

**T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ-TOKSİKOLOJİSİ ANA BİLİM DALI**



**İNSAN HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA HÜCRELERİNE  
(HepG2) FARKLI PH ORTAMLARINDA UYGULANAN  
SORAFENİBİN ANTİKANSER ETKİNLİĞİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Doktora Tezi

**Sedat GÖKMEN**

Danışman

**Doç. Dr. Dilek GÜVENÇ**

Bu tez çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (OMÜBAP) Koordinasyon Birimi tarafından PYO.VET.1904.20.007 proje numarası ile desteklenmiştir.

**SAMSUN**  
2021

## TEZ KABUL VE ONAYI

Sedat GÖKMEN tarafından, Doç. Dr. Dilek GÜVENÇ danışmanlığında hazırlanan “İnsan Hepatosellüler Karsinoma Hücrelerine (HepG2) Farklı pH Ortamlarında Uygulanan Sorafenibin Antikanser Etkinliğinin Değerlendirilmesi” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 9.7.2021 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy çokluğu ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
<b>Başkan</b>	Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ Ankara Üniversitesi Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
	Doç. Dr. Dilek GÜVENÇ Ondokuz Mayıs Üniversitesi (Danışman) Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
<b>Üye</b>	Prof. Dr. Abdurrahman AKSOY Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi ve Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
<b>Üye</b>	Doç. Dr. Ebru YILDIRIM Kırıkkale Üniversitesi Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
<b>Üye</b>	Dr. Öğr. Üyesi Emre ÖZAN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veterinerlik Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY

... / ... / ...

Prof. Dr. Ali BOLAT  
Enstitü Müdürü

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım yüksek lisans/doktora/sanatta yeterlik tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

İmza  
... / ... / 20...  
Sedat GÖKMEN

## TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

**Tez Başlığı:** İnsan Hepatosellüler Karsinoma Hücrelerine (HepG2) Farklı pH Ortamlarında Uygulanan Sorafenibin Antikanser Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 10 Haziran 2021 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 6

Tek kaynak oranı : % 1 çıkmıştır.

İmza  
... / ... / 20...  
Doç. Dr. Dilek GÜVENÇ

## ÖZET

### İNSAN HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA HÜCRELERİNE (HepG2) FARKLI pH ORTAMLARINDA UYGULANAN SORAFENİBİN ANTİKANSER ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Sedat GÖKMEN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Veterinerlik Farmakoloji-Toksikolojisi Ana Bilim Dalı

Doktora, Haziran/2021

Danışman: Doç. Dr. Dilek GÜVENÇ

Hepatosellüler karsinoma (HCC) karaciğer tümörleri arasında en yaygın karşılaşılan türdür. HCC dünyada kanser nedeni ölümlerin üçüncü sırasında yer almaktadır. İleri seviye HCC tedavisinin ilk basamağını FDA tarafından onaylanmış antianjiyojenik ve antiproliferatif özellikler gösteren çoklu kinaz inhibitörü olan sorafenib oluşturmaktadır. Kanser hücrelerinin mikroçevresinin pH değeri Warburg Etkisinden dolayı asidik karakter (6.6-6.9 pH) göstermektedir. Asidik mikroçevre kanser hücrelerinin başta hücre canlılığını olmak üzere proliferasyon, invazyon, metastaz ve kemoterapötiklere karşı direnç oluşturma yeteneğini arttırmaktadır. Bu tez çalışmasında farklı pH ortamlarında sorafenibin *in vitro* sitotoksik ve proliferasyon üzerindeki inhibe edici etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 6.6, 6.8, 7.2, 7.6 ve 7.8 pH değerindeki medyumla hazırlanan sorafenibin insan hepatosellüler karsinoma (HepG2) hücrelerine IC<sub>50</sub>, IC<sub>50/5</sub>, IC<sub>50/10</sub> ve IC<sub>50/20</sub> konsantrasyonları 24, 48 ve 72 saat uygulanmıştır. Hücre canlılığı belirlenen konsantrasyon ve sürelerde WST-8 sitotoksikite testi kullanılarak mikropilaya okuyuculu spektrofotometrede değerlendirilmiştir. Proliferasyon testi ilacın IC<sub>50/20</sub> konsantrasyonu ve 24 saatlik maruziyet periyodunda canlı hücre analiz ve görüntüleme sistemi ile analiz edilmiştir. Sorafenibin WST-8 sitotoksikite testine göre 24 saatlik IC<sub>50</sub> konsantrasyonu 13.40 µM olarak belirlenmiştir. İlacın 24 saat maruziyet periyodu sonrasında tüm konsantrasyonları için HepG2 hücrelerinde en güçlü sitotoksik etkisini pH 7.6 değerinde (IC<sub>50</sub>; %19.76±0.61, IC<sub>50/5</sub>; %20.90±1.39, IC<sub>50/10</sub>; %26.10±1.65 ve IC<sub>50/20</sub>; %31.35±1.86) gösterdiği saptanmıştır (p<0.05). İlacın en düşük konsantrasyonda, pH 7.6' daki güçlü sitotoksik etkisi 48 saat maruziyet periyodu uygulamasında da (IC<sub>50/20</sub>; %66.28±1.39) devam ettiği belirlenmiştir. Sorafenibin en düşük iki (IC<sub>50/10</sub> ve IC<sub>50/20</sub>) konsantrasyonun 72 saat maruziyet periyodu sonrasında güçlü sitotoksik etkisini (IC<sub>50/10</sub>; %51.56±1.98, IC<sub>50/20</sub>; %61.09±1.13) pH 7.8 grubunda meydana getirdiği tespit edilmiştir. Proliferasyon testi sonucunda 7.6 pH değerinde hazırlanan sorafenibin hem kontrol grubu hem de 7.2 ve 6.6 pH değerinde hazırlanan sorafenibe göre proliferasyonu istatistiksel olarak anlamlı derece azalttığı (15.84±0.53) belirlenmiştir (p<0.001). Sonuç olarak alkali mikroçevrenin sorafenibin sitotoksik ve antiproliferatif etkisini arttırdığı belirlenmiştir. Sorafenib kullanan ileri seviye HCC' li hastaların sistemik ya da lokal alkalileştiriciler kullanması ilacın etkinliğini arttırabileceği düşünülmüştür.

**Anahtar Sözcükler:** Sorafenib, HepG2, Warburg Etkisi, sitotoksikite, proliferasyon

## ABSTRACT

### EVALUATION OF THE ANTICARCINOGENIC EFFECT OF SORAFENIB ON HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS (HepG2) IN DIFFERENT pH ENVIRONMENTS

Sedat GÖKMEN

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Veterinary Pharmacology and Toxicology

Master, June/2021

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Dilek GÜVENÇ

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common hepatic tumor. It is the third among tumors to cause cancer related deaths worldwide. First step of advanced stage HCC treatment is sorafenib, which is an FDA approved multiple kinase inhibitor with antiangiogenic and antiproliferative properties. The microenvironment of cancer cells is acidic (6.6-6.9 pH) due to the Warburg effect. This acidic environment primarily promote cell viability as well as proliferation, invasiveness, metastasis and chemotherapeutic resistance. The aim of this thesis is to determine the cytotoxicity of sorafenib and its inhibitory effect on proliferation in different pH levels *in vitro*. For this purpose,  $IC_{50}$ ,  $IC_{50/5}$ ,  $IC_{50/10}$ ,  $IC_{50/20}$  concentrations of sorafenib were applied to hepatocellular carcinoma (HepG2) cells for 24, 48 and 72 hours in 6.6, 6.8, 7.2, 7.6, and 7.8 mediums. Cell viability was evaluated with WST-8 cytotoxicity test using a spectrophotometer with microplate reader for each concentration and duration. The proliferation test was evaluated with live cell analysis and imaging system at  $IC_{50/20}$  concentration and 24-hour exposure duration. According to the WST-8 cytotoxicity test, the  $IC_{50}$  concentration of sorafenib at 24-hour exposure was found as 13.40  $\mu$ M. The most powerful cytotoxic effect of the drug on HepG cells at pH 7.6 ( $IC_{50}$ ; 19.76  $\pm$  0.61%,  $IC_{50/5}$ ; 20.90  $\pm$  1.39,  $IC_{50/10}$ ; 26.10  $\pm$  1.65,  $IC_{50/20}$ ; 31.35  $\pm$  1.86%) was at the 24 hour exposure period ( $p < 0.05$ ). The strong cytotoxic effect of the drug at its lowest concentration carried on to the 48 hour exposure ( $IC_{50/20}$ ; 66.28  $\pm$  1.39%) at pH 7.6. The most cytotoxic effect of sorafenib's two lowest dosages ( $IC_{50/10}$ ; 51.56  $\pm$  1.98%,  $IC_{50/20}$ ; 61.09  $\pm$  1.13%) were seen at the pH 7.8 group. According to the proliferation test, the sorafenib prepared at pH 7.6 had statistically significant decrease (15.84  $\pm$  0.53,  $p < 0.001$ ) in proliferation when compared to control, and sorafenib prepared at pH 7.2 and 6.6. As a result an alkaline microenvironment increases the cytotoxic and antiproliferative effects of sorafenib. It may be possible to increase the effectiveness of sorafenib with local alkalizing agents in patients with advanced stage HCC.

**Keywords:** Sorafenib, HepG2, Warburg Effect, cytotoxicity, proliferation

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince ve tez çalışmam boyunca bilgi, deneyim ve hoşgörüsünü eksik etmeyen ve her türlü yardımını esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Dilek GÜVENÇ' e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım. Bilimsel olarak her türlü destek veren Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine teşekkürlerimi sunarım. Tezime olan katkılarından dolayı tez izleme komitemde yer alan Dr. Öğr. Üyesi Emre ÖZAN' a en içten teşekkür ederim. Deneysel çalışmalarım sırasında bilgi, tecrübe ve yardımını esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalının değerli öğretim üyesi Prof. Dr. Tolga GÜVENÇ' e, Araş. Gör. Nilüfer KURUCA' ya ve doktora öğrencisi Muhammed Taha KAYA' ya teşekkür ederim. Tezimin her aşamasında beni destekleyen değerli eşim Zeynep GÖKMEN' e, minik destekçim kızım Melike GÖKMEN' e ve beni bugünlere getiren anneme ve babama sonsuz destek ve anlayışlarından dolayı teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını PYO.VET.1904.20.007 no' lu proje ile destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (OMÜBAP) Koordinasyon Birimi' ne teşekkür ederim.

Sedat GÖKMEN

## İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI .....	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT .....	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
TABLolar DİZİNİ .....	xii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Kanser.....	3
2.1.1. Karaciğer ve Karaciğer Kanseri.....	3
2.1.2. Karaciğer Kanser Türleri .....	4
2.1.3. Hepatosellüler Karsinom .....	5
2.1.4. HCC ve Tirozin Kinazlar.....	7
2.1.5. HCC' nin Tedavisi.....	9
2.2. Sorafenib.....	11
2.2.1. Sorafenibin Genel Özellikleri .....	11
2.2.2. Sorafenibin Farmakokinetik Özellikleri .....	12
2.2.3. Sorafenibin Farmakodinamik Özellikleri .....	13
2.2.4. Sorafenibin Kullanım Alanı ve Dozu .....	16
2.2.5. Sorafenibin Yan ve İstenmeyen Etkileri.....	17
2.3. Kanserın Metabolik Özellikleri .....	17
2.3.1. Enerji Metabolizması ve Warburg Etkisi .....	17
2.3.2. Asidik Mikroçevre .....	21
2.4. Hücre Kültürü.....	29
2.4.1. HepG2 (İnsan Hepatosellüler Karsinoma) Hücre Hattının Genel Özellikleri .....	30
2.4.2. Hücre Canlılık Testleri .....	31
2.4.3. Hücre Canlılık Testlerinin Sınıflandırılması .....	31
2.4.4. WST-8 Sitotoksosite Testi.....	32

<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>34</b>
3.1. Materyal.....	34
3.1.1. Kullanılan Hücre Hattı.....	34
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	34
3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	35
3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	36
3.2. Yöntem .....	36
3.2.1. Hücre Kültürü .....	36
3.2.2. Sorafenibin Sitotoksitesinin Belirlenmesi .....	42
3.2.3. Farklı pH' larda Medyum Hazırlanması.....	43
3.2.4. Deney Grupları ve İlaç Maruziyeti.....	44
3.2.5. Hücre Sitototoksisite Testi.....	46
3.2.6. Hücre Proliferasyon Testi .....	48
3.2.7. İstatistiksel Hesaplamalar .....	51
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>52</b>
4.1. Sorafenibin IC <sub>50</sub> Değeri.....	52
4.2. Sorafenibin Farklı pH Gruplarının Doza ve Zamana Göre Hücre Canlılığına Etkisi .....	52
4.2.1. Sorafenibin pH 6.6' daki Farklı Dozlarının Hücre Canlılığına Etkisi .....	52
4.2.2. Sorafenibin pH 6.8' deki Farklı Dozlarının Hücre Canlılığına Etkisi .....	54
4.2.3. Sorafenibin pH 7.2' deki Farklı Dozlarının Hücre Canlılığına Etkisi .....	56
4.2.4. Sorafenibin pH 7.6' daki Farklı Dozlarının Hücre Canlılığına Etkisi .....	57
4.2.5. Sorafenibin pH 7.8' deki Farklı Dozlarının Hücre Canlılığına Etkisi .....	58
4.2.6. Sorafenibin 24 Saatlik Maruziyetine pH Etkisinin Karşılaştırılması .....	60
4.2.7. Sorafenibin 48 Saatlik Maruziyetine pH Etkisinin Karşılaştırılması .....	62
4.2.8. Sorafenibin 72 Saatlik Maruziyetine pH Etkisinin Karşılaştırılması .....	64
4.3. Hücre Proliferasyon Testi.....	66
<b>5. SONUÇ .....</b>	<b>82</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>83</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### SİMGELER

mL	: Mililitre
$\mu$ L	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
$\mu$ M	: Mikromolar
mg	: Miligram
$\mu$ g	: Mikrogram
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat

### KISALTMALAR

ATP	: Adenozin 3-Trifosfat
ATTC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
BCLC	: Barselona Kliniği Karaciğer Kanseri Sınıflandırması
CA	: Karbonik Anhidraz
CaCO <sub>3</sub>	: Kalsiyum Karbonat
CLIP	: Karaciğer Kanseri İtalyan Programı
CIK	: Sitokinle Uyarılmış Katil Hücreler
CO <sub>2</sub>	: Karbondioksit
CYP 450	: Sitokrom P450
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetat
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
ERK	: Ekstraselüler Sinyal Regüle Edici Kinaz
FBS	: Fötal Buzağı Serumumu
FDA	: Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
H <sup>+</sup>	: Hidrojen
HBC	: Hepatit C Virüsü
HBV	: Hepatit B Virüsü
HCC	: Hepatosellüler Karsinom
HCl	: Hidroklorik Asit
HCV	: Hepatit C Virüsü
Hep3B	: İnsan Hepatosellüler Karsinom Hücresi
HepaRG	: İnsan Hepatosellüler Karsinom Hücresi
HepG2	: İnsan Hepatosellüler Karsinom Hücresi
HIF	: Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör
HuH7	: İnsan Hepatosellüler Karsinom Hücresi
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IC <sub>50</sub>	: İnhibitör Konsantrasyon 50
IL	: İnterlöykin
MAP	: Mitojenaktif Edilmiş Protein Kinaz
MCT	: Monokarboksilat Taşıyıcısı
MDR	: Çoklu İlaç Direnci
MEM	: Minimum Essential Medium
MMP	: Matriks Metallo Proteinaz
MRI	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MRS	: Manyetik Rezonans Spektroskopisi
mTOR	: Memeli Hedefi Rapamisinini

NADPH <sup>+</sup>	:Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NaHCO <sub>3</sub>	: Sodyum Bikarbonat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NEAA	: Non Esansiyal Aminoasit
NK	: Doğal Öldürücü Hücreler
NRTK	: Reseptör Olmayan Tirozin Kinaz
O <sub>2</sub>	: Oksijen
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
pGP	: P-glikoprotein
PI3K	: Fosfatidilinozid 3-Kinaz
Ras	: Sıçan Sarkomu
Raf	: Serin/Treonin Kinaza Özgü Protein Kinaz
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
TAKE	: Transarteryel Kemoembolizasyon
TNF- $\alpha$	: Tümör Nekroz Faktörü-alfa
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
V-ATPaz	: Vakuoler ATPaz
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
WST-8	:(2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu)

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Sorafenibin kimyasal yapısı .....	11
Şekil 2.2.	Sorafenibin etki mekanizması .....	14
Şekil 2.3.	Sorafenib tarafından hedeflenen büyüme faktörü reseptörü ve tirozin kinazlar .....	14
Şekil 2.4.	Sorafenib tarafından hedeflenen sinyal yolları.....	15
Şekil 2.5.	Hücresel düzeyde glikoz metabolizması.....	19
Şekil 2.6.	Farklılaşan doku çoğalan doku ve tümör hücrelerinde oksidatif fosforilasyon, anaerobik glikoliz ve aerobik glikolizin (Warburg etkisi) şematik gösterim .....	20
Şekil 2.7.	Hipoksik ve asidik kanser hücrelerinde pH düzenleyicileri.....	22
Şekil 2.8.	Normal ve kanserli dokuların mikroçevresininin pH değeri .....	24
Şekil 2.9.	HepG2 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü.....	30
Şekil 2.10.	WST-8 tetrazolyum tuzunun canlı hücreler tarafından turuncu renkli formazana dönüştürülmesi .....	33
Şekil 3.1.	Hücrelerin subkültüre edilmesi .....	39
Şekil 3.2.	HepG2 hücre hattının çoğaltılması.....	39
Şekil 3.3.	HepG2 hücrelerinin invert mikroskopta görüntüsü.....	40
Şekil 3.4.	Canlı hücre sayımı için hazırlık .....	40
Şekil 3.5.	Otomatik hücre sayım cihazında tripan mavisini test yöntemiyle canlı hücre sayımı .....	42
Şekil 3.6.	Farklı pH değerlerinde medyumların hazırlanması ve steril hale getirilmesi .....	43
Şekil 3.7.	Farklı pH değerlerinde hazırlanan farklı konsantrasyondaki sorafenibin hücrelere uygulanması.....	46
Şekil 3.8.	Deney gruplarında bulunan hücrelere ilaç maruziyeti uygulaması.....	46
Şekil 3.9.	Sorafenib uygulanan HepG2 hücrelerinin WST-8 testi görüntüsü .....	48
Şekil 3.10.	WST-8 yönteminde mikropilaka okuyucu spektrofotometrede absorbans değeri ölçümü.....	48
Şekil 3.11.	Juli BR cihazıyla eş zamanlı canlı hücre görüntülemesi.....	49
Şekil 3.12.	pH 7.6 değerinde bulunan IC <sub>50/20</sub> konsantrasyondaki sorafenibin HepG2 hücrelerinde proliferasyon eğrisi.....	50
Şekil 3.13.	pH 7.2 değerinde bulunan HepG2 hücrelerinde proliferasyon eğrisi.....	50
Şekil 4.1.	HepG2 hücrelerinde 5-80 µM aralığında artan konsantrasyonlarda uygulanan sorafenibin % canlılık verileri .....	52
Şekil 4.2.	HepG2 hücrelerinde pH 6.6' da hazırlanan sorafenibin doza bağlı olarak gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları.....	54

Şekil 4.3.	HepG2 hücrelerinde pH 6.8' de hazırlanan sorafenibin doza bağlı olarak gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları.....	55
Şekil 4.4.	HepG2 hücrelerinde pH 7.2' de hazırlanan sorafenibin doza bağlı olarak gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları.....	57
Şekil 4.5.	HepG2 hücrelerinde pH 7.6' de hazırlanan sorafenibin doza bağlı olarak gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları.....	58
Şekil 4.6.	HepG2 hücrelerinde pH 7.8' de hazırlanan sorafenibin doza bağlı olarak gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları.....	60
Şekil 4.7.	Farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin 24 saat maruziyet süresinde HepG2 hücrelerinde % canlılığa etkisi.....	62
Şekil 4.8.	Farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin 48 saat maruziyet süresinde HepG2 hücrelerinde % canlılığa etkisi.....	64
Şekil 4.9.	Farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin 72 saat maruziyet süresinde HepG2 hücrelerinde % canlılığa etkisi.....	66
Şekil 4.10.	HepG2 hücrelerinde farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin 24 saatteki hücre proliferasyon eğrileri.....	68
Şekil 4.11.	HepG2 hücrelerinde farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin maruziyet periyodunun başlangıç ve 24 saat sonundaki görüntüleri .....	69

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Karaciğerin temel fonksiyonları.....	4
Tablo 2.2. BCLC' ye göre HCC' nin sınıflandırılması ve tedavi yöntemleri .....	6
Tablo 2.3. Sorafenibin çeşitli fizikokimyasal özellikleri.....	12
Tablo 2.4. Tümör hücrelerindeki pH düzenleyicileri ve temel fonksiyonları .....	22
Tablo 3.1. Kullanılan hücre hattı .....	34
Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar .....	34
Tablo 3.3. Kullanılan sarf malzemeler .....	35
Tablo 3.4. Kullanılan kimyasal maddeler.....	36
Tablo 3.5. Grup adı ve çalışma grupları .....	45
Tablo 4.1. HepG2 hücrelerinde pH 6.6' da hazırlanan sorafenibin zaman ve doza bağlı olarak gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları.....	53
Tablo 4.2. HepG2 hücrelerinde pH 6.8' de hazırlanan sorafenibin zaman ve doza bağlı olarak gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları.....	55
Tablo 4.3. HepG2 hücrelerinde pH 7.2' de hazırlanan sorafenibin zaman ve doza bağlı olarak gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları.....	56
Tablo 4.4. WST-8 yöntemine göre pH 7.6 değerindeki sorafenibin 24, 48 ve 72 saat maruziyet süresinde HepG2 hücrelerindeki sitotoksik etkisi.....	58
Tablo 4.5. WST-8 yöntemine göre pH 7.8 değerindeki sorafenibin 24, 48 ve 72 saat maruziyet süresinde HepG2 hücrelerindeki sitotoksik etkisi.....	59
Tablo 4.6. HepG2 hücrelerinde farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin 24 saat maruziyet periyodu sonrasında gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları.....	62
Tablo 4.7. HepG2 hücrelerinde farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin 48 saat maruziyet periyodu sonrasında gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları.....	64
Tablo 4.8. HepG2 hücrelerinde farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin 72 saat maruziyet periyodu sonrasında gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları.....	65
Tablo 4.9. HepG2 hücrelerinde farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin 24 saatteki proliferasyon oranları.....	67

# 1. GİRİŞ

Günümüzde artan teşhis ve tedavi yöntemlerine rağmen kanser tüm dünyada sağlık sorunlarının en başında gelen ve ölüm oranı en yüksek hastalıktan biridir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre son beş yılda kanser vaka sayısı toplamda 50 milyona kadar yükselmiştir. 2020 yılında yaklaşık 20 milyon olan yeni kanser vakasının 2030 yılında 25 milyon, 2040 yılında ise 30 milyona kadar yükseleceği öngörülmektedir. Benzer şekilde bir yılda kanserden kaynaklanan ölüm sayılarında 2040' lı yıllarda 16 milyonu geçeceğini tahmin edilmektedir (IARC, 2020).

Hepatoselüler karsinom (HCC) karaciğerin kendi hücreleri olan hepatositlerden kaynaklanan primer karaciğer tümörüdür. Dünyada en sık rastlanan kanser türleri arasında yer almaktadır. HCC' nin tedavi seçenekleri büyük ölçüde tümör evresine bağlıdır. HCC' nin erken evrelerinde cerrahi operasyon ya da organ nakli ile tedavi edilebilir. Ancak HCC' nin erken evrelerinde teşhis edilmesi oldukça zordur. İlerlemiş HCC vakalarda uygulanan kemoterapi ve destekleyici tedaviler ortalama sağkalım süresini ve yaşamın kalitesinin artırılmasına yardımcı olabilir (Kim et al., 2011; Reig et al., 2018).

Sorafenib ilk olarak metastatik renal hücreli karsinomun tedavisi için 2005 yılında onaylanmış oral yolla kullanılan multikinaz inhibitörüdür. Sorafenib kanser hücrelerinin proliferasyon, metastaz, invazyon ve anjiyogenezinde rol oynayan çeşitli antiproliferatif ve antianjiyogenez etki gösterir. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (United States Food and Drug Administration, FDA) tarafından 2007 yılında HCC' nin sistemik tedavisinde kullanılmak üzere onay almış ilk kemoterapötiktir. İleri seviye HCC' li hastaların ilk ve birinci basamak tedavisinde standart tedavi olarak kullanılmaktadır (Keating, 2017).

Kanser hücreleri enerji ihtiyaçlarını ortamda yeterli oksijen bulunmasına rağmen glikozu glikolizle pirüvata ve sonra da laktik aside dönüştürerek temin ederler. Bu olaya da “aerobik glikoliz” ya da “Warburg Etkisi” adı verilmektedir. Kanser hücreleri hızlı bölünebilen hücreler oldukları için fazla enerjiye gereksinimleri vardır. Enerji ihtiyaçlarını karşılamak için çok fazla miktardaki glikozu metabolize ederler. Aerobik glikolizis metabolizmasında fazla miktarda oluşan laktik asit hücre mikroçevresinde birikerek kanser hücrelerinin hücre dışı pH değerini (6.5-6.9) normal

hücrelerin mikroçevresine (7.2-7.5) göre daha asidik karakterde olmasına neden olur. Asidik mikroçevre birçok kanser hücrelerinin karakteristik özelliğidir (Ferreira, 2010). Warburg etkisi sonucu meydana gelen asidik mikroçevre kanser hücrelerinin proliferasyon, invazyon, metastaz ve anjiyogenez olaylarını ayrıca immün yanıt ve kemoterapötiklere karşı direnç oluşturma yeteneğini arttırmaktadır (Liberti and Locasale, 2016).

HepG2 insan hepatosellüler karsinoma kaynaklı hücre hattıdır. HepG2 hücreleri plazma proteini sentezi ve sekresyonu, kolesterol ve trigliserid metabolizması ve glikojen sentezi gibi bir çok özelliği normal hepatositlere göre benzerlik göstermektedir (Donato et al., 2015). HepG2 hücre hattı sorafenib ve HCC ile ilgili araştırmaları da içeren hücre sinyal iletim mekanizmaları, ilaç araştırması, tedavi geliştirme, mikroçevre ve sitotoksite gibi birçok çalışmada model olarak kullanılmaktadır (Geng et al., 2014; Yang and Liu, 2017).

HCC' li hastalarda tümör ilaç tedavisine dirençli, nüks etme oranı yüksek ve sağkalım oranı düşük olmasından dolayı transarteriyel temoembolizasyon (TAKE), radyofrekans ablasyon (RA) ile birlikte uygulanması ve nanofarmülasyonlarının sentezlenmesi gibi daha etkili ve daha güvenli tedavi seçenekleri ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (Chen et al., 2021; Kong et al., 2021). Warburg Etkisi sonucu kanser hücrelerinde meydana gelen asidik mikroçevre sorafenibin kanser hücrelerindeki tirozin kinaz ve kinaz reseptörleriyle etkileşmesini azaltabileceği ve bu nedenle tümör mikroçevre pH' sının alkali pH' ya doğru değiştirildiğinde ilacın etkinliğinin artırabileceği düşünülmüştür.

Bu tez çalışmasında, farklı asidik ve alkali pH ortamlarında bulunan HepG2 hücrelerine sorafenibin sitotoksik etkisinin doz ve zamana bağlı olarak incelenmesi ve hücre proliferasyonu üzerindeki inhibe edici etkisinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Böylece ileri seviye HCC tedavisinde kullanılan sorafenibin etkinliğinin artırılmasına yönelik çalışmalara ve mevcut literatür bilgilerin artırılmasına destek sağlanacaktır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Kanser**

Kanser, gen ekspresyonundaki değişiklikler nedeniyle hücre proliferasyonu ve programlı hücre ölümü arasındaki dengenin bozulması sonucu oluşan anormal hücre büyümesi olarak tanımlanır (Ruddon, 2007). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (International Agency for Research on Cancer, IARC) raporlarına göre, 2018 yılında 18.1 milyon insana kanser teşhisi konulmuş ve 9.6 milyon kişi kanserden hayatını kaybetmiştir (Bray et al., 2018). Ülkemiz için Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), 2019 yılı ölüm ve ölüm nedeni istatistik verileri incelendiğinde; ilk sırada 160 263 kişiyle (%36.8) dolaşım sistemi hastalıkları yer alırken ikinci sırada 80 186 kişiyle (%18.4) kanser yer almaktadır (TÜİK, 2019).

#### **2.1.1. Karaciğer ve Karaciğer Kanseri**

Yetişkin insanlarda sağlıklı karaciğer yaklaşık 1 400 - 1 600 g ağırlığa sahip olup vücudun en büyük organıdır. Karaciğer anatomik olarak; karın bölgesinin sağ üst kadranda ve diyaframın hemen altında bulunmaktadır (Gryspeerd et al., 1997). Karaciğere kan akışı hem portal toplar damar (yaklaşık %75) hem de hepatik atar damardan (yaklaşık %25) olması bakımından eşsiz bir organdır. Vücutta bir çok organ ve sistemle anatomik ve fizyolojik olarak ilişkisi bulunduğundan çeşitli patojenlere maruz kalma ihtimali çok daha yüksektir. HCC başta olmak üzere diğer karaciğer kanser türü ve hastalıklarının gelişmesinde birçok faktörün rol oynamasının sebeplerinden birisi de sahip olduğu bu fizyolojik ve anatomik özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Kalra et al., 2018; Mukhtar and Khalili 2016).

Karaciğer vücutta hayati öneme sahip metabolizma, sindirim ve bağışıklık gibi birçok görevi yerine getirir. Başlıca görevleri arasında karbonhidrat, protein ve lipid metabolizması, safra üretimi ve salımı, bilirübin metabolizması, ilaç metabolizması-detoksifikasyon ve depolama yer almaktadır. Safra üretimi özelliğiyle ekzokrin bez; glikoz, lipoprotein ve plazma proteinlerini kana verme özelliğiyle de endokrin bez niteliği taşımaktadır (Pavelka and Roth, 2010). Karaciğerin temel fonksiyonları Tablo 2.1.' de gösterilmiştir (Mukhtar and Khalili, 2016).

Tablo 2.1. Karaciğerin temel fonksiyonları (Mukhtar and Khalili, 2016)

Temel Fonksiyon	Açıklama
Enerji metabolizması	Glikogenezis ve glikolizis aracılığıyla glikoz üretimi Glikojen sentezi, yağ asidi sentezi, glikolizis ve TCA döngüsü ile glikoz tüketimi Asetattan kolesterol sentezi, yağ asidinden trigliserit sentezi Asetattan kolesterol sentezi, yağ asitlerinden trigliserid sentezi ve her ikisinin de çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) partiküllerinde salgılanması Safrada kolesterol ekstraksiyonuyla yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) partiküllerinin endositozuyla kolesterol ve trigliserit alımı, yağ asitlerinin B-oksidasyonu ve fazla asetil-Coa' nın ketonlara dönüştürülmesi Non-amino asitlerin <i>de novo</i> sentezi ve transaminasyonu
Protein sentezi	Albümin, pıhtılaşma faktörleri, bağlayıcı proteinler, apolipoprotein, anjiyotensinojen, insülin benzeri büyüme faktörü I gibi çeşitli proteinlerin sentezi
Taşıma, depolama ve çözünürlük sağlama	Faz I ve II biyotransformasyon reaksiyonları ile ilaç ve zehirlerin detoksifikasyonu Bağırsak hücreleri tarafından emilimini sağlamak için safradaki yağların ve yağda çözünebilir vitaminlerin çözünürlüğü Vitamin A, D ve B12' nin depolanması ve geri emilimi
Koruyucu ve klerens fonksiyonları	Üre döngüsü vasıtasıyla amonyak detoksifikasyonu Mikrozomal oksidasyon ve konjugasyon sistemi aracılığıyla ilaçların detoksifikasyonu Glutasyon sentezi ve salınımı

Karaciğer kanseri dünya genelinde %4.7 oranıyla en yaygın altıncı (905 677 kişi) kanser türü ve kansere bağlı ölümlerin %8.3 oranıyla üçüncü (830 180 kişi) en yaygın nedenidir (IARC, 2020). Ülkemizde de 2019 yılında kansere bağlı ölüm nedenleri arasında %3.47 (2 788 kişi) oranıyla yedinci sırada yer almaktadır (TÜİK, 2019).

### 2.1.2. Karaciğer Kanseri Türleri

Karaciğer tümörleri primer iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) olmak üzere ikiye ayrılır. İyi huylu karaciğer tümör türleri arasında; a) hepatosellüler kaynaklı; adenom, fokal nodüler hiperplazi, diffüz nodüler hiperplazi, makrorejeneratif nodüller ve displastik nodüller, b) safra epiteli kaynaklı; safra kanalı kisti, safra kanalı adenom, müsinöz kistik neoplazm, peribiliyer bezi hamartom, von meyenburg kompleksi, safra kistadenomu ve safra papillomatozis, c) vasküler kaynaklı; kavernoöz hemanjiyom ve inoltil hemanjiyoendotelyoma, d) diğer; anjiyomyolipoma, mezenkimal hamartoma, soliter fibröz tümör ve inflamatuvar psödötümör yer almaktadır. Kötü huylu karaciğer tümörleri arasında; a) hepatosellüler kaynaklı; hepatosellüler karsinom, fibrolamellar karsinom, hepatokolangiokarsinom, hepatoblastom ve karsinosarkom, b) safra epiteli kaynaklı; kistadenokarsinom ve

kolanjiokarsinom, c) vasküler kaynaklı; anjiyosarkom, hemanjiyoendotelyoma ve epiteloid, d) diğer; primer lenfomalar ve sarkomlar yer almaktadır (Ferrell et al., 2017; López Panqueva, 2015; Yang and Roberts, 2016).

### **2.1.3. Hepatosellüler Karsinom**

HCC ya da primer karaciğer kanseri en sık görülen karaciğer kanser türüdür (Tunissioli et al., 2017; White et al., 2016). HCC başlıca kronik karaciğer hastalıkları ve karaciğer sirozu olmak üzere birçok farklı nedenden dolayı gelişebilir. HCC' nin ana risk faktörleri arasında hepatit B veya C virüsü (HBV veya HCV), sık ve aşırı alkol tüketimi, aflatoksin (özellikle aflatoksin B1) ve alkilnitrozaminler gibi toksik kanserojenlere maruz kalma, şeker hastalığı ve obezite gibi metabolik bozukluklar, alkolden bağımsız karaciğer yağlanması ve hemokromatoz gibi kalıtsal hastalıklar yer almaktadır ( Alotaibi et al., 2016; Balogh et al., 2016; Goodman et al., 2012). HCC oluşum mekanizmaları arasında hücre döngüsü kontrol kaybı, yaşlanma kontrolünden kaçma, kontrollü hücre ölümüne direnç, fenotipik plastisite, hareketlilik, invazyon ve metastaz olduğu düşünülmektedir (Alotaibi et al., 2016).

#### **2.1.3.1. HCC' nin Evreleri**

HCC' li hastaların gösterdikleri klinik tablo (semptom) ve laboratuvar bulguları göz önünde tutularak çeşitli HCC sınıflandırmaları yapılmıştır. Barcelona Kliniği Karaciğer Kanseri (Barcelona Clinic Liver Cancer, BCLC) sınıflandırması, Karaciğer Kanseri İtalyan Program (Cancer of the Liver Italian Program, CLIP) skorlaması, Japon Entegre Evreleme Sistemi (Japan Integrated Staging, JIS) ve Hong Kong Karaciğer Kanseri Evreleme Sistemi (Hong Kong Liver Cancer, HKLC) gibi farklı sınıflandırmalar mevcuttur (Ferrell et al., 2017). BCLC sınıflandırma sistemi birçok çalışmada onaylanmış ve HCC tedavisi için Amerikan Karaciğer Hastalıkları Araştırma Derneğinin (American Association for the Study of Liver Diseases-AASLD) kılavuzlarına dahil edilmiştir (Bruix and Sherman, 2011; Cillo et al., 2006). Ülkemizde de genellikle BCLC sınıflandırılması kabul görmektedir. Bu sınıflandırma kanserin evresine göre hastaya uygulanacak en uygun tedavi seçeneğinin karar verilmesinde yardımcı olmaktadır (Bruix and Sherman, 2011). BCLC' ye göre HCC' nin sınıflandırılması ve tedavi yöntemleri Tablo 2.2.' de verilmiştir.

Tablo 2.2. BCLC' ye göre HCC' nin sınıflandırılması ve tedavi yöntemleri (Bruix and Sherman, 2011; Cillo et al., 2006)

Evre	PS	Tümör	Karaciğer Fonksiyonları	Tedavi Seçenekleri
Evre 0 (Çok Erken Evre HCC)	0	Tek Tümör ve <2 cm	CTP sınıf A Portal hipertansiyon yok Bilirubin seviyeleri normal	Rezeksiyon
	A1 0	Tek Tümör	Portal hipertansiyon yok Bilirubin seviyeleri normal	Rezeksiyon
Evre A (Erken Evre HCC)	A2 0	Tek Tümör	Portal hipertansiyon var Bilirubin seviyeleri normal	
	A3 0	Tek Tümör	Portal hipertansiyon var Bilirubin seviyeleri yüksek	Radyofrekans Ablasyon/ Karaciğer nakli
	A4 0	2 ya da 3 Tümör ve her biri <3 cm	CTP sınıf A ya da B	
Evre B (Orta Evre HCC)	0	Geniş multinodüller	CTP sınıf A ya da B	Transarteryel Kemoembolizasyon (TAKE)
Evre C (İleri Evre HCC)	1-2	Vasküler invazyon ya da ekstrahepatik yayılım	CTP sınıf A ya da B	Sorafenib
Evre D (Son Evre HCC)	3-4	Herhangi biri	CTP sınıf C	Semptomatik tedavi

(CTP: Child-Turcott-Pugh, CTP Sınıf A; bilirubin <2 mg/dl, albümin >3.5 g/dl, protrombin zamanı <4, CTP Sınıf B; ensefalopati 1-2 evre, bilirubin 2-3 mg/dl, albümin 2.8-3.5 g/dl, protrombin zamanı <4-6, CTP Sınıf C; ensefalopati 3-4 evre, bilirubin >3 mg/dl, albümin <2.8 g/dl, protrombin zamanı >6)

### 2.1.3.2. HCC' nin Patogenezi

Kanserin biyolojisi ve sinyal iletim mekanizmalarında önemli rol oynayan başlıca moleküllerin tanımlanmasıyla kanser ilerlemesini kontrol altına almak veya durdurmak için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden birisi de hücre sinyal iletim mekanizmalarını (kansere hücrelerinde apoptozu yeniden aktif hale getirip hücre büyümesini, hücre sağkalımını ve anjiyogenezi azaltacak) modüle edebilen moleküler hedefli ajanlar kullanılarak yapılan rasyonel tedavidir. Son yıllarda bu yeni bilgi ve tedaviye yaklaşım yöntemi sadece bir yolu hedefleyen değil aynı zamanda klinik faydalarda sağlayan farmakolojik ajanların üretilmesini sağlamıştır (White et al., 2016). HCC' de hücre sağkalımı, proliferasyon, anjiyogenezi ve apoptotik hücre ölümü ile ilgili olan hepatokarsinogenezin moleküler sinyal iletim yollarını a) sıçan sarkomu (rat sarcoma, Ras), serin/treonin kinaza özgü protein kinaz (serine/threonine-specific protein kinase, Raf), mitojen-ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz (mitogen extracellular signal regulating kinase, MEK) ve ekstrasellüler sinyal regüle edici kinaz (extracellular-signal-regulated kinase, ERK) moleküllerinin rol oynadığı

Ras/Raf/MEK/ERK sinyal iletim yolu, b) fosfatidilinositol 3-kinaz (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K), protein kinaz B (protein kinase B, AKT) ve Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mammalian target of rapamycin, mTOR) moleküllerinin rol oynadığı PI3K/AKT/mTOR sinyal iletim yolu, c) Wnt,  $\beta$ -katenin rol oynadığı sinyal iletim yolu ve d) Janus kinaz (Janus kinase, JAK), sinyal transdüserleri transkripsiyon aktivatör (signal transducer and activator of transcription, STAT) moleküllerinin rol oynadığı JAK/STAT sinyal iletim yolu oluşturmaktadır (Dimri and Satyanarayana, 2020). HCC' nin ilerlemesini kontrol altına almak için bu sinyal iletim mekanizmalarında rol oynayan molekülleri hedefleyen rasyonel ilaçlar geliştirilmektedir (White et al., 2016).

#### **2.1.4. HCC ve Tirozin Kinazlar**

Tirozin kinazlar temel olarak reseptör tirozin kinaz (RTK) ve reseptör olmayan tirozin kinaz (sitoplazmik tirozin kinaz) (NRTK) olmak üzere iki sınıfa ayrılır. RTK hücre zarında, NRTK ise hücre sitoplazmasında bulunur. RTK sınıfında epidermal büyüme faktörü reseptörü (epidermal growth factor receptor, EGFR), trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR), fibroblast büyüme faktörü reseptörü (fibroblast growth factor receptor, FGFR), insülin bağımlı büyüme faktörü reseptörü (insulin-like growth factor receptor, IGR) ve NRTK sınıfında, abelson tirozin kinaz (abelson tyrosine kinase, ABL), fokal adezyon kinaz (focal adhesion kinase, FAK) ve januskinaz (Janus kinases, JAK) bulunmaktadır (Paul and Mukhopadhyay, 2004). Normal hücrelerde tirozin kinazlar aracılığıyla başlatılan sinyal iletim mekanizması hücrelerde büyüme ve gelişmeyi sağlamaktadır. Ancak çeşitli kanser olgularında tirozin kinazları kodlayan genlerde bir dizi farklı mutasyonlar meydana gelmektedir. Tirozin kinazlardaki mutasyonlar tümör anjiyogenezis, metastaz, proliferasyon ve programlanmış hücre ölümü mekanizmalarıyla da yakından ilişkilidir (Hunter, 2000; Karpov et al., 2015; Pathi et al., 2016; Schenk and Snaar-Jagalska, 1999).

##### **2.1.4.1. MAPK/ERK (ya da Ras-Raf-MEK-ERK) Yolağı**

Mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolağı öncelikle gen ekspresyonunun düzenlenmesi, hücre büyümesi ve farklılaşmasında rol oynamaktadır. Anormal MAPK sinyal iletimi artan ya da kontrolsüz hücre proliferasyonuna ve apoptoza karşı dirence yol açabilir. MAPK yolağı küçük bir G proteini olan Ras ve

protein kinazlardan olan Raf, MEK, ERK moleküllerini içerir. MAPK sinyal iletim yolağı başta epidermal EGFR, VEGF, PDGFR ve IGF reseptörü tarafından uyarılabilir. Reseptör etkileşmesi sonrası protoonkogen (mutasyon sonucu onkogene dönüşebilen normal gen) Ras ve Raf' ı aktive ederek MEK 1/2 ve ERK 1/2' nin aşağı akış (downstream) aktivasyonuna neden olur. Bu sinyal iletimi hücre proliferasyonunu uyarır (Kolch, 2000; Roberts and Gores, 2005). Ayrıca ERK hücre büyümesi, apoptoz direnci ve anjiyogenezle ilgili proteinlerin fosforilasyonuna da neden olmaktadır. Bu nedenle Ras aracılı sinyal yolağının aktivasyonu kanser gelişmesinde önemli rol oynamaktadır (Schmidt et al., 1997). HCC tümörlerinin yaklaşık %30' unda Ras mutasyonu meydana gelmektedir. İleri seviye HCC vakalarında özellikle MAPK/ERK sinyal iletim yolunun aşırı aktivasyonu meydana gelmektedir (Bos, 1989; Huynh et al., 2003).

#### **2.1.4.2. PI3K-AKT-mTOR Yolağı**

PI3K-AKT-mTOR sinyal iletim yolağı hücre büyümesi ve kontrolünde önemli rol oynar. Sitokin interlökin-2 ve büyüme faktörlerinin (IGF ve EGF gibi) tirozin kinaz reseptörlerine bağlanması PI3K' nın aktivasyonunu sağlar. PI3K, serin/treonin kinaz AKT' yi (protein kinaz B olarak da bilinir) aktive eden lipid PIP3b' nin üretilmesine neden olur. AKT, BAD gibi bir çok proapoptotik proteinini fosforile ederek inaktif hale gelmesine neden olur ve rapamisin memeli hedefi (mTOR) proteinini aktive eder. mTOR, p70 ribozomal S6 kinazın fosforilasyonu, hücrelerin devamlı büyümesi ve çoğalmasını uyan proteinlerin sentezini arttırmaktadır (Chen et al., 2009; Roberts and Gores, 2005; Zhou et al., 2010). HCC vakalarının %50' sinde artmış mTOR sinyal aktivitesi bulunmaktadır (Hu et al., 2003; Villanueva et al., 2008).

#### **2.1.4.3. Wnt/ $\beta$ -Katenin Yolağı**

Wnt reseptör aracılı sinyal iletim yollarını aktive eden glikoproteinlerin ligandlarıdır. Wnt sinyal yolları hücrelerin adezyon, proliferasyon, farklılaşma ve hücre göçünde önemli rol oynamaktadır. Wnt/  $\beta$ -katenin sinyal iletimi çeşitli kanser türlerinin gelişimiyle yakından ilişkilidir. Wnt sinyal iletimi  $\beta$ -katenin fosforilasyonunu önleyen bir dizi olaylara neden olmaktadır. Hücre sitoplazmasında seviyesi artan  $\beta$ -katenin çekirdeğe yerleşir ve anormal hücre çoğalmasını uyan birden fazla genin transkripsiyonunu aktive eder (Shin and Chung, 2013). HCC' nin gelişmesine Wnt sinyal yolunun anahtar bileşeni olan transkripsiyon faktörü  $\beta$ -

kateninin anormal artışı neden olmaktadır. HCC vakalarının yaklaşık %30-40' ında artmış Wnt- $\beta$ -katenin sinyal aktivasyonu bulunmaktadır (Giles et al., 2003).

#### **2.1.4.4. Proanjyogenik Yollar**

HCC vasküler özellik gösteren bir tümör türüdür. Bu yüzden anjiyogenez HCC' nin patogenezi için önemli rol oynamaktadır. VEGF, PDGF, fibroblast büyüme faktörü ve hepatosit büyüme faktörü gibi faktörler Ras-Raf-mTOR ve Wnt sinyal iletim mekanizmasını uyarır. Bu faktörler tümör dokusunun vaskülarizasyon, invazyon ve metastazından sorumludur. VEGF reseptör-1 ve -2 endotel hücrelerinde sentezlenir ve yüksek seviyeleri kanser hastalarında sağkalım süresini kısaltmaktadır (Poon et al., 2004). Özellikle VEGF-A gen transkripsiyonuna bağımlı hipoksi ile indüklenmiş HIF-1 aracılığıyla VEGF-A ekspresyonunu yükselterek tümör dokularında anjiyogenez artırırlar (Karpov et al., 2015). Ayrıca PDGF' de endotel hücrelerinde sentezlenir ve metastatik karsinomada yüksek seviyede bulunmaktadır (Zhang et al., 2005). Fibroblast büyüme faktörü aynı zamanda anjiyogenezin temel bir faktörüdür ve ekspresyonun HCC' li hastalarda yüksek seviyede bulunduğu bildirilmiştir (Uematsu et al., 2005).

#### **2.1.4.5. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör (EGFR) Yolu**

EGFR, insan epidermal reseptör (HER) ailesinin bir üyesidir. EGFR epidermal büyüme faktörü (EGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü  $\alpha$ ' nın (TGF $\alpha$ ) reseptöre bağlanmasıyla aktive edilir. EGFR aktivasyonu MAPK ve PI3K-AKT-mTOR sinyal iletim yollarının aktivasyonu ile sonuçlanan sinyal basamaklarını uyarır. Bu aktivasyon sonucunda da hücre proliferasyonu ve anjiyogenez artarken apoptotik hücre ölümü inhibe edilir. EGFR bir çok HCC vakasında aşırı ekspresyona uğradığı bildirilmiştir (Acar and Altuntaş, 2019; Ciardiello and Tortora, 2008).

#### **2.1.5. HCC' nin Tedavisi**

Günümüzde HCC' nin evresine göre yaşam süresini olumlu yönde etkileyen küratif ve palyatif tedavi yöntemleri bulunmaktadır. Küratif tedavi yöntemleri; cerrahi rezeksiyon, karaciğer transplantasyonu ve perkütan ablasyondur. Palyatif tedavi yöntemleri arasında trans-arteriyel embolizasyon-kemoembolizasyon ve sorafenib gibi sistemik kemoterapötiklerin kullanımı yer almaktadır. Cerrahi rezeksiyon, karaciğer transplantasyonu veya lokal ablasyon gibi küratif amaçlı tedavi seçenekleri HCC' nin erken evresi için uygundur. Ancak orta ve ileri HCC için sadece

kemoembolizasyon ve sistemik terapi tedavi seçeneği uygulanabilmektedir. Sistemik tedavi arasında multikinaz inhibitörü olan sorafenib kullanımı son 10 yıldır ileri evre HCC hastaları için mevcut tek sistemik tedavi olmuştur (De Mattia et al., 2019). Günümüzde de ileri seviye HCC' nin birinci tedavi basamağında sorafenib uygulanmaktadır (Vogel and Saborowski, 2020). Daha sonraları diğer multikinaz inhibitörleri olan lenvatinib, regorafenib ve kabozantinib HCC tedavisi için kullanılmaya başlanmıştır. Bunlar ikinci tedavi basamağını oluşturmaktadır ya da sorafenibi tolere edemeyen hastalarda kullanılması önerilmektedir. Ancak lenvatinib, regorafenib ve kabozantinib için yapılan Faz III klinik çalışmalarının bazılarında başarısızlıkla sonuçlandığı bildirilmiştir. Ayrıca monoklonal antikordardan olan nivolumab ve pembrolizumabın HCC tedavisinde kullanımına yönelik ileri klinik çalışmalar devam etmektedir. Özellikle sorafenibe karşı dirençli olan bazı hastalarda nivolumabın kullanımı önerilmektedir. Kanser çok ilerlemiş ise sorafenible birlikte regorafenib, kabozantinib, ramusirumab, nivolumab ya da pembrolizumabın kullanılması önerilmektedir (Benson et al., 2019; De Mattia et al., 2019; Vogel and Saborowski, 2020).

HCC' li hastaların sağkalım süresi (beklentisi) kanser teşhisi konulduğu zamanki kanserin evresine bağlıdır (Tunissioli et al., 2017). Kansere ilişkin semptomların ortaya çıkmasından sonra hastaların sadece %10' u yaklaşık olarak beş yıl sağkalım süresine sahiptirler (Akyıldız et al., 2011). Erken teşhis edildiği zaman cerrahi rezeksiyon ve transplantasyon gibi küratif tedavi seçenekleri uygulandığında hastaların %40-70' i ortalama sağkalım süresi beş yıldan daha fazla olabilmektedir. Ancak HCC' nin erken teşhisi oldukça zordur. Teşhis genellikle hastaların %15-42' sinde vasküler invazyon veya ekstrahepatik tümör yayılımı göstermiş ileri evrelerde konulabilmektedir (Onan ve Pehlivan, 2020). Palyatif tedavi gerektiren durumlarda ise ortalama sağkalım süresi yaklaşık 11-20 ay arasında değişmektedir (Tunissioli et al., 2017). İleri evre HCC' li hastalar tedavi olmadan 6-8 ay ortalama sağkalım beklentisi ve kötü prognoz gösterirler (Labeur et al., 2020). Lokorejyonel yaklaşımların başarısızlığından sonra 2007 yılına kadar hastalar için etkili bir tedavi bulunmamaktaydı. İleri HCC' li hastalarda etkinliği bulunan ve ilk sistemik ajan olarak sorafenibin onaylanması hastalığın tedavisinde yeni bir dönemi açmış oldu (Vogel and Saborowski, 2020). İlerlemiş HCC' li hastalarda sorafenibin kullanımı ortalama

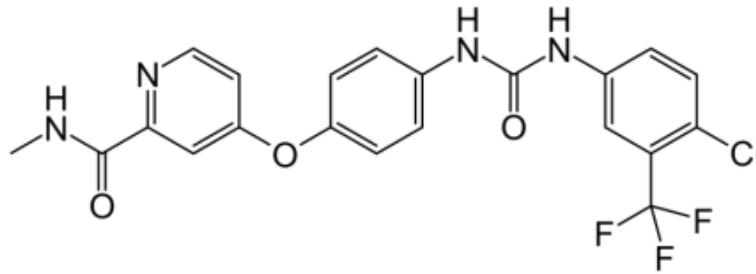
sağkalımı ve progresyona kadar geçen süreyi yaklaşık üç ay uzattığı bildirilmiştir (Llovet et al., 2008).

## 2.2. Sorafenib

Sorafenib ağız yoluyla kullanılan multikinaz kinaz inhibitörüdür (Woo and Heo, 2012). Kanser hücrelerinde hücre içi büyüme uyarıcı molekülleri etkileyerek antiproliferatif (antikanser) ve tümör dokusunu besleyen kan damarlarının şekillenmesini engelleyerek ya da yapısını bozarak antianjiyojenik etki gösterir (Tang et al., 2020). Sorafenibin antiproliferatif ve antianjiyojenik etkisi *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir. FDA tarafından 2007 yılında HCC' nin sistemik tedavisinde kullanılmak üzere onay almış ilk kemoterapötiktir. İleri seviye HCC hastalarının birinci basamak tedavisinde standart tedavi olarak kullanılmaktadır (Kim et al, 2017). Ayrıca 2005 yılında ilerlemiş böbrek hücre karsinoması ve 2013 yılında da farklılaşmış tiroid karsinomasının tedavisinde kullanılması için FDA tarafından onaylanmıştır (Hasskarl, 2014). Günümüzde akciğer, kolorektal, pankreas, glioblastoma, miyeloid lösemi, ovaryum ve meme kanseri olmak üzere diğer kanser türleri üzerine tek başına ya da diğer kanser ilaçlarıyla birlikte etkisini araştıran prelinik çalışmalar devam etmektedir (Booth et al., 2020; Chekerov et al., 2018; Decker et al., 2017; Gian et al., 2012; Hasskarl, 2014; Khan et al., 2018; Ohanian et al., 2018; Schiff et al., 2018; Wilhelm et al., 2006).

### 2.2.1. Sorafenibin Genel Özellikleri

Sorafenibin kimyasal yapısı ve çeşitli fizikokimyasal özellikleri Şekil 2.1. ve Tablo 2.3.' de gösterilmiştir (Kim et al., 2009).



Şekil 2.1. Sorafenibin kimyasal yapısı (Kim et al., 2009)

Tablo 2.3. Sorafenibin çeşitli fizikokimyasal özellikleri (NCBI, 2020, Kim et al., 2009)

Özellikler	Açıklama
Kimyasal Formülü	$C_{21}H_{16}ClF_3N_4O_3$
Kimyasal Adı (IUPAC)	4- [4 - [[4-kloro-3- (triflorometil) fenil] karbamoilamino] fenoksi] -metilpiridin-2-karboksamid
Molekül Ağırlığı	464.829 g/mol
Renk ve Form	Beyaz kristalize toz
Erime Noktası	205.6 °C
Çözünürlük	3.59x10 <sup>-2</sup> mg/L at 25 °C (est)
Partisyon Katsayısı (LogP)	3.8
log Kow	5.30 (est)
CAS No	284461-73-0
Ayrışma Sabiti(pKa)	2.03-11.55
Buhar Yoğunluğu	4,11x10 <sup>-14</sup> mm Hg (25 °C)

### 2.2.2. Sorafenibin Farmakokinetik Özellikleri

Sorafenib tablet dozaj formlarının uygulanmasından sonra ortalama nispi biyoyararlanımı bir oral çözelti ile karşılaştırıldığında %38-49 arasındadır (Woo ve Heo, 2012). Ancak mutlak biyoyararlanımı değerlendirilmemiştir. Ağız yoluyla alındıktan yaklaşık üç saat sonra en yüksek plazma yoğunluğuna ve yedi günde de denge durum yoğunluğuna ulaşmaktadır. Günlük toplam 800 mg' dan daha fazla miktarda ilaç alınması eğri altı ilaç alanı (AUC) ve maksimum plazma konsantrasyonunu ( $C_{max}$ ) orantısal olarak daha az arttığı bildirilmiştir. Görünür dağılım hacmin 213 L' dir. *In vitro* ortamda %99.5 oranında plazma proteinlerine bağlanmaktadır ( Abdelgalil et al., 2019; Keating, 2017).

Sorafenib düşük çözünürlüğe ve yüksek permeabiliteye sahip küçük lipofilik bileşiktir. Oral uygulamadan sonra hızla gastrointestinal sistemden emilir ve portal toplar damar yoluyla karaciğere ulaşır (Gion, et al., 2018).

Sorafenib başlıca karaciğerde metabolize edilir. Sitokrom P450 (CYP 450) 3A4' ün (CYP3A4) aracılık ettiği faz I oksidasyon ve UDP glukuroniltransferaz 1A9' un (UGT1A9) aracılık ettiği faz II konjugasyonu tepkimeleriyle metabolize edilir (De Mattia et al., 2019; Ghassabian et al., 2012). Glukoronid konjugatları bağırsaklarda bakteriyel glukuronidaz enzimleri aracılığıyla hidrolize edilir ve serbest forma dönüşen ilaç molekülleri bağırsaklardan tekrar emilerek genel kan dolaşımına geçer

(Keating, 2017; Abdelgalil et al., 2019). Klirensi glukuronidasyon tepkimesinde yaklaşık %15 ve oksidasyon tepkimesinde ise yaklaşık %5 oranındadır. İlacın tanımlanan sekiz metaboliti (M1–M8) bulunmaktadır (Gong et al., 2017; Keating and Santoro, 2009). Plazmada en yüksek miktarda bulunan metaboliti sorafenib N-oksittir (M2)' dir. M2 metaboliti CYP3A4 tepkimesi sonucu meydana gelmektedir. Ayrıca sorafenib M2 *in vitro* araştırmalarda ana ilaca benzer bir potens gösterdiği bildirilmiştir. M2, demetilasyon ile oluşan sorafenib M4 ile birlikte ve oksidatif bir metabolit olan M5, VEGFR ve PDGFR sinyalini ve MAPK sinyal iletim yolağının moleküllerini inhibe edebilmektedir (De Mattia et al., 2019; Gong et al., 2017).

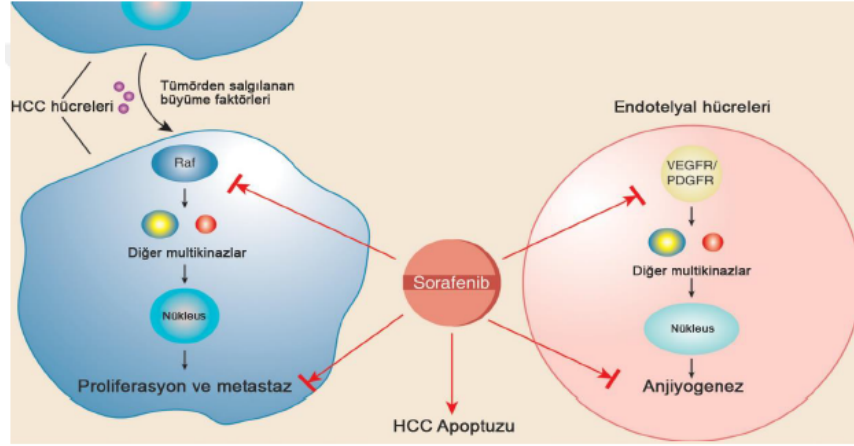
Karbamazepin, deksametazon, fenobarbital, fenitoin, rifampisin ve rifabutin gibi güçlü CYP3A4 indükleyicileri sorafenibin etkisini azalttığı için bu ilaçlarla birlikte kullanımından kaçınılmalıdır (Keating, 2017).

İlacın büyük bir kısmı dışkı (%77) ve idrar (%19) yoluyla vücuttan uzaklaştırılır (Lathia et al., 2006; Woo and Heo, 2012). İlacın atılma yarı ömrü 25-48 saat arasında değişmektedir. Cinsiyet, yaş ve vücut ağırlığının sorafenibin farmakokinetik üzerine belirgin klinik etkisi bulunmamaktadır (Gion, et al., 2012; Lathia et al., 2006).

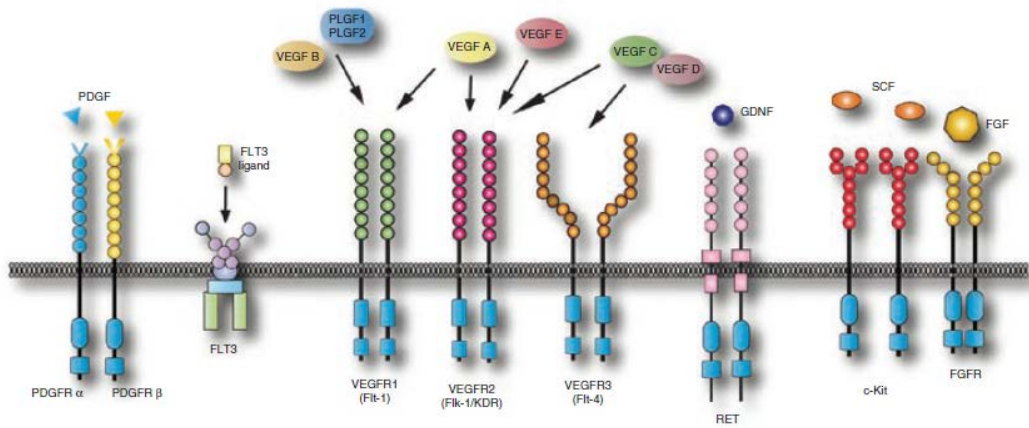
### **2.2.3. Sorafenibin Farmakodinamik Özellikleri**

#### **2.2.3.1. Etki Mekanizması**

Sorafenib hücre içindeki RAF kinazları (c-CRAF, BRAF ve mutant BRAF) ve hücre yüzeyi kinazlarından vasküler endotel büyüme faktör reseptörleri (VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3), KIT, FMS benzeri tirozinkinaz 3 (Fms-like tyrosine kinase 3, FLT-3), RET, RET/PTC ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü beta (PDGFR-β) yı inhibe ederek etkisini gösterir (Şekil 2.2. ve 2.3.) (Adnane et al, 2006; Wilhelm et al., 2004; L. Ye et al., 2019). En önemli ve güçlü etkisini Raf-1 kinaz ve VEGFR üzerinde göstermektedir (Gong et al., 2017). Tirozin kinazlar kanser hücrelerinde canlılık, proliferasyon, farklılaşma, migrasyon, invazyon, metastaz, sinyal iletimi, anjiyogenez ve apoptoz gibi programlanmış hücre ölümüne yol açan sinyal iletim yollarında görev alan önemli araçlarıdır (Adnane et al., 2006; Hunter, 2000; Keating, 2017; Wilhelm et al., 2004). Sorafenib hem sitoplazmada tirozin kinazları inhibe ederek proliferasyonu hem de tirozin kinaz reseptörlerini etkileyerek anjiyogenezisi baskılar ve kanser hücrelerinde apoptotik ölümüne neden olur (Khan et al., 2018; Semela and Dufour, 2004; Villanueva et al., 2007).



Şekil 2.2. Sorafenibin etki mekanizması (Daher et al., 2017)



(PDGFR trombositleşmiş büyüme faktörü reseptörü; FLT3 FMS benzeri tirozin kinaz 3; VEGFR vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü; PLGF plasental büyüme faktörü; RET transfeksiyon sırasında yeniden düzenlendi; GDNF glial türevli nörotrofik faktör; SCF kök hücre faktörü; FGFR fibroblast büyüme faktörü)

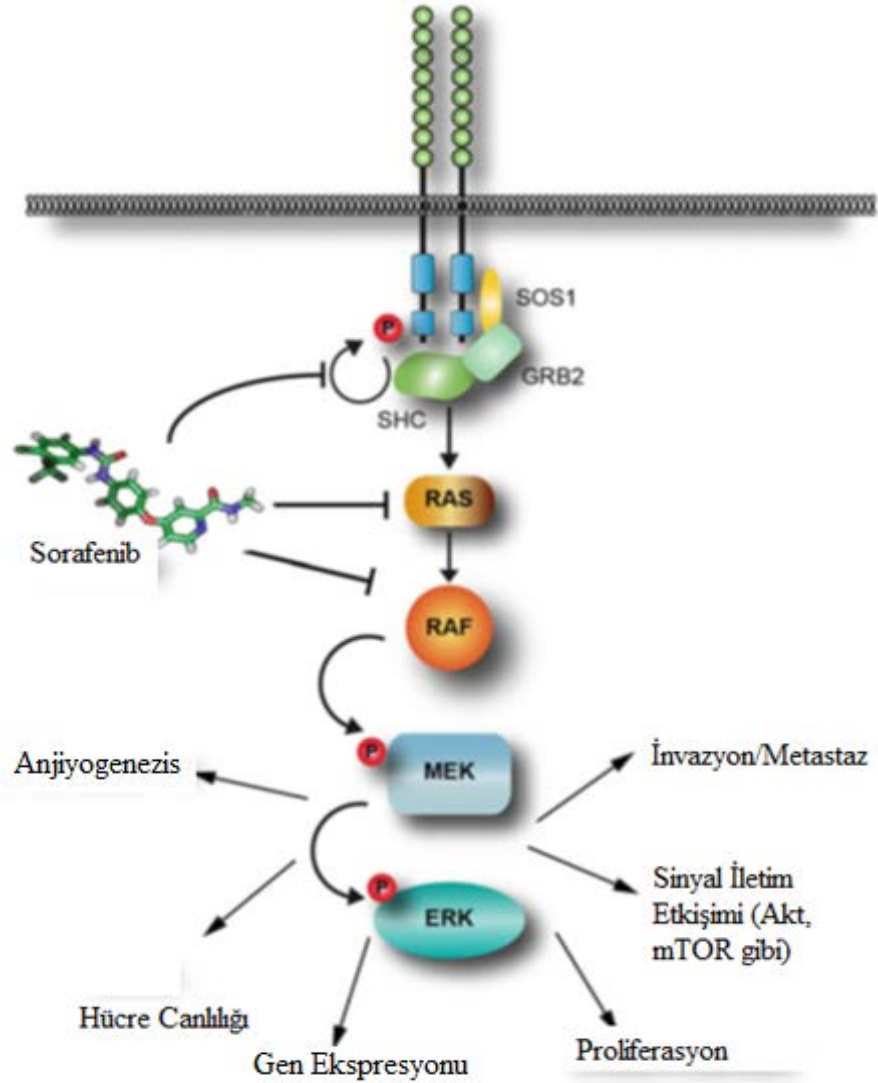
Şekil 2.3. Sorafenib tarafından hedeflenen büyüme faktörü reseptörü ve tirozin kinazlar (Hasskarl, 2014)

Birçok kanser kökenli hücre hattında (karaciğer, böbrek ve tiroid, kolon, meme ve akciğer kökenli kanser hücre hatları gibi) serin/treonin kinazlar (Raf-1 ve B-Raf) ve reseptör tirozin kinaz (VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- $\beta$ , c-it, Flt-1 ve RET) hedeflerinin aktivitesi sorafenib tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir. Bu hücre hatlarında sorafenibin konsantrasyonuna bağlı olarak apoptotik hücre ölümüne sebep olduğu da gösterilmiştir (Wilhelm et al., 2008).

### 2.2.3.2. Sorafenibin *In Vitro* Antikanser Etkisi

Sorafenib, Raf/MEK/ERK ve VEGF sinyal iletim yolağını engelleyerek tümör hücre proliferasyonunu ve tümör anjiyogenezini engeller. Sorafenibin başta HepG2 olmak üzere diğer karaciğer kanser kökenli hücre hatlarında (Hep3B, Huh7 ve

PLC/PRF/5 gibi) etkisi incelendiğinde; Raf/MEK/ERK sinyal iletim yolağındaki MEK ve ERK' nin fosforilasyonunu ve BCR/ABL kinaz aktivitesini inhibe ederek, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörünü (STAT3) etkileyerek, siklin D1 seviyelerini düşürerek, antiapoptotik protein olan Mcl-1' i aşağı regüle ederek doza bağlı bir şekilde hücre proliferasyonunu baskılayarak ve apoptotik hücre ölümünü tetikleyerek etki meydana getirmektedir (Şekil 2.4.) (Fernando et al., 2012; Keating, 2017; Woo and Heo, 2012).



Şekil 2.4. Sorafenib tarafından hedeflenen sinyal yolları (Hasskarl, 2010)

### 2.2.3.3. Sorafenibin *In Vivo* Antikanser Etkisi

Sorafenibin tümör büyümesi ve anjiyogenezisi baskıladığı *in vivo* ksenograft HCC modelleri kullanılarak kanıtlanmıştır. Yapılan *in vivo* deneylerde sorafenibin 10-30 mg/kg/gün dozlarındaki uygulamaları tümör büyümesini %49-78 arasında

baskıladığı gösterilmiştir (Keating, 2017; Woo and Heo, 2012). Ayrıca atimik farelerde geliştirilen insan tümör ksenograftlarının büyümesini baskılamıştır (Kim et al., 2007; Wilhelm et al., 2004). Etki mekanizması araştırmalarında ERK fosforilasyonunu baskıladığı, tümör etrafındaki damarlaşmayı azalttığı (CD34 immünohistokimya değerlendirme) ve tümör ksenogreftinde apoptozu (TUNEL boyama tekniği) uyardığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar sorafenibin HCC modeli geliştirilen deney hayvanlarında tümör anjiyogenezini baskıladığını ve tümör hücre proliferasyonu/sağkalım üzerine doğrudan etkilerinin olduğunu kanıtlamıştır (Keating, 2017; Woo and Heo, 2012).

#### **2.2.4. Sorafenibin Kullanım Alanı ve Dozu**

Sorafenib ilerlemiş HCC, metastatik renal hücreli karsinoma ve farklılaşmış tiroid kanseri hastalarında kullanılmaktadır (Hasskarl, 2010). Lokal tedavi yöntemlerinin uygun olmadığı ve BCLC sınıflandırmasına göre Evre C aşamasında bulunan HCC' nin birinci basamak tedavisinde endikedir (Colagrande et al., 2015). Metastatik renal hücreli karsinoma (mRHK) olgularında standart tedaviye (interferon alfa ve/veya interlökin-2) yanıt alınamadığı veya tedavinin yan etkileri nedeniyle uygun olmadığı durumlarda kullanılması önerilmektedir (Randrup Hansen et al., 2017). Sorafenib farklılaşmış tiroid kanserlerinde de kullanılmaktadır. Ancak hastaların daha önce VEGF-TKİ gibi hedefe yönelik tedavi uygulanmamış, cerrahi ve radyoterapi gibi lokal tedavilere uygun olmayan veya bu tedaviler sonrası progresyon gösteren, son 14 ay içerisinde RECIST (Solid Tümörlerde Yanıt Değerlendirme Kriterleri) kriterlerine göre progresyon göstermiş radyoaktif iyot tedavisine dirençli lokal relaps veya metastatik diferansiyel tiroid kanserlerinde monoterapi olarak progresyona kadar kullanımı endikedir. Ancak progresyon sonrası kombinasyon veya monoterapi olarak kullanılması kontrendikedir (Fallahi et al., 2013; Thomas et al., 2014).

Sorafenibin dozu günlük 800 mg' dır. Günde iki kez 400 mg oral yolla alınması tavsiye edilmektedir. İlaç aç karnına ya da düşük/orta yağlı öğün ile birlikte kullanılabilir. Ancak yüksek yağlı bir öğünle alınacaksa yemekten en az bir saat önce veya yemekten iki saat sonra alınması önerilmektedir. HCC ve RHK tedavisinde çeşitli durumlarda doz azaltımının gerekli olduğu durumlarda günde bir kez 400 mg' a kadar azaltılabilir (Al-Rajabi et al., 2015).

### **2.2.5. Sorafenibin Yan ve İstenmeyen Etkileri**

Sorafenib kullanan kanser hastalarında en sık görülen yan etki Ulusal Kanser Enstitüsü Ortak Toksikite Kriterlerine göre 1. ve 2. derecede el-ayak cilt reaksiyonu (palmar-plantar eritrodisestezi) (facial eritem, tırnakların altında dikey kanamalar, eksanem döküntüsü), döküntü (alopesi) ve hipertansiyondur (Randrup Hansen et al., 2017; Wood, 2006). Hastalarda el-ayak cilt reaksiyonları genellikle tedavinin ilk altı haftasında görülmektedir. En önemli ciddi istenmeyen etkisi miyokard enfarktüsü (kalp krizi)/iskemisi, gastrointestinal perforasyon, hemoraji ve hipertansiyondur. Diğer yan etkileri arasında yorgunluk, ishal, mide bulantısı, gastrointestinal ve abdominal ağrı, iştahsızlık, kilo kaybı, enfeksiyon ve kaşıntı yer almaktadır (Li et al., 2015; Woo and Heo, 2012).

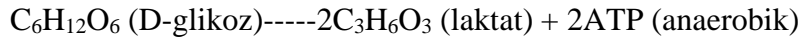
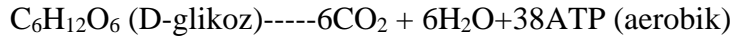
### **2.3. Kanser Metabolik Özellikleri**

#### **2.3.1. Enerji Metabolizması ve Warburg Etkisi**

Hücre metabolizması; canlı hücrelerin faaliyetlerini gerçekleştirmek için karbonhidrat, protein, yağ asidi gibi moleküllerin enerjiye dönüştürülmesini amaçlayan hücresel düzeydeki kimyasal reaksiyonlar dizisi olarak tanımlanabilir. Metabolizma, anabolizma (yapım) ve katabolizma (yıkım) tepkimeleri olarak ikiye ayrılır ve birbirleri ile denge halindedirler. Katabolizma; enerji elde etmek için karbonhidrat, lipid ve protein gibi organik moleküllerin basamak basamak katabolik reaksiyona uğrayarak daha küçük ve daha basit moleküllere ayrılmasıdır. Anabolizma da; enerji kullanarak küçük yapı taşı olan moleküllerden polisakkarit, protein, lipid ve nükleik asit gibi makromoleküllerin sentezini sağlayan reaksiyonlardır (Cooper and Hausman, 2016).

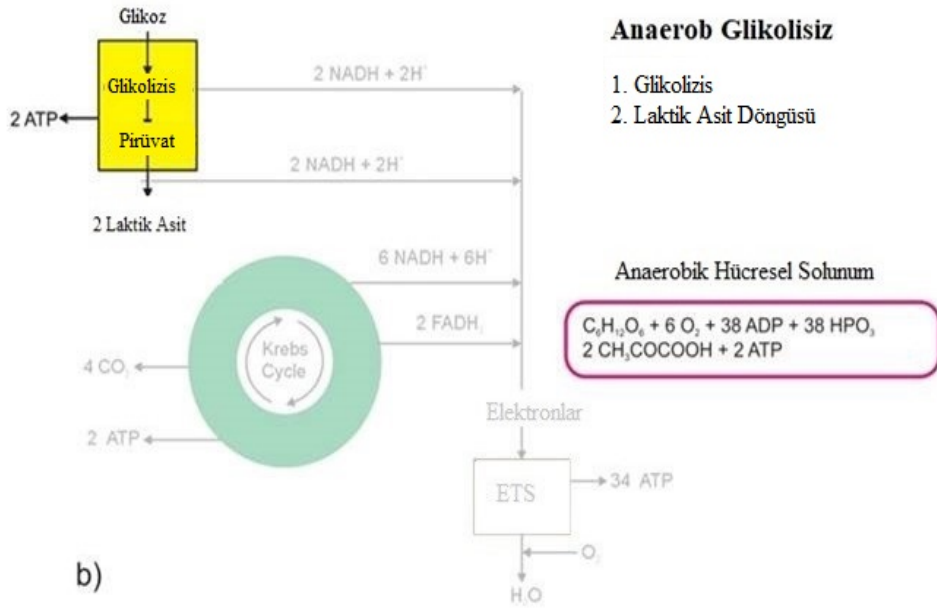
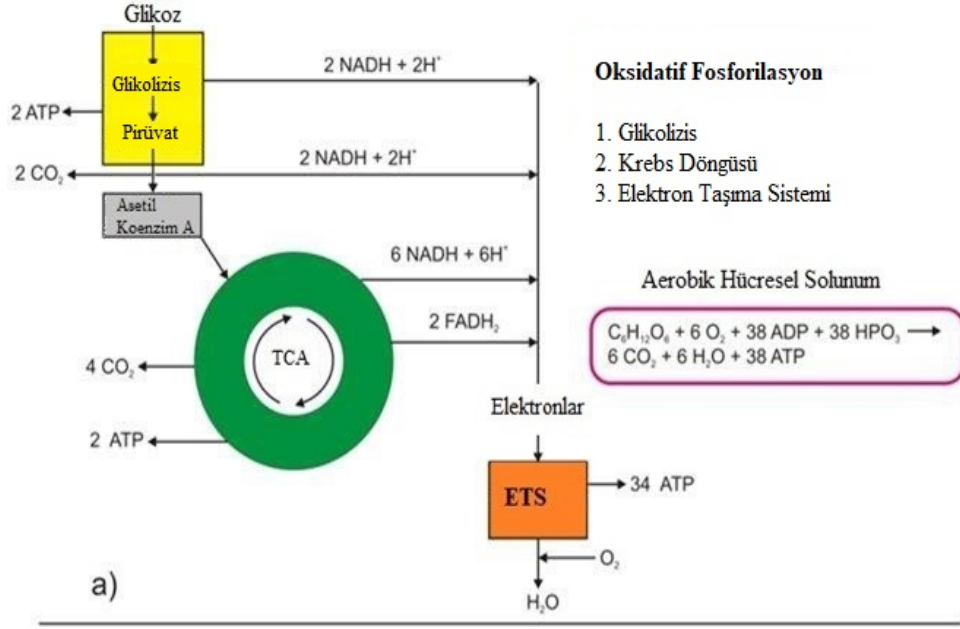
Hücreler metabolik faaliyetlerini gerçekleştirmek için gerekli olan enerjiyi başlıca glikozdan temin ederler. Glikoz sitoplazmada glikolizis aracılığıyla pirüvata kadar parçalanır ve 2 molekül ATP sentezlenir. Eğer ortamda yeterli miktarda oksijen varsa oluşan pirüvat mitokondride trikarboksilik asit döngüsüne (TCA, Krebs ya da sitrik asit döngüsü) girer ve daha sonra da elektron taşıma sistemi (ETS) yardımıyla CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O' ya kadar katabolize edilir. Bu olayın sonunda da net 36 molekül ATP sentezlenir. Mitokondride oksijen varlığında glikozdan enerji sentezlemek için meydana gelen kimyasal tepkimelere oksidatif fosforilasyon adı verilir ve toplamda 38 molekül ATP sentezlenir. Ancak eğer ortamda yeteri kadar oksijen yoksa glikolizis

sonucu oluşan pirüvat oksidatif fosforilasyona uğramadan laktat dehidrojenaz (LDH) enziminin etkisiyle laktik aside (laktat) dönüştürülür. Bu olaya ise anaerob glikoliz adı verilir ve sadece 2 molekül ATP sentezlenir (Şekil 2.5.) (Burnette and Lippincott-Schwartz, 2016; Melkonian and Schury, 2019). Bu iki reaksiyon kısaca aşağıda gösterilmiştir (De Berardinis et al., 2008).

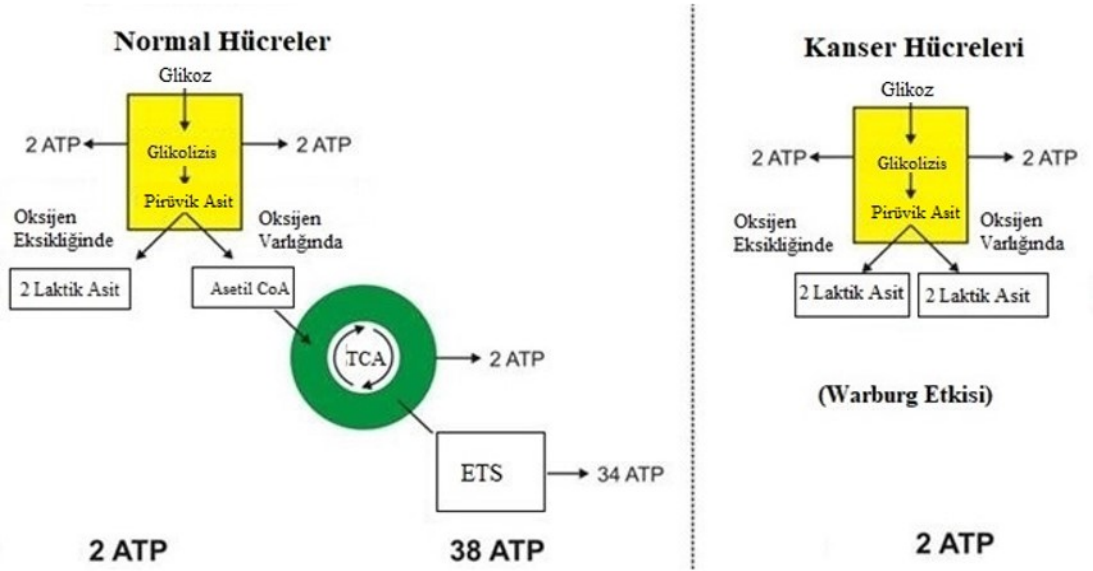


Kanser hücrelerinin canlılığını devam ettirme, büyüme ve çoğalma gibi anabolik reaksiyonlarını desteklemek için metabolik faaliyetlerini değiştirmeleri kanserin temel özellikleri arasında yer almaktadır. Metabolik değişikliklerin önemli bölümü enerji metabolizmasında meydana gelmektedir ve aerobik glikolize dayalı olarak yeniden programlanmıştır (Liberti and Locasale, 2016). Kanser hücreleri ortamda yeteri kadar oksijen bulunmasına rağmen glikozu glikolizisle pirüvata ve sonra da ilginç bir şekilde laktik aside dönüştürürler. Bu olaya da aerobik glikoliz ya da “Warburg Etkisi” adı verilmektedir (Şekil 2.6.) (Cairns et al., 2011; Devic, 2016).

İlk defa 1920’ lerde Otto Heinrich Warburg (sitokrom c oksidazın keşfi ve mitokondriyal solunum ve hücrel metabolizma konusundaki çalışmalarıyla Nobel Ödülü sahibi Alman Fizyolog) ve arkadaşları, kanser hücrelerinin normal hücrelere oranla çok fazla miktarda glikozu hücre içine aldığını ve oksijen varlığında bile glikozu laktik aside metabolize ederek enerji sentezlediğini göstermişlerdir (Koppenol et al., 2011; Warburg, 1925).



Şekil 2.5. Hüresel düzeyde glikoz metabolizması (a; Oksidatif fosforilasyon, b; anaerobik glikoliz) (Devic, 2016)



Şekil 2.6. Farklılaşan doku çoğalan doku ve tümör hücrelerinde oksidatif fosforilasyon, anaerobik glikoliz ve aerobik glikolizin (Warburg Etkisi) şematik gösterimi (Devic, 2016)

Warburg etkisi ya da aerob glikolizis olayı kanser hücreleriyle özdeşleşmiş olmasına rağmen hem fizyolojik hem de patolojik koşullar altında hızlı çoğalan hücrelerde de meydana gelebilmektedir. Embriyonik kök hücre, T lenfosit ve makrofajlar gibi hızlı proliferasyon özelliği gösteren normal hücreler ihtiyaç duydukları enerjiyi aerobik glikolizis yoluyla elde ederler (Sun et al., 2019). Ayrıca memeli ve kanser hücrelerinden başka *Plasmodium* ve *Toxoplasma* gibi hızlı çoğalan parazitlerin gelişim evrelerinde, maya ve *E. Coli* türlerinde de aerobik glikolizis görülmektedir (Abdel-Haleem et al., 2017).

Son yıllarda Warburg etkisinin altında yatan moleküler mekanizmaları anlamak için yapılan araştırmaların sayısı artmıştır. Ancak tümör hücrelerinde, neden glikolizisin arttığı ve yeteri kadar oksijen olmasına rağmen neden daha az enerji verimliliğiyle sonuçlanan bu enerji metabolizmasını kullandığı net bir şekilde açıklanmış değildir. Bu “neden” sorusunun hakkında öne sürülen bazı muhtemel mekanizmalar vardır. Bunların 1) mitokondriyal DNA mutasyon ve delesyonları 2) nükleer DNA (Ndna) mutasyonları veya anormal gen ekspresyonu 3) onkojenik transformasyon ve 4) tümör mikroçevresinin etkisi olduğu düşünülmektedir (Chen et al., 2007).

Warburg etkisiyle enerji elde edilmesi kanser hücrelerine avantaj sağlamaktadır. Kanser hücreleri hızlı bölünebilen hücreler oldukları için enerji ihtiyaçlarının kısa süre

içinde karşılanması gerekmektedir. Kanser türüne göre değişiklik göstermekle beraber kanser hücrelerinde glikolitik akış normal hücelere göre 2-200 kat daha yüksektir (Akram, 2013; Marín-Hernández et al., 2006; Moreno-Sánchez et al., 2007). Enerji verimliliği daha az olmasına rağmen aerobik glikoliz metabolizmasının hızı, mitokondride glikozun oksidatif fosforilasyonundan 10-100 kat daha hızlıdır. Ayrıca kanser hücrelerinin devamlı bölünmeleri gerektiği göz önüne alındığında da ATP sentezinin devamlı olması gerekmektedir (Liberti and Locasale, 2016; Melkonian and Schury, 2019).

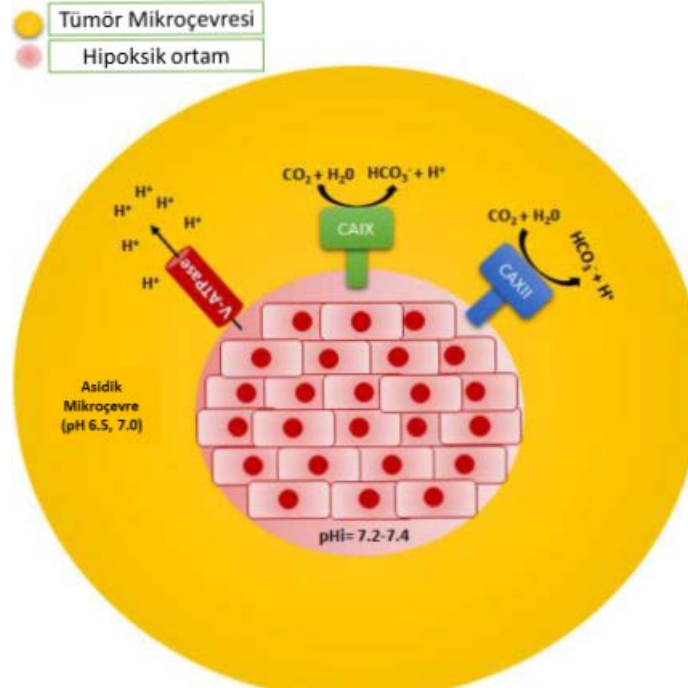
### **2.3.2. Asidik Mikroçevre**

Kanser hücrelerinin hızlı proliferasyon özelliğinden dolayı normal doku hücrelerine göre daha fazla enerjiye gereksinimleri vardır. Gereksinim duydukları enerjiyi karşılamak için fazla miktarda glikozu metabolize ederler ve bunun sonucunda yüksek miktarda CO<sub>2</sub> ve laktat meydana gelir. Açığa çıkan laktat ve CO<sub>2</sub> molekülünün hücre dışına taşınması tümör mikroçevresinin normal dokulara göre daha asidik yapı kazanmasına neden olur (Hao et al., 2018; Pavlova and Thompson, 2016). Hipoksik/asidik mikroçevre özellikle invaziv tümörlerin genel özelliğidir (Webb et al, 2011; Ye et al., 2016).

Hücrel faaliyetlerin bir düzen içinde gerçekleşmesi için hücre içi Ph değerinin nötr ya da hafif alkali dengede tutulması gereklidir. Bu dengenin sağlanması ve devam ettirilebilmesi için glikoz metabolizması sonucu açığa çıkan laktat ve CO<sub>2</sub> gibi son ürünlerin hücre membranından dışarı taşınması gerekmektedir. Bu yüzden hücre dışı hücre içine göre daha düşük Ph değerine sahiptir. CO<sub>2</sub> difüzyon taşıma sistemiyle pasif bir şekilde taşınmaktadır. Fakat çoğu durumda glikoz metabolizmasından sonra açığa çıkan CO<sub>2</sub> ve laktat düşük perfüzyondan dolayı hücre dışındaki tümör mikroçevresinde birikir. Bu durumda mikroçevredeki laktat ve CO<sub>2</sub>' in salınımı karbonik anhidraz enzim gibi özel membran proteinlerinin yardımlarıyla gerçekleştirilir. Tümör hücrelerindeki Ph düzenlenmesinde anyon değiştirici (SLC4A1, SLC4A2 ve SLC4A3), proton taşıyıcısı vakuoler ATPaz (V-ATPaz), monokarboksilat taşıyıcısı (MCT1, MCT2, MCT3 ve MCT4), sodyuma bağımlı klor/bikarbonat taşıyıcısı (SLC4A8) ve Na/H taşıyıcısı rol oynamaktadır (Hao et al., 2018; Neri and Supuran, 2011). Tümör hücrelerindeki bazı Ph düzenleyicileri ve temel fonksiyonları Tablo 2.4. ve Şekil 2.7.' de belirtilmiştir.

Tablo 2.4. Tümör hücrelerindeki pH düzenleyicileri ve temel fonksiyonları (Hao et al., 2018; Neri and Supuran, 2011)

Adı	Tanımı	Fonksiyonu
SLC4A1 SLC4A2 SLC4A3	Anyon taşıyıcısı	Kanser hücresinin içinde bulunan $\text{HCO}_3^-$ iyonunu hücre dışına taşır.
SLC4A7	Sodyum bikarbonat taşıyıcısı	Hücre membranından sodyum ve bikarbonat iyonlarını birlikte taşır.
SLC4A8	Klor/Bikarbonat iyonuna bağımlı sodyum taşıyıcısı	Tümör hücresinden dışarıya $\text{Cl}^-$ taşırken aynı zamanda $\text{Na}^+$ iyonuna bağlı $\text{HCO}_3^-$ hücre içine taşır.
SLC9A1	$\text{Na}^+/\text{H}^+$ taşıyıcısı 1	Hücre içi $\text{H}^+$ 'yi hücre dışına ve aynı anda $\text{Na}^+$ 'u hücre içine taşır.
MCT1 MCT2 MCT3	Monokarboksilat taşıyıcısı	Glikoliz ürünlerinin (hem laktik asit hem de diğer monokarboksilatlar) içeriden dışarıya ve dışarıdan içeriye taşır.
V-ATPaz	Proton taşıyıcı vakuoler ATPaz	$\text{H}^+$ 'nın hücre içi ve dışı taşınmasından sorumlu olan tümör hücrelerinin zarı üzerindeki proton pompasıdır.

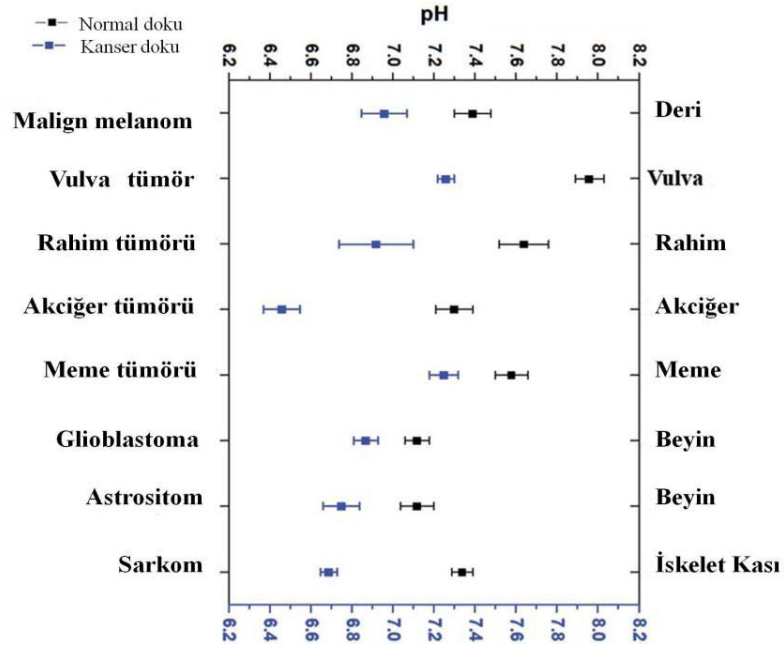


Şekil 2.7. Hipoksik ve asidik kanser hücrelerinde pH düzenleyicileri (Tuccitto, 2018)

V-ATPaz ve karbonik anhidrazlar (CAIX ve CAXII) hipoksik ve asidik tümör hücrelerinin hücre yüzeyinde eksprese edilir. V-ATPaz, ATP hidrolizi sonucu açığa

çıkan proton ( $H^+$ ) ile birleşerek hücre içinden hücre dışı boşluğa taşınmasında görevlidir. CAIX ve CAXII,  $CO_2$  ve  $H_2O$ 'yu bikarbonata ( $HCO_3^-$ ) ve protonlara dönüştürür. Bu reaksiyonlar hücre dışı pH'ı asitleştirirken hücre içi pH'ın nötr ya da hafif alkali pH değerinde kalmasına yardımcı olur (Tuccitto, 2018).

Tümör hücrelerinin mikroçevresi genellikle asidik özellikte olması kanserin karakteristik özelliğindedir. Son yıllarda kanser hücrelerinin hücre içi ve dışı pH değerini pH-duyarlı nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (MRS), pozitron emisyon tomografisi (PET), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve optik görüntüleme gibi gelişmiş teknikler kullanılarak belirlemek mümkün olmuştur (Zhang et al., 2010). Kanser hücrelerinde hücre içi pH değerinin normal hücrelere benzer şekilde hafif alkali veya nötr civarında olduğu tespit edilmiştir (Hao et al., 2018). Normal hücrelerin hücre içi pH değeri yaklaşık 6.99-7.05 arasında değişirken kanser hücrelerinin ki 7.1-7.7 arasında değişmektedir (Alessandra, 2017). Ancak kanser hücrelerinin hücre dışı pH değeri normal hücrelerinkine göre daha asidik özelliktedir. Tümör hücrelerinin ekstrasellüler pH'ı normal hücrelere göre 0.3-0.7 birim kadar düşüktür. Normal dokuların hücre dışı pH değerleri 7.2 ile 7.5 arasında iken tümör dokusunun hücre dışı pH değerleri 6.5 ile 6.9 arasında değişmektedir (Hao et al., 2018). Örneğin malign melanom dokularında ekstrasellüler pH değeri ortalama 6.96 olmasına rağmen normal cilt hücrelerinde ortalama 7.39 pH değerindedir ve arada 0.43 fark bulunmaktadır. Uterus pH ortalaması 7.64 iken uterus tümörlerinde ekstrasellüler pH değerinin ortalaması 6.92'dir. Çeşitli doku ve tümör hücrelerinin pH değerleri arasındaki farklar Şekil 2.8.'de gösterilmiştir (Hao et al., 2018).



Şekil 2.8. Normal ve kanserli dokuların mikroçevresinin pH değeri (Hao et al., 2018, Güvenalp, 2019)

### 2.3.2.1. Asidik Mikroçevrenin Tümör Proliferasyonuna Etkisi

Asidik mikroçevre kanser hücrelerinin büyümesini, proliferasyonunu ve hareketliliğini destekleyen birçok dezavantaj sağlamaktadır (McIntyre et al., 2016; Sever and Brugge, 2015). Ayrıca asidik mikroçevre kontrollü hücre ölümü sinyal iletim mekanizmasında rol oynayan bazı molekülleri (Bcl-2 ve Bcl-xL) çeşitli yollarla etkileyerek tümör hücresinin hayatta kalmasına ve hücrelerin normal doku sınırlarının ötesinde anormal yayılmasına katkıda bulunur (Ryder et al. 2012). Apoptoz başta olmak üzere diğer hücre ölüm mekanizmalarına karşı direnç oluşturmaktadır. Kanser hücrelerinde büyüme uyarıcı ve engelleyici çoklu kontrol mekanizmalarında deregülasyon meydana gelmektedir. Bunların temelinde, kansere neden olan genetik ve epigenetik değişikliklerin neden olduğu hücre sinyal iletim düzensizliği yer almaktadır. Bu deregülasyon hücrelerde büyümeyi uyarıcı veya inhibe edici sinyallerden farklı seviyede bağımsız hale gelerek hücrelerin devamlı büyümesi ve bölünmesine neden olmaktadır (Sarosi et al., 2005; Sever and Brugge, 2015).

### 2.3.2.2. Asidik Mikroçevrenin Tümör İnvazyonu ve Metastazına Etkisi

Tümör hücrelerinin invazyon mekanizmaları karmaşıktır ve çevresel koşullara yanıt olarak değişebilmektedir (Estrella et al., 2013). Hücrelerin mezenkimal özellikler kazanarak epitel özelliklerini kaybettiği süreç olan epitelden mezenkime geçiş (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) kanserin ilerlemesinde önemli bir adımı

oluşturmaktadır. Hücre-hücre ve hücre-matriks yapışma moleküllerinin ekspresyon seviyesi azaldığı veya ortadan kalktığı durumlarda hücreler kendi mikroçevreleriyle bağlantılarını kaybederler. Bu durum kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz olaylarına daha yatkın hale gelmesine katkı sağlamaktadır (Lamouille et al, 2014; Le Bras et al., 2012; Ye and Weinberg, 2015). EMT geçiren tümör hücreleri tümör kitlesini terk edebilir ve çevresindeki normal dokuya ya da uzak dokulara göç ederek tümörlerin yayılmasına yol açabilir (Le Bras et al., 2012; Redfern et al., 2018). Asidik mikroçevre E-kaderin, N-kaderin ve vimentinin gibi EMT ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunu modüle ederek hücre arası bağlantıları etkilemesi sonucu invazyonu arttırmaktadır (Riemann et al., 2019).

Lizozomal proteinaz veya endopeptidaz grubunda yer alan katepsinler metastaz ve invazyon gibi farklı tümorojenik olaylarda önemli rol oynamaktadır. Katepsinler hücre yüzeyinde bulunan proteinlere bağlandıklarında proteolitik etki meydana getirir (Joyce and Hanahan, 2004). Hücre dışında meydana gelen bu etkileşim sonucunda kanser hücreleri çevrede bulunan doku, kan ve lenf damarlarına ya da daha uzak bölgelerde bulunan dokulara invazyon veya metastaz yapabilir (Tan et al., 2013). Katepsinler inaktif olarak sentezlenirler ve endopeptidaz ya da ektopeptidazlar tarafından aktive edilirler. Warburg etkisinden kaynaklanan asidik mikroçevre hücre dışı katepsin L' nin aktivitesini kolaylaştırır. Asidik bir ortamda, katepsin L, ECM' nin kolajen tipleri I ve IV, fibronektin ve laminin gibi bileşenlerini parçalayabilir (Lankelma et al., 2010). Asitle-aktive tümöral katepsin L, ürokinaz tipi plazminojen aktivasyonu (uPA) aracılığıyla plazminojeni kanserle yakın ilişkili olan plazmine dönüştürür. Plazmin daha sonra hücrelerin yapısı ve hareketini etkileyen fibronektin, laminin, proteoglikan ve kollajen gibi hücre dışı matrikste (ECM) bulunan çeşitli bileşenlerin yapısını bozarak büyüme faktörlerini aktive eder (Lyons et al., 1988). Kanser hücrelerinde meydana gelen uPA' nın artan ekspresyonu hücrelerin invazyon yeteneğini artırır (Ellis et al., 1992). uPA ve uPA reseptör etkileşmesi reseptör tirozin kinazları da etkinleştirebilir. Bu türde meydana gelen etkileşim, EGF, PDGF, ILGF ve HGF yokluğunda bile fokal adezyon kinaza bağımlı bir şekilde hücrelerin invazyon yeteneğini indükleyebilir (Eden et al., 2011; Smith and Marshall, 2010).

Tümör hücrelerinin invazyon ve migrasyonunda hücre-hücre, hücre-matriks yapışmasının kaybı ve hücre dışı matriks (ECM) bileşenlerinin bozulması meydana gelir. Hücre-hücre ve hücre-matriks yapışma moleküllerinin ekspresyonu azaldığında

veya yok olduğunda, hücreler kendi mikroçevreleriyle temaslarını kaybeder ve çevreleyen dokuya invaze olmayan ve migrasyona yatkın hale gelir (Lankelma et al., 2010). Katepsin B MMP-1 ve MMP-3' ü doğrudan aktive ederek ECM' nin kolajen, jelatin ve tenasin gibi bileşenlerin yapısını bozabilir. Böylece tümör hücrelerinin hücre dışı boşluktan invazyonunu ya da metastazını kolaylaştırır (Tan et al., 2013). Ayrıca, asitle aktive olan katepsin B ve katepsinle aktive edilmiş uPA/plazminojen/plazmin, proteolitik sinyal iletim yoluyla salgılanan metalo-proteazları (MMP' ler) aktive eder. MMP' ler, hücre dışı matriksin bütün bileşenlerini tamamen parçalayabilen endopeptidazlardır. Tümör hücrelerinin salgıladığı MMP-1, -2, ve -9 ile birlikte proteolitik ürokinaz-tip plazminojen aktivatör sisteminin (uPA/uPAR) aktivasyonu invazyonu arttırmasının yanı sıra anjiyogenez ve tümör hücresi yayılması, kana göç etmeleri, uzak dokularda kolonize olma yeteneklerini geliştirirler (Pachmayre et al., 2017).

### **2.3.2.3. Asidik Mikroçevrenin Tümör Angiogenezisine Etkisi**

Anjiyogenez tümör kitlesinde önceden var olan kan damarlarından yeni kan damarlarının oluşması anlamına gelmektedir. Kanser hücreleri çok hızlı çoğaldıklarından büyüme ve gelişmesi için ihtiyaç duydukları besin maddelerini anjiyogenezisi artırarak karşılamaya çalışırlar (Hanahan and Weinberg, 2000; Semenza, 2003). Proanjiyojenik (damar oluşumunu destekleyen) ve antianjiyojenik (damar oluşumunu baskılayan) faktörler arasındaki etkileşim tümör hücrelerindeki genetik değişiklik ve lokal hipoksi durumundan etkilenerek yeni damarların şekillenmesini sağlayan anjiyojenik faktörlerin salgılanmasına yol açar. HCC ve birçok solid-tümörde endotel hücrelerinin aktivasyonu anjiyogenez, proliferasyon ve invazyonu arttırmaktadır. Anjiyojenik faktörlerin salgılanması damar endotel hücrelerini aktive ederek yeni kan damarlarının oluşmasıyla sonuçlanır. Ancak kanser hücrelerinin sahip olduğu kan damarları normal kan damarlarından yapısal ve işlevsel olarak farklı özellikler göstermektedir. Bu farklılığın sebebini başlıca anjiyogenezde yer alan sinyal yollarının düzensizliği ve anjiyojenik faktörlerin gen ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler oluşturmaktadır. Tümör kan damarları; tipik olarak düzensiz ve anormal dallanma, tam şekillenmemiş bazal membran, tam olarak çevrelemeyen damar düz kası ve aşırı derecede geçirgenlikle karakterizedir. Ayrıca bazı tümör kan damarlarında lümen yüzeyinde kanser hücreleri de bulunabilmektedir (Chang et al., 2000). Kanser ile ilişkili kan damarları sadece

yapısal açıdan değil, aynı zamanda moleküler ekspresyon ve düzenleme seviyesinde de normal kan damarlarından farklılık gösterir (Nagy et al., 2009).

Anjiogenezde uyarıcı ve inhibe edici faktörler arasında bir denge mevcuttur. Anjiyogenez, proanjiyojenik (uyarıcı) faktörlerin artması durumunda uyarılır. Özellikle bu basamak tümör gelişiminde hız sınırlayıcı bir rol oynadığı kabul edilmektedir (Hanahan and Folkman, 1996). Kanser hücreleri hipoksi ve mikroçevrede meydana gelen değişikliklere yanıt olarak anjiyojenik faktörlerin salınımını artırır ve anjiyogenez inhibitörlerini baskılar (Elias and Dias, 2008). HCC hücreleri tarafından vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), bazik fibroblast büyüme faktörleri (bFGF), anjiyopoiyetinler, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), plasental büyüme faktörü (PLGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) gibi proanjiyojenik faktörlerin salgılanması yakınlarda yeni damarların şekillenmesini destekler (Fukumura et al., 1998; Hanahan and Folkman, 1996; Jung et al., 2003). Angiogenezisde rol oynayan VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasental büyüme faktörünün sentezine tirozin kinazlar rol oynamaktadır (Ferrara et al., 2003). Büyüyen tümörlerin merkezindeki hipoksi, hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF) -1 $\alpha$  ve VEGF gibi bir çok hipoksiye yanıt genlerinin ekspresyonunu indükler (Harris, 2002). Hipoksi ayrıca trombospondin-1 gibi antianjiyojenik faktörlerin ekspresyonunu da inhibe eder (Fox et al., 2001). Ayrıca tümör baskılayıcı genlerdeki genetik değişiklikler proanjiyojenik faktörlerin sentezini artırabilir (Longo et al., 2002). En güçlü uyarıcı anjiyojenik faktörlerden biri olan VEGF bir çok kanser türünde ekspresyon seviyesinin önemli derecede arttığı bildirilmiştir (Ferrara and Davis-Smyth, 1997).

#### **2.3.2.4. Asidik Mikroçevrenin Kemoterapötiklere Karşı Oluşan Dirence Etkisi**

Asidik mikroçevre özellikle solid tümörlerin tedavisinde kullanılan kemoterapötiklere karşı ilaç direnci meydana getirir (Liu, 2009; Natarajan Raghunand and Gillies, 2000). Başarılı antikanser tedavisinde ilaç moleküllerinin kanser hücreleri tarafından hücre içine alınması ve/veya hücre içi hedef noktalarını etkilemesi gerekmektedir. Bu iki mekanizma da hücre dışı pH' dan etkilenir. Asidik hücre dışı pH "iyon yakalama" olarak adlandırılan ve ilaçların iyon protonasyonuna dayanan mekanizma yoluyla özellikle zayıf bazik karakterde olan kemoterapötik ajanların hücre içi konsantrasyonunu azalmaktadır (Daniel et al., 2013; Gerweck et al., 2006;

Mahoney et al., 2003; Natarajan Raghunand et al., 2003). Bu nedenle, kanser hücrelerinin hücre dışı pH değerini arttırarak hücre içi pH' ya yakın değere ulaştırılması tedavide başarı oranını büyük ölçüde arttırabilir (Peppicelli et al., 2017). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarda düşük pH' ının antrasiklin (doksorubisin gibi), antrakınon (mitoksantron gibi) ve vinka alkaloidleri (vinkristin ve vinblastin) gibi zayıf baz kemoterapötiklerin hücre içine alımını ve etkinliğini azalttığı gösterilmiştir (Gerweck et al., 2006; Tannock and Rotin, 1989). Asidik mikroçevrenin çeşitli yöntemlerle alkali pH' ya kaydırılması bu zayıf baz karakterdeki ilaçların bazılarının hücre içi birikimini ve sitotoksitesini arttırmıştır (Raghunand et al., 1999).

Asidik mikroçevre çoklu ilaç direncinde (Multi Drug Resistance, MDR) önemli rol oynayan P-glikoprotein (pGP) ekspresyonu ve aktivitesini arttırmaktadır. Etkinliği artan pGP kemoterapide kullanılan ilaçlara yönelik direnç meydana gelmesinde büyük önem taşımaktadır (Robinson et al., 2020) . Ayrıca hücrelerin S-fazı basamağı diğer hücre döngüsü basamaklarına göre kemoterapi ve radyoterapiye daha fazla duyarlıdır. Asidik mikroçevre G0 fazındaki hücrelerin yüzdesini artırarak kanser tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı başka bir yolla da direnç meydana getirebilmektedir (Peppicelli et al., 2017).

### **2.3.2.5. Asidik Mikroçevrenin İmmun Yanıt Üzerindeki Etkisi**

İmmun sistem hücreleri vücudu yabancı patojenlere karşı koruma sağlamanın yanı sıra hasarlı hücreleri ve tümör hücrelerini yok etmede de önemli rol oynamaktadır. T hücreleri, immün sistemin en önemli efektör hücreleridir. Sitotoksik T hücreleri (CD8<sup>+</sup> hücreleri) ve yardımcı T hücreleri (CD4<sup>+</sup> hücreleri) olmak üzere iki tür tümörü infiltre eden T hücresi (tumor-infiltrating lymphocytes) vardır. Bu hücreler, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon gama (IFN- $\gamma$ ), interlökin (IL)-2, IL-17, IL-22 ve IL-36 gibi sitokinleri salgılayarak antitümör etki gösterirler (Dankbar et al., 2000; Ferlin et al., 2000). Düzenleyici T hücresi ve B lenfositleri immün sisteminin başlıca baskılayıcı hücreleridir. Bu hücreler, lenfositlerin bağışıklık tepkisini bastırmak için dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- $\beta$ ), IL-10, IL-35, IL-37 ve diğer sitokinleri salgılar (Jiang et al., 2020). Kanser hücrelerine karşı immün yanıtın şekillenmesinde doğal öldürücü (NK) hücreler önemli görev yapmaktadır. NK' lar kemokinler tarafından yönlendirilen kanserli bölgelere göç ederler. Aktive edilmiş NK hücreleri, tümör büyümesini inhibe etmek için IFN- $\gamma$ , granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör, TNF- $\alpha$ , IL-18 ve diğer faktörleri salgırlar

(Hayashi et al., 2004; Hideshima et al., 2002). Bazı kanser türlerinde asidik mikroçevre sitotoksik T lenfosit ve NK' ların tümörisidal aktivitesini baskılamaktadır. Asidik mikroçevre düzenleyici T hücrelerinin aktivitesini veya immunsupresif sitokinlerin üretimini artıran kemokinlerin antikanser aktivitesini baskılar. Ayrıca hücre dışı pH 6.5' e düştüğünde tümör- infiltre T hücrelerinin sitolitik aktivitesi ve sitokin sekresyonunu bozulur (Calcinotto et al., 2012).

#### 2.4. Hücre Kültürü

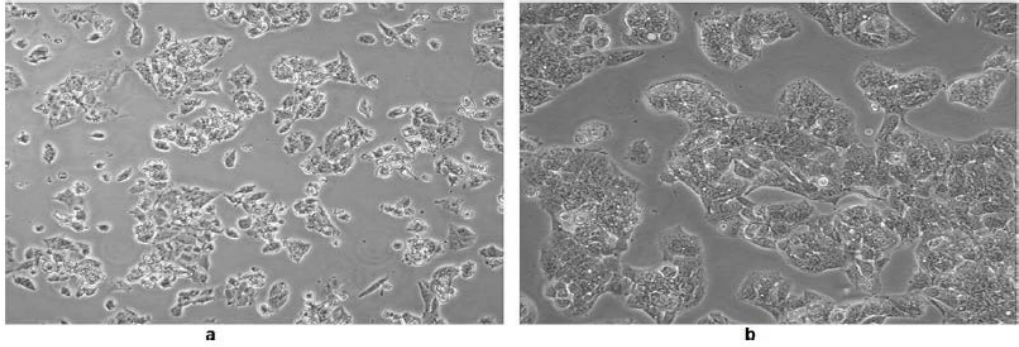
Kanser çalışmalarında *in vitro* ve *in vivo* modeller, özellikle ilaç araştırma-geliştirme, proliferasyon, metastaz, invazyon ve moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına imkan sağlayan yöntemlerdir (Katt et al., 2016). Hücre kültürü ve hayvan deneyleri kanser araştırmalarında insan çalışmaları arasında köprü kurarlar (Suckow et al., 2012). Hücre kültürü primer ve hücre hattı olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır. Primer hücre kültürü ilgili ana dokudan doğrudan izole edilen hücrelerin kültürleridir. Hücre hattı ise primer kültür aşamasından sonra subkültür ya da pasajlama yapıldığında elde edilir. Hücre hatları ya sınırsız bölünebilme potansiyeline sahip “devamlı hücre hattı (continuous lines)” ya da bölünebilme yetenekleri sınırlı olan sonlu çizgiler olarak kategorize edilebilir (Langdon, 2004). Primer hücre kültürleri elde edildikleri dokularının morfolojik, fonksiyonel özelliklerini koruması ve *in vivo* koşullarla çok benzer olması gibi avantajları bulunmaktadır. Ancak *in vitro* şartlar altında proliferasyon yeteneğinin sınırlı ve belirli bir yaşam süresinin olması, donörler arası değişkenlik göstermesi ve yüksek maliyet gerektirmesi gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Hücre hatları devamlı veya sınırlı sınırsız büyüme yeteneğine sahip olabilirler. Hücre hatlarının temin ve kullanım kolaylığı, optimal kültür koşulları altında sürekli olarak bölünebilme/büyüme yeteneği (devamlı hücre hattı) ve donöre bağlı olmayan sabit fenotip gibi *in vitro* çalışmalarda avantaj sağlayan birçok özelliklere sahiptirler. Tümörlerden elde edilen hücre hatları tümör hücrelerinin basitleştirilmiş ve kontrollü bir ortamda araştırılmasına olanak tanır (Gomez-Lechon et al., 2008; Meditz and Rinner, 2018). Kanser kökenli devam hücre hatları elde edildiği kanser türünün genotipik ve fenotipik özellikleri, gen ekspresyonunu ve ilaç duyarlılığı yansıtmaktadır (Masters, 2000).

Hücre kültürü uygulamalarında tümör modelleri kanser ile ilgili ilaç araştırma-geliştirme ve moleküler mekanizmaların araştırılmasında geniş kullanım alanı bulmuştur (Katt et al., 2016).

### 2.4.1. HepG2 (İnsan Hepatosellüler Karsinoma) Hücre Hattının Genel Özellikleri

HepG2, Hep3B, HepaRG, Huh7 ve HBG-BC2 hücreleri *in vitro* çalışmalarda primer insan hepatositlerine alternatif olarak kullanılan hepatoma hücre hatlarıdır. Bu hücre hatları arasında HepG2 hücre hattı ilaç metabolizması ve hepatotoksisite çalışmalarında yaygın olarak tercih edilmektedir (Donato et al., 2015).

HepG2 hücre hattı iyi derecede farklılaşma gösteren 15 yaşındaki Kafkaslı bir erkek hastanın hepatosellüler karsinoma örneğinden hazırlanmıştır (Qiu et al., 2015). 1980 yılında, Philadelphia Wistar Enstitüsü' ndeki araştırmacılar tarafından "The Human Hepatoma-Derived Cell Line" patenti alınarak literatüre girmiştir. HB 8065 kodlu Amerikan Tip Kültür (American Type Culture Collection, ATCC) havuzunda bulunmaktadır (ATCC, 2020). HepG2 hücreleri tümorojenik olmayan, yüksek proliferasyon oranına sahip adherent hücrelerdir. Bu hücreler tek tabaka halinde büyüyen (monolayer) ve karakteristik hücre kümeleri veya adaları (island) oluşturan epitel benzeri özellikler göstermektedir. Ayrıca hepatit B virüsü negatif ve ortalama 55 (50-56) kromozoma sahiptirler (Donato et al., 2015; Qiu et al., 2015). HepG2 hücrelerinin histomorfolojik görüntüleri Şekil 2.9.' da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. HepG2 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (a: Düşük yoğunluk, b: Yüksek yoğunluk, 40X) (ATCC, 2020)

HepG2 hücrelerinin en önemli özelliği birçok farklılaşmış karaciğer fonksiyonunu gerçekleştirmesidir. HepG2 hücreleri hücre zarında bulunan reseptörleri koruyabilmesi, plazma proteinlerinin büyük bir kısmını üretebilmesi, sitokinler ile IL-6 proteinlerini işleyebilmesi, yüksek-düşük yoğunluktaki lipoproteinleri sentezlemesi-salıvermesi, serumsuz besi yerinde üretilmesi durumunda karaciğere özgü çeşitli serum proteinlerini üretebilmesi, CYP450' ye bağımlı monooksijenaz enzimlerine

sahip olması ve glukuronik-sülfatla birleşme tepkimelerini gerçekleştirebilmesi sonucu detoksifikasyon işlemlerinde gerekli olan normal biyotransformasyon etkinliklerinin büyük bir kısmını yapabilmesi gibi avantajlarından dolayı *in vitro* toksisite modellemesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Dehn et al., 2004).

HepG2 hücreleri, sorafenib ve HCC ile ilgili hücre sinyal iletim mekanizmaları, ilaç araştırması, tedavi geliştirme, mikroçevre ve sitotoksisite gibi araştırmaları içeren birçok çalışmada kullanılmıştır (Geng et al., 2014; Li et al., 2016; Morisaki et al., 2013; Yang and Liu, 2017).

#### **2.4.2. Hücre Canlılık Testleri**

Hücrelerin canlılık düzeyleri ve/veya proliferasyon oranları hücre canlılığının bir göstergesidir (Ishiyama et al., 1996). Sitotoksisite *in vitro* çalışmalarda biyolojik değerlendirme için en önemli parametreler arasında yer almaktadır (Aslantürk, 2018). İlaç başta olmak üzere çeşitli kimyasal maddeler ve pH gibi fiziksel ortam şartları hücre canlılığını ve metabolizmasını etkilemektedir. Kimyasal madde ve farklı fiziksel şartlara maruz kalan hücrelerde hücre membranının yapısal bütünlüğünde bozulma, protein sentezinde duraksama, reseptörlere geri dönüşümsüz bağlanma ve enzimatik reaksiyonlarda aksama gibi farklı mekanizmalar aracılığıyla hasar meydana getirmektedir (Ishiyama et al., 1996). Bu hasarların neden olduğu hücre ölümünü belirlemek için ekonomik, güvenilir ve tekrarlanabilir kısa süreli sitotoksisite ve hücre canlılığı testlerine gereksinim duyulmaktadır. Hücre canlılık ve sitotoksisite testleri; hücre zarı geçirgenliği, enzim aktivitesi, metabolik aktivitenin ölçümü, ATP üretimi, ko-enzim üretimi ve nükleotit alım aktivitesi gibi çeşitli hücre fonksiyonlarına dayanmaktadır. Onkolojik çalışmalarda hücre canlılık testleri, ilaç araştırma-geliştirme yöntemlerinde hem bileşik toksisitesini hem de hücre proliferasyonunu değerlendirmek için kullanılmaktadır (Riss et al., 2016).

#### **2.4.3. Hücre Canlılık Testlerinin Sınıflandırılması**

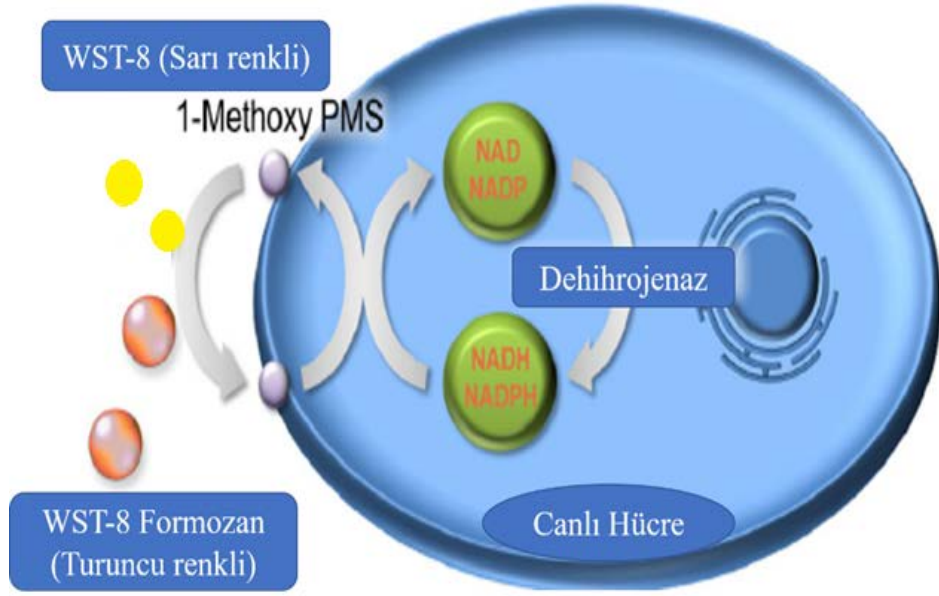
Günümüzde farmakoloji ve toksikoloji alanlarında sitotoksisite-hücre canlılığı tespit etmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler için farklı sınıflandırmalar olmasına rağmen genelde testlerin son aşamalarındaki noktaların ölçüm yöntemine (renk değişiklikleri, floresan vb.) dayanmaktadır. Bu sınıflandırma türüne göre a) boya dışlama testleri; tripan mavisi, eozin, kongo kırmızısı, eritrosin B analizleri, b) kolometrik testler; MTT, MTS, XTT, WST-1, WST-8, LDH, SRB, NRU

ve kristal menekşe testi, c) florometrik testler; alamar mavisi ve CFDA-AM testi ve d) luminometrik analizler; ATP testi ve gerçek zamanlı canlılık analizi olarak ayrılmaktadır (Stoddart, 2011a; Tokur ve Aksoy, 2017). Bu testler arasında çalışmaya uygun yöntemi seçmek doğru ve güvenilir sonuçlar elde etmek için oldukça önemlidir (Aslantürk, 2018).

#### **2.4.4. WST-8 Sitotoksosite Testi**

Hücre kültürü çalışmalarında canlı hücreleri tespit etmek için çeşitli tetrazolyum bileşikleri kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan tetrazolyum bileşiklerini MTT, MTS, XTT, WST-1 ve WST-8 oluşturmaktadır (Riss et al., 2016; Stoddart, 2011b). WST-8' in tespit duyarlılığı diğer tetrazolyum tuzlarına göre daha yüksektir. İkinci nesil tetrazolyum tuzu olarak bilinen WST-8 ilk olarak 1999 yılında Tominaga tarafından sentezlenmiştir. WST-8 (tetrazolium monosodium tuzu, 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) sitotoksik etki ve metabolik aktivitenin belirlenmesi için kullanılmaktadır (Tominaga et al., 1999). Bu yöntem kültür ortamında çözünebilen hafif sarı renkli tetrazolyum tuzunun canlı hücreler tarafından turuncu renkli formazana dönüştürülmesi esasına dayanan spektrofotometrik bir yöntemdir (Kamiloglu et al., 2020).

WST-8 negatif yüklü olduğundan hücre zarından hücre içine geçemez. Elektron taşıyıcısı olan 1-metoksi fenazin metosülfat (1-metoksi PMS) canlı hücrelerden elektronları alarak kültür ortamında bulunan WST-8' e aktarır. Elektron taşıyıcılığı canlı hücrelerdeki dehidrojenaz enzimiyle gerçekleştirilir. Hücre dışına 1- metoksi PMS' nin aktarımı WST-8' i indirgeyerek turuncu renkte formazana dönüştürür (Şekil 2.10.). Ortamdaki indirgenmiş WST-8 miktarı, canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Oluşan turuncu rengin yoğunluğu 30 dakika – 4 saat sonra spektrofotometre yardımıyla 450 nm dalga boyunda ölçülerek canlı hücre sayısı tespit edilebilmektedir (Chamchoy et al., 2019; Kamiloglu et al., 2020; Präbst et al., 2017).



Şekil 2.10. WST-8 tetrazolyum tuzunun canlı hücreler tarafından turuncu renkli formazana dönüştürülmesi (Dojindo, 2020)

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan Hücre Hattı

Tablo 3.1. Kullanılan hücre hattı

Hücre Hattı	Üretici Bilgileri
İnsan Hepatosellüler Karsinoma (HepG2) Hücre Hattı	ATCC, HB-8065, Manassas, VA, USA

##### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihazlar	Üretici Bilgisi
-80 °C Derin Dondurucu	Nüve-DF 490
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik 5006 NF
CO <sub>2</sub> İnkübatör	Nüve-EC 160
Hassas Terazı	Shimadzu Auw 220 D
Hücre Sayım Cihazı (Cell Counter)	Bio-RadTC20™ - 1450102
Canlı Hücre Analiz ve Görüntüleme Sistemi	Nano Entek, Juli-BR, Güney Kore
İnkübatör	Nüve
İnvert Mikroskop	Zeiss-Vert.A1
Laminar Akışlı Güvenlik Kabini	Nüve-MN 120
Mikroplaka Okuyuculu Spektrofotometre	Tecan Software Magellan
Orbital (Manyetik) Karıştırıcı	Wise-Stir-MSH-20A
Otoklav	Nüve-OT 40L
Otomatik Pipetör	Thermo S1 Filler
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Milli-Di, Simplicity 185
Hassas pH Metre	Thermo 710 A
Su Banyosu	Nüve-Nb 20
Soğutmalı Santrifüj Cihazı	Nüve, NF 800 R

### 3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

Tablo 3.3. Kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzeme Adı	Üretici Bilgisi
96 Kuyucuklu Mikroplaka	Corning
75 cm <sup>2</sup> Hücre Kültürü Flaskı	SPL Life Sciences
6 Kuyucuklu Mikroplaka	Corning
Mavi Kapaklı Falcon Tüp (50 mL, steril)	ISOLAB
Mavi Kapaklı Falcon Tüp (15 mL, steril)	ISOLAB
Hücre Sayım Lamı (Cell Counting Slide)	Bio-Rad 145-0011
Kriyovyal (1.5 mL, steril)	ISOLAB
Portüp	ISOLAB
Pudrasız Lateks Eldiven	Tentyflex
Serolojik Pipet (5 mL, steril)	LP Itahana
Serolojik Pipet (10 mL, steril)	LP Itahana
Serolojik Pipet (25 mL, steril)	LP Itahana
Pipet Ucu (1-10 µL, steril)	ISOLAB
Pipet Ucu (10-100 µl, steril)	ISOLAB
Pipet Ucu (200-1000 µl, steril)	ISOLAB
Vasat Süzme Filtresi	TPP (Kod: 199500) 22
Plastik Enjektör (25 mL)	Ayset
Beher (50 mL)	ISOLAB
Parafilm (100 mm genişlik)	ISOLAB
Spatül (makro ve mikro kaşıklı)	ISOLAB

### 3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 3.4. Kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde Adı	Üretici Bilgisi
Sorafenib	Santa Cruz
Fetal Sığır Serumu	GIBCO
L-Glutamin	SIGMA-49419
Minimum Esansiyel Medium Eagle (MEM)	SIGMA-M0275
MEM- Esansiyel Olmayan Amino Asitler	GIBCO-Thermo Fisher-11140-035
NaOH (Sodyum Hidroksit)	Merck-106462
HCl (Hidroklorik asit)	SIGMA-30721
Penisilin-Streptomisin	SIGMA-P4333
Sodyum Bikarbonat	SIGMA-31437
Sodyum Pirüvat	SIGMA-Thermo Fisher-11360070
Tripan Mavisi	SIGMA-T8154
Tripsin-EDTA	Biological Industries, 03-051-5B
Hücre Sayım Kiti (Sitotoksosite Kiti, WST-8)	Abcam
Dimetil-Sülfoksit	Merck

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Hücre Kültürü

#### 3.2.1.1. Hücre Hattının Temini

Tez çalışmasında hücre hattı “HepG2 hepatoma hücre hattında siflutrinle indüklenen toksisitenin mekanizmasında otofajinin regülasyonunun sinyal yolları üzerinden moleküler teknikler ile araştırılması” başlıklı ve PYO.VET.1901.16.013 nolu proje kapsamında temin edilmiş olan HepG2 hücre hattı kullanıldı.

#### 3.2.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Hücre büyütme medyumu Minimum Esansiyel Medyum Eagle’ ın (MEM) hazırlanması; 100 mL MEM’ e 900 mL deiyonize su, 2.2 g sodyum bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ), 2.292 g L-glutamin (2 mM), 10 mL sodyum pirüvat (%1), 10 mL minimum esansiyel medyum esansiyel olmayan amino asit (MEM NEAA) (%1) ve 10 mL penisilin- streptomisin (10 000 IU/mL penisilin ve 10 mg/mL streptomisin) eklenerek hazırlandı. MEM vakum pompası aracılığı ile laminar akış kabini içerisinde membran filtreden geçirilerek steril hale getirildi. Filtreden geçirilen medyum hücrelerin

çözdürülmesi, yıkanması ve subkültüre (pasajlanması) edilmesi aşamalarında taze olarak hazırlandı.

### 3.2.1.3. Hücrelerin Çözdürülmesi

Kriyoviyal içerisinde -80 °C' de saklanan HepG2 hücrelerinin çözdürülme işleminde aşağıdaki prosedür izlenilmiştir.

- Çalışma öncesi laminar akış kabini ve hücre kültürü çalışmaları için gerekli olan tüm malzemeler %70' lik etil alkolle sterilize edildi. Laminar akış kabininin ultraviyole ışığı çalışmadan önce ve sonra 10 dakika açık bırakıldı.

- Ön hazırlık olarak su banyosunun sıcaklığı 37 °C' ye ayarlandı.

- Daha önce hazırlanmış olan ve 37 °C' de bekletilen 100 mL %1 antibiyotik içeren MEM ve 25 mL FBS laminar akış kabini içerisine alındı. 75 cm<sup>2</sup>' lik steril flasklara %20 FBS içeren 20 mL (16 mL MEM ve 4 mL FBS) MEM eklendi. Hücreler çözüldükten sonra kısa sürede bölünme yeteneklerini geri kazanmaları için temel protein kaynağı olan FBS %20 oranında kullanılmıştır.

- Kriyoviyallerdeki dondurulmuş hücreler 37 °C' lik su banyosunda dairesel hareketler yapılarak çözünene kadar (yaklaşık 1-2 dk.) bekletildi. Kontaminasyonu önlemek için kriyoviyal kapağının suyla temas etmemesine dikkat edildi.

- Hücreler çözüldükten sonra kriyoviyallerin dış yüzeyi %70' lik etil alkolle sterilize edildi ve laminar akış kabinine alındı.

- Kriyoviyal içerisinde çözünen hücreler mikropipet yardımıyla homojenize edildi.

- Hücreler medyum (%20 FBS, 20 mL) bulunan 75 cm<sup>2</sup>' lik flask içerisine mikropipet yardımıyla damla damla aktarıldı.

- Hücrelerin tamamen dağılması için flaska ileri-geri dairesel hareketler yaptırıldı ve daha sonra pipetleme yapılarak hücrelerin medyum içine homojen olarak dağılmaları sağlandı.

- Flask üzerine tarih, pasaj no ve hücre tipi yazıldı.

- Flaskta bulunan hücreler invert mikroskopta kontrol edilerek %5 CO<sub>2</sub>' li inkübatörde 37 °C' lik sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı.

▪ Hücrelerin medyumunu 48-72 saat aralıklarla %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren 20 mL (18 mL MEM ve 2 mL FBS) MEM ile değiştirildi.

▪ İvert mikroskop altında hücrelerin büyümesi düzenli olarak kontrol edildi ve %75-80 yoğunluğa (confluence) ulaşıncaya hücreler subkültür (pasaj) edildi.

#### **3.2.1.4. Hücrelerin Subkültür Edilmesi**

HepG2 hücreleri 75 cm<sup>2</sup> lik flasklarda yaklaşık %75-80 yoğunluğa ulaştığında tripsinizasyonla flask yüzeyinden kaldırıldı ve subkültürleri yapıldı. Hücrelerin subkültür edilmesinde aşağıdaki işlemler sırasıyla gerçekleştirildi;

▪ Ön hazırlık olarak MEM, tripsin-EDTA çözeltisi ve FBS 37 °C sıcaklığa ayarlanmış etüvde bekletildi.

▪ Flasklara gerekli sterilizasyon işlemleri yapılarak laminar akış kabine aktarıldı.

▪ Flask içerisinde bulunan medyum uzaklaştırıldı. Sonra hücreler 1 mL %0.25 (w/v) tripsin-EDTA eklenerek yıkandı. Bu yıkama işlemi 2-3 dakika arayla iki kez tekrar edildi.

▪ Yıkama işleminden sonra 5 mL %0.25 (w/v) tripsin-EDTA eklendi ve hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması için %5 CO<sub>2</sub> li etüvde 37 °C' de yaklaşık 5-8 dakika bekletildi.

▪ Hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı invert mikroskop altında kontrol edildi. Yüzeyden ayrılmayan hücreler için flaskın kenarına hafifçe vurularak yüzeyden ayrılmaları sağlandı.

▪ Yüzeyden ayrılan hücreler üzerine tripsinin aktivitesini engellemek için 5 mL MEM ilave edilerek hücrelerin birbirlerinden ayrılmaları için pipetasyon yapıldı.

▪ Flask içeriği 15 mL' lik steril falkon tüplerine aktarıldı ve 2500 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve hücreler 1 mL MEM ile tekrar resüspanse edildi.

▪ Hücrelerin MEM içerisinde homojen dağılması için pipetasyon yapıldı.

▪ Canlı hücre sayımı için steril epondorfa 10 µL hücre süspansiyonu ve 10 µL tripan mavisi eklendi. Epondorftan 10 µL hücre sayım lamına aktarıldı ve otomatik hücre sayım cihazında canlı hücre sayımı yapıldı.

▪ Hesaplanan canlı hücre sayısına göre falkonda bulunan hücelere her flaskta 106 hücre olacak şekilde MEM' le gerekli sulandırma işlemi yapıldı.

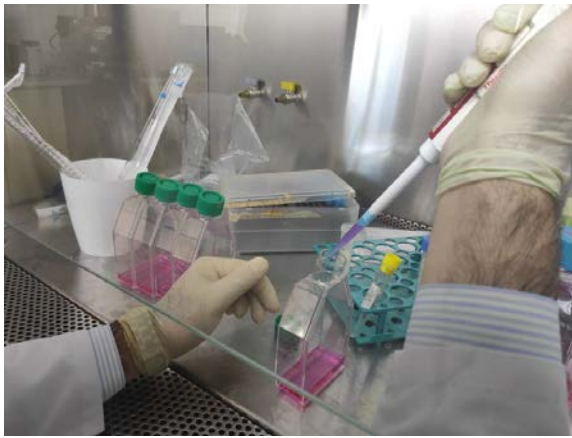
▪ Hücreler %10 FBS içeren 20 mL medyum bulunan 75 cm<sup>2</sup>' lik flasklara 106 hücre düşecek şekilde dağıtıldı (Şekil 3.1. ve 3.2.).

▪ Flask üzerine tarih, pasaj no ve hücre tipi yazıldı.

▪ Hücreler %5 CO<sub>2</sub>' li inkübatörde 37 °C' lik sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı.

▪ Flasklardaki hücre büyümesi her gün invert mikroskop altında kontrol edildi (Şekil 3.3.). 48 saat aralıklarla medyum %10 FBS içeren 20 mL MEM ile değiştirildi. Hücreler 75 cm<sup>2</sup>' lik flaskta %75-80 yoğunluğa ulaşınca tekrar subkültüre edildi.

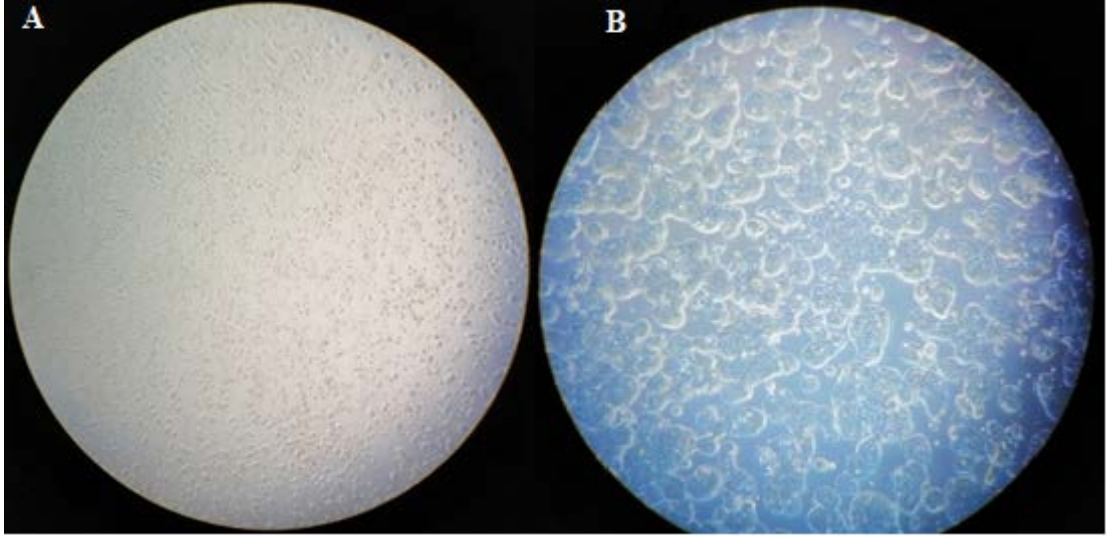
▪ Deney grupları için gerekli olan hücre sayısına ulaşınca kadar subkültür işlemine devam edildi (Şekil 3.4.).



Şekil 3.1. Hücrelerin subkültüre edilmesi



Şekil 3.2. HepG2 hücre hattının çoğaltılması



Şekil 3.3.HepG2 hücrelerinin invert mikroskopta görüntüsü A) (10X) B) (40X)



Şekil 3.4.Canlı hücre sayımı için hazırlık

### 3.2.1.5. Hücrelerin Dondurulması

Hücrelerin bir kısmı ilk pasajlama işlemi sırasında daha sonra yapılacak çalışmalarda kullanılmak üzere kriyoviallere aktarıldı ve  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de dondurularak muhafaza edildi. Hücrelerin dondurulması aşağıdaki işlem sırasıyla gerçekleştirildi;

▪ Flasktaki hücreler yukarıda belirtilen tripsinizasyon işlemiyle yüzeyden kaldırıldı.

▪ Hücrelere 3 mL MEM ilave edildi ve sonra 15 mL' lik falkon tüplerine aktarıldı.

▪ Hücre süspansiyonu 2500 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.

▪ Falkonun dip kısmında bulunan hücre peletine önce 100 µL medyum eklendi ve hücre peleti tamamen çözününe kadar pipetasyon yapıldı.

▪ Tripan mavisi kullanılarak otomatik hücre sayım cihazında canlı hücre sayım yapıldı. Daha sonra her bir kriyovial tüpüne 106 hücre olacak şekilde hücreler aktarıldı. Daha sonra 900 µL dondurma medyumu (%20 FBS ve %10 DMSO) eklendi.

▪ Kriyovialler -20 °C derin dondurucuda 2-4 saat bekletildikten sonra -80 °C derin dondurucuda saklandı.

### **3.2.1.6. Hücrelerin 96' lı ve 6' lı Plakalara Aktarılması**

Hücreler subkültür işleminden sonra yaklaşık %75-80 yoğunluğa ulaştığı zaman aşağıda ifade edildiği gibi 75 cm<sup>2</sup>' li flasktan 96 ve 6 kuyucuklu plakalara aktarıldı.

▪ Flask içerisinde bulunan medyum uzaklaştırıldı. Hücrelerin yüzeyi 1 mL %0.25 (w/v) tripsin-EDTA eklenerek yıkandı. Bu yıkama işlemi 2-3 dakika arayla iki kez tekrar edildi.

▪ Yıkama işleminden sonra 5 mL %0.25 (w/v) tripsin-EDTA çözeltisinden eklendi ve hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması için %5 CO<sub>2</sub>' li etüvde 37 °C' de yaklaşık 5-8 dakika bekletildi.

▪ Hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı invert mikroskop altında kontrol edildi. Yüzeyinden ayrılmayan hücreler için flaskın kenarına hafifçe vurularak yüzeyden ayrılmaları sağlandı.

▪ Yüzeyden kalkan hücreler üzerindeki tripsinin aktivitesini engellemek için 5 mL MEM ilave edildi. Hücreler flask tabanından ayrılmasını kolaylaştırmak için pipetasyon yapıldı.

▪ Flask içeriği (hücre, tripsin ve MEM) 25 mL' lik steril falkon tüplerine aktarıldı ve 2500 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve hücreler 1 mL MEM' le tekrar resüspanse edildi.

- Hücrelerin MEM içerisinde homojen dağılması için pipetasyon yapıldı.
- Canlı hücre sayımı için steril epondorfa 10  $\mu$ L hücre süspansiyonu ve 10  $\mu$ L tripan mavisini eklendi. Epondorftan 10  $\mu$ L hücre sayım lamına aktarıldı ve otomatik hücre sayım cihazında canlı hücre sayım yapıldı (Şekil 3.5.).
- Canlı hücre sayımdan sonra hesaplanan dilüsyon oranıyla falkonda bulunan hücreler MEM' le dilüe edildi. Hücreler 96 kuyulu mikropalakalara  $3 \times 10^4$  hücre/100  $\mu$ L medyum/kuyu ve 6 kuyucuklu plakaya ise  $3 \times 10^5$  hücre/mL medyum/kuyu olacak şekilde dağıtıldı.
- Plakalara aktarılan hücrelerin yüzeye tutunabilmeleri için %5 CO<sub>2</sub>' li inkübatörde 37 °C' lik sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.5. Otomatik hücre sayım cihazında tripan mavisini test yöntemiyle canlı hücre sayımı

### 3.2.2. Sorafenibin Sitotoksitesinin Belirlenmesi

#### 3.2.2.1. Sorafenib Stok Çözeltisinin Hazırlanması

İlacın 20 mM stok çözeltisi için steril ortamda 4.6825 mg sorafenib tartılıp 500  $\mu$ L steril DMSO bulunan epondorf içerisinde vortex ve ultrasonik su banyosu kullanılarak çözdürüldü.

#### 3.2.2.2. Sorafenibin IC<sub>50</sub> Değerinin Belirlenmesi

Sorafenibin HepG2 hücrelerindeki inhibitör konsantrasyon 50 (IC<sub>50</sub>) değerinin belirlemek için; ilacın 20 mM stok çözeltisi MEM' le (pH 7.0) dilüe edilerek 5, 10, 20, 30, 40, 60 ve 80  $\mu$ M' lik konsantrasyonları hazırlandı.

Sorafenibin HepG2 hücrelerinde IC<sub>50</sub> değerini belirlemek için aşağıdaki işlem sırasıyla gerçekleştirildi;

- 96' lı plakada bulunan hücrelerin medyumunu uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuktaki hücelere 100' er  $\mu\text{L}$  sorafenibin 5-80  $\mu\text{M}$  arasında değişen yedi farklı konsantrasyonu uygulandı.
- Negatif kontrol grubundaki HepG2 hücrelerine MEM ve pozitif kontrol grubundaki HepG2 hücrelerine %0.2 DMSO içeren MEM uygulandı.
- Sorafenibe maruz bırakılan hücreler 24 saat %5  $\text{CO}_2$ ' li inkübatörde 37 °C' lik sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı.
- Hücre canlılığının belirlenmesi için WST-8 test reaktifi kullanıldı. İnkübasyon periyodundan sonra plakanın her kuyucuğuna 10  $\mu\text{L}$  WST- 8 reaktifi eklendi (Chamchoy et al., 2019). Plakalar karanlık ortam şartlarında orbital çalkalayıcı kullanılarak 2 dk. Süre ile karıştırıldı. %5  $\text{CO}_2$ ' li inkübatörde 37 °C' de 1 saat bekletildikten sonra 450 nm' de mikropilaka okuyucu spektrofotometrede absorbans değerleri ölçüldü.

### 3.2.3. Farklı pH' larda Medyum Hazırlanması

HepG2 hücrelerinin optimum üreme pH' sı yaklaşık 7.2 (7.0-7.4 arasında)' dir. Asidik hücre medyumunu 1.2 N' lik HCl kullanılarak 6.6-6.8 pH değerlerinde ve alkali hücre medyumunu NaOH kullanılarak 7.6-7.8 değerlerinde hassas pH metre kullanılarak hazırlandı (Chen vd., 2009). Farklı pH değerlerine sahip medyumlar 0.22  $\mu\text{m}$  şırınga ucu filtre yardımıyla süzülerek steril hale getirildi (Şekil 3.6.). Medyum pH' sı daha önce laboratuvarımızda çalışılan ve ‘‘HepG2 Hücre Hattının Canlılığı Üzerine medyum pH' sının Etkilerinin İncelenmesi’’ başlığındaki yüksek lisans tez çalışmasından seçilmiştir (Güvenalp, 2019).



Şekil 3.6. Farklı pH değerlerinde medyumların hazırlanması ve steril hale getirilmesi

### 3.2.4. Deney Grupları ve İlaç Maruziyeti

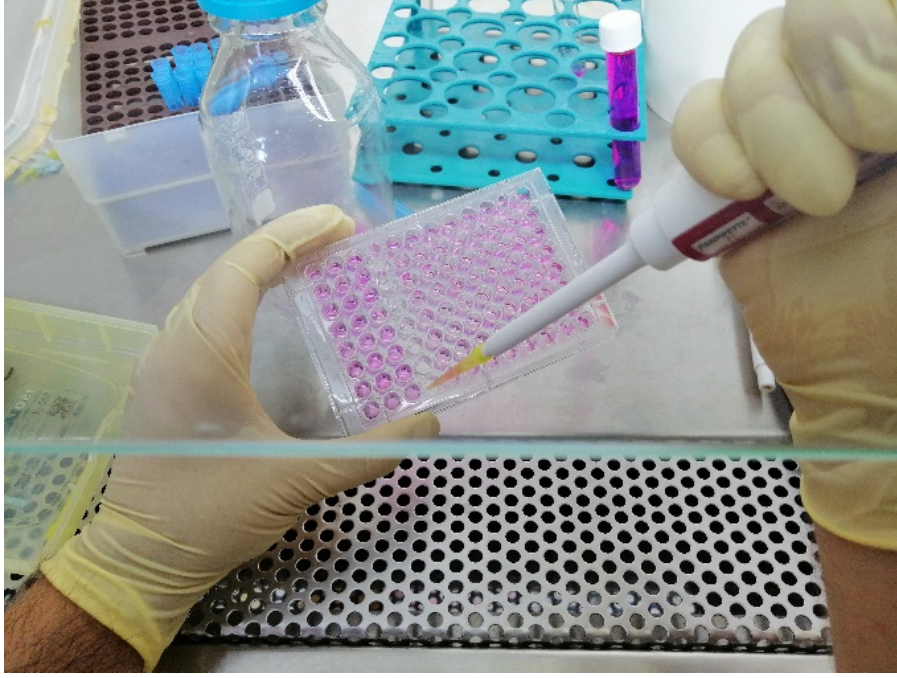
Sorafenibin IC<sub>50</sub> (13.40 µM), IC<sub>50/5</sub> (2.68 µM), IC<sub>50/10</sub> (1.34 µM) ve IC<sub>50/20</sub> (0.67 µM) konsantrasyonları 6.6, 6.8, 7.2, 7.6 ve 7.8 pH değerlerine ayarlanmış medyumla sorafenib stok çözeltisinden (20 mM) dilüe edilerek hazırlandı.

Flaskta bulunan hücreler 96' lı mikropalakaya 3x10<sup>4</sup> hücre/kuyu olacak şekilde dağıtıldı. Hücrelerin yüzeye tutunması için %5 CO<sub>2</sub>' li inkübatörde 37 °C de 24 saat inkübasyona bırakıldı.

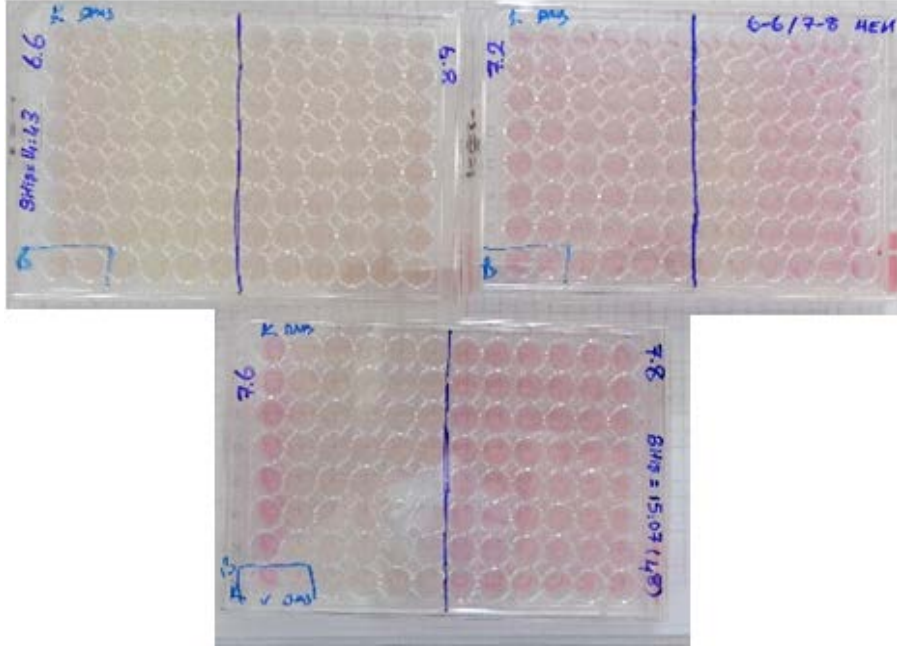
İlaç maruziyetinden önce mikropalakada bulunan hücrelerin medyumunu uzaklaştırıldı. Deney gruplarında bulunan hücelere 100' er µL 6.6, 6.8, 7.2, 7.6 ve 7.8 pH değerlerindeki medyumla hazırlanmış olan sorafenibin IC<sub>50</sub>, IC<sub>50/5</sub>, IC<sub>50/10</sub> ve IC<sub>50/20</sub> konsantrasyonları eklendi (Şekil 3.7. ve 3.8.). Her pH deney grubunun negatif kontrolüne sadece kendi pH değerindeki medyum ve pozitif kontrolüne %0.2 DMSO içeren medyum eklendi. Daha sonra hücreler %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde 37 °C' de 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. Tüm uygulamalar steril şartlar altında gerçekleştirildi. Mikropalaka üzerine etiketleme yapıldı. Çalışma grupları Tablo 3.5.' de gösterilmiştir.

Tablo 3.5. Grup adı ve çalışma grupları

Grup Adı	Çalışma Grupları
pH 6.6 Çalışma Grubu	Hücre+6.6 pH Medyum (Kontrol)
	Hücre+6.6 pH Medyum+%0.2 DMSO (Negatif Kontrol)
	Hücre+6.6 pH Medyum+Sorafenib IC <sub>50</sub> konsantrasyon
	Hücre+6.6 pH Medyum+Sorafenib IC <sub>50/5</sub> konsantrasyon
	Hücre+6.6 pH Medyum+Sorafenib IC <sub>50/10</sub> konsantrasyon
	Hücre+6.6 pH Medyum+Sorafenib IC <sub>50/20</sub> konsantrasyon
pH 6.8 Çalışma Grubu	Hücre+6.8 pH Medyum (Kontrol)
	Hücre+6.8 pH Medyum+%0.2 DMSO (Negatif Kontrol)
	Hücre+6.8 pH Medyum+Sorafenib IC <sub>50</sub> konsantrasyon
	Hücre+6.8 pH Medyum+Sorafenib IC <sub>50/5</sub> konsantrasyon
	Hücre+6.8 pH Medyum+Sorafenib IC <sub>50/10</sub> konsantrasyon
	Hücre+6.8 pH Medyum+Sorafenib IC <sub>50/20</sub> konsantrasyon
pH 7.2 Çalışma Grubu	Hücre+7.2 pH Medyum (Kontrol)
	Hücre+7.2 pH Medyum+%0.2 DMSO (Negatif Kontrol)
	Hücre+7.2 pH Medyum+Sorafenib IC <sub>50</sub> konsantrasyon
	Hücre+7.2 pH Medyum+Sorafenib IC <sub>50/5</sub> konsantrasyon
	Hücre+7.2 pH Medyum+Sorafenib IC <sub>50/10</sub> konsantrasyon
	Hücre+7.2 pH Medyum+Sorafenib IC <sub>50/20</sub> konsantrasyon
pH 7.6 Çalışma Grubu	Hücre+7.6 pH Medyum (Kontrol)
	Hücre+7.6 pH Medyum+%0.2 DMSO (Negatif Kontrol)
	Hücre+7.6 pH Medyum+Sorafenib IC <sub>50</sub> konsantrasyon
	Hücre+7.6 pH Medyum+Sorafenib IC <sub>50/5</sub> konsantrasyon
	Hücre+7.6 pH Medyum+Sorafenib IC <sub>50/10</sub> konsantrasyon
	Hücre+7.6 pH Medyum+Sorafenib IC <sub>50/20</sub> konsantrasyon
pH 7.8 Çalışma Grubu	Hücre+7.8 pH Medyum (Kontrol)
	Hücre+7.8 pH Medyum+%0.2 DMSO (Negatif Kontrol)
	Hücre+7.8 pH Medyum+Sorafenib IC <sub>50</sub> konsantrasyon
	Hücre+7.8 pH Medyum+Sorafenib IC <sub>50/5</sub> konsantrasyon
	Hücre+7.8 pH Medyum+Sorafenib IC <sub>50/10</sub> konsantrasyon
	Hücre+7.8 pH Medyum+Sorafenib IC <sub>50/20</sub> konsantrasyon



Şekil 3.7. Farklı pH değerlerinde hazırlanan farklı konsantrasyondaki sorafenibin hücelere uygulanması



Şekil 3.8. Deney gruplarında bulunan hücelere ilaç maruziyeti uygulaması

### 3.2.5. Hücre Sitotoksosite Testi

pH 6.6, 6.8, 7.2, 7.6 ve 7.8 değerindeki medyumda bulunan sorafenibin  $IC_{50}$ ,  $IC_{50/5}$ ,  $IC_{50/10}$  ve  $IC_{50/20}$  konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerin canlılıkları 24, 48 ve 72 saat sonra WST-8 test yöntemiyle tespit edildi.

### 3.2.5.1. WST-8 Testi

WST-8 sitotoksosite testi üretici firmanın belirttiği protokole göre aşağıdaki şekilde uygulandı.

- İnkübasyon periyodu (24, 48 ve 72 saat) sonrası 10 µL WST-8 test reaktifi pipet yardımıyla 96' lı plakadaki her bir kuyucuğa 10 µL eklendi (Şekil 3.9.). Sonra orbital karıştırıcıda bir dakika süreyle yavaşça karıştırıldı.

- Hücreler bir saat %5 CO<sub>2</sub>' li inkübatörde 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı.

- İnkübasyon periyodundan sonra mikrolaka okuyuculu spektrofotometede 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü (Şekil 3.10.). Ölçümden önce oluşan formazan rengini kuyucuklarda homojen dağılmasını sağlamak için mikrolaka yaklaşık 10 saniye çalkalandı.

- Gerçekleştirilen testler üç kez tekrar edildi ve sonuçların ortalaması alındı.

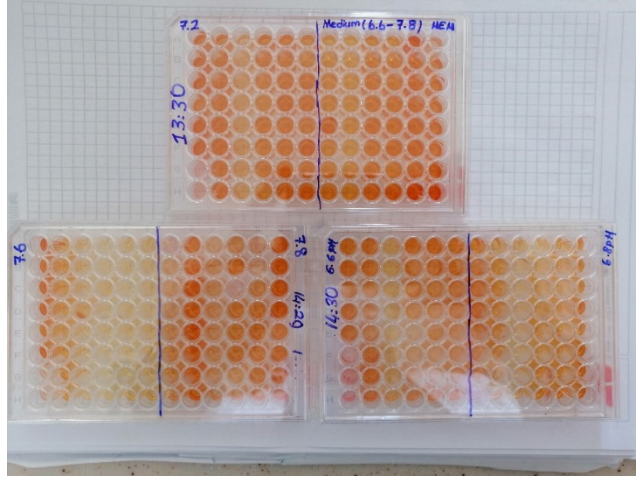
- % Hücre canlılığını belirlemek için deney ve kontrol grubunda bulunan hücrelerin absorbans değeri kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

- %Hücre canlılığı=
$$\frac{(A_{\text{test}} - A_{\text{blank}})}{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blank}})} \times 100$$

- Kontrol grubundan elde edilen absorbans değerine göre hesaplanan canlı hücre sayısı %100 olarak kabul edildi.

- Deney gruplarının absorbans değerine göre % hücre canlılığı hesaplandı.

- Deney grubundan elde edilen sonuçlar negatif ve pozitif kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak istatistiksel olarak değerlendirildi.



Şekil 3.9. Sorafenib uygulanan HepG2 hücrelerinin WST-8 testi görüntüsü



Şekil 3.10. WST-8 yönteminde mikrolaka okuyuculu spektrofotometrede absorbans değeri ölçümü

### 3.2.6. Hücre Proliferasyon Testi

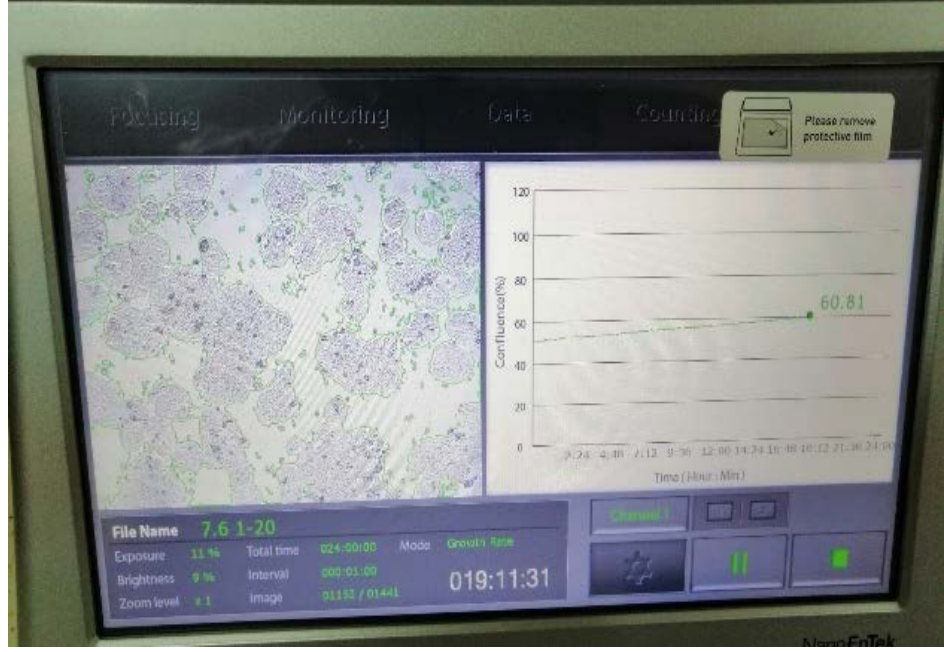
Proliferasyon testi canlı hücre analizi ve görüntüleme (JuLI Br) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Cihaz başta hücre proliferasyonu olmak üzere hücre göçü, kök hücre gelişimi ve yara iyileşmesi gibi çalışmalarda kullanılmaktadır. JuLI Br ile minimum 60 saniye zaman ayarlı fotoğraf çekimi ve video, otomatik hücre yoğunluk ölçümü yapılabilmekte ve gerçek zamanlı hücre büyüme eğrisi oluşturabilmektedir.

Hücreler 6 gözlü plakalara  $3 \times 10^5$  hücre/kuyu olacak şekilde ekildikten sonra yüzeye tutunmaları için 48 saat %5 CO<sub>2</sub>' li inkübatörde 37 °C' de inkübe edildi. İnkübasyon periyodu sonunda medyum değiştirilerek hücrelere WST-8 testine göre istatistiksel olarak anlamlı çıkan ve hücreleri öldürmeyen 7.6, 6.6 ve 7.2 pH değerinde

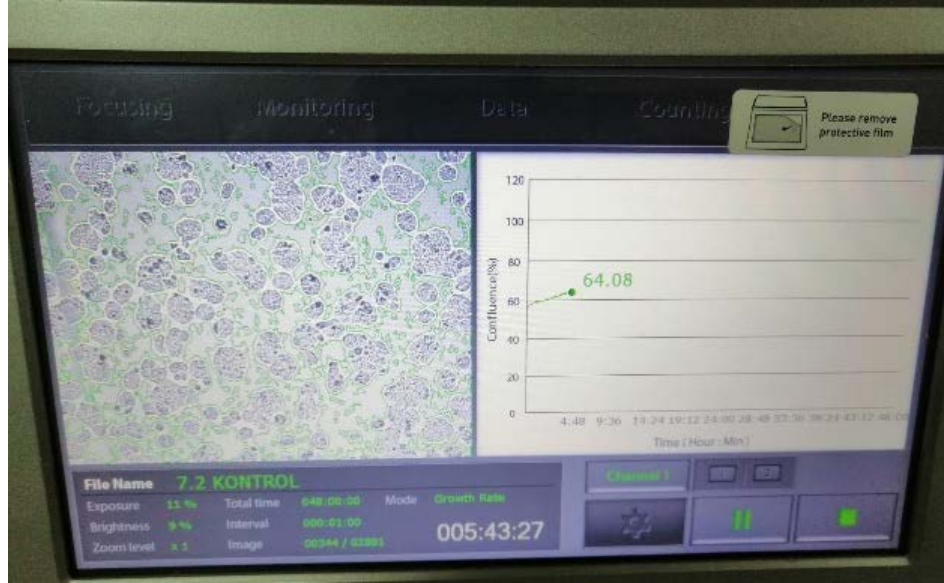
hazırlanan sorafenibin IC<sub>50/20</sub> konsantrasyonları ayrı ayrı denemeler olmak üzere uygulandı. Farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin hücre proliferasyonu üzerine etkilerini karşılaştırabilmek için kendi pH değerindeki medyuma bulunan hücreler kontrol (7.6, 6.6 ve 7.2 pH medyum) grubu olarak seçildi. Kontrol ve deney grubunda bulunan hücreler 24 saat aralıklarla JULI-BR canlı hücre görüntüleme sistemine yerleştirildi ve %5 CO<sub>2</sub>' lik inkübatörde 37 °C sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakıldı. Plakalarda başlangıç hücre yoğunluğu için ortalama %50 ve hücrelerin homojen olarak dağıldığı alanlar seçildi. İnkübasyon periyodu süresince Juli-BR canlı hücre analiz-görüntüleme cihazında 60 saniye aralıklarla eş zamanlı fotoğrafları çekilmiş ve hücre yoğunluğu hesaplanarak gerçek zamanlı hücre büyüme eğrileri elde edilmiştir (Şekil 3.11., 3.12. ve 3.13.).



Şekil 3.11. Juli BR cihazıyla eş zamanlı canlı hücre görüntülemesi



Şekil 3.12. pH 7.6 değerinde bulunan IC<sub>50/20</sub> konsantrasyondaki sorafenibin HepG2 hücrelerinde proliferasyon eğrisi



Şekil 3.13. pH 7.2 değerinde bulunan HepG2 hücrelerinde proliferasyon eğrisi

Her bir deney grubu için başlangıç anında (0. saat) alınan hücre yoğunluk değeri %100 kabul edildi ve 24 saat sonundaki yoğunluk değeri dikkate alınarak % proliferasyon artışı hesaplanmıştır. Ortalama % proliferasyon artış değerinin hesaplanması amacıyla aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\% \text{Proliferasyon} = [(\% \text{Son Yoğunluk} - \% \text{Başlangıç Yoğunluk}) / (\% \text{Başlangıç Yoğunluk})] \times 100$$

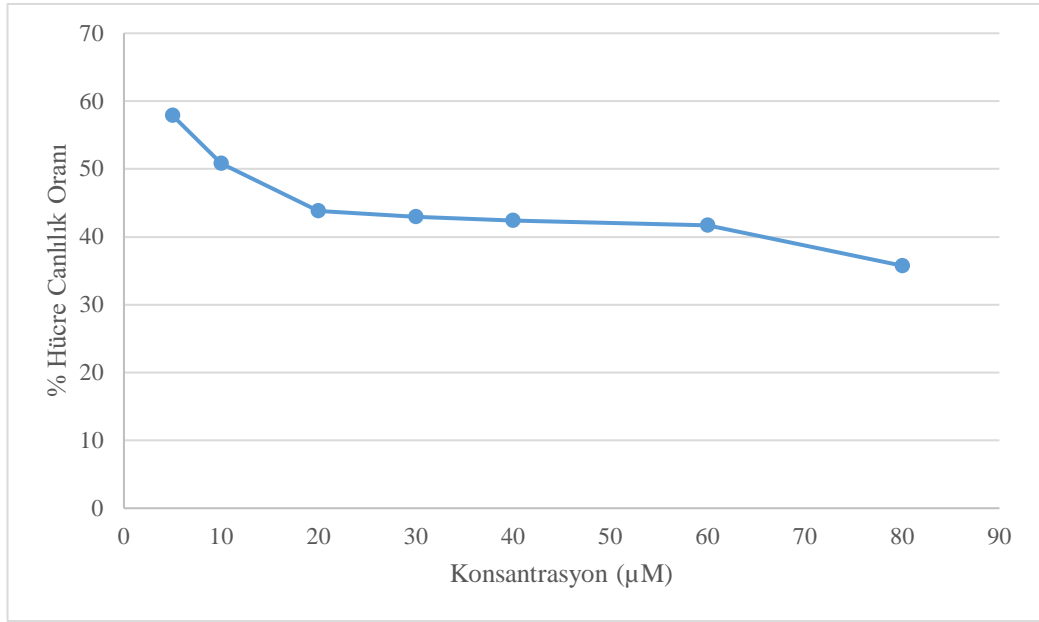
### 3.2.7. İstatistiksel Hesaplamalar

Çalışmadan elde edilen sonuçlar aritmetik ortalamama± standart hata (SE) şeklinde verildi. Çalışmada gerçekleştirilen *in vitro* deneyler üç tekrarlı olacak şekilde uygulandı. Sitotoksisite denemelerinden elde edilen sayısal veriler SPSS v 21 Base lisanslı istatistik analiz programı kullanılarak değerlendirildi. IC<sub>50</sub> değerinin hesaplanmasında probit analizi kullanıldı. Deneme gruplarının değerlendirilmesinde; önce normalite testi Shapiro-Wilk testi ile yapıldı. Bütün veriler normal dağılım gösterdiğinden gruplar arası farkın istatistik kontrolünde parametrik yöntem olan tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ve Turkey's ve Dunnet Post Hoc testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme ve veriler arasındaki farkın önem derecesi  $p < 0.05$  olduğunda anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Sorafenibin IC<sub>50</sub> Değeri

Sorafenibin 5-80 µM arasındaki konsantrasyonlarının sitotoksosite değerlendirmesi için WST-8 testi kullanıldı. Mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede elde edilen absorbans değerlerine göre % canlı hücre değeri hesaplandı (Şekil 4.1.). Sorafenib uygulanan gruplarda konsantrasyon arttıkça canlı hücre sayısında azalma olduğu belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki % hücre canlılık değerleri kullanılarak hücrelerin %50' sinin öldüğü konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) SPSS programında probit analiziyle 13.40 µM olarak hesaplandı.



Şekil 4.1. HepG2 hücrelerinde 5-80 µM aralığında artan konsantrasyonlarda uygulanan sorafenibin % canlılık verileri

### 4.2. Sorafenibin Farklı pH Gruplarının Doza ve Zamana Göre Hücre Canlılığına Etkisi

Çalışmada HepG2 hücre hattında farklı pH (6.6, 6.8, 7.2, 7.6 ve 7.8) değerlerinde hazırlanan sorafenibin zaman (24, 48 ve 72 saat) ve konsantrasyona (IC<sub>50</sub>, IC<sub>50/5</sub>, IC<sub>50/10</sub> ve IC<sub>50/20</sub>) bağlı hücre canlılığına etkisi WST-8 testiyle gerçekleştirilmiştir. Sorafenib uygulanmayan grubun hücre canlılığı %100 olarak kabul edildi.

#### 4.2.1. Sorafenibin pH 6.6' daki Farklı Dozlarının Hücre Canlılığına Etkisi

Sorafenibin 6.6 pH' daki medyumla hazırlanan farklı konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat maruziyet periyodunda hücre canlılığına etkisi

Tablo 4.1. ve Şekil 4.2.' de gösterilmiştir. DMSO' nun hücre canlılığına etkisi bulunmadığı belirlenmiştir ( $p>0.05$ ). İlacın  $IC_{50}$  ( $p<0.001$ ) ve  $IC_{50/5}$  ( $p<0.05$ ) konsantrasyonlarının 24 saat uygulaması hücre canlılığını kontrol grubuna göre önemli derecede azaltmıştır. İlacın  $IC_{50/10}$  ve  $IC_{50/20}$  konsantrasyonlarının ise hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunmadığı belirlenmiştir ( $p>0.05$ ). İlacın 24 saat uygulamasında en yüksek konsantrasyonu hücre canlılığını %50' den daha fazla azaltırken diğer konsantrasyonlarda yaklaşık %80-99 arasında olduğu tespit edilmiştir. Sorafenibin 48 ve 72 saat maruziyet periyodu sonrasında tüm konsantrasyonlarında hücre canlılığında kontrol grubuna göre azalmaya yol açtığı belirlenmiştir ( $p<0.001$ ). İlacın 48 ve 72 saat maruziyet periyodunda bütün konsantrasyonları hücre canlılığını %50' nin altına düşürdüğü tespit edilmiştir.

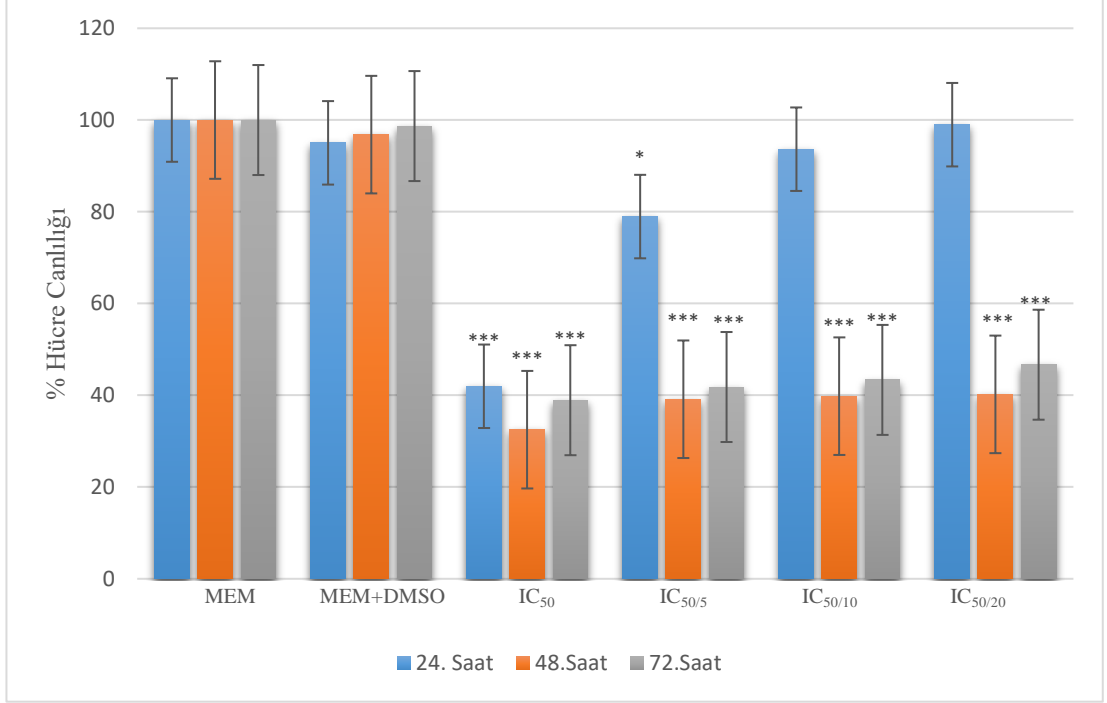
Zamana göre gruplar arası karşılaştırma yapıldığında;  $IC_{50/5}$ ,  $IC_{50/10}$  ve  $IC_{50/20}$  konsantrasyonları 24 saatlik grupla karşılaştırıldığında 48 ve 72. saatlerde hücre canlılığını anlamlı bir şekilde değiştirmiştir ( $p<0.05$ ). Ancak 48 ve 72 saatlik gruplar karşılaştırıldığında sitotoksik etki bakımından fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

Tablo 4.1. HepG2 hücrelerinde pH 6.6' da hazırlanan sorafenibin zaman ve doza bağlı olarak gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları

Sorafenib Konsantrasyon ( $\mu$ M)	Hücre Canlılığı (%) $\pm$ SE		
	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol (MEM)	100 $\pm$ 3.06 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 4.62 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 7.15 <sup>a</sup>
MEM+DMSO	95.02 $\pm$ 1.03 <sup>ac</sup>	96.81 $\pm$ 4.18 <sup>a</sup>	98.68 $\pm$ 10.50 <sup>a</sup>
$IC_{50}$	41.96 $\pm$ 2.01 <sup>b,x</sup>	32.50 $\pm$ 2.87 <sup>b,y</sup>	38.92 $\pm$ 0.75 <sup>b,xy</sup>
$IC_{50/5}$	78.95 $\pm$ 2.02 <sup>c,x</sup>	39.13 $\pm$ 0.38 <sup>b,y</sup>	41.80 $\pm$ 0.70 <sup>b,y</sup>
$IC_{50/10}$	93.64 $\pm$ 5.31 <sup>ac,x</sup>	39.80 $\pm$ 1.13 <sup>b,y</sup>	43.35 $\pm$ 0.98 <sup>b,y</sup>
$IC_{50/20}$	98.98 $\pm$ 3.03 <sup>a,x</sup>	40.20 $\pm$ .78 <sup>b,y</sup>	46.66 $\pm$ 5.04 <sup>b,y</sup>

<sup>a,b,c</sup> Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder ( $p<0.05$ )

<sup>x,y,z</sup> Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder ( $p<0.05$ )



Şekil 4.2. HepG2 hücrelerinde pH 6.6’ da hazırlanan sorafenibin doza bağlı olarak gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları (\* p<0.05 ve \*\*\* p<0.001)

#### 4.2.2. Sorafenibin pH 6.8’ deki Farklı Dozlarının Hücre Canlılığına Etkisi

Sorafenibin 6.8 pH’ daki medyumla hazırlanan farklı konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat maruziyet periyodundaki hücre canlılığına etkisi Tablo 4.2. ve Şekil 4.3’ de gösterilmiştir. DMSO’ nun hücre canlılığına etkisi bulunmadığı belirlenmiştir (p>0.05). İlacın bütün konsantrasyonlarının 24 saatlik maruziyeti hücre canlılığını kontrol grubuna göre önemli derecede azaltmıştır (p<0.001). İlacın 24 saatlik maruziyeti periyodunda en yüksek konsantrasyonu hücre canlılığını %50’ nin altına kadar azaltırken diğer konsantrasyonlarda yaklaşık %50-60 olduğu tespit edilmiştir.

Sorafenibin 48 saat maruziyet periyodu sonrasında IC<sub>50</sub>, IC<sub>50/5</sub> ve IC<sub>50/10</sub> konsantrasyonlarında ve 72 saat maruziyet periyodu sonrasında ise IC<sub>50</sub>, IC<sub>50/5</sub> konsantrasyonlarında hücre canlılığında kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmaya yol açtığı belirlenmiştir (p<0.001). İlacın 48 ve 72 saat maruziyet periyodunda IC<sub>50</sub> konsantrasyonları hücre canlılığını %50’ nin altına düşürdüğü ancak diğer konsantrasyonlarında hücre canlılığını %50’ nin üstünde olduğu tespit edilmiştir.

Zamana göre gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; IC<sub>50</sub> ve IC<sub>50/10</sub> konsantrasyonları 24 saatlik grupla karşılaştırıldığında 48 ve 72. saatlerdeki hücre canlılığını anlamlı bir şekilde değiştirmiştir (p<0.05). Ancak 48 ve 72 saatlik

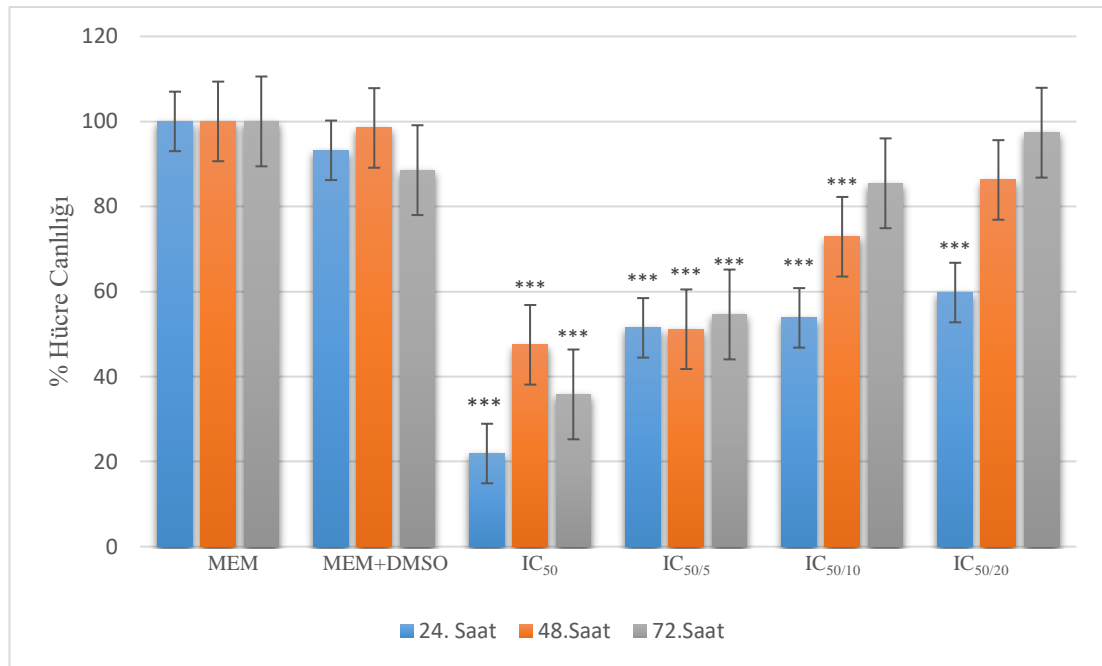
maruziyetler karşılaştırıldığında sitotoksik etki bakımından sadece IC<sub>50</sub> ve IC<sub>50/10</sub> konsantrasyonlarında fark bulunmuştur (p<0.01).

Tablo 4.2. HepG2 hücrelerinde pH 6.8' de hazırlanan sorafenibin zaman ve doza bağlı olarak gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları

Sorafenib Konsantrasyon (µM)	Hücre Canlılığı (%)±SE		
	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol (MEM)	100±3.02 <sup>a</sup>	100±3.42 <sup>a</sup>	100±3.33 <sup>a</sup>
MEM+DMSO	93.20±0.44 <sup>a</sup>	98.46±2.88 <sup>a</sup>	88.53±3.91 <sup>a</sup>
IC <sub>50</sub>	21.89±0.57 <sup>b,x</sup>	47.46±0.40 <sup>b,y</sup>	35.79±2.47 <sup>b,z</sup>
IC <sub>50/5</sub>	51.44±1.49 <sup>c,x</sup>	51.12±1.81 <sup>b,x</sup>	54.59±4.08 <sup>c,x</sup>
IC <sub>50/10</sub>	53.79±1.33 <sup>cd,x</sup>	72.87±2.52 <sup>c,y</sup>	85.44±1.79 <sup>a,z</sup>
IC <sub>50/20</sub>	59.75±1.13 <sup>d,x</sup>	86.23±1.34 <sup>a,y</sup>	97.34±4.31 <sup>a,y</sup>

<sup>a,b,c</sup> Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder (p<0.001)

<sup>x,y,z</sup> Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder (p<0.05)



Şekil 4.3. HepG2 hücrelerinde pH 6.8' de hazırlanan sorafenibin doza bağlı olarak gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları (\* p<0.05 ve \*\*\* p<0.001)

### 4.2.3. Sorafenibin pH 7.2' deki Farklı Dozlarının Hücre Canlılığına Etkisi

Sorafenibin 7.2 pH' daki medyumla hazırlanan farklı konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat maruziyet periyodunda hücre canlılığına etkisi Tablo 4.3. ve Şekil 4.4' de gösterilmiştir. DMSO' nun hücre canlılığına etkisi bulunmadığı belirlenmiştir ( $p>0.05$ ). İlacın bütün konsantrasyonlarının 24 saat uygulaması hücre canlılığını kontrol grubuna göre önemli derecede azaltmıştır ( $p<0.001$ ). İlacın 24 saat uygulamasında en yüksek konsantrasyonu hücre canlılığını %50' nin altına kadar azaltırken diğer konsantrasyonlarda yaklaşık %70-80 olduğu tespit edilmiştir.

Sorafenibin 48 saat maruziyet periyodu sonrasında  $IC_{50}$  ( $p<0.001$ ) ve  $IC_{50/5}$  ( $p<0.01$ ) konsantrasyonlarında, 72 saat maruziyet periyodu sonrasında ise  $IC_{50}$  ( $p<0.001$ ),  $IC_{50/5}$  ( $p<0.001$ ) ve  $IC_{50/10}$  ( $p<0.01$ ) konsantrasyonlarında hücre canlılığında kontrol grubuna göre azalmaya yol açtığı belirlenmiştir.

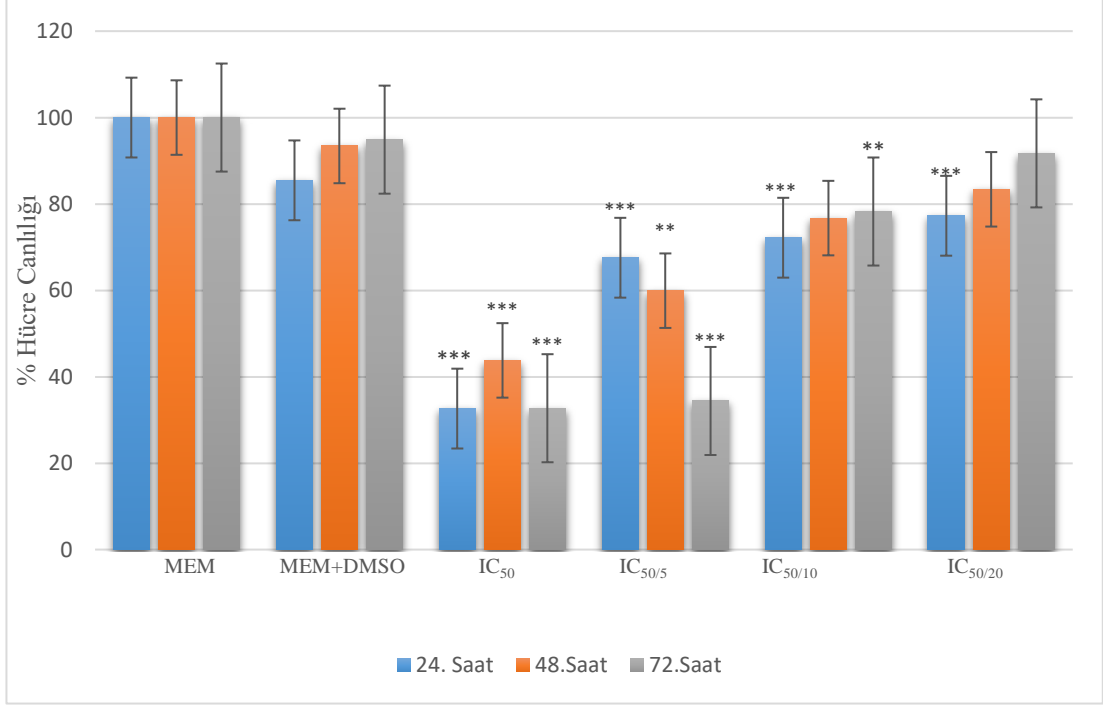
Zamana göre gruplar arası karşılaştırma yapıldığında;  $IC_{50}$  konsantrasyonu 24 saatlik grupla karşılaştırıldığında 48. saatteki hücre canlılığı artışa ( $p<0.05$ ),  $IC_{50/5}$  konsantrasyonu 24 saatlik grupla karşılaştırıldığında 72. saatteki hücre canlılığı azalmaya yol açmıştır ( $p<0.05$ ).

Tablo 4.3. HepG2 hücrelerinde pH 7.2' de hazırlanan sorafenibin zaman ve doza bağlı olarak gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları

Sorafenib Konsantrasyon ( $\mu$ M)	Hücre Canlılığı (%) $\pm$ SE		
	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol (MEM)	100 $\pm$ 2.58 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 8.43 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 2.45 <sup>a</sup>
MEM+DMSO	85.46 $\pm$ 1.68 <sup>a</sup>	93.42 $\pm$ 3.96 <sup>a</sup>	94.88 $\pm$ 1.95 <sup>a</sup>
$IC_{50}$	32.63 $\pm$ 0.86 <sup>b,x</sup>	43.79 $\pm$ 1.90 <sup>b,y</sup>	32.71 $\pm$ 1.42 <sup>b,x</sup>
$IC_{50/5}$	67.55 $\pm$ 4.97 <sup>c,x</sup>	59.92 $\pm$ 2.03 <sup>bc,x</sup>	34.39 $\pm$ 0.49 <sup>b,y</sup>
$IC_{50/10}$	72.18 $\pm$ 1.02 <sup>c,x</sup>	76.72 $\pm$ 2.14 <sup>ac,x</sup>	78.25 $\pm$ 4.24 <sup>c,x</sup>
$IC_{50/20}$	77.26 $\pm$ 1.96 <sup>c,x</sup>	83.38 $\pm$ 5.03 <sup>ac,x</sup>	91.70 $\pm$ 4.64 <sup>ac,x</sup>

<sup>a,b,c</sup> Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder ( $p<0.001$ )

<sup>x,y,z</sup> Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder ( $p<0.05$ )



Şekil 4.4. HepG2 hücrelerinde pH 7.2’ de hazırlanan sorafenibin doza bağlı olarak gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları (\* p<0.05, \*\* p<0.01 ve \*\*\* p<0.001)

#### 4.2.4. Sorafenibin pH 7.6’ daki Farklı Dozlarının Hücre Canlılığına Etkisi

Sorafenibin 7.6 pH’ daki medyumla hazırlanan farklı konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat maruziyet periyodundaki hücre canlılığına etkisi Tablo 4.4. ve Şekil 4.5.’ de gösterilmiştir. DMSO’ nun hücre canlılığına etkisi bulunmadığı belirlenmiştir (p>0.05). İlacın bütün konsantrasyonlarının 24 ve 48 saat maruziyet uygulaması hücre canlılığını kontrol grubuna göre önemli derecede azaltmıştır (p<0.001). Hücre canlılığı 24 saat maruziyet periyodu için ilacın tüm konsantrasyonları hücre canlılığını %50’ nin altında (yaklaşık %20-30 arasında) olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca en düşük ilaç konsantrasyonu dahil tüm konsantrasyonlarda %50’ nin altında hücre canlılığı tespit edilen grubun sadece 7.6 pH-24 saat olduğu belirlenmiştir. Hücre canlılığı 48 saat maruziyet periyodu için ise %50’ nin üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Sorafenibin 72 saat maruziyet periyodu sonrasında IC<sub>50</sub> konsantrasyonunda hücre canlılığında kontrol grubuna göre anlamlı değişikliğe yol açtığı belirlenmiştir (p<0.05).

Zamana göre gruplar arası karşılaştırma yapıldığında IC<sub>50</sub> ve IC<sub>50/20</sub> konsantrasyonları 24 saatlik gruba karşılaştırıldığında 48 ve 72. saatlerdeki hücre canlılığı anlamlı bir şekilde artmıştır (p<0.01). Ancak 48 ve 72 saatlik maruziyetler

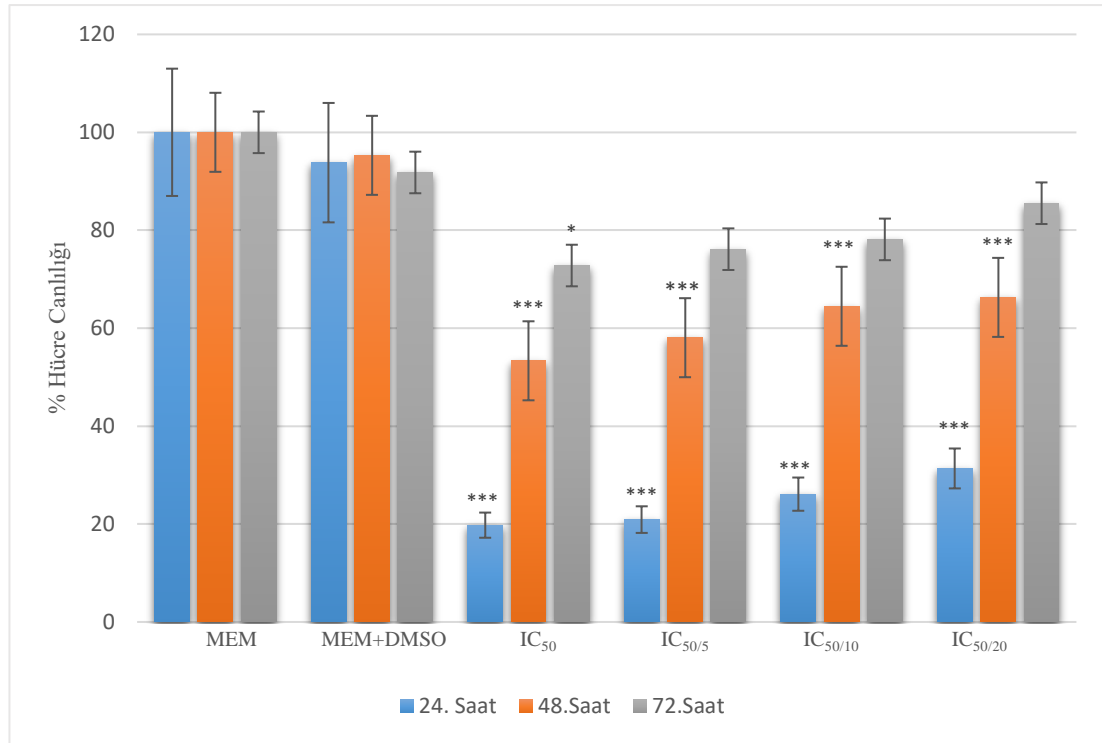
karşılaştırıldığında sitotoksik etki bakımından sadece IC<sub>50</sub> ve IC<sub>50/20</sub> konsantrasyonlarında fark bulunmuştur (p<0.01).

Tablo 4.4. WST-8 yöntemine göre pH 7.6 değerindeki sorafenibin 24, 48 ve 72 saat maruziyet süresinde HepG2 hücrelerindeki sitotoksik etkisi

Sorafenib Konsantrasyon (µM)	Hücre Canlılığı (%) $\pm$ SE		
	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol (MEM)	100 $\pm$ 1.54 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 2.22 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 2.84 <sup>a</sup>
MEM+DMSO	93.80 $\pm$ 2.11 <sup>a</sup>	95.29 $\pm$ 2.44 <sup>a</sup>	91.80 $\pm$ 3.33 <sup>a</sup>
IC <sub>50</sub>	19.76 $\pm$ 0.61 <sup>b,x</sup>	53.33 $\pm$ 0.10 <sup>b,y</sup>	72.79 $\pm$ 3.44 <sup>b,z</sup>
IC <sub>50/5</sub>	20.90 $\pm$ 1.39 <sup>b,x</sup>	58.05 $\pm$ 0.64 <sup>bc,y</sup>	76.13 $\pm$ 2.59 <sup>ab,y</sup>
IC <sub>50/10</sub>	26.10 $\pm$ 1.65 <sup>bc,x</sup>	64.47 $\pm$ 1.75 <sup>cd,y</sup>	78.12 $\pm$ 2.73 <sup>ab,y</sup>
IC <sub>50/20</sub>	31.35 $\pm$ 1.86 <sup>c,x</sup>	66.28 $\pm$ 1.39 <sup>d,y</sup>	85.51 $\pm$ 5.05 <sup>ab,z</sup>

<sup>a,b,c</sup> Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder (p<0.05)

<sup>x,y,z</sup> Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder (p<0.05)



Şekil 4.5. HepG2 hücrelerinde pH 7.6' da hazırlanan sorafenibin doza bağlı olarak gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları (\* p<0.05 ve \*\*\* p<0.001)

#### 4.2.5. Sorafenibin pH 7.8' deki Farklı Dozlarının Hücre Canlılığına Etkisi

Sorafenibin 7.8 pH' daki medyumla hazırlanan farklı konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat maruziyet periyodundaki hücre canlılığına etkisi Tablo 4.5. ve Şekil 4.6.' da gösterilmiştir. DMSO' nun hücre canlılığına etkisi bulunmadığı belirlenmiştir (p>0.05). İlacın IC<sub>50</sub>, IC<sub>50/5</sub> ve IC<sub>50/10</sub> konsantrasyonlarının 24 saat maruziyet uygulaması hücre canlılığını kontrol grubuna göre azaltmıştır

( $p<0.001$ ). Hücre canlılığı 24 saat maruziyet uygulaması ilacın  $IC_{50}$  ve  $IC_{50/5}$  konsantrasyonlarında %50' nin altında iken diğer konsantrasyonlarında %50' nin üzerinde olduğu tespit edilmiştir.

Sorafenibin 48 saat maruziyet periyodu sonrasında  $IC_{50}$  ( $p<0.001$ ),  $IC_{50/5}$  ( $p<0.001$ ) ve  $IC_{50/10}$  ( $p<0.01$ ) konsantrasyonlarında, 72 saat maruziyet periyodu sonrasında ise tüm konsantrasyonlarında ( $p<0.001$ ) hücre canlılığında kontrol grubuna göre azalmaya yol açtığı belirlenmiştir. Hücre canlılığı 72 saat maruziyet uygulamasında %40-60 arasında olduğu tespit edilmiştir.

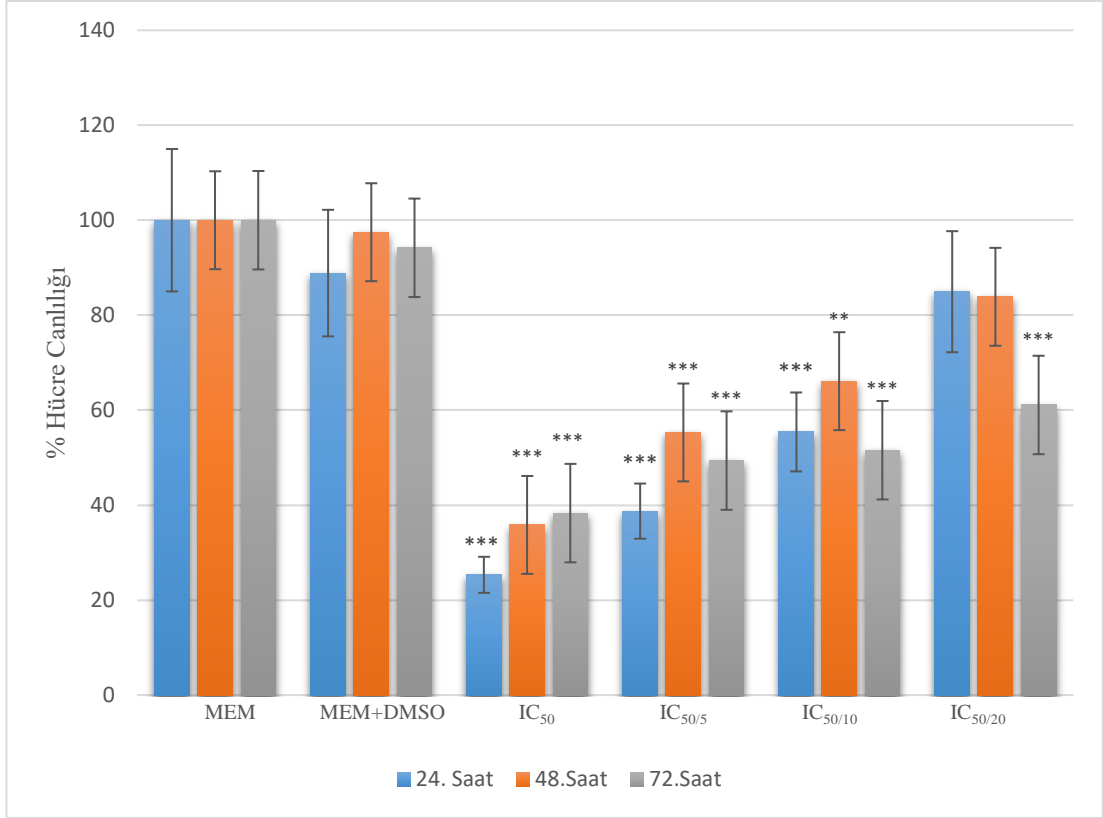
Zamana göre gruplar arası karşılaştırma yapıldığında;  $IC_{50}$  konsantrasyonu 24 saatlik grupla karşılaştırıldığında 48 ya da 72 saatlerdeki hücre canlılığı artmıştır ( $p<0.05$ ). Ancak 48 ve 72 saatlik maruziyet periyodu sonrasında meydana gelen sitotoksik etki bakımından kendi aralarında yapılan karşılaştırmada sadece  $IC_{50/20}$  konsantrasyonlarında fark bulunmuştur ( $p<0.01$ ).

Tablo 4.5. WST-8 yöntemine göre pH 7.8 değerindeki sorafenibin 24, 48 ve 72 saat maruziyet süresinde HepG2 hücrelerindeki sitotoksik etkisi

Sorafenib Konsantrasyon ( $\mu$ M)	Hücre Canlılığı (%) $\pm$ SE		
	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol (MEM)	100 $\pm$ 4.40 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 3.03 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 4.32 <sup>a</sup>
MEM+DMSO	88.86 $\pm$ 2.70 <sup>a</sup>	97.47 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>	94.18 $\pm$ 5.24 <sup>a</sup>
$IC_{50}$	25.32 $\pm$ 0.48 <sup>b,x</sup>	35.83 $\pm$ 3.55 <sup>b,y</sup>	38.32 $\pm$ 0.67 <sup>b,y</sup>
$IC_{50/5}$	38.73 $\pm$ 3.68 <sup>bc,x</sup>	55.30 $\pm$ 5.52 <sup>c,x</sup>	49.38 $\pm$ 2.57 <sup>bc,x</sup>
$IC_{50/10}$	55.41 $\pm$ 5.62 <sup>c,x</sup>	66.10 $\pm$ 5.24 <sup>cd,x</sup>	51.56 $\pm$ 1.98 <sup>bc,x</sup>
$IC_{50/20}$	84.95 $\pm$ 1.26 <sup>a,x</sup>	83.87 $\pm$ 2.047 <sup>ad,x</sup>	61.09 $\pm$ 1.13 <sup>c,y</sup>

<sup>a,b,c</sup> Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder ( $p<0.01$ )

<sup>x,y,z</sup> Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder ( $p<0.05$ )



Şekil 4.6. HepG2 hücrelerinde pH 7.8’ de hazırlanan sorafenibin doza bağlı olarak gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları (\* p<0.05, \*\* p<0.01 ve \*\*\* p<0.001)

#### 4.2.6. Sorafenibin 24 Saatlik Maruziyetine pH Etkisinin Karşılaştırılması

Tez çalışmasından elde edilen WST-8 testi sonucuna göre; sorafenibin 24 saat maruziyet periyodu sonrasında tüm konsantrasyonları için HepG2 hücrelerinde en güçlü sitotoksik etkisini pH 7.6’ da gösterdiği tespit edilmiştir. İlacın pH 7.6’ daki bütün konsantrasyonları hücre canlılığını %50’ den daha fazla azaltmıştır.

Farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin HepG2 hücrelerinde 24 saat maruziyet periyodu sonrasındaki hücre canlılığına etkisinin konsantrasyona göre karşılaştırması Tablo 4.6. ve Şekil 4.7.’ de gösterilmiştir. Buna göre; ilacın IC<sub>50</sub> konsantrasyonu hücre canlılığını %19.76±0.61’ e düşürerek en yüksek sitotoksik etkisini pH 7.6 grubunda gösterdiği belirlenmiştir. Daha sonra IC<sub>50</sub> konsantrasyonunda en yüksek sitotoksik etkisini sırasıyla pH 6.8, 7.8, 7.2 ve 6.6 pH grubunda gösterdiği belirlenmiştir. IC<sub>50</sub> konsantrasyonunda hücre canlılığında en fazla azalma tespit edilen pH 7.6 grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında 6.6, 7.2 (p<0.001) ve 7.8 (p<0.05) pH grupları arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Ancak IC<sub>50</sub> konsantrasyonunda pH 7.6 grubu ile pH 6.8 grubu arasında

hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ( $p>0.05$ ).

İlacın  $IC_{50/5}$  konsantrasyonu hücre canlılığını  $\%20.90\pm1.39$ ' a kadar düşürerek en yüksek sitotoksik etkisini pH 7.6 grubunda gösterdiği belirlenmiştir. Sorafenibin  $IC_{50/5}$  konsantrasyonda en yüksek sitotoksik etkisini sırasıyla 7.8, 6.8, 7.2 ve 6.6 pH gruplarında gösterdiği belirlenmiştir. Hücre canlılığında en fazla azalma tespit edilen pH 7.6 grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında 6.8 ( $p<0.01$ ), 7.2 ve 6.6 ( $p<0.001$ ) pH gruplarında arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Ancak  $IC_{50/5}$  konsantrasyonu için pH 7.6 grubu ile pH 7.8 grubu arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ( $p>0.05$ ).

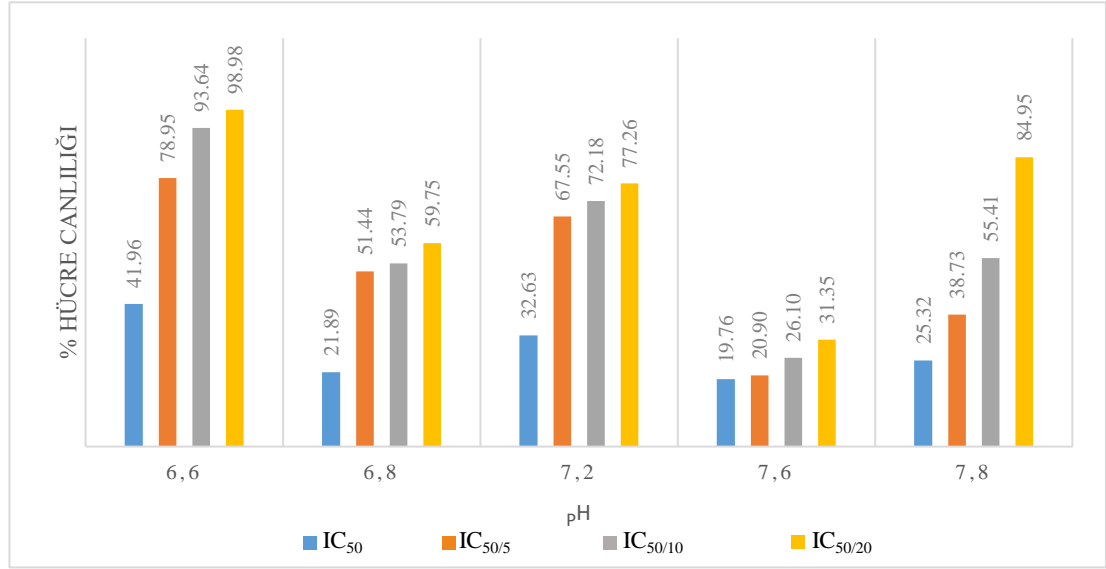
İlacın  $IC_{50/10}$  ve  $IC_{50/20}$  konsantrasyonları hücre canlılığını sırasıyla  $\%16.10\pm1.65$  ve  $\%31.35\pm1.86$ ' ya düşürerek en yüksek sitotoksik etkisini pH 7.6 grubunda gösterdiği belirlenmiştir. Daha sonra  $IC_{50/10}$  ve  $IC_{50/20}$  konsantrasyonlarında en yüksek sitotoksik etkisini sırasıyla 6.8, 7.8, 7.2 ve 6.6 pH gruplarında gösterdiği belirlenmiştir.  $IC_{50/10}$  ve  $IC_{50/20}$  konsantrasyonlarında hücre canlılığında en fazla azalma tespit edilen pH 7.6 grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında tüm pH grupları arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ( $p<0.01$ ).

Elde edilen sonuçlara göre sorafenib en düşük konsantrasyonlarda ( $IC_{50/10}$  ve  $IC_{50/20}$ ) pH 7.6' da diğer pH gruplarına göre hücre canlılığını  $\%50$ ' den daha fazla azaltarak yüksek sitotoksik etkisinin devam ettiği belirlenmiştir. Aynı konsantrasyonlarda pH 7.6 haricindeki pH larda hücre canlılığı  $\%50$ ' nin üzerinde kalmıştır.. Ayrıca azalan konsantrasyonlarda hücre canlılığı artmasına rağmen pH 7.6 grubundaki hücre canlılığının artışı diğer pH gruplarına göre oldukça düşük seviyede olduğu belirlenmiştir. pH 7.6 grubunda sorafenibin en yüksek ve en düşük konsantrasyonlardaki hücre canlılığı arasındaki fark  $\%11.59$  iken sitotoksik etki pH 7.6' ya en yakın olan pH 6.8 grubunda ise fark  $\%37.86$  olarak tespit edilmiştir. Bu durum sorafenibin alkali ortamda asidik ortama göre daha etkili olduğunu göstermektedir. pH 7.8, 6.6 ve 7.2 gruplarında en düşük ve en yüksek konsantrasyon arasındaki sitotoksik etki ise sırasıyla  $\%59.63$ ,  $\%57.03$  ve  $\%44.63$  olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.6. HepG2 hücrelerinde farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin 24 saat maruziyet periyodu sonrasında gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları

pH	MEM	MEM+DMSO	Sorafenib			
			IC <sub>50</sub>	IC <sub>50/5</sub>	IC <sub>50/10</sub>	IC <sub>50/20</sub>
6.6	100±3.06	95.02±1.03	41.96±2.01 <sup>a</sup>	78.95±2.02 <sup>a</sup>	93.64±5.31 <sup>a</sup>	98.98±3.03 <sup>a</sup>
6.8	100±3.02	93.20±0.44	21.89±0.57 <sup>bd</sup>	51.44±1.49 <sup>bc</sup>	53.79±1.33 <sup>b</sup>	59.75±1.13 <sup>b</sup>
7.2	100±2.58	85.46±1.68	32.63±0.86 <sup>c</sup>	67.55±4.97 <sup>ac</sup>	72.18±1.02 <sup>c</sup>	77.26±1.96 <sup>c</sup>
7.6	100±1.54	93.80±2.11	19.76±0.61 <sup>b</sup>	20.90±1.39 <sup>d</sup>	26.10±1.65 <sup>d</sup>	31.35±1.86 <sup>d</sup>
7.8	100±4.40	88.86±2.70	25.32±0.48 <sup>d</sup>	38.73±3.68 <sup>bd</sup>	55.41±5.62 <sup>bc</sup>	84.95±1.26 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder (p<0.05).



Şekil 4.7. Farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin 24 saat maruziyet süresinde HepG2 hücrelerinde % canlılığa etkisi

#### 4.2.7. Sorafenibin 48 Saatlik Maruziyetine pH Etkisinin Karşılaştırılması

WST-8 testi sonucuna göre; sorafenibin 48 saat maruziyet periyodu sonrasında tüm konsantrasyonları için HepG2 hücrelerinde en güçlü sitotoksik etkisini pH 6.6 değerinde gösterdiği tespit edilmiştir.

Farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin HepG2 hücrelerinde 48 saat maruziyet periyodu sonrasındaki hücre canlılığına etkisinin konsantrasyona göre karşılaştırması Tablo 4.7. ve Şekil 4.8.' de gösterilmiştir. Buna göre; ilacın IC<sub>50</sub> konsantrasyonu hücre canlılığını %32.50± 2.87' ye düşürerek en yüksek sitotoksik etkisini pH 6.6 grubunda gösterdiği belirlenmiştir. İlacın IC<sub>50</sub> konsantrasyonunda en yüksek sitotoksik etkisini sırasıyla 7.8, 7.2, 6.8 ve 7.6 pH grubunda gösterdiği belirlenmiştir. IC<sub>50</sub> konsantrasyonunda hücre canlılığında en fazla azalma tespit edilen pH 6.6 grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında 6.8, 7.2 (p<0.05) ve 7.6 (p<0.001) pH

grupları arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Ancak IC<sub>50</sub> konsantrasyonunda 6.6 pH grubu ile 7.8 pH grubu arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (p>0.05).

İlacın IC<sub>50/5</sub> konsantrasyonunda hücre canlılığını %39.13±0.38' e düşürerek en yüksek sitotoksik etkisini pH 6.6 grubunda gösterdiği belirlenmiştir. İlacın IC<sub>50/5</sub> konsantrasyonunda en yüksek sitotoksik etkisini sırasıyla 6.8, 7.8, 7.6 ve 7.2 pH grubunda gösterdiği belirlenmiştir. IC<sub>50/5</sub> konsantrasyonunda hücre canlılığında en fazla azalma tespit edilen pH 6.6 grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında 7.8 (p<0.05), 7.6 ve 7.2 (p<0.01) pH grupları arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Ancak IC<sub>50/5</sub> konsantrasyonunda 6.6 pH grubu ile 6.8 pH grubu arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (p>0.05).

İlacın IC<sub>50/10</sub> konsantrasyonunda hücre canlılığını %39.13±0.38' e düşürerek en yüksek sitotoksik etkisini pH 6.6 grubunda gösterdiği belirlenmiştir. Daha sonra IC<sub>50/10</sub> konsantrasyonunda en yüksek sitotoksik etkisini sırasıyla 7.6, 7.8, 6.8 ve 7.2 pH grubunda gösterdiği belirlenmiştir. IC<sub>50/10</sub> konsantrasyonunda hücre canlılığında en fazla azalma tespit edilen pH 6.6 grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında 7.8 (p<0.05), 6.8 ve 7.2 (p<0.01) pH grupları arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Ancak IC<sub>50/10</sub> konsantrasyonunda 6.6 pH grubu ile 7.6 pH grubu arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (p>0.05).

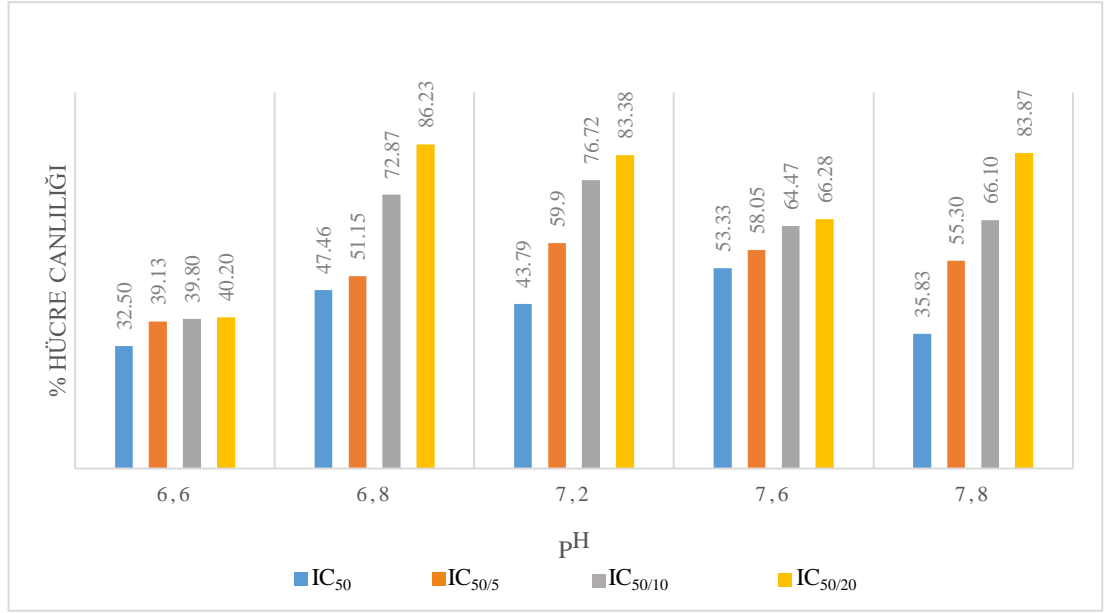
İlacın IC<sub>50/20</sub> konsantrasyonunda hücre canlılığını %39.13±0.38' e düşürerek en yüksek sitotoksik etkisini pH 6.6 grubunda gösterdiği belirlenmiştir. Daha sonra IC<sub>50/20</sub> konsantrasyonunda en yüksek sitotoksik etkisini sırasıyla 7.6, 7.2, 7.8 ve 6.8 pH grubunda gösterdiği belirlenmiştir. IC<sub>50/20</sub> konsantrasyonu için hücre canlılığında en fazla azalma tespit edilen pH 6.6 grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında tüm gruplarda hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p<0.001).

İlacın en düşük konsantrasyonda pH 7.6' daki güçlü sitotoksik etkisi 24 saatten (%31.35±1.86) sonra 48 saatte de devam etmektedir.

Tablo 4.7. HepG2 hücrelerinde farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin 48 saat maruziyet periyodu sonrasında gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları

pH	MEM	MEM+DMSO	Sorafenib			
			IC <sub>50</sub>	IC <sub>50/5</sub>	IC <sub>50/10</sub>	IC <sub>50/20</sub>
6.6	100±4.62	96.81±0.18	32.50±2.87 <sup>a</sup>	39.13±0.38 <sup>a</sup>	39.80±1.13 <sup>a</sup>	40.20±0.78 <sup>a</sup>
6.8	100±3.42	98.46±2.88	47.46±0.40 <sup>b</sup>	51.12±1.81 <sup>ab</sup>	72.87±2.52 <sup>b</sup>	86.23±1.34 <sup>b</sup>
7.2	100±8.43	93.42±3.96	43.79±1.90 <sup>bc</sup>	59.92±2.03 <sup>b</sup>	76.72±2.14 <sup>b</sup>	83.38±5.03 <sup>b</sup>
7.6	100±2.22	95.29±2.44	53.33±0.10 <sup>b</sup>	58.05±0.64 <sup>b</sup>	64.47±1.75 <sup>ab</sup>	66.28±1.39 <sup>c</sup>
7.8	100±3.03	97.47±1.08	35.83±3.55 <sup>ac</sup>	55.30±5.52 <sup>b</sup>	66.10±5.24 <sup>b</sup>	83.87±2.04 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup> Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder (p<0.05).



Şekil 4.8. Farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin 48 saat maruziyet süresinde HepG2 hücrelerinde % canlılığı etkisi

#### 4.2.8. Sorafenibin 72 Saatlik Maruziyetine pH Etkisinin Karşılaştırılması

Farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin HepG2 hücrelerinde 72 saat maruziyet periyodu sonrasındaki hücre canlılığına etkisinin konsantrasyona göre karşılaştırması Tablo 4.8. ve Şekil 4.9.' da gösterilmiştir. Buna göre; ilacın IC<sub>50</sub> konsantrasyonu hücre canlılığını %32.71±1.48' e düşürerek en yüksek sitotoksik etkisini pH 7.2 grubunda gösterdiği belirlenmiştir. Daha sonra IC<sub>50</sub> konsantrasyonun en yüksek sitotoksik etkisini sırasıyla 6.8, 7.8, 6.6 ve 7.6 pH grubunda gösterdiği belirlenmiştir. IC<sub>50</sub> konsantrasyonu için hücre canlılığında en fazla azalma tespit edilen pH 7.2 grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında sadece 7.6 pH ' da grubunda hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p<0.05).

İlacın IC<sub>50/5</sub> konsantrasyonunda hücre canlılığını %34.39±0.49' a düşürerek en yüksek sitotoksik etkisini pH 7.2 grubunda gösterdiği belirlenmiştir. Daha sonra en

yüksek sitotoksik etkisini sırasıyla 6.6, 7.8, 6.8 ve 7.6 pH grubunda gösterdiği belirlenmiştir. Hücre canlılığında en fazla azalma tespit edilen pH 7.2 grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında sadece 7.6 pH' da grubunda hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ( $p<0.001$ ).

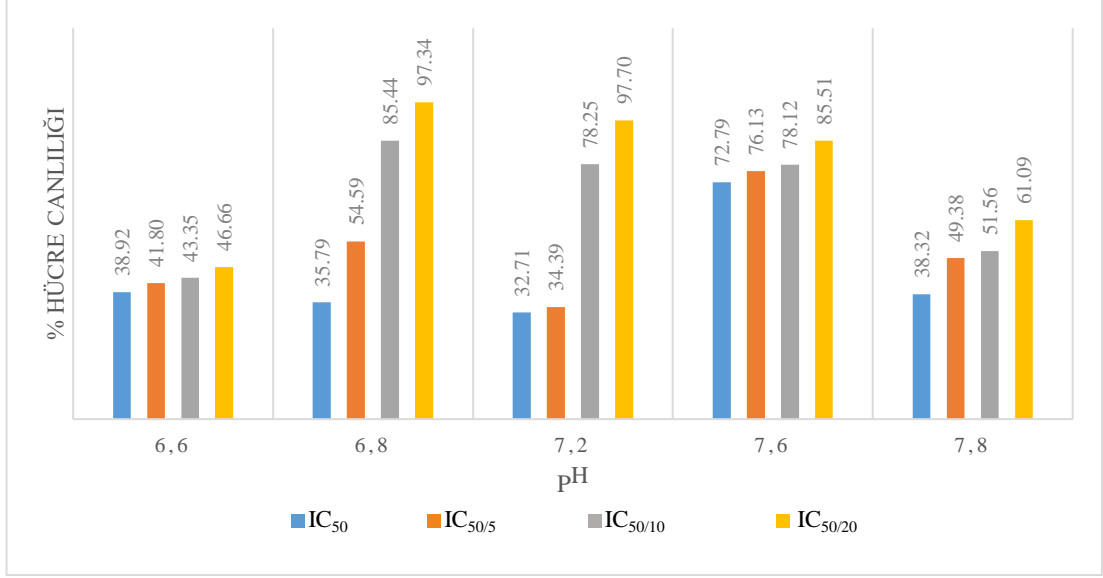
İlacın  $IC_{50/10}$  ve  $IC_{50/20}$  konsantrasyonunda hücre canlılığını sırasıyla  $43.35\pm 0.98$  ve  $46.66\pm 5.04$ ' a düşürerek en yüksek sitotoksik etkisini pH 6.6 grubunda gösterdiği belirlenmiştir. Daha sonra en yüksek sitotoksik etkisini sırasıyla 7.8, 7.6, 7.2 ve 6.8 pH grubunda gösterdiği belirlenmiştir. Hücre canlılığında en fazla azalma tespit edilen pH 6.6 pH grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında 7.6, 7.2 ve 6.8 pH' da grubunda hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ( $p<0.001$ ).

İlacın en düşük iki ( $IC_{50/10}$  ve  $IC_{50/20}$ ) konsantrasyonlarında hücre canlılığını yaklaşık %50-60' a kadar azaltarak en güçlü sitotoksik etkisini pH 6.6' dan sonra pH 7.8' de gösterdiği tespit edilmiştir. İlacın  $IC_{50/10}$  ve  $IC_{50/20}$  konsantrasyonlarında diğer pH gruplarında ise hücre canlılığı yaklaşık %80-97 arasında olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.8. HepG2 hücrelerinde farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin 72 saat maruziyet periyodu sonrasında gözlenen % hücre canlılığının WST-8 analizi sonuçları

pH	MEM	MEM+DMSO	Sorafenib			
			$IC_{50}$	$IC_{50/5}$	$IC_{50/10}$	$IC_{50/20}$
6.6	100±7.15	98.68±10.50	38.92±0.75 <sup>a</sup>	41.80±0.70 <sup>a</sup>	43.35±0.98 <sup>a</sup>	46.66±5.04 <sup>a</sup>
6.8	100±3.33	88.53±3.91	35.79±2.47 <sup>a</sup>	54.59±4.08 <sup>a</sup>	85.44±1.79 <sup>b</sup>	97.34±4.31 <sup>b</sup>
7.2	100±2.45	94.88±1.95	32.71±1.42 <sup>a</sup>	34.39±0.49 <sup>a</sup>	78.25±4.24 <sup>b</sup>	91.70±4.64 <sup>b</sup>
7.6	100±2.84	91.80±3.33	72.79±3.44 <sup>b</sup>	76.13±2.59 <sup>b</sup>	78.12±2.73 <sup>b</sup>	85.51±5.05 <sup>b</sup>
7.8	100±4.32	94.18±5.24	38.32±0.67 <sup>a</sup>	49.38±2.57 <sup>a</sup>	51.56±1.98 <sup>a</sup>	61.09±1.13 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade eder ( $p<0.05$ ).



Şekil 4.9. Farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin 72 saat maruziyet süresinde HepG2 hücrelerinde % canlılığı etkisi

### 4.3. Hücre Proliferasyon Testi

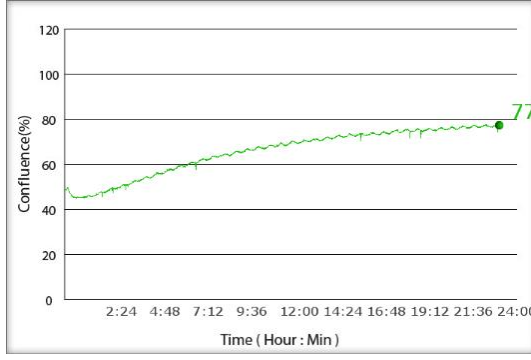
Sorafenibin 7.6, 6.6 ve 7.2 pH değerinde hücrelere uygulanan IC<sub>50/20</sub> konsantrasyonlarının 24 saat maruziyet periyodu süresinde gözlenen hücre proliferasyon verileri Tablo 4.9.' da gösterilmiştir.

Proliferasyon testi sonucuna göre farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenib kendi pH kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunu belirgin derecede baskılamıştır ( $p < 0.001$ ). Farklı pH' lardaki sorafenibin hücre proliferasyonunu baskılama sıralaması 7.6 > 7.2 > 6.6 olarak tespit edilmiştir. Grupların hücre proliferasyon sonuçları arasında istatistiksel olarak önemli fark belirlenmiştir ( $p < 0.001$ ).

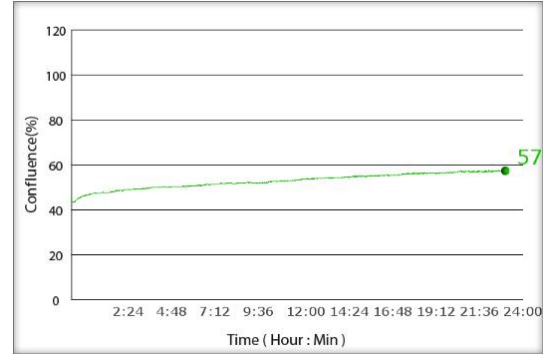
HepG2 hücrelerinde farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin 24 saatteki hücre proliferasyon eğrileri, maruziyet periyodunun başlangıç ve 24 saat sonundaki hücre yoğunluğu görüntüleri Şekil 4.10. ve 4.11.' de gösterilmiştir.

Tablo 4.9. HepG2 hücrelerinde farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin 24 saatteki proliferasyon oranları

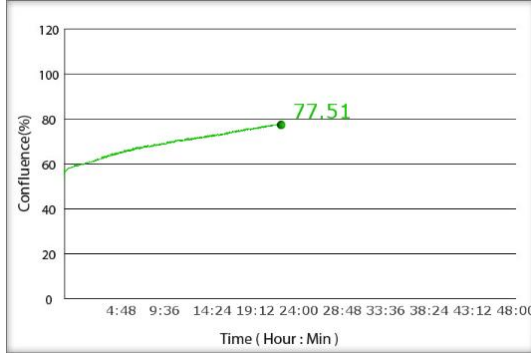
Grup (pH)	Tekrar	% Yoğunluk (Başlangıç)	% Yoğunluk (24 saat sonu)	Proliferasyon Artışı (%)	Proliferasyon Artışı (% Ortalama)	
6.6	Kontrol	1	46.07	74.53	61.78	61.13±0.34 <sup>a</sup>
		2	48.03	77.14	60.61	
		3	49.17	79.16	60.99	
6.6	IC <sub>50/20</sub>	1	42.81	54.53	27.38	27.65±0.30 <sup>b</sup>
		2	43.64	55.97	28.25	
		3	44.97	57.25	27.31	
7.2	Kontrol	1	56.71	81.19	43.17	46.61±0.41 <sup>c</sup>
		2	58.87	84.15	42.94	
		3	53.72	77.51	44.29	
7.2	IC <sub>50/20</sub>	1	46.89	56.11	19.66	19.67±0.50 <sup>d</sup>
		2	45.47	54.02	18.80	
		3	47.57	57.34	20.54	
7.6	Kontrol	1	48.57	67.42	38.81	38.69±0.77 <sup>e</sup>
		2	46.04	64.44	39.97	
		3	49.61	68.11	37.29	
7.6	IC <sub>50/20</sub>	1	52.41	61.25	16.87	15.84±0.53 <sup>f</sup>
		2	51.68	59.75	15.62	
		3	50.18	57.73	15.05	



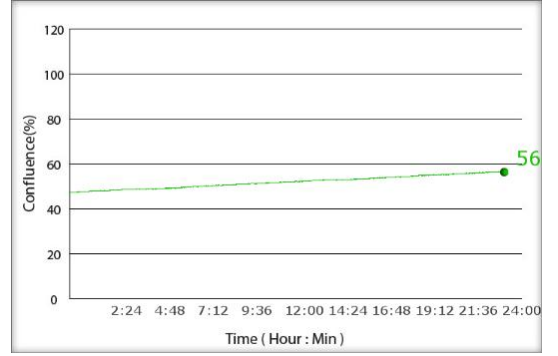
pH 6.6 Kontrol  
(Proliferasyon artışı %61.61)



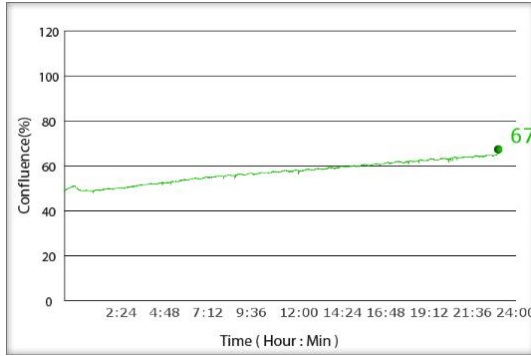
pH 6.6 IC<sub>50/20</sub>  
(Proliferasyon artışı %27.31)



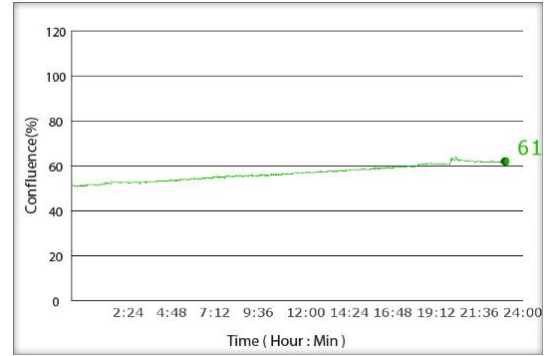
pH 7.2 Kontrol  
(Proliferasyon artışı %44.29)



pH 7.2 IC<sub>50/20</sub>  
(Proliferasyon artışı %19.66)



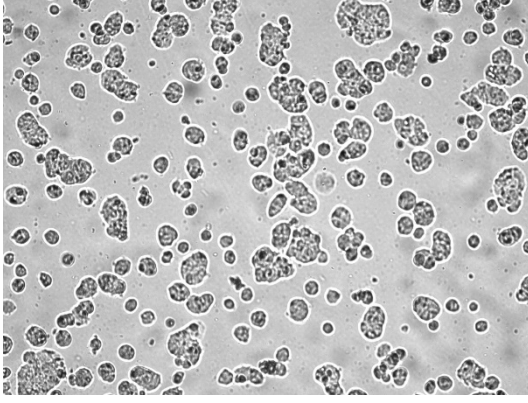
pH 7.6 Kontrol  
(Proliferasyon artışı %38.81)



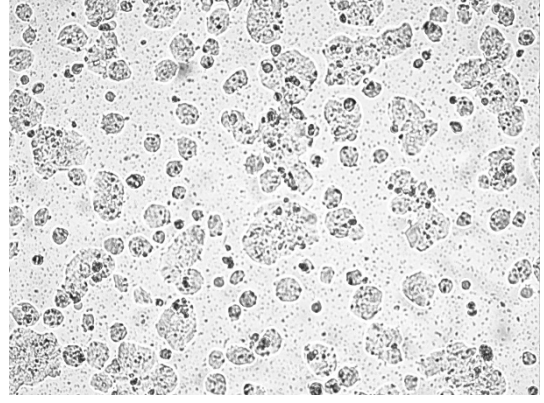
pH 7.6 IC<sub>50/20</sub>  
(Proliferasyon artışı %16.87)

Şekil 4.10. HepG2 hücrelerinde farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin 24 saatteki hücre proliferasyon eğrileri

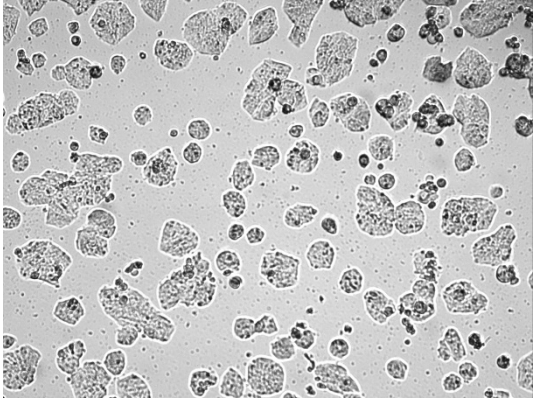
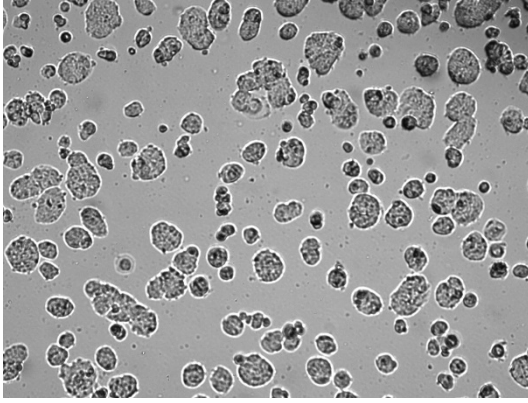
**Yoğunluk  
(Başlangıç)**



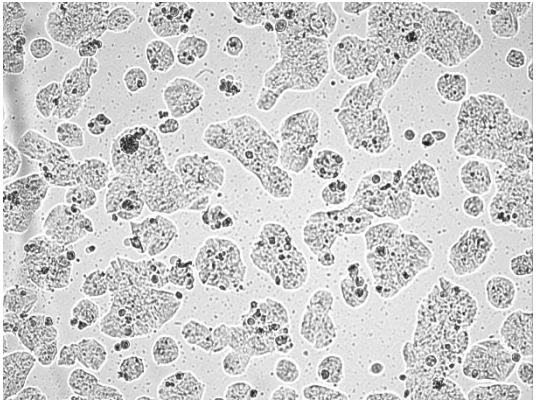
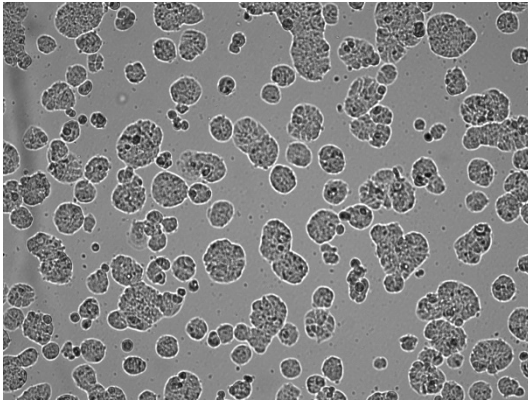
**Yoğunluk  
(24 saat sonu)**



**(pH 6.6 Kontrol)**

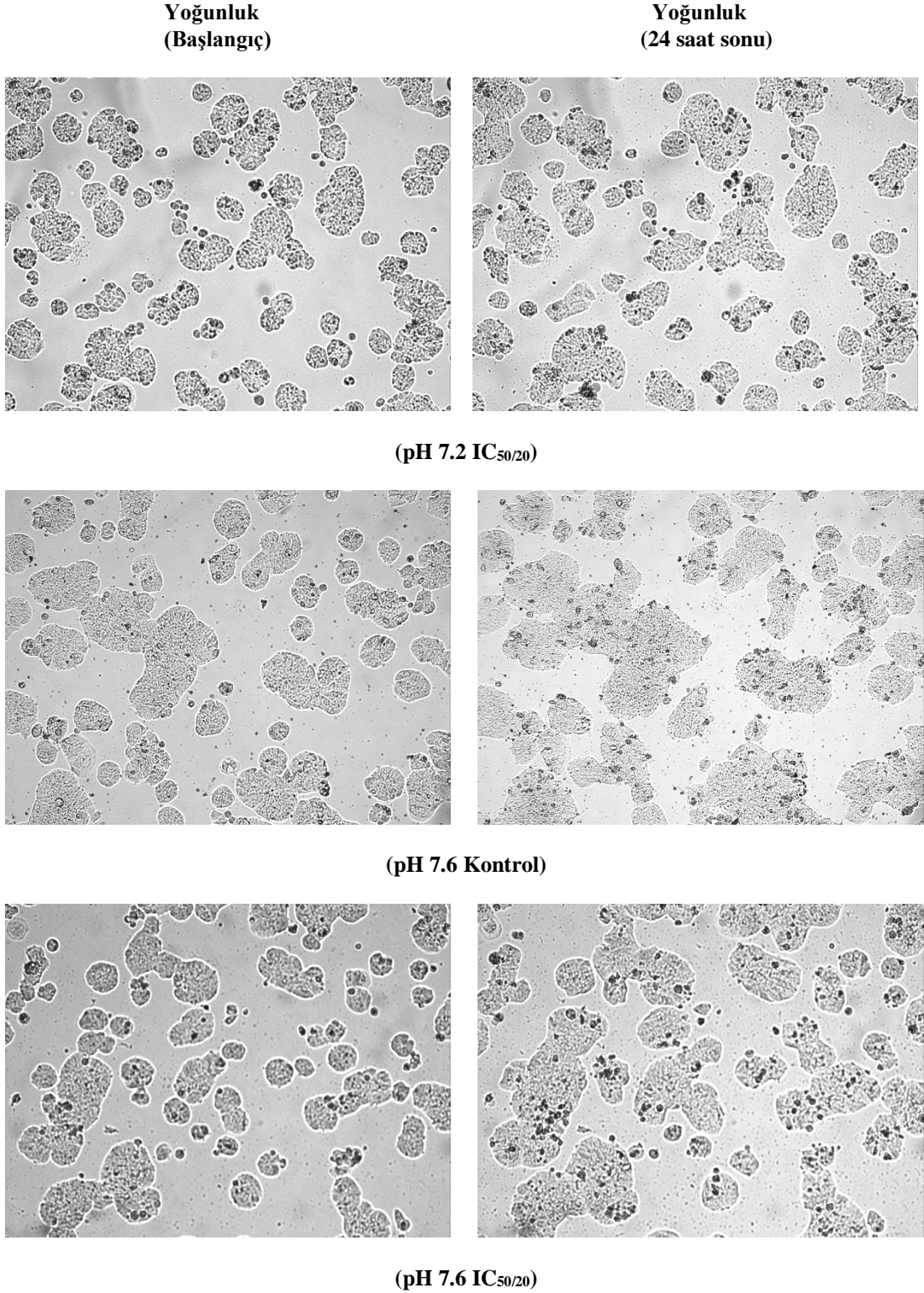


**(pH 6.6 IC<sub>50/20</sub>)**



**(pH 7.2 Kontrol)**

Şekil 4.11. HepG2 hücrelerinde farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin maruziyet periyodunun başlangıç ve 24 saat sonundaki görüntüleri



Şekil 4.11. (Devam) HepG2 hücrelerinde farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin maruziyet periyodunun başlangıç ve 24 saat sonundaki görüntüleri

Karaciğer kanseri Dünyada yüksek insidans ve mortalite oranına sahip kanser türleri arasında yer almaktadır (Reig et al., 2018). Uluslararası kanser araştırma ajansı verilerine göre, Dünya genelinde 2020 yılında 905 677 yeni karaciğer kanser vakası olduğu ve tüm malign tümörler arasında altıncı sırada yer aldığı bildirilmiştir (IARC,

2020). Ülkemizde de 2 788 kişinin karaciğer kanserinden dolayı hayatını kaybetmesi sonucu dünyadaki durumla benzerlik göstermektedir (TÜİK, 2019). HCC' nin erken teşhisi zordur ve genellikle hastalığın ilerlemiş aşamalarında konulabilmektedir. İleri seviye HCC tedavisinde kullanılan ilk tedavi seçeneğini hem multikinaz inhibitörü hem de anjiyogenezisi inhibe eden sorafenib oluşturmaktadır. Sorafenib ileri seviye HCC kanseri dışında çeşitli evredeki böbrek kanseri ve tiroid kanseri hastalarında da kullanılmaktadır (Colagrande et al., 2015). Ayrıca akciğer, kolorektal, pankreas, glioblastoma, miyeloid lösemi, ovaryum ve meme kanserinde de kullanılmasına yönelik çeşitli prelinik çalışmalar bulunmaktadır (Booth et al., 2020; Chekerov et al., 2018; Decker et al., 2017; Gian et al., 2012; Ohanian et al., 2018; Schiff et al., 2018).

HCC ilaç tedavisine oldukça dirençlidir. Ayrıca rezeke edilemeyen HCC' li hastalarda tümörün nüks etme oranının yüksek ve uzun süre sağkalım oranının düşük olmasından dolayı daha etkili ve daha güvenli tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır (Marquardt et al., 2012). Kemoterapötik ilaçların etkinliğinin arttırmaya yönelik çalışmalardan birisi kemoterapötik ile transarteryel kemoembolizasyonun birleştirilmesidir. Böylece antikanser ilacın kanser bölgesindeki konsantrasyonu sistemik uygulamasına kıyasla artmaktadır ve birkaç saatten birkaç güne kadar yüksek seviyelerde devam edebilmektedir. TAKE lokal bir tedavi yöntemidir ve hepatik arteri embolize (vücuttaki bir doku ya da organın damarlarını anjiyo yöntemiyle tıkamak anlamına gelir) edebilir. TAKE uygulaması orta evre HCC (BCLC evre B) olan, portal ven tümör trombozu (PVTT) veya ekstrahepatik metastazı olmayan büyük veya multinodüler HCC' li hastalar için standart tedavi seçeneği olarak önerilmektedir (Kudo et al., 2020). Antineoplastik ilaçların intravenöz yolla kullanıldığı kemoterapi BCLC tedavi stratejisinde yer almamaktadır. Moleküler biyoloji çalışmaları VEGF seviyesinin TAKE tedavisi yapıldıktan sonra genellikle lokal ve sistemik olarak arttığını göstermiştir. Ancak sorafenib antiproliferatif etkinliğinin yanısıra VEGFR' yi inhibe ederek antianjiyojenik aktivite de göstermektedir (Pascale et al., 2015). Bu nedenle son yıllarda, rezeke edilemeyen HCC' li hastalar için sorafenib ile TAKE' yi birleştirmeye çalışan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Meta-analiz sonuçları TAKE ile kombine sorafenibin prognoza kadar geçen zaman (time to progression, TTP/ "kansere gibi bir hastalığın tedavisi sırasında ve sonrasında bir hastanın bu hastalıkla yaşadığı, ancak daha da kötüleşmediği süredir") açısından tek başına TAKE' den üstün olabileceğini göstermiştir (Liu et al.,

2014). Ancak hem hayatta kalma oranı (overall survival, OS) hem de TTP' yi iyileştirdiği yönünde pozitif sonuçları destekleyen sınırlı sayıda çalışma olmasına rağmen genel görüş hayatta kalma süresi üzerinde olumlu yönde etkisinin bulunmadığı yönündedir (Kudo et al., 2020; Pascale et al., 2015).

Sorafenibin etkinliğini arttırmaya yönelik diğer bir uygulama ilacın yttrium-90 (Y-90) transarteriyel radyoembolizasyon (Y-90 RE) birlikte kullanmasıdır. Y-90 RE tedavisi tam tümör nekrozu, küratif gibi çeşitli amaçlarla semptomatik ve palyatif tedavide kullanılmaktadır. Ancak sorafenibin transarteriyel radyoembolizasyon yöntemi ile beraber kullanılması TAKE' de olduğu gibi BCLC tedavi stratejisi arasında yer almamaktadır. Y-90 RE ile sorafenibin etkinliğini arttırmaya yönelik yapılan klinik çalışmalarda OS' yi değiştirmedeği ancak Y-90 RE+sorafenib grubunda objektif cevap oranının daha yüksek ve dermatolojik yan etkilerin daha az olduğu bildirilmiştir (Chow et al., 2018; Vilgrain et al., 2017).

Sorafenibin biyoyararlanımını arttırmak ve hedefe yönelik tedavi yöntemi için nanoformülasyonları da (sorafenib yüklü sodyum selenit nanopartiküllerinin, SSSNP) geliştirilmiştir (Chen et al., 2020; Moni et al., 2020). Sorafenib nanoparçacıkları ile tedaviye takiben sıçanların tümör dokularındaki sorafenib konsantrasyonu, normal dokulardakinden önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Daha da önemlisi sorafenib nanopartikülleri tek başına sorafenib ile karşılaştırıldığında tümör büyümesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir (Sheng et al., 2017). Deney hayvanlarından elde edilen sonuçlar sorafenib nanopartiküllerinin insanlarda spesifik olarak hepatoselüler karsinomu hedefleyebileceğini öne sürülmektedir (Moni et al., 2020). Sorafenib' in insan serum albümini (HSA) ve folik asit (FA) ile hazırlanan nanofarmülasyonu (FA-HSA-SRF-NP) ksenograft tümörlerini taşıyan çıplak farelerde tümör proliferasyonu ve anjiyogenezi azaltarak etkili antitümör aktivitesini sergilediği bildirilmiştir (Gao et al., 2019). Mevcut çalışmada, sorafenibin sitotoksik etkisini Warburg Etkisi sonucu meydana gelen asidik mikroçevrenin azaltabileceği düşünüldüğünden, farklı pH değerlerinde medyum kullanılarak sorafenibin karaciğer karsinoma hücre hattı olan HepG2 hücrelerindeki sitotoksik ve proliferasyon üzerine etkisi araştırılmıştır.

Tez çalışmasında ileri seviye HCC tedavisinde kullanılan sorafenibin 6.6 ve 7.8 arasında değişen farklı pH değerlerindeki medyumla hazırlanan IC<sub>50</sub>, IC<sub>50/5</sub>, IC<sub>50/10</sub> ve IC<sub>50/20</sub> konsantrasyonunun HepG2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi WST-8 test yöntemi kullanılarak araştırıldı. Ayrıca aralarında anlamlı fark bulunan pH 6.6, 7.2 ve

7.6 değerlerinde hazırlanan sorafenibin en düşük konsantrasyonu olan IC<sub>50/20</sub>' nin hücre proliferasyon üzerindeki etkisi Juli-BR cihazında değerlendirildi.

Yapmış olduğumuz çalışmada öncelikle sorafenibin IC<sub>50</sub> değeri 24 saat maruziyetten sonra WST-8 test yöntemiyle değerlendirilmiş olup 13.40 µmol/L olarak belirlenmiştir. Sorafenibin HepG2 hücre hatlarında yapılan çeşitli çalışmalarda IC<sub>50</sub> değeri (24 saat) 10-15.9 µmol/L arasında bulunmuştur (Abdel-Mohsen et al., 2020; Alghamdi et al., 2020; Elsayed et al., 2019; Liao et al., 2021; Liu et al., 2017; Suo et al., 2012; Şirin, 2018). Sorafenibin HepG2' ye karşı daha önce bildirilen IC<sub>50</sub> değeri ile mevcut çalışmadaki IC<sub>50</sub> değeri benzerlik göstermektedir. Ancak bazı çalışmalarda HepG2 hücrelerindeki IC<sub>50</sub> değeri 6.20-9 µmol/L arasında olduğu belirtilmiştir (Eilenberger et al., 2019; Pascale et al., 2015; Rangwala et al., 2012; Tan et al., 2019; Zhang et al., 2020). Bu farklılığın sebebi IC<sub>50</sub> değeri belirlenmesinde kullanılan test yönteminin (MTT, MTS, sulforhodamine B, WST-1, WST-8 ya da alamar mavisi) ve zamanın (24, 48 ve 72 saat) farklı olmasına bağlı olabilir. Ayrıca *in vitro* denemelerde monolayer (tek tabakalı) hücre yoğunluğu da kemosenitiviteyi etkileyebilmektedir. Hücre yoğunluğu doğrudan veya dolaylı olarak hücre döngüsü, ilaç Emilimi, oksijen difüzyonu ve hücre yapışması gibi olayları etkilemektedir. Bu nedenle hücre yoğunluğu başta ilaç direnci olmak üzere proliferasyon oranı, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimindeki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir (Meli et al., 2012; Pascale et al., 2015).

Kanser hücreleri hücre sel faaliyetlerini yerine getirmek için gerekli olan enerjiyi (ATP) ‘‘Warburg etkisi’’ adı verilen metabolik süreçte glikozu aerobik veya anaerobik koşullar altında laktik aside dönüştürerek elde ederler (Westley and May, 2013). Asidik mikroçevre, Warburg Etkisi sonucu açığa çıkan yüksek miktardaki laktik asidin hücre içinden dışına taşınarak ekstrasellüler ortamda birikmesiyle meydana gelmektedir. Hücre içi pH’ da meydana gelen düşüş endonükleazları (polinükleotit zincirindeki fosfodiester bağını kesen enzim) aktive ederek DNA kırılmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda da hücrelerde başta apoptoz olmak üzere hücre ölüm mekanizmaları tetiklenerek ölüm meydana gelmektedir. Kanser hücreleri bu durumdan kaçmak için pH düzenleyici proteinlerin sentezini artırmak gibi çeşitli mekanizmaları kullanarak hücre içi pH’ yı dengede tutmaya çalışırlar (Izumi et al., 2003). Örneğin, V-ATPaz proton pompası ile H<sup>+</sup>’ nin hücre dışına taşınması sonucu hücre dışı pH’ nın asidik ve hücre içi pH’ nın ise nötr yada hafif alkali değerinde

kalmasını sağlar (Katara et al., 2014). Ayrıca  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  değiştirici 1 (NHE-1) ekspresyonu da artar ve hücre içindeki fazla  $\text{H}^+$  iyonu NHE-1 tarafından ekstrasellüler ortama taşınır. Anyon değiştirici-2' nin de (AE-2) ekspresyonun azalması sonucu  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  değişimi inhibe edilir. Bunun sonucunda da hücre içi ve hücre dışı arasındaki pH farkında artış meydana gelmektedir (Heming and Bidani, 2003; Rotin et al., 1989).

Asidik mikroçevre tümör dokularının en önemli ayırt edici özelliklerinden (The Hallmarks of Cancer) birisi olup hücrelerin canlılığını destekleyerek proliferasyon, invazyon, metastaz ve kemoterapötiklere karşı direnç oluşturma yeteneğini arttırmaktadır (Peppicelli et al., 2017). Çalışmamızda asidik pH' lardaki hücre canlılığı ve sorafenibin etkinliği 24 saat uygulamada karşılaştırıldığında asitlik arttıka hücre canlılığının arttığı ilacın etkinliğinin azaldığı tespit edilmiştir. Sorafenibin pH 6.6' da tüm dozlarının etkinliği pH 6.8' e göre önemli düzeyde düşük bulunmuştur. İlacın pH 6.6' da uygulanan  $\text{IC}_{50}$  konsantrasyon grubunda hücre canlılığı %41.96 iken aynı dozun pH 6.8 deki hücre canlılığı (%21.89) yaklaşık yarı yarıya azalmıştır. Doz azaldıkça  $\text{IC}_{50/10}$  ve  $\text{IC}_{50/20}$  düzeylerinde pH 6.6' da hücre canlılığı %90' nın üzerine çıkmıştır. Sorafenibin aynı dozlarında pH 6.8' de yaklaşık %55 hücre canlılığı belirlenmiştir. Ayrıca sorafenibin HepG2 hücreleri üzerine 24 saat maruziyet periyodu sonrasındaki sitotoksik etkisi pH 7.6 koşullarında diğer pH gruplarına göre önemli derecede artmıştır ( $p < 0.05$ ).

Tümör mikroçevresinin asidik özellikte olması sadece kanser hücrelerinin yüksek metabolizma sonucu meydana gelen laktik asit değil aynı zamanda yetersiz perfüzyon (hipoksi) nedeniyle de kaynaklanmaktadır. Kanser hücreleri hipoksik şartlar altında HIF1  $\alpha$ ' nın aracılık ettiği gen ekspresyonunu uyararak glikozun parçalanmasını arttırır. Böylece hücrede laktik asit ve  $\text{CO}_2$  üretiminin artmasına neden olur (Kung et al., 2000; Seagroves et al., 2001). Kanser hücrelerinde meydana gelen fazla laktik asit üretimi ve tümörün hipoksik şartlarından dolayı kanser hücrelerinin mikroçevre pH değeri 6.4 ve 7.0 arasında değişmektedir. Hatta insan skuamöz hücre karsinomasında mikroçevre pH' sının değeri 5.6' ya kadar düştüğü bildirilmiştir (Griffiths, 1991; Boedtkjer and Pedersen, 2020). Çeşitli çalışmalar, asidik mikroçevrenin genomik mutasyonları tetikleyerek; lokal invazyon ve migrasyonu uyarması, antitümör bağışıklığını baskılaması ve özellikle kemoterapötik ilaçlara karşı direnci artırması sonucu tümör ilerlemesini desteklediğini doğrulamıştır (Fan et al.,

2015; Pilon-Thomas et al., 2016). Çalışmamızda medyum pH sınırı yalnızca 0.2 birim artırılması ile pH 6.8 de sitotoksik etki pH 6.6 ya göre yükselmiştir. Sorafenibin azalan tüm dozlarında (IC<sub>50/5</sub>, IC<sub>50/10</sub> ve IC<sub>50/20</sub>) benzer durum gözlenmiş, ilacın etkinliği ortam pH' sı artıkça artmıştır.

Faes ve ark., (2016) sorafenibin 1 ve 10 µM konsantrasyonları alkali pH' da (7.4) kültüre edilen insan umbilikal ven endotelial hücrelerine (HUVEC) 48 saat maruziyet periyodu uygulandığında hücre proliferasyonunu %17 ve 68 oranında baskılamıştır (p<0.0001). Ancak sorafenibin aynı konsantrasyonları asidik pH' da (6.4) bulunan hücrelerin proliferasyonunda önemli değişikliğe neden olmamıştır. Ayrıca HCC tedavisinde kullanılan sunitinib 1 ve 10 µM konsantrasyonlarında alkali pH' da hücre proliferasyonunu sırasıyla %23 ve 71 oranında baskılamıştır. Ancak sunitinibin aynı konsantrasyonları asidik pH' da (6.4) bulunan hücrelerin proliferasyon oranında sorafenibde olduğu gibi önemli değişikliğe neden olmamıştır. Ayrıca araştırmacılar sorafenib ve sunitinibin asidik pH' daki HUVEC hücreleri üzerindeki azalan antiproliferatif etkinliğinin fizyolojik pH' a yeniden maruz bırakılmasıyla etkilerinin tekrar artabileceği de araştırmışlardır. Bunun için hücreler önce pH 6.4 değerinde 24 saat ve daha sonra pH 7.4 değerinde 48 saat inkübe etmişlerdir. Araştırmacılar HUVEC' nin VEGFR-2' yi yeniden eksprese edilmesi için gereken sürenin fizyolojik pH' da 48 saat olduğundan 48 saat periyodunu seçtiklerini belirtmişlerdir. Asidik pH' ya maruz kalan hücrelerin pH 7.4' e maruz kaldıktan sonra proliferasyon hızlarının yeniden arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca bu hücrelere 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda sorafenib veya sunitinib uygulandığında (48 saat) hücre proliferasyonunu önemli ölçüde (p<0.05) azalttığını bildirmişlerdir. Bu veriler asidik mikroçevrenin sorafenib ve sunitinibin antiproliferatif etkinliğini azalttığını göstermektedir. Ayrıca bu ilaçların etkinliklerini sürdürmek için hedef yapının fizyolojik pH sınırları arasında korunması gerektiğini öne sürmüşlerdir (Faes et al., 2016). Bizim yapmış olduğumuz proliferasyon testinde pH 7.6' da hazırlanan sorafenib hücre proliferasyon oranını (%15.84±0.53), pH 7.2 (%19.67±0.50) ve 6.6 (%27.65±0.30) değerinde hazırlanan sorafenibe göre daha yüksek oranda baskıladığı bulunmuştur (p<0.001). Proliferasyon testinde elde ettiğimiz sonuçlar; sorafenibin alkali ortamda HepG2 hücrelerinin çoğalmasını diğer pH ortamlarına göre daha yüksek seviyede baskıladığını göstermiştir.

Sorafenibin de aralarında yer aldığı çeşitli kanser ilaçlarının (doksorubisin, cisplatin, metotreksat, paklitaksel, erlotinib ve borteomib) etkinliği hem normal pH (7.3-7.4) değerindeki HCT116 ve asidik pH' ya adapte edilmiş AA-HCT116 hücreleri kullanılarak araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle kolon karsinoma hücre hattı HCT116 hücreleri pH 6.8 şartlarında kronik olarak büyümeye adapte edilerek alt hücre tipi olan AA-HCT116 elde edilmiştir. Sorafenib ve everolimus (böbrek hücresi kanseri ve diğer kanser türlerinin tedavisinde immünoşüpresan olarak kullanılan ilaç) AA-HCT116 ve HCT116 hücrelerinde 0.352 ve 50 µM arasındaki konsantrasyonlarına 72 saat süre maruziyet uygulamasında benzer oranda sitotoksik etki meydana getirmiştir. Ancak AA-HCT116 hücreleri diğer kanser ilaçlarına daha az duyarlılık göstermiştir. Sorafenib HCT116 ve AA-HCT116 hücrelerinde hücre canlılığını benzer oranda etkilemesine rağmen 72 saat maruziyet periyodunda IC<sub>50</sub> değeri HCT116 hücrelerinde 10.16 µmol/L ve AA-HCT116 hücrelerinde 13.19 µmol/L olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar doksorubisin, cisplatin, metotreksat, paklitaksel, erlotinib ve borteomibin asidik koşullara adapte olan hücrelerde daha düşük seviyede sitotoksik etki meydana getirdiğini vurgulamışlardır. Bu durum kronik olarak asidik pH' ya adapte olmuş hücrelerin birçok kemoterapötige dirençli olduğunu göstermektedir (Pellegrini et al., 2018). Çalışmamızda sorafenibin en etkin olduğu ortam pH' sında (7.6) hücre canlılığı en yüksek dozda (%19.76±0.61) ile en düşük dozda (%31.35±1.86) olarak belirlenmiştir. İlacın konsantrasyonu 1/20 oranında azaltılması hücre canlılığında %11.59 artışa neden olmuştur. Alkali ortamla ilaç dozunun azaltılabilmesi sorafenibin advers etkileri yönünden de olumlu olabileceği yönünde yorumlanmıştır. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da sorafenibin 72 saat maruziyet periyodu sonrasında gözlenen hücre canlılığı pH 6.8 grubunda 7.2' ye göre daha yüksektir ancak hücre canlılığı arasında istatistiksel fark bulunmamıştır. Ancak en düşük konsantrasyonlarda (IC<sub>50/10</sub> ve IC<sub>50/20</sub>) hem 6.8 hem de 7.2 pH grubunda yüksek oranda hücre canlılığı (%80-97) devam ederken pH 7.8 grubunda aynı konsantrasyonlarda hücre canlılığı önemli derecede (%51-61) azaldığı tespit edilmiştir.

Çoklu ilaç direncinde (MDR) görevli olan P-glikoproteini (pGP) kanser tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı direnç oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Asidik mikroçevre kanser hücrelerindeki pGP' nin ekspresyon ve aktivitesini %70 oranına kadar arttırabilmektedir. Sıçan R3327-AT1 prostat karsinoma hücrelerinde pH

6.6' daki pGP aktivitesi pH 7.6' ya göre iki kat artmıştır. Bu durum antrasiklin grubundaki danorubisinin asidik pH' daki hücrelerde daha düşük konsantrasyonda bulunması ve sitotoksitesinin belirgin seviyede azalmasıyla gösterilmiştir (Thews et al., 2006). Benzer şekilde meme kanseri tedavisinde sık kullanılan paklitaksel ve doksorubisin farklı dozlarda (5, 0.8 ve 0.01  $\mu$ M) pH 7.4' de bulunan MCF-7 (meme kanseri hücre hattı) hücrelerine asidik (6.6) pH' ya göre daha fazla sitotoksik etki meydana getirmişlerdir (Tavares-Valente et al., 2013). İnsan kolorektal karsinoma hücrelerinde (LS513) pH ve hipoksi pGP' nin aktivitesi normal pH (7.5 pH) koşullar altında aktivitesi ve ekspresyonu belirgin şekilde değişmezken asidik pH (6.6) koşullar altında aktivitesi %70 oranında artmıştır (Lotz et al., 2007). Tümör mikroçevre pH' sı ilaçlara karşı hücre duyarlılığını dolaylı yoldan da etkilemektedir. Hücreler mitoz bölünmedeki S-fazında diğer hücre döngüsü aşamalarına göre kemoterapotik ve radyasyon tedavisine daha duyarlıdır. Ancak hücre dışı asidik pH G0 fazındaki hücrelerin oranını arttırmaktadır (Mills et al., 2018). Diğer dolaylı etkisi, asidik pH' ya uzun süre maruziyet kanser hücrelerinde ısı şoku proteini olan HSP27 düzeyini artırır. HSP27 apoptozun baskılanması gibi çeşitli mekanizma yollarıyla hücre sağkalımında önemli rol oynamaktadır. Asidik pH' ya uzun süre maruz kalan hücreler sisplatin gibi birçok kanser ilacına karşı daha az sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Wachsberger et al., 1997). Asidik mikroçevreye sahip hücreler sadece kemoterapötiklere karşı değil aynı zamanda radyasyon tedavisinde direnç göstermektedir. Kronik olarak düşük pH' ya (pH 6.8) adapte edilen insan maksiller karsinoma hücrelerinin radyasyon tedavisine daha dirençli olduğu bildirilmiştir (Ohtsubo et al., 2001). Uzun süre devam eden G2 arresti sırasında DNA hasarı onarımında hızlanması; p53 ekspresyonunu uyarır ve radyasyona bağlı apoptozu baskılamaktadır (Park et al., 2003; Peppicelli et al., 2017). Bu çalışmada 24 saatlik maruziyette 7.6 pH değerindeki en düşük konsantrasyondaki sorafenibin oluşturduğu sitotoksik etki en düşük asidik pH değerindeki (6.6 pH) en yüksek ilaç konsantrasyonunun oluşturduğundan daha yüksek bulunmuştur. Ancak 48 ve 72 saat maruziyet süresi sonrasında pH 7.6 grubunda bulunan hücrelerin canlılığı artmaktadır. Bunun sebebinin ortamda bulunan ilaç moleküllerinin ilk 24 saat içerisinde etkisini meydana getirip ortamdaki miktarının azalmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Ancak 6.8' de IC<sub>50</sub> konsantrasyonu hariç diğer tüm konsantrasyonlarda maruziyet süresi arttıkça hücre canlılığı artmış ve %50' nin üzerinde bulunmuştur. Ayrıca pH 6.6 grubundaki hücrelerin 48 saat maruziyette tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığı

azalırken 72 saatte tekrar artmaya başlamıştır. Bu durum asidik mikroçevrenin sorafenibe karşı direnç oluşturduğu şeklinde yorumlanabilir.

Sodyum bikarbonatın ( $\text{NaHCO}_3$ ) tümör büyümesi üzerindeki etkisini araştırıldığı bir çalışmada C3H meme karsinomu tümör fragmentleri (~100 mg) C3H/Hen farelerine ve MCF-7 hücreleri ( $5 \times 10^6$ , 0.05 mL) şiddetli kombine immün yetmezlik hastalığı olan farelerin (severe combined immunodeficient, SCID) meme dokularına implante etmişlerdir. Daha sonra farelere bir defa intraperitoneal yolla 0.7 mL x 1 M  $\text{NaHCO}_3$  (4 saat boyunca *ad libitum* suya erişimi engellenmiş) uygulanmıştır. Tümör büyüme hızı 2 hafta boyunca tuzlu su verilmiş kontrol grubunda bulunan C3H/Hen ve SCID farelerle karşılaştırıldığında aralarında fark bulunmadığını ve tek başına  $\text{NaHCO}_3$  tedavisinin her iki C3H ve MCF-7 tümörünün büyüme oranları üzerinde etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Ancak hayvan deneyleri bazı kanser ilaçlarının tümör büyümesini alkali ortamda daha fazla baskıladığını göstermiştir. Akut (gavaj ya da intraperitoneal) ya da kronik (*ad libitum*)  $\text{NaHCO}_3$  uygulaması kanser hücrelerinde hücre dışı pH' sını alkaliye kaydırarak ilaçların etkisini arttırmaktadır. Meme dokusunda C3H tümörü ( $1982 \pm 242 \text{ mm}^3$ ) taşıyan C3H/Hen farelerin bir kısmına 7 gün arayla iki doz mitoksantron (i.v., 6 mg/kg) ya da tek doz mitoksantron (i.v., 12 mg/kg) uygulanmış, bir kısmına ise mitoksantron uygulamasından 2 saat önce intraperitoneal yolla 0.7 mL 1 M  $\text{NaHCO}_3$  uygulanmış ve 4 saat boyunca *ad libitum* suya erişimi engellenmiştir. Mitoksantronun fareler üzerindeki toksisitesinin belirgin bir sirkadiyen bağımlılığa sahip olduğu ve en düşük toksisitenin ışık başlangıcından 11-15 saat sonra gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu nedenle, tüm deneylerde mitoksantron ışık başlangıcından 12 saat sonra uygulanmıştır. C3H tümör modelinde farelerde mitoksantron tedavisinden önce sodyum bikarbonat uygulanırsa tümör büyümesini yaklaşık iki kat geciktirdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca sistemik sodyum bikarbonat uygulaması, mitoksantronun biyodağılımını doksorubisinden daha fazla etkilemiştir. C3H farelerinde eğri altında kalan alanın (AUC) değeri mitoksantrondan önce sodyum bikarbonat uygulanan farelerde ( $19\ 744 \pm 1339 \text{ ng/g doku}$ ) uygulanmayanlara göre ( $13\ 557 \pm 517 \text{ ng/g doku}$ ) %45 daha yüksek ( $p < 0.01$ ) olduğu bildirilmiştir. Fakat SCID farelerinde AUC değerinin doksorubisinden önce akut ya da kronik sodyum bikarbonat uygulanan farelerde ( $14.215 \pm 0.858$ ,  $15 \pm 0.839 \text{ ng/g doku}$ ) uygulanmayanlara göre ( $15.494 \pm 1.453 \text{ ng/g doku}$ ) istatistiksel olarak önemli olmadığı bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar MCF-7 tümör modeli taşıyan SCID farelerde

(1286±89 mm<sup>3</sup>) doksorubisin uygulamasından (2 mg/kg, kuyruk veni) 2 saat önce 1 M 0.5 mL (ip) ya da 48 saat önce içme suyuna 200 mM sodyum bikarbonat uygulamasının tümör büyümesini geciktirdiğini bildirmişlerdir. Ancak MCF-7/SCID meme tümörü taşıyan farelerde paklitaksel (i.v., 60 mg/kg ya da 7 gün arayla 45x2 mg/kg) uygulamasında önce akut sodyum bikarbonat uygulamasının (0.5 mL, ip, 1 M) paklitakselin terapötik etkinliği üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Ayrıca sodyum bikarbonat kemoterapötik ilaçların antitümör aktivitesinde artış sağladığı dozlarda konakçı üzerinde herhangi bir toksisiteye neden olmamaktadır (Raghunand et al., 2003). Tez çalışmasından elde edilen verilere göre sorafenibin etkinliğini arttırmaya yönelik yapılan TAKE uygulaması ile birlikte sodyum bikarbonat gibi sistemik alkalileştirici antiproliferatif özelliğini daha arttırabilir.

Antikanser etkisi de bulunan melatonin hormonunun asidik mikroçevrede (pH 6.7) insan meme kanseri hücrelerinde (MCF-7 ve MDA-MB-231) sağkalım mekanizması üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; melatonin tedavisinin, kaspaz-3' ün ekspresyonunu artırarak apoptozu artırdığı, GLUT-1 ve Ki-67 ekspresyonunu azaltarak proliferasyonu azalttığını ortaya koymuştur. Ancak melatonin hormonu alkali pH' da bulunan (pH 7.4) hücrelerde aynı mekanizmalar aracılığıyla hücre proliferasyonunu daha fazla azaltmıştır (Sonehara et al., 2019).

Sadece hücre medyum pH' sı alkali özellikte olduğunda bile hücre canlılığı ve proliferasyon oranında önemli azalmalar meydana gelmektedir. HepG2 hücrelerinin medyum pH' sı 6.6 ve 7.8 arasında değiştirildiğinde hücre canlılığı pH 6.8' de kontrol grubuna (7.2 pH) göre benzerlik gösterirken pH 6.6' da hücre canlılığındaki artış WST-1 ve tripan mavisi testleriyle gösterilmiştir. Alkali pH ortamında özellikle de pH 7.8' de hücre canlılığı önemli derecede azalmıştır (Güvenalp ve Güvenç, 2020). Benzer şekilde EC ve insan gastrik hücrelerinde de (SGC-7901 ve MKN45) alkali değerdeki medyum pH' sı (7.4-8.0) hücre canlılığını asidik pH' ya (6.0 ile pH 7.0, 6.6 ve 6.8) göre baskılamış ve proliferasyonu %35-65 oranında baskılamıştır (Li et al., 2020). Yapmış olduğumuz tez çalışmasında proliferasyon testinde pH 7.6 kontrol grubunda bulunan hücrelerin proliferasyon oranı (%38.12) pH 7.2 (%43.72) ve 6.6 (%60.47) kontrol grubundaki hücrelerin proliferasyon oranlarıyla karşılaştırıldığında oldukça düşük seviyede olduğu bulunmuştur. Proliferasyon testinde elde ettiğimiz sonuçlara göre asidik ortam HepG2 hücrelerinin çoğalması üzerinde uyarıcı etki meydana getirirken alkali ortam hücrelerin çoğalmasını baskılamaktadır.

Asidik mikroçevre sitotoksik T lenfosit ve doğal öldürücü hücreler gibi kansere karşı bağışıklık yanıtın şekillenmesinde rol oynayan immun yanıtı da baskılamaktadır. Asidik mikroçevre p38 ve JNK/c-Jun sinyal iletim yolağının inhibisyonu aracılığıyla sitotoksik T lenfositlerin aktivitesini ve proliferasyonu inhibe etmektedir (Fischer et al., 2007; Mendler et al., 2012). Ayrıca, yüksek seviyedeki laktik asite (20 mM) uzun süreli inkübasyon sitotoksik T lenfositlerin yarısından fazlasının ölümüne neden olmaktadır. Kanser hücreleri tarafından üretilen laktik asidin HCC ile ilişkili olan arginaz-1 (ARG1) ekspresyonunu ve tümör ilişkili M2 fenotipli makrofajlar (TAMs) tarafından IL-23/IL-17 salgılanmasını indükleyerek bağışıklık yanıtını baskılaması sonucu tümör gelişimini arttırdığı gösterilmiştir (Ohashi et al., 2013; Timek et al., 2012). HCC' nin bazı evrelerindeki tedavi seçenekleri arasında immünoterapi de bulunmaktadır. Sitokin ile uyarılmış öldürücü hücre (cytokine-induced killer cells- CIK) tedavisi günümüzde en sık kullanılan immünoterapi yöntemleri arasında yer almaktadır. Sitokin ile uyarılmış öldürücü hücreler pH 7.4' de pH 6.5' e göre daha yüksek sitotoksik aktiviteye sahiptir. 10:1 ve 80:1 arasında değişen CIK ve HepG2 hücrelerinin oranları pH 7.4' de bulunan HepG2-luc hücrelerin orana bağlı olarak %19-80' inin öldürürken pH 6.5 ise sadece %4-45 arasında hücre ölümü meydana gelmiştir. %50-100 oranında CIK içeren medyumda apoptoz pH 6.5' de %15-25 iken pH 7.4' de %26-45 olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar, asidik ortamın CIK hücrelerinin antitümör aktivitesini engellediğini göstermektedir (Yuan et al., 2016).

Çeşitli *in vivo* çalışmalar, proton pompa inhibitörü olan (PPI) esomeprazolün melanom lezyonlarında düşük pH oluşumunun engelleyerek lenfositlerin etkinliğini arttırdığı ve tümör taşıyan farelerde kanserin ilerlemesini geciktirdiğini göstermektedir (Bellone et al., 2013; Calcinotto et al., 2012). Bir başka PPI olan pantoprazol de tümör hücreleri üzerindeki proton pompalarını inhibe ederek makrofajların etkinliğini baskıladığı hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak gösterilmiştir (Vishvakarma and Singh, 2010, 2011). Melanom taşıyan farelerde (C57BL/6 fare) tümör pH' sını nötralize etmek için uygulanan sodyum bikarbonat kanser büyümesini baskılamıştır. Daha da önemlisi düzenleyici T lenfosit tedavisiyle birlikte kullanılması tedaviye olumlu yönde katkı sağlamıştır (Pilon-Thomas et al., 2016). Bulgular, bikarbonat tampon uygulamasıyla mikroçevre pH' sını yükseltmenin immünoterapiye verilen yanıtları iyileştirebileceğini göstermektedir (Peppicelli et al., 2017).

Tümör mikroçevresi kanser hücrelerinin apoptoz ve otofaji gibi hücre ölüm mekanizmalarını da etkilemektedir. Hücre dışı düşük pH' ın çeşitli tümör hücrelerinde MAPK sinyalini aktive ettiğini ve çoklu sitotoksik stresin neden olduğu apoptoza karşı koruyucu etki oluşturarak hücre sağkalımını arttırmaktadır. Asidik medyum (pH 6-6.7) koşullar altında bulunan lenfoma (WEHI7.2, CEM-C7 ve S49), meme kanseri (MDA-MB 231) ve mide kanseri (SGC-7901 ve MKN45) hücrelerinde apoptotik hücre ölümünün baskılandığı bildirilmiştir (Ryder et al., 2012; Rabiee et al., 2019; Li et al., 2020). Bu etkiye aside duyarlı G protein-çift reseptörü (GPR65) (asidoza yanıt olarak hayatta kalmak için sinyalleme başlatan faktörlerden birisi) tarafından Bcl-2 ve Bcl-xL' nin ekspresyonunun seviyesinin artması aracılık etmektedir. pH' nın artmasıyla hücrelerin apoptotik hızının kademeli olarak arttığı ve alkali ortamın (7.4-8) apoptozu uyardığı bildirilmiştir (Ryder et al., 2012).

## 5. SONUÇ

Kanser hücrelerinde Warburg etkisi sonucu meydana gelen asidik mikroçevre, hücrelerin proliferasyon, invazyon, metastaz ve anjiyogenezis yeteneği yanında immun yanıt ve kemoterapötiklere karşı direnç oluşturma kapasitesini de arttırmaktadır.

Tez çalışmasında incelenen sorafenib ileri seviye HCC hastaların tedavisinde standart olarak kullanılan antikanser ilacıdır. Ancak tümör mikroçevresinin asidik karakterde olması ilacın etkisini azaltmaktadır. Sodyum bikarbonat gibi alkalileştiricilerin sistemik ya da lokal kullanımını bazı kanser ilaçlarının etkinliğini artırmaktadır.

Çalışmamızda, farklı pH değerlerinde hazırlanan sorafenibin HepG2 hücre hattında sitotoksikite ve proliferasyon oranına etkileri incelenmiştir. HepG2 hücreleri üzerinde en güçlü sitotoksik etki 24 saat maruziyet periyodu sonrasında tüm konsantrasyonlarda pH 7.6 değerinde ve 48-72 saat maruziyet periyodu sonrasında ise düşük konsantrasyonlarda pH 7.6 ve 7.8 de gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca alkali pH (7.6)' da hazırlanan sorafenib (IC<sub>50/20</sub>) nötr (7.2) ve asidik (6.6) pH değerinde bulunan sorafenibe göre proliferasyonu istatistiksel olarak anlamlı derece azalttığı belirlenmiştir. Literatürdeki bazı kanser ilaçlarının etkisini arttırmaya yönelik *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara paralel olarak, sorafenibin etkisinin alkali ortamda daha güçlü olduğu tez çalışmasında da tespit edilmiştir. Böylece alkali ortamla ilacın etkisini artırmanın yanı sıra dozunun da azaltılabilmesi hem ilacın etkisini arttırmada hem de ilacın advers etkilerinin azalmasında olumlu olabileceği sonucuna varılmıştır.

Tez çalışması kapsamında elde edilen bulgularda alkali mikroçevrenin sorafenibin sitotoksik ve antiproliferatif etkisini arttırdığı belirlenmiştir. Bu nedenle elde edilen bulgular ışığında çalışmalara deney hayvanları ile yapılacak modellemelerle devam edilmesi ve böylelikle HCC' da sistemik ya da lokal alkalizasyonun sorafenib üzerindeki olası etkilerinin ayrıntılı bir şekilde ortaya konması önerilebilir. İleri seviye HCC hastalarında tedavi stratejisi olarak sorafenib ile birlikte lokal ya da sistemik alkalileştiricilerin kullanılması gelecekteki araştırmalar için bilimsel temel sağlayabilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abdelgalil, A. A., Alkahtani, H. M., Al-Jenoobi, F. I. (2019). ‘‘Sorafenib’’. Brittain, H. G. (eds.). in: Profiles of drug substances, excipients and related methodology (pp. 239-266). USA: Academic Press.
- Abdel-Haleem, A. M., Lewis, N. E., Jamshidi, N., Mineta, K., Gao, X., Gojobori, T. (2017). The emerging facets of non-cancerous warburg effect. *Frontiers in Endocrinology*. 8, 279.
- Abdel-Mohsen, H. T., Abdullaziz, M. A., Kerdawy, A. M. E., Ragab, F. A., Flanagan, K. J., Mahmoud, A. E., Ali, M. M., Siwani, H. I., Senge, M. O. (2020). Targeting receptor tyrosine kinase VEGFR-2 in hepatocellular cancer: Rational design, synthesis and biological evaluation of 1, 2-disubstituted benzimidazoles. *Molecules*. 25(4), 770.
- Acar, C., Altuntaş, T. G. (2019). Hedefe yönelik kanser tedavisinde kullanılan akıllı ilaçlar: EGFR inhibitörleri. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*. 44(1), 47-63.
- Adnane, L., Trail, P. A., Taylor, I., Wilhelm, S. M. (2006). Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar®), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature. *Methods in Enzymology*. 407, 597-612.
- Akram, M. (2013). Mini-review on glycolysis and cancer. *Journal of Cancer Education*. 28(3), 454-457.
- Akyıldız, Ü., Yalçın, K. S., Türkay, F. C. (2011). Hepatosellüler karsinom tedavisi. *Güncel Gastroenteroloji*. 15(3), 184-189.
- Alessandra, L. (2017). Manipulating pH in cancer treatment: Alkalinizing drugs and alkaline diet. *Journal of Complementary Medicine and Alternative Healthcare*. 2(1), 1-5.
- Alghamdi, H. A., Alrasheedi, A. A., El-Kady, A. I., Al-Thaiban, M. A., Al-Ghamdi, S. A. (2020). Elettaria cardamom extract synergistically enhancing sorafenib-induced apoptosis in HepG2 cells. *International Journal of Pharmaceutical Research and Allied Sciences*. 9(2), 50-61.
- Alotaibi, H., Atabey, N., Diril, K., Erdal, E., Ozturk, M. (2016). ‘‘Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma’’. Carr B. (eds.). in: Hepatocellular Carcinoma (pp. 43-63). Switzerland: Springer.
- Al-Rajabi, R., Patel, S., Ketchum, N. S., Jaime, N. A., Lu, T.-W., Pollock, B. H., Mahalingam, D. (2015). Comparative dosing and efficacy of sorafenib in hepatocellular cancer patients with varying liver dysfunction. *Journal of Gastrointestinal Oncology*. 6(3), 259-267.
- Aslantürk, Ö. S. (2018). *In Vitro* Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In Larramendy, L. M. (Ed.), Genotoxicity: A Predictable Risk to Our Actual World (pp. 1-18). United Kingdom: IntechOpen.
- ATCC. (2020). HepG2. Retrieved February 23, 2020, from <https://www.atcc.org/products/hb-8065fr/>.
- Balogh, J., Victor, D., Asham, E. H., Burroughs, S. G., Boktour, M., Saharia, A., Li, X., Ghobrial, R.M., Monsour H. P. (2016). Hepatocellular carcinoma: a review. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*. 3, 41-53.
- Bellone, M., Calcinotto, A., Filipazzi, P., De Milito, A., Fais, S., Rivoltini, L. (2013). The acidity of the tumor microenvironment is a mechanism of immune escape that can be overcome by proton pump inhibitors. *Oncoimmunology*. 2(1), e22058.

- Benson, A. B., D'Angelica, M. I., Abbott, D. E., Abrams, T. A., Alberts, S. R., Anaya, D. A., Anders, R., Are, C., Brown, D., Chang, D. T. (2019). Hepatobiliary cancers. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 17(4), 302-310.
- Boedtkjer, E., Pedersen, S. F. (2020). The acidic tumor microenvironment as a driver of cancer. *Annual Review of Physiology*. 82, 103-126.
- Booth, L., Poklepovic, A., Dent, P. (2020). Neratinib decreases pro-survival responses of (sorafenib+ vorinostat) in pancreatic cancer. *Biochemical Pharmacology*. 178, 114067.
- Bos, J.L. (1989). Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Research*. 49(17), 4682-4689.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 68(6), 394-424.
- Bruix, J., Sherman, M. (2011). Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*. 53(3), 1020-1022.
- Burnette, D., Lippincott-Schwartz, J. (2016). "Cellular Energetics". Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Baltimore, D., Matsudaira, P. (eds.). in: *Molecular Cell Biology* (pp. 513-582). United States of America: W. H. Freeman and Company.
- Cairns, R. A., Harris, I. S., Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*. 11(2), 85-95.
- Calcinotto, A., Filipazzi, P., Grioni, M., Iero, M., De Milito, A., Ricupito, A., Cova, A., Canese, R., Jachetti, E., Rossetti, M., Huber, V., Parmiani, G., Generoso, L., Santinami, M., Borghi, M., Fais, S., Bellone, M., Rivoltini, L. (2012). Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor-infiltrating T lymphocytes. *Cancer Research*. 72(11), 2746-2756.
- Chamchoy, K., Pakotiprapha, D., Pumirat, P., Leartsakulpanich, U. (2019). Application of WST-8 based colorimetric NAD (P) H detection for quantitative dehydrogenase assays. *BMC Biochemistry*. 20(1), 1-14.
- Chang, Y. S., di Tomaso, E., McDonald, D. M., Jones, R., Jain, R. K., Munn, L. L. (2000). Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(26), 14608-14613.
- Chekerov, R., Hilpert, F., Mahner, S., El-Balat, A., Harter, P., De Gregorio, N., Fridrich, C., Markmann, S., Potenberg, J., Lorenz, R., Oskay-Oezcelik, G., Schmidt, M., Krabisch, P., Lueck, H. J., Richter, R., Braicu, E. I., Boi, A., Sehouli, J. (2018). Sorafenib plus topotecan versus placebo plus topotecan for platinum-resistant ovarian cancer (TRIAS): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 19(9), 1247-1258.
- Chen, F., Fang, Y., Chen, X., Deng, R., Shao, J. (2021). Recent advances of sorafenib nanoformulations for cancer therapy: smart nanosystem and combination therapy. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 16(3), 318-336.
- Chen, J. S., Wang, Q., Fu, X. H., Huang, X. H., Chen, X., Cao, L. Chen, L. Z., Tan, H. X., Li, W., Bi, J., Zhang, L. J. (2009). Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: association with MMP-9. *Hepatology Research*. 39(2), 177-186.
- Chen, Z., Lu, W., Garcia-Prieto, C., Huang, P. (2007). The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 39(3), 267-274.

- Chen, Z., Xie, H., Hu, M., Huang, T., Hu, Y., Sang, N., Zhao, Y. (2020). Recent progress in treatment of hepatocellular carcinoma. *American Journal of Cancer Research*. 10(9), 2993-3036.
- Chow, P. K., Gandhi, M., Tan, S. B., Khin, M. W., Khasbazar, A., Ong, J., Lim, K. (2018). SIRveNIB: selective internal radiation therapy versus sorafenib in Asia-Pacific patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 36(19), 1913-1921.
- Ciardiello, F., Tortora, G. (2008). EGFR antagonists in cancer treatment. *New England Journal of Medicine*. 358(11), 1160-1174.
- Cillo, U., Vitale, A., Grigoletto, F., Farinati, F., Brolese, A., Zanusi, G., Neri, D., Boccagni, P., Srsen, N., D'Amico, F., Ciarleglio, F. A., Brida, A. (2006). Prospective validation of the Barcelona Clinic Liver Cancer staging system. *Journal of Hepatology*. 44(4), 723-731.
- Colagrande, S., Regini, F., Taliani, G. G., Nardi, C., Inghilesi, A. L. (2015). Advanced hepatocellular carcinoma and sorafenib: Diagnosis, indications, clinical and radiological follow-up. *World Journal of Hepatology*. 7(8), 1041-1053.
- Cooper, G. M. Hausman, R. E. (2016). "Bioenergetics and Metabolism". Cooper, G. M. Hausman, R. E. (eds.). in: *The Cell A Molecular Approach* (pp. 81-110). U.S.A: Sinauer.
- Daher, S., Massarwa, M., Benson, A. A., Khoury, T. (2017). Current and future treatment of hepatocellular carcinoma: An updated comprehensive review. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 6, 1-10.
- Daniel, C., Bell, C., Burton, C., Harguindey, S., Reshkin, S. J., Rauch, C. (2013). The role of proton dynamics in the development and maintenance of multidrug resistance in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1832(5), 606-617.
- Dankbar, B., Padró, T., Leo, R., Feldmann, B., Kropff, M., Mesters, R. M., Serve, H., Berdel, E. W., Kienast, J. (2000). Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 95(8), 2630-2636.
- De Berardinis, R. J., Sayed, N., Ditsworth, D., Thompson, C. B. (2008). Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Current opinion in Genetics and Development*. 18(1), 54-61.
- De Mattia, E., Cecchin, E., Guardascione, M., Foltran, L., Di Raimo, T., Angelini, F., Toffoli, G. (2019). Pharmacogenetics of the systemic treatment in advanced hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*. 25(29), 3870-3896.
- Decker, T., Overkamp, F., Rösel, S., Nusch, A., Göhler, T., Indorf, M., Trarbach, T. (2017). A randomized phase II study of paclitaxel alone versus paclitaxel plus sorafenib in second and third line treatment of patients with HER2-negative metastatic breast cancer (PASO). *BMC Cancer*. 17(1), 1-9.
- Dehn, P., White, C., Connors, D., Shipkey, G., Cumbo, T. (2004). Characterization of the human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line as an *in vitro* model for cadmium toxicity studies. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*. 40(5-6), 172-182.
- Devic, S. (2016). Warburg effect-a consequence or the cause of carcinogenesis? *Journal of Cancer*. 7(7), 817-822.
- Dimri, M., Satyanarayana, A. (2020). Molecular signaling pathways and therapeutic targets in hepatocellular carcinoma. *Cancers*. 12(2), 491.

- Dojindo (2020). Cell Proliferation and Cytotoxicity, Cell Counting Kit-8 (CCK-8) WST Method. Retrieved September 23, 2020, from [http://www.woongbee.com/0NewHome/Dojindo/JH\\_Dojindo\\_CCK-8/sources/CK04\\_MTT\\_MTS\\_WST1.pdf](http://www.woongbee.com/0NewHome/Dojindo/JH_Dojindo_CCK-8/sources/CK04_MTT_MTS_WST1.pdf).
- Donato, M. T., Tolosa, L., Gómez-Lechón, M. J. (2015). “Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells”. Vinken, M., Rogiers, V. (eds.). in: Protocols in *In Vitro* Hepatocyte Research (pp. 77-93). New York: Mathieu Vinken Vera Rogiers.
- Eden, G., Archinti, M., Furlan, F., Murphy, R., Degryse, B. (2011). The urokinase receptor interactome. *Current Pharmaceutical Design*. 17(19), 1874-1889.
- Eilenberger, C., Rothbauer, M., Ehmoser, E.-K., Ertl, P., Küpcü, S. (2019). Effect of spheroidal age on sorafenib diffusivity and toxicity in a 3D HepG2 spheroid model. *Scientific Reports*. 9(1), 1-11.
- Elias, A. P., Dias, S. (2008). Microenvironment changes (in pH) affect VEGF alternative splicing. *Cancer Microenvironment*. 1(1), 131-139.
- Ellis, V., Pyke, C., Eriksen, J., Solberg, H., Danø, K. (1992). The urokinase receptor: involvement in cell surface proteolysis and cancer invasion. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 667(1), 13-31.
- Elsayed, M. M., Mostafa, M. E., Alaaeldin, E., Sarhan, H. A., Shaykoon, M. S., Allam, S., Elsadek, B. E. (2019). Design and characterisation of novel Sorafenib-loaded carbon nanotubes with distinct tumour-suppressive activity in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Nanomedicine*. 14, 8445-8467.
- Estrella, V., Chen, T., Lloyd, M., Wojtkowiak, J., Cornnell, H. H., Ibrahim-Hashim, A., Bailey, K., Balagurunathan, Y., Rothberg, J. M., Johnson, J., Gatenby, A. R., Sloane, B. F. (2013). Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Research*. 73(5), 1524-1535.
- Faes, S., Uldry, E., Planche, A., Santoro, T., Pythoud, C., Demartines, N., Dormond, O. (2016). Acidic pH reduces VEGF-mediated endothelial cell responses by downregulation of VEGFR-2; relevance for anti-angiogenic therapies. *Oncotarget*. 7(52), 86026- 86038.
- Fallahi, P., Ferrari, S. M., Santini, F., Corrado, A., Materazzi, G., Ulisse, S., Antonelli, A. (2013). Sorafenib and thyroid cancer. *BioDrugs*. 27(6), 615-628.
- Fan, S. H, Wang, Y. Y., Wu, Z. Y., Zhang, Z. F, Lu, J., Li, M. Q., Hu, B. (2015). AGPAT9 suppresses cell growth, invasion and metastasis by counteracting acidic tumor microenvironment through KLF4/LASS2/V-ATPase signaling pathway in breast cancer. *Oncotarget*. 6(21), 18406- 18417.
- Ferlin, M., Noraz, N., Hertogh, C., Brochier, J., Taylor, N., Klein, B. (2000). Insulin-like growth factor induces the survival and proliferation of myeloma cells through an interleukin-6-independent transduction pathway. *British Journal of Haematology*. 111(2), 626-634.
- Fernando, J., Sancho, P., Fernández-Rodríguez, C. M., Lledó, J. L., Caja, L., Campbell, J. S., Fabregat, I. (2012). Sorafenib sensitizes hepatocellular carcinoma cells to physiological apoptotic stimuli. *Journal of Cellular Physiology*. 227(4), 1319-1325.
- Ferrara, N., Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Reviews*. 18(1), 4-25.
- Ferrara, N., Gerber, H. P., LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*. 9(6), 669-676.

- Ferreira, L. M. (2010). Cancer metabolism: the Warburg effect today. *Experimental and Molecular Pathology*. 89(3), 372-380.
- Ferrell, L. D., Kakar, S., Terracciano, L. M., Wee, A. (2017). “Tumours and Tumour-like Lesions of the Liver”. Burt, A. D., Ferrell, L. D., Hubscher, S. G. (eds.). MacSween's pathology of the liver (pp. 780-779). Philadelphia: Elsevier Health Sciences.
- Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Hoves, S. (2007). Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*. 109(9), 3812-3819.
- Fox, S. B., Gasparini, G., Harris, A. L. (2001). Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *The Lancet Oncology*. 2(5), 278-289.
- Fukumura, D., Xavier, R., Sugiura, T., Chen, Y., Park, E.-C., Lu, N., Selig, M., Nielsen, G., Taksir, T., Jain, R. K., Seed, B. (1998). Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell*. 94(6), 715-725.
- Gao, W., Jia, X., Wu, J., Song, Y., Yin, J., Zhang, M., Qi, X. (2019). Preparation and evaluation of folate-decorated human serum albumin nanoparticles for the targeted delivery of sorafenib to enhance antihepatocarcinoma efficacy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 54, 101349.
- Geng, Z. M., Jha, R. K., Li, B., Chen, C., Li, W. Z., Zheng, J. B., Wang, L., Huanchen, S. (2014). Sorafenib inhibition of hepatic stellate cell proliferation in tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma: a study of the sorafenib mechanisms. *Cell biochemistry and Biophysics*. 69(3), 717-724.
- Gerweck, L. E., Vijayappa, S., Kozin, S. (2006). Tumor pH controls the *in vivo* efficacy of weak acid and base chemotherapeutics. *Molecular Cancer Therapeutics*. 5(5), 1275-1279.
- Ghassabian, S., Rawling, T., Zhou, F., Doddareddy, M. R., Tattam, B. N., Hibbs, D. E., Murray, M. (2012). Role of human CYP3A4 in the biotransformation of sorafenib to its major oxidized metabolites. *Biochemical Pharmacology*. 84(2), 215-223.
- Gian, V., Rubin, M. S., Shipley, D., Burris, H. A., Kaplan, J., Kosloff, R. A., Shih, K. C., Quinn, R., Greco, F. A., Hainsworth, J. D. (2012). Sorafenib and continued erlotinib or sorafenib alone in patients with advanced non-small cell lung cancer progressing on erlotinib: A randomized phase II study of the Sarah Cannon Research Institute (SCRI). *American Society of Clinical Oncology*. 30(15), 7587.
- Giles, R. H., Van E. S., J. H., Clevers, H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 1653(1), 1-24.
- Gion, P. D., Kanefendt, F., Lindauer, A., Scheffler M., Doroshenko, O., Fuhr, U., Wolf, J., Jaehde, U. (2012). Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Clinical Pharmacokinetics*. 50 (9): 551-603.
- Gomez-Lechon, M., Donato, M., Lahoz, A., Castell, J. (2008). Cell lines: a tool for *in vitro* drug metabolism studies. *Current Drug Metabolism*. 9(1), 1-11.
- Gong, L., Giacomini, M. M., Giacomini, C., Maitland, M. L., Altman, R. B., Klein, T. E. (2017). PharmGKB summary: sorafenib pathways. *Pharmacogenetics and Genomics*. 27(6), 240-246.
- Goodman, Z. D., Terracciano, L. M., Wee, A. (2012). “Tumours and tumour-like lesions of the liver”. Burt, A., Ferrell, L., Hubscher, S. (eds.). in: MacSween's pathology of the liver (pp. 761-851). China: Elsevier.
- Griffiths, J.R. (1991). Are cancer cells acidic? *British Journal of Cancer*. 64(3): 425–427.

- Gryspeerdt, S., Van Hoe, L., Marchal, G., Baert, A. L. (1997). Evaluation of hepatic perfusion disorders with double-phase spiral CT. *Radiographics*. 17(2), 337-348.
- Güvenalp, N. (2019). HepG2 Hücre Hattının Canlılığı Üzerine Medium pH'sının Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalı, Samsun.
- Güvenalp, N., Güvenç, D. (2020). An evaluation of the effects of medium pH on the viability of the HepG2 cell line. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 31(2), 107-114.
- Hanahan, D., Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 86(3), 353-364.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*. 100(1), 57-70.
- Hao, G., Xu, Z. P., Li, L. (2018). Manipulating extracellular tumour pH: an effective target for cancer therapy. *RSC Advances*. 8(39), 22182-22192.
- Harris, A. L. (2002). Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer*. 2(1), 38-47.
- Hasskarl, J. (2010). Sorafenib. *Recent Results in Cancer Research*. 184:61-70.
- Hasskarl, J. (2014). “Sorafenib: Targeting Multiple Tyrosine Kinases in Cancer”. Martens U. M. (eds.). in: *Small Molecules in Oncology* (pp. 145-164). Berlin: Springer.
- Hayashi, T., Hideshima, T., Nguyen, A. N., Munoz, O., Podar, K., Hamasaki, M., Ishitsuka, K., Yasui, H., Murphuy, H., Chakravarty, S., Higgins, L. S., Anderson K. J. (2004). Transforming growth factor  $\beta$  receptor I kinase inhibitor down-regulates cytokine secretion and multiple myeloma cell growth in the bone marrow microenvironment. *Clinical Cancer Research*. 10(22), 7540-7546.
- Heming, T. A., Bidani, A. (2003). Intracellular pH regulation in U937 human monocytes: roles of V-ATPase and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Immunobiology*. 207(2), 141-148.
- Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Casto, A., Palombella, V., Adams, J., Anderson, J. (2002). NF- $\kappa$ B as a therapeutic target in multiple myeloma. *Journal of Biological Chemistry*. 277(19), 16639-16647.
- Hu, T. H., Huang, C. C., Lin, P. R., Chang, H. W., Ger, L. P., Lin, Y. W., Lee, C. M., Tai, M. H. (2003). Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 97(8), 1929-1940.
- Hunter, T. (2000). Signaling-2000 and beyond. *Cell*. 100(1), 113-127.
- Huynh, H., Nguyen, T. T. T., Chow, K.-H. K.-P., Tan, P. H., Soo, K. C., Tran, E. (2003). Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterology*. 3(1), 1-21.
- IARC. (2020). Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2020, worldwide, both sexes, all ages. Retrieved May 18, 2020, from <https://gco.iarc.fr/>.
- Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y., Ueno, K. (1996). A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 19(11), 1518-1520.
- Izumi, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Uramoto, H., Yoshida, Y., Tanabe, M., Nomoto, M. (2003). Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treatment Reviews*. 29(6), 541-549.

- Jiang, X., Wang, J., Deng, X., Xiong, F., Zhang, S., Gong, Z., Li, X., Caoi K., Deng, H., He, Y., Zhou, Ming., Guo, C., Zeng, Z., Li, G., Li, X. (2020). The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 39(1), 1-19.
- Joyce, J. A., Hanahan, D. (2004). Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer. *Cell Cycle*. 3(12), 1516-1519.
- Jung, J. O., Gwak, G. Y., Lim, Y. S., Kim, C. Y., Lee, H. S. (2003). Role of hepatic stellate cells in the angiogenesis of hepatoma. *The Korean Journal of Gastroenterology*. 42(2), 142-148.
- Kalra, A., Yetiskul, E., Wehrle, C. J., Tuma, F. (2018). Physiology, Liver. Retrieved July 13, 2020, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535438/>
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*. 1(3), 332-349.
- Karpov, O. A., Fearnley, G. W., Smith, G. A., Kankanala, J., McPherson, M. J., Tomlinson, D. C., Harison, A. M., Ponnambalam, S. (2015). Receptor tyrosine kinase structure and function in health and disease. *AIMS Biophysics*. 2(4), 476-502.
- Katara, G., Jaiswal, M., Kulshrestha, A., Kolli, B., Gilman-Sachs, A., Beaman, K. (2014). Tumor-associated vacuolar ATPase subunit promotes tumorigenic characteristics in macrophages. *Oncogene*. 33(49), 5649-5654.
- Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. S., Searson, P. C. (2016). *In vitro* tumor models: advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 4, 12.
- Keating, G. M. (2017). Sorafenib: a review in hepatocellular carcinoma. *Targeted Oncology*. 12(2), 243-253.
- Keating, G. M., Santoro, A. (2009). Sorafenib. *Drugs*. 69(2), 223-240.
- Khan, M. A., Raza, A., Ovais, M., Sohail, M. F., Ali, S. (2018). Current state and prospects of nano-delivery systems for sorafenib. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 67(18), 1105-1115.
- Kim, A., Balis, F. M., Widemann, B. C. (2009). Sorafenib and sunitinib. *The Oncologist*. 14(8), 800-805.
- Kim, D. W., Talati, C., Kim, R. (2017). Hepatocellular carcinoma (HCC): beyond sorafenib-chemotherapy. *Journal of Gastrointestinal Oncology*. 8(2), 256-265.
- Kim, K. W., Lee, J. M., Choi, B. I. (2011). Assessment of the treatment response of HCC. *Abdominal Imaging*. 36(3), 300-314.
- Kim, S., Yazici, Y. D., Calzada, G., Wang, Z.-Y., Younes, M. N., Jasser, S. A., El-Naggar, A. K., Myers, J. N. (2007). Sorafenib inhibits the angiogenesis and growth of orthotopic anaplastic thyroid carcinoma xenografts in nude mice. *Molecular Cancer Therapeutics*. 6(6), 1785-1792.
- Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochemical Journal*. 351(2), 289-305.
- Kong, F. H., Ye, Q. F., Miao, X. Y., Liu, X., Huang, S. Q., Xiong, L., Wen, Y., Zhang, Z. J. (2021). Current status of sorafenib nanoparticle delivery systems in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Theranostics*. 11(11), 5464-5490.
- Koppenol, W. H., Bounds, P. L., Dang, C. V. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*. 11(5), 325-337.

- Kudo, M., Ueshima, K., Ikeda, M., Torimura, T., Tanabe, N., Aikata, H., Hino, K. (2020). Randomised, multicentre prospective trial of transarterial chemoembolisation (TACE) plus sorafenib as compared with TACE alone in patients with hepatocellular carcinoma: TACTICS trial. *Gut*. 69(8), 1492-1501.
- Kung, A. L., Klco, J. M., Kaelin, W. G., Livingston, D. M. (2000). Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nature Medicine*. 6(12), 1335-1340.
- Labeur, T. A., Achterbergh, R., Takkenberg, B., Van Delden, O., Mathôt, R., Klümpen, H. J. (2020). Sorafenib for Patients with Hepatocellular Carcinoma and Child-Pugh B Liver Cirrhosis: Lessons Learned from a Terminated Study. *The Oncologist*. 25(9), e1274.
- Lamouille, S., Xu, J., Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 15(3), 178-196.
- Langdon, S. P. (2004). Characterization and authentication of cancer cell lines. *Cancer Cell Culture*. 88, 33-42.
- Lankelma, J. M., Voorend, D. M., Barwari, T., Koetsveld, J., Van der Spek, A. H., De Porto, A. P., Van Noorden, C. J. (2010). Cathepsin L, target in cancer treatment? *Life Sciences*. 86(7-8), 225-233.
- Lathia, C., Lettieri, J., Cihon, F., Gallentine, M., Radtke, M., undaresan, P. (2006). Lack of effect of ketoconazole-mediated CYP3A inhibition on sorafenib clinical pharmacokinetics. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 57(5), 685-692.
- Le Bras, G. F., Taubenslag, K. J., Andl, C. D. (2012). The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression. *Cell Adhesion and Migration*. 6(4), 365-373.
- Li, L., Zhao, G. D., Shi, Z., Qi, L. L., Zhou, L. Y., Fu, Z. X. (2016). The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC. *Oncology Letters*. 12(5), 3045-3050.
- Li, Y., Gao, Z. H., Qu, X. J. (2015). The adverse effects of sorafenib in patients with advanced cancers. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 116(3), 216-221.
- Li, W., Zhou, Y., Shang, C., Sang, H., Zhu, H. (2020). Effects of environmental pH on the growth of gastric cancer cells. *Gastroenterology Research and Practice*. 2020, 3245359.
- Liao, Y., Yang, Y., Pan, D., Ding, Y., Zhang, H., Ye, Y., Zhao, L. (2021). HSP90 $\alpha$  mediates sorafenib resistance in human hepatocellular carcinoma by necroptosis inhibition under hypoxia. *Cancers*. 13(2), 243.
- Liberti, M. V., Locasale, J. W. (2016). The Warburg effect: How does it benefit cancer cells? *Trends in Biochemical Sciences*. 41(3), 211-218.
- Liu, F. S. (2009). Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy—a quick review. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 48(3), 239-244.
- Liu, L., Chen, H., Wang, M., Zhao, Y., Cai, G., Qi, X., Han, G. (2014). Combination therapy of sorafenib and TACE for unresectable HCC: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 9(3), e91124.
- Liu, Y., Liu, J., Cheng, L., Fan, L., Wang, F., Yu, H., Li, X. (2017). Melatonin increases the anti-tumor effects of sorafenib on human hepatoma cell lines via down-regulating autophagy. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 10(9), 14109-14120.

- Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J. F., Oliverae, A. C., Santoro, A., Raoul, J. L., Forner, A., Porta, J., Zeuzem, S., Boondi, L., Galle, P., Seitz, J. F., Borbath, I., Giannirs, T., Shan, M., Moscovici, M., Voliotis, D., Bruix, J. (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 359(4), 378-390.
- Longo, R., Sarmiento, R., Fanelli, M., Capaccetti, B., Gattuso, D., Gasparini, G. (2002). Anti-angiogenic therapy: rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis*. 5(4), 237-256.
- López Panqueva, R. D. P. (2015). Diagnosis and differential diagnosis problems with histological variants of benign liver neoplasms. *Revista Colombiana de Gastroenterologia*. 30(1), 116-124.
- Lotz, C., Kelleher, D. K., Gassner, B., Gekle, M., Vaupel, P., Thews, O. (2007). Role of the tumor microenvironment in the activity and expression of the p-glycoprotein in human colon carcinoma cells. *Oncology Reports*. 17(1), 239-244.
- Lyons, R. M., Keski-Oja, J., Moses, H. L. (1988). Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *The Journal of Cell Biology*. 106(5), 1659-1665.
- Mahoney, B. P., Raghunand, N., Baggett, B., Gillies, R. J. (2003). Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics: I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents *in vitro*. *Biochemical Pharmacology*. 66(7), 1207-1218.
- Marín-Hernández, A., Rodríguez-Enríquez, S., Vital-González, P. A., Flores-Rodríguez, F. L., Macías-Silva, M., Sosa-Garrocho, M., Moreno-Sánchez, R. (2006). Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells: Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *The FEBS Journal*. 273(9), 1975-1988.
- Marquardt, J. U. Galle, P. R. Teufel, A. (2012). Molecular diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma (HCC): An emerging field for advanced technologies. *Journal of Hepatology*. 56(1), 267-275.
- McIntyre, A., Hulikova, A., Ledaki, I., Snell, C., Singleton, D., Steers, G., Seden, P., Jones, D., Wigfield, S., Li, J. L., Russel, A., Swiaatch, A., Hariis, A. L., (2016). Disrupting hypoxia-induced bicarbonate transport acidifies tumor cells and suppresses tumor growth. *Cancer Research*. 76(13), 3744-3755.
- Meditz, K., Rinner, B. (2018). ‘‘Establishment of Tumor Cell Lines: From Primary Tumor Cells to a Tumor Cell Line Cell Culture Technology’’. Kasper, C., Charwat, V., Lavrentieva, A. (eds.). in: *Cell Culture Technology* (pp. 61-73). Germany: Springer.
- Meli, L., Jordan, E. T., Clark, D. S., Linhardt, R. J., Dordick, J. S. (2012). Influence of a three-dimensional, microarray environment on human cell culture in drug screening systems. *Biomaterials*. 33(35), 9087-9096.
- Melkonian, E. A., Schury, M. P. (2019). Biochemistry, anaerobic glycolysis. Retrieved November 23, 2020, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31536301/>
- Mendler, A. N., Hu, B., Prinz, P. U., Kreutz, M., Gottfried, E., Noessner, E. (2012). Tumor lactic acidosis suppresses CTL function by inhibition of p38 and JNK/c-Jun activation. *International Journal of Cancer*. 131(3), 633-640.
- Mills, C. C., Kolb, E., Sampson, V. B. (2018). Development of chemotherapy with cell-cycle inhibitors for adult and pediatric cancer therapy. *Cancer Research*. 78(2), 320-325.

- Moni, S. S., Alam, M. F., Safhi, M. M., Sultan, M. H., Makeen, H. A., Elmobark, M. E. (2020). Development of formulation methods and physical characterization of injectable sodium selenite nanoparticles for the delivery of sorafenib tosylate. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 21(8), 659-666.
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS Journal*. 274(6), 1393-1418.
- Morisaki, T., Umebayashi, M., Kiyota, A., Koya, N., Tanaka, H., Onishi, H., Katano, M. (2013). Combining celecoxib with sorafenib synergistically inhibits hepatocellular carcinoma cells *in vitro*. *Anticancer Research*. 33(4), 1387-1395.
- Mukhtar, N. A., Khalili, M. (2016). ‘Liver Disease’. Hammer, G. D., McPhee, S. J., Education, M. H. (eds.). in: *Pathophysiology of disease: an introduction to clinical medicine* (pp. 935-1031). USA: McGraw-Hill Education.
- Nagy, J., Chang, S., Dvorak, A., Dvorak, H. (2009). Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *British Journal of Cancer*. 100(6), 865-869.
- Neri, D., Supuran, C. T. (2011). Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 10(10), 767-777.
- NCBI (2020). Sorafenib. Retrieved February 23, 2020, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sorafenib>.
- Ohanian, M., Garcia-Manero, G., Levis, M., Jabbour, E., Daver, N., Borthakur, G., Richie, M. A. (2018). Sorafenib combined with 5-azacytidine in older patients with untreated FLT3-ITD mutated acute myeloid leukemia. *American Journal of Hematology*. 93(9), 1136-1141.
- Ohashi, T., Akazawa, T., Aoki, M., Kuze, B., Mizuta, K., Ito, Y., Inoue, N. (2013). Dichloroacetate improves immune dysfunction caused by tumor-secreted lactic acid and increases antitumor immunoreactivity. *International Journal of Cancer*. 133(5), 1107-1118.
- Ohtsubo, T., Igawa, H., Saito, T., Matsumoto, H., Park, H. J., Song, C. W., Saito, H. (2001). Acidic environment modifies heat-or radiation-induced apoptosis in human maxillary cancer cells. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 49(5), 1391-1398.
- Onan, H. B., Pehlivan, U. A. (2020). Metastatik hepatosellüler karsinom tedavisinde transarteryel kemoembolizasyon (TAKE). Sedef, A. M., Yıldırım, B. A., Sedef, A. K (eds.). in: *Onkolojide Görüntüleme ve Nükleer Tıp Temelli Tedaviler* (s. 103-112). Ankara: Akademisyen Kitabevi.
- Pachmayr, E., Treese, C., Stein, U. (2017). Underlying mechanisms for distant metastasis-molecular biology. *Visceral Medicine*. 33(1), 11-20.
- Park, H. J., Lee, S. H., Chung, H., Rhee, Y. H., Lim, B. U., Ha, S. W., Choi, E. K. (2003). Influence of environmental pH on G2-phase arrest caused by ionizing radiation. *Radiation Research*. 159(1), 86-93.
- Pascale, F., Bedouet, L., Baylatry, M., Namur, J., Laurent, A. (2015). Comparative chemosensitivity of VX2 and HCC cell lines to drugs used in TACE. *Anticancer Research*. 35(12), 6497-6503.
- Pathi, N., Viswanath, S., Pathak, A., Rathore, A., Prukayastha, A. (2016). Receptor tyrosine kinase signaling pathways: a review. *International Journal of Advances in Medicine*. 3(4), 783-789.
- Paul, M. K., Mukhopadhyay, A. K. (2004). Tyrosine kinase–role and significance in cancer. *International Journal of Medical Sciences*. 1(2), 101-115.

- Pavelka, M., Roth, J. (2010). ‘Liver Epithelium: Bile Canaliculi’. Pavelka, M., Roth, J. (eds.). in: *Functional Ultrastructure* (pp. 216-217). Vienna: Springer.
- Pavlova, N. N., Thompson, C. B. (2016). The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metabolism*. 23(1), 27-47.
- Pellegrini, P., Serviss, J. T., Lundbäck, T., Bancaro, N., Mazurkiewicz, M., Kolosenko, I., Linder, S. (2018). A drug screening assay on cancer cells chronically adapted to acidosis. *Cancer Cell International*. 18(1), 1-15.
- Peppicelli, S., Andreucci, E., Ruzzolini, J., Laurenzana, A., Margheri, F., Fibbi, G., Rosso, M. D., Bianchini, F., Calorini, L. (2017). The acidic microenvironment as a possible niche of dormant tumor cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 74(15), 2761-2771.
- Pilon-Thomas, S., Kodumudi, K. N., El-Kenawi, A. E., Russell, S., Weber, A. M., Luddy, K., Ibrahim-Hashim, A. (2016). Neutralization of tumor acidity improves antitumor responses to immunotherapy. *Cancer Research*. 76(6), 1381-1390.
- Poon, R., Ho, J., Tong, C., Lau, C., Ng, I., Fan, S. T. (2004). Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *British Journal of Surgery*. 91(10), 1354-1360.
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., Hübner, H. (2017). ‘Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin’. Gilbert D., Friedrich O. (eds.). in: *Cell Viability Assays* (pp. 1-17). New York: Humana Press.
- Qiu, G. H., Xie, X., Xu, F., Shi, X., Wang, Y., Deng, L. (2015). Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B. *Cytotechnology*. 67(1), 1-12.
- Rabiee, S., Tavakol, S., Barati, M., Joghataei, M. T. (2019). Autophagic, apoptotic, and necrotic cancer cell fates triggered by acidic pH microenvironment. *Journal of Cellular Physiology*. 234(7), 12061-12069.
- Raghunand, N., He, X., Van Sluis, R., Mahoney, B., Baggett, B., Taylor, C., Roe, D., Bhujwala, Z. M., Gillies, R. (1999). Enhancement of chemotherapy by manipulation of tumour pH. *British Journal of Cancer*. 80(7), 1005-1011.
- Raghunand, N., Gillies, R. J. (2000). pH and drug resistance in tumors. *Drug Resistance Updates*. 3(1), 39-47.
- Raghunand, N., Mahoney, B. P., Gillies, R. J. (2003). Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics: II. pH-dependent partition coefficients predict importance of ion trapping on pharmacokinetics of weakly basic chemotherapeutic agents. *Biochemical Pharmacology*. 66(7), 1219-1229.
- Randrup Hansen, C., Grimm, D., Bauer, J., Wehland, M., Magnusson, N. E. (2017). Effects and side effects of using sorafenib and sunitinib in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *International Journal of molecular Sciences*. 18(2), 461.
- Rangwala, F., Williams, K. P., Smith, G. R., Thomas, Z., Allensworth, J. L., Lyerly, H. K., Devi, G. R. (2012). Differential effects of arsenic trioxide on chemosensitization in human hepatic tumor and stellate cell lines. *BMC Cancer*. 12(1), 1-11.
- Redfern, A. D., Spalding, L. J., Thompson, E. W. (2018). The Kraken Wakes: induced EMT as a driver of tumour aggression and poor outcome. *Clinical and Experimental Metastasis*. 35(4), 285-308.
- Reig, M., da Fonseca, L. G., Faivre, S. (2018). New trials and results in systemic treatment of HCC. *Journal of Hepatology*. 69(2), 525-533.

- Riemann, A., Rauschner, M., Gießelmann, M., Reime, S., Haupt, V., Thews, O. (2019). Extracellular acidosis modulates the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers and adhesion of epithelial and tumor cells. *Neoplasia*. 21(5), 450-458.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., Minor, L. (2016). Cell viability assays. Retrieved March 23, 2020, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23805433/>
- Roberts, L. R., Gores, G. J. (2005). Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. *Seminars Liver Disease*. 25(2): 212-225.
- Rotin, D., Steele-Norwood, D., Grinstein, S., Tannock, I. (1989). Requirement of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger for tumor growth. *Cancer Research*. 49(1), 205-211.
- Ruddon, R. W. (2007). Cancer biology. New York: Oxford University Press.
- Ryder, C., McColl, K., Zhong, F., Distelhorst, C. W. (2012). Acidosis promotes Bcl-2 family-mediated evasion of apoptosis: involvement of acid-sensing G protein-coupled receptor Gpr65 signaling to Mek/Erk. *Journal of Biological Chemistry*. 287(33), 27863-27875.
- Sarosi J. R., G. A., Jaiswal, K., Herndon, E., Lopez-Guzman, C., Spechler, S. J., Souza, R. F. (2005). Acid increases MAPK-mediated proliferation in Barrett's esophageal adenocarcinoma cells via intracellular acidification through a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 289(6), G991-G996.
- Schenk, P. W., Snaar-Jagalska, B. E. (1999). Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1449(1), 1-24.
- Schiff, D., Jaeckle, K. A., Anderson, S. K., Galanis, E., Giannini, C., Buckner, J. C., Stella, P., Flynn, P. J., Schwerkoske, J. F., Kaluza, V., Dancey, J., Wright, J., Sarkaria J. N. (2018). Phase 1/2 trial of temsirolimus and sorafenib in the treatment of patients with recurrent glioblastoma: North Central Cancer Treatment Group Study/Alliance N0572. *Cancer*. 124(7), 1455-1463.
- Schmidt, C. M., McKillop, I. H., Cahill, P. A., Sitzmann, J. V. (1997). Increased MAPK expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 236(1), 54-58.
- Seagroves, T. N., Ryan, H. E., Lu, H., Wouters, B. G., Knapp, M., Thibault, P., Johnson, R. S. (2001). Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*. 21(10), 3436-3444.
- Semela, D., Dufour, J. F. (2004). Angiogenesis and hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 41(5), 864-880.
- Semenza, G. L. (2003). Angiogenesis ischemic and neoplastic disorders. *Annual Review of Medicine*. 54(1), 17-28.
- Sever, R., Brugge, J. S. (2015). Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 5(4), a006098.
- Sheng, X., Huang, T., Qin, J., Li, Q., Wang, W., Deng, L., Dong, A. (2017). Preparation, pharmacokinetics, tissue distribution and antitumor effect of sorafenib-incorporating nanoparticles *in vivo*. *Oncology Letters*. 14(5), 6163-6169.
- Shin, J. W., Chung, Y. H. (2013). Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: current and future. *World Journal of Gastroenterology*. 19(37), 6144-6155.
- Smith, H. W., Marshall, C. J. (2010). Regulation of cell signalling by uPAR. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11(1), 23-36.

- Sonehara, N. M., Lacerda, J. Z., Jardim-Perassi, B. V., de Paula J. R., Moschetta-Pinheiro, M. G., Souza, Y. S. T., Zuccari, D. A. (2019). Melatonin regulates tumor aggressiveness under acidosis condition in breast cancer cell lines. *Oncology Letters*. 17(2), 1635-1645
- Stoddart, M. J. (2011a). "Cell viability assays: introduction". Stoddart M. (eds.). in: *Mammalian Cell Viability* (pp. 21-25). London: Humana Press.
- Stoddart, M. J. (2011b). "WST-8 analysis of cell viability during osteogenesis of human mesenchymal stem cells". Stoddart M. (eds.). in: *Mammalian Cell Viability* (pp. 21-25). London: Humana Press.
- Suckow, M. A., Stevens, K. A., Wilson, R. P. (2012). *The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents*. USA: Academic Press.
- Sun, H., Chen, L., Cao, S., Liang, Y., Xu, Y. (2019). Warburg effects in cancer and normal proliferating cells: two tales of the same name. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. 17(3), 273-286.
- Suo, A., Zhang, M., Yao, Y., Zhang, L., Huang, C., Nan, K., Zhang, W. (2012). Proteome analysis of the effects of sorafenib on human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *Medical Oncology*. 29(3), 1827-1836.
- Şirin, N. (2018). Hepatoselüler kanser hücrelerinde apigenin, sorafenib ve kombine uygulamalarının apoptoz ve hücre döngüsü üzerine olası etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Denizli.
- Tan, G. J., Peng, Z. K., Lu, J. P., Tang, F. Q. (2013). Cathepsins mediate tumor metastasis. *World Journal of Biological Chemistry*. 4(4), 91-101.
- Tan, W., Luo, X., Li, W., Zhong, J., Cao, J., Zhu, S., Chen, Y. (2019). TNF- $\alpha$  is a potential therapeutic target to overcome sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *EBioMedicine*. 40, 446-456.
- Tang, W., Chen, Z., Zhang, W., Cheng, Y., Zhang, B., Wu, F., Wang, Q., Reiter, F., Toni, E. D. N., Wang, X., (2020). The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 5(1), 1-15.
- Tannock, I. F., Rotin, D. (1989). Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Research*. 49(16), 4373-4384.
- Thews, O., Gassner, B., Kelleher, D. K., Schwerd, G., Gekle, M. (2006). Impact of extracellular acidity on the activity of P-glycoprotein and the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Neoplasia*. 8(2), 143-152.
- Thomas, L., Lai, S. Y., Dong, W., Feng, L., Dadu, R., Regone, R. M., Cabanillas, M. E. (2014). Sorafenib in metastatic thyroid cancer: a systematic review. *The Oncologist*. 19(3), 251-258.
- Timek, D. T., Shi, J., Liu, H., Lin, F. (2012). Arginase-1, HepPar-1, and Glypican-3 are the most effective panel of markers in distinguishing hepatocellular carcinoma from metastatic tumor on fine-needle aspiration specimens. *American Journal of Clinical Pathology*. 138(2), 203-210.
- Tokur, O., Aksoy, A. (2017). *In vitro* sitotoksosite testleri. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 6(1), 112-118.
- Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K., Watanabe, M. (1999). A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Analytical Communications*. 36(2), 47-50.

- Tuccitto, A. (2018). pH regulatory molecules in the tumour microenvironment: modulators of aggressiveness and immune profile of human hepatocellular carcinoma. Retrieved February 23, 2020, from [http://oro.open.ac.uk/55985/1/Tuccitto%20A\\_Thesis\\_PhD.pdf](http://oro.open.ac.uk/55985/1/Tuccitto%20A_Thesis_PhD.pdf)
- Tunissiolli, N. M., Castanhole-Nunes, M. M. U., Biselli-Chicote, P. M., Pavarino, É. C., da Silva, R. F. (2017). Hepatocellular carcinoma: a comprehensive review of biomarkers, clinical aspects, and therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 18(4), 863-872.
- TÜİK (2019). Ölüm ve Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2019. Ölüm nedeni ve cinsiyete göre ölümler. Retrieved July 23, 2020, from <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-ve-Olum-Nedeni-Istatistikleri-2019-33710>
- Uematsu, S., Higashi, T., Nouse, K., Kariyama, K., Nakamura, S. I., Suzuki, M., Tsuji, T. (2005). Altered expression of vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor-2 and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 20(4), 583-588.
- Vilgrain, V., Pereira, H., Assenat, E., Guiu, B., Ilonca, A. D., Pageaux, G.-P., Allaham, W. (2017). Efficacy and safety of selective internal radiotherapy with yttrium-90 resin microspheres compared with sorafenib in locally advanced and inoperable hepatocellular carcinoma (SARAH): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 18(12), 1624-1636.
- Villanueva, A., Chiang, D. Y., Newell, P., Peix, J., Thung, S., Alsinet, C., Tover, V., Sole, M., Feo, A. D., Yea, S., Toffanin, S., Ramos, A., Mazzaferro, A., Waxman, A., Schwartz, M., Meyerson, M., Friedman, S. L., Llovet J. M. (2008). Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 135(6), 1972-1983.
- Villanueva, A., Newell, P., Chiang, D. Y., Friedman, S. L., Llovet, J. M. (2007). Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Seminars in Liver Disease*. 27(1), 55-76.
- Vishvakarma, N. K., Singh, S. M. (2010). Immunopotentiating effect of proton pump inhibitor pantoprazole in a lymphoma-bearing murine host: implication in antitumor activation of tumor-associated macrophages. *Immunology Letters*. 134(1), 83-92.
- Vishvakarma, N. K., Singh, S. M. (2011). Augmentation of myelopoiesis in a murine host bearing a T cell lymphoma following *in vivo* administration of proton pump inhibitor pantoprazole. *Biochimie*. 93(10), 1786-1796.
- Vogel, A., Saborowski, A. (2020). Current strategies for the treatment of intermediate and advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Treatment Reviews*. 82, 101946.
- Wachsberger, P., Landry, J., Storck, C., Davis, K., O'Hara, M., Owen, C., Coss, R. (1997). Mammalian cells adapted to growth at pH 6.7 have elevated HSP27 levels and are resistant to cisplatin. *International Journal of Hyperthermia*. 13(3), 251-255.
- Warburg, O. (1925). The metabolism of carcinoma cells. *The Journal of Cancer Research*. 9(1), 148-163.
- Webb, B. A., Chimenti, M., Jacobson, M. P., Barber, D. L. (2011). Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nature Reviews Cancer*. 11(9), 671-677.
- Westley, R. L., May, F. E. (2013). A twenty-first century cancer epidemic caused by obesity: the involvement of insulin, diabetes, and insulin-like growth factors. *International Journal of Endocrinology*. 2013, 632461
- White, D. L., Kanwal, F., Jiao, L., El-Serag, H. B. (2016). Epidemiology of hepatocellular carcinoma. In Carr B. (Ed.), *Hepatocellular carcinoma* (pp. 3-24). Switzerland: Springer.

- Wilhelm, S. M., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., McHugh, M. (2004). BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Research*. 64(19), 7099-7109.
- Wilhelm, S., Carter, C., Lynch, M., Lowinger, T., Dumas, J., Smith, R. A., Kelley, S. (2006). Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*. 5(10), 835-844.
- Wilhelm, S. M., Adnane, L., Newell, P., Villanueva, A., Llovet, J. M., Lynch, M. (2008). Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*. 7(10), 3129-3140.
- Woo, H. Y., Heo, J. (2012). Sorafenib in liver cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 13(7), 1059-1067.
- Wood, L. S. (2006). Managing the side effects of sorafenib and sunitinib. *Community Oncology*. 9(3), 558-562.
- Yang, J. D., Roberts, L. R. (2016). "Other Malignant Hepatic Tumors". Boyer, T.D., Lindor, K.D. (eds.). in: Zakim and Boyer's hepatology: A textbook of liver disease (pp. 708-720). Philadelphia: Elsevier Health Sciences.
- Yang, S., Liu, G. (2017). Targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncology Letters*. 13(3), 1041-1047.
- Ye, X., Weinberg, R. A. (2015). Epithelial–mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression. *Trends in Cell Biology*. 25(11), 675-686.
- Ye, L. Y., Chen, W., Bai, X. L., Xu, X. Y., Zhang, Q., Xia, X. F., Fu, Q. H. (2016). Hypoxia-induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma induces an immunosuppressive tumor microenvironment to promote metastasis. *Cancer Research*. 76(4), 818-830.
- Ye, L., Mayerle, J., Ziesch, A., Reiter, F. P., Gerbes, A. L., De Toni, E. N. (2019). The PI3K inhibitor copanlisib synergizes with sorafenib to induce cell death in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Discovery*. 5(1), 86.
- Yuan, Y. H., Zhou, C. F., Yuan, J., Liu, L., Guo, X. R., Wang, X. L., Tu, H. J. (2016). NaHCO<sub>3</sub> enhances the antitumor activities of cytokine-induced killer cells against hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Oncology Letters*. 12(5), 3167-3174.
- Zhang, T., Sun, H. C., Xu, Y., Zhang, K. Z., Wang, L., Qin, L. X., Tang, Z. Y. (2005). Overexpression of platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  in endothelial cells of hepatocellular carcinoma associated with high metastatic potential. *Clinical Cancer Research*. 11(24), 8557-8563.
- Zhang, X., Lin, Y., Gillies, R. J. (2010). Tumor pH and its measurement. *Journal of Nuclear Medicine*. 51(8), 1167-1170.
- Zhang, Z., Tan, X., Luo, J., Yao, H., Si, Z., Tong, J. S. (2020). The miR-30a-5p/CLCF1 axis regulates sorafenib resistance and aerobic glycolysis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death and Disease*. 11(10), 1-14.
- Zhou, L., Huang, Y., Li, J., Wang, Z. (2010). The mTOR pathway is associated with the poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Medical Oncology*. 27(2), 255-261.

## ÖZ GEÇMİŞ

Sedat GÖKMEN Kastamonu Orhan Şaik Gökyay Lisesi'ni bitirdikten sonra Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2010 yılında mezun oldu. 2013 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Farmakoloji-Toksikolojisi Yüksek Lisans programını bitirdi. Mezuniyetinden bu yana Amasya Üniversitesi Suluova Meslek Yüksekokulu Veteriner Bölümü'ne Öğretim Görevlisi olarak görev yapmaktadır. Halen bu görevine devam etmektedir (10.06.2021).

(ORCID ID: 0000-0002-4793-3030)

### Yayınlanmış Çalışmalar:

- Gökmen, S., Dağoğlu, G., Baykalır Gül, B. (2014). Alabalıkların Yenilebilir Doku Örneklerinde Florfenikol Kalıntılarının Araştırılması. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*. 28 (1):05-08.
- Gökmen, S., Güvenç, D. (2018). Fipronilin Genel Özellikleri ve Toksikitesinin Mekanizmaları. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences Journal Identity*. 9(2):69-78.
- Gökmen, S., Güvenç, D. (2018). "İlaç Metabolizması ve Toksikite Çalışmalarında Kullanılan Primer Hepatosit ve Hepatoma Hücre Hatları" Güvenç, D. (ed.). İlaç Araştırma, Geliştirme ve Toksikolojik Çalışmalarda Kullanılan Alternatif Yöntemler. (s.28-34). Ankara: Türkiye Klinikleri.
- Gökmen, S., Pehlivan, A., Aksoy, A. (2019). Laboratuvar Hayvanlarında Ötenazi Yöntemleri. *Etlik Veteriner Mikrobiyolojisi Dergisi*. 30 (1): 78-85.
- Gökmen, S., Güvenç, D. (2018). Toxicology of Fipronil. *International Congress on Engineering and Life Science-ICELIS*. 29-29 Nisan 2018, Kastamonu (Poster Sunum).
- Güvenç, D., İnal, S., Kuruca, N., Gökmen, S., Güvenç, T. (2021). Synthetic pyrethroids common metabolite 3- phenoxybenzoic acid induces caspase-3 and Bcl-2 mediated apoptosis in human hepatocyte cells. *Drug and Chemical Toxicology*. doi.org/10.1080/01480545.2021.1894720.
- Güvenç, D., Gökmen, S. (2021). "Kurkumin ve Klinik Uygulamaları" Hişmioğulları, ŞE (ed.). Nutrasötikler. (s.35-42). Ankara: Türkiye Klinikleri.