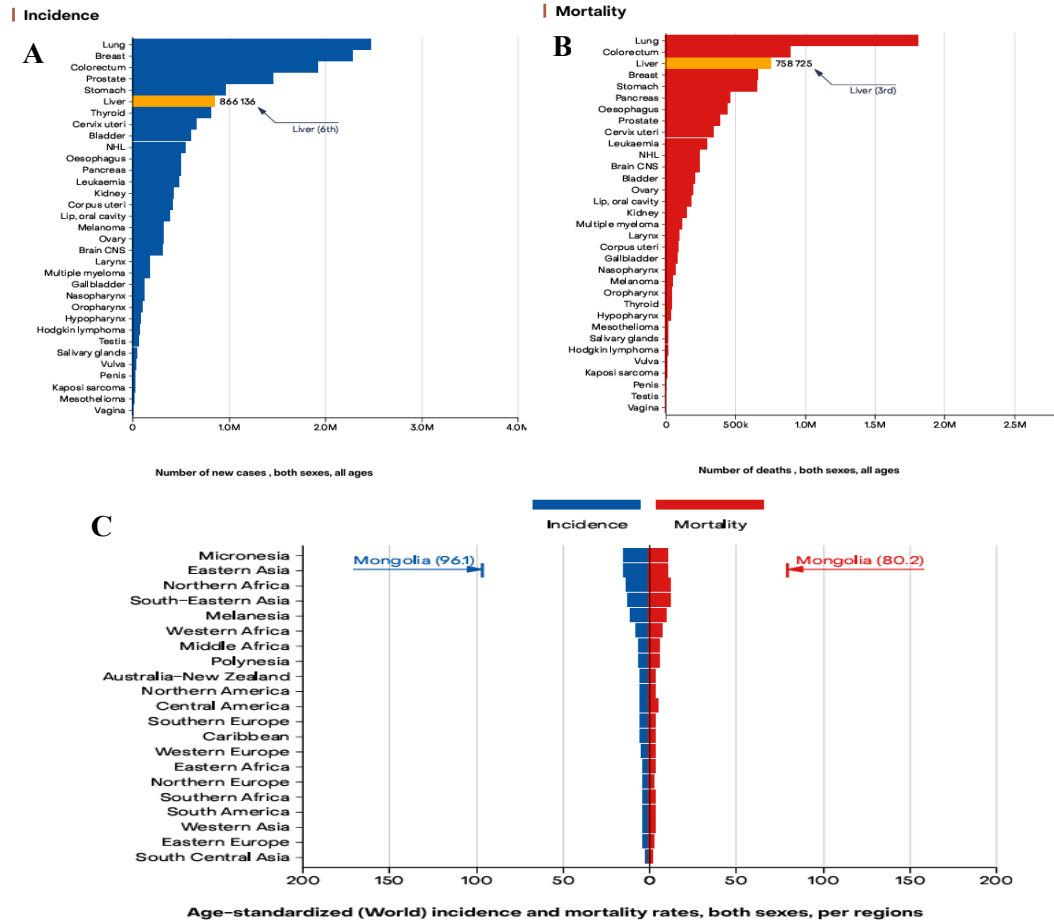
Kanser belirtileri hastalığın türüne ve evresine göre değişebilir. Ancak bazı yaygın belirtiler yorgunluk, açıklanamayan kilo kaybı, ağrı, yorgunluk, ciltte veya benlerde değişiklikler, uykusuzluk, yutma zorluğu, sürekli öksürük veya ses kısıklığı, karın ağrısı veya şişkinlik, bağırsak veya mesane alışkanlıklarında değişiklikler, sürekli baş ağrıları olarak sıralanabilir (Salvetti et al., 2020)(Ali et al., 2023).

Kanser, 21. yüzyılda önemli bir toplumsal, halk sağlığı ve ekonomik sorun olup, dünya çapında meydana gelen ortalama dört ölümden birinden (%22,8) ve bulaşıcı olmayan hastalıklardan (non-infectious disease, NID) kaynaklanan altı ölümden birinden (%16,8) sorumludur. Hastalık, NID'lerden kaynaklanan küresel erken ölümlerin onda üçüne neden olur (30-69 yaş aralığındakilerde %30,3) ve 183 ülkenin 177'sinde bu yaş grubundaki önde gelen üç ölüm nedeni arasındadır. Yaşam beklentisini artırmanın önünde önemli bir engel olmasının yanı sıra kanser, kanser türlerine, coğrafyaya ve cinsiyete göre dereceleri değişen önemli toplumsal ve makroekonomik maliyetlerle ilişkilidir. Akciğer kanseri dünya çapında en sık teşhis edilen kanserdir (%12,4), bunu kadın meme kanseri (%11,6), kolorektum (%9,6), prostat (%7,3) ve mide (%4,9) takip eder. Kadınlarda meme kanseri en sık teşhis edilen kanserdir ve kanserden ölümün önde gelen nedenidir, bunu hem kanser vakaları hem de ölümler açısından akciğer ve kolorektal kanser takip eder; buna karşın akciğer kanseri erkeklerde en sık görülen kanserdir (hem vakalar hem de ölümler açısından), bunu yeni vakalar açısından prostat ve kolorektal kanser ve ölümler açısından karaciğer ve kolorektal kanser takip eder (Bray et al., 2024).

2.2 Karaciğer Kanseri

Primer karaciğer kanseri, dünya genelinde altıncı en sık görülen kanser ve kansere bağlı ölümlerin üçüncü önde gelen nedenidir (Şekil 1) (E. Y. Tan et al., 2024) (Q. Li et al., 2022)(Rumgay et al., 2022). Primer karaciğer kanserlerinin hepatosellüler karsinom (HCC) ve intrahepatik kolanjiyokarsinom (ICC) olarak iki ana türü olmakla birlikte anjiyosarkom, hemanjiyosarkom ve hepatoblastom gibi daha az sıklıkta görülen tipleri de bulunmaktadır. ICC safra kanallarından kaynaklanırken, HCC karaciğerin ana parankimal hücreleri olan hepatositlerden kaynaklanır. HCC dünya çapında primer karaciğer kanseri vakalarının %80'inden fazlasını oluşturur. Sekonder karaciğer kanseri, vücudun başka bir yerinde oluşan bir primer tümörün karaciğere metastaz yapmasıyla oluşur. Meme, özofageal, mide, pankreas, akciğer, böbrek ve

diğer birkaç kanser karaciğere metastaz yapabilse de sekonder karaciğer kanserlerinin çoğu kolorektal kanserlerden kaynaklanır. Kolorektal kanser hastalarının yaklaşık %70'inde sekonder karaciğer kanseri gelişir (Chidambaranathan-Reghupaty et al., 2021a). GLOBOCAN 2022 verilerine göre, dünya çapında 866.136 yeni karaciğer kanseri vakası tahmin edilmiştir. Yaşa göre standartlaştırılmış insidans oranları (ASIR'ler) ve yaşa göre standartlaştırılmış ölüm oranları (ASMR'ler) her iki cinsiyet için sırasıyla 100.000'de 8,6 ve 7,4'tür. Erkeklerde kadınlara göre çok daha yüksek bir insidans ve ölüm oranı görülür ve sırasıyla toplam vakaların yaklaşık %69,35'ini ve %49,96'sını oluştururlar. (Şekil 1) (Q. Li et al., 2024). Birkaç çalışma, 2025 yılına kadar küresel insidansın yılda bir milyonun üzerinde olacağını tahmin etmektedir. Bu nedenle, karaciğer kanseri dünya çapında önemli ve zorlu bir sağlık yükü oluşturmaktadır.



Şekil 1. 2022'de Dünya Çapında Karaciğer Kanseri Epidemiyolojisi.

A. Her iki cinsiyet ve tüm yaş grupları için yeni vaka sayısı. B. Her iki cinsiyet ve tüm yaş grupları için ölüm sayısı. C. Her iki cinsiyet için karaciğer kanserinin yaşa göre standardize edilmiş (dünya) insidans ve ölüm oranları bölge başına. (Cancer Site Ranking,).

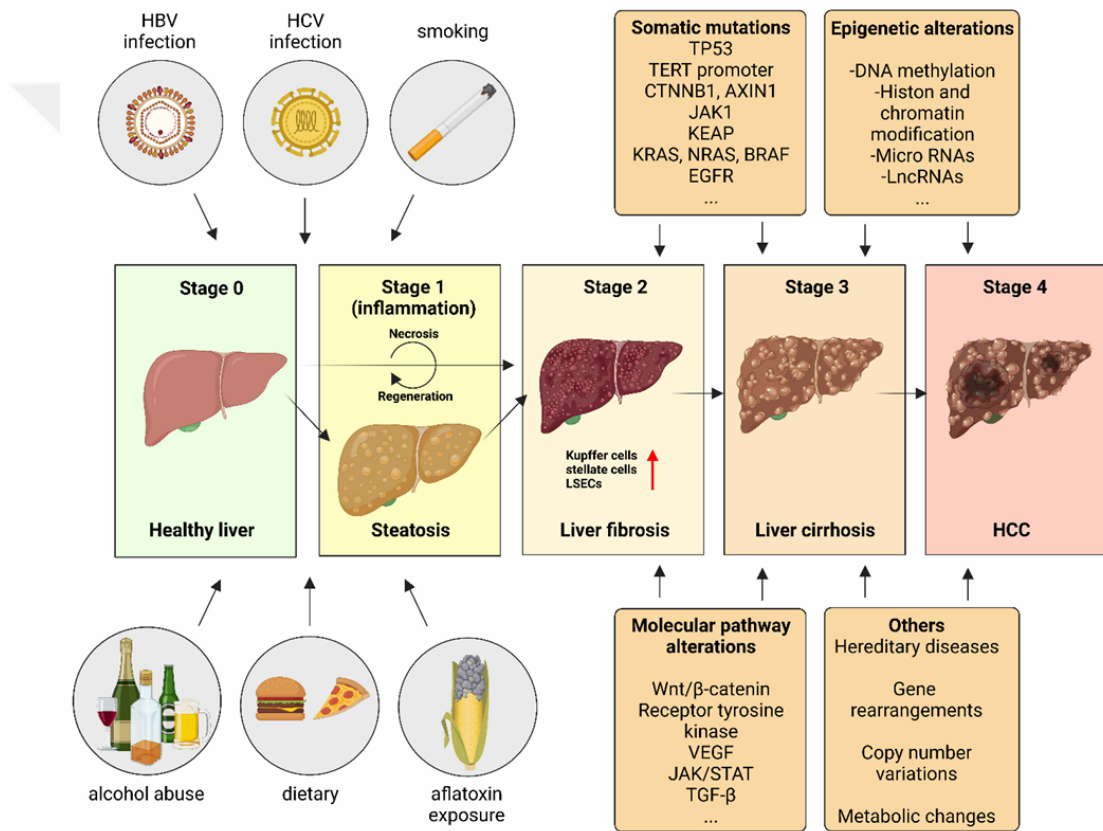
2.2.1 Hepatoselüler Karsinom (HCC)

Karaciğer kanserinin en yaygın türü olan Hepatoselüler karsinom (HCC), dünya çapında kanserle ilişkili ölümlerin dördüncü önde gelen nedenidir ve ilişkili ölüm oranının önümüzdeki on yıl içinde artması beklenmektedir. HCC, tüm karaciğer kanserlerinin %90'ini oluşturur (Alawya & Constantinou, 2023). HCC'nin medyan hayatta kalma süresi 6-10 aydır (Toh et al., 2023). Hepatoselüler karsinom insidansı ülkeler arasında önemli ölçüde farklılık göstermektedir; bu durum, her ülkenin yaş, cinsiyet, ırk/etnik köken gibi farklı demografik özelliklerine ve HCC ile ilişkili çeşitli risk faktörlerine bağlanabilir (Alawya & Constantinou, 2023). Son yıllarda, Kuzey Amerika ve Avrupa'nın belirli bölgeleri gibi HCC insidansının daha düşük olduğu bölgelerde HCC insidansında artış görülürken, Japonya ve Çin gibi geleneksel olarak yüksek risk taşıyan bölgelerde oranlarda düşüş görülmektedir. HCC patogenezi, hücre döngüsü düzensizliği, DNA metilasyon değişikliği, kromozomal instabilite, immünomodülasyon, epitelyal mezenkimal dönüşüm, HCC kök hücrelerinde artış ve mikroRNA (miRNA) düzensizliği gibi birden çok moleküler yolda düzensizliği içerir. Hastalığın mekanizması altta yatan etiyolojiye bağlı olarak değişse de genellikle karaciğer hasarını takip eden kronik inflamasyon, fibröz ve siroz sonrasında HCC gelişimi gözlemlenir. Karaciğerde meydana gelen akut inflamatuvar yanıt, dış uyaran ortadan kaldırıldığında çeşitli bağışıklık hücrelerinde bulunan reseptörler tarafından sonlandırılırken, inflamasyonun devam etmesi durumunda meydana gelen kronik inflamasyon önce fibroza ve sonunda siroza neden olabilir. Çoğu HCC (%80-90) siroz gelişiminden sonra görülür (Chidambaranathan-Reghupaty et al., 2021b).

2.2.2 Hepatoselüler Karsinomun Etiyolojileri ve Risk Faktörleri

Karaciğer kanseri ve özellikle HCC hastalarının çoğunda görülen risk faktörleri, hepatit C virüsü (HCV) / hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonu, alkolle ilişkili karaciğer hastalığı (ALD) ve metabolik fonksiyon bozukluğuyla ilişkili steatotik karaciğer hastalığı (MASLD) ve bu hastalıkların sonucunda gelişen sirozdur. Daha az yaygın olan diğer risk faktörleri arasında kalıtsal hemokromatoz, primer sklerozan kolanjit, primer biliyer kolanjit, otoimmün hepatit ve diğer kronik hepatitler yer alır. Epidemiyolojik kanıtlar ayrıca aflatoksin, sigara ve hava kirliliği gibi çevresel maruziyetler ile HCC riskinin artması arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Buna göre, HCC'nin epidemiyolojisi bu etiyolojik risk faktörlerinin yaygınlığını yansıtır; bu

nedenle, dünya çapında HCC insidansındaki eğilimler, HBV'ye karşı ulusal aşılama programlarının başlatılması, HCV enfeksiyonunu tedavi etmek için doğrudan etkili antiviral ajanların (DAA'lar) tanıtılması ve alkol tüketimi ve obezitenin değişen yaygınlığı (sırasıyla ALD ve MASLD yaygınlığını etkiler) ile zamanla değişmiştir (Şekil 2) (Singal, Kanwal, et al., 2023). Genel olarak, çoğu HCC vakası, Asya ve Afrika'da kronik HBV enfeksiyonu ve aflatoksin B1 alımına bağlı olarak görülmektedir. Buna karşın, genel HCC insidans oranının daha düşük olduğu Batı ülkelerinde, HCC genellikle HCV enfeksiyonu, alkolizm ve alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) ile ilişkilidir (Lampimukhi et al., 2023).



Şekil 2. HCC karsinogenezi teşvik eden etyoloji ve risk faktörleri. Metabolik değişikliklere ve moleküler yol değişikliklerine yol açabilen somatik mutasyonlar, epigenetik değişiklikler ve gen düzenlemeleri. HCC: Hepatosellüler karsinom, HCV: Hepatit C Virüsü, HBV: Hepatit B Virüsü (Tümen et al., 2022).

2.2.2.1 Viral enfeksiyonlar

Hepatit B Virüsü (HBV) ve Hepatit C Virüsü (HCV) enfeksiyonlarının neden olduğu kronik hepatit, HCC için önemli bir risk faktörüdür. HBV ve HCV her ikisi de kan yoluyla bulaşan patojenlerdir ve HCV diğer vücut sıvıları yoluyla da bulaşabilir. İğne paylaşımı, perinatal bulaşma ve enfekte bir bireyden kan temasının diğer yolları ana

bulaşma yollarıdır. Bu enfeksiyonların yaygınlığının yüksek olduğu bölgelerde, HBV/HCV koenfeksiyonu meydana gelebilir ve bu da HCC geliştirme riskini daha da artırır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 257 milyon kişinin veya küresel nüfusun %3,3'ünün kronik HBV enfeksiyonu ile yaşadığını, 71 milyon kişinin ise kronik HCV enfeksiyonu ile yaşadığını tahmin etmektedir. 2018 yılında, yeni küresel HCC vakalarının sırasıyla %54,5'i HBV ve %21,2'si HCV enfeksiyonlarına atfedilmiştir. HBV ve HCV'nin küresel yaygınlığında coğrafyaya dayalı bir fark vardır (Chidambaranathan-Reghupaty et al., 2021b). Hepatit B aşılması ve hepatit C tedavi programlarının dünya çapında uygulanmasıyla HCC epidemiyolojisi, viral hepatitin baskın olduğu bir hastalıktan uzaklaşmakta, bununla birlikte vakaların giderek artan bir oranı ise alkolsüz steatohepatit ile ilişkilendirilmektedir (Singal et al., 2020).

HBV enfeksiyonu, virüsle ilişkili HCC'nin %75-80'ini oluşturur ve dünya çapında 240 milyondan fazla insanı enfekte eder. Bu virüsün genetik materyalinin insan genomuna dahil edilmesi p53 inaktivasyonuna, inflamasyona veya oksidatif strese neden olur ve bu da hepatokarsinogeneze neden olur (Jia et al., 2020). HBV kaynaklı HCC, sirotik veya sirotik olmayan şekilde gelişebilir. p53 inaktivasyonu sonucu proliferasyon ve büyüme kontrolünün kaybı, inflamasyon nedeniyle nekroz ve rejenerasyon döngüleri, PI3K/Akt/STAT3 yolunun aktivasyonu ve Wnt/ β -katenin aracılı oksidatif stresin indüksiyonu gibi çeşitli onkogenik yolların aktivasyonu genomik instabiliteye yol açarak HCC gelişimine neden olur (Neuveut et al., 2010) (Choudhari et al., 2007).

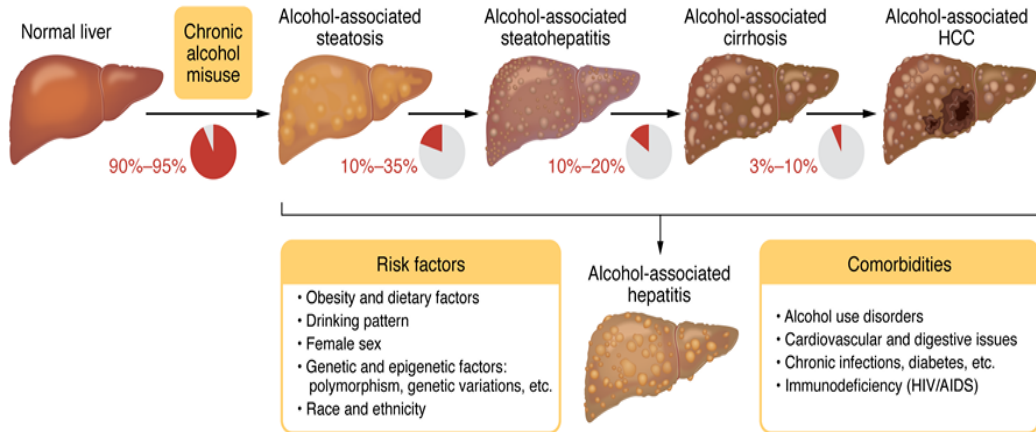
Kronik hepatit B (CHB) hastalarında konakla ilişkili birkaç faktörün HCC riskini etkilediği gösterilmiştir, yaşlı hastalarda ve Afrika kökenli HBV taşıyıcılarında daha yüksek risk vardır. Ek olarak, HCC'nin erkeklerde HCC'ye karşı daha yüksek genetik duyarlılığa sahip olduğu bilinmektedir (Choudhari et al., 2007) (J. D. Yang et al., 2019) (V. W. S. Wong & Janssen, 2015). Ayrıca, HBV taşıyıcılarının yaşam tarzı HCC riski üzerinde derin bir etkiye sahip olabilir. Araştırmalara göre, yoğun alkol kullanımının HBV hastalarında siroz gelişimini hızlandırdığı ve sonuçta HCC riskinde 1,3 ila 8,4 kat artışa neden olduğu bulunmuştur (Iida-Ueno et al., 2017). Benzer şekilde, HBV taşıyıcılarında tütün içmenin doğrudan karaciğer kanseri gelişimiyle ilişkili olduğu açıklanmıştır. HBV negatif sigara içmeyenlere kıyasla HCC riski, HBV pozitif sigara içmeyenlerde 15,8 kat, HBV pozitif sigara içenlerde ise 21,6 kat daha fazla olduğu görülmüştür (Chuang et al., 2010).

HBV'nin aksine, Hepatit C virüsü (HCV), Flaviviridae ailesinin Hepacivirus cinsine ait, genoma entegre olmayan, tek zincirli bir RNA virüsüdür. HCV dünya çapında 57 milyondan fazla insanı enfekte eder ve virüsle ilişkili HCC'nin %10-20'sini oluşturur (Hajarizadeh et al., 2013) (Heffernan et al., 2019). HBV enfeksiyonunun aksine, HCV virüsü tarafından genetik materyalin konakçı genomuna entegrasyonu yoktur. HCV'nin yapısal ve yapısal olmayan proteinleri HCC'nin gelişiminde kritik bir rol oynar (Banerjee et al., 2010). HCV kaynaklı hepatokarsinogenez, birden fazla hücresel yolun aktivasyonunu içeren oldukça karmaşık bir yoldur ve kronik hepatik inflamasyona yol açan HCV enfeksiyonuyla başlar ve daha sonra karaciğer sirozuna ve HCC gelişimine ilerler (Goossens & Hoshida, 2015). HCV proteinleri, transkripsiyonel düzenleme, sitokin modülasyonu, hepatosit büyüme düzenlemesi ve kronik karaciğer hasarına yol açan lipid metabolizması dahil olmak üzere geniş bir yelpazedeki konak hücresel aktivitelerini doğrudan veya dolaylı olarak düzenler. Oksidatif stres ve endoplazmik retikulum (ER) stresi indüklemenin yanı sıra, HCV proteinlerinin konak hücrelerinde mikroRNA'ları (miRNA) ve uzun kodlamayan RNA'ları (lncRNA) modüle ederek epigenetik değişikliklere neden olduğu da bilinmektedir (Irshad et al., 2017). Bu nedenle, HCV kronik enfeksiyon oluşturma konusunda yüksek bir eğilim (%60-80) gösterir ve karaciğer sirozunu HBV'den 10-20 kat daha fazla teşvik eder. HCV tarafından aktive edilen anjiyojenik ve metastatik yollar, hepatositlerin malignant transformasyonunu daha da teşvik eder ve HCC gelişimini hızlandırır (Vescovo et al., 2016). HCV'li hastalarda HCC riskini etkileyen birkaç risk faktörü tanımlanmıştır. Erkek cinsiyeti ve ileri yaş, kronik HCV enfeksiyonu olan hastalarda HCC gelişimi için bağımsız risk faktörleri olarak tanımlanmıştır (C. F. Huang et al., 2017) (K. C. Chang et al., 2013). Birkaç çalışma, HBV veya HIV ile ko-enfeksiyonun HCV enfeksiyonunun seyrini etkilediğini göstermiştir. HIV ile ko-enfeksiyon veya çift HBV/HCV enfeksiyonu, HCV'li hastalarda fibroz ve sirozun ilerlemesini teşvik eder ve bu da ciddi karaciğer hastalığı riskini önemli ölçüde artırır (López-Diéguez et al., 2011) (Tovo et al., 2013). Sonuç olarak, HCV mono-enfekte hastalara kıyasla HCC riskini artırır (Konstantinou & Deutsch, 2015) (Chuang et al., 2010). HCV hastalarında yaşam tarzı faktörleri ile HCC riski arasında önemli ilişkiler vardır. HCV'li sigara içenlerde (göreceli risk 23) sigara içmeyenlere (göreceli risk 7.9) kıyasla HCC'nin göreceli riskinde önemli bir artış gösteren bir çalışma vardır (Hernández-Évole et al., 2024). Ayrıca, alkol

tüketiminin HCV enfeksiyonlu hastalarda karaciğer fibrozunu hızlandırdığı ve bunun siroz ve HCC'ye ilerleme riskini artırdığı gösterilmiştir.

2.2.2.2 Alkolik karaciğer hastalığı (ALD)

Alkol, HCC gelişimi için önemli risk faktörlerinden biridir. Uzun süreli ve aşırı alkol tüketimi, alkolik karaciğer hastalığının (ALD) gelişmesine yol açar. Aşırı alkol tüketiminde, alkol metabolizmasının metabolitleri olan asetaldehit ve asetat karaciğerde birikir ve hepatotoksik etki gösterir. Ayrıca, NADH seviyeleri önemli ölçüde azalır ve bu da vücudun oksidatif strese karşı korumasını bozar. Dahası, karaciğerin sitokrom P450 enzimatik sistemi upregüle olur ve alkol metabolizmasına katılır. Bu durum, karaciğer hasarına katkıda bulunan reaktif oksijen türlerinin fazla miktarda üretilmesine neden olur (Alawiyia & Constantinou, 2023). ALD, steatozdan steatohepatit ve fibroza, siroz ve komplikasyonlarının ortaya çıkmasına ve bazı durumlarda hepatosellüler karsinomaya ilerleyebilir (Şekil 3).



Şekil 3. Alkolik karaciğer hastalığının (ALD) risk faktörleri ve komorbiditesi

Kronik alkol kullanımı, sırayla alkol ilişkili steatoz, alkol ilişkili steatohepatitis, alkol ilişkili siroz ve alkol aracı hepatosellüler karsinomaya neden olur. HCC: Hepatosellüler karsinom, HIV: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü, AIDS: Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu (Mackowiak et al., 2024).

Yüksek miktarda alkol kullanan kişilerin %90'ında steatoz gelişirken %10-20'sinde siroza ilerleme görülür. Bu durum, hastalığın ilerlemesinde farklı faktörlerin etkili olabileceğini göstermektedir. Daha yavaş ilerleyen etiyolojilerin aksine, siroz, yüksek miktarda alkol kullanımından 10 yıl sonra gelişebilir. (Hernández-Évole et al., 2024; D. Q. Huang et al., 2023). Küresel olarak, 2019'daki tüm karaciğer kanseri ölümlerinin tahmini %19'u alkol ile ilişkiliydi ve bu, hepatit B virüsü enfeksiyonu (%40) ve hepatit C virüsü enfeksiyonu (%29) ile ilişkili karaciğer kanseri ölümlerinden daha düşüktü.

Alkol kaynaklı karaciğer kanseri ölümlerinin yüzdesinde bölgesel farklılıklar dikkat çekmektedir; en yüksek yüzde Avrupa'da (%35), en düşük yüzde ise Doğu Akdeniz bölgesinde (%10) bulunmuştur (Maurice & Manousou, 2018).

2.2.2.3 Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD)

NAFLD, steatozdan daha agresif olan ve non-alkolik steatohepatite (NASH) kadar ilerleyen bir yelpazedeki karaciğer rahatsızlıklarını ifade eder. %25'lik küresel yaygınlığıyla en yaygın karaciğer rahatsızlığıdır (Nakagawa et al., 2018). Aşırı karaciğer lipid birikimi (steatoz) ile karakterize olup, iltihabi reaksiyon sonucu steatohepatite, siroza ve HCC'ye dönüşür (Sunny et al., 2017) (K. Liu & McCaughan, 2018). NAFLD klasik olarak obezite, hipertansiyon, dislipidemi, insülin direnci ve tip 2 diyabet gibi metabolik bozukluklarla ilişkilidir (Younossi, 2019). Obezite ve diyabet, NAFLD için iki önemli risk faktörüdür ve son on yılda NAFLD vakalarındaki artış, obezite ve diyabetin dünya çapındaki insidansındaki artışla paralellik göstermektedir. Her ne kadar NAFLD etiyolojisi alkol tüketimi ile ilişkili olmasa da patolojisi alkolik yağlı karaciğer hastalığına benzer (Ascha et al., 2010). Erken NAFLD veya steatozlu hastaların %20'si NASH sirozuna ilerler ve bunların %2,6'sı HCC'ye dönüşür (R. J. Wong et al., 2015). Yapılan çalışmalar NAFLD'nin HCC vakalarının yaklaşık %13'ünü oluşturduğunu gösterse de Wong ve arkadaşları NAFLD'nin en hızlı büyüyen etiyoloji olduğunu ve HCC hastalarında karaciğer naklinin göstergesi olduğunu bildirmişlerdir (Estes et al., 2018). Sayı diğer etiyolojilere göre daha düşük olsa da NAFLD vakalarının ABD'de 2015 ile 2030 arasında %21 ve NASH ile ilişkili HCC'nin %137 oranında artacağı tahmin ediliyor olması önemli bir endişe kaynağıdır (Stroisnider et al., 2006).

2.2.2.4 Aflatoksin (*Aspergillus flavus* toksinleri)

Aflatoksinler, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* mantarlarının doğal olarak oluşan sekonder metabolitleridir. Mısır, yağlı tohumlar, baharatlar, yer fıstığı, ağaç yemişleri, süt ve kurutulmuş meyveler dahil olmak üzere çok çeşitli gıda maddelerini kolonize eder (Johannesburg & Kew, 2013) (M. Kew, 2014) (Ramos, 2000). Aflatoksin B1, özellikle sıcak, nemli ortamlara sahip ülkelerde olmak üzere küresel olarak birçok yerde bulunur (Johannesburg & Kew, 2013). Birkaç farklı Aflatoksin türü vardır ve bunların neredeyse hepsi insanlarda ve hayvanlarda hastalığa neden

olabilir. Aflatoksin B1, ailenin en yaygın ve toksik üyesidir. Ayrıca bilinen en güçlü hepatokarsinojendir. Aflatoksin B1, hepatosellüler karsinomun (HCC) patogenezinin kanıtlanmış katkısı nedeniyle Dünya Sağlık Örgütü tarafından bir "grup A" kanserojen olarak sınıflandırılmıştır (Schulze et al., 2015). Aflatoksin B1, HCC riski üzerinde HBV ile sinerjik bir etkiye sahiptir; bu ilişki, her iki risk faktörünün de yaygın olduğu Güneydoğu Asya ve Sahra Altı Afrika'da yaşayan insanlarda HCC riskinin yüksek olmasını açıklar (M. C. Kew, 2010) (M. C. Kew & Kew, 2003). Aflatoksin, kronik HBV enfeksiyonuyla birlikte görüldüğünde, Aflatoksine maruz kalmayan sağlıklı bireylere kıyasla HCC geliştirme olasılığının 60 kata kadar artmasına yol açabilir (Calderon-Martinez et al., 2023). Bir ekzom dizileme analizi, HBV ile enfekte hastalardan alınan HCC tümörlerinde Aflatoksin B1 ile ilişkili belirli bir mutasyon imzasını ortaya koydu (Janevska et al., 2015). Aflatoksin maruziyeti, p53 tümör baskılayıcı geninin 249. kodonunda arginin-serin (G-T) mutasyonuna (R249S; 249 ser mutasyonu) neden olur (Müller et al., 2020) (Villar et al., 2012) (Gouas et al., 2009a) (I. C. Hsu et al., 1991). Aflatoksine maruz kalan HCC hastalarının %30 ila 60'ında p53 mutasyonlarının görülmesi, aflatoksin varlığının hepatokarsinogenez sırasında seçici bir avantaj sağladığını göstermektedir (Tümen et al., 2022).

2.2.2.5 Tütün

Sigara içmek HCC için kanıtlanmış bir risk faktörüdür. Sigara tütünü, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) veya hepatosellüler karsinom (HCC) gibi çeşitli kronik karaciğer hastalıklarına neden olabilir. Ayrıca sigara içmenin primer biliyer siroz (PBC) riskini artırdığını ve kronik hepatit B virüsü veya hepatit C virüsü olan hastalarda karaciğer fibrozu olasılığını artırabileceğini ve antiviral tedavinin etkinliğini azaltabileceğini vurgulayan epidemiyolojik çalışmalar da vardır (Rutledge & Asgharpour, 2020) (Jain et al., 2021). Tütün ve birincil karaciğer kanseri türü arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmaya göre, eski ve mevcut sigara içicilerinde, hiç sigara içmeyenlere kıyasla HCC ve ICC riskleri artmıştır. Günde 25'ten fazla sigara içmek, HCC riskini %55 ve ICC riskini %86 oranında artırmıştır. Hem HCC hem de ICC için artan risk, artan sigara yoğunluğu seviyeleriyle ilişkilendirilmiştir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, sigarayı >30 yıl önce bırakan bireylerde HCC

riskinin hiç sigara içmeyenlerdekine neredeyse eşit olduğu bildirilmiştir; bu da sigarayı bırakmanın HCC riskini azalttığını göstermektedir (Petrick et al., 2018).

2.2.3 Hepatoselüler karsinomanın moleküler patogenezi

HCC'nin yaklaşık %70-80'i, karmaşık çok adımlı bir süreci içeren siroz bağlamında gelişir. Sirotik karaciğerde HCC, düşük dereceli displastik nodüller (low grade dysplastic nodules, LGDN'ler) adı verilen kanser öncesi sirotik nodüllerin varlığıyla başlar ve bunlar yüksek dereceli displastik nodüllere (high grade dysplastic nodules, HGDN'ler) ve buna bağlı olarak erken evre HCC'ye dönüşebilir ve ileri HCC'ye ilerleyebilir (Llovet et al., 2021). HCC, vakaların %20-30'unda sirozdaki bağımsız olarak HBV enfeksiyonu, NASH (Llovet et al., 2018) (Villanueva, 2019) veya daha az sıklıkla adenomlar zemininde gelişebilir (Nault et al., 2017). HCC, somatik mutasyonların ve epigenetik değişikliklerin birikmesinden kaynaklanır. Bunların çoğu 'yolcu' genlerinde meydana gelir ve birkaçı hepatokarsinogeneze yol açan temel sinyal yollarının aktivasyonundan sorumlu 'sürücüler' olarak kabul edilir (Llovet et al., 2018) (Villanueva, 2019). Moleküler patogenezi, genetik (*p53*, *TERT*, *CTNNB1* vb.) ve epigenetikteki (DNA-metilasyon, miRNA, lncRNA vb.) endojen değişimler HCC gelişimine güçlü bir şekilde katkıda bulunur (Tümen et al., 2022). Viral enfeksiyona yanıt olarak veya HCC'de toksik ajanlara maruz kalma nedeniyle çok sayıda sinyal yolunun düzensiz olduğu gözlemlenmiştir. Bunlar, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF/c-MET) gibi büyüme sinyal yollarını içerir. Ayrıca, Wnt/ β -catenin, Janus kinaz (Jak)-transkripsiyon faktörünün sinyal transdüktör aktivatörü (Stat) (JAK/STAT), Hedgehog (HH), Hippo ve Tirozin kinaz bağımlı sinyal yolları arasında fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/AKT/rapamisin memeli hedefi (mTOR), Ras mitogenle aktive olan protein kinaz (Ras/Raf/MAPK) yolları HCC'de tekrarlayan şekilde düzensizdir (Dimri & Satyanarayana, 2020a) (Farzaneh et al., 2021).

2.2.4 Hepatoselüler karsinomada genetik ve epigenetik olaylar

Genetik değişiklik, HCC'nin başlatılması ve ilerlemesiyle ilişkili en önemli mekanizmalardan biridir. Sirotik karaciğerin neoplastik öncesi lezyonlarında genetik değişiklikler gözlenebilmektedir ve bunun hepatokarsinogenezi başlatıcı olaylar

olduğu düşünülmektedir. Kalıcı genetik anormallikler hepatositlerde birikerek gen ekspresyonunun bozulmasına neden olur ve sonuçta malign transformasyona yol açar. Genetik değişiklikler, büyük kromozomal amplifikasyon, translokasyon, delesyon, küçük fraksiyon kaybı ve tek nükleotid varyasyonu dahil olmak üzere çeşitli türlere ayrılabilir. Her düzeydeki genetik değişiklikler genellikle hücre büyümesini ve çoğalmasını yöneten bazı önemli onkogenlerin aktive olmasına veya tümör baskılayıcı genlerin işlev kaybına neden olur (M. Liu et al., 2014) (Niu et al., 2016) (Kan et al., 2013). Çok sayıda çalışma, dizi karşılaştırmalı genom hibridizasyonu (array comparative genome hybridization, aCGH) verileri ve tek nükleotid polimorfizmi (single nucleotide polymorphism, SNP) dizileri kullanılarak, HCC'de belirli bölgelerin sıklıkla etkilendiğini göstermiştir. Bunlara 1q, 5p, 6p, 7p-q, 8q, 17q ve 20q kromozomlardaki amplifikasyonlar ve 1p, 4q, 6q, 8p, 9p, 13q, 14q, 16p-q, 17p, 21p-q ve 22q kromozomlardaki delesyonlar dahildir (Kan et al., 2013) (Homayounfar et al., 2013). (Nishida et al., 2013) (Roessler et al., 2012) (K. Wang et al., 2013). 1q amplifikasyonu, HCC'de en sık tespit edilen değişikliklerden biridir (%58-%78). Özellikle, 1q21 amplifikasyonu HCC'nin ilerlemesi sırasında erken genomik değişimle ilişkilendirilmiştir (C. Zhou et al., 2017) (L. Chen et al., 2010). Kromodomain helikaz DNA bağlanma proteini 1-benzeri (*CHD1L*), aynı zamanda karaciğer kanseri 1 geni (*ALCI*) olarak da bilinir, HCC'de (hepatoselüler karsinom) anlamlı şekilde upregüle olduğu tespit edilen 1q21'in yeni bir hedef geni olarak tanımlanmıştır. CHD1L'in karaciğer kanseri tümör oluşumundaki moleküler mekanizması, hücre proliferasyonunu, anti-apoptotik, invazyonu ve metastazı teşvik etme rolüyle ilişkilidir (L. Zhang et al., 2021). Kromozom 8q, HCC'deki en sık amplifiye olan ikinci bölgedir. Daha spesifik olarak, 8q24.21-24.22 bölgesinin amplifikasyonu örneklerin %53,4'ünde gerçekleşir. Bu bölge, bilinen onkogenler olan miyelosito-matoz viral onkogen (*MYC*), Arf-GAP ile SH3 domaini, ANK tekrarları ve PH domaini içeren protein 1 (DDEF1) ve insan melanoma kaynaklı lösin fermuarı ekstra-nükleer faktör (MLZE) hedef almaktadır (Niu et al., 2016). Hipermetilasyon, HCC'deki tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgesindeki CpG adalarında yaygın olarak gözlemlenir. JAK/STAT sinyal yolunu düzenleyen sitokin sinyalleme baskılayıcısı (*SOCS-1*), HCC hastalarının %60'ından fazlasında promotör hipermetilasyonu nedeniyle susturulmuş olarak bulunmuştur (H. Yoshikawa et al., 2001) (*Aberrant Promoter Methylation of SOCS-1 Gene May Contribute to the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis* | Request PDF, n.d.).

İnsan HCC'sinde, küresel hipometilasyon arka planında anormal bir DNA hipermetilasyon paterni tanımlanmıştır. Sekiz gen (*HIC1*, *GSTP1*, *SOCS1*, *RASSF1*, *CDKN2A*, *APC*, *RUNX3* ve *PRDM2*) erken HCC'lerde önemli ölçüde artmış metilasyon göstermiş ve HCC oluşumuna daha kısa sürede neden olma ile ilişkilendirilmiştir (Mann, 2014).

p53, kromozom 17p üzerinde bulunan bir tümör baskılayıcı gendir ve 53 kD'lik bir DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörünü kodlar (Patil & Bihari, 2022) (Cha & DeMatteo, 2005). Normal hücrelerde *p53*, hücre döngüsünün ilerlemesi, DNA onarımı ve apoptozun düzenlenmesinden sorumludur (Link & Iwakuma, 2017) (Cha & DeMatteo, 2005) (Levine & Oren, 2009) (Kastenhuber & Lowe, 2017). *p53*'ün ekspresyonu, hücrel stres ve DNA hasarına yanıt olarak artar. Genellikle, bir alelin tek bir nokta mutasyonu ve diğer alelin silinmesi *p53*'ü inaktive eder. *p53*, hepatoselüler karsinom (HCC) hastalarında en sık mutasyona uğrayan genlerden biridir. *p53* mutasyonları HCC'lerin %30-60'ında gözlemlenmiştir (Alqahtani et al., 2019a). Ayrıca, bazı HCC vakalarında, 26S proteozom düzenleyici proteini gankirin ve *p53*'e özgü ubiquitin ligazı olan murine double minute 2 (MDM2) gibi proteinlerin seviyeleri artmış olup, bu da *p53* protein seviyelerini düşürmektedir. MikroRNA'lar (miRNA'lar) da *p53* aktivitesini inhibe edebilir; özellikle, miRNA-24, HCC'de düzensizleştğinde *p53* seviyelerini düşürerek invazyon ve metastazı teşvik ettiği gösterilmiştir (Link & Iwakuma, 2017). Birçok HBV proteini, hepatositlerde MDM2–*p53* ekseninin homeostazını bozarak onkogenik rollerini gerçekleştirebilir. HBV X proteini (HBx), 154 amino asitten oluşan polipeptidleri kodlayan X bölgesi, yalnızca HBV'nin hepatositlerde hayatta kalmasını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda MDM2–*p53* eksenini bozarak hepatositlerin normal ritimlerini de etkileyebilir (Cao et al., 2020).

Wang XW, HBx proteininin *p53* konformasyonunu değiştirebileceğini ve HBx–*p53* kompleksini oluşturarak *p53*'ün DNA konsensus dizisine bağlanmasını engellediğini öne sürmüştür. Bu durum, insan kanserlerindeki *p53* anlamlı olmayan mutantlarına benzemektedir. Bu nedenle, hepatositlerin hepatoma hücrelerine dönüşmesinin olası bir mekanizması olarak, *p53*-bağımlı hasar görmüş DNA onarım yolunun bloke olduğunu ve hepatositlerin ana tümör baskılayıcı genlerinin fonksiyonlarının yok olduğunu düşünmüştür (X. W. Wang et al., 1994) (L. Yang et al., 2022). Ranxu Zhu ve arkadaşlarının benzer bir çalışmada, HBx proteinlerinin insan hepatositlerinde

GAS2 genini transkripsiyonel olarak susturduğu ve bunun, p53-bağımlı apoptoz ve senesansı engelleyerek HBx proteini ile ilişkili onkogenezi dengelemeye yardımcı olduğu bulunmuştur (R. Zhu et al., 2015). Ayrıca, aflatoksinler, *p53*'ün 249.kodonunun üçüncü bazında mutasyonlarına neden olur ve bu mutasyonlar aflatoksine maruz kalan HCC hastalarının %30 ila %60'ında tespit edilebilir. *p53* mutasyonu meydana geldiğinde hücrel dejenerasyon riski 4 kat artar (Tümen et al., 2022) (Gouas et al., 2009b).

Telomeraz enzimi, telomeraz revers transkriptaz (TERT) katalitik domaini ve telomeraz RNA (TERC) içeren kompleks bir enzimdir. *TERT* geni, genomik bütünlüğü koruyan telomerazın katalitik alt birimini kodlar. *TERT* ifadesi, somatik hücrelerde baskılanırken, kendini yenileyen dokularda ve kanserlerde proliferatif hücrelerde baskılanmaz. Telomeraz ters transkriptaz (TERT) genindeki anormallikler, hepatoselüler karsinom (HCC) vakalarının %80'inden fazlasında tespit edilebilir (Yuan et al., 2019a) (Mishima et al., 2024) (Pezzuto et al., 2016). Telomeraz ekspresyonunun arttığı en yaygın somatik mutasyon, başlangıç kodonunun 228. ve 250. bazlarına yakın TERT promotöründeki C'den T'ye olan dönüşümdür (Yuan et al., 2019b) (Nault et al., 2013). İki çalışma, HBV-DNA'nın tercihen TERT veya TERT'e yakın bölgelerine entegrasyon sağladığını göstermektedir (Totoki et al., 2014) (X. Zhang et al., 2005). PROX1 (TERT'nin pozitif modülatörü), Hepatit B virüsü X (HBx) varlığı tarafından downregüle edilmektedir (Y. J. Kim et al., 2018). Özellikle, TERT promotör mutasyonlarının HCC'deki *CTNNT1* mutasyonlarıyla ilişkilendirildiği bulunmuştur (Schulze et al., 2015) (Pezzuto et al., 2016) (Totoki et al., 2014). Bu da TERT promotör mutasyonlarının ve Wnt/ β -katenin yolunun deregülasyonunun, hepatositlerin malign transformasyonunda etkileşime girebileceğini göstermektedir. Bu nedenle, TERT promotör mutasyonları, patolojik karaciğer ilerlemesindeki en kritik sürücü mutasyonlardan birini temsil etmektedir.

2.2.4.1 Wnt/ β -katenin sinyal yolu

WNT sinyal yolu, embriyonik gelişim, organogenez, hücre çoğalması, farklılaşma, yetişkinlerde doku homeostazisi, anjiyogenez ve çok sayıda hastalık dahil olmak üzere birden fazla biyolojik süreci düzenlemede önemli roller oynar. Özellikle doğumdan önce embriyonik dokuların gelişiminde yoğun olarak rol oynadığı gösterilmiştir (A. M. Khalaf et al., 2018b) (L. Hu et al., 2024). Wnt sinyal yolunun, kök hücre soylarının

spesifikasyonu ve bakımında önemli bir rol oynadığı ve çok çeşitli doku ve organlardaki çoklu kök hücre bölümlerinde önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Ring et al., 2014). Wnt/ β -katenin sinyal yolunun anormal aktivasyonu, HCC tümör oluşumunda rol oynayan birincil onkogenlerden biridir ve HCC hastalarında yaygın olarak bulunur ve aralarındaki ilişki iyi bilinmektedir. Exon3'te β -katenin kodlayan *CTNNB1* genindeki mutasyonlar, bu yolun en yaygın aktivasyon mekanizmasıdır (Monga, 2015) (A. M. Khalaf et al., 2018b). J. Calderaro ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *CTNNB1* mutant tümörlerinin genellikle büyük hacimli, iyi farklılaşmış, mikro ışın iskeletine sahip, tümör kolestazi gösteren ve inflamatuvar infiltrasyonun olmadığı gösterilmiştir (Calderaro et al., 2019). Araştırmalar, *CTNNB1* gen mutasyonlarının HCC vakalarının yaklaşık %20-40'ında bulunduğunu ve bu mutasyonun Hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonuyla ilişkili HCC vakalarında Hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonuyla ilişkili HCC vakalarından daha sık meydana geldiğini göstermektedir (Waisberg & Saba, 2015) (A. M. Khalaf et al., 2018a). Ayrıca, Axin, GSK-3b ve APC'nin Axin kompleksinin üyeleri olarak işlev kaybı veya mutasyonu da yolu aktive edebilir ve onkojenik etkiler gösterebilir (M. Lee et al., 2018) (W. Wang et al., 2016) (W. Xu et al., 2017). *Axin1* mutasyonlarının tüm HCC vakalarının yaklaşık %3-16'sını ve *Axin2* mutasyonlarının yaklaşık %3'ünü oluşturduğu bildirilmiştir (S. He & Tang, 2020) (Taniguchi et al., 2002) (Z. Zhao et al., 2024) (Levrero & Zucman-Rossi, 2016). Ancak, HCC vakalarının %40-60'ında *CTNNB1*, *Axin1*/*Axin2* genlerinin mutasyonu gözlemlenmemiştir (Z. Zhao et al., 2024). Buna dayanarak, özellikle alkolle ilişkili HCC'yi hedef alan yakın tarihli bir genom çapında ilişki çalışmasında (GWAS) yolu kontrol eden başka bir varyasyon bulunmuştur. (*WNT3A-WNT9A*) gen varyantları, alkolik karaciğer hastalığı hastalarında HCC'nin oluşumuyla özel olarak bağlantılıdır (Trépo et al., 2022) (Nahon et al., 2023).

2.2.4.2 Ras/Raf/MAPK sinyal yolu

HCC'de rol oynayan araştırılan sinyal yolları arasında Ras/Raf/MAPK, HCC gelişimindeki en kritik yoldur. Bu yolun upstream molekülleri, İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü (IGFR), Vasküler epidermal faktör reseptörü (VEGFR), trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR), hepatosit büyüme faktörü reseptörü (HCFR) ve c-met reseptörü dahil olmak üzere farklı reseptör tirozin kinazlarıdır. Bu reseptörlerden gelen sinyaller, hücre çoğalması, hücre büyümesi, farklılaşması ve hayatta kalması dahil olmak üzere birden fazla hücresel işlevi düzenlemek için

Grb2/Shc/SOS molekülleri aracılığıyla downstream sinyal yolu Ras/Raf/MAPK'ya iletilir. Bu yolun düzensizliği, gelişmiş hücre büyümesi, farklılaşması ve hayatta kalması dahil olmak üzere uygunsuz hücresel aktivitelere ve nihayetinde kansere yol açar (Delire & Stärkel, 2015) (Alqahtani et al., 2019b). Ras/Raf/MAPK yolunun yapısal aktivasyonunun HCC'de gözlemlenmesi, tümör oluşumundaki rolünü düşündürmektedir. Ayrıca, MEK1/2 fosforilasyonunun HCC dokularında, bitişik iyi huylu dokulara kıyasla yedi kat arttığı bildirilmiştir (Huynh et al., 2003). MEK/ERK ekspresyonu ve fosforilasyonuna dayanarak, Ras/Raf/MAPK sinyallemesinin HCC hastalarının %50'sinden fazlasında aktive olduğu düşünülmektedir (Moon & Ro, 2021). Başka bir çalışmada, Ras efektörlerinin yüksek düzeyde ekspresyonunun, HCC hastalarında düşük sağkalım oranlarıyla yüksek oranda ilişkili olduğu gösterilmiştir. Raf1'in aşırı ekspresyonu ise, HCC'de erken tümör nüksü ve kötü prognoz için bağımsız bir belirteç olarak değerlendirilmektedir (L. Chen et al., 2011). Ayrıca HCC'de HBV ve HCV enfeksiyonlarının da RAF/MEK/ERK yolağına etki edebildiği bildirilmiştir (Moon & Ro, 2021).

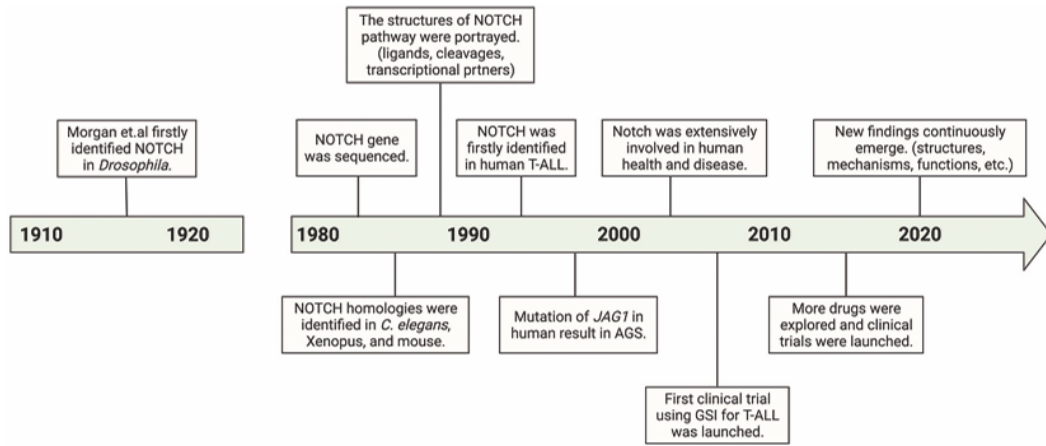
2.2.4.3 PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu

PI3K/AKT/mTOR yolu, hücrenin hayatta kalmasını, büyümesini, çoğalmasını, metabolizmasını ve ölüm oranını düzenleyen başlıca yollardan biridir (Kudo, 2011). PTEN fonksiyonundaki anormalliklerin HCC'de PI3K/AKT/mTOR yolunun hiperaktivasyonuna yol açabileceği bildirilmiştir (Q. Zhou et al., 2011). *PTEN* geninin mutasyonu veya *PTEN* ekspresyonunun azalması tüm HCC tümörlerinin yaklaşık yarısında gözlemlenir ve bu da *PTEN* inaktivasyonunun HCC patogenezinde rol oynadığını düşündürmektedir (Q. Zhou et al., 2011) (Z. Xu et al., 2018). PI3K/AKT/mTOR yolunun aktivasyonu, hepatoselüler karsinom (HCC) tümörlerinin yaklaşık %50'sinde görülür ve bu yolun aktif olması kötü prognoz ile ilişkilidir (Faivre et al., 2011) (E. J. Sun et al., 2021). *mTORC1* ve *mTORC2*, bu sinyal yolundaki iki kritik bileşendir ve HCC'li hastaların %40-50'sinde upregüle edilir. Ek olarak, *mTOR* ekspresyonunda artış daha büyük tümörlerde veya HCC'nin ileri evrelerinde bulunur (Ferrín et al., 2020). Çalışmalar mTOR inhibisyonunun otofaji aktivasyonu ile ilişkili olduğunu ve aksine mTOR hiperaktivasyonunun obezite, diyabet ve yağlı karaciğer hastalığına paralel lipid üretimini artırabileceğini göstermiştir. İnsülin ve büyüme faktörleri tarafından aktive edilen AKT/mTOR/SREBP sinyal yolu, tümörle ilişkili maddelerin sentezlendiği anabolik metabolizmada temel bir eksenidir (Shimano &

Sato, 2017). Çalışmalar, AKT/mTOR sinyal yolunun aktivasyonunun SREBP1 ifadesini artırdığını, bunun da lipogenezle ilgili genlerin transkripsiyonunu aktive ederek lipid metabolizmasını güçlendirdiğini ve böylece HCC hücrelerinin büyümesini teşvik ettiğini göstermiştir (Yin et al., 2017).

2.2.4.4 Notch sinyal yolu

NOTCH geni ilk kez 1910'larda NOTCH'lü kanat ile *Drosophila melanogaster* üzerinde yapılan çalışmalarda adlandırılmıştır. *D. melanogaster* *NOTCH* geni daha sonra 1980'lerde izole edildi ve sekanslandı. 1988 ve 1989'da LIN-12 ve GLP-1, *Caenorhabditis elegans*'ta NOTCH homologları olarak tanımlandı ve benzer şekilde *C. elegans* gelişimiyle ilişkiliydi. 1990 yılında *Xenopus*'ta XOTCH (*D.melanogaster* NOTCH'un bir homologu) tanımlandı. 1991 yılında *NOTCH* geni ilk olarak insan T hücreli akut lenfoblastik lösemiye (T-ALL) bağlandı. 1997 yılında Alagille sendromunun (AGS), NOTCH1 ligandını kodlayan *JAG1* mutasyonundan kaynaklandığı bulundu (Şekil 4) (B. Zhou et al., 2022). NOTCH sinyalini içeren ilk klinik çalışma, T-ALL veya diğer lösemili hastaları tedavi etmek için bir γ -sekretaz inhibitörü kullanılarak 2006 yılında başlatıldı (Shih & Wang, 2007).

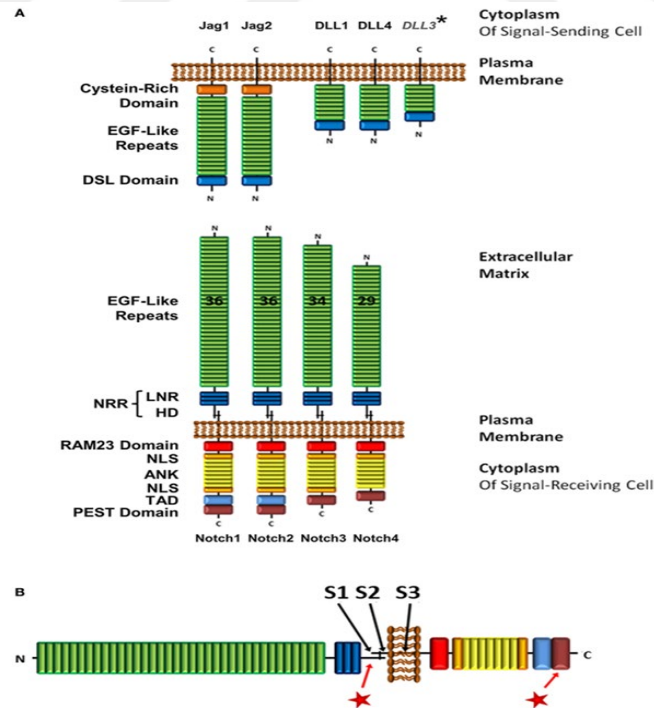


Şekil 4. NOTCH sinyal yolunun kısa tarihçesi

T-ALL, T hücreli akut lenfoblastik lösemi; AGS, Alagille sendromu (B. Zhou et al., 2022)

Notch, birçok temel fizyolojik süreçte gerekli olan, yüksek derecede korunan bir gelişimsel sinyal yoludur. Bu süreçler arasında hücre proliferasyonu, farklılaşma, apoptoz, çeşitli dokularda hücre kaderinin düzenlenmesi yer alır (Wael et al., 2014) (Bray, 2016). Yetişkinlerde doku homeostazının düzenlenmesi ile kök hücrelerin korunmasında önemli bir rol oynar (Guo et al., 2014) (Nowell & Radtke, 2017). Notch proteinleri, evrim sırasında omurgalılar ve omurgasızlar arasında yüksek derecede

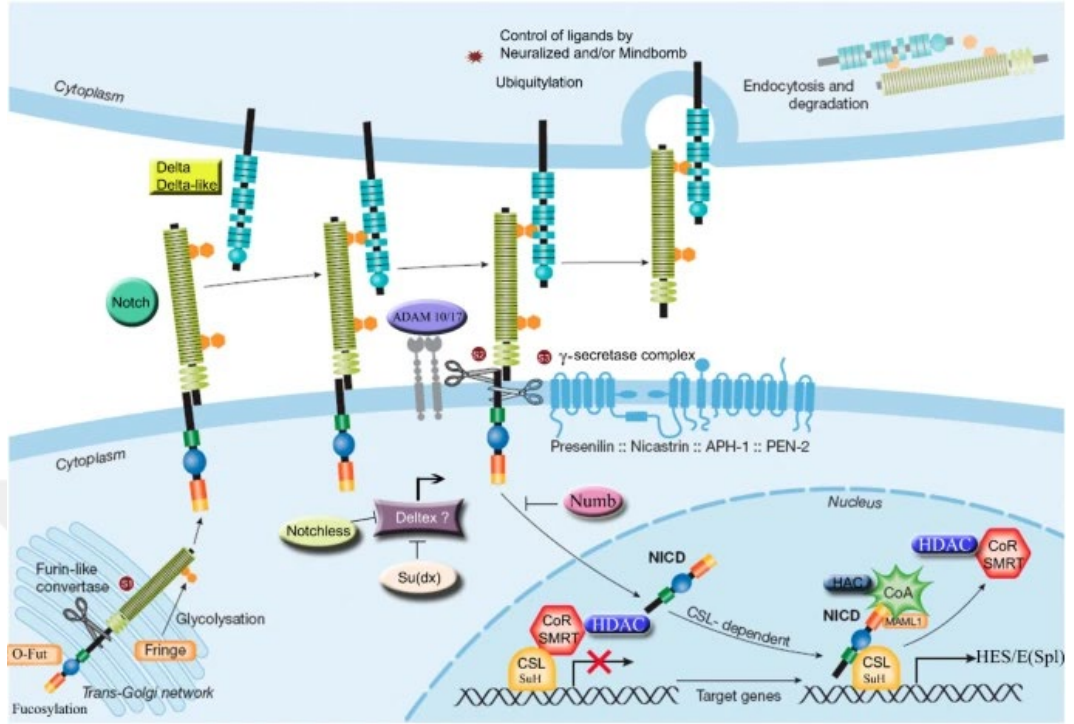
korunmuş bir ekspresyonla hücre yüzeyinde sunulmaktadır (LaFoya et al., 2016). Memelilerde, dört Notch proteini (Notch 1–4) ve Jagged (Jagged1,2) ve Delta-like (Delta-like, Dll1, 3 ve 4) ailesine ait beş ligand bulunur (Şekil 5). Bu homologlar, yüksek derecede korunmuş bir domain yapısını paylaşır (Steinbuck & Winandy, 2018) (Q. Huang et al., 2019). Notch proteinleri, ekstraselüler bir domain (NECD, Notch Ekstra-Hücre Domaini), intraselüler bir domain (NICD, Notch İç-Hücre Domaini) ve bir transmembran domaininden oluşan, transmembran reseptörlerinden oluşan bir aileyi tanımlar (300–350kDa). Notch'un hücre dışı domaini, ligand bağlanmasından sorumlu olan ve üç LIN tekrarından oluşan korunan bir negatif düzenleyici bölge (NRR veya LNR) ile takip edilen, 29–36 epidermal büyüme faktörü (EGF)-benzeri tekrar dizileri içerir. Notch reseptörlerinin intraselüler kısmı, bir amino-asit metabolizması düzenleyici (RAM) bölgesi, nükleer lokalizasyon dizileri, altı ankyrin (ANK) tekrarları, bir transaktivasyon domaini (TAD) ve proteinin stabilitesi için önemli olan C-terminal PEST (Prolin, Glutamik asit, Serin, Treonin) bölgesini içerir. Omurgalılar ve memeliler, ana olarak EGF benzeri tekrarların sayısı ve ANK ile PEST bölgeleri arasında yer alan C-terminal dizilerdeki farklılıklarla birbirinden ayrılan dört farklı Notch reseptörüne sahiptir (M. M. Wang, 2011).



Şekil 5. Notch reseptör ailesi ve ligandlarının yapısı
A. Sinyali alan hücrelerdeki Notch reseptörlerinin ve sinyali gönderen hücrelerdeki Notch ligandlarının yapısı. B. NOTCH reseptörü (S1-3) üzerindeki üç bölünme bölgesinin yerleri (Steinbuck & Winandy, 2018)

Notch sinyal yolunun aktivasyonu, Notch'a bağımlı süreçleri içeren kanonik Notch sinyal yolu ve kanonik olmayan Notch sinyal yolu olmak üzere iki yolla gerçekleşebilir. Notch sinyalinin aktivasyonu, Notch reseptörü ile ligandı arasındaki etkileşim yoluyla hücreler arası teması gerektirir (Cai et al., 2024), bu etkileşim sırasıyla “alıcı” hücre ve “gönderici” hücre tarafından ifade edilen reseptör ve ligandlarla gerçekleşir. Sürekli ligand-reseptör etkileşimleri, sinyal ileten hücrelerin reseptörleri ifade etmeye başlaması ve sinyal alan hücrelerin ligantları ifade etmeye başlaması ile sonuçlanan bir geçişe yol açar (Fortini, 2009). Bir dizi hücre yüzeyi ligandının, sinyal alan hücrelerdeki Notch reseptörlerine bağlanması, reseptörün konformasyonel değişikliklerine yol açar. Bu değişiklikler, ligandın ligandı ifade eden hücrede (sinyal veren hücre) endositoz sırasında mekanik kuvvetlerle tetiklenmiş olabilir ve bu da reseptörün ekstrasellüler bölgesinde ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) için kesilme bölgesinin açılmasına yol açar (L. Yin et al., 2010). ADAM'lar tarafından yapılan ekstrasellüler kesilmeden sonra, NICD, zar içinde gömülü olan γ -sekretaz kompleksi tarafından kesilir ve bu kompleks presenilin, nikastrin, APH1 ve PEN2 içerir. İkinci kesilmeden sonra, NICD sitozola salınır ve nükleusa geçerek CSL protein kompleksi (insanlarda CBF1/RBP-J, *Drosophila*'da Su (H) ve *Caenorhabditis elegans*'ta Lag-1) ile bağlanır (Borggreffe & Oswald, 2009) (Kovall et al., 2017). Nükleusa girdikten sonra, NICD, CBF1/SKIP ile yüksek afiniteyle bağlanır. NICD/CBF1/SKIP kompleksi, transkripsiyonel ko-aktivatör Mastermind-like (MAML) ve histon asetiltransferazları (HAT) ile bağlanarak, Notch hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive eder (Şekil 6). Bu genler arasında Hairy enhancer of split homologs transkripsiyon faktörleri (Hes ve Hey), Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), siklin D1, c-myc, Peroksizom-proliferatör aktive edilmiş reseptör (PPAR) ve Notch reseptörleri de yer alır (Minter & Osborne, 2012) (Y. Yao et al., 2017). Bu transkripsiyon faktörleri, kanser gelişimi ve ilerlemesinde

bozulmuş olan, proliferasyon, diferansiasyon ve apoptoz dahil olmak üzere bir dizi hücresel süreci kontrol eder (Licciulli et al., 2013) (Sonoshita et al., 2015).



Şekil 6. Notch sinyal yolu ve sinyal aktivasyonu

Notch reseptörleri ve ligandları hücre yüzeyinde eksprese edilir. Ligand bağlanması, metalloproteaz TACE ve γ -sekretaz enzimleri tarafından gerçekleştirilen iki ardışık proteolitik kesilme işlemi başlatır. Serbest bırakılan Notch'un hücre içi bölgesi (NICD) çekirdeğe taşınır ve transkripsiyon faktörü CSL ile bağlanarak transkripsiyonel aktivasyonu başlatır (Tarasova et al., 2011).

2.2.5 Hepatoselüler Karsinomda (HCC) Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT)

1980 'lerden önce, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) çoğunlukla embriyogenez ve doku onarımıyla ilgili bir süreç olarak bilinirdi (Greenburg & Hay, 1982). Epitelyal mezenkimal geçiş, hücrelerin epitelyal, polarize bir durumdan mezenkimal ve apolarize fenotipe geçişini ifade eder. Bu, sağlıklı embriyonik gelişim için temel bir fizyolojik süreçtir; ancak, kanser ve inflamasyon gibi bazı patolojik durumlarda bu süreç ele geçirilir (Brabletz, 2012) (Kalluri & Weinberg, 2009) (D. H. Kim et al., 2017). EMT 'nin üç farklı tipi vardır. Gelişimsel (tip I) EMT, mezoderm oluşumu, nöral krest delaminasyonu, kalp kapağının oluşumu, palatogenez ve miyogenez için gereklidir (Greenburg & Hay, 1982) (Theveneau & Mayor, 2012) (Thiery et al., 2009) (Yokoyama & Asahara, 2011). Doku hasarının ardından EMT, fibroz ve yara iyileşmesi sırasında aktive olur (tip II) (Haensel & Dai, 2017) (Stone et al., 2016). Ancak, kanser hücrelerinin yayılmaya, invazyon yapmaya ve metastaz oluşturmaya

başladığı tümör oluşumunda da anormal şekilde aktive edilir (tip III) (Y. Zhang & Weinberg, 2018) (Francou & Anderson, 2020) (Ribatti et al., 2020). Kansere bağlamında EMT, karsinoma hücrelerine fenotipik değişiklikler kazandıran fonksiyonel bir yeniden programlamadır. Tümör hücrelerinin tabi olduğu bu plastisite süreci, birçok epitel özelliğinin kaybını içerir; bu özellikler arasında sıkı, aderans ve açıklık (gap) bağlantıları ile apikal-bazal polarite yer alır. Aynı zamanda, anterior ve posterior polaritenin kazanılması ve fibroblast benzeri morfoloji ile mezenkimal özelliklerin kazanılması da gözlemlenir (Dituri et al., 2019). Mezenkimal hücreler, mezenkimal epitelyal geçiş (MET) yoluyla epitelyal duruma kazanabilir. EMT-MET geçişleri, tümör başlatma, ilerleme ve metastatik kolonizasyonun bir özelliği olan hücresel plastisiteye neden olur (W. Lu & Kang, 2019) (Bakir et al., 2020). Fenotipik olarak çok heterojen olan tümör hücreleri, EMT'den faydalanarak artan invazivlik ve metastatik kapasite gibi bazı özellikler kazanabilir ve bunlar, tümör mikroçevresindeki hızlı değişimlere uyum sağlamak için kök benzeri özellikler kazandırarak daha malign tümörlerin oluşmasına yol açar (Ribatti et al., 2020) (Suarez-Carmona et al., 2017) (Celià-Terrassa & Jolly, 2020). TGF β , Wnt, Notch, NF- κ B, hedgehog ve reseptör tirozin kinazları, kanser gelişimi ve metastaz sırasında EMT'yi başlatan önemli sinyal yollarıdır. Bu yollar, tümör mikroçevresinden gelen sinyallerle aktive edilen Snail/Slug, Smads ve Twist gibi kritik araçlar tarafından yönlendirilir (Deshmukh et al., 2021) (Gonzalez & Medici, 2014) (Moustakas & Heldin, 2007). Son dönemde yayınlanan çalışmalar, epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT), hepatoselüler karsinomda hem kemorezistansın gelişiminde hem de daha kısa sağkalım süresiyle ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. hepatoselüler karsinomda EMT'yi uyaran çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır ve EMT'yi indükleyen spesifik faktörden bağımsız olarak, EMT özellikleri gösteren HCC'lerin, EMT özellikleri taşımayanlara kıyasla daha fazla vasküler invazyon, metastaz ve daha kötü bir prognoz sergilediği tutarlı bir şekilde gözlemlenmektedir (Aksoy & Aksoy, 2023; Jou & Diehl, 2010). EMT'nin temel adımı olarak kabul edilen E-kaderin ekspresyonunun baskılanması, sürecin karakteristik bir özelliğidir. Snail, Slug ve Twist gibi çinko parmak yapısına sahip transkripsiyonel baskılayıcılar, E-kaderin promotör bölgesinde yer alan E-box dizilerine bağlanarak, upstreamden gelen sinyallere yanıt olarak transkripsiyonu baskıladıkları düşünülmektedir. Bu transkripsiyon faktörleri, E-kaderin'in baskılanmasında en güçlü düzenleyiciler arasında yer almaktadır. Primer hepatoselüler karsinom (HCC) olgularında Snail, Twist ve Slug pozitifliği sırasıyla %57, %43 ve

%51 oranlarında bildirilmiştir (Giordano & Columbano, 2014; Kasprzak et al., 2017; M. H. Yang et al., 2009a). β -katenin'in membrandan nükleusa taşınması da, tıpkı Snail'in nükleusa translokasyonu gibi, EMT'nin bir göstergesidir (H. C. Hsu et al., 2000). E-cadherin negatifliği, Snail ve Twist pozitifliği ile β -katenin'in nükleer ekspresyonunun bir arada bulunması; HCC için bağımsız bir olumsuz prognostik faktör ve yüksek metastatik potansiyelin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir (Gui et al., 2017; M. H. Yang et al., 2009a). Terence K Lee ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, Twist aşırı ekspresyonunun EMT değişikliklerinin indüksiyonu ve hepatoselüler hücre invazivliği yoluyla hepatoselüler karsinom metastazı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (T. K. Lee et al., 2006).

2.2.5.2 Notch sinyalleme ve HCC invazyonu ile metastazı

NICD1'in serviks, kolon, beyin ve yumurtalık tümör hücrelerinde aşırı ekspresyonu, kısmen Snail aracılı EMT yoluyla artan migrasyon ve invazyon ile sonuçlanır (Sahlgren et al., 2008). EMT ayrıca HCC'lerin vasküler invazyonu için kritik olan moleküler bir mekanizmadır (Hanahan & Weinberg, 2000) (Ogunwobi et al., 2012) (M. H. Yang et al., 2009b) (Their, 2002). Modern tıbbın ve HCC tedavisinde kullanılan teknolojilerin gelişmesine rağmen, intrahepatik ve ekstrahepatik metastaz oranlarının yüksek olması nedeniyle genel sağkalım oranı düşük kalmaktadır (Aravalli et al., 2008). Tümör invazyonu ve metastazı, tümör hücreleri arasındaki karmaşık etkileşimlerin yanı sıra, konak doku ile tümör hücreleri arasındaki etkileşimleri içeren bir dizi biyolojik süreçten oluşur. Bununla birlikte, tümör hücrelerinin metastaz yapabilmesi için bir dizi ardışık hız sınırlayıcı adımı aşması gerekir. Tümör hücrelerindeki biyokimyasal özelliklerdeki değişiklikler, intravazasyon, duraklama ve ekstrasvazasyon, dormansi, anjiyogenez ve metastatik kolonizasyonu içerir ve bu durum anormal sinyallerin iletilmesine, kanserin invazyonunu sürdürmesine ve teşvik etmesine yol açar (Steeg, 2006). Notch sinyali, tümör anjiyogenezi ve metastaz ile ilişkilidir. *Notch1* ve *Jagged1* ekspresyonu HCC'de artmıştır ve HCC tümör nodu metastaz (TNM) evrelemesi, artan *Notch1* mRNA seviyeleri ile anlamlı şekilde ilişkilidir. Wang XQ ve ark., tarafından yapılan bir çalışmada, TNM Evre I-II hastaları ve tümör venöz invazyonu olmayan hastalarla karşılaştırıldığında, TNM Evre III-IV ve tümör venöz invazyonu olan HCC hastalarında Notch1 ekspresyon düzeyleri daha yüksektir. *Notch1*'in shRNA ile knock-out edilmesi, Snail1 ekspresyonunu ortadan kaldırmış ve *in vitro* kanser hücresi hareketliliğini ve pulmoner metastazı etkili bir

şekilde inhibe etmiştir. Son olarak, bu çalışma, Notch sinyalinin HCC'nin invazyonu ve metastazı üzerindeki etkisini Notch1-Snail1-E-kaderin ilişkisi ile doğrulamıştır (X. Q. Wang et al., 2012). Bu nedenle, anormal Notch sinyali, EMT'yi indükleyerek HCC metastazını teşvik ediyor olabilir.

2.2.5.3 Notch sinyalleme ve HCC anjiyogenezi

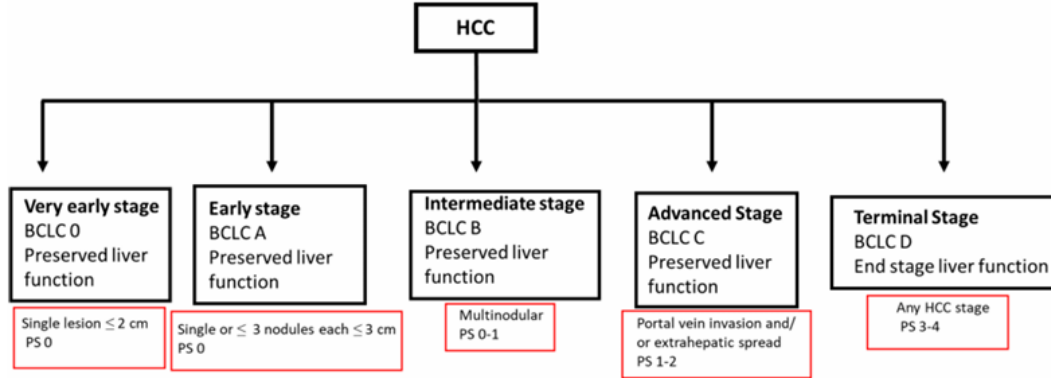
Anjiyogenez, genel olarak mevcut damar yapılarından yeni kan damarlarının oluşumunu ifade eder; bu süreç, normal doku büyümesi, gelişimi ve yara iyileşmesi için hayati öneme sahiptir (Ren et al., 2019) (H. Liu et al., 2020). Kanserde, anjiyogenez hastalık progresyonu için kritik öneme sahiptir. Tümör mikroçevresindeki (TME) anormal anjiyogenez, tümör büyümesini ve progresyonunu teşvik edebilir (Carmeliet, 2005). HCC, anjiyogenezin neoplazm ilerlemesinde kritik bir rol oynadığı, en hipervasküler solid neoplazmlardan biridir. Anjiyogenez, aynı zamanda HCC ile ilişkili yüksek nüks ve kötü sağkalım oranlarına da katkıda bulunur (Muto et al., 2015). HCC'nin vaskülaritesi, karaciğerin periferik parankimasından benzersiz ve büyük ölçüde farklıdır. Notch sinyal yolu, vasküler gelişim sürecinde anahtar bir rol oynar, vasküler stabiliteyi, vasküler düz kas hücrelerinin farklılaşmasını ve arteriyovenöz oluşumu doğrudan etkiler (Dou et al., 2012) (Heil et al., 2006). Yetişkin karaciğerinde 4 Notch reseptörü ifade edilirken, sadece 2 anahtar Notch sinyal yolu ligandı HCC angiogenezisinde rol oynamaktadır: Dll4 ve Jagged1 (Nijjar et al., 2002). Dll4, memelilerde embriyogenez sırasında arterial endotelyumda ifade edilir. Dll4'ün yüksek seviyeleri, normal doku damarlarıyla karşılaştırıldığında tümör damarlarının endotelyumunda da gözlemlenmiştir. Delta-like ligand 4 (DLL4), angiogenezi uyarmak için kritik bir Notch ligandı olarak gösterilmiştir (Benedito et al., 2009) (Blanco & Gerhardt, 2013) (Oon et al., 2017) (Naito et al., 2021). Jagged1, endotel hücreleri ve damar düz kas hücrelerinin düzenlenmesi yoluyla erken kardiyovasküler gelişimde yer aldığı tespit edilen bir bileşiktir ve tümör hücrelerinde Notch-bağımlı anjiyogenezi uyarabilir (Skrtic et al., 2011) (Benedito et al., 2009). Jagged1 (Jag1), DLL4 ile rekabet ederek anjiyogenezi negatif olarak düzenleyebilir (Taslimi & Das, 2018). Bu kavram, yapılan bir *in vitro* çalışmada, Jag1'in anjiyogenezde DLL4-aracılı Notch sinyal yolunu antagonize edebilen güçlü bir pro-anjiyogenik düzenleyici olduğunu gösteren bir çalışma ile net bir şekilde ortaya konmuştur (Benedito et al., 2009). Çalışmalar, Notch sinyal yolunun, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) sinyal yolu gibi diğer yollarla çapraz etkileşimlerin yanı sıra, Notch ligandlarıyla

etkileşimler yoluyla anjiyogeneizde temel bir rol oynadığını önermektedir (Luo et al., 2019). VEGF-A ve VEGF-R2 anjiyogenezi düzenleyici seviyeleri, Dll4'ün inhibe edildiği HCC tümörlerinde kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azalmıştır. Dahası, tümör hücrelerinde Dll4 ifadesinin inhibe edilmesi, tümörde yeni kan damarlarının oluşumunu ve hücre proliferasyonunu azaltmıştır (Kunanopparat et al., 2018). HCC xenograft fare tümörlerinde, *Livistoniae chinensis* tohumları intratümoral mikrodamar yoğunluğunu derinden azaltmış ve bu anti-anjiyogenik etki, Notch, Dll4, Jagged1, VEGF-A ve VEGF-R2'nin ekspresyon seviyelerinin belirgin şekilde azalması ile aracılık edilmiştir (Lin et al., 2014). Ayrıca, Notch sinyal yolunun ana araçları olan Notch1, Dll4 ve Jagged1, *Rubus alceifolius* Poir'in HCC anjiyogeneze karşı inhibe edici etkisini *in vivo* olarak gösteren biyomarkerler olarak kullanılabilir (J. Zhao et al., 2015). Bu nedenle, Notch sinyal yolunun farklı yönlerini hedeflemek, HCC'deki patojenik anjiyogenezi inhibe etmek için uygulanabilir bir yaklaşım olabilir.

2.3 Hepatoselüler Karsinomda Tedavi Stratejileri

Hepatoselüler karsinom, yüksek mortalite oranı ve düşük beş yıllık sağkalım oranları ile sağlık sistemleri üzerinde dünya çapında büyük bir yük oluşturmaktadır (Massarweh & El-Serag, 2017; Petrick et al., 2020; Sung et al., 2021a). Ciddiyeti ve zararlılığı tanındıkça, HCC tedavisinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Tedavi seçenekleri büyük ölçüde HCC'nin tümör evresine bağlıdır. Şu ana kadar, araştırmacılar HCC'nin prognozunu tahmin etmek veya en uygun tedavi rejimini seçmek için 10'dan fazla kanser evreleme sistemi önermiştir. Bunlar arasında Barcelona Klinik Karaciğer Kanseri (BCLC) evreleme sistemi ve Hong Kong Karaciğer Kanseri (HKLC) evreleme sistemi bulunmaktadır (P. H. Liu et al., 2016). Bu evreleme sistemlerinden en yaygın olarak tanınan ve klinik olarak kullanılabildiği BCLC'dir (Şekil 7). Bu sistem HCC'yi evre 0, A, B, C ve D olarak sınıflandırır. Bu beş kategoriye dayanarak, HCC evresi A1, A2, A3 ve A4 gibi daha da alt evrelere ayrılabilir. BCLC'nin değerlendirme ve sınıflandırması, tümör yükü, hastanın performans durumu (PS) ve karaciğer fonksiyonu gibi kriterlere dayandığından, güçlü bir sınıflandırma ve prognoz tahmini yapabilme yeteneğine sahiptir. Yüksek riskli grupların izlenmesi sayesinde, erken evre HCC'li hastalar tanı ve tedavi için tespit edilebilir ve nihayetinde farklı hastalar için farklı tedavi yöntemleri önerilebilir. BCLC sınıflandırma sistemine göre, erken evre (BCLC 0/A) HCC hastaları çoğunlukla

karaciğer rezeksiyonu, karaciğer nakli (LT) veya ablatif tedaviler gibi küratif tedavilerle tedavi edilmektedir. Ara evre HCC (BCLC B) hastalarına ise transarteriyel kemoterapi embolizasyonu (TACE) ve Yttrium-90 radyoembolizasyonu (Y90) gibi lokal bölgesel tedaviler uygulanmaktadır. İleri evre HCC (aHCC) hastaları için ise sistemik farmakolojik tedavi ve immünoterapiler şu anda en etkili tedavi seçenekleridir (Kinsey & Lee, 2024; Singal, Llovet, et al., 2023).



Şekil 7. Barcelona Klinik Karaciğer Kanseri (BCLC) HCC evreleme 2022

Bu sisteme göre HCC, evre 0, A, B, C ve D olarak 5 sınıfa ayırır. Sınıflandırmanın temeli tümör yükü, hastanın performans durumu ve karaciğer fonksiyonuna dayanır (Kinsey & Lee, 2024)

2.3.1 Rezeksiyon

Cerrahi rezeksiyon, siroz olmayan ve portal hipertansiyonu olmayan BCLC 0/Child-Pugh (CP) A sirozu olan hastalarda lokalize HCC için tercih edilen küratif tedavi yöntemidir (Kinsey & Lee, 2024). Tek bir tümörü olan, boyutu ne olursa olsun belirgin damar invazyonu göstermeyen hastalarda, parsiyel heptatektomi ile yapılan rezeksiyon potansiyel olarak küratif olabilir. Sirozu olmayan ve rezeksiyon uygulanan hastalar, sirozu olan ve rezeksiyon uygulanan hastalara kıyasla daha düşük postoperatif karaciğerle ilgili morbidite, daha düşük kümülatif HCC nüks oranları ve daha yüksek hastalığa özgü sağkalım oranlarına sahiptir (Hong et al., 2022). İyi seçilmiş hastalarda karaciğer rezeksiyonu için sağkalım oranları çok umut vericidir, yaklaşık 5 yıl için %70 civarındadır (Ivanics et al., 2022; Marrero et al., 2018). Büyük tümörleri olan hastalarda bile, rezeksiyon hala küratif olma potansiyeline sahiptir, ancak küçük tümörlere kıyasla sağkalım oranları daha düşük olabilir (Hong et al., 2022). Bununla birlikte, nüks oranları beş yıl içinde %50–70 civarına yaklaşmaktadır (Ivanics et al., 2022).

2.3.2 Karaciğer nakli

Erken evre HCC hastaları için, karaciğer fonksiyon bozukluğu veya tümörün multifokalitesi nedeniyle rezeksiyon için uygun olmayan hastalarda, karaciğer nakli (LT) optimal bir tedavi stratejisidir çünkü hem HCC'yi hem de genellikle mortalitenin nedeni olan altta yatan karaciğer hastalığını tedavi eder. LT, rezeksiyon veya ablatif tedaviye kıyasla 10 yıl ortalama sağkalım süresi ile ve nüks eden kanser riskinin önemli ölçüde daha düşük olmasıyla ilişkilidir (5 yıllık insidans: ~%10 vs. %50–60) (Singal, Llovet, et al., 2023). Milan kriterleri, 1 ile 5 cm arasında bir lezyon veya 1 ile 3 cm arasında iki ila üç lezyon, damar invazyonu veya ekstrahepatik yayılma olmadan tanımlanmış olup, optimal hasta seçimi için standart olarak kabul edilmiştir. Bu parametreler içinde nakil yapılan hastaların sonuçları, malign olmayan nedenlerle nakil yapılan hastalarla benzer olmaktadır (Mazzaferro et al., 1996; Yoo et al., 2003). Eğer bir hastanın AFP seviyesi başlangıçta ≥ 1000 ng/ml ise, bu seviyenin istisna için uygun olabilmesi için 500 ng/ml'nin altına inmesi gerekmektedir. Tümör evresinin küçültülmesi, kabul edilebilir LT kriterlerini karşılamak için lokal bölgesel tedaviler (LRT) kullanılarak canlı tümörün boyutunun küçültülmesi olarak tanımlanır. Şu anda, Milan kriterlerine uyan veya United Network for Organ Sharing (UNOS) indirilmiş kriterlerinden (downstaging criteria) (UNOS-DS: bir lezyon 5,1–8 cm; iki ila üç lezyon < 5 cm; dört ila beş lezyon < 3 cm ve toplam tümör çapı < 8 cm), çeşitli lokal bölgesel tedaviler kullanılarak hasta nakil için köprüleme ve tümör yükünün küçültülmesi için tedavi uygulanabilir. Çoğu hasta UNOS-DS kriterlerinden indirilebilir ve bu hastaların sağkalım oranları yüksekken nüks oranları düşüktür (Mehta et al., 2021; D. J. H. Tan et al., 2023; F. Y. Yao et al., 2015).

2.3.3 Ablasyon

Karaciğer nakli (LT) ve rezeksiyon için uygun olmayan, tek lezyonlu HCC hastalarına küratif ablatif tedaviler uygulanmalıdır. Major heptatektomi gerektiren merkezi yerleşimli tümörleri olan veya çok erken evre HCC (BCLC evre 0 ve BCLC evre A) olan hastalar için ablasyon-öncelikli bir strateji düşünülebilir. Bu strateji, düşük komplikasyon oranları ve maliyet etkinliği ile birlikte, HCC < 2 cm olan hastalarda rezeksiyon ile benzer sağkalım oranları sağlar (Doyle et al., 2019; G.-A. Kim et al., 2016; Ng et al., 2017). Ablasyon için uygunluk, tümör boyutu (< 3 cm), konum ve yeterli ablatif marjların elde edilme yeteneği ile belirlenir (Omata et al., 2017; Shiina

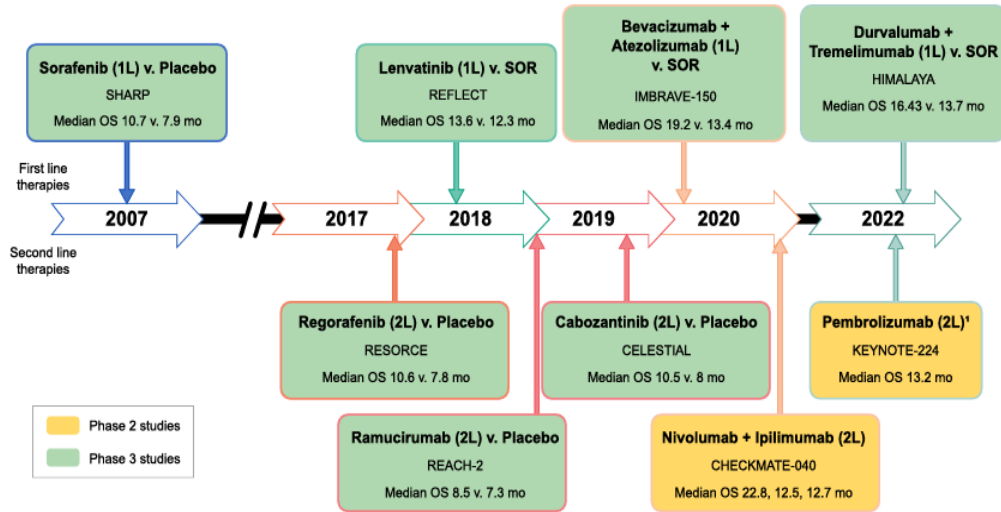
et al., 2012). Birçok farklı ablatif yöntem önerilmiş ve kabul edilmiştir; bunlar arasında radyo frekans ablasyonu (RFA), mikrodalga ablasyonu (MWA), perkütan etanol enjeksiyonu (PEI), lazer ablasyonu (LSA), kriyoablasyon (CRA), yüksek yoğunluklu odaklanmış ultrason (HIFU) ve bunların kombinasyonları yer almaktadır. Ablasyon teknikleri, farklı post-ablasyon etkileri ile, termal koagülasyon, hızlı dondurma ve kimyasal hücre dehidrasyonu gibi çeşitli mekanizmalarla tümör dokusu nekrozu oluşturur (Z. Chen et al., 2020).

2.3.4 Transarteriyel tedaviler

Orta evre HCC, BCLC evre B olarak sınıflandırıldığında, transarteriyel kemoterapi embolizasyonu (TACE) standart bir tedavi yöntemidir (Lencioni et al., 2016; W. Lu et al., 2017; Sacco et al., 2017). Bu yaklaşım, Avrupa ve Amerikan kılavuzlarına dayanmaktadır (Galle et al., 2018; Heimbach et al., 2018). TACE, erken evre HCC (BCLC evre A) için de karaciğer nakline köprüleme tedavisi olarak veya neoadjuvan tedavi amaçlı daha iyi rezektabilite sağlamak için kullanılabilir (O'Leary et al., 2021; Raoul et al., 2019). Karaciğer dolaşımı, portal ven ve hepatik arter tarafından sağlanan çift kan akışı nedeniyle benzersizdir. Sağlıklı karaciğer dokusunda, portal ven kan akışının %80'inden sorumludur. Kalan %20'lik kan akışı hepatik arter tarafından sağlanır. HCC'de, karaciğer tümörlerine giden kan akışının %99'u hepatik arter tarafından sağlanır (Takayasu et al., 1987; M. Yoshikawa et al., 1994). Konvansiyonel TACE, iyotlu yağ ile kemoterapötik ilacın karışımından oluşan bir süspansiyonun infüzyonu ile uygulanır. İyotlu yağ, ilacın taşıyıcısı olarak görev yapar ve neoplastik (tümörlü) hücreler tarafından seçici olarak tutulur; bu da hepatoselüler karsinomun ilaca maruz kalma düzeyini artırır. Bu işlemi embolizan partiküllerin uygulanması takip eder. Öte yandan, ilaç salımlı boncuklarla yapılan TACE (DEB-TACE), farklı boyutlardaki polivinilklorürden yapılmış, kemoterapötik ilaçla (örneğin, doksorubisin, epirubisin) önceden yüklenmiş embolizan mikroküreler kullanır. Bu mikroküreler, tümörü besleyen artere enjekte edilir ve ilacı, tümörün kan dolaşımına sürekli, uzun süreli ve kontrollü bir şekilde salar. Bu yöntem, kemoterapötik ajanın sistemik dolaşıma geçişini azaltarak yan etkilerin azalmasını sağlar (Inchingolo et al., 2019; O'Leary et al., 2021). Dünya çapında, HCC tedavisinde TACE için en yaygın kullanılan kemoterapi ajanları doksorubisin, epirubisin, mitomisin C ve sisplatin'dir (J. E. Song & Kim, 2017).

Transarteriyel radyoembolizasyon (TARE), rezeksiyona uygun olmayan HCC tedavisinde güvenli ve etkilidir. TARE, radyoaktif bileşikler (örneğin, itriyum-90 veya iyot-131 ile işaretlenmiş Lipiodol veya renyum-188) içeren mikrosferlerin perkütan yol aracılığıyla selektif intra-arteriyel uygulamasını içerir (Sacco et al., 2016; Y. Yang & Si, 2018). HCC'nin kan akışının yaklaşık %90'ı hepatik arterlerden sağlanırken, normal karaciğer parankimasının kan akışının %70'i portal venöz sistemden gelir. TARE, bu konsepti kullanarak HCC için hedefe yönelik tedavi sağlar ve minimum düzeyde önemli hasar oluşturur. TACE, BCLC-B HCC hastaları için standart bir tedavi paradigması olsa da, çalışmalar TARE'nin rolünün arttığını göstermektedir. TARE ile tedavi edilen hastaların çoğu, TACE ile tedavi edilen hastalardan daha ileri evre hastalığa sahip olup, tedavi daha az seçicidir. Bununla birlikte, TARE, hastalığın ilerlemesi için geçen süre (TTP), toksik yan etkiler ve tedavi sonrası yaşam kalitesi açısından TACE'yi geride bırakmıştır (Dhondt et al., 2022). TARE, BCLC evre A HCC'nin ablatif tedavisi ve destekleyici rezeksiyonu için alternatif olarak kullanılabilir (Kallini et al., 2016). TARE, portal ven trombozu (PVT) olan hastalarda da etkili olduğu gösterilmiştir, bunun aksine, Y90'ın embolik etkisi minimaldir, karaciğer iskemi riski düşüktür ve bu nedenle güvenli bir şekilde uygulanabilir (Abouchaleh et al., 2018). PVT varlığı, Y90 için bir kontrendikasyon olmasa da, kötü prognostik bir işaret olup, bu hastalar için sonuçlar daha kötüdür (H. M. Lee et al., 2023).

Eğer hastalar "karaciğer nakli için genişletilmiş kriterler" ile uyumlu değilse ya da TACE tedavisinin terapötik başarıyı gösteren kriterlere uymuyorsa, sistemik tedavi düşünülmelidir. Multifokal tümör manifestasyonu, makrovasküler portal ven invazyonu, ekstrahepatik tümör yayılımı (BCLC evre C), bazı orta evre HCC hastaları (BCLC evre B) ve lokal bölgesel tedaviye rağmen hastalık ilerlemesi olan hastalarda, kılavuzlar sistemik tedaviyi önermektedir (N. Khalaf et al., 2017). 2023 yılı itibarıyla, HCC için birinci basamak tedavi seçenekleri arasında, sorafenib ve lenvatinib gibi multikinaz inhibitörleri (MKI), anti-VEGF tedavileri, immün kontrol noktası inhibitörleri (ICI'ler) veya bunların kombinasyonları yer almaktadır (Şekil 8)



Şekil 8. Hepatoselüler karsinom (HCC) için sistemik tedavilerin zaman çizelgesi ve elde edilen sağkalım

Birinci basamak tedaviler zaman çizelgesinin üst kısmında; ikinci basamak tedaviler ise zaman çizelgesinin alt kısmında yer almaktadır.) KEYNOTE 224, randomize olmayan bir Faz 2 çalışma (Singal, Llovet, et al., 2023).

2.3.5 Multi-kinaz inhibitörleri (MKI)

HCC tedavisinde TKİ'ler (Tirozin kinaz inhibitörleri) çoklu-kinaz inhibitörleri MKI olarak genellikle VEGF reseptörü, PDGF reseptörü, RAF reseptörü, FGF reseptörü, KIT reseptörü ve RET reseptörünü hedef alır. Patofizyolojik saldırının bir noktası, TKİ'ler tarafından tümör dokusunun mikro ortamında anjiyogenezin ve hücre çoğalmasının inhibe edilmesidir (Fernández et al., 2009; Galle et al., 2021). Anjiyogenezin sinyal iletiminde rol oynayan başlıca reseptörler VEGF reseptörü, PDGF reseptörü ve FGF reseptörüdür (C. Yao et al., 2023). Tümör hücresi proliferasyonuna yol açan bir dizi reseptör tirozin kinazı ile ilişkili sinyal yolları aktive olur (WNT- β -katenin, RAS-MAPK, AKT-mTOR, EGFR, IGFR, HGF-MET) (Tümen et al., 2022). TKİ'ler, tirozin kinazlarının aktif bölgesine bağlanarak fosforilasyonu engeller ve bir dizi büyüme faktörünün downstream sinyal iletimini inhibe eder. Kanserlerdeki anahtar tirozin kinaz yollarını, örneğin damar endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR), epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (EGFR) ve platelet türevli büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) engelleyerek, tümör büyümesi durdurulur (Ling Khoo et al., 2019a).

2.3.5.1 Sorafenib

Sorafenib (BAY-43-9006), Bayer tarafından Nexavar® (ABD) markasıyla pazarlanan, 2007 yılından bu yana HCC'nin sistemik tedavisi için Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış bir oral çoklu kinaz inhibitörüdür ve ileri evre HCC'li hastalar için onaylanan ilk hedeflenmiş tedavi olmuştur (Z. Chen et al., 2020; Cheng et al., 2009a; L. Liu et al., 2006; Llovet et al., 2008). Sorafenib, iyi korunmuş karaciğer fonksiyonuna sahip (Child-Pugh A veya erken B sınıfı), ileri evre tümörleri olan, BCLC-C sınıfı veya lokal tedavilere rağmen tümörleri ilerleyen HCC hastalarında birinci basamak sistemik tedavi olarak önerilmektedir (Galle et al., 2018). Dermatik reaksiyonların, sorafenib tedavisi sonrasında daha iyi sağkalım ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Reig et al., 2014a). Sorafenib tedavisinin en yaygın yan etkileri diyare (%8–9 hastalar) ve el-ayak deri reaksiyonu (%8–16 hastalar) olarak sıralanmıştır (Llovet et al., 2008). Sorafenib, VEGFR1, 2 ve 3, PDGFR, KIT ve RET gibi 40'a kadar tirozin kinazının fosforilasyonunu inhibe eden küçük bir moleküldür. Bu tirozin kinaz inhibitörü (TKI) ayrıca wild-type Raf1, B-Raf ve mutant b-raf V600E gibi Raf kinaz izoformlarını da baskılar. Sorafenib, HCC hücre hatlarında anti-proliferatif, anti-anjiyogenik ve pro-apoptotik özellikler sergilemiştir (Choi et al., 2015; Galle et al., 2021; L. Liu et al., 2006; Méndez-Sánchez et al., 2008). Sorafenib'in etkinliği, hem tümör hücrelerini hem de tümör mikroçevresini hedefleme kapasitesinde yatmaktadır (Llovet et al., 2016). Sorafenib, HCC'de plasebo ile karşılaştırıldığında sağkalım faydası gösteren ilk bileşik olmuştur (SHARP denemesi). Sorafenib grubundaki hastaların median genel sağkalımı 10,7 ay iken, kontrol grubunda bu süre 7,9 aydı (Llovet et al., 2008). Asya-Pasifik nüfusunda yapılan paralel bir çalışmada da sorafenib benzer bir sağkalım oranı göstermiştir (Cheng et al., 2009b).

2.3.5.2 Lenvatinib

Sorafenib, 2018 yılına kadar ilk basamaktaki tedavi için tek seçenek olarak kaldı ve 2018'de güçlü bir MKI olan lenvatinib tedavi grubuna eklendi (Matsuki et al., 2018). Lenvatinib (Lenvima), 2018 yılında ileri evre hepatoselüler karsinom (HCC) tedavisinde (BCLC C) onaylanan ikinci TKI'dır. Ek olarak, VEGF reseptörü, PDGF reseptörü, FGFR reseptörü, KIT ve RET'i inhibe eden çok hedefli bir TKI olarak işlev görmektedir (Cheng et al., 2009c; Galle et al., 2018; Reig et al., 2014b). Lenvatinibin HCC'de FGF sinyal yollarını hedeflemesi, onu sorafenibden ayıran bir özelliktir.

Bu nedenle, lenvatinib, antitümör, antiproliferatif ve antianjiyogenik özellikler sergileyerek etkili olmaktadır (Dimri & Satyanarayana, 2020b; Matsui et al., 2008; Sung et al., 2021b). Multisentrik faz III REFLECT çalışmasında araştırmacılar, Lenvatinib'in median OS açısından sorafenibe kıyasla inferiyor olmadığını göstermiştir. Lenvatinib, 13.6 ay median OS'a ulaşırken, sorafenib grubunda bu süre 12.3 ay olmuştur. Ayrıca, objektif yanıt oranları Lenvatinib ile %24.1'e yükselirken, sorafenib ile %9.2'de kalmıştır. Hipertansiyon, ishal, iştah kaybı ve kilo kaybı en yaygın yan etkiler arasında yer almıştır (Tohyama et al., 2014). NAFLD/NASH kaynaklı HCC'li hastaların lenvatinib tedavisi altında daha iyi performans gösterdiğini destekleyen bazı alt grup analizlerinden gelen deneysel veriler bulunmaktadır (Kudo et al., 2018; Vogel et al., 2021).

2.3.5.3 Regorafenib

Regorafenib (Stivarga), tümör anjiyogenezi, hücre çoğalması ve hayatta kalma ile ilgili kinazları hedefleyen oral bir diphenylurea multikinaz inhibitörüdür (Ettrich & Seufferlein, 2018; Rimassa et al., 2017). On yıl süren ve ikinci basamak tedavilerin geniş bir yelpazede değerlendirildiği başarısız klinik denemelerin ardından, 2016 yılında yapılan randomize, plasebo kontrollü faz III RESORCE denemesi, regorafenib tedavisinin, daha önce birinci basamak sorafenib tedavisi başarısız olmuş hastalarda, plasebo alan hastalara kıyasla genel sağkalımda (OS) anlamlı bir artış sağladığını ilk kez kanıtlamıştır (10.6'ya karşı 7.8 ay). 2017 yılında regorafenib, daha önce sorafenib tedavisi görmüş ileri evre hepatoselüler karsinom hastalarının tedavisi için FDA onayı almıştır (Bruix et al., 2017). Regorafenib'in hedefleri arasında vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörleri 1-3 (VEGFR1-3), anjiyopoietin 1 reseptörü (TIE2), fibroblast büyüme reseptörleri (FGFR'ler), platelet türevli büyüme faktörü reseptör beta (PDGFR- β), onkogen kinazlar KIT ve RET, ve fibrosarkom (c-RAF/RAF-1) kinazlarını, B-RAF'ı ve BRAF V600E mutasyonunu hızlandıran içsel sinyal iletim molekülleri yer alır (Ettrich & Seufferlein, 2018; Galle et al., 2021; Kudo, 2019; Strumberg & Schultheis, 2012). Regorafenib'in inhibitör profili, VEGFR ve TIE2'yi, KIT ve RET'i hedeflemede daha güçlü bir potansiyele sahip olması nedeniyle, sorafenibden biraz farklıdır (Strumberg & Schultheis, 2012).

2.3.5.4 Cabozantinib

Cabozantinib (Cometriq, Cabometyx), 2019 yılında, sorafenib tedavisinin ardından, rezektabl olmayan HCC BCLC C hastalarının tedavisi için onaylanan oral bir çoklu tirozin kinaz reseptör inhibitörüdür (Abou-Alfa et al., 2018; Galle et al., 2021; Trojan, 2020). Cabozantinib, tümör büyümesini, anjiyogenezi, invazyonu ve migrasyonu inhibe ederek HCC hücrelerinde anti-tümör etkinliği göstermiştir. Ayrıca farelerdeki akciğer ve karaciğerdeki HCC metastatik nodüllerinin sayısını azaltmıştır (Xiang et al., 2014). Bir faz II klinik çalışmada, cabozantinib HCC hastalarında etkinlik göstermiştir (Kelley et al., 2017). Ayrıca, Faz II Cabo-Tx çalışmasında Cabozantinib, karaciğer nakli sonrası tedavi edilemeyen tekrarlayan hepatoselüler karsinom (HCC) hastalarının tedavisinde etkinlik göstermiştir (Azhie et al., 2022). Cabozantinib'in ileri evre HCC tedavisindeki etkinliği, faz III CELESTIAL denemesinde gösterilmiştir. Cabozantinib, plasebo grubundaki 8,0 aya karşı, 10,62 aylık ortalama genel sağkalım (OS) ile istatistiksel olarak anlamlı bir fayda sağlamıştır (Abou-Alfa et al., 2018). Cabozantinib, çeşitli kinazlar üzerindeki inhibitör aktivitesi için değerlendirilmiş ve MET (hepatosit büyüme faktörü reseptör proteini) ve VEGF reseptörlerinin inhibitörü olarak tanımlanmıştır. Ayrıca cabozantinib, GAS6 reseptörü (AXL), RET, ROS1, TYRO3, MER, kök hücre faktörü reseptörü (KIT), TRKB, Fms-benzeri tirozin kinaz-3 (FLT3) ve TIE-2 gibi diğer tirozin kinazlarını da inhibe etmektedir (Ling Khoo et al., 2019b; Pinter & Peck-Radosavljevic, 2018; Yakes et al., 2011). En sık görülen yan etkiler el-ayak deri reaksiyonu, hipertansiyon, artmış aspartat aminotransferaz düzeyi, yorgunluk ve ishaldir (Mody & Abou-Alfa, 2019).

2.3.6 İmmünoterapi

Hepatoselüler karsinomda (HCC), tümör mikroçevresi (TME); ekstraselüler matriks, bağışıklık hücreleri, yardımcı hücreler (fibroblastlar, hepatik stellat hücreler ve vasküler endotel hücreleri), sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri gibi çeşitli bileşenlerden oluşur. Bu bileşenler bir araya gelerek HCC'nin bağışıklıktan kaçışını, invazyonunu ve metastazını kolaylaştırır (Z. Li et al., 2023). Ancak, bu karmaşıklık aynı zamanda hastalığın tedavisinde immünoterapiler için potansiyel moleküler hedefler sunabilir. İmmün kontrol noktası proteinleri (ICPs), bağışıklık yanıtlarını düzenleyen ligand-reseptör çiftlerinin etkileşimini ifade eder. Bu bağlamda, bağışıklık hücreleri üzerinde eksprese edilen reseptörler "immün kontrol noktası reseptörleri"

olarak adlandırılırken, antijen sunan hücreler, tümör hücreleri veya diğer hücreler fenotipleri üzerindeki karşılık gelen ligandlar ise "immün kontrol noktası ligandları" olarak adlandırılır. Günümüze kadar tanımlanan immün kontrol noktası moleküllerinin büyük çoğunluğu, özellikle T hücreleri olmak üzere adaptif bağışıklık sistemi hücrelerinde eksprese edilmektedir (Marcucci et al., 2017). Bununla birlikte, bağışıklık kontrol noktaları (ICP'ler), inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve kanser immünoterapisi bağlamında bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri (ICI'ler) ile hedeflenebilir. ICI'ler bu kontrol noktalarını inhibe ettiğinde, hastanın bağışıklık yanıtı aktive olur ve kanser hücrelerini yok edebilir. Hepatoselüler karsinomda (HCC) ICI'lerle ilgili zorluklardan biri, kanser hücrelerinin genellikle kronik inflamasyon ortamında ortaya çıkmasıdır. Ayrıca karaciğerdeki birçok bağışıklık hücresi, neo-antijenlere karşı toleransın sürdürülmesi ve desteklenmesinde rol oynar. HCC'nin tümör bağışıklık mikroçevresi, konak bağışıklık yanıtını baskılayabilir ve toleransı teşvik edebilir (Kinsey & Lee, 2024). Mevcut ICI'ler arasında programlanmış hücre ölümü 1 (PD-1) inhibitörleri (pembrolizumab ve nivolumab) veya ligandı (PD-L1) inhibitörleri (durvalumab ve atezolizumab) ile sitotoksik T lenfosit ilişkili protein 4 (CTLA-4) inhibitörleri (tremelimumab ve ipilimumab) bulunmaktadır (Singal, Llovet, et al., 2023).

2.3.6.1 Atezolizumab-Bevacizumab (Atezo-Bev)

Atezolizumab ve Bevacizumab kombinasyonu, Mayıs 2020'de FDA tarafından onaylanmış olup, son on yılda sorafenib'e kıyasla sağkalımı iyileştirdiği tespit edilen ilk sistemik tedavi seçeneği olmuştur (Finn, Qin, et al., 2020; Kinsey & Lee, 2024; Rimini et al., 2022). Atezolizumab (Tecentriq), PD-1 ve B7-1 reseptörleri ile bağlanmasını engelleyerek T hücre baskılanmasını tersine çeviren, PD-L1 hedefleyen insanize edilmiş bir IgG1 monoklonal antikordur (Herbst et al., 2014). Bevacizumab (Avastin), vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF) hedefleyen bir monoklonal antikordur ve anjiyogenezi ve tümör büyümesini inhibe eder (Morse et al., 2019). Anti-VEGF tedavisi ayrıca, VEGF aracılı immün baskılamayı azaltarak ve tümörlerde T hücre infiltrasyonunu artırarak anti-PD-1/PD-L1 aktivitesini güçlendirir (Wallin et al., 2016).

2.3.6.2 Nivolumab

Nivolumab (Opdivo), programlanmış hücre ölümü proteini 1 (PD-1) hedefleyen bir insan monoklonal antikordur. PD-1'e karşı geliştirilmiş ilk anti-PD-1 antikoru olup, HCC (hepatoselüler karsinom) hastalarında ikinci basamak tedavi olarak etkinliğini gösterdiği Faz 1/2, açık etiketli CheckMate040 çalışması sayesinde Eylül 2017'de FDA tarafından hızlandırılmış onay almıştır (El-Khoueiry et al., 2017). Önceki çalışmanın sonuçlarına bağlı olarak, CheckMate459 Faz 3 çalışması başlatılmıştır. Bu çalışma, nivolumabın ilk basamak tedavi olarak sorafenibe karşı üstünlüğünü gösterip göstermediğini değerlendirmek amacıyla tasarlanmıştır. Nivolumab ile ilk basamak tedavi, sorafenib ile karşılaştırıldığında genel sağkalımda anlamlı bir iyileşme göstermemiştir, ancak ileri evre HCC'li hastalarda olumlu klinik etki ve uygun bir güvenlik profili sergilemiştir (Yau et al., 2019). Bu nedenle, nivolumab, TKI'lar ve antianjiyogenik ajanların kontrendike olduğu veya önemli riskler taşıyan hastalar için tedavi seçeneği olarak değerlendirilebilir. Ayrıca, CTLA-4, inhibitör bir T hücre reseptörü olan ipilimumab ile birlikte nivolumabın uygulanması, birinci basamaktaki TKI tedavisinde hastalığı ilerleyen hastalar için erken etkinlik verilerine dayalı olarak FDA Hızlandırılmış Onayı'nı almıştır (Yau et al., 2020, 2022).

2.3.6.3 Pembrolizumab

Pembrolizumab (Keytruda), PD-1 hedefleyen bir monoklonal antikor olup, insanize edilmiş IgG4 antikorudur. Tek başına tedavi olarak onaylanan ikinci anti-PD-1 antikorudur ve birinci basamak TKI tedavisinde hastalığı ilerleyen HCC'li hastaların tedavisinde potansiyel kullanımı için kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Randomize olmayan bir Faz 2 klinik çalışmada (KEYNOTE-224), pembrolizumabın daha önce sorafenib ile tedavi edilen HCC'li hastalarda etkili ve tolere edilebilir olduğu gösterilmiştir (Pembrolizumab|FDA, n.d.; A. X. Zhu et al., 2018). Bu sonuçlar, pembrolizumabın plasebo ile karşılaştırıldığı bir Faz 3 randomize klinik çalışmasında (KEYNOTE-240) test edilmesine yol açmıştır. Çalışmanın birincil hedefi, progresyonsuz sağkalımdır. Bu çalışmanın sonuçları, KEYNOTE-224 çalışmasının sonuçlarıyla uyumlu olmakla birlikte, genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım, istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır (Finn, Ryoo, et al., 2020).

2.3.6.4 Ramucirumab

Ramucirumab (Cyramza), rekombinant bir IgG1 monoklonal antikoru ve VEGFR-2 antagonistidir (Poole & Vaidya, 2014). Ramucirumab, yalnızca yüksek AFP seviyelerine sahip (>400 ng/mL) sorafenib ile tedavi edilen hastalar için ikinci basamak tedavi olarak onaylanmıştır. Bu onay, randomize faz III klinik çalışması olan REACH-2'nin sonuçlarına dayanmaktadır. Bu antikor, plasebo grubuyla karşılaştırıldığında (8,5 ay vs. 7,3 ay) medyan genel sağkalımı (OS) anlamlı şekilde artırmıştır (A. X. Zhu et al., 2019). Ramucirumab, Hipertansiyon, karaciğer yetmezliği ve hiponatremi en yaygın grade 3–4 yan etkiler arasında yer almıştır (Cucarull et al., 2022).

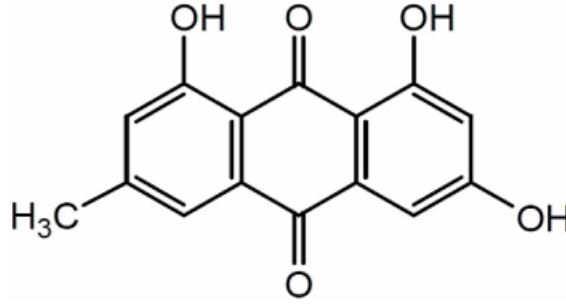
2.4. Emodin

Emodin (1,3,8-trihidroksi-6-metilantakinon), *Rheum palmatum* L. (RP), *Polygonum multiflorum* Thunb. (PM), *Polygonum cuspidatum* Sieb. Et Zucc. (PC) ve diğer bitkiler ile Çin geleneksel ilaçlarında yaygın olarak bulunan doğal bir antakinon bileşiğidir. Ayrıca, emodin, Aloe vera gibi diğer bazı bitki familyalarında da bildirilmiştir (Dong et al., 2016; S. C. Hsu & Chung, 2012; Peng et al., 2013; Vasas et al., 2015). Botanik kökeni açısından bakıldığında, *R. palmatum* L.'deki emodin içeriği, üç farklı ravent (rhubarb) kaynağı arasında en yüksektir (Zheng et al., 2021). Birleşik çalışmalar, emodinün önemli farmakolojik işlevler ve etkili klinik tedavi edici etkiler gösterdiğini ortaya koyduğundan, uzun zamandır raventin başlıca farmakodinamik bileşiği olarak kabul edilmektedir (J. Sun et al., 2018). Ayrıca, Emodin 2020 yılı Çin Farmakopeesi'nde ana kalite tespit göstergesi olarak kullanılmaktadır.

Bitkilerden emodin ekstraksiyonu verimsizdir ve büyük miktarda bitki materyali gerektirir. Neyse ki, emodinün verimi sentetik yöntemlerle büyük ölçüde artırılabilir. Biyosentetik yolla, emodin, Piruvat'tan başlayarak asetil CoA karboksilaz (ACC1), poliketid sentaz (PKS), tiyoesteraz (MβL-TE), dekarboksilaz (DC) ve diğer enzimler tarafından sentezlenmiştir. Ayrıca, bazı verimli kimyasal sentez yöntemleri de emodin kaynaklarını zenginleştirmektedir (L. Sun et al., 2019).

Antrakinonlar, serbest antrakinonlar (rehin, emodin, krizofanol, aloe-emodin ve fiskeyon gibi) ve bağlı antrakinonlar olarak daha da ayrılabilir (Q. Huang et al., 2007; Izhaki, 2002). Antrakinonların emilimi, özellikle kuinon (quinone) yapısı ve normal

koşullar altında lipofiliklik gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlıdır. Antrakinonların baskın emilim bölgeleri genellikle bağırsaklardır, ancak emodin, bağırsaklardan daha hızlı bir şekilde mideye emilir. Bunun nedeni, antrakinonların bağırsaklarda mideye kıyasla daha uzun süre kaldıkları için emilim sürelerinin farklı olması olabilir (D. Wang et al., 2021). Emodin, C9 ve C10'da bulunan iki keton grubu ile bir antrasen halkasından (üç halkalı aromatik) oluşur (Şekil 9).



Şekil 9. Emodinin kimyasal yapısı

Emodin, C9 ve C10'da bulunan iki keton grubu ile bir antrasen halkasından (üç halkalı aromatik) oluşur (Yu et al., 2023)

Emodin, 270.24 g/mol moleküler ağırlığında turuncu-sarı renkte uzun iğne şeklinde bir kristaldir (Yu et al., 2023). Emodin, 255°C erime noktasına sahip, suda çözünmeyen bir bileşiktir ve alkol veya dimetil sülfoksitte çözünür (Izhaki, 2002). Emodinin fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Emodinin fiziksel ve kimyasal özellikleri (Emodin CAS#: 518-82-1, n.d.)

Ad	1,3,8-Trihidroksi-6-metilantrakinon
Takma ad	6-Methyl-1,3,8-trihydroxyanthraquinone
Kaynak	<i>Rhubarb palmatum</i> L., <i>Polygonum multiflorum</i> Thunb. ve <i>Polygonum cuspidatum</i> Sieb.EtZucc
CAS numarası	518-82-1
EINECS numarası	208-258-8
Bileşik türü	antrakinon
Moleküler formül	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
Moleküler ağırlık	270.24
Özellikler	toz
Renk	Renk turuncu
Çözünürlük	<0.1g/100mLat19°C
Yoğunluk	1.3280g/cm ³
pKa	6.39±0.20(Tahmin edilen)
Kaynama noktası	373.35°Cat760mmHg
Parlama noktası	322.8°C±23.6°C
buhar basıncı	0.0±1.7mmHgat25°C
Refraktivite	1.745
Polar yüzey alanı	94.83
LogP	3.641(est)
Depolama koşulları	2°C–8°C, serin, kuru ve kapalı

Emodin, yapısında birçok hidroksil ve karbonil grubu bulundurur, bu gruplar biyolojik hedef enzimlerdeki metal iyonları ile şelat oluşturarak nispeten kararlı şelatlar meydana getirir, bu da geniş biyolojik aktivitesinin önemli nedenlerinden biridir. Emodin, DNA için geri dönüşümlü bir bağlayıcı ajan olarak kullanılabilir. Aromatik halka düzlem yapısı, DNA'nın çift sarmal baz çiftleri arasında yerleşip üst üste binerek DNA ile birleşir, DNA'nın normal sarmal yapısını bozar ve DNA bağlayıcı enzimleri, örneğin DNA topoizomeraşı ve DNA polimerazının işlevini engeller. Kısacası, emodin, DNA-topoizomeraşı II ile çözünür kompleksini yakalayabilir ve emodin-DNA-topoizomeraşı terpolimer kompleksini oluşturup bunu stabilize eder ve DNA kırılma noktalarının yeniden bağlantı reaksiyonunu engeller. Emodinin DNA polimerazına müdahalesi, sadece DNA zincirinin 5' den 3' ye doğru uzamasını engellemekle kalmaz, aynı zamanda hatalı eşleşmiş nükleotidlerin kesilme sürecini inhibe ederek DNA hata düzeltmesini de engelleyebilir. Sonuç olarak, emodin, DNA replikasyonunu inhibe edebilir ve DNA'nın şimerizmi yoluyla farmakolojik aktivite gösterebilir. Aynı zamanda, emodinin DNA'ya zarar verme etkinliği, diğer antrasiklin antibiyotiklerle tutarlı olan elektron transferi kimyasını da içerir (Y. Li et al., 2010).

Geleneksel tıpta, Emodin öncelikle müshil olarak ve obeziteye bağlı hastalıklar için kullanılmıştır (Y. Liu et al., 2017). Ana geleneksel kullanımının yanı sıra, emodinin antitümör özelliklerine dair birçok çalışma yayımlanmıştır (Dong et al., 2016b; Q. Zhang et al., 2022). Emodinin antineoplastik aktiviteleri, onun anti-mutajenik, anti-proliferatif, anti-anjiyogenik ve anti-metastatik etkilerine dayalıdır, ayrıca apoptozu teşvik etme ve çoklu ilaç direncini tersine çevirme özellikleri de bulunmaktadır (Dong et al., 2016b; Semwal et al., 2021; Q. Zhang et al., 2022). Ancak son yıllarda daha birçok farmakolojik etkinlik de bildirilmiştir. Örneğin, emodin anti-inflamatuar, anti-alerjik, immünsüpresif, antioksidan, antifungal, antibakteriyel, antiviral, anti-aging, antiosteoporotik, antidiabetik, kardiyoprotektif, nöroprotektif, hepatoprotektif ve nefroprotektif, ağrı kesici etkiler ve lipid düşürücü etkiler göstermektedir (CUI et al., 2020; L. F. He et al., 2022; Y. Liu et al., 2022; Semwal et al., 2021; H. Y. Yang et al., 2023).

Emodin, kanser tedavisi klinik yöntemi kullanılan daunorubisin ve mitoksantron ile aynı sınıfa ait bir antrokinondur. Ancak emodin tek başına düşük DNA bağlantısı afinitesine sahip olduğundan dolayı düşük antikanser etkilerine sahiptir. Emodin'in antikanser özelliklerini artırmak amacıyla, araştırmacıların özelliklerini değiştirmeyi,

özellikle antrokinon yapılı bir pirazol paketi eklemeyi hedeflemektedir. Bu değişiklik, DNA bağlantısı afinitesini artırmayı, radikal türlerine karşı direnç artırmayı, enzimatik bozulmayı azaltmayı ve kardiyotoksisiteyi azaltmayı değiştirmeyi sağlar (J. H. Tan et al., 2006). Pirazolün parlaklığına göre katyonik amino yan zincirler, bu resimlerin DNA ile bağlanmasını sağlar ve kanserin değişimine karşı engelleyici varlığını artırır. Emodin'in bir türü (DK-V-47), p185neu reseptörünün (HER-2/neu reseptörü ile çoğalması) fosforilasyonunu inhibe etmede emodin'den daha etkili olduğu görülmektedir. Bu türev (DK-V-47), ayrıca HER-2/neu aşırı eksprese eden meme kanserinin büyümesini ve metastazını baskılamada emodinden daha etkili bulunmuştur (L. Zhang et al., 1998a).

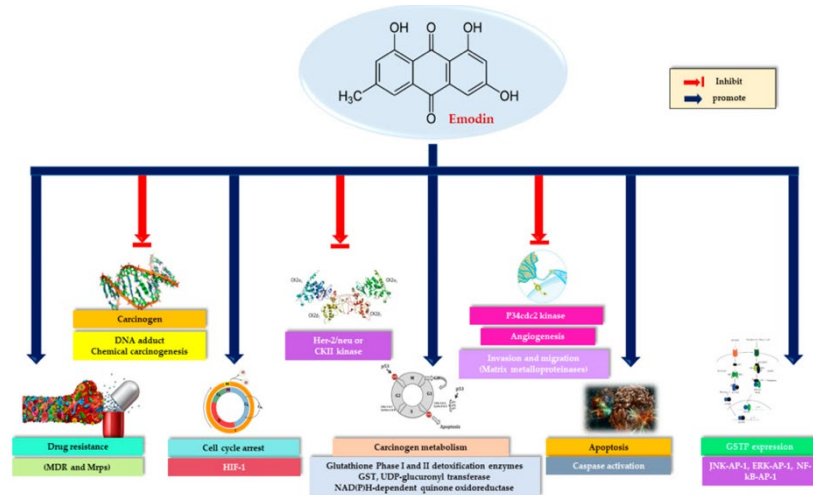
Bitki kökenli bileşikler, emodin gibi, kanser tedavisinde kanser hücrelerini hedef alıp sağlıklı hücrelere zarar vermemeleri nedeniyle umut verici sonuçlar gösterse de, bazı zorluklar mevcuttur. Bunlar arasında ilaç toleransı gelişimi, yan etkiler ve sağlıklı hücrelere zarar verme gibi sorunlar bulunmaktadır (Yan et al., 2020). Nano ilaç taşıma sistemleri, bir ilacın vücutta dağılımını ve metabolizmasını (farmakokinetik) değiştirmek, daha iyi emilim ve daha uzun süreli etkinlik sağlamak için tasarlanmıştır. Bu sistemler, kontrollü salım sağlar, böylece ilaç seviyelerini sabit tutar ve yan etkileri azaltır. Bu sistemler, doğrudan tümör dokularını hedefleyebilir, ilaç biyoyararlanımını artırabilir ve toksisiteyi azaltabilir. Bu sayede daha düşük ilaç dozları kullanılabilir, terapötik etkiler güçlendirilir (Yan et al., 2020). Emodin, yüksek hidrofobik özelliklere sahip olup organik çözücülerde çözünür ve bu da onun terapötik ajan olarak kullanımını sınırlamaktadır. Ayrıca, Emodin Biopharmaceutical Classification System (BCS) Sınıf II'ye aittir, yani düşük çözünürlük ancak yüksek permeabiliteye sahip olup bu da düşük biyoyararlanıma yol açar (S. Wang et al., 2012). Bu nedenle, araştırmacılar biyoyararlanımını iyileştirmek amacıyla nanoformülasyonlara odaklanmaktadır. Örneğin, yapılan çalışmalar, nanoemülsiyonların (emodin içeren nano boyuttaki emülsiyonlar) oral biyoyararlanımı artırabileceğini, ilacın vücutta kalış süresini uzatarak başta beyin, karaciğer ve böbrekler olmak üzere ana organlarda daha iyi emilim sağladığını göstermiştir (Shi et al., 2015). Katı Lipid Nanopartikülleri (SLN'ler) başka bir ilaç taşıma yöntemidir ve emodinin stabilitesini ve kanser tedavisindeki etkinliğini artırmak için kullanılır. Araştırmalar, emodin yüklü SLN'lerin 72 saatten fazla süren bir salım süresine sahip olduğunu ve serbest emodine kıyasla kanser hücrelerini öldürmede daha etkili olduğunu göstermiştir. Lipozomal

formülasyonlar (emodin lipozomlarda kapsüllenmiş) ise özellikle HER-2/neu aşırı ekspresyonu gösteren meme kanseri hücrelerinde emodinin çözünürlüğünü ve etkinliğini iyileştirmek için geliştirilmiştir. Lipozomlar, emodinin salımını yavaşlatan ipek fibroini gibi maddelerle kaplanabilir, böylece ilacı bozulmaktan korur ve hedefleme potansiyelini artırır (S. Wang et al., 2012).

Emodin, genotoksisite (genetik materyale zarar), nefrotoksisite (böbrek zehirlenmesi), hepatotoksisite (karaciğer zehirlenmesi) ve üreme toksisitesi gibi çeşitli toksisite türlerine neden olduğu gösterilmiştir (M. H. Chang et al., 2012; Dong et al., 2016b; Jiang et al., 2018; Liang et al., 2015).

2.4.1 Emodin ve kanserin yayılması (metastaz ve anjiyogenezi)

Emodinin, çeşitli hücresel işlevlerde yer alan genlerin ekspresyonunu etkileyerek hücre apoptozu, tümör metastazı ve kemoterapiye direnç üzerinde aktif bir rol oynadığı kanıtlanmıştır. Emodin, kanser hücrelerinin yayılmasını engellemeye veya azaltmaya yardımcı olabilir ve metastazla ilişkili birkaç yolağa müdahale ederek anti-metastatik etkinliğini gösterebilir (G. H. Shi & Zhou, 2018; Sougiannis et al., 2022). Ayrıca, emodin, tümörlerin büyüebilmesi için ihtiyaç duyduğu yeni kan damarlarının oluşumunu engelleyebilir; bunu, anjiyogenezi teşvik eden önemli bir molekül olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) üzerinde inhibe edici etki göstererek yapar (Şekil 10) (G. H. Shi & Zhou, 2018).



Şekil 10. Emodin'in Antikanser Etkinliğine Genel Bir Bakış

Emodin, hücre döngüsünün durdurulması, apoptozun indüklenmesi, anjiyogenezin baskılanması gibi temel tümör mekanizmalarına etki ederek antikanser etkiler gösterir. MDR: Çoklu İlaç Direnci, Mrps: MDR ile ilişkili proteinler, GST: Glutatyon S-Transferaz, CKII: Casein Kinase II, GSTP: Glutathione S-Transferase Pi (Akkol et al., 2021)

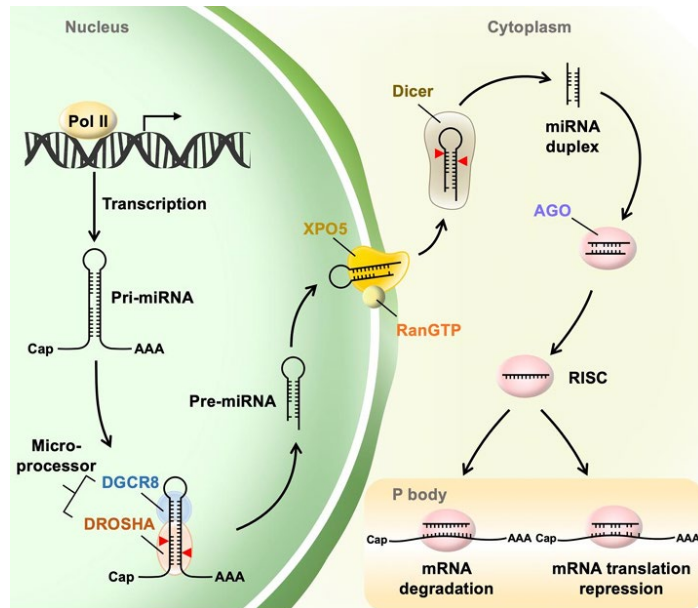
Emodin, MAPK, PI3K/Akt, Wnt/ β -katenin, P2X7, TGF- β 1, NF- κ B ve HER-2/neu reseptörü gibi çeşitli sinyal yollarını hedefleyerek farklı kanser türlerinde anti-metastatik ve anti-angiogenez aktivitelerini gösterebilir (Gu et al., 2019a; Jelassi et al., 2013; Lin et al., 2016; A. Liu et al., 2011; Q. Liu et al., 2020; L. Zhang et al., 1998b). Ayrıca, Emodin, Snail, N-kadherin, β -katenin, TWIST1, ZEB1, ZEB2, vimentin, survivin, MMP-2, MMP-7, MMP-9 ve VEGF proteinleri gibi metastaz ve anjiyogenez ile ilişkili faktörlerin ekspresyonunu düşürerek kanserin invazyonunu ve migrasyonunu azaltabilir ve E-kadherin, klaudin ve keratin gibi normal epitel hücreleriyle ilişkili proteinlerin ekspresyonunu artırabilir (Feng et al., 2018; Gu et al., 2019a; C. Hu et al., 2016; A. Liu et al., 2011; J. Lu et al., 2016; Pooja & Karunakaran, 2014; X. Song et al., 2018; X.-A. Zhao et al., 2018). Emodin tedavisi (*in vitro* 5–20 μ M veya *in vivo* 40 mg/kg), insan kolon kanseri hücre hattı (RKO) ve xenograft fare modelinde, Wnt/ β -katenin sinyal yolunun downstream hedefleri olan TCF4, Cyclin D1 ve C-MYC'i baskılayarak EMT'yi engellemiş ve tümör büyümesini inhibe etmiştir (Gu et al., 2019a). Ayrıca, siRNA ile Notch-1'in susturulması sayesinde, Rundi Gao ve arkadaşları emodin (2,5–20 μ M) rat alveolar epitel hücrelerinde (RLE-6TN) TGF- β 1'in indüklediği EMT ve fibrozisi, Notch-1'in nükleer translasyonunu azaltarak ve Notch1/Jagged1 eksenini baskılayarak iyileştirdiğini öne sürmüşlerdir (Gao et al., 2017).

2.5 MicroRNA

MicroRNA'lar (miRNA'lar), ökaryotik organizmalarda (bitkiler ve hayvanlar) gen ekspresyonunun negatif düzenleyicileri olarak işlev gören, yaklaşık 19-24 nükleotid (nt) uzunluğunda, endojen, tek iplikli kısa kodlama yapmayan RNA'lardır. MicroRNA'lar, protein kodlayan DNA ve mRNA'ların stabilitesini, transkripsiyonunu ve translasyonunu kontrol ederek, hücre proliferasyonu, farklılaşma, hücre döngüsü ilerlemesi, otofaji, apoptoz ve organ gelişimi gibi birçok biyolojik süreçte kritik roller oynar. İnsan DNA'sının %30-60'ının microRNA'lar tarafından düzenlendiği tahmin edilmektedir (Axtell et al., 2011; Fasoulakis et al., 2020; Iorio & Croce, 2012; Perecman et al., 2022; Z. L. Zeng et al., 2021).

Olgun miRNA'lar, RNA polimeraz II tarafından sentezlenen ve genellikle 1000 nükleotid uzunluğunda olan çift iplikli birincil miRNA'lardan (pri-miRNA'lar) türetilir (Y. Lee et al., 2004). Pri-miRNA'lar, nükleusta, tip III ribonükleaz Drosha ve RNA

bağlayıcı protein DiGeorge kritik bölgesi 8 (DGCR8) içeren bir mikroişlemci tarafından yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda, saç tokası şeklindeki öncül miRNA'lara (pre-miRNA) işlenir (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Y. Lee et al., 2003). Eksportin-5 (XPO5) ve küçük nükleer GTPaz RanGTP, pre-miRNA saç tokasını bağlayarak nükleazlar tarafından degradasyona karşı korur ve pre-miRNA'ların nükleer membran por kompleksi aracılığıyla sitoplazmaya taşınmasına yardımcı olur (Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004; Okada et al., 2009; Y. Zeng & Cullen, 2004). Sitoplazmaya geçişin ardından, pre-miRNA, XPO5'ten RanGTP'nin RanGDP'ye hidrolize edilmesiyle serbest bırakılır ve ardından tip III ribonükleaz Dicer tarafından yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda olgun miRNA çift iplikli olacak şekilde bağlanıp kesilir (Şekil 11). MiRNA çift ipliği, ATP bağımlı bir şekilde Argonaute (Ago) proteinine yüklenir. MiRNA çift ipliğinin her iki ipliği de guide (rehber) iplik olarak seçilebilir, ardından Ago ile RNA'ya bağlı susturma kompleksi (RISC) içine yüklenir (J. J. Song et al., 2004; Yoda et al., 2009). Genel olarak, guide ipliği, diğer yolcu (passenger) ipliğinden daha düşük stabiliteye sahip olup, guide ipliğinin 5' ucundaki nükleotid pozisyonu genellikle urasil'dir (Frank et al., 2010; Khvorova et al., 2003). Yolcu ipliği, Ago tarafından çözülür, Ago'dan çıkarılır ve degrade olur (Kwak & Tomari, 2012; Schwarz et al., 2003). Guide ipliği, 2-8 nükleotidi içeren, mRNA'ların 3'UTR'sine bağlanarak, P cisimciklerinde (P body) translasyonun baskılanmasına neden olur (Lai, 2002; Lewis et al., 2003; J. Liu et al., 2005).



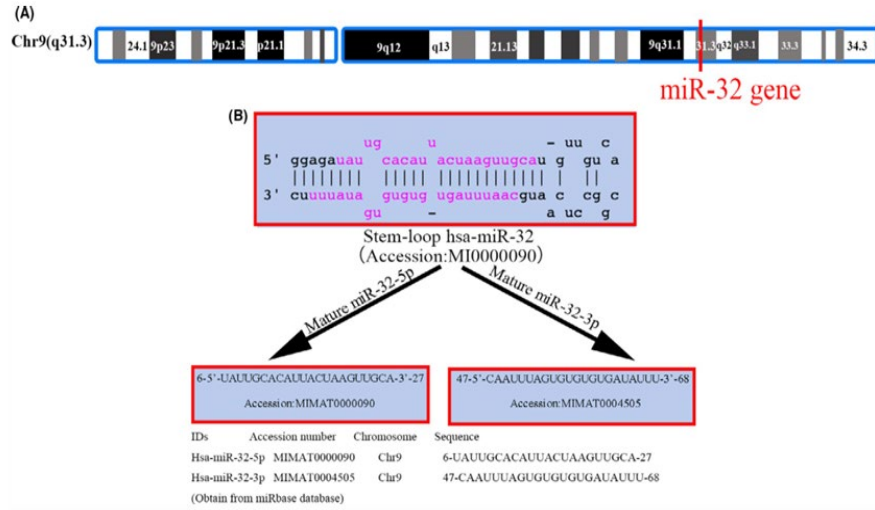
Şekil 11. mikroRNA (miRNA) biyogenezisi
mikroRNA'lar RNA polimeraz II tarafından nükleusta sentezlendikten sonra olgunlaşma ve sitoplazmaya taşınma sürecinden sonra fonksiyonel rol oynarlar (Weng et al., 2023).

Birçok hastalıkta, kanser de dahil olmak üzere, miRNA ekspresyon seviyelerinin yaygın şekilde bozulduğuna dair birçok rapor bulunmaktadır. miRNA'nın anormal ekspresyonunun farklı mekanizmaları vardır; bunlar arasında genetik değişiklikler ve tek nükleotid polimorfizmleri (SNP), epigenetik susturma ve miRNA biyogenez yolundaki bozukluklar yer almaktadır (Reddy, 2015; Yong & Dutta, 2009). miRNA genlerinin %50'den fazlası, kanserle ilişkili, kırılmaya ve yeniden düzenlemeye yatkın olan ve kanser hücrelerinde bozulmalar yaşayan genetik kırılğan bölgelerde veya genom alanlarında yer almaktadır (Calin et al., 2002, 2004; Sevignani et al., 2007). Ayrıca, bazı iyi bilinen onkogenler ve tümör baskılayıcı genler, miRNA ekspresyonunu transkripsiyon seviyesinde düzenler. Örneğin, c-Myc, kültürlenmiş insan trofoblastlarında miR-17 ve miR-106a ekspresyonlarını artırdığı gözlemlenmiştir (P. Kumar et al., 2013). MiRNA'ların, sırasıyla, çeşitli tümör baskılayıcı ve onkogenik mRNA'ları inhibe etmeleri nedeniyle onkogenler veya tümör baskılayıcı genler olarak işlev gördüğü öne sürülmüştür (Plasterk, 2006; Ventura & Jacks, 2009; Yong & Dutta, 2009; B. Zhang et al., 2007). Özellikle üç ayrı mekanizma öne sürülmüştür. İlk olarak, aşırı ifade edilen miRNA'lar, tümör baskılayıcı genleri hedef alır ve hücre proliferasyonu, anjiyogenez, metastaz gibi süreçleri uyarır; bu miRNA'lar onkomiR'ler olarak adlandırılır (Svoronos et al., 2016). OnkomiR'ler, genom amplifikasyonları nedeniyle tümörlerde işlev kazancı yaşayabilir. Bu, miR-1 ~ 92 kümesinin B-hücreli lenfomalarında amplifikasyonunun, tümör gelişimini teşvik ettiğini açıkça göstermiştir (L. He et al., 2005; Koralov et al., 2008; Ventura et al., 2008). Ayrıca, tümör baskılayıcı miRNA'lar, kromozomal yeniden düzenlemeler, delesyonlar veya mutasyonlar nedeniyle tümörlerde işlev kaybına uğrayabilir. Bu, let-7 ailesi de dahil olmak üzere birkaç miRNA için gösterilmiştir; bu miRNA'ların ekspresyonu, RAS ailesi ve *HMGA2* gibi onkogenlerin inhibe edilmesi yoluyla tümör oluşumunu engelleyebilir (Esquela-Kerscher et al., 2008; M. S. Kumar et al., 2008). Ancak, miRNA'ların çift yönlülüğü günümüzde sıkça rapor edilmektedir. MiRNA'nın işlevi hücreye özgüdür. Bir kanser türünde tümör baskılayıcı olarak işlev gören miRNA'lar, başka bir kanser hücresinde onkogen olarak hareket edebilir (Svoronos et al., 2016). Son olarak, mRNA hedefleri açısından, onkogenler tümörlerde miRNA bağlanma bölgelerini kaldırarak şekilde mutasyonlar kazanabilir. Bu durum, *HMGA2* için tanımlanmıştır; translokasyonu, let-7 aracılı tümör baskılamasından serbest bırakarak lipom gelişimini teşvik eder (Mayr et al., 2007).

miRNA'lar, tümör oluşumundaki birçok önemli faktörü düzenlediğinden, miRNA kullanarak yapılan tümör tedavisi giderek daha fazla ilgi görmektedir. miRNA terapötikleri alanındaki en son yaklaşım, esasen iki stratejiye dayanmaktadır: Onkogenik miRNA'ların inhibe edilmesi ve dolayısıyla hedefledikleri tümör baskılayıcı genlerin ifadesinin geri kazandırılması; ya da tümör baskılayıcı miRNA'ların ifadesinin geri kazandırılması ve dolayısıyla hedefledikleri onkogenlerin inhibe edilmesi (Menon et al., 2022). miRNA aktivitesinin inhibe edilmesi, miRNA inhibitörleri ve oligomerlerinin kullanımıyla kolayca sağlanabilir. Bunlar arasında RNA, DNA ve DNA analogları (miRNA antisens terapisi) (Lennox & Behlke, 2011), küçük molekül inhibitörleri, kilitlenmiş nükleik asitler (LNA'lar) (Lundin et al., 2013; Stenvang et al., 2008), peptid nükleik asitler (PNA'lar) (Avitabile et al., 2018), morfolinler (Ristori et al., 2015), miRNA süngerleri (Ebert et al., 2007; K. C. Li et al., 2016), mowers molekülleri (Y. Liu et al., 2012) veya miRNA maskelenmesi yer alır. miRNA maskelenmesi, hedef mRNA'nın miRNA bağlanma bölgesini, hedef dizisine komplementer olarak modifiye edilmiş tek iplikli RNA kullanarak maskeler ve böylece miRNA fonksiyonunu inhibe eder (Cassidy et al., 2016; Z. Wang, 2011). Aksine, miRNA fonksiyonunun artırılması (miRNA yerine koyma terapisi), modifiye edilmiş miRNA benzeri moleküllerin kullanımıyla sağlanabilir. Bunlar sentetik olabilir veya miRNA dizilerini taşıyan plazmid veya lentiviral vektörler ile üretilmiş olabilir (Askou et al., 2015; Bader, 2012).

2.5.1 MiR-32

MiR-32, kromozom 9'da yer alan *c9orf5* geninin intron 14'ünde bulunan bir intronik miRNA'dır. Bu gen, transmembran protein 245 (TMEM245) kodlar. İnsan miR-32, ilk olarak 2001 yılında Dr. Thomas Tuschl'ın laboratuvarı tarafından bildirilmiştir. MiRBase'e göre, miR-32 ailesi 22 dizi içerir. Bu diziler arasında, hsa-miR-32-3p ve hsa-miR-32-5p kromozom 9'da (chr9: 109 046 229–109 046 298, 9q31.3) yer almakta olup, türler arasında yüksek oranda korunmuştur (miRcode'a göre, miR-32 geni, sırasıyla primatlar ve memeliler arasında %89 ve %61 oranında korunmaktadır). Daha detaylı bir şekilde (Şekil 12), miR-32, insan ve farelerde serum, karaciğer, böbrek, meme ve beyin dokuları da dahil olmak üzere çeşitli dokularda ifade edilir (Z. L. Zeng et al., 2021b).



Şekil 12. miR-32'nin Konumu ve Dizisi

(A) miR-32'nin Konumu. miR-32, kromozom 9q31'de (NR_029506.1 kodlamayan bölgede) yer almaktadır; (B) miR-32 Dizisi. miR-32-5p ve miR-32-3p'nin stem- loop ve olgunlaşma dizileri (Z. L. Zeng et al., 2021b).

3 MATERYAL VE METOD

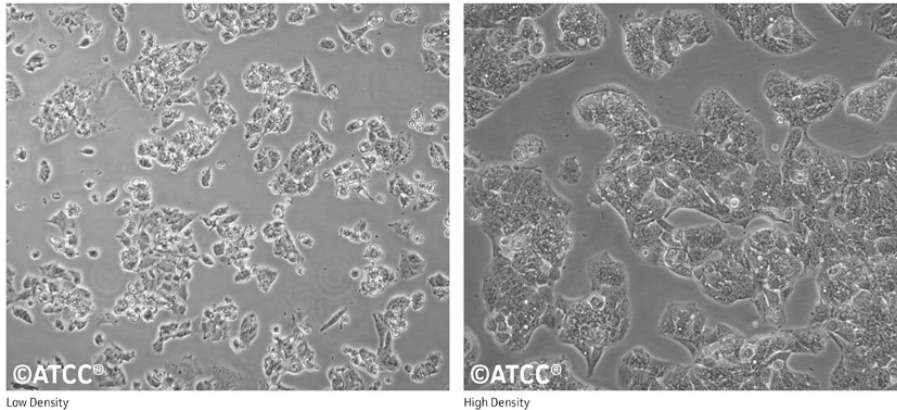
3.1 Materyaller

3.1.1 Kullanılan Hücre Hattı

HepG2, (ATCC numarası: HB-8065™) karaciğer kanseri olan 15 yaşındaki beyaz ırk bir erkek hastanın hepatoselüler karsinomundan izole edilen epitel benzeri morfoloji sergileyen bir hücre hattıdır. İnsülin ve insülin benzeri büyüme faktörü II (IGF-II) ekspresyon belirteçlerini taşımaktadır (Hep G2 [HEPG2] - HB-8065 | ATCC).

HepG2 hücrelerinin kromozom sayısı 50 ile 60 arasında değişmekte olup, 1 ve 21 numaralı kromozomların kısa kolları arasında translokasyonlar, 2, 16 ve 17 numaralı kromozomlarda trizomiler ve 20 numaralı kromozomda tetrazomi içermektedir. HepG2 hücre hattı, *TERT* promotör bölgesinde bir mutasyon taşımaktadır. Bu hücre hattını normal hepatositlerden ayıran en önemli özellik ise, sitokrom P450 (CYP) süper ailesine ait olan CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2A6 ve CYP2D6 enzimlerinin ekspresyonunun zayıf ya da hiç olmamasıdır (Arzumanian et al., 2021).

-130°C'nin altındaki sıcaklıklarda sıvı nitrojen buharında depolanır ve 37°C'de (%5 CO₂ inkübatöründe) adheren bir hücre olarak büyür (Şekil 13) (Hep G2 [HEPG2] - HB-8065 | ATCC). HepG2 hücre hattının çoğalma süresi (doubling time) yaklaşık 48 saattir (HepG2 Cells).



Şekil 13. Hep G2 hücre hattının mikroskop altında görüntülenmesi
Sol panel: Düşük yoğunluklu, Sağ panel: Yüksek yoğunluklu hücrelerin mikroskop görüntüleri (ATCC)

3.1.2 Kullanılan cihazlar

Kullanılan cihazlar Tablo 3’te verilmiştir.

3.1.3 Kullanılan malzemeler

3.1.3.1 Hücre Kültürü Ekipmanları

Hücre kültüründe kullanılan malzemeler Tablo 4’te verilmiştir.

3.1.3.2 Kullanılan Kimyasallar

Çalışma süresince kullanılan kimyasallar Tablo 5’te verilmiştir.

3.1.4 Çalışma Süresince Kullanılan Antikor, miRNA ve primerler

Notch1, GAPDH, E-cadheın, Snail1 ve vimentin antibodyleri Cell Signaling Technology (CST)’ den alınmıştır. Her primer ve sekonder 1:1000-1:3000 aralığında çalışılmıştır. hsa-miR-32-5p miRCURY LNA miRNA Mimic ve hsa-miR-32-5p miRCURY LNA miRNAinhibitor (QIAGEN) kullanılmıştır.

3.2 Metodlar

3.2.1 Hücre Kültürü

HepG2 hücre hattı, %10 fetal bovin serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren 1X Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) ile kültüre edildi. Hücre kültürü için kullanılan ana stok, +4°C’de muhafaza edildi ve kullanım öncesinde 37°C’ye kadar ısıtılarak hazırlandı. Hücreler, DMEM içeren T25 hücre kültür kaplarında kültüre edildi ve 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ atmosferinde inkübe edildi.

3.2.2 Hücrelerin Açılması

Hücrelerin çözülmesi dikkatli bir şekilde yapıldı. Kriyo tüpleri -80°C’den buz içerisinde aktarıldı, böylece hücrelerin sıcak hava ile teması engellendi. Steril koşulların sağlanabilmesi için kriyo tüpleri, açılmadan çeker ocağa taşındı. FBS-DMSO içeren medium ile donmuş hücrelerin üzerine, DMEM besiyeri 1:1 oranında damla damla eklendi ve hücreler yavaşça homojenize edildi. Çözülmüş hücreler önceden 37°C’ye ısıtılmış 1 ml DMEM besiyeri içeren 15 mL lik bir Falkon tüpüne

damla damla ilave edildi ve yavaşça homojenize edildi. Hücre süspansiyonu yaklaşık 2000 rpm'de 5 dakika santrifüje alındı. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant hücre pelletine zarar vermeden çekilerek atıldı ve yaklaşık 1 ml DMEM besiyeri eklenerek yavaşça homojenize edildi. Çözülen hücreler, 3 ml DMEM içeren T25 petri kaplarında 37°C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edildi.

3.2.3 Hücrelerin Dondurulması

Yaklaşık %80-90 konfluens seviyesine ulaşan HepG2 hücreleri, “dondurulabilir” olarak kabul edildi. Bu işlem için, öncelikle eski kültür ortamı aspire edildi ve hücreler bir kez 1X PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkandı. PBS aspire edildikten sonra, hücrelerin üzerine Trypsin-EDTA çözeltisi damlatılmış ve tripsinin enzimatik aktivitesini başlatmak amacıyla plaklar 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. Enzim aktivitesini durdurmak için eşit hacimde (1:1 oranında) FBS içeren DMEM besiyeri eklendi ve hücreler 15 ml Falcon tüpüne toplandı. Tripsinize edilen hücreler toplandıktan sonra, 2000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Ardından, oluşan hücre pelletine dondurma solüsyonu (9:1 oranında FBS:DMSO) eklendi ve pipetleme ile yavaşça homojenize edildi. Elde edilen homojen süspansiyon, önceden etiketlenmiş kriyo tüplerine aktarıldı. Bu tüpler, -80°C'de izopropanol içeren bir dondurucu kabında 24 saat süreyle bekletildikten sonra, uzun süreli saklama amacıyla -196°C sıvı azot tankına transfer edildi.

3.2.4 miRNA Transfeksiyonu

miRCURY® LNA® kiti (Qiagen) kullanılarak temin edilen miRNA-32-5p inhibitörü ve miRNA-32-5p mimiği, üretici firmanın el kitabında belirtilen talimatlara uygun şekilde çözüldü. Transfeksiyon işlemi, Canfast™ Transfection Reagent protokolüne göre gerçekleştirildi. Transfeksiyon ajanı (TF), miR-32-5p mimik ve miR-32-5p inhibitörü, FBS içermeyen DMEM (F-) ile oda sıcaklığında 10–15 dakika inkübe edildi. Daha sonra TF süspansiyonu, sırasıyla miR-32-5p mimik ve miR-32-5p inhibitörü süspansiyonları ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10–15 dakika inkübe edildi. HepG2 hücreleri, kültür ortamının toplam hacminin %10'u oranında miR-32-5p mimik-TF veya miR-32-5p inhibitör-TF süspansiyonları ile muamele edildi. Ardından 37°C'de 72 saat inkübe edildi. HepG2 hücrelerinin miR-32-5p mimik ve miR-32-5p inhibitörü ile transfeksiyonu sırasıyla 5 nM ve 50 nM olarak uygulandı.

3.2.5 MTT Hücre Canlılığı Testi

HepG2 hücreleri %90 konfluense ulaştığında pasajlama işlemi yapıldı ve hücre sayımı hemositometre ile gerçekleştirildi. Sayımı yapılan hücreler, her kuyuya 100  L DMEM besiyeri içerisinde 5000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekildi (Hücre ekimi, her bir ilaç dozu için 5 tekrar olacak şekilde yapıldı). Emodinin HepG2 hücre canlılığı üzerindeki etkisi 24, 48 ve 72 saatte incelendi. Hücre ekiminden 24 saat sonra, farklı Emodin ilaç dozları (10, 20, 30, 40 ve 50  M) ve %0,1 DMSO kondisyonları DMEM içerisinde hazırlanarak her kuyuya 100  L olacak şekilde uygulanmıştır.

İlaç uygulamasından 24 saat sonra, her bir kuyuya 10  L MTT reagent eklendi ve plaklar 37 C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Ardından ortamdan medyum uzaklaştırıldı ve oluşan formazan kristallerini çözmek amacıyla her bir kuyuya 100  L DMSO eklenmiştir. Kristallerin çözünmesi için plaklar oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra, bu bileşiklerin oluşturduğu mor renk 570 nm ve 655 nm dalga boylarında spektrofotometrik olarak     m ş ve ilaç uygulanmamış kontrol örnekleriyle karşılaştırılarak bağlı hücre canlılığı belirlendi.

3.2.6 HepG2 Hücrelerin koloni oluşturma verimliliğinin     lmesi

HepG2 hücreleri %90 yoğunluğa ulaştığında pasajlama işlemi yapıldı ve hücre sayımı hemositometre ile gerçekleştirildi. Sayılan hücreler, her bir kuyuya 1000 hücre ve 1mL besiyeri olacak şekilde 6 kuyulu plakalara ekildi. Emodin'in HepG2 hücrelerinin koloni oluşturma verimliliği üzerindeki etkisi 48. saatte incelenmiştir. Hücreler 37 C'de 24 saat inkübe edildikten sonra, farklı Emodin ilaç dozları (10, 20, 30 ve 40  M) ve %0,1 DMSO doğrudan 6 kuyulu plaka üzerine uygulandı. Emodin uygulamasından 48 saat sonra, hücrelerin üzerindeki medyum taze medyum ile değiştirildi. Yaklaşık her iki günde bir, hücrelerin durumu ve medyum kontrol edildi. Kontrol grubundaki koloniler yeterli büyüklüğe ulaştığında fiksasyon aşamasına geçildi. Hücreler, oda sıcaklığında 10 dakika boyunca (3:1) oranında metanol:asetik asit karışımında inkübe edilerek fikse edildi. Ardından hücreler %0,5 kristal viyole ile boyandı ve karanlık ortamda, oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Fazla boya uzaklaştırılarak ve hücreler saf su ile yıkandı. Oluşan kolonilerin sayısı ImageJ yazılımı, çapları ve morfolojik görüntüleri inverted mikroskop altında alındı.

3.2.7 Protein İzolasyonu

HepG2 hücreleri %90 yoğunluğa ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi ve hücreler hemositometre ile sayıldı. Sayılan hücreler, her bir 60 mm Petri kabına 3 mL besiyeri içinde 5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra, kontrol ve ilaç grubu petri kaplarındaki besiyerleri değiştirildi. İlaç grubuna 20 μ M Emodin uygulandı. İlaç uygulamasından 48 saat sonra protein izolasyonu gerçekleştirildi. Kontrol hücrelerinin medyumunu atıldı ve ilaç uygulanan grubun medyumunu toplanarak santrifüj edildi. Her iki Petri kabı, 1 mL soğuk 1X PBS (Fosfat tamponlu salin solüsyonu) ile yıkandı. Ardından her kaba 1 mL soğuk 1X PBS eklendi ve hücreler scraper (kazıyıcı) ile kazınarak toplandı. Kazınan hücreler 1.5 mL'lik Eppendorf tüplerine alındı. Petri kabında kalan hücrelerin toplanması için ek olarak 500 μ L 1X PBS daha eklenerek yıkama yapıldı ve aynı tüplere aktarıldı. Hücreler, 4°C'de $2500 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pelletin miktarına göre uygun hacimde 1X Proteaz inhibitör kokteyli (Thermo Fisher) içeren M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher) eklenerek çözelti hazırlanıp, pellet tamamen çözünene kadar pipetlenerek karıştırıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu, oda sıcaklığında 10 dakika boyunca çalkalandı. Çalkalama sonrasında hücreler, 4°C'de $14000 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant temiz bir Eppendorf tüpüne dikkatlice aktarıldı ve -20°C'de saklandı.

3.2.8 Bradford Protein Miktar Tayini

İzole edilen proteinlerin konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla Bradford testi uygulandı. İlk olarak, standart eğri oluşturmak için Bovine Serum Albumin (BSA) kullanıldı. Bilinen konsantrasyona sahip BSA örnekleri, 96 kuyulu petriye artan miktarlarda (1,5, 3, 4,5, 6, 7,5 μ g) eklendi. Aynı şekilde, izole edilen protein örneklerinden de her bir kuyuya 1 μ L olacak şekilde eklendi. Daha sonra her kuyunun üzerine 200 μ L Bradford çözeltisi (Coomassie Brilliant Blue G-250) eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından absorbens değerleri 595 nm dalga boyunda mikroparka okuyucu cihazı (Microplate Reader) ile ölçüldü. Elde edilen standartlara ait absorbens/konsantrasyon grafiği Excel programında oluşturuldu ve bu grafiğin eğim denklemi (doğrusal regresyon) kullanılarak, absorbens değeri bilinmeyen protein örneklerinin konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.9 Western Blot

Western blot işlemine başlamadan önce, HepG2 hücrelerinden izole edilen proteinlerin konsantrasyonu, yukarıda belirtildiği şekilde Bradford yöntemi ile belirlendi. Yükleme için genellikle 30–40 µg protein kullanıldı. Protein örnekleri, 4X Laemmli örnek tamponu ile karıştırılarak 1.5 mL’lik Eppendorf tüplerine hazırlandı ve önceden 95°C’ye ısıtılmış ısı bloklarında 5 dakika inkübe edildi. Ardından örnekler, jele yüklenmeden önce 1 dakika süreyle buz üzerinde bekletildi. Poliakrilamid jel konsantrasyonu, incelenmek istenen proteinlerin moleküler ağırlığına bağlı olarak %10–12 arasında hazırlandı. %12’lik Alt jel (Seperating Gel) ve %4 üst jel (Stacking Gel) hazırlama prosedürleri Ekler’de sırasıyla Tablo 6 ve Tablo 7 olarak belirtilmiştir. Jel hazırlığı tamamlandıktan sonra mini tank sistemine yerleştirildi. Tank, 1X running buffer ile doldurulduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı. Daha önce hazırlanmış olan protein örnekleri, jellere dikkatlice yüklendi. Güç kaynağı bağlanarak başlangıçta 80V’a ayarlandı ve örnekler stacking jelinden geçene kadar bu voltajda çalıştırıldı. Ardından voltaj 120V’a çıkarılarak jel, istenen süre boyunca çalıştırıldı. Running aşamasının ardından transfer işlemi gerçekleştirildi. Amaç, jelde tutulan proteinlerin PVDF membrana aktarılmasıydı. Bu işlem, wet transfer sistemi kullanılarak yapıldı. Tam transfer tamponu; 1X transfer tamponu, %10–20 metanol ve kalan hacim kadar saf su (ddH₂O) içeriyordu. Transfer için iki sünger, Whatman kağıtları, membran ve jel doğru sıralama ile “sandviç” düzeneğine yerleştirildi, ardından bu düzenek transfer tankına yerleştirilip transfer tamponu ile dolduruldu. Transfer, 100V’da ve incelenen proteinin kDa değerine bağlı olarak uygun sürede gerçekleştirildi. Transferin ardından bloklama adımı uygulandı. Bloklama için %5 yağsız süt çözeltisi hazırlandı ve membran, hafifçe çalkalayarak 1 saat inkübe edildi. Toplam proteinler arasından hedef proteini tespit edebilmek için membran, 1:1000 oranında hazırlanmış spesifik primer antikor içeren çözelti içinde gece boyunca 4°C’de inkübe edildi. Ertesi gün membran, 1X TBS-T ile yıkandı ve HRP konjugatlı sekonder antikor ile yine gece boyunca 4°C’de inkübe edildi. İnkübe işleminin ardından membran 1X TBS-T ve 1X TBS ile yıkandı, ECL çözeltisi ile karanlık ortamda inkübe edildi ve kemilüminesans sinyal BioRad ChemiDoc Görüntüleme Sistemi ile görüntülenmiştir.

3.2.10 Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Total RNA izolasyonu, hem kontrol HepG2 hücrelerinden hem de miRNA-32-5p mimiği ve inhibitörü ile transfekte edilmiş HepG2 hücrelerinden PureZOL RNA izolasyon protokolüne göre gerçekleştirildi. Hücre ekimini takiben 24 saat sonra, hücreler miRNA-32-5p mimiği ve inhibitörü ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücrelere 20 μ M Emodin uygulandı. Emodin uygulamasından 48 saat sonra, kültür medyumunu uzaklaştırıldı ve her bir 60 mm petri kabına 1 ml PureZOL eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Elde edilen lizatlar 1.5 ml Eppendorf tüplerine aktarıldı ve her 1 ml PureZOL için 0.2 ml kloroform eklendi. Tüpler 15 saniye boyunca ters çevrilerek karıştırıldı, ardından oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. $12.000 \times g$ 'de, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 15 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası oluşan üç fazın en üst kısmındaki berrak sıvı faz RNA'yı içermektedir ve bu faz dikkatlice RNaz içermeyen temiz bir tüpe aktarıldı. Her 1 ml PureZOL için 0.5 ml izopropanol eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. $12.000 \times g$ 'de, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Oluşan pelletin üzerine her 1 ml PureZOL için 1 ml %75 etanol eklendi, tüp ters çevrilerek karıştırıldı ve $7.500 \times g$ 'de, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet kurutuldu. Pellet miktarına uygun olarak DEPC (Diethylpyrocarbonate) ile hazırlanmış su eklendi ve 60°C 'de 20 saniye inkübe edilmiştir. İzole edilen RNA konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometre ile ölçüldü ve -80°C 'de saklandı. RNA'nın cDNA'ya dönüşümü için, BIORAD iScript™ cDNA Synthesis Kit protokolüne uygun olarak toplam hacim 20 μ l olacak şekilde hazırlandı ve deney gerçekleştirildi. Termal döngüleyici cihazında 25°C , 5 dakika Primer bağlanması (priming), 46°C , 20 dakika reverse transkripsiyon ve 90°C , 1 dakika reverse transkriptaz inaktivasyonu olarak ayarlandı. Elde edilen cDNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometre ile ölçüldükten sonra -20°C 'de saklandı.

3.2.11 Kantitatif-Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

HepG2 hücrelerinde gen ekspresyonunu belirlemek amacıyla yukarıda belirtilen şekilde cDNA örnekleri hazırlandı ve ardından qRT-PCR hesaplamaları için cDNA konsantrasyonu ölçüldü. Tablo 2'de listelenen primerler ve SYBR Green PCR karışımı qRT-PCR reaksiyonunda kullanıldı. β -aktin, internal referans gen olarak kullanıldı. Hazırlanan örnekler CFX Connect Real Time PCR (BioRad) cihazına yerleştirildi ve

qRT-PCR reaksiyonu Ekler bölümünde yer alan Tablo 8’de belirtilen adımlara göre gerçekleştirildi. Hücrelerdeki gen ekspresyon düzeyleri, deney sonrası elde edilen C_T değerleri ve reaksiyon verimliliği kullanılarak PFAFFL yöntemine göre hesaplandı. Deneyler en az iki tekrar halinde gerçekleştirildi.

Tablo 2. qRT-PCR reaksiyonunda kullanılan primerler.

Gen Adı	Primer Dizileri
β -Actin	F: 5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3' R: 5'-TGCATTGTTCAAGGAAGTTCCTT-3'
Snail-1	R: 5'-GCACTGGTACTTCTTGACCATCTG-3'
Snail-2	R: 5'-TGAGCCCTCAGATTTGACCTG-3'
E-Cadherin	F: 5'-ATTTTTCCTCGACACCCGAT-3' R: 5'-TCCCAGGCGTAGACCAAGA-3'
Twist-1	F: 5'-GTCCGCAGTCTTACGAGGAG-3' R: 5'-TGAGGGTCTGAATCTTGCT-3'

3.2.12 Floresan Boyamalar

HepG2 hücreleri %90 yoğunluğa ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi ve hücreler hemositometre kullanılarak sayıldı. Sayımı yapılan hücreler, her bir kuyuya 1 mL besiyeri içerisinde 4×10^4 hücre olacak şekilde 12 kuyulu petrilere ekildi. Emodin’in hücre canlılığı ve mitokondriyal membran potansiyeli üzerindeki etkisi 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde değerlendirildi. Hücreler 37°C’de 24 saat inkübe edildikten sonra, farklı ilaç dozları (10–50 μ M) ve DMSO kontrol grubu, DMEM içinde hazırlanarak her bir kuyuya 1 mL olacak şekilde uygulandı. İlaç uygulamasından 24 saat sonra, hücreler 4 nM 3,3'-diheksiloksakarbosiyanin iyodür ($DiOC_6$) ile 15–20 dakika ve 3 μ M Propidium Iodide (PI) ile 30 dakika süreyle boyandı. Mitokondriyal membran potansiyelindeki (MMP) bozulma, floresan ataçmanlı mikroskop (IX71-Olympus) ile, 482 nm eksitasyon ve 504 nm emisyon dalga boylarında mavi filtre kullanılarak gözlemlendi. İlaç uygulaması sonucu oluşan ölü hücreler (kırmızı boyanmış hücreler) ise aynı mikroskopta 535 nm eksitasyon ve 617 nm emisyon dalga boylarında yeşil filtre ile tespit edildi.

3.2.12 Hücre Sağkalım Deneyi

Artan Emodin konsantrasyonlarının (0, 10, 20, 30 ve 40 μ M) HepG2 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini zaman içinde (24, 48 ve 72 saat) incelemek amacıyla bir hücre sağkalım testi (growth assay) gerçekleştirildi. Deney üç kez tekrarlandı. HepG2

hücreleri, 6 kuyucuklu plaklara her bir kuyucuğa 1 mL besiyeri içerecek şekilde 5×10^4 hücre yoğunluğunda ekildi. Hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra, farklı Emodin konsantrasyonları (0, 10, 20, 30 ve 40 μM) ve DMSO ile muamele edildi. İlaç uygulamasından sonra 24, 48 ve 72. saatlerde hücreler tripsin kullanılarak kaldırıldı ve santrifüj edildi. Elde edilen hücre pelleti, 50 μL PBS içerisinde çözüldü ve üzerine %0.4 (w/v) oranında Trypan Blue boyası içeren 50 μL çözelti eklendi. Canlı hücre sayımı, Neubauer hemositometresi kullanılarak iki tekrar halinde gerçekleştirildi.

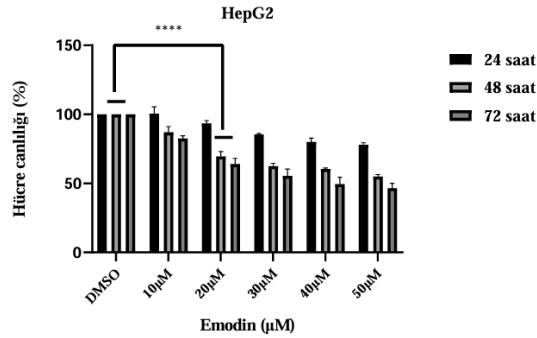
3.2.14 İstatiksel Analizler

Tüm deneysel veriler, üç bağımsız biyolojik tekrarın ortalaması $\pm$ standart sapma (SD) şeklinde raporlanmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi, GraphPad Prism yazılımı (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıkların belirlenmesi amacıyla iki yönlü varyans analizi (Two-way ANOVA) uygulanmış ve bunu takiben uygun çoklu karşılaştırma testler ile analizler detaylandırılmıştır. Tüm istatistiksel testlerde $p < 0.05$ değeri anlamlılık eşiği olarak kabul edilmiştir.

4 SONUÇLAR

4.1. Emodin'in HepG2 Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

Emodin'in HepG2 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi, MTT testi kullanılarak incelenmiştir. Emodin'in sitotoksitesisi, 10, 20, 30, 40 ve 50 μM dozlarında, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinden sonra, üçlü tekrarlar halinde uygulanarak değerlendirilmiştir. Emodin ile muamele edilen HepG2 hücrelerinin canlılığı, Emodin'i çözmek için kullanılan çözücü olan DMSO ile muamele edilmiş grup ile karşılaştırıldı. MTT testi sonuçlarını değerlendirmek için DMSO grubunun hücre canlılığı %100 olarak kabul edildi ve farklı konsantrasyonlarda Emodin uygulanan hücrelerin bu canlılığa göre değişen derecelerde canlılığa sahip olduğu gösterildi. Elde edilen sonuçlara göre, 10 μM konsantrasyonunda Emodin'in HepG2 hücreleri üzerinde düşük sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, 10 μM 'nin üzerindeki konsantrasyonlarda Emodin'in, zamana ve doza bağlı olarak hücre canlılığını inhibe ettiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak deneyden elde edilen verilere göre, Emodin'in etki dozu 48. saatin sonunda 20 μM olarak belirlenmiş ve deneylere bu doz ile devam edildi (Şekil 14).



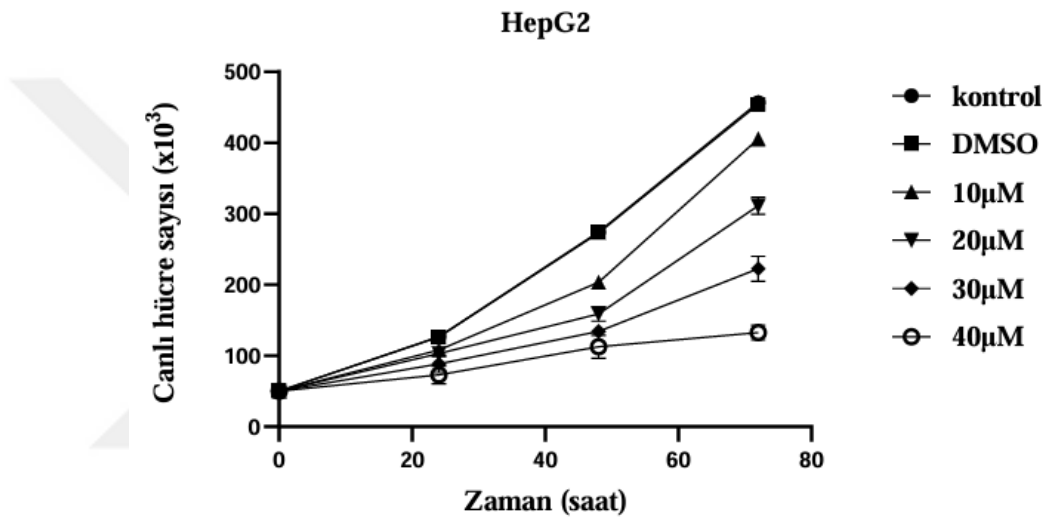
Şekil 14. Emodinin HepG2 hücre canlılığına etkisinin MTT yöntemi ile gösterilmesi

HepG2 hücre hattı kültürlenerek DMSO ve farklı emodin konsantrasyonları (10, 20, 30, 40 ve 50 μM) ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edildi. Emodinin farklı konsantrasyonlarının HepG2 hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT testi ile değerlendirildi. GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu. **** p < 0,0001

4.2. Emodin'in HepG2 Hücre Sağkalımı Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

Trypan Blue kullanılarak yapılan deney, Emodin'in HepG2 hücre sağkalımı üzerindeki etkisini gözlemlemek amacıyla gerçekleştirildi. 24. saatte yapılan hücre

sayımları, kontrol grubuna kıyasla doza bağlı bir büyüme inhibisyonu olduğunu gösterdi. 10 μM konsantrasyonunda hafif bir azalma gözlemlendi (kontrol: 134×10^3 , 10 μM : 111×10^3), daha yüksek konsantrasyonlarda ise bu etki daha belirgin hale geldi. Bu eğilim 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde de devam etti. DMSO ile muamele edilen hücreler, kontrol grubuna benzer sağkalım paternleri sergiledi ve bu da çözücünün hücre sağkalımı üzerinde minimal etkiye sahip olduğunu gösterdi. Genel olarak, elde edilen veriler, hücre büyümesinde konsantrasyona bağlı bir inhibisyon olduğunu ortaya koymakta ve MTT testinden elde edilen sonuçlarla uyum göstermektedir (Şekil 15).

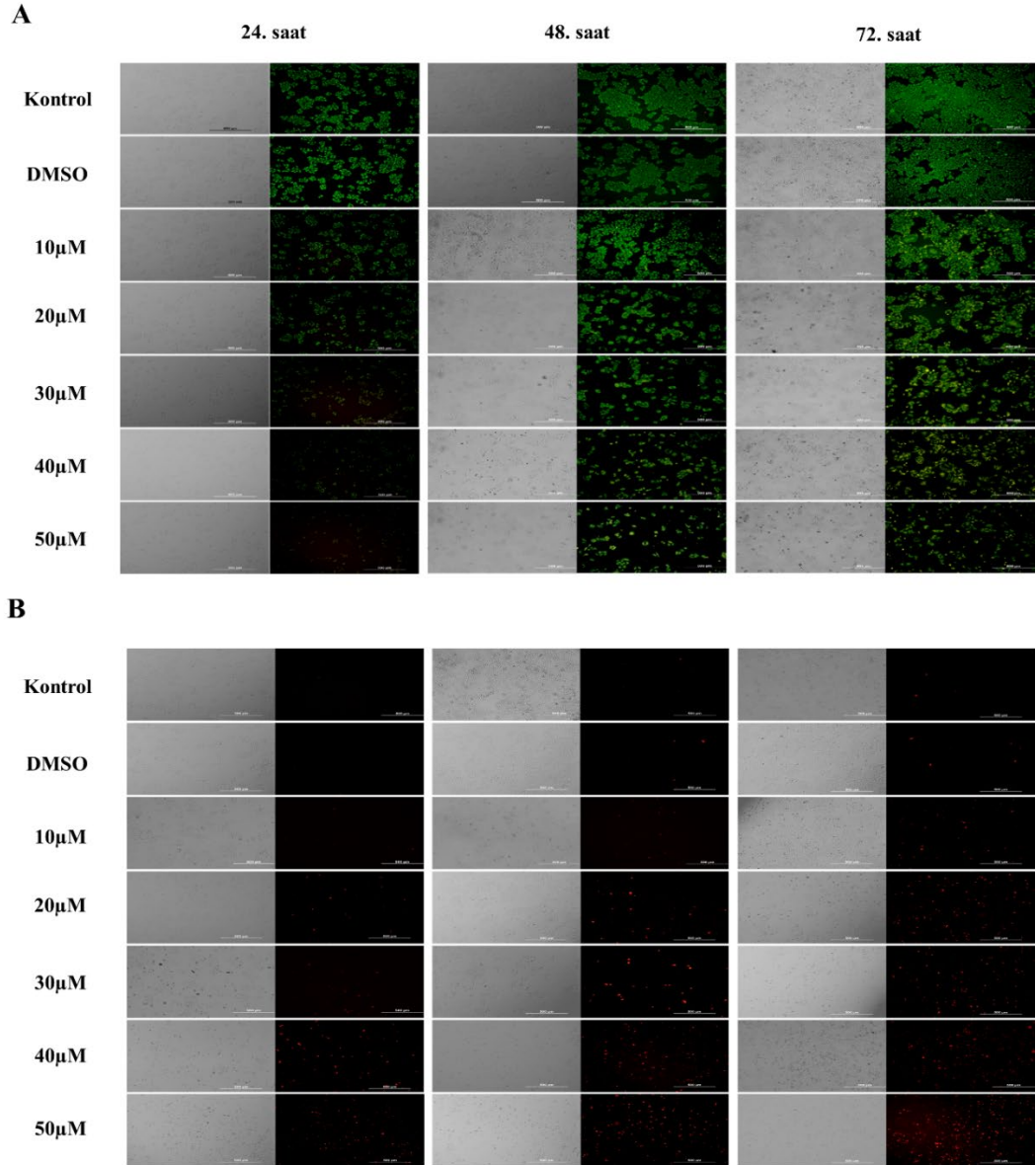


Şekil 15. Emodinin doza ve zamana bağlı olarak hücre sağkalıma etkisinin değerlendirilmesi. Artan dozlarda emodin uygulaması yapılan hücreler 24., 48. ve 72. saatlerde tripan mavisi ile boyanarak canlı hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

4.3. Emodin ile Muamele Edilen HepG2 Hücrelerinde Hücre Canlılığı ve Hücre Ölümünün Floresan Boyama ile Gösterilmesi

HepG2 hücrelerine Emodin uygulandıktan sonra hücre canlılığı ve ölümü incelemek amacıyla DiOC₆ ve PI floresan boyamalar kullanıldı. HepG2 hücreleri, DMSO ve artan konsantrasyonlarda (10, 20, 30, 40 ve 50 μM) Emodin ile muamele edildikten sonra mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) incelendi. Emodin'e bağlı MMP kaybı, yeşil boyanmış hücrelerin doz ve zamana bağlı olarak azalmasıyla gözlemlendi (Şekil 16A). Propidyum iyodür (PI), DNA'ya bağlanan küçük bir floresan moleküldür ancak sağlam plazma membranına sahip hücrelere giremez. Bu nedenle, PI'nin hücreye alınıp alınmaması, ölüm mekanizmasından bağımsız olarak, zarı geçirgen hale gelmiş ölü hücreleri, zar bütünlüğü korunmuş canlı hücrelerden ayırt etmek için

kullanılabilir. DMSO ve artan Emodin dozlarının (10, 20, 30, 40 ve 50 μ M) uygulanmasını takiben, PI pozitif (kırmızı boyanmış) ölü hücre sayısı doz ve zamana bağlı olarak arttı (Şekil 16B).

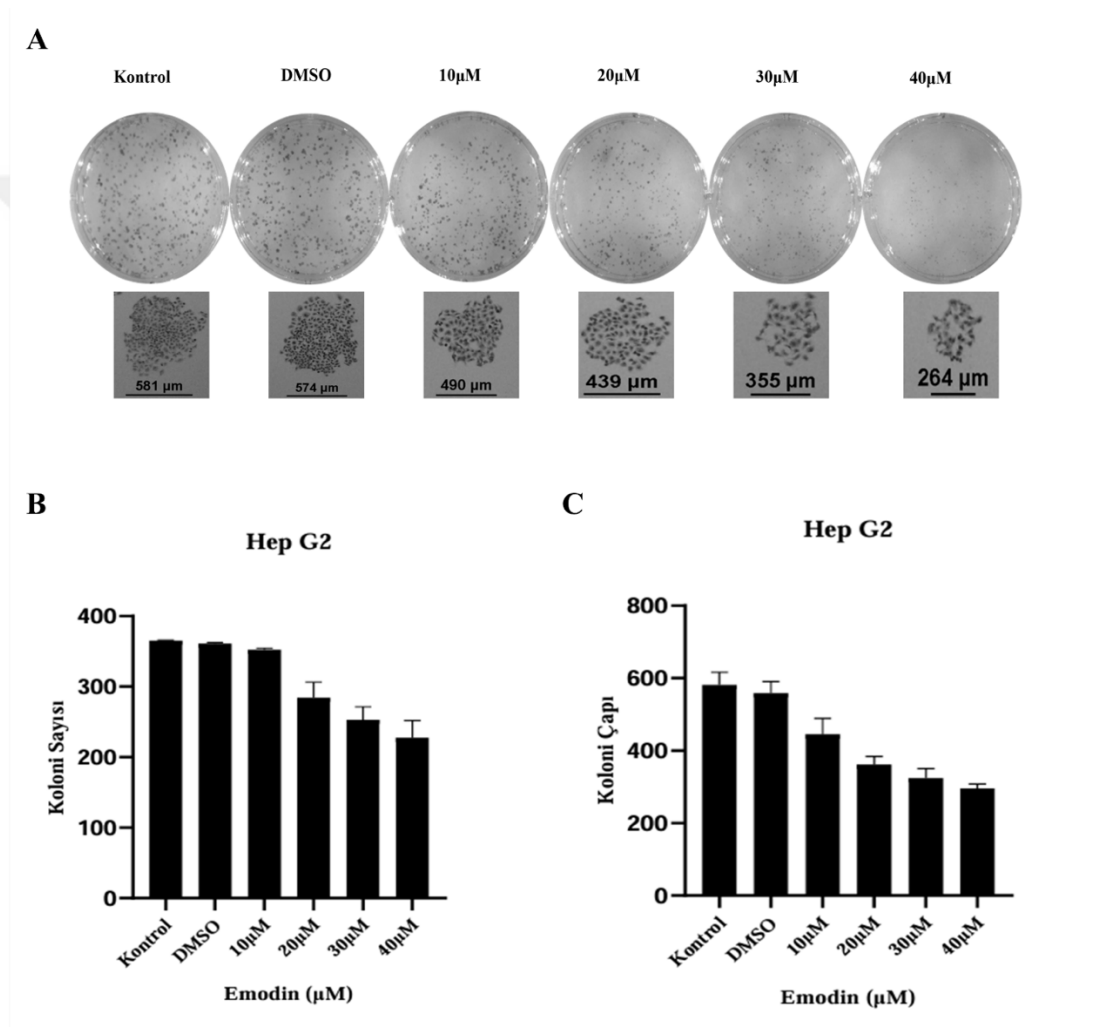


Şekil 16. HepG2 hücrelerinde, Emodinin mitokondri membran potansiyeli ve hücre ölümüne etkisinin gösterilmesi.

A. Emodin tedavisinden sonra HepG2 hücre canlılığı, zamana ve doza bağlı olarak azaldı ve bu durum DiOC₆ boyaması ile floresan mikroskobu altında gösterildi B. Emodin'in HepG2 hücrelerinde hücre ölümünü indükleyici etkisi, zamana ve doza bağlı olarak floresan mikroskobu kullanılarak PI boyaması ile tespit edildi.

4.4. Emodinin, HepG2 Hücrelerinin Koloni Oluşturma Potansiyeline Etkisinin Araştırılması

HepG2 hücreleri 48 saat boyunca DMSO ve artan dozlarda Emodin ile muamele edildikten sonra, koloni oluşturma yetenekleri test edildi. Koloni sayısı, ImageJ yazılımı kullanılarak piksel analiziyle sayıldı. Emodin uygulamasıyla, HepG2 hücrelerinin doza bağlı olarak koloni sayısında ve koloni çapında azalma meydana geldiği gözlemlendi (Şekil 17).

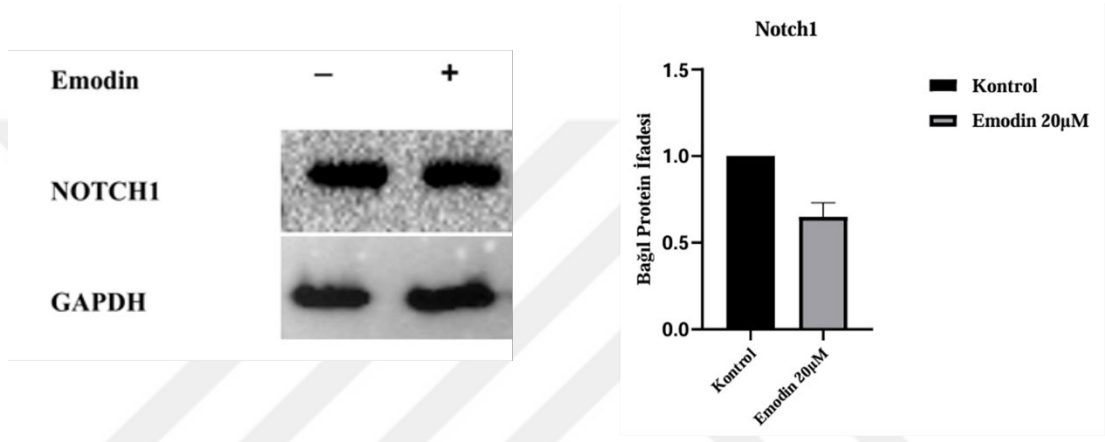


Şekil 17. Emodinin HepG2 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğine etkisinin incelenmesi.

A. HepG2 hücrelerinin DMSO ve artan dozlarda Emodin (10, 20, 30 ve 40 µM) ile muamele edilmesinden sonra koloni oluşturma verimliliğinin incelenmesi. B. Koloni oluşum oranı, ImageJ yazılımı kullanılarak piksel analiziyle hesaplandı (sol panel). C. Koloni çapları, ışık mikroskobu altında çekilen görüntüler üzerinden hesaplandı. GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.

4.5. HepG Hücrelerinde Emodin'in *Notch1* Gen Ekspresyonu Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

Notch1 proteini üzerindeki etkiler, Western blot analizi ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ile 20 μ M Emodin uygulanan grup arasındaki Notch1 protein düzeyleri karşılaştırılmıştır (Şekil 18). Bant yoğunluklarının normalize edilmiş göreceli ifadeleri sırasıyla 1 (kontrol), ve 0,64 (Emodin) olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler, Emodin'in HepG2 hücrelerinde Notch1 protein ekspresyonunu anlamlı düzeyde inhibe ettiğini ortaya koymaktadır.

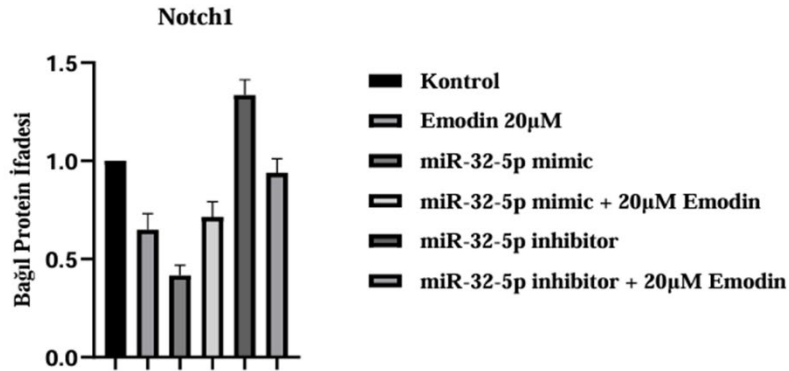
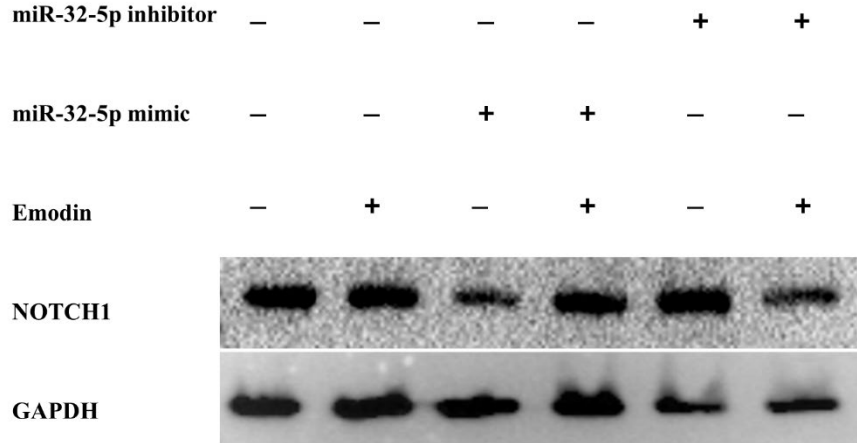


Şekil 18. Emodinin Notch1 protein seviyesine etkisinin incelenmesi
Hücreler 48 saat boyunca 20 μ M emodin ile muamele edildi ve ardından Notch1 proteininin ekspresyon düzeyi Western blot yöntemiyle analiz edildi. GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.

4. 6. HepG2 Hücrelerinde miR-32-5p'nin *Notch1* Gen Ekspresyonu Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

Kazanç ve kayıp fonksiyonu (gain- ve loss-of-function) deneylerini gerçekleştirmek amacıyla, HepG2 hücreleri 20 μ M emodin ile muamele edildi, miR-32-5p mimik ve inhibitörü ile tek başına veya 20 μ M emodin ile kombinasyon halinde transfekte edildi. Ardından, HCC'de miR-32-5p'nin tek başına ve emodin ile birlikte Notch proteini ekspresyonunun baskılanmasındaki rolünü araştırmak için Western blot analizi yapıldı. Notch1 protein düzeyleri; Kontrol, 20 μ M Emodin, miR-32-5p mimic, miR-32-5p mimic + 20 μ M Emodin, miR-32-5p inhibitör ve miR-32-5p inhibitör + 20 μ M Emodin grupları arasında karşılaştırıldı (Şekil 19). Bant yoğunluklarının normalize edilmiş göreceli ekspresyon değerleri sırasıyla şu şekilde bulundu: 1 (Kontrol), 0,64 (20 μ M Emodin), 0,41 (miR-32-5p mimic), 0,71 (miR-32-5p mimic + 20 μ M Emodin),

1,33 (miR-32-5p inhibitör) ve 0,94 (miR-32-5p inhibitör + 20 μ M Emodin). 20 μ M emodin ve miR-32-5p mimik, HepG2 hücrelerinde Notch1 protein ekspresyonunu azaltmış olup, en güçlü baskılama etkisi miR-32-5p mimik ile gözlenmiştir. miR-32-5p inhibitörü Notch1 ekspresyonunu artırmış, ancak emodin ile birlikte uygulandığında bu artış kısmen tersine çevrilmiştir.



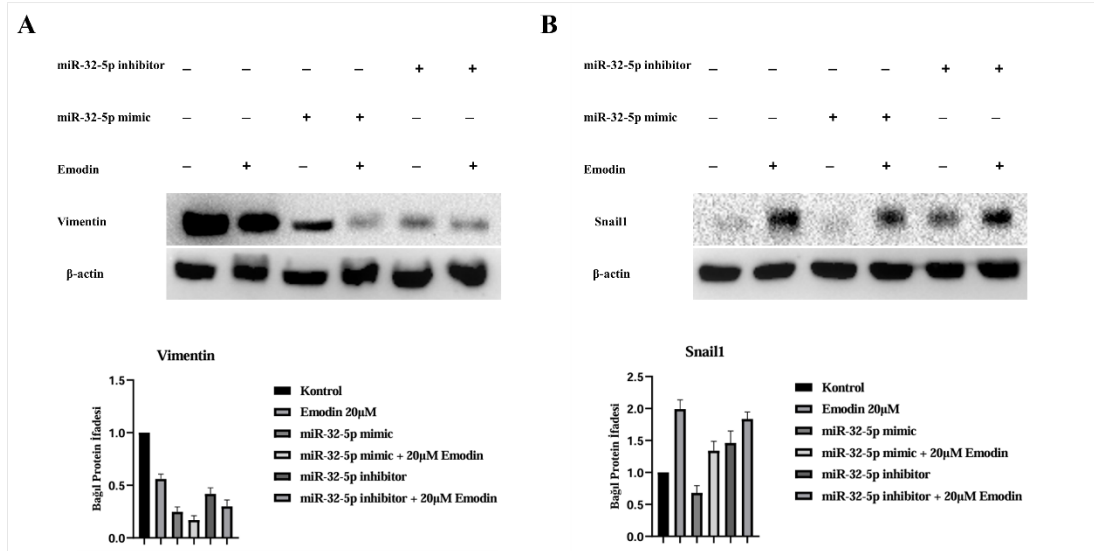
Şekil 19. miR-32-5p'nin Notch1 protein seviyesine etkisinin incelenmesi
Hücreler 48 saat boyunca 20 μ M emodin ile muamele edildi, ardından sırasıyla miR-32-5p mimik ve inhibitörü ile veya 20 μ M emodin ile kombinasyon halinde transfekte edildi ve Notch1 protein düzeyi Western blot yöntemiyle analiz edildi. GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.

4.7. HepG2 Kanseri Hücrelerinde miR-32-5p'nin EMT Proteinleri Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

Emodin, miR-32-5p mimik ve inhibitörünün EMT üzerindeki rolünü daha ayrıntılı olarak incelemek amacıyla, HepG2 hücrelerinde EMT proteinleri olan Vimentin ve Snail'in ekspresyon paternleri Western blot yöntemiyle belirlendi. HepG2 hücreleri 20 μ M emodin ile muamele edildi, miR-32-5p mimik ve inhibitörü ise tek başına veya 20 μ M emodin ile kombinasyon halinde transfekte edildi. Daha sonra Western blot

sonuçları kullanılarak Vimentin protein seviyeleri; kontrol, 20 μ M emodin, miR-32-5p mimik, miR-32-5p mimik + 20 μ M emodin, miR-32-5p inhibitör ve miR-32-5p inhibitör + 20 μ M emodin grupları arasında karşılaştırıldı (Şekil 20A). Bant yoğunluklarının normalize edilmiş göreceli Vimentin protein ekspresyon değerleri ise sırasıyla şu şekilde bulunmuştur: 1 (Kontrol), 0,56 (20 μ M emodin), 0,24 (miR-32-5p mimik), 0,17 (miR-32-5p mimik + 20 μ M emodin), 0,42 (miR-32-5p inhibitör) ve 0,30 (miR-32-5p inhibitör + 20 μ M emodin). Western blot analizleri Vimentin ekspresyonunun kontrol (1.00) grubuna kıyasla 20 μ M emodin (0,56), miR-32-5p mimik (0,24) ve miR-32-5p mimik + 20 μ M emodin (0,17) gruplarında sırasıyla azaldığını gösterdi. miR-32-5p inhibitörü Vimentin düzeyini kısmen yükseltirken (0,42), inhibitör + emodin kombinasyonunda Vimentin tekrar düşüş gösterdi (0,30). Bu sonuçlar emodinin miR-325p'nin EMT'yi baskılayan etkisini güçlendirdiğini düşündürmektedir.

HepG2 hücrelerinde Snail1 proteininin ekspresyon paterni de Western blot yöntemiyle belirlenmiştir. Snail1 protein seviyeleri; kontrol, 20 μ M emodin, miR-32-5p mimik, miR-32-5p mimik + 20 μ M emodin, miR-32-5p inhibitör ve miR-32-5p inhibitör + 20 μ M emodin grupları arasında karşılaştırıldı (Şekil 20B). Western blot analizi, 20 μ M emodinin Snail1 ekspresyonunu kontrol grubuna kıyasla 1,99 kat artırdığını gösterdi. miR-32-5p mimik, Snail1 ekspresyonunu 0,68'e düşürürken, emodin ile kombinasyonu emodinin artırıcı etkisini kısmen azalttı (1,34). miR-32-5p inhibitörü Snail1'i 1,46'ya yükseltti ve emodin ile kombinasyonunda Snail1 1,84'e ulaştı. Bu sonuçlar, miR-32-5p'nin Snail1'i negatif olarak düzenlediğini ve 20 μ M emodinin Snail1'i geçici olarak artırabileceğini, daha önce bildirilen doz-bağımlı etkilere uygun şekilde göstermektedir.

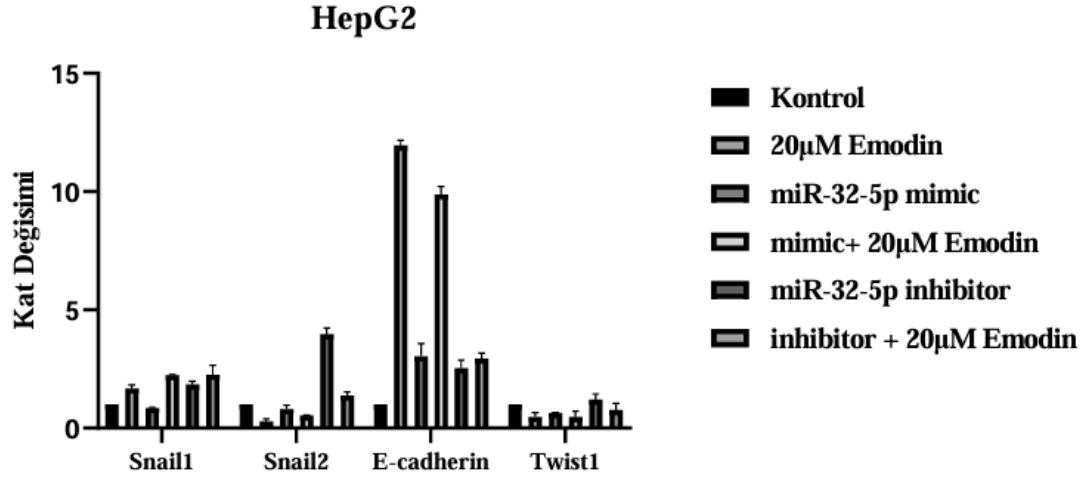


Şekil 20. miR32-5p ve Emodinin Vimentin ve Snail1 protein seviyesine etkisinin incelenmesi HepG2 Hücreleri 48 saat boyunca 20 μ M emodin ile muamele edildi, ardından sırasıyla miR-32-5p mimik ve inhibitörü ile veya 20 μ M emodin ile kombinasyon halinde transfeke edildi. A. Vimentin ve B. Snail1 protein seviyesi Western blot ile analiz edildi. Sonuçlar GraphPad Prism 8.0.1 ile sütun grafiği oluşturulmuştur.

4. 8. HepG2 Kanser Hücrelerinde miR-32-5p'nin, EMT ile İlişkili Genlerin Ekspresyonu Üzerindeki Etkisinin qRT-PCR ile Gösterilmesi

Emodin ile miR-32-5p mimik ve inhibitörünün EMT süreçleri ile epitelyal belirteçlerin mRNA düzeyleri üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla qRT-PCR analizi gerçekleştirildi. Bu kapsamda HepG2 hücreleri 20 μ M emodin ile muamele edildi; miR-32-5p mimik ve inhibitörü ise tek başına ya da 20 μ M emodin ile kombinasyon halinde hücrelere transfeke edildi. Ardından Snail1, Snail2, E-cadherin ve Twist mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol, 20 μ M Emodin, miR-32-5p mimik, miR-32-5p mimik + 20 μ M Emodin, miR-32-5p inhibitör ve miR-32-5p inhibitör + 20 μ M Emodin grupları arasında karşılaştırıldı (Şekil 21). Snail1 ekspresyonu 20 μ M emodin ile orta düzeyde artış göstermiştir (1,68 kat), ancak miR-32-5p mimik ile baskılanmıştır (0,86). Mimik ve emodin kombinasyonu belirgin bir artışa yol açmıştır (2,24). miR-32-5p inhibitörü ve inhibitör + emodin uygulamaları ise Snail1'i daha da yükseltmiştir (sırasıyla 1,84 ve 2,25). Snail2 ekspresyonu emodin (0,28) ve miR-32-5p mimik (0,80) ile güçlü şekilde azalmış, mimik + emodin grubunda ise daha da baskılanmıştır (0,53). Buna karşılık, miR-32-5p inhibitörü Snail2'yi belirgin düzeyde artırmıştır (3,96) ve bu artış emodin ile birlikte uygulandığında kısmen tersine çevrilmiştir (1,38). E-cadherin, emodin ile güçlü şekilde indüklenmiştir (11,95), ancak hem mimik hem de inhibitör ekspresyonunu düşürmüştür (sırasıyla 3,04 ve 2,53).

Emodin ile birlikte uygulama, E-cadherin düzeylerini yeniden yükseltmiştir (mimik + emodin 9,88 ; inhibitör + emodin 2,95). Twist1 ekspresyonu emodin (0,47) ve mimik (0,64) ile azalmış, inhibitör tedavisi ile 1,20'ye çıkmıştır. Emodin ile birlikte uygulamalar inhibitör kaynaklı bu artışı yeniden baskılamıştır (0,77).



Şekil 21. Emodin ve miR-32-5p'nin EMT belirteçlerinin mRNA seviyelerine etkilerinin araştırılması
HepG hücreleri 48 saat boyunca 20 µM emodin ile muamele edildikten sonra sırasıyla miR-32-5p mimik ve inhibitörü ile veya 20 µM emodin ile kombinasyon halinde transfeke edildi ve Snail1, Snail2, E-cadherin ve Twist1 mRNA düzeyleri qRT-PCR ile analiz edildi. GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.

5 TARTIŞMA

Hepatoselüler karsinom (HCC), geç tanı, yüksek metastatik potansiyel ve konvansiyonel tedavilere karşı direnç nedeniyle dünya genelinde en yaygın ve ölümcül malignitelerden biridir. HCC progresyonuna katkıda bulunan temel süreçlerden biri, epitel hücrelerinin hücre polaritesini ve adezyon özelliklerini kaybederek artmış hareketlilik ve invazivlik ile karakterize edilen mezenkimal bir fenotip kazandığı epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) sürecidir. EMT, metastazın, tedavi direncinin ve tümör hücrelerinin kök hücre benzeri özellikler kazanmasının başlıca nedenlerinden biridir (Bakir et al., 2020; Francou & Anderson, 2020).

Emodin, antiinflamatuvar, antioksidan, antibakteriyel ve özellikle antikanser aktiviteleri dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik etkileriyle yaygın olarak belgelenmiş doğal bir antrakinon türevidir. Önceki çalışmalar, emodinin hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini, apoptozu indüklediğini ve çeşitli kanser hücre tiplerinde invazyon ve metastazı baskıladığını göstermiştir (Gu et al., 2019a; C. Hu et al., 2016; Jelassi et al., 2013; Lin et al., 2016; J. Lu et al., 2016; Ma et al., 2017). Karaciğer kanseri bağlamında, emodinin hastalığın önlenmesi ve tedavisinde bazı faydalar sağladığı bildirilmiştir (S. R. Chen et al., 2016; Liao et al., 2020). Emodinin, HCC progresyonu ve EMT düzenlenmesi açısından kritik öneme sahip olan PI3K/Akt ve β -katenin gibi çeşitli önemli sinyal yollarını modüle ettiği gösterilmiştir (Qin et al., 2022). Ayrıca, emodin suksinil esterinin, HCC hücrelerinde androjen reseptörü (AR) ve EZH2 etkileşimini hedefleyerek proliferasyon ve migrasyonu inhibe ettiği bildirilmiştir (Khan et al., 2020). Bu çalışmada, emodinin HepG2 hepatoselüler karsinom hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın öncelikli hedefi, emodinin EMT üzerindeki etkisini Notch sinyal yolu aracılığıyla ve özellikle miR-32-5p'nin rolünü dikkate alarak moleküler düzeyde açıklamaktır.

MTT yöntemi, metabolik olarak aktif olan hücrelerin, sarı renkli MTT molekülünü keserek mor renkli formazan kristallerine indirgemesi prensibine dayanır. MTT yöntemi uygulanarak elde edilen bulgular, emodinin doza ve zamana bağlı olarak HepG2 hücrelerinde anlamlı düzeyde hücre canlılığını azaltıcı etki gösterdiğini ortaya

koymuştur. Bu sonuçlar, emodinin HCC, kolon ve prostat kanseri hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli kanser hücre hatlarında gösterdiği etkileri bildiren önceki çalışmalarla (Deng et al., 2015; Gu et al., 2019b; Qin et al., 2022) uyumludur. Hücre sağkalım testiyle yapılan ileri analizler, emodinin hücre proliferasyonunu anlamlı şekilde inhibe ettiğini ve bu etkinin yine doz ve zamana bağımlı olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle, düşük konsantrasyonlar sınırlı etki gösterirken, yüksek konsantrasyonlar 24, 48 ve 72 saatlik srelerde canlı hücre sayısında belirgin bir azalmaya neden olmuş ve bu da emodinin sağ kalımı düşürücü özelliklerini desteklemiştir. Ayrıca, emodin uygulaması HepG2 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğini de zayıflatmış ve bu durum, hücrelerin klonojenik potansiyelini ve uzun vadeli proliferasyon yeteneklerini kaybettiğini göstermiştir. Hücre canlılığı ve ölümü incelemek amacıyla DiOC₆ ve PI floresan boyamaları kullanıldı. DiOC₆(3) (3,3'-Diheksiloksakarbosiyanin İyodür), hücreye nüfuz eden, yeşil floresan, lipofilik bir boyadır. Düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında canlı hücrelerin mitokondrileri için seçici bir boyadır. Pozitif yüklü DiOC₆, mitokondrinin metabolik aktiviteleri tarafından üretilen negatif mitokondri membran potansiyeli nedeniyle mitokondride birikir. Dolayısıyla, DiOC₆ mitokondriyal membran potansiyeli sağlam olan hücrelerin boyanmasını sağlar. Emodin uygulanan hücrelerde, DiOC₆ floresansındaki azalma mitokondriyal membran potansiyelinde doz bağımlı bir kaybı göstermiştir. Bu sonuçlar, Emodinin mitokondride birikerek HepG2 hücrelerinde mitokondri disfonksiyonunu ve apoptozu indüklediğini gösteren Ling Zhang ve arkadaşlarının bulgularıyla uyumludur (L. Zhang et al., 2017). Propidyum iyodür (PI), DNA'ya bağlanan küçük bir floresan moleküldür ancak sağlam plazma membranına sahip hücrelere giremez. Bu nedenle, PI'nin hücreye alınıp alınmaması, ölüm mekanizmasından bağımsız olarak, zarı geçirgen hale gelmiş l hücreleri, zar bütünlüğü korunmuş canlı hücrelerden ayırt etmek için kullanılabilir. rtan emodin konsantrasyonlarıyla birlikte PI-pozitif hücre sayısında artış gözlenmiş, bu da plazma membranı bütünlüğünün bozulduğunu ve apoptoz veya nekroz yoluyla hücre ölümünün meydana geldiğini göstermiştir. Bu bulgular, emodinin mitokondriyal disfonksiyona neden olduğunu ve bunun içsel apoptotik sinyallemeyi tetikleyebileceğini ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, emodinin pro-apoptotik etkiler gösterdiğini bildiren literatürle (Qin et al., 2022) uyumludur.

Notch sinyal yolu, embriyonik gelişim, doku homeostazı ve tümör oluşumunda temel roller oynayan, oldukça korunmuş bir hücresel iletişim sistemidir. Gelişim ve tümör oluşumu sürecinde Notch sinyal yolunun EMT üzerinde teşvik edici bir etki gösterdiğini öne süren kanıtlar bulunmaktadır (Leong & Karsan, 2006; Timmerman et al., 2004). Önceki çalışmalar, Notch sinyal yolunun karaciğer rejenerasyonu ve tümör oluşumunu desteklediğini göstermiştir (Ranganathan et al., 2011). Aktif Notch1 ekspresyonunun, hücre döngüsünde duraklama ve apoptoz indüksiyonu yoluyla HCC hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Viatour et al., 2011). Croquelois ve ark., *Notch1* silinmesi sonrasında farelerde birkaç hafta içinde vasküler değişiklik olmadan nodüler rejeneratif hiperplazi geliştiğini gözlemlemiştir (Croquelois et al., 2005). Öte yandan, bazı çalışmalarda Notch'un karaciğer karsinogenezinde onkojenik bir rol oynayabileceği de bildirilmiştir (Gramantieri et al., 2007).

Farklı araştırmalar Emodin'in, Notch sinyal yolunu hedef alarak farklı kanser türlerinde EMT'yi inhibe edebildiğini göstermiştir (Gao et al., 2017b; L. Zhou et al., 2020). Bu çalışmada elde edilen bulgular, Emodin'in HepG2 hücrelerinde Notch1 protein ekspresyonunu anlamlı düzeyde inhibe ettiğini ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, Notch1 yolunun karaciğer fizyolojisi ve karsinogenezdeki çift yönlü rolünü vurgulamakta ve hepatoselüler karsinomda onkojenik işlevlerini seçici olarak inhibe edebilecek Emodin gibi modülatörlerin araştırılmasının önemini altını çizmektedir.

MikroRNA'lar (miRNA), gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel düzeyde düzenleyen küçük, kodlamayan RNA molekülleridir ve kanser biyolojisinde temel roller üstlenirler. miR-32-5p, özellikle çeşitli kanserlerde tümör baskılayıcı ya da onkogen olarak rol alabileceği gösterildiği için dikkat çekmektedir. Biyoinformatik analizler (TargetScan), *Notch1* mRNA'sının 3' UTR bölgesinde miR-32-5p için olası bağlanma bölgeleri olduğunu ortaya koymuş ve bu durum olası bir düzenleyici etkileşimi düşündürmektedir.

Fu ve ark. tarafından yapılan çalışmada, miR-32-5p'nin HCC'de PI3K/Akt aktivasyonu ve PTEN baskılanması yoluyla EMT ve ilaç direncini teşvik edebileceğini göstermiştir (Fu et al., 2018), bu da onun onkogenik rolünü vurgulamaktadır. Önceki çalışmalar, miR-32-5p'nin hücre proliferasyonu ve hayatta kalma süreçlerini düzenleyen GSK3 β /NF- κ B aksı gibi kilit onkogenik yolları hedefleyerek HCC'de tümör karşıtı etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur (G. Wang et al., 2025). Bu çalışmada, emodin, miR-32-5p mimik ve miR-32-5p inhibitörü uygulamalarının HepG2 hepatoselüler

karsinom hücrelerinde Notch protein ekspresyonu üzerindeki bireysel ve kombinasyon halinde etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, hem 20 μ M emodin hem de miR-32-5p mimik uygulamasının HepG2 hepatoselüler karsinoma hücrelerinde Notch1 protein ekspresyonunu belirgin şekilde azalttığını ve en güçlü baskılayıcı etkinin miR-32-5p mimik grubunda gözlemlendiğini açıkça ortaya koymaktadır. Mimiğin bu güçlü inhibitör etkisi, miR-32-5p'nin tümör progresyonu, epitelyal mezenkimal geçiş ve metastazda rol oynadığı bilinen Notch sinyal yolunun güçlü bir negatif düzenleyicisi olma potansiyelini vurgulamaktadır. Buna karşılık, miR-32-5p inhibitörünün uygulanması Notch protein ekspresyonunda belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Bu durum, söz konusu mikroRNA'nın baskılayıcı rolünü bir kez daha doğrulamıştır. Dikkat çekici olarak, inhibitör ile birlikte emodin uygulanması bu artışı kısmen tersine çevirmiştir; bu da emodinin Notch1 ekspresyonunu miR-32-5p'den bağımsız mekanizmalar aracılığıyla da düzenleyebildiğini göstermektedir.

Genel olarak, bu sonuçlar miR-32-5p'nin, en azından kısmen, Notch1 protein ekspresyonunu baskılayarak HCC'de tümör baskılayıcı bir mikroRNA olarak işlev gördüğünü ve emodinin bu düzenleyici etkiyi güçlendirebileceğini düşündürmektedir. İnhibitör kaynaklı Notch1 artışının emodin tarafından kısmen tersine çevrilmesi, emodinin Notch sinyal ağı içinde birden fazla moleküler hedef üzerinden etkili olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular, hepatoselüler karsinomda onkojenik sinyal yollarını hedeflemek amacıyla, emodin gibi doğal bileşiklerin miRNA temelli stratejilerle birlikte kullanılmasının terapötik potansiyeline dair önemli bilgiler sunmaktadır.

EMT'nin HCC metastazı ile olan artan ilişkisi ve bu süreçte Notch sinyal yolunun rolü göz önüne alındığında, bu çalışma aynı zamanda emodinin Notch yolu aracılığıyla EMT'yi modüle edip etmediğini, özellikle Notch1 hedeflenmesi ve miR-32-5p üzerinden düzenlenmesi yoluyla incelemeyi amaçlamaktadır. Chen Hu ve arkadaşlarının yumurtalık kanseri hücrelerinde Emodin'in EMT üzerindeki etkisini incelediği bir çalışmada, Emodin'in özellikle 20 μ M konsantrasyonda olmak üzere, doz bağımlı bir şekilde vimentin düzeylerini anlamlı şekilde düşürdüğü gösterilmiştir (C. Hu et al., 2016b). EMT belirteçleri olan Vimentin ve Snail1 üzerinde yapılan analizler, emodin ve miR-32-5p'nin HepG2 hücrelerinde farklı ancak birbirini tamamlayan düzenleyici etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Bulgularımız, 20 μ M emodinin Vimentin protein ekspresyonunu anlamlı şekilde azalttığını ve bu etkinin

miR-32-5p mimik ile daha da güçlendiğini göstermektedir. Buna karşılık, miR-32-5p inhibitörü Vimentin seviyelerini kısmen artırmış, ancak emodin ile kombinasyon halinde bu artış tekrar baskılanmıştır. Bu sonuçlar, miR-32-5p'nin Vimentin üzerinden EMT sürecinin güçlü bir negatif düzenleyicisi olduğunu ve emodin bu etkileri destekleyerek epitel fenotipin korunmasına katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Snail1 protein ekspresyonu ise farklı bir desen sergilemiştir; 20 µM emodin, snail1 protein seviyesini arttırmış, bu da Binyu Qin ve ark. tarafından yapılan çalışmada, bildirilen doz-bağımlı etkilerle uyumlu bulunmuştur; zira emodin düşük konsantrasyonlarda Snail1'i artırdığı, daha yüksek konsantrasyonlarda ise azalttığı bildirilmektedir (Qin et al., 2022). Çalışmamızda miR-32-5p mimik Snail1 ekspresyonunu baskılamış, emodin ile birlikte uygulandığında ise emodin artırıcı etkisini yalnızca kısmen engelleyebilmiştir. Buna karşılık, miR-32-5p inhibitörü Snail1 düzeylerini yükseltmiş ve emodin ile kombinasyonu bu artışı daha da pekiştirmiştir. Bu bulgular, miR-32-5p'nin Snail1 üzerinde negatif bir düzenleyici rol üstlendiğini ve emodin Snail1'i konsantrasyona bağlı olarak çift yönlü düzenleyebildiğini göstermektedir.

Özellikle emodin, Snail2 ve Twist1 ekspresyonunu güçlü bir şekilde baskımlarken, E-cadherin'i belirgin biçimde artırmıştır; bu durum, epitel fenotipinin desteklendiğini ve EMT'nin inhibe edildiğini göstermektedir. Bu bulgular, önceki çalışmalarla uyumludur: Chen ve arkadaşları, 20 µM emodin akciğer kanseri hücrelerinde Snail2 ve Twist1 mRNA ekspresyonunu inhibe ettiğini göstermiştir; başka bir çalışmada ise 20 µM emodin pankreas kanseri hücrelerinde E-cadherin mRNA düzeyini anlamlı şekilde artırdığı bildirilmiştir.

qRT-PCR sonuçlarımız, emodin EMT ile ilişkili genlerin düzenlenmesinde ayrıntılı bir bakış sunmaktadır. Snail2 ve Twist1'in emodin tarafından güçlü şekilde baskılandığı, E-cadherin'in ise belirgin biçimde artırıldığı görülmüştür. bu durum, epitel fenotipinin desteklendiğini ve EMT'nin inhibe edildiğini göstermektedir. Bu bulgular, önceki çalışmalarla uyumludur: Yuan Ying ve arkadaşları, 20 µM emodin akciğer kanseri hücrelerinde Snail2 ve Twist1 mRNA ekspresyonunu inhibe ettiğini göstermiştir (Ying et al., 2017); başka bir çalışmada ise 20 µM emodin pankreas kanseri hücrelerinde E-cadherin mRNA düzeyini anlamlı şekilde artırdığı bildirilmiştir.

(N. Li et al., 2018). Bu sonuçlar, emodin EMT'yi etkili bir şekilde karşılayabileceğini ve kanser ilerlemesini ve metastazını baskılamak için potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini göstermektedir. Öte yandan, Snail1 transkript seviyeleri emodin ile artmış, bu da protein düzeylerindeki bulgularla paralellik göstermiştir. miR-32-5p mimik genel olarak Snail1, Snail2 ve Twist1 gibi EMT sürücülerini baskılayarak, inhibitör bu faktörleri artırmış ve aynı zamanda E-cadherin'i azaltmıştır. Bu bulgular, miR-32-5p'nin EMT sürecinde baskılayıcı rolünü bir kez daha doğrulamaktadır.

Genel olarak, bu çalışma emodin ve miR-32-5p'nin HCC'de hem Notch1 sinyali hem de EMT belirteçleri üzerinden çok katmanlı etkileşimler sergilediğini ortaya koymaktadır. Vimentin ve Twist1'in baskılanması ve E-cadherin'in artışı, emodin EMT'yi engelleyici potansiyelini desteklerken; Snail1'in 20 μ M'da artışı, emodin doza bağlı çift yönlü etkilerini ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, emodin yalnızca tek bir yolak üzerinden değil, birden fazla EMT düzenleyici mekanizma üzerinden etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Özellikle miR-32-5p'nin hem Notch1 hem de EMT faktörleri üzerindeki baskılayıcı etkisi, bu mikroRNA'nın tümör baskılayıcı bir rol üstlendiğini göstermektedir. Emodin ile birlikte uygulandığında bu etkinin güçlenmesi, HCC tedavisinde doğal bileşikler ve miRNA temelli yaklaşımların birlikte kullanılmasının terapötik potansiyeline işaret etmektedir.

Sonuç olarak, elde edilen veriler bugüne kadar emodin HepG2 hepatosellüler karsinom hücrelerinde anti-kanser etkiler gösterdiğini; hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini, koloni oluşumunu azalttığını, mitokondriyal fonksiyonu bozduğunu ve hücre ölümünü indüklediğini ortaya koymaktadır. Bu etkiler, Notch sinyal yolunun ve EMT'nin modülasyonu aracılığıyla gerçekleşiyor olabilir ve miR-32-5p olası bir yukarı akış düzenleyici olarak öne çıkmaktadır. Emodinin, Notch1 ekspresyonunu aşağı düzenleyerek ve muhtemelen miR-32-5p modülasyonu aracılığıyla EMT'yi dolaylı olarak baskıladığı bir model desteklenmiştir. Bu bulgu, emodin sadece EMT belirteçlerini doğrudan etkileyerek değil, aynı zamanda Notch sinyal yolunu ve ilgili mikroRNA düzenlemelerini modüle ederek hücrelerin epitel fenotipini korumasına ve geçişi engellemesine katkıda bulunduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Aberrant promoter methylation of SOCS-1 gene may contribute to the pathogenesis of hepatocellular carcinoma: A meta-analysis* | Request PDF. (n.d.). Retrieved April 8, 2025, from https://www.researchgate.net/publication/303572779_Aberrant_promoter_methylation_of_SOCS-1_gene_may_contribute_to_the_pathogenesis_of_hepatocellular_carcinoma_A_meta-analysis
- Abou-Alfa, G. K., Meyer, T., Cheng, A.-L., El-Khoueiry, A. B., Rimassa, L., Ryoo, B.-Y., Cicin, I., Merle, P., Chen, Y., Park, J.-W., Blanc, J.-F., Bolondi, L., Klumpen, H.-J., Chan, S. L., Zagonel, V., Pressiani, T., Ryu, M.-H., Venook, A. P., Hessel, C., ... Kelley, R. K. (2018). Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 379(1), 54–63. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1717002>
- Abouchaleh, N., Gabr, A., Ali, R., Asadi, A. Al, Mora, R. A., Kallini, J. R., Mouli, S., Riaz, A., Lewandowski, R. J., & Salem, R. (2018). 90Y Radioembolization for Locally Advanced Hepatocellular Carcinoma with Portal Vein Thrombosis: Long-Term Outcomes in a 185-Patient Cohort. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 59(7), 1042–1048. <https://doi.org/10.2967/JNUMED.117.199752>
- Akkol, E. K., Tatlı, I. I., Karatoprak, G. Ş., Ağar, O. T., Yücel, Ç., Sobarzo-sánchez, E., & Capasso, R. (2021). Is Emodin with Anticancer Effects Completely Innocent? Two Sides of the Coin. *Cancers*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/CANCERS13112733>
- Aksoy, F., & Aksoy, S. A. (2023). ESTABLISHMENT OF ACQUIRED SORAFENIB RESISTANCE IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELL LINE AND EXAMINATION OF EMT HEPATOSELÜLER KARSİNOM HÜCRE HATTINDA EDİNİLMİŞ SORAFENİB DİRENCİNİN BELİRLENMESİ VE EMT'İN İNCELENMESİ. 6(6). <https://doi.org/10.53446/actamednicomedia.1329643>
- Alawya, B., & Constantinou, C. (2023). Hepatocellular Carcinoma: a Narrative Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Current Treatment Options in Oncology*, 24(7), 711–724. <https://doi.org/10.1007/S11864-023-01098-9>
- Alqahtani, A., Khan, Z., Alloghbi, A., Ahmed, T. S. S., Ashraf, M., & Hammouda, D. M. (2019a). Hepatocellular Carcinoma: Molecular Mechanisms and Targeted Therapies. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 55(9). <https://doi.org/10.3390/MEDICINA55090526>
- Alqahtani, A., Khan, Z., Alloghbi, A., Ahmed, T. S. S., Ashraf, M., & Hammouda, D. M. (2019b). Hepatocellular Carcinoma: Molecular Mechanisms and Targeted Therapies. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 55(9). <https://doi.org/10.3390/MEDICINA55090526>
- Aravalli, R. N., Steer, C. J., & Cressman, E. N. K. (2008). Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 48(6), 2047–2063. <https://doi.org/10.1002/HEP.22580>

- Arzumanyan, V. A., Kiseleva, O. I., & Poverennaya, E. V. (2021). The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/IJMS222313135>
- Ascha, M. S., Hanouneh, I. A., Lopez, R., Tamimi, T. A. R., Feldstein, A. F., & Zein, N. N. (2010). The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51(6), 1972–1978. <https://doi.org/10.1002/HEP.23527>
- Askou, A. L., Aagaard, L., Kostic, C., Arsenijevic, Y., Hollensen, A. K., Bek, T., Jensen, T. G., Mikkelsen, J. G., & Corydon, T. J. (2015). Multigenic lentiviral vectors for combined and tissue-specific expression of miRNA- and protein-based antiangiogenic factors. *Molecular Therapy Methods and Clinical Development*, 2, 14064. <https://doi.org/10.1038/mtm.2014.64>
- Avitabile, C., Accardo, A., Ringhieri, P., Morelli, G., Saviano, M., Montagner, G., Fabbri, E., Gallerani, E., Gambari, R., & Romanelli, A. (2018). Incorporation of Naked Peptide Nucleic Acids into Liposomes Leads to Fast and Efficient Delivery. *BIOCONJUGATE CHEMISTRY*, 26(8), 1533–1541. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.5B00156>
- Axtell, M. J., Westholm, J. O., & Lai, E. C. (2011). Vive la différence: Biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biology*, 12(4), 1–13. <https://doi.org/10.1186/GB-2011-12-4-221/FIGURES/2>
- Azhie, A., Grant, R. C., Herman, M., Wang, L., Knox, J. J., & Bhat, M. (2022). Phase II clinical trial of cabozantinib for the treatment of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Future Oncology (London, England)*, 18(18), 2173–2191. <https://doi.org/10.2217/FON-2021-1635>
- Bader, A. G. (2012). MiR-34 - a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Frontiers in Genetics*, 3(JUL). <https://doi.org/10.3389/FGENE.2012.00120>,
- Bakir, B., Chiarella, A. M., Pitarresi, J. R., & Rustgi, A. K. (2020). EMT, MET, Plasticity, and Tumor Metastasis. *Trends in Cell Biology*, 30(10), 764–776. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2020.07.003>
- Banerjee, A., Ray, R. B., & Ray, R. (2010). Oncogenic potential of hepatitis C virus proteins. *Viruses*, 2(9), 2108–2133. <https://doi.org/10.3390/V2092108>
- Benedito, R., Roca, C., Sörensen, I., Adams, S., Gossler, A., Fruttiger, M., & Adams, R. H. (2009). The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell*, 137(6), 1124–1135. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.03.025>
- Blanco, R., & Gerhardt, H. (2013). VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(1). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A006569>
- Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., & Görlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10(2), 185–191. <https://doi.org/10.1261/RNA.5167604>,
- Borggreffe, T., & Oswald, F. (2009). The Notch signaling pathway: Transcriptional regulation at Notch target genes. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 66(10), 1631. <https://doi.org/10.1007/S00018-009-8668-7>
- Brabletz, T. (2012). To differentiate or not — routes towards metastasis. *Nature Reviews Cancer* 2012 12:6, 12(6), 425–436. <https://doi.org/10.1038/nrc3265>
- Bray, S. J. (2016). Notch signalling in context. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(11), 722–735. <https://doi.org/10.1038/NRM.2016.94>

- Brown, J. S., Amend, S. R., Austin, R. H., Gatenby, R. A., Hammarlund, E. U., & Pienta, K. J. (2023). Updating the Definition of Cancer. *Molecular Cancer Research*, 21(11), 1142–1147. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-23-0411/727658/AM/UPDATING-THE-DEFINITION-OF-CANCERUPDATING-THE>
- Bruix, J., Qin, S., Merle, P., Granito, A., Huang, Y. H., Bodoky, G., Pracht, M., Yokosuka, O., Rosmorduc, O., Breder, V., Gerolami, R., Masi, G., Ross, P. J., Song, T., Bronowicki, J. P., Ollivier-Hourmand, I., Kudo, M., Cheng, A. L., Llovet, J. M., ... Han, G. (2017). Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, 389(10064), 56–66. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32453-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32453-9)
- Cai, J., Qiao, Y., Chen, L., Lu, Y., & Zheng, D. (2024). Regulation of the Notch signaling pathway by natural products for cancer therapy. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 123. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2023.109483>
- Calderaro, J., Ziol, M., Paradis, V., & Zucman-Rossi, J. (2019). Molecular and histological correlations in liver cancer. *Journal of Hepatology*, 71(3), 616–630. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2019.06.001>
- Calderon-Martinez, E., Landazuri-Navas, S., Vilchez, E., Cantu-Hernandez, R., Mosquera-Moscoso, J., Encalada, S., Al lami, Z., Zevallos-Delgado, C., & Cinicola, J. (2023). Prognostic Scores and Survival Rates by Etiology of Hepatocellular Carcinoma: A Review. *Journal of Clinical Medicine Research*, 15(4), 200. <https://doi.org/10.14740/JOCMR4902>
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., & Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15524–15529. <https://doi.org/10.1073/PNAS.242606799>,
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., & Croce, C. M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 2999–3004. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0307323101>,
- Cancer site ranking*. (n.d.).
- Cao, H., Chen, X., Wang, Z., Wang, L., Xia, Q., & Zhang, W. (2020). The role of MDM2-p53 axis dysfunction in the hepatocellular carcinoma transformation. *Cell Death Discovery*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/S41420-020-0287-Y>
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005 438:7070, 438(7070), 932–936. <https://doi.org/10.1038/nature04478>
- Cassidy, J. J., Straughan, A. J., & Carthew, R. W. (2016). Differential masking of natural genetic variation by miR-9a in Drosophila. *Genetics*, 202(2), 675–687. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.115.183822/-/DC1>
- Celià-Terrassa, T., & Jolly, M. K. (2020). Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Metastasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(7), 1–17. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A036905>
- Cha, C., & DeMatteo, R. P. (2005). Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 19(1), 25–37. <https://doi.org/10.1016/J.BPG.2004.11.005>

- Chang, K. C., Wu, Y. Y., Hung, C. H., Lu, S. N., Lee, C. M., Chiu, K. W., Tsai, M. C., Tseng, P. L., Huang, C. M., Cho, C. L., Chen, H. H., & Hu, T. H. (2013). Clinical-guide risk prediction of hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients after interferon-based therapy. *British Journal of Cancer*, 109(9), 2481–2488. <https://doi.org/10.1038/BJC.2013.564>
- Chang, M. H., Huang, F. J., & Chan, W. H. (2012). Emodin induces embryonic toxicity in mouse blastocysts through apoptosis. *Toxicology*, 299(1), 25–32. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2012.05.006>
- Chen, L., Chan, T. H. M., & Guan, X. Y. (2010). Chromosome 1q21 amplification and oncogenes in hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(9), 1165–1171. <https://doi.org/10.1038/APS.2010.94>
- Chen, L., Shi, Y., Jiang, C. Y., Wei, L. X., Wang, Y. L., & Dai, G. H. (2011). Expression and prognostic role of pan-Ras, Raf-1, pMEK1 and pERK1/2 in patients with hepatocellular carcinoma. *European Journal of Surgical Oncology*, 37(6), 513–520. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2011.01.023>
- Chen, S., Cao, Z., Prettnner, K., Kuhn, M., Yang, J., Jiao, L., Wang, Z., Li, W., Geldsetzer, P., Bärnighausen, T., Bloom, D. E., & Wang, C. (2023). Estimates and Projections of the Global Economic Cost of 29 Cancers in 204 Countries and Territories From 2020 to 2050. *JAMA Oncology*, 9(4), 465–472. <https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2022.7826>
- Chen, S. R., Qiu, H. C., Hu, Y., Wang, Y., & Wang, Y. T. (2016). Herbal Medicine Offered as an Initiative Therapeutic Option for the Management of Hepatocellular Carcinoma. *Phytotherapy Research*, 30(6), 863–877. <https://doi.org/10.1002/PTR.5594>; JOURNAL: JOURNAL:10991573; WGROU: STRING: PUBLICATION
- Chen, Z., Xie, H., Hu, M., Huang, T., Hu, Y., Sang, N., & Zhao, Y. (2020). Recent progress in treatment of hepatocellular carcinoma. *American Journal of Cancer Research*, 10(9), 2993. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7539784/>
- Cheng, A. L., Kang, Y. K., Chen, Z., Tsao, C. J., Qin, S., Kim, J. S., Luo, R., Feng, J., Ye, S., Yang, T. S., Xu, J., Sun, Y., Liang, H., Liu, J., Wang, J., Tak, W. Y., Pan, H., Burock, K., Zou, J., ... Guan, Z. (2009a). Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet. Oncology*, 10(1), 25–34. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70285-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70285-7)
- Cheng, A. L., Kang, Y. K., Chen, Z., Tsao, C. J., Qin, S., Kim, J. S., Luo, R., Feng, J., Ye, S., Yang, T. S., Xu, J., Sun, Y., Liang, H., Liu, J., Wang, J., Tak, W. Y., Pan, H., Burock, K., Zou, J., ... Guan, Z. (2009b). Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet. Oncology*, 10(1), 25–34. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70285-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70285-7)
- Cheng, A. L., Kang, Y. K., Chen, Z., Tsao, C. J., Qin, S., Kim, J. S., Luo, R., Feng, J., Ye, S., Yang, T. S., Xu, J., Sun, Y., Liang, H., Liu, J., Wang, J., Tak, W. Y., Pan, H., Burock, K., Zou, J., ... Guan, Z. (2009c). Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet. Oncology*, 10(1), 25–34. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70285-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70285-7)
- Chidambaranathan-Reghupaty, S., Fisher, P. B., & Sarkar, D. (2021a). 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>

- Chidambaranathan-Reghupaty, S., Fisher, P. B., & Sarkar, D. (2021b). 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, K. J., Baik, I. H., Ye, S. K., & Lee, Y. H. (2015). Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: Present status and future directions. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38(7), 986–991. <https://doi.org/10.1248/BPB.B15-00231>
- Choudhari, S. R., Khan, M. A., Harris, G., Picker, D., Jacob, G. S., Block, T., & Shailubhai, K. (2007). Deactivation of Akt and STAT3 signaling promotes apoptosis, inhibits proliferation, and enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to an anticancer agent, Atiprimod. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(1), 112–121. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0561>
- Chuang, S. C., Lee, Y. C. A., Hashibe, M., Dai, M., Zheng, T., & Boffetta, P. (2010). Interaction between cigarette smoking and hepatitis B and C virus infection on the risk of liver cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 19(5), 1261–1268. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-1297>
- Croquelois, A., Blindenbacher, A., Terracciano, L., Wang, X., Langer, I., Radtke, F., & Heim, M. H. (2005). Inducible inactivation of Notch1 causes nodular regenerative hyperplasia in mice. *Hepatology*, 41(3), 487–496. <https://doi.org/10.1002/HEP.20571>,
- Cucarull, B., Tutusaus, A., Rider, P., Hernáez-Alsina, T., Cuño, C., de Frutos, P. G., Colell, A., Marí, M., & Morales, A. (2022). Hepatocellular Carcinoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Advances. *Cancers*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/CANCERS14030621>
- CUI, Y., CHEN, L. J., HUANG, T., YING, J. Q., & LI, J. (2020). The pharmacology, toxicology and therapeutic potential of anthraquinone derivative emodin. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 18(6), 425–435. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(20\)30050-9](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(20)30050-9)
- Delire, B., & Stärkel, P. (2015). The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications. *European Journal of Clinical Investigation*, 45(6), 609–623. <https://doi.org/10.1111/ECI.12441>
- Deng, G., Ju, X., Meng, Q., Yu, Z. J., & Ma, L. Bin. (2015). Emodin inhibits the proliferation of PC3 prostate cancer cells in vitro via the Notch signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, 12(3), 4427–4433. <https://doi.org/10.3892/MMR.2015.3923>
- Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), 231–235. <https://doi.org/10.1038/NATURE03049;KWRD=SCIENCE>
- Deshmukh, A. P., Vasaikar, S. V., Tomczak, K., Tripathi, S., den Hollander, P., Arslan, E., Chakraborty, P., Soundararajan, R., Jolly, M. K., Rai, K., Levine, H., & Mani, S. A. (2021). Identification of EMT signaling cross-talk and gene regulatory networks by single-cell RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(19). <https://doi.org/10.1073/PNAS.2102050118>
- Dhondt, E., Lambert, B., Hermie, L., Huyck, L., Vanlangenhove, P., Geerts, A., Verhelst, X., Aerts, M., Vanlander, A., Berrevoet, F., Troisi, R. I., Van

- Vlierberghe, H., & Defreyne, L. (2022). 90Y Radioembolization versus Drug-eluting Bead Chemoembolization for Unresectable Hepatocellular Carcinoma: Results from the TRACE Phase II Randomized Controlled Trial. *Radiology*, 303(3), 699–710. <https://doi.org/10.1148/RADIOL.211806/ASSET/IMAGES/LARGE/RADIOL.211806.TBL4.JPEG>
- Dimri, M., & Satyanarayana, A. (2020a). Molecular Signaling Pathways and Therapeutic Targets in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, 12(2), 491. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12020491>
- Dimri, M., & Satyanarayana, A. (2020b). Molecular Signaling Pathways and Therapeutic Targets in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/CANCERS12020491>
- Dituri, F., Mancarella, S., Cigliano, A., Chieti, A., & Giannelli, G. (2019). TGF- β as Multifaceted Orchestrator in HCC Progression: Signaling, EMT, Immune Microenvironment, and Novel Therapeutic Perspectives. *Seminars in Liver Disease*, 39(1), 53–69. <https://doi.org/10.1055/S-0038-1676121>
- Dong, X., Fu, J., Yin, X., Cao, S., Li, X., Lin, L., & Ni, J. (2016a). Emodin: A Review of its Pharmacology, Toxicity and Pharmacokinetics. *Phytotherapy Research*, 30(8), 1207. <https://doi.org/10.1002/PTR.5631>
- Dong, X., Fu, J., Yin, X., Cao, S., Li, X., Lin, L., & Ni, J. (2016b). Emodin: A Review of its Pharmacology, Toxicity and Pharmacokinetics. *Phytotherapy Research*, 30(8), 1207. <https://doi.org/10.1002/PTR.5631>
- Dou, G. R., Wang, L., Wang, Y. S., & Han, H. (2012). Notch signaling in ocular vasculature development and diseases. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 18(1), 47–55. <https://doi.org/10.2119/MOLMED.2011.00256>
- Doyle, A., Gorgen, A., Muaddi, H., Aravinthan, A. D., Issachar, A., Mironov, O., Zhang, W., Kachura, J., Beecroft, R., Cleary, S. P., Ghanekar, A., Greig, P. D., McGilvray, I. D., Selzner, M., Cattral, M. S., Grant, D. R., Lilly, L. B., Selzner, N., Renner, E. L., ... Sapisochin, G. (2019). Outcomes of radiofrequency ablation as first-line therapy for hepatocellular carcinoma less than 3 cm in potentially transplantable patients. *Journal of Hepatology*, 70(5), 866–873. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2018.12.027>
- Ebert, M. S., Neilson, J. R., & Sharp, P. A. (2007). MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nature Methods*, 4(9), 10.1038/nmeth1079. <https://doi.org/10.1038/NMETH1079>
- Egbuna, C., & Hassan, S. (2021). Dietary phytochemicals: A source of novel bioactive compounds for the treatment of obesity, cancer and diabetes. *Dietary Phytochemicals: A Source of Novel Bioactive Compounds for the Treatment of Obesity, Cancer and Diabetes*, 1–265. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-72999-8/COVER>
- El-Khoueiry, A. B., Sangro, B., Yau, T., Crocenzi, T. S., Kudo, M., Hsu, C., Kim, T. Y., Choo, S. P., Trojan, J., Welling, T. H., Meyer, T., Kang, Y. K., Yeo, W., Chopra, A., Anderson, J., dela Cruz, C., Lang, L., Neely, J., Tang, H., ... Melero, I. (2017). Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet (London, England)*, 389(10088), 2492–2502. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31046-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31046-2)
- Emodin CAS#: 518-82-1. (n.d.). Retrieved April 22, 2025, from https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB2258856_EN.htm

- Esquela-Kerscher, A., Trang, P., Wiggins, J. F., Patrawala, L., Cheng, A., Ford, L., Weidhaas, J. B., Brown, D., Bader, A. G., & Slack, F. J. (2008). The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle*, 7(6), 759–764. <https://doi.org/10.4161/CC.7.6.5834>;WGROU:STRING:PUBLICATION
- Estes, C., Razavi, H., Loomba, R., Younossi, Z., & Sanyal, A. J. (2018). Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 67(1), 123–133. <https://doi.org/10.1002/HEP.29466>
- Ettrich, T. J., & Seufferlein, T. (2018). Regorafenib. *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progres Dans Les Recherches Sur Le Cancer*, 211, 45–56. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91442-8_3
- Faivre, S., Bouattour, M., & Raymond, E. (2011). Novel molecular therapies in hepatocellular carcinoma. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 31 Suppl 1(SUPPL. 1), 151–160. <https://doi.org/10.1111/J.1478-3231.2010.02395.X>
- Farzaneh, Z., Vosough, M., Agarwal, T., & Farzaneh, M. (2021). Critical signaling pathways governing hepatocellular carcinoma behavior; small molecule-based approaches. *Cancer Cell International*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/S12935-021-01924-W>
- Fasoulakis, Z., Daskalakis, G., Diakosavvas, M., Papapanagiotou, I., Theodora, M., Bourazan, A., Alatzidou, D., Pagkalos, A., & Kontomanolis, E. N. (2020). MicroRNAs Determining Carcinogenesis by Regulating Oncogenes and Tumor Suppressor Genes During Cell Cycle. *Microrna (Sharjah, United Arab Emirates)*, 9(2), 82. <https://doi.org/10.2174/2211536608666190919161849>
- Feng, L., Zhang, J., Qian, J., Gang, W., & Zhenyu, M. (2018). Emodin alleviates CCl4-induced liver fibrosis by suppressing epithelial-mesenchymal transition and transforming growth factor- β 1 in rats. *Molecular Medicine Reports*, 18(3), 3262–3270. <https://doi.org/10.3892/MMR.2018.9324>,
- Fernández, M., Semela, D., Bruix, J., Colle, I., Pinzani, M., & Bosch, J. (2009). Angiogenesis in liver disease. *Journal of Hepatology*, 50(3), 604–620. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2008.12.011>
- Ferrín, G., Guerrero, M., Amado, V., Rodríguez-Perálvarez, M., & De la Mata, M. (2020). Activation of mTOR Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4). <https://doi.org/10.3390/IJMS21041266>
- Finn, R. S., Qin, S., Ikeda, M., Galle, P. R., Ducreux, M., Kim, T.-Y., Kudo, M., Breder, V., Merle, P., Kaseb, A. O., Li, D., Verret, W., Xu, D.-Z., Hernandez, S., Liu, J., Huang, C., Mulla, S., Wang, Y., Lim, H. Y., ... Cheng, A.-L. (2020). Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 382(20), 1894–1905. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1915745>
- Finn, R. S., Ryoo, B. Y., Merle, P., Kudo, M., Bouattour, M., Lim, H. Y., Breder, V., Edeline, J., Chao, Y., Ogasawara, S., Yau, T., Garrido, M., Chan, S. L., Knox, J., Daniele, B., Ebbinghaus, S. W., Chen, E., Siegel, A. B., Zhu, A. X., & Cheng, A. L. (2020). Pembrolizumab As Second-Line Therapy in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma in KEYNOTE-240: A Randomized, Double-Blind, Phase III Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 38(3), 193–202. https://doi.org/10.1200/JCO.19.01307/SUPPL_FILE/PROTOCOL_JCO.19.01307.PDF

- Fortini, M. E. (2009). Notch Signaling: The Core Pathway and Its Posttranslational Regulation. *Developmental Cell*, 16(5), 633–647. https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2009.03.010/ASSET/98C0B3B0-6CC1-4EE5-A547-CAD9A267ADEC/MAIN.ASSETS/GR5_LRG.JPG
- Francou, A., & Anderson, K. V. (2020). The Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in Development and Cancer. *Annual Review of Cancer Biology*, 4, 197–220. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CANCERBIO-030518-055425>
- Friedenreich, C. M., Ryder-Burbidge, C., & McNeil, J. (2021). Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Molecular Oncology*, 15(3), 790–800. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12772>
- Fu, X., Liu, M., Qu, S., Ma, J., Zhang, Y., Shi, T., Wen, H., Yang, Y., Wang, S., Wang, J., Nan, K., Yao, Y., & Tian, T. (2018). Exosomal microRNA-32-5p induces multidrug resistance in hepatocellular carcinoma via the PI3K/Akt pathway. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 37(1). <https://doi.org/10.1186/S13046-018-0677-7>,
- Galle, P. R., Dufour, J. F., Peck-Radosavljevic, M., Trojan, J., & Vogel, A. (2021). Systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma. *Future Oncology (London, England)*, 17(10), 1237–1251. <https://doi.org/10.2217/FON-2020-0758>
- Galle, P. R., Forner, A., Llovet, J. M., Mazzaferro, V., Piscaglia, F., Raoul, J. L., Schirmacher, P., & Vilgrain, V. (2018). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 69(1), 182–236. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2018.03.019/ASSET/913108F6-6400-49B7-9959-4BB278483E4B/MAIN.ASSETS/GR1.JPG>
- Gao, R., Chen, R., Cao, Y., Wang, Y., Song, K., Zhang, Y., & Yang, J. (2017a). Emodin suppresses TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells through Notch signaling pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 318, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.12.009>
- Gao, R., Chen, R., Cao, Y., Wang, Y., Song, K., Zhang, Y., & Yang, J. (2017b). Emodin suppresses TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells through Notch signaling pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 318, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.12.009>
- Giordano, S., & Columbano, A. (2014). Met as a therapeutic target in HCC: Facts and hopes. *Journal of Hepatology*, 60(2), 442–452. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.09.009>
- Gonzalez, D. M., & Medici, D. (2014). Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science Signaling*, 7(344), re8. <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.2005189>
- Goossens, N., & Hoshida, Y. (2015). Hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Clinical and Molecular Hepatology*, 21(2), 105. <https://doi.org/10.3350/CMH.2015.21.2.105>
- Gouas, D., Shi, H., & Hainaut, P. (2009a). The aflatoxin-induced TP53 mutation at codon 249 (R249S): biomarker of exposure, early detection and target for therapy. *Cancer Letters*, 286(1), 29–37. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2009.02.057>
- Gouas, D., Shi, H., & Hainaut, P. (2009b). The aflatoxin-induced TP53 mutation at codon 249 (R249S): Biomarker of exposure, early detection and target for therapy. *Cancer Letters*, 286(1), 29–37. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2009.02.057>

- Gramantieri, L., Giovannini, C., Lanzi, A., Chieco, P., Ravaioli, M., Venturi, A., Grazi, G. L., & Bolondi, L. (2007). Aberrant Notch3 and Notch4 expression in human hepatocellular carcinoma. *Liver International*, 27(7), 997–1007. <https://doi.org/10.1111/J.1478-3231.2007.01544.X>,
- Greenburg, G., & Hay, E. D. (1982). Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *The Journal of Cell Biology*, 95(1), 333. <https://doi.org/10.1083/JCB.95.1.333>
- Gregory, R. I., Yan, K. P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432(7014), 235–240. <https://doi.org/10.1038/NATURE03120;KWRD=SCIENCE>
- Gu, J., Cui, C. fu, Yang, L., Wang, L., & Jiang, X. hua. (2019a). Emodin Inhibits Colon Cancer Cell Invasion and Migration by Suppressing Epithelial–Mesenchymal Transition via the Wnt/ β -Catenin Pathway. *Oncology Research*, 27(2), 193. <https://doi.org/10.3727/096504018X15150662230295>
- Gu, J., Cui, C. fu, Yang, L., Wang, L., & Jiang, X. hua. (2019b). Emodin Inhibits Colon Cancer Cell Invasion and Migration by Suppressing Epithelial–Mesenchymal Transition via the Wnt/ β -Catenin Pathway. *Oncology Research*, 27(2), 193–202. <https://doi.org/10.3727/096504018X15150662230295>
- Gui, Y., Khan, M. G. M., Bobbala, D., Dubois, C., Ramanathan, S., Saucier, C., & Ilangumaran, S. (2017). Attenuation of MET-mediated migration and invasion in hepatocellular carcinoma cells by SOCS1. *World Journal of Gastroenterology*, 23(36), 6639. <https://doi.org/10.3748/WJG.V23.I36.6639>
- Guo, H., Lu, Y., Wang, J., Liu, X., Keller, E. T., Liu, Q., Zhou, Q., & Zhang, J. (2014). Targeting the Notch signaling pathway in cancer therapeutics. *Thoracic Cancer*, 5(6), 473. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12143>
- Haensel, D., & Dai, X. (2017). Epithelial-to-mesenchymal transition in cutaneous wound healing: where we are and where we are heading. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 247(3), 473. <https://doi.org/10.1002/DVDY.24561>
- Hajarizadeh, B., Grebely, J., & Dore, G. J. (2013). Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 10(9), 553–562. <https://doi.org/10.1038/NRGASTRO.2013.107>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- He, L. F., Wang, C., Zhang, Y. F., Guo, C. C., Wan, Y., & Li, Y. X. (2022). Effect of Emodin on Hyperlipidemia and Hepatic Lipid Metabolism in Zebrafish Larvae Fed a High-Cholesterol Diet**. *Chemistry & Biodiversity*, 19(2), e202100675. <https://doi.org/10.1002/CBDV.202100675>
- He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S. W., Hannon, G. J., & Hammond, S. M. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 435(7043), 828–833. <https://doi.org/10.1038/NATURE03552;KWRD=SCIENCE>
- He, S., & Tang, S. (2020). WNT/ β -catenin signaling in the development of liver cancers. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 132, 110851. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2020.110851>
- Heffernan, A., Cooke, G. S., Nayagam, S., Thursz, M., & Hallett, T. B. (2019). Scaling up prevention and treatment towards the elimination of hepatitis C: a global

- mathematical model. *Lancet (London, England)*, 393(10178), 1319–1329. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32277-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32277-3)
- Heil, M., Eitenmüller, I., Schmitz-Rixen, T., & Schaper, W. (2006). Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(1), 45–55. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2006.TB00290.X>
- Heimbach, J. K., Kulik, L. M., Finn, R. S., Sirlin, C. B., Abecassis, M. M., Roberts, L. R., Zhu, A. X., Murad, M. H., & Marrero, J. A. (2018). AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 67(1), 358–380. <https://doi.org/10.1002/HEP.29086>
- Hep G2 [HEPG2] - HB-8065 | ATCC. (n.d.). Retrieved April 14, 2025, from <https://www.atcc.org/products/hb-8065>
- HepG2 Cells. (n.d.). Retrieved April 14, 2025, from <https://www.cytion.com/HepG2-Cells/300198>
- Herbst, R. S., Soria, J. C., Kowanetz, M., Fine, G. D., Hamid, O., Gordon, M. S., Sosman, J. A., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Gettinger, S. N., Kohrt, H. E. K., Horn, L., Lawrence, D. P., Rost, S., Leabman, M., Xiao, Y., Moktrin, A., Koeppen, H., Hegde, P. S., ... Hodi, F. S. (2014). Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*, 515(7528), 563–567. <https://doi.org/10.1038/NATURE14011>
- Hernández-Évole, H., Jiménez-Esquivel, N., Pose, E., & Bataller, R. (2024). Alcohol-associated liver disease: Epidemiology and management. *Annals of Hepatology*, 29(1). <https://doi.org/10.1016/J.AOHEP.2023.101162>
- Homayounfar, K., Schwarz, A., Enders, C., Cameron, S., Baumhoer, D., Ramadori, G., Lorf, T., Gunawan, B., & Sander, B. (2013). Etiologic influence on chromosomal aberrations in European hepatocellular carcinoma identified by CGH. *Pathology, Research and Practice*, 209(6), 380–387. <https://doi.org/10.1016/J.PRP.2013.04.004>
- Hong, S. K., Lee, K. W., Lee, S., Hong, S. young, Suh, S., Han, E. S., Choi, Y. R., Yi, N. J., & Suh, K. S. (2022). Impact of tumor size on hepatectomy outcomes in hepatocellular carcinoma: a nationwide propensity score matching analysis. *Annals of Surgical Treatment and Research*, 102(4), 193–204. <https://doi.org/10.4174/ASTR.2022.102.4.193>
- Hsu, H. C., Jeng, Y. M., Mao, T. L., Chu, J. S., Lai, P. L., & Peng, S. Y. (2000). β -Catenin Mutations Are Associated with a Subset of Low-Stage Hepatocellular Carcinoma Negative for Hepatitis B Virus and with Favorable Prognosis. *The American Journal of Pathology*, 157(3), 763. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64590-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64590-7)
- Hsu, I. C., Metcalf, R. A., Sun, T., Welsh, J. A., Wang, N. J., & Harris, C. C. (1991). Mutational hot spot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 1991 350:6317, 350(6317), 427–428. <https://doi.org/10.1038/350427a0>
- Hsu, S. C., & Chung, J. G. (2012). Anticancer potential of emodin. *BioMedicine*, 2(3), 108–116. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMED.2012.03.003>
- Hu, C., Dong, T., Li, R., Lu, J., Wei, X., & Liu, P. (2016a). Emodin inhibits epithelial to mesenchymal transition in epithelial ovarian cancer cells by regulation of GSK-3/-catenin/ZEB1 signaling pathway. *Oncology Reports*, 35(4), 2027–2034. <https://doi.org/10.3892/OR.2016.4591>,
- Hu, C., Dong, T., Li, R., Lu, J., Wei, X., & Liu, P. (2016b). Emodin inhibits epithelial to mesenchymal transition in epithelial ovarian cancer cells by regulation of

- GSK-3/-catenin/ZEB1 signaling pathway. *Oncology Reports*, 35(4), 2027–2034. <https://doi.org/10.3892/OR.2016.4591>
- Hu, L., Chen, W., Qian, A., & Li, Y. P. (2024). Wnt/ β -catenin signaling components and mechanisms in bone formation, homeostasis, and disease. *Bone Research*, 12(1), 39. <https://doi.org/10.1038/S41413-024-00342-8>
- Huang, C. F., Yeh, M. L., Huang, C. I., Lin, Y. J., Tsai, P. C., Lin, Z. Y., Chan, S. Y., Chen, S. C., Yang, H. I., Huang, J. F., Lu, S. N., Dai, C. Y., Jen, C. L., Yuan, Y., L'Italien, G., Wang, L. Y., Lee, M. H., Yu, M. L., Chuang, W. L., & Chen, C. J. (2017). Risk of hepatitis C virus related hepatocellular carcinoma between subjects with spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Oncotarget*, 8(27), 43925. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.14937>
- Huang, D. Q., Mathurin, P., Cortez-Pinto, H., & Loomba, R. (2023). Global epidemiology of alcohol-associated cirrhosis and HCC: trends, projections and risk factors. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 20(1), 37–49. <https://doi.org/10.1038/S41575-022-00688-6>
- Huang, Q., Li, J., Zheng, J., & Wei, A. (2019). The Carcinogenic Role of the Notch Signaling Pathway in the Development of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Cancer*, 10(6), 1570. <https://doi.org/10.7150/JCA.26847>
- Huang, Q., Lu, G., Shen, H. M., Chung, M. C. M., & Choon, N. O. (2007). Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb. *Medicinal Research Reviews*, 27(5), 609–630. <https://doi.org/10.1002/MED.20094>
- Huynh, H., Tuyen Nguyen, T. T., Pierce Chow, K. H., Tan, P. H., Soo, K. C., & Tran, E. (2003). Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterology*, 3. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-3-19>
- Iida-Ueno, A., Enomoto, M., Tamori, A., & Kawada, N. (2017). Hepatitis B virus infection and alcohol consumption. *World Journal of Gastroenterology*, 23(15), 2651. <https://doi.org/10.3748/WJG.V23.I15.2651>
- Inchingolo, R., Posa, A., Mariappan, M., & Spiliopoulos, S. (2019). Locoregional treatments for hepatocellular carcinoma: Current evidence and future directions. *World Journal of Gastroenterology*, 25(32), 4614–4628. <https://doi.org/10.3748/WJG.V25.I32.4614>
- Iorio, M. V., & Croce, C. M. (2012). microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis*, 33(6), 1126–1133. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGS140>
- Irshad, M., Gupta, P., & Irshad, K. (2017). Molecular basis of hepatocellular carcinoma induced by hepatitis C virus infection. *World Journal of Hepatology*, 9(36), 1305–1314. <https://doi.org/10.4254/WJH.V9.I36.1305>
- Ivanics, T., Murillo Perez, C. F., Claasen, M. P. A. W., Patel, M. S., Morgenshtern, G., Erdman, L., Shwaartz, C., Rajendran, L., O'Kane, G. M., Hansen, B. E., Cleary, S. P., & Sapisochin, G. (2022). Dynamic risk profiling of HCC recurrence after curative intent liver resection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 76(5), 1291–1301. <https://doi.org/10.1002/HEP.32411>
- Izhaki, I. (2002). Emodin – a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. *New Phytologist*, 155(2), 205–217. <https://doi.org/10.1046/J.1469-8137.2002.00459.X>
- Jain, D., Chaudhary, P., Varshney, N., Bin Razzak, K. S., Verma, D., Khan Zahra, T. R., Janmeda, P., Sharifi-Rad, J., Daştan, S. D., Mahmud, S., Docea, A. O., & Calina, D. (2021). Tobacco Smoking and Liver Cancer Risk: Potential Avenues

- for Carcinogenesis. *Journal of Oncology*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5905357>
- Janevska, D., Chaloska-Ivanova, V., & Janevski, V. (2015). Hepatocellular Carcinoma: Risk Factors, Diagnosis and Treatment. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 3(4), 732–736. <https://doi.org/10.3889/OAMJMS.2015.111>
- Jelassi, B., Anchelin, M., Chamouton, J., Cayuela, M. L., Clarysse, L., Li, J., Goré, J., Jiang, L. H., & Roger, S. (2013). Anthraquinone emodin inhibits human cancer cell invasiveness by antagonizing P2X7 receptors. *Carcinogenesis*, 34(7), 1487–1496. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGT099>,
- Jia, L., Gao, Y., He, Y., Hooper, J. D., & Yang, P. (2020). HBV induced hepatocellular carcinoma and related potential immunotherapy. *Pharmacological Research*, 159. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2020.104992>
- Jiang, L. L., Jiang, Y., Zhao, D. S., Fan, Y. X., Yu, Q., Li, P., & Li, H. J. (2018). CYP3A Activation and Glutathione Depletion Aggravate Emodin-Induced Liver Injury. *Chemical Research in Toxicology*, 31(10), 1052–1060. https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMRESTOX.8B00117/SUPPL_FILE/TX8B00117_SI_001.PDF
- Johannesburg, W., & Kew, M. C. (2013). Aflatoxins as a Cause of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 22(3), 305–310. <https://www.jgld.ro/jgld/index.php/jgld/article/view/2013.3.13>
- Jou, J., & Diehl, A. M. (2010). Epithelial-mesenchymal transitions and hepatocarcinogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 1031–1034. <https://doi.org/10.1172/JCI42615>
- Kallini, J. R., Gabr, A., Salem, R., & Lewandowski, R. J. (2016). Transarterial Radioembolization with Yttrium-90 for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Advances in Therapy*, 33(5), 699–714. <https://doi.org/10.1007/S12325-016-0324-7>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Kan, Z., Zheng, H., Liu, X., Li, S., Barber, T. D., Gong, Z., Gao, H., Hao, K., Willard, M. D., Xu, J., Hauptschein, R., Rejto, P. A., Fernandez, J., Wang, G., Zhang, Q., Wang, B., Chen, R., Wang, J., Lee, N. P., ... Mao, M. (2013). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma. *Genome Research*, 23(9), 1422–1433. <https://doi.org/10.1101/GR.154492.113>
- Kasprzak, A., Rogacki, K., Adamek, A., Sterzynska, K., Przybyszewska, W., Seraszek-Jaros, A., Helak-Lapaj, C., & Pyda, P. (2017). Tissue expression of β -catenin and E- and N-cadherins in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Archives of Medical Science*, 13(6), 1269–1280. <https://doi.org/10.5114/AOMS.2017.65272>,
- Kastenhuber, E. R., & Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell*, 170(6), 1062–1078. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.08.028>
- Kelley, R. K., Verslype, C., Cohn, A. L., Yang, T. S., Su, W. C., Burris, H., Braiteh, F., Vogelzang, N., Spira, A., Foster, P., Lee, Y., & Van Cutsem, E. (2017). Cabozantinib in hepatocellular carcinoma: results of a phase 2 placebo-controlled randomized discontinuation study. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(3), 528–534. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDW651>

- Kew, M. (2014). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and risk factors. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, 1, 115. <https://doi.org/10.2147/JHC.S44381>
- Kew, M. C. (2010). Interaction between aflatoxin B1 and other risk factors in hepatocarcinogenesis. *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*, 93–111. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00725-5_7
- Kew, M. C., & Kew, M. C. (2003). Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. *Liver International*, 23(6), 405–409. <https://doi.org/10.1111/J.1478-3231.2003.00869.X>
- Khalaf, A. M., Fuentes, D., Morshid, A. I., Burke, M. R., Kaseb, A. O., Hassan, M., Hazle, J. D., & Elsayes, K. M. (2018a). Role of Wnt/β-catenin signaling in hepatocellular carcinoma, pathogenesis, and clinical significance. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, Volume 5, 61–73. <https://doi.org/10.2147/JHC.S156701>
- Khalaf, A. M., Fuentes, D., Morshid, A. I., Burke, M. R., Kaseb, A. O., Hassan, M., Hazle, J. D., & Elsayes, K. M. (2018b). Role of Wnt/β-catenin signaling in hepatocellular carcinoma, pathogenesis, and clinical significance. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, 5, 61. <https://doi.org/10.2147/JHC.S156701>
- Khalaf, N., Ying, J., Mittal, S., Temple, S., Kanwal, F., Davila, J., & El-Serag, H. B. (2017). Natural History of Untreated Hepatocellular Carcinoma in a US Cohort and the Role of Cancer Surveillance. *Clinical Gastroenterology and Hepatology : The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 15(2), 273–281.e1. <https://doi.org/10.1016/J.CGH.2016.07.033>
- Khan, H., Jia, W., Yu, Z., Zaib, T., Feng, J., Jiang, Y., Song, H., Bai, Y., Yang, B., & Feng, H. (2020). Emodin succinyl ester inhibits malignant proliferation and migration of hepatocellular carcinoma by suppressing the interaction of AR and EZH2. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 128. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2020.110244>,
- Kim, D. H., Xing, T., Yang, Z., Dudek, R., Lu, Q., & Chen, Y. H. (2017). Epithelial Mesenchymal Transition in Embryonic Development, Tissue Repair and Cancer: A Comprehensive Overview. *Journal of Clinical Medicine* 2018, Vol. 7, Page 1, 7(1), 1. <https://doi.org/10.3390/JCM7010001>
- Kim, G.-A., Shim, J. H., Kim, M.-J., Kim, S. Y., Won, H. J., Shin, Y. M., Kim, P. N., Kim, K.-H., Lee, S.-G., & Lee, H. C. (2016). Radiofrequency ablation as an alternative to hepatic resection for single small hepatocellular carcinomas. *The British Journal of Surgery*, 103(1), 126–135. <https://doi.org/10.1002/bjs.9960>
- Kim, Y. J., Yoo, J. E., Jeon, Y., Chong, J. U., Choi, G. H., Song, D. G., Jung, S. H., Oh, B. K., & Park, Y. N. (2018). Suppression of PROX1-mediated TERT expression in hepatitis B viral hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer*, 143(12), 3155–3168. <https://doi.org/10.1002/IJC.31731>
- Kinsey, E., & Lee, H. M. (2024). Management of Hepatocellular Carcinoma in 2024: The Multidisciplinary Paradigm in an Evolving Treatment Landscape. *Cancers*, 16(3). <https://doi.org/10.3390/CANCERS16030666>
- Konstantinou, D., & Deutsch, M. (2015). The spectrum of HBV/HCV coinfection: epidemiology, clinical characteristics, viral interactions and management. *Annals of Gastroenterology: Quarterly Publication of the Hellenic Society of Gastroenterology*, 28(2), 221. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4367211/>
- Koralov, S. B., Muljo, S. A., Galler, G. R., Krek, A., Chakraborty, T., Kanellopoulou, C., Jensen, K., Cobb, B. S., Merckenschlager, M., Rajewsky, N., & Rajewsky, K. (2008). Dicer Ablation Affects Antibody Diversity and Cell Survival in the B

- Lymphocyte Lineage. *Cell*, 132(5), 860–874. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.020>
- Kovall, R. A., Gebelein, B., Sprinzak, D., & Kopan, R. (2017). The Canonical Notch Signaling Pathway: Structural and Biochemical Insights into Shape, Sugar, and Force. *Developmental Cell*, 41(3), 228–241. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2017.04.001>
- Kudo, M. (2011). Signaling pathway and molecular-targeted therapy for hepatocellular carcinoma. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 29(3), 289–302. <https://doi.org/10.1159/000327562>
- Kudo, M. (2019). Targeted and immune therapies for hepatocellular carcinoma: Predictions for 2019 and beyond. *World Journal of Gastroenterology*, 25(7), 789–807. <https://doi.org/10.3748/WJG.V25.I7.789>
- Kudo, M., Finn, R. S., Qin, S., Han, K. H., Ikeda, K., Piscaglia, F., Baron, A., Park, J. W., Han, G., Jassem, J., Blanc, J. F., Vogel, A., Komov, D., Evans, T. R. J., Lopez, C., Dutcus, C., Guo, M., Saito, K., Kraljevic, S., ... Cheng, A. L. (2018). Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet (London, England)*, 391(10126), 1163–1173. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30207-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30207-1)
- Kumar, M. S., Erkeland, S. J., Pester, R. E., Chen, C. Y., Ebert, M. S., Sharp, P. A., & Jacks, T. (2008). Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10), 3903–3908. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0712321105>
- Kumar, P., Luo, Y., Tudela, C., Alexander, J. M., & Mendelson, C. R. (2013). The c-Myc-Regulated MicroRNA-17~92 (miR-17~92) and miR-106a~363 Clusters Target hCYP19A1 and hGCM1 To Inhibit Human Trophoblast Differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 33(9), 1782–1796. <https://doi.org/10.1128/MCB.01228-12>
- Kunanopparat, A., Issara-Amphorn, J., Leelahavanichkul, A., Sanpavat, A., Patumraj, S., Tangkijvanich, P., Palaga, T., & Hirankarn, N. (2018). Delta-like ligand 4 in hepatocellular carcinoma intrinsically promotes tumour growth and suppresses hepatitis B virus replication. *World Journal of Gastroenterology*, 24(34), 3861. <https://doi.org/10.3748/WJG.V24.I34.3861>
- Kwak, P. B., & Tomari, Y. (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nature Structural and Molecular Biology*, 19(2), 145–151. <https://doi.org/10.1038/NSMB.2232;SUBJMETA=2272,337,45,505,535,57,631;KWRD=MOLECULAR+BIOPHYSICS,RNAL,STRUCTURAL+BIOLOGY>
- LaFoya, B., Munroe, J. A., Mia, M. M., Detweiler, M. A., Crow, J. J., Wood, T., Roth, S., Sharma, B., & Albig, A. R. (2016). Notch: A multi-functional integrating system of microenvironmental signals. *Developmental Biology*, 418(2), 227–241. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2016.08.023>
- Lai, E. C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nature Genetics*, 30(4), 363–364. <https://doi.org/10.1038/NG865;KWRD=BIOMEDICINE>
- Lampimukhi, M., Qassim, T., Venu, R., Pakhala, N., Mylavarapu, S., Perera, T., Sathar, B. S., & Nair, A. (2023). A Review of Incidence and Related Risk Factors in the Development of Hepatocellular Carcinoma. *Cureus*, 15(11), e49429. <https://doi.org/10.7759/CUREUS.49429>

- Lee, H. M., Alder, L., Nguyen, M., Dougherty, S. C., Qu, Y., Thacker, L. R., & Poklepovic, A. (2023). Long-term outcome analysis of Y90 radioembolization in hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 14(3), 1378–1391. <https://doi.org/10.21037/JGO-22-882>
- Lee, M., Ko, H., & Yun, M. (2018). Cancer Metabolism as a Mechanism of Treatment Resistance and Potential Therapeutic Target in Hepatocellular Carcinoma. *Yonsei Medical Journal*, 59(10), 1143. <https://doi.org/10.3349/YMJ.2018.59.10.1143>
- Lee, T. K., Poon, R. T. P., Yuen, A. P., Ling, M. T., Kwok, W. K., Wang, X. H., Wong, Y. C., Guan, X., Man, K., Chau, K. L., & Fan, S. T. (2006). Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clinical Cancer Research*, 12(18), 5369–5376. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2722>,
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415–419. <https://doi.org/10.1038/NATURE01957;KWRD=SCIENCE>
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO Journal*, 23(20), 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7600385>,
- Lencioni, R., de Baere, T., Soulen, M. C., Rilling, W. S., & Geschwind, J. F. H. (2016). Lipiodol transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: A systematic review of efficacy and safety data. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 64(1), 106–116. <https://doi.org/10.1002/HEP.28453>
- Lennox, K. A., & Behlke, M. A. (2011). Chemical modification and design of anti-miRNA oligonucleotides. *Gene Therapy*, 18(12), 1111–1120. <https://doi.org/10.1038/GT.2011.100;SUBJMETA=1511,1647,331,337,384,631;KWRD=GENETIC+ENGINEERING,MIRNAS>
- Leong, K. G., & Karsan, A. (2006). Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood*, 107(6), 2223–2233. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2005-08-3329>,
- Levine, A. J., & Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature Reviews. Cancer*, 9(10), 749–758. <https://doi.org/10.1038/NRC2723>
- Leverro, M., & Zucman-Rossi, J. (2016). Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 64(1 Suppl), S84–S101. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2016.02.021>
- Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Burge, C. B. (2003). Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*, 115(7), 787–798. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01018-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01018-3)
- Li, K. C., Chang, Y. H., Yeh, C. L., & Hu, Y. C. (2016). Healing of osteoporotic bone defects by baculovirus-engineered bone marrow-derived MSCs expressing MicroRNA sponges. *Biomaterials*, 74, 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.09.046>
- Li, N., Wang, C., Zhang, P., & You, S. (2018). Emodin inhibits pancreatic cancer EMT and invasion by up-regulating microRNA-1271. *Molecular Medicine Reports*, 18(3), 3366–3374. <https://doi.org/10.3892/MMR.2018.9304/ABSTRACT>
- Li, Q., Cao, M., Lei, L., Yang, F., Li, H., Yan, X., He, S., Zhang, S., Teng, Y., Xia, C., & Chen, W. (2022). Burden of liver cancer: From epidemiology to prevention. *Chinese Journal of Cancer Research = Chung-Kuo Yen Cheng Yen Chiu*, 34(6), 554–566. <https://doi.org/10.21147/J.ISSN.1000-9604.2022.06.02>

- Li, Q., Ding, C., Cao, M., Yang, F., Yan, X., He, S., Cao, M., Zhang, S., Teng, Y., Tan, N., Wang, J., Xia, C., & Chen, W. (2024). Global epidemiology of liver cancer 2022: An emphasis on geographic disparities. *Chinese Medical Journal*, 137. <https://doi.org/10.1097/CM9.00000000000003264/ASSET/9BBF6956-4CBA-4F2F-80F2-F08DAB78462A/ASSETS/GRAPHIC/0366-6999-137-19-006-F004.PNG>
- Li, Y., Luan, Y., Qi, X., Li, M., Gong, L., Xue, X., Wu, X., Wu, Y., Chen, M., Xing, G., Yao, J., & Ren, J. (2010). Emodin triggers DNA double-strand breaks by stabilizing topoisomerase II-DNA cleavage complexes and by inhibiting ATP hydrolysis of topoisomerase II. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 118(2), 435–443. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFQ282>
- Li, Z., Zhang, Z., Fang, L., Zhao, J., Niu, Z., Chen, H., & Cao, G. (2023). Tumor Microenvironment Composition and Related Therapy in Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, 10, 2083–2099. <https://doi.org/10.2147/JHC.S436962>
- Liang, X., Xia, Z., Yan, J., Wang, Y., Xue, S., & Zhang, X. (2015). Emodin inhibits human sperm functions by reducing sperm $[Ca^{2+}]_i$ and tyrosine phosphorylation. *Reproductive Toxicology*, 51(6), 14–21. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2014.11.007>
- Liao, X., Bu, Y., & Jia, Q. (2020). Traditional Chinese medicine as supportive care for the management of liver cancer: Past, present, and future. *Genes and Diseases*, 7(3), 370–379. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.10.016>
- Licciulli, S., Avila, J. L., Hanlon, L., Troutman, S., Cesaroni, M., Kota, S., Keith, B., Simon, M. C., Puré, E., Radtke, F., Capobianco, A. J., & Kissil, J. L. (2013). Notch1 is required for Kras-induced lung adenocarcinoma and controls tumor cell survival via p53. *Cancer Research*, 73(19), 5974–5984. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1384>
- Lin, W., Zhao, J., Cao, Z., Zhuang, Q., Zheng, L., Zeng, J., Hong, Z., & Peng, J. (2014). *Livistona chinensis* seeds inhibit hepatocellular carcinoma angiogenesis in vivo via suppression of the Notch pathway. *Oncology Reports*, 31(4), 1723–1728. <https://doi.org/10.3892/OR.2014.3051>
- Lin, W., Zhong, M., Liang, S., Chen, Y., Liu, D., Yin, Z., Cao, Q., Wang, C., & Ling, C. (2016). Emodin inhibits migration and invasion of MHCC-97h human hepatocellular carcinoma cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(5), 3369–3374. <https://doi.org/10.3892/ETM.2016.3793>
- Ling Khoo, T. S. W., Rehman, A., & Olynyk, J. K. (2019a). Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatocellular Carcinoma*, 127–139. <https://doi.org/10.15586/HEPATOCELLULARCARCINOMA.2019.CH7>
- Ling Khoo, T. S. W., Rehman, A., & Olynyk, J. K. (2019b). Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatocellular Carcinoma*, 127–139. <https://doi.org/10.15586/HEPATOCELLULARCARCINOMA.2019.CH7>
- Link, T., & Iwakuma, T. (2017). Roles of p53 in extrinsic factor-induced liver carcinogenesis. *Hepatoma Research*, 3(6), 95. <https://doi.org/10.20517/2394-5079.2017.07>
- Liu, A., Chen, H., Wei, W., Ye, S., Liao, W., Gong, J., Jiang, Z., Wang, L., & Lin, S. (2011). Antiproliferative and antimetastatic effects of emodin on human pancreatic cancer. *Oncology Reports*, 26(1), 81–89. <https://doi.org/10.3892/OR.2011.1257>

- Liu, H., Mei, F. C., Yang, W., Wang, H., Wong, E., Cai, J., Toth, E., Luo, P., Li, Y. M., Zhang, W., & Cheng, X. (2020). Epc1 inhibition ameliorates pathological angiogenesis through coordinated activation of Notch and suppression of VEGF signaling. *Science Advances*, 6(1). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAY3566>
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J., & Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature Cell Biology*, 7(7), 719. <https://doi.org/10.1038/NCB1274>
- Liu, K., & McCaughan, G. W. (2018). Epidemiology and etiologic associations of non-alcoholic fatty liver disease and associated HCC. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1061, 3–18. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8684-7_2
- Liu, L., Cao, Y., Chen, C., Zhang, X., McNabola, A., Wilkie, D., Wilhelm, S., Lynch, M., & Carter, C. (2006). Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Research*, 66(24), 11851–11858. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1377>
- Liu, M., Jiang, L., & Guan, X. Y. (2014). The genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma: a recent update. *Protein & Cell*, 5(9), 673–691. <https://doi.org/10.1007/S13238-014-0065-9>
- Liu, P. H., Hsu, C. Y., Hsia, C. Y., Lee, Y. H., Su, C. W., Huang, Y. H., Lee, F. Y., Lin, H. C., & Huo, T. I. (2016). Prognosis of hepatocellular carcinoma: Assessment of eleven staging systems. *Journal of Hepatology*, 64(3), 601–608. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2015.10.029>
- Liu, Q., Hodge, J., Wang, J., Wang, Y., Wang, L., Singh, U., Li, Y., Yao, Y., Wang, D., Ai, W., Nagarkatti, P., Chen, H., Xu, P., Angela Murphy, E., & Fan, D. (2020). Emodin reduces breast cancer lung metastasis by suppressing macrophage-induced breast cancer cell epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell formation. *Theranostics*, 10(18), 8365–8381. <https://doi.org/10.7150/THNO.45395>
- Liu, Y., Han, Y., Zhang, H., Nie, L., Jiang, Z., Fa, P., Gui, Y., & Cai, Z. (2012). Synthetic miRNA-Mowers Targeting miR-183-96-182 Cluster or miR-210 Inhibit Growth and Migration and Induce Apoptosis in Bladder Cancer Cells. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0052280>
- Liu, Y., Li, M., Teh, L. K., Zhao, L., Ye, N., Wu, L., & Wu, L. (2022). Emodin-Mediated Treatment of Acute Kidney Injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/5699615>
- Liu, Y., Sun, M., Yao, H., Liu, Y., & Gao, R. (2017). Herbal Medicine for the Treatment of Obesity: An Overview of Scientific Evidence from 2007 to 2017. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8943059>
- Llovet, J. M., Kelley, R. K., Villanueva, A., Singal, A. G., Pikarsky, E., Roayaie, S., Lencioni, R., Koike, K., Zucman-Rossi, J., & Finn, R. S. (2021). Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers* 2021 7:1, 7(1), 1–28. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3>
- Llovet, J. M., Montal, R., Sia, D., & Finn, R. S. (2018). Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 15(10), 599–616. <https://doi.org/10.1038/S41571-018-0073-4>
- Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J.-F., de Oliveira, A. C., Santoro, A., Raoul, J.-L., Forner, A., Schwartz, M., Porta, C., Zeuzem, S., Bolondi, L., Greten, T. F., Galle, P. R., Seitz, J.-F., Borbath, I., Häussinger, D.,

- ... Bruix, J. (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 359(4), 378–390. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA0708857>
- Llovet, J. M., Zucman-Rossi, J., Pikarsky, E., Sangro, B., Schwartz, M., Sherman, M., & Gores, G. (2016). Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews. Disease Primers*, 2. <https://doi.org/10.1038/NRDP.2016.18>
- López-Diéguez, M., Montes, M. L., Pascual-Pareja, J. F., Quereda, C., Von Wichmann, M. A., Berenguer, J., Tural, C., Hernando, A., González-García, J., Serrano, L., & Arribas, J. R. (2011). The natural history of liver cirrhosis in HIV-hepatitis C virus-coinfected patients. *AIDS*, 25(7), 899–904. <https://doi.org/10.1097/QAD.0B013E3283454174>
- Lu, J., Xu, Y., Wei, X., Zhao, Z., Xue, J., & Liu, P. (2016). Emodin Inhibits the Epithelial to Mesenchymal Transition of Epithelial Ovarian Cancer Cells via ILK/GSK-3 β /Slug Signaling Pathway. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6253280>,
- Lu, W., Jin, X. L., Yang, C., Du, P., Jiang, F. Q., Ma, J. P., Yang, J., Xie, P., & Zhang, Z. (2017). Comparison of efficacy between TACE combined with apatinib and TACE alone in the treatment of intermediate and advanced hepatocellular carcinoma: A single-center randomized controlled trial. *Cancer Biology & Therapy*, 18(6), 433–438. <https://doi.org/10.1080/15384047.2017.1323589>
- Lu, W., & Kang, Y. (2019). Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. *Developmental Cell*, 49(3), 361–374. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2019.04.010>
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science*, 303(5654), 95–98. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1090599>,
- Lundin, K. E., Højland, T., Hansen, B. R., Persson, R., Bramsen, J. B., Kjems, J., Koch, T., Wengel, J., & Smith, C. I. E. (2013). Biological Activity and Biotechnological Aspects of Locked Nucleic Acids. *Advances in Genetics*, 82, 47–107. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407676-1.00002-0>
- Luo, Z., Shang, X., Zhang, H., Wang, G., Massey, P. A., Barton, S. R., Kevil, C. G., & Dong, Y. (2019). Notch Signaling in Osteogenesis, Osteoclastogenesis, and Angiogenesis. *The American Journal of Pathology*, 189(8), 1495–1500. <https://doi.org/10.1016/J.AJP.2019.05.005>
- Ma, L., Chen, K., Jiang, K., Deng, G., Jiang, P., Shao, J., & Yu, Z. (2017). Emodin inhibits the proliferation and invasion of bladder cancer cells via down-regulating Notch1. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*.
- Mackowiak, B., Fu, Y., Maccioni, L., & Gao, B. (2024). Alcohol-associated liver disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 134(3). <https://doi.org/10.1172/JCI176345>
- Mann, D. A. (2014). Epigenetics in liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 60(4), 1418–1425. <https://doi.org/10.1002/HEP.27131>
- Marcucci, F., Rumio, C., & Corti, A. (2017). Tumor cell-associated immune checkpoint molecules – Drivers of malignancy and stemness. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1868(2), 571–583. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2017.10.006>
- Marrero, J. A., Kulik, L. M., Sirlin, C. B., Zhu, A. X., Finn, R. S., Abecassis, M. M., Roberts, L. R., & Heimbach, J. K. (2018). Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American

- Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 68(2), 723–750. <https://doi.org/10.1002/HEP.29913>
- Massarweh, N. N., & El-Serag, H. B. (2017). Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Cancer Control : Journal of the Moffitt Cancer Center*, 24(3). <https://doi.org/10.1177/1073274817729245>
- Matsui, J., Funahashi, Y., Uenaka, T., Watanabe, T., Tsuruoka, A., & Asada, M. (2008). Multi-kinase inhibitor E7080 suppresses lymph node and lung metastases of human mammary breast tumor MDA-MB-231 via inhibition of vascular endothelial growth factor-receptor (VEGF-R) 2 and VEGF-R3 kinase. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(17), 5459–5465. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5270>
- Matsuki, M., Hoshi, T., Yamamoto, Y., Ikemori-Kawada, M., Minoshima, Y., Funahashi, Y., & Matsui, J. (2018). Lenvatinib inhibits angiogenesis and tumor fibroblast growth factor signaling pathways in human hepatocellular carcinoma models. *Cancer Medicine*, 7(6), 2641–2653. <https://doi.org/10.1002/CAM4.1517>
- Maurice, J., & Manousou, P. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical Medicine (London, England)*, 18(3), 245–250. <https://doi.org/10.7861/CLINMEDICINE.18-3-245>
- Mayr, C., Hemann, M. T., & Bartel, D. P. (2007). Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science*, 315(5818), 1576–1579. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1137999>
- Mazzaferro, V., Regalia, E., Doci, R., Andreola, S., Pulvirenti, A., Bozzetti, F., Montalto, F., Ammatuna, M., Morabito, A., & Gennari, L. (1996). Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *The New England Journal of Medicine*, 334(11), 693–700. <https://doi.org/10.1056/NEJM199603143341104>
- Mehta, N., Frenette, C., Tabrizian, P., Hoteit, M., Guy, J., Parikh, N., Ghaziani, T. T., Dhanasekaran, R., Dodge, J. L., Natarajan, B., Holzner, M. L., Frankul, L., Chan, W., Fobar, A., Florman, S., & Yao, F. Y. (2021). Downstaging Outcomes for Hepatocellular Carcinoma: Results From the Multicenter Evaluation of Reduction in Tumor Size before Liver Transplantation (MERITS-LT) Consortium. *Gastroenterology*, 161(5), 1502–1512. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2021.07.033>
- Méndez-Sánchez, N., Vásquez-Fernández, F., Zamora-Valdés, D., & Uribe, M. (2008). Sorafenib, a systemic therapy for hepatocellular carcinoma. *Annals of Hepatology*, 7(1), 46–51. [https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)31886-1](https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31886-1)
- Menon, A., Abd-Aziz, N., Khalid, K., Poh, C. L., & Naidu, R. (2022). miRNA: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19). <https://doi.org/10.3390/IJMS231911502>
- Minter, L. M., & Osborne, B. A. (2012). *Canonical and Non-Canonical Notch Signaling in CD4+ T Cells*. 99–114. https://doi.org/10.1007/82_2012_233
- Mishima, M., Takai, A., Takeda, H., Iguchi, E., Nakano, S., Fujii, Y., Ueno, M., Ito, T., Teramura, M., Eso, Y., Shimizu, T., Maruno, T., Hidema, S., Nishimori, K., Marusawa, H., Hatano, E., & Seno, H. (2024). TERT upregulation promotes cell proliferation via degradation of p21 and increases carcinogenic potential. *The Journal of Pathology*, 264(3), 318–331. <https://doi.org/10.1002/PATH.6351>
- Mody, K., & Abou-Alfa, G. K. (2019). Systemic Therapy for Advanced Hepatocellular Carcinoma in an Evolving Landscape. *Current Treatment Options in Oncology*, 20(2). <https://doi.org/10.1007/S11864-019-0601-1>

- Monga, S. P. (2015). β -Catenin Signaling and Roles in Liver Homeostasis, Injury, and Tumorigenesis. *Gastroenterology*, 148(7), 1294–1310. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2015.02.056>
- Moon, H., & Ro, S. W. (2021). Ras Mitogen-activated Protein Kinase Signaling and Kinase Suppressor of Ras as Therapeutic Targets for Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Liver Cancer*, 21(1). <https://doi.org/10.17998/JLC.21.1.1>
- Morse, M. A., Sun, W., Kim, R., He, A. R., Abada, P. B., Mynderse, M., & Finn, R. S. (2019). The Role of Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 25(3), 912–920. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1254>
- Moustakas, A., & Heldin, C. H. (2007). Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Science*, 98(10), 1512–1520. <https://doi.org/10.1111/J.1349-7006.2007.00550.X>
- Müller, M., Bird, T. G., & Nault, J. C. (2020). The landscape of gene mutations in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 72(5), 990–1002. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2020.01.019>
- Muto, J., Shirabe, K., Sugimachi, K., & Maehara, Y. (2015). Review of angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research*, 45(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/HEPR.12310>
- Nahon, P., Bamba-Funck, J., Layese, R., Trépo, E., Zucman-Rossi, J., Cagnot, C., Ganne-Carrié, N., Chaffaut, C., Guyot, E., Ziol, M., Sutton, A., Audureau, E., Asselah, T., Guyader, D., Pol, S., Fontaine, H., Pageaux, G. P., De Lédinghen, V., Ouzan, D., ... Chevret, S. (2023). Integrating genetic variants into clinical models for hepatocellular carcinoma risk stratification in cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 78(3), 584–595. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2022.11.003>
- Naito, H., Iba, T., & Takakura, N. (2021). Mechanisms of new blood-vessel formation and proliferative heterogeneity of endothelial cells. *International Immunology*, 32(5), 295–305. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/DXAA008>
- Nakagawa, H., Hayata, Y., Kawamura, S., Yamada, T., Fujiwara, N., & Koike, K. (2018). Lipid Metabolic Reprogramming in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/CANCERS10110447>
- Nault, J. C., Couchy, G., Balabaud, C., Morcrette, G., Caruso, S., Blanc, J. F., Bacq, Y., Calderaro, J., Paradis, V., Ramos, J., Scoazec, J. Y., Gnemmi, V., Sturm, N., Guettier, C., Fabre, M., Savier, E., Chiche, L., Labrune, P., Selves, J., ... Zucman-Rossi, J. (2017). Molecular Classification of Hepatocellular Adenoma Associates With Risk Factors, Bleeding, and Malignant Transformation. *Gastroenterology*, 152(4), 880-894.e6. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2016.11.042>
- Nault, J. C., Mallet, M., Pilati, C., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Laurent, C., Laurent, A., Cherqui, D., Balabaud, C., & Rossi, J. Z. (2013). High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nature Communications*, 4, 2218. <https://doi.org/10.1038/ncomms3218>
- Neuveut, C., Wei, Y., & Buendia, M. A. (2010). Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. *Journal of Hepatology*, 52(4), 594–604. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2009.10.033>
- Ng, K. K. C., Chok, K. S. H., Chan, A. C. Y., Cheung, T. T., Wong, T. C. L., Fung, J. Y. Y., Yuen, J., Poon, R. T. P., Fan, S. T., & Lo, C. M. (2017). Randomized clinical trial of hepatic resection versus radiofrequency ablation for early-stage hepatocellular carcinoma. *The British Journal of Surgery*, 104(13), 1775–1784. <https://doi.org/10.1002/BJS.10677>

- Nijjar, S. S., Wallace, L., Crosby, H. A., Hubscher, S. G., & Strain, A. J. (2002). Altered Notch ligand expression in human liver disease: further evidence for a role of the Notch signaling pathway in hepatic neovascularization and biliary ductular defects. *The American Journal of Pathology*, 160(5), 1695–1703. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61116-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61116-9)
- Nishida, N., Kudo, M., Nishimura, T., Arizumi, T., Takita, M., Kitai, S., Yada, N., Hagiwara, S., Inoue, T., Minami, Y., Ueshima, K., Sakurai, T., Yokomichi, N., Nagasaka, T., & Goel, A. (2013). Unique association between global DNA hypomethylation and chromosomal alterations in human hepatocellular carcinoma. *PloS One*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0072312>
- Niu, Z. S., Niu, X. J., & Wang, W. H. (2016). Genetic alterations in hepatocellular carcinoma: An update. *World Journal of Gastroenterology*, 22(41), 9069. <https://doi.org/10.3748/WJG.V22.I41.9069>
- Nowell, C. S., & Radtke, F. (2017). Notch as a tumour suppressor. *Nature Reviews. Cancer*, 17(3), 145–159. <https://doi.org/10.1038/NRC.2016.145>
- Ogunwobi, O. O., Wang, T., Zhang, L., & Liu, C. (2012). COX-2 and Akt mediate multiple growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 27(3), 566. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1746.2011.06980.X>
- Okada, C., Yamashita, E., Lee, S. J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y., & Tsukihara, T. (2009). A high-Resolution structure of the pre-miRNA nuclear export machinery. *Science*, 326(5957), 1275–1279. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1178705/SUPPL_FILE/OKADA.SOM.PDF
- O’Leary, C., Mahler, M., & Soulen, M. C. (2021). Liver-directed therapy for hepatocellular carcinoma. *Chinese Clinical Oncology*, 10(1). <https://doi.org/10.21037/CCO-20-51>
- Omata, M., Cheng, A. L., Kokudo, N., Kudo, M., Lee, J. M., Jia, J., Tateishi, R., Han, K. H., Chawla, Y. K., Shiina, S., Jafri, W., Payawal, D. A., Ohki, T., Ogasawara, S., Chen, P. J., Lesmana, C. R. A., Lesmana, L. A., Gani, R. A., Obi, S., ... Sarin, S. K. (2017). Asia-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatocellular carcinoma: a 2017 update. *Hepatology International*, 11(4), 317–370. <https://doi.org/10.1007/S12072-017-9799-9>
- Oon, C. E., Bridges, E., Sheldon, H., Sainson, R. C. A., Jubb, A., Turley, H., Leek, R., Buffa, F., Harris, A. L., & Li, J. L. (2017). Role of Delta-like 4 in Jagged1-induced tumour angiogenesis and tumour growth. *Oncotarget*, 8(25), 40115–40131. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.16969>
- Patil, M. R., & Bihari, A. (2022). A comprehensive study of p53 protein. *Journal of Cellular Biochemistry*, 123(12), 1891–1937. <https://doi.org/10.1002/JCB.30331> (PDF) *Cancer: From Theory to Practice –Ideology of Etiology and Treatment*. (n.d.). Retrieved March 6, 2025, from https://www.researchgate.net/publication/326893702_Cancer_From_Theory_to_Practice_Ideology_of_Etiology_and_Treatment
- (PDF) *Cancer is a group of diseases characterized by the uncontrolled growth and spread of abnormal cells in the body*. (n.d.). Retrieved March 6, 2025, from https://www.researchgate.net/publication/369416068_Cancer_is_a_group_of_diseases_characterized_by_the_uncontrolled_growth_and_spread_of_abnormal_cells_in_the_body
- Pembrolizumab (Keytruda): Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma | FDA*. (n.d.). Retrieved April 21, 2025, from <https://www.fda.gov/drugs/resources->

information-approved-drugs/pembrolizumab-keytruda-advanced-or-metastatic-urothelial-carcinoma

- Peng, W., Qin, R., Li, X., & Zhou, H. (2013). Botany, phytochemistry, pharmacology, and potential application of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(3), 729–745. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2013.05.007>
- Perecman, A., Wiggins, A., Xu, J., Das, S., Kalantzakos, T., Sullivan, T., & Rieger-Christ, K. (2022). The Role of MicroRNA in the Metastatic Phenotype of Bladder Cancer. *Urologic Cancers*, 29–43. <https://doi.org/10.36255/EXON-PUBLICATIONS-UROLOGIC-CANCERS-MICRORNA-BLADDER-CANCER>,
- Petrick, J. L., Campbell, P. T., Koshiol, J., Thistle, J. E., Andreotti, G., Beane-Freeman, L. E., Buring, J. E., Chan, A. T., Chong, D. Q., Doody, M. M., Gapstur, S. M., Gaziano, J. M., Giovannucci, E., Graubard, B. I., Lee, I. M., Liao, L. M., Linet, M. S., Palmer, J. R., Poynter, J. N., ... McGlynn, K. A. (2018). Tobacco, alcohol use and risk of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: The Liver Cancer Pooling Project. *British Journal of Cancer*, 118(7), 1005–1012. <https://doi.org/10.1038/S41416-018-0007-Z>
- Petrick, J. L., Florio, A. A., Znaor, A., Ruggieri, D., Laversanne, M., Alvarez, C. S., Ferlay, J., Valery, P. C., Bray, F., & McGlynn, K. A. (2020). International trends in hepatocellular carcinoma incidence, 1978-2012. *International Journal of Cancer*, 147(2), 317–330. <https://doi.org/10.1002/IJC.32723>
- Pezzuto, F., Izzo, F., Buonaguro, L., Annunziata, C., Tatangelo, F., Botti, G., Buonaguro, F. M., & Tornesello, M. L. (2016). Tumor specific mutations in TERT promoter and CTNNB1 gene in hepatitis B and hepatitis C related hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 7(34), 54253. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.9801>
- Pinter, M., & Peck-Radosavljevic, M. (2018). Review article: systemic treatment of hepatocellular carcinoma. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 48(6), 598–609. <https://doi.org/10.1111/APT.14913>
- Plasterk, R. H. A. (2006). Micro RNAs in animal development. *Cell*, 124(5), 877–881. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.030>
- Pooja, T., & Karunakaran, D. (2014). Emodin suppresses Wnt signaling in human colorectal cancer cells SW480 and SW620. *European Journal of Pharmacology*, 742, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.08.028>
- Poole, R. M., & Vaidya, A. (2014). Ramucirumab: first global approval. *Drugs*, 74(9), 1047–1058. <https://doi.org/10.1007/S40265-014-0244-2>
- Pourmasoumi, P., Moradi, A., & Bayat, M. (2024). BRCA1/2 Mutations and Breast/Ovarian Cancer Risk: A New Insights Review. *Reproductive Sciences*, 31(12), 3624–3634. <https://doi.org/10.1007/S43032-024-01666-W/TABLES/3>
- Qin, B., Zeng, Z., Xu, J., Shangwen, J., Ye, Z. J., Wang, S., Wu, Y., Peng, G., Wang, Q., Gu, W., & Tang, Y. (2022). Emodin inhibits invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells via regulating autophagy-mediated degradation of snail and β -catenin. *BMC Cancer*, 22(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S12885-022-09684-0/FIGURES/8>
- Ramos, L. (2000). *AFLATOXIN B1 CONTENT IN PATIENTS WITH HEPATIC DISEASES*. https://www.academia.edu/10798391/AFLATOXIN_B1_CONTENT_IN_PATIENTS_WITH_HEPATIC_DISEASES

- Ranganathan, P., Weaver, K. L., & Capobianco, A. J. (2011). Notch signalling in solid tumours: A little bit of everything but not all the time. *Nature Reviews Cancer*, 11(5), 338–351. <https://doi.org/10.1038/NRC3035>,
- Raoul, J. L., Forner, A., Bolondi, L., Cheung, T. T., Kloeckner, R., & de Baere, T. (2019). Updated use of TACE for hepatocellular carcinoma treatment: How and when to use it based on clinical evidence. *Cancer Treatment Reviews*, 72, 28–36. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2018.11.002>
- Reddy, K. B. (2015). MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell International*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12935-015-0185-1>,
- Reig, M., Torres, F., Rodriguez-Lope, C., Forner, A., Llarch, N., Rimola, J., Darnell, A., Ríos, J., Ayuso, C., & Bruix, J. (2014a). Early dermatologic adverse events predict better outcome in HCC patients treated with sorafenib. *Journal of Hepatology*, 61(2), 318–324. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2014.03.030>
- Reig, M., Torres, F., Rodriguez-Lope, C., Forner, A., Llarch, N., Rimola, J., Darnell, A., Ríos, J., Ayuso, C., & Bruix, J. (2014b). Early dermatologic adverse events predict better outcome in HCC patients treated with sorafenib. *Journal of Hepatology*, 61(2), 318–324. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2014.03.030>
- Ren, B., Bart Rose, J., Liu, Y., Jaskular-Sztul, R., Contreras, C., Beck, A., & Chen, H. (2019). Heterogeneity of Vascular Endothelial Cells, De Novo Arteriogenesis and Therapeutic Implications in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Journal of Clinical Medicine*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/JCM8111980>
- Ribatti, D., Tamma, R., & Annese, T. (2020). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Translational Oncology*, 13(6). <https://doi.org/10.1016/J.TRANON.2020.100773>
- Rimassa, L., Pressiani, T., Personeni, N., & Santoro, A. (2017). Regorafenib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 17(7), 567–576. <https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1338955>
- Rimini, M., Rimassa, L., Ueshima, K., Burgio, V., Shigeo, S., Tada, T., Suda, G., Yoo, C., Cheon, J., Pinato, D. J., Lonardi, S., Scartozzi, M., Iavarone, M., Di Costanzo, G. G., Marra, F., Soldà, C., Tamburini, E., Piscaglia, F., Masi, G., ... Casadei-Gardini, A. (2022). Atezolizumab plus bevacizumab versus lenvatinib or sorafenib in non-viral unresectable hepatocellular carcinoma: an international propensity score matching analysis. *ESMO Open*, 7(6). <https://doi.org/10.1016/J.ESMOOP.2022.100591>
- Ring, A., Kim, Y. M., & Kahn, M. (2014). Wnt/catenin signaling in adult stem cell physiology and disease. *Stem Cell Reviews and Reports*, 10(4), 512–525. <https://doi.org/10.1007/S12015-014-9515-2>
- Ristori, E., Lopez-Ramirez, M. A., Narayanan, A., Hill-Teran, G., Moro, A., Calvo, C. F., Thomas, J. L., & Nicoli, S. (2015). A Dicer-miR-107 Interaction Regulates Biogenesis of Specific miRNAs Crucial for Neurogenesis. *Developmental Cell*, 32(5), 546–560. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.12.013>
- Roessler, S., Long, E. L., Budhu, A., Chen, Y., Zhao, X., Ji, J., Walker, R., Jia, H. L., Ye, Q. H., Qin, L. X., Tang, Z. Y., He, P., Hunter, K. W., Thorgerirsson, S. S., Meltzer, P. S., & Wang, X. W. (2012). Integrative genomic identification of genes on 8p associated with hepatocellular carcinoma progression and patient survival. *Gastroenterology*, 142(4). <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2011.12.039>
- Rumgay, H., Arnold, M., Ferlay, J., Lesi, O., Cabasag, C. J., Vignat, J., Laversanne, M., McGlynn, K. A., & Soerjomataram, I. (2022). Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040. *Journal of Hepatology*, 77(6), 1598–1606. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2022.08.021>

- Rutledge, S. M., & Asgharpour, A. (2020). Smoking and Liver Disease. *Gastroenterology & Hepatology*, 16(12), 617. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8132692/>
- Sacco, R., Tapete, G., Simonetti, N., Sellitri, R., Natali, V., Melissari, S., Cabibbo, G., Biscaglia, L., Bresci, G., & Giacomelli, L. (2017). Transarterial chemoembolization for the treatment of hepatocellular carcinoma: a review. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, Volume 4, 105–110. <https://doi.org/10.2147/JHC.S103661>
- Sahlgren, C., Gustafsson, M. V., Jin, S., Poellinger, L., & Lendahl, U. (2008). Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(17), 6392. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0802047105>
- Salveti, M. de G., Machado, C. S. P., Donato, S. C. T., & da Silva, A. M. (2020). Prevalence of symptoms and quality of life of cancer patients. *Revista Brasileira de Enfermagem*, 73(2), e20180287. <https://doi.org/10.1590/0034-7167-2018-0287>
- Schulze, K., Imbeaud, S., Letouzé, E., Alexandrov, L. B., Calderaro, J., Rebouissou, S., Couchy, G., Meiller, C., Shinde, J., Soysouvanh, F., Calatayud, A. L., Pinyol, R., Pelletier, L., Balabaud, C., Laurent, A., Blanc, J. F., Mazzaferro, V., Calvo, F., Villanueva, A., ... Zucman-Rossi, J. (2015). Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nature Genetics*, 47(5), 505–511. <https://doi.org/10.1038/NG.3252>
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., & Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115(2), 199–208. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00759-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00759-1)
- Semwal, R. B., Semwal, D. K., Combrinck, S., & Viljoen, A. (2021). Emodin - A natural anthraquinone derivative with diverse pharmacological activities. *Phytochemistry*, 190. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112854>
- Sevignani, C., Calin, G. A., Nnadi, S. C., Shimizu, M., Davuluri, R. V., Hyslop, T., Demant, P., Croce, C. M., & Siracusa, L. D. (2007). MicroRNA genes are frequently located near mouse cancer susceptibility loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(19), 8017–8022. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0702177104>
- Shi, G. H., & Zhou, L. (2018). Emodin suppresses angiogenesis and metastasis in anaplastic thyroid cancer by affecting TRAF6-mediated pathways in vivo and in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 18(6), 5191–5197. <https://doi.org/10.3892/MMR.2018.9510>
- Shi, Y., Li, J., Ren, Y., Wang, H., Cong, Z., Wu, G., Du, L., Li, H., & Zhang, X. (2015). Pharmacokinetics and tissue distribution of emodin loaded nanoemulsion in rats. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 30, 242–249. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2015.10.019>
- Shih, I. M., & Wang, T. L. (2007). Notch signaling, gamma-secretase inhibitors, and cancer therapy. *Cancer Research*, 67(5), 1879–1882. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3958>
- Shiina, S., Tateishi, R., Arano, T., Uchino, K., Enooku, K., Nakagawa, H., Asaoka, Y., Sato, T., Masuzaki, R., Kondo, Y., Goto, T., Yoshida, H., Omata, M., & Koike, K. (2012). Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: 10-Year outcome and prognostic factors. *American Journal of Gastroenterology*, 107(4), 569–577. <https://doi.org/10.1038/AJG.2011.425>

- Shimano, H., & Sato, R. (2017). SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology - divergent pathophysiology. *Nature Reviews. Endocrinology*, 13(12), 710–730. <https://doi.org/10.1038/NREND0.2017.91>
- Singal, A. G., Kanwal, F., & Llovet, J. M. (2023). Global trends in hepatocellular carcinoma epidemiology: implications for screening, prevention and therapy. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 20(12), 864–884. <https://doi.org/10.1038/S41571-023-00825-3>
- Singal, A. G., Lampertico, P., & Nahon, P. (2020). Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: New trends. *Journal of Hepatology*, 72(2), 250–261. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2019.08.025>
- Singal, A. G., Llovet, J. M., Yarchoan, M., Mehta, N., Heimbach, J. K., Dawson, L. A., Jou, J. H., Kulik, L. M., Agopian, V. G., Marrero, J. A., Mendiratta-Lala, M., Brown, D. B., Rilling, W. S., Goyal, L., Wei, A. C., & Taddei, T. H. (2023). AASLD Practice Guidance on prevention, diagnosis, and treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 78(6), 1922. <https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000466>
- Skrtic, A., Sokolic, L., Borovecki, A., Rosa, J., & Fenzl, V. (2011). Immunohistochemical localization of CD31, NOTCH1 and JAGGED1 proteins in experimentally induced polycystic ovaries of immature rats. *Acta Histochemica*, 113(3), 262–269. <https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2009.10.008>
- Song, J. E., & Kim, D. Y. (2017). Conventional vs drug-eluting beads transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *World Journal of Hepatology*, 9(18), 808. <https://doi.org/10.4254/WJH.V9.I18.808>
- Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J., & Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 305(5689), 1434–1437. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1102514>
- Song, X., Zhou, X., Qin, Y., Yang, J., Wang, Y., Sun, Z., Yu, K., Zhang, S., & Liu, S. (2018). Emodin inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis of triple negative breast cancer via antagonism of CC-chemokine ligand 5 secreted from adipocytes. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(1), 579–588. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2018.3638>
- Sonoshita, M., Itatani, Y., Kakizaki, F., Sakimura, K., Terashima, T., Katsuyama, Y., Sakai, Y., & Taketo, M. M. (2015). Promotion of colorectal cancer invasion and metastasis through activation of NOTCH-DAB1-ABL-RHOGEF protein TRIO. *Cancer Discovery*, 5(2), 198–211. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0595>
- Sougiannis, A. T., VanderVeen, B., Chatzistamou, I., Kubinak, J. L., Nagarkatti, M., Fan, D., & Murphy, E. A. (2022). Emodin reduces tumor burden by diminishing M2-like macrophages in colorectal cancer. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 322(3), G383. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00303.2021>
- Steeg, P. S. (2006). Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature Medicine*, 12(8), 895–904. <https://doi.org/10.1038/NM1469>
- Steinbuck, M. P., & Winandy, S. (2018). A review of Notch processing with new insights into ligand-independent notch signaling in T-cells. *Frontiers in Immunology*, 9(JUN), 369403. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01230/XML/NLM>
- Stenvang, J., Silahtaroglu, A. N., Lindow, M., Elmen, J., & Kauppinen, S. (2008). The utility of LNA in microRNA-based cancer diagnostics and therapeutics. *Seminars*

- in *Cancer Biology*, 18(2), 89–102.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.01.004>
- Stone, R. C., Pastar, I., Ojeh, N., Chen, V., Liu, S., Garzon, K. I., & Tomic-Canic, M. (2016). Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell and Tissue Research*, 365(3), 495–506. <https://doi.org/10.1007/S00441-016-2464-0>
- Strosnider, H., Azziz-Baumgartner, E., Banziger, M., Bhat, R. V., Breiman, R., Brune, M. N., DeCock, K., Dilley, A., Groopman, J., Hell, K., Henry, S. H., Jeffers, D., Jolly, C., Jolly, P., Kibata, G. N., Lewis, L., Liu, X., Lubner, G., McCoy, L., ... Wilson, D. (2006). Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environmental Health Perspectives*, 114(12), 1898–1903. <https://doi.org/10.1289/EHP.9302>
- Strumberg, D., & Schultheis, B. (2012). Regorafenib for cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 21(6), 879–889.
<https://doi.org/10.1517/13543784.2012.684752>
- Suarez-Carmona, M., Lesage, J., Cataldo, D., & Gilles, C. (2017). EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Molecular Oncology*, 11(7), 805–823. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12095>
- Sun, E. J., Wankell, M., Palamuthusingam, P., McFarlane, C., & Hebbard, L. (2021). Targeting the pi3k/akt/mtor pathway in hepatocellular carcinoma. *Biomedicines*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9111639>
- Sun, J., Wu, Y., Dong, S., Li, X., & Gao, W. (2018). Influence of the drying method on the bioactive compounds and pharmacological activities of rhubarb. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(9), 3551–3562.
<https://doi.org/10.1002/JSFA.8871>
- Sun, L., Liu, G., Li, Y., Jiang, D., Guo, W., Xu, H., & Zhan, R. (2019). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of endocrocin and emodin. *Metabolic Engineering*, 54, 212–221.
<https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2019.04.008>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021a). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249.
<https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021b). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249.
<https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- Sunny, N. E., Bril, F., & Cusi, K. (2017). Mitochondrial Adaptation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Novel Mechanisms and Treatment Strategies. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 28(4), 250–260.
<https://doi.org/10.1016/J.TEM.2016.11.006>
- Svoronos, A. A., Engelman, D. M., & Slack, F. J. (2016). OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Research*, 76(13), 3666. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0359>
- Takayasu, K., Shima, Y., Muramatsu, Y., Moriyama, N., Yamada, T., Makuuchi, M., Hasegawa, H., & Hirohashi, S. (1987). Hepatocellular carcinoma: treatment with intraarterial iodized oil with and without chemotherapeutic agents. <https://doi.org/10.1148/RADIOLOGY.163.2.3031724>, 163(2), 345–351.
<https://doi.org/10.1148/RADIOLOGY.163.2.3031724>

- Tan, D. J. H., Lim, W. H., Yong, J. N., Ng, C. H., Muthiah, M. D., Tan, E. X., Xiao, J., Lim, S. Y., Pin Tang, A. S., Pan, X. H., Kabir, T., Bonney, G. K., Sundar, R., Syn, N., Kim, B. K., Dan, Y. Y., Nouredin, M., Loomba, R., & Huang, D. Q. (2023). UNOS Down-Staging Criteria for Liver Transplantation of Hepatocellular Carcinoma: Systematic Review and Meta-Analysis of 25 Studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 21(6), 1475–1484. <https://doi.org/10.1016/J.CGH.2022.02.018>
- Tan, E. Y., Danpanichkul, P., Yong, J. N., Yu, Z., Tan, D. J. H., Lim, W. H., Koh, B., Lim, R. Y. Z., Tham, E. K. J., Mitra, K., Morishita, A., Hsu, Y. C., Yang, J. D., Takahashi, H., Zheng, M. H., Nakajima, A., Ng, C. H., Wijarnpreecha, K., Muthiah, M. D., ... Huang, D. Q. (2024). Liver cancer in 2021: Global burden of disease study. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2024.10.031>
- Tan, J. H., Zhang, Q. X., Huang, Z. S., Chen, Y., Wang, X. D., Gu, L. Q., & Wu, J. Y. (2006). Synthesis, DNA binding and cytotoxicity of new pyrazole emodin derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41(9), 1041–1047. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2006.04.006>
- Taniguchi, K., Roberts, L. R., Aderca, I. N., Dong, X., Qian, C., Murphy, L. M., Nagorney, D. M., Burgart, L. J., Roche, P. C., Smith, D. I., Ross, J. A., & Liu, W. (2002). Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene*, 21(31), 4863–4871. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1205591>
- Tarasova, A., Haylock, D., & Winkler, D. (2011). Principal signalling complexes in haematopoiesis: Structural aspects and mimetic discovery. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 22(4), 231–253. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.09.001>
- Taslimi, S., & Das, S. (2018). Angiogenesis and Angiogenesis Inhibitors in Brain Tumors. *Handbook of Brain Tumor Chemotherapy, Molecular Therapeutics, and Immunotherapy: Second Edition*, 361–371. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812100-9.00027-9>
- Their, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer* 2002 2:6, 2(6), 442–454. <https://doi.org/10.1038/nrc822>
- Theveneau, E., & Mayor, R. (2012). Neural crest delamination and migration: From epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Developmental Biology*, 366(1), 34–54. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2011.12.041>
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871–890. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.11.007>
- Timmerman, L. A., Grego-Bessa, J., Raya, A., Bertrán, E., Pérez-Pomares, J. M., Díez, J., Aranda, S., Palomo, S., McCormick, F., Izpisua-Belmonte, J. C., & De La Pompa, J. L. (2004). Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes and Development*, 18(1), 99–115. <https://doi.org/10.1101/GAD.276304>
- Toh, M. R., Wong, E. Y. T., Wong, S. H., Ng, A. W. T., Loo, L. H., Chow, P. K. H., & Ngeow, J. (2023). Global Epidemiology and Genetics of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, 164(5), 766–782. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2023.01.033>
- Tohyama, O., Matsui, J., Kodama, K., Hata-Sugi, N., Kimura, T., Okamoto, K., Minoshima, Y., Iwata, M., & Funahashi, Y. (2014). Antitumor activity of lenvatinib (e7080): an angiogenesis inhibitor that targets multiple receptor

- tyrosine kinases in preclinical human thyroid cancer models. *Journal of Thyroid Research*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/638747>
- Totoki, Y., Tatsuno, K., Covington, K. R., Ueda, H., Creighton, C. J., Kato, M., Tsuji, S., Donehower, L. A., Slagle, B. L., Nakamura, H., Yamamoto, S., Shinbrot, E., Hama, N., Lehmkuhl, M., Hosoda, F., Arai, Y., Walker, K., Dahdouli, M., Gotoh, K., ... Shibata, T. (2014). Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nature Genetics* 2014 46:12, 46(12), 1267–1273. <https://doi.org/10.1038/ng.3126>
- Tovo, C. V., Becker, S. C. da C., Almeida, P. R. L. de, Galperim, B., & Chaves, S. (2013). Progression of liver fibrosis in monoinfected patients by hepatitis C virus and coinfecting by HCV and human immunodeficiency virus. *Arquivos de Gastroenterologia*, 50(1), 19–22. <https://doi.org/10.1590/S0004-28032013000100005>
- Trépo, E., Caruso, S., Yang, J., Imbeaud, S., Couchy, G., Bayard, Q., Letouzé, E., Ganne-Carrié, N., Moreno, C., Oussalah, A., Féray, C., Blanc, J. F., Clément, B., Hillon, P., Boursier, J., Paradis, V., Calderaro, J., Gnemmi, V., Nault, J. C., ... Zucman-Rossi, J. (2022). Common genetic variation in alcohol-related hepatocellular carcinoma: a case-control genome-wide association study. *The Lancet. Oncology*, 23(1), 161–171. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00603-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00603-3)
- Trojan, J. (2020). Cabozantinib for the Treatment of Advanced Hepatocellular Carcinoma: Current Data and Future Perspectives. *Drugs*, 80(12), 1203–1210. <https://doi.org/10.1007/S40265-020-01361-5/FIGURES/1>
- Tümen, D., Heumann, P., Gülow, K., Demirci, C. N., Cosma, L. S., Müller, M., & Kandulski, A. (2022). Pathogenesis and Current Treatment Strategies of Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/BIMEDICINES10123202>
- Vasas, A., Orbán-Gyapai, O., & Hohmann, J. (2015). The Genus Rumex: Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 175, 198–228. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2015.09.001>
- Ventura, A., & Jacks, T. (2009). MicroRNAs and Cancer: Short RNAs Go a Long Way. *Cell*, 136(4), 586–591. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.005>
- Ventura, A., Young, A. G., Winslow, M. M., Lintault, L., Meissner, A., Erkland, S. J., Newman, J., Bronson, R. T., Crowley, D., Stone, J. R., Jaenisch, R., Sharp, P. A., & Jacks, T. (2008). Targeted Deletion Reveals Essential and Overlapping Functions of the miR-17~92 Family of miRNA Clusters. *Cell*, 132(5), 875–886. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.019>
- Vescovo, T., Refolo, G., Vitagliano, G., Fimia, G. M., & Piacentini, M. (2016). Molecular mechanisms of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 22(10), 853–861. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2016.07.019>
- Viatour, P., Ehmer, U., Saddic, L. A., Dorrell, C., Andersen, J. B., Lin, C., Zmoos, A. F., Mazur, P. K., Schaffer, B. E., Ostermeier, A., Vogel, H., Sylvester, K. G., Thorgeirsson, S. S., Grompe, M., & Sage, J. (2011). Notch signaling inhibits hepatocellular carcinoma following inactivation of the RB pathway. *Journal of Experimental Medicine*, 208(10), 1963–1976. <https://doi.org/10.1084/JEM.20110198>
- Villanueva, A. (2019). Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 380(15), 1450–1462. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA1713263>

- Villar, S., Ortiz-Cuaran, S., Abedi-Ardekani, B., Gouas, D., da Costa, A. N., Plymoth, A., Khuhaprema, T., Kalalak, A., Sangrajrang, S., Friesen, M. D., Groopman, J. D., & Hainaut, P. (2012). Aflatoxin-induced TP53 R249S mutation in hepatocellular carcinoma in Thailand: association with tumors developing in the absence of liver cirrhosis. *PloS One*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0037707>
- Vogel, A., Qin, S., Kudo, M., Su, Y., Hudgens, S., Yamashita, T., Yoon, J. H., Fartoux, L., Simon, K., López, C., Sung, M., Mody, K., Ohtsuka, T., Tamai, T., Bennett, L., Meier, G., & Breder, V. (2021). Lenvatinib versus sorafenib for first-line treatment of unresectable hepatocellular carcinoma: patient-reported outcomes from a randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 trial. *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology*, 6(8), 649–658. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(21\)00110-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(21)00110-2)
- Wael, H., Yoshida, R., Kudoh, S., Hasegawa, K., Niimori-Kita, K., & Ito, T. (2014). Notch1 signaling controls cell proliferation, apoptosis and differentiation in lung carcinoma. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 85(2), 131–140. <https://doi.org/10.1016/J.LUNGCAN.2014.05.001>
- Waisberg, J., & Saba, G. T. (2015). Wnt/- β -catenin pathway signaling in human hepatocellular carcinoma. *World Journal of Hepatology*, 7(26), 2631. <https://doi.org/10.4254/WJH.V7.I26.2631>
- Wallin, J. J., Bendell, J. C., Funke, R., Sznol, M., Korski, K., Jones, S., Hernandez, G., Mier, J., He, X., Hodi, F. S., Denker, M., Leveque, V., Cañamero, M., Babitski, G., Koeppen, H., Ziai, J., Sharma, N., Gaire, F., Chen, D. S., ... McDermott, D. F. (2016). Atezolizumab in combination with bevacizumab enhances antigen-specific T-cell migration in metastatic renal cell carcinoma. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS12624>
- Wang, D., Wang, X. H., Yu, X., Cao, F., Cai, X., Chen, P., Li, M., Feng, Y., Li, H., & Wang, X. (2021). Pharmacokinetics of Anthraquinones from Medicinal Plants. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.638993>
- Wang, G., Yang, Q., Han, Y., Zhang, Y., Pan, W., Ma, Z., Tian, H., & Qu, X. (2025). miR-32-5p suppresses the progression of hepatocellular carcinoma by regulating the GSK3 β /NF- κ B signaling. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 57(7), 1125–1138. <https://doi.org/10.3724/ABBS.2025038>
- Wang, K., Lim, H. Y., Shi, S., Lee, J., Deng, S., Xie, T., Zhu, Z., Wang, Y., Pocalyko, D., Yang, W. J., Rejto, P. A., Mao, M., Park, C. K., & Xu, J. (2013). Genomic landscape of copy number aberrations enables the identification of oncogenic drivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 58(2), 706–717. <https://doi.org/10.1002/HEP.26402>
- Wang, M. M. (2011). Notch signaling and Notch signaling modifiers. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(11), 1550–1562. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2011.08.005>
- Wang, S., Chen, T., Chen, R., Hu, Y., Chen, M., & Wang, Y. (2012). Emodin loaded solid lipid nanoparticles: Preparation, characterization and antitumor activity studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 430(1–2), 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.03.027>
- Wang, W., Pan, Q., Fuhler, G. M., Smits, R., & Peppelenbosch, M. P. (2016). Action and function of Wnt/ β -catenin signaling in the progression from chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology*, 52(4), 419. <https://doi.org/10.1007/S00535-016-1299-5>

- Wang, X. Q., Zhang, W., Lui, E. L. H., Zhu, Y., Lu, P., Yu, X., Sun, J., Yang, S., Poon, R. T. P., & Fan, S. T. (2012). Notch1-Snail1-E-cadherin pathway in metastatic hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer*, 131(3), E163–E172. <https://doi.org/10.1002/IJC.27336>
- Wang, X. W., Forrester, K., Yeh, H., Feitelson, M. A., Gu, J. R., & Harris, C. C. (1994). Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(6), 2230–2234. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.6.2230>
- Wang, Z. (2011). The Principles of MiRNA-Masking Antisense Oligonucleotides Technology. *Methods in Molecular Biology*, 676, 43–49. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-863-8_3
- Weng, Y. T., Chang, Y. M., & Chern, Y. (2023). The Impact of Dysregulated microRNA Biogenesis Machinery and microRNA Sorting on Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4). <https://doi.org/10.3390/IJMS24043443>
- Wong, R. J., Aguilar, M., Cheung, R., Perumpail, R. B., Harrison, S. A., Younossi, Z. M., & Ahmed, A. (2015). Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology*, 148(3), 547–555. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2014.11.039>
- Wong, V. W. S., & Janssen, H. L. A. (2015). Can we use HCC risk scores to individualize surveillance in chronic hepatitis B infection? *Journal of Hepatology*, 63(3), 722–732. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2015.05.019>
- Xiang, Q., Chen, W., Ren, M., Wang, J., Zhang, H., Deng, D. Y. B., Zhang, L., Shang, C., & Chen, Y. (2014). Cabozantinib suppresses tumor growth and metastasis in hepatocellular carcinoma by a dual blockade of VEGFR2 and MET. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(11), 2959–2970. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2620>
- Xu, W., Zhou, W., Cheng, M., Wang, J., Liu, Z., He, S., Luo, X., Huang, W., Chen, T., Yan, W., & Xiao, J. (2017). Hypoxia activates Wnt/ β -catenin signaling by regulating the expression of BCL9 in human hepatocellular carcinoma. *Scientific Reports*, 7, 40446. <https://doi.org/10.1038/SREP40446>
- Xu, Z., Hu, J., Cao, H., Pilo, M. G., Cigliano, A., Shao, Z., Xu, M., Ribback, S., Dombrowski, F., Calvisi, D. F., & Chen, X. (2018). Loss of Pten synergizes with c-Met to promote hepatocellular carcinoma development via mTORC2 pathway. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(1). <https://doi.org/10.1038/EMM.2017.158>
- Yakes, F. M., Chen, J., Tan, J., Yamaguchi, K., Shi, Y., Yu, P., Qian, F., Chu, F., Bentzien, F., Cancilla, B., Orf, J., You, A., Laird, A. D., Engst, S., Lee, L., Lesch, J., Chou, Y. C., & Joly, A. H. (2011). Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(12), 2298–2308. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0264>
- Yan, L., Shen, J., Wang, J., Yang, X., Dong, S., & Lu, S. (2020). Nanoparticle-Based Drug Delivery System: A Patient-Friendly Chemotherapy for Oncology. *Dose-Response*, 18(3). <https://doi.org/10.1177/1559325820936161>
- Yang, H. Y., Wu, J., Lu, H., Cheng, M. L., Wang, B. H., Zhu, H. L., Liu, L., & Xie, M. (2023). Emodin suppresses oxaliplatin-induced neuropathic pain by inhibiting COX2/NF- κ B mediated spinal inflammation. *Journal of Biochemical and*

- Molecular Toxicology*, 37(1), e23229.
<https://doi.org/10.1002/JBT.23229>;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:10990
 461;JOURNAL:JOURNAL:15227146;WGROU:STRING:PUBLICATION
- Yang, J. D., Hainaut, P., Gores, G. J., Amadou, A., Plymoth, A., & Roberts, L. R. (2019). A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 16(10), 589–604. <https://doi.org/10.1038/S41575-019-0186-Y>
- Yang, L., Zou, T., Chen, Y., Zhao, Y., Wu, X., Li, M., Du, F., Chen, Y., Xiao, Z., & Shen, J. (2022). Hepatitis B virus X protein mediated epigenetic alterations in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology International*, 16(4), 741–754. <https://doi.org/10.1007/S12072-022-10351-6>
- Yang, M. H., Chen, C. L., Chau, G. Y., Chiou, S. H., Su, C. W., Chou, T. Y., Peng, W. L., & Wu, J. C. (2009a). Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 50(5), 1464–1474. <https://doi.org/10.1002/HEP.23221>,
- Yang, M. H., Chen, C. L., Chau, G. Y., Chiou, S. H., Su, C. W., Chou, T. Y., Peng, W. L., & Wu, J. C. (2009b). Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 50(5), 1464–1474. <https://doi.org/10.1002/HEP.23221>
- Yao, C., Wu, S., Kong, J., Sun, Y., Bai, Y., Zhu, R., Li, Z., Sun, W., & Zheng, L. (2023). Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: mechanisms and anti-angiogenic therapies. *Cancer Biology & Medicine*, 20(1), 25–43. <https://doi.org/10.20892/J.ISSN.2095-3941.2022.0449>
- Yao, F. Y., Mehta, N., Flemming, J., Dodge, J., Hameed, B., Fix, O., Hirose, R., Fidelman, N., Kerlan, R. K., & Roberts, J. P. (2015). Downstaging of Hepatocellular Cancer before Liver Transplant: Long-term Outcome compared to Tumors within Milan Criteria. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 61(6), 1968. <https://doi.org/10.1002/HEP.27752>
- Yao, Y., Ni, Y., Zhang, J., Wang, H., & Shao, S. (2017). The role of Notch signaling in gastric carcinoma: molecular pathogenesis and novel therapeutic targets. *Oncotarget*, 8(32), 53839–53853. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.17809>
- Yau, T., Kang, Y. K., Kim, T. Y., El-Khoueiry, A. B., Santoro, A., Sangro, B., Melero, I., Kudo, M., Hou, M. M., Matilla, A., Tovoli, F., Knox, J. J., Ruth He, A., El-Rayes, B. F., Acosta-Rivera, M., Lim, H. Y., Neely, J., Shen, Y., Wisniewski, T., ... Hsu, C. (2020). Efficacy and Safety of Nivolumab Plus Ipilimumab in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma Previously Treated With Sorafenib: The CheckMate 040 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*, 6(11). <https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2020.4564>
- Yau, T., Park, J. W., Finn, R. S., Cheng, A. L., Mathurin, P., Edeline, J., Kudo, M., Harding, J. J., Merle, P., Rosmorduc, O., Wyrwicz, L., Schott, E., Choo, S. P., Kelley, R. K., Sieghart, W., Assenat, E., Zaucha, R., Furuse, J., Abou-Alfa, G. K., ... Sangro, B. (2022). Nivolumab versus sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 459): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 23(1), 77–90. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00604-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00604-5)
- Yau, T., Park, J. W., Finn, R. S., Cheng, A.-L., Mathurin, P., Edeline, J., Kudo, M., Han, K.-H., Harding, J. J., Merle, P., Rosmorduc, O., Wyrwicz, L., Schott, E., Choo, S. P., Kelley, R. K., Begic, D., Chen, G., Neely, J., Anderson, J., & Sangro, B. (2019). CheckMate 459: A randomized, multi-center phase III study of

- nivolumab (NIVO) vs sorafenib (SOR) as first-line (1L) treatment in patients (pts) with advanced hepatocellular carcinoma (aHCC). *Annals of Oncology*, 30, v874–v875. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDZ394.029>
- Yin, F., Sharen, G., Yuan, F., Peng, Y., Chen, R., Zhou, X., Wei, H., Li, B., Jing, W., & Zhao, J. (2017). TIP30 regulates lipid metabolism in hepatocellular carcinoma by regulating SREBP1 through the Akt/mTOR signaling pathway. *Oncogenesis*, 6(6). <https://doi.org/10.1038/ONCSIS.2017.49>
- Yin, L., Velazquez, O. C., & Liu, Z. J. (2010). Notch signaling: Emerging molecular targets for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, 80(5), 690–701. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2010.03.026>
- Ying, Y., Qingwu, L., Mingming, X., Zhenju, S., Chaoyang, T., & Zhengang, T. (2017). Emodin: One Main Ingredient of Shufeng Jiedu Capsule Reverses Chemoresistance of Lung Cancer Cells Through Inhibition of EMT. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 42(3), 1063–1072. <https://doi.org/10.1159/000478754>
- Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., Liu, Q., & Tomari, Y. (2009). ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(1), 17. <https://doi.org/10.1038/NSMB.1733>
- Yokoyama, S., & Asahara, H. (2011). The myogenic transcriptional network. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 68(11), 1843–1849. <https://doi.org/10.1007/S00018-011-0629-2>
- Yong, S. L., & Dutta, A. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Pathology*, 4, 199. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PATHOL.4.110807.092222>
- Yoo, H. Y., Patt, C. H., Geschwind, J. F., & Thuluvath, P. J. (2003). The Outcome of Liver Transplantation in Patients With Hepatocellular Carcinoma in the United States Between 1988 and 2001: 5-Year Survival Has Improved Significantly With Time. *Journal of Clinical Oncology*, 21(23), 4329–4335. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.11.137>
- Yoshikawa, H., Matsubara, K., Qian, G.-S., Jackson, P., Groopman, J. D., Manning, J. E., Harris, C. C., & Herman, J. G. (2001). SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nature Genetics* 2001 28:1, 28(1), 29–35. <https://doi.org/10.1038/ng0501-29>
- Yoshikawa, M., Saisho, H., Ebara, M., Iijima, T., Iwama, S., Endo, F., Kimura, M., Shimamura, Y., Suzuki, Y., Nakano, T., Fukuyama, Y., Fujise, K., Nambu, M., & Ohto, M. (1994). A randomized trial of intrahepatic arterial infusion of 4'-epidoxorubicin with Lipiodol versus 4'-epidoxorubicin alone in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 33 Suppl(1 Supplement). <https://doi.org/10.1007/BF00686689>
- Younossi, Z. M. (2019). Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective. *Journal of Hepatology*, 70(3), 531–544. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2018.10.033>
- Yu, L., Zhao, Y., & Zhao, Y. (2023). Advances in the pharmacological effects and molecular mechanisms of emodin in the treatment of metabolic diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2023.1240820>
- Yuan, X., Larsson, C., & Xu, D. (2019a). Mechanisms underlying the activation of TERT transcription and telomerase activity in human cancer: old actors and new players. *Oncogene*, 38(34), 6172–6183. <https://doi.org/10.1038/S41388-019-0872-9>

- Yuan, X., Larsson, C., & Xu, D. (2019b). Mechanisms underlying the activation of TERT transcription and telomerase activity in human cancer: old actors and new players. *Oncogene*, 38(34), 6172. <https://doi.org/10.1038/S41388-019-0872-9>
- Zeng, Y., & Cullen, B. R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Research*, 32(16), 4776–4785. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKH824>,
- Zeng, Z. L., Zhu, Q., Zhao, Z., Zu, X., & Liu, J. (2021a). Magic and mystery of microRNA-32. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(18), 8588–8601. <https://doi.org/10.1111/JCMM.16861>,
- Zeng, Z. L., Zhu, Q., Zhao, Z., Zu, X., & Liu, J. (2021b). Magic and mystery of microRNA-32. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(18), 8588–8601. <https://doi.org/10.1111/JCMM.16861>,
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, 302(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.028>
- Zhang, L., He, D., Li, K., Liu, H., Wang, B., Zheng, L., & Li, J. (2017). Emodin targets mitochondrial cyclophilin D to induce apoptosis in HepG2 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 90, 222–228. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.03.046>
- Zhang, L., Jiang, Y., Jiao, P., Deng, X., & Xie, Y. (2021). The high expression of CHD1L and its clinical significance in human solid tumors: A meta-analysis. *Medicine*, 100(10), e24851. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000024851>
- Zhang, L., Lau, Y. K., Xi, L., Hong, R. L., Kim, D. S. H. L., Chen, C. F., Hortobagyi, G. N., Chang, C. J., & Hung, M. C. (1998a). Tyrosine kinase inhibitors, emodin and its derivative repress HER-2/neu-induced cellular transformation and metastasis-associated properties. *Oncogene*, 16(22), 2855–2863. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1201813>,
- Zhang, L., Lau, Y. K., Xi, L., Hong, R. L., Kim, D. S. H. L., Chen, C. F., Hortobagyi, G. N., Chang, C. J., & Hung, M. C. (1998b). Tyrosine kinase inhibitors, emodin and its derivative repress HER-2/neu-induced cellular transformation and metastasis-associated properties. *Oncogene*, 16(22), 2855–2863. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1201813>,
- Zhang, Q., Chen, W. W., Sun, X., Qian, D., Tang, D. D., Zhang, L. L., Li, M. Y., Wang, L. Y., Wu, C. J., & Peng, W. (2022). The versatile emodin: A natural easily acquired anthraquinone possesses promising anticancer properties against a variety of cancers. *International Journal of Biological Sciences*, 18(8), 3498–3527. <https://doi.org/10.7150/IJBS.70447>,
- Zhang, X., Dong, N., Zhang, H., You, J., Wang, H., & Ye, L. (2005). Effects of hepatitis B virus X protein on human telomerase reverse transcriptase expression and activity in hepatoma cells. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 145(2), 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.lab.2004.11.018>
- Zhang, Y., & Weinberg, R. A. (2018). Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Frontiers of Medicine*, 12(4), 361–373. <https://doi.org/10.1007/S11684-018-0656-6>
- Zhao, J., Lin, W., Cao, Z., Zhuang, Q., Zheng, L., Peng, J., & Hong, Z. (2015). Total alkaloids of *Rubus alceifolius* Poir inhibit tumor angiogenesis through suppression of the Notch signaling pathway in a mouse model of hepatocellular carcinoma. *Molecular Medicine Reports*, 11(1), 357–361. <https://doi.org/10.3892/MMR.2014.2702>
- Zhao, X.-A., Chen, G., Liu, Y., Wu, H., Chen, J., Xiong, Y., Tian, C., Jia, B., Wang, G., Xia, J., Chen, Y., Wang, J., Yan, X., Zhang, Z., Huang, R., & Wu, C. (2018).

- Emodin Alleviates Liver Fibrosis of Mice by Reducing Infiltration of Gr1hi Monocytes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, 2018(1). <https://doi.org/10.1155/2018/5738101>
- Zhao, Z., Cui, T., Wei, F., Zhou, Z., Sun, Y., Gao, C., Xu, X., & Zhang, H. (2024). Wnt/ β -Catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma: pathogenic role and therapeutic target. *Frontiers in Oncology*, 14, 1367364. <https://doi.org/10.3389/FONC.2024.1367364/PDF>
- Zheng, Q., Li, S., Li, X., & Liu, R. (2021). Advances in the study of emodin: an update on pharmacological properties and mechanistic basis. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S13020-021-00509-Z>
- Zhou, B., Lin, W., Long, Y., Yang, Y., Zhang, H., Wu, K., & Chu, Q. (2022). Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41392-022-00934-Y>
- Zhou, C., Zhang, W., Chen, W., Yin, Y., Atyah, M., Liu, S., Guo, L., Shi, Y., Ye, Q., Dong, Q., & Ren, N. (2017). Integrated Analysis of Copy Number Variations and Gene Expression Profiling in Hepatocellular carcinoma. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-11029-Y>
- Zhou, L., Gao, R., Hong, H., Li, X., Yang, J., Shen, W., Wang, Z., & Yang, J. (2020). Emodin inhibiting neutrophil elastase-induced epithelial-mesenchymal transition through Notch1 signalling in alveolar epithelial cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(20), 11998–12007. <https://doi.org/10.1111/JCMM.15827>
- Zhou, Q., Lui, V. W. Y., & Yeo, W. (2011). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma. *Future Oncology (London, England)*, 7(10), 1149–1167. <https://doi.org/10.2217/FON.11.95>
- Zhu, A. X., Finn, R. S., Edeline, J., Cattani, S., Ogasawara, S., Palmer, D., Verslype, C., Zagonel, V., Fartoux, L., Vogel, A., Sarker, D., Verset, G., Chan, S. L., Knox, J., Daniele, B., Webber, A. L., Ebbinghaus, S. W., Ma, J., Siegel, A. B., ... Yamashita, T. (2018). Pembrolizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma previously treated with sorafenib (KEYNOTE-224): a non-randomised, open-label phase 2 trial. *The Lancet. Oncology*, 19(7), 940–952. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30351-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30351-6)
- Zhu, A. X., Kang, Y. K., Yen, C. J., Finn, R. S., Galle, P. R., Llovet, J. M., Assenat, E., Brandi, G., Pracht, M., Lim, H. Y., Rau, K. M., Motomura, K., Ohno, I., Merle, P., Daniele, B., Shin, D. B., Gerken, G., Borg, C., Hiriart, J. B., ... Kudo, M. (2019). Ramucirumab after sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma and increased α -fetoprotein concentrations (REACH-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 20(2), 282–296. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30937-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30937-9)
- Zhu, R., Mok, M. T. S., Kang, W., Lau, S. S. K., Yip, W. K., Chen, Y., Lai, P. B. S., Wong, V. W. S., To, K. F., Sung, J. J. Y., Cheng, A. S. L., & Chan, H. L. Y. (2015). Truncated HBx-dependent silencing of GAS2 promotes hepatocarcinogenesis through deregulation of cell cycle, senescence and p53-mediated apoptosis. *The Journal of Pathology*, 237(1), 38–49. <https://doi.org/10.1002/PATH.4554>

6 EKLER

Tablo 3. Kullanılan Cihazların Listesi

Ürün Adı	Ürün Kodu	Marka
Buz Makinası	AF80	Scotsman
CO2 inkübatörü	50116047	Thermo Fisher Scientific
Çalkalayıcı	GyroTwister	Labnet
Derin Dondurucu	Ultra Low Temperature Freezer (ULTF)	ARCTIKO
Dikey Jel Elektforezi Sistemi	Mini-PROTEAN Tetra Cell	BioRad
Distile Su Cihazı	Tank 30 Liter PE/Milipore	Labor Teknik
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature Freezer Innova U725	New Brunswick Scientific
Elektroforez Donanımları		BioRad
Floresan Mikroskop	IX71	Olympus
QRT-PCR Cihazı	CFX Connect	BioRad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Hemositometre	Neubauer Improved	Assistent Germany
İnvert Mikroskop	XDS-1B	SOIF
Laminar Flow	HERASAFE KS	Thermo Scientific
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart
Saf Su Cihazı	Direct-Q 5UV	Labor Teknik
Santrifüj	NF 200	Nüve
Kemilüminesans Görüntüleme Cihazı	ChemIDoc MP System 1708280	BioRad
Optik Mikroskop	TH4-200	Olympus
Termal Döngüleyici	MyCycler Thermal Cycler	BioRad
Mikropipetler 10 µl, 100 µl, 1000 µl		CAPP
Mini Santrifüj Cihazı	CR-1512	CAPP
Mikroplaka Okuyucu	iMark	BioRad
Mini Spin Cihazı	Fisherbrand 15358266	ThermoFisher Scientific
Spektrofotometre	IMPLEN NanoPhotometer	BO-GA
Mikrodalga Fırın	MD 595	Arçelik

Tablo 4. Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemeler

Ürün Adı	Ürün Kodu	Marka
HEPG2	HB-8065	ATCC
DMEM	P04-03590	PAN Biotech
Fetal Sığır Serum (FBS)	FBS-11A	Capricorn Scientific
Penisilin/Streptomisin	P06-07100	PAN Biotech
Trypsin-EDTA (0.25%) (1X)	SH40003.01	HyClone
Emodin	BD6309	BLD PHARMATECH GmbH
hsa-miR-32-5p miRNA Mimic	701502654	QIAGEN
hsa-miR-32-5p miRNA inhibitor	699623271	QIAGEN
Transfeksiyon Ajanı	T0083	Canvax
50 ml Santrifüj Tüpleri	430828	CORNING
15 ml Santrifüj Tüpleri	5100015	CAPP
Kriyojenik Tüpleri	607001	NEST
1.5 ml mikrofüj tüpleri		TPP
75 cm ² Hücre Kültür Kapları	90076	TPP
25 cm ² Hücre Kültür Kapları	90026	TPP
60 mm Hücre Kültür Kapları	93060	TPP
96 Kuyucuklu Hücre Kabı	92096	TPP

Tablo 5. Kullanılan Kimyasalların Listesi.

Ürün Adı	Ürün Kodu	Marka
MTT Reaktifi	BD18787	BLDpharm
DMSO	D1370	Duchefa Biochemie
Agaroz	121853	MERCK
Sybr Safe	MG-SSGD-01-1000	Hibrogen
M-PER Memeli Protein Ekstraksiyon Reaktifi	78505	ThermoFisher Scientific
Proteaz İnhibitör Kokteyli	87786	ThermoFisher Scientific
Proteaz İnhibitör Tablet (EDTA içermez)	A32955	ThermoFisher Scientific
Protein Marker	PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 26619	Thermo Scientific
Akrilamid/Bis- Akrilamid (%30 çözelti, 37.5:1)	A0011	BIOBASIC
SDS	1177GR100	BIOFROXX
TEMED	8027ML100	BIOFROXX
Etanol	TK.200650	Teksoll
Metanol	34860	Honeywell

Tris Hidroklorür	648317	CALBIOCHEM
Yağsız Süt Tozu	1172KG001	BIOFROXX
p-Kumarik Asit	C9008-1G	Sigma-Aldrich
luminol	A2185	AppliChem
APS	A2941	AppliChem
Hidrojen Peroksit %35	1086001000	MERCK
Kristal Viyole	FN1048735	MERCK
Coomassie Brilliant Blue R- 250 Staining Solution	1610436	BioRad
Ponceau S Solüsyonu	A2935	AppliChem
Tween-20	A600560-0500	Sangon Biotech
PureZOL RNA İzolasyon Ajanı	7326890	BioRad
Kloroform	1024452500	MERCK
DEPC	A0881	AppliChem
2-Propanol (İzopropanol)	1096342500	MERCK
1 kb DNA Ladder	GeneRuler SM0311	Thermo Scientific
DNA Jel Yükleme Boyası (6X)	DNA Jel Yükleme Boyası (6X)	Thermo Scientific
miScript II RT Kit	218161	QIAGEN
iScript cDNA Sentez Kit	1708891	BioRad
miScript SYBR Green PCR Kit	218073	QIAGEN

Tablo 6. %12'lik Alt Jel (Seperating Gel) hazırlama prosedürü (2Jel)

Ürün Adı	2 Jel için Kullanılan Miktar
Su	4.1 ml
1.5M Tris-HCL, pH 8.8	2.5 ml
%10 SDS	0.1 ml
Acrylamid/bisacry (%30, %0.8 w/v)	4 ml
%10 (w/v) Ammonium Persulphate (aps)	0.05 ml
TEMED	0.01 ml

Tablo 7. % 4'lük Üst Jel (Stacking Gel) hazırlama prosedürü

Ürün Adı	2 Jel için Kullanılan Miktar
Su	3.075 ml
0.5M Tris-HCL, pH 6.8	1.25 ml
%10 SDS	0.05 ml
Acrylamid/bisacry (%30, %0.8 w/v)	0.67 ml
%10 (w/v) Ammonium Persulphate (aps)	0.025 ml
TEMED	0.005 ml

Tablo 8. qRT-PCR 'da Kullanılan Protokol

Reaksiyon	Sıcaklık	Süre
İlk Denatürasyon	95 °C	3 dk
Denatürasyon	95 °C	15 sn
Bağlanma	56 °C	30 sn
Uzama	72 °C	30 dk
Son Uzama	72 °C	10 dk

Tablo 9. Çalışma süresince kullanılan çözeltiler

DMEM besiyeri	500 ml DMEM'e %10 fetal bovin serumu (FBS) ve %1 Penisilin/Streptomisin eklenerek hazırlanır. 0,22 µm gözenek çapına sahip filtreden süzülür. 50 ml'lik santrifüj tüplerine alikotlanarak +4 °C'de saklanır
Hücre Dondurma Medyası (Freezing Media)	1 ml dimetil sülfoksit (DMSO), 9 ml fetal sığır serumu (FBS) içerisine eklenir. Karışım 0,22 µm gözenek çapına sahip filtreden süzülür. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alikotlanarak karanlık ortamda -20 °C'de saklanır
MTT Reaktifi	0.05 gram %98 saflıkta 2-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyl-2H-tetrazol-3-ium bromide (Thiazolyl Blue, MTT tozu, BLDpharm) 10 ml 1X PBS içinde çözülür. 0,22 µm gözenek çapına sahip filtreden süzülür. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alikotlanarak karanlık ortamda -20 °C'de saklanır
Bradford Reaktifi	1L'lik Ana stock hazırlamak için, 100 mg Coomassie Brilliant Blue (G-250) boyası tartılarak 50 ml %95'lik etanol içerisinde çözündürülür. Ardından 100 ml %85'lik fosforik asit eklenir. Son olarak çözelti, distile su ile 1 litreye tamamlanır ve karanlık ortamda +4 °C'de saklanır
Floresan boyamalar	4nM DiOC6(3) (3,3'-Diheksiloksakarbosiyanin İyodür) boya hazırlamak için, 0,0006 gram DiOC6 tozu tartılarak 1 ml DMEM içinde çözündürülür ve +4 °C'de saklanır. 2µg/ul Propidium iyodür (PI) boya hazırlamak için, 0,023 gram PI tozu tartılarak 1 ml DMEM içinde çözündürülür ve +4 °C'de saklanır
Kristal Viyole	50ml Kristal viyole hazırlamak için, 0.25 gram kristal viyole tartılır, 12.5 ml %25'lik metanol ve 37.5 ml distile su içerisinde çözündürülür. 0,22 µm gözenek çapına sahip filtreden süzülür ve oda sıcaklığında karanlık ortamda saklanır
Laemmli (5X) Tamponu	10 ml Laemmli yükleme tamponu hazırlamak için 2 ml Tris-Cl çözeltisi (1,5 M, pH=6,8), 0,5 ml Bromofenol mavisi (%1), 5 ml Gliserol, 2,5 ml β-merkaptoetanol, 2,0 g SDS içerir. Hazırlandıktan sonra +4°C'de karanlık ortamda saklanır
Yürütme Tamponu (10X)	Yürütme tamponunun 1L 10X ana stokunu hazırlamak için 30,3 g Tris Baz, 144 g Glisin ve 10 g Sodyum Dodeasil Sülfat (SDS) tartılır ve 800 ml distile su ile çözündürülür. pH 8-9 arasında ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml'ye

	tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır. Hazırlanan ana stok distile su ile 1X'e dönüştürülür ve kullanılır
Transfer Tamponu (10X)	Transfer tamponunun 1L 10X ana stokunu hazırlamak için 30,2 g Tris Baz ve 144 g Glisin tartılır ve 700 ml distile su ile çözündürülür. pH 8-9 arasında ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır. Hazırlanan ana stok 1X'e dönüştürmek için 100 ml transfer tamponuna 700 ml distilat su eklenir ve ardından 1000 ml'ye tamamlamak için 200 ml metanol eklenir
Bloklama sütü (%5 yağsız süt)	50 ml olarak hazırlanan bloklama sütünü hazırlamak için 2,5 gr yağsız süt tozu tartılıp TBS-T (TBS Tween20) içerisinde bir karıştırıcı yardımıyla çözündürülür
Memeli Hücre Lizis Tamponu (CLB)	Hücre lizis tamponu, 10 ml M-PER memeli protein ekstraksiyonuna 1X dilüe edilen proteaz inhibitör kokteyli eklenerek hazırlanır. +4°C'de saklanır
Mild Strip Tamponu	15 g Glisin, 1 g SDS ve 10 ml Tween 20 tartılır ve manyetik karıştırıcı kullanılarak 800 ml distile su içerisinde çözündürülür. PH 2,2'ye ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır
10X TBS	5,6 g Tris-baz, 88 g NaCl ve 24 g tartılır ve manyetik karıştırıcı kullanılarak 900 ml Tris-HCl içerisinde çözündürülür. 5M HCl ve 5M NaoH kullanılarak pH 7,6 olarak ayarlanır ve Tris-HCl ile 1000 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan ana stok distile su ile 1X'e dönüştürülür ve kullanılır
Luminol	0,44 g Luminol tozu tartılır ve 10 ml dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözündürülür. karanlık ortamda 20°C'de saklanır
Kumarik Asit	0,15 g Kumarik asit tartılarak 10 ml etanol ile çözündürülür. +4°C'de saklanır
Amonyum Persülfat (%10)	1 g APS tartılır ve 10 ml distile su ile çözündürülür. -20°C'de saklanır
Membran görüntüleme için çözelti A ve B	Çözelti A, 9 ml distile su, 1M Tris-HCl, 50 µl Kumarik asit ve 200 µl Luminol eklenerek hazırlandı. Çözelti B, 9 ml distile su, 1M Tris-HCl pH=8,5 ve 10 µl Hidrojen Peroksit eklenerek hazırlandı