

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**miR-21 ifadesi arttırılan HEPG2 Karaciğer Kanseri Hücresinde Oleandrinin
Hücre Sağkalım ve Hücre Ölüm Mekanizmalarına Etkilerinin İncelenmesi**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
EBRAR KARAKAYA
1700003761

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

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Özge RENCÜZOĞULLARI

MAYIS 2024

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**miR-21 ifadesi arttırılan HEPG2 Karaciğer Kanseri Hücresinde Oleandrinin
Hücre Sağkalım ve Hücre Ölüm Mekanizmalarına Etkilerinin İncelenmesi**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
EBRAR KARAKAYA
1700003761

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

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Özge RENCÜZOĞULLARI
Jüri Üyeleri: Dr. Öğr. Üyesi Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Fatih SEYHAN

MAYIS 2024

ÖNSÖZ

İstanbul Kültür Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarına ışık tutan, saygı ve sevgi duyduğum saygıdeğer proje ve tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Özge RENCÜZOĞULLARI'na teşekkürlerimi sunarım.

Lisans hayatım süresince teorik ve uygulamada bilgi ve tecrübelerinden çok şey öğrendiğim değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Elif Damla ARISAN, Sayın Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN'a, Sayın Prof. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA'ya, Dr. Öğr. Üyesi Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Doğduğum andan itibaren her anımda bana destek olan ve arkamda duran sevgi ve sabırla benim için fedakarlıklar yapan annem Tülay KARAKAYA'ya, her zaman desteğini hissettiğim merhum babam Ahmet KARAKAYA'ya, her zaman yanımda olan ailem ve en kıymetlilerim yeğenlerime en içten saygı, sevgi ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans eğitim sürecimde yanımda olan, maddi manevi zorlukların üstesinden beraber geldiğimiz, her konuda her zaman bana destek olan çok değerli ve canım arkadaşlarım İlke SARAK'a, Didem SEZGİN'e, Mine Yıldırım BORUCU'ya, Kaan DİNÇKURT'a, Beyza Nur ÖZTÜRK'e, Dilara Betül GÜNDÜZ'e, Ayper BOLAT'a, Aykut HİNİK'e, Nisanur Ezgi YILDIRIM'a, Çağla TİRYAKİ'ye, Zeynep Sude YANAR'a,

Laboratuvar ortamında birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ve desteklerini esirgemeyen lisans ve yüksek lisans çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmamın uygulanmasında, BAP 2307 nolu proje ile beni destekleyen İstanbul Kültür Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) teşekkürü borç bilirim.

Mayıs, 2024

Ebrar KARAKAYA

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ	xii
KISALTMALAR	xiii
SEMBOL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvi
SUMMARY	xvii
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Karaciğer Kanseri	3
2.1.1 Karaciğer Kanserinin Epidemiyolojisi	4
2.1.2 Karaciğer Kanserinin Risk Faktörleri.....	4
2.1.3 Karaciğer Kanserinde Temel Moleküler Mekanizmalar	13
2.1.3.1 Hücre Döngüsü	14
2.1.3.2 PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolu.....	17
2.1.3.3 NF-κB Sinyal Yolu	20
2.1.3.4 Apoptotik Mekanizmalar	24
2.1.4 Karaciğer Kanserinde Terapi Modelleri	30
2.1.4.1 Gen Terapi	33
2.1.4.2 İmmüno Terapi	34
2.1.4.3 Epigenetik Değişiklik Tabanlı Terapi	34
2.1.4.4 Hedefli Radyonüklid Terapi	35
2.1.4.5 Moleküler Hedefli Terapi.....	36
2.2 Oleandrin	36
2.2.1 Oleandrin ve Apoptoz.....	40

2.3	MicroRNA(miRNA)	42
2.3.1	miRNA-21	45
2.3.1.1	Hepatoselüler karsinom (HCC) miRNA'ların Rolü	49
3	MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	52
3.1	Materyal	52
3.1.1	Kullanılan hücre ve özellikleri.....	52
3.1.2	Kullanılan cihazlar	52
3.1.3	Hücre kültürü donanımları.....	52
3.1.4	Kullanılan Kimyasallar	52
3.1.5	Kullanılan Çözeltiler.....	52
3.1.6	Kullanılan antikor,miRNA ve plazmidler	52
3.2	Yöntemler.....	52
3.2.1	Hücre Kültürü.....	52
3.2.2	Stabil Hücre Hattı Eldesi	53
3.2.3	Hücrelerin Dondurulması	53
3.2.4	Hücrelerin Açılması.....	53
3.2.5	Plazmid İzolasyonu	54
3.2.6	miRNA Transfeksiyonu.....	54
3.2.7	miRNA izolasyonu ve cDNA Dönüştürülmesi.....	54
3.2.8	Total RNA İzolasyonu ve cDNA Dönüşümü	55
3.2.9	Hücre Canlılığının Belirlenmesi (MTT Testi)	55
3.2.10	Hücrelerin Koloni Oluşturma Potansiyellerinin İncelenmesi.....	56
3.2.11	Floresan Boyamalar.....	56
3.2.12	Protein İzolasyonu	57
3.2.13	Bradford Protein Miktar Tayini	57
3.2.14	İmmunoblotlama Yöntemi.....	57
3.2.15	Yarı Yumuşak Agar Yöntemi.....	58
3.2.16	Hanging Drop (Asılı Damla) deneyi.....	58
3.2.17	PI (Propidium iyodür) Hücre Akış Sitometrisi Deneyi	59
3.2.18	Annexin V/PI Hücre Akış Sitometrisi Deneyi	59
3.2.19	Hücre Sağkalım Deneyi.....	59

3.2.20	İstatiksel Analiz.....	60
4	SONUÇLAR.....	61
4.1	miR-21 Transfeksiyonu Yapılan HEPG2 Hücrelerinde miR-21 İfadesinin İncelenmesi	61
4.2	miR-21 Transfeksiyon Başarısının miR-21 İfadesi ve Hedef Proteinleri Açısından İncelenmesi	62
4.3	miR-21 İfadesi Arttırıldığında Epitelyal Mezenkimal Geçiş Elemanlarının İfadesinin İncelenmesi.....	62
4.4	Oleandrin HEPG2 ve miR-21+ Hücre Canlılığını Azalmıştır.....	63
4.5	Oleandrin miR-21 İfadesini Baskılamıştır	64
4.6	Oleandrin HEPG2 ve miR-21+ Hücrelerinin Koloni Oluşum Potansiyelini Baskılamıştır	65
4.7	Asılı Damla Deneyi İle HEPG2 ve miR-21+ Hücrelerinde 60nM Oleandrin'in Üç Boyutlu Hücre Formlarının Oluşmasına Etkisinin Gösterilmesi	66
4.8	Yumuşak Agar Deneyi İle HEPG2 ve miR-21+ Hücrelerinde Oleandrin'in Üç Boyutlu Hücre Formlarının Oluşmasına Etkisinin Gösterilmesi	68
4.9	Oleandrin'in HEPG2 ve miR-21+ Hücrelerinde Hücre Çoğalmasına Etkisinin İncelenmesi.....	68
4.10	HEPG2 ve miR-21+ Hücrelerinde Oleandrin'in Hücre Sağkalımının ve Apoptoza Bağlı Hücre Ölümünün Floresans Boyama İle Gösterilmesi	69
4.11	HEPG2 ve miR-21+ Hücrelerinde Oleandrin'in Hücre Döngüsü Üzerine Etkisinin İncelenmesi.....	73
4.12	HEPG2 ve miR-21+ Hücrelerinde Oleandrin'in NF- κ B Sinyal Yolağına Ait Proteinlerin Ekspresyon Seviyelerine Etkisinin İncelenmesi.....	75
4.13	HEPG2 ve miR-21+ Hücrelerinde Oleandrin'in PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağına Ait Proteinlerin Ekspresyon Seviyelerinin İncelenmesi ..	77
4.14	HEPG2 ve miR-21+ Hücrelerinde Oleandrin'in Apoptoz Yolağına Ait Proteinlerin Ekspresyon Seviyelerinin İncelenmesi	78

4.15	HEPG2 ve miR-21+ Hücrelerinde Oleandrin'in Apoptotik Popölasyonlar Üzerine Etkisinin İncelenmesi.....	79
5	TARTIŞMA	81
	KAYNAKLAR	89
	EKLER.....	119
5.1.1	Ek A: Çalışma Süresince Kullanılan Cihazlar.....	119
5.1.2	Ek B: Çalışma Süresince Hücre Kültüründe Kullanılan Materyaller	120
5.1.3	Ek C: Çalışma Süresince Kullanılan Kimyasallar.....	121
5.1.4	Ek D: Çalışma Süresince Kullanılan Çözeltiler	123
5.1.5	Ek E: Çalışma Süresince Kullanılan Antikor,miRNA ve Plazmidler	125

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 2020'de Dünya Çapında Karaciğer Kanseri Epidemiyolojisi. A. 2020 yılında dünya çapında karaciğer kanserinin yaşa göre standardize edilmiş tahmini insidansları. B. Dünya çapında tahmini vaka vakalarının çubuk grafikleri. C. Dünya çapında tahmini ölüm sayısını gösteren çubuk grafikler. D.DSÖ'nün 2040'a kadar karaciğer kanserinin sebep olduğu ölümlerin tahmini sayısı. Veri kaynağı: GLOBOCAN 2020 (http://gco.iarc.fr/) [2]	3
Şekil 2 Coğrafi bölgelerine ve etiyolojisine göre HCC insidansı gösterilmektedir [19].	5
Şekil 3 Hücre bölünmesi döngüsünün şematik gösterimi [92]	15
Şekil 4 Hücre Döngüsündeki Kontrol Noktaları ve Düzenleyici Proteinler [90].	17
Şekil 5 PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının şematik gösterimi [96].....	18
Şekil 6 NF-κB sinyal yolağının şematik gösterimi [108].	22
Şekil 7 Apoptoz yolağının şeması [119].	25
Şekil 8 Oleandrin'in doğal kaynakları ve yapısal özellikleri. A) Yaygın olarak "zakkum" olarak bilinen bitki kategorileri. B) Zakkumun ana kaynakları: Nerium zakkum. C) Kardiyak glikozitlerin (CG'ler) sınıflandırılması. D) Oleandrin ve onun hidrolizatı oleandrigenin'in kimyasal yapısı ve tipik CG'lerin diğer yapısı. [159].....	37
Şekil 9 Oleandrin'in emilimi, dağıtımı, metabolizması ve atılımı (ADME) sürecinin şematik gösterimi. A) Oleandrin'in farmakolojik özellikleri. B) Oleandrin'in in vivo ayrıntılı ADME süreci . C) Oleandrin'in in vivo safra atılımı ve enterohepatik dolaşımı (EHC) olasılığı . D) Olası ilk geçiş etkisi. [159].....	38
Şekil 10 Oleandrin'in toksisitesi ve tipik toksisite mekanizmasının gösterimi. A) Oleandrin'in toksisitesinin özeti. B) Kardiyak miyositlerde Na/K-ATPaz'ın oleandrin aracılı inhibisyonunun şematik gösterimi. [159]	39

Şekil 11 Oleandrin'in kansere karşı etki mekanizmasının şematik gösterimi.	
Oleandrin'in, p-ERK, JNK, Akt ve NF-κB sinyal yollarını modüle ederek apoptozu indüklediği bilinmektedir. Ayrıca intrinsik yol, pro-apoptotik/anti-apoptotik proteinlerin arttırılması, kaspazların aktivasyonu ve PARP bölünmesi yoluyla gerçekleştirilir. [160] ...	42
Şekil 12 mikroRNA işlemenin 'doğrusal' kanonik yolu [183].	44
Şekil 13 miR-21'in Genomik ve Epigenomik Görünümü A) miR-21'in genomik konumu: miR-21 , VMP1 proteininin TMEM49 gen öncüsünün 10. intronunda kromozom 17 (17q.23.1) üzerinde bulunur. B) miR-21'in epigenetik manzarası. H3K27me3 ve H3K9me3 gibi kromatin işaretleri miRNA promotöründe tamamen bulunmazken, aktif transkripsiyonla ilişkili H3K4me3 ve H3K4me1 işaretleri miR-21 promotöründe mevcuttur. C) Varsayılan miRNA promoter bölgesi, AP-1, Ets/PU.1, C/EBP, NFI, SRF, p53 ve STAT3 için çeşitli bağlanma bölgeleri içerir [191].	46
Şekil 14 miR-21'in epigenetik düzenleyicileri ve kanser, farklılaşma, hücre ölümü ve kemorezistans açısından miR-21'in aşağı akış hedefleri. Her hücresel sürecin temsili düzenleyicileri listelenmiştir. TMEM49(transmembran proteini 49), VMP1(vakuol membran proteini 1), AP-1(aktivatör protein 1), Ets/PU.1(Ets ailesi transkripsiyon faktörü PU.1), SRF(serum yanıt faktörü), C/EBP(CCAAT/geliştirici bağlanma proteini) , NFI(nükleer faktör I), STAT3(sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3) [188].	48
Şekil 15 Hepatoselüler karsinomun başlangıcı ve gelişimi (solda) ve karaciğer kanseri gelişimi sırasında miRNA'ların ekspresyonu ve hedefleri (sağda). A) Yukarı regüle edilmiş miRNA'lar, B) Yukarı regüle edilmiş miRNA'ların hedefleri, C) Aşağı regüle edilmiş miRNA'lar ve D) Aşağı regüle edilmiş miRNA'ların hedefleri [222].	51
Şekil 16 HEPG2 hücrelerine miR-21 plazmiti transfeksiyonu sonrası miR-21+ hücrelerindeki miR-21 ifadesinin genomik incelenmesi. HEPG2	

- hücrelerine miR-21 plazmitinin transfeksiyonundan 48 saat sonra G-418 uygulandı ve 48 saatin ardından miRNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen miRNA cDNA'ya dönüştürüldü ve qRT-PCR gerçekleştirildi. Normalizasyon RNU6'ya göre gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar GraphPad Prism ile analiz edildi. (*p=0.04).....61
- Şekil 17 HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde miR-21 plazmitinin PTEN ve c-Myc ifadelerine etkisi. miR-21 transfeksiyonu yapılan hücrelerin total protein izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon sonrasında 30 µg protein %12'lik SDS-PAGE jelde yürütüldü. PTEN ve c-Myc ifadeleri immunoblotlama ile incelendi.....62
- Şekil 18 HEPG2 hücrelerine miR-21 plazmiti transfeksiyonu sonrası miR-21+ hücrelerindeki miR-21 ifadesinin genomik incelenmesi. HEPG2 hücrelerine miR-21 plazmitinin transfeksiyonundan 48 saat sonra G-418 uygulandı ve 48 saatin ardından miRNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen miRNA cDNA'ya dönüştürüldü ve qRT-PCR gerçekleştirildi. EMT elemanlarından E-Cadherin, Twist, Snail 1 ve Snail-2 ifadeleri incelendir. GraphPad Prism ile sonuçlar grafik haline getirildi.....63
- Şekil 19 HEPG2 ve HEPG2 miR-21+ hücrelerinde Oleandrin'in (50-100nM) hücre canlılığına etkisinin doza bağlı olarak değişiminin incelenmesi. Hücreler 24 saat boyunca ilaç dozları ile inkübe edildikten sonra 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)- 2,5- difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi ile analiz edildi. Yapılan deney grupları 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır. GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu. (*p=0.0102, **p= 0.0072).....64
- Şekil 20 HEPG2 hücrelerine miR-21 plazmiti transfeksiyonu sonrası miR-21+ hücrelerindeki oleandrin uygulanan hücrelerde miR-21 ifadesinin incelenmesi. miR-21+ hücrelerine 24 saat 60 nM Oleandrin uygulanmasının ardından miRNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen miRNA cDNA'ya dönüştürüldü ve qRT-PCR gerçekleştirildi.

	Normalizasyon RNU6'ya göre gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu. (*p=0.02).....	65
Şekil 21	HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde Oleandrin'in (60- 85nM) koloni oluşum potansiyeline etkisinin incelenmesi. Hücreler 24 saat boyunca ilaç dozları ile inkübe edildikten sonra koloni deneyi gerçekleştirildi. Koloniler kristal viyole ile boyandı. A) Koloni oluşum deneyinin görüntüsü. B) Sayılan koloni sayılarının analizini grafik ile gösterimi. Yapılan deney grupları 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır. Elde edilen sonuçlar GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu (****p<0.0001).	66
Şekil 22	Asılı damla yöntemi ile HEPG2 hücresinde Oleandrin uygulanmasının üç boyutlu hücre formu oluşumuna etkisinin incelenmesi. A) HEPG2 hücrelerinde ilaçlı ve kontrol gruplarının 24. 48. ve 72.saatte ışık mikroskopunda sferoid çaplarının ölçülmesi. B) HEPG2 hücrelerinde gerçekleştirilen asılı damla deneyinin sonuçlarının GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.	67
Şekil 23	Asılı damla yöntemi ile miR-21+ hücresinde Oleandrin uygulanmasının üç boyutlu hücre formu oluşumuna etkisinin incelenmesi. A) miR-21+ hücrelerinde ilaçlı ve kontrol gruplarının 24. 48. ve 72.saatte ışık mikroskopunda sferoid çaplarının ölçülmesi. B) miR-21+ hücrelerinde gerçekleştirilen asılı damla deneyinin sonuçlarının GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.	67
Şekil 24	Koloni oluşumuna etkisinin yumuşak agar deneyi ile incelenmesi. Deney 4 hafta sonunda Işık mikroskopu ile çekim alınmıştır.	68
Şekil 25	HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde Oleandrin 60nM uygulanmasının hücre proliferasyonu üzerine etkisinin incelenmesi. Hücreler 24 saat boyunca ilaç dozu ile inkübe edildikten sonra tripan mavisi deneyi gerçekleştirildi. Yapılan deney grupları 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır. Elde edilen sonuçlar GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.	69

Şekil 26 HEPG2 hücre hattında Oleandrin'in hücre sağkalımı, hücre ölümünün ve mitokondriyal membran potansiyelinin floresan boya ile mikroskop altında incelenmesi.....	71
Şekil 27 miR-21+ hücre hattında Oleandrin'in hücre sağkalımı, hücre ölümünün ve mitokondriyal membran potansiyelinin floresan boya ile mikroskop altında incelenmesi.....	72
Şekil 28 Oleandrin'in HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde 24 saat uygulanmasının hücre siklusu üzerine etkisinin incelenmesi. Elde edilen sonuçların GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.....	74
Şekil 29 HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde Oleandrin'in NF- κ B sinyal yolağına etkisinin immunoblotlama yöntemi ile incelenmesi. Total protein izolasyonunun ardından 30 μ g hazırlanan protein örnekleri %12'lik SDS-PAGE jel sisteminde yürütüldü. İncelenen antikorlarla problandı. Yükleme kontrolü için GAPDH kullanıldı. Elde edilen sonuçların GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.	76
Şekil 30 HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde Oleandrin'in Nükleer ve Sitoplazmik protein ifadelerinin incelenmesi için immunoblotlama yöntemi gerçekleştirildi. Protein izolasyonunun ardından 30 μ g hazırlanan protein örnekleri %12'lik SDS-PAGE jel sisteminde yürütüldü. İncelenen antikorlarla problandı. Nükleer ve Sitoplazmik kontrol için Histon H3 ve GAPDH kullanıldı. Elde edilen sonuçların GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.....	77
Şekil 31 HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde Oleandrin'in PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağına etkisinin immunoblotlama yöntemi ile incelenmesi. Total protein izolasyonunun ardından 30 μ g hazırlanan protein örnekleri %12'lik SDS-PAGE jel sisteminde yürütüldü. İncelenen antikorlarla problandı. Yükleme kontrolü için GAPDH kullanıldı. GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.	78
Şekil 32 HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde Oleandrin'in Apoptoz yolağına etkisinin immunoblotlama yöntemi ile incelenmesi. Total protein izolasyonunun ardından 30 μ g hazırlanan protein örnekleri %12'lik	

SDS-PAGE jel sisteminde yürütüldü. İncelenen antikorlarla
probandı. Yükleme kontrolü için GAPDH kullanıldı. GraphPad
Prism ile sütun grafiği oluşturuldu 79

Şekil 33 HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde Annexin V/PI ile hücre ölümü analizi.

Sonuçlar GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu **p=0.0040
..... 80



TABLO LİSTESİ

Tablo 1 HCC Hücrelerinde kullanılan ilaçlar ve hedefleri [96].	20
Tablo 2 HCC tedavisinde kullanılan bazı ilaçlar ve onların gen hedeflerinin şematik gösterimi [219].	32
Tablo 3 Kullanılan Cihazların Listesi	119
Tablo 4 Hücre Kültüründe Kullanılan Materyaller	120
Tablo 5 Kullanılan Kimyasalların Listesi.	121



KISALTMALAR

3B:	3 Boyutlu
HCC:	Hepatosellüler Karsinom
miRNA:	mikroRNA
NKP:	Sodyum/Potasyum (Na ⁺ /K ⁺)-Atpase Pompası
G-418:	Neomisin
HCV:	Hepatit C Virüsü
HBV:	Hepatit B Virüsü
NA:	Nükleosit Analoglarıdır
SVR:	Sürekli Virolojik Yanıt
DAA:	Doğrudan Etkili Antiviral
HDV:	Hepatit D Virüsü
NAFLD:	Alkolsüz Yağlı Karaciğer Hastalığı
NASH:	Alkol Olmayan Steatohepatit
AFB1:	Aflatoksin B1
WHO-DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
VCM:	Vinil Klorür
ICC:	İntrahepatik Kolanjiokarsinom
TZD:	Tiazolidinedionlar
GST:	Glutasyon S-Transferazlar
HFE:	Hemokromatoz
CDK:	Siklin-Bağımlı Kinazlar
PI3K:	Fosfatidilinositol 3-Kinaz
VEGF:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
NF-κB:	Nükleer Faktör-Kb
PRR:	Model Tanıma Reseptörleri
TNFR:	TNF Reseptörü
TCR:	T Hücresi Reseptörü
TNF-α:	Tümör Nekroz Faktör-A
BCL-2:	B-hücreli lenfoma 2

BCL-XL:	Ekstra Büyük B Hücreli Lenfoma
MMP:	Matriks Metaloproteinazlar
ECM:	Hücre Dışı Matrisi
KRAS:	Kirsten Ras Sarcoma viral onkogen
ROS:	Reaktif Oksijen Türlerinin
TME:	Tümör Mikroçevresi
TRAIL:	TNF İle İlişkili Ligand
FADD:	Fas-İlişkili Ölüm Alanı
DED:	Ölüm Efektör Alanı
BID:	Bcl-2 Etkileşimli Protein
TKI:	Çoklu Kinaz İnhibitörü
TK:	Tirozin Kinaz
KKH:	Kronik Karaciğer Hastalıkları
DC:	Dendritik Hücre
TRT:	Hedefli Radyonüklid Tedavisi
ncRNA:	Kodlamayan RNA
Apoptoz:	Programlanmış Hücre Ölümü
MK:	Monokinaz İnhibitörlerine
HPLC:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
GC:	Gaz Kromatografisi
ELISA:	Enzim Bağlantılı İmmunosorbent Testi
UV:	Ultraviyole
LC-MS:	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi
MAPK:	Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinaz
Ago:	Argonaute Proteinleriyle
RISC:	RNA-İndüklenmiş Susturma Kompleksi
HB:	Hepatoblastoma
FBS:	Fetal Sığır Serumu
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium

SEMBOL LİSTESİ

%:	Yüzde
µl:	Mikrolitre
µM:	Mikromolar
K⁺:	Potasyum iyonu
kg:	Kilo gram
mm:	Milimetre
Na⁺:	Sodyum iyonu
nM:	Nanomolar
rpm:	Dakikada devir sayısı
U:	Enzim ünitesi
µg:	Mikrogram
µm:	Mikrometre
°C:	Santigrat derece
gr:	Gram
kDa:	Kilo Dalton
ml:	Mililitre
mol:	Madde miktarı
nm:	Nanometre
pH:	Bir çözeltinin asit baz derecesini ifade eden ölçü birimi
β:	Beta
µm:	Mikro metre
α:	Alfa

ÖZET

Hepatosellüler karsinom (HCC) primer karaciğer kanserlerinin %82'sini oluşturmaktadır. Kansere bağlı ölümlerin üçüncü ana sebebidir. HCC'nin altında yatan ayrıntılı mekanizmanın ve patogenezinin araştırılması, yeni biyobelirteçlerin bulunup etkin öncül tedavi ve tanının keşfedilmesi, yeni terapötik ilaçların geliştirilmesi hasta ve potansiyel hastalar için önemlidir. miR-21, bir dizi kanserde yaygın olarak incelenen onkogenik miRNA'lardan biridir. Hücre proliferasyonu, göçü ve apoptoz ile ilgilidir ve kanserde invazyonu ve metastazı teşvik edebilir. Kanser tedavisinde ilgi gören Sodyum/potasyum (Na⁺/K⁺)-ATPase pompası (NKP) inhibitörlerinden Oleandrin'in anti-tümorigenik etkisi çeşitli kanser tiplerinde gösterilmiştir ve bu sebeple gelecekteki çalışmalar için umut vaat etmektedir. Bu sebeple bu tez çalışmasında, Oleandrin'in HCC hücresinde miR-21 ifadesi artırılarak elde edilen (miR-21+) daha agresif hücrelerle stabil hücre hattı oluşturulmuş ve çeşitli kanser tiplerinde anti-tümorigenik etki gösteren Oleandrin'in HCC hücrelerine etkisini gözlemleyebilmek için iki boyutlu ve üç boyutlu ortamda transkriptomik ve proteomik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. İki boyutlu ortamda Oleandrin'in HEPG2 ve miR-21+ hücreleri üzerindeki etkinliğini gözlemek için hücre canlılığı, proliferasyonu, koloni oluşturma potansiyeli, hücre siklusundaki etkisini gözlemleyebilmek için Annexin V/PI deneyi uygulanmıştır. Tümörün ilaca karşı verdiği cevabı taklit etme amacıyla oluşturduğumuz üç boyutlu hücre kültüründe yumuşak agar koloni oluşturma deneyi ve asılı damla deneyi gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda Oleandrin'in miR-21+ ve HEPG2 hücrelerinde hücre canlılığı ve koloni oluşturma potansiyelini azalttığı ve miR-21 ifadesini baskıladığı gösterilmiştir. Oleandrin'in hücre siklusunda G2/M fazında tutulu bıraktığı ve hücre içi sinyal yollarından PI3K/Akt/mTOR ve NF-κB'yi baskıladığı, apoptoz sinyal yolağını indüklediği incelenmiştir. Tez çalışmamızdan elde edilen sonuçlar doğrultusunda, Oleandrin'in Hepatosellüler karsinom hücre hattı HEPG2 ve miR-21 ifadesi artmış hücrelerde hücre canlılığını baskıladığı ve hücre ölümünü indüklediğini göstermiştir. Bu öncül çalışmanın sonuçları bağlı olarak Oleandrin'nin gelecekte *in vivo* çalışmalarının gerçekleştirilmesinin ardından Hepatosellüler Karsinom tedavisinde kullanılabilecek umut verici bir ajan olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer Kanseri, miRNA-21, Oleandrin, HEPG2, Apoptoz, PI3K/Akt

SUMMARY

Hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for 82% of primary liver cancers. It is the third main cause of cancer-related deaths. The investigation of the detailed mechanism and pathogenesis underlying HCC, the discovery of new biomarkers and the discovery of effective initial treatment and diagnosis, the development of new therapeutic drugs are important for patients and potential patients. miR-21 is one of the oncogenic miRNAs that has been widely studied in several cancers. It is related to cell proliferation, migration, and apoptosis, and may promote invasion and metastasis in cancer. The anti-tumorigenic effect of Oleandrin, one of the sodium/potassium (Na⁺/K⁺)-ATPase pump (NKP) inhibitors of interest in cancer treatment, has been shown in various cancer types and therefore shows promise for future studies. For this reason, in this thesis study, a stable cell line was created with more aggressive cells obtained by increasing the expression of mir-21 of oleandrin in the HCC cell (miR-21+), and transcriptomic and proteomic studies were performed in a two-dimensional and three-dimensional environment to observe the effect of Oleandrin on HCC cells, which has an anti-tumorigenic effect on various types of cancer. To observe the activity of oleandrin on HEPG2 and miR-21+ cells in a two-dimensional environment, the Annexin V/PI experiment was applied to observe cell viability, proliferation, colony-forming potential, and its effect on the cell cycle. A soft agar colony formation experiment and a hanging drop experiment were performed in a three-dimensional cell culture that we created to simulate the tumor's response to the drug. In our study, it was shown that Oleandrin reduces cell viability and colony-forming potential in miR-21+ and HEPG2 cells and suppresses MIR-21 expression. It has been studied that oleandrin is retained in the G2/M phase of the cell cycle and suppresses PI3K/Akt/mTOR and NF-KB intracellular signaling pathways, inducing the apoptosis signaling pathway. According to the results obtained from our thesis study, it has been shown that Oleandrin suppresses cell viability and induces cell death in cells with increased Hepatocellular carcinoma cell line HEPG2 and miR-21 expression. Depending on the results of this preliminary study, Oleandrin has shown to be a promising agent that can be used in the treatment of Hepatocellular Carcinoma following the implementation of *in vivo* studies in the future.

Key words: Liver Cancer, miRNA-21, Oleandrin, HEPG2, apoptosis, PI3K/Akt

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer kanseri Dünya’da kansere bağlı ölümlerde üçüncü nedendir. HCC primer karaciğer kanserlerinin %80-90’nını oluşturmaktadır ve genellikle metastaz yaparak daha agresif hale gelmektedir. Bu şekilde hastaların yaşam süreleri kısalmaktadır. Tezimde öncelikli amacım, HEPG2 HCC hücrelerinde miR-21 ifadesinin, miR-21 içeren plazmid transfeksiyonu yapılarak arttırılmasıdır. miR-21 ifadesindeki artış gerçek zamanlı PZR ile incelenecek ve en az iki kat artış gözlenen hücreler miR-21 ifadesi arttırılan HEPG2 (miR-21+) olarak Neomisin (G-418) içeren besi ortamında kültürleneceklerdir. miR-21+ HCC hücrelerinde miR-21’in hedeflediği PTEN ifadesindeki en az iki kat azalma ile miR-21’in artışına bağlı olarak hücrelerdeki etkinliği immunoblotlama ile doğrulanacaktır. İkinci amacım miR-21+ ve normal HCC hücrelerinde sodyum/potasyum pompası (NKP) inhibitörü olan Oleandrin’in hücre sağ kalım mekanizmalarının üzerindeki etkilerini incelemektir. Öncelikle Oleandrin’in MTT hücre sağ kalım testinde kullanılabilecek doz aralığı (1-100nM) literatürdeki veriler ışığında elde edilmiştir. Bu doz aralığında hem normal hem de miR-21+ HCC hücrelerinde IC50 konsantrasyonları belirlenecektir. Zamana bağlı olarak yapılcak hücre sağ kalım ve proliferasyon testleri ile oleandrin uygulama süresi belirlenecektir. HCC hücrelerinde Oleandrin’in etkisi ilk defa çalışmamız ile gösterilmiş olacaktır. HCC hücrelerinde yüksek ifade edilen NF- κ B ve PI3K/Akt/mTOR sinyallerinin miR-21+ hücrelerinde daha yüksek oranda ifade edileceği öngörülmektedir. Oleandrin’in bu sinyal yollarındaki inhibitör etkisi meme, glioblastoma, over kanserlerinde gösterilmiştir. Bu sebeple Oleandrin’in HCC hücrelerinde de yüksek ifade edilen bu sinyal mekanizmalarına etkisini göstermek çalışmamızın özgün değerini oluşturmaktadır. Oleandrin’in miR-21 ile ilişkili olarak HCC hücrelerinde hücre ölüm mekanizmalarına etkisinin belirlenmesi için HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde apoptotik hücre ölüm mekanizması immunoblotlama yöntemi ile PARP, kaspaz 9, kaspaz 8, kaspaz 3 ifadelerinin belirlenmesi ve anti-apoptotik Bcl-2 ifadesi

incelenecektir. Propidyum iyodür ile boyanan hücrelerde hücre sikulusu analizi ile Oleandrin'in hücre fazlarına etkisi belirlenecektir.

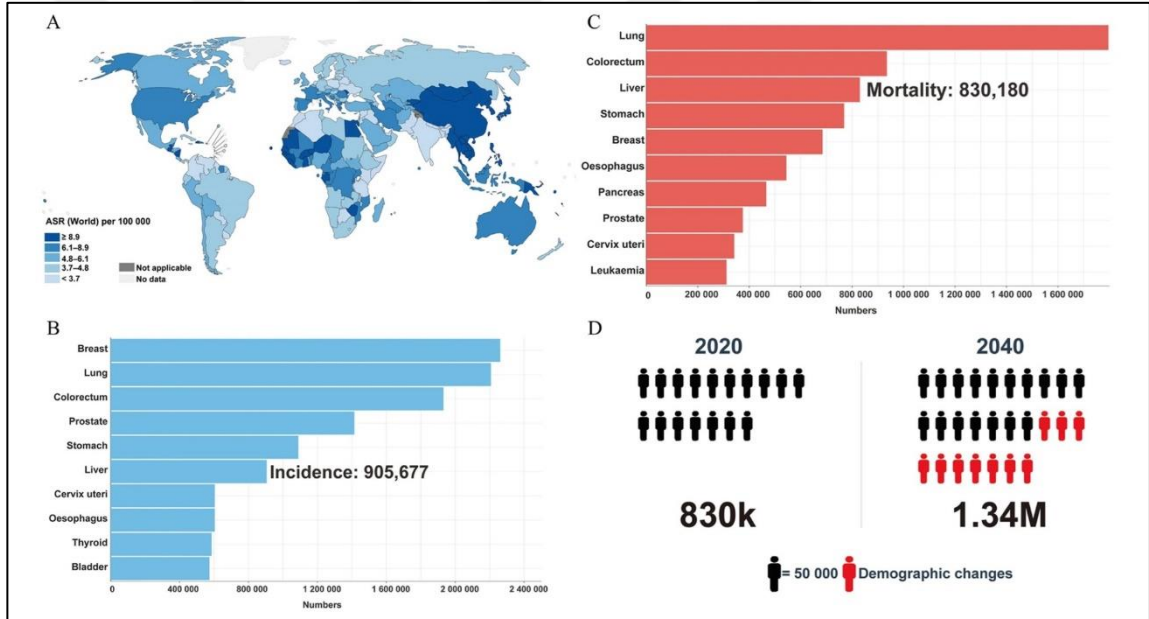
Sonuç olarak bu çalışmada, HCC hücrelerinde etkin mekanizması henüz bilinmeyen Oleandrin'in, HCC vakalarında sıklıkla görülen aşırı miR-21 ifadesi üzerindeki etkisi bu çalışma ile ilk defa belirlenmiş olacaktır.



2 GENEL BİLGİLER

2.1 KARACİĞER KANSERİ

Karaciğer kanseri dünya sıralamasında yedinci en yaygın görülen kanserdir ve kansere bağlı ölümlerin üçüncü sırasındadır (Şekil 1 ve 2) [1], [2]. Dünyada en yüksek insidansı Asya ve Afrika bölgelerinde bulunmaktadır.



Şekil 1 2020'de Dünya Çapında Karaciğer Kanserİ Epidemiyolojisi. A. 2020 yılında dünya çapında karaciğer kanserinin yaşa göre standardize edilmiş tahmini insidansları. B. Dünya çapında tahmini vaka vakalarının çubuk grafikleri. C. Dünya çapında tahmini ölüm sayısını gösteren çubuk grafikler. D.DSÖ'nün 2040'a kadar karaciğer kanserinin sebep olduğu ölümlerin tahmini sayısı. Veri kaynağı:

GLOBOCAN 2020 (<http://gco.iarc.fr/>) [2]

Hepatosellüler karsinom (HCC) karaciğer kanserinin en baskın türüdür ve tüm karaciğer kanserlerinin yaklaşık olarak 82'sini kapsamaktadır. 2018'de yapılan incelemeye göre yıllık 100.000 kişi başına tahmini olarak bakıldığında küresel insidansı 9.3'dür ve ölüm oranı 8.5'dir yaklaşık olarak insidans ve ölüm oranları birbirine eşdeğer sayılmaktadır

[3].Elde edilen veriler doğrultusunda 2025 yılına kadar HCC'nin yılda 1 milyondan fazla insanı etkilemesi tahmin edilmektedir [4], [5], [6], [7], [8]

2.1.1 Karaciğer Kanserinin Epidemiyolojisi

Epidemiyolojik araştırmalara bakıldığında erişkin insanlarda HCC vakalarının büyük çoğunluğunun başlangıcının sporadik olduğunu belirtmişlerdir. Bunlara örnek olarak alkolün kötüye kullanımı veya kronik HCV ve HBV enfeksiyonu gibi en az bir belirlenmiş genetik olmayan risk faktörüne sahip olduğu göstermiştir. Bununla birlikte, bilinen bu çevresel risk faktörlerine sahip çoğu insanda siroz veya HCC gelişimi olmamasına rağmen, risk faktörü olmayan kişilerde de HCC gelişebilmektedir [9].

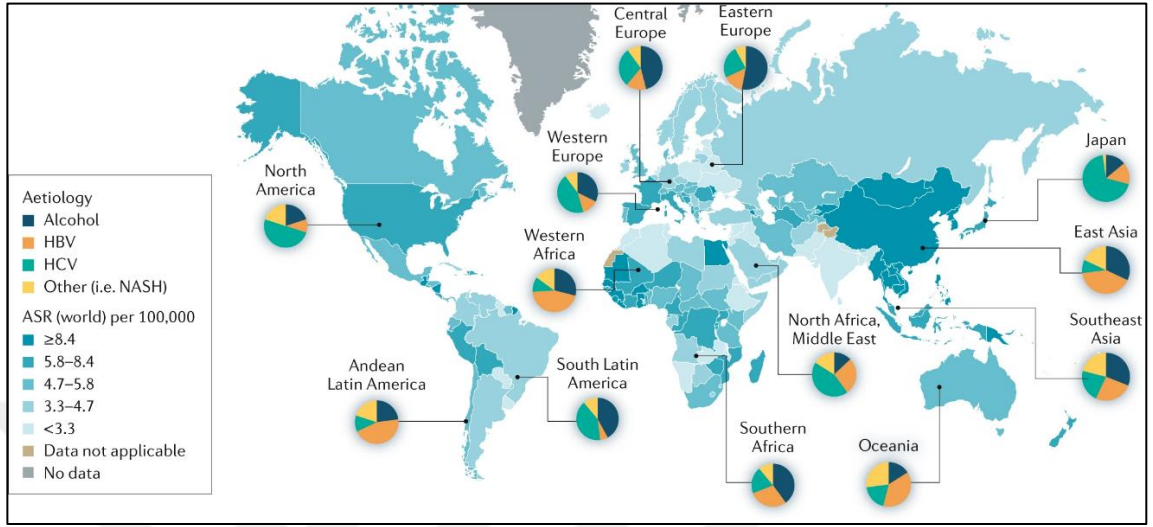
HCC'nin genetik varyasyonu hem popülasyonlar içinde hem de popülasyonlar arasındaki farklılıklardan dolayı değişimi gözlemek için çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada 500 sirozlu hasta ve karaciğer dışı hastalığı olan 500 kontrol grubu hasta ile çalışılmıştır. Çalışma sonucunda, HCV ile ilişkili olan sirozlu hastaların birinci derece akrabalarında siroz prevalansında anlamlı bir artış bildirmiştir (olasılık oranı, 17; %95 GA), 4.2–12.9)[10].

Yapılan başka bir çalışmada NAYKH ve sirozlu hastalarda, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında insülin direnci için aile hikayesi bulunduğu ve ailelerde hepatit B taşıyıcılarının çok olduğu gösterilmiştir. Buna bağlı olarak, HBV enfeksiyonu dikkate alınması gerektiği ileri aşamada HCC'ye genetik altyapı oluşturduğuna dair kanıt bulunmuştur [10], [11], [12], [13], [14].

2.1.2 Karaciğer Kanserinin Risk Faktörleri

HCC vakalarında %90 oranında etken olarak kronik karaciğer hastalığı ve siroz gösterilmektedir. Farklı etiyolojilerden kaynaklanmakta olan siroz'un HCC için en önemli risk faktörü olduğu ve yıllık ölüm insidansının %1-6 olduğu gözlemlenilmiştir [15], [16], [17], [18].

HCC'nin diğer risk faktörleri şunlardır; Hepatit B virüsü enfeksiyonu, Hepatit C virüsü enfeksiyonu, Hepatit D virüsü enfeksiyonu, Alkol, Metabolik Sendrom, Diyabet ve Obezite, NASH, Alkolsüz Yağlı Karaciğer Hastalığı (NAFLD), Aflatoksin B1, Tütün, Diyet Faktörleri, Yaş, cinsiyet ve diğer etkenler, Genetik faktörlerdir [17], [18].



Şekil 2 Coğrafi bölgelerine ve etiyolojisine göre HCC insidansı gösterilmektedir [19].

HCC demografik özellikleri açısından incelendiğinde çoğu popülasyonda insidans yaş ile doğru orantılıdır. Yaş arttıkça risk de artmaktadır. Cinsiyet bazından olayı ele aldığımızda erkeklerde görülme sıklığı kadınlarda görülme sıklığına göre iki veya dört kat daha fazladır. 2016'da ABD'de yapılmış bir çalışmaya göre 100.000 insan üzerinde insidans oranı erkeklerde 10.4 iken kadınlar 2.9'dur. 2001'de ABD'de yapılan çalışmada asyalılar ve pasifik adalılarda 100.000 insanda insidans 11.3 olarak hesaplanmıştır ve en yüksek HCC oranına sahip olduğu gösterilmiştir ancak bu oran düşmeye başlamıştır. 2016'da yapılan çalışmada Amerikan kıızılderililer ve alaska yerlileri insidans oranında 11.4 olarak en yüksek insidans olmuştur ve sıralamanın devamında hispanikler 9.8, Asyalılar ve pasifik adalılar 9.1 insidansa sahiptirler. Sonuç olarak HCC insidansı cinsiyet, yaş, ırk ve coğrafi bölge açısından bakıldığında değişkenlik göstermektedir [20].

HCC vakalarının yaklaşık olarak %80'i, Doğu Asya'da kronik hepatit B virüsü taşıyıcılarının benzer yüksek prevalans modeli gözlemlenmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çalışmadaki elde edilen sonuçlara göre HCC insidansı son kırk yılda üç kat arttı, bu da muhtemelen kronik hepatit C'den kaynaklanmaktadır. HCC hastalarında öngörülen bu artışa artık artan obezite prevalansının ve buna bağlı yağlı karaciğer hastalığının neden olduğuna inanılmaktadır. ABD'deki nüfusa dayalı çalışmalar, HCC dağılımının, Asyalılar/Pasifik Adalılar (API'ler) gibi çeşitli ırk ve etnik gruplar

arasında farklılık gösterdiğini, diğer Kafkasyalılar ve Hispaniklerle karşılaştırıldığında daha yüksek HCC oranlarına sahip olduğunu göstermiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde HCC için bildirilen ortalama beş yıllık sağkalım oranı %14'tür ve gelişmekte olan ülkelerde bu durumun daha da kötü olması muhtemeldir [21].

Hepatit B virüsü enfeksiyonu

Hepatit B virüsü (HBV), karaciğer hücrelerinde mutasyonu teşvik eden ve HCC'ye dönüşümüne sebep olan nekro-inflamatuvar hastalığı indükleyen DNA virüsüdür. HBV taşıyıcılarında hayat boyu HCC olma riski %10-25 arasında değişmektedir. HBV enfeksiyonu HCC vakalarındaki asya ve afrika bölgesinde %60'lık, batı bölgesinde %20'lik orandan sorumludur [22], [23]. ABD'de HCC görülme sıklığı üzerine yapılan bir araştırmada %0,42 olduğu sonucuna varılmıştır ancak bu oran HBV enfeksiyonu veya siroz hikayesine bağlı olarak değişiklik gösterebilir [22], [23], [24], [25], [26]

Yapılan çalışmalarda, HBV enfeksiyonu antiviral ile tedavi edildiğinde, HBV-DNA düzeylerinde düşüş sağlayabildiğini ve karaciğer fonksiyonu ile histolojiyi iyileştirebildiği göstermiştir. Kullanılmakta olan ilaçlardan birincisi nükleos(t)it analoglarıdır (NA'lar). Elde edilen bulgular sonucunda NA tedavisinin kısa ve orta vadeli süreçlerde HCC riskini azaltabileceği ancak ortadan kaldıramayacağı gösterilmiştir [27], [28], [29], [30]. HBV aşılama programı önemli bir HCC önleme stratejisidir. Tayvan'daki neonatal HBV aşılama çalışmalarına yönelik elde edilen 30 yıllık rapora bakıldığında, aşılama programının ardından HCC'nin görülme sıklığının %80 oranında azaldığı ve mortalitenin %92 azaldığı sonucuna varılmıştır [23], [31], [32], [33].

Hepatit C virüsü enfeksiyonu

Kronik HCV enfeksiyonu, HCC için en önemli risk faktörlerinden biridir ve riski 10 ila 20 kat artırır. HCV, konağın DNA'sına entegre olmayan bir RNA virüsüdür ve bu nedenle tek başına tümör oluşumuna sebep olması pek olası değildir. Aksine, HCV ile ilişkili HCC vakalarının yaklaşık %90'ında siroz önceden oluşmuştur. Bu nedenle, HCV karaciğere tekrarlanan hasar, rejenerasyon ve fibroz yoluyla tümör oluşumunu teşvik eder [34], [35]. HCV ile ilişkili sirozu olan kişilerde yıllık HCC insidansı %0,5 ile %10 arasında değişmektedir. Gelişmiş ülkelerdeki HCC'lerin büyük bir kısmı kronik HCV ile ilişkilidir.

HCV, HCC gelişme riskini neredeyse 17 kat artırır. Siroz, en önemli risk faktörüdür ve bu risk alkol kullanımı, Hepatit B virüsü (HBV) ile koenfeksiyon, diyabet, ileri yaş, Afro-Amerika ırkı ve sigara kullanımı gibi diğer faktörlerle birlikte daha da artmaktadır. HCV enfeksiyonu genellikle uzun yıllar boyunca belirti göstermez. Bu nedenle, tarama ile erken teşhis ve ardından tedavi, HCV ile ilişkili siroz ve sonrasında karaciğer kanseri gelişme riskini önemli ölçüde azaltmak için önemlidir [34], [35], [36], [37].

Aktif HCV enfeksiyonu olan kişiler HCC riski birçok faktörden etkilenmektedir. Bu faktörlere bakıldığında, erkeklerde HCC riski kadınlara göre daha yüksektir. Hispanik kökenli kişilerde HCC riski diğer etnik kökenlerden daha yüksektir [38], [39]. HCV genotip 3 en yüksek HCC riski ile ilişkilidir. HCV ile daha uzun süre enfekte olan kişilerde HCC riski daha yüksektir. HBV veya HIV ile koenfeksiyon, HCV ile ilişkili HCC riskini insülin direnci, obezite ve diyabet gibi metabolik sendrom bileşenleri, tütün ve alkol kullanımı HCC riskini artırır [38], [39], [40], [41]

HCC riskini azaltmanın en önemli yolu: Antiviral tedavi yoluyla sürekli virolojik yanıt (SVR) elde etmektir. Doğrudan etkili antiviral (DAA) tedavisi, SVR'ye ulaşan kişilerde HCC riskinin %50-80 oranında azaldığını göstermiştir [42], [43], [44]. SVR ile bile HCC riski tamamen ortadan kalkmaz: Özellikle sirozlu hastalarda. SVR elde eden hastalarda HCC riski, alkol kullanımı, ileri yaş, HCV genotip 3 enfeksiyonu ve yüksek hepatik fibrozis belirteçleri ile ilişkili olarak daha yüksektir. SVR'ye ulaşan hastalarda bile düzenli HCC taraması önemlidir. SVR'ye ulaşan hastalar 1, 2 ve 3 yıllık kümülatif HCC riskleri sırasıyla %1,1, %1,9 ve %2,8'dir [45], [46], [47], [48]. Bu riskin yüksek olduğu grup ise sirozlu hastalardır (%1,0-2,2). Sonuç olarak, aktif HCV enfeksiyonu olan kişilerde HCC riski, çeşitli faktörlerden etkilenir. SVR elde etmek, HCC riskini önemli ölçüde azaltmanın en etkili yoludur. Ancak SVR ile bile bazı risk faktörleri HCC riskini artırabilir. Bu nedenle, SVR'ye ulaşan hastaların da düzenli HCC taraması yaptırmaları önemlidir [38], [39], [40], [41], [42], [43], [44], [45], [46], [47], [48], [49], [50], [51].

Hepatit D virüsü enfeksiyonu

Hepatit D virüsü (HDV), sadece Hepatit B virüsü (HBV) taşıyan kişileri etkileyen ve HBV'ye kıyasla daha ciddi karaciğer hastalığına yol açabilen bir RNA virüsüdür. HDV, dünya çapında 20-40 milyon insanı etkilemektedir ve karaciğer kanseri (HCC) riskini

önemli ölçüde artırmaktadır [52], [53]. HDV'nin karsinogenezi, hücrel sinyalleri ve genomik profili etkileyerek gerçekleşir. Bu mekanizmalar, HBV ile ilişkili HCC'den farklıdır ve HDV'nin HCC'ye özgü bir etken olduğunu gösterir. HDV ile ilişkili HCC'nin moleküler mekanizmaları hala tam olarak anlaşılmış değildir. Daha fazla bilgi edinmek için çok merkezli çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmalar, HDV'nin karsinogenezdeki rolünü daha iyi anlamamızı ve viral ilişkili HCC'nin farklı formları arasındaki farkları belirlememizi sağlayacaktır [52], [53], [54], [55], [56].

Alkol

Aşırı alkol tüketimi, karaciğer kanseri (HCC) için önemli bir risk faktörüdür. Günde 3 veya daha fazla içecek tüketen kişilerde HCC riski %16 artar [9], [43]. Alkol sirozunun yıllık insidansı %1 ile %3 arasında değişmektedir ve HCC vakalarının %15-30'unu oluşturmaktadır. Alkol, HBV gibi diğer virüslerden kaynaklanan HCC riskini de artırır. Alkolün HCC'ye neden olma mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır, ancak alkole özgü bazı pro-tümörojenik mekanizmalar olduğu düşünülmektedir. Daha düşük alkol tüketiminin (günde 3'ten az içecek) HCC riski üzerindeki etkisi net değildir. Alkolün HCC riskiyle ilişkisi, diyabet durumuna göre de değişebilir [56], [57], [58]. Diyabeti olmayan kişilerde, daha düşük alkol tüketimi riski %35 oranında azaltabilirken, diyabetiklerde herhangi bir azalma görülmez. Alkolün HCC riskiyle ilişkisi kadınlarda erkeklere kıyasla daha güçlü olabilir. Bunun nedeni alkol dehidrojenaz aktivitesindeki farklılıklar veya kadınlar ile alkol ve siroz arasında daha güçlü bir ilişki olması olabilir. Ağır içiciliği inceleyen bir meta-analizlerde, alkolün kadınlarda neredeyse dört kat artan riskle ilişkili olduğu, ancak erkeklerde yalnızca %59 oranında artan riskle ilişkili olduğu görülmektedir. Alkol, siroz riskini önemli ölçüde artırır. Bu sebeple sirozlu hastalarda HCC gelişme riski de önemli ölçüde artmaktadır. Alkol tüketimine bağlı olarak gelişen sirozun yıllık insidansı %1 ile %3 arasında değişmektedir ve HCC vakalarının %15-30'unu oluşturmaktadır. Aşırı alkol tüketimi, karaciğere ciddi zararlar verebilir ve HCC de dahil olmak üzere birçok sağlık sorununa yol açabilir. Alkol tüketimini sınırlamak veya tamamen bırakmak, karaciğer sağlığını korumak ve karaciğer kanseri riskini azaltmak için önemlidir [9], [43], [56], [57], [58], [59], [60], [61], [62].

Metabolik Sendrom, Diyabet ve Obezite

Metabolik sendromun (diyabet, obezite, yüksek tansiyon ve kolesterol) artması, karaciğer kanseri (HCC) riskini önemli ölçüde artırdığını göstermektedir. 2014 tarihinde yapılan bir çalışmaya göre meta-analiz, metabolik sendromun HCC riskini %81 oranında artırdığını tahmin etmiştir. Metabolik sendromun bir bileşeni olan dislipidemiye statinlerle tedavi etmek, riski %37-42 oranında azaltabilir [24], [57], [63]. Çeşitli çalışmalarda diyabetin HCC riskini 2 ile 3 kat artırdığı görülmüştür. Erkeklerde diyabet, HCC riskinde kadınlara kıyasla daha fazla artışa neden olur. Daha uzun diyabet süresi, daha yüksek HCC riski ile ilişkilidir. Tip 2 diyabetin metformin ile tedavisinin HCC riskini azalttığı, insülin veya sülfonilürelerle tedavinin ise riski artırdığı düşünülmektedir. Yetişkinlerde aşırı abdominal yağlanmanın HCC riskini önemli ölçüde artırdığı bilinmektedir [64], [65], [66]. Çalışmalarda, yağlanmanın daha erken yaşlarda da HCC riskini artırabileceğini göstermektedir. Erken yaşta obezite, HCC riskini 2 ile 3 kat artırabilir. Bel ve kalça çevresi, obezitenin ölçüsü olarak BMI'dan daha doğru bir gösterge olabilir. Bel çevresi yüksek olan kişilerde HCC riski 2 kat artmaktadır. Aşırı karın boyutu, BMI'si normal olan kişilerde bile HCC riskinin artmasıyla ilişkilidir [24], [57], [63], [64], [65], [66], [67], [68], [69], [70].

Alkolden bağımsız karaciğer yağlanması (NAFLD)

Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), karaciğerde anormal miktarda yağ birikmesiyle karakterize edilen bir karaciğer hastalığıdır. Alkol tüketmeyen kişilerde de görülebilir. NAFLD'nin iki ana türü vardır: Alkol Olmayan Yağlı Karaciğer (NAFLD), karaciğerde yağ birikmesinin en yaygın türüdür ve alkol tüketimi ile ilişkili değildir. Alkol Olmayan Steatohepatit (NASH), NAFLD'nin daha şiddetli bir şeklidir ve karaciğer iltihabı ve hasarına yol açabilir. NASH, siroz ve HCC de dahil olmak üzere karaciğer hastalıklarının önde gelen bir nedenidir [34], [43], [56]. NAFLD'nin genellikle herhangi bir belirtisi yoktur. Ancak, bazı kişiler şu belirtileri yaşayabilir; yorgunluk, karın ağrısı, karaciğerde büyüme, iştahsızlık, mide bulantısı ve kusma. Risk faktörlerine baktığımızda, obezite veya fazla kilolu olmak, diyabet, yüksek kolesterol, yüksek tansiyon, yaşlanma, aile öyküsü, belirli ilaçlardır. NAFLD, kan testleri, karaciğer ultrasonu veya karaciğer biyopsisi gibi görüntüleme testleri kullanılarak teşhis edilebilir. NAFLD için şu anda

onaylanmış bir tedavi yoktur [63], [71]. Ancak, NAFLD'yi yönetmenin ve karaciğer hasarını önlemenin en iyi yolu kilo vermek ve sağlıklı bir yaşam tarzı benimsemektir. Sağlıklı bir diyet yapmak, düzenli egzersiz yapmak diyabet ve yüksek tansiyon gibi diğer risk faktörlerini kontrol altına almaktadır. NAFLD için bazı potansiyel tedaviler geliştirilmektedir. Bu tedaviler, karaciğerdeki yağ birikimini azaltmaya veya iltihabı ve hasarı önlemeye yardımcı olabilir. NAFLD, HCC için önemli bir risk faktörüdür. NAFLD'li kişilerde HCC riski önemli ölçüde artar. NASH'li kişilerde HCC riski, HCV veya HBV ile ilişkili sirozlu kişilerdekine kıyasla daha düşüktür. NAFLD ile ilişkili HCC'lerin %20-30'u sirozsuz karaciğerlerde gelişir [34], [43], [56], [63], [71], [72], [73], [74].

Aflatoksin B1 (AFB1)

AFB1, Aspergillus mantarı tarafından üretilen bir mikotoksindir. Bu mantar, sıcak ve nemli ortamlarda depolanan mısır, yer fıstığı ve ağaç yemişleri gibi gıdalarda yaygın olarak bulunur. AFB1, HCC için en önemli risk faktörlerinden biridir. Hayvan deneyleri ve insan çalışmaları, AFB1'in DNA'ya zarar verebileceğini ve p53 tümör baskılayıcı geninde mutasyonlara yol açabileceğini göstermiştir. Bu mutasyonlar, HCC'nin gelişmesine katkıda bulunur. Kronik AFB1 maruziyeti, siroz, karaciğer yetmezliği, zayıf bağışıklık sistemi ve büyüme geriliği gibi diğer sağlık sorunlarına da yol açabilir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından Grup 1 kanserojen olarak sınıflandırılmıştır. AFB1'e maruziyet, kontamine gıdaları tüketerek oluşur. En yüksek riskli gıdalar mısır, yer fıstığı, badem, fıstık ve ceviz olarak bilinmektedir. AFB1'e maruziyeti önlemek için, HBV aşısı yaptırılabilir. HBV enfeksiyonu, AFB1 ile birlikte olduğunda HCC riskini önemli ölçüde artırır. Bu nedenle, HBV aşısı yaptırmak önemlidir. Gıdaların test edilmesini sağlanabilir, mısır, yer fıstığı ve ağaç yemişleri gibi gıdaların AFB1 kontaminasyonu için test edilmesini sağlanmalıdır. Yüksek riskli bölgelerde yaşıyorsanız dikkatli olunmalıdır. Asya ve Afrika'da yaşıyorsanız veya bu bölgelere seyahat ediyorsanız, küflü veya hasarlı gıdalardan kaçınılmalıdır. Son 15 yılda, AFB1 ve HCC arasındaki ilişkiyi inceleyen bir dizi epidemiyolojik çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar, AFB1 maruziyetinin HCC riskiyle önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermiştir [34], [43], [75], [76]. Çin'de yapılan çalışmada, AFB1 metabolitlerini idrarla atılımı olan kişilerin HCC riskinin 4 kat, HBV

taşıyıcılarının riskinin 7 kat arttığı görülmüştür. Her iki faktöre de maruz kalan kişilerin riski ise 60 kat artmıştır. Afrika'da yapılan bir çalışmada, AFB1 maruziyeti ile HCC riski arasında güçlü bir ilişki olduğu ve bu riskin özellikle HBV enfeksiyonu olan kişilerde yüksek olduğu görülmüştür [75], [76].

Vinil Klorür (VCM)

Vinil klorür (VCM), plastik ve diğer sentetik ürünlerin üretiminde kullanılan yaygın bir kimyasaldır. Fabrika işçilerinde VCM'ye maruz kalmanın karaciğer kanseri, özellikle de anjiyosarkom adı verilen nadir bir kanser türü riskini artırdığı bilinmektedir. VCM'nin DNA'ya zarar vererek ve p53 tümör baskılayıcı genini inaktive ederek anjiyosarkoma neden olduğu düşünülmektedir. VCM maruziyeti, siroz ve karaciğer yetmezliği gibi diğer ciddi karaciğer hastalıklarına da yol açabilir. Uzun süreli VCM maruziyeti, karaciğerde hasara ve işlev bozukluğuna yol açarak siroza yol açabilir. Siroz, karaciğer yetmezliğine ve ölüme yol açabilen geri dönülemez bir durumdur [9], [77], [78].

Tütün

Sigara içmenin, özellikle HCC ve intrahepatik kolanjiokarsinom (ICC) olmak üzere karaciğer kanseri riskini önemli ölçüde artırdığı bilinmektedir. ABD'deki yapılan bir çalışmada en büyük kohortlardan biri kullanılarak sigara içmenin HCC ve ICC riski üzerindeki etkisinin ayrıntılı bir incelemesi gözlemlenmiştir [9], [43]. Sigara içmenin HCC riski üzerindeki etkisine bakıldığında, sigara içenlerde HCC riski %51 oranında artmaktadır. Eskiden sigara içenlerde HCC riski %24 oranında artmaktadır. Sigarayı 30 yıldan uzun süre önce bırakanlarda HCC riski sigara içmeyenlerle benzer seviyelere düşmektedir. HBV veya HCV ile enfekte kişilerde sigara içmek, HCC riskinin %29-60 oranında artmasına neden olmaktadır [9], [43], [79], [80].

Diyabet

Diyabet, dünya çapında yaygın bir sağlık sorunudur ve karaciğer hastalıkları ve HCC için önemli bir risk faktörüdür. Vaka kontrol ve kohort çalışmaları, diyabet ile HCC arasında anlamlı bir pozitif ilişki olduğunu göstermiştir. Diyabetli hastalarda HCC insidansı, diyabetsiz hastalara kıyasla 2-3 kat daha yüksektir. Bu ilişkinin altında yatan

mekanizmalar tam olarak anlaşılmassa da diyabetin karaciğer iltihabı, oksidatif stres, insülin direnci ve karaciğer yağlanması gibi HCC gelişmesine katkıda bulunabilecek birçok faktöre yol açtığı düşünülmektedir. Hem tip 1 hem de tip 2 diyabet, HCC riski ile ilişkilidir. Fakat tip 2 diyabet, daha yaygın olması ve daha uzun süreli kan şekeri kontrol eksikliği riski taşıması nedeniyle HCC'ye daha güçlü bir şekilde katkıda bulunur. Metformin ve tiazolidinedionlar (TZD'ler) gibi diyabet ilaçlarının HCC riskini azaltılabileceği gösterilmiştir. Metformin, AMPK aktivasyonu yoluyla insülin duyarlılığını artırır ve glikoz metabolizmasını düzenler. Metformin, diyabetli hastalarda HCC riskini %20-30 oranında azaltabilir. TZD'ler, PPAR γ reseptörünü aktive ederek insülin direncini azaltan bir ilaç sınıfıdır. Pioglitazon ve rosiglitazon, Çin'de mevcut olan iki TZD'dir. Bazı çalışmalar TZD'lerin diyabetli hastalarda HCC riskini %10-20 oranında azaltılabileceğini göstermiştir [9], [81].

Yaş, cinsiyet ve diğer etkenler

HCC'nin küresel yaş dağılımı, cinsiyet ve coğrafi bölgelere göre önemli ölçüde değişiklik göstermektedir. HCC riski yaşla birlikte artar ve 70 yaş ve üzeri kişilerde en yüksektir. HCC, erkeklerde kadınlara kıyasla 2-3 kat daha yaygındır. Cinsiyet hormonlarının HCC gelişimi üzerinde farklı rolleri olabileceği öne sürülmüştür. Düşük Riskli Bölgeler (ABD, Kanada, Birleşik Krallık): En yüksek oranlar 75 yaş ve üzeri kişilerde görülür. Yüksek Riskli Asya Bölgeleri (Hong Kong, Şangay): En yüksek oranlar 75 yaş ve üzeri kişilerde görülür. Yüksek Riskli Afrika Bölgeleri (Gambiya, Mali): Erkeklerde en yüksek oranlar 60-65 yaşlarında görülürken, kadınlarda en yüksek oranlar 65-70 yaşlarında görülür ve daha sonra düşer [9], [56].

Genetik faktörler

Detoksifikasyon Enzimleri: Sitokrom P-450'ler, N-asetil transferazlar ve glutatyon S-transferazlar (GST'ler) gibi detoksifikasyon yollarında rol oynayan enzimlerin genlerindeki polimorfizmler, HCC riski ile ilişkilendirilmiştir. Kronik karaciğer hastalığı ve inflamatuvar yanıt (örneğin, interlekin 1 β , IRN) ve DNA onarımı (örneğin, XRCC1) gibi karsinogenezele ilişkili biyolojik yollarda rol oynayan genlerin polimorfizmleri de HCC ile ilişkilidir. Alkol veya aflatoksin (örn. ADH3, ALDH2, EPHX1) gibi HCC için

spesifik etiyolojik risk faktörlerine maruz kalmanın etkilerini hafifletmede veya şiddetlendirmede rol oynayan genlerin polimorfizmleri de incelenmiştir. Hemokromatoz (HFE), alfa 1-antitripsin eksikliği (SERPINA1), glikojen depo hastalıkları (G6PC, SLC37A4), porfiriler (HMBS, UROD), tirozinemi (FAH) ve Wilson Hastalığı (ATP7B) gibi kalıtsal hastalıklarla ilişkili gen mutasyonları da HCC riskini artırabilir [9], [14], [43]. HBV veya HCV'nin faktör olduğu Asya popülasyonlarında gerçekleştirilen GWAS (Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları) çalışmaları, en yaygın olarak HLA bölgesinde bulunanlar (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, MİKA) olmak üzere bir dizi lokus ile ilişkili olarak risklerin arttığını bildirmiştir. HCC tümör baskılayıcı geni barındırabilen bir bölge olan 1p36.22 kromozomuyla eşleşir. Bu bölgedeki KIF1B geninin apoptozla ilişkili olduğu gösterilmiştir. STAT4, GRIK1, EFCAB11 ve EFCAB11 ile ilişkiler de bulunmuştur. Asyalı olmayan popülasyonlarda PNPLA3 genindeki bir polimorfizmin HCC ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Rs738409 SNP'nin ilk olarak NAFLD ile ilişkili olduğu, risk aleli açısından homozigot kişiler arasında 4 kat, heterozigotlar arasında ise neredeyse 2 kat artan risk sağlamaktadır [9], [14], [43], [82], [83]

2.1.3 Karaciğer Kanseriinde Temel Moleküler Mekanizmalar

HCC, dünya çapında en yaygın kanser türlerinden biridir ve her yıl yüzbinlerce insanın ölümüne neden olmaktadır. HCC'nin gelişimi, proto-onkogenlerin ve anti-onkogenlerin aktivasyonu ve inaktivasyonu arasındaki dengedir. Proto-onkogenler, hücreleri çoğalma döngüsüne girmeye teşvik eden genlerdir. Sağlıklı hücrelerde düşük seviyelerde eksprese edilirler veya hiç eksprese edilmezler. Çevresel faktörler, proto-onkogenlerde mutasyonlara neden olabilir ve bu da onları onkogenlere dönüştürür. Onkogenler, kontrolsüz hücre çoğalmasına ve kansere yol açan aktif kanser genleridir. Anti-onkogenler, hücre büyümesini ve farklılaşmasını düzenleyen genlerdir. Normal hücrelerde eksprese edilirler ve hücrelerin çoğalma döngüsüne girmesini engelleyebilir, terminal farklılaşmayı ve hücre apoptozunu indükleyebilirler. N-Ras ve HBV X Proteini, HCC'de en yaygın proto-onkogendir. HBV X proteini, viral bir onkoproteindir ve hücrel sinyal yolları, transkripsiyonel düzenlemeler, hücre döngüsü ilerlemesi, DNA onarımı, apoptoz ve genetik stabilite üzerinde çok işlevli aktiviteleri nedeniyle HCC ile ilişkilidir. BTG2, anti-proliferatif gen ailesinin bir üyesidir ve hücre proliferasyonunu inhibe eder.

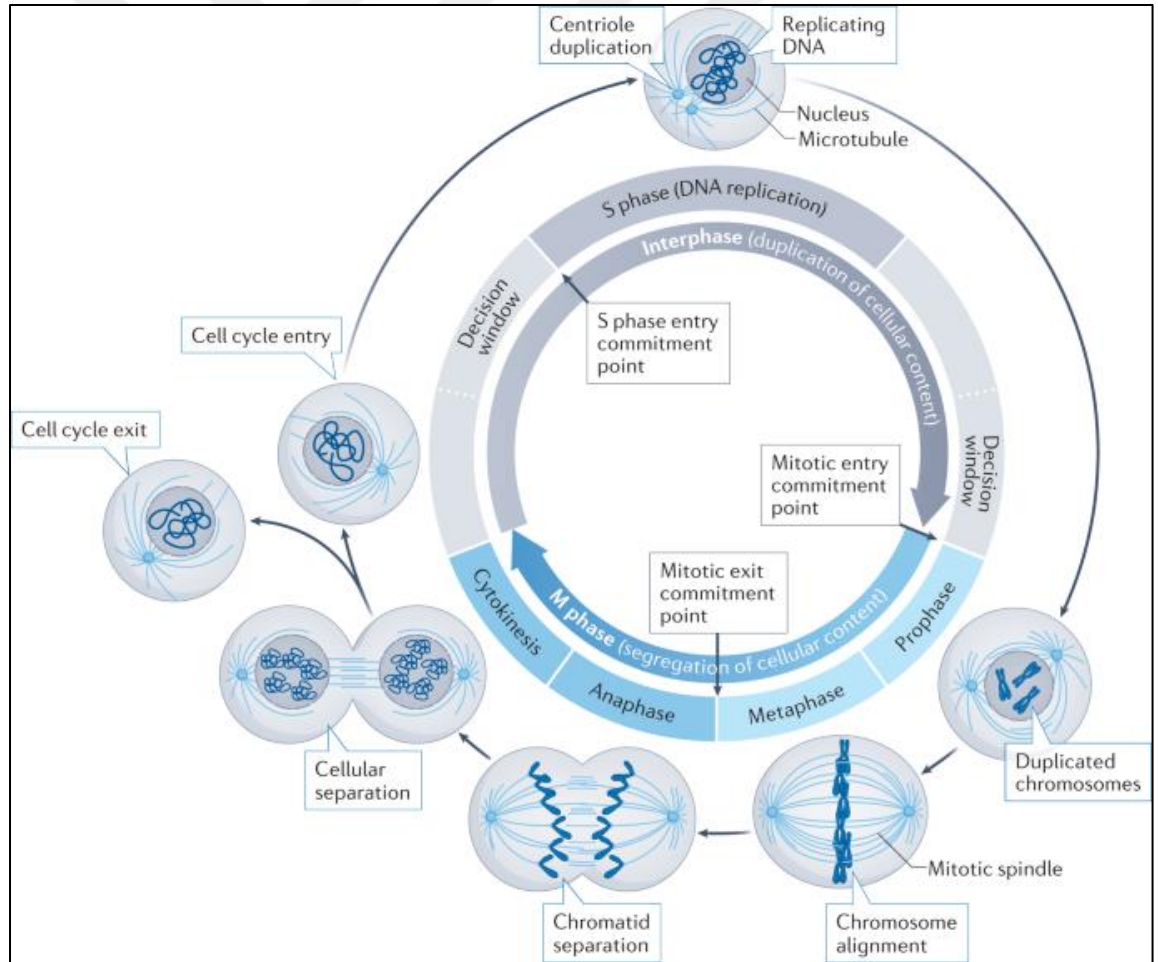
BTG2 ekspresyonu HCC'de önemli ölçüde azalır ve p53 ekspresyonu ile pozitif korelasyon gösterir. Proto-onkogenler ve anti-onkogenler arasındaki dengenin bozulması, HCC'nin gelişmesinde önemli rol oynar. Bu genlerin aktivasyonu ve inaktivasyonu, hücre çoğalması, farklılaşma ve apoptoz gibi kritik hücresel süreçleri etkileyebilir. Bu genlerin işlevini daha iyi anlamak, HCC'nin önlenmesi ve tedavisi için yeni stratejiler geliştirmeye yardımcı olabilir [84], [85], [86]

HCC'de en sık görülen moleküler sapma türleri telomer kısalması, kopyalama numarası varyasyonları, tek nükleotid varyantları ve küçük silmeler, epigenetik modifikasyonlardır. HCC vakalarında en yaygın kromozomal değişiklikler 1q, 6p, 8q, 17q ve 20q kromozomlarındaki amplifikasyonlar ve 1p, 4q, 5q, 6q, 8p, 13q, 16q ve 17p kromozomlarındaki delesyonlardır. HCC'de en sık mutasyona uğrayan tümör baskılayıcı genler p53, pRb, p21 ve PTEN olarak belirlenmiştir. Proto-onkogenler ise Ras, c-fos, c-erb2 ve c-myc'dir. p53 geni, hücre döngüsü ilerlemesi, DNA onarımı ve apoptozun düzenlenmesinden sorumlu bir tümör baskılayıcı gendir. HCC'nin %30-60'ında p53 mutasyonları gözlenmiştir. Bu mutasyonlar, AFB1 gibi kanserojenlere maruz kalma ve HCV enfeksiyonları dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir [87], [88], [89].

2.1.3.1 Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, ökaryot hücrelerin genomik DNA'larını kopyalayıp ikiye böldüğü ve ardından iki yavru hücreye ayrıldığı karmaşık ve düzenlenmiş bir süreçtir. Bu süreç, hücrelerin çoğalmasını ve dokuların onarılmasını sağlar. Hücre döngüsü kontrolü, DNA replikasyonunun ve hücre bölünmesinin doğru bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan bir dizi moleküler mekanizmadan oluşur. Bu kontrol mekanizmaları, DNA hasarı gibi anormallikleri tespit ederek ve hücre döngüsünün ilerlemesini durdurarak hücrelerin hasarlı DNA'yı onarmasına veya apoptoza (programlanmış hücre ölümü) girmesine zaman tanır [90], [91], [92] . Hücre döngüsü, dört ana aşamadan oluşur (Şekil 3). G1 Aşaması (Büyüme 1 Aşaması): Bu aşamada hücreler DNA replikasyonuna hazırlanır. Hücreler, büyüme faktörleri gibi dış sinyallere yanıt verir ve hücre döngüsüne girmeye karar verir. G1 aşamasının son kontrol noktası, hücrelerin DNA hasarı veya diğer anormallikler için tarandığı G1/S geçiş noktasıdır. S Aşaması (Sentez Aşaması): Bu aşamada DNA replikasyonu gerçekleşir. Kromozomlardaki DNA, DNA polimeraz enzimleri tarafından

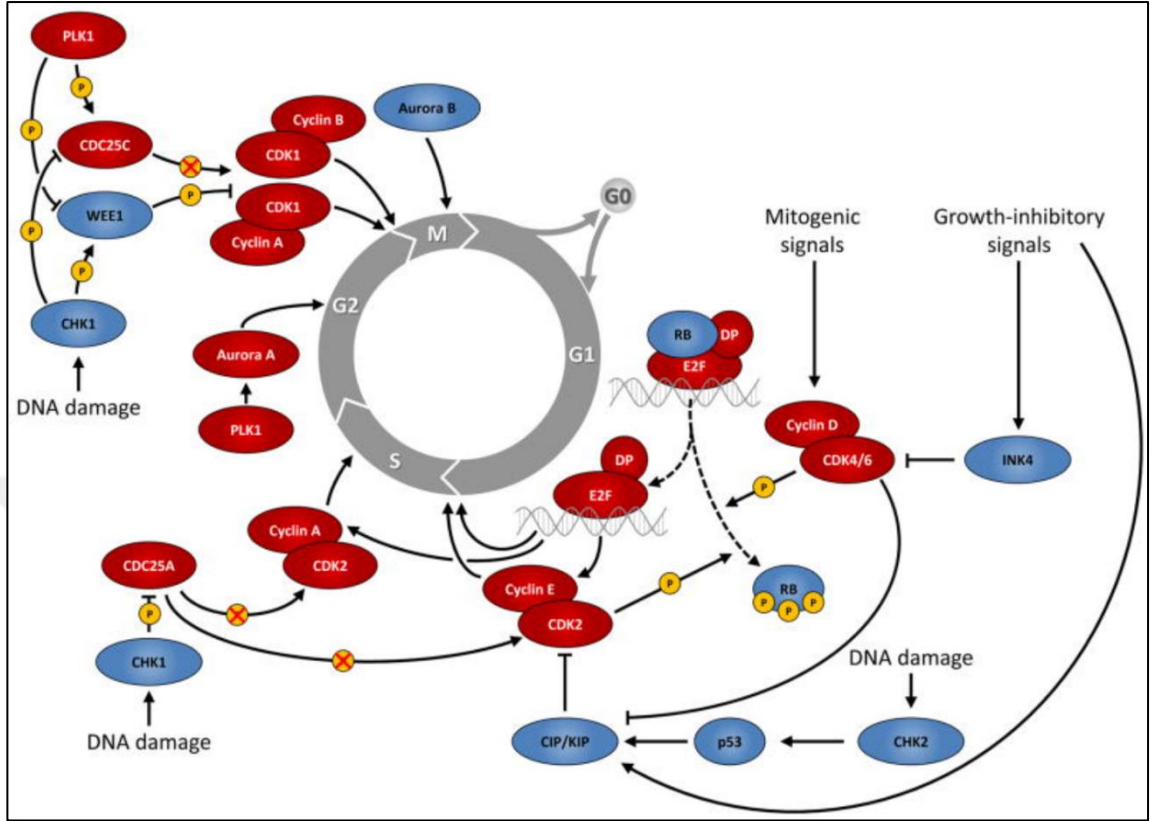
kopyalanır. S aşamasının sonunda, her kromozomun iki özdeş kopyası bulunur. G2 Aşaması (Büyüme 2 Aşaması): Bu aşamada kromozomlar bölünmeye hazırlanır. Kromozomlar yoğunlaşır ve çekirdek zarı bozulmaya başlar. G2 aşamasının son kontrol noktası, M geçiş noktasıdır, burada hücrelerin kromozom ayırımına hazır olup olmadığı kontrol edilir. M Aşaması (Mitoz Aşaması): Bu aşamada kromozomlar ayrılır ve hücre iki yavru hücreye bölünür. Mitoz, çekirdek bölünmesi (karyokinez) ve sitoplazmanın bölünmesi (sitokinez) olmak üzere iki ana aşamadan oluşur. Mitozun tamamlanmasıyla hücre döngüsü tamamlanır ve iki yeni yavru hücre oluşur [92].



Şekil 3 Hücre bölünmesi döngüsünün şematik gösterimi [92]

Hücre döngüsü kontrol noktaları, siklin-bağımlı kinazlar (CDK'lar) ve siklinler adı verilen proteinler tarafından düzenlenir. CDK'lar, hücre döngüsünün ilerlemesini sağlayan enzimlerdir. Siklinler, CDK'ların aktivasyonu için gerekli olan proteinlerdir. Farklı hücre döngüsü aşamalarında, farklı siklin-CDK kompleksleri aktiftir. Bu kompleksler, hücre döngüsü ilerlemesinde yer alan kritik proteinleri fosforile ederek hücre döngüsünün ilerlemesini kontrol eder. G1/S Geçiş Noktası: Bu kontrol noktası, G1 aşamasının sonunda bulunur ve hücrelerin DNA hasarı veya diğer anormallikler için tarandığı yerdir. DNA hasarı tespit edilirse, hücre döngüsü durdurulur ve DNA onarılır. DNA onarılamazsa, hücre apoptoza girebilir. S Aşaması Kontrol Noktası: Bu kontrol noktası, S aşaması sırasında bulunur ve DNA replikasyonunun doğru bir şekilde gerçekleştiğini kontrol eder. DNA replikasyonunda herhangi bir hata tespit edilirse, hücre döngüsü durdurulur ve hata düzeltilir. Hata düzeltilemezse, hücre apoptoza girebilir. G2/M Geçiş Noktası: Bu kontrol noktası, G2 aşamasının sonunda bulunur ve kromozomların bölünmeye hazır olup olmadığını kontrol eder. Kromozomlarda herhangi bir anormallik tespit edilirse, hücre döngüsü durdurulur ve anormallikler düzeltilir. Anormallikler düzeltilemezse, hücre apoptoza girebilir. M Aşaması Kontrol Noktası: Bu kontrol noktası, M aşaması sırasında bulunur ve kromozom ayrımını kontrol eder. Kromozom ayrımında herhangi bir hata tespit edildiğinde düzeltilmezse p53'ün aktivasyonu yolu ile hücreyi apoptoza yönlendirir. [93], [94]

Kanser hücrelerinde, CDK-2 ve CDK-1'in aktivitesi genellikle artar ve bu da hücre döngüsünün hızlı ilerlemesine yol açar. Siklin D ve siklin E'nin ekspresyonu genellikle artar ve bu da CDK-4 ve CDK-6'nın aktivasyonuna yol açar. Hücre döngüsü kontrol noktaları genellikle işlevsizdir ve bu da DNA hasarının birikimine yol açar [90], [92].



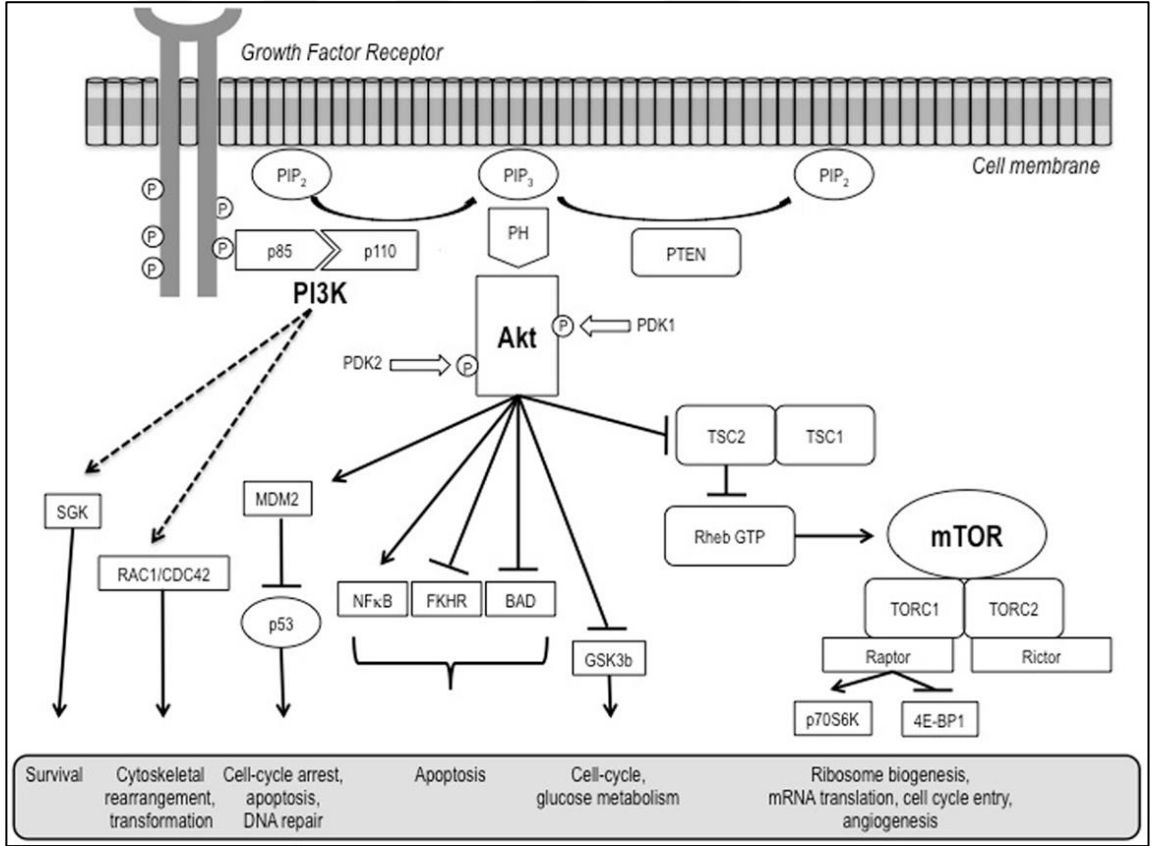
Şekil 4 Hücre Döngüsündeki Kontrol Noktaları ve Düzenleyici Proteinler [90].

2.1.3.2 PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolu

PI3K/Akt/mTOR yolu, hücre büyümesi, çoğalma, metabolizma ve hayatta kalma gibi birçok kritik hücresel işlevi düzenleyen karmaşık bir sinyal iletişim yoludur (Şekil 5). Bu yolun anormal aktivasyonu, kanser de dahil olmak üzere birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, PI3K/Akt/mTOR yolu, kanser tedavisinde önemli bir terapötik hedef haline gelmiştir [84], [86].

PI3K, Fosfatidilinositalleri fosforile ederek PI3P üreten bir kinazdır. PI3P, hücre sinyal iletiminde önemli bir rol oynar. Bu sinyaller, PI3K'yı aktive ederek PI3P üretimini tetikler. PI3P, Akt'nin hücre membranına taşınmasını ve aktive olmasını sağlar. PI3K'nın dört ana sınıfı vardır: I, II, III ve V. Her sınıfın farklı işlevleri ve düzenleme mekanizmaları vardır. Bazı kanserlerde, PI3K genlerinde bulunan mutasyonlar, enzimi sürekli aktif hale getirerek yolun hiperaktivitesine yol açabilir. Akt, PI3P tarafından aktive edilen bir serin/treonin kinazdır. Akt, hücre büyümesi ve hayatta kalması için kritik olan bir dizi

proteinin fosforilemesini ve aktivasyonunu sağlar. Aktif Akt, mTOR da dahil olmak üzere bir dizi protein kinazını aktive eder. Üç ana Akt izoformu vardır (Akt1, Akt2 ve Akt3). Her izoformun farklı hücresel konumları ve işlevleri vardır. Akt, serin ve treonin kalıntılarının fosforile edilmesi yoluyla çeşitli protein kinazlar ve fosfatazlar tarafından düzenlenir. mTOR, Protein sentezini ve hücre büyümesini düzenleyen bir kinazdır. mTOR, PI3K/Akt yolunun birincil aşağı akış efektörüdür ve hücresel büyüme ve metabolizmanın ana düzenleyicilerinden biridir. mTOR, iki farklı protein kompleksi halinde bulunur: mTORC1 ve mTORC2. Her kompleks, farklı bir dizi protein kinaz ve fosfatazdan oluşur ve farklı işlevlere sahiptir. mTOR aktivitesi, çeşitli faktörler tarafından düzenlenir, bunlara büyüme faktörleri, besin maddeleri ve enerji durumu dahildir. [95], [96], [97]



Şekil 5 PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının şematik gösterimi [96].

PI3K/Akt/mTOR yolu, birçok kanser türünde hiperaktiftir. Bu durum, kanser hücrelerinin anormal bir şekilde büyümesine ve çoğalmasına, ayrıca apoptoza (programlanmış hücre

ölümü) karşı direnç kazanmasına yol açabilir. Kanselerde gözlenen PI3K/Akt/mTOR hiperaktivitesinin çeşitli nedenleri olabilir. Bunlar; Bazı onkogenler, PI3K'yı doğrudan aktive ederek veya Akt ve mTOR'un aktivasyonunu teşvik ederek yolu aktive edebilir. RAS, MYC ve PIK3CA mutasyonları, PI3K/Akt/mTOR yolunun hiperaktivitesine yol açabilen yaygın onkogenlere örnektir. PTEN ve PHLPP gibi tümör supresör genlerin inaktivasyonu, PI3K'nın aktivitesini artırarak ve Akt ve mTOR'un aktivasyonunu engelleyerek yolu aktive edebilir. Buna örnek olarak; PTEN ve PHLPP genlerindeki mutasyonlar veya delesyonlardır. Kanser hücreleri, PI3K/Akt/mTOR yolunu aktive eden büyüme faktörleri ve sitokinleri aşırı üretebilir veya bu sinyallere karşı artan duyarlılık gösterebilir [95], [96], [97]. Örneğin; Kanser hücreleri tarafından üretilen VEGF, IGF-1 ve IL-6 gibi faktörler, PI3K/Akt/mTOR yolunu aktive edebilir. Bu sinyal yolunu hedef alan bir dizi tedavi yaklaşımı geliştirilmiştir bu tedavilerin mekanizmaları incelendiğinde aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır. PI3K İnhibitörleri, bu ilaçlar, PI3K'nın aktivitesini farklı şekillerde engelleyebilir. Sınıf I PI3K İnhibitörleri, en çok araştırılan PI3K inhibitörleridir ve PI3K'nın p110 alfa ve beta alt birimlerini hedefler. Sınıf IA PI3K İnhibitörleri, PI3K'nın p110 alfa alt birimini daha spesifik olarak hedefler. Diğer PI3K İnhibitörleri, PI3K'nın delta ve gama alt birimlerini hedefleyen diğer inhibitörler de geliştirilmektedir. Akt İnhibitörleri, Akt'nin aktivitesini doğrudan ATP (adenozin trifosfat) bağlanma bölgesini bloke ederek engelleyebilir. Akt inhibitörlerinin kanser tedavisindeki klinik faydası halen araştırılmaktadır. mTOR İnhibitörleri, mTOR komplekslerinin (mTORC1 ve mTORC2) aktivitesini engelleyebilir. mTORC1 İnhibitörleri, Rapamisin ve rapamisin analogları, mTORC1 kompleksini hedefler ve protein sentezini baskılayarak kanser hücrelerinin büyümesini önler. mTORC1/2 İnhibitörleri, hem mTORC1 hem de mTORC2 komplekslerini hedefler ve potansiyel olarak daha geniş bir etki spektrumuna sahiptir. Ancak inhibitörlerin bazı zorlukları mevcuttur. Kanser hücreleri, PI3K/Akt/mTOR yolunun inhibe edilmesine direnç geliştirebilir. Bu direnç, yolun farklı bir bölümünün aktive olması veya alternatif sinyal yollarının kullanılmasıyla ortaya çıkabilir. Örneğin, PI3K inhibitörlerine direnç, Akt veya mTOR'un aktivasyonu yoluyla gelişebilir. PI3K/Akt/mTOR inhibitörleri, ishal, yorgunluk, cilt sorunları, enfeksiyonlar ve kan şekeri düzeylerinde yükselme gibi yan etkileri nedeniyle bazı hastalarda iyi tolere edilemeyebilir. PI3K/Akt/mTOR yolunun karmaşıklığı nedeniyle, bu yolu hedefleyen

etkili ve güvenli ilaçlar geliştirmek zordur[95], [96], [97], [98], [99]. Tablo 1’de bazı ilaçlar ve hedef genleri verilmiştir.

Tablo 1 HCC Hücresinde kullanılan ilaçlar ve hedefleri [96].

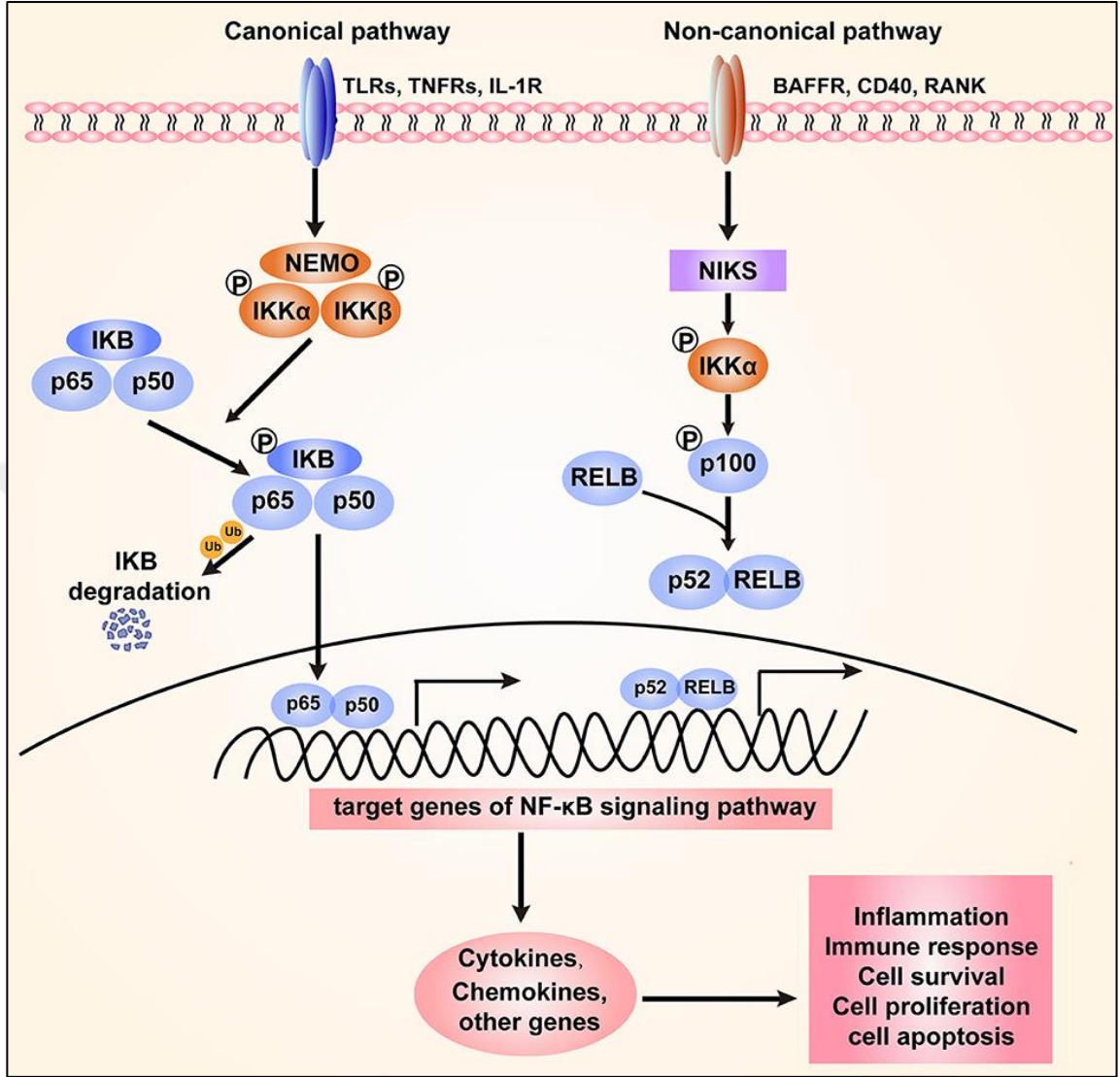
İLAC	HEDEF GEN	FENOTİP	HCC HÜCRE HATTI
Erlotin	EGFR	Hücre Proliferasyonunda azalma	MHCC7H, PLC/RLF/5
AG1478	EGFR	Hücre Proliferasyonunda azalma	HEPG2
Lenvatinib	AKT/mTOR	Hücre göçünde ve büyümesinde azalma	HEPG2, HEP3B
GW2974	EGFR	Apoptozun indüklenmesi ve hücre çoğalmasında azalma	HEPG2
Rapamycin	mTOR	Kanser kök hücrelerinin büyümesini önlemek	HEP3B
AKT inhibitor VIII	AKT	Baskılanmış hücre büyümesi, indüklenmiş apoptoz	Huh7
Wortmannin	PI3K	İndüklenmiş apoptoz	HEPG2

2.1.3.3 NF-κB Sinyal Yolu

Nükleer faktör-κB (NF-κB), çeşitli immün ve inflamatuvar süreçlerde yer alan geniş bir gen ailesini düzenleyen indüklenabilir transkripsiyon faktörleri ailesini temsil eder. Bu aile, hedef genlerin transkripsiyonuna aracılık eden NF-κB1 (aynı zamanda p50 olarak da adlandırılır), NF-κB2 (aynı zamanda p52 olarak da adlandırılır), RelA (aynı zamanda p65 olarak da adlandırılır), RelB ve c-Rel dahil olmak üzere yapısal olarak ilişkili beş üyeden oluşur. Bu proteinler, çeşitli hetero-dimer veya homo-dimerler halinde spesifik bir DNA elemanına bağlanarak işlev görür. NF-κB proteinleri normalde sitoplazmada, IκB ailesi üyeleri ve ankirin tekrarları içeren ilgili proteinler tarafından tutulan bir inhibitör protein ailesi tarafından tutulur. Bugüne kadar en iyi çalışılan ve en önemli IκB ailesi üyesi IκBα’dır. Ek olarak, NF-κB1 ve NF-κB2’nin öncü proteinleri olan p105 ve p100, IκB

benzeri proteinler olarak görev yapar çünkü bunların C-terminal ucu, I κ B'nin yapısına benzer ve NF- κ B inhibitör fonksiyonlarına sahiptir[100], [101], [102].

NF- κ B'nin aktivasyonu iki ana sinyal yolu kanonik ve kanonik olmayan (veya alternatif) olarak belirlenmiştir. Her ikisi de sinyal mekanizmasındaki farklılıklara rağmen bağışıklık ve inflamatuvar yanıtları düzenlemek için önemlidir. Kanonik NF- κ B yolu, çeşitli sitokin reseptörlerinin ligandları, model tanıma reseptörleri (PRR'ler), TNF reseptörü (TNFR) süper aile üyelerinin yanı sıra T hücresi reseptörü (TCR) ve B-hücre reseptörü dahil olmak üzere çeşitli uyarılara yanıt verir. Kanonik NF- κ B aktivasyonunun birincil mekanizması, çok alt birimli bir I κ B kinaz (IKK) kompleksi tarafından bölgeye özgü fosforilasyon yoluyla tetiklenen I κ Ba'nın indüklenabilir bozunmasıdır. IKK, iki katalitik alt birimden, IKKa ve IKK β 'dan ve NF- κ B temel modülatörü (NEMO) veya IKK γ adı verilen düzenleyici bir alt birimden oluşur [103], [104], [105]. IKK, sitokinler, büyüme faktörleri, mitojenler, mikrobiyal bileşenler ve stres ajanları dahil olmak üzere farklı uyarılarla aktive edilebilir. Aktivasyon üzerine IKK, I κ Ba'yı iki N-terminal serinde fosforile eder ve böylece proteozomda ubiquitin bağımlı I κ Ba bozulmasını tetikler, sonuçta p50/RelA ve p50/c-Rel kanonik NF- κ B dimerlerinin hızlı ve geçici nükleer translokasyonuna neden olur. Kanonik olmayan NF- κ B yolu, LT β R, BAFFR, CD40 ve RANK gibi TNFR süper aile üyelerinin ligandları dahil olmak üzere spesifik bir uyarı grubuna seçici olarak yanıt verir. Ek olarak, kanonik olmayan NF- κ B aktivasyonu, I κ Ba bozunmasını içermez, bunun yerine NF- κ B2 öncü proteini p100'ün p52'ye işlenmesine dayanır. Bu yol için merkezi bir sinyal molekülü, p100 fosforilasyonuna aracılık etmek için IKKa'yı aktive eden ve işlevsel olarak işbirliği yapan NF- κ B indükleyici kinazdır (NIK). Bu da p100'ün çoğalmasını ve işlenmesini indükler. p100'ün işlenmesi, C-terminal I κ B benzeri yapısının bozulmasını içerir, bu da olgun NF- κ B2 p52'nin üretilmesine ve kanonik olmayan NF- κ B kompleksi p52/RelB'nin nükleer translokasyonuna neden olur (Şekil 6) [103], [104], [105], [106], [107], [108].



Şekil 6 NF-κB sinyal yolağının şematik gösterimi [108].

NF-κB, inflamasyon, bağışıklık yanıtı, hücre sağkalımı, apoptozis, proliferasyon, diferansiasyon, gelişme ve kanser gibi çeşitli hücresel süreçlerde kritik roller oynayan çok yönlü bir transkripsiyon faktörüdür. NF-κB sinyal yolu, proinflamatuvar sitokinlerin (örneğin, IL-1β, TNF-α, IL-6) transkripsiyonunu indükleyerek enflamasyonun başlatılmasında ve sürdürülmesinde rol oynar. Bu sitokinler, vasküler endotel hücreleri, fibroblastlar ve sinovyal hücreler gibi çeşitli hücre tiplerinde NF-κB aktivasyonunu indükleyebilir ve bu da daha fazla sitokin üretimi, inflamatuvar hücre göçü ve doku hasarı ile sonuçlanır. NF-κB, hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. B hücrelerinin olgunlaşması ve antikor üretimi, T

hücrelerinin aktivasyonu ve sitokin üretimi, dendritik hücrelerin olgunlaşması ve antijen sunumu gibi çeşitli immün süreçlerde yer alır [102], [106]. NF- κ B, hücre sağkalımını ve apoptozis (programlanmış hücre ölümü) dengeleyen çeşitli anti-apoptotik genlerin transkripsiyonunu düzenler. Bu nedenle, NF- κ B aktivasyonu, hücrelerin stres ve hasara karşı direncini artırarak hücre sağkalımını destekler. NF- κ B sinyal yolunun anormal regülasyonu, kanser gelişimi ve progresyonunda rol oynayabilir. NF- κ B, tümör büyümesini, invazyonu, metastazı ve kanser hücrelerinin kemoterapiye direncini destekleyen çeşitli genlerin transkripsiyonunu indükleyebilir. Bu nedenle, NF- κ B yolunu hedefleyen terapiler, kanser tedavisinde potansiyel bir rol oynayabilir. NF- κ B aktivasyonu, tümör hücrelerinin büyümesini, hayatta kalmasını, istilasını ve anjiyogenezi teşvik ederek tümör gelişimi ve ilerlemesi için kritik öneme sahiptir. Bu nedenle, NF- κ B sinyal yolunu hedef alan terapötik stratejiler, kanser tedavisinde umut verici bir yaklaşımdır [102], [106], [109] .

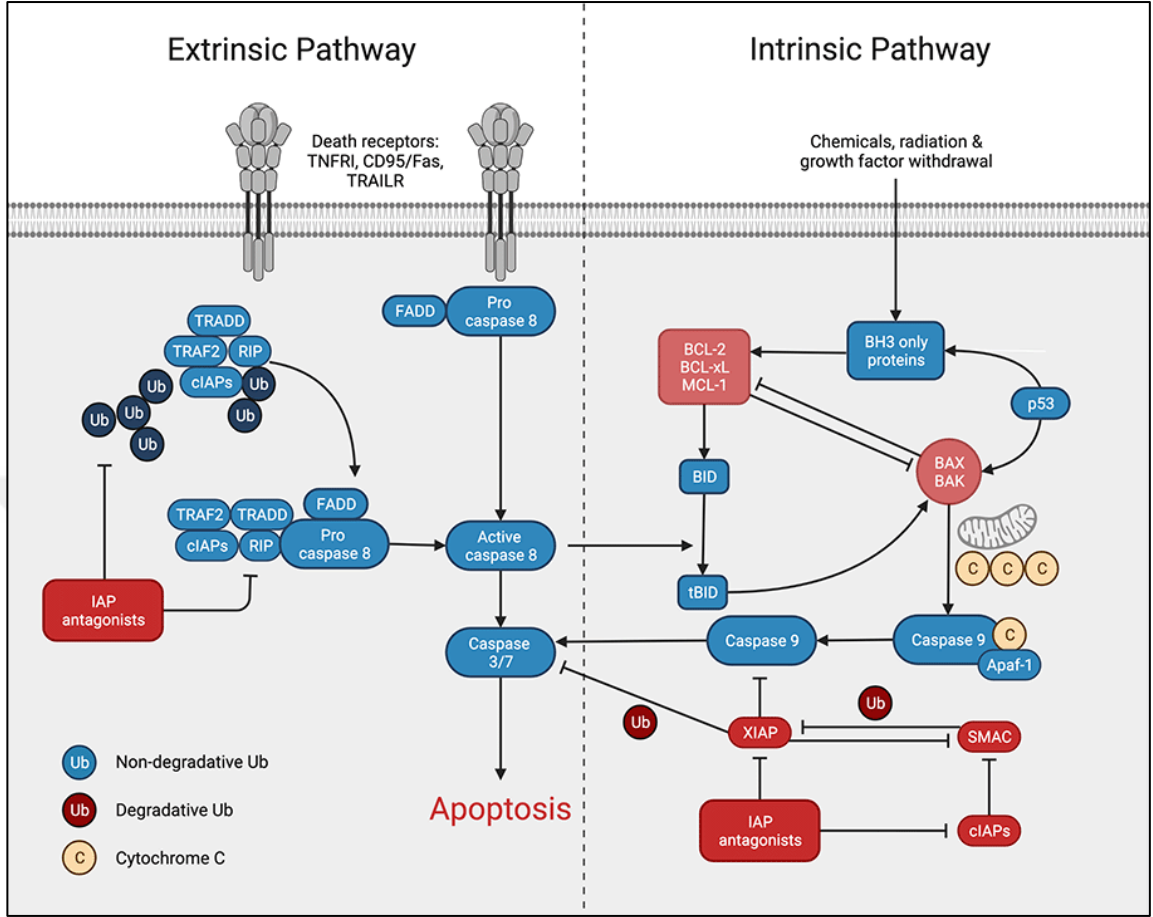
NF- κ B, kanser hücrelerinde siklin D1 ve c-Myc gibi pro-proliferatif genlerin transkripsiyonunu indükleyerek hücre büyümesini ve proliferasyonunu teşvik eder. NF- κ B, BCL-2 ve BCL-XL gibi anti-apoptotik genlerin transkripsiyonunu indükleyerek hücre hayatta kalmasını sağlar. NF- κ B, matriks metaloproteinazlar (MMP'ler) gibi hücre dışı matrisi (ECM) bozucu enzimlerin transkripsiyonunu indükleyerek tümör hücrelerinin istilasını ve metastazını, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi pro-anjiyojenik genlerin transkripsiyonunu indükleyerek tümör vaskülarizasyonunu, apoptotik hücre ölümünü indükleyen genlerin transkripsiyonunu baskılayarak ve apoptoz direncini teşvik eder [103], [104].

Kanser hücrelerinde NF- κ B aktivasyonu, çeşitli mekanizmalar yoluyla gerçekleşebilir. En yaygın mekanizmalardan bazıları şunlardır; KRAS, BRAF ve PI3K gibi birçok onkojen, NF- κ B sinyal yolunu doğrudan veya dolaylı olarak aktive edebilir. Kanser mikro ortamı genellikle kronik inflamasyon ile karakterize edilir ve bu da NF- κ B aktivasyonuna yol açan pro-inflamatuar sitokinlerin ve diğer faktörlerin salınımına yol açar [104], [109]. DNA hasarı, NF- κ B aktivasyonunu tetikleyen reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini indükleyebilir. NF- κ B'nin inhibitörlerinden bazıları kanserle ilgili mekanizmaları çalışılmaktadır bunlardan bazıları, IKK inhibitörleri, IKK kompleksinin aktivitesini bloke

ederek NF- κ B aktivasyonunun ilk basamaklarını hedeflemektedir. IKK inhibitörlerine örnek olarak SM3068, BAY 11-7082 verilmektedir. PS-1145 ve GSK-872 I κ B proteinlerinin yapısına benzer moleküllerdir. Bu moleküller NF- κ B p50 ve p65 alt birimleri ile etkileşerek çekirdeki DNA'ya bağlanmalarını engeller. I κ Ba proteininin yıkımı proteazomlar tarafından gerçekleştirilir. Proteazom inhibitörlerinden olan Bortezomib ve Carfilzomib I κ Ba yıkımını engelleyerek dolaylı olarak NF- κ B aktivasyonunu baskılar. Kurkumin, Resveratrol antioksidanları NF- κ B aktivasyonunda rol oynayan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini azaltarak dolaylı bir inhibe edici etki gösterebilirler. Antisens oligonükleotidler, NF- κ B mRNA'sının transkripsiyonunu veya translasyonunu bloke ederek NF- κ B ekspresyonunu azaltır. Bazı NF- κ B inhibitörleri, multipl miyelom ve lenfoma gibi belirli kanser türlerinin tedavisinde FDA tarafından onaylanmıştır. Diğer inhibitörler ise halen klinik denemelerde araştırılmaktadır[104], [109], [110].

2.1.3.4 Apoptotik Mekanizmalar

Apoptoz, anormal veya gereksiz hücrelerin vücut tarafından düzenli bir şekilde temizlenmesini sağlayan programlanmış bir hücre ölüm şeklidir. Kaspazlar, apoptotik mekanizma için kritik öneme sahip olan apoptozu başlatan ve yürüten moleküllerdir ve hem dışsal hem de içsel yollar aracılığıyla aktive edilebilirler [111], [112]. Dışsal-Ekstrinsik yol, ölüm reseptörleri (Fas, TNFR1) gibi hücre yüzeyindeki reseptörlerin aktivasyonu ile başlatılır ve bu da kaspaz 8'in aktivasyonuna yol açar. Aktive olan kaspaz 8, diğer kaspazları aktive ederek apoptotik programı başlatır [114], [116]. İçsel-İntrinsik yol, mitokondriyal disfonksiyon, DNA hasarı veya oksidatif stres gibi faktörler tarafından tetiklenir ve sitokrom c salınımına ve apoptozom oluşumuna yol açar. Apoptozom, kaspaz 9'u aktive ederek apoptotik programı başlatır (Şekil 7) [111], [112], [113], [114], [115], [116], [117], [118]



Şekil 7 Apoptoz yolağının şeması [119].

Kanser hücreleri, apoptozdan kaçmak için çeşitli mekanizmalar geliştirerek apoptoz direnci kazanabilirler. Bcl-2 ve Bcl-XL gibi proteinler, apoptozu engelleyen proteinlerdir. Kanser hücrelerinde bu proteinlerin seviyesi yüksek olabilir. Bax ve Bak gibi proteinler, apoptozu indükleyen proteinlerdir. Kanser hücrelerinde bu proteinlerin seviyesi düşük olabilir [113], [115]. Kanser hücreleri, kaspazların aktivitesini engelleyen moleküller üretebilir. Kanser hücrelerinde ölüm reseptörleri hasar görebilir veya işlevsiz hale gelebilir. Apoptozu indükleyerek veya apoptoz direncini yenerek kanser hücrelerini öldürmeye yönelik birçok kanser tedavisi türü geliştirilmektedir. Birçok kemoterapi ilacı, DNA hasarı yoluyla apoptozu indükler. Bu hasar, kaspazların aktivasyonuna ve hücre ölümüne yol açar. Bazı ilaçlar Bcl-2 proteinini bloke ederek apoptozu indükler. Bazı immünoterapi ajanları, kanser hücrelerinin apoptoz direncini azaltabilir [113], [115], [117], [120].

Tümör mikroçevresi (TME), kanser hücrelerini çevreleyen hücreler ve moleküllerden oluşan karmaşık bir ortamdır. Apoptotik hücreler, bağışıklık hücrelerini aktive eden ve kanser hücrelerine karşı saldırıyı tetikleyen sinyal molekülleri salabilir, çevredeki hücreleri etkileyerek tümör büyümesini ve anjiyogenezi engelleyebilen sinyal molekülleri salabilir [121], [122], [123]. Apoptotik hücrelerden salınan moleküller, kanser hücrelerinde genetik mutasyonlara ve yeni kanser hücrelerinin seçilimine yol açabilir [111], [113], [115], [117], [120], [121], [122], [123], [124], [125].

Apoptozu kanser tedavisinde hedefleyen yeni stratejiler üzerinde yoğun bir şekilde araştırma yapılmaktadır. Bu stratejilerden bazıları şunlardır; Apoptozu indükleyen ilaçlar, diğer kanser tedavileriyle birlikte kullanılarak kanser hücrelerinin apoptoz direncini aşabilir. Örneğin, bir kemoterapi ilacı DNA hasarı yoluyla apoptozu indüklerken, bir Bcl-2 inhibitörünün eklenmesi apoptoz direnci azaltabilir. Bu şekilde kombine tedaviler, tek başına kullanılan tedavilere göre daha etkili ve yan etkileri daha az olabilir. Apoptoz yolundaki daha az bilinen proteinler, yeni kanser ilaçları için potansiyel hedefler olarak araştırılmaktadır. Bu yeni hedeflere yönelik ilaçlar, kanser hücrelerinin apoptoz direncini aşmada ve tümör tedavisinde daha etkili olabilir. TME'de bağışıklık hücrelerinin işlevini bastırmak için çeşitli mekanizmalar kullanabilir. Bu immünosupresyon, kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçmasına ve kontrolsüz bir şekilde büyümesine izin verir. Apoptotik hücre ölümünün TME'deki bağışıklık hücrelerini aktive ettiği ve kanser hücrelerine karşı immün yanıtı geliştirdiği bilinmektedir. Bu nedenle, TME'deki immünosupresyonu azaltmak ve apoptotik hücre ölümünün immünomodülatör etkilerini artırmak için yeni stratejiler geliştirilmektedir. Kanser hücreleri, kan damarlarının oluşumunu (anjiyogenezi) uyararak tümöre oksijen ve besin taşınmasını sağlar [113], [117]. Apoptotik hücrelerden salınan bazı moleküller, anjiyojenik faktörlerin üretimini ve kan damarlarının oluşumunu engelleyebilir. Bu nedenle, TME'deki anjiyogenezi engelleyen ve apoptotik hücre ölümünün anti-anjiyojenik etkilerini en üst düzeye çıkaran yeni stratejiler geliştirilmektedir. Kanser hücreleri, sağlıklı hücrelerden farklı bir metabolizmaya sahiptir ve bu durum onları bazı ilaçlara dirençli hale getirir. Apoptotik hücre ölümünün, kanser hücrelerinin metabolizmasını değiştirerek ve onları ilaçlara daha duyarlı hale getirerek tedaviye katkıda bulunabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle,

TME'deki kanser hücrelerinin metabolizmasını hedefleyen ve apoptotik hücre ölümünün bu etkisini artıran yeni stratejiler geliştirilmektedir [113], [117], [126].

Mitokondri/ Sitokrom C Aracılı Hücre Ölümü (İçsel- İntrinsik Yolak)

İçsel apoptoz yolu, hücre içi sinyaller tarafından tetiklenen bir apoptotik yoldur. Bu sinyaller, DNA hasarı, hipoksi ve hayatta kalma faktörü yoksunluğu gibi çeşitli streslerden kaynaklanabilir [113]. İçsel apoptoz yolun moleküler mekanizmasına baktığımızda; Stresli koşullar altında, mitokondriyal membran geçirgenliği (MMP) bozulur [120]. Bu, sitokrom c ve diğer proapoptotik proteinlerin mitokondriden sitoplazmaya salınmasına yol açar. Sitokrom c, Apaf-1 adlı bir protein ile birleşerek Apaf-1 apoptozom adı verilen bir kompleksi oluşturur. Apaf-1 apoptozomu, pro-kaspaz-9 adlı bir efektör kaspazı aktive eder. Pro-kaspaz-9, kaspaz-3 ve kaspaz-7 gibi diğer efektör kaspazları aktive ederek bir kaspaz kaskadı başlatır. Kaspaz-3 ve kaspaz-7, DNA'yı parçalayan ve hücreyi yok eden nükleazları aktive eder [113], [120], [122].

Bcl-2 ailesi proteinleri, içsel apoptoz yolunun kontrolünde önemli rol oynar. Bu proteinler, anti-apoptotik (hücre ölümünü engelleyen) ve pro-apoptotik (hücre ölümünü tetikleyen) olarak ikiye ayrılabilir. Anti-apoptotik Bcl-2 Ailesi Proteinleri; Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w ve Bcl-XS gibi anti-apoptotik proteinler, mitokondriyal membran geçirgenliğini stabilize ederek ve pro-apoptotik proteinleri bağlayarak apoptozu engeller. Pro-apoptotik Bcl-2 Ailesi Proteinleri; Bax, Bak, Bim ve Puma gibi pro-apoptotik proteinler, mitokondriyal membran geçirgenliğini bozarak ve kaspaz kaskadını aktive ederek apoptozu tetikler. İçsel apoptoz yolunun bozulması, kanser, otoimmün hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıklara yol açabilir [113]. Kanser hücreleri genellikle apoptoza karşı dirençlidir ve anormal şekilde çoğalabilir. Bu direnç, anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin aşırı ekspresyonu veya proapoptotik Bcl-2 proteinlerinin eksikliği gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir. Otoimmün hastalıklarda, bağışıklık sistemi normal hücrelere saldırır ve onları yok eder. Apoptozun bozulması, bağışıklık sisteminin kontrolünü kaybetmesine ve normal hücrelerin ölümüne yol açabilir. Nörodejeneratif hastalıklarda, beyin hücreleri zamanla ölür. Apoptozun bozulması, beyin hücrelerinin ölümüne ve bilişsel işlevde bozulmaya yol açabilir[127].

Bcl-2 ve Bax gibi proapoptotik proteinlerin ekspresyonunun ve aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynayan birçok protein vardır. Bu proteinler incelendiğinde, p53, DNA hasarı algıladığında proapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin ekspresyonunu ve kaspazların aktivasyonunu tetikleyen bir tümör baskılayıcı proteindir [115]. MDM2, p53'ün ubiquitinasyonunu ve proteozomal degradasyonunu teşvik ederek p53'ün aktivitesini baskılayabilir [117]. IAP'ler, kaspazların aktivasyonunu ve apoptozu engelleyebilir. SMAC/DIABLO ve HtrA2/Omi Proteinleri, IAP'leri inhibe ederek apoptozu teşvik edebilir. Otoimmün hastalıklarda, bağışıklık sistemi normal hücrelere saldırır ve onları yok eder. Apoptozun bozulması, bağışıklık sisteminin kontrolünü kaybetmesine ve normal hücrelerin ölümüne yol açabilir. Nörodejeneratif hastalıklarda, beyin hücreleri zamanla ölür. Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve Huntington hastalığı gibi hastalıklarda, apoptozun aşırı aktivasyonu veya yetersiz aktivasyonu rol oynayabilir [113], [115], [117], [120].

Ölüm Sinyalleri Aracılığı ile Hücre Ölümü (Dışsal- Ekstrinsik Yolak)

Dışsal yol, hücreler diğer hücrelerden ölüm sinyalleri aldığı anda tetiklenir. Bu yol, reseptöre bağlıdır ve diğer hücrelerden gelen ligandlar hücre yüzeyindeki bu ölüm reseptörlerine bağlanarak apoptozu aktive eder. Dışsal yolun ilerleyişi şu şekildedir; İlk adımda, bir ligand adı verilen bir sinyal molekülü, hücre yüzeyindeki spesifik bir ölüm reseptörüne bağlanır [112]. Dışsal yolda rol oynayan yaygın ligandlar Fas ligandı (FasL), TNF- α (tümör nekroz faktör- α) ve TRAIL (TNF ile ilişkili ligand) dir. Bu ligandlar, karşılık gelen ölüm reseptörleri olan Fas (CD95), TNFR1 (TNF reseptör-1) ve TRAIL reseptörlerini (DR4 ve DR5) aktive eder. Ligand ölüm reseptörüne bağlandığında, FADD (Fas-İlişkili Ölüm Alanı) gibi bir adaptör protein reseptörün sitoplazmik kuyruğuna bağlanır. Bu adaptör protein, bir sonraki adımda kaspaz aktivasyonu için kritik olan bir platform oluşturur. FADD proteini, DED (Ölüm Efektör Alanı) adı verilen bir motif aracılığıyla pro-caspase-8 adı verilen bir başlatıcı kaspaz ile etkileşime girer. Bu etkileşim, pro-caspase-8'in kendi kendini kesmesine ve aktif kaspaz-8'e dönüşmesine yol açar [113]. Aktif kaspaz-8, apoptotik yolda kritik bir rol oynayan efektör kaspazları aktive etme yeteneğine sahiptir. Aktif kaspaz-8, aşağı akışta yer alan kaspaz-3 ve kaspaz-7 gibi efektör kaspazları doğrudan keserek veya BID (Bcl-2 Etkileşimli Protein) adı verilen bir protein

üzerinde bir sinyal yolağı başlatarak aktive edebilir. BID'nin kesilmesi, mitokondriyal yola da yol açarak apoptozis sürecini güçlendirebilir. Efektör kaspazlar, bir dizi hücrel proteinin parçalanmasından sorumlu olan enzimlerdir. Bu proteinlerin parçalanması, hücrenin işlevlerini bozar ve nihayetinde hücre ölümüne yol açar. Aktif efektör kaspazlar, hücrenin DNA'sını parçalayan ve proteinleri parçalayan çeşitli enzimleri aktive eder. Bu, hücrenin kendisini yok etmesine ve apoptotik cisimcik adı verilen küçük parçalara ayrılmasına yol açar. Apoptotik cisimcikler daha sonra fagositler tarafından temizlenir, böylece çevredeki dokulara zarar vermez [128].

Dışsal yolun işlevleri; Hasar görmüş, yaşlı veya anormal protein birikimi olan hücreler, dışsal yol aracılığıyla apoptoza uğrayarak ortadan kaldırılabilir. Bu, dokuların sağlıklı bir şekilde yenilenmesini sağlar[120]. Dışsal yol, bağışıklık sisteminin işlevselliği için önemlidir. Bağışıklık sistemi hücreleri, virüsler veya anormal hücreler gibi yabancı maddeleri tanıdıklarında, bu hedeflere ölüm sinyalleri göndererek apoptozu tetikleyebilirler. Bu, vücudun patojenlere karşı korunmasına yardımcı olur. Dışsal yol, embriyonik gelişim sırasında ve yetişkin dokuların homeostazını korumak için hücrelerin ölümünü düzenlemeye yardımcı olur. Dışsal yol, kanser tedavisinde yeni terapötiklerin geliştirilmesi için bir hedef olarak kullanılmaktadır. Bu terapötikler, apoptozu tetiklemek veya kanser hücrelerinin apoptoza karşı direncini yenmek için tasarlanabilir[112], [113], [120], [128].

Dışsal yolun apoptotik süreçteki önemli rolü nedeniyle, bozulması çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilir. Bu bozulmalar iki şekilde gerçekleşir bunlar; Hücreler apoptoza uğrama yeteneklerini kaybedebilirler. Bu durum genellikle kanser gelişiminde rol oynar [112]. Kanser hücreleri, dışsal yolun sinyalleşme yollarındaki mutasyonlar nedeniyle ölüm sinyallerine karşı dirençli hale gelebilir. Bu direnç, kanser hücrelerinin kontrol dışı bir şekilde çoğalmasına ve tümör oluşumuna yol açar [113]. Diğer durumda dışsal yol aşırı aktif hale gelebilir ve sağlıklı hücrelerin bile apoptoza uğramasına neden olabilir. Bu durum, otoimmün hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıklara yol açabilir. Örneğin, otoimmün hastalıklarda vücudun kendi dokularına saldıran bağışıklık hücreleri, sağlıklı hücrelere ölüm sinyalleri göndererek apoptozu tetikleyebilir [120]. Bu durum, dokuların hasar görmesine ve organ yetmezliğine yol

açabilir. Dışsal yolun apoptozdaki kritik rolü nedeniyle, kanser tedavisinde yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi için bir hedef olarak araştırılmaktadır. Kanser hücrelerindeki apoptoz direncini aşmak için, dışsal yolun sinyalleşme yollarındaki hedef proteinleri aktive eden ilaçlar geliştirilmektedir. Bu ilaçlar, kanser hücrelerinde yeniden apoptoz yeteneğini kazandırarak kanser tedavisinde kullanılabilir. Kanser hücreleri bazen apoptoz sinyallerini yok sayan veya etkisiz hale getiren mekanizmalar geliştirir. Bu mekanizmaları bloke eden ilaçlar geliştirilerek kanser hücrelerinin apoptoza karşı direncini kırmak ve kanser tedavisini daha etkili hale getirmek hedeflenmektedir [112], [113], [120], [128].

2.1.4 Karaciğer Kanseri Terapi Modelleri

Karaciğer kanseri (HCC), dünya çapında kanser ölümlerinin en önde gelen nedenlerinden biridir. Erken ve orta evre HCC'de cerrahi rezeksiyon gibi tedaviler mevcuttur, ancak ileri evre hastalarda prognoz zayıftır [97], [98]. Sorafenib, 2007 yılında ileri evre HCC için ilk olarak onaylanan bir çoklu kinaz inhibitörü (TKI) idi. O zamandan beri, lenvatinib, regorafenib ve kabozantinib dahil olmak üzere yeni TKI'ler onaylanmıştır. Bu ajanlar, genel sağkalımı ve hastaların yaşam kalitesini iyileştirmede önemli faydalar sağlamıştır [129], [130]. Bununla birlikte, TKI'lere direnç kaçınılmazdır ve yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. PI3K/Akt/mTOR yolu, hücre büyümesi, proliferasyonu, metabolizma ve hayatta kalma dahil olmak üzere çeşitli hücresel işlevlerde rol oynayan bir sinyal yolağıdır. Bu yol, HCC'de sıklıkla aşırı aktiftir ve bu da tümör büyümesi ve ilerlemesine katkıda bulunur. PI3K/Akt/mTOR yolunu hedef alan bir dizi küçük moleküllü inhibitör ve immünoterapi ajanı geliştirilmektedir. Bu ajanlar, TKI'lere dirençli hastalar için yeni tedavi seçenekleri sunma potansiyeline sahiptir [97], [98], [129], [130], [131], [132].

Birinci basamak tedavilerde kullanılan ilaçlar; Sorafenib, VEGFR, PDGFR, Raf ve Ret dahil olmak üzere bir dizi tirozin kinazı (TK) hedef alan bir TKI'dir. 2007 yılında ileri evre HCC için ilk olarak onaylanmıştır ve hala ileri evre HCC'li hastalar için birinci basamak tedavi seçeneğidir. Sorafenib, genel sağkalımı yaklaşık 3 ay uzatabilir ve hastaların yaşam kalitesini iyileştirebilir. Lenvatinib, VEGFR, PDGFR, FGFR, Ret ve KIT dahil olmak üzere bir dizi TK'yı hedef alan bir TKI'dir. 2018 yılında ileri evre HCC için onaylanmıştır [133]. Lenvatinib, sorafenib kadar etkilidir ve bazı hastalarda daha iyi

tolere edilebilir olabilir. İkinci basamak tedavilerde kullanılan ilaçlar; Regorafenib, VEGFR, PDGFR, FGFR, c-Met, AXL ve Ret dahil olmak üzere bir dizi TK'yı hedef alan bir TKI'dir. 2017 yılında sorafenib tedavisinde ilerleme kaydeden HCC hastaları için onaylanmıştır. Regorafenib, sorafenib tedavisinde ilerleme kaydeden hastalarda genel sağkalımı yaklaşık 3 ay uzatabilir. Kabozantinib, VEGFR, c-Met, AXL ve Ret dahil olmak üzere bir dizi TK'yı hedef alan bir TKI'dir. 2019 yılında sorafenib tedavisinde ilerleme kaydeden HCC hastaları için onaylanmıştır. Kabozantinib, sorafenib tedavisinde ilerleme kaydeden hastalarda genel sağkalımı yaklaşık 2 ay uzatabilir. Üçüncü basamak tedavilerde kullanılan ilaçlar; Ramucirumab, VEGFR2'yi doğrudan hedef alan bir monoklonal antikorudur. 2014 yılında sorafenib tedavisinde ilerleme kaydeden HCC hastaları için onaylanmıştır. Ramucirumab, sorafenib tedavisinde ilerleme kaydeden hastalarda progresyonsuz sağkalımı yaklaşık 2 ay uzatabilir. Nivolumab, PD-1'i hedef alan bir immün kontrol noktası inhibitörüdür. 2016 yılında sorafenib tedavisinde ilerleme kaydeden HCC hastaları için onaylanmıştır [133], [134].

İmmünoterapi, bağışıklık sisteminin kanserle savaşmasını sağlamak için tasarlanmış bir tedavi türüdür. Atezolizumab ve bevacizumab kombinasyonu, önceden sistemik tedavisi olmayan ileri evre HCC hastaları için birinci basamak tedavi olarak onaylanmıştır [133]. Atezolizumab, PD-L1'i hedef alan bir immün kontrol noktası inhibitörüdür. PD-L1, tümör hücrelerinde bulunan bir proteindir ve bağışıklık sisteminin T hücrelerini bastırmak için kullanılabilir. Atezolizumab, bağışıklık sisteminin tümör hücrelerini tanımasına ve yok etmesine yardımcı olabilir. Bevacizumab, VEGFR'yi hedef alan bir monoklonal antikorudur. VEGFR, tümör hücrelerinin büyümesi ve hayatta kalması için gerekli olan bir proteindir. Bevacizumab, tümörlere kan akışını engelleyerek ve tümör büyümesini engelleyerek çalışır. Kullanılan bazı ilaçlar ve gen bölgeleri tablo 2'de verilmiştir [133], [134].

Tablo 2 HCC tedavisinde kullanılan bazı ilaçlar ve onların gen hedeflerinin şematik gösterimi [219].

Product	DrugBank ID	ChEMBL	Indications	Targets
Cabozantinib	DB08875	CHEMBL2105717	Advanced Renal Cell Carcinoma; Hepatocellular Carcinoma; Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma; Progressive, metastatic Medullary thyroid cancer	MET; RET; KIT; PIK3CA; HRAS; HGF; TEK; FLT3; CTNNB1; ABL1; GNA11; KDR; NRAS; CFLAR; YES1; ROS1
Ipilimumab	DB06186	CHEMBL1789844	Advanced Renal Cell Carcinoma; Cutaneous Melanoma; Hepatocellular Carcinoma; Metastatic Melanoma; Unresectable Melanoma; Metastatic MSI-H/dMMR colorectal cancer	CTLA4; CD274; BRAF; MDM2; EGFR; HLA-A; ALK; NRAS; PBRM1; TP53; MSH6; MLH1
Mitoxantrone	DB01204	CHEMBL58	Acute Lymphocytic Leukemia (ALL); Acute Myeloid Leukemia (AML); Acute Promyelocytic Leukemia (APL); Lymphoma, Hodgkins; Metastatic Breast Cancer; Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL); Relapsed Leukemia; Relapsed Lymphomas; Hormone refractory, advanced Prostate cancer; Relapsed Hepatocellular carcinoma	CYP3A4; ABCG2; MECP2; MBNL1; GALNT14; POLH; RPSA; POLK; RACGAP1; UGT1A5; MAPK1; SLC01B1; RECQL; BRCA1; WRN; ARSA; SMAD3; TOP2A; RGS4; BCL2; NSD2; YES1; NFKB1; RAD52; KDM4A; CBX1; EHMT2; HTT; POLI; ABCB1; PIM1; BAX; MPHOSPH8; C10orf67; TP53; DNMT1; FLT3; THPO; BLM; ATAD5; ATXN2; FEN1
Nivolumab	DB09035	CHEMBL2108738	Advanced Renal Cell Cancer; Classical Hodgkin's Lymphoma; Hepatocellular Carcinoma; Low Risk Advanced Renal Cell Cancer; Melanomas; Metastatic Colorectal Cancer (MCR); Metastatic Melanoma; Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer; Metastatic Small Cell Lung Cancer; Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck; Metastatic Urothelial Carcinoma (UC); Recurrent Head and Neck Squamous Cell Carcinoma; Unresectable Melanoma; Intermediate risk Advanced Renal Cell Cancer; Locally advanced Urothelial Carcinoma	PTEN; CD274; PDCD1; CDK12; BRAF; MDM2; ALK; MLH1; IDH1; PMS2; FGFR3; KRAS; TP53; EGFR; HLA-DRA; NRAS; PBRM1; ARID1A; MDM4; STK11; MSH6; ERBB2
Regorafenib	DB08896	CHEMBL1946170	Hepatocellular Carcinoma; Metastatic Colorectal Cancer (MCR); Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumor; Locally advanced Gastrointestinal stromal tumor; Unresectable Gastrointestinal stromal tumor	MAPK11; RET; ARAF; FGFR2; FLT4; BRAF; EPHA2; FRK; DDR2; ZHX2; TEK; FGFR3; RAF1; KDR; PDGFRB; KRAS; FLT1; FGFR1; PTEN; MAP2K1; NRAS; VEGFA; FBXW7; ABL1; PIK3CA; EGFR; NTRK1; PDGFRA; YES1; KIT; VHL
Sorafenib	DB00398	CHEMBL1336	Advanced Renal Cell Carcinoma; Gastrointestinal Stromal Tumors; Hemangiosarcoma; Unresectable Hepatocellular Carcinoma; Locally recurrent refractory to radioactive iodine treatment Thyroid carcinoma; Metastatic refractory to radioactive iodine treatment Thyroid carcinoma	FLT1; JAK3; ARAF; DYRK3; RAF1; AURKB; PTPN6; RET; CYP2C9; SLC15A2; CDK8; VHL; HIF1A; NTRK2; ARID1A; PDGFRB; SLK; MAP2K1; BRAF; FGFR3; KRAS; YES1; IRAK1; NTRK1; PDGFRA; MAPK9; FGFR1; PIK3CA; MAPK13; MAPK12; NRAS; FLT4; EGFR; NTSR1; PLK4; KIT; UGT1A1; MAPK10; ZHX2; VEGFA; CSF1R; VEGFB; RPS6KB1; MAPK11; NF1; SRPK1; CYP3A4; MKNK2; AR; LYN; UGT1A9; IDH2; HMOX1; GMNN; MAPK7; HIPK4; MINK1; AXL; SLC22A1; ABCB1; ABCC2; ABCG2; AURKA; CYP2C8; BLK; MC4R; CYP2B6; SLC01B1; TAOK1; CTNNB1; HIPK2; TNF; PTEN; LIMK1; CAMK2B; MAPK4; CBL; PAX8; MAPK8; MAP3K20; NTRK3; TP53; KDR; FGF3; NOS3; MAPK14; EPHA2; ABL1; MAPK6; FLT3; VEGFC; MAPK1; MAPK3; ATXN2; MAP4K5; NFE2L2
Tremelimumab	DB11771	CHEMBL2108658	Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer, Unresectable Hepatocellular Carcinoma (HCC)	CTLA4

2.1.4.1 Gen Terapi

Son yıllarda, sinyal yollarının anlaşılmasında, tümör ilerlemesini belirleme tekniklerinde ve bu yolların aktivitesini bloke eden ilaçların geliştirilmesinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir [130]. Bu gelişmeler, HCC tedavisinde kesin tedavilerin geliştirilmesi için yeni fırsatlar sunmaktadır[130], [135].

TKI'ler ve immünoterapinin kombinasyonu, her iki tedavi yaklaşımıyla tek başına elde edilenden daha güçlü bir antitümör etkisi gösterebilir. Atezolizumab ve bevacizumab kombinasyonu, ilerlemiş HCC için FDA onaylı birinci basamak tedavidir ve sorafenib ve lenvatinib'e göre önemli faydalar sunmaktadır [135]. İmmünoterapi, cerrahi rezeksiyon veya ablasyon gibi diğer tedavilerle de kombine edilebilir. Rezeksiyon sonrası adjuvan immünoterapi, HCC nüksünü önlemede ve hastaların uzun vadeli sağkalımını iyileştirmede etkili olabilir. Epigenetik tedaviler, gen ekspresyonunu DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi mekanizmaları değiştirerek etkileyen ilaçlardır. HCC'de epigenetik değişiklikler yaygındır ve bu değişiklikleri hedefleyen tedaviler, hastalığın tedavisinde yeni bir umut vadetmektedir. Gen terapisi, HCC tedavisinde yeni ve umut verici bir yaklaşımdır. Bu alandaki araştırmalar, viral olmayan ve viral vektörler olmak üzere iki ana gen terapisi yaklaşımına odaklanmaktadır. Viral olmayan vektörler, genleri hedef hücrelere iletmek için virüsler yerine yapay taşıyıcılar kullanır. Bu, viral vektörlere kıyasla daha güvenli bir yaklaşım olarak kabul edilir, çünkü viral vektörler bağışıklık sisteminin aşırı tepkisine veya istenmeyen gen mutasyonlarına yol açabilir. Viral olmayan vektörler kullanılarak HCC tedavisinde birçok umut verici çalışma yürütülmüştür. Örneğin, kitosan bazlı nanopartiküller, tümör büyümesini önemli ölçüde azaltan ve karaciğer toksisitesini azaltan HCC hücrelerine ilaçlar ve siRNA'lar iletmek için kullanılmıştır. Viral vektörler, genleri hedef hücrelere iletmek için virüsler kullanır [136]. Bu, viral olmayan vektörlere kıyasla daha yüksek transgen ekspresyonu sağlayabilir, ancak viral vektörlerin bağışıklık sisteminin aşırı tepkisine veya istenmeyen gen mutasyonlarına yol açma riski de daha yüksektir. Viral vektörler kullanılarak HCC tedavisinde birçok klinik çalışma yürütülmektedir. Örneğin, bir Faz II klinik çalışması (NCT02561546), ileri HCC'li hastalarda adenovirüs aracılığıyla p53 geninin aktarılmasının güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmektedir. Viral olmayan ve viral

vektörler, hepatoselüler karsinom (HCC) tedavisinde yeni ve umut verici yaklaşımlar sunmaktadır. Her iki yaklaşımın da kendine özgü avantajları ve dezavantajları vardır ve en uygun yaklaşım, hastanın bireysel özelliklerine ve hastalığın evresine bağlı olacaktır [135], [136], [137], [138].

2.1.4.2 *İmmüno Terapi*

Kronik karaciğer hastalıkları (KKH), dünya çapında önemli bir ölüm nedenidir. Karaciğer sirozu ve karaciğer kanseri dahil olmak üzere KKH'nın ilerlemiş aşamaları, geleneksel tedavilere dirençli olabilir ve bu da zayıf hasta sonuçlarına yol açar [139], [140]. İmmünoterapi, KKH'da umut verici bir yeni tedavi seçeneğidir. Farklı immünoterapi türleri, KKH'nın tedavisinde ve sonuçlarının iyileştirilmesinde büyük potansiyele sahiptir [139], [140], [141], [142].

Bağışıklık kontrol noktası proteinleri, bağışıklık sisteminin tümör hücrelerine saldırmasını önler. PD-1 ve PD-L1, KKH'da bağışıklık tepkisini bastırmada rol oynayan iki önemli bağışıklık kontrol noktası proteindir. Bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri, bu proteinlerin işlevini bloke ederek çalışır ve bu da bağışıklık sisteminin tümör hücrelerine saldırmasını sağlar. CAR T hücreleri, belirli bir tümör hücre tipini tanımasını ve yok etmesini sağlayan özel olarak tasarlanmış reseptörlerle modifiye edilmiş T hücreleridir [130]. CAR T hücreleri, hastadan alınan T hücrelerinin laboratuvarında modifiye edilmesi ve daha sonra hastaya geri enjekte edilmesiyle üretilir. Dendritik Hücre (DC) aşıları, bağışıklık sisteminin tümör hücrelerini tanımasını ve yok etmesini öğretmek için kullanılan bir aşı türüdür. DC'ler, tümör antijenleri ile yüklenir ve daha sonra hastaya enjekte edilir. DC aşıları, KKH'da klinik çalışmalarda araştırılmaktadır. Nivolumab ve pembrolizumab, HCC tedavisinde FDA onaylı iki bağışıklık kontrol noktası inhibitörüdür. Bu ilaçlar, daha önce sistemik tedaviye maruz kalmış HCC'li hastalarda hayatta kalma süresini önemli ölçüde uzatmıştır [130], [143].

2.1.4.3 *Epigenetik Değişiklik Tabanlı Terapi*

Kronik karaciğer hastalıkları (KKH), dünya çapında önemli bir ölüm nedenidir. Karaciğer sirozu ve karaciğer kanseri (HCC) dahil olmak üzere KKH'nın ilerlemiş aşamaları, geleneksel tedavilere dirençli olabilir ve bu da zayıf hasta sonuçlarına yol açar [130],

[144]. Son yıllarda, epigenetik değişiklikler KKH'da hastalığın başlaması, ilerlemesi ve metastazında önemli rol oynadığı için yeni tedavi hedefleri olarak ortaya çıkmıştır. Epigenetik, DNA dizilimini değiştirmeden gen ekspresyonunu ve diğer hücresel süreçleri etkileyen kalıtsal değişikliklerdir [145], [146]. Bu değişiklikler, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'ların (ncRNA'lar) ekspresyonu gibi çeşitli şekillerde ortaya çıkabilir [130], [144], [145], [146], [147], [148].

Epigenetik değişiklikler, KKH'nın başlaması, ilerlemesi ve metastazında önemli rol oynar. Tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesini ve bölünmesini kontrol etmeye yardımcı olan genlerdir [144]. DNA metilasyonu yoluyla tümör baskılayıcı genlerin bastırılması, hücre büyümesinin kontrolsüz bir şekilde artmasına yol açabilir. Onkojenler, hücreleri kansere dönüştürebilen genlerdir. DNA metilasyonu yoluyla onkojenlerin aktivasyonu, tümör gelişimine yol açabilir[145]. Histon modifikasyonları, DNA onarım mekanizmalarını bozabilir ve bu da genomik istikrarsızlığa ve mutasyonlara yol açabilir. Mutasyonlar, kanser hücrelerinin gelişmesine ve büyümesine katkıda bulunabilir. Epigenetik ilaçlar, KKH tedavisinde hala araştırma aşamasındadır, ancak bazı yaklaşımlar halihazırda klinik uygulamada kullanılmaktadır. Epigenetik değişikliklere yönelik tedaviler, KKH tedavisinde umut verici bir yeni yaklaşımdır. Gelecekte epigenetik ilaçlar, KKH'lı hastalar için standart bir tedavi seçeneği haline gelebilir[144], [145], [148].

2.1.4.4 Hedefli Radyonüklid Terapi

Kanser, dünya çapında önemli bir ölüm nedenidir. Mevcut kanser tedavileri, cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi invaziv ve toksik prosedürleri içerir. Bu tedaviler, tümör hücrelerini öldürmede etkili olsa da, sağlıklı dokulara da zarar verebilir ve önemli yan etkilere neden olabilir [130], [149]. Hedefli radyonüklid tedavisi (TRT), bu sorunun üstesinden gelmeyi ve kanserli hücreleri seçici bir şekilde yok etmeyi amaçlayan yeni bir kanser tedavisidir. TRT'nin Çalışma Prensipleri, radyoaktif izotopların (radyonüklidler) kanser hücrelerini hedefleyen moleküllere (ligandlar veya antikorlar) bağlanmasıyla çalışır [150], [151]. Radyonüklidler, DNA'ya zarar vererek ve apoptoz (hücre ölümü) yoluyla kanser hücrelerini yok eden yüksek enerjili radyasyon yayarlar. TRT, sağlıklı dokulara minimal hasarla kanser hücrelerini seçici olarak hedefler. Dirençli kanserlere

karşı bile etkin olabilir. Geleneksel kanser tedavilerine kıyasla daha az yan etkiye sahiptir [130], [149], [150], [151], [152], [153].

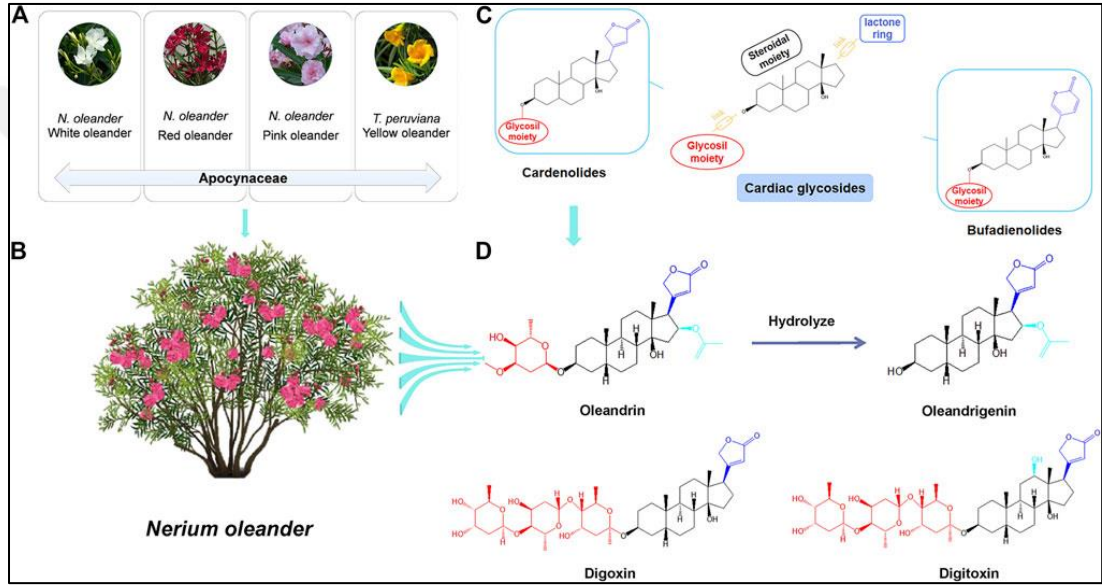
2.1.4.5 Moleküler Hedefli Terapi

Kanser, hücrel sinyalleşme ağlarında bozulmaların neden olduğu karmaşık bir hastalıktır. Bu ağlar, transkripsiyon faktörleri, reseptörler ve kinazlar gibi çeşitli biyomoleküllerden oluşur [154], [155]. Bu biyomoleküllerden bazılarının, ağın işlevini kontrol eden merkezi düğümler olduğu düşünülmektedir. Bu merkezi biyomolekülleri hedeflemek, tümör hücrelerinin büyümesini, hayatta kalmasını ve yayılmasını engellemek için umut verici bir kanser tedavisi stratejisi olabilir [130]. Çoklu kinaz inhibitörleri (MKI'ler), birden fazla kinazı aynı anda hedefleyen ilaçlardır. MKI'ler, monokinaz inhibitörlerine (MK'ler) kıyasla daha geniş bir etkiye sahip olabilir ve direnç geliştirmeyi zorlaştırabilir [156]. Onaylanmış bazı MKI'lar şunlardır; Sorafenib, Lenvatinib, Regorafenib, Cabozantinib, Ramucirumab (Tablo 2). Gelecekte, daha fazla MKI'nin geliştirilmesi ve onaylanması kanser tedavisinde önemli bir ilerleme sağlayabilir [154], [155], [156], [157], [158].

2.2 OLEANDRİN

Oleandrin, *Apocynaceae* familyasından *Nerium oleander* (zakkum) bitkisinden izole edilen yüksek oranda yağda çözünebilen bir kalp glikozitidir (Şekil 8)[159]. Oleandrin, beyaz kristal bir tozudur ve suda çözünmez, ancak metanol, etanol ve kloroformda çözünür. Mükemmel farmakolojik özellikleri nedeniyle geleneksel bitkisel ilaç olarak kullanılır [160]. Oleandrin, konjestif kalp yetmezliği gibi çeşitli hastalık tedavilerinde yaygın olarak uygulanır. Son yıllarda oleandrin, anti-kanser ve anti-viral potansiyeli nedeniyle araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Oleandrin, *Nerium oleander* (zakkum) bitkisinin tüm kısımlarında bulunur [161]. Bu bitki, tropikal ve subtropikal bölgelerde yaygın olarak yetiştirilen bir süs çalıdır. Oleandrin, bitkiden ekstraksiyon yöntemi ile elde edilir. En yaygın ekstraksiyon yöntemleri arasında organik çözücü ekstraksiyonu ve süper kritik sıvı ekstraksiyonu yer alır [160], [161], [162].

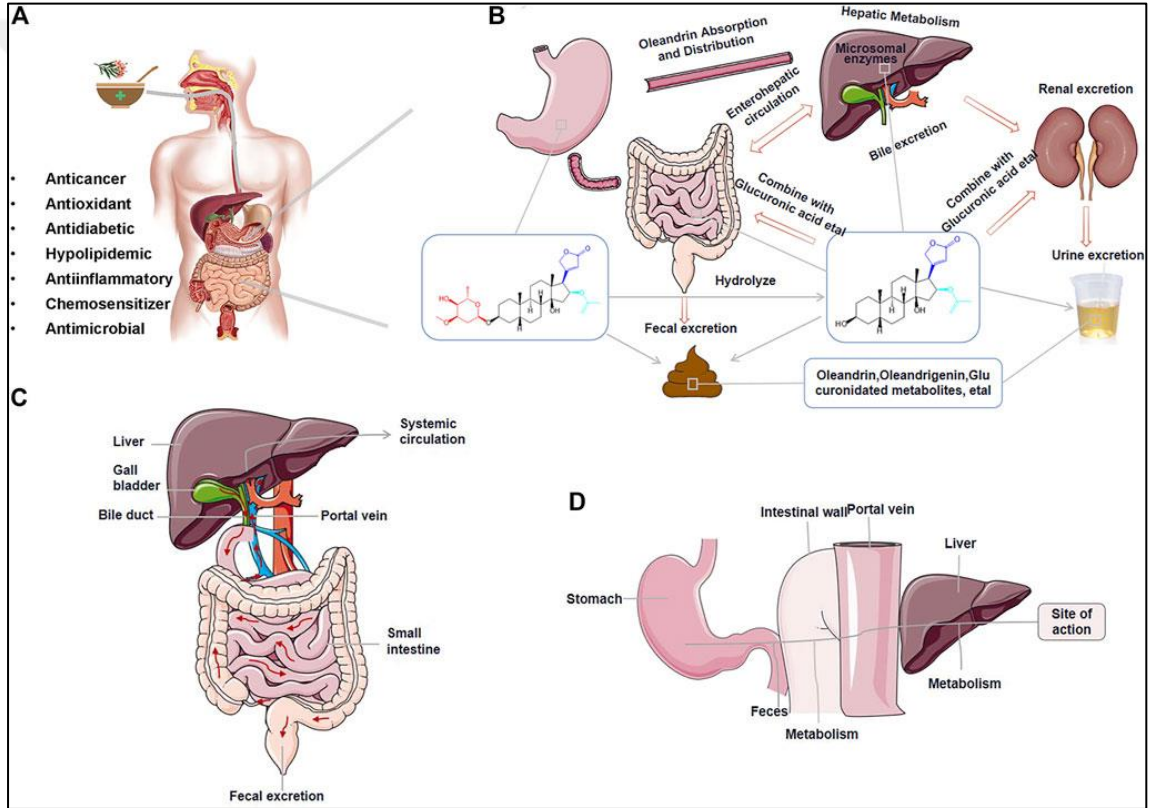
Oleandrin, steroid çekirdeği ve kardiyogenik aglikon içeren bir digitoksin türüdür. Yağda çözünebilir bir moleküldür. Moleküler formülü $C_{34}H_{48}O_{19}$ 'dur ve moleküler ağırlığı 648.77 g/mol'dür. Oleandrin, kardiyolojik etkisinden sorumlu olan lakton halkası ve şeker zinciri içerir. Oleandrin'in molekülü üç ana bölümden oluşur, Aglikon (steroidal kısım), bu kısım oleandrin'in farmakolojik aktivitesinden sorumlu farmakoforik kısımdır [163]. Lakton halkası, C-17 atomunda doymamış lakton yapısı bulunur. Glikosil kısmı, C-3'te bir dideoksi arabinoz grubu içerir [163], [164], [165].



Şekil 8 Oleandrin'in doğal kaynakları ve yapısal özellikleri. A) Yaygın olarak "zakkum" olarak bilinen bitki kategorileri. B) Zakkumun ana kaynakları: *Nerium zakkum*. C) Kardiyak glikozitlerin (CG'ler) sınıflandırılması. D) Oleandrin ve onun hidrolizata oleandrigenin'in kimyasal yapısı ve tipik CG'lerin diğer yapısı. [159]

Oleandrin, çeşitli analitik teknikler kullanılarak tespit edilebilir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve gaz kromatografisi (GC), Oleandrin'in kimyasal bileşimini analiz etmek için en yaygın kullanılan yöntemlerdir. Ultraviyole (UV) spektroskopisi ve sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (LC-MS) Oleandrin'in moleküler yapısını tanımlamak için kullanılabilir. Enzim bağlantılı immunosorbent testi (ELISA) ve radyoimmünoassay (RIA) gibi immünoassay teknikleri, Oleandrin'in spesifik olarak tespit edilmesi için kullanılabilir. LC-MS, oleandrin'in biyolojik örneklerde hem niteliksel hem de niceliksel olarak analiz edilmesi için tercih edilen yöntemdir. Bu yöntem, oleandrin'in farmakokinetik ve deneysel toksikolojik çalışmaları için idealdir.

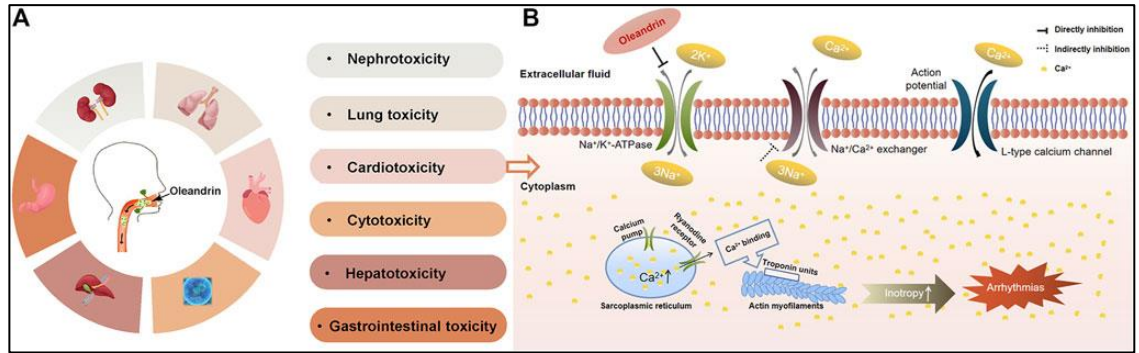
Oleandrin'in farmakokinetiği karmaşıktır ve emilimi, dağılımı, metabolizması ve atılımı (ADME) birçok faktöre bağlıdır. Oleandrin, gastrointestinal sistemden emilir. Emilim oranı, formülasyon türüne, gıda alımına ve bireysel değişkenliğe bağlıdır [165]. Oleandrin, plazma proteinlerine bağlanır ve karaciğere, kalbe ve diğer dokulara dağılır. Dağılım hacmi, yaklaşık 1.5-2.0 L/kg'dır. Oleandrin, karaciğerde CYP3A4 ve CYP2D6 enzimleri tarafından metabolize edilir. Metabolizma ürünlerinden bazıları oleandrin-28-O-glukuronid ve oleandrin-16-O-glukuronid'dir. Oleandrin, safra ve böbrekler yoluyla atılır. Yarı ömrü, bireysel değişkenliğe bağlı olarak 10-20 saat arasındadır (Şekil 9).



Şekil 9 Oleandrin'in emilimi, dağılımı, metabolizması ve atılımı (ADME) sürecinin şematik gösterimi. A) Oleandrin'in farmakolojik özellikleri. B) Oleandrin'in in vivo ayrıntılı ADME süreci . C) Oleandrin'in in vivo safra atılımı ve enterohepatik dolaşımı (EHC) olasılığı . D) Olası ilk geçiş etkisi. [159]

Oleandrin zehirlenmesi, bitkinin herhangi bir kısmının yanlışlıkla yutulması veya yüksek dozda oleandrin içeren ürünlerin kullanımı nedeniyle ortaya çıkabilir. Oleandrin zehirlenmesi belirtileri şunları içerir; gastrointestinal semptomlara baktığımızda mide bulantısı, kusma, karın ağrısı, ishal. Kardiyovasküler semptomlarda düzensiz kalp atışı (aritmî), kalp yetmezliği, düşük kan basıncı. Nörolojik semptomlar baş dönmesi, baş

ağrısı, uyuşukluk. Diğer semptomlar yorgunluk, güçsüzlük, solunum güçlüğü görülmektedir. Oleandrin zehirlenmesi ciddi bir durumdur ve acil tıbbi müdahale gerektirir [165]. Tedavi genellikle semptomatiktir ve mide yıkamayı, aktif kömürü, antiaritmik ilaçları ve destekleyici bakımı içerir. Oleandrin oldukça toksiktir ve kolayca birikerek yaşamı tehdit eden zehirlenmelere yol açabilir. Oleandrin zehirlenmesi vakaları sığır, kediler, köpekler, tavuklar, atlar, koyunlar, keçiler, fareler, sıçanlar, tavşanlar, eşekler ve insanlarda rapor edilmiştir. Oleandrin'in toksik dozu yaklaşık 1-2 ng/mL'dir ve akut olarak ölümcül doz ise 9,8-10 ng/mL'dir. Oleandrin zehirlenmesi belirtileri mide-bağırsak rahatsızlığı, bulantı, kusma, karın ağrısı, uyuşukluk, deliryum, genel halsizlik, hiperkalemi, aritmi, bradikardi, atriyoventriküler iletim bloğu, kanlı ishal, solunum felci, gözlerde, ağızda ve mide-bağırsak sisteminde yanıklar, kasılmalar ve bilinç kaybıdır. Oleandrin zehirlenmesinin en çok kabul gören mekanizması, Na/K-ATPaz'ın inhibisyonudur. Na/K-ATPaz, hücre içi iyon dengesinin korunmasından sorumlu bir membran proteinidir [166]. Oleandrin, Na/K-ATPaz'ı inhibe ederek hücre içi Na^+ ve Ca^{2+} düzeyinde artışa ve hücre içi K^+ düzeyinde azalmaya neden olur. Bu durum kalp kasılma kuvvetinde ve kalp hücrelerinin özerkliğinde artışa yol açar ve aritmieye neden olur. Oleandrin zehirlenmesinin sinir sistemi üzerindeki etkileri de tam olarak anlaşılmamıştır, ancak Na/K-ATPaz inhibisyonunun sinir iletim sürelerini etkileyebileceği düşünülmektedir [165], [166], [167]



Şekil 10 Oleandrin'in toksisitesi ve tipik toksisite mekanizmasının gösterimi. A) Oleandrin'in toksisitesinin özeti. B) Kardiyak miyositlerde Na/K-ATPaz'ın oleandrin aracılı inhibisyonunun şematik gösterimi. [159]

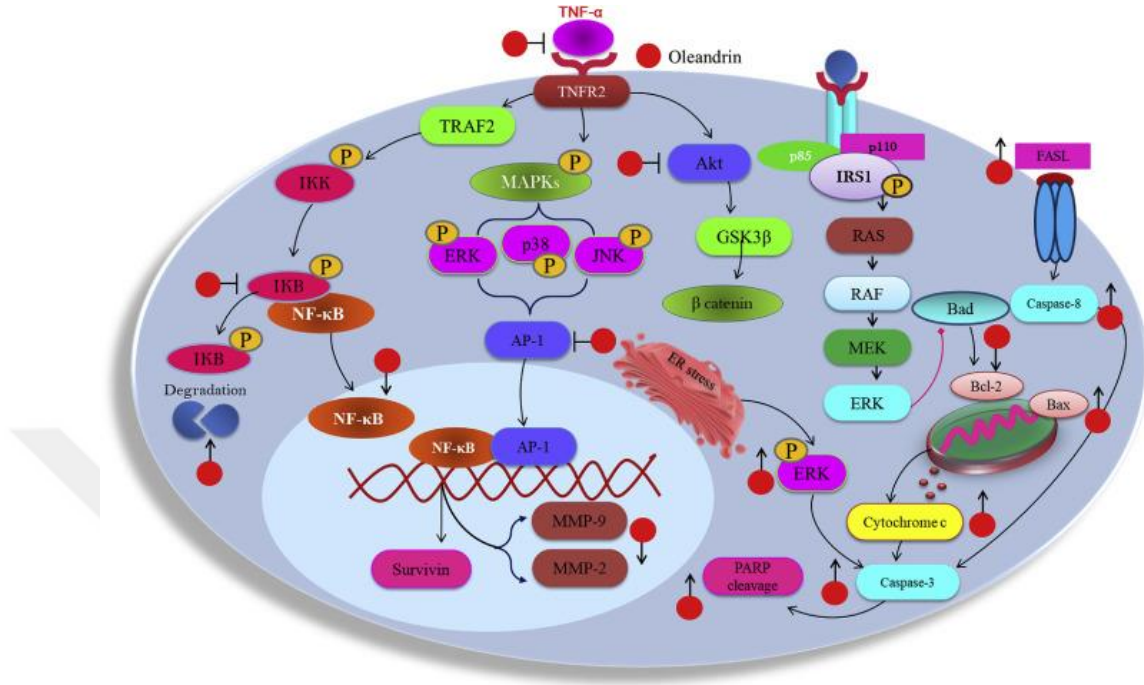
Oleandrin, kalp kasının kasılma gücünü ve kalp atış hızını artırır. Bu etki, Na^+/K^+ ATPase enzimini inhibe ederek kalp kası hücrelerinde kalsiyum iyonlarının girişini artırmasından kaynaklanır. Kalp ritminin düzenini sağlayarak aritmiyi önler. Bu etki, kalp kası hücrelerinde repolarizasyon aşamasını uzatarak gerçekleştirilir. Bazı kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını önleyebilir. Bu etki, apoptoz yoluyla gerçekleştirilir. Oleandrin'in bazı viral enfeksiyonlara karşı antiviral etkileri olabileceğine dair öncü çalışmalar vardır. SARS-CoV-2 (COVID-19 virüsü) dahil olmak üzere çeşitli virüsler üzerinde yapılan araştırmalar devam etmektedir [160], [161], [162], [163], [164], [165], [166], [167], [168].

2.2.1 Oleandrin ve Apoptoz

Oleandrin, çeşitli kanser hücre hatlarında apoptozu (programlanmış hücre ölümü) indükleyerek antikanser aktivite gösterir [168]. Bu etki çeşitli mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştirilir, bunlar; Hücrelerin G2/M fazında durmasına neden olarak hücre proliferasyonunu engeller. Bu, kanser hücrelerinin çoğalmasını ve tümör büyümesini durdurmaya yardımcı olur. Kaspazların aktivasyonu, ROS birikimi ve pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunun artması yoluyla apoptozu tetikler [169]. Oleandrin, tümör büyümesi için gerekli olan yeni kan damarlarının oluşumunu engeller. Bu, tümörün besin ve oksijen alımını azaltarak kanser hücrelerinin ölümüne yol açabilir [170]. Oleandrin, kanser hücrelerinin kemoterapi ilaçlarına karşı direncini azaltarak kemoterapinin etkinliğini artırabilir. Bu, kanser tedavisinin başarısını iyileştirmeye yardımcı olabilir [168], [169], [170], [171].

Oleandrin, kanser hücrelerinin büyümesini ve hayatta kalmasını destekleyen bir dizi moleküler hedefi hedef alır [159], [160]. Bu hedeflerden bazıları Akt, ERK, NF- κ B ve VEGF'dir. NF- κ B, transkripsiyonel faktörler ailesidir. NF- κ B, CDK2, siklin D1, D2, D3, siklin E, COX-2, metaloproteaz ve hücre yüzeyi yapışma molekülleri gibi çeşitli genlerin ekspresyonunu indükleyerek tümör oluşumunu uyaran kanser gelişiminin birincil düzenleyicisi olarak görev yapar [162], [168]. Oleandrin'in tümör nekroz faktörünü (TNF- α), I κ B-a'nın bozulmasını, sitokrom c salınımını ve PARP bölünmesini modüle ettiği bilinmektedir. Oleandrin tedavisi NF- κ B aktivitesini durdurur ve TNF aracılı AP-1 aktivasyonunu inhibe etmiştir [169], [170].

Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz (MAPK), kanser hücresinin hayatta kalması, ilerlemesi ve geleneksel ilaç tedavilerine direncinde anahtar rol oynayan anahtar sinyal iletim yollarından biridir [171], [172]. MAPK ailesinin şu üyeleri bulunmaktadır; ERK, JNK ve p38 MAPK. PI3K/Akt yolu aynı zamanda kanserin ilerlemesi ve başlamasında da önemli bir oyuncu olarak bilinmektedir. Bu nedenle, Akt yolunu ve bununla ilişkili proteinleri hedeflemek, kanserin ilerlemesiyle mücadele etme potansiyeline sahiptir. Oleandrin tedavisi MAPK ve JNK'yi aktive etti, FasL ekspresyonunu indükledi, PARP bölünmesini uyardı, Akt'ın fosforilasyonunu azalttı ve MCF-7, PC3, HeLa, U-937 ve HL-60'ta membran potansiyelini değiştirdi [173], [174]. Toplu olarak bu mekanizmalar, çeşitli insan kanser hücre hatlarında apoptozun başlatılması ve hücre ölümü ile bağlantılıdır. Oleandrin'in ayrıca nanomolar konsantrasyonlarda insan pankreas (PANC-1) hücrelerinde otofaji yoluyla hücre ölümüne neden olduğu da biliniyordu. Mitokondriyal yoğunlaşma, translokasyon ve otofagozomlarda birikim gibi çeşitli morfolojik değişiklikler de gözlemlendi. Oleandrin tarafından artan p-ERK aktivasyonu, kanser hücresi proliferasyonunu durdurmuştur (Şekil 11). Oleandrin, kanser tedavisinde umut verici bir biyoaktif bileşiktir. Moleküler mekanizmaları ve kanser hücreleri üzerindeki etkileri hakkında daha fazla bilgi edinmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır [159], [160], [162], [168], [169], [170], [171], [172], [173], [174], [175], [176], [177], [178].

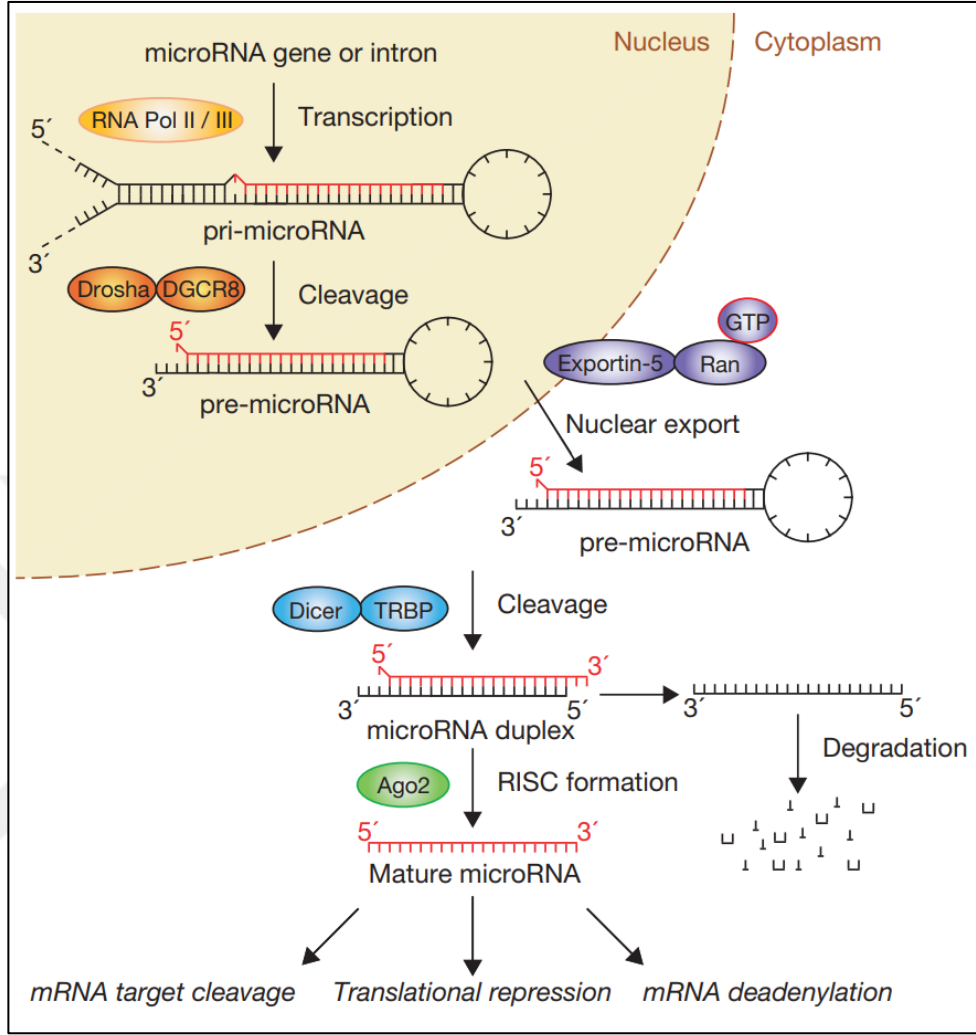


Şekil 11 Oleandrin'in kansere karşı etki mekanizmasının şematik gösterimi. Oleandrin'in, p-ERK, JNK, Akt ve NF-κB sinyal yollarını modüle ederek apoptozu indüklediği bilinmektedir. Ayrıca intrinsik yol, pro-apoptotik/anti-apoptotik proteinlerin arttırılması, kaspazların aktivasyonu ve PARP bölünmesi yoluyla gerçekleştirilir. [160]

2.3 MİCRORNA(MİRNA)

MikroRNA'lar (miRNA'lar), 20-22 nükleotit uzunluğunda kodlamayan RNA molekülleridir [179]. Gen ekspresyonunu düzenlemede önemli rol oynarlar ve kanser, kalp hastalığı ve diyabet gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilidirler. miRNA'lar, çeşitli hücresel süreçlerde rol oynarlar. miRNA'lar, birçok farklı mRNA'yı hedefleyebilir ve protein üretimini baskılayarak hücrenin işlevlerini kontrol eder. Hücre bölünmesini (proliferasyon) ve programlanmış hücre ölümünü (apoptoz) kontrol eden genleri hedefleyerek hücre sayısının düzenlenmesinde rol oynar. Lipid ve glikoz metabolizması gibi metabolik süreçleri düzenleyebilir. Bağışıklık sisteminin işlevini düzenleyebilir [179], [180], [181] .

miRNA'ların biyogenezi karmaşık bir süreçtir ve 4 ana aşamadan oluşmaktadır. Transkripsiyon, RNA polimeraz II veya III, bir gen üzerindeki DNA'yı okuyarak birincil miRNA (pri-miRNA) transkripti oluşturur. Pri-miRNA, yüzlerce ila binlerce nükleotid uzunluğunda bir RNA molekülüdür ve olgun miRNA'yı içeren bir saç tokası yapısına sahiptir [182]. İşleme, Drosha enzimi, çekirdek içinde pri-miRNA'yı yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda bir pre-miRNA'ya keser. Pre-miRNA, çekirdek zarfından Dicer enzimi tarafından sitoplazmaya taşınır. Dicer enzimi, pre-miRNA'yı yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda iki olgun miRNA'ya keser. Dışa Aktarım, Olgun miRNA'lardan biri, Argonaute proteinleriyle (Ago proteinleri) birleşmek üzere seçilirken, diğeri parçalanır. Seçilen miRNA, Exportin-5 proteininin yardımıyla çekirdek zarfından sitoplazmaya taşınır. İşlev, Sitoplazmada seçilen miRNA Ago proteinleri ile RNA-indüklenmiş susturma kompleksi (RISC) oluşturur. RISC, hedef mRNA'nın 3' UTR (3' Uç, prime untranslated region) bölgesine kısmen tamamlayıcı bir şekilde bağlanır. Bu bağlanma, hedef mRNA'nın translasyonunu (protein yapımını) engeller veya mRNA'nın bozunmasına yol açar (Şekil 12) [182], [183].



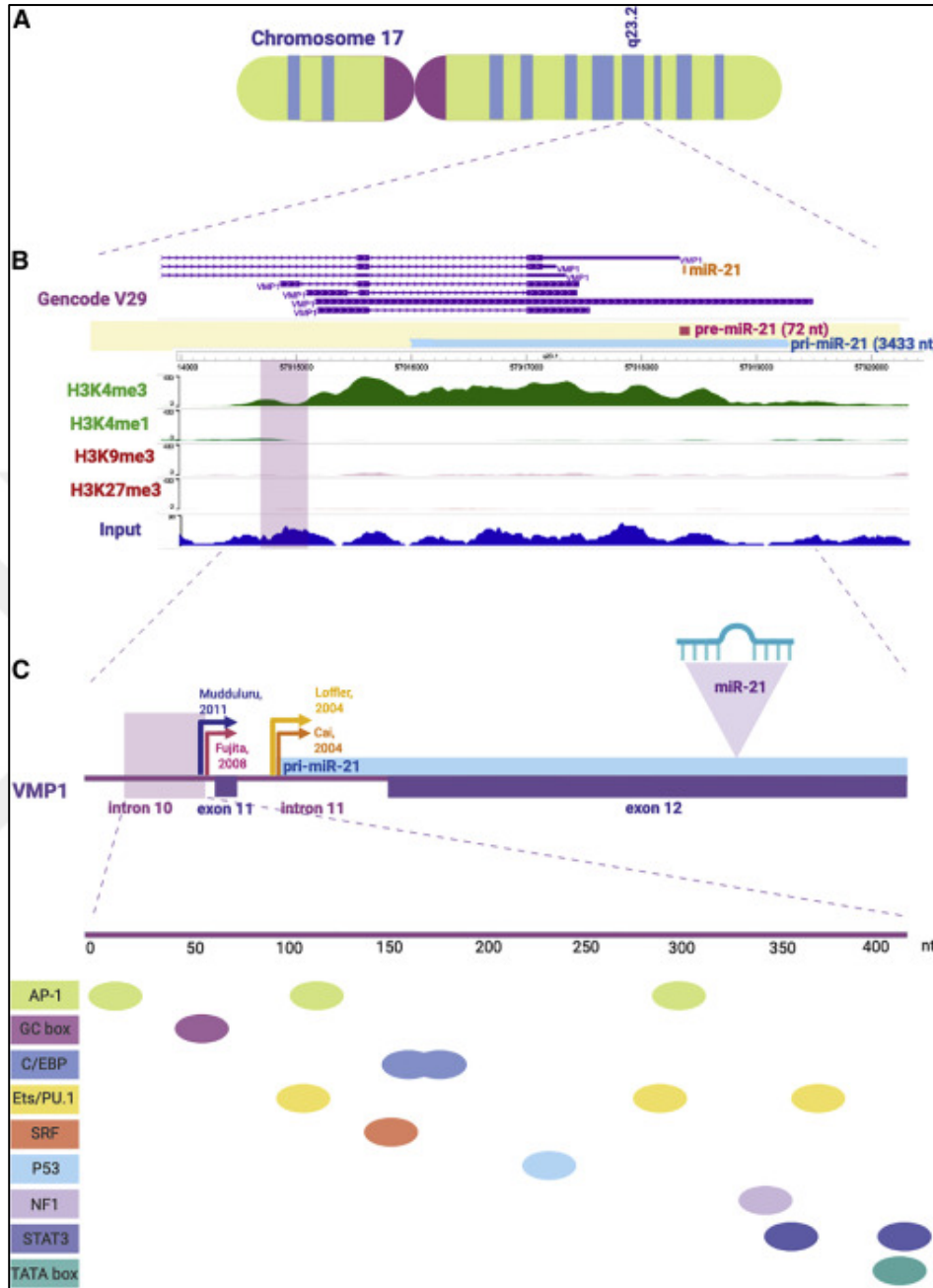
Şekil 12 mikroRNA işlemenin 'doğrusal' kanonik yolu [183].

miRNA'lar, kanser gelişiminde ve ilerlemesinde önemli rol oynar. Bazı miRNA'lar onkogeniktir ve tümör büyümesini ve metastazı teşvik ederken, diğerleri tümör baskılayıcıdır ve tümör büyümesini ve metastazı engeller [180], [181]. miRNA'lar, kanser tedavisinde yeni ve umut verici bir hedeftir. miRNA'ların potansiyel terapötik uygulamalarından miRNA analogları, kanser hücrelerinde eksik olan veya işlevsiz olan miRNA'ları taklit edebilir veya kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilen miRNA'ları bastırabilir [184], [185]. Antisense oligonükleotidler, kanser hücrelerinde miRNA'ların işlevini engellemek için kullanılabilir. miRNA'ların biyogenezi, işlevleri ve kanser

tedavisinde potansiyel kullanımları hakkında daha fazla bilgi edinmek, yeni ve daha etkili kanser tedavilerinin geliştirilmesine yol açabilir [180], [181], [184], [185], [186], [187].

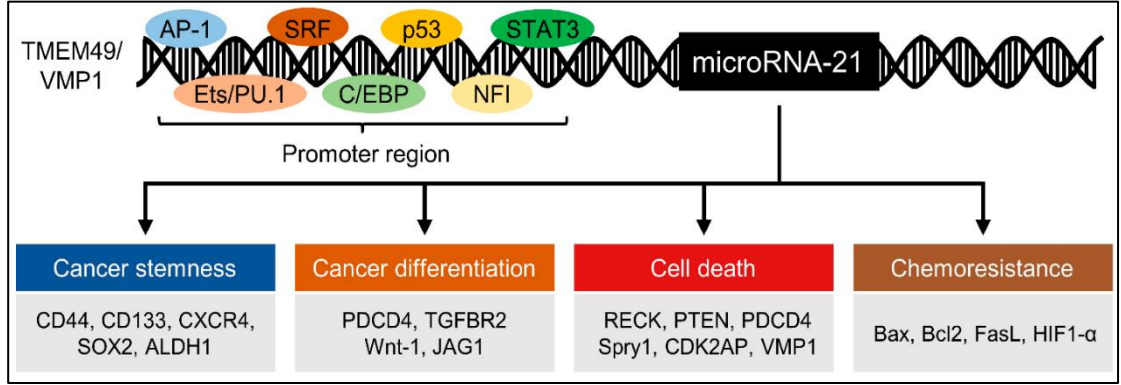
2.3.1 miRNA-21

miR-21, hem kanser hem de immün sisteminde kritik roller oynayan, en çok çalışılmış onkomiR'lerden biridir [188], [189], [190]. 17q23.2 kromozomunda bulunan 107 nükleotitlik bir mikroRNA'dır (Şekil 13). Transkripsiyondan sonra, Drosha ve Dicer enzimleri tarafından işlenir ve olgun mikroRNA'ya dönüştürülür [191], [192]. Olgun miR-21, Argonaute proteinleriyle birleşerek, komplementer mRNA dizileriyle hibritleşerek ve hedef genlerin translasyonunu baskılayarak işlev görür[180], [181], [184], [186], [188], [189], [190], [191], [192], [193], [194], [195].



Şekil 13 miR-21'in Genomik ve Epigenomik Görünümü A) miR-21'in genomik konumu: miR-21 , VMP1 proteininin TMEM49 gen öncüsünün 10. intronunda kromozom 17 (17q.23.1) üzerinde bulunur. B) miR-21'in epigenetik manzarası. H3K27me3 ve H3K9me3 gibi kromatin işaretleri miRNA promotöründe tamamen bulunmazken, aktif transkripsiyonla ilişkili H3K4me3 ve H3K4me1 işaretleri miR-21 promotöründe mevcuttur. C) Varsayılan miRNA promoter bölgesi, AP-1, Ets/PU.1, C/EBP, NFI, SRF, p53 ve STAT3 için çeşitli bağlanma bölgeleri içerir [191].

miR-21, PTEN, PDCD4 ve RECK gibi apoptotik proteinleri kodlayan genleri hedefleyerek kanser hücrelerinin hayatta kalmasına yardımcı olur ve apoptozu bastırır [180]. CDKN1A ve p53 gibi hücre döngüsünü düzenleyen genleri hedefleyerek tümör büyümesini ve çoğalmasını teşvik eder. TIMP3 ve Maspin gibi hücre hareketliliği ve adhezyonu ile ilişkili genleri hedefleyerek kanser hücrelerinin komşu dokulara ve uzak bölgelere göç etmesini kolaylaştırır. Bu durum, metastazın önünü açar. Tümör büyüdükçe, hayatta kalabilmek için daha fazla oksijen ve besin maddesine ihtiyaç duyar. miR-21, VEGF ve VEGFR2 gibi angiogenez faktörlerini kodlayan genleri hedefleyerek tümöre kan teminini arttırır [185], [186], [188]. miR-21, immün sisteminin işlevini çeşitli şekillerde etkileyebilir, PDCD4 ve IFN- γ gibi T hücrelerinin aktivasyonunu ve fonksiyonlarını bastıran genleri hedefleyerek T hücrelerinin bağışıklık tepkisini zayıflatır. PTEN ve SOCS1 gibi genleri hedefleyerek makrofajları pro-inflamatuar hale getirir ve tümör büyümesini ve metastazı teşvik eder. NF- κ B gibi genleri hedefleyerek dendritik hücrelerin fonksiyonunu bozar ve immün toleransı teşvik eder. miR-21, Treg hücrelerinin fonksiyonlarını artırarak ve immün sistemi baskılayıcı sinyalleri uyararak tümörün bağışıklık sisteminden kaçmasına yardımcı olabilir. İmmün yetmezliği teşvik ederek kanserin bağışıklık sisteminden kaçmasına yardımcı olabilir. miR-21, inflamatuvar sitokinlerin üretimini artırarak ve inflamatuvar sinyal yollarını aktive ederek tümör mikroçevresinde inflamasyonu teşvik eder. Bu durum, tümör büyümesini ve metastazı daha da ilerletebilir (Şekil 14)[180], [185], [186], [188], [189], [190], [191], [192].



Şekil 14 miR-21'in epigenetik düzenleyicileri ve kanser, farklılaşma, hücre ölümü ve kemorezistans açısından miR-21'in aşağı akış hedefleri. Her hücresel sürecin temsili düzenleyicileri listelenmiştir. TMEM49(transmembran proteini 49), VMP1(vakuol membran proteini 1), AP-1(aktivatör protein 1), Ets/PU.1(Ets ailesi transkripsiyon faktörü PU.1), SRF(serum yanıt faktörü), C/EBP(CCAAT/geliştirici bağlanma proteini) , NFI(nükleer faktör I), STAT3(sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3) [188].

miR-21, çeşitli kanser türlerinde aşırı eksprese edilir ve bu da tümör büyümesi, istilası ve metastazına katkıda bulunur. En sık görülen miR-21 yüksek ekspresyonuna sahip kanserler şunlardır; Akciğer kanserinde hücre proliferasyonunu, invazyonu ve metastazı teşvik eder ve kemoterapiye direnci artırır. Meme kanserinde tümör büyümesini, invazyonu ve metastazı teşvik eder ve ER-negatif meme kanserinde daha agresif bir prognozla ilişkilidir [196], [197], [198]. Kolorektal kanser hücrelerinde proliferasyonu, invazyonu ve metastazı teşvik eder ve kemoterapiye direnci artırır. Pankreas kanserinde tümör büyümesini, invazyonu ve metastazı teşvik eder ve prognozu kötüleştirir. Kan kanserlerinde (Lösemi) hücre proliferasyonunu ve hayatta kalmasını teşvik eder. Karaciğer kanserinde tümör büyümesini, invazyonu ve metastazı teşvik eder ve prognozu kötüleştirir. Ayrıca, karaciğer kanseri hücrelerinde kemoterapiye direnci de artırır [196], [197], [198], [199], [200], [201].

miR-21'in kanser tedavisinde ve teşhisinde potansiyel bir hedef olduğu düşünülmektedir. Kanser tedavisinde, miR-21'in inhibisyonu (engellenmesi) kanser hücrelerinin apoptozunu indükleyebilir, hücre çoğalmasını engelleyebilir ve metastazı azaltabilir. Bu nedenle, miR-21'i hedefleyen ilaçlar kanser tedavisinde umut vaat eden bir yaklaşım

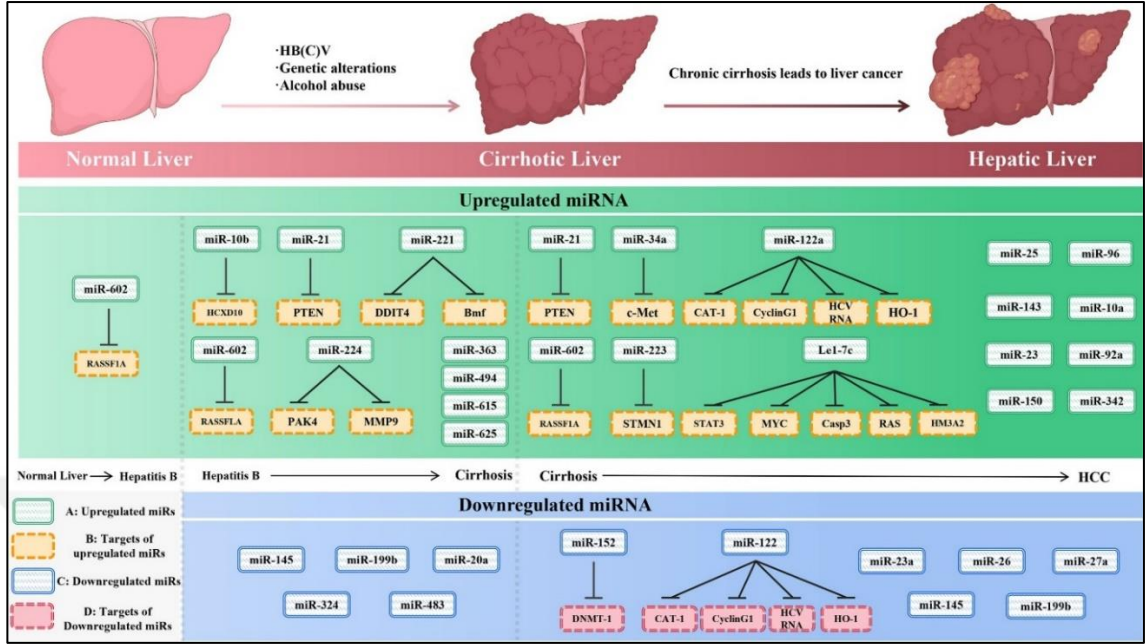
olarak araştırılmaktadır [202], [203], [204]. miR-21 antagonistleri kodlayan genler, kanser hücrelerine aktarılırsa, miR-21'in işlevini engelleyebilir ve tümör büyümesini baskılayabilir. miR-21 inhibisyon ajanlarını kanser hücrelerine hedefli bir şekilde iletmek için nanoteknoloji kullanılabilir [187], [196], [197], [198], [199]. Kanser teşhisinde, kanserli dokularda ve kanda miR-21 seviyeleri genellikle sağlıklı dokulardan daha yüksektir. Bu nedenle, miR-21 ölçümleri, kanseri erken evrelerde tespit etmek ve hastalığın seyrini izlemek için kullanılabilir. miR-21'e özgü moleküllerle işaretlenmiş görüntüleme ajanları kullanılarak kanser hücreleri ve tümörler görüntülenebilir [187], [196], [197], [198], [199], [200], [201], [202], [203], [204], [205], [206], [207], [208] .

2.3.1.1 Hepatoselüler karsinom (HCC) miRNA'ların Rolü

Hepatoselüler karsinom (HCC), dünya çapında kanser ölümlerinin önde gelen nedenlerinden biridir. Erken teşhis ve tedavi eksikliği nedeniyle prognoz hala zayıftır[209], [210], [211]. HCC'de miRNA'lar, tümör büyümesini, istilayı ve metastazı teşvik ederek veya bastırarak önemli rol oynayabilir. Onkogen miRNA'lar, tümör büyümesini ve ilerlemesini teşvik eden proteinlerin ekspresyonunu artırır. miR-21 ve miR-222 gibi onkogen miRNA'lar HCC'de sıklıkla yukarı regüle edilir. Tümör baskılayıcı miRNA'lar, tümör büyümesini ve ilerlemesini engelleyen proteinlerin ekspresyonunu azaltır. miR-26a ve miR-122 gibi tümör baskılayıcı miRNA'lar HCC'de sıklıkla aşağı regüle edilir [196], [197], [201], [202], [208], [212]. Anti-miRNA'lar, miR-21'in işlevini bloke ederek HCC hücrelerindeki onkogenik sinyalleri bastırmak için tasarlanmış sentetik oligonükleotitlerdir. miR-21'e karşı geliştirilmiş en çok araştırılan antimirRNA'lardan biri Miravirsen (SPC-3649). Faz II klinik bir çalışmada Miravirsen, sorafenib ile kombine olarak HCC'li hastalarda genel sağkalımı önemli ölçüde iyileştirir. miRNA analogları, tümör baskılayıcı miRNA'ların işlevini taklit ederek HCC hücrelerinde apoptozu teşvik edebilir ve tümör büyümesini engelleyebilir. miR-26a ve miR-122 gibi tümör baskılayıcı miRNA'ların analogları HCC tedavisinde potansiyel terapötik ajanlar olarak araştırılmaktadır. Nanoteknoloji tabanlı miRNA iletim sistemleri, miR-21 antagonistlerini veya miRNA analoglarını tümör hücrelerine özel olarak iletmek için kullanılabilir. Bu, sağlıklı dokulara maruziyeti ve yan etkileri sınırlayarak terapötik etkinliği artırabilir. Lipid nanopartiküller, polimerler ve eksozomlar gibi çeşitli nanoteknolojiler, miR-21'i

hedefleyen ajanları iletmek için araştırılmaktadır. CRISPR/Cas9 sistemi, DNA'yı hassas bir şekilde düzenlemek için kullanılabilen güçlü bir araçtır. Bu sistem, miR-21 genini doğrudan düzenlemek veya miR-21'in hedef genlerini etkilemek için kullanılabilir. HCC tedavisinde CRISPR/Cas9 tabanlı terapötik yaklaşımların ön klinik değerlendirmeleri umut verici sonuçlar vermiştir. miR-21'e dayalı terapötik yaklaşımlar, geleneksel kemoterapi ajanları, radyasyon tedavisi veya immünoterapi gibi diğer tedavi yöntemleriyle de kombine edilebilir. Bu kombinasyon terapileri, sinerjik etkiler sağlayarak tek başına ajanlara kıyasla daha yüksek etkinlik sağlayabilir[187], [213], [214].

miRNA'lar, HCC tanısında da kullanılabilir. HCC hastalarının kanında ve dokularında, sağlıklı bireylere kıyasla belirli miRNA'ların seviyelerinde değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Bu miRNA'lar, HCC'nin erken teşhisi ve izlenmesi için potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabilir. HCC'de potansiyel terapötik hedefler olarak kabul edilen bir dizi miRNA vardır. Bu miRNA'lardan bazıları; miR-21, HCC'de sıklıkla yukarı regüle edilen bir onkomiRNA'dır [212], [215], [216]. miR-21, PTEN ve PDCD4 gibi tümör baskılayıcı genleri hedefleyerek kanser hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını teşvik eder. miR-21'in inhibisyonu, HCC hücrelerinde hücre ölümünü indükleyebilir ve tümör büyümesini bastırabilir. miR-122, karaciğerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan bir karaciğer-spesifik miRNA'dır [217], [218], [219]. miR-122, HCC'de sıklıkla aşağı regüle edilir ve HCC hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını bastırabilir. miR-122'nin ektopik ekspresyonu, HCC hücrelerinde hücre ölümünü indükleyebilir ve tümör büyümesini bastırabilir. miR-223, hematopoyezde önemli rol oynayan bir miRNA'dır. miR-223, HCC'de sıklıkla yukarı regüle edilir ve kanser hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını teşvik eder. miR-223'ün inhibisyonu, HCC hücrelerinde hücre ölümünü indükleyebilir ve tümör büyümesini bastırabilir [212], [215], [216], [217], [218], [219], [220], [221].



Şekil 15 Hepatoselüler karsinomun başlangıcı ve gelişimi (solda) ve karaciğer kanseri gelişimi sırasında miRNA'ların ekspresyonu ve hedefleri (sağda). A) Yukarı regüle edilmiş miRNA'lar, B) Yukarı regüle edilmiş miRNA'ların hedefleri, C) Aşağı regüle edilmiş miRNA'lar ve D) Aşağı regüle edilmiş miRNA'ların hedefleri [222].

miRNA'lar, HCC teşhis ve tedavisinde umut verici yeni bir araç sınıfıdır. miRNA'lar hakkında daha fazla araştırma, HCC hastaları için daha etkili ve kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine yol açabilir [222], [223], [224].

3 MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1 MATERYAL

3.1.1 Kullanılan hücre ve özellikleri

HEPG2 (ATCC HB8065) hücresi TERT promoteri C228T'de bir mutasyon taşır. TERT promoterindeki mutasyon hem HCC (Hepatosellüler karsinom) hem de HB (Hepatoblastoma) 'da meydana gelir. Sitokrom P450 (CYP) süper ailesi olan CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2A6, CYP2D6 ekspresyonları zayıftır ve ya yoktur [225].

3.1.2 Kullanılan cihazlar

Kullanılan cihazlar Ek A'da verilmiştir.

3.1.3 Hücre kültürü donanımları

Hücre kültüründe kullanılan materyaller Ek B'de verilmiştir.

3.1.4 Kullanılan Kimyasallar

Çalışma süresince kullanılan kimyasallar Ek C'de verilmiştir.

3.1.5 Kullanılan Çözeltiler

Çalışma süresince kullanılan çözeltiler Ek D'de verilmiştir.

3.1.6 Kullanılan antikor,miRNA ve plazmidler

Çalışma süresince kullanılan antikor,miRNA ve plazmidler Ek E'de verilmiştir.

3.2 YÖNTEMLER

3.2.1 Hücre Kültürü

HEPG2 hücre hattının kültürü için, %10 FBS (fetal sığır serumu) ve %1 penisilin/streptomisin içeriğine sahip, 1x Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

hücre besiyeri hazırlanmış ve ana stok +4°C’de saklanmıştır. Karaciğer kanseri hücresi T75 hücre kültürü kaplarında DMEM besiyer ile %5 CO₂ içeren 37°C’li inkübatörde büyütülmüştür. HEPG2 hücresinin doubling time (iki katına çıkma süresi) 48 saattir. Hücreler, hücre kültür kabının yüzeyinde %70-80 yoğunluğa ulaştıklarından sonra, pasajlama (alt kültüre alma) işlemi veya yapılacak deney için ekim gerçekleştirilmiştir.

3.2.2 Stabil Hücre Hattı Eldesi

miR-21 plazmiti içeren *E.coli* DH5α bakterisinin çoğaltılması için ampicillin içeren LB agarda colony pick-up yapılmıştır. Seçilen koloni LB Broth da büyütüldü ve 35 µl’ye tamamlanmıştır. Bir gece çalkalıyıcıda 37°C’de büyütülen bakterilere plazmit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmiti HEPG2 kanser hücresine transfeksiyonunu gerçekleştirmek için lipofectamin 2000 protokolünü kullanılmıştır. 48 saatlik transfeksiyonun ardından hücrelere, seçim gerçekleştirmek için G-418 antibiyotigi uygulanmıştır ve 48 saat beklenilmiştir. Protein izolasyonunun ardından immunoblotlama yöntemi ile PTEN antibody ile muamele edildi miR-21+ hücrelerinin ifadesi incelenmiştir.

3.2.3 Hücrelerin Dondurulması

Hücre kültür kabının yüzeyine yapışmış olan hücreler tripsin-EDTA ile muamele ederek kaldırılmıştır. 1:1 oranda besiyeri eklenerek enzim aktivitesi inhibe edilmiştir ve 15ml’lik falkon tüplerine toplanan hücreler santrifüj cihazından 2000 rpm 5 dakika çöktürülmüştür. Süpernetant atıldıktan sonra pellet üzerine hücre dondurma medyası (Freezing Media 9:1 FBS-DMSO) eklenip pipetaj yapılmıştır. Homojen süspansiyon önceden etiketlemiş olduğumuz kriyo tüplere aktarılmıştır -80°C’de izopropanolde bekletilmiştir. Uzun süre saklamak için -196°C sıvı azot tankına kaldırılmış ve orda muhafaza edilmiştir.

3.2.4 Hücrelerin Açılması

İki tip hücre açılması yöntemi vardır; Santrifüjlü hücre açma yöntemi; -80°C kriyo tüpler içerisinde bulunan FBS-DMSO içeren besiyeri ile dondurulmuş olan hücre hattı hızlıca çözdürülerek önceden üzerine 1:1 oranda besiyeri eklenmiş 15ml’lik falkon tüplerine alınıp 2000 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem sırasında DMSO’ nun hücre canlılığına olan negatif etkisi azaltılmaya çalışılmıştır. Santrifüj işleminin ardından

süpernatant kısım uzaklaştırılmıştır ve taze besiyeri ile pellet çözölmüştür. Kullanılacak olan 25 cm²'lik petrilere 3 ml besiyeri veya 75 cm²'lik petrilere 5 ml besiyeri konularak taze besiyeri ile çözölmüş olan hücrelerin ekimi gerçekleştirilmiştir. Santrifüjsüz hücre açma yöntemi; ilk olarak direkt petrilere besiyeri eklenmiştir ve kriyo tüpün içerisinde bulunan FBS-DMSO içeren besiyeri ile muamele edilmiş hücreler direkt olarak besiyeri olan petrilere eklenmiştir. Petriler %5 CO₂ içeren 37°C'li inkübatöre konulmuştur. Birkaç saat sonra hücreler kontrol edilmiştir ve yapışan hücreler gözlemlenildiğinde besiyeri değiştirilmiştir.

3.2.5 Plazmid İzolasyonu

Ana stok plazmitini büyüttüğümüz LB Broth içerisindeki miR-21 plazmitini, 50'lik falkon içerisine 35 ml 50mg/μl ampicillin basılmış LB Broth'un içine 300-500μl ana stoktan ekim gerçekleştirildi ve overnight 37°C de shakerda bekletildi. Ertesi gün OD ölçümü yapıldı ve 0.2 aralığında olanların plazmit izolasyonu ZymoPURE™ Plazmid Miniprep Kit (Catalog Nos. D4209, D4209, D4210, D4211& D4212) protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

3.2.6 miRNA Transfeksiyonu

Plazmit izolasyonu sonucunda elde edilen miR-21 plazmitinin konsantrasyonu ölçüldü kuyu başı 1000ng olarak hesaplandıktan sonra Canfast™ Transfection Reagent protokolüne göre transfeksiyon gerçekleştirildi.

3.2.7 miRNA izolasyonu ve cDNA Dönüştürölmesi

HEPG2 ve miR-21+ olan hücrelerdeki miR-21 seviyelerinin incelenmesi için miRNA izolasyonu miRNeasy Micro Kit (Qiagen kat: 217004) protokolüne göre gerçekleştirildi. İzole edilen miRNA konsantrasyonları Implen nanodrop ile ölçüldü. cDNA dönüşümü için miScript II RT Kit (Qiagen kat: 218161) protokolüne göre deney gerçekleştirildi. cDNA dönüşümünün ardından Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu CFX Connect (BioRad) Real-Time PCR Detection System cihazı kullanıldı. miRNA primeri miR-21 ve endojen kontrol RNU6 primeri ile miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen, Kat No: 218073) kullanıldı. Cihazda 94°C'de 15 sn denatürasyon, 55°C'de 30 sn bağlanma, 70°C'de 30 sn uzama basamaklarını takiben 40 siklus ayarlandı. Veri analizi, her örneğe

ait miRNA'ların ΔCT değerleri ile internal kontrol RNU6'ya göre normalize edildi ve en az 2 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.2.8 Total RNA İzolasyonu ve cDNA Dönüşümü

HEPG2 ve miR-21+ olan hücrelerdeki total RNA'nın izolasyonu PureZOL RNA izolasyonun protokolüne göre gerçekleştirildi. 60mm'lik petri kabına ekilmiş hücrelerde ilaç uygulanmasının 24 saat ardından besiyeri uzaklaştırılır. 10 cm² petriye 1 ml PureZOL eklenir ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 1,5'luk ependorfa geirildilen lizat için her 1 ml PureZOL için 0.2 ml Kloroform eklenir ve 15 sn alt-st edilir oda sıcaklığında 5dk inkübe edilir. 12000xg de +4°C'de 15dk santrifüj yapılır. Santrifüj sonrası oluşan 3 fazdan, üstteki şeffaf sıvıda RNA bulunuyor. RNA yeni RNAz içermeyen temiz tüpe alınır. Her 1 ml PureZOL için 0.5 ml izopropanol eklenir ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilir. 12000xg de +4°C'de 10 dk santrifüj yapılır, supernatant atılır. Pellet zerine her 1 ml PureZOL için 1 ml %75 etanol eklenir ve alt-st yapılır. 7500xg'de +4°C'de 5dk santrifüjlenir. Süpernatant uzaklaştırılır ve pellet kurutulur. Pelletin miktarına bağlı olarak uygun hacimde DEPC'li (Diethylpropiyonat) su ile 55-60 C 10dakika inkübe edilir. Elde edilen RNA'yı -80 C'de saklanır.

İzole ettiğimiz RNA'nın spektrofotometre ile ölçümü gerçekleştirildi. RNA'yı cDNA'ya çevirmek için BIORAD iScript™ cDNA Sentez kiti protokolüne göre total hacim 20l olarak hesaplandı ve deney gerçekleştirildi. Thermal siklus cihazında PCR'ın döngüsü için 25°C'de 5 dakika priming, 46°C'de 20 dakika ters transkripsiyon, 90°C'de 1 dakika RT inaktivasyonu ayarlanır deney sonucunda elde edilen cDNA'yı -20°C'de saklanır.

3.2.9 Hücre Canlılığının Belirlenmesi (MTT Testi)

Transfeksiyonu gerçekleştirilmiş HEPG2 miR-21+ hücrelerde ve HEPG2 hücrelerinin %90 oranında konfluent olduktan sonra pasajlama işlemi gerçekleştirildi ve hücreler hemistometre ile sayıldı. Sayılan hücreler kuyu başı 10.000 hücre 100l olacak şekilde hesaplama yapıldı ve 96 kuyucuklu platelere ekimleri gerçekleştirildi. Ekildikten 24 saat sonrasında kuyu başı (1-100nM) ilaç dozları denemesi için ilaçlama gerçekleştirildi. İlalamadan 24 saat sonra kuyu başı 10l MTT Reagent basıldı ve 4 saat inkübatörde bekletildi. 4 saat sonunda her kuyudaki media çekildi ve oluşan formazan kristallerinin

üzerine DMSO 100µl basıldı. 5 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildikten 570nm ve 655 dalga boylarında Spektrofotometrik ölçümü gerçekleştirildi.

3.2.10 Hücrelerin Koloni Oluşturma Potansiyellerinin İncelenmesi

%90 oranında yoğunluğa ulaşan HEPG2 ve miR-21+ HEPG2 hücrelerini pasajladıktan sonra hemistometre ile sayıldı. Koloni oluşumu deneyi için 6 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 2×10^3 hücre olacak şekilde ekildi. Ekimden 24 saat sonra 60nM oleandrin uygulandı. Oleandrin uygulanmasından 24 saat sonra hücreler üzerindeki besiyeri, taze besiyeri ile değiştirildi. Hücrenin duplikasyon zamanına bağlı olarak kontrol grubu hücreleri kontrol edildi ve %90 yoğunluğa ulaştığında fiksasyon aşaması gerçekleştirildi. Hücre grupları 3:1 oranında metanol/asetik kullanılarak fikse edildi ve ardından 30 dk oda sıcaklığında %5 kristal viyole kullanılarak boyandı.

3.2.11 Floresan Boyamalar

%90 oranında yoğunluğa ulaşan hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Pasajlama işlemi yaptıktan sonra hücrelerin hemistometre ile sayımı yapıldı ve 12 kuyucuklu platelere kuyu başı 20.000 hücre olacak şekilde hesaplaması yapıldı ve ekimleri gerçekleştirildi. 24 saat sonra ilaçlı kondüsyonların ilacı uygulandı kontrol gruplarına taze besiyeri uygulandı. İlaç uygulanmasından 24 saat sonra DIOC6 (3) (3,3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide) floresan boyası 10-20nM dozunda uygulanıp 15-20 dk inkübe edildikten sonra Floresan ataçmanlı invert mikroskop (IX71-Olympus) mikroskobunda mavi filtrede (484/501 nm) görüntülendi. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) boyası, 3uM dozunda uygulanıp 30 dk inkübe edildikten sonra Floresan ataçmanlı invert mikroskop (IX71-Olympus) mikroskobunda menekşe filtresinde (405 nm) görüntülendi. PI (Propidium İyodür) boyası 5ug/mL dozunda uygulanıp 30 dk inkübe edildikten sonra Floresan ataçmanlı invert mikroskop (IX71-Olympus) mikroskobunda yeşil filtresinde (535/617 nm) görüntülendi. MitoTracker boyası 250nM dozunda uygulandı 30dk inkübe edildikten sonra Floresan ataçmanlı invert mikroskop (IX71-Olympus) mikroskobunda yeşil filtresinde (575/595 nm) görüntülendi.

3.2.12 Protein İzolasyonu

HEPG2 ve miR-21+ HEPG2 hücreleri 100mm'lik petrilere 2×10^6 hücre olacak şekilde ekimleri gerçekleştirildi ve %80 yoğunluğa ulaştıktan sonra 60nM oleandrin uygulandı. İnkübasyondan 24 saat sonra Kontrol hücrelerin medyası atıldı ve ilaçlı besiyeri toplandı. Petri kapları 1 ml 1x PBS ile petri yıkanır. Daha sonra petrilere soğuk 3 ml 1x PBS (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi) eklendi ve kazıma yapıldı. Kazınan hücreler 1,5'luk ependorfa toplandı, 13.200 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve üst faz atıldı. Bu işlem kazınan hücreler bitene kadar tekrar edilir. Pellet miktarına göre 1X Proteaz inhibitör kokteyli (Thermo fisher) içeren Hücre Lizis Çözeltisi (M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo Fisher) eklenir. CLB eklendikten sonra pipetaj işlemi uygulayarak pellet çözdürülür. Ependorf 15-20 dakika boyunca çalkalayıcıda çalkalanır. Çalkalama sonrasında 15-20 dakika boyunca 13.200 rpm'de santrifüj yapılır. Süpernatant, alikvatlanan temiz ependorfa alınır ve -80°C 'de muhafaza edilir.

3.2.13 Bradford Protein Miktar Tayini

İzolasyonu yapılan proteinlerin miktar tayinini yapmak amacıyla Bradford tekniği uygulanır. Bradford tekniğinde konsantrasyonu $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ olan sığır serum albumini (BSA) kullanılır ve ilk olarak excel'de standart eğri oluşturulur. Standart eğriyi oluşturmak için: $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $4,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $7,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA'nın üzerine Bradford solüsyonu (Coomassie Brilliant Blue G-250) eklenir ve elde edilen proteinlerden $1 \mu\text{l}$ alınarak Microplate Reader cihazında 595 nm dalga boyunda absorbansları ölçülür. Standartların absorbans/konsantrasyon grafiği oluşturulduktan sonra, bu grafiğin eğim eşitliği kullanılarak absorbans değerleri bilinen protein örneklerinin konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.14 İmmunoblotlama Yöntemi

Hücrelerdeki PI3K/Akt/mTOR, NF- κ B ve apoptoz sinyal yolağındaki protein seviyelerinin incelenmesi için, HEPG2 ve miR-21+ HEPG2 hücrelerinden izole edilen protein konsantrasyonları bradford yöntemi ile tespit edildi. İncelencek proteinin kDa'una göre değişiklik gösteren %10-12'lik poliakrilamid jel hazırlandı. Jelde ayrılan proteinler PVDF membrana transferi gerçekleştirildi ve %5'lik yağsız süt çözeltisinde oda

sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Yağsız süt çözeltisinde bloklanan membran, primer antikor (PTEN, NF- κ B, IKKa, p- IKKa, IKK β , p- IKK β , β -Actin, Caspase 3,9,8, PARP vb.) ile +4°C’de gece boyu muamele edildikten sonra 1xTBS-Tween (TBS-T) ile yıkanacak ve sekonder antikor ile (anti-tavşan, anti-fare) +4°C’de gece boyu inkübe edilecektir. İnkübasyon sonrası membran 1xTBS ve 1xTBS-T ile yıkanacak, ECL solüsyonları ile inkübe edilecek ve kemilünesans ışımlar ChemiDoc Görüntüleme Sistemi (BioRad) ile görüntülenmiştir.

3.2.15 Yarı Yumuşak Agar Yöntemi

HEPG2 ve miR-21+ HEPG2 hücrelerinin 3B ortamda koloni oluşumunu gözlemlemek için yumuşak agar yöntemi kullanıldı. Deney 6 kuyucuklu plate de gerçekleştirilecek. 1xPBS ile hazırlanan %0.3’lük ve %0.5’lük agar (Agarose, Type1, Molecular Biology Grade, Calbicohem), mikrodalgada ısıtılarak çözdürüldü ve kullanıldı. 6 kuyucuklu plate’de alt tabakanın oluşturulması için 1:1 oranında 2xDMEM (%20 FBS, %1 penisilin/streptomisin) ile karıştırılan %0.3’lük agar, her kuyucuğa 1ml olacak şekilde paylaştırıldı ve 30 dakika boyunca inkübasyon için oda sıcaklığında bekletildi. %80-90 oranında büyümüş olan HEPG2 ve miR-21+ HEPG2 hücreleri tripsin ile kaldırıldı ve hücreler sayıldı. Her kuyuda 5000 hücre ve 60 nM Oleandrin olacak şekilde hesaplandı. 2xDMEM ile karıştırılan hücre ve ilaçlı süspansiyon elde edilir. Her deney grubuna ait hücre süspansiyonları 1:1 oranında %0.5’lük agar ile karıştırılarak donan alt agarın üzerine eklenir ve inkübatöre bırakılır. Ertesi gün 2xDMEM hücre besiyeri (500 μ l) eklenir ve gözlemlenir gerektiğinde besiyeri temizliği ve eklenmesi gerçekleştirilir. Yaklaşık olarak üç haftanın sonunda deney gruplarının oluşturduğu üç boyutlu hücreler ışık mikroskobu altında beş gün boyunca görüntülenir. Üçüncü haftanın sonunda hücre canlılığını gözlemlemek için DiOC₆ ile boyanarak floresan mikroskobu ile görüntülenmiştir.

3.2.16 Hanging Drop (Asılı Damla) deneyi

HEPG2 ve miR-21+ HEPG2 hücreleri pasajlandıktan sonra hemistometre ile sayım gerçekleştirecek ve 30 μ l damlada 5000 hücre olacak şekilde hesaplama yapılacak, ilaçlı kondüsyonlar için ilaç hesaplaması yapılacaktır. 60’lık petrinin kapağının iç kısmına damlalar aralıklı bırakıldı 1xPBS konulmuş petriye ters çevrilerek kapak kapatıldı ve 37°C

de %5 CO₂ inkübatörlerde bırakıldı. 24, 48 ve 72 saatlerde damlaların çap boyutlarının çekimleri gerçekleştirildi. Sonuçlarının graphpad ile analizi gerçekleştirildi.

3.2.17 PI (Propidium iyodür) Hücre Akış Sitometrisi Deneyi

Propidium iyodür, hücreleri ve nükleik asitleri boyamak için kullanılabilen bir floresan interkalasyon ajanıdır. PI, bazlar arasında çok az veya hiç dizi tercihi olmadan araya girerek DNA'ya bağlanır, bu sayede nükleus boyutuna göre hücrenin hangi fazda olduğunun belirlenmesi sağlanır. HEPG2 ve miR-21+ HEPG2 hücrelerinde 3×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakelere ekim yapılacaktır, 24 saat sonrasında 60nM Oleandrin uygulanıp beklenilecektir. 24 saat sonra tripsinle kaldırılıp 500xg'de santrifüj yapılacaktır. Elde edilen hücreler %70 soğuk Etanol ile 2 gün boyunca +4°C'de fiksasyon edileceklerdir. Fiksasyon işlemi sonrası 1x PBS ile yıkanan hücreler, 4 mM propidium iodide (PI) ve 20 µM RNaz ile 30 dk oda sıcaklığında inkübe edileceklerdir. PI boyanan hücreler hücre akış sitometrisinde (FL2 filtresi kullanılarak) her bir deney grubu 1×10^4 hücre şeklinde okutulacak ve normalize edilecektir. Elde edilecek SubG1 oranı apoptotik hücre sayısını belirtecektir. Oleandrin ile muamele edilen ve edilmeyen kontrol hücre hatlarının apoptoz, akış sitometrisi (BD Accuri™ C6, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, ABD) ile analizi gerçekleştirilecektir.

3.2.18 Annexin V/PI Hücre Akış Sitometrisi Deneyi

HEPG2 ve miR-21+ HEPG2 hücrelerin 3×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakelere ekim yapılacaktır, 24 saat sonrasında 60nM Oleandrin uygulanıp beklenilecektir. 24 saat sonra 1x PBS ile yıkandıktan sonra tripsin ile kaldırılır ve hücreler 500xg'de 5 dakika santrifüj yapılır. Pellet üzerinden ki PBS uzaklaştırıldıktan sonra 1xPBS ile tekrar santrifüjlenecektir. PBS uzaklaştırıldıktan sonra eBioscience™ Annexin V Apoptosis Detection Kits (#BMS500FI-100, Invitrogen™) belirtilen protokole göre uygulama yapılacaktır. Uygulama sonrası akış sitometrisi (BD Accuri™ C6, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, ABD) ile analizi gerçekleştirilecektir.

3.2.19 Hücre Sağkalım Deneyi

HEPG2 ve miR-21+ HEPG2 hücrelerini her bir kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde 12 kuyucuklu petrilere ekildi. İlaç uygulamalarını takiben 24, 48, 72 ve 96. saatlerde hücreler

iki tekrarlı şekilde sayımı gerçekleştirildi. Pasajlama işlemi gerçekleştirmek için kaldırılan hücrelerin üzerine 1xPBS eklenerek homojen solüsyon elde edilir. Santrifüjlenen hücrelere 50 µl 0.4 % (w/v) Tripan Mavisi eklenir ve bu karışımdan 10 µl çekilerek Neubauer hemositometresi ile sayıldı.

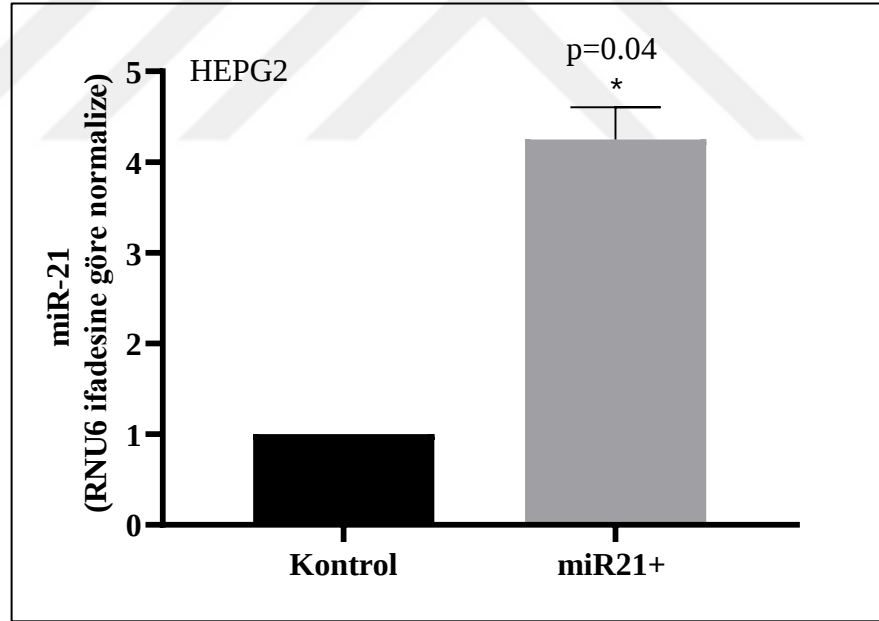
3.2.20 İstatiksel Analiz

Deneylerin istatistiksel analizlerinin yapılabilmesi için sonuçlardaki veriler GraphPad Prism 8 programı aracılığı ile çoklu veri analizi ANOVA ile değerlendirildi. Tüm test sonuçları ilgili şekillerin altında istatistiksel anlamlılık sınırları, p value değerleri şekil alt yazısında belirtilmiştir.

4 SONUÇLAR

4.1 miR-21 Transfeksiyonu Yapılan HEPG2 Hücrelerinde miR-21 İfadesinin İncelenmesi

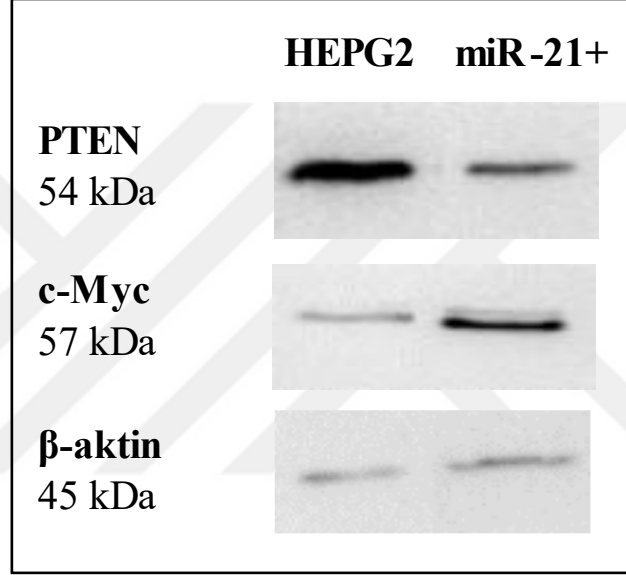
HEPG2 hücrelerine, LB broth’da büyütülen miR-21 plazmiti metodlarda geçen plazmit izolasyonu yöntemi ile izole edilmiştir. İzole edilen plazmitin konsantrasyonu ölçüldü ve metodlarda anlatıldığı şekilde transfeksiyonu gerçekleştirildi, transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerden miR-21+ olarak bahsedilecektir. Transfeksiyon sonrasında hücrelerin miR-21 ifadesini incelemek için qRT-PCR yapıldı. qRT-PCR sonucunda HEPG2’ye oranla miR-21+ olan hücrelerde miR-21 ifadelerinde 4 kat artış gözlemlenmiştir (Şekil 16).



Şekil 16 HEPG2 hücrelerine miR-21 plazmiti transfeksiyonu sonrası miR-21+ hücrelerindeki miR-21 ifadesinin genomik incelenmesi. HEPG2 hücrelerine miR-21 plazmitinin transfeksiyonundan 48 saat sonra G-418 uygulandı ve 48 saatin ardından miRNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen miRNA cDNA’ya dönüştürüldü ve qRT-PCR gerçekleştirildi. Normalizasyon RNU6’ya göre gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar GraphPad Prism ile analiz edildi. (*p=0.04)

4.2 miR-21 Transfeksiyon Başarısının miR-21 İfadesi ve Hedef Proteinleri Açısından İncelenmesi

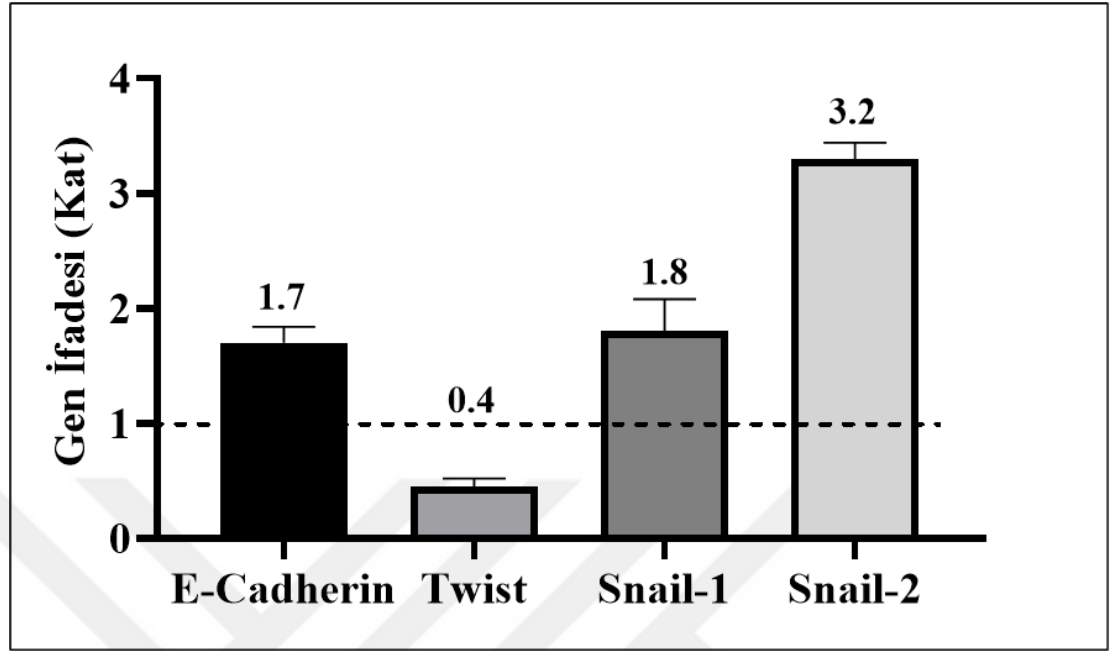
HEPG2 ve miR-21+ hücrelerde proteomik ifadesini incelemek için immunoblotlama deneyi gerçekleştirildi. Deney sonucunda miR-21+ hücrelerinde HEPG2 hücrelerine kıyasla PTEN proteininin ifadesinde azalma gözlenmiştir. Ancak tam tersi şekilde c-Myc protein ifadesinde artma gözlemlenmiştir (Şekil 17).



Şekil 17 HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde miR-21 plazmitinin PTEN ve c-Myc ifadelerine etkisi. miR-21 transfeksiyonu yapılan hücrelerin total protein izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon sonrasında 30 µg protein %12'lik SDS-PAGE jelde yürütüldü. PTEN ve c-Myc ifadeleri immunoblotlama ile incelendi.

4.3 miR-21 İfadesi Arttırıldığında Epitelyal Mezenkimal Geçiş Elemanlarının İfadesinin İncelenmesi

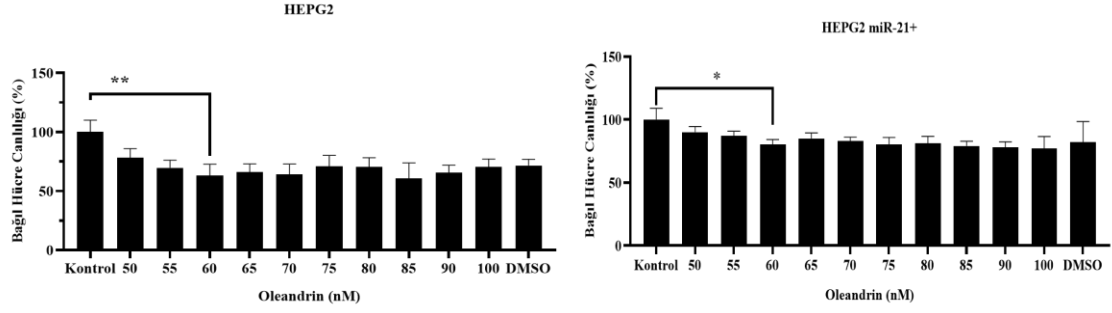
HEPG2 ve miR-21+ hücrelerde genomik ifadesinde EMT elemanlarından Snail-1/2, Twist ve E-Cadherin ifadelerindeki değişimi incelemek için qRT-PCR deneyi gerçekleştirildi. Deney sonucunda miR-21+ hücrelerinde HEPG2 hücrelerine oranla E-Cadherin 1.7 kat, Snail-1 1.8 kat, Snail-2 3.2 kat arttığı, Twist'in 0.4 kata kadar azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 18).



Şekil 18 HEPG2 hücrelerine miR-21 plazmiti transfeksiyonu sonrası miR-21+ hücrelerindeki miR-21 ifadesinin genomik incelenmesi. HEPG2 hücrelerine miR-21 plazmitinin transfeksiyonundan 48 saat sonra G-418 uygulandı ve 48 saatin ardından miRNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen miRNA cDNA'ya dönüştürüldü ve qRT-PCR gerçekleştirildi. EMT elemanlarından E-Cadherin, Twist, Snail 1 ve Snail-2 ifadeleri incelendir. GraphPad Prism ile sonuçlar grafik haline getirildi.

4.4 Oleandrin HEPG2 ve miR-21+ Hücre Canlılığını Azalmıştır

miR-21 ifadesi arttırılan HEPG2 hücrelerinde (miR-21+ hücreler) ve HEPG2 hücrelerinde uygun ilaç dozunu belirlemek için hücre sağkalım deneyi gerçekleştirildi. Oleandrin HEPG2 ve miR-21+ hücrelerine 50-100nM doz aralığında 24 saat muamele edildi ve metodlarda bahsedildiği şekilde deney gerçekleştirildi. Deney sonucunda elde edilen verilere göre toksik etkiyi önlemek için %50 canlılık oranından az öldüren, HEPG2 hücresine %63, miR-21+ hücrelerde %80 olan 60nM dozu seçildi ve o doz ile deneylere devam edildi (Şekil 19).

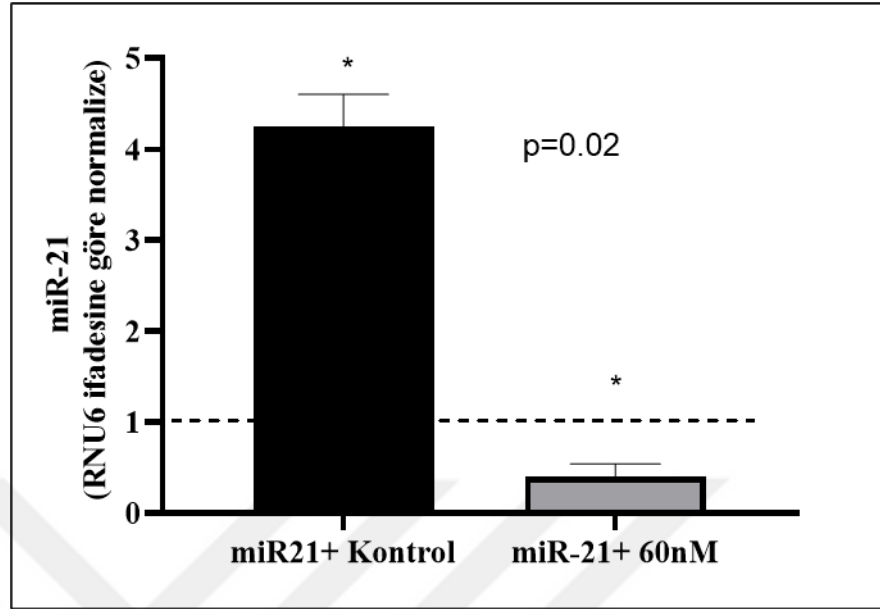


Şekil 19 HEPG2 ve HEPG2 miR-21+ hücrelerinde Oleandrin'in (50-100nM) hücre canlılığına etkisinin doza bağlı olarak değişiminin incelenmesi. Hücreler 24 saat boyunca ilaç dozları ile inkübe edildikten sonra 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5- difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi ile analiz edildi. Yapılan deney grupları 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır. GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.

(*p=0.0102, **p= 0.0072)

4.5 Oleandrin miR-21 İfadesini Baskılamıştır

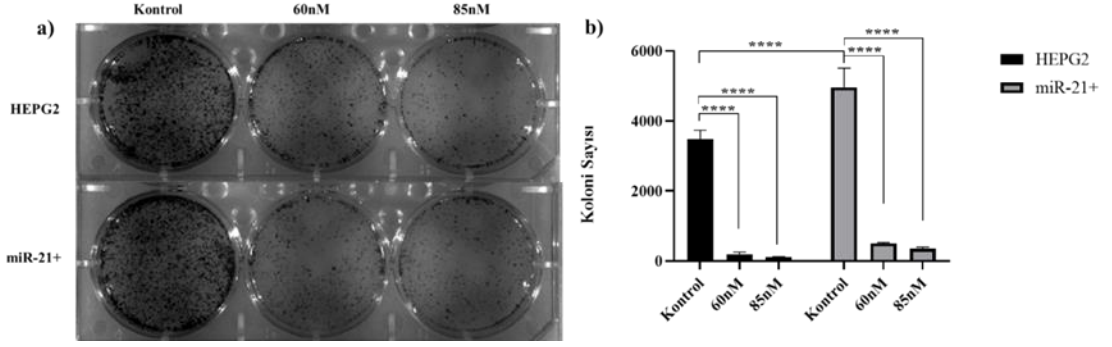
Önceki deneylerde miR-21 transfeksiyonu kanıtlanan miR-21+ hücrelerinde oleandrin'in uygulanmasının miR-21'in ifadesinin değişikliğinin gözlenmesi için qRT-PCR deneyi metadlarda ifade edildiği şekilde gerçekleştirildi. Deney sonucunda miR-21 primerinin, miR-21+ hücrelerinde HEPG2 hücrelerine oranla 4 kat ifadesi artmıştır. Oleandrin uygulanmış hücre hattında 0.3 kata kadar ifadesi azalmıştır (Şekil 20).



Şekil 20 HEPG2 hücrelerine miR-21 plazmiti transfeksiyonu sonrası miR-21+ hücrelerindeki oleandrin uygulanan hücrelerde miR-21 ifadesinin incelenmesi. miR-21+ hücrelerine 24 saat 60 nM Oleandrin uygulanmasının ardından miRNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen miRNA cDNA'ya dönüştürüldü ve qRT-PCR gerçekleştirildi. Normalizasyon RNU6'ya göre gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu. (*p=0.02)

4.6 Oleandrin HEPG2 ve miR-21+ Hücrelerinin Koloni Oluşum Potansiyelini Baskılamıştır

HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde 60nM ve 85nM Oleandrin'in uygulanmasının ardından hücrelerde koloni oluşturma testi metodlarda bahsedildiği şekilde gerçekleştirildi. HEPG2 hücrelerin kontrol gruplarında 3483, 60nM olan 199, 85nM olan 113, miR-21+ hücrelerin kontrol gruplarında 4962, miR-21+ 60nM hücrelerin 503, 85nM hücrelerin 353 koloni gözlemlenmiştir. HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde Oleandrin'in zamana bağlı olarak koloni oluşumunu anlamlı ölçüde baskıladığı gösterilmiştir (Şekil 21).

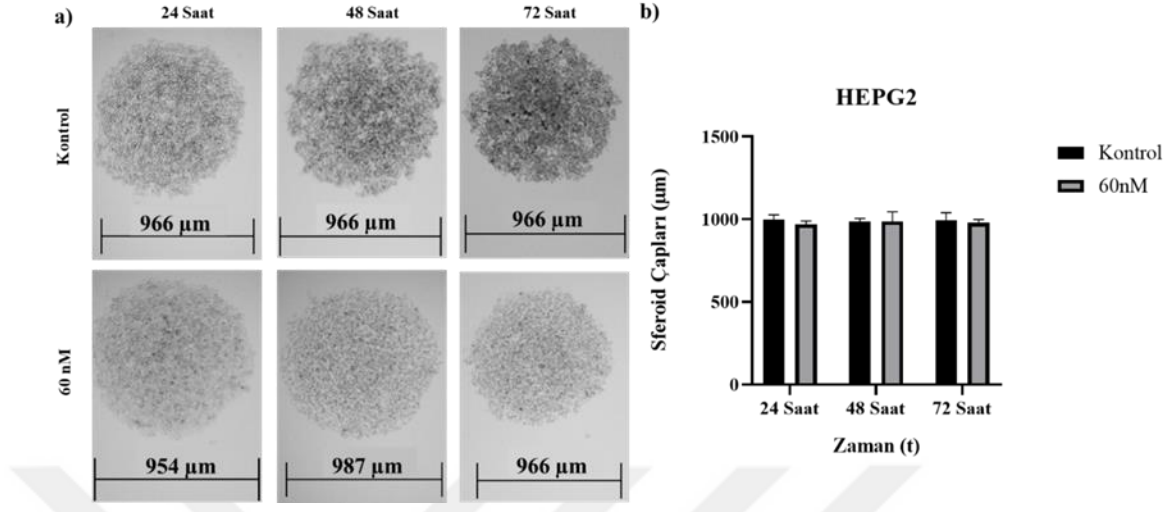


Şekil 21 HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde Oleandrin'in (60- 85nM) koloni oluşum potansiyeline etkisinin incelenmesi. Hücreler 24 saat boyunca ilaç dozları ile inkübe edildikten sonra koloni deneyi gerçekleştirildi. Koloniler kristal viyole ile boyandı. A) Koloni oluşum deneyinin görüntüsü. B) Sayılan koloni sayılarının analizini grafik ile gösterimi. Yapılan deney grupları 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır. Elde edilen sonuçlar GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu (****p<0.0001).

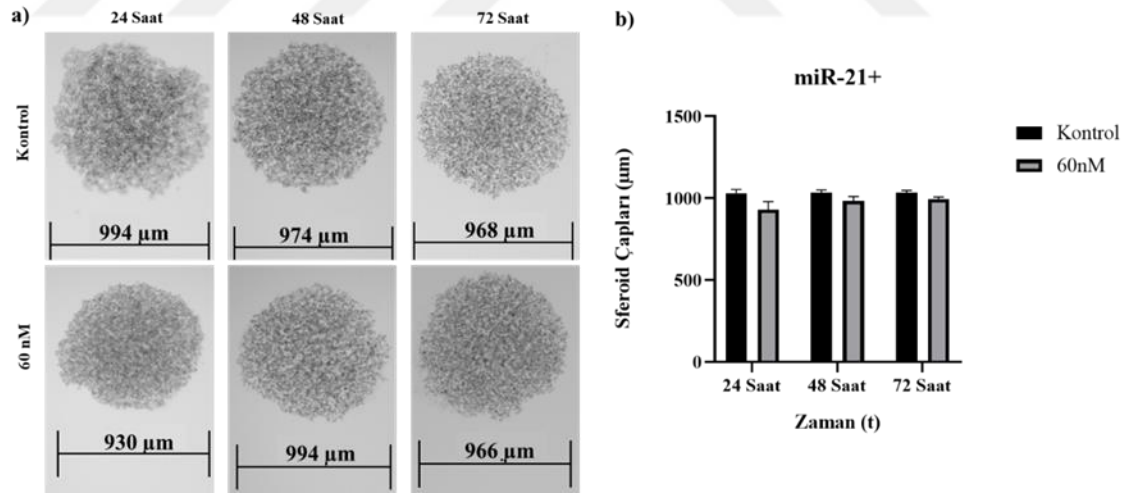
4.7 Asılı Damla Deneyi İle HEPG2 ve miR-21+ Hücrelerinde 60nM Oleandrin'in Üç Boyutlu Hücre Formlarının Oluşmasına Etkisinin Gösterilmesi

Bu tez kapsamında üç boyutlu kültür oluşturmak için kullanılan yöntemlerden birisi asılı damla deneyidir. Asılı damla deneyinde hücre süspansiyonu ile damla oluşturuluyor ve bu damlada bulunan hücrelerin, hücreler arası etkileşimle oluşturacakları sferoid formu gözlemleniyor.

HEPG2 ve miR-21+ hücrelerine uygulanan Oleandrin'in sferoid oluşumuna etkisine baktığımızda 24. 48. ve 72.saatlerde sferoid çapları ölçüldü. Çaplar kıyaslandığında anlamlı farklılık gözlenememiştir (Şekil 22). miR-21+ hücrelerinde kontrol ve ilaçlı grupları kıyasladığımızda 24.saatle 72.saat arasında sferoid çaplarının azaldığı gözlenilmektedir (Şekil 23).



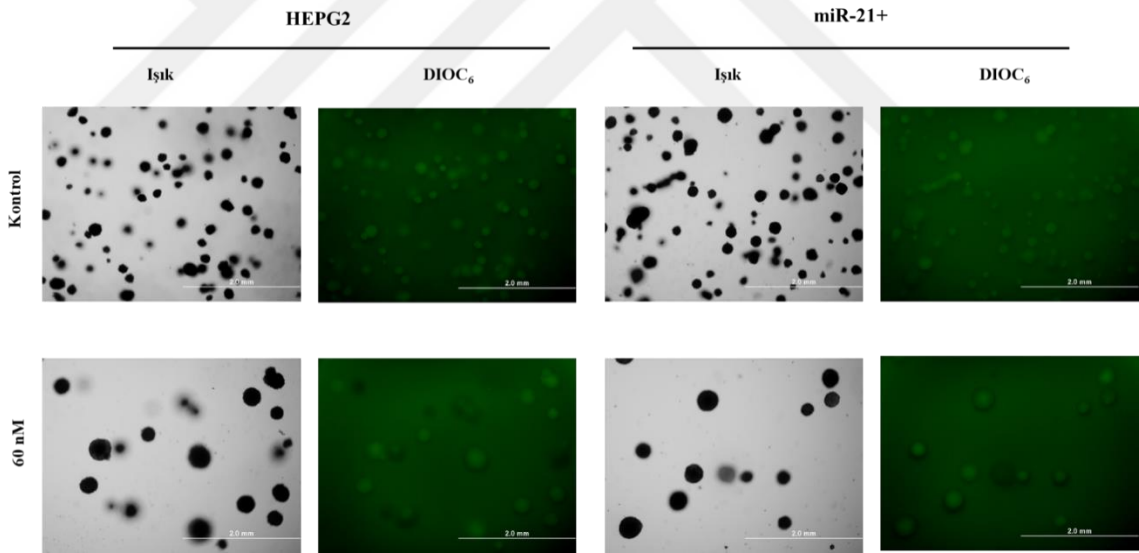
Şekil 22 Asılı damla yöntemi ile HEPG2 hücresinde Oleandrin uygulanmasının üç boyutlu hücre formu oluşumuna etkisinin incelenmesi. A) HEPG2 hücrelerinde ilaçlı ve kontrol gruplarının 24. 48. ve 72.saatte ışık mikroskobunda sferoid çaplarının ölçülmesi. B) HEPG2 hücrelerinde gerçekleştirilen asılı damla deneyinin sonuçlarının GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.



Şekil 23 Asılı damla yöntemi ile miR-21+ hücresinde Oleandrin uygulanmasının üç boyutlu hücre formu oluşumuna etkisinin incelenmesi. A) miR-21+ hücrelerinde ilaçlı ve kontrol gruplarının 24. 48. ve 72.saatte ışık mikroskobunda sferoid çaplarının ölçülmesi. B) miR-21+ hücrelerinde gerçekleştirilen asılı damla deneyinin sonuçlarının GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.

4.8 Yumuşak Agar Deneyi İle HEPG2 ve miR-21+ Hücrelerinde Oleandrin'in Üç Boyutlu Hücre Formlarının Oluşmasına Etkisinin Gösterilmesi

Çalışmamızda miR-21 ifadesi arttırılan HEPG2 hücrelerinde hücreSEL yüzeyden bağımsız olarak oluşturdukları üç boyutlu ortamı inceleyebilmek için yumuşak agar yöntemi gerçekleştirildi. 4 hafta uygulanan deneyin ardından hücrelerin oluşturduğu üç boyutlu koloni formları zamana ve doza bağlı olarak değişiklik gözlenmiştir. HEPG2 kontrol grubuna oranla miR-21+ hücrelerin kontrol gruplarında koloni formunda artış gözlenmiştir. İlaçlı gruplara baktığımızda kontrol gruplarına kıyasla anlamlı ölçüde koloni oluşumunu baskıladığı ve koloni çaplarında gözle görülür artış gözlemlenmiştir. DIOC₆ Floresans mikroskop boyası ile boyanan koloni formları incelendiğinde kontrol gruplarına oranla ilaçlı dozlarda canlı hücre sayısının azaldığı gösterilmiştir (Şekil 24).

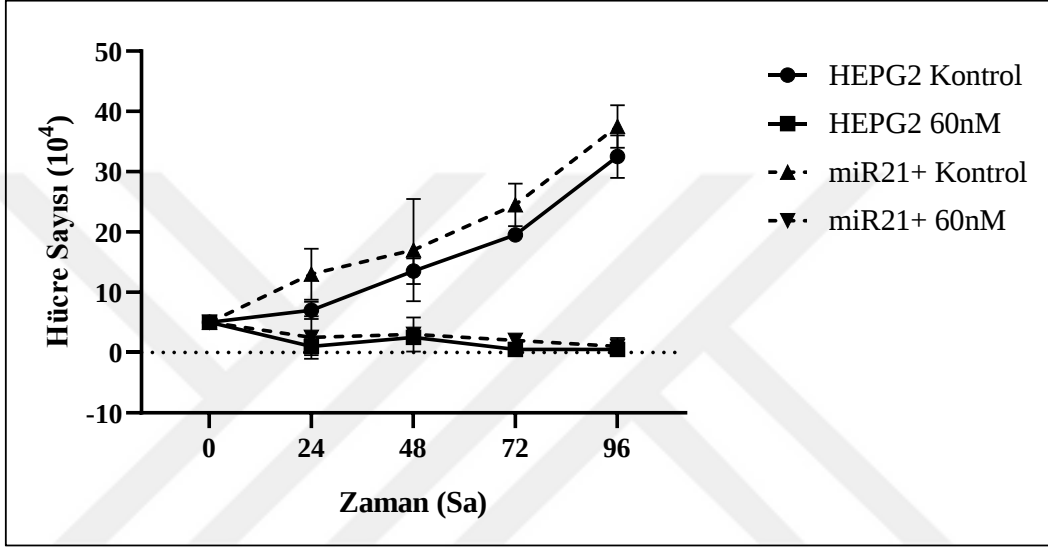


Şekil 24 Koloni oluşumuna etkisinin yumuşak agar deneyi ile incelenmesi. Deney 4 hafta sonunda Işık mikroskobu ile çekim alınmıştır.

4.9 Oleandrin'in HEPG2 ve miR-21+ Hücrelerinde Hücre Çoğalmasına Etkisinin İncelenmesi

Belirlenen dozlardan 60 nM ile deneylere devam edilmiştir ve Oleandrin'in hücre proliferasyonunu gözlemleyebilmek için Tripan mavisi ile deney metodlarda bahsedildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Oleandrin zamana bağlı olarak hücre sayısını azaltmıştır,

24.saatte oleandrin sitotoksik bir etki göstererek HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde hücre canlılığını MTT dataları ile uyumlu şekilde azaltmıştır. 48. 72. ve 96.saat aralığında Oleandrin'in bu etkisini kontrol gruplarına göre devam ettirdiği gözlenmiştir. Oleandrin hücre çoğalmasını baskılamıştır (Şekil 25).



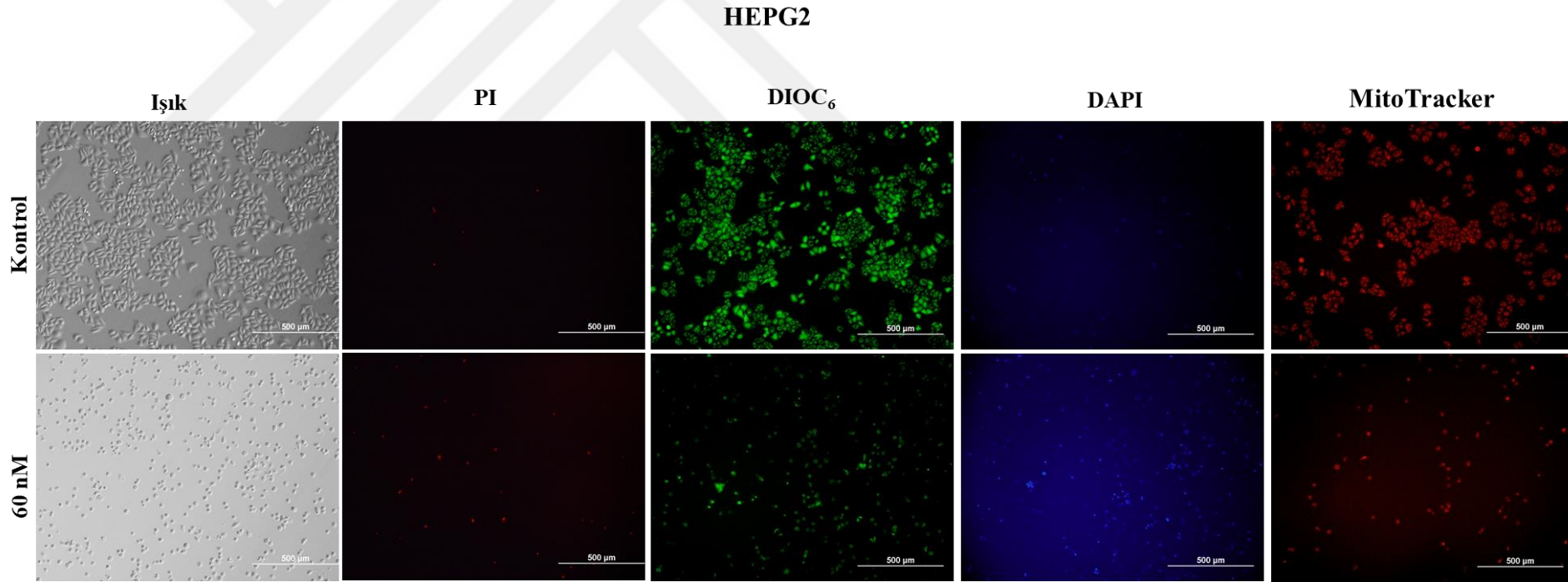
Şekil 25 HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde Oleandrin 60nM uygulanmasının hücre proliferasyonu üzerine etkisinin incelenmesi. Hücreler 24 saat boyunca ilaç dozu ile inkübe edildikten sonra tripan mavisi deneyi gerçekleştirildi. Yapılan deney grupları 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır. Elde edilen sonuçlar GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.

4.10 HEPG2 ve miR-21+ Hücrelerinde Oleandrin'in Hücre Sağkalımının ve Apoptoza Bağlı Hücre Ölümünün Floresans Boyama İle Gösterilmesi

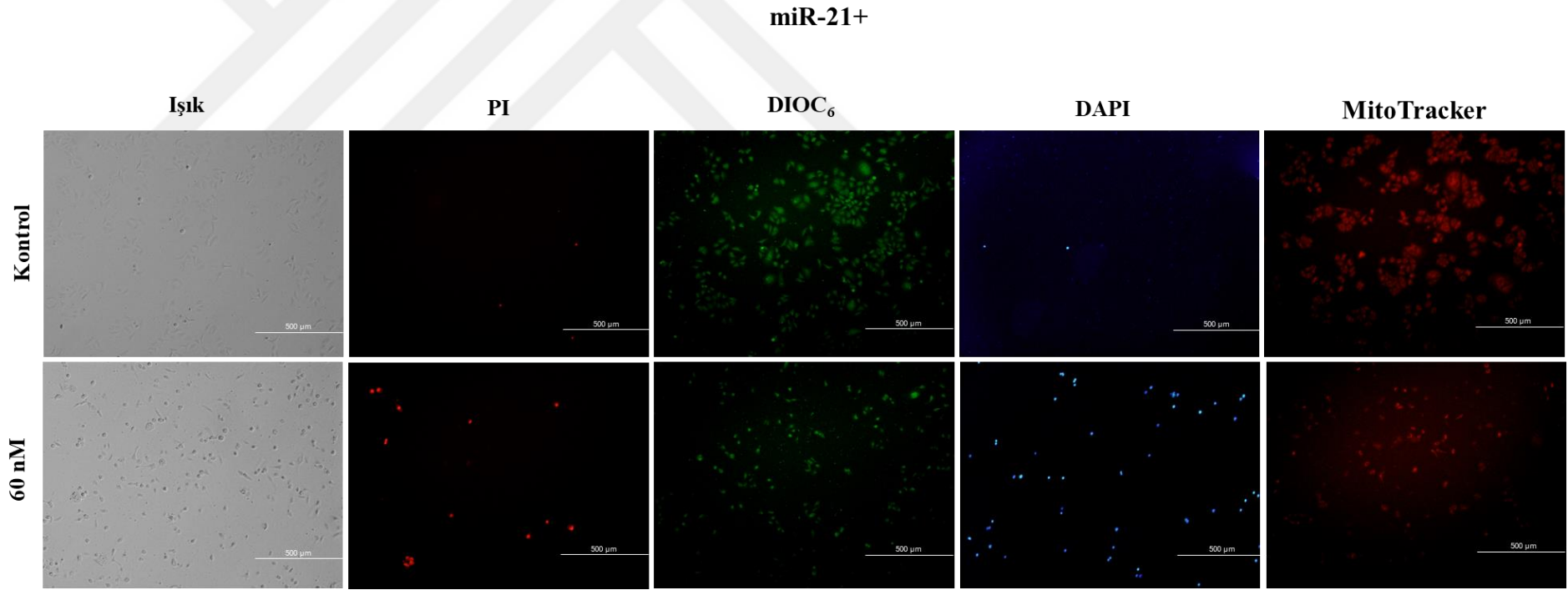
HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde Oleandrin'in uygulanmasından sonra hücre sağkalım ve ölümünü incelemek için floresan boyama gerçekleştirildi. DIOC₆ boyası pozitif yüklü bir boyadır, mitokondri negatif yüklüdür ve bu şekilde ışığa geçirir. Mitokondri membran potansiyeli (MMP) bozulmuşsa, hücreler apoptoza gidiyorsa DIOC₆ boyası hücreler boyanamaz ve bu şekilde ışığa vermemektedir. PI boyası, hücre permabilitesi bozulmuş hücrelerde, hücre ölümünü belirlemek için kullanılmaktadır. DAPI boyası DNA'ya bağlanır ve nükleusu görünür hale getirerek apoptotik süreçte oluşan DNA kırıklarının gözlenmesini sağlamaktadır. MitoTracker boyası canlı hücrelerde mitokondriyi boyamak için kullanılmaktadır.

HEPG2 ışık mikroskobu görüntülerinde kontrol gruplarında sağlıklı hücreler gözlemlenirken 60nM Oleandrin grubunda hücre canlılığında azalmaya sebep olmuştur aynı zamanda hücre morfolojilerinde değişikliğe yol açarak hücre morfolojileri yuvarlak bir hal almıştır. PI boyamasında görülen kırmızı noktalar kontrol grubunda yokken ilaçlı grupta vardır ve sayıca artmıştır. HEPG2 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyel kaybına bağlı olarak hücre ölümü varsa DIOC₆ boyamada azalma gözlemlenir. HEPG2 ilaçlı grupta, kontrol grubuna kıyasla mitokondriyal membran potansiyeline bağlı olarak hücre canlılığında azalma gözlemlemekteyiz. DAPI boyaması nükleus boyamalarını gösterir mor ışımalar DNA kırıklarını ifade etmektedir. Oleandrin HEPG2 hücrelerinde DNA kırıklarına sebep olmuştur. MitoTracker boyası DIOC₆ gibi mitokondrileri boyamaktadır. DIOC₆ görüntülerini doğrular niteliktedir (Şekil 26).

miR-21+ hücrelerinde ışık mikroskobu görüntülerinde kontrol gruplarında sağlıklı hücreler gözlemlenirken 60nM Oleandrin grubunda hücre canlılığında azalmaya sebep olmuştur aynı zamanda hücre morfolojilerinde değişikliğe yol açarak hücre morfolojileri yuvarlak bir hal almıştır. PI boyamasında görülen kırmızı noktalar kontrol grubunda yoktur ancak ilaçlı grupta vardır ve sayıca artmıştır. miR-21+ hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyel kaybına bağlı olarak hücre ölümü varsa DIOC₆ boyamada azalma gözlemlenir. miR-21+ ilaçlı grupta, kontrol grubuna kıyasla mitokondriyal membran potansiyeline bağlı olarak hücre canlılığında azalma gözlemlemekteyiz. DAPI boyaması nükleus boyamalarını gösterir mor ışımalar DNA kırıklarını ifade etmektedir. Oleandrin miR-21+ hücrelerinde HEPG2 hücrelerine kıyasla daha fazla DNA kırıklarına sebep olmuştur. MitoTracker boyası DIOC₆ gibi mitokondrileri boyamaktadır. DIOC₆ görüntülerini doğrular niteliktedir (Şekil 27).



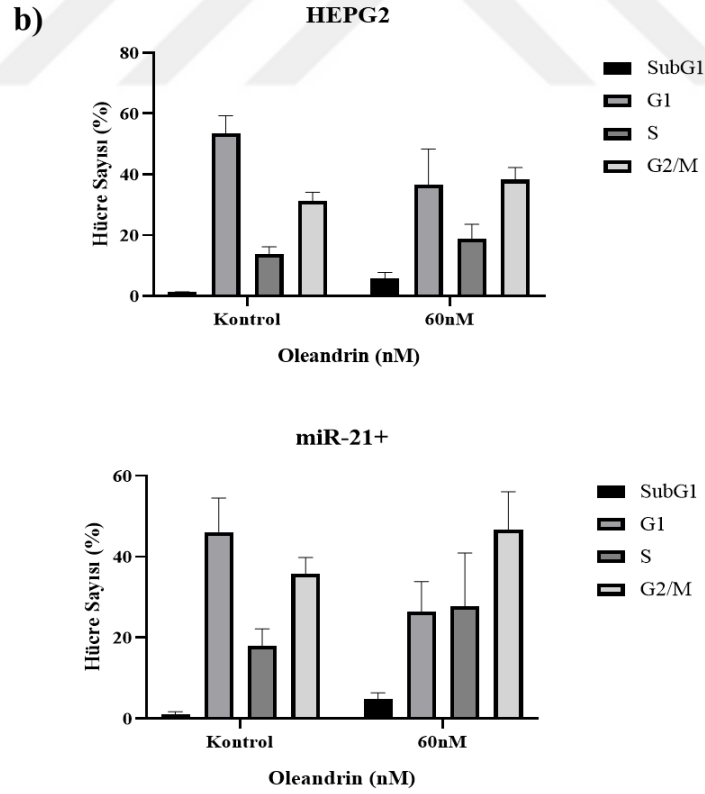
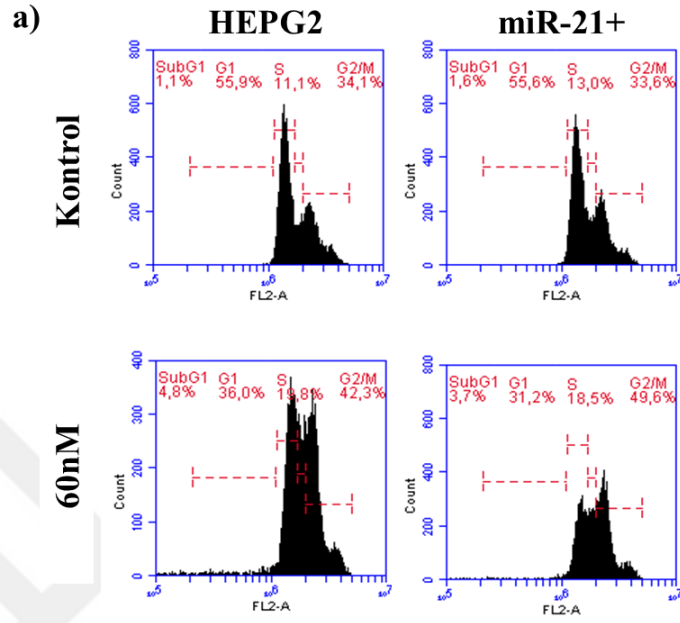
Şekil 26 HEPG2 hücre hattında Oleandrin'in hücre sağkalımı, hücre ölümünün ve mitokondriyal membran potansiyelinin floresan boya ile mikroskop altında incelenmesi.



Şekil 27 miR-21+ hücre hattında Oleandrin'in hücre sağkalımı, hücre ölümünün ve mitokondriyal membran potansiyelinin floresan boya ile mikroskop altında incelenmesi.

4.11 HEPG2 ve miR-21+ Hücrelerinde Oleandrin'in Hücre Döngüsü Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Oleandrin'in HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinin hücre döngüsünde tutulmasına etkisinin incelenmesi için hücre akış sitometrisi yapıldı. Hücreler 60nM Oleandrin uygulanmasının 24 saat sonrasında %70'lik etanol ile fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. 1 hafta sonra PI boyaması yapıldı ve hücre akış sitometrisinde ölçüm gerçekleştirildi. Deney sonucunda elde ettiğimiz verilere göre HEPG2 kontrol grubunda SubG1 %1.1, G1 %55,9, S %11.1 ve G2/M %34.1 iken ilaçlı grupta bu oranlar SubG1 %4.8, G1 %36, S %19.8 ve G2/M %42.3 olmuştur. miR-21+ hücrelerini incelediğimizde kontrol grubunda SubG1 %1.6, G1 %55,6, S %13 ve G2/M %33.6 iken ilaçlı grupta SubG1 %3.7, G1 %31.2, S %18.5 ve G2/M %49,6 olmuştur. Kontroller ile ilaçlıları kıyasladığımızda ilaçlı gruplarda kontrole oranla G2/M fazının arttığını Oleandrin'in bu fazda ket vurduğu görülmektedir (Şekil 28).



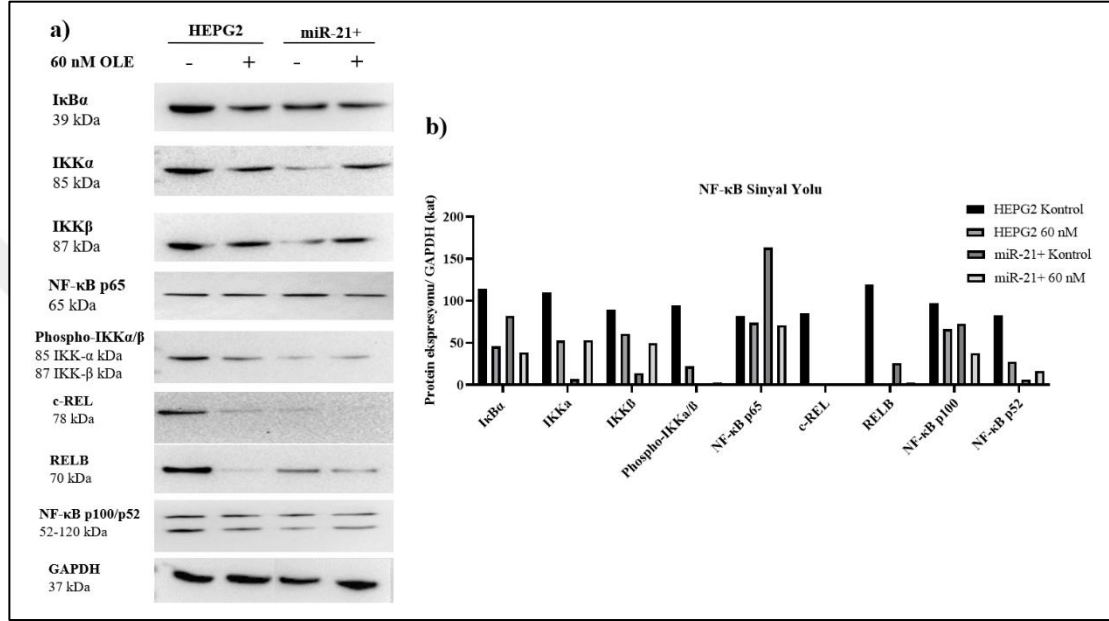
Şekil 28 Oleandrin'in HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde 24 saat uygulanmasının hücre siklusu üzerine etkisinin incelenmesi. Elde edilen sonuçların GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.

4.12 HEPG2 ve miR-21+ Hücrelerinde Oleandrin'in NF-κB Sinyal Yolağına Ait Proteinlerin Ekspresyon Seviyelerine Etkisinin İncelenmesi

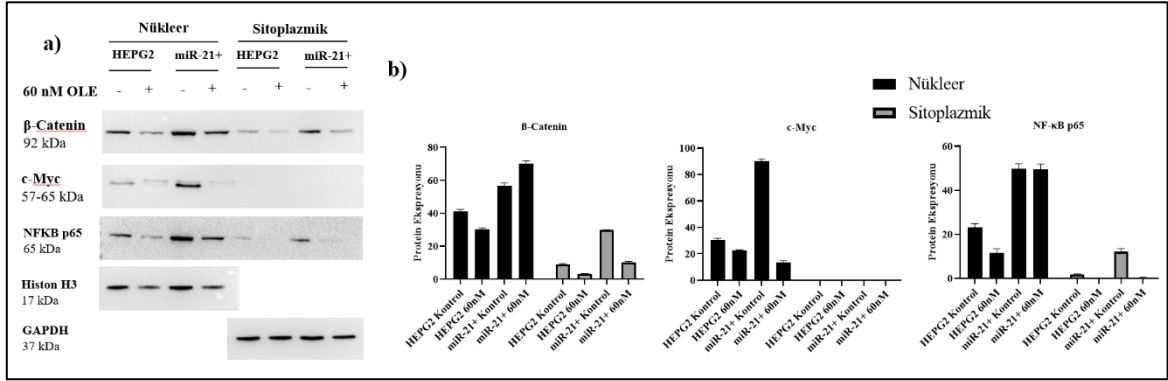
Çalışmamızda inflamasyonun gelişimi ve ilerlemesinde rol oynayan NF-κB sinyal yolunda Oleandrin'in proteomik değişikliğini gözlemlemek için immunoblotlama deneyi gerçekleştirdik. Bu deney basamağında hem nükleer hem de sitoplazmik proteinler de incelendi. IκBα seviyesi HEPG2 hücrelerinde miR-21+ hücrelerine kıyasla artmıştır ancak oleandrin uygulamasıyla ifadesi azalmıştır. IKKα, IKKβ ve Phospho-IKKα/β ifadesi HEPG2 hücrelerinde miR-21+ hücrelerine oranla artmıştır ancak ilaçlı gruplara bakıldığında HEPG2 de kontrole oranla azalırken, miR-21+ hücrelerin kontrolüne oranla ilaçlı grupta ifadesi artmaktadır. NF-κB p65 seviyesi HEPG2 hücre kontrol grubuna oranla miR-21+ hücrelerinin kontrol grubunda biraz artış görülmektedir, ilaçlı gruplarda da ifadesi seviyesinde az oranda azalış görülmektedir. c-REL ifadesi HEPG2 hücresinde gözlenmektedir diğer gruplarda çok ifadesi görülememektedir. RELB HEPG2 hücresinin kontrol grubunda en yüksek ifadeye sahiptir, ilaçlı grupta kontrole oranla ifadesi azalmıştır. miR-21+ hücrelerin kontrol grubu HEPG2 nin kontrol grubuna göre ifadesi azalmıştır. İlaçlı miR-21+ grup kontrolüne oranla ifadesi azalmıştır. NF-κB p100/p52 ifadesi miR-21+ hücrelerde HEPG2 kontrol grubuna oranla ifadesi azalmıştır (Şekil 29).

β-Catenin nükleer ve sitoplazmik lokasyonlarındaki ifadesini anlamak için izolasyon gerçekleştirilmiştir ve immunoblotlama yöntemi ile incelenmiştir. HEPG2 hücrelerine kıyasla miR-21+ hücrelerinde β-Catenin seviyesi nükleusta artmıştır. Oleandrin HEPG2 ve miR-21+ hücrelerindeki nükleustaki β-Catenin seviyelerini kayda değer ölçüde azaltmıştır. β-Catenin seviyesinin sitoplazmik lokasyonda nükleusa göre daha az ifade edildiği bu deneyde ispatlanmıştır. Ancak miR-21+ hücrelerinde HEPG2 kontrol hücrelerine göre β-Catenin seviyesinin sitoplazmada yüksek ifade edildiği gözlemlenmiştir. Oleandrin sitoplazmadaki β-Catenin seviyesini de azaltmıştır. c-Myc ifade seviyesini nükleer ve sitoplazmikte incelendiğinde, nükleusta miR-21+ kontrol hücrelerinin HEPG2 kontrole göre ifadesi artmıştır. Oleandrin uygulamasında kontrol gruplarına göre c-Myc ifadesini baskılamıştır. c-Myc ifadesi incelendiğinde sitoplazmada ifade edilmediği görülmektedir. NF-κB p65 nükleer seviyedeki ifadesi miR-21+ kontrol gruplarında HEPG2 kontrol grubuna göre ifadesi artmıştır. Oleandrin nükleer seviyedeki NF-κB p65 protein ifadesini kontrol gruplarına kıyasla azaltmıştır. NF-κB p65

sitoplazmik düzeyde ifadesi nükleer seviyedeki ifadesine göre azalmıştır ve miR-21+ kontrol hücre hattında HEPG2 kontrol grubuna göre ifadesi artmıştır, ilaçlı gruplarda ifadesi kontrol gruplarına göre azalmıştır. Nükleer kontrol için Histon H3, sitoplazmik kontrol için GAPDH kullanılmıştır (Şekil 30).



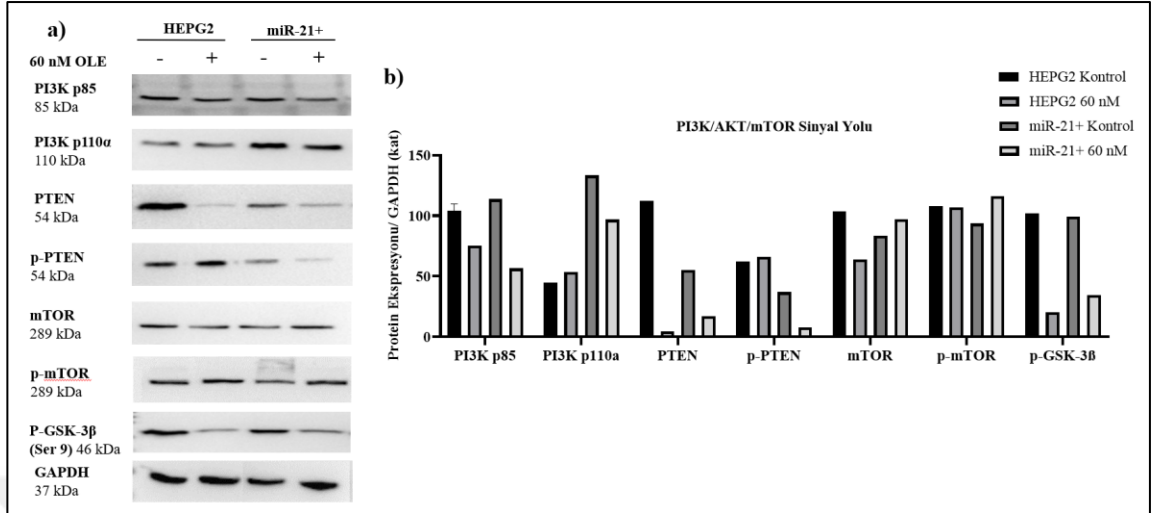
Şekil 29 HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde Oleandrin'in NF-κB sinyal yolağına etkisinin immunoblotlama yöntemi ile incelenmesi. Total protein izolasyonunun ardından 30µg hazırlanan protein örnekleri %12'lik SDS-PAGE jel sisteminde yürütüldü. İncelenen antikorlarla problandı. Yükleme kontrolü için GAPDH kullanıldı. Elde edilen sonuçların GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.



Şekil 30 HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde Oleandrin'in Nükleer ve Sitoplazmik protein ifadelerinin incelenmesi için immunoblotlama yöntemi gerçekleştirildi. Protein izolasyonunun ardından 30µg hazırlanan protein örnekleri %12'lik SDS-PAGE jel sisteminde yürütüldü. İncelenen antikorlarla problandı. Nükleer ve Sitoplazmik kontrol için Histon H3 ve GAPDH kullanıldı. Elde edilen sonuçların GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.

4.13 HEPG2 ve miR-21+ Hücrelerinde Oleandrin'in PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağına Ait Proteinlerin Ekspresyon Seviyelerinin İncelenmesi

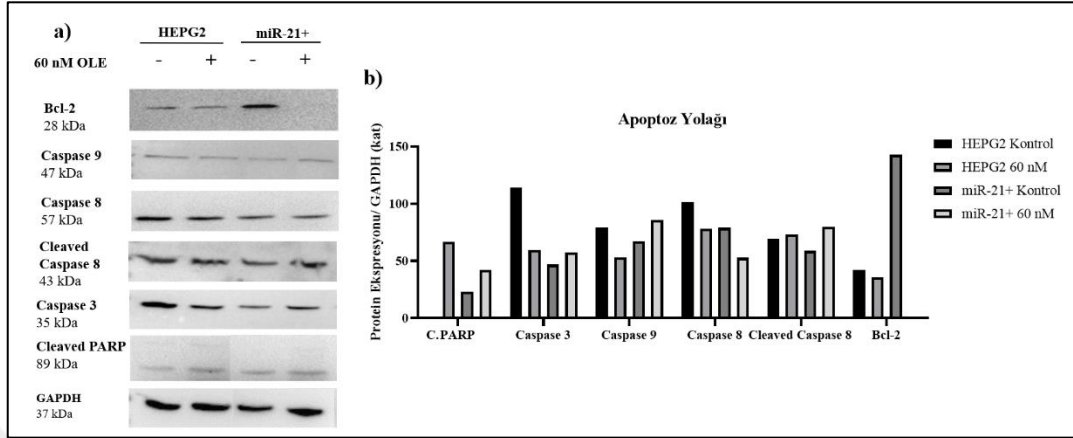
Çalışmamızda hücre büyümesi, çoğalması ve hayata kalması için kritik öneme sahip olan PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunda Oleandrin'in proteomik değişikliğini gözlemlemek için immunoblotlama deneyi gerçekleştirdik. PI3K p85 ifade seviyeleri incelendiğinde HEPG2 kontrol grubuna kıyasla miR-21+ kontrol grubunun ifadesinin azaldığı görülmektedir ek olarak ilaçlı gruplarda kontrollere oranda ifadesi anlamlı ölçüde azalmıştır. PI3K p110α protein seviyeleri miR-21+ hücrelerinin kontrol grubunda HEPG2'nin kontrol grubuna oranla ifadesi artmıştır, ilaçlı gruplarda kontrole kıyasla azalmıştır. PTEN, p-PTEN ve p-GSK-3β ifadesi HEPG2 kontrol grubunda miR-21+ kontrole oranla artmıştır. İlaçlı gruplarda kontrole oranla azalmıştır. mTOR ve p-mTOR protein seviyeleri HEPG2 kontrole oranla miR-21+ kontrollerde azalmıştır ancak ilaçlı kondüsyonda mTOR azalırken p-mTOR ifadesi artmıştır. β-catenin ifadesi HEPG2 hücrelerinin kontrolüne oranla miR-21+ hücrelerinin kontrolünde artmıştır, ilaçlı gruplarda kontrole oranla HEPG2 ilaçlı artarken miR-21+ ilaçlı azalmıştır. GAPDH kontrol yüklemesi olarak kullanılmıştır (Şekil 31).



Şekil 31 HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde Oleandrin'in PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağına etkisinin immunoblotlama yöntemi ile incelenmesi. Total protein izolasyonunun ardından 30µg hazırlanan protein örnekleri %12'lik SDS-PAGE jel sisteminde yürütüldü. İncelenen antikorlarla problandı. Yükleme kontrolü için GAPDH kullanıldı. GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.

4.14 HEPG2 ve miR-21+ Hücrelerinde Oleandrin'in Apoptoz Yolağına Ait Proteinlerin Ekspresyon Seviyelerinin İncelenmesi

Bu tez kapsamında Oleandrin'in kontrol hücelere oranla apoptotik süreçte rol oynayan protein ifadelerini incelemek için immunoblot yöntemi ile inceleme gerçekleştirdik. Caspase 3 35 kDa inaktif formu oleandrin uygulaması ile azalmıştır, bu aktif formundaki arttığına işaret eder. miR-21+ hücrelerinde Caspase 3 ifadelerinde azalmıştır, Oleandrin'in bu seviyeyi arttırdığı gözlemlenmiştir. Caspase 9 ifadesinde kontrol ve ilaçlı gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Caspase 8 ifadesinin inaktif formu oleandrin seviyesi ile azalmıştır bu da Caspase 8'in aktif olabileceği anlamına gelmektedir. miR-21 ifadesi artan HEPG2 hücrelerinde oleandrin uygulamasıyla Caspase 8 ifadesinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Kesilmiş Caspase 8 formunda, oleandrin kontrol miR-21+ grubuna göre caspase 8 seviyesini arttırmıştır. Anti-apoptotik olan Bcl-2 ifadesi oleandrin tarafından etkilenmemiştir. miR-21+ hücrelerde kontrol grubunda Bcl-2 yüksek ifadesi görülmektedir bu miR-21+ hücrelerinin agresif olduğunu kanıtlamaktadır. Oleandrin'in Bcl-2 ifadesini anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Aktif formda olan PARP seviyeleri ilaçlı gruplarda kontrol gruplarına göre artmıştır bu da Oleandrin'in apoptoza götürdüğünün göstergesidir (Şekil 32).

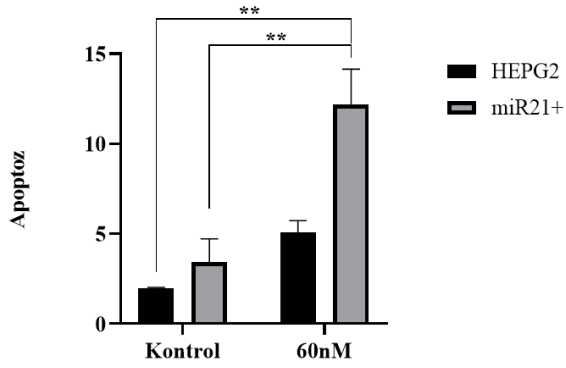
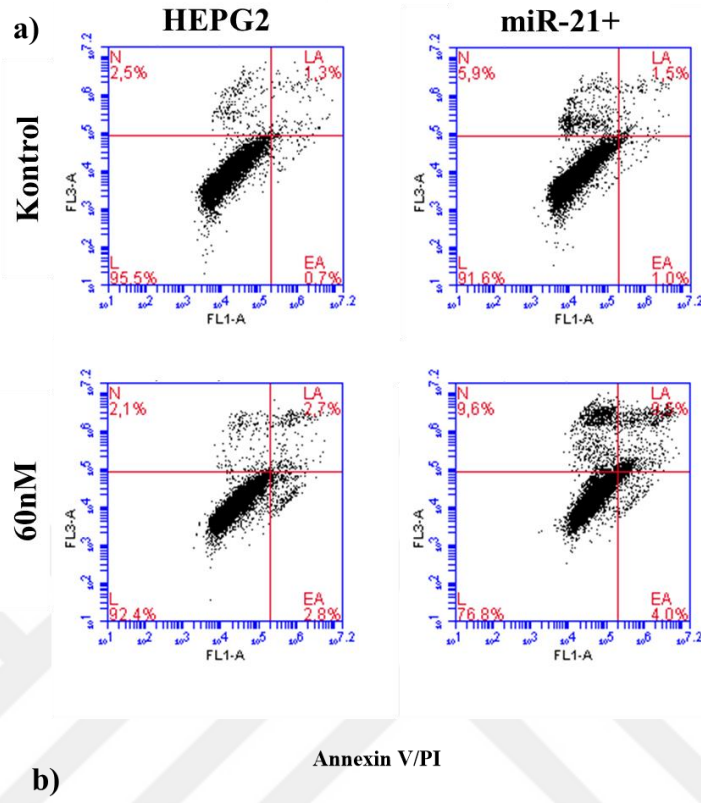


Şekil 32 HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde Oleandrin'in Apoptoz yolağına etkisinin immunoblotlama yöntemi ile incelenmesi. Total protein izolasyonunun ardından 30µg hazırlanan protein örnekleri %12'lik SDS-PAGE jel sisteminde yürütüldü. İncelenen antikorlarla problandı.

Yükleme kontrolü için GAPDH kullanıldı. GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu

4.15 HEPG2 ve miR-21+ Hücrelerinde Oleandrin'in Apoptotik Popülasyonlar Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Oleandrin'in HEPG2 ve miR-21+ hücrelerdeki apoptoz mekanizmasının anlaşılması için Annexin V/PI ile analizi ile gerçekleştirildi. HEPG2 hücrelerinin kontrol grubunda nekrotik %2.5, geç apoptoz %1.3, erken apoptoz %0.7 iken Oleandrinli HEPG2 grubunda nekrotik %2.1, geç apoptoz %2.7, erken apoptoz %2.8 olmuştur. miR-21+ hücrelerinin kontrol grubunda nekrotik %5.9, geç apoptoz %1.5, erken apoptoz %1 iken Oleandrinli miR-21+ grubunda nekrotik %9.6, geç apoptoz %9.5, erken apoptoz %4 olmuştur (Şekil 33).



Şekil 33 HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde Annexin V/PI ile hücre ölümü analizi. Sonuçlar GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu
 **p=0.0040

5 TARTIŞMA

Mevcut çalışmada HEPG2 HCC hücrelerinde miR-21 ifadesi ile ilişkili olarak anti-karsinojenik özellikteki Oleandrin'in hücre canlılığı ve hücre ölüm mekanizmalarına etkisi araştırılmıştır. Bu kapsamda öncelikle hücrelerdeki miR-21 ifadesi plazmid transfeksiyonu aracılığı ile arttırılmıştır. miR-21 transfeksiyon başarısı hücre içindeki miR-21 ifadesinin incelenmesinin yanısıra miR-21'in hedeflediği PTEN ve c-myc protein ifadeleri ile doğrulanmıştır. HCC tümör dokularında yüksek ifade edilen miR-21 onkomiR olarak görev aldığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir ve çalışmamızda da miR-21 ifadesi artan hücrelerde sağ kalım oranının normal HEPG2 hücrelerine göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu gösterilmiştir. Literatürde oleandrinle yapılan çalışmalarda hücre canlılığını inhibe ettiği bildirilmiştir bunun doğrultusunda çalışmamızda yaptığımız deney sonucunda, Oleandrin'in doza bağımlı olarak HEPG2 ve miR-21+ HEPG2 hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı, zamana bağlı olarak seçili doz olan 60 nM konsantrasyonunda hücre proliferasyonunu baskıladığı gözlemlenmiştir. Koloni oluşum potansiyeli oleandrin tarafından hem HEPG2 hem de miR-21+ hücrelerde baskılanmıştır. HEPG2 ve miR-21+ hücrelerde Oleandrin'in zamana bağlı olarak hücre proliferasyonuna etkisini gözlemleyebilmek için tripan mavisi deneyi gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlara göre Oleandrin'in zamanla sitotoksik etkiye sahip olduğu, hücre bölünmesine ket vurduğu gözlemlenmiştir. Çalışmamız süresince iki boyutlu ve üç boyutlu kültür oluşturulmuştur. 3B kültürde asılı damla ve yumuşak agar deneyleri gerçekleştirilmiştir. Asılı damla deneyinden elde edilen sonuçlara göre Oleandrin'in HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinin sferoid çaplarında azalmaya sebep olduğu ve ek olarak yumuşak agar deneyinde hücrelerin 3B kültür ortamındaki koloni oluşturma potansiyeline ket vurduğu gözlemlenmiştir. HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde Oleandrin'in apoptoza ve sağkalıma etkisini görebilmek için floresan boyamalar gerçekleştirilmiştir. Oleandrin'in hücreleri apoptoza götürdüğü özellikle miR-21+ hücrelerde DNA kırıklarına sebep olduğu ve hücre canlılığının azalmasını etkilediği sonucuna varılmıştır. Oleandrin'in HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde, hücre döngüsüne etkisi incelendiğinde, hücre döngüsünün G2/M evresinde tutuklu kalma oranının arttırdığı gözlemlendi. Oleandrin'in hücre sağkalım ve ölüm mekanizmalarındaki görevini anlayabilmek çalışmamız için önemli bir basamaktır bu süreçte immunoblot yöntemi ile NF- κ B, PI3K/Akt/mTOR ve apoptoz sinyal

yolaklarındaki protein ifadeleri seviyelerindeki değişiklikler incelendi. Apoptoz mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi için Annexin V/PI analizi gerçekleştirilerek ilaçlı grupların apoptoz oranının kontrol gruplarına göre anlamlı ölçüde fazla olduğu gösterilmiştir.

miR-21 PTEN'in düzenlenmesi, metastaz ve proliferasyonda rol oynamaktadır [226]. miR-21+ hücreleri, HEPG2 hücrelerine miR-21 plazmitinin transfeksiyonu ile hazırlanmıştır. Transfeksiyonun ardından miR-21 plazmitinin antibiyotiği G-418 uygulanarak hücre seçilimi gerçekleştirilmiştir. miR-21 primerleriyle gerçekleştirilen PZR sonucunda hücrelerin miR-21 ifadelerinin HEPG2 hücrelerine kıyasla 4 kat fazla olduğu gösterilmiştir (Şekil 16). miR-21 ifadesi arttıran hücrelerin proteomik seviyedeki değişiminin gözlemlenmesi için immunoblotlama yöntemiyle PTEN ve c-Myc seviyelerine bakılmıştır. miR-21+ hücrelerinde HEPG2 hücrelerine oranla PTEN protein ifadesini azaldığı, c-Myc protein ifadesininse arttığı gösterilmiştir (Şekil 17). Yapılan bir çalışmada prostat kanseri hücre hatları LNCaP ve PC3'de miR-21 seviyelerinin PZR ölçümleri ile yüksek olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte bu çalışmada anti-miR-21 uygulamasının ardından miR-21 seviyelerinde anlamlı ölçüde azalma elde edilmiştir [226]. HCC hasta dokuları ile yapılan bir çalışmada PZR deneyi ile miR-21 seviyelerinin yüksek olduğu gösterilmiştir. HepG2, PLC/PRF-5, SK-HEP-1 ve SNU-182 hücrelerinde anti-miR-21 uygulanmasının ardından hücre proliferasyonunda azalma gözlemlenerek tümör hücresindeki büyümenin miR-21 seviyesi ile modüle edilebileceği sonucu çıkarılmıştır [227].

EMT'nin (Epitelyal-mezenkimal geçiş), polarize ve yapışkan epitel hücrelerinin hareketli ve istilacı mezenkimal hücrelere dönüştürülmesi yoluyla çeşitli kanser hücrelerinin istilasında anahtar bir rol oynadığı bilinmektedir [228], [229]. EMT'de E-kadherin ifadesinin anahtar transkripsiyonel baskılayıcısı Snail, embriyonik gelişimde ve kanserin ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. Snail'in tümör hücrelerine kanser kök hücre benzeri özellikler kazandırdığı ve ilaç direncini sağlayarak, tümör nüksetmesini ve metastazı desteklediğini gösterilmiştir [230]. TWIST1, embriyonik gelişimin birçok aşamasında temel ve önemli roller oynayan ve tümör metastazına, hatta tümörün başlatılması ve birincil tümör büyümesine önemli ölçüde katkıda bulunan temel bir

sarmal-halka-sarmal (bHLH) transkripsiyon faktörüdür. TWIST1'in aşırı ekspresyonu, kanserin metastaz oluşumunda anahtar bir süreç olan EMT'yi indüklemektedir. TWIST1 ayrıca kanser kök hücrelerinin oluşumunu teşvik ederek ve tümör oluşum sürecini kolaylaştırmaktadır [231]. miR-21+ ifadesi arttırılan hücrelerde EMT elemanlarındaki değişikliği gözlemlemek için PZR uygulanmıştır. HEPG2 hücresindeki gen ifadesine oranla miR-21+ hücrelerde E-Cadherin 1.7 kat, Snail-1 1.8 kat, Snail-2 3.2 kat artmıştır ancak Twist 0.4 kat azalmıştır (Şekil 18). Skuamöz hücreli karsinom (SCC) hücresinde yapılan bir çalışmada, miR-21 ifadesindeki artışın ardından metastazın ve Snail ifadesinin arttığı gösterilmiştir [232]. miR-21'in anormal ekspresyonunun EMT'yi engelleyebildiği gözlemlenmiştir [233]. MDA-MB-231 hücre hattında yapılan bir çalışmada antagomir uygulanmasının ardından E-cadherin ifadelerinde anlamlı bir azalış söz konusu olmuştur [234].

Bu çalışmada, Oleandrin'in hücre canlılığına etkisini gözlemleyebilmek için HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde hücre sağkalım deneyi gerçekleştirdik. Kanser ölümlerinin çoğundan birincil tümörlerin etkisinden daha çok kanser metastazı sorumlu olmaktadır. Bu sebeple çalışmamızda ilaç dozunun sitotoksitesinden ziyade anti-invazif ve anti-metastatik etkileriyle daha çok ilgilendik ve IC50'lerin altındaki konsantrasyon olan 60nM seçerek deneylere devam etmeye karar verdik (Şekil 19). Meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 ve radyoterapiye dirençli (RT-R) MDA-MB-231 hücre hattında yapılan bir çalışmada oleandrin'in hücre canlılığını doza bağımlı olarak azalttığı gösterilmiştir [235]. SW480, HCT116 ve RKO kolon kanseri hücre hatlarında Oleandrin'in hücre canlılığına etkisi incelendiğinde, hücre canlılığını önemi ölçüde azalttığı gösterilmiştir [236].

Oleandrin'in miR-21 ifadesine etkisini gözlemlemek için PZR deneyi gerçekleştirdik ve HEPG2'ye oranla kontrol miR-21+ grubunun 4 kat arttığı ve oleandrin'in kontrol grubuna oranla 0.3 kata kadar miR-21 ifadesini azalttığını gösterdik (Şekil 20). A375 malign melanom hücre hattında yapılan bir çalışmada, oleandrin'in miRNA'lar üzerine etkisi PZR ile incelenerek, miR-21 ifadesinin seviyesinde önemli ölçüde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir [237].

Oleandrin'in koloni oluşum potansiyelinde oleandrinin etkilerini incelememizin ardından koloni oluşum potansiyelini indüklediğini gözlemledik (şekil 21). Meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 ve radyoterapiye dirençli (RT-R) MDA-MB-231 hücre hattında yapılan bir çalışmada oleandrin'in koloni oluşumunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir [235]. Osteosarkom kanseri 143B, U-2OS ve MG-63 hücrelerinde uygulanan Oleandrin'in koloni oluşumunu inhibe ettiği bulunmuştur [238].

3B hücre kültürü, hücrelerin birbirleri arasındaki etkileşiminin *in vitro* ortamda, sferoid ve koloni oluşumu sayesinde incelenebildiği bir yöntemdir. Çalışmamızda asılı damla deneyinde sferoid çaplarından elde ettiğimiz sonuçlara göre çaplar arasında anlamlı farklılıklar gözlenememiştir (şekil 23). Ancak yumuşak agar deneyinde DIOC6 boyası ile yapılan boyama sonucunda, oleandrinin koloni oluşumunu anlamlı ölçüde baskıladığı ve hücre canlılığını azalttığı görülmüştür (şekil 24). Prostat kanseri LNCaP ve PC3 hücre hatlarında anti-miR-21 uygulamasının ardından DIOC₆ floresan boyamalı asılı damla deneyi sonucunda apoptotik hücre artışı gözlemlenmiştir [226]. Meme kanseri MDA-MB-231 hücresinde kontrol ve anti-miR-21 kullanılarak gerçekteştirilen asılı damla deneyinin 72.saatın sonunda anti-miR-21 uygulananların sferoid çaplarında azalma olduğu, ROS seviyesinin arttığını göstermişlerdir [239].

Oleandrin'in hücre çoğalmasına etkisini gözlemleyebilmek için tripan mavisi deneyi gerçekteştirerek, zamana bağlı olarak hücre bölünmesine ket vurduğunu gösterdik (şekil 25). PC12 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, miR-21 transfeksiyonlu hücrelerde hücre sağkalımı arttığı gösterilmiştir [240].

Çalışmamızda elde edilnen sonuca göre HEPG2 hücrelerine oranla miR-21+ hücrelerinde ilaçlı grupta DNA kırıkları gözlemlenmiştir. HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde Oleandrin'in hücre canlılığında azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir (şekil 26-27). Osteosarkom kanseri 143B, U-2OS ve MG-63 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, oleandrin uygulamasının ardından DAPI boyaması ile gözlemlenildiğinde, kromatinlerin yoğunlaşmasına ve DNA parçalanmasına sebep olarak ciddi şekilde DNA hasarına sebep olduğu bulunmuştur [238]. UZOS ve SaOS-2 hücrelerinde oleandrin'in artan dozlarda uygulanmasının ardından yapılan DAPI boyaması ile incelendiğinde, hücre

çekirdeklerinin piknoz hatta karyolizle beraber düzensiz bir morfolojiye sebep olduğu gösterilmiştir [241].

Oleandrin'in hücre döngüsü üzerine etkisini HEPG2 ve miR-21+ hücrelerinde incelemek için PI deneyi gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlara göre HEPG2 kontrol grubunda SubG1 %1.1, G1 %55,9, S %11.1 ve G2/M %34.1 iken ilaçlı grupta bu oranlar SubG1 %4.8, G1 %36, S %19.8 ve G2/M %42.3 olmuştur. miR-21+ hücreleri incelendiğinde kontrol grubunda SubG1 %1.6, G1 %55,6, S %13 ve G2/M %33.6 iken ilaçlı grupta SubG1 %3.7, G1 %31.2, S %18.5 ve G2/M %49,6 olmuştur. Kontroller ile ilaçlı gruplar kıyaslandığında, ilaçlı gruplarda kontrole oranla G2/M fazının arttığı ve Oleandrin'in bu fazda ket vurduğu görülmektedir (Şekil 28). A549 hücresinde Oleandrin'in hücre siklusuna etkisini incelemek için yapılan PI deneyinde G2/M fazındaki popülasyonda kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik tespit edilememiş [242], ancak SW480 ve RKO hücrelerinden elde edilen sonuca göre Oleandrin'in G2/M aşamasında hücre döngüsünü durdurduğu gösterilmiştir [243].

NF- κ B, çeşitli genlerin ifade seviyesini düzenleyen bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. İfadesini düzenlediği genler arasında inflamasyon, viral replikasyon, tümör oluşumu ve apoptoz gibi önemli role sahip moleküller bulunmaktadır. Bu durum NF- κ B faktörünü farmasötik çalışmaların ilgi odağı haline getirmiştir. Apoptozu engellemesi ve proliferasyonu artırması sebebiyle NF- κ B kanser ilaç geliştirme süreçlerinde ideal bir hedef olarak görülmektedir. NF- κ B faktörünün aktive edilmesi, kemoterapötik ajanlara karşı direnç oluşumuna ve tümör hücrelerinde proliferasyona neden olmaktadır. NF- κ B, p50 (NF- κ B1) ve p65 (RelA) adlı iki alt birimden oluşan heterodimer bir yapıdadır. NF- κ B, aktif olmadığı durumlarda sitoplazmada bulunur ve yapısında I κ Ba inhibisyon alt birimini içerir. I κ Ba'nın fosforilasyona uğrayarak parçalanması sonucunda, p50-p65 heterodimerinin nükleer lokalizasyon sinyali açığa çıkar ve bağımlı genlerin transkripsiyonu tetiklenir. NF- κ B'nin aktive olabilmesi için inhibite edici alt birim I κ Ba'nın fosforilasyona uğrayarak parçalanması gerekmektedir. Oleandrin, I κ Ba alt biriminin parçalanmasını engelleyerek NF- κ B'nin p65 alt biriminin nükleer translokasyonunun önüne geçtiği gösterilmiştir [244], [245].

miR-21 ifadesi arttırılan HEPG2 hücrelerinde NF- κ B p65 protein ifadesi HEPG2 kontrol hücrelerine oranla artmıştır. Oleandrin uygulaması NF- κ B seviyesini kontrole grubuna azalmasını indüklemiştir. miR-21+ hücrelerinde bu oranın daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 29). Literatürde çeşitli kanser hücre hatlarında miR-21 ifadesinin NF- κ B yolu üzerindeki etkileri melanoma ve gastrik kanseri hücrelerinde incelenmiştir. Melanoma A375 hücrelerinde miR-21 ifadesi baskılandığında NF- κ B ifadesinin azaldığı gözlemlenmiştir [246]. Gastrik kanseri hücrelerinde miR-21 ifadesinin arttırılması EP2/4 reseptörü aktivastonu aracılığıyla NF- κ B aktivasyonuna neden olarak hücre proliferasyonunu indüklediği gösterilmiştir [247]. U937, CaOV3, HeLa, Jurkat ve L-929 hücreleri ile yapılan Oleandrin'in uygulamasının ardından, Oleandrin'in NF- κ B aktivasyonunun güçlü bir inhibitörü olduğu sonucuna ulaşılmıştır [248]. IKK α , IKK β ve Phospho-IKK α/β ifade seviyeleri HEPG2 hücrelerinde, miR-21+ hücrelerine oranla artmıştır ancak ilaçlı gruplara bakıldığında HEPG2 de kontrole oranla azalırken, miR-21+ hücrelerin kontrolüne oranla ilaçlı grupta protein ifadesi artmaktadır. HeLa ve HEK293 hücrelerinde oleandrin uygulamasının ardından elde edilen sonuçlara göre, oleandrin IKK substratını baskılayarak fosforile olmasını engellemektedir, Phospho-IKK α/β fosforilasyonunu bloke edilmesiyle ifade düzeyleri baskılanmıştır [249].

PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağında yapılan immunoblotlama sonuçları şekil 31'de belirtildiği gibidir. Sonuçlardan elde edilen verilere göre Oleandrin'in PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağını inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Crohn hastalığı (CD) ile yapılan bir kohort çalışmasında mimik ve anti-mimik miR-21 seviyeleri ölçüldüğünde kontrole kıyasla mimik miR-21 sonuçları şu şekilde çıkıyor, PTEN ve PI3K ifadesi azaldığı, p-PTEN, mTOR ve p-mTOR ifade seviyelerinin ise arttığı gösterilmiştir [250].

Bu tez kapsamında Oleandrin'in kontrol hücrelere oranla apoptotik süreçte rol oynayan protein ifadelerini incelemek için immunoblot yöntemi gerçekleştirilmiştir. PARP ekspresyon seviyesinin miR-21+ hücrelerde HEPG2 hücrelere oranla fazla olduğu gözlemlenmiştir ancak ilaç uygulandığında kontrol gruplarına oranla PARP ifadesi azalmıştır. U937 hücreleri ile yapılan çalışmada, Oleandrin uygulamasının ardından PARP ifadesinin seviyesinde azalma gözlemlenmiştir [251]. Caspase 3 ifade seviyesi HEPG2 kontrolde miR-21+ hücrelerinin kontrolüne oranla artış görülmektedir ancak Oleandrinli gruplara

bakıldığında HEPG2'nin ilaçlı kondisyonu, kontrolüne oranla azalırken miR-21+ ilaçlı grubu kontrole oranla arttığı gözlenmiştir. İnsan yumurtalık adenokarsinomu A2780 hücreleri ile yapılan bir çalışmada miR-21 inhibitörü uygulanması sonucunda caspase 3 ekspresyon seviyelerinin arttığı görülmüştür [252] 4T1 hücrelerinde yapılan bir çalışmada miR-21 mimik uygulanmasının ardından caspase 3 seviyesinde azalma görülmüştür [253]. Caspase 9 ifade seviyeleri miR-21+ hücrelerinde HEPG2 kontrol grubuna oranla azalttığı ve ilaçlı miR-21+ grubu kontrol grubuna göre arttığı görülmüştür. U87 glioblastoma hücreleri ile yapılan bir çalışmada miR-21 ekspresyonunun inhibe edilmesi, caspase 9 ekspresyon seviyelerinde artışa sebep olmuş ve böylece apoptozu indüklemiştir [243]. Caspase 8 ekspresyon seviyeleri miR-21+ kontrol grubunda HEPG2 kontrole oranla azalmıştır. Her ilaçlı kondüsyon kendi kontrol grubuna göre protein ifadesinde azalmaya yol açmıştır. Kesilmiş caspase 8 ifadesi incelendiğinde ilaçlı grupların kontrollere oranla ifadesinin arttığı, HEPG2 kontrolün de miR-21+ kontrole kıyasla seviyesinin arttığı gösterilmiştir. SAOS-2 hücreleri ile yapılan bir çalışmada, hücrelere miR-21 uygulaması sonucunda hem caspase-8'in hem de kesilmiş caspase-8'in ekspresyon seviyelerinde azalma görülmüştür. SAOS-2 hücrelerine miR-21 inhibitörü uygulandığında ise bu durum kısmen ortadan kalkmıştır [254]. Hem U2OS hem de SaOS-2 hücreleri ile yapılan bir çalışmada ise hücrelere Oleandrin uygulanması sonucunda hem caspase-8'in hem de kesilmiş caspase-8'in ekspresyon seviyesinin arttığı görülmüştür [241]. Bcl-2 ifadesi en yüksek miR-21+ kontrol grubunda ifade edilmiştir. U87MG glioblastoma hücreleri ile yapılan bir çalışmada miR-21'in Bax'ı aşağı doğru düzenleyebildiği ve Bcl-2 ekspresyonunda artışa sebep olarak apoptozu inhibe edebildiği görülmüştür [255]. SW480 kolon kanseri hücreleri kullanılarak yapılan bir başka çalışmada ise Oleandrin kaynaklı apoptozun, Bcl-2 ekspresyonunun azalması ile sonuçlandığı görülmüştür [243].

Şimdiye kadar yaptığımız çalışmalar Oleandrin'in apoptozla ilişkili olduğunu göstermiştir. Apoptoz mekanizmasının tam anlaşılabilmesi için HEPG2 ve miR-21+ hücrelerimizde Annexin V/PI deneyi gerçekleştirilmiştir. Ölüm oranları incelendiğinde HEPG2 kontrol grubunda %2 oranında oleandrin uygulanan grupta %5.5 oranında, miR-21+ hücrelerin kontrol grubunda ise %2.5 iken ilaçlı grupta bu oranın %13.5'e çıktığı görülmüştür. Oleandrin'in HEPG2 ve miR-21+ hücrelerde apoptozu anlamlı şekilde arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 33). Osteosarkom kanseri 143B, U-2OS ve MG-63

hücrelerinde yapılan bir araştırmaya göre, Oleandrin'in apoptozun ekstrinsik ve intrinsik yollarında rol aldığı, apoptotik süreçte caspase-3 ve 8'i aktive ederek Bax ekspresyonunu tetiklediğı gösterilmiştir [238]. SW480 ve RKO hücrelerinde yapılan bir araştırmada oleandrin'in artan dozlarda apoptik hücre oranını arttırdığı gözlemlenmiştir [243]. Hem U2OS hem de SaOS-2 OS hücreleri ile Oleandrin'in mekanizması incelendiğinde, apoptozda hem intrinsik hem de ekstrinsik yolların kullanıldığı ileri sürülmüştür [241] .

Sonuc olarak, Oleandrin, HEPG2 ve miR-21 ifadesi arttırılmış hücrelerde hücre canlılığını önemli ölçüde bastırması ve hücre ölümünü ind klemitir. Bu etki, Oleandrin'in PI3K/Akt ve NF- B yolaklarının sinyallerini bastırması, Bcl-2 ekspresyon seviyesini azaltması ve kesilmiş PARP ifadesini artırmasıyla ger ekleşmitir. Oleandrin, miR-21 ifadesi arttırılmış hücrelerde miR-21 ekspresyon seviyelerinin azalmasına sebep olmuştur. Bu durum HCC hücrelerinin büyümesini ve hayatta kalmasını engellemiştir. Oleandrin, diğ r HCC tedavilerine kıyasla bazı avantajlara sahip olabilir. Araştırılması gereken muhtemel avantajları arasında daha az yan etkiye neden olup olmadığı, direnç geliştirme riskinin daha düşük olup olmadığı ve farklı HCC alt tiplerine karşı etkin olup olmadığı yer almaktadır. Ayrıca kemoterapi ile sinerjistik etki gösterebilir. Oleandrin'in HCC tedavisinde kullanımına yönelik klinik araştırmalar devam etmektedir. Mevcut klinik denemelerde, Oleandrin'in bazı hastalarda tümörde küçülmeye yol açan güvenli ve iyi tolere edilebilir bir ajan olduğunu göstermiştir.  n sonuçlar umut verici olsa da, Oleandrin'in HCC tedavisinde etkinliğini ve güvenliğini kesin olarak belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Gelecekteki araştırmalar, Oleandrin'in HCC tedavisinde kullanımını daha da geliştirmeye odaklanmalıdır. Bu, Oleandrin'in diğ r ilaçlarla kombinasyon tedavisinin araştırılmasını, Oleandrin'in farklı kanser türlerindeki etkinliğinin değerlendirilmesini ve Oleandrin'in biyomarkerlerinin geliştirilmesini içerebilir.

KAYNAKLAR

- [1] K. A. McGlynn, J. L. Petrick, and H. B. El-Serag, “Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma,” *Hepatology*, vol. 73, no. Suppl 1, p. 4, Jan. 2021, doi: 10.1002/HEP.31288.
- [2] H. Zhang, W. Zhang, L. Jiang, and Y. Chen, “Recent advances in systemic therapy for hepatocellular carcinoma,” *Biomarker Research* 2021 10:1, vol. 10, no. 1, pp. 1–21, Jan. 2022, doi: 10.1186/S40364-021-00350-4.
- [3] P. C. Valery, M. Laversanne, P. J. Clark, J. L. Petrick, K. A. McGlynn, and F. Bray, “Projections of primary liver cancer to 2030 in 30 countries worldwide,” *Hepatology*, vol. 67, no. 2, pp. 600–611, Feb. 2018, doi: 10.1002/HEP.29498.
- [4] G. N. Ioannou, M. F. Splan, N. S. Weiss, G. B. McDonald, L. Beretta, and S. P. Lee, “Incidence and predictors of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis,” *Clin Gastroenterol Hepatol*, vol. 5, no. 8, 2007, doi: 10.1016/J.CGH.2007.02.039.
- [5] A. Jemal *et al.*, “Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2014, Featuring Survival,” *J Natl Cancer Inst*, vol. 109, no. 9, Sep. 2017, doi: 10.1093/JNCI/DJX030.
- [6] J. Ferlay *et al.*, “Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012,” *Int J Cancer*, vol. 136, no. 5, pp. E359–E386, Mar. 2015, doi: 10.1002/IJC.29210.
- [7] D. Motola-Kuba, D. Zamora-Valdés, M. Uribe, and N. Méndez-Sánchez, “Hepatocellular carcinoma. An overview,” *Ann Hepatol*, vol. 5, no. 1, pp. 16–24, Jan. 2006, doi: 10.1016/S1665-2681(19)32034-4.
- [8] K. O. Asafo-Agyei and H. Samant, “Hepatocellular Carcinoma,” *StatPearls*, Jun. 2023, Accessed: May 03, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559177/>

- [9] H. B. El-Serag and K. L. Rudolph, "Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis," *Gastroenterology*, vol. 132, no. 7, pp. 2557–2576, Jun. 2007, doi: 10.1053/j.gastro.2007.04.061.
- [10] L. Pagliaro, L. Pasta, G. D'Amico, S. Madonia, and G. Pietrosi, "Familial clustering of (mostly) HCV-related cirrhosis. A case-control study," *J Hepatol*, vol. 37, no. 6, pp. 762–766, Dec. 2002, doi: 10.1016/S0168-8278(02)00304-5.
- [11] M. W. Yu *et al.*, "Increased risk for hepatitis B-related liver cirrhosis in relatives of patients with hepatocellular carcinoma in northern Taiwan," *Int J Epidemiol*, vol. 31, no. 5, pp. 1008–1015, Oct. 2002, doi: 10.1093/IJE/31.5.1008.
- [12] M. W. Yu *et al.*, "Familial Risk of Hepatocellular Carcinoma Among Chronic Hepatitis B Carriers and Their Relatives," *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, vol. 92, no. 14, pp. 1159–1164, Jul. 2000, doi: 10.1093/JNCI/92.14.1159.
- [13] M. F. Abdelmalek, C. Liu, J. Shuster, D. R. Nelson, and N. R. Asal, "Familial Aggregation of Insulin Resistance in First-Degree Relatives of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease," *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 4, no. 9, pp. 1162–1169, Sep. 2006, doi: 10.1016/j.cgh.2006.06.001.
- [14] G. D. Smith, S. Ebrahim, S. Lewis, A. L. Hansell, L. J. Palmer, and P. R. Burton, "Genetic epidemiology and public health: hope, hype, and future prospects," *The Lancet*, vol. 366, no. 9495, pp. 1484–1498, Oct. 2005, doi: 10.1016/S0140-6736(05)67601-5.
- [15] A. L. Fracanzani *et al.*, "Increased cancer risk in a cohort of 230 patients with hereditary hemochromatosis in comparison to matched control patients with non-iron-related chronic liver disease," *Hepatology*, vol. 33, no. 3, pp. 647–651, 2001, doi: 10.1053/JHEP.2001.22506.
- [16] J. A. Marrero *et al.*, "Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases," *Hepatology*, vol. 68, no. 2, pp. 723–750, Aug. 2018, doi: 10.1002/HEP.29913.

- [17] P. R. Galle *et al.*, “EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma,” *J Hepatol*, vol. 69, no. 1, pp. 182–236, Jul. 2018, doi: 10.1016/J.JHEP.2018.03.019.
- [18] J. M. Llovet *et al.*, “Hepatocellular carcinoma,” *Nature Reviews Disease Primers* 2021 7:1, vol. 7, no. 1, pp. 1–28, Jan. 2021, doi: 10.1038/s41572-020-00240-3.
- [19] A. H. Shannon, S. M. Ruff, and T. M. Pawlik, “Expert Insights on Current Treatments for Hepatocellular Carcinoma: Clinical and Molecular Approaches and Bottlenecks to Progress,” *J Hepatocell Carcinoma*, vol. Volume 9, pp. 1247–1261, Dec. 2022, doi: 10.2147/JHC.S383922.
- [20] K. A. McGlynn, J. L. Petrick, and H. B. El-Serag, “Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma,” *Hepatology*, vol. 73, no. Suppl 1, p. 4, Jan. 2021, doi: 10.1002/HEP.31288.
- [21] H. Samant, H. S. Amiri, and G. B. Zibari, “Addressing the worldwide hepatocellular carcinoma: epidemiology, prevention and management,” *J Gastrointest Oncol*, vol. 12, no. Suppl 2, pp. 361–373, Jul. 2021, doi: 10.21037/JGO.2020.02.08.
- [22] J. Ahn *et al.*, “Lower Observed Hepatocellular Carcinoma Incidence in Chronic Hepatitis B Patients Treated With Entecavir: Results of the ENUMERATE Study,” *Am J Gastroenterol*, vol. 111, no. 9, pp. 1297–1304, Sep. 2016, doi: 10.1038/AJG.2016.257.
- [23] H. B. El-Serag, “Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma,” *Gastroenterology*, vol. 142, no. 6, 2012, doi: 10.1053/J.GASTRO.2011.12.061.
- [24] K. A. McGlynn, J. L. Petrick, and H. B. El-Serag, “Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma,” *Hepatology*, vol. 73, no. Suppl 1, p. 4, Jan. 2021, doi: 10.1002/HEP.31288.
- [25] S. C. Gordon *et al.*, “Antiviral therapy for chronic hepatitis B virus infection and development of hepatocellular carcinoma in a US population,” *Clin Gastroenterol Hepatol*, vol. 12, no. 5, pp. 885–893, 2014, doi: 10.1016/J.CGH.2013.09.062.

- [26] J. M. Llovet *et al.*, “Hepatocellular carcinoma,” *Nature Reviews Disease Primers* 2021 7:1, vol. 7, no. 1, pp. 1–28, Jan. 2021, doi: 10.1038/s41572-020-00240-3.
- [27] R. Statement *et al.*, “Guidelines for the Prevention, Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis B Infection,” *Who*, vol. 160, no. 7, p. 166, 2015, Accessed: May 03, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305553/>
- [28] G. V. Papatheodoridis, P. Lampertico, S. Manolakopoulos, and A. Lok, “Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B patients receiving nucleos(t)ide therapy: a systematic review,” *J Hepatol*, vol. 53, no. 2, pp. 348–356, Aug. 2010, doi: 10.1016/J.JHEP.2010.02.035.
- [29] Y. C. Hsu *et al.*, “Determinants of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients treated with nucleos(t)ide analogues for chronic hepatitis B,” *J Antimicrob Chemother*, vol. 69, no. 7, pp. 1920–1927, 2014, doi: 10.1093/JAC/DKU041.
- [30] A. G. Singal and H. B. El-Serag, “Hepatocellular Carcinoma From Epidemiology to Prevention: Translating Knowledge into Practice,” *Clin Gastroenterol Hepatol*, vol. 13, no. 12, pp. 2140–2151, Nov. 2015, doi: 10.1016/J.CGH.2015.08.014.
- [31] H. Samant, H. S. Amiri, and G. B. Zibari, “Addressing the worldwide hepatocellular carcinoma: epidemiology, prevention and management,” *J Gastrointest Oncol*, vol. 12, no. Suppl 2, pp. 361–373, Jul. 2021, doi: 10.21037/JGO.2020.02.08.
- [32] K. A. McGlynn, J. L. Petrick, and H. B. El-Serag, “Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma,” *Hepatology*, vol. 73, no. Suppl 1, p. 4, Jan. 2021, doi: 10.1002/HEP.31288.
- [33] G. V. Papatheodoridis *et al.*, “The risk of hepatocellular carcinoma decreases after the first 5 years of entecavir or tenofovir in Caucasians with chronic hepatitis B,” *Hepatology*, vol. 66, no. 5, pp. 1444–1453, Nov. 2017, doi: 10.1002/HEP.29320.
- [34] H. Samant, H. S. Amiri, and G. B. Zibari, “Addressing the worldwide hepatocellular carcinoma: epidemiology, prevention and management,” *J*

- Gastrointest Oncol*, vol. 12, no. Suppl 2, pp. 361–373, Jul. 2021, doi: 10.21037/JGO.2020.02.08.
- [35] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, “Biological agents.,” *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, vol. 100, no. Pt B, pp. 1–441, 2012.
 - [36] M. S. De Mitri *et al.*, “HCV-associated liver cancer without cirrhosis,” *Lancet*, vol. 345, no. 8947, pp. 413–415, Feb. 1995, doi: 10.1016/S0140-6736(95)90400-X.
 - [37] H. B. El-Serag and F. Kanwal, “Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma in the United States: Where Are We? Where Do We Go?,” *Hepatology*, vol. 60, no. 5, p. 1767, Nov. 2014, doi: 10.1002/HEP.27222.
 - [38] J. Chhatwal, F. Kanwal, M. S. Roberts, and M. A. Dunn, “Cost-effectiveness and budget impact of hepatitis C virus treatment with sofosbuvir and ledipasvir in the United States,” *Ann Intern Med*, vol. 162, no. 6, pp. 397–406, Mar. 2015, doi: 10.7326/M14-1336.
 - [39] F. Kanwal, J. Kramer, S. M. Asch, M. Chayanupatkul, Y. Cao, and H. B. El-Serag, “Risk of Hepatocellular Cancer in HCV Patients Treated With Direct-Acting Antiviral Agents,” *Gastroenterology*, vol. 153, no. 4, pp. 996–1005.e1, Oct. 2017, doi: 10.1053/J.GASTRO.2017.06.012.
 - [40] F. Kanwal, J. R. Kramer, S. M. Asch, Y. Cao, L. Li, and H. B. El-Serag, “Long-Term Risk of Hepatocellular Carcinoma in HCV Patients Treated With Direct Acting Antiviral Agents,” *Hepatology*, vol. 71, no. 1, pp. 44–55, Jan. 2020, doi: 10.1002/HEP.30823.
 - [41] G. L. Davis, M. J. Alter, H. El-Serag, T. Poynard, and L. W. Jennings, “Aging of hepatitis C virus (HCV)-infected persons in the United States: a multiple cohort model of HCV prevalence and disease progression,” *Gastroenterology*, vol. 138, no. 2, 2010, doi: 10.1053/J.GASTRO.2009.09.067.
 - [42] J. M. Llovet *et al.*, “Hepatocellular carcinoma,” *Nature Reviews Disease Primers* 2021 7:1, vol. 7, no. 1, pp. 1–28, Jan. 2021, doi: 10.1038/s41572-020-00240-3.

- [43] K. A. McGlynn, J. L. Petrick, and H. B. El-Serag, “Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma,” *Hepatology*, vol. 73, no. Suppl 1, p. 4, Jan. 2021, doi: 10.1002/HEP.31288.
- [44] C. J. Chiang, Y. W. Yang, S. L. You, M. S. Lai, and C. J. Chen, “Thirty-year outcomes of the national hepatitis B immunization program in Taiwan,” *JAMA*, vol. 310, no. 9, pp. 974–976, Sep. 2013, doi: 10.1001/JAMA.2013.276701.
- [45] M. S. De Mitri *et al.*, “HCV-associated liver cancer without cirrhosis,” *Lancet*, vol. 345, no. 8947, pp. 413–415, Feb. 1995, doi: 10.1016/S0140-6736(95)90400-X.
- [46] H. B. El-Serag and F. Kanwal, “Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma in the United States: Where Are We? Where Do We Go?,” *Hepatology*, vol. 60, no. 5, p. 1767, Nov. 2014, doi: 10.1002/HEP.27222.
- [47] J. L. Petrick, S. P. Kelly, S. F. Altekruse, K. A. McGlynn, and P. S. Rosenberg, “Future of Hepatocellular Carcinoma Incidence in the United States Forecast Through 2030,” *J Clin Oncol*, vol. 34, no. 15, pp. 1787–1794, May 2016, doi: 10.1200/JCO.2015.64.7412.
- [48] K. C. Chang *et al.*, “Clinical-guide risk prediction of hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients after interferon-based therapy,” *Br J Cancer*, vol. 109, no. 9, pp. 2481–2488, Oct. 2013, doi: 10.1038/BJC.2013.564.
- [49] R. Waziry *et al.*, “Hepatocellular carcinoma risk following direct-acting antiviral HCV therapy: A systematic review, meta-analyses, and meta-regression,” *J Hepatol*, vol. 67, no. 6, pp. 1204–1212, Dec. 2017, doi: 10.1016/J.JHEP.2017.07.025.
- [50] A. C. Huang, N. Mehta, J. L. Dodge, F. Y. Yao, and N. A. Terrault, “Direct-acting antivirals do not increase the risk of hepatocellular carcinoma recurrence after local-regional therapy or liver transplant waitlist dropout,” *Hepatology*, vol. 68, no. 2, pp. 449–461, Aug. 2018, doi: 10.1002/HEP.29855.

- [51] G. N. Ioannou, P. K. Green, and K. Berry, “HCV eradication induced by direct-acting antiviral agents reduces the risk of hepatocellular carcinoma,” *J Hepatol*, vol. 68, no. 1, pp. 25–32, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.JHEP.2017.08.030.
- [52] P. Farci, G. A. Niro, F. Zamboni, and G. Diaz, “Hepatitis D Virus and Hepatocellular Carcinoma,” *Viruses*, vol. 13, no. 5, May 2021, doi: 10.3390/V13050830.
- [53] G. Diaz *et al.*, “Molecular Signature and Mechanisms of Hepatitis D Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma,” *Mol Cancer Res*, vol. 16, no. 9, pp. 1406–1419, Sep. 2018, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0012.
- [54] J. Candia *et al.*, “The genomic landscape of Mongolian hepatocellular carcinoma,” *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/S41467-020-18186-1.
- [55] M. Puigvehí, C. Moctezuma-Velázquez, A. Villanueva, and J. M. Llovet, “The oncogenic role of hepatitis delta virus in hepatocellular carcinoma,” *JHEP Rep*, vol. 1, no. 2, pp. 120–130, Aug. 2019, doi: 10.1016/J.JHEPR.2019.05.001.
- [56] J. M. Llovet *et al.*, “Hepatocellular carcinoma,” *Nature Reviews Disease Primers* 2021 7:1, vol. 7, no. 1, pp. 1–28, Jan. 2021, doi: 10.1038/s41572-020-00240-3.
- [57] A. M. Moon, A. G. Singal, and E. B. Tapper, “Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis,” *Clin Gastroenterol Hepatol*, vol. 18, no. 12, pp. 2650–2666, Nov. 2020, doi: 10.1016/J.CGH.2019.07.060.
- [58] G. Corrao, S. Aricò, A. Zamboni, P. Torchio, and F. Di Orio, “Female sex and the risk of liver cirrhosis. Collaborative Groups for the Study of Liver Diseases in Italy,” *Scand J Gastroenterol*, vol. 32, no. 11, pp. 1174–1180, 1997, doi: 10.3109/00365529709002999.
- [59] M. Frezza, C. di Padova, G. Pozzato, M. Terpin, E. Baraona, and C. S. Lieber, “High Blood Alcohol Levels in Women,” *New England Journal of Medicine*, vol. 322, no. 2, pp. 95–99, Jan. 1990, doi: 10.1056/nejm199001113220205.

- [60] J. L. Petrick *et al.*, “Tobacco, alcohol use and risk of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: The Liver Cancer Pooling Project,” *Br J Cancer*, vol. 118, no. 7, pp. 1005–1012, Apr. 2018, doi: 10.1038/S41416-018-0007-Z.
- [61] F. Turati *et al.*, “Alcohol and liver cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies,” *Ann Oncol*, vol. 25, no. 8, pp. 1526–1535, 2014, doi: 10.1093/ANNONC/MDU020.
- [62] V. Bagnardi *et al.*, “Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis,” *Br J Cancer*, vol. 112, no. 3, pp. 580–593, Feb. 2015, doi: 10.1038/BJC.2014.579.
- [63] R. Jinjuvadia, S. Patel, and S. Liangpunsakul, “The association between metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma: systemic review and meta-analysis,” *J Clin Gastroenterol*, vol. 48, no. 2, pp. 172–177, Feb. 2014, doi: 10.1097/MCG.0B013E3182A030C4.
- [64] D. Pradelli *et al.*, “Statins and primary liver cancer: a meta-analysis of observational studies,” *Eur J Cancer Prev*, vol. 22, no. 3, pp. 229–234, May 2013, doi: 10.1097/CEJ.0B013E328358761A.
- [65] S. Singh, P. P. Singh, A. G. Singh, M. H. Murad, and W. Sanchez, “Statins are associated with a reduced risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis,” *Gastroenterology*, vol. 144, no. 2, pp. 323–332, 2013, doi: 10.1053/J.GASTRO.2012.10.005.
- [66] H. B. El-Serag, T. Tran, and J. E. Everhart, “Diabetes Increases the Risk of Chronic Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma,” *Gastroenterology*, vol. 126, no. 2, pp. 460–468, 2004, doi: 10.1053/j.gastro.2003.10.065.
- [67] S. Schlesinger *et al.*, “Abdominal obesity, weight gain during adulthood and risk of liver and biliary tract cancer in a European cohort,” *Int J Cancer*, vol. 132, no. 3, pp. 645–657, Feb. 2013, doi: 10.1002/IJC.27645.
- [68] M. Franciosi, G. Lucisano, E. Lapice, G. F. M. Strippoli, F. Pellegrini, and A. Nicolucci, “Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes:

- systematic review,” *PLoS One*, vol. 8, no. 8, Aug. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0071583.
- [69] M. M. Hassan *et al.*, “Obesity Early in Adulthood Increases Risk but Does Not Affect Outcomes of Hepatocellular Carcinoma,” *Gastroenterology*, vol. 149, no. 1, pp. 119–129, Jul. 2015, doi: 10.1053/J.GASTRO.2015.03.044.
- [70] P. T. Campbell *et al.*, “Body Mass Index, Waist Circumference, Diabetes, and Risk of Liver Cancer for U.S. Adults,” *Cancer Res*, vol. 76, no. 20, pp. 6076–6083, Oct. 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0787.
- [71] F. Z. Khan, R. B. Perumpail, R. J. Wong, and A. Ahmed, “Advances in hepatocellular carcinoma: Nonalcoholic steatohepatitis-related hepatocellular carcinoma,” *World J Hepatol*, vol. 7, no. 18, pp. 2155–2161, 2015, doi: 10.4254/WJH.V7.I18.2155.
- [72] Z. Younossi *et al.*, “Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention,” *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 15, no. 1, pp. 11–20, Jan. 2018, doi: 10.1038/NRGASTRO.2017.109.
- [73] E. Degasperi and M. Colombo, “Distinctive features of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease,” *Lancet Gastroenterol Hepatol*, vol. 1, no. 2, pp. 156–164, 2016, doi: 10.1016/S2468-1253(16)30018-8.
- [74] C. Argyrou, D. Moris, and S. Vernadakis, “Hepatocellular carcinoma development in non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. Is it going to be the ‘Plague’ of the 21st century? A literature review focusing on pathogenesis, prevention and treatment,” *J BUON*, vol. 22, no. 1, pp. 6–20, 2017.
- [75] H. C. Wu *et al.*, “Aflatoxin B1 exposure, hepatitis B virus infection, and hepatocellular carcinoma in Taiwan,” *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 18, no. 3, pp. 846–853, Mar. 2009, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0697.
- [76] Y. Liu and F. Wu, “Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment,” *Environ Health Perspect*, vol. 118, no. 6, pp. 818–824, Jun. 2010, doi: 10.1289/EHP.0901388.

- [77] U. Fedeli, P. Girardi, and G. Mastrangelo, "Occupational exposure to vinyl chloride and liver diseases," *World J Gastroenterol*, vol. 25, no. 33, p. 4885, Sep. 2019, doi: 10.3748/WJG.V25.I33.4885.
- [78] M. Sherman, "Vinyl chloride and the liver," *J Hepatol*, vol. 51, no. 6, pp. 1074–1081, Dec. 2009, doi: 10.1016/J.JHEP.2009.09.012.
- [79] J. L. Petrick *et al.*, "Tobacco, alcohol use and risk of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: The Liver Cancer Pooling Project," *Br J Cancer*, vol. 118, no. 7, p. 1005, Apr. 2018, doi: 10.1038/S41416-018-0007-Z.
- [80] J. J. Yoo *et al.*, "Smoking Increases the Risk of Hepatocellular Carcinoma and Cardiovascular Disease in Patients with Metabolic-Associated Fatty Liver Disease," *Journal of Clinical Medicine* 2023, Vol. 12, Page 3336, vol. 12, no. 9, p. 3336, May 2023, doi: 10.3390/JCM12093336.
- [81] X. Li, X. Wang, and P. Gao, "Diabetes Mellitus and Risk of Hepatocellular Carcinoma," *Biomed Res Int*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/5202684.
- [82] H. J. Cordell and D. G. Clayton, "Genetic association studies," *Lancet*, vol. 366, no. 9491, pp. 1121–1131, Sep. 2005, doi: 10.1016/S0140-6736(05)67424-7.
- [83] A. T. Hattersley and M. I. McCarthy, "What makes a good genetic association study?," *Lancet*, vol. 366, no. 9493, pp. 1315–1323, Oct. 2005, doi: 10.1016/S0140-6736(05)67531-9.
- [84] A. Alqahtani, Z. Khan, A. Alloghbi, T. S. S. Ahmed, M. Ashraf, and D. M. Hammouda, "Hepatocellular Carcinoma: Molecular Mechanisms and Targeted Therapies," *Medicina (B Aires)*, vol. 55, no. 9, Sep. 2019, doi: 10.3390/MEDICINA55090526.
- [85] S. K. Yoon, "Molecular mechanism of hepatocellular carcinoma," *Hepatoma Res*, vol. 4, no. 0, p. null-null, Aug. 2018, doi: 10.20517/2394-5079.2018.23.
- [86] C. Chen and G. Wang, "Mechanisms of hepatocellular carcinoma and challenges and opportunities for molecular targeted therapy.," *World J Hepatol*, vol. 7, no. 15, pp. 1964–70, Jul. 2015, doi: 10.4254/wjh.v7.i15.1964.

- [87] P. A. Farazi and R. A. DePinho, "Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment," *Nat Rev Cancer*, vol. 6, no. 9, pp. 674–687, Sep. 2006, doi: 10.1038/NRC1934.
- [88] R. N. Aravalli, C. J. Steer, and E. N. K. Cressman, "Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma," *Hepatology*, vol. 48, no. 6, pp. 2047–2063, 2008, doi: 10.1002/HEP.22580.
- [89] C. Cha and R. P. DeMatteo, "Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development," *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, vol. 19, no. 1, pp. 25–37, 2005, doi: 10.1016/J.BPG.2004.11.005.
- [90] T. Otto and P. Sicinski, "Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy," *Nat Rev Cancer*, vol. 17, no. 2, p. 93, Jan. 2017, doi: 10.1038/NRC.2016.138.
- [91] A. A. Mercadante and A. Kasi, "Genetics, Cancer Cell Cycle Phases," *StatPearls*, Aug. 2023, Accessed: May 03, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563158/>
- [92] H. K. Matthews, C. Bertoli, and R. A. M. de Bruin, "Cell cycle control in cancer," *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2021 23:1, vol. 23, no. 1, pp. 74–88, Sep. 2021, doi: 10.1038/s41580-021-00404-3.
- [93] R. P. Fisher, "The CDK Network: Linking Cycles of Cell Division and Gene Expression," *Genes Cancer*, vol. 3, no. 11–12, p. 731, Nov. 2012, doi: 10.1177/1947601912473308.
- [94] L. A. Simmons Kovacs, D. A. Orlando, and S. B. Haase, "Transcription network and cyclin/CDKs: The yin and yang of cell cycle oscillators," *Cell Cycle*, vol. 7, no. 17, pp. 2626–2629, Sep. 2008, doi: 10.4161/CC.7.17.6515.
- [95] L. Y. Tian, D. J. Smit, and M. Jücker, "The Role of PI3K/AKT/mTOR Signaling in Hepatocellular Carcinoma Metabolism," *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 3, Feb. 2023, doi: 10.3390/IJMS24032652.

- [96] C. Porta, C. Paglino, and A. Mosca, “Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer,” *Front Oncol*, vol. 4 APR, p. 67531, Apr. 2014, doi: 10.3389/FONC.2014.00064/BIBTEX.
- [97] E. J. Sun, M. Wankell, P. Palamuthusingam, C. McFarlane, and L. Hebbard, “Targeting the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Hepatocellular Carcinoma,” *Biomedicines*, vol. 9, no. 11, Nov. 2021, doi: 10.3390/BIOMEDICINES9111639.
- [98] K. H. Khan, T. A. Yap, L. Yan, and D. Cunningham, “Targeting the PI3K-AKT-mTOR signaling network in cancer,” *Chin J Cancer*, vol. 32, no. 5, pp. 253–265, 2013, doi: 10.5732/CJC.013.10057.
- [99] C. Y. Lai *et al.*, “MicroRNA-21 Plays Multiple Oncometabolic Roles in the Process of NAFLD-Related Hepatocellular Carcinoma via PI3K/AKT, TGF- β , and STAT3 Signaling,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 5, pp. 1–31, Mar. 2021, doi: 10.3390/CANCERS13050940.
- [100] T. Liu, L. Zhang, D. Joo, and S. C. Sun, “NF- κ B signaling in inflammation,” *Signal Transduction and Targeted Therapy 2017 2:1*, vol. 2, no. 1, pp. 1–9, Jul. 2017, doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.
- [101] K. Taniguchi and M. Karin, “NF-B, inflammation, immunity and cancer: Coming of age,” *Nat Rev Immunol*, vol. 18, no. 5, pp. 309–324, May 2018, doi: 10.1038/NRI.2017.142.
- [102] Y. Xia, S. Shen, and I. M. Verma, “NF- κ B, an active player in human cancers,” *Cancer Immunol Res*, vol. 2, no. 9, p. 823, Sep. 2014, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0112.
- [103] E. Pikarsky *et al.*, “NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer,” *Nature*, vol. 431, no. 7007, pp. 461–466, Sep. 2004, doi: 10.1038/nature02924.
- [104] L. M. Coussens and Z. Werb, “Inflammation and cancer,” *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 860–867, Dec. 2002, doi: 10.1038/nature01322.

- [105] A. C. Bharti and B. B. Aggarwal, "Chemopreventive agents induce suppression of nuclear factor- κ B leading to chemosensitization," *Ann. NY Acad. Sci.*, vol. 973, pp. 392–395, 2002, doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04671.x.
- [106] M. Karin and F. R. Greten, "NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression," *Nature Reviews Immunology* 2005 5:10, vol. 5, no. 10, pp. 749–759, Sep. 2005, doi: 10.1038/nri1703.
- [107] M. Karin, Y. Cao, F. R. Greten, and Z. W. Li, "NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit," *Nature Rev. Cancer*, vol. 2, no. 4, pp. 301–310, 2002, doi: 10.1038/nrc780.
- [108] C. Peng, Y. Ouyang, N. Lu, and N. Li, "The NF- κ B Signaling Pathway, the Microbiota, and Gastrointestinal Tumorigenesis: Recent Advances," *Front Immunol*, vol. 11, p. 1387, Jun. 2020, doi: 10.3389/FIMMU.2020.01387/BIBTEX.
- [109] T. Lawrence, "The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 1, no. 6, 2009, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A001651.
- [110] H. Yu, L. Lin, Z. Zhang, H. Zhang, and H. Hu, "Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study," *Signal Transduct Target Ther*, vol. 5, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/S41392-020-00312-6.
- [111] D. R. Green and F. Llambi, "Cell death signaling," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 7, no. 12, Dec. 2015, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A006080.
- [112] M. Hassan, H. Watari, A. Abualmaaty, Y. Ohba, and N. Sakuragi, "Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer," *Biomed Res Int*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/150845.
- [113] S. Elmore, "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death," *Toxicol Pathol*, vol. 35, no. 4, pp. 495–516, 2007, doi: 10.1080/01926230701320337.
- [114] J. Lopez and S. W. G. Tait, "Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within," *Br J Cancer*, vol. 112, pp. 957–962, Mar. 2015, doi: 10.1038/BJC.2015.85.

- [115] B. A. Carneiro and W. S. El-Deiry, “Targeting apoptosis in cancer therapy,” *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 17, no. 7, pp. 395–417, Jul. 2020, doi: 10.1038/S41571-020-0341-Y.
- [116] D. Tang, R. Kang, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, and G. Kroemer, “The molecular machinery of regulated cell death,” *Cell Res*, vol. 29, no. 5, pp. 347–364, May 2019, doi: 10.1038/S41422-019-0164-5.
- [117] C. M. Pfeffer and A. T. K. Singh, “Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy,” *Int J Mol Sci*, vol. 19, no. 2, Feb. 2018, doi: 10.3390/IJMS19020448.
- [118] I. Fabregat, “Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells,” *World Journal of Gastroenterology: WJG*, vol. 15, no. 5, p. 513, Feb. 2009, doi: 10.3748/WJG.15.513.
- [119] “Apoptosis Pathway Antibodies | Rockland.” Accessed: May 09, 2024. [Online]. Available: <https://www.rockland.com/resources/apoptosis-pathway-antibodies/>
- [120] F. Akhtar and S. R. A. Bokhari, “Apoptosis,” *StatPearls*, Apr. 2023, Accessed: May 03, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499821/>
- [121] E. Kouroumalis, I. Tsomidis, and A. Voumvouraki, “Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma: The Interplay of Apoptosis and Autophagy,” *Biomedicines*, vol. 11, no. 4, Apr. 2023, doi: 10.3390/BIOMEDICINES11041166.
- [122] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: The next generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011, doi: 10.1016/J.CELL.2011.02.013.
- [123] O. Morana, W. Wood, and C. D. Gregory, “The Apoptosis Paradox in Cancer,” *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 3, Feb. 2022, doi: 10.3390/IJMS23031328.
- [124] D. Wendlocha, R. Kubina, K. Krzykowski, and A. Mielczarek-Palacz, “Selected Flavonols Targeting Cell Death Pathways in Cancer Therapy: The Latest Achievements in Research on Apoptosis, Autophagy, Necroptosis, Pyroptosis, Ferroptosis, and Cuproptosis,” *Nutrients*, vol. 16, no. 8, Apr. 2024, doi: 10.3390/NU16081201.

- [125] Y. Li, J. Zhu, Z. Yu, F. Zhai, H. Li, and X. Jin, "Regulation of apoptosis by ubiquitination in liver cancer," *Am J Cancer Res*, vol. 13, no. 10, p. 4832, 2023, Accessed: May 03, 2024. [Online]. Available: [/pmc/articles/PMC10636691/](#)
- [126] K. M. Debatin, "Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy," *Cancer Immunol Immunother*, vol. 53, no. 3, p. 153, Mar. 2004, doi: 10.1007/S00262-003-0474-8.
- [127] C. C. Wu and S. B. Bratton, "Regulation of the Intrinsic Apoptosis Pathway by Reactive Oxygen Species," *Antioxid Redox Signal*, vol. 19, no. 6, p. 546, Aug. 2013, doi: 10.1089/ARS.2012.4905.
- [128] A. Yanumula and J. K. Cusick, "Biochemistry, Extrinsic Pathway of Apoptosis," *StatPearls*, Jul. 2023, Accessed: May 03, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560811/>
- [129] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2020," *CA Cancer J Clin*, vol. 70, no. 1, pp. 7–30, Jan. 2020, doi: 10.3322/CAAC.21590.
- [130] B. Shokoohian *et al.*, "Advanced therapeutic modalities in hepatocellular carcinoma: Novel insights," *J Cell Mol Med*, vol. 25, no. 18, pp. 8602–8614, Sep. 2021, doi: 10.1111/JCMM.16875.
- [131] A. Villanueva *et al.*, "Pivotal Role of mTOR Signaling in Hepatocellular Carcinoma," *Gastroenterology*, vol. 135, no. 6, 2008, doi: 10.1053/J.GASTRO.2008.08.008.
- [132] Y. J. Yao *et al.*, "PTEN/MMAC1 mutations in hepatocellular carcinomas," *Oncogene*, vol. 18, no. 20, pp. 3181–3185, May 1999, doi: 10.1038/SJ.ONC.1202659.
- [133] J. M. Llovet *et al.*, "Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma," *New England Journal of Medicine*, vol. 359, no. 4, pp. 378–390, Jul. 2008, doi: 10.1056/NEJMOA0708857.

- [134] H. B. El-Serag, J. A. Marrero, L. Rudolph, and K. R. Reddy, “Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma,” *Gastroenterology*, vol. 134, no. 6, pp. 1752–1763, 2008, doi: 10.1053/J.GASTRO.2008.02.090.
- [135] S. C. Reghupaty and D. Sarkar, “Current Status of Gene Therapy in Hepatocellular Carcinoma,” *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 9, p. 1265, Aug. 2019, doi: 10.3390/cancers11091265.
- [136] C. Kosmidis *et al.*, “Gene Therapy for Hepatocellular Carcinoma: An Update,” *Journal of Biomedicine*, vol. 4, pp. 7–13, 2019, doi: 10.7150/JBM.29161.
- [137] L. Mohr *et al.*, “Gene therapy of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo in nude mice by adenoviral transfer of the Escherichia coli purine nucleoside phosphorylase gene,” *Hepatology*, vol. 31, no. 3, pp. 606–614, 2000, doi: 10.1002/HEP.510310310.
- [138] Z. Karjoo, V. Ganapathy, and A. Hatefi, “Gene-Directed Enzyme Prodrug Cancer Therapy,” *Gene Therapy of Cancer: Translational Approaches from Preclinical Studies to Clinical Implementation: Third Edition*, pp. 77–91, Jan. 2014, doi: 10.1016/B978-0-12-394295-1.00006-8.
- [139] O. V. Makarova-Rusher, J. Medina-Echeverz, A. G. Duffy, and T. F. Greten, “The yin and yang of evasion and immune activation in HCC,” *J Hepatol*, vol. 62, no. 6, pp. 1420–1429, Jun. 2015, doi: 10.1016/J.JHEP.2015.02.038.
- [140] Y. Fu, S. Liu, S. Zeng, and H. Shen, “From bench to bed: the tumor immune microenvironment and current immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma,” *J Exp Clin Cancer Res*, vol. 38, no. 1, Sep. 2019, doi: 10.1186/S13046-019-1396-4.
- [141] J. A. Marin-Acevedo, B. Dholaria, A. E. Soyano, K. L. Knutson, S. Chumsri, and Y. Lou, “Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges,” *J Hematol Oncol*, vol. 11, no. 1, Mar. 2018, doi: 10.1186/S13045-018-0582-8.

- [142] Y. Zhao, W. Yang, Y. Huang, R. Cui, X. Li, and B. Li, “Evolving Roles for Targeting CTLA-4 in Cancer Immunotherapy,” *Cell Physiol Biochem*, vol. 47, no. 2, pp. 721–734, Jun. 2018, doi: 10.1159/000490025.
- [143] J. Prieto, I. Melero, and B. Sangro, “Immunological landscape and immunotherapy of hepatocellular carcinoma,” *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 12, no. 12, pp. 681–700, Dec. 2015, doi: 10.1038/NRGASTRO.2015.173.
- [144] T. B. Toh, J. J. Lim, and E. K. Chow, “Epigenetics of hepatocellular carcinoma,” *Clin Transl Med*, vol. 8, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1186/S40169-019-0230-0.
- [145] S. Shukla and B. L. Tekwani, “Histone Deacetylases Inhibitors in Neurodegenerative Diseases, Neuroprotection and Neuronal Differentiation,” *Front Pharmacol*, vol. 11, Apr. 2020, doi: 10.3389/FPHAR.2020.00537.
- [146] S. Jueliger *et al.*, “Efficacy and epigenetic interactions of novel DNA hypomethylating agent guadecitabine (SGI-110) in preclinical models of hepatocellular carcinoma,” *Epigenetics*, vol. 11, no. 10, pp. 709–720, Oct. 2016, doi: 10.1080/15592294.2016.1214781.
- [147] Q. Xie *et al.*, “Epigenetic silencing of SFRP1 and SFRP5 by hepatitis B virus X protein enhances hepatoma cell tumorigenicity through Wnt signaling pathway,” *Int J Cancer*, vol. 135, no. 3, pp. 635–646, Aug. 2014, doi: 10.1002/IJC.28697.
- [148] G. Egger, G. Liang, A. Aparicio, and P. A. Jones, “Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy,” *Nature*, vol. 429, no. 6990, pp. 457–463, May 2004, doi: 10.1038/NATURE02625.
- [149] H. J. Shah *et al.*, “Current and upcoming radionuclide therapies in the direction of precision oncology: A narrative review.,” *Eur J Radiol Open*, vol. 10, p. 100477, 2023, doi: 10.1016/j.ejro.2023.100477.
- [150] K. Zakeri *et al.*, “Advancing Targeted Radionuclide Therapy Through the National Cancer Institute’s Small Business Innovation Research Pathway.,” *J Nucl Med*, vol. 60, no. 1, pp. 41–49, Jan. 2019, doi: 10.2967/jnumed.118.214684.

- [151] S. Asadian *et al.*, “ β -radiating radionuclides in cancer treatment, novel insight into promising approach,” *Pharmacol Res*, vol. 160, p. 105070, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.phrs.2020.105070.
- [152] H. Petrowsky, R. Fritsch, M. Guckenberger, M. L. De Oliveira, P. Dutkowski, and P.-A. Clavien, “Modern therapeutic approaches for the treatment of malignant liver tumours,” *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 17, no. 12, pp. 755–772, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41575-020-0314-8.
- [153] H. Jadvar, “Targeted Radionuclide Therapy: An Evolution Toward Precision Cancer Treatment,” *American Journal of Roentgenology*, vol. 209, no. 2, pp. 277–288, Aug. 2017, doi: 10.2214/AJR.17.18264.
- [154] A. X. Zhu *et al.*, “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,” *Lancet Oncol*, vol. 20, no. 2, pp. 282–296, Feb. 2019, doi: 10.1016/S1470-2045(18)30937-9.
- [155] G. K. Abou-Alfa *et al.*, “Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma,” *New England Journal of Medicine*, vol. 379, no. 1, pp. 54–63, Jul. 2018, doi: 10.1056/NEJMoa1717002.
- [156] J. Bruix *et al.*, “Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial,” *The Lancet*, vol. 389, no. 10064, pp. 56–66, Jan. 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(16)32453-9.
- [157] M. Kudo *et al.*, “Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial,” *The Lancet*, vol. 391, no. 10126, pp. 1163–1173, Mar. 2018, doi: 10.1016/S0140-6736(18)30207-1.
- [158] A.-L. Cheng *et al.*, “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,” *Lancet Oncol*, vol. 10, no. 1, pp. 25–34, Jan. 2009, doi: 10.1016/S1470-2045(08)70285-7.

- [159] J. Zhai, X. Dong, F. Yan, H. Guo, and J. Yang, "Oleandrin: A Systematic Review of its Natural Sources, Structural Properties, Detection Methods, Pharmacokinetics and Toxicology," *Front Pharmacol*, vol. 13, Feb. 2022, doi: 10.3389/FPHAR.2022.822726.
- [160] N. Kanwal *et al.*, "Oleandrin: A bioactive phytochemical and potential cancer killer via multiple cellular signaling pathways," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 143, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.fct.2020.111570.
- [161] D. Ni, T. L. Madden, M. Johansen, E. Felix, D. H. Ho, and R. A. Newman, "Murine pharmacokinetics and metabolism of oleandrin, a cytotoxic component of Nerium oleander," *J Exp Ther Oncol*, vol. 2, no. 5, pp. 278–285, Sep. 2002, doi: 10.1046/j.1359-4117.2002.01052.x.
- [162] J. Zhai, X. Dong, F. Yan, H. Guo, and J. Yang, "Oleandrin: A Systematic Review of its Natural Sources, Structural Properties, Detection Methods, Pharmacokinetics and Toxicology," *Front Pharmacol*, vol. 13, Feb. 2022, doi: 10.3389/FPHAR.2022.822726.
- [163] L. J. Rashan *et al.*, "Molecular Modes of Action of an Aqueous Nerium oleander Extract in Cancer Cells In Vitro and In Vivo," *Molecules*, vol. 28, no. 4, Feb. 2023, doi: 10.3390/molecules28041871.
- [164] A. Omid, A. T. Razavizadeh, A. R. Movassaghi, and M. R. Aslani, "Experimental oleander (Nerium oleander) intoxication in broiler chickens (Gallus gallus)," *Hum Exp Toxicol*, vol. 31, no. 8, pp. 853–858, Aug. 2012, doi: 10.1177/0960327111408150.
- [165] A. Kumar, T. De, A. Mishra, and A. Mishra, "Oleandrin: A cardiac glycosides with potent cytotoxicity," *Pharmacogn Rev*, vol. 7, no. 14, p. 131, Jul. 2013, doi: 10.4103/0973-7847.120512.
- [166] T. Farkhondeh, M. Kianmehr, T. Kazemi, S. Samarghandian, and M. R. Khazdair, "Toxicity effects of Nerium oleander, basic and clinical evidence: A comprehensive review," *Hum Exp Toxicol*, vol. 39, no. 6, pp. 773–784, Jun. 2020, doi: 10.1177/0960327120901571.

- [167] R. Sharma, S. Singh, N. Tewari, and P. Dey, “A toxic shrub turned therapeutic: The dichotomy of *Nerium oleander* bioactivities,” *Toxicon*, vol. 224, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.toxicon.2023.107047.
- [168] A. F. M. Botelho, F. Pierezan, B. Soto-Blanco, and M. M. Melo, “A review of cardiac glycosides: Structure, toxicokinetics, clinical signs, diagnosis and antineoplastic potential,” *Toxicon*, vol. 158, pp. 63–68, Feb. 2019, doi: 10.1016/J.TOXICON.2018.11.429.
- [169] X. xi Li *et al.*, “Oleandrin induces apoptosis via activating endoplasmic reticulum stress in breast cancer cells,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 124, p. 109852, Apr. 2020, doi: 10.1016/J.BIOPHA.2020.109852.
- [170] X. Li, J. Zheng, S. Chen, F. dong Meng, J. Ning, and S. lan Sun, “Oleandrin, a cardiac glycoside, induces immunogenic cell death via the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP pathway in breast cancer,” *Cell Death Dis*, vol. 12, no. 4, Apr. 2021, doi: 10.1038/S41419-021-03605-Y.
- [171] T. Yamauchi, N. Takata, and T. Mimura, “Cardiac glycosides of the leaves of *Nerium odorum*,” *Phytochemistry*, vol. 14, no. 5–6, pp. 1379–1382, 1975, doi: 10.1016/S0031-9422(00)98630-8.
- [172] L. L. Ruta, C. V. Popa, and I. C. Farcasanu, “Cytotoxicity of Oleandrin Is Mediated by Calcium Influx and by Increased Manganese Uptake in *Saccharomyces cerevisiae* Cells,” *Molecules*, vol. 25, no. 18, Sep. 2020, doi: 10.3390/MOLECULES25184259.
- [173] T. Yamauchi, F. Abe, Y. Tachibana, C. K. Atal, B. M. Sharma, and Z. Imre, “Quantitative variations in the cardiac glycosides of oleander,” *Phytochemistry*, vol. 22, no. 10, pp. 2211–2214, 1983, doi: 10.1016/S0031-9422(00)80149-1.
- [174] J. Suchard and A. Greb, “Negligible Oleandrin Content of Hot Dogs Cooked on *Nerium oleander* Skewers,” *Journal of Medical Toxicology*, vol. 17, no. 1, p. 57, Jan. 2021, doi: 10.1007/S13181-020-00805-4.

- [175] I. Dachlan, Y. W. Wirohadidjojo, M. S. H. Wahyuningsih, T. Aryandono, H. Soebono, and D. Afandy, "The effect of 5 α -oleandrin on keloid fibroblast activities," *BMC Proc*, vol. 13, no. Suppl 11, Dec. 2019, doi: 10.1186/S12919-019-0177-6.
- [176] R. A. Newman *et al.*, "Efficacy of oleandrin and PBI-05204 against bovine viruses of importance to commercial cattle health," *Antivir Chem Chemother*, vol. 30, 2022, doi: 10.1177/20402066221103960.
- [177] R. Newman and K. Jagannadha Sastry, "Antiviral effects of oleandrin," *J Am Coll Emerg Physicians Open*, vol. 2, no. 3, Jun. 2021, doi: 10.1002/EMP2.12469.
- [178] S. E. I. Adam, M. A. Al-Yahya, and A. H. Al-Farhan, "Acute toxicity of various oral doses of dried nerium oleander leaves in sheep," *American Journal of Chinese Medicine*, vol. 29, no. 3–4, pp. 525–532, 2001, doi: 10.1142/S0192415X01000551.
- [179] D. P. Bartel, "MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function," *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 281–297, Jan. 2004, doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
- [180] K. N. Ivey and D. Srivastava, "microRNAs as developmental regulators," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 7, no. 7, pp. 1–9, Jul. 2015, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A008144.
- [181] M. V. Iorio *et al.*, "MicroRNA signatures in human ovarian cancer," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 18, pp. 8699–8707, Sep. 2007, doi: 10.1158/0008-5472.can-07-1936.
- [182] K. Rogers and X. Chen, "Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs," *Plant Cell*, vol. 25, no. 7, pp. 2383–2399, Aug. 2013, doi: 10.1105/TPC.113.113159.
- [183] J. Winter, S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, and S. Diederichs, "Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation," *Nat Cell Biol*, vol. 11, no. 3, pp. 228–234, Mar. 2009, doi: 10.1038/ncb0309-228.
- [184] D. P. Bartel, "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function," *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 281–297, Jan. 2004, doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.

- [185] “Emerging role of microRNA-21 in cancer (Review).” Accessed: May 07, 2024. [Online]. Available: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/br.2016.747>
- [186] S. R. Pfeffer, C. H. Yang, and L. M. Pfeffer, “The Role of miR-21 in Cancer,” *Drug Dev Res*, vol. 76, no. 6, pp. 270–277, Sep. 2015, doi: 10.1002/DDR.21257.
- [187] J. Wang, J. Chen, and S. Sen, “MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics,” *J Cell Physiol*, vol. 231, no. 1, pp. 25–30, Jan. 2016, doi: 10.1002/JCP.25056.
- [188] J. Rhim, W. Baek, Y. Seo, and J. H. Kim, “From Molecular Mechanisms to Therapeutics: Understanding MicroRNA-21 in Cancer,” *Cells*, vol. 11, no. 18, Sep. 2022, doi: 10.3390/CELLS11182791.
- [189] D. Bautista-Sánchez *et al.*, “The Promising Role of miR-21 as a Cancer Biomarker and Its Importance in RNA-Based Therapeutics,” *Mol Ther Nucleic Acids*, vol. 20, p. 409, Jun. 2020, doi: 10.1016/J.OMTN.2020.03.003.
- [190] M. Hashemi *et al.*, “Pre-clinical and clinical importance of miR-21 in human cancers: Tumorigenesis, therapy response, delivery approaches and targeting agents,” *Pharmacol Res*, vol. 187, p. 106568, Jan. 2023, doi: 10.1016/J.PHRS.2022.106568.
- [191] D. Bautista-Sánchez *et al.*, “The Promising Role of miR-21 as a Cancer Biomarker and Its Importance in RNA-Based Therapeutics,” *Mol Ther Nucleic Acids*, vol. 20, pp. 409–420, Jun. 2020, doi: 10.1016/J.OMTN.2020.03.003.
- [192] D. Bautista-Sánchez *et al.*, “The promising role of miR-21 as a cancer biomarker and its importance in RNA-based therapeutics,” *Mol. Ther. Nucleic Acids*, vol. 20, pp. 409–420, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.omtn.2020.03.003.
- [193] S. Raniolo *et al.*, “Combined and selective miR-21 silencing and doxorubicin delivery in cancer cells using tailored DNA nanostructures,” *Cell Death & Disease* 2021 12:1, vol. 12, no. 1, pp. 1–9, Jan. 2021, doi: 10.1038/s41419-020-03339-3.

- [194] A. M. Krichevsky and G. Gabriely, “miR-21: a small multi-faceted RNA,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 13, no. 1, pp. 39–53, Jan. 2009, doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00556.x.
- [195] Y. H. Feng and C. J. Tsao, “Emerging role of microRNA-21 in cancer,” *Biomed Rep*, vol. 5, no. 4, p. 395, Oct. 2016, doi: 10.3892/BR.2016.747.
- [196] M. Sahraei *et al.*, “Suppressing miR-21 activity in tumor-associated macrophages promotes an antitumor immune response,” *J Clin Invest*, vol. 129, no. 12, pp. 5518–5536, Dec. 2019, doi: 10.1172/JCI127125.
- [197] S. Raniolo *et al.*, “Combined and selective miR-21 silencing and doxorubicin delivery in cancer cells using tailored DNA nanostructures,” *Cell Death & Disease* 2021 12:1, vol. 12, no. 1, pp. 1–9, Jan. 2021, doi: 10.1038/s41419-020-03339-3.
- [198] “Emerging role of microRNA-21 in cancer (Review).” Accessed: May 07, 2024. [Online]. Available: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/br.2016.747>
- [199] A. E. Jenike and M. K. Halushka, “miR-21: a non-specific biomarker of all maladies,” *Biomark Res*, vol. 9, no. 1, pp. 1–7, Dec. 2021, doi: 10.1186/S40364-021-00272-1/TABLES/2.
- [200] D. Bautista-Sánchez *et al.*, “The Promising Role of miR-21 as a Cancer Biomarker and Its Importance in RNA-Based Therapeutics,” *Mol Ther Nucleic Acids*, vol. 20, pp. 409–420, Jun. 2020, doi: 10.1016/J.OMTN.2020.03.003.
- [201] S. R. Pfeffer, C. H. Yang, and L. M. Pfeffer, “The Role of miR-21 in Cancer,” *Drug Dev Res*, vol. 76, no. 6, pp. 270–277, Sep. 2015, doi: 10.1002/DDR.21257.
- [202] A. A. Svoronos, D. M. Engelman, and F. J. Slack, “OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of MicroRNAs in cancer,” *Cancer Res*, vol. 76, no. 13, pp. 3666–3670, Jul. 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0359.
- [203] M. Hashemi *et al.*, “Pre-clinical and clinical importance of miR-21 in human cancers: Tumorigenesis, therapy response, delivery approaches and targeting

- agents,” *Pharmacol Res*, vol. 187, p. 106568, Jan. 2023, doi: 10.1016/J.PHRS.2022.106568.
- [204] J. Cao, Y. Zhang, J. Mu, D. Yang, X. Gu, and J. Zhang, “Exosomal miR-21-5p contributes to ovarian cancer progression by regulating CDK6,” *Hum Cell*, vol. 34, no. 4, pp. 1185–1196, Jul. 2021, doi: 10.1007/S13577-021-00522-2.
- [205] L. X. Yan *et al.*, “MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis,” *RNA*, vol. 14, no. 11, pp. 2348–60, Nov. 2008, doi: 10.1261/rna.1034808.
- [206] S. R. Pfeffer, C. H. Yang, and L. M. Pfeffer, “The Role of miR-21 in Cancer,” *Drug Dev Res*, vol. 76, no. 6, pp. 270–7, Sep. 2015, doi: 10.1002/ddr.21257.
- [207] L. H. Chi *et al.*, “MicroRNA-21 is immunosuppressive and pro-metastatic via separate mechanisms,” *Oncogenesis 2022 11:1*, vol. 11, no. 1, pp. 1–12, Jul. 2022, doi: 10.1038/s41389-022-00413-7.
- [208] Y. W. Kong, D. Ferland-McCollough, T. J. Jackson, and M. Bushell, “microRNAs in cancer management,” *Lancet Oncol*, vol. 13, no. 6, pp. e249-58, Jun. 2012, doi: 10.1016/s1470-2045(12)70073-6.
- [209] J. M. Llovet *et al.*, “Hepatocellular carcinoma,” *Nat Rev Dis Primers*, vol. 2, Apr. 2016, doi: 10.1038/NRDP.2016.18.
- [210] A. Villanueva, “Hepatocellular Carcinoma,” *New England Journal of Medicine*, vol. 380, no. 15, pp. 1450–1462, Apr. 2019, doi: 10.1056/NEJMRA1713263.
- [211] A. J. Craig, J. von Felden, T. Garcia-Lezana, S. Sarcognato, and A. Villanueva, “Tumour evolution in hepatocellular carcinoma,” *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 17, no. 3, pp. 139–152, Mar. 2020, doi: 10.1038/S41575-019-0229-4.
- [212] Y. Zhou *et al.*, “Hepatocellular carcinoma-derived exosomal miRNA-21 contributes to tumor progression by converting hepatocyte stellate cells to cancer-associated fibroblasts,” *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, vol. 37, no. 1, pp. 1–18, Dec. 2018, doi: 10.1186/S13046-018-0965-2/FIGURES/9.

- [213] Y. Tomimaru *et al.*, “Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma,” *J Hepatol*, vol. 56, no. 1, pp. 167–175, Jan. 2012, doi: 10.1016/J.JHEP.2011.04.026.
- [214] J. Qu *et al.*, “MicroRNA-21 as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis,” *Pak J Med Sci*, vol. 35, no. 5, p. 1466, Sep. 2019, doi: 10.12669/PJMS.35.5.685.
- [215] J. Shi, “Considering Exosomal miR-21 as a biomarker for Cancer,” *J Clin Med*, vol. 5, no. 4, p. 42, Apr. 2016, doi: 10.3390/jcm5040042.
- [216] L. Q. Cao, X. W. Yang, Y. Bin Chen, D. W. Zhang, X. F. Jiang, and P. Xue, “Exosomal miR-21 regulates the TETs/PTENp1/PTEN pathway to promote hepatocellular carcinoma growth,” *Mol Cancer*, vol. 18, no. 1, pp. 1–14, Oct. 2019, doi: 10.1186/S12943-019-1075-2/FIGURES/8.
- [217] T. Clark, S. Maximin, J. Meier, S. Pokharel, and P. Bhargava, “Hepatocellular Carcinoma: Review of Epidemiology, Screening, Imaging Diagnosis, Response Assessment, and Treatment,” *Curr Probl Diagn Radiol*, vol. 44, no. 6, pp. 479–486, Nov. 2015, doi: 10.1067/J.CPRADIOL.2015.04.004.
- [218] A. Forner, M. Reig, and J. Bruix, “Hepatocellular carcinoma,” *Lancet*, vol. 391, no. 10127, pp. 1301–1314, Mar. 2018, doi: 10.1016/s0140-6736(18)30010-2.
- [219] S. Chen *et al.*, “miR-21-5p Suppressed the Sensitivity of Hepatocellular Carcinoma Cells to Cisplatin by Targeting FASLG,” <https://home.liebertpub.com/dna>, vol. 38, no. 8, pp. 865–873, Aug. 2019, doi: 10.1089/DNA.2018.4529.
- [220] X. Huang, Y. Xiong, J. Yang, G. Yang, and J. Li, “The Prognostic Significance of miR-21 Expression among Surgically Resected Hepatocellular Carcinoma Patients: Evidence from a Meta-Analysis and Retrospective Cohort Study,” *Biomed Res Int*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/8848158.
- [221] Y. Hong *et al.*, “MiR-21-3p Promotes Hepatocellular Carcinoma Progression via SMAD7/YAP1 Regulation,” *Front Oncol*, vol. 11, p. 642030, Mar. 2021, doi: 10.3389/FONC.2021.642030/BIBTEX.

- [222] S. Khan *et al.*, “The Key Role of microRNAs in Initiation and Progression of Hepatocellular Carcinoma,” *Front Oncol*, vol. 12, p. 950374, Jul. 2022, doi: 10.3389/FONC.2022.950374/BIBTEX.
- [223] T. Zhang, Z. Yang, P. Kusumanchi, S. Han, and S. Liangpunsakul, “Critical Role of microRNA-21 in the Pathogenesis of Liver Diseases,” *Front Med (Lausanne)*, vol. 7, no. 7, Jan. 2020, doi: 10.3389/FMED.2020.00007.
- [224] M. Correia de Sousa *et al.*, “Mir-21 suppression promotes mouse hepatocarcinogenesis,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 19, p. 4983, Oct. 2021, doi: 10.3390/CANCERS13194983/S1.
- [225] V. A. Arzumanyan, O. I. Kiseleva, and E. V. Poverennaya, “The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise,” *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 23, Dec. 2021, doi: 10.3390/IJMS222313135/S1.
- [226] E. D. Arisan *et al.*, “Upregulated Wnt-11 and miR-21 Expression Trigger Epithelial Mesenchymal Transition in Aggressive Prostate Cancer Cells,” *Biology 2020, Vol. 9, Page 52*, vol. 9, no. 3, p. 52, Mar. 2020, doi: 10.3390/BIOLOGY9030052.
- [227] F. Meng, R. Henson, H. Wehbe-Janek, K. Ghoshal, S. T. Jacob, and T. Patel, “MicroRNA-21 Regulates Expression of the PTEN Tumor Suppressor Gene in Human Hepatocellular Cancer,” *Gastroenterology*, vol. 133, no. 2, p. 647, 2007, doi: 10.1053/J.GASTRO.2007.05.022.
- [228] Z. Liu, Z. Y. Jin, C. H. Liu, F. Xie, X. S. Lin, and Q. Huang, “MicroRNA-21 regulates biological behavior by inducing EMT in human cholangiocarcinoma,” *Int J Clin Exp Pathol*, vol. 8, no. 5, p. 4684, 2015, Accessed: May 13, 2024. [Online]. Available: /pmc/articles/PMC4503030/
- [229] J. Baulida, V. M. Díaz, and A. G. De Herreros, “Snail1: A Transcriptional Factor Controlled at Multiple Levels,” *J Clin Med*, vol. 8, no. 6, Jun. 2019, doi: 10.3390/JCM8060757.

- [230] Y. Wang, J. Shi, K. Chai, X. Ying, and B. P. Zhou, “The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis,” *Curr Cancer Drug Targets*, vol. 13, no. 9, p. 963, Mar. 2013, doi: 10.2174/15680096113136660102.
- [231] Q. Q. Zhu, C. Ma, Q. Wang, Y. Song, and T. Lv, “The role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers,” *Tumour Biol*, vol. 37, no. 1, pp. 185–197, Jan. 2016, doi: 10.1007/S13277-015-4450-7.
- [232] O. Bornachea *et al.*, “EMT and induction of miR-21 mediate metastasis development in Trp53-deficient tumours,” *Scientific Reports 2012 2:1*, vol. 2, no. 1, pp. 1–12, May 2012, doi: 10.1038/srep00434.
- [233] A. Ghosh *et al.*, “Fine-tuning miR-21 expression and inhibition of EMT in breast cancer cells using aromatic-neomycin derivatives,” *Mol Ther Nucleic Acids*, vol. 27, pp. 685–698, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.omtn.2021.12.027.
- [234] M. Han *et al.*, “Antagonism of miR-21 Reverses Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cell Phenotype through AKT/ERK1/2 Inactivation by Targeting PTEN,” *PLoS One*, vol. 7, no. 6, Jun. 2012, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0039520.
- [235] Y. S. Ko, T. Rugira, H. Jin, S. W. Park, and H. J. Kim, “Oleandrin and Its Derivative Odoroside A, Both Cardiac Glycosides, Exhibit Anticancer Effects by Inhibiting Invasion via Suppressing the STAT-3 Signaling Pathway,” *Int J Mol Sci*, vol. 19, no. 11, Nov. 2018, doi: 10.3390/IJMS19113350.
- [236] L. Pan, Y. Zhang, W. Zhao, X. Zhou, C. Wang, and F. Deng, “The cardiac glycoside oleandrin induces apoptosis in human colon cancer cells via the mitochondrial pathway,” *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 80, no. 1, pp. 91–100, Jul. 2017, doi: 10.1007/S00280-017-3337-2/FIGURES/5.
- [237] C. Eroğlu Güneş, F. Seçer Çelik, M. Seçme, L. Elmas, Y. Dodurga, and E. Kurar, “Glycoside oleandrin downregulates toll-like receptor pathway genes and associated miRNAs in human melanoma cells,” *Gene*, vol. 843, p. 146805, Nov. 2022, doi: 10.1016/J.GENE.2022.146805.

- [238] L. Yong *et al.*, “Oleandrin synergizes with cisplatin in human osteosarcoma cells by enhancing cell apoptosis through activation of the p38 MAPK signaling pathway,” *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 82, no. 6, p. 1009, Dec. 2018, doi: 10.1007/S00280-018-3692-7.
- [239] E. D. Arisan *et al.*, “MiR-21 Is Required for the Epithelial–Mesenchymal Transition in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells,” *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 4, pp. 1–22, Feb. 2021, doi: 10.3390/IJMS22041557.
- [240] E. Montalban *et al.*, “MiR-21 is an Ngf-modulated MicroRNA That supports Ngf signaling and regulates neuronal degeneration in PC12 cells,” *Neuromolecular Med*, vol. 16, no. 2, pp. 415–430, Feb. 2014, doi: 10.1007/S12017-014-8292-Z/FIGURES/7.
- [241] Y. Ma *et al.*, “Regulation of Intrinsic and Extrinsic Apoptotic Pathways in Osteosarcoma Cells Following Oleandrin Treatment,” *International Journal of Molecular Sciences 2016*, Vol. 17, Page 1950, vol. 17, no. 11, p. 1950, Nov. 2016, doi: 10.3390/IJMS17111950.
- [242] Z. Bao *et al.*, “Oleandrin induces DNA damage responses in cancer cells by suppressing the expression of Rad51,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 37, pp. 59572–59579, Jul. 2016, doi: 10.18632/ONCOTARGET.10726.
- [243] L. Pan, Y. Zhang, W. Zhao, X. Zhou, C. Wang, and F. Deng, “The cardiac glycoside oleandrin induces apoptosis in human colon cancer cells via the mitochondrial pathway,” *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 80, no. 1, pp. 91–100, Jul. 2017, doi: 10.1007/s00280-017-3337-2.
- [244] Y. Sreenivasan, A. Sarkar, and S. K. Manna, “Oleandrin suppresses activation of nuclear transcription factor- κ B and activator protein-1 and potentiates apoptosis induced by ceramide,” *Biochem Pharmacol*, vol. 66, no. 11, pp. 2223–2239, Dec. 2003, doi: 10.1016/j.bcp.2003.07.010.
- [245] X. H. Mao, M. Chen, Y. Wang, P. G. Cui, S. B. Liu, and Z. Y. Xu, “MicroRNA-21 regulates the ERK/NF- κ B signaling pathway to affect the proliferation, migration, and apoptosis of human melanoma A375 cells by targeting SPRY1, PDCD4, and

- PTEN,” *Mol Carcinog*, vol. 56, no. 3, pp. 886–894, Mar. 2017, doi: 10.1002/MC.22542.
- [246] X. H. Mao, M. Chen, Y. Wang, P. G. Cui, S. B. Liu, and Z. Y. Xu, “MicroRNA-21 regulates the ERK/NF- κ B signaling pathway to affect the proliferation, migration, and apoptosis of human melanoma A375 cells by targeting SPRY1, PDCD4, and PTEN,” *Mol Carcinog*, vol. 56, no. 3, pp. 886–894, Mar. 2017, doi: 10.1002/MC.22542.
- [247] V. Y. Shin *et al.*, “NF- κ B targets miR-16 and miR-21 in gastric cancer: involvement of prostaglandin E receptors,” *Carcinogenesis*, vol. 32, no. 2, pp. 240–245, Feb. 2011, doi: 10.1093/CARCIN/BGQ240.
- [248] “Oleandrin Suppresses Activation of Nuclear Transcription Factor- κ B, Activator Protein-1, and c-Jun NH2-Terminal Kinase1 | Cancer Research | American Association for Cancer Research.” Accessed: May 13, 2024. [Online]. Available: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/60/14/3838/506451/Oleandrin-Suppresses-Activation-of-Nuclear>
- [249] Q. Yang *et al.*, “Cardiac glycosides inhibit TNF- α /NF- κ B signaling by blocking recruitment of TNF receptor-associated death domain to the TNF receptor,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, no. 27, p. 9631, Jul. 2005, doi: 10.1073/PNAS.0504097102.
- [250] Z. Wang, H. Zhou, F. Cheng, Z. Zhang, and S. Long, “miR-21 Negatively Regulates the PTEN-PI3K-Akt-mTOR Signaling Pathway in Crohn’s Disease by Altering Immune Tolerance and Epithelial-Mesenchymal Transition,” *Discov Med*, vol. 33, no. 170, pp. 153–166, Aug. 2022.
- [251] N. Raviprakash and S. K. Manna, “Short-term exposure to oleandrin enhances responses to IL-8 by increasing cell surface IL-8 receptors,” *Br J Pharmacol*, vol. 171, no. 14, p. 3339, 2014, doi: 10.1111/BPH.12493.
- [252] J. K. Chan *et al.*, “The inhibition of miR-21 promotes apoptosis and chemosensitivity in ovarian cancer,” *Gynecol Oncol*, vol. 132, no. 3, pp. 739–744, Mar. 2014, doi: 10.1016/J.YGYNO.2014.01.034.

- [253] D. Zhao *et al.*, “In Vivo Monitoring of Angiogenesis Inhibition via Down-Regulation of Mir-21 in a VEGFR2-Luc Murine Breast Cancer Model Using Bioluminescent Imaging,” *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e71472, Aug. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0071472.
- [254] B. Xu, H. Xia, J. Cao, Z. Wang, Y. Yang, and Y. Lin, “MicroRNA-21 Inhibits the Apoptosis of Osteosarcoma Cell Line SAOS-2 via Targeting Caspase 8,” *Oncol Res*, vol. 25, no. 7, p. 1161, 2017, doi: 10.3727/096504017X14841698396829.
- [255] L. Shi, J. Chen, J. Yang, T. Pan, S. Zhang, and Z. Wang, “MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity,” *Brain Res*, vol. 1352, pp. 255–264, Sep. 2010, doi: 10.1016/J.BRAINRES.2010.07.009.

EKLER

5.1.1 Ek A: Çalışma Süresince Kullanılan Cihazlar

Tablo 3 Kullanılan Cihazların Listesi

ÜRÜN ADI	ÜRÜN KODU	FİRMANIN ADI
Buz Makinası	AF80	Scotsman
CO2 inkübatörü	50116047	Thermo Fsiher 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
Mikrodalga Fırın	MD 595	Arçelik
Mikropipetler 10 µl, 200 µl, 1000 µl		CAPP
Mikroplaka Okuyucu	iMark	BioRad
Mini Santrifüj Cihazı	CR-1512	CAPP
Mini Spin Cihazı	Fisherbrand 15358266	ThermoFisher Scientific
Optik Mikroskop	TH4-200	Olympus

PCR Kapakları, Stripler	AB-0783	Thermo Scientific
Saf Su Cihazı	Direct-Q 5UV	Labor Teknik
Santrifüj	NF 200	Nüve
Spektrofotometre	IMPLEN NanoPhotometer	BO-GA
Termal Döngüleyici	MyCycler Thermal Cycler	BioRad
Kemilüminesans Görüntüleme Cihazı	ChemiDoc MP System 1708280	BioRad

5.1.2 Ek B: Çalışma Süresince Hücre Kültüründe Kullanılan Materyaller

Tablo 4 Hücre Kültüründe Kullanılan Materyaller

ÜRÜN ADI	ÜRÜN KODU	FİRMANIN ADI
HEPG2	HB-8065	ATCC
75 cm ² Hücre Büyütme Kapları	90076	TPP
96 Kuyucuklu Hücre Kabı	92096	TPP
Kriyojenik Şişe	607001	NEST
15 ml Santrifüj Tüpleri	5100015	CAPP
50 ml Santrifüj Tüpleri	430828	CORNING
DMEM	P04-03590	PAN Biotech
Fetal Sığır Serumı Gelişmiş(FBS)	FBS-11A	Capricorn Scientific
Penisilin/Streptomisin	P06-07100	PAN Biotech
Oleandrin	PBI-05204	MedChemExpress
Transfeksiyon Ajanı	15081	İntron Biotechnology
Trypsin-EDTA (0.25%) (1X)	SH40003.01	HyClone
25 cm ² Hücre Büyütme Kapları	90026	TPP
75 cm ² Hücre Büyütme Kapları	90076	TPP
60 mm Hücre Büyütme Kapları	93060	TPP
100 mm Hücre Büyütme Kaplari	704001	NEST
15 ml Santrifüj Tüpleri	5100015	CAPP

50 ml Santrifüj Tüpleri	430828	CORNING
DMEM	P04-03590	PAN Biotech
miR-21 plazmit	21114	Addgene

5.1.3 Ek C: Çalışma Süresince Kullanılan Kimyasallar

Tablo 5 Kullanılan Kimyasalların Listesi.

ÜRÜN ADI	ÜRÜN KODU	FIRMANIN ADI
Agaroz(Tip 1)	121853	MERCK
DEPC	A0881	AppliChem
DMSO	D1370	Duchefa Biochemie
1 kb DNA Ladder	GeneRuler SM0311	Thermo Scientific
DNA Jel Yükleme Boyası (6X)	R0611	Thermo Scientific
DPBS (10x)	P04-53500	PAN Biotech
Etanol	TK.200650	Teksoll
iScript cDNA Sentez Kit	1708891	BioRad
2-Propanol (İzopropanol)	1096342500	MERCK
miRNeasy Mini Kit	217004	Qiagen
miScript II RT Kit	218161	Qiagen
miScript SYBR Green PCR Kit	218073	Qiagen
Kloroform	1024452500	MERCK
PureZOL RNA İzolasyon Ajanı	7326890	BioRad
Saf Etanol	920.026	ISOLAB
Sybr Safe	MG-SSGD-01-1000	Hibrigen
Akrilamid/Bis- Akrilamid (%30 çözelti, 37.5:1)	A0011	BIOBASIC
APS	A2941	AppliChem
Asetik Asit	901.013	ISOLAB

Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution	1610436	BioRad
Glisin	1275KG001	BIOFROXX
Hidrojen Peroksit %35	1086001000	MERCK
iScript cDNA Sentez Kit	1708891	BioRad
Metanol	34860	Honeywell
miRNeasy Mini Kit	217004	Qiagen
miScript II RT Kit	218161	Qiagen
miScript SYBR Green PCR Kit	218073	Qiagen
Kloroform	1024452500	MERCK
Kristal Viyole	FN1048735	MERCK
Luminol	A2185	AppliChem
M-PER Memeli Protein Ekstraksiyon Reaktifi	78505	ThermoFisher Scientific
p-Kumarik Asit	C9008-1G	Sigma-Aldrich
Ponceau S Solüsyonu	A2935	Applchem
Proteaz İnhibitör Kokteyli	87786	ThermoFisher Scientific
Proteaz İnhibitör Tablet (EDTA içermez)	A32955	ThermoFisher Scientific
Protein Marker	PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 26619	Thermo Scientific
SDS	1177GR100	BIOFROXX
TEMED	8027ML100	BIOFROXX
Tris Hidroklorür	648317	CALBIOCHEM
Tween-20	A600560-0500	Sangon Biotech
Yağsız Süt Tozu	1172KG001	BIOFROXX

5.1.4 Ek D: Çalışma Süresince Kullanılan Çözeltiler

Amonyum Persülfat (%10): 1 g tartılan APS 10 ml distile su ile çözündürülür. Hazırlanan çözelti -20°C’de saklanır.

Bloklama sütü (%5): 50 ml olarak hazırlanan bloklama sütü için 2,5 g tartılan yağsız süt tozu TBS-T (TBS Tween20) ile tamamlanarak karıştırıcı yardımı ile çözülür.

Bradford Reaktifi: Ana stok 100 mg Coomassie Brilliant Blue (G-250) boyası, %95’lik etanolden 50 ml, %85’lik fosforik asitten 100 ml, 1000 ml distile su içerisinde çözünür. Tamamen çözünen ana stok 0,22 µm por çapına sahip filtreler yardımı ile süzülür ve alüminyum folyo ile kaplanarak +4°C’de saklanır.

Etanol (%70): 500 ml olarak hazırlanan çözeltide 350 ml saf etanol 150 distile su ile dilüe edilerek kullanılır.

Hücre Besiyeri: DMEM besiyeri (500 ml) içerisine 0,22 µm por çapına sahip filtreden geçirilerek kullanılan %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 Penisilin/Streptomisin eklenerek hazırlanır. Kullanıma hazır olarak 50 ml santrifüj tüpler içerisinde +4°C’de saklanır.

Hücre Dondurma Medyası (Freezing Media): 9 ml fetal sığır serumuna (FBS) ve 1 ml dimetil sülfoksit (DMSO) içeren hücre dondurma medyası 0,22 µm por çapına sahip filtre ile süzülerek hazırlanır ve medya 20°C’de saklanır.

Kemilüminesans Membran Görüntüleme Çözeltisi: Görüntüleme için A ve B olmak üzere iki çözelti hazırlanır. A çözeltisi, 9 ml distile suya 1 ml 1M Tris-HCl pH=8,5 ardından 50 µl Kumarik asit ve 200 µl Luminol eklenerek hazırlanır. B çözeltisinde ise 9 ml distile suya 1 ml 1M Tris-HCl pH=8,5 ardından 10 µl Hidrojen Peroksit eklenerek hazırlanır.

Kristal Viyole: Kristal viyole 0,05 gr tartılarak 2,5 ml %100 metanol içerisine eklenir ve distile su eklenerek solüsyon 10 ml’e tamamlanır.

Kumarik Asit: 0,15 g tartılan Kumarik asit 10 ml etanol ile çözündürülür ve +4°C’de saklanır.

Laemmli (5X) Tamponu: 10 ml olarak hazırlanacak Laemmli yükleme tamponu; 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 gr SDS içermektedir. Hazırlandıktan sonra -20°C’de saklanır.

Luminol: 0,44 g tartılan Luminol 10 ml dimetilsülfoksit (DMSO) ile çözündürülür ve -20°C’de alüminyum ile sarılarak saklanır.

Mild Strip Tamponu: 1L için tartılan 15 g Glisin ve 1 g SDS ile 10 ml Tween 20, 800 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı kullanarak çözündürülür ve pH’ı 2,2 olarak ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml’e tamamlanarak hazırlanır.

Memeli Hücre Lizis Tamponu (CLB): 10 ml M-PER memeli protein ekstraksiyon reaktifi içerisine 1X dilüe edilerek eklenen proteaz inhibitör kokteyli ile hazırlanan hücre lizis tamponu +4°C’de saklanır.

p-CLB: 10 mL M-PERTM Memeli protein ekstraksiyon solüsyonuna 1 tablet Roche PhosTOP fosfataz inhibitor kokteyli ve Roche Proteaz inhibitor (PI) kokteyli eklenir. Eppendorflara 1 er mL olacak şekilde aliquatlama yapılır. Hazırlanan CLB +4 °C’de muhafaza edilir.

SDS (%10): 1 g tartılan SDS 10 ml distile su içerisinde çözünerek hazırlanır.

10X TBS: 5,6 g Tris-baz, 88 g NaCl ve 24 g Tris-HCl 900 ml’de manyetik karıştırıcı kullanılarak çözülür. 5M HCl ve 5M NaOH yardımı ile pH=7,6 olarak ayarlanır ve çözelti 1000 ml’ye tamamlanarak hazırlanır. Ana stok olarak hazırlanan 10X TBS, distile su ile 1X TBS’e çevrilir.

1X TBS-T: 10X TBS’ten çevrilen 1X TBS’e Tween 20 eklenerek hazırlanır.

Transfer Tamponu (10X): 10X ana stok transfer çözeltisinden 1l hazırlamak için 30,3 g Tris-Baz, 144 g Glisin tartılır ve önce 800 ml distile su ile manyetik karıştırıcı kullanılarak çözülür. 8 ila 9 pH aralığında ayarlandıktan sonra 1000 ml’ye tamamlanır. 1X’e çevirirken 100 ml transfer tamponuna 700 ml distile eklendikten sonra 200 ml metanol eklenerek 1000 ml’ye tamamlanır.

Yürütme tamponu (10X): 1L 10X ana stok hazırlanması için 30,3 g Tris Baz, 144 g Glisin ve 10 g Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) tartılır ve önce 800 ml distile su ile çözülür. 8 ila 9

pH aralığında ayarlandıktan sonra 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlanan ana stok, distile su ile 1X'e çevrilerek kullanılır.

5.1.5 Ek E: Çalışma Süresince Kullanılan Antikor,miRNA ve Plazmidler

IKK α , IKK β , Phospho-IKK α/β , NF- κ B p65, c-REL, RELB, NF- κ B p100/p52, β -Catenin, c-Myc, Ikb α , Histon H3, GAPDH, PI3K p85, PI3K p110 α , PTEN, p-PTEN, p-GSK-3 β , mTOR, p-mTOR, PARP, Caspase 3, Caspase 9, Caspase 8, Bcl-2 antibodyleri Cell Signaling Technology (CST)' den alınmıştır. Her primer ve sekonder 1:1000-1:3000 aralığında çalışılmıştır. miR-21 plazmidi (Addgene #21114) kullanılmıştır.